

國立台灣大學醫學院微生物學研究所寄生蟲學組

碩士論文

Department of Parasitology, Graduate Institute of Microbiology

College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

陰道滴蟲 Myb2 及 Myb3 轉錄因子受鐵及過氧化氫誘導入核之調控機制

Iron and Hydrogen Peroxide Regulate the Nuclear Translocation of Myb2
and Myb3 Transcription Factors in the protozoan *Trichomonas vaginalis*



李由

Yu Lee

指導教授：翁秀貞 博士，戴榮湘 博士

Advisor : Ong, Shiou-Jeng Ph. D. and Tai, Jung-Hsiang Ph.D.

中華民國 100 年 7 月

July, 2011

國立臺灣大學（碩）博士學位論文
口試委員會審定書

中文題目：

陰道滴蟲 Myb2 及 Myb3 轉錄因子受鐵及過氧化氫誘導入核之調控機制

英文題目：

Iron and Hydrogen Peroxide Regulate the Nuclear Translocation of Myb2 and Myb3 Transcription Factors in the protozoan *Trichomonas vaginalis*

本論文係 李由君（學號 r98445201）在國立臺灣大學微生物學所完成之碩士學位論文，於民國 100 年 7 月 22 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

翁秀貞

（簽名）

（指導教授）

戴等扣

蕭信忠

系主任、所長

王喜佳

（簽名）

誌謝

說長不長、說短也不短的碩士生涯即將畫下句點，實受惠於人太多，只能於此簡短表達謝意。感謝翁老師及戴老師給我加入這個研究團隊的機會，並在我求學過程中，在科學知能以及處世方面的諄諄教誨；也感謝實驗室的諸位前輩一行瑋學長、弘明學長、建勳學長、隆俊學長、怡婷學姐、純綺學姐及中鳴小姐的陪伴、鼓勵及指導，使我的研究進行得更加順利。謝謝台大寄生蟲學科的蘇霸靄老師、孫錦虹老師、蕭信宏老師及洪健清醫師授與我們與寄生蟲相關的專業知識，並特別感謝蕭老師在論文口試時的指導與建議。也謝謝寄生蟲學科的諸位同學、學弟妹、學長姐及學科助教，在課業上給予我不少幫助，也讓我有分享這一段碩士生活經驗的對象。最重要的，我非常感謝一路陪伴我的家人們；尤其是我的父親和母親，沒有他們的支持和付出，也不會有今日的我。很高興能有這個機會接觸寄生蟲學的研究，這兩年內，我從實驗過程和日常生活中都得到不少啟發；能夠親身摸索生物科學的無盡奧妙，哪怕只了解自己能力所及的一小部份，我深感榮幸。

目錄

口試委員審定書	i
誌謝	ii
表目錄	3
圖目錄	4
縮寫表	6
英文摘要	8
中文摘要	9
第一章 前言	
一. 陰道滴蟲	10
二. Myb 轉錄因子	10
三. 環境因子對陰道滴蟲的影響	11
四. 轉錄因子之核輸入調控	11
五. 研究目的	12
第二章 材料與方法	
一. 陰道滴蟲培養及蟲株保存	13
二. 免疫螢光染色分析及螢光訊號強度定量	13
三. 西方墨點分析	14
四. 激酶抑制劑分析 (Kinase inhibitor assay)	14
五. 激酶活化劑分析 (Kinase activator assay)	15
第三章 結果	
一. Myb 轉錄因子受環境因子誘導入核	16
二. 控制 Myb2 及 Myb3 核輸入之訊息傳導路徑主導	17
三. Myb3 轉錄因子出入細胞核之序列	18
第四章 討論	

一. Myb2 及 Myb3 轉錄因子之誘導入核	21
二. 陰道滴蟲之訊息傳導	21
三. Myb3 蛋白質調控核輸入功能之區域	23
附表	26
附圖	29
參考文獻	109



表目錄

表一·本實驗所使用之激酶抑制劑種類及作用濃度	26
表二·本實驗所使用之激酶活化劑種類及作用濃度	27
表三·本實驗建構點突變之 Myb3 蛋白質	28



圖目錄

圖一· Myb3 轉錄因子於普通培養條件下位於細胞核內	29
圖二· Myb3 轉錄因子受鐵離子誘導後於短時間內入核	31
圖三· HA-Myb3 受誘導之核輸入具鐵離子專一性	33
圖四· HA-Myb3 誘導入核之程度受添加之鐵離子濃度影響	35
圖五· Myb2 及 Myb3 轉錄因子之誘導入核	37
圖六· Myb2 及 Myb3 之誘導入核不受氫氧自由基影響	39
圖七· PKA 抑制劑 H-89 有效阻擋鐵離子引起之 Myb3 核輸入	41
圖八· PKG 抑制劑 KT5823 有效阻擋鐵離子引起之 Myb3 核輸入	43
圖九· G 蛋白抑制劑 Suramin 有效阻擋鐵離子引起之 Myb3 核輸入	45
圖十· MEK 抑制劑 PD98059 有效阻擋鐵離子引起之 Myb3 核輸入	47
圖十一· Ras 蛋白抑制劑 FTS 有效阻擋鐵離子引起之 Myb3 核輸入	49
圖十二· 8-Br-cAMP 誘導 Myb3 轉錄因子輸入細胞核	51
圖十三· 8-Br-cGMP 誘導 Myb3 轉錄因子輸入細胞核	53
圖十四· GTP- γ -S 誘導 Myb3 轉錄因子輸入細胞	55
圖十五· PKC 抑制劑 Bisindolylmaleimide-I 對鐵誘導之 Myb3 核輸入無抑制效 果	57
圖十六· TPA 無法誘導 Myb3 轉錄因子輸入細胞核	59
圖十七· G 蛋白抑制劑 suramin 對 8-Br-cAMP 及 8-Br-cGMP 誘導之 Myb3 核輸入 無抑制效果	61
圖十八· MEK 抑制劑 PD98059 有效阻擋過氧化氫引起之 Myb3 核輸入	63
圖十九· Ras 蛋白抑制劑 FTS 有效阻擋過氧化氫引起之 Myb3 核輸入	65
圖廿· MEK 抑制劑 PD98059 有效阻擋過氧化氫引起之 Myb2 核輸入	67
圖廿一· G 蛋白抑制劑 Suramin 有效阻擋過氧化氫引起之 Myb2 核輸入	69
圖廿二· PKG 抑制劑 KT5823 有效阻擋鐵離子引起之 Myb2 核輸入	71

圖廿三 · 8-Br-cGMP 誘導 Myb2 轉錄因子輸入細胞核	73
圖廿四 · Menadione 與過氧化氫誘導 Myb2 及 Myb3 入核的機制相同	75
圖廿五 · 主導 Myb3 核輸入之區域	77
圖廿六 · Myb3 突變位置及 Myb3 野生株受鐵離子誘導之入核情形	79
圖廿七 · NSN157-159AAA 於低鐵環境或受鐵刺激後均大量存在細胞核	81
圖廿八 · S158A 受鐵離子刺激核輸入及輸出反應與野生株無異	83
圖廿九 · HKE160-162AAA 於受鐵離子刺激後，核輸入反應延遲	85
圖卅 · ILL163-165AAA 於鐵誘導輸入細胞核後滯留於核中	87
圖卅一 · S155 A 於低鐵環境或受鐵刺激後均大量存在細胞核	89
圖卅二 · ST155-156AA 於低鐵環境或受鐵刺激後均存在細胞核	91
圖卅三 · T156 A 受鐵刺激後之核輸出時間延後	93
圖卅四 · S149 A 受鐵刺激後之核輸出時間延後	95
圖卅五 · SS148-149AA 受鐵刺激後之核輸出時間延後	97
圖卅六 · S148 A 受鐵刺激後之核輸入時間延後	99
圖卅七 · S203A 於鐵誘導輸入細胞核後滯留於核中	101
圖卅八 · S87A 之表現型與野生株相似	103
圖卅九 · KKRK170-173AAAA 於鐵誘導輸入細胞核後滯留於核中	105
圖卅 · C91S 於添加鐵離子及過氧化氫刺激之表現型差異	107

縮寫表

1.	<i>ap</i>	adhesion protein gene
2.	AP	adhesion protein
3.	BSA	bovine serum albumin
4.	cAMP	cyclic adenosine monophosphate
5.	cGMP	cyclic guanosine monophosphate
6.	DMSO	dimethyl sulfoxide
7.	DNA	deoxyribonucleic acid
8.	FITC	fluorescein isothiocyanate
9.	FTS	farnesyl thiosalicylic acid
10.	G proteins	guanine nucleotide-binding proteins
11.	GDP	guanine diphosphate
12.	GTP	guanine triphosphate
13.	kDa	kilodalton
14.	MAPK	mitogen activated protein kinase
15.	MKK	MAPK kinase
16.	NAD(P)H	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase
17.	PBS	phosphate buffered saline
18.	PKA	protein kinase A

19. PKG protein kinase G
20. Ran Ras related nuclear protein
21. Ras rat sarcoma
22. SDS sodium dodecyl sulfate
23. TPA tissue plasminogen activator
24. tetR tetracyclin repressor
25. Tub tublin protein



Abstract

Trichomonas vaginalis that spreads among the humans causes the most widespread nonviral sexually transmitted disease, trichomoniasis. This protozoan parasite harbors numerous Myb transcription factors, among which Myb2 and Myb3 were demonstrated to co-regulate transcription of an iron-inducible virulence gene, *ap 65-1*. In this study, underlying mechanisms of iron- and hydrogen peroxide-inducible nuclear import of Myb2 and Myb3 were investigated by the inhibitor and activator assays, with results indicating that iron may trigger trimeric G- and Ras- protein- related signaling pathways leading to Myb3 nuclear import, while hydrogen peroxide induces both Myb2 and Myb3 nuclear import via distinct mechanisms. Possible cis-acting and posttranslational modification sites on iron-inducible nuclear translocation of Myb3 were also investigated by depletion mapping and site-directed mutagenesis. The results suggest that the sequence spanning amino acid residues 48-167 is essential for Myb3 nuclear translocation, and inducible nuclear import of Myb3 may be co-regulated by multiple sites. Information generated from this study may provide a preliminary map for further understanding of iron-triggered signal transduction in this important human pathogen.

Key words: *Trichomonas vaginalis*, Myb2, Myb3, signaling pathways, nuclear translocation

摘要

陰道滴蟲(*Trichomonas vaginalis*)為寄生於人類生殖泌尿系統的微小原蟲，引起人類之陰道滴蟲症(trichomoniasis)，是目前世界上最常見的性傳染病病原體之一。陰道滴蟲具有數百個 Myb 基因，其中已知 Myb2 及 Myb3 轉錄因子可共同調控 *ap65-1* 致病基因的表現。實驗觀察發現，高濃度的鐵離子可誘使 Myb3 轉錄因子於短時間內大量輸入並接著輸出細胞核，且 Myb2 及 Myb3 均受過氧化氫誘導而產生同樣的現象。本研究主要探討 Myb2 及 Myb3 轉錄因子受鐵離子及過氧化氫誘導入核之調控機制，及與 Myb3 入核及出核功能相關之蛋白結構或位點。激酶抑制劑及活化劑分析結果顯示，鐵離子可能活化陰道滴蟲 Gα 蛋白，並透過 cAMP 及 cGMP 調控下游 PKA 及 PKG 活性，同時活化 Ras 及 MEK，影響 Myb3 的核輸入；而過氧化氫可能透過 Ras 相關之訊息傳導路徑，調控 Myb2 及 Myb3 的核輸入。觀察不同位點突變之 Myb3 蛋白質受鐵誘導後的入核及出核情形，得知 Myb3 的核輸入功能至少須要胺基酸序列 48-167，且胺基酸 156-167 附近之數個順式作用因子及磷酸化位置亦與 Myb3 之入核調控相關。目前針對陰道滴蟲轉錄因子之核輸入機制及訊息傳導路徑了解甚少，本研究可提供初步數據，作為進一步實驗之基礎。

關鍵字：陰道滴蟲、Myb2、Myb3、訊息傳導路徑、入核調控

第一章 前言

一. 陰道滴蟲

陰道滴蟲(*Trichomonas vaginalis*)為一微好氧之致病性原蟲，以滋養體(trophozoite)形態寄生於人體生殖泌尿系統中，主要經由性行為傳染。據估計，全球每年高達一億五千萬至一億八千萬人感染此蟲(24)，所引起的陰道滴蟲症(trichomoniasis)是當今世界上最重要的非病毒性性傳染病。陰道滴蟲症患者可能出現尿道炎或生殖系統發炎等症狀，而懷孕婦女若感染此病，可能導致胎兒早產或體重過輕(5)。雖然陰道滴蟲症非致命疾病且症狀相對輕微而容易為人忽略，卻有許多研究報告指出，此寄生蟲的感染與女性罹患子宮頸癌及男性罹患前列腺癌有關(7)；另外，陰道滴蟲在人類免疫缺乏病毒(Human immunodeficiency virus, HIV)的傳播上也扮演著相當重要的角色 (17, 22)。目前臨床上多以 Metronidazole 治療陰道滴蟲症(15)，而近年來抗藥性蟲株的出現(17)，更彰顯陰道滴蟲在公共衛生上的重要性。

二. Myb 轉錄因子

脊椎動物的 Myb 轉錄因子可分為 A-Myb、B-Myb 及 c-Myb 等三類。Myb 蛋白質的主要結構包含 N 端 DNA 結合區域(DNA binding domain; DBD)、轉錄活化區域(transactivation domain)及 C 端調控區域(regulatory domain) (9)。N 端的 DNA 結合區域包含 3 個由約 50 個胺基酸組成的重複序列區段 R1、R2 及 R3，在不同物種間具有高度保留性；R2 及 R3 的主要功能為辨認並結合 DNA 上的 Myb 結合區域(Myb recognition element; MRE)，而 R1 則能提高 R2R3 與 DNA 結合後的穩定度。轉錄活化區域可與其他轉錄因子結合形成複合體，調控轉錄速率。C 端調控區域經不同的轉譯後修飾(posttranslational modification)，改變對 DNA 的結合能力而負向調控 A-Myb 及 c-Myb，對 B-Myb 則具正向調控的功能(8)。

陰道滴蟲具有超過 400 個 Myb 基因(3)，其功能仍多數未知。目前為止，本研

究團隊成功篩選出 Myb1、Myb2、Myb3 及 Myb4 等四個轉錄因子，分子量介於 21-31kDa 間，R2R3 DNA 結合區域具有高度保留性(12, 13)。先前的研究中，發現 Myb1、Myb2 及 Myb3 轉錄因子共同調控陰道滴蟲 *ap65-1* 致病基因之表現(8, 12, 13, 15, 23)，其中 Myb2 及 Myb3 可和 Myb1 競爭與 *ap65-1* 啟動子結合之位置，活化 *ap65-1* 基因之轉錄活性(8)。

三. 環境因子對陰道滴蟲的影響

陰道滴蟲寄生於人體時，常需對許多環境因子的改變產生快速反應，以利其生存。鐵離子為生物體必須的養分之一，對於陰道滴蟲更有調節生長速率、細胞代謝活性及致病因子表現等多種功能(10)。相較於一般細菌，陰道滴蟲對鐵的需求量及耐受性均高出許多(6)，而人類陰道內的鐵離子濃度因月經周期而常有變化，故可合理推測陰道滴蟲應具特定機制以應變環境中的鐵離子濃度變化。在其生活史中，陰道滴蟲亦須面對宿主免疫系統或陰道內乳酸桿菌產生的大量活性氧自由基(reactive oxygen species; ROS)，包括超氧離子($O_2^{\cdot-}$)、氫氧自由基($\cdot OH$)及過氧化氫(H_2O_2)等對細胞具高度毒性的物質(4, 16)。這些 ROS 可對細胞造成多方面的傷害，亦可能誘使細胞及組織產生凋亡或壞死的反應(20)。相較於其他病原體，陰道滴蟲對陰道內的正常乳酸菌叢有較高的抵抗力(21)，故陰道滴蟲應也具備對環境中過氧化氫快速反應的生物機制。

四. 轉錄因子之核輸入調控

轉錄因子的核輸入是真核細胞基因調控的一大關鍵，此過程受到細胞的訊息傳導路徑控制，需要許多蛋白質共同參與(19)；其中 G proteins，包括三元體 G 蛋白質(trimeric G protein)及 Ras 蛋白質家族，是目前所知數量最多的一類(2)。這類蛋白質藉由結合相互轉換的 GDP 或 GTP 以改變活性；與 GDP 結合時為不活化態，與 GTP 結合則為活化狀態。GDP 及 GTP 的轉換仰賴 GEFs (guanine nucleotide

exchange factors) 和 GAPs (GTPase-activating proteins) 的功能，前者可將結合在 G 蛋白質上的 GDP 置換為 GTP，而後者則可將 GTP 水解成 GDP。

真核細胞的三元體 G 蛋白質存在於細胞膜內側，能將 GPCR (G protein coupled receptor) 從細胞外接收的訊息傳遞至細胞內。三元體 G 蛋白質由 α 、 β 及 γ 三個次單元組成， α 次單元可與 GTP 或 GDP 結合，控制 G 蛋白質的活性； β 及 γ 次單元則形成穩定的二元體結構，並與細胞膜接觸。當 GPCR 與其配體(ligand)結合時，三元體 G 蛋白質受 GTP 活化， α 次單元與 $\beta \gamma$ 複合體解離並分別作用至不同的下游蛋白質，進行訊息傳導。活化態的 α 次單元能促使 adenylyl cyclase (AC) 或 guanylyl cyclase (GC) 生成 cAMP 或 cGMP 等二級訊號傳遞分子(second messenger)；cAMP 及 cGMP 則能分別活化 PKA、PKG 或其他蛋白質，並經由這些蛋白質對其受質的修飾作用，繼續進行下游蛋白質的活化及訊息傳遞。

另一種常見的 G 蛋白質—Ras 也存在細胞膜，是 MAPK 路徑上游的傳訊蛋白質。MAPK 路徑在真核生物中高度保留，與細胞生長週期調控密切相關(18)。哺乳類的 Ras 可受 RTK (receptor tyrosine kinase) 刺激，活化與之相連的 Raf 蛋白質，並進一步活化下游的 MKK 及 MAPK，將訊息傳遞至細胞核內，控制特定基因的轉錄。

分子量大於 40 kDa 的蛋白質通過細胞核時，多以主動運輸的方式穿過核孔複合體(nuclear pore complex ; NPC)，此過程常涉及另一種 G 蛋白質—Ran 的作用(1)。Ran-GTP 能幫助內輸蛋白質(importin α / β) 釋放運輸至核內的貨物蛋白質(cargo protein)，並於內輸蛋白質返回細胞質後，水解成 Ran-GDP 並回到細胞核。

五. 研究目的

本研究主要探討陰道滴蟲 Myb2 及 Myb3 轉錄因子分別受鐵離子或過氧化氫誘導入核之調控機制，及 Myb3 之蛋白質結構或轉錄後修飾與其入核功能之關聯，以助於進一步了解陰道滴蟲面對環境壓力時產生之生物機制。

第二章 材料與方法

一. 陰道滴蟲培養及蟲株保存

將陰道滴蟲培養於 37°C，含 10%胎牛血清之改良式 TYI-S33 培養液中，作為普通培養條件；而添加 50 μ M 鐵離子螯合劑 2,2'-dipyridyl (Sigma™)之培養液為低鐵的培養環境；若不添加小牛血清，則為不含血清及鐵離子之去鐵之培養液。在低鐵培養液中隔夜培養蟲株至對數生長期(細胞密度約為 1~1.5 $\times 10^6$ cells/ml)後，加入最終濃度 750 μ M 之硫酸亞鐵銨(Sigma™)，模擬陰道滴蟲於人體寄生過程中遭遇大量鐵離子刺激之環境；而加入最終濃度為 250 μ M 之過氧化氫溶液，模擬陰道滴蟲遭遇氧化壓力之情形。保存蟲株時，將陰道滴蟲細胞株培養至對數生長期 (約 2 $\times 10^6$ cells/ml)，離心收取細胞液，並重新懸浮於含 7~8%DMSO 之新鮮培養液，放入冷凍保存盒(Nalgene™)，以 1°C/min 冷卻速率冷凍後移入-80°C 或液態氮中保存。

二. 免疫螢光染色分析及螢光訊號強度定量

前人於 Myb3 蛋白質 N 端融合 HA (hemagglutinin)標誌，建構過量表現 Myb3 及 Myb2 蛋白質之轉染蟲株 pAP65-2-HA-myb3 及 pAP65-2-HA-Myb2，分別簡稱為 HA-Myb3 及 HA-Myb2，並以免疫螢光染色分析觀察 HA-Myb3 及 HA-Myb2 於陰道滴蟲細胞內的分布狀況。將陰道滴蟲培養於改良式 TYI-S33 培養液中，達生長對數期(細胞濃度約為 1.5~2.0 $\times 10^6$ cells / ml)後，離心收取細胞液，重新懸浮於 30 μ l 培養液中作為一份樣本。將濃縮細胞液滴於載玻片上，置於保濕盒(humid chamber)內，於 37°C 使細胞沉降 10 分鐘；再迅速將載玻片放入-20°C 之 100% 甲醇作用 15 分鐘；取出玻片風乾後，即完成細胞樣本之固定。在每份樣本上滴加 30 μ l 以 1 \times PBS 稀釋之一級抗體 mouse monoclonal anti-HA 混合液，於室溫下作用 1 小時；再以 1 \times PBS 於室溫下震盪潤洗 3 次，每次 10 分鐘。二級抗體 FITC-conjugated goat anti-mouse immunoglobulin G 以內含 10% BSA 的 1 \times PBS 稀釋 500 倍，取 30 μ l 滴於樣本上，室溫下作用 1 小時後重複震盪潤洗的步驟，風乾後在樣本上滴加 2 μ l

含有 DAPI 的 mounting medium (Vectashield™)，蓋上蓋玻片後以螢光顯微鏡觀察並拍照存檔。本研究之免疫螢光分析皆以未轉染之 T1 細胞株做為陰性對照組，在所有實驗中均未偵測到訊號。以 Metamorph™ 軟體量化影像中細胞核之 FITC 訊號強度，取三次定量結果製成統計圖表。

三. 西方墨點分析

將蛋白質樣本與等體積 2× SDS sample buffer 震盪混合，於 100°C 加熱 5~7 分鐘後，以 15000 rpm(KR-1500, KUBOTA™) 離心 1 分鐘，取上層液作為樣本。以 12% 聚丙烯醯胺膠體電泳(SDS-PAGE)分離蛋白；上層膠(stacking gel)通以 10mA 電流，下層膠(seperating gel)通以 20mA 電流。電泳完成後利用半乾式轉漬器(E-Z lab™)以 150mV 轉漬 1 小時，將聚丙烯醯胺膠體上的蛋白質轉漬到孔徑 0.4μm 的硝化纖維膜上(Schleicher & Schuell™)。轉漬完成後的硝化纖維膜以 blocking solution (5% non-fat milk in 0.1% PBST) 於 37°C 震盪反應 1 小時，接著將 blocking solution 移除，並適當稀釋一級抗體，與硝化纖維膜 37°C 震盪反應 1 小時。反應完成後，移除一級抗體溶液，以 0.1% PBST 在室溫下震盪潤洗 3 次，每次 10 分鐘；之後將硝化纖維膜與適當稀釋的二級抗體於 37°C 震盪反應 1 小時，再重複潤洗的步驟，便可將硝化纖維膜與螢光受質(SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, PIERCE™)反應 1 分鐘，以冷光影像分析系統(Fuji™)偵測螢光訊號。

四. 激酶抑制劑分析 (Kinase inhibitor assay)

將陰道滴蟲細胞隔夜培養於 45μM 鐵螯合劑 2,2'-dipyridyl 處理後的低鐵培養液中，達對數生長期（細胞濃度約 $1.5\sim 2.0 \times 10^6$ cells / ml）後，收取細胞液，並加入不同激酶抑制劑作用 30 分鐘，再添加 750 μM 鐵離子或 250μM 過氧化氫溶液作用，於不同時間間隔收取細胞樣本，以免疫螢光分析觀察帶有 HA 標誌的 Myb 蛋白於細胞內之分布情形。本研究所使用之激酶抑制劑種類及濃度列於表一。

五. 激酶活化劑分析 (Kinase activator assay)

將陰道滴蟲細胞隔夜培養於 45 μ M 鐵螯合劑 2,2'-dipyridyl 處理後的低鐵培養液中，達對數生長期（細胞濃度約 1.5~2.0 $\times 10^6$ cells / ml）後，收取細胞液，並添加激酶活化劑作用，於不同時間間隔收取細胞樣本，以免疫螢光分析觀察帶有 HA 標誌的 Myb 蛋白於細胞內之分布。本研究所使用之激酶活化劑種類及濃度列於表二。



第三章 結果

一. Myb 轉錄因子受環境因子誘導入核

陰道滴蟲中過量表現之 Myb3 蛋白質分子量約為 32kDa，以 300 倍稀釋之 anti-HA 抗體進行免疫螢光染色分析，觀察得知 Myb3 於一般培養條件下位於細胞核內(圖一 A)。

(一) 鐵離子誘導 Myb3 輸入細胞核

若於低鐵環境下培養的陰道滴蟲細胞液中添加鐵離子，發現 3 分鐘後 HA 訊號於細胞核中出現，至 15 分鐘時最為明顯，而至 30 分鐘時，核中的 HA 訊號再度減弱 (圖二 A、B)。同時，以西方墨點法偵測相同方式處理的全細胞液(total cell lysate)樣本，發現不論是未添加鐵離子或添加後的 15 及 30 分鐘，細胞內的 Myb3 訊號表現量均不改變 (圖二 C)。若以 5 nM 之核輸出抑制劑 LMB (leptomycin B) 處理細胞後，再添加鐵離子作用，則可發現 HA 訊號於未添加鐵離子時即出現於細胞核，而加鐵 15 分鐘至 30 分鐘後仍於核中持續累積 (圖二 D)。顯示上述 HA 訊號的強弱變化，為 Myb3 主動輸入及輸出細胞核所產生之現象。

此外，將陰道滴蟲細胞培養於未添加胎牛血清之去鐵培養液，亦發現核中 Myb3 訊號顯著減弱；此時若分別加入 10%胎牛血清或 750 μ M 鐵離子與細胞作用 15 及 30 分鐘，對照兩組細胞中 Myb3 蛋白之分布情形，可發現鐵離子仍引起 Myb3 蛋白於 15 分鐘內大量輸入細胞核，而胎牛血清卻無法引起此現象 (圖三)。若以不同濃度之鐵離子與陰道滴蟲細胞作用 15 分鐘，則發現添加的鐵離子濃度可影響 Myb3 蛋白的核輸入量(圖四)，其中以添加最終濃度為 750 μ M 之鐵離子時，Myb3 受誘導入核的情況最為顯著。

(二) 過氧化氫誘導 Myb2 及 Myb3 輸入細胞核

若以 250 μ M 過氧化氫溶液處理低鐵培養之陰道滴蟲，亦可於 15 分鐘內觀察到

Myb3 大量核輸入之現象，與鐵引起的反應相似 (圖五 A、B)。另外，前人研究得知 Myb2 轉錄因子於細胞內之分布不受鐵離子影響，而本研究發現，過氧化氫可誘導 Myb2 於 15 分鐘內大量輸入細胞核(圖五 A、B)。過氧化氫於環境中可能與鐵離子作用，進行 fenton reaction 而產生氫氧自由基($\cdot\text{OH}$)及過氧離子($\text{O}_2\cdot^-$)等 ROS。為釐清 Myb2 及 Myb3 進入細胞核的現象係源自於 ROS 或過氧化氫及鐵離子本身對細胞的影響，於細胞液中加入 $100\ \mu\text{M}$ menadione，使其與細胞之 NAD(P)H 作用而生成過氧離子，觀察是否影響 Myb2 及 Myb3 於細胞中的分布，發現 menadione 亦能於短時間內引起 Myb2 及 Myb3 之核輸入(圖五 C)。另外，以能夠中和氫氧自由基的 10mM 硫脲(thiourea) 及 230mM ethelene glycol 分別處理陰道滴蟲細胞一小時後，再添加鐵離子或過氧化氫，觀察 Myb2 及 Myb3 之核輸入現象是否改變，發現結果均與未添加中和劑之樣本無異(圖六 A、B、C)，故得知 Myb2 及 Myb3 之入核不受氫氧自由基影響。

以上結果顯示，鐵及過氧化氫可能引起陰道滴蟲之細胞氧化壓力，並透過不同訊息傳遞路徑控制 Myb2 及 Myb3 的核輸入。

二. 控制 Myb2 及 Myb3 核輸入之訊息傳導路徑

為探討鐵及過氧化氫可能分別藉由何種訊息傳遞路徑影響 Myb2 及 Myb3 之核輸入及輸出，以不同激酶抑制劑(表一)處理低鐵培養至對數期之陰道滴蟲細胞 30 分鐘，再添加鐵離子或過氧化氫作用，以免疫螢光染色分析觀察抑制劑對 Myb2 及 Myb3 的誘導入核是否產生影響；亦以相對應之活化劑處理細胞，觀察是否能誘導 Myb2 及 Myb3 入核。

實驗發現 PKA 抑制劑 H-89、PKG 抑制劑 KT5823、G α 蛋白質抑制劑 suramin、MEK 抑制劑 PD98059 及 Ras 蛋白質抑制劑 FTS 均能抑制 Myb3 受鐵誘導之核輸入(圖七~圖十一)；相對地，若以 PKA 活化劑 8-Br-cAMP、PKG 活化劑 8-Br-cGMP 及 G 蛋白活化劑 GTP- γ -S 等合成物處理細胞，發現均能於低鐵環境下誘導 Myb3

進入細胞核(圖十二~十四)。而 PKC 之抑制劑 bisindolylmaleimide-I 及活化劑 TPA 對 Myb3 之核輸入均無影響(圖十五、十六)。另外，經 suramin 處理的細胞中，Myb3 雖不受鐵離子誘導入核，但能在 8-Br-cAMP 及 8-Br-cGMP 的刺激下產生核輸入反應(圖十七)。以上現象說明，環境中的鐵離子可能活化陰道滴蟲 G α 蛋白質，並促使 cAMP 及 cGMP 合成，再分別活化下游 PKA 及 PKG，影響 Myb3 入核。同時，亦可能活化 Ras 蛋白質及其下游之 MEK，共同控制 Myb3 進入細胞核。

另一方面，過氧化氫引起的 Myb3 核輸入僅受 PD98059 及 FTS 所抑制(圖十八、十九)，而過氧化氫引起之 Myb2 核輸入可被 PKG、MEK 及 G α 蛋白質抑制劑所阻擋(圖廿~廿二)，且激酶活化劑分析發現，Myb2 於低鐵環境下僅受 cGMP 誘導入核(圖廿三)；顯示 Myb2 及 Myb3 的核輸入調控機制有所差異。若於同樣條件下，以 100 μ M menadione 取代過氧化氫溶液與陰道滴蟲細胞作用，發現 Myb2 及 Myb3 對兩者的反應相同(圖廿四)，顯示過氧化氫及 menadione 引起 Myb2 及 Myb3 進入細胞核的機制可能均來自過氧離子的影響。

三. 主導 Myb3 轉錄因子出入細胞核之序列

為了解 Myb3 轉錄因子輸出、輸入細胞核之功能位置，本實驗室建立一系列 Myb3 截斷(truncation)及點突變(site directed mutation)之陰道滴蟲轉染株，並以免疫螢光染色法觀察突變之 Myb3 蛋白質於細胞內的分布位置，及是否能受鐵離子調控而正常輸入並輸出細胞核。將所有結果彙整於表三。

(一) 主導 Myb3 轉錄因子核輸入之區域

利用免疫螢光分析法檢查前人以 Myb3 截斷蛋白質 48-156、48-167 及 48-180 建構之 48-156-tetR、48-167-tetR 及 48-180-tetR 轉染陰道滴蟲株，觀察上述突變之 Myb3 於轉染蟲株細胞內的分布情形。結果發現 HA-Myb3 野生株、48-167-tetR 及 48-180-tetR 於普通培養條件下均位於細胞核內，48-156-tetR 則位於細胞質(圖廿五

