

آنالیز یک ژن یوکاریوتی

دکتر عبدالحسن کاظمی: استادیار گروه انگل شناسی و ایمنی شناسی دانشگاه علوم پزشکی تبریز: نویسنده رابط
دکتر جفری رابسون: دانشیار زیست شناسی مولکولی و زیست فن آوری دانشکده علوم حیاتی دانشگاه منچستر
دکتر دیوید دنینگ: استاد بیماری های عفونی و فوق تخصص میکوزهای ریوی دانشکده علوم حیاتی دانشگاه منچستر

دریافت: ۸۲/۴/۱۱، بازنگری نهایی: ۸۲/۱۰/۲۷، پذیرش: ۸۲/۱۱/۱

چکیده

زمینه و اهداف: ساختار یک ژن در برگرفته اجزای مختلفی در قسمت های بالادست، پایین دست و همچنین در طول ژن است که شامل توالی های ایفاگر نقش پروموتور (راه انداز)، توالی های ویژه قبل از کد آغازگر، کد آغازگر، توالی های تنظیم بیان ژن، توالی های محفوظ در مسیر تکاملی، ایترون (ها)، اکرون (ها) و توالی های خاص آغاز و پایان آنها و در نهایت، علامت دنباله پلی A است.

روش بررسی: در این بررسی پس از جداسازی، کلونینگ و توالی یابی ژن فسفولیپاز B_۲ (*plb_۲*)، قارچ کپکی و بیماریزای *A. fumigatus* توالی کامل این ژن از نظر وجود و نحوه آرایش عناصر ساختاری در یک ژن یوکاریوتی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته ها: آنالیز ژن *plb_۲* *A. fumigatus* نشان دهنده وجود حداقل سه بسته TATA در فواصل ۷۱- تا ۲۵۲- از نوکلئوتید +۱، دو توالی CAAT در فواصل bp ۱۲۴- و ۲۲۷bp- و همچنین دو توالی CAAC در فواصل ۱۴۶bp- و ۳۰۶bp- از نوکلئوتید +۱ و یک کدون آغازگر غیر معمول GTG در ژن *plb_۲* *A. fumigatus* است که با فاصله سه نوکلئوتید از یک منطقه غنی از اسیدهای نوکلئیک CT واقع شده است. همچنین در این ژن چند ناحیه غنی از پریمیدین در قسمت بالادست ژن وجود دارد. یک ایترون به طول ۵۹bp در ژن *plb_۲* *A. fumigatus* ردیابی شد که این ایترون حاوی توالی متداول در طول ایترون ژن های قارچی یعنی توالی TACTCAC از اسیدهای نوکلئیک است. در ژن *plb_۲* *A. fumigatus* همچنین وجود شش توالی GATA به عنوان توالی مؤثر در مهار بیان ژن با نیتروژن و موسوم به AREA در قسمت بالادست ژن و یک توالی GTGGGG به عنوان توالی مؤثر در مهار بیان ژن با کربن موسوم به CREA شناسایی شد. توالی مؤثر در بیان ژن به وسیله pH و موسوم به PACC در توالی این ژن و ترجمه توالی اسیدهای نوکلئیک آن به اسیدهای آمینه مشاهده نشد.

نتیجه گیری: بسته TATA و توالی های CAAT و CAAC و مناطق غنی از اسیدهای نوکلئیک CT در فواصل متداول از نوکلئوتید +۱ به عنوان پروموتورهای محتمل در ژن *plb_۲* *A. fumigatus* وجود دارند. این ژن دارای یک کدون آغازگر غیر معمول GTG، یک ایترون مشابه با ایترون ژن فسفولیپاز در سایر قارچ های کپکی و غیر کپکی، توالی های مربوط به تنظیم بیان ژن با نیتروژن و کربن و فاقد توالی مؤثر در بیان ژن به وسیله pH است.

کلید واژه ها: آنالیز ژن، *A. fumigatus*، فسفولیپاز B_۲

مقدمه

ایفا می کند (۱ و ۴). وجود توالی مربوط به تنظیم مهار بیان ژن توسط یون های قوی (آمونیم) و ضعیف (نیترات) نیتروژن موسوم به AREA (۹-۶) و توالی مربوط به تنظیم مهار بیان ژن توسط کربن موسوم به CREA (۱۲-۱۰) و همچنین توالی مربوط به نقش pH در تنظیم بیان ژن موسوم به PACC در ساختار ژن نیز از اجزای مهم و مورد توجه است (۱۵-۱۳). شناسایی کدون آغازگر در اولین نقطه طول ژن و همچنین توجه به وجود قطعات کاتالبتیک عمومی و اختصاصی در طول هر ژن (در سطح اسید آمینه) و جزء ترشخی و مزید بر این موارد، عنایت به وجود یا عدم وجود ایترون و طول (توالی) و تعداد ایترون (ها) و توالی های ویژه آغاز و پایان ایترون (ها) نیز از موارد مهم و قابل توجه است (۱۸-۱۶). شناسایی دامنه های احتمالی فسفریلاسیون و گلیکوزیلاسیون در طول توالی ژنی (در سطح اسید آمینه) نیز توجه ویژه ای را طلب می کند (۱، ۴، ۸، ۱۹-۲۴) و در ناحیه پایین دست ژن نیز شناسایی کدون بی معنی یا پایان دهنده و علامت پلی A یا دنباله^۱ متشکل از اسید نوکلئیک آدنین که ناحیه ختم طول ژن را برای ما مشخص خواهد کرد (۱۴، ۱۹ و ۲۵) و توجه

ساختار یک ژن در برگرفته اجزای مختلفی است که امکان بیان و سطح بیان آن ژن، و در نتیجه، سنتز میزان معینی از محصول ژن را مقدر می سازد. این اجزا شامل قسمت هایی از ساختار ژن در منطقه^۲ بالا دست ژن، طول ژن و همچنین منطقه پایین دست ژن^۳ است (۳-۱). در منطقه بالا دست ژن عموماً قسمتی غنی از اسیدهای نوکلئیک AT وجود دارد که اصطلاحاً بسته TATA نامیده می شود. در بعضی از ژن ها، توالی AT با پذیرش تغییراتی در ترتیب منظم AT، به صورت قسمتی غنی از AT با آرایش نسبتاً غیر منظم از این دو اسید نوکلئیک تظاهر می یابد و محل اتصال آنزیم DNA پلیمراز II همراه با سایر عوامل رونویسی است (۲، ۴ و ۵). جزء ساختاری دیگری در این قسمت از ژن به صورت توالی CAAT و احیاناً با مختصر تغییراتی در این توالی دیده می شود که به نظر می رسد این دو قسمت نقش پروموتور را برای بیان ژن بازی می کنند (۲ و ۳). در ژن های فاقد دو ناحیه فوق الذکر، امکان وجود یک منطقه غنی از اسیدهای نوکلئیک CT وجود دارد که در غیاب منطقه غنی از AT و ناحیه CAAT احتمالاً نقش پروموتور قوی را در ژن های دارای میزان بالای بیان ژنی

