

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (10) :1185 - 1192; 4 October 2014
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.10.011

几种白念珠菌高铁还原酶基因的功能研究

徐宁, 梁勇, 程欣欣, 钱柯帆, 喻其林, 邢来君, 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:【目的】高铁还原酶在白念珠菌铁离子获得过程中发挥着重要作用。通过研究高铁还原酶基因的功能和表达调控, 揭示其不同的环境应答策略。【方法】通过 Northern 杂交的方法分析不同低铁环境对高铁还原酶基因表达水平的影响。构建高铁还原酶基因缺失菌株, 探究基因缺失后对细胞表面高铁还原酶活力和生长状况的影响。利用激光共聚焦显微镜观察 Frp1 蛋白的细胞学定位。【结果】酸性条件显著上调 *FRE10* 基因的表达水平, 而碱性条件能显著提高 *FRE2* 基因的表达量。在酸性条件下, *FRE10* 基因的缺失会显著地下调细胞表面高铁还原酶活力。在碱性条件下, *fre2Δ/Δ* 缺失菌株表现出严重缺陷的生长能力和显著降低的表面高铁还原酶活力。细胞学定位实验发现 Frp1 蛋白位于液泡中。【结论】*FRE2* 和 *FRE10* 基因的表达模式主要是酸碱依赖性的。Fre2 是碱性条件下高铁还原酶活力的主要贡献者。Frp1 蛋白位于液泡中, 在液泡内储存铁的活化和转运过程中可能发挥重要作用。

关键词: 白色念珠菌, 高铁还原酶基因, *FRE2*, *FRP1*

中图分类号: Q935 **文章编号:** 0001-6209 (2014) 10-1185-08

铁是绝大多数生物生长和代谢过程中必需的营养元素。铁离子自身的生化特性, 一方面使其能够参加许多氧化还原反应, 是代谢过程中许多酶的重要辅助因子, 另一方面也使其容易将电子传递给氧或过氧化氢, 产生高毒性的氧自由基, 从而对细胞产生毒害作用^[1-2]。另外, 人体中游离铁离子的浓度较低, 主要以铁蛋白, 铁转运蛋白和乳铁蛋白的形式存在, 进一步限制了微生物从宿主内获取和利用铁的能力。因此许多微生物进化出了复杂的策略来应对环境压力, 提高铁获得能力^[3]。研究病原微生物和宿主之间的铁竞争关系将有助于揭示病原菌的致病机制, 为临床上其感染治疗和药物开发提供理论基础。

白念珠菌是一种重要的人类条件致病性真菌。铁的获得能力是白念珠菌在宿主中定居、存活和致病过程中重要的影响因素。目前研究表明, 白念珠菌主要拥有三种高亲和性铁获得系统, 即还原铁获得系统、铁载体获得系统和血红素利用系统^[3-4]。其中还原铁获得系统是白念珠菌从胞外环境中获得铁的最主要途径, 是其低铁环境中存活和致病的关键因素。主要分为两部分, 首先膜上的高铁还原酶将 Fe(III) 还原为 Fe(II); 然后 Fe(II) 经多铜氧化酶/铁通透酶复合物转运进胞内。白念珠菌还原性铁获得系统比酿酒酵母复杂的多, 基因组序列分析发现白念珠菌基因组至少编码 17 种高铁还原酶, 6 种多铜氧化酶和 2 种铁通透酶。Jane E. H 等鉴定

基金项目: 国家自然科学基金(31070126, 81171541); 天津市自然科学基金(13JCYBJC20700)

* 通信作者。Tel: +86-22-23508506; Fax: +86-22-23508800; E-mail: nklimingchun@163.com

作者简介: 徐宁(1986 -), 男, 山东泰安人, 博士研究生, 主要从事真菌的分子生物学研究。

收稿日期: 2013-12-13; **修回日期:** 2014-03-28

出首个白念珠菌高铁还原酶基因 *FRE1*, 发现低铁条件能够诱导其表达, 其编码蛋白定位于细胞膜上, 能弥补酿酒酵母 *fre1Δ* 突变株生长缺陷表型^[5]。Knight, S. A 等鉴定出了第二个高铁还原酶基因 *FRE10*, 发现该基因也是一种低铁应答基因, 是酸性条件下细胞高铁还原酶的最主要贡献者^[6]。我们实验室前期研究中发现, 白念珠菌高铁还原酶 *FRP1* 既是碱性应答基因, 又是低铁应答基因^[7-8]。但是目前对其他高铁还原酶基因功能的阐释和表达调控的研究仍处于空白阶段。白念珠菌含有的高铁还原酶种类较多, 高铁还原酶间可能存在着功能冗余或互补现象, 又进一步增加了研究的难度。因此, 目前缺乏对高铁还原酶功能的系统性研究, 主要集中于单个基因生物学功能的阐释, 对于细胞调控各种高铁还原酶活性的机制, 以及在特定微环境下哪一种或几种高铁还原酶发挥作用仍不清楚^[9-11]。

