

財團法人明日醫學基金會專題研究計畫申請書

一、基本資料：

申請條碼：

本申請案所需經費(單選)		<input checked="" type="checkbox"/> A類(研究主持費及執行計畫所需經費) <input type="checkbox"/> B類(研究主持費，限人文處計畫，不須填寫表 C002 及 C004 至 C009)		
計畫類別(單選)		<input type="checkbox"/> 一般型研究計畫 <input type="checkbox"/> 特約研究計畫 <input checked="" type="checkbox"/> 新進人員研究計畫 <input type="checkbox"/> 其他		
研究型別		<input checked="" type="checkbox"/> 個別型計畫 <input type="checkbox"/> 整合型計畫		
計畫歸屬		<input type="checkbox"/> 自然處 <input type="checkbox"/> 工程處 <input checked="" type="checkbox"/> 生物處 <input type="checkbox"/> 人文處 <input type="checkbox"/> 科教處 <input type="checkbox"/> 永續會		
申請機構/系所(單位)		中國醫藥大學 醫學系		
本計畫主持人姓名		賴志河	職稱	副教授
				身分證號碼
本計畫名稱	中文	探討彎曲桿菌引起腸胃炎之分子機轉		
	英文	Molecular mechanisms of <i>Campylobacter jejuni</i> -induced gastroenteritis		
整合型總計畫名稱				
整合型總計畫主持人				身分證號碼
全程執行期限		自民國 <u>100</u> 年 <u>1</u> 月 <u>1</u> 日起至民國 <u>101</u> 年 <u>12</u> 月 <u>31</u> 日		
研究學門(請參考本申請書所附之學門專長分類表填寫)		學門代碼		名稱(如為其他類，請自行填寫學門)
		BI		
研究性質		<input checked="" type="checkbox"/> 純基礎研究 <input type="checkbox"/> 導向性基礎研究 <input type="checkbox"/> 應用研究 <input type="checkbox"/> 技術發展		
本計畫是否為國際合作計畫 <input checked="" type="checkbox"/> 否； <input type="checkbox"/> 是，合作國家：_____，請加填表 I001~I003				
本計畫是否申請海洋研究船		<input checked="" type="checkbox"/> 否； <input type="checkbox"/> 是，請務必填寫表 C014。		
本計畫是否有進行下列實驗：(勾選下列任一項，須附相關實驗之同意文件)				
<input type="checkbox"/> 人體實驗 <input type="checkbox"/> 基因重組實驗 <input type="checkbox"/> 動物實驗				
計畫連絡人		姓名： <u>賴志河</u> 電話：(公) <u>04-22052121 ext 7729</u> (宅/手機) <u>0937-936212</u>		
通訊地址		台中市學士路 91 號 醫學系 微生物學科		
傳真號碼		04-22053764	E-MAIL	chl@mail.cmu.edu.tw

二、申請補助經費：

- (一) 請將本計畫申請書之第四項(表 C004)、第五項(表 C005)、第六項(表 C006)、第七項(表 C007)、第八項(表 C008)所列費用個別加總後，分別填入「研究人力費」、「耗材、物品及雜項費用」、「研究設備費」、「國外或大陸地區差旅費」及「出席國際學術會議差旅費」欄內。
- (二) 若有申請國際合作研究計畫費用者，請將表 I002 之「C類經費合計」欄金額填入「國際合作研究計畫國外學者來臺費用」欄內，「A類經費與B類經費合計」欄金額填入「國際合作研究計畫出國差旅費」欄內。
- (三) 管理費為申請機構配合執行本計畫所需之費用，其計算方式係依本會規定核給補助管理費之項目費用總和及各申請機構管理費補助比例計算後直接產生，申請人不須填寫「管理費」欄。
- (四) 「貴重儀器中心使用額度」係將第九項(表 C009)所列使用費用合計數填入。
- (五) 請依各年度申請博士後研究之名額填入下表。
- (六) 申請機構或其他單位（含產業界）提供之配合項目，請檢附相關證明文件。

金額單位：新台幣元

執行年次		第一年 (100年01月~ 100年12月)	第二年 (__年__月~ __年__月)	第三年 (__年__月~ __年__月)	第四年 (__年__月~ __年__月)	第五年 (__年__月~ __年__月)
補助項目						
業 務 費						
研究人力費						
耗材、物品及雜項費用						
國際合作研究計畫國外 學者來臺費用						
研 究 設 備 費						
國 外 差 旅 費						
國外或大陸地區差旅費						
出席國際學術會議差旅費						
國際合作研究計畫 出國差旅費						
管 理 費						
合 計						
貴重儀器中心使用額度						
博士後研究	國內、外 地 區	共 _____ 名	共 _____ 名	共 _____ 名	共 _____ 名	共 _____ 名
	大陸地區	共 _____ 名	共 _____ 名	共 _____ 名	共 _____ 名	共 _____ 名
申請機構或其他單位（含產業界）提供之配合項目（無配合補助項目者免填）						
配合單位名稱	配合補助項目	配合補助金額	配合年次	證明文件		

三、主要研究人力：

(一) 請依照「主持人」、「共同主持人」、「協同研究人員」及「博士後研究」等類別之順序分別填寫。

類別	姓名	服務機構/系所	職稱	在本研究計畫內擔任之具體工作性質、項目及範圍	*每週平均投入工作時數比率(%)
主持人	賴志河	中國醫藥大學/ 醫學系	副教授	統籌及推動本研究計畫、參與主要實驗工作、整理文獻背景及撰寫研究成果	80%

※註：每週平均投入工作時數比率係填寫每人每週平均投入本計畫工作時數佔其每週全部工作時間之比率，以百分比表示（例如：50%即表示該研究人員每週投入本計畫研究工作之時數佔其每週全部工時之百分之五十）。

(二) 如申請博士後研究，請另填表 CIF2101 及 CIF2102(若已有人選者，請務必填註人選姓名，並將其個人資料表併同本計畫書送本會)。

五、耗材、物品及雜項費用：

- (一) 凡執行研究計畫所需之耗材、物品及雜項費用，均可填入本表內。
- (二) 說明欄請就該項目之規格、用途等相關資料詳細填寫，以利審查。
- (三) 若申請單位有配合款，請於備註欄註明。
- (四) 請分年列述。

金額單位：新台幣元

項目名稱	說明	單位	數量	單價	金額	備註
消耗性器材	細胞培養耗材：培養基、胎牛血清、無菌培養皿、液態氮、無菌吸管、CO ₂ 氣體及離心管等	年	1			
消耗性器材	微生物培養耗材：培養基、洋菜膠、棉棒、培養皿、無菌吸管及離心管等	年	1			
消耗性器材	Reporter assay kit , ELISA assay kit 分析 IL-8, NF-κB 及 AP-1 promoter activity , 每組十瓶(盤) , 共五組	組	5			
消耗性器材	分子生物學實驗藥品與耗材：限制酶、聚合酶、電泳膠、緩衝液及 DNA marker 等	年	1			
消耗性器材	蛋白質電泳試劑與耗材：電泳配製試劑、protein marker、PVDF membrane 及濾紙等	批	1			
消耗性器材	吸管、玻璃瓶、塑膠瓶及血清瓶等耗材	年	1			

