

白念珠菌菌丝发育的遗传调控

蒋伶活* 李西川 智慧

(天津大学药物科学与技术学院, 天津 300072)

摘要 白念珠菌(*Candida albicans*)是人体内最重要的机会型致病真菌,能以酵母、假菌丝、菌丝等多种形态存在。白念珠菌的菌丝发育与它的致病性成正相关,这一过程由胞内多种信号转导途径所调控。现对控制白念珠菌菌丝发育的主要信号转导途径进行综述。

关键词 白念珠菌; 菌丝发育; 遗传调控; MAPK 级联; cAMP-PKA

白念珠菌(*Candida albicans*)是人体内最重要的机会型致病真菌,属半知菌亚门芽孢菌纲隐球酵母科念珠菌属,常存在于人体的皮肤及口腔、胃肠道和阴道黏膜。在健康人体内一般不引起疾病或仅引起轻微表皮感染,但在 AIDS 患者、器官移植病人以及经过化疗和放疗的癌症病人等免疫能力低下的人群中,很容易引发严重的系统真菌感染,危及病人生命。临床上导致人死亡的严重真菌感染病例主要是由白念珠菌引起的^[1]。白念珠菌致病能力与菌丝的形成和发育密切相关,近年来一直是人们研究的热点^[2]。

1 白念珠菌的形态转换

白念珠菌是二倍体,能以酵母(yeast)、假菌丝(pseudohyphae)和菌丝(hyphae)三种形态存在。酵母态是圆形或椭圆形单细胞,象酿酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)一样以芽孢的方式增殖。假菌丝是一串延长的酵母态细胞,细胞间有缢缩,而菌丝是由初期形成的芽管不断生长而形成的多细胞形态,菌丝的细胞之间无缢缩(图 1)。白念珠菌从酵母态向假菌丝态或菌丝态的转换是通过细胞的极性生长实现的。与酵母态相比,白念珠菌的菌丝态细胞更易于附着和侵入宿主组织,逃避人体免疫系统的攻击^[2]。

pH、温度、营养和诱导因子等多种环境因素都可影响白念珠菌形态的转换。白念珠菌在 pH 4.5 和温度 25 °C 的条件下只形成酵母态,而在 pH 6.5~7.0 和温度 37 °C 的条件下,或在氮源缺乏培养基上,或加入诱导因子如血清、L- 脯氨酸和 N- 乙酰葡萄糖胺等都可以诱导和促进菌丝的生长^[3]。如图 1 所示,在营养丰富的 YPD 培养基和 30 °C 条件下,

白念珠菌只以酵母态芽孢繁殖。当 YPD 培养基中加入 10% 小牛血清且温度改变为 37 °C 时,1 h 后细胞便不再以芽孢方式生长,而是形成菌丝的初期阶段—芽管,2 h 后芽管进一步延长发育成菌丝,5 h 后便可见成熟的菌丝。以上外界环境因素通过不同的信号转导途径,调节白念珠菌细胞内转录因子的活性以控制一系列应答基因(如菌丝特异性基因和细胞壁合成基因)的表达,最终实现对细胞形态转换的调控。

2 调控白念珠菌菌丝发育的信号转导途径

白念珠菌和酿酒酵母的很多生物学过程非常相

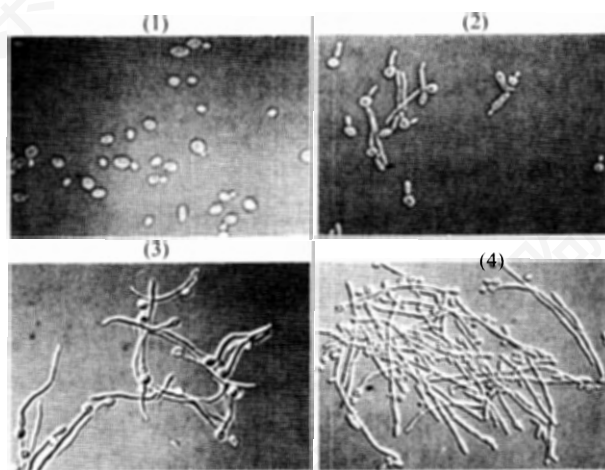


图 1 白念珠菌血清诱导菌丝的发育过程

1: 单细胞酵母状(30 °C YPD 培养基中); 2~4 为白念珠菌细胞在类似于人体条件(37 °C 含 10% 小牛血清)的 YPD 培养基中诱导菌丝的发育阶段; 2: 芽管形成(诱导 1 h); 3: 生长中的菌丝(诱导 2 h); 4: 成熟的菌丝(诱导 5 h)。

