

科技部補助
大專學生研究計畫研究成果報告

計 畫 名 稱	利用具有JHD2表達標記和NOT4表達調控的菌株研究 Not4介導的Jhd2降解以及對白色念珠菌組蛋白H3K4甲基 化和相關性狀的影響
------------	---

執行計畫學生：吳俞儀

學生計畫編號：MOST 107-2813-C-040-039-B

研究期間：107年07月01日至108年02月28日止，計8個月

指導教授：謝家慶

處理方式：本計畫可公開查詢

執行單位：中山醫學大學生物醫學科學學系（所）

中華民國 108年03月25日

利用具有 *Jhd2* 表達標記和 *Not4* 表達調控的菌株研究 *Not4* 介導的
Jhd2 降解以及對白色念珠菌組蛋白 H3K4 甲基化和相關性狀的影響

The use of a strain with *JHD2* expression-tagged and *NOT4*
expression-regulatable to study *Not4*-mediated degradation of *Jhd2* for histone
H3K4 methylation and associated traits in *Candida albicans*

執行計畫學生：吳俞儀

學生計畫編號：107-2813-C-040 -039 -B

研究期間：2018/07/01 ~ 2019/02/28

指導教授：謝家慶 副教授

(一)摘要

白色念珠菌 (*Candida albicans*) 是一種伺機性病原體，其致病力與其多樣性的生長型態有關。而 *Not4* 基因功能已被證實與其生長型態及致病力改變有相關性。在釀酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中已證實 *Not4* 編碼 E3 泛素連接酶，其受質為能編碼組蛋白 H3 第四賴胺酸 (H3K4) 去甲基酶之 *Jhd2*。此兩者基因亦被證實與白色念珠菌的生長型態及致病力改變有相關性。

本研究探討白色念珠菌 *Not4* (*CaNot4*) 是否會透過 *Jhd2* 影響 H3K4 之甲基化。首先利用 tet-off 系統降低 *Not4* 表現，並觀察 H3K4 在該情況下表現量的差異。而後利用 v5-6xHis 於 *Not4* tet-off 品系上的 *Jhd2* 加上標記，藉此來探討 *Jhd2* 是否透過 *Not4* 泛素化後降解而被抑制，進而影響 H3K4 的甲基化。本研究旨在探討白色念珠菌中

與組蛋白甲基化有關基因與形態生成的關係。

(關鍵字)白色念珠菌、NOT4、JHD2、H3K4 甲基化、泛素化

(二)研究動機與研究問題

白色念珠菌是一種人類共生真菌，會在免疫低下時大量增生，並產生疾病，為引起院內感染的主要細菌之一，常導致病患延長住院時間甚至提高死亡率。白色念珠菌能以菌絲型、酵母菌型及假菌絲型等態生長，其生長形態的可塑性已被證實與其致病力有相關性。

因白色念珠菌和釀酒酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的同源性相當接近，在釀酒酵母菌中已證實本次探討的基因 *NOT4* 產物會透過泛素化降解其下游基因 *JHD2* 之產物，促使 *Jhd2* 對 H3K4 去甲基的活性喪失，達到抑制 H3K4 去甲基化的效果。

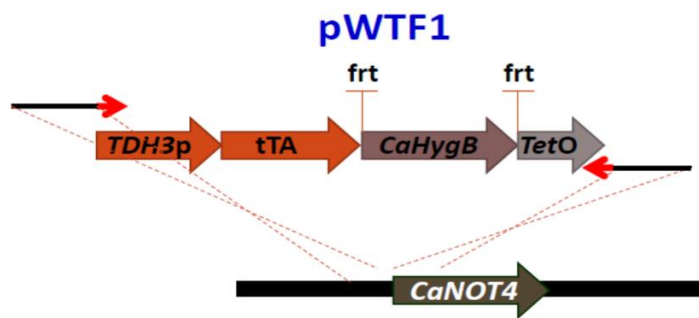
而 *NOT4* 在白色念珠菌中已知與致病力及形態生成有關，為了釐清在白色念珠菌中 *Not4* 是否藉由將 *Jhd2* 泛素化造成 H3K4 去甲基被抑制，影響標靶基因表現使形態生成及致病力改變 (Sudbery, Gow et al. 2004)。本計畫首先構築 *Not4* tet-off 系統，使 *Not4* 表現量降低，觀察 H3K4 去甲基化的效果。再將該品系的 *Jhd2* 基因插入 v5-6xHis 標記，觀察 *Not4* 表現量下降時 *Jhd2* 的改變，進一步探討 *Not4* 是否是經由泛素化 *Jhd2*，使 H3K4 去甲基化功能喪失。本計畫中提出下列幾點研究問題：

1. *CaNot4* 表現量下降是否會影響白色念珠菌的型態？
2. *CaNot4* 與 *CaJhd2* 是否有直接的交互作用？
3. *CaJhd2* 是否會因 *CaNot4* 表現量下降而增加活性？
4. *CaNot4* 的表現是否藉由會 *CaJhd2* 影響 H3K4 的甲基化修飾？