消耗性器材	清潔劑、酒精、有機溶劑及化學試劑等	批	1			
資訊設備費	A4 紙、碳粉夾、光碟片等資訊耗材	年	1			
論文投稿費	期刊雜誌投稿	篇	2			
合 計						

十一、研究計畫中英文摘要：請就本計畫要點作一概述，並依本計畫性質自訂關鍵詞。

(一) 計畫中文摘要。(五百字以內)

彎曲桿菌可在動物引起腹瀉，同時也是在人類造成腸胃炎的主要細菌之一，近年來已逐漸受到重視，因此探討彎曲桿菌的特性及其致病因子更顯現其重要性。而細胞致死腫脹毒素(cytolethal distending toxin, Cdt)在空腸彎曲桿菌的致病上被認為扮演非常重要角色，我們的初步分析結果顯示 Cdt 對於空腸彎曲桿菌來說應該是一必需的毒素，我們也利用重組 CdtA, B, C 三個毒素次單位觀察其對細胞的致病機制，發現重組 Cdt 具有抑制細胞週期的功能。因此，本計畫將研究空腸彎曲桿菌細胞致死腫脹毒素及探討三個毒素次單位(subunits)對細胞致病的作用機制。細胞脂質筏(lipid rafts)對於微生物的感染或是毒素的內噬及運送非常重要，我們先期的研究發現彎曲桿菌的 Cdt 會藉由脂質筏來感染宿主細胞，因此我們將利用已純化的重組 Cdt 蛋白質研究 Cdt 次單位與免疫細胞脂質筏交互作用、並利用小鼠初級 T cells 探討 Cdt 毒素的作用、及探討彎曲桿菌感染細胞引起 NF- κ B 與 AP-1 路徑之發炎反應是否受脂質筏的影響。除此之外，我們將進一步利用超高速離心及蛋白質體學的分析方法找尋脂質筏中 CdtA 與 CdtC 結合的分子或接受體，並利用共軛焦顯微鏡研究 CdtB 於細胞內的輸送途徑。這些研究結果將有助於了解彎曲桿菌及其細胞腫脹毒素的致病機轉並提供臨床醫師治療彎曲桿菌導致腸胃炎之參考。

關鍵詞：空腸彎曲桿菌、細胞毒素、脂質筏、膽固醇、介白素-8

(二) 計畫英文摘要。(五百字以內)

Campylobacter sp. are the most common causes of human gastroenteritis as well as livestock diarrhea worldwide. While *Campylobacter* infections are quit common and often severe, relatively little is known about mechanisms of their pathogenesis. It is thought that bacterial virulence factors are more important for those infectious diseases. Numerous cytotoxins in *Campylobacter jejuni* have been described, but only cytolethal distending toxin (Cdt) has been well characterized. While the molecular characterization of *cdt* gene in clinical isolates in Taiwan was still absence. Our preliminary data showed that *cdt* gene was existed in all clinical isolates, indicated that *cdt* was essential for clinical diseases. In addition, we found that purified recombinant CdtA, B, C fusion proteins have their cytopathic effects in the induction of cell cycle arrest. In the aim of this research plan, we will examine the molecular mechanisms of CdtA, B, C subunits on epithelial cells. Lipid rafts are crucial for microbe infection and toxins delivery. We hypothesized that *Campylobacter* Cdt-mediated immunotoxicity is raft-dependent. The association of three Cdt subunits with lipid rafts on immune cells will be investigated. We will also examine the interaction of Cdt and mouse primary T cells. Whether NF- κ B and AP-1 signaling pathway are involved in Cdt-mediated cytopathic effects via lipid rafts will be also determined in this project. Further investigation of common receptors of CdtA and CdtC will be analyzed by sucrose gradient ultracentrifuge and proteomics approaches. The trafficking pathway of CdtB in toxin-treated cells will be also confirmed by Confocal microscopy. These results will help us to understand the complicated processes of Cdt-induced cell pathogenesis and would be beneficial for the clinical diagnosis and treatment of *Campylobacter*-induced gastroenteritis.

Keywords: *Campylobacter jejuni*, cytotoxin, lipid rafts, cholesterol, interleukin-8

十二、研究計畫內容：

A. 研究計畫之背景

一、彎曲桿菌及其致病因子

1. 彎曲桿菌的微生物特性

彎曲桿菌本身的菌體較小，為革蘭氏陰性（Gram negative）桿菌，具有彎曲（spirally curved）的外觀及一端到二端的單鞭毛，因此具有運動性。而彎曲桿菌與幽門螺旋菌（*H. pylori*）最大的不同，則在於尿素酶—幽門螺旋菌具有尿素酶陽性，彎曲桿菌則無此酵素（1）。不同菌種的彎曲桿菌感染宿主的差異相當大，例如：空腸彎曲桿菌（*C. jejuni*）除了感染牲畜動物、寵物之外，還易感染人類，而胎兒彎曲桿菌（*C. fetus*）則大部分只感染牛、羊等牲畜動物；但是感染人類則仍以空腸彎曲桿菌為主（2）。

2. 彎曲桿菌與臨床疾病

感染彎曲桿菌之後，重要的臨床症狀包括胃腸炎（gastroenteritis）、急性腹痛（acute abdominal pain）、敗血症（septicemia）以及一種與急性神經性麻痺症狀有關的 Guillain–Barre syndrome (GBS)（3,4）。在歐美國家的報導發現彎曲桿菌為世界上最常引起人類腹瀉的致病菌，在美國平均每年約有兩百萬個病例（3），雖然不致引起患者死亡，但卻會影響大眾健康與對經濟的負擔。而彎曲桿菌在台灣的流行病學情況與國外大不相同，根據台灣的研究發現，在中部地區之腹瀉或胃腸炎患者糞便檢體中僅 2.5% 分離出彎曲桿菌，為台灣中部次重要的細菌性腸胃炎致病菌（5），這與歐美或其他已開發國家有明顯的不同，而研究也指出在台灣感染彎曲桿菌的病患大多是小於五歲的孩童，所分離出的彎曲桿菌則以空腸彎曲桿菌最常見（6）。

