

科技部補助
大專學生研究計畫研究成果報告

計 畫 名 稱	： 結合NOT4和JHD2缺失和表達調控的菌株在白色念珠菌中 研究上位性和對組蛋白H3K4甲基化及相關性狀影響
------------	--

執行計畫學生：陳宜璇

學生計畫編號：MOST 107-2813-C-040-033-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：李娟

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2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 108年03月26日

結合 *NOT4* 和 *JHD2* 缺失和表達調控的菌株在白色念珠菌中研究上位性和對組蛋白 *H3K4* 甲基化及相關性狀影響

The use of strains combined with deletion and expression-regulatable of *NOT4* and *JHD2* to study epistasis and impact on histone H3K4 methylation and associated traits in *Candida albicans*

執行計畫學生：陳宜璇

學生計畫編號：107-2813-C-040 -033 -B

研究期間：2018 年 7 月 1 日至 2019 年 2 月 28 日止，計 8 個月

指導教授：李娟 教授

(一)摘要

白色念珠菌(*Candida albicans*)屬於真菌界中的酵母菌屬，為人類重要的伺機性病原菌，為多型態真菌，具有酵母菌(Yeast form)、菌絲(Hyphae)、假菌絲(Pseudohyphae)等型態，從人類嬰兒時期開始便能存在於人類口腔、喉部、消化道、皮膚及陰道等黏膜組織表面，當人抵抗力機能衰退時，體內菌落生態發生變化，即開始大量繁殖伺機感染，嚴重者甚至能導致菌血症的發生，而近年來有許多研究顯示白色念珠菌的型態轉變與白色念珠菌的致病力有關，為研究白色念珠菌值得探討的一環。先前實驗室已識別出白色念珠菌 H3K4 去甲基酶基因 *JHD2*，而 *Not4* 在釀酒酵母中已知能透過泛素化降解其下游基因 *Jhd2* 且白色念珠菌 *NOT4* 與致病力有關，因此想進一步釐清 *JHD2* 與 *NOT4* 的功能關聯。透過 *JHD2* 基因剔除株，建立 *NOT4* 的四環黴素誘導關閉系統 (Tet-off)，或透過 *NOT4* 基因剔

除株，建立 *JHD2* 的四環黴素誘導關閉系統 (Tet-off)，藉此系統開啟及關閉，同時分析 H3K4 甲基化的變化，可決定 *JHD2* 及 *NOT4* 何者具備上位性，同時分析相關致病力外表型與 H3K4 甲基化的改變作關聯分析，以確認彼此功能交互作用的方式。

(二)研究動機與研究問題

隨著長期使用廣效型抗生素、抗癌藥物及免疫抑制劑的應用，白色念珠菌已成為院內感染菌血症之重要致病菌之一[1]，且死亡率高達 40-60%，且人類真菌感染有日益增加的趨勢，其中白色念珠菌佔了相當多的比例，在美國相關的醫療費用估計為每年 10 億美金[2]，由此可知，白色念珠菌在致病力上有十足的威脅性。

白色念珠菌的致病能力受下列幾項因素影響，念珠菌與細胞間的黏附能力、水解酵素、菌絲形態變化及型態上自然會進行白色(White phase)與混濁(Opaque phase)的轉換[3]，其中我們對形態的可塑性與致病力有正相關的部分有一定的了解與認知，若我們能透過分析不同形態時致病力的分子機制，將會對防治白色念珠菌相關疾病來說十分重要。由於在 2004 年，白色念珠菌的 mating type locus 被發現與釀酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)具有相似的同源基因，且釀酒酵母相較白色念珠菌來說有夠完整研究資料，因此我們使用此菌種來作為研究的參考依據，以利我們的研究有個可信度高的依據對象。

於是本計畫主軸首先是利用實驗室已建立之 Tet-off 載體[4]分別將白色念珠菌

之 *NOT4* 和 *JHD2* 蛋白質編碼區選殖入 *CaJHD2* 剔除株和 *CaNOT4* 剔除株中，建構出 *CaJHD2* *-/-* *CaNOT4* Tet-off/*-* 和 *CaNOT4* *-/-* *CaJHD2* Tet-off/*-* 的品系，藉由四環黴素誘導關閉系統(Tet-off)將系統開啟(無 doxycycline, Dox)及關閉(有 Dox)，探討以下研究問題:

1. *CaNOT4* *-/-* *CaJHD2* Tet-Off/*-*及*CaJHD2* *-/-* *CaNOT4* Tet-Off/*-*兩品系表現開啟及關閉條件下能否呈現單一基因缺失但另一基因表現抑制或過量表現的狀態?
2. H3K4甲基化的形式在該兩種品系表現開啟及關閉條件下為何?能否用以辨別*CaJHD2*與*CaNOT4*何者具上位性?
3. 該兩種品系表現開啟及關閉條件下影響之致病力外表型為何?
4. 該兩種品系表現開啟及關閉條件下之致病力外表型與H3K4甲基化狀的關聯性為何?

(三)文獻回顧與探討

3-1 白色念珠菌

在所有真菌中，只有約 600 種是人類病原體[5]而白色念珠菌為其中之一，白色念珠菌為一種出芽型酵母，在自然界中以二倍體(Diploid)的形式存在[6]，且釀酒酵母與白色念珠菌具有高相似的同源性特徵，以二倍體與二倍體交配的方式產生擬有性世代，因此我們可利用研究較完整的釀酒酵母資料，進而推測白色念珠菌的基因功能[7]。

而白色念珠菌的感染能力包括形態之間的轉變，細胞表面的黏附素與侵入

素、生物膜的形成、水解酶的分泌等皆被認為是毒性因子。一系列的環境因子影響白色念珠菌的形態，例如在低 pH 值(<6)下白色念珠菌主要以酵母形式生長，而在高 pH 值(>7)下則誘導菌絲生長[8]，事實上包括飢餓、血清、或 N-乙醯基葡萄糖胺、溫度、CO₂ 濃度等條件均會誘導菌絲生成[9]，酵母和菌絲生長形式之間的轉換為二態性，並且已經提出兩種生長形式對於致病性都是重要的[10]，菌絲形式已經顯示比酵母形式更具侵入性。

