مقاله پژوهشی

بررسی و مقایسه محتوی پروتئینی پروماستیگوت و آماستیگوت لیشمانیا ماژور تهیه شده در محیط کشت با استفاده از روش الکتروفورز ژل پلی اکریلامید

سیمین دخت سلیمانی فرد*، رضا ارجمند*، دکتر سیدحسین حجازی**

دریافت : ۹۱/۴/۱۲ ، پذیرش : ۹۱/۱۰/۱۲

چکیده:

مقدمه و هدف: لیشمانیا تک یاخته ای ازخانواده تریپانوزوماتیده ازرده سارکوماستیگوفورا می باشدکه دارای دو مرحلـه ی قابـل تشخیص در چرخه ی زندگی خود است. فرم پروماستیگوت، فلاژل دار و متحرک بوده و در روده پشه خاکی ناقل تکثیر می یابـد. فرم آماستیگوت، غیر متحرک بوده و در داخل ماکروفاژهای میزبان پستاندار مستقر می گردد. یکی از راه های مبارزه مـؤثر بـا یک میکروارگانیسم ، شناسایی آنتی ژن های هدف اختصاصی آن می باشد. همچنین تولید واکـسن هـای کارآمـد متـضمن تعیـین هویت و تولید و تخلیص ایمونوژن های مصونیت بخش است . هدف از انجام این مطالعه ، یافتن محتوی پروتئینـی آماسـتیگوت و پروماستیگوت، شناسایی پروتئین های هر مرحله از انگل ، مقایسه این یافته ها و دستیابی به تفاوت ها و شباهت های آنها با یکدیگر بوده است.

روش کار: این مطالعه یک مطالعه مقطعی بوده و برای نیل به اهداف از پیش تعیین شده ، نمونـه L.major (MRHO/IR/75/ER) از موش های Balb/c از قبل آلوده شده به محیط کشت NNN اصلاح شده و سپس به محیط مایع کشت سلولی RPMI-1640 انتقـال داده شـد. بـرای تهیـه اشـکال آماسـتیگوت از محـیط RPMI-1640 بـا PH ۵/۵ در دمـای $37^{\circ}c$ و حـضور ۵٪ Co_2 اسـتفاده شـد. الکتروفورز به روش سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE) انجام گردید و اوزان ملکولی باندهای حاصل از دو آنتی ژن مقایسه گردید.

نتایج: باندهای مشترک میان هر دو فرم، باندهای با وزن ملکـولی۱۳۰تـا۱۱۰، ۹۶، ۹٤، ۹۰، ۸۰، ۶۵، ۶۳، ۵۰، ۳۶و ۱۹کیلـو دالتـون بودند. باندهای مختص پروماستیگوت، باندهای با وزن ملکولی ۲۲،۲۸،۴۶کیلودالتون بود. همچنین باندهای ۱۲ و ۳۵ کیلودالتـونی فقط در فرم آماستیگوت دیده شد.

نتیجه نهایی: با توجه به نتایج مطالعه حاضر انگل لیشمانیا در مراحل پروماستیگوت و آماسـتیگوت واجـد پـروتئین هـای اختـصاصی همان مرحله است . طبق تحقیقات انجام شده آماستیگوت های اکسنیک و بافتی مشابه هستند در نتیجه با تکیه بـر آنتـی ژن هـای اختصاصی هر مرحله ، می توان در جهت طراحی و تهیه واکسن و داروهای مؤثر برضد انگل گام برداشت .

کلید واژه ها: آماستیگوت / پروماستیگوت / دودسیل سولفات سدیم / لیشمانیا ماژور

مقدمه :

لیشمانیا تک یاخته ای ازخانواده تریپانوزوماتیده ازرده سارکوماستیگوفورا می باشـدکه گروهـی از بیمـاری هـای تحت عنوان لیشمانیوز با اشکال بـالینی متفـاوت را ایجـاد می کند.این جنس توسط نیش گونه هـایی ازپـشه خـاکی ازجنسphlebotomus بـه انـسان منتقـل مـی شـود و در داخل سلولهای بیگانه خوار تک هسته ای زنـدگی کـرده و تکثیر می یابد(۱).

ارگانیـسم ایجـاد کننـده بیمـاری دردنیـای قـدیم major Leishmania و Leishmania tropica و L.aethiopica می باشد. تخمین زده می شود که بیش از ۱۲میلیون نفـر از مردم جهان بااین انگل آلوده باشند و تعداد موارد جدیـد سالیانه دو میلیون نفر تخمین زده شـده کـه ۱/۵ میلیـون مورد لیشمانیوز جلـدی و ۵۰۰۰۰۰ مـورد شـامل اشـکال

* دانشجوی دوره دکتری انگل شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

** دانشیار گروه انگل شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان (hejazi@med.mui.ac.ir)

احشایی است(۲).

تک یاخته های انگلی لیشمانیا دارای دو مرحله ی قابل تشخیص در چرخه ی زندگی خود می باشند:
فرم پروماستیگوت، فلاژل دار و متحرک بوده به صورت اجسام دوکی تاژک دار به طول μ ۲۵-۱۵ و عرض μ ۳-۲ می باشد.این مرحله از انگل در روده پشه خاکی ناقل تکثیر یافته و سپس به قسمت فوقانی دستگاه گوارش پشه مهاجرت کرده و خود را به حلق وحفره دهانی می رساند(۳). انگل هایی که توسط پشه در پوست تلقیح شده اند بوسیله ماکروفاژ بلعیده شده و از فرم پروماستیگوت به فرم آماستیگوت تبدیل و شروع به تکثیر می کنند.

