دانشگاه علوم پزشکی کرمان
دکتر زهرا بابایی
دکتر بهرام کاظمی

دانشگاه علوم پزشکی کرمان

دانشکده پزشکی

پایان نامه مقطع‌دکترای تخصصی(ph.D)رشته‌انگل شناسی پزشکی

عنوان:

بررسی مهار بیان ژن های نوکلئوزید ترنسپورتر ۳ و ۴ در پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور و لیشمانیا تروپیکا به کمک mRNA آنتی سنس

توسط:

فریده توحیدی

استادراهنما:

دکتر زهرا بابایی- دکتر بهرام کاظمی

استاد مشاور:

دکتر ایرج شریفی- دکتر مژگان بنده پور

سال ۱۳۹۷

دانشگاه علوم پزشکی کرمان
معاونت تحقیقات و فناوری
کتابخانه مرکزی

Kerman University of Medical Sciences

Kerman Faculty of Medicine

IN Partial Fulfilment of the Requirments for the Degree of Ph.D

Title:

Evaluation of Inhibition of Expression Nucleoside Transporter 3 and 4 Genes expression in Promastigotes *Leishmania major* and *Leishmania tropica* by mRNA Antisense

By: Farideh Tohidi

Supervisors:

Dr. Zahra Babaei- Dr. Bahram Kazemi

Advisors:

Dr. Iraj Sharifi - Dr. Mojgan Bandehpour

Year: 2018

چکیده

بررسی مهار ژن های نوکلئوزید ترنسپورتر ۳ و ۴ در پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور و لیشمانیا تروپیکا به کمک mRNA آنتی سنس

مقدمه و هدف : لیشمانیا در انسان باعث ایجاد علائم کلینیکی مختلفی می‌شوند، این علائم از زخم‌های پوستی محدود تا بیماری‌های احشایی کشنده متغیر می‌باشند. گونه های لیشمانیا قادر به سنتز پورین‌های حلقوی از راه de novo نیستند و باید آن‌ها را از میزبانانشان دریافت کنند، این انگل ها پورین‌ها را از طریق salvage مواد غذایی بوسیله پورین پرمه آز دریافت می‌کنند. داروهای غیر پورینی ضدلیشمانیا که برای انگل ها سمی می باشد از طریق ترنسپورترهای پورین وارد این ارگانیسم ها می شوند .نوکلئوزید ترنسپورتر ۳ و نوکلئوزید ترنسپورتر ۴ محل های انتقال پورین در ژنوم لیشمانیا ماژور و لیشمانیا تروپیکا هستند. با اینکه نوکلئوبازهای پرمه آز NT3 و NT4 برای انگل ضروری نیستند، حذف ژن آنها ممکن است به زنده بودن انگل آسیب برساند و موجب مرگ انگل شود. در پژوهش حاضر ما سعی کردیم تا نوکلئوباز پرمه آز NT4 و NT3 را که در مسیر salvage لیشمانیا دخالت دارند را مهار کنیم تا در دریافت نوکلئوتیدهای پورینی در انگل اختلال بوجود آید و در نتیجه موجب از بین رفتن انگل گردد.

روش پژوهش: در این مطالعه ابتدا قطعه 502bp از سکانس ژن های NT4 و NT3 لیشمانیا ماژورانتخاب و سپس این قطعات طوری طراحی شدند که که به محض ورود وکتور به داخل انگل به صورت آنتی سنس رونویسی شد. Construct NT4 وConstruct NT3 تهیه و به داخل پروماستیگوت های لیشمانیا ماژورو لیشمانیا تروپیکا ترانسفکت شدند و بیان ژن های NT3 و NT4 (لیشمانیا ماژورو لیشمانیا تروپیکا) در شرایط برون تنی و درون تنی مطالعه شدند.

Real- time
DNA
RNA
cDNA
LB
DME
FBS
WH
SDS
PBS
TEM

نتایج : نتایجReal time-RT PCR نشان داد که بیان ژن NT3 لیشمانیا ماژور در انگل ترانسژن در روز دهم کاهش داشته است. نتایج ما در بیان ژن NT4 لیشمانیا ماژور نشان داد که بیان این ژن از روز سوم تا بیستم کمتر از کنترل بوده است. نتایج ما در بیان ژن NT3 لیشمانیا تروپیکا نیز نشان داد که بیان این ژن از روز دهم تا بیستم کمتر از کنترل بوده است. این نتایج همچنین نشان داد که بیان ژن NT4 لیشمانیا تروپیکا تاروز بیستم کمتر از کنترل بوده است.