收稿日期: 2005-11-25 接受日期: 2006-02-10

国家自然科学基金资助项目(No.30470850)

* 通讯作者。Tel: 022-27401248, E-mail: linghuojiang@yahoo.com.cn

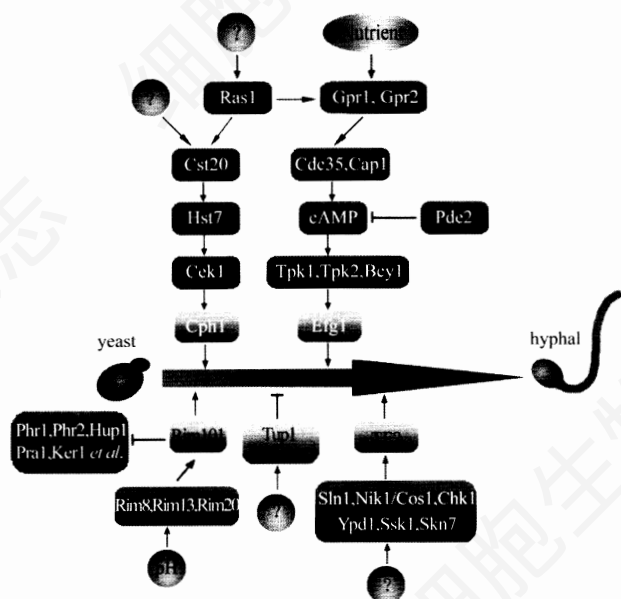


图2 调控白念珠菌菌丝发育的信号转导途径^[2,4]

似,基因组的同源性也非常高。酿酒酵母作为真核生物模式菌,遗传分析手段非常完善,对白念珠菌生物学和致病机制研究提供了非常有利的手段。现今对于白念珠菌菌丝发育遗传调控的研究成果基本上得益于人们对酿酒酵母的分子遗传学研究基础。随着现代分子生物学技术的发展和白念珠菌基因组测序(<http://www.candidagenome.org>)的完成,人们对白念珠菌菌丝发育遗传调控的研究已经发展到了全基因组水平。基因组测序结果显示白念珠菌中共含有6 354个可能的基因^[1]。目前已经发现和鉴定了包括MAPK级联在内的多种信号转导途径,它们共同调控白念珠菌的菌丝发育(图2)。

2.1 MAPK级联途径

Liu等^[5]最先研究发现白念珠菌中存在着促分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)级联途径。外界环境因素(接合信息素或营养条件)首先通过一定机制(目前未知)作用于白念珠菌MAPK级联途径的上游组分CaRas1,然后CaRas1将信号传递至MAPKKK Cst20,然后Cst20磷酸化并激活其下游的MAPKK Hst7,被激活的Hst7转而磷酸化并激活其底物MAPK Cek1或Cek2,最后被激活的Cek1或Cek2将信号传递至转录因子Cph1,调节一系列基因的表达,最终实现调节菌丝生长的目的。分别将Cst20、Hst7、Cek1或Cph1剔除后,各自得到的缺失株在spider固体培养基上都不能形成菌丝,而且高表达Cph1能校正Cph1、Cek1、

Cst20基因的缺失,高表达Hst7能校正Cst20、Hst7的缺失但不能校正Cek1和Cph1的缺失,这些结果进一步证明了它们之间的上下游关系(如上所述)。过量表达Cph1能够诱导CEK1、CEK2和一些与酿酒酵母信息素诱导基因相似的基因的表达,说明它们可能受到MAPK途径的调控^[4]。

MAPK级联途径能调控白念珠菌MTLa(mating type locus a)和MTL α (mating type locus α)型菌株间的结合。缺失Cph1或Hst7的MTLa或MTL α 菌株完全失去结合能力,而过量表达Cph1的MTLa菌株结合效率显著上升^[6]。

此外,白念珠菌中除了上述Cek MAPK途径外,还存在HOG MAPK和MKC MAPK途径。HOG MAPK途径应答于外界渗透压和氧化胁迫,并能够轻微影响白念珠菌的菌丝发育^[7,8],而MKC MAPK途径为真菌细胞完整性途径的一部分,以接触激活的方式影响白念珠菌的侵入生长和细胞壁的合成^[9]。

