

**科技部補助**  
**大專學生研究計畫研究成果報告**

計 畫 名 稱	： 利用四環素調節的雙分子螢光互補方法驗證Jhd2 和 Not4 蛋白質 在白色念珠菌具交互作用
------------	---

執行計畫學生：章禮君

學生計畫編號：MOST 108-2813-C-040-024-B

研究期間：108年07月01日至109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，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 109年03月29日

# 科技部大專生研究計畫

利用四環素調節的雙分子螢光互補方法驗證 Jhd2 和 Not4 蛋白質

在白色念珠菌具交互作用

## The use of a tetracycline-regulated bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assay to verify the interaction between Jhd2 and Not4 in *Candida albicans*

執行計畫學生：章禮君

學生計畫編號：編號 108-2813-C-040-024-B

研究期間：108 年 7 月 1 日至 109 年 2 月底止，計 8 個月

指導教授：謝家慶 副教授

### (一) 摘要

白色念珠菌 (*Candida albicans*) 是一種伺機性真菌病原體，存在健康的人體內的微生物菌叢內。但當人體免疫力下降或受藥物副作用影響，體內菌落生態環境失衡，白色念珠菌便會伺機感染而造成臨床症狀，輕微症狀如鵝口瘡、外陰部搔癢等局部感染，嚴重者會造成菌血症且可能致死。為了因應人體內的環境變化，白色念珠菌會藉由改變生長型態適應不同環境，也造就了其多樣性的生長型態與其致病力密切相關。從釀酒酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的文獻中得知，ScNot4 為一泛素連接酶，在轉錄時泛素化去甲基酶 ScJhd2，使其降解進而阻止組蛋白 H3 第四賴胺酸 (H3K4) 的去甲基化。目前文獻已知，剔除 *CaNOT4* 基因抑制白色念珠菌的菌絲形成，並降低對於感染小鼠的致病力。因為白色念珠菌與釀酒酵母菌有相近的親緣關係，同源基因的研究時常以釀酒酵母菌作為參考，但依舊存在著系統演化學上的分歧。由此假設 *CaNot4* 應可泛素化白色念珠菌去甲基酶 *CaJhd2*，進而維持組蛋白 H3K4 甲基化調節型態轉變相關的基因。本研究利用四環素調節雙分子螢光互補測定法，探討 *CaNOT4* 及 *CaJHD2* 之蛋白質產物是否有交互作用，並從中探討兩者間的功能調節能導致與致病力有關外表型的改變。

## (二)研究動機與研究問題

### 2-1 白色念珠菌

白色念珠菌是一種人類共生真菌，會在免疫低下時伺機大量增生，造成疾病，且為院內感染的主要致病菌之一，常導致病患延長住院時間，甚至提高死亡率 (Fortun, Martin-Davila et al. 2012)。以台灣為例，從1996年至2003年念珠菌屬就位居院內感染前五名，其中白色念珠菌是醫院最常見的致病念珠菌屬(Wu, Lee et al. 2006)。白色念珠菌能以菌絲型(hyphal form)、酵母菌型(yeast form)及假菌絲型(pseudohyphal form)等型態生長，其生長形態的可塑性已被證實與其致病力有相關性 (Calderone and Fonzi 2001)。本研究從白色念珠菌調節組蛋白H3K4甲基化的基因切入，探討可能造成伺機性感染之致病因子。