منطقه غنی از اسیدهای نوکلئیک CT واقع شده است. همچنین در این ژن چند ناحیه غنی از پریمیدین (CT) در قسمت بالادست ژن وجود دارد که طولانی ترین توالی غنی از CT همان توالی ما قبل نوکلئوتید ۱+ است که با فاصله سه اسیدنوکلئیک آدینین از نوکلئوتید ۱+ قرار گرفته است. وجود یک ایترون به طول ۵۹ bp در طول ژن که با توالی های متداول GTA در ابتدای توالی ایترون های ژن های قارچی و CAG در انتهای توالی ایترون های ژن های قارچی احاطه شده است، ردیابی شد. این ایترون حاوی توالی متداول در طول ایترون ژن های قارچی یعنی توالی TACTCAC از اسیدهای نوکلئیک است. علاوه بر ایترون فوق الذکر در طول توالی ژن، دو ایترون در توالی قسمت ما قبل ژن *plb_r*، فومیکاتوس شناسایی شد که مربوط به انتهای ۳' ریک ژن دیگر در ژنوم *A. فومیکاتوس* هستند و هر دوی آنها با توالی متداول GTA آغاز شده ولی فقط یکی از آنها با توالی متداول CAG خاتمه یافته است (شکل ۱). فسفولپازها آنزیم های دارای فعالیت استرازی هستند که در همه موجودات زنده یافت می شوند و با توجه به نوع فعالیت آنزیمی خود به دو گروه آسیل هیدرولازها و فسفودی استرازاها تقسیم می شوند. آسیل هیدرولازها، شامل فسفولپاز A1 و A2، فسفولپاز B و لیزوفسفولپازها بوده و فسفودی استرازاها شامل فسفولپاز C و فسفولپاز D هستند. علیرغم امکان وجود تفاوت های فراوان در فعالیت فسفولپاز های مختلف در میکروارگانیسم های گوناگون، دو فعالیت اصلی برای این آنزیم ها شناسایی شده است. فسفولپاز های ترشحاتی خارج سلولی عموماً در هیدرولیز فسفولپید های خارج سلولی، و در نتیجه، تهیه منابع تغذیه ای کربن، نیتروژن و فسفات برای سلول دخالت دارند ولی فسفولپازهای های درون سلولی عموماً دارای فعالیت کاتالیتیکی اندکی هستند و در قیاس با فسفولپاز های ترشحاتی خارج سلولی در حد بسیار پایینی تولید می شوند. فسفولپازهای درون سلولی در کنترل اعمال متابولیکی سلول مؤثر هستند و نقش تنظیمی برای فعالیت بیولوژیک سلول بر عهده دارند و برای جلوگیری از سیتولیز خود سلول های تولید کننده این آنزیم ها فعالیت آنها تحت کنترل چند جانبه قرار دارد. همچنین این آنزیم ها از نظر دخالت در تولید تعدادی از واسطه های بیوشیمیایی مانند دی آسیل گلیسرل، لیزوفسفاتیدیک اسید و اینوزیتول تری فسفات مورد توجه هستند.

آنالیز ژن *plb_r*، فومیکاتوس همچنین نشان دهنده وجود شش توالی GATA به عنوان توالی مؤثر در مهار بیان ژن با نیتروژن و موسوم به AREA در قسمت بالادست ژن و یک توالی GTGGGG به عنوان توالی مؤثر در مهار بیان ژن با کربن موسوم به CREA است. توالی مؤثر در بیان ژن به وسیله pH و موسوم به PACC نیز در توالی این ژن و ترجمه توالی اسیدهای نوکلئیک آن به اسیدهای آمینه مشاهده نشد. از ترجمه توالی اسیدهای نوکلئیک ژن *plb_r*، فومیکاتوس به اسید آمینه بعد از حذف ۵۹ bp از اسیدهای نوکلئیک مربوط به ایترون موجود در طول ژن، نتیجه ای به طول ۶۰۷ اسیدآمینه حاصل شد که برای توالی اسیدآمینه ای حاصل، وزن مولکولی ۶۵/۱ کیلو دالتون (KD) و نقطه پیزوالکتریک PI=۵/۰۹ محاسبه شد (شکل ۲).

به توازن جهت ژن مورد نظر با ژن های مجاور نیز اهمیت ویژه ای دارد، زیرا امکان دارد که منطقه بالا دست ژن مجاور، بعد از منطقه پایین دست ژن قبلی قرار نگرفته باشد. بدین معنی که جهت ژن مجاور با ژن قبلی متفاوت بوده، و در نتیجه، منطقه پایین دست ژن مجاور، نزدیک به همان منطقه پایین دست ژن قبلی و منطقه بالادست ژن مجاور دور از منطقه پایین دست ژن قبلی قرار گرفته باشد، و حال آنکه در صورت تشابه جهت ژن های مجاور با همدیگر، منطقه بالا دست ژن مجاور، نزدیک به منطقه پایین دست ژن قبلی و برعکس خواهد بود (او ۱۹).

