شناسائی و کلونینگ ژن ECM33 درآسپرژیلوس نیجر و آنالیز بیان آن

مهدی کریمی[۱]، محمد نوری[۱]، یدالله امیدی[۱]، صفر فرج نیا[۲]، محمد عزیزی[۳] ، وحید خلج[*۳]

[۱] مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی داروئی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران [۲]مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

[۳] بخش بیوتکنولوژی پزشکی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۸۷/۳/۱۳ ، تاریخ پذیرش: ۸۷/۵/۱۲

Identification, cloning and expression analysis of ECM33 gene in *Aspergillus niger*

Karimi M.[1], Nouri M.[1], Omidi Y.[1], Farajnia S.[2], Azizi M.[3], Khalaj V.[3]

[1]Research Center for Pharmaceutical Nanotechnology, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran. [2]Drug applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran, [3] Biotechnology Department, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Received: 2 Apr. 2008, Accepted: 2 Aug. 2008

Objectives: ECM33 gene encodes a protein which belongs to a large group of GPI-anchored protein family. Although the precise molecular function of this protein is unknown, several studies have demonstrated an important role in fungal cell wall integrity and virulence. The aim of this study was to identify and clone ECM33 gene in *Aspergillus niger*. Also the expressional analysis of the gene was carried out. **Methods**: The complete genomic sequence of ECM33 gene along with 5' and 3' flanking regions has been identified in *Aspergillus niger* by means of bioinformatics and using ECM33 gene of *A. fumigatus* as template. The genomic fragment was PCR-amplified using specific primers and subsequently was cloned. The expression analysis was performed by RT-PCR. **Results**: The *Aspergillus niger* ECM33 gene containing 1327 bp was cloned as a 5.2 kb fragment. Bioinformatic analysis predicted the presence of two introns which was confirmed experimentally. The gene product is a 397 amino acids protein with approximately 70% identity to the homologue proteins from other aspergilli. Expression analysis of ECM33 under different growth conditions including different temperatures, different carbon sources, and different nitrogen sources confirmed a constitutive expression. **Conclusion**: This is the first report on characterization of ECM33 gene in an industrially *important* fungus, *Aspergillus niger*. The cloned fragment will be used in construction of gene disruption cassette which will be subsequently applied in gene knock out experiments.

Keywords: *Aspergillus niger, glycosylate phosphatidyl inositol (GPI), ECM33 gene, Cell wall.*

زمینه و هدف : ژن ECM33 ، پروتینی ازخانواده بزرگglycosyl phosphatidyl inositol-anchored proteins (GPI) را کد می کند. اگرچه هنوز نقش دقیق پروتئین ECM33 مشخص نشده است ولی مطالعات نشان می دهد که این پروتئین نقش مهمی در حفظ یکپارچگی دیواره سلولی و ویرولانس قارچ دارد. هدف از این مطالعه شناسائی و کلون نمودن ژن ECM33 از قارچ آسپرژیلوس نیجر و همچنین بررسی نحوه بیان آن درحین رشد این قارچ بوده است. **روش ها:** ابتدا توالی کامل ژنECM33 آسپرژیلوس نیجر به همراه توالی نواحی کناری آن با استفاده از روشهای بیوانفورماتیکی و با مقایسه با ژن ECM33 آسپرژیلوس فومیگاتوس به عنوان الگو، بدست آمد ومتعاقباً با طراحی پرایمر های اختصاصی و PCR قطعه ژنومی تکثیر و کلون گردید. بیان ژن ECM33 آسپرژیلوس نیجر با استفاده از ر وش RT-PCR مورد آنالیز قرار گرفت .**یافته ها**: ژن ECM33 بطولbp ۱۳۲۷ همراه با نواحی کناری آن به شکل یک قطعه ۵/۲ کیلو بازی کلون شد. آنالیز توالی ژنومی وجود دو اینترون در این ژن را پیش گوئی نمود که بطور تجربی تأئید شدند. پروتئین حاصل از بیان این ژن حاوی ۳۹۷ اسید آمینه با یکسانی حدود ۷۰ درصد با پروتئین هم خانواده در گونه های دیگر آسپرژیلوس، می باشد در این بررسی ها نشان داده شد که ژن مذکور در شرایط مختلف از جمله شرایط دمایی گوناگون، منابع کربنی مختلف وهمچنین منابع مختلف نیتروژن بطور مداوم بیان می گردد. **نتیجه گیری**: این مطالعه اولین مطالعه در تعیین خصوصیات ژن ECM33 در قارچ صنعتی آسپرژیلوس نیجر می باشد. قطعه ژنومی کلون شده در این مطالعه در تهیه سازه ژنی که در آزمایشات gene knock out کاربرد دارد، استفاده خواهد شد..

واژه های کلیدی: *آسپرژیلوس نیجر، گلیکوزیل فسفاتیدیل اینوزیتول (GPI) ، ژن ECM33 ، دیواره سلولی،*

*نویسنده مسئول: وحید خلج، استادیار، بخش بیو تکنولوژی پزشکی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران تلفن: ۰۲۱،۰۹۱۲۳۱۶۵۹٤۵-٦٦٤٨۰۷۸۰، نمابر: ۰۲۱- ٦٦٤٨۰۷۸۰

**Corresponding Author: Vahid Khalaj, Assistant Professor, Biotechnology Department, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran. Tel: +98-21-66480780, +98-9123165945; Fax: +98-12-66480780, Email: khalajs@pasteur.ac.ir*