### 2-2 泛素連接酶 (*CaNot4*) 及去甲基酶 (*CaJhd2*)

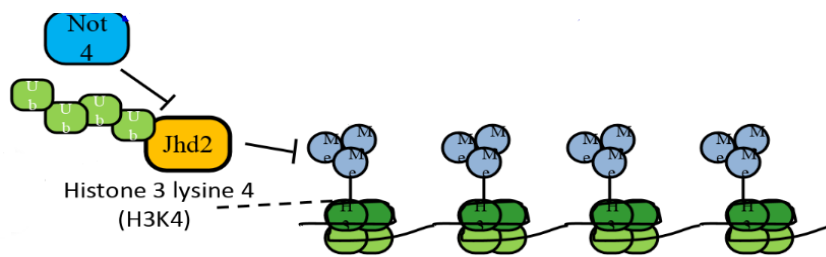
由於白色念珠菌和釀酒酵母菌的親緣關係相當接近，在釀酒酵母菌中已證實泛素連接酶 *ScNot4* 會透過泛素化降解去甲基酶 *ScJhd2*，達到抑制 H3K4 去甲基化的效果 (Mersman, Du et al. 2009)。(圖一)

在白色念珠菌中，已知 *Canot4* 剔除突變株存在菌絲形成的缺陷及感染小鼠的致病力下降(Krueger, Ghosh et al. 2004)。為了進一步釐清 *CaNot4* 是否藉由泛素化 *CaJhd2* 進而阻止 H3K4 的去甲基化，影響菌絲形態生成基因表現，致使影響致病力(Sudbery, Gow et al. 2004)。本計畫利用四環素調節的雙分子螢光互補測定多方確認 *CaNot4* 和 *CaJhd2* 是否有交互作用，以映證兩者功能關係。在此基礎下，也將透過建立白色念珠菌 *Canot4* 和 *Cajhd2* 剔除突變株及 Tet-off 調控突變株驗證其對於型態變化之影響 (Lai, Sun et al. 2016)。

### 2-3 四環素調節的雙分子螢光互補測定

螢光蛋白質的發現，衍伸至其應用及發展出多種螢光，協助科學研究得以觀察活細胞內的各種作用。藉由蛋白質結構互補特性，將兩個會交互作用的標的基因分別與 N 端片段和 C 端片段具互補特性的蛋白質形成融合蛋白質，當這兩個蛋白質交互作用發生時，具互補特性的蛋白質便可形成互補啟動報導。當中雙分子螢光互補測定(BiFC)在對活細胞干擾最少的情況下能夠直接偵測蛋白之間的交互作用(Kerppola 2008)。除此之外，此系統敏感度夠高可偵測蛋白間微弱的交互作用，且目標蛋白質之間的交互作用強度和螢光成正相關(Morell, Espargaro et al. 2008)，相較於其他偵測蛋白交互作用(PPI)的方法是具有優勢的。和其它多數技術相比，雙分子螢光互補技術適用範圍廣，既可以用於體內也可以應用於體外的蛋白質之間交互作用研究。不論在細菌、真菌、或真核細胞，BiFC 系統都能實施(Zamyatnin Jr, Solovyev et al. 2006, Sung and Huh 2007)，也能進行定位、定量相關研究。

四環素調節轉錄系統 (Tetracycline-inducible gene expression system) 主要由 TetR (Tetracycline repressor) 和 TetO (Tetracycline operator) 兩個主要元件組成。其中 TetR 的 C 端融合了 DNA 活化功能域，並改造成為須與四環素結合，才可與 TetO 結合的轉錄因子。此特性可以藉由四環素的濃度及加入的時間點快速地調控標的基因的表現強度及特定的環境，以得知標的基因的功能。為了探討蛋白質交互作用，可以透過四環素調節轉錄系統在特定時間點及環境，啟動融合 N 端或 C 端的螢光蛋白質標的基因。



