

行政院國家科學委員會補助
大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

* *****
* 計畫：研究白色念珠菌 CDC4 及 GPH1 在型態生成及逆境回應之
* 名稱：功能交互作用
* *****

執行計畫學生：李宛蓁
學生計畫編號：NSC 100-2815-C-040-028-B
研究期間：100 年 07 月 01 日至 101 年 02 月 28 日止，計 8 個月
指導教授：謝家慶

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，1 年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學生物醫學科學學系（所）

中華民國 101 年 03 月 30 日

Study of the functional interaction between *Candida albicans* *GPH1* and *CDC4* on morphogenesis and response

執行計畫學生：李宛蓁

學生計畫編號：NSC 100-2815-C-040 -028-B

研究期間：100 年7 月1日至101 年2 月底止，計8 個月

指導教授：謝家慶 副教授

Abstract

白色念珠菌 (*Candida albicans*) 是一種伺機性真菌病原體，在自然界中以雙倍體的形式存在，分布於人體皮膚黏膜、消化道及生殖泌尿道黏膜表皮上。當人體免疫力低下或體內正常菌群失衡的情況，白色念珠菌便伺機大量繁殖。酵母菌生長形式的念珠菌有機會經血液全身擴散，到達肝臟、腎臟和大腦的念珠菌，便以真菌絲生長形式破壞宿主細胞，造成生命威脅。

CDC4 在出芽酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中屬必要基因，其轉譯的蛋白質為一泛素化黏合酶 SCF 複合物的成員之一。然而，白色念珠菌的 *CDC4* 為非必要基因，且負调控菌絲形成。實驗室曾以親合力蛋白質純化法與酵母菌雙雜交法 (yeast two-hybrid) 找出與 *CaCdc4* 有直接交互作用的相關蛋白質 *CaGph1*，並證實持續表現 *CaGPH1* 能部分地遏止因 *CaCDC4* 表現下降而造成的菌絲生成。因此，本研究著重於 *CaGPH1* 的生化及生理特性，進而推知 *CaCDC4* 與 *CaGPH1* 兩者間的關聯性。

藉由本研究將 *CaGPH1* 兩條對偶基因剔除，藉此分析其功能。另外，將 *CaCDC4* 與 *CaGPH1* 做雙重剔除，觀察 *CaCDC4* 與 *CaGPH1* 之交互作用會如何影響白色念珠菌不同的生長型態。由於 *GPH1* 被推測與逆境回應有相關，因此，也將探討 *CaGPH1* 對逆境反應的功能。在蛋白質調節層次，處理 Cycloheximide，希望由細胞型態和蛋白質調節層次了解 *CaCdc4* 與 *CaGph1* 之間的關係。

Introduction

白色念珠菌(*Candida albicans*)為最常見的人類侵入性真菌病菌之一，屬於真菌界芽孢綱子囊菌屬。在正常人體中，主要分佈在腸胃道和泌尿道的黏膜表皮上，為正常的共生菌種，當身體免疫力下降時容易造成感染，導致人類黏膜表皮層以及全身性念珠菌症，屬於伺機性病菌。

白色念珠菌是一種多型態的真菌(Fungi)，可以以酵母菌(yeast form)、假性菌絲(pseudohyphal form)、真性菌絲(hyphal form)等形式生長。其染色體為雙套，並且缺乏完整的世代交替，故對於白色念珠菌基因的功能分析，常由親源關係相近的 *S. cerevisiae* 作為假設。但此兩種生物在基因體、生殖模式、密碼子的特殊使用(Santos and Tuite, 1995)等方面皆不盡相同，所以還是須直接對白色念珠菌的基因做調控及其相關性的外表形觀察。

隨著抗真菌藥物的濫用，使得白色念珠菌對現有的抗真菌藥物逐漸產生抗藥性(Barchiesi et al., 2000)，對於抵抗力較差病人尤其容易造成威脅，因此白色念珠菌也是院內感染常見的菌株(Beck-Sague and Jarvis, 1993; Cheng et al., 2005; Fridkin and Jarvis, 1996)

白色念珠菌的 *CDC4* 為非必要基因，當 *CaCDC4* 在白色念珠菌中被剔除掉時，會促使其菌絲的形成(Atir-Lande et al., 2005)。而且菌絲的形成和白色念珠菌的致病性是有關的(Noble et al., 2010; Oberholzer et al., 2004; Whiteway and Oberholzer, 2004)。於是實驗室對 *CaCDC4* 的功能解析做探討。在研究的結果中發現，以親合力蛋白質純化法找出數個與白色念珠菌 Cdc4 相關的蛋白質，經質譜儀分析得知相對基因，在這些蛋白質中有個基因為 *GPH1*，並以 Yeast two-hybrid 實驗得知 Cdc4 與 Gph1 兩者間是有直接交互作用的，因此兩者必定有功能相關性 (Tseng et al., 2010)。於是想進一步探討 *CDC4* 與 *GPH1* 上下游的關係為何，及兩者交互作用對白色念珠菌型態的影響。

