

國立台灣大學醫學院微生物研究所

碩士論文

Graduate Institute of Microbiology

College of Medicine


National Taiwan University

Master Thesis

梨形鞭毛蟲拓樸異構酶-II 的鑑定與功能分析

Characterization and Functional Study of

Topoisomerase II in *Giardia lamblia*



林柏齊

Bo-Chi Lin

指導教授：孫錦虹 博士

Advisor: Chin-Hung Sun, 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

梨形鞭毛蟲拓模異構酶-II 的鑑定與功能分析

**Characterization and Functional Study of  
Topoisomerase II in *Giardia lamblia***

本論文係林柏齊君 (R98445203) 在國立臺灣大學微生物所寄生蟲學組完成之碩 (博) 士學位論文，於民國壹百年七月七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：

李錦忠

(指導教授)

李財坤

李海立

系主任、所長

鄧述諱

## 致謝

很高興此刻終於將這份論文在這邊畫下一個句點，回想一開始進入這實驗室時，對很多實驗器具和藥品很不熟，實驗的操作方式也是不大會，常常要麻煩實驗室裡的學長姐，實驗的進度也不算是太順利，為了要確定自己研究的方向，確實是吃了許多苦頭，現在回想起來那段日子還真是不可思議。在這研究所的兩年過程裡，學到的不只是寄生蟲和分子生物學上了知識和技術，其實更重要的是在這過程中我知道了我自己做事的缺點，我想這對我來說是很重要的，我想對我以後會有很大的幫助，所以很感謝老師用一個這麼好的方式在領導他的學生，適時的在教導我的過程中有一些叮嚀，提醒我一些我所犯的過錯，而這就是讓我知道自己缺點所在，也很感謝實驗室的立欣學姊、玉嬌學姐和昭成學長在實驗上給予我很多教導，加偉學弟和紹維學弟也在實驗上給我很大的幫助，也很開心和我一起進研究所的同學佳好、盈君、嘉偉、李由，我們一起努力完成了這兩年來大大小小的考試、專討和報告，當然也包括各自的論文，恭喜大家可以一起畢業，再朝向下一個目標前進。感謝我的口試委員李財坤老師和詹迺立老師在我的論文內給我很多很專業的建議和幫助，也謝謝李老師實驗室的王學姐和梁同學，還有詹老師實驗室的吳學姐，在我實驗上遇到問題時給我的幫助。也很感謝台灣大學給我們一個好環境，好設備，做我們研究的後盾。最後我要謝謝我的家人，以前從來沒想過我可以從台大研究所畢業，謝謝你們給我的支持，讓我可以讀書讀到碩士，在未來我會用我最大的努力來回報你們給我的一切。

## 摘要

梨形鞭毛蟲是具有鞭毛的單細胞生物，它是全世界造成腹瀉的常見原因之一。根據 16s rRNA 序列分析，梨形鞭毛蟲是非常原始的真核生物。已經有研究發現在梨形鞭毛蟲的基因體存在有拓樸異構酶-II 的基因。拓樸異構酶-II 的功能是當基因進行轉錄或是 DNA 複製時負責對 DNA 進行解螺旋和恢復超螺旋結構。先前研究發現梨形鞭毛蟲 Myb2 蛋白是一個重要的轉錄因子之一，負責調節囊體化時期大量表現之基因。而我們也在梨形鞭毛蟲拓樸異構酶-II 基因的啟動子上找到了 Myb2 蛋白的結合位置，所以本研究目標是想要了解在梨形鞭毛蟲囊體化過程中，拓樸異構酶所扮演的角色。我們發現拓樸異構酶-II 基因在囊體化時期 mRNA 的表現上升，而且拓樸異構酶-II 基因的啟動子活性也在囊體化時期上升，表示拓樸異構酶-II 在囊體化時期表現量提高，可能在這個時期有某些功能或作用。而梨形鞭毛蟲拓樸異構酶-II 的序列也和真核生物的拓樸異構酶-II 相似。從電泳位移分析實驗中得知拓樸異構酶-II 和其 C 端部分也具有結合雙股 DNA 的能力，並且也具有切割雙股 DNA 的能力。從分解 ATP 活性分析中得知拓樸異構酶-II 和其 N 端部分也具有分解 ATP 能力。Etoposide 是一種抗腫瘤藥物，在藥物治療上此藥物屬於拓樸異構酶-II 的抑制劑。以添加濃度為 400 $\mu$ M 的抑制劑-etoposide，觀察梨形鞭毛蟲的生長情形，發現加藥後 3~24 小時滋養體數目明顯少於對照組。表示 etoposide 可以抑制滋養體的生長。在進行囊體化 24 小時期間添加濃度 400 $\mu$ M 的 etoposide，也發現囊體數目明顯少於對照組，表示 etoposide 也會抑制梨形鞭毛蟲從滋養體分化成囊體。而在過度表現拓樸異構酶-II 細胞株中我們發現細胞形成囊體的能力有上升的情形，且一些與囊體化相關的基因表現都有上升，例如 *cwp1*、*cwp2*、*myb*，表示拓樸異構酶確實在梨形鞭毛蟲囊體化過程中扮演一個重要的角色。

關鍵字:梨形鞭毛蟲、拓樸異構酶、囊壁蛋白、囊體化、etoposide

## Abstract

*Giardia lamblia* is a flagellated unicellular eukaryotic microorganism that commonly causes diarrheal disease throughout the world. According to the 16s rRNA sequence analysis, *G. lamblia* has been proposed as an early branching eukaryote. A gene encoding type II DNA topoisomerase was identified in *G. lamblia* genome. Topoisomerases are enzymes that unwind and wind DNA, in order for genes to be transcribed and to facilitate DNA replication. Myb2 protein is a transcription factor that regulates some genes that were highly expressed during encystation stage. We found that a Myb2 binding site is present in the topoisomerase II gene promoter. The aim of this study is to understand the role of topoisomerase II in *Giardia* encystation. We found that the endogenous topoisomerase II mRNA levels increases significantly during encystation. The topoisomerase II activity tested by a luciferase reporter system also increased during encystation. The results suggest that topoisomerase II gene may be upregulated during encystation stage and it may have some function in this stage. The sequence of the *G. lamblia* topoisomerase II is similar to that of the eukaryotic topoisomerase II. EMSA data indicate that topoisomerase II and C-terminal part of topoisomerase II can bind to double stranded DNA, and topoisomerase II and C-terminal part of topoisomerase II have double stranded DNA cleavage ability. ATPase data indicate that topoisomerase II and N-terminal part of topoisomerase II can hydrolyze ATP. Etoposide is an anti-cancer chemotherapy drug. This medication is classified as a topoisomerase II inhibitor. We added etoposide in trophozoite cultures at 400 $\mu$ M concentration and observed cell growth, and found that the cell number decreased significantly 3~24 h after treatment. The results suggest that topoisomerase II may lead to inhibition of *G. lamblia* cell growth. Addition of 400 $\mu$ M etoposide also resulted a significant decrease of cyst number during 24h

encystation, suggesting that topoisomerase II may inhibit *G. lamblia* differentiation into cysts. Overexpression of topoisomerase II resulted in an increase in the levels of cyst formation and expression of genes for encystation, including *cwp1*, *cwp2* and *myb* genes, suggesting that topoisomerase II plays an important role in the encystation of *G. lamblia*.

Keywords: *Giardia lamblia* 、 topoisomerase II 、 cyst wall protein 、 etoposide 、 encystation



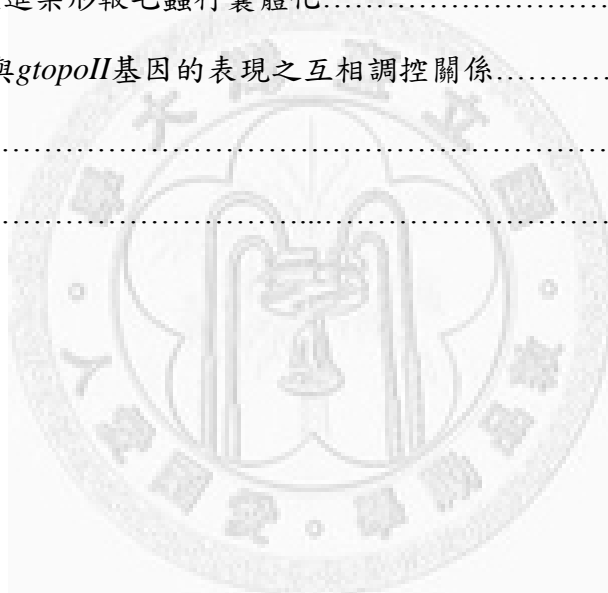
# 目 錄

口試委員會審定書.....	i
誌謝.....	ii
中文摘要.....	iii
英文摘要.....	iv
第一章 前言.....	1
1.1 簡介.....	1
1.2 拓樸異構酶.....	2
1.3 研究動機.....	5
第二章 材料與方法.....	7
2.1 梨形鞭毛蟲細胞株的培養.....	7
2.2 轉殖質體的建構.....	7
2.2.1 5'Δ5N-Pac.....	7
2.2.2 pPgTopoIIWT.....	7
2.2.3 pPgTopoII <sub>m1</sub> .....	8
2.2.4 pPgTopoII <sub>m2</sub> .....	8
2.2.5 pPgTopoII <sub>m3</sub> .....	9
2.3 重組 gTopoII 以及突變 gTopoII 蛋白質的表現載體建構.....	9
2.3.1 gTopoII.....	9
2.3.2 gTopoII-N.....	10
2.3.3 gTopoII-C.....	10
2.3.4 gTopoII-C <sub>m1</sub> .....	10
2.3.5 gTopoII-C <sub>m2</sub> .....	11
2.3.6 gTopoII-C <sub>m3</sub> .....	11

2.4 轉殖質體的轉型與萃取.....	11
2.4.1 質體的轉型 (transformation) .....	11
2.4.2 質體的萃取.....	12
2.5 重組蛋白的表現與純化.....	12
2.6 梨形鞭毛蟲的轉染與選殖.....	13
2.7 反轉錄聚合酶鏈式反應 (RT-PCR) .....	13
2.8 西方墨點法 (Western blot) 與 Coomassie blue 染色.....	14
2.8.1 西方墨點法.....	14
2.8.2 Coomassie blue 染色.....	15
2.9 免疫螢光染色 (Immunofluorescence assay) .....	15
2.10 Electoretic Mobility Shift Assays (EMSA) .....	16
2.11 切割 DNA 活性分析.....	16
2.12 水解 ATP 活性分析.....	16
第三章 實驗結果.....	18
3.1 梨形鞭毛蟲 <i>gtopoII</i> 基因序列及胺基酸序列分析.....	18
3.2 以 RT-PCR 及 luciferase 偵測滋養體時期和囊體時期 <i>gtopoII</i> 基因的 mRNA 表現量與啟動子活性.....	19
3.3 梨形鞭毛蟲 <i>gtopoII</i> 基因的表現.....	20
3.4 梨形鞭毛蟲拓撲異構酶、N 端、C 端切割雙股 DNA 活性分析.....	20
3.5 梨形鞭毛蟲拓撲異構酶、N 端、C 端 ATPase 活性分析.....	21
3.6 梨形鞭毛蟲拓撲異構酶、N 端、C 端結合雙股 DNA 活性分.....	22
3.7 利用不同基因的啟動子序列鑑定 gTopoII-C 端蛋白與 DNA 結合能...22	
3.8 抗腫瘤藥物 etoposide 抑制梨形鞭毛蟲生長.....	23
3.9 抗腫瘤藥物 etoposide 抑制滋養體時期梨形鞭毛蟲 Cwp1 表現.....	25
3.10 抗腫瘤藥物 etoposide 抑制梨形鞭毛蟲形成囊體.....	25



3.11 鑑定突變 gTopoII 的表現以及切割和結合 DNA 的能力.....	26
3.12 分析gTopoII以及gTopoII突變蛋白對於囊體化相關基因的調控和囊體 形成的影響.....	27
第四章 討論.....	29
4.1 梨形鞭毛蟲 TopoII 蛋白功能區域分析.....	29
4.2 gTopoII 具有與鎂離子結合區域.....	30
4.3 gTopoII 偏好與 AT-rich 序列做結合.....	31
4.4 Etoposide對梨形鞭毛蟲的生長和分化的影響.....	31
4.5 gTopoII促進梨形鞭毛蟲行囊體化.....	32
4.6 <i>myb</i> 基因與 <i>gtopoII</i> 基因的表現之互相調控關係.....	32
附圖.....	34
參考文獻.....	68



## 第一章 前言

### 1.1 簡介

梨形鞭毛蟲(*Giardia lamblia*)是一種人體腸道的致病性原蟲類寄生蟲，為世界性分布，每年造成 2 億 8000 萬個感染病例(Lane and Lloyd, 2002)。感染途徑主要為透過食入受汙染的食物及飲水(Adam, 2001)，感染型的梨形鞭毛蟲可存活在環境中非常長的時間，且只要接觸少量的感染型梨形鞭毛蟲即會被感染(10 cyst)(Rendtorff, 1954)。首次是在 1681 年 van Leeuwenhoek 利用顯微鏡觀察自己腹瀉之糞便而發現，至今已被認為是主要造成人類和哺乳類動物腹瀉原因之一，但致病機制尚未清楚(Ankarklev, 2010)。Giardiasis 的症狀出現在受感染後六到十五天，包含下痢、噁心、嘔吐、上腹部疼痛、體重減輕。容易受感染之族群為孩童、營養不良或是免疫系統缺陷之人 (Ankarklev, 2010)，大約一半左右的感染者在受感染期間並無症狀且會自然痊癒(Farthing, 1997)。

利用 16S rRNA 作演化上的分析，顯示梨形鞭毛蟲是非常原始的真核生物(Sogin *et al.*, 1989)。它有像一般真核生物的細胞核(雙核、4N 染色體)、細胞核膜、細胞骨架等，但缺乏一些一般真核生物所應有的胞器，例如：核仁、過氧化體(peroxisome)等；此外，它是一種厭氧性生物，且欠缺了參與氧化磷酸化的因子以及粒線體(Adam, 2001)，但 Tovar 等人在一些小胞器內發現粒線體的標記蛋白質 IscS 和 IscU，因此目前認為在梨形鞭毛蟲中是具有萎縮的粒線體，稱之為 Mitosome(Tovar *et al.*, 2003)。梨形鞭毛蟲也不具有高基氏體(Golgi apparatus)，但其細胞中有 encystation-specific vesicles(ESVs)的存在，也被認為可能是高基氏體的類似胞器(Marti *et al.*, 2003)。

梨形鞭毛蟲的生活史可以分為兩個時期，包含囊體(cyst)和滋養體(trophozoite)，感染型為囊體，滋養體具有一對吸盤，兩個細胞核，四對鞭毛，會以落葉狀運動。當宿主吃下囊體後，囊體受到胃酸刺激會在小腸進行脫囊

(excystation)，釋出兩個滋養體，滋養體主要寄生在小腸，並在此處大量繁殖。具有吸盤的滋養體會吸附在腸道上皮細胞，進而影響營養素吸收而引起腹瀉等症狀。當進入結腸之後開始進行囊體化(encystation)，經過一次複製形成四個核的囊體並隨糞便排出，如再被宿主吃入則可完成其生活史。在形成囊體時，囊體壁蛋白(cyst wall protein, Cwp)相關的基因需要被大量表現，像是*cwp1*、*cwp2*及*cwp3* (Lujan *et al.*, 1995; Leigh A *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 2003)等，但目前這幾個基因的調控機制並不是非常清楚，已知有數個轉錄因子參與此調控，例如Myb、GARP、WRKY、ARID及Pax(Sun *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2006, Wang *et al.*, 2007, Huang *et al.*, 2008; Pan *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010)。梨形鞭毛蟲Myb蛋白會在囊體化時期大量表現，先前已經有研究指出Myb是一個囊體化時期重要的轉錄因子，並會結合在囊體化時期大量表現之基因的啟動子(promoter) C(T/A)ACAG序列上，例如*cwp1*、*cwp2*及*cwp3*(Sun *et al.*, 2002)。

## 1.2 拓樸異構酶

DNA 拓樸異構酶(Topoisomerase)已經被發現存在於真核生物和原核生物細胞內，功能在於解決 DNA 在生理現象上的拓樸性質的問題(Wang, 1996)。可以催化單股或雙股 DNA 的斷裂，而使斷裂的單股通過到完整的單股 DNA 另一邊，斷裂的雙股 DNA 通過到另一條完整雙股 DNA 的另一邊，造成拓樸性質的改變。當 DNA 進行複製、轉錄時都需要拓樸異構酶的幫助(Wang, 2009)。DNA 拓樸異構酶可以分為 Type I、Type II、兩種不同的類型(Wang, 2009)，而 Type I 又可以細分為 Type IA 和 Type IB，Type II 也可以細分為 Type IIA 和 Type IIB。其中 Type I 拓樸異構酶可以切斷單股 DNA，type II 拓樸異構酶可以切斷雙股 DNA，所有的拓樸異構酶都是利用酵素活性中心的 Tyrosine 做親合性的攻擊去打斷 DNA 的磷酸雙酯鍵(Phosphodiester bond)(Corbett *et al.*, 2004)。

Type II 拓樸異構酶是需要消耗 ATP 來達到打斷雙股 DNA 作用。在 1976 年

首先由 Gellert 等人分離出來(Gellert *et al.*, 1976)，是屬於 Type IIA，此類別包括真核生物的拓樸異構酶-II、細菌的 Gyrase 和拓樸異構酶-IV。真核生物的拓樸異構酶-II 是以同型二聚體(Homodimer)的形式存在於細胞內，而細菌的 Gyrase 和拓樸異構酶-IV 有兩種次單位(subunit)，以異型四聚體(Heterotetramer)的形式存在，GyrA、GyrB 為 Gyrase 的次單位，ParC、ParE 為拓樸異構酶-IV 的次單位(Bergerat *et al.*, 1997)。經過 Type II 拓樸異構酶的催化，可以藉由導入正向螺旋或是負向螺旋改變 DNA 的兩個環繞數(linking number)(Gellert *et al.*, 1976; Brown *et al.*, 1979)。過去研究也發現 Type II DNA 拓樸異構酶也參與在染色體的分離(segregation)和維持染色體的結構(Wang, 2002)。Type IIB 是由 Bergerat 等人發現(Bergerat *et al.*, 1994)，包括了古細菌和一些植物中都發現有拓樸異構酶-VI 的存在(Kevin *et al.*, 2007)，也有兩種次單位 A 和 B，但拓樸異構酶-VI 的構型和其他種類的拓樸異構酶不太一樣，在序列上有別於其它種類的拓樸異構酶，因此 Type II DNA 拓樸異構酶的分類上分成兩種不同家族的蛋白質(Buhler *et al.*, 1998)。Type II DNA 拓樸異構酶在大多數的具有生命現象的細胞中都可以發現，而真核生物至少會包含一種以上的 Type II DNA 拓樸異構酶，例如在大多數真核細胞中都會存在 DNA 拓樸異構酶-II，在脊椎動物中存在著兩種 DNA 拓樸異構酶-II 異構物，拓樸異構酶- II $\alpha$  和拓樸異構酶-II $\beta$ (Watt *et al.*, 1994; Gimenez-Abian *et al.*, 1995)。

真核生物的細胞分裂包括了兩個重要步驟，染色體的複製和染色體分離到兩個子細胞，此時可能會受到一些外來的致病因子所威脅，像是自由基或是紫外線，但主要造成基因體不穩定 (genomic instability) 的原因來自於 DNA 的生理現象，致因包括 DNA 複製、同源性重組(homologous recombination)、有絲分裂時的染色體分離，可能造成缺失或是不正常交換現象(German, 1974; Murray *et al.*, 1985; Holm, 1994; Bierne *et al.*, 1994)。先前已有在一些實驗中發現拓樸異構酶-II 對於細胞週期和細胞分裂的重要性，例如酵母菌在拓樸異構酶-II 的突變實驗中，

有絲分裂時因為拓樸異構酶-II 的突變，使染色體分離造成了斷裂(DiNardo *et al.*, 1984; Holm *et al.*, 1985, 1989; Uemura *et al.*, 1987)。在其他實驗中發現失去正常功能的拓樸異構酶-II 會造成細胞週期停留在有絲分裂第一期，停止細胞生長，但不會失去存活能力(Rose *et al.*, 1990, 1993)。而在哺乳動物中存在著兩種拓樸異構酶-II 異構物，已經有研究發現兩種拓樸異構酶雖然具有相似的活性(Austin *et al.*, 1998)，但是在細胞的生長中卻受到不同的調節，並且兩種酵素之間的角色無法互相補償(Carpenter *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2000; Akimitsu *et al.*, 2003)。另一方面，拓樸異構酶- II $\alpha$  只發現在增殖(proliferation)的細胞當中(Heck *et al.*, 1988; Hsiang *et al.*, 1988)，而拓樸異構酶-II $\beta$  則是顯著的表現在分化晚期的細胞當中(Capranico *et al.*, 1992; Tsutsui *et al.*, 1993, 2001; Turley *et al.*, 1997; Lyu *et al.*, 2003; Watanabe *et al.*, 1994)。細胞發育或分化的過程中包括了基因的轉錄、DNA 的複製、染色體的分離，這些都必須有拓樸異構酶的參與，以解決在 DNA 上遇到的拓樸性質問題，以利於進行發育和分化，因此拓樸異構酶在細胞的生長上扮演了一個不可或缺的角色。目前已經得知拓樸異構酶- II $\alpha$  在細胞進行有絲分裂是必須的，參與在 DNA 的複製與分離染色體(Wang, 2002)。拓樸異構酶-II $\beta$  已經被發現參與在神經系統的發育。研究發現缺失拓樸異構酶-II $\beta$  基因會導致小鼠運動神經發育不完全(Yang *et al.*, 2000)。並發現拓樸異構酶-II $\beta$  可能參與在小腦神經早期發育，調控相關發育基因的表現(Tsutsui *et al.*, 2001)。

先前已經有一些關於梨形鞭毛蟲染色體的研究報告，例如，雖然梨形鞭毛蟲的五條染色體已經利用 PFGE(Pulsed Field Gel Electrophoresis)技術分離開來，但是目前並沒有任何 DNA 以染色體(chromosome)的型態被發現(Adam, 2001)，所以可能梨形鞭毛蟲並沒有染色質(chromatin)轉換成染色體的情形存在(He *et al.*, 2005)。還有目前並沒有發現到有核仁(nucleoli)的存在，而且 rRNA 的轉錄和修飾也不是在細胞核的中心進行(Li *et al.*, 1997; Narcisi *et al.*, 1998; Adam, 2001)。

先前已經有研究發現梨形鞭毛蟲具有 Type II DNA 拓樸異構酶的基因存在，

但僅限於序列分析(He *et al.*, 2005)，梨形鞭毛蟲的 Type II DNA 拓樸異構酶是屬於 Type IIA，基因全長有 4476 個核苷酸，且不帶有內含子(Intron)，並且從胺基酸序列上來看，和其它真核生物的 DNA 拓樸異構酶-II 具有高度的同源性(He *et al.*, 2005)，但是有一些相異於其它真核生物 DNA 拓樸異構酶-II 的地方有被發現，像是有一些短片段序列，7~46 個胺基酸序列插入在 ATPase domain 和序列中心區域(central domain)，中心區域也較其它 DNA 拓樸異構酶-II 多了大約 100 個胺基酸，但 C 端短了大約 200 個胺基酸，且特別的是梨形鞭毛蟲 DNA 拓樸異構酶-II 的 C 端(第 1335~1491 胺基酸)富含帶有電荷的胺基酸，D、E、K 和 R 大約占了 C 端的 43%(He *et al.*, 2005)。