(三)實驗材料與方法

設計引子

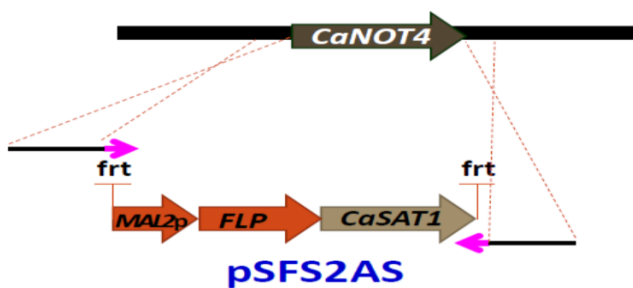
1. 設計 NOT4 Tet-off 長引子



▲圖一 將質體 pWTF1 插入 *CaNOT4* 上游

將質體 pWTF1 (Lai, et al. 2016) 的 TF1 F 與 TF1 R (表一)端分別接上 *CaNot4* 的上游、前端序列。

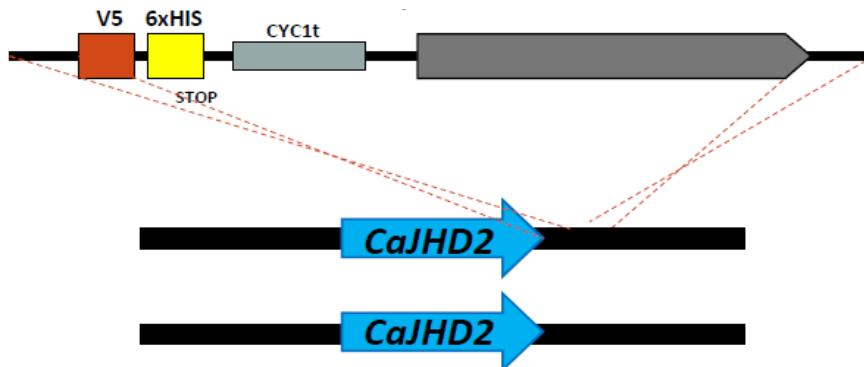
2. 設計 NOT4 deletion 長引子



▲圖二 將 *CaNOT4* 以質體 pSFS2AS 取代

將質體 pSFS2AS (Lai, et al. 2016) 的 S1 F 與 S2 R (表一)端分別接上 *CaNot4* 的上、下游序列。

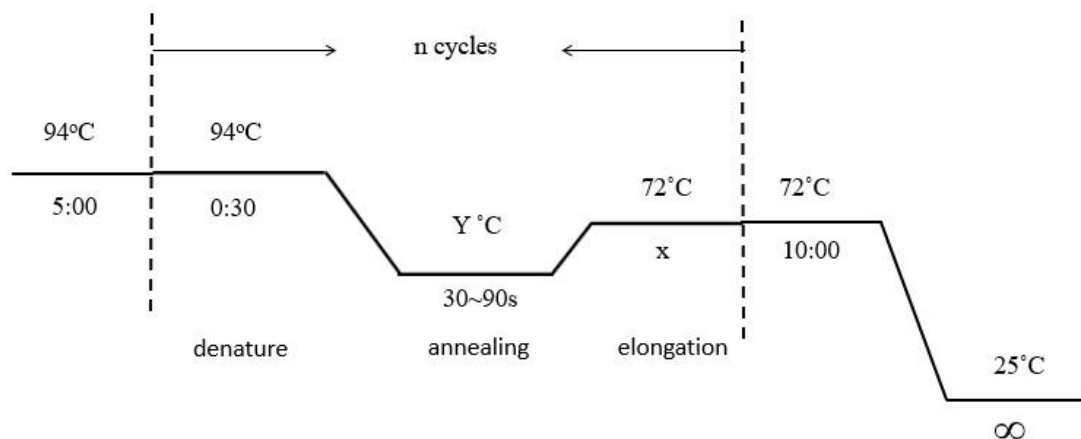
3. 設計 JHD2-V5-6His tag 長引子



▲圖三 將標記表現量之質體 pV5-NAT1 插入 *CaJHD2* 下游

將質體 pV5-NAT1 (Milne et al., 2011) 的 NAT1-F 與 NAT1-R (表一)端分別接上 *CaJHD2* 的末端、下游序列。

polymerase chain reaction (PCR)



▲圖四 PCR 反應示意圖

Y 值依引子的溶解溫度減去 3~5°C，x 值依產物大小而定，最終

反應總量約為 2^n 。再利用電泳確認產物大小，並進行膠純化，將非專一物質除去。

膠純化

先將所需長引子加入質體，利用 PCR 將其放大，跑電泳膠後，切取所需產物後放入 1.5 ml 的離心管中，加入 600 μ l 的 gel buffer，並加熱至 55~60°C 15分鐘，每 2~3 分鐘翻轉一次，使膠完全溶解。將所有液體吸取至 column 中，離心 13000 rpm、1分鐘後，倒掉液體，加入 400 μ l 的 W1 buffer，離心 13000 rpm、1分鐘，倒掉液體。加入 600 μ l 的 wash buffer，靜置1分鐘後，離心13000 rpm、1分鐘，倒掉液體後，再重複此步驟一次，倒掉液體，空轉 13000 rpm、5分鐘，最後利用 55~60°C 的二次水 20~50 μ l 回溶。