فرم آماستیگوت، غیر متحرک و حدودا" μ ۵-۲ اندازه داشته و فاقد تاژک آزاد است. این شکل از انگل در داخل ماکروفاژهای میزبان پستاندار مستقر گردیده وایجاد بیماری می کند (۱). فرم آماستیگوت از تغییر فرم پروماستیگوت واردشده به بدن میزبان مهره دار ، درون واکوئل پارازیتوفروس ماکروفاژ ایجادمی شود. میکروتوبول های زیرغشایی آرایش جدیدی پیدا می کنند، مصرف اکسیژن به حداقل می رسد و مسیرهای متابولیکی که در رابطه بامصرف پیش سازهای اسیدنوکلئیک میزبان هستند فعال می شوند.

آماستیگوت ها نسبت به هضم توسط آنزیم های لیزوزومی مقاوم بوده ، درصورتیکه پروماستیگوت ها نسبت به این آنزیم ها حساس می باشند و قبل ازتبدیل شدن به آماستیگوت، تعدادی از آنها درون ماکروفاژ از بین می روند. این تفاوت درمقاومت میان آماستیگوت ها وپروماستیگوت ها احتمالا"بعلت وجود یک ترکیب متفاوت درغشا آنها است. علی رغم اطلاعات فراوان که درمورد روند ورود پروماستیگوت به درون ماکروفاژها وجود دارد، مطالعات اندکی درمورد روند فاگوسیته شدن اشکال آماستیگوت انگل انجام شده است(۴،۵).

کشت پروماستیگوت درInvitro به آسانی انجام پذیر است لذا در سال های گذشته تحقیقات بسیار زیاد و دامنه داری که روی لیشمانیوز انجام گرفته همگی با استفاده از پروماستیگوت های کشت داده شده در Invitro بوده است(۷،۶). ولی از آنجا که فرم پروماستیگوت فرمی است که در بدن پشه خاکی رشد و تکثیر می یابد و فرم آماستیگوت شکلی از انگل است که در زخم روی بدن میزبان مهره دار مستقر شده و بیماری ایجاد می کنند، به راحتی نمی توان نتیجه تحقیقات در مورد پروماستیگوت را به فرم آماستیگوت تعمیم داد(۷). این مسئله با یافتن شباهت ها و تفاوت های آماستیگوت از نظر خصوصیاتی مثل پروتئین های سطحی با فرم پروماستیگوت قابل بررسی بوده و می تواند در نتیجه گیری بهتر ازآزمایشات Invitro مؤثر بوده و کمک شایانی از نظر مبارزه موفقیت آمیز با این بیماری به خصوص طراحی روش های درمانی جدید بنماید.

دانستن تفاوت ها وشباهت های آنتی ژنیکی بین آماستیگوت و پروماستیگوت درتهیه واکسن های برپایه اجزا آنتی ژنی بسیارمثمر ثمر بوده ومی تواند به تولید واکسن های موثرتر وکار آمدتر کمک کند. همچنین با شناخت کافی از محتوای پروتئینی مراحل گوناگون انگل می توان به تفاوت های آنزیمی ومسیرهای مختلف متابولیکی هرمرحله از انگل پی برده وبا تاکید برموارد اختلاف، داروهایی طراحی نمود که مرحلهٔ خاصی از انگل را مورد هدف قرار داده و مؤثرتر و کار آمدتر ازداروهای قبل عمل کنند همچنین آنتی ژن های هدف برای ساخت منوکلونال آنتی بادی ها نیز شناسایی خواهند شد.

هدف از انجام این مطالعه ، یافتن محتوی پروتئینی آماستیگوت و پروماستیگوت، شناسایی پروتئین های هر مرحله از انگل ، مقایسه این یافته ها و دستیابی به تفاوتها و شباهتهای آنها با یکدیگر بوده است. امید است با استفاده از نتایج حاصل از این مطالعه مسیرهایی برای پژوهشهای کاربردی از جمله تهیه دارو و واکسن هموار گردد.

روش کار:

این مطالعه از نوع مقطعی بوده و در ابتدا برای حصول اهداف پیش بینی شده نیاز به تولید انبوه انگل لیشمانیا بود. برای تهیه انگل لیشمانیا ابتدا سویه L.major (MRHO/IR/75/ER) تهیه شده از انستیتو پاستور تهران به قاعده دم موش Balb/c تلقیح شد. پس از گذشت مدت زمان مناسب(حدود۴ هفته) در محل تلقیح،زخم لیشمانیوز ایجاد شد که منبع آماستیگوت مورد نیاز برای کشت بود. این کار برای اجتناب از استفاده از انگلی بود که پاساژ زیاد خورده است. با اتوپسی موش های آلوده و تلقیح بافتهای درگیر مثل غدد لنفاوی،کبد و یا طحال به داخل محیط کشت N.N.N اصلاح شده،عمل کشت انجام گرفت. پس از رشد، پروماستیگوت ها از این محیط، به محیط کشت RPMI-1640 غنی شده با ۲۰٪ FCS (Fetal calf serum)

انتقال داده شد. پس از رسیدن کـشت بـه مرحلـه ایـستا ، ارگانیسمها سـه مرتبـه بـا بـافرPBS شستـشو داده شـد و درویال های اپندورف ۲ میلی لیتری در فریـزر C °۸۰- تـا زمان استفاده نگهداری گردید.