3-2 H3K4 methylation

3-2-1 DNA 甲基化及組蛋白修飾概述

DNA 甲基化及組蛋白修飾為近年來越來越多的研究在探討的表觀遺傳學 (Epigenetics) 範疇，表觀遺傳學是指專門研究可遺傳，並影響生物表現型 (Phenotype) 差異，卻沒有涉及任何基因型 (Genotype) 改變因子。

DNA 甲基化是指在 DNA 序列上某些特定區域-胞嘧啶 (Cytosine) 5' 端的碳原子結構上透過甲基轉移酶加上甲基 (-CH₃)，此作用影響且調控基因表現，操控基因是否進行轉錄作用，當 DNA 進行甲基化修飾時，會抑制啟動子及轉錄起始點的轉錄作用，使基因表達量下降或不表達。DNA 甲基化這種修飾在維持基因組完整性、轉錄調控和發育過程中扮演著重要的作用[11]，在哺乳動物和植物中，DNA 甲基化也發生在基因的啟動子區域，藉由抑制轉錄起始使基因不表達[12]。

組蛋白全名為組織蛋白，是一群被 DNA 纏繞的核內蛋白，組蛋白和 DNA 纏繞會形成染色質，當組蛋白與 DNA 纏繞打開時，轉錄因子能結合在 DNA 上，促使基因表達，若兩者纏繞緊密，則會抑制基因表現。早在 1964 年科學家已發現

組蛋白可以被接上乙醯基(-COCH₃)或甲基(-CH₃)，並影響 DNA 轉錄，然而組蛋白甲基化更為複雜，組蛋白上不同位置的氨基酸被甲基化，可正向或負向調控 DNA 轉錄[13]。

3-2-2 H3K4 methylation 機制

近年來有研究顯示組蛋白 3 第四賴氨酸(H3K4)甲基化抑制轉錄的分子機制，這些現象是真核生物細胞隨環境變化而改變基因表達的重要調控方式[14]

3-3 *NOT4* 及 *JHD2*

有證據顯示，Not4 protein 有 E3 泛素連接酶的功能[15]，且有研究顯示 *NOT4* 在釀酒酵母野生型的品系中對於 H3K4 三甲基化而言是重要的[16]，而白色念珠菌 *NOT4* 基因影響菌絲的生成和致病力也已被證實[17]。*JHD2* 全名為 Jmjc domain-containing histone demethylase，Jhd2 蛋白質已知在釀酒酵母菌能使 H3K4 去甲基化[18]。實驗室建構白色念珠菌 *JHD2* 基因剔除品系在菌絲誘導條件下顯現比野生型品系較高的凝聚能力，此外表型也是致病力特徵之一。

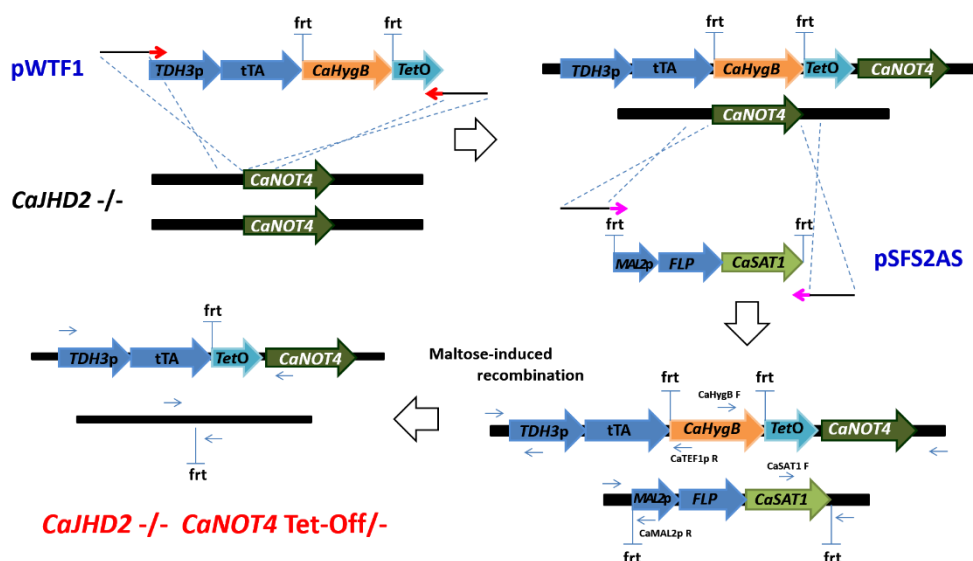
此計畫探討的 *NOT4* 基因在釀酒酵母中已被證實其產物 Not4 會透過編碼蛋白質泛素化連接酶的活性抑制其下游由 *JHD2* 基因所編碼的蛋白質，而 *JHD2* 基因所產生的 Jhd2 蛋白質已知在釀酒酵母能使 H3K4 去甲基化[19]。

(四)研究方法及步驟

一、

1. 於 *CaJHD2* 基因剔除品系中建構 *CaNOT4* 的四環黴素誘導關閉系統 (Tet-off)

利用實驗室先前構築之 *CaJHD2* 基因剔除株，以四環黴素誘導關閉 (Tet-off) 及剔除系統將其 *CaNOT4* 的一條基因剔除，而將另一條等位 *CaNOT4* 置於 Tet-off 調控得到 *CaJHD2* *-/-* *CaNOT4* Tet-Off/*-* 品系。先以一對能互補涵蓋 *CaNOT4* 基因蛋白質編碼區起始密碼子鄰接上游兩段 60 個及 Tet-off 質體 (pWTF1，如圖一) cassette 專一上下游 20 個核苷酸序列的長引子，以 polymerase chain reaction (PCR) 將質體 pWTF1 中含有抗生素篩選標記基因 *CaHygB* 的 Tet-off cassette 擴增為含有 *CaNOT4* 上游兩段核苷酸同源序列之 cassette，經由電穿孔的方式，將 Tet-off cassette 轉殖入白色念珠菌 *CaJHD2* 基因剔除株，篩選出具有 HygB 抗性的菌落之菌株 (Tet-off-*CaNOT4*)。接著，以一對能互補涵蓋 *CaNOT4* 基因蛋白質編碼區起始密碼子及終止密碼子上下游兩段 60 個及 deletion 質體 (pSFS2AS，如圖一) cassette 專一上下游 18 個核苷酸序列的長引子以 PCR 方式將 pSFS2AS 中含有抗生素篩選標記基因 *CaSAT1* 的 SAT1-flipper cassette 擴增為含有 *CaNOT4* 上下游兩段同源序列之 cassette，並利用電穿孔將 NOT4-flipper cassette 轉殖至含 Tet-off-*CaNOT4* 的菌株，與 *CaNOT4* 另一個等位基因進行同