Archive of SID

www.SID.ir

۱- مقدمه

آسپرژیلوس نیجر یکی از قارچهای رشته ای بسیار مهم در فناوری زیستی بشمار می آید. از آنجایی که سیستم های انتقال و بیان ژن در این قارچ به خوبی شناخته شده است، ابزار لازم برای تولید پروتئین های نوترکیب در این ارگانیسم نیز در دسترس می باشد(۱). از آسپرژیلوس نیجر برای تولید محصولات مهمی نظیر اسید های آلی (اسید سیتریک) (۲) و پروتئین های نوترکیب یا غیر نوترکیب (سلولاز، همی سلولاز، پروتئازو فیتاز)استفاده می شود (۳)و احتمالاً در آینده سهم عمده ای در تولید محصولاتی مانند فروکتوفورانوزیداز، منگنز پراکسیداز (MNP)، متالوپروتئین ها و گزیلاناز خواهد داشت(٦-٤) .استراتژی های مختلفی در بهبود فرایند تولید و ترشح پروتئینهای نوترکیب در قارچها بکار رفته که از آن جمله می توان به اتصال ژن مورد نظر با ژنهای رمز کننده پروتئینهای ترشحی قارچ (فیوژن)، بکار گیری پرموتورهای قوی قارچی و سیگنالهای ترشحی کارآمد ، بیان همزمان چپرونها و استفاده از سویه های جهش یافته اشاره نمود(۱۰-۷). مطالعات متعدد ارتباط تنگاتنگ ترشح پروتئین و بسط دیواره سلولی را به اثبات رسانده است. توقف ترشح پروتئین با استفاده از مهار کننده های مختلف موجب مهار ساخت دیواره سلولی می شود. از طرفی سویه های جهش یافته ای که در آنها ساخت دیواره سلولی مختل بوده است، میزان بالاتری از ترشح پروتئین را نشان داده اند (۱۱). از این رو دیواره سلولی به عنوان سدی در مقابل ترشح مطرح بوده و این احتمال وجود دارد که تضعیف دیواره بر میزان ترشح پروتئین تأ ثیر گذارباشد.

تمامیت و یکپارچگی دیواره سلولی قارچها مدیون وجود سه نوع ساختار پلی ساکاریدی عمده یعنی گلوکان ها، مانو پروتئینها و کیتین می باشد. در این بین مانوپروتئینها حدود ٤٠ درصد وزن خشک را تشکیل داده که بعضاً در بین شبکه کیتین و گلوکان جای می گیرند. بخشی از این مانوپروتئینها بواسطه گلیکوزیل فسفاتیدیل اینوزیتول (GPI) به غشاء پلاسمائی و یا به گلوکان متصل شده که از این روبه آنها GPI-anchored می گویند(۱۲).

ECM33 یکی ازپروتینهای متعلق به خانواده بزرگ glycosyl phosphatidyl inositol-anchored proteins (GPI-proteins) می باشد که در سازماندهی دیواره نقش ایفاء می نماید. حذف این ژن در آسپرژیلوس فومیگاتوس منجر به تغییرات ضخامت دیواره، افزایش ویرولانس و افزایش مقاومت داروئی شده است(۱۳،۱٤).

در تحقیق حاضر به شناسائی و کلونینگ ژن ECM33 در آسپرژیلوس نیجر پرداخته شده است که گام اول در ساخت سازه های ژنی جهت حذف این ژن می باشد. همچنین جهت تائید بیان این ژن در قارچ ، RNA بدست آمده از این سویه در شرایط مختلف کشت با استفاده از روش RT-PCR مورد بررسی قرار گرفته است.

۲- مواد وروشها

۲-۱: آنالیزهای بیوانفورماتیکی

جهت شناسائی ژن ECM33 در آسپرژیلوس نیجر، ابتدا توالی پروتئین ECM33 آسپرژیلوس فومیگاتوس از سایت NCBI (AFUA_4G06820) بدست آمد. توالی بدست آمده سپس با استفاده از نرم افزار blast p و در سایت http://genome.jgi-psf.org در مقابل کانتیگ های در دسترس Aspergillus niger مقایسه شد و بالاترین تطابق برای تجزیه وتحلیل بیشتر انتخاب گردید. بررسی ساختار پروتئین و پیش بینی موتیف های مختلف نیز با استفاده از نرم افزارهای غیر online (نظیر Gene Runner)و یا online که در متن به آنها اشاره شده است انجام گرفت.

۲-۲: پلاسمیدها و سوشها

آسپرژیلوس نیجر N402 (هدیه از طرف Geoff Robson، دانشگاه منچستر، انگلستان) برای جداکردن ژن ECM33 مورد استفاده قرارگرفت. سلولهای اشریشیا کلی (Invitrogen)TOP10 به عنوان میزبان پلاسمیدهای نوترکیب در مراحل کلونینگ استفاده شد. وکتور pGEM-(Promega) TEasy برای کلون کردن محصولات PCR استفاده شد. استخراج پلاسمید ها با استفاده از کیت تخلیص پلاسمید QIAGEN mini prep و تخلیص محصولات PCR با استفاده از کیت تجاری QIAGEN gel extraction انجام پذیرفت.

۲-۳: شرایط کشت و رشد

جهت جمع آوری اسپور سویه قارچی، قارچ مورد نظر بر روی محیط غنی SAB (سابورو دکستروز) آگار به مدت ٥-٤ روز در دمای ۳۰ درجه کشت داده شده و پس از اسپور زائی ، اسپورها به آرامی با استفاده از محلول۰/۱٪ PBS-Tween(20) جمع آوری شدند. برای تهیه توده زیستی از سویه مورد نظردر این تحقیق ، تعداد ۱×۱۰^{٦} اسپور (غلظت نهایی) در ۵۰ میلی لیتر محیط کشت مایع SAB و محیط اصلاح شده Vogel (۱۵) تلقیح و بسته به شرایط ازمایش در دماهای ۳۷،۳۰ و٤۲ درجه سانتیگراد با دور ۲۵۰rpm در دقیقه به مدت ۲٤-۱٦ ساعت رشد داده شدند.

