

## شناسایی مولکولی فسفولیپاز B<sub>3</sub> به عنوان عامل موثر در بیماری زایی آسپرژیلوس فومیگاتوس

تاریخ دریافت: ۸۸/۱۱/۳۰ - تاریخ پذیرش: ۸۹/۱/۲۶

### خلاصه

#### مقدمه

فسفولیپیدها یکی از ترکیبات اصلی غشا سیتوپلاسمی سلول های یوکاریوتی می باشند. فسفولیپازها نیز آنزیم هایی هستند که در همه سلول های یوکاریوت وجود دارند و با توجه به وجود فسفولیپیدها در غشا سیتوپلاسمی یوکاریوت ها روشن است که قدرت تخریب غشا سیتوپلاسمی به وسیله این آنزیم ها می تواند نقش مهمی در بیماری زایی میکروارگانیسم ها داشته باشد. با توجه به موضوعات فوق، در این تحقیق کلونینگ و تعیین توالی ژن فسفولیپاز B<sub>3</sub> در *آسپرژیلوس فومیگاتوس* انجام پذیرفت.

#### روش کار

این مطالعه توصیفی در مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز در سال ۱۳۸۷-۱۳۸۹ انجام شده است. DNA ژنومی قارچ های *آسپرژیلوس فومیگاتوس*، *آ. نیجر*، *کاندیدا آلبیکانس*، *اورتوبازیدیم پولولنس* و *فوزاریوم ونوناتوم* استخراج و متعاقب تکثیر قطعه مورد نظر با PCR، محصول PCR به حامل pGEMT-Easy vector پیوند زده شد و به سلول میزبان (*E. coli Top 10 F'*) ترانسفورم گردید.

#### نتایج

مقایسه همسانی توالی نوکلئوتیدی و اسید آمینه ای سکوانس نوکلئوتیدی ژن *plb3* به دست آمده به طول ۲۰۲۸ bp همسانی بسیار بالایی با توالی نوکلئوتیدی ژن های مشابه در سایر قارچ ها نشان می دهد.

#### نتیجه گیری

آنالیز درخت فیلوژنیک ژن *plb3* نشان می دهد که این ژن با گروه بزرگی از ژن های مشابه در سایر میکروارگانیسم ها ارتباط دارد و مقایسه همسانی توالی این ژن با ژن مشابه در قارچ های دیگر، نشان دهنده همسانی زیاد توالی این ژن با ژن های *PLB* در سایر قارچ ها است. مطالعات مربوط به تعیین توالی ژن هایی که عملکرد آنها در بیماری زایی میکروارگانیسم ها موثر می باشند، عمدتاً به منظور استنباط اطلاعات برای ارائه شیوه مصنوعیت بخشی، تهیه واکسن، طراحی دارو، تهیه بلوکر برای خود ژن و یا محصول ژن و استفاده از آن ها به عنوان معرف آزمایشگاهی وجود عفونت انجام می گیرد.

