



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ ΤΟΥ
ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ *Leishmania* spp. ΣΤΑ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ
ΤΕΛΙΚΟΥ ΞΕΝΙΣΤΗ

ΠΑΠΑΔΑΚΗ ΑΜΑΛΙΑ

Κτηνίατρος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Ταμείο
Περιφερειακής Ανάπτυξης



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Υπουργείο Πολιτισμού, Παιδείας & Θρησκευμάτων
Γενική Γραμματεία Έρευνας & Τεχνολογίας



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΟΙΚΟΝΟΜΙΑΣ
ΥΠΟΔΟΜΩΝ, ΝΑΥΤΙΛΙΑΣ & ΤΟΥΡΙΣΜΟΥ



η περιφέρεια στο **επίκεντρο** της ανάπτυξης

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης - Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης (ΕΤΠΑ),
στο πλαίσιο του Ε.Π. Ανταγωνιστικότητα και Επιχειρηματικότητα (ΕΠΑΝ II) και των Π.Ε.Π. Αττικής, Π.Ε.Π. Μακεδονίας - Θράκης

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2015

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμών του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».

Ημερομηνία αίτησης της κ. Παπαδάκη Αμαλίας: 9-9-2008

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 650^α/16-12-2008

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Παπαμαρκάκη Θωμά Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας

Μέλη

Χριστοφορίδης Σάββας Επίκουρος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας

Μπολέτη Χαραλαμπία Ερευνήτρια Γ' Ινστιτούτο Παστέρ

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 12-1-2009

*«Μελέτη μοριακών μηχανισμών επιβίωσης του παρασίτου *Leishmania* sp. στα φαγοκύτταρα του τελικού ξενιστή».*

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 775^α/17-3-2015

1. Φριλίγγος Ευστάθιος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
2. Παπαδοπούλου Χρυσάνθη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
3. Παπαμαρκάκη Θωμά Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
4. Πολίτου Αναστασία Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
5. Παπαδόπουλος Ηλίας Αναπληρωτής Καθηγητής Παρασιτολογίας & Παρασιτικά Νοσήματα του Τμήματος Κτηνιατρικής του ΑΠΘ
6. Χριστοφορίδης Σάββας Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
7. Μπολέτη Χαραλαμπία Ερευνήτρια Β' Ινστιτούτο Παστέρ

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 27-4-2015

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Πασχόπουλος Μηνάς

Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η λεισμανίωση είναι η μόνη από τις παραμελημένες τροπικές ασθένειες που ενδημούν στην Ευρώπη, ενώ αποτελεί σημαντικό πρόβλημα Δημόσιας και Κτηνιατρικής Υγείας στις χώρες της Μεσογείου. Προκαλείται από τα πρωτόζωα παράσιτα *Leishmania* spp. τα οποία έχουν αναπτύξει στρατηγικές που τους επιτρέπουν να επιβιώνουν στα μακροφάγα του θηλαστικού-ξενιστή. Τα είδη του παρασίτου που ανήκουν στο σύμπλεγμα *L. donovani* είναι υπεύθυνα για την πρόκληση της πιο σοβαρή μορφής της νόσου, της ανθρώπινης σπλαχνικής λεισμανίωσης και της επίσης εν δυνάμει θανατηφόρας λεισμανίωσης του σκύλου. Η παρούσα διατριβή ασχολήθηκε με τη μελέτη μοριακών μηχανισμών που πιθανά να εμπλέκονται στην επιβίωση των παρασίτων *L. donovani* στα μακροφάγα.

Η έρευνα πραγματοποιήθηκε εξ' ολοκλήρου στην Ομάδα Ενδοκυττάριου Παρασιτισμού του τμήματος Μικροβιολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ, υπό την επίβλεψη της κύριας ερευνήτριας Δρ Χαραλαμπίας Μπολέτη και υπό την εποπτεία της αν. καθηγήτριας Θωμαΐδας Παπαμαρκάκη του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Στο σημείο αυτό, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στη Δρ. Χαραλαμπία Μπολέτη της οποίας οφείλω ευγνωμοσύνη που με εμπιστεύτηκε και που μου πρόσφερε απλόχερα πλούσια εφόδια σε επιστημονικό και προσωπικό επίπεδο καθ' όλη τη διάρκεια της δύσκολης αλλά και ευχάριστης αυτής διαδρομής. Επίσης, την ευχαριστώ πολύ που μου πρόσφερε την ευκαιρία να ταξιδέψω και να επισκεφτώ κορυφαία Ινστιτούτα στο χώρο της βιοϊατρικής έρευνας και να συναναστραφώ με σημαντικούς επιστήμονες.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ την αν. καθηγήτρια Δρ. Θωμαΐδα Παπαμαρκάκη που μου έδωσε τη δυνατότητα να εκπονήσω την παρούσα διατριβή και με υποστήριξε μέχρι την ολοκλήρωσή της, καθώς και τον αν. καθηγητή Δρ. Σάββα Χριστοφορίδη που αποτέλεσε μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής μου επιτροπής. Επίσης, απευθύνω ευχαριστίες στα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς επιτροπής, καθηγητή Ευστάθιο Φριλίγγο, καθηγήτρια Χρυσάνθη Παπαδοπούλου, αν. καθηγητή Ηλία Παπαδόπουλο και αν. καθηγήτρια Αναστασία Πολίτου, για τη συμμετοχή τους σε αυτή και για τις σημαντικές τους παρατηρήσεις για τη βελτίωση του τελικού κειμένου της διατριβής.

Με πολλή αγάπη ευχαριστώ, όλα τα μέλη της Ομάδας Ενδοκυττάριου Παρασιτισμού, παλαιότερα και νεότερα, τους Μαρία Κοτίνη, Αναστασία Κοτοπούλη, Άρη Δούκα, Ολύβια Τζιουβάρα και Χρήστο Καράμπελα για τη βοήθεια, τη συμπαράσταση και όλες τις ωραίες στιγμές που μοιραστήκαμε, μέσα και έξω από το εργαστήριο.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω, επίσης, σε όλους τους συναδέλφους του εργαστηρίου Μοριακής Παρασιτολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ, Χρίστο Χαραλάμπους, Εύη Γκουζέλου, Τόνια Ευσταθίου και Αλέξανδρο Αλεξανδράτο για όλα όσα ζήσαμε και ανταλλάξαμε. Ιδιαίτερα ευχαριστώ την ερευνήτρια Γ' Δρ. Δέσποινα Σμυρλή και την τεχνικό κ. Γεωργία Κονείδου τόσο για την άριστη συνεργασία μας όσο και για την πολύπλευρη συμπαράστασή τους.

Τέλος, ευχαριστώ πολύ τον σύντροφό μου Αλέξανδρο και όλους τους αγαπημένους μου φίλους για την ενθάρρυνση και τις όμορφες στιγμές που ζούμε και μοιραζόμαστε τους οποίους αν και δεν αναφέρω ονομαστικά, έχω μέσα στην καρδιά μου σε θέση ξεχωριστή.

Στους γονείς μου Αντώνη και Ασπασία και την αδερφή μου Τζουλιάννα αφιερώνω όλη αυτή την προσπάθεια. Σας ευχαριστώ και σας αγαπώ.

Για τη σημαντική οικονομική στήριξη θα ήθελα να ευχαριστήσω το Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ το οποίο μου προσέφερε 4ετή υποτροφία για την εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής, τη δράση «Αναπτυξιακές προτάσεις ερευνητικών φορέων–ΚΡΗΠΙΣ» του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανταγωνιστικότητα και Επιχειρηματικότητα» (ΕΠΑΝ-II) που εντάσσεται στα πλαίσια του έργου με τίτλο: *«Λοιμώδη και νευροεκφυλιστικά νοσήματα στον 21ο αιώνα: από τη μελέτη των βασικών μηχανισμών στην ανάπτυξη μεταφραστικής έρευνας και μεθοδολογιών αιχμής με στόχο τη διάγνωση, την πρόληψη και τη θεραπεία, MIS 450598»* και την Πράξη «Διμερής E&T Συνεργασία Ελλάδας-Γαλλίας 2013» (no 1811).

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	1
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
1.1 Λεϊσμανίωση.....	6
1.1.1 Γενικά στοιχεία.....	6
1.1.2 Ιστορικά στοιχεία.....	6
1.1.3 Κλινικές μορφές.....	7
1.2 Επιδημιολογία της λεϊσμανίωσης.....	9
1.2.1 Γεωγραφική κατανομή.....	11
1.2.2 Ασυμπτωματικός παρασιτισμός.....	12
1.2.3 Συλλοιμώσεις.....	12
1.2.4 Η λεϊσμανίωση στην Ελλάδα.....	13
1.3 Διάγνωση της λεϊσμανίωσης.....	15
1.4 Πρόληψη.....	16
1.4.1 Εμβολιασμός κατά της λεϊσμανίωσης.....	17
1.5 Θεραπεία.....	19
1.5.1 Νέοι θεραπευτικοί στόχοι και φάρμακα- Φωσφατάσες ως μοριακοί στόχοι για την ανάπτυξη αντι-παρασιτικών φαρμάκων.....	19
1.6 Το παράσιτο <i>Leishmania</i> spp.....	20
1.6.1 Συστηματική κατάταξη.....	20
1.6.2 Μορφολογικά στάδια.....	22
1.6.3 Κύκλος ζωής.....	24
1.6.4 Ενδιάμεσος ξενιστής.....	26
1.7 Μοριακή βιολογία του παρασίτου <i>Leishmania</i>	27
1.7.1 Το γονιδίωμα.....	27
1.7.2 Γονιδιακή οργάνωση.....	28
1.7.3 Ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης.....	28
1.8 Αλληλεπίδραση παρασίτου και θηλαστικού-ξενιστή.....	30
1.8.1 Μολυσματικοί παράγοντες του παρασίτου.....	30
1.8.2 Ανοσολογική απόκριση στη μόλυνση με το παράσιτο.....	31
1.8.3 Ο ρόλος της φωσφορυλίωσης- αποφωσφορυλίωσης στη φαγοκυττάρωση του παρασίτου <i>Leishmania</i>	32
1.9 Φωσφοϊνοσιτίδια (PIs) και φαγοκυττάρωση.....	33
1.9.1 Ο ρόλος των PIs στη βιογένεση του φαγολυσοσώματος.....	33
1.9.2 Στρατηγικές ανατροπής της δράσης ή του μεταβολισμού των PIs από παθογόνα μικρόβια.....	37
1.10 Φωσφατάσες των παρασίτων <i>Leishmania</i>	39
1.10.1 Όξινες φωσφατάσες ιστιδίνης του παρασίτου <i>L. donovani</i>	40
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	44
2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	46

2.1	Υλικά.....	46
2.1.1	Αντιδραστήρια	46
2.1.2	Αναλώσιμα υλικά.....	47
2.1.3	Διαλύματα	48
2.1.4	Αντισώματα	50
2.1.5	Φορείς κλωνοποίησης- βακτηριακά στελέχη.....	51
2.1.6	Εναρκτήρια μόρια για την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)	52
2.1.7	Στελέχη παρασίτων – Κυτταρικές σειρές θηλαστικών	53
2.2	ΜΕΘΟΔΟΙ.....	54
2.2.1	Κλωνοποιήσεις.....	54
2.2.2	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής πραγματικού χρόνου (qPCR).....	62
2.2.3	Κυτταροκαλλιέργειες.....	65
2.2.4	Επιμολύνσεις της <i>Leishmania</i> με πλασμίδια/ Ηλεκτροδιάτρηση παρασίτων	66
2.2.5	Επιμόλυνση κυττάρων θηλαστικού	67
2.2.6	Μικροσκοπία φθορισμού	68
2.2.7	<i>In vitro</i> μελέτη της χωροχρονικής κατανομής μορίων-δεικτών της ωρίμανσης του φαγοσώματος και συγκεκριμένων ειδών PIs	69
2.2.8	<i>In vitro</i> μελέτη φαγοκυττάρωσης παρασίτων στην κυτταρική σειρά μακροφάγων J774	71
2.2.9	Κυτταρομετρία ροής (FACS).....	74
2.2.10	Απομόνωση πρωτεϊνών από βακτήρια και ευκαρυωτικά κύτταρα	76
2.2.11	Παραγωγή πολυκλωνικών αντισωμάτων από κουνέλι και ποντίκια.....	77
2.2.12	Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford	80
2.2.13	Ανοσοαποτύπωση Western	80
2.2.14	Υποκυτταρική κλασμάτωση κυττάρων θηλαστικού και προμαστιγωτών μορφών <i>Leishmania</i> με τη χρήση απορρυπαντικών	83
2.2.15	Παρασκευή ολικών μεμβρανών από προμαστιγωτές μορφές <i>Leishmania</i>	86
2.2.16	Ενζυμολογία.....	86
2.2.17	Βιοτινυλίωση των πρωτεϊνών της κυτταροπλασματικής μεμβράνης παρασίτων <i>L. donovani</i> -rLdMACP-mRFP1.....	89
2.2.18	Βιοπληροφορική ανάλυση	89
3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	91
3.1	Μελέτη της ωρίμανσης του φαγοσώματος που φέρει <i>L. donovani</i> σε μακροφάγα κύτταρα θηλαστικού	91
3.1.1	Χωροχρονική κατανομή συγκεκριμένων δεικτών ωρίμανσης του φαγοσώματος	92
3.1.2	Χωροχρονική κατανομή συγκεκριμένων PIs στη μεμβράνη του λείσμανιοφόρου φαγοσώματος	101
3.2	Μοριακός και βιοχημικός χαρακτηρισμός της LdMACP. Διερεύνηση του πιθανού ρόλου της ως μολυσματικού παράγοντα του παρασίτου <i>L. donovani</i>	114
3.2.1	Μοριακός χαρακτηρισμός της LdMACP.....	115

3.2.1	Εντοπισμός ομόλογων της <i>LdMACP</i> υποθετικών μεμβρανικών φωσφατασών ιστιδίνης και άλλων υποψήφιων έξω-φωσφατασών σε <i>Leishmania</i> spp.	120
3.2.2	<i>In silico</i> τρισδιάστατο (3D) δομικό μοντέλο της <i>LdMACP</i> και σύγκριση του με τη <i>LdSACP1</i> και την ανθρώπινη προστατική όξινη φωσφατάση (hPAP)	122
3.2.3	Έκφραση της <i>LdMACPsol</i> σε βακτήρια και παραγωγή α- <i>LdMACP</i> αντισωμάτων 125	
3.2.4	Έκφραση της διαγονιδιακής <i>rLdMACP-mRFP1</i> σε παράσιτα <i>L. donovani</i>	130
3.2.5	Βιοχημική μελέτη της διαγονιδιακής <i>rLdMACP-mRFP1</i> και της ενδογενούς <i>LdMACP</i> σε παράσιτα <i>L. donovani</i>	132
3.2.6	Υποκυτταρική εντόπιση της ανασυνδυασμένης <i>rLdMACP-mRFP1</i> και της ενδογενούς <i>LdMACP</i> σε παράσιτα <i>L. donovani</i>	139
3.2.7	Ενζυμικός χαρακτηρισμός της ενδογενούς <i>LdMACP</i> και της ανασυνδυασμένης <i>rLdMACP-mRFP1</i>	143
3.2.8	Ετερόλογη έκφραση της <i>LdMACP</i> σε ανώτερα ευκαρυωτικά κύτταρα και ταυτοποίηση της ενζυμικής ενεργότητας του ανασυνδυασμένου ενζύμου	146
3.2.9	<i>In vitro</i> μελέτη της <i>LdMACP</i> ως πιθανού μολυσματικού παράγοντα	150
4	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	159
4.1	Μελέτη της ωρίμανσης του φαγοσώματος που φέρει <i>L. donovani</i> σε μολυσμένα μακροφάγα κύτταρα θηλαστικού	159
4.2	Μοριακός και βιοχημικός χαρακτηρισμός της <i>LdMACP</i> . Διερεύνηση του πιθανού ρόλου της ως μολυσματικός παράγοντας του παρασίτου <i>L. donovani</i>	166
4.2.1	Η <i>LdMACP</i> υπάρχει μόνο στο σύμπλεγμα παρασίτων <i>L. donovani</i> που προκαλούν VL	166
4.2.2	<i>In silico</i> μελέτη δομικών χαρακτηριστικών της <i>LdMACP</i> και των <i>LdSACPs</i>	168
4.2.3	Εντοπισμός της <i>LdMACP</i> στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των παρασίτων <i>L. donovani</i> και η ενεργότητα όξινης έξω-φωσφατάσης	170
4.2.4	Η <i>LdMACP</i> προσδίδει ενεργότητα όξινης έξω-φωσφατάσης στην επιφάνεια ζωντανών προμαστιγωτών παρασίτων <i>Leishmania</i>	176
4.2.5	Πιθανή σύνδεση της ενεργότητας της <i>rLdMACP</i> με τη μολυσματικότητα και λοιμογόνο ικανότητα των προμαστιγωτών <i>L. donovani</i>	178
4.2.6	Επίτοποι της <i>LdMACP</i> εντοπίζονται σε μακροφάγα J774 μολυσμένα με προμαστιγωτές μορφές <i>Leishmania</i>	180
5	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	182
	ΠΕΡΙΛΗΨΗ	187
	SUMMARY	191
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	195
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι	212
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ	215
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ - ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ	216
	ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ	219

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Λεϊσμανίωση

1.1.1 Γενικά στοιχεία

Η λεϊσμανίωση αποτελεί μία ομάδα λοιμωδών νοσημάτων, η οποία προκαλείται από τα μονοκύτταρα πρωτόζωα παράσιτα του γένους *Leishmania* που προσβάλλουν τους ανθρώπους και τα ζώα (άγρια και κατοικίδια). Η λεϊσμανίωση κατανέμεται γεωγραφικά σε όλες τις ηπείρους, πλην της Αυστραλίας και της Ανταρκτικής, ενώ σύμφωνα με πρόσφατες καταγραφές του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (Π.Ο.Υ) πάνω από 98 χώρες είναι ενδημικές και κάθε χρόνο καταγράφονται περίπου 1,3 εκατομμύρια νέα κρούσματα και 20-30.000 θάνατοι ανθρώπων [1]. Επιπρόσθετα, το άθροισμα των χρόνων ζωής και των παραγωγικών χρόνων που χάνονται λόγω της ασθένειας (DALYs: Disability Adjusted Life Years) πλησιάζει τα 2,35 εκατομμύρια, κατατάσσοντας τη λεϊσμανίωση τρίτη σε σχέση με άλλα παρασιτικά νοσήματα [2].