۲-٤: استخراج DNA ژنومی

Archive of SID

www.SID.ir

نمونه های DNA قارچی براساس روش مولر استخراج گردید (۱۶). روشهای مولکولی برای هضم آنزیمی، متصل کردن قطعات DNA و ترانسفورماسیون در E. coli براساس روشهای تعریف شده، انجام گردید (۱۷).

۵-۲: کلون کردن ژن ECM33

قطعه ژنومی حاوی ژن ECM33 به همراه نواحی جانبی آن (حدوداً ۵ kb)با استفاده از پرایمر بالادست ECM_f2 و پرایمر پائین دست ECM_r2 و DNA ژنومی آسپرژیلوس نیجر به عنوان الگو تکثیر شد. با توجه به طول محصول (۵ kb) ، PCR مطابق شرایط توصیه شده در کیت Long PCR enzyme mix(Fermentas) و طی سیکل های حرارتی زیر انجام گرفت:^{o}C ۹۵ ،۲ دقیقه یک سیکل، ^{o}C ۹۵ ، ۲۰ ثانیه، ^{o}C ۵۸ ، ۳۰ ثانیه، ^{o}C ٦٨ ، ٤ دقیقه در ۱۰ سیکل و سپس ۲۵ سیکل از ^{o}C ۹۵ ، ۲۰ ثانیه، ^{o}C ۵۸ ، ۳۰ ثانیه، ^{o}C ٦٨ ، ٤ دقیقه با افزایش ۱۰ ثانیه به مرحله طویل شدن در هر سیکل . محصول PCR پس از تخلیص در وکتور pGEM-TEasy کلون شد و پلاسمید نوترکیب حاصل pGEM-ECM33 نام گرفت . برای تأیید ژن کلون شده از روش هضم آنزیمی و PCR با پرایمرهای داخل ژنی ECM_f1 و ECM_r1 و نهایتاً تعیین توالی(DNA sequencing) استفاده گردید.

٦-۲: آنالیز بیان ژن

برای آنالیز بیان ژن ECM33، سویه آسپرژیلوس نیجر(N402) در محیط کشت مایع غنی (SAB) و همچنین محیط حداقل Vogel واجد منابع متفاوت کربن (از قبیل گلوکز و مالتوز) و نیتروژن(نیترات آمونیوم و سولفات آمونیوم)و در شرایط متفاوت دمایی (۳۷،۳۰و۴۲ درجه سانتیگراد) رشد داده شد. پس از رشد سویه در هر یک از شرایط مورد مطالعه (٢٤-١٦ ساعت) توده ی زیستی قارچ جمع آوری و ۱۰۰ میلی گرم از آن با استفاده از ازت مایع و در هاون چینی خرد و بصورت پودر در آمد. سپس RNA تام با استفاده از کیت RNeasy Mini Protocol (Qiagen) استخراج گردید. جهت تهیه cDNA یک میکروگرم از RNA در واکنش ساخت cDNA مطابق دستورالعمل کیت (First strand cDNA synthesis:Fermentas). بکار گرفته شد. با توجه به وجود دو اینترون بالقوه در توالی ژن مورد مطالعه دو زوج پرایمر به نحوی طراحی شدند که باند حاصل از PCR آنها بر روی cDNA و DNA از لحاظ اندازه قابل تفکیک باشد . این پرایمر ها به ترتیب ECM_rt1، ECM_rt2 و ECM_rt3 ، ECM_rt4 نام گرفتند. سیکل های حرارتی برای انجام این PCR بدین ترتیب بود: ^{o}C ۹۵ ،۵ دقیقه یک سیکل، ^{o}C ۹۵ ، ۱دقیقه، ^{o}C ۵۸ ، ۳۰ ثانیه، ^{o}C ۷۲ ، ٤٥ ثانیه در ۳۰ سیکل. توالی پرایمر های مورد استفاده در این تحقیق درجدول ۱ آورده شده است. همچنین شکل ۱ نمای شماتیک قطعه ژنومی و موقعیت پرایمر های مورد استفاده را به تصویر کشیده است.

۳-نتایج

در مقایسه توالی پروتئینی ECM33 آسپرژیلوس فومیگاتوس به عنوان الگو در مقابل توالی ژنومی آسپرژیلوس نیجر(با استفاده از نرم افزار blast) ، یک تطابق بسیار بالا (e^{-143}) معادل با اسکافولد (scaffold) ۱۳ (بطول۱۲۱۷۵۵۰bp)، کانتیگ (contig)۵ (۱۱٦۱۵۵bp) شناسائی گردید. توالی DNA کانتیگ استخراج و توالی ژن ECM33 شناسائی و ژن مذکور Aniecm33 نام گرفت. پرایمر های ECM_f2 و ECM_r2 قطعه حدوداًkb ۵/۲ را تکثیر می کنند (شکل ۲).

