

## 格特隐球菌基因组学研究进展

贾鑫淼<sup>1,3</sup>, 肖盟<sup>2,3</sup>, 孙天舒<sup>1,3</sup>, 徐英春<sup>2,3</sup>

中国医学科学院 北京协和医学院 北京协和医院<sup>1</sup>中心实验室<sup>2</sup>检验科, 北京 100730

<sup>3</sup>侵袭性真菌病机制研究与精准诊断北京市重点实验室, 北京 100730

通信作者: 徐英春 电话: 010-69159766, E-mail: xycpumch@139.com

**【摘要】**格特隐球菌属于新生隐球菌复合体, 既往被认为是新生隐球菌复合体的变种, 但最终被确立为独立的物种。与新生隐球菌不同, 格特隐球菌多感染免疫力正常人群, 目前致病机制尚未明确。格特隐球菌的基因组学研究不仅可全面了解其基因组组成、分子进化、毒力因子以及致病机制等特点, 还可对致病相关基因和重要蛋白进行预测, 为疫苗和新型抗生素的研发提供分子基础, 并进一步为高效治疗和防控隐球菌病提供理论依据。本文就格特隐球菌的基因组测序和基本特征、基因组进化、重要毒力基因以及比较基因组研究予以概述。

**【关键词】**格特隐球菌; 基因组; 比较基因组; 进化; 感染毒力

**【中图分类号】**R379.5; Q933 **【文献标志码】**A **【文章编号】**1674-9081(2019)05-0505-09

**DOI:** 10.3969/j.issn.1674-9081.2019.05.014

## Advances in Genomic Research of *Cryptococcus Gattii*

JIA Xin-miao<sup>1,3</sup>, XIAO Meng<sup>2,3</sup>, SUN Tian-shu<sup>1,3</sup>, XU Ying-chun<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Central Research Laboratory, <sup>2</sup>Department of Clinical Laboratory, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100730, China

<sup>3</sup>Beijing Key Laboratory for Mechanisms Research and Precision Diagnosis of Invasive Fungal Diseases, Beijing 100730, China

Corresponding author: XU Ying-chun Tel: 86-10-69159766, E-mail: xycpumch@139.com

**【Abstract】***Cryptococcus gattii* (*C. gattii*) belongs to the *Cryptococcus neoformans* complex and was previously considered to be a variant of the *Cryptococcus neoformans* complex (*C. neoformans* var. *gattii*) but eventually established as a separate species. Unlike *C. neoformans*, *C. gattii* predominantly infects immunocompetent persons. The pathogenic mechanism of *C. gattii* is not yet clear. The genomic research of *C. gattii* can not only comprehensively characterize the genetic composition, molecular evolution, virulence factors and pathogenic mechanisms, but also be used for the prediction of pathogenic genes and important proteins, which further facilitates the development of vaccines and new antibiotics and the construction of new effective treatments and prevention strategies against cryptococcosis. In this paper, the whole genome sequencing, genome features, genomic evolution, important virulence factors, and comparative genomic researches are reviewed.

**【Key words】***Cryptococcus gattii*; genome; comparative genome; evolution; pathogenicity

*Med J PUMCH*, 2019, 10(5): 505-513

基金项目: 北京市自然科学基金 (5184037); 中央高校基本科研业务费专项资金 (3332018024); “十三五”国家科技重大专项 (2018ZX10712001); 河北省科技计划项目 (17277775D)

利益冲突: 无

格特隐球菌 (*Cryptococcus gattii*) 属于新生隐球菌复合体 (*Cryptococcus neoformans* complex), 既往被认为是新生隐球菌复合体的变种 (*C. neoformans* var. *gattii*), 但最终被确立为独立的物种<sup>[1]</sup>。与新生隐球菌不同, 格特隐球菌多感染免疫力正常人群<sup>[2]</sup>。格特隐球菌以担孢子和酵母细胞形态被吸入, 引起人或动物肺部感染, 再传播到中枢神经系统, 导致脑膜炎或脑膜脑炎, 感染后具有致命性; 除了中枢神经系统和肺部, 还可累及皮肤、骨、关节、喉淋巴结、腹腔、前列腺、眼睛、尿路和循环系统等部位<sup>[3]</sup>。

格特隐球菌主要分为 4 个谱系: VG I、VG II、VG III 和 VG IV<sup>[2,4]</sup>, 其中 VG II 是最古老的谱系, 其次是 VG IV<sup>[5]</sup>。通过对临床、动物和环境分离株的分析发现<sup>[2,6-9]</sup>: 在所有分离株中, 最常见的分子类型为 VG II, 占有所有分离株的 47%, 其次是 VG I (34%)、VG III (11%) 和 VG IV (8%); 在临床分离株中, VG I 和 VG II 具有相似的比例, VG III 和 VG IV 次之; 而大多数环境分离株属于分子型 VG II, 其次是 VG I 和 VG III, 环境分离株则很少出现 VG IV 型。

格特隐球菌感染主要分布于热带和亚热带地区。1999 年在地处温带的加拿大温哥华岛<sup>[6]</sup>及美国西北部地区<sup>[10]</sup>发生了格特隐球菌暴发流行, 我国及欧洲地区亦有病例报道<sup>[11-13]</sup>。近期研究显示, 其所致感染病例地理分布正在不断扩大<sup>[14]</sup>。目前格特隐球菌的致病机制、毒力作用机制、暴发流行和进化机制尚不完全明确, 致使安全有效的治疗药物和疫苗开发处于停滞状态。随着测序技术的不断发展, 针对格特隐球菌的基因组学分析将有助于解决这一难题。因此, 本文就格特隐球菌的基因组测序和基本特征、基因组进化、重要毒力基因以及比较基因组研究予以概述。

## 1 基因组测序及其基本特征

格特隐球菌为二倍体, 基因组包含 14 条线性染色体。随着测序技术的不断发展, 虽然越来越多的格特隐球菌菌株被测序, 但由于真菌基因组具有较多的重复序列, 目前仅有一株 VG I 菌株 (WM276) 和一株 VG II 菌株 (R265) 基因组拼接至染色体水平。

