

التحري تجريبياً عن الجينات المرزمة لبروتينات PSA الغشائية في جينوم سلالة من اللشمانيا الكبرى *Leishmania major* المعزولة محلياً

عبد الرحمن يوسف⁽¹⁾ و شادي سكرية⁽²⁾ و محمود قويدر⁽³⁾

تاريخ الإيداع 2013/03/07

قبل للنشر في 2013/05/28

الملخص

تشكل PSA (المستضدات السطحية للشكل المسوط) عائلة من بروتينات اللشمانيا المرتبطة بالسطح، أو المفرزة، التي تتسم بوجود التسلسل النوعي LRR. وكما هي حال البروتينات الغشائية الأخرى، تُرمز بروتينات PSA من قبل العديد من الجينات، ولم يكن عدد نسخ هذه الجينات معروفاً قبل السلسلة الكلية لجينوم اللشمانيا الكبرى *L. major*. وحديثاً، تنبأت دراسة حاسوبية حيوية بأن عدد هذه الجينات هو 32 جيناً، وهي موزعة على الكروموزومات رقم 5 و9 و12 و21 و31. وقد اعتمدت هذه الدراسة على تفصي تحليلي للجينوم الكامل باستعمال برنامج BLAST وبعض تسلسلات بروتينات PSA المتوافرة في الدراسات المرجعية. في دراستنا، قمنا أولاً بعزل وزراعة وتنميط سلالة من *L. major*، ومن ثم بحثنا بشكل تجريبي عن العدد الكامل لجينات PSA المرزمة للبروتينات الغشائية في الجينوم، مستعملين PCR كمنهج معتمد على مرئسات نوعية. وبالنسبة، تمكنا من الكشف عن الوجود الفعلي لـ 22 جيناً مختلفة مرزمة للبروتينات الغشائية في جينوم سلالة سورية من *L. major*.

الكلمات المفتاحية: اللشمانيا الكبرى، التحول الشكلي، PSA المستضدات السطحية للشكل المسوط

(1) طالب ماجستير، (2) الأستاذ المشرف، (3) الأستاذ المشرف المشارك، قسم علم الحياة الحيوانية، كلية العلوم، جامعة دمشق، سورية.

Experimentally detection of genes coding for PSA surface proteins in the genome of *Leishmania major* strain locally isolated

A. AL-R. Youssif⁽¹⁾, Ch.Soukkarieh⁽²⁾ and M.Kweider⁽³⁾

Received 07/03/2013

Accepted 28/05/2013

ABSTRACT

PSA (promastigote surface antigen) is a *Leishmania* family of membrane-bound or secreted proteins, whose main signature consists in a specific LRR sequence. As for the other membrane proteins, PSAs are encoded by multicopy genes. Before the complete sequencing of *L. major* genome, the number of copies was largely unknown. Recently, a bioinformatics study has been predicted the presence of 32 genes dispersed on chromosomes 5, 9, 12, 21 and 31. That study was based on a BLAST search analysis performed against the complete genome sequences using as a query sequence some of the PSA protein sequences reported in the literature. In our study, we have first isolated, cultivated, typed and strain of *L. major*. Then we have investigated experimentally the complete list of PSA genes coding for membrane proteins in its genome, using PCR approach based on specific primers. In conclusion, we have detected the physical presence of 22 different genes coding for membrane proteins in the genome of Syrian strain of *L. major*.

Key words: *Leishmania Major*, Metacyclogenesis, PSA Promastigote Surface Antigen

⁽¹⁾MSC., Student, ⁽²⁾ Supervisor, ⁽³⁾ Associated supervisor, Department of Animal Biology, Faculty of Sciences, Damascus University, Syria.

المقدمة

يعدُّ داء اللشمانيات بأشكاله الثلاثة: الجلدي والجلدي المخاطي والحشوي الذي يسببه طفيلي وحيد خلية من جنس اللشمانيا، واحداً من أكثر الأمراض الطفيلية انتشاراً في العالم. ويقدر عدد الإصابات بهذا الداء بنحو 20 مليون إصابة حول العالم، كما يسجل سنوياً 2 مليون إصابة حديثة. ويعدُّ نحو 350 مليون شخص معرضين لخطر الإصابة بهذا الداء نظراً إلى وجودهم في أماكن انتشاره (www.who.int/tdr/diseases/leish). ينتشر داء اللشمانيات في أربع قارات (آسية، وأوروبا، وإفريقية، وأمريكا)، ويستوطن في 88 دولة من بينها سورية، إذ شُخصَ منذ القرن الثامن عشر في مدينة حلب وريفها وينتشر حالياً في محافظات القطر كلها وفي البيئات جميعها، ويقدر عدد الإصابات به 92500 إصابة، إذ سجلت 29000 إصابة حديثة عام 2008.