Στην Ευρώπη και ιδιαίτερα στις χώρες της Μεσογείου, λόγω περιβαλλοντικών αλλαγών και πληθυσμιακών μετακινήσεων, η επιδημιολογία της νόσου αλλάζει με γρήγορους ρυθμούς ενώ περίπου 700 νέα κρούσματα αναφέρονται κάθε χρόνο [3].

1.1.2 Ιστορικά στοιχεία

Παρά το γεγονός ότι η σπλαχνική λεϊσμανίωση είναι γνωστή από την αρχαιότητα [4], ήταν το 1901 στην Καλκούτα όταν ο σκωτσέζος στρατιωτικός γιατρός Leishman περιέγραψε για πρώτη φορά την ύπαρξη ενός μικροοργανισμού σε επιχρίσματα από τη σπλήνα ασθενούς ο οποίος πέθανε από μία σοβαρή σπλαχνική νόσο που οι ντόπιοι αποκαλούσαν Kala-azar, δηλαδή στη σανσκριτική διάλεκτο «μαύρο πυρετό». Το 1903 ο Leishman δημοσίευσε αυτές τις παρατηρήσεις αναφέροντας ότι πιθανά πρόκειται για περιστατικά Τρυπανοσωμίας. Τον ίδιο χρόνο, ο συνταγματάρχης ιατρός Donovan έκανε παρόμοιες μικροσκοπικές παρατηρήσεις αναφέροντας ότι πρόκειται όμως για ένα άλλο μικροοργανισμό και όχι «τρυπανοσωματίδα». Τελικά, ο ιατρός Ross ήταν εκείνος ο οποίος πραγματοποίησε την κατάταξη/ ταξινόμηση του παρασίτου και δημιούργησε το γένος *Leishmania* το οποίο συνέδεσε με το Kala-azar. Προς τιμήν των Leishman και

Donovan, το είδος αυτό του παρασίτου που προκαλεί σπλαχνική λεισμανίωση ονομάστηκε *Leishmania donovani* (*L. donovani*) [5].

Τα πρώτα δεδομένα για τη δερματική λεισμανίωση προέκυψαν από τον Wright ο οποίος περιέγραψε την παρουσία ενός παθογόνου παράγοντα στη δερματική πληγή μιας κοπέλας από την Αρμενία. Η δερματική πληγή, λόγω της χαρακτηριστικής της μορφής, ονομάστηκε «φύμα της Ανατολής». Το 1906, ο Luhe ταξινόμησε το παράσιτο στο γένος *Leishmania* και ο παθογόνος παράγοντας που βρέθηκε στο «φύμα της Ανατολής» ονομάστηκε *L. tropica*. Το 1914 οι Yakimoff και Schokhor διέκριναν δύο διαφορετικά «είδη» παρασίτων που θεωρήθηκαν υπεύθυνα για τη δερματική λεισμανίωση, αλλά προκαλούσαν διαφορετική κλινική εικόνα λόγω της διαφορετικής ταχύτητας εμφάνισης της πληγής. Οι ερευνητές με βάση αυτή την παρατήρηση διαχώρισαν τα παράσιτα στη *L. tropica major* και στη *L. tropica minor*. Το 1973, ο Bray, [6] κατέταξε τις δύο ποικιλίες ως ξεχωριστές ταξινομικές μονάδες, κάτι που οδήγησε στην μετονομασία τους στα δύο είδη που γνωρίζουμε σήμερα (*L. major* και *L. tropica*). Η ταξινόμηση αυτή, για τα παράσιτα του Παλιού Κόσμου, ισχύει μέχρι σήμερα.

1.1.3 Κλινικές μορφές

Με βάση το είδος του παρασίτου *Leishmania* και την ανοσολογική απόκριση του ανθρώπου-ασθενούς, η λεισμανίωση εκδηλώνεται με τρεις κύριες κλινικές μορφές 1) τη σπλαχνική (VL, Visceral Leishmaniasis), 2) τη δερματική (CL, Cutaneous Leishmaniasis) και 3) τη βλεννογονοδερματική λεισμανίωση (MCL, Muco-cutaneous Leishmaniasis)

1.1.3.1 Σπλαχνική λεισμανίωση (VL)

Η σπλαχνική λεισμανίωση (VL) (Kala-azar) ενδημεί στην Ινδία και στην Ανατολική Αφρική και προκαλείται από παράσιτα του είδους *L. donovani*. Τα παράσιτα *L. infantum* προκαλούν τη νόσο στη Μεσόγειο καθώς και την Κεντρική και Νότια Αμερική [7, 8]. Κάθε χρόνο αναφέρονται 200.000-400.000 νέα περιστατικά VL και πάνω από 50.000 θάνατοι [1], ενώ εάν δεν εφαρμοστεί έγκαιρα η κατάλληλη φαρμακευτική αγωγή, η θνησιμότητα πλησιάζει το 75-95%.

Η νόσος προκύπτει από τον πολλαπλασιασμό των αμαστιγωτών μορφών του παρασίτου στα μονοπύρηννα φαγοκύτταρα των οργάνων του δικτυοενδοθηλιακού

συστήματος όπως είναι ο σπλήνας, το ήπαρ, τα λεμφοειδή γάγγλια και ο μυελός των οστών. Η περίοδος επώασης κυμαίνεται από 2-6 μήνες.

Μετά από την επιτυχή θεραπεία της VL, οι ασθενείς μπορεί να εμφανίσουν την post-Kala-azar δερματική λειψμανιώση (PKDL). Ειδικότερα, ο ινδικός τύπος της PKDL εμφανίζεται στο ~5-10% των Ινδών ασθενών μετά από την θεραπεία της VL. Σε αυτή την περίπτωση εμφανίζονται διάσπαρτες δερματικές αλλοιώσεις (υπόχρωμες κηλίδες, ερύθημα, οζίδια) κυρίως στον κορμό, στους βραχίονες, στο μηρό και την κνήμη. Στην αρχή οι κηλίδες είναι μικρές, αλλά αυξανόμενες αθροίζονται και σχηματίζουν πλάκες. Συχνά, κατά την εξέλιξη της μόλυνσης εμφανίζονται στο πρόσωπο οζίδια, τα οποία σε μεγάλο αριθμό ασθενών παρουσιάζουν την κλινική εικόνα της λέπρας. Ο Αφρικανικός τύπος της PKDL εμφανίζεται πολύ νωρίτερα (0-6 μήνες) και μπορεί να παρουσιαστεί ακόμη και κατά την διάρκεια της θεραπείας της VL, πριν ακόμα υποχωρήσουν οι κλινικές εκδηλώσεις της σπλαχνικής νόσου. Μάλιστα, σχεδόν το 50% των ασθενών με VL εμφανίζουν PKDL. Σε αντίθεση με τον ινδικό, ο αφρικανικός τύπος είναι αυτοθεραπευόμενος. Τέλος, σύμφωνα με τον Π.Ο.Υ [9], οι ασθενείς με PKDL θεωρείται ότι δρουν ως πιθανές «δέξαμενές» της σπλαχνικής μορφής της νόσου, επηρεάζοντας την επιδημιολογία της στις ενδημικές περιοχές.

1.1.3.2 Δερματική λειψμανιώση (CL)

Η δερματική λειψμανιώση (CL) αποτελεί την πιο διαδεδομένη μορφή του νοσήματος με 0,7-1,3 εκατομμύρια περιστατικά στον κόσμο κάθε χρόνο [1]. Η δερματική αλλοίωση (οζίδιο) εμφανίζεται στο σημείο του τσιμπήματος, που είναι συνήθως τα εκτεθειμένα μέρη του σώματος, όπως το πρόσωπο και τα άκρα. Η μορφή αυτή της νόσου δεν είναι εν γένει απειλητική για τη ζωή του ασθενούς, όμως η μακροχρόνια παραμονή των παραμορφωτικών αλλοιώσεων οδηγεί σε κοινωνικό αποκλεισμό και ανικανότητα.

Πιο συγκεκριμένα, τα παράσιτα *L. major* και *L. tropica* προκαλούν δερματική λειψμανιώση ξηρού τύπου. Η αρχική δερματική αλλοίωση είναι μονήρης ή πολλαπλή και εμφανίζεται ως ερυθρωματώδης βλατίδα. Μέσα σε λίγες εβδομάδες η βλατίδα αυξάνει σε διάμετρο και όγκο, γίνεται οζώδης, εξελκώνεται και εμφανίζει κεντρική εφελκίδα. Βαθμιαία, το οζίδιο χάνει την οίδηματώδη αίσθηση και γίνεται στερεό. Η επούλωση διαρκεί από 3 μήνες έως 2 χρόνια αλλά συνήθως επέρχεται σε 1 χρόνο. Ξηρά έλκη μπορούν να προκαλέσουν και παράσιτα του είδους *L. infantum* και *L. aethiopica*.

Το παράσιτο *L. major* προκαλεί δερματική λεισμανίωση υγρού τύπου. Η αλλοίωση αναπτύσσεται με τον ίδιο τρόπο όπως η ξηρού τύπου, αλλά υπάρχει τάση νέκρωσης της κεντρικής περιοχής και δημιουργία αιμορραγικής εφελκίδας. Η αλλοίωση είναι μεγαλύτερη από αυτήν του ξηρού τύπου αλλά η επούλωση επέρχεται γρηγορότερα (2-8 εβδομάδες). Παρόμοια συμπτώματα αναφέρονται και στην περίπτωση μόλυνσης με τα είδη του Νέου Κόσμου (*L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. peruviana*, *L. guyanensis*, *L. panamensis* και *L. braziliensis*).

Η διάχυτη δερματική λεισμανίαση (Diffuse cutaneous leishmaniasis, DCL) είναι μια σπάνια εκδήλωση της δερματικής λεισμανίωσης, που οφείλεται κυρίως στο παράσιτο *L. aethiopica*, αλλά και σε παράσιτα του είδους *L. amazonensis*. Στην περίπτωση αυτή, παρατηρούνται ευρείες οζώδεις δερματικές αλλοιώσεις οι οποίες διατηρούνται για μεγάλο χρονικό διάστημα. Ο κύκλος της ασθένειας είναι παρατεταμένος αλλά δεν παρατηρείται προσβολή των σπλαχνικών οργάνων [10].

1.1.3.3 Βλεννογονοδερματική λεισμανίωση (MCL)

Η βλεννογονοδερματική λεισμανίαση (mucocutaneous leishmaniasis, MCL ή *esprundia*) προκαλείται από το παράσιτο *L. brasiliensis*. Αρχικά εμφανίζονται δερματικές αλλοιώσεις οι οποίες, εξαιτίας της διασποράς του παρασίτου μέσω του αίματος ή των λεμφαγγείων στο βλεννογόνο του στόματος, της μύτης και του φάρυγγα προκαλούν παραμορφωτικές βλάβες στα όργανα του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος. Η MCL δεν επουλώνεται αυτόματα και αν μείνει χωρίς θεραπεία, προκαλεί προοδευτικά εκτεταμένες παραμορφωτικές αλλοιώσεις [10] οι οποίες όμως δεν οδηγούν στο θάνατο. Πρόσφατα δημοσιεύτηκε μία αναφορά, σύμφωνα με την οποία, η παρουσία ενός RNA-1 ιού (LRV1) που παρασιτεί τη *L. guyanensis* (*Vianna*) οδηγεί στην επιδείνωση της MCL. Συγκεκριμένα, όταν το παράσιτο είναι μολυσμένο με τον ιό, ο ιός εκτρέπει την ανοσολογική απάντηση του ξενιστή προκαλώντας υπερφλεγμονώδη αντίδραση η οποία επιδεινώνει την κλινική εικόνα τους ασθενούς. [11].

1.2 Επιδημιολογία της λεισμανίωσης

Το γένος *Leishmania* περιλαμβάνει περίπου 30 είδη, από τα οποία τα περισσότερα (~20) είναι ικανά να μολύνουν τον άνθρωπο προκαλώντας τη νόσο λεισμανίωση [1]. Η λεισμανίωση χαρακτηρίζεται ως ζωοανθρωπονόσος (ζώο-φλεβοτόμος-άνθρωπος),

ζωονόσος (ζώο-φλεβοτόμος-ζώο) ή ανθρωπονόσος (άνθρωπος-ζώο-άνθρωπος) ανάλογα με το είδος του θηλαστικού που αποτελεί τον τελικό ξενιστή ή/ και την αποθήκη (reservoir) του παρασίτου στη φύση [7, 12]. Οι αποθήκες του παρασίτου, δηλαδή οι τελικοί ξενιστές που είναι απαραίτητοι για τη διατήρηση και διασπορά της *Leishmania* στη φύση, είναι μία μεγάλη ποικιλία θηλαστικών (κυνίδες, λαγόμορφα, τρωκτικά) [13]. Στη λεκάνη της Μεσογείου, ο σκύλος αποτελεί τον κυριότερο ξενιστή και αποθήκη του παρασίτου *L. infantum* που είναι το υπεύθυνο παράσιτο για την πρόκληση της σημαντικότερης, από κλινική και επιδημιολογική άποψη, μορφής λεισμανίωσης, της VL [13, 14].

Παγκοσμίως, η λεισμανίωση ανήκει στις τροπικές αναδυόμενες ασθένειες μαζί με την αφρικανική τρυπανοσωμίαση (sleeping sickness), την ασθένεια Chagas' και την τοξοπλάσμωση, ενώ ταυτόχρονα έχει χαρακτηριστεί ως «νόσος των φτωχών» [15]. Πράγματι, η έλλειψη κοινωνικών και ατομικών πόρων εντείνει τους παράγοντες κινδύνου (risk factors) για εκδήλωση της νόσου, όπως είναι πχ. η περιορισμένη ιατροφαρμακευτική περίθαλψη, οι κακές συνθήκες οικιακής υγιεινής, η ύπαρξη ανοιχτού αποχετευτικού συστήματος και η περιορισμένη πρόσβαση σε καλής ποιότητας και ικανής ποσότητας τροφή. Άλλοι παράγοντες που έχουν καθορίσει τον παγκόσμιο επιδημιολογικό χάρτη της λεισμανίωσης είναι η έξαρση του φαινομένου της οικονομικής μετανάστευσης, των συλλοιμώξεων [1] και τέλος, η αλλαγή των κλιματολογικών συνθηκών η οποία έχει επιτρέψει την επέκταση των δυνητικών περιοχών εκκόλαψης και διαβίωσης των ασπόνδυλων ξενιστών του παρασίτου (σκνίπα) πλησιέστερα προς στα μεγάλα αστικά κέντρα [3].

Η ηλικία των ασθενών που πλήττονται περισσότερο εξαρτάται από το είδος του παρασίτου και την συχνότητα της νόσου στην εκάστοτε γεωγραφική περιοχή. Στις περιοχές όπου ενδημεί το παράσιτο *L. infantum* η μέση ηλικία των ασθενών που νοσούν από VL τείνει να είναι πολύ μικρή (<5 ετών), ενώ σε περιοχές ενδημικές στο είδος *L. donovani* (περιοχές της Ασίας και Αφρικής) η μέση ηλικία είναι τα 13-23 έτη. Από την άλλη πλευρά, οι ενήλικες μεγάλης ηλικίας ή/ και ανοσοκατεσταλμένοι οι οποίοι είτε διαβιούν είτε εισέρχονται σε ενδημική περιοχή, διατρέχουν επίσης υψηλό κίνδυνο νόσησης [3, 16].

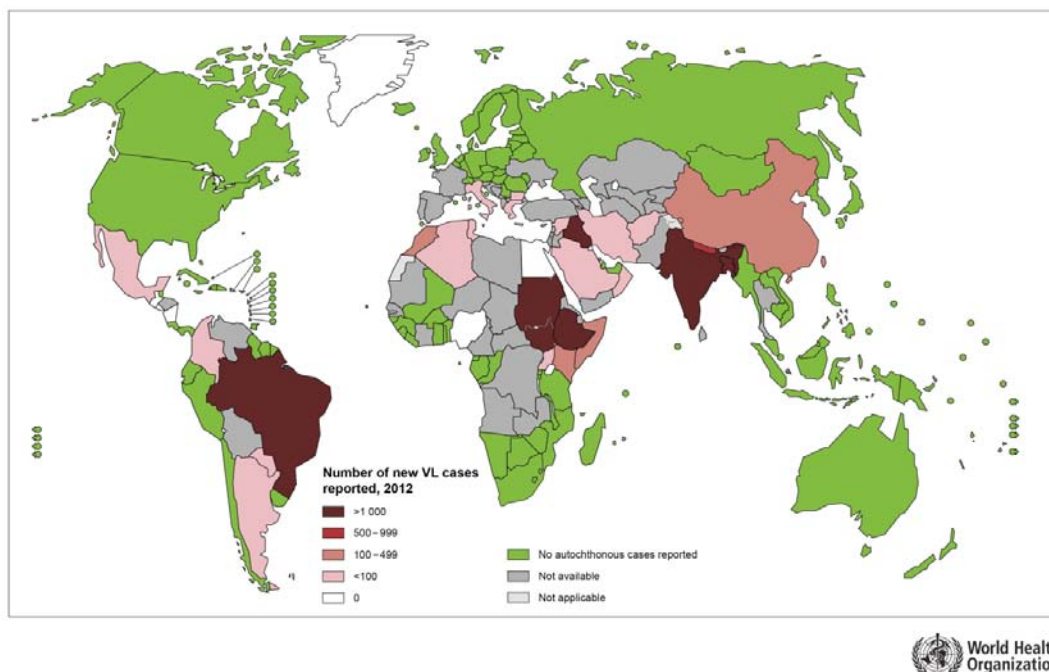
Σε μικρότερο ποσοστό η νόσος μπορεί να μεταδοθεί από τη μητέρα στο έμβρυο διαπερνώντας τον διαπλακουντικό φραγμό [16]. Επιπρόσθετα, η μετάδοση του παρασίτου μπορεί να γίνει ιατρογενώς, μετά από χορήγηση μολυσμένου αίματος από δότες-φορείς

του παρασίτου ή μετά από χρήση μολυσμένων συρίγγων [17, 18], αλλά και μετά από επαφή με τραύματα και εκκρίσεις μολυσμένων ζώων, ειδικά αν πρόκειται για ανοσοκατεσταλμένους οργανισμούς (πχ. ασθενείς με HIVσυλλοίμωξη) [19-21].

