کلون و بیان ژن P4 انگل Leishmania infantum در اشریشیا کولی به منظور تولید آنتی ژن P4 نوترکیب

صفر فرج نیا[۱،۲] *، عباس به پژوه[۵]، محمد حسین علیمحمدیان[۴]، حسین بابائی[۱،۳]، محمد اصغر زاده[۵] ، جعفر مجیدی[۶]، عبدالحسن کاظمی[۶]، مهران مسگری[۱] ، لیلا محمد نژاد[۲]، جلال عبدالعلی زاده[۷]

[۱] مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، [۲] مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، [۳] دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، [۴] دپارتمان ایمونولوژی، انستیتوپاستور ایران، [۵] دپارتمان بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، [۶] گروه ایمونولوژی و انگل شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

تاریخ دریافت: ۸۶/۱۰/۳ ، تاریخ پذیرش: ۸۶/۱۲/۵

Cloning and Expression of Leishmania infantum P4 gene for production of recombinant P4 antigen

Farajnia S.[1,2], Beh-Pajooh A. [2], Alimohammadian M.H. [4], Babaei H[1, 3]., Asgharzadeh M. [5], Majidi J. [6], Kazemi A. [6], Mesgari M. [1], Mohammadnejad L. [2], Abdolalizadeh J. [1]

[1]Drug applied Research center, Tabriz University of Medical Sciences, [2]Biotechnology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, [3]Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, [4]Immunology Department, Pasteur Institute of Iran, [5]Biochemistry Department, Tabriz University of Medical Sciences, [6]Immunology and Parasitology Department, Tabriz University of Medical Sciences

Received: 2007/12/24 , Accepted: 2008/2/24

Objectives: Visceral leishmaniasis (VL) or Kala-azar caused by Leishmania infantum is a severe endemic disease in the Mediterranean basin countries including Iran. The Drugs available for treatment of VL are toxic and drug resistance is increasing in many parts of the world, thus, it is believed that vaccine development is an ideal method for prevention and control of VL. The aim of this study was to prepare recombinant P4 protein from Leishmania infantum and evaluate its immunogenicity in VL patients. **Methods:** DNA was extracted from Leishmania infantum and used for amplification of P4 gene by PCR. The PCR product was cloned, sequenced and expressed in E. coli using pET 28a expression vector. Recombinant P4 protein were purified and used for analysis of sera of VL patients. **Results:** Analysis of the sequence of Leishmania infantum P4 gene (Li-P4) revealed that the gene consists of an ORF of 951bp with a 89% homology with P4 gene of cutaneous leishmaniasis agents. Expression of Li-P4 gene in E. coli resulted in high levels of recombinant proteins with molecular weight of 33 KD in SDS-PAGE. Immunoblotting analysis of the purified Li-P4 with sera of VL patients indicated that Li-P4 protein is a highly immunogenic protein expressed in the amastigote-stage of Leishmania infantum. **Conclusion:** This is the first study on isolation and characterization of P4 antigen from Leishmania infantum and indicates that Li-P4 protein is highly immunogenic and could be considered as a potent vaccine candidate against VL caused by Leishmania infantum.

Keywords: *Visceral leishmaniasis, P4 antigen, Leishmania infantum.*

زمینه و هدف: لیشمانیوز احشایی یا کالاآزار یک بیماری عفونی مهلک و کشنده ای است که عامل آن درمنطقه مدیترانه ای از جمله ایران لیشمانیا اینفانتوم میباشد. درمانهای دارویی موجود علیه این بیماری دارای عوارض سمی بوده و مقاومت دارویی در نقاط مختلف جهان در حال توسعه می باشد. لذا عقیده بر این است که توسعه واکسن بهترین راه پیشگیری و کنترل بیماری لیشمانیوز می باشد. هدف مطالعه حاضر تولید پروتئین P4 نوترکیب لیشمانیا اینفانتوم و ارزیابی اولیه آن به عنوان یک کاندیدای واکسن جدید علیه لیشمانیوز احشایی می باشد. **روش ها:** انگل لیشمانیا اینفانتوم کشت داده شده و DNA آن استخراج و برای تکثیر ژن P4 از PCR استفاده شد. ژن تکثیر شده کلون گردیده و پس از تایید توالی آن، از طریق وکتور بیانی pET 28a در E. coli بیان گردید. پروتئین نوترکیب تخلیص گردیده و واکنش سرمی بیماران لیشمانیوز احشایی با آن مورد بررسی قرار گرفت. **یافته ها:** آنالیز توالی ژن P4 کلون شده از لیشمانیا اینفانتوم نشان میدهد که این ژن ۹۵۱ باز طول داشته و دارای همولوژی بالایی (۸۹٪) با ژن P4 گزارش شده از عوامل لیشمانیوز جلدی می باشد. بیان ژن P4 در E. coli منجر به تولید پروتئین نوترکیب در غلظت بالا گردید که خود را به صورت باند واضحی در محدوده ۳۳ کیلو دالتون نشان می دهد. ایمونوبلاتینگ سرم بیماران لیشمانیوز احشایی با آنتی ژن P4 نوترکیب نشان می دهد که بیماران دارای آنتی بادی از نوع IgG علیه این آنتی ژن می باشند. **نتیجه گیری:** این مطالعه اولین مطالعه در مورد جداسازی و ارزیابی آنتی ژن P4 لیشمانیا اینفانتوم بوده و نتایج آن نشان میدهد که این پروتئین ایمونوژنیک بوده و می تواند بعنوان یک کاندید واکسن بالقوه برای بیماری لیشمانیوز احشایی در نظر گرفته شود.