A), 顯示胺基酸 48-167 為 Myb3 輸入細胞核所必須, 且 Myb3 胺基酸序列 156-167 附近可能帶有調控核輸入的相關位點。另一方面, 將 48-167-tetR、48-180-tetR 及 HA-Myb3 之轉染蟲株培養於低鐵環境, 並給予鐵離子刺激, 發現 48-180-tetR 與 HA-Myb3 野生株表現型類似, 均於添加鐵離子後 15 分鐘內快速且大量輸入細胞核 (圖廿五 B); 然而, 48-167-tetR 於低鐵環境下位於細胞核之訊號強度明顯高於 48-180-tetR 與 HA-Myb3 野生株, 且加入鐵離子後無明顯入核或出核現象。

(二) 與 Myb3 核輸入相關之調控因子

為探討 Myb3 調控核輸入及輸出的相關序列, 建構一系列點突變之 Myb3 蛋白質, 包括 S87A、C91S、S148A、S149A、SS148-149AA、S155A、T156A、ST155-156AA、NSN157-159AAA、S158A、HKE160-162AAA、ILL163-165AAA、S169A、KKRK170-173AAA 及 S203A 等 (圖廿六 A), 並轉染於陰道滴蟲 T1 蟲株。以免疫螢光染色分析檢查個別突變株受鐵誘導之核輸入及輸出情況, 並與野生株表現型 (圖廿六 B) 對照。

實驗發現, 胺基酸序列 156-167 之間緊鄰的 157NSN159、160 HKE 162、及 163 ILL 165 於突變後分別產生三種影響核輸入或輸出功能的表現型。NSN157-159AAA 不論在低鐵環境下或受鐵離子刺激後, 免疫螢光染色均於細胞核內偵測到大量訊號, 且與 Myb3 野生株於普通培養條件下之核訊號強度相當 (圖廿七), 顯示此區域可能為 Myb3 滯留於細胞質所需; 有趣的是, 若將 158S 單點突變為 S158A, 則其受鐵誘導之核輸入、輸出情況與野生株無異 (圖廿八)。HKE160-162AAA 則於低鐵培養時, 與野生株之訊號強度類似, 而在受到鐵離子刺激後, 輸入細胞核的反應延後至 22.5 分鐘 (圖廿九), 顯示此區域可能與 Myb3 進入細胞核的能力相關; 而 ILL163-165AAA 則於鐵離子刺激後大量輸入細胞核, 但不發生後續之核輸出 (圖卅), 顯示此區域可能控制 Myb3 輸出細胞核。

(三) PKA 結合位置之突變影響 Myb3 之核輸入及輸出

Myb3 胺基酸序列 152KRIST156 為一預測之 PKA 結合位置，此段序列附近之磷酸化位點 155ST156 及 148SS149 若分別產生單點或雙點突變，亦出現影響核輸入、輸出的表現型。S155A 之單點突變及 ST155-156AA 同時突變，於低鐵環境下存在細胞核中的量均與普通培養環境下相當(圖卅一、卅二)，並於鐵離子刺激後持續累積於細胞核中。T156A 則於加鐵刺激後，核輸入之時間較長，於 22.5 分鐘時才大量出現於細胞核內(圖卅三)。ST 148-149 及 S149A 之 Myb3 突變株均有鐵離子刺激後核輸出減緩的情形(圖卅四、卅五)，S148A 則與 T156A 之表現型類似，有核輸入反應延遲的現象(圖卅六)。

(四) Myb3 其他位置產生點突變之影響

前人研究得知，Myb3 之 87S 與 203S 的磷酸化分別促進及抑制 Myb3 於細胞液轉換後 2 小時內的降解反應(25)；本實驗中，以免疫螢光反應觀察 S87A 及 S203A 突變 Myb3 蛋白質於鐵離子刺激後於細胞內的分布情形，發現 S203A 受鐵離子誘導進入細胞核後，於核中滯留時間較長(圖卅七)，顯示 Myb3 之降解機制可能與核輸出相關。S87A 受鐵刺激後之變化則與野生株相似(圖卅八)。

將 Myb3 序列上類似典型核定位訊號(classical nuclear localization signal; cNLS) 之 170KKRK173 序列突變為 KKRK170-173AAAA，發現此突變 Myb3 蛋白質受鐵離子刺激的核輸入功能未受影響(圖卅九)，顯示 Myb3 可能不經由典型 NLS 機制調控輸進入細胞核。

另外，將 Myb3 蛋白質 R2 DNA 結合區域具保留性的半胱胺酸(cysteine)突變為絲胺酸(serine)，可觀察到此突變蟲株受鐵離子刺激後，輸入核中的 C91S 突變 Myb3 蛋白質核輸出程度降低；然而，若以過氧化氫溶液作用，則 C91S 不產生核輸入現象，並且持續出核(圖卅)。

第四章 討論

陰道滴蟲寄生於人體時，常需克服多種環境因子的變化，以利其生存。以人體陰道環境而言，鐵離子、過氧化氫(hydrogen peroxide)及雌激素(estrogen)等物質對陰道滴蟲與宿主之間的交互作用影響最甚。本研究以免疫螢光分析法檢視陰道滴蟲接觸高濃度鐵離子及過氧化氫時，短時間內 Myb2 及 Myb3 轉錄因子在細胞中的分布變化，以了解陰道滴蟲面對環境壓力時產生之生物機制。

一. Myb2 及 Myb3 轉錄因子之誘導入核

本研究發現，陰道滴蟲在環境中的鐵離子濃度增加或接觸到過氧化氫時，HA-Myb3 於 15 分鐘內快速出現於細胞核，並於 30 分鐘時自細胞核消失(圖二 A)。同時，西方墨點分析發現細胞中之 Myb3 總含量不改變，且 HA-Myb3 訊號受 LMB 作用而持續累積於核中(圖二 B、C)；推測陰道滴蟲 Myb3 轉錄因子於一般培養環境下，持續輸入及輸出細胞核(constitutive nuclear import and export)；而於低鐵環境下，Myb3 進入核中的比例減少，部分滯留於細胞質(cytoplasmic retention)。此時，若陰道滴蟲細胞接觸到高濃度之鐵離子，則 Myb3 轉錄因子會於 3 分鐘至 15 分鐘內快速且大量的輸入細胞核(inducible nuclear import)，再於 15 到 30 分鐘後持續輸出細胞核(nuclear export)。

實驗結果進一步證實此反應受鐵專一性調控(圖三)，且 Myb3 入核程度受環境中的鐵離子濃度影響(圖四)，顯示陰道滴蟲 Myb3 轉錄因子受鐵離子誘導的核輸入及輸出可能由訊息傳導機制所調控；而後續螢光免疫分析顯示過氧化氫亦可能經由類似機制影響 Myb2 及 Myb3 的核輸入及輸出。此短時間內發生的現象，應為細胞接受外界刺激後產生的上游反應，對陰道滴蟲之細胞生理應具重要意義。

二. 陰道滴蟲之訊息傳導

儘管陰道滴蟲生活史十分單純，卻具有已知原生生物中數量最多的 60,000 個

基因，總計 170MB 的龐大基因體；2007 年完成的陰道滴蟲基因體計畫中，更發現陰道滴蟲具有遠高於哺乳動物細胞的 927 個激酶基因和 328 個 small GTPases (3)，顯示此寄生蟲應具高度發展的訊息傳遞系統。但至目前為止，此方面的相關研究依然十分有限。

本研究發現，鐵離子及過氧化氫可能活化陰道滴蟲訊息傳導路徑，而引起 Myb2 及 Myb3 的核輸入反應。由於過氧化氫與 menadione 對此兩個 Myb 轉錄因子產生的影響相同，且兩者對激酶抑制劑的反應亦同(圖廿四)，推測過氧化氫引起之 Myb2 及 Myb3 核輸入反應可能來自環境中過氧離子對細胞產生的氧化壓力。另外，鐵離子促使 Myb3 入核，顯示陰道滴蟲 Myb 轉錄因子可能負責調控與對抗各種環境壓力相關的基因。

激酶抑制劑及活化劑分析發現，Myb2 及 Myb3 轉錄因子需不同的激酶活性以在鐵或過氧化氫的作用之下入核(圖七~廿三)，顯示陰道滴蟲對環境刺激的反應，是由複雜的訊息傳導機制所調控。實驗觀察得知，PKA 抑制劑 H-89 及 PKG 抑制劑 KT 均延緩 Myb3 受鐵離子誘導入核(圖七、八)，G 蛋白質抑制劑 suramin 則完全阻斷 Myb3 的入核(圖九)，且 suramin 無法抑制 8-Br-cAMP 及 8-Br-cGMP 誘導之 Myb3 入核(圖十六)，推測鐵離子引起之陰道滴蟲訊息傳導中，PKA 及 PKG 為平行存在的路徑；而 PKA 及 PKG 之活化，可能需要上游 G 蛋白的作用。另外，鐵離子及過氧化氫誘導之 Myb3 入核，均受 Ras 蛋白質抑制劑 FTS 及其下游之 MEK 抑制劑 PD98059 所阻擋(圖十、十一)，顯示此二種物質引起之訊息傳導路徑可能有部分重疊或下游傳導路徑的交互作用(cross-talk)。

另一方面，過氧化氫引起的 Myb2 入核亦受 suramin 及 KT5823 抑制，且受 cGMP 誘導進入細胞核(圖廿一~廿三)。Myb2 與 Myb3 對環境中的高濃度過氧化氫之刺激，產生不同的核輸入控制機制，表示此二轉錄因子於陰道滴蟲面對氧化壓力時，可能扮演不同的角色。

綜合上述實驗觀察，可假設陰道滴蟲細胞在接觸環境中高濃度的鐵離子時，

靠近細胞表面的 G 蛋白質受到活化，促使 cAMP 及 cGMP 合成，並分別活化 PKA 及 PKG，進而使 Myb3 轉錄因子進入細胞核。同時，鐵亦活化陰道滴蟲細胞膜上的 Ras 蛋白質，連帶影響下游的 MEK 活性並使 Myb3 轉錄因子進入核中。而陰道滴蟲接觸過氧化氫時，亦活化 Ras 蛋白質而啟動下游傳導機制，誘使 Myb3 進入細胞核；而 Myb2 除了 Ras 相關訊息傳導路徑外，可能也受到 G 蛋白及 PKG 的作用而影響其受誘導入核的功能。

三. Myb3 蛋白質調控核輸入功能之區域

Myb3 在細胞內定位的功能，可概略分為三個部分 - 滯留於細胞質的能力 (cytoplasmic retention)、受誘導輸入細胞核的能力 (inducible nuclear import)、及輸出細胞核的能力 (nuclear export)。將 Myb3 突變後轉染陰道滴蟲，分析其在細胞內分布位置的改變，發現上述功能均受到 Myb3 上多個區域共同影響。可見此轉錄因子的作用被嚴密的控制，可能負責陰道滴蟲重要基因的調控。

(一) Myb3 之序列完整性與核輸入功能

轉錄因子的核輸入為真核細胞進行轉錄作用的重要關鍵，本研究利用過量表現突變 Myb3 之陰道滴蟲轉染株，以螢光免疫分析法觀察 Myb3 轉錄因子的序列完整性與核輸入功能的相關性。相較於 Myb2 轉錄因子僅需胺基酸 48-143 之 R2R3 DNA 結合區即保有正常核輸入功能，本研究中發現 Myb3 轉錄因子至少須具備胺基酸 48-167 以正常輸入細胞核(圖廿四)，且胺基酸 48-180 為 Myb3 受鐵離子誘導入核所需。此段區域除 Myb3 的 R2R3 DNA 結合區外，亦包含一段非結構性蛋白質序列，可見 R2R3 對於 Myb2 及 Myb3 的正常入核功能均扮演重要的角色，但兩者的入核調控機制可能有所差異。

(二) Myb3 轉錄因子之調控因子與核輸入功能

胺基酸 156-167 之間的 157NSN159、160HKE162 及 163ILL165 三個緊鄰的因子分別突變後，對鐵誘導產生之核輸入及輸出有不同的影響(圖廿六、廿七、廿九)，由個別突變 Myb3 的表現型推測，157NSN159 可能與 Myb3 滯留於細胞質的能力相關，160HKE162 可能控制 Myb3 進入細胞核的能力，而 163ILL165 與 Myb3 的出核能力相關。其中，157NSN159 的 158S 磷酸化位置若突變為 S158A，產生之誘導入核於表現型與野生株無異，足見 Myb3 滯留於細胞質的功能可能與此位置的磷酸化無直接關聯，而與胺基酸位置 157 及 159 兩個天門冬胺酸(asparagine)的結構性或糖化作用相關。160H 及 161K 兩個相鄰的鹼性胺基酸突變後，Myb3 受鐵誘導入核速度減緩，可能代表此位置能幫助 Myb3 與 DNA 結合，而影響核輸入效率。而 163-165 的白胺酸(leucine)及異白胺酸(isoleucine)應不產生轉錄後修飾，推測此區域及胺基酸 157-162 的因子可能與細胞內的其他蛋白質相互作用，共同控制 Myb3 在細胞中的分布位置。

(三) Myb3 轉錄因子之轉錄後修飾與核輸入功能

將 Myb3 序列上預測之 PKA 結合位置 152KRIST156 附近之磷酸化位置進行點突變，所得突變 Myb3 蛋白質產生數種異於野生株的表現型；包括於低鐵環境下亦多數存在於細胞核中的 ST155-156AA 雙點突變(圖卅一)、S155A 單點突變 Myb3(圖卅二)、受鐵離子刺激後較慢進入細胞核的 S149A 單點突變(圖卅三)，及受鐵誘導入核後即不再出核的 SS148-149AA(圖卅四)、S148A(圖卅五)和 T156A(圖卅六)。目前雖並未證實 152KRIST156 為 Myb3 與 PKA 作用的位置，但可確定此區域附近的上述磷酸化位點在受鐵離子引發之 Myb3 入核扮演特定角色。

前人研究發現，陰道滴蟲於轉換培養液時，Myb3 於 2 小時內產生持續降解的現象；若將 Myb3 胺基酸 203S 點突變成為 S203A，則蛋白質穩定性明顯提高，至 2 小時後依然無降解反應；而若將 87S 處突變成為 S87A，則轉換培養液後，此突變 Myb3 之半衰期提早至 15 分鐘。本研究中，以螢光免疫分析觀察 S203A 及 S87A

在鐵離子影響之下的核輸入情形，發現 S203A 於鐵離子刺激後，於 15 分鐘大量輸入細胞核，並持續累積於細胞核內達 1 小時之久(圖卅六)；而 S87A 則與野生株表現型類似，於鐵離子作用後大量輸入細胞核，並於 30 分鐘後輸出細胞核(圖卅七)。綜合 Myb3 穩定性分析及免疫螢光分析觀察之結果，推測 Myb3 於降解前或許需先行輸出細胞核。

陰道滴蟲 Myb2 轉錄因子具有類似高等生物核定位訊號的 48KKQK51，但先前研究發現，若將此序列突變並不影響 Myb2 之核輸入，且陰道滴蟲之非核蛋白質即使與 SV40T 之 cNLS 融合，亦無法輸入細胞核；再加上本研究發現 Myb3 預測的核輸入訊號位置 170KKRK173 突變後，也不影響其核輸入功能(圖卅八)，顯示陰道滴蟲可能經由非典型機制調控 Myb 蛋白質輸入細胞核。

(四) 氧化壓力對 Myb3 之影響

位於 Myb 蛋白質 R2 DNA 結合區域的氨基酸 91C 具保留性，可能為 Myb 蛋白質形成分子內或分子間的雙硫鍵所需；若將 Myb3 此位置的半胱胺酸(cysteine)突變為絲胺酸(serine)，可觀察到 C91S 的突變蛋白質對鐵及過氧化氫刺激之反應有所差異；C91S 在鐵離子作用下，於 15 分鐘大量進入細胞核，並於核中持續累積，而在過氧化氫作用下反而持續輸出細胞核(圖卅九)。細胞承受氧化壓力時，可促使半胱胺酸於蛋白質分子間形成雙硫鍵，而上述現象暗示 Myb3 可能需形成二聚體(dimer)以便輸出細胞核，也再度證實鐵及過氧化氫以不同機制控制 Myb3 進入細胞核。

陰道滴蟲為一演化史上早期分支的鞭毛蟲，其生物機制與哺乳類真核細胞有諸多相異之處。到目前為止，關於陰道滴蟲與宿主相互作用而產生的生物反應，所知非常有限。本研究結果顯示陰道滴蟲在宿主體內遭遇刺激時，可能透過快速而嚴密的訊息傳導路徑來應付所處環境的變化。針對 Myb 蛋白質複雜的核輸入調控機制加以檢視，可提供日後研究抗陰道滴蟲藥物標的之相關資訊。

表一·本實驗所使用之激酶抑制劑種類及作用濃度

激酶抑制劑	作用標的	作用濃度	作用時間
Leptomycin B (LMB)	CRM1	5nM	30min
H-89	PKA	48nM	30min
KT5823	PKG	234nM	30min
PD98059	MEK	5 μ M	30min
Suramin	GTP	50 μ M	30min
Farnesyl Thiosalicylic Acid (FTS)	Ras	10 μ M	30min
Bisindolylmaleimide I	PKC	10nM	30min



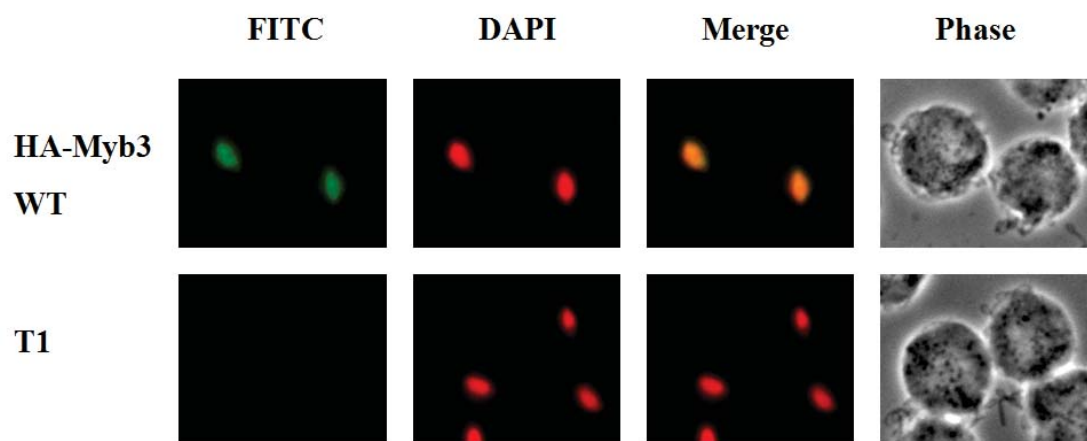
表二·本實驗所使用之激酶活化劑種類及作用濃度

激酶活化劑	作用標的	作用濃度
8-bromo-cAMP	PKA	50 μ M
8-bromo-cGMP	PKG	50 μ M
GTP- γ -S	G α subunit	100 μ M
TPA	PKC	300ng/ml



表三·本研究中建構之突變 Myb3 蛋白質及表現型

表現型	Myb3 突變位點	位點預測之功能
滯留於細胞質之能力	NSN157-159AAA	順式作用元件
	S155A	PKA 作用位置
受鐵刺激之核輸入	S148A	磷酸化
	T156A	PKA 作用位置
	ST155-156AA	PKA 作用位置
	HKE160-162AAA	順式作用元件
核輸出	C91S	形成 Myb3 分子內或分子間之雙
	S149A	硫鍵
	ILL163-165AAA	磷酸化
	KKRK170-173AAAA	順式作用元件
	S203A	磷酸化
無	S87A	磷酸化
	SS148-149AA	磷酸化
	S158A	磷酸化

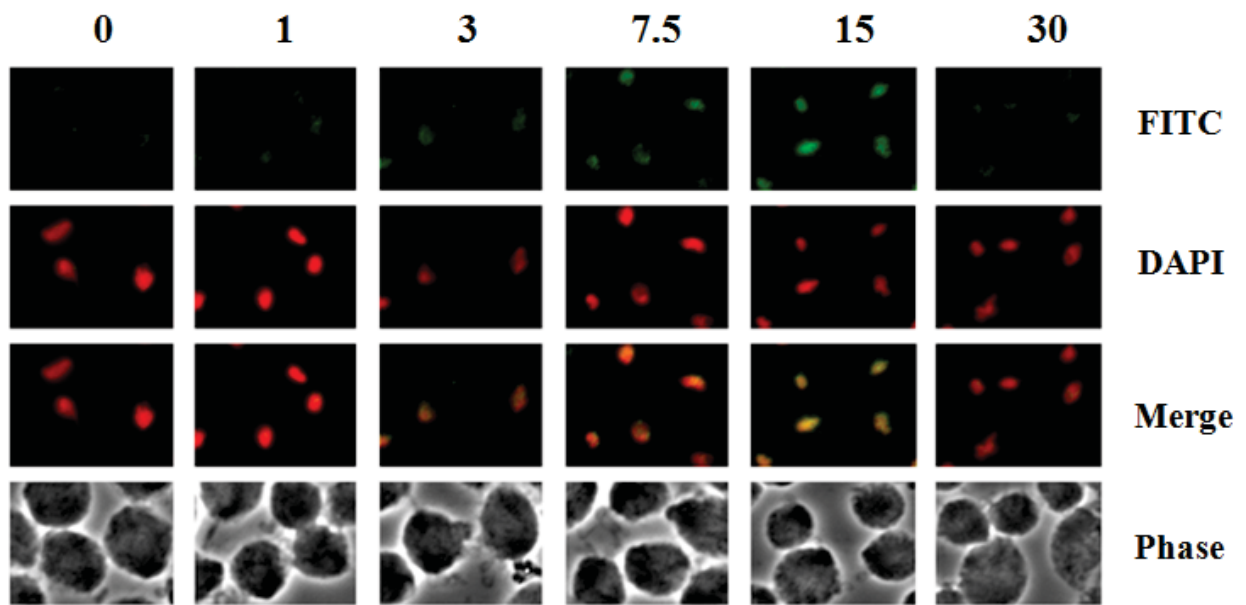


圖一． Myb3 轉錄因子於普通培養條件下位於細胞核內

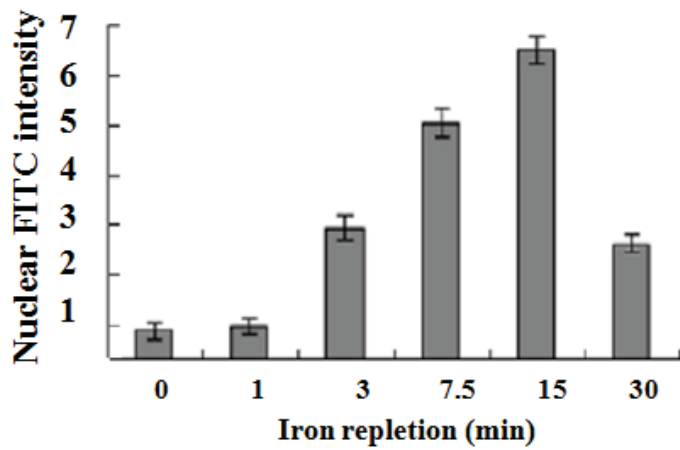
將過量表現 HA-Myb3 之陰道滴蟲細胞隔夜培養於含 10% 胎牛血清之改良式 TYI-S33 培養液中，達對數生長期（細胞濃度約 $1.5\sim 2.0 \times 10^6$ cells / ml）後，以免疫螢光分析觀察 Myb3 蛋白質於細胞內的分布狀況；以 T1 未轉染細胞株作為免疫螢光分析之陰性對照組。



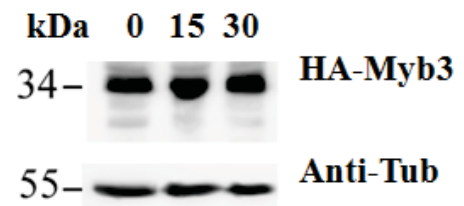
A. Iron repletion (min)



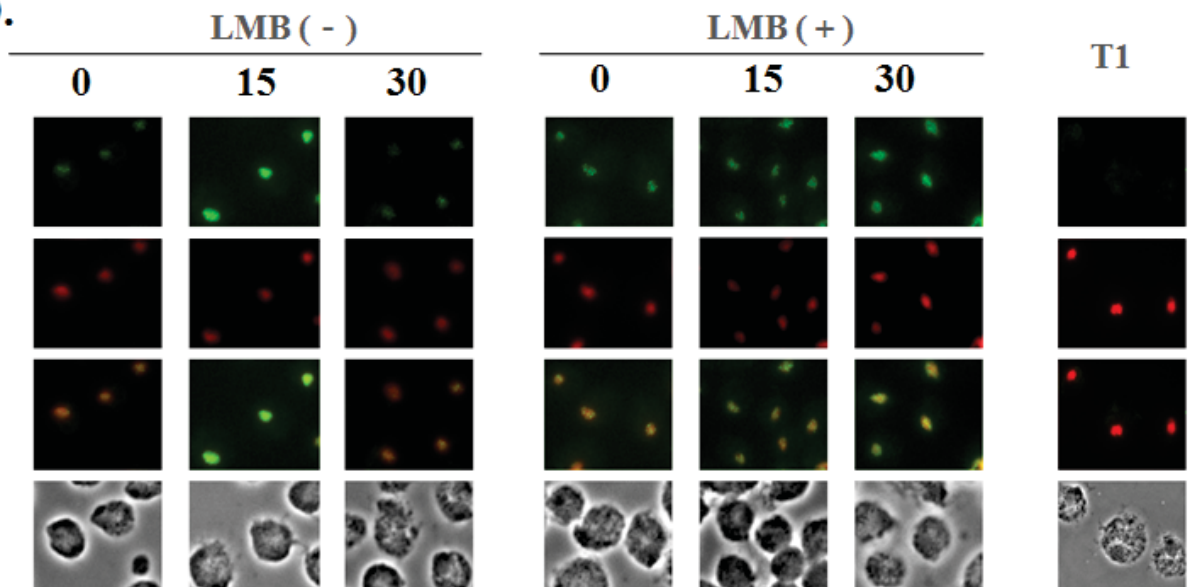
B.



C. Total cell lysate



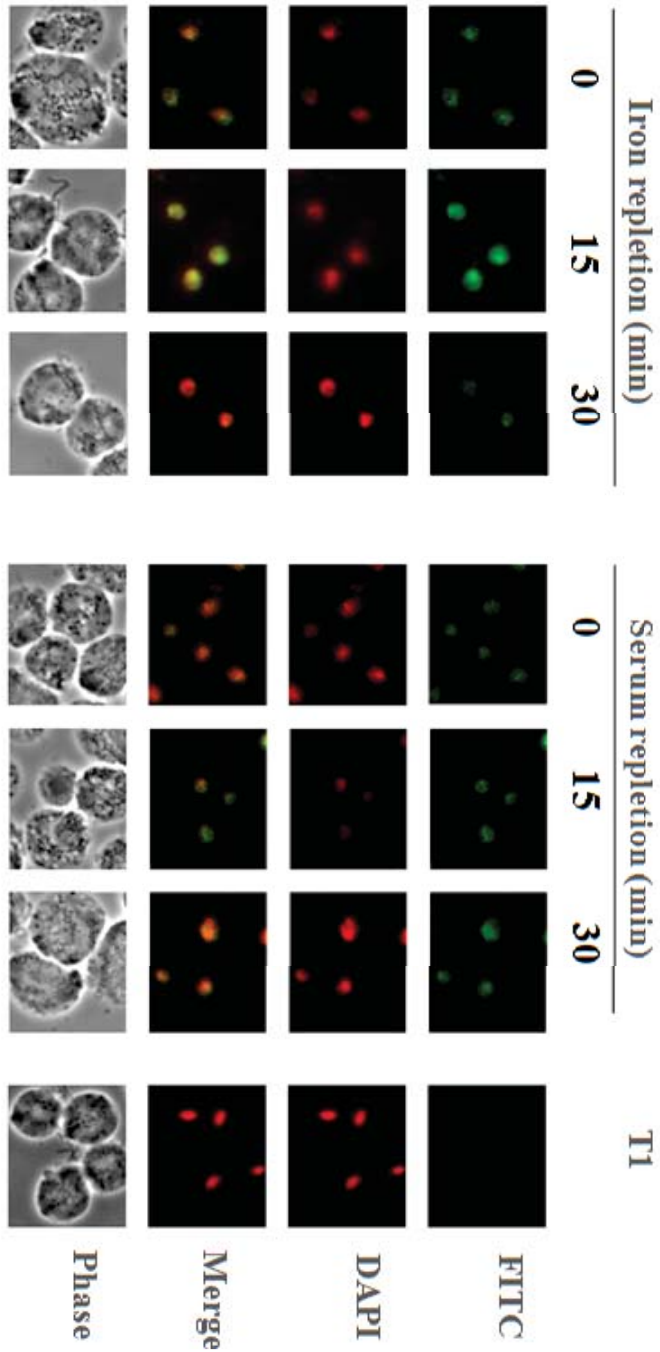
D.



