

## تحضير جين *LMJF-31-1450* المرمزة لبروتين PSA الليشمانيا الكبرى بشكل لقاح DNA

عائشة الجعصي\* د. سحر الخطيب\*\* د. شادي سكريّة\*\*\*

### الملخص

يُعد داء الليشمانيات مشكلة صحة عامة في كثيرٍ من البلدان حول العالم، وعلى الرّغم من أنّ إنتاج الأدوية الجديدة يبعث التفاؤل، إلا أنّ تطوير لقاحات آمنة وفعالة لا يزال الغاية المنشودة، لاسيما في ضوء نشوء مقاومة لهذه الأدوية، ويُعدّ تطوير لقاح الحمض النوويّ أو لقاح DNA إحدى الإستراتيجيات الرئيسيّة للسيطرة على الداء. وفي هذا الصدد قيّمت مستضدات مختلفة أُنتجت بوصفها جزءًا من لقاحات الحمض النوويّ أو بشكل لقاحات مؤشبة ضد داء الليشمانيات. قمنا في هذا العمل بتحضير بنى بلاسميديّة، تعمل في حقيقيّات النوى، تحتوي على الجين المرمّزة لبروتين (*L. major* PSA) بشكله المفرز مفردًا أو مدمجًا مع البروتين المتفلور الأخضر (sGFP) في محاولة لتحسين طيّ بروتين (PSA) والحفاظ على ثباتيّته، وسهولة تتبع إنتاجه. ولقد نجحنا في التأكد من صحة البنى البلاسميديّة

\* طالبة ماجستير، قسم علم الحياة الحيوانيّة، كليّة العلوم، جامعة دمشق.

\*\* أستاذ مشرف مشارك، قسم علم الحياة الحيوانيّة، كليّة العلوم، جامعة دمشق.

\*\*\* أستاذ مشرف، قسم علم الحياة الحيوانيّة، كليّة العلوم جامعة دمشق.

المنتجة، والتحقق من التعبير البروتيني للبنية المدمجة ضمن الخلايا (HEK-293T) باستخدام التصيم المناعي، وبذلك نكون قد حصلنا على مادة أولية للقاح (DNA) يمكن اختبار دورها الوقائي في النماذج الحيوانية.

الكلمات المفتاحية: التسيل الجيني، لقاح DNA، الليشمانيا الكبرى، PSA، sGFP.

## Preparation of the *LMJF-31-1450* gene that encoding PSA protein of *Leishmania major* as DNA vaccine

A. Al-Jaghasi\*    Dr. S. Al-Khateeb\*\*    Dr. Ch. Soukkarieh\*\*\*

### Abstract

Leishmaniasis remains a major health problem in many countries worldwide. Although the production of new drugs is promising, the development of safe and effective vaccines remains the best hope, especially given the emergence of drug resistance. One of the main strategies to control leishmaniasis is to develop a DNA vaccine. In this regard, various antigens have been evaluated as parts of potential DNA or recombinant vaccines against leishmaniasis. Here, we expressed a recombinant eukaryotic plasmid containing gene that expressed of PSA protein in its secreted form from *Leishmania major* promastigotes and PSA protein fusion with superfolder green fluorescent protein (sGFP) for enhancing PSA folding and improve its stability In addition to using sGFP as a marker for the expression. We succeeded in confirming the validity of the produced plasmid structures and verified the production of the fusion protein in HEK-293T cells using Western blotting. Thus, we have obtained the basic material for a DNA vaccine whose protective role can be tested in animal models.

**Key words** Cloning, DNA vaccine, *Leishmania major*, PSA, sGFP

---

\* MSC., Student, Department of Animal Biology, Faculty of Sciences, Damascus University.

\*\* Associated Supervisor, Department of Animal Biology, Faculty of Sciences, Damascus University, Syria.

\*\*\* Supervisor, Department of Animal Biology, Faculty of Sciences, Damascus University, Syria.

## المقدمة:

يُعد داء الليشمانيات من الأمراض الطفيلية المهملة المنتشر في 97 دولة من دول العالم مسبباً مشكلة صحة عامة في هذه الدول. يسبب الداء طفيلي وحيد خلية من جنس الليشمانيا، ويتمثل بشكلين سريريين رئيسيين هما الداء الجلدي والداء الحشوي (Alvar et al., 2012). تعدّ سورية واحدة من أكثر البلدان الموبوءة بالداء الجلدي، الذي يسببه نوعان من طفيليات الليشمانيا هما: الليشمانيا المدارية (*L. tropica*) والليشمانيا الكبرى (*L. major*) (Reithinger et al., 2007; Haddad et al., 2015). يمر طفيلي الليشمانيا في أثناء دورة حياته بطورين، مسوط promastigote يوجد في معي الحشرة الناقلة، وداخل خلوي عديم السوط amastigote يوجد ضمن بالعات المضيف الفقاري (Reithinger et al., 2007). يعتمد الشفاء من داء الليشمانيات على المناعة خلوية الواسطة، وذلك بتوليد استجابة مناعية من النمط (Th1) تترافق بإنتاج مستويات عالية من (IFN- $\gamma$ ) وتفعيل البالعات للتخلص من الطفيليات الداخلة خلوية، يعرف هذا النمط من الاستجابة المناعية بالنمط المفيد (Scott, 1991; Nylen and Gautam, 2010). يعدّ العلاج الكيميائي الوسيلة الأكثر شيوعاً لتدبير الداء في ظل غياب لقاح مرخص وفعال (de Vries et al., 2015). أثبتت التجارب على النماذج الحيوانية إمكانية ترشيح عدد من جينات وبروتينات طفيلي الليشمانيا بوصفها لقاحات لقدرتها على تحقيق مستويات مختلفة من الحماية ضد الإصابة بالداء، وذلك عند تمنيع النماذج الحيوانية بها (Sundar and Singh, 2014). أسهمت جامعة دمشق في السنوات الماضية بإنتاج عدد من المستضدات المؤشبة بشكل مفرد، أو مدمج، أو بشكل لقاحات DNA بالاعتماد على مجموعة من جينات الطفيلي الهامة منها: (Ali et al., 2016)، و LACK (Hammoudeh, 2015)، و SOD (شفيق، 2018)، و KPM11 (مرعي، 2014). واختبرت قدرة بعض هذه اللقاحات التجريبية على توليد استجابة مناعية في