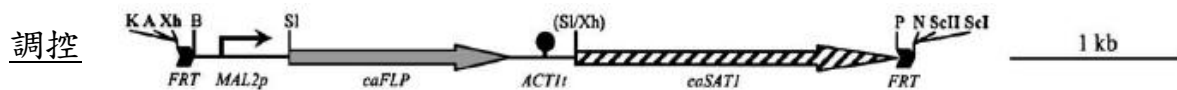
GPH1 的功能在 CGD 中的描述中被推測為醣原的去磷酸酶(glycogen phosphorylase)。受 Ssk1p, Mig1p, Tup1p 所調控(Chauhan et al., 2003)。在 *S.cerevisiae* 中 Gph1 功能為調控醣類的代謝。且 *GPH1* 於逆境環境下的調控也有相關(Favre et al.,

2008)。實驗室先前的研究成果中有得知當 *CaCDC4* 被剔除並且持續表現 *CaGPH1* 時，其形成菌絲型態的程度較低。因此為了想了解 *CaCDC4* 與 *CaGPH1* 的關係，先對 *CaGPH1* 做基本的研究，以了解其生化、生理特性。進而推知兩者間的相關聯性。在此計畫中提出下列幾點研究問題。

1. *CaGPH1* 是否為白色念珠菌之必要基因？
2. *CaGPH1* 的缺失是否對型態造成影響？與 *CaCDC4* 一樣同為菌絲的負調控者？
3. 若過度表現 *CaGPH1*，是否對型態造成影響？
4. 比較白色念珠菌野生型與 *CaGPH1* 突變株在逆境環境中(氧化壓力、高張壓、熱休克)有何差異？
5. 若同時剔除 *CaCDC4* 與 *CaGPH1* 其形態上的差異為何，進而推知這兩者之間上位基因的關係。

Materials and Methods

1. 以營養缺乏菌株為親本剔除一條 *CaGPH12* 對偶基因，另一條則置於 *MET3* promoter



(Reuss et al., 2004)

利用兩對引子 *CaGPH1-U-F*、*CaGPH1-U-R*、*CaGPH1-D-F*、*CaGPH1-D-R* 將 *CaGPH1* 的上下游約 500 bp 片段複製下並殖入 *pSFS2A* 中。*pSFS2A* 為一帶有 *SAT1-flipper cassette* 的質體(如上圖)。*Cassette* 上的 *SAT1* 產物能幫助細胞抵抗 *nourseothricin (nou.)* 抗真菌藥物，有成功將 *GPH1* 換成 *cassette* 的菌株能存活於含有 *nou.* 的培養基上。*Cassette* 兩端皆有三組限制酶位點可以作為片段殖入的使用，當 *CaGPH1* 上下游片段分別接上 *SAT1-flipper cassette* 上下游後，此建構好的質體將質體 *pSFS2A-GPH1-UP-DOWN*，利用最外兩端限制酶酵素將整段 *cassette* 切下。以電穿孔的方式送入白色念珠菌 *BWP17* 中，由於 *cassette* 上帶有 *CaGPH1* 上下游片段，因此利用同源互換方式將 *BWP17* 中一條 *GPH1* 剔除。如此得到 *CaGPH1/Cagph1::SAT1* 品系。

建構pFA-HIS1-Met3p-CaGPH1 質體。設計一組引子front of GPH1-F、front of GPH1-R，利用PCR 的方式放大GPH1 在N-端約500 bp 的DNA 片段，殖入pFA-HIS1-Met3p 中，完成pFA-HIS-Met3p-CaGPH1 質體的建構。將pFA-HIS-Met3p-CaGPH1 對質體上單一限制酶酵素切點作用，使質體呈線狀。線狀化後的DNA 送入CaGPH1/Cagph1::SAT1中，篩選能在缺乏組胺酸的培養基中生長的菌落。以colony PCR 方式檢測此菌落中菌的基因體是否已被改造。

2.以野生型之品系SC5314 作為親本，利用SAT1-flipper 的方式剔除CaGPH1 兩條對偶基因

將已建構好的將質體pSFS2A-GPH1-UP-DOWN 以限制酶作用，將此cassette 以電穿孔的方式送入白色念珠菌野生型SC5314中，以剔除GPH1。若有成功插入cassette，則可在含有nourseothricin (nou.)的培養基上長出菌落。接著將菌培養於以含2% maltose 取代glucose 的培養液中，便會啟動SAT1-flippercassette 上MAL2p 使其下游基因FLP 產生產物Flp recombinase，可辨識到FRT序列並將兩個FRT之間片段剔除，僅留下一個FRT 序列。如此一來便能重複使用此cassette 去剔除另一條GPH1。重複上述步驟，完成Cagph1/Cagph1 的建構。並以南方點末法確定基因體的改造是否符合預期。

