

研究报告

白假丝酵母 Vps74 蛋白的鉴定及其功能

张冰 李虹悦 梁超 彭丽萍 任彤彤 李建荣 喻其林 李明春*

(南开大学微生物学系 分子微生物学与技术教育部重点实验室 天津 300071)

摘要:【背景】Vps74/GOLPH3 是参与高尔基体蛋白糖基化修饰的关键蛋白, 并且是重要的磷酸磷脂酰肌醇效应因子, 在胞内参与多种信号通路。【目的】鉴定白假丝酵母 Vps74 蛋白, 并探索其在该病原菌压力应答、蛋白分泌、形态发生及致病过程中的功能。【方法】采用在线序列比对方法, 初步鉴定白假丝酵母 Vps74 蛋白; 采用两步 PCR 介导的同源重组方法, 构建白假丝酵母 *vps74* 基因缺失菌株 *vps74Δ/Δ* 及回补菌株 *VPS74c*; 采用反向遗传学方法, 探究 Vps74 在白假丝酵母的压力应答、蛋白分泌、形态发生及致病过程中的功能。【结果】白假丝酵母中存在典型的 Vps74/GOLPH3 同源蛋白, Vps74 参与蛋白糖基化修饰过程, *vps74* 基因缺失导致白假丝酵母蛋白分泌能力、形态发生能力、黏附能力以及侵染宿主能力的显著降低。【结论】Vps74 通过影响蛋白分泌、形态发生、黏附、嵌入式生长等过程, 在白假丝酵母致病过程中发挥重要作用。

关键词: 白假丝酵母, Vps74/GOLPH3, 糖基化修饰, 蛋白分泌, 形态发生, 致病性

Characterization of Vps74 in *Candida albicans*ZHANG Bing LI Hong-Yue LIANG Chao PENG Li-Ping REN Tong-Tong
LI Jian-Rong YU Qi-Lin LI Ming-Chun*

(Key Laboratory of Molecular Microbiology and Technology, Ministry of Education, Department of Microbiology, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: [Background] Vps74/GOLPH3 is a key protein involved in the glycosylation of the Golgi protein, and an important phosphatidylinositol-4-kinase effector and phosphatidylinositol-4-phosphate sensor participating in a variety of intracellular signaling pathways. [Objective] To characterize the Vps74/GOLPH3 homologue in *Candida albicans* and investigate the role of *Cavps74* in stress response, secretion, morphogenesis and pathogenicity. [Methods] Sequence alignment and analysis were performed by the relevant biosoftware. The gene deletion strain *vps74Δ/Δ* and reconstructed strain *VPS74c* were constructed by PCR-mediated gene disruption. With reverse genetic analysis, we further investigated the function of Vps74 in protein glycosylation, stress response, secretion, morphogenesis and pathogenicity. [Results] There is a typical homologue

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31670146, 81471923, 31400132); Natural Science Foundation of Tianjin City (17JCZDJC33300, 15JCQNJC09300)

*Corresponding author: Tel: 86-22-23508506; E-mail: nklimingchun@163.com

Received: February 07, 2018; Accepted: May 18, 2018; Published online (www.cnki.net): June 05, 2018

基金项目: 国家自然科学基金(31670146, 81471923, 31400132); 天津市自然科学基金(17JCZDJC33300, 15JCQNJC09300)

*通信作者: Tel: 86-22-23508506; E-mail: nklimingchun@163.com

收稿日期: 2018-02-07; 接受日期: 2018-05-18; 网络首发日期(www.cnki.net): 2018-06-05

of Vps74/GOLPH3 in *C. albicans* which also plays important role in glycosylation process. Deletion of *vps74* resulted in various effects, including decreased secretion ability, morphogenesis, adhesion and loss of pathogenicity. **[Conclusion]** Vps74 plays a key role in protein secretion, morphogenesis, adhesion and pathogenicity in *C. albicans*.

Keywords: *Candida albicans*, Vps74/GOLPH3, Glycosylation, Protein secretion, Morphogenesis, Pathogenicity

白假丝酵母(*Candida albicans*)是临床上重要的条件致病性真菌,普遍存在于健康人群的口腔、肠道、阴道及泌尿系统中。一般情况下,白假丝酵母并不会感染人体,但当人体免疫力下降或免疫功能不全时,则极易出现白假丝酵母感染,严重时甚至会危及生命^[1-2]。近年来,随着免疫缺陷患者的增多,白假丝酵母的感染逐渐趋于普遍,引起了学术界广泛关注。目前,在科研工作中,亟需找到针对该病原真菌的有效治疗靶点,从而为开发针对该条件致病真菌的靶向治疗药物提供理论依据。

白假丝酵母的致病能力主要决定于3个方面^[1-2]。

(1) 形态发生能力。白假丝酵母是典型的二相型真菌,在宿主体内,白假丝酵母可以适时实现酵母形态和菌丝形态之间的相互转换,菌丝形态有助于其侵入宿主组织,而酵母形态有助于其在宿主体内的散播。(2) 压力应答能力。宿主本身具有强大的免疫系统,该系统会对异常侵染的病原体进行清除,通常以造成外源压力的方式[例如巨噬细胞产生活性氧(Reactive oxygen species, ROS)]将其杀死,以避免侵染的发生。白假丝酵母在长期进化过程中形成了完善的信号压力应答途径(例如钙信号途径、氧化压力应答途径、药物压力应答途径等),从而在面临外界压力时能够将其激活,维持其在宿主组织中的生存。(3) 胞外酶。白假丝酵母可分泌胞外酶,有助于其降解宿主组织或摄取外源营养物质,保证其在宿主体内的存活及进一步的侵染。

目前研究发现,磷脂酰肌醇(Phosphatidylinositol, PI)信号通路是普遍存在于真核细胞中的信号传递方式,在胞内信号传递和胞内细胞器识别过程中发挥关键作用,该过程主要是通过磷脂酰肌醇激酶产生的磷酸化产物作用于下游效应蛋白所实

