

شناسایی مولکولی ژنهای سوبتیلیزین (سوبتیلیزین ۳ و سوبتیلیزین ۶) در

اپیدرموفایتون فلوکوزوم

عرفانه خدمتی^۱، سیدجمال هاشمی هزاوه^{۲*}، منصور بیات^۱، کیومرث امینی^۳

چکیده

اپیدرموفایتون فلوکوزوم درماتوفیتی انسان دوست می باشد که توزیع جهانی دارد و به ساختارهای کراتینی پوست و ناخن میزبان نفوذ می نماید و در ایجاد عفونت از پروتئازهای مهمی چون سوبتیلیزین استفاده می نمایند. هدف این مطالعه بررسی حضور ژن سوبتیلیزین ۳ و ۶ (SUB3-SUB6) در نمونه دریافت شده از کلکسیون فارچی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران، به روش مولکولی و تعیین توالی محصول با استفاده از DNA ژنومی بود. برای نیل به این هدف، بر اساس نواحی بسیار ثابت ژنهای مشابه در سایر درماتوفیتها، پرایمرهای خاصی برای دو ژن مورد نظر طراحی شد. با انجام PCR و تعیین توالی قطعات حاصل از آن به کمک ABI PRISM@3730XL automated Sanger sequencer، حضور دو ژن جدید سوبتیلیزین ۳ و سوبتیلیزین ۶ در این درماتوفیت مشخص شد. دو ژن مورد نظر در مرکز ملی اطلاعات زیست فناوری (NCBI) شماره دسترسی MN206114، MN177931 ثبت شدند. با تعیین توالی مشخص شد که نواحی کدکننده ژن سوبتیلیزین ۳ مشتمل بر ۸۶۱ جفت باز میباشد که کدکننده ۲۸۷ آمینو اسید می باشد و نواحی کدکننده ژن سوبتیلیزین ۶ مشتمل بر ۶۹۹ جفت باز میباشد که کدکننده ۲۳۳ آمینو اسید است. مقایسه توالی ها و آمینو اسیدهای به دست آمده با توالی های موجود در بانک اطلاعات ژنی، تشابه (همولوژی) معناداری را نشان داد. دستیابی به درک بهتر از خصوصیات مولکولی ژنهای بیماریزا میتواند به عنوان بستری برای توسعه روشهای درمانی و راهکارهای پیشگیری موثر واقع شود.

واژگان کلیدی: سرین پروتئازها، ژنهای سوبتیلیزین، اپیدرموفایتون فلوکوزوم، درماتوفیت

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۸/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۲/۱۱

مقدمه

درماتوفیتها گروهی از قارچهای رشته ای می باشند که بر اساس زیستگاه طبیعی خود به سه گروه انسان دوست، حیوان دوست و خاک دوست تقسیم بندی می شوند و در سه جنس ترایکوفایتون، اپیدرموفایتون و میکروسپوروم گروه بندی میشوند. اشکال بالینی ایجاد شده توسط درماتوفیتها

تحت عنوان کچلی (درماتوفیتوزیس) نامیده میشود که اشکال کلینیکی همانند کچلی سر، کچلی بدن، کچلی کشاله ران، کچلی ناخن و کچلی صورت و ریش و کچلی دست را ایجاد مینمایند. درماتوفیتها ساختار کراتینی بدن میزبان همانند پوست، مو و ناخن را مورد حمله قرار داده و در خلال عفونت آنزیمهایی ترشح میکنند که به کمک آنها به طبقه شاخی پوست متصل گردیده و با اتصال آرتروکونیدی خود به بافت میزبان زمینه اتصال و نفوذ به ضامم کراتینی را تسهیل مینمایند (۱). از ویژگیهای بارز ضامم کراتین دار وجود سولفور فراوان به واسطه وجود پیوندهای دی سولفیدی بکار رفته در اسید آمینه های سیستئین و متیونین میباشد علاوه بر آن کراتین به عنوان منبع غنی از کربن و نیتروژن میباشد به طوریکه برای قارچهای کراتین دوست به عنوان یک منبع غذایی مناسب جهت رشد و نموشان مطرح شده و درماتوفیتها با کلونیزه شدن در سطح پوست ایجاد ضایعات کچلی میکنند. اپیدرموفایتون فلوکوزوم از درماتوفیت های انسان دوست و کراتین دوست از خانواده آسکومیست می باشد. از بین دو گونه ای که در جنس اپیدرموفایتون وجود دارد تنها اپیدرموفایتون فلوکوزوم است که از بیمار یزایی برای انسان برخوردار است، این ارگانیزم توزیع جهانی دارد و می تواند باعث ایجاد اشکال مختلف کچلی در پوست به خصوص در ناحیه کشاله ران شود اما هرگز نمی تواند موی سر میزبان را آلوده کند (۲). درماتوفیتها با قرار گرفتن در محیط کشت های مخصوص، می توانند پروتئین های مختلفی از جمله پروتئازهای تجزیه کننده کراتین، الاستین و کلاژن را ترشح نمایند. بررسی بر روی بسیاری از کراتینازهایی که از مایع

۱- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
 ۲- استاد گروه انکال شناسی و قارچ شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران
 sjhashemihazaveh@gmail.com

۳- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساوه، ساوه، ایران.

صورت گرفته (۱۲، ۱۳)، در درماتوفیت ها این مطالعات بیشتر بر روی درماتوفیت هایی چون ترایکوفایتون روبروم، ترایکوفایتون متاگروفایتس و میکروسپوروم کنیس متمرکز بوده (۸، ۱۱، ۱۴) و در مورد درماتوفیت مورد بررسی در تحقیق حاضر، اپیدرموفایتون فلوکوزوم، مطالعات بسیار کم و انگشت شمار می باشد. تعیین توالی، رمزگشایی و دستکاری ژنوم درماتوفیتها میتواند منابع مفیدی را در روشن سازی مکانیسمهای بیماریزایی قارچهای کراتین دوست فراهم میکند. مطالعه عوامل مختلف حدت در سطح مولکولی در قارچهای مهم مطرح بیماریزا به شناخت پاتوژن آنها، تشخیص عفونت، پیشگیری و طراحی روشهای درمانی جدید کمک میکند (۱۵).

