

شناسائی مولکولی ژن تولیدکننده پروتئین شوک حرارتی ۷۰ کیلودالتونی در قارچ درماتوفیت ترایکوفایتون وروکوزوم

دکتر کامیار متواضع^۱، دکتر مسعود امامی^۲، دکتر فتح‌اله فلاحیان^۳، دکتر محمدرضا خرمی‌زاده^۴، دکتر ساسان رضائی^۵

^۱ استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی
^۲ استاد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی
^۳ استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی
^۴ دانشیار، بخش بیولوژی مولکولی، گروه قارچ‌شناسی و انگل‌شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
^۵ دانشیار، بخش بیولوژی مولکولی، گروه قارچ‌شناسی و انگل‌شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

سابقه و هدف: ترایکوفایتون وروکوزوم (*T.verrucosum*) یکی از قارچ‌های درماتوفیت است که پوست و ضمام آن در انسان و حیوانات به ویژه دام را مورد تهاجم قرار می‌دهد. در مطالعه حاضر سعی شده است تا پروتئین‌های کاپرونی منسوب به پروتئین‌های شوک حرارتی ۷۰ کیلودالتونی در این قارچ تشخیص داده شده و بیان ژن مولد آن تحت شرایط استرس گرمایی بررسی شود.
روش بررسی: در این مطالعه تجربی، پرایمرهایی به اندازه ۲۰ یا ۲۱ نوکلئوتید با استفاده از نواحی بسیار ثابت ژن‌های مشابه دیگر طراحی گردیدند. این پرایمرها در PCRهای متعددی با استفاده از DNA ژنومی و نیز cDNA قارچ درماتوفیت ترایکوفایتون وروکوزوم به کار گرفته شده و قطعات PCR حاصله، تعیین توالی گردیدند.

یافته‌ها: در این بررسی ۲۲۱۷ نوکلئوتید از این ژن جدید، توالی‌یابی شد که ORF آن به طول ۱۹۶۲ bp بوده، حاوی دو اینترون می‌باشد و پروتئینی با ۶۵۴ آمینواسید را رمز می‌نماید. پروتئین حاصله غنی از گلیسین، آلانین و گلوتامیک اسید بود در حالی که میزان تریپتوفان و سیستئین آن ناچیز است. مقایسه توالی‌های به دست آمده در بانک اطلاعات ژنی چه در مورد ژن جدید و چه در مورد آمینواسید منتج از آن، همولوژی معنی‌داری را با دیگر پروتئین‌های شوک حرارتی ۷۰ کیلودالتونی نشان داده است. مطالعات بیشتر نشان داد بیان این ژن تحت تأثیر استرس‌های حرارتی افزایش می‌یابد.

نتیجه‌گیری: ژن سنتزکننده پروتئین شوک حرارتی ۷۰ کیلودالتونی که از قارچ درماتوفیت ترایکوفایتون وروکوزوم به دست آمده است، از نظر توالی نوکلئوتیدی شباهت زیادی با سایر ژن‌های این خانواده در دیگر ارگانیسم‌ها دارد. این پروتئین به طور محسوسی میکروارگانیسم را در برابر استرس‌های گرمایی محافظت می‌کند.

واژگان کلیدی: درماتوفیت، ترایکوفایتون وروکوزوم، کاپرون، پروتئین شوک حرارتی.

مقدمه

قرارگیری سلول‌ها در معرض تنش‌های محیطی همچون شوک حرارتی، فلزات سنگین (۱) و اشعه ماوراء بنفش (۲) باعث فعال شدن ژن‌های شوک حرارتی و سنتز پروتئین‌های شوک

حرارتی (Heat shock protein:HSP) می‌شود (۳،۴). تاکنون HSPهای مختلفی از نظر اندازه و عملکرد شناخته شده‌اند (۵). پروتئین‌های شوک حرارتی ۷۰ کیلودالتونی، یکی از پروتئین‌های بسیار ثابت از نظر توالی آمینو اسیدی هستند (۶)، همچنین این پروتئین‌ها در نقش کاپرون‌های مولکولی، باعث متابولیسم پروتئین‌ها و جابه‌جائی آنها چه در شرایط تنش و چه در شرایط عادی می‌گردند (۷-۱۱). HSPها،

آدرس نویسنده مسئول: تهران، میدان قدس، ابتدای خیابان دریند، واحد تهران شمال دانشگاه آزاد اسلامی، دکتر کامیار متواضع (email: motavaze49@yahoo.com)
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۵/۱/۲۰
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۵/۵/۵

(۲۴:۱) دنبال شد. با افزودن حجم مساوی از ایزوپروپانول، DNA رسوب داده شد و در اتانول نگهداری گردید.