圖一

本計畫中提出下列幾點探討：

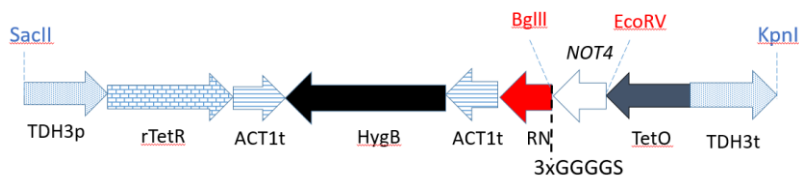
1. *CaNOT4* 和 *CaJHD2* 構築於此 BiFC 系統預期會產生螢光融合蛋白且能直接藉由觀察螢光表現確認兩者是否有交互作用？
2. 藉由不同濃度四環素類似物(doxycycline, Dox)及作用時間誘導螢光融合蛋白表現量，是否能更有效偵測其交互作用？
3. 白色念珠菌其生物型態與致病力相關，藉由各種逆境及不同營養條件下使其改變型態，觀察不同型態在 *CaNot4* 及 *CaJhd2* 之間的交互作用強度。
4. 利用藥物使白色念珠菌停滯在不同細胞週期，像是 Hydroxyurea 引起 G1 時期停滯，在特定的細胞週期偵測螢光主要發生位置及強度。
5. 利用認識螢光蛋白片段的 mCherry 抗體去辨認 *CaJhd2*，進行免疫沉澱法，預期能找到在交互作用時被泛素化的 *CaJhd2* 及其相關的蛋白質。

### (三)材料及方法

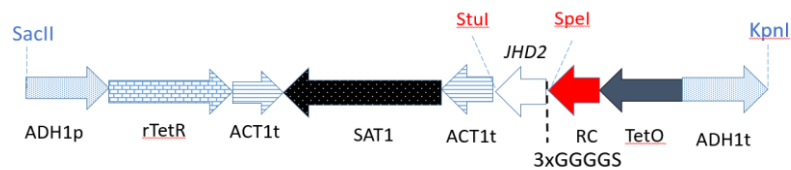
本計畫主要是以實驗室原有的 *C.albican* BiFC 系統建構含有 *CaNOT4* 和 *CaJHD2* 的 cassette 探討兩基因之編碼蛋白是否有直接的交互作用。

1. 設計帶有特定限制酶切點的引子，並以帶有 *CaNOT4* 及 *CaJHD2* 模板進行 PCR 放大目標基因 *CaNOT4* 及 *CaJHD2*。
2. 分別亞克隆 *CaNOT4* 和 *CaJHD2* 於質體 pWTN1-6H-N 及 pNIM1-C 建構 cassette，兩質體分別帶 N 端(紅螢光蛋白質的胺基酸 1-159)及 C 端(紅螢光蛋白質的胺基酸 160-237)的 mCherry (RFP) 做為雙分子螢光互補報導基因，且能在白色念珠菌產生兩部分不會發螢光的片段。

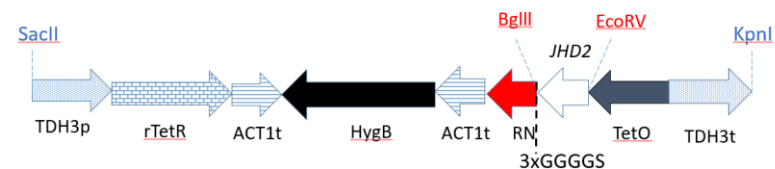
3. 建立如圖所示的四個質體 (圖二、圖三、圖四、圖五) , 利用電穿孔轉形的方式送入白色念珠菌, 預期得到pWTN1-6H-NOT4-N及pNIN1-C-JHD2或 pWTN1-6H-JHD2-N及pNIM1-C-NOT4 兩實驗品系, 用以驗證融合蛋白結合於CaJhd2及CaNot4不會干擾交互作用, 搭配負控制組9個品系共有11品系 (表一)。
4. 使用西方墨點法, 利用rabbit anti-mCherry去偵測是否形成螢光融合蛋白, 並以β-actin為loading control。