在 1993 年時 Bell 等人找到一種可以有效抑制梨形鞭毛蟲的拓樸異構酶-II 的藥物，Bis-Benzimidazoles，他們發現此種藥物效果比之前用來治療梨形鞭毛蟲的 Quinacrine HCl 和 Metronidazole 效果還要好(Bell *et al.*, 1993)，但其實驗中使用純化自梨形鞭毛蟲的拓樸異構酶-II，可能含有其他拓樸異構酶。烷化劑(alkylating agents)是一種抗腫瘤藥物，Bis-Benzimidazoles 是烷化劑的攜帶者(carrier)，和 DNA 的次要溝槽(minor groove)有高親和性，可以將烷化劑帶到特定的 DNA 序列上(Stephanie *et al.*, 2007)。而現在普遍用來抑制拓樸異構酶-II 的藥物為 etoposide，是一種抗癌藥物，可以穩定拓樸異構酶-II 切斷 DNA 所暫時形成的 DNA-酵素複合物，使 DNA 保持在斷裂的狀態，造成細胞的嚴重損傷(Helen *et al.*, 2007)。

### 1.3 研究動機

對於梨形鞭毛蟲來說要不斷的繁衍，生活史就必須一直循環下去，所以梨形鞭毛蟲生活史中滋養體和囊體間的循環對於物種的延續是非常重要的事情。許多研究指出生物的拓樸異構酶-II 對於細胞的週期和細胞的發育都扮演著極重要的角色，但梨形鞭毛蟲的拓樸異構酶的研究只有對於梨形鞭毛蟲的拓樸異構酶-II 的序列做一些分析，或者是針對抑制拓樸異構酶-II 的藥物，測試其治療梨形鞭毛

蟲感染症的效果。由於已知梨形鞭毛蟲生活史兩個時期的轉換是非常重要的，而梨形鞭毛蟲在進入囊體期還會進行一次細胞複製，轉變為四個細胞核，更可以想像拓樸異構酶-II對於梨形鞭毛蟲的重要性，所以我們想要進一步研究拓樸異構酶-II的一些特性，並且想知道是否會影響梨形鞭毛蟲的細胞分化。另外我們發現梨形鞭毛蟲拓樸異構酶-II的啟動子上有一段Myb蛋白的結合序列CTACAG，因此Myb蛋白可能可以調節拓樸異構酶-II的表現。我們已經知道Myb為囊體化時期一個重要的轉錄因子，會結合在囊體化時期大量表現之基因的啟動子(promoter) C(T/A)ACAG序列上，例如*cwp1*、*cwp2*及*cwp3*(Sun *et al.*, 2002)。而在進入囊體化時期可能又需要拓樸異構酶的輔助，以利於一些有關囊體化的基因表現和細胞核的複製與分離，因此在這之中調節囊體化的一連串關係是我們所想要研究的。



## 第二章 材料與方法

### 2.1 梨形鞭毛蟲細胞株的培養

梨形鞭毛蟲 WB 蟲株(ATCC30957)培養在 TYI-S-33 培養液 (Keister *et al.*, 1983) 中，含 10%(v/v)小牛血清。經基因轉殖之蟲株，於培養液加入 54ug/ml 嘌呤霉素作為篩選蟲株之用；行囊體化時，將梨形鞭毛蟲滋養體培養至 late log phase 時，放入含有 12.5mg/ml 小牛膽鹽 (bovine bile) 的 TYI-S-33 培養液，在 pH 7.8 的環境下培養 24 小時。

### 2.2 轉殖質體的建構

#### 2.2.1 5'△5N-Pac

實驗中所使用的 5'△5N-Pac 為沿用 Singer *et al.*,1998 所發表的 5' △5N-Pac 質體。此質體包含 puromycin-*N*-acetyltransferase(*pac*)基因，其 5'和 3'flanking region 為 glutamate dehydrogenase gene(*gdh*)基因的 5'和 3'flanking region，分別為 44bp 和 129bp。

#### 2.2.2 pPgTopoIIWT

質體 pPgTopoIIWT 建構方式為利用帶有 KpnI 切位序列的引子 gTopoIIKF(TCGCCGGTACCTCTCCTACCTCATCATGTTCT)和帶有 AvrII 切位的引子 gTopoIIR(GGCCGCCTAGGCTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAAAGGTCATCTTCTCCATTTTC)，gTopoIIR 上帶有 HA-tag 序列，以便在 *gtopoII* 基因後接上 HA-tag。之後將這兩段引子以梨形鞭毛蟲 genomic DNA 為模板做 PCR 反應，將所得到的 DNA 片段以 KpnI 和 AvrII 處理後，最後接入以 KpnI 和 XbaI 處理過後之 5'pac OP23N 載體。完成後的質體 pPgTopoIIWT 是由 *gtopoII* 基因本



身的啟動子調控 *gtopoII* 基因並且在 C 端有一個 HA- tag，而質體的篩選是利用 puromycin。

### 2.2.3 pPgTopoII<sub>m1</sub>

質體 pPgTopoII<sub>m1</sub> 建構方式分為兩段式 PCR 反應，第一階段是分別利用兩組引子以梨形鞭毛蟲 genomic DNA 為模板做 PCR 反應，兩組引子分別為帶有 KpnI 切位序列的引子 gTopoIIKF(TCGCCGGTACCTCTCCTACCTCATCATGTTCT) 和 TopoII<sub>m1</sub>R( TATGTAGAAATGTGACGAGGAGCA) 和另一組引子，TopoII<sub>m1</sub>F(TGCTCCTCGTCACATTTCTACATA) 和帶有 AvrII 切位的引子 gTopoIIAR(GGCCGCCTAGGCTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAAAGGTCATCTTCTCCATTTTC)，gTopoIIAR 上帶有 HA-tag 序列。第二階段是利用分別為帶有 KpnI 切位序列的引子 gTopoIIKF(TCGCCGGTACCTCTCCTACCTCATCATGTTCT) 和帶有 AvrII 切位的引子 gTopoIIAR(GGCCGCCTAGGCTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAAAGGTCATCTTCTCCATTTTC) 以第一階段的兩段 PCR 產物為模板在進行 PCR 反應，將所得到的 DNA 片段以 KpnI 和 AvrII 處理後，最後接入以 KpnI 和 XbaI 處理過後之 5'pac OP23N 載體。完成後的質體 pPgTopoII<sub>m1</sub> 是由 *gtopoII* 基因本身的啟動子調控 *gtopoII<sub>m1</sub>* 基因並且在 C 端有一個 HA- tag，而質體的篩選是利用 puromycin。

### 2.2.4 pPgTopoII<sub>m2</sub>

質體 pPgTopoII<sub>m2</sub> 建構方式為利用帶有 KpnI 切位序列的引子 gTopoIIKF(TCGCCGGTACCTCTCCTACCTCATCATGTTCT) 和帶有 AvrII 切位的引子

gTopoII<sub>m2</sub>R(GGCCGCCTAGGCTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAGGTTTGCTCCATGTGGCGATC), gTopoII<sub>m2</sub>R 上帶有 HA-tag 序列, 以便在 *gtopoII<sub>m2</sub>* 基因後接上 HA-tag。之後將這兩段引子以梨形鞭毛蟲 genomic DNA 為模板做 PCR 反應, 將所得到的 DNA 片段以 KpnI 和 AvrII 處理後, 最後接入以 KpnI 和 XbaI 處理過後之 5'pac OP23N 載體。完成後的質體 pPgTopoII<sub>m2</sub> 是由 *gtopoII* 基因本身的啟動子調控 *gtopoII<sub>m2</sub>* 基因並且在 C 端有一個 HA-tag, 而質體的篩選是利用 puromycin。

### 2.2.5 pPgTopoII<sub>m3</sub>

質體 pPgTopoII<sub>m3</sub> 建構方式為利用帶有 KpnI 切位序列的引子 gTopoII<sub>KF</sub>(TCGCCGGTACCTCTCCTACCTCATCATGTTCT)和帶有 AvrII 切位的引子 gTopoII<sub>m3</sub>R(TCTTCCCTAGGCTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGATACCTTGCAAGAGGATCCAAGTA), gTopoII<sub>m3</sub>R 上帶有 HA-tag 序列, 以便在 *gtopoII<sub>m3</sub>* 基因後接上 HA-tag。之後將這兩段引子以梨形鞭毛蟲 genomic DNA 為模板做 PCR 反應, 將所得到的 DNA 片段以 KpnI 和 AvrII 處理後, 最後接入以 KpnI 和 XbaI 處理過後之 5'pac OP23N 載體。完成後的質體 pPgTopoII<sub>m3</sub> 是由 *gtopoII* 基因本身的啟動子調控 *gtopoII<sub>m3</sub>* 基因並且在 C 端有一個 HA-tag, 而質體的篩選是利用 puromycin。

## 2.3 重組 gTopoII 以及突變 gTopoII 蛋白質的表現載體建構

### 2.3.1 gTopoII

以梨形鞭毛蟲 genomic DNA 為模板, 利用 gTopoII<sub>F</sub>(CACCATGGCCCAGAAGGCGAAG) 和 gTopoII<sub>R</sub>(AAGGTCATCTTCTCCATT) 進行 PCR 反應, 將 PCR 產物接到表現載

體 pET101/D-TOPO<sup>®</sup>(Invitrogen)，表現出的蛋白質 C 端帶有 6-His 和 V5 的抗原決定標記。

### 2.3.2 gTopoII-N

以梨形鞭毛蟲 genomic DNA 為模板，利用 gTopoIIF(CACCATGGCCCAGAAGGCGAAG) 和 gTopoIIR(GAGAAGCTGGCTTGT TTT)進行 PCR 反應，將 PCR 產物接到表現載體 pET101/D-TOPO<sup>®</sup>(Invitrogen)，表現出的蛋白質 C 端帶有 6-His 和 V5 的抗原決定標記。

### 2.3.3 gTopoII-C

以梨形鞭毛蟲 genomic DNA 為模板，利用 gTopoIIC(CACCATGGGCATCCCTAAGCTC) 和 gTopoIIR(AAGGTCATCTTCTCCATT)進行 PCR 反應，將 PCR 產物接到表現載體 pET101/D-TOPO<sup>®</sup>(Invitrogen)，表現出的蛋白質 C 端帶有 6-His 和 V5 的抗原決定標記。

### 2.3.4 gTopoII-Cm1

以梨形鞭毛蟲 genomic DNA 為模板將 gTopoIIC(CACCATGGGCATCCCTAAGCTC) 和 gTopoIm1R(TATGTAGAAATGTGACGAGGAGCA)進行 PCR 反應產物和另一組引子 gTopoIm1F(TGCTCCTCGTCACATTTCTACATA) 和 gTopoIIR(AAGGTCATCTTCTCCATT) 的 PCR 產物利用 gTopoIIC(CACCATGGGCATCCCTAAGCTC) 和

gTopoIIR(AAGGTCATCTTCTCCATT)進行第二次 PCR 反應，將 PCR 產物接到表現載體 pET101/D-TOPO<sup>®</sup>(Invitrogen)，表現出的蛋白質 C 端帶有 6-His 和 V5 的抗原決定標記。

### 2.3.5 gTopoII-Cm2

以梨形鞭毛蟲 genomic DNA 為模板，利用 gTopoII-CF(CACCATGGGCATCCCTAAGCTC) 和 gTopoIIm2R(GGTTTGCTCCATGTGGCG)進行 PCR 反應，將 PCR 產物接到表現載體 pET101/D-TOPO<sup>®</sup>(Invitrogen)，表現出的蛋白質 C 端帶有 6-His 和 V5 的抗原決定標記。

### 2.3.6 gTopoII-Cm3

以梨形鞭毛蟲 genomic DNA 為模板，利用 gTopoII-CF(CACCATGGGCATCCCTAAGCTC) 和 gTopoIIm3R(CCTTGCAAGAGGATCCAAGTA)進行 PCR 反應，將 PCR 產物接到表現載體 pET101/D-TOPO<sup>®</sup>(Invitrogen)，表現出的蛋白質 C 端帶有 6-His 和 V5 的抗原決定標記。

## 2.4 轉殖質體的轉型與萃取

### 2.4.1 質體的轉型 (transformation)

將建構完成之質體 DNA 以 42 度 C 熱休克法 (heat shock) 送入大腸桿菌勝任細胞 (competent cell; DH5 $\alpha$ )，將菌液塗抹在 LB-ampicillin plate 上並放置於 37°C 下培養 16 小時，質體上帶有抗 ampicillin 基因，藉此篩選出成功轉型的勝任細胞，從長出的數個菌落挑取單一菌株，之後利用 PCR 方式來初步挑選出帶有

我們所接進質體內的序列。

#### 2.4.2 質體的萃取

將挑選出的菌株置於含有 ampicillin 的 LB 培養液，在 37°C 震盪培養 16 小時。以 High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid) 萃取質體 DNA，溶於 50  $\mu$ l 的滅菌二次水，將之保存於 -20°C。萃取出質體 DNA 利用限制酶做確認，在 37°C 反應 2 小時，再利用凝膠電泳法分離各片段，確認切出的產物符合預期並將質體 DNA 以自動 DNA 定序法 (ABI 3730) 確認序列。經過自動 DNA 定序法確認序列無誤之菌株，接種至含有 ampicillin 之 250ml LB 培養液，於 37°C 震盪培養 16 小時。利用 Maxi plasmid Kit 進行 DNA 萃取，最後將 DNA 溶於 60  $\mu$ l 無菌二次水，保存於 -20°C。

#### 2.5 重組蛋白的表現與純化

表現載體則是轉型至 *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS (Invitrogen)，隨後加入 5ml 的 LB 培養液中隔夜培養後，倒入 250ml 的 LB 培養液裡，使其菌量生長至  $A_{600}$  吸光值為 0.5 時，加入 1 mM 的 isopropyl-D-thiogalactopyranoside (IPTG; Promega) 反應 4 小時，隨後細菌藉由離心收集後，加入 10 ml sonication buffer (50 mM sodium phosphate/pH 8.0, 300 mM NaCl 和 10 mM imidazole) 和蛋白酶抑制劑 (Sigma) 後，利用聲裂法 (SONICATOR® 3000; MISONIX) 將細菌打破，離心後將上清液和 1ml 的 50% Ni-NTA Agarose (Qiagen) 混合於 4°C 下 1 小時，使其吸附蛋白質，之後將 resin 用 20ml wash bufer (50 mM sodium phosphate/pH 8.0, 300 mM NaCl 和 20 mM imidazole) 清洗，再利用 6ml elution buffer (50 mM sodium phosphate/pH 8.0, 300 mM NaCl 和 250 mM imidazole) 將蛋白質分離下來，之後將其放入透析袋裡放至於透析液 (25 mM HEPES, pH 7.9, 20mM KCl, and 15% glycerol) 裡透析，隨後將之分裝保存於 -80°C。

## 2.6 梨形鞭毛蟲的轉染與選殖

將培養於50ml TYI-S-33培養液的梨形鞭毛蟲WB蟲株生長至細胞密度為 $2.5 \times 10^6$  cells/ml時，放在冰上30分鐘讓吸附在管壁上的蟲體落下，離心1500 rpm七分鐘後將上清液到掉，再用10 ml TYI-S-33培養液清洗、再懸浮沉澱的蟲體，再次離心後，把上清液倒掉7 ml後，用剩下的培養液再懸浮蟲體，取600  $\mu$ l來做轉染用，將建構完成的轉染質體約60  $\mu$ g以電穿孔方式（720  $\Omega$ 、1000  $\mu$ F、350 V）轉染進入WB蟲株內。轉染後的蟲株在16~24小時之間加入篩選藥物54  $\mu$ g/ml噻吩霉毒素，此後每隔48小時換藥，在此過程中，蟲體會逐漸死亡，當貼壁細胞剩下1%時已達到篩選完成之作用，此時將噻吩霉毒素濃度維持不變，使蟲株繼續生長完成選殖。

## 2.7 反轉錄聚合酶鏈式反應 (RT-PCR)

利用 TRIzol reagent (MD Bio Inc) 抽取梨形鞭毛蟲滋養體和囊體化 24 小時的全部 RNA，利用 DNase 處理後，再利用含有 0.9% (v/v) formaldehyde 的 1.3% (w/v) 洋菜糖膠體電泳法，確認 RNA 品質與定量。取 5  $\mu$ g RNA 加入 oligo (dT)、Random hexamer 和 Superscript II RNase H 反轉錄酶(Invitrogen)，經 42°C 下 50 分鐘後，將 RNA 反轉錄為 cDNA，並將 cDNA 以 PCR 方式增幅。分析的基因和使用的引子如下；*gTopoII* (total): topoII828F(AATACCAATGACTCTGAC)、topoII1311R(CTCCTCCGTAGCCTTGGA) ， *gTopoII* (overexpressed): topoII1794F(GATGGGTCGCACATTA) 、 anti-HA(AGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTA) ， *cwp1*: CWP1F(ATGATGCTCGCTCTCCTT)、CWP1R(TCAAGGCGGGGTGAGGCA) ， *cwp2*: CWP2realF2(GATGCCCTGGATGGTGCTA) 、 TOPOCWP2R(CCTTCTGCGGACAATAGGCT) ， *cwp3*:CWPrealF3(GCAAATTGGATGCCAAACAA) 、

CWP3AU5ER(GGCGGAATTCTTACTTGAGGTAGAAATCGGTTCTGTAGTAG  
GGCGGCTGTATCTTG) , *myb*:  
MYBm2F(GTGCTATCAACAAAATAGCCATTATTTGAGGAG) 、  
MYBrealR(AGCACGCAGAGGCCAAGT) , *ran*: RANF  
(ATGTCTGACCCAATCAGC) 、 RANR (TCAATCATCGTCGGGAAG) ,  
riboL7:RIBOL7F(CACCATGCCTATCCCCGAGCTCGT) 、  
RIBOL7R(TTAGATCATTCGGGCAACAA) ,  
18S:18SF(AAGACCGCCTCTGTCAATCAA) 、  
18SR(GTTTACGGCCGGGAATACG)

## 2.8 西方墨點法 (Western blot) 與 Coomassie blue 染色

將梨形鞭毛蟲滋養體或囊體化 24 小時的梨形鞭毛蟲，培養至細胞密度為  $2 \times 10^6$  cell/ml 時，放置冰上約 30 分鐘後，1500 rpm 離心 7 分鐘，去除上清液，以 1ml 1X PBS 清洗過一次，加入 50  $\mu$ l 1X PBS、5  $\mu$ l protease inhibitor 和 500  $\mu$ l 6%TCA，在 4°C 下放置隔夜以沉澱全部的蛋白質，隨後離心 12500 rpm 10 分鐘移除上清液，將沉澱的蛋白質加入 80  $\mu$ l 2X sample buffer (62.5 mM Tris、4.1% SDS、20% glycerol、0.2% bromophenol blue、10 mM DTT)將蛋白質溶解，利用 1N NaOH 將溶液滴定成藍色；取定量體積的蛋白質 (20  $\mu$ l) 置於 95°C 加熱 5 分鐘後。經過處理之 sample 依序注入 SDS-PAGE 中以電泳分離(電壓 150V~250V)。

### 2.8.1 西方墨點法

進行西方墨點法，將 SDS-PAGE 利用濕式轉漬器將分離的蛋白質轉漬到 nitrocellulose membrane (GE healthcare)上(電壓 70V，3 小時)，隨後將轉漬膜於室溫下浸泡於 6% 脫脂奶粉的 PBST (20 mM Tris、150 mM NaCl 與 0.1% Tween-20) 1 小時，藉以阻斷非專一性抗原反應，之後以 1X PBST 將抗體稀釋至適當倍率( for anti-HA；for anti-CWP1；for anti-Myb；for anti-Ran) 後加入，於室溫下作用 1

小時後移除一級抗體，並以 PBST 清洗 3 次，每次 10 分鐘。之後，再加入相同於上述比例稀釋於 1X PBST 溶液的二級抗體 anti-mouse-HRP 和 anti-rabbit-HRP 抗體 (Sigma)，於室溫下作用 1 小時後，使用 1X PBST 清洗 3 次，每次 10 分鐘。最後將經抗體處理過之轉漬膜加入化學冷光劑 ECL kit (Visglow ; Millipore) 作用 1 分鐘後。將轉漬膜置於壓片夾中與 High performance chemiluminescence film (Fuji) 進行感光作用，完成感光之底片進行顯影作用。

### 2.8.2 Coomassie blue 染色

進行Coomassie blue染色，將SDS-PAGE放入Coomassie blue染液染色一天，隔天以de-stain進行退染作用三次後，以肉眼觀察即可。

## 2.9 免疫螢光染色 (Immunofluorescence assay)

將轉染不同質體的滋養體或囊體化 24 小時的梨形鞭毛蟲，生長至細胞密度為  $2 \times 10^6$  cells/ml 時，放置冰上約 30 分鐘後，1500rpm 離心 7 分鐘，去除上清液，利用 1X PBS 清洗後，再加入 400  $\mu$ l 1X PBS 使蟲體懸浮，將其放置玻璃蓋玻片上，37°C 下放置 15 分鐘，經 1X PBS 清洗 2 次後，於 4°C 下置於甲醇 (methanol) 固定 10 分鐘後風乾，隨後利用 0.5% Triton 反應 30 分鐘，blocking buffer (goat serum 5%、glycerol 1%、BSA 0.1%、fish gelatin 0.1%、sodium azide 0.04%) 反應 1 小時，之後以 anti-HA mono-clonal antibody (1/300 倍稀釋於 blocking buffer) 作用一小時，以 1X PBS 清洗 4 次 (每次 5 分鐘) 後，再以 anti-mouse ALEXA 568 (1/300 倍稀釋於 blocking buffer) 作用一小時後，以 1X PBS 清洗 3 次 (每次 5 分鐘)，4% Paraformadhyde 作用 7 分鐘，以 ProLong® Antifade Kit (Invitrogen) 封片後，使用 Leica TCS SP5 Spectral Confocal System 照相觀察。



## 2.10 Electoretic Mobility Shift Assays (EMSA)

利用 T4 polynucleotide kinase(NEB)將探針的 5 端標定  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ (GE healthcare)，隨後將標定好探針(0.02 pmol)與 5 ng 純化的蛋白質於 binding buffer(50 mM Tris-Cl (pH7.4)，50 mM KCl, 1 mM EDTA，1 mM dithiothreitol，0.1 mg/ml bovine serum albumin)室溫下反應 15 分鐘；如進行競爭反應，則加入超過標定探針 200 倍濃度的非標定探針；如進行抗體 supershift 反應，則加入 0.8 $\mu\text{g}$  的 anti- V5-horseradish peroxidase antibody(Bethyl Laboratories)；反應後再利用 PAGE 經由電泳分離探針和探針-蛋白質複合物，之後將 PAGE 乾燥於濾紙上，利用 storage phosphor screen (Molecular Dyamics) 收集放射線訊號，以及用 Typhoon Trio Variable Mode Imager (GE Healthcare) 掃描此 storage phosphor screen，再用 ImageQuant 軟體分析實驗結果。

## 2.11 切割 DNA 活性分析

將純化出的 gTopoII 和突變 gTopoII 蛋白在反應 Buffer 中(10mM Tris-HCl pH 7.5，100mM KCl，5mM MgCl<sub>2</sub>，30 $\mu\text{g}$ )與 300ng pUC119 supercoil DNA 在 37°C 反應 30 分鐘，加入 Stop buffer(0.5% SDS, 10mM EDTA)和蛋白酶(Proteinase K) 400ug/ul 在 37°C 反應 30 分鐘以停止酵素反應。之後利用膠體電泳分析實驗結果，將反應在物放入不含 Ethidium bromide (EtBr)的瓊指膠體內，以 20V 跑膠 16 小時後，做膠體外染 EtBr(0.125ul/ml)5 分鐘，之後以清水退染 2 次 5 分鐘，即可利用螢光影像分析。