در ادامه برای انجام کشت آماستیگوت، اشـکال انگلـی پروماســتیگوت کــشت داده شــده در N.N.N درمرحلــه لگاریتمی به محیط کشت RPMI-1640 بـا PH برابـر ۵/۵ به اضـافه ۲۰٪ FCS انتقـال داده شـد . سـپس در دمـای ۳۷°C و ۵٪ Co_2 انکوبـه گردیـد. رشـد انگـل هـا هـر ۴۸ ساعت یک بار کنترل شد(۸) .

الکترو فورزآنتی ژنهای تهیه شده از دوشکل انگل Leishmania:

مراحل SDS-PAGE به روشLaemali انجام گرفت(۹). درتوضیح روش کار برای آماده سـازی نمونـه هـا بـه طـور اختصار باید گفت از محلـول بـافر نمونـه کـه حـاوی بـافر تریس اسید کلریدریکی۰/۱۲۵ مولار ، بروموفنل بلو ۰/۲٪، 2ME و سوکروز یاگلیسرول همراه باSDS ۵٪ بود اسـتفاده شد.انگل های از قبل تهیه شده را شمارش نموده و تعـداد مساوی از آنها برداشت شد و با بافر نمونه مخلوط گردید و به مدت۵ تا۷ دقیقه در دمـای C °۱۰۰قـرار داده شـد تـا عمــل denaturation پــروتئین هــا واحیــاء بانــدهای دی سولفیدی صورت گیـرد. در ایـن حالـت پـروتئین هـا بصورت خطی درآمـده وبراحتـی ازمنافـذ پلـی اکریلامیـد می تواند عبورکنـد و ضـمن باردارشـدن اسـیدهای آمینـه بااتصال بهSDS نمونه بار منفی پیدا می کند.

ژل تهیه شده در تانک الکتروفورز قرار داده شد و تانک بالایی و پایینی از بافر های مخصوص خود پر شد و نمونه گذاری به مقادیر ۵۰ میکروگرم پروتئین در چاهکهـای ژل بـه روش برادفـورد انجـام گرفـت.سـپس مجموعـه ای از پروتئینهای استاندارد نیز در چاهک وسط ژل نشانده شـد. جریان الکتروفورز ابتدا روی ولتاژ۶۰ و پس از نفوذ نمونه به داخل stacking gel روی ولتاژ ۱۲۰ تنظیم شد.با رسـیدن رنگ نشانه به لبه پائینی ژل جریان فوق قطع گردید.

پس از این که ژل از دستگاه الکتروفورز خارج گردیـد، در محلول ثابت کننده قرار گرفت که این کـار هـم باعـث تثبیت باندهای پروتئینی درون آن شـده و هـم تـا حـدی سبب آبگیری ژل می شود. رنگ آمیزی ژل بـا اسـتفاده از رنگ آبی کوماسی R-250 صورت گرفت. این نــــوع رنگ آمیزی باندهای پروتئینی تا حداقل ۱ میکروگرم را ظاهــر می سازد. برای حذف رنگ های اضافی، ژل رنگ آمیــزی شده مدت زمان کافی در محلول رنگ بر، قرار گرفت.

برای تعیین وزن ملکولی بانـد هـای بدسـت آمـده، بـا استفاده از باندهای مربوط به پروتئین های اسـتاندارد و بـا محاسبهRelative mobility که از رابطه زیر بدست می آید اقدام به رسم منحنی کالیبراسیون شد.

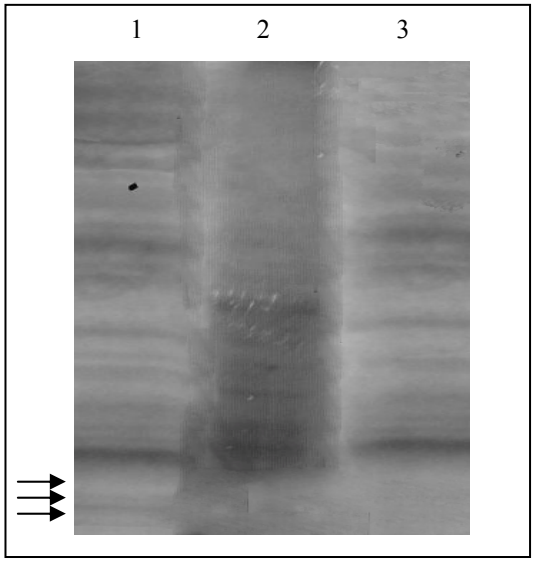
$$(Rf)=\frac{\text{فاصله طی شده پروتئین از مبدا}}{\text{فاصله نقطه مرجع از نقطه مبداء}}$$

نتایج:

کشت اشکال آماستیگوت بصورت اکسنیک در صـورت انتقال مستقیم از دمای C °۲۶ به C °۳۷ امکان پذیر بوده ودر ایــن شــرایط بــیش از ۹۵٪ پروماســتیگوت هــا بــه آماستیگوت تبـدیل مـی شـوند . در حالیکـه در غیـر ایـن صورت و ایجاد گرادیان دمایی این امر میسر نخواهد بود.

