بررسی پروموتر ژن los1 در آسکومیست‌ها

علی رضا عزیزی [۱]، وحید خلج [۲*]، منصور بیات [۳]

چکیده

آسکومیکوتا شامل بزرگترین و متنوع ترین گروه قارچی است و از نظر اقتصادی نقش بسیار مهمی در بیشتر اکوسیستم ها برعهده دارند. جنبه‌های مختلف فعالیت زیستی آسکومیست‌ها، آنها را به موضوعی جذاب برای مطالعات زیستی تبدیل کرده است که از آن جمله می‌توان به یافتن راهکارهایی برای تغییر طول عمر این قارچ‌ها اشاره نمود. ژن *los1* با دخالت مستقیم در حمل و نقل tRNA بین هسته و سیتوپلاسم، نقشی کلیدی در تنظیم سرعت رشد قارچ، طول عمر آن و همچنین مقاومت دارویی برعهده دارد. در این پژوهش، ناحیه بالادستی ژن *los1* در بین ۱۰ گونه از آسکومیست‌ها بررسی شد. نتایج حاصل پیشنهاد می‌کنند که ناحیه بالادستی ژن *los1* در بین آسکومیست‌ها، حاوی جایگاه‌های اتصالی برای فاکتورهای رونویسی SFP1 و FKH1 است. احتمال ضعیفی نیز برای وجود محل اتصال فاکتور رونویسی YAP6 در ناحیه بالادستی این ژن وجود دارد. همچنین حذف این ژن، احتمالا موجب افزایش طول عمر قارچ و افزایش مقاومت آن به برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شود. در حالی که مقاومت آن به گروه دیگر، کاهش می‌یابد. از نتایج این پژوهش، می‌توان در انتخاب هدفمند و هوشمندانه‌تر آنتی‌بیوتیک‌های قارچی استفاده نمود و همچنین، از اطلاعات مربوط به نقش ژن *los1* در رشد و طول عمر آسکومیست‌ها، و نیز مقاومت و حساسیت دارویی آن‌ها، در طراحی و ساخت سویه‌های صنعتی بهره گرفت.

واژگان کلیدی: *آسکومیست، ژن los1، انتقال tRNA، پروموتر، شبکه تنظیمی*

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۴/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۱۲

مقدمه

آسکومیکوتا، دربرگیرنده بزرگ‌ترین و متنوع‌ترین مجموعه قارچی است که از نظر اقتصادی، از اهمیت زیادی برخوردار است. این شاخه، حاوی بیش از ۳۲ هزار گونه قارچی است. همه این گونه‌ها در صورت تولید مثل جنسی، آسک (کیسه) تولید می‌کنند که حاوی هاگ (اسپور) است. آسکومیست‌ها نقش اصلی را در بیشتر اکوسیستم‌های زمینی برعهده دارند. بسیاری از آنها تجزیه کننده‌های مهمی هستند که مواد آلی مانند برگ‌ها و حیوانات مرده را تجزیه و به این ترتیب، غذای گروه بزرگی از موجودات زنده را فراهم می‌کنند. آن‌ها همراه با سایر قارچ‌ها می‌توانند مولکول‌های بزرگی مانند سلولز یا لیگنین را تجزیه کنند و بنابراین نقش مهمی در چرخه مواد غذایی، مانند چرخه نیتروژن، بر عهده دارند. علاوه بر این، اجزای سلولی آسکومیست‌ها، غذای بسیاری از حیوانات را تأمین می‌کند. بسیاری از آسکومیست‌ها نیز رابطه‌های همزیستی با موجودات دیگر از جمله گیاهان و حیوانات دارند (۱).

جنبه‌های گوناگون فعالیت زیستی، کاربردها و خطرات این گروه بزرگ از قارچ‌ها، آن‌ها را به موضوعی جذاب برای مطالعات زیستی تبدیل کرده است. بخشی از این بررسی‌ها به راهکارهای ممکن برای تغییر طول عمر قارچ می‌پردازد. شواهد نشان می‌دهد، یکی از راهکارهای مهم در تغییر طول عمر آسکومیست‌ها، دستورزی مسیر انتقال tRNA است که با تغییر سرعت بیوسنتز پروتئین‌ها، تاثیر قابل توجهی بر متابولیسم و چرخه حیات قارچ دارد.

در یوکاریوت ها، مولکول‌های RNA انتقال دهنده (tRNA) در هسته رونویسی و پردازش می‌شوند. سپس به سیتوپلاسم رفته و در آنجا نقش خود را ایفا می‌کنند. باور اولیه بر این بود که جهت حرکت این مولکول‌ها یک‌طرفه و از هسته به سیتوپلاسم است. اما پژوهش‌های اخیر نشان می‌دهد که tRNAهای بالغ نیز با یک سیستم برگشتی (Retrograde)، از سیتوپلاسم به هسته بازمی‌گردند. این فرایند، از مخمر تا مهره‌داران، به شدت حفاظت‌شده است و به نظر می‌رسد نقش کلیدی آن در تصحیح tRNAها است تا اطمینان حاصل