واژه های کلیدی: *لیشمانیوز احشایی، لیشمانیا اینفانتوم، آنتی ژن* P4.

*نویسنده مسئول: دکتر صفر فرج نیا، استادیار، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تلفن: ۳۳۶۳۲۳۴-۰۴۱۱، ۰۹۱۴۳۰۱۸۵۸۹، نمابر: ۳۳۶۳۲۳۱-۰۴۱۱،

*Corresponding Author: Dr.Safar Farajnia, Assistant Professor, Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tel: 0411- 3363234; Fax: 0411- 3363231; E-mail:farajnias@tbzmed.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir

۱- مقدمه

لیـــشمانیوز احشایی یا کالاآزار یک بیماری سیستمیک است که سالیـــانه نـیم میلیون نفر را در٦٥ کشور جهان مبتلا می کند (۱). انگل های تک یاخته از خانواده Leishmania (L.) donovani، عوامل ایجاد کننده این بیماری بوده (۲) و L. infantum، عضوی از این خانواده، عامل اصلی لیشمانیوز احشایی در بسیاری از مناطق دنیا از جمله ایران می باشد (۳). توزیع جغرافیایی این بیماری شامل بیشتر نواحی آسیا، مدیترانه و آمریکای جنوبی است. مخزن اصلی انگل، حیواناتی چون سگ سانان و جوندگان بوده و انتقال بیماری از راه گزش پشه های خاکی از گونه Phlebotomus به وقوع می پیوندد (٤). چرخه زندگی این انگل شامل دو مرحله پروماستیگوتی و آماستیگوتی است. پروماستیگوتهای تاژک دار در روده پشه خاکی زندگی و تکثیر می کنند و توسط نیش پشه خاکی به مهره داران منتقل می شوند، ولی زمانی عفونت حاصل می شود که پروماستیگوت ها بتوانند به درون ماکروفاژها وارد و به سرعت تبدیل به آماستیگوت شوند. پخش شدن عفونت با تکثیر آماستیگوت ها در فاگولیزوزم سلولهای فاگوسیتی رخ می دهد (۵). علایم اصلی لیشمانیوز احشایی شامل تب، کم خونی، لاغری، افزایش گاما گلوبولین، بزرگ شدن کبد و طحال و سرکوب پیش رونده پاسخ ایمنی سلولی بوده (٦) و تقریبا نیمی از قربانیان بیماری را کودکان تشکیل میدهند (٤). در حال حاضر واکسن قطعی برای این بیماری در دسترس نبوده، روش شیمی درمانی مورد استفاده برای درمان بیماری بسیار سمی بوده و در ۵ تا ۱۰ درصد موارد به شکست می انجامد (٦). توسعه مقاومت پایدار پس از بهبودی ازعفونت نشان میدهد که تولید واکسن علیه این بیماری امکان پذیر است. روشهای مختلفی برای توسعه واکسن علیه این بیماری استفاده گردیده که شامل واکسیناسیون با انگل های زنده تخفیف حدت یافته و انگل های کشته شده بـــا حرارت می گردد ولی به علت مسایل ایمنی و یا کارایی پایین مورد تایید قرار نگرفته اند (۷، ۸) مطالعات جدید بر واکسنهای زیر واحدی (Subunit) متمرکز بوده و آنتی ژن هایی متعددی نظیر آنتی ژن های A2 ، P-4، gp63، GP46/M-2 (۹)، p36/LACK (۱۰)، LiP0 (۱۱)، TSA/LmSTI1 (۱۲) و CPB (۱۳، ۱٤) جداسازی و مورد بررسی قرار گرفته اند. این تحقیقات نشان داده اند که برخی از این آنتی ژن ها قادرند در مدل های موشی در مقابل عفونت با گونه های لیشمانیا ایمنی نسبی ایجاد کنند. در سالهای اخیر شناسایی مکانیسمهای ایمنی دخیل در بیماری افق جدیدی را در توسعه واکسن علیه لیشمانیوز پدیدار ساخته و نشان داده شده است که ایمنی حفاظت بخش در لیشمانیوز همراه با پاسخ ایمنی سلولی از نوع Th1 است. این نوع پاسخ با تولید IL-2 ، IFN-γ و IL-12 مشخص شده و همراه با فعال شدن ماکروفاژهای فاگوسیتی است (٤). لذا آنتی ژنهایی که قادر به القا پاسخ ایمنی سلولی از نوع Th1 هستند به عنوان کاندیدای واکسن های بالقوه علیه بیماری محسوب میشوند. آنتی ژن P-4 یک آنزیم نوکلئازی کلاس I است که انگل به کمک آن نوکلئوتید های پورینی مورد نیاز برای رشد و تکثیر خود را از میزبان به دست می آورد. این آنتی ژن نخستین بار در L. pifanoi شناسایی گردیـــد و سپـــس از L. mexicana و L. major جداسازی و مورد مطالعه قرار گرفت (۷، ۱۵). نشان داده شده است که این پروتئین علاوه بر نقش کلیدی در متابولیسم نوکلئوتید ها و تامین بازهای پورینی برای انگل، یک ملکولی ایمنی زا با توانایی بالای تحریک سامانه ایمنی سلولی بوده و قادر به القا پاسخ از نوع Th1 می باشد (۷). تحقیقات نشان داده اند که آنتی ژن P4 تخلیص شده از L. pifanoi می تواند پاسخ ایمنی حافظت بخش را القا نموده و به طور گزینشی پاسخ سلولی Th1 را در خون محیطی سلولهای تک هسته ای بیماران آلوده به لیشمانیوز پوستی آمریکایی تحریک نماید (۷). این پروتئین هم در پروماستیگوت و هم در آماستیگوت بیان می شود ولی میزان بیان آن در مرحله آماستیگوتی یعنی مرحله عفونت زا به صورت قابل توجهی بیشتر است (۵). مجموعه مطالعات فوق الذکر مولکول P4 را بعنوان یک کاندیدای واکسن امید بخش برای لیشمانیوز جلدی مطرح کرده است اما اطلاعاتی در مورد خصوصیات مولکولی یا ایمونولوژیک این پروتئین در عوامل لیشمانیوز احشایی وجود ندارد. هدف مطالعه حاضر کلون و بیان نوترکیب ژن پروتئین P4 از لیشمانیا اینفانتوم، عامل لیـشمانیوز احشایی در منطقه مدیترانه ای از جمله ایران و بررسی پاسخ ایمونولوژیک بیماران مبتلا به لیشمانیوز احشایی علیه پروتئین P4 نوترکیب می باشد.

