

تعیین جایگاه سلولی پروتئین انکسین C3.1 (ANXC3.1) و تأثیر بیان

بیش از حد آن بر روی رشد و ترشح پروتئین در آسپرژیلوس نیجر

چکیده

زمینه و هدف: انکسین‌ها، خانواده بزرگی از پروتئین‌های متصل شونده به کلسیم و فسفولیپیدها می‌باشند که تقریباً در تمامی رده‌های یوکاریوتی وجود دارند. پروتئین‌های مذکور در طیفی از قارچ‌ها از جمله 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 توانایی ترشحی قارچ بررسی گردید.

روش بررسی: در این 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 تأیید 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 پرموتور سلوبیوهیدرولاز در ناقل بیانی PGEM-Egfp و در سازه دوم، ژن مذکور تحت کنترل پرموتور 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 ترانسفورمته 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 ($P < 0.05$). 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 در قارچ رشته‌ای آسپرژیلوس نیجر نمی‌گردد.

کلیدواژه‌ها: ۱- آسپرژیلوس نیجر ۲- انکسین C3.1 (AnnexinC3.1) ۳- سلوبیوهیدرولاز ۴- گلوکوآمیلان ۵- پروتئین سیتوزولی

حمزه رحیمی I

دکتر محمد مراد فرج‌اللهی II

دکتر سید امیر یزدان پرست III

دکتر محمد عزیز ی IV

* دکتر وحید خلیج V

مقدمه

انکسین‌ها، خانواده بزرگی از پروتئین‌ها متصل‌شونده به کلسیم و فسفولیپیدها بوده و تا به حال بیش از ۲۰۰ نوع (ایزوفرم) از آن‌ها در گیاهان 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 توانایی اتصال به ساختارهای غشائی می‌شود. دومین (Domain) مرکزی انکسین‌ها شامل چهار تا هشت

این مقاله خلاصه‌ای است از پایان‌نامه آقای حمزه رحیمی جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته بیوتکنولوژی پزشکی به راهنمایی دکتر خلیج و دکتر فرج‌اللهی و مشاوره دکتر یزدان‌پزست، سال ۱۳۸۶. 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 قارچ‌شناسی پزشکی، گروه قارچ‌شناسی 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)

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) به کار گرفته شدند، به شرح زیر می‌باشند:

پلاسمیدها و سوش‌ها

آسپرژیلوس نیجر N402^(۱۰) برای جداکردن ژن انکسین و بررسی بیان بیش از حد انکسین مورد استفاده قرار گرفت. سلول‌های اشریشیا کلی (E.Coli) TOP۱۰ (Invitrogen) به عنوان میزبان پلاسمیدهای نو ترکیب 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 ترانسفورمانت‌های قارچی به آنتی‌بیوتیک هایگرومایسین 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 آوماری است. پلاسمید pAN7.1 حاوی مارکر مقاومت هایگرومایسین باکتریایی تحت کنترل پروموتور gpdA (گلیسرآلدئید ۳-فسفات دهیدروژناز) آسپرژیلوس نیدولانس^(۱۶) می‌باشد که برای انتخاب ترانسفورمانت‌های 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 ۱/۸٪ (۲۰) PBS-Tween جمع‌آوری شدند. برای تهیه توده زیستی از سویه‌های مختلف در این تحقیق، تعداد

توالی تکراری ۷۰ آمینواسیدی است. این بخش از مولکول به عنوان بخش حفظ شده (Conserved) شناخته می‌شود که به واسطه آن پروتئین به کلسیم و غشاهای سلولی متصل می‌گردد.^(۷-۹) 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 به عنوان رابط غشاء-اسکلت سلولی یا غشاء-غشاء عمل کرده و در وقایع آگوسیتوز 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 تزیاد سلولی نقش دارند^(۱۱) و^(۱۲) انکسین‌ها می‌توانند جایگاه داخل سلولی خود را با توجه 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 به طور تجربی تعیین خصوصیت شدند. برای مثال خلج و همکاران ژن انکسین C3.1 را از آسپرژیلوس نیجر کلون و مورد بررسی قرار داده‌اند.^(۱۵ و ۱۶)

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

شد. استخراج پلاسمیدها با استفاده از کیت تخلیص پلاسمید Qiagen mini prep و تخلیص محصولات PCR با استفاده از کیت 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).

