مطالعه مولکولی ژن سوبتیلیزین درترایکوفایتون وروکوزوم و میکروسپوروم جیپسئوم نمونه های جداسازی شده انسان وحیوان ونمونه های خاک به روش مولکولی و رسم دندروگرام

فاطمه نعیمی پور[۱]، سید جمال هاشمی[۲*]، ساسان رضایی[۲]، منصور بیات[۱]

چکیده

ژن های سوبتیلیزین که سرین پروتئازها را کد می کنند، نقش بسیار مهمی در بیماریزایی درماتوفیت ها دارند.هدف این مطالعه بررسی حضور و تشابه ژن سوبتیلیزین در ۲۵ نمونه کلینیکی و غیر کلینیکی دو درماتوفیت ترایکوفایتون وروکوزوم (ت.وروکوزوم) و میکروسپوروم جیپسئوم (م.جیپسئوم) به روش مولکولی و رسم دندروگرام بود (۱۶/۲۵). ٪٦٤ سویه ها، حضور ژن را به خوبی نشان دادند. تحلیل آماری داده ها نشان از ارتباط بین حضور ژن سوبتیلیزین و میزبان (انسان/حیوان/خاک)، نوع درماتوفیت را نشان داد($P< 0.005$). با به کار گیری نرم افزار NTsys ، متد UPGMA و کات آف نامبر۷۰٪، سویه های مورد مطالعه از نظرمشابهت ژن سوبتیلیزین در آنها، در۱۰ ژنوتایپ متفاوت دسته بندی شدند (ضریب سیمپسون برای پرایمرها ۰،۸۸ بود). به دلیل وجود گزارشات متفاوت مبنی بر حضور/عدم حضور ژن سوبتیلیزین در نمونه های بالینی و غیر بالینی ت.وروکوزوم و م.جیپسئوم، در این بررسی، پرایمرهای جدید برای تایید حضور ژن در نمونه ها (٦٤٪) طراحی و سنتز شد.گرچه نیاز به مطالعات کامل تر برای تاییدات بیشتر وجود دارد.

واژگان کلیدی: *ترایکوفایتون وروکوزوم ، میکروسپوروم جیپسئوم ، سوبتیلیزین، درماتوفیت.*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۹/۱٦ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۲/۹

مقدمه

ترایکوفایتون وروکوزوم(درماتوفیت حیوان دوست ومهم ترین عامل ایجاد درماتوفیتوزیس در گاو) و میکروسپوروم جیپسئوم(درماتوفیت خاک دوست)، گروهی از درماتوفیت ها می باشند که با ترشح متابولیت های ثانویه و به خصوص آنزیم های برون سلولی از جمله پروتئازها، باعث ایجاد و گسترش بیماری(درماتوفیتوزیس) در حیوان و انسان می گردند. بسیاری از درماتوفیت ها واجد ویژگی های آنزیمی متفاوت هستند که در بیماریزایی نقش مهمی دارند که شناسایی ماهیت ژنومی عوامل حدت بیماریزایی و توزیع آن در جنس و گونه های مختلف درماتوفیت به درک بهتر روند درماتوفیتوزیس منجر می شود (۱, ۲).