* ۱- گروه پاتوبیولوژی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲- رئیس دپارتمان بیوتکنولوژی پزشکی و مسئول آزمایشگاه بیوتکنولوژی قارچها. انستیتو پاستور ایران
(v_khalaj@yahoo.com)
۳- گروه پاتوبیولوژی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

شود که فقط tRNAهای مناسب به سیتوپلاسم وارد می‌شوند و با ماشین آلات ترجمه همکاری می‌کنند (۲).
بنابراین، tRNAهای حاوی اینترون، که در دو سر خود، متحمل پردازش شده‌اند، از هسته خارج و به سوی سیتوپلاسم، هدایت می‌شوند. این خروج اولیه (Primary export) در مخمر، توسط یکی از اعضای خانواده بتا–ایمپورتین، به نام LOS1 (Loss Of Suppression) صورت می‌گیرد. این پروتئین که در جنس آرابیدوپسیس، با نام PAUSED و در مهره‌داران، عموما با نام Xpo-t یا اکسپورتین–t شناخته می‌شود، دارای توالی حفاظت‌شده‌ای در بین یوکاریوت‌هاست (۳). گزارش‌های مختلف نشان می‌دهد که پروتئین LOS1 و همولوگ‌های آن، به روش وابسته به Ran-GTP به هر دو نوع مولکول tRNA پردازش شده و پردازش نشده متصل می‌شوند و در خروج آن‌ها از هسته دخالت دارند، مشروط بر آن که در دو سر '۵ و '۳، کاملا بالغ شده باشند (٤). آن دسته از مولکول‌های tRNA که به درستی پردازش یا بارگیری نشده‌اند، در فرایند برگشت به هسته، یکی از دو سرنوشت ذیل را متحمل خواهند شد: یا تخریب می‌شوند و یا پس از تصحیح، دوباره به سیتوپلاسم بازمی‌گردند. مولکول‌های tRNA بالغ سالم نیز، پس از تغییرات نهایی، طی فرایند خروج مجدد (re-export) دوباره وارد سیتوپلاسم خواهند شد (۵). به این ترتیب، فرایند برگشت tRNAها به هسته، مسیری را برای کنترل کیفیت tRNA فراهم می‌کند که هم پردازش دو سر pre-tRNAها و هم وضعیت تغییرات tRNAهای بالغ را کنترل می‌کند (۲).
با وجود شواهد مختلفی که نقش LOS1 را در انتقال tRNA به هسته تایید می‌کند، به نظر می‌رسد این پروتئین، تنها راه انتقال این مولکول‌ها نیست؛ چرا که بنا بر گزارش‌های متعدد، حذف ژن رمزکننده آن، به مرگ سلول جهش‌یافته منجر نمی‌شود، بلکه تنها موجب کندی رشد آن خواهد شد. به بیان دیگر، ژن *los1* در گروه ژن‌های غیرضروری برای سلول یوکاریوتی طبقه‌بندی می‌شود. این نتیجه، در مورد همولوگ انسانی آن نیز صدق می‌کند (٦).
شواهد نشان می‌دهند که پروتئین LOS1 به همراه Msn5 در خروج مجدد tRNAها از هسته، نقش دارد. پروتئین MSN5 یکی دیگر از اعضای خانواده بتا–ایمپورتین است که همولوگ انسانی آن، با نام اکسپورتین–۵ (Xpo-5) شناخته می‌شود. بر اساس گزارش‌ها، حذف این دو ژن از سلول مخمری، نه تنها موجب مرگ سلول نمی‌شود، بلکه باعث افزایش طول عمر آن نیز خواهد شد. به بیان دیگر، ژن *los1* علاوه بر نقش خود در نقل و انتقال tRNAها، در فرایند پیری سلول مخمر نیز دخالت دارد و حذف یا خاموش شدن آن، موجب کندی رشد و بنابراین افزایش طول عمر سلول خواهد شد (۷).

علاوه بر موارد بالا، برخی از شواهد نشان می‌دهند که حذف ژن *los1* در سویه‌های قارچی، منجر به تغییر حساسیت سویه میزبان به انواعی از آنتی‌بیوتیک‌ها خواهد شد. نکته جالب اینجاست که این تغییرات، کاملا دوسویه بوده و در مورد برخی از داروها، مانند بلئومایسین، موجب افزایش و در مورد گروه دیگر، مانند سیکلوهگزیمید، منجر به کاهش مقاومت سلول می‌شوند (۸). با توجه به نقش پروتئین LOS1 در تراکنش مولکول‌های tRNA بین هسته و سیتوپلاسم، و همچنین اهمیت آن در طول عمر سویه‌های مخمری و مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها، در این پژوهش، به بررسی عوامل موثر در تنظیم بیان این ژن پرداخته شده است. به این منظور، ناحیه بالادستی ژن *los1* در بین آسکومیست‌ها بررسی و جایگاه‌های احتمالی اتصال فاکتورهای رونویسی و عوامل تنظیمی، بر روی آن شناسایی شد. سرانجام، با توجه به نتایج حاصل از پژوهش، شبکه تنظیمی ژن *los1* در آسکومیست‌ها ترسیم شد.