VG I 型的 WM276 由来自加拿大不列颠哥伦比亚大学迈克尔·史密斯实验室的 J. Kronstad 等于 2011 年测序完成, 基因组组装基于 BAC 文库构建的物理图谱和包含来自 BAC 克隆末端的测序 reads 支持完成。WM276 基因组长约 18.4 Mb, 包含 8 个 gap 区域, 8 条染色体的两端鉴定出由基序重复序列组成的

端粒序列 (TTAGGG)<sub>n</sub>, 4 条染色体的一端鉴定出端粒序列, 其余 2 条染色体两端均未鉴定出端粒序列。其中, 最大的染色体 2.23 Mb, 最小的染色体 0.52 Mb, 平均 G+C 含量 47.9%, 共计编码约 6560 个基因<sup>[15]</sup>。

VG II 型的 R265 由 Broad 研究所测序完成, 是 Broad 真菌基因组计划的一部分, 该菌株是引起加拿大温哥华地区格特隐球菌感染的爆发菌株。作为 NH-GRI 白皮书的一部分, Broad 研究所还对其他格特隐球菌菌株进行了测序, 以辅助提高 R265 的基因组组装水平。R265 基因组约 17.5 Mb, G+C 含量 47.8%, 最大的染色体 2.21 Mb, 最小的染色体 0.52 Mb, 共编码约 6470 个基因。此外, 研究人员还拼接得到了 0.03 Mb, G+C 含量 33.4% 的线粒体基因组<sup>[15]</sup>。

VG III 和 VG IV 型别的菌株尚无基因组相对完整的代表菌株。

## 2 基因组进化特征

早期研究中, 格特隐球菌的进化分析主要基于少数基因位点。2008 年, Bovers 等<sup>[5]</sup>通过对 6 个基因位点 LAC1、ITS1/2、IGS、RPB1、RPB2 和 TEF1 的分析, 鉴定 VG II 为格特隐球菌菌株的起源, 其次是 VG IV, 同时 VG IV 又为姐妹分支 VG I 和 VG III 的起源。除 6 个基因位点之外, 通过对线粒体基因组上两个基因位点 *mtl*rRNA 和 ATP6 的分析发现, 格特隐球菌不同谱系之间在线粒体基因组上存在较为广泛的基因重组<sup>[16]</sup>。利用 PCR 指纹图谱对 4 个基因座 ACT1、IDE1、PLB1 和 URA5 的分析, 进一步确认 VG II 为格特隐球菌最古老的谱系, 且 4 大谱系包含 B、C 两个血清型<sup>[17-18]</sup>。对这 4 个基因座的进一步分析显示, 格特隐球菌较新生隐球菌位于进化的下级。此外, 基于 10 个基因位点 ACT1、LAC1、IDE1、ITS1/2、IGS、PLB1、RPB1、RPB2、TEF1 和 URA5, 并通过对进化时间的推算, 进一步确立了 VG II 的祖先地位<sup>[19]</sup>, VG II 与其他分支的分离约在 6200 万年前 (范围: 3300~8700 万年前), VG VI 分支与 VG III 和 VG I 分支的分离在 5200 万年前 (范围: 2700~7700 万年前), VG III 和 VG I 的分离约在 4700 万年前 (范围: 2600~6700 万年前) (图 1)<sup>[2]</sup>。

近年来, 随着测序技术的不断发展, 全基因组序列分型 (whole-genome sequence typing, WGST) 得到越来越广泛的应用。2011 年, Gillette 等<sup>[20]</sup>对太平洋西部高毒力 VG II 型菌株的传播分析发现, VG II 内部