لطفيلي اللشمانيا دورة حياة معقدة، كما هي حال معظم الطفيليات المنتمية لعائلة السوطيات Flagellate، يحتاج فيها الطفيلي إلى مضيفين، مضيف أو ناقل لا فقاري ومضيف نهائي فقاري. تعدُّ أنثى ذبابة الرمل (Sand fly) أو الفاصدة (Phlebotomus) العامل الناقل للعديد من أنواع طفيلي اللشمانيا (Killick-Kendrick, 1999)، في حين يعدُّ الإنسان والكلاب والقطط المضيف النهائي. يمر الطفيلي خلال دورة حياته بشكلين تطورين رئيسيين، الشكل غير المسوط Amastigote الذي يعيش ضمن بالعات المضيف الفقاري، والشكل المسوط Promastigote ويعيش في المعى المتوسط للمضيف اللافقاري (Alexander and Russell 1992). يمر الشكل المسوط في أثناء تطور الطفيلي في معى الحشرة بمرحلتين انتقاليتين: Procyclic Promastigote وهو الشكل المسوط الانقسامي الذي يتكاثر بالانشطار الطولي داخل معى الحشرة، ومن صفاته الإخماجية المنخفضة تجاه المضيف الفقاري، وبعد نحو 1-3 أسابيع يعاني هذا الشكل المسوط الانقسامي من عملية التحول الشكلي Metacyclogenesis ليتحول إلى الشكل المسوط الثاني Metacyclic Promastigote إذ يتوقف عن الانقسام ويتغير شكله المورفولوجي وتصبح إخماجيته مرتفعة تجاه المضيف الفقاري، لذلك يعرف بالشكل المسوط المخمج. يكمن الاختلاف بين الشكلين الانقسامي والمخمج على المستوى الجزيئي في طبيعة ومستوى التعبير عن كثير من الجزيئات الكبيرة، وبشكل خاص الجزيئات السطحية والمفرزة في حلقة حياة طفيلي اللشمانيا وخاصة في مساعدته على البقاء حياً في الشروط المختلفة عند كل من المضيف الفقاري واللافقاري (Singh and Singh, 2008)، وفي إخماجيته لخلايا المضيف الفقاري. أظهرت كثير من الدراسات وجود تغيرات كمية ونوعية في التعبير عن الجزيئات السطحية والمفرزة في أثناء التحول الشكلي Metacyclogenesis في طفيلي اللشمانيا (Rittig and Bogdan, 2000)، ومن الجزيئات التي تعاني هذه

التغيرات الليبيدات السكرية، وأهمها: (GIPL) Glicoinositolphospholipids و (LPG) Lipophosphoglycan، والبروتينات وأهمها: Major surface protease و (MSP) و (PPG) Proteophosphoglycan و (PSA) Promastigote surface antigen (Beverley and Turco, 1998).

أثبتت كثير من الدراسات مؤخراً أدوار العديد من هذه الجزيئات. فمثلاً يؤدي كل من LPG و MSP دوراً في التهرب المناعي ومقاومة الانحلال بالمتمة والارتباط بالبالعات (Franke, McGreevy *et al.*, 1985; Joshi, Sacks *et al.*, 1998) كما تؤدي GIPL أيضاً دوراً في التهرب المناعي للطفيلي وفي حمايته من أثر إنتاج بالعات المضيف لأوكسيد النترريك (Devault and Banuls, 2008)، وتقوم تراكيز منخفضة من جزيئات PPG بدور رئيس بارتباط الشكل الانقسامي Procyclic Promastigote إلى جدار أمعاء المضيف اللاقاري حتى تمام نضجه، وبعد تحوله إلى الشكل المخمج Metacyclic Promastigote يزيد التعبير عنه؛ مما يؤدي إلى فقدان قدرة الارتباط بأمعاء المضيف اللاقاري، ومن ثم هجرته إلى الغدد اللعابية، وبهذه الآلية تحمي أمعاء المضيف اللاقاري من الانفجار (Killick-Kendrick, Molyneux *et al.*, 1974) (Pimenta, Turco *et al.*, 1992) (Kamhawi, Ramalho-Ortigao *et al.*, 2004).

يعدّ المعقد PSA أحد أهم الجزيئات السطحية/المفرزة في دورة حياة الطفيلي، إذ تنسب إليه أدوارٌ عدة منها: دوره في الفوعة الإراضية (Beetham, Donelson *et al.*, 2003) وفي القدرة الإخماجية للطفيلي (Ben Achour, Chenik *et al.*, 2002) وفي مقاومة انحلال الطفيلي بالمتمة والتأزر الحاصل بين الطفيلي وخلايا المضيف (Lincoln, Ozaki *et al.*, 2004) (Kemp, Handman *et al.*, 1998). تشير الدراسات المرجعية إلى وجود 3 أشكال لهذا البروتين عند اللشمانيا وهي ذات أوزان جزيئية 80، 90، 50 كيلو دالتون ويعدّ الشكل M2 ذو 50 كيلو دالتون من أبرز المستضدات الاستمناعية للطور المخمج Promastigote لدى اللشمانيا الأمازونية (Champs and McMahon-Pratt, 1988).

تنتمي بروتينات PSA لعائلة البروتينات السكرية، وتوجد بشكل رئيس في الشكل المسوط Promastigote (Myung, Beetham *et al.*, 2002) (Beetham, Donelson *et al.*, 2003)، ومن الناحية البنوية يتألف هذا البروتين من عدة مجالات: المجال المركزي LRR (Leucine rich repeats) المؤلف من تكرارات للحمض الأميني اللوسين، ويجاور هذا المجال من النهاية الأمينية المجال LRR-like، وبحسب وجود المجال GPI-anchor في النهاية الكربوكسيلية فإن البروتين إما أن يكون مثبتاً على الغشاء الخلوي برابطة من النمط GPI (Glycosylphosphatidylinositol)، أو يكون

مفرزاً إلى الوسط خارج الخلية في حال عدم وجود هذا المجال في بنية البروتين (Kajava 1998) (Fankhauser and Maser 2005).

أمّا على المستوى الجيني فقد تبين حديثاً أن عدد الجينات المرزمة لهذه البروتينات يختلف اختلافاً كبيراً باختلاف أنواع طفيلي اللشمانيا، وقبل عام 2008 لم يكن عدد هذه الجينات في النوع *L. major* معروفاً، وتنبأت دراسة حاسوبية *In Silico* أجريت بمقارنة تسلسلات بروتينات PSA المرجعية بالجينوم المسلسل لطفيلي *L. major* بوجود 32 جيناً افتراضية موزعة بشكل مجموعات على الصبغيات 5، 9، 12، 21، 31 (Devault and Banuls 2008) (Ivens, Peacock *et al.*, 2005).