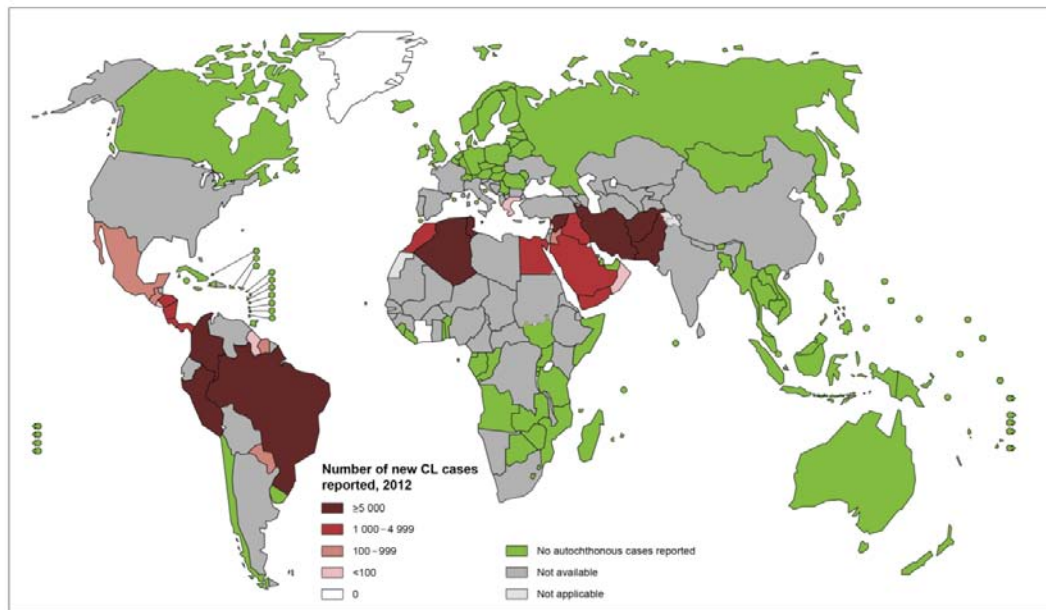
1.2.1 Γεωγραφική κατανομή

Παγκοσμίως, πάνω από το 90% των περιστατικών της VL απαντώνται στο Μπαγκλαντές, τη Βραζιλία, την Αιθιοπία, την Ινδία, το Σουδάν, ενώ η πλειοψηφία των περιστατικών CL απαντώνται στο Αφγανιστάν, την Αλγερία, τη Βραζιλία, την Κολομβία, το Ιράν, το Πακιστάν, το Περού, τη Σαουδική Αραβία και τη Αραβική Δημοκρατία της Συρίας. Τέλος, το 90% των περιστατικών της MCL συγκεντρώνονται στη Βολιβία, Βραζιλία και στο Περού [1] (Εικόνα 1.1 και Εικόνα 1.2).

Στη λεκάνη της Μεσογείου, η επιδημιολογία της νόσου αλλάζει με ταχείς ρυθμούς. Το κυρίαρχο είδος το οποίο είναι υπεύθυνο κυρίως για την εμφάνιση της VL και σπανιότερα της CL, είναι η *L. infantum* που ανήκει στο σύμπλεγμα *L. donovani* [22] και έχει ως κύρια δεξαμενή το σκύλο. Στον άνθρωπο, τα περισσότερα κρούσματα εμφανίζονται στην Ισπανία, την Πορτογαλία, τη Νότια Γαλλία και την Ιταλία [3].



Εικόνα 1.1 Γεωγραφική κατανομή της VL (πηγή Π.Ο.Υ 2014, <http://gamapserver.who.int/mapLibrary/app/searchResults.aspx>)



Εικόνα 1.2 Γεωγραφική κατανομή της CL (πηγή Π.Ο.Υ 2014, <http://gamapserver.who.int/mapLibrary/app/searchResults.aspx>)

1.2.2 Ασυμπτωματικός παρασιτισμός

Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, στις ενδημικές περιοχές ένας σημαντικός αριθμός μολυσμένων ατόμων από το είδος *L. infantum* δεν αναπτύσσουν ούτε δερματικές αλλοιώσεις ούτε εμφανίζουν άλλα κλινικά συμπτώματα της νόσου [23]. Συγκεκριμένα, υπολογίζεται ότι μόνο ένα στα πέντε ή στα δέκα φυσιολογικά άτομα που μολύνονται με το παράσιτο αναπτύσσουν τη νόσο [24]. Η ύπαρξη ασυμπτωματικού πληθυσμού ο οποίος δεν έχει πρόσβαση στη θεραπευτική αγωγή, συνδέεται με την παραμονή των παρασίτων σε μια περιοχή και την εμφάνιση της VL [25]. Το ίδιο παρατηρείται και στις ενδημικές περιοχές της Μεσογείου όπου οι σκύλοι εμφανίζουν πολύ υψηλά ποσοστά οροθετικότητας (10-37%) [26, 27], με τους περισσότερους από αυτούς να είναι ασυμπτωματικοί και να μη λαμβάνουν θεραπεία.

1.2.3 Συλλοιμώσεις

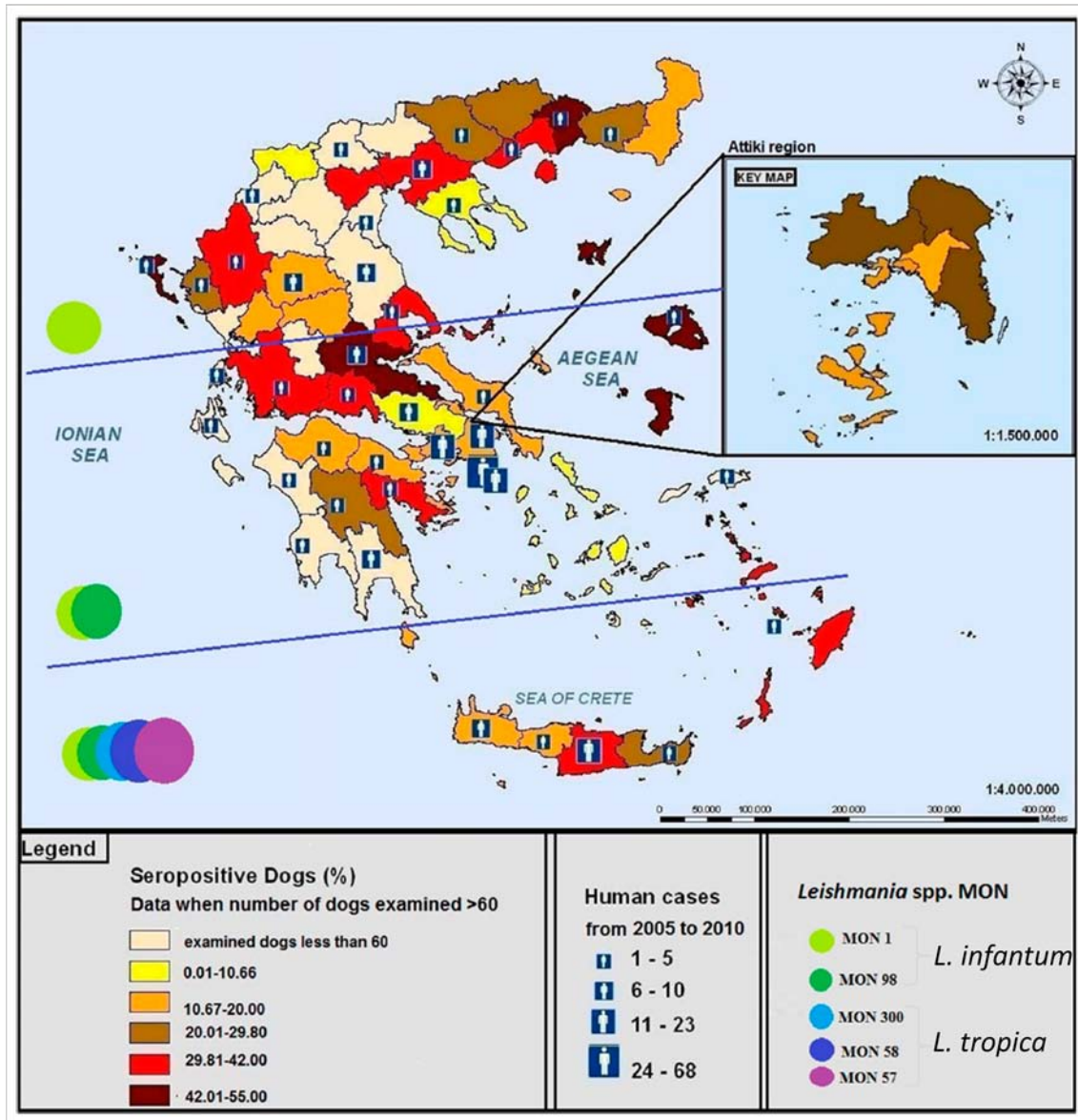
Η πιο συνήθης συλλοιμώση της λεισμανίωσης απο πλεί αυτή με τον ιό HIV. Σε 35 χώρες παγκοσμίως έχουν αναφερθεί περιστατικά συλλοιμώσης HIV/ *Leishmania*, με το ποσοστό της να παρουσιάζει τάσεις δραματικής αύξησης.

Το ανοσοποιητικό σύστημα των ασθενών με HIV/ *Leishmania* συλλοίμωξη υπολειτουργεί καθιστώντας τους ευαίσθητους σε ευκαιριακές λοιμώξεις. Συνεπώς, έχουν αυξημένο κίνδυνο να μολυνθούν με το παράσιτο *Leishmania* και να αποτελούν δεξαμενή του στη φύση. Σημειώνεται ότι το παράσιτο στοχεύει τα κύτταρα του ανοσοποιητικού που καταστρέφει και ο ιός HIV επιδεινώνοντας την κατάσταση του ασθενή. Σύμφωνα με τον Π.Ο.Υ. η λήψη αντι-ιικής αγωγής εμποδίζει την εξέλιξη της νόσου, προσφέρει προστασία έναντι των αναμολύνσεων και γενικά αυξάνει το ποσοστό επιβίωσης του ασθενούς με συλλοίμωξη HIV/ *Leishmania* [1].

Δυστυχώς ακόμα και στις μέρες μας οι επιδημιολογικές καταγραφές για τη συλλοίμωξη HIV/ *Leishmania* δεν περιγράφουν την πραγματική έκταση του προβλήματος, λόγω υποεκτιμήσεων και υποδιαγνώσεων των περιστατικών [19-21]. Παρά το γεγονός αυτό, πάνω από 2000 περιστατικά VL/ HIV έχουν αναφερθεί στην Δυτική Ευρώπη τις τελευταίες δύο δεκαετίες [28, 29], ενώ υπολογίζεται ότι το 71% των ασθενών στην Νοτιοανατολική Ευρώπη με συλλοίμωξη HIV/ *Leishmania* είναι χρήστες ενδοφλέβιων ουσιών [30].

1.2.4 Η λεισμανίωση στην Ελλάδα

Το πρώτο περιστατικό λεισμανίωσης στην Ελλάδα αναφέρθηκε στην Κρήτη το 1907. Κατά τη δεκαετία του 1940, αναφέρονταν ετησίως περίπου 160 περιστατικά ανθρώπινης VL. Τις δεκαετίες που ακλούθησαν, τα κρούσματα παρουσίασαν ελαφριά αριθμητική κάμψη. Από το 1962 έως το 1992 το Υπουργείο Υγείας κατέγραψε 1005 περιστατικά VL στην Αττική [31]. Παρ' όλα αυτά, τα τελευταία χρόνια η νόσος φαίνεται να ανακάμπτει [27]. Αυξημένος επιπολασμός της ασθένειας έχει αναφερθεί σε περιοχές όπως το Λασιθί στην Ανατολική Κρήτη και την Αττική. Στην Ελλάδα έχει απομονωθεί και ταυτοποιηθεί από ανθρώπους με VL το στέλεχος *L. infantum*, ενώ από δερματικές αλλοιώσεις το στέλεχος *L. tropica* [27, 32, 33] (Εικόνα 1.3). Τις περισσότερες φορές φαίνεται πως τα κρούσματα αυτά δεν είναι αυτόχθονα, αλλά εισαγόμενα [22]. Τα τελευταία χρόνια, τα πολιτικοκοινωνικά γεγονότα στη λεκάνη της Μεσογείου καθώς και οι πολεμικές συρράξεις, προκάλεσαν εκτεταμένες εκτοπίσεις και μετακινήσεις πληθυσμιακών ομάδων από χώρες ενδημικές στη νόσο προς την περιοχή της Ευρώπης. Η Ελλάδα λόγω γεωγραφικής θέσης, δέχτηκε ένα πολύ μεγάλος μέρος των προσφύγων αυτών, με αποτέλεσμα την αύξηση του αριθμού ασθενών με λεισμανίωση που καταγράφονται στα ελληνικά νοσοκομεία.



Εικόνα 1.3 Σχηματική καταγραφή της διασποράς της ανθρώπινης λείσμανιώσης και του ποσοστού των οροθετικών σκύλων στη Ελλάδα (τροποποιημένο, [34]).

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να τονίσουμε τη διαχρονική υποεκτίμηση του αριθμού των περιστατικών στη χώρα μας λόγω της μη συστηματικής τους καταγραφής. Σύμφωνα με την πιο πρόσφατη έκθεση του Κέντρου Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων [35], η εξέλιξη της δηλούμενης επίπτωσης της λείσμανιώσης στη χώρα μας για τη δεκαετία 2000-2009 είναι στα 0,5 κρούσματα ανά 100.000 πληθυσμού (μέση τιμή αριθμού κρουσμάτων κατ' έτος 47, συνολικός αριθμός κρουσμάτων πενταετίας 234). Η VL είναι η συχνότερη μορφή (περίπου το 90% των δηλωθέντων κρουσμάτων κατά το διάστημα 2005-2009).

Σε ό,τι αφορά στην επιζωοτιολογία της νόσου στην Ελλάδα, πρόσφατη μελέτη παρουσιάζει ότι το ~30% των σκύλων που ελέγχθηκαν στην περιοχή της Αττικής βρέθηκαν

οροθετικοί έναντι της *L. infantum*. Αντίθετα, στη Φλώρινα, όπου το κλίμα δεν ευνοεί την ανάπτυξη της σκνίπας, το αντίστοιχο ποσοστό ήταν μόλις 2,05% [36]. Επιπρόσθετα, έχει δειχτεί ότι στη χώρα μας μεγάλο ποσοστό των οροθετικών σκύλων είναι ασυμπτωματικοί, δηλαδή δεν παρουσιάζουν κλινικές εκδηλώσεις, δρουν όμως ως εν δυνάμει αποθήκες του παρασίτου, γεγονός που μπορεί να επιφέρει σοβαρές επιπτώσεις στην επιδημιολογία της ανθρώπινης VL στην περιοχή [37].

1.3 Διάγνωση της λεισμανίωσης

Η διάγνωση της λεισμανίωσης βασίζεται στην κλινική εξέταση και επιβεβαιώνεται με την εντόπιση των παρασίτων (ή του DNA αυτών) σε δείγματα μολυσμένων ιστών (αίμα, δέρμα, σπλήνα, λεμφαδένες και μυελος των οστών). Με εξειδικευμένες παρασιτολογικές εξετάσεις (καλλιέργεια και μικροσκόπηση για τον εντοπισμό των παρασίτων) ή/ και με ορολογικές και μοριακές μεθόδους, επιτυγχάνεται η επιβεβαίωση της νόσου ενώ είναι δυνατή και η διάγνωση του είδους της *Leishmania* που είναι υπεύθυνο για το εκάστοτε περιστατικό. Η διάγνωση στο επίπεδο αυτό, είναι πολύ χρήσιμη από επιδημιολογικής και κλινικής άποψης και γίνεται με μοριακές τεχνικές όπως η PCR-RLFP (Restriction Fragment Length Polymorphism), η μέθοδος της ισοενζυμικής πολυεστιακής ηλεκτροφόρησης (MLEE, Multilocus Enzyme Electrophoresis) και η αλληλούχιση.

Η ανοσολογική διάγνωση είναι η απλούστερη και περισσότερο χρησιμοποιούμενη στην πράξη διαγνωστική μέθοδος. Κατά τη VL και τη DCL, ο ασθενής αναπτύσσει χυμική ανοσία με την παραγωγή υψηλών τίτλων ειδικών για τη *Leishmania* αντισωμάτων που ανιχνεύονται με μια ποικιλία ορολογικών μεθόδων. Οι μέθοδοι που εφαρμόζονται στην περίπτωση αυτή είναι το Leishmanin skin test (ειδικό για μόλυνση από την *L. major*), ο έμμεσος ανοσοφθορισμός (IFA, ειδικότητα 70-89%, ευαισθησία 55-70%), η ανοσοενζυμική δοκιμή (ELISA, ειδικότητα 84 -100%, ευαισθησία 63-100%) και η άμεση συγκόλληση (DAT, ειδικότητα 72-95%, ευαισθησία 91-100%) [38]. Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί πολλά ορολογικά τεστ που βασίζονται στην ανίχνευση από τα αντισώματα του ορού του αντιγόνου rk39 το οποίο βρίσκεται ακινητοποιημένο σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Η ειδικότητα των ανοσοχρωματογραφικών ταινιών κυμαίνεται μεταξύ 88-100% [38]. Καθώς, όμως, τα παραγόμενα από τον οργανισμό αντισώματα έναντι επιφανειακών, διαλυτών και εκκρινόμενων αντιγόνων του παρασίτου παραμένουν για αρκετό καιρό μετά την μόλυνση, οι μέθοδοι διάγνωσης που βασίζονται στην ανίχνευση τους, δεν είναι ικανές να διαφοροποιήσουν τις νέες από τις παλαιές

μολύνσεις. Επιπρόσθετα, έχουν χαμηλή ευαισθησία σε περιπτώσεις ασθενών που δεν αναπτύσσουν υψηλούς τίτλους αντισωμάτων, όπως είναι οι ασθενείς με HIV-λεϊσμανίωση, οι ασυμπτωματικοί ασθενείς καθώς και οι ασθενείς με CL. Στις περιπτώσεις αυτές, η διάγνωση βασίζεται σε μοριακές τεχνικές, όπως πχ. η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής πραγματικού χρόνου (real time-PCR, nested PCR, PCR-Elisa) [39].