**کلمات کلیدی:** بیماری زایی، میکروارگانیسم ها، فسفولیپاز B<sub>3</sub>

۱- عبدالحسن کاظمی\*

۲- جفری رابسون

۳- دیوید دنینگ

۴- علی زارعی محمود آبادی

۵- عباسعلی جعفری

۱- دانشیار مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، مرکز

تحقیقات تغذیه، مرکز تحقیقات بیماری های

عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی تبریز

تبریز، ایران

۲- استاد مولکولار بیولوژی - گروه PME -

دانشکده علوم حیاتی - دانشگاه منچستر

۳- استاد بیماری های عفونی و فوق تخصص

میکوزهای ریوی - گروه PME - دانشکده

علوم حیاتی - دانشگاه منچستر

۴- دانشیار گروه انگل شناسی و قارچ شناسی

دانشگاه علوم پزشکی اهواز، اهواز، ایران

۵- دانشیار گروه انگل شناسی و قارچ شناسی

دانشگاه علوم پزشکی یزد، یزد، ایران

\* تبریز - دانشگاه علوم پزشکی تبریز، دانشکده

پزشکی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی

تلفاکس: ۰۲۱-۳۳۷۳۷۴۵-۴۱۱-۹۸+

email: Kazemi1338@gmail.com

## مقدمه

فسفولیپازها آنزیم هایی دارای فالت استرازی می باشند که در همه موجودات زنده یافت می شوند و با توجه به نوع فعالیت آنزیمی خود به دو گروه آسیل هیدرولازها<sup>۱</sup> و فسفودی استرازاها<sup>۲</sup> تقسیم می گردند. آسیل هیدرولازها، شامل فسفولیپاز<sup>۳</sup> A1 و A2، فسفولیپاز B و لیزوفسفولیپازها<sup>۴</sup> بوده و فسفودی استرازاها شامل فسفولیپاز C و فسفولیپاز D می باشند.

علی رغم امکان وجود تفاوت های فراوان در فعالیت فسفولیپاز های مختلف در میکروارگانیسم های مختلف، دو فعالیت اصلی برای این آنزیم ها شناسایی شده است. فسفولیپاز های ترشخی خارج سلولی عموماً در هیدرولیز فسفولیپد های خارج سلولی و در نتیجه، تهیه منابع تغذیه ای کربن، نیتروژن و فسفات برای سلول دخالت دارند (۱-۳). ولی فسفولیپازهای های درون سلولی عموماً دارای فعالیت کاتالیتیکی اندکی بوده و در قیاس با فسفولیپاز های ترشخی خارج سلولی در حد بسیار پایینی تولید می گردند. فسفولیپازهای های درون سلولی در کنترل اعمال متابولیکی سلول موثر بوده و نقش تنظیمی برای فعالیت بیولوژیکی 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. این آنزیم ها از نظر تولید تعدادی از واسطه های بیوشیمیایی مانند دی آسیل گلیسرید<sup>۵</sup>، لیزوفسفاتیدیدیک اسید<sup>۶</sup> و اینوزیتول تری فسفات<sup>۷</sup> نیز مورد توجه هستند (۴).

تولید فسفولیپاز ها در میکروارگانیسم های مختلف بیماری زا و نحوه اثر آنها در بیماریزایی این میکروارگانیسم ها اخیراً مورد توجه بسیار گسترده ای قرار گرفته است. مقایسه بیماری زایی ۲۳ استرین کریپتوکوکوس نئوformans<sup>۸</sup> به عنوان قارچی مرگبار در مبتلایان به ایدز AIDS، رابطه معنی دار مابین تولید فسفولیپاز و بیماری زایی این میکروارگانیسم را در ۲۲ استرین نشان داد

(۵-۶). همچنین متعاقب کلون نمودن ژن فسفولیپاز B1 کریپتوکوکوس نئوformans<sup>۹</sup> و تولید موتانت های فاقد این ژن و مقایسه بیماری زایی استرین اولیه و موتانت تفاوت معنی داری مابین آنها گزارش شده است (۷). قدرت تولید فسفولیپاز ها و ارتباط آن با بیماریزایی قارچ بیماری زای *Candida albicans*<sup>۱۰</sup> نیز در مقایسه یازده نمونه جدا شده از خون بیماران مبتلا به کاندیدیازیس سیستمیک با یازده نمونه کومنسال جدا شده از حفره دهان افراد سالم داوطلب مورد تایید قرار گرفت است و نتیجه مشابهی نیز در پژوهش بر روی مدل حیوانی به دست آمده است (۹،۸). همچنین بررسی میزان بیان ژن فسفولیپاز B1 در مرحله عفونت زایی ک. آلیکانس در حالات بالینی مختلف در پژوهش های مختلف نیز نشان داده است که میزان بیان ژن فسفولیپاز B1 در مرحله عفونت زایی این میکروارگانیسم به شدت افزایش می یابد که این یافته ها با نتایج به دست آمده در مورد نقش فسفولیپاز ها در بیماری زایی باکتری ها نیز مشابه است که فسفولیپاز ها با افزایش قدرت اتصال میکروارگانیسم های مختلف به سلول های بافت میربان و ورود به درون سلول، افزایش بیماریزایی را باعث می شوند (۱۰، ۱۴، ۱۵، ۱۷).

