تعیین جایگاه سلولی پروتئین انکسین C3.1 (ANXC3.1) و تأثیر بیان بیش از حد آن بر روی رشد وترشح پروتئین در آسپرژیلوس نیجر

حمزه رحیمی I
دکتر محمدمراد فرج‌اللهی II
دکتر سیدامیر یزدان‌پرست III
دکتر محمد عزیزی IV
* دکتر وحید خلج V

چکیده

زمینه و هدف: انکسین‌ها، خانواده بزرگی از پروتئین‌های متصل شونده به کلسیم و فسفولیپیدها می‌باشند که تقریباً درتمامی رده‌های یوکاریوتی وجود دارند. پروتئین‌های مذکور در طیفی از قارچ‌ها ازجمله آسکومیست‌ها، بازیدیومیست‌ها و همچنین اوومیست‌ها یافت شده‌اند. این مطالعه با هدف بررسی جایگاه سلولی انکسین C3.1 در قارچ رشته‌ای آسپرژیلوس نیجر به انجام رسیده است. همچنین، تأثیر بیان بیش از حد این پروتئین بر روی رشد و توانائی ترشحی قارچ بررسی گردید.

روش بررسی: دراین مطالعه تجربی، ژن انکسین C3.1 با استفاده از روش PCR (Polymerase Chain Reaction) از روی DNA ژنومی قارچ آسپرژیلوس نیجر تکثیر و پس از تأئید صحت توالی، در ساخت دو سازه ژنی قابل القاء به‌کار گرفته شد. در سازه اول، انکسین به‌صورت ممزوج با GFP(Green Fluorescent Protein) و تحت کنترل پروموتور گلوکوآمیلاز در ناقل بیانی PGEM–Egfp و در سازه دوم، ژن مذکور تحت کنترل پروموتور سلوبیوهیدرولاز در ناقل بیانی pMJB104 کلون گردید. این سازه‌ها با استفاده از روش استاندارد ترانسفورماسیون قارچ‌ها به سویه آسپرژیلوس نیجر N402 وارد شدند. بیان هر یک از سازه‌ها با استفاده از منبع کربنی القاءکننده، القاء و تأثیر بیان بیش از حد ژن انکسین بر روی رشد شعاعی سویه‌های ترانسفورمنت و میزان ترشح پروتئین توسط آن‌ها بررسی گردید. مقایسه میانگین سرعت رشد شعاعی و میانگین میزان ترشح پروتئین سویه‌های ترانسفورمنت با میانگین‌های مربوطه در سویه وحشی با استفاده از آزمون t انجام پذیرفت. جایگاه سلولی انکسین در سویه ترانسفورمنتی که پروتئین ممزوج با GFP را بیان می‌نمود، با استفاده از میکروسکوپ فلئورسنت تعیین گردید.

یافته‌ها: اثر بیان بیش از حد ژن انکسین C3.1 بر روی سرعت رشد و ترشح پروتئین در آسپرژیلوس نیجر بررسی گردید. مقایسه میانگین سرعت رشد شعاعی و میزان ترشح پروتئین سویه‌های ترانسفورمنت با سویه وحشی، تفاوت معنی‌داری را نشان نداد ($\alpha< ۰/۰۵$). مطالعه‌ی میکروسکوپی سویه‌ی بیان‌کننده پروتئین ممزوج انکسین-GFP نشان داد که انکسین یک پروتئین سیتوزولی است که در سراسر هیف قارچی منتشر می‌باشد.

نتیجه‌گیری: این نوع مطالعه در تعیین جایگاه سلولی انکسین C3.1 برای اولین بار انجام گرفته و گزارش می‌شود. انکسین، یک توزیع سیتوزولی داشته و بیان بیش از حد آن منجر به افزایش ترشح پروتئین درقارچ رشته‌ای آسپرژیلوس نیجر نمی‌گردد.

کلیدواژه‌ها: ۱- آسپرژیلوس نیجر ۲- انکسین C3.1 (AnnexinC3.1) ۳- سلوبیوهیدرولاز ٤- گلوکوآمیلاز ٥- پروتئین سیتوزولی

مقدمه

انکسین‌ها، خانواده بزرگی از پروتئین‌ها متصل‌شونده به کلسیم و فسفولیپیدها بوده و تا به‌حال بیش از ۲۰۰ نوع (ایزوفرم) از آن‌ها درگیاهان و جانوران یافت شده است.[۱] انکسین‌ها در طیفی از قارچ‌ها نیز شناسایی شده‌اند که از لحاظ فیلوژنی در گروه C انکسین‌ها طبقه‌بندی می‌شوند.[۲ و ۳] ساختار منحصر به فرد این پروتئین‌ها موجب توانائی اتصال به ساختارهای غشائی می‌شود.

دومین(Domain) مرکزی انکسین‌ها شامل چهارتا هشت

این مقاله خلاصه‌ای است از پایان‌نامه آقای حمزه رحیمی جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته بیوتکنولوژی پزشکی به راهنمایی دکتر خلج و دکتر فرج‌اللهی و مشاوره دکتر یزدان‌پرست، سال ۱۳۸٦. این مطالعه تحت حمایت مالی انستیتو پاستور ایران صورت گرفت.

I) دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی پزشکی، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی ایران، تهران، ایران
II) استادیار بیوشیمی بالینی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی ایران، تهران، ایران
III) استادیار قارچ شناسی پزشکی، گروه قارچ شناسی پزشکی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی ایران، تهران، ایران
IV) محقق گروه بیوتکنولوژی پزشکی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
V) استادیار بیوتکنولوژی مولکولی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، خیابان کارگر، خیابان پاستور، تهران، ایران (*مؤلف مسؤول)

توالی تکراری ۷۰ آمینواسیدی است. این بخش از مولکول به‌عنوان بخش حفظ شده (Conserved) شناخته می‌شود که به واسطه آن پروتئین به کلسیم و غشاهای سلولی متصل می‌گردد.[۳-۷] انکسین‌های قارچی حاوی دومین‌های غیرهمولوگ در انتهای آمینی زنجیره آمینواسیدی بوده که طول و توالی متفاوتی دارند. این تفاوت، عامل جایگیری سلولی متنوع و عملکردهای اختصاصی این پروتئین‌ها می‌باشد. این پروتئین‌ها از نوع سیتوزولی بوده که به دو حالت محلول و متصل به ساختارهای غشائی و اجزای اسکلت داخل سلولی (Cytoskeleton) دیده می‌شوند. در بعضی از موارد ممکن است در سطح سلولی نیز نمایان شوند.[۸]

انکسین‌ها به‌عنوان رابط غشاء-اسکلت سلولی یا غشاء- غشاء عمل کرده و در وقایع اگزوسیتوز با واسطه کلسیم، مراحل خاصی از اندوسیتوز و پایدارسازی دومین‌های خاصی از غشای اندامک‌ها و غشای پلاسمایی دخیل می‌باشند.[۹] ایزوفرم‌های انکسین در برقراری هموستاز کلسیم[۱۰]، اندوسیتوز تسهیل شده با واسطه رسپتور و در تنظیم رشد و تزاید سلولی نقش دارند[۱۱ و ۱۲]. انکسین‌ها می‌توانند جایگاه داخل سلولی خود را باتوجه به نوسانات غلظت کلسیم سیتوزولی و یا تحت شرایط استرس (استرس اکسیداتیو) تغییر دهند.[۱۳]

اولین انکسین قارچی با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیک در آسکومیست نورسپورا کراسا شناسایی شد.[۱۴] در اواخر سال ۲۰۰۴، تعداد دیگری از انکسین‌ها در سایر قارچ‌های رشته‌ای نظیر آسپرژیلوس‌ها شناسائی و برخی از آن‌ها نیز به‌طور تجربی تعیین خصوصیت شدند. برای مثال خلج و همکاران ژن انکسین C3.1 را از آسپرژیلوس نیجر کلون و مورد بررسی قرار داده اند.[۲ و ۱۵]

ژنوم قارچ آسپرژیلوس نیجر (A.niger) حاوی یک نسخه از ژن انکسین C3.1 می‌باشد. این ژن، با طول تقریبی ۱/۵ kb یک پروتئین ۵۰۶ اسید آمینه‌ای را کد می‌کند. تخریب این ژن هیچ‌گونه اثری در میزان ترشح پروتئین و یا فنوتیپ رشد قارچ نداشته است.[۱۵] هدف از انجام این پژوهش بررسی جایگاه سلولی این پروتئین و همچنین بررسی تأثیر احتمالی بیان بیش از حد انکسین C3.1 بر روی میزان ترشح پروتئین توسط قارچ آسپرژیلوس نیجر بوده است.

روش بررسی

روش‌ها و مواد مختلفی که در این مطالعه تجربی (Experimental) به‌کار گرفته شدند، به شرح زیر می‌باشند:

پلاسمیدها و سوش‌ها

آسپرژیلوس نیجر N402[۱۵] برای جداکردن ژن انکسین و بررسی بیان بیش از حد انکسین مورد استفاده قرار گرفت. سلول‌های اشریشیا کلی (E.Coli) TOP۱۰ (Invitrogen) به‌عنوان میزبان پلاسمیدهای نوترکیب در مراحل کلونینگ، استفاده شد. وکتور pGEM-TEasy (Promega) برای کلون کردن محصولات PCR استفاده شد. پلاسمید pMJB104 (هدیه از طرف کمپانی F2g، انگلستان) حاوی پروموتور و ترمیناتور ژن cbh B (سلوبیوهیدرولاز B) و مارکر مقاومت هایگرومایسین است که سبب مقاومت ترانسفورمنت‌های قارچی به آنتی‌بیوتیک هایگرومایسن B و رشد در محیط حاوی این آنتی‌بیوتیک می‌شود. پلاسمید pGEM-Egfp (هدیه از طرف کمپانی F2G، انگلستان) واجد ژن کدکننده eGFP و پروموتور glaA مربوط به آسپرژیلوس آووماری است. پلاسمید pAN7.1 حاوی مارکر مقاومت هایگرومایسین باکتریایی تحت کنترل پروموتور gpdA (گلیسرآلدئید ۳- فسفات دهیدروژناز) آسپرژیلوس نیدولانس[۱۶] می‌باشد که برای انتخاب ترانسفورمنت‌های قارچی استفاده شد.

شرایط کشت و رشد

جهت جمع‌آوری اسپور سویه‌های قارچی، قارچ‌های مورد نظر بر روی محیط غنی SAB (سابورو دکستروز) آگار به مدت ۵-۴ روز در دمای ۳۰ درجه کشت داده شد. پس از اسپورزائی، اسپورها به آرامی با استفاده از محلول ۰/۱٪ (۲۰)PBS-Tween جمع‌آوری شدند. برای تهیه توده زیستی از سویه‌های مختلف در این تحقیق، تعداد

۱×۱۰^{۶} اسپور (غلظت نهایی) در ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع SAB تلقیح و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با دور ۲۵۰rpm در دقیقه به مدت ۲۴–۱۶ ساعت رشد داده شدند.