۲- مواد و روش ها

۲-۱: کشت انگل و استخراج DNA

در این پژوهش انگل L. infantum، سویه بومی ایران از انستیتو پاستور ایران تهیه و مورد استفاده قرار گرفت. پروماستیگوت ها در 26 °C در محیط RPMI 1640 حاوی ال- گلوتامین (Gibco BRL) و FCS ۱۰٪ غیر فعال شده با حرارت کشت داده شدند. انگل ها در مرحله رشد لگاریتمی جمع آوری شده و با PBS (pH 7.2) شستشو داده شدند. جهت استخراج DNA ژنومی، رسوب سلولی حاوی

Archive of SID

www.SID.ir

پروماستیگوت ها در بافر لیزکننده (50 mM NaCl, 50 mM 1%SDS, 50 mM EDTA, Tris–HCl, pH 8.0) حل گردیده برای یک شب با Proteinase K (100 µg/ml, Sigma-Aldrich) انکوبه گردید. سپس DNA موجود در نمونه از طریق استخراج فنل- کلروفرم و رسوب با اتانول خاص سازی شد. برای این منظور، مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از مخلوط فنل- کلروفرم (۱:۱) با ۵۰۰ میکرولیتر از انگل موجود در بافر لیز مخلوط شده و در دور ۱۰۰۰۰ برای ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس فاز روئی به لوله جدید منتقل شده و روی آن دو حجم از اتانل ۱۰۰٪ اضافه گردید. مخلوط سپس در دور ۱۲۰۰۰ برای ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شده و رسوب پس از شستشو با اتانل ۷۰٪ و خشک شدن در ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر حل گردید.

