

## جداسازی، توالی‌یابی و بررسی عناصر تنظیمی ناحیه پروموتوری ژن C3 در ماهی قزل‌آلا



علی محمد احدی\*، سمیه خاتمی و هدا آیت

شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، دانشکده علوم پایه، گروه ژنتیک

تاریخ دریافت: ۹۵/۵/۱ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۱

### چکیده

سیستم کمپلمان از اجزاء اصلی سیستم دفاعی بدن بسیاری از موجودات می‌باشد. وجود این سیستم در موجودات متعددی تأیید شده است اما در مورد مکانیسم‌های تنظیم بیان آن در سطح ژنومی برخی از موجودات اطلاعاتی وجود ندارد. در این مطالعه به بررسی ناحیه بالادستی ژن C3 از ماهی قزل‌آلا پرداخته شده است. بافتهای مختلف ماهی تهیه و DNA با روش تغییر یافته فنل-کلروفورم استخراج شد. به کمک پرایمرهای دجنره طراحی شده برای ناحیه بالادستی این ژن که بر اساس اطلاعات سایر گونه‌ها انجام شد، با روش زنجیره پلیمرز غیر کلاسیک، قطعه هدف تکثیر و تعیین توالی و در نهایت در بانک اطلاعات ژنومی ثبت شد. در مرحله بعد به کمک سرورها و نرم افزارهای مختلف آناتومی کامل توالی به دست آمده از نظر وجود عناصر تنظیمی بررسی گردید. توالی ناحیه پروموتوری ژن C3 ماهی قزل‌آلا در بانک ژنومی NCBI با شماره دستیابی JQ799884.1 به ثبت رسید. وجود توالبهای حفاظت شده جعبه TATA و همچنین عناصر پاسخگو به فاکتورهایی مانند *CTCF/C/EBP*، *GR*، *JL-6* و *PPAR* اثبات شد، هرچند وجود نواحی پاسخگو مانند *Sp1*، *CRE*، *ERE* تأیید نشد. نتایج این مطالعه علاوه بر تأیید وجود سیستم نسبتاً تکامل یافته‌ای از تنظیم روی سیستم کمپلمان در ماهیهای استخوانی می‌تواند از قدیمی بودن این سیستم حمایت نماید. این مطالعه اولین گزارش دقیق از عناصر تنظیمی کنترل کننده بیان ژنی از سیستم کمپلمان است و شاید مؤید نقشهای جدیدی مانند دخالت مشتقات کمپلمان در تکوین اولیه جنین باشد که در مطالعاتی مطرح شده است.

واژه‌های کلیدی: سیستم کمپلمان - عناصر تنظیم ژنی - ناحیه پروموتوری

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۲۰۹۴۰۴۷، پست الکترونیکی: [ahadi\\_al@sci.sku.ac.ir](mailto:ahadi_al@sci.sku.ac.ir)

### مقدمه

مولکول C3 به صورت پیش‌ساز بوده و در حالت طبیعی غیر فعال است. بعد از اینکه پروتئین پیش‌ساز C3 شکسته شد، یک توالی چهار اسیدآمینه‌ای از پلی‌پپتید خارج می‌شود و C3 به زنجیره  $\alpha$  (۱۱۵ kD) و زنجیره  $\beta$  (۷۵ kD) تبدیل می‌شود (۱۷). قطعه بزرگتر C3b با اتصال به سطوح سلولی به وسیله گروه تیواستر موجود در قلمرو TED منجر به تسهیل فاگوسیتوز و تشکیل کمپلکس حمله غشایی (Mac:Membrane attack complex) می‌گردد. قطعه کوچکتر C3a خاصیت آنافیلاتوکسینی دارد و واسطه

سیستم کمپلمان جزئی از سیستم دفاعی بدن بوده و از ۳۰ پروتئین سطحی سلولی و پلازما تشکیل شده است که به صورت دقیق و تنظیم شده با یکدیگر میان‌کنش دارند (۴ و ۷). سیستم کمپلمان زمانی که فعال می‌شود موجب تولید پلی‌پپتیدهایی می‌گردد که واسطه پاسخهای فیزیولوژیکی در التهاب، ایمنی و دفاع میزبان می‌باشند. کمپلمان دارای سه مسیر فعال‌شدن کلاسیک، متناوب و لکتین است. هر سه مسیرها سبب فعال‌شدن کانورتازهای C3 می‌شوند. این کانورتازها C3 را به دو قطعه C3a و C3b تقسیم می‌کند.

ساختار و عملکردی مشابه با این فاکتورها در پستانداران دارند. هر دو مسیر فعال سازی کلاسیک و متناوب در مرغ وجود داشته و میزان غلظت C3 در سرم مرغ 0.5 mg/ml می باشد که این مقدار نصف غلظتی است که در انسان مشاهده شده است (۱۰). این تحقیقات نشان می دهد که سیستم کمپلمان تا رده دوزیستان شناسایی شده است اما در مورد ماهیها اطلاعات کمی در دست است که در این مطالعه به بخش کوچکی از آن پرداخته شده است. با توجه به اهمیت این سیستم در موجودات، بررسی چگونگی تنظیم این ژن در جانوران مختلف به صورت مولکولی می تواند دریچه‌ای در رابطه با تکامل این ژن و همچنین استفاده از پروموتور این ژن در رابطه با شناخت مسیر های کنترلی و بیان سایر ژنهای مرتبط باز نماید.

### مواد و روشها

**نمونه گیری و استخراج DNA ژنومی:** در این بررسی از نمونه های خون انسان، کبدموش و بافت دیواره شکم ماهی نمونه گیری صورت گرفت. استخراج DNA کامل با روش استاندارد فنل-کلوروفرم انجام گرفت. کیفیت DNA استخراج شده در الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد بررسی شد.