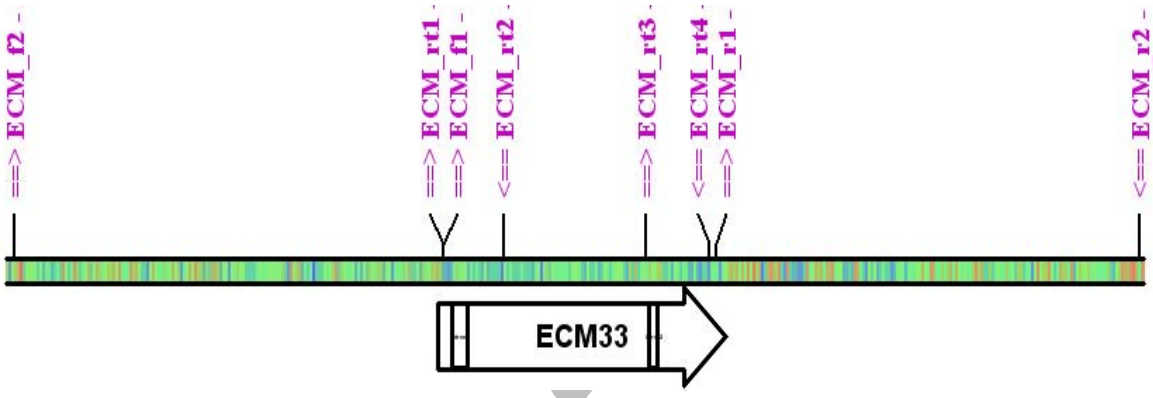
پس از کلون نمودن این قطعه در پلاسمید pGEM-Teasy جهت تائید صحت قطعه از چندین روش استفاده شد. آنچنانکه در شکل شماتیک ۳ ملاحظه می شود قطعه کلون شده حاوی دو جایگاه برش برای آنزیم XhoI ودو جایگاه برش برای آنزیم EcoRI می باشد. بنابر این در برش با آنزیم XhoI دو قطعه حدوداً kb ٦/٦ و ۱/۷ قابل انتظار است که در شکل۳ ملاحظه می گردد. همچنین با وجود دو جایگاه برش EcoRI بر روی قطعه ECM33 و دو جایگاه بر روی پلاسمید pGEM-Teasy (مجموعاً ٤ جایگاه) سه قطعه تقریبیkb ٤/٤ ، ۳ و ۰/۸ قابل انتظار است که در شکل ۳ قابل مشاهده می باشد. علاوه بر این PCR با استفاده از پرایمر های ECM_f1 و ECM_r1 بر روی قطعه کلون شده فوق منجر به تکثیر اختصاصی ژن ECM33 با اندازه kb ۱/۳ شد (شکل ٤). همچنین تعیین توالی قطعهkb ۱/۳ صحت قطعه ECM33 را تائید نمود.

آنالیز توالی DNA ژن Aniecm33 و مقایسه قالب های قرائت مختلف حاصل از ترجمه DNA (با استفاده از نرم افزار Gene Runner) با توالی اسید آمینه ای پروتئین مشابه در آسپرژیلوس فومیگاتوس احتمال وجود دو اینترون بالقوه را مطرح ساخت. وجود اینترون ها به شکل تجربی و با طراحی پرایمر های اختصاصی تائید گردید. در این خصوص RNA حاصل از کشت ١٦ ساعته آسپرژیلوس نیجر در محیط مایع SAB با روش RT-PCR مورد آنالیز قرار گرفت. پرایمر های ECM_rt1 و ECM_rt2 در تکثیر DNA ژنومی ، قطعه ای با اندازه bp ۳۲۰ را بوجود می آورند در حالیکه در صورت وجود اینترون اندازه محصول RT-PCR (

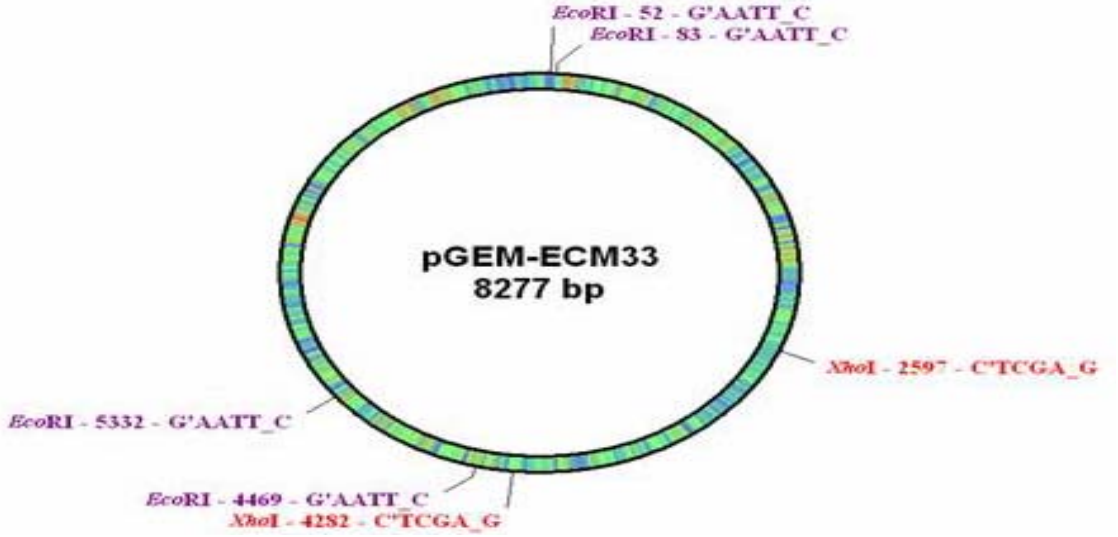
Archive of SID

www.SID.ir

تکثیر قطعه cDNA) به۲۵۵ bp تنزل می یابد. همچنین پرایمر های ECM_rt3 و ECM_rt4 که جهت کنترل دومین اینترون طراحی شدند ، در تکثیر DNA ژنومی قطعه ای به اندازه ۳۳۱ bp و در RT-PCR (تکثیر cDNA) قطعه ای به طول ۲۷۷ bp را بوجود می آورند. شکل ۵ صحت ادعای فوق را نشان می دهد. با استفاده از همین دو زوج پرایمر، RNA حاصل از کشت قارچ در محیط حداقل وگل و در دماهای مختلف نشان داد که ژن مذکور آنچنانکه در مورد ژن مشابه در آسپرژیلوس فومیگاتوس دیده می شود، بطور دائم بیان می گردد (شکل ٦ را ملاحظه نمائید).