۲-۲: تکثیر ژن Li-P4 با PCR

DNA استخراج شده به همراه پرایمر رفت 5'-ATCATATGTGGGGCTGCGTGGGTCACAT-3' و پرایمر برگشت 5'-TACTCGAGCACCTCGCTTCGGACG-3' که بر اساس توالی های حفظ شده ژن P4 در سویه های لیشمانیوز جلدی طراحی شده بود در واکنش PCR وارد گردید. مخلوط واکنشPCR شامل 10 pM از هر پرایمر، 200 µM dNTPs و $MgCl_2$ 1.5 mM و 2U از آنزیم Pfu DNA polymerase (Fermentas) بود. شرایط PCR شامل واسرشت اولیه در ۹۴ °C برای ٤ دقیقه و به دنبال آن ۳۰ سیکل واسرشت در۹۴ °C برای ۱ دقیقه، اتصال پرایمرها در ۶۰ °C برای ۱ دقیقه، گسترش در ۷۲°C برای ۱ دقیقه بود. سپس ده واحد از آنزیم Taq DNA ploymerase به مخلوط اضافه گردیده و واکنش برای ۲۰ ذقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد ادامه یافت. تکثیر محصول مورد نظر از طریق الکتروفورز در ژل آگاروز و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید آشکارسازی گردید.

۲-۳: کلون وتعیین توالی ژن Li-P4

محصول PCR به کمک کیت تخلیص محصول PCR (Roche) خالص سازی شده و به همراه حامل pGEM-T easy (Promega) و آنزیم T4 لیگاز در واکنش اتصال وارد گردید. محصول واکنش به E. coli سویه ی DH5α (Promega) ترانسفورم شده پس از کشت بر روی محیط حاوی IPTG، Xgal و آمپی سیلین، کلونی های سفید رنگ انتخاب و از آنها استخراج پلاسمید به عمل آمد. پلاسمیدهای جدا شده برای دارا بودن اینسرت مربوطه با روش PCR و همچنین هضم آنزیمی مورد بررسی قرار گرفتند. جهت تعیین توالی ژن کلون شده، یکی از کلونهای حاوی اینسرت خالص سازی شده و برای تعیین توالی به شرکت Prime ایتالیا فرستاده شد.

۲-۳: بیان نوترکیب ژن Li-P4

برای بیان ژن p-4 در E. coli از حامل بیانی pET28a (Novagen) که دارای پروموتر T7 می باشد استفاده گردید. ابتدا قطعه ژن مورد نظر با آنزیم های محدودگر Xho I و NdeI از حامل pGEM جدا شده، سپس به حامل pET28a برش داده شده با آنزیمهای فوق الذکر متصل گردیده و سازه pET28a-LiP4 به دست آمد. این سازه به E. coli سویه یBL21 (Novagen) ترانسفورم شده و در محیط کشت LB Broth تا رسیدن به OD = 0.5 رشد داده شد سپس با افزودن IPTG (با غلظت نهایی 0.5 mM) برای ٤ ساعت القا گردیده و بیان از طریق SDS-PAGE آنالیز گردید.

۲-۵: خالص سازی پروتئین نو ترکیب Li -P4

E. coli سویه ی Bl21 حاوی سازه بیانیpET28a-LiP4 در حجم یک لیتر کشت داده شده و پس از القا توسط IPTG به کمک سانتریفوژ باکتریها جمع آوری شد. رسوب باکتریایی در 5ml بافر لیز کننده (300mM NaCl، 50 mM NaH2PO4، 8 =PH) سونیکه و لیز شد. مخلوط حاوی باکتری لیز شده سپس سانتریفوژ گردیده و به دو قسمت سوپ و رسوب تفکیک شد. برای پی بردن به ماهیت پروتئین مورد نظر فراکسیونهای سوپ و رسوب از طریق SDS-PAGE آنالیز شد. با توجه به اینکه پروتئین نوترکیب به صورت 6 His-tag بیان شده بود از ستونNi-NTA (Qiagen) برای تخلیص پروتئین نوترکیب استفاده گردید. برای این منظور رسوب سونیکاسیون در بافر لیز حاوی ۸ مولار اوره حل گردیده و از ستون Ni-NTA که قبلا با بافر مربوطه متعادل سازی شده بود عبور داده شد. سپس ستون شستشو داده شده و پروتئین مورد نظر با استفاده از بافر حاوی ایمیدازول (250 mM) از ستون جداسازی و جمع آوری گردیده و در برابر PBS دیالیز گردید. کیفیت پروتئین خالص سازی شده با استفاده از ژل SDS-PAGE ده درصد کنترل شد.

۲-٦: وسترن بلاتینگ

برای بررسی پاسخ ایمنی بیماران مبتلا به لیشمانیوز احشایی علیه آنتی ژن P4 از وسترن بلاتینگ استفاده گردید. برای این منظور ابتدا پروتئین P4 تخلیص شده به میزان 5 µL/well در ژل SDS-PAGE الکتروفورز شده و پس از پایان الکتروفورز، پروتئین از روی ژل با روش Semi-dry blotting به کاغذ نیتروسلولز منتقل شد. پس از بلوکه کردن جایگاه های غیر اختصاصی با Skimmed Milk، نوارهای PVDF حاوی آنتی ژن با سرم های بیماران مبتلا به

Archive of SID

www.SID.ir

لیشمانیوز احشایی ناشی از لیشمانیا اینفانتوم با رقت 1/100 و به مدت ۱ ساعت مجاور گردید. پس از شستشو با TBST، نوارها با آنتی بادی Anti-human IgG متصل به HRP به مدت ۱ ساعت انکوبه شد و نهایتا واکنش از طریق مجاورت نوارها با سوبسترای DAB آشکارسازی گردید.