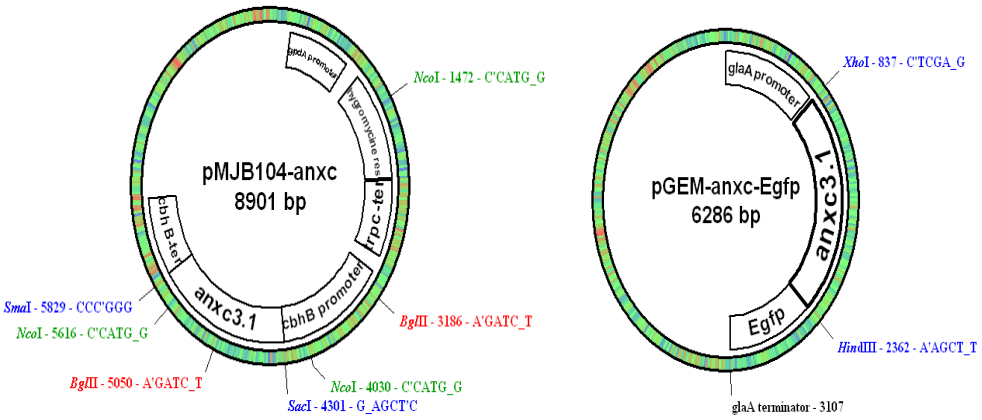
برای بررسی تأثیر بیان بیش از حد ژن انکسین C3.1 در سویه‌های ترانسفورمنت و وحشی، این سویه‌ها در محیط حداقل وگل (Vogel's minimum medium)[۱۷] جامد حاوی منابع کربنی القاءکننده بیان [کربوکسی متیل سلولز ۱٪ برای پروموتور سلوبیوهیدرولاز B، (cbhB)، ومالتودکسترین ۱٪ برای پروموتور گلوکوآمیلاز، (glaA)] در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد رشد داده شدند.

استخراج DNA ژنومی و پلاسمیدی

نمونه‌های DNA قارچی براساس روش مولر استخراج گردید.[۱۸] به‌طور خلاصه، ۲۰۰–۱۰۰ میلی‌گرم از توده زیستی قارچ جمع‌آوری شد و در هاون چینی و تحت ازت مایع خرد و به‌صورت پودر ریز درآمد. سپس هم حجم توده خرد شده، بافر لیزکننده (0.7 M NaCl, 0.1 M Na2 (SO3), 0.1 M Tris/HCl pH 7.5, 0.05 M EDTA, 1% (w/v) SDS) اضافه و مخلوط به مدت ۲۰ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی‌گراد نگه داشته شد. مخلوط مذکور سپس با میزان هم حجم از محلول کلروفرم- ایزوآمیل الکل (۲۴:۱) استخراج و DNA ژنومی با استفاده از میزان هم حجم از ایزوپروپانل رسوب داده شد. استخراج پلاسمیدها با استفاده از کیت تخلیص پلاسمید Qiagen mini prep و تخلیص محصولات PCR با استفاده ازکیت تجاری Qiagen gel extraction انجام پذیرفت. روش‌های مولکولی برای هضم آنزیمی، متصل کردن قطعات DNA و ترانسفورماسیون در E. coli براساس روش‌های تعریف شده، انجام گردید[۱۹].

کلون کردن ژن anx C3.1 و تهیه سازه‌های ژنی

ژن انکسین C3.1 با استفاده از پرایمر بالادست (RAHF1) 5′-CCG-AGC-TCA-TGT-CTT-ATC-AGC- و پرایمر پائین‌دست (RAHR1) 5′-CAC- AAC-C-<T>-3′ CCG-GGT-TAT-CAA-TGA-GAG-ACC-A-<C>-3′ تکثیر شد. در این پرایمرها توالی که زیر آن خط کشیده شده است به ترتیب نشانگر جایگاه اثر آنزیم‌های *Sac*I و *Sma*I می‌باشد. PCR با شرایط زیر انجام شد: ۹۵ °C، ۵ دقیقه یک سیکل، ۹۵°C، ۱دقیقه، ۵۸°C، ۳۰ ثانیه، ۶۸°C، ۲ دقیقه در ۳۰ سیکل. محصول PCR پس از خالص‌سازی در وکتور pGEM-TEasy کلون و پلاسمید نوترکیب pGEM-anxc3.1 نام گرفت. پس از تعیین توالی قطعه کلون شده (anxc3.1) و تأئید صحت آن، ژن انکسین از پلاسمید نوترکیب pGEM-anxc3.1 با هضم آنزیمی *sac*I/*sma*I جدا و سپس در وکتور pMJB-104 کلون گردید. پلاسمید نوترکیب حاصل pMJB104–anxc نام گرفت (شکل شماره ۱).



شکل شماره ۱– نقشه سازه‌های تهیه شده. A) pMJB104-anxc : ژن انکسین بین پروموتور و ترمیناتور cbhB کلون شده است. این سازه حاوی مارکر آنتی‌بیوتیکی هایگرومایسینB برای جداسازی ترانسفورمنت‌ها می‌باشد. B) pGEM-anxc-Egfp : در این سازه ژنEGFP به‌صورت C-terminal fusion با ژن انکسین ممزوج شده است. جایگاه برش آنزیم‌های به‌کار رفته در این تحقیق مشخص می‌باشد.