圖二· Myb3 轉錄因子受鐵離子誘導後於短時間內入核

將過量表現 HA-Myb3 之陰道滴蟲細胞隔夜培養於 45 μ M 鐵螯合劑 2,2'-dipyridyl 處理之低鐵培養液中，達對數生長期(細胞濃度約 1.5~2.0 $\times 10^6$ cells / ml)後，於細胞液加入 750 μ M 鐵離子作用，並觀察 Myb3 蛋白質於細胞內的分布狀況。(A) 加入鐵離子刺激後，於 1 分鐘、3 分鐘、7.5 分鐘、15 分鐘及 30 分鐘時，收取細胞液，以 anti-HA 抗體(300 倍稀釋)進行免疫螢光染色分析。FITC 標記 Myb3 位置；DAPI 標記細胞核位置；Merge 為 DAPI 及 FITC 重疊之結果。(B) 以 MetamorphTM 影像處理軟體定量上述樣本照片之核訊號強度。橫軸為加鐵刺激後，收取細胞液的不同時間點，縱軸為細胞核內之 FITC 螢光強度；本圖表係採用三次實驗之定量數據統計所得之結果。(C) 將鐵離子刺激後 1 分鐘、15 分鐘及 30 分鐘的陰道滴蟲細胞打破，收取全細胞蛋白溶液，以西方墨點法偵測 Myb3 蛋白含量。(D)於添加鐵離子前，先以 Lectomycin B (LMB)之核輸出抑制劑處理陰道滴蟲細胞，並以免疫螢光分析觀察經 LMB 處理及未處理之細胞於鐵離子刺激 0 分鐘、15 分鐘及 30 分鐘後，兩者 Myb 3 核質分布之差異。FITC 標記 Myb3 位置；DAPI 標記細胞核位置；Merge 為 DAPI 及 FITC 重疊之結果；T1 未轉染細胞株為陰性對照組。

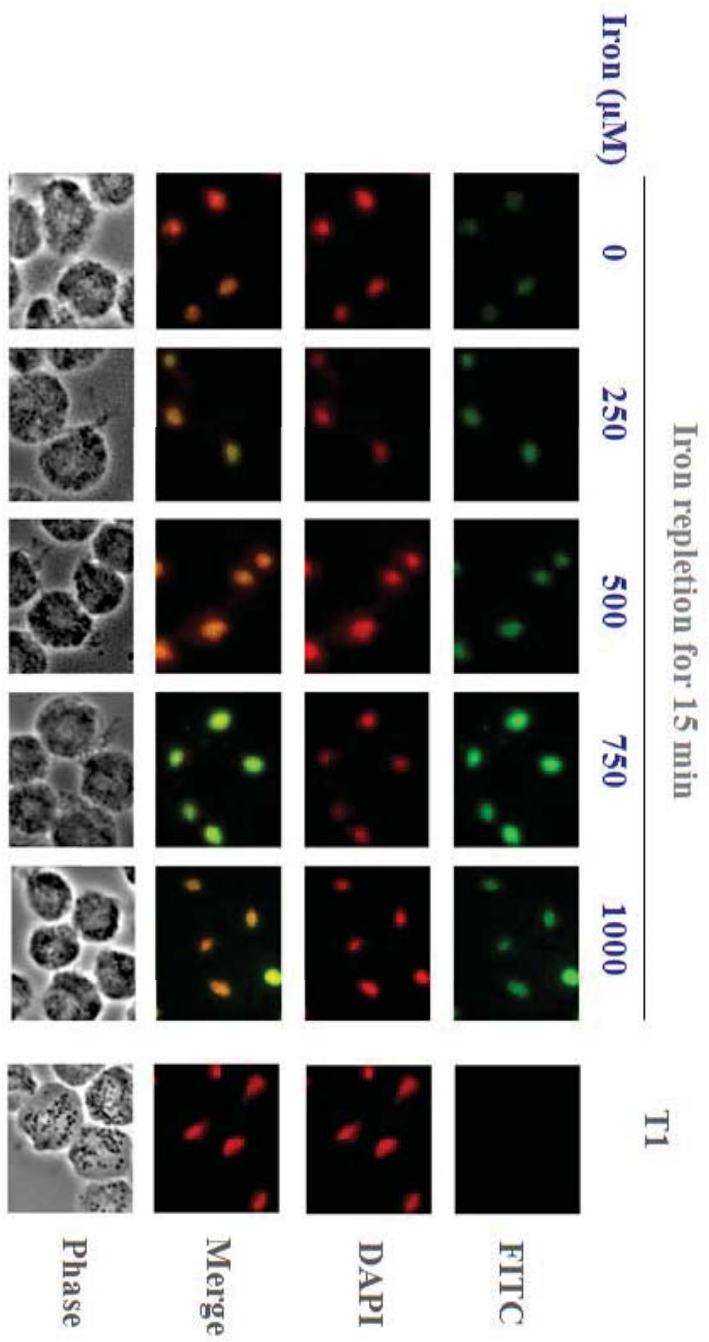
Serum starved cells



圖三· HA-Myb3 受誘導之核輸入具鐵離子專一性

將過量表現 HA-Myb3 的陰道滴蟲隔夜培養至對數生長期(細胞濃度約 $1.5\sim 2.0 \times 10^6$ cells/ml) 後，收取細胞並以未添加胎牛血清之缺鐵培養液處理四小時。接著再次收取細胞液，並分別加入 750 μ M 鐵離子或 10% 胎牛血清，於 0、15 及 30 分鐘後，以 anti-HA 抗體 (300 倍稀釋) 進行免疫螢光染色分析，觀察 Myb3 於細胞中之分布情況。FITC 標記 Myb3 位置；DAPI 標記細胞核位置；Merge 為 DAPI 及 FITC 重疊之結果；T1 未轉染細胞株為陰性對照組。

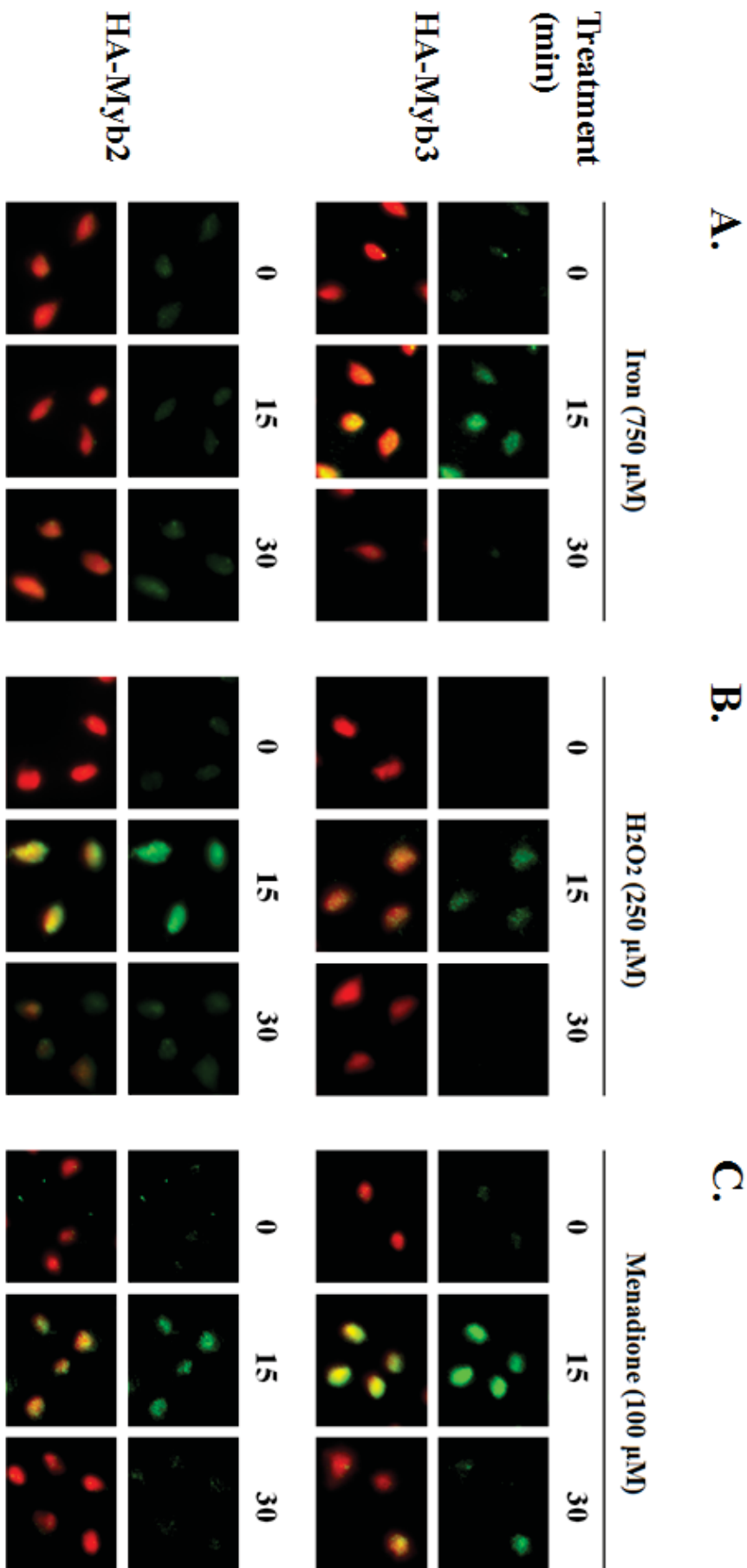




圖四 · HA-Myb3 誘導入核之程度受添加之鐵離子濃度影響

將過量表現 HA-Myb3 的陰道滴蟲培養於低鐵培養液中，達對數生長期（細胞濃度約 $1.5\sim 2.0 \times 10^6$ cells / ml）後，於細胞液中分別加入 0、250、500、750 及 1000 μ M 之鐵離子作用 15 分鐘後，收取細胞液，並以 anti-HA 抗體(300 倍稀釋)進行免疫螢光染色分析，觀察 Myb3 於細胞中之核質分布情況，並比較各組結果之差異。FITC 標記 Myb3 位置；DAPI 標記細胞核位置；Merge 為 DAPI 及 FITC 重疊之結果；T1 未轉染細胞株為陰性對照組。



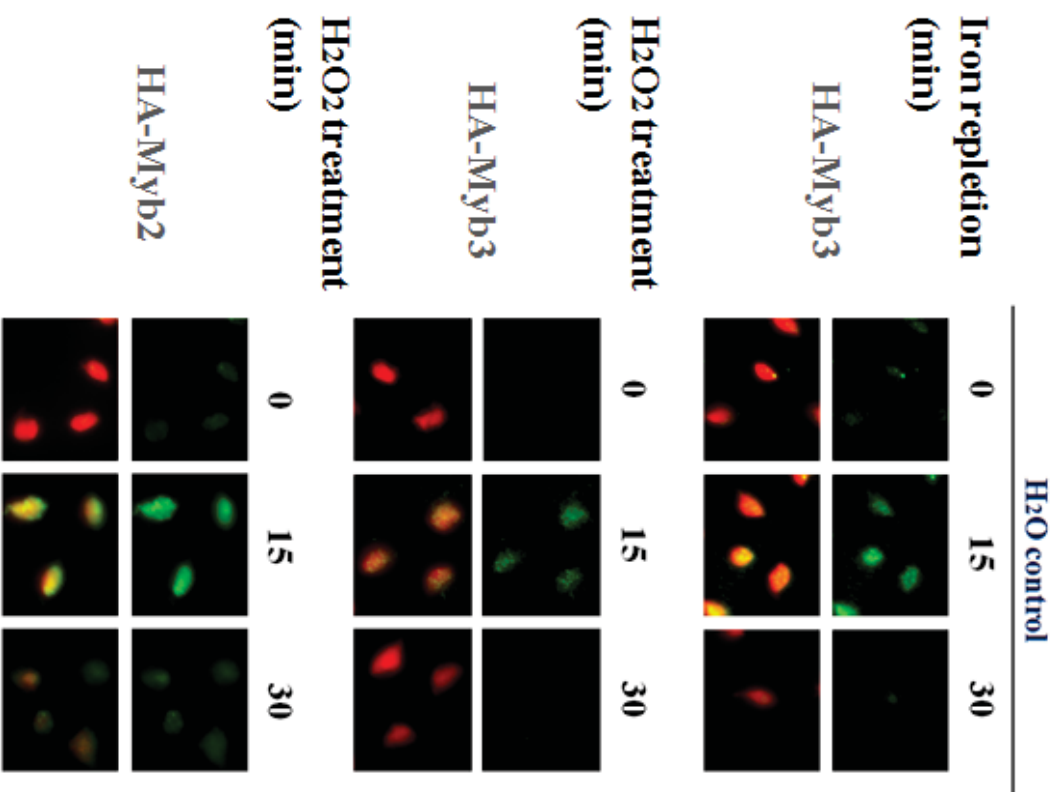


圖五 · Myb2 及 Myb3 轉錄因子之誘導入核

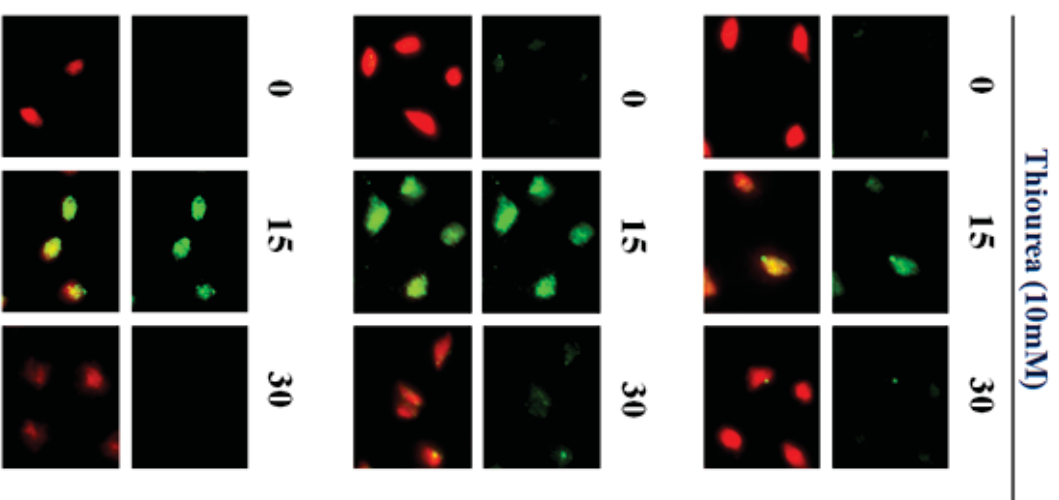
將過量表現 HA-Myb2 及 HA-Myb3 的陰道滴蟲分別培養於低鐵培養液中，達對數生長期（細胞濃度約 $1.5\sim 2.0 \times 10^6$ cells / ml）後，分別加入(A) 750 μ M 鐵離子、(B) 250 μ M 過氧化氫溶液、及(C)100 μ M menadione 作用，於 0、15 及 30 分鐘時收取細胞樣本，以 anti-HA 抗體(300 倍稀釋)進行免疫螢光染色分析，觀察 Myb2 及 Myb3 於細胞中之核質分布情況。FITC 標記 Myb3 位置；Merge 則為 DAPI 及 FITC 重疊之結果。



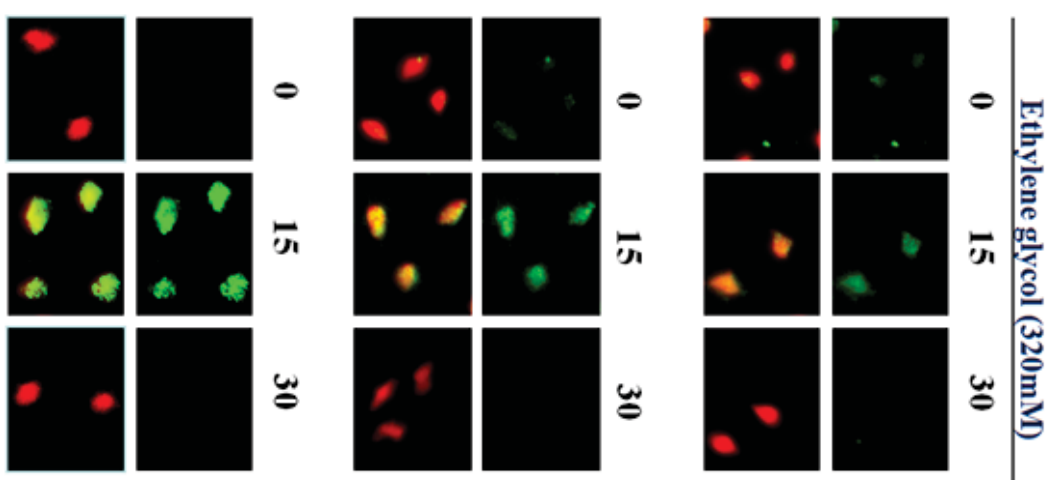
A.



B.



C.

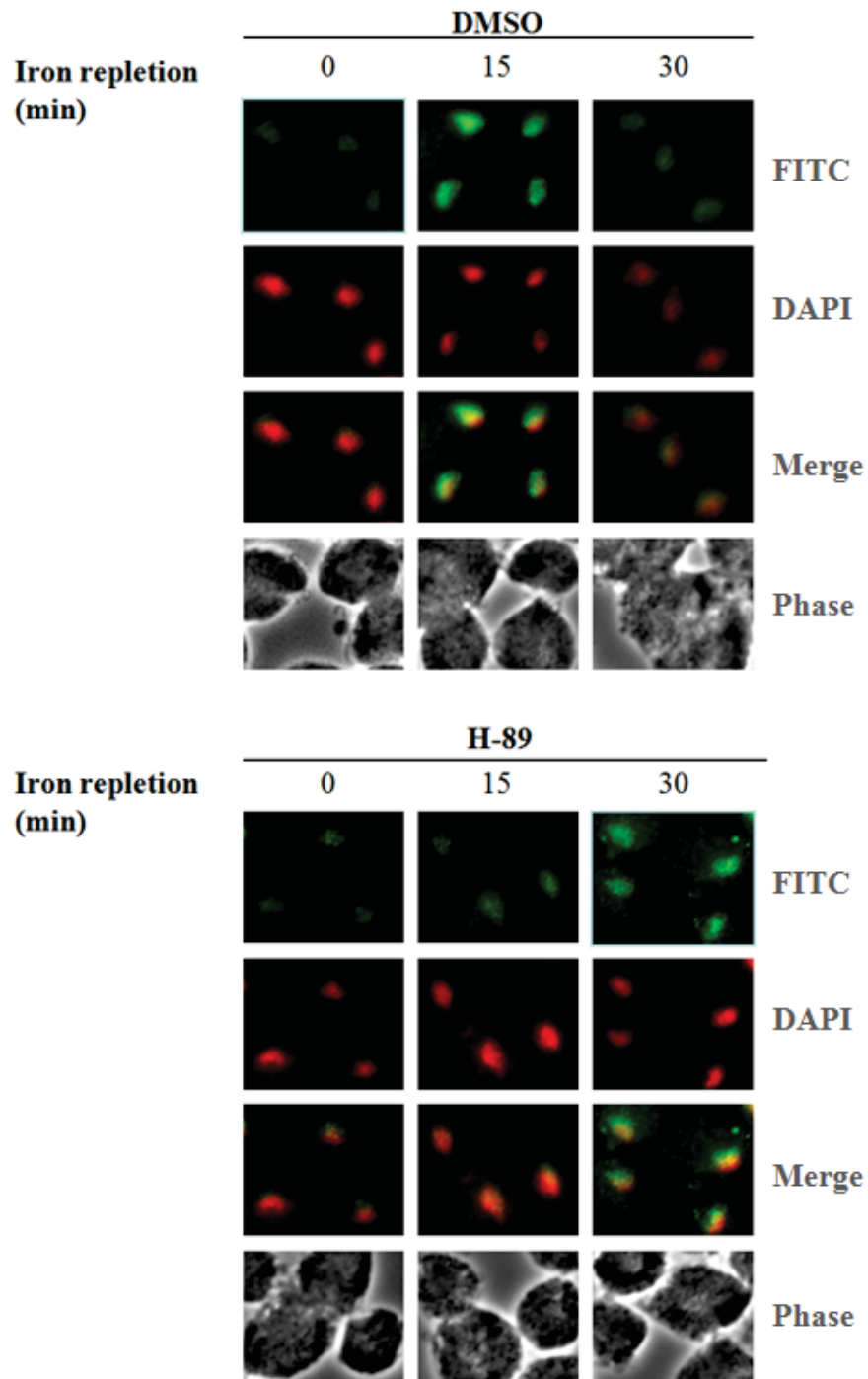


圖六· Myb2 及 Myb3 之誘導入核不受氫氧自由基影響

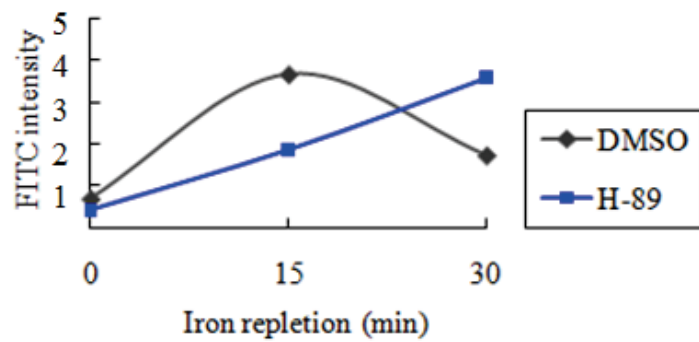
將過量表現 HA-Myb2 及 HA-Myb3 的陰道滴蟲分別培養於低鐵培養液中，達對數生長期（細胞濃度約 $1.5\sim 2.0 \times 10^6$ cells / ml）後，分別加入(A) 水、(B) 10mM 硫脲、及(C) 320mM ethelene glycol 與細胞作用 30 分鐘，再分別添加 750 μ M 鐵離及 250 μ M 過氧化氫溶液，於 0、15 及 30 分鐘後收取細胞樣本，以 anti-HA 抗體(300 倍稀釋)進行免疫螢光染色分析，觀察 Myb2 及 Myb3 於細胞中之核質分布情況。FITC 標記 Myb3 位置；Merge 則為 DAPI 及 FITC 重疊之結果。



A.



B.

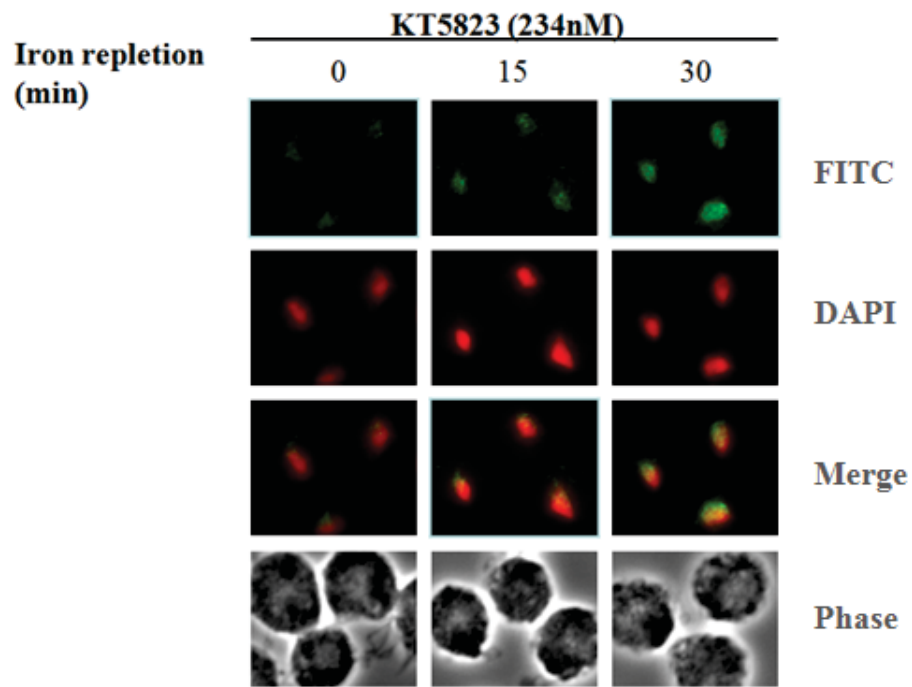
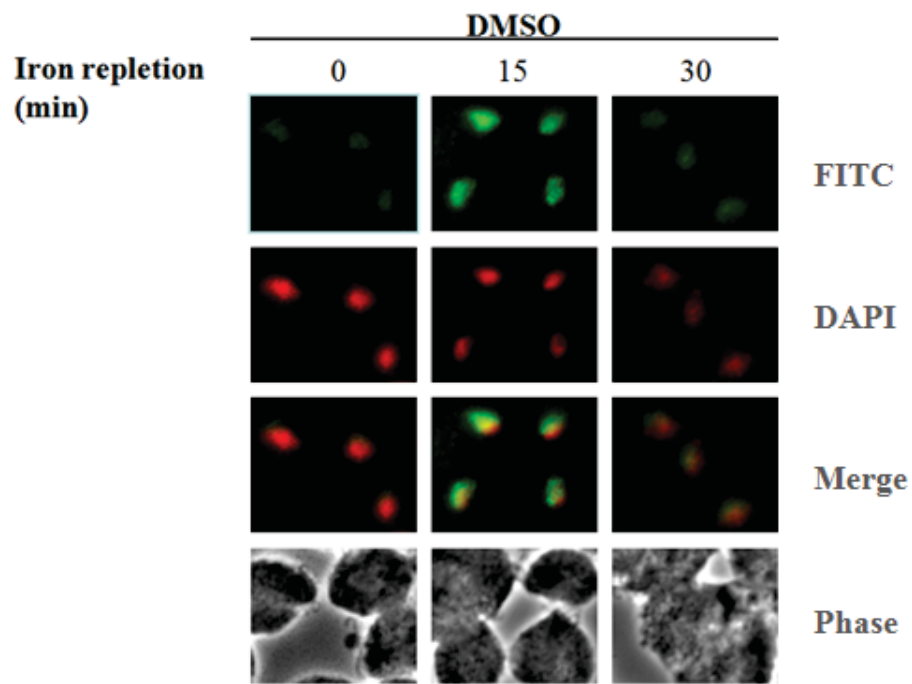


圖七·PKA 抑制劑 H-89 有效阻擋鐵離子引起之 Myb3 核輸入

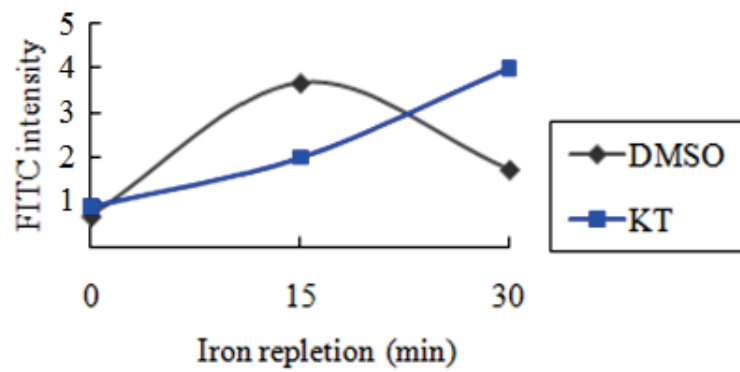
將陰道滴蟲細胞隔夜培養於低鐵環境達對數生長期(細胞濃度約 $1.5\sim 2.0 \times 10^6$ cells / ml) 後，分別以 DMSO 及最終濃度 48nM 之 PKA 抑制劑 H-89 處理細胞 30 分鐘，再添加 750 μ M 鐵離子作用，觀察抑制劑對鐵離子引起之 Myb3 核輸入及輸出是否產生影響。(A) 加入鐵離子刺激後，於 0、15 及 30 分鐘時，收取細胞液，以 anti-HA 抗體(300 倍稀釋)進行免疫螢光染色分析。FITC 標記 Myb3 位置；DAPI 標記細胞核位置；Merge 為 DAPI 及 FITC 重疊之結果。(B) 以 Metamorph™ 影像處理軟體定量上述樣本照片之核訊號強度。橫軸為加鐵刺激後，收取細胞液的不同時間點，縱軸為細胞核內之 FITC 螢光強度；本圖表係採用三次實驗之定量數據統計所得之結果。



A.



B.

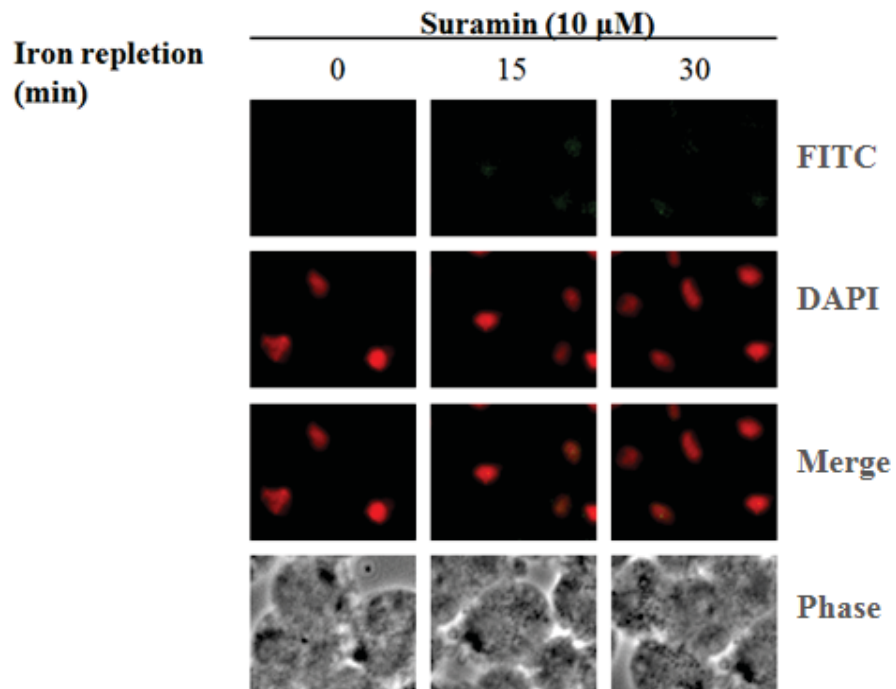
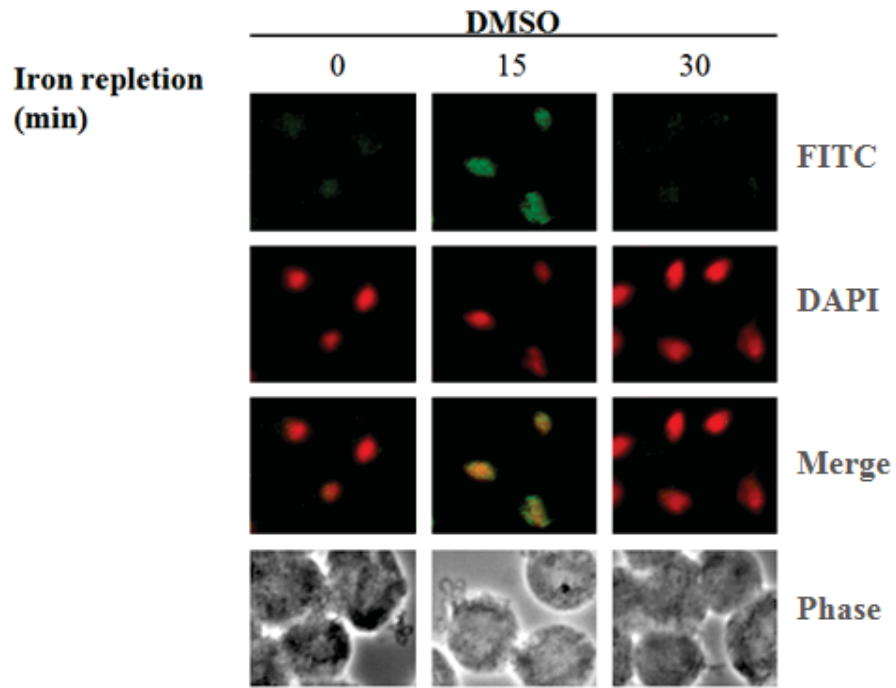


圖八·PKG 抑制劑 KT5823 有效阻擋鐵離子引起之 Myb3 核輸入

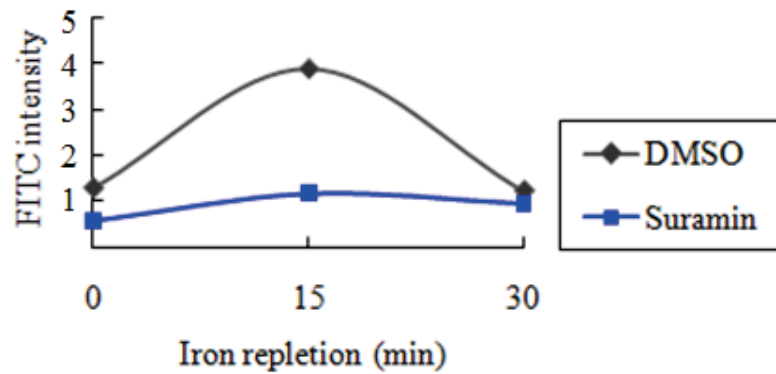
將陰道滴蟲細胞隔夜培養於低鐵環境達對數生長期(細胞濃度約 $1.5\sim 2.0 \times 10^6$ cells / ml) 後,分別以 DMSO 及最終濃度 234nM 之 PKG 抑制劑 KT5823 處理細胞 30 分鐘,再添加 750 μ M 鐵離子作用,觀察抑制劑對鐵離子引起之 Myb3 核輸入及輸出是否產生影響。(A) 加入鐵離子刺激後,於 0、15 及 30 分鐘時,收取細胞液,以 anti-HA 抗體(300 倍稀釋)進行免疫螢光染色分析。FITC 標記 Myb3 位置;DAPI 標記細胞核位置;Merge 為 DAPI 及 FITC 重疊之結果。(B) 以 Metamorph™ 影像處理軟體定量上述樣本照片之核訊號強度。橫軸為加鐵刺激後,收取細胞液的不同時間點,縱軸為細胞核內之 FITC 螢光強度;本圖表係採用三次實驗之定量數據統計所得之結果。



A.



B.