۳- نتایج

۳-۱: تکثیر، کلونینگ و تعیین توالی ژن P4 لیشمانیا اینفانتوم

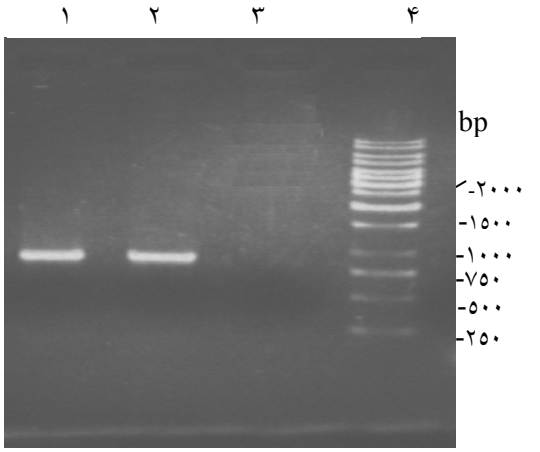
تکثیر ناحیه کد کننده ژن نوکلئاز P4 لیشمانیا اینفانتوم با PCR منجر به تکثیر قطعه ای اختصاصی گردید که به صورت باندی با اندازه تقریبی 860 bp در ژل آگارز ظاهر گردید (تصویر-۱). محصول PCR با روش T-A کلونینگ در وکتور pGEM-T easy کلون گردیده و با استفاده از روش هضم آنزیمی تایید گردید (تصویر-۲). آنالیز توالی ژن کلون شده نشان داد که ژن P4 لیشمانیا اینفانتوم دارای ۹۹٪ همولوژی با ژن P4 گزارش شده از لیشمانیا دونووانی و ۸۹٪ همولـوژی بـــا ژن گزارش شده از لیشمانیا ماژور می باشد.

۳-۲: بیان آنتی ژن نو ترکیب P4 در E. coli و تخلیص آن

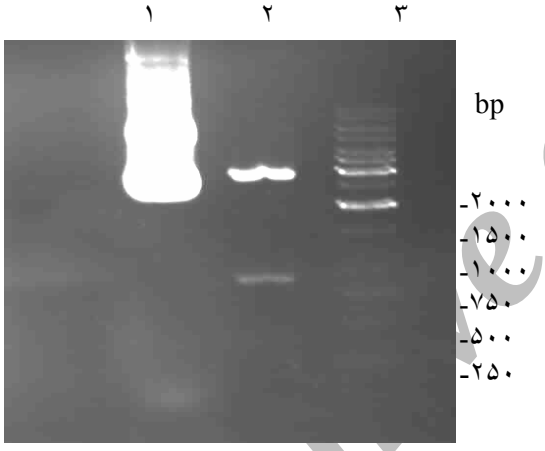
اینسرت مورد نظر پس از تایید با تعیین توالی، در وکتور pET 28a ساب کلون شده و سازه pET28-LiP4 در میزبان BL21 ترانسفرم گردید (تصویر ۳). بیان پروتئین نوترکیب با این سازه منجر به تولید پروتئین P4 با غلظت بالایی گردید که بیش از ۲۰٪ پروتئین سلولی را تـــشکیل داده و بـــصورت یک باند ۳۳ کیلو دالتونی غلیظ در آنالیز SDS-PAGE مشخص گردید. بـــا توجه به پیش بیـــنی فیوژن 6 His-Tag در انتهایN-terminal پروتئین نوترکیب، تخلیص با ستون Ni-NTA منجر به تخلیص پروتئین مورد نظر در خلوص بالایی گردید که به صورت باند ۳۳ کیلو دالتونی در ژل SDS-PAGE رنگ آمیزی شده با کوماسی بلو مشخص گردید (تصویر٤).

۳-۳: بررسی پاسخ ایمونولوژیک به آنتی ژن Li-P4 در بیماران مبتلا به لیشمانیوز احشایی