مواد و روش‌کار

نرم‌افزارها و پایگاه‌های اطلاعاتی

اطلاعات مربوط به همولوگ‌های قارچی ژن *los1* از پایگاه KEGG، و کلیه توالی‌های نوکلئوتیدی، از پایگاه NCBI دریافت شدند. فاکتورهای رونویسی شناسایی شده در مخمر *ساکارومایسز سرویزیه*، از دو پایگاه SGD (/https://www.yeastgenome.org) و Yeastract (http://www.yeastract.com) به دست آمدند. آنالیز پروموترها با استفاده از نرم‌افزار CLC Genomics Workbrench 3 صورت گرفت.

جدول ۱. ناحیه دربردارنده پروموتر احتمالی، در ۱۱ گونه از آسکومیست‌ها. در مورد هر گونه، بر اساس توالی ژنومی ثبت شده در پایگاه NCBI موقعیت آخرین نوکلئوتید ژن بالادستی همولوگ los1 و همچنین موقعیت نخستین نوکلئوتید این ژن، بر روی کروموزوم قارچی نشان داده شده است. در ستون آخر، از تفریق دو عدد یاد شده، طول محدوده بالادستی همولوگ los1 در گونه‌های مورد بررسی، تخمین زده شده است.

ردیف	گونه	Locus tag	جایگاه آخرین نوکلئوتید ژن بالادست los1	جایگاه نخستین نوکلئوتید ژن همولوگ los1	طول محدوده بالادستی همولوگ *los1*
۱	Aspergillus Fumigatus	AFUA_5G09850	۲۵٤٦۳۵۲	۲۵٤۷۱۰۵	۷۵۳
۲	Bipolaris zeicola	COCCADRAFT_92726	۱۰۵۰۱۵	۱۰۵۸۹۱	۸۷٦
۳	Blastomyces gilchristii	BDBG_04543	۷۵٦۵۷۷	۷۵۷۳۷۲	۷۹۵
٤	Candida glabrata	CAGL0K00473g	٤٦٤۰۷	٤۸۹٦٤	۲۵۵۷
۵	Komagataella phaffii	PAS_chr2-1_0617	۱۱۵٤۸۸۷	۱۱۵۷۰۵۷	۲۱۷۰
٦	Lodderomyces elongisporus	LELG_05576	٤۰۲۲۵۹	٤۰۳۱٦۲	۹۰۳
۷	Neurospora crassa	NCU00134	۲۷٤۰۱۰۹	۲۷٤۰۵۹۳	٤۸٤
۸	Neurospora tetrasperma	NEUTE1DRAFT_122182	۲۵۱۸۱۹۳	۲۵۱۹۲۵۲	۱۰۵۹
۹	Penicillium chrysogenum	Pc12g05760	۱۳۵٤۵٤۰	۱۳۵۵۱۳۱	۵۹۱
۱۰	Saccharomyces cerevisiae	YKL205W	٤۸۹۵۵	۵۰۰۵۱	۱۰۹٦
۱۱	Talaromyces rugulosus	TRUGW13939_00087	۲۸۰۸۹۸	۲۸۱٦۳۰	۷۳۲

جدول ۲. جایگاه اتصالی فاکتورهای رونویسی SFP1p، FKH1 و YAP6 بر اساس پژوهش‌های انجام شده بر روی ساکارومایسز سرویزیه

(M=A,C ؛W=A,T ؛H=A,C,T)

فاکتور رونویسی	جایگاه اتصال احتمالی
SFP1p	cHgxRRAAAAWTTTTYHxxxt Vxxxxaxxa
FKH1	AAACA RYMAAYA
YAP6	gtctgMTTAcgTaAgcgac

استخراج اطلاعات پروموتر احتمالی

ژن *los1* مخمر *ساکارومایسز سرویزیه* (YKL205W)، به عنوان قطعه مرجع، انتخاب و اطلاعات آن دریافت شد. در

گام بعد، مجموعه همولوگ‌های این ژن نیز دریافت و از این مجموعه، تعداد ۱۰ گونه از آسکومیست‌ها برای آنالیز پروموتر، انتخاب شدند (جدول ۱).

با استفاده از پایگاه داده‌های NCBI، جایگاه این ژن و ژن بالادستی آن بر روی ژنوم گونه‌های مورد بررسی، شناسایی و فاصله آن با ژن قبلی (فرادست) تخمین زده شد (جدول ۱). با توجه به طول این ناحیه بالادستی، چهارصد نوکلئوتید نزدیک به ابتدای ORF ژن *los1*، به عنوان ناحیه دربردارنده

پروموتر احتمالی، مورد بررسی قرار گرفتند.

آنالیز پروموترها

شناسایی جایگاه اتصالی فاکتورهای رونویسی

در مورد هریک از سه پروتئین SFP1، YAP6 و FKH1، توالی احتمالی جایگاه اتصالی، از پایگاه Yeastract استخراج شد و وجود آن بر روی ناحیه تنظیمی همولوگ *los1* مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین توالی TATA-box که محل اتصال پروتئین TBP است، به عنوان کنترل مثبت و موتیف اتصالی RFX8 انسانی، به عنوان کنترل منفی، مورد ارزیابی قرار گرفتند. موتیف‌های احتمالی اتصال TFهای قارچی مورد مطالعه، در جدول ۲ نشان داده شده‌اند.