本文以白念珠菌高铁还原酶基因 *FRE2*、*FRE10*

和 *FRP1* 为研究对象, 探索高铁还原酶的环境应答模式, 证实了 *FRE10* 是酸性条件下高铁还原酶活力的主要贡献者, 同时也首次报道 *FRE2* 是碱性条件下高铁还原酶活力的主要贡献者, 进一步丰富和完善了 pH 依赖性高铁还原酶活力的研究结果。细胞学定位实验发现, 不同于细胞膜高铁还原酶 *Fre1* 和 *Fre10*, *Frp1* 高铁还原酶并不位于细胞膜, 而是定位于液泡中, 说明 *Frp1* 可能在液泡内储存铁的活化和转运过程中发挥重要作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 实验中所用的菌株和质粒参见表 1。

1.1.2 引物: 实验中所用的引物参见表 2, 由上海生工生物技术有限公司合成。

表 1 本研究中所使用菌株和质粒

Table 1 The strains and plasmids used in this study

| strains and plasmids | genotype | source |
|----------------------|--|------------|
| BWP17 | <i>ura3Δ::λimm434/ura3Δ::λimm434 his1::hisG/his1::hisG arg4::hisG/arg4::hisG</i> | Dana Davis |
| DAY609 | BWP17 strain but <i>ftr1::ARG4/ftr1::URA3</i> | Dana Davis |
| NKF2 | BWP17 strain but <i>frp1::ARG4/frp1::URA3-dpl200</i> | Dana Davis |
| NKF3 | BWP17 strain but <i>fre10::ARG4/fre10::URA3-dpl200</i> | Dana Davis |
| NKF4 | BWP17 strain but <i>FRE2/fre2::ARG4</i> | This study |
| NKF5 | BWP17 strain but <i>FRE2/fre2::URA3-dpl200</i> | This study |
| NKF6 | BWP17 strain but <i>fre2::ARG4/fre2::URA3-dpl200</i> | This study |
| NKF7 | BWP17 strain but <i>fre10::ARG4/fre10::dpl200 FRE2/fre2::URA3-dpl200</i> | This study |
| NKF8 | BWP17 strain but <i>fre10::ARG4/fre10::dpl200 fre2::URA3-dpl200/fre2::dpl200</i> | This study |
| NKF37 | BWP17 strain but <i>FRP1/FRP1-GFP::URA3</i> | This study |
| pDDB57 | Containing <i>URA3</i> marker, <i>Amp^r</i> | Dana Davis |
| pRS-ARG4ΔSpeI | Containing <i>ARG4</i> marker, <i>Amp^r</i> | Dana Davis |
| pDDB373 | Containing <i>GFP</i> marker, <i>Amp^r</i> | Dana Davis |

表 2 本研究中所使用引物

Table 2 Primers used in this study

| primer name | Sequence (5'→3') |
|-------------|---|
| FRE2-5' | TCAGTTAATAACTTCTTGC |
| FRE2-3' | TGATACATGATAAAAGTTGC |
| FRE10-5' | TCCCTTCAGTACAAGCCCTC |
| FRE10-3' | AGTGATGAATCAATAGTTGC |
| TEF1-5' | ATAGTCATAATCAATCATGGGT |
| TEF1-3' | CTTACATAATATTCAACTAGC |
| FRE2-5DR | GCAACTAACTTGTGCGATTTTATTGTACAATTTTCAACACCAAGAAGAGTTTCCTAAATCATTTCACAGTCACGACGTT |
| FRE2-3DR | CAACATGTGACAAGTCTTGTGTTGATTTTGAACAAAAGAGTTTGTAGGTGATTCAACTGGTGGAAATTGTGAGCGGATA |
| FRE2-5det | GCATATTACGGATAATCAAC |
| FRE2-3det | AAGGTAACCTAACAATCCAG |
| FRP1-5GFP | CAAACATCATTTGTCAAAGTGCTAGAAAGGGTGAAGGTGCACCGGAAAGTGTATTGTTATACAGAGTCGTTTGGTGGTGGTT |
| FRP1-3GFP | CTAAAGGTGAAGAATTATT TCTTCTTGAAAAGAACCCTGCCTTCTTACCAATCAATTGGTACTTTAACATTGCTGAAAAGAAAAGTTGTCTAGAA GGACCACCTTTGATTG |

