



## 白念珠菌 14-3-3 蛋白 Bmh1 在细胞生长和菌丝发育中的功能解析

尹华<sup>1</sup>, 陈江野<sup>2</sup>, 常鹏<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>西南大学资源环境学院, 生物能源与环境修复研究中心, 重庆 400715

<sup>2</sup>中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031

**摘要:**【目的】应用 Tet-off 启动子研究白念珠菌唯一的 14-3-3 蛋白 Bmh1 在白念珠菌生长和菌丝发育过程中的功能。【方法】在白念珠菌 *URA3*<sup>+</sup> 菌株 SN152 中, 我们敲除了 1 个 *BMH1* 基因拷贝, 并用 Tet-off 启动子替代另一个 *BMH1* 基因拷贝的启动子, 得到了可以用强力霉素(Doxycycline)控制 Bmh1 表达水平的菌株。然后通过斑点试验和形态学观察对该菌株的生长和菌丝发育表型进行了分析。通过在 *ras1*、*flo8*、*efg1*、*cph1*、*tec1* 等重要菌丝发育调控因子突变体中过表达 Bmh1, 我们初步研究了 Bmh1 在菌丝发育调控网络中的位置。最后, 我们构建了一些不同 C 末端的 Bmh1 嵌合体并检测了其对白念珠菌生长和菌丝发育的影响。【结果】Doxycycline 诱导 Bmh1 表达水平下调时严重抑制了细胞的生长。非 Doxycycline 诱导条件下 Bmh1 高表达强烈促进了细胞的菌丝发育。这一促进作用绕过了 *ras1*、*efg1*、*cph1* 和 *tec1* 等基因缺失的影响, 却被 *flo8* 基因的缺失阻断。C 末端缺失或更换异源 C 末端的所有 Bmh1 突变株在 Doxycycline 诱导时都能够正常生长, 但是没有明显促进菌丝发育。【结论】验证了白念珠菌 14-3-3 蛋白 Bmh1 是细胞生长所必需的, 证明了 Tet-off 启动子可以严密控制 Bmh1 的表达水平。Bmh1 是一个菌丝发育的正调控因子, 位于 Ras1、Efg1、Cph1 和 Tec1 的下游, Flo8 的上游。Bmh1 的保守结构域是细胞生长所必需的, 而 C 末端则是生长非必需的。

**关键词:** 白念珠菌, 14-3-3, Bmh1, 菌丝发育

白念珠菌(*Candida albicans*)是一类广泛存在于人类和温血动物的皮肤和粘膜等处的机会性致病真菌。在由于严重疾病或衰老导致的免疫功能低下或缺陷的病人中能够发展成为系统性白念珠菌感染, 从而导致较高的死亡率<sup>[1]</sup>。因此, 研究白

念珠菌的致病机制对解决这一严重致病威胁是非常重要的。白念珠菌能够因应不同的环境刺激形成不同的细胞形态, 即酵母态和菌丝态, 并可在两种形态之中快速转换<sup>[2]</sup>。这一形态转换的功能与其致病能力紧密相关。白念珠菌的菌丝发育过程

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金(XDJK2017C083); 重庆市博士后科学基金(Xm2017023)

\*通信作者。Tel: +86-23-68250994; E-mail: cp1986@swu.edu.cn

收稿日期: 2018-02-13; 修回日期: 2018-03-31; 网络出版日期: 2018-04-26

是通过严密复杂的转录调控网络来实现的<sup>[3]</sup>。鉴定和发现参与这一菌丝发育调控网络的转录因子以及相关蛋白,有助于深刻理解白念珠菌的致病机理。

14-3-3 蛋白通过不同的分子作用机制在众多细胞进程中发挥了非常关键的作用,包括细胞生长与增殖、细胞分化、信号传导、蛋白运输、细胞凋亡和转录调控<sup>[4]</sup>。14-3-3 蛋白家族在所有真核物种中都是非常保守的,其结构的保守性导致其不同物种中的功能大同小异<sup>[5-6]</sup>。在人类细胞中 14-3-3 蛋白家族有 7 个成员<sup>[7]</sup>,其功能和晶体结构都已经被很好地解析<sup>[6]</sup>。在酿酒酵母中,14-3-3 蛋白家族只有 2 个成员,即 ScBmh1 和 ScBmh2。二者绝大部分功能重叠且参与了细胞生长分化和转录调控<sup>[8-9]</sup>,特别是在假菌丝诱导和芽孢生长过程中发挥了关键作用<sup>[10]</sup>。在新型隐球菌中,其唯一的 14-3-3 蛋白是其毒力和生长所必需的<sup>[11]</sup>。

白念珠菌对不同环境因子的应答适应是其致病能力的关键所在,其中包括了上述多个细胞进程的共同协作。14-3-3 蛋白作为一个作用广泛的调控蛋白,极有可能参与了这些进程的协同调控。在白念珠菌中,只存在 1 个 14-3-3 蛋白,即 CaBmh1,且是细胞生长和菌丝发育所必需的<sup>[12]</sup>。通过随机突变构建一系列的 Bmh1 点突变体和基于 *MAL2* 启动子的条件性表达菌株,Palmer 等发现 Bmh1 在白念珠菌细胞生长和菌丝发育过程中的功能是相对独立的<sup>[13-14]</sup>。进一步地,他们发现每种 Bmh1 突变体对菌丝发育诱导信号的应答不一样,暗示 Bmh1 在多个菌丝诱导信号途径中发挥作用<sup>[15]</sup>。

但是,这些报道主要研究了 Bmh1 表达量下调(knockdown)或失能(dysfunction)对白念珠菌生长和菌丝发育的影响,并没有阐述 Bmh1 高表达

时的作用,也没有分析 Bmh1 在菌丝发育调控网络中的地位。本研究中,我们构建了 Tet-off 启动子控制 Bmh1 表达的白念珠菌菌株并进行了菌丝发育研究。通过研究抑制条件和非抑制条件下细胞的生长和菌丝发育表型,我们发现 Bmh1 是一个菌丝发育的正调控因子,作用于菌丝发育调控网络中 Ras1、Efg1、Cph1 和 Tec1 的下游,Flo8 的上游。而且其非保守的 C 末端则是生长非必需的。这些结果丰富了白念珠菌 Bmh1 在细胞生长与菌丝发育中的功能研究,有助于对菌丝发育调控网络的进一步认识。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株与质粒

