

碱性 pH 条件下白念珠菌钙离子通道 *CCH1* 和 *MID1* 基因对钙内流的影响及 *Crz1p* 转录因子对其的调控作用

王慧, 徐宁, 邢来君, 李明春, 魏东盛

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: 白念珠菌 *Candida albicans* 对环境 pH 的适应能力与其致病性有密切关系, 钙信号转导途径介导许多环境压力的应答并伴随胞内钙离子浓度的瞬间变化。通过构建钙通道基因 *CCH1* 和 *MID1* 的缺失突变株, 在碱性 pH 条件下, 研究其对胞内钙内流的影响以及转录因子 *Crz1p* 对 *CCH1* 和 *MID1* 基因的调控作用。使用二步法 PCR 介导的基因敲除技术构建 *cch1Δ/Δ* 和 *mid1Δ/Δ* 突变菌株, 利用流式细胞术比较野生型和突变型菌株在碱性 pH 条件刺激下胞内钙的瞬间变化, 进一步构建 pPHO89-LacZ 重组质粒并利用 β-半乳糖苷酶体系分析 *CCH1* 和 *MID1* 基因缺失对外钙内流以及转录因子 *Crz1p* 对 LacZ 活性的影响, 结果发现碱性 pH 条件引起的钙离子浓度的瞬间变化在 *cch1Δ/Δ* 和 *mid1Δ/Δ* 缺失突变株中明显减弱, LacZ 活性也显著降低, 且在 *crz1Δ/Δ* 缺失突变株中完全消失。最后利用实时定量 PCR, 确定转录因子 *Crz1p* 在碱性 pH 条件下对 *CCH1* 和 *MID1* 具有非钙调神经磷酸酶依赖性的调控作用。对钙信号途径在碱性 pH 压力应答中作用的研究, 将为临床上白念珠菌感染的治疗和新药靶点导向提供重要的理论依据。

关键词: 白念珠菌, 碱性 pH, *CCH1*, *MID1*, 钙内流, *Crz1p*

Effect of *CCH1* and *MID1* in calcium influx under alkaline pH and its regulation by *Crz1p* transcription factor in *Candida albicans*

Hui Wang, Ning Xu, Laijun Xing, Mingchun Li, and Dongsheng Wei

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

Abstract: In *Candida albicans*, adaptation to environmental pH is relevant to its pathogenicity. Calcium signaling pathway involves in many stress responses and often accompany with Ca^{2+} fluctuation. We constructed *CCH1* and *MID1* mutant strains and studied their effect on calcium influx and further investigated the regulation by *Crz1p* transcription factor. We used

Received: August 31, 2010; **Accepted:** November 12, 2010

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31070126), Natural Science Foundation of Tianjin (No. 10JCYBJC09700), The PhD Programs Foundation, Ministry of Education of China (No. 20070055011).

Corresponding author: Mingchun Li. Tel: +86-22-23508506; Fax: +86-22-23508800; E-mail: nklimingchun@yahoo.com.cn

国家自然科学基金 (No. 31070126), 天津自然科学基金 (No. 10JCYBJC09700), 教育部博士点基金项目 (No. 20070055011) 资助。

PCR-directed gene disruption to construct *cch1Δ/Δ* and *mid1Δ/Δ* null mutant. By using a flow cytometry-based method we monitored the free cytosolic Ca^{2+} levels under alkaline stress. Moreover, we constructed pPHO89-LacZ plasmids and by β -Galactosidase assays, we analyzed the changes of LacZ activities after gene disruption. The results showed that alkaline stress induced calcium burst reduced obviously in *cch1Δ/Δ* and *mid1Δ/Δ* mutant strains, also for LacZ activities, and fully abolished in *crz1Δ/Δ* mutant strain. Finally, by realtime PCR, we confirmed the regulation role of Crz1p in *CCHI* and *MIDI* genes but in a calcineurin independent way. Studies on the effect of calcium pathway on response to alkaline stress will provide an important theoretical basis for *Candida albicans* infection-oriented treatment and new drug targets.

Keywords: *Candida albicans*, alkaline pH, *CCHI*, *MIDI*, calcium influx, Crz1p

钙离子是微生物细胞生长必须的营养元素之一,并且在细胞内充当着重要的第二信使分子的角色^[1-2]。真核生物细胞对外界环境变化的适应能力对其存活至关重要,酵母细胞在暴露于多数环境压力时,如:离子饥饿^[3]、高等渗透压^[4]、碱性 pH^[5]以及其他信号分子(如 α -因子^[6]和药物胺碘酮^[7])等,都会引起胞内钙离子浓度的瞬间变化。细胞内钙离子浓度的变化机制极其复杂,可能是外钙内流的结果,也可能是胞内钙库,如液泡或高尔基体释放钙离子的结果。Brand 等发现钙离子通道(VGCC)电压门控膜蛋白 Cch1p 和 Mid1p,与白念珠菌钙内流有关^[8]。胞外钙离子通过 Cch1p 和 Mid1p 进入细胞内,引起细胞内钙浓度的瞬间变化进而激活钙调神经磷酸酶(CaN),使得转录因子 Crz1p 去磷酸化,与 CDRE(CaN 依赖性的应答元件)结合来进一步激活下游的应答基因,随后将胞内的钙离子浓度降低到变化前的水平^[5]。