حيوانات التجربة. عمدنا في دراستنا إلى استهداف إحدى جينات عائلة (PSA) التي رشحت الدراسات المرجعية بعض أفرادها لكي تكون لقاحات واعدة. تنتمي بروتينات (PSA) إلى عائلة من البروتينات السكرية (Glycoprotein)، وقد أُثبت وجودها في جميع أنواع جنس الليشمانيا التي دُرست حتى الآن (Handman *et al.*, 1995; Devault and Bañuls, 2008). ترمز العائلة الجينية نمطين من بروتينات (PSA) مفرزة ومتتبتة إلى الغشاء، ولقد كُشف عن الشكل المفرز لدى نوعي الليشمانيا الكبرى *L. major* والطفلية *L. infantum* (Symons *et al.*, 1994; Jiménez-Ruiz *et al.*, 1998) يضم جينوم *L. major* 32 جيناً مرمزاً لكل من الشكّلين السطحي والمفرز؛ إذ يتم التمييز بينهما بوجود إشارة الإرساء على الغشاء GPI أو غيابها في النهاية الكربوكسيلية للبروتين (Devault and Bañuls, 2008). تؤدي الجزيئات السطحية والمفرزة لطفيلي الليشمانيا دوراً رئيسياً في تحديد فوعته، وقدرته على العيش والتكيف داخل خلايا المضيف الفقاري (Holzmuller *et al.*, 2018)، وقد حَققت المكونات المفرزة لطفيليات الليشمانيا من النوعين *L. infantum* و *L. major* نتائج واعدة في مجال استخدامها كلقاحات (Tonui *et al.*, 2004; Lemesre *et al.*, 2005). وأكدت إحدى الدراسات أن للبروتين PSA الدور الرئيس من حيث الفعالية الواقية من الإصابة بالطفيلي عند استعمال إجمالي البروتينات المفرزة لنوع *L. infantum* كلقاح (Bras-Gonçalves *et al.*, 2014). يشير تحليل البنية الأولية المرمزة لبروتينات (PSA) إلى أنها تتألف من مجالات محددة؛ إذ تعد المنطقة المركزية الغنية بالحمض الأميني اللوسين Leucine Rich Repeats (LRR) المجال المميز لهذه البروتينات (Devault and Bañuls, 2008). دُرست الأهمية المناعية لبروتينات (PSA) لدى مجموعة من أنواع الليشمانيا المسببة للداء الحشوي والداء الجلدي (McMahon-Pratt *et al.*, 1993; Jiménez-Ruiz *et al.*, 1998; Kemp *et al.*, 1998)، وأوضحت معظم النتائج أهمية الشكل الفراغي لبروتين

PSA في تحفيز الاستجابة المناعية المفيدة في القضاء على الطفيلي، وكذلك أهمية النظام الخلوي المستخدم لإنتاجه بالطول وبالشكل الصحيح؛ فقد يشمل إنتاجه مجموعة من الإضافات والتعديلات التي يحتاجها في أثناء عملية التعبير أو بعدها، كإضافة السلاسل السكرية، وعمليات الطي المناسبة (Handman et al., 1995; Chamakh-Ayari et al., 2014). تعدّ لقاحات DNA طريقة حديثة وفعّالة في توليد استجابة مناعية واقية من الإصابة، وقد بينت ذلك دراسات عدّة مرتبطة بداء الليشمانيات، كما تمتاز لقاحات DNA بثباتية عالية، وانخفاض كلفة إنتاجها، وتتيح التعبير بشكل فعّال ومديد عن المستضدات المرتبطة بها بشكلها الصحيح (Sjölander et al., 1998; Handman, 2001). يهدف هذا البحث لإنتاج المادة الأساس للقاح DNA ضد الليشمانيا الجلدية، وتتمثل بحوامل تعبير تعمل في حقيقيات النوى من النمطين (+) pCDNA3.1 و pCDNA-sGFP تحمل الجين المرمزة لبروتين (PSA) المفرز LMJF-31-1450 وهي أكثر الجينات تعبيراً عن نفسها في الطور المخمج لدى الليشمانيا الكبرى (يوسف، 2014) التي تمثل أحد الأنواع المسببة للداء الجلدي في سورية، بالإضافة إلى اختبار كفاءة التعبير عن البنية المنتجة للبروتين المدمج مع البروتين المتألق الأخضر Green Florescent Protein (PSA-sGFP) في خلايا مزروعة.

مواد البحث وطرقه:

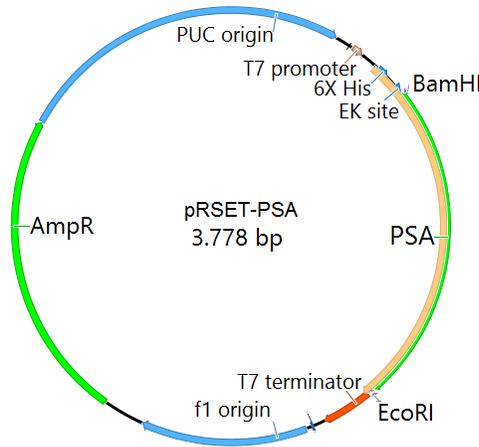
#### **تضخيم جين PSA وتنسليها ضمن الحامل pRSET:**

ابتدئ من (ng200) من DNA مستخلص من سلالة محلية من الليشمانيا الكبرى *L. major* سبق عزلها من أحد المرضى المراجعين لمشفى الأمراض الجلدية بجامعة دمشق في عام 2011، واستنابتها ومن ثمّ تمطيها بواسطة تفاعل (PCR). ولقد جرى تضخيم الجين

LMJF-31-1450 بإجراء تفاعل PCR على مرحلتين الأولى باستخدام أنزيم Taq بوليميراز (thermo)، والثانية باستخدام أنزيم Pfu عالي الوثوقية (thermo) high fidelity. أنجزت تفاعلات (PCR) باستخدام جهاز مدور حراري Applied Biosystem Thermocycler وفق برنامج يتألف من 35 دورة، كل دورة تتضمن ثلاث مراحل: فك تشافع شريطي DNA المزدوج (95 م°-30 ثا)، وتشافع البادئات مع أطراف الجين الهدف (60 م°-45 ثا)، والاستطالة (72 م°-1 د) وقد عُمد إلى زيادة زمن الاستطالة لتصبح (72 م°-1.5 د) في التفاعل الذي يحوي أنزيم Pfu. يسبق الدورة الأولى رفع درجة الحرارة لدرجة 95 م° لمدة 2 د، بهدف فك تشافع DNA الاستهلاكي، يلي الدورة الأخيرة تثبيت درجة الحرارة على 72 م° مدة 7 دقائق (الاستطالة النهائية). تم اصطناع المرشسات من قبل شركة Alpha DNA الكندية اعتماداً على التسلسل المرجعي للجين (XM\_001685079.1). رُحلت نتائج تفاعل (PCR) على هلامه أغاروز تركيزها 1.5% إلى جانب سلم DNA العياري (1 Kb Promega)، بوجود دائرة الزحلان TAE (EDTA، Tris-Base، Acetic Acid)، ثم نقيت الشدفة المضخمة من الهلام باستخدام طقم خاص جاهز للاستعمال The PureLink Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen). بعدها هُضمت كل من الجين المضخمة والبلاسميد pRSET بأنزيمي التقييد BamHI وEcoRI (Fermentas)، وأجري تفاعل الربط على نواتج التهضيم باستخدام أنزيم T4 Ligase (Fermentas) بالاعتماد على النسبة المولية 3:1 لكل من البلاسميد والجين على التوالي.