**طراحی پرایمر:** با توجه به اینکه در رابطه با توالی مورد نظر اطلاعات مستقیمی در دست نبود، ابتدا توالی پروموتری ژن C3 برخی مهره داران ثبت شده در پایگاه-های اطلاعات NCBI و ENSEMBL مورد بررسی قرار گرفت. توالی پروموتور ژن C3 انسان (*Homo sapiens*)، موش (*Mus musculus*) و گاو (*Bos taurus*) با شماره دسترسی به ترتیب X62904، X62903 و Q693V9 از سایت NCBI گرفته شد. در مورد خروس و قورباغه ناحیه پروموتری به صورت جزئی تعیین توالی شده است. توالی پروموتری این ژن در مورد خروس (*Gallus gallus*) و قورباغه (*Xenopustropicalis*) با شماره دسترسی به ترتیب G00000011509 و G00000017270 از پایگاه اطلاعات

فعالتهای بیولوژیکی متنوع شامل انقباض ماهیچه‌های صاف، اتساع رگهای خونی، آزاد شدن هیستامین از ماست سلها و جذب شیمیایی ائوزینوفیلها می باشد. و خاصیت کانورتازی دارد iC3b هنگامی تشکیل می شود که فاکتور I قطعه می شود (۱۲ و ۱۴). جزء سوم کمپلمان C3 در تمام مهره داران ترشح می شود و یکی از فراوان ترین پروتئینهای سرم پستانداران است. عده‌ای از پژوهشگران عنوان کرده‌اند که میزان پروتئین C3 در پاسخ به سیتوکینهای مختلف تغییر می کند. به عنوان مثال در مطالعات محققین میزان بیان mRNA کد گذار C3 در پاسخ به IL-1 تا ۴۰ برابر افزایش نشان داد (۸). با توجه به نقشهای فیزیولوژیکی متعدد این سیستم، مطالعات متعددی در رابطه با تنظیم بیان این ژن صورت گرفته است. ناحیه پروموتور ناحیه تنظیمی ژنهای است که بیان آنها تحت تأثیر هورمونها و سیتوکینهای مختلف بوده و از طریق نواحی پاسخ‌گوی بالادست ژنها کنترل می گردد. ناحیه پروموتور اجزای کمپلمان در انسان و موش و برخی دیگر از مهره داران تعیین توالی شده است، اما هیچ اطلاعاتی در مورد ماهیها ثبت نشده است. در زنوپوس (*Xenopus*) هر دو مسیر فعال شدن کلاسیک و متناوب کمپلمان وجود دارد. پروتئین کمپلمان C3 و C4 که از سرم زنوپوس جدا شده است دارای زیر واحدهایی شبیه به C3 و C4 پستانداران است. مشاهدات نشان می-دهند C3b انسان به وسیله سرم زنوپوس شکسته می شود. محل برش شبیه به محل برشی است که توسط سرم انسان شکسته شده است و این مشاهدات نشان دهنده آن است که پروتئینهای تنظیمی مانند فاکتور I و H در سرم زنوپوس حضور دارند. همچنین گیرنده‌هایی برای قطعات C3 در زنوپوس روی سطح ماکروفاژهای این جانور حضور دارند. البته این مشخص نیست که این رسپتورها با رسپتورهای ماکروفاژهای پستانداران مانند CR1 و CR3 همولوژی داشته باشند. نوکلئوتیدها و آمینواسیدهای C3 در زنوپوس، شبیه توالی انسان، موش و خرگوش می باشند (۶). C3، Clq و فاکتور B از پرندگان خالص سازی شده است و

Ensembl گرفته شد. سپس بررسی هم‌ردیفی دوتایی و همولوژیهای موجود پرایمرها طراحی شدند (جدول ۱).

جدول ۱- توالی پرایمرهای به کار رفته در این تحقیق.

نام پرایمر	توالی پرایمر	ارگانسیم
FC3H1	GCACCACTGCAATTTAGCCT	انسان ۱۱۱۹
FC3B1	CTGCACATACTCAAAGCCC	موش ۱۵۰۰
RC3u	TGAGCATCGTGGGCCTCCAG	گاو ۷۵۰

\* پرایمرهای FC3H1 و معکوس RC3u در انسان یک آمپلیکون ۱۱۱۹ جفت بازی تکثیر می‌کردند. پرایمرهای FC3B1 و معکوس RC3u در موش یک آمپلیکون ۱۵۰۰ جفت بازی و در گاو آمپلیکونی به طول ۷۵۰ جفت بازی تکثیر می‌کردند. در خروس و قورباغه به دلیل گسسته بودن توالی مرجع، طول آمپلیکون قابل محاسبه نبود. در ماهی هیچ اطلاعاتی در دسترس نبود.

*Xenopus tropicalis* و خروس (*Gallus gallus*) انجام شد. از سرورهای دیگر در جهت مطالعه دقیق آناتومی توالی به دست آمده استفاده شد که در جدول ۲ خلاصه شده است.

### نتایج

استخراج DNA و انجام PCR ناحیه پروموتور ژن C3 در ماهی قزل‌آلا: شکل ۱-الف نتیجه الکتروفورز DNA استخراج شده از بافت عضلات شکمی ماهی قزل‌آلا روی ژل آگارز ۱ درصد را نشان می‌دهد. شکل ۱-ب نتیجه واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای دجنره طراحی شده براساس توالی انسان (*Homo sapiens*)، موش (*Mus musculus*) و گاو (*Bos taurus*) را با باند اختصاصی به طول ۷۰۰ جفت بازی که در ماهی به دست آمد نشان داده است.