آنالیز پروموترها با استفاده از نرم‌افزار CLC Genomics Workbrench 3 صورت گرفت و به منظور حذف حداکثری نتایج مثبت کاذب، میزان شباهت مورد قبول، در هر مورد، برابر با ۱۰۰٪ در نظر گرفته شد.

نتایج

جدول ۳ و نگاره ۱، نتایج آنالیز پروموتر همولوگ‌های ژن *los1* در آسکومیست‌ها را نشان می‌دهند. همانطور که مشخص شده است، در محدوده کلی ۵۰- تا ٦۵- از توالی‌های قارچی، TATA-box با توالی حفاظت شده TNTAAN و در محدوده ۱۱۰- تا ۱۲۳- از توالی‌های مورد بررسی، CAAT-box با توالی حفاظت شده CNTCA

جدول ۳. جایگاه‌های احتمالی اتصال فاکتورهای رونویسی بر روی ناحیه فرادست ژن los1

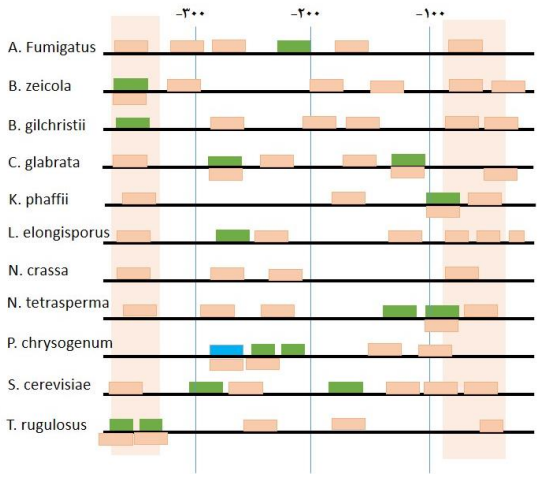
فاکتور رونویسی / گونه	YAP6	FKH1	SFP1
Aspergillus fumigatus	–	[۲۰۶– و ۲۱۰–]	[۳۷٤– و ۳٦٦–]
			[۳۰۲– و ۲۹٤–]
			[۲۷۰– و ۲٦۲–]
			[۱۷۳– و ۱٦٥–]
			[۷٤– و ٦٦–]
Bipolaris zeicola	–	[۳٥۸– و ۳٥۲–]	[۳٥۸– و ۳٥۲–]
			[۳۰٥– و ۲۹۷–]
			[۲۰۰– و ۱۹۲–]
			[۱٤۰– و ۱۳۲–]
			[۷۱– و ٦۳–]
			[۳۷– و ۲۹–]
Blastomyces gilchristii	–	[۳۲۰– و ۳۱۳–]	[۲۷٥– و ۲٦۷–]
			[۲۰۲– و ۱۹٤–]
			[۱۷۲– و ۱٦٤–]
			[۷۸– و ۷۰–]
			[٤۲– و ۳٤–]
Candida glabrata	–	[۲۷۹– و ۲۷۳–]	[۳۸۳– و ۳۷٥–]
		[۱۲۲– و ۱۱۸–]	[۲۸۱– و ۲۷۳–]
			[۲۳٤– و ۲۲٦–]

			[۱۷۳– و ۱٦٥–]
			[۱۲٥– و ۱۱۷–]
			[۳۰– و ۲۲–]
Komagataella phaffii	–	[۱۰۳– و ۹٦–]	[۳۷۳– و ۳٦٥–]
			[۱۸٥– و ۱۷۷–]
			[۱۰۳– و ۹٦–]
			[٦۱– و ٥۳–]
Lodderomyces elongisporus	–	[۲۸۰– و ۲۷۳–]	[۳۷۷– و ۳٦۹–]
			[۲٤٤– و ۲۳٦–]
			[۱۱٦– و ۱۰۸–]
			[۸۸– و ۸۰–]
			[۷۱– و ٦۳–]
			[٤٥– و ۳۷–]
Neurospora crassa	–	–	[۳۷۳– و ۳٦٥–]
			[۲۷۹– و ۲۷۱–]
			[۲۱٦– و ۲۰۸–]
			[٦٥– و ٥۷–]
Neurospora tetrasperma	–	[۱۱۹– و ۱۱۳–]	[۳٥۸– و ۳٥۱–]
		[۱۰٤– و ۹۸–]	[۲۹۰– و ۲۸۲–]
			[۲۳۳– و ۲۲٥–]
			[۱۰۳– و ۹٥–]
			[۷٥– و ٦۷–]
Penicillium chrysogenum	[۲۷۷– و ۲٥۹–]	[۲۲٦– و ۲۲۲–]	[۲۷٤– و ۲٦٦–]