تمت تهيئة الجراثيم *E. coli* (Top10) باستخدام كلوريد الكالسيوم، ثم حوّرت بالبنية البلاسميدية pRSET-PSA بطريقة الصدمة الحرارية. نُميت الخلايا الجرثومية المحوّرة بناتج الربط على وسط من الأغار المغذي (LB-Agar) المضاف إليه الصاد الحيوي الأمبسلين (Amp 100 µg/ml)، بعد ذلك وبشكل عشوائي انتقي عدد من المستعمرات النامية والتأكد

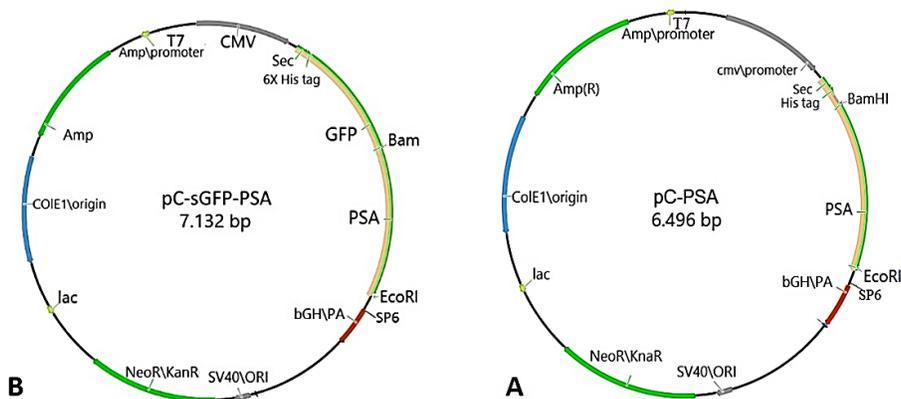
من وجود البلاسميدات المؤشبة فيها بإجراء تفاعل (Colony PCR) باستخدام مرئسات نوعيّة تضخم الجين المدخلة (PSA F/R)، وبعد تمييز المستعمرات الإيجابيّة (التي تحوي البلاسميد المؤشب pRSET-PSA)، من المستعمرات السلبيّة (التي تحوي البلاسميد pRSET فارغاً من الجين) تمت العودة إلى الإيجابيّة منها في الطبق المرجعي وُئمت مستعمرتان ضمن وسط زرع سائل يحوي الأمبسلين LB+Amp ثم عزل البلاسميد المؤشب منها بتفاعل (miniprep) باستخدام طقم جاهز (Miniprep (Fermentas) وجرى التأكد من وجود جين (PSA) ضمن البلاسميد المستخلص بإجراء تفاعل هضم استخدمت فيه أنزيمات التقيد (BamHI) و(EcoRI)، ومن ثمّ ترحيل النواتج على هلامة أغاروز. كما تمّ التأكد من سلامة التسلسل النيكليوتيدي للجين، وحُلّوه من الطفرات أو روائز التوقف من خلال سلسلة البنية البلاسميديّة (pRSET-PSA) في هيئة الطاقة الذريّة باستخدام مرئسات خاصة نوعيّة ترتبط بالجين، ومقارنة نتيجة السلسلة مع التسلسل الخاص بالليشمانيا الكبرى والمسجّل في البنك الجيني (XM\_001685079.1) باستخدام برنامج BLAST.



الشكل (1): رسم تخطيطي للبنية للـ pRSET-PSA

**إعادة تنسيل جين (PSA) في حوامل تعمل ضمن حقيقتات النوى:**

نُسلت جين (PSA) ضمن حاملي (+) pCDNA3.1 و pCDNA-sGFP اللذين يستطيعان التعبير عن بروتين (PSA) بشكل مفرد أو مدمج مع بروتين sGFP في خلايا حقيقتات النوى. تم الحصول على جين (PSA) بدءاً من البلاسميد المؤشب pRSET-PSA، وذلك من خلال تهضيم هذا البلاسميد بأنزيمي التقيد BamHI و EcoRI؛ إذ أُجري التفاعل بحجم نهائي قدره 30µl وبوجود 3µg من البلاسميد، كما هُضم البلاسميد (+) pCDNA3.1 و pCDNA-sGFP بالطريقة نفسها، وبعد ترحيل ناتج التهضيم على هلام الأغاروز نُقيت الشدفة المناسبة من كلا البلاسميد و جين (PSA) باستخدام طقم جاهز QIA quick Gel (Qiagen) Extraction Kit، ثم أُعيد ترحيل ناتج التنقية لكل منها. بعد ذلك أُجري تفاعل الربط لكل من البلاسميد (+) pCDNA3.1 و pCDNA-sGFP و جين PSA في تفاعلين مستقلين، باستعمال أنزيم T4 ليغاز ونسبة الربط 3:1 للبلاسميد والجين على التوالي. حوّرت الخلايا المهيئة (DH5α) بنواتج الربط بطريقة الصدمة الحرارية، ونُميت على أوساط آغار+ Amp، وتم اختبار وجود البنى البلاسميدية المؤشبة (pC-sGFP-PSA) و pC- (PSA) بإجراء تفاعل Colony PCR لثمانية مستعمرات اختيرت بشكل عشوائي من كل نمو بكتيري خاص ببنية بلاسميدية مؤشبة، باستخدام المرئسات SP6/T7(F) والتي تستطيع تضخيم جين (PSA) مع جين (sGFP) في حال وجودها ضمن البنية، بعد ذلك نُميت مستعمرتان إيجابيتا التفاعل أُخذتا من الطبق المرجعي الخاص بكل بنية بلاسميدية مؤشبة (pC-sGFP-PSA) و (pC-PSA)، واستخلصت البلاسميدات منها بتفاعل miniprep (Qiagen Plasmid mini Kit).



الشكل (2): رسم تخطيطي للبنى البلاسميدية التي تعمل في حقيقيات النوى

A. البنية pC-sGFP و تتألف من البلاسميد (+) pCDNA3.1 وجين *L. major* PSA. B. البنية pC-sGFP-PSA و تتألف من البلاسميد (+) pCDNA3.1 و الجينتان sGFP و *L. major* PSA بحيث تتوضعان في إطار القراء ذاته (in-frame). للتأكد من وجود الجين ضمن البلاسميدات المستخلصة، أُجري تفاعل تهضيم باستخدام أنزيمي التقييد (HindIII) و (EcoRI) ويشمل الهضم بهما جين (PSA) بالإضافة إلى جين (sGFP) في البنية البلاسميدية pC-sGFP-PSA، ولقد تمت التفاعلات بمرافقة البلاسميدات الأصل كشاهد (+) pCDNA3.1 أو pC-sGFP للتمييز فيما بينها وبين البلاسميدات المؤشبة.

الجدول (1): المرئسات المستخدمة في تنسيل جين PSA وسلسلتها

التسلسل النيكلوتيدي	اسم المرئسة	البروتوكول
5'ATATATGTCGACGCAAGGATCCATGCC CATGCTGCTGCTCCG 3'	PSA (F)	المرئسات المستخدمة في التنسيل ضمن البلاسميد pRSET
5'ATATATGGTACC GAATTC TCTACTAGC ACGCGTTGGCTGTGCGAGC 3'	PSA (R)	
5' CGCGAACCCGCTGCTTGAGA 3'	F2PSA	المرئسات المستخدمة في السلسلة
5' ACATGACGTGGGCGTGCCTG 3'	F3PSA	
5' GAACTCGCTGACGGGCACCC 3'	R3PSA	
5' CCACCGCTGAGCAATAACTA3'	T7R	
5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'	T7F	المرئسات المستخدمة للتحقق من وجود الجين ضمن البلاسميدات التي تعمل في حقيقيات النوى
5' CTATAGTGCACCTAAAT 3'	SP6	