نتایج حاصل از SDS-PAGE

پس از الکتروفورز آنتی ژن تام حاصل از دو فـرم مـورد مطالعه، باند های متعددی حاصل شـد. بانـدهای مـشاهده شدهٔ مشترک میان هر دو فرم، بانـدهای بـا وزن ملکـولی: ۱۳۰تا۱۱۰، ۹۶، ۹۴، ۹۰، ۸۰، ۶۵، ۶۳، ۵۰، ۳۶و ۱۹کیلـو دالتون بودند.باندهایی که فقط در پروماستیگوت مـشاهده گردید، باندهای با وزن ملکـولی ۲۲، ۲۸ و ۴۶ کیلودالتـون بود. همچنین باندهای ۱۲ و ۳۵ کیلودالتونی فقط در فـرم آماستیگوت دیده شد (شکل۱).



شکل ۱: مقایسه محتوی پروتئینی دو فرم آماستیگوت و پروماستیگوتL.major

ستون ۱: الگوی الکتروفورز آنتی ژن تام پروماستیگوت
ستون ۲: باندهای مربوط به پروتئین های استاندارد شامل آلبومین (۶۷۰۰۰)، اوآلبومین(۴۳۰۰۰)، کربونیک انیدراز(۳۰۰۰۰)، تریپسین اینهابیتور(۲۰۰۰۰)
ستون ۳: الگوی الکتروفورز آنتی ژن تام آماستیگوت

طیفی از باندهای نزدیک به هم پروتئینی در الکتروفورز هردو آنتی ژن دیده شد ،در مورد پروماستیگوت از ۶۳ تا ۶۸ کیلودالتون ودر مورد آماستیگوت، باند هایی در طیف ۶۰ تا ۷۲ کیلودالتون مشاهده شد که با ا ستناد به مطالعات قبل این باندها همان پروتئینKDa ۶۳ هستندکه در واقع در حالت طبیعی روی خود انگل بصورت ملکول هایی با وزن ملکولی نزدیک به هم بوده وبیشترین آنها با وزن ملکولی ۶۳KDa خود را نشان می دهد(۱۰). بنابر نتایج حاصل ملکول ۶۳KDa هم در پروماستیگوت و هم در آماستیگوت مشاهده شد ولی میزان آن در پروماستیگوت به طور چشمگیری بیشتر ازآماستیگوت بود. این پروتئین در پروماستیگوت بیشترین و مشخص ترین پروتئین بود.

بحث:

یکی از راه های ساخت یک داروی مؤثر و بی خطر شناسایی آنتی ژن های هدف اختصاصی در میکروارگانیسم بوده به طوری که داروی ساخته شده فقط روی آن آنتی ژن از همان میکروارگانیسم اثرکرده واثری روی سلول های میزبان نداشته باشد.

علاوه برآن تولید واکسن های مؤثر نیز متضمن تعیین هویت و تولید و تخلیص ایمونوژن های مصونیت بخش است. طبق تحقیقات انجام شده آماستیگوت های محیط کشت و آماستیگوت های بافتی با یکدیگر مشابه بوده و با مقایسه ای که اکنون بین پروماستیگوت و آماستیگوت انجام شد می توان از آماستیگوت های محیط کشت در انجام آزمایشات گوناگون ،تهیه واکسن، داروهای جدید و... استفاده کرد (۱۳-۱۱).

در این مطالعهSDS-PAGE به عنوان متد اصلی انتخاب گردید. مزیت استفاده ازSDS-PAGE این است که در هر بار آزمایش با استفاده ازمقدار اندک آنتی ژن می توان باند های مربوط به اجزاء پروتئینی آن را بدست آورد. محققین دیگر از روش فیلتراسیون ژل برای جداسازی آنتی ژنهای لیشمانیا استفاده کرده اند. اوگون کولاد و همکاران در مطالعه ای به منظور تفکیک آنتی ژن هایL.infantum از sephadex-150 استفاده کرده اند که ۸ جزء آنتی ژنی حاصل مطالعه آن ها بوده است(۱۴). این روش از نظر مقایسه ای نسبت به روش SDS-PAGE حساسیت بسیار کمتری دارد چرا که در نتیجه حاصل از این مطالعه و همچنین مطالعات دیگر مشخص شده است که روش SDS-PAGE در تفکیک عناصر آنتی ژنی انگل لیشمانیا راندمان بسیار بالاتری دارد و تعداد باندهای تفکیکی حاصل از این روش نسبتا" زیاد است. همچنین از نظر عملی می توان هرکدام ازاجزاء حاصل از روش کروماتوگرافی را با انجام الکتروفورز ژل پلی اکریلامید به چند باند جداگانه تبدیل نمود. به این ترتیب باندهای حاصل از روش SDS-PAGE زیر واحدهای خالص تر آنتی ژنی را تشکیل می دهندکه با تخلیه آنها از ژل (elution) می توان از نظر تعیین هویت واختصاصات آن ها با استفاده از متدهای مختلف ایمونولوژی و بیوشیمیایی درحد وسیعی اطلاعات مورد نظر را حاصل نمود.

روشSDS-PAGE به منظور مقایسه محتوای پروتئینی انگل L.major سالم و دو واکسن استخراج شده از آن یعنی Killed Leishmania major(KLm) و Autoclaved Leishmania major (ALm) با موفقیت به کار برده شد (۱۵). همچنین این روش در تحقیقی دیگر تحت عنوان مقایسه محتوی پروتئینیL.major و L.gerbilli نیز توسط حجازی و همکاران با موفقیت انجام شد(۱۶).