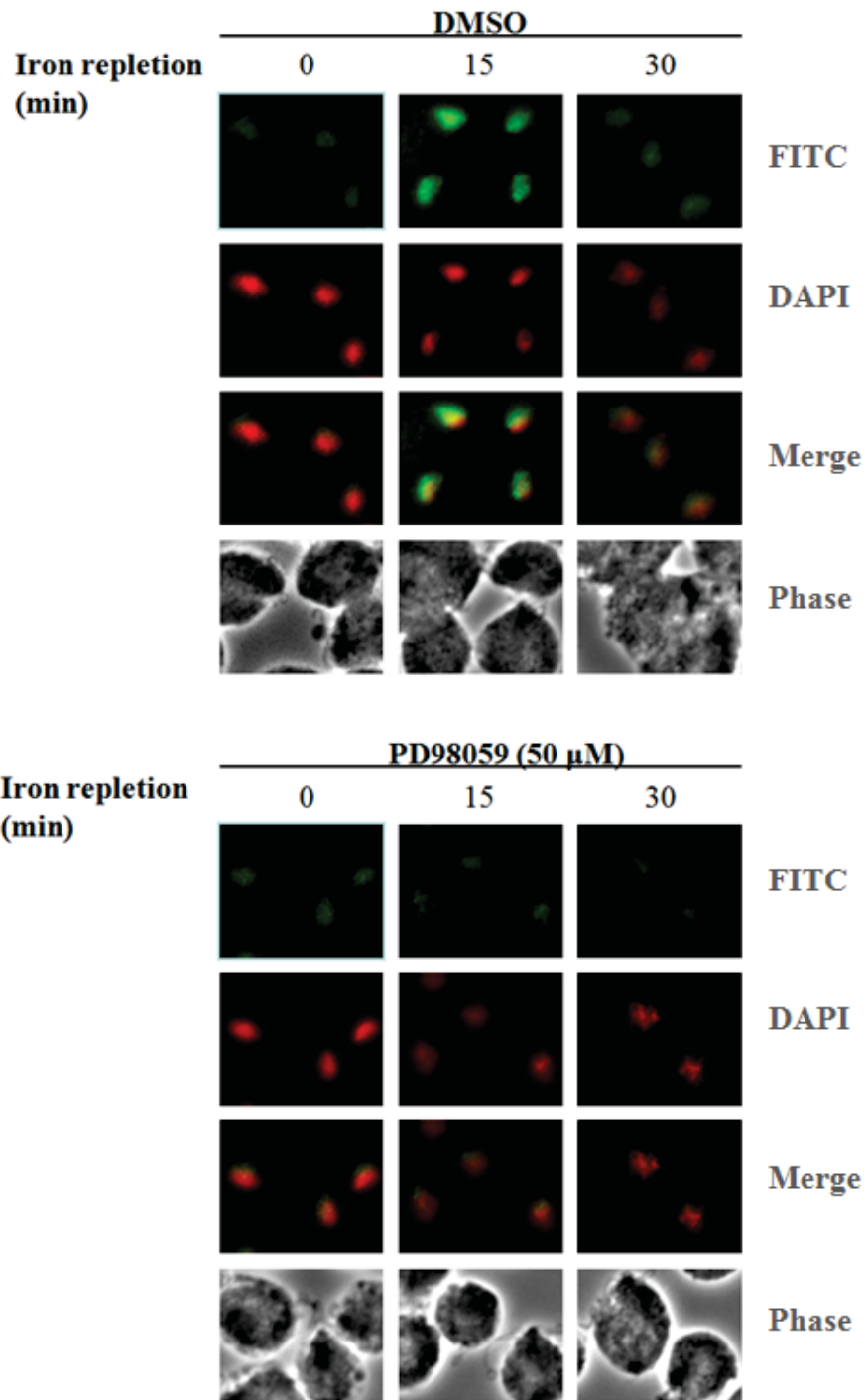


圖九· G 蛋白抑制劑 Suramin 有效阻擋鐵離子引起之 Myb3 核輸入

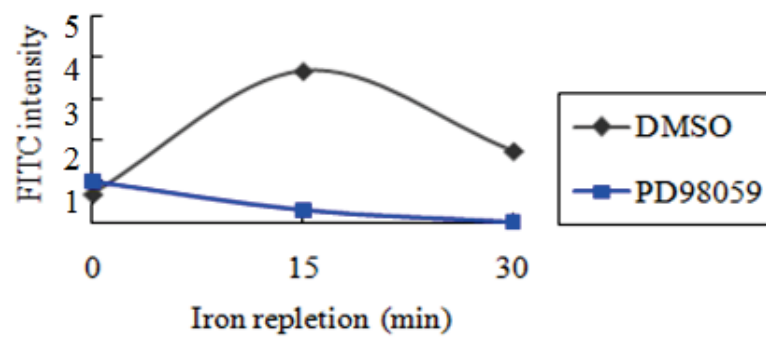
將陰道滴蟲細胞隔夜培養於低鐵環境達對數生長期(細胞濃度約 $1.5\sim 2.0 \times 10^6$ cells / ml) 後,分別以 DMSO 及最終濃度 $10\mu\text{M}$ 之 G 蛋白抑制劑 Suramin 處理細胞 30 分鐘,再添加 $750\mu\text{M}$ 鐵離子作用,觀察抑制劑對鐵離子引起之 Myb3 核輸入及輸出是否產生影響。(A) 加入鐵離子刺激後,於 0、15 及 30 分鐘時,收取細胞液,以 anti-HA 抗體(300 倍稀釋)進行免疫螢光染色分析。FITC 標記 Myb3 位置;DAPI 標記細胞核位置;Merge 為 DAPI 及 FITC 重疊之結果。(B) 以 Metamorph™ 影像處理軟體定量上述樣本照片之核訊號強度。橫軸為加鐵刺激後,收取細胞液的不同時間點,縱軸為細胞核內之 FITC 螢光強度;本圖表係採用三次實驗之定量數據統計所得之結果。



A.



B.

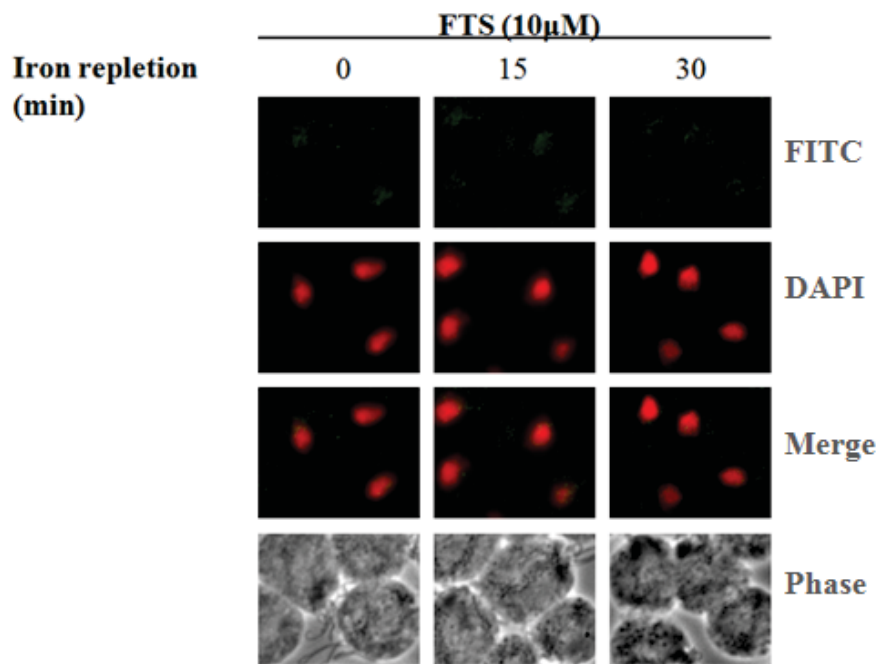
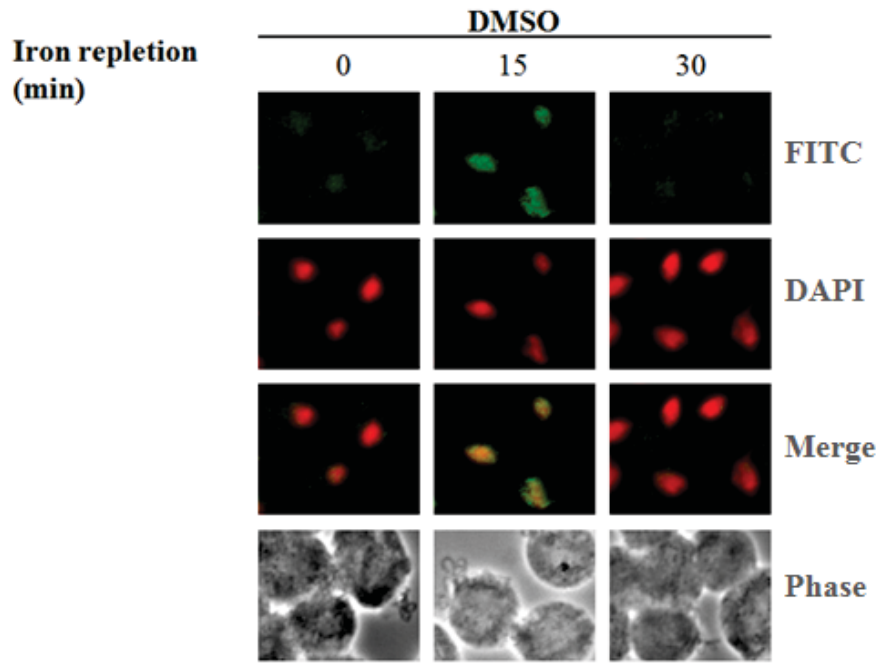


圖十· MEK 抑制劑 PD98059 有效阻擋鐵離子引起之 Myb3 核輸入

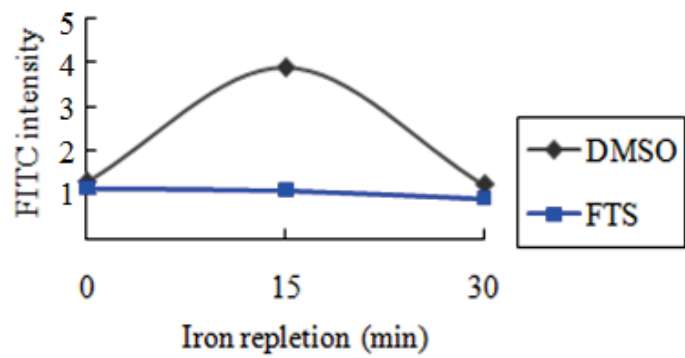
將陰道滴蟲細胞隔夜培養於低鐵環境達對數生長期(細胞濃度約 $1.5\sim 2.0 \times 10^6$ cells / ml) 後,分別以 DMSO 及最終濃度 $50\mu\text{M}$ 之 MEK 抑制劑 PD98059 處理細胞 30 分鐘,再添加 $750\mu\text{M}$ 鐵離子作用,觀察抑制劑對鐵離子引起之 Myb3 核輸入及輸出是否產生影響。(A) 加入鐵離子刺激後,於 0、15 及 30 分鐘時,收取細胞液,以 anti-HA 抗體(300 倍稀釋)進行免疫螢光染色分析。FITC 標記 Myb3 位置;DAPI 標記細胞核位置;Merge 為 DAPI 及 FITC 重疊之結果。(B) 以 Metamorph™ 影像處理軟體定量上述樣本照片之核訊號強度。橫軸為加鐵刺激後,收取細胞液的不同時間點,縱軸為細胞核內之 FITC 螢光強度;本圖表係採用三次實驗之定量數據統計所得之結果。



A.



B.



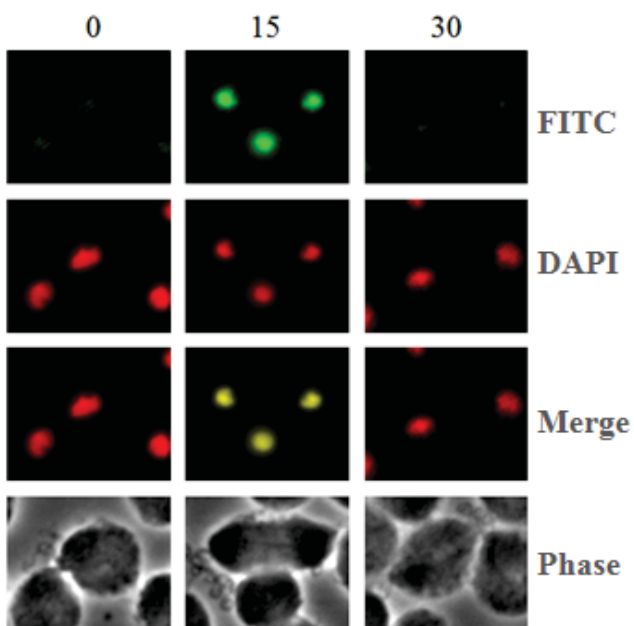
圖十一· Ras 蛋白抑制劑 FTS 有效阻擋鐵離子引起之 Myb3 核輸入

將陰道滴蟲細胞隔夜培養於低鐵環境達對數生長期(細胞濃度約 $1.5\sim 2.0 \times 10^6$ cells / ml) 後,分別以 DMSO 及最終濃度 $10\mu\text{M}$ 之 Ras 蛋白抑制劑 FTS 處理細胞 30 分鐘,再添加 $750\mu\text{M}$ 鐵離子作用,觀察抑制劑對鐵離子引起之 Myb3 核輸入及輸出是否產生影響。(A) 加入鐵離子刺激後,於 0、15 及 30 分鐘時,收取細胞液,以 anti-HA 抗體(300 倍稀釋)進行免疫螢光染色分析。FITC 標記 Myb3 位置;DAPI 標記細胞核位置;Merge 為 DAPI 及 FITC 重疊之結果。(B) 以 Metamorph™ 影像處理軟體定量上述樣本照片之核訊號強度。橫軸為加鐵刺激後,收取細胞液的不同時間點,縱軸為細胞核內之 FITC 螢光強度;本圖表係採用三次實驗之定量數據統計所得之結果。

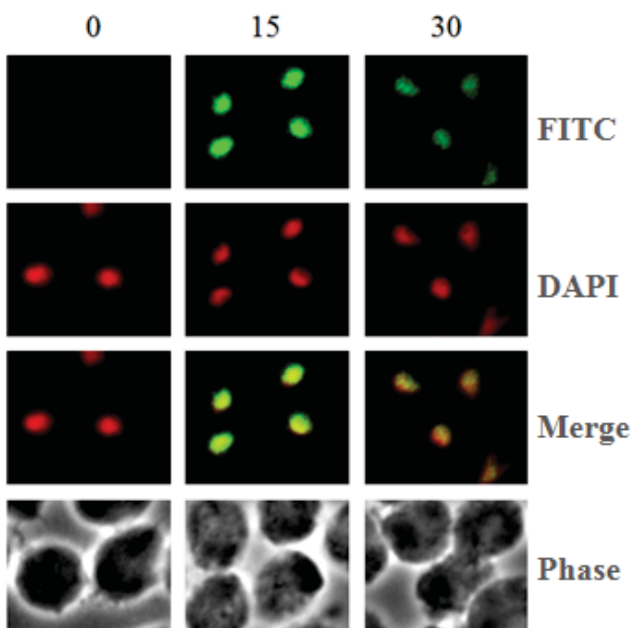


A.

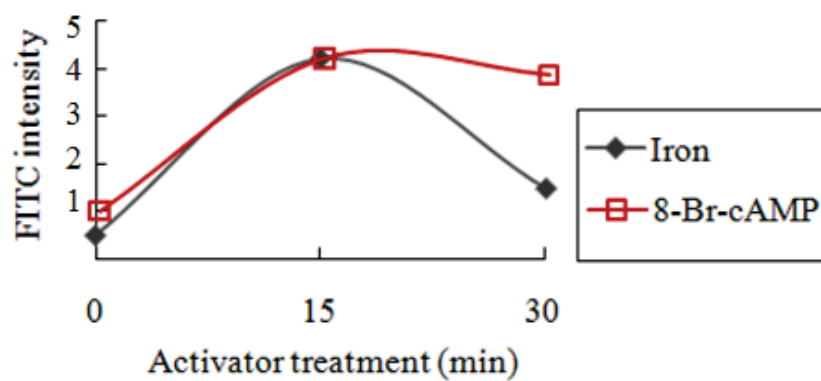
**Iron repletion
(min)**



**8-Br-cAMP
treatment (min)**



B.

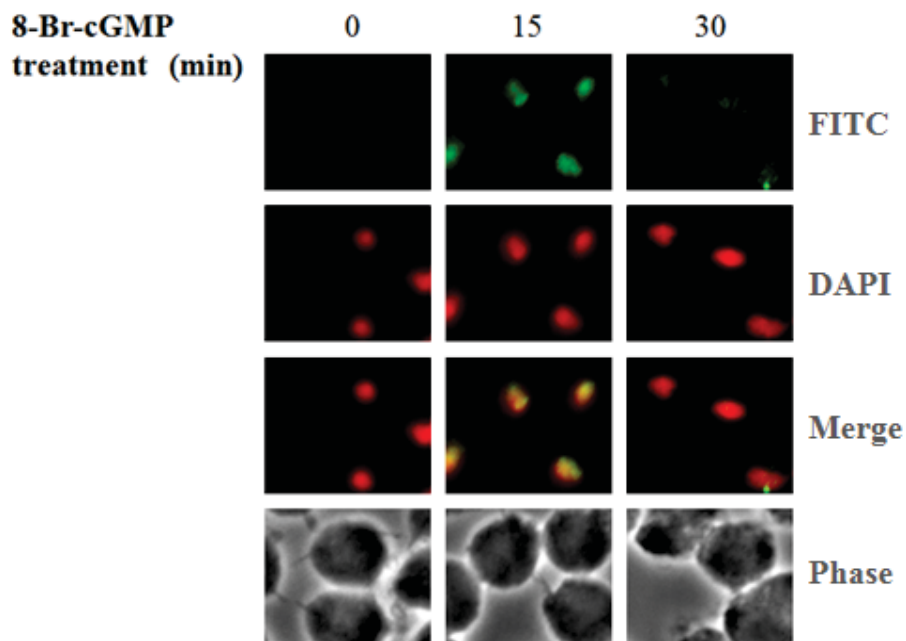
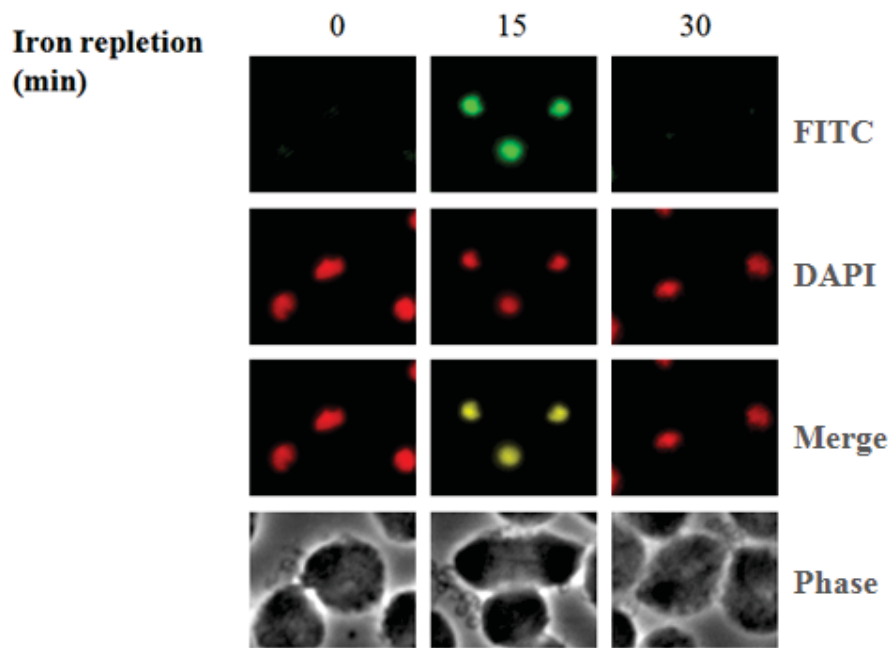


圖十二· 8-Br-cAMP 誘導 Myb3 轉錄因子輸入細胞核

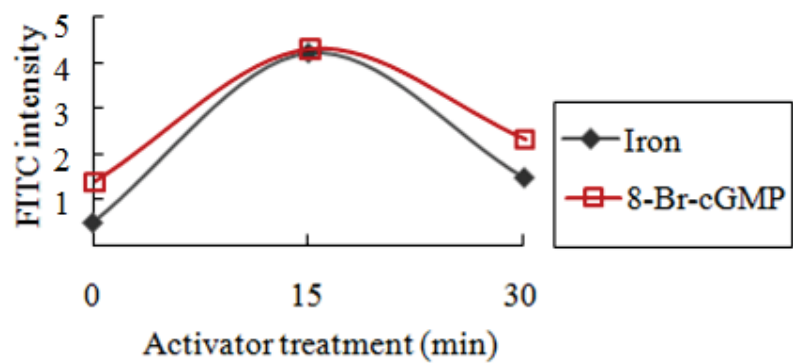
將陰道滴蟲細胞隔夜培養於低鐵環境達對數生長期(細胞濃度約 $1.5\sim 2.0 \times 10^6$ cells / ml) 後，分別以 $750\mu\text{M}$ 鐵離子及 $50\mu\text{M}$ 8-Br cAMP 處理細胞，觀察是否誘導 Myb3 核輸入及後續核輸出。(A) 加入鐵離子及 8-Br-cAMP 後，於 0、15 及 30 分鐘時，收取細胞液，以 anti-HA 抗體(300 倍稀釋)進行免疫螢光染色分析。FITC 標記 Myb3 位置；DAPI 標記細胞核位置；Merge 為 DAPI 及 FITC 重疊之結果。(B) 以 MetamorphTM 影像處理軟體定量上述樣本照片之核訊號強度。橫軸為加鐵或 8-Br-cAMP 刺激後，收取細胞液的不同時間點，縱軸為細胞核內之 FITC 螢光強度；本圖表係採用三次實驗之定量數據統計所得之結果。



A.



B.

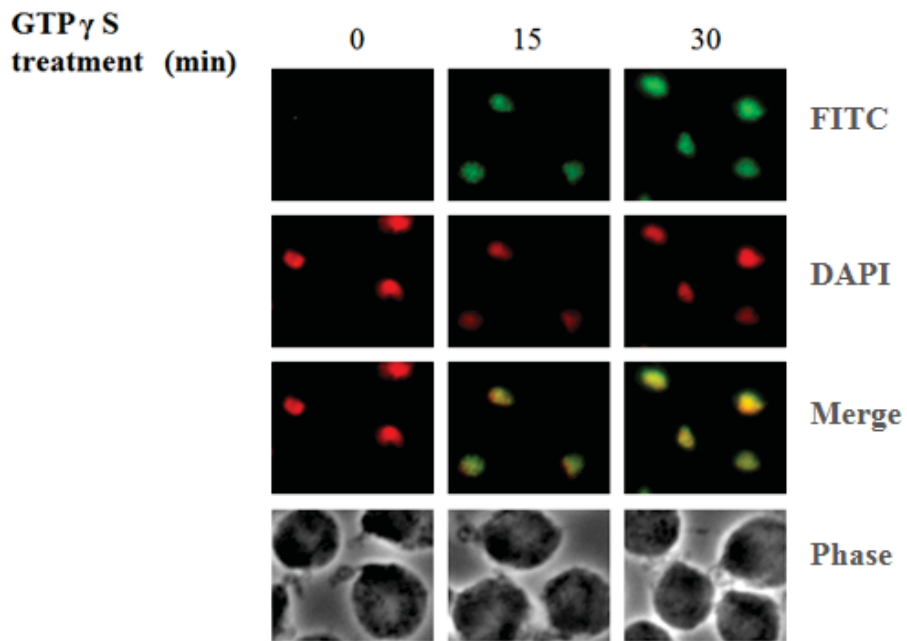
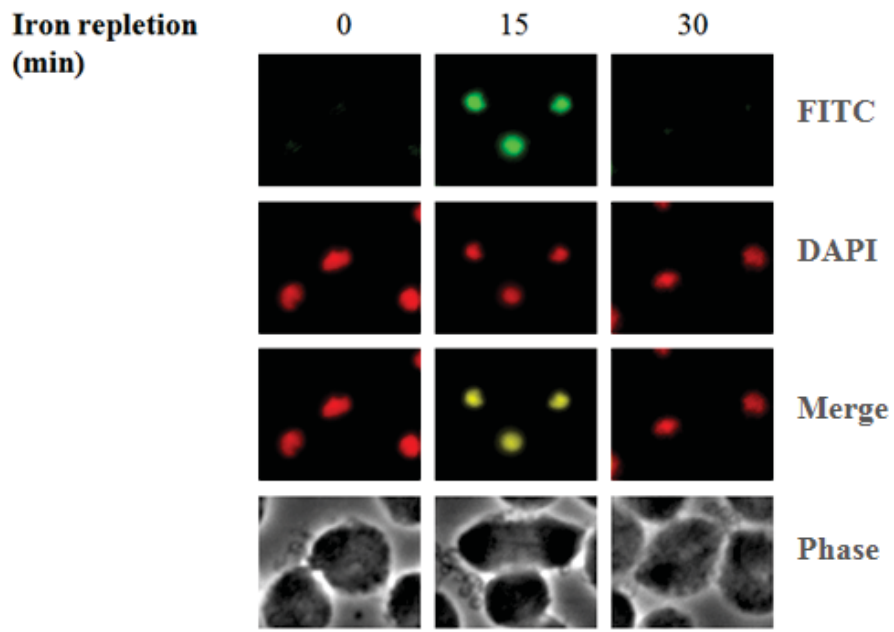


圖十三· 8-Br-cGMP 誘導 Myb3 轉錄因子輸入細胞核

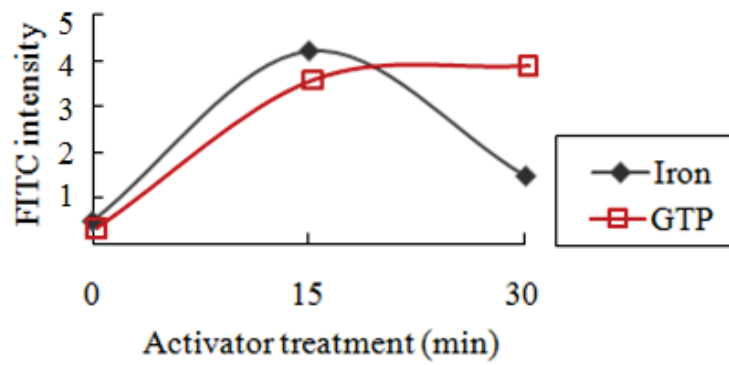
將陰道滴蟲細胞隔夜培養於低鐵環境達對數生長期(細胞濃度約 $1.5\sim 2.0 \times 10^6$ cells / ml) 後，分別以 $750\mu\text{M}$ 鐵離子及 $50\mu\text{M}$ 8-Br-cGMP 處理細胞，觀察是否誘導 Myb3 核輸入及後續核輸出。(A) 加入鐵離子及 8-Br-cGMP 後，於 0、15 及 30 分鐘時，收取細胞液，以 anti-HA 抗體(300 倍稀釋)進行免疫螢光染色分析。FITC 標記 Myb3 位置；DAPI 標記細胞核位置；Merge 為 DAPI 及 FITC 重疊之結果。(B) 以 Metamorph™ 影像處理軟體定量上述樣本照片之核訊號強度。橫軸為加鐵或 8-Br-cGMP 刺激後，收取細胞液的不同時間點，縱軸為細胞核內之 FITC 螢光強度；本圖表係採用三次實驗之定量數據統計所得之結果。



A.



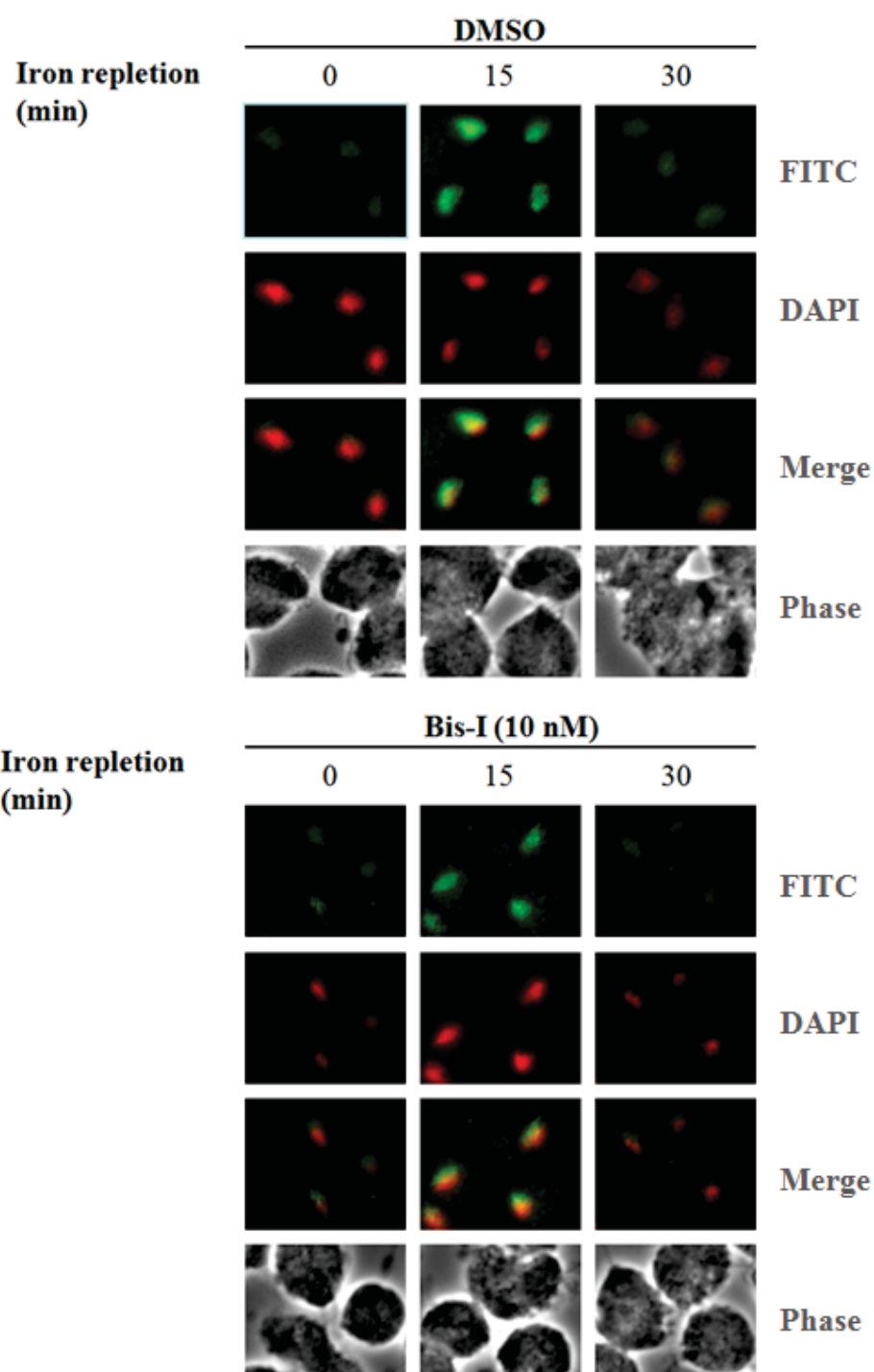
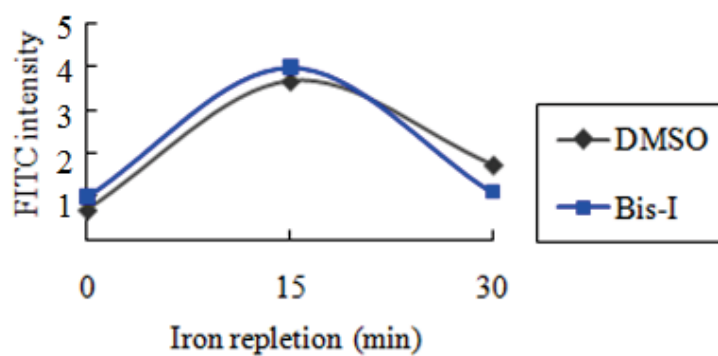
B.