پروتئازها دارای اهمیت زیادی در کنترل فعالیت‌های سلولی هستند. یکی از راه‌های کنترل فعالیت پروتئین‌ها، برش پروتئازی در آنها است که که به طور برگشت ناپذیر، باعث فعال شدن آنها می گردد. درماتوفیت ها از تولید آنزیم های خاص برای حمله به بافت میزبان و ایجاد بیماری بهره می برند(۱ و۳). ژن سوبتیلیزین کد کننده سرین پروتئازها است و وزن مولکولی بالایی دارد. پروتئاز ها و به خصوص سرین پروتئازها ،باعث تجزیه پروتئین بسیار مهمی به نام کراتین (ازپروتئینهای مهم درپوست بدن انسان و حیوان) ژن های سوبتیلیزین شامل SUB3،SUB2،SUB6،SUB1 است که طی حمله به کراتین میزبان توسط درماتوفیت ها تولید می شوند و باعث تسهیل در اتصال قارچ به میزبان و هضم کراتین می گردند(٤ و ٥). خسروی و همکاران در تهران در بررسی های خود، ترایکوفایتون وروکوزوم را به عنوان تنها عامل اتیولوژیک درماتوفیتوزیس در گاوها معرفی نمودند(٦). تحقیقی در زمینه فعالیت آنزیمی و ویژگی های مولکولی سوبتیلیزین در میکروسپوروم جیپسئوم و ترایکوفایتون وان بروسگمی بر روی سوبستراهای کروموژنیک، حاکی از فعالیت آنزیمی قوی درترایکوفایتون وان بروسگمی و برعکس آن فعالیت آنزیمی پایینی در میکروسپوروم جیپسئوم بود (۷). طبق تحقیقات

۱-گروه پاتوبیولوژی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

*۲- گروه قارچ شناسی و انگل شناسی،-دانشگاه تهران ، تهران، ایران (SJhashemi@tums.ac.ir)

مشخص گردید که شدت بیماریزایی درماتوفیت ها نیازمند آزاد سازی آنزیم های خاصی است که می تواند نفوذ آنها را به داخل بافت میزبان تسهیل کند.این یافته ها داده های اولیه برای بررسی وجود ژنهای پروتئاز در ترایکوفایتون وروکوزوم بود(۸)

بررسی درماتوفیت های جداسازی شده از نمونه های بالینی، فعالیت و حضور بالای این ژنهای بیماریزا ی سوبتیلیزین ۷-۱ و ۲-۳ در ترایکوفایتون وروکوزوم و میکروسپوروم جیپسئوم را به تر تیب نشان داد(۵). بروز فعالیت بالای آنزیمی خارج سلولی در ژنوم گونه های خاک دوست و حیوان دوست از جمله میکروسپوروم جیپسئوم که منجر به واکنش های التهابی شدیدو چرکی در روند عفونت می گردد، تاییدی بر نقش بیماریزایی و القاء پاسخ ایمنی این عامل حدت خواهد بود(۹).

گر چه در زمینه حضور ژنوم خانواده سوبتیلیزین(سوبتیلیزین ۱-۷) موثر دربیماریزایی درماتوفیت هایی چون ترایکوفیتون روبروم ، میکروسپوروم کنیس و ترایکوفایتون منتاگروفایتس بررسی هایی صورت گرفته (۱۰, ۱۱) ، مطالعه حضور خانواده ژن سوبتیلیزین در درماتوفیت های مورد پژوهش در این بررسی بسیار اندک می باشد. بنابراین در مطالعه پیش رو سعی شده که با روش شناسایی مولکولی، حضور/عدم این ژن و تشابه این حضور در این دو درماتوفیت بررسی گردد.

مواد و روش کار

جمع آوری نمونه

از کل ۲۵ نمونه تهیه شده ،۱٤ نمونه مربوط به ترایکوفایتون وروکوزوم(شامل ۲ نمونه موی سر و ۱ نمونه ریش انسان و ۱۱ نمونه از پوست گاو) و ۱۱ نمونه مربوط به میکروسپوروم جیپسئوم (۱۱/۲۵)، (شامل ۱ نمونه موی سر انسان، ۱ نمونه موی اسب، دو نمونه موی سگ و ۷ نمونه خاک)بود. ۳ نمونه از موی سر و ریش افراد مبتلا به درماتوفیتوزیس ناشی از ت. وروکوزوم و یک نمونه کچلی موی سر ناشی از م. جیپسئوم از مراجعین به آزمایشگاه قارچ شناسی دانشکده بهداشت تهران تهیه شد که پس از آزمایشات مستقیم و کشت نمونه ها (به ترتیب در محیط های سابورود دکستروز آگار، سابورود دکستروز آگار حاوی کلرامفنیکل و سیکلوهگزامید به مدت ۲ تا ۳ هفته و در دماهای 30^{oC} و^{oC} ۳۷ و بررسی میکروسکوپی نمونه ها با استفاده از اسمیر میکروبی تهیه شده از کلنی های رشد کرده و رنگ آمیزی با لاکتوفنل کاتن بلو)،تایید شدند. نمونه های حیوانی و خاک نیز از آرشیو بیمارستان آتیه در فردیس کرج ،ایران، تهیه و مورد استفاده قرار گرفت.