**التعبير البروتيني في حقيقيات النوى والتبصيم المناعي:**

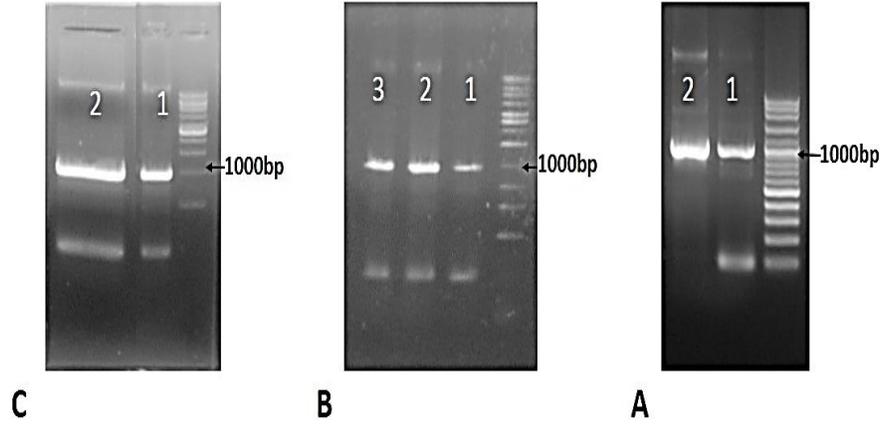
زُرعت الخلايا HEK-293T في صفيحة زراعة خلوية، بتركيز  $10^3 \times 100$  خلية في البئر ضمن  $500 \mu\text{l}$  من وسط الزراعة RPMI 1640 (Sigma, Germany) المزود بـ 10% من مصّل جنين البقر (Cytogen, Germany) (FBS)، و 1% غلوتامين، و 0.1% بنسولين/ستربتومييسين، مدة 48 ساعة. مُزج  $1 \mu\text{g}$  من البنية البلاسميدية pC-sGFP-PSA مع حجم  $3 \mu\text{l}$  من عامل التحويل (PEI/ 1X) (Roche, Germany) Polyethylenimine بنسبة 3:1 ضمن  $50 \mu\text{l}$  من وسط الزراعة (RPMI) خالي المصل، كما حُضرت عيّنة إضافيةً باتباع الطريقة السابقة تحتوي على البلاسميد (pC-sGFP) واستُخدمت بوصفها شاهدًا للتحويل والتعبير والكشف. حُفظ المزيج نصف ساعة بدرجة حرارة المخبر، ثم أُضيف

إلى الخلايا بشكل قطرات، مع مراعاة رج الصفيحة بلطف. حُضنت الصفيحة مدة 72 ساعة، في حاضنة درجة حرارتها 37 م°، بوجود CO2 بتركيز 5%. في أثناء هذه المدة قُيِّم التعبير البروتيني بوساطة مجهر الفلورة، ثم كُشف عن البروتين المدمج (PSA-sGFP) في طاف الخلايا بالتبصيم المناعي؛ إذ فُصلت البروتينات بالرحلان الكهربائي العمودي على هلامة عديد الأكريلاميد (SDS-PAGE)، ثم نُقلت إلى غشاء نيتروسيلوز الذي تم ملء الفراغات الشاغرة فيه بحفظه ليلة كاملة ضمن محلول الإقفال Blocking solution (حليب خالي الدسم 4%، PBS 1X، Tween 0.05%). بعد ذلك جرى معالجة الغشاء بالأضداد الأولية Rabbit anti-GFP 1/2500، والأضداد الثانوية Goat-anti-Rabbit –AP 1/2000، وأخيراً أظهرت النتيجة باستخدام الركيزة 1% NBT، 0.5% BCIP.

#### النتائج:

#### تضخيم جين (PSA):

استخدم جينوم طفيلي الليشمانيا *L. major* المستفرد سابقاً (ng200) بوصفه قالباً لتضخيم إحدى الجينات المرمزة لبروتينات (PSA) المفردة (LMJF\_31\_1450) بطولها الكامل باستخدام زوج من المرئسات النوعية أمامية وعكسية (F/R) (PSA)، وصممت هذه المرئسات اعتماداً على التسلسل النيكلوتيدي المرجعي للجين (XM\_001685079.1)، بعد إضافة تسلسل أنزيمات التقييد المستخدمة في التسلسل إلى كل مرئسة، والتأكد من خلو الجين من المواقع النوعية للهضم بها. تمت ضبط الشروط اللازمة للتضخيم والتأكد من طول الجين الصحيح بواسطة تفاعل (PCR) الأول بوجود أنزيم (Taq Polymerase)، ثم أجري التفاعل الثاني باستخدام أنزيم (Pfu Polymerase) عالي الوثوقية، وأعطى ناتج التفاعل بكل منهما شدة بطول تقريبي 900bp وهو الطول المتوقع للجين. ولقد رُحِّل كامل كمية ناتج تفاعل PCR على هلامة أغاروز 1.5%، ونقي جين PSA من الهلام.

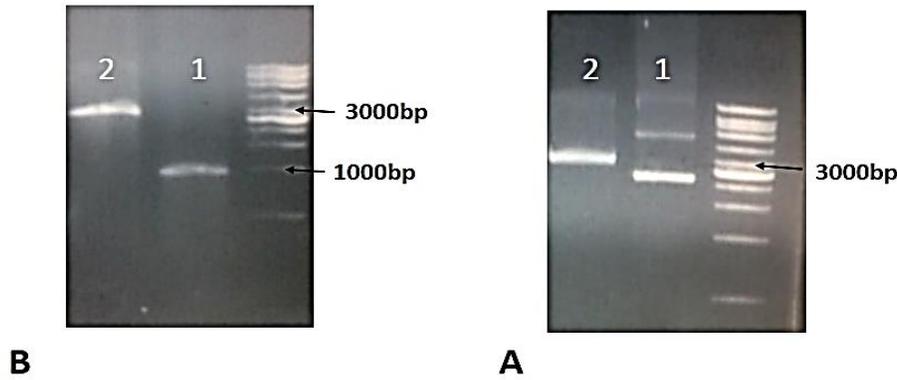


الشكل (3): تضخيم جين PSA

A. المسار 1، 2: ناتج تضخيم جين (PSA) بأنزيم Taq Polymerase، B. المسار 1، 2، 3: ناتج تضخيم جين (PSA) بأنزيم Pfu Polymerase، C. المسار 1، 2: ترحيل كامل كمية الجين تمهيداً للتقنية من الهلام. استخدم في تجارب الرحلان الأفقي واسم DNA المعياري 1Kb.

#### تنسيل جين PSA في الحامل pRSET:

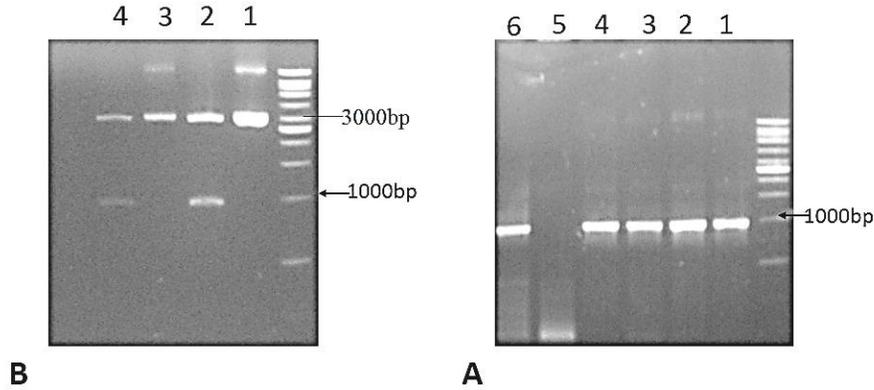
بعد الحصول على جين (PSA) بشكل نقي، أُجري تفاعلا هضم لكل من الجين والبلازميد pRSET، باستخدام أنزيمي التقيد (BamHI) و(EcoRI)، ثم نقيت الشدفة المطلوبة. وأظهر ناتج رحلان العينات بعد عمليتي القطع والتنقية اختلافاً في شكل البلازميد، وصحة طوله بشكله الخطي بحدود 2900bp، بالإضافة إلى صحة طول الجين 900bp تقريباً.