1.1.3 主要试剂和仪器: ExTaq DNA 聚合酶、各种限制性内切酶和同位素标记试剂盒 Random Primer Labeling kit 购于 TaKaRa 公司; 聚乙二醇 3350、醋酸锂、BIP (2, 2'-bipyridyl)、BPS (bathophenanthroline disulphonate) 和 Ferrizon 购于 Sigma 公司; M199 培养基购于 Invitrogen 公司。其余有机试剂和药品均为国产分析纯。台式 pH 计, 瑞士 Mettler-Toledo 公司; PCR 扩增仪, 德国 Biometra 公司; 激光共聚焦显微镜, 德国 Leica 公司。

1.1.4 培养基和培养条件: M199 培养基: M199 粉末一袋, 150 mmol/L HEPES, 调整 pH 值至所需值, 过滤除菌。YPD 培养基: 1% 酵母浸出粉, 2% 蛋白胨, 2% 葡萄糖。选择性 SD 培养基: 0.67% 无氨基酸酵母氮源, 2% 葡萄糖, 0.2% 省却氨基酸混合物。培养基中添加终浓度为 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 尿苷。铁离子螯合剂 BPS/BIP/Ferrizon 按照指定浓度添加至培养基中造成铁离子匮乏条件。

1.2 白念珠菌高铁还原酶基因缺失菌株的构建

采用 PCR 介导同源重组技术进行基因敲除^[12]。以 FRE2-5DR/FRE2-3DR 为引物, 从 pRS-ARG4 Δ SpeI 和 pDDB57 质粒模板上分别扩增得到 FRE2-ARG4 和 FRE2-URA3 敲除盒。采用两步法, 转化野生型 BWP17 菌株, 筛选鉴定得到正确的杂合基因缺失突变株 NKF4/NKF5 和纯和基因缺失突变株 NKF6。本实验中重复使用 URA3 营养型选择标记构建 *fre10 Δ / Δ fre2 Δ / Δ* 双基因缺失菌株。双基因缺失菌株构建中, 以 NKF3 为出发菌株, 使用含有 5-氟乳清酸和尿苷的 SD 培养基, 筛选 *ura3*-菌株 *fre10::ARG4/fre10::dpl200*。采用 FRE2-URA3 敲除盒, 依次敲除该菌株中的 *FRE2* 基因的 2 个拷贝。采用 PCR 方法对转化子进行鉴定。

1.3 PCR 介导的靶基因和 GFP 融合结构的构建

FRP1-GFP 羧基端融合结构的构建也采用 PCR 介导的同源重组技术^[13]。首先设计一对长引物, 包含 60 bp 同源侧翼序列和 20 bp 用于扩增 GFP 选择标记的通用序列。上游引物所包含的同源侧翼序列与靶基因终止密码子前 60 bp 序列一样, 下游引物所包含的同源侧翼序列与靶基因终止密码子后 60 bp 序列一样。扩增得到的 PCR 片段直接转化野生型 BWP17 菌株, PCR 筛选鉴定正确的转化子。

1.4 RNA 提取和 Northern 杂交

采用热酚法提取白念珠菌总 RNA^[14-15]。将过夜培养菌株, 转接于 YPD 或者 YPD 添加不同浓度铁离子螯合剂的培养基中, 培养至对数中期。离心收集菌体, 用于 RNA 提取。通过随机引物标记的方法进行同位素标记探针标记。FRE2-5'/FRE2-3' 用于扩增 *FRE2* 基因的标记探针, FRE10-5'/FRE10-3' 用于扩增 *FRE10* 基因的标记探针。提取后的 RNA 经甲醛变性凝胶电泳, 转膜, 杂交和检测^[14]。

1.5 细胞表面高铁还原酶的活力测定

采用 TTC 法 (氯化三苯基四氮唑) 检测细胞表面还原酶活力^[15]。细胞表面还原酶能够将 TTC 还原成不溶于水的红色三苯基甲月替, 并聚集在细胞表面。可以根据红色的深浅程度鉴定细胞表面还原酶活力。细胞表面还原酶活力的定量测定主要根据 BPS-Fe (II) 红色复合物的形成^[6]。Fe (III) 能够被细胞表面高铁还原酶还原为 Fe (II), Fe (II) 能够与 BPS 螯合剂形成红色复合物。通过测定该复合物在 520 nm 吸光度, 可以定量描述细胞表面高铁还原酶活力。

1.6 细胞学定位分析

采用激光共聚焦显微镜 (LEICA, TCP SP5) 观察活细胞内 Frp1 蛋白定位^[16]。将构建成功的含有 FRP1-GFP 融合结构的菌株, 在缺铁条件下培养至对数中期后, 收集菌体。细胞经过 3.7% 多聚甲醛固定后, 在激光共聚焦显微镜下观察绿色荧光在细胞内的分布。