现,并由磷脂酰肌醇磷酸酶的去磷酸化作用所终止^[3]。在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中,Vps74是磷脂酰肌醇-4-磷酸(Phosphatidylinositol-4-phosphate, PI4P)的关键效应因子,该蛋白可以促进糖基转移酶(Glycosyltransferases)与COPI有被小泡(COPI-coated vesicles)的融合,进而维持糖基转移酶在高尔基体(Golgi)上的定位,影响高尔基体上的蛋白糖基化修饰过程^[4]。*vps74*基因缺失导致甘露糖转移酶Kre2p、Mnn2p、Mnn5p、Och1p定位紊乱,从而导致高尔基体上N-糖基化和O-糖基化严重缺陷^[4-5]。Vps74在哺乳动物中的同源蛋白为GOLPH3,该蛋白也具有与磷脂酰肌醇-4-磷酸(PI4P)结合的能力,并且该蛋白可以通过结合肌球蛋白MYO18A,调节肌动蛋白介导的高尔基体转运及形态^[6]。此外,GOLPH3可参与mTOR信号通路,进而影响肿瘤细胞对雷帕霉素(Rapamycin)的敏感性^[7]。通过移植瘤模型也发现,GOLPH3的敲除会导致肿瘤细胞增殖、迁移、浸润能力的降低,从而降低肿瘤在体内的生长速度。此外,在黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)中的研究发现,GOLPH3可以通过影响磷脂酰肌醇下游信号通路参与肌动蛋白的动态组织及囊泡在胞内的转运过程,从而影响精母细胞的分裂^[8]。然而在致病性真菌白假丝酵母中是否同样存在Vps74/GOLPH3的同源蛋白,以及该蛋白是否具有多种生理功能,至今尚未见报道。

本研究通过序列比对和同源性分析,在白假丝酵母中鉴定了一个潜在的Vps74/GOLPH3同源蛋白CaVps74,通过基因敲除手段并采用反向遗传学方法分析了该蛋白在白假丝酵母中的功能,结果发现该蛋白在蛋白分泌、形态发生等过程中发挥重要功能,从而影响白假丝酵母的致病性。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和引物

所用菌株和质粒见表 1，引物见表 2。

1.2 主要试剂和仪器

醋酸锂、聚乙二醇 3350 等购自 Sigma 公司；RNase A、dNTPs、牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA)等购自北京鼎国生物技术有限责任公司；RPMI-1640、M199 培养基粉末购自 Gibco 公司；*Taq* DNA 聚合酶、DNA 分子量标准购自天根生化科技(北京)有限公司；其余试剂和药品均为国产分析纯。PCR 仪，Gene 公司；凝胶成像仪，UVP 公司；蛋白电泳仪，Bio-Rad 公司；荧光显微镜，Olympus 公司。

1.3 培养基

YPD 和 SC 培养基(SC-ura 除外)均添加终浓度

为 80 mg/L 的无菌尿苷^[9]。药物敏感性测定培养基：将灭菌完成的 YPD 培养基冷却至 50 °C，按照相应浓度要求[5 mmol/L 过氧化氢(H₂O₂)、4 g/L 特比萘酚(Terbinafine)、2 g/L 两性霉素 B (Amphotericine B) 或 0.2 mg/L 卡泊芬净(Caspofungi)]将药物加入培养基中，倒平板，待平板冷却凝固后即可。沙氏葡萄糖培养基(g/L)：蛋白胨 10.0，MgSO₄ 1.2，葡萄糖 40.0，氨水 1% (质量体积比)，充分搅拌后采用 0.45 μm 滤膜过滤，调整 pH 至 5.4，1×10⁵ Pa 灭菌 30 min。BSA 培养基：葡萄糖 10.0 g/L，1 000×微量元素溶液 0.1%，1 000×维生素溶液 0.1%，调 pH 至 4.4，1×10⁵ Pa 灭菌 30 min 后冷却至 50 °C，添加 0.1% (质量体积比)的 BSA，固体培养基添加 20 g/L 的琼脂粉。1 000×微量元素溶液(g/L)：ZnSO₄·7H₂O 22.0，H₃BO₃ 11.0，MnCl₂·4H₂O 5.0，FeSO₄·7H₂O 5.0，

表 1 实验中所用菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Genotype and description	References
<i>C. albicans</i> strains		
BWP17 (Wild type)	<i>ura3Δ::λimm434/ura3Δ::λimm434 his1::hisG/his1::hisG arg4::hisG/arg4::hisG</i>	This study
<i>vps74Δ/VPS74</i>	<i>ura3Δ::λimm434/ura3Δ::λimm434 his1::hisG/his1::hisG arg4::hisG/arg4::hisG vps74::arg4/vps74</i>	This study
<i>vps74Δ/Δ</i>	<i>ura3Δ::λimm434/ura3Δ::λimm434 his1::hisG/his1::hisG arg4::hisG/arg4::hisG vps74::arg4/vps74::ura3-dpl200</i>	This study
<i>VPS74c</i>	<i>ura3Δ::λimm434/ura3Δ::λimm434 his1::hisG/his1::hisG arg4::hisG/arg4::hisG vps74::arg4/vps74::ura3-dpl200 vps74</i>	This study
Plasmids		
pRS-ARG4ΔSpeI	Containing <i>arg4</i> marker, Amp ^r	[9]
pDDB57	Containing <i>ura3</i> marker, Amp ^r	[9]
pDDB78	Containing <i>his1</i> marker, Amp ^r	[9]
pDDB78- <i>vps74</i>	Containing <i>his1</i> marker, Amp ^r , <i>vps74</i>	This study

表 2 实验中所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primers name	Sequences (5'→3')
<i>vps74</i> -5DR	TTGAACCTCATTTAAATATTAATTTAGTTGAATAATTGGATAGCAGGTAAAAGTTTGT CATTTCCCAGTCACGACGTT
<i>vps74</i> -5DR	TATTATATTGAAACCCCTTGACTATATGTACTTATATATATATATATGCTAGACTTCTTGT TGGAATTGTGAGCGGATA
<i>vps74</i> -5det	CCCAATCAATCTCAACTTTTTCATT
<i>vps74</i> -3det	TGATCAACTAGGTGGTGTGGA
<i>vps74</i> -5com	CCGGAATTCTTAATACTTGTGAGGATT
<i>vps74</i> -5com	CCCATCGATTGGTGTGGAAGTACTTGA
Iner- <i>vps74</i> -3det	TCTCAGCACTAACATACTC

CoCl₂·6H₂O 1.7, CuSO₄·5H₂O 1.6, Na₄-EDTA 50.0。1 000×维生素溶液(g/L): 生物素 0.1, 吡哆醇 0.1, 维生素 B1 0.1, 核黄素 0.1, 对氨基苯甲酸 0.1, 烟酸 0.1。RPMI-1640 培养基(g/L): RPMI-1640 粉末 10.4, 丙磺酸 4.18, 碳酸钠 2.0, 调 pH 至 7.0–7.4, 过滤除菌, 使用前添加终浓度为 80 mg/L 的无菌尿苷。M199 培养基(g/L): M199 粉末 9.5, 4-羟乙基哌嗪乙磺酸 35.75, 调 pH 至 7.0–7.4, 过滤除菌, 使用前添加终浓度为 80 mg/L 的无菌尿苷。Spider 培养基(g/L): 营养肉汤 10.0, 甘露醇 10.0, K₂HPO₄ 2.0, 调 pH 至 7.0–7.4, 固体培养基添加 2% 的琼脂粉, 1×10⁵ Pa 灭菌 30 min。