هدف این مطالعه، بررسی حضور ژن های سوبتیلیزین ۳ و ۶ کد کننده سرین پروتئاز و همچنین شناسایی مولکولی آنها و تعیین توالی محصول حاصل از واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) به منظور یافتن تشابه توالی های مورد نظر با سایر ارگانیسیمهای دیگر می باشد. تحقیق پیش رو بررسی مولکولی حضور ژن سوبتیلیزین در درماتوفیت اپیدرموفایتون فلوکوزوم را برای اولین بار در ایران انجام داده و می تواند به عنوان بستری برای مطالعات بعدی جهت طراحی داروهای جدید به شمار آید.

مواد و روش کار

تهیه نمونه

از آنجا که هدف اصلی در تحقیق حاضر بررسی حضور ژن سوبتیلیزین در درماتوفیت مورد بحث ما میباشد، از ایزوله / اپیدرموفایتون فلوکوزوم جدا شده از ضایعات بالینی از کلکسیون قارچی موجود در آزمایشگاه گروه انگل شناسی و قارچ شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران استفاده گردید. نمونه مورد نظر از طریق میکروسکوپی و روش مولکولی تایید شد (کشت نمونه در محیط سابورود دکستروز آگار، سابورود دکستروز آگار حاوی کلرامفنیکل و

روی درماتوفیتها در محیط کشت جدا شده اند تایید کننده وجود سرین پروتئازها میباشد که توسط ژنهای بیماریزای سوبتیلیزین کد میشوند. از آنیمهای کراتینولیتیک میتوان به سرین پروتئاز و متالوپروتئاز اشاره نمود (۳، ۴). سرین پروتئازها و به خصوص سوبتیلیزین ها، پروتئازهایی از گروه اندوپیتیدازها هستند و قادرند که پیوندهای پپتیدی را در داخل زنجیره پلی پپتیدی بشکنند و توسط هفت خانواده ژنی سوبتیلیزین کد میشوند و در هنگام اتصال و نفوذ درماتوفیت ها به بافت میزبان ترشح می شوند و میتوانند کراتین رابه عنوان یک منبع پروتئینی تجزیه کرده و از اسیدهای آمینه بدست آمده به عنوان منبع غذایی و بقاء خود استفاده کنند (۵، ۶). همچنین به عنوان آنتی ژن خارجی مورد

شناسایی سیستم ایمنی قرار می گیرند، نقش مهمی در تحریک سیستم ایمنی بدن و ایجاد پاسخ ایمنی هومورال و سلولی دارند و در برخی از مطالعات به عنوان کاندید مناسب جهت طراحی واکسن مطرح میشوند (۷-۹). مطالعات مختلف وجود و یا عدم وجود هفت خانواده ژنومی سوبتیلیزین در درماتوفیت های جنس ترایکوفایتون و میکروسپوروم را مورد بررسی قرار داده است. به طوریکه معمولا در جنس ترایکوفایتون هر هفت ژن سوبتیلیزین و در جنس میکروسپوروم سه ژن سوبتیلیزین (SUB ۱-۳) شناسایی شده است. شناسایی عملکرد برخی از این ژنهای موثر در بیماریزایی و توزیع آنها در گونه های مختلف جنسهای مورد نظر تا حدودی روند تولید عفونت را در آنها آشکار ساخته است، به طوریکه وجود ژن سوبتیلیزین ۳ در میکروسپوروم کنیس برای اتصال آرتروکونیدی این ارگانسیم به سلولهای اپی تلیال لازم و ضروری است، همچنین وجود ژن سوبتیلیزین ۶ در جنس ترایکوفایتون به عنوان آلرژن مطرح شده و در برانگیخته کردن سلولهای دفاعی بدن موثر میباشد (۱۰، ۱۱). با وجود مطالعات زیادی که در زمینه ترشح متابولیت های ثانویه موثر در ایجاد عفونت در قارچهایی چون گونه های کاندیدا، گونه های اسپریتیلوس

به عنوان کنترل مثبت و تیوب عاری از DNA به عنوان کنترل منفی مورد استفاده قرار گرفت.

طراحی پرایمر برای سوبتیلیزین ۳ و سوبتیلیزین ۶

بر اساس نواحی بسیار ثابت ژنهای مشابه در درماتوفیت‌های دیگر، پرایمرهای این دوژن با استفاده از نرم افزار Oligo7 طراحی شد و سپس اثربخشی آنها در بخش Primer-BLAST از سایت NCBI

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>)

مورد ارزیابی قرار گرفت. مشخصات این پرایمرها در جدول ۱ نشان داده شده است:

جدول ۱- پرایمرهای طراحی شده مورد استفاده در این بررسی

نام پرایمر	توالی پرایمر	طول محصول PCR (جفت باز)
۱ سوبتیلیزین ۳	5'-TCAAGGTTATCTCCGTCCTTC-3'	۱۰۷۰
۲ سوبتیلیزین ۳	5'-AAAGAGGACTTCTGGTCATC-3'	۱۰۷۰
۱ سوبتیلیزین ۶	5'-GCTCATACAACCTGGCTTAG-3'	۹۰۵
۲ سوبتیلیزین ۶	5'-TCAGAGGCAGGAGAAGAGT-3'	۹۰۵

اتوالی رفت، ۲، توالی برگشت

واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر Bio-Rad T 100 ساخت کشور امریکا و با استفاده از DNA ژنومی صورت گرفت. پروتکل انجام این واکنش و مراحل آن به صورت زیر بود: حجم کلی واکنش ۲۰ μ l بود که شامل ۱۰ μ l مسترمیکس، ۲ μ l DNA و ۱ μ l از هر پرایمر بود حجم باقی مانده تا ۲۰ μ l را آب تشکیل داد. (پروتکل انجام واکنش قبلا ذکر شد) سپس نتایج از طریق الکتروفوروز

سیکلوهرگزامید به مدت ۲ هفته و در دمای ۲۵ °C و بررسی میکروسکوپی نمونه ها با استفاده از کلنی های رشد کرده به روش تیزمانت و اسلاید کالچر صورت گرفت).