本研究中所使用的菌株、质粒如表 1 所示。

### 1.2 引物

本研究中所用的引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,采用 HAP 纯化方式,见表 2。

### 1.3 质粒和菌株构建

本文中所有质粒的构建都采用了基于 *Exo III* 的非连接酶依赖的 15 bp 重叠区重组克隆方法(LIC)<sup>[18]</sup>。质粒测序均由上海美吉生物科技公司完成。白念珠菌基因敲除应用了 Overlap PCR 片段快速基因敲除方案<sup>[16]</sup>。白念珠菌转化采用了修改后的 LiAc 转化法<sup>[19]</sup>。所有转化子均通过 Colony PCR 鉴定。pCPC48 中的 *CmLEU2* 基因盒插入替代了菌株 SN152 的 *BMHI* 基因编码区+184 至+304 区域,产生了 *BMHI* 单拷贝缺失株 CPS42。*BMHI* 及其上下游序列(-781 至+1761)由引物 *BMHI*-781s 与 *BMHI*+1761a 从 SN152 的基因组 DNA 扩增获得,然后与引物 pUC18+800s 及 pUC18+2628a 扩

表 1. 本文所用菌株与质粒  
Table 1. Strains and plasmids used in this study

| Strains and plasmids | Characteristics  | Sources    |
|----------------------|--|------------|
| Strains              |  |            |
| SN152                | <i>his1 leu2 arg4</i>  | [16]       |
| CAI4                 | <i>ura3</i>  | [17]       |
| CPS42                | <i>BMH1/bmh1::CmLEU2</i>   | This study |
| CPS43                | $P_{Tet-off}$ - <i>BMH1/bmh1 CmLEU2 HIS1</i>                               | This study |
| CPS179               | <i>BMH1/P<sub>Tet-off</sub>-BMH1 URA3</i>                                  | This study |
| CPS64                | <i>ras1/ras1 BMH1/P<sub>Tet-off</sub>-BMH1 URA3</i>                        | This study |
| CPS65                | <i>flo8/flo8 BMH1/P<sub>Tet-off</sub>-BMH1 URA3</i>                        | This study |
| CPS184               | <i>efg1/efg1 BMH1/P<sub>Tet-off</sub>-BMH1 URA3</i>                        | This study |
| CPS185               | <i>cph1/cph1 BMH1/P<sub>Tet-off</sub>-BMH1 URA3</i>                        | This study |
| CPS193               | <i>tec1 α HIS1, BMH1/P<sub>Tet-off</sub>-BMH1 URA3</i>                     | This study |
| CPS105               | <i>bmh1/ P<sub>Tet-off</sub>-BMH1 ade2::ADH1p ARG4 HIS1 CmLEU2</i>         | This study |
| CPS187               | <i>bmh1/ P<sub>Tet-off</sub>-BMH1 ade2::ADH1p-BMH1 ARG4 HIS1 CmLEU2</i>    | This study |
| CPS106               | <i>bmh1/ P<sub>Tet-off</sub>-BMH1 ade2::ADH1p-BMH1-t0 ARG4 HIS1 CmLEU2</i> | This study |
| CPS107               | <i>bmh1/ P<sub>Tet-off</sub>-BMH1 ade2::ADH1p-BMH1-t1 ARG4 HIS1 CmLEU2</i> | This study |
| CPS108               | <i>bmh1/ P<sub>Tet-off</sub>-BMH1 ade2::ADH1p-BMH1-t2 ARG4 HIS1 CmLEU2</i> | This study |
| CPS109               | <i>bmh1/ P<sub>Tet-off</sub>-BMH1 ade2::ADH1p-BMH1-t3 ARG4 HIS1 CmLEU2</i> | This study |
| CPS110               | <i>bmh1/ P<sub>Tet-off</sub>-BMH1 ade2::ADH1p-BMH1-t4 ARG4 HIS1 CmLEU2</i> | This study |
| CPS111               | <i>bmh1/ P<sub>Tet-off</sub>-BMH1 ade2::ADH1p-BMH1-t5 ARG4 HIS1 CmLEU2</i> | This study |
| Plasmids             |  |            |
| pCPC42               | <i>URA3 P<sub>Tet-off</sub></i>  | This study |
| pCPC43               | <i>HIS1 P<sub>Tet-off</sub></i>  | This study |
| pCPC48               | <i>loxP-CmLEU2-loxP</i>  | This study |
| pCPC70               | <i>BMH1</i> (-781 to +1761) in pUC18 backbone                              | This study |
| pCPC101              | $P_{Tet-off}$ - <i>BMH1 HIS1</i>   | This study |
| pCPC86               | $P_{Tet-off}$ - <i>BMH1 URA3</i>   | This study |
| pCPC20               | <i>ade2::ADH1p ARG4</i>  | This study |
| pCPC203              | <i>ade2::ADH1p-BMH1 ARG4</i>   | This study |
| pCPC111              | <i>ade2::ADH1p-BMH1-t0 ARG4</i>  | This study |
| pCPC112              | <i>ade2::ADH1p-BMH1-t1 ARG4</i>  | This study |
| pCPC113              | <i>ade2::ADH1p-BMH1-t2 ARG4</i>  | This study |
| pCPC114              | <i>ade2::ADH1p-BMH1-t3 ARG4</i>  | This study |
| pCPC115              | <i>ade2::ADH1p-BMH1-t4 ARG4</i>  | This study |
| pCPC116              | <i>ade2::ADH1p-BMH1-t5 ARG4</i>  | This study |

增的 pUC18 载体核心片段通过 LIC 方法重组得到 pCPC70。引物 CaP8 和 CaP9 用于从 pCPC42、pCPC43 中扩增  $P_{Tet-off}$  启动子，分别与引物 *BMH1*+1s 与 *BMH1*-42a 扩增的 pCPC70 载体骨架通过 LIC 方法重组得到 pCPC86 与 pCPC101。用

引物 *BMH1*-425s 与 *BMH1*+419a 从 pCPC86 与 pCPC101 分别扩增 *URA3-P<sub>Tet-off</sub>-BMH1* 和 *HIS1-P<sub>Tet-off</sub>-BMH1*。用 *HIS1-P<sub>Tet-off</sub>-BMH1* 片段转化 CPS42，得到 CPS43。用 *URA3-P<sub>Tet-off</sub>-BMH1* 片段转化 CAI4 以及 *ras1*、*flo8*、*efg1*、*cph1*、*tec1* 等