3. 將Cagph1/Cagph1 與野生型作為比較，在逆境環境中，有什麼差異。

測量生長曲線。分析CaGPH1 是否與生長速率有關。將SC5314、CaGPH1/Cagph1、Cagph1/Cagph1 培養於YPD 中。隔日將菌稀釋成OD600 = 0.1 為起始濃度，培養在30°C 200 rpm 的環境中。紀錄生長速率。在具有各種壓力的培養基上，點上不同濃度的SC5314、CaGPH1/Cagph1、Cagph1/Cagph1，觀察菌落的形成是否會因基因的剔除而有影響。氧化壓力測試：2 mM H₂O₂、0.1 mM menadione；高張壓力測試：0.7 M NaCl、1.5 M NaCl、2 M NaCl；抗真菌藥物測試：75 ug/ul Hygromycin B；熱休克將菌株以高溫42°C、處理30分鐘後，再塗於培養基上。

4. 建構四環黴素基因調控系統(Tet-on)，可持續且大量表現CaGPH1 的菌珠。

首先，將完整CaGPH1片段殖入pNIM1-6HF 中的操縱子下。再以限制酶作用pNIM1-CaGPH1-6HF 得到線性的DNA 片段，藉電穿孔方式轉殖入白色念珠菌的基因

體中。由於送入的片段下游帶有可辨識抗原(FLAG-tag)，因此可以利用西方點墨法確定基因組的改造是否符合預期。

Results and Discussion

1 確認 *CaGPH1* 為必要基因

以 BWP17 做為親本，剔除一條 *GPH1* 對偶基因，另一條置於 MET3 啟動子之下將菌株培養在含 2.5 mM methionine/cysteine 的培養液中模擬基因剔除，突變株沒有因此死亡。故可知 *CaGPH1* 為非必要基因。

2 建構 *CaGPH1* 基因剔除株

以 SAT1-flipper 方式剔除 *CaGPH1*。得到 *CaGPH1/Cagph1::SAT1*、*CaGPH1/Cagph1*、*Cagph1/Cagph1::SAT1*、*Cagph1/Cagph1*。

確認建構正確

將菌株 SC5314、*CaGPH1/Cagph1*、*Cagph1/Cagph1::SAT1*、*Cagph1/Cagph1* 以南方點墨法(Southern blot)方式確認結構。以及 RT-PCR (reverse transcript PCR) 方式確認在 RNA 層面已無表現 (Figure 1.)。

3 *CaGPH1* 的缺失對型態無影響

觀察 *Cagph1* 突變株型態

將 *Cagph1/Cagph1* 突變株與 SC5314 野生型相比，在型態上皆呈芽孢型(yeast form) (Figure 2.)。

紀錄 *Cagph1* 生長速率

測量 SC5314、*CaGPH1/Cagph1*、*Cagph1/Cagph1* 菌株的生長速率。將前一天所培養的菌稀釋成 O.D = 0.1 培養在 YPD 中，並於許多時間點取出測量 O.D 值。做成一生長速率圖(Figure 3.)。可看到突變株與野生型的生長速率無差異。可知 *GPH1* 可能不會影響白色念珠菌的生長速率。

4 建構四環黴素基因調控系統(Tet-on)，可持續且大量表現 *CaGPH1* 的菌珠(圖十)

pNIM1-6HF 上帶有一基因 rtTA，此基因產物可與誘導子(Doxycycline)結合，形成活化的轉錄因子，與 TetO 操縱子結合使下游基因表現。

以蛋白質電泳與西方點末法確認 tet-on-GPH1 有成功建構並且有表現。

進一步以 RT-PCR 確認 tet-on-GPH1 有大量表現 (Figure 4.)。

觀察型態變化

培養 tet-on-GPH1 菌株，分別培養在含與不含 40 µg/ml Dox. 的 YPD 中，經過 1 小時後，以顯微鏡觀察，發現無論有無啟動 tet-on 表現，白色念珠菌型態皆為芽孢型 (yeast form) (Figure 5.)。

5 *CaGPH1* 其功能可能與碳源的回應有關

將 SC5314、*CaGPH1/Cagph1*、*Cagph1/Cagph1* 菌株培養於 Spider 培養基，可發現突變株的外表型較野生型光滑，野生型較顯皺折(Figure 6.)。由於 Spider 培養基成分中含有甘露醇，於是推測此現象可能與 *CaGPH1* 對碳源的回應有關。

6 *CaGPH1* 可能與防止老化有關

當SC5314、*CaGPH1/Cagph1*、*Cagph1/Cagph1* 菌株生長達平原期後，可觀察到在低倍率下剔除珠有較多聚集的現象(Figure 7.)。此現象說明GPH1其功能可能與老化 (aging)相關。