استخراج DNA

استخراج DNA با استفاده از دستورالعمل کیت اینترون کره ای i- genomic Plant, DNA Mini Kit (Lot .No 13110450) نجام شد.

طراحی پرایمرها و انجام PCR

برای بررسی ژن سوبتیلیزین در هر درماتوفیت یک جفت پرایمرالیگونوکلئوتیدی جدید طراحی(جدول ۱). و در شرکت سینا ژن ، تهران- ایران سنتز شدند (کدهای دسترسی پرایمرها: XM_003025488: درNCBI (National Centre for Biotechnology Information) برای ت.وروکوزوم و DQ923809.1 برای م.جیپسئوم در(Gene Bank) .

واکنش پی سی آر در دستگاه ترموسایکلر و با حجم کلی ۲۵ میلی لیتر، شامل بافر، مستر میکس، DNA درماتوفیت ها و پرایمرهای اختصاصی دو درماتوفیت صورت گرفت. پروتکل پی سی آر بامرحله دناچوره کردن DNA (۳٦ چرخه) در دمای ۹٤ درجه برای ۵ دقیقه آغاز شد.دمای پیش بینی شده اتصال ۵۱ درجه بود که با ست آپ کردن دستگاه، این مرحله در ٦۳ صورت گرفت. مرحله گسترش در دمای ۷۲ درجه و به مدت ٦ دقیقه صورت گرفت.سپس نتایج از طریق الکتروفوروز محصولاتPCR بر روی ژل ۲٪ بررسی شد و باسیستم ثبت ژل عکس برداری گردید.لدر مورد استفاده به عنوان مارکر وزن مولکولی، ۱۰۰۰ کیلوبایتی بود وسویه بالینی تایید شده به روش مولکولی در آزمایشگاه ، به عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفت.

جدول ۱. پرایمرهای طراحی شده مورد استفاده در این بررسی

نام پرایمر	توالی پرایمر	طول پرایمر (جفت باز)
میکروسپوروم جیپسئوم ۱	5’ GCAGCA GGA CAA CGT TCC AT 3’	٤٢٠
میکروسپوروم جیپسئوم ۲	5’ TGG GAG AAG GCA ACA CGA TG 3’	٤٢٠
ترایکوفایتون وروکوزوم ۱	5’ TGT CCA GAC CCT CGC TGA TA 3’	٤٦١
ترایکوفایتون وروکوزوم ۲	5’ CAA CGA AGT TTG CAC CCC AG 3’	٤٦١