表 2. 本研究中所用的主要引物  
Table 2. Primers used in this study

| Primers                | Sequences (5'→3')  |
|------------------------|--|
| <i>BMH1</i> -781s      | ACAGTCTGCCAGACTTGATTGCATAGAGAGGGTGA                          |
| <i>BMH1</i> +1761a     | CTGACTGACTGACTGCCGCGTAACAAAATT                               |
| pUC18+800s             | CAGTCAGTCAGTCAGGATAACGCAGGAAAGAACAT                          |
| pUC18+2628a            | AGTCTGGCAGACTGTCTTAAGGGATCCAAGCTTCCCGGGTTCTTAGACGTCAGGTGGCA  |
| CaP8                   | CGTCCACGAAACGTTGAGAAAGAGGAGTATTGGCATTG                       |
| CaP9                   | TGACAATGATTACCTATTTATATTTGTATGTGTGTAGGAGT                    |
| <i>BMH1</i> +1s        | AGGTAATCATGTCAATGCCAGCCTCCCGTGAAGAT                          |
| <i>BMH1</i> -42a       | AACGTTTCGTGGACGGATGTTTTGACTGTAACCTTGAGATG                    |
| <i>BMH1</i> -425s      | TTTTTCGGACCATTTGCAC  |
| <i>BMH1</i> +419a      | TCAGCGATAGCAAATTCAGC   |
| <i>BMH1</i> +882a      | CAATGGCACTACAGCCAGCCAATGATAAGAACTTAAATGAA                    |
| CaP22                  | TTGGACGCAGCCAAATCAC  |
| CaP23                  | TGAGTTCAAATGGCACACCAA  |
| CaP19                  | GCTGTAGTGCCATTGCATTGTTCCACCACAAATGTTTCT                      |
| CaP28                  | TGACAATGATTACCTATGGTAGCGATGCACGGT                            |
| <i>BMH1</i> +705a      | GTAGCGATGCACGGTCTATAAATCGGTCCATAAAGTCAAGTTA                  |
| <i>ACT1</i> +1765s     | ACCGTGCATCGCTACCATTGTTCCACCACAAATGTTTCT                      |
| <i>BMH1</i> +699a-t1R  | CCGGCTTCTCATCTTGTGATCTGAGGTCCATAAAGTCAAGTTATCTCTCAA          |
| <i>ACT1</i> +1765s-t1F | AAGATGAAGAAGCCGGGAAGGTAACCTAGCATTGTTCCACCACAAATGTTTCT        |
| <i>BMH1</i> +699a-t2R  | CCCTTGCATATCTGAGGTCCATAAAGTCAAGTTATCTCTCAA                   |
| <i>ACT1</i> +1765s-t2F | GAAGATGAAAACCAATAGCATTGTTCCACCACAAATGTTTCT                   |
| <i>BMH1</i> -t2F       | TCAGATATGCAAGGGGATGGTGAGGAGCAAAATAAAGAAGCATTGCAGGATGTG       |
| <i>BMH1</i> -t2R       | TTGGTTTTTCATCTTCCACATCTGCAATGCTTCTTTATTTTGCTCCTCACCATC       |
| <i>BMH1</i> +699a-t3R  | TGATCCTCTTGGCCTGACTCACTGATGTCTGAGGTCCATAAAGTCAAGTTATCTCTCAA  |
| <i>ACT1</i> +1765s-t3F | CCCGCGGAACAGACACAAGGAGAACCGACTAAATAGCATTGTTCCACCACAAATGTTTCT |
| <i>BMH1</i> -t3F       | AGGCCAAGAGGATCAACAGCAACAGCAGCAACAGCAACAACAGCAGCAACAACAGCAGC  |
| <i>BMH1</i> -t3R       | TGTCTGTTCCGCGGGAGCTTGCTGCTGCTGTTGTTGCTGCTGTTGTTGCTGTTGCTGCT  |
| <i>BMH1</i> +705a-t4R  | TCACGTTGTCTACGACCACCCACCAGCCATTAATCGGTCCATAAAGTCAAGTTA       |
| <i>ACT1</i> +1765s-t4F | TCGTAGACAACGTGATGCACCAGCTAAAAAATAGCATTGTTCCACCACAAATGTTTCT   |
| <i>BMH1</i> +705a-t5R  | ATCAGCAGATCGTCCACCACCCTGCCATTAATCGGTCCATAAAGTCAAGTTA         |
| <i>ACT1</i> +1765s-t5F | GGACGATCTGCTGATGAACCAGCTAAGAAGTAGCATTGTTCCACCACAAATGTTTCT    |

基因缺失突变体, 分别得到了 CPS179、CPS64、CPS65、CPS184、CPS185、CPS193。从 SN152 基因组 DNA 用引物 *BMHI*+1s 与 *BMHI*+882a 扩增得到野生型 *BMHI*, 然后与 CaP19 和 CaP28 扩增的 pCPC20 载体骨架通过 LIC 方法重组得到 pCPC203。引物 *BMHI*+705a 与 *ACT1*+1765s 用于突变 pCPC203 产生 pCPC111。引物 *BMHI*+699a-t1R 与 *ACT1*+1765s-t1F 用于突变 pCPC203 产生 pCPC112。引物 *BMHI*+699a-t2R、*ACT1*+1765s-t2F、*BMHI*-t2F 与 *BMHI*-t2R 用于突变 pCPC203 产生 pCPC113。引物 *BMHI*+699a-t3R、*ACT1*+1765s-t3F、*BMHI*-t3F 与 *BMHI*-t3R 用于突变 pCPC203 产生 pCPC114。引物 *BMHI*+705a-t4R 与 *ACT1*+1765s-t4F 用于突变 pCPC203 产生 pCPC115。引物 *BMHI*+705a-t5R 与 *ACT1*+1765s-t5F 用于突变 pCPC203 产生 pCPC116。以 pCPC20、pCPC203、pCPC111–pCPC116 为 PCR 模板, 用引物 CaP22 与 CaP23 扩增的产物分别转化 CPS43, 得到 CPS105、CPS187、CPS106–CPS111。

#### 1.4 细胞生长与形态学表型分析

白念珠菌的常规培养使用通用 YPD 培养基, 30 °C、240 r/min 振荡培养。Doxycycline hydrochloride 购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

斑点实验: 将过夜培养至平台期的白念珠菌培养物稀释数倍后测  $OD_{600}$ , 换算得到母液的  $OD_{600}$  值。然后用无菌水稀释至  $OD_{600}=1$ 。按照 10 倍梯度稀释至  $OD_{600}$  值为  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 。将每种稀释液 2.5  $\mu$ L 依次滴加于含适当培养基的平板上, 置于 25 °C 培养并拍照。

在白念珠菌包埋实验(YPD 培养基)形态观察中, 挑取单菌落于 YPD 培养基中, 30 °C 培养过夜后, 按照  $4 \times 10^4$  CFU/mL (CFU: 菌落形成单位) 转接到新鲜的 YPD 培养基中, 30 °C 培养 4 h。然