## 2.12 水解 ATP 活性分析

ATPase 活性分析是利用自己純化的 gTopoII 加上丙酮酸激酶(Pyruvate kinase; PK)/ 乳酸脫氫酶(Lactate Dehydrogenase; LDH)，偵測煙醯胺腺嘌呤二核苷酸(Nicotinamide adenine dinucleotide，NADH)在 O.D.340 下吸光值的改變。將所純

化出的蛋白加入 24 ng 在反應 Buffer 中(0.4mM NADH，2mM 磷酸烯醇丙酮酸 (Phosphoenolpyruvate;PEP)，3mM 三磷酸腺苷 (Adenosine triphosphate;ATP))與 PK/LDH(1U/1.5U)(以上均為 Sigma)在 37°C 做反應，每 50 秒偵測一次 O.D.340 吸光值，總共反應進行 15 分鐘，將收集到數據帶入公式:

$$-(\Delta O.D.340/\Delta time)/cuvet\ pathlength\ in\ cm/6.22mM^{-1}$$

(6.22 = NADH 在波長 340 時的消光係數)

帶入公式後所得到數據即為 ATP 分解速率。



### 第三章 實驗結果

#### 3.1 梨形鞭毛蟲*gtopoII*基因序列及胺基酸序列分析

拓樸異構酶是一種廣泛存在於各種生物之中的蛋白質，先前已經有研究發現梨形鞭毛蟲的拓樸異構酶，並對序列做分析，分類為拓樸異構酶-II。在梨形鞭毛蟲基因組資料庫(<http://www.giardadb.org/giardadb/>)中 open reading frame 編號為 16975。全長4476個核苷酸，1491個胺基酸，分子量大約為164.01kDa。我將梨形鞭毛蟲拓樸異構酶-II(*gtopoII*)序列與人類拓樸異構酶-II  $\alpha$  與 II  $\beta$  型序列比對(圖一 A)。根據Pfam程式預測發現人類拓樸異構酶-II  $\alpha$  第79到222個胺基酸、人類拓樸異構酶-II  $\beta$  第96到238個胺基酸和梨形鞭毛蟲拓樸異構酶-II第52到201個胺基酸為具有ATPase活性區域。另外有研究指出拓樸異構酶的ATPase活性區域存在著一個G-loop motif負責與ATP結合，保留序列為5'-GXXGXGXX-3'(HE *et al.*, 2005)。我們發現在梨形鞭毛蟲拓樸異構酶-II也有此保留區域，胺基酸序列第140-GRNGYGAK-147，而在人類的II  $\alpha$  型和II  $\beta$  型也有此保留序列的存在(II  $\alpha$  -161~168、II  $\beta$  -177~184)(圖一 A)。在序列中段部分也發現了人類拓樸異構酶-II  $\alpha$ 、II  $\beta$  和梨形鞭毛蟲拓樸異構酶-II具有切割DNA的活性區域，Pfam分析歸類為DNA gyrase/拓樸異構酶-IV subunit A，Gyrase subunit A和拓樸異構酶-IV的ParC為同源性蛋白，都有切割DNA的活性(Pommier *et al.*, 2010)，分別為人類拓樸異構酶-II  $\alpha$ 、II  $\beta$  胺基酸第713~1171、729~1184和梨形鞭毛蟲的755~997與1057~1322(圖一 A)。另外分別在人類拓樸異構酶-II  $\alpha$  第805胺基酸以及II  $\beta$  第821胺基酸和梨形鞭毛蟲拓樸異構酶-II第847胺基酸都存在著負責打斷DNA磷酸雙酯鍵的酪胺酸(圖一 A) (Corbett *et al.*, 2004)。

利用Pfam(<http://pfam.sanger.ac.uk/>)程式分析梨形鞭毛蟲拓樸異構酶-II胺基酸序列，發現存在一個DNA gyrase B domain於胺基酸序列N端及兩個DNA topoIV

domain 於胺基酸序列C端(圖一 B)，下方為之後實驗所用的突變gTopoII蛋白示意圖，包括將全長蛋白分成兩段的gTopoII-N(胺基酸1~488)以及gTopoII-C(胺基酸489~1491)和gTopoII-C的突變蛋白，gTopoII-Cm1(胺基酸489~1491，並在第847的位置上將Tyr圖變為His)、gTopoII-Cm2(胺基酸489~1338)、gTopoII-Cm3(胺基酸489~857)。DNA gyrase和DNA topoisomerase IV在拓樸異構酶分類中都是屬於第二型的拓樸異構酶，存在於原核生物中(Bergerat *et al.*, 1997)。有研究指出真核生物拓樸異構酶-II的N端蛋白演化自原核生物gyrase subunit B，具有ATPase活性(Pommier *et al.*, 2010)。真核生物拓樸異構酶-II的中段位置演化自原核生物gyrase subunit A，gyrase subunit A與topoisomerase IV ParC subunit是具有同源性的蛋白，具有切割DNA的活性(Pommier *et al.*, 2010)。依據演化關係和Pfam程式預測出的三個區域，我們將蛋白分為N端(胺基酸第1~488)和C端(胺基酸第489~1491)，我們認為梨形鞭毛蟲N端蛋白可能是具有ATPase活性的區域，C端蛋白是可能具有切割DNA活性的區域。

### 3.2 以RT-PCR及luciferase偵測滋養體時期和囊體時期gtopoII基因的mRNA表現量與啟動子活性

首先，為了瞭解內生性gtopoII基因在梨形鞭毛蟲當中的兩個時期的表現差異，我們分別從滋養體和進行囊體化培養24小時的wild-type梨形鞭毛蟲萃取出RNA，並進行RT-PCR，發現gtopoII基因在24小時囊體化後，mRNA的表現量高於滋養體時期的表現(圖二 A)，表示gtopoII基因在囊體化時的表現會上升。另外為了更加確定gtopoII基因會在囊體化時期提高表現量，我們更進一步去測試啟動子活性在滋養體和囊體化時的差異。首先我們先將gtopoII基因5'端上游300個核苷酸序列接入一個帶有螢火蟲螢光酶基因(firefly luciferase)的質體，將gtopoII基因5'端上游300個核苷酸序列當作螢光酶基因的啟動子(圖二 B)，來啟動螢光酶

基因的表現。該質體上帶有嘌呤黴素(puromycin)抗藥基因，我們將質體送入梨形鞭毛蟲中，用嘌呤黴素做篩選，培養出帶有質體的梨形鞭毛蟲，接著做滋養體和進行囊體化培養24小時梨形鞭毛蟲的螢光酶活性測試。依照螢光酶分解受質而發出冷光，冷光儀測得數據將滋養體定為螢光酶活性定為100%，發現進行囊體化24小時的*gtopoII*基因啟動子活性約為滋養體的2.53倍(圖二 C)，表示在囊體化時期，*gtopoII*基因確實會因為啟動子活性增加而增加*gtopoII*基因的表現。

### 3.3 梨形鞭毛蟲*gtopoII*基因的表現

為了瞭解gTopoII在梨形鞭毛蟲中表現的位置，將*gtopoII*基因接入可以在梨形鞭毛蟲中穩定表現的質體(圖三 A)，*gtopoII*基因以自身的啟動子(包含在5'端啟動子上游300bp的序列)來啟動*gtopoII*基因，並在*gtopoII* C端接有HA-tag，該質體帶有嘌呤黴素抗藥基因做為篩選基因。以免疫螢光染色法可以偵測到gTopoII不論在滋養體時期或者是囊體化時期表現在位置皆在細胞核內(圖三 B)。利用anti-HA抗體，以西方點墨法分析gTopoII表現的情形，可以發現在囊體化時期gTopoII的表現量有上升的情況(圖三 C)。Anti-Ran和下方Coomassie blue stain為loading control。

### 3.4 梨形鞭毛蟲拓樸異構酶、N端、C端切割雙股DNA活性分析

我們將gTopoII胺基酸序列用Pfam(<http://pfam.sanger.ac.uk/search>)程式分析，找到了一個屬於DNA gyrase B和兩個屬於拓樸異構酶-IV的區域，各別代表了具有ATPase活性的區域和可以切割DNA與DNA形成酵素-DNA複合物、拓樸異構酶與DNA結合的區域。因此我們將這兩種不同活性區域分開做活性測試，並且也和全長的拓樸異構酶做活性的比較。分別將全長4473個核苷酸、N端1464個核苷酸和C端3012個核苷酸接到表現載體pET-101/D-TOPO，轉型到*Escherichia coli* BL21表現蛋白，將三種蛋白質純化出來。首先先測試gTopoII蛋白切割DNA的活

性，結果顯示將gTopoII蛋白與plasmid反應會將環狀DNA切割成線性DNA(圖四)，如果將反應buffer內的鎂離子移除發現切割plasmid的活性明顯降低，如果以正常含有鎂離子的反應Buffer在外加高於鎂離子濃度的Ethylene diamine tetraacetic acid(EDTA)也會出現切割DNA活性下降的情況，因此可以知道gTopoII要切割DNA是需要鎂離子輔助的(圖四)。之後把gTopoII、gTopoII-N、gTopoII-C三種蛋白與plasmid加入同一反應，發現gTopoII-C也會出現和gTopoII一樣有切割DNA的活性，gTopoII-N則無此活性(圖五A)。接下來就分別將gTopoII-N、gTopoII-C進一步做切割DNA的活性測試，發現C端蛋白會因蛋白濃度的上升而使原本呈現超螺旋結構的plasmid出線型成線型結構的DNA(圖五C)，顯示C端蛋白將呈超螺旋結構的plasmid切割而形成斷裂的線型DNA。而N端蛋白卻沒有出現此活性(圖五B)，再次證明N端蛋白並無切割DNA的活性存在。

### 3.5 梨形鞭毛蟲拓撲異構酶、N端、C端ATPase活性分析

因為Pfam程式預測在gTopoII上具有gyrase B區域，表示可能存在具有分解ATP的活性區域存在，於是我們純化出gTopoII和他的突變蛋白gTopoII-N和gTopoII-C，其中gTopoII-N包括了gyrase B區域，將這三種蛋白進行分解ATP活性分析，結果以Lineweaver-Burk plot雙倒數作圖表示，顯示gTopoII的 $K_m$ 值等於0.21mM，最大分解速率為53.2 nM/sec。而在加入DNA一起進行反應會進一步發現gTopoII的 $K_m$ 值等於0.13mM，最大分解速率為107.5 nM/sec，顯示在加入DNA之後gTopoII與ATP的親和性有上升的情況，分解ATP的速率也一樣有上升情形(圖六)。之後也將gTopoII-N和gTopoII-C進行分解ATP的活性分析，結果顯示，gTopoII-N的分解速率大約為60nM/sec，但在反應中加入DNA並沒有出現分解速率上升的情況，而gTopoII-C的ATP分解活性與gTopoII、gTopoII-N比較起來則是相對的非常低(圖七)。

### 3.6 梨形鞭毛蟲拓樸異構酶、N端、C端結合雙股DNA活性分析

因為先前研究指出gTopoII-C具有切割DNA和結合DNA的能力，我們也將gTopoII和突變蛋白gTopoII-N和gTopoII-C進行電泳位移實驗 (Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA)，驗證有gTopoII-C存在的區域是否有結合DNA的能力，根據先前研究報告發現與拓樸異構酶-II高親和力的序列片段做為探針 (Andersen *et al.*, 1989)，我們將探針TOP2 BS (TopoII binding site) 以 $\gamma$ -32p標定，加入gTopoII、gTopoII-N、gTopoII-C，結果顯示gTopoII與gTopoII-C都有bound form，表現這兩個蛋白都有結合DNA能力，gTopoII-N則沒有(圖八)。之後我們將以gTopoII-C做更進一步的分析，首先在EMSA實驗中加入抗體anti-V5，anti-V5可以辨認pET-101/D-TOPO所純化出的蛋白，純化出來的蛋白質C端帶有V5標籤。加入抗體anti-V5做supershift assay，結果顯示加入抗體anti-V5可以使bound form位移，表示gTopoII-C會結合DNA序列(圖九)。

### 3.7 利用不同基因的啟動子序列鑑定gTopoII-C端蛋白與DNA結合能力

先前已經確認梨形鞭毛蟲拓樸異構酶-II C端可以與探針TOP2 BS結合，但除了已知的結合序列TOP2 BS之外，我們還想知道梨形鞭毛蟲拓樸異構酶-II是否會結合其他序列，由於梨形鞭毛蟲大部分基因的啟動子都和ATG距離很近之故，因此我們加入*cyst wall protein 1 (cwp1)*基因轉譯起始位置ATG上游中-45/-1區域(cwp1-45/-1)以 $\gamma$ -32p標定做為探針，結果顯示，gTopoII-C端蛋白可以和cwp1-45/-1形成bound form，且結合強度相較於TOP2 BS差不多(圖十 A)，表示gTopoII-C端蛋白可以和已知的topoisomeraseII高親和性序列TOP2 BS結合以外，也可以和*cwp1*的啟動子做結合。為了更加確定這個結果，於是我們將未標定放射線的TOP2 BS，cwp1-45/-1當作是競爭物質，與標定 $\gamma$ -32p的TPO2 BS做競爭，另外再加上18S-30/-1，18S-60/-31兩段比較GC-rich的序列也當做競爭物，做電泳位移實驗。結果顯示，當以TOP2 BS，cwp1-45/-1當作是競爭物質時，可以觀察

到原本的bound form明顯減弱，表示TOP2 BS，*cwp1-45/-1*兩段序列確實都會與gTopoII-C端蛋白做結合(圖十 B)，另外18S-30/-1，18S-60/-31兩段競爭物則無明顯競爭效果，也因為這兩段序列為GC-rich序列，因此讓我們推測是否梨形鞭毛蟲拓樸異構酶不偏好於結合GC-rich序列。為了證實這樣的假設，因此我們利用了*cwp 1*，*cwp 2*，*cwp 3*，*ran*，*myb*基因的啟動子當作競爭物，每個基因的啟動子序列都分成一段以上的序列做為競爭物，也加入了AT-rich序列，*poA*，*poA-T1*，*poA-T2*，*poA-TC*，當做競爭物，做電泳位移實驗。結果顯示，當競爭物為*cwp1-45/-1*，*cwp2-30/+8*，*cwp3-30/+10*，*ran-51/-20*，*myba-30/-1*，*myba-60/-31*時，bound form強度有明顯減弱(圖十 C)，分析以上序列發現這一些序列有共同特徵，*cwp1-45/-1*中有一段AAATAAAATAT序列，*cwp2-30/+8*中有一段AAAATAAAAT序列，*cwp3-30/+10*中有一段AAAAAATAA，*ran-51/-20*中有一段TAAAATAAATTAAAT 和 AAATTAAAA，*myba-30/-1*中有一段TAAAATAAATAATTA，*myba-60/-31*中有一段TATTTTTTT，以上這些序列都有出現一小段連續AT的序列，且AT-rich序列，*poA*，*poA-T1*，*poA-T2*，*poA-TC*也出現bound form強度減弱現象(圖十 C)，因此可以推論梨形鞭毛蟲拓樸異構酶偏好結合於AT-rich的序列。另外再以Distamycin A做為競爭物，利用Distamycin A會結合在雙股DNA的minor groove AT-rich 序列的特性和gTopoII-C端蛋白做競爭，結果顯示當Distamycin A的濃度上升，bound form強度出現減弱現象，也再次證實了因為Distamycin A偏好結合在DNA的minor groove AT-rich的位置，而競爭掉了gTopoII-C偏好的結合位置，(圖十一)但是並沒有完全的將bound form競爭掉，因為gTopoII也可能會結合不在minor groove上的AT-rich位置。

### 3.8 抗腫瘤藥物etoposide抑制梨形鞭毛蟲生長

先前研究已經知道etoposide抑制拓樸異構酶-II的作用機制為抑制受到切割的DNA再復原，呈現酵素與斷裂DNA的複合物，而斷裂的DNA對細胞來說會造



成極大損傷甚至死亡。因此我們想知道利用etoposide來抑制拓撲異構酶-II是否會對梨形鞭毛蟲的生長造成影響。首先我們先測試各種不同etoposide濃度觀察加藥24小時後滋養體梨形鞭毛蟲生長情形，再利用血球計數器計算細胞數量。我們以對照組的細胞數設定為100%，發現當etoposide濃度為200 $\mu$ M時，與對照組相比大約只剩下85%的細胞數，而當濃度為400 $\mu$ M時與對照組相比會有明顯差異，大約只剩下54%的細胞數(圖十二 A)，因此我們得知，當etoposide濃度為400 $\mu$ M時可以對梨形鞭毛蟲的生長有抑制或是殺死細胞的效果。因為得知當etoposide濃度為400 $\mu$ M可以明顯減少梨形鞭毛蟲的數量，於是我們另外以etoposide濃度為400 $\mu$ M去收不同時間點滋養體梨形鞭毛蟲的細胞數，每三個小時收一次細胞，做加藥與對照組48小時的生長曲線。結果顯示加藥的梨形鞭毛蟲生長曲線與對照組相比趨於平緩(圖十二 B)，結果表示梨形鞭毛蟲是會受到etoposide的抑制而生長緩慢。而48小時過後因為對照組細胞生長過盛開始出現死亡情形，所以細胞數在48小時時間點降了下來。另外我們以不同的細胞數量做etoposide抑制細胞生長的分析。分別以兩種不同細胞數，每毫升 $3.125 \times 10^5$ 和 $1.25 \times 10^6$ 細胞數做加藥處理，24小時後計數滋養體細胞數目。因為在先前實驗已經觀察到細胞生長曲線是趨於平緩(圖十二 B)，推測是etoposide可以抑制細胞生長，所以利用不同細胞數做加藥處理，目的為希望24小時後可以長滿8ml的細胞量為最低限度( $3.125 \times 10^5$  cells/ml)，與正常繼代細胞方式做比較( $1.25 \times 10^6$  cells/ml)，可以看到更明顯的細胞數量差異。結果顯示，和對照組做比較，以每毫升 $3.125 \times 10^5$ 細胞數在加藥處理24小時後，細胞數大約只有對照組的30%(圖十三)。與每毫升 $1.25 \times 10^6$ 細胞數相比，實驗組大約只有對照組58%(圖十三)，兩組實驗都可以觀察到經過etoposide處理過後的梨形鞭毛蟲生長情形確實都出現受到抑制的情況，而且以較少的細胞數量進行分析可以有更明顯的效果。

### 3.9 抗腫瘤藥物etoposide抑制滋養體時期梨形鞭毛蟲Cwp1表現

我們將 $1.25 \times 10^6$  cells/ml滋養體時期的梨形鞭毛蟲以etoposide處理24小時後，先進行滋養體中形成囊體的細胞計數，在經過etoposide處理的細胞形成囊體的數目與對照組相比發現大約只有其30%，表示囊體化的情形受到了抑制(圖十四A左)。圖十四A右為實際滋養體細胞量與囊體的比例。

步去萃取其RNA和蛋白質做分析，從RT-PCR來看，可以看到囊體化的標記蛋白有明顯下降的趨勢，包括*cwp1*、*cwp2*、*cwp3*，*gtopoII*自己本身也有下降的情形，*myb*也有下降的情形(圖十四B)。以anti-CWP1抗體做西方點墨法分析蛋白質表現情形，發現經過etoposide處理後的梨形鞭毛蟲Cwp1的表現量會降低，因為Cwp1為囊體化時期會大量表現的基因，因此可以推測etoposide這個藥物可能會抑制梨形鞭毛蟲進行囊體化(圖十四C)。anti-Ran和Coomassie blue染色做為loading control。

### 3.10 抗腫瘤藥物etoposide抑制梨形鞭毛蟲形成囊體

從上一個實驗我們發現etopodide可能會降低Cwp1的表現，所以我們想知道etoposide是否可以對梨形鞭毛蟲囊體化的形成造成影響，因為在囊體化的過程當中會進行一次的細胞核複製，從兩顆細胞核變為四顆細胞核。為了了解拓撲異構酶受到抑制是否也會使梨形鞭毛蟲無法進行囊體化，我們將 $2 \times 10^7$ 梨形鞭毛蟲進行囊體化並且加入 $400 \mu\text{M}$ 的etoposide，24小時候收細胞，利用血球計數器來觀察形成囊體的數目。首先收24小時的細胞，將其中的滋養體利用加入清水破壞，只留下不會被清水脹破的囊體。我們將對照組的細胞數設定為100%，結果顯示當進行囊體化並加藥24小時的細胞形成囊體的數目只有對照組的45%(圖十五A)，表示在梨形鞭毛蟲進行囊體化的過程中，確實會因為拓撲異構酶受到抑制進而影響到囊體的形成。另外我們也利用RT-PCR和西方點墨法分析，我們從RT-PCR中發現經過etoposide處理的梨形鞭毛蟲，除了囊體化代表性基因*cwp1*、*cwp2*、*cwp3*

有下降情況外，發現gTopoII本身有會有表現量下降的情形(圖十五B)。也可以從西方點墨法中觀察到囊體化時期Cwp1蛋白也有下降情形(圖十五C)，因此可以證明etoposide會抑制梨形鞭毛蟲進行囊體化。anti-Ran和Coomassie blue染色做為loading control。

從以上實驗得知etoposide可能會影響到梨形鞭毛蟲的生長以及囊體化，因此我們想要進一步知道是否etoposide抑制了gTopoII的一些活性。我們進行了分解ATP活性分析和做切割DNA的實驗，觀察在反應中加入etoposide是否會影響蛋白的活性。在ATPase活性分析實驗中，不論etoposide濃度低到高(100uM~800uM)都不會影響其分解ATP的活性(未附圖)，而在切割DNA實驗中發現，當反應中加入1mM etoposide時，不論是gTopoII，gTopoII-C和gTopoII-Cm2切割DNA的能力會有受到抑制的情形(圖十六)。

### 3.11 鑑定突變gTopoII的表現以及切割和結合DNA的能力

先前研究指出所有的拓樸異構酶都有一個負責打斷雙股DNA的酪胺酸存在，在與人類的拓樸異構酶比對序列之後，我們在梨形鞭毛蟲的第847個胺基酸也找到了與人類拓樸異構酶相對應的酪胺酸，於是我們也想知道將此酪胺酸作突變是否也會使梨形鞭毛蟲拓樸異構酶-II的切割活性消失。首先我們建構一個在*gtopoII*基因序列第2539的Thymidine突變為Cytosine，轉譯後胺基酸從酪胺酸(Tyrosine)突變為組胺酸(Histidine)，將此pPgTopoII<sub>m1</sub>載體轉染至梨形鞭毛蟲內以免疫螢光染色法觀察表現。結果顯示，在梨形鞭毛蟲細胞中表現的gTopoII<sub>m1</sub>蛋白是表現在細胞質當中(圖十七)。另外針對具有結合和切割DNA活性的cleavage domain部分，我們也分別做了一個刪除cleavage domain之後第1339到1491個胺基酸的突變(pPgTopoII<sub>m2</sub>)，和另一個刪除大部分cleavage domain，第858到1491個胺基酸的突變(pPgTopoII<sub>m3</sub>)。也將這兩個突變質體轉染到梨形鞭毛蟲內以免疫螢光染色法觀察表現。結果顯示在梨形鞭毛蟲細胞中表現的gTopoII<sub>m2</sub>和

gTopoII $\alpha$ 3蛋白是表現在細胞質當中(圖十八、十九)。之後我們也想知道經過突變的gTopoII-C端蛋白是否他們的切割dsDNA活性和結合DNA能力也會受到影響，因此我們將純化出來的gTopoII-C端以及突變C端蛋白做切割DNA活性分析，將蛋白和超螺旋結構的DNA在37°C反應半小時後，利用電泳分析，可以觀察到除了為突變的gTopoII-C端蛋白有活性之外，gTopoII-C $\alpha$ 2也具有切割DNA的能力，而gTopoII-C $\alpha$ 1和gTopoII-C $\alpha$ 3相較之下就明顯沒有線性DNA的形成(圖二十)，比較沒有切割DNA的能力。另外我們也利用 $\gamma$ -32p標定TOP2 BS當作探針將純化出來的gTopoII-C端以及突變C端蛋白做電泳位移實驗，測試經過突變的gTopoII-C端蛋白與DNA結合能力是否會受到影響。結果顯示點突變的gTopoII-C $\alpha$ 1和gTopoII-C $\alpha$ 2還有 bound form 的出現，表示gTopoII-C $\alpha$ 1及gTopoII-C $\alpha$ 2還具有結合DNA的能力，gTopoII-C $\alpha$ 3則減少與DNA結合能力(圖二十一)。