۱توالی برگشت، ۲ توالی رفت

رسم دندروگرام

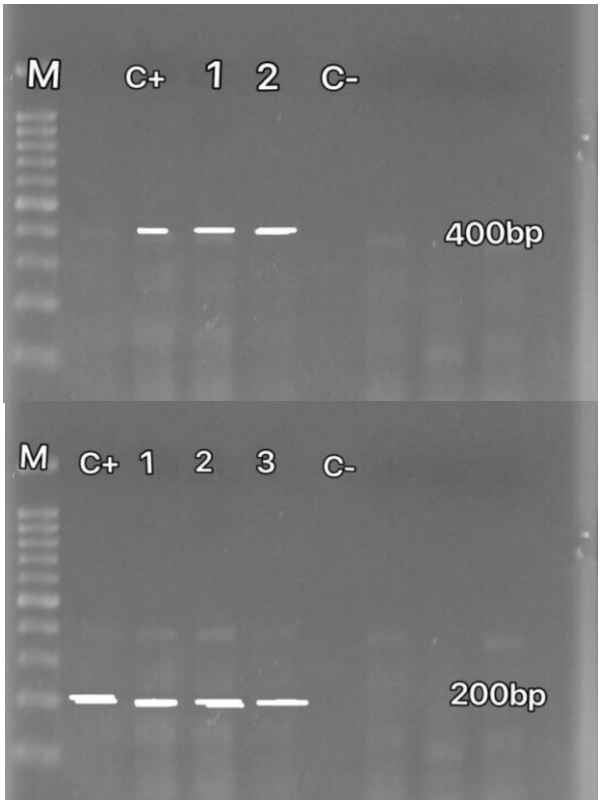
به منظور بررسی تشابه ژنهای سوبتیلیزین مشاهده شده در نمونه ها نرم افزار NTsys مورد استفاده قرار گرفت و دندروگرام مربوطه با استفاده از متد UPGMA رسم گردید.ابتدا برای هر نمونه در صورت وجود باند عدد ۱ و عدم وجود باند عدد ۰ داده شد. بدین ترتیب باندهای بدست آمده برای هر نمونه به صورت یک کد ۰۱ بدست آمد. برای مشخص شدن کارایی این پرایمر ها در ژنوتایپینگ ضریب سیمپون از طریق فرمول زیر به روش دستی محاسبه گردید.

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^{S} n_j(n_{j-1})$$

با توجه به فرمول: N تعداد کل سویه های مورد مطالعه است، S تعداد کلاس های ژنتیکی محاسبه شده، nj تعداد سویه های متعلق به تیپ j است.

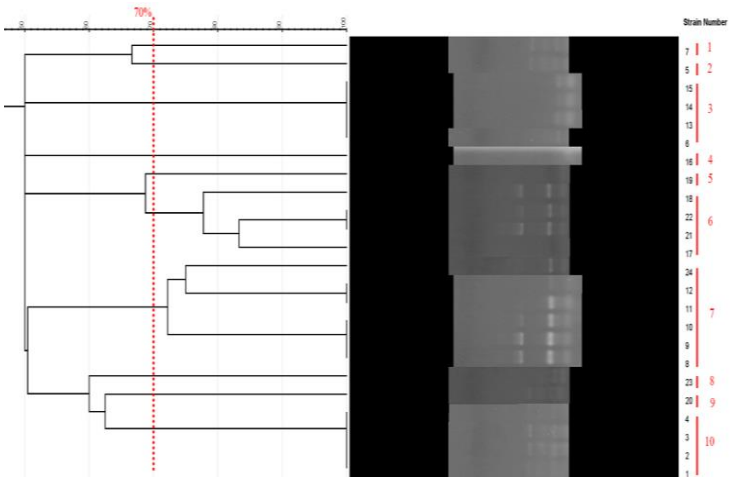
نتایج

در بررسی مولکولی (پی سی آر) سویه های جداسازی شده مشخص گردید که ۱۱/۱٤ سویه ترایکوفایتون وروکوزوم حضور ژن سوبتیلیزین را به خوبی روی باند ٤۰۰ bp نشان دادند در حالی که باند مورد نظر برای سویه های میکروسپوروم جیپسئوم ۲۰۰bp بود(۵/۱۱).نگاره ۱ نتایج حاصل از واکنش محصولات PCR را نشان می دهد.



نگاره ۱- نتایج PCR به دست آمده از حضور ژن سوبتیلیزین از DNA ترایکوفایتون وروکوزوم ومیکروسپوروم جیپسئوم؛ M – نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰جفت باز ؛ C+ - کنترل مثبت سویه های بالینی ت. وروکوزوم و میکروسپوروم جیپسئوم تایید شده به روش مولکولی در آزمایشگاه، C- کنترل منفی : آب مقطر . بالا – ستون ۱ مربوط به نتایج مثبت ایزوله های ترایکوفایتون وروکوزوم جداسازی شده از مو و ریش انسان (۳/۱۱)، ۲-ستون ۲ مربوط به نتایج مثبت ایزوله های ترایکوفایتون وروکوزوم جداسازی شده از گاو(۸/۱۱). پایین- نتایج مثبت سویه های میکروسپوروم جیپسئوم روی باند bp ۲۰۰: ستون ۱- سویه جدا شده از موی انسان(۱/۱)، ستون ۲- سویه جداشده از سگ واسب(۲/۳)، ستون ۳- نمونه های خاک(۲/۷).