微生物体必须在环境变化的适应过程中存活,这对于人体条件致病性真菌白念珠菌尤为重要。pH 是一种重要的生理环境压力条件,对白念珠菌的形态有显著影响,细胞对环境 pH 的适应能力对其致病性至关重要^[9]。酵母细胞内钙离子的动态平衡与 pH 密切相关,在酿酒酵母中对碱性 pH 转录应答的研究首次给出钙离子信号转导途径介导 pH 压力应答的证据。DNA 微阵列数据^[10]表明在碱性 pH 条件下,共有 150 个 pH 依赖性的基因在 mRNA 水平上表达上调至少 2 倍。碱性 pH 条件诱导的许多基因的表达在 *CNAI/CNBI* 或 *CRZI* 基因缺失的菌株中下调,甚

至在添加 CaN 的免疫抑制剂药物 FK506 时完全受到抑制。对 *ENAI* 启动子元件分析的结果表明,在其中有 2 个 pH 应答区,包含着最小的 CDRE 元件,来激活碱性 pH 条件引发的转录应答。可见,以钙离子信号作为信使,转录因子 Crz1p 介导的钙信号途径是 pH 压力应答中的重要途径。

为了研究钙信号途径在碱性 pH 条件应答中的重要作用,本文构建了钙通道基因 *CCHI* 和 *MIDI* 的缺失突变株,研究其在碱性 pH 条件下对钙内流的影响。微生物细胞胞内钙浓度变化的测定方法很多,其中钙发光蛋白指示法^[11]有过多报道,然而很少使用流式细胞术来检测酵母细胞中钙离子的变化。本文利用流式细胞术在全细胞水平上测定碱性 pH 条件下胞内钙波变化的动力学,分析 *CCHI* 和 *MIDI* 缺失对钙内流的影响,通过 β -半乳糖苷酶体系和实时定量 PCR 方法进一步追踪 Crz1p 转录因子的调控作用。总之,对钙信号途径的研究将有助于加深对白念珠菌碱性 pH 应答机制的了解。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂

Taq、*Taq plus*、long *Taq* DNA 聚合酶、常用限制性内切酶购于 TaKaRa 公司;限制性内切酶 *BspQ I*、*NogM IV* 和 *Ase I* 购于 NEB 公司; pGEM-T Easy Vector、T4 DNA 连接酶及反转录酶购于 Promega 北京生物技术有限公司;DNA 快速纯化/回收试剂盒、M199 培养基、ONPG 和 dNTPs

等购于北京鼎国生物技术有限公司; 转化使用试剂 PEG3350、LiAc 以及钙离子螯合剂 EGTA 和钙探针 Fluo-3AM 购于 Sigma 公司; 荧光定量 PCR 使用天根公司的 SYBR-Green 试剂盒。其余试剂均为国产分析纯; 所有引物均由北京奥科公司合成。

1.1.2 菌株、质粒和引物

实验使用的菌株和质粒见表 1, 引物见表 2。

1.1.3 培养基

LB 培养基: 1%胰蛋白胨, 0.5%酵母提取物, 1% NaCl。白念珠菌培养使用的所有培养基(SC-ura

表 1 本研究使用的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains/plasmids	Genotype	Reference and sources
DAY1	<i>ure3Δ::λimm434/ura3Δ::λimm434 his1::hisG/his1::hisG arg4::hisG/arg4::hisG</i>	From Dr. Dana Davis
NKC67	<i>mid1::ARG4/MID1</i>	This work
NKC68	<i>mid1::ARG4/mid1::URA3</i>	This work
NKC72	<i>cch1::ARG4/CCH1</i>	This work
NKC73	<i>cch1::ARG4/cch1::URA3</i>	This work
NKC71	<i>crz1::ARG4/crz1::URA3</i>	Conserved in the lab
<i>E. coli</i> DH5α	<i>SupE44 hsdR17 recA1 end A1 gyrA96 thi-1 recA1</i>	Conserved in this lab
DAY414	<i>Saccharomyces cerevisiae trpΔ</i>	
pDDB211	Containing <i>LacZ</i> gene, Amp ⁺	
pDDB78	Containing <i>HisG</i> from <i>Candida albicans</i>	From Dr. Dana Davis
pRS-ArgΔSpeI	Containing ARG4 marker, Amp ⁺	
pDDB57	Containing URA3 marker, Amp ⁺	

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primers	Sequences (5'-3')
MID1-5DR	AAAAAACTAACTGATTACTCAAACCTATCCATGTGCTATTCATTAACCACTAGCCTTCATCTTTCCCAGTCAC GACGTTGT
MID1-3DR	ATCAGATACATGAACATCCCAATAATAAATCAATTTAATTGAATCATTTTTTCGTGGGACATGTGGAATTGT GAGCGGATA
MID1-5detect	AATCAAATTACTGTTTCTCA
MID1-3detect	TTTTATGGCACCACTTTTAC
CCH1-5DR	TAGACTCACCTGCATGGAATAGTGACCAATCAACTAATTTACAAGACTTTTCAATAAATCTTTCCCAGTCA CGACGTTGT
CCH1-3DR	CAACTGGCTTATAAGGAGCAACACCATCAATTCTTTCCCATAAATTGGTTTAACCATTTTGTGGAATTGTG AGCGGATA
CCH1-5detect	TTGGCTATTCCTTTTTTTAA
CCH1-3detect	CAATACAACCATGGCTTCTG
PHO89-ATG	CTCACTTATATTGGTTTGTA
PHO89- Pdistal	CATATGTGTATATATTTGAA
MID1-5RT	GCTTATAGTGTTCCTGCCAT
MID1-3RT	TTCAGGGACCGTATCACAAG
CCH1-5RT	CCACCAACTATATTGTCCAC
CCH1-3RT	TAGCCACTGGTGTACTAGGA
ACT1-5RT	GGTAGACCAAGACATCAAGG
ACT1-3RT	CCGTGTTCAATTGGGTATCT