2 结果

2.1 Northern 杂交揭示高铁还原酶基因具有不同低铁应答模式

不同环境条件可能会诱导不同高铁还原酶基因的表达。早前的微阵列研究虽然鉴定出多种低铁应答的高铁还原酶基因, 但是对于其具体应答机制仍不清楚^[17]。本研究首先通过 Northern 杂交技术, 探索 *FRE2* 和 *FRE10* 两种高铁还原酶基因在菌株遭受不同低铁刺激信号时的应答模式。由图 1 可知, 无论是否含有铁离子螯合剂, 酸性条件 (pH4) 显著上调 *FRE10* 基因的表达水平, 而碱性条件 (pH8) 则能显著提高 *FRE2* 基因的表达量。在所有测定条件下, 阳性对照 *TEF1* 基因表达量没有显著变化。以上结果证

实, *FRE2* 和 *FRE10* 基因的表达模式主要是酸碱依赖性的, 和胞外环境中铁离子水平无显著关联。

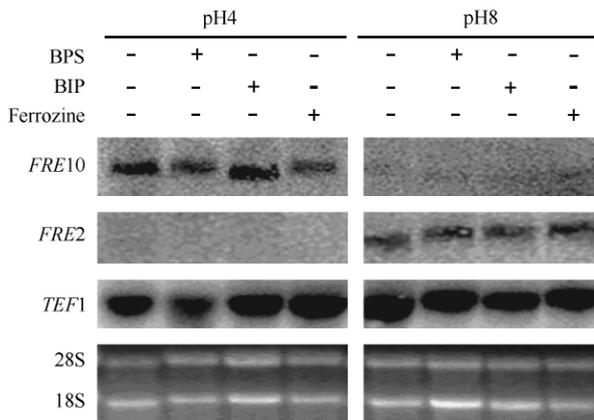


图 1. Northern blot 法分析不同低铁应答条件下高铁还原酶基因的表达活性

Figure 1. Northern blot analyses of *FRE10* and *FRE2* in iron deficiency responses. The expression levels of *TEF1* gene were used as the positive control.

2.2 *Fre2* 是碱性条件下细胞表面高铁还原酶活力的主要贡献者

高铁还原酶基因的缺失会影响细胞表面高铁还原酶的活力。已经有报道表明, 在酸性条件下 ($\text{pH} < 6.3$), *FRE10* 是高铁还原酶活力的最主要贡献者^[6]。而哪种基因负责编码碱性条件下细胞高铁还原酶仍不清楚。因此, 为了进一步分析高铁还原酶基因的功能, 通过 TTC 法和基于 BPS-Fe(II) 分光光度法检测了高铁还原酶基因缺失后对细胞表面高铁还原酶活力的影响。TTC 法实验结果, 由图 2-A 可知: 相较于野生型菌株, *fre2Δ/Δ* 缺失菌株细胞表面着色程度稍浅, 说明高铁还原酶活力有一定程度下降, 而 *fre10Δ/Δ* 和 *fre2Δ/Δfre10Δ/Δ* 缺失菌株基本丧失菌落着色形成能力, 表现出严重缺陷的细胞表面高铁还原酶活力。随后定量测定了各个菌株在不同培养条件下的高铁还原酶活力, 如图 2-B: 在酸性条件下 ($\text{pH}4$), *FRE10* 基因的缺失会显著地下调细胞表面高铁还原酶活力, 与野生型相比降低了 75.5%, *FRE10* 和 *FRE2* 双基因同时缺失则使高铁还原酶活力进一步降低至野生型菌株的 12.1%。另外, *FRE2* 和 *FRP1* 基因的单独缺失对高铁还原酶活力没有显著影响。而在碱性条件下 ($\text{pH}8$), *fre2Δ/Δ* 缺失菌株表现出显著弱化的细胞表面高铁还原酶活力, 约为野生型菌株活力的 31.3%, *fre2Δ/Δ*

Δfre10Δ/Δ 双基因缺失菌株细胞表面高铁还原酶活力则仅为野生型菌株的 17.1%。同样, *FRE10* 和 *FRP1* 基因的单独缺失对高铁还原酶活力没有显著影响。有趣的是, 在酸性缺铁条件下 ($\text{pH}4 + 50 \mu\text{mol/L BPS}$), 所有菌株的高铁还原酶的活力都有一定程度的提高, 尤其是 *fre10Δ/Δ* 基因缺失菌株。鉴于白念珠菌中含有 17 个潜在的高铁还原酶基因, 这些结果表明酸性铁匮乏条件可能会激活一些替代的高铁还原酶基因, 从而补救 *FRE10* 等基因缺失所造成的负面影响。综上所述, 研究结果表明 *Fre10* 是酸性条件下高铁还原酶活力的最主要贡献者, 而 *Fre2* 是碱性条件下高铁还原酶活力的最主要贡献者, *Fre10* 和 *Fre2* 的双缺失会严重影响酸碱条件下菌株的高铁还原酶活力。