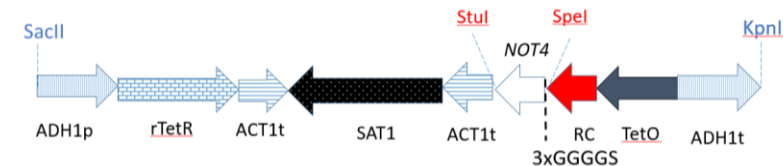
圖二 pWTN1-6H-NOT4-N



圖三 pNIN1-C-JHD2



圖四 pWTN1-6H-JHD2-N



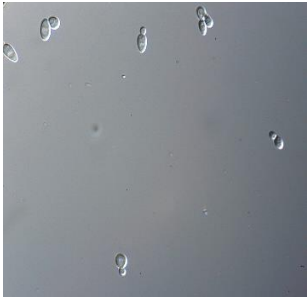
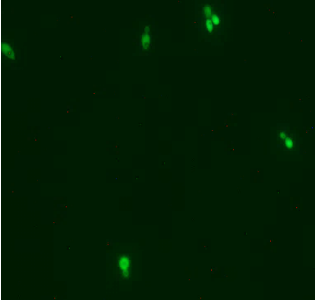
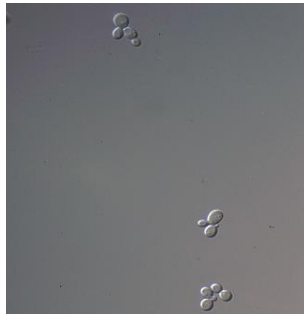
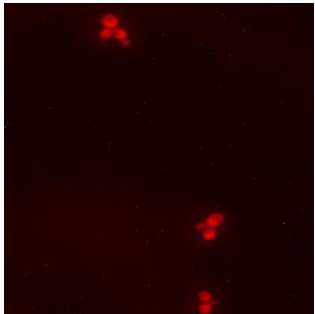
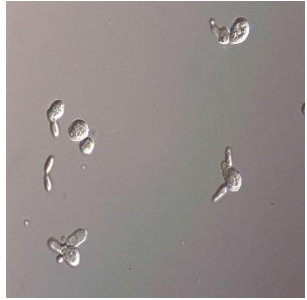
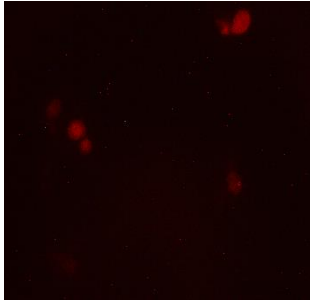
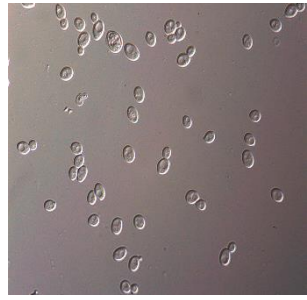



圖五 pNIM1-C-NOT4

表一 Strains used in this study (including control)


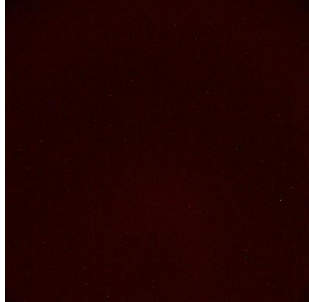
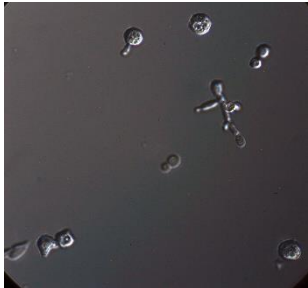
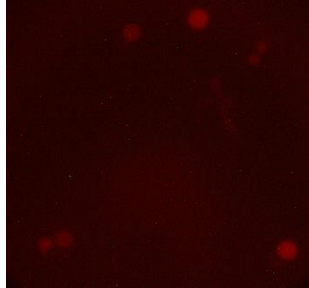