1.4 Πρόληψη

Οι πρώτες καταγεγραμμένες απόπειρες ελέγχου και περιορισμού της νόσου αναφέρονται το 1920-1923, όταν ο McCombie Young κατάφερε να ελέγξει μια υποτροπή VL, μετά από επιδημία γρίπης στην περιοχή Assam (Ινδία), καταγράφοντας όλα τα κρούσματα και μεταφέροντας τους ασθενείς σε κέντρο περίθαλψης. Πάνω από 80.000 άτομα έλαβαν ενδοφλέβια θεραπεία με ουσίες βασισμένες στο τρισθενές αντιμόνιο για μία περίοδο 3 μηνών. Ο ψεκασμός των υπόγειων στοών των γέρβιλων με εντομοκτόνες ουσίες κατάφερε να ελέγξει τη CL σε μια ενδημική περιοχή του Τουρκμενιστάν τη δεκαετία του 1940, αλλά αντίστοιχα απέτυχε όταν εφαρμόστηκε στο Ιράν. Μεγάλης κλίμακας έλεγχος των σκνιπών-φορέων της λεϊσμανίωσης με τη χρήση εντομοκτόνων ουσιών, εισήχθη το 1950 και η χρήση τους σε συνδυασμό με την καταγραφή και θεραπεία των κρουσμάτων, οδήγησε στον έλεγχο της CL στη Σοβιετική Ένωση και την κεντρική Ασία. Παρ' όλα αυτά, τα τελευταία χρόνια παρατηρήθηκε επανεμφάνιση της νόσου σε μερικές περιοχές της Κεντρικής Ασίας.

Στην Ελλάδα, το Π.Δ 400/83 άρθρο 9 παρ 4,5, καθιστά ως μέτρο πρόληψης της νόσου την υποχρεωτική την ευθανασία των σκύλων που έχουν διαγνωστεί με λεϊσμανίωση. Το μέτρο αυτό, εφαρμόστηκε για κάποια χρόνια, πλέον όμως τόσο οι κτηνίατροι όσο και οι ιδιοκτήτες των κατοικίδιων αντιδρούν στην εκτέλεσή του, καθώς η ασθένεια μπορεί να αντιμετωπιστεί σε ικανοποιητικό βαθμό και τα θεραπευμένα ζώα ευζωούν μετά την ολοκλήρωσή της. Από την άλλη πλευρά, απαιτείται η προστασία των σκύλων στις ενδημικές περιοχές [40] με α) εφαρμογή συστηματικής εντομοαπώθησης κατά την περίοδο δραστηριότητας των σκνιπών (από τον Μάιο έως τον Νοέμβριο), β) έγκαιρη διάγνωση και θεραπεία των ζώων-ασθενών και γ) εφαρμογή προληπτικού εμβολιασμού στις περιπτώσεις που αυτό επιτρέπεται.

1.4.1 Εμβολιασμός κατά της λεισμανίωσης

Καθώς δεν έχουν αποσαφηνιστεί όλοι οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην ανοσοαπόκριση και ανοσοπροστασία έναντι της λεισμανίωσης, η βιοϊατρική κοινότητα δεν έχει καταφέρει μέχρι σήμερα να κατασκευάσει ένα εμβόλιο που να συνδυάζει την αποτελεσματικότητα και τη μακρά προστασία με την ασφάλεια για τον άνθρωπο και την εύκολη διαθεσιμότητά του στις ενδημικές περιοχές.

Πίνακας 1 Συνοπτικός πίνακας των τύπων των εμβολίων που έχουν δοκιμαστεί μέχρι σήμερα (τροποποιημένο, [39])

Τύπος εμβολίου	Είδος παρασίτου
Live virulent parasites	<i>L. major</i>
Live non-virulent parasites	<i>L. tarentolae</i>
Live attenuated parasites	<i>L. major</i> (gamma-irradiated)
	<i>L. mexicana</i> (cystein proteinase knockout)
	<i>L. major</i> (dihydrofolate reductase-thymidylate synthase knockout)
	<i>L. major</i> (lipophosphoglycan 2 knockout)
	<i>L. infantum</i> (silent information regulatory 2 single knockout)
	<i>L. major</i> (phosphomannomutase knockout)
	<i>L. major</i>
	<i>L. mexicana</i> (gentamicin-attenuated)
	<i>L. donovani</i> (centrin gene deleted)
	<i>L. major</i> (dihydrofolate reductase-thymidylate synthase mutant)
	<i>L. infantum</i> (gentamicin-attenuated)
	<i>L. amazonensis</i> (δ-aminolevulinate dehydratase and porphobilinogen deaminase transgenic)
Killed parasites	<i>L. braziliensis</i> <i>L. guayanensis</i> <i>L. amazonensis</i> <i>L. major</i>
Protein vaccines	
Gp63 (63 kDa glycoprotein) derived peptides	<i>L. major</i>
Gp63 derived peptide PT3 (residues 154-169)	<i>L. major</i>
Gp63 protein	<i>L. major</i>
LACK protein	<i>L. major</i>
LACK, LmPDI proteins	<i>L. major</i>
Promastigote surface antigen 2 (PSA-2)	<i>L. major</i> , <i>L. mexicana</i>
Nucleoside hydrolase protein	<i>L. major</i>
Nucleoside hydrolase (NH36) recombinant	<i>L. chagasi</i> ,

proteins	<i>L. amazonensis</i>
Leish-111f polyprotein	<i>L. major</i> <i>L. infantum</i>
Leish-110f polyprotein	<i>L. major</i> <i>L. infantum</i>
KSAC polyprotein (kinetoplastid membrane protein 11, sterol 24-methyltransferase, A2 and cysteine proteinase B)	<i>L. major</i> <i>L. infantum</i>
Q polyprotein (Lip2a, Lip2b, P0 and the histone H2A proteins)	<i>L. infantum</i>
Q polyprotein	<i>L. infantum</i>
LEISH-F1 + MPLSE peptides	<i>L. major</i> <i>L. braziliensis</i>
Leishmune® FML (fucosemannose ligand)	<i>L. donovani</i>
DNA vaccines	
gp63 gene	<i>L. major</i>
LACK (<i>Leishmania</i> homolog of receptors for activated Ckinase) gene	<i>L. major</i>
LACK gene	<i>L. chagasi</i>
pCI-neo-LACK (LACK gene in pCI-neo vector)	<i>L. chagasi</i>
Parasite surface antigen 2 (PSA-2)	<i>L. major</i>
<i>L. major</i> signal peptidase	<i>L. major</i>
Cocktail of plasmids encoding LACKp24, TSA, <i>LmSTI1</i>, CPa	<i>L. major</i>
Cocktail of plasmids encoding cysteine proteinases I, II and III	<i>L. major</i>
Combination of TRYP (tryparedoxin peroxidase) plasmid with MVA (modified vaccinia virus Ankara) and TLR 1/2 agonist Pam3CSK4	<i>L. panamensis</i>
Sand fly saliva	
Total saliva of <i>Phlebotomus duboscqi</i>	<i>L. major</i>
LJM11 salivary protein gene from <i>Lutzomyia longipalpis</i>	<i>L. major</i>
Synthetic maxadilan (MAX) of <i>Lutzomyia longipalpis</i>	<i>L. major</i>
Protein SP15 (<i>PpSP15</i>) or plasmid encoding SP15 from <i>Phlebotomus papatasi</i>	<i>L. major</i>
Plasmids encoding <i>PpSP15</i>, <i>PpSP44</i> proteins of <i>Phlebotomus papatasi</i>	<i>L. major</i>

Η μόνη μακράς διάρκειας προστασία κατά της CL επιτεύχθηκε μετά από ανοσοποίηση των δυνητικά ασθενών με ζωντανά μολυσματικά παράσιτα («leishmanization-vaccination»). Η προσέγγιση αυτή εγκαταλείφτηκε για λόγους ασφαλείας, ενώ τώρα επανεξετάζεται με χρήση φυσικά κατεσταλμένων παρασίτων [41]. Σχετικά επιτυχημένο έχει κριθεί το εμβόλιο Leishmune® το οποίο προσφέρει προστασία από τη μετάδοση της λεισμανίωσης από τους σκύλους στον άνθρωπο [39], ενώ πολύ πρόσφατα, το 2011,

εγκρίθηκε για κτηνιατρική χρήση το εμβόλιο CaniLeish[®] (Virbac). Η αποτελεσματικότητά του, όμως, είναι ακόμα υπό αξιολόγηση [42]. Παραπάνω (Πίνακας 1) συνοψίζονται οι τύποι των εμβολίων που έχουν δοκιμαστεί μέχρι σήμερα έναντι συγκεκριμένων ειδών της *Leishmania* [39].

1.5 Θεραπεία

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η λεισμανίωση αποτελεί μείζονα ανθρωποζωνόσο για την οποία μέχρι τις μέρες μας δεν υπάρχει ασφαλής θεραπεία [39]. Συγκεκριμένα, η μέχρι τώρα θεραπεία της νόσου βασίζεται σχεδόν αποκλειστικά σε χημειοθεραπευτικά σχήματα και η νοσηλεία στο νοσοκομείο κρίνεται αναγκαία εξαιτίας των συνοδών παρενεργειών (πυρετός, νεφρική ανεπάρκεια, εμετοί ή ακόμα και καρδιακή ανακοπή, οξεία ηπατική ανεπάρκεια και σπασμοί) [43-46].

Ως φάρμακα πρώτης γραμμής χορηγούνται κυρίως ενώσεις πεντασθενούς αντιμονίου, π.χ. sodium antimony glucolate (Pentostam) και meglumine antimoniate (Glucantime) που ανακαλύφθηκαν πριν περίπου έναν αιώνα [45]. Οι ενώσεις αμφοτερικίνη Β και πενταμιδίνη αποτελούν φάρμακα δεύτερης γραμμής και η μιλτεφοσίνη (αλκυλοφωσφοχολίνη) είναι η πρώτη αναγνωρισμένη θεραπεία για τη VL που χορηγείται από το στόμα [47]. Ανησυχητικό αποτελεί το γεγονός ότι το παράσιτο *Leishmania* έχει αναπτύξει αντοχή σε κάποια από τα παραπάνω φάρμακα [48]. Τέλος, τα τελευταία χρόνια έχουν ανακαλυφθεί φάρμακα (πχ. το Sitamaquine και διάφορες αζόλες, όπως ketonazole, fluconazole, itraconazole) τα οποία παρά την υψηλή αποτελεσματικότητά τους [49] παρουσιάζουν και αυτά σοβαρές παρενέργειες.

Συμπερασματικά, το υψηλό κόστος της θεραπείας, η τοξικότητα και η ανάγκη για παραμονή και παρακολούθηση του ασθενούς στον χώρο του νοσοκομείου, σε συνδυασμό με την ανάπτυξη αντοχής και την έλλειψη προστατευτικών εμβολίων, καθιστά αναγκαία την ανακάλυψη νέων μη τοξικών φαρμάκων και εμβολίων για τον έλεγχο της λεισμανίωσης [15, 50, 51].

1.5.1 Νέοι θεραπευτικοί στόχοι και φάρμακα- Φωσφατάσες ως μοριακοί στόχοι για την ανάπτυξη αντι-παρασιτικών φαρμάκων

Οι αναστολείς κινασών και φωσφατασών θεωρούνται εν δυνάμει φάρμακα ή χρησιμοποιούνται ήδη για την αντιμετώπιση αρκετών ασθενειών. Για παράδειγμα, η

έγκριση της ραπαμυκίνης (Sirolimus) για ανοσοκαταστολή, του imatinib (Gleevec) για τη χρόνια μυελογενή λευχαιμία και για αντιμετώπιση όγκων του γαστρεντερικού και του gefitinib (Iressa) για τον καρκίνο του πνεύμονα έχουν ανοίξει το δρόμο για την ανάπτυξη φαρμάκων που στοχεύουν σε πρωτεϊνικές κινάσες και ήδη βρίσκονται στο στάδιο των κλινικών δοκιμών [52]. Από την άλλη πλευρά, η έρευνα σχετικά με φωσφατάσες, ειδικά ως στόχοι αντι-παρασιτικών φαρμάκων έχει ελάχιστα προχωρήσει. Το ευρύ φάσμα υποστρωμάτων που αποφωσφορυλιώνουν, η ύπαρξη διαφορετικών λειτουργικών υπομονάδων των ολοενζύμων και η έλλειψη αντιδραστηρίων (ειδικότερα αναστολέων) για την μελέτη ειδικά επιλεγμένων φωσφατασών, αποτελούν κάποιους από τους λόγους [53, 54]. Πρόσφατα, ενθαρρυντικά αποτελέσματα δείχνουν ότι είναι εφικτό να σχεδιαστούν ισχυροί και εκλεκτικοί ρυθμιστές φωσφατασών με θεραπευτική δυναμική ενθαρρύνοντας την έρευνα με στόχο την επικύρωση των φωσφατασών ως στόχους για ανάπτυξη φαρμάκων [55, 56].

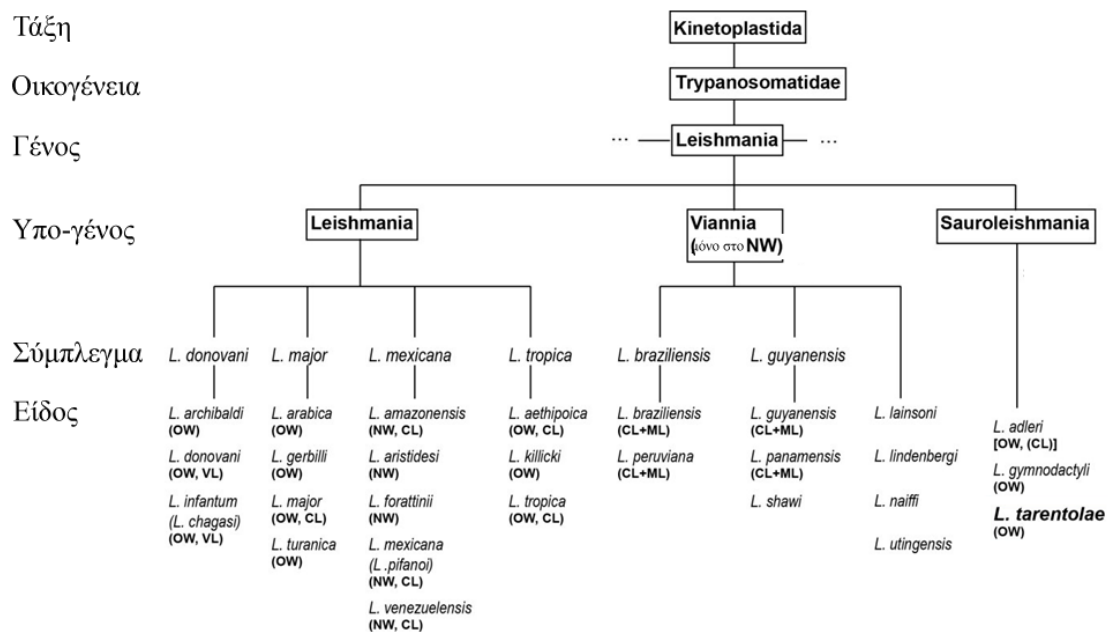
1.6 Το παράσιτο *Leishmania* spp.

1.6.1 Συστηματική κατάταξη

Η *Leishmania* είναι ένα μονοκύτταρο πρωτόζωο παράσιτο που ανήκει στην τάξη των κινητοπλαστοειδών και στην εξελικτικά αρχαία οικογένεια των τρυπανοσωματίδων (*Trypanosomatidae*) (Εικόνα 1.4). Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει παράσιτα διαφόρων οργανισμών, όπως φυτών, εντόμων, ψαριών, αμφιβίων, ερπετών και θηλαστικών (*Trypanosoma*, *Leishmania*, *Endotrypanum*).

Η κατάταξη του παρασίτου *Leishmania* είχε αρχικά βασιστεί σε κλινικά, βιολογικά και γεωγραφικά κριτήρια τα οποία, όμως, ήδη από τα τέλη της δεκαετίας του 1980 θεωρήθηκαν ανεπαρκή [57]. Η πρόοδος της μοριακής βιολογίας οδήγησε στην ανάπτυξη της MLEE η οποία αποτελεί το βασικό εργαλείο για την ταξινόμηση των ειδών του γένους *Leishmania* και μέχρι σήμερα θεωρείται τεχνική αναφοράς [58-60]. Παρά το γεγονός αυτό, πρόσφατα η γενετική ανάλυση κατέδειξε τη μέθοδο της πολυεστιακής τυποποίησης αλληλουχιών (Multilocus sequence typing MLST) ως την τεχνική φυλογενετικών αναλύσεων που εν δυνάμει θα την αντικαταστήσει. Τέλος, η μέθοδος της πολυεστιακής τυποποίησης με χρήση μικροδορυφορικών αλληλουχιών (Multilocus microsatellite typing, MLMT) που έχει διακριτική ικανότητα κάτω του επιπέδου του ζυμοδέματος, αποτελεί μία υποψήφια τεχνική αναφοράς για διάκριση στο επίπεδο των ειδών [61].

Με βάση τις ισχύουσες φυλογενετικές αναλύσεις, το γένος *Leishmania* διαιρείται σε τρία διακριτά υπογένη: *Leishmania*, *Viannia* και *Sauroleishmania* [62] (Εικόνα 1.4). Χαρακτηριστικό αποτελεί το γεγονός ότι τα παράσιτα που ανήκουν στα υπογένη *Leishmania* και *Viannia* και μολύνουν τα θηλαστικά κατηγοριοποιούνται, επίσης, με βάση το τμήμα του έντερου όπου εντοπίζονται στον ασπόνδυλο ξενιστή (τα είδη του υπογένη *Viannia* αναπτύσσονται στο οπίσθιο τμήμα του εντέρου, τα υπόλοιπα στο πρόσθιο τμήμα). Επίσης, υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν την ξεχωριστή εξέλιξη των δύο αυτών υπογεών μετά τον διαχωρισμό των ηπείρων και την μετέπειτα εισαγωγή παρασίτων του υπογένη *Leishmania* στην Κεντρική (*L. mexicana*) και Νότια Αμερική (*L. chagasi*). Τέλος, τα παράσιτα που ανήκουν στο υπογένος *Sauroleishmania* (*L. tarentolae*) απομονώθηκαν το 1921 [63] από το είδος της σαύρας *Tarentolae mauritanica* και θεωρούνται μη παθογόνα για τον άνθρωπο.



Εικόνα 1.4 Ταξινόμηση του πρωτοζώου *Leishmania*. Το γένος περιλαμβάνει πάνω από 30 είδη. Εδώ παρουσιάζεται ένα μικρό μέρος από τα πλέον γνωστά και περισσότερο μελετημένα είδη. Τα παράσιτα των υπογεών *Leishmania* και *Vianna* μολύνουν θηλαστικά, ενώ το υπο-γένος *Sauroleishmania* ερπετά. OW: Old World, NW: New World, VL: Visceral Leishmaniasis, CL: Cutaneous Leishmaniasis, ML: Mucocutaneous Leishmaniasis (τροποποιημένο, [62]).

Όπως ήδη τονίστηκε, η εισαγωγή των νέων μεθόδων μοριακής και γενετικής ανάλυσης θέτει την μέχρι τώρα φυλογενετική κατάταξη του παρασίτου *Leishmania* υπό επανεξέταση [22, 64].