جداسازی RNA: استخراج RNA، هم برای نمونه‌های شاهد و هم سه نمونه از سلول‌های قارچی که به ترتیب به مدت ۱، ۲ و ۴ ساعت در حرارت 40°C قرار داده شده بودند، انجام گرفت. به این منظور برای هر یک از گروهها، ۴۰ پلیت حاوی محیط سابورو دکستروز آگار مایع به همراه سیکلوهگزامید و کلرامفنیکل جهت برداشت میسلیموم و استخراج RNA مورد استفاده قرار گرفت. پودر میسلیمومی به دست آمده با کمک نیتروژن مایع، در داخل محلول گوانیدین ایزوتیوسیانات (GITC) سرد و به مدت ۱۵ دقیقه به صورت هموزنیزه درآمد و به دنبال آن نمونه در سانتریفوژ 2500 دور به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت. عمل استخراج با سدیم استات ۲ مولار، فنل اسیدی و کلروفرم- ایزوآمیل الکل (۲۴:۱) همراه با سانتریفوژ 12000 دور به مدت ۷ دقیقه دنبال شد. بعد از افزودن حجم مساوی از ایزوپروپانول و قرارگیری نمونه‌ها در حرارت 20°C - به مدت ۱ ساعت، سانتریفوژ 12000 دور به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. سپس GITC و ایزوپروپانول به نمونه‌ها افزوده شده و مخلوط حاصل در 20°C - به مدت ۱ ساعت قرار گرفت. نمونه‌های نهائی در سانتریفوژ 12000 دور به مدت ۵ دقیقه قرار گرفته و رسوب RNA حاصله، با کمک اتانول ۷۰٪ به آرامی شستشو داده شد.

انجام PCR: PCR با استفاده از DNA ژنومی و با کمک پرایمرهای اولیگونوکلوئیدی سنتتیک صورت گرفت. به طور خلاصه مجموعه‌ای از هر یک از پرایمرها به محلول حاوی بافر PCR به صورت $10\times$ همراه با MgCl_2 ، مخلوط dNTP 10 میلی‌مولار، آنزیم Taq و DNA ژنومی اضافه گردید. برنامه PCR به کار رفته جهت تکثیر بخش اول ژن مورد نظر به این صورت بوده است: 94°C به مدت یک دقیقه، 50°C به مدت یک دقیقه و 72°C به مدت یک دقیقه (مجموعاً ۳۵ دور) همچنانکه در مورد بخش میانی و انتهایی ژن، برنامه به این شکل تنظیم شد: 94°C به مدت ۱ دقیقه، 53°C به مدت ۱ دقیقه و 72°C به مدت ۷۵ ثانیه (مجموعاً ۳۵ دور). در پایان محصولات PCR به دست آمده با کمک الکتروفورز روی ژل آگاروز ۱٪ بررسی گردیدند.

انجام RT-PCR: عمل RT-PCR با کمک cDNA انجام شد. برای این منظور ابتدا دو مخلوط جداگانه تهیه شد. یکی از این محلول‌ها حاوی Random Hexamer، هر یک از پرایمرها و RNA بود که ابتدا به مدت ۳ دقیقه در 70°C و سپس ۱ دقیقه در 4°C قرار داده شدند. در حالی که مخلوط دوم حاوی بافر

جابه‌جایی پروتئین‌های سیتوپلاسمی را به درون میتوکندری تسهیل می‌نمایند (۱۳، ۱۲). این پروتئین‌ها، موجودات زنده را در برابر استرس‌های محیطی نیز محافظت می‌کنند (۱۴، ۸، ۳). عملکرد HSPها، چه در شرایط استرس و چه در شرایط معمول، وابسته به ATP می‌باشد (۱۵). خانواده پروتئین‌های شوک حرارتی ۷۰ کیلودالتونی در مخمرها به طور گسترده‌ای مورد بررسی قرار گرفته‌اند (۱۶) با این وجود در مورد قارچهای رشته‌ای خصوصاً آنهایی که با عفونتهای انسانی در ارتباط هستند اطلاعات بسیار کمی در دسترس است.

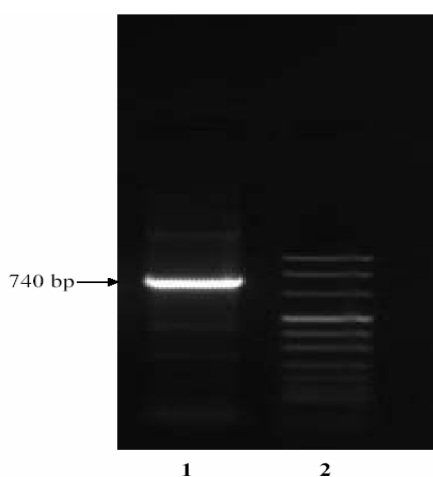
درماتوفیت‌ها، گروهی از قارچهای رشته‌ای کراتین‌دوست هستند که پوست و ضامم آن در انسان و حیوانات را مورد حمله قرار می‌دهند (۱۷). طیف وسیعی از عفونتهای درماتوفیتی در انسان توسط *T. verrucosum* ایجاد می‌شود (۱۷-۱۹). این قارچ یکی از عوامل ایجاد کننده انواع مختلف کچلی است (۲۰). هدف از این بررسی، شناسایی مولکولی ژن سنتزکننده پروتئین شوک حرارتی ۷۰ کیلو دالتونی و بررسی بیان ژن مذکور تحت تأثیر استرس‌های گرمایی در این درماتوفیت بوده است.