1.4 白假丝酵母的转化

白假丝酵母的转化使用醋酸锂转化法, 具体方法参见文献[9]。

1.5 白假丝酵母 *vps74* 基因缺失菌株和回补菌株的构建

使用 PCR 介导的同源重组方法构建基因缺失菌株 *vps74Δ/Δ*, 具体方法参照文献[9]。回补菌株的构建采用非原位同源重组方法, 将 *vps74* 基因(包括启动子、ORF 区、终止子等区域)克隆至载体质粒 pDDB78 上, 将其转化进入缺失菌株 *vps74Δ/Δ*, 构建回补菌株 *VPS74c*。菌株的鉴定采用 PCR 方法^[9]。

1.6 分泌性酸性磷酸酶(SAPs)的糖基化水平分析^[9]

将 30 °C、180 r/min 培养过夜的菌体转接至沙氏葡萄糖培养基中, 调整初始菌液浓度 *OD*₆₀₀ 为 0.1, 30 °C、180 r/min 振荡培养 16 h, 充分诱导 SAPs 的表达。4 000 r/min 离心 2 min 收集菌体细胞, 用无菌水洗涤 2 遍, 重悬于 500 μL 非变性裂解液中, 加入 200 μL 玻璃珠, 振荡破碎菌体。将细胞裂解液于 4 °C、13 000 r/min 条件下离心 30 min, 得到上清液即为总蛋白。测定蛋白样品的浓度后将各样品蛋白量进行统一, 采用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳对等量的蛋白样品进行分离, 采用 SAPs 染色法对凝胶进行染色^[9], 观察 SAPs 的泳动速度以反映其糖基化水平。

1.7 压力敏感性测定

将 30 °C、180 r/min 培养过夜的菌体转接至新鲜的 YPD 培养基中, 调整初始 *OD*₆₀₀ 为 0.1, 30 °C、180 r/min 振荡培养 4–6 h, 使菌体细胞处于旺盛分裂的对数初期。4 000 r/min 离心 2 min 收集菌体细胞, 用无菌 PBS 溶液洗涤一遍, 重悬于 PBS 中, 调整 *OD*₆₀₀ 为 0.2。进行 10 倍梯度稀释, 稀释 4–5 个梯度。取 2 μL 菌液, 将各稀释度的菌液按顺序点种于 YPD 平板及各种药物敏感培养基平板上。各平板在 30 °C 恒温培养箱内静置培养 1–2 d, 观察菌株生长情况。

1.8 蛋白分泌能力测定

将 30 °C、180 r/min 培养过夜的菌体转接至新鲜的 YPD 培养基中, 调整初始菌体浓度 *OD*₆₀₀ 为 0.1, 30 °C、180 r/min 振荡培养 4–6 h, 使菌体细胞处于旺盛分裂的对数初期。固体观察测定方法: 4 000 r/min 离心 2 min 收集菌体细胞, 用无菌 PBS 洗涤一遍, 重悬于 PBS 中, 调整菌体浓度 *OD*₆₀₀ 为 0.5, 取 2 μL 菌液点种于 BSA 平板上, 将平板置于 37 °C 恒温培养箱内静置培养 5–7 d, 观察蛋白水解圈的形成。液体培养测定方法: 将菌体转接至液体 BSA 培养基中, 调整 *OD*₆₀₀ 为 0.5, 置于 30 °C、180 r/min 振荡培养 8–30 h, 取等量培养液上清, 经 SDS-PAGE 分离后, 采用考马斯亮蓝 R-250 染色液进行染色, 脱色后观察 BSA 的降解情况。

1.9 白假丝酵母形态发生能力的测定

将 30 °C、180 r/min 培养过夜的菌体转接到新鲜 YPD 培养基中, 继续培养 4–6 h 至对数初期。固体测定方法: 室温、4 000 r/min 离心 2 min 收集菌体, 用无菌 PBS 洗涤一遍, 调整 *OD*₆₀₀ 至 0.8, 取 2 μL 菌液按顺序点种于 RPMI-1640、M199、Spider 平板上, 置于 37 °C 培养箱中培养 6–8 d, 观察菌落周围菌丝的形成状况。液体测定方法: 4 000 r/min 离心 2 min 收集菌体, 用无菌 PBS 洗涤一遍, 转接至 RPMI-1640 培养基中, 调整 *OD*₆₀₀ 至 0.05, 于 37 °C、120 r/min 振荡培养 3–6 h, 分别在培养 3 h 和 6 h 时收集菌体, 置于显微镜下观察菌丝形成情况。

1.10 白假丝酵母系统性感染能力检测

将 30℃、180 r/min 培养过夜的菌体 4 000 r/min 离心 2 min, 收集菌体沉淀重悬于 0.9% 的无菌生理盐水中, 调整菌体浓度为 5×10^6 个细胞/mL。选取健康状况良好的 4 周龄雌性 ICR 小鼠(体重 15–20 g)作为白念珠菌感染宿主, 采用尾静脉注射方式进行感染, 每只小鼠注射菌液剂量为 100 μ L (等同于 5×10^5 个细胞), 每种菌株感染 10 只小鼠。自注射感染后第 1 天开始观察并记录小鼠死亡情况, 绘制生存曲线。在感染第 8 天对小鼠进行解剖, 取其肾脏进行菌落计数以反映菌株的深部感染能力。

2 结果与分析

2.1 白假丝酵母 Vps74 蛋白的鉴定

通过 NCBI 同源序列比对分析, 发现在白假丝

酵母中存在 Vps74/GOLPH3 同源蛋白, 由 orf19.1514 编码, 将其命名为 *CaVps74*。该蛋白由 340 个氨基酸组成, 其编码基因全长 1 023 bp。通过 NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 序列比对分析发现(图 1A), *CaVps74* 与酿酒酵母 *ScVps74* 的氨基酸序列相似性最高, 一致性为 60%。同时发现, Vps74/GOLPH3 在生物界也相对保守, *CaVps74* 与哺乳动物 *HsGOLPH3*、果蝇 *DmGOLPH3* 的一致性分别为 49% 和 42%。保守结构域分析发现(图 1B), *CaVps74*、*ScVps74*、*HsGOLPH3*、*DmGOLPH3* 均含有典型的 GPP34 结构域, 并且在氨基酸序列 N 端均具有典型的精氨酸(R)保守基序^[10-11], 推测 *CaVps74* 蛋白在功能上也相对保守。