برای تهیه سازه ممزوج (فیوژن) anxC3.1-GFP، ابتدا ژن anxC3.1 با پرایمر بالا دست 5′-ACC-TCG-AGA-TGT-CTT-ATC-AGC-AAC-CTT-A-C-3' (RAHF2) و پرایمر پائین دست(RAHR2) (5′-GTA-AGC-TTG - ATG - AGA - GCA-AAC-GGC-CAT-CAT-TG-C-3′ تکثیر و در وکتور pGEM-TEasy کلون گردید. طراحی پرایمرها به نحوی بود که جایگاه برش *Xho*I در بالادست و جایگاه برش *Hin*dIII در پائین دست ژن تعبیه شوند. همچنین پرایمر بالا دست طوری طراحی گردید که پس از کلون نمودن ژن انکسین در وکتور pGEM-Egfp، قالب قرائت صحیح پروتئین ممزوج برقرار گردد. همانند سازه قبلی، ژن انکسین با آنزیم‌های *Xho*I/*Hind*III از پلاسمید نوترکیب جدا ودر وکتور pGEM-Egfp که با دو آنزیم مذکور برش خورده بود، کلون گردید و پلاسمید نو ترکیب حاصل pGEM-anxc-Egfp نام گرفت (شکل شماره ۱). تمامی پلاسمیدهای نوترکیب حاصله در این تحقیق با روش PCR، هضم آنزیمی و تعیین توالی تأیید شده‌اند.

ترانسفورماسیون قارچی و جدا سازی ترانسفورمنت‌ها

سازه‌های تهیه شده با روش استاندارد پلی‌اتیلن گلیکول (Polyethylene glycole-PEG) به درون پروتوپلاست‌های قارچی انتقال داده شدند.[۱۶] در این روش، از PEG با وزن مولکولی ۶۰۰۰ و غلظت ۶۰٪ استفاده گردید. یک میکروگرم از سازه‌های فوق که با آنزیم DraI خطی شده بودند، در واکنش ترانسفورماسیون به کار رفتند. سازه pGEM-anxc-Egfp به‌دلیل نداشتن مارکر انتخابی قارچی (Selection marker) همراه با پلاسمید pAN7.1 که واجد مارکر انتخابی هایگرومایسین B است، به درون پروتوپلاست‌های قارچی وارد شد (روش Co-transformation). جداسازی ترانسفورمنت‌ها بر روی محیط اسموتیک SAB-Sorbitol آگار حاوی آنتی‌بیوتیک هایگرومایسین B با غلظت ۲۰۰ میکروگرم در هر میلی‌متر (µg/ml) صورت پذیرفت. ورود سازه‌ها به درون قارچ با رشد سویه‌ی ترانسفورمنت در محیط حاوی هایگرومایسین B و سپس آنالیز PCR تأئید گردید.

مشاهدات میکروسکوپی

برای بررسی سویه‌های قارچی بیان‌کننده سازه ژنی pGEM-anxc-Egfp از میکروسکوپ فلورسنت Nikon مجهز به فیلتر FITC استفاده شد. اسپورهای قارچ بر روی یک لامل در محیط حاوی ۱٪ مالتودکسترین (شرائط القاء پروموتور گلوکوآمیلاز) رشد داده شده و به‌صورت مستقیم با عدسی ۱۰۰ (بزرگ‌نمائی نهائی ۱۰۰۰) بررسی گردیدند.

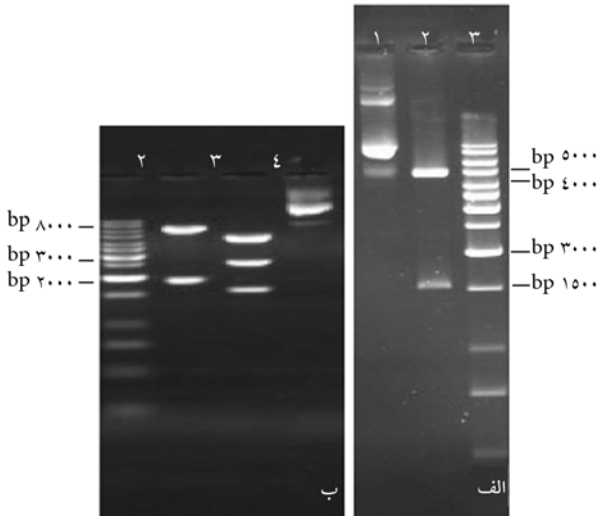
روش‌های آنالیتیک

سرعت رشد شعاعی (Radial growth rate) برای سویه‌های ترانسفورمنت و وحشی با اندازه‌گیری پیوسته قطر ناحیه رشد به مدت ۵ روز بر روی محیط تغییریافته وگل (۱٪ CMC و یا مالتودکسترین ۱٪) انجام شد. برای بررسی قدرت ترشحی سویه‌های ترانسفورمنت، ترشح پروتئازها و آمیلاز مد نظر قرار گرفت. جهت این بررسی به‌صورت نیمه کمی، حدود 10^4 اسپور از سوش ترانسفورمنت و یا سوش وحشی در مرکز پلیت جامد حاوی محیط تغییریافته وگل فاقد نیترات آمونیوم (۱٪ CMC به عنوان منبع کربن و ۱٪ ژلاتین به عنوان منبع ازت) و یا محیط وگل حاوی نشاسته ذرت (برای بررسی ترشح آمیلاز قارچی) کشت داده شدند. در این روش‌ها سوش A. niger N402 به‌عنوان کنترل منفی مورد استفاده قرارگرفت. قطر هاله‌های حاصل از تجزیه ژلاتین و یا نشاسته در اطراف کلنی‌های ترانسفورمنت‌ها و سویه وحشی (غیر ترانسفورمنت)، اندازه‌گیری و با یکدیگر مقایسه شدند. آزمایش‌های فوق تماماً به‌صورت سه تائی (تریپلیکه) انجام گرفتند و مقایسه میانگین‌ها از طریق آزمون t به انجام رسید.

