

إنتاج سلالة محلية من طفيليات الليشمانيا المدارية *Leishmania tropica* محورة جينياً ومعبرة عن بروتين GFP

فاطمة الحراكي¹ شادي سكرية²

¹ جامعة دمشق، كلية العلوم، قسم علم الحياة الحيوانية

² أستاذ مساعد في كلية العلوم، قسم علم الحياة الحيوانية

المُلخَص

تُستخدم الطفيليات المحورة المُعبرة عن البروتين المتفلور الأخضر Green fluorescent protein اختصاراً GFP بشكل واسع كأداة لدراسة الآليات المرضية في نماذج حيوانية متعددة، وقد تم الاعتماد عليها حديثاً في تقييم فعالية المواد الدوائية. هدفت هذه الدراسة إلى الحصول على سلالة محلية من طفيليات الليشمانيا المدارية المحورة جينياً والقادرة على التعبير بشكل دائم عن بروتين GFP. لتحقيق ذلك تم تحضير البنية البلاسميدية pLEXSY-GFP-sat2.1 بكمية كافية ومن ثم تجهيزها بالشكل الخطي، بعدها حُوت طفيليات عرلة محلية من الليشمانيا المدارية *L. tropica* بهذه البنية وذلك بوساطة التنقيب الكهربائي Electroporation. تعمل هذه البنية على إدخال الجين المُرمز GFP ضمن المواقع العديدة لجينات 18s-rRNA في جينوم الليشمانيا. تكتسب الطفيليات المحورة صفة المقاومة للصاد الحيوي Nourseothricin، ويمكن الاعتماد على هذه الصفة في انتقاءها، كما تبدأ بالتعبير عن بروتين GFP والذي يمكن كشفه باستعمال مجهر الفلورة. أظهرت النتائج نجاح عملية التحوير والحصول للمرة الأولى في سورية على سلالة محلية محورة من الليشمانيا المدارية *L. tropica*^{GFP} تُعبر بشكل دائم عن

بروتين GFP سيتوبلاسمي التوضع والتي يمكن استعمالها فيما بعد في تطبيقات بحثية مختلفة.

تاريخ الإيداع: 2022/03/22

تاريخ القبول: 2022/06/19



حقوق النشر: جامعة دمشق -

سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق

النشر بموجب الترخيص

CC BY-NC-SA 04

الكلمات المفتاحية: الليشمانيا المدارية، التحوير، جين مُخبر، GFP، بلاسميدات LEXSY.

Producing a local strain of genetic modified *Leishmania tropica* parasites expressing *GFP* protein

Fatema Alhraki¹

Dr. Chadi Soukkarieh²

¹Damascus University, Faculty of Sciences, Department of Animal Biology.

²Damascus University, Faculty of Sciences, Department of Animal Biology.

Abstract

Green fluorescent protein (GFP)- transfected parasites have been widely used as a tool for studying diseases pathogenicity in several animal models, and the application of these transfectants in drug screening assays has increased recently. This study reports generation of transgenic parasite (*Leishmania tropica*) constitutively expressing *GFP*. linearized cassette containing *gfp* gene was stably integrated from the expression construct pLEXSY-GFP-sat2.1 into Syrian isolate of wild-type *L. tropica* genome, 18srRNA locus, by homologous recombination. For the first time in Syria, Transfection and integration of *GFP* was successfully carried out, and the primary phenotype observations of parasite by fluorescent microscopy has shown that recombinant *L. tropica*^{GFP} was successfully produced *GFP* protein into cytoplasm. this genetic modified strain could be exploited for a wide range of research applications in the next few years.

Received :2021/03/22

Accepted:2022/06/19



Copyright: Damascus University- Syria, The authors retain the copyright under a CC BY- NC-SA

Key words: *LEISHMANIA TROPICA*, TRANSFECTION, REPORTER GENE, GFP, LEXSY PLASMIDS.

1. المقدمة:

تعرف التقانة الحيوية بأنها تطبيق مبادئ الهندسة الوراثية والبيولوجيا الجزيئية بهدف إنتاج منتجات مفيدة مثل الأدوية البيولوجية واللقاحات والأطعمة وذلك باستعمال كائنات أو خلايا حية. حيث تحسن منتجات التقانة الحيوية واقع حياة البشر من العديد من النواحي الصحية والغذائية والبيئية وغيرها. ويعتمد المبدأ العام في تحضير هذه المنتجات على عملية نقل جينات محددة بين الكائنات أو تعديل بعض الجينات في كائن ما بهدف إزالة أو إضافة صفة معينة (Verma et al., 2011).

ويتم تطبيق مثل هذه العمليات باستعمال طرائق عديدة ومتنوعة تعتمد بنسبة عالية منها على تقانات التحويل Transfection التي تتلخص بأنها عملية إدخال لحمض نووي من مصدر خارجي إلى داخل الخلايا المستهدفة باتباع طرائق قد تكون فيزيائية (مثل التنقيب الكهربائي electroporation) أو كيميائية (مثل اللييدات المشحونة إيجاباً cationic lipid وكواشف فوسفات الكالسيوم calcium phosphate reagents)، ويعتمد اختيار الطريقة المناسبة على نمط الخلايا المراد تحويلها (Bao and Palecek, 2016; Sheikh et al., 2017).