后将 400 CFU 的菌液和未凝固的 40–60 °C 恒温的 YPS 琼脂(2% tryptone、1% yeast extract、2% sucrose、1% Agar)培养基混合均匀并铺板, 在 25 °C 或 37 °C 培养 2–5 d。在解剖镜下观察菌落形态并拍照。

## 2 结果和分析

### 2.1 Tet-off 启动子能够严密控制 Bmh1 表达

白念珠菌 Bmh1 是一个结构非常简单的蛋白, 由非常保守的 N 端 14-3-3 superfamily 结构域和非保守的 C 端尾巴组成。由于 *BMHI* 已经被证明是必需基因, 因而构建基因缺失株是不可能的。Tet-off 系统是一个严谨高效的诱导型基因表达调控系统<sup>[20–21]</sup>。本研究采用的 pCPC43 质粒, 含有白念珠菌密码子优化的 Tet-off 启动子系统, 其整体 Tet-off 启动子结构图参见图 1-A。白念珠菌密码子优化的 *TetR* (tetracycline repressor), 与转录激活元件 *GAL4AD* 组装成融合表达的基因 *caTetR-caGAL4AD*, 即 catTA (*C. albicans* tetracycline-controlled transactivator)并置于白念珠菌稳定高表达的 *ADHI* 启动子和 *ACT1* 终止子控制下。*HIS1* 基因作为营养缺陷型筛选标记。*TetR* 应答元件  $P_{tet}$  置于 *HIS1* 基因之后。在细胞中, TetR-Gal4AD 融合蛋白 catTA 是组成型高表达的。在 Doxycycline (Dox)不存在时, catTA 持续结合到  $P_{tet}$ , 起始下游基因的转录, 实现下游基因的高表达。在 Dox 存在时, catTA 与 Dox 结合, 不能结合到  $P_{tet}$ , 造成下游基因不能转录而产生抑制效应。

为了构建  $P_{Tet-off}$  启动子控制的 *BMHI* 条件表达菌株, 在 SN152 菌株中我们利用 PCR 方法先用 *CmLEU2* 基因盒将 *BMHI* 的一个拷贝敲除, 然后

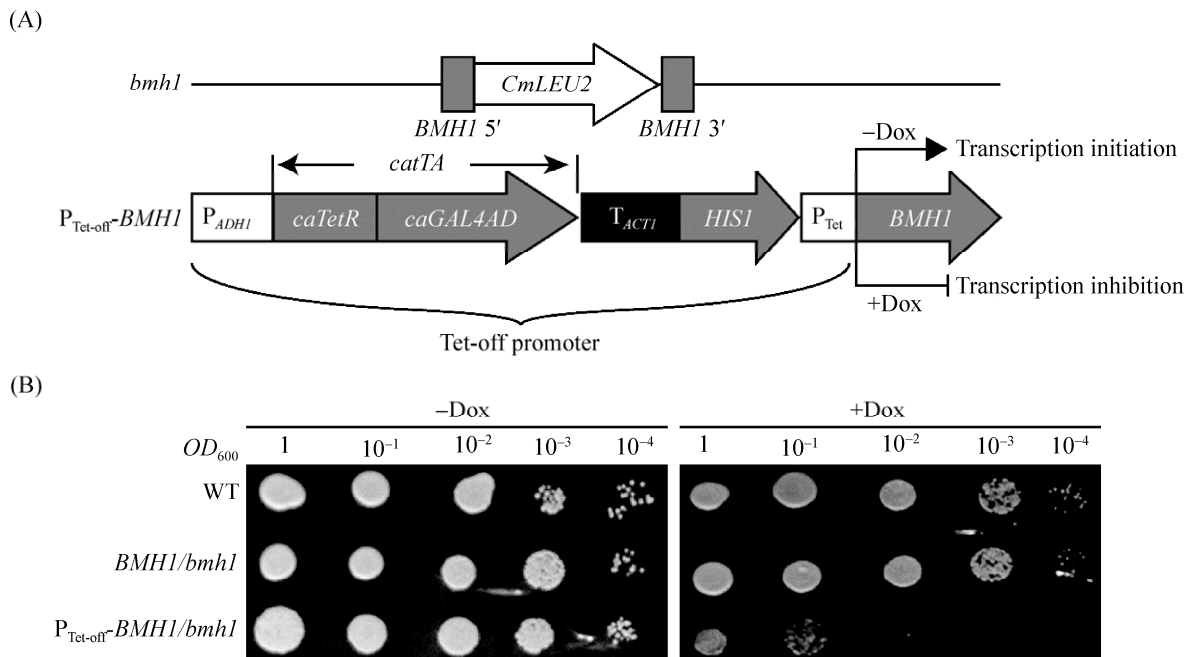


图 1. 加入 Dox 使 *BMHI* 表达水平下调时细胞生长被抑制

Figure 1. Cell growth was inhibited when *BMHI* was knocked down by adding Dox. A: Schematic depiction of the Tet-off promoter controlled *BMHI* strain. One *BMHI* allele was disrupted by the selection marker gene *CmLEU2*. The Tet-off promoter was integrated into the upstream region of the other *BMHI* allele to replace its native promoter. *BMHI* will be transcribed without Dox and the transcription will be inhibited in the presence of Dox. B: The cell growth of the  $P_{Tet-off}$ -*BMHI/bmh1* mutant was severely repressed in the presence of Dox. Overnight-cultured cells were diluted to  $OD_{600}=1$  and were then serially diluted by 10-fold. 2.5  $\mu$ L of each dilution of WT (SN152), *BMHI/bmh1* mutant (CPS42) and  $P_{Tet-off}$ -*BMHI/bmh1* mutant (CPS43) were spotted onto YPD plates with/without 50  $\mu$ g/mL Dox and incubated at 25  $^{\circ}$ C. WT: Wild-type.

将  $P_{Tet-off}$  启动子同源整合替换了另一个 *BMHI* 拷贝的原生启动子。这样得到的菌株在没有 Dox 存在时可以高表达 Bmh1, 在 Dox 存在时则不能表达 Bmh1 (图 1-A)。然后我们测试了该菌株和对照菌株在常规培养条件下 (YPD, 30  $^{\circ}$ C) 的生长能力。如图 1-B 所示, 在不含 Dox 的 YPD 培养基上, 野生型菌株 SN152 (*BMHI/BMHI*)、单拷贝缺失菌株 *BMHI/bmh1* (CPS42) 和 Tet-off 菌株  $P_{Tet-off}$ -*BMHI/bmh1* (CPS43) 的生长趋势没有明显差别。在 YPD+50  $\mu$ g/mL Dox 的培养基上,  $P_{Tet-off}$ -*BMHI/bmh1* 菌株的生长受到了显著抑制, 而 *BMHI/bmh1*