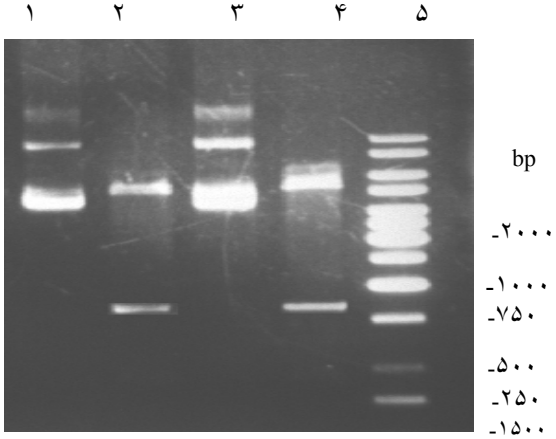
برای بررسی آنتی زنیسیته پروتئین P4 در طی عفونت با لیشمانیا اینفانتوم، از بررسی حضور آنتی بادی اختصاصی ضد پروتئین P4 در سرم کودکان مبتلا به لیشمانیوز احشایی استفاده گردید. آنالیز با وسترن بلات نشان داد که بیماران مبتلا به لیشمانیوز احشایی دارای آنتی بادی اختصاصی علیه آنتی ژن فوق بوده و واکنش ایمنی مربوطه در آنالیز وسترن بلات قابل مشاهده است (تصویر۵).



تصویر۱: تکثیر ژن نوکلئاز P4 لیشمانیا اینفانتوم. با PCR . ستون ۱ و ۲ ، محصول PCR ژن نوکلئاز P4 لیشمانیا اینفانتوم ستون ۳ ، کنترل No DNA ستون ٤، مارکر وزن مولکولی



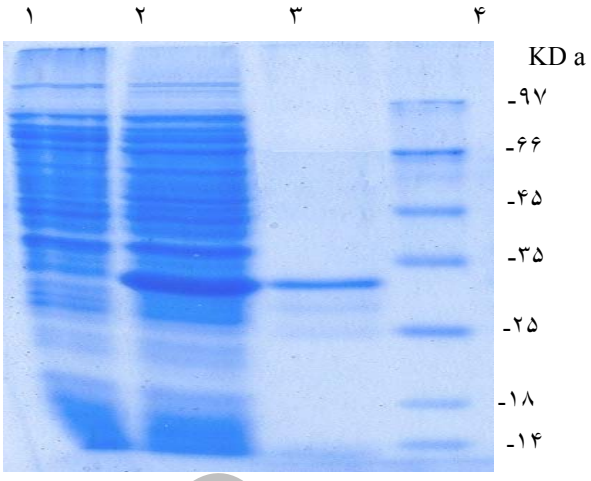
تصویر۲: کلونینگ ژن نوکلئاز P4 لیشمانیا اینفانتوم در وکتور pGEM-T ستون ۱ - پلاسمید pGEM -LiP4 ، قبل ازهضم آنزیمی، ستون ۲- پلاسمید pGEM-LiP4 ، هضم شده با آنزیم E coR I، ستون ۳- مارکر وزن مولکولی



تصویر ۳- کلونینگ ژن LiP4 در وکتور pET 28a. ستون ۱و ۳، پلاسمید pET 28a-LiP4 قبل ار هضم آنزیمی، ستون۲و ٤، پلاسمید pET 28a-LiP4 بعد از هضم با آنزیمهای Sal I-Pst I، ستون۵، مارکر وزن مولکولی

Archive of SID

www.SID.ir

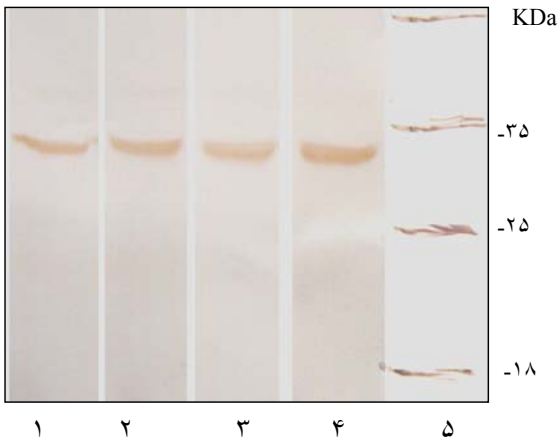


تصویر ٤: بررسی بیان پروتئین P4 نوترکیب با SDS-PAGE. ستون ۱، Lysate سلولهای Bl21 حاوی سازه ژنی بیانی pET 28-LiP4 ؛ قبل از القا، ستون ۲، Lysate سلولهای Bl21 حاوی سازه ژنی بیانی pET 28-LiP4 ؛ بعد از القا، ستون ۳ ، پروتئین خالص شده P4، ستون ٤ ، مارکر وزن مولکولی

٤- بحث

رویکرد جدید در توسعه واکسن علیه لیشمانیوز استفاده از آنتی ژن های خالصی است که بتواند ایمنی سلولی از نوع Th1 را فعال نموده و منجر به تولید اینترفرون گاما گردد (١٦). مطالعات انجام گرفته در زمینه توسعه واکسن علیه لیشمانیا اغلب بر روی لیشمانیوز جلدی متمرکز بوده و مطالعات اندکی در مورد واکسن لیشمانیوز احشایی انجام گرفته است. در حالیکه لیشمانیوز احشایی شدیدترین شکل بیماری بوده ودر صورت عدم تشخیص و درمان به موقع منجر به مرگ می گردد (۷).