源互換。

(圖一)

因 *NOT4-flipper cassette* 能使菌體具有抵抗抗生素 Nourseothricin (Nou) 的能力，故篩選出具有 Nou 抗性菌落，此菌落菌株也同時具有 HygB 及 Nou 抗性，再以菌落 PCR 確認 Tet-off cassette 嵌入 *CaNOT4* 的其中一個基因座上游且 *NOT4-flipper cassette* 嵌入 *CaNOT4* 的另一個等位基因座的菌株。最後，由於 *NOT4-flipper cassette* 具有 *CaMAL2p* 啟動子能夠調控 FLP 重組酶，因此以 maltose 啟動 FLP 重組酶辨認 *CaHygB* 及 *NOT4-flipper cassette* 兩側的 FRT 序列，透過重組將抗生素篩選標記基因從基因座上移除，即得到 *CaJHD2 -/- CaNOT4 Tet-off/-* 品系。

2. 觀察 *CaJHD2* 缺失與 *CaNOT4* 表達受抑制分析 H3K4 甲基化的影響

在已建構完成的 *CaJHD2 -/- CaNOT4 Tet-off/-* 品系中，加入 Dox 抑制 *CaNOT4* 的表現，利用 RT-PCR 分析 *CaNOT4* 和 *CaJHD2* 表現是否近似於 *CaNOT4* 和 *CaJHD2* 雙基因剔除的條件，再抽取其組蛋白，進行十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳 (SDS-PAGE)，再透過西方墨點法 (Western Blotting) 利用抗體 Anti-Histone H3 lysin 4 mono-, di-, tri-methylation 分別偵測組蛋白 H3K4 的單、雙、三甲基，觀察在 *CaJHD2* 缺失與 *CaNOT4* 表達受抑制時，組蛋白 3 第四賴氨酸之甲基修飾的情形。

3. 觀察 *CaJHD2* 缺失但 *CaNOT4* 過量表現對 H3K4 甲基化的影響

利用 *CaJHD2 -/- CaNOT4 Tet-off/-* 品系，在不加 Dox 條件下，形成 *CaJHD2* 缺失

下但 *CaNOT4* 過量表達，再抽取其組蛋白，進行 SDS-PAGE 並透過西方墨點法以 Anti-Histone H3 lysin 4 mono-, di-, tri-methylation 分別偵測組蛋白 H3K4 的單、雙、三甲基，觀察在 *CaJHD2* 缺失下而 *CaNOT4* 過量表達對組蛋白 3 第四賴氨酸之甲基化修飾的情形。

4. *CaJHD2* -/- *CaNOT4* Tet-Off/-品系進行致病力特性分析

a. 芽管形成試驗(Germ tube formation assay)

C.albicans 細胞以 YPD 培養液培養至指數期，再分別培養於含有 10% bovine serum 的 RPMI 1640 (RPMI 1640 broth/ MOPS/ glucose)培養液中誘導 1 小時之菌絲生成初期，並於顯微鏡下觀察 *C.albicans* 細胞菌絲初始態芽管(germ tube)的長度。

b. 細胞表面疏水性測試 (Cell Surface Hydrophobicity (CSH) assay)

C.albicans 細胞以 YPD 培養液培養至指數期，將之以 PBS 清洗後，回溶於 PBS 再加入疏水性之碳氫化合物十六烷 (n-hexadecane)均勻混和，利用分光光度計測量其 600 nm 吸光度決定測定疏水層(十六烷)下親水層(PBS)內細胞數目，藉以決定 *C. albicans* 細胞表面疏水性的狀態。

c. 鈣離子依賴絮凝分析(Ca^{2+} -dependent flocculation assay)

C.albicans 細胞以 YPD 培養液培養至指數期，清除培養液後分別溶於 deflocculation buffer (citrate/ EDTA)中，再加入 CaCl_2 誘導細胞產生絮凝現象 (Flocculation)導致沉澱，並每隔一段時間利用分光光度計測量其 600 nm 吸光度，觀察 *C.albicans* 細胞鈣離子依賴絮凝現象的影響。

d. 黏附試驗(Adhesion assay- Fibronectin)

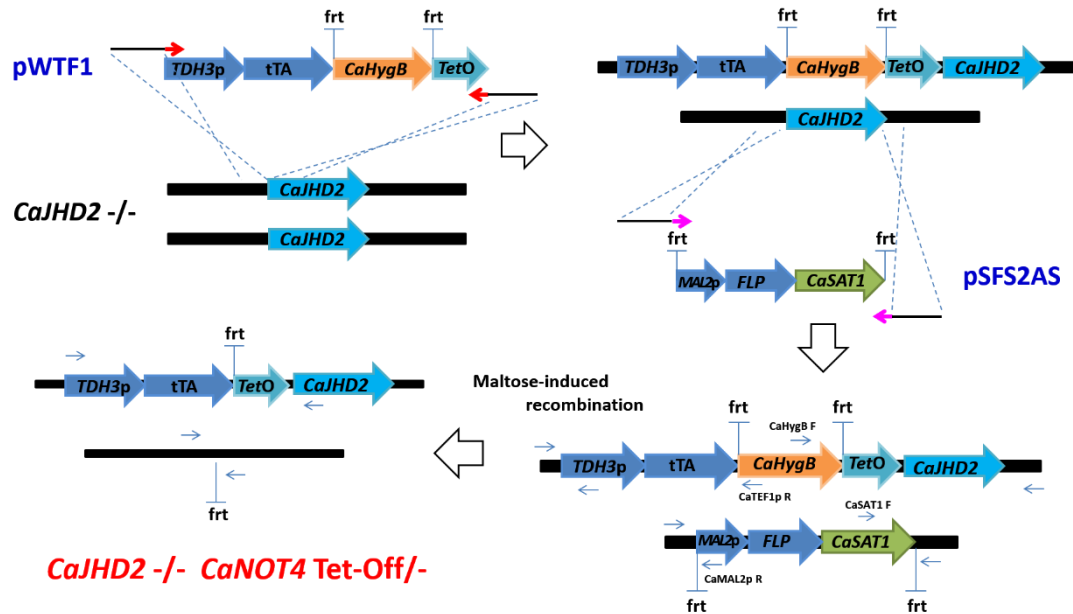
C.albicans 細胞以 YPD 培養液培養至指數期，清除培養液後分別溶入 RPMI 1640 培養液中，加入 0.0001% 的 Fibronectin 使之與菌的表面結合，將 *C.albicans* 細胞以離心收集，再透過西方墨點法，利用 anti-fibronectin 偵測黏附於 *C.albicans* 表面的 Fibronectin，可決定 *C.albicans* 細胞表面黏附 Fibronectin 的能力。