توالی‌یابی و بررسی وجود نواحی تنظیمی پاسخگو در توالی پروموتور ژن C3 در ماهی: کروماتوگرام توالی به دست آمده در اینجا آورده نشده است و در صورت درخواست قابل ارائه می‌باشد. توالی به دست آمده ناحیه پروموتوری ژن C3 ماهی در بانک ژنی NCBI با شماره دستیابی JQ799884.1 به ثبت رسید.

انجام PCR و تعیین توالی: جهت بهینه‌سازی شرایط PCR روی ژنوم ماهی ابتدا شرایط عملکرد پرایمرها روی نمونه‌های DNA انسان و موش بهینه‌سازی شد. پس از حصول نتیجه با شرایط به دست آمده روی DNA ماهی واکنش PCR انجام شد و در نهایت با روش Hot Start و همچنین گردایان به سمت بالا (Touch Up) که در طی آن شرایط واکنش به مرور سخت‌تر می‌شود، محصولی در حدود ۶۰۰ جفت بازی به دست آمد. محصول به دست آمده جهت تعیین توالی با روش پیروسکونسینگ، ارسال شد. واکنشهای انجام شده از شرایط استاندارد برای غلظت مواد واکنش استفاده شد (بافر ۱X PCR، ۱/۵ میلی مولار MgCl<sub>2</sub>، ۲۰۰ میکرومولار dNTP و پرایمرها با غلظت نهایی ۰/۴ میکرومولار و ۱/۵ واحد بین المللی آنزیم Taq polymerase).

بررسی و تعیین آناتومی توالی به دست آمده: پس از تصحیح توالی به کمک نرم افزار Chromas 2.1، توالی به دست آمده ماهی در بانک ژنی NCBI به ثبت رسید. توالی به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار CLC Main Workbench 5.6.1 و همچنین سرور Clustal W هم‌ردیفی چندگانه بین توالی پروموتوری مورد نظر این تحقیق (*Oncorhynchus mykiss*)، انسان (*Homo sapiens*)، موش (*Mus musculus*)، گاو (*Bos taurus*)، قورباغه

جدول ۲- لیست نرم افزارها و سرورهای به کار رفته در این تحقیق.

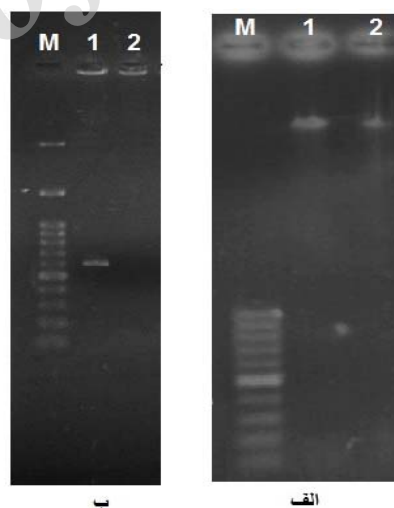
نام پایگاه یا نرم افزار	نوع	نوع بررسی	آدرس
Chromas 2.1	نرم افزار	بررسی توالی و کروماتوگرام	<a href="http://technelysium.com.au/wp/chromas/">http://technelysium.com.au/wp/chromas/</a>
CLC Main Workbench 5.6.1	نرم افزار	بررسی همولوژی	<a href="http://www.clcbio.com/products/clc-main-workbench-old-releases/">http://www.clcbio.com/products/clc-main-workbench-old-releases/</a>
CLUSTALW	سرور	بررسی همولوژی	<a href="http://www.genome.jp/tools/clustalw/">http://www.genome.jp/tools/clustalw/</a>
BDGP Berkeley Drosophila Genome Project	سرور	بررسی توالیهای هسته ای پروموتوری	<a href="http://www.fruitfly.org/index.html">http://www.fruitfly.org/index.html</a>
Hctata	سرور	بررسی وجود جعبه‌ی TATA و موقعیت آن	<a href="http://bioinfo.itb.cnr.it/~webgene/wwwHC_tata.html">http://bioinfo.itb.cnr.it/~webgene/wwwHC_tata.html</a>
FProm	سرور	بررسی محل جعبه‌ی TATA و موقعیت آن	<a href="http://www.softberry.com/freedownloadhelp/fprom/description.html">http://www.softberry.com/freedownloadhelp/fprom/description.html</a>
CisTer Cis-element Cluster Finder	سرور	بررسی محل و وجود عناصر سیس	<a href="http://zlab.bu.edu/~mfrith/cister.shtml">http://zlab.bu.edu/~mfrith/cister.shtml</a>
Gene regulation	سرور	بررسی محل اتصال فاکتورهای نسخه برداری	<a href="https://bioinformatics.ca/links_directory/category/expression/gene-regulation">https://bioinformatics.ca/links_directory/category/expression/gene-regulation</a>

دست آمده، سرور BDGP، به کار گرفته شد که ناحیه پروموتور هسته ای با امتیاز ۰/۹ از ۱ را مشخص نمود (شکل ۲).

پایگاه اطلاعات Hctata وجود جعبه TATA را در ۳ موقعیت نشان داد که موقعیت ۳۲۹ توالی می تواند صحیح ترین حالت ممکن و نزدیکترین توالی به توالی مهره داران باشد (شکل ۳). نتایج سرور FPROM جعبه TATA را در موقعیت ۳۲۹ نشان داد که با نتیجه Hctata همخوانی داشت (شکل ۴). این سرور امتیاز بالاتر از ۳ را برای این پروموتور محاسبه کرد.