مواد و روش ها

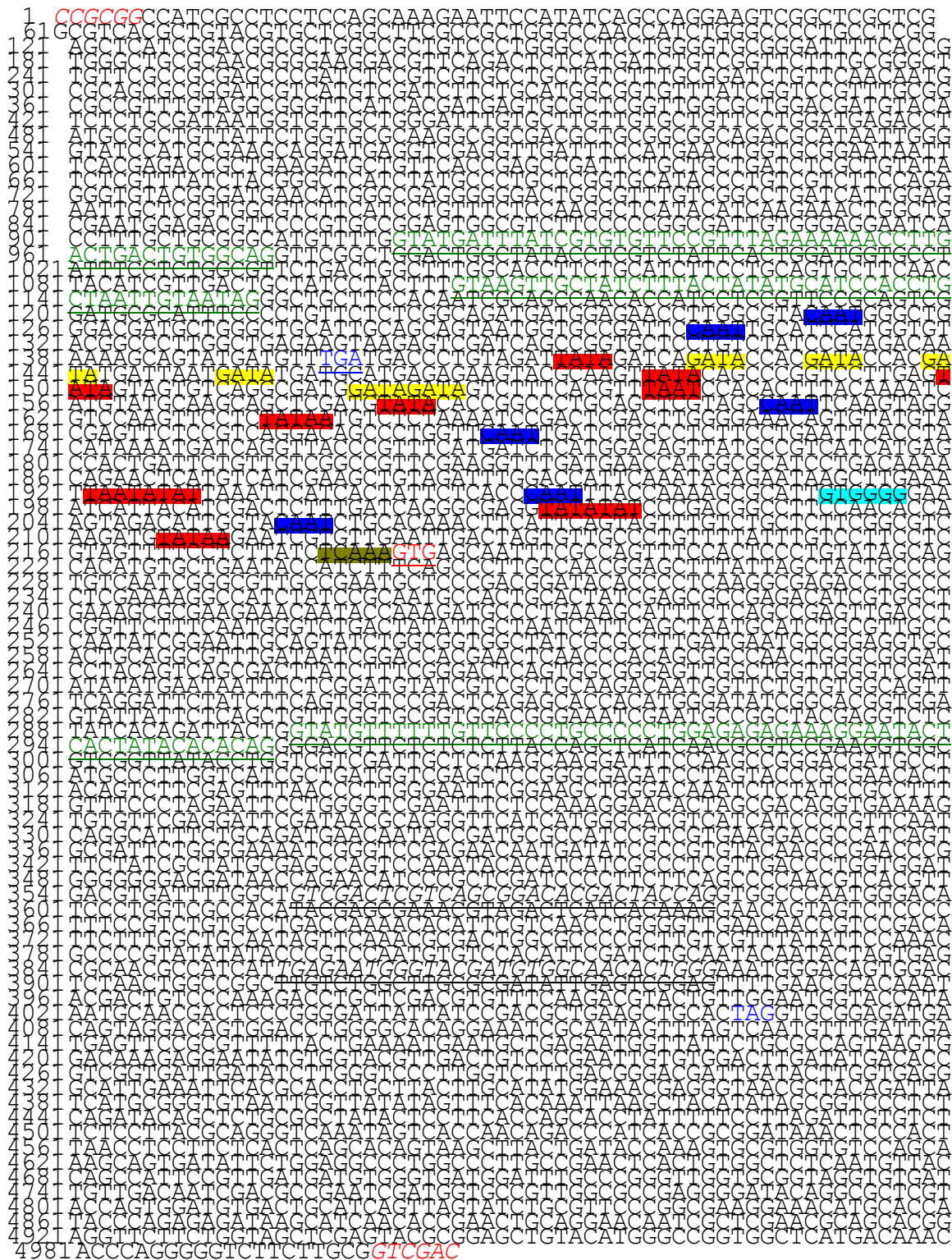
با استفاده از ردیف های نوکلئوتیدی محفوظ برای ژن *plb* در چند میکروارگانیسم، پرایمرهای (آغازگرهای) لازم برای تکثیر یک قطعه تخمینی با روش PCR دژنراتیو به طول ۵۵۰bp طراحی و قطعه مورد نظر با موفقیت تکثیر شد. پرایمرهای مورد استفاده برای PCR دژنراتیو عبارت بودند از:

Forward primer:
5' GAYGGIGGIGARGAYAAAYCARAA 3'
Reverse Primer:
5' AYIGTICCRITCCARCARTA 3'

برای کلونینگ و توالی یابی طول بیشتری از ژن، روش PCR برگشتی (IPCR) در چند مرحله مورد استفاده قرار گرفت و برای هر مرحله پرایمرهای لازم طراحی و استفاده شد. برای انجام PCR برگشتی، DNA ژنومی میکروارگانیسم با استفاده از چند آنزیم محدودالتر منتخب هضم گردید و سپس قطعات DNA حاصل از هضم DNA ژنومی با استفاده از آنزیم لیگاز (T4 DNA ligase) به DNA حلقوی تبدیل شد و به عنوان DNA الگو برای واکنش PCR برگشتی مورد استفاده قرار گرفت. از فرآورده های مراحل فوق پس از انجام ترانسفورماسیون و جداسازی قطعات ترانسفورم شده، برای تعیین توالی نوکلئوتیدی قطعات استفاده شد و با تلفیق توالی های نوکلئوتیدی حاصل از مراحل مختلف، توالی نوکلئوتیدی ژن کامل فسفولپاز *B_r*، فومیکاتوس به دست آمد. این تحقیق در گروه PME دانشکده علوم حیاتی دانشگاه منچستر انگلستان انجام پذیرفت.

آنالیز ژن

یافته ها: در توالی ژن کامل فسفولپاز *B_r*، فومیکاتوس به طول ۱۸۲۴ bp، سه منطقه غنی از اسیدنوکلئیک AT در فواصل ۷۱ bp- به صورت TATAA، در ۱۶۲ bp- به صورت TATATAT یعنی حالت کلاسیک و در ۲۵۲bp- با توالی TATATT در منطقه بالا دست نوکلئوتید ۱+ شناسایی شد. توالی های مشابهی با تغییر مختصر در توالی TATA نیز به صورت مناطق غنی از AT در این منطقه وجود دارند. همچنین دو توالی CAAT در فواصل ۱۲۴bp- و ۲۲۷bp- از نوکلئوتید ۱+ در طول این ژن واقع شده است. دو توالی CAAC نیز در این قسمت شناسایی شد که در فواصل ۱۴۶bp- و ۳۰۶bp- از نوکلئوتید ۱+ واقع شده اند. کدون آغازگر در ژن *plb_r*، فومیکاتوس یک کدون غیر معمول GTG است که با فاصله سه نوکلئوتید از یک



شکل ۱: توالی کامل ژن *p1b*، فومینگاتوس. ۱۳۹۷ bp ابتدای توالی فوق مربوط به ORF یک ژن دیگر بوده و در نوکلئوتید شماره ۴۰۷ ژن *afplb* خاتمه می یابد. توالی مربوط به منطقه برش توسط آنزیم *Sac II* محدودالایز با رنگ قرمز و توالی های مربوط به پرایمرهای IPCR به صورت خمیده و دارای خط زیرین، اینترون ها با رنگ سبز و خط زیرین و کدون متوقف کننده با رنگ آبی و خط زیرین و کدون آغازگر با رنگ قرمز و خط زیرین مشخص شده است. بسته GATA به رنگ زرد، بسته TATA به رنگ قرمز، بسته CAAT به رنگ آبی پر رنگ، توالی CREA به رنگ آبی کم رنگ و توالی TCAAA به رنگ سبز پر رنگ نشان داده شده است.