تعد الخلايا حقيقيات النوى Eukaryotic cells من أهم الخلايا التي يتم تسخيرها لأغراض علمية تطبيقية عديدة، لما تتمتع به من ميزات تجعلها تتفوق على الخلايا بدائيات النوى، خاصة فيما يتعلق بإنجازها لتعديلات ما بعد الترجمة post-translational modifications، وقيامها بعمليات الطي folding الصحيح للبروتين (Rosano and Ceccarelli, 2014). تسلط الأبحاث الحديثة في مجال التقانة الحيوية الأضواء على واحدة من أهم الخلايا حقيقية النوى التي من الممكن استثمارها في إنتاج مركبات مفيدة، وهي خلايا طفيليات الليشمانيا التي تنتمي إلى حقيقيات النوى الدنيا، حيث تتفوق على نظائرها من الخلايا الأخرى حقيقية النوى وحتى العليا منها، إذ تتمتع بالعديد من الميزات فهي توفر مردوداً إنتاجياً جيداً من البروتينات يصل إلى 30mg/ml (Breitling et al., 2002)، كما تتميز بسهولة التعامل معها إذ تنمو بشكل معلق في أوساط الزرع ولا تحتاج للاتصاق وتشبه بذلك البكتيريا، بالإضافة إلى قلة تكلفة الأوساط الصناعية المستخدمة لزراعتها مقارنة مع غيرها من الخلايا، وعدم تشكيلها أجساماً ضمنية inclusion bodies داخل السيتوبلازما كما يحدث في سيتوبلازما البكتيريا، كما أن المدة الزمنية اللازمة لانقسامها وتكاثرها تعتبر مناسبة وسريعة مقارنة مع الخلايا حقيقيات النوى الأخرى كخلايا الخميرة والثدييات والحشرات (Taheri et al., 2016). ومن الجدير بالذكر أن خلايا الليشمانيا قادرة على القيام بجميع التعديلات ما بعد الترجمة كما هي حال حقيقيات النوى الأخرى (Lai et al., 2019).

ونظراً لتوافر جميع هذه الميزات في خلايا الليشمانيا، فقد أصبحت حديثاً من أكثر الخلايا المستهدفة في التقانات الحيوية، وبشكل كبير في الأبحاث المتعلقة بتقنيات التعبير أو الإسكات الجيني، وفي الأبحاث المتعلقة بدراسة فعالية بعض الأدوية واللقاحات (Bolhassani et al., 2011)، إذ يتم في تلك الدراسات إنتاج ليشمانيا مأسوبة بجينات مُخيرة reporter gene وقادرة على التعبير عنها وبالتالي استعمالها في عمليات التتبع سواء في الوسط الحي أم في الوسط الصناعي، ومن أهم الجينات المُخيرة التي استعملت في دراسات سابقة تلك المُرْمزة للبروتين المنفلور الأخضر GFP (Bolhassani et al., 2011)، وللبروتين المنفلور الأحمر mCherry (Vacas et al., 2017)، ولبروتين اللوسيفيراز Luciferase المصدر للضوء (Coelho et al., 2016). ومما شجع على استخدام خلايا الليشمانيا أيضاً هو انتشارها الواسع في العديد من الدول ومنها دول الشرق الأوسط، إذ تعد من الطفيليات الهامة وتسبب داء الليشمانيا الجلدي والحشوي.

تتعد سبل الوقاية والعلاج المتاحة تجاه الأنواع المختلفة والسلالات المختلفة من طفيليات الليشمانيا الممرضة، وذلك لما تبديه سلالاتها من تنوع كبير يتمثل بأنماط ظاهرية مختلفة، مثل المقاومة الدوائية للعديد من أنواع الأدوية المستعملة في التدبير العلاجي للداء والتي تتوسع وتزداد مع مرور الزمن (Ejazi and Ali, 2013; Zucca and Savoia, 2011).

ولا تزال الأبحاث المتعلقة بإيجاد علاج فعال دون آثار جانبية خطيرة أو تطوير لقاح تجاه هذه الطفيليات تواجه تحديات كثيرة، منها نقص الأدوات الخلوية والجزيئية كالسلالات المحلية المحورة جينياً والتي يمكن أن تفتح آفاقاً واسعة في مجال تطوير الأدوية وإيجاد اللقاح المناسب (Muhjazi et al., 2019). ونظراً لعدم وجود دراسات محلية سابقة هدفت إلى الحصول على عزلات محلية من الليشمانيا المحورة جينياً، فقد تم في هذا العمل أمثلة شروط عملية تحويل طفيليات الليشمانيا في طور أممي السوط وذلك باستعمال تقانة التنقيب الكهربائي، بهدف الحصول على سلالة محلية من طفيليات الليشمانيا المدارية المحورة بجين *gfp*، والقادرة على إنتاج بروتين *GFP* بشكل دائم، للاستفادة منها لاحقاً في تطبيقات مختلفة.

2. أهمية وهدف البحث:

نظراً للاستخدامات الهامة والمختلفة التي تقدمها تقانات تحويل الخلايا سواء في الكائن الحي أم في الوسط الصناعي، ونظراً للميزات التي يتمتع بها طفيلي الليشمانيا عند تحويله بمختلف الأدوات الجزيئية المستعملة، إضافة إلى قلة الدراسات والأبحاث المعتمدة على تحويل نوع الليشمانيا المدارية تحديداً، وافتقارنا محلياً لبروتوكولات تحويل خاصة بهذا النوع من الطفيليات رغم انتشاره الواسع وخطورته، واستناداً إلى أهمية عمليات التنبع الطفيلي التي تعتمد على البروتينات والجزيئات المُخبرة وفي مقدمتها بروتين الفلورة الأخضر *GFP*، فقد هدفت هذه الدراسة إلى أمثلة شروط تحويل طفيليات الليشمانيا المدارية وتسخيرها للعمل كنظام حيوي قادر على التعبير الدائم والمستمر بكفاءة عالية عن بروتين الفلورة الأخضر، مما سيسمح باستخدامها لأهداف تطبيقية هامة في مراحل لاحقة.

3. مواد وطرائق البحث:

3.1. زراعة الطفيليات: أجريت هذه الدراسة على عزلة من طفيليات الليشمانيا المدارية المعزولة محلياً والمحددة النوع بوساطة التقانات الجزيئية، تعرف هذه العزلة بالاسم (Lt.SYR-24). استنبتت الطفيليات بشكلها أمامي السوط promastigote في وسط الزرع RPMI-1640 (sigma, Germany) المدعم بنسبة 10% من المصل البقري الجنيني (FBS) بالإضافة إلى صادات حيوية (Cytogen, Germany) 1x Penicillin-Streptomycin وحُضنت عند درجة حرارة 26 °C.