7 同時剔除 *CaCDC4* 與 *CaGPH1* 其形態上無差異

欲探討 *CaCDC4* 與 *CaGPH1* 之間的關係，計劃建構雙基因剔除株，期望可找到一表現型是與 *CDC4* 和 *GPH1* 都相關，進而推知此兩者可能的相互關係。

以 *Cagph1* 突變株為親本，以 SAT1-flipper 方式將 *Cagph1* 中的 *CaCDC4* 剔除。以此實驗步驟得到 *CaCDC4/Cacdc4::SAT1*、*CaCDC4/Cacdc4*、*Cacdc4/Cacdc4::SAT1*、*Cacdc4/Cacdc4*。

確認建構正確

將菌株 SC5314、*CaCDC4/Cacdc4::SAT1*、*CaCDC4/Cacdc4*、*Cacdc4/Cacdc4::SAT1* 抽取 genome DNA，並以南方點墨法(Southern blot)方式確認結構。以 RT-PCR (reverse transcript PCR) 方式確認在 RNA 層面已無表現(Figure 8.)。

8 *CaGPH1* 在逆境環境中與野生型無差異

在出芽酵母菌中 (*S.cerevisiae*) *Gph1* 似乎與壓力的回應有關(Favre et al., 2008)所

以做一些壓力的測試。測試壓力包含，氧化壓力、高張壓力、抗真菌藥物測試、熱休克。結果顯示 *CaGph1* 突變株與野生型無差異(Figure 9)。

9 *CaCdc4* 與 *CaGph1* 之間可能透過泛素化的關係而有直接接觸

我們猜測 *Cdc4* 與 *Gph1* 的關聯可能是，*Gph1* 會被 SCF^{cdc4} 接觸並且接上泛素，進而分解掉。於是，利用 JSCA0022-ACT1-GPH1 菌株，在加入蛋白質合成抑制藥物 cycloheximide 後，於不同時間點收下菌體。並利用西方點墨法(Western blot)偵測 *Gph1* 在不同時間點時表現量。結果顯示當存在 *CaCDC4* 時，*Gph1* 蛋白量隨時間有逐漸下降趨勢，對照組為不存在 *CaCDC4* 時，*Gph1* 蛋白量在各時間點皆維持(Figure 10.)。由此實驗結果，我們推論，*CaCdc4* 與 *CaGph1* 之間的關係可能為，*CaGph1* 是會被 *CaCdc4* 泛素化的受質。

Future work

1. 持續找尋 *CaGPH1* 在白色念珠菌中的功能

Gph1 在其他物種中角色為醣類的去磷酸化酶，因此，想直接探討在白色念珠菌中是否具此功能。想利用間接的方式，例如檢測醣類的累積。欲建構 *Gph1* 帶有綠螢光的融合蛋白，轉殖入白色念珠菌中，以螢光顯微鏡觀察 *Gph1* 的位置

2. 探討 *CaCdc4* 與 *CaGph1* 是否真為泛素化的關係

以 MG132 處理，確定 *Gph1* 的確受泛素化進而進入蛋白酶體(proteasome)分解。MG132 為抑制蛋白酶體(proteasome)活性，加入此藥物後，可抑制蛋白被分解掉。以此藥物處理沒關閉 *CDC4* 表現的 JSCA0022-ACT1-GPH1，偵測 *Gph1* 蛋白，若含量無下降則表示 *CaCdc4* 與 *CaGph1* 之間的關係為 *CaGph1* 是受 *CaCdc4* 泛素化的受質。