	(٪٦٠)	[-٢١٥ و -٢١١]	[-٢٣٢ و -٢٢٤]
			[-١٤٣ و -١٣٥]
			[-١٠٦ و ٩٨]
Saccharomyces cerevisiae	-	[-٣٠١ و -٢٩٥]	[-٣٧١ و -٣٦٣]
		[-١٦٦ و -١٥٩]	[-٢٥٥ و -٢٦٣]
			[-١١٤ و -١٠٦]
			[-١٠٠ و -٩٢]
			[-٧١ و -٦٣]
Talaromyces rugulosus	-	[-٣٥٣ و -٣٤٧]	[-٣٨٤ و -٣٧٦]
		[-٣٨١ و -٣٧٧]	[-٣٥٩ و -٣٥١]
			[-٢٥١ و -٢٤٣]
			[-١٨٥ و -١٧٧]
			[-٥٠ و -٤٢]

شناسایی شد. همچنین جایگاه‌های اتصال فاکتورهای رونویسی بر روی هریک از توالی‌های مورد بررسی، شناسایی و نشان گذاری شدند.

در مورد YAP6 جایگاه اتصالی این پروتئین، در پروموتر هیچ‌یک از توالی‌های مورد مطالعه، یافت نشد و تنها پس از کاهش حساسیت نرم‌افزار، تا ٦٠٪ مشابهت، موتیف احتمالی اتصال این فاکتور، در ناحیه [-٢٧٧ و -٢٥٩] از قارچ *پنیسیلیوم کرایزوژنوم* دیده شد.



نگاره ١. جایگاه‌های احتمالی اتصال فاکتورهای رونویسی SFP1 (صورتی)، FKH1 (سبز) و YAP6 (آبی). بازه‌های -محتمل‌تر برای اتصال SFP1 با رنگ‌آمیزی پس زمینه، مشخص شده‌اند. این مناطق، در بازه‌های نوکلئوتیدی [-٨٠ و -٥٠] و [-٣٨٠ و -٣٦٠] قرار دارند.

بحث

آسکومیکوتا، بزرگ‌ترین مجموعه قارچی است که از اهمیت اقتصادی زیادی برخوردار است. بر اساس یک طبقه‌بندی، سه زیرشاخه مهم از شاخه آسکومیست، عبارتند از: تافرینومایکوتینا (Taphrinomycotina)، ساکارومایکوتینا (Saccharomycotina) و پزیزومایکوتینا (Pezizomycotina). هرچند گونه‌های آزاد و همزیست نیز در این زیرشاخه‌ها وجود دارد، اما بسیاری از اعضای این گروه، به عنوان انگل شناخته شده و تعداد زیادی از آن‌ها عوامل بیماریزای گیاهی و حتی انسانی به شمار می‌روند. با این حال، بسیاری از مخمرهای آسکومیست (زیرشاخه ساکاروماکوتینا) در فرایند گرده‌افشانی، ارتباط نزدیکی با حشرات دارند و علاوه بر آن، انواعی از ویتامین‌ها، آنزیم‌ها و منابع دیگر را نیز برای حشرات میزبان فراهم می‌کنند (۹). کاربردهای گوناگون این گروه بزرگ، آن‌ها را به سوژه‌های جذابی برای پژوهش‌های مختلف تبدیل کرده است. یکی از این حوزه‌های پژوهشی، بررسی فرایندهای رشد و مقاومت دارویی آن‌ها و چگونگی تاثیر ژن‌های دخیل در چنین فرایندهایی است. یکی از ژن‌های مهم درگیر در رشد و حیات سلول، *los1* است که پروتئین رمزشده توسط آن، علاوه بر نقش خود در نقل و انتقال tRNAها، در فرایند پیری سلول مخمر نیز دخالت دارد و حذف یا خاموش شدن ژن رمزکننده آن، موجب کندی رشد و بنابراین افزایش طول عمر سلول خواهد شد (۷). این ویژگی، عمدتا به دلیل فعال‌سازی ژن تنظیمی دیگری است که در مخمر، با نام GCN4 شناخته می‌شود و در برخی تنش‌های محیطی، فعال شده و با کند کردن متابولیسم سلول، به این شرایط، پاسخ می‌دهد (۷, ۱۰). پیامد این پاسخ، تجمع tRNAها درون هسته است که در شرایط کمبود اسید آمینه، و هریک از منابع کربن و فسفر، دیده می‌شود (۱۱).

بیان ژن *gcn4*، در سطح ترجمه تنظیم می‌شود و در شرایط تنش، از جمله کمبود اسیدهای آمینه، افزایش می‌یابد. در این حالت، پروتئین GCN4 از یک سو، در قالب یک فاکتور رونویسی قدرتمند، بیان ژن‌های دخیل در بیوسنتز اسیدهای آمینه را تحریک می‌کند و از سوی دیگر، به طور همزمان، به عنوان یک مهارگر عمل کرده و بیوسنتز پروتئین‌ها را متوقف می‌سازد تا شرایط تنش، برطرف شود (۱۰). کمبود مواد غذایی و هرگونه مهار پروتئین mTOR نیز موجب افزایش بیان ژن *gcn4* خواهد شد. به نظر می‌رسد دو مورد آخر، با مکانیسم وابسته به Rad-53 پروتئین LOS1 را از دسترس هسته خارج و به این ترتیب، اثر خود را بر سلول، اعمال می‌کنند (۷).