菌株则与野生型 SN152 一样正常生长。这个结果说明 Bmh1 的确是白念珠菌细胞生长所必需的, 其表达水平下调导致细胞生长被抑制。这与先前的报道一致<sup>[12-13]</sup>。这个结果说明我们构建的这个菌株中 Tet-off 启动子能够严密地控制 *BMHI* 的表达。

## 2.2 高表达的白念珠菌 Bmh1 促进菌丝发育

证明了 Tet-off 启动子可以严密控制 *BMHI* 的表达水平之后, 我们检测了该菌株在 Dox 诱导和非诱导条件下的菌丝发育能力。如图 2-A 所示, 在 YPD 中 37  $^{\circ}$ C (生理温度) 培养时, 野生型菌株

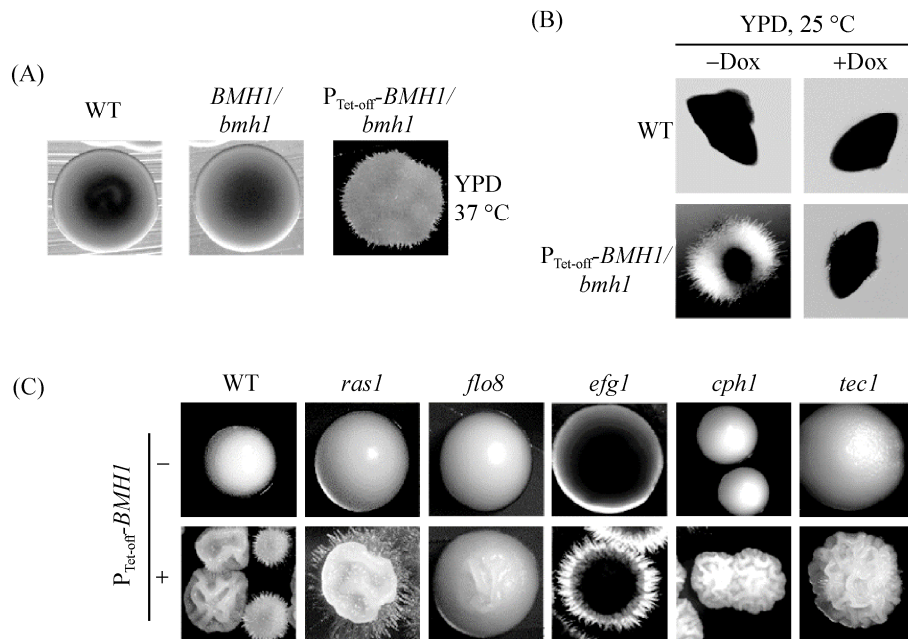


图 2. 高表达的 *Bmh1* 强烈促进菌丝发育

Figure 2. Overexpressed *Bmh1* improved filamentation significantly. A: The *P<sub>Tet-off</sub>-BMH1/bmh1* strain grew hyperfilamentous colonies on YPD plates at 37 °C in the absence of Dox. Cells of the three strains were streaked out directly on YPD plates and incubated at 37 °C. B: The *P<sub>Tet-off</sub>-BMH1/bmh1* strain grew excellent filamentous colonies under embedded condition (microaerobic for weak hypha induction) which was inhibited by adding Dox. Cells were embedded with YPS +/-20 µg/mL Dox and incubated at 25 °C. C: The improvement of filamentation by highly expressed *Bmh1* was blocked by deleting *flo8*. The *P<sub>Tet-off</sub>* promoter cassette containing a *URA3* marker was introduced into the *ras1*, *flo8*, *efg1*, *cph1* and *tec1* mutants to replace the native promoter of one *BMH1* allele and then cells were streaked out on YPD plates and incubated at 25 °C (yeast growth condition). WT: Wild-type strain SN152. “+” means that the Tet-off promoter was introduced in the strain while “-” means not.

SN152 在菌落中间形成了假菌丝(pseudohyphae), *BMH1* 单拷贝缺失菌株 *BMH1/bmh1* 则形成光滑的单克隆。这说明 *BMH1* 的单拷贝缺失就足以导致其菌丝发育能力的受损,这与之前的报道是一致的<sup>[14]</sup>。有趣的是, *P<sub>Tet-off</sub>-BMH1/bmh1* 菌株形成了菌丝发育极好的菌落。由于没有 Dox 存在时, *Bmh1* 的表达水平极高,说明高表达的 *Bmh1* 在生理温度时能够强烈促进白念珠菌的菌丝发育。

接着,我们进行了 YPS 包埋(微氧诱导菌丝发育)形态学实验。由于 50 µg/mL Dox 能够强烈抑制

细胞的生长,因此,我们降低 Dox 浓度至 20 µg/mL, 以在细胞生长不被显著抑制的条件下观察菌丝发育。如图 2-B 所示 野生型菌株在 YPS +/- 20 µg/mL Dox、25 °C 的条件下都不能形成菌丝。而 *P<sub>Tet-off</sub>-BMH1/bmh1* 菌株在不含 Dox 的 YPS 包埋条件下,形成了发育极好的菌丝。在 Dox 存在时, *P<sub>Tet-off</sub>-BMH1/bmh1* 菌株的菌丝发育被极大地抑制,但是仍有少量菌丝形成。这是因为所用的 Dox 浓度较低,未达到有效抑制浓度(50 µg/mL),因而抑制 *Bmh1* 表达的效果并不彻底。这一结果表明高表达的 *Bmh1* 在微氧条件下能够极大地促进菌

丝发育, 这一促进作用因 Dox 诱导的 Bmh1 表达下调而被抑制。

白念珠菌的菌丝发育过程受到多条信号通路的调控, 包括 MAPK 途径(mitogen-activated protein kinase pathway); cAMP/PKA 途径(cAMP-dependent protein kinase A pathway); 由 Rim8、Rim101 介导的 pH 应答途径; 由组氨酸激酶 Sln1p、Nik1p/Cos1p 和 Chk1p 组成的二元信号途径(two-component signaling pathway); 基质内生长时 Czf1、Efg1 介导的菌丝发育促进途径; Rbf1 介导的菌丝发育抑制; Efg1 和 Cph2 调控的 Tec1 转录因子途径; 通过 DNA 结合蛋白 Nrg1 和 Rfg1 介导的转录抑制因子 Tup1 抑制途径等<sup>[22]</sup>。了解 Bmh1 在白念珠菌菌丝发育转录调控网络中的位置, 有助于进一步研究其参与菌丝发育调控的分子机制。因此, 我们选择了几个重要的菌丝发育调控因子, 即 *ras1*、*flo8*、*efg1*、*cph1* 和 *tec1* 的基因缺失株, 在其细胞中高表达 Bmh1 并观察了细胞的菌丝发育能力。这些转录因子主要参与了 MAPK 途径、cAMP 途径、Tec1 途径和 Czf1 途径。