3. 彎曲桿菌的細胞致死腫脹毒素（Cytolethal Distending Toxin, Cdt）

細胞致死腫脹毒素（以下簡稱 Cdt）是由 Johnson 和 Lior 在 1988 年所發表（Johnson and Lior, 1988b），他們發現在某種大腸桿菌中有一種毒素會造成倉鼠卵巢細胞（Chinese hamster ovary cells, CHO cells）明顯的變長腫脹，隨即也在彎曲桿菌中發現具有 Cdt 毒素（7），之後陸陸續續在 *Hemophilus ducreyi*（8）、*Actinobacillus actinomycetemcomitans*（9）、*Shigella dysenteriae*（10）、subsets of *Helicobacter* species（11）中發現。Cdt 為一 holotoxin，是由三個位置相近的基因所表現，分別為 *cdtA*、*cdtB*、*cdtC*，空腸彎曲桿菌的細胞致死腫脹毒素預期的蛋白質大小分別為 30116、28989 和 21157 Da（12）。Cdt 會造成許多種的細胞腫脹最後使細胞死亡，除了細胞腫脹外，Cdt 還會造成染色絲濃縮、裂解（13）且和調控腸道上皮細胞 IL-8 的分泌有關（14），另外會使細胞週期暫停在 G2/M 時期（15-17），這也是除了細胞腫脹之外另一項判斷 Cdt 活性的指標。

4. 細胞致死腫脹毒素對細胞週期的影響

細胞週期的調控是由許多複雜的分子所調控，由多個 kinases 及 phosphatases 的磷酸化或去磷酸化作用使分子活化或不活來調控。當 Cdt 處理細胞時會發現細胞中的 CDK1（cyclin-dependent kinase，一調控細胞周期由 G2 進入 mitosis 的重要分子）皆處於高度磷酸化的不活化狀態，並使細胞暫停在 G2/M 時期（13,17,18）。

二、脂質筏的生化功能

1. 脂質筏的結構

脂質筏位於細胞膜上，最主要由膽固醇（cholesterol）、磷脂質（phospholipid）及鞘脂質（sphingolipid）所組成，而其存在的型態大略可分為三種：(i)膠體-脂質呈半固體狀、(ii)無排序液態-全部的脂質都為液體狀態、(iii)固定排序液態-磷脂質與飽和的碳水化合物，再加上膽固醇共同形成緊密的結構，這幾種成分分別在細胞膜的生物活性上提供重要功能(19)。而這三種成分即形成動態且具有規則並緊密包裹於細胞膜內的「脂質筏」(20)。

由於脂質筏的結構非常穩定，因此可以抵抗一些清潔劑的作用，例如：以 Triton X-100 在低溫的狀態下處理細胞，細胞膜上的脂質筏並不會被溶解，因而形成所謂的清潔劑抵抗性的細胞膜（detergent-resistant membrane, DRM），在這個完整而穩定的結構中，不僅僅含有膽固醇與磷脂質，尚含許多重複的蛋白質，這些蛋白質有些提供訊息的傳遞，有些則使脂質筏形成更穩定的結構，而有些則可提供微生物感染細胞的新途徑(21,22)。

表一、與脂質筏相互作用的微生物及毒素 [Adapted from (21)]

細菌
霍亂弧菌 (<i>Vibrio cholerae</i>)
大腸桿菌 (FimH ⁺ <i>E. coli</i>)
志賀氏桿菌 (<i>Shigella Flexneri</i>)
沙門氏菌 (<i>Salmonella typhimurium</i>)
綠膿桿菌 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)
幽門螺旋桿菌 (<i>Helicobacter pylori</i>)
細菌毒素
霍亂毒素 (Cholera toxin)
炭疽毒素 (anthrax toxin)
幽門螺旋菌的液泡毒素 (vacuolating cytotoxin)
病毒
SV40 (Simian virus 40)
HIV-1
Ebola virus
Epstein-Barr virus
其他病原體
瘧原蟲 (<i>Plasmodium</i>)
弓漿蟲 (<i>Toxoplasma gondii</i>)
傳染性蛋白 (Prion)

2. 微生物與脂質筏的作用

目前已知脂質筏不但可以提供並放大活化細胞的訊息傳遞，而且可以使細胞骨架重組、細胞膜凹陷，因而有助於細胞執行內噬作用（endocytosis），近年來有更多新的研究報告指出脂質筏亦可提供微生物感染細胞的一種新途徑，這些可以藉由脂質筏而感染宿主細胞的微生物包括細菌、細菌毒素與病毒，甚至連傳染性蛋白（prion）亦可與脂質筏作用（表一）(21)；以微生物感染宿主的角度而言，這些微生物一旦藉由脂質筏進到宿主細胞內，不但可以使細胞膜裂開與細胞骨架重組而讓微生物更易進入宿主細胞，而且尚可避免細胞內容小體的分解作用，因此脂質筏的形成對微生物感染宿主而言是非常有利的，例如：志賀氏桿菌（*Shigella flexneri*）可藉由其侵入素（invasin）IpaB 與脂質筏相關蛋白 CD44 交互作用(23)。同樣的情況也發生在綠膿桿菌

(*Pseudomonas aeruginosa*) 感染呼吸道上皮細胞，使得脂質筏相關蛋白 CD95 (Apo-1) 匯集在脂質筏中，因而導致感染細胞更容易進行凋亡 (apoptosis) (24,25)。除此之外，我們實驗室最近的研究也發現幽門螺旋菌注射 CagA 毒素進入上皮細胞亦是經由脂質筏的協助(26)。由以上的研究文獻可以得知，脂質筏在細菌感染細胞的過程扮演著許多重要角色，不但提供微生物進入細胞的管道，亦可保護細菌免於受宿主細胞的免疫攻擊。

3. 細菌毒素與脂質筏的作用

不只是細菌菌體的分子可與脂質筏作用，有些細菌亦會分泌致病毒素，再藉由脂質筏的攜帶而對宿主細胞產生病理效應，例如：霍亂毒素 (cholera toxin)，一旦霍亂毒素與受器結合後會形成複合物，附近的液泡或是脂質筏上的 caveolae 會帶著毒素輸送到靠近細胞膜，並與 Gs protein 及腺苷酸環化酶 (adenyl cyclase) 作用，進而活化腺苷酸環化酶，而使 ATP 轉變為 cAMP，因而造成細胞內的氯離子與水份過度分泌引起腹瀉。其他細菌分泌的毒素如：炭疽毒素 (anthrax toxin) (27)與幽門螺旋菌的液泡毒素 (vacuolating cytotoxin) (28,29)等，也都陸續被發現是經由脂質筏誘導受體群聚 (raft-induced receptor cluster) 而引起細胞的病變，因此當毒素結合受器再透過脂質筏匯集，造成細胞內一些訊息被大量活化而傳遞，一旦訊息開始被傳遞後，受細菌感染細胞就會引起致病效應。在先前我們研究幽門螺旋菌感染細胞的過程發現：不僅僅是細菌本身會跟脂質筏作用，有些細菌分泌的毒素(例如：幽門螺旋菌的 VacA 與 CagA)亦是依賴脂質筏來運輸進入細胞，以執行其致病機轉(28,30)，因此我們認為脂質筏對於細菌感染細胞及之後產生致病效應 (cytopathic effects) 扮演著非常重要的角色。