3.2. استخلاص DNA الجينومي: بعد استنبات الطفيليات وزراعتها في الأوساط المناسبة تم استخلاص DNA الجينومي من طفيليات الليشمانيا المدارية وهي بشكلها أمامي السوط promastigote في طور الثبات انطلاقاً من عدد طفيليات يصل إلى 20×10^6 طفيلي باستخدام كيت (Promega) Wizard Genomic DNA Purification Kit وتم قياس تركيزه باستخدام جهاز (Thermo) Nano drop.

3.3. البلاسميدات المستعملة في البحث:

استُعمل بلاسميد pLEXSY-GFP-sat 2.1 (JenaBioscience, Germany) الذي يحوي جين *gfp* التي تعد جين مُخبرة يتم التعبير عنها بصورة دائمة ضمن الطفيليات ويتم الكشف عنها بفحص عينات من هذه الطفيليات باستعمال مجهر الفلورة. يقوم هذا البلاسميد بإدخال جين *gfp* ضمن جينوم الليشمانيا وفق مبدأ التاشيب المتماثل homologous recombination وذلك في مواقع *18SrRNA(ssu)* عالية التكرارية والتي تخضع لسيطرة محضض قوي يعمل بوساطة أنزيم RNA polymerase I، مما يؤمن معدلات انتساخ عالية وإنتاج كميات كبيرة من جزيئات mRNAs. كما يتميز هذا البلاسميد أيضاً بوجود المحضض ذاته ضمن بنيته، مما سيرفع بدوره معدل الانتساخ بعد الدخول في جينوم الليشمانيا إلى الضعف. يؤمن نظام التحويل هذا تعبير ثابت ودائم constitutive expression عن جين *gfp* (Niimi, 2012).

استخدمت بكتيريا الـ *Escherichia coli* TOP10 كسلالة مضيضة لتكثير البلاسميد pLEXSY-GFP-sat2، بحيث تُزرع هذه البكتيريا في وسط LB (Luria Bertani) مضاف له الصاد الحيوي Ampicillin (100µg/ml) بهدف انتقاء المستعمرات البكتيرية الحاوية على البنى المأشوبة فيما بعد.

في البداية تم القيام بعملية تهيئة وتحويل البكتيريا وفق خطوات عمل محددة مسبقاً (Chang et al., 2017). وبعد نمو المستعمرات البكتيرية المحورة والنماتة على أطباق الآغار المعدّة للانتقاء تم اختيار إحدى المستعمرات وتكثيرها في وسط LB السائل والمزود

بالصنادق نفسه وحُضنت مع التحريك عند درجة الحرارة 37°C مدة ليلة كاملة، وابتاع خطوات العمل المرفقة في كيت الاستخلاص البلازميدي (Maxi-prep, Thermo) تم الحصول على البلاسميد pLEXSY-GFP-sat2 واستخلاصه من البكتيريا. أمثلة شروط عملية التحويل Transfection:

4.3. تحضير البنى البلاسميدية اللازمة لتحويل طفيليات الليشمانيا المدارية:

تم في هذا الجزء من البحث إجراء تفاعلي هضم للبلاسميد pLEXSY-GFP-sat2 بإنزيم القطع *Swa I* (Thermo, Lithuania) المسؤول عن قطع البلاسميد بنهايات عمياء في موقعين محددين بحيث نحصل على شذفتين الأولى تتضمن المنطقة الخاصة بالتسلي في البكتيريا والتي يصل طولها إلى 2864 bp والشذفة الثانية الخاصة بالتعبير ضمن جينوم الليشمانيا expression cassette والتي يصل طولها إلى 5395 bp ذلك لتحضير شكلين من DNA الأول منقى والثاني غير منقى.

❖ في التفاعل الأول تم هضم حوالي 35µg من البلاسميد بإنزيم *Swa I* وبوجود الدائرة المناسبة لعمل الإنزيم حسب توصيات الشركة المصنعة، وابتاع طريقة الرحلان التحضيري تم التخلص من الشذفة الخاصة بالتسلي البكتيري والاحتفاظ بالشذفة المتبقية المسؤولة عن التعبير ضمن جينوم الليشمانيا expression cassette عن طريق تنقيتها من الهلام باستعمال كيت تنقية (Gel Purification, Vivantes, Malaysia)

❖ في التفاعل الثاني تم هضم حوالي 18µg من البلاسميد بإنزيم *Swa I* ولم تتم تنقية نواتج القطع وإنما حسب النسبة المولية للشذفة الناتجة عن القطع بشكل تقريبي.

5.3. تحديد قيم الفولطية المناسبة لتنقيب طفيليات الليشمانيا المدارية باستعمال جهاز التنقيب الكهربائي:

تم نقل طفيليات الليشمانيا بمعدل (2×10^6 cell/ml) إلى حجم نهائي 25 ml وعند وصولها إلى منتصف الطور اللوغاريتمي تم عد الطفيليات وتنقيتها (2500 rpm/4°C/5 min). غُسلت الرسابة الحاوية على العدد الكلي للطفيليات في دائرة التحويل مرتين ثم علقت بحجم نهائي مناسب من الدائرة بحيث يصل العدد إلى ($80-100 \times 10^6$ cell/ml).

حُضرت دائرة التحويل وفقاً للتركيز التالية: 21mM HEPES, 150µM CaCl₂, 5mM MgCl₂, 120mM KCl, 0.7mM NaH₂PO₄, 6mM Glucose, pH=7.4 ثم تمت فلترتها باستعمال فلتر 0.22µm وحُفظت عند الدرجة 4°C.