圖十四 · GTP- γ -S 誘導 Myb3 轉錄因子輸入細胞核

將陰道滴蟲細胞隔夜培養於低鐵環境達對數生長期(細胞濃度約 $1.5\sim 2.0 \times 10^6$ cells / ml) 後，分別以 $750\mu\text{M}$ 鐵離子及 $100\mu\text{M}$ GTP- γ -S 處理細胞，觀察是否誘導 Myb3 核輸入及後續核輸出。(A) 加入鐵離子及 GTP- γ -S 後，於 0、15 及 30 分鐘時，收取細胞液，以 anti-HA 抗體(300 倍稀釋)進行免疫螢光染色分析。FITC 標記 Myb3 位置；DAPI 標記細胞核位置；Merge 為 DAPI 及 FITC 重疊之結果。(B) 以 MetamorphTM 影像處理軟體定量上述樣本照片之核訊號強度。橫軸為加鐵或 GTP- γ -S 刺激後，收取細胞液的不同時間點，縱軸為細胞核內之 FITC 螢光強度；本圖表係採用三次實驗之定量數據統計所得之結果。



A**B.**

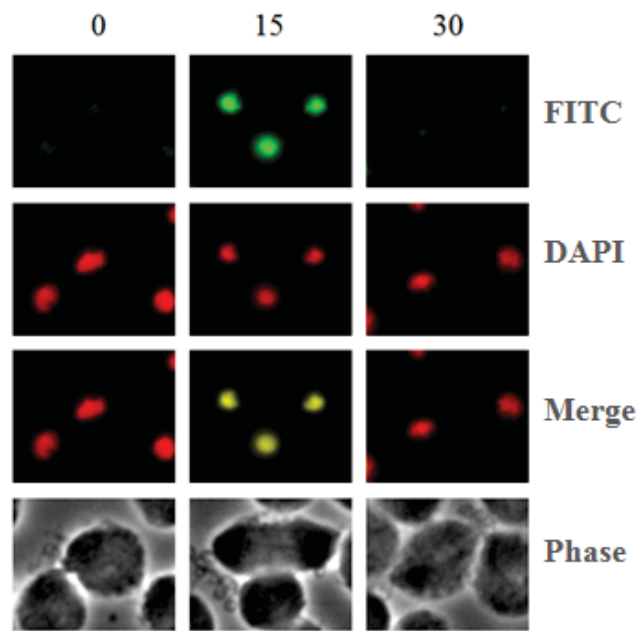
圖十五 · PKC 抑制劑 Bisindolylmaleimide-I 對鐵誘導之 Myb3 核輸入無抑制效果

將陰道滴蟲細胞隔夜培養於低鐵環境達對數生長期(細胞濃度約 $1.5\sim 2.0 \times 10^6$ cells / ml) 後,分別以 DMSO 及最終濃度 10nM 之 PKC 抑制劑 Bisindolylmaleimide-處理細胞 30 分鐘,再添加 $750\mu\text{M}$ 鐵離子作用,觀察抑制劑對鐵離子引起之 Myb3 核輸入及輸出是否產生影響。(A) 加入鐵離子刺激後,於 0、15 及 30 分鐘時,收取細胞液,以 anti-HA 抗體(300 倍稀釋)進行免疫螢光染色分析。FITC 標記 Myb3 位置;DAPI 標記細胞核位置;Merge 為 DAPI 及 FITC 重疊之結果。(B) 以 Metamorph™ 影像處理軟體定量上述樣本照片之核訊號強度。橫軸為加鐵刺激後,收取細胞液的不同時間點,縱軸為細胞核內之 FITC 螢光強度;本圖表係採用三次實驗之定量數據統計所得之結果。

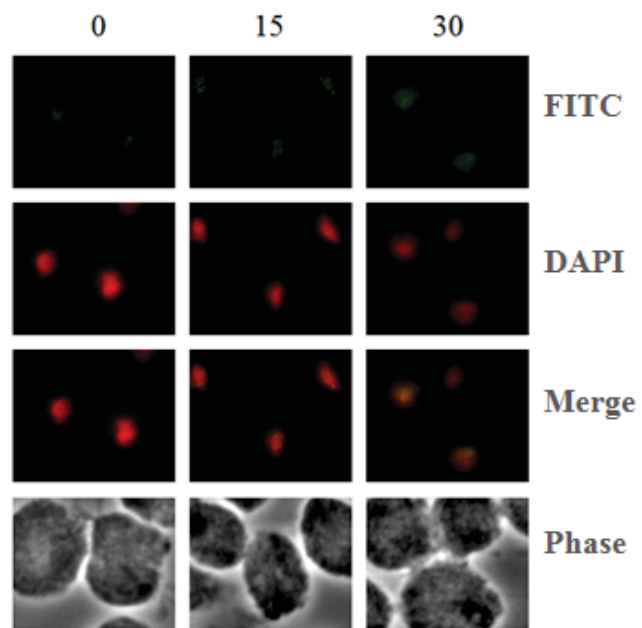


A.

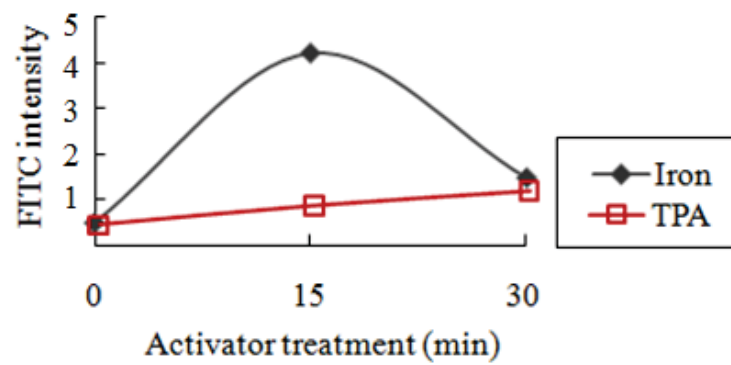
**Iron repletion
(min)**



**TPA treatment
(min)**



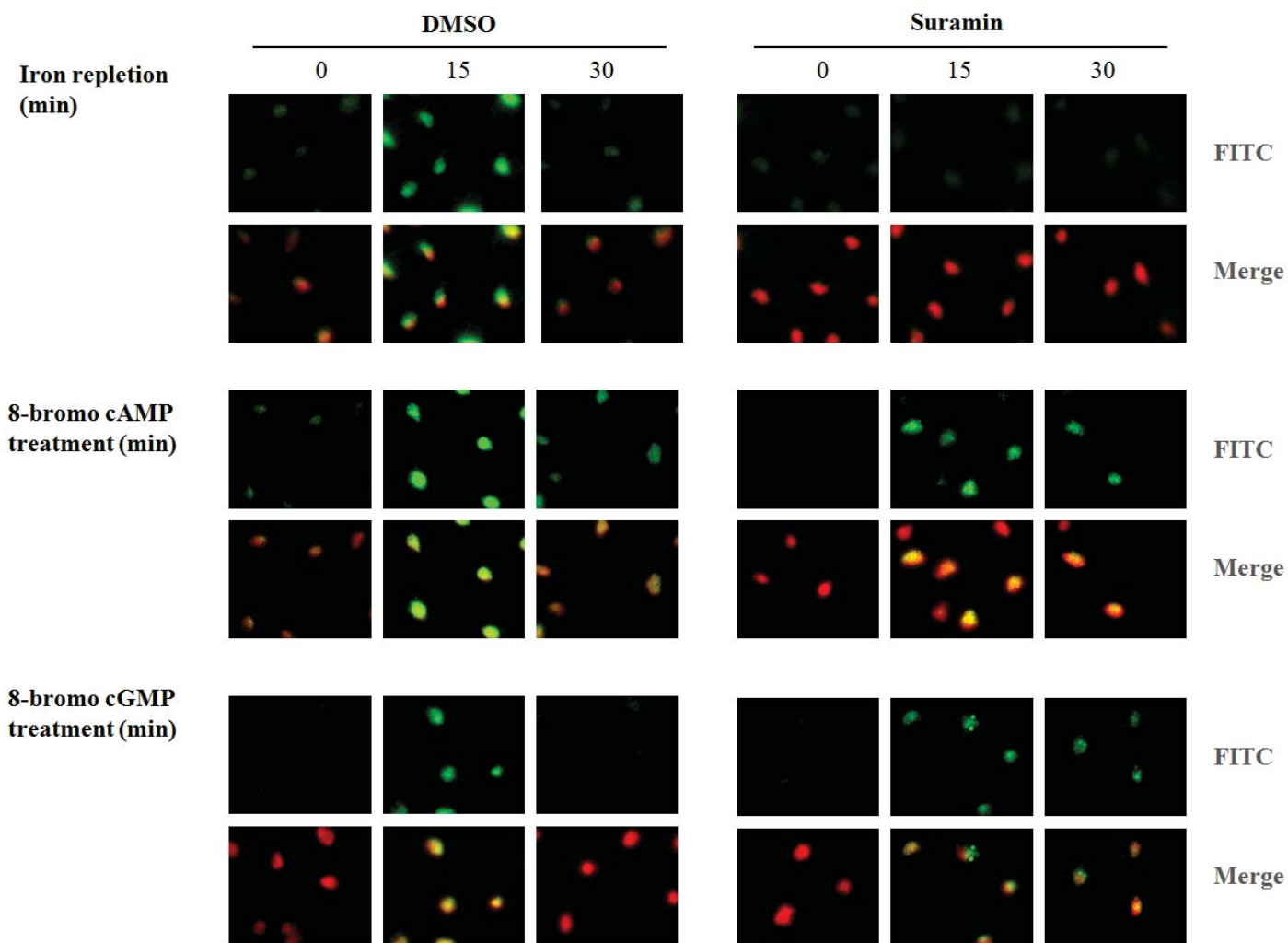
B.



圖十六· TPA 無法誘導 Myb3 轉錄因子輸入細胞核

將陰道滴蟲細胞隔夜培養於低鐵環境達對數生長期(細胞濃度約 $1.5\sim 2.0 \times 10^6$ cells / ml) 後，分別以 $750\mu\text{M}$ 鐵離子及 300ng/ml 之 TPA 處理細胞，觀察是否誘導 Myb3 核輸入及後續核輸出。(A) 加入鐵離子及 TPA 後，於 0、15 及 30 分鐘時，收取細胞液，以 anti-HA 抗體(300 倍稀釋)進行免疫螢光染色分析。FITC 標記 Myb3 位置；DAPI 標記細胞核位置；Merge 為 DAPI 及 FITC 重疊之結果。(B) 以 MetamorphTM 影像處理軟體定量上述樣本照片之核訊號強度。橫軸為加鐵或 TPA 刺激後，收取細胞液的不同時間點，縱軸為細胞核內之 FITC 螢光強度；本圖表係採用三次實驗之定量數據統計所得之結果。

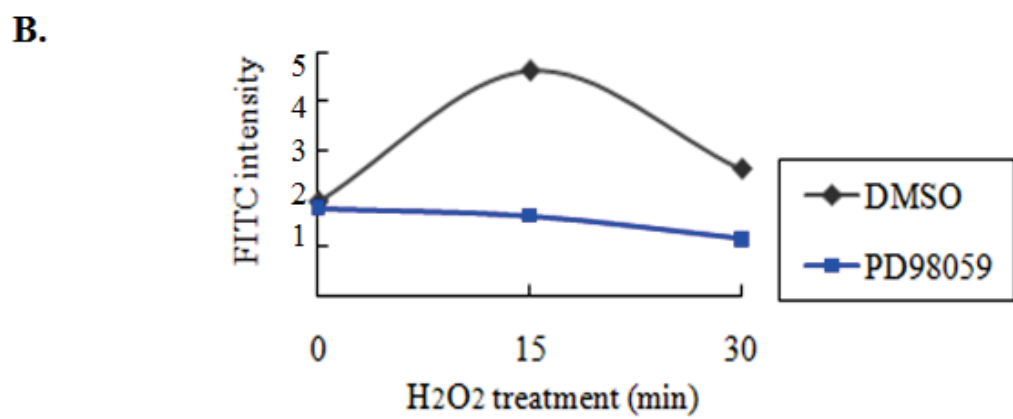
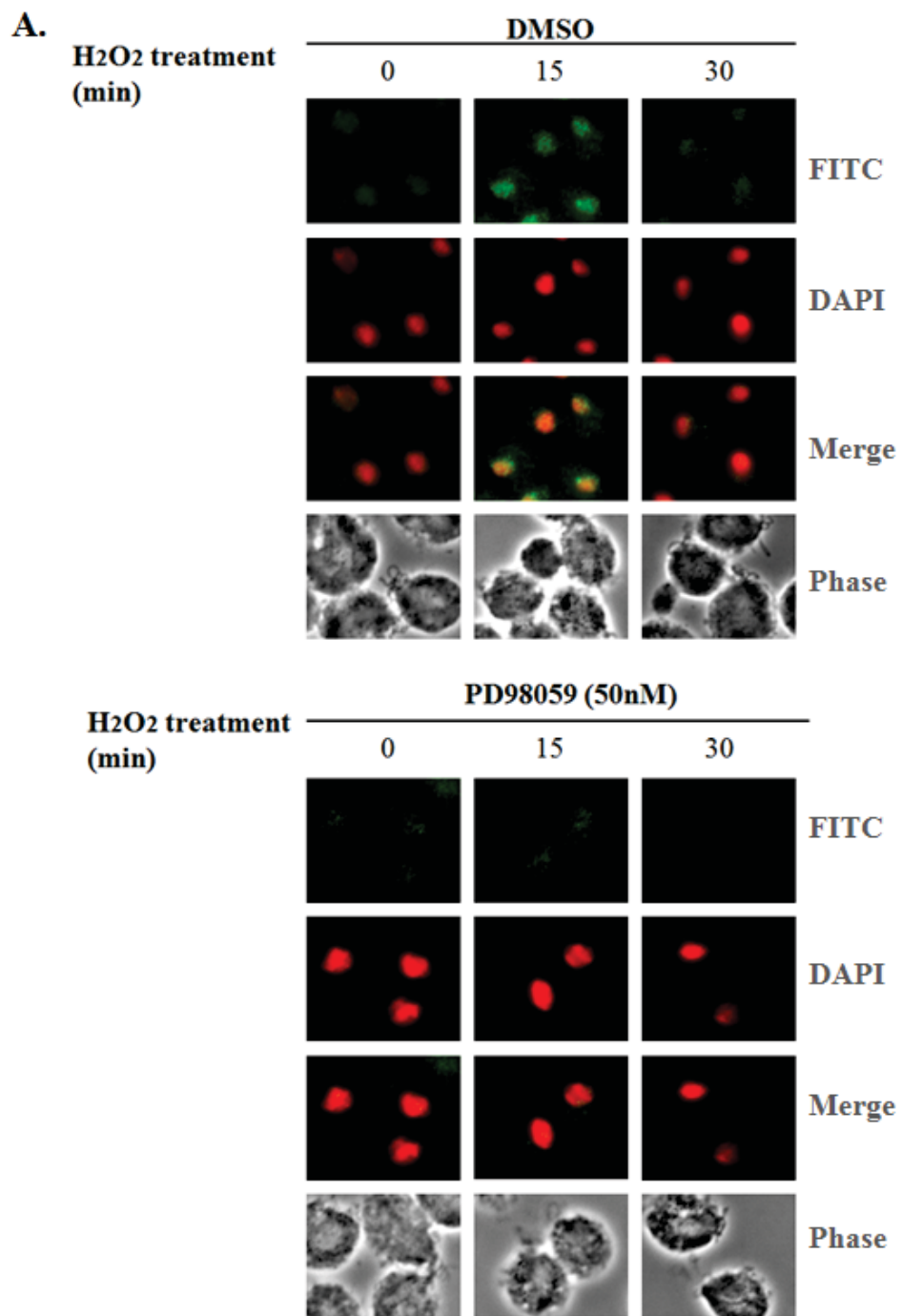




圖十七· G 蛋白抑制劑 suramin 無法抑制 8-Br-cAMP 及 8-Br-cGMP 誘導之 Myb3 核輸入

將陰道滴蟲細胞隔夜培養於低鐵環境達對數生長期(細胞濃度約 $1.5\sim 2.0 \times 10^6$ cells / ml) 後,分別以 DMSO 及最終濃度 $10\mu\text{M}$ 之 G 蛋白抑制劑 suramin 處理細胞 30 分鐘,再添加 $750\mu\text{M}$ 鐵離子、8-Br-cAMP 及 8-Br-cGMP 作用,於 0、15 及 30 分鐘時,收取細胞樣本,以 anti-HA 抗體(300 倍稀釋)進行免疫螢光染色分析,觀察 suramin 對上述物質誘導之 Myb3 核輸入及輸出是否產生影響。FITC 標記 Myb3 位置; Merge 為 DAPI 及 FITC 重疊之結果。



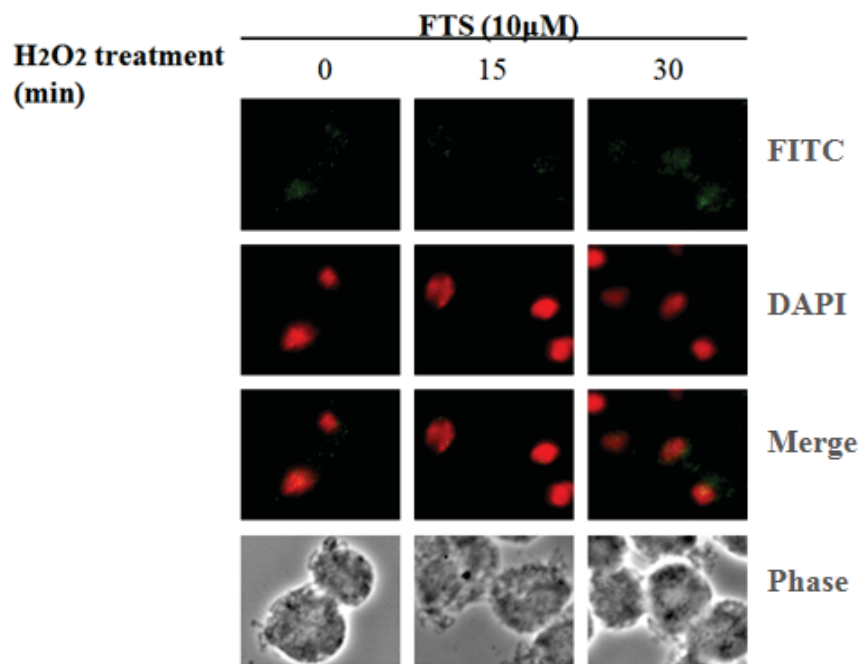
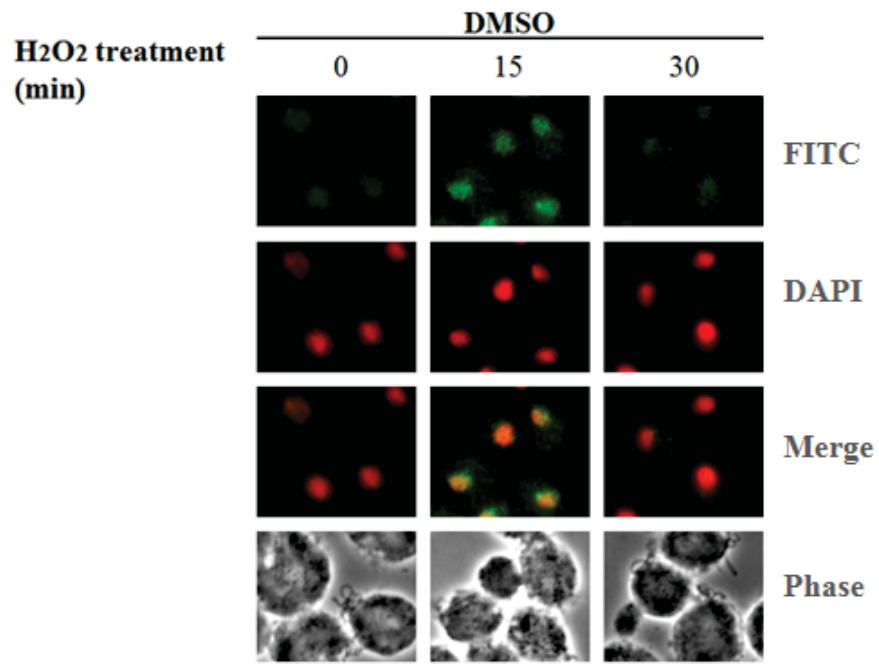


圖十八· MEK 抑制劑 PD98059 有效阻擋過氧化氫引起之 Myb3 核輸入

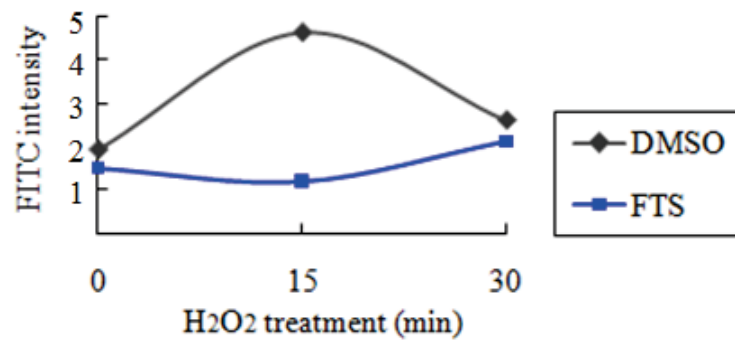
將陰道滴蟲細胞隔夜培養於低鐵環境達對數生長期(細胞濃度約 $1.5\sim 2.0 \times 10^6$ cells/ml)後,分別以 DMSO 及最終濃度 $50\mu\text{M}$ 之 MEK 抑制劑 PD98059 處理細胞 30 分鐘,再添加 $250\mu\text{M}$ 過氧化氫作用,觀察抑制劑對過氧化氫引起之 Myb3 核輸入及輸出是否產生影響。(A) 加入過氧化氫溶液刺激後,於 0、15 及 30 分鐘時,收取細胞液,以 anti-HA 抗體(300 倍稀釋)進行免疫螢光染色分析。FITC 標記 Myb3 位置;DAPI 標記細胞核位置;Merge 為 DAPI 及 FITC 重疊之結果。(B) 以 Metamorph™ 影像處理軟體定量上述樣本照片之核訊號強度。橫軸為加過氧化氫刺激後,收取細胞液的不同時間點,縱軸為細胞核內之 FITC 螢光強度;本圖表係採用三次實驗之定量數據統計所得之結果。



A.



B.

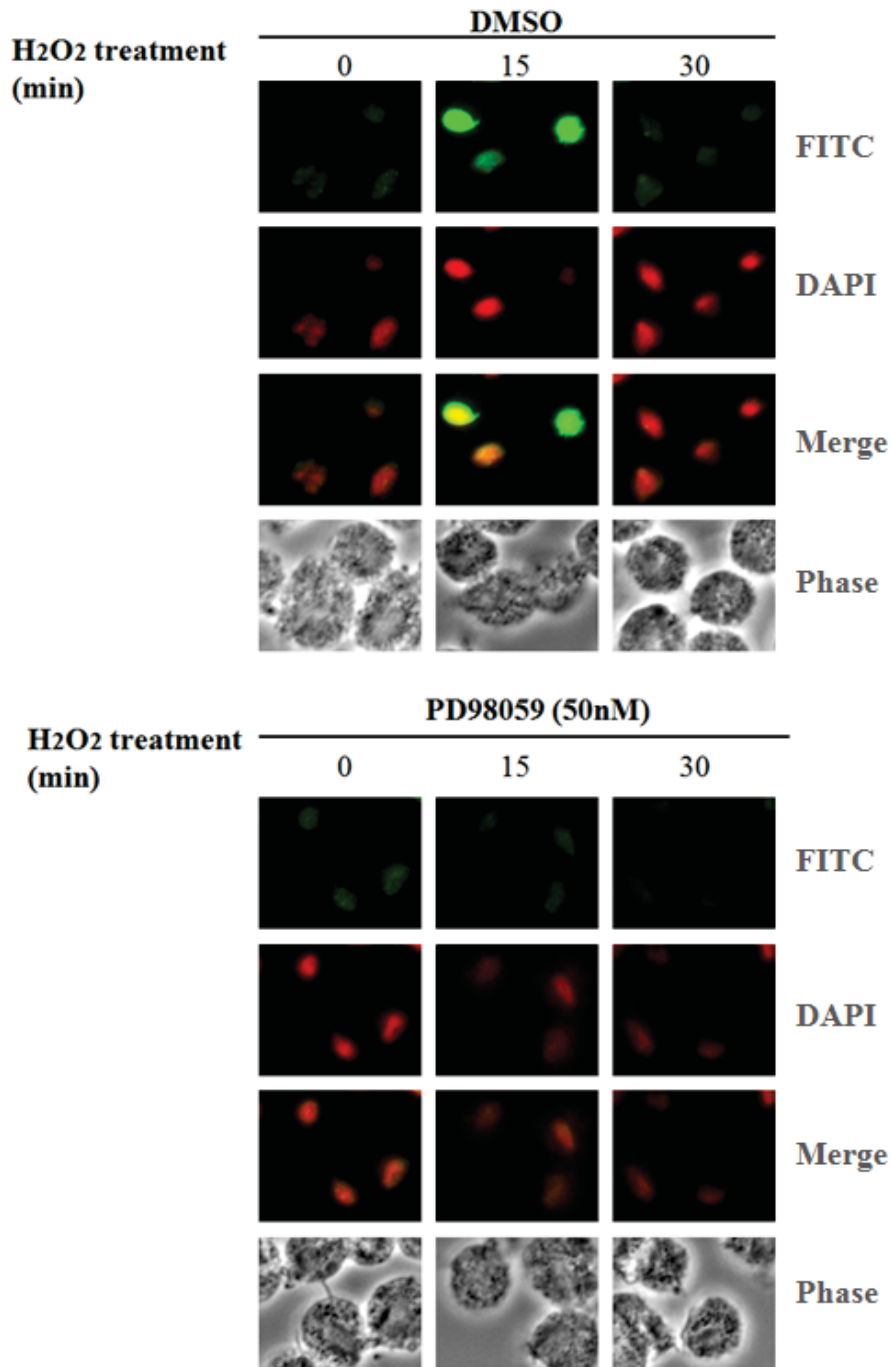


圖十九· Ras 蛋白抑制劑 FTS 有效阻擋鐵過氧化氫引起之 Myb3 核輸入

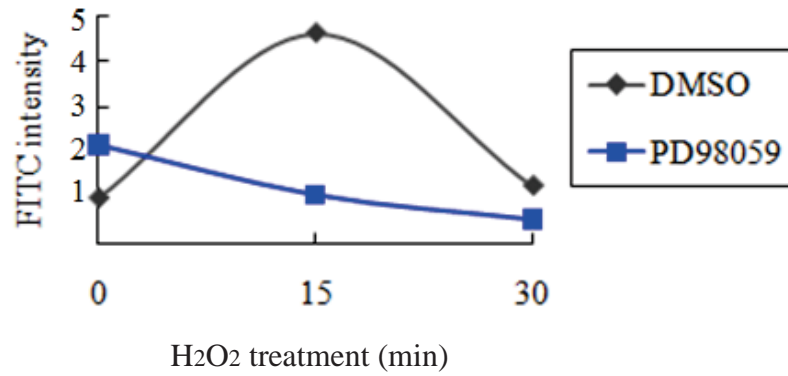
將陰道滴蟲細胞隔夜培養於低鐵環境達對數生長期(細胞濃度約 $1.5\sim 2.0 \times 10^6$ cells / ml) 後,分別以 DMSO 及最終濃度 $10\mu\text{M}$ 之 Ras 蛋白抑制劑 FTS 處理細胞 30 分鐘,再添加 $250\mu\text{M}$ 過氧化氫作用,觀察抑制劑對過氧化氫引起之 Myb3 核輸入及輸出是否產生影響。(A) 加入過氧化氫溶液刺激後,於 0、15 及 30 分鐘時,收取細胞液,以 anti-HA 抗體(300 倍稀釋)進行免疫螢光染色分析。FITC 標記 Myb3 位置;DAPI 標記細胞核位置;Merge 為 DAPI 及 FITC 重疊之結果。(B) 以 Metamorph™ 影像處理軟體定量上述樣本照片之核訊號強度。橫軸為加過氧化氫刺激後,收取細胞液的不同時間點,縱軸為細胞核內之 FITC 螢光強度;本圖表係採用三次實驗之定量數據統計所得之結果。



A.



B.

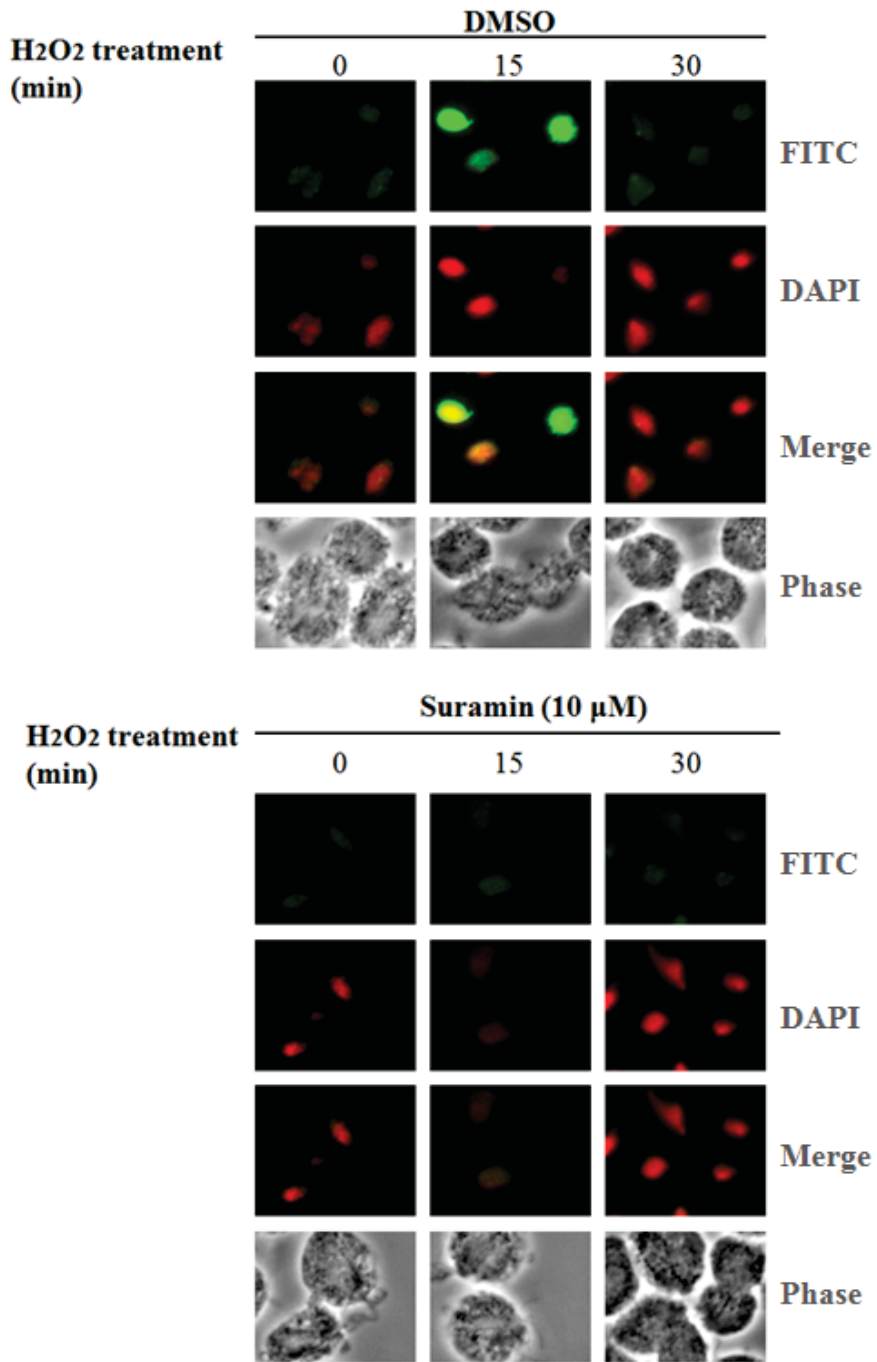


圖廿· MEK 抑制劑 PD98059 有效阻擋過氧化氫引起之 Myb2 核輸入

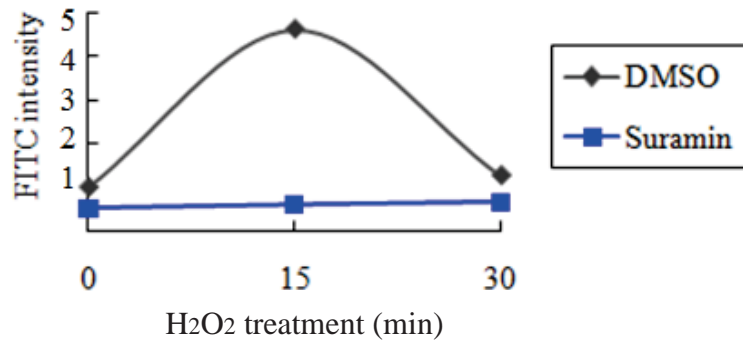
將陰道滴蟲細胞隔夜培養於低鐵環境達對數生長期(細胞濃度約 $1.5\sim 2.0 \times 10^6$ cells / ml) 後,分別以 DMSO 及最終濃度 $50\mu\text{M}$ 之 MEK 抑制劑 PD98059 處理細胞 30 分鐘,再添加 $250\mu\text{M}$ 過氧化氫作用,觀察抑制劑對過氧化氫引起之 Myb2 核輸入及輸出是否產生影響。(A) 加入過氧化氫溶液刺激後,於 0、15 及 30 分鐘時,收取細胞液,以 anti-HA 抗體(300 倍稀釋)進行免疫螢光染色分析。FITC 標記 Myb2 位置;DAPI 標記細胞核位置;Merge 為 DAPI 及 FITC 重疊之結果。(B) 以 Metamorph™ 影像處理軟體定量上述樣本照片之核訊號強度。橫軸為加過氧化氫刺激後,收取細胞液的不同時間點,縱軸為細胞核內之 FITC 螢光強度;本圖表係採用三次實驗之定量數據統計所得之結果。



A.