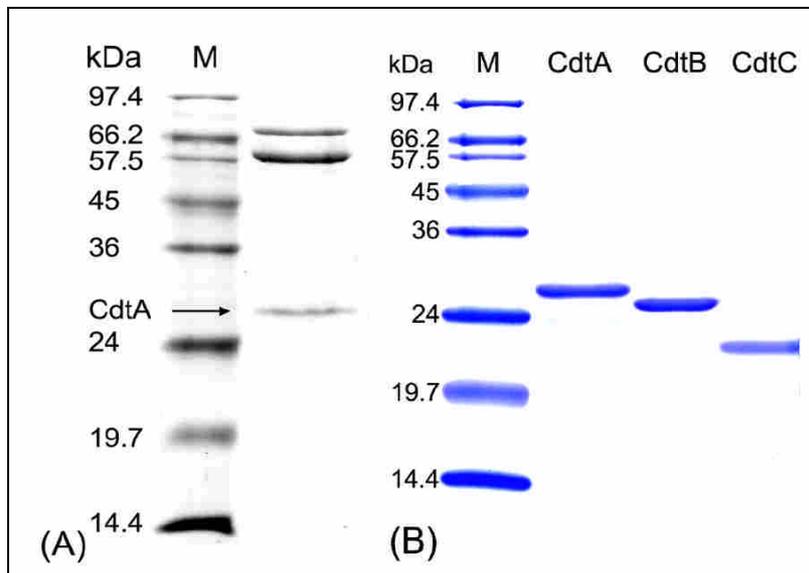
B. 初期研究成果 (Preliminary results)

1. 表現與純化CdtA、CdtB及CdtC蛋白質

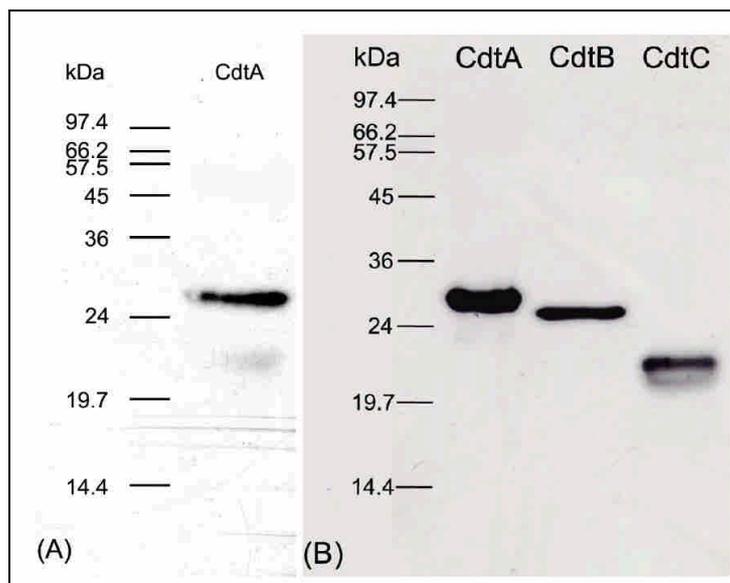
我們將三個去除signal sequence的Cdt次單元基因個別構築到pET-21d (+)中利用*E.coli*大量表現，為得到大量並足夠純度的重組蛋白質，利用低溫(16 °C)誘導來純化重組蛋白質，重組的Cdt蛋白質其氨基端(N-terminal)會多出methionine及alanine，碳基端(C-terminal)會多出6個histidine，預測分子量分別為28630.53、28156.47及20165.01 Da (CdtA、CdtB及CdtC)。目前我們已經可以利用大腸桿菌表現出三個毒素的蛋白質，重組後的Cdt次單元蛋白質經純化後如圖一所示。純化後的蛋白質因帶有His-tagged，因此可利用anti-His monoclonal antibody辨識，如圖二所示。

2. 重組 Cdt 完全毒素(holo toxin)活性

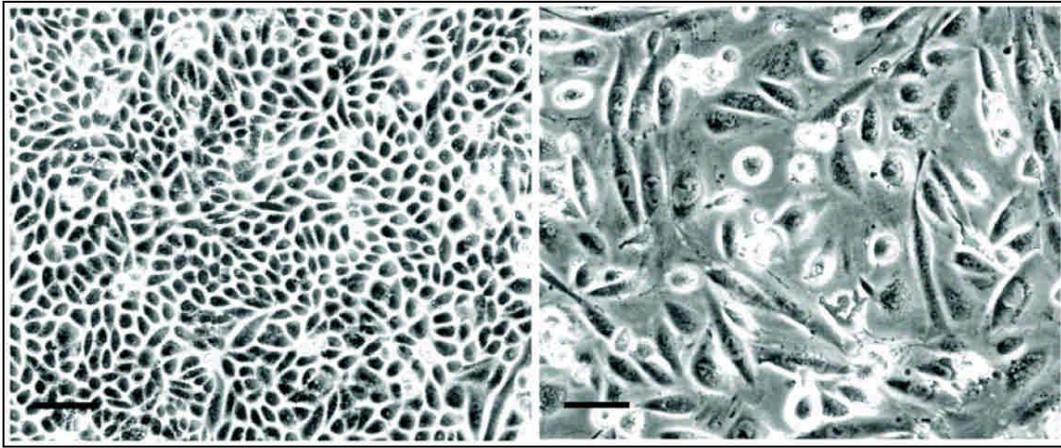
雖然我們已經可以有效表現Cdt蛋白質，但是並無法卻認這三個毒素次單位具有生化活性，為證實經由*E. coli*表現的三個重組CdtA, B, and C次單元蛋白質可以組成具有Cdt完全毒素毒性的蛋白質，我們將三個Cdt次單元蛋白質以每個濃度439 nM，比例1:1:1 (CdtA:CdtB:CdtC)處理細胞24小時後，待毒素處理48小時後以顯微鏡觀察細胞型態並收集細胞，用70%酒精固定細胞後，以propidium iodide染細胞核，用流式細胞儀偵測其核酸含量以分析細胞週期。我們發現：在重組Cdt蛋白質的處理下細胞明顯比negative control腫脹(圖三)，而且細胞週期也暫停在G2/M時期(圖四)，暫停在G2/M時期的細胞有72.24% 而negative的只有7.96% 的細胞在 G2/M時期。此外，我們收集空腸彎曲桿菌的培養上清液，並濃縮100倍，再將其稀釋4倍到細胞培養液中，並依照上述方法處理作為positive control，發現細胞處於G1時期有40%，而G2時期則有27.4%；因此由初步研究的結果證實我們所純化的Cdt蛋白質 (CdtA, B, and C) 是具有生化活性的功能。