我们用含有 *URA3* 基因的  $P_{Tet-off}$  启动子替换了这些缺失株其中一个 *BMH1* 拷贝的原生启动子。然后以未替换启动子的菌株为对照, 我们检测了这些菌株的菌丝发育能力。如图 2-C 所示, 在 YPD、25 °C (酵母态生长) 条件下, 未引入  $P_{Tet-off}$ -*BMH1* 的野生型(SN152)和这 5 个突变株都只能形成表面光滑的菌落, 而导入了  $P_{Tet-off}$ -*BMH1* 的野生型(CPS179)、*ras1* (CPS64)、*efg1* (CPS184)、*cph1* (CPS185)和 *tec1* (CPS193)菌株等则形成了褶皱或绒球状的菌丝发育良好的菌落。这说明高表达 Bmh1 对菌丝发育的促进作用绕过了 *ras1*、*efg1*、*cph1* 和 *tec1* 缺失的影响。但是在 *flo8* 缺失株中导入  $P_{Tet-off}$ -*BMH1* 时, 该菌株(CPS65)形成了中心略

带褶皱的菌落(即 pseudohyphae), 说明高表达 Bmh1 对菌丝发育的促进作用能被 *flo8* 缺失极大地阻断。这个结果意味着在菌丝发育信号转导途径中 Bmh1 可能位于 Flo8 的上游, 位于 Ras1、Efg1、Cph1 和 Tec1 的下游。

### 2.3 白念珠菌 C 末端结构不影响细胞生长

14-3-3 蛋白在所有真核生物中都是高度保守的。我们未发表的蛋白晶体结构数据表明, CaBmh1 的 14-3-3 superfamily 结构域的晶体结构与酿酒酵母及人的 14-3-3 几乎一样。在酿酒酵母中, 14-3-3 蛋白的 C 端显示了跟其他物种 14-3-3 蛋白明显不同的结构<sup>[23]</sup>。此外, 酿酒酵母 14-3-3 蛋白的转录调控活性需要 C 端氨基酸残基的参与<sup>[24]</sup>。而白念珠菌 Bmh1 的 N 端保守结构域与 C 端非保守结构域对于其在细胞生长和菌丝发育中功能贡献还未被阐释。

为了探索 Bmh1 的 14-3-3 superfamily 保守区域(1-235 aa)和 C 端区域对 Bmh1 功能的贡献, 我们构建了一系列的 *BMH1* 突变体和嵌合体, 如图 3-A 所示。这些突变体含有不同的 C 端序列, 分别来自人 14-3-3 蛋白  $\eta$  和  $\epsilon$ , 酿酒酵母 Bmh2 和 2 个基于 14-3-3 结合基序的用于 14-3-3 蛋白结晶的结合肽段<sup>[7]</sup>。通过将野生型 *BMH1* 与 *BMH1*-t0-t5 置于 *ADH1* 启动子控制下, 并导入到  $P_{Tet-off}$ -*BMH1/bmh1* 菌株的 *ADE2* 基因位点中(图 3-B), 我们得到了既可以用 Dox 控制 *BMH1* 表达水平又有异位过表达 *BMH1* 嵌合体的菌株。

然后我们检测了这些菌株在酵母态生长条件(YPD, 25 °C)下的表型。如图 3-C 所示, 在没有 Dox 存在时, 野生型(SN152)细胞形成光滑的菌落, 而转入 Vec (empty vector pCPC20)的菌株(CPS105)、转入 *BMH1* 的菌株(CPS187)和转入



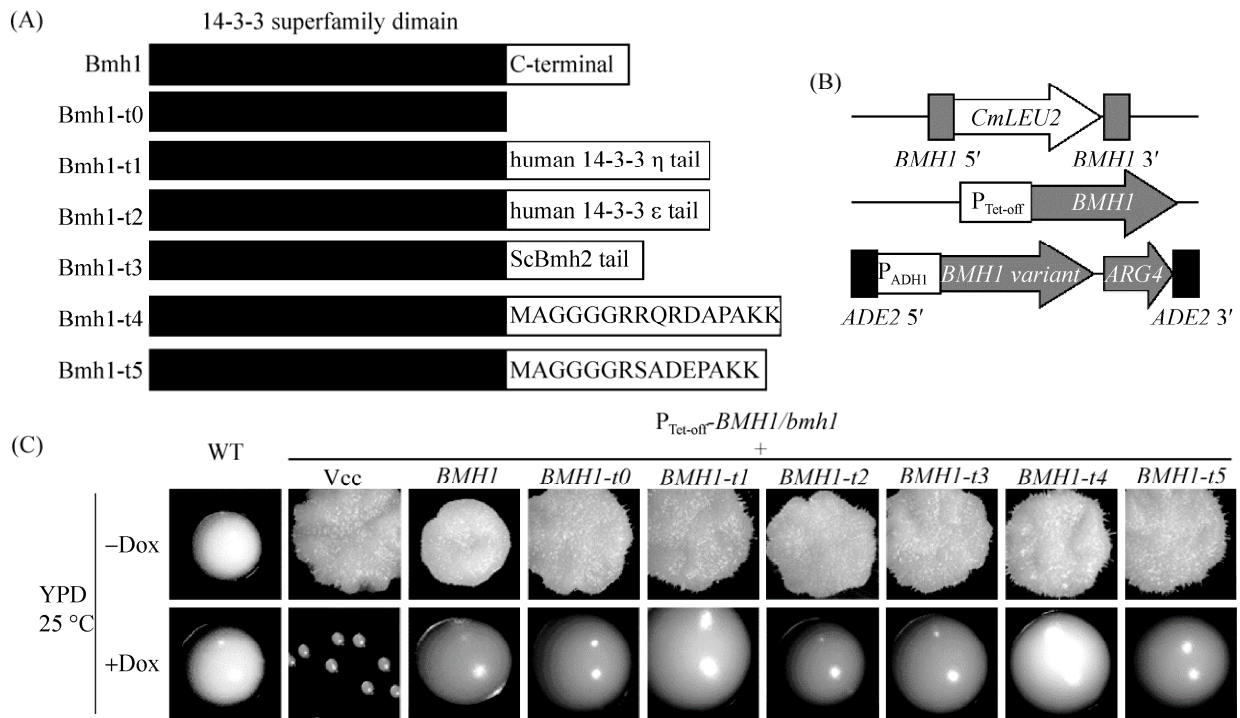


图 3. *Bmh1* 的 C 端改变不影响细胞生长

Figure 3. C-terminal region variations of *Bmh1* did not affect cell growth. A: Schematic depiction of *Bmh1* mutants and chimeras with heterologous C-terminal tails. B: Genotypes of different *BMH1* variant strains. *BMH1* variants was controlled by the *ADH1* promoter and was introduced into the *ADE2* locus for over-expression. C: *Bmh1* variant strains grew normally under yeast growth condition (YPD, 25 °C). Cells were streaked out on YPD +/- 50 µg/mL Dox plates and incubated at 25 °C. Vec: empty vector pCPC20.