مواد و روشها

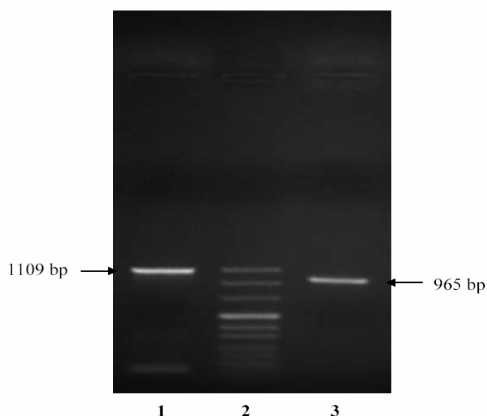
تهیه نمونه قارچی: برای انجام این مطالعه بنیادی، از بیماران مشکوک مبتلا به عفونت قارچی جلدی مراجعه‌کننده به آزمایشگاه قارچ‌شناسی دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران در سال ۱۳۸۲، نمونه‌برداری صورت گرفت که بعد از بررسیهای میکروسکوپی و میکروسکوپی وجود قارچ *T. verrucosum* تأیید گردید.

جداسازی DNA: DNA با وزن مولکولی بالا با کمک روش تغییر یافته Choi، از قارچ *T. verrucosum* به دست آمد. به طور خلاصه، توده میسلیمومی فریز شده، با کمک نیتروژن مایع در داخل یک هاون چینی به صورت پودر کاملاً یکنواخت درآمد. پودر حاصله در داخل بافر استخراج کننده DNA ریخته شد. این بافر شامل Tris- HCl 50 میلی‌مولار، EDTA 50 میلی‌مولار، SDS ۳٪، بتا مرکاپتواتانول ۱٪ و پروتئیناز K می‌باشد. سوسپانسیون حاصل در دمای 65°C به مدت ۱ ساعت قرار داده شد و توده سلولی با سانتریفوژ 2500 دور در مدت ۱۵ دقیقه جدا شد. پس از افزودن RNase-H، سوسپانسیون حاصله به مدت نیم ساعت در دمای 37°C قرار داده شد. سپس عمل استخراج ابتدا با کمک فنل- کلروفرم- ایزوآمیل الکل (۲۴:۱) و سپس با کمک کلروفرم- ایزو آمیل الکل

می‌دهد. توالی آمینواسیدی پروتئین حاصله حدود ۹۸٪ با *T. rubrum*، ۸۶٪ با *D. melanogaster* و ۷۵٪ با انسان شباهت نشان می‌دهد. ترکیب شیمیایی پروتئین حاصله نشان می‌دهد که این پروتئین غنی از گلیسین (۸۸/۸۶٪)، آلانین (۹/۷۸٪) و گلوتامیک اسید (۸/۲۵٪) بوده در حالی که میزان تریپتوفان و سیستئین آن ناچیز است (به ترتیب ۰/۱۵٪ و ۰/۰۶۱٪). تجزیه و تحلیل‌های نشانه‌گذاری بعد از Northern blotting بر روی هرچهار نمونه RNA مورد بررسی و مقایسه نمونه‌های شاهد و حرارت دیده نشان می‌دهد بیان ژن HSP ۷۰ کیلودالتونی با افزایش مدت زمان شوک حرارتی به طور محسوسی افزایش پیدا می‌کند (شکل ۴).



شکل ۱- محصول PCR به دست آمده از قطعه ابتدائی ژن TvHSP70 (ردیف ۱). طول باندهای سایزمارکر (ردیف ۲) عبارتند از: ۱۱۱۴، ۹۰۰، ۶۹۲، ۵۰۱، ۴۸۹، ۴۰۴، ۳۲۰، ۲۴۲ و ۱۹۰pb (از بالا به پائین).



شکل ۲- محصول PCR به دست آمده از قطعه میانی (ردیف ۱) و انتهائی (ردیف ۳) ژن TvHSP70. اندازه باندهای سایزمارکر (ردیف ۲) عبارتند از: ۱۱۱۴، ۹۰۰، ۶۹۲، ۵۰۱، ۴۸۹، ۴۰۴، ۳۲۰، ۲۴۲ و ۱۹۰pb (از بالا به پائین).

PCR به صورت ۵× با $MgCl_2$ همراه با دی‌تیوتریتول، بازدارنده RNase، آنزیم RT و مخلوط dNTP بوده است. از محصول نهایی حاصل از ادغام این دو مخلوط برای تولید cDNA مطابق برنامه زیر استفاده گردید: ۳۸°C به مدت ۵۵ دقیقه، ۹۵°C به مدت ۳ دقیقه و ۲۰°C به مدت ۱ دقیقه. cDNA حاصله با کمک برنامه‌های ذکر شده در بخش PCR، تکثیر شده و محصولات PCR با کمک الکتروفورز روی ژل آگاروز ۱٪ بررسی گردیدند.