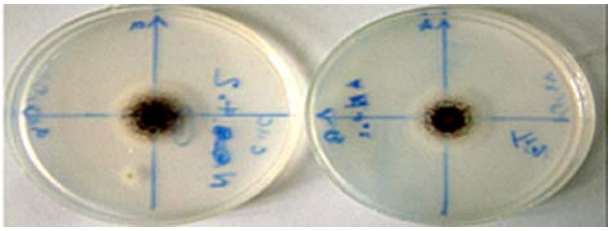
یافته‌ها

در این تحقیق با استفاده از روش‌های مرسوم مهندسی ژنتیک دو سازه بیانی قابل القاء در

آسپرژیلوس نیجر تهیه و صحت سازه‌ها با روش هضم آنزیمی به همراه تعیین توالی تأئید گردید (اشکال شماره ۱ و ۲). وجود سازه‌های ژنی pGEM-anxc-Egfp (بیان‌کننده پروتئین ممزوج ANXC-GFP به شکل C-terminal fusion) و pMJB104-anxc در ترانسفورمنت‌های قارچی با رشد آن‌ها در محیط حاوی هایگرومایسین B و PCR مشخص گردید. مقایسه سرعت رشد شعاعی در بین سوش حاوی سازه ژنی pMJB104-anxc یا pGEM-anxc-Egfp و سوش وحشی با استفاده از آزمون t اختلاف معنی‌داری را نشان نداد ($\alpha<0/05$) (شکل شماره ۳). همچنین، مقایسه ترشحی نسبی پروتئازها و یا آمیلاز نشان‌دهنده تفاوت آماری معنی‌داری نبود ($\alpha<0/05$).

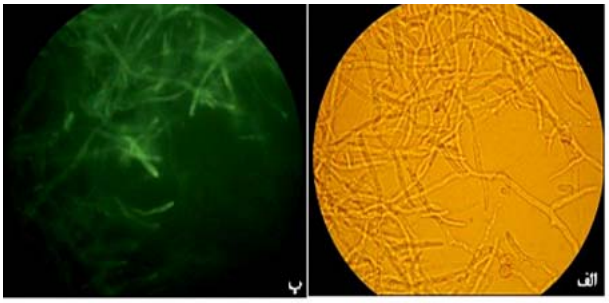


شکل شماره ۲- بررسی هضم آنزیمی سازه‌های ژنی. الف) ۱- پلاسمید pGEM-Egfp-anxC هضم نشده ۲- هضم آنزیمی سازه ژنی pGEM-Egfp-anxC با آنزیم‌های *Xho*I/*Hind*III (ایجاد دو قطعه پیش‌بینی شده ۱/۵ kb و ۴/۷ kb) و ۳- مارکر DNA.
ب) ردیف‌ها به ترتیب: ۱- مارکر DNA، ۲ و۳- هضم آنزیمی سازه ژنی pJMB104-anxc با آنزیم‌های *Bgl*II (دو قطعه تقریبی ۷ kb و ۱/۸ kb) و *Nco*I (سه قطعه ۴/۷ kb، ۲/۵ kb و ۱/۶ kb)، ۴ - سازه ژنی هضم نشده



شکل شماره ۳- مقایسه رشد سویه ترانسفورم شده با سازه ژنی تهیه شده جهت بیان بیش از حد انکسین C3.1 (الف) با سویه وحشی (ب). شکل کلنی‌ها و سرعت رشد دو سویه مشابه است و تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد

مشاهدات میکروسکوپ فلورسنت نشان داد که انکسین C3.1 یک پروتئین سیتوزولی می‌باشد که در انتهای هیف قارچ تجمع بیشتری را نشان می‌دهد (شکل شماره ٤).



شکل شماره ۴- الگوی بیان GFP::AnnexinC3.1 در آسپرژیلوس نیجر. الف) نمای میکروسکوپ نوری ب) نمای فلئورسنت (100X). فلئورسنت سبز ناشی از GFP در سراسر هیف مشاهده می‌گردد

بحث

رشد قارچ‌های رشته‌ای به شدت پلاریزه می‌باشد. این بدان معنی است که هیف از ناحیه انتهائی رأس به طور مداوم رشد می‌کند. ناحیه مذکور محلی است که آنزیم‌های تجزیه‌کننده از آن قسمت در محیط آزاد می‌شوند و ترکیبات تشکیل‌دهنده دیواره سلولی به رأس اضافه می‌گردند تا امکان رشد بیشتر فراهم آید. بنابراین یک فرایند شدید اگزوسیتوزی در ناحیه مذکور متصور می‌باشد.[۲۰] انکسین‌ها به‌عنوان پروتئین‌های دخیل در اگزوسیتوز موضوع مطالعات گسترده‌ای بوده‌اند. متأسفانه تاکنون مطالعات بسیار محدودی در مورد انکسین‌های قارچی و نقش آن‌ها در فیزیولوژی این ارگانیسم ها انجام گرفته است. مطالعات بیو انفورماتیک و آزمایشگاهی وجود سه ژن (C3.1، C3.2 و C4) از این خانواده را در قارچ آسپرژیلوس نیجر که یک قارچ صنعتی مهم است، نشان داده است. حذف ژن انکسین C3.1 به‌منظور درک بهتر عملکرد احتمالی آن در رشد و ترشح پروتئین در آسپر ژیلوس نیجر صورت گرفته است که نتایج حاکی از نقش غیرضروری این ژن در دو فرآیند رشد و ترشح پروتئین می‌باشد.[۱۵] این مشاهده احتمالاً

به‌دلیل عملکرد جبرانی اعضای دیگر این خانواده و یا پروتئین‌های با عملکرد مشابه می‌باشد. اخیراً یک مطالعه بیوشیمیائی در قارچ اوومیستی ساپرولگنیا، وجود یک انکسین به‌عنوان فعال‌کننده آنزیم ساخت دیواره سلولی یعنی ۳-۱ بتا دی گلوکان سنتاز را به اثبات رسانده است.[۲۱] باتوجه به اهمیت این آنزیم در ساخت دیواره سلولی، باید منتظر ماند تا مطالعات از کاراندازی این ژن در قارچ مذکور انجام و نتایج منتشر گردد.