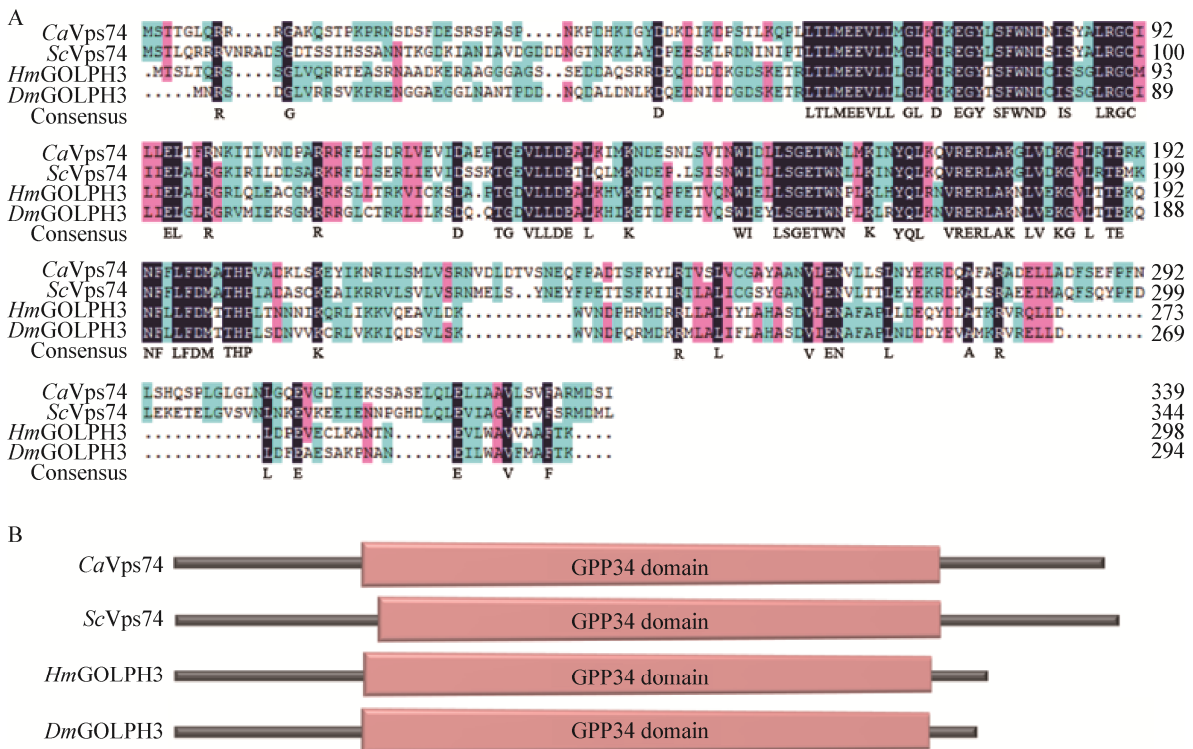


图 1 不同生物 Vps74/GOLPH3 蛋白序列比对及保守结构域分析

Figure 1 Sequence alignment and conserved domain analysis of Vps74/GOLPH3 in different organisms

注: A: NCBI 在线序列比对分析不同生物(白假丝酵母 *Ca*、酿酒酵母 *Sc*、人 *Hs*、黑腹果蝇 *Dm*)中 Vps74/GOLPH3 蛋白的一致性; B: 蛋白保守结构域分析。

Note: A: Sequences alignment of Vps74/GOLPH3 homologous among *C. albicans*, *S. cerevisiae*, *Homo sapiens* and *D. melanogaster*; B: Conserved GPP34 domain of the Vps74/GOLPH3 homologous in different organisms.

2.2 *vps74* 缺失菌株及回补菌株的构建

为进一步利用反向遗传学方法研究 Vps74 在白假丝酵母中的生物学功能, 构建了白假丝酵母基因缺失菌株。白假丝酵母是二倍体生物, 因此构建基因缺失菌株需要逐次将 *vps74* 基因的 2 个拷贝进行敲除。我们采用 PCR 介导的同源重组技术进行基因缺失菌株 *vps74*Δ/Δ 的构建^[9], 利用敲除片段大小的差异性进行了 PCR 验证。单拷贝基因缺失菌株(杂合子 *vps74*Δ/*VPS74*)预期可以得到 2 572 bp (*arg4* 片段)和 1 554 bp (*vps74* 片段), 双拷贝基因缺失菌株(纯合子 *vps74*Δ/Δ)预期能够得到 2 541 bp (*arg4* 片段)和 2 189 bp (*ura3* 片段)。由图 2A 可见, PCR 验证结果符合预期, 获得了正确的基因缺失菌株

(纯合子 *vps74*Δ/Δ)。回补菌株的构建采用非原位同源重组方法, 将完整的 *vps74* 表达框重组至 *his1* 基因位点。同样采用 PCR 方法进行验证, 预期得到 911 bp 的片段。由图 2B 可见, 回补菌株 *VPS74c* 构建成功。

2.3 *vps74* 缺失对白假丝酵母糖基化能力的影响

酿酒酵母 *vps74* 基因的缺失会导致糖基转移酶 Ktr1 等多种糖基转移酶由高尔基体转移至液泡分布, 进而导致酿酒酵母的糖基化功能缺陷^[4-5]。为了验证 Vps74 在白假丝酵母中是否也参与糖基化过程, 首先对白假丝酵母糖基转移酶 Mnt1 (与酿酒酵母 Ktr1 同源)进行 GFP (Green fluorescent protein)标记, 观察了 Mnt1-GFP 在细胞内的定位。结果发现(图 3A),

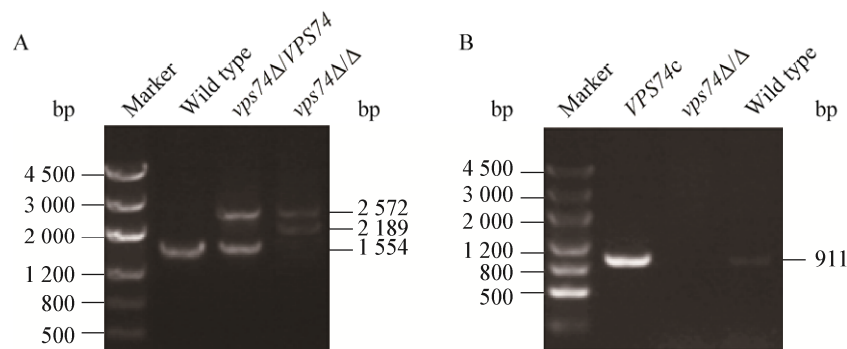


图 2 白假丝酵母 *vps74* 基因缺失菌株 *vps74*Δ/Δ 及回补菌株 *VPS74c* 的验证

Figure 2 Identification of *vps74*Δ/Δ and *VPS74c* by PCR

注: A: 单拷贝基因缺失菌株(杂合子 *vps74*Δ/*VPS74*)和双拷贝基因缺失菌株(纯合子 *vps74*Δ/Δ)的 PCR 验证; B: 回补菌株 *VPS74c* 的 PCR 验证。

Note: A: *vps74*Δ/*VPS74* and *vps74*Δ/Δ identification by PCR; B: *vps74*Δ/Δ identification by PCR with the wild type as control.