二、

1. 於 *CaNOT4* 基因剔除品系中建構 *CaJHD2* 的四環黴素誘導關閉系統 (Tet-off)

利用實驗室先前構築之 *CaNOT4* 基因剔除株，以四環黴素誘導關閉 (Tet-off) 及剔除系統將其 *CaJHD2* 的一條基因剔除，而將另一條等位 *CaNOT4* 置於 Tet-off 調控得到 *CaNOT4*^{-/-} *CaJHD2* Tet-Off^{-/-} 品系。先以一對能互補涵蓋 *CaJHD2* 基因蛋白質編碼區起始密碼子鄰接上游兩段 60 個及 Tet-off 質體(pWTF1，如圖二) cassette 專一上下游 20 個核苷酸序列的長引子，以 polymerase chain reaction (PCR) 將質體 pWTF1 中含有抗生素篩選標記基因 *CaHygB* 的 Tet-off cassette 擴增為含有 *CaJHD2* 上游兩段核苷酸同源序列之 cassette，經由電穿孔的方式，將 Tet-off cassette 轉殖入白色念珠菌 *CaNOT4* 基因剔除株，篩選出具有 HygB 抗性的菌落之菌株 (Tet-off- *CaJHD2*)。接著，以一對能互補涵蓋 *CaJHD2* 基因蛋白質編碼區起始密碼子及終止密碼子上下游兩段 60 個及 deletion 質體 (pSFS2AS，如圖二) cassette 專一上下游 18 個核苷酸序列的長引子以 PCR 方式將 pSFS2AS 中含有抗生素篩選標記基因 *CaSAT1* 的 *SAT1*-flipper cassette 擴增為

含有 *CaJHD2* 上下游兩段同源序列之 cassette，並利用電穿孔將 *JHD2-flipper* cassette 轉殖至含 Tet-off-*CaJHD2* 的菌株，與 *CaJHD2* 另一個等位基因進行同源互換。



(圖二)

因 *JHD2-flipper* cassette 能使菌體具有抵抗抗生素 Nourseothricin (Nou) 的能力，故篩選出具有 Nou 抗性菌落，此菌落菌株也同時具有 HygB 及 Nou 抗性，再以菌落 PCR 確認 Tet-off cassette 嵌入 *CaJHD2* 的其中一個基因座上游且 *JHD2-flipper* cassette 嵌入 *CaJHD2* 的另一個等位基因座的菌株。最後，由於 *JHD2-flipper* cassette 具有 *CaMAL2p* 啟動子能夠調控 FLP 重組酶，因此以 maltose 啟動 FLP 重組酶辨認 *CaHygB* 及 *JHD2-flipper* cassette 兩側的 FRT 序列，透過重組將抗生素篩選標記基因從基因座上移除，即得到 *CaNOT4* $-/-$ *CaJHD2* Tet-off/ $-$ 品系。

2. 觀察 *CaNOT4* 缺失但 *CaJHD2* 表達受抑制分析 H3K4 甲基化的影響

在已建構完成的 *CaNOT4* $-/-$ *CaJHD2* Tet-off/ $-$ 品系中，加入 Dox 抑制 *CaJHD2* 的

表現，利用 RT-PCR 分析 *CaNOT4* 和 *CaJHD2* 表現是否近似於近似於 *CaNOT4* *CaJHD2* 雙基因剔除的條件，再抽取其組蛋白，進行十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳 (SDS-PAGE)，再透過西方墨點法 (Western Blotting) 利用抗體 Anti-Histone H3 lysin 4 mono-, di-, tri-methylation 分別偵測組蛋白 H3K4 的單、雙、三甲基，觀察在 *CaNOT4* 缺失與 *CaJHD2* 表達受抑制時，組蛋白 3 第四賴氨酸之甲基修飾的情形。

3. 觀察 *CaNOT4* 缺失但 *CaJHD2* 過量表現對 H3K4 甲基化的影響

利用 *CaNOT4* *-/-* *CaJHD2* Tet-off/*-* 品系，在不加 Dox 條件下，形成 *CaNOT4* 缺失下但 *CaJHD2* 過量表達，再抽取其組蛋白，進行 SDS-PAGE 並透過西方墨點法以 Anti-Histone H3 lysin 4 mono-, di-, tri-methylation 分別偵測組蛋白 H3K4 的單、雙、三甲基，觀察在 *CaNOT4* 缺失下而 *CaJHD2* 過量表達對組蛋白 3 第四賴氨酸之甲基化修飾的情形。

4. *CaNOT4* *-/-* *CaJHD2* Tet-Off/*-* 品系進行致病力特性分析

相關致病力特性分析如一、4

(五) 預期結果

1. 完成建構 *CaJHD2* *-/-* *CaNOT4* Tet-off/*-* 品系

透過抗生素篩選標記基因 *CaHygB* 和 *NOT4*-flipper 能夠有效篩選出嵌有 Tet-off cassette 及 *NOT4*-flipper cassette 的菌株，利用 FLP/Frt 重組系統將 *CaHygB* 和 *NOT4* 移除便可得到 *CaJHD2* *-/-* *CaNOT4* Tet-off/*-* 品系。