در تحقیق حاضر به تأثیر بیان بیش از حد (Overexpression) این ژن در قارچ آسپرژیلوس نیجر پرداخته شده است. همچنین با بیان یک سازه ممزوج (Fusion construct) که در آن GFP به‌عنوان یک گزارشگر به انتهای کربوکسی انکسین متصل شده، نحوه توزیع سلولی این پروتئین بررسی گردید. جهت کنترل بیان دو سازه به‌کار گرفته شده در قارچ، از پروموتورهای به‌شدت القاءپذیر استفاده شد. پروموتور گلوکوآمیلاز آسپرژیلوس آووماری برای بیان سازه GFP و پروموتور سلوبیوهیدرولاز B (cbhB) آسپرژیلوس فومیگاتوس برای بیان سازه دوم به‌کار رفتند. پروموتور سلوبیوهیدرولاز، یک پروموتور بسیار قوی و به شدت قابل تنظیم بوده که در حضور منبع کربن گلوکز خاموش و در حضور منبع کربن القائی نظیر کربوکسی متیل سلولز (Carboxy Methyl Cellulose-CMC) به شدت فعال می‌گردد.[۲۲] وضعیت مشابهی در مورد پروموتور گلوکوآمیلاز وجود دارد؛ به این معنی که این پروموتور در حضور گلوکز خاموش و در حضور نشاسته یا مالتودکسترین فعال می‌گردد.[۲۳] القاء بیان انکسین C3.1 تحت کنترل پروموتورهای فوق، افزایش ترشح پروتئین (از طریق مشاهده قدرت هیدرولیز ژلاتین و نشاسته که مربوط به توانائی ترشح آنزیم‌های تجزیه‌کننده این مواد می‌باشد) را به همراه نداشت. همچنین رشد شعاعی سویه‌های نوترکیب تحت تأثیر بیان بیش از حد انکسین C3.1 قرار نگرفت. این مشاهدات احتمالاً به‌دلیل عدم دخالت مستقیم این پروتئین در فرآیندهای مذکور می‌باشد.

در یوکاریوت‌های عالی، انکسین‌ها توزیع سیتوزولی داشته که گاهاً به غشاهای مختلف و اجزای اسکلت سلولی متصل می‌باشند. استفاده از GFP به عنوان یک پروتئین گزارشگر در تعیین جایگاه سلولی پروتئین‌های مختلف، روشی متداول بوده و گزارش‌هایی نیز مبنی بر به‌کارگیری GFP در تعیین جایگاه سلولی پروتئین‌های مختلف در مخمر[۲۴] و قارچ‌های رشته‌ای[۲۵] وجود دارد. از بین یوکاریوت‌های پست‌تر اخیراً مطالعه‌ای در مورد نحوه توزیع سلولی انکسین‌های گروه C در کپک لزجی(slime mold) دیکتیوستلیوم با استفاده از GFP انجام گرفته است. اگرچه این ارگانیسم از لحاظ تکاملی متفاوت از قارچ‌های رشته‌ای نظیر آسپرژیلوس است، ولی از لحاظ فیلوژنی دو انکسین موجود در آن یعنی انکسین C1 و C2، با انکسین‌های یافت شده در قارچ‌های رشته‌ای (C3) در یک گروه جای می‌گیرند. براساس آنچه که مارکو و همکاران[۲۶] به زیبائی نشان داده‌اند، هر دو نوع انکسین دیکتیوستلیوم در مقادیر کم ولی به‌طور مداوم در طول سیکل زندگی قارچ بیان می‌شوند. توزیع سلولی ANXC1-GFP در سیتوزول، غشاء سلولی، هسته و اندوزوم بوده است، در حالی‌که ANXC2-GFP در غشاء سلولی و سطح گلژی حضور دارد. همچنین، این مطالعه نظیر مطالعات مشابه دیگر نشان می‌دهد که اتصال GFP نحوه توزیع سلولی و عملکرد انکسین را تحت تأثیر قرار نمی‌دهد.