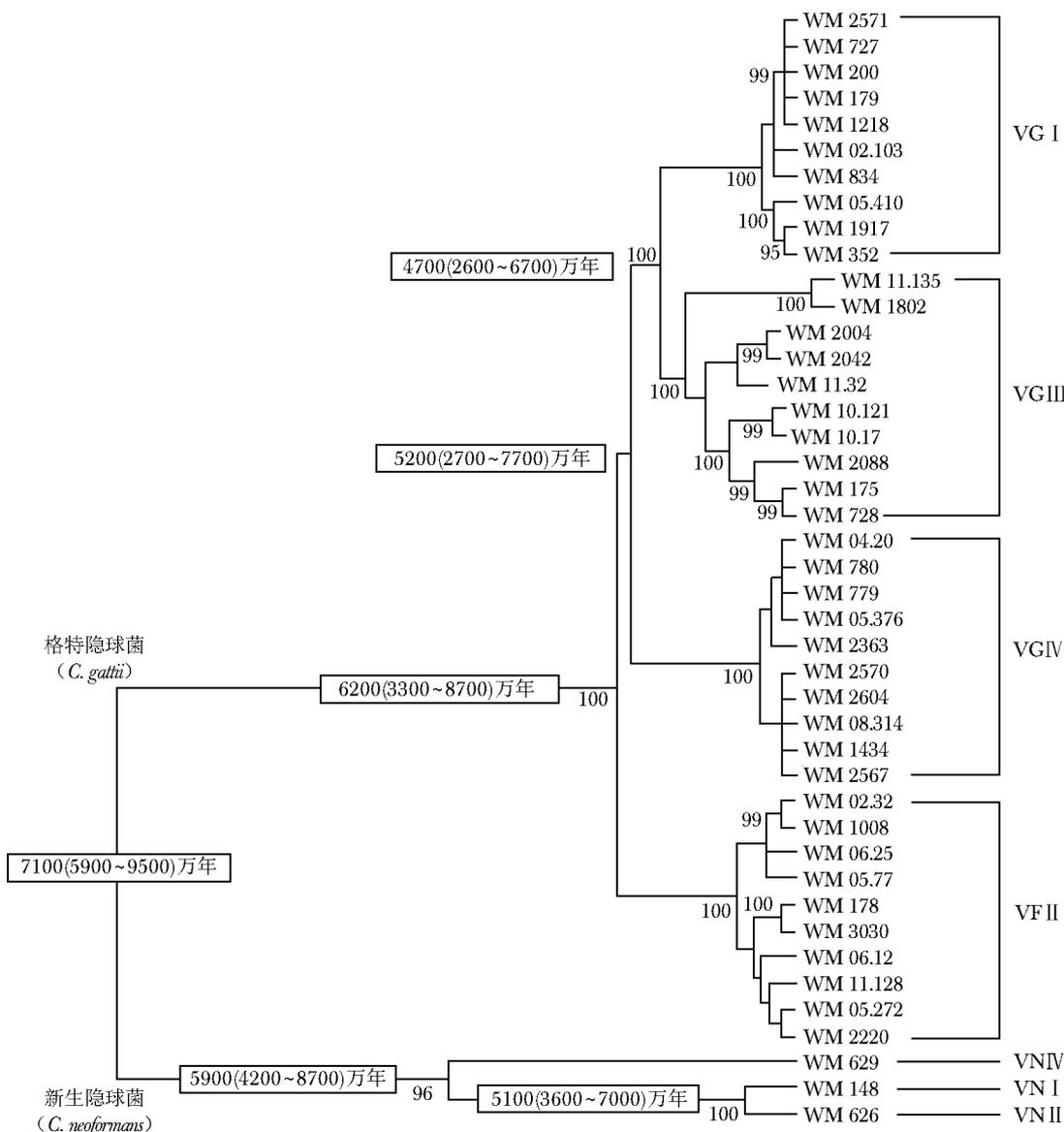


图 1 格特隐球菌菌株多位点序列分型进化树<sup>[2]</sup>

具有 3 种不同亚型的菌株 (VGIIa、VGIIb 和 VGIIc)，其中 VGIIa 遗传多样性最高，其次是 VGIIc 和 VGIIb，而 VG IIc 基因型菌株是引起太平洋西部感染最常见的菌株，在基因组上与温哥华岛爆发亚型 VG IIa 和 VG IIb 具有较大差异。基于多位点序列分型和多位点微卫星分型分析也具有相似的发现，并且进一步得到 WGST 的证实<sup>[21-23]</sup>。目前所有研究均表明，VG II 3 个亚型的出现是基因组重组的结果，且重组发生在进入太平洋西部之前。

此外，VG I、VG II、VG III 和 VG IV 在不同地区的分布具有地区特异性：(1) 美洲：主要为 VG II 和 VG III 型，其中大多数 VG II 临床株来自于南美洲<sup>[7]</sup>。VG II 的两种主要亚型 VG IIa 和 VG IIb 主要来自加拿大

和太平洋西北地区<sup>[6]</sup>。此外，新的高毒力亚型 VG IIc 也已在俄勒冈州以及太平洋西北地区被鉴定出来<sup>[24]</sup>。(2) 欧洲：仅有 VG I 和 VG II 的报道，且多数病例为 VG I 感染<sup>[25]</sup>。(3) 非洲：虽然对非洲的格特隐球菌知之甚少，但其流行病学似乎与世界上其他地区大不相同，主要是 VG IV 类型菌株，且主要来自非洲南部<sup>[26]</sup>。(4) 亚洲和澳大利亚：主要的分子类型是 VG I，其次是 VG II，VG III 很少被分离出来<sup>[27]</sup>。

### 3 重要毒力因子

研究表明，荚膜、黑色素、生理温度下的生长能力、降解酶以及交配型等与隐球菌致病性紧

密相关<sup>[28-29]</sup>。

### 3.1 荚膜

荚膜由 90%~95% 的葡萄糖醛木糖基甘露聚糖 (glucuronoxylomannan, GXM)、5% 的半乳糖木糖甘露聚糖和小于 1% 的甘露糖蛋白构成, 对于隐球菌在其宿主中的存活至关重要, 其通过为酵母细胞提供直接保护以增加隐球菌的适应性。例如, 在不存在噬菌素的情况下, 荚膜抑制噬细胞对隐球菌的吞噬作用<sup>[30]</sup>, 且抵抗吞噬体消化<sup>[31]</sup>。荚膜多糖亦直接作用于宿主, 在巨噬细胞中, 隐球菌将多糖从其荚膜中释放到吞噬体周围的囊泡中, 且这些囊泡在宿主细胞的细胞质中积累导致巨噬细胞功能障碍和溶解<sup>[31-32]</sup>。

目前已报道与荚膜生成相关的基因及其功能包括 CAP59 (跨膜蛋白, 介导 GXM 的运输)、CAP64 (与荚膜生成和宿主致命感染相关)、CAP60/CAP10 (编码定位于核膜和细胞质的蛋白)、CAS1/CAS3 (介导 GXM 乙酰化)、UXS1/UGD1/CAS31/CAS32/CAS33/CAS34/CAS35 (介导 GXM 的木糖基化)<sup>[29]</sup>。

### 3.2 黑色素

黑色素是一种带负电荷的疏水性高分子量颜料, 由酚类化合物的氧化聚合形成<sup>[33]</sup>。在某些邻二酚化合物如 3,4-二羟基苯丙氨酸<sup>[34]</sup>的存在下, 漆酶催化隐球菌中的黑色素合成。研究发现, 从人脑组织中回收的新生隐球菌细胞是黑化的, 产生黑色素的新生隐球菌毒性更高<sup>[33]</sup>。此外, 与黑化的新生隐球菌细胞相比, 非黑化细胞对氧化剂的敏感性较高, 且易被抗真菌药物 (如卡泊芬净和两性霉素 B) 杀死<sup>[35]</sup>。由于吞噬作用后氧化剂的产生是免疫细胞介导抗微生物作用的重要机制, 因此这些结果表明黑色素可通过保护真菌细胞免受免疫系统的攻击来增强毒力。此外, 观察到的黑化新生隐球菌能更好地抵御吞噬作用和抑菌作用, 也进一步证实了这一点。