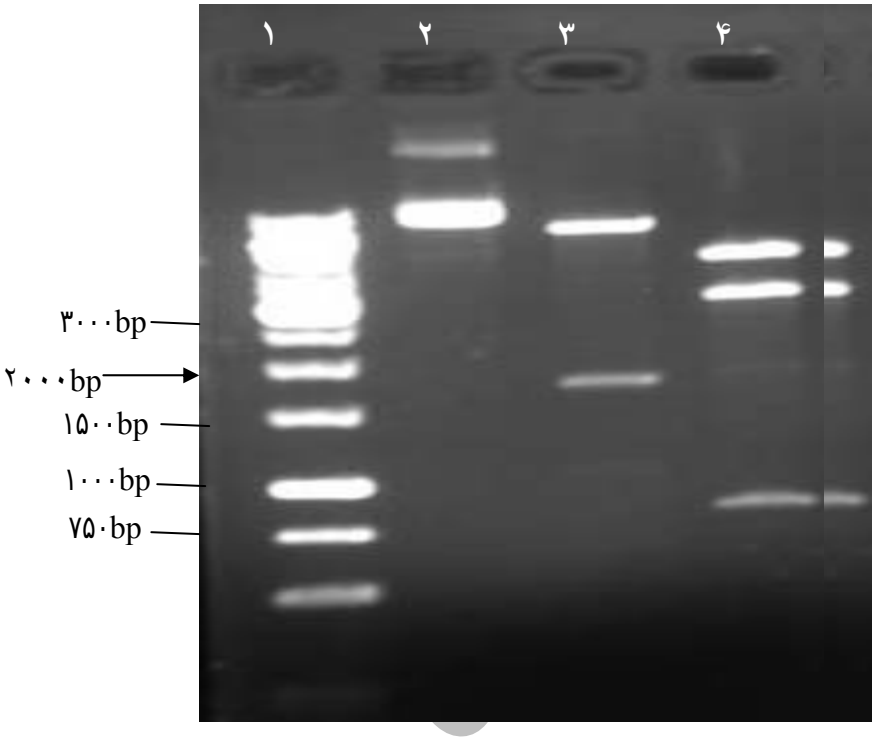


شکل ۱. نمای شماتیک قطعهkb ۵/۲ حاوی ژن ECM33 . جایگاه پرایمرهای مورداستفاده در این تحقیق مشخص گردیده است. ژن ECM33 به صورت یک پیکان توخالی و ضخیم نشان داده شده است. جایگاه دو اینترون با مستطیل های توخالی درون پیکان مشخص شده است.



شکل ۲. شکل شماتیک از قطعه kb ۵ حاوی ژن ECM33 آسپرژیلوس نیجر کلون شده در وکتورpGEM-T Easy .

www.SID.ir



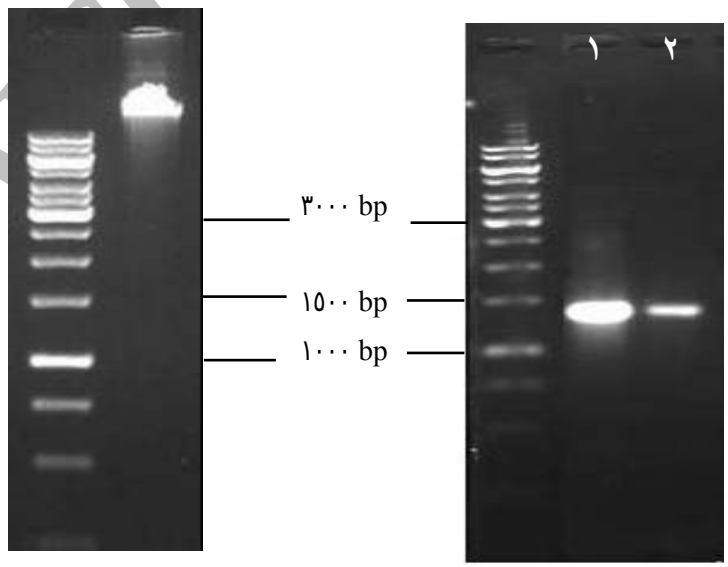
شکل ۳. تائید صحت قطعه ژنومی ECM33 با استفاده از نقشه برش آنزیمی : با وجود جایگاه های برش EcoRI و XhoI قطعات مورد انتظار مشاهده می شود.

۱-مارکر DNA

۲-پلاسمید هضم نشده pGEM-ECM33

۳-پلاسمید هضم شده توسط XhoI (دو قطعه به ترتیب ۱/۷kbو۶/۶)

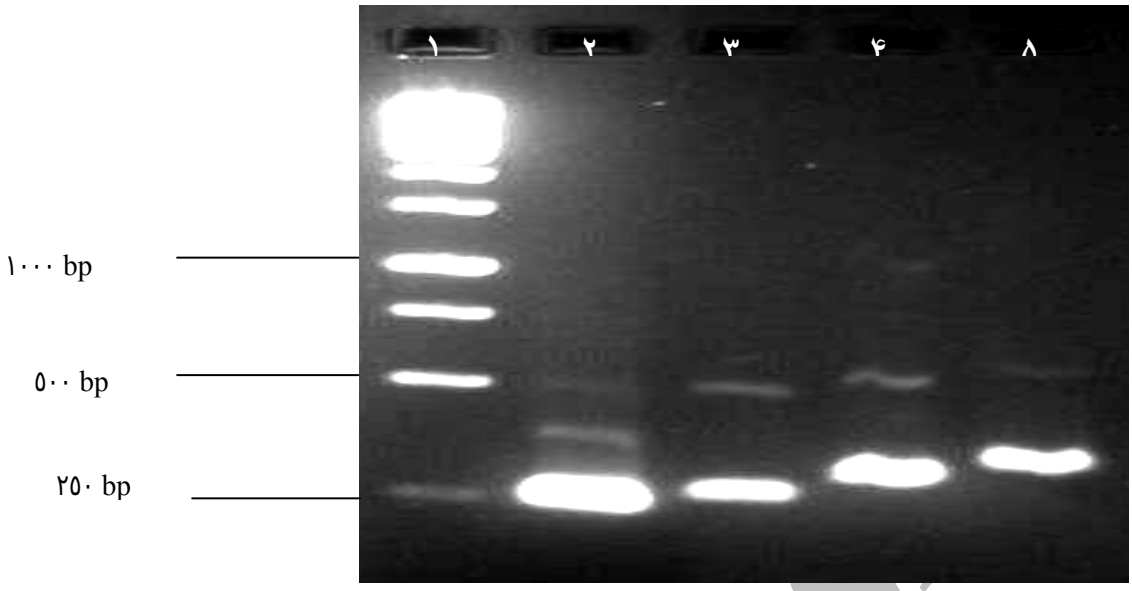
٤-پلاسمید هضم شده توسط EcoRI (سه قطعه به ترتیبkb ۰/۸ ،۳ و ٤/٤)