2.3 高铁还原酶基因缺失后对细胞生长的影响

铁离子是微生物的必需营养元素, 铁离子的匮乏会影响细胞的生长。高铁还原酶介导的还原性铁吸收途径是微生物在低铁环境下获得铁离子的主要途径^[1]。为了进一步研究高铁还原酶基因对细胞生长的影响, 分析了菌株在不同 pH 和低铁条件下的生长状况。结果如图 3 所示: 在酸性条件下, 几种高铁还原酶基因的缺失都不影响菌株生长。而在酸性缺铁条件下, *FRE2* 和 *FRE10* 双基因同时缺失却导致菌株对这种低铁环境敏感性增强。虽然在中性条件下, *FRE2* 基因的缺失不影响菌株的生长状况, 但是在碱性 ($\text{pH}10$) 以及中碱性 ($\text{pH}8$) 缺铁条件下, *fre2Δ/Δ* 缺失菌株都表现出严重弱化的生长能力。另外, 在碱性缺铁条件下, *fre2Δ/Δfre10Δ/Δ* 双基因缺失菌株生长也非常缓慢。综上结果表明, *Fre2* 对于菌株细胞在碱性及碱性缺铁条件下的生长都非常重要, 该基因的缺失将削弱菌株环境应答能力。

2.4 白念珠菌 *Frp1* 蛋白定位于液泡中

尽管白念珠菌 *FRP1* 高铁还原酶基因是一种重要的低铁应答基因, 但是研究中发现 *FRP1* 基因的缺失并未显著影响细胞表面高铁还原酶活力, 在不同培养条件下也没表现出明显的生长缺陷。因此推测 *Frp1* 可能并不定位于细胞膜。为了进一步了解 *Frp1* 的作用机制, 首先采用生物信息学软件 pSORT 对 *Frp1* 蛋白进行预测分析, 有 60.9% 的可能性显示 *Frp1* 是一种膜蛋白。同时采用膜蛋白结构预测系统 TMpred 对 *Frp1* 跨膜结构进行预测, 结果发现 *Frp1* 是一个潜在的具有 5 次跨膜区域的膜蛋白。

本实验通过同源重组的方法, 构建含有 Frp1-GFP 融合结构的菌株, 通过激光共聚焦显微镜观察发现, 荧

光亮点主要集中在液泡中(图 4)。综上所述结果表明, Frp1 是一种位于液泡膜的高铁还原酶基因。

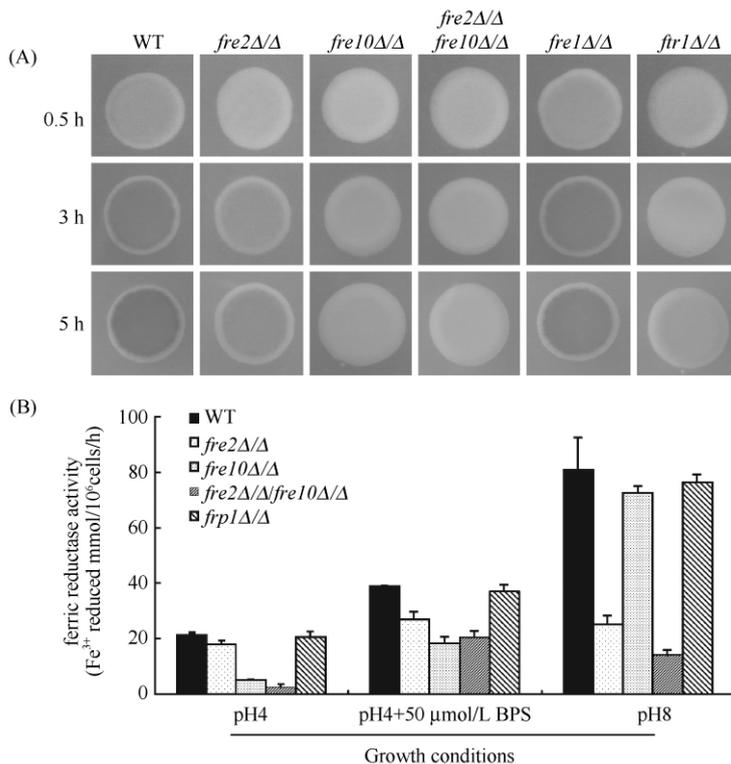


图 2. 白念珠菌野生型和基因缺失菌株的细胞表面高铁还原酶活力

Figure 2. Ferric reductase activity in *C. albicans* wild-type, *fre2Δ/Δ*, *fre10Δ/Δ* and *frp1Δ/Δ* mutants. A: Colonies of different strains were overlaid with the agarose containing 0.1% TTC, and incubated for the indicated times. The *frp1Δ/Δ* mutant was used as a control because of its defective in iron uptake. B: Quantitative ferric reductase activity was measured as described in Materials and Methods.