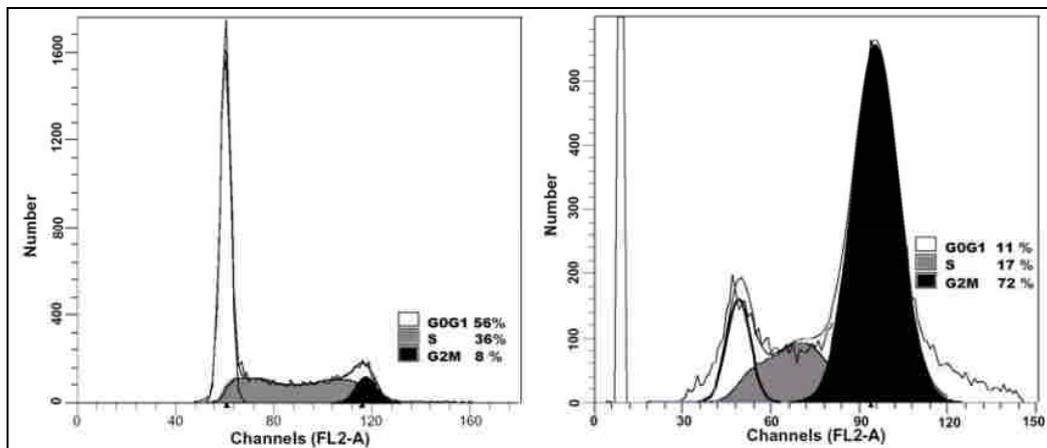
圖一、經純化的重組 His-tagged Cdt 蛋白質電泳圖。(A) 箭頭所指的 CdtA 為可溶性的重組 His-tagged CdtA 蛋白質；(B) 其中的 CdtA 為經由 8 M urea 純化再重新摺疊的重組 His-tagged CdtA 蛋白質，CdtB 和 CdtC 為可溶性的重組 His-tagged 蛋白質。M：protein marker。



圖二、西方墨點法分析 Cdt 毒素蛋白。利用 anti-His monoclonal antibody 偵測經純化的重組 Cdt-His-tagged 蛋白質。(A) CdtA 為可溶性的重組 His-tagged CdtA 蛋白質；(B) 其中的 CdtA 為經由 8 M urea 純化再重新摺疊的重組 His-tagged CdtA 蛋白質，CdtB 和 CdtC 為可溶性的重組 His-tagged 蛋白質。



圖三、重組 His-tagged Cdt 蛋白質造成細胞腫脹。左圖為未處理的控制組，右圖為處理 His-tagged Cdt 蛋白質(各個次單元濃度皆為 439 nM)。



圖四、重組 His-tagged Cdt 蛋白質細胞週期暫停在 G2/M 時期。左圖為未處理的控制組，右圖為處理 His-tagged Cdt 蛋白質。

C. 研究計畫目的及目標

Cdt 有三個次單元，目前已知 CdtB 為一 DNase I-like 蛋白質，並且和 Cdt 造成細胞週期停在 G2/M 時期有關(13,31)，這三個次單元對於造成 Cdt 毒性為缺一不可(32)，但是 CdtA 和 CdtC 的功能目前還都不清楚。利用 NCBI 網站的 PSI-Blast 工具我們發現 CdtA 的一段胺基酸序列和 Ricin toxin (典型的 AB 毒素) 的 B chain (會和 galactosides 結合促使 A chain 被攝入) 有相似性。因此 Cdt 可能為一典型的 AB 毒素，而 CdtA 或 CdtC 甚至是多個次單元對於 Cdt 和細胞接受器的結合有關。因此本計畫主要欲以表現及純化的重組 Cdt 蛋白質研究探討各個次單元的功能，並利用流式細胞儀以間接免疫螢光分析哪一次單元為結合次單元並對其結合特性作酵素學上的分析。

先前許多研究已發現細胞脂質筏對於微生物的感染或是毒素的內噬 (internalization) 及運送非常重要(21)，我們推測彎曲桿菌與其 Cdt 極有可能藉由脂質筏來感染宿主細胞的原因有以下兩個原因：(1)我們分析空腸彎曲桿菌侵襲或黏附細胞的基因發現：其 *ciaB* 基因 (*Campylobacter invasion antigen B*) 的基因序列與沙門氏桿菌 (*Salmonella typhimurium*) 的 *sipB* 及志賀氏桿菌

(*Shigella flexneri*) 的 *ipaB* 基因有很高的相似性(約 40~45%)，而 *sipB* 及 *ipaB* 基因所製造的蛋白質在最近都被報導是依靠細菌的第三型分泌系統 (type III secretion system, TTSS) 與細胞膜脂質筏交互作用來運送毒力因子(33,34)；(2)除此之外其他細菌如：嗜血桿菌 (*Haemophilus ducreyi*) 及放線菌 (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*) 的 Cdt 亦被發現是藉由脂質筏來造成細胞週期靜止 (cell cycle arrest) (35,36)。因此由上述兩個重要的發現，我們推測彎曲桿菌極有可能藉由脂質筏來感染宿主細胞，並將其 Cdt 經由 cholesterol-rich 的區間輸送到細胞質內，因而引起細胞的致病現象；為了證實我們的假設，最後我們將探討彎曲桿菌細胞腫脹毒素對細胞致病的作用機制，特別是著重在與細胞 lipid rafts 的交互作用及細胞內傳遞路徑之研究。

因此，為了證實我們的推測，我們預計完成三大目標：

- 一、探討彎曲桿菌細胞腫脹毒素對細胞致病的作用機制
- 二、研究 Cdt 次單位與免疫細胞脂質筏交互作用
- 三、利用小鼠 primary T cells 探討 Cdt 毒素的作用