شکل٤. A :DNA ژنومی آسپرژیلوس نیجر در کنار ماکر DNA و B: محصول PCR با پرایمر های ECM_f1 و ECM_r1 بر روی پلاسمید pGEM-ECM33 (۱) و DNA ژنومی (۲)

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۵. آنالیز بیان ژن ECM33 در آسپرژیلوس نیجر. سویه مورد آزمایش بمدت ١٦ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد و در محیط مایع SAB با دور ۲۵۰ rpm رشد داده شده است.

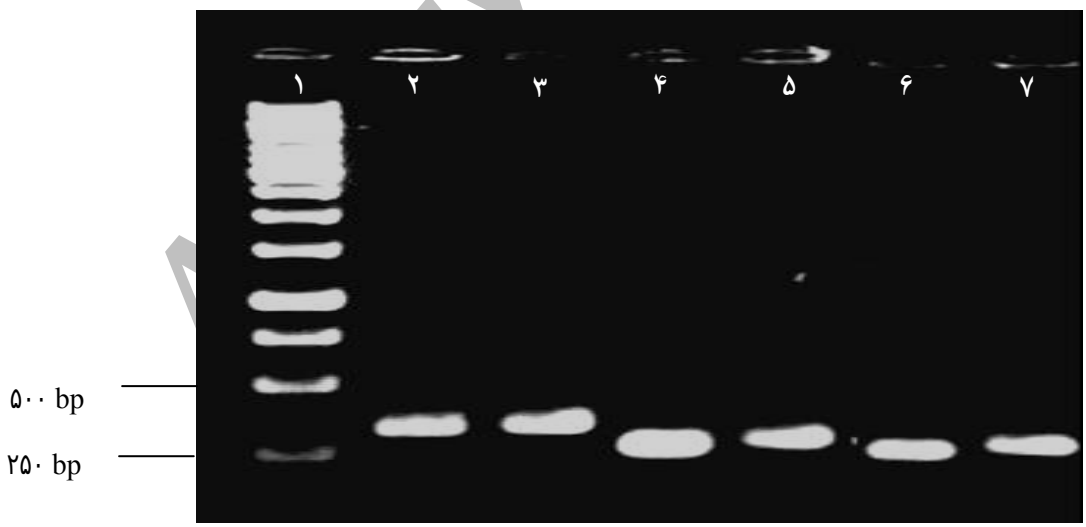
۱- مارکر DNA

۲-محصول RT-PCR با استفاده از پرایمرهای ECM_rt1 و ECM_rt2(۲۵۵bp)

۳-محصول RT-PCR با استفاده از پرایمرهای ECM_rt3 و ECM_rt4 (۲۷۷ bp)

٤-محصول PCR بر روی Genomic DNA با پرایمرهای ECM_rt1 و ECM_rt2 (۳۲۰ bp)

۵-محصول PCR بر روی Genomic DNA با پرایمرهای ECM_rt3 و ECM_rt4 (۳۳۱bp)



شکل ٦. نمونه ای از آنالیز بیان Aniecm33 در شرایط مختلف.

۱-مارکر DNA

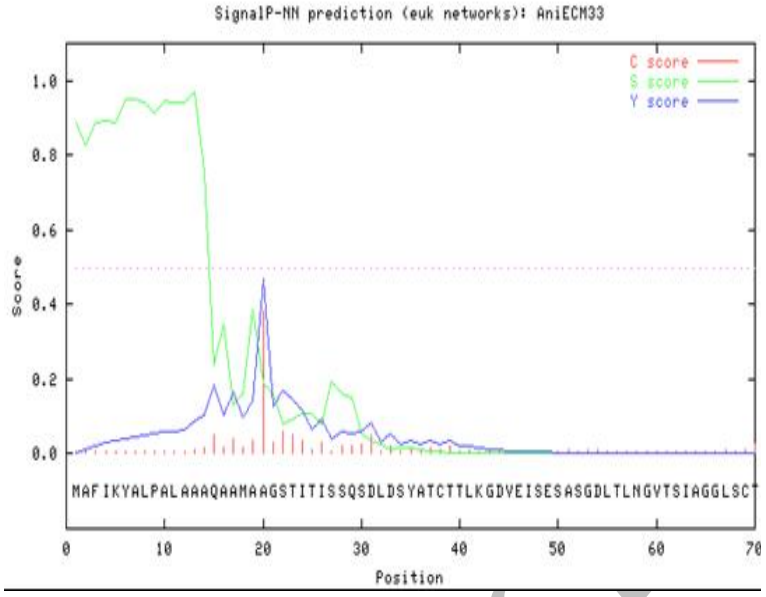
۲و۳-محصول PCR بر روی DNA ژنومی با استفاده از پرایمر های (ECM_rt1 ، ECM_rt2) و (ECM_rt3 ، ECM_rt4)