電穿孔

將白色念珠菌單一菌落培養於 50 ml YPD (Yeast extract-peptone-dextrose) 培養液中，30°C、200 rpm 約 16 小時。取出 1 ml 測 OD_{600nm} (便於計算細胞數量)，再分別取出 24 ml 於兩管 50 ml 離心管中，離心 4000 rpm、5 分鐘。去除上清液後，加入 8 ml 常溫二次水、1 ml 10X buffer、1 ml 1M 醋酸鋰，30°C、200 rpm 震盪培養一小時。加入 250 μ l 1M DTT，30°C、200 rpm 震盪培養 30 分鐘。(以下步驟須於冰上操作) 加入 25 ml、4°C 二次水清洗細胞，

離心 4000 rpm、4°C、5 分鐘。去除上清液，加入 5 ml、4°C、1 M sorbitol，並小力將沉澱拍散，離心 4000 rpm、4°C、5 分鐘。去除上清液，加入 50 μ l、4°C、1 M sorbitol，並小力將沉澱拍散，即為勝任細胞。將 50 μ l 勝任細胞和膠純化後回收的 DNA 混合，加入電穿孔 cuvette 中，將氣泡將出，以 1800 mV 電擊轉型。加入 1 ml 4°C、1 M sorbitol 混合菌液，移至 1.5 ml 離心管中，離心 4000 rpm、5 分鐘，去除上清液，利用 1 ml YPD 回養 4 小時後塗抹於 YPD + 篩選抗生素培養盤上。

建構可調節 *CaNOT4* 表現量之白色念珠菌品系

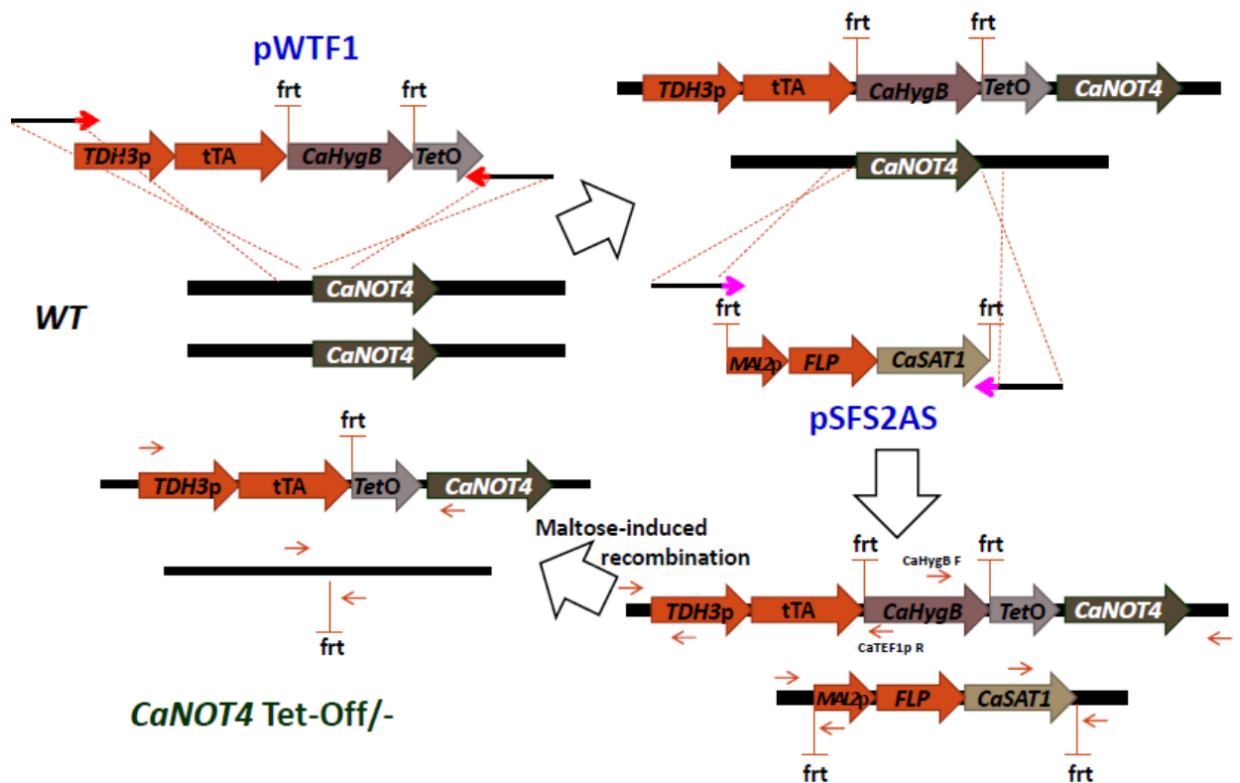
利用野生型白色念珠菌的兩條等位基因，分別以四環黴素 (tetracycline) 誘導關閉 (Tet-off) 以及剔除系統，建構 *CaNOT4* Tet-Off/- 品系。

先利用長引子 NOT4TF1 F、NOT4TF1 R (表一) 透過 polymerase chain reaction (PCR) 將質體 pWTF1 插入其中一條等位基因的 *CaNOT4* 上游後，以 YPD + 1 mg/ml Hygromycin B (Hyg B) 篩選具有抗性的菌株，再以引子 HygB F、NOT4 WYY-R (表一) 確認質體送入的位置。