1 VSNFASFHSLYSSTCAEYHLSALANGALLATAPVNRALPNAPDGYTPQGE
 51 TCPSKRPSIRNATALSSAETSWLKARRNNTKDALKAFLSRVDLGSFNGSD
 101 YIANHSANASALPNIGIAVSGGGYRALMNGGGALQAFDNRTTNSTHSGQL
 151 GGILQSATYLSGLSGGSWLVGSIYMNFSDVSSLQDNGSVWQFQDSIFSG
 201 PTQSTTWDIGTVEYYSQLLGAVDVGKSNAGYEVSI TDYWGRSLSYQLINAS
 251 EGGVGTWSSIALSKDFQAGTMPMLVIADGRAPGEILVPANTTVFEFNP
 301 WEFGSWDKLSLAFVLSLEFLGSNFSKGTLATGEKCVRGFDNAGFIMGTSSS
 351 LFNQAFLOMNNTDAPSVVKDAISAILGKIGSENNDIAVYKPNPFYRYASQ
 401 SKYTSSPSLTLVDGGEDLQNIPLDPLLQQRHVDVILAVDSSADTTTRWP
 451 NGTSLVATYRNVDSQRNSSLPFSPVDPQNTFVNLGLNRRPTFFGCNSSN
 501 ATGAPLVVYIPNAPYIYPSNVSTFDLQYNTSERNAI IENGYDVATLGNGT
 551 VDSNWPACLACAILSRSFERTNTTVPKTCSTCFKTYCWNGTINATTPGDY
 601 YPTLKLH

شکل ۲: ترجمه توالی اسیدهای نوکلئیک ژن *plb_۲* آ. فومیگاتوس به اسید آمینه بعد از حذف ۵۹ bp از اسیدهای نوکلئیک مربوط به ایترون موجود در طول ژن. توالی های قرمز، مناطق محفوظ در مسیر تکاملی و دارای تشابه زیاد با قسمت های دارای فعالیت کاتالیتیکی در فسفولیپازهای یوکاریوت ها را نشان می دهد.

plb_۲ آ. فومیگاتوس این توالی در ۱۷bp- به صورت TATAA، در ۱۶۲bp- به صورت TATATAT، در ۲۵۲bp- به صورت TATATT و همچنین توالی های مشابه دیگر در فواصل دورتر از نوکلئوتید +۱ دیده می شود (۳-۱، ۱۷ و ۱۹). علیرغم نظر علمی به عنوان احتساب بسته TATA به عنوان پروموتور ژن، مطابق گزارش هامر و تیمبرلاک حذف این ناحیه از قسمت بالا دست ژن *trpC* اسپیریلیوس نیدولانس در میزان بیان این ژن، تأثیری ایجاد نکرد (۱۷) و به نظر می رسد که ایفای نقش پروموتوری به وسیله ترکیبی پیچیده از توالی های متفاوت در ناحیه بالا دست ژن ها، بیان ژن ها و سطح فعالیت آن ها را کنترل می کنند که به عنوان مثال، از توالی های CAAT و توالی نواحی غنی از CT به عنوان ایفاگر نقش پروموتور یاد می شود، زیرا معمولاً در فواصل ۱۲۰bp- تا ۷۰bp- از نوکلئوتید +۱ وجود توالی CAAT از اسیدهای نوکلئیک نیز پروموتور بیان ژن محسوب می شود (۲، ۳، ۲۵ و ۳۱-۲۸) ولی گاهی این توالی در ناحیه ۲۱۳- از نوکلئوتید +۱ ژن مثلاً در ژن *tptA* اسپیریلیوس نیدولانس مشاهده شده است. در مورد مشارکت و تداخل اثر توالی CAAT با توالی TATA و همچنین تأثیر تعداد کپی این توالی ها در کنترل بیان ژن و سطح بیان اتفاق نظر قطعی وجود ندارد. ضمن آنکه برای وجود یک توالی مشابه با CAAT یعنی توالی CAAC در ناحیه بالادست ژن هم نقش پروموتوری در نظر گرفته می شود (۱، ۲، ۳، ۳۲ و ۳۳). توالی CAAC در ژن *trpC* اسپیریلیوس نیدولانس در فاصله ۳۰۶- از نوکلئوتید +۱ قرار گرفت (۱۷). در ژن *plb_۲* آ. فومیگاتوس دو توالی CAAT در فواصل ۲۲۷- و ۱۲۴bp- از نوکلئوتید +۱ ژن و دو توالی CAAT دیگر نیز در فاصله بسیار دورتر قرار گرفته اند. همچنین دو توالی CAAC نیز در ناحیه بالا دست نوکلئوتید +۱ ژن وجود دارد که یکی از آنها در فاصله ۱۴۴bp- و دیگری در فاصله ای بسیار دورتر قرار گرفته است. همچنین بیان و سطح بیان ژن از وجود نواحی غنی از پیریمیدین یعنی اسیدهای نوکلئیک سیتوزین و تیمین متأثر می شود که این ناحیه را اصطلاحاً قطعه غنی از CT می نامند و حضور این قطعه در قسمت بالا دست ژن هایی که فاقد نواحی TATA و CAAT بوده، و در عین حال در سطح قوی و چشمگیری بیان می شوند، قابل تأمل است. به

توالی اسیدآمینه ای فوق در بردارنده قطعه توالی GLSG (G/S,S=CG) ما بین شماره های ۱۶۶-۱۶۰ در طول توالی اسیدآمینه ای است که این قطعه به صورت محفوظ در همه آنزیم های دارای فعالیت لیبولیتیک وجود دارد. همچنین در طول توالی اسیدآمینه ای فوق، قطعه کاتالیتیک فسفولیپازی با توالی اسیدهای آمینه QSGGGXRA(M/L,S=CG, R=AG) ما بین شماره های ۱۲۶-۱۱۹ مستقر است که انتظار علمی مربوط به ساختمان فسفولیپازی این آنزیم را همراه با توالی اسیدهای آمینه شماره ۱۶۶-۱۶۰ برآورده می سازد. آنالیز توالی اسیدآمینه ای آنزیم برای یافتن خوشه اسیدهای آمینه آب گریز (۳۳) به عنوان جزء ترشچی در ساختمان آنزیم، فقدان این خوشه را در انتهای N آنزیم نشان داد.