## روش کار

این مطالعه توصیفی در مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز در سال ۱۳۸۷-۱۳۸۹ انجام شده است. DNA ژنومی سه قارچ بیماری زای *Aspergillus fumigatus*، ک. آلیکانس و *A. niger* ترتیب از کلنی های حاصل از کشت خلط یک بیمار مبتلا به آسپرژیلوس ریوی مهاجم<sup>۱۱</sup> و کاندیدیازیس سیستمیک، اتومایکوزیس و DNA ژنومی قارچهای غیر بیماری زای اورئوبازیدیوم پولولنس<sup>۱۲</sup> و فوزاریوم ونوناتوم<sup>۱۳</sup> از کلنی های حاصل از کشت نمونه های محیط، با استفاده از روش پایه ریدر و برود<sup>۱۴</sup> استخراج گردید. (روش کلروفورم و ایزومیل الکل) و پس از افزودن RN Aasa A ماده DNA حاصله برای

<sup>1</sup> Acyl hydrolases

<sup>2</sup> Phosphodiesterases

<sup>3</sup> phospholipase

<sup>4</sup> lysophospholipases

<sup>5</sup> diacylglycerol

<sup>6</sup> lysophosphatidic acid

<sup>7</sup> inositol triphosphate

<sup>8</sup> Cryptococcus neoformans

<sup>9</sup> C. neoformans

<sup>10</sup> Candida albicans

<sup>11</sup> invasive pulmonary aspergillosis I.A

<sup>12</sup> Arebasidium pullulanse

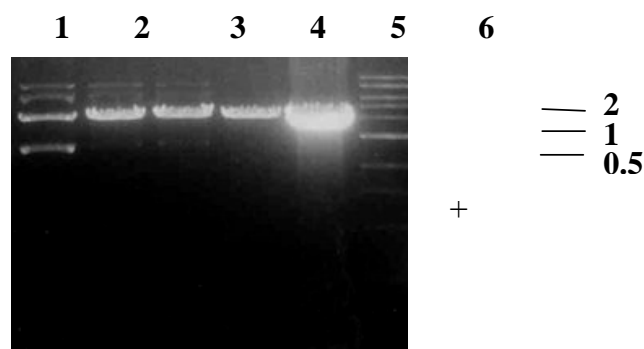
<sup>13</sup> Fusarium venenatum

<sup>14</sup> Reader and Brode

باند ۲۱۰۰bp حاصل از الکتروفورز مقدار کافی (۵۰ul) از محصول PCR در ژل تهیه شده با بافر TAE پس از برش از روی ژل، استخراج و تلخیص گردید (QIAquick gel extraction kit) باند استخراج شده به حامل پلاسمیدی pGEMT-Easy vector پیوند زده شده و سپس به سلول میزبان (E.coli Top 10 F') ترانسفورم شد. غربالگری کلنی های آبی-سفید در محیط کشت (LB (Luria-Burtani حاوی-۵ برومو ۴-کلرو ۳ ایندول بتا دی گالاکتوپیرانوزید (X-gal) و ایزوپروپیل-بتا-دی-تیوگالاکتوپیرانوزید (IPTG) انجام شده و پس از انتخاب شش کلنی حاوی وکتور ترانسفورم شده، و رشد آن ها در محیط LB، حامل پلاسمیدی حاوی قطعه PCR از باکتری ها جدا گردید و سپس برش قطعه PCR از ناحیه Multi Cloning Site (MCS) حامل، با اندونوکلاز محدودالایتر *Eco RI* انجام گردیده و برای انجام مراحل مربوط به تعیین سکوانس باند هدف، PCR مجدد با استفاده از پلاسمید M13 انجام گرفت و با تعیین توالی، سکوانس قطعه ای از ژن *plb3* آ. فومیگاتوس، به طول ۲۱۰۰bp به دست آمد. برای تایید صحت توالی بدست آمده، جستجوی همسانی توالی ژن *plb3* آ. فومیگاتوس با نرم افزار بیوانفورماتیکی BLASTX، همسانی بسیار بالایی با توالی نوکلئوتیدهای ژن مشابه را در سایر قارچ ها را نشان داد (جدول ۱) نشان دهنده توفیق در شناسایی ژن مورد نظر می باشد.