در ناحیه پروموتوری ژن C3 در انسان نواحی پاسخگوی متعددی از جمله عناصر پاسخگو به NF-KB، IFN- $\gamma$ ، IL-6 و عناصر پاسخگو به استروژن وجود دارد.

جهت بررسی وجود نواحی تنظیمی در پروموتور ژن C3 در ماهی از پایگاه اطلاعات مختلف از جمله Cis-element Cluster Finder و Gene regulation استفاده شد.



شکل ۱- الف) بررسی کیفی DNA استخراج شده در ژل آگارز ۱ درصد. چاهک M مارکر DNA (SMO373) و چاهک ۱ و ۲ به ترتیب DNA استخراج شده از کبد و گوشت ماهی قزل آلا می باشد. ب) نتایج PCR ناحیه پروموتور ژن C3 در ژل آگارز ۱ درصد، چاهک M مارکر DNA (SMO373)، چاهک ۱ محصول PCR باند بیش از ۶۰۰ جفت بازی دیده می شود، چاهک شماره ۲ کنترل منفی. جهت تأیید ناحیه وجود ناحیه پروموتوری در توالی به

## Promoter predictions for 1 eukaryotic sequence with score cutoff 0.80 (transcription start shown in larger font):

## Promoter predictions for seq0 :

Start	End	Score	Promoter Sequence
422	472	0.98	AGGGTGTCTATCTAAAACAGTCTGGCCCACTGTATCAC <b>AGGCCATATC</b>

شکل ۲- ناحیه هسته پروموتوری مشخص شده در توالی ناحیه پروموتوری ژن C3 به کمک سرور BDGP با امتیاز ۰.۹ می‌باشد.

Position	Pattern
329	ACTATAATGC
434	TCTAAAACAG
571	TCITTATAGC

شکل ۳- پایگاه اطلاعات Hctata جهت پیش‌بینی وجود جعبه‌ی TATA در توالی مورد نظر می‌باشد. بر طبق نتیجه این پایگاه ۳ جعبه TATA در توالی ما وجود دارد که موقعیت ۳۲۹ می‌تواند کاندیدای اصلی باشد.

Sequence 1 of 1, Name: test sequence	
Length of sequence:	617
1 promoter/enhancer(s) are predicted	
Promoter Pos:	+0.356 TATA box at 329 +3.736 TTTATAAT

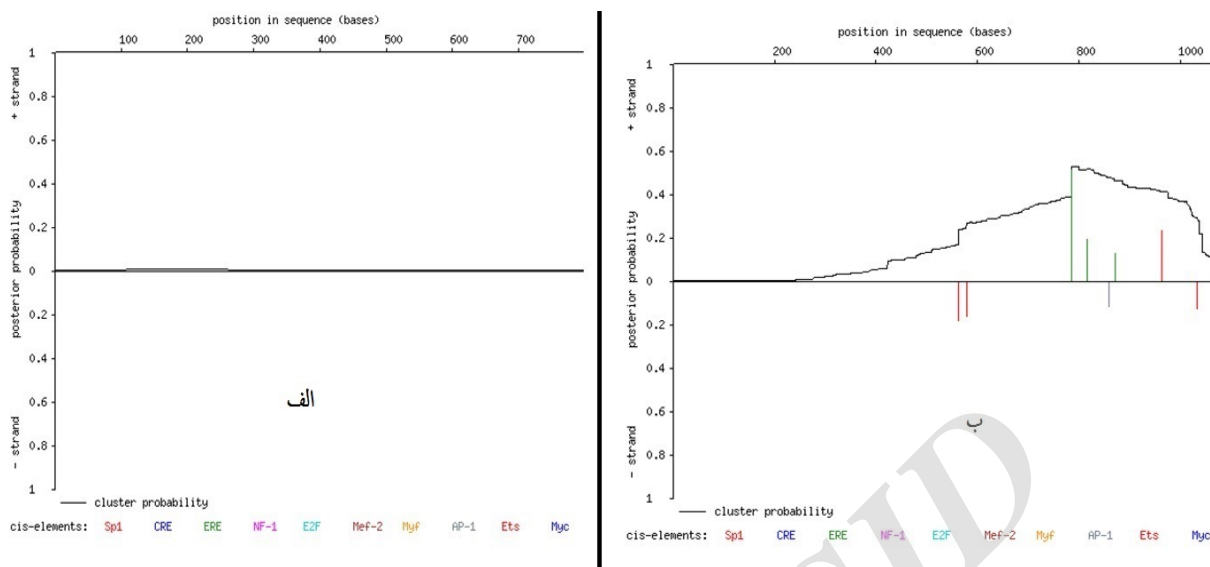
شکل ۴- بر اساس نتایج FPRM جعبه TATA در محل ۳۲۹ وجود دارد که با نتیجه Hctata منطبق می‌باشد.

ترانس متعدد و جایگاه اتصال آن‌ها در پروموتور ژن C3 ماهی در جدول ۳ آورده شده‌است.

بررسی همولوژی پروموتور ژن C3 در ماهی با سایر مهره‌داران مورد مطالعه: جدول ۴ هم‌ردیفی چندگانه بین توالی پروموتوری به دست آمده (*Oncorhynchus mykiss*) و توالیهای مربوط به انسان (*Homo sapiens*)، موش (*Mus musculus*)، گاو (*Bos taurus*)، قورباغه (*Xenopus tropicalis*) و خروس (*Gallus gallus*) را که توسط سرور ClustalW انجام شده، نشان می‌دهد.