توالی یابی قطعات PCR: بعد از خالص‌سازی قطعات PCR به دست آمده با کمک کیت Qiagen، تعیین توالی قطعات مربوط به DNA ژنومی و cDNA توسط کمپانی MWG آلمان و با کمک پرایمرهای ۲۰ و ۲۱ نوکلئوتیدی طراحی شده انجام گردید. توالی یابی هر بخش از ژن حداقل سه بار برای هر دو رشته انجام شد. توالی نوکلئوتیدی به دست آمده با توالی ژن‌های مشابه در بانک جهانی ژن مقایسه گردیدند.

انجام Northern Blotting: مولکول‌های RNA جداشده در ژل الکتروفورز، ابتدا بر روی غشا نیتروسولوزی انتقال یافتند. بعد از عمل حرارت‌دهی در ۸۰°C به مدت ۲ ساعت، از غشا نیتروسولوزی لکه‌گذاری شده، برای عمل هیبریدیزاسیون استفاده گردید. با استفاده از فسفر رادیواکتیو، عمل هیبریدیزاسیون در حرارت ۶۵°C به مدت ۱۲ ساعت تکمیل گردید و بعد از شستشوی متناوب با SDS و SSC (سالین سدیم سیترات) اتورادیوگرافی انجام شد.

یافته‌ها

بعد از تکثیر سه قطعه از ژن مورد نظر با کمک PCR، پروتئین شوک حرارتی ۷۰ کیلودالتونی دیگری در قارچ *T. verrucosum* شناسایی گردید. قطعه ابتدایی این ژن، ۷۴۰bp طول دارد (شکل ۱) در حالی که بخش‌های میانی و انتهایی آن به ترتیب ۱۱۰۹bp و ۹۶۵bp طول داشتند (شکل ۲).

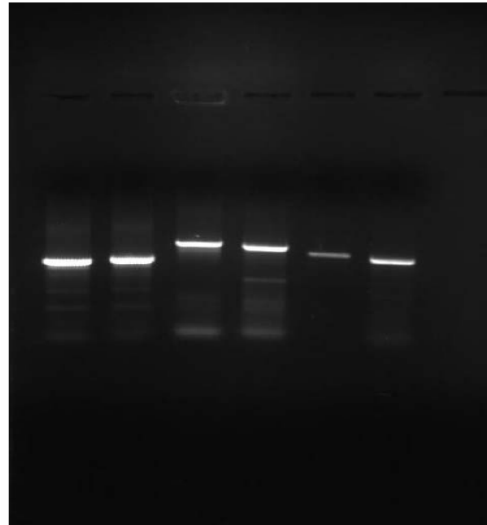
این ژن جدید، دارای ۲ اینترون می‌باشد که بر پایه مقایسه قطعات PCR بین DNA ژنومی و cDNA به دست آمده‌اند (شکل ۳).

توالی کامل نوکلئوتیدی و آمینواسیدی این ژن نیز در شکل ۴ آورده شده است. این ژن، حاوی یک ORF به طول ۱۹۶۲bp است که ۶۵۴ آمینواسید را رمز نموده است. مقایسه توالی‌های نوکلئوتیدی و آمینواسیدی به دست آمده در بانک جهانی ژن، شباهت معنی‌داری را با سایر HSPهای ۷۰ کیلودالتونی نشان

جنس‌های تریکوفایتون و میکروسپوروم در بین درماتوفیت‌ها انجام شده است. *T. verrucosum* یکی از پاتوژن‌های حیوان دوست است که باعث کچلی ریش و سبیل، کچلی بدن و کچلی ناخن در انسان می‌شود و یکی از مهمترین عوامل درماتوفیتوزیس مشترک در انسان و حیوانات خصوصاً دام است (۲۰). به دلیل اهمیت دخالت این قارچ در عفونت‌های انسان و حیوانات، سعی بر آن شد تا یکی از جنبه‌های مولکولی این قارچ که احتمالاً در بیماری‌زایی آن موثر می‌باشد، بررسی شود. هر چند اطلاعات مولکولی درباره این قارچ بسیار اندک است، اما گزارش‌هایی درباره تنوع DNA میتوکندریایی *T. verrucosum* در دسترس است (۲۱، ۲۲) و پرایمرهای اختصاصی نیز در برخی تحقیقات ژنتیکی مشخص طراحی و استفاده شده است (۲۳-۲۵). در ضمن این قارچ از طریق توالی‌یابی ناحیه ITS2 مربوط به rDNA مورد شناسایی مولکولی قرار گرفته است (۲۶). گونه‌های تریکوفایتون با کمک PCR Lightcycler (۲۷)، Repetitive-Sequence-PCR-based DNA fingerprinting (۲۸) و تجزیه و تحلیل‌های RAPD (۲۵) مورد بررسی قرار گرفته‌اند.