B.

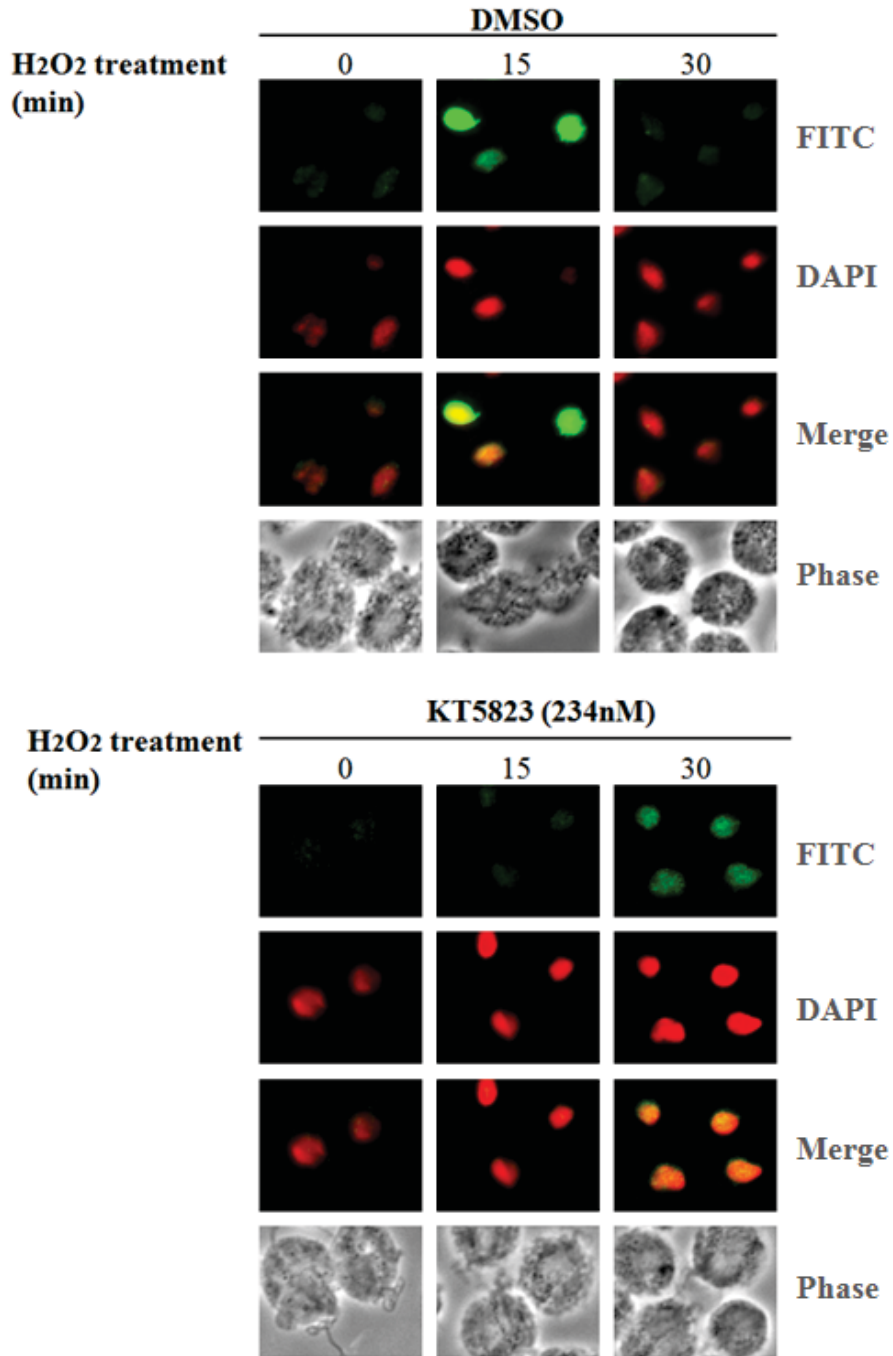


圖廿一· G 蛋白抑制劑 Suramin 有效阻擋過氧化氫引起之 Myb2 核輸入

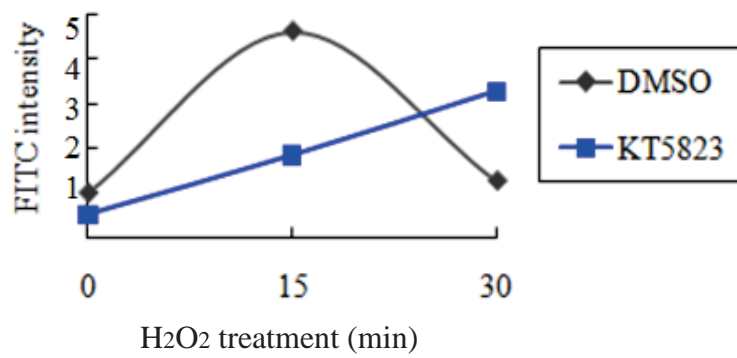
將陰道滴蟲細胞隔夜培養於低鐵環境達對數生長期(細胞濃度約 $1.5\sim 2.0 \times 10^6$ cells / ml) 後,分別以 DMSO 及最終濃度 $10\mu\text{M}$ 之 G 蛋白抑制劑 Suramin 處理細胞 30 分鐘,再添加 $250\mu\text{M}$ 過氧化氫作用,觀察抑制劑對過氧化氫引起之 Myb2 核輸入及輸出是否產生影響。(A) 加入過氧化氫溶液刺激後,於 0、15 及 30 分鐘時,收取細胞液,以 anti-HA 抗體(300 倍稀釋)進行免疫螢光染色分析。FITC 標記 Myb2 位置;DAPI 標記細胞核位置;Merge 為 DAPI 及 FITC 重疊之結果。(B) 以 Metamorph™ 影像處理軟體定量上述樣本照片之核訊號強度。橫軸為加過氧化氫刺激後,收取細胞液的不同時間點,縱軸為細胞核內之 FITC 螢光強度;本圖表係採用三次實驗之定量數據統計所得之結果。



A.



B.

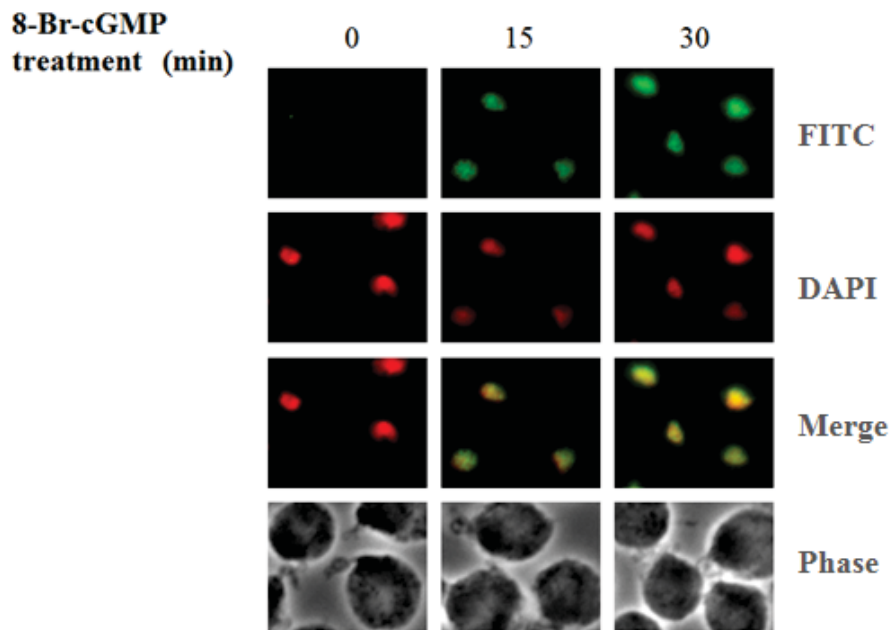
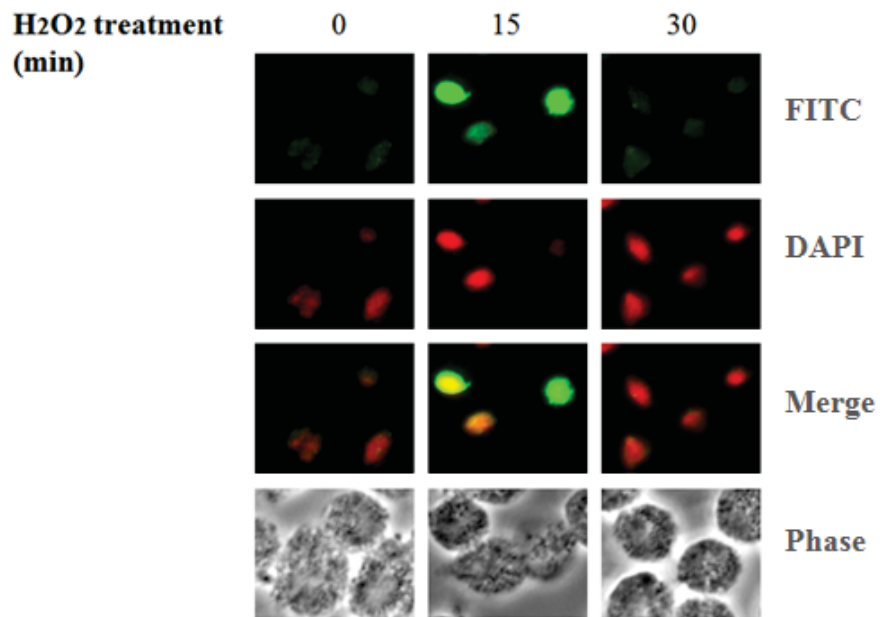


圖廿二 · PKG 抑制劑 KT5823 有效阻擋過氧化氫引起之 Myb2 核輸入

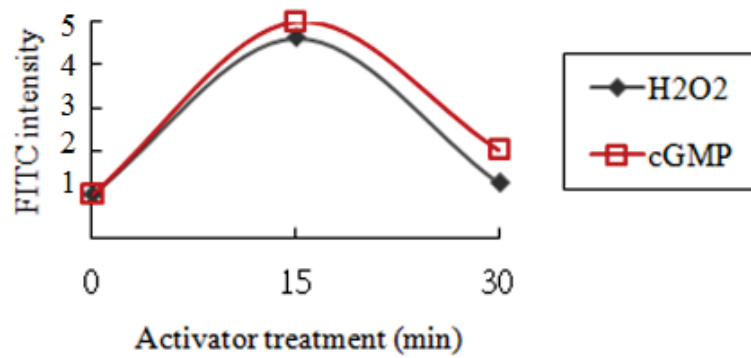
將陰道滴蟲細胞隔夜培養於低鐵環境達對數生長期(細胞濃度約 $1.5\sim 2.0 \times 10^6$ cells / ml) 後,分別以 DMSO 及最終濃度 234nM 之 PKG 抑制劑 KT5823 處理細胞 30 分鐘,再添加 250 μ M 過氧化氫作用,觀察抑制劑對過氧化氫引起之 Myb2 核輸入及輸出是否產生影響。(A) 加入過氧化氫溶液刺激後,於 0、15 及 30 分鐘時,收取細胞液,以 anti-HA 抗體(300 倍稀釋)進行免疫螢光染色分析。FITC 標記 Myb2 位置;DAPI 標記細胞核位置;Merge 為 DAPI 及 FITC 重疊之結果。(B) 以 Metamorph™ 影像處理軟體定量上述樣本照片之核訊號強度。橫軸為加過氧化氫刺激後,收取細胞液的不同時間點,縱軸為細胞核內之 FITC 螢光強度;本圖表係採用三次實驗之定量數據統計所得之結果。



A.



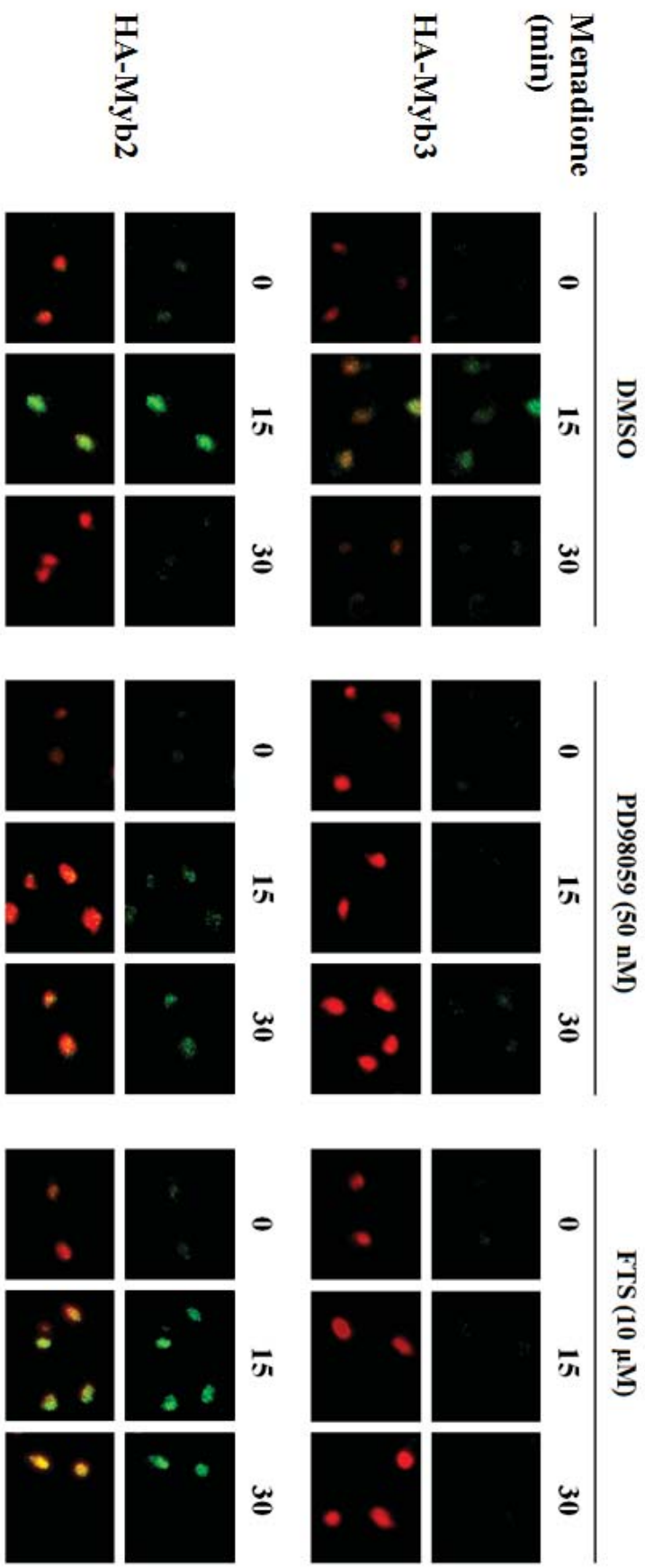
B.



圖廿三 · 8-Br-cGMP 誘導 Myb2 轉錄因子輸入細胞核

將陰道滴蟲細胞隔夜培養於低鐵環境達對數生長期(細胞濃度約 $1.5\sim 2.0 \times 10^6$ cells / ml) 後，分別以 $250\mu\text{M}$ 過氧化氫及 $50\mu\text{M}$ 8-Br-cGMP 處理細胞，觀察是否誘導 Myb2 核輸入及後續核輸出。(A) 加入過氧化氫及 8-Br-cGMP 後，於 0、15 及 30 分鐘時，收取細胞液，以 anti-HA 抗體(300 倍稀釋)進行免疫螢光染色分析。FITC 標記 Myb2 位置；DAPI 標記細胞核位置；Merge 為 DAPI 及 FITC 重疊之結果。(B) 以 Metamorph™ 影像處理軟體定量上述樣本照片之核訊號強度。橫軸為加過氧化氫或 8-Br-cGMP 刺激後，收取細胞液的不同時間點，縱軸為細胞核內之 FITC 螢光強度；本圖表係採用三次實驗之定量數據統計所得之結果。



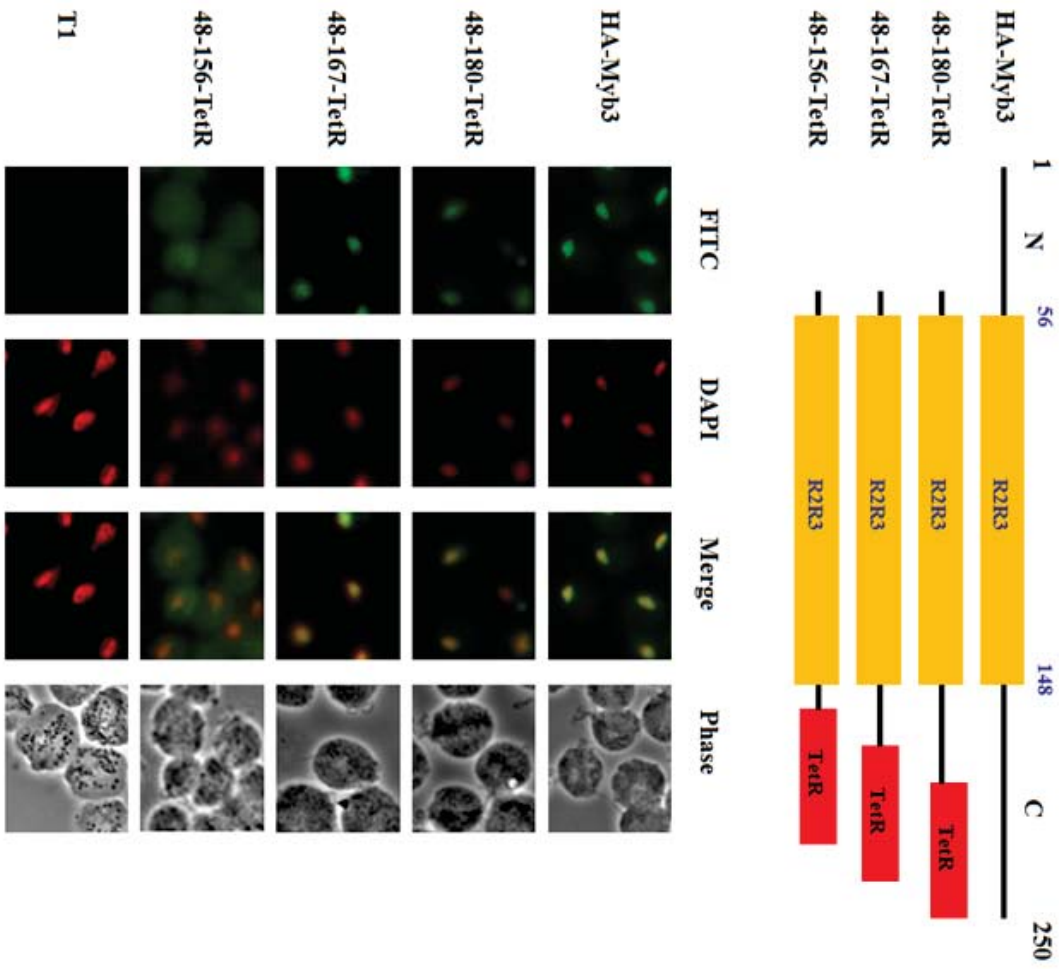


圖廿四 · Menadione 與過氧化氫誘導 Myb2 及 Myb3 入核的機制相同

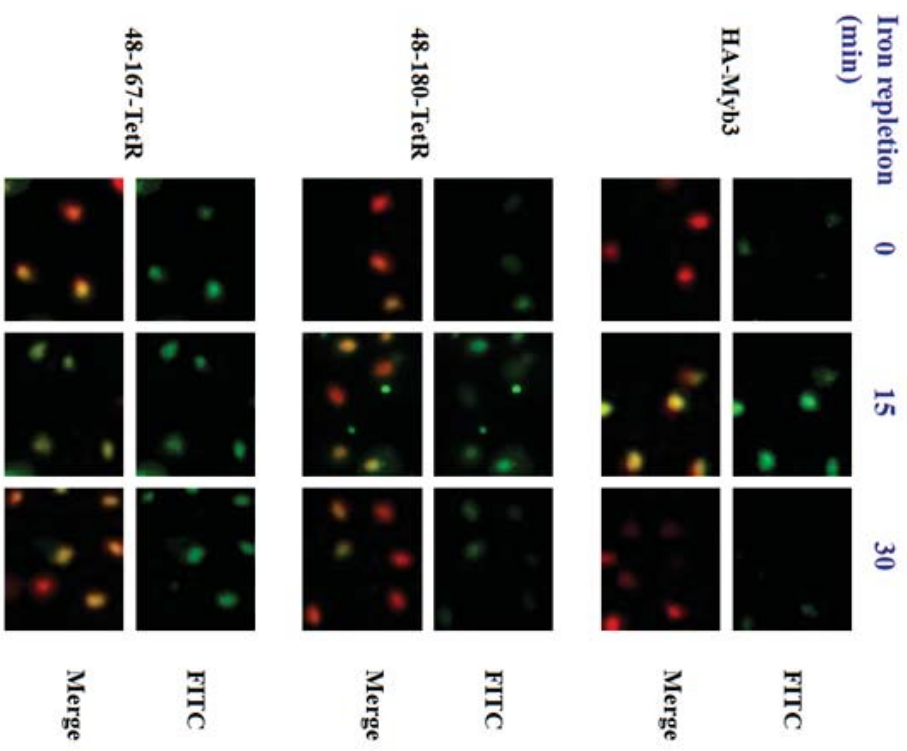
將過量表現 HA-Myb2 及 HA-Myb3 的陰道滴蟲分別培養於低鐵培養液中，達對數生長期（細胞濃度約 $1.5\sim 2.0 \times 10^6$ cells / ml）後，分別加入(A) DMSO、(B) 50nM PD98059、及(C) 10 μ M FTS 與細胞作用 30 分鐘，再添加 100 μ M menadione，於 0、15 及 30 分鐘後收取細胞樣本，以 anti-HA 抗體(300 倍稀釋)進行免疫螢光染色分析，觀察 Myb2 及 Myb3 於細胞中之核質分布情況。FITC 標記 Myb3 位置；Merge 則為 DAPI 及 FITC 重疊之結果。



A.



B.



圖廿五·主導 Myb3 核輸入之區域

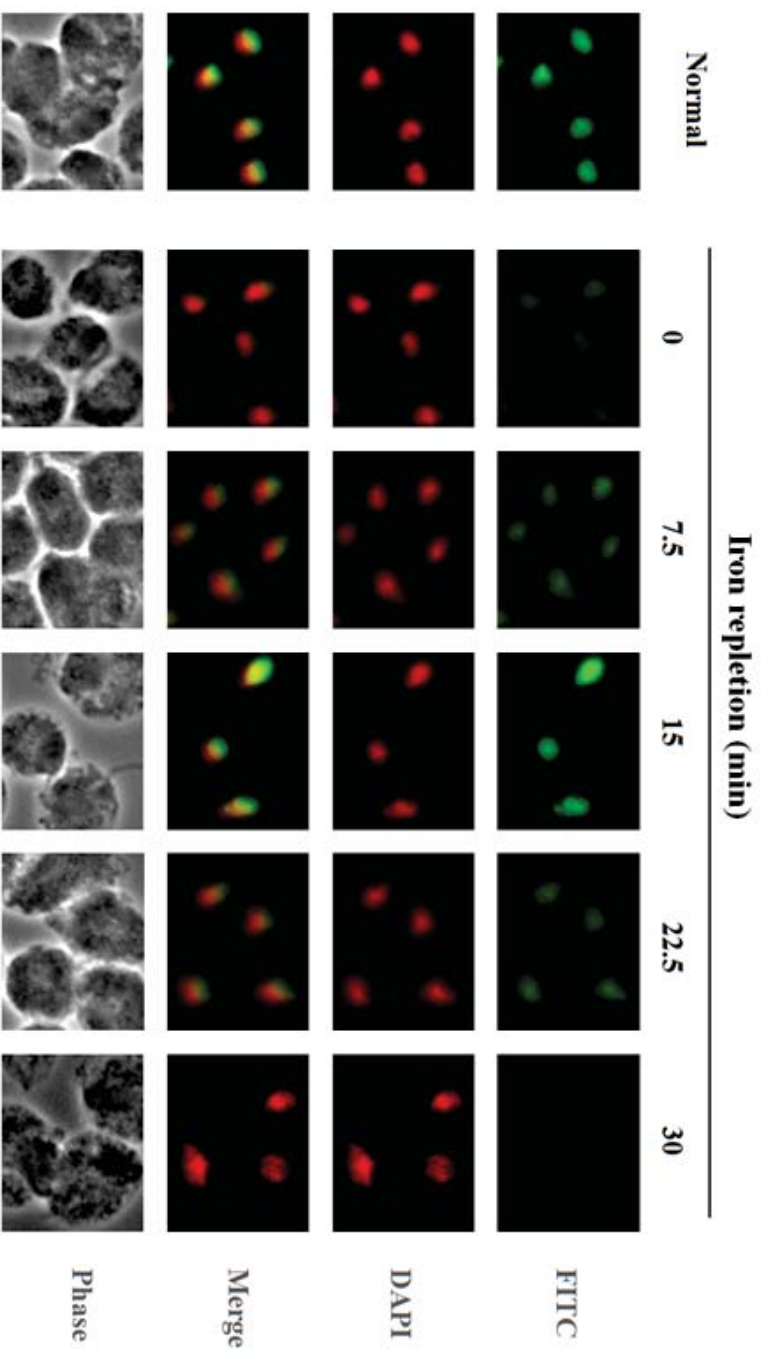
(A) 以簡圖表示 Myb3 構造；Myb3 野生株由 250 個胺基酸組成，黃色方塊代表位於胺基酸序列 56-148 的 R2R3 DNA 結合區域，N 及 C 分別代表 Myb3 之 N 端及 C 端序列。本實驗室以基因轉殖技術建構一系列截斷 Myb3 蛋白 N 端及 C 端序列之陰道滴蟲轉染蟲株，並以 anti-HA(稀釋 300 倍)進行免疫螢光分析，偵測這些截斷蛋白在細胞內的分布情形。FITC 標記 HA-Myb3 位置；DAPI 標記細胞核位置；Merge 為 DAPI 及 FITC 重疊之結果；T1 未轉染細胞株為陰性對照組。(B) 以免疫螢光分析分別檢察 Myb3 截斷蛋白於低鐵環境下，受到鐵離子刺激後的核輸入、輸出情形。FITC 標記 HA-Myb3 位置，Merge 為 DAPI 及 FITC 重疊之結果。



A.



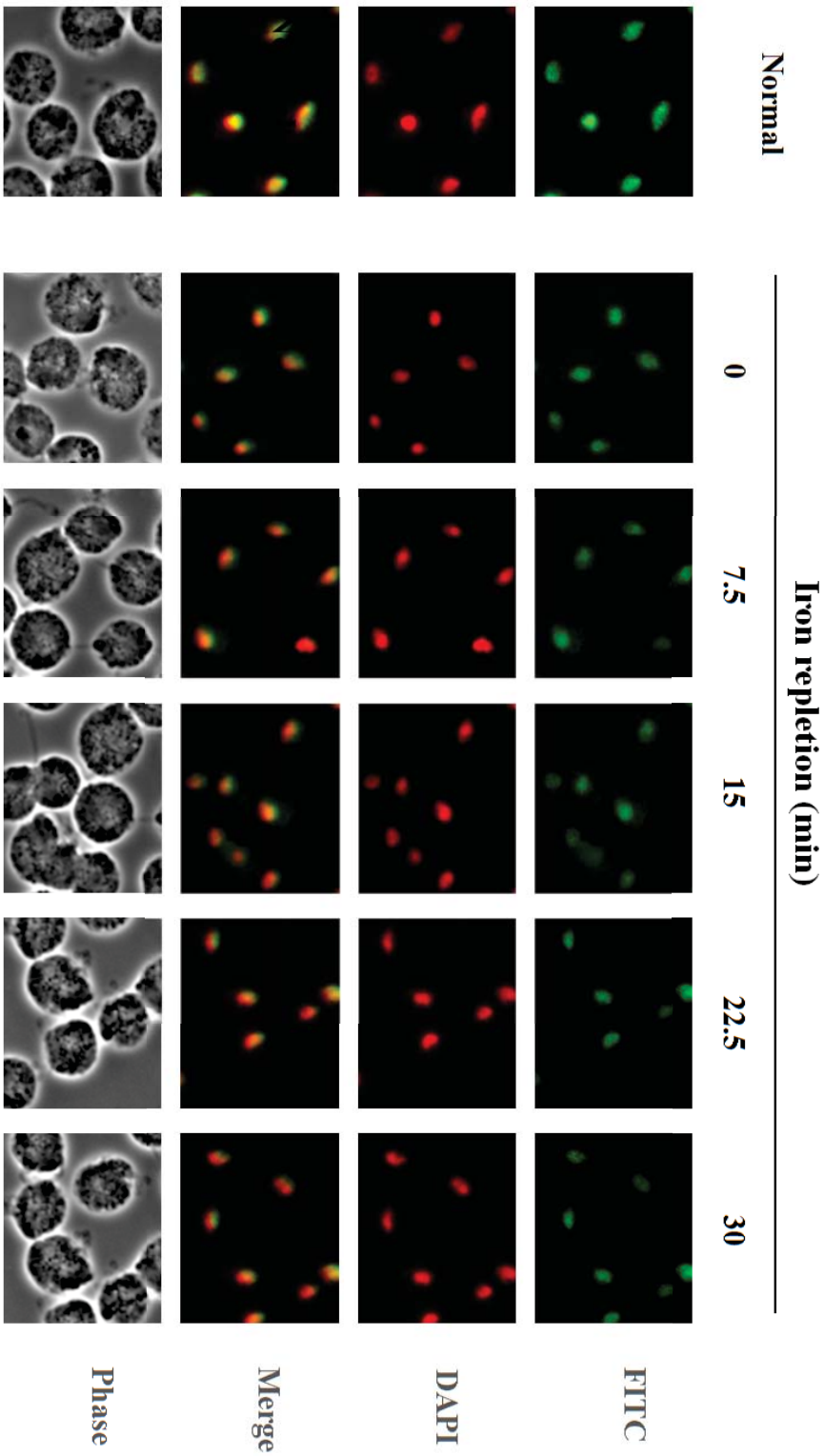
B.