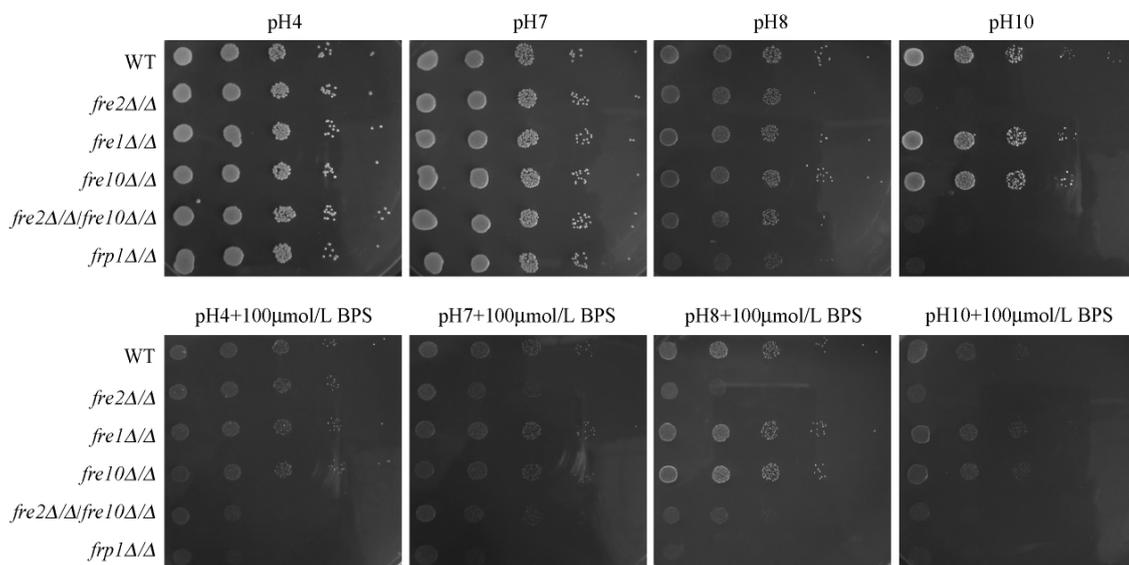


图 3. 白念珠菌野生型和基因缺失菌株在不同 pH 和铁匮乏条件下的生长状况

Figure 3. Sensitivity of *C. albicans* wild-type and mutant strains to different pH and iron-deficient conditions.

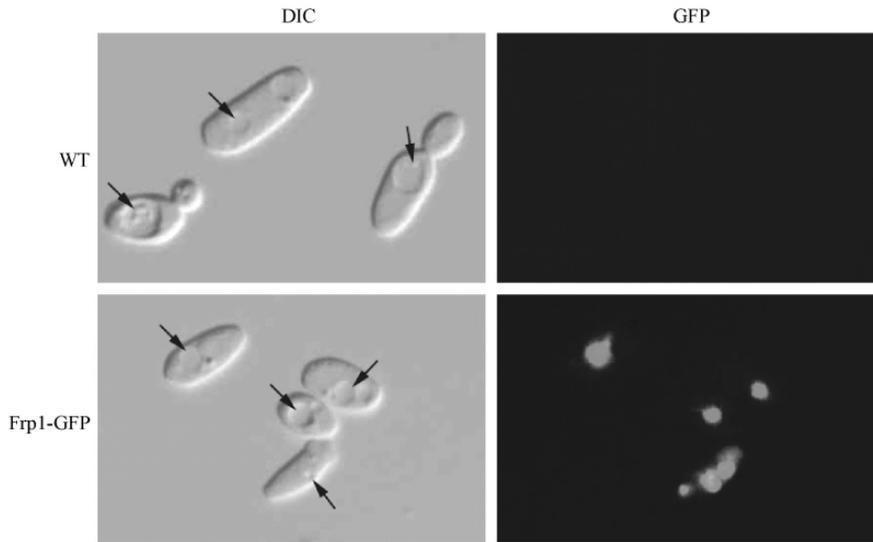


图 4. 白念珠菌 Frp1 蛋白的细胞学定位

Figure 4. Localization of Frp1-GFP in *C. albicans*. The fixed cells with or without Frp1-GFP fusion were washed, and examined with a confocal laser scanning microscopy (LEICA, TCS-SP5). Black arrows indicate the vacuole. DIC, differential interference contrast.