两种漆酶基因 LAC1 和 LAC2 被鉴定为黑色素生物合成的中心酶<sup>[29]</sup>。其他基因, 包括 VPH1、CLC1、CCC2、ATX1 和 MBF1 也被发现是黑色素生成所必需的。

### 3.3 生理温度下的生长能力

在生理温度下的生长能力对于新生隐球菌和格特隐球菌的毒力是必不可少的。虽然一些隐球菌物种 (例如播散隐球菌) 也具有胶囊, 并产生黑色素, 但很少能在 37℃ 下生长, 因此不会在哺乳动物中引起感染<sup>[36]</sup>。隐球菌在鸟粪富集, 但鸟类不会被感染, 可能是因为隐球菌在 40~42℃ 的禽类体温下不能很好地生存。因此, 这种温度限制是隐球菌致病性的重

要决定因素。

早期研究发现了十几种高温生长所必需的基因, 包括 CNA1、CNB1、CPA1、CCN1、TPS1、TPS2、MGA2、RAS1、SOD2、TSA1、ILV2、SPE3/LYS9、MPK1 和 STE20 等<sup>[36]</sup>。

### 3.4 降解酶

#### 3.4.1 蛋白酶

降解包括胶原、弹性蛋白、纤维蛋白、免疫球蛋白和补充因子在内的宿主蛋白, 引起宿主组织破坏, 为隐球菌提供营养物质<sup>[31]</sup>。

#### 3.4.2 磷脂酶

能够水解甘油磷脂中的一个或多个酯键, 可破坏膜稳定性, 导致细胞裂解和脂质第二信使的释放<sup>[37]</sup>。隐球菌分泌的磷脂酶表现出磷脂酶 B、溶血磷脂酶水解酶和溶血磷脂酶转酰酶活性。与蛋白酶相同, 磷脂酶有助于宿主细胞膜的降解, 从而促进细胞裂解。在用于感染小鼠的菌株中, 磷脂酶表达与毒力呈剂量依赖性相关<sup>[37]</sup>。PLB1 基因的破坏导致体内毒力降低, 抑制巨噬细胞样细胞系中的生长<sup>[38]</sup>。磷脂酶还可裂解二棕榈酰磷脂酰胆碱, 即一种肺表面活性剂主要成分, 从而有助于真菌扩散<sup>[39]</sup>。最近研究表明, 新生隐球菌的磷脂酶 B 增强了新生隐球菌对人肺上皮细胞系的黏附<sup>[40]</sup>和小鼠模型中隐球菌病的传播<sup>[41]</sup>。

#### 3.4.3 脲酶

催化尿素水解成氨和氨基甲酸酯, 并且是某些致病菌的重要致病因子<sup>[39]</sup>。隐球菌脲酶 (编码基因: URE1) 是重要的毒力因子, 用 URE1 突变株感染的小鼠比用野生型菌株 H99 感染的小鼠寿命更长<sup>[42]</sup>。虽然脲酶不是大脑生长所必需的, 但静脉接种 URE1 突变株后, 脑、脾和其他器官的传播模式与野生型菌株显著不同, 因此提出 URE1 通过增强微毛细管内的酵母螯合作用对中枢神经系统入侵发挥作用。

### 3.5 交配型

一些有趣的观察结果表明, 交配型也是一种毒力因子。首先, MAT $\alpha$  细胞比 MAT $\alpha$  细胞更普遍。例如, MAT $\alpha$  交配型比 MAT $\alpha$  在环境分离株中的含量高 40 倍, 在临床分离株中的含量高 30 倍<sup>[43]</sup>。其次, 当在隐球菌病的小鼠模型中研究血清型 D (除交配型基因座外其他基因相同) 菌株 JEC21 时, 发现 MAT $\alpha$  菌株比 MAT $\alpha$  菌株毒性更高<sup>[44]</sup>。MAT $\alpha$  细胞比 MAT $\alpha$  细胞更普遍和更具毒性的发现促进了对 MAT $\alpha$  交配型基因座的分析。最初, 仅在 MAT $\alpha$  菌株中约 50 kb 的区域被定义为 MAT $\alpha$  基因座, 且其包含许多  $\alpha$  特异

性基因, 包括 STE12a<sup>[45]</sup>。然而, MAT 基因座的实际大小似乎远大于此, 在新生隐球菌和格特隐球菌中的长度均超过 100 kb, 含有 >20 个基因, 包括那些参与信息素产生、传感、建立细胞类型特性、MAP 激酶途径的成分等<sup>[46]</sup>。

此外, 一些基因参与隐球菌多个致病相关过程, 在隐球菌致病过程中发挥重要作用 (表 1)。

## 4 比较基因组学研究

不同谱系的格特隐球菌菌株基因组长度 (17.32~18.36 Mb) 和基因个数 (6456~6763) 差别不大, 但谱系之间存在较大的遗传变异 (平均基因组一致性 93%, 52 SNPs/kb), 而谱系内部菌株平均基因组一致性为 97%, 每 kb 少于 6 个 SNPs<sup>[47]</sup>。格特隐球菌菌株的第一个全基因组比较分析由 D'Souza 等<sup>[15]</sup>于 2011 年完成, 主要对单个 VG I 分离株 WM276 (代表导致全球大多数格特隐球菌感染的分子类型) 和 VG II 分离株 R265 (代表高毒力 VG IIa 温哥华岛爆发基因型) 进行了分析。随着测序和分析技术的不断发展, 研究人员逐渐关注到格特隐球菌各个谱系的菌株。

### 4.1 基因组结构

研究表明, 4 个谱系菌株染色体结构高度保守, 其中 VG II 尤为保守<sup>[47]</sup>。几乎所有的同线性变异都在 3 个密切相关的谱系 VG I、VG III 和 VG IV 中。进一步研究发现, 大于 100 kb 的染色体重排约 15 个, 平均而言, 约 2.6% 的区域发生了重排。15 个重排区域包括 10 个易位 (7 条染色体间和 3 条染色体内) 和 5 个支架融合, 其中大多数 (15 个中的 13 个) 与在着丝粒中发现的 TcN 转座子簇相关<sup>[48]</sup>, 表明这些主要