圖廿六· Myb3 突變位置及 Myb3 野生株受鐵離子誘導之入核情形

(A) 於 Myb3 胺基酸序列 87-203 之間建構一系列位點突變之陰道滴蟲轉染株，並逐一以免疫螢光分析觀察鐵離子誘導入核之情形。以綠色字體代表與 Myb3 滯留於細胞質功能相關的位點；紅色字體代表與鐵誘導之核輸入功能相關之位點；以藍色字體代表與 Myb3 核輸出功能相關之位點。(B) Myb3 野生株於普通培養條件和低鐵培養後添加 750 μ M 鐵離子作用 0、7.5、15、22.5 及 30 分鐘時，核輸入及輸出之情形。FITC 綠色螢光標記 HA-Myb3 位置(細胞核)。

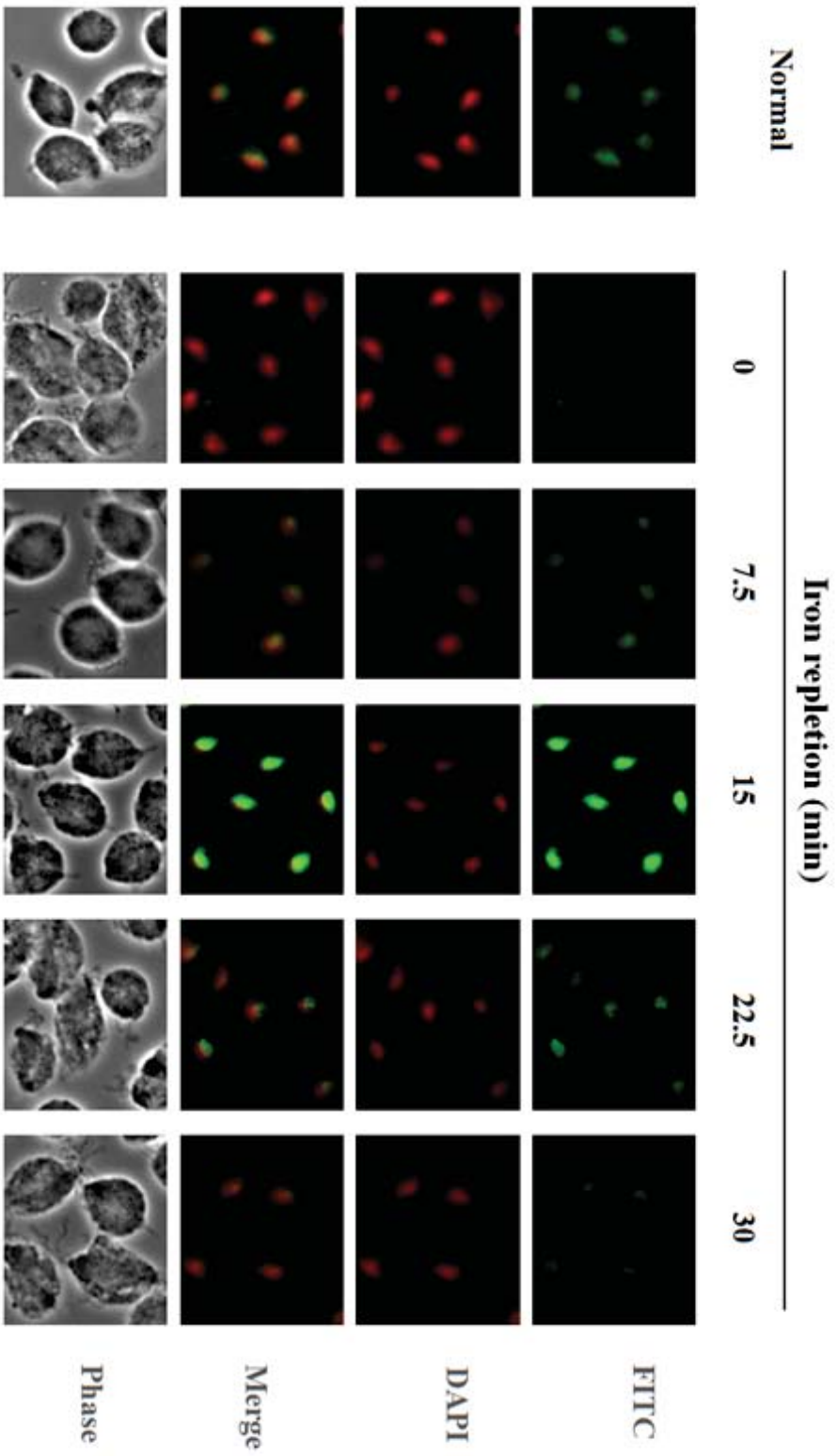




圖廿七· NSN157-159AAA 於低鐵環境或受鐵刺激後均大量存在細胞核

將 NSN157-159AAA 之突變 Myb3 蛋白轉染蟲株培養於低鐵環境下，達對數生長期（細胞濃度約 $1.5\sim 2.0 \times 10^6$ cells / ml）後，在細胞液中加入 $750\mu\text{M}$ 鐵離子作用，並於 0、7.5、15、22.5 及 30 分鐘時，收取細胞液，以 anti-HA 抗體(300 倍稀釋)進行免疫螢光染色分析，觀察突變之 Myb3 蛋白於細胞內的分布情形。FITC 標記 Myb3 位置；DAPI 標記細胞核位置；Merge 為 DAPI 及 FITC 重疊之結果；T1 未轉染細胞株為陰性對照組。

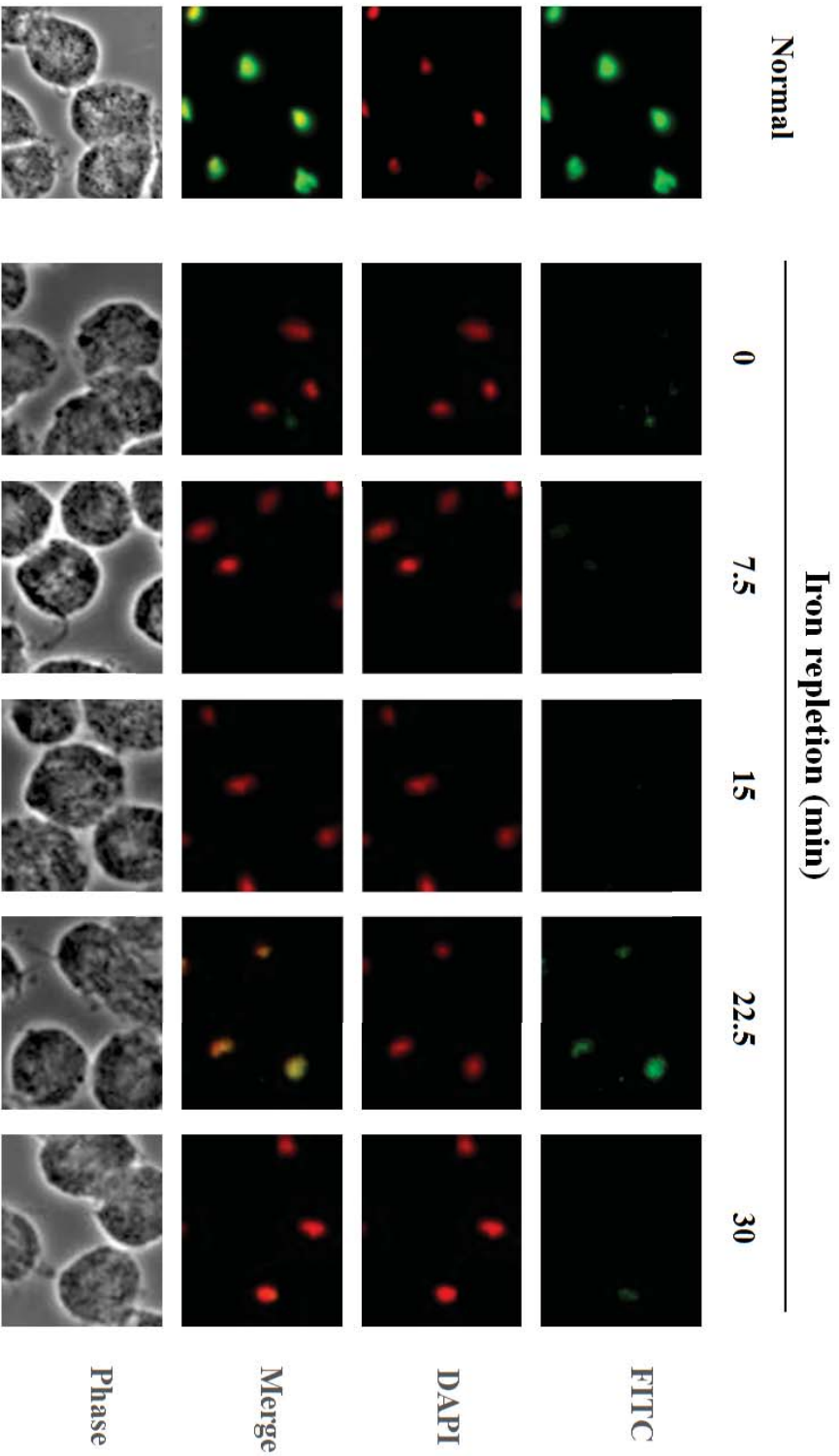




圖廿八· S158A 受鐵離子刺激核輸入及輸出反應與野生株無異

將 S158A 之突變 Myb3 蛋白轉染蟲株培養於低鐵環境下，達對數生長期（細胞濃度約 $1.5\sim 2.0 \times 10^6$ cells / ml）後，在細胞液中加入 $750\mu\text{M}$ 鐵離子作用，並於 0、7.5、15、22.5 及 30 分鐘時，收取細胞液，以 anti-HA 抗體(300 倍稀釋)進行免疫螢光染色分析，觀察突變之 Myb3 蛋白於細胞內的分布情形。FITC 標記 Myb3 位置；DAPI 標記細胞核位置；Merge 為 DAPI 及 FITC 重疊之結果；T1 未轉染細胞株為陰性對照組。

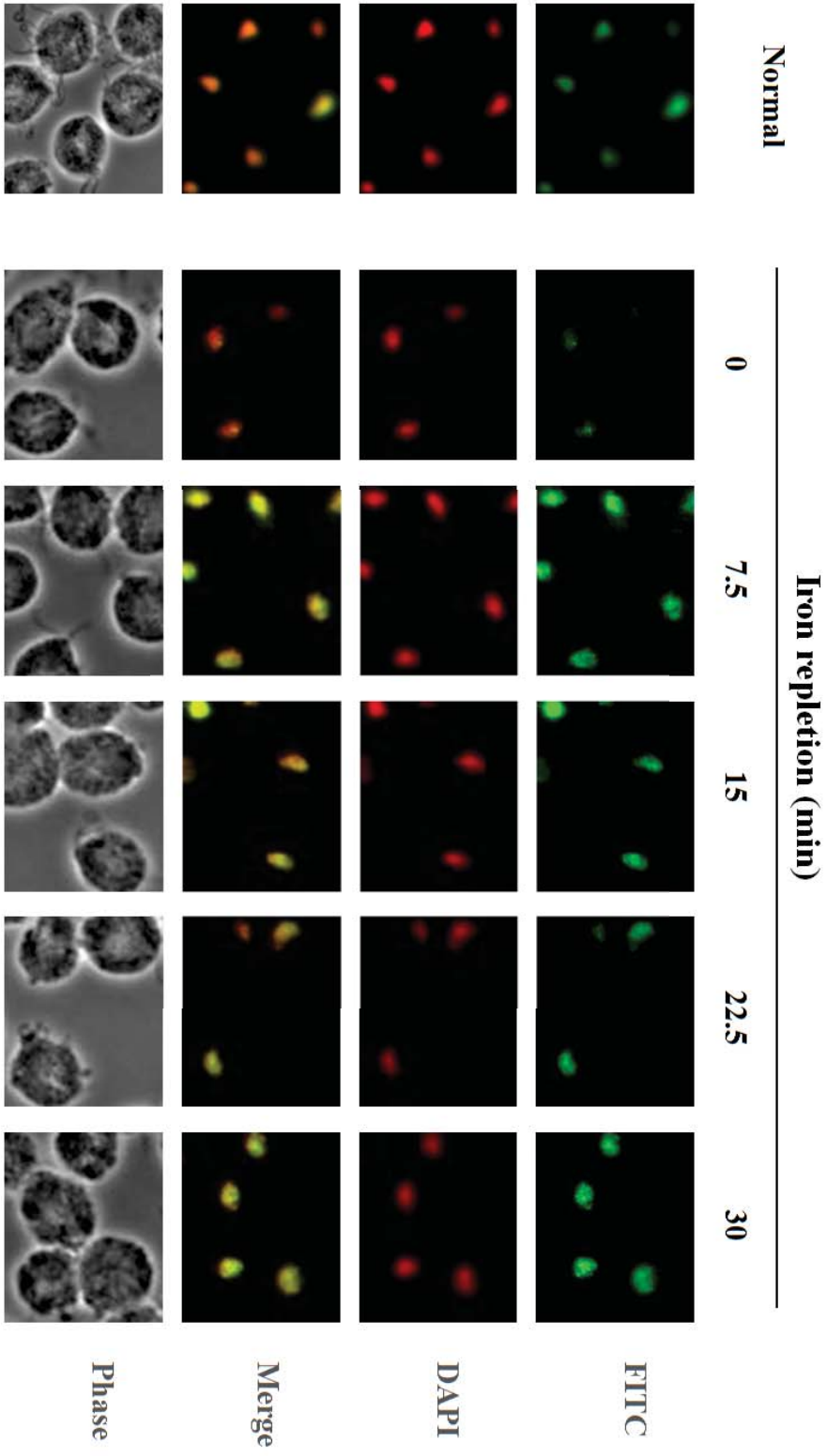




圖廿九 · HKE160-162AAA 於受鐵離子刺激後，核輸入反應延遲

將 HKE160-162AAA 之突變 Myb3 蛋白轉染蟲株培養於低鐵環境下，達對數生長期（細胞濃度約 $1.5\sim 2.0 \times 10^6$ cells / ml）後，在細胞液中加入 $750\mu\text{M}$ 鐵離子作用，並於 0、7.5、15、22.5 及 30 分鐘時，收取細胞液，以 anti-HA 抗體(300 倍稀釋)進行免疫螢光染色分析，觀察突變之 Myb3 蛋白於細胞內的分布情形。FITC 標記 Myb3 位置；DAPI 標記細胞核位置；Merge 為 DAPI 及 FITC 重疊之結果；T1 未轉染細胞株為陰性對照組。

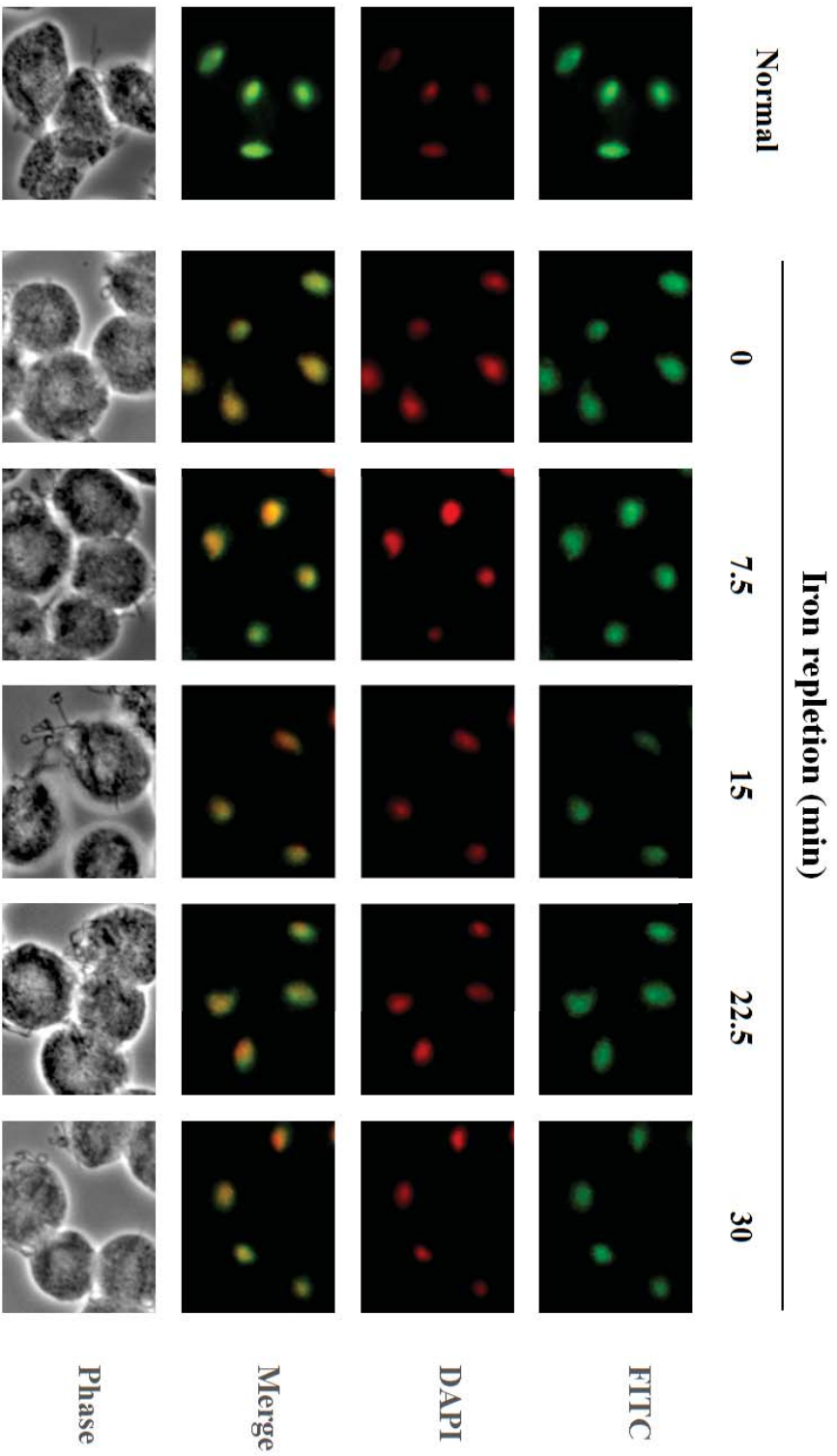




圖卅· ILL163-165AAA 於鐵誘導輸入細胞核後滯留於核中

將 ILL163-165AAA 之突變 Myb3 蛋白轉染蟲株培養於低鐵環境下，達對數生長期（細胞濃度約 $1.5\sim 2.0 \times 10^6$ cells / ml）後，在細胞液中加入 $750\mu\text{M}$ 鐵離子作用，並於 0、7.5、15、22.5 及 30 分鐘時，收取細胞液，以 anti-HA 抗體(300 倍稀釋)進行免疫螢光染色分析，觀察突變之 Myb3 蛋白於細胞內的分布情形。FITC 標記 Myb3 位置；DAPI 標記細胞核位置；Merge 為 DAPI 及 FITC 重疊之結果；T1 未轉染細胞株為陰性對照組。

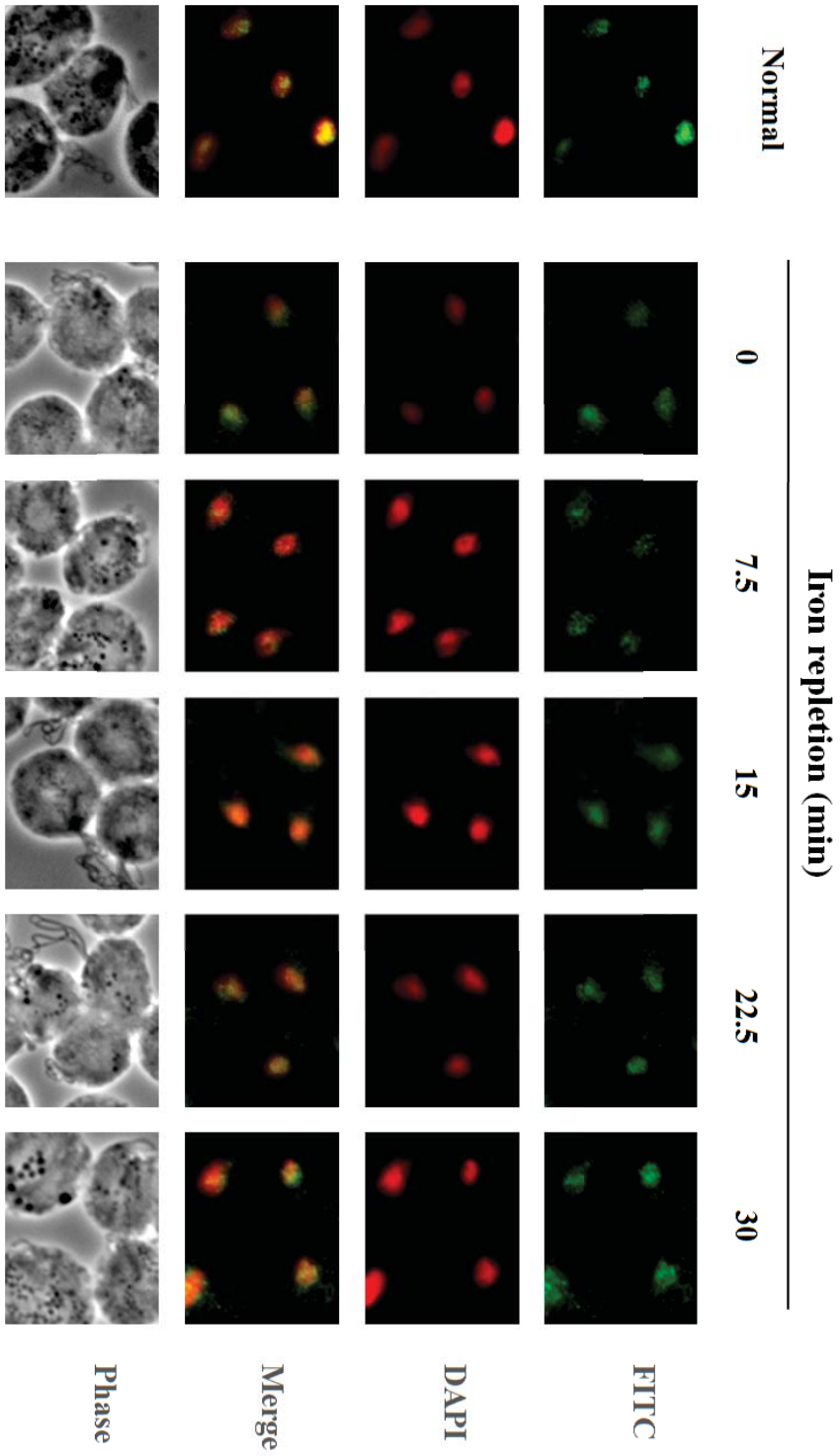




圖卅一· S155 A 於低鐵環境或受鐵刺激後均大量存在細胞核

將 S155A 之突變 Myb3 蛋白轉染蟲株培養於低鐵環境下，達對數生長期（細胞濃度約 $1.5\sim 2.0 \times 10^6$ cells / ml）後，在細胞液中加入 $750\mu\text{M}$ 鐵離子作用，並於 0、7.5、15、22.5 及 30 分鐘時，收取細胞液，以 anti-HA 抗體(300 倍稀釋)進行免疫螢光染色分析，觀察突變之 Myb3 蛋白於細胞內的分布情形。FITC 標記 Myb3 位置；DAPI 標記細胞核位置；Merge 為 DAPI 及 FITC 重疊之結果；T1 未轉染細胞株為陰性對照組。

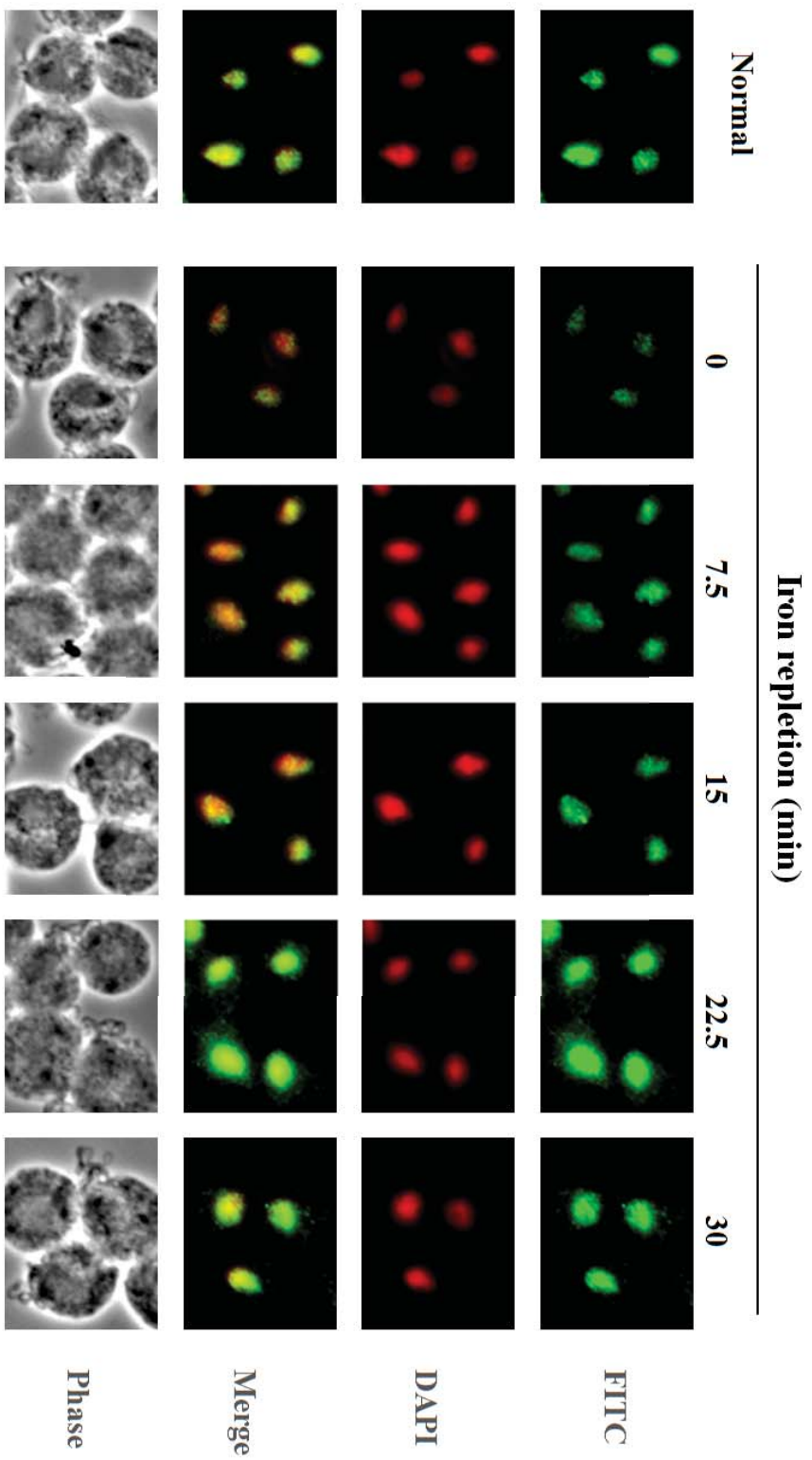




圖卅二 · ST155-156AA 於低鐵環境或受鐵刺激後均存在細胞核

將 ST155-156AA 之突變 Myb3 蛋白轉染蟲株培養於低鐵環境下，達對數生長期（細胞濃度約 $1.5\sim 2.0 \times 10^6$ cells / ml）後，在細胞液中加入 $750\mu\text{M}$ 鐵離子作用，並於 0、7.5、15、22.5 及 30 分鐘時，收取細胞液，以 anti-HA 抗體(300 倍稀釋)進行免疫螢光染色分析，觀察突變之 Myb3 蛋白於細胞內的分布情形。FITC 標記 Myb3 位置；DAPI 標記細胞核位置；Merge 為 DAPI 及 FITC 重疊之結果；T1 未轉染細胞株為陰性對照組。

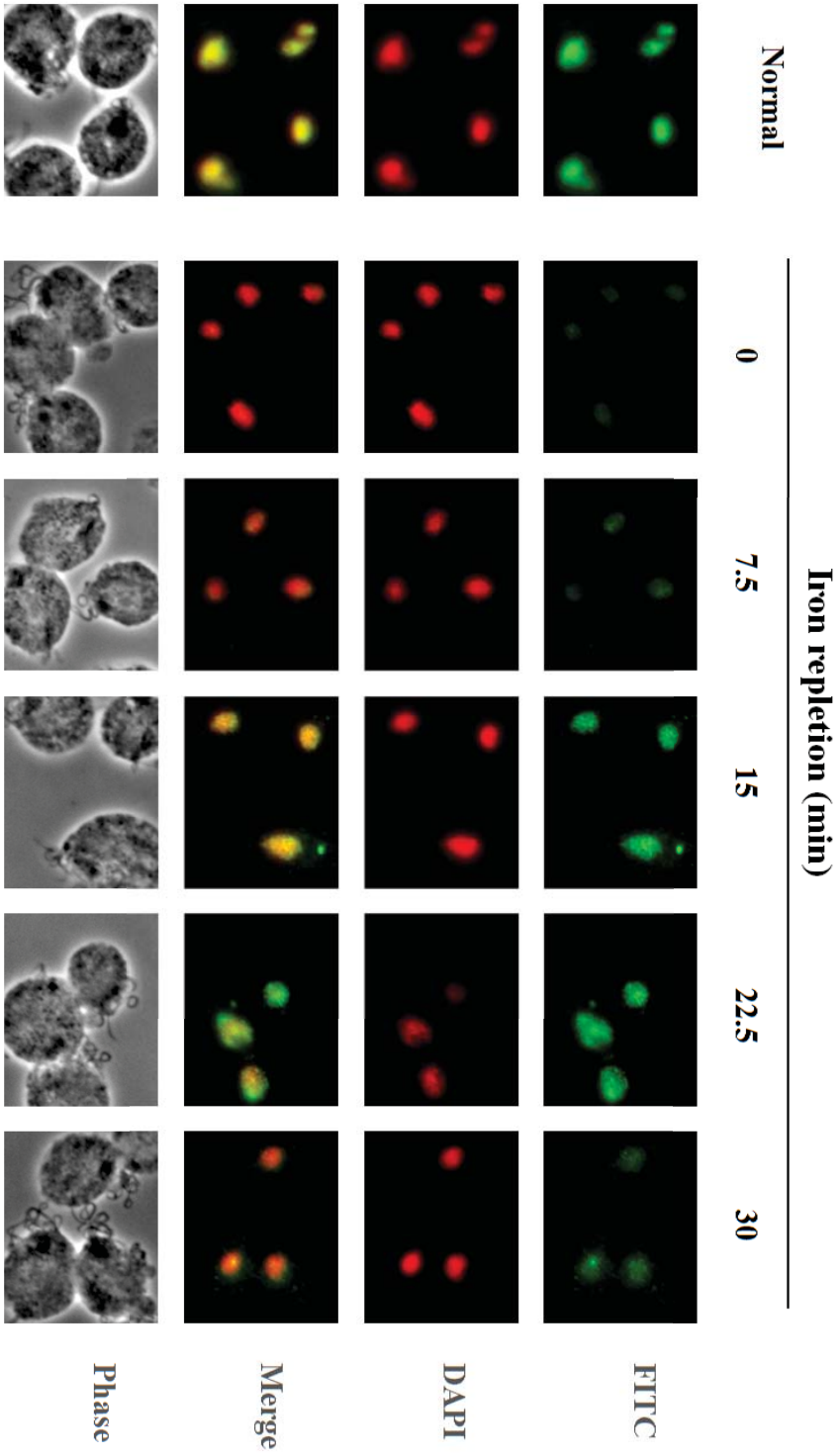




圖卅三· T156 A 受鐵刺激後之核輸出時間延後

將 T156A 之突變 Myb3 蛋白轉染蟲株培養於低鐵環境下，達對數生長期（細胞濃度約 $1.5\sim 2.0 \times 10^6$ cells / ml）後，在細胞液中加入 $750\mu\text{M}$ 鐵離子作用，並於 0、7.5、15、22.5 及 30 分鐘時，收取細胞液，以 anti-HA 抗體(300 倍稀釋)進行免疫螢光染色分析，觀察突變之 Myb3 蛋白於細胞內的分布情形。FITC 標記 Myb3 位置；DAPI 標記細胞核位置；Merge 為 DAPI 及 FITC 重疊之結果；T1 未轉染細胞株為陰性對照組。