除外) 均添加终浓度 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 尿苷。YPD 培养基: 1% 酵母浸出粉, 2% 蛋白胨, 2% 葡萄糖。SC 培养基: 0.67% 无氨基酵母氮源, 0.2% 省却混合物粉末, 2% 葡萄糖。M199 培养基: M199 粉末一袋, 150 mmol/L HEPES, 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 尿苷, 调溶液的 pH 至 4 或 8, 抽滤除菌。钙离子螯合剂 EGTA 配成 100 mmol/L 贮液, 过滤后添加到培养基中使终浓度达到 10 mmol/L, 形成钙离子缺陷的培养条件, CaN 的免疫抑制剂 FK506 配成 1 mg/mL 贮液, 添加到培养基的终浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, CaCl_2 配成 1 mol/L 贮液, 添加时终浓度为 200 mmol/L。

1.2 白念珠菌基因的敲除

使用二步法 PCR 介导的基因敲除的方法^[12]。分别以质粒 pRS-Arg Δ SpeI 和 pDDB57 为模板, MID1/CCH1-5DR 和 3DR 为引物, 通过 PCR 获得含有 ARG4 或 URA3 选择性标记的 PCR 产物。将 PCR 产物直接转化野生型菌株 DAY1。白念珠菌细胞的转化使用醋酸锂法, 具体方法参见文献[13]。使用 MID1/CCH1-5detect 和 3detect 引物通过 PCR 的方法进行转化子的鉴定。

1.3 Fluo-3 荧光染料负载及流式细胞术测钙

离心收获对数生长期的细胞, 用 HBSS 缓冲液 (氯化钾 0.4 g/L、氯化钠 8.77 g/L、六水合氯化镁 0.2 g/L、氯化钙 0.22 g/L、HEPES 2.38 g/L、葡萄糖 1.98 g/L, pH 7.0) 洗涤细胞, 荧光染料 Fluo-3AM 贮液用 20% Pluronic F-127 DMSO 溶解至浓度为 1 mg/mL, 使用时终浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。加染料的细胞置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 50 min, 负载后用 HBSS 洗涤细胞 3 次。使用 FACSCalibur 流式细胞仪测定胞内钙离子浓度, 在加入刺激物质前, 钙离子的荧光值平稳, 显示为基线, 30 s 后加入 KOH 或 HCl, 混匀流式管中的细胞后跟踪细胞内钙离子的动态变化 482 s, 总时间为 512 s。数据使用 Winmdi 2.9 软件进行分析。

1.4 pPHO89-LacZ-His 重组质粒的构建

使用 PHO89-Pdistal 和 PHO89-ATG 引物扩增得

到 PHO89 启动子, 终质粒 pPHO89-LacZ-His 的构建方法参见文献[14]。

1.5 β -半乳糖苷酶活性测定

转化不同菌株的 pPHO89-LacZ-His 质粒, 在 SC-His 缺陷培养基上筛选正确转化子, 将转化子接种于 30 mL 不同条件的 M199 培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养至 $OD_{600} \approx 0.8 \sim 1.0$ 时收集菌体, β -半乳糖苷酶活性的测定具体步骤见文献[13], β -半乳糖苷酶的活性计算公式, $OD_{420} \times 1000 / [OD_{600} \times t (\text{min}) \times 3 (\text{稀释因子})]$, 单位为 Miller, 每组数据的获得均来自至少 3 次独立平行实验。

1.6 白念珠菌总 RNA 提取

将白念珠菌接种至 3 mL M199 (pH 7) 培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 过夜振荡培养。稀释过夜培养的菌液, 转接至 50 mL M199 (pH 4 或 pH 8) 培养基中, 起始 $OD_{600} \approx 0.1$, 30 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养至 $OD_{600} \approx 0.6 \sim 0.8$, 离心收集菌体, 洗涤后液氮冻存。使用玻璃珠破壁的方法提取 RNA^[15]。提取的 RNA 样品保存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中备用。

1.7 cDNA 的合成和荧光定量 PCR

使用 Promega 公司的 Oligo(dT) 引导 cDNA 第一链的合成, 反应程序为: 37 $^{\circ}\text{C}$, 30 min 使引物结合; 42 $^{\circ}\text{C}$ 、1 h 进行反转录; 70 $^{\circ}\text{C}$ 、15 min 灭活反转录酶。反转录得到的 cDNA 样品在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 荧光定量 PCR 使用 Bio-rad IQ5 仪器, ACT1-5RT 和 ACT1-3RT 引物用于 ACT1 的扩增, MID1-5RT/3RT、CCH1-5RT/3RT 引物分别来扩增 MID1 和 CCH1 基因, 每个反应设 4 个平行。PCR 扩增条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 68 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40 个循环。PCR 完成后, 温度从 58 $^{\circ}\text{C}$ 升至 94 $^{\circ}\text{C}$, 仪器自动收集荧光信号, 得到融解曲线。进行 3 次独立平行实验后, 使用 Bio-rad IQ5 软件分析实验结果, 计算 MID1 和 CCH1 的 Threshold cycle (C_t 值), 使用内参基因 ACT1 的 C_t 值校正目的基因的 C_t 值得到 ΔC_t 值, 然后进一步比较野生型菌株和缺失突变株中同一基因的 C_t 值得到 $\Delta \Delta C_t$ 值, 基因相对表达