2. 透過 Dox 誘導了解類 *CaJHD2* 剔除 *CaNOT4* 抑制或過量表現對 H3K4 甲基化的影響

經過 Dox 誘導，可以使 *CaJHD2* 和 *CaNOT4* 達到雙剔除的效果，若在此系統下無 Dox 誘導，可達到 *CaJHD2* 剔除 *CaNOT4* 過量表現的情況，分析兩者 H3K4 甲基化的情形。在 *JHD2* 基因剔除下，*NOT4* 表現的有無預期不影響 H3K4 甲基化，若不然可能存在其他具備 *JHD2* 去 H3K4 甲基化活性而受 *Not4* 調控之基因。

3. 釐清 *CaJHD2* $-/-$ *CaNOT4* Tet-off/ $-$ 品系對 *C. albicans* 外表型

藉由外表型試驗方法，可分析 *CaJHD2* $-/-$ *CaNOT4* Tet-off/ $-$ 品系在有或無 Dox 誘導的下觀察外表型，外表型改變與 H3K4 甲基化變化可進行關聯性分析。

4. 完成建構 *CaNOT4* $-/-$ *CaJHD2* Tet-off/ $-$ 品系

透過抗生素篩選標記基因 *CaHygB* 和 *JHD2*-flipper 能夠有效篩選出嵌有 Tet-off cassette 及 *JHD2*-flipper cassette 的菌株，利用 FLP/Frt 重組系統將 *CaHygB* 和 *JHD2* 移除便可得到 *CaNOT4* $-/-$ *CaJHD2* Tet-off/ $-$ 。

5. 透過 Dox 誘導了解類 *CaNOT4* 剔除 *CaJHD2* 抑制或過量表現對 H3K4 甲基化的影響

經過 Dox 誘導，可以使 *CaNOT4* 和 *CaJHD2* 達到雙剔除的效果，若在此系統下無 Dox 誘導，可達到 *CaNOT4* 剔除 *CaJHD2* 過量表現的情況，分析兩者 H3K4 甲基化的情形，預期在 *NOT4* 基因剔除下，*JHD2* 表現被抑制或去抑制

(過量表現)會分別反映成為 H3K4 甲基化增加及減少。結合第 2 點，若 H3K4 可能得以判定 H3K4 的單、雙、三的去甲基化的增減與哪一些致病力外表型改變具關聯性。

6. 釐清 *CaNOT4*^{-/-} *CaJHD2 Tet-off*^{-/-} 品系對 *C. albicans* 外表型

藉由外表型試驗方法，可分析 *CaNOT4*^{-/-} *CaJHD2 Tet-off*^{-/-} 品系在有或無 Dox 誘導的下觀察外表型，外表型改變與 H3K4 甲基化變化可進行關聯性分析。結合第 3 點，H3K4 的單、雙、三的甲基化之增減與哪一些致病力外表型改變之關聯性可分析。後續可嘗試鑑定哪一些致病力外表型的基因表現受影響。

(六)結果與討論

為了釐清 *CaJHD2* 和 *CaNOT4* 對於 H3K4 甲基化影響，本次實驗建構之品系除了計畫中所提及的 *CaJHD2*^{-/-} *CaNOT4 Tet-off*^{-/-} (JN-) 與 *CaNOT4*^{-/-} *CaJHD2 Tet-off*^{-/-} (NJ-)，在與謝家慶老師及賴威仲學長的討論過後，決定再建構 SC5314+*CaJHD2 Tet-off*^{-/-} (SJ-) 及 SC5314+*CaNOT4 Tet-off*^{-/-} (SN-)，更能夠將各品系交叉比對。以野生型 SC5314 與 SC5314+*CaJHD2 Tet-off*^{-/-}、SC5314+*CaNOT4 Tet-off*^{-/-} 比較，可以分別單純看 *JHD2* 和 *NOT2* 兩基因的表現量對於 H3K4 甲基化影響以及外表型改變；而計劃本身提及的 *CaJHD2*^{-/-} *CaNOT4 Tet-off*^{-/-} 與 *CaNOT4*^{-/-} *CaJHD2 Tet-off*^{-/-} 兩品系中 *JHD2* 和 *NOT2* 皆和 H3L4 甲基化有關，將其一剔除，另一基因使用 Tet off 系統調控，可比較出兩基因對於甲基化方面何者較具上位性。因此，

首先實驗室共同設計了 CaJHD2 TF1F、CaJHD2 TF1R 及 CaNOT4 TF1F、CaNOT4 TF1R (figure 1.)，分別利用長引子 PCR 放大出 JHD2-tetoff-cassette 及 NOT4-tetoff-cassette (figure 2.)，接下來利用白色念珠菌電穿孔的方式將 JHD2-tetoff-cassette 轉殖入 SC5314 及 *CaNOT4* *-/-*，NOT4-tetoff-cassette 轉殖入 SC5314 及 *CaJHD2* *-/-*，以含 HygB(1mg/μl)的 YPD 培養基篩選第一條對偶基因遭 Tet-off cassette 替換的菌株，得到 SC5314+JHD2Tet off/+ (SJ+)、*CaNOT4* *-/-* +JHD2Tet off/+ (NJ+)、SC5314+NOT4Tet off/+ (SN+) 及 *CaJHD2* *-/-* +NOT4Tet off/+ (JN+)的品系。篩選出第一條對偶基因遭 Tet-off cassette 替換的菌株後，再分別利用長引子 PCR 放大出 JHD2-deletion-cassette 及 NOT4-deletion-cassette (figure 3.)，接下來利用白色念珠菌電穿孔的方式將 JHD2-deletion-cassette 轉殖入 SC5314+JHD2Tet off/+ (SJ+)及 *CaNOT4* *-/-* +JHD2Tet off/+ (NJ+)，NOT4-tetoff-cassette 轉殖入 SC5314+NOT4Tet off/+ (SN+)及 *CaJHD2* *-/-* +NOT4Tet off/+ (JN+)，以含 Nou(200μg/ml)的 YPD 培養基篩選第二條對偶基因遭 deletion cassette 替換的菌株，得到 SC5314+JHD2Tet off/- (SJ-)、*CaNOT4* *-/-* +JHD2Tet off/- (NJ-)、SC5314+NOT4Tet off/- (SN-) 及 *CaJHD2* *-/-* +NOT4Tet off/- (JN-)。電穿孔轉殖後的菌株首先以雙抗生素 HygB(1mg/μl)、Nou(200μg/ml)盤子做篩選 (figure 4.)，接著設計引子: (1)確認 JHD2 tet off cassette: Forward 引子位於 Tet off cassette 上游之 *CaJHD2*，Reverse 引子位於 Tet off cassette 上之 *Tet repressor* 上；另一組引子，Forward 引子位於 Tet off cassette 上之 *CaHygB*，Reverse 引子位於 Tet off cassette 下游之 *CaJHD2* 下游基因。(2) 確認 JHD2 deletion cassette: Forward 引子位於 deletion cassette 上游之 *CaJHD2*，