به منظور تایید وجود ژن *PLB3* در ژنوم قارچ، بررسی تعداد کپی ژن در ژنوم و همچنین تخمین اندازه مناسب قطعه ژنومی برای کلونینگ و تعیین توالی، DNA ژنومی آ. فومیگاتوس با اندونوکلازهای محدودالایتر *Apa I* و *Brf I* و *Bji I* و *Kpn I* و *Sal I* و *Xba I* و *Xho I* هضم گردید و سترن بلاتینگ با استفاده از پروب DNA نشاندار شده با دیگوکسی جنین (DIG) انجام شد و قطعات DNA حاوی تمام یا قسمتی از ژن *plb3* به ترتیب به طولهای تخمینی ۹/۶ kb و ۱۱/۲ kb و ۶/۱ kb و ۱۰/۱ kb و ۳ kb و ۵/۷ kb و ۲/۲ kb شناسایی گردید. با توجه به نتایج سترن بلاتینگ، فقط وجود یک نسخه از ژن *plb3* در ژنوم میکروارگانیزم تایید شد (شکل ۲).

مصارف آتی در  $20^{\circ}C$ - نگهداری گردید (۱۸). کمیت سنجی DNA ژنومی استخراج شده از میکروارگانیزم های مورد نظر و شاهد مثبت با استفاده از دو تکنیک ۱- مقایسه غلظت رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید در ژل الکتروفورز با غلظت DNA استاندارد (DNA شاخص 1kb (GIBCO BRL) ۲- غلظت سنجی DNA در محلول تهیه شده با استفاده از OD  $260=1$  در اسپکتروفتومتر انجام گرفت (۱۸). با استفاده از ردیف های نوکلئوتیدی محفوظ برای ژن *plb* در ک. آلیکانس، ساکارومایسس سرویسیه<sup>۱</sup> و پنسیلیوم کرایزوتروم<sup>۲</sup>، و دسترسی به توالی نوکلئوتیدی مناطق بالادست<sup>۳</sup> و پایین دست<sup>۴</sup> طول کامل ژن های مشابه در این میکروارگانیزم ها، پرایمرهای (GAY GGI GGI GAR GAY AAY AR (DBF AA و (AYI GTI CCR TTC CAR CAR (DBP TA) برای تکثیر یک قطعه تخمینی به طول ۲۱۰۰bp طراحی شد. تکثیر قطعه مورد نظر با تکنیک PCR دژنراتیو از DNA ژنومی میکروارگانیزم ها در ترموسایکلر با شرایط ۳ دقیقه در  $94^{\circ}C$  برای یک سیکل، یک دقیقه در  $94^{\circ}C$  نیم دقیقه در  $49^{\circ}C$  و ۹۰ ثانیه در  $72^{\circ}C$  برای ۲۹ سیکل و نهایتاً هفت دقیقه در  $72^{\circ}C$  برای یک سیکل با موفقیت انجام گردید و از باند های محصول PCR تصویر تهیه گردید (شکل ۱).