量使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算^[16]。

2 结果

2.1 白念珠菌 *CCH1* 和 *MIDI1* 基因缺失突变株的构建

CCH1 和 *MIDI1* 基因杂合缺失突变株比较容易获得, 挑取 SC-Arg 选择性平板上的转化子, 分别提取基因组 DNA, 进行转化子的 PCR 鉴定。结果显示: 对于 *CCH1*, 筛选的 14 个转化子中, 有 11 个出现 3.8 kb 的 *CCH1* 基因野生型条带和 2.3 kb 的 ARG4 条带 (图 1A, 泳道 3), 获得杂合子的阳性率为 78.6%。对于 *MIDI1*, 筛选的 21 个转化子中, 有 17 个出现 1.7 kb 的 *MIDI1* 基因野生型条带和 2.4 kb 的 ARG4 条带 (图 1B, 泳道 2), 获得杂合子的阳性率为 80.9%。但是纯合突变株不易获得, 第 2 次重组后大部分转化子是由 URA3 替换了 ARG4 造成的杂合突变株, 从 SC-Ura 平板分别筛选了 75 个 *CCH1* 和 80 个 *MIDI1* 的转化子, 仅获得 1 株纯合突变株 *cch1::ARG4/cch1::URA3* (图 1A, 泳道 1) 和 *mid1::ARG4/mid1::URA3* (图 1B, 泳道 3), 阳性率分别为 1.33% 和 1.25%。

2.2 碱性 pH 条件引起胞内钙离子浓度的瞬间变化以及 *CCH1* 和 *MIDI1* 基因缺失对钙波变化的影响分析

经 Fluo-3AM 负载的细胞上流式管, 图 2A 为白念珠菌 DAY1 细胞 FSC/SSC 散点图, 图中细胞最为集中的 R1 区域设定为研究范围。野生型白念珠菌细胞受到 3 mol/L KOH 刺激后, 由于胞内的 pH 由中性变为碱性, 200 s 内即可看到明显的钙峰出现, 而在 250 s 后胞内钙离子浓度又回到刺激前的基线水平 (图 2B)。使用 6 mmol/L 的 HCl 刺激同样的细胞, 使胞内 pH 由中性变为酸性, 却没有明显的钙峰出现 (图 2C)。为了进一步研究 pH 对胞内钙波变化的影响, 使用不同浓度的 KOH 和 HCl 刺激 DAY1 细胞, 比较每一种 pH 条件下钙波变化区域的平均荧光强度值与最大变化区域值的比值来确定能引起钙波变化最为显著的 pH 条件范围。从图 2D 可以看出, 当胞外 pH 达到 7.5 时, 比值大于 50%, 证明开始出现了较为明显的钙波变化并且在 pH 8.2 时达到最大, 在 pH 8.5 后, 这种变化又逐渐减弱, 表明不同 pH 引起的胞内钙离子浓度的瞬间变化是剂量依赖性的。我们使用同样浓度的 KOH 刺激 *cch1Δ/Δ* 和

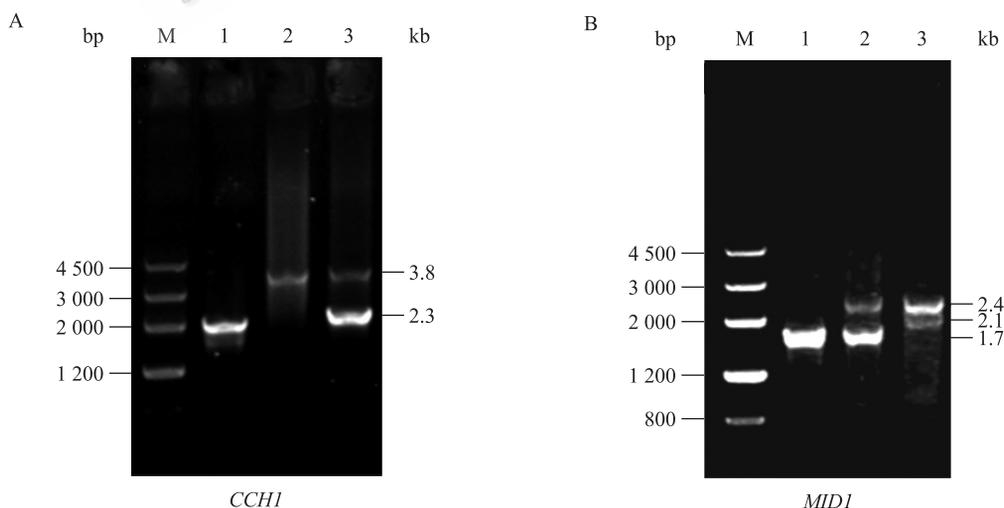


图 1 *CCH1* 和 *MIDI1* 基因缺失突变株的 PCR 检测

Fig. 1 PCR confirmation of *CCH1* and *MIDI1* mutants. (A) 1: NKC73 (*cch1::ARG4/cch1::URA3*); 2: wild type; 3: NKC72 (*cch1::ARG4/CCH1*). (B): 1: wild type; 2: NKC67 (*mid1::ARG4/MIDI1*); 3: NKC68 (*mid1::ARG4/mid1::URA3*); M: marker III 4.5 kb, 3.0 kb, 2.0 kb, 1.2 kb, 800 bp from top to bottom.