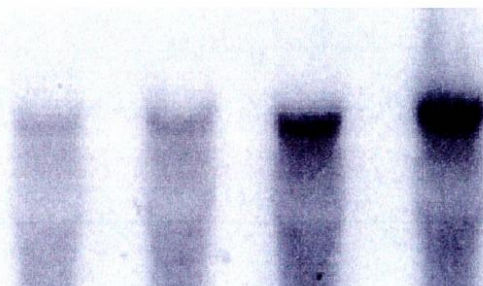
پروتئین‌های شوک حرارتی موجودات زنده را در برابر تنش‌های محیطی نظیر شوک‌های حرارتی، املاح فلزات سنگین و اشعه ماوراء بنفش مقاوم می‌سازند، علیرغم نقشی که به عنوان کاپرون‌های مولکولی در تنظیم تاخوردگی پروتئین‌های تازه ساخته شده و نیز جابه‌جایی آن‌ها به درون اندامک‌های سلولی دارند (۳-۸، ۱). HSPها در پاسخ‌های مختلف ایمنی نیز موثرند (۲۹-۳۲). این پروتئین‌ها در موجودات مختلفی همچون کرم‌ها، مگس سرکه و انسان مطالعه شده‌اند.

در بررسی حاضر، چهار گروه کشت قارچی مورد پژوهش قرار گرفتند. یک گروه به عنوان شاهد در نظر گرفته شد که در دمای ۳۰°C قرار گرفته بودند و سه گروه دیگر در دمای ۴۰°C به مدت ۱، ۲ و ۴ ساعت؛ به عبارت دیگر این سه گروه با شوک حرارتی ۱۰ درجه‌ای مواجه گردیدند. در این تحقیق سه جفت پرایمر مختلف برای تکثیر بخش‌های ابتدایی، میانی و انتهایی این ژن طراحی و استفاده گردیدند.



۱ ۲ ۳ ۴ ۵ ۶

شکل ۳- شناسایی اینترون در ژن *TvHSP70*. محصول PCR مربوط به DNA ژنومی از قطعه ابتدایی ژن (ردیف ۱)؛ محصول PCR مربوط به cDNA از قطعه ابتدایی ژن (ردیف ۲)؛ محصول PCR مربوط به DNA ژنومی از قطعه میانی ژن (ردیف ۳)؛ محصول PCR مربوط به cDNA از قطعه میانی ژن (ردیف ۴)؛ محصول PCR مربوط به DNA ژنومی از قطعه انتهایی ژن (ردیف ۵)؛ محصول PCR مربوط به cDNA از قطعه انتهایی ژن (ردیف ۶). اختلاف اندازه قطعات PCR حاصله بین ردیف‌های ۳ و ۴ و نیز ردیف‌های ۵ و ۶ نشان دهنده وجود دو اینترون می‌باشد.



۱ ۲ ۳ ۴

شکل ۴- افزایش بیان ژن *TvHSP70* در نتیجه انجام Northern blotting. ردیف ۱: RNA شاهد؛ ردیف ۲: RNA مربوط به نمونه حرارت دیده در دمای ۴۰°C به مدت ۱ ساعت؛ ردیف ۳: RNA مربوط به نمونه حرارت دیده در دمای ۴۰°C به مدت ۲ ساعت؛ ردیف ۴: RNA مربوط به نمونه حرارت دیده در دمای ۴۰°C به مدت ۴ ساعت.

بحث

در مطالعه حاضر، شناسایی و تشخیص مولکولی ژن کدکننده یک پروتئین ۷۰ کیلودالتونی از قارچ *T. verrucosum* گزارش شده است که از این پس به عنوان *TvHSP70* لقب گرفته است. به طور کلی، تحقیقات مولکولی بسیاری بر روی