是全染色体臂重排。对更多的菌株基因组的研究进一步证实了存在 4 种染色体重排, 包括 VG II 特有的染色体融合、VG III 独有的两种易位 (分别为 700 kb 和 140 kb) 以及 VG IV 特有的一种易位 (450 kb)。由于一些重排事件会产生缺失的染色体区域或其他非整倍体和不可存活的后代, 因此这些变化可能影响谱系之间的遗传交换能力。

除了染色体重排, VG II 和 VG III 谱系菌株中还发现存在非整倍体<sup>[47]</sup>。如对 VG II 谱系动物分离株 B8828 的研究发现, scaffold 13 拥有额外两个拷贝; 对 VG III 谱系临床株 CA1280 的研究发现, scaffold 2 二倍体缺失; 对 VG II 临床分离株 LA55 研究发现, scaffold 1 中具有 60 kb 的染色体内重复。已有研究显示, 染色体拷贝数的变异影响新生隐球菌的毒力<sup>[49]</sup>, 且可通过增加唑类药物靶标 (ERG11) 或转运蛋白 (AFR1) 的拷贝数进一步提高对唑类药物的抗性。然而, 格特隐球菌分离株中的这类基因似乎没有更高的拷贝数, 表明这些非整倍体与已知的抗药性机制无关, 可能对这些分离株产生其他影响。

对线粒体基因组结构的分析发现, 线粒体基因组谱系之间的重组比染色体的重组更加频繁。研究发现, VG I 谱系菌株线粒体基因组序列与 VG II 的相似性远高于核基因组, 且对两两谱系 Fst 值<sup>[50]</sup>的计算也表明线粒体基因组 [VG I-VG III (0.642), VG I-VG IV (0.672), VG III-VG IV (0.658)] 比核基因组 [VG I-VG III (0.885), VG I-VG IV (0.894), VG III-VG IV (0.885)] 重组率更高<sup>[49]</sup>。

### 4.2 特异基因

Farrer 等<sup>[46]</sup>涉及 4 个谱系 16 株格特隐球菌菌株的研究发现了 737 个谱系特异或者在 2 或 3 个谱系特异的直系同源基因簇 (表 2)。这些基因主要来源于

表 1 格特隐球菌重要致病性相关基因<sup>[2]</sup>

基因	功能	表型
SOD1	细胞质抗氧化	毒力因子脲酶、磷脂酶 B 和漆酶的产生
SOD2	线粒体抗氧化	在 37 °C 20% 的氧气下生长
TPS1/TPS2	海藻糖 (一种抗氧化剂和压力保护剂) 生物合成	交配、荚膜/黑色素的产生、细胞壁的完整性和耐热性
PKA1	信号转导通路调节子	交配、荚膜/黑色素的产生、宿主病原体相互作用
PKA2	信号转导通路调节子	交配、荚膜/黑色素的产生
PLC1	信号转导通路调节子	37 °C 下生长、黑色素/磷脂酶产生
MPK1	信号转导通路调节子	调节黑色素和荚膜产生以及细胞壁完整性
STE12a	转录因子	调节黑色素产生、交配和生态适应性
GAT1	GATA 转录因子	调节氮利用
CNA1	钙调素异二聚体亚基, 钙调素活化的丝氨酸-苏氨酸特异性蛋白磷酸酶	调节耐热性、质膜完整性、氟康唑耐受性和在游离钙存在下的生长

表 2 不同谱系格特隐球菌特异基因

谱系	基因类别
VG I	铁还原酶样跨膜组分和铁还原酶 NAD 结合结构域基因
VG II	膜转运相关的膜分泌载体膜蛋白基因、Prmt1 (Fop) 染色质相关基因以及热休克蛋白 70
VG III	PIF1 样解旋酶和磷酸丙酮酸水合酶/烯醇酶基因
VG IV	缺失 Ctr 铜转运蛋白家族结构域的 3 个基因中的 1 个, 以及 3 种卤酸脱卤素酶的 Pfam 结构域基因

许多小的染色体内部变化,并在所有染色体散在分布。研究人员进一步对这些基因 Pfam 结构域和 GO 的功能富集进行分析,发现每个谱系携带一类独特的基因功能子集,这些基因可能参与毒力和疾病预后,包括 Fe<sup>+</sup>/Cu<sup>+</sup>结合基因,维持或影响线粒体形态的基因,以及应激反应相关基因。其中,最大 GO 富集类别为氧化应激。

VG I 具有携带铁还原酶样跨膜组分和铁还原酶 NAD 结合结构域基因的特异扩增。铁还原酶参与毒力因子黑色素产生和对唑类抗真菌药物的抗性<sup>[51]</sup>。总体而言,VG I 具有 4 个谱系中最少的谱系特异基因,但有 12 个显著富集的 Pfam 结构域,其中包括被认为参与 DNA 修复的 HORMA 结构域的基因扩增<sup>[52]</sup>。