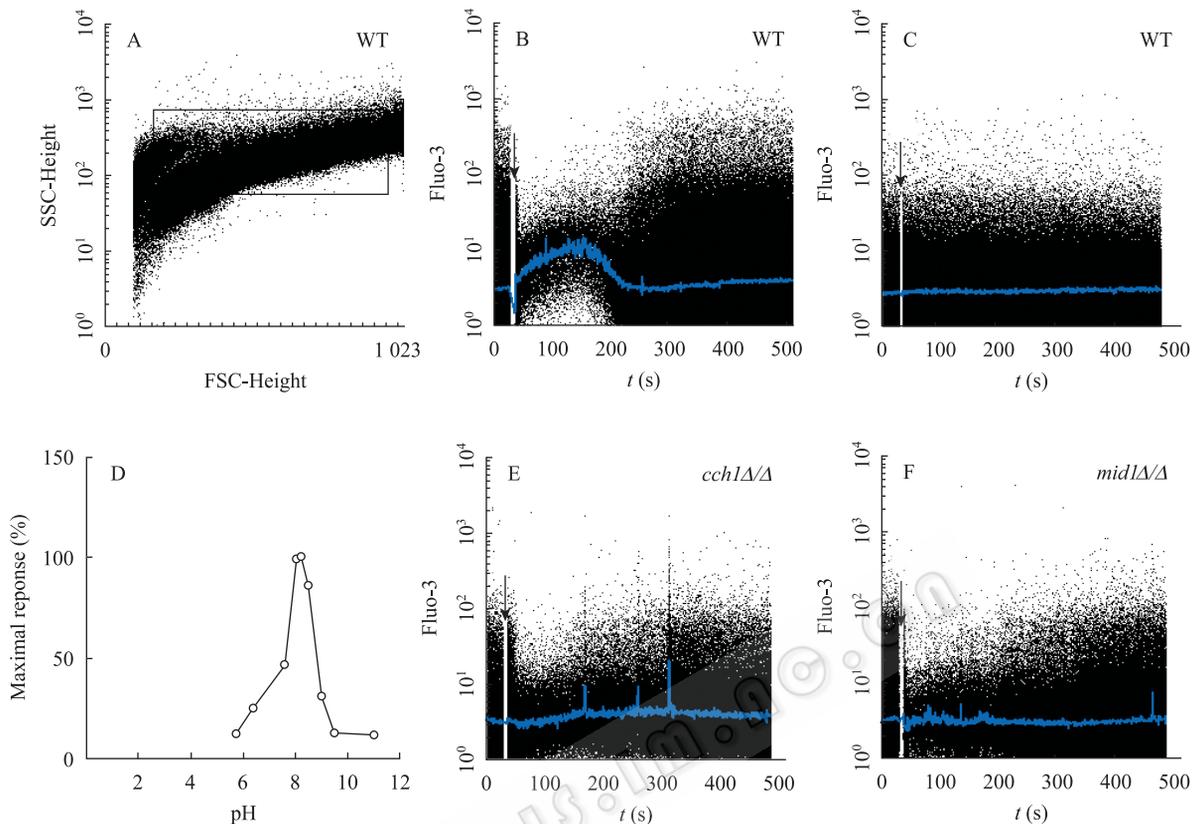


图2 不同 pH 条件下钙波变化的动力学及 *cch1Δ/Δ* 和 *mid1Δ/Δ* 对碱性 pH 条件下钙内流的影响

Fig. 2 Kinetics of the calcium fluctuation in response to different pH and effect of *cch1Δ/Δ* and *mid1Δ/Δ* mutants on calcium fluctuation in response to alkaline stress.

mid1Δ/Δ 细胞 (图 2E、2F), 使胞内的 pH 达到 8.2, 但并没有看到明显的钙峰出现, 表明 *CCH1* 和 *MIDI* 基因缺失影响了碱性 pH 条件下钙离子的内流。

2.3 *CCH1* 和 *MIDI* 基因缺失对 *PHO89-LacZ* 活性的影响分析

PHO89 是一个碱性 pH 应答基因, 且它的激活要通过钙调神经磷酸酶途径^[11]。如果碱性 pH 能引起胞内钙浓度的瞬间升高, 我们推测许多钙离子或 CaN 应答的启动子将会被激活, 而在钙离子浓度没有发生变化的情况下, 启动子无应答。为证实这种假设, 我们构建了 *PHO89-LacZ-His* 报告基因并将其分别转化 *DAY1*、*cch1Δ/Δ* 和 *mid1Δ/Δ*, 利用 β-半乳糖苷酶报告体系, 通过比较不同 pH 以及不同钙浓度条件下启动子活性的强弱来分析 *CCH1* 和 *MIDI* 基因缺失对 *PHO89-LacZ* 活性的影响。结果发现:

1) 在 pH 4 条件下, *PHO89* 启动子几乎无应答, 只有较低的 *LacZ* 活性, 但是添加 Ca^{2+} 后, *LacZ* 活性在野生型菌株中上升了 10 倍, 在突变株中也上升了 2~5 倍。2) 在 pH 8 条件下, *cch1Δ/Δ* 和 *mid1Δ/Δ* 中 *LacZ* 活性比野生型菌株中的活性下降近 2 倍 (图 3), 说明碱性 pH 条件下缺失突变株对钙离子浓度变化的影响直接影响到了 *PHO89* 启动子的活性, 而在 pH8+EGTA 条件下 *LacZ* 活性的明显下降进一步说明 *PHO89-LacZ* 活性是钙离子依赖性的。