1.6.2 Μορφολογικά στάδια

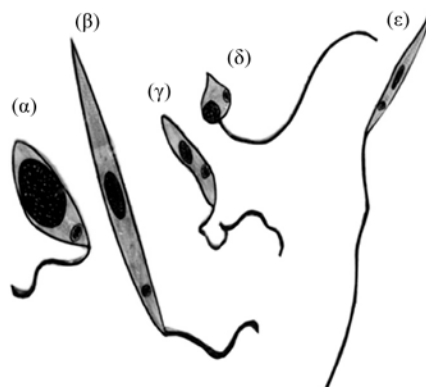
Τα παράσιτα του γένους *Leishmania* απαντώνται σε δύο κύριες μορφές: την προμαστιγωτή μορφή η οποία βρίσκεται στο μεσέντερο του ασπόνδυλου ενδιάμεσου ξενιστή (σκνίπα) και την αμαστιγωτή μορφή η οποία επιβιώνει και αναπτύσσεται εντός των μονοπύρηνων/ μακροφάγων του σπονδυλωτού τελικού ξενιστή (Εικόνα 1.6).

Η προμαστιγωτή μορφή είναι επιμήκης με μέγεθος 5-20 μm x 1-4 μm , φέρει μαστίγιο που εκφύεται από το πρόσθιο τμήμα του σώματος του παρασίτου και έχει ίσο ή μεγαλύτερο μήκος από αυτό (Εικόνα 1.5, Εικόνα 1.6 Α και Εικόνα 1.7 Α) [65]. Στο κέντρο υπάρχει ένας μεγάλος, σφαιρικός πυρήνας με σαφή πυρηνίσκο και περιφερική χρωματίνη. Στο κυτταρόπλασμα απαντώνται πολυάριθμα ριβοσώματα, συσκευή Golgi, κυστίδια λίπους, κοκκώδες και λείο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) και λυσοσώματα (Εικόνα 1.7 Α). Κοντά στην βάση του μαστιγίου ξεκινά ένας τροποποιημένος τύπος επιμήκους μιτοχονδρίου που περιέχει ένα δισκοειδή κινητοπλάστη και αποτελεί χαρακτηριστική δομή των παρασίτων που ανήκουν στην τάξη των κινητοπλαστοειδών. Αυτός περιέχει δύο τύπους κυκλικών μορίων DNA που είναι γνωστά και ως kDNA, τους μικροκύκλους (5×10^3 – 5×10^4 διαπλεγμένοι μικρόκυκλοι ανά παράσιτο) και τους μακροκύκλους. Οι μακρόκυκλοι εκφράζουν τα τυπικά προϊόντα ενός μιτοχονδρίου αλλά με ένα καθόλου τυπικό μηχανισμό έκφρασης, καθώς με την βοήθεια οδηγών RNA που μεταγράφονται από τους μικρόκυκλους, γίνεται επιδιόρθωση του αρχικού μεταγράφου με προσθήκη ή αφαίρεση βάσεων ουριδίνης [66].

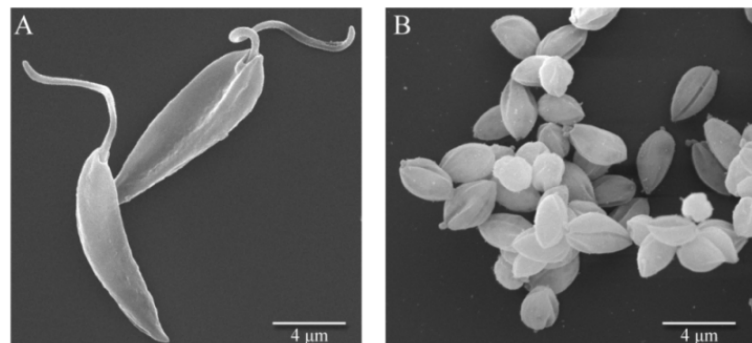
Οι προμαστιγωτές μορφές, που φτάνουν στο έντερο του ενδιάμεσου ξενιστή (σκνίπα) μετά το γεύμα αίματος, διέρχονται από διάφορα στάδια μέχρι να μετατραπούν τελικά στις μολύνουσες μετακυκλικές μορφές (Εικόνα 1.5 ε). Αρχικά διαφοροποιούνται στις νεκτομονάδες (nectonomad promastigotes) οι οποίες δεν πολλαπλασιάζονται αλλά μεταφέρονται στο πρόσθιο μέρος του εντέρου της σκνίπας, όπου διέρχονται από το στάδιο της απομονάδας (haptomonad) και των παραμαστιγωτών (paramastigote), μέχρι να μετατραπούν σε λεπτομονάδες (leptonomad promastigotes) που αποτελούν τις πρόδρομες μορφές των μετακυκλικών προμαστιγωτών [67, 68].

Στα φαγόλυσοσώματα των μονοπύρηνων/ μακροφάγων του τελικού ξενιστή τα μετακυκλικά παράσιτα μετατρέπονται σε αμαστιγωτά. Η αμαστιγωτή μορφή είναι ωοειδής με διάμετρο 2-6 μm x 1,5-2 μm και φέρει έναν έκκεντρο πυρήνα με πυρηνίσκο και έναν κινητοπλάστη που καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο μέρος του κυττάρου (Εικόνα 1.6 Β και Εικόνα 1.7 Β). Ο υπόλοιπος χώρος του κυττάρου περιλαμβάνει τα ίδια

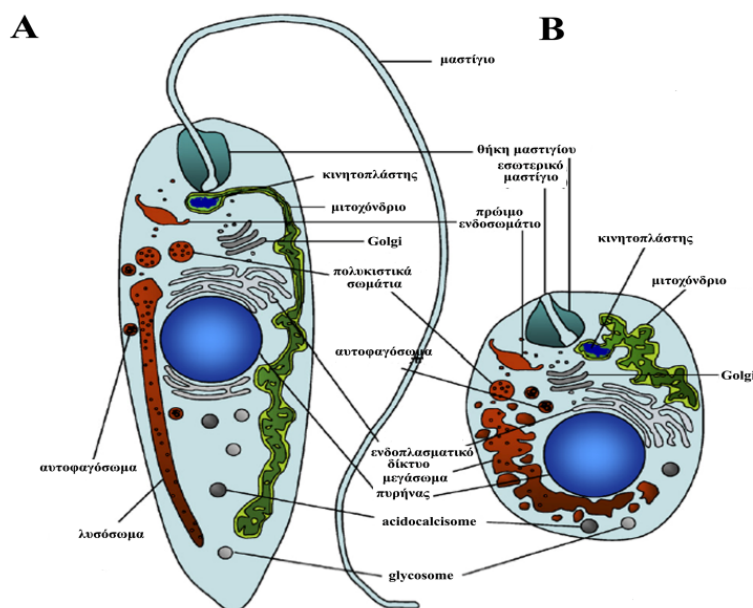
οργανίδια με τη προμαστιγωτή μορφή τα οποία όμως είναι λιγότερο αναπτυγμένα. Επιπλέον η αμαστιγωτή μορφή περιέχει ένα ενδοκυτταρικό μικρού μήκους μαστίγιο (Εικόνα 1.7 Β).



Εικόνα 1.5 Τα εξελικτικά στάδια των προμαστιγωτών μορφών της *Leishmania* εντός του εντέρου του ασπόνδυλου ξενιστή (σκνίπα). (α) προκυκλικό προμαστιγωτό (procyclic), (β) νεκτομονάδα (nectomonad), (γ) απτομονάδα (haptomonad), (δ) παραμαστιγωτό (paramastigote) και (ε) μετακυκλικό προμαστιγωτό (metacyclic) (τροποποιημένο) [68].



Εικόνα 1.6 Μορφολογικά στάδια του παρασίτου *Leishmania*. Α. εξωκυττάρια προμαστιγωτές μορφές και Β. ενδοκυττάρια αμαστιγωτές μορφές, όπως φαίνονται σε εικόνες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (τροποποιημένο, πηγή: <http://www.cellimagelibrary.org/images/12402>).



Εικόνα 1.7 Σχηματική αναπαράσταση της υποκυτταρικής οργάνωσης και των κύριων οργανιδίων του **A.** προμαστιγωτού και **B.** του αμαστιγωτού παρασίτου *Leishmania* (τροποποιημένο) [69].

1.6.3 Κύκλος ζωής

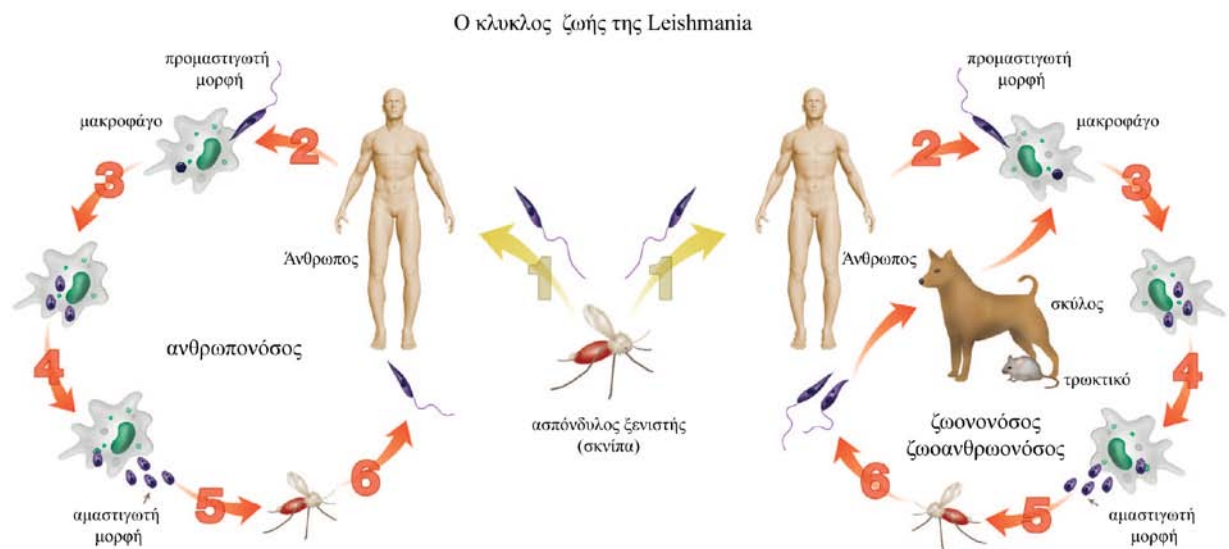
Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα παράσιτα του γένους *Leishmania* εισέρχονται, επιβιώνουν και πολλαπλασιάζονται σε δύο διαφορετικούς ξενιστές, στον ενδιάμεσο ασπόνδυλο (σκνίπα του γένους *Phlebotomus* και *Lutzomyia*) και στον τελικό σπονδυλωτό ξενιστή. Για να ολοκληρώσουν τον περίπλοκο κύκλο ζωής τους (Εικόνα 1.8) τα παράσιτα *Leishmania* διέρχονται από διάφορα βιολογικά στάδια που προκύπτουν μέσω μίας διαδικασίας διαφοροποίησης που επιτρέπει την αυστηρή προσαρμογή στις μεταβολές του μικροπεριβάλλοντος (Εικόνα 1.6).

Συγκεκριμένα, στο έντερο των εντόμων (θηλυκή σκνίπα) το παράσιτο μετατρέπεται στην προμαστιγωτή μορφή μέσα σε χρονικό διάστημα περίπου μίας εβδομάδας. Τα προμαστιγωτά αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται και τελικά, μεταφέρονται στο πρόσθιο τμήμα του εντέρου του, όπου μετατρέπονται σε μετακυκλικά προμαστιγωτά (μετακυκλογένεση). Οι μορφές αυτή των παρασίτων μεταναστεύουν στην προβοσκίδα του εντόμου και με ένα νέο τσίμπημα, ενίονται στον θηλαστικό ξενιστή (σπονδυλωτό) (Εικόνα 1.8₁) [70]. Εντός του τελευταίου, τα παράσιτα φαγοκυτταρώνονται από τα δενδριτικά, τα ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα/ μακροφάγα («επαγγελματίες φαγοκύτταρα») και μέσα στο φαγολυσόσωμα διαφοροποιούνται στις ανθεκτικές αμαστιγωτές μορφές [71]. Τα αμαστιγωτά καταφέρνουν να επιζήσουν και να

πολλαπλασιαστούν στο όξινο περιβάλλον των φαγολυσοσωμάτων. Τελικά, με μηχανισμό ο οποίος δεν είναι τελείως αποσαφηνισμένος, τα αμαστιγωτά απελευθερώνονται από τα φαγοκύτταρα [72, 73] και τα παράσιτα βρισκόμενα στην κυκλοφορία του αίματος συλλαμβάνονται από άλλα μακροφάγα (εξάπλωση της μόλυνσης) (Εικόνα 1.8 4).

Τα διάφορα είδη/υποείδη του παρασίτου εμφανίζουν συνήθως συγκεκριμένο τροπισμό ο οποίος εξαρτάται από παράγοντες, όπως είναι ο γονότυπος του παρασίτου και η ανοσολογική απόκριση του ξενιστή [65, 74].

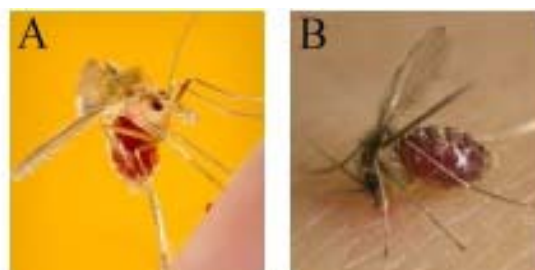
Ο κύκλος ολοκληρώνεται όταν μία θηλυκή σκνίπα, κατά τη διάρκεια ενός γεύματος αίματος, προσλάβει τα μονοπύρρηνα/ μακροφάγα κύτταρα που περιέχουν τις αμαστιγωτές μορφές του παρασίτου από το μολυσμένο τελικό ξενιστή (Εικόνα 1.8 6).



Εικόνα 1.8 Σχηματική αναπαράσταση του κύκλου ζωής της *Leishmania* (τροποποιημένο) [75]. 1. Είσοδος της μετακυκλικής προμαστιγωτής μορφής στο δέρμα του τελικού ξενιστή κατά το δήγμα της μολυσμένης σκνίπας, 2. Φαγοκυττάρωση των παρασίτων από μακροφάγα, 3. Δημιουργία παρασιτοφόρου φαγολυσοσώματος και μετασχηματισμός των προμαστιγωτών σε αμαστιγωτά, 4. Πολλαπλασιασμός των αμαστιγωτών μορφών στο φαγολυσόσωμα, 5. Έξοδος από το μακροφάγο και ελευθέρωση των παρασίτων τα οποία στη συνέχεια μολύνουν άλλα μακροφάγα, 6. Πρόσληψη μολυσμένου μακροφάγου του τελικού ξενιστή από την σκνίπα κατά την απομύζηση αίματος, 7. Ελευθέρωση των παρασίτων στο έντερο του ενδιάμεσου ξενιστή όπου ξεκινάει ο μετασχηματισμός των αμαστιγωτών μορφών σε προμαστιγωτές που μπορούν να μεταδοθούν εκ νέου σε κάποιο άλλο άνθρωπο (ανθρωπονόσος) ή ζώο που λειτουργεί ως αποθήκη του παρασίτου στη φύση (ανθρωποζωνονόσος).

1.6.4 Ενδιάμεσος ξενιστής

Υπάρχουν 600 περίπου είδη σκνιπών, που κατατάσσονται στην τάξη *Diptera*, στην οικογένεια *Psychodidae* και την υπο-οικογένεια *Phlebotominae* η οποία περιλαμβάνει έξι γένη. Έχει διαπιστωθεί ότι περίπου 80 είδη είναι μεταδότες του παρασίτου *Leishmania* spp. [76-78]. Οι σκνίπες *Phlebotomus* spp. να είναι οι κύριοι μεταδότες του παρασίτου στην Ευρώπη, στην Ασία και την Αφρική και οι σκνίπες *Lutzomyia* spp. στην Αμερική (Εικόνα 1.9). Τα κυριότερα είδη των φλεβοτόμων που απαντώνται στη Λεκάνη της Μεσογείου συνοψίζονται παρακάτω (Πίνακας 2).



Εικόνα 1.9 Φλεβοτόμοι των ειδών **A.** *Phlebotomus* spp., **B.** *Lutzomyia* spp. (πηγή: VectorBase).

Ο κύκλος ζωής της σκνίπας περιλαμβάνει δύο διαφορετικά βιολογικά στάδια: το ενήλικο (ιπτάμενο έντομο) και το αναπτυσσόμενο (λάρβα) που χρειάζεται υγρό έδαφος πλούσιο σε οργανικά υλικά. Μόνο οι ενήλικες θηλυκές σκνίπες είναι αιματοφάγες και μπορούν κατά συνέπεια να μεταδώσουν τη λείσμανίωση. Η είσοδος και η εγκαθίδρυση του παρασίτου στον τελικό ξενιστή διευκολύνεται σε μεγάλο βαθμό από τη σίελο της σκνίπας που έχειδειχθεί ότι αυξάνει τη μολυσματικότητα του παρασίτου *Leishmania* [31, 79]. Συγκεκριμένα, η σίελος περιέχει φαρμακολογικά ενεργά υποστρώματα που γενικά αναστέλλουν τους αιμοστατικούς μηχανισμούς του ξενιστή, προκαλούν αγγειοδιαστολή και τοπική ανοσοκαταστολή [80, 81] προς όφελος της εγκατάστασης των παρασίτων που ενίονται στο σημείο της νύξης.

Στην Ελλάδα είναι γνωστά δώδεκα είδη φλεβοτόμων, 9 από τα οποία ανήκουν στο γένος *Phlebotomus* και 3 στο γένος *Sergentomyia*. Ο δυνητικός φορέας του παρασίτου *L. infantum* είναι το είδος *Phlebotomus neglectus* το οποίο είναι και από τα πιο συχνά απαντημένα είδη στον Ελλαδικό χώρο [27].