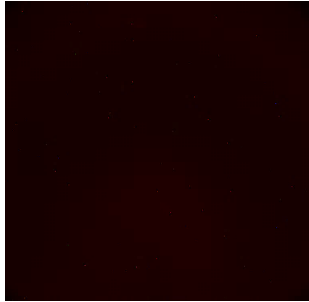
Strain	Plasmid 1	Plasmid 2
<i>CaNOT4-RN/RC-JHD2</i>	pWTN1-6H-NOT4-N	pNIN1-C-JHD2
<i>CaRN/RC-JHD2</i>	pWTN1-6H-N	pNIN1-C-JHD2
<i>CaRC-JHD2</i>	×	pNIN1-C-JHD2
<i>CaNOT4-RN/RC</i>	pWTN1-6H-NOT4-N	pNIN1-C
<i>CaNOT4-RN</i>	pWTN1-6H-NOT4-N	×
<i>CaJHD2-RN/RC-NOT4</i>	pWTN1-6H-JHD2-N	pNIM1-C-NOT4
<i>CaRN/RC-NOT4</i>	pWTN1-6H-N	pNIM1-C-NOT4
<i>CaRC-NOT4</i>	×	pNIM1-C-NOT4
<i>CaJHD2-RN/RC</i>	pWTN1-6H-JHD2-N	pNIM1-C
<i>CaJHD2-RN</i>	pWTN1-6H-JHD2-N	×
<i>Ca-RN/RC</i>	pWTN1-6H-N	pNIN1-C

### 隨機挑選已構築品系觀察

BiFC 品系須培養於含有 40ug/ml doxycycline 的 YPD ( Yeast extract-peptone-dextrose ) 培養液中 6 小時，誘導蛋白大量表現。加入 10ul 的 0.1% Poly-L-lysine 並均勻的塗抹於載玻片，以 5ul 誘導 6 小時的菌液為樣本，蓋上蓋玻片，以指甲油密封並靜置風乾。DIC(different interference contrast)和 fluorescent image 是由 ZEISS Axio Imager A2 microscope 觀察及 QCapture Pro7 分析。

Strain	plasmids	protein expressed	DIC	fluorescent image
WCL102	pWTN1	GFPmut2		
WCL103	pWTN2	mCherry		
WCL108	pWTN1-6H- CDC42- RN&pNIM1-RC- RDI1	Cdc42- RN&RC- Rdi1		
WCL111	pWTN1- RN&pNIM1-RC	RN&RC		
WCL112	pWTN1- RN&pNIM1-RC- RDI1	RN&RC- Rdi1		



WCL113	pWTN1-6H- CDC42- RN&pNIM1-RC	Cdc42- RN&RC		
WCL118	pWTN1-RN- CDC42&pNIM1- RC-RDI1	RN- Cdc42&RC- Rdi1		
WCL125	pWTN1-RN- CDC42&pNIM1- RC	RN- Cdc42&RC		

### BiFC 品系構築

從Candida Genome Database(CGD)尋找基因序列並設計引子PCR放大CaNOT4和CaJHD2的exon且前後含有限制酶切點(fig.1)，同時，把經過限制酶EcoRV、Bgl II、SpeI、StuI 37°C處理過的CaNOT4和CaJHD2片段和TA vector以T4 ligase作用於4°C的環境下進行接合。接著把 ligation 的產物利用 Heat Shock 的方式送入已製備的E.coli competent cells(10B) 中，用含有 ampicillin 的 LB 培養基選殖。利用藍白篩的方式挑出目標colony以Colony PCR進行初步檢查(fig.2)，再進行定序確認。同時分析序列得知 coding sequence上含有限制酶切點，設計引子進行點突變去掉coding sequence上的cutting site，並且以DNA電泳進行確認(fig.3)。再以限制酶EcoRV、BglII剪切pTANOT4及pTAJHD2，SpeI、StuI剪切pTANOT4及pTAJHD2(fig.3)和實驗室原有的BiFC cassette進行亞克隆。