3 讨论

白念珠菌作为一种人体主要的条件致病性真菌,必须存在有效和特异的铁吸收系统才能在宿主体内存活^[3]。高铁还原酶是还原性铁吸收系统的重要组分,主要负责将三价铁 Fe(III) 还原为二价铁 Fe(II),在细胞铁获得过程以及胞内铁稳态的维持中都发挥着重要作用^[1-18]。目前已知白念珠菌基因组至少编码 17 种高铁还原酶,但是关于高铁还原酶基因功能和表达调控的研究仍相对较少。

本研究发现高铁还原酶基因具有不同的表达模式。*FRE2* 和 *FRE10* 基因的表达模式主要是酸碱依赖性的,胞外环境中铁离子水平对两种基因的表达没有显著影响。尽管先前的研究已经发现 *FRE10* 是在酸性条件下 (pH < 6.3) 高铁还原酶活力的最主要贡献者,但是白念珠菌中哪一种或几种高铁还原酶在中碱性条件下或缺铁条件下发挥主要作用,并没有任何报道^[6]。我们的研究首次发现,白念珠菌 *fre2Δ/Δ* 缺失菌株在碱性条件下表现出严重的生长缺陷和显著降低的细胞表面高铁还原酶活力,说明 *Fre2* 是碱性条件下高铁还原酶活力的主要贡献者。进一步丰富和完善了 pH 依赖性高铁还原酶活力的研究结果,表明不同的高铁还原酶参与酸碱应答过

程。鉴于人体血液中 pH 值呈现弱碱性,血液游离铁离子较低,对白念珠菌而言会造成一种天然的铁离子匮乏环境^[3]。*FRE2* 基因表达水平的紊乱将会直接影响白念珠菌和宿主竞争铁离子的能力,从而影响白念珠菌的生长和致病力。因此,抑制 *FRE2* 基因表达的一些策略可能会为临床药物开发提供一个新的思路。

在酿酒酵母中,高铁还原酶蛋白的定位具有多样性,主要定位于细胞膜,负责在低铁环境下高亲和性转运胞外铁离子,而在液泡膜或其他位置也鉴定出多个高铁还原酶^[18]。在白念珠菌中,已经鉴定的具有高铁还原酶功能的两个基因 *FRE1* 和 *FRE10*,其编码蛋白也位于细胞膜上,而对其他高铁还原酶蛋白定位研究较少^[5-6]。我们在研究中发现 *FRP1* 基因虽然编码高铁还原酶,但是该基因的缺失并未显著影响细胞表面高铁还原酶活力,在不同培养条件下也没表现出明显的生长缺陷。一个可能的原因是 *Frp1* 并不是位于细胞膜的高铁还原酶。为进一步验证猜测,采用信息学软件分析表明,*Frp1* 很可能是一个潜在的具有 5 次跨膜区域的膜蛋白。细胞学定位实验也首次证实,*Frp1* 蛋白并不位于细胞膜,而是定位于液泡中。由于液泡是胞内铁离子存储的主要场所,因此推测 *Frp1* 可能在液泡内储存铁的活化和转运过程中发挥重要作用。