Reverse 引子位於 deletion cassette 上之 *CaMAL2p*；另一組引子，Forward 引子位於 deletion cassette 上之 *CaSAT1*，Reverse 引子位於 deletion cassette 下游之 *CaJHD2* 下游基因上。(3) 確認 NOT4 tet off cassette: Forward 引子位於 Tet off cassette 上游之 *CaNOT4*，Reverse 引子位於 Tet off cassette 上之 *Tet repressor* 上；另一組引子，Forward 引子位於 Tet off cassette 上之 *CaHygB*，Reverse 引子位於 Tet off cassette 下游之 *CaNOT4* 下游基因上。(4) 確認 NOT4 deletion cassette: Forward 引子位於 deletion cassette 上游之 *CaNOT4*，Reverse 引子位於 deletion cassette 上之 *CaMAL2p*；另一組引子，Forward 引子位於 deletion cassette 上之 *CaSAT1*，Reverse 引子位於 deletion cassette 下游之 *CaNOT4* 下游基因上 (figure 5.)。每個品系皆以上下游各一組引子放大確認 cassette 是否如預期般取代其位置 (figure 6.) (figure 7.)。再確認得到品系後，利用 2% maltose 取代 glucose 為碳源的培養液誘導 cassette 剔除，無法存於 HygB(1mg/μl)、Nou(200μg/ml) YPD 培養基之菌株表示其 cassette 中抗生素基因成功剔除，而目前經多次嘗試，皆未成功將兩條等位基因中抗生素基因同時剔除，因此以抗生素基因存在的情況下使用 Dox 調控基因表現，在不加入 Dox 的條件下基因處於過量表達的型態，在加入 Dox 的條件下基因表現可達到趨近為關閉的型態。已嘗試在不同品系未加入 Dox 的菌株測試外表型分析的實驗，尚未加入 Dox 調控不同基因的表現量做更完整的分析。

Figures :

Figure 1.

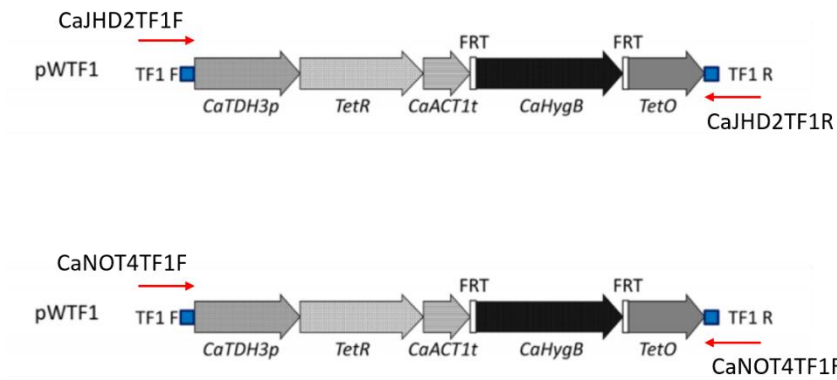
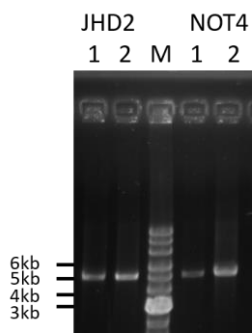


Figure 2.



利用長引子 PCR 放大出 JHD2-tetoff-cassette 及 NOT4-tetoff-cassette

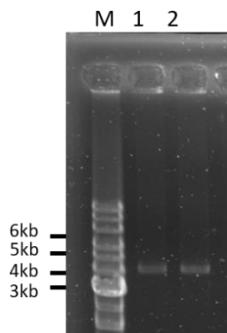
Primer :

1~2 : CaJHD2 TF1F / CaJHD2 TF1R

3~4 : CaNOT4 TF1F / CaNOT4 TF1R

→ 5368 bp

Figure 3.



利用長引子 PCR 放大出 JHD2-deletion-cassette 及 NOT4-deletion-cassette

Primer :