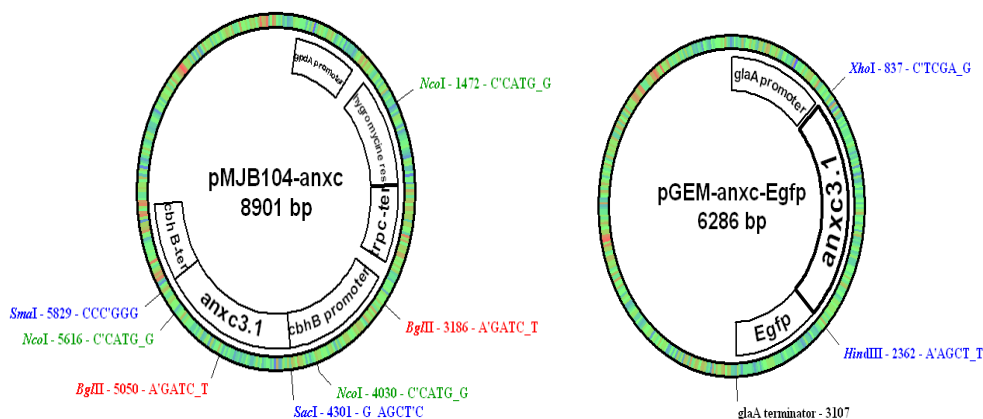
کلون کردن ژن *anx C3.1* و تهیه سازه‌های ژنی

ژن انکسین C3.1 با استفاده از پرایمر بالادست 5'-CCG-AGC-TCA-TGT-CTT-ATC-AGC- (RAHF1) 5'-CAC- (RAHR1) و پرایمر پائین‌دست 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 *SmaI* و *SacI* می‌باشد. PCR با شرایط زیر انجام شد: ۹۵ °C، ۵ دقیقه یک سیکل، ۹۵ °C، ۱ دقیقه، ۵۸ °C، ۳۰ ثانیه، ۶۸ °C، ۲ دقیقه در ۳۰ سیکل. محصول PCR پس از خالص‌سازی در وکتور pGEM-TEasy کلون و پلاسمید نو ترکیب pGEM-anxc3.1 نام گرفت. پس از تعیین توالی قطعه کلون شده (*anxc3.1*) و تأیید صحت آن، ژن انکسین از پلاسمید نو ترکیب pGEM-anxc3.1 با هضم آنزیمی *sacI/smaI* جدا و سپس در وکتور pMJB-104 کلون گردید. پلاسمید نو ترکیب حاصل pMJB104-anxc نام گرفت (شکل شماره ۱).

۱×۱۰^۶ اسپور (غلظت نهایی) در ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع SAB تلقیح و در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد با دور ۲۵۰ rpm در دقیقه به مدت ۲۴-۱۶ ساعت رشد داده شدند. برای بررسی تأثیر بیان بیش از حد ژن انکسین C3.1 در سویه‌های ترانسفورمانت 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 سلولوبیوهیدرولاز B، (*cbhB*)، و مالتو دکسترین ۱٪ برای پروموتور گلوکو آمیلاز، (*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 (۱:۲۴) استخراج و DNA ژنومی با استفاده از میزان هم حجم از ایزوپروپانل رسوب داده



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 هایگرومایسین B برای جداسازی ترانسفورمانت‌ها می‌باشد. B) pGEM-anxc-Egfp: در این سازه ژن EGFP به‌صورت C-terminal fusion با ژن انکسین ممزوج شده است. جایگاه برش آنزیم‌های به‌کار رفته در این تحقیق مشخص می‌باشد.