استخراج DNA قارچی

پس از کشت سویه اپیدرموفایتون فلوکوزوم استخراج DNA با استفاده از دستورالعمل کیت استخراج DNA قارچی، (Asia) Denazist، شماره s-۱۰۳۴ ساخت مشهد - ایران)، صورت پذیرفت.

شناسایی مولکولی اپیدرموفایتون فلوکوزوم بر اساس فضای نسخه برداری داخلی (ITS1, 5.8srDNA, ITS2)

جهت شناسایی مولکولی ایزوله اپیدرموفایتون از پرایمر اختصاصی اپیدرموفایتون فلوکوزوم با شماره دسترسی MT150728.1 که محصول PCR حاصل از آن ۴۸۰ جفت باز بود استفاده شد.

توالی رفت 5'-ACACGCCATTCTTGCTAC-3'

توالی برگشت 5'-TCCCCTCCACTTTCTCCTC-3'

واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر BIO-RAD T100 و با حجم کلی ۲۰ میکرو لیتر، شامل بافر، مستر میکس، DNA درماتوفیت و پرایمرها صورت گرفت. پروتکل پی سی آر شامل مرحله اول حرارت ۹۴ درجه سانتی گراد با زمان ۵ دقیقه، یک چرخه برای واسرشت سازی اولیه و مرحله دوم، واسرشت حرارت ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله سوم، اتصال در دمای ۵۸ درجه سانتی گراد با زمان ۴۵ ثانیه و مرحله چهارم، طویل سازی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد با زمان ۱ دقیقه و ۱۵ ثانیه که مراحل دوم تا چهارم جمعاً سی و پنج چرخه برای تکثیر DNA و تکثیر نهایی یا مرحله پنجم حرارت ۷۲ درجه سانتی گراد و زمان ۷ دقیقه در یک چرخه انجام شد. سپس نتایج از طریق الکتروفوروز محصولات PCR بر روی ژل ۱٪ بررسی شد. سویه مرجع مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران (IBRC-M30223)

پس از ویرایش توالی نوکلئوتیدی ژن سوبتیلیزین ۳ توسط BioEdit توالی نوکلئوتیدی bp1008 بدست آمد که پس از اتصال آگزونهای آن به یکدیگر توالی ۸۶۱ نوکلئوتیدی بدست آمد که ۲۸۷ اسید آمینه را کد می‌کند. همچنین از ویرایش توالی نوکلئوتیدی ژن سوبتیلیزین ۶ توالی نوکلئوتیدی bp824 بدست آمد که پس از اتصال آگزونهای آن به یکدیگر توالی نوکلئوتیدی بدست آمد که ۲۳۳ اسید آمینه را کد می‌کند. با توجه به این که توالی های حاصل شده از این دو ژن در اپیدرموفایتون فلوکوزوم جدید بودند، در بانک ژنی ثبت شدند. نگاره های ۳ و ۲ قسمتی از توالی نوکلئوتیدها و اسید آمینه های این دو ژن جدید را نشان می دهند.

بررسی توالی نوکلئوتیدی سوبتیلیزین ۳

مقایسه توالی های نوکلئوتیدی ژن سوبتیلیزین ۳ در اپیدرموفایتون فلوکوزوم در NCBI، تشابه قابل ملاحظه ای را با سایر درماتوفیت ها و قارچها نشان داد. بطوری که این توالی حدود ۹۳٪ با تریکوفایتون روبروم، ۹۴/۵٪ با تریکوفایتون وروکوزوم، ۹۵/۱٪ با تریکوفایتون بنهامی، ۹۶/۴۹٪ با تریکوفایتون متناگروفایتیس، ۸۳/۷٪ با میکروسپوروم کنیس، ۷۲/۴۱٪ با پنسیلیوم نوردیکوم، ۶۶/۴۲٪ با کوکسیدیوئیدیس ایمیتیس و ۸۹٪ با نانیزیاچیپسنا ۸۶/۶۹٪ با آرترودرماواتائه تشابه داشت. تشابه توالی آمینواسیدهای کد کننده پروتئین سوبتیلیزین ۳ در اپیدرموفایتون فلوکوزوم مطالعه شده در این تحقیق در تریکوفایتون اینتردیجیتال (۹۷/۵۶٪)، تریکوفایتون روبروم (۹۶/۵۱٪)، تریکوفایتون ویولاسئوم (۹۶/۱۵٪)، میکروسپوروم کنیس (۹۳/۳۶٪)، میکروسپوروم جیبسنا (۹۳/۷٪)، کوکسیدیوئیدس پسوداسی (۶۰/۲۲٪)، کوکسیدیوئیدس ایمیتیس (۵۹/۵۱٪) و پنسیلیوم کرایوزنوم (۵۴/۲۹٪) بود. پروتئین سوبتیلیزین ۳ دیده شده در این بررسی غنی از آلانین (۱۲/۵٪) و گلیسین (۱۱/۱٪)

محصولات PCR بر روی ژل ۱٪ بررسی شد (سویه مرجع JBRC-M30223 به عنوان کنترل مثبت و تیوب عاری از DNA به عنوان کنترل منفی مورد استفاده قرار گرفت. سپس از ژل آگارز ۱٪ برای بررسی محصول PCR استفاده شد. با پایان یافتن واکنش PCR، خالص سازی قطعات به دست آمده بر اساس دستورالعمل کیت Bioneer ساخت کشور کره انجام شد.