Acknowledgements

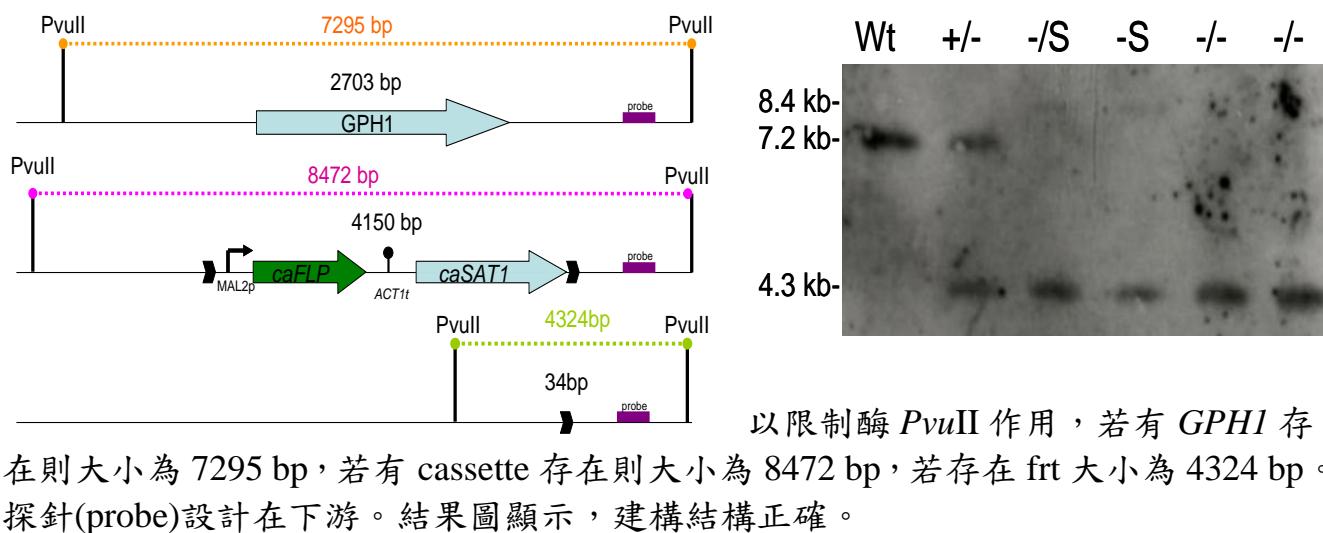
在此，要謝謝我的指導老師謝家慶老師總是給予我很大的鼓勵與支持，也很感謝實驗室裡的學長姐總不吝嗇的給予我幫助與指導。在這時期哩，不管是在實驗上或是在生活上，我都學習到很多，對於實驗上的設計與討論也有更深一層的領悟與理解。雖然實驗的結果尚未發現明顯的差異與了解機制，這整個故事還具有很大的後續發展。不過還是激勵了讓我對於研究有更深一層的認識與喜愛。

Table and Figures

Table 1. Synthetic oligonucleotides used in this study

Name	Sequence
CaGPH1-U-F	5'-CGGGGTACCCACCTAACTAATAACTATTGC-3'
CaGPH1-U-R	5'-CCGCTCGAGGGGTAAGATAATCCATTGGC-3'
CaGPH1-D-F	5'-TCCCCGCGGGAAAGTAAGACAACGAGCGA-3'
CaGPH1-D-R	5'-CTAGGAGCTCCTTAGCTGAGTTAGGATCTG-3'
front of GPH1-F	5'-GGACTAGTATGCCAATGGATTATCTTACC-3'
front of GPH1-R	5'-GGACTAGTAACCCGTAACCCCAACCAC-3'
GPH1 probe-F	5'-CTGATTTAGATCAAGTGGCTGA-3'
GPH1 probe-R	5'-AACTCTGCCATTACATTCGTC-3'