نتایج نشان داد که درصد آلودگی ماکروفاژها با سویه های موتانت این چهار ژن(NT3 و NT4 لیشمانیا ماژور و NT3 و NT4 لیشمانیا تروپیکا) کمتر از درصد ماکروفاژهای آلوده با سویه های وحشی آنها بود. همچنین تعداد آماستیگوت ها در ماکروفاژهای آلوده با سویه موتانت هرچهار ژن(NT3 و NT4 لیشمانیا ماژور و NT3 و NT4 لیشمانیا تروپیکا)کمتر از تعداد آماستیگوت ها در ماکروفاژهای آلوده با سویه های وحشی آنها بود. نتایج ما در بار انگلی در هر دو ژن موتانت NT3 و NT4 لیشمانیا ماژور،کاهش تعداد انگل را در بافت‌های غدد لنفاوی و پوست موش‌های BALB/c را نشان داده است .

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از آنتی سنس باعث کاهش بیان ژن هایNT3 و NT4 لیشمانیا ماژور و لیشمانیا تروپیکا شد. با توجه به نتایج این پژوهش تحقیقات بیشتری لازم است تا نشان دهد که ترنسپورتر NT4 و NT3 می توانند به عنوان تارگت دارویی مناسبی برای درمان بیماری لیشمانیوز به شمار آیند.

کلید واژه ها: ژن نوکلئوزید ترنسپورتر ۳، ژن نوکلئوزید ترنسپورتر ۴، لیشمانیا ماژور، لیشمانیا تروپیکا، پروماستیگوت، RNA آنتی سنس، مهار ژن.

Abstract

Background & Objective: *Leishmania* causes various clinical symptoms in humans such as cutaneous ulcers and fatal visceral diseases. *Leishmania spp* are unable to synthesize cyclic purines *de novo* and must import purines from both their vertebrate and insect hosts. These parasites absorb purines via purine permease through nutrient uptake and salvage. Non-purine anti-*Leishmania* drugs that are toxic to parasites are imported into the organism through purine transporters. Nucleoside transporter 3 (NT3) & Nucleoside transporter 4 (NT4) are sites for purine transmission in the *Leishmania major & Leishmania tropica* genomes. Although nucleobases of NT3 and NT4 permease are not essential for the parasite, but NT3 and NT4 genes deletion may decrease parasite viability and lead to the death of the parasite. This study was aimed to silencing the NT3 and NT4 permease nucleobases that are involved in the salvage pathway of *Leishmania major & Leishmania tropica* in order to disrupt purine nucleotide uptake in the parasite and consequently, destruction of the parasite.

Methods: In this study, a 502 bp fragment of the NT3 and NT4 gene sequences were designed to produce an antisense transcript upon entry of the vector into the parasite. The NT3 and NT4 construct were transfected into *L. major and L.tropica* promastigotes and NT3 and NT4 gene expression were studied *in vivo* and *in vitro* conditions.

Results: Real time-RT PCR results showed that relative expression *L.major* NT3 gene in transgenic *Leishmania* was decreased in tenth day. Our results showed that relative expression L.major NT4 gene in mutant *Leishmania* was lower than in the control from the third to the twentieth day. Our results showed that relative expression NT3 gene in mutant *Leishmania tropica* was lower than in the control from the tenth to the twentieth day. . Our results showed that relative expression NT4 gene in mutant *Leishmania tropica* was lower than in the control to the twentieth day. The percentages and the number of amastigotes infected macrophages with transgenic *L. major and L. tropica* were less than infected macrophages with wild-type

strains. Size and number of ulcers in BALB/c mice infected with transgenic *Leishmania major* promastigotes were less than the BALB/c mice infected with wild-type parasites.

Conclusion: The results of this study indicate the use of antisense RNA reduce of NT3 and NT4genes expression in *Leishmania major* and *Leishmania tropica*. More studies are required to obtain a new approach for treating *Leishmania* infection.

Keywords: Nucleoside Transporter 3 Gene; Nucleoside Transporter 4 Gene *Leishmania major*; *Leishmania tropica*; Promastigote; Antisense mRNA; Gene Expression.