参考文献

- [1] Kaplan CD, Kaplan J. Iron acquisition and transcriptional regulation. *Chemical Reviews*, 2009, 109 (10): 4536-4552.
- [2] Theil EC, Goss DJ. Living with iron (and oxygen): questions and answers about iron homeostasis. *Chemical Reviews*, 2009, 109 (10): 4568-4579.
- [3] Almeida RS, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* iron acquisition within the host. *FEMS Yeast Research*, 2009, 9 (7): 1000-1012.
- [4] Chen C, Pande K, French SD, Tuch BB, Noble SM. An Iron Homeostasis Regulatory Circuit with Reciprocal Roles in *Candida albicans* Commensalism and Pathogenesis. *Cell Host Microbe*, 2011, 10 (2): 118-135.
- [5] Hammacott JE, Williams PH, Cashmore AM. *Candida albicans* CFL1 encodes a functional ferric reductase activity that can rescue a *Saccharomyces cerevisiae* fre1 mutant. *Microbiology*, 2000, 146 (Pt 4): 869-876.
- [6] Knight SA, Vilaire G, Lesuisse E, Dancis A. Iron acquisition from transferrin by *Candida albicans* depends on the reductive pathway. *Infection and Immunity*, 2005, 73 (9): 5482-5492.
- [7] Baek YU, Li M, Davis DA. *Candida albicans* ferric reductases are differentially regulated in response to distinct forms of iron limitation by the Rim101 and CBF transcription factors. *Eukaryotic Cell*, 2008, 7 (7): 1168-1179.
- [8] Liang Y, Gui L, Wei DS, Zheng W, Xing LJ, Li MC. *Candida albicans* ferric reductase FRP1 is regulated by direct interaction with Rim101p transcription factor. *FEMS Yeast Research*, 2009, 9 (2): 270-277.
- [9] Jeeves RE, Mason RP, Woodacre A, Cashmore AM. Ferric reductase genes involved in high-affinity iron uptake are differentially regulated in yeast and hyphae of *Candida albicans*. *Yeast*, 2011.
- [10] Xu N, Cheng X, Yu Q, Xing L, Li M. Research advances of iron homeostasis regulatory networks in *Candida albicans*. *Microbiology China*, 2012, 39 (3): 386-393. (in Chinese)
- 徐宁,程欣欣,喻其林,邢来君,李明春. 白念珠菌铁稳态调控网络研究进展. *微生物学通报*, 2012, 39 (3): 386-393.
- [11] Noble SM. *Candida albicans* specializations for iron homeostasis: from commensalism to virulence. *Current Opinion in Microbiology*, 2013, 16 (6): 708-715.
- [12] Wilson RB, Davis D, Mitchell AP. Rapid hypothesis testing with *Candida albicans* through gene disruption with short homology regions. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181 (6): 1868-1874.
- [13] Gerami-Nejad M, Berman J, Gale CA. Cassettes for PCR-mediated construction of green, yellow, and cyan fluorescent protein fusions in *Candida albicans*. *Yeast*, 2001, 18 (9): 859-864.
- [14] Cao F, Lane S, Raniga PP, Lu Y, Zhou Z, Ramon K, Chen J, Liu H. The Flo8 transcription factor is essential for hyphal development and virulence in *Candida albicans*. *Molecular Biology of the Cell*, 2006, 17 (1): 295-307.
- [15] Hsu PC, Yang CY, Lan CY. *Candida albicans* Hap43 is a repressor induced under low-iron conditions and is essential for iron-responsive transcriptional regulation and virulence. *Eukaryotic Cell*, 2011, 10 (2): 207-225.
- [16] Xu N, Cheng X, Yu Q, Qian K, Ding X, Liu R, Zhang B, Xing L, Li M. Aft2, a novel transcription regulator, is required for iron metabolism, oxidative stress, surface adhesion and hyphal development in *Candida albicans*. *PLoS One*, 2013, 8 (4): e62367.
- [17] Lan CY, Rodarte G, Murillo LA, Jones T, Davis RW, Dungan J, Newport G, Agabian N. Regulatory networks affected by iron availability in *Candida albicans*. *Molecular Microbiology*, 2004, 53 (5): 1451-1469.
- [18] Schroder I, Johnson E, de Vries S. Microbial ferric iron reductases. *FEMS Microbiology Reviews*, 2003, 27 (2-3): 427-447.

Characterization of *Candida albicans* ferric reductase genes in response to environmental stresses

Ning Xu, Yong Liang, Xinxin Cheng, Kefan Qian, Qilin Yu, Mingchun Li*

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

Abstract: [Objective] Ferric reductases play a central role in iron acquisition and mobilization in *C. albicans*. This study focuses on stress response strategies exhibited by several ferric reductase genes through function and expression analyses. [Methods] Northern blot analysis was used to examine ferric reductase genes expression levels in different iron deficiency. We constructed ferric reductase-null mutants by a PCR-based homologous recombination, and examined the effects of gene deletion on cell-surface ferric reductase activity and growth ability under different conditions. Sub-cellular localization of Frp1-GFP fusion was imaged and analyzed by confocal laser scanning fluorescence microscopy. [Results] *FRE10* was highly expressed at acidic pH, compared to that at alkaline pH, whereas the expression of *FRE2* was just the opposite. Deletion of *FRE10* resulted in a significant decreased surface reductase activity at acidic pH, with 75.5% down-regulation compared to wild-type levels. The *fre2* Δ/Δ mutant showed significantly attenuated growth ability and cell-surface ferric reductase activity at alkaline pH. Sub-cellular localization revealed that the green fluorescence was accumulated in the vacuoles. [Conclusion] The expression of both *FRE10* and *FRE2* is induced in a pH-dependent manner. *FRE2* encodes a major cell surface ferric reductase under alkaline pH condition. Frp1 localizes to the vacuole, and might support mobilization and transport of vacuolar ferric iron stores.

Keywords: *Candida albicans*, ferric reductase gene, *FRE2*, *FRP1*

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31070126, 81171541) and by the Tianjin Research Program of Application Foundation and Advanced Technology (13JCYBJC20700)

* Corresponding author. Tel: +86-22-23508506; Fax: +86-22-23508800; E-mail: nklimingchun@163.com

Received: 13 December 2013 / Revised: 28 March 2014