به درون قارچ با رشد سویه‌ی ترانسفورمانت در محیط حاوی هایگرومایسین B و سپس آنالیز PCR تأیید گردید.

مشاهدات میکروسکوپی

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

روش‌های آنالیتیک

سرعت رشد شعاعی (Radial growth rate) برای سویه‌های ترانسفورمانت و وحشی با اندازه‌گیری پیوسته قطر ناحیه رشد به مدت ۵ روز بر روی محیط تغییر یافته و گل (۱٪ CMC و یا مالتودکسترین ۱٪) انجام شد. برای بررسی قدرت ترش‌حی سویه‌های ترانسفورمانت، ترشح پروتئازها و آمیلاز مد نظر قرار گرفت. جهت این بررسی به صورت نیمه کمی، حدود ۱۰^۴ اسپور از سوش ترانسفورمانت و یا سوش وحشی در مرکز پلیت جامد حاوی محیط تغییر یافته و گل فاقد نیترات آمونیوم (۱٪ CMC به عنوان منبع کربن و ۱٪ ژلاتین به عنوان منبع ازت) و یا محیط و گل حاوی نشاسته زرت (برای بررسی ترشح آمیلاز قارچی) کشت داده شدند. در این روش‌ها سوش *A. niger* N402 به عنوان کنترل منفی مورد استفاده قرار گرفت. قطر هاله‌های حاصل از تجزیه ژلاتین و یا نشاسته در اطراف کلنی‌های ترانسفورمانت‌ها و سویه وحشی (غیر ترانسفورمانت)، اندازه‌گیری و با یکدیگر مقایسه شدند. آزمایش‌های فوق تماماً به صورت سه تائی (تریپلیک) انجام گرفتند و مقایسه میانگین‌ها از طریق آزمون t به انجام رسید.

یافته‌ها

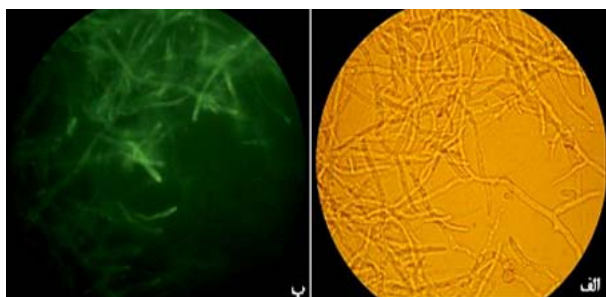
در این تحقیق با استفاده از روش‌های مرسوم مهندسی ژنتیک دو سازه بیانی قابل القاء در

برای تهیه سازه ممزوج (فیوژن) anx3.1-GFP، ابتدا ژن anx3.1 با پرایمر بالا دست -ACC-5': TCG-AGA-TGT-CTT-ATC-AGC-AAC-CTT-A-5'-GTA-) (RAHR2) و پرایمر پائین دست (RAHF2) 3'-CAT-TG-C-3' در بالادست و در وکتور pGEM-TEasy کلون گردید. طراحی پرایمرها به نحوی بود که جایگاه برش *XhoI* در بالادست و جایگاه برش *HindIII* 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 *XhoI/HindIII* از پلاسמיד نو ترکیب جدا و در وکتور pGEM-Egfp که با دو آنزیم مذکور برش خورده بود، کلون گردید و پلاسמיד نو ترکیب حاصل pGEM-anxc-Egfp نام گرفت (شکل شماره ۱). تمامی پلاسמידهای نو ترکیب حاصله در این تحقیق با روش PCR، هضم آنزیمی و تعیین توالی تأیید شده‌اند.