آنالیز توالی اسیدآمینه ای آنزیم با نرم افزارهای رایانه ای موجود در سایت <http://ca.eapasy.org/cgi-bin/nicesite.pl> وجود ۲۳ موقعیت N- گلیکوزیلاسیون بالقوه، شش موقعیت بالقوه فسفوریلاسیون پروتئین کیناز C، دوازده موقعیت بالقوه فسفوریلاسیون کازئین کیناز دو را در ساختار آنزیم نشان داد.

بحث

در یوکاریوت های عالی، یکی از پروموتورهای وصفی ژن ها یک منطقه غنی از اسیدهای نوکلئیک آدنین و تیمین ارزیابی می شود که معمولاً در حدود ۳۰bp- از نوکلئوتید +۱ ژن قرار گرفته و بسته TATA نامیده می شود. در باکتری ها این قطعه معمولاً در حدود bp ۱۰- از نوکلئوتید +۱ ژن قرار می گیرد. علاوه بر این قطعه، قطعاتی با توالی مشابه تا موقعیت ۲۷۵bp- از نوکلئوتید +۱ ژن نیز به عنوان مناطق غنی از AT و دارای نقش پروموتوری برای ژن شناسایی شده اند (۳-۱ و ۱۸). در ساختار ژن های تعدادی از قارچ های کپکی، مثلاً در ژن های *autG*, *autB*, *alcC* اسپیریلیوس نیدولانس، *glaA* اسپیریلیوس نیجر، *glaA* اسپیریلیوس آوار موری، *cbh_۲* تریکودرما ریسی، موکور پوسیلیوس و *am* نوروسپورااکراسا توالی TATAAA در فاصله ۱۱۰bp- تا ۳۰bp- از نوکلئوتید +۱ ژن شناسایی شده است (۱، ۳، ۴، ۱۶، ۱۹، ۲۶ و ۲۷). این ناحیه با توالی TATATAA در ژن ۹ *cum-* نوروسپورااکراسا، TATATAA در ژن *cbh_۱* تریکودرما ریسی و TATAAT در ژن *pcbC* پنسیلیوم کرایوزنوم وجود دارد. در ژن

همچنین نوکلئوتید +۱ ژن *egII* در ترکیب *درما ریسئی* و ژن *cutA* در *کاندیدا گلوکوسپوریولیدس* نیز بعد از توالی نوکلئوتیدی CCAA قرار گرفته اند که تشابه بسیار زیادی با توالی های ذکر شده قبلی دارند (۱، ۴، ۵، ۱۳-۱۷، ۱۵، ۱۹، ۲۴ و ۳۴).

مقایسه جهت ۳' → ۵' ژن *plb_۲* آ. فومیگاتوس در ژنوم آ. فومیگاتوس با جهت ۳' → ۵' ژن فسفولپاز B پنسیلیوم نوتاتوم (۳۵ و ۳۶) نشان داد که هر دو ژن در جهت مشابهی قرار گرفته اند. این مقایسه با ترجمه توالی اسیدهای نوکلئیک طول ژن *plb_۲* آ. فومیگاتوس و ژن *plb* پنسیلیوم نوتاتوم به اسید آمینه امکان پذیر شد زیرا توالی اسیدهای نوکلئیک تشکیل دهنده هر دو ژن در الگوی مشابهی قابل ترجمه به اسیدهای آمینه بود. نکته قابل توجه این است که بلافاصله بعد از ژن *plb_۲* آ. فومیگاتوس، ژن اسید فسفاتاز در ژنوم قارچ در روی همان کروموزوم ولی با جهتی مخالف قرار دارد، بدین معنی که انتهای ۳' ژن اسید فسفاتاز مجاور و انتهای ۳' ژن *afplb_۲*، انتهای ۵' ژن اسید فسفاتاز دور از انتهای ۳' ژن *plb_۲* آ. فومیگاتوس قرار دارد، یعنی جهت ۳' → ۵' ژن اسید فسفاتاز مخالف جهت ۳' → ۵' ژن *plb_۲* آ. فومیگاتوس است و حال آنکه در صورت مشابهت جهت ۳' → ۵' این دو ژن، باید انتهای ۳' ژن اسید فسفاتاز دور از انتهای ۳' ژن *afplb_۲* قرار می گرفت و انتهای ۵' ژن اسید فسفاتاز باید مجاور انتهای ۳' ژن *plb_۲* آ. فومیگاتوس واقع می شد.

وجود یا عدم وجود قطعات تنظیم کننده بیان ژن مانند PACC و AREA و CREA نیز از عواملی است که رونویسی mRNA از روی ژن، و در نتیجه، ساخت *PLB_۲* را در سلول قارچی تحت تأثیر قرار می دهد (۷-۱۱، ۵-۹، ۱۱-۱۳، ۲۲ و ۳۵). با توجه به وجود شش توالی GATA مربوط به AREA در قسمت بالا دست نوکلئوتید +۱ ژن، به نظر می رسد که بیان ژن *plb_۲* آ. فومیگاتوس تحت تأثیر یون های قوی نیتروژن یعنی آمونیوم و یون های ضعیف نیتروژن یعنی نترات نخواهد بود، ولی برای تأیید حتمی این موضوع، رشد قارچ در محیط های کشت حاوی غلظت های مختلف از یون های فوق الذکر و اندازه گیری تولید فسفولپاز B خارج و داخل سلولی باید انجام گیرد، و در عین حال، در انجام این مطالعه، توجه به وجود کپی های دیگری از ژن های تولید کننده فسفولپاز باید مدنظر باشد یا اینکه با کلون کردن ژن *plb_۲* آ. فومیگاتوس در یک سلول میزبان دیگر (ترجیحاً یوکاریوتی)، تأثیر یون های فوق الذکر بر بیان ژن فوق سنجیده شود. همچنین وجود تنها یک قطعه مؤثر در مهار تنظیم بیان ژن توسط کربن، یعنی CREA، در قسمت بالا دست نوکلئوتید +۱ ژن *plb_۲* آ. فومیگاتوس نشان دهنده این موضوع است که این ژن به صورت ضعیف یا خیلی ضعیفی تحت تأثیر وجود، عدم وجود یا تغییر منابع کربن قرار خواهد گرفت همچنان که مطالعه تولید فسفولپاز B تحت تأثیر منابع مختلف کربن در مراحل مختلف رشد این قارچ مؤید این موضوع بود، زیرا تغییر معنی داری در سطح تولید فسفولپاز B با حذف یا جایگزینی منابع مختلف کربن در محیط کشت مشاهده شد. عدم وجود منطقه یا مناطق مربوط به تنظیم بیان ژن توسط pH خارجی به