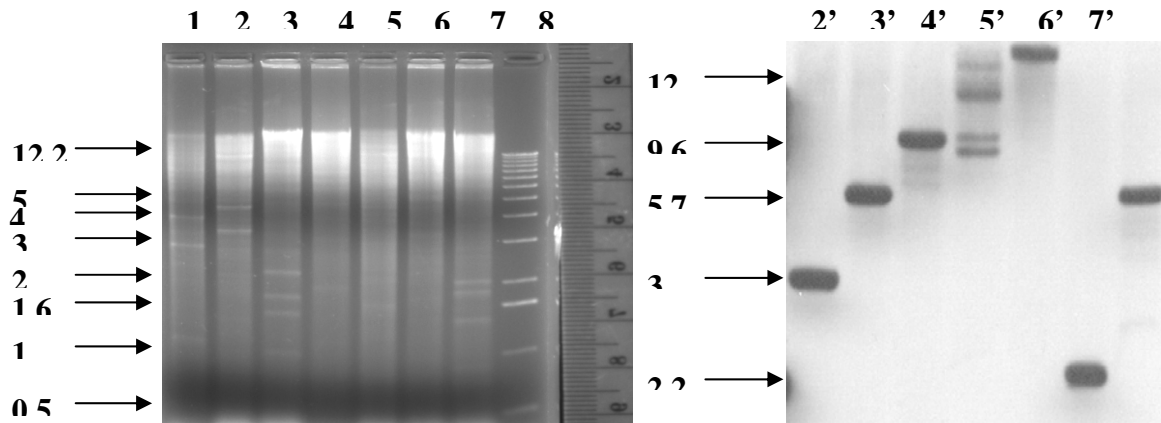
شکل ۱- الکتروفورز محصولات PCR دژنراتیو

<sup>1</sup> *Saccharomyces cerevisiae*

<sup>2</sup> *Penicillium chrysogenum*

<sup>3</sup> upstream

<sup>4</sup> downstream



A

شکل ۲- ساترن بلائینگ DNA ژنومی آسپرژیلوس فومیگاتوس

**A:** الکتروفورز DNA ژنومی آسپرژیلوس فومیگاتوس پس از هضم با آنزیم های محدودالایر *Brf I* *Apa I* *Xho I* *Xba I* *Sal I* *Kpn I* *Bji I* ستون هشت، باندهای شاخص و ستونهای ۱-۷ باندهای مربوط به هضم DNA ژنومی آسپرژیلوس فومیگاتوس را پس از هضم با آنزیم محدودالایر فوق الذکر نشان می دهد.

**B:** باند های حاصل از ساترن بلائینگ DNA ژنومی آسپرژیلوس فومیگاتوس با استفاده از پروب DNA نشاندار شده با دیگوکسی جنین (DG) Digoxigenin (DG)

جدول ۱- درصد تطابق سکوانس ژن *plb3* آ. فومیگاتوس با سکوانس ژن های *plb* منتشر شده قارچ ها

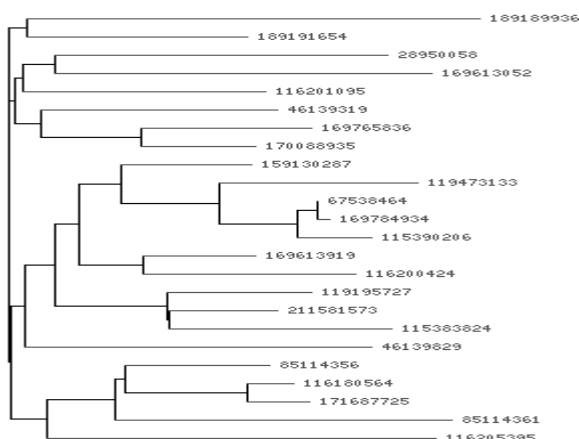
Species	Classification	% Identity
<i>Aspergillus oryzae</i> AX112082.1	Ascomycota	86%
<i>Aspergillus oryzae</i> AX112084.	Ascomycota	74%
<i>Aspergillus niger</i> AX112078.1	Ascomycota	72%
<i>Aspergillus niger</i> AX112080.1	Ascomycota	67%
<i>Penicillium chrysogenum</i> P39457	Ascomycete	65%
<i>Neurospora crassa</i> AF045574	Ascomycete	57%
<i>Torulaspora delbrueckii</i> Q11121	Ascomycete	52%
<i>Kluyveromyces lactis</i> AB014495	Ascomycete	48%
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S533037	Ascomycete	48%
<i>Candida albicans</i> BAA36162	Ascomycete	47%
<i>Candida albicans</i> AAC72296	Ascomycete	46%
<i>Cryptococcus neoformans</i> AAF61964.1	Basidiomycete	43%