٤و۵-محصول RT-PCR بر روی RNA حاصل از کشت قارچ در محیط حداقل وگل در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد

٦و۷- محصول RT-PCR بر روی RNA حاصل از کشت قارچ در محیط حداقل وگل در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد

Archive of SID

www.SID.ir



شكل ۷. پيش بيني توالي پپتيد نشانه و محل برش آن از پروتئين. برش بين دو اسيد آمينه ۱۹ و ۲۰ مي باشد

جدول۱. توالي پرايمرهاي مورد استفاده در اين تحقيق

پرايمر	توالي پرايمر
ECM_f1	5´- ATGGCTTTCATCAAATACGCCC-3´
ECM_r1	5´- TGGCTAACATGCCCGCTCTT-3´
ECM_f2	5´- TCACGGTAGTGCCACAGAAT -3´
ECM_r2	5´- CCAGAAGGGGAAATGAAAACAG -3´
ECM_rt1	5´- TGGCTTTCATCAAATACGCC-3´
ECM_rt2	5´- GGAGCTGAACGAGGTGATGT-3´
ECM_rt3	5´- CATTGACTTCAGCGGTGACT-3´
ECM_rt4	5´- ATGTTAGCCACGTTCATGACG-3´

٤-بحث

ژن ECM33 در آسپرژيلوس نيجر (Aniecm33) از ۱۳۲۷ نوكلئوتيد تشكيل شده است كه حاوي دو اينترون و سه اگزون مي باشد. موقعيت اولين اينترون از نوكلئوتيد ٦١ تا ۱۲۷ (٦٥ نوكلئوتيد) و دومين اينترون از نوكلئوتيد ۹٦۹ تا ۱۰۲۳ (٥٤ نوكلئوتيد) مي باشد. محصول اين ژن يك پروتئين ٤۰۰ اسيد آمينه اي با وزن مولكولي محاسبه شده حدوداً ٤۰ كيلو دالتون (بدون احتساب ريشه هاي قندي) است . مقايسه توالي پروتئين ECM33 در آسپرژيلوس نيجر با پروتئين مشابه در ساير آسپرژيلوس ها ، يكساني ٦۹% (در ۳۱۸ اسيد آمينه) با آسپرژيلوس فوميگاتوس، يكساني ٦٥% (در۳٤٤ اسيد آمينه) با آسپرژيلوس نيدولانس و يكساني ۷۰% (در ۳۲۰ اسيد آمينه) با آسپرژيلوس ترئوس را نشان مي دهد. اخيراً با پايان يافتن پروژه تعيين توالي آسپرژيلوس نيجر CBS 513.88 پروتئين مذكور باشناسه A2QHW0_ASPNG درسايت http://www.expasy.org/uniprot/A2QHW0 وارد شده است. آناليز توالي پروتئين از جهت يافتن پپتيد نشانه (signal peptide) و محل برش آن با استفاده از نرم افزار signalp3.0 در سايت (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) نشان دهنده

Archive of SID

www.SID.ir

وجود پپتيد نشانه از اسيد آمينه ۱ الي ۱۹ بوده كه محل شكسته شدن آن از پروتئين بالغ در بين دو اسيد آمينه ۱۹ و ۲۰ (Ala-Ala) مي باشد (شكل ۷). موقعيت پپتيد نشانه و محل جدائي آن دقيقاً شبيه پروتئين ECM33 در آسپرژيلوس فوميگاتوس مي باشد. بررسي پروتئين از لحاظ وضعيت گليكوزيله شدن با استفاده از نرم افزاز Gene Runner(3.05) وجود ۹ اسيد آمينه به عنو ان مكانهاي بالقوه گليكوزيله شدن از نوع N را تأئيد نمود. نتايج حاصل از بررسي بيان اين ژن در شرايط مختلف نشان دهنده بيان مداوم آن نظير آنچه كه در مورد ژن ECM33 آسپرژيلوس فوميگاتوس ديده شده است (۱۳) مي باشد. اين امر نشان دهنده نقشي كليدي اين ژن در سلول بوده هر چند كه حذف آن در آسپرژيلوس فوميگاتوس موجب مرگ سلول نشده است. تغييرات ديواره سلولي اسپور از جمله تغيير ضخامت و نامنظم شدن آن و همچنين بزرگتر شدن اندازه اسپور (كه مانع از بين بردن آن توسط سلول هاي دفاعي مي شود) و افزايش مقاومت به تركيبات مختل كننده ديواره نظير كنگوي قرمز و يا داروهاي ضد قارچ نظير كسپوفانجين و همچنين آنتي يوتيك هايگرومايسين بيانگر اهميت ساختار ديواره در ويرولانس بوده و بررسي اين پروتئين در گونه هاي مقاوم به دارو ممكن است رهگشا باشد(۱۳). نكته جالب آنكه حذف عملكرد اين ژن در قارچ مخمري ساكارومايسس، تأثير متفاوتي در مقاومت داروئي داشته چرا كه عليرغم آنچه كه در مورد قارچ رشته اي آسپرژيلوس فوميگاتوس ديده شده است، فقدان اين ژن افزايش حساسيت ارگانيسم به تركيبات فوق شده را سبب گشته است(۱۲). همچنين حذف عملكرد اين ژن در سويه مخمري پاتوژن كانديدا آلبيكنس موجب تضعيف بيماريزائي آن شده است (۱۸). اين مشاهدات نشاندهنده اثرات متفاوت مكانيسم هاي جبراني در حفظ ديواره سلولي و همچنين تفاوت مكانيسم هاي بيماريزائي در قارچهاي پاتوژن مي باشد.