### 3.12 分析gTopoII以及gTopoII突變蛋白對於囊體化相關基因的調控和囊體形成的影響

從WB clone C6中發現*gtopoII*是一個會在囊體化時期表現量會上升的基因(圖二A)，並且也在拓撲異構酶-II抑制藥物etoposide處理梨形鞭毛蟲的實驗中發現梨形鞭毛蟲形成囊體的能力會受到影響(圖十五A)，也從西方點墨法中觀察到etoposide處理過後Cwp1的表現量確實有下降情形(圖十五C)，因此我們想要更進一步瞭解gTopoII與梨形鞭毛蟲進行囊體化之間的關聯，因此我們轉染了帶有*gtopoII*以及*gtopoII*基因突變質體到梨形鞭毛蟲中，並先用anti-HA偵測帶有HA-tag的各種蛋白是否可以在梨形鞭毛蟲中成功表現。利用西方點墨法分析滋養體時期和囊體化時期的表現，不帶有HA-tag蛋白的pP5'pac5n沒有偵測到任何訊號，表現量最高的為pPgTopoIIWT，可以觀察到在164KDa處有大量的表現，pPgTopoII $\alpha$ 2表現量次之，在147KDa處可以觀察到其表現量，pPgTopoII $\alpha$ 1和

pPgTopoII<sub>m3</sub> 表現量都遠低於 pPgTopoII<sub>WT</sub> 和 pPgTopoII<sub>m2</sub>，pPgTopoII<sub>m1</sub> 在 164KDa 處有小量表現，表現量略高於 pPgTopoII<sub>m3</sub>，pPgTopoII<sub>m3</sub> 表現量最低，在 95KDa 處可以觀察到其表現量。(圖二十二C、二十三C)。我們接下來再利用 anti-Cwp1 觀察各細胞株的表現，結果顯示 Cwp1 的表現量以 pPgTopoII<sub>WT</sub> 最高，pPgTopoII<sub>m2</sub> 次之，pPgTopoII<sub>m1</sub> 和 pPgTopoII<sub>m3</sub> 表現量較少，pPgTopoII<sub>m1</sub> 略高於 pPgTopoII<sub>m3</sub>，pP5'pac5n 表現量最低(圖二十二C、二十三C)。對照到囊體的形成能力方面，我們利用細胞計數來分析形成囊體的數目，不論在滋養體時期和囊體化時期都發現形成囊體的能力以 pPgTopoII<sub>WT</sub> 細胞株為最高，pPgTopoII<sub>m2</sub> 次之，pPgTopoII<sub>m1</sub> 略高於 pPgTopoII<sub>m3</sub>，pPgTopoII<sub>m3</sub> 表現量最低(圖二十二A、二十三A)。RNA 表現方面，囊體化時大量表現基因例如 *cwp1*、*cwp2*、*myb2* 也有相同的趨勢(圖二十二B、二十三B)。



## 第四章 討論

### 4.1 梨形鞭毛蟲 TopoII 蛋白功能區域分析

將 gTopoII 與人類 TopoII 比較，特別的地方是梨形鞭毛蟲的拓樸異構酶-IV 區域被分為兩個區塊(圖一 A)。比對序列的相似度，梨形鞭毛蟲與人類拓樸異構酶-II  $\alpha$ 、II  $\beta$  的全長胺基酸序列相似程度分別為 41.52%和 38.94%，相同序列比例分別為 28.05%和 27.18%。如果只以 Pfam 程式預測的拓樸異構酶-IV 區域做相似程度分析，梨形鞭毛蟲與人類拓樸異構酶-II  $\alpha$ 、II  $\beta$  的胺基酸序列相似程度個別為 44.89 分%和 44.72%，相同序列比例分別為 30.11%和 29.93%，第 998~1056 個胺基酸不被 Pfam 程式認為屬於拓樸異構酶-IV 區域，如果單獨將第 998~1056 個胺基酸與人類拓樸異構酶-II  $\alpha$ 、II  $\beta$  做序列比對時在拓樸異構酶-IV 區域多出來的一段序列做相似度比較，發現分別只有 23.29%和 13.70%的相同程度，13.70%和 2.74%相似度，可能是此段梨形鞭毛蟲失去了一段長 10 個核苷酸序列且其它序列相似度太低(圖一 A 和 B)，導致 Pfam 程式分析將此拓樸異構酶-IV 區域區分為兩段。

另外在 Pfam 程式預測不論在人類的拓樸異構酶-II 或是其他的原蟲拓樸異構酶-II 例如，阿米巴原蟲(*Entamoeba histolytica*)、陰道滴蟲(*Trichomonas vaginalis*)、利什曼原蟲(*Leishmania donovani*)、惡性瘧原蟲(*Plasmodium falciparum*) 和錐蟲(*Trypanosoma cruzi*)的拓樸異構酶-II 都存在一個顯著的 ATPase 區域(結果未顯示)。Pfam 程式分析中發現梨形鞭毛蟲拓樸異構酶-II 的 N 端部分並未有顯著的 ATPase 活性區域存在(圖一 B)，推測可能會影響到梨形鞭毛蟲拓樸異構酶-II 的酵素作用的活性，但如果將梨形鞭毛蟲相對於其他物種 ATPase 活性區域的序列(胺基酸第 52 到 201)單獨立用 Pfam 分析，又可以得到這一段序列為具有 ATPase 活性的一段蛋白，因此 gTopoII 的 ATPase 活性這一部分在經過活性分析之後，

我們有測得 gTopoII 是具有 ATPase 活性，且當有 DNA 存在反應中時，ATPase 的活性大約會上升兩倍，但這種情形只出現在全長的 gTopoII 中，同樣具有 ATPase 活性的 gTopoII-N 則沒有這種現象(圖七)。相同的情形也出現在 T.Sengupta 2005 的研究中，研究指出 *Leishmania topoisomeraseII* 在有 DNA 的情況下分解 ATP 的平均速率也會上升的情況。

然而因為 Pfam 是將具有 ATPase 活性的區域預測為 gyrase 蛋白的區域，為了瞭解 gTopoII 是否是具有 gyrase 的特性或是屬於 topoisomerase II，所以我們利用抑制 gyrase ATPase 活性的抑制藥物，Coumermycin A1 (Maxwell 1997)，去觀察此藥物是否會對 gTopoII 分解 ATP 的活性有所影響，實驗結果顯示當我們以不同的 Coumermycin A1 的濃度去做 ATPase 活性分析實驗，各別為 0 $\mu$ M、100 $\mu$ M、200 $\mu$ M、400 $\mu$ M，在這些不同藥物濃度實驗中與對照組相比，皆沒有任何差異(未附圖)，表示 Coumermycin A1 並沒有抑制 gTopoII 的作用，gTopoII 的 ATPase 活性與 gyrase 蛋白的特性可能不同。

#### 4.2 gTopoII 具有與鎂離子結合區域

先前已經有研究指出 TopoII 必須在有鎂離子存在的環境下才具有活性 (Deweese et al., 2008)，並且已經知道與鎂離子作用的胺基酸殘基，分別是在人類的 topoisomerase II  $\alpha$  胺基酸 E461、D541、D543、D545 或是人類的 topoisomerase II  $\beta$  胺基酸 E477、D557、D559、D561 (Deweese et al., 2009)，我們去比對梨形鞭毛蟲與這些胺基酸的相對位置，分別在 gTopoII 胺基酸 E513、D595、D597、D599(圖一 A)，這四個與鎂離子作用的四個胺基酸在 gTopoII 中也都是存在著。在 gTopoII 切割 dsDNA 的實驗中觀察到當反應中不存在鎂離子時，gTopoII 就不會將環狀 DNA 切割成線性的 DNA(圖四)，表示 gTopoII 的活性確實也是需要鎂離子來當作輔因子。

### 4.3 gTopoII 偏好與 AT-rich 序列做結合

在發現了gTopoII會與真核生物TopoII偏好結合序列(TOP2 BS)以外序列結合之後，我們推測是否gTopoII會有偏好的序列做結合，所以我們將一些不同的序列當作探針，結果發現在不同序列當中確實gTopoII會和他們做結合，並且有結合強弱程度之分，我們發現了在一些結合程度較強的序列當中，都明顯存在著一段AT-rich的序列，且在不同基因的啟動子上的AT-rich部分都有發現這個結果(圖十 C)，之後有在利用會結合在AT-rich序列上的化合物Distamycin A來當做競爭物，與gTopoII做競爭，結果也出現了抑制gTopoII結合序列的效果(圖十一)。所以推論gTopoII似乎有偏好結合在AT-rich的序列上。另外有研究指出拓樸異構酶可能會調節基因的表現(Durand-Dubief *et al.*, 2010)，且也發現TopoII失活將會降低rRNA的量，進一步去影響到mRNA的合成(Schultz *et al.*, 1992, Collins *et al.*, 2001)。我們所使用的探針大部分都是與囊體化有關的基因，所以有存在著一種可能性，就是gTopoII其實是會結合在這一些序列上去調節這些與囊體化有關基因的表現，這一部分有待更深一步的研究。

### 4.4 Etoposide對梨形鞭毛蟲的生長和分化的影響

在滋養體時期的梨形鞭毛蟲經過etoposide處理24小時後，我們可以看到細胞數目與對照組相比確實是有差異(圖十四 A)，顯示是生長分裂受到了影響，但etoposide的作用機制是造成細胞DNA斷裂，是有殺死細胞的作用，但是在做不同時間點數細胞數的實驗中發現生長曲線是趨於平緩，沒有出現下降的情形(圖十二)，推論原因可能是因為在試管裡面的所有細胞並沒有百分之百每一隻都被藥物殺死，而梨型鞭毛蟲的生長分裂速度又太快，以致於看不出細胞數目有下降的情況。

在梨形鞭毛蟲形成囊體化的能力上我們觀察到在經過etoposide處理過後，形成的囊體數目與對照組比較只有其百分之四十(圖十五 A)，但是因為etoposide也



可以抑制生長，所以也存在一種可能性是因為在囊體化時有些細胞還是在持續分裂生長，所以會有比較多的細胞數目可以形成囊體，而讓結果看起來是因為囊體化受到了抑制，所以我們從RNA和蛋白質表現來看囊體化相關基因的表現情況。結果顯示在*cwp1*、*cwp2*、*cwp3*、*myb*的RNA表現都下降的情形，蛋白質表現方面，Cwp1也是有表現量降低，所以可以證實囊體化的能是確實是有受到影響。

#### 4.5 gTopoII促進梨形鞭毛蟲行囊體化

有研究指出在細胞中細胞週期在S phase晚期topoisomeraseII  $\alpha$  開始大量表現，當到達G<sub>2</sub>/M時期表現到達最高峰(Woessner *et al.*, 1991)，而梨形鞭毛蟲在囊體時期細胞週期是停留在G<sub>2</sub>的時期(Bernander *et al.*, 2001)，我們也發現gtopoII在囊體時期會大量表現(圖二和三)。另外，我們從過度表現gtopoII的細胞株發現細胞會比較傾向形成囊體(圖二十二 A、圖二十三 A)，顯示gtopoII在梨形鞭毛蟲囊體化過程中扮演一個重要的角色。

#### 4.5 *myb*基因與*gtopoII*基因的表現之互相調控關係

野生型梨形鞭毛蟲經過etoposide處理後，*gtopoII*和*myb*的RNA表現都有下降的情形(圖十四 B、圖十五 B)，顯示etoposide會影響他們的表現，但etoposide的作用機制是以gTopoII蛋白質為目標，所以我們推論*gtopoII*的RNA表現量受到影響是因為*myb*基因表現受到抑制進而影響到*gtopoII*的表現，因為有其他研究指出Myb可以影響*topoII*的啟動子活性(Brandt *et al.*, 1997、Singh *et al.*, 2008)，而我們也在*gtopoII*的啟動子上有找到梨形鞭毛蟲Myb蛋白的結合位置，所以認為gTopoII表現量下降是因為Myb的表現降低緣故。*myb*的表現也受到etoposide的影響下降，而且過度表現*gtopoII*的細胞株發現*myb*的表現也會有上升的情況，所以也存在著一個可能性，就是*myb*也是會受到*gtopoII*的調控，表示兩個基因之間是一種互相調控的角色存在，因為*myb*也是一個會在囊體化時期大量表現的基因，以來調控其

它下游其它與囊體化有關的基因，如果*gtopoII*在囊體化時期確實是扮演一個關鍵角色，或許也是可能與*myb*基因之間有密切關係。



附圖

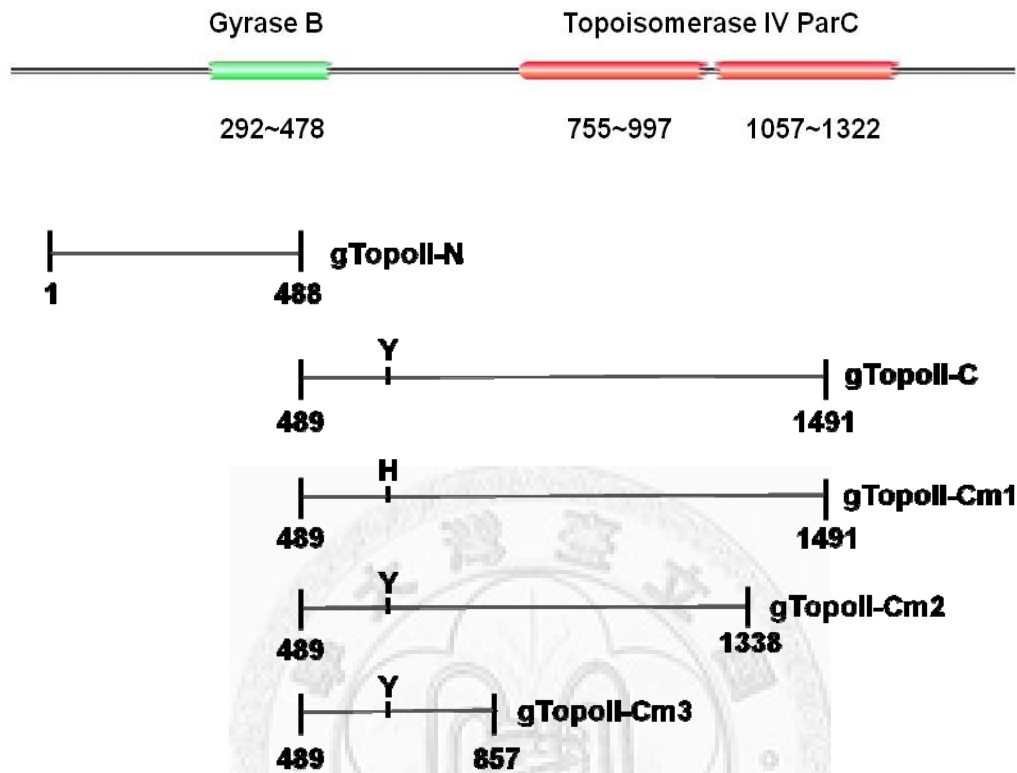
A.

Human topolα	1	MEVS-----PLQPVN--ENMQVNKIKKNE <del>DAKRL</del> LSVERIYQKKTQLEHIL
Human topolβ	1	MAKSGGCGAGAGVGGNGALTVVNNAAKKEESETANKNDS <del>SKRL</del> LSVERVYQKKTQLEHIL
G.lambliatopol	1	-----MAQKAKIQ <del>RV</del> TGSEHVL
Human topolα	45	LRPDTYIGSVELV <del>TQ</del> QMVVYDEDVGINYREVTFVPGLYKIFDEILVNAADNKQRP----
Human topolβ	61	LRPDTYIGSV <del>EP</del> TQFMVVYDEDVGMNCREVTFVPGLYKIFDEILVNAADNKQDK----
G.lambliatopol	18	LRPDMYV <del>GSV</del> SAAETF <del>LW</del> LYEPGQGLYYTKANI <del>V</del> PGLCKIFDEI <del>L</del> VNASDNKQRSDSRSA
Human topolα	101	--KMS <del>CIR</del> VTIDPEN <del>NI</del> LSIWNNKGIPVVEHKVEKMYVPALIFGOLLTSSNYDDDEKKV
Human topolβ	117	--NMT <del>CI</del> KVSIDPES <del>NI</del> LSIWNNKGIPVVEHKVEK <del>V</del> YVPALIFGOLLTSSNYDDDEKKV
G.lambliatopol	78	EHKMT <del>YIK</del> CSVDVASGAISV <del>EN</del> DGVEGLLHFDEK <del>E</del> KMYL <del>P</del> TLAFGILMTSSNYDDTEQRV
Human topolα	159	TGGRNGYGAKLCNIFSTKFTVETASREYK <del>K</del> MFQ <del>T</del> WMDNMGRAGEMELKPFNGE--DYTC
Human topolβ	175	TGGRNGYGAKLCNIFSTKFTVETACK <del>E</del> YKHSFK <del>Q</del> TWMMNMMKTS <del>E</del> AKIKHFDGE--DYTC
G.lambliatopol	138	TGGRNGYGAKL <del>T</del> NIFSTKFTVLLQ--ENGQV <del>E</del> Q <del>T</del> WTDNMKN <del>T</del> KPPRIEDVRDKKKNFIR
Human topolα	217	ITFQPDLSKFKMQS-LDKDIVALM <del>V</del> RRAYDL <del>A</del> GS <del>T</del> KDVKVFLNGNKL <del>P</del> VK <del>G</del> FRSYVDMYL
Human topolβ	233	ITFQPDLSKFKMEK-LDKDIVALM <del>T</del> RRAYDL <del>A</del> GS <del>C</del> RGVKVMFNGK <del>L</del> PVNGFRSYVD <del>L</del> YV
G.lambliatopol	196	F <del>S</del> F <del>T</del> PDYMKFG <del>M</del> TSG <del>L</del> DRDHA <del>A</del> Y <del>M</del> RRAYD <del>V</del> AG <del>C</del> NI <del>G</del> LK <del>L</del> I <del>N</del> GTELKIAN <del>E</del> QYARMVY
Human topolα	276	K-----DKLDET <del>G</del> NSL <del>K</del> VIHE
Human topolβ	292	K-----DKLDET <del>G</del> V <del>A</del> L <del>K</del> VIHE
G.lambliatopol	256	RSINPEITQFYETSKGD <del>T</del> AQVNTNDS <del>S</del> DL <del>D</del> IKSAAKAKPK <del>T</del> KRT <del>K</del> TI <del>E</del> TNSL <del>L</del> IPVDD
Human topolα	292	QVN-----HRWEVCLT <del>M</del> SEK <del>G</del> -FQ <del>I</del> SFVNSIAT <del>S</del> KGGRHVDYVADQIVT
Human topolβ	308	LAN-----ERWDVCLT <del>L</del> SEK <del>G</del> -FQ <del>I</del> SFVNSIAT <del>T</del> KGGRHVDYVVDQ <del>V</del> VG
G.lambliatopol	316	LSKPSD <del>W</del> THDYLK <del>V</del> IPV <del>N</del> K <del>F</del> WD <del>E</del> GL <del>G</del> Y <del>T</del> DS <del>G</del> ELV <del>Q</del> V <del>S</del> FVNSI <del>N</del> T <del>T</del> DGG <del>T</del> HVDA <del>I</del> LDL <del>I</del> MS
Human topolα	336	KLVDV <del>V</del> VKK---K <del>N</del> K <del>G</del> VAVKAH <del>Q</del> VKNHM <del>W</del> L <del>F</del> V <del>N</del> ALIENPTFDSQTKENMTLQPKSFG--
Human topolβ	652	KL <del>E</del> V <del>V</del> VKK---K <del>N</del> K <del>A</del> GVSVK <del>P</del> FQ <del>V</del> KNH <del>I</del> W <del>F</del> IN <del>C</del> L <del>I</del> ENPTFDSQTKENMTLQPKSFG--
G.lambliatopol	376	QL <del>N</del> D <del>V</del> IK <del>S</del> FQ <del>D</del> AK <del>N</del> AK <del>L</del> TR <del>Q</del> QL <del>K</del> SCLV <del>L</del> F <del>I</del> RS <del>L</del> V <del>V</del> NP <del>S</del> FDSQTKIS <del>L</del> K <del>T</del> DKAALLRS
Human topolα	390	-----STCQLSEK <del>F</del> I <del>K</del> AAIG <del>C</del> GIVESILN <del>W</del> V <del>K</del> FKAQ <del>V</del> QLNKKCS <del>A</del> V <del>K</del> HNR <del>I</del> K <del>G</del> IPK <del>L</del> DD
Human topolβ	406	-----SKCQLSEK <del>F</del> F <del>K</del> AA <del>S</del> NC <del>G</del> IVESILN <del>W</del> V <del>K</del> FKAQ <del>T</del> QLNKKCS <del>S</del> V <del>K</del> YS <del>K</del> I <del>K</del> GIPK <del>L</del> DD
G.lambliatopol	436	LGSTQ <del>A</del> ELAT <del>L</del> A <del>T</del> Q <del>L</del> V <del>K</del> R <del>I</del> Q <del>E</del> IR <del>P</del> L <del>W</del> NS <del>L</del> RQASYNQA <del>A</del> KL <del>T</del> K <del>T</del> D <del>G</del> SK <del>T</del> S <del>Q</del> L <del>G</del> IPK <del>L</del> DD
Human topolα	444	ANDAGGRNSTECTLL <del>L</del> TEGDSAK <del>L</del> AVSGLGV <del>V</del> GRDK--YGVFPLRGKILN <del>V</del> REASHKQI
Human topolβ	460	ANDAGG <del>K</del> HSLE <del>C</del> TLL <del>L</del> TEGDSAK <del>S</del> AVSGLGV <del>I</del> GRDR--YGVFPLRGKILN <del>V</del> REASHKQI
G.lambliatopol	496	ATA <del>A</del> GTRES <del>S</del> K <del>T</del> L <del>L</del> TEGDSAK <del>A</del> LAVD <del>G</del> ISS <del>I</del> EDGK <del>K</del> Y <del>Y</del> GVFPLRGK <del>V</del> IN <del>V</del> RNESIDKY
Human topolα	502	MENAEINNI <del>I</del> KIVGLQYKKN <del>Y</del> ED <del>E</del> DSLKTLRYGKIMIMTDQDQD <del>G</del> SHIKGL <del>L</del> IN <del>F</del> FIH <del>N</del> W
Human topolβ	518	MENAEINNI <del>I</del> KIVGLQYKKS <del>Y</del> DD <del>A</del> ESLKTLRYGKIMIMTDQDQD <del>G</del> SHIKGL <del>L</del> IN <del>F</del> FIH <del>N</del> W
G.lambliatopol	556	S <del>N</del> NAEIT <del>N</del> L <del>K</del> K <del>I</del> GL <del>K</del> Q <del>G</del> MD <del>V</del> ST <del>Q</del> E <del>A</del> RNT <del>L</del> RYG <del>H</del> VMIMTDQD <del>F</del> D <del>G</del> SHIKGL <del>L</del> IN <del>F</del> LD <del>T</del> Y <del>W</del>
Human topolα	562	PSLLRHR-FLEEFITPIV <del>K</del> VSK <del>N</del> KQEMAFYS <del>L</del> PE <del>F</del> FEWKSSTPN <del>H</del> KK <del>W</del> K <del>V</del> K <del>Y</del> YKGLGTST
Human topolβ	578	PSLL <del>R</del> HG-FLEEFITPIV <del>K</del> ASK <del>N</del> KQELSFYSI <del>P</del> EFDEW <del>K</del> K <del>H</del> EN <del>O</del> K <del>A</del> W <del>K</del> I <del>K</del> Y <del>Y</del> KGLGTST
G.lambliatopol	616	NG <del>L</del> AR <del>S</del> NK <del>F</del> LD <del>F</del> ITPIV <del>R</del> CT <del>A</del> R <del>N</del> M <del>K</del> TFY <del>T</del> PE <del>Y</del> KK <del>W</del> T <del>Q</del> T <del>V</del> TDLP <del>K</del> WN <del>I</del> N <del>Y</del> YKGLGSSN
Human topolα	621	SKEAKEYFAD <del>M</del> K <del>R</del> HRI <del>Q</del> FKYS <del>G</del> PEDDA <del>A</del> ISLAFS <del>K</del> KQIDDRKEWLTNFMEDRRQR <del>K</del> LLGL
Human topolβ	637	AKEAKEYFAD <del>M</del> E <del>R</del> HRI <del>L</del> FRY <del>A</del> GPEDDA <del>A</del> ITLAFS <del>K</del> KQIDDRKEWLTNFMEDRRQR <del>R</del> LHGL
G.lambliatopol	676	T <del>T</del> DA <del>K</del> QY <del>F</del> Q <del>Q</del> IANN <del>R</del> K <del>T</del> L <del>I</del> Y <del>N</del> -PESASK <del>L</del> KLAF <del>D</del> K <del>L</del> LAD <del>D</del> R <del>K</del> T <del>W</del> IS-----GT
Human topolα	681	PE <del>D</del> Y <del>L</del> Y <del>G</del> Q <del>T</del> TT <del>Y</del> LT <del>Y</del> NDFINKEL <del>L</del> FSNSD <del>N</del> ERSIPS <del>M</del> VDGLK <del>P</del> GQRK <del>V</del> L <del>F</del> TC <del>F</del> K <del>R</del> ND <del>K</del> R
Human topolβ	697	PE <del>Q</del> F <del>L</del> Y <del>G</del> TAT <del>K</del> H <del>L</del> TY <del>N</del> DFINKEL <del>L</del> FSNSD <del>N</del> ERSIPS <del>L</del> V <del>D</del> G <del>K</del> PGQRK <del>V</del> L <del>F</del> TC <del>F</del> K <del>R</del> ND <del>K</del> R
G.lambliatopol	723	D <del>P</del> D <del>T</del> Y <del>L</del> DL <del>S</del> P <del>T</del> K <del>I</del> DITAF <del>V</del> DKEL <del>V</del> LY <del>D</del> IES <del>N</del> OR <del>A</del> IP <del>S</del> LM <del>D</del> GLK <del>P</del> GQRK <del>V</del> L <del>F</del> TC <del>F</del> K <del>R</del> ND <del>K</del> R
Human topolα	741	E <del>V</del> KVAQLAGSVAEMS <del>S</del> YHHGEM <del>S</del> LM <del>M</del> TI <del>L</del> NLAQNFVGSNN <del>L</del> NLLQPIGQ <del>F</del> G <del>T</del> RLHGGK <del>D</del> S
Human topolβ	757	E <del>V</del> KVAQLAGSVAEMSA <del>Y</del> HHGEM <del>Q</del> LM <del>M</del> TI <del>V</del> NLAQNFVGSNN <del>I</del> NLLQPIGQ <del>F</del> G <del>T</del> RLHGGK <del>D</del> A
G.lambliatopol	788	K <del>T</del> V <del>S</del> QL <del>S</del> G <del>F</del> V <del>S</del> DKA <del>A</del> YHHGEM <del>S</del> L <del>N</del> GTIV <del>N</del> MA <del>Q</del> S <del>F</del> TGSNNI <del>A</del> LL <del>V</del> PAGI <del>F</del> G <del>S</del> RARGGK <del>D</del> S