2.2 cAMP-PKA途径

白念珠菌cAMP-PKA信号转导途径通过转录因子Efg1起作用,因途径中涉及依赖cAMP的蛋白激酶A(cAMP-dependent protein kinase A, cAMP-PKA)而得名。目前一般认为cAMP-PKA途径应答于外界环境中的营养因素如氨基酸“饥饿”和葡萄糖诱导等。

Efg1是bHLH(basic helix-loop-helix)类转录因子,能和菌丝特异性基因启动子中普遍存在的一种DNA回文序列E box(5'CANNTG3')结合,调节大多数菌丝特异性基因的表达。efg1缺失株在大多数菌丝诱导条件,甚至是血清因子的诱导下都难以形成菌丝,而且在小鼠模型实验中表现为毒力下降,说明了Efg1在调控白念珠菌菌丝发育中起着非常重要的作用^[10]。此外,Lane等^[11]研究发现Efg1还与其他转录因子存在广泛的相互作用。

Efg1上含有一个潜在的磷酸化位点(T₂₀₆),可被依赖cAMP的蛋白激酶A磷酸化而激活。酿酒酵母中存在三种依赖cAMP的蛋白激酶A催化组分,包括ScTpk1、ScTpk2和ScTpk3。但目前在白念珠菌中只发现了两种依赖cAMP的蛋白激酶A催化组分,CaTpk1和CaTpk2,它们都能正向调控菌丝生长。有趣的是二者的作用并不完全相同,Catpk1缺失株只在固体诱导培养基上有明显的菌丝生长缺陷,而Catpk2缺失株的表型缺陷只在液体诱导培养基上有所表现。后者还在琼脂培养基中表现出严重的侵入生长缺陷而前者则没有。同时,二者的PKA

活性也不同, CaTpk2 的缺失可导致细胞整体 PKA 活性下降 90%。CaTpk1 和 CaTpk2 功能的差异可能是由其结构的不同造成的, 它们 C 端催化域约 300 个残基高度保守, 但 N 端约 80 个残基高度可变。CaTpk1 的 N 端不含谷氨酰胺丰富区域, 而 CaTpk2 的 N 端则含有长达 16 个串连的谷氨酰胺残基(不连续)^[12]。另外, Cassola 等^[13]在白念珠菌中发现了 PKA 的调节组分 CaBcy1, 它能够调节 PKA 催化组分的活性, 而且 CaBcy1 的缺失亦导致菌丝生长缺陷。

合成 cAMP 的腺苷酸环化酶基因 *CDC35*、腺苷酸环化酶相关基因 *CAP1* 和降解 cAMP 的磷酸二酯酶基因 *PDE2* 共同控制酵母细胞内 cAMP 的水平, 从而影响依赖 cAMP 的蛋白激酶 A 的活性。目前尚无关于白念珠菌 CaCdc35 的研究, 但腺苷酸环化酶相关基因编码蛋白 CaCap1 缺失的细胞内 cAMP 水平明显下降。在包括血清因子等诱导条件下 *Cacap1* 缺失株细胞都不能形成菌丝, 但外加一定量的 cAMP 或重新表达 CaCap1 时则可恢复其菌丝诱导形成的能力, 说明 CaCap1 能正向调节 cAMP 的水平^[14]。CaPDE2 编码白念珠菌高亲和性 cAMP 磷酸二酯酶, 能把 cAMP 降解成 5'-AMP。Capde2 缺失株细胞内 cAMP 水平明显上升, 而且在 *Cacap1* 缺失株中剔除 CaPde2 可以校正 *Cacap1* 缺失所引起的菌丝生长缺陷。CaPde2 的缺失还会严重影响细胞壁的特性, 使其与野生型细胞相比麦角固醇含量上升 30%、葡聚糖含量下降 20%、细胞壁厚度由原来的 80~85 nm 下降到 60~65 nm, 这种现象可能是由于 CaPde2 的缺失使 cAMP-PKA 途径一直处于过度激活的状态所造成的^[15,16]。