الشكل (4): هضم جين (PSA)، والبلاسميد pRSET

A. المسار 1: البلاسميد pRSET قبل الهضم، المسار 2: البلاسميد pRSET بعد الهضم  
المزدوج، B. المسار 1: جين (PSA) بعد الهضم المزدوج، المسار 2: البلاسميد pRSET  
بعد الهضم المزدوج.

بعد ذلك حُوت البكتريا المهيئة Top10 بناتج ربط الجين إلى البلاسميد، وجرى التأكد من وجود البنية البلاسميدية المؤشبة pRSET-PSA في عدد من المستعمرات النامية بإجراء تفاعل (PCR) يتضمن وجود مرئسات نوعية للجين وبين الرحلان الكهربائي لنواتج تفاعل المستعمرات الإيجابية ظهور عصابة بطول جين PSA 900bp تقريباً. استخلص البلاسميد المؤشبه من مستعمرتين إيجابيتي التفاعل، وجرى التأكد من احتوائه على الجين بإجراء تفاعل هضم باستخدام أنزيمي التقيد (BamHI) و(EcoRI).



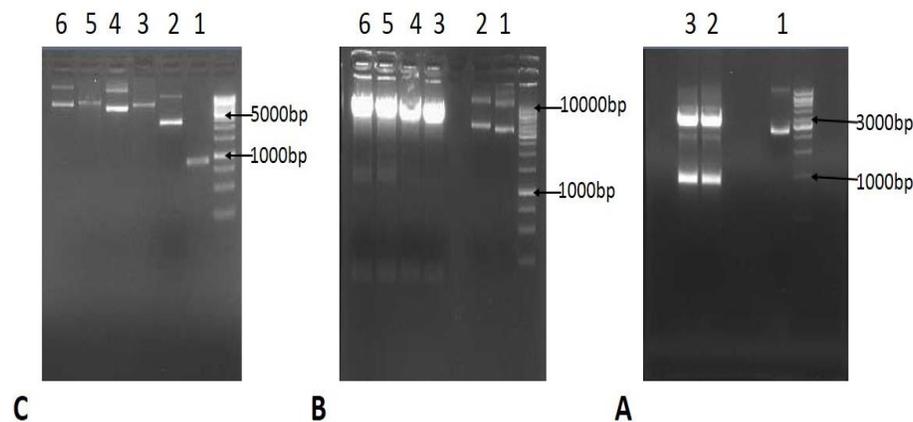
الشكل (5): التحقق من البنية البلاسميدية المؤشبة pRSET-PSA

A. ناتج تفاعل Colony (PCR) المسار 1، 2، 3، 4، 6: الناتج إيجابي (عصابة بطول 900bp تقريباً)، وبالتالي المستعمرات تحتوي على البنية pRSET-PSA. المسار 5: الناتج سلبي والمستعمرة تحتوي على البلاسميد pRSET الفارغ، B. ناتج هضم البنية البلاسميدية pRSET-PSA. المسار 1، 3: البنية المؤشبة قبل الهضم، المسار 2، 4: ناتج الهضم بأنزيمي التقيد BamHI وEcoRI وظهور عصابتان تمثلان الجين (900bp) والبلاسميد (2900bp). أكدّت نتيجة السلسلة تماثل جين PSA مع التسلسل المسجّل في البنك الجيني، NCBI Reference Sequence XM\_001685079.1؛ إذ بيّنت النتائج غياب روائز توقف مبكرة ضمن التسلسل، إضافة لخلوّه من أي طفرات، ما يدل على نجاح تضخيم الجين وتنسيه بالشكل الصحيح.

#### تنسيل جين (PSA) في حوامل تعمل في حقيقتات النوى:

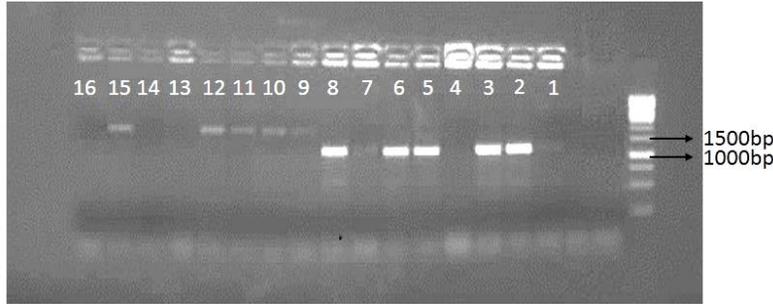
أجري تفاعل الهضم لكل من البلاسميدين pC-sGFP وpCDNA3.1 (+) والبنية البلاسميدية المؤشبة pRSET-PSA باستخدام أنزيمي التقيد BamHI وEcoRI. رُحلت بعد ذلك نواتج

التفاعلات، ونقيت الشدف المطلوبة من الهلام، ثم رُحلت من جديد للتأكد من سلامة التنقية وتقدير التركيز لكل منها.



الشكل (6): هضم البنية المؤشبة pRSET-PSA والبلاسميدات التي تعمل في حقيقتات النوى  
**A.** المسار 1: البنية المؤشبة pRSET-PSA دون هضم، المسار 2، 3: ناتج الهضم  
**B.** المسار 1: البلاسميد (+) pCDNA3.1 دون هضم،  
 المسار 2: البلاسميد pC-sGFP دون هضم، المسار 3، 4: ناتج الهضم المزوج للبلاسميد  
 (+) pCDNA3.1، المسار 5، 6: ناتج الهضم المزوج للبلاسميد pC-sGFP. **C.** ناتج  
 تنقية الشدف المطلوبة من كل بلاسميد. المسار 1: جين PSA، المسار 2: البلاسميد  
 المؤشبة pRSET-PSA قبل الهضم، المسار 3: البلاسميد (+) pCDNA3.1 بعد الهضم  
 والتنقية، المسار 4: البلاسميد (+) pCDNA3.1 قبل الهضم. المسار 5: البلاسميد pC-  
 sGFP بعد الهضم والتنقية، المسار 6: البلاسميد pC-sGFP قبل الهضم.