وُزعت الطفيليات في أنابيب منفصلة يحوي كل منها على 450µl من الطفيليات المعقولة بدائرة التحويل بالإضافة إلى 50µl من دائرة TE، ثم حُضنت هذه الأنابيب بالإضافة إلى الكوفيات الخاصة بالتحويل (4mm) على الثلج لمدة 20 min، بعد ذلك نُقل محتوى كل أنبوب إلى أحد الكوفيات المبردة وتم تطبيق صعقتين متتاليتين بفاصل زمني قدره 10 s باستعمال جهاز التنقيب الكهربائي (ECM, 399, USA). صُعقت العينة الأولى بفولطية قدرها 2200 V، بينما العينة الثانية تم صعقها بفولطية قدرها 1500 V، وثُركت العينة الثالثة دون صعق كعينة شاهدة لحساب العدد النهائي. بعد الصعق مباشرة نقلت الكوفيات إلى الثلج وحُضنت لمدة 10 min. نقل بعدها محتوى كل كوفيت إلى فلاسك تحوي 5 ml من وسط الزرع الكامل وحُضنت الأنابيب عند الدرجة 26°C. وبعد مرور 24 ساعة تم فحص العينات وعد الطفيليات الحية في العينات المعرضة للصعق ونسب عددها إلى العدد الموجود في العينة الشاهدة، وذلك بهدف تحديد نسبة العيوشية وبالتالي تحديد قيمة الفولطية الأنسب، إذ يجب أن تتسبب الصعقة الناجمة بتموت نصف عدد طفيليات الليشمانيا الموجودة في العينة حتى تكون فعّالة.

6.3. تحويل طفيليات الليشمانيا المدارية بالبلاسميد pLEXSY GFP-sat2:

تم اتباع نفس الخطوات السابقة وأضيفت البلاسميدات الخطية الناتجة عن تفاعلي القطع وفق الترتيب التالي:

- الأنبوب الأول أضيف إليه 50µl تحوي كمية البلاسميد الخطي المنقى من الهلام.
- الأنبوب الثاني أضيف إليه 50µl من البلاسميد الخطي الناتج عن تفاعل القطع وغير المنقى من الهلام.
- الأنبوب الثالث يحوي أضيف إليه 50µl من الدائرة TE لا تحوي بلاسميدات لاستعمالها كشاهد سلبي.

صُعقت جميعها بالفولطية التي تم اختيارها في التجربة السابقة وهي 2200V. وبعد 24 ساعة تم إضافة الصاد الحيوي الخاص بالانتقاء وهو Neureothricin (NTC) بتركيز نهائي 100µg/ml. وبعد 72 ساعة تم فحص العينات باستعمال مجهر الفلورة (Olympus) وتم تحديد قيمة وسطية لكفاءة التحوير عن طريق عد الطفيليات في 5 ساحات مجهرية في كل عينة. تمت متابعة العينات في الأنابيب الثلاثة حتى التأكد التام من تموت جميع الطفيليات الموجودة في العينة الشاهدة مع مقارنة العينات المراد تحويرها مع العينة الشاهدة حتى استكمال عملية الانتقاء تحت تأثير الصاد الحيوي النوعي.

بعد استكمال الانتقاء تم الكشف عن استمرارية التعبير عن بروتين *GFP* في الطور عديم السوط وذلك بحضن الطفيليات المحورة أمامية السوط عند الدرجة C 37 لمدة 72 ساعة ثم فحصها بالمجهر الضوئي للتأكد من تحولها شكلياً إلى الطور عديم السوط، وفحصها بمجهر الفلورة لمراقبة التعبير عن بروتين *GFP*.

7.3. دراسة النمط الجيني وتحديد مدى صحة التأشير باستعمال تفاعل PCR:

تم استخلاص DNA الجينومي من طفيليات الليشمانيا المدارية وهي بشكلها أمامي السوط promastigote في طور النبات (30×10⁶ cell/ml) باستخدام كيت Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega).

بعد التأكد من جودة DNA الجينومي المستخلص عن طريق الرحلان الكهربائي تم إجراء تفاعل PCR باستعمال إنزيم Taq polymerase (master mix, GeneDirex)، واتباع شروط تفاعل PCR التالية:

95°-5 min - 35 circle (95°-2 min / 60°-30 s / 72°- 1 min) -72° -7 min.

استُعملت مرئسات خاصة بالكشف عن نجاح التأشير حيث ترتبط المرئسة الأمامية F3001 forward primer في الموقع SSU من جينوم الليشمانيا، بينما ترتبط المرئسة العكسية A1715 reverse primer ضمن الجزء المخصص للتعبير expression cassette حيث تتشافع مع المنطقة 5'UTR الخاصة بالجين الهدف *gfp*. هذه تسلسلات المرئسات من إنتاج (Jena bioscience, Germany):

F3001: 5'-GAT CTG GTT GAT TCT GCC AGT AG-3'
A1715: 5'-TAT TCG TTG TCA GAT GGC GCA C-3'

أجري بعد هذا التفاعل رحلان كهربائي لتقييم النتيجة باستعمال هلامة أغاروز 1%، ضمن دائرة TAE 0.5X، بتأثير تيار شدته 100 V، ولمدة 30 min، واحتوت الهلامة على بروميد الإيثيديوم 0.5µg/ml.

8.3. دراسة دورة حياة طفيليات الليشمانيا المدارية المحورة بالبلاسميد pLEXSY GFP-sat2:

- منحى النمو: تمت مراقبة نمو الطفيليات ومتابعتها بالمقارنة مع الطفيليات الشاهدة غير المحورة بشكل يومي بهدف تحديد المراحل التطورية المختلفة ومدة كل منها، حيث تم عدها باستعمال عداة Neubauer بعد تثبيتها بالفورم الدهيد 0.1%، ورُسم وفقاً لذلك منحى نمو خاص بكل من الطفيليات غير المحورة والطفيليات المحورة للمقارنة فيما بينهما. كما تمت تنمية الطفيليات المحورة بهدف الحصول على الشكل عديم السوط ومراقبة التغيرات في التعبير عن بروتين *GFP*، وذلك بوضعها عند درجة الحرارة C 37، إذ وضع حوالي 2×10⁶ خلية بحجم 2 ml من الوسط الكامل لمدة 72 ساعة ثم تم تصويرها باستعمال مجهر الفلورة.