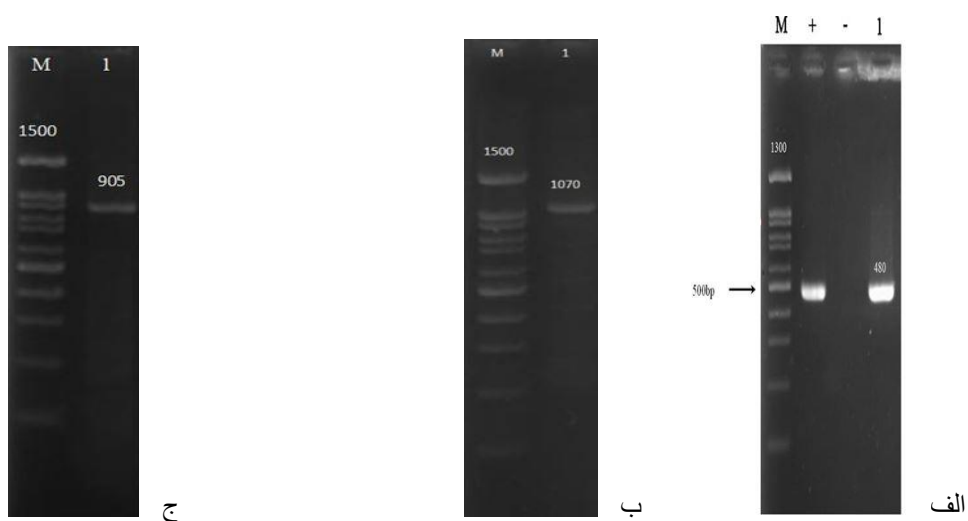
توالی یابی و ویرایش توالی ها

توالی یابی محصول PCR به کمک ABI PRISM[®]3730XL automated Sanger sequencer ساخت کشور امریکا صورت گرفت. پس از خوانش دوطرفه توالیها و ویرایش آنها به کمک نرم افزار Bio-Edit، ورژن ۷،۲،۵ انجام گردید و قسمتهای ناخوانا حذف و توالی های مناسب برای به دست آوردن توالی کامل با یکدیگر همتراز شدند (Alignment). این توالی ها به کمک برنامه آنالیز نوکلئوتیدی BLAST بررسی و تحلیل شده و توالی های مشابه مشخص گردید. اطلاعات توالی ها در برنامه EXPASY-ProtParam tool (<http://web.expasy.org/ProtParam>) بارگزاری شده و درصد آمینواسیدهایی که منجر به تولید آنزیم ها می شدند، بررسی شدند.

نتایج

نتایج تایید مولکولی

پس از انجام واکنش PCR و الکتروفورز محصول سویه مورد استفاده به عنوان اپیدرموفایتون فلوکوزوم تایید شد. نتیجه مثبت تایید این درماتوفیت بر روی باندها bp480 دیده شد (نگاره ۱-الف). الکتروفورز قطعه ای از محصول PCR برای ژن های سوبتیلیزین و سوبتیلیزین ۶ بر روی ژل آگارز ۱٪ صورت گرفت که حضور این دو ژن جدید را روی باندها bp1070 برای سوبتیلیزین ۳ و باندها bp905 برای سوبتیلیزین ۶ در اپیدرموفایتون فلوکوزوم نشان داد (نگاره ۱-ب و ج).



نگاره ۱-الف: نتایج به دست آمده از تایید مولکولی سویه اپیدرموفایتون فلوکوزوم *M*: نشانگر با وزن مولکولی *bp* ۱۳۰۰+ : سویه مرجع *IBRC-M30223* به عنوان کنترل مثبت ، - : و تیوب عاری از *DNA* به عنوان کنترل منفی مورد استفاده قرار گرفت. نتایج مثبت سویه اپیدرموفایتون فلوکوزوم روی باند *bp* ۴۸۰ قابل رویت میباشد. نگاره ۱-ب: نتایج مثبت *PCR* برای ژن سوبتیلیزین ۳ روی باند *bp* ۱۰۷۰. نگاره ۱-ج: نتایج مثبت *PCR* برای ژن سوبتیلیزین ۶ روی باند *bp* ۹۰۵.

۱	A	F	F	H	N	R	G	G	N	D	V	I	P	N	S	Y	I	V	V	M	۲۰
۱	gct	ttc	ttc	cac	aac	cgt	ggc	ggc	aac	gat	gtc	atc	ccc	aac	tcc	tac	atc	gtt	gtc	atg	۶۰
۲۱	K	D	G	V	T	A	E	D	F	D	S	H	I	S	S	V	A	A	T	H	۴۰
۶۱	aag	gac	ggg	gtt	act	gct	gag	gat	ttt	gac	tct	cat	atc	tcc	tct	ggt	gct	gcc	acc	cac	۱۲۰
۴۱	S	L	N	K	A	K	R	G	S	E	T	V	G	H	K	D	S	F	N	I	۶۰
۱۲۱	agc	ctc	aac	aag	gcg	aag	cgt	ggc	tcc	gag	acc	gtc	gga	cac	aag	gac	tcc	tcc	aac	att	۱۸۰
۶۱	N	G	W	R	A	Y	N	G	H	F	D	E	A	T	I	E	S	I	L	K	۸۰
۱۸۱	aac	gga	tgg	aga	gcc	tat	aac	ggc	cac	ttc	gac	gag	gcc	acc	atc	gaa	tct	atc	ctc	aaa	۲۴۰
۸۱	D	D	K	V	N	Y	V	E	H	D	R	V	V	K	L	A	A	L	V	T	۱۰۰
۲۴۱	gat	gac	aag	gtc	aac	tat	gta	gag	cac	gac	cgc	gtt	gtc	aag	ctg	gcc	gct	ctc	gtc	acc	۳۰۰
۱۰۱	Q	P	N	A	P	T	W	G	L	G	R	V	S	H	K	A	P	G	N	K	۱۲۰
۳۰۱	cag	cca	aac	gct	ccc	act	tgg	ggg	ttg	ggc	aga	gtc	tcc	cac	aag	gct	cct	gga	aac	aaa	۳۶۰
۱۲۱	D	F	V	Y	D	S	S	A	G	Q	G	I	T	I	Y	G	V	D	T	G	۱۴۰
۳۶۱	gac	ttt	gtc	tat	gac	agc	tct	gct	ggc	caa	ggc	atc	acc	atc	tat	ggc	gtt	gac	acc	ggg	۴۲۰
۱۴۱	I	D	I	R	H	P	E	F	A	G	R	I	R	W	G	T	N	T	V	D	۱۶۰