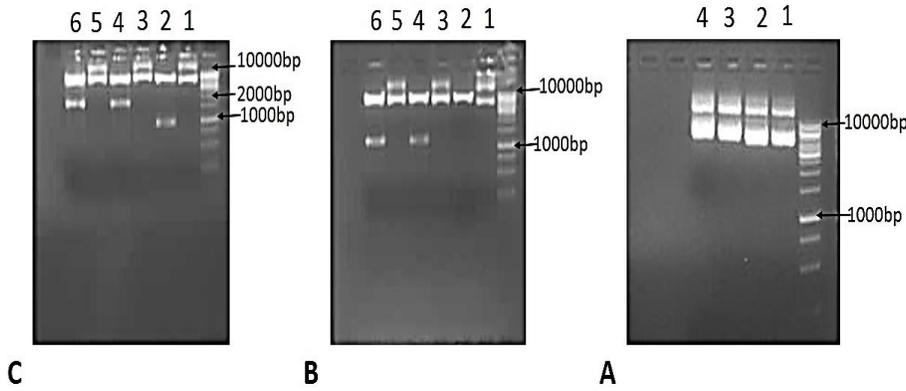
حوّرت الخلايا البكتيريّة (DH5 $\alpha$ ) بناتجى ربط الجين إلى كل بلاسميد، واختبر وجود البنى البلاسميدية المؤشبة pC-sGFP-PSA و pC-PSA في المستعمرات النامية بإجراء تفاعل (PCR) لعدد منها باستخدام مرئسات نوعيّة؛ أظهرت نتيجة الرحلان للمستعمرات الإيجابيّة التي تحوي البنية pC-PSA عصابة بطول 900bp تقريبًا وهو طول جين (PSA)، أما البنية pC-sGFP-PSA فقد أعطى الناتج الإيجابي لتفاعلها عصابة بطول 1600bp وهو طول جين (PSA) و(sGFP) معًا.



الشكل (7): تفاعل Colony PCR واختبار وجود البنى المؤشبة pC-sGFP-PSA و pC-PSA ضمن المستعمرات

اختبار البنية pC-PSA. المسار 2، 3، 5، 6، 8: ناتج تفاعل (PCR) إيجابي (عصابة بطول 900bp تقريبًا)، وبالتالي المستعمرات تحتوي على البلاسميد المؤشب pC-PSA، المسار 1، 4، 7: ناتج تفاعل (PCR) سلبي والمستعمرات تحتوي بلاسميد فارغ. اختبار البنية pC-sGFP-PSA. المسار 10، 11، 12، 15: ناتج التفاعل إيجابي (عصابة بطول

1600bp تقريبًا)، وبالتالي المستعمرات تحتوي على البلاسميد المؤشب pC-sGFP-PSA، المسار 9، 13، 14، 16: التفاعل سلبي والمستعمرات تحتوي على بلاسميد فارغ. عزلت البلاسميدات المؤشبة من المستعمرات الإيجابية (مستعمرتان لكل بنية مؤشبة)، وجرى التأكد من صحة تسليج جين (PSA) ضمنها بإجراء تفاعل هضم باستعمال أنزيمي التقيد (HindIII) و(EcoRI). ومقارنة النتيجة مع البلاسميدات الأصل (+) pCDNA3.1 أو pC-sGFP.



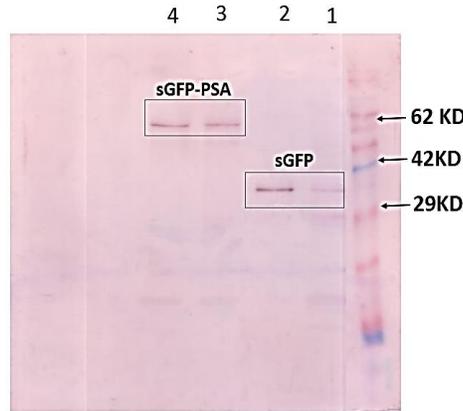
الشكل (8): استخلاص وهضم البنى البلاسميدية المؤشبة pC-PSA و pC-sGFP-PSA

A. ناتج استخلاص البنى البلاسميدية. المسار 1، 2: البلاسميد المؤشب pC-PSA، المسار 3، 4: البلاسميد المؤشب pC-sGFP-PSA، B. هضم البنية pC-PSA. المسار 1: البلاسميد الشاهد (+) pCDNA3.1 غير مقطوع، المسار 2: ناتج الهضم المزدوج للبلاسميد الشاهد، المسار 3، 5: البلاسميد المؤشب pC-PSA غير مقطوع، المسار 4، 6: ناتج الهضم المزدوج للبلاسميد pC-PSA ونلاحظ ظهور عصابة تدل على جين (PSA) بطول 900bp، وأخرى تدل على البلاسميد المقطوع 5600bp تقريبًا، C. هضم البنية pC-sGFP-PSA. المسار 1: البلاسميد الشاهد pC-sGFP غير مقطوع، المسار 2: ناتج الهضم

المزدوج للبلاسميد الشاهد ونلاحظ عصابة بطول تقريبي 700bp تدل على جين sGFP، المسار 3، 5: البلاسميد المؤشب pC-sGFP-PSA غير مقطوع، المسار 4، 6: ناتج الهضم المزدوج للبلاسميد pC-sGFP-PSA ونلاحظ ظهور عصابة تدل على الجينين (PSA+sGFP) معًا بطول تقريبي 1600bp وعصابة أخرى تدل على البلاسميد المقطوع 5500bp تقريبًا.

#### التعبير في حقيقيات النوى:

بعد التحقق من البنيتين البلاسميديتين pC-sGFP-PSA و pC-PSA والتأكد من وجود جين (PSA) فيهما من خلال الهضم بأنزيمات التقييد المناسبة، زرعت الخلايا HEK-293T وحوّرت بالبنيتين البلاسميديتين pC-sGFP-PSA و pC-sGFP ليكون الأخير شاهدًا في أثناء عملية التعبير والتبصيم، وقد جرى تقييم إنتاج البروتين المدمج PSA-sGFP بواسطة مجهر الفلورة خلال 12، 24، 48، 72 ساعة من بدء التحوير، وتبين في أثناء ذلك كفاءة الخلايا HEK-293T في التعبير، كما جرى التأكد من الوزن الجزيئي للبروتين المدمج 63kDa من خلال التبصيم المناعي مع أضداد anti-GFP؛ إذ أثبتت النتيجة أنّ التعبير عن بروتين PSA-sGFP ضمن الخلايا HEK-293T كان صحيحًا.



الشكل (9): التبرص المناعي لنتاج التعبير البروتيني في حقيقيات النوى

المسار 1، 2: ناتج التعبير البروتيني للبلاسميد الشاهد pC-sGFP، وتظهر عصابة البروتين المسار 3، 4: ناتج التعبير البروتيني للبلاسميد المؤشب pC-sGFP-PSA وتظهر عصابة البروتين المدمج PSA-sGFP عند الوزن الجزيئي 63KD. تم التبرص المناعي باستخدام أضداد موجهة ضد بروتين sGFP، الواسم المعياري للبروتينات يحدد الأوزان الجزيئية بالكيلو دالتون KD.