در غشاء لیشمانیا پروتئازی ظاهر می شود که پروتئاز سطحی پروماستیگوت (PSP) نامیده شده است. این پروتئین ۶۳کیلودالتونی (gp63) در سطح غشاء تمام گونه های لیشمانیا گزارش شده است (۱۹-۱۷) و نشان داده شده است که توسط یک قلاب فسفاتیدیل اینوزیتول به انگل متصل است(۲۰،۲۱). این گلیکوپروتئین با عمل متالوپروتئازی ،جزء C3bرا بر سطح پروماستیگوت بهC3bi تبدیل می کند که نقش اپسونین دارد و به همراه لیپوفسفوگلیکان (LPG) فاگوسیته شدن فرم متاسیکلیک را تسهیل می کند (۲۲) . تقابل بین پروماستیگوت و ماکروفاژ دارای خصوصیات چندمرحله ای است که با پروتئاز gp63 و لیپوفسفوگلیکان وساطت می شود(۲۳،۲۴). در مقابل اطلاعات فراوان در دسترس در مورد مراحل فاگوسیتوز پروماستیگوت ، مطالعات اندکی درخصوص فاگوسیتوز اشکال آماستیگوت وجود دارد(۴،۵). مطالعات قبلی روی نقش آنتی ژن های گلیکو اسفنگولیپید لیشمانیا(GSL) اینطور توضیح داده است که آنتی بادیهای منوکلونال به طور اختصاصی روی GSL های لیشمانیا آمازوننسیس مؤثر است وتهاجم آماستیگوت به ماکروفاژ را مهار کرده و حدس زده می شود که اپیتوپ های شناسایی

شده توسط اینmAb ها در سطح GSL ها در میانجیگری اتـــصال آماســـتیگوت بـــه ماکروفـــاژ حـــائز اهمیـــت هستند(۲۵،۲۶).

LPG ملکول اصلی گلیکوکالیکس سطحی پروماستیگوت L.major اسـت. محـلLPG در L.major بـا بکـار بـردن میکروسـکوپ ایمنـوالکترون تـشخیص داده شـده و گفتـه شده LPG بصورت یک لایه ضخیم شکل گرفته وپوشـشی بر روی سایرمولکول های gp63 می باشـد (۱۰). ماکروفـاژ چندین رسپتور برای ملکول های سطحی متاسیکلیک هـا بخـصوصLPG دارد. بـا ورود متاسـیکلیک بـه فـاگوزوم مولکولهای LPG باجمع کردن ملکول های اکتـین اطـراف فاگوزوم ازاتصال فاگوزوم با لیزوزوم ممانعت می کند تا فرم متاسیکلیک که به آنـزیم هـای لیزوزومـی حـساس اسـت فرصت یابد تا بـه فـرم مقـاوم آماسـتیگوت تبـدیل شـود. درعوض فرم آماستیگوت نسبت به آنزیم هـای لیزوزمـال و همچنین pH پایین فاگولیزوزوم مقاوم است (۲۲).

gp63 لنگرشده به GPI(glycosylinositol phospholipid) بـــا فعالیـــت متالوپروتئـــازی متـــصل بـــه روی (zinc endopeptidase) است که طیف وسیعی از سوبسترای اختصاصی، بـا pH اپتـیمم اسـیدی را دارد(۲۷). gp63 در سـطح تـام و دسـت نخـورده پروماسـتیگوت و فـلاژل آن منتشر شده اما فراوانی آن ۱۰بار کمتر ازفراوانی LPG بوده و به این صورت پوشش متراکمی نیست. طی تغییر شـکل پروماستیگوت به فرم متاسیکلیک عفونت زا ،ظهور سطحی gp63 افزایش می یابـد. پروماسـتیگوت بوسـیله ماکروفـاژ فاگوسیته می شود و به فرم آماستیگوت تبدیل می گـردد. gp63 نقش تسهیل کننده در این پروسه دارد و این کـاررا با آسان سازی فاگوسیت پروماسـتیگوت توسـط ماکروفـاژ انجام می دهـد و همچنـین بـه پروماسـتیگوت هـا کمـک می کند که بـه زنـدگی درون سـلولی ودرون فـاگولیزوزوم ادامه دهند(۲۸،۲۹).

در مورد آماستیگوت مطالعات متعدد مؤیـد ایـن نکتـه است که اکثر اشکال ایزوفرم gp63 درمعرض سطح نیستند و GPI آن نیـز از نظـر سـاختمانی از GPI پروماسـتیگوت قابـل تفکیـک اسـت (۳۰). تجزیـه آماسـتیگوت بـه روش ایمنوفلورسانس و روش هـای میکروسـکپی ایمنـوالکترون نشان داده است که gp63 غیرقابل دسترس در روش هـای سطحی، بـه طـور غالـب درمجـرای حفـره تـاژکی تجمـع می یابد. ساختمان این ملکول در گونه های لیشمانیـــا و بین فـرم هـای مختلـف انگـل درچرخـه زنـدگی متفـاوت اسـت(۳۰).بـه نظـر مـی رسـد حفـره تـاژکی همـه تریپانوزوماتیده هـا ، ناحیـه ای تخـصص یافتـه اسـت کـه واسـطه ترشـح ،آندوسـیتوز و ترشـح اسـید فـسفاتاز در لیـشمانیا مـی باشـد (۳۱).عمـل gp63 در حفـره تـاژکی، ممکن است تجزیه ماکروملکول های میزبان به دو منظـور باشد، یکـی حفاظـت از ترکیبـات حـساس غـشاء و حفـره تاژکی و دیگری تغذیه آماستیگوت. LPG در آماسـتیگوت، دارای وزن ملکولی بین پروماستیگوت های پروسـیکلیک و متاسیکلیک است که درآن متوسطی از۳۶ واحـد تکـراری در هرملکـول LPG آماسـتیگوت وجـود داردکـه حـاوی گالاکتوز و گلوکز درشاخه های جانبی است.