		*
Human topolix	801	ASPRYIFTMLSSLARLLFPKDDHTLKFLYDDNQRVEPEWYIPIIPMVLINGAEGIGTGW
Human topoliβ	817	ASPRYIFTMLSTLARLLFPAVDDNLLKFLYDDNQRVEPEWYIPIIPMVLINGAEGIGTGW
G.lambliatopoli	843	SAPRYISTYLDPLARYLFFPEPDDAIMQYKEDDGKVIIEPFYFAPILIPMVLINGSDDGIGTGF
<hr/>		
Human topolix	861	SCKIPNFDVREIVNNIRRLMDGEEPLMPLPSYKNFKGTIBELAPNOYVISG-----
Human topoliβ	877	ACKIPNYDAREIVNNVRRMLDGLDPHPMLPNYKNFKGTIQELGONQYAVSG-----
G.lambliatopoli	903	STTIPQFDPLDMLHSIRLRIYGKTTREKRTLKPFSSNGWKGTMTHEYDKSGKFRWRMTG
<hr/>		
Human topolix	912	EVAILNSTTIEISELPVRTWTQTYKEQVLEPMLNGTEKTPPLITDYREYHTDTTVKFVVK
Human topoliβ	928	EIVFVDRNTVEITELPVRTWTQVYKEQVLEPMLNGTDKTPALISDYKEYHTDTTVKFVVK
G.lambliatopoli	963	CFSVVDLKTIIQITDLPFGVWTESYREIEIETWVKGNEDAG-----TAKKPATKQVSA
<hr/>		
Human topolix	972	MTEEKLAEAERVGLHKVFKLQTSLTCNSMVLFDHVGCLKKYDTVLDILRDFFEELRLKYYG
Human topoliβ	988	MTEEKLAQAEAAAGLHKVFKLQTTLTCNSMVLFDHMGCLKKYETVODILKEFFDLRLSYYG
G.lambliatopoli	1013	TKGKAKLKGASGAAKKPKPAKDQLYDSVTGYKGIHPALMKVIDMSDNNTVNIIVTLSD
<hr/>		
Human topolix	1032	LRKEWLVGMLGAESAKLNNQARFILEKIDGKIITENKPKKELIKVLIQRGYSDPVKAWK
Human topoliβ	1048	LRKEWLVGMLGAESTKLNNQARFILEKIQGKIITENRSKDLIQMLVQRGYESDPVKAWK
G.lambliatopoli	1073	ECARYLIGTSDVDIETCNTAGTARYDNIKGFKLDGSIKPSNMWLYNERNMLCLYHTPFK
<hr/>		
Human topolix	1092	EAQQKVPDEEENEESDNEKETEKSDSVTDSGPTFNYLDMPLWYLTKEKKDELCLRLNEK
Human topoliβ	1108	EAQEKAAEE--DETQNHDDSSSDSGTSPGPDFNYILNMSLWLSLTKKVEELIKQRDAK
G.lambliatopoli	1133	IIDAFYAKRLDLRVRN-----NQIIDMDRSLMLNEKARFIKLIIEID
<hr/>		
Human topolix	1152	EQELDTLKRKSPSDLWKEDLATFIEELEAVEAKEKQDEQVGLP----GKGKAKGKKTQ
Human topoliβ	1165	GREVNDLKRKSPSDLWKEDLAAFVEELDKVESQEREDVLAGMSGKAIKGKVGKPKVKKLQ
G.lambliatopoli	1177	KLNIKNVPRDSVTELLWGKYQFHPSRKHRIILLSHRN-----LINKRQALKID
<hr/>		
Human topolix	1207	MAEVLPSPRGQRVIPRITIEKAEAEKKNKKIK-----NENTEGSPQEDG--
Human topoliβ	1225	LEETMPSPYGRRIIPEIT-AMKADASKKLLKKKKGDLDTAAVKVEFDEEFSGAPVEGAGE
G.lambliatopoli	1225	EDSERPEEDDDADQRDLKHLAETVKDLIG-----
<hr/>		
Human topolix	1253	---VELEGLKQRLEKKQKREPQTKTKKQTTLAFKP-IKKGKRNPNWSDSESRRSS--DE
Human topoliβ	1284	EALTPSVPIKNGPKPKREKKEPQTRVRKTPPTSSGKPSAKKVKKRNPNWSDDESSESLEE
G.lambliatopoli	1255	-----PQFFDAINSWSGFTVQDRNECYEYLLRMPISTMTKESYRNLLSSAELIRAAE
<hr/>		
Human topolix	1306	SNFDVPPRETEPRRAAT-KTKETMDLSDSEDFSDFDEKTD-----DE
Human topoliβ	1344	TEPVVIPRDSLRRRAAERPKYTFDFSEEDDDADDDDDNNDLEELKVKASPIITNDGED
G.lambliatopoli	1308	KLRNTTVENMWLRDLAAFEAAVEVDRHMEQTKSAET-----
<hr/>		
Human topolix	1347	DFVPSD-----ASPPKTKTSPKLSNKEKLPQ-----KSVVSDLEADDVKGSVPL
Human topoliβ	1404	EFVPSDGLDKDEYTFSPGKSKATPEKSLHDKKSKQDFGNLFSFSPYSQKSEDDSAKFDSE
G.lambliatopoli	1344	-----RRLTVTETMIQKLEE-----SERKYKAMDDRVDSDN
<hr/>		
Human topolix	1391	SSSPPAATHFPDETEITNPVFKKNVTVKKTAAKSQSS-TSTTGAKKRAAPKGTKRDPALNS
Human topoliβ	1464	EDSASVFSFSGFLKQTDKVPKSKTVAAKKPKSSDTPVKKRAPKQKVVVEAVNSDSESEF
G.lambliatopoli	1377	BIEYSTTRDDQGLKIKGEPKPKKEHVPKTAPASKAKVQKPEEGLETAPTEPKRKRPAAP
<hr/>		
Human topolix	1450	GVSQKPPDAKTKNR--RKRKPSSTSDSDSNFEKIVSKAVTSKSKSGESDD-----FHM
Human topoliβ	1524	GIPKKTTPPKGKGRGAKRKRKASGSENEGDPYNGPKRKTSTKPKPKTSFDQSDVDIYFPS
G.lambliatopoli	1437	-----DENGEDDL-----VDTKKASAKRGKKE--ESSFT
<hr/>		
Human topolix	1501	DFDSAVAPRAKSVRAKPKIKYLESEDEDD-----LF-
Human topoliβ	1584	DFPTEPPSLPRTGRARKEVKYFAESDEEEDDVFAMFN
G.lambliatopoli	1484	EESGATELSDSSVLEDDYSYVSYTYDED-----

█ ATPase domain  
█ Human topolix  
█ Human topoliβ  
█ G.lambliatopoli  
\* Tyrosine

B.



圖一:梨形鞭毛蟲*gtopoII*基因序列分析

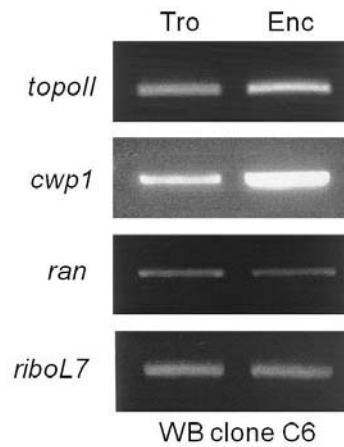
(A) 利用Clustal W將人類拓樸異構酶-II  $\alpha$  和II  $\beta$  型與梨形鞭毛蟲拓樸異構酶-II序列做比對。紅色方框表示ATP與蛋白質結合位置(HE *et al.*, 2005)。利用Pfam程式分析,深藍色底線表示具有ATPase活性區域,紫色底線表示人類拓樸異構酶-II  $\alpha$  具有切割DNA活性區域,綠色底線表示人類拓樸異構酶-II  $\alpha$  具有切割DNA活性區域,橘色表示梨形鞭毛蟲拓樸異構酶-II具有切割DNA活性區域。紅色星號表示負責打斷DNA的酪胺酸殘基( Corbett *et al.*, 2004)。

(B) 利用Pfam程式(<http://pfam.sanger.ac.uk/>)分析梨形鞭毛蟲拓樸異構酶-II的胺基酸序列。綠色表示相似於DNA gyraseB區域(第292~478個胺基酸),紅色表示相似於拓樸異構酶-IV區域(第755~997個胺基酸,第1057~1322個胺基酸)。序列全長1491個胺基酸。下方圖表示為突變蛋白gTopoII-N和gTopoII-C片段蛋白和gTopoII-C的突變蛋白gTopoII-Cm1、gTopoII-Cm2和gTopoII-Cm3, gTopoII-N

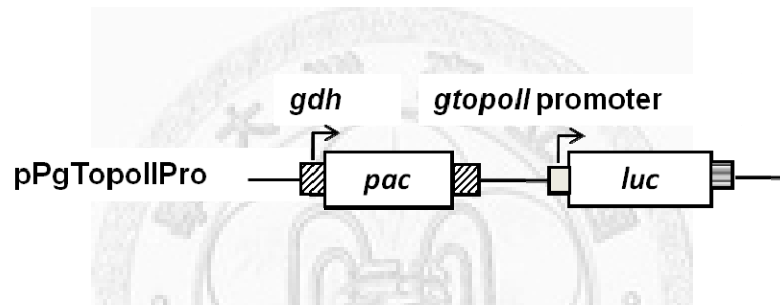
是第1~488個胺基酸，gTopoII-C是489~1491個胺基酸，gTopoII-Cm1是在第847個胺基酸上做突變(Y847H)，gTopoII-Cm2是489~1338個胺基酸，gTopoII-Cm3是489~857。



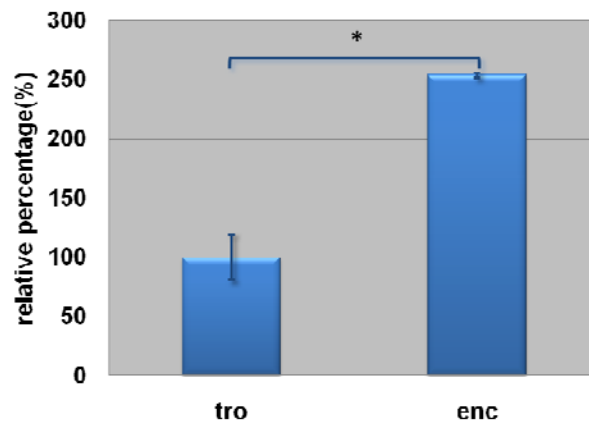
A.



B.



C.



圖二:以 RT-PCR 及 luciferase 活性偵測滋養體時期和囊體時期 *gtopoII* 基因的 mRNA 表現量與啟動子活性

(A) 分別從滋養體和囊體化 24 小時培養的 wild-type(WB)梨形鞭毛蟲，萃取出 RNA 進行 RT-PCR，*gtopoII*、*cwp1*、*ran* 以及 *ribosomal protein L7(riboL7)* 的 mRNA 表現量。其中 *riboL7* 以及 *ran* 基因表現為 internal control。

(B) pPgTopoIIPro 質體示意圖，嘌呤黴素抗藥基因(*pac*)做為篩選細胞株用，以

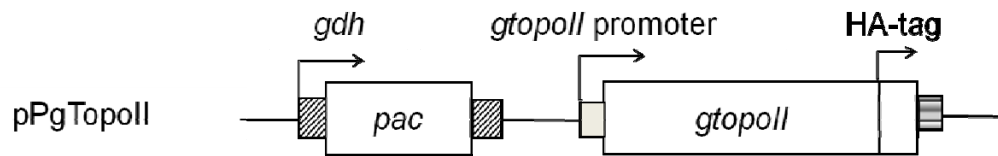
glutamate dehydrogenase(*gdh*)做為其啟動子。螢光酶(*luc*)基因做為報告基因，由 *gtopoII* 基因 5'端上游 300 個核苷酸做為其啟動子。

(C) 測試由 *gtopoII* 基因 5'端上游 300 個核苷酸做為其啟動子所表現出的螢光酶活性。分別測試滋養體(Tro)時期以及囊體化(Enc)24 小時時期。

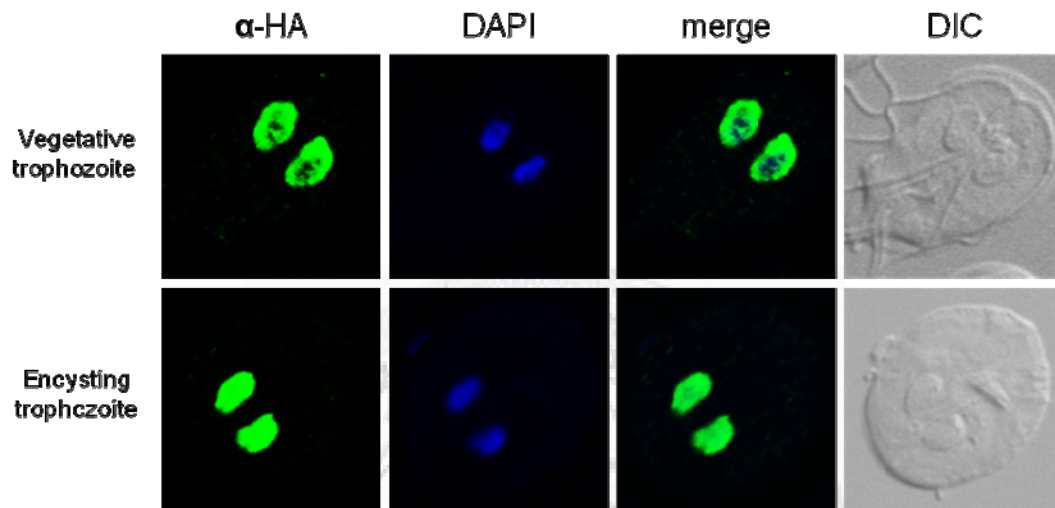




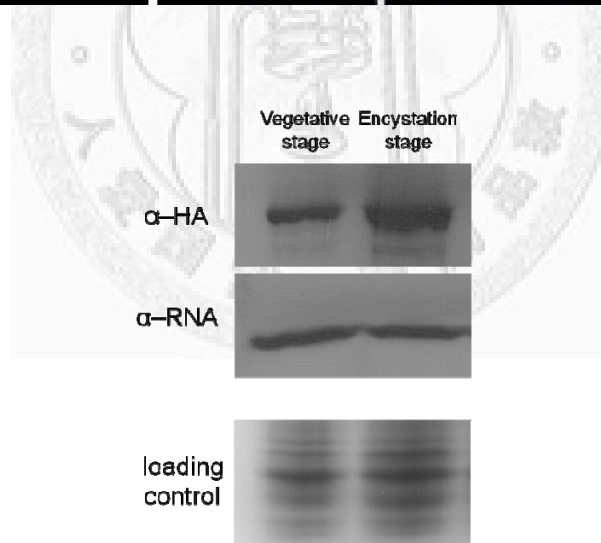
A.



B.



C.



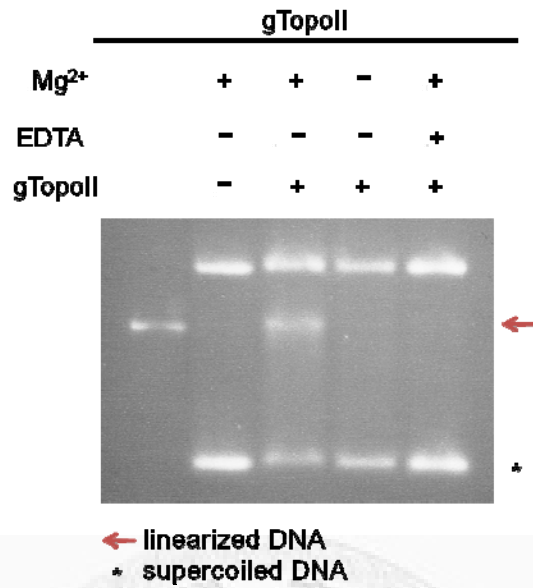
圖三.gTopoII 在梨形鞭毛蟲表現分析

(A)pPgTopoIIWT細胞質體示意圖，該質體以 *glutamate dehydrogenase(gdh)* 啟動子調控 *puromycin N-acetyltransferase(pac)* 基因做為篩選基因，*gtopoII* 以自己的 5'flanking region，約 300 base pair 區域所控制，*gtopoII* C端接有 HA-tag，其 3'flanking region 為 *ran* 基因，

(B)利用抗HA-tag的抗體偵測帶有HA-tag的gTopoII做免疫螢光染色法分析，顯示pPgTopoIIWT細胞株中gTopoII的表現位置，DAPI染色的結果作為細胞核的marker，DIC為細胞立體影像。

(C)使用anti-HA抗體做西方點墨法，分析帶有HA-tag gTopoII蛋白在滋養體和囊體化時期表現，anti-RAN以及下方Coomassie blue為loading control。

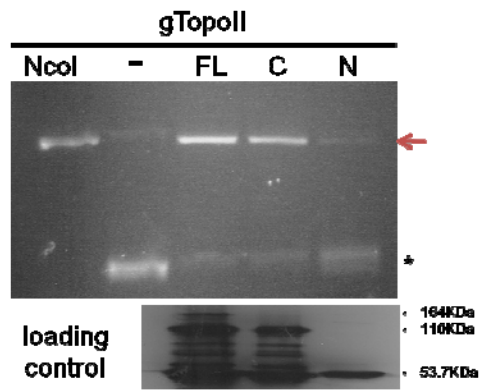




**圖四：鎂離子是gTopoII切割dsDNA所必須**

以 gTopoII 蛋白和 300 ng pUC119 DNA 作用，分別以反應中沒有 Mg<sup>2+</sup> 或是含有 5 mM 的 Mg<sup>2+</sup> 和 10 mM EDTA 或是沒有 EDTA 觀察 gTopoII 切割 DNA 能力。紅色箭頭( ← )表示線型 DNA，星星符號(\*)表示超螺旋結構 DNA。

A.



FL-gTopoll

C -gTopoll-C

N -gTopoll-N

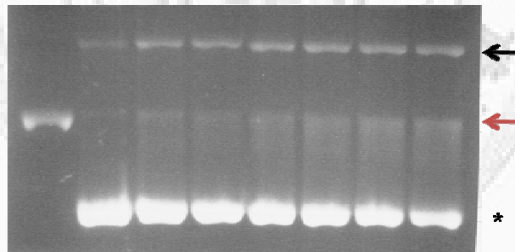
← linearized DNA

\* supercoiled DNA

B.