4. النتائج:

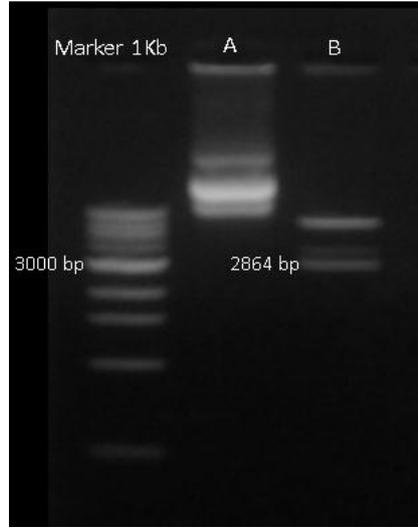
1.4. تحضير البنى البلاسميدية اللازمة لتحوير طفيليات الليشمانيا المدارية:

كنتيجة لتفاعلات القطع التي أُجريت باستعمال الإنزيم *Swa I* تم الحصول على التراكيز التالية:

في التفاعل الأول تم الحصول بعد التنقية على 6µg من التسلسل الخاص بالتعبير expression cassette.

وفي التفاعل الثاني لم تتم تنقية تفاعل القطع وإنما حسبت النسبة المولية للشدفة الناتجة عن القطع بشكل تقريبي كما يلي:

- نسبة طول الشدفة المراد تسيلها في جينوم في الليشمانيا إلى الطول الكلي للبلاسميد $\frac{5395}{8259} = 65.3\%$ وبذلك فإن نسبة هذه الشدفة تعادل حوالي $\frac{2}{3}$ من الطول الكلي للبلاسميد.
- نسبة طول الشدفة المعبرة في البكتريا إلى الطول الكلي للبلاسميد $\frac{2864}{8259} = 34.6\%$ وبذلك فإن نسبة هذه الشدفة تعادل حوالي $\frac{1}{3}$ من الطول الكلي للبلاسميد.
- من ذلك تم توقع نسبة الشدفة المعبرة في الليشمانيا بعد تفاعل القطع ودون تنقيته $18\mu\text{g} \times \frac{2}{3}$ وبالتالي تم تقدير الكمية الناتجة بحوالي $12\mu\text{g}$ من التسلسل الخاص بالتعبير في الليشمانيا، الشكل (1).



الشكل (1): صورة لهلامة الرحلان الكهربائي. البئر A البلاسميد pLEXSY GFP-sat2 غير المقطوع بأشكاله الثلاث الحلقي والملف وعالي الالتفاف، البئر B ناتج قطع البلاسميد باستعمال الأنزيم *Swa I* إذ تظهر الشدفة الهدف المراد تأسيبها ضمن جينوم الليشمانيا وهي بطول 2864 bp.

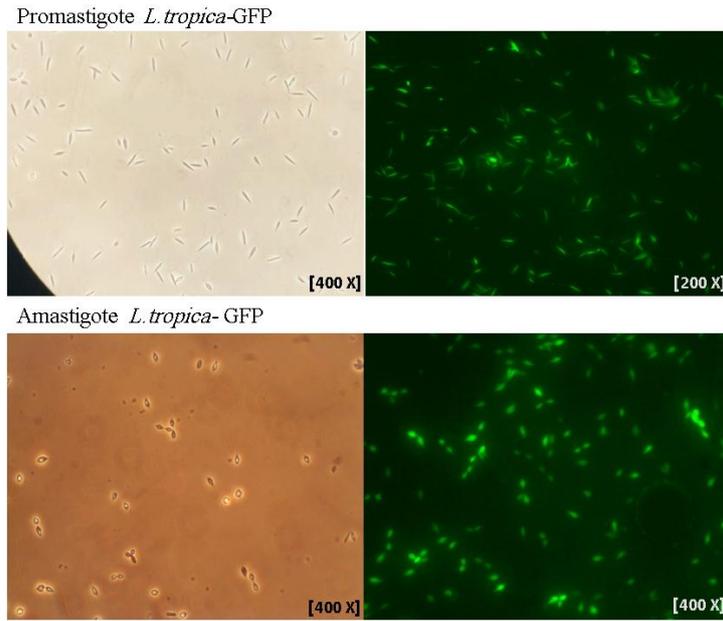
2.4. تحديد قيم الفولطية المناسبة لتنقيب طفيليات الليشمانيا المدارية باستعمال جهاز تنقيب كهربائي:
كنتيجة لتجربة الصعق تم تحديد الصعقة القاتلة للنصف بحيث تم الحصول على عينات ذات نسب عيوشية مختلفة موضحة في الجدول رقم (1)، وعليه فقد تم اختيار قيمة الفولطية 2200V لتطبيق الصعقة في التجربة التالية.