با رسم دندروگرام و تعیین عدد کات آف ۷۰٪ ، سویه ها در ۱۰ گروه با ژنوتیپ متفاوت دسته بندی شدند. ظریب سیمپسون محاسبه شده ۰,۸۸ بود که قدرت تفکیک پذیری بسیار خوب این متد با پرایمرهای طراحی شده در این مطالعه را نشان داد (نگاره۲).



نگاره۲. دسته بندی نمونه ها از نظر حضور ژن سوبتیلیزین مشابه از طریق رسم دندروگرام

با توجه به نمودار دندروگرام، مشخص شد که گروه های شماره: ۱و ۲ (نمونه های جداسازی شده از گاو)، ٤ (جیپسئوم جداسازی شده از سگ)، ۵و۸و۹ (نمونه های جیپسئوم جداسازی شده از خاک) هیچ تشابه ژنوتیپی با یکدیگر و سایر گروهها نداشتند. درگروه ۳ نمونه های شماره ۱۳ و ١٤ (نمونه های وروکوزوم جداسازی شده از گاو) و نمونه شماره ۱۵ (نمونه جیپسئوم جداسازی شده از موی سر انسان) تشابه ژنوتیپی را نشان دادند.گروه شماره ٦ شامل نمونه های شماره ۱۷ و ۱۸ (نمونه جیپسئوم جداسازی شده از سگ و اسب به ترتیب) بود و در گروه شماره ۹ نمونه های شماره ۹و۱۰و۱۱و۱۲ (نمونه های وروکوزوم جداسازی شده از گاو) و نمونه شماره ٢٤ (نمونه جیپسئوم جداسازی شده از خاک) قرار گرفتند. در گروه شماره ۱۰ تشابه ژنوتیپی در نمونه های شماره ۱و۲و ۳ (نمونه های وروکوزوم جداسازی شده از مو و ریش انسان به ترتیب) و نمونه ٤ (نمونه وروکوزوم جداسازی شده از گاو) دیده شد.

بحث

به درماتوفیت ها به خصوص نوع خاک دوست و حیوان دوست می توانند اثرات شدیدتری در میزبان انسانی خود ایجاد کنند و به دلیل تماس انسان با حیواناتی چون گاو واسب و گربه و سگ، در پاره ای از موارد اپیدمی های وسیعی از کچلی ها مشاهده می گردد علی رغم شیوع بالای عفونت های درماتوفیتی، اطلاعات اندکی در زمینه مکانیزم های موثر بیماریزایی در درماتوفیت های مورد نظر ما وجود دارد.این میکروارگانیسم ها با تولید آنزیم هایی چون کراتیناز باعث تجزیه کراتین و ایجاد بیماری می گردند.بنابراین بررسی حضور ژنهای بیماریزایی چون سوبتیلیزین، می تواند در تشخیص فاکتورهای بیماریزا کمک نماید (۱۲, ۱۳). مطالعات پیشین حضور خانواده ژنی سوبتیلیزین ۷-۱ و نقش آنها را در درماتوفیت ها اثبات نموده است. در این تحقیق با طراحی پرایمرهای جدید، ١٤ سویه جداشده کلینکی ترایکوفایتون وروکوزوم به منظوریافتن حضور/عدم حضور ژن سوبتیلیزین مورد بررسی قرار گرفت.۱۱/۱٤ سویه،(۳/۳ سویه جداشده از مو و ریش انسان و ۸ سویه جداشده از گاو) حضور ژن را به خوبی نشان دادند که مطالعه (۵) را تایید می کند.