**gTopoll-N**

NcoI 0 20 60 100 140 180 220(ng)

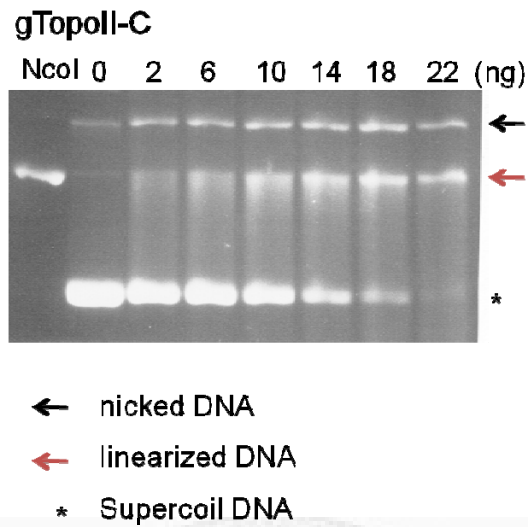


← nicked DNA

← linearized DNA

\* Supercoil DNA

C.



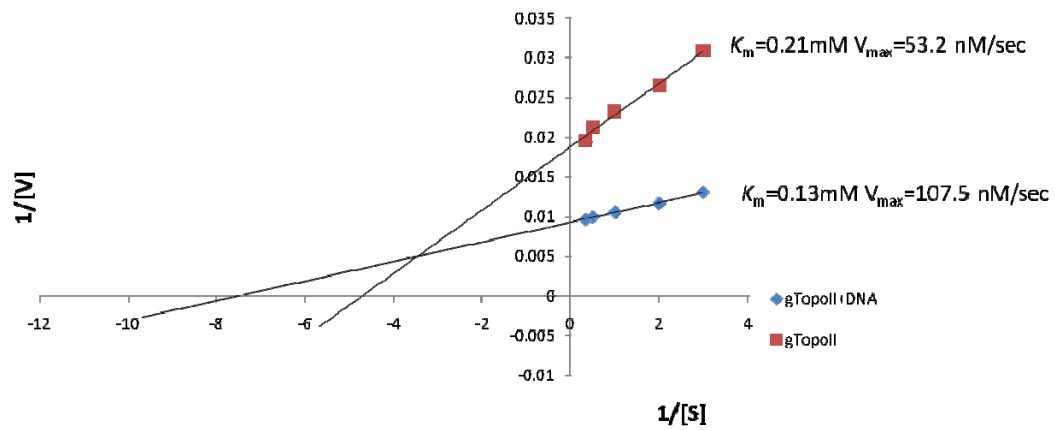
**圖五: gTopoII、gTopoII-N端以及C端切割dsDNA活性分析**

以gTopoII、gTopoII-N和gTopoII-C端片段蛋白與300 ng pUC119 DNA作用。NcoI 做為線型DNA的對照組。黑色鍵頭(←)表示有缺口的環狀DNA，紅色箭頭(←) 表示線型DNA，星星符號(\*)表示超螺旋結構DNA。

(A)將2 ng gTopoII(指164 kDa的band)、100 ng gTopoII-N(指110 kDa的band)和10 ng gTopoII-C(指53.7 kDa的band)蛋白進行切割DNA活性分析，下方為loading control。

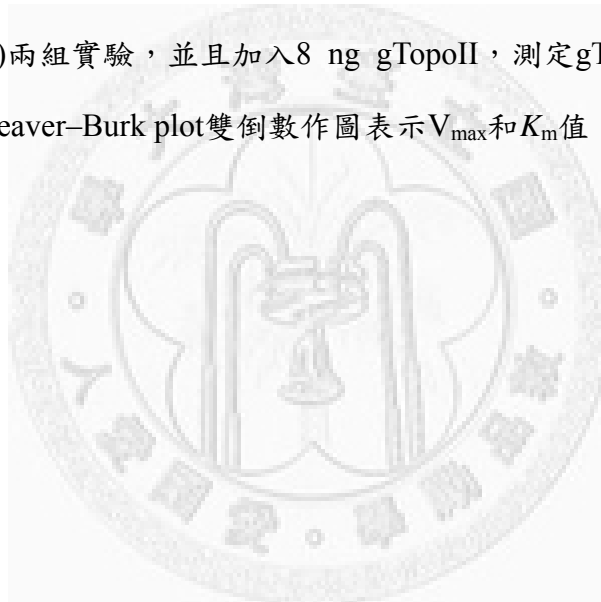
(B)分別以0ng、20 ng、60 ng、100 ng、140 ng、180 ng、220 ng gTopoII-N端蛋白進行切割DNA活性分析。

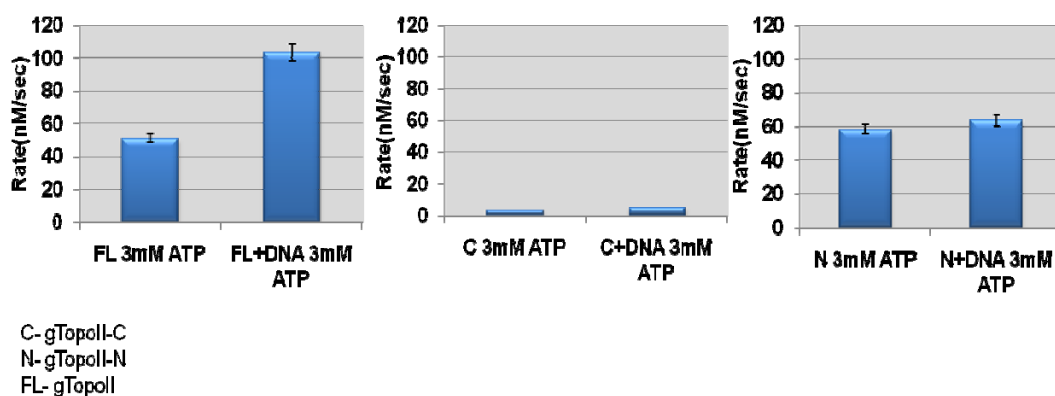
(C) 分別以0ng、2 ng、6 ng、10 ng、14 ng、18 ng、22 ng gTopoII-C端蛋白進行切割DNA活性分析。



圖六:測量gTopoII 分解ATP活性

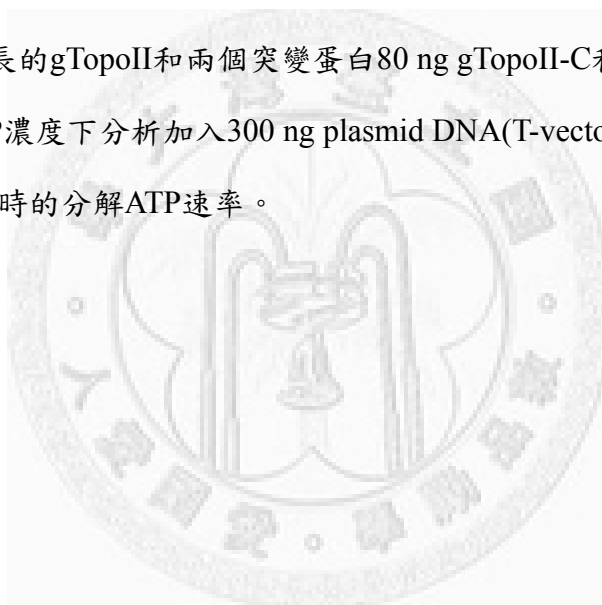
分別以有加入300 ng plasmid DNA(T-vector, 3610 bp)(藍色菱形)和不加入plasmid DNA(紅色正方形)兩組實驗，並且加入8 ng gTopoII，測定gTopoII分解ATP的能力，並且用Lineweaver-Burk plot雙倒數作圖表示 $V_{max}$ 和 $K_m$ 值。

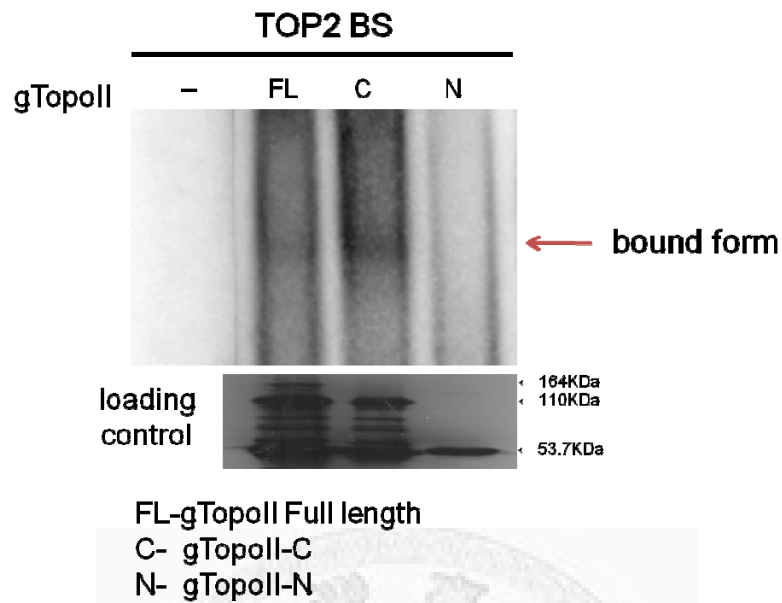




圖七:分析gTopoII、gTopoII-C和gTopoII-N蛋白分解ATP活性是否受到DNA所影響

分別利用8 ng 全長的gTopoII和兩個突變蛋白80 ng gTopoII-C和800 ng gTopoII-N 分別在相同的ATP濃度下分析加入300 ng plasmid DNA(T-vector, 3610 bp)和無 plasmid DNA存在時的分解ATP速率。

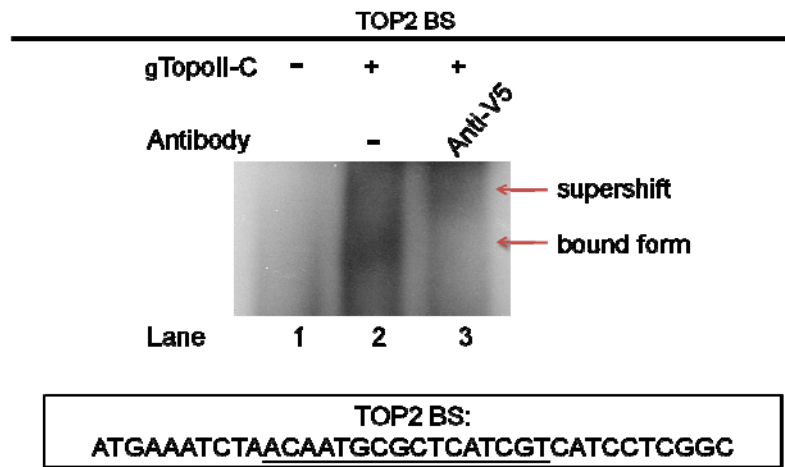




**圖八:鑑定gTopoII蛋白與DNA結合能力**

利用純化出的2.9 ng gTopoII(FL) , 29 ng gTopoII-C(C) , 290 ng gTopoII-N(N)端蛋白做電泳位移實驗 (Electrophoretic Mobility Shift Assay , EMSA) , 探針TOP2 BS 以  $\gamma$ -32p標定。箭頭表示bound form位置。

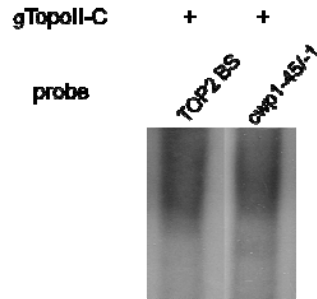




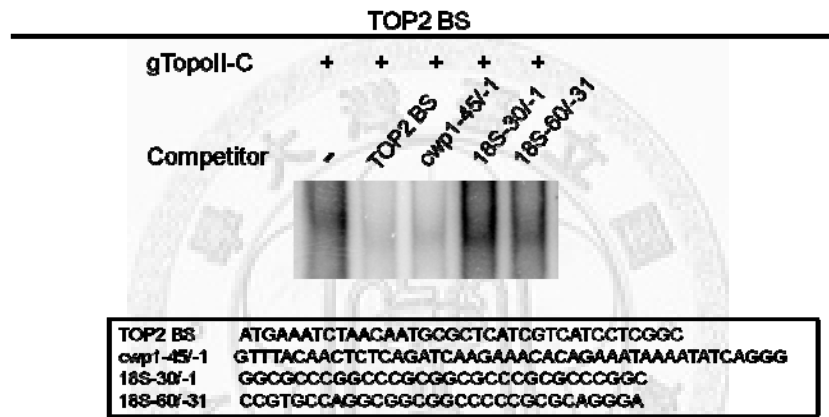
**圖九:鑑定gTopoII-C端蛋白與DNA結合能力**

利用純化出的gTopoII-C端蛋白做電泳位移實驗 (Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA)，探針TOP2 BS以  $\gamma$ -32p 標定，加入純化過的29 ng gTopoII-C端蛋白作反應(Lane 2)。另外加入0.8  $\mu$ g anti-V5抗體進行supershift assay分析(Lane 3)。箭頭表示supershift和bound form位置。

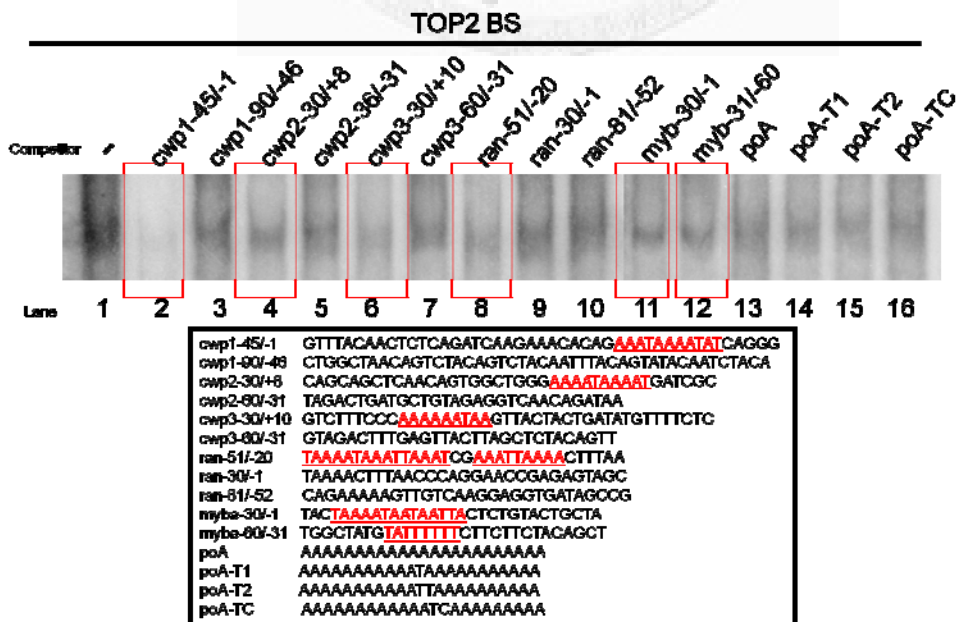
A.



B.



C.



**圖十：利用不同基因的啟動子序列鑑定gTopoII-C端蛋白與DNA結合能力**

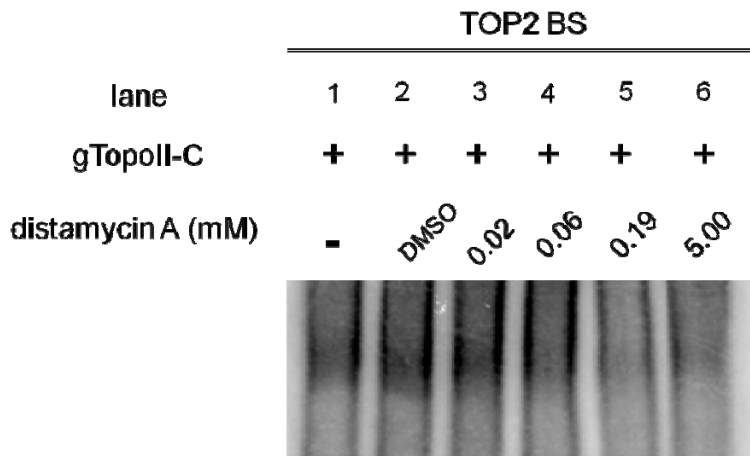
(A) 利用純化出的gTopoII-C端蛋白做電泳位移實驗 (Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA)，探針TOP2 BS、cwp1-45/-1以  $\gamma$ -32p標定，加入純化過的29 ng gTopoII-C端蛋白作反應。

(B)用高50倍濃度的未標定的探針TOP2 BS，cwp1-45/-1，18S-30/-1，18S-60/-31做專一性競爭和非專一性競爭與29 ng gTopoII-C端蛋白做電泳位移實驗。

(C)用高250倍濃度的未標定的探針cwp1-45/-1，cwp1-90/-6，cwp2-30/+8，cwp2-60/-31，cwp3-30/+10，cwp3-60/-31，rna-51/-20，ran-30/-1，rna-81/-52，myba-30/-1，myba-60/-31，poA，poA-T1，poA-T2，poA-TC做為競爭物，加入29 ng gTopoII-C蛋白。紅框框起部分為bound form有明顯受到競爭，附表為競爭物之序列，紅字加底線序列為具有AT-rich片段。



A.

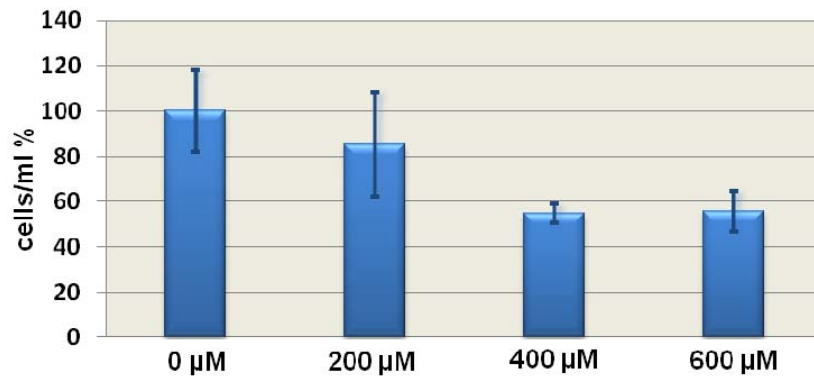


**Distamycin A : DNA minor groove binding agent**

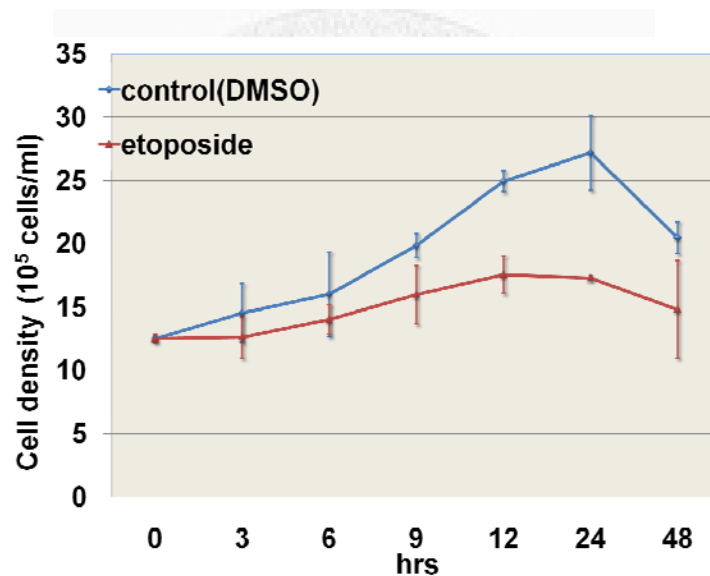
**圖十一：利用distamycin A和gTopoII-C端蛋白競爭DNA結合位置**

利用distamycin A可以結合在DNA minor groove的特性和gTopoII-C端蛋白(29 ng)做競爭，做電泳位移實驗。對照組共兩組，”—“代表完全不加distamycin A和distamycin A溶劑DMSO，”DMSO”代表加入distamycin A的溶劑，distamycin A分為四種不同濃度分別為0.02，0.06，0.19，5.00mM。

A.



B.

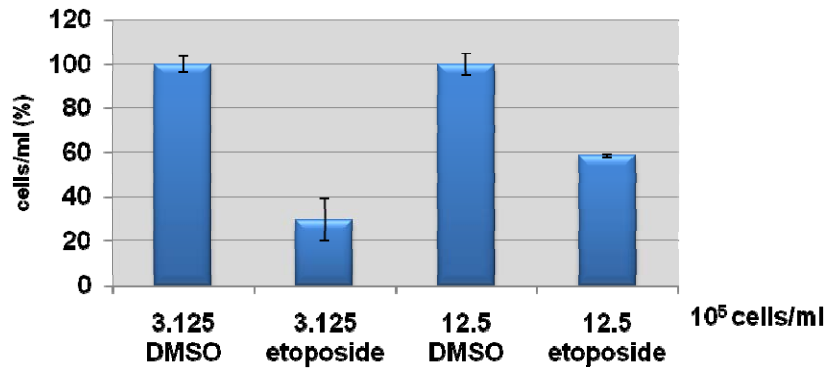


圖十二：抗腫瘤藥物etoposide抑制梨形鞭毛蟲生長

Etoposide為一種抗腫瘤藥物，作用機制是抑制拓撲異構酶-II的活性。

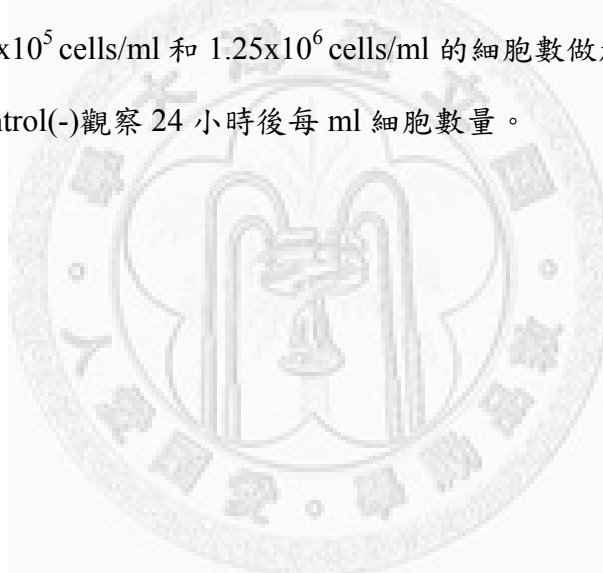
(A) 將 $1.25 \times 10^6$  cells/ml的滋養體細胞分別以 $0 \mu\text{M}$ 、 $200 \mu\text{M}$ 、 $400 \mu\text{M}$ 和 $600 \mu\text{M}$ 不同etoposide濃度加藥24小時後計算各別滋養體數目。將 $0 \mu\text{M}$ 組其細胞數定為100%。

(B) 經由圖A得知當etoposide濃度為 $400 \mu\text{M}$ 時梨形鞭毛蟲數量明顯降低。將 $1.25 \times 10^6$  cells/ml的滋養體細胞加藥濃度設定為 $400 \mu\text{M}$ 分別加藥0、3、6、9、12、24、48小時後計算滋養體數目。

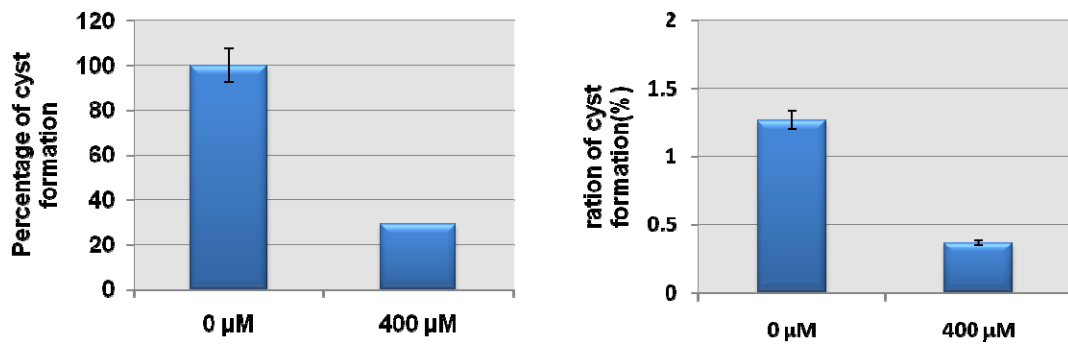


圖十三:以不同細胞數觀察經過處理 etoposide 的梨形鞭毛蟲生長情形

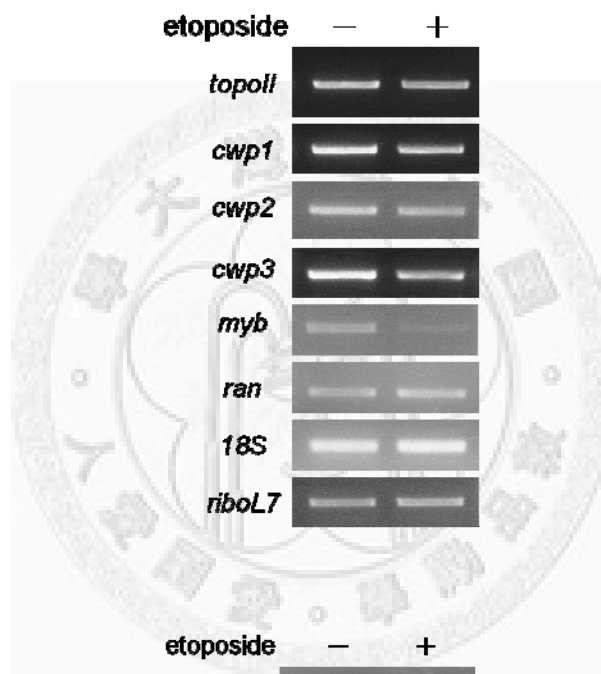
分別以  $3.125 \times 10^5$  cells/ml 和  $1.25 \times 10^6$  cells/ml 的細胞數做加  $400 \mu\text{M}$  etoposide(+)和 control(-)觀察 24 小時後每 ml 細胞數量。



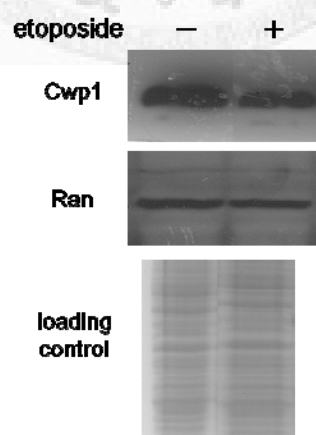
A.