در مطالعه کنونی پروتئین P4 از لیشمانیا اینفانتوم عامل بیماری لیشمانیوز احشایی در منطقه مدیترانه ای به صورت نوترکیب بیان و خالص سازی شد تا مقدمه ای برای مطالعات واکسن علیه لیشمانیوز احشایی باشد. پروتئینهای متعددی از گونه های مختلف لیشمانیا جداسازی و از نظر پتانسیل پیشگیری از عفونت مورد ارزیابی گرفته انـــد (۱۳-۹). طی این مطالعات مشخص گردیده که پروتئینهای آماستیگوتی توانایی بالاتری در تحریک سامانه ایمنی داشته و کاندیدای واکسن بهتری هستند چرا که مرحله آماستیگوتی، مرحله ای از زندگی انگل است که نسبت به سیستم ایمنی میزبان مقاوم بوده و باعث استقرار عفونت در بدن میزبان می گردد. پروتئین P4 یک پروتئین با خاصیت نوکلئازی است که بصورت بارزی در مرحله آماستیگوتی انگل بیان و به خارج سلول ترشح شده (۱۷) و با هیدرولیز مولکولهای DNA و RNA، بازهای پورینی را برای بقا و تکثیر انگل در درون سلولهای فاگوسیتی فراهم می کند. این فرایند با توجه به عدم توانایی انگل در سنتز de-novo



تصویر ٥- بررسی واکنش ایمنی بیماران مبتلا به لیشمانیوز احشایی به آنتی ژن Li-P4 نوترکیب با روش ایمونوبلاتینگ. ستون ۱الی ٤، ایمونوبلات پروتئین P4 نوترکیب لیشمانیا اینفانتوم با سرم بدست آمده از ٤ بیمار مبتلا به کالاآزار. ستون ٥، مارکر وزن مولکولی.

بازهای پورینی از اهمیت حیاتی برای لیشمانیاها برخوردار است. همچنین ویژگی ترشحی بودن پروتئین P4 امکان قرارگرفتن این پروتئین را در معرض سیستم ایمنی فراهم کرده و به این پروتئین خاصیت ایمونوژنیک می بخشد.

سونگ و همکاران در سال ۱۹۹۵ نخستین بار پروتئین P4 را از L. pifanoi و L. amazonensis تخلیص کرده و توانایی آن را در محافظت بخشی موش های BALB/c در برابر لیشمانیوز جلدی ناشی از L. pifanoi و L. amazonensis نشان دادند (۹). در سال ۲۰۰۰ ژن P4 از L. pifanoi (۷) و در سال ۲۰۰٤ از لیشمانیا ماژور (۱۵) جداسازی و تعیین خصوصیت شد. مطالعات انجام گرفته در مورد پتانسیلهای ایمونولوژیکی پروتئین P4 لیشمانیا ماژور نشان داد که این آنتی ژن باعث تحریک تولید اینترفرون گاما و اینترلوکین-۱۲ از سلولهای تک هسته ای بهبود یافتگان از عفونت با لیشمانیا ماژور شده و سیستم ایمنی را در جهت Th1 سوق میدهد (۱۸).

مطالعه حاضر نخستین گزارش از کلون و تعیین توالی ژن P4 از لیشمانیا اینفانتوم می باشد. بررسی توالی ژن P4 لیشمانیا اینفانتوم نشان می دهد که این آنتی ژن دارای ۸۹٪ همولوژی با ژن P4 گزارش شده از لیشمانیا ماژور می باشد حفاظت بالای این مولکول در گونه های مختلف انگل لیشمانیا از یکسو نشانه ای از اهمیت این مولکول برای حیات انگل بـــــوده و از سوی دیگر نشان می دهد که این پروتئین احتمالا مشابه همتای خود در عوامل لیشمانیـــوز جلدی از خاصیت ایمونوژنیسیته بالایی برخوردار باشد.

نتایج مطالعات اولیه با روش ایمونوبلاتینگ موید این نظر بوده و نشان میدهد که بیماران لیشمانیوز احشایی قادر به

Archive of SID

www.SID.ir

شناسایـــــی این آنتی ژن بوده و اغلب بیماران با آن واکنش میدهند. مطالعات آتی به صورت In-vivo و In-vitro، قابلیت این پروتئین در القا سیستم ایمنی سلولی، الگوی سایتوکینی تولید شده و حفاظت بخشی آن در مدل های حیوانی را هر چه بیشتر روشن خواهد کرد.

۵- تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی مشترک مرکز تحقیقات کاربردی دارویی تبریز و انستیتو پاستور ایران به انجام رسیده است که بدین وسیله از دو مرکز فوق قدردانی میگردد.