۴۶۱	att	gat	atc	cgc	cac	ccc	gaa	ttc	gct	ggc	cg	atc	cgc	tgg	gga	acc	aac	acc	gtc	gac	۴۸۰
۶۶۱	N	D	N	T	D	G	N	G	H	G	T	H	T	A	G	T	F	A	G	T	۶۸۰
۴۸۱	aac	gac	aac	act	gat	ggc	aac	ggc	cac	gga	acc	cac	aca	gct	ggt	acc	ttc	gct	ggc	act	۵۴۰
۶۸۱	T	Y	G	V	A	K	K	A	N	I	V	A	V	K	V	L	S	A	G	G	۶۰۰
۵۴۱	aca	tac	gga	ggt	gct	aag	aag	gcc	aac	att	ggt	gcc	gtc	aag	gtc	ctt	tcc	gct	gga	ggc	۶۰۰
۶۰۱	S	G	S	T	A	G	V	I	K	G	I	D	W	C	V	T	D	A	R	S	۶۲۰
۶۰۱	tcc	ggc	tct	acc	gct	ggc	gtg	ata	aag	ggc	att	gac	tgg	tgt	gtt	act	gat	gcc	cga	tcc	۶۶۰
۶۲۱	R	N	I	L	G	K	A	A	L	N	L	S	L	G	G	S	F	S	Q	A	۶۴۰
۶۶۱	agg	aac	att	ctc	gga	aag	gct	gcc	ctt	aac	ctg	agc	ttg	ggc	ggt	tct	ttc	agt	cag	gct	۶۲۰
۶۴۱	N	N	D	A	V	T	R	A	Q	E	A	G	I	F	V	A	V	A	A	G	۶۶۰
۶۲۱	aac	aac	gat	gcc	ggt	acc	cg	gcc	cag	gaa	gct	ggt	atc	ttc	gta	gct	ggt	gcc	gct	gga	۶۸۰
۶۶۱	N	D	K	R	D	A	R	N	Y	S	P	A	S	A	P	A	V	C	T	A	۶۸۰
۶۸۱	aac	gac	aag	agg	gac	gcc	agg	aac	tat	tct	cca	gcc	tca	gct	cca	gct	gtc	tgc	acc	gcc	۸۴۰
۶۸۱	A	S	S	T	I	D	D	۶۸۷													
۸۴۱	gcc	tcc	tcc	acc	att	gat	gac	۸۶۱													

نگاره ۲- قسمتی از توالی نوکلئوتید DNA و اسید آمینه های ژن سویتیلیزین ۳ در اپیدرموفایتون فلوکوزوم

۱	L	M	R	R	A	G	S	S	K	P	M	A	G	M	Q	N	K	Y	S	L	۲۰
۱	cta	atg	cg	cgc	gcc	gg	ag	tcc	aa	ccc	atg	gct	gg	atg	ca	aa	aa	tac	tcc	ctt	۶۰
			c			c	c		g			a		a	c	g					
۲۱	G	G	I	F	R	A	Y	S	G	E	F	D	D	A	M	I	K	D	I	S	۴۰
۶۱	gg	ggt	atc	ttc	cg	gg	tac	tct	gg	ga	ttc	gat	ga	gcg	atg	att	aa	gat	att	tcc	۱۲
	a				g	c			c	g			c			a					
۴۱	G	H	D	D	V	D	F	I	E	P	D	F	V	V	R	A	T	T	N	G	۶۰
۱۲	gg	ca	ga	gat	gtc	ga	ttc	att	ga	ccc	ga	ttt	ggt	gtg	ag	gcc	acc	act	aa	gg	۱۸
	c	c	t		c				g		c			g				c	c		
۶۱	T	N	L	T	H	Q	D	N	V	P	S	W	G	L	A	R	V	S	T	M	۸۰
۱۸	act	aa	ctc	acc	cat	ca	ga	aa	gtc	ccc	tct	tgg	gg	ctt	gcc	cgc	ggt	agt	act	atg	۲۴
		c			g	c	c					a									
۸۱	K	R	G	G	T	T	Y	Y	Y	D	P	S	A	G	K	G	V	T	A	Y	۱۰
۲۴	aa	cg	gg	gg	ac	acc	tac	tac	tat	gat	ccc	tcc	gct	ggc	aa	ggt	ggt	ac	gcc	tat	۳۰
	g	c	t	c	a									a			g				
۱۰	V	I	D	T	G	I	D	T	K	H	E	D	F	G	G	R	A	K	W	G	۱۲
۳۰	ggt	atc	ga	act	ggt	atc	gat	acc	aa	cat	ga	gat	ttc	gga	gg	cg	gct	aa	tgg	ggt	۳۶
			t						g		a			c			g				
۱۲	K	N	F	A	D	Q	M	D	E	D	C	N	G	H	G	T	H	V	A	G	۱۴
۳۶	aa	aa	ttt	gct	gat	ca	atg	gat	ga	ga	tgc	aat	gg	cat	gg	acc	cat	ggt	gct	gg	۴۲
	g	c			g				g	c			c		a					a	
۱۴	T	V	G	G	T	K	Y	G	L	A	K	S	V	S	L	V	A	V	K	V	۱۶
۴۲	act	ggt	gg	gg	ac	aa	tac	gg	ctt	gct	aa	agt	gtc	tcc	ctc	ggt	gct	gtc	aa	gtc	۴۸
			t	a	g	a		a		g								g			
۱۶	L	D	C	E	G	S	G	S	N	S	G	V	I	K	G	M	E	W	A	M	۱۸
۴۸	ctt	ga	tgt	ga	gg	tcc	gg	tct	aa	tct	ggt	gtc	atc	aag	ggt	atg	ga	tgg	gcc	atg	۵۴
		c		g	c		a		c								a				
۱۸	K	D	A	S	G	G	G	N	G	T	A	K	A	A	G	K	A	V	M	N	۶۰
۵۴	aa	ga	gct	tct	ggt	ggt	ggt	aat	gg	acc	gct	aa	gct	gct	gg	aa	gct	gtc	atg	aa	۶۰
	a	c							c			g			a	g				c	
۲۰	M	S	L	G	G	P	R	S	E	A	T	N	Q	A	A	K	A	I	S	D	۶۲
۶۰	atg	tcc	ctc	ggt	gg	cct	cg	tct	ga	gcc	acc	aa	ca	gct	Gc	aa	gcc	att	tct	gat	۶۶
				a					a			c	g		t	g					
۲۲	A	G	I	F	L	A	V	A	A	G	N	E	N								
۶۶	gct	ggt	atc	ttc	ttg	gct	gtc	gct	gct	ggt	aa	ga	aa								
											c	a	c								