پایگاه اطلاعات Cis-element Cluster Finder جهت بررسی وجود نواحی پاسخگو مانند Sp1، CRE، ERE، AP-1، Myf، Mef-2، E2F، NF-1 و Ets و Myc می‌باشد. بر اساس نتایج این پایگاه هیچ کدام از عناصر تنظیمی که اشاره گردید در رابطه با توالی پروموتوری ماهی یافت نشد. شکل ۵.

پایگاه اطلاعات Gene regulation جهت پیش‌بینی نواحی اتصال عناصر عمل‌کننده ترانس و فاکتورهای رونویسی می‌باشد. بر اساس نتایج این پایگاه عناصر عمل‌کننده



شکل ۵- خروجی گرافیکی پایگاه اطلاعات Cis-element Cluster Finder جهت شناسایی عناصر پاسخ‌گو در پروموتور ژن C3 در ماهی. هیچ کدام از عناصر تنظیمی که اشاره گردید در رابطه با توالی پروموتوری ماهی یافت نشد (الف). جهت صحت کار این پایگاه توالی پروموتوری انسان نیز از نظر وجود این توالیها بررسی گردید(ب).

در این مقاله توالی ناحیه پروموتوری ژن C3 ماهی قزل آلا از اجزای سیستم کمپلمان شناسایی و معرفی شده است. این تحقیق و نتایج آن می‌تواند دلیلی بر وجود سیستم کمپلمان در ماهیان استخوانی باشد و از دیدگاه تکاملی نیز حائز اهمیت است. به علاوه اثبات وجود توالیهای دقیق تنظیمی نیز به جذابیت این مطالعه افزوده است.

اطلاعات به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار CLC workbench تأیید شد (نتایج مربوطه آورده نشده است). بر طبق نتایج سرور ClustalW بیشترین میزان همولوژی با موش ۴۵ درصد و کمترین میزان با خروس ۳۶ درصد است. در این جدول نیز میزان همولوژی توالی پروموتوری ژن C3 در سایر گونه‌ها آورده شده است.

## بحث

جدول ۳- شناسایی عناصر تنظیمی و جایگاه اتصال عناصر عمل‌کننده ترانس در پروموتور ژن C3 در ماهی.

فاکتور متصل شونده	موقعیت در توالی	توالی حفاظت شده محل اتصال
abaA	638	CATTCY
abaA	94	CATTCY
C/EBP	402	ATTGC
C/EBP	260	TCNACTC
CTCF	352	CCCTC
IL-6	591	TGAAAAA
GR	43	nAGAACAnnnTGTTCtnnnnnnn
PPAR	119	AGGTCA

\* این جدول براساس نتایج پایگاه اطلاعات Gene regulation می‌باشد. شماره موقعیت بر اساس توالی ثبت شده با شماره JQ799884.1 در بانک ژنومی می‌باشد. در این جدول موقعیتها بر اساس مکانیسم عمل فاکتور متصل شونده غربال‌گری شده است.

جدول ۴- نتایج استخراج شده از بررسیهای میزان همولوژی توالی ناحیه پروموتوری ژن C3 در ماهی، انسان، موش، گاو، خروس و قورباغه .

The screenshot shows the ClustalW2 Results interface. At the top, there are tabs for 'Alignments', 'Result Summary', 'Guide Tree', 'Submission Details', and 'Submit Another Job'. Below these, there are buttons for 'Download Alignment File' and 'Hide Colors'. The main content area is titled 'CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment' and contains a 'Scores Table'.

SeqA	Name	Length	SeqB	Name	Length	Score
1	fish	797	2	H.sapiens	1029	38.0
1	fish	797	3	M.musculus	1516	45.0
1	fish	797	4	Bos	800	43.0
1	fish	797	5	Gallus	600	36.0
1	fish	797	6	X.tropicalis	600	42.0

\* امتیاز همولوژی بین ناحیه پروموتوری ژن C3 ماهی و سایر گونه‌های مورد بررسی از ۳۶ تا ۴۵ به دست آمد.

همچنین مطالعه حاضر تأییدی بر ارزش مطالعات بیوانفورماتیک در واکاوی سیستم‌های ایمنی بدن موجودات می‌باشد که در مطالعات دیگری نیز تأکید شده است (۱).

C3 فراوان‌ترین پروتئین سیستم کمپلمان در خون مهره-داران می‌باشد. جزء سوم کمپلمان یک نقش مرکزی در تمام مسیرهای فعال‌سازی کمپلمان بازی می‌کند. C3 از تعداد زیادی از گونه‌های مهره‌داران از انواع ابتدایی (لامپری و مارماهی دهان‌گرد) تا انسان خالص سازی شده است. در همه گونه‌هایی که مورد مطالعه قرار گرفته‌اند، به جز لامپری، C3 از دو زنجیره تشکیل شده است که به وسیله یک پیوند دی‌سولفیدی و همچنین نیروهای غیر-کووالان با یکدیگر مرتبط می‌باشند. ساختار پروتئین C3 در انسان، خوکچه هندی، موش، رت، ماهی دهان‌گرد، لامپری، مار کبری، ماهی قزل‌آلا، خرگوش و قورباغه مشخص شده است. اطلاعات مربوط به عناصر ساختمانی C3 و عملکرد آنها با شناسایی مکانهای حفاظت شده در گونه‌های مختلف به دست آمده است (۱۳). سیستم کمپلمان مهره‌داران به نظر می‌رسد در اثر مضاعف‌سازی ژنی ایجاد شده باشد. این مضاعف‌سازی در طول دوران تکامل مهره‌داران اتفاق افتاده است (۵). در مطالعه دیگری