最新研究发现, 白念珠菌 G 蛋白-偶联受体(G protein-coupled receptor)CaGpr1 和 G 蛋白 α 亚基 CaGpa2 也通过 cAMP-PKA 途径调控白念珠菌细胞的菌丝发育。*Cagpr1* 缺失株在固体菌丝诱导培养基上菌丝生长有缺陷, 但是这种生长缺陷可以通过外加 cAMP 或过量表达 CaGpa2 或 CaTpk1 所弥补, 说明 CaGpr1 作用于 cAMP-PKA 途径的上游^[17]。不过 CaGpr1 和 CaGpa2 与 cAMP-PKA 途径其他组分相互作用的具体机制尚不清楚。

白念珠菌 MAPK 级联途径和 cAMP-PKA 途径的上游可能被一个共同的组分——CaRas1 所调控。*Caras1* 缺失株的菌丝生长缺陷可以同时被外加的 cAMP 或过量表达 MAPK 途径组分所弥补, 但是 CaRas1 控制这两种途径的具体机制目前还不清楚^[18]。

2.3 pH- 应答途径

白念珠菌能够在 pH 2~10 的环境条件下生存, 这种能力使其可以在人体胃肠道、血液等具有不同 pH 环境的组织内存活^[19]。白念珠菌在酸性条件下一般以酵母态存在, 而在碱性或中性条件下则多以菌丝态存在, 这一过程受到由锌指蛋白转录因子 CaRim101 介导的 pH- 应答途径的调控。

CaRim101 与酿酒酵母 ScRim101 和构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*)PacC 同源, 调控酸或碱应答基因的表达。CaRim101 的活性受到其自身蛋白酶解过程的调节, 在酸性条件下 CaRim101 以全长形式存在, 但其生物学功能尚未被发现; 在碱性条件下, CaRim101 酶解失去部分 C 端残基, 得到一个“短”的蛋白质, 具有了调控碱应答基因的活性^[20]。CaRim101 的激活过程还需要另外三种蛋白质 CaRim20、CaRim8 和 CaRim13 的共同参与。pH- 应答途径中 CaRim101、CaRim20、CaRim8 和 CaRim13 四种蛋白质中的任意一个的缺失都可以导致该菌株碱诱导菌丝形成能力的丧失, 并能影响白念珠菌在小鼠中的毒力以及对上皮细胞的黏附性^[21]。

白念珠菌 pH- 应答途径对其菌丝发育的调控可能是通过对一些特定基因表达的调控来实现的。*CaPHR1* 和 *CaPHR2* 是一对 pH 调控基因, 它们之间有极高的同源性, 编码细胞壁 β -1,3- 葡聚糖形成所需的糖苷酶, 而且这两个基因中任意一个的缺失都会引起菌丝形成缺陷及毒力减弱。然而这两个基因表达所需要的 pH 环境不同: *CaPHR1* 在 pH 小于 5.5 时表达受抑制, 在碱性条件下被诱导, 而 *CaPHR2* 则正好与之相反, 这可能被白念珠菌细胞用来保证某种机制在酸/碱性条件下都能实现。在碱性环境下的 *Caphr1* 缺失株中, 本来被抑制的 *CaPHR2* 也能够表达, 说明二者之间可能存在一些目前尚未发现的特定关系^[22]。此外, 白念珠菌 pH- 应答途径还能调节碱诱导细胞壁跨膜蛋白基因 *CaKER1*、细胞壁表面抗原基因 *CaPRA1* 和一些菌丝特异性基因如 *HWP1*、*RBT1*、*RBR1*、*RBR2*、*RBR3* 等的表达^[23,24]。

2.4 双组分信号转导途径

双组分(two-component)信号转导途径是组氨酸激酶途径, 最早是从细菌中发现的, 它主要调节细菌的抗药性和降解芳香化合物的活性。在酿酒酵母中, 该途径作用于高渗透压甘油 MAPK(high osmolarity glycerol MAPK, HOG-MAPK)途径下游, 用