براساس اطلاعات موجود در پایگاه SGD سه فاکتور رونویسی SFP1، YAP6، و FKH1 در تنظیم بیان ژن ***los1*** دخالت دارند. پروتئین SFP1 (YLR403W) در تنظیم رونویسی از ژن‌های بیوژنز ریبوزوم و ساخت پروتئین ریبوزومی دخالت دارد. این پروتئین، همچنین انتقال G2 / M را در طی چرخه سلولی تنظیم و اندازه سلول را تعدیل می‌کند و به این ترتیب به محرک‌های ناشی از کمبود مواد مغذی، تنش‌های محیطی، و هرگونه آسیب به DNA پاسخ می‌دهد. شواهد مختلف نشان می‌دهند که این پروتئین، مستقیما یا به واسطه پروتئین Rap1p به نواحی تنظیمی ژن‌های هدف خود، متصل می‌شود (۱۲). بیان این ژن، به نوبه خود، با فاکتورهای TORC1 و Mrs.6p تنظیم می‌گردد.

پروتئین YAP6 در پاسخ به انواعی از تنش‌های محیطی مانند فعال کننده رونویسی که در تنظیم ژن‌های بیان شده در پاسخ به تغییرات محیطی و نیازهای متابولیکی نقش دارد. طبق مطالعات مربوط به اتصال پروموتر و بیان ژن، این پروتئین، بیان ژن‌های مربوط به بیوژنز ریبوزوم، سنتز پروتئین، متابولیسم کربوهیدرات و انتقال کربوهیدرات را تنظیم می‌کند. همچنین ممکن است در مقاومت دارویی پلیوتروپیک نقش داشته باشد. در صورت بیان بیش از حد، به سیس پلاتین، متیل متانوسولفونات و میتومایسین C

مقاومت می‌دهد و تحمل سلولی به سدیم و لیتیوم را افزایش می‌دهد (۱۳).

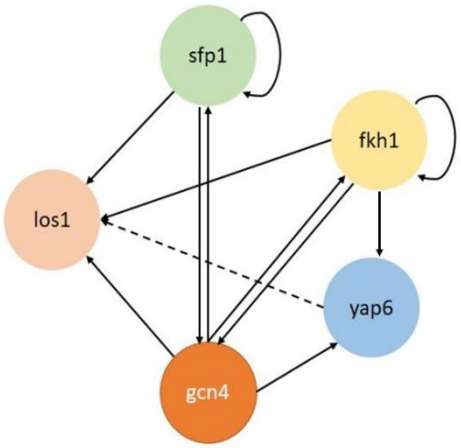
همانطور که در جدول ۳ و نگاره ۱ مشخص است، کلیه گونه‌های مورد بررسی، حاوی چندین جایگاه اتصال برای فاکتور SFP1 هستند. در پژوهش انجام شده توسط عزیزی و همکاران، حذف ژن *los1* در *آسپرژیلوس فومیگاتوس* موجب کاهش سطح بیان ژن *sfp1* شده است (۱٤). هرچند این نتیجه، با وجود جایگاه‌های متعدد اتصالی پروتئین SFP1 بر روی پروموتر *los1* تطابق و همخوانی دارد، اما می‌بایست به این نکته دقت داشت که ممکن است شناسایی این جایگاه‌های متعدد، ناشی از هرز (Degenerated)بودن توالی معرفی شده به عنوان محل اتصال پروتئین باشد. بنابراین، اظهار نظر قطعی در مورد تعداد و موقعیت دقیق هر جایگاه اتصالی، نیازمند انجام آزمایش‌های تکمیلی است.

پروتئین FKH1 (YIL131C) عضوی از خانواده فاکتورهای رونویسی سرچنگالی است. نقش این پروتئین، در تنظیم طول عمر قارچ به اثبات رسیده است و به نظر می‌رسد، در این مسیر، با عضو دیگر این خانواده، FKH2، همکاری نزدیکی دارد (۱۵). وجود جایگاه‌های مختلف اتصال این فاکتور رونویسی، در پروموتر ژن *los1* پیشنهاد می‌کند که احتمالا این پروتئین، با دخالت در فرایند حمل و نقل tRNA اثر خود را بر سرعت متابولیسم سلول، و در نتیجه سرعت رشد و فرایند پیری آن، اعمال می‌کند. از سوی دیگر، شواهد گوناگونی وجود دارند که پیشنهاد می‌کنند در شرایط تنش، بیان ژن *fkh1* به نوبه خود، تحت تاثیر پروتئین GCN4 افزایش می‌یابد و رونویسی از گروهی از ژن‌های دخیل در پاسخ سلولی را القا می‌کند. از جمله این ژن‌ها می‌توان به *hsp70* و *cmd1* اشاره کرد، که بیان هر دو در شرایط تنش، افزایش می‌یابد.