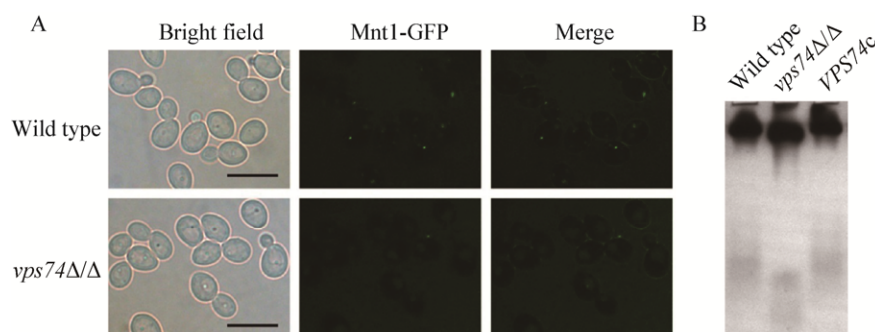


图 3 *vps74* 基因缺失对白假丝酵母糖基化能力的影响

Figure 3 Deletion of *vps74* affects glycosylation of *C. albicans*

注: A: 糖基转移酶 Mnt1 定位分析, 比例尺为 5 μm; B: 分泌性酸性磷酸酶(SAPs)糖基化水平检测。

Note: A: The intracellular localization of glycosyltransferase Mnt1-GFP in wild-type strain and *vps74*Δ/Δ mutant; Bar=5 μm; B: Glycosylation assays of SAPs.

野生型菌株中 Mnt1-GFP 呈现斑点状分布, 与高尔基体的分布状态一致, 说明 Mnt1 在白假丝酵母中也定位于高尔基体, 而 *vps74* 缺失后导致 Mnt1-GFP 集中分布在液泡中, 无法观察到类似于高尔基体的斑点分布状态。上述结果表明, 在白假丝酵母中, Vps74 参与维持糖基转移酶 Mnt1 在高尔基体上的定位。

分泌性酸性磷酸酶(Secreted acid phosphatases, SAPs)是白假丝酵母中一类重要的糖基化蛋白, 其糖基化水平可反映高尔基体糖基化功能的完整性。SAPs 的糖基化水平可通过非变性凝胶分离及染色的方法进行测定, 成熟的 SAPs 具有大量糖基化特征, 因而在 PAGE 凝胶中泳动较慢, 而糖基化修饰缺陷的 SAPs 分子量变小, 会出现泳动速度加快的现象, 可通过 SAPs 在凝胶中的泳动速度判断其糖基化水平。为了进一步验证 *vps74* 缺失后导致的糖基转移酶异常定位是否会影响胞内的糖基化修饰过程, 采用蛋白染色方法测定了 SAPs 的糖基化水平。结果如图 3B 所示, 野生型及回补菌株的 SAPs 距离点样孔较近, 泳动速度明显较慢, 而 *vps74Δ/Δ* 菌株的 SAPs 泳动速度明显加快, 说明 *vps74* 基因缺失导致了 SAPs 糖基化水平的显著降低。

2.4 *vps74* 缺失对白假丝酵母应对外源氧化压力及药物压力能力的影响

白假丝酵母在宿主体内面临着各种压力, 尤其是来自于宿主免疫细胞的氧化压力及外源抗真菌

药物的压力^[12-13], 其压力应答能力是衡量致病能力的重要因素之一。利用梯度稀释方法测定了 *vps74* 缺失对白假丝酵母应对外源压力能力的影响, 结果表明(图 4), *vps74* 缺失并不会造成白假丝酵母应对氧化压力(H_2O_2)及抗真菌药物[特比萘酚(Terbinafine)、两性霉素 B (Amphotericin B)、卡泊芬净(Caspofungin)]压力能力的改变。说明 Vps74 在白假丝酵母压力耐受方面并不发挥主要功能。

2.5 *vps74* 缺失对白假丝酵母蛋白分泌能力的影响

白假丝酵母在侵染宿主组织时, 会分泌酸性蛋白酶(主要为天冬氨酸蛋白酶)帮助降解宿主细胞外基质、角蛋白及免疫球蛋白等^[1,14], 一方面有助于白假丝酵母摄取外源营养, 另一方面有助于其黏附并进一步侵染宿主组织。采用牛血清白蛋白培养基(BSA 培养基)测定了 Vps74 在白假丝酵母蛋白分泌过程中的作用, 固体水解圈观测结果表明(图 5A), *vps74* 缺失导致蛋白水解圈减小, 提示白假丝酵母降解 BSA 的能力降低。液体培养液中 BSA 残留量检测(图 5B)结果进一步表明, 相对于野生型菌株和回补菌株而言, 在短时间培养条件下(8 h), *vps74Δ/Δ* 表现出较弱的降解 BSA 的能力, 而经过长时间(30 h)的培养之后, *vps74Δ/Δ* 与对照菌株的 BSA 降解能力则不表现出明显的差异性。上述结果表明, *vps74* 缺失导致了白念珠菌分泌胞外蛋白酶能力的削弱, 但并没有导致分泌能力的完全丧失。