وفي ضوء الاختلافات الكبيرة بين الدراسات البروتينية التي تظهر وجود ثلاثة أشكال لبروتينات عائلة PSA، والدراسات الحاسوبية التي تفترض وجود عائلة جينية كبيرة تحوي 32 جيناً من جينات PSA ونظراً إلى أهمية هذه البروتينات في دورة حياة الطفيلي هدفت هذه الدراسة إلى التحري تجريبياً عن عدد جينات PSA المفرزة ضمن جينوم سلالة من طفيلي *L. major* معزولة محلياً؛ وذلك باستعمال تقنية PCR بعد تصميم مرشحات نوعية خاصة بكل جين.

مواد البحث وطرقه

الحصول على العينات واستنابت الطفيلي:

عُزلت الطفيليات من الآفة مباشرة لمرضى في مشفى الأمراض الجلدية بجامعة دمشق مصابين باللشمانيا الجلدية، ثم استنبتت هذه الطفيليات على الوسط نصف الصلب N.N.N. المكون من أغار مضاف إليه دم أرنب منزوع الفيبرين وصادات البنسلين penicillin والستريبتومايسين streptomycin (Cytogen) بتركيز نهائي قدره 100 وحدة دولية/مل. حُضنت الطفيليات بدرجة حرارة 26 مئوية، جرت متابعة نمو الطفيلي في الزرع بفحص أنابيب الزرع بشكل مباشر بالمجهر المقلوب (Optika)، وعد الطفيليات باستخدام عدادة نيوباور. وعُدت الزروع سلبية في حال عدم ظهور الطفيلي في وسط الزرع بعد مرور أسبوعين على الزراعة. ونقلت الطفيليات في العينات الإيجابية إلى الوسط السائل RPMI 1640 (Sigma) المدعم بـ 10% من المصل البقري الجيني منزوع المتممة (Cytogen).

استخلاص DNA الكلي:

يُثقل 1 مل من وسط الزرع السائل الحاوي 10^6 طفيلي باستخدام مثقلة مبردة Hettich Universal 320R بسرعة دوران 4000 دورة/الدقيقة، في درجة حرارة +4 م°، مدة 10 دقائق. يزال السائل الطافي وتغسل الرسابة الطفيلية مرتين بدائرة PBS بدرجة +4 م° للتخلص من بقايا وسط الزرع والمصل. يُستخلص DNA من خلايا الطفيلي

باستخدام أعمدة كروماتوغرافيا مكروية تحوي على غشاء من السيليكا رابط DNA (شركة MN الألمانية). وقد اتبعت الخطوات العامة للاستخلاص المنصوح بها من قبل الشركة المصنعة مع بعض التعديلات، حيث حضنت الطفيليات في دارئة Tris تحوي البروتيناز K مدة عشر دقائق في الدرجة 56 م°، وأضيف دارئة الحل الحاوية على 0.1% من SDS، وحُضن المزيج في الدرجة 70 م° مدة عشر دقائق، ثم أُضيف 200µl من الكحول الإيثيلي، ومُرر المزيج على أعمدة الكروماتوغرافيا التي تتميز بألفة عالية لـ DNA في وسط كحولي. وثقلت هذه الأعمدة مدة 1 دقيقة بسرعة دوران 8000 دورة/الدقيقة، وغسلت بدارئة تحوي الإيتانول للتخلص من الشوائب وخاصة البروتينات. وشطف DNA المرتبط على الغشاء بالماء المقطر الدافئ، وجُمع في أنابيب إندورف نظيفة، وحُفظ في الدرجة -20 م°.

الرحلان الكهربائي التحليلي:

تم التأكد من نتائج استقراد DNA الكلي بتقنية الرحلان الكهربائي الأفقي على هلامه أغاروز (Roth) بتركيز 0.8% في دارئة الرحلان TBE. وصُبَّت الهلامه في قوالب خاصة بجهاز الرحلان (PeQlab)، وأضيف الاتيديوم برومايد بتركيز نهائي قدره 0.5µg/ml. مزجت العينات بدارئة تحميل العينة Loading Buffer بتركيز 6X (Roth)، ورحلت العينات وواسمات الأطوال المعيارية 100bp (Promega) بتطبيق تيار كهربائي قدره 100 فولت مدة 30 دقيقة. وكشفت عصائب DNA باستخدام منبع أشعة فوق بنفسجية قصيرة الموجة (Cleaver)، ووثقت الهلامه باستخدام جهاز موثق الهلام Gel documentation (Cleaver) مزود بآلة تصوير رقمية ذات مرشحة خاصة بالأشعة فوق البنفسجية.

قياس تركيز DNA باستخدام مقياس الطيف الضوئي:

قيس تركيز DNA المستقراد لتحديد تركيزه ودرجة نقاوته بقياس الامتصاصية على طول الموجتين 260nm و 280nm في مجال الطيف فوق البنفسجي لمقياس الطيف الضوئي T80 Spectrophotometer. استعمل الماء المقطر لضبط قيمة الصفر للجهاز، وقرئت قيم الامتصاص لتحديد تركيز DNA في العينات المختلفة، وحُسبت النسبة A260/A280 لتحديد نقاوة العينات.

الدراسة البيولوجية الحاسوبية Bioinformatics:

أجريت دراسة حاسوبية *in silico* لجينوم *L. major* باستخدام عدة برامج بيولوجية حاسوبية Bioinformatics softwares هدفت إلى الحصول على تسلسلات جينات PSA من قاعدتي بيانات Databases على الإنترنت، ومن ثم دُرست بهدف تحديد تسلسل الجينات المرزمة لبروتينات PSA المتنبئة غشائياً؛ وذلك بتقصي وجود التسلسل المميز

للرابطة GPI anchor أو غيابه باستخدام البرنامج (gpi.unibe)، قورنت تسلسلات هذه الجينات تراكيباً باستعمال أحد تطبيقات برنامج (invetogene Vector NTI Advance) (11) المعروف بالتراكب المتعدد Multiple Alignment لتحديد التسلسلات المتغيرة فيما بينها. ضمن هذه التسلسلات المتغيرة صممت يدوياً مرئسات نوعية خاصة بكل جين، ومن ثم تم التأكد من نوعية هذه المرئسات باستعمال برنامج المقارنة الحاسوبية BLAST.