VG II 分离株携带的特异基因包括涉及膜转运相关的膜分泌载体膜蛋白、Prmt1 (Fop) 染色质相关蛋白<sup>[53]</sup>以及在伴侣蛋白中发现的热休克蛋白 70 (heat shock protein 70, HSP70)。在新型隐球菌中,对 HSP70 基因家族成员 Ssa1 的缺失表明,HSP70 作为真菌毒力所需的应激相关转录共激活因子起作用<sup>[54]</sup>。HSP70 在 VG II 分离株中的扩增表明其可能是适应新环境的机制。进一步研究还发现,VG II 缺失了其他 3 个谱系中存在的约 150 个基因,比 VG I-III-IV 谱系中相应的基因丢失组合少 3 倍,进一步表明该谱系的基因组随着时间推移变得更加稳定。这些缺失基因富集的结构域包括 PAZ、Piwi 和 DUF1785,所有这些都是 RNA 干扰机制的组成部分<sup>[55-56]</sup>。此外,VG II 中丢失的基因还包括参与蛋白质加工和降解的功能结构域,例如 Alg14 结构域 (N-连接糖基化第二步所需)<sup>[57]</sup>、两个 S9 肽酶以及后期促进复合物亚基 5。VG II 菌株还缺失了一半对核和线粒体基因组维持至关重要的 PIF1 样螺旋酶<sup>[58]</sup>,这些可能在 VG II 的不同管状线粒体形态中发挥作用。此外,过氧化物酶、细胞色素氧化酶 c 亚基 VIIb (COX6B) 和铁蛋白铁结合区 2 也在 VG II 分离株特异缺失,其可能参与了隐球菌的抗氧化应激反应<sup>[59]</sup>。

VG III 分离株约包含 70 个谱系特异基因,这个数

目可能会随着 VG III 测序菌株的增加而减少。目前发现,VG III 特异基因包括对基因组稳定性起重要作用的 PIF1 样解旋酶<sup>[58]</sup>和磷酸丙酮酸水合酶/烯醇酶<sup>[60]</sup>,这是主要的高度保守的真菌过敏原<sup>[60]</sup>。此外,葡萄糖-甲醇-胆碱氧化还原酶,包括由多种真菌物种分泌的抗真菌蛋白,在 VG III 中丢失<sup>[61]</sup>。含有亮氨酸拉链-EF-hand 结构域跨膜蛋白 1 (leucine zipper/EF-hand-containing transmembrane protein 1, LETM1) 也未在 VG III 中预测到,尽管翻译的 BLAST 比对结果揭示了 LETM1 样序列的存在。

VG IV 主要感染免疫功能低下的宿主,研究表明,VG IV 具有最多的谱系特异基因,不过 VG IV 谱系菌株也特异缺失了一部分重要基因,如含有 Ctr 铜转运蛋白家族结构域的 3 个基因中的一个,这些基因已被证明可影响肺部感染期间的隐球菌存活和脑膜炎的发病<sup>[62]</sup>。VG IV 缺失的基因还包括 3 种卤酸脱卤素酶的 Pfam 结构域,其在多种底物上催化碳或磷酰基转移反应<sup>[63]</sup>。

#### 4.3 单核苷酸多态性

目前,针对格特隐球菌菌株单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 的分析主要集中于利用全基因组 SNP 进行格特隐球菌的进化研究,深入的细化和功能研究较少。2014 年,Engelthaler 等<sup>[22]</sup>首次对全球 118 株格特隐球菌菌株 (主要为太平洋西北地区,115 株 VG II 谱系菌株以及 VG I、VG III 和 VG IV 谱系各一株) 进行了全基因组 SNP 比较分析,在所有基因组中共鉴定出 1 282 876 个 SNP,544 881 个简约 SNP (区分不止一个菌株);在 115 个 VG II 基因组中,发现 310 969 个 SNP,其中 221 248 个简约 SNP;对太平洋西北地区爆发株不同亚型的分析显示,VG IIa、VG IIb 和 VG IIc 分别仅包含 717、246 和 528 个 SNP。进一步研究还表明,具有更高毒力的 VG IIa 群体来自毒力较弱的谱系,该谱系在 MSH2 直系同源基因中存在突变,但随后在 VG IIa 株中恢复,表现出瞬时突变体表型,可能有助于其适应环境并增加毒力<sup>[23]</sup>。

## 5 结语

格特隐球菌是近年来受到关注的人类重要的病原性真菌之一,随着基因组测序技术的不断发展和成熟,格特隐球菌的基因组学研究逐渐引起学术界关注。基于新一代高通量测序技术的全基因组测序,不仅可更好地了解格特隐球菌基因组特征,为基因功能研究提供指导;同时在格特隐球菌的致病性和防治方面,还可进行致病相关基因鉴定,促进疫苗以及新型抗生素的开发。格特隐球菌的基因组学研究必将在隐球菌病的防治工作中发挥重要作用。