طبق مشاهدات کاپتیزکی و همکاران، حذف ژن *los1* موجب تغییر مقاومت قارچ، به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف می‌شود. به عنوان مثال، می‌توان به افزایش مقاومت قارچ، نسبت به داروی بلئومایسین، و کاهش مقاومت آن نسبت به سیکلوهگزیمید اشاره نمود (۸). سیکلوهگزیمید یک آنتی بیوتیک گلوتاریمیدی است و مانند یک مهارکننده قوی عمل می‌کند که سنتز پروتئین را از طریق اتصال به زیر واحد 60S ریبوزوم و اختلال در ترجمه، متوقف می‌سازد. بنابراین، می‌توان انتظار داشت که حذف ژن *los1* با ایجاد اختلال در سیستم حمل و نقل tRNA، موجب افزایش حساسیت به داروهایی از این دست شود. بلئومایسین، با توقف جوانه‌زنی، رشد کنیدی‌ها و مهار تولید مثل جنسی، اثر خود را بر قارچ‌ها اعمال می‌کند. این آنتی‌بیوتیک گلیکوپپتیدی، موجب صدمات اکسایشی به DNA می‌شود که شکست‌های تک و دو رشته‌ای آن را در پی دارد و همچنین منجر به تخریب RNA در همسایگی نوکلئوتیدهای گوانوزین می‌شود. از آنجا که مهار سنتز پروتئین، با این شکست‌های ویژه جایگاه، در RNA مرتبط است، می‌توان نتیجه گرفت که این شکست‌ها، نقش مهمی در عملکرد بلئومایسین دارد. علاوه بر این، گزارش‌هایی مبنی بر دخالت ژن *blm10* در ایجاد مقاومت به بلئومایسین وجود دارد (۱٦). همچنین پژوهش‌های اخیر، در مخمر *ساکارومایسز سرویزیه* ، نقش ژن *mtr10* را در این مقاومت آنتی‌بیوتیکی، آشکار ساخته‌اند، به طوری‌که مطالعات دافی و همکاران نشان می‌دهد که کاهش بیان این ژن، موجب ایجاد مقاومت به گروهی از آنتی‌بیوتیک‌ها، از جمله بلئومایسین می‌شود (۱۷).

نتایج پژوهش حاضر، شبکه تنظیمی ژن *los1* را به صورت ارائه شده در نگاره ۲ پیشنهاد می‌کند. بر اساس این شبکه پیشنهادی، در صورت حذف *los1*، اختلال در خروج tRNA از هسته، و کاهش سطح این مولکول‌ها در سیتوزول، ممکن است موجب کاهش دسترسی این آنتی بیوتیک به tRNA شده و به این ترتیب، منجر به افزایش مقاومت به آن شود.

هر سه فاکتور مورد بررسی، علاوه بر ژن *los1* موجب تحریک رونویسی از ژن‌های متعدد دیگر نیز می‌شوند که سرانجام، آبشاری از فعالیت‌های تنظیمی را در پاسخ به تنش‌های محیطی و کمبود مواد غذایی و اسید آمینه، به راه خواهد انداخت. علاوه بر این، هر سه پروتئین، دارای جایگاه‌های اتصالی در پروموتر خود هستند که در فرایند خود-تنظیمی آن‌ها به کار گرفته می‌شود. نکته جالب توجه این جاست که پروتئین FKH1 به نوبه خود، در تنظیم بیان ژن YAP6 دخالت دارد. از طرفی، پروتئین‌های FKH1 و SFP1 در تنظیم بیان ژن *gcn4* نیز دخالت دارند. این در حالی است که پروتئین GCN4 به عنوان یک فاکتور رونویسی عمومی‌تر، تنظیم بیان ژن هر سه فاکتور یاد شده در این پژوهش را بر عهده دارد. بنابراین، به کمک اطلاعات موجود، می‌توان شبکه تنظیمی ژن *los1* را به صورت نگاره ۲ در نظر گرفت. همانطور که در این تصویر مشخص است، پروتئین های SFP1، FKH1 و GCN4 به طور مستقیم، و پروتئین YAP6 به صورت غیر مستقیم در تنظیم بیان ژن *los1* دخالت دارند.



نگاره ۲. شبکه تنظیمی los1 در آسکومیست‌ها.

با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش، می‌توان نتیجه گرفت که مسیر بازگشت مجدد tRNA ها به هسته، به موازات مسیرتخریب سریع tRNA سیتوپلاسمی عمل می‌کند که نقش آن در کنترل کیفیت tRNA پیشتر، نشان داده شده بود. شواهد نشان می‌دهد که سلول‌های فاقد هر دو مسیر، نمی‌توانند به بقای خود ادامه دهند. پروتئین LOS1 در هر دو مسیر خروج اولیه و ثانویه tRNAها نقش دارد. اما با وجود این نقش کلیدی، حذف کامل این ژن، نه تنها منجر به مرگ سلول آسکومیست نمی‌شود، بلکه با کند کردن متابولیسم آن، به طولانی شدن عمر سلول نیز منجر خواهد شد. دو فاکتور رونویسی FKH1 و SFP1 احتمالا دارای جایگاه‌های اتصالی بر روی ناحیه تنظیمی فرادست ژن *los1* هستند و در صورت بروز تنش، توسط فاکتور رونویسی GCN4 فعال شده و رونویسی از این ژن را القا می‌کنند. حذف پروتئین LOS1، ویژگی‌های دوگانه‌ای را در ارتباط با مقاومت آنتی‌بیوتیکی قارچ، ایجاد می‌کند. به طوری‌که احتمالا موجب افزایش مقاومت به بلئومایسین و کاهش مقاومت به سیکلوهگزیمید خواهد شد.