عملکرد بالقوه ژن سوبتیلیزین در سویه های میکروسپوروم جیپسئوم و بیان بالای این ژن در درماتوفیت ها، آنها را قادر به شکستن کراتین کرده و به دنبال آن موجب تسهیل روند عفونت زایی در میزبان مورد تهاجم می گردد (۷, ۹) در تحقیق حاضر، حضور ژن سوبتیلیزین در سویه های بالینی (انسان و حیوان) و غیر بالینی(خاک) این درماتوفیت (که به عنوان ۳ سوبسترای مختلف برای فعالیت کراتینولایتیک آن به حساب می

رود)،بررسی شد .یافته ها حضور ژن سوبتیلیزین در ۳/٤ نمونه بالینی (۱/٤ موی انسان، ۱/٤ موی سگ، ۱/٤ موی اسب) را نشان داد که با مطالعه (۵) همخوانی داشت.

در بین ۱۱ نمونه جداشده میکروسپوروم جیپسئوم، ۷ نمونه از خاک تهیه شده بود که تنها ۲ نمونه حضور ژن را نشان دادند که با تنها تحقیق در این زمینه در ایران (۷) مبنی بر فعالیت ضعیف این ژن در نمونه های خاک میکروسپوروم جیپسئوم و تحقیق (١٤) هماهنگی دارد. خانواده ژنی SUB2-3 و SUB1-7، تولید سرین پروتئازها را به ترتیب در میکروسپوروم جیپسئوم و ترایکوفایتون وروکوزوم کد می کنند(۵) که بیان این ژنها می تواند در مراحل اتصال و نفوذ به بافت میزبان موثر باشد.طبق بررسیهای پیشین ژنهای سوبتیلیزین ۲و۳ در هردو درماتوفیت مورد نظر ما گزارش شده، از آنجا که تعیین توالی و بررسی بیان این ژنوم در تحقیق حاضر با مشکلاتی روبه رو شد،رسم دندروگرام با استفاده از متد UPGMA صورت گرفت ومشاهده شد که برخی از سویه های میکروسپوروم جیپسئوم و ترایکوفایتون از نظر حضور خانواده ژنی سوبتیلیزین مشابه در یک گروه قرار گرفتند که می تواند تاییدی برحضور ژن سوبتیلیزین مشابه(سوبتیلیزین ۲و۳) در این دو درماتوفیت باشد(۵) علاوه بر اینها، در برخی از سویه ها هیچ تشابهی از نظر حضور ژن سوبتیلیزین دیده نشد.

به دلیل مطالعات بسیار کم و متفاوت در زمینه حضور/عدم حضور ژن سوبتیلیزین در سویه های بالینی و غیر بالینی ترایکوفایتون وروکوزوم و میکروسپوروم جیپسئوم، در این بررسی با طراحی و سنتز پرایمر جدید حضور ژن سوبتیلیزین را در ٦٤٪ درصد سویه ها اثبات گردید نتایج این بررسی حاکی از آن بود که شیوع ژن سوبتیلیزین در ایزوله های انسانی و حیوان بیشتر از نمونه های خاک بوده که این امر نشان دهنده فعالیت زیاد این ژن در این میزبانها در مقایسه با خاک است. علی رغم تفاوت میزبان و نوع قارچ، قرار گرفتن نمونه های شماره ۱۳ و ١٤ (نمونه های وروکوزوم جداسازی شده از گاو) و نمونه شماره ۱۵ (نمونه جیپسئوم جداسازی شده از موی سر انسان) در یک گروه، حاکی از وجود ژنهای سوبتیلیزین مشابه در ایزوله های جدا سازی شده بود.گر چه به دلیل طراحی کلی پرایمر ژن سوبتیلیزین برای دو درماتوفیت مورد بحث ، به طور دقیق مشخص نشد که کدام یک از خانواده ژن سوبتیلیزین ۱-۷ در هر ایزوله حضور داشته، اما با رسم دندروگرام و قرار گرفتن ایزوله ها در ۱۰ گروه، ایزوله هایی که در یک گروه قرار گرفتند تشابه ژنتیکی ژن مورد نظر را نشان دادند و با توجه به اینکه نمونه های حیوانی دو درماتوفیت مورد نظر از مناطق مختلف به آزمایشگاه آتیه فرستاده شده بودند، قرار گرفتن تعدای ازآنها در یک گروه می تواند تایید کننده این نکته باشد که تفاوت منطقه جغرافیایی تاثیری در بیان ژن سوبتیلیزین مشابه ندارد. از آنجا که مطالعه حاضر در سطح کار دانشجویی بوده و برای اولین بار در ایران صورت گرفته، بررسی های بیشتر و مطالعات دقیق تر، بسیار ضروری می باشد.