## 参 考 文 献

- [1] Kwon-Chung KJ, Varma A. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? [J]. FEMS Yeast Res, 2006, 6: 574-587.
- [2] Chen SCA, Meyer W, Sorrell TC. *Cryptococcus gattii* Infections [J]. Clin Microbiol Rev, 2014, 27: 980-1024.
- [3] Chen CH, Wang SH, Chen WL, et al. Ocular complications caused by *Cryptococcus gattii* AFLP4/VGI meningitis in an immunocompetent host [J]. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 2016, 58: 85.
- [4] Meyer W. *Cryptococcus gattii* in the age of whole-genome sequencing [J]. Mbio, 2015, 6: e01761-15.
- [5] Bovers M, Hagen F, Kuramae EE, et al. Six monophyletic lineages identified within *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by multi-locus sequence typing [J]. Fungal Genet Biol, 2008, 45: 400-421.
- [6] Kidd SE, Hagen F, Tschärke RL, et al. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada) [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101: 17258-17263.
- [7] Meyer W, Castaneda A, Jackson S, et al. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates [J]. Emerg Infect Dis, 2003, 9: 189-195.
- [8] Trilles L, Lazera M, Wanke B, et al. Genetic characterization of environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex from Brazil [J]. Med Mycol, 2003, 41: 383-390.
- [9] Trilles L, Lazera Mdos S, Wanke B, et al. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil [J]. Mem I Oswaldo Cruz, 2008, 103: 455-462.
- [10] Harris JR, Lockhart SR, Debess E, et al. *Cryptococcus gattii* in the United States: clinical aspects of infection with an emerging pathogen [J]. Clin Infect Dis, 2011, 53: 1188-1195.
- [11] 窦红涛, 万喆, 杨启文, 等. 格特隐球菌在河北地区引起1例脑膜炎的临床与实验研究 [J]. 中国真菌学杂志, 2015, 10: 11-15.
- [12] 金亮, 沈定霞. 格特隐球菌感染的临床特征与实验室研究进展 [J]. 检验医学, 2017, 32: 1065-1069.
- [13] 葛璞, 张凯宇, 马小军, 等. 隐球菌脑膜炎62例临床分析 [J]. 协和医学杂志, 2018, 9: 431-436.
- [14] Velez N, Escandon P. Report on novel environmental niches for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Colombia: *Tabebuia guayacan* and *Roystonea regia* [J]. Med Mycol, 2017, 55: 794-797.
- [15] D'Souza CA, Kronstad JW, Taylor G, et al. Genome variation in *Cryptococcus gattii*, an emerging pathogen of immunocompetent hosts [J]. Mbio, 2011, 2: e00342-10.
- [16] Bovers M, Hagen F, Kuramae EE, et al. Promiscuous mitochondria in *Cryptococcus gattii* [J]. FEMS Yeast Res, 2009, 9: 489-503.
- [17] Ngamskulrungron P, Gilgado F, Faganello J, et al. Genetic diversity of the *Cryptococcus* species complex suggests that *Cryptococcus gattii* deserves to have varieties [J]. PLoS One, 2009, 4: e5862.
- [18] Xu J, Vilgalys R, Mitchell TG. Multiple gene genealogies reveal recent dispersion and hybridization in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* [J]. Mol Ecol, 2000, 9: 1471-1481.
- [19] Gonzalez GM, Casillas-Vega N, Garza-Gonzalez E, et al. Molecular typing of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* species complex from Northeast Mexico [J]. Folia Microbiol, 2016, 61: 51-56.
- [20] Gillece JD, Schupp JM, Balajee SA, et al. Whole genome sequence analysis of *Cryptococcus gattii* from the Pacific Northwest reveals unexpected diversity [J]. PLoS One, 2011, 6: e28550.
- [21] Hagen F, Ceresini PC, Polacheck I, et al. Ancient dispersal of the human fungal pathogen *Cryptococcus gattii* from the Amazon rainforest [J]. PLoS One, 2013, 8: e71148.
- [22] Engelthaler DM, Hicks ND, Gillece JD, et al. *Cryptococcus gattii* in North American Pacific Northwest: Whole-population genome analysis provides insights into species evolution and dispersal [J]. Mbio, 2014, 5: e01464-14.
- [23] Billmyre RB, Croll D, Li WJ, et al. Highly recombinant VGII *Cryptococcus gattii* population develops clonal outbreak clusters through both sexual macroevolution and asexual microevolution [J]. Mbio, 2014, 5: e01494-14.
- [24] Byrnes EJ, Bildfell RJ, Frank SA, et al. Molecular evidence that the range of the Vancouver Island out-break of *Crypto-*

- coccus gattii* infection has expanded into the Pacific Northwest in the United States [J]. *J Infect Dis*, 2009, 199: 1081-1086.
- [25] Hagen F, Colom MF, Swinne D, et al. Autochthonous and dormant *Cryptococcus gattii* infections in Europe [J]. *Emerg Infect Dis*, 2012, 18: 1618-1624.
- [26] Steele KT, Thakur R, Nthobatsang R, et al. In-hospital mortality of HIV-infected cryptococcal meningitis patients with *C. gattii* and *C. neoformans* infection in Gaborone, Botswana [J]. *Med Mycol*, 2010, 48: 1112-1115.
- [27] Carriconde F, Gilgado F, Arthur I, et al. Clonality and alpha-a recombination in the Australian *Cryptococcus gattii* VGII population—an emerging outbreak in Australia [J]. *PLoS One*, 2011, 6: e16936.
- [28] Kronstad JW, Attarian R, Cadieux B, et al. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2011, 9: 193-203.
- [29] Ma H, May RC. Virulence in *Cryptococcus* species [J]. *Adv Appl Microbiol*, 2009, 67: 131-190.
- [30] Kozel TR, Gotschlich EC. The capsule of *Cryptococcus neoformans* passively inhibits phagocytosis of the yeast by macrophages [J]. *J Immunol*, 1982, 129: 1675-1680.
- [31] Tucker SC, Casadevall A. Replication of *Cryptococcus neoformans* in macrophages is accompanied by phagosomal permeabilization and accumulation of vesicles containing polysaccharide in the cytoplasm [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99: 3165-3170.
- [32] Feldmesser M, Kress Y, Novikoff P, et al. *Cryptococcus neoformans* is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection [J]. *Infect Immun*, 2000, 68: 4225-4237.
- [33] Casadevall A, Rosas AL, Nosanchuk JD. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans* [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2000, 3: 354-358.
- [34] Williamson PR. Laccase and melanin in the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans* [J]. *Frontiers Biosci*, 1997, 2: e99-e107.
- [35] van Duin D, Casadevall A, Nosanchuk JD. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and histoplasma capsulatum reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin [J]. *Antimicrob Agents Ch*, 2002, 46: 3394-3400.
- [36] Perfect JR. *Cryptococcus neoformans*: A sugar-coated killer with designer genes [J]. *Fems Immunol Med Mic*, 2005, 45: 395-404.
- [37] Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2000, 13: 122-143.
- [38] Cox GM, McDade HC, Chen SCA, et al. Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans* [J]. *Mol Microbiol*, 2001, 39: 166-175.
- [39] Steenberg JN, Casadevall A. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* [J]. *Microbes Infect*, 2003, 5: 667-675.
- [40] Ganendren R, Carter E, Sorrell T, et al. Phospholipase B activity enhances adhesion of *Cryptococcus neoformans* to a human lung epithelial cell line [J]. *Microbes Infect*, 2006, 8: 1006-1015.
- [41] Santangelo R, Zoellner H, Sorrell T, et al. Role of extracellular phospholipases and mononuclear phagocytes in dissemination of cryptococcosis in a murine model [J]. *Infect Immun*, 2004, 72: 2229-2239.
- [42] Cox GM, Mukherjee J, Cole GT, et al. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis [J]. *Infect Immun*, 2000, 68: 443-448.
- [43] Kwonchung KJ, Bennett JE. Distribution of alpha and a mating types of *Cryptococcus neoformans* among natural and clinical isolates [J]. *Am J Epidemiol*, 1978, 108: 337-340.
- [44] Kwon-Chung KJ, Edman JC, Wickes BL. Genetic association of mating types and virulence in *Cryptococcus neoformans* [J]. *Infect Immun*, 1992, 60: 602-605.
- [45] Karos M, Chang YC, McClelland CM, et al. Mapping of the *Cryptococcus neoformans* MAT alpha locus: Presence of mating type-specific mitogen-activated protein kinase cascade homologs [J]. *J Bacteriol*, 2000, 182: 6222-6227.
- [46] Fraser JA, Heitman J. Evolution of fungal sex chromosomes [J]. *Mol Microbiol*, 2004, 51: 299-306.
- [47] Farrer RA, Desjardins CA, Sakthikumar S, et al. Genome evolution and innovation across the four major lineages of *Cryptococcus gattii* [J]. *Mbio*, 2015, 6: e00868-15.
- [48] Janbon G, Ormerod KL, Paulet D, et al. Analysis of the genome and transcriptome of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* reveals complex RNA expression and microevolution leading to virulence attenuation [J]. *PLoS Genet*, 2014, 10: e1004261.
- [49] Hu G, Wang J, Choi J, et al. Variation in chromosome copy number influences the virulence of *Cryptococcus neoformans* and occurs in isolates from AIDS patients [J]. *BMC Genomics*, 2011, 12: 526.
- [50] Hudson RR. Genetic data analysis: Methods for discrete population genetic data [J]. *Science*, 1990, 250: 575.
- [51] Saikia S, Oliveira D, Hu G, et al. Role of ferric reductases in iron acquisition and virulence in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* [J]. *Infect Immun*, 2014, 82: 839-850.
- [52] Aravind L, Koonin EV. The HORMA domain: a common structural denominator in mitotic checkpoints, chromosome