پوشش سطحی تک یاخته لیـشمانیا نقـش محافظـت کننده انگل را در مقابل حملات محـیط یعنـی روده پـشه وماکروفاژ میزبـان مهـره دار دارد. همچنـین واکـنش بـین انگل و سلول های سطح روده پشه و ماکروفاژهای میزبـان را به همراه دارد. همانطور که درقسمت نتـایج اشـاره شـد ملکول KDa۶۳ به مقدار زیاد در پروماستیگوت دیده شد و همچنین در آماستیگوت نیز ملکولی با همین وزن مشاهده گردید ولی با مقدار کمتر.

در بررسی نتایج حاصل از الکتروفـورز پروماسـتیگوت، پروتئینی با وزن ملکولی ۱۹ کیلودالتون مشاهده شد. ایـن پروتئین یک پروتئین سبک مـی باشـدکه بعنـوان انتقـال دهنده گلیکوپروتئینی حاوی مانوز شناسائی شده و انتقـال دهنده گلوکز است. این پـروتئین بـه طـور قابـل تـوجهی ازپروتئین های انتقال دهنده گلوکز درپستانداران کوچکتر است(۳۱). پروماستیگوت ها توسط همـین انتقـال دهنـده گلوکز قادربه تجمع D.glucose می باشـند.چنـین انتقـال دهنده کارآمدی که برای یک سـلول یوکـاریوت غیرعـادی است به انگل این امکان رامی دهد از سطوح بالایی ازگلوکز درون سلولی برخوردار شود و در طول تکامل خود حتی در شرایطی که دسترسی به گلوکز محدود است متابولیسم کاملاً عادی داشته باشد(۳۱). همانطور که اشاره شد پروتئینی با وزن ۱۹کیلودالتون در الکتروفورزآماستیگوت نیزمشاهده شد و این نکته مؤید آن است که انتقال گلوکز در آماسـتیگوت نیز به همان طریق پروماستیگوت صورت می گیرد.

باند پروتئینی ۶۵ کیلودالتـون کـه هـم درالکتروفـورز پروماستیگوت و هم در الکتروفورز آماستیگوت مشاهده شد یک گلیکوپروتئین اصلی تشخیص داه شد. در تحقیقی بـه

روش radio iodination نشان داده شد که گلیکوپروتئین ۶۵ کیلودالتون برروی آماستیگوت وپروماستیگوت شش گونه مختلف لیشمانیا وجود دارد(۳۲) و در مطالعه حاضر نیز مشخص شدکه علاوه بر شش گونه ذکر شده در تحقیق فوق، این گلیکوپروتئین برروی پروماستیگوت و آماستیگوت L.major نیز وجود دارد. این ترکیب یک ترکیب ایمنوژن در انسان بوده و بوسیله سرم بیماران سایر اشکال لیشمانیوز شناسایی می شود. به علاوه مدارک کافی در دست است که گلیکوپروتئین ۶۵ کیلودالتونی در گونه های مختلف لیشمانیا در اپی توپ های همراه مشابه است و موجب cross immunity و cross protection می شود(۳۳).

باند ۴۶ کیلودالتون که در پروماستیگوت مشاهده شد در واقع یک همولگ PSA-2 است. PSA-2 گلیکوپروتئین مرکب در سطح پروماستیگوت L.major می باشد(۳۴). این پروتئیناز در جزء تریتون X-114 پس از جداسازی فاز دترژانت تعیین هویت شده و حاوی سه عضو۹۰،۸۰ و۹۴ کیلودالتون است که همگی توسط قلاب های فسفاتیدیل اینوزیتول ،در سطح غشاء سلول نگهداری می شوند(۳۵).

در این تحقیق پروتئین ۳۶ کیلودالتونی هم درفرم پروماستیگوت وهم درفرم آماستیگوت دیده شد. LACK (Leishmania homologue of receptors for actived C kinase) لیشمانیا ماژور ،پروتئین ۳۶ کیلودالتونی است و در گونه های مختلف لیشمانیا وجود دارد. ژن کد کننده آنتی ژن LACK پاسخ ایمنی سریعی علیه انگل ایجاد می کند(۳۶).

در مطالعه حاضر باندهای پروتئینی ۸۰،۵۰و۹۶ کیلودالتون در پروماستیگوت مشاهده شد و همچنین باند ۵۰ کیلودالتون در آماستیگوت دیده شد. طبق مطالعاتی که در گذشته انجام شده این پروتئین ها جزء پلی پپتیدهای PSA-2 محسوب می شوند که القاکننده تبدیل Th_o به Th_1 و فعال کننده ترشح INF-γ,TNF-β وIL-4 می باشند که این همان الگوی ترشح Th_1 است، بنابراین پلی پپتیدهای ۸۰،۵۰ و۹۶ کیلودالتون کاندیدهای مناسبی برای واکسن لیشمانیا معرفی شده اند (۳۵).