بررسی نواحی تنظیمی و پروموتوری ژنها در موجودات مختلف می‌تواند اطلاعات با ارزشی در رابطه با مکانیسم‌های کنترلی و شناسه ژنتیکی آنها در اختیار بشر قرار دهد. در این تحقیق برای اولین بار به توالی یابی ناحیه پروموتوری ژن C3 در ماهی پرداخته شده است. توالی این ناحیه در پستانداران، پرندگان و دوزیستان در مواردی مشخص شده است. اطلاعات موجود به عنوان ابزار اولیه جهت بررسیهای بیوانفورماتیک مد نظر قرار گرفت و بر اساس حفاظت شدگی نواحی خاص، سه دسته پرایمر طراحی شد. بهینه‌سازی شرایط برای حصول محصول مناسب PCR جهت تعیین توالی یخس زیادی از این تحقیق را به خود اختصاص داد. نتایج به دست آمده به خوبی صحت عملیات انجام شده را تأیید می‌نماید. با استفاده از سرورهای متعدد، وجود نواحی پروموتوری در توالی به دست آمده تأیید شد. همچنین وجود سایر عناصر تنظیمی مشابه با نوع پستانداران مانند انسان نیز نقطه تأیید دیگری بر صحت نتایج است. در بررسی همولوژی نتایج همانند نتایج بررسی تشابه بین انسان و موش یا انسان و گاو می‌باشد که مؤید کم اهمیت بودن توالیهای فاصله‌گذار بین نواحی تنظیمی خاص این پروموتور می‌باشد.

مشخص شده است که پروتئینهای C5/C4/C3 همولوگ  $\alpha$ -2 ماکروگلوبین هستند و توسط پدیده مضاعف شدن ژنها ایجاد شده‌اند. در رابطه با سه مسیر فعال‌شدن کمپلمان، مسیر متناوب نسبت به دو مسیر کلاسیک و لکتین قدیمی‌تر بوده و در مهره‌داران بی‌آرواره نیز وجود داشته است (۳). با این وجود مطالعات بسیار کمی در رابطه با عناصر تنظیمی و توالیهای مربوطه در رابطه با بیان این پروتئینها وجود دارد که به نوبه خود ارزش مطالعه حاضر را بیشتر می‌کند. هرچند اطلاعات موجود در رابطه با قرابت پروتئینهای فوق طراحی آزمایشات لازم برای این مطالعه را آسان تر نمود.

مکانیسم مولکولی بیان ژن C3 و تنظیم آن به وسیله عناصر پاسخ دهنده مختلفی صورت می‌گیرد که در انتهای ۵' این ژن واقع شده است. پروموتور ژن C3 انسان شامل عناصر تنظیمی مختلفی است که بیان آن را تحت تأثیر قرار می‌دهند. جعبه TATA و CAAT در محل ۲۸- و ۸۷- قرار گرفته اند. در منطقه ۵' تعدادی ناحیه وجود دارند که با توالیهای تنظیمی عمل کننده سیس همولوژی دارند برای مثال در مطالعات Vik و همکارانش مشخص شده که پروموتور ژن C3 در انسان شامل عناصر پاسخگوی متعددی است که بیان این ژن را تنظیم می‌کنند (۱۷). در موش نیز ناحیه پروموتوری ژن C3 تعیین توالی شده است و نواحی پاسخگو به IL-6 و IL-1 شناسایی شده است (۹). این مطالعه اولین گزارش دقیق از عناصر تنظیمی کنترل کننده بیان ژنی از سیستم کمپلمان است و شاید مؤید نقشهای جدیدی مانند دخالت مشتقات کمپلمان در فرآیند تکوین اولیه جنین باشد که در مطالعاتی مطرح شده است (۱۲).

در این مطالعه جهت بررسی وجود نواحی تنظیمی در پروموتور ژن C3 در ماهی از پایگاههای اطلاعات مختلفی شامل Cis-element Cluster Finder و gene regulation استفاده شد. پایگاه اطلاعات Cis-element Cluster Finder جهت بررسی وجود نواحی پاسخگو مانند CRE، Sp1،

با این وجود در توالی به دست آمده در ماهی توسط گروه این تحقیق، موتیفهای اتصالی برای فاکتورهای abaA، C/EBP، CTCF، IL-6، GR و PPAR نشان دهنده وجود سیستم تنظیمی نسبتاً پیچیده روی این ژن می باشد. در این بررسی توالی محل اتصال فاکتور CTCF در ناحیه پروموتوری ژن C3 ماهی شناسایی شد (CCCTC) که قبلاً به عنوان یک فاکتور مهارتی در پروموتور ژن c-Myc مرغ شناسایی شده بود (۱۱). همچنین توالی محل اتصال فاکتور C/EBPs که خانواده ای از فاکتورهای نسخه برداری متصل شونده با عوامل افزاینده (Enhancer) می باشند نیز در موقعیتهای ۴۰۲ و ۲۶۰ شناسایی شد (CCAAT) که در خور توجه بوده و با ماهیت بیان ژن C3 همخوانی دارد (۱۵). موقعیت به دست آمده در این مطالعه با مطالعات و گزارشهای قبلی تا حدی همخوانی نشان می دهد. برای مثال عناصر سیس و ترانس متعددی در پروموتور ژن C3 در *murine* شناسایی شده‌اند که جهت تنظیم بیان این ژن توسط سیتوکینهای (IL-6، IL-1) مورد نیاز است. میزان شباهت بین ناحیه ۵' ژن C3 انسان و *murine* ۵۱ درصد است. همچنین جعبه‌های TATA متعددی در بالادست نقطه آغازین رونویسی این ژن در *murine* شناسایی شده است. C3 به صورت ثابت در بافتهای زیادی بیان می شود و بیان آن مختص بافت می باشد. عناصری که برای بیان ابتدایی ژن مورد نیاز هستند و همچنین عناصر