الجدول رقم (1): قيم العيوشية في العينات المعرضة للتنقيب الكهربائي

نسبة العيوشية %	عدد الطفيليات الحية cell/ml	العيونة الشاهدة
100 %	10×10^6	1500 V
84 %	8.4×10^6	2200 V
45 %	4.5×10^6	

3.4. تحوير طفيليات الليشمانيا المدارية بالبلاسميد pLEXSY GFP-sat2:

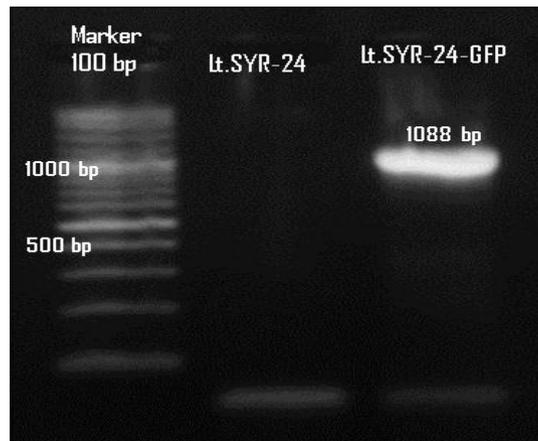
بعد مرور 72 ساعة على عملية التحوير فحصت العينات باستعمال مجهر الفلورة وتم الحصول على عينات ليشمانيا مؤشبة بجين *gfp* في كلا العينتين، وبإضافة الصاد الحيوي *NTC* استمرت عملية الانتقاء لمدة 12 يوم من الإضافة الأولى للصاد الحيوي حيث يصبح وسط العينة الشاهدة رائق بسبب تموت وانحلال خلايا الليشمانيا غير المحورة، بينما يتعكر وسط الليشمانيا المحورة بسبب نموها المتزايد وتم التأكد من التمثول الكامل للطفيليات في العينة الشاهدة عن طريق فحصها بالمجهر الضوئي. كما تم التأكد من استمرارية التعبير عن بروتين *GFP* في الطور عديم السوط، الشكل (2).



الشكل (2): صورة مجهرية لطفيليات الليشمانيا المدارية المحورة بطورها أمامي السوط وديم السوط، والمعبرة عن بروتين GFP بالتصوير باستعمال المجهر الضوئي على اليسار ومجهر الفلورة على اليمين.

4.4. دراسة النمط الجيني وتحديد مدى صحة التأشيب باستعمال تفاعل PCR:

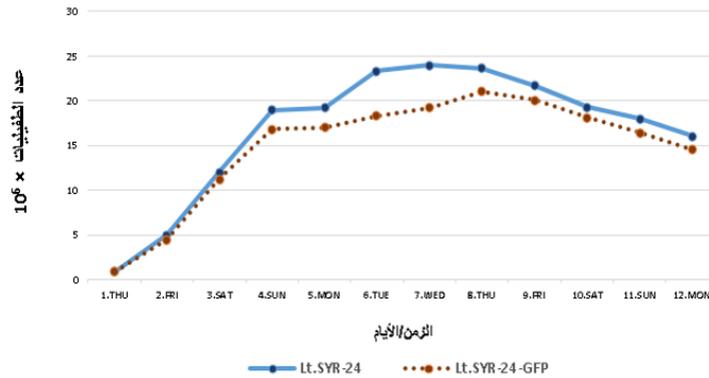
تم التأكد من نجاح عملية التأشيب بالحصول على شذفة بطول 1088 bp بعد تفاعل PCR، كون التضخيم لن يحدث إلا في حال دخول التسلسل المُدخل ضمن الموقع 18S-rRNA، بينما في الشاهد السلبي الذي يتضمن المرئسات ذاتها مع DNA جينومي لطفيليات ليشمانيا غير محورة لم يتم تضخيم أي شذف تُذكر، وهذا ما يؤكد نجاح عملية التأشيب ضمن جينوم الليشمانيا ودخول التسلسل الخاص بالتعبير بشكله وتسلسله الصحيح، الشكل (3).



الشكل (3): يبين صورة الرحلان الكهربائي لتفاعل PCR حيث تم استعمال الواسم المعياري 100 bp، ويبين الشكل ظهور شذفة بطول 1088 bp في العينة المدروسة مع عدم ظهور أي شذف في عينة الشاهد السلبي.

5.4. دراسة دورة حياة طفيليات الليشمانيا المدارية المحورة بالبلاسميد pLEXSY GFP-sat2:

منحنى النمو: تمت متابعة دورة حياة الطفيليات المحورة خلال 12 يوم، وتبين أنها لم تختلف عن مراحل دورة حياة الطفيليات غير المحورة حيث تشابه منحنى النمو تقريبا في كلا السلالتين، الشكل (4). وكان الاختلاف الوحيد في انخفاض عدد الطفيليات المحورة انخفاضاً بسيطاً دون أن يكون له تأثير على الأطوار الأربعة المميزة لمنحنى النمو، كما تم الحصول على طفيليات عديمة السوط Amastigotes مأشوية تعبر عن بروتين GFP عند الحضانة لمدة 72 ساعة في الدرجة 37°C.



الشكل (4): يبين الشكل منحنيات النمو الخاصة بطفيليات الليشمانيا المدارية غير المحورة Lt.SYR-24، وطفيليات الليشمانيا المدارية المحورة والمعبرة عن بروتين GFP المأشوب Lt.SYR-24-GFP.

5. المناقشة:

تم في هذه الدراسة تحويل خلايا من طفيليات الليشمانيا المدارية بحيث أصبحت قادرة على التعبير عن بروتين GFP داخل السيتوبلازما، فقد لوحظ نتيجة لفحص الطفيليات باستعمال مجهر الفلورة تركيز اللون الأخضر الناتج عن تألق بروتين الفلورة الأخضر داخل حدود الخلية وفي السيات، ولم يلاحظ وجوده في الوسط المحيط بالخلايا مما يدل على أن هذا البروتين غير مُفرز. تتميز هذه الطفيليات المحورة والمنتجة للبروتين الأخضر المفطور بالقدرة على تعقبها بشكل دقيق ضمن الخلايا في الوسط الصناعي أو ضمن حيوان التجربة، وذلك مهما اختلف الطور الذي ستتحده خلال عملية التحول الشكلي metacyclogenesis التي تقوم بها سواء في الطور أمامي السوط Promastigote أم عديم السوط Amastigote. وهذا ما يخدم الدراسات المتعلقة بتقييم فعالية الأدوية واللقاحات أو حتى الأبحاث التي تهدف لفهم بيولوجية هذا الطفيلي بحيث يمكن بسهولة متابعة تحركات هذا الطفيلي بدقة من خلال تقانات حيوية مختلفة كتصوير التألؤ البيولوجي الخاص بالطفيليات المحورة (Talimi-bioluminescence imaging) (Frank et al., 2012)، قبل التوجه إلى التضحية بحيوان التجربة والكشف عن الطفيلي في النسيج والخلايا وما إلى ذلك من مراحل وخطوات طويلة ومرهقة (Bolhassani et al., 2011; Talimi-Frank et al., 2012).