確認過的菌株以同樣方式，利用長引子 NOT4S1 F、NOT4S2 R (表一) 透過 PCR 將質體 pSFS2AS 取代另外一條等位基因上的

CaNOT4，並以引子 CaSAT1 F、NOT4 WYY-R (表一) 確認是否替換成功。

最後 FLP/frt 重組系統剔除基因，以 YPD + 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ nourseothricin (Nou)、YPD + 200 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Nou 做篩選，再利用所得即為 CaNOT4 Tet-Off/- (如圖一所示)。此品系在有 doxycycline (Dox) 下使 CaNOT4 表現量降低，而無 Dox 下使 CaNOT4 過量表現，可利用此特性觀察 H3K4 去甲基化的於抑制表現和過量表現兩者的比較。

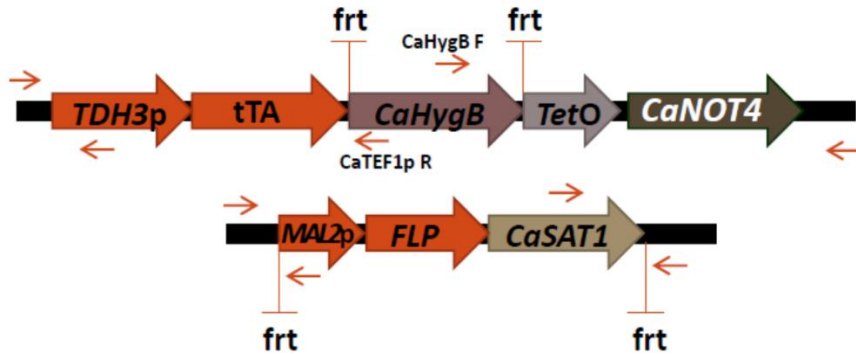


▲圖五 流程示意圖

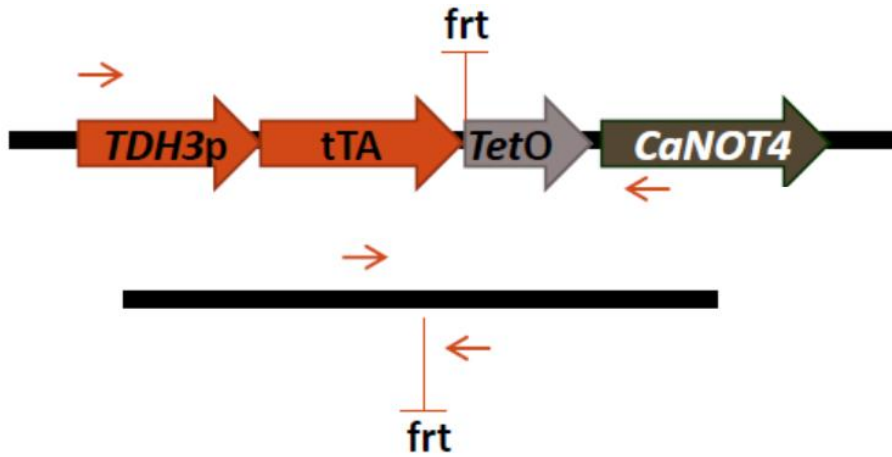
麥芽糖誘導 FLP/frt 系統進行基因重組

利用麥芽糖取代葡萄糖成為以改造菌株之碳源，於 30°C、200 rpm 震盪培養兩天，誘導 MAL2p 活化，進行 FLP/frt 系統重組，剔除 frt

序列區間片段。



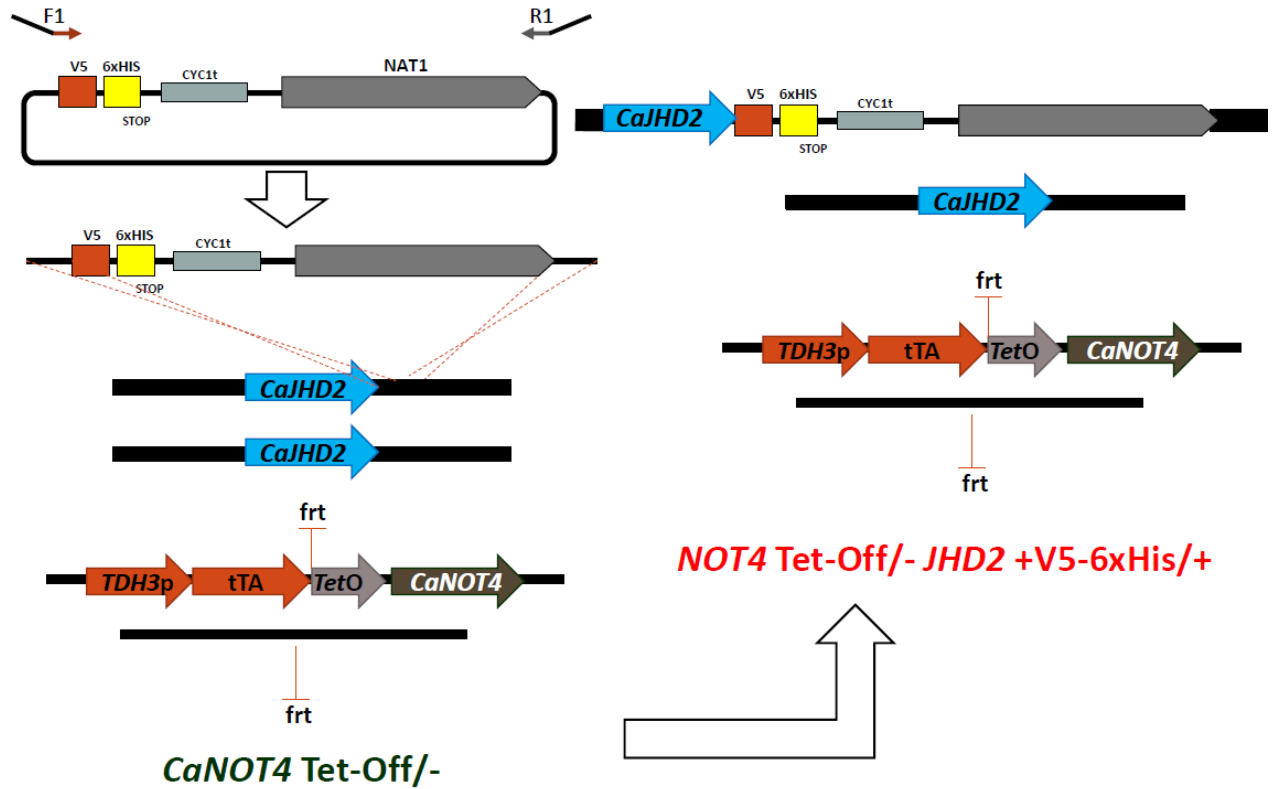
▲圖六 經麥芽糖誘導前白色念珠菌之序列示意圖



▲圖七 經麥芽糖誘導後白色念珠菌序列示意圖

建構可調節 *CaNOT4* 表現量之白色念珠菌品系

利用長引子 JHD2-V5-F、JHD2-V5-NAT-R (表一)透過 polymerase chain reaction (PCR) 將質體 pV5-NAT1插入其中一條等位基因的 *CaJHD2* 下游後，以 YPD + 200 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Nou 篩選具有抗性的菌株，再以引子 JHD2-V5-check F、JHD2-V5-check R (表一)確認質體送入的位置。