B.



C.



圖十四：抗腫瘤藥物etoposide抑制滋養體時期Cwp1的表現

(A) 將  $1.25 \times 10^6$  cells/ml 的滋養體細胞放入 TYI-S-33 培養液培養 24 小時並用  $400 \mu\text{M}$  etoposide 處理，破壞掉梨形鞭毛蟲滋養體後計算囊體數量，對照組(加入 DMSO)囊體數量設定為 100%(左圖)。右圖為滋養體形成囊體比例，為培養液內實際囊體數除以滋養體數目。

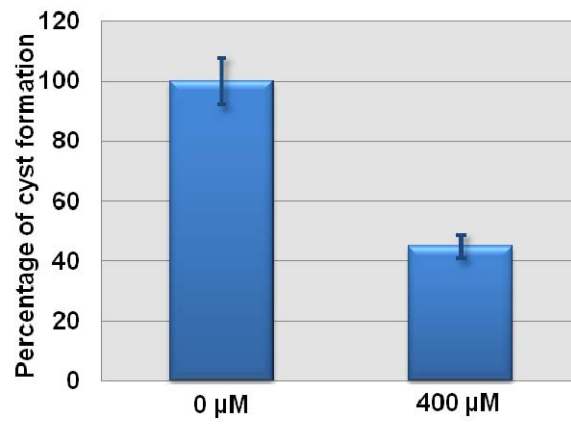
(B) 從滋養體 wild-type(WB) 梨形鞭毛蟲做加藥( $400 \mu\text{M}$  etoposide)和未加藥(DMSO)處理 24 小時，萃取出 RNA 進行 RT-PCR，觀察 *topoII*、*cwp1*、*cwp2*、*cwp3*、*myb*、*ran*、18S ribosomal RNA(18s)以及 ribosomal protein L7(*riboL7*)的 mRNA 表現量。其中 *ran*、18S 以及 *riboL7* 基因表現為 internal control。

(C) 使用 anti-Cwp1 抗體對滋養體時期的梨形鞭毛蟲做西方點墨法分析，下方 RAN 以及 Coomassie blue 染色為 loading control。

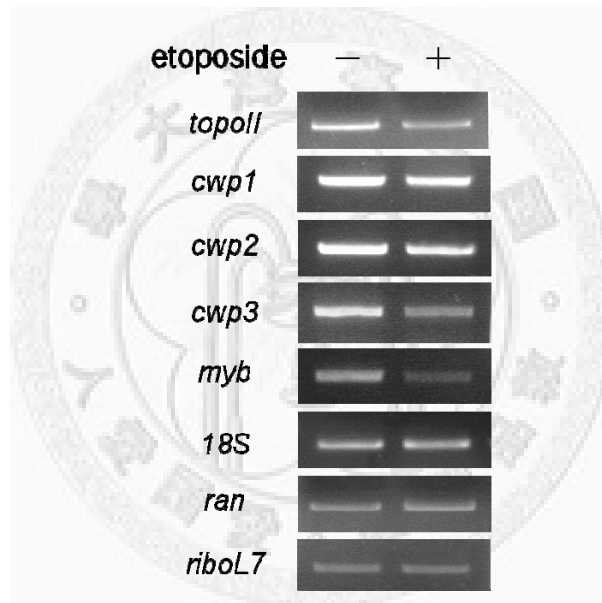




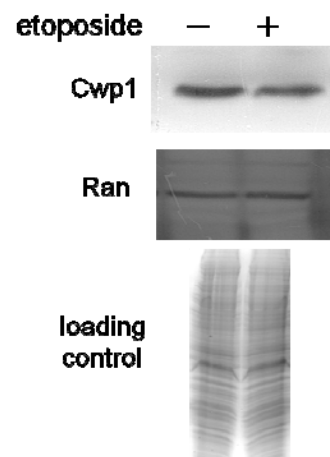
A.



B.



C.



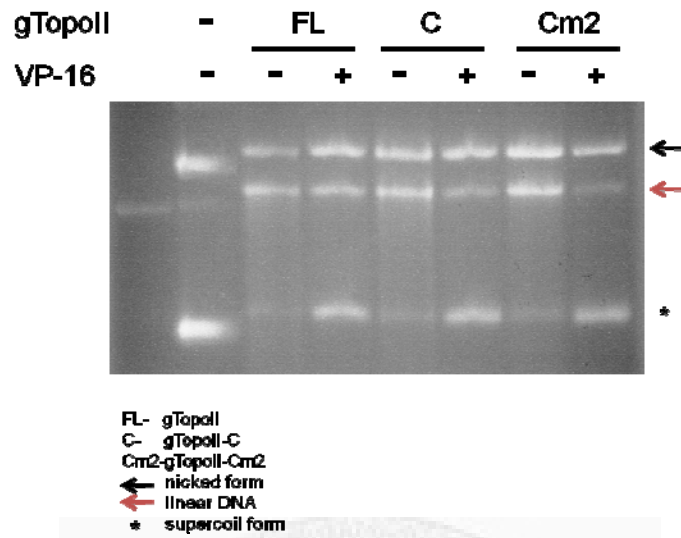
**圖十五：抗腫瘤藥物 etoposide抑制梨形鞭毛蟲形成囊體**

(A)將 $2 \times 10^7$ 的滋養體細胞放入囊體培養液中培養24小時，並做400 $\mu$ M etoposide加藥處理。在破壞掉梨形鞭毛蟲滋養體後計算囊體數量，對照組(加入DMSO)囊體數量設定為100%。

(B)將 $2 \times 10^7$ 的滋養體細胞放入囊體培養液中培養24小時，並做400 $\mu$ M etoposide加藥處理，之後萃取出RNA進行RT-PCR，觀察*topoII*、*cwp1*、*cwp2*、*cwp3*、*myb*、*ran*、18S ribosomal RNA(18s)以及 ribosomal protein L7(*riboL7*)的 mRNA 表現量。其中*ran*、18S 以及 *riboL7* 基因表現為 internal control 。

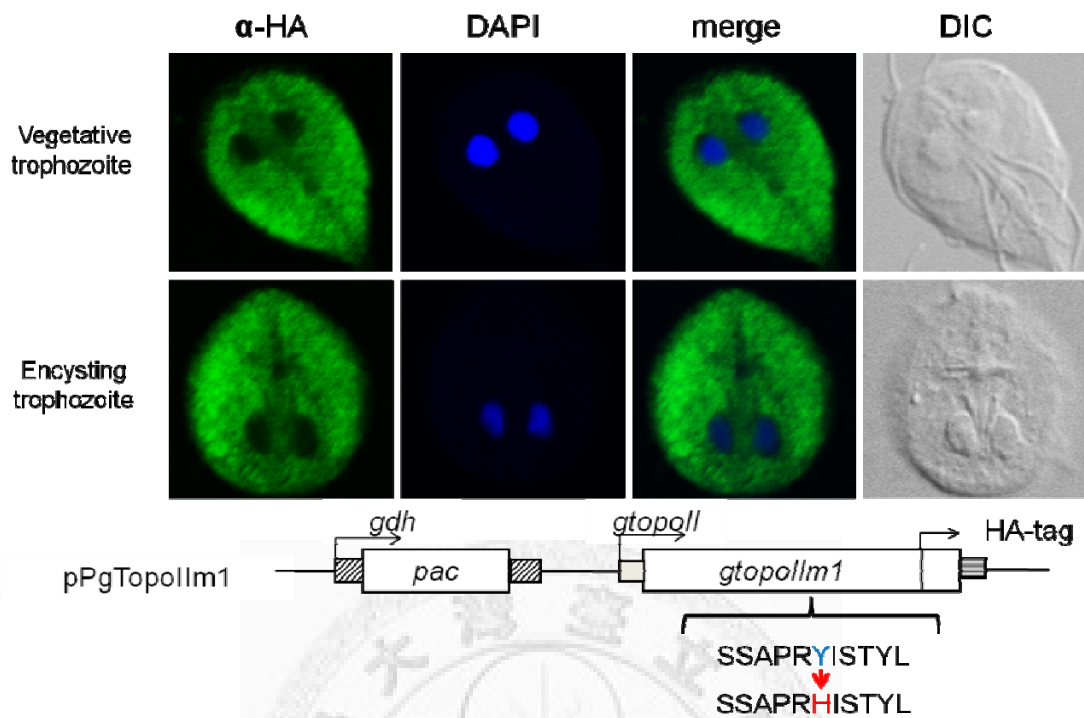
(C)使用抗 Cwp1 抗體對囊體化時期梨形鞭毛蟲做西方點墨法分析，下方 Ran 以及 Coomassie blue 染色為 loading control 。





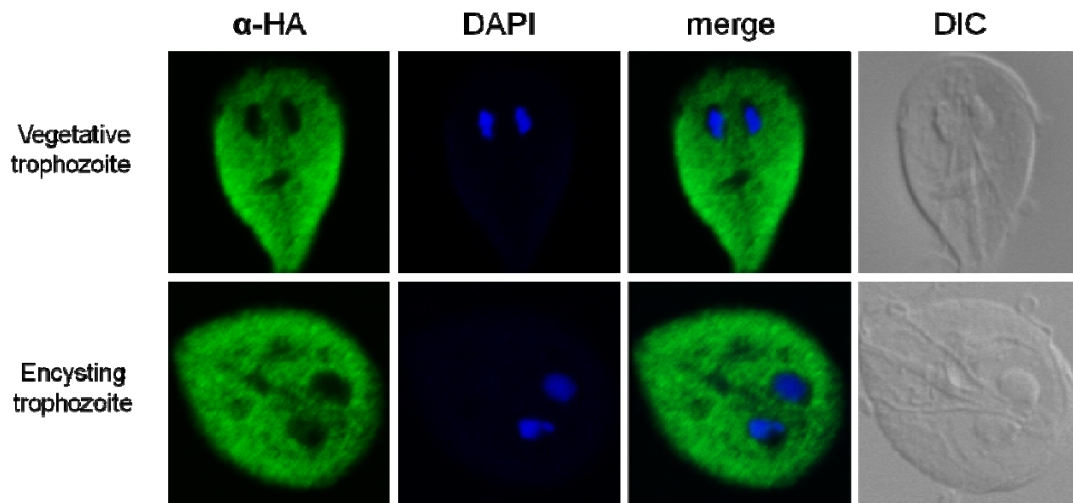
**圖十六: Etoposide 抑制 gTopoII 的切割 dsDNA 活性**

利用拓樸異構酶抑制物 etoposide(1mM)，對 2.2 ng gTopoII、6 ng gTopoII-C 以及 13.2 ng gTopoII-Cm2 進行抑制作用，再進行切割 pUC119 DNA(300 ng)活性測試。黑色鍵頭(←)表示有缺口的環狀 DNA，紅色箭頭(←)表示線型 DNA，星星符號(\*)表示超螺旋結構 DNA，左起第一條 lane 為 control，表示線型 DNA 的位置。



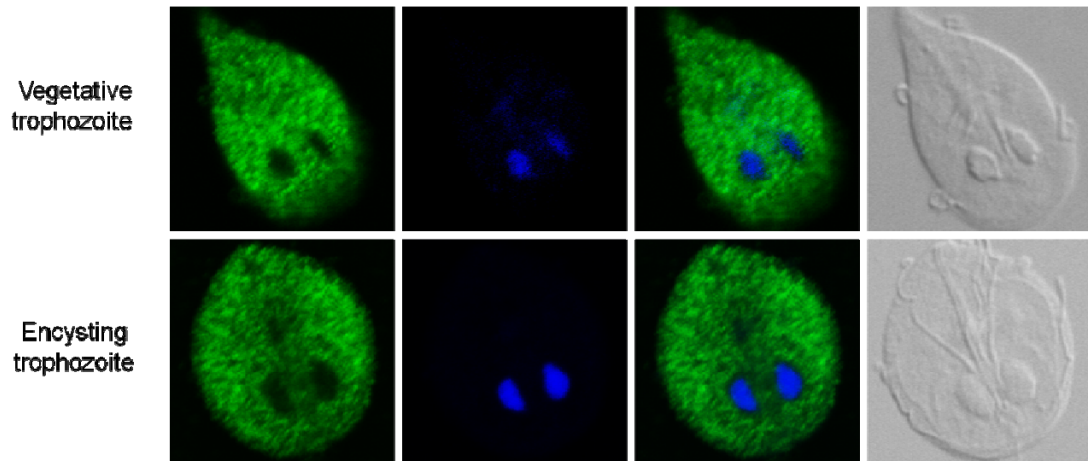
圖十七:鑑定 gTopoIIm1 在梨形鞭毛蟲內表現位置

以 anti-HA 抗體進行免疫螢光染色法鑑定 gTopoIIm1 細胞株蛋白表現位置，可以觀察到標定綠色螢光的 anti-HA 表現在細胞質位置。DAPI 表是細胞核位置。DIC 表示細胞立體影像。下方圖為質體結構示意圖，*gtopoIIm1* 為將原本為酪胺酸 (Tyrosine) 突變為組胺酸 (Histidine)。



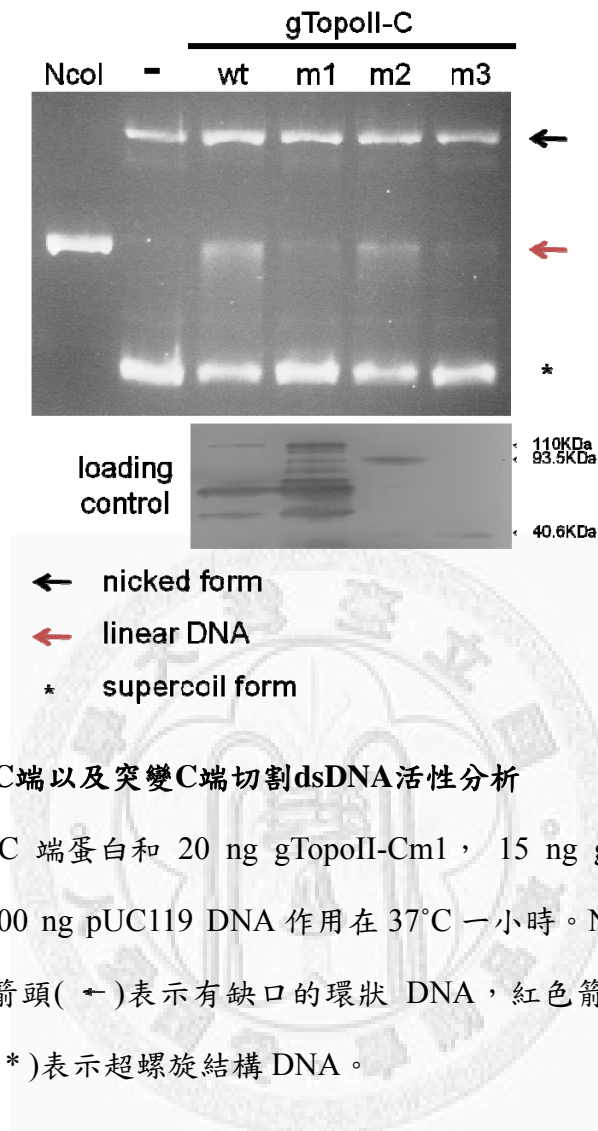
圖十八: 鑑定 gTopoIIm2 在梨形鞭毛蟲內表現位置

以 anti-HA 抗體進行免疫螢光染色法鑑定 gTopoIIm2 細胞株蛋白表現位置，可以觀察到標定綠色螢光的 anti-HA 表現在細胞質位置。DAPI 表是細胞核位置。DIC 表示細胞立體影像。下方圖為質體結構示意圖，*gtopoIIm2* 為去除第 1339~1491 個胺基酸。



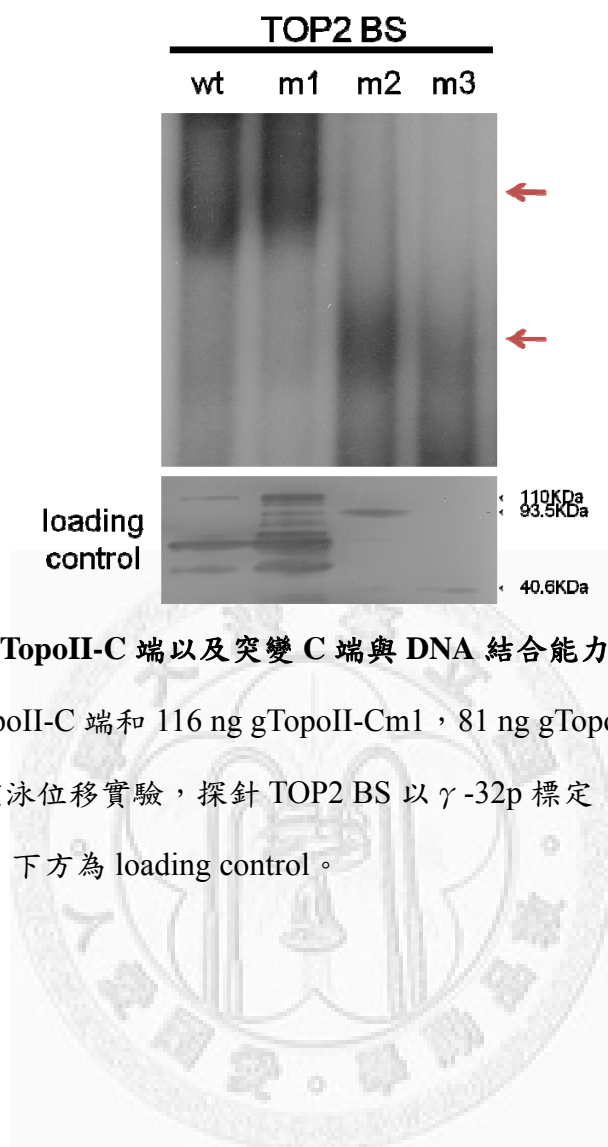
圖十九: 鑑定 gTopoIIm3 在梨形鞭毛蟲內表現位置

以 anti-HA 抗體進行免疫螢光染色法鑑定 gTopoIIm3 細胞株蛋白表現位置，可以觀察到標定綠色螢光的 anti-HA 表現在細胞質位置。DAPI 表是細胞核位置。DIC 表示細胞立體影像。下方圖為質體結構示意圖，*gtopoIIm3* 為去除第 858~1491 個胺基酸。



**圖二十: gTopoII-C端以及突變C端切割dsDNA活性分析**

以 5 ng gTopoII-C 端蛋白和 20 ng gTopoII-Cm1，15 ng gTopoII-Cm2，5 ng gTopoII-Cm3 與 300 ng pUC119 DNA 作用在 37°C 一小時。NcoI 做為線型 DNA 的對照組。黑色箭頭( ← )表示有缺口的環狀 DNA，紅色箭頭( ← )表示線型 DNA，星星符號(\*)表示超螺旋結構 DNA。

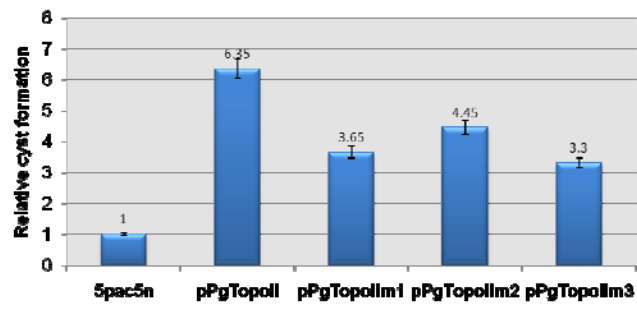


**圖二十一：鑑定 gTopoII-C 端以及突變 C 端與 DNA 結合能力**

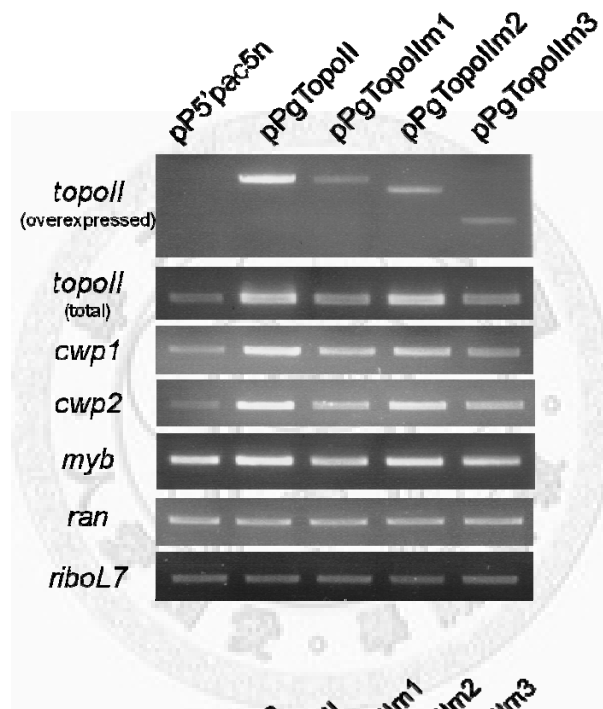
分別以 29 ng gTopoII-C 端和 116 ng gTopoII-Cm1，81 ng gTopoII-Cm2，29 ng gTopoII-Cm3 做電泳位移實驗，探針 TOP2 BS 以  $\gamma$ -32p 標定，紅色箭頭表示為 bound form 位置。下方為 loading control。



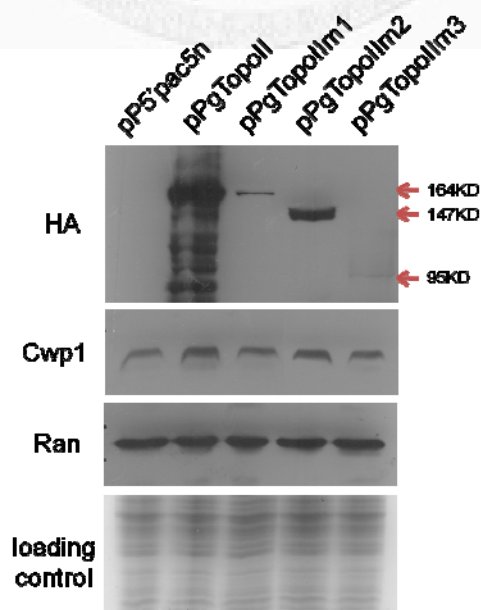
A.