*BMH1-t0-t5* 变体的 *P<sub>Tet-off</sub>-BMH1* 菌株(CPS106–CPS111)则全部形成了不规则的菌丝型菌落。在 Dox 存在时,野生型菌株依然形成光滑的菌落。而转入空载 pCPC20 的 *P<sub>Tet-off</sub>-BMH1* 菌株(CPS105)生长受到明显抑制,转入了 *BMH1-t0-t5* 变体的 *P<sub>Tet-off</sub>-BMH1* 菌株则生长正常,与转入完整 *BMH1* 的菌株 CPS187 一致。因为此时野生型 *BMH1* 表达被严密抑制,转入空载的菌株生长被抑制是合理的。过表达 *BMH1-t0* 的菌株生长正常,说明此 *Bmh1* 变体回补了 *BMH1* 转录抑制对细胞生长的影响,证明 *Bmh1* 的 C 端区域缺失不影响细胞生长。过表达 *BMH1-t1-t5* 变体的菌株正常生长,说

明 *Bmh1* 在细胞生长中的功能主要是由 N 端的 14-3-3 superfamily 结构域提供,而 C 端的结构变化不影响细胞生长。

### 3 讨论

白念珠菌只有 1 个 14-3-3 蛋白即 *Bmh1*, 已经被证明其表达水平下调或点突变导致的功能失活会造成细胞生长和菌丝发育的抑制,是细胞生长所必需的。但是过表达的 *Bmh1* 对菌丝发育的影响还没有报道。我们采用了 Tet-off 启动子系统来调控 *Bmh1* 的表达。使用这一启动子系统的好处在于:(1) 试验过程中培养基成分保持不变,仅

需要添加 Dox 即可实现严格的抑制效果；(2) 在无 Dox 存在时，Tet-off 启动子能够高水平表达被控制的基因，因此常规培养条件即为高表达条件。Dox 存在和不存在时，被调控基因的表达水平差别为 400–1000 倍<sup>[21]</sup>。因此，这一系统仅通过是否添加 Dox 就能实现在相同营养培养基中目标基因的 knockdown 和 knockup 两个方面的调控，因此可以极大地方便其他生长必需的功能基因的研究。

通过构建 Tet-off 启动子控制的条件性表达 Bmh1 的菌株，我们也证实了 Bmh1 表达水平下调导致了细胞生长被强烈抑制，说明我们构建的这个 Tet-off 启动子控制系统能够严密控制 Bmh1 的表达水平，证明了 Tet-off 调控 Bmh1 表达水平的严谨性和有效性。

进一步地，我们研究发现在无 Dox 诱导抑制时，高表达的 Bmh1 能够强烈促进菌丝发育。这一促进作用能够被添加 Dox 导致的 Bmh1 表达水平下调所抑制。由于野生型 *BMH1* 是稳定表达的基因，单拷贝缺失株 *BMH1/bmh1* 和野生型相比 *BMH1* 表达量必定减少，而在 *P<sub>Tet-off</sub>-BMH1/bmh1* 菌株中 *BMH1* 则是高表达状态，对应的菌丝发育表型也从弱到强，因而 Bmh1 是菌丝发育的正调控因子，其促进作用与其表达水平紧密相关。

高表达 Bmh1 对菌丝发育的促进作用绕过了 *ras1*、*efg1*、*cph1* 和 *tec1* 缺失的影响，说明在菌丝发育调控网络中，Bmh1 可能位于 Ras1、Efg1、Cph1 和 Tec1 的下游。高表达 Bmh1 对菌丝发育的促进作用能被 *flo8* 缺失极大地阻断，说明 Bmh1 可能位于 Flo8 的上游。这样的结果暗示 Bmh1 极有可能参与了不同信号调控途径的交叉协调。我们相信，利用这一个 Tet-off 启动子控制 Bmh1 表达的系统，后续可以更加方便地对 Bmh1 在信号

调控途径中的协同调控作用进行研究。

过表达 C 端缺失的 Bmh1 $\Delta$ C 和其他的 Bmh1 嵌合体能够回补 *P<sub>Tet-off</sub>-BMH1/bmh1* 菌株在 Dox 存在时的生长缺陷表型，说明 Bmh1 的 14-3-3 superfamily 结构域是细胞生长所必需的，而 C 端则是非必需的。这一结果是合理的，因为在所有的 14-3-3 同源物中 N 端 14-3-3 superfamily 结构域都高度保守，而不同物种甚至同一物种中的不同 isoform，其 C 末端氨基酸组成变化都非常大。过表达野生型 Bmh1 不能回补 *P<sub>Tet-off</sub>-BMH1/bmh1* 菌株在 Dox 存在时的菌丝发育缺陷表型，这可能是由于 *ADH1* 启动子的表达水平远低于 *P<sub>Tet-off</sub>* 启动子，在无 Dox 存在时的表达水平造成的。因此，我们目前还不能推断 Bmh1 的 2 个结构域在菌丝发育中的功能贡献。考虑到酿酒酵母 14-3-3 蛋白的 C 端在转录调控中的重要作用，白念珠菌 Bmh1 的 C 端是否可能在菌丝发育调控过程中发挥一定的功能仍需要进一步的实验探究。

## 参 考 文 献

- [1] Mccullough MJ, Ross BC, Reade PC. *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 1996, 25(2): 136–144.
- [2] Noble SM, Johnson AD. Genetics of *Candida albicans*, a diploid human fungal pathogen. *Annual Review of Genetics*, 2007, 41(1): 193–211.
- [3] Lu Y, Su C, Liu HP. *Candida albicans* hyphal initiation and elongation. *Trends in Microbiology*, 2014, 22(12): 707–714.
- [4] Aghazadeh Y, Papadopoulos V. The role of the 14-3-3 protein family in health, disease, and drug development. *Drug Discovery Today*, 2016, 21(2): 278–287.
- [5] Obsilova V, Kopecka M, Kosek D, Kacirova M, Kylarova S, Rezabkova L, Obsil T. Mechanisms of the 14-3-3 protein function: regulation of protein function through