لوحظ باستعمال مجهر الفلورة ارتفاع كفاءة التعبير عن بروتين الفلورة، ويمكن أن نعزو ذلك المعدل العالي للانتساخ إلى سببين أساسيين: الأول هو امتلاك هذه الطفيليات تكرارية عالية من الموقع ssu 18SrRNA ضمن جينومها، هذا الموقع يتضمن التسلسل الخاص بالتعبير عن تحت الوحدة الصغيرة للـ rRNA (18S rRNA) ويُعرف أن انتساخه يتم بمعدل عالي في كلا الطورين أمامي وعديم السوط تحت سيطرة الانزيم RNA polymerase I (Mißlitz et al., 2000)، والسبب الثاني هو وجود نسختين من المحضض الريبوزومي إحداهما تعود للجينوم نفسه والثانية تمت إضافتها من التسلسل الخاص بالتعبير expression cassette الذي تم إدخاله بعملية التأسيس المتجانس homologous recombination التي يتم من خلالها تقابل تسلسلات متماثلة تتمثل بمواقع ssu في دراستنا الحالية بحيث يتم إدخال التسلسل الخاص بالتعبير من البلاسميد إلى الجينوم داخل هذه المواقع.

فيما يتعلق بأمثلة شروط التحويل، تم اتباع البروتوكول المطبق في الكثير من الدراسات التي اعتمدت على استخدام قيم فولطية عالية بمعدل 1500 V (Eberhardt et al., 2019; Robinson and Beverley, 2003; Rojas-Sánchez et al., 2016)، وذلك بعد أن تمت معايرة جهاز التنقيب الكهربائي المُستعمل (ECM,399,USA)، حيث تبين أن القيمة المطبقة على العينة بمجال بين 1500-1700 تقابل قيمة مدخلة تصل إلى 2200 V، علماً أن هذه القيمة تعتبر عالية جداً ولكن تم اختيارها لأنها أدت تجريبياً إلى تموت نصف العدد تقريباً من الطفيليات المعرضة للصدق، وهذا ما أكدته إحدى الدراسات بأن نسبة التموت التي تصل 50% هي النسبة التي يتم من خلالها التأكد

مبدئياً من نجاح عملية التحويل بكفاءة جيدة (Potter, 1988)، كما أن بعض الدراسات طبقت ذات القيمة من الفولطية (Ghosh et al., 1990; Kapler et al., 2003).

فيما بعد تم الانتقاء باستعمال الصاد الحيوي Nourseothricin وهذا ما يتوافق مع جين المقاومة *sat* الموجودة ضمن تصميم التسلسل الخاص بالتعبير ويعرف أن هذا الصاد ينتمي إلى الأمينوجليوكوسيدات التي تعتمد في عملها على إعاقة ارتباط ال mRNA على الجسيمات الريبية وبالتالي إعاقة عملية الترجمة وتركيب البروتينات، وبوجود جين المقاومة *sat* المرزمة لمركبات streptothricine acetyltransferase يمكن من خلالها مقاومة الصاد الحيوي وبالتالي الحفاظ على الخلايا المحورة والتخلص من الخلايا غير المحورة (Joshi et al., 1995).

أكدت نتائج تفاعل PCR على صحة عملية التأشيب ودخول التسلسل الخاص بالتعبير بالشكل الصحيح حيث تم اختيار زوج من المرئسات تتشافع إحداهما (F3001-forward) مع تسلسل موافق ضمن جينوم الليشمانيا (SSU) بينما تتشافع المرئسة الأخرى (A1715-reverse) مع تسلسل موافق ضمن التسلسل المعبر (5' UTR) وهذا ما يضمن دقة عملية الكشف عن دخول التسلسلات بشكلها الصحيح، بالإضافة إلى عدم ظهور عصابة موافقة بالعينة الشاهدة غير المحورة مما يزيد من تأكيد صحة عملية التأشيب. فيما يتعلق بدراسة التغيرات التي قد تطرأ على السلالة المحورة لم يلاحظ أي تغير في النمط الظاهري عليها مقارنة مع العينة الشاهدة، حيث لوحظ ثبات منحنى النمو في كلا السلالتين مع انخفاض بسيط في عدد الطفيليات المحورة خلال دورة الحياة، دون أن يشكل ذلك فارقاً هاماً طالما أن المراحل الأساسية في منحنى النمو بقيت ثابتة في كلا السلالتين، وهذا ما يتوافق مع معظم الدراسات وفي أنواع مختلفة من طفيلي الليشمانيا (Patel et al., 2014).

تعد هذه الدراسة الأولى التي نجحت في تحويل طفيليات الليشمانيا المدارية على مستوى سورية، وتم فيها تحديد الشروط المثلى لتطبيق ذلك، مما سيفتح المجال أمام المزيد من الأبحاث المستقبلية التي ستسهم بشكل فعال في مواجهة هذا الداء والاستفادة من نظام التعبير pLEXSY لتطبيقات عملية وبحثة كثيرة.