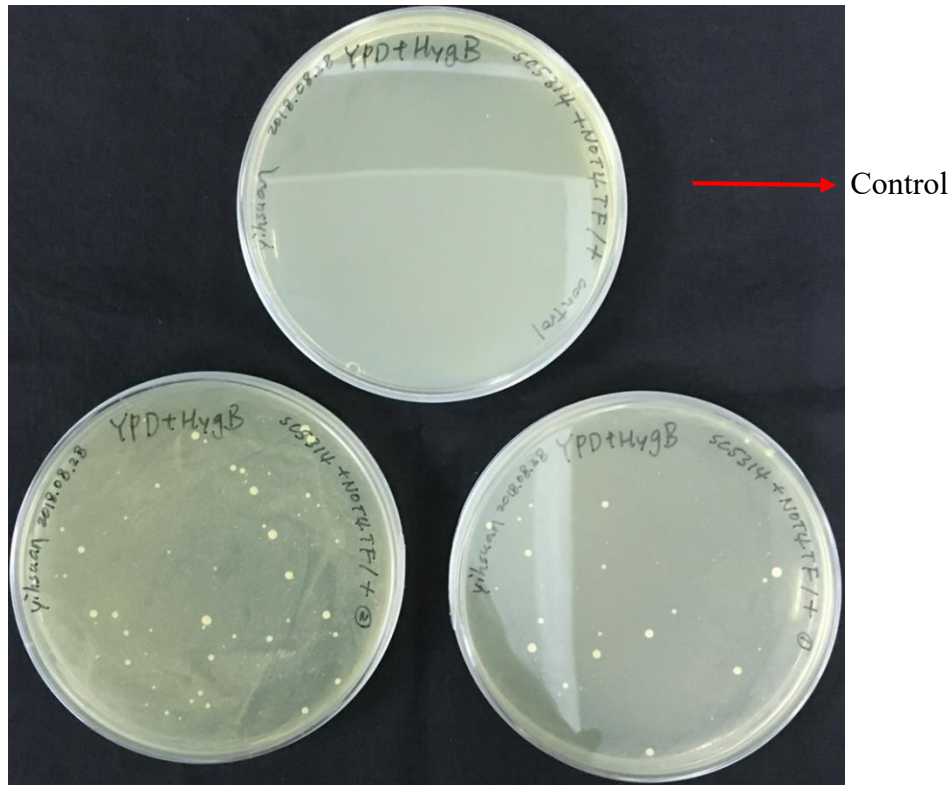


▲圖八 流程示意圖

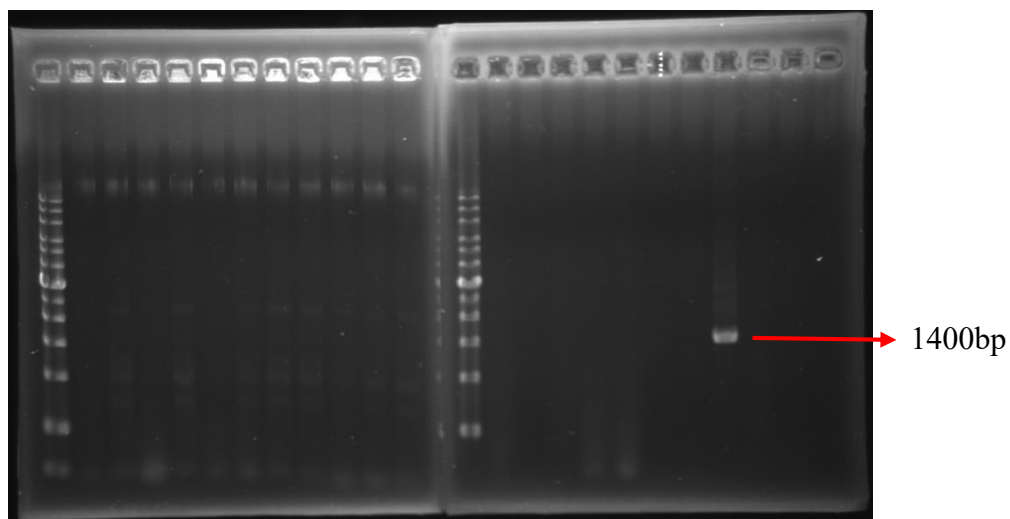
(四)結果

野生型白色念珠菌插入 tet-off (可調節基因表現量之系統)

將進行 pWTF1 質體轉型後之白色念珠菌塗抹於 YPD + 1 mg /ml Hyg B 培養基上培養，並以 HygB F 、NOT4 check R 進行 yeast colony PCR，確認菌株之序列(大小為 1400bp)，成功之菌落進行另一條等位基因之轉型。



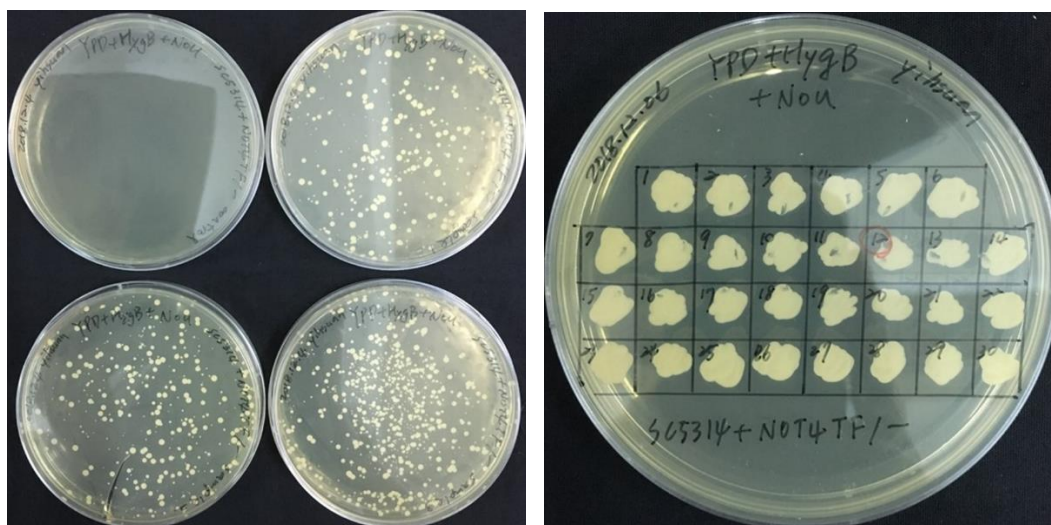
▲圖九 因質體 pWTF1 中 CaHyg B 片段具有 Hyg B 抗性，固可將此做為篩選標記，將轉型後的白色念珠菌先培養於具有 Hyg B 的培養盤上，作為初步篩選質體是否進入菌中。