ترانسفورماسیون قارچی و جدا سازی ترانسفورمانت‌ها

سازه‌های تهیه شده با روش استاندارد پلی اتیلن 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 پGEM-anxc-Egfp به دلیل نداشتن مارکر انتخابی قارچی (Selection marker) همراه با پلاسמיד pAN7.1 که واجد مارکر انتخابی هایگرومایسین B است، به درون پروتوپلاست‌های قارچی وارد شد (روش Co-transformation). جداسازی ترانسفورمانت‌ها بر روی محیط اسموتیک SAB-Sorbitol آگار حاوی آنتی بیوتیک هایگرومایسین B با غلظت ۲۰۰ میکروگرم در هر میلی‌متر (μg/ml) صورت پذیرفت. ورود سازه‌ها

مشاهدات میکروسکوپ فلورسنت نشان داد که انکسین C3.1 یک پروتئین سیتوزولی می باشد که در انتهای هیف قارچ تجمع بیشتری را نشان می دهد (شکل شماره ۴).

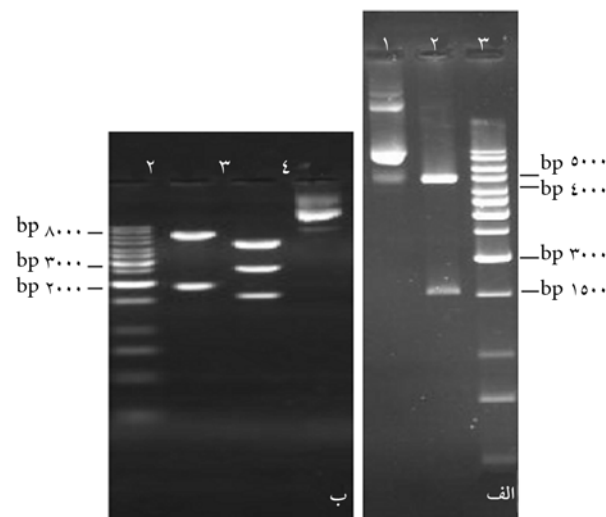


شکل شماره ۴- الگوی بیان GFP::AnnexinC3.1 در آسپرژیلوس نیجر. (الف) نمای میکروسکوپ نوری (ب) نمای فلورسنت (100X). فلورسنت سبز ناشی از GFP در سراسر هیف مشاهده می گردد

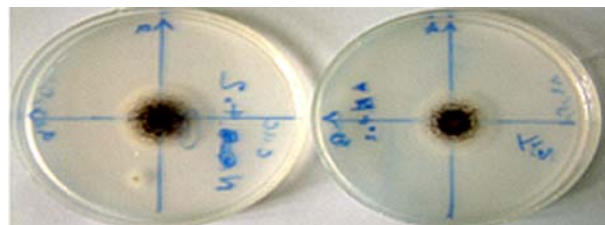
بحث

رشد قارچ های رشته ای به شدت پلاریزه می باشد. این بدان معنی است که هیف از ناحیه انتهائی رأس به طور مداوم رشد می کند. ناحیه مذکور محلی است که آنزیم های تجزیه کننده از آن قسمت در محیط آزاد می شوند و ترکیبات تشکیل دهنده دیواره سلولی به رأس اضافه می گردند تا امکان رشد بیشتر فراهم آید. بنابراین یک فرایند شدید آگروسیتوزی در ناحیه مذکور متصور می باشد.^(۲۰) انکسین ها به عنوان پروتئین های دخیل در آگروسیتوز موضوع مطالعات گسترده ای بوده اند. متأسفانه تاکنون مطالعات بسیار محدودی در مورد انکسین های قارچی و نقش آن ها در فیزیولوژی این ارگانیسم ها انجام گرفته است. مطالعات بیو انفورماتیک و آزمایشگاهی وجود سه ژن (C3.1, C3.2, C4) از این خانواده را در قارچ آسپرژیلوس نیجر که یک قارچ صنعتی مهم است، نشان داده است. حذف ژن انکسین C3.1 به منظور درک بهتر عملکرد احتمالی آن در رشد و ترشح پروتئین در آسپرژیلوس نیجر صورت گرفته است که نتایج حاکی از نقش غیرضروری این ژن در دو فرآیند رشد و ترشح پروتئین می باشد.^(۱۵) این مشاهده احتمالاً