نتیجه نهایی:

همانطور که دیده شد پروماستیگوت ها، پروتئین هایی با وزن ملکولی خاص دارندکه برای این مرحله از انگل اختصاصی است و آماستیگوت ها نیز به همین صورت پروتئین های اختصاصی برای خود دارند . طبق تحقیقات انجام شده آماستیگوت های محیط کشت و آماستیگوتهای بافتی بایکدیگر مشابه بوده و بدین ترتیب باندهایی که فقط در آماستیگوت مشاهده گردید، هدف خوبی برای طراحی واکسن، داروهای جدید و تولید منوکلونال آنتی بادی ضد انگل هستند.

سپاسگزاری:

از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به دلیل تأمین بودجهٔ این طرح تشکر می نمائیم.

منابع :

1. David JT, William PA, Petri Jr A. William, Markell and voges medical parasitology. 9th ed. Philadelphia: Elsevier Health Sciences, 2006: 123-125.
2. do Monte-Neto RL, Coelho AC, Raymond F, Legare D. Gene expression profiling and molecular characterization of antimony resistance in leishmania amazonensis. Neglected Trop Dis 2011;5(5): e1167.
3. Handman E, Mitchell GF. Immunization with leishmania receptor for macrophages protects mice against cutaneous leishmaniasis Proc Nat Sci USA 1985;82:5910-5914.
4. Handman E. Cell biology of leishmania. Adv Parasitol 1999;44: 1-39.
5. Guy RA, Belosevic M. Comparison of receptors required for entry of leishmania major amastigotes into macrophages. Infect Immunol 1993; 61: 1553-1558.
6. Fadili K, Messier N, Leprohon P. Role of the ABC transporter MRPA (PGPA) in antimony resistance in leishmania infantum axenic and intracellular amastigotes. Antimicrob Agents Chemoter 2005; 49(5):1988-1993.
7. Haytham AZ, Michael LC, Paul AB. The axenic cultivation of leishmania donovani amastigotes. Saudi Med J 1999; 20(5):334-340.
8. Hejazi Sh, Soleymanifard S, Ghabavizadeh J. [The effect of pH and temperature on axenic culture media of leishmania amastigotes]. J Isfahan Med Sch 2004;22(72):15-19 (Persian)
9. Chakavarti B, Chakavarti D. Electrophoretic separation of proteins. J Vis Exp 2008;(16):758.
10. Moody SF. Molecular variation in leishmania Acta Tropica 1993;53(3-4):185-204.
11. Robertson CD, Coombs GH. Stage specific proteinase of leishmania Mexicana promastigotes. FEMS Microbial Lett 1992; 73 (1-2): 127-132.
12. Galvao-Quintao L, Alfeiri SC, Eyter A. Rabinoviteh MC. Interacellular differentiation of leishmania amazonensis promastigote to amastigote presence of megasomes,cystein proteinase activity and susceptibility to leucine methyl ester. Parasitology 1990;101:7-13.
13. Bates PA, Robertson CD, Tetley L, Coombs GH.