2.4 *Crz1p* 转录因子对钙离子依赖性的 *PHO89-LacZ* 活性的调控作用

Crz1p 是钙信号转导途径的核心, 为了研究这种碱性 pH 诱导的钙离子依赖性的 *PHO89-LacZ* 活性是否受到转录因子 *Crz1* 的调控作用, 我们将含报告基因的质粒进一步转化了 *crz1Δ/Δ* 菌株, 并且在 pH 4

和 pH 8 两种背景环境下, 同时添加 Ca^{2+} 和 EGTA, 以及 CaN 的免疫抑制剂 FK506, 通过测定 12 种条件下 LacZ 的活性, 比较野生型和突变型菌株中 β -半乳糖苷酶的活性差异, 来分析 Crz1p 转录因子对钙离子依赖性的 *PHO89*-LacZ 活性的调控作用。从图 4 可以看出, 1) 在 *crz1Δ/Δ* 菌株中, 两种 pH 条件时无论是否添加 Ca^{2+} 或药物 FK506, 都没有明显的 LacZ 活性, 证明 *PHO89* 启动子的活性是受到 Crz1p 正向调控的; 2) 野生型菌株中, pH 4 和 pH 4+FK506 这两种条件下, 只能检测到较低的

LacZ 活性, 补加 Ca^{2+} 后, LacZ 活性上升 10 倍, 但由于 FK506 的添加, LacZ 活性又下降了 2 倍; 相比较酸性条件 (pH 4), 碱性条件下 (pH 8) 无论是否添加 FK506 都有较高 LacZ 活性, 但在添加 Ca^{2+} 螯合剂 EGTA 后, LacZ 活性明显下降, 而且 FK506 的添加使得 LacZ 活性又下降了 2 倍。综上可以得出, 碱性 pH 压力下钙离子诱导的 *PHO89* 启动子的激活是 CaN/Crz1p 依赖的。

2.5 Crz1p 转录因子对钙通道基因 *CCH1* 和 *MIDI1* 的调控作用

对碱性 pH 的应答需要 Rim101p、Crz1p 和 CaN, 并且依赖于许多 Na^+ -ATP 酶转运体基因的表达。例如, 在白念珠菌中, *ENA2* 受到 Rim101 的严格调控, 但是 Crz1 在碱性 pH 应答中似乎需要更多的除 Na^+ -ATP 酶转运体基因以外的靶点^[10]。*CCH1* 和 *MIDI1* 基因作为钙离子内流的通道, 是 CaN 激活必需的, 而 *cch1Δ/Δ* 和 *mid1Δ/Δ* 在碱性 pH 条件下对钙内流以及对 *PHO89*-LacZ 活性的影响, 很大程度上是由于 CaN 没有被激活。因此, 我们推测为了应答碱性 pH, Crz1p 对 *CCH1* 和 *MIDI1* 基因也具有一定的调控作用。

通过荧光定量 PCR, 我们比较了 pH 4 和 pH 8 两种条件下 *CCH1* 和 *MIDI1* 基因在野生型菌株和 *crz1Δ/Δ* 缺失菌株中的表达差异, 从图 5 中的结果可以看出, 在 pH 8 条件下, *CCH1* 和 *MIDI1* 基因在 *crz1Δ/Δ* 缺失菌株中的表达量都有显著下降, 是其在野生型菌株中的 40%~60%, 添加药物 FK506 对 *CCH1* 和 *MIDI1* 基因的表达没有明显影响, 证明碱性 pH 条件下 *CCH1* 和 *MIDI1* 基因的表达受到 Crz1p 转录因子的正向调控作用, 但非 CaN 依赖。而在 pH 4 条件下, *CCH1* 和 *MIDI1* 基因在 *crz1Δ/Δ* 缺失菌株中的表达量与其在野生型菌株中没有太大的差异, 但是药物 FK506 的添加, 使其表达量下降了将近 50%, 说明 CaN 对酸性 pH 条件诱导的 *CCH1* 和 *MIDI1* 基因的表达是必需的。

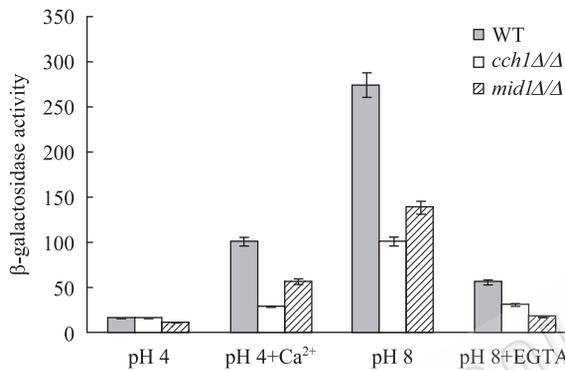


图 3 含 *PHO89*-LacZ 片段的野生型和缺失突变株在不同培养条件下的 β -半乳糖苷酶活性分析

Fig. 3 β -Galactosidase activity analysis of *PHO89*-LacZ band containing wild type and mutant strains.