آسپرژیلوس نیجر تهیه و صحت سازه ها با روش هضم آنزیمی به همراه تعیین توالی تأیید گردید (اشکال شماره ۱ و ۲). وجود سازه های ژنی pGEM-anxc-Egfp (بیان کننده پروتئین ممزوج ANXC-GFP به شکل C-terminal fusion) و pMJB104-anxc در ترانسفورمانت های قارچی با رشد آن ها 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 معنی داری را نشان نداد ($\alpha < 0.05$) (شکل شماره ۳). همچنین، مقایسه ترشحی نسبی پروتئین ها و یا آمیلاز نشان دهنده تفاوت آماری معنی داری نبود ($\alpha < 0.05$).



شکل شماره ۲- بررسی هضم آنزیمی سازه های ژنی. (الف) ۱- پلاسمید pGEM-Egfp-anxc هضم نشده ۲- هضم آنزیمی سازه ژنی pGEM-Egfp-anxc با آنزیم های *XhoI/HindIII* (ایجاد دو قطعه پیش بینی شده ۱/۵ kb و ۴/۷ kb) و ۳- مارکر DNA. (ب) ردیف ها به ترتیب: ۱- مارکر DNA، ۲ و ۳- هضم آنزیمی سازه ژنی pMJB104-anxc با آنزیم های *BglIII* (دو قطعه تقریبی ۷ kb و ۱/۸ kb) و *NcoI* (سه قطعه ۲/۵ kb، ۴/۷ 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 کلنی ها و سرعت رشد دو سویه مشابه است و تفاوت معنی داری مشاهده نشد

دخالته 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 ارگانسیم 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 زیبایی 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 حالی که 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 میسلیم 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 در واقع قسمت فعال هیف قارچی است، تراکم بیشتری نشان داده است. مطالعه مشابهی در مورد نحوه توزیع سلولی

به دلیل عملکرد جبرانی اعضای دیگر این خانواده و یا پروتئین‌های با عملکرد مشابه می‌باشد. اخیراً یک مطالعه بیوشیمیایی در قارچ اوومیستی ساپروولگنیا، وجود یک انکسین به‌عنوان فعال‌کننده آنزیم ساخت دیواره سلولی یعنی ۱-۳ 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 آوماری برای بیان سازه GFP و پروموتور سلوبیوهیدرولاز B (cbhB) آسپرژیلوس فومیگاتوس برای بیان سازه دوم به‌کار رفتند. پروموتور سلوبیوهیدرولاز، یک پروموتور بسیار قوی و به‌شدت قابل تنظیم بوده که در حضور منبع کربن گلوکز خاموش و در حضور منبع کربن القائی نظیر کربوکسی متیل سلولز (Carboxy Methyl Cellulose-CMC) به‌شدت 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 به دلیل عدم

مفیدتری در این خصوص فراهم آورد. همچنین مطالعات ترانسکریپتومیکس و پروتئومیکس سوییچ فاقد این ژن، می‌تواند رهگشای تحقیقات آتی باشد.

نتیجه گیری

این تحقیق در پاسخ به این دو سؤال که اولاً توزیع سلولی پروتئین انکسین C3.1 چگونه می‌باشد و ثانیاً آیا بیان بیش از حد ژن انکسین C3.1 می‌تواند موجب افزایش قدرت ترشعی 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 ترشعی 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.

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 به کار 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 کمیت میزان بیان نیاز به روش‌های کمی 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

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 Ca²⁺-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 Ca²⁺-dependent membrane-binding proteins. *Nature* 1986; 320: 636-638.
- 6- Geisow M J. Common domain structure of Ca²⁺ 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, Dingemans 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 *Nero spora* (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 ($\alpha < 0.05$). 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)