1: CaJHD2 S1F / CaJHD2 S2R

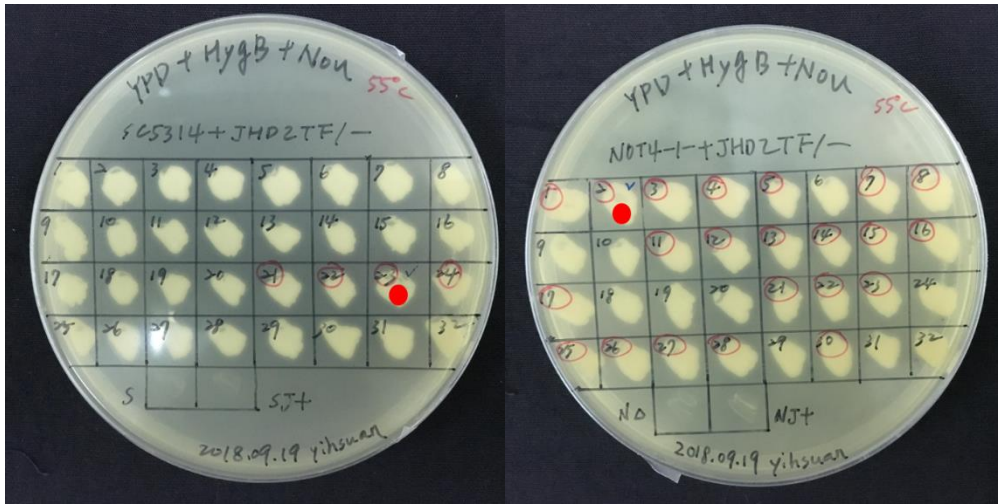
2: CaNOT4 S1F / CaNOT4 S2R

→ 4360 bp

Figure 4. 先以雙抗生素 HygB(1mg/μl)、Nou(200μg/ml) 盤子做篩選

SC5314+JHD2Tet off/-

CaNOT4 -/- +JHD2Tet off/-



SC5314+NOT4Tet off/- CaJHD2 -/- +NOT4Tet off/-

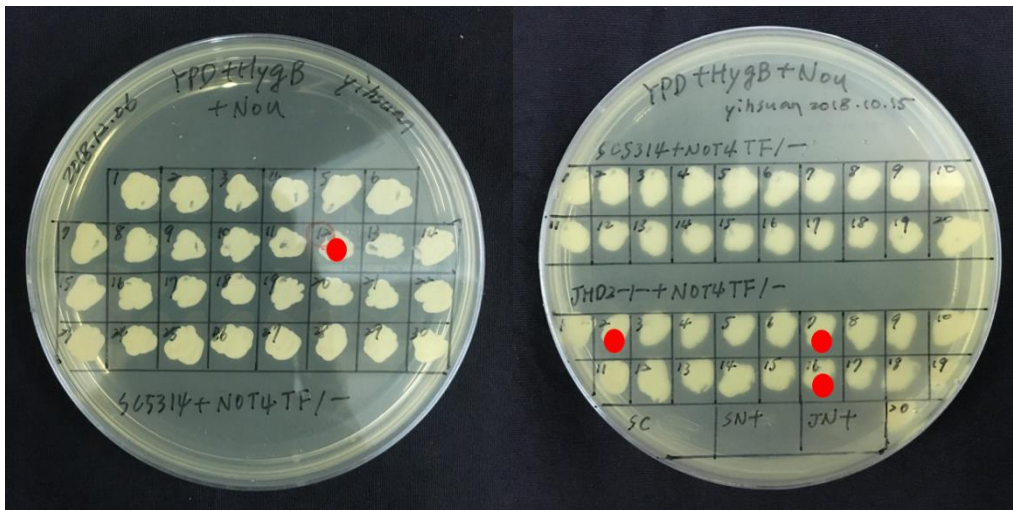


Figure 5. 確認 tet off cassette 及 deletion cassette 成功轉殖之 primer

MAL2p-R	CAGACAGTCGAGTTAGACAG
CaHygB F	TTAGATCAGGTGCTGGTACT
JHD2 check R	ATCTTAACTAGGCCGTAGGT
NOT4 check R	CACTTGAACCAATAACTCAC
NOT4 WYY-R	ATAACGGAGCCACCCGAAAA
NOT401 F	AGGAGTAGTACCTGGCGTAAA
JHD201 F	CCAGTTTCTGATGCTGTCCTT
CaSAT1F	GCTCCTTGGCATAACGATTAG

JHD201 R	CCTCGTTTGCTTCACACTCA
pNIM1 inte detect R	GTATGGTGCCTATCTAAC

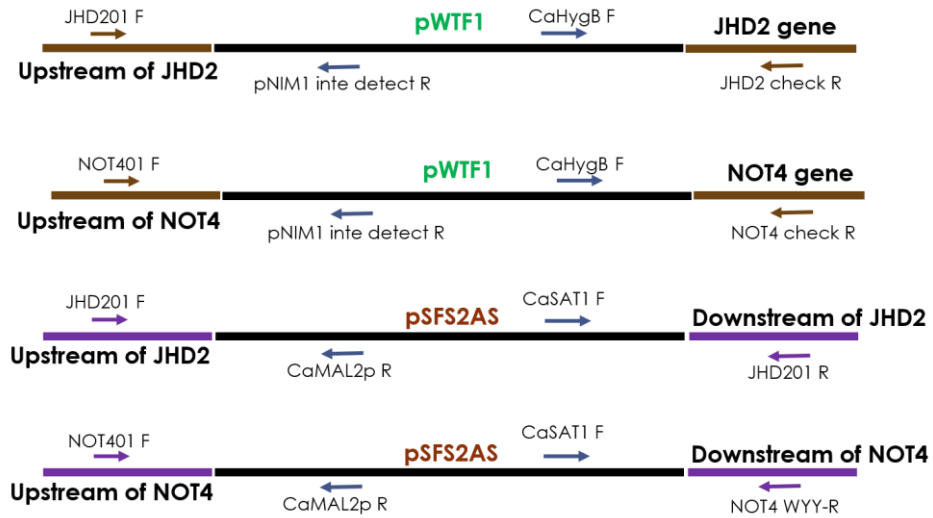
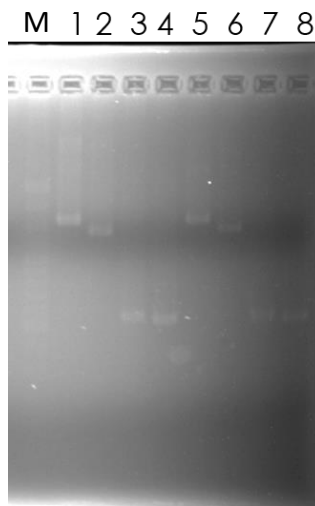
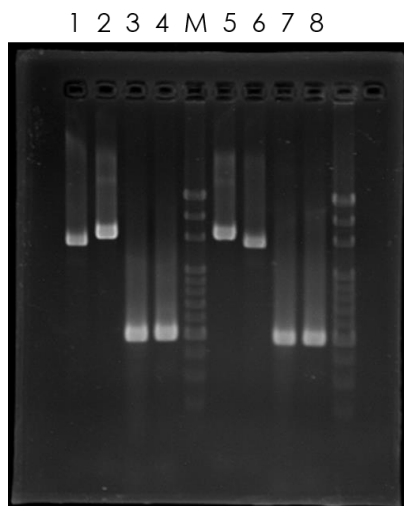


Figure 6.