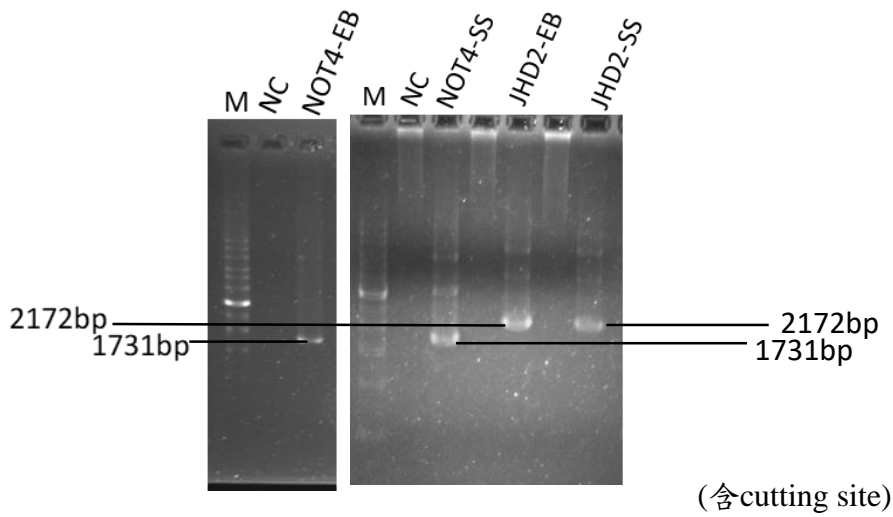
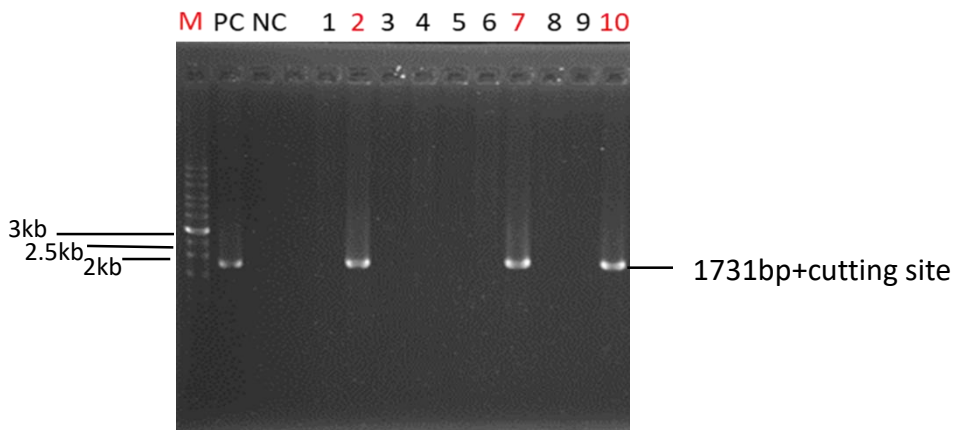


fig.1 PCR amplifeid NOT4-EB(EcoRV、BglII)、NOT4-SS(SpeI、StuI)、JHD2(EcoRV、BglII)、JHD2(SpeI、StuI)

A.



B.