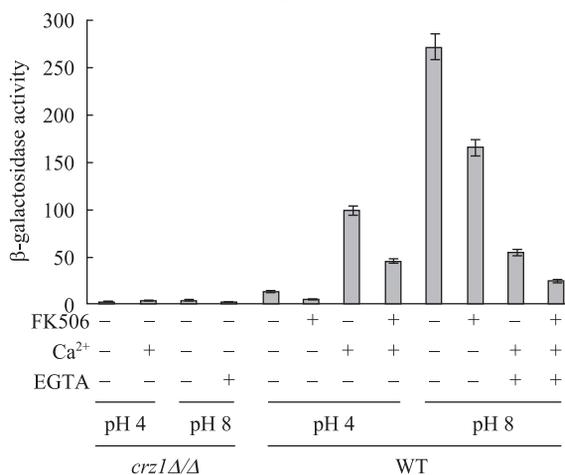


图 4 Crz1p 对碱性 pH 压力下钙离子诱导的 *PHO89* 启动子的调控作用

Fig. 4 Regulating role of Crz1p in activation of calcium-responsive *PHO89* promoter under alkaline stress.

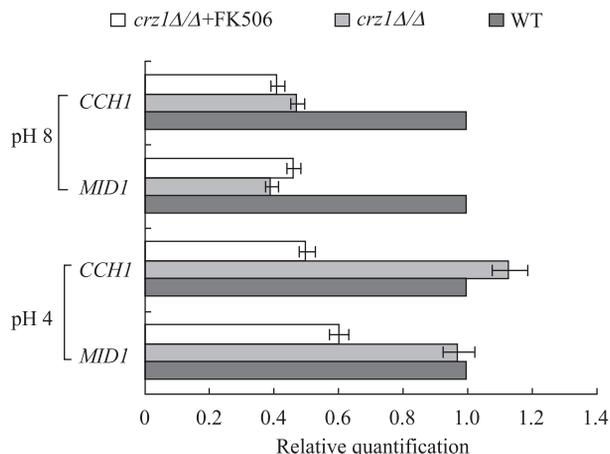


图5 *CCHI* 和 *MIDI* 基因在野生型菌株和 *crz1Δ/Δ* 缺失菌株中的表达差异

Fig. 5 Differential expression of *Candida albicans* *MIDI* and *CCHI* in wild type and *crz1Δ/Δ* mutant strains.

3 讨论

真核生物细胞能够通过许多信号转导机制来对各种各样的环境压力变化作出应答, 钙调神经磷酸酶 CaN/Crz1 途径在 pH 变化过程中调控离子的动态平衡^[17]。本文重点研究了以 Cch1p/Mid1p 通道为起点影响碱性 pH 压力条件下的钙内流, 以及 Crz1p 为核心对相关基因进行调控的钙离子信号转导途径在碱性 pH 压力应答中的重要作用。实验中首先需要解决的问题是寻找合适的方法测定碱性 pH 条件对白念珠菌细胞胞内钙波变化的影响, 而报道较多的钙发光蛋白法、Fura-2 荧光指示剂负载法, 或是使用单细胞钙离子成像分析系统测定胞内钙离子浓度变化的方法, 都只能反映单个细胞在环境变化下胞内钙波变化的情况, 却不能代表整体细胞的平均水平。本文结合 Fluo-3AM 荧光染料负载与流式细胞术, 对碱性 pH 压力下胞内钙波变化动力学的检测, 是微生物细胞胞内钙离子测定方法的重要改进, 实现了全细胞水平, 使实验结果更为科学、可信。

实验中, 我们发现碱性 pH 条件能引起胞内钙离子浓度的瞬间变化并且这种变化在 *cch1Δ/Δ* 和 *mid1Δ/Δ* 突变株中消失, Cch1p 和 Mid1p 作为酵母细胞膜上高亲和力的钙离子转运系统通道, 能够将胞

外的钙运送至胞内, *CCHI* 和 *MIDI* 基因的缺失必然会导致这种钙内流受阻。我们的实验结果显示了 *CCHI* 和 *MIDI* 基因在碱性 pH 诱导的胞内钙离子浓度的瞬间升高过程中发挥着重要的作用, 但这并不排除胞内钙库可能向细胞中释放钙离子, 从而引起胞内钙浓度升高的可能性, 高的等渗压力就能够诱导液泡通过 Yvc1p 向胞内释放钙离子^[18]。在酿酒酵母中, P-型 ATP 酶 Pmr1p 转运体能够将 Ca^{2+} 和 Mn^{2+} 运送回高尔基体, *PMRI* 基因的缺失也可能导致胞内钙离子浓度的积累^[19]。所以本实验也使用同样的方法分析了保存的 *ycv1Δ/Δ* 和 *pmr1Δ/Δ* 突变株在碱性 pH 条件下胞内的钙波变化, 结果发现突变菌株与野生型菌株中的钙波变化基本一致, 再次证明 *CCHI* 和 *MIDI* 基因在钙离子动态平衡和碱性 pH 条件下外钙内流的调控过程中的重要作用。

Crz1p 是酵母细胞钙信号转导过程中的核心转录因子, 能够特异性地与一个 24 bp 的 CDRE 序列结合, 这对于钙离子诱导的、CaN 依赖的基因表达是必不可少的^[20]。在碱性 pH 条件下, *PHO89* 基因的表达上调, 在其启动子序列中很可能含有 CDRE, 我们的实验证实了这一点, β -半乳糖苷酶体系的建立一方面说明了 pPHO89-LacZ 的表达是钙离子依赖性的, 另一方面在 *crz1Δ/Δ* 突变菌株中启动子应答的消失以及在野生型菌株中添加 FK506 后 LacZ 活性的减弱, 证明 *PHO89* 基因的表达是受到 Crz1p 严格调控的, 并且是 CaN 依赖性的。既然 Crz1p 对碱性 pH 应答基因具有调控作用, 鉴于其在钙信号转导途径中的核心角色, 而 *CCHI* 和 *MIDI* 基因作为压力变化时钙离子信号传递的重要通道因子, 我们推测 Crz1p 对 *CCHI* 和 *MIDI* 基因也具有一定的调控作用, 所以最后利用荧光定量 PCR 证实了这一点, 但是 Crz1p 对 *CCHI* 和 *MIDI* 基因的调控作用不是 CaN 依赖性的。