Check JHD2 Tet off
 1(SJ-): upstream 1576 bp
 2(SJ-): down stream 1429 bp
 5(NJ-): up stream 533 bp
 6(NJ-): down stream 519 bp
 Check JHD2 Deletion
 3(SJ-): up stream 1576 bp
 4(SJ-): down stream 1429 bp
 7(NJ-): up stream 533 bp
 8(NJ-): down stream 519 bp

Figure 7.



Check NOT4 Tet off
 1(SN-): down stream 1400 bp
 2(SN-): up stream 1492 bp
 5(JN-): up stream 1429 bp
 6(JN-): down stream 1400 bp
 Check NOT4 Deletion
 3(SN-): up stream 482 bp
 4(SN-): down stream 489 bp
 7(JN-): up stream 482 bp
 8(JN-): down stream 489 bp

(七)未來的研究方向

先前嘗試 maltose 誘導 SC5314+JHD2Tet off/- 、CaNOT4 -/- +JHD2Tet off/- 、SC5314+NOT4Tet off/- 及 CaJHD2 -/- +NOT4Tet off/- (JN-)，沒成功得到抗生素剔除後的品系，會再調整嘗試出最佳條件來進行誘導。同時，也將先前所嘗試的外表型分析試驗，在加入 Dox 誘導後，基因關閉的條件下做分析，不同品系的交叉比對，可分析 H3L4 甲基化的變化、芽管形成試驗、細胞表面疏水性測試、鈣離子依賴絮凝分析以及黏附試驗，比對後統計比較出 CaJHD2 和 CaNOT4 兩基因中何者對於甲基化較具調控 H3L4 甲基化的上位性，其外表型分析與型態的變化與白色念珠菌感染入侵、黏附於醫藥材料上的能力有相當的關聯性，希望能繼續完成本計畫，並對於兩基因功能所對應的外表型變化有更全面的了解。

(八)參考文獻

1. Chen YC, Chang SC, Sun CC, Yang LS, Hsieh WC, Luh KT: **Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections at a teaching hospital in Taiwan, 1981 to 1993.** *Infect Control Hosp Epidemiol* 1997, **18**(5):369-375.
2. Wilson LS, Reyes CM, Stolpman M, Speckman J, Allen K, Beney J: **The direct cost and incidence of systemic fungal infections.** *Value Health* 2002, **5**(1):26-34.
3. Lan CY, Newport G, Murillo LA, Jones T, Scherer S, Davis RW, Agabian N: **Metabolic specialization associated with phenotypic switching in Candida albicans.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**(23):14907-14912.

4. Lai WC, Sun HF, Lin PH, Ho Lin HL, Shieh JC: **A new rapid and efficient system with dominant selection developed to inactivate and conditionally express genes in *Candida albicans***. *Curr Genet* 2016, **62**(1):213-235.
5. Brown GD, Denning DW, Levitz SM: **Tackling human fungal infections**. *Science* 2012, **336**(6082):647.
6. Hickman MA, Zeng G, Forche A, Hidakawa MP, Abbey D, Harrison BD, Wang YM, Su CH, Bennett RJ, Wang Y *et al*: **The 'obligate diploid' *Candida albicans* forms mating-competent haploids**. *Nature* 2013, **494**(7435):55-59.
7. Berman J, Sudbery PE: ***Candida Albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast**. *Nat Rev Genet* 2002, **3**(12):918-930.
8. Odds FC: ***Candida and candidosis***, 2nd edn. London ; Philadelphia: Bailli©*re Tindall; 1988.
9. Sudbery PE: **Growth of *Candida albicans* hyphae**. *Nat Rev Microbiol* 2011.
10. Jacobsen ID, Wilson D, Wachtler B, Brunke S, Naglik JR, Hube B: ***Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target**. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2012, **10**(1):85-93.
11. Kornberg RD: **Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA**. *Science* 1974, **184**(4139):868-871.
12. Wang SS, Zhou BO, Zhou JQ: **Histone H3 lysine 4 hypermethylation prevents aberrant nucleosome remodeling at the PHO5 promoter**. *Mol Cell Biol* 2011, **31**(15):3171-3181.
13. Law JA, Jacobsen SE: **Establishing, maintaining and modifying DNA methylation**

- patterns in plants and animals.** *Nat Rev Genet* 2010, **11**(3):204-220.
14. Zilberman D, Gehring M, Tran RK, Ballinger T, Henikoff S: **Genome-wide analysis of Arabidopsis thaliana DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription.** *Nat Genet* 2007, **39**(1):61-69.
 15. Albert TK, Hanzawa H, Legtenberg YI, de Ruwe MJ, van den Heuvel FA, Collart MA, Boelens R, Timmers HT: **Identification of a ubiquitin-protein ligase subunit within the CCR4-NOT transcription repressor complex.** *EMBO J* 2002, **21**(3):355-364.
 16. Laribee RN, Shibata Y, Mersman DP, Collins SR, Kemmeren P, Roguev A, Weissman JS, Briggs SD, Krogan NJ, Strahl BD: **CCR4/NOT complex associates with the proteasome and regulates histone methylation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**(14):5836-5841.
 17. Krueger KE, Ghosh AK, Krom BP, Cihlar RL: **Deletion of the NOT4 gene impairs hyphal development and pathogenicity in Candida albicans.** *Microbiology* 2004, **150**(Pt 1):229-240.
 18. Liang G, Klose RJ, Gardner KE, Zhang Y: **Yeast Jhd2p is a histone H3 Lys4 trimethyl demethylase.** *Nat Struct Mol Biol* 2007, **14**(3):243-245.
 19. Mersman DP, Du HN, Fingerhahn IM, South PF, Briggs SD: **Polyubiquitination of the demethylase Jhd2 controls histone methylation and gene expression.** *Genes Dev* 2009, **23**(8):951-962.

(九)感謝

在此感謝國家科技部委員會資助本次計畫，以及謝家慶老師、李娟老師和實驗室其它成員的協助與指導，使我能夠在執行計畫的期間得到一些成果，雖然本次計畫仍未解答所有的問題，但在執行計畫的期間，不斷的和老師及已畢業的賴威仲學長討論，我學習到了更多東西，除了實驗上的技術，還有研究設計的邏輯、蒐集整合文獻資料的能力，對未來繼續在此領域學習絕對有相當大的幫助。