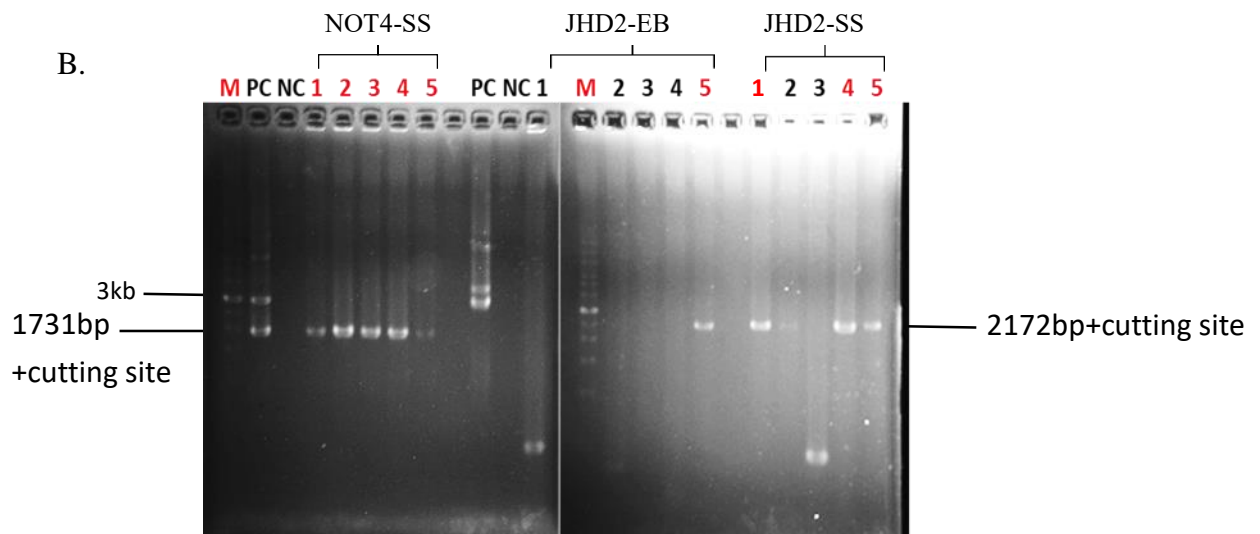
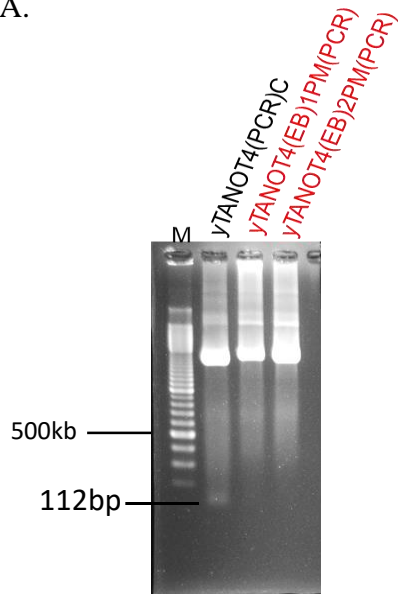


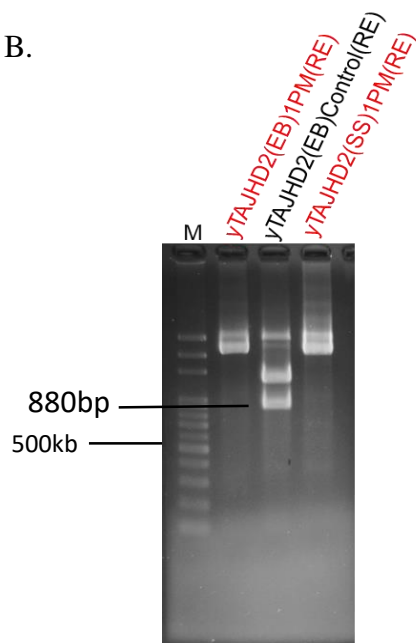
fig.2 Colony PCR check(NOT4=1731bp/JHD2=2172bp) (A)NOT4-EB 1-10 (B)NOT4-SS 1-5、JHD2-EB 1-5、JHD2 1-5

A.



(2%DNA gel)

B.