总之, 白念珠菌对环境 pH 的应答与其致病性密切相关, 对钙信号途径在碱性 pH 压力应答中作用的研究将有助于我们进一步了解这种在医学上极为

重要的病原菌是如何在宿主中存活的, 对临床上念珠菌感染的治疗和新药物靶点导向具有重要的理论和实际意义。

致谢: 本实验中的部分菌株和质粒由美国明尼苏达大学 Dr. Dana Davis 教授惠赠, 在此表示衷心感谢!

REFERENCES

- [1] Kader MA, Lindberg S. Cytosolic calcium and pH signaling in plants under salinity stress. *Plant Signal Behav*, 2010, 5(3): 1559–2324.
- [2] Bootman MD, Lipp P, Berridge MJ. The organization and functions of local Ca^{2+} signals. *J Cell Sci*, 2001, 114(12): 2213–2222.
- [3] Wiesenberger G, Steinleitner K, Malli R, et al. Mg^{2+} deprivation elicits rapid Ca^{2+} uptake and activates Ca^{2+} /calcineurin signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Euk Cell*, 2007, 6(4): 592–599.
- [4] Gennemark P, Nordlander B, Hohmann S, et al. A simple mathematical model of adaptation to high osmolarity in yeast. *In Silico Biol*, 2006, 6: 193–214.
- [5] Viladevall L, Serrano R, Ruiz A, et al. Characterization of the calcium-mediated response to alkaline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 2004, 279(42): 43614–43624.
- [6] Muller EM, Locke EG, Cunningham KW. Differential regulation of two Ca^{2+} influx systems by pheromone signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 2001, 159(4): 1527–1538.
- [7] Muend S, Rao R. Fungicidal activity of amiodarone is tightly coupled to calcium influx. *FEMS Yeast Res*, 2008, 8(3): 425–431.
- [8] Brand A, Shanks S, Duncan VMS, et al. Hyphal orientation of *Candida albicans* is regulated by a calcium dependent mechanism. *Curr Biol*, 2007, 17(4): 347–352.
- [9] Kullas AL, Martin SJ, Davis D. Adaptation to environmental pH: integrating the Rim101 and calcineurin signal transduction pathways. *Mol Microbiol*, 2007, 66(4): 858–871.
- [10] Serrano R, Ruiz A, Bernal D, et al. The transcriptional response to alkaline pH in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for calcium-mediated signalling. *Mol Microbiol*, 2002, 46(5): 1319–1333.
- [11] Gupta SS, Ton VK, Beaudry V, et al. Antifungal activity of amiodarone is mediated by disruption of calcium homeostasis. *J Biol Chem*, 2003, 278(31): 28831–28839.
- [12] Wilson RB, Davis D, Mitchell AP, et al. Rapid hypothesis testing with *Candida albicans* through gene disruption with short homology regions. *J Bacteriol*, 1999, 181(6): 1868–1874.
- [13] Yong-Un B, Samuel JM, Dana AD. Evidence for novel pH-dependent regulation of *Candida albicans* Rim101, a direct transcriptional repressor of the cell wall β -Glycosidase Phr2. *Eukaryotic Cell*, 2006, 5(9): 1550–1559.
- [14] Gui L, Liang Y, Wei DS, et al. Regulating promoter element of iron-dependent gene *FRP1* in *Candida albicans* by site-directed mutation. *Chin J Biotech*, 2008, 24(8): 1348–1353.
桂磊, 梁勇, 魏东盛, 等. 利用定点突变分析白念珠菌依赖铁基因 *FRP1* 启动子元件. *生物工程学报*, 2008, 24(8): 1348–1353.
- [15] Zhang YF, Jiao LX, He D, et al. Isolation method of total RNA from *Candida Albicans*. *J Jilin Univ: Med Ed*, 2007, 33(2): 359–3611.
张云峰, 焦立新, 贺丹, 等. 白色念珠菌总 RNA 的提取方法. *吉林大学学报: 医学版*, 2007, 33(2): 359–3611.
- [16] Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc*, 2008, 3(6): 1101–1108.
- [17] Bensen ES, Martin SJ, Li M, et al. Transcriptional profiling in *Candida albicans* reveals new adaptive responses to extracellular pH and functions for Rim101p. *Mol Microbiol*, 2004, 54(5): 1335–1351.
- [18] Denis V, Cyert MS. Internal Ca^{2+} release in yeast is triggered by hypertonic shock and mediated by a TRP channel homologue. *J Cell Biol*, 2002, 156(1): 29–34.
- [19] Bates S, MacCallum D M, et al. *Candida albicans* Pmr1p, a secretory pathway P-type $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -ATPase, is required for glycosylation and virulence. *J Biol Chem*, 2005, 280(24): 23408–23415.
- [20] Stathopoulos AM, Cyert MS. Calcineurin acts through the CRZ1/TCN1-encoded transcription factor to regulate gene expression in yeast. *Genes Dev*, 1997, 11(24): 3432–3444.