در این مطالعه، انکسین ممزوج با GFP یک توزیع سیتوزولی را در سراسر میسلیوم آسپرژیلوس نیجر به نمایش گذاشت. این مشاهده با نحوه توزیع سیتوزولی انواع مختلفی از انکسین‌های یوکاریوتی مطابقت دارد. همچنین، در این مطالعه پروتئین مذکور در ناحیه رأسی که درواقع قسمت فعال هیف قارچی است، تراکم بیشتری نشان داده است. مطالعه مشابهی در مورد نحوه توزیع سلولی

کالمودولین در آسپرژیلوس نیدولانس صورت گرفته است. پروتئین مذکور نیز یک پروتئین متصل‌شونده به کلسیم ولی متفاوت از انکسین‌ها می‌باشد و توزیع سلولی پروتئین ممزوج کالمودولین-GFP، یک توزیع سیتوزولی همراه با تجمع بیشتر در ناحیه رأسی را به نمایش می‌گذارد.[۲۷]

استفاده از میکروسکوپ فلئورسنت معمولی که در این تحقیق به‌کار رفته است، یکی از محدودیت‌های این مطالعه به شمار می‌آید. بررسی دقیق‌تر توزیع سیتوزولی انکسین با روش‌های میکروسکوپی پیشرفته‌تر نظیر استفاده از میکروسکوپ Confocal عملی بوده و این امکان وجود دارد که با استفاده از سیستم‌های پیشرفته میکروسکوپی بتوان حضور احتمالی این پروتئین در اندامک‌هایی نظیر گلژی را نیز به اثبات رساند. همچنین اگرچه بیان سازه ممزوج تحت کنترل گلوکوآمیلاز با استفاده از روش میکروسکوپی نشان داده شد، ولی برای تعیین کمّیت میزان بیان نیاز به روش‌های کمّی نظیر Real-time PCR می‌باشد.

با توجه به عدم تأثیر معنی‌دار حذف یا بیان بیش از حد انکسین C3.1 بر فیزیولوژی رشد آسپرژیلوس، به نظر می‌رسد که حذف یا down-regulation همزمان سه عضو خانواده انکسین در این قارچ بتواند اطلاعات مفیدتری در این خصوص فراهم آورد. همچنین مطالعات ترانسکریپتومیکس و پروتئومیکس سویه‌ی فاقد این ژن، می‌تواند رهگشای تحقیقات آتی باشد.

نتیجه‌گیری

این تحقیق در پاسخ به این دو سؤال که اولاً توزیع سلولی پروتئین انکسین C3.1 چگونه می باشد و ثانیاً آیا بیان بیش از حد ژن انکسین C3.1 می‌تواند موجب افزایش قدرت ترشحی قارچ آسپرژیلوس نیجر و یا تسریع رشد گردد، انجام گرفت. نتایج این تحقیق با استفاده از دوسازه القاءپذیر، نشان داد که انکسین یک توزیع سیتوزولی داشته و بیان بیش از حد پروتئین مذکور، تأثیری در رشد و یا قدرت ترشحی قارچ ندارد.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله مؤلفین مراتب قدردانی خود را از گروه بیوتکنولوژی پزشکی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران و گروه بیوتکنولوژی پزشکی انستیتو پاستور ایران جهت حمایت‌های مالی و در اختیار قرار دادن امکانات آزمایشگاهی ابراز می‌دارند.

فهرست منابع

1- Rescher U, Gerke V. Annexins--unique membrane binding proteins with diverse functions. J Cell Sci 2004; 117: 2631-2639.

2- Khalaj V, Smith L, Brookman J, Tuckwell D. Identification of a novel class of annexin genes. FEBS Lett 2004; 562: 79-86.

3- Moss S E, Morgan, R O. The annexins. Genome Biol 2004; 5: 219.

4- Geisow M J, Walker J H, Boustead C, Taylor W. Annexins--new family of Ca^{2+}-regulated-phospholipid binding protein. Biosci Rep 1987; 7: 289-298.

5- Geisow M J, Fritsche U, Hexham J M, Dash B, Johnson T. A consensus amino-acid sequence repeat in Torpedo and mammalian Ca^{2+}-dependent membrane-binding proteins. Nature 1986; 320: 636-638.

6- Geisow M J. Common domain structure of Ca^{2+} and lipid-binding proteins. FEBS Lett 1986; 203: 99-103.

7- Morgan RO, Martin-Almedina S, Iglesias JM, Gonzalez-Florez MI, Fernandez, MP. Evolutionary perspective on annexin calcium-binding domains. Biochim Biophys Acta 2004; 1742: 133-140.

8- Solito E, Nuti S, Parente, L. Dexamethasone-induced translocation of lipocortin (annexin) 1 to the

cell membrane of U-937 cells. Br J Pharmacol 1994; 112: 347-348.

9- Gerke V, Moss SE. Annexins: from structure to function. Physiol Rev 2002; 82: 331-371.

10- Wang W, Xu J, Kirsch, T. Annexin V and terminal differentiation of growth plate chondrocytes. Exp Cell Res 2005; 305: 156-165.

11- Balcerzak M, Hamade E, Zhang L, Pikula S, Azzar G, Radisson J, et al.. The roles of annexins and alkaline phosphatase in mineralization process. Acta Biochim Pol 2003; 50: 1019-1038.

12- Grewal T, Evans R, Rentero C, Tebar F, Cubells, L, de Diego I, et al. Annexin A6 stimulates the membrane recruitment of p120GAP to modulate Ras and Raf-1 activity. Oncogene 2005; 24: 5809-5820.

13- Hoyal CR, Thomas AP, Forman HJ. Hydroperoxide-induced increases in intracellular calcium due to annexin VI translocation and inactivation of plasma membrane Ca^{2+}-ATPase. J Biol Chem 1996; 271: 29205-29210.

14- Braun EL, Kang S, Nelson MA, Natvig DO. Identification of the first fungal annexin: analysis of annexin gene duplications and implications for eukaryotic evolution. J Mol Evol 1998; 47: 531-543.

15- Khalaj V, Hey P, Smith L, Robson GD, Brookman J. The Aspergillus niger annexin, anxC3.1 is constitutively expressed and is not essential for protein secretion. FEMS Microbiol Lett 2004; 239: 163-169.