(2%DNA gel)

fig.3 DNA electrophoresis (A)以M13為上下游引子進行PCR，再以相對應之限制酶處理，跑電泳確認大小，約為100bp (B)質體以限制酶處理，跑電泳確認大小，約為880bp

#### (四)結果及討論

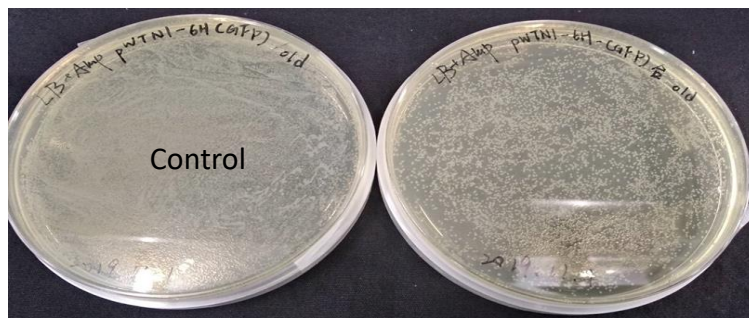
亞克隆轉型尚未成功，可能問題如下：

##### (1) 質體大小為11kb不易轉型

改以商業型ECOS™101 DH5  $\alpha$  取代實驗室製備的Ecoli. competent cell，以確保轉型效率。

##### (2) 黏合效率不佳

以對應之限制酶EcoRV和Bgl II 剪切BiFC cassette(pWTIN1-6H-N)並自我接合，測試轉型效率。相對於Control，測試組colony數量下降，但尚在可接受範圍，得知T4 ligase及T4 ligase buffer沒問題。



##### (3) sticky end 操作過程中被破壞

未來嘗試利用傳統有機溶劑取代kit提取質體，使質體不經過silica column，測試轉型效率。

## (六)參考文獻

1. Calderone, R. A. and W. A. Fonzi (2001). "Virulence factors of *Candida albicans*." Trends Microbiol **9**(7): 327-335.
2. Fortun, J., et al. (2012). "Emerging trends in candidemia: a higher incidence but a similar outcome." J Infect **65**(1): 64-70.
3. Frenkel, M., et al. (2016). "Pathogenicity of *Candida albicans* isolates from bloodstream and mucosal candidiasis assessed in mice and *Galleria mellonella*." J Mycol Med **26**(1): 1-8.
4. Hyun, K., et al. (2017). "Writing, erasing and reading histone lysine methylations." **49**(4): e324.
5. Kornberg, R. D. J. S. (1974). "Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA." **184**(4139): 868-871.
6. Krueger, K. E., et al. (2004). "Deletion of the NOT4 gene impairs hyphal development and pathogenicity in *Candida albicans*." Microbiology **150**(Pt 1): 229-240.
7. Lai, W. C., et al. (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.
8. Mersman, D. P., et al. (2009). "Polyubiquitination of the demethylase Jhd2 controls histone methylation and gene expression." Genes Dev **23**(8): 951-962.
9. Pla, J., et al. (1996). "Understanding *Candida albicans* at the molecular level." Yeast **12**(16): 1677-1702.
10. Ramakrishnan, S., et al. (2016). "Counteracting H3K4 methylation modulators Set1 and Jhd2 co-regulate chromatin dynamics and gene transcription." **7**: 11949.
11. Sudbery, P., et al. (2004). "The distinct morphogenic states of *Candida albicans*." Trends Microbiol **12**(7): 317-324.
12. Sung, M. K. and W. K. J. Y. Huh (2007). "Bimolecular fluorescence complementation analysis system for in vivo detection of protein-protein interaction in *Saccharomyces cerevisiae*." **24**(9): 767-775.
13. Wang, S.-S., et al. (2011). "Histone H3 lysine 4 hypermethylation prevents aberrant nucleosome remodeling at the PH05 promoter." MCB. 05017-05011.
14. Wu, C.-J., et al. (2006). "Predominance of Gram-negative bacilli and increasing antimicrobial resistance in nosocomial bloodstream infections at a university hospital in southern Taiwan, 1996-2003." **39**(2): 135-143.
15. Zamyatnin Jr, A. A., et al. (2006). "Assessment of the integral membrane protein topology in living cells." **46**(1): 145-154.
16. Zilberman, D., et al. (2007). "Genome-wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription." **39**(1): 61.