نظر می رسد که در فقدان قطعات TATA و CAAT، این ناحیه غنی از CT نقش پروموتور را ایفا می کند. این قطعه به صورت چسبیده به نوکلئوتید +۱ ژن و یا با فاصله کوتاهی از این نوکلئوتید +۱ در توالی ژن های تعدادی از قارچ های کپکی مشاهده شده است (۴-۱۶، ۱۷ و ۱۹). در ژن *oliC* اسپریلیوس نیدولانس در فاصله ۹۰۰bp از نوکلئوتید +۱ قرار دارد (۴، ۸، ۱۷ و ۲۷). در ژن *plb_۲* آ. فومیگاتوس، نواحی غنی از CT به صورت متعدد در ناحیه بالا دست نوکلئوتید +۱ ژن وجود دارند که دو قطعه در فاصله بسیار نزدیک به نوکلئوتید +۱ ژن در ۹۰bp و ۳bp واقع شده است و قطعات دیگر غنی از CT در فواصل ۱۰۲bp و ۹۰bp و نواحی دورتر نیز وجود دارند و معمولاً چنین به نظر می رسد که قطعات TATA، CAAT و نواحی غنی از CT در رونویسی از DNA مؤثر بوده و شروع رونویسی mRNA از روی رشته DNA و تعداد کپی های رونویسی شده، و در نتیجه، شروع بیان و میزان بیان هر ژن به وسیله آنها کنترل می شود، زیرا محصول نهایی ژن، از ترجمه رمز ژنتیکی mRNA به اسیدهای آمینه حاصل خواهد شد (۱، ۲ و ۴). بعد از قطعات فوق الذکر موسوم به عوامل رونویسی کدون آغازگر ATG قرار می گیرد (۱ و ۱۸) که این کدون در ژن *plb_۲* آ. فومیگاتوس به صورت GTG مشاهده شد. علم وجود کدون آغازگر معمول و مشاهده یک تغییر نوکلئوتیدی در کدون آغازگر ژن، استثنای ژنتیکی بسیار مهمی است که توصیف آن در مجال نمی گنجد ولی بدین نکته اشاره می شود که تاکنون فقط دو مورد از این استثنای ژنتیکی در ساختار ژنتیکی ژن های یوکاریوتی گزارش شده است (۲۸ و ۳۴).

در توالی ژن های شناسایی شده از ژنوم اسپریلیوس ها مثلاً در ژن های *gdhA* و *trpC* و *alcA* و *alcR* و *areB* و *oliC* و *benA* و *tubB* در اسپریلیوس نیدولانس و ژن *niaD* در اسپریلیوس نیچر و *bexA* اسپریلیوس اواموری، ساختار مشخصی از توالی نوکلئوتیدها در قسمت بالا دست چسبیده به نوکلئوتید +۱ ژن یعنی بلافاصله قبل از نوکلئوتید +۱ مشخص شده است که این توالی به صورت TCAAAA یا توالی های بسیار مشابه بوده است (۱، ۴، ۵، ۱۱-۱۳، ۱۶، ۱۷ و ۲۴). در ژن *afplb_۲* توالی TCAAA نیز درست قبل از نوکلئوتید +۱ ژن *plb_۲* آ. فومیگاتوس قرار دارد که همسانی بسیار زیادی با توالی نوکلئوتیدی موجود در ناحیه چسبیده به نوکلئوتید +۱ در سایر ژن های آ. فومیگاتوس را نشان می دهد و از جمله دلایل و مستندات احتساب کدون GTG به عنوان کدون آغازگر در این قسمت از طول ژن نیز محسوب می شود. توالی های مشابه با TCAAAA درست در ناحیه قبل از نوکلئوتید +۱ ژن، در ساختار ژن های سایر قارچ ها نیز مشاهده شده است. در ژن های *PI-1* و *H4* و *cum-1* و *am* از نوروپورواکراسا، *gdhA* و *alcA* از اسپریلیوس نیدولانس، نوکلئوتید +۱ این ژنها درست بلافاصله بعد از توالی TCAAAA فوق الذکر قرار گرفته است و در ژن های *H3* و *act-1* و *acp-1* نوروپورواکراسا، در ژن های *tubB* و *oliC* و *benA* اسپریلیوس نیدولانس، نوکلئوتید +۱ بعد از توالی TCAAG اسیدهای نوکلئیک قرار گرفته است که تشابه زیادی با توالی TCAAAA نشان می دهد.

۲۴). در ساختار فسفولپاز B قارچ های مخمری ساکارومایسس سرویسبه، کاندیدا آلیکانس و تورولاسپورا دلبروکسی، توالی ای از اسیدهای آمینه، متشکل از دو اسید آمینه آبگریز مانند ایزولوسین، لوسین، فنیل آلانین و والین در انتهای N آنزیم وجود دارد که امکان عبور آنزیم را از غشای سیتوپلاسمی فراهم می آورد. قارچ های کپکی آسپرژیلوس نیجر و آسپرژیلوس اوریزه آ نیز در ساختمان آنزیم های لیزوفسفولپاز یک (LPL1) و لیزوفسفولپاز دو (LPL2) هم واجد چنین توالی ای به عنوان جزء ترشعی است (۲۳ و ۲۴) ولی این جزء ترشعی در ساختار *afpb* نشان می دهد که این آنزیم یک آنزیم درون سیتوپلاسمی است. با توجه به شناسایی و اندازه گیری وجود و فعالیت فسفولپاز B در آ. فومیگاتوس در مراحل دیگر این پژوهش، به نظر می رسد که فسفولپاز B ترشعی، ناشی از محصول ژن فسفولپاز B1 آ. فومیگاتوس (*plb1*) باشد که در نوشتاری مجزا در مورد آن بحث شده است. انتساب فعالیت فسفولپازی خارج سلولی آ. فومیگاتوس به *plb1* از آن جهت صورت می گیرد که آنالیز DNA ژنومی این قارچ با لکه گذاری ساترن در چند مرحله و در شرایط منعطف، وجود ژن فسفولپاز دیگری غیر از دو ژن *plb1* و *plb2* در ژنوم آ. فومیگاتوس را نشان نداد.