#### المناقشة:

توصف المكونات المفرزة من قبل الكائنات الحية الدقيقة الطفيلية والجراثيم والفيروسات بشكل عام، بأنها العوامل الأولى التي تتأثر مع المضيف، وتكون قادرة على إنشاء تأثيرات وارتباطات مع بيئته (Holzmuller *et al.*, 2018)، ولقد استطاعت المكونات المفرزة لطفيلي *L. major* و *L. infantum*، تحقيق نتائج واعدة في مجال إنتاج لقاحات ضد داء الليشمانيات؛ إذ تمكنت حديثاً البروتينات المفرزة لليشمانيا *L. infantum* من توليد حماية لدى الكلاب تتوسطها استجابة مناعية من النمط Th1 اتجاه الإصابة التجريبية والطبيعية بالداء

الحشوي عند استخدامها بوصفها لقاحًا بمشاركة MDP (muramyl dipeptide) بوصفه مساعدًا، وبذلك رُشحت وسوّقت بوصفها لقاحًا ضد الداء الحشوي للكلاب في أوروبا (Lemesre *et al.*, 2005; Oliva *et al.*, 2014). في حين تمّ الإشارة سابقًا إلى الجزينات المفرزة من الليشمانيا *L. major* بأنها ذات استمناعية عالية؛ إذ استطاعت حماية الفئران تجاه الإصابة التجريبية بالداء الجلدي دون الحاجة إلى مساعد (Tonui *et al.*, 2004). ومن المثير للاهتمام تحديد بروتين (PSA) بشكله المنحل بأنه المكوّن الفعال من إجمالي البروتينات المفرزة لليشمانيا *L. infantum* ولقد حرّض بدوره مناعة واقية لدى الكلاب عند استخدامه بوصفه لقاحًا ضد الليشمانيا الحشوية (Bras-Gonçalves *et al.*, 2014). ينتمي بروتين (PSA) إلى عائلة مميّزة من البروتينات المرتبطة بالغشاء والمفرزة أثبت وجوده لدى أنواع الليشمانيا المدروسة جميعها، كما كشف عن الشكل المفرز منه لدى نوعي الليشمانيا *L. major* و *L. infantum* (Devault and Bañuls, 2008). أتاحت سلسلة جينوم بعض أنواع طفيليات الليشمانيا من رسم البنية الدقيقة لبروتين (PSA) والتنبؤ بوظائفه، كما ارتبطت بروتينات (PSA) مع بعض الصفات الهامة التي يتمتع بها الطفيلي في أثناء دورة حياته ويتجلّى ذلك بقدرته على الإخماج ومقاومة حل الطفيلي بواسطة بروتينات المتممة (Kedzierski *et al.*, 2004; Lincoln *et al.*, 2004)، ولقد جذب بروتين (PSA) لليشمانيا *L. major* بشكل خاص اهتمام الباحثين لترشيحه بوصفه لقاحًا ضد الداء الجلدي لدى البشر؛ فقد أثبت البروتين المعزول من الطفيلي (native PSA) تحفيزه لخلايا مناعية ذاكرة من النمط Th1 في الأشخاص المُمنعين بالليشمانيا الجلدية، كذلك أثبت قدرته على توليد حماية ضد الإصابة بالليشمانيا *L. major* في الفئران عند استخدامه بوصفه لقاحًا (Khabiri *et al.*, 2004)، وأكدت الأبحاث أهمية اختيار نظام إنتاج بروتين *L. major* PSA، فأشارت إلى إمكانية تأثير عمليات الطي، كذلك تعديلات ما بعد الترجمة على استمناعيته. فلقد تمكّن

بروتين (PSA) المعزول من الطفيلي، كذلك المنتج ضمن الليشمانيا المكسيكية أو المنتج بشكل لقاح DNA، من تحقيق مناعة واقية ضد الإصابة بالليشمانيا الكبرى لدى الفئران، في حين لم يستطع البروتين المؤشب المنتج في البكتريا من تحقيق ذلك (Handman *et al.*, 1998; Sjölander *et al.*, 1995). ووفقاً لنتائج الدراسات المرجعية تأتي أهمية هذا البحث في نجاحه بإنتاج المادة الأساس للقاح DNA بدءاً من إحدى الجينات المرمزة لبروتينات (PSA) المفردة، مما يضمن التعبير بشكل فعال ومديد عن هذا البروتين بشكله المطوي الصحيح ضمن الخلايا إما مفرداً، أو مدمجاً مع البروتين المتألق الأخضر (sGFP). وبذلك يمكن التغلب على المشكلات جميعها التي قد ترافق إنتاج بروتين بشكله المؤشب من انحلالية وقدرة الطي بالشكل الصحيح وغيرها (Sahdev *et al.*, 2008; Demain and Vaishnav, 2009). وتعد فكرة الدمج مع sGFP وإعادة للاستفادة من الميزات التي يقدمها بروتين sGFP للبروتين المدمج معه من مساعدة في الطي، وزيادة الثباتية، وسهولة الكشف عن التعبير البروتيني، وزيادة في الاستمناعية عن طريق زيادة الوزن الجزيئي للبروتين وتكبير حجمه (Waldo *et al.*, 1999). وأكدت النتائج صحة البنى البلاسميدية المؤشبة، والتسلسل النيكلوتيدي للجين ضمنها، كما أكدت قدرة البنية المدمجة pC-sGFP-PSA على التعبير ضمن الخلايا حقيقية النوى وإنتاج البروتين بالوزن الجزيئي الصحيح، وبذلك تكون البنى البلاسميدية المنتجة قابلة للتطبيق *in vivo*؛ إذ يمكن اختبار استمناعيتها وقدرتها على إحداث استجابة مناعية واقية من الإصابة التجريبية بالليشمانيا الكبرى والمدارية، وهما النوعان المسببان لليشمانيا الجلدية في سورية، وذلك عند استعمالها بوصفها لقاحات تجريبية في نماذج حيوانية.

## المراجع

## REFERENCES

1. Ali, D., A.-Q. Abbady, M. Kweider and C. Soukkarieh (2016). "Cloning, expression, purification and characterization of *Leishmania tropica* PDI-2 protein." *Open Life Sciences* **11**(1): 166- 176.
2. Alvar, J., I. D. Velez, C. Bern, M. Herrero, P. Desjeux, J. Cano, J. Jannin, M. den Boer and W.
3. L. C. Team (2012). "Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence." *PloS one* **7**(5): e35671.
4. Bras-Gonçalves, R., E. Petitdidier, J. Pagniez, R. Veyrier, P. Cibrelus, M. Cavaleyra, S. Maquaire, J. Moreaux and J.-L. Lemesre (2014). "Identification and characterization of new *Leishmania* promastigote surface antigens, LaPSA-38S and LiPSA-50S, as major immunodominant excreted/secreted components of *L. amazonensis* and *L. infantum*." *Infection, Genetics and Evolution* **24**: 1-14.
5. Chamakh-Ayari, R., R. Bras-Gonçalves, N. Bahi-Jaber, E. Petitdidier, W. Markikou-Ouni, K.
7. Aoun, J. Moreno, E. Carrillo, P. Salotra and H. Kaushal (2014). "In vitro evaluation of a soluble *Leishmania* promastigote surface antigen as a potential vaccine candidate against human leishmaniasis." *PloS one* **9**(5): e92708.
8. de Vries, H. J., S. H. Reedijk and H. D. Schallig (2015). "Cutaneous leishmaniasis: recent developments in diagnosis and management." *American journal of clinical dermatology* **16**(2): 99-109.
9. Demain, A. L. and P. Vaishnav (2009). "Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms." *Biotechnology advances* **27**(3): 297-306.
10. Devault, A. and A.-L. Bañuls (2008). "The promastigote surface antigen gene family of the
11. *Leishmania* parasite: differential evolution by positive selection and recombination." *BMC*