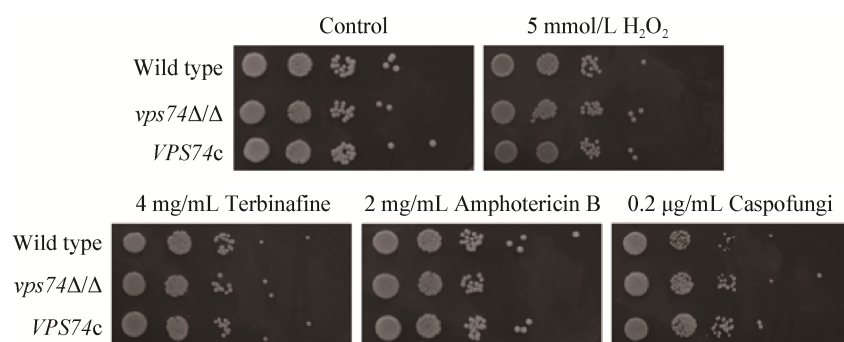


图 4 *vps74* 基因缺失对白假丝酵母压力耐受性的影响

Figure 4 Effect of *vps74* deletion on stress response in *C. albicans*

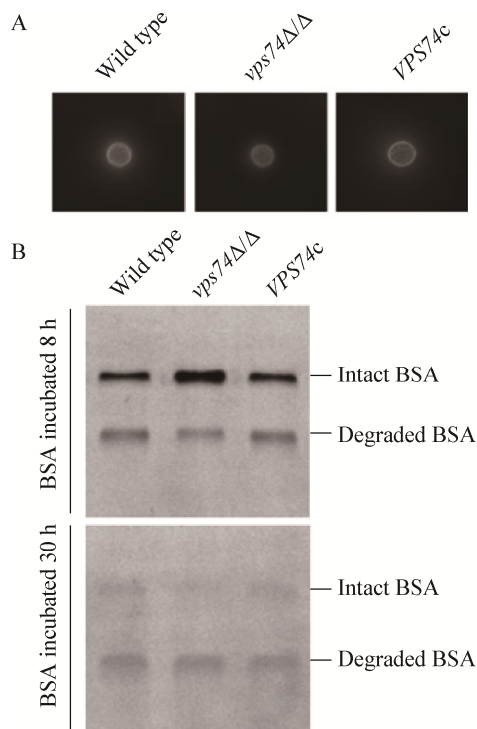


图5 *vps74* 基因缺失对白假丝酵母蛋白分泌能力的影响
Figure 5 Deletion of *vps74* affects protein secretion of *C. albicans*

注: A: 固体 BSA 平板检测蛋白水解圈大小, 反映白假丝酵母蛋白分泌及降解外源蛋白的能力; B: 液体培养菌株后培养基中 BSA 残余量检测。

Note: A: The secretory ability detection by evaluating the area hydrolytic halo on BSA plate; B: The secretory ability was reflected by the ratio of residual integrated BSA and degraded BSA in liquid medium.

2.6 *vps74* 缺失对形态发生能力的影响

鉴于胞内蛋白加工修饰的紊乱会影响白假丝酵母的形态发生^[13,15], 进一步探究了 Vps74 对白假丝酵母形态发生能力的影响。固体菌丝诱导结果(图 6A)表明, 在 RPMI-1640、M199、Spider 培养基中, *vps74Δ/Δ* 菌落周边菌丝明显减少, 菌丝形成能力显著降低。液体 RPMI-1640 培养结果(图 6B)显示, 菌丝诱导 3 h 后, 野生型及回补菌株能够形成伸展平滑的菌丝, 而 *vps74Δ/Δ* 形成的菌丝明显较短, 伴随少量的酵母细胞存在。将培养时间延长至 6 h 后, 上述差异更为显著, 野生型及回补菌株形成了具有明显分枝的菌丝网络, 而 *vps74Δ/Δ* 菌丝较短, 并且呈现弯曲及不规则分枝的状态。菌丝长度统

计结果(图 6C)表明, *vps74Δ/Δ* 形成的菌丝长度约为对照菌株的 1/2, 且该差异并不依赖于菌丝诱导时间的变化。进一步对视野中各种形态的细胞[菌丝型(Hyphae)、假菌丝型(Pseudohyphae)及酵母型(Yeast)细胞]所占比例进行统计(图 6D), 发现 *vps74* 缺失造成菌丝诱导条件下酵母型细胞及假菌丝型细胞显著增多, 菌丝型细胞则相对减少。以上结果表明, Vps74 在白假丝酵母形态发生方面发挥重要功能。

2.7 *vps74* 缺失对白假丝酵母黏附和嵌入式生长能力的影响

除形态发生能力之外, 白假丝酵母的黏附能力及嵌入式生长能力均对其致病能力具有重要影响^[15-16]。采用体外聚乙烯孔板模型测定了 Vps74 在白假丝酵母黏附方面的功能, 结果表明(图 7A), *vps74* 缺失后导致白假丝酵母黏附能力显著下降。嵌入式生长测定结果表明(图 7B), 野生型及回补菌株能够在培养基中形成繁茂的发散状菌丝, 而 *vps74Δ/Δ* 形成菌丝的能力显著减弱, 不能够很好地嵌入到培养基内部, 说明 Vps74 在白假丝酵母嵌入式生长过程中发挥重要功能。综上所述, Vps74 对白假丝酵母黏附及嵌入式生长至关重要。

2.8 Vps74 在白假丝酵母系统性感染宿主过程中的功能

基于 Vps74 在白假丝酵母分泌能力、形态发生、黏附及嵌入式生长等方面均发挥重要作用, 采用小鼠感染模型探讨了该蛋白在白假丝酵母系统性感染宿主过程中的功能。小鼠存活率统计结果表明(图 8A), 野生型菌株及回补菌株在感染小鼠 15 d 内全部死亡, 而 *vps74* 缺失后导致白假丝酵母完全丧失了系统性感染小鼠的能力, 感染后的小鼠一直正常存活。此外, 肾脏真菌负载量检测结果(图 8B)表明, 野生型菌株及回补菌株在感染小鼠 8 d 后, 肾脏明显出现感染的肿胀症状, 而且肾脏中能够分离获得大量的白假丝酵母, 而 *vps74Δ/Δ* 感染后的小鼠肾脏中完全没有白假丝酵母的存在, 说明 Vps74 在白假丝酵母造成深部感染过程中发挥重要作用, 是造成系统性感染不可或缺的重要因子。