نتیجه گیری

بسته TATA و توالی های CAAT و CAAC و مناطق غنی از اسیدهای نوکلئیک CT در فواصل متداول از نوکلئوتید +1 به عنوان پروموتورهای محتمل در ژن *afpb* وجود دارند. این ژن دارای یک کدون آغازگر غیر معمول GTG، یک ایترون مشابه با ایترون ژن فسفولپاز در سایر قارچ های کپکی و غیر کپکی، توالی های مربوط به تنظیم بیان ژن با نیتروژن و کربن و فاقد توالی موثر در بیان ژن به وسیله pH است.

صورت توالی GCCARG یا GCCAAG یا GCCAGG موسوم به *pacC* در ساختمان ژن *plb2* آ. فومیگاتوس نیز نشان دهنده این موضوع است که بیان این ژن، و در نتیجه، میزان تولید فسفولپاز B تحت تأثیر pH محیط رشد قارچ قرار نخواهد گرفت و این موضوع با ساختار عمومی رشد قارچ های کپکی نیز تناسب دارد، زیرا قارچ ها قادر به حفظ قدرت رشد خود در طیف وسیعی از pH (۳/۵-۷/۵) هستند.

ایترون موجود در طول ژن *plb2* آ. فومیگاتوس با طول ۵۹bp دارای توالی های معمول GAT در ابتدا و CAG در ابتدا و انتهای خود است و دارای طول منتظره برای ایترون های موجود در ژن های قارچی است (۹، ۱۹، ۲۰، ۳۲ و ۳۳). در ژنوم ساکارومایسس سرویسبه، ایترون های شناسایی شده دارای حداکثر طول ما بین ۲۵۶ نوکلئوتید هستند که اکثر آنها از ۱۰۰-۵۰ نوکلئوتید تشکیل یافته اند و ایترون های دارای طول بیش از ۲۰۰bp یا کمتر از ۵۰bp اندک هستند (۱۹). در مجموع، حدود دو سوم ژن های توالی شده قارچی دارای ۸-۱ ایترون در طول خود هستند (۱، ۴ و ۹). علاوه بر این، مقایسه همسانی ژن *plb2* آ. فومیگاتوس با ژن های توالی شده فسفولپاز B در قارچ هایی مانند پنسیلیوم نوتاتوم، کاندیدا آلیکانس، کریپتوکوکوس نئوفرمس و ... (۳۷، ۳۸ و ۳۹) نشان داد که ژن فسفولپاز B در همه این قارچها دارای ایترونی با طول و توالی مشابه ایترون *plb2* آ. فومیگاتوس است که نمایانگر انتقال محافظه کارانه ژن فسفولپاز B در مسیر تکاملی ما بین قارچ ها است و جالب تر آنکه ایترون موجود در ژن فسفولپاز B سایر قارچ ها نیز در طول این ژن ها در همان موقعیتی در طول ژن ها قرار گرفته است که ایترون ژن *plb2* آ. فومیگاتوس در آن موقعیت قرار دارد.

آنالیز ژن *plb2* آ. فومیگاتوس برای یافتن دامنه ای از اسیدهای آمینه آبگریز در انتهای N پروتئین حاصل از ترجمه رونوشت ژن به اسیدهای آمینه، وجود چنین خوشه ای را نشان نداد. خوشه اسیدهای آمینه انتهای N پروتئین جزء ترشعی برای پروتئین محسوب می شود و امکان عبور پروتئین از غشای سیتوپلاسمی را فراهم می آورد (۲۳ و

References

1. Kinghorn JR, In: Gene Structure in Eukaryotic Microbes. Oxford press. U.K. 1995; P: 93-139.
2. Nussinov R, Owens J, Maizel JV. Jr. Sequence signals in eukaryotic upstream regions. *Biochem Biophys Acta* 1986; 26: 866(2-3): 109-19.
3. Nussinov R. Compilation of eukaryotic sequences around transcription initiation sites. *J Theor Biol* 1986 Jun; 21: 120(4): 479-87.
4. Nussinov R, Strong sequence patterns in eukaryotic promoter regions: potential implications for DNA structure. *Int J Biochem* 1993; 25(4): 597-607.
5. Unkles SE, Campbell EL, Punt PJ, Hawker, KL, Contreras R, Hawkins AR, Van den Hondel CA, Kinghorn JR. The *Aspergillus niger niaD* gene encoding nitrate reductase: upstream nucleotide and amino acid sequence comparisons. *Gene* 1992; 111(2): 149-55.
6. Kuruvilla FG, Shamji AF, Schreiber SL. Carbon- and nitrogen-quality signaling to translation are mediated by distinct GATA-type transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jun 19;98(13):7283-8.
7. Sczacchio, C. The fungal GATA factors. *Curr Opin Microbiol*. 2000; 3(2): 126-31.
8. Ravagnani A, Gorfinkiel L, Langdon T, Diallynas G, Adjadj E, Demais S, Gorton D, Arst HN. Jr, Sczacchio C. Subtle hydrophobic interactions between the seventh residue of the zinc finger loop and the first base of an HGATAR sequence determine