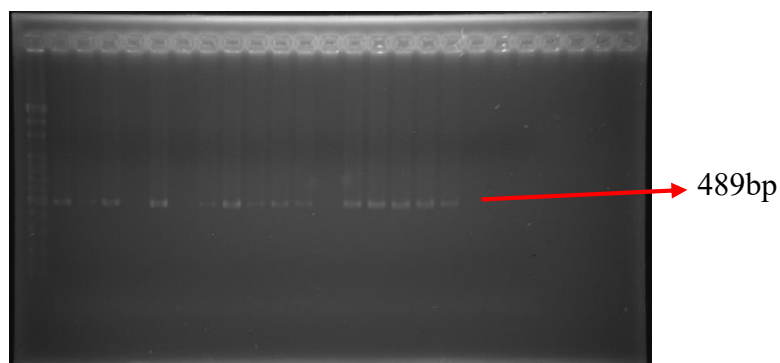
▲圖十 利用引子 HygB F 、NOT4 check R 測試於含有 Hyg B 培養盤上仍然正常生長的菌落。

pSFS2AS 質體剔除另一條等位基因

將進行 pSFS2AS 質體轉型之白色念珠菌塗抹於 YPD + HygB 1mg/ml + Nou 200 μ l/ml 培養基上培養，並以 Ca SAT1 F、NOT4 WYY R 進行 yeast colony PCR，確認菌株之序列(大小為 489bp)，並將轉型成功之菌株進行後續麥芽糖誘導實驗。



▲圖十一 因質體 pSFS2AS 中 CaSAT1 片段具有 Nou 抗性，固可將此做為篩選標記，將轉型後的白色念珠菌先培養於具有 Nou 的培養盤上，作為初步篩選質體是否進入菌中。右圖為左圖菌落隨機挑選數顆後重新培養。