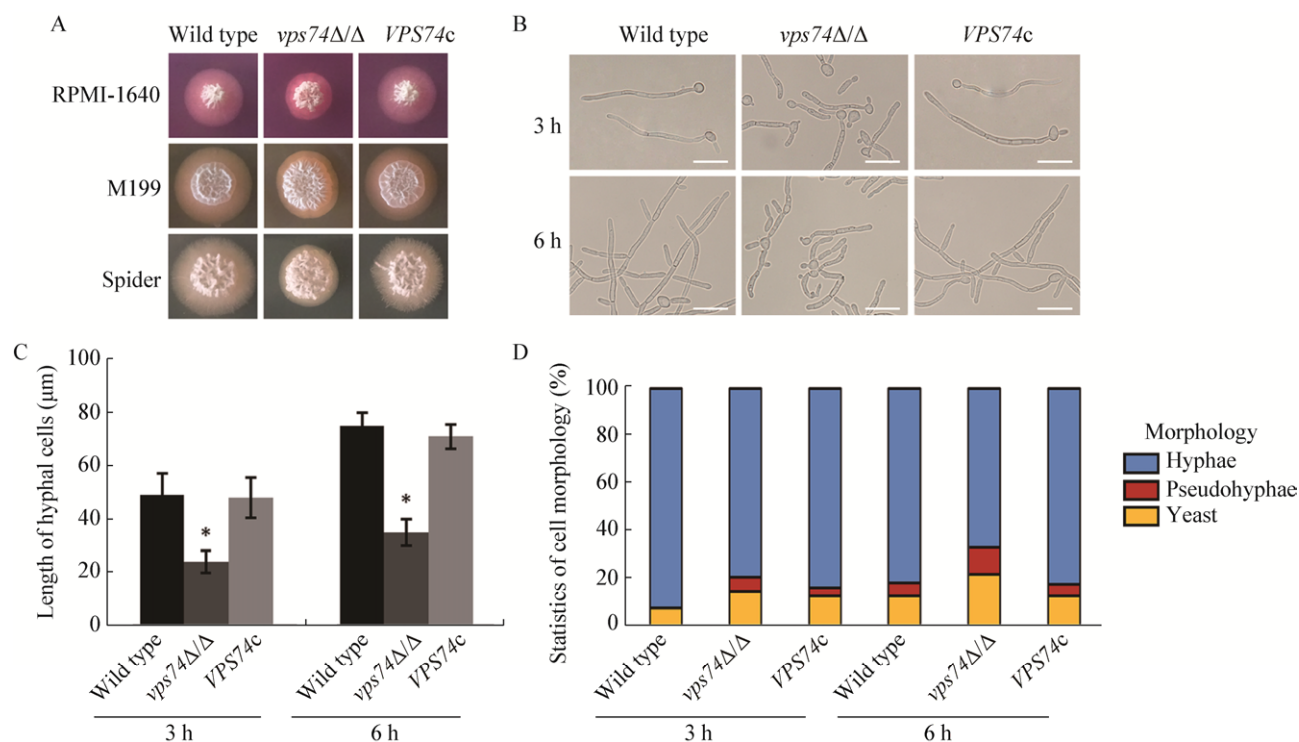


图6 *vps74* 基因缺失对白假丝酵母形态发生能力的影响

Figure 6 Deletion of *vps74* affects yeast-to-hypha morphogenesis of *C. albicans*

注: A: 不同固体菌丝诱导条件下, 观察不同菌株的菌丝诱导情况; B: 液体菌丝诱导条件下, 显微镜下观察不同菌株的菌丝形态, 比例尺为 20 μm; C: 液体菌丝诱导条件下不同菌株形成的菌丝长度比较, *: 与对照组相比较差异显著($P<0.05$); D: 液体菌丝诱导条件下, 菌丝型、假菌丝型及酵母型细胞的比例。

Note: A: Colonial morphology of different strains under solid hyphal-inducing condition; B: The morphology of different strains under liquid RPMI-1640 hyphal-inducing condition (bar=20 μm); C: Hyphal length statistics of different strains under liquid hyphal-inducing condition. *: There was significant different with control group ($P<0.05$); D: Cell form statistics of different strains under liquid hyphal-inducing condition.

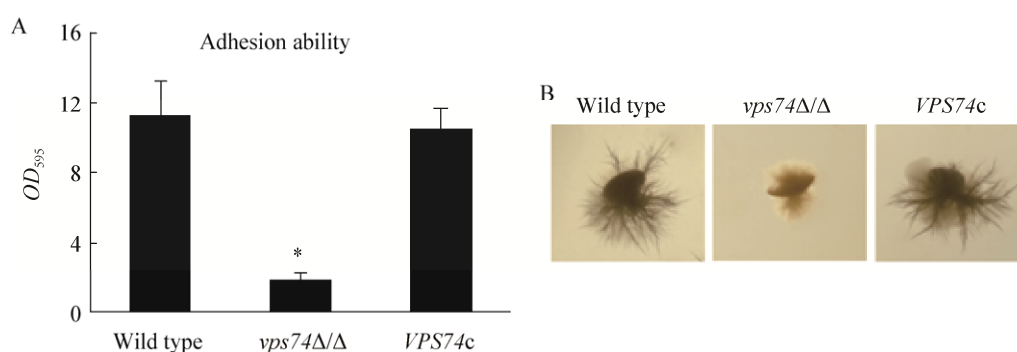


图7 *vps74* 基因缺失对白假丝酵母黏附和嵌入式生长能力的影响

Figure 7 Deletion of *vps74* affects adhesion and embedded growth of *C. albicans*

注: A: 采用聚乙烯孔板模型检测白假丝酵母黏附能力, *: 与对照组相比较差异显著($P<0.05$); B: 白假丝酵母低温嵌入式生长能力检测。

Note: A: The adhesion ability detection of different strains with polyethylene orifice plate. *: There was significant different with control group ($P<0.05$). B: The embedded growth was assayed with YPD plate under 25 °C.

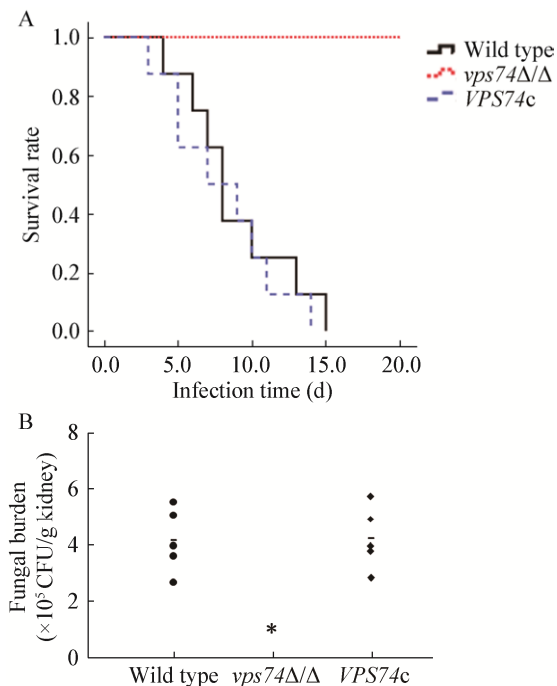


图8 *vps74* 缺失对白假丝酵母系统性感染宿主能力的影响

Figure 8 Deletion of *vps74* affects the pathogenicity of *C. albicans*

注: A: 小鼠被白假丝酵母感染后的存活情况统计; B: 感染小鼠肾脏中真菌负载量统计, *: $P < 0.05$.