Figure 1. 確認 *CaGPH1* 突變株建構正確



以 RT-PCR 確認已無基因表現

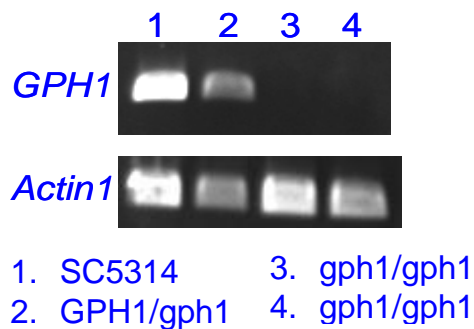


Figure 2. 觀察 *Cagph1* 突變株型態

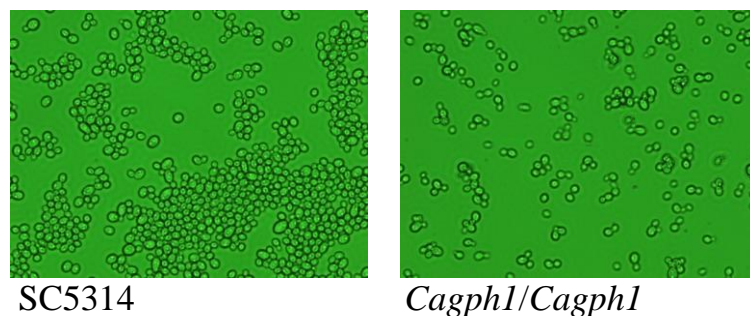


Figure 3. 紀錄生長速率

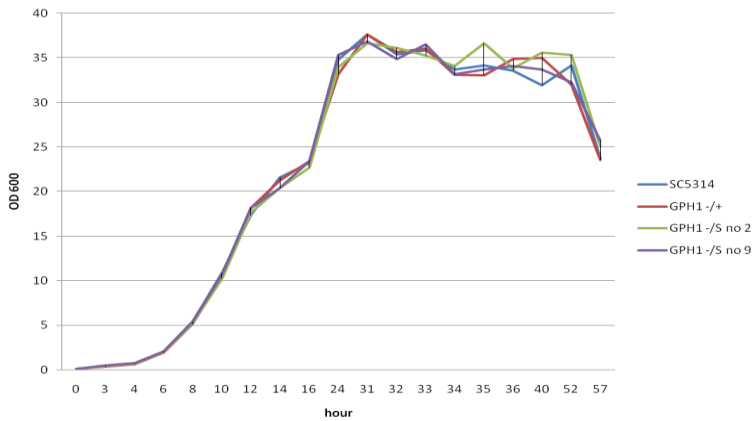


Figure 4. 確認 tet-on-GPH1 建構正確，以 RT-PCR 確定 GPH1 有過量表現

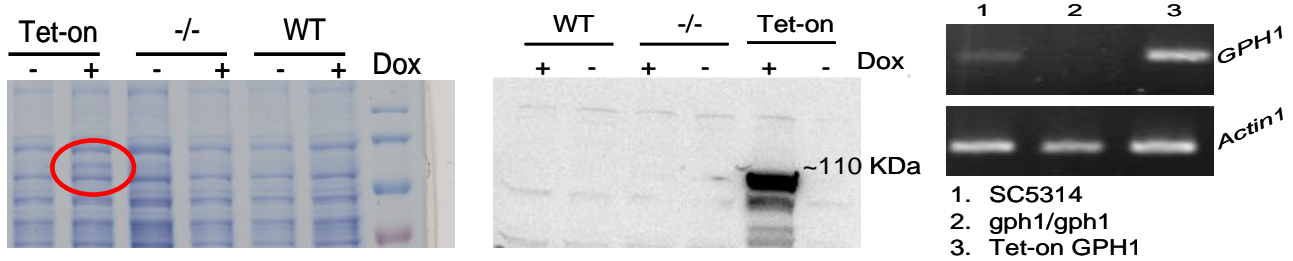


Figure 5. 以Dox.誘導，觀察過度表現GPH1其型態變化

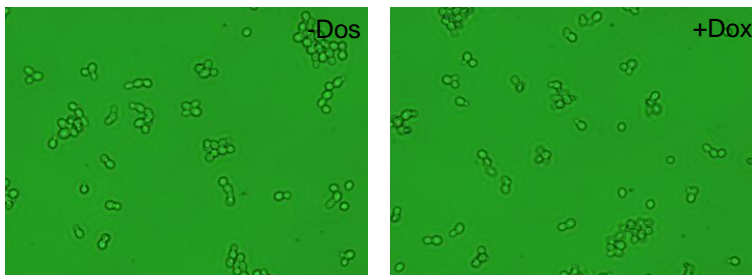


Figure 6.

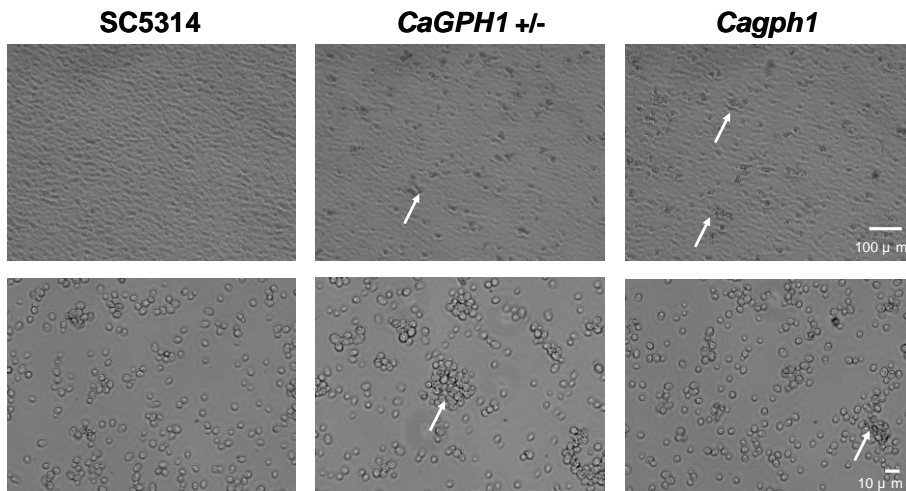
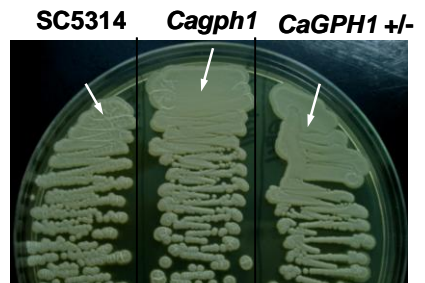


Figure 7.