目標一、探討彎曲桿菌細胞腫脹毒素對細胞致病的作用機制

1. **表現及純化 CdtA、CdtB 及 CdtC 蛋白質：**Cdt 有三個次單元，目前已知 CdtB 為一 DNase I-like 蛋白質，並且和 Cdt 造成細胞週期停在 G2/M 時期有關，這三個次單元對於造成 Cdt 毒性為缺一不可，但是 CdtA 和 CdtC 的功能目前還都不清楚。因此本研究計畫初步將利用 Cdt 的重組蛋白質研究探討哪一次單元為結合次單元 (binding subunit) 並對其結合特性作酵素學上的分析。本實驗將利用 pET 表現純化系統，將三個扣除 signal sequence 的 *cdt* 次單元基因個別構築到 pET-21d (+) 中利用 *E. coli* 大量表現。為得到大量並足夠純度的重組蛋白質，利用低溫 (16 °C) 誘導或是 8 M urea 來純化重組蛋白質，純化的 CdtA、B、C 重組蛋白質可用於分析毒素的活性及毒素與細胞結合的能力。
2. **測試重組 Cdt 完全毒素 (holo toxin) 毒性及 CdtB DNase 的活性：**為了測試 Cdt 的活性，接下來我們將利用三個 Cdt 次單元蛋白質以比例 1 : 1 : 1 (CdtA : CdtB : CdtC) 處理細胞 24 小時後，再換成完全培養基繼續培養，待毒素處理 48 小時後以顯微鏡觀察細胞型態並收集細胞，用 70% 酒精固定細胞後，以 propidium iodide (PI) 染細胞，用流式細胞儀偵測其核酸含量，並以 ModFit LT Ver. 3.0 DNA 直方圖分析軟體來定量細胞週期於 G1, S, 及 G2/M。此外，為證明純化的重組 CdtB 具有 DNase 的酵素活性，我們將利用質體 DNA 分別與不同濃度的重組 CdtB 蛋白質一起反應，在 37 °C 作用 1 小時後，再以 1 % 瓊脂凝膠電泳膠分析並且定量其 DNase 的活性。
3. **偵測 CdtA-His 是否具有專一性結合到細胞表面的能力：***Haemophilus ducreyi* 的 Cdt 進入細胞是藉由 clathrin-coated pits 的途徑進入，由於 clathrin-coated pits 上有許多的接受器會嵌在細胞膜上，所以 Cdt 進入細胞可能會先經由和細胞上的接受器結合(37)。我們先期比對基因序列，利用 NCBI 網站的 PSI-Blast search 及 conserved domain (CD) database search 發現，CdtA 的一段氨基酸序列和 Ricin toxin (典型的 AB 毒素) 的 B chain 有相似性。基於上述假設，本研究將利用流式細胞儀，以間接免疫螢光染色法分析 CdtA 是否即為負責和細胞結合的次單元、或是由 CdtC、或是兩者共同負責。
4. **分析 CdtA, CdtC 與細胞專一性的結合對 Cdt 完全毒素 (holotoxin) 的功能：**基因上的證據顯示三個 Cdt 次單元蛋白質對於造成 Cdt 毒性來說是必須的，但是目前只了解 CdtB 為 Cdt 完全毒素

中負責酵素活性的次單元，而 CdtA 和(或)CdtC 是可能是幫助扮演幫助 CdtB 進入細胞的角色，或是扮演和細胞結合的角色，迄今也尚未完全了解。為證實此專一性的結合對 Cdt 完全毒素是必須的，我們將利用細胞週期分析，將培養 18–24 小時的 CHO 細胞以固定濃度的 CdtB 及 CdtC 另加 CdtA 處理細胞 24 小時後，換成完全培養基繼續培養，待毒素處理 48 小時後收集細胞，再用流式細胞儀分析細胞週期。

目標二、探討 Cdt 次單位與免疫細胞脂質筏 (lipid rafts) 交互作用

- 1. 測試 Cdt 次單位個別與細胞結合的能力：**為了分析彎曲桿菌 Cdt 與免疫細胞的交互作用，我們將以免疫細胞株–Jurkat 來探討個別 Cdt 次單位與細胞結合的能力，我們的實驗將：
 - (1) 利用流式細胞分析儀來分析個別 CdtA, B, or C 次單位與 Jurkat 細胞的結合能力。
 - (2) 我們也將以共軛焦顯微鏡觀察個別 CdtA, B, or C 在 Jurkat 細胞膜上的分布情形。
- 2. 偵測 CdtABC 三個毒素次單位是否與細胞膜脂質筏交互作用：**為了分析 CdtA, B, C 是否與細胞膜脂質筏交互作用，我們將：
 - (1) 純化重組 CdtA, B, and C (holotoxin)與細胞結合，再利用共軛焦顯微鏡來觀察 Cdt 分子是否與細胞脂質筏或其內的蛋白質有交互作用。
 - (2) 另外我們也將 Cdt 結合的細胞以 1% TritonX-100 溶解再以超高速離心分層(sucrose gradient ultracentrifuge fractionation)，來偵測 Cdt 是否位於 cholesterol-rich fractions 之內。
 - (3) 緊接著我們將探討利用 M β CD (methyl- β -cyclodextrin)去除細胞膜脂質筏之後，Cdt 的細胞結合能力或造成細胞週期停滯是否會有影響。
 - (4) 最後我們將利用共軛焦顯微鏡(confocal microscope)一併探討 Cdt 在細胞內的作用分子及傳遞路徑是否與脂質筏有關。

目標三、探討 Cdt 毒素與小鼠初級 T lymphocytes 的作用

- 1. 探討 Cdt holotoxin 是否會抑制小鼠 spleen cells 的活化：**利用六週大的小鼠 C57BL/6J，取其 spleen cells，再加入 mitogen–concanavalin A (ConA)以活化 T lymphocytes，接著加入 CdtA, B, C 或是 holotoxin 與細胞作用，最後藉由流式細胞分析儀分析 Cdt 造成細胞週期停滯的情況。
- 2. 證明以 M β CD 去除細胞膜脂質筏之後，Cdt 造成細胞週期停滯的影響：**另外再以 M β CD 去除細胞膜脂質筏之後，接著加入 holotoxin 與細胞作用，分析 Cdt 造成細胞週期停滯是否亦會受到脂質筏存在與否的影響。

八、研究方法及進行步驟：

1. 空腸彎曲桿菌的培養與儲存

原因：為了分析 *cdt* 基因在不同菌株的差異與存在的機率。

方法：我們將細菌培養在固態培養基的菌轉塗佈到新鮮的培養基(2.8% Brucella broth, 1.5% agar, amphotericin B 1ug/ml, 10% 綿羊紅血球, pH 7.5)上, 在 37°C 下以微需氧條件(5 % O₂, 10 % CO₂, 85 % N₂)培養 2 到 3 天。待細菌在固態或液態環境培養到一定菌數時, 便儲存在包含 Brucella broth 及 15 % 甘油(glycerol)的冷凍培養基中(freezing medium), 並且迅速置於-70 °C 的冷凍櫃中保存。

2. 空腸彎曲桿菌染色體 DNA 的抽取

原因：為分析不同來源菌種其 *cdt* 基因的序列。

方法：收集已在固態培養基長滿的細菌, 加入 lysis buffer 600μl (20 mM 的 Tris-Cl, 40 mM 的 NaCl, 10 mM EDTA, 0.2% SDS, protease K 20μg/ml)中作用。再以 phenol/chloroform (1 : 1)萃取 DNA, 實驗方法如我們之前所述(38)。