التفاعل السلسلي للبوليميراز PCR:

أجري نوعان من تفاعلات PCR:

الأول هدف إلى تحديد نوع الطفيلي باستخدام المرئسات الموضحة في الجدول (1) و DNA مستخلص من سلالة مرجعية *L. major* مأخوذة من بنك مرجعي مونتيليه-فرنسا، في حين هدف التفاعل الثاني إلى التحري عن وجود جينات *PSA* المرمزة للبروتينات المنتبثة العشائية في جينوم طفيلي *L. major*. أنجزت تفاعلات PCR باستخدام جهاز مدور حراري (PeQlab) Thermocycler وطقم (Promega) Go Taq DNA Polymerase. اصطنعت المرئسات Primers المختلفة من قبل شركة Alpha DNA الكندية.

الجدول (1) مرئسات تنميط للشمانيا

CSB1Xr	atTTTTcgcgattttcgagaacg
CSB2XF	cgagtagcagaactcccgttca

حُضِر حجم نهائي قدره 25µl لكل تفاعل PCR يحوي على دائرة خاصة بالأنزيم بتركيز 1X و 1.5mM من MgCl₂ و 0.2mM من كل نكليوتيد ثلاثي الفوسفات منزوع الأكسجين dNTPs (Roth) و 25pmol من كل مرئسة و 1.25U من Taq بوليميراز (Promega). وُبرمج جهاز PCR لينجز 35 دورة تتألف كل منها من ثلاث مراحل مدة كل منها 30 ثانية. أُجري التسخين في المرحلة الأولى إلى الدرجة 95 م°، وفي الثانية إلى الدرجة 56 م° لمرئسات التنميط و 60 م° لمرئسات التحري عن الجينات، وفي الثالثة إلى الدرجة 72 م°. ولتحليل نواتج تفاعل PCR رحلت العينات على هلامة أغاروز بتركيز 1.5% بتقنية الرحلان الكهربائي التحليلي على الهلام من الأغاروز Gel electrophoresis.

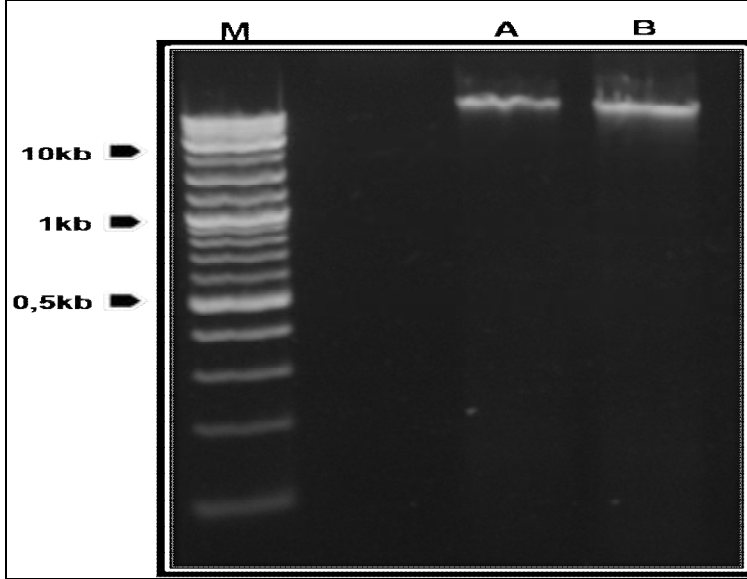
النتائج

استنبتات الطفيليات:

استنبتت الطفيليات وفقاً للطريقة المذكورة في مواد البحث وطرائقه، وتمت متابعة نموها بالفحص المجهرى المباشر، ونقلت الطفيليات إلى الوسط السائل بتركيز 10⁵ طفيلي/مل، وعند وصول عدد الطفيليات إلى 10⁶ طفيلي/مل، أخذ 1 مل من وسط الزرع لاستقراد DNA.

استفراء DNA الكلي:

جمعت الطفيليات من وسط الزرع بالتنقيط بسرعة دوران منخفضة كما هو مذكور في الطرائق. غسلت الرسابة مرتين بدارئة PBS المبردة (+4 م) للتخلص من بقايا وسط الزرع والمصل. استخلص DNA من الرسابة الطفيلية باستخدام طقم خاص باستخلاص DNA من الأنسجة الحيوانية مع بعض التعديلات على خطوات العمل، ذكرت في الطرائق، لضمان استفراء DNA من طفيليات اللشمانيا بشكل أمثل. تم التأكد من جودة DNA المستفرد من العينات المختلفة بالرحلان الكهربائي الأفقي على هلامة أغاروز بتركيز 0.8%. بتعريض الهلامة لمنبع للأشعة فوق البنفسجية تبين وجود عصابة رئيسة تمثل DNA الجينومي (الشكل 1). تظهر نتائج الرحلان جودة استفراء DNA حيث يظهر على الهلامة بشكل عصابة واحدة؛ مما يشير إلى عدم تدركه في أثناء الاستفراء.



الشكل (1) الرحلان الكهربائي لـ DNA المستخلص من سلالة اللشمانيا المدروسة.

العمود M: واسمات أطوال معيارية DNA Ladder، العمود A: DNA المستفرد من السلالة المرجعية
العمود B: DNA المستفرد من عينة من اللشمانيا، تشير العصابات في العمودين A و B إلى DNA الجينومي جيد التحضير.

قياس تركيز DNA:

قيس تركيز DNA المستفرد من العينات المختلفة، وحددت درجة نقاوة المحلول، فتبين أن تركيز DNA في العينات جميعها يراوح بين 100ng/μl و 150ng/μl، وراوحت النسبة A260/A280 بين القيمتين 1.8 و 2؛ مما يشير إلى نقاوة عالية لعينات DNA المستفردة.