نگاره ۳- قسمتی از توالی نوکلئوتیدی DNA و اسید آمینه های ژن سویتیلیزین ۶ در اپیدرموفایتون فلوکوزوم

ب

جدول ۳- درصد آمینواسید های سرین پروتئازهای کدشده توسط

سویتیلیزین ۶

اسید آمینه ها	تکرار	درصد
(A) آلانین	۲۷	۱۱٪/۶
(R) آرژینین	۸	۳٪/۴
(N) آسپاراژین	۱۲	۵٪/۲
(D) اسید آسپاراتیک	۱۸	۷٪/۷
(C) سیستئین	۲	۰٪/۹
(Q) گلوتامین	۴	۱٪/۷
(E) اسید گلو تامیک	۸	۳٪/۴
(G) گلیسین	۳۵	۱۵٪
(H) هیستیدین	۵	۲٪/۱
(I) ایزولوسین	۹	۳٪/۹
(L) لوسین	۹	۳٪/۹
(K) لیزین	۱۶	۶٪/۹
(M) متیونین	۱۰	۴٪/۳
(F) فنیل آلانین	۷	۳٪
(P) پرولین	۵	۲٪/۱
(S) سرین	۱۷	۷٪/۳
(T) ترئونین	۱۵	۶٪/۴
(W) تریپتوفان	۳	۱٪/۳
(Y) تیروزین	۷	۳٪
(V) والین	۱۶	۶٪/۹

بود اما مقدار سیستئین (۰/۷٪) و متیونین (۰/۳٪) کمترین مقادیر را نشان دادند. (جدول ۲).

جدول ۲- درصد آمینواسید های سرین پروتئازهای کدشده توسط

سویتیلیزین ۳

اسید آمینه ها	تکرار	درصد
(A) آلانین	۳۶	۱۲٪/۵
(R) آرژینین	۱۳	۴٪/۵
(N) آسپاراژین	۲۱	۷٪/۳
(D) اسید آسپاراتیک	۲۳	۸٪
(C) سیستئین	۲	۰٪/۷
(Q) گلوتامین	۴	۱٪/۴
(E) اسید گلو تامیک	۷	۲٪/۴
(G) گلیسین	۳۲	۱۱٪/۱
(H) هیستیدین	۱۰	۳٪/۵
(I) ایزولوسین	۱۷	۵٪/۹
(L) لوسین	۱۰	۳٪/۵
(K) لیزین	۱۵	۵٪/۲
(M) متیونین	۱	۰٪/۳
(F) فنیل آلانین	۱۰	۳٪/۵
(P) پرولین	۷	۲٪/۴
(S) سرین	۲۲	۷٪/۷
(T) ترئونین	۲۱	۷٪/۳
(W) تریپتوفان	۴	۱٪/۴
(Y) تیروزین	۷	۲٪/۴
(V) والین	۲۵	۸٪/۷

بررسی توالی نوکلئوتیدی سوبتیلیزین ۶

توالی نوکلئوتیدی ژن سوبتیلیزین ۶ نیز تشابه زیادی را با سایر درماتوفیت ها و قارچها نشان داد. این توالی جدید تشابه زیادی با ترایکوفایتون روبروم (۹۱/۴۸٪)، ترایکوفایتون سودانسیس (۹۱/۶۱٪)، ترایکوفایتون تونسورنس (۹۰/۸۹٪) نانیزیا جیسیا (۸۲/۸۹٪) و پنسیلیوم دیجیتاتوم (۶۹/۱۱٪) داشت. توالی اسید آمینه های کدکننده پروتئین سوبتیلیزین ۶ تشابه قابل ملاحظه ای با ترایکوفایتون متاگروفایتیس (۹۰/۱۳٪)، ترایکوفایتون بن هامی (۹۱/۴٪)، ترایکوفایتون روبروم (۹۴/۸۹٪)، کوکسیدیوئیدس ایمیتیس (۵۷/۳۳٪)، کوکسیدیوئیدس پسوداسی (۵۶/۹٪) نشان داد. در این پروتئین جدید نیز همانند سوبتیلیزین ۳ مقادیر بالای گلايسين و آلانين (۱۵٪ و ۱۱/۶٪ به ترتیب) دیده شد (جدول ۳). در عوض تنها مقادیر کمی از تریپتوفان (۱/۳٪) و سیستین (۰/۹٪) را دارا بود. همچنین این توالی ها جدید به وسیله نرم افزار BANKIT در پایگاه NCBI ثبت گردید. کد دسترسی این توالی ها در NCBI به ترتیب برای سوبتیلیزین ۳، MN206114 و برای سوبتیلیزین ۶، MN177931 می باشد.

بحث

به منظور توسعه استراتژیهای پیشگیری و درمان، شناسایی فاکتورهای بیماریزای درماتوفیتها و آشنایی با عملکرد آنها لازم و ضروری به نظر میرسد. شیوع بالای عفونت های ناشی از درماتوفیت ها و اطلاعات اندکی که در زمینه مکانیزم های موثر بیماریزایی در درماتوفیت های مورد نظر ما وجود دارد، باعث شده که محققین به این امر توجه نشان دهند (۱۵). درماتوفیتها آندسته از قارچهای کراتین دوستی هستند که از سازگاری بسیار بالایی برای اتصال به بافتهای غنی از کراتین میزبان و تجزیه آن برخوردارند از آن جمله میتوان به تولید آنزیم هایی چون کراتیناز که باعث تجزیه کراتین و ایجاد بیماری می گردد اشاره کرد (۱۶، ۱۷).