- promoter-specific recognition by the *Aspergillus nidulans* GATA factor AreA. *EMBO J* 1997; 16(13): 3974-86.
9. Conlon H, Zadra I, Haas H, Arst HN. Jr, Jones MG, Caddick MX. The *Aspergillus nidulans* GATA transcription factor gene *areB* encodes at least three proteins and features three classes of mutation. *Mol Microbiol* 2001 Apr; 40(2): 361-75.
 10. Cubero B, Scazzocchio C. Two different, adjacent and divergent zinc finger binding sites are necessary for CREA-mediated carbon catabolite repression in the proline gene cluster of *Aspergillus nidulans*. *EMBO J* 1994; 13(2): 407-15.
 11. Kulmburg P, Mathieu M, Dowzer C, Kelly J, Felenbok B. Specific binding sites in the *alcR* and *alcA* promoters of the ethanol regulon for the CREA repressor mediating carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 1993 Mar; 7(6): 847-57.
 12. Kubicek CP, Messner R, Gruber F, Mandels M, Kubicek-Pranz EM. Triggering of cellulase biosynthesis by cellulose in *Trichoderma reesei*. Involvement of a constitutive, sophorose-inducible, glucose-inhibited beta-diglycoside permease. *J Biol Chem* 1993; 268(26): 19364-8.
 13. Espeso EA, Tilburn J, Sanchez-Pulido L, Brown CV, Valencia A, Arst HN Jr, Penalva, MA Specific DNA recognition by the *Aspergillus nidulans* three zinc finger transcription factor PacC. *J Mol Biol* 1997; 274(4): 466-80.
 14. Denison SH. pH regulation of gene expression in fungi. *Fungal Genet Biol* 2000; 29(2): 61-71.
 15. Kubicek CP, Messner R, Gruber F, Mach RL, Kubicek-Pranz EM. The *Trichoderma* cellulase regulatory puzzle: from the interior life of a secretory fungus. *Enzyme Microb Technol* 1993; 15(2): 90-99.
 16. Tilburn J, Sarkar S, Widdick DA, Espeso EA, Orejas M, Mungroo J, Penalva MA, Arst HN Jr. The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. *EMBO J*. 1995; 14(4): 779-90.
 17. Hamer JE, Timberlake WE. Functional organization of the *Aspergillus nidulans* *trpC* promoter. *Mol Cell Biol* 1987; 7(7): 2352-9.
 18. Kozak M. At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J Mol Biol* 1987; 196(4): 947-50.
 19. Radford A, Parish JH. The genome and genes of *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol* 1997; 21(3): 258-66.
 20. Rio DC. RNA processing. *Curr Opin Cell Biol* 1992; 4(3): 444-52.
 21. Iida Y. Quantification analysis of splice signal sequences: mutation of 3'-splice signal sequence and mechanism of unsplicing in a beta-thalassemia pre-mRNA. *Nucleic Acids Symp Ser* 1999; (42): 63-4.
 22. Nussinov R. Some guideline for identification of recognition sequences: regulate sequences frequently contain (T)GTG/CAC(A), TGA/TCA and (T)CTC/GAG(A). *Biochem Biophys Acta* 1986; 866(2-3): 93-108.
 23. Kyte J, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 1982; 157(1): 105-32.
 24. Conesa A, Punt PJ, van Lwijk N, van den Hondel CA. The secretion pathway in filamentous fungi: a biotechnological view. *Fungal Genet Biol* 2001 Aug; 33(3): 155-71.
 25. Nussinov R. Sequence signals which may be required for efficient formation of mRNA 3' terminal. *Nucleic Acid Res* 1986; 14(8): 3557-71.
 26. Kuhls K, Lieckfeldt E, Samuels GJ, Kovacs W, Meyer W, Petrini O, Gams W, Bomer T, Kubicek CP. Molecular evidence that the asexual industrial fungus *Trichoderma reesei* is a clonal derivative of the ascomycete *Hypocrea jecorina*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(15): 7755-60.
 27. Gouka RJ, Stam H, Fellinger AJ, Muijsenberg RJ, van de Wijngaard A, Punt PJ, Musters W, van den Hondel CA. Kinetics of mRNA and protein synthesis of genes controlled by the 1,4-beta-endoxylanase A promoter in controlled fermentations of *Aspergillus awamori*. *Appl Environ Microbiol* 1996 Oct; 62(10): 3646-9.
 28. Moon RP, Uncles SE, Duncan JM, Hawkis AR, Kinghorn JR. sequence of *Phytophthora infestans* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding gene (*gpdA*). *Plant Molecular Biology* 1992; 1209-11.
 29. Nussinov R. The eukaryotic CCAAT and TATA boxes, DNA spacer flexibility and looping. *J Theor Biol* 1992; 155(2): 243-70.
 30. Nussinov R. DNA spatial considerations in the arrangement of G/C and A/T blocks. *Comput Biol Med* 1992; 22(1-2): 97-112.
 31. Nussinov R. DNA sequences at and between the GC and TATA boxes: potential DNA looping and spatial juxtapositioning of the protein factors. *J Biomol Struct Dyn* 1992; 9(6): 1213-37.
 32. Nussinov R. Signals in DNA sequences and their potential properties. *Comput Appl Biosci* 1991; 7(3): 295-9.
 33. Simpson AG, MacQuarrie EK, Roger AJ. Eukaryotic evolution: early origin of canonical introns. *Nature* 2002; 419(6904): 270.
 34. Gutierrez S, Diez B, Montenegro E, Martin JF. Characterization of the *Cephalosporium acremonium* *pcbAB* gene encoding alpha-aminoacyl-cysteiny-valine synthetase, a large multidomain peptide synthetase: linkage to the *pcbC* gene as a cluster of early cephalosporin biosynthetic genes and evidence of multiple functional domains. *J Bacteriol* 1991; 173(7): 2354-65.
 35. Morozov IY, Galbis-Martinez M, Jones MG, Caddick MX. Characterization of nitrogen metabolite signalling

- in *Aspergillus* via the regulated degradation of *areA* mRNA. *Mol Microbiol* 2001; 42(1): 269-77.
36. Berbee ML, Carmean DA, Winka K. Ribosomal DNA and resolution of branching order among the ascomycota: how many nucleotides are enough? *Mol Phylogenet Evol* 2000; 17(3): 337-44.
 37. Sharp PA. Splicing of messenger RNA precursors. *Science* 1987; 235(4790): 766-71.
 38. Cox GM, McDade HC, Chen SC, Tucker SC, Gottfredsson M, Wright LC, Sorrell TC, Leidich SD, Casadevall A, Ghannoum MA, Perfect JR. Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology* 2001; 39(1):166-175.
 39. Sugiyama Y, Nakashima S, Mirbod F, Kanoh H, Kitajimo Y, Ghannoum MA, and Nozawa Y. Molecular cloning of a second phospholipase B gene, *caplb2* from *Candida albicans*. *Med Myco* 1999; 137: 61-67.