- conformational modulation. *Physiological Research*, 2014, 63 Suppl 1: S155–S164.
- [6] Obsil T, Obsilova V. Structural basis of 14-3-3 protein functions. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2011, 22(7): 663–672.
- [7] Yang XW, Lee WH, Sobott F, Papagrigoriou E, Robinson CV, Grossmann JG, Sundström M, Doyle DA, Elkins JM. Structural basis for protein-protein interactions in the 14-3-3 protein family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(46): 17237–17242.
- [8] Parua PK, Dombek KM, Young ET. Yeast 14-3-3 protein functions as a comodulator of transcription by inhibiting coactivator functions. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(51): 35542–35560.
- [9] van Heusden GPH, Griffiths DJF, Ford JC, Chin-A-Woeng TFC, Schrader PAT, Carr AM, Steensma HY. The 14-3-3 proteins encoded by the BMH1 and BMH2 genes are essential in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and can be replaced by a plant homologue. *European Journal of Biochemistry*, 1995, 229(1): 45–53.
- [10] Trembley MA, Berrus HL, Whicher JR, Humphrey-Dixon EL. The yeast 14-3-3 proteins BMH1 and BMH2 differentially regulate rapamycin-mediated transcription. *Bioscience Reports*, 2014, 34(2): e00099.
- [11] Li JB, Chang YC, Wu CH, Liu J, Kwon-Chung KJ, Huang SH, Shimada H, Fante R, Fu XW, Jong A. The 14-3-3 gene function of *Cryptococcus neoformans* is required for its growth and virulence. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2016, 26(5): 918–927.
- [12] Cognetti D, Davis D, Sturtevant J. The *Candida albicans* 14-3-3 gene, *BMH1*, is essential for growth. *Yeast*, 2002, 19(1): 55–67.
- [13] Palmer GE, Johnson KJ, Ghosh S, Sturtevant J. Mutant alleles of the essential 14-3-3 gene in *Candida albicans* distinguish between growth and filamentation. *Microbiology*, 2004, 150(6): 1911–1924.
- [14] Palmer GE, Sturtevant JE. Random mutagenesis of an essential *Candida albicans* gene. *Current Genetics*, 2004, 46(6): 343–356.
- [15] Kelly MN, Johnston DA, Peel BA, Morgan TW, Palmer GE, Sturtevant JE. Bmh1p (14-3-3) mediates pathways associated with virulence in *Candida albicans*. *Microbiology*, 2009, 155(5): 1536–1546.
- [16] Noble SM, Johnson AD. Strains and strategies for large-scale gene deletion studies of the diploid human fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell*, 2005, 4(2): 298–309.
- [17] Fonzi WA, Irwin MY. Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics*, 1993, 134(3): 717–728.
- [18] Li C, Evans RM. Ligation independent cloning irrespective of restriction site compatibility. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(20): 4165–4166.
- [19] Walther A, Wendland JXF. An improved transformation protocol for the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Current Genetics*, 2003, 42(6): 339–343.
- [20] Park Y, Morschhäuser J. Tetracycline-inducible gene expression and gene deletion in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell*, 2005, 4(8): 1328–1342.
- [21] Nakayama H, Mio T, Nagahashi S, Kokado M, Arisawa M, Aoki Y. Tetracycline-regulatable system to tightly control gene expression in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Infection and Immunity*, 2000, 68(12): 6712–6719.
- [22] Sudbery PE. Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nature Reviews Microbiology*, 2011, 9(10): 737–748.
- [23] Veisova D, Rezabkova L, Stepanek M, Novotna P, Herman P, Vecer J, Obsil T, Obsilova V. The C-terminal segment of yeast BMH proteins exhibits different structure compared to other 14-3-3 protein isoforms. *Biochemistry*, 2010, 49(18): 3853–3861.
- [24] Parua PK, Young ET. Binding and transcriptional regulation by 14-3-3 (Bmh) proteins requires residues outside of the canonical motif. *Eukaryotic Cell*, 2014, 13(1): 21–30.

# Functions of 14-3-3 protein Bmh1 in cell growth and hyphal development of *Candida albicans*

Hua Yin<sup>1</sup>, Jiangye Chen<sup>2</sup>, Peng Chang<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Research Center of Bioenergy & Bioremediation, College of Resources and Environment, Southwest University, Chongqing 400715, China

<sup>2</sup> Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China

**Abstract:** [Objective] We studied the roles of 14-3-3 protein Bmh1 of *Candida albicans* in its cell growth and hyphal development by using a Tet-off promoter. [Methods] Based on the *URA3*<sup>+</sup> strain SN152 of *C. albicans*, we deleted one *BMH1* allele and replaced the promoter of the other allele with the Tet-off promoter, generating a strain in which Bmh1 expression was controlled by Doxycycline. Then we explored the phenotypes of cell growth and hyphal development via spot analysis and morphological observations. Further, we preliminarily studied the position of Bmh1 in the network of hyphal development regulation via overexpression of Bmh1 in the mutants of *ras1*, *flo8*, *efg1*, *cph1* and *tec1*, which were very important hyphal development regulators. Finally, we constructed some Bmh1 mutants with different C-terminals and detected their effects on cell growth and hyphal development of *Candida albicans*. [Results] Doxycycline-induced knockdown of Bmh1 inhibited cell growth severely. Highly-expressed Bmh1 improved hyphal development significantly without Doxycycline induction. This improvement bypassed the effects of *ras1*, *efg1*, *cph1* and *tec1* gene deletions and was blocked by *flo8* deficiency. All Bmh1 mutants with C-terminal deletion or heterologous C-terminals grew normally with Doxycycline induction and the hyphal development was not improved obviously. [Conclusion] We validated that the 14-3-3 protein Bmh1 of *Candida albicans* is essential for cell growth, proving the tight controlling of the Tet-off promoter on Bmh1 expression. Bmh1 functions as a positive regulator of hyphal development and plays roles in the downstream of Ras1, Efg1, Cph1 and Tec1, and in the upstream of Flo8. The conserved domain of Bmh1 is required for cell growth while the C-terminal is not.

**Keywords:** *Candida albicans*, 14-3-3, Bmh1, hyphal development

(本文责编: 李磊)

Supported by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (XDJK2017C083) and by the Chongqing Postdoctoral Science Foundation (Xm2017023)

\*Corresponding author. Tel: +86-23-68250994; E-mail: cp1986@swu.edu.cn

Received: 13 February 2018; Revised: 31 March 2018; Published online: 26 April 2018

常鹏, 博士, 现为西南大学资源环境学院博士后。博士毕业于中科院上海生物化学与细胞生物学研究所生物化学与分子生物学专业。博士期间主要研究白念珠菌形态发生的转录调控机制。现主要从事白腐真菌和莱茵衣藻基因功能研究。