- synapsis and DNA repair [J]. Trends Biochem Sci, 1998, 23: 284-286.
- [53] van Dijk TB, Gillemans N, Stein C, et al. Friend of Prmt1, a novel chromatin target of protein arginine methyltransferases [J]. Mol cell biol, 2010, 30: 260-272.
- [54] Zhang S, Hacham M, Panepinto J, et al. The Hsp70 member, Ssa1, acts as a DNA-binding transcriptional co-activator of laccase in *Cryptococcus neoformans* [J]. Mol Microbiol, 2006, 62: 1090-1101.
- [55] Janbon G, Maeng S, Yang DH, et al. Characterizing the role of RNA silencing components in *Cryptococcus neoformans* [J]. Fungal Genet Biol, 2010, 47: 1070-1080.
- [56] Wang X, Hsueh YP, Li W, et al. Sex-induced silencing defends the genome of *Cryptococcus neoformans* via RNAi [J]. Gene Dev, 2010, 24: 2566-2582.
- [57] Gao XD, Tachikawa H, Sato T, et al. Alg14 recruits Alg13 to the cytoplasmic face of the endoplasmic reticulum to form a novel bipartite UDP-N-acetylglucosamine transferase required for the second step of N-linked glycosylation [J]. J Biol Chem, 2005, 280: 36254-36262.
- [58] Bochman ML, Sabouri N, Zakian VA. Unwinding the functions of the Pif1 family helicases [J]. DNA Repair, 2010, 9: 237-249.
- [59] Giles SS, Perfect JR, Cox GM. Cytochrome c peroxidase contributes to the antioxidant defense of *Cryptococcus neoformans* [J]. Fungal Genet Biol, 2005, 42: 20-29.
- [60] Breitenbach M, Simon B, Probst G, et al. Enolases are highly conserved fungal allergens [J]. Int Arch Allergy Imm, 1997, 113: 114-117.
- [61] Kawabe M, Okabe Onokubo A, Arimoto Y, et al. GMC oxidoreductase, a highly expressed protein in a potent biocontrol agent *Fusarium oxysporum* Cong: 1-2, is dispensable for biocontrol activity [J]. J Gen Appl Microbiol, 2011, 57: 207-217.
- [62] Sun TS, Ju X, Gao HL, et al. Reciprocal functions of *Cryptococcus neoformans* copper homeostasis machinery during pulmonary infection and meningoencephalitis [J]. Nat Commun, 2014, 5: 5550.
- [63] Burroughs AM, Allen KN, Dunaway-Mariano D, et al. Evolutionary genomics of the HAD superfamily: understanding the structural adaptations and catalytic diversity in a superfamily of phosphoesterases and allied enzymes [J]. J Mol Biol, 2006, 361: 1003-1034.

(收稿日期: 2019-03-14)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 《协和医学杂志》2020年第2期征稿

《协和医学杂志》致力于报道临床工作者广泛关注的最新研究成果,根据综合性医学期刊定位,结合优质学科及学科发展趋势,拟定2020年第2期重点选题为“溶栓-抗栓治疗新进展”,本期执行主编为北京协和医院崔丽英教授。本刊设立述评、专家论坛、指南与共识、论著、争鸣等多个专栏,欢迎大家针对重点选题方向及相应栏目积极踊跃投稿,投稿请注明“溶栓-抗栓治疗新进展征稿”。稿件通过终审后择优发表,目前不收取审稿费、版面费等任何费用。

截稿时间: 2019年11月30日

投稿网址: <http://mjpmch.cbpt.cnki.net>

编辑部地址: 北京市东城区王府井帅府园1号北京协和医院老楼7号楼7-302室

联系电话: 010-69154262

E-mail: [mjpmch@126.com](mailto:mjpmch@126.com); [medj@pumch.cn](mailto:medj@pumch.cn)