1	catttgcaactgcagaaatcacaacatccaaa	31
32	atg gct ccc gca gtt ggt atc gat ttg ggt acc acg tac tcc tgc gtg ggt atc ttc cgt	91
1	M A P A V G I D L G T T Y S C V G I F R	20
92	gat gac cgc att gaa atc atc gcc aac gat cag gga aac cgc acc act ccc tcc ttc gtt	151
21	D D R I E I I A N D Q G N R T T P S F V	40
152	gcc ttc aca gac acc gag cgt ctc att gga gat gcc gca aag aac cag gtc gcc atg aac	211
41	A F T D T E R L I G D A A K N Q V A M N	60
212	cct atc aac acc gtc ttc gat gct aag cgt ctc att gga cgc aag ttc aac gac gcc gag	271
61	P I N T V F D A K R L I G R K F N D A E	80
272	gtc cag gcc gac atg aag cac ttc ccc ttc aag gtt gtc gag aag agc ggc aag ccc atc	331
81	V Q A D M K H F P F K V V E K S G K P I	100
332	gtc cag gtc gag ttc aag ggc gag gag aag cag ttc acc cct gag gaa atc tcc tcc atg	391
101	V Q V E F K G E E K Q F T P E E I S S M	120
392	gtc ctc acc aag atg cgt gag acc gcc gag gcc tat ctc ggt ggc acc gtc aac aac gct	451
121	V L T K M R E T A E A Y L G G T V N N A	140
452	gtc atc act gtc cct gcc tac ttc aac gac tcc cag cgt caa gct act aag gac gcc ggt	511
141	V I T V P A Y F N D S Q R Q A T K D A G	160
512	ctc att gcc ggt ctc aac gtc ctc cgt atc atc aac gag ccc act gct gct gct att gcc	571
161	L I A G L N V L R I I N E P T A A A I A	180
572	tac ggt ctc gag aag aag gcc gaa tgt gag cgc aac gtt ctc atc ttc gat ctc ggt ggt	631
181	Y G L D K K A E C E R N V L I F D L G G	200
632	ggt acc ttc gat gtc tcc ctc ctg acc atc gaa gag ggt atc ttc gaa gtc aag tcc act	691
201	G T F D V S L L T I E E G I F E V K S T	220
692	gcc ggt gac act cac ttg ggt ggt gag gac ttt gac aac cgt ctc gtc aac cac ttc gtc	751
221	A G D T H L G G E D F D N R L V N H F V	240
752	aac gaa ttc aag cgc aag aac aag aag	778
241	N E F K R K N K K	249
779	GTATGGGCATATTAATAATTCGCCCTTTCTCCAATTGAAATAAATTAAGTTACTAACCCTTTTGGACAG	848
849	gat ctc tcc acc aat gct cgt gct ctc cgc cgt ctc cgc act gcc tgc gag cgt gct aag	908
250	D L S T N A A L R A C L R T A C E R A K	269
909	cgt act ctc tct tct gct gcc cag acc tcc act gag att gat tct ctc tat gag ggt gtt	968
270	R T L S S A A Q T S I E I D S L Y E G V	289
969	gac ttc tac acc tcc atc acc cgt gct cgt ttc gag gag ctc tgc cag gac ctc ttc cgc	1028
290	D F Y T S I T R A R F E E L C Q D L F R	309
1029	tcc act atg gag cct gtc gag cga gtc ctc cgt gac gcc aag atc gac aag tcc tcc gtc	1088
310	S T M E P V E R V L R D A K I D K S S V	329
1089	cac gag att gtc ctc gtc ggt ggt tct act cgt atc ccc aag atc cag aag atg gtc tcc	1148
330	H E I V L V G G S T R I P K I Q K M V S	349
1149	gac ttc ttc aac ggc aag gag cca aac aag tcc atc aac ccc gat gaa gcc gtt gcc tac	1208
350	D F F N G K E P N K S I N P D E A V A Y	369
1209	ggt gct gcc gtc cag gcc gcc att ctc tcc ggt gac acc tcc tcc aag tcc acc aac gag	1268
370	G A A V Q A A I L S G D T S S K S T N E	389
1269	atc ctc ctg ctc gat gtc gct ccc ctc tct ctc ggt atc gag act gct ggc ggt gtc atg	1328
390	I L L L D V A P L S L G I E T A G G V M	409
1329	act cct ctc atc aag cgc aac acc acc atc cct acc aag aag tct gag act ttc tcc acc	1388
410	T P L I K R N T T I P T K K S E T F S T	429
1389	ttc tct gac aac cag cct ggt gtc ttg atc cag gtc ttc gag ggt gag cgt gcc cgc acc	1448
430	F S D N Q P G V L I Q V F E G E R A R T	449
1449	aag gac aac aac ttg ctc ggc aag ttc gag ctc acc ggt atc cca cct gcc acc cgt ggt	1508
450	K D N N L L G K F E L T G I P P A P R G	469
1509	ggt cct cag atc gaa gtc acc ttc gat gtt gat gcc aac ggt att atg aac gtc tct gct	1568
470	V P Q I E V T F D V D A N G I M N V S A	489
1569	ctc gag aag ggc act gga aag acc aac aag att gtc atc acc aac gac aag ggc cgt ctg	1628
490	L E K G T G K T N K I V I T N D K G R L	509
1629	tcc aag gag gag atc gag cgt atg ctt gct gag gcc gag aag tac aag gcc gag gac gag	1688
510	S K E E I E R M L A E A E K Y K A E D E	529
1689	gct gag act gcc cgt atc ggt gct aag aac ggt ctc gag tcc tat gct tac tcc ctc aag	1748
530	A E T A R I G A K N G L E S Y A Y S L K	549
1749	aac acc ttg agc gac tcc aag gtc gac gag aag ctc gac gct gcc gac aag gag aaa ctc	1808
550	N T L S D S K V D E K L D A A D K E K L	569
1809	aag tcc gag atc gac aag gtt gtt gtt gtc gat gac aac cag acc gcc acc aag gag	1868
570	K S E I D K V V A W L D D N Q T A T K E	589
1869	gaa tat gag tcc cag cag aag gag ctt gaa gg	1900
590	E Y E S Q Q K E L E G	600
1901	GTATGTATATCCATTCTCGCAACACCTCCATTGAAAAGAAACATTATGCTAACATCTTTCCCTTACAG	1967
1968	t gtt gcc aac ccc atc atg atg aag ttc tac ggt gct ggc ggt gag ggt ggt gct cca ggt	2028
601	V A N P I M M K F Y G A G G E G G A P G	620
2029	ggc ttc cca ggt gct ggt gct ggc cct ggc ggt ttc ccc ggt gcc ggt gct ggt ggc	2088
621	G F P G A G A G G P G G F P G A G A G G	640
2089	gct gct gcc cac gac gac gcc cca acc gtc gag gaa gtc gac taa	2133
641	A A A H D D G P T V E E V D	654
2134	atgtctcgtccacatcagcgaagagacatcctccttccaacattaaaaaaaaaataccaataattcctgccaaaa	2212
2213	aaaaa	2217