بنابراین بررسی حضور ژنهای بیماریزایی چون سوبتیلیزین، می تواند در تشخیص فاکتورهای بیماریزا کمک نماید. مطالعات پیشین حضور خانواده ژنی سوبتیلیزین ۷-۱ و نقش آنها را در درماتوفیت ها اثبات نموده است (۱۰، ۱۴). اما بیشتر این بررسی ها بر روی جنس های میکروسپوروم و ترایکوفایتون از گروه درماتوفیت ها صورت گرفته است و در مورد اپیدرموفایتون فلوکوزوم بررسی فاکتورهایی که در اتصال و تهاجم این ارگانیسم به سلولهای میزبان دخالت میکنند بسیار کم صورت گرفته است. اپیدرموفایتون فلوکوزوم تنهاگونه درجنس خود میباشد که از خاصیت ایجادبیماریزایی برخوردار است و درماتوفیتی انسان دوست است اگر چه هرگز موی سر میزبان را آلوده نمی کند اما باعث کچلی ها (درماتوفیتوزیس) در پوست به خصوص در ناحیه کشاله ران می شود (۱، ۲). عملکرد بالقوه ژن سوبتیلیزین در سویه های مختلف درماتوفیت ها و بیان بالای این ژن در این قارچها، آنها را قادر به شکستن کراتین کرده و به دنبال آن موجب تسهیل روند عفونت زایی در میزبان مورد تهاجم می گردد (۶). طبق مطالعات پیشین سه مرحله اصلی بیماریزایی درماتوفیت ها، اتصال، نفوذ و تحریک پاسخ ایمنی می باشد بنابراین حضور این ژن ها در درماتوفیت مورد بررسی ما می تواند نشان دهنده اهمیت آن در مرحله چسبیدن قارچ به سلول های پوست و تاییدی بر مطالعات پیشین باشد (۵). نکته قابل توجه در مطالعه انجام شده توسط لمسادک و همکاران این بود که از بین تمام جنسها و گونه های مختلف درماتوفیتی که مورد بررسی قرار گرفتند ژن سوبتیلیزین ۳ که از توانایی تجزیه آلبومین، کلاژن، کراتین و الاستین برخوردار بود از تمام ارگانیسمها جدا گردید (۱۰) در مطالعه خدمتی و همکاران ژن سوبتیلیزین ۳ نیز از تمام ایزوله های اپیدرموفایتون فلوکوزوم جدا گردید (۱۸)، به نظر میرسد که حضور این ژن در مراحل مختلف بیماریزایی لازم و ضروری به نظر میرسد. مطالعات

درماتوفیتهای خاکدوست و حیواندوست که با واکنشهای التهابی بیشتری برخوردارند همراه بود (۱۰) در مطالعه کرمی رباطی و همکاران (۱۱) ژن سوبتیلیزین ۶ در درماتوفیت انساندوست ترایکوفایتون روبروم و همچنین در مطالعه خدمتی و همکاران (۱۸) این ژن در اپیدرموفایتون فلوکوزوم از درصد فراوانی کمی برخوردار بود که این مساله مرتبط با انساندوست بودن این ارگانیسرها و تأیید کننده مطالعه لمساکد و کرمی رباطی و همکاران میباشد (۱۰، ۱۱). در مطالعه لمساکد و همکاران تمام ایزوله های ترایکوفایتون متاگروفایتیس به عنوان یک ارگانیسر زئونوز دارای ژن سوبتیلیزین ۶ بودند (۱۰). در مطالعه انجام شده توسط شای و همکاران سویه موتانت سوبتیلیزین ۶ در ترایکوفایتون متاگروفایتیس در مقایسه با سویه کنترل ضایعات خفیفتری را در حیوان آزمایشگاهی ایجاد کرده بود که این مساله میتواند تأیید کننده نقش ژن سوبتیلیزین ۶ در تحریک سیستم دفاعی بدن باشد و ژن مورد نظر رابه عنوان کاندید مناسبی برای طراحی واکسن معرفی میکنند (۸). از آنجا که با تعیین توالی پروتئین و اسید آمینه سوبتیلیزین ۶ جدید این تحقیق و شباهت ۹۴/۸۲٪ آن با توالی های ترایکوفایتون روبروم ثبت شده در پایگاه داده های بانک ژنی، شاید بتوان گفت که این ژن و پروتئین جدید نیز احتمالاً در ایجاد پاسخ سیستم ایمنی در اپیدرموفایتون فلوکوزوم موثر می باشد.

بررسی ترکیبات پروتئین سوبتیلیزین در برخی از قارچها بسیار مشابه است. در تحقیقی که بر روی پروتئین سوبتیلیزین در قارچ ترمواکتینومایسس ولگاریس صورت گرفت مشخص شد که این پروتئین حاوی مقادیر بالایی از اسید آمینه های گلیسین و آلانین بود که تأیید کننده نتایج تحقیق حاضر می باشد (۲۰). با وجود اینکه تحقیق پیش رو یک طرح دانشجویی با محدودیت زمانی بود اما به دلیل اینکه برای اولین بار بررسی ژن بیماریزای سوبتیلیزین در