الدراسة البيولوجية الحاسوبية Bioinformatics:

اعتمدت هذه الدراسة لجينوم *L. major* على البرامج البيولوجية الحاسوبية المتخصصة. تم الحصول على تسلسلات جينات *PSA* جميعها لدى النوع *L. major* المنشورة عالمياً ابتداءً من الموقعين العالميين (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) و (<http://www.genedb.org>)، وبيّن الجدول (2) الرمز العالمي لهذه الجينات بالاعتماد على البرنامج الحاسوبي القادر على تحديد التسلسلات المميزة للرابطة GPI anchor المتوافر على الموقع (<http://gpi.unibe.ch>) جرى التمييز بين الجينات المرزمة لبروتينات *PSA* المثبتة على الغشاء وتلك المفردة، بيّن الجدول (2) هذين النمطين من الجينات.

الجدول (2) جينات *PSA* المعروفة لدى النوع *L. major*

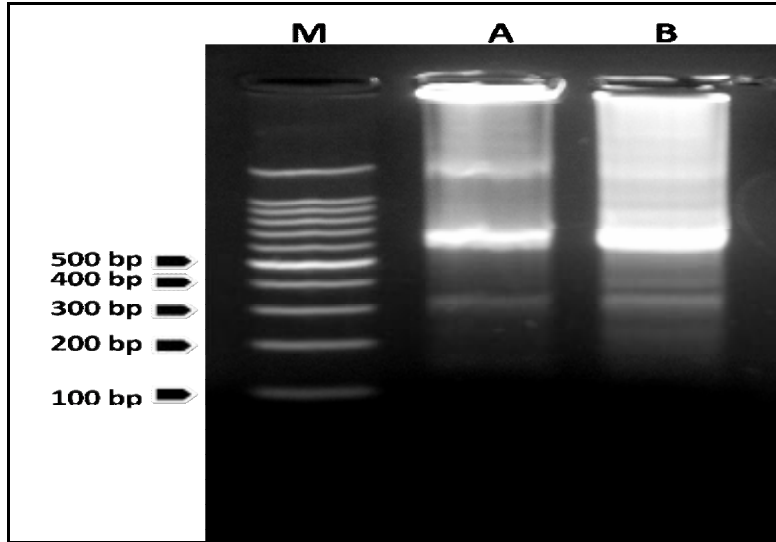
اسم الجين العالمي	الرمز في قواعد البيانات			البروتين		رقم الكروموسوم
	GeneID	NCBI Reference	UniProtKB/TrEMBL Reference	غشائي	مفرز	
LMJF_05_0900	5648952	XM_001687515.1	Q4QJB2	X		C5
LMJF_05_1215	5648944	XM_003721727.1	E9ACQ0	X		C5
LMJF_09_0580	5649487	XM_001681180.1	Q4QHW6	X		C9
LMJF_21_1170	5651676	XM_001683017.1	Q4QC79		X	C21
LMJF_31_1450	5654076	XM_001685079.1	Q4Q6B7		X	C31
LMJF_31_1460	5654077	XM_001685080.1	Q4Q6B6		X	C31
LMJF_31_1445	5654037	XM_003722326.1	E9AEF4	X		C31
LMJF_31_1440	5654075	XM_001685078.2	Q4Q6B8	X		C31
LMJF_12_0730	5649997	XM_001681660.1	Q4QGI6	X		C12
LMJF_12_0740	5649995	XM_001681658.1	Q4QGI8	X		C12
LMJF_12_0755	5649983	XM_001681646.1	Q4QGK0	X		C12
LMJF_12_0760	5649984	XM_001681647.2	Q4QGJ9	X		C12
LMJF_12_0765	5649987	XM_001681650.1	Q4QGJ6	X		C12
LMJF_12_0780	5649986	XM_001681649.1	Q4QGJ7	X		C12
LMJF_12_0810	5649989	XM_001681652.1	Q4QGJ4	X		C12
LMJF_12_0830	5649991	XM_001681654.1	"Q4QGJ2	X		C12
LMJF_12_0850	5649993	XM_001681656.1	Q4QGJ0	X		C12
LMJF_12_0860	5649962	XM_001681625.1	Q4QGM1		X	C12
LMJF_12_0870	5649968	XM_001681631.1	Q4QGL5	X		C12
LMJF_12_0890	5649969	XM_001681632.1	Q4QGL4	X		C12
LMJF_12_0910	5649971	XM_001681634.1	Q4QGL2		X	C12
LMJF_12_0920	5649975	XM_001681638.1	Q4QGK8		X	C12
LMJF_12_0940	5649977	XM_001681640.1	Q4QGK6	X		C12
LMJF_12_0960	5649979	XM_001681642.1	Q4QGK4	X		C12
LMJF_12_0980	5649964	XM_001681627.1	Q2533K1	X		C12
LMJF_12_0990	5649965	XM_001681628.1	Q4QGL8	X		C12
LMJF_12_1000	5649966	XM_001681629.1	Q4QGK6	X		C12
LMJF_12_1020	5649999	XM_001681662.1	Q4QGI4		X	C12
LMJF_12_1040	5650001	XM_001681664.2	Q4QGI2		X	C12
LMJF_12_1060	5649981	XM_001681644.1	Q4QGK2		X	C12
LMJF_12_1070	5649982	XM_001681645.1	Q4QGK1	X		C12
LMJF_12_1090	5650003	XM_001681666.2	Q4QGI0		X	C12

بمقارنة التسلسلات المرزمة للبروتينات المثبتة على الغشاء تراكيباً alignment باستعمال البرنامج الحاسوبي المتخصص (Invitrogen Vector NTI Advance 11)، كما هو مذكور في الطرائق حددت نسبة التشابه بين هذه الجينات التي بلغت 86% كما عيّنت مواضع أكثر التسلسلات تماثلاً وأكثرها تغيّراً.