با وجود آنالیزهای مختلفی که در این پژوهش، بر روی ناحیه تنظیمی ژن *los1* انجام شد، هرگونه اظهارنظر قطعی در مورد توالی و موقعیت دقیق جایگاه‌های اتصالی و همچنین تغییر میزان حساسیت آنتی‌بیوتیکی در گونه‌های دیگر قارچی، نیازمند آزمایش‌های تکمیلی است.

فهرست منابع

1. Gómez-Brandón M, Probst M, Siles JA, Peintner U, Bardelli T, Egli M, et al. Fungal communities and their association with nitrogen-fixing bacteria affect early decomposition of Norway spruce deadwood. Scientific reports. 2020;10(1):1-11.
2. Kramer EB, Hopper AK. Retrograde transfer RNA nuclear import provides a new level of

tRNA quality control in Saccharomyces cerevisiae. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2013;110(52):21042-7.
3. Chatterjee K, Majumder S, Wan Y, Shah V, Wu J, Huang H-Y, et al. Sharing the load: Mex67–Mtr2 cofunctions with Los1 in primary tRNA nuclear export. Genes & development. 2017;31(21):2186-98.
4. Shaheen HH, Hopper AK. Retrograde movement of tRNAs from the cytoplasm to the nucleus in Saccharomyces cerevisiae. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2005;102(32):11290-5.
5. Murthi A, Shaheen HH, Huang H-Y, Preston MA, Lai T-P, Phizicky EM, et al. Regulation of tRNA bidirectional nuclear-cytoplasmic trafficking in Saccharomyces cerevisiae. Molecular biology of the cell. 2010;21(4):639-49.
6. Markina-Iñarrairaegui A, Etxebeste O, Herrero-García E, Araújo-Bazán L, Fernández-Martínez J, Flores JA, et al. Nuclear transporters in a multinucleated organism: functional and localization analyses in Aspergillus nidulans. Molecular biology of the cell. 2011;22(20):3874-86.
7. McCormick MA, Delaney JR, Tsuchiya M, Tsuchiyama S, Shemorry A, Sim S, et al. A comprehensive analysis of replicative lifespan in 4,698 single-gene deletion strains uncovers conserved mechanisms of aging. Cell metabolism. 2015;22(5):895-906.
8. Kapitzky L, Beltrao P, Berens TJ, Gassner N, Zhou C, Wüster A, et al. Cross-species chemogenomic profiling reveals evolutionarily conserved drug mode of action. Molecular systems biology. 2010;6(1):451.
9. Taylor TN, Krings M, Taylor EL. Fossil fungi: Academic Press; 2014.
10. Mittal N, Guimaraes JC, Gross T, Schmidt A, Vina-Vilaseca A, Nedialkova DD, et al. The Gcn4 transcription factor reduces protein synthesis capacity and extends yeast lifespan. Nature communications. 2017;8(1):1-12.
11. Whitney ML, Hurto RL, Shaheen HH, Hopper AK. Rapid and reversible nuclear accumulation of cytoplasmic tRNA in response to nutrient availability. Molecular biology of the cell. 2007;18(7):2678-86.
12. Marion RM, Regev A, Segal E, Barash Y, Koller D, Friedman N, et al. Sfp1 is a stress- and nutrient-sensitive regulator of ribosomal protein gene expression. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(40):14315-22.
13. Huang C, Chen Z, Yang C, Chen L, Lai C, Zhang Y, et al. Combinational inhibition of EGFR and YAP reverses 5-Fu resistance in colorectal cancer. Journal of Cancer. 2020;11(18):5432.
14. Azizi A, SharifiRad A, Enayati S, Azizi M, Bayat M, Khalaj V. Absence of AfuXpot, the yeast Los1 homologue, limits Aspergillus fumigatus growth under amino acid deprived condition. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2020;36(2):1-11.
15. Postnikoff SD, Malo ME, Wong B, Harkness TA. The yeast forkhead transcription factors fkh1 and fkh2 regulate lifespan and stress response together with the anaphase-promoting complex. PLoS Genet. 2012;8(3):e1002583.
16. Moore CW, McKoy J, Del Valle R, Armstrong D, Bernard EM, Katz N, et al. Fungal cell wall septation and cytokinesis are inhibited by bleomycins. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2003;47(10):3281-9.
17. Duffy S, Fam HK, Wang YK, Styles EB, Kim J-H, Ang JS, et al. Overexpression screens identify conserved dosage chromosome instability genes in yeast and human cancer. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2016;113(36):9967-76.