Axenic cultivation and characterization of leishmania Mexicana amastigote-like forms. Parasitology 1992;105:193-202.
14. Ogunkolade BW, Monjour L, Vouldoukis I. Inocolation of BALB/c mice against leishmania major infection with leishmania-derived antigens isolated by gel filtration. J Chromatography 1988; 440: 459-465.
15. Kemp M, Theander TG, Handman E. Activation of human T. lymphocytes by leishmania lipophosphglycan, second. J Immunol 1991; 33: 219-224.
16. Hejazi Sh, Soleymanifard S, Yousefi HA, Ghavaminejad A. [Investigation and comparison of L.major and L.gerbilli protein content by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis]. J Isfahan Med Sch 2000; 17 (56): 14-17. (Persian)
17. Brittingham A, Morrison CJ, McMaster WR, McGwire BS, KP Chang, DM Mosser. Role of the leishmania surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. Immunology 1995; 155: 3102-3111.
18. Hallé M, Adelaida Gomez M, Stuible M, Shimizu H, McMaster WR, et al. The leishmania surface protease gp63 cleaves multiple intracellular proteins and actively participates in p38 mitogen-activated protein kinase inactivation. Biol Chem 2009;13; 284(11): 6893–6908.
19. Inversoa JA, Acosta a EM, O'Connor AJ, Russell DG. Crithidia fasciculata contains a transcribed leishmanial surface proteinase(gp63) gene homologue. Mole Biochem Parasitol 1993; 57; 47-54 .
20. Andre LS Santos, Branquinha MH, D'avila LCM. The ubiquitous gp63-like metalloprotease from lower trypanosomatids:in the search for a function Anais da Academia Brasileira de Ciências 2006;78(4); 687-714.
21. Elhay M, Kelleher M, BacicA, McConville MJ. Lipophosphoglycan expression and virulence in Ricin-resistant variants of leishmania major. Mole Biochem Parasitol 1990;40(2) ;255-267.
22. Mahy BWJ . Topley and Wilson's microbiology and microbial infections. 10th ed. London: Hodder Arnold, 2005.
23. Von Brand T. Biochemistry and physiology of endoparasites. Amsterdam: Elsevier/North Holland Biomedical Press, 1979.
24. Oduro KK., Bowman IBR, Flyrm IW. Trypanosoma brucei: Preparation and some properties of a multienzyme complex catalyzing part of the glycolytic pathway. Expl Parasitol 1980;50: 240-250.
25. Straus AH, Levery SB, Jasiulionis MG, Salyan ME, Steele SJ, Travassos LR, et al. Stage-specific glycosphingolipids from amastigote forms of leishmania (L.) amazonensis. Immunogenicity and role in parasite binding and invasion of macrophages. J Biol Chem 1993; 268: 13723-13730.
26. Straus AH, Valero VB, Takizawa CM, Levery SB, Toledo MS, Suzuki E, et al. Glycosphingolipid antigens from leishmania (L.) amazonensis amastigotes. Binding of anti-glycosphingolipid monoclonal antibodies in vitro and in vivo. Braz J Med Biol Res 1997; 30: 395-399.
27. Rojas A, Garc´ıa-Lugo P, Crisante G. Isolation, purification, characterization and antigenic evaluation of GPI-anchored membrane proteins from Leishmania (Viannia) braziliensis. Acta Tropica 2008;105:139–144.
28. Valin FA, Tort J´ F, Bernardi G. Nonrandom spatial distribution of synonymous substitutions in the GP63 gene from leishmania. Genetics 2000; 155:1683–1692 .
29. Abu-Dayyeh I, Hassani K, Westra ER. Mottram JC, Olivier M. Comparative study of the ability of leishmania Mexicana promastigotes and amastigotes to alter macrophage signaling and functions. Infect Immunol 2010; 2438–2445.
30. Hsiao CH, Yao C, Storlie P, Donelson JE, Wilson ME. The major surface protease (MSP or GP63) in the intracellular amastigote stage of Leishmania chagasi. Mol Biochem Parasitol 2008;157: 148-59.
31. Bates PA, Hermes I, Dwyer DM. Leishmania donovani: immunochemichal localization and secretory mechanism of soluble acid phosphatase. Exp Parasitol 1989;68:335-346.
32. Zilberstein SD, Dwyer DM, MatthaeiQll S, Hdoruk R. Identification and biochemical characterizationo f the plasma membrane glucose transporter of leishmania donouani. J Biol Chem 1986;261: 15053-15057.
33. Gould VC, Quintao LG. A common major surface antigen on amastigotes and promastigotes of Leishmania species. J Exp Med 1985;162: 902-916.
34. Murray PJ, Spithill TW, Handman E, The PSA-2glycoprotein complex of leishmania major is a glycosylphosphatidylinositol linked promastigote surface antigen. J Immunol 1989; 143: 4221-4223.
35. Kemp M, Handman E, Kemp K, Ismail A. The Leishmania promastigote surface antigen-2 (PSA-2) is specially recognised by Th1 cells in humans with naturally acquired immunity to L. major. FEMS Immunol Med Microbiol 1998; 20: 209-218.
36. Maillard I, Launois P, Himmelrich H, Acha-Orbea H, Diggelmann H. Functional plasticity of the LACK reactive Vbeta4-Valpha8 CD4(+) T cells normally producing the early IL-4 instructing Th2 cell development and susceptibility to Leishmania major in BALB/ c mice. Eur J Immunol 2001; 31(4): 1288-96.

Original Article

Investigation and Comparison of Leishmania major Promastigote and Amastigote Protein Content by Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

S. Soleimanifard, Ph.D. Student [*]; R. Arjmand, Ph.D. Student [*]; S.H.Hejazi, Ph.D. [**]

Received: 2.7.2012 Accepted: 1.1.2013

Abstract

Introduction & Objective: Leishmania is a protozoan of the trypanosomatidae family. This protozoan has two stages in its life cycle, promastigote form in sand flies and amastigote form in macrophage of mammalian hosts. The purpose of this study was identification and comparison of proteins of Leishmania amastigote and promastigote stages.

Materials & Methods: The present study is a cross sectional study of two forms of Leishmania major. To culture promastigotes , L.major (MRHO/IR/75/ER) from previously infected Balb/c mice was transferred to modified N.N.N medium with overlay of liquid BHI and then transferred to RPMI-1640 at $26^{oc} \pm 1$ for mass production. After isolation and growth, promastigotes were transferred to liquid cell culture medium RPMI-1640 with pH 5.5 and incubated at 5% CO_2 at $37^{o}c$ for 72 hours until promastigote to amastigote transformation. Electrophoresis was performed with SDS-PAGE method to find and compare the molecular weight of the antigens of two stages.

Results: The molecular weights of the bands observed in both forms were as follows: 19, 36, 50, 63, 65, 80, 90, 94, 96, 110- 130 KDa. The proteins in the surface of only promastigote were 22, 28 and 46 KDa and special proteins in the surface of amastigote were 12 and 32 KDa.

Conclusion : According to this study Leishmania parasite has stage specific proteins. Various studies have shown that axenic amastigotes and tissue amastigotes are similar in their protein content. Therefore, based on stage specific proteins ,effective drugs and vaccines can be designed against leishmaniasis.

(Sci J Hamadan Univ Med Sci 2013; 20 (1):1-8)

Keywords: Amastigote / Leishmania major / Promastigote / Sodium Dodecyl Sulfate

---

* Ph.D Studenr in Parasitology, School of Medicine
Isfahan University of Medical Sciences & Health Services, Isfahan, Iran.
** Associate Professor, Department of Parasitology, School of Medicine
Isfahan University of Medical Sciences & Health Services, Isfahan, Iran. (hejazi@med.mui.ac.ir)