بالاعتماد على الدراسات الحاسوبية التي ذكرت سابقاً اختيرت المناطق المتغيرة فيما بينها لهذه الجينات لتصميم مرئسات نوعية خاصة بكل جين، ما عدا ثلاثة جينات كانت نسبة التشابه فيما بينها 99% فصُمّ شفع واحد من المرئسات لهم. تم التأكد من نوعية هذه المرئسات حاسوبياً بمقارنتها بقواعد البيانات الحاوية على التسلسلات الجينية المعروفة للكائنات الحية جميعها، باستخدام برنامج BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) المتوافر على الموقع الآتي: (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

تحديد نوع طفيلي اللشمانيا بواسطة تفاعل PCR:

استخدمت تقنية PCR لتحديد نوع الطفيلي المسبب لداء اللشمانيا الجلدي، علماً أن هذا الداء يسببه نوعان من طفيلي اللشمانيا هما *L. tropica* و *L. major*، ولذلك اختير شفع من المرئسات الخاصة بتسلسلات محددة ومحفوظة من DNA الكينيتوبلاستي في كلا النوعين تحصر بينها تسلسلاً متغياً في طوله بحسب النوع (CSB1XR/CSB2XF). ويتضخيم DNA باستخدام هاتين المرئستين (الجدول 1)، نحصل على شدة بطول نحو 600 شفع من الأسس في النوع *L. major* ونحو 800 شفع من الأسس في النوع *L. tropica*. استخدمنا في هذه الدراسة تفاعل PCR على DNA المستفرد من العزلة المدروسة فضلاً عن DNA المستفرد من عزلة مرجعية من النوع *L. major* (الشكل 2). أظهرت السلالة المدروسة بعد عملية الرحلان الكهربائي على الهلام عصابة بطول 600 شفع من الأسس، وبمقارنة طول هذه الشدة بطول الشدة المميزة للسلالة المرجعية، نستنتج أن السلالة المنمطة تنتمي لنوع اللشمانيا الكبرى *L. major*.

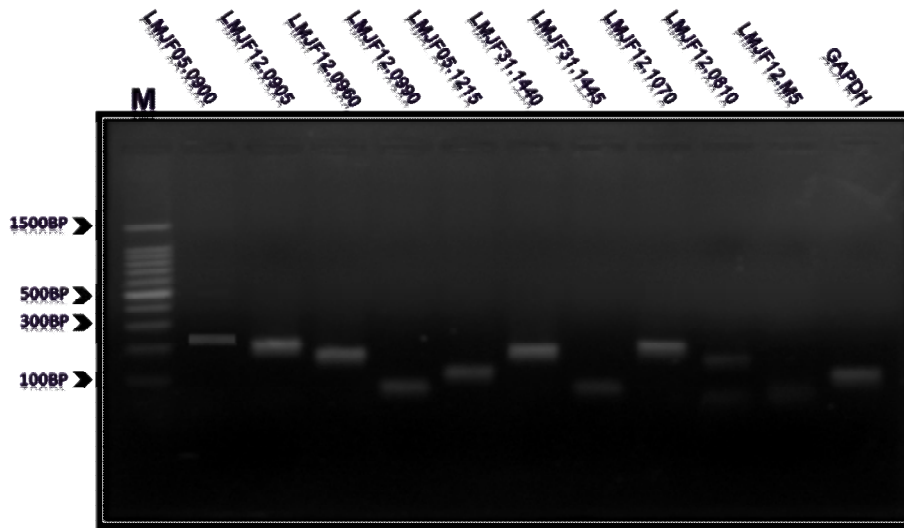
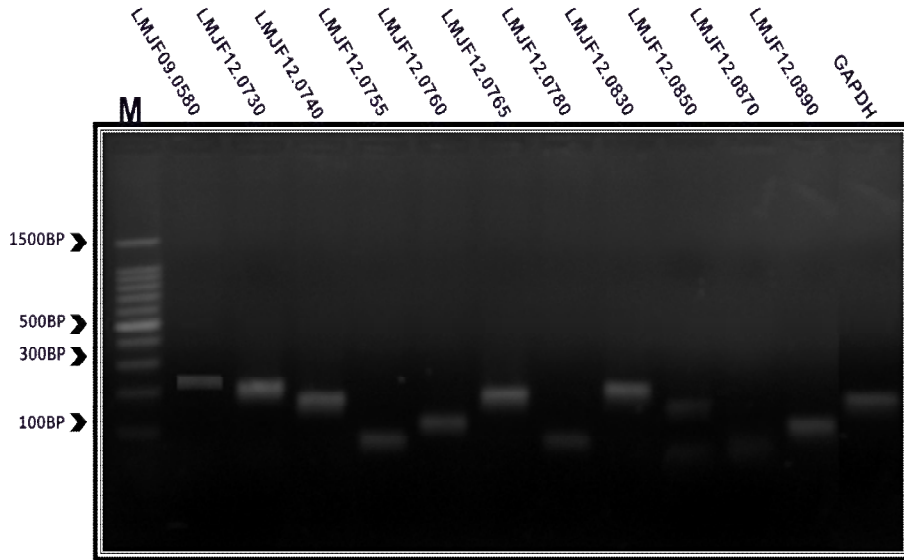


الشكل (2) الرحلان الكهربائي لنواتج تنميط DNA المستفرد للسلالة المدروسة باستخدام تفاعل PCR.

العمود M، واسمات أطوال معيارية DNA Ladder. العمود A، ناتج تنميط للسلالة المرجعية *L. major* باستخدام المرئسات النوعية. العمود B، ناتج تنميط للسلالة المدروسة باستخدام المرئسات النوعية، ومن الملاحظ وجود عصابة بطول 600 شفع من الأسس وبمقارنة طول هذه العصابة بأطوال العصابة المميزة للسلالة المرجعية، نستنتج أن السلالة المنمطة تنتمي لنوع اللشمانيا الكبرى *L. major*.