6- References:

1. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases, 2004, 27(5):305-318.
2. Mauricio L., Gaunt M. W., Stothard J. R, Miles M. A. Genetic typing and phylogeny of the Leishmania donovani complex by restriction analysis of PCR amplified gp63 intergenic regions. Parasitology, 2001, 122(4): 393-403.
3. del Giudice P. Marty P., Lacour J.P., Perrin C., Pratlong F., Haas H., Dellamonica P., Le Fichoux Y. Cutaneous Leishmaniasis due to L. infantum, case report and literature Review. Archives of Dermatology, 1998, 134(2):193-8.
4. Bhattacharya S.K., Dipika S., Karbwang J. Childhood visceral leishmaniasis. Indian Journal of Medical Research, 2006, 123(3): 353-356.
5. Soong L., Duboise M., Kima P., Mcmahon-Pratt D. Leishmania pifanoi Amastigote Antigens Protect Mice against Cutaneous Leishmaniasis. Infection and Immunity, 1995, 63(9): 3559-3566.
6. Gamboa-Le´on R., Paraguai de Souza E., Borja-Cabrera G.P.,. Santos F.N. Myashiro L.M., Pinheiro R.O., Dumonteil E., Palatnik-de-Sousa C.B. Immunotherapy against visceral leishmaniasis with the nucleoside hydrolase DNA vaccine of Leishmania donovani. Vaccine, 2006, 24(22): 4863-4873.
7. Kar S., Soong L., Colmenares M, Goldsmith-Pestana K., McMahon-Pratt D. The Immunologically Protective P-4 Antigen of Leishmania Amastigotes. The Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(48): 37789-37797.
8. Campbell K., Diao H., Ji J, Soong L. DNA Immunization with the Gene Encoding P4 Nuclease of Leishmania amazonensis Protects Mice against Cutaneous Leishmaniasis. Infection and Immunity, 71(11): 6270-6278.
9. Soong L., Duboise S.M., Kima P., McMahon-Pratt D. Leishmania pifanoi Amastigote Antigens Protect Mice against Cutaneous Leishmaniasis. Infection and Immunity, 1995, 63 (9): 3559-3566.
10. Melby P.C., Yang J., Zhao W., Perez L.E., Cheng J. Leishmania donovani p36 (LACK) DNA Vaccine Is Highly Immunogenic but Not Protective against Experimental Visceral Leishmaniasis. Infection and Immunity, 2001, 69(8): 4719-4725.
11. Iborra S., Soto M., Carrio´n J., Nieto A., Ferna´ndez E Alonso C Requena J.M. The Leishmania infantum Acidic Ribosomal Protein P0 Administered as a DNA Vaccine Confers Protective Immunity to Leishmania major Infection in BALB/c Mice. Infection and Immunity, 2003, 71(11): 6562-6572.
12. Campos-Neto A., Webb J. R., Greeson K., Coler R. N., Skeiky Y. A. W., Reed S. G. Vaccination with Plasmid DNA Encoding TSALmSTI1 Leishmanial Fusion Proteins Confers Protection against Leishmania major Infection in Susceptible BALB/c Mice. Infection and Immunity, 2002, 70(6): 2828-2836.
13. Zadeh-Vakili A., Taheri T., Taslimi Y., Doustdari F., Salmanian A.H., Rafati S. Immunization with the hybrid protein vaccine, consisting of Leishmania major cysteine proteinases Type I (CPB) and Type II (CPA), partially protects against leishmaniasis. Vaccine, 2004, 24(15), 1930-1940.
14. Rafati S., Ghaemimanesh F., Zahedifard F. Comparison of potential protection induced by three vaccination strategies (DNA/DNA, Protein/Protein and DNA/Protein) against Leishmania major infection using Signal Peptidase type I in BALB/c mice. Vaccine, 2006, 24 (16): 3290-3297.
15. Farajnia S., Alimohammadian M.H., Reiner N.E., Karimi M., Ajdari S., Mahboudi F. Molecular characterization of a novel amastigote stage specific Class I nuclease from Leishmania major. International Journal for Parasitology, 2004, 34(8): 899–908.
16. Mansueto P, Vitale G, Di Lorenzo G, Rini GB, Mansueto S, Cillari E. Immunopathology of leishmaniasis: an update. Int J Immunopathol Pharmacol. 2007, 20 (3): 435-45.
17. Joshi MB, Dwyer DM. Molecular and functional analyses of a novel class I secretory nuclease from the human pathogen, Leishmania donovani.Journal of Biological Chemistry, 2007, 282 (13): 10079-95
18. Farajnia S, Mahboudi F, Ajdari S, NE Reiner, Kariminia A and Alimohammadian M.H. Mononuclear cells from patients recovered from cutaneous leishmaniasis respond to Leishmania major amastigote class I nuclease with a predominant Th1 like response. Clinical and Experimental Immunology, 2005, 139(3): 498-505.

Archive of SID

www.SID.ir