3. 細胞致死腫脹毒素基因序列分析質體的選殖

原因：為確認及了解台灣地區空腸彎曲桿菌的細胞致死腫脹毒素基因序列是否與歐美等國外地區的菌株有所差異。

方法：因此必須分析此段 DNA 的序列, 所以便要將 *cdt* 基因選殖出來, 其基因選殖步驟如下：使用根據 gene bank 中 *Campylobacter jejuni* (81-176)的 *cdtABC* gene 所設計的寡核苷酸引子對, 以空腸彎曲桿菌染色體 DNA 為模板, 置於 DNA 溫度循環控制機進行反應。再以 1 % 瓊脂凝膠電泳膠分析, 以確認複製所得的核酸片段為 2.6 Kbp 的 *cdt* 基因。將聚合酶鏈鎖反應的產物以瓊脂凝膠電泳膠分離, 利用 Gel Extraction System Kit (Viogene) 純化, 並以 1 % 瓊脂凝膠的電泳確定 DNA 之品質及濃度。

4. 回收純化各個 Cdt 次單元蛋白質

pET 純化系統為純化載體 pET-*cdtA*、*cdtB* 和 *cdtC* 中大量表現的 CdtA-H、CdtB-H 及 CdtC-H。純化步驟主要參照 TALON Metal Affinity Resins User Manual (CLONTECH)。將已活化帶有載體 pET-*cdtA* (或 pET-*cdtB*、*cdtC*) 的 *E.coli* 接種到 15 ml LB 液態培養基 (含有 100 μg/ml ampicillin) 中, 置於 37°C 恆溫培養箱中培養 6 小時後, 取出 10 ml 再接種入 LB (100 g/ml ampicillin)液態培養基中培養 4 小時, 隨後加入 IPTG, 置於恆溫培養箱中, 震盪培養 (IPTG 濃度、溫度及時間如表三)。將誘導過後之菌液以 6,000 rpm 離心 10 分鐘, 回收菌體。利用超音波破碎機打破細菌, 隨後置於 4°C 離心機以 15,000 rpm 離心 15 分鐘。取上清液, 以 0.45μm 的濾膜過濾後, 置於冰液中待用, 此即為粗萃取液。取適量之 TALON metal affinity resin (CLONTECH), 均勻地滴入管柱中, 讓樹脂慢慢沉澱於管底, 然後使管柱內之液體緩慢流出。流盡後加入緩衝液, 讓緩衝液流過管柱, 以沖掉殘餘的酒精, 隨後將過濾好的粗萃取液滴入管柱中。再加入 elution buffer (含 20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl 和 150 mM imidazole, pH 7.0)。此時結合於 resin 上的 Cdt 會被洗出, 同時以微量離心管置於管柱下方, 回收所洗出之蛋白質, 利用透析膜進行透析, 將所有回收之蛋白質溶液置入透析膜中, 之後再以 1 倍 PBS 緩衝液 (pH 7.4)進行透析交換。

5. 蛋白質電泳凝膠製備與電泳分析 (SDS-PAGE)

組合蛋白質電泳儀器組件, 配製 12~14 % SDS-PAGE, 倒入玻璃夾層中, 加入去離子水壓平

凝膠界面，待凝膠凝固後旋即倒入 4 % 十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠並插入樣品槽製造梳，凝固後將玻片架於電泳槽上。取蛋白質樣品液置於凝膠之樣品槽中，將電泳槽充滿 1 倍蛋白質電泳緩衝液 (250 mM glycine, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 25 mM Tris-HCl, pH 8.5)，以 100 伏特電壓進行電泳約 2-4 小時，使蛋白質依分子量大小分離。

6. 西方墨點法 (Western Blot)

由於我們純化的蛋白質都是含有 6 x His 的 fusion proteins，因此我們可以利用 anti-His Ab 來偵測專一性的純化蛋白。取自得到的蛋白質利用 12-14 % 蛋白質凝膠電泳，使蛋白質依分子量大小分離，再轉漬至 PVDF 膜。取出 PVDF 膜改置入含稀釋的初級抗體 (anti-His-tag Ab) 之含 5% 脫脂奶 TTBS 溶液內，再將 PVDF 膜移至含稀釋的二級抗體 (IgG HRP conjugated) 中，最後將 PVDF 膜以混合的冷光呈色劑作用 3 分鐘，進行自動放射顯影。

7. 利用流式細胞儀細胞致死腫脹毒素與細胞結合能力分析

原因：CdtA 的氨基酸序列和 Ricin toxin (典型的 A-B 型毒素) 的 B chain 相似，為了證實我們所純化出來的 CdtA-His 具有細胞結合能力。

方法：將培養在 Alpha-MEM 完全培養基的 CHO 細胞與不同濃度的 Cdt (Cdt 在含 3 % BSA 的 PBS 緩衝液中) 在 4°C 下處理不同的時間，接著細胞以 anti-His-tag (0.1 µg/ml, Novagene) 於 4°C 下作用兩小時，再與 FITC-labeled anti-mouse IgG (1 : 200, Calbiochem) 於 4°C 下作用兩小時。最後以 Flow Cytometer (Becton Dickinson) 分析細胞表面結合毒素的能力。

8. 細胞週期分析

原因：三個 Cdt 次單元蛋白質對於造成 Cdt 毒性來說是必須的缺一不可，為了分析分析 CdtA, CdtC 與細胞專一性的結合對 Cdt 完全毒素 (holotoxin) 的功能，也就是 CdtA, CdtC 幫助扮演幫助 CdtB 進入細胞的角色，以執行 cell cycle arrest 的功能。

方法：我們將 CHO 細胞培養 18-24 小時，以不同濃度的 Cdt 蛋白質在完全培養基中處理細胞 24 小時，偵測前將固定好的細胞以轉速 1,000 rpm 離心 10 分鐘移除上清液，加入配置好的染劑 (1% Triton X-100, 20 µg/ml RNase A, 20 µg/ml propidium iodide) 混合均勻，靜置 30 分鐘後，以流式細胞分析儀 (Becton Dickinson) 測量細胞中 DNA 的含量。

9. Cdt 與免疫細胞結合能力分析

原因：為了探討 CdtA, B, C 與免疫細胞的結合能力。

方法：將培養在 RPMI-1640 完全培養基的 Jurkat 細胞與不同濃度的 CdtA, B, C 次單位在 4°C 下使其結合但不會內噬到細胞質中，接著細胞以 anti-His-tag (0.1 µg/ml, Novagene) 於 4°C 下作用兩小時，再與 FITC-labeled anti-mouse IgG (1 : 200, Calbiochem) 於 4°C 下作用兩小時。最後以 Flow Cytometer (Becton Dickinson) 分析 Jurkat 細胞表面結合毒素的能力。