شکل ۵- توالی‌های کامل نوکلئوتیدی و آمینواسیدی ژن TvHSP70. نوکلئوتیدهای ۸۴۸-۷۷۹ و نیز ۱۹۶۷-۱۹۰۱، توالی‌های اینترونی هستند. کدون آغازین (atg) و پایانی (taa) روی شکل مشخص می‌باشند

ژن HSP70 در نتیجه افزایش مدت زمان شوک حرارتی افزایش یافته است که این نتیجه نیز با مطالعات مشابه قبلی (۳۴،۳۳) مطابقت دارد.

می‌توان نتیجه گرفت که HSP70 در قارچ درماتوفیت *T. verrucosum* علاوه بر کاپرون بودن، نقش مهمی را در مقاوم کردن میکروارگانیسم نسبت به استرس‌های محیطی دارد.

با بررسی‌های بیشتر بر روی ساختار این ژن و مطالعه عوامل موثر بر آن، می‌توان به راهکارهایی برای تولید داروهای جدید ضد قارچی دست یافت.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از زحمات بی‌شائبه همکاران محترم در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات و همچنین پرسنل آزمایشگاه قارچ‌شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

ژن کامل HSP70 در قارچ تریکوفایتون وروکوزوم، دارای ۲۲۱۷ نوکلئوتید است که یک ORF به اندازه ۱۹۶۲bp داشته و پروتئینی با ۶۵۴ آمینواسید را سنتز می‌نماید. مقایسه توالی نوکلئوتیدی DNA ژنومی و cDNA درمورد ژن TvHSP70 نشان دهنده وجود ۲ اینترون در این ژن بوده که شباهت بسیار زیادی با ژن HSP70 مشابه کشف شده در قارچ درماتوفیت تریکوفایتون روبروم دارد (۳۳). اخیراً ژن HSP70 مشابهی در قارچ ریزوپوس نیگریکانس بررسی شده که حاوی ۴ اینترون است (۳۴). تجزیه و تحلیل توالی آمینواسیدی ژن TvHSP70، شباهت معنی‌داری با دیگر ژن‌های HSP70 جدا شده دارد به طوری که ۹۸٪ با تریکوفایتون روبروم، ۸۷٪ با نوروسپورا کراسا، ۸۶٪ با مگس سرکه، ۷۸٪ با سنورابدیتیس الگانس، ۷۵٪ با انسان و ۷۳٪ با کاندیدا آلبیکنز همولوژی نشان می‌دهد. مطالعات بیشتر نشان داد بیان ژن HSP70 در نتیجه افزایش حرارت، بالا می‌رود و این افزایش برحسب زمان شوک حرارتی به طور تصاعدی انجام می‌شود. به طور کلی، بیان ژن‌های HSP70 در نتیجه استرس‌های محیطی تغییر می‌کنند. در این مطالعه مشخص شد که بیان

REFERENCES

- Lindquist S, Craig EA. The heat shock proteins. *Annu Rev Genet* 1988;22:631-7.
- Trautinger F, Kindas-Mugge I, Barlan B, Neuner P, Knobler RM. 72kDa heat shock protein is a mediator of resistance to ultraviolet B light. *J Invest Dermatol* 1995;105:160-2.
- Leppa S, Sistonen L. Heat shock response; Pathophysiological implication. *Ann Med* 1997; 29:73-8.
- Steen BR, Lian T, Zuyderduyn S, MacDonald WK, Marra M, Jones SJ, et al. Temperature-regulated transcription in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Genome Research* 2002;12(9):1386-1400.
- Moseley PL. Heat shock proteins and heat adaptation of the whole organism. *J Appl Physiol* 1997;83:1413-17
- Boorstein WR, Ziegelhoffer T, Craig EA. Molecular evolution of the HSP70 multigene family. *J Mol Evol* 1994;38:1-17.
- Bukau B, Horwich AL. The HSP70 and HSP60 Chaperone machines. *Cell* 1998;92:351-366.
- Hartl FU. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 1996;381:571-79.
- Hendrick JP, Hartl FU. Molecular chaperone functions of HSPs. *Annu Rev Biochem* 1993; 62:349-84.
- Mayer MP, Bukau B. HSP70 chaperone system: diversity of cellular functions and mechanisms of action. *Biol Chem* 1998;379:261-68
- Morimoto RI, Kline MP, Bimston DN, Cotto JJ. The heat-shock response: regulation and function of heat-shock proteins and molecular chaperones. *Essay Biochem* 1997;32:17-29.
- Chirico WJ, Waters MG, Blobel G. 70 kDa heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsome. *Nature* 1988;332:805-10.
- Deshaies RJ, Koch BD, Werner-Washburne M, Craig EA, Schekman R. A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides. *Nature* 1988;332:800-5.
- Ohtsuka K, Kawashima D, Gu Y, Saito K. Inducers and co-inducers of molecular chaperones. *Int J Hyperthermia* 2005;21(8):703-11.