## نتایج

توالی نوکلئوتیدی ژن های *plb3* فومیگاتوس همسانی بسیار زیادی با توالی نوکلئوتیدهای ژن مشابه را در سایر میکروارگانیسم ها نشان می دهد. جستجوی بانکهای اطلاعاتی ژنوم در پایگاه های اطلاعات ژنومی با استفاده از نرم افزار بیوانفورماتیکی BLASTX همسانی ژن های *plb3* حاصل را با ژن مشابه در *Aspergillus oryzae* اوریزه آ به میزان حداکثر ۸۶٪ و با ژن فسفولیباز *plb B* کریپتوکوکوس نئوفرمنس *C neoformans* به میزان حداقل ۴۳٪ و مقادیر ما بین این دو عدد را برای سایر میکروارگانیسم ها در سطح اسید آمینه ای نشان داد (جدول ۱).

## بحث

مقایسه همسانی ما بین توالی نوکلئوتیدهای بخشی از ژن *plb3* آ. فومیگاتوس، با ژن مشابه در سایر میکروارگانیسم ها، نشانه همسانی بسیار بالای توالی اسیدهای نوکلئیک این ژن با ژن های مشابه در میکروارگانیسم هایی است که سکوانس ژنتیکی این ژنها در آن میکروارگانیسم ها شناسایی شده است. مطابق استانداردهای محافل علمی و بانکهای اطلاعات ژنومی، همسانی توالی اسیدهای نوکلئیک ما بین دو ژن در حد ۲۵٪، مشابهت زیاد *High identity* و نشانه قرابت فیلوژنیک تلقی می گردد و بدین جهت همسانی حداکثر ۸۶٪ بخشی از ژن مشابه در آ. اوریزه با بخشی از ژن *plb3* آ. فومیگاتوس، نشان دهنده قرابت فیلوژنیک بسیار زیاد ما بین این دو میکروارگانیسم در میراث ژنومی و انتقال کاملاً محافظه کارانه گنجینه ژنی در طول مسیر تکاملی در ما بین گونه های مختلف جنس *Aspergillus SP.* می باشد همچنان که حداقل همسانی ۴۳٪ ما بین ژن مشابه قارچ مخمری ک. نئوفرمنس نیز از استاندارد تشابه ۲۵٪ بسیار زیادتر بوده و می تواند دلالت بر این امر داشته باشد که در مسیر تکاملی سلسله قارچ ها، انتقال میراث ژنی در مورد ژن های دارای نقش اساسی در ساختار حیاتی و ژنتیکی این میکروارگانیسم ها، به نحو بسیار محافظه کارانه ای انجام گرفته است (شکل ۳).



شکل ۳- درخت فیلوژنیک ژن های مشابه ژن PLB3

آ. فومیگاتوس

با توجه به شناسایی نقش مؤثر فسفولیبازها در بیماری زایی میکروارگانیسم هایی نظیر ک. نئوفرمنس کاندیدا آلیکانس، انواع آسپرژیلوس ها پاراکوکسیدیوئیدس برازیلینریس، مالاگزیا فور فور، انواع کلاستریدیوم، انواع باسیلوس انواع سودوموناس، انواع ریکتريا، آنتامباهیستولیتیکا، پژوهش هایی نیز برای استفاده از این آنزیم برای طراحی و تهیه دارو، تشخیص آزمایشگاهی عفونت، تهیه واکسن انجام گرفته است (۱-۳، ۵-۸، ۷-۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۶، ۱۹-۲۸).