مشخص شده است که پروتئینهای C5/C4/C3 همولوگ  $\alpha$ -2 ماکروگلوبین هستند و توسط پدیده مضاعف شدن ژنها ایجاد شده‌اند. در رابطه با سه مسیر فعال‌شدن کمپلمان، مسیر متناوب نسبت به دو مسیر کلاسیک و لکتین قدیمی‌تر بوده و در مهره‌داران بی‌آرواره نیز وجود داشته است (۳). با این وجود مطالعات بسیار کمی در رابطه با عناصر تنظیمی و توالیهای مربوطه در رابطه با بیان این پروتئینها وجود دارد که به نوبه خود ارزش مطالعه حاضر را بیشتر می‌کند. هرچند اطلاعات موجود در رابطه با قرابت پروتئینهای فوق طراحی آزمایشات لازم برای این مطالعه را آسان تر نمود.

مکانیسم مولکولی بیان ژن C3 و تنظیم آن به وسیله عناصر پاسخ دهنده مختلفی صورت می‌گیرد که در انتهای ۵' این ژن واقع شده است. پروموتور ژن C3 انسان شامل عناصر تنظیمی مختلفی است که بیان آن را تحت تأثیر قرار می‌دهند. جعبه TATA و CAAT در محل ۲۸- و ۸۷- قرار گرفته اند. در منطقه ۵' تعدادی ناحیه وجود دارند که با توالیهای تنظیمی عمل کننده سیس همولوژی دارند برای مثال در مطالعات Vik و همکارانش مشخص شده که پروموتور ژن C3 در انسان شامل عناصر پاسخگوی متعددی است که بیان این ژن را تنظیم می‌کنند (۱۷). در موش نیز ناحیه پروموتوری ژن C3 تعیین توالی شده است و نواحی پاسخگو به IL-6 و IL-1 شناسایی شده است (۹). این مطالعه اولین گزارش دقیق از عناصر تنظیمی کنترل کننده بیان ژنی از سیستم کمپلمان است و شاید مؤید نقشهای جدیدی مانند دخالت مشتقات کمپلمان در فرآیند تکوین اولیه جنین باشد که در مطالعاتی مطرح شده است (۱۲).

در این مطالعه جهت بررسی وجود نواحی تنظیمی در پروموتور ژن C3 در ماهی از پایگاههای اطلاعات مختلفی شامل Cis-element Cluster Finder و gene regulation استفاده شد. پایگاه اطلاعات Cis-element Cluster Finder جهت بررسی وجود نواحی پاسخگو مانند CRE، Sp1،



گلوبولهای خرگوش را می‌تواند تجزیه کند. علاوه بر این در ماهیها میزان اجزای مسیر متناوب بسیار بالا بوده و این مقدار ۱۰ برابر بیشتر از سایر مهره‌داران است (۱۶). وجود توالی پاسخگو به هورمونهای خاص می‌تواند دست‌مایه مطالعات مشابه و مفیدی در این زمینه باشد (۲). شناخت توالی ناحیه پروموتوری ژن C3 در ماهی قزل‌آلا به عنوان یکی از مهره‌داران ابتدایی می‌تواند نشانگر اهمیت این خانواده ژنی در فرآیندهای فیزیولوژیک باشد. نتایج این مطالعه علاوه بر تأیید وجود سیستم نسبتاً تکامل یافته از سطح تنظیمی روی سیستم کمپلمان در ماهیهای استخوانی می‌تواند از قدیمی‌تر بودن این سیستم نسبت به سایر ژنهای دفاعی بدن حمایت نماید.

قدردانی: نویسندگان از دانشگاه شهرکرد به خاطر حمایت‌های مالی و معنوی در این تحقیق قدردانی مینمایند.

تنظیمی منفی به صورت تجربی در بالادست جعبه TATA ژن C3 در *murine* شناسایی شده‌اند که در ۳۹۵- تا ۱۱۱- و ۱۴۵۷- تا ۸۰۰- قرار دارند. این عناصر نقش مهمی را در بیان ویژه بافتی ژن C3 ایفاء می‌کنند. برای مثال عناصر پاسخ دهنده به IL1 و IL6 بین محل ۹۱- تا ۴۰- از ژن *murine* C3 قرار گرفته‌اند (۹). در این مطالعه امتیاز همولوژی بین ناحیه پروموتوری ژن C3 ماهی و سایر گونه‌های مورد بررسی از ۳۶ تا ۴۵ به دست آمد. مطالعات نشان می‌دهند که هر سه مسیر فعال‌شدن کمپلمان در ماهیهای غضروفی و استخوانی وجود دارد. ماهیها سیستم ایمنی تکامل یافته‌ای دارند که نقش مهمی در پاسخ ایمنی ذاتی آنها بازی می‌کند. ویژگی منحصر به فرد سیستم کمپلمان در ماهی این است که در برخی از آنها، سرم می‌تواند گلوبولهای قرمز گوسفند، بز، سگ و خرگوش را از طریق مسیر متناوب تجزیه کند در حالی که سرم انسان تنها