Note: A: The survival situation of mice infected by different strains; B: The fungal burden in the kidney was evaluated by CFU. *: There was significant different with control group ($P < 0.05$).

3 讨论与结论

序列比对分析结果表明, 白假丝酵母 Vps74 蛋白具有保守的 GPP34 结构域及氨基酸肽链 N 端具有的典型精氨酸(R)保守基序^[11], 提示该蛋白结构与其他生物具有高度同源性并可能参与高尔基体蛋白加工及物质转运过程。在酿酒酵母中的研究发现, Vps74/GOLPH3 是参与高尔基体蛋白糖基化修饰的关键蛋白, 并且是重要的 PI4P 效应因子^[3-4]。本研究发现, *vps74* 基因的缺失导致糖基转移酶 Mnt1 由高尔基体定位转移至液泡, 并导致分泌性酸性磷酸酶(SAPs)糖基化修饰的严重缺陷, 证明该蛋白在糖基化功能方面具有保守性, 并且该调节依赖于 Vps74 参与调节的糖基转移酶 Mnt1 在高尔基体上的定位。此外, 本研究证实, Vps74 在维持酸性

蛋白酶分泌过程中发挥重要作用, 由于蛋白糖基化修饰的紊乱会导致蛋白分泌途径异常, 进一步削弱白假丝酵母降解外源蛋白的能力, 因此推测 Vps74 参与调节的分泌途径也与糖基化修饰过程有关。然而, *vps74* 缺失后仍能继续降解外源蛋白, 说明其在分泌途径中发挥的并非关卡性作用, 或者胞内有其他蛋白与 Vps74 存在冗余性功能。此外, 本研究还发现, Vps74 对白假丝酵母黏附过程至关重要, 而白假丝酵母的黏附能力也依赖于细胞表面黏附因子的分泌, 进一步证实了 Vps74 对于蛋白分泌的重要性, 说明其参与的蛋白分泌过程并不局限于酸性蛋白酶的分泌。

形态发生能力检测结果表明, Vps74 在形态发生过程中发挥正调控作用。 *vps74* 缺失不会造成菌丝形成能力的完全丧失, 但菌丝形态表现出延伸能力的缺陷。此外, 嵌入式生长能力检测进一步表明, *vps74* 缺失后白假丝酵母在低温下嵌入式生长能力显著降低, 也表现为菌丝的延伸受到抑制, 说明 Vps74 在菌丝的极性生长过程中发挥重要作用。而白假丝酵母在极性生长过程中需要多种特异蛋白的共同作用^[1,15], 多数蛋白均需要经过糖基化修饰成熟, 所以推测 Vps74 参与的菌丝延伸过程可能与其发挥的蛋白加工修饰过程相关。

小鼠系统性感染试验结果证明, *vps74* 缺失可以完全阻断白假丝酵母对宿主组织的深部感染过程, 其原因可能与 Vps74 参与蛋白分泌过程、黏附过程、形态发生过程均紧密相关。因此, 基于白假丝酵母 Vps74 在深部感染过程中发挥的重要功能, 可进一步以 Vps74 为药物靶点, 开发靶向治疗白假丝酵母药物, 为临床应用提供有用的参考。

REFERENCES

- [1] Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms[J]. Virulence, 2013, 4(2): 119-128
- [2] Gow NAR, van de Veerdonk FL, Brown AJP, et al. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization[J]. Nature Reviews Microbiology, 2012, 10(2): 112-122
- [3] Graham TR, Burd CG. Coordination of Golgi functions by phosphatidylinositol 4-kinases[J]. Trends in Cell Biology, 2011,

- 21(2): 113-121
- [4] Tu LN, Tai WCS, Chen L, et al. Signal-mediated dynamic retention of glycosyltransferases in the Golgi[J]. *Science*, 2008, 321(5887): 404-407
- [5] Schmitz KR, Liu JX, Li SQ, et al. Golgi localization of glycosyltransferases requires a Vps74p oligomer[J]. *Developmental Cell*, 2008, 14(4): 523-534
- [6] Dippold HC, Ng MM, Farber-Katz SE, et al. GOLPH3 bridges phosphatidylinositol-4-phosphate and actomyosin to stretch and shape the Golgi to promote budding[J]. *Cell*, 2009, 139(2): 337-351
- [7] Scott KL, Kabbarah O, Liang MC, et al. GOLPH3 modulates mTOR signalling and rapamycin sensitivity in cancer[J]. *Nature*, 2009, 459(7250): 1085-1090
- [8] Sechi S, Colotti G, Belloni G, et al. GOLPH3 is essential for contractile ring formation and Rab11 localization to the cleavage site during cytokinesis in *Drosophila melanogaster*[J]. *PLoS Genetics*, 2014, 10(5): e1004305
- [9] Zhang B. Identification and functional study of Sac1 in *Candida albicans*[D]. Tianjin: Master's Thesis of Nankai University, 2015 (in Chinese)
张冰. 白念珠菌 Sac1 蛋白的鉴定及其功能的研究[D]. 天津: 南开大学硕士学位论文, 2015
- [10] Makowski SL, Tran TTT, Field SJ. Emerging themes of regulation at the Golgi[J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2017, 45: 17-23
- [11] Tu LN, Chen L, Banfield DK. A conserved N-terminal arginine-motif in GOLPH3-family proteins mediates binding to coatomer[J]. *Traffic*, 2012, 13(11): 1496-1507
- [12] Qiao JJ, Liu W, Li RY. Molecular resistance mechanisms of *Candida albicans* to antifungal agents[J]. *Microbiology China*, 2007, 34(2): 393-396 (in Chinese)
乔建军, 刘伟, 李若瑜. 白念珠菌耐药的分子机制研究进展[J]. *微生物学通报*, 2007, 34(2): 393-396
- [13] Yu QL, Wang H, Xu N, et al. Spf1 strongly influences calcium homeostasis, hyphal development, biofilm formation and virulence in *Candida albicans*[J]. *Microbiology*, 2012, 158(9): 2272-2282
- [14] Schaller M, Borelli C, Korting HC, et al. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*[J]. *Mycoses*, 2005, 48(6): 365-377
- [15] Sudbery PE. Growth of *Candida albicans* hyphae[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2011, 9(10): 737-748
- [16] Kumamoto CA, Vines MD. Alternative *Candida albicans* lifestyles: growth on surfaces[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2005, 59(1): 113-133