15. Hemmingsen SM, Woolford C, van der Vies SM, Tilly K, Dennis DT, Georgopoulos CP, et al. Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. *Nature* 1988;333:330-4.
16. Craven RA, Tyson JR, Stirling CJ. A novel subfamily of HSP70s in the endoplasmic reticulum. *Trends Cell Biology* 1997;7:277-282.
17. Weitzman I, Summerbell RC. The dermatophytes. *Clin Microbiol Rev* 1995;8:240-59
18. Dahl MV, Grando SG. Chronic dermatophytosis. *Adv Dermatol* 1994;9:97-111.
19. Odom R. Pathophysiology of dermatophyte infection. *J Am Acad Dermatol* 1993;28:S2-S7.
20. Rippon J, editor. *Medical mycology*. 3rd edition. WB Saunders, New York. 1988.
21. Kawasaki M, Inoue T, Ohsawa T, Ishioka S, Mochizuki T, Ishizaki H. Two *Arthroderma benhamiae* isolates showing mitochondrial DNA type of *Trichophyton verrucosum*. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* 2002;43(2):103-6.
22. Nishio K, Kawasaki M, Ishizaki H. Phylogeny of the genera *Trichophyton* using mitochondrial DNA analysis. *Mycopathologia* 1992;117(3):127-32.
23. Blanz P, Buzina W, Ginter G, Graser Y. Molecular biological methods and their consequences in taxonomy and diagnosis of dermatophytes. *Mycoses* 2000;Suppl 1:11-16.
24. Bock M, Maiwald M, Kappe R, Nickel P, Naher H. Polymerase chain reaction-based detection of dermatophytes DNA with a fungus-specific primer system. *Mycoses* 1994;37(3-4):79-84.
25. Hajduch M, Drabek J, Raclavsky V, Kotala V, Michalek T, Zelenkova I. Diversity among wild type and vaccination strains of *Trichophyton verrucosum* investigated using random amplified polymorphic DNA analysis. *Folia Biol (praha)* 1999;45(4): 151-6.
26. Woldeamanuel Y, Leekassa R, Chryssanthou E, Mengistu Y, Petrini B. Clinico-mycological profile of dermatophytosis in a reference center for leprosy and dermatological diseases in Addis Ababa. *Mycopathologia* 2006;161(3):167-72.
27. Gutzmer R, Mommert S, Kuttler U, Werfel T, Kapp A. Rapid identification and differentiation of fungal DNA in dermatological specimens by lightcycler PCR. *J Med Microbiol* 2004;53:1207-14.
28. Pounder JI, Williams S, Hansen D, Healy M, Reece K, Woods GL. Repetitive-sequence-PCR-based DNA fingerprinting using the DiversiLab system for identification of commonly encountered dermatophytes. *J Clin Microbiol* 2005;43(5):2141-7.
29. Bahr GM, Rook GA, al-Saffar M, Van Embden J, Stanford JL, Behbehani K. Antibody levels to Mycobacteria in relation to HLA type: evidence for non-HLA-linked high levels of antibody to the 65 kDa heat shock protein of *M.bovis* in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 1988; 74:211-15.
30. Gomes FJ. An 80 kDa antigen from *Histoplasma capsulatum* that has homology with HSP70 induces cell-mediated immune response in mice. *Infect Immun* 1992;60:2565-71.
31. Mizzen L. Immune response to stress proteins (application to infectious disease and cancer). *Biotherapy* 1998;10:173-89.
32. Tsoulfa G, Rook GA, Van-Embden JD, Young DB, Mehlert A, Isenberg DA, et al. Raised serum IgG and IgA antibodies to mycobacterial antigens in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1989;48:118-23.
33. Rezaie S, Ban J, Mildner M, Poitschek C, Brna C, Tschachler E. Characterization of a cDNA clone, encoding a 70 kDa heat shock protein from the dermatophyte pathogen *Trichophyton rubrum*. *Gene* 2000;241(1):27-33.
34. Cernila B, Cresnar B, Breskvar K. Molecular characterization of a ribosome-associated hsp70 homologous gene from *Rhizopus nigricans*. *Biochim Biophys Acta* 2003;1629(1-3):109-13.