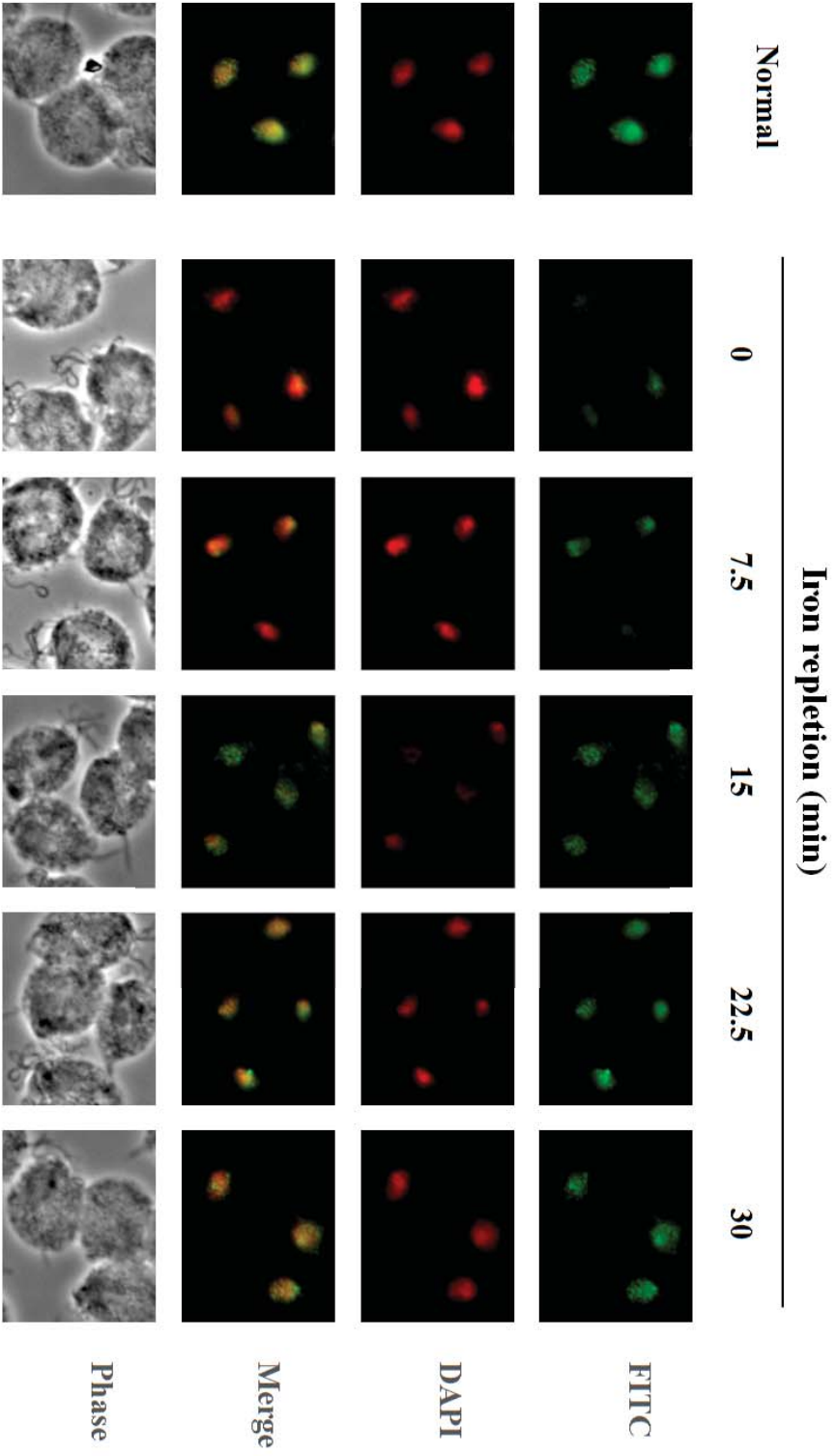




圖卅四 · S149 A 受鐵刺激後之核輸出時間延後

將 S149 A 之突變 Myb3 蛋白轉染蟲株培養於低鐵環境下，達對數生長期（細胞濃度約 $1.5\sim 2.0 \times 10^6$ cells / ml）後，在細胞液中加入 $750\mu\text{M}$ 鐵離子作用，並於 0、7.5、15、22.5 及 30 分鐘時，收取細胞液，以 anti-HA 抗體(300 倍稀釋)進行免疫螢光染色分析，觀察突變之 Myb3 蛋白於細胞內的分布情形。FITC 標記 Myb3 位置；DAPI 標記細胞核位置；Merge 為 DAPI 及 FITC 重疊之結果；T1 未轉染細胞株為陰性對照組。

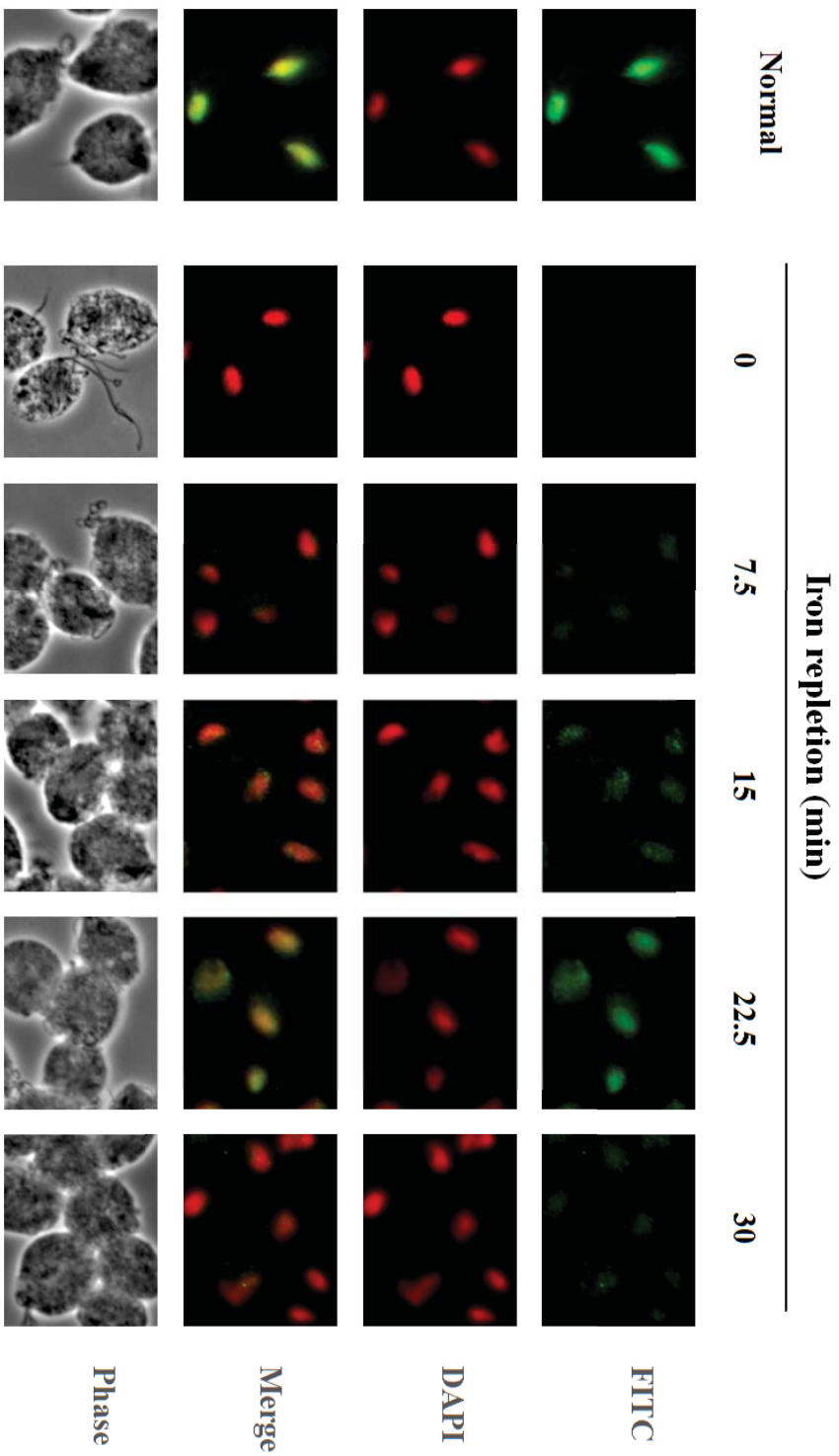




圖卅五·SS148-149A A 受鐵刺激後之核輸出時間延後

將 S149 A 之突變 Myb3 蛋白轉染蟲株培養於低鐵環境下，達對數生長期（細胞濃度約 $1.5\sim 2.0 \times 10^6$ cells / ml）後，在細胞液中加入 $750\mu\text{M}$ 鐵離子作用，並於 0、7.5、15、22.5 及 30 分鐘時，收取細胞液，以 anti-HA 抗體(300 倍稀釋)進行免疫螢光染色分析，觀察突變之 Myb3 蛋白於細胞內的分布情形。FITC 標記 Myb3 位置；DAPI 標記細胞核位置；Merge 為 DAPI 及 FITC 重疊之結果；T1 未轉染細胞株為陰性對照組。

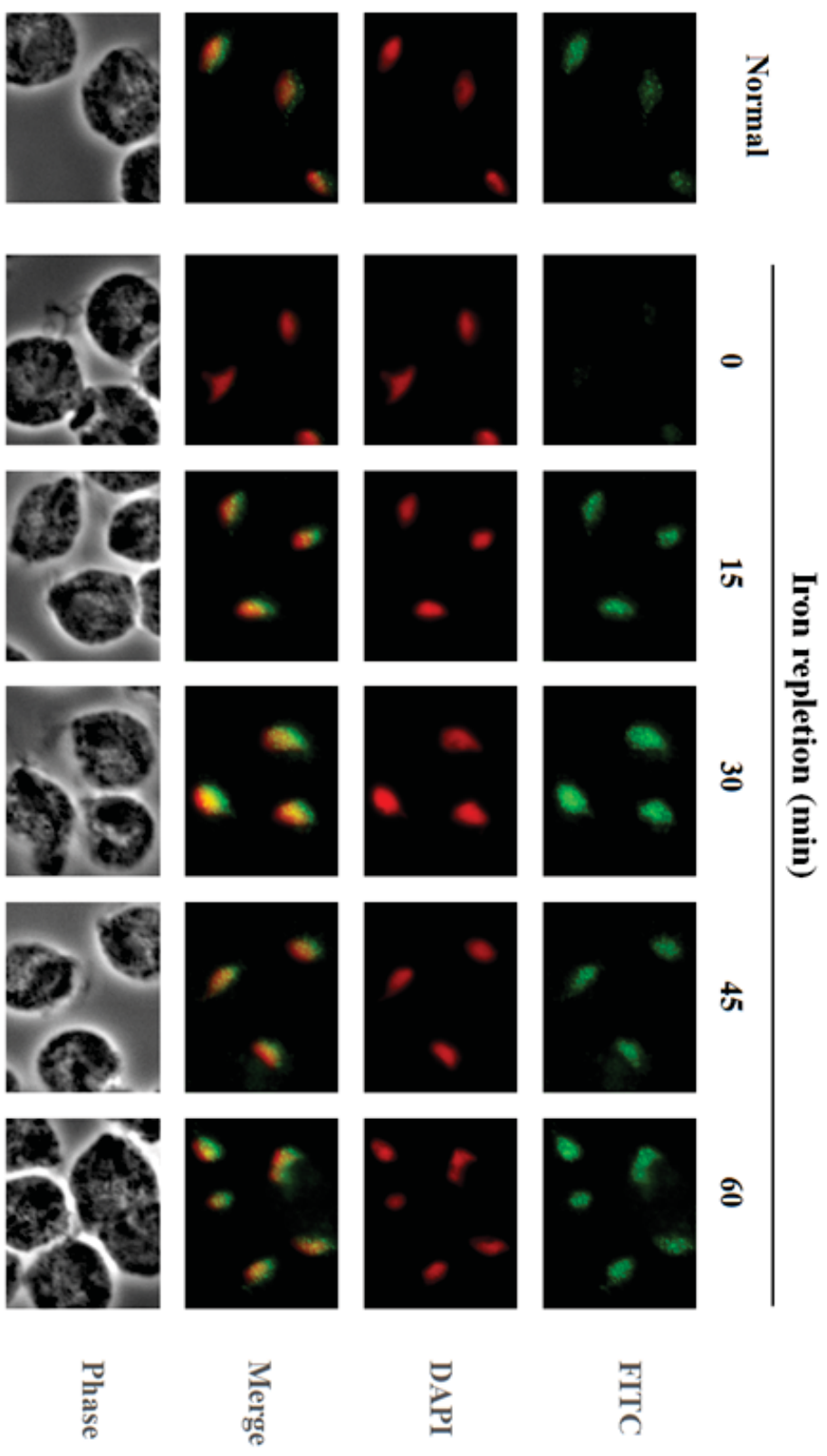




圖卅六· S148 A 受鐵刺激後之核輸入時間延後

將 S148 A 之突變 Myb3 蛋白轉染蟲株培養於低鐵環境下，達對數生長期（細胞濃度約 $1.5\sim 2.0 \times 10^6$ cells / ml）後，在細胞液中加入 $750\mu\text{M}$ 鐵離子作用，並於 0、7.5、15、22.5 及 30 分鐘時，收取細胞液，以 anti-HA 抗體(300 倍稀釋)進行免疫螢光染色分析，觀察突變之 Myb3 蛋白於細胞內的分布情形。FITC 標記 Myb3 位置；DAPI 標記細胞核位置；Merge 為 DAPI 及 FITC 重疊之結果；T1 未轉染細胞株為陰性對照組。

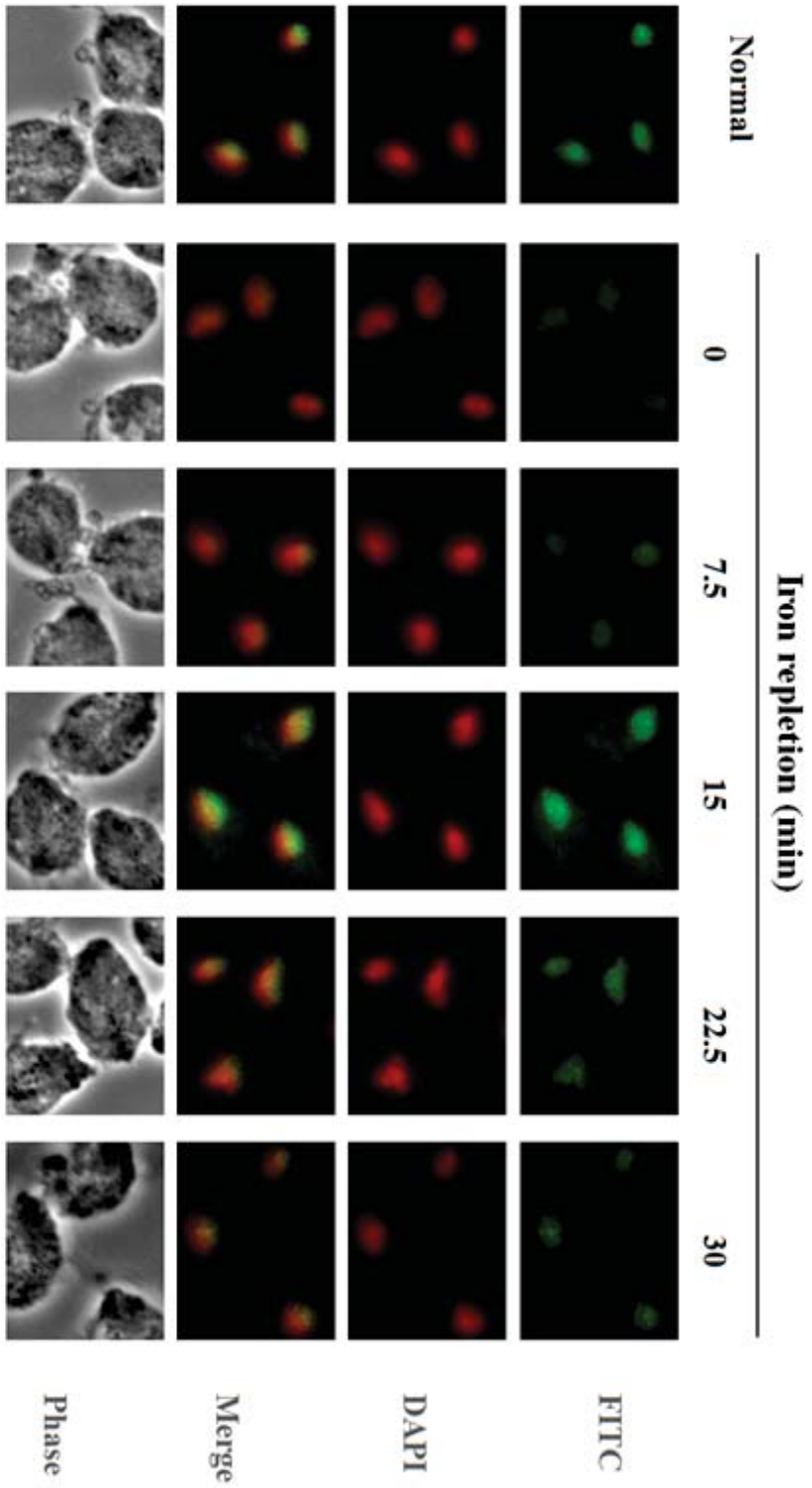




圖卅七· S203A 於鐵誘導輸入細胞核後滯留於核中

將 S203 A 之突變 Myb3 蛋白轉染蟲株培養於低鐵環境下，達對數生長期（細胞濃度約 $1.5\sim 2.0 \times 10^6$ cells / ml）後，在細胞液中加入 $750\mu\text{M}$ 鐵離子作用，並於 0、15、30、45 及 60 分鐘時，收取細胞液，以 anti-HA 抗體(300 倍稀釋)進行免疫螢光染色分析，觀察突變之 Myb3 蛋白於細胞內的分布情形。FITC 標記 Myb3 位置；DAPI 標記細胞核位置；Merge 為 DAPI 及 FITC 重疊之結果；T1 未轉染細胞株為陰性對照組。

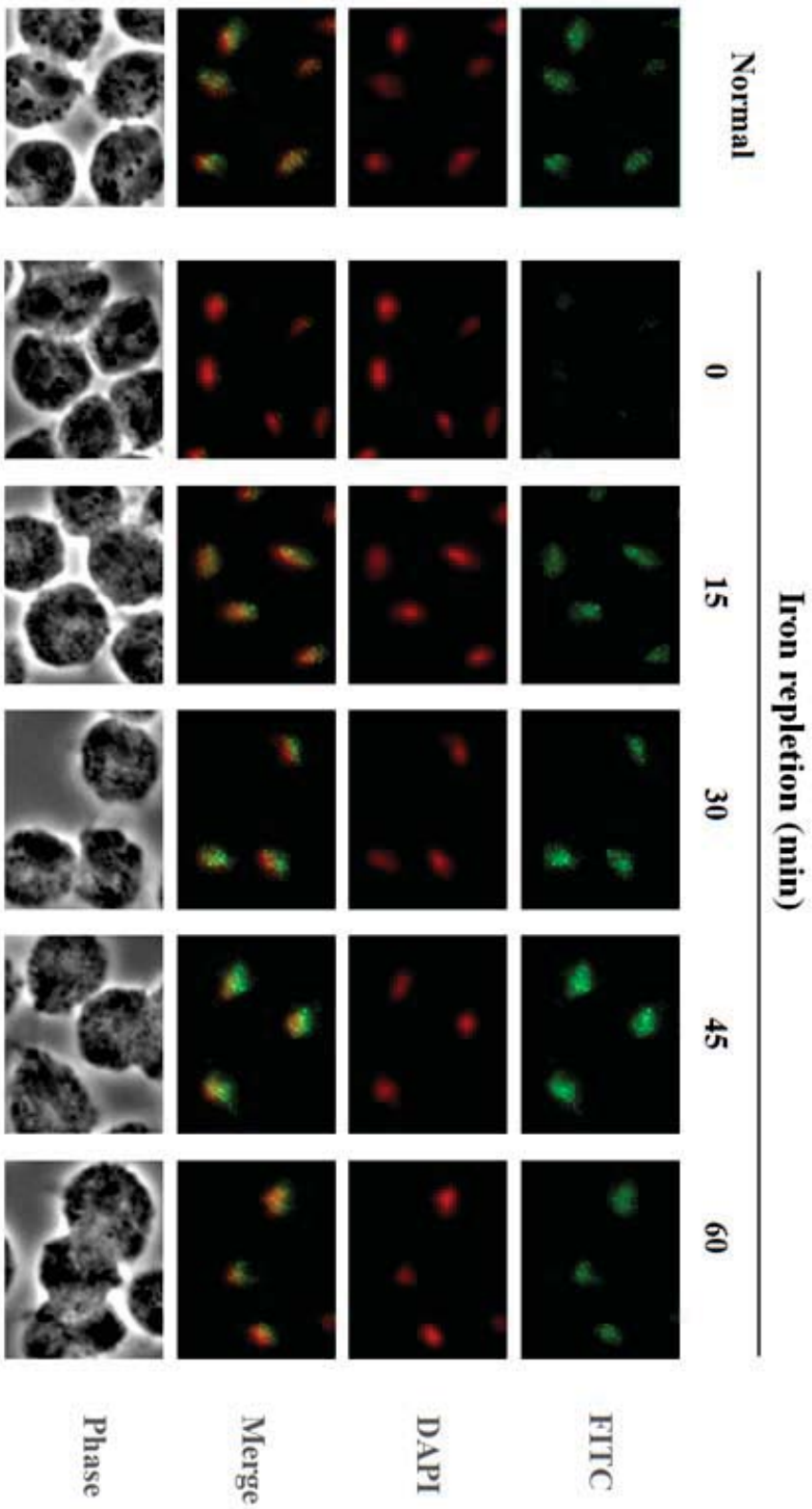




圖卅八· S87A 之表現型與野生株相似

將 S87 A 之突變 Myb3 蛋白轉染蟲株培養於低鐵環境下，達對數生長期（細胞濃度約 $1.5\sim 2.0 \times 10^6$ cells / ml）後，在細胞液中加入 $750\mu\text{M}$ 鐵離子作用，並於 0、7.5、15、22.5 及 30 分鐘時，收取細胞液，以 anti-HA 抗體(300 倍稀釋)進行免疫螢光染色分析，觀察突變之 Myb3 蛋白於細胞內的分布情形。FITC 標記 Myb3 位置；DAPI 標記細胞核位置；Merge 為 DAPI 及 FITC 重疊之結果；T1 未轉染細胞株為陰性對照組。

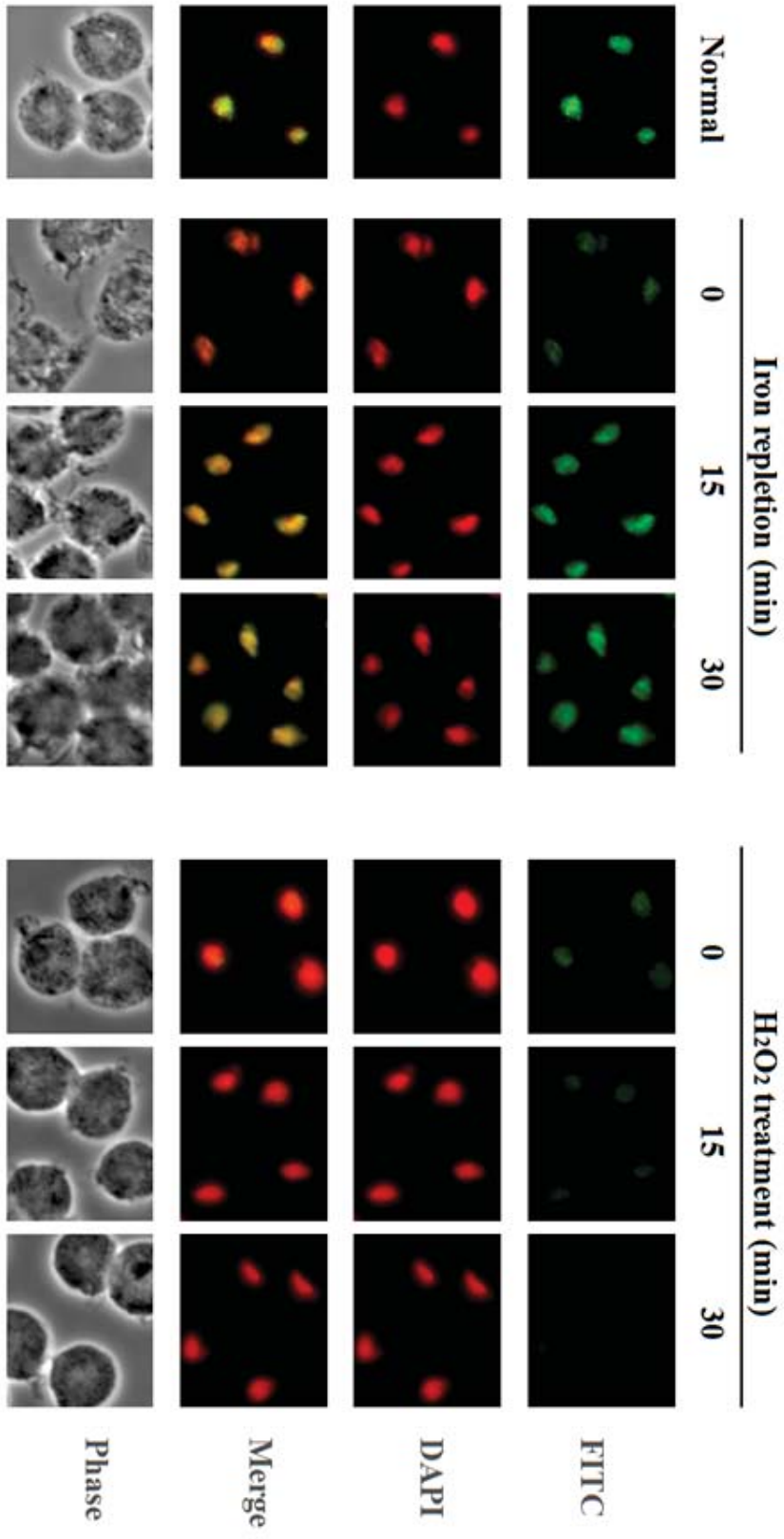




圖卅九 · KKRK170-173AAAA 於鐵誘導輸入細胞核後滯留於核中

將 KKRK170-173AAAA 之突變 Myb3 蛋白轉染蟲株培養於低鐵環境下，達對數生長期(細胞濃度約 $1.5\sim 2.0 \times 10^6$ cells / ml) 後，在細胞液中加入 $750\mu\text{M}$ 鐵離子作用，並於 0、15、30、45 及 60 分鐘時，收取細胞液，以 anti-HA 抗體(300 倍稀釋)進行免疫螢光染色分析，觀察突變之 Myb3 蛋白於細胞內的分布情形。FITC 標記 Myb3 位置；DAPI 標記細胞核位置；Merge 為 DAPI 及 FITC 重疊之結果；T1 未轉染細胞株為陰性對照組。





圖冊·C91S 於添加鐵離子及過氧化氫刺激之表現型差異

將 C91S 之突變 Myb3 蛋白轉染蟲株培養於低鐵環境下，達對數生長期（細胞濃度約 $1.5\sim 2.0 \times 10^6$ cells / ml)後，在細胞液中加入 750 μ M 鐵離子或 250 μ M 過氧化氫作用，並於 0、15 及 30 分鐘時，收取細胞液，以 anti-HA 抗體(300 倍稀釋)進行免疫螢光染色分析，觀察突變之 Myb3 蛋白於細胞內的分布情形。FITC 標記 Myb3 位置；DAPI 標記細胞核位置；Merge 為 DAPI 及 FITC 重疊之結果；T1 未轉染細胞株為陰性對照組。



參考文獻

1. **Allison Lange, Ryan E. Mills, Christopher J. Lange, Murray Stewart, Scott E. Devine, and Anita H. Corbett.** (2007) Classical Nuclear Localization Signals: Definition, Function, and Interaction with Importin. *The Journal of Biological Chemistry* 282: 8, 5101–5105
2. **C. R. McCudden, M. D. Hains, R. J. Kimple, D. P. Siderovski and F. S. Willard.** (2005) G-protein signaling: back to the future. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 62 551–577
3. **Carlton JM, Hirt RP, Silva JC, Delcher AL, Schatz M, Zhao Q, Wortman JR.** (2007) Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science* 315: 207–212
4. **Coombs GH, Westrop GD, Suchan P, Puzova G, Hirt RP, Embley TM, Mottram JC, Müller S.** (2004) The amitochondriate eukaryote *Trichomonas vaginalis* contains a divergent thioredoxin-linked peroxiredoxin antioxidant system. *J Biol Chem* 279:5249–5256
5. **Cotch MF, Pastorek JG 2nd, Nugent RP, Hillier SL, Gibbs RS, Martin DH, Eschenbach DA, Edelman R, Carey JC, Regan JA, Krohn MA, Klebanoff MA, Rao AV, Rhoads GG .** (1997) *Trichomonas vaginalis* associated with low birth weights and preterm delivery. *Sex Transm Dis* 24: 353–360
6. **Gorrell, T.E.** (1985) Effect of culture medium iron content on the biochemical composition and metabolism of *Trichomonas vaginalis*. *J. Bacteriol.* 161, 1228–1230
7. **Gram IT, Macaluso M, Churchill J, Stalsberg H.** (1992) *Trichomonas vaginalis* and human papilloma virus infection and the incidence of cervical intraepithelial neoplasia grade III.

8. **Hsu, H.M., S. J. Ong, M. C. Lee, H. W. Liu, and J. H. Tai.** (2009) Transcriptional regulation of an iron-inducible gene by differential and alternate promoter entries of multiple Myb proteins in the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*. *Eukaryot. Cell* 8:362-372.
9. **Il-Hoan Oh and E Premkumar Reddy.** (1999) The myb gene family in cell growth, differentiation and apoptosis *Oncogene*. 18: 3017 -3033
10. **J. S. Ryu, H. K. Choi, D. Y. Min, S. E. Ha, and M. H. Ahn.** (2001) Effect of Iron on the Virulence of *Trichomonas vaginalis* *J. Parasitol.*, 87(2), p. 457-460
11. **Kostas Pantopoulos.** (2004) Iron Metabolism and the IRE/IRP Regulatory System: an Update. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1012: 1-13
12. **Ong, S. J., H. M. Hsu, H. W. Liu, C. H. Chu, and J. H. Tai.** (2006) Multifarious transcriptional regulation of adhesion protein gene ap65-1 by a novel Myb1 protein in the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*. *Eukaryot. Cell* 5:391-399.
13. **Ong, S. J., H. M. Hsu, H. W. Liu, C. H. Chu, and J. H. Tai.** (2007) Activation of multifarious transcription of an adhesion protein ap65-1 gene by a novel Myb2 protein in the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*. *J. Biol. Chem.* 282:6716-25.
14. **Raina N. Fichorova.** (2009) Impact of *T. vaginalis* infection on innate immune responses and reproductive outcome. *Journal of Reproductive Immunology* 83: 185–189
15. **Sarah L. Cudmore, Kiera L. Delgaty, Shannon F. Hayward-McClelland, Dino P. Petrin, and Gary E. Garber.** (2004) Treatment of Infections Caused by

Metronidazole-Resistant *Trichomonas vaginalis*. Clin Microbiol Rev. 17(4): 783–793.

16. **Sara R. Davis and William B. Lushbaugh.** (1993) Oxidative stress and *Trichomonas vaginalis*: the effect of hydrogen peroxide in vitro. Am. J. Trop. Med. Hyg. 48(4): 480-487
17. **Shafir, S. C., F. J. Sorvillo, and L. Smith.** (2009) Current issues and considerations regarding trichomoniasis and human immunodeficiency virus in African-Americans. Clin. Microbiol. Rev. 22:37–45.
18. **Sharon L Campbell, Roya Khosravi-Far, Kent L Rossman, Geoffrey J Clark and Channing J Der.** (1998) Increasing complexity of Ras signaling. Oncogene 17, 1395 ± 1413
19. **Simon T. Whiteside and Stephen Goodbourn.** (1993) Signal transduction and nuclear targeting: regulation of transcription factor activity by subcellular localisation. Journal of Cell Science 104, 949-955
20. **Stefan W. Ryter, Hong Pyo Kim, Alexander Hoetzel, Jeong W. Park, Kiichi Nakahira, Xue Wang, and Augustine M.K. Choi.** (2007) Mechanisms of Cell Death in Oxidative Stress. Antioxidants and redox signaling 9: 1, 49-89
21. **Stephen E. Hawes, Sharon L. Hillier, Jacqueline Benedetti, Claire E. Stevens, Laura A. Koutsky, Pal Welner-Hanssen, and King K. Holmes.** (1996) Hydrogen Peroxide-Producing Lactobacilli and Acquisition of Vaginal Infections The Journal of Infectious Diseases 174: 1058-63
22. **Thurman AR, Doncel GF.** (2010) Innate immunity and inflammatory response to *Trichomonas vaginalis* and bacterial vaginosis: relationship to HIV acquisition. Am J Reprod Immunol. doi:10.1111/j.1600-0897.2010.00902.x

23. **Tsai, C. D., H. W. Liu, and J. H. Tai.** (2002) Characterization of an iron-responsive promoter in the protozoan pathogen *Trichomonas vaginalis*. *J. Biol. Chem.* 277:5153-5162.
24. **World Health Organization.** (1999) Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted diseases: overview and estimates.
25. **張怡婷.** 2010. 陰道滴蟲 Myb3 蛋白質降解機制之分析. 台灣大學微生物研究所碩士論文