Πίνακας 2 Τα είδη φλεβοτόμων σκνιπών που μεταδίδουν την ανθρώπινη λεισμανίωση στη περιοχή της Μεσογείου (τροποποιημένο, [14])

<i>Leishmania</i> species	<i>L. tropica</i> species complex - Greece only	<i>L. major</i>	<i>L. infantum</i> (= <i>L. chagasi</i> in Neotropics) - Mediterranean region only	<i>L. infantum</i> (= <i>L. chagasi</i> in Neotropics) - Mediterranean region only
Human disease	(Diffuse and muco-) cutaneous leishmaniasis	Cutaneous leishmaniasis	Cutaneous leishmaniasis	Visceral leishmaniasis
EU biome	Mediterranean forests	Absent	Mediterranean forests, Tem- perate broadleaf forest	Mediterranean forests, Tem- perate broadleaf forest
EU: Cyprus	<i>P. sergenti</i> s.l.	<i>P. papatasi</i>	<i>P. perfliewi</i> s.l., <i>P. tobbi</i>	<i>P. perfliewi</i> s.l., <i>P. tobbi</i>
EU: France	<i>P. sergenti</i> s.l.	<i>P. papatasi</i>	<i>P. ariasi</i> , <i>P. perniciosus</i> , <i>P. perfliewi</i> ?	<i>P. ariasi</i> , <i>P. perniciosus</i>
EU: Germany	No vectors	No vectors	<i>P. perniciosus</i>	<i>P. perniciosus</i>
EU: Greece	<i>P. sergenti</i> s.l.	<i>P. papatasi</i>	<i>P. perfliewi</i> s.l., <i>P. tobbi</i>	<i>P. perfliewi</i> , <i>P. tobbi</i> , <i>P. neglectus</i>
EU: Hungary	No vectors?	No vectors?	<i>P. neglectus</i> , <i>P. perfliewi</i> ?	<i>P. neglectus</i> , <i>P. perfliewi</i> ?
EU: Italy	<i>P. sergenti</i> s.l.	<i>P. papatasi</i>	<i>P. ariasi</i> , <i>P. perfliewi</i> , <i>P. perniciosus</i> , <i>P. neglectus</i>	<i>P. ariasi</i> , <i>P. perfliewi</i> , <i>P. perniciosus</i> , <i>P. neglectus</i>
EU: Malta	<i>P. sergenti</i> s.l.	<i>P. papatasi</i>	<i>P. perfliewi</i> , <i>P. perniciosus</i> , <i>P. neglectus</i>	<i>P. perfliewi</i> , <i>P. perniciosus</i> , <i>P. neglectus</i>
EU: Portugal	<i>P. sergenti</i> s.l.	<i>P. papatasi</i>	<i>P. ariasi</i> , <i>P. perniciosus</i>	<i>P. ariasi</i> , <i>P. perniciosus</i>
EU: Romania	No vectors?	<i>P. papatasi</i>	<i>P. perfliewi</i> , <i>P. neglectus</i>	<i>P. perfliewi</i>
EU: Spain	<i>P. sergenti</i> s.l.	<i>P. papatasi</i>	<i>P. ariasi</i> , <i>P. perniciosus</i>	<i>P. ariasi</i> , <i>P. perniciosus</i>
EU candidate: Former Yu- goslav Republic of Mace- donia	<i>P. sergenti</i> s.l.	<i>P. papatasi</i>	<i>P. perfliewi</i> , <i>P. tobbi</i> , <i>P. neglectus</i>	<i>P. perfliewi</i> , <i>P. tobbi</i> , <i>P. neglectus</i>
EU candidate: European Turkey (Asiatic Turkey)	(<i>P. sergenti</i> s.l.)	(<i>P. papatasi</i>)	(<i>P. perfliewi</i> s.l., <i>P. tobbi</i> , <i>P. neglectus</i>)	(<i>P. perfliewi</i> s.l., <i>P. tobbi</i> , <i>P. neglectus</i>)
Other Europe: Albania	<i>P. sergenti</i> s.l.	<i>P. papatasi</i>	<i>P. perfliewi</i> , <i>P. tobbi</i> , <i>P. neglectus</i>	<i>P. perfliewi</i> , <i>P. tobbi</i> , <i>P. neglectus</i>
Other Europe: Switzer- land	No vectors	No vectors	<i>P. perniciosus</i>	<i>P. perniciosus</i>

1.7 Μοριακή βιολογία του παρασίτου *Leishmania*

1.7.1 Το γονιδίωμα

Το γονιδίωμα του παρασίτου *Leishmania*, όπως ήδη αναφέρθηκε παραπάνω, αποτελείται από δύο τύπους DNA, το πυρηνικό και το μιτοχονδριακό, γνωστό και ως κινητοπλαστικό DNA. Η τεχνική ηλεκτροφόρησης εναλλασσόμενου πεδίου (PFGE) αποκάλυψε ότι ο καρυότυπος του παρασίτου αποτελείται από 36 χρωμοσώματα στα είδη του Παλαιού κόσμου *L. major*, *L. infantum*, *L. tropica*, και *L. aethiopica* και από 35 με 34 χρωμοσώματα στα είδη του Νέου κόσμου *L. braziliensis* και *L. mexicana*, αντίστοιχα [82]. Επίσης, περίπου το 25% του γενωμικού DNA αποτελείται από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες και τα χρωμοσώματα του παρασίτου δεν παρουσιάζουν εμφανή συμύκνωση στη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου [83].

Μολονότι τα περισσότερα στελέχη *Leishmania*, που καλλιεργούνται *in vitro* έχουν σταθερό καρυότυπο, έχουν παρατηρηθεί χρωμοσωμικές ανακατατάξεις είτε κατά τη

διάρκεια της καλλιέργειας είτε κατά την εφαρμογή διατροφικού ή φαρμακευτικού stress [58, 84]. Η οργάνωση των χρωμοσωμάτων στο παράσιτο είναι παρόμοια με αυτή αρκετών πρωτοζώων και χαρακτηρίζεται από συντηρημένες περιοχές και πολυμορφικά άκρα. Η δομή και ο μηχανισμός διατήρησης των χρωμοσωμικών άκρων στη *Leishmania* δεν διαφέρουν από εκείνα άλλων ευκαρυωτικών οργανισμών, καθώς έχει ανιχνευθεί η δράση της τελομεράσης με παρόμοιες ιδιότητες με αυτές άλλων ευκαρυωτικών τελομερασών [85].

1.7.2 Γονιδιακή οργάνωση

Στα παράσιτα *Leishmania* spp. και *Trypanosoma* spp. τα χρωμοσώματα οργανώνονται σε ομάδες/ συμπλέγματα γονιδίων που βρίσκονται στην ίδια αλυσίδα DNA [86]. Οι ομάδες αυτές είναι αποκλίνουσες ή συγκλίνουσες, δηλαδή η μεταγραφή γίνεται προς ή αντίθετα από τα τελομερή αντίστοιχα. Αυτή η οργάνωση των γονιδίων θυμίζει περισσότερο εκείνη των ευκαρυωτικών οργανισμών που τα γονίδια χωρίς καμία προφανή λειτουργική σχέση μεταξύ τους σχηματίζουν ομάδες/ συμπλέγματα. Επιπρόσθετα, η παρουσία ψευδογονιδίων (pseudogenes), φαινόμενο συχνό στα ανώτερα ευκαρυωτικά, έχει αναφερθεί και στη *Leishmania* [87].

Μετά τη δημοσίευση του συνολικού γονιδιώματος του παρασίτου *L. major* [82], διαπιστώθηκε πως η πλειοψηφία των γονιδίων είναι οργανωμένη σε μεγάλα συμπλέγματα. Παράλληλες συστοιχίες γονιδίων rRNA βρίσκονται μεταξύ των συμπλεγμάτων. Τα περισσότερα tRNA γονίδια οργανώνονται σε ομάδες των 2-10 γονιδίων στο άνω ή κάτω άκρο και μπορεί να περιέχουν γονίδια που μεταγράφονται από τη DNA πολυμεράση III [88]. Σε αντίθεση με άλλους οργανισμούς η κατανομή των tRNA γονιδίων στο γονιδίωμα του παρασίτου *Leishmania* δε φαίνεται να είναι τυχαία, καθώς τα γονίδια αυτά περιορίζονται σε μια μικρή ομάδα χρωμοσωμάτων. Επιπλέον, η συντριπτική πλειοψηφία των γονιδίων στερούνται ιντρονίων και παρ' ότι οι οργανισμοί αυτοί είναι διπλοειδείς μερικά χρωμοσώματα είναι ανευπλοειδή [89].

1.7.3 Ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης

Σε αντίθεση με την πλειοψηφία των ευκαρυωτικών οργανισμών, η μεταγραφή στο παράσιτο *Leishmania* είναι πολυσιστρονική. Τα περισσότερα χρωμοσώματα περιέχουν τουλάχιστον δυο συμπλέγματα γονιδίων τα οποία μπορούν να μεταγραφούν είτε αποκλινόμενα (με κατεύθυνση προς τα τελομερή) είτε συγκλινόμενα (με κατεύθυνση από

τα τελομερή). Τα γονίδια που οργανώνονται σε ένα πολυσιστρονικό σύμπλεγμα συνήθως δεν κωδικοποιούν για σχετιζόμενες λειτουργικά πρωτεΐνες, αντίθετα με τον τρόπο που τα οπερόνια λειτουργούν στα βακτήρια [90]. Τα ώριμα πυρηνικά mRNA προκύπτουν από τα πρώιμα μόρια εφόσον πραγματοποιηθεί η διαδικασία του ματίσματος (trans-splicing) και της πολυαδενυλίωσης [90]. Το μάτισμα είναι μια διαδικασία κατά την οποία ένα μικρο-εξώνιο μήκους 39 νουκλεοτιδίων (mini-exon ή Spliced Leader) προστίθεται στο 5' άκρο του mRNA. Το μάτισμα και η πολυαδενυλίωση παρακείμενων γονιδίων συνδέονται, καθώς η επιλογή του σημείου ματίσματος για ένα γονίδιο επηρεάζει την επιλογή για το σημείο πολυαδενυλίωσης για το γονίδιο που βρίσκεται σε προηγούμενη θέση. Όλα τα γονίδια που αποτελούν μέρος ενός συμπλέγματος γονιδίων μεταγράφονται στον ίδιο βαθμό σαν αποτέλεσμα της πολυσιστρονικής μεταγραφής. Παρ' όλα αυτά, τα ώριμα mRNA παρακείμενων γονιδίων εμφανίζουν πολύ διαφορετικές συγκεντρώσεις ή ποσοστό έκφρασης σε συγκεκριμένα στάδια το κυτταρικού κύκλου. Το γεγονός αυτό οφείλεται κυρίως στο ότι η γονιδιακή έκφραση στα παράσιτα ρυθμίζεται σε μεγάλο βαθμό μετα-μεταγραφικά, δηλαδή στο επίπεδο της επεξεργασίας και σταθερότητας του mRNA. Αλληλουχίες που βρίσκονται στην 3' αμετάφραστη περιοχή (3'-UTR) ενός mRNA διαδραματίζουν επίσης μείζονα ρόλο στη γονιδιακή έκφραση [91]. Αξίζει να αναφερθεί, πως υπάρχουν μελέτες οι οποίες υποστηρίζουν ότι η ποσότητα του mRNA και της πρωτεϊνικής αφθονίας δε σχετίζονται πάντα, καθώς ο μεταφραστικός και μετα-μεταφραστικός έλεγχος παίζουν σημαντικό ρόλο στις τρυπανοσωματίδες [92, 93].

Τέλος, επισημαίνεται ότι ενώ τα παράσιτα *Leishmania* είναι διπλοειδείς οργανισμοί, παρουσιάζουν ανευπλοειδία σε ένα μικρό αριθμό χρωμοσωμάτων [89] και ειδικά μετά από *in vitro* απαλοιφή συγκεκριμένων γονιδίων (gene knockouts) [94] ή επαγόμενη ανοχή σε αντιβιοτικά [95, 96]. Πρόσφατα, μία συστηματική μελέτη γονιδιωμάτων *L. donovani* από κλινικά δείγματα που παρουσίαζαν ανθεκτικότητα ή μη σε συγκεκριμένα φάρμακα που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία της VL, αποκάλυψε την ύπαρξη ανευπλοειδίας αλλά και επισωμάτων τα οποία διέφεραν σε αριθμό από στέλεχος σε στέλεχος, γεγονός που ερμηνεύτηκε ως αποτέλεσμα της προσαρμογής του παρασίτου στην παρουσία των φαρμάκων [84]. Μάλιστα, τα επισώματα περιείχαν ένα γονίδιο MAPK (LdBPK_366760) και ένα που κωδικοποιεί για μία όξινη φωσφατάση (LdBPK_366770) η οποία είναι ομόλογη της φωσφατάσης *LdMacP*, που μελετήθηκε στην παρούσα διατριβή [97].

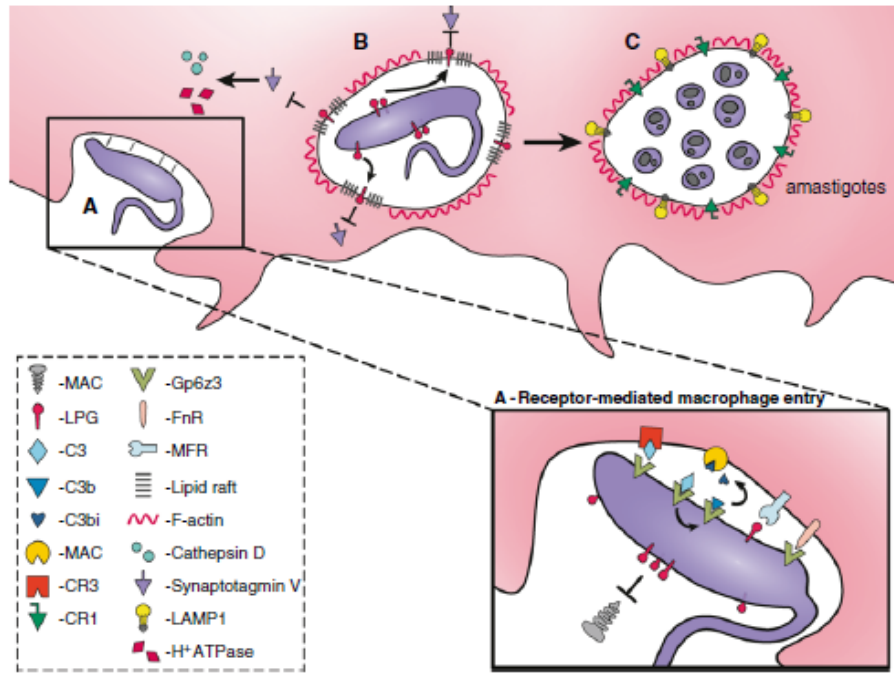
1.8 Αλληλεπίδραση παρασίτου και θηλαστικού-ξενιστή

1.8.1 Μολυσματικοί παράγοντες του παρασίτου

Τα μετακυκλικά προμαστιγωτά παράσιτα *Leishmania*, έχουν αναπτύξει ποικίλες στρατηγικές με σκοπό να επιβιώσουν εντός του αφιλόξενου περιβάλλοντος του φαγολυσσοσώματος [71]. Στην αλληλεπίδραση παρασίτου και κυττάρου-ξενιστή εμπλέκονται πολλά μόρια (Εικόνα 1.10). Οι συστηματικότερα μελετημένοι μολυσματικοί παράγοντες της *Leishmania* οι οποίοι έχουν ενοχοποιηθεί για την εκτροπή της βιογένεσης του παρασιτοφόρου φαγολυσσοσώματος με σκοπό την εγκαθίδρυση της μόλυνσης, είναι η λιποφωσφογλυκάνη (LPG [98-104]), η γλυκοπρωτεΐνη 63 (gp63, leishmanolysin-major surface protease [105, 106]) και οι όξινες φωσφατάσες της *L. donovani* (LdMAcP και LdSACPs) που περιγράφονται παρακάτω (βλ. Εισαγωγή Παράγραφο 1.10.1).

Συνοπτικά, η LPG έχει δεικτεί ότι συμβάλλει α) στην απενεργοποίηση του συστήματος του συμπληρώματος των φαγοκυττάρων του ξενιστή με αποτέλεσμα τη μη άμεση καταστροφή των προμαστιγωτών παρασίτων που ενοφθαλμίζονται στο δέρμα του θηλαστικού [107], β) στην καθυστέρηση της ωρίμανσης του λεισμανιοφόρου φαγοσώματος, λόγω της απενεργοποίησης της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) α [108] και της διατήρησης της δράσης του συστήματος ανασυγκρότησης της ακτίνης (actin polymerization machinery) [109, 110], με αποτέλεσμα την παρατεταμένη παραμονή της πολυμερισμένης ακτίνης γύρω από τη μεμβράνη του, γ) στην παρεμπόδιση της πρόσληψης της cathepsin D και της αντλίας πρωτονίων V-ATPase (Vesicular proton-ATPase) στη μεμβράνη του φαγοσώματος, με αποτέλεσμα την καθυστέρηση της οξίνισης του για περισσότερες από 20 ώρες [102] και, δ) στην παρεμπόδιση της συγκρότησης της NADPH οξειδάσης και επομένως, της έκκρισης των βλαπτικών για το παράσιτο ενεργών ριζών οξυγόνου (reactive oxygen intermediates, ROI) [111].

Η gp63 πρωτεάση διαδραματίζει επίσης σημαντικό ρόλο στην επιβίωση του παρασίτου, καθώς αποδομεί τον παράγοντα C3b σε C3bi του συμπληρώματος, ο οποίος μεσολαβεί στην είσοδο των προμαστιγωτών παρασίτων στα μονοκύτταρα/ μακροφάγα μέσω του υποδοχέα CR3 παρεμποδίζοντας τη λύση τους [105, 106, 112], ενώ εμπλέκεται και στον έλεγχο ποικίλων σηματοδοτικών μονοπατιών του μακροφάγου προς όφελος της επιβίωσης της *Leishmania* εντός αυτού [105, 113, 114].



Εικόνα 1.10 Τα μόρια που εμπλέκονται στους μηχανισμούς αλληλεπίδρασης της *Leishmania* με το κύτταρο-ξενιστή [115]

1.8.2 Ανοσολογική απόκριση στη μόλυνση με το παράσιτο

Η μολυσμένη θηλυκή σκνίπα ενοφθαλμίζει τα μετακυκλικά προμαστιγωτά παράσιτα *Leishmania* στο δέρμα του θηλαστικού τα οποία στη συνέχεια, έρχονται σε επαφή με τα κύτταρα του αίματος (βλ. Εισαγωγή Παράγραφος 1.6.3). Αρχικά, τα παράσιτα φαγοκυτταρώνονται κυρίως από τα ουδετερόφιλα τα οποία χημειοτακτικά προσελκύονται στην περιοχή της αρχόμενης φλεγμονής [116]. Ακολούθως, τα μολυσμένα ουδετερόφιλα δρώντας ως «Δούρειοι Ίπποι» [117] αλλά και τα απελευθερούμενα από αυτά παράσιτα, φαγοκυτταρώνονται από τα δενδριτικά (DC) και τα μακροφάγα του δέρματος [115, 116, 118, 119]. Τα DC διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη μόλυνση μεταφέροντας τα παράσιτα στους σύστοιχους λεμφαδένες και ενεργοποιώντας την διαφοροποίηση των ειδικών T-λεμφοκυττάρων [115], ενώ τα μακροφάγα αποτελούν τα κύτταρα-στόχο των παρασίτων εντός των οποίων επιβιώνουν, μεταμορφώνονται στην ανθεκτική αμαστιγωτή μορφή και αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται εγκαθιδρύοντας τη μόλυνση.

