CORE
Metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
Provided by Simorgh Research Repository

دانشگاه علوم پزشکی کرمان
معاونت پژوهشی
کتابخانه مرکزی

دانشگاه علوم پزشکی کرمان

دانشکده پزشکی

پایان نامه مقطع دکتری تخصصی (Ph.D)

عنوان:

مطالعه حذف ژن GlcNAc-PI-de-N-acetylase *لیشمانیا ماژور* به صورت homologous recombination در شرایط برون تنی و درون تنی

توسط : پویا قاسمی نژاد آلمانی

اساتید راهنما : پروفسور ایرج شریفی – پروفسور بهرام کاظمی

اساتید مشاور: دکتر زهرا بابایی – دکتر مژگان بنده پور

سال تحصیلی :۱۳۹۴-۱۳۹۵

Kerman University of Medical Sciences

Faculty of Medicine

In Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree Ph.D

Title:

Study of the role of GlcNAc-PI-de-N-acetylase gene by gene knockout through homologous recombination and its consequences on survival, growth and infectivity of *L. major* in *in vitro* and *in vivo* condition

By:

Pooya Ghasemi Nejad Almani

Supervisors:

Prof. Iraj Sharifi

Prof. Bahram Kazemi

Advisors:

Dr. Zahra Babaei

Dr. Mojgan Bandehpour

دانشگاه علوم پزشکی کرمان
سپرده تا کودا نشین یجی
کتابخانه مرکزی

Year:

2015

چکیده:

مقدمه و اهداف : لیشمانیازیس یک مشکل مهم بهداشت عمومی درکشورهای گرمسیری و نیمه گرمسیری است. نوآوری های جدید برای کنترل بیماری به شدت احساس می شود . یکی ازراههای موجود جهت دستیابی به این مهم مطالعه آنزیمها ، پروتیئنها و ماکرومولکولهای حیاتی انگل از طریق مهندسی معکوس ژنتیکی می باشد . در اینگونه مطالعات ژن ماکرومولکول مورد نظر حذف و تاثیر حذف این ژن و نقش آن دررشد، تکثیر و بیماری زایی انگل بررسی میگردد. یکی از آنزیم های مهم در مسیر بیوسنتز Glycosylphosphatidylinositol (GPI) ، آنزیم *GlcNAc-PI-de-N-acetylase* (*GPI12*) می باشد .در این تحقیق ژن این آنزیم در انگل لیشمانیا ماژور حذف گردید و تاثیر آنرا در رشد ، تکثیر و عفونت زایی در شرایط برون تنی (*In vitro*) و درون تنی (*In vivo*) مورد بررسی قرار گرفت.

روشها : از وکتورهای pLEXSY-neo2 و pLEXSY-hyg2 جهت طراحی و ساخت سازه های مولکولی برای حذف ژن *GPI12* استفاده گردید. سازه های مولکولی در باکتری *E.coli* سویه Top10 کلون گردیدند بوسیله روش های مولکولی تایید شدند. ترانسفکشن سازه ها پس از خطی شدن با آنزیم *Swa I* به داخل انگل طی دو مرحله انجام شد. در مرحله اول سازه حاوی کاست ژن مقاومت نئومایسین و در مرحله دوم سازه حاوی کاست ژن مقاومت هیگرومایسین توسط دستگاه الکتروپوریشن به داخل انگل ترانسفکت شدند. انگل موتانت در شرایط *In vitro* و *In vivo* مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته ها : جهت تایید سازه های مولکولی پس از انجام Colony PCR ، تعیین توالی انجام گرفت. پس از انتخاب سویه های نوترکیب بوسیله آنتی بیوتیک های انتخابی ، انگل نوترکیب توسط PCR ، Southern blot ، Western blot و RT PCR مورد تایید قرار گرفت و انگل نوترکیب ایجاد شد. جهت بررسی در شرایط *In vitro* از سل لاین ماکروفاژهای J774 استفاده گردید و مشاهده گردید توانایی آلوده سازی انگل نوترکیب کاهش یافته است . از موشهای BALB/c جهت بررسی *In vivo* استفاده شد. و جهت تعیین بار انگلی از روش Real time PCR استفاده شد.

نتیجه گیری : انگل موتانت قادر به ایجاد زخم در موشها نبود اما در بدن موشهای آلوده زنده باقی ماند . در این مطالعه انگل موتانتی ایجاد شد که قادر به حفظ عفونت ولی ناتوان در ایجاد آسیب در میزبان بود و می توان از آن به عنوان کاندید در مطالعات واکسن جهت بررسی پروفایل های ایمنی در حیوان آزمایشگاهی استفاده کرد.

کلید واژه : لیشمانیازیس ،*GlcNAc-PI-de-N-acetylase* (*GPI12*) ، مهندسی معکوس ژنتیکی ، کلونینگ ، انگل موتانت

Kerman University of Medical Sciences

Faculty of Medicine

In Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree Ph.D

Title:

Study of the role of GlcNAc-PI-de-N-acetylase gene by gene knockout through homologous recombination and its consequences on survival, growth and infectivity of *L. major* in *in vitro* and *in vivo* condition

By:

Pooya Ghasemi Nejad Almani

Supervisors:

Prof. Iraj Sharifi

Prof. Bahram Kazemi

Advisors:

Dr. Zahra Babaei

Dr. Mojgan Bandehpour

دانشگاه علوم پزشکی کرمان
دبیرخانه تکوردانس پیوی
کتابخانه مرکزی

Year:

2015

Abstract

Background: At present, there are no efficacious vaccines or effective drugs against leishmaniasis therefore; new and innovative control methods are urgently required. One way to achieve this important goal is through using reverse genetic engineering to evaluate important enzymes, proteins and macromolecules. One of the most important enzymes for Glycosylphosphatidylinositol (GPI) biosynthetic pathways is *GlcNAc-PI-de-N-acetylase* (*GPI12*).

Methods: pLEXSY-neo2 and pLEXSY-hyg2 vectors were used for designing and making molecular constructs. The molecular constructs were cloned in *E. coli* strain Top10. The molecular constructs were transfected by electroporation into *L. major* in two stages.

Results: The molecular constructs were confirmed by Colony PCR and sequenced .The recombinant strains isolated by selective antibiotics, after which they were confirmed by PCR, Southern and Western blots. Consequently recombinant parasites were created and examined for subsequent *In vitro* and *In vivo* study. For *In vitro* study using macrophage cell line J774 .It was observed using recombinant parasites infecting ability declined. BALB/c mice were used to assess *In vivo* study. To determine the parasitic load Real time PCR was used.

Conclusions: In these study demonstrated that two alleles of the *GPI12* gene in *L. major* were successfully removed and enabling the generation of a null mutant, which supports the idea that *GPI12* is not an essential gene for the growth and survival of *Leishmania* and the homozygous knockouts of *Leishmania* are able to survive. It was able to produce a mutant parasite that caused no damaged to the host. Further investigations are essential to check the safety profile in laboratory animals.

Keywords: Leishmaniasis, Reverse genetic engineering, *GPI12*, null mutant