نشان داده است که ژن سوبتیلیزین ۳ موجب اتصال درماتوفیت به اپیدرم پوست میزبان و به دنبال آن نفوذ به داخل پوست در میکروسپوروم کنیس می گردد (۱۹). در مطالعه تجربی انجام شده سویه ای از میکروسپوروم کنیس که در آن ژن سوبتیلیزین ۳ خاموش سازی شده بود در مقایسه با سویه کنترل با کاهش اتصال آرتروکونیدی به سلولهای اپی تلیال مدل حیوانی برخوردار بود، همچنین وجود مهارکننده سرین پروتئاز ۳ به طور قابل توجهی از عملکرد سوبتیلیزین ۳ و اتصال آرتروکونیدی این ارگانیسر به سلولهای اپی تلیال جلوگیری به عمل آورد که این مساله تأیید کننده نقش این ژن میباشد (۱۹). از آنجا که با مقایسه توالی ژن جدید سوبتیلیزین ۳ تشابه بسیار زیادی از این ژن در درماتوفیت مورد نظر ما و میکروسپوروم کنیس (۹۳/۳۶٪) دیده شده، احتمالاً این ژن جدید نیز در مرحله اتصال قارچ به بافت میزبان در اپیدرموفایتون فلوکوزوم موثر است. وجود تشابه بین توالی های نوکلئوتیدی و اسید آمینه های بدست آمده در تحقیق حاضر با توالی ژن سوبتیلیزین ۳ در ترایکوفایتون روبروم (۹۴/۵٪)، می تواند تعیین کننده اهمیت اثر این ژن در ایجاد بیماریزایی در هر دو درماتوفیت و تأیید تحقیقات صورت گرفته دیگر در این زمینه باشد. ژن سوبتیلیزین ۶ باعث ایجاد حساسیت فوری و تاخیری ناشی از عملکرد سیستم ایمنی در درماتوفیت ها می گردد (۸). سوبتیلیزین ۶ در جنس ترایکوفایتون به عنوان یک فاکتور آلرژن مطرح میشود، نقش آلرژن Tri r2 در ترایکوفایتون روبروم و Tri m4 در ترایکوفایتون متاگروفایتیس در ایجاد ازدیاد حساسیت تاخیری و فوری ثابت شده است، همچنین ژن مورد نظر از خاصیت تجزیه کراتین، کلاژن، آلبومین و کازئین برخوردار است (۸، ۱۰). در مطالعه لمساکد و همکاران ژن سوبتیلیزین ۶ در ترایکوفایتون روبروم و ارگانیسرهای انساندوست که با واکنشهای التهابی کمتری برخوردارند از درصد فراوانی کمتری نسبت به

- isolates of dermatophytes in Hamadan city, Central west of Iran, using PCR-RLFP method. *Journal de Mycologie Médicale*. 2018;28(1):101-105.
- 3- Giddey K, Monod M, Barblan J, Potts A, Waridel P, Zaugg C, et al. Comprehensive analysis of proteins secreted by *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton violaceum* under in vitro conditions. *Journal of proteome research*. 2007;6(8):3081-3092.
 - 4- Monod M. Secreted proteases from dermatophytes. *Mycopathologia*. 2008;166(5-6):285-294.
 - 5- Chinnapun D. Virulence factors involved in pathogenicity of dermatophytes. *Walailak Journal of Science and Technology (WJST)*. 2015;12(7):573-580.
 - 6- Mercer DK, Stewart CS. Keratin hydrolysis by dermatophytes. *Medical Mycology*. 2019;57(1):13-22.
 - 7- Peres NTdA, Maranhão FCA, Rossi A, Martinez-Rossi NM. Dermatophytes: host-pathogen interaction and antifungal resistance. *Anais brasileiros de dermatologia*. 2010;85(5):657-667.
 - 8- Shi Y, Niu Q, Yu X, Jia X, Wang J, Lin D, et al. Assessment of the function of SUB6 in the pathogenic dermatophyte *Trichophyton mentagrophytes*. *Medical mycology*. 2016;54(1):59-71.
 - 9- Achterman RR, White TC. Dermatophyte virulence factors: identifying and analyzing genes that may contribute to chronic or acute skin infections. *International journal of microbiology*. 2012 (1687-918X):358305. Available from: doi: 10.1155/2012/358305.
 - 10- Lemsaddek L, Chambel L, Tenreiro R. Incidence of fungalysin and subtilisin virulence genes in dermatophytes. *Spain: Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology A*. 2010:658-665.
 - 11- Robati AK, Khalili M, Hazaveh SJH, Bayat M. Assessment of the subtilisin genes in *Trichophyton rubrum* and *Microsporum*

درماتوفیت مورد مطالعه در ایران صورت گرفته است، می تواند در تحقیقات آتی مورد استفاده قرار گیرد.

نتیجه گیری

در تحقیق حاضر بررسی مولکولی حضور ژن های سوبتیلیزین ۳ و سوبتیلیزین ۶ در اپیدرموفایتون فلوکوزوم صورت گرفت. از آنجایی که تایید سویه مورد استفاده در این بررسی به صورت سنتی، ممکن بود به اشتباهاتی منجر گردد، علاوه بر روش سنتی از روش مولکولی که مطمئن ترین روش شناسایی گونه های درماتوفیت است نیز استفاده شد. سپس برای بررسی حضور دو ژن مهم سوبتیلیزین ۳ و سوبتیلیزین ۶ که در بیماری های درماتوفیت هایی چون ترایکوفایتون روبروم، ترایکوفایتون متاگروفایتس و میکروسپوروم کنیس نقش بسیار مهمی دارند، PCR انجام شد و دو ژن جدید در این درماتوفیت شناسایی و توالی نوکلئوتید و سپس از روی آنها اسید آمینه های کدشونده تعیین گردید و در NCBI ثبت گردید. بررسی و مقایسه این توالی ها تشابه بسیار بالایی با توالی های ثبت شده در بانک ژنی را نشان داد. نتایج مطالعه پیش رو در شناسایی ژن های سوبتیلیزین جدید در اپیدرموفایتون فلوکوزوم و تعیین توالی نوکلئوتیدها و به دنبال آن شناسایی اسیدهای آمینه ای که کدمیکند می تواند تاییدی بر مطالعات پیشین صورت گرفته در این زمینه مبنی بر اهمیت تعیین توالی ژن ها و استفاده از این اطلاعات برای تولید داروهای جدید و واکسن برای درمان عفونت های درماتوفیتی ناشی از این قارچ و سایر درماتوفیت ها باشد.

فهرست منابع

- 1- Ebrahimi M, Zarrinfar H, Naseri A, Najafzadeh MJ, Fata A, Parian M, et al. Epidemiology of dermatophytosis in northeastern Iran; A subtropical region. *Current Medical Mycology*. 2019;5(2):16-21.
- 2- Farokhipor S, Ghiasian S, Nazeri H, Kord M, Didehdar M. Characterizing the clinical

- canis from dermatophytosis. *Comparative Clinical Pathology*. 2018;27(5):1343-1347.
- 12- Dos Santos ALS, de Carvalho IM, da Silva BA, Portela MB, Alviano CS, de Araújo Soares RM. Secretion of serine peptidase by a clinical strain of *Candida albicans*: influence of growth conditions and cleavage of human serum proteins and extracellular matrix components. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2006;46(2):209-220.