Η αρχική «προσκόλληση» και είσοδος των προμαστιγωτών είναι αποτέλεσμα της εγκατάστασης «γεφυρών» μεταξύ παραγόντων του συμπληρώματος (C3, C3b και C3bi) οι οποίοι οψονοποιούν τα παράσιτα και των αντίστοιχων υποδοχέων (CR3 και CR1) που βρίσκονται στην επιφάνεια των φαγοκυττάρων [119, 120]. Επιπλέον, τα μόρια του

επιφανειακού γλυκοκάλυκα των προμαστιγωτών (LPG, gr63 και άλλες πλούσιες σε μαννόζη-γλυκάνες) συνδέονται με υποδοχείς λεκτίνης (lectin & fibronectin receptors) και υποδοχείς μαννόζης-φουκόζης (FMR) της επιφάνειας των φαγοκυττάρων (Εικόνα 1.10) [115].

Σε ό,τι αφορά στις αμαστιγωτές μορφές του παρασίτου, απελευθερώνονται από τα μακροφάγα, με ένα μηχανισμό ο οποίος δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένος [72, 73], και προσλαμβάνονται από τα γειτονικά μακροφάγα και DC [121]. Η «προσκόλληση» και η πρόσληψη τους γίνεται είτε με την εγκατάσταση «γεφυρών» μεταξύ παραγόντων του συμπληρώματος και του υποδοχέα CR3 στην επιφάνεια των μακροφάγων είτε με την αναγνώριση των ανοσοσυμπλεγμάτων που δημιουργούνται μεταξύ μορίων της μεμβράνης των παρασίτων και των ανοσοσφαιρινών από τον υποδοχέα Fc των μακροφάγων. Τέλος, και σε αυτήν την περίπτωση τα μόρια επιφάνειας (gr63 και πρωτεοφωσφογλυκάνη PPG) του αμαστιγωτού εμπλέκονται στο φαινόμενο, μέσω της πρόσδεσης σε υποδοχείς ινωδογόνου, λεκτίνης ή μαννόζης-φουκόζης του μακροφάγου [121-123].

Το παράσιτο εξασφαλίζει την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό του στα μονοκύτταρα/ μακροφάγα διεγείροντας την παραγωγή αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών TGF- β και IL-10 από αυτά. Με τις κυτταροκίνες αυτές παρεμποδίζεται η παραγωγή των προφλεγμονωδών κυτταροκινών IL-1, TNF α και IL-12, η παραγωγή NO και η έκφραση των συνδιεγερτικών μορίων CD80 και CD86 [124] που θα οδηγούσαν στην καταστροφή του παρασίτου. Ειδικότερα, η παρεμπόδιση της παραγωγής της IL-12 συνεπάγεται την παρεμπόδιση της ενεργοποίησης των Th1-λεμφοκυττάρων καθώς και της παραγωγής της INF- γ , με αποτέλεσμα τη μη ενεργοποίηση των παρασιτοκτόνων μηχανισμών των μακροφάγων. Αντίθετα, με την παραγωγή της κυτταροκίνης IL-4 και την ενεργοποίηση των Th2-λεμφοκυττάρων εξασφαλίζεται η επιβίωση του παρασίτου [125]. Τέλος, το παράσιτο αποτρέπει την ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων παρεμποδίζοντας τις αντιγονοπαρουσιαστικές ιδιότητες των μακροφάγων με: α) την παρεμπόδιση της έκφρασης του γονιδίου που κωδικοποιεί τα μόρια MHC-II και β) την παρεμπόδιση της σύνδεσης των αντιγονικών επιτόπων στα μόρια MHC-II [119].

1.8.3 Ο ρόλος της φωσφορυλίωσης- αποφωσφορυλίωσης στη φαγοκυττάρωση του παρασίτου *Leishmania*

Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς ένα μεγάλο μέρος της κυτταρικής σηματοδότησης ρυθμίζεται από δύο κύριες ομάδες ενζύμων, τις κινάσες και τις φωσφατάσες. Τα ένζυμα

αυτά εμπλέκονται σε πολύπλοκα σηματοδοτικά μονοπάτια που περιλαμβάνουν συνεχείς κύκλους φωσφορυλίωσης και αποφωσφορυλίωσης [126]. Τα παράσιτα *Leishmania* με τη σειρά τους διαθέτουν κινάσες [127] και φωσφατάσες [127, 128] με τις οποίες «ελέγχουν» και παρεμβαίνουν στο σύστημα σηματοδότησης του κυττάρου-ξενιστή κατά τη φαγοκυττάρωση με σκοπό την απενεργοποίηση των παρασιτοκτόνων ιδιοτήτων του [119, 129].

Χαρακτηριστικά, έχειδειχθεί ότι το παράσιτο παρεμποδίζει την παραγωγή του ενζύμου iNOS και της κυτταροκίνης IL-12 μέσω της δράσης της SHP-1 (Src homology 2 domain phosphotyrosine phosphatase 1), που είναι φωσφατάση τυροσίνης (PTP, protein tyrosine phosphatase) και αποφωσφορυλιώνει και τις τρεις οικογένειες των MAP κινασών (MAPK, mitogen activated protein kinases), δηλαδή τις ERK1/2, p38 και JNK1/2. Επιπλέον, παρεμποδίζει την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ και αποφωσφορυλιώνει τις κινάσες JAK2/ STAT1 (Janus tyrosine kinase 2/ signal transducer & activator of transcription 1) [119, 129]. Όλες οι παραπάνω αλλαγές καταλήγουν στην παρεμπόδιση της έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν το ένζυμο iNOS και την κυτταροκίνη IL-12 προς όφελος της επιβίωσης του παρασίτου.

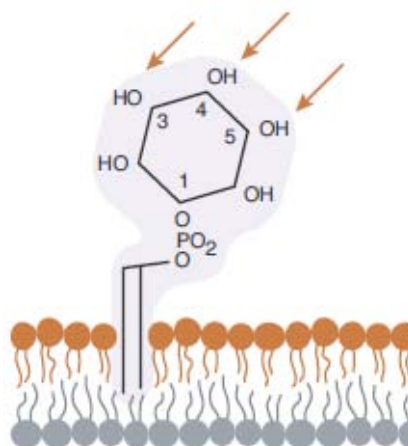
Οι φωσφατάσες του παρασίτου που έχουν το καταλυτικό του κέντρο προς τον εξωκυττάριο χώρο (έξω-φωσφατάσες) και φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση του με το κύτταρο-ξενιστή [130] περιγράφονται παρακάτω (βλ. Εισαγωγή Παράγραφος 1.10).

1.9 Φωσφοϊνοσιτιδία (PIs) και φαγοκυττάρωση

1.9.1 Ο ρόλος των PIs στη βιογένεση του φαγολυσσοσώματος

Τα φωσφοϊνοσιτιδία (PIs) είναι φωσφολιπίδια τα οποία μαζί με άλλα, όπως η φωσφατιδυλοχολίνη και η φωσφατιδυλοσερίνη, συμμετέχουν στη σύσταση της λιπιδικής διπλοστιβάδας της κυτταροπλασματικής μεμβράνης των ευκαρυωτικών κυττάρων [131].

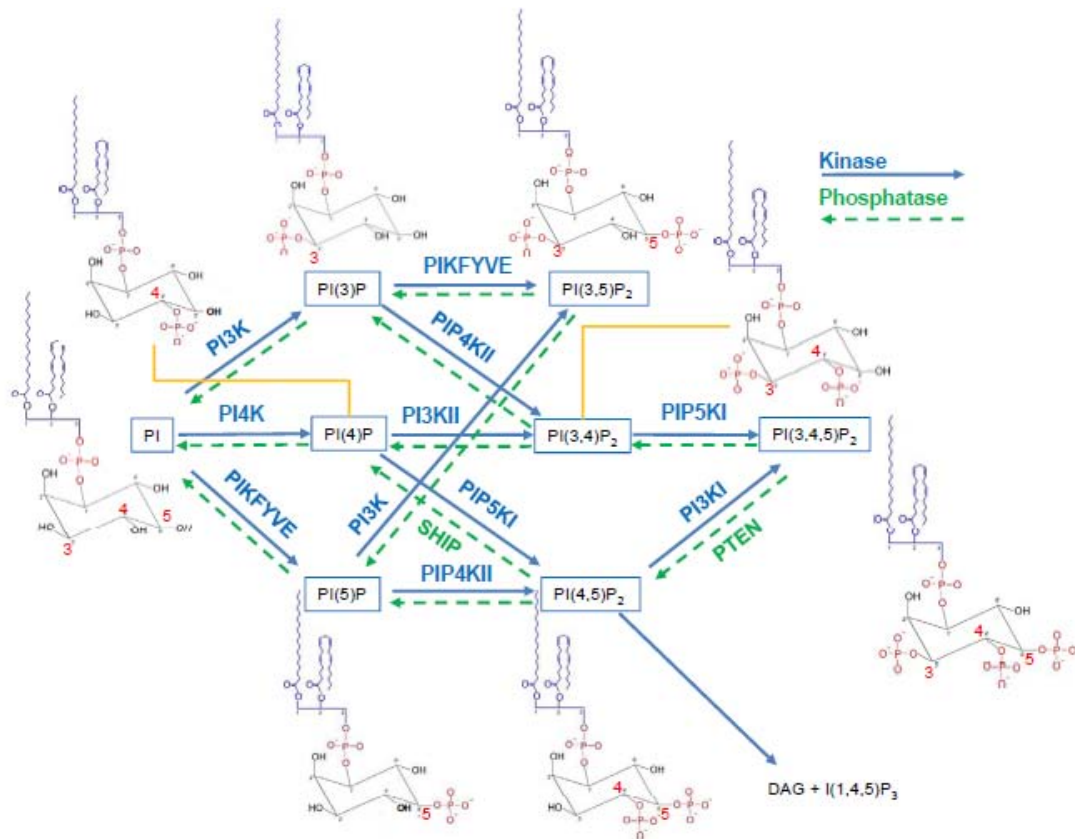
Τα PIs, που έχουν βασικό δομικό χαρακτηριστικό την ινοσιτόλη, βρίσκονται σε όλες τις κυτταρικές μεμβράνες, αλλά κυρίως στην εσωτερική μονοστιβάδα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Τα φωσφολιπίδια αυτής της κατηγορίας έχουν εντοπιστεί στους περισσότερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων και μελών της οικογένειας των Τρυπανοσωματίδων [132-134], ενώ ανάλογες μελέτες δεν έχουν πραγματοποιηθεί για τα παράσιτα του γένους *Leishmania*.



Εικόνα 1.11 Σχηματική αναπαράσταση της δομής της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PtdIns). Τα βέλη δείχνουν τις υδροξυλικές ομάδες στις θέσεις 3, 4 και 5 του δακτυλίου της ινοσιτόλης οι οποίες μπορούν να φωσφορυλιωθούν από PI κινάσες. Οι φωσφορικές ομάδες στις θέσεις αυτές αποφωσφορυλιώνονται από PI φωσφατάσες, αντίστοιχα. (τροποποιημένο, [135]).

Το φωσφολιπίδιο φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (PtdIns) είναι η πρόδρομη ένωση όλων των PIs (Εικόνα 1.11) και αποτελεί λιγότερο από το 15% του συνόλου των φωσφολιπιδίων των κυττάρων των θηλαστικών [131]. Παρά το γεγονός ότι η βιοσύνθεσή της PtdIns και όλων των PIs γίνεται κατά κύριο λόγο στο ER [136], μπορεί να προέρχεται και από τον εξωκυττάριο χώρο, γεγονός που επιτρέπει τη ραδιενεργή σηματοδότηση των φωσφολιπιδίων της ινοσιτόλης στα κύτταρα. Τα PIs προκύπτουν μετά από φωσφορυλίωση των τριών από τις πέντε ελεύθερες υδροξυλομάδες του δακτυλίου ινοσιτόλης της PtdIns (Εικόνα 1.11, βέλη). Τα επτά διαφορετικά είδη PIs που εν δυνάμει προκύπτουν είναι τα μονοφωσφορυλιωμένα PtdIns(3)P, PtdIns(4)P και PtdIns(5), τα διφωσφορυλιωμένα PtdIns(3.5)P₂, PtdIns(3.4)P₂ και PtdIns(4.5)P₂ και το τριφωσφορυλιωμένο PtdIns(3.4.5)P₃ [135] (Εικόνα 1.12)]. Τη δυναμική ισορροπία ανάμεσα στις 8 ξεχωριστές αλλά αλληλομετατρέπόμενες μορφές των PIs, εξασφαλίζουν ειδικές PI κινάσες οι οποίες ρυθμίζουν τη σύνθεση αλλά και PI φωσφατάσες και φωσφολιπάσες που ρυθμίζουν την αποικοδόμησή τους [131, 137] (Εικόνα 1.13).

Τα επίπεδα των PIs στα κύτταρα είναι πολύ χαμηλά (~0,1% του συνόλου των φωσφολιπιδίων), με συχνότερα απαντώμενα από τα μονοφωσφορυλιωμένα το PtdIns(4)P και από τα διφωσφορυλιωμένα το PtdIns(4.5)P₂ [138, 139].



Εικόνα 1.12 Σχηματική αναπαράσταση του μεταβολισμού των PIs [140]

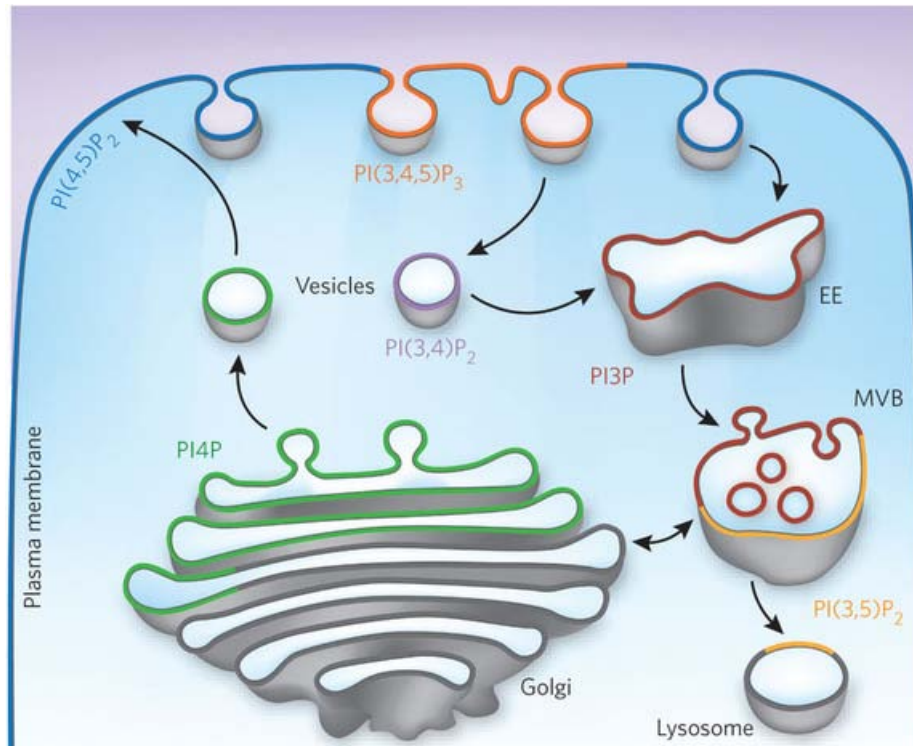
Πέρα από το δομικό τους ρόλο και παρά τη μικρή τους ποσότητα μέσα στα κύτταρα, τα PIs ρυθμίζουν θεμελιώδεις κυτταρικές λειτουργίες [141]. Συνοπτικά, τα PIs δρουν ως σηματοδοτικά μόρια, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της κυκλοφορίας των μεμβρανικών κυστιδίων, της δυναμικής της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και του κυτταροσκελετού της ακτίνης, ενώ συμβάλλουν και στον προσδιορισμό της ταυτότητας των κυτταρικών οργανιδίων [135]. Η ρύθμιση των παραπάνω κυτταρικών λειτουργιών επιτυγχάνεται μέσω των αλληλεπιδράσεων της πολικής κεφαλής των PIs με κατάλληλες ρυθμιστικές πρωτεΐνες [131, 135].

Υπεύθυνοι για τη σύνδεση των πρωτεϊνών αυτών με τα PIs είναι διατηρημένα πρωτεϊνικά δομικά μοτίβα (υποτομείς, domains), τα οποία αποκαλούνται «φωσφοϊνοσιτιδικοί προσδέτες» (Phosphoinositide binding domains) (Πίνακας 3). Οι πρωτεΐνες που αναγνωρίζουν τους PI προσδέτες είτε είναι ένζυμα που καταλύουν τη φωσφορυλίωση ή αποφωσφορυλίωση της ινοσιτόλης είτε τελεστές μεταγωγής σήματος που αποδίδεται σε PIs [139].