التحري تجريبياً عن وجود جينات *PSA* المرمزة للبروتينات المثبتة على الغشاء في جينوم النوع *L. major*:

جرى التحري تجريبياً عن الوجود الفعلي لجينات *PSA* المرمزة للبروتينات المثبتة على الغشاء بواسطة تفاعل PCR، باستعمال أشفاغ المرئسات المصممة بحيث تكون نوعية لكل جين و DNA الجينومي المستفرد من طفيلي *L. major*. رحلت نواتج تفاعل PCR على هلامة الأغاروز 1.5% وبيّنت صورة الهلامة الموضحة في الشكل (3) وجود عصابة واحدة نوعية لكل جين من الجينات المدروسة، بالطول المفترض بين 300-80 bp، ومن تمّ وجود جينات *PSA* كلها المثبتة الغشائية التي تمّ التنبؤ بوجودها في دراسات حاسوبية سابقة، بشكل فعلي في جينوم اللشمانيا *L. major*.



الشكل (3) الرحلان الكهربائي لنواتج تفاعل PCR للتحري عن وجود جينات PSA المرزمة للبروتينات المتثبته الغشائية في DNA المستفرد للسلالة المدروسة *L.majior*. العمود M، واسمات أطوال معيارية DNA Ladder، يلاحظ ظهور عصابات مختلفة الأطوال تشير إلى وجود جينات الـ PSA المرزمة للبروتينات المتثبته الغشائية ضمن DNA سلالة *L.majior* المدروسة.

المناقشة

استطعنا، في هذا البحث، أن نعزل ونستنتج وننمط سلالة من *L. major* من أحد المرضى السوريين، ومن ثم أن نثبت الوجود الفعلي لمجموعة الجينات المرمرزة للبروتينات المنتبئة على الغشاء المنتبئة لعائلة PSA في هذه السلالة المعزولة محلياً، بعدما كان وجودها يقوم على الدراسات المقارنة الحاسوبية بين التسلسل البروتيني لأحد بروتينات PSA مع التسلسل الكامل لجينوم هذا النوع من الطفيلي.

أشارت الدراسات التي سبقت سلسلة جينوم اللشمانيا الكبرى *L. major*، إلى وجود ثلاثة أشكال بروتينية من PSA تنتمي لعائلة gp46/M2 حددت أوزانها الجزيئية بـ 50KDa و 80KDa و 96KDa (Champsy and McMahon-Pratt, 1988)، وتبين أن هذه البروتينات متشابهة -إلى حد بعيد- من حيث التسلسل مع اختلاف واضح في النهاية الأمينية. كما تبين أن هذه البروتينات ترمز من قبل عدة جينات غير معروفة بشكل دقيق (Kajava 1998) (Fankhauser and Maser 2005).

أما الدراسات الحديثة التي جرت بعد سلسلة عدد من جينومات الأنواع المختلفة لطفيلي اللشمانيا ومنها جينوم *L. major*، فقد استطاعت أن ترسم صورة افتراضية لما هي عليه جينات PSA إذ توصلت إحدى الدراسات بمقارنة تسلسل بعض بروتينات PSA المنشورة في الدراسات المرجعية بتسلسل جينوم *L. major* بواسطة برنامج BLAST إلى التنبؤ بالعدد الكلي الافتراضي لجينات PSA. وبنتيجة هذه الدراسة *in silico* تبين أن PSA عبارة عن عائلة جينية مكونة من 32 جيناً منها 22 جيناً مرمرزة للبروتينات المنتبئة على الغشاء والباقي مرمرز للبروتينات المفترزة (Devault and Banuls, 2008) (Ivens, Peacock *et al.*, 2005)، لكن لم يتم التأكد من الوجود الفعلي لهذه الجينات في الجينوم. استطعنا في هذه الدراسة من خلال اعتماد منهج تجريبي يقوم على الكشف المخبري بتقانة PCR وباستخدام مرئسات نوعية لكل تسلسل من تسلسلات جينات PSA المرمرزة للبروتينات المنتبئة غشائياً أن نثبت وجود كل جين من هذه الجينات بشكل فعلي في جينوم سلالة معزولة محلياً من *L. major*.

تعدّ PSA عائلة من البروتينات تحوي بشكل رئيسي تكرارات من تسلسلات LRR وتكون هذه البروتينات إماً منتبئة على الغشاء أو مفترزة، وتقتصر هذه الخصائص إكمانية اشتراك بروتينات هذه العائلة بالتأثر بين المضيف والطفيلي. إن التنوع الموجود بين أفراد هذه العائلة الذي يشمل بشكل أساسي المجال LRR يمكن أن يدعم هذا الدور، ولا يقتصر هذا التنوع على الاختلاف في تسلسل المجال LRR فقط بل أيضاً بعدد التكرارات لهذا المجال في كل بروتين الذي يراوح بين 2-25 تكراراً، يمكن أن تؤثر بشكل مباشر في شكل البروتين والبنية ثلاثية الأبعاد الخاصة به، ومن ثمّ في خصائصه الارتباطية مع

خلايا المضيف، ويفسر هذا التنوع الاختلافات الكبيرة في أطوال الجينات المرزمة لهذه البروتينات (الجدول 2).

يكن أيضاً عاملان آخران من عوامل تنوع PSA خارج المجال LRR يتعلق الأول بالمجال The/Ser الذي يتغير طوله تغيراً كبيراً حتى أنه يمكن أن يغيب تماماً في بعض بروتينات PSA، أما العامل الثاني فهو إمكانية تعرض PSA لتغيرات ما بعد الترجمة التي يعدُّ ربط السكاكر من أهم هذه التغيرات، وحتى الآن لا تزال مواقع ربط السكاكر وطبيعة الرابطة بين الحموض الأمينية والسكاكر غير معروفة لدى هذا البروتين.