المراجع:

1. Bao, X., Palecek, S., 2016. Genetic Engineering in Stem Cell Biomanufacturing, In: Stem Cell Manufacturing. Elsevier, pp. 1-25.
2. Bolhassani, A., Taheri, T., Taslimi, Y., Zamanilui, S., Zahedifard, F., Seyed, N., Torkashvand, F., Vaziri, B., Rafati, S., 2011. Fluorescent *Leishmania* species: development of stable GFP expression and its application for *in vitro* and *in vivo* studies. *Experimental parasitology* 127, 637-645.
3. Breitling, R., Klingner, S., Callewaert, N., Pietrucha, R., Geyer, A., Ehrlich, G., Hartung, R., Müller, A., Contreras, R., Beverley, S.M., 2002. Non-pathogenic trypanosomatid protozoa as a platform for protein research and production. *Protein expression and purification* 25, 209-218.
4. Chang, A.Y., Chau, V., Landas, J.A., Pang, Y., 2017. Preparation of calcium competent *Escherichia coli* and heat-shock transformation. *JEMI methods* 1, 22-25.
5. Coelho, A.C., Oliveira, J.C., Espada, C.R., Reimao, J.Q., Trinconi, C.T., Uliana, S.R., 2016. A luciferase-expressing *Leishmania braziliensis* line that leads to sustained skin lesions in BALB/c mice and allows monitoring of miltefosine treatment outcome. *PLoS neglected tropical diseases* 10, e0004660.
6. Eberhardt, E., Bulté, D., Van Bockstal, L., Van den Kerkhof, M., Cos, P., Delputte, P., Hendrickx, S., Maes, L., Caljon, G., 2019. Miltefosine enhances the fitness of a non-virulent drug-resistant *Leishmania infantum* strain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 74, 395-406.
7. Ejazi, S.A., Ali, N., 2013. Developments in diagnosis and treatment of visceral leishmaniasis during the last decade and future prospects. *Expert review of anti-infective therapy* 11, 79-98.
8. Ghosh, S., Goswami, S., Adhya, S., 2003. Role of superoxide dismutase in survival of *Leishmania* within the macrophage. *Biochemical Journal* 369, 447-452.
9. Joshi, P.B., Webb, J.R., Davies, J.E., McMaster, W.R., 1995. The gene encoding streptothricin acetyltransferase (sat) as a selectable marker for *Leishmania* expression vectors. *Gene* 156, 145-149.
10. Kapler, G.M., Coburn, C.M., Beverley, S.M., 1990. Stable transfection of the human parasite *Leishmania major* delineates a 30-kilobase region sufficient for extrachromosomal replication and expression. *Molecular and cellular biology* 10, 1084-1094.
11. Lai, J.Y., Klatt, S., Lim, T.S., 2019. Potential application of *Leishmania tarentolae* as an alternative platform for antibody expression. *Critical reviews in biotechnology* 39, 380-394.
12. Mißlitz, A., Mottram, J.C., Overath, P., Aebischer, T., 2000. Targeted integration into a rRNA locus results in uniform and high level expression of transgenes in *Leishmania* amastigotes. *Molecular and biochemical parasitology* 107, 251-261.
13. Muhjazi, G., Gabrielli, A.F., Ruiz-Postigo, J.A., Atta, H., Osman, M., Bashour, H., Al Tawil, A., Hussein, H., Allahham, R., Allan, R., 2019. Cutaneous leishmaniasis in Syria: A review of available data during the war years: 2011-2018. *PLoS neglected tropical diseases* 13, e0007827.
14. Niimi, T., 2012. Recombinant protein production in the eukaryotic protozoan parasite *Leishmania tarentolae*: a review. *Recombinant Gene Expression*, 307-315.
15. Patel, A.P., Deacon, A., Getti, G., 2014. Development and validation of four *Leishmania* species constitutively expressing GFP protein. A model for drug discovery and disease pathogenesis studies. *Parasitology* 141, 501.
16. Potter, H., 1988. Electroporation in biology: methods, applications, and instrumentation. *Analytical biochemistry* 174, 361-373.
17. Robinson, K.A., Beverley, S.M., 2003. Improvements in transfection efficiency and tests of RNA interference (RNAi) approaches in the protozoan parasite *Leishmania*. *Molecular and biochemical parasitology* 128, 217-228. Rojas-Sánchez, S., Figueroa-Angulo, E., Moreno-Campos, R., Florencio-Martínez, L.E., Manning-Cela, R.G., Martínez-Calvillo, S., 2016. Transcription of *Leishmania major* U2 small nuclear RNA gene is directed by extragenic sequences located within a tRNA-like and a tRNA-Ala gene. *Parasites & vectors* 9, 1-14.
18. Rosano, G.L., Ceccarelli, E.A., 2014. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in microbiology* 5, 172.
19. Sheikh, S., Coutts, A.S., La Thangue, N.B., 2017. Transfection, In: *Basic Science Methods for Clinical Researchers*. Elsevier, pp. 191-209.
20. Taheri, T., Seyed, N., Mizbani, A., Rafati, S., 2016. *Leishmania*-based expression systems. *Applied microbiology and biotechnology* 100, 7377-7385.

21. Talmi-Frank, D., Jaffe, C.L., Nasereddin, A., Baneth, G., 2012. *Leishmania tropica* experimental infection in the rat using luciferase-transfected parasites. *Veterinary parasitology* 187, 57-62.
22. Vacas, A., Sugden, C., Velasco-Rodriguez, Ó., Algarabel-Olona, M., Peña-Guerrero, J., Larrea, E., Fernández-Rubio, C., Nguewa, P.A., 2017. Construction of two mcherry plasmids (pXG-mCherry) for transgenic *leishmania*: valuable tools for future molecular analysis. *Journal of parasitology research* 2017.
23. Verma, A.S., Agrahari, S., Rastogi, S., Singh, A., 2011. Biotechnology in the realm of history. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences* 3, 321.
24. Zucca, M., Savoia, D., 2011. Current developments in the therapy of protozoan infections. *The open medicinal chemistry journal* 5, 4.