將菌珠培養於YPD 30 °C 13 天後，以顯微鏡觀察發現有聚集現象(可能和老化有關)。白色箭頭處為聚集。

Figure 8. 確認 *CaCDC4* 突變株建構正確，並以 RT-PCR 確認已無基因表現

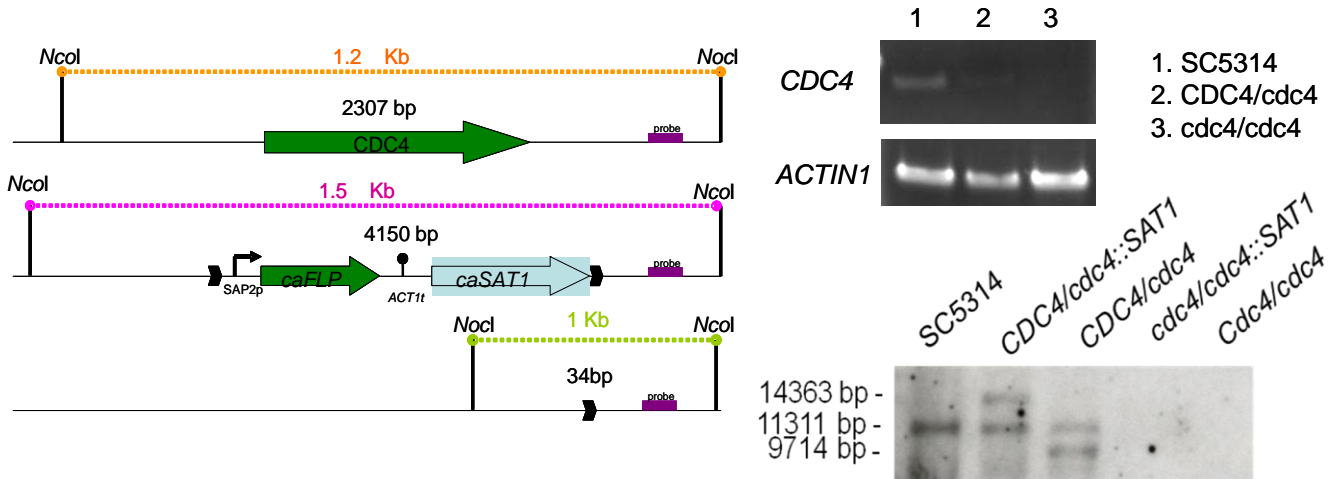
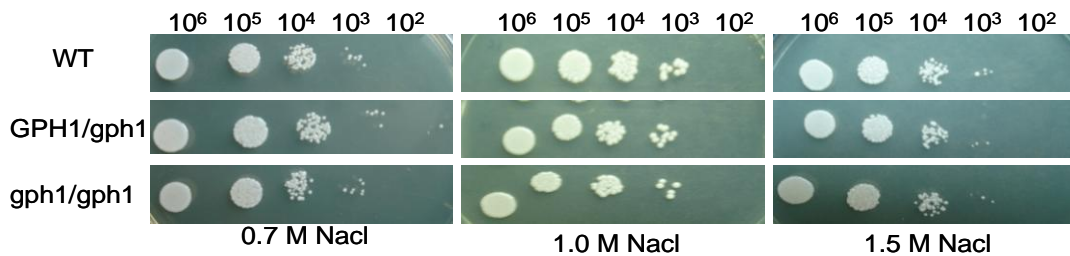
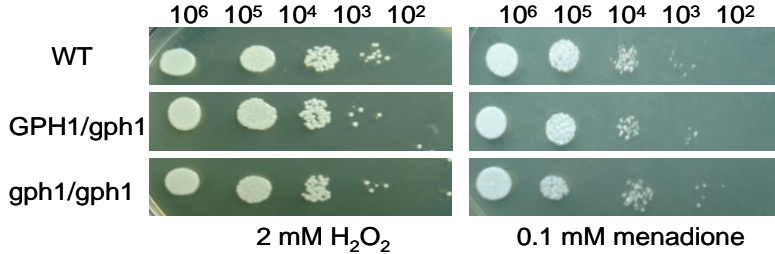


Figure 9.