Πίνακας 3 Περιοχές πρωτεϊνών για πρόσδεση σε PIs (τροποποιημένο [131, 142])

PIs	PI προσδέτης
PI(3)P	FYVE, PX, PH
PI(4)P	PH, A/ENTH, PDZ
PI(5)P	PX, PHD
PI(3.4)P₂	PH, A/ENTH
PI(3.5)P₂	PH, GRAM
PI(4.5)P₂	PH, A/ENTH, ENTH, FERM, AP-2a, C2, tubby, PTB
PI(3.4.5)P₃	PH, PX, PTB

Τα PIs διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο ειδικά κατά τη διαδικασία της φαγοκυττάρωσης [143]. Μέσω των αρνητικά φορτισμένων PO_4^{2-} ομάδων στο δακτύλιο της ινοσιτόλης και μέσω των PI προσδετών (Πίνακας 3), υπαγορεύουν την ηλεκτροστατική στόχευση στην κυτταροπλασματική μεμβράνη ή τη μεμβράνη του φαγοσώματος πρωτεϊνών οι οποίες ρυθμίζουν τη δυναμική του κυτταροσκελετού της ακτίνης ή/ και τη μεμβρανική κυκλοφορία, ελέγχοντας την πορεία της βιογένεσης του φαγοσώματος [135, 142, 144]. Συνοπτικά, γνωρίζουμε ότι το $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ συγκεντρώνεται στη μεμβράνη των εκτεινόμενων ψευδοποδίων και στο φαγοκυτταρικό κύπελλο προσελκύοντας τελεστές που ρυθμίζουν τον πολυμερισμό της ακτίνης. Πριν ακόμα το σφράγισμα του φαγοσώματος, το $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ είτε καταβολίζεται από φωσφολιπάσες και εξαφανίζεται είτε μετατρέπεται σε $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ το οποίο με τη σειρά του είναι απαραίτητο για το σφράγισμα του φαγοσώματος. Ακολούθως καθώς εξελίσσεται η βιογένεση του φαγοσώματος, στη μεμβράνη του συγκεντρώνεται το $\text{PtdIns}(3)\text{P}$ που προσελκύει πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τη σύντηξη με τα πρώιμα και ώριμα ενδοσώματα και τελικά με τα λυσοσώματα τα οποία είναι απαραίτητα στάδια για την ωρίμανσή του σε φαγολυσόσωμα. Τέλος, το $\text{PtdIns}(3)\text{P}$ αποφωσφορυλιώνεται σε PtdIns ή φωσφορυλιώνεται σε $\text{PtdIns}(3,5)\text{P}_2$ το οποίο εντοπίζεται στα πολυκυστιδικά σώματα [multivesicular bodies (MVBs)] και τα ώριμα ενδοσώματα (Εικόνα 1.13) [145]. Το $\text{PtdIns}(4)\text{P}$ εντοπίζεται στο Golgi και το ER και συμβάλλει στη δημιουργία της ταυτότητας των ενδοκυττάρων μεμβρανών και τη διαμερισματοποίηση.

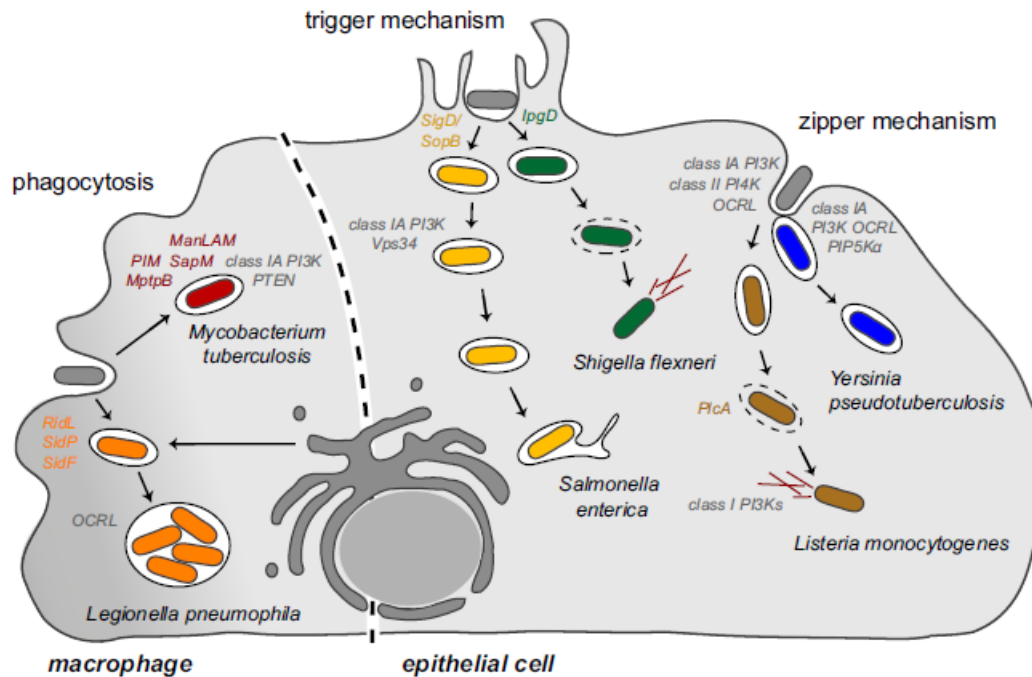


Εικόνα 1.13 Η κατανομή των PIs κατά την ενδοκυττάρωση/ φαγοκυττάρωση [146]

1.9.2 Στρατηγικές ανατροπής της δράσης ή του μεταβολισμού των PIs από παθογόνα μικρόβια

Εξαιτίας του ρόλου «κλειδί» των PIs στη φαγοκυττάρωση [135, 143], η δράση τους έχει αποτελέσει στόχο πολλών ενδοκυττάρων βακτηριακών παθογόνων τα οποία έχουν αναπτύξει μηχανισμούς ανατροπής της με σκοπό την είσοδό τους ή/ και την ενδοκυττάρια επιβίωσή τους στο τροποποιημένο βακτηριοφόρο φαγόσωμα [144]. Παρακάτω αναφέρονται κάποια χαρακτηριστικά παραδείγματα (Εικόνα 1.14).

Η *Legionella pneumophila* και το *Mycobacterium tuberculosis* επιβιώνουν εντός των μακροφάγων κυττάρων όπου εισέρχονται με κλασσική φαγοκυττάρωση. Η δράση τους στο μεταβολισμό των PIs του κυττάρου-ξενιστή ξεκινά στο πρώιμο φαγόσωμα με έκκριση μολυσματικών παραγόντων, πρωτεϊνών ή γλυκολιπιδίων, που ενεργοποιούν ή αναστέλλουν διάφορους τύπους των PtdIns(3) ή PtdIns(4)κινασών (Εικόνα 1.14), με αποτέλεσμα να εκτρέπουν την ωρίμανση του βακτηριοφόρου φαγοςώματος προς βακτηριοκτόνο φαγολυσόσωμα.



Εικόνα 1.14 Τα κύρια βήματα της σύνθεσης και αποικοδόμησης των PIs με μερικά από τα ένζυμα που καταλύουν τις αντιδράσεις αυτές και τα σημεία στα οποία ανατρέπεται ο μεταβολισμός τους από βακτηριακά παθογόνα [144].

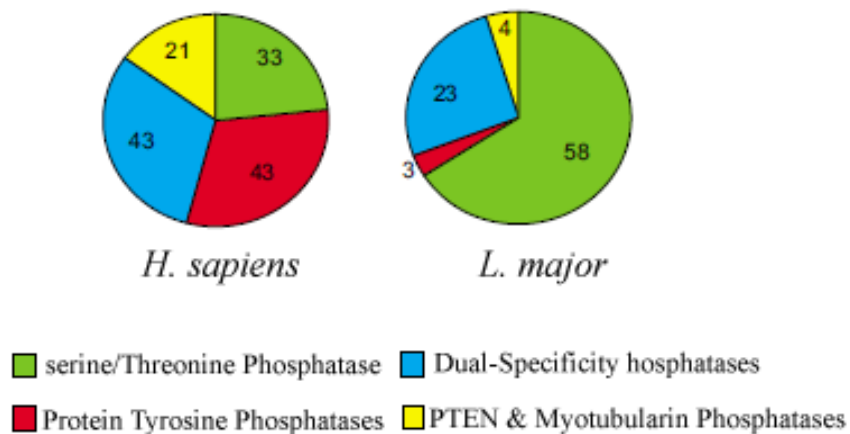
Πιο συγκεκριμένα, η *Legionella pneumophila* εννύει, μέσω του βακτηριακού συστήματος T4SS, στο κυτταρόπλασμα του μακροφάγου τις πρωτεΐνες SidP και SidF που αποφωσφορυλιώνουν τα $\text{PtdIns}(3)\text{P}$ και $\text{PtdIns}(3,5)\text{P}_2$ ή τα $\text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2$ και $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$, αντίστοιχα, με αποτέλεσμα το φαγόσωμα να αποκτά χαρακτηριστικά του βακτηριακού εκκριτικού συστήματος. Το *Mycobacterium tuberculosis* με τη σειρά του εκτρέπει τη βιογένεση του φαγολυσοσώματος εκκρίνοντας τις PI φωσφατάσες SapM και MptpB (φωσφατάση τριπλής ειδικότητας και PI-φωσφατάση) και το λιπίδιο lipoarabinomannan (ManLAM) το οποίο αναστέλλει την ενεργοποίηση της κινάσης τύπου III που παράγει $\text{PtdIns}(3)\text{P}$ [142, 144, 147].

Από την άλλη πλευρά, βακτήρια όπως η *Listeria monocytogenes*, η *Shigella flexneri*, η *Salmonella enterica* και η *Yersinia* spp. διαβιούν μέσα σε επιθηλιακά κύτταρα στα οποία δεν εισέρχονται με κλασική φαγοκυττάρωση αλλά μέσω μηχανισμών που επάγουν την είσοδό τους στα κύτταρα-στόχο με ανασυγκρότηση του κυτταροσκελετού της ακτίνης (trigger ή zippering mechanism, Εικόνα 10) [144]. Συνοπτικά, η *Yersinia pseudotuberculosis* επάγει την ενεργοποίηση μιας $\text{PtdIns}(5)$ κινάσης προωθώντας τη σύνθεση των $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ και $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$, ενώ η *Listeria monocytogenes* εκκρίνει

την πρωτεΐνη InlB η οποία ρυθμίζει τη δράση της ομάδας II των PtdIns(4) κινασών και της ομάδας I των PtdIns(3)κινασών με σκοπό τη σύνθεση των PtdIns(4)P και PtdIns(3,4,5)P₃, αντίστοιχα, τα οποία οδηγούν στον πολυμερισμό της ακτίνης μέσω του συμπλέγματος Arp2/3. Η *Shigella flexneri* εννύει στο κύτταρο ξενιστή το βακτηριακό ένζυμο IpgD που αποφωσφορυλιώνει το PtdIns(4,5)P₂ σε PtdIns(5)P και τέλος, η *Salmonella enterica* εννύει, μέσω του συστήματος έκκρισης τύπου III, στο κυτταρόπλασμα του εντερικού επιθηλιακού κυττάρου-ξενιστή το πρωτεϊνικό σύμπλεγμα SigD/SopB που έχει δράση φωσφατάσης και έχει προταθεί ότι αποφωσφορυλιώνει την 5'-φωσφορική ρίζα από το PtdIns(3,5)P₂, και το PtdIns(3,4,5)P₃. Το σύμπλοκο SigD/SopB εμπλέκεται επίσης στην αναστροφή (turnover) του PtdIns(4,5)P₂ και στην ενεργοποίηση των PtdIns(3)κινασών τύπου III (VPS34) οι οποίες προάγουν την παραγωγή του PtdIns(3)P που είναι απαραίτητο για τη βιογένεση του βακτηριοφόρου φαγολυσωσώματος [142, 144, 148].

1.10 Φωσφατάσες των παρασίτων *Leishmania*

Ανάλυση του συνόλου των φωσφατασών (phosphatome) των κινητοπλαστιδίων [128] έδειξε ότι τα παράσιτα που ανήκουν στην τάξη αυτή, όπως η *Leishmania*, διαθέτουν ορθόλογα μόρια (orthologues) με ήδη μελετημένες ευκαρυωτικές φωσφατάσες από άλλα είδη παρασίτων αλλά και από τον άνθρωπο.



Εικόνα 1.15 Σχηματική αναπαράσταση (γράφημα πίτας) από την κατανομή των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις καταλυτικές περιοχές των 4 βασικών κατηγοριών φωσφατασών στους οργανισμούς *H. sapiens* και *L. major* [128].

Σύμφωνα με τη μελέτη των Brenchley et al. (2007) όπου ανέλυσαν το phosphatome του είδους *L. major*, εντοπίστηκαν αντιπρόσωποι από όλες τις κατηγορίες των φωσφατασών που υπάρχουν στον άνθρωπο (Εικόνα 1.15). Ωστόσο, υπάρχουν διαφορές ως προς την ποσοστιαία κατανομή τους με προφανέστερες στην *L. major* της μικρότερης αναλογίας φωσφατασών τυροσίνης και της σημαντικά μεγαλύτερης αναλογίας φωσφατασών σερίνης/ θρεονίνης [128].

Επιπλέον, μια ενδιαφέρουσα διαφορά που παρουσιάζουν οι φωσφατάσες των κινητοπλαστιδών σε σχέση με άλλα ευκαρυωτικά phosphatomes είναι ο μεγάλος αριθμός των άτυπων φωσφατασών (πάνω από ένα τρίτο του συνόλου) [149], οι περισσότερες των οποίων ανήκουν στην οικογένεια φωσφατασών διπλής ειδικότητας (dual specificity phosphatases DSPs). Οι τελευταίες αποφωσφορυλιώνουν κατάλοιπα φωσφοτυροσίνης και φωσφοσερίνης/ φωσφοθρεονίνης εντός του ίδιου υποστρώματος, διαφέρουν όμως σημαντικά από τις κλασσικές DSPs [150]. Πιο πρόσφατα,δείχθηκε ότι τα παράσιτα *Leishmania* διαθέτουν και άτυπες φωσφατάσες λιπιδίων (atypical lipid phosphatases, ALP) οι οποίες είναι ορθόλογες του μολυσματικού παράγοντα MptpB από το *Mycobacterium tuberculosis* [151].

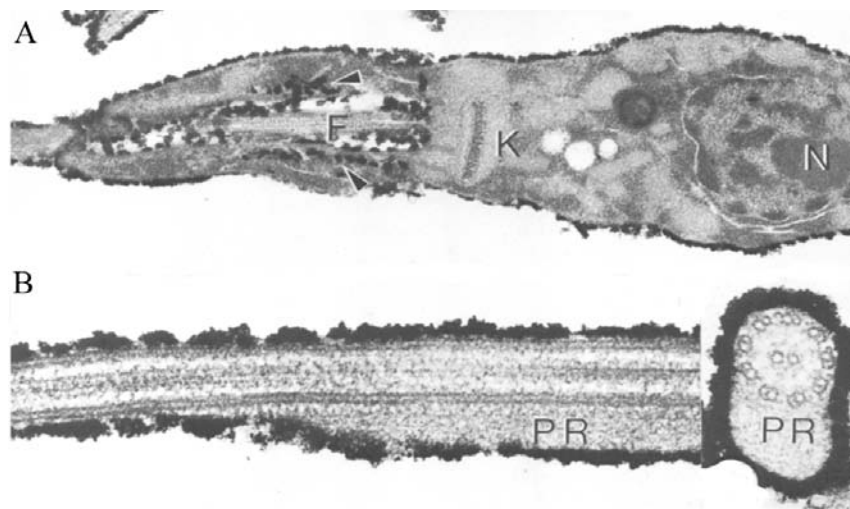
Συνοψίζοντας, τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των φωσφατασών από τα είδη *Leishmania* οι οποίες διαθέτουν πρωτότυπη αρχιτεκτονική και ασυνήθιστους συνδυασμούς των δομικών τους στοιχείων, τις καθιστούν πιθανούς νέους στόχους για την ανάπτυξη αντι-λεϊσμανιακών φαρμάκων [152, 153].

1.10.1 Όξινες φωσφατάσες ιστιδίνης του παρασίτου *L. donovani*

Οι φωσφατάσες των παρασίτων *Leishmania* κατηγοριοποιούνται και με βάση την εντόπισή τους στο παρασιτικό κύτταρο. Τα ένζυμα που βρίσκονται στην επιφανειακή μεμβράνη του παρασίτου (membrane bound ecto-enzymes) με τα ενεργά τους κέντρα στραμμένα προς το εξωκυττάριο μέσο, καλούνται έξω-φωσφατάσες και αναμένεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο τόσο για την επιβίωση του παρασίτου όσο και για την αλληλεπίδραση με το θηλαστικό-ξενιστή.

Οι πιθανοί ρόλοι των έκτο-φωσφατασών για διάφορα μέλη της οικογένειας των Τρυπανοσωματιδίων έχουν μελετηθεί σε ικανοποιητικό βαθμό [154]. Συνοπτικά, έχει προταθεί η εμπλοκή τους στην πρόσληψη των απαραίτητων συστατικών μέσω της υδρόλυσης οργανικών φωσφορικών υποστρωμάτων [155], στην κυτταρική ανάπτυξη [156], αλλά και στη διαφοροποίηση και τη μολυσματικότητα των παρασίτων [130, 154].

Τέλος, οι έξω-φωσφατάσες έχουν συνδεθεί με την ικανότητα επιβίωσης ενδοκυττάρων παρασίτων μέσα στα φαγοκύτταρα του θηλαστικού-ξενιστή αναστέλλοντας την οξειδωτική καταστροφή από τα δραστικά μόρια οξυγόνου (ρίζα υπεροξειδίου/ O_2^- και υπεροξείδιο του Υδρογόνου/ H_2O_2) [157], υποδεικνύοντας ότι οι φωσφατάσες αυτές όντως μπορεί να δρουν και ως παράγοντες μολυσματικότητας.

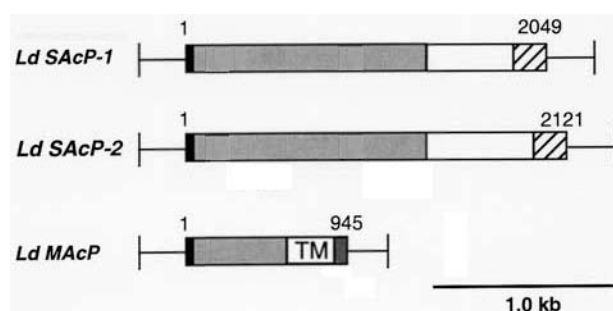


Εικόνα 1.16 Ηλεκτρονική μικροσκοπία που παρουσιάζει την ενζυμική αντίδραση της όξινης φωσφατάσης στην επιφάνεια του παρασίτου *L. donovani*. Επώαση ζωντανών κυττάρων με το υπόστρωμα φωσφατάσης β-γλυκεροφωσφορικό σε pH 5.5 απελευθερώνει φωσφορικές ρίζες που αντιδρούν με ιόντα Μολύβδου για να σχηματίσουν Φωσφορικό Μόλυβδο που στη συνέχεια ανιχνεύονται με ηλεκτρονική μικροσκοπία. **A.** επιμήκης και **B.** εγκάρσια τομή [155].

Ειδικότερα, οι έξω-φωσφατάσες, που υδρολύουν φωσφομονοεστέρες σε όξινο περιβάλλον, ανήκουν στην κατηγορία των όξινων έξω-φωσφατασών. Το 1981 οι Gottlieb and Dwyer περιέγραψαν για πρώτη φορά τη δράση όξινης φωσφατάσης στην κυτταροπλασματική μεμβράνη του παρασίτου *L. donovani* [155]. Σύμφωνα