10. 超高速離心分層

原因：為了確認共軛焦顯微鏡所觀察到的結果，我們利用 sucrose-gradient 超高速離心來分析 Cdt 次單位是否位於脂質筏 DRM 分層之中。

方法：Jurkat 細胞與 CdtA, B, C 在 37°C 下作用 2 小時，在以 1% Triton X-100 於 4°C 下作用 1 小時，然後再將細胞溶解液置入 40%, 30% 與 5% 的 sucrose 之中，進行超高速離心 36,000rpm, 4°C 下離心 20 小時 (Beckman Coulter)，待離心結束由上層至下層每 500µl 分一層，經 acetone 沉澱，再進行 Western blot，以 anti-His Ab 來偵測 Cdt 各個 subunits 是否位於 sucrose 濃度梯度比較小的上層 (fractions 1~5 即 lipid rafts)。

References

1. On, S. L. (1996) *Clin Microbiol Rev* **9**(3), 405-422
2. Wooldridge, K. G., and Ketley, J. M. (1997) *Trends Microbiol* **5**(3), 96-102
3. Ketley, J. M. (1997) *Microbiology* **143** (Pt 1), 5-21
4. Hadden, R. D., Gregson, N. A., Gold, R., Willison, H. J., and Hughes, R. A. (2001) *J Neuroimmunol* **119**(2), 306-316
5. Lin, C. W., Yin, P. L., and Cheng, K. S. (1998) *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)* **61**(6), 339-345
6. Li, C. C., Chiu, C. H., Wu, J. L., Huang, Y. C., and Lin, T. Y. (1998) *Scand J Infect Dis* **30**(1), 39-42
7. Johnson, W. M., and Lior, H. (1988) *Microb Pathog* **4**(2), 115-126
8. Cortes-Bratti, X., Chaves-Olarte, E., Lagergard, T., and Thelestam, M. (1999) *J Clin Invest* **103**(1), 107-115
9. Shenker, B. J., McKay, T., Datar, S., Miller, M., Chowhan, R., and Demuth, D. (1999) *J Immunol* **162**(8), 4773-4780
10. Okuda, J., Kurazono, H., and Takeda, Y. (1995) *Microb Pathog* **18**(3), 167-172
11. Young, V. B., Chien, C. C., Knox, K. A., Taylor, N. S., Schauer, D. B., and Fox, J. G. (2000) *J Infect Dis* **182**(2), 620-623
12. Pickett, C. L., Pesci, E. C., Cottle, D. L., Russell, G., Erdem, A. N., and Zeytin, H. (1996) *Infect Immun* **64**(6), 2070-2078
13. Lara-Tejero, M., and Galan, J. E. (2000) *Science* **290**(5490), 354-357
14. Hickey, T. E., McVeigh, A. L., Scott, D. A., Michielutti, R. E., Bixby, A., Carroll, S. A., Bourgeois, A. L., and Guerry, P. (2000) *Infect Immun* **68**(12), 6535-6541
15. Shenker, B. J., Dlakic, M., Walker, L. P., Besack, D., Jaffe, E., LaBelle, E., and Boesze-Battaglia, K. (2007) *J Immunol* **178**(8), 5099-5108
16. Nesic, D., and Stebbins, C. E. (2005) *PLoS Pathog* **1**(3), e28
17. Bielaszewska, M., Sinha, B., Kuczius, T., and Karch, H. (2005) *Infect Immun* **73**(1), 552-562
18. Hontz, J. S., Villar-Lecumberri, M. T., Potter, B. M., Yoder, M. D., Dreyfus, L. A., and Laity, J. H. (2006) *J Biol Chem* **281**(35), 25365-25372
19. Simons, K., and Toomre, D. (2000) *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**(1), 31-39
20. Brown, D. A., and London, E. (2000) *J Biol Chem* **275**(23), 17221-17224
21. Manes, S., del Real, G., and Martinez, A. C. (2003) *Nat Rev Immunol* **3**(7), 557-568
22. Dykstra, M., Cherukuri, A., Sohn, H. W., Tzeng, S. J., and Pierce, S. K. (2003) *Annu Rev Immunol* **21**, 457-481
23. Lafont, F., Tran Van Nhieu, G., Hanada, K., Sansonetti, P., and van der Goot, F. G. (2002) *Embo J* **21**(17), 4449-4457
24. Kowalski, M. P., and Pier, G. B. (2004) *J Immunol* **172**(1), 418-425
25. Grassme, H., Jendrossek, V., Riehle, A., von Kurthy, G., Berger, J., Schwarz, H., Weller, M., Kolesnick, R., and Gulbins, E. (2003) *Nat Med* **9**(3), 322-330
26. Lai, C. H., Chang, Y. C., Du, S. Y., Wang, H. J., Kuo, C. H., Fang, S. H., Fu, H. W., Lin, H. H., Chiang, A. S., and Wang, W. C. (2008) *Infect Immun* **76**(7), 3293-3303
27. Abrami, L., Liu, S., Cosson, P., Leppla, S. H., and van der Goot, F. G. (2003) *J Cell Biol* **160**(3), 321-328

28. Kuo, C. H., and Wang, W. C. (2003) *Biochem Biophys Res Commun* **303**(2), 640-644
29. Nakayama, M., Hisatsune, J., Yamasaki, E., Nishi, Y., Wada, A., Kurazono, H., Sap, J., Yahiro, K., Moss, J., and Hirayama, T. (2006) *Infect Immun* **74**(12), 6571-6580
30. Lai, C. H., Chang, Y. C., Du, S. Y., Wang, H. J., Kuo, C. H., Fang, S. H., Fu, H. W., and Wang, W. C. (2007) *Infect Immun* (submitted and under review)
31. Hontz, J. S., Villar-Lecumberri, M. T., Dreyfus, L. A., and Yoder, M. D. (2006) *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **62**(Pt 3), 192-195
32. Lara-Tejero, M., and Galan, J. E. (2001) *Infect Immun* **69**(7), 4358-4365
33. van der Goot, F. G., Tran van Nhieu, G., Allaoui, A., Sansonetti, P., and Lafont, F. (2004) *J Biol Chem* **279**(46), 47792-47798
34. Hayward, R. D., Cain, R. J., McGhie, E. J., Phillips, N., Garner, M. J., and Koronakis, V. (2005) *Mol Microbiol* **56**(3), 590-603
35. Guerra, L., Teter, K., Lilley, B. N., Stenerlow, B., Holmes, R. K., Ploegh, H. L., Sandvig, K., Thelestam, M., and Frisan, T. (2005) *Cell Microbiol* **7**(7), 921-934
36. Boesze-Battaglia, K., Besack, D., McKay, T., Zekavat, A., Otis, L., Jordan-Sciutto, K., and Shenker, B. J. (2006) *Cell Microbiol* **8**(5), 823-836
37. Cortes-Bratti, X., Karlsson, C., Lagergard, T., Thelestam, M., and Frisan, T. (2001) *J Biol Chem* **276**(7), 5296-5302
38. Lai, C. H., Kuo, C. H., Chen, Y. C., Chao, F. Y., Poon, S. K., Chang, C. S., and Wang, W. C. (2002) *J Clin Microbiol* **40**(10), 3860-3862