وجود محددات الارتباط الغشائية، التي تنتج في معظمها عن وجود تسلسلات تجعل البروتين قابلاً للارتباط على الغشاء الخلوي برابطة من نمط GPI، يحدد مصير بروتينات PSA إماً للإفراز أو للارتباط على سطح الطفيلي. اقترحت الدراسة *in silico* أن معظم بروتينات PSA تنتج على الغشاء والقليل منها مفرز، كما أثبتت هذه الدراسات أن البروتينات المفروزة تتشابه - إلى حد كبير - بين الأنواع الثلاثة للشمانيا مسلسلة الجينوم *L. major* و *L. braziliense* و *L. infantum* (Devault and Banuls, 2008).

نظراً إلى أهمية بروتينات PSA في حياة طفيلي اللشمانيا (Beetham, Donelson *et al.*, 2003) (Lincoln, Ozaki *et al.*, 2004) وإخماجيته (Ben Achour, Chenik *et al.*, 2002) اهتمت كثير من الدراسات بوظيفة هذه البروتينات، في حين تعدُّ الدراسات التي اهتمت بالجينات التي ترمز هذه البروتينات قليلة جداً، كان آخرها دراسة *in silico* التي أشارت إلى إمكانية وجود 22 جيناً مرزمة لبروتينات مثبتة غشائياً، وقد استطعنا في دراستنا هذه إثبات وجود 22 ناتجاً للـ PCR باستخدام المرئسات النوعية لمورثات PSA؛ مما يوحى بالوجود الفعلي لهذه المورثات في جينوم *L. major* وهو الأمر الذي يستوجب لاحقاً إجراء تفاعل سلسلة الـ DNA للتأكد من هذه النتائج ومتابعة الدراسة لمعرفة: هل تُعبّر بعض هذه الجينات أو جميعها عن نفسها؟ ولمعرفة كيفية هذا التعبير؟

REFERENCE

- Alexander, J. and D. G. Russell (1992). "The interaction of *Leishmania* species with macrophages." *Adv. Parasitol* 31: 175-254.
- Beetham, J. K., J. E. Donelson, et al. (2003). "Surface glycoprotein PSA (GP46) expression during short- and long-term culture of *Leishmania chagasi*." *Mol. Biochem. Parasitol.* 131(2): 109-117.
- Ben Achour, Y., M. Chenik, et al. (2002). "Identification of a disulfide isomerase protein of *Leishmania major* as a putative virulence factor." *Infect. Immun.* 70(7): 3576-3585.
- Beverly, S. M. and S. J. Turco (1998). "Lipophosphoglycan (LPG) and the identification of virulence genes in the protozoan parasite *Leishmania*." *Trends. Microbiol.* 6(1): 35-40.
- Champsi, J. and D. McMahon-Pratt (1988). "Membrane glycoprotein M-2 protects against *Leishmania amazonensis* infection." *Infect. Immun.* 56(12): 3272-3279.
- Devault, A. and A. L. Banuls (2008). "The promastigote surface antigen gene family of the *Leishmania* parasite: differential evolution by positive selection and recombination." *BMC. Evol. Biol.* 8: 292.
- Fankhauser, N. and P. Maser (2005). "Identification of GPI anchor attachment signals by a Kohonen self-organizing map." *Bioinformatics* 21(9): 1846-1852.
- Franke, E. D., P. B. McGreevy, et al. (1985). "Growth cycle-dependent generation of complement-resistant *Leishmania* promastigotes." *J. Immunol.* 134(4): 2713-2718.
- Ivens, A. C., C. S. Peacock, et al. (2005). "The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*." *Science* 309(5733): 436-442.
- Joshi, P. B., D. L. Sacks, et al. (1998). "Targeted gene deletion of *Leishmania major* genes encoding developmental stage-specific leishmanolysin (GP63)." *Mol. Microbiol.* 27(3): 519-530.
- Kajava, A. V. (1998). "Structural diversity of leucine-rich repeat proteins." *J. Mol. Biol.* 277(3): 519-527.
- Kamhawi, S., M. Ramalho-Ortigao et al. (2004). "A role for insect galectins in parasite survival." *Cell* 119(3): 329-341.
- Kemp, M., E. Handman, et al. (1998). "The *Leishmania* promastigote surface antigen-2 (PSA-2) is specifically recognised by Th1 cells in humans with naturally acquired immunity to *L. major*." *FEMS. Immunol. Med. Microbiol.* 20(3): 209-218.
- Killick-Kendrick, R. (1999). "The biology and control of phlebotomine sand flies." *Clin. Dermatol.* 17(3): 279-289.
- Killick-Kendrick, R., D. H. Molyneux, et al. (1974). "*Leishmania* in phlebotomid sandflies. I. Modifications of the flagellum associated with attachment to the mid-gut and oesophageal valve of the sandfly." *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 187(1089): 409-419.

- Lincoln, L. M., M. Ozaki, et al. (2004). "Genetic complementation of Leishmania deficient in PSA (GP46) restores their resistance to lysis by complement." *Mol. Biochem. Parasitol.* 137(1): 185-189.
- Myung, K. S., J. K. Beetham, et al. (2002). "Comparison of the post-transcriptional regulation of the mRNAs for the surface proteins PSA (GP46) and MSP (GP63) of *Leishmania chagasi*." *J. Biol. Chem.* 277(19): 16489-16497.
- Pimenta, P. F., S. J. Turco, et al. (1992). "Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut." *Science* 256(5065): 1812-1815.
- Rittig, M. G. and C. Bogdan (2000). "Leishmania-host-cell interaction: complexities and alternative views." *Parasitol. Today.* 16(7): 292-297.
- Saraiva, E. M., P. F. Pimenta, et al. (1995). "Changes in lipophosphoglycan and gene expression associated with the development of *Leishmania major* in *Phlebotomus papatasi*." *Parasitology* 111 (Pt 3): 275-287.
- Schlein, Y. (1993). "Leishmania and Sandflies: interactions in the life cycle and transmission." *Parasitol. Today.* 9(7): 255-258.
- Singh, V. and D. D. Singh (2008). "Leishmania major: genome analysis for identification of putative adhesin-like and other surface proteins." *Exp. Parasitol.* 118(1): 139-145.