12. evolutionary biology **8**(1): 292.
- 13.Haddad, N., H. Saliba, A. Altawil, J. Villinsky and S. Al-Nahhas (2015). "Cutaneous
14. leishmaniasis in the central provinces of Hama and Edlib in Syria: Vector identification and
15. parasite typing." Parasites & vectors **8**(1): 524.
- 16.Hammoudeh, N. (2015). "STUDYING THE EXPRESSION OF P36 (LACK) GENE IN A STRAIN OF CUTANEUS LEISHMANIA (*L.TROPICA*) AND ITS PRODOUCTION AS
- 17.RECOMBINANT PROTEIN." master theisis, University of Damascus.
- 18.Handman, E. (2001). "Leishmaniasis: current status of vaccine development." Clinical microbiology reviews **14**(2): 229-243.
- 19.Handman, E., A. H. Osborn, F. Symons, R. van Driel and R. Cappai (1995). "The Leishmania
- 20.promastigote surface antigen 2 complex is differentially expressed during the parasite life
21. cycle." Molecular and biochemical parasitology **74**(2): 189-200.
- 22.Handman, E., F. M. Symons, T. M. Baldwin, J. M. Curtis and J. Scheerlinck (1995). "Protective
23. vaccination with promastigote surface antigen 2 from *Leishmania major* is mediated by a
24. TH1 type of immune response." Infection and immunity **63**(11): 4261-4267.
- 25.Holzmuller, P., A. Geiger, R. Nzoumbou-Boko, J. Pissarra, S. Hambrouni, V. Rodrigues, F.-A.
- 26.Dauchy, J. L. Lemesre, P. Vincendeau and R. Bras-Gonçalves (2018). "Trypanosomatid
- 27.infections: how do parasites and their excreted-secreted factors modulate the inducible
- 28.metabolism of L-arginine in macrophages?" Frontiers in immunology **9**: 778.
- 29.Jiménez-Ruiz, A., C. Boceta, P. Bonay, J. M. Requena and C. Alonso (1998). "Cloning,

30. sequencing, and expression of the PSA genes from *Leishmania infantum*." European journal of biochemistry **251**(1-2): 389-397.
31. Kedzierski, L., J. Montgomery, D. Bullen, J. Curtis, E. Gardiner, A. Jimenez-Ruiz and E. Handman (2004). "A leucine-rich repeat motif of *Leishmania* parasite surface antigen 2 binds to macrophages through the complement receptor 3." The Journal of Immunology **172**(8): 4902-4906.
32. Kemp, M., E. Handman, K. Kemp, A. Ismail, M. D. Mustafa, A. Y. Kordofani, K. Bendtzen, A.
33. Kharazmi and T. G. Theander (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 Immunology & Medical Microbiology **20**(3): 209-218.
34. Khabiri, A., F. Bagheri, S. Naddaf, M. Assmar and A. H. Taghavi (2004). "Characterization of a
35. Monoclonal Antibody Specific for the Parasite Surface Antigen-2 of *Leishmania major*." Iranian Journal of Public Health: 10-14.
36. Lemesre, J.-L., P. Holzmuller, M. Cavaleyra, R. B. Gonçalves, G. Hottin and G. Papierok (2005). "Protection against experimental visceral leishmaniasis infection in dogs immunized
37. with purified excreted secreted antigens of *Leishmania infantum* promastigotes." Vaccine **23**(22): 2825-2840.
38. Lincoln, L. M., M. Ozaki, J. E. Donelson and J. K. Beetham (2004). "Genetic complementation of *Leishmania* deficient in PSA (GP46) restores their resistance to lysis by complement."
39. Molecular & Biochemical Parasitology **1**(137): 185-189.
40. McMahon-Pratt, D., D. Rodriguez, J. Rodriguez, Y. Zhang, K. Manson, C. Bergman, L. Rivas, J.
41. Rodriguez, K. Lohman and N. Ruddle (1993). "Recombinant vaccinia viruses expressing
42. GP46/M-2 protect against *Leishmania* infection." Infection and immunity **61**(8): 3351-3359.
43. Nylen, S. and S. Gautam (2010). "Immunological perspectives of leishmaniasis." Journal of global infectious diseases **2**(2): 135.

44. Oliva, G., J. Nieto, V. F. Manzillo, S. Cappiello, E. Fiorentino, T. Di Muccio, A. Scalone, J.
45. Moreno, C. Chicharro and E. Carrillo (2014). "A randomised, double-blind, controlled efficacy trial of the LiESP/QA-21 vaccine in naïve dogs exposed to two *Leishmania infantum* transmission seasons." PLoS neglected tropical diseases **8**(10): e3213.
46. Reithinger, R., J.-C. Dujardin, H. Louzir, C. Pirmez, B. Alexander and S. Brooker (2007).
47. "Cutaneous leishmaniasis." The Lancet infectious diseases **7**(9): 581-596. Sahdev, S., S. K. Khattar and K. S. Saini (2008). "Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies." Molecular and cellular biochemistry **307**(1-2): 249-264.
48. Scott, P. (1991). "IFN-gamma modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis." The Journal of Immunology **147**(9): 3149-3155.
49. Sjölander, A., T. M. Baldwin, J. M. Curtis and E. Handman (1998). "Induction of a Th1 immune response and simultaneous lack of activation of a Th2 response are required for generation of immunity to leishmaniasis." The Journal of Immunology **160**(8): 3949-3957.
50. Sundar, S. and B. Singh (2014). "Identifying vaccine targets for anti-leishmanial vaccine development." Expert review of vaccines **13**(4): 489-505.
51. Symons, F. M., P. J. Murray, H. Ji, R. J. Simpson, A. H. Osborn, R. Cappai and E. Handman (1994). "Characterization of a polymorphic family of integral membrane proteins in promastigotes of different *Leishmania* species." Molecular and biochemical parasitology **67**(1): 103-113.
52. Tonui, W. K., J. S. Mejia, L. Hochberg, M. L. Mbow, J. R. Ryan, A. S. Chan, S. K. Martin and R. G. Titus (2004). "Immunization with *Leishmania major* exogenous antigens protects
53. susceptible BALB/c mice against challenge infection with *L. major*." Infection and immunity **72**(10): 5654-5661.

54. Waldo, G. S., B. M. Standish, J. Berendzen and T. C. Terwilliger (1999). "Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein." *Nature biotechnology* **17**(7): 691.
- شفيح، مريم (2018). دراسة التعبير عن جين SODB1 في سلالة من الليشمانيا المدارية *L. tropica* وإنتاج البروتين
55. المأشوب rSODB1 واختبار استمناعيته. رسالة ماجستير، جامعة دمشق.
56. مرعي، مؤيد (2014). دراسة التعبير عن جين KMP11 في سلالة من الليشمانيا الجلدية وتنسيله. رسالة ماجستير، جامعة دمشق.
57. دمشق.
58. يوسف، عبد الرحمن (2014). دراسة على المستوى الجزيئي لتبدلات التعبير عن الجينات المرمزة لبروتينات PSA بين الطور
59. المخمج Metacyclic promastigote والطور غير المخمج procyclic promastigote لطفي الليشمانيا
60. الجلدية *L. major*. رسالة ماجستير، جامعة دمشق، ص 102.