B.



C.



**圖二十二:分析轉染 gTopoII 和突變蛋白在滋養體時期對囊體化相關基因影響**

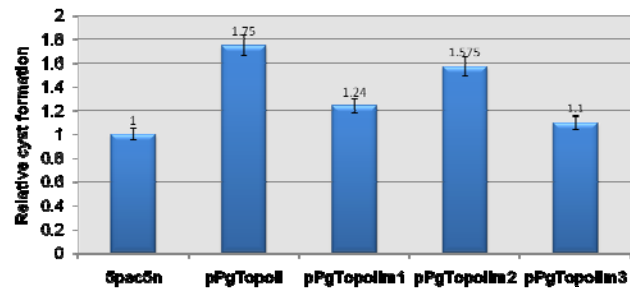
(A)將 pP5'Pac5n, pPgTopoII, pPgTopoII<sub>m1</sub>, pPgTopoII<sub>m2</sub>, pPgTopoII<sub>m3</sub> 細胞株以  $1.25 \times 10^6$  cells/ml 細胞放入 TYI-S-33 培養液培養 24 小時後算形成囊體的數量。將 pP5'Pac5n 形成囊體數目為基準, 與其它細胞株做比較。

(B)分別從轉染 *gtopoII* 和 *gtopoII* 突變基因以及不帶有任何基因 pP5'Pac5n 的滋養體梨形鞭毛蟲中粹取其 RNA, 利用 RT-PCR 分析 *topoII*, *cwp1*, *cwp2*, *myb*, *riboL7*, *ran* 的 mRNA 表現, 其中 *riboL7* 以及 *ran* 基因表現為 internal control 。

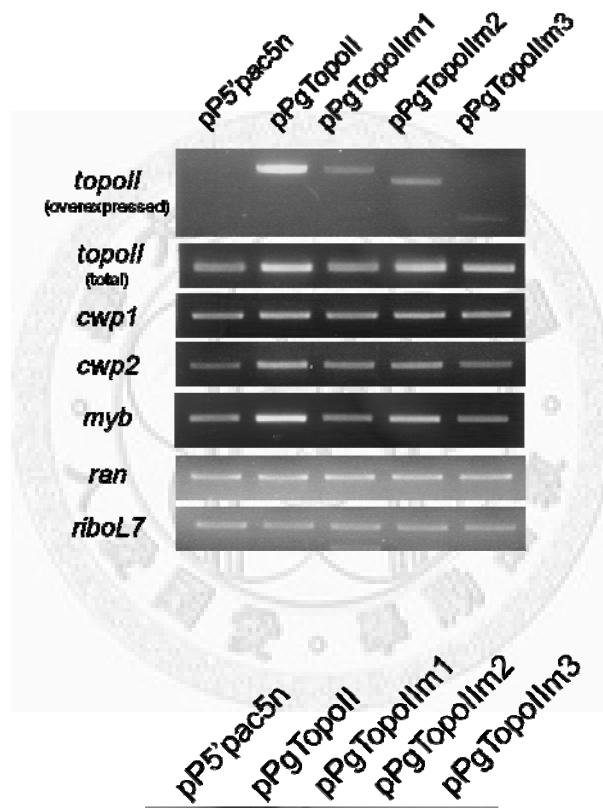
(C)利用 anti-HA, anti-Cwp1 抗體做西方墨點墨法, 偵測在 pP5'Pac5n, pPgTopoII, pPgTopoII<sub>m1</sub>, pPgTopoII<sub>m2</sub>, pPgTopoII<sub>m3</sub> 細胞株中帶有 HA-tag gTopoII 以及 Cwp1 的表現量, 下方 RAN 以及 Coomassie blue 染色為 loading control 。



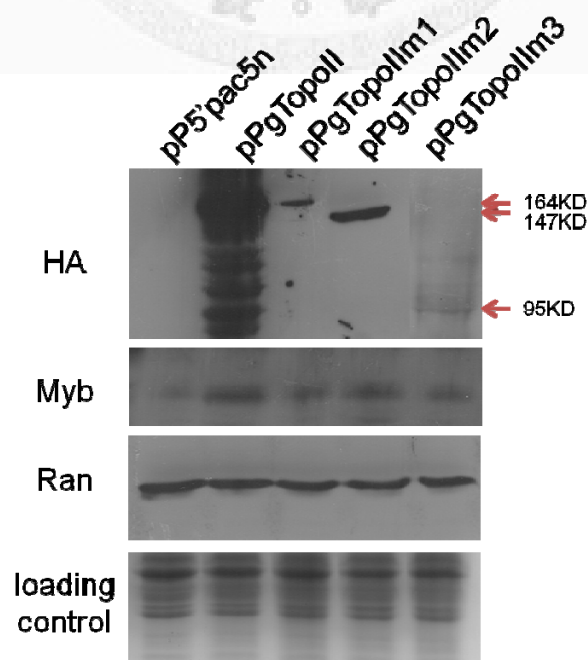
A.



B.



C.



**圖二十三:分析轉染 gTopoII 以及突變蛋白在囊體化時期對囊體化相關基因影響**

(A)將 pP5'Pac5n, pPgTopoII, pPgTopoII<sub>m1</sub>, pPgTopoII<sub>m2</sub>, pPgTopoII<sub>m3</sub> 細胞株以  $2 \times 10^7$  細胞量放入囊體培養液中培養 24 小時,之後進行囊體數目計數,將 pP5'Pac5n 形成囊體數定為基準,與其它細胞株做比較。

(B)分別從轉染 *gtopoII* 和 *gtopoII* 突變基因以及不帶有任何基因 pP5'Pac5n 的滋養體梨形鞭毛蟲中粹取其 RNA,利用 RT-PCR 分析 *topoII*, *cwp1*, *cwp2*, *myb*, *riboL7*, *ran* 的 mRNA 表現,其中 *riboL7* 以及 *ran* 基因表現為 internal control 。

(C)利用 anti-HA 抗體做西方墨點墨法,偵測在 pP5'Pac5n, pPgTopoII, pPgTopoII<sub>m1</sub>, pPgTopoII<sub>m2</sub>, pPgTopoII<sub>m3</sub> 細胞株中帶有 HA-tag gTopoII 的表現量以及 anti-Myb 的表現量。下方 RAN 以及 Coomassie blue 染色為 loading control。



## 参考文献

- Adam RD. Clin Microbiol Rev 2001; 14:447–75. Biology of *Giardia lamblia*.
- Akimitsu,N., Kamura,K., Tone' ,S., Sakaguchi,A., Kikuchi,A., Hamamoto,H. and Sekimizu,K. Biochem. Biophys. Res. Commun., 307, 301–307. (2003) Induction of apoptosis by depletion of DNA topoisomerase IIalpha in mammalian cells.
- Andersen AH, Christiansen K, Zechiedrich EL, Jensen PS, Osheroff N, Westergaard O. Biochemistry. 1989 Jul 25;28(15):6237-44. Strand specificity of the topoisomerase II mediated double-stranded DNA cleavage reaction.
- Ankarklev J, Jerlström-Hultqvist J, Ringqvist E, Troell K, Svärd SG. Nat Rev Microbiol. 2010 Jun;8(6):413-22. Epub 2010 Apr 19. Review. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species
- Austin CA, Marsh KL. Bioessays. 1998 Mar;20(3):215-26. Review. Eukaryotic DNA topoisomerase II beta.
- Austin,C.A. and Marsh,K.L. Bioessays, 20, 215–226 (1998).Eukaryotic DNA topoisomerase II beta.
- Bell CA, Dykstra CC, Naiman NA, Cory M, Fairley TA, Tidwell RR. Antimicrob Agents Chemother. 1993 Dec;37(12):2668-73. Structure-activity studies of dicationically substituted bis-benzimidazoles against *Giardia lamblia*: correlation of anti-giardial activity with DNA binding affinity and giardial topoisomerase II inhibition.
- Bergerat A, de Massy B, Gadelle D, et al. Nature 1997; 386:414–17. An atypical topoisomerase II from archaea with implications for meiotic recombination.
- Bergerat A, Gadelle D, Forterre P. 1994. J. Biol. Chem. 269:27663–69 Purification of a DNA topoisomerase II from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus shibatae*: a thermostable enzyme with both bacterial and eucaryal features.
- Bierne,H. and Michel,B. Mol Microbiol\_ 1994 Jul;13(1):17-23. When replication forks stop.
- Brown PO, Cozzarelli NR. 1979. Science 206:1081–83A sign inversion mechanism for enzymatic supercoiling of DNA.

- Buhler C, Gadelle D, Forterre P, Wang JC, Bergerat A. *Nucleic Acids Res* 1998; 26:5157–62. Reconstitution of DNA topoisomerase VI of the thermophilic archaeon *Sulfolobus shibatae* from subunits separately overexpressed in *Escherichia coli*.
- Buret, A. G. *Gut* 56, 316–317 (2007). and update. *Clin. Infect. Dis.* 25, 545–549(1997).Mechanisms of epithelial dysfunction in giardiasis.
- Capranico,G., Tinelli,S., Austin,C.A., Fisher,M.L. and Zunino,F. *Biophys. Acta*, 1132, 43–48. (1992) Different patterns of gene expression of topoisomerase II isoforms in differentiated tissues during murine development. *Biochim.*
- Carpenter,A.J. and Porter,A.C. *Mol. Biol. Cell*, 15, 5700–5711. (2004) Construction, characterization, and complementation of a conditional-lethal DNA topoisomerase IIalpha mutant human cell line.
- Corbett KD, Berger JM. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 2004;33:95-118. Review. Structure, molecular mechanisms, and evolutionary relationships in DNA topoisomerases.
- De HE, Jian Fan WEN, Wan Qun CHEN, Si Qi LU, De Dong XIN *Cell Research*, 15(6):474-482, Jan 2005 Identification, characteristic and phylogenetic analysis of type II DNA topoisomerase gene in *Giardia lamblia*.
- DiNardo,S., Voelkel,K. and Sternglanz,R. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 2616–2620. DNA topoisomerase II mutant of *Saccharomyces cerevisiae*: topoisomerase II is required for segregation of daughter molecules at the termination of DNA replication.
- Farthing, M. J. The molecular pathogenesis of giardiasis. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 24, 79–88 (1997).
- Faubert G. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13: 35-54, table of contents Immune response to *Giardia duodenalis*.
- Gellert M, Mizuuchi K, O’Dea MH, Nash HA. 1976. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73:3872– 76 DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA.
- Gimenez-Abian JF, Clarke DJ, Mullinger AM, Downes CS, Johnson RT. *J Cell Biol* 1995; 131:7-17. A postprophase topoisomerase II-dependent chromatid core separation step in the formation of metaphase chromosomes.
- Hanevik, K., Dizdar, V., Langeland, N. & Hausken, T. *BMC Gastroenterol.* 9, 27

(2009).Development of functional gastrointestinal disorders after Giardia lamblia infection.

Heck,M.M., Hittelman,W.N. and Earnshaw,W.C. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 85, 1086–1090. (1988) Differential expression of DNA topoisomerases I and II during the eukaryotic cell cycle.

Helen Robinson, Sigrid Bratlie-Thoresen, Robert Brown and David A.F. Gillespie  
Volume 6, Issue 10 May 15, 2007 Pages 1265 – 1267. Chk1 is required for G2/M  
Checkpoint Response Induced by the Catalytic Topoisomerase II Inhibitor ICRF-193

Holm,C. Cell. 1994 Jul 1;77(7):955-7. Coming undone: how to untangle a chromosome.

Holm,C., Goto,T., Wang,J.C. and Botstein,D. (1985) Cell, 41, 553–563. DNA topoisomerase II is required at the time of mitosis in yeast.

Holm,C., Stearns,T. and Botstein,D. (1989) Mol. Cell. Biol., 9, 159–68. DNA topoisomerase II must act at mitosis to prevent nondisjunction and chromosome breakage.

Hsiang,Y.H., Wu,H.Y. and Liu,L.F. Cancer Res., 48, 3230–3235. (1988)  
Proliferation-dependent regulation of DNA topoisomerase II in cultured human cells.

Huang YC, Su LH, Lee GA, Chiu PW, Cho CC, Wu JY, Sun CH. J Biol Chem. 2008 Nov 7;283(45):31021-9. Epub 2008 Sep 3. Regulation of cyst wall protein promoters by Myb2 in Giardia lamblia.

J. German, ed. Wiley, New York. 756 pp. 1974. Chromosomes and cancer.

Kevin D Corbett, Piero Benedetti & James M Berger. Nat Struct Mol Biol. 2007 Jul;14(7):611-9. Epub 2007 Jul 1. Holoenzyme assembly and ATP-mediated conformational dynamics of topoisomerase VI

Lane, S. & Lloyd, D. Crit. Rev. Microbiol. 28, 123–147 (2002).Current trends in research into the waterborne parasite Giardia.

Li JY, He YJ, Chen SF. Endocyt & Cell Res 1997; 12:65–70. The primitive cell nucleus, in which the nucleolus has not emerged yet.

Luján HD, Mowatt MR, Conrad JT, Bowers B, Nash TE. *J Biol Chem*. 1995 Dec 8;270(49):29307-13. Identification of a novel *Giardia lamblia* cyst wall protein with leucine-rich repeats. Implications for secretory granule formation and protein assembly into the cyst wall.

Lujan, H.D., Mowatt, M.R., Conrad, J.T., Bowers, B., and Nash, T.E. *J Biol Chem* 270: 29307-29313. (1995) Identification of a novel *Giardia lamblia* cyst wall protein with leucine-rich repeats.

Lyu, Y.L. and Wang, J.C. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 100, 7123–7128. (2003) Aberrant lamination in the cerebral cortex of mouse embryos lacking DNA topoisomerase IIb.

Marti M, Regös A, Li Y, Schraner EM, Wild P, Müller N, Knopf LG, Hehl AB. *J Biol Chem*. 2003 Jul 4;278(27):24837-48. Epub 2003 Apr 23. An ancestral secretory apparatus in the protozoan parasite *Giardia intestinalis*.

Murray AW, Szostak JW. *Annu Rev Cell Biol*. 1985;1:289-315. Review. No abstract available. Chromosome segregation in mitosis and meiosis.

Narcisi EM, Glover CV, Fechheimer M. *Fibrillarin*, *J Eukaryot Microbiol*. 1998; 45:105–11. A conserved pre-ribosomal RNA processing protein of *Giardia*.

Pan YJ, Cho CC, Kao YY, Sun CH. *J Biol Chem*. 2009 Jul 3;284(27):17975-88. Epub 2009 May 7. A novel WRKY-like protein involved in transcriptional activation of cyst wall protein genes in *Giardia lamblia*.

Pan, Y. J., Cho, C. C., Kao, Y. Y. & Sun, C. H. *J. Biol. Chem.* 284, 17975–17988 (2009). A novel WRKY-like protein involved in transcriptional activation of cyst wall protein genes in *Giardia lamblia*.

Pommier Y, Leo E, Zhang H, Marchand C. *Chem Biol*. 2010 May 28;17(5):421-33. Review. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs.

Rendtorff, R. C. *Am. J. Hyg.* 59, 209–220 (1954). The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites. II. *Giardia lamblia* cysts given in capsules.



Rose,D. and Holm,C. (1993) *Mol. Cell. Biol.*, 13, 3445–3455. Meiosis-specific arrest revealed in DNA topoisomerase II mutants.

Rose,D., Thomas,W. and Holm,C. (1990) *Cell*, 60, 1009–1017. Segregation of recombined chromosomes in meiosis I requires DNA topoisomerase II.

Sogin ML, Gunderson JH, Elwood HJ, Alonso RA, Peattie DA. *Science*. 1989 Jan 6;243(4887):75-7. Phylogenetic meaning of the kingdom concept: an unusual ribosomal RNA from *Giardia lamblia*

Stephanie M. Nelson, Lynnette R. Ferguson and William A. Denny. *Mutat Res*. 2007 Oct 1;623(1-2):24-40. Epub 2007 Apr 6. Non-covalent ligand/DNA interactions: Minor groove binding agents

Sun CH, McCaffery JM, Reiner DS, Gillin FD. *J Biol Chem*. 2003 Jun 13;278(24):21701-8. Epub 2003 Apr 9. Mining the *Giardia lamblia* genome for new cyst wall proteins.

Sun CH, Palm D, McArthur AG, Svärd SG, Gillin FD. *Mol Microbiol*. 2002 Nov;46(4):971-84. A novel Myb-related protein involved in transcriptional activation of encystation genes in *Giardia lamblia*.

Sun CH, Su LH, Gillin FD. *Mol Biochem Parasitol*. 2006 Mar;146(1):45-57. Epub 2005 Nov. Novel plant-GARP-like transcription factors in *Giardia lamblia*.

Sun, C. H., Su, L. H. & Gillin, F. D. *Mol. Biochem. Parasitol*. 146, 45–57 (2006). Novel plant-GARP-like transcription factors in *Giardia lamblia*.

Tovar J, León-Avila G, Sánchez LB, Sutak R, Tachezy J, van der Giezen M, Hernández M, Müller M, Lucocq JM. *Nature*. 2003 Nov 13;426(6963):172-6. Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation.

Tsutsui,K., Hosoya,O., Sano,K. and Tokunaga,A. *J. Comp. Neurol.*, 431, 228–239. (2001) Immunohistochemical analyses of DNA topoisomerase II isoforms in developing rat cerebellum.

Tsutsui,K., Okada,S., Watanabe,M., Shohmori,T., Seki,S. and Inoue,Y. *J. Biol. Chem.*,

268, 19076–19083. (1993) Molecular cloning of partial cDNAs for rat DNA topoisomerase II isoforms and their differential expression in brain development.

Turley,H., Comley,M., Houlbrook,S., Nozaki,N., Kikuchi,A., Hickson,I.D., Gatter,K. and Harris,A.L. *Br. J. Cancer*, 75, 1340–1346. (1997) The distribution and expression of the two isoforms of DNA topoisomerase II in normal and neoplastic human tissues.

Uemura,T., Ohkura,H., Adachi,Y., Morino,K., Shiozaki,K. and Yanagida,M. (1987) *Cell*, 50, 917–925. DNA topoisomerase II is required for condensation and separation of mitotic chromosomes in *S. pombe*.

Wang CH, Su LH, Sun CH. *J Biol Chem*. 2007 Mar 23;282(12):8905-14. Epub 2007 Jan 23. Erratum in: *J Biol Chem*. 2007 May 25;282(21):15940. A novel ARID/Bright-like protein involved in transcriptional activation of cyst wall protein 1 gene in *Giardia lamblia*.

Wang JC. *Annu Rev Biochem*. 1996;65:635-92. Review. DNA topoisomerases.

Wang JC. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3:430–40. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective.

Wang YT, Pan YJ, Cho CC, Lin BC, Su LH, Huang YC, Sun CH. *J Biol Chem*. 2010 Oct 15;285(42):32213-26. Epub 2010 Aug 10. A novel pax-like protein involved in transcriptional activation of cyst wall protein genes in *Giardia lamblia*.

Wang, C. H., Su, L. H. & Sun, C. H. *J. Biol. Chem.* 282, 8905–8914 (2007). A novel ARID/ Bright-like protein involved in transcriptional activation of cyst wall protein 1 gene in *Giardia lamblia*.

Wang, J.C. (2009b). *Untangling the Double Helix* (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Watanabe,M., Tsutsui,K. and Inoue,Y. *Neurosci Res.*, 19, 51–57. (1994) Differential expressions of the topoisomerase II alpha and II beta mRNAs in developing rat brain.

Watt PM, Hickson ID. *Biochem J* 1994; 303:681-95. Structure and function of type II DNA topoisomerases.

Yang,X., Li,W., Prescott,ED., Burden,SJ. and Wang,JC. *Science*, 287, 131–134. (2000) DNA topoisomerase IIbeta and neural development.

Durand-Dubief\_M, Persson J, Norman U, Hartsuiker E, Ekwall K. *EMBO J.* 2010 Jul 7;29(13):2126-34. Epub 2010 Jun 4. Topoisomerase I regulates open chromatin and controls gene expression in vivo.

Maxwell A. *Trends Microbiol.* 1997 Mar;5(3):102-9. DNA gyrase as a drug target.

Deweese JE, Burgin AB, Osheroff N. *Nucleic Acids Res.* 2008 Sep;36(15):4883-93. Epub 2008 Jul 24. Human topoisomerase IIalpha uses a two-metal-ion mechanism for DNA cleavage.

Deweese JE, Burch AM, Burgin AB, Osheroff N. *Biochemistry.* 2009 Mar 10;48(9):1862-9. Use of divalent metal ions in the dna cleavage reaction of human type II topoisomerases.

Schultz\_MC, Brill SJ, Ju Q, Sternglanz R, Reeder RH. *Genes Dev.* 1992 Jul;6(7):1332-41. Topoisomerases and yeast rRNA transcription: negative supercoiling stimulates initiation and topoisomerase activity is required for elongation.

Collins\_I, Weber A, Levens D. *Mol Cell Biol.* Mol Cell Biol. 2001 Dec;21(24):8437-51. Transcriptional consequences of topoisomerase inhibition.

Woessner RD, Mattern MR, Mirabelli CK, Johnson RK, Drake FH. *Cell Growth Differ.* 1991 Apr;2(4):209-14. Proliferation- and cell cycle-dependent differences in expression of the 170 kilodalton and 180 kilodalton forms of topoisomerase II in NIH-3T3 cells.

Bernander\_R, Palm JE, Svärd SG. *Cell Microbiol.* 2001 Jan;3(1):55-62. Genome ploidy in different stages of the *Giardia lamblia* life cycle.

Brandt TL, Fraser DJ, Leal S, Halandras PM, Kroll AR, Kroll DJ. *J Biol Chem.* 1997 Mar 7;272(10):6278-84. c-Myb trans-activates the human DNA topoisomerase IIalpha gene promoter.

Singh\_R, Winn LM. *Mutat Res.* 2008 Oct 14;645(1-2):33-8. Epub 2008 Aug 20. The effects of 1,4-benzoquinone on c-Myb and topoisomerase II in K-562 cells.