## منابع

- ۱- سعید خلیلی، ابولفضل جهانگیری؛ جعفر امانی؛ علی هانت سلیمانان. ۱۳۹۳. کاربرد بیوانفورماتیک در مطالعات ایمنی‌شناسی. مقاله ۴، دوره ۲۷، شماره ۲، صفحه ۱۹۲-۲۱۰
- ۲- سمیه عرب نژاد؛ احمد قرایی؛ مصطفی غفاری؛ عبدالعلی راهداری. ۱۳۹۳. بررسی تغییرات کیفی اسپرم ماهی سفیدک سیستان (Schizothorax zarudnyi Nikolskii, 1897) در پاسخ به القاء هورمونی. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی ایران. مقاله ۱۳، دوره ۲۷، شماره ۴، صفحه ۶۱۱-۶۱۷.
- 3- Doolittle R.F. 1987. The Evolution of the vertebrate plasma proteins. *Biology Bull.* 172: 269-283.
- 4- Fredslund F, Jenner L, Husted L.B, Nyborg J, Andersen G.R, and Sottrup-Jensen L. 2006. The structure of bovine complement component 3 reveals the basis for thioester function. *Journal Mol. Biology* 361: 115-127.
- 5- Gongora R, Figueroa F, and Klein J. 1998. Independent Duplications of *Bf* and *C3* Complement Genes in the Zebrafish. *Scand. J. Immunol* 48: 651-658.
- 6- Grossberger D, Marcuz A, Du Pasquier L, and Lambris j. D. 1989. Conservation of structural and functional domains in complement component C3 of *Xenopus* and mammals. *PNAS* 86(4):1323-1327.
- 7- Janssen B.J.C, Huizinga E.G, Raaijmakers H.C.A, Roos A, Daha M.R, Nilsson-Ekdahl K, Nilsson B, and Gros P. 2005. Structures of complement component C3 provide insights in function and evolution of immunity. *Nature* 437: 505-511.
- 8- Juan T.S.C, Wilson D.R, Wilde M.D, and Darlington G.J. 1993. Participation of the transcription factor C/EBP6 in the acute-phase regulation of the human gene for complement component C3. *Biochemistry*. 90: 2584-2588.
- 9- Kawamura N, Singer L, Wetsel R. A, Colten H. R. 1992. Cis- and Trans-acting elements required for constitutive and cytokine-regulated expression of the mouse complement C3 gene. *Biochemical Journal*. 283 (3):705-712.
- 10- Kirschfink M, and Mollnes T. E. 2003. Modern Complement Analysis. 10(6): 982-989.
- 11- Lobanenkova V.V, Nicolas R.H, Adler V.V, Paterson H, Klenova E.M, Polotskaja A.V, Goodwin G.H. 1990. A novel sequence-specific DNA binding protein which interacts with three regularly spaced direct repeats of the CCCTC-

- motif in the 5'-flanking sequence of the chicken c-myc gene. *Oncogene* 5 (12): 1743-53.
- 12- Matthews K.W. Drouin S.M. Liu C. Martin J.F. Skidgel R.A. and Wetsel R.A. 2004. Expression of the third complement component (C3) and carboxypeptidase N small subunit (CPN1) during mouse embryonic development. *Developmental and Comparative Immunology*, 28: 647-655.
- 13- Mavroidi M. Sunye O.J. and Lambri J.D. 1995. Isolation, Primary Structure, and Evolution of the Third Component of Chicken Complement and Evidence for a New Member of the-Macroglobulin Famil. *The Journal of Immunology*. 154: 21 64-21 74.
- 14- Nishida N. Walz T. and Springer T.A. 2006. Structural transitions of complement component C3 and its activation products. *Proc Natl Acad Sci*. 103: 19737-19742.
- 15- Ramji D.P. Foka P. 2002. "CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation". *The Biochemical Journal* 365 (3): 561-75.
- 16- Sunyer J.O. Tort L. and Lambris J.D. 1997. Diversity of the third form of complement, C3, in fish: functional characterization of five forms of C3 in the diploid fish *Sparus aurata*. *Biochemistry Journal*. 326: 877-881.
- 17- Vik D.P. Amiguet P. Moffat G.J. Fey M. and Amiguet-Barras F. 1991. Structural features of the human C3 gene: intron/exon organization, transcriptional start site, and promoter region sequence. *Biochemistry*. 30: 1080-1085.

## Isolation, sequencing and analysis of regulatory element in C3 gene promoter region of Salmon fish

Ahadi A.M., Khatami S. and Ayat H.

Genetics Dept., Faculty of Science, Shahrekord University, Shahrekord, I.R. of Iran

### Abstract

The complement system is one of the main components of the immune system in many organisms. Existence of this system has been confirmed in numerous organisms, but there is no information about the mechanisms regulating the expression of it in some of them. In this study, we are focused on the upstream element of salmon fish C3 gene. Different tissues of the fish were prepared and DNA was extracted with a modified phenol-chloroform method. Target sequence was amplified using unclassical PCR method by using of designed degenerate primers and PCR product was purified and sequenced and finally confirmed sequence was recorded in Genomic Bank Database. In the next step, full anatomy of obtained sequence was examined for the presence of regulatory elements by application of different servers and software. Salmon fish C3 gene promoter region sequence was recorded in NCBI genomic data bank with access number JQ799884.1. Presence of conserved TATA box and abaA, C/EBP, CTCF, IL-6, GR and PPAR transcription factors responsive elements were confirmed, however responsive element sequence for factors such as Sp1, CRE, ERE were not detected. Our results can confirm the existence of an evolutionary well-developed regulatory system on the complement system in bony fishes and support ancestral nature of complement system genes. This study is the first detailed report on the regulatory elements controlling gene expression of the C3 gene and may suggest involvement of complement derivatives in the early embryonic development steps that have been reported in some study.

**Key words:** Complement system, gene regulatory elements, promoter region