16- Punt PJ, Oliver R P, Dingemanse MA, Pouwels PH, van den Hondel CA. Transformation of Aspergillus based on the hygromycin B resistance marker from Escherichia coli. Gene 1987; 56: 117-124.

17- Vogel HJ. A convenient growth medium for Nerospora (medium N). Micro Gene Bull 1956; 13: 42-44.

18- Moller EM, Bahnweg G, Sandermann H, Geiger HH. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. Nucleic Acids Res 1992; 20: 6115-6116.

19- Sambrook J, Fritsch E , Maniatis T. Molecular cloning. A Laboratory Manual. 2nd ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989. P.53-72.

20- Deacon J W. Modern Mycology.3rd ed. Cambridge: Blackwell Science Ltd; 1997. P. 45-53.

21- Bouzenzana J, Pelosi L, Briolay A, Briolay J, Bulone V. Identification of the first Oomycete annexin as a (1-->3)-beta-D-glucan synthase activator. Mol Microbiol 2006; 62: 552-565.

22- Bromley M, Gordon C, Rovira-Graells N, Oliver J. The Aspergillus fumigatus cellobiohydrolase B (cbhB) promoter is tightly regulated and can be exploited for controlled protein expression and RNAi. FEMS Microbiol Lett 2006; 264: 246-254.

23- Fowler T, Berka RM, Ward M. Regulation of the glaA gene of Aspergillus niger. Curr Genet 1990; 18: 537-545.

24- De Giorgi F, Brini M, Bastianutto C, Marsault R, Montero M, Pizzo P, et al. Targeting aequorin and green fluorescent protein to intracellular organelles. Gene 1996; 173: 113-117.

25- Gordon CL, Khalaj V, Ram AF, Archer DB, Brookman JL, Trinci AP, et al.(2000) Glucoamylase::green fluorescent protein fusions to monitor protein secretion in Aspergillus niger. Microbiology 2000; 146 (2): 415-426.

26- Marko M, Prabhu Y, Muller R, Blau-Wasser R, Schleicher M, Noegel AA.) The annexins of Dictyostelium. Eur J Cell Biol 2006; 85: 1011-1022.

27- Wang G, Lu L, Zhang CY, Singapuri A, Yuan S. Calmodulin concentrates at the apex of growing hyphae and localizes to the Spitzenkorper in Aspergillus nidulans. Protoplasma 2006; 228: 159-166.

Cellular Localization of AnnexinC3.1 and the Effect of its Overexpression on Growth and Protein Secretion in Aspergillus niger

H. Rahimi, MSc[I] M.M. Farajollahi, PhD[II] S.A. Yazdanparast, PhD[III]
M. Azizi, PhD[IV] *V. Khalaj, PhD[V]

Abstract

Background and Aim: Annexins are a large family of calcium-phospholipid binding proteins which are distributed among nearly all eukaryotes. These proteins have been found in a wide range of fungi including ascomycetes, basidiomycetes and oomycetes. The aim of present study has been the investigation of cellular localization of ANXC3.1 in filamentous fungus Aspergillus niger (A. niger). The effect of ANXC3.1 overexpression on growth rate and protein secretion of A. niger has also been investigated.

Materials and Methods: In this experimental study, the annexin C3.1 gene was PCR-amplified using genomic DNA of Aspergillus niger as a template. Following the confirmation of gene sequence, it was used in the preparation of two inducible gene constructs. In the first construct, annexinC3.1 was cloned in PGEM–Egfp expression vector as a GFP fusion and under the control of glucoamylase promoter. In the second construct, the gene was cloned in pMJB104 expression vector, driven by cbhB (cellobiohydrolase B) promoter. These constructs, then were transformed into A. niger N402 using a standard method. Overexpression of each construct was induced by an inducer carbon source and the effect of annexinC3.1 overexpression on radial growth rate and protein secretion was analysed in transformants. Comparisons of radial growth rates, as well as protein secretion level, between wild type and transformants was performed using t test. Cellular localization of annexinC3.1 was investigated in annexin-GFP expressing transformant by fluorescent microscopy.

Results: The effect of annexinC3.1 overexpression on growth rate and protein secretion was investigated in Aspergillus niger. No significance difference was observed in growth rate or level of protein secretion when transformants and wild type were compared (α <0.05). Microscopic examination of annexin C3.1-GFP fusion protein demonstrated that annexinC3.1 is a cytosolic protein which is distributed along the fungal mycelium.

Conclusion: This is the first report on annexinC3.1 cellular localization. Annexin C3.1 is a cytosolic protein and its overexpression in A. niger does not increase the protein secretion level.

Key Word: 1) Aspergillus niger 2) Annexin C3.1 3) Cellobiohydrolase B (cbhB) 4) Glucoamylase 5) Cytosolic protein

This article is summary of thesis by H. Rahimi for MSc degree in Medical Biotechnology under supervision of V. Khalaj, PhD and M.M. Farajollahi, PhD and consultation with S.A. Yazdanparast, PhD (2007). This study has been conducted under the financial support of Pasteur Institute of Iran.

I) *Msc student in Medical Biotechnology, Faculty of Paramedical Science, Medical Biotechnology Group, Iran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran*

II) *Assistant Professor of Medical Biochemistry, Medical Biotechnology Group, Faculty of Paramedical Science, Iran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran*

III) *Assistant Professor of Medical Mycology, Medical Mycology Group, Faculty of Paramedical Science, Iran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran*

IV) *Researcher of Medical Biotechnology Group, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran*

V) *Assistant Professor of Molecular Biotechnology, Medical Biotechnology Department, Biotechnology Research Center, Pasteur Str., South Karegar Ave., Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran (*Corresponding Author)*