## نتیجه گیری

پژوهش های مربوط به شناسایی توالی ژن هایی که محصولات نهایی آنها اثر موثری در بیماری زایی میکروارگانیسم ها دارند، عمدتاً به منظور تعیین سهم بیان ژن در پاتوژنیسیته میکروارگانیسم، تعیین خصوصیات بیوشیمیایی و اثر فیزیولوژیک محصول ژن هم برای خود میکروارگانیسم و هم برای میزبان مورد تهاجم، درک اطلاعات پایه برای ارائه روش مصونیت بخشی، تهیه واکسن و بلوکر، طراحی دارو و ... برای محصول ژن، استفاده از محصول ژن به عنوان ابزار و معرف آزمایشگاهی تشخیص عفونت و ... صورت می گیرد و کلونینگ و تعیین توالی کامل ژن *plb3* در تحقیقات بعدی قدم موثری برای رسیدن به اهداف فوق خواهد بود.

## تشکر و قدردانی

تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز در مورد انجام و اتمام این تحقیق سپاسگزاری می گردد.

از تشریک مساعی ارزنده همکاران و مسئولین محترم مرکز

## References:

- 1- Alp S, Arikan S. Investigation of extracellular elastase, acid proteinase and phospholipase activities as putative virulence factors in clinical isolates of *Aspergillus* species. *J Basic Microbiol* 2008; 48:331-337.
- 2- Sergeev N, Distler M, Vargas M, Chizhikov V, Herold KE, Rasooly A. Microarray analysis of *Bacillus cereus* group virulence factors. *J Microbiol Methods* 2006; 65:488-502.
- 3- Xu S, Cai L, Zhao L, Douhan-Håkansson L, Kristjánsson G, Pauksen K, *et al.* Tissue localization and the establishment of a sensitive immunoassay of the newly discovered human phospholipase B-precursor (PLB-P). *J Immunol Methods* 2010; 353:71-77.
- 4- Leon C, Taylor R, Bartlett KH, Wasan KM. Effect of heat-treatment and the role of phospholipases on Fungizone-induced cytotoxicity within human kidney proximal tubular (HK-2) cells and *Aspergillus fumigatus*. *Int J Pharm* 2005; 14:211-218.
- 5- Ganendren R, Carter E, Sorrell T, Widmer F, Wright L. Phospholipase B activity enhances adhesion of *Cryptococcus neoformans* to a human lung epithelial cell line. *Microbes Infect* 2006; 8:1006-10015.
- 6- Ganendren R, Widmer F, Singhal V, Wilson C, Sorrell T, Wright L. In vitro antifungal activities of inhibitors of phospholipases from the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:1561-1569.
- 7- Djordjevic JT, Del Poeta M, Sorrell TC, Turner KM, Wright LC. Secretion of cryptococcal phospholipase B1 (PLB1) is regulated by a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor. *Biochem J* 2005; 389:803-812.
- 8- Rementeria A, López-Molina N, Ludwig A, Vivanco AB, Bikandi J, Pontón J, *et al.* Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence. *Rev Iberoam Micol* 2005; 22:1-23.
- 9- Widmer F, Wright LC, Obando D, Handke R, Ganendren R, Ellis DH, *et al.* Hexadecylphosphocholine (miltefosine) has broad-spectrum fungicidal activity and is efficacious in a mouse model of cryptococcosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:414-421.
- 10- Ma L, Xie L, Dong X, Shi W. Role of extracellular phospholipase B of *Candida albicans* as a virulent factor in experimental keratomycosis. *Curr Eye Res* 2009; 34:761-768.
- 11- Schofield DA, Westwater C, Warner T, Nicholas PJ, Paulling EE, Balish E. Hydrolytic gene expression during oroesophageal and gastric candidiasis in immunocompetent and immunodeficient gnotobiotic mice. *J Infect Dis* 2003; 188:591-599.
- 12- Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13:122-143.
- 13- Theiss S, Ishdorj G, Brenot A, Kretschmar M, Lan CY, Nichterlein T, *et al.* Inactivation of the phospholipase B gene in wild-type *Candida albicans* reduces cell-associated phospholipase A2 activity and attenuates virulence. *Int J Med Microbiol* 2006; 296:405-420.
- 14- Mukherjee PK, Seshan KR, Leidich SD, Chandra J, Cole GT, Ghannoum MA. Reintroduction of the PLB1 gene into *Candida albicans* restores virulence in vivo. *Microbiology* 2001; 147:2585-2597.
- 15- Shen DK, Noodeh AD, Kazemi A, Grillot R, Robson G, Brugère JF. Characterisation and expression of phospholipases B from the opportunistic fungus *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiol Lett* 2004; 1:87-93.
- 16- Singh J, Ranganathan R, Hajdu J. Kinetics of bacterial phospholipase C activity at micellar interfaces: effect of substrate aggregate microstructure and a model for the kinetic parameters. *J Phys Chem B* 2008; 112:16741-16751.
- 17- Cronin UP, Wilkinson MG. Monitoring growth phase-related changes in phosphatidylcholine-specific phospholipase C production, adhesion properties and physiology of *Bacillus cereus* vegetative cells. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2008; 35:1695-16703.
- 18- Reader U, Brode P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Lett Appl Microbiol* 1985; 1:17-20.
- 19- Tavares AH, Silva SS, Bernardes VV, Maranhão AQ, Kyaw CM, Poças-Fonseca M, *et al.* Virulence insights from the *Paracoccidioides brasiliensis* transcriptome. *Genet Mol Res* 2005; 4:372-389.
- 20- Plotkin I, Mathov I, Squiquera L, Leoni J. Arachidonic acid released from epithelial cells by *Malassezia furfur* phospholipase A(2): a potential pathophysiologic mechanism. *Mycologia* 1998; 90:163-169.
- 21- Birch M, Denning DW, Robson GD. Comparison of extracellular phospholipase activities in clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* isolates. *Med Mycol* 2004; 42:81-86.
- 22- Okino N, Ito M. Ceramidase enhances phospholipase C-induced hemolysis by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* 2007; 282:6021-6030.