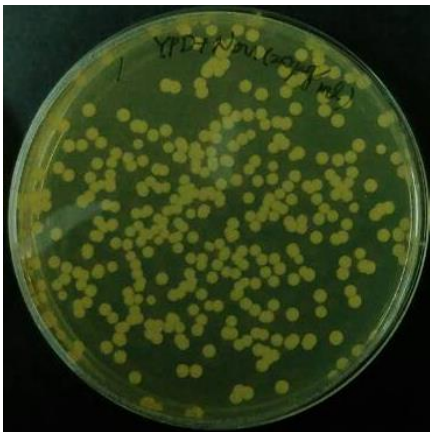
▲圖十二 利用引子 Ca SAT1 F、NOT4 WYY R 測試於含有 Nou 培養

盤上仍然正常生長的菌落

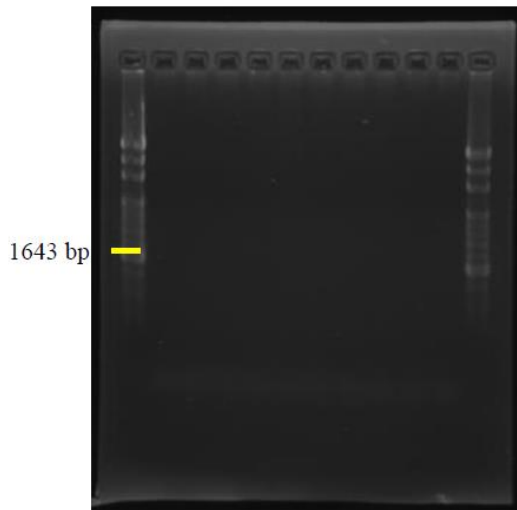
確認麥芽糖誘導啟動 FLP/frt 基因重組系統之結果

因經過麥芽糖誘導後的菌株僅具有低濃度(20 $\mu\text{l/ml}$) Nou 的抗性，故可將誘導後的菌株塗抹於 YPD + 20 $\mu\text{l/ml}$ Nou 培養基上培養，並將較小顆的菌落利用 PCR 確認菌株序列是否重組成功。(圖十一)

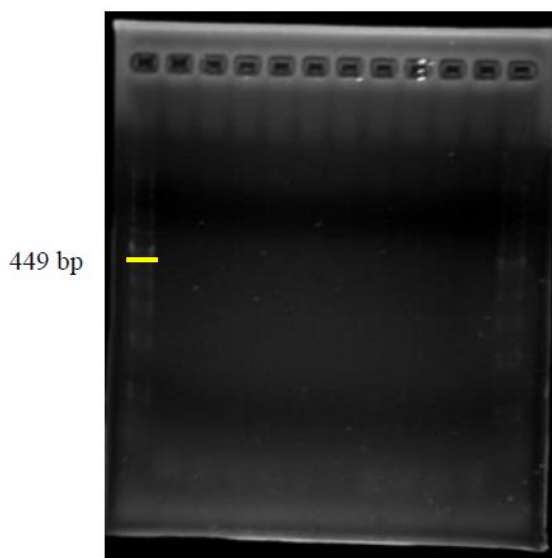
1. 將經過麥芽糖誘導後的菌株利用 CaTEF1p F1、NOT4-check R 確認可調節基因表現量之序列是否經過正確重組(大小約 1643bp)。(圖十二)
2. 將經過麥芽糖誘導後的菌株利用 NOT4 01 F、NOT4 WYY-R 確認基因是否成功剔除(大小約 449bp)。(圖十三)



▲圖十三 將利用麥芽糖誘導過後的白色念珠菌塗抹於具低濃度 Nou 培養盤上



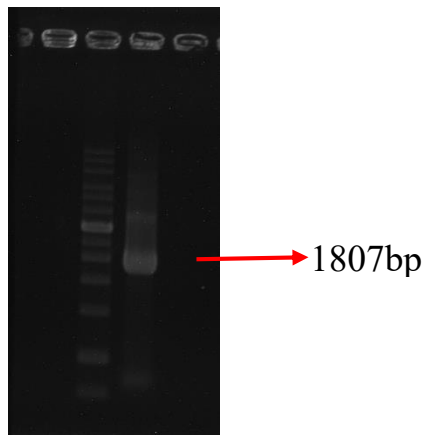
▲圖十四 利用引子 CaTEF1p F1、NOT4-check R 確認可調節基因表現量之序列是否經過正確重組。如圖所示誘導並未成功。



▲圖十五 利用引子 NOT4 01 F、NOT4 WYY-R 確認基因是否成功剔除。如圖所示誘導並未成功。

將可標記基因表現量之質體與野生型白色念珠菌之 JHD2 接合

將標的質體 pV5-6His-NAT1 與 CaJHD2 末端、下游序列以 PCR 方式結合(大小約 1807bp)。



▲圖十六 確認質體 pV5-6His-NAT1 是否與 CaJHD2 末端、下游序列接合。由圖可知質體與序列接合成功。

(五)討論

為何 FLP/frt 重組系統剔除基因無法成功？

(1) 誘導時間不夠

實驗操作建議誘導時間為五小時以上，嘗試後失敗，便試著逐漸將誘導時間延長(目前延長至兩天)，仍然得不到理想結果。

(2) 誘導所需的麥芽糖失效

原本想可能是麥芽糖放置過久，導致汙染或是效用退化，嘗試過利用新鮮配置的麥芽糖，仍然得不到理想結果。

(3) 誘導時所提供的麥芽糖量不足(碳源不足)