در حال حاضر گزارشي مبني بر نقش ECM33 در ترشح پروتئين به خارج از سلول در دسترس نيست، هر چند كه افزايش نشت پروتئينهاي متصل به ۱و٦ بتا گلوكان به خارج از سلول و همچنين نقص در روند گليكوزيله شدن از نوع N در سويه مخمري فاقد اين ژن گزارش شده است (۱۲). آنچنانكه در مقدمه نيز ذكر شد ديواره سلولي به عنوان سدي در برابر ترشح بوده و ترشح پروتئين ها صرفاً از ناحيه رأسي ميسليوم كه در آن ديواره سلولي ظريف تر مي باشد، انجام مي گيرد(۱۹). حذف اين ژن و بررسي ميزان ترشح پروتئين هاي ترشحي مدل نظير گلوكوآميلاز درآسپرژيلوس نيجر مي تواند در روشن نمودن اثر احتمالي اين پروتئين ديواره اي در ترشح كمک نمايد كه شناسائي توالي اين ژن در آسپرژيلوس نيجر و كلون نمودن آن بعنوان اولين قدم در اين راه بوده است.

۵- تشكر و قدرداني

اين تحقيق با حمايت مالي مركز تحقيقات نانو بيوتكنولوژي داروئي دانشگاه علوم پزشكي تبريز و انستيتو پاستور ايران به انجام رسيده است كه بدين وسيله از دو مركز فوق قدرداني مي شود.

References

1. Punt P.J., van Biezen N., Conesa A., Albers A., Mangnus, J. , van den Hondel C. Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production, Trends in Biotechnology, 2002, 20(5): 200-206.
2. Magnuson, J.L., LL. Organic Acid Production by Filamentous Fungi, In Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Agriculture, and Medicine (Ed. Lange, J.L., L) Kluwer Academic/Plenum Publication, 2004, 307-333.
3. van den Hombergh J.P., van de Vondervoort P.J., Fraissinet-Tachet L., Visser J. Aspergillus as a host for heterologous protein production: the problem of proteases, Trends in Biotechnology, 1997, 15(7): 256-263.
4. Conesa A., Jeenes D., Archer D.B., van den Honde, C.A., Punt P.J. Calnexin overexpression increases manganese peroxidase production in Aspergillus niger, Applied and Environmental Biotechnology, 2002, 68(2): 846-851.
5. Conesa A., Punt P.J., van den Hondel C.A. Fungal peroxidases: molecular aspects and applications, Journal of Biotechnology, 2002, 93(2): 143-158.
6. Te'o V.S., Cziferszky A.E., Bergquist P.L., Nevalainen K.M. Codon optimization of xylanase gene xynB from the thermophilic bacterium Dictyoglomus thermophilum for expression in the filamentous fungus Trichoderma reesei, FEMS Microbiology Letters, 2000, 190(1): 13-19.
7. Archer D.B., Jeenes D.J., Mackenzie D.A. Strategies for improving heterologous protein production from filamentous fungi, Antonie Van Leeuwenhoek, 1994, 65(3): 245-250.
8. Valkonen M., Ward M., Wang H., Penttila M., Saloheimo M. Improvement of foreign-protein production in Aspergillus niger var. awamori by constitutive induction of the

Archive of SID

www.SID.ir

unfolded-protein response, Applied and Environmental Biotechnology, 2003, 69(12): 6979-6986.
9. Gouka R.J., Punt P.J., van den Hondel C.A. Glucoamylase gene fusions alleviate limitations for protein production in Aspergillus awamori at the transcriptional and (post) translational levels, Applied and Environmental Biotechnology, 1997, 63(2): 488-497.
10. Gouka R.J., Punt P.J., van den Hondel C.A. Efficient production of secreted proteins by Aspergillus: progress, limitations and prospects, Applied and Environmental Biotechnology, 1997, 47(1): 1-11.
11. Peberdy J.F. Protein secretion in filamentous fungi--trying to understand a highly productive black box, Trends in Biotechnology, 1994, 12(2): 50-57.
12. Pardo M., Monteoliva L., Vazquez P. Martinez R., Molero G., Nombela C., Gil C. PST1 and ECM33 encode two yeast cell surface GPI proteins important for cell wall integrity, Microbiology, 2004, 150(12): 4157-4170.
13. Romano J., Nimrod G., Ben-Tal N., Shadkchan Y., Baruch K., Sharon H., Osherov N. Disruption of the Aspergillus fumigatus ECM33 homologue results in rapid conidial germination, antifungal resistance and hypervirulence, Microbiology, 2006, 152(7): 1919-1928.
14. Chabane S., Sarfati J., Ibrahim-Granet O., Du C., Schmidt C., Mouyna I.,Prevost M. C., Calderone R., Latge J. P. Glycosylphosphatidylinositol-anchored Ecm33p influences conidial cell wall biosynthesis in Aspergillus fumigatus, Applied and Environmental Biotechnology, 2006, 72(5): 3259-3267.
15. Vogel H.J. A convenient growth medium for *Nerospora* (medium N), Micrbiology and genetics bullten, 1956, 13: 42-44.
16. Moller E.M., Bahnweg G., Sandermann H, Geiger H.H. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues, Nucleic Acids Research, 1992, 20(22): 6115-6116.
17. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis, T. (eds.) Molecular cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
18. Martinez-Lopez R., Park H., Myers C.L., Gil C., Filler S.G. Candida albicans Ecm33p is important for normal cell wall architecture and interactions with host cells, Eukaryotic Cell, 2006, 5(1): 140-147.
19. Robson G.D. Hyphal cell biology, In *Molecular fungal biology*, (Ed. oliver R.P., Schweizer M.), 1999, 164-184.

Archive of SID

www.SID.ir