- 23- Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13:122-143.
- 24- Renesto P, Dehoux P, Gouin E, Touqui L, Cossart P, Raoult D. Identification and characterization of a phospholipase D-superfamily gene in rickettsiae. *J Infect Dis* 2003; 188:1276-1283.
- 25- Eckmann L, Reed SL, Smith JR, Kagnoff MF. Entamoeba histolytica trophozoites induce an inflammatory cytokine response by cultured human cells through the paracrine action of cytolytically released interleukin-1. *J Clin Invest* 1995; 96:1269 -1279.
- 26- Balderas-Renteria I, García-Lázaro JF, Carranza-Rosales P, Morales-Ramos LH, Galan-Wong LJ, Muñoz-Espinosa LE. Transcriptional upregulation of genes related to virulence activation in Entamoeba histolytica. *Arch Med Res* 2007; 38:372-379.
- 27- Bos MP, Tefsen B, Voet P, Weynants V, van Putten JP, Tommassen J. Function of neisserial outer membrane phospholipase A in autolysis and assessment of its vaccine potential. *Infect Immun* 2005; 73:2222-2231.
- 28- Angelakopoulos H, Looock K, Sisul DM, Jensen ER, Miller JF, Hohmann EL. Safety and shedding of an attenuated strain of Listeria monocytogenes with a deletion of actA/plcB in adult volunteers: a dose escalation study of oral inoculation. *Infect Immun* 2002; 70:3592-3601.