فهرست منابع

1 Achterman RR, White TC. Dermatophyte virulence factors: identifying and analyzing genes that may contribute to chronic or acute skin infections. International journal of microbiology. 2011;2012.

2. Vermout S, Tabart J, Baldo A, Mathy A, Losson B, Mignon B. Pathogenesis of dermatophytosis. Mycopathologia. 2008;166(5-6):267.

3. Sanyal A, Das S, Banerjee A. Purification and partial characterization of an exocellular proteinase from Trichophyton rubrum. Sabouraudia. 1985;23(3):165-78.

4. Pannkuk EL, Risch TS, Savary BJ. Isolation and identification of an extracellular subtilisin-like serine protease secreted by the bat pathogen Pseudogymnoascus destructans. PLoS One. 2015;10(3):e0120508.

5. Lemsaddek L, Chambel L, Tenreiro R. Incidence of fungalysin and subtilisin virulence genes in dermatophytes. Spain: Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology A. 2010:658-65.
6. Khosravi A, Mahmoudi M. Dermatophytes isolated from domestic animals in Iran. Mycoses. 2003;46(5-6):222-5.
7. Moallaei H, Zaini F, Rezaie S, Nourbakhsh F, Larcher G. The Enzymatic Activity and Molecular Characterization of a Secreted Subtilisin-Like Protease in Microsporum gypseum and Trichophyton vanbreuseghemii. Iranian Journal of Public Health. 2009:25-33.
8. Burmester A, Shelest E, Glöckner G, Heddergott C, Schindler S, Staib P, et al. Comparative and functional genomics provide insights into the pathogenicity of dermatophytic fungi. Genome biology. 2011;12(1):R7.
9. Giudice MC, Reis-Menezes AA, Rittner GMG, Mota AJ, Gambale W. Isolation of Microsporum gypseum in soil samples from different geographical regions of Brazil, evaluation of the extracellular proteolytic enzymes activities (keratinase and elastase) and molecular sequencing of selected strains. Brazilian Journal of Microbiology. 2012;43(3):895-902.
10. Woodfolk JA, Wheatley LM, Piyasena RV, Benjamin DC, Platts-Mills TA. Trichophyton Antigens Associated with IgE Antibodies and Delayed Type Hypersensitivity sequence homology to two families of serine proteinases. Journal of Biological Chemistry. 1998;273(45):29489-96.
11. Leng W, Liu T, Wang J, Li R, Jin Q. Expression dynamics of secreted protease genes in Trichophyton rubrum induced by key host's proteinaceous components. Sabouraudia. 2009;47(7):759-65.
12. Cabañes FJ. Dermatophytes in domestic animals. Rev Iberoam Micol. 2000;17:104-8.
13. Peres NTdA, Maranhão FCA, Rossi A, Martinez-Rossi NM. Dermatophytes: host-pathogen interaction and antifungal resistance. Anais brasileiros de dermatologia. 2010;85(5):657-67.
14. Tarabees R, Sabry M, Abdeen E. Incidence of fungalysins virulence genes (MEP1-5) in dermatophytes isolated form infected cases in Egypt. Int J Microbiol Res. 2013;4:180-7.
15. Jousson O, Léchenne B, Bontems O, Mignon B, Reichard U, Barblan J, et al. Secreted subtilisin gene family in Trichophyton rubrum. Gene. 2004;339:79-88.