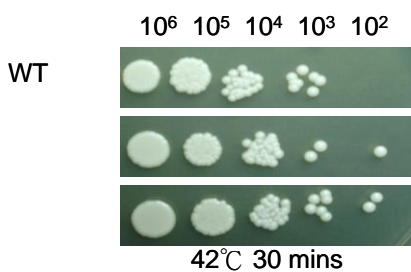
(A) Stress -- hyperosmotic



(B) Stress -- oxidative



(C) Stress -- 42°C heat shock



(D) Stress -- antifungal drug

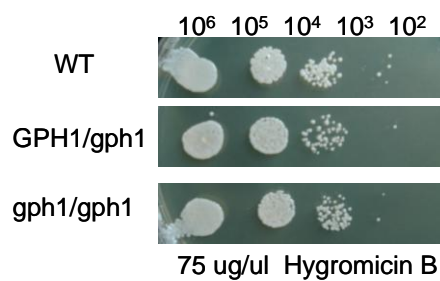
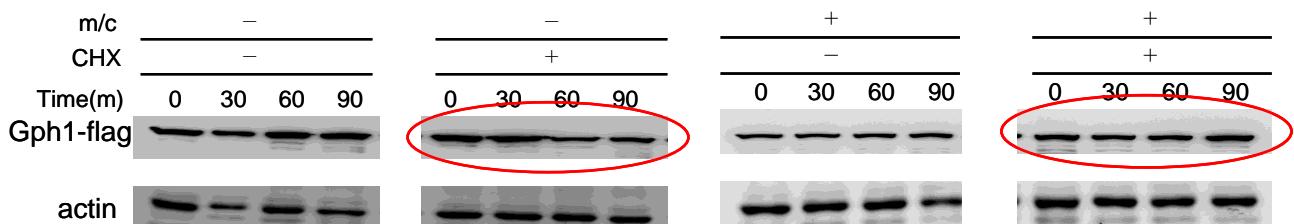


Figure 10. 並利用西方點墨法(Western blot)偵測Gph1



References

- Atir-Lande, A., Gildor, T., and Kornitzer, D. (2005).** Role for the SCFCDC4 ubiquitin ligase in *Candida albicans* morphogenesis. *Mol Biol Cell* 16, 2772-2785.
- Arzeni, D., Di Cesare, S., Di Francesco, L.F., Fortuna, M., et al. (2000).** Interactions between triazoles and amphotericin B against *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother* 44, 2435-2441.
- Beck-Sague, C., and Jarvis, W.R. (1993).** Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. National Nosocomial Infections Surveillance System. *J Infect Dis* 167, 1247-1251.
- Berman, J., and Sudbery, P.E. (2002).** *Candida Albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nat Rev Genet* 3, 918-930.
- Chauhan, N., Inglis, D., Roman, E., Pla, J., Li, D., Calera, J.A., and Calderone, R. (2003).** *Candida albicans* response regulator gene SSK1 regulates a subset of genes whose functions are associated with cell wall biosynthesis and adaptation to oxidative stress. *Eukaryot Cell* 2, 1018-1024.
- Cheng, M.F., Yang, Y.L., Yao, T.J., Lin, C.Y., Liu, J.S., Tang, R.B., Yu, K.W., Fan, Y.H., Hsieh, K.S., Ho, M., et al. (2005).** Risk factors for fatal candidemia caused by *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* species. *BMC Infect Dis* 5, 22.
- Favre, C., Aguilar, P.S., and Carrillo, M.C. (2008).** Oxidative stress and chronological aging in glycogen-phosphorylase-deleted yeast. *Free Radic Biol Med* 45, 1446-1456.
- Fridkin, S.K., and Jarvis, W.R. (1996).** Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol Rev* 9, 499-511.
- Hwang, P.K., Tugendreich, S., and Fletterick, R.J. (1989).** Molecular analysis of GPH1, the gene encoding glycogen phosphorylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 9,1659-1666.
- Noble, S.M., French, S., Kohn, L.A., Chen, V., and Johnson, A.D. (2010).** Systematic screens of a *Candida albicans* homozygous deletion library decouple morphogenetic switching and pathogenicity. *Nat Genet* 42, 590-598.
- Oberholzer, U., Iouk, T.L., Thomas, D.Y., and Whiteway, M. (2004).** Functional characterization of myosin I tail regions in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 3, 1272-1286.
- Payne, M.G., and Kingman, H.E. (1947).** Carotene blood levels and reproductive performance in range Hereford cattle. *J Anim Sci* 6, 50-55.
- Reuss, O., Vik, A., Kolter, R., and Morschhauser, J. (2004).** The SAT1 flipper, an optimized tool for gene disruption in *Candida albicans*. *Gene* 341, 119-127.
- Santos, M.A., and Tuite, M.F. (1995).** The CUG codon is decoded in vivo as serine and not leucine in *Candida albicans*. *Nucleic Acids Res* 23, 1481-1486.
- Shieh, J.C., White, A., Cheng, Y.C., and Rosamond, J. (2005).** Identification and functional characterization of *Candida albicans* CDC4. *J Biomed Sci* 12, 913-924.
- Sudbery, P., Gow, N., and Berman, J. (2004).** The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 12, 317-324.
- Tseng, T.L., Lai, W.C., Jian, T., Li, C., Sun, H.F., Way, T.D., and Shieh, J.C. (2010).** Affinity purification of *Candida albicans* CaCdc4-associated proteins reveals the presence of novel proteins involved in morphogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 395, 152-157.
- Whiteway, M., and Oberholzer, U. (2004).** *Candida* morphogenesis and host-pathogen interactions. *Curr Opin Microbiol* 7, 350-357.