来调节细胞对外界渗透压的应答^[25]。在白念珠菌中,双组分途径可以调节菌丝的形成,对菌株毒力有一定影响,甚至还有可能参与调节氧化应激反应。

酿酒酵母的双组分信号转导途径是由组氨酸激酶 ScSln1、组氨酸磷酸化介导蛋白 ScYpd1 和应答调节蛋白 ScSsk1 共同组成,作用于 HOG-MAPK 途径下游,调节自身对胞外渗透压的应答^[26]。目前在白念珠菌中已经鉴定出了三种组氨酸激酶(CaSln1、CaNik1P/Cos1 和 Chk1),一种组氨酸磷酸化介导蛋白(CaYpd1)和两种应答调节蛋白(CaSsk1 和 CaSkn7)。白念珠菌三种组氨酸激酶中的任何一种的缺失基本不影响细胞对渗透压的应答,却可以减弱细胞在 Spider 等培养基上菌丝的形成以及在小鼠系统感染模型中的毒性^[25,27]。其中 *chk1* 缺失株的效果最为明显,白念珠菌 *chk1* 缺失株在小鼠模型中表现为无毒力,并且对食道组织的黏附力下降,对体内多形核中性白细胞(polymorphonuclear leukocytes, PMNs)的抵抗力下降,细胞容易凝结成絮状。这可能与 Chk1 在细胞壁葡聚糖和甘露聚糖的生物合成中的重要作用有关^[28,29]。CaYpd1 与酿酒酵母 ScYpd1 同源,能够互补酿酒酵母中 ScYpd1 的功能,说明它可能起着类似于酿酒酵母 ScYpd1 的作用^[27]。*Cassk1* 缺失株在血清琼脂糖培养基上菌丝形成有缺陷,在 Spider 等固体培养基上不能形成菌丝。*Cassk1* 缺失株还能严重影响白念珠菌的毒力和对食道细胞的吸附能力。还有研究表明这个基因与细胞壁合成有关, CaSsk1 的缺失可使白念珠菌细胞被 PMNs 杀死的几率大大增加^[30,31]。*Caskn7* 缺失株在琼脂糖和 Spider 固体培养基上菌丝形成受到抑制。与 CaSsk1 的缺失相比, CaSkn7 的缺失对白念珠菌毒力影响甚小,而且也不能影响白念珠菌细胞被 PMNs 杀死的几率。另外, CaSkn7 和 CaSsk1 的缺失都可使细胞对 H₂O₂ 等过氧化物敏感性增加,说明它们还可能与氧化剂应激作用有关^[25,31]。

2.5 Tup1 介导的负调控途径

除了上述能正向调控菌丝形成的信号转导途径外,白念珠菌中还存在一个能显著的负向调控菌丝形成的信号转导途径,该途径由 CaTup1 介导在 CaNrg1 和 CaRfg1 的共同作用下完成。

白念珠菌 CaTup1 是一个阻遏转录的序列特异性 DNA 结合蛋白, *Catup1* 缺失株在无任何诱导条件下都能很好的形成菌丝。Braun 等^[32]鉴定出了多个受 CaTup1 抑制的基因 *RBTs*(repressed by tup1),

包括 *RBT1*、*RBT2*、*RBT4*、*RBT5*、*RBT7*、*HWPI* 和 *WAPI* 等。白念珠菌 CaRfg1 是一种 DNA 结合蛋白,可能作用于 CaTup1 途径的下游。CaRfg1 的缺失可以促进菌丝的形成和一些菌丝特异性基因 *RBTs* 的表达^[33]。白念珠菌 CaNrg1 是一种锌指 DNA 结合蛋白,其缺失同样能够促进菌丝的形成和一部分 *RBTs* 的表达。近来研究表明 37 °C 时白念珠菌细胞内 *CaNRG1* mRNA 水平下调,从而减弱 CaNrg1 对菌丝形成的抑制,这与 37 °C 促进菌丝表达的事实相吻合^[34]。

Kadosh 等^[35]使用 DNA 微阵列分析发现白念珠菌在 37 °C、血清因子诱导条件下的菌丝形成过程中有 61 个基因的表达明显上升。而这 61 个基因中约有一半是受到 CaTup1、CaNrg1 和 CaRfg1 的抑制的,说明本途径在菌丝形成过程中起着非常重要的作用。

3 小结与展望

迄今为止,对白念珠菌菌丝发育遗传调控途径的研究已经取得了很大的进展。如上所述,影响白念珠菌从酵母态到菌丝态的转换的多种信号转导途径已被鉴定。目前的研究主要集中在单个基因和单个途径上,以后工作的重点应该转移到寻找各基因、各途径之间的关系以及它们如何协同工作共同调节白念珠菌形态转换上。然而由于世界上各研究小组之间用来剔除基因的菌株遗传背景和策略的不同以及用于菌丝诱导的条件和培养基的差异,对上述工作的开展增加了一定的困难。此外,信号转导途径的上下游组分还不够明确,胞外信号通过何种感受器激活体内的信号转导途径、被激活的信号转导途径与菌丝细胞极性生长之间的关系等问题也有待解决。同时,白念珠菌的形态转换除了酵母-菌丝态的转换外,还存在 White-Opaque 形态转换和厚壁孢子(chlamydospore)的形成等形式,对它们的研究还处于起步阶段,有待进一步研究。