因誘導時間由原本的五小時延長為兩天，可能是因為誘導兩天使原本誘導重組的營養量不足，需要先誘導一天後，在重新取出以誘導的菌液送入全新的 YPM 中進行第二天誘導。

(六)未來工作

1. 改善 FLP/rtt 重組系統剔除基因：

試著脫離操作守則上的培養時間和麥芽糖濃度等因素，逐步測試看看。

2. 將品系 *CaNOT4 Tet-Off/-* 的 *CaJHD2* 基因下游插入能編碼

V5-6xHis 標記：

觀察 *CaNot4* 表現量改變時時 *CaJhd2* 的改變，進一步探討

CaNot4 是否是經由泛素化 *Jhd2*，使 H3K4 去甲基化功能喪失。

3. 完成品系建構後，以西方墨點法、芽管形成試驗、細胞表面疏水

性測試、鈣離子依賴性絮凝測試以及黏附試驗等外表型分析實驗，

深入探討 *CaNot4* 對於白色念珠菌毒力以及外表型態的影響。

(七)圖表

primer	Sequence (5'- 3')
NOT4TF1 F	AAGGCAAATCTATCAATTATAACTAATTACATTTATACAGCTACACAAATTTA ACTAATCAGCTTGGACTCTGAATCCG ¹
NOT4TF1 R	TTAAACATACCAGTATTCTTCTTCATCATCACTGATGAAAGTATCGTCGGCT TGAATCATTACTGCACCAGCTCCGGTAC ¹
NOT4S1 F	AAGGCAAATCTATCAATTATAACTAATTACATTTATACAGCTACACAAATTTA ACTAATCGGTACCGAAGCTTCGTAC ²
NOT4S2 R	TATACAGATCACTAAATATTATTGTAATATATCAAATATAAACTTGTAAAGGG ATGATGAGCTCTGATATCATCGA ²
JHD2-V5-F	TGATACACGGCAAACACTAGTACTTCGGAAACAACCTCTCCACTTTAAAGGAAT TGATTGAAGAAACCAAATGAATCTTGTAAAGGCGAGCTTCGAGGTC ³ CCTTTATGTCGCGGTCGTGCTCATAATTAATGAGAGACATCACTATGCTAA
JHD2-V5-NAT-R	TGTCGCAAAAAAAGTATACATTTCA ³ CGTTAGTATCGAATCGACAGC ³
HygB F	TTAGATCAGGTGCTGGTACT
NOT4 WYY-R	ATAACGGAGCCACCCGAAAA
NOT4-check R	CACTTGAACCAATAACTCAC
CaSAT1 F	GCTCCTTGGCATAACGATTAG
CaTEF1p F1	CACATTGATGTTGGAATAAC
NOT4S pop out check-F	CACTACTGGTTACCTAATGT
JHD2-V5-check F	GCCCAATCAAACCTATGTTC
JHD2-V5-check R	GGATGTATGGGCTAAATGTA

▲表一 本計畫中所使用的所有引子序列，以黑色框線標記處為已設計好之質體序列，1 為 pWTF1、2 為 pSFS2AS、3 為 pV5-NAT1 之序列

(八) 參考文獻

- Calderone, R. A. and W. A. Fonzi (2001). "Virulence factors of *Candida albicans*." Trends Microbiol **9**(7): 327-335.
- Fortun, J., P. Martin-Davila, E. Gomez-Garcia de la Pedrosa, V. Pintado, J. Cobo, G. Fresco, Y. Meije, L. Ros, M. E. Alvarez, J. Luengo, M. Agundez, A. Belso, A. Sanchez-Sousa, E. Loza and S. Moreno (2012). "Emerging trends in candidemia: a higher incidence but a similar outcome." J Infect **65**(1): 64-70.
- Frenkel, M., M. Mandelblat, A. Alastruey-Izquierdo, S. Mendlovic, R. Semis and E. Segal (2016). "Pathogenicity of *Candida albicans* isolates from bloodstream and mucosal candidiasis assessed in mice and *Galleria mellonella*." J Mycol Med **26**(1): 1-8.
- Krueger, K. E., A. K. Ghosh, B. P. Krom and R. L. Cihlar (2004). "Deletion of the NOT4 gene impairs hyphal development and pathogenicity in *Candida albicans*." Microbiology **150**(Pt 1): 229-240.
- Lai, W. C., H. F. Sun, P. H. Lin, H. L. Ho Lin and J. C. Shieh (2016). "A new rapid and efficient system with dominant selection developed to inactivate and conditionally express genes in *Candida albicans*." Curr Genet **62**(1): 213-235.
- Mersman, D. P., H. N. Du, I. M. Fingerman, P. F. South and S. D. Briggs (2009). "Polyubiquitination of the demethylase Jhd2 controls histone methylation and gene expression." Genes Dev **23**(8): 951-962.
- Pla, J., C. Gil, L. Monteoliva, F. Navarro-Garcia, M. Sanchez and C. Nombela (1996). "Understanding *Candida albicans* at the molecular level." Yeast **12**(16): 1677-1702.
- Stephen W. Milne, Jill Cheetham, Deborah Lloyd, Stephen Aves and Steven Bates (2011). "Cassettes for PCR-mediated gene tagging in *Candida albicans* utilizing nourseothricin resistance." Yeast **28**: 833-841.
- Sudbery, P., N. Gow and J. Berman (2004). "The distinct morphogenic states of *Candida albicans*." Trends Microbiol **12**(7): 317-324.