DNA 微阵列技术能够让人们从全基因组水平分析不同环境条件下,不同形态之间白念珠菌基因表达的差异,这将使人们能够更好地理解外界环境、信号转导途径和白念珠菌形态之间的关系^[36]。

参考文献(References)

- [1] Braun BR et al. *PLoS Genet*, 2005, 1: 36
- [2] Whiteway M. *Curr Opin Microbiol*, 2004, 7: 350

- [3] Berman J *et al. Nat Rev Genet*, 2002, **3**: 918
[4] Liu H. *Curr Opin Microbiol*, 2001, **4**: 728
[5] Liu H *et al. Science*, 1994, **266**: 1723
[6] Chen J *et al. Mol Microbiol*, 2002, **46**: 1335
[7] Ikner A *et al. Mutat Res*, 2005, **569**: 13
[8] Smith DA *et al. Mol Biol Cell*, 2004, **15**: 4179
[9] Kumamoto CA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**: 5576
[10] Leng P *et al. J Bacteriol*, 2001, **183**: 4090
[11] Lane S *et al. J Biol Chem*, 2001, **276**: 48988
[12] Cloutier M *et al. Fungal Genet Biol*, 2003, **38**: 133
[13] Cassola A *et al. Eukaryot Cell*, 2004, **3**: 190
[14] Bahn YS *et al. J Bacteriol*, 2001, **183**: 3211
[15] Bahn YS *et al. Mol Microbiol*, 2003, **50**: 391
[16] Jung WH *et al. Yeast*, 2005, **22**: 285
[17] Maidan MM *et al. Mol Biol Cell*, 2005, **16**: 1971
[18] Leberer E *et al. Mol Microbiol*, 2001, **42**: 673
[19] Calderone R *et al. FEMS Yeast Res*, 2004, **4**: 885
[20] El Barkani A *et al. Mol Cell Biol*, 2000, **20**: 4635
[21] Li M *et al. Eukaryot Cell*, 2004, **3**: 741
[22] Fonzi WA *et al. J Bacteriol*, 1999, **181**: 7070
[23] Galan A *et al. Microbiology*, 2004, **150**: 2641
[24] Lotz H *et al. Eukaryot Cell*, 2004, **3**: 776
[25] Singh P *et al. Infect Immun*, 2004, **72**: 2390
[26] Singh KK. *Free Radic Biol Med*, 2000, **29**: 1043
[27] Calera JA *et al. Yeast*, 2000, **16**: 1053
[28] Torosantucci A *et al. Infect Immun*, 2002, **70**: 985
[29] Kruppa M *et al. FEMS Yeast Res*, 2003, **3**: 289
[30] Calera JA *et al. Infect Immun*, 2000, **68**: 518
[31] Chauhan N *et al. Eukaryot Cell*, 2003, **2**: 1018
[32] Braun BR *et al. Genetics*, 2000, **156**: 31
[33] Khalaf RA *et al. Genetics*, 2001, **157**: 1503
[34] Braun BR *et al. EMBO J*, 2001, **20**: 4753
[35] Kadosh D *et al. Mol Biol Cell*, 2005, **16**: 2903
[36] Singh V *et al. Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **334**: 1149

Genetic Regulation of Hyphal Development in *Candida albicans*

Ling-Huo Jiang*, Xi-Chuan Li, Hui Zhi

(College of Pharmaceuticals & Biotechnology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract The important opportunistic fungal pathogen *Candida albicans* exists in yeast, pseudohyphal and hyphal forms. Morphological transition from yeast to hyphae in *C. albicans* is regulated by a variety of cellular signal transduction pathways under different environmental conditions. This review focuses on recent research progress on major signal transduction pathways regulating the yeast to hyphae transition process in *C. albicans*.

Key words *Candida albicans*; hyphal development; genetic regulation; MAPK; cAMP-PKA

Received: November 25, 2005 Accepted: February 10, 2006

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30470850)

*Corresponding author. Tel: 86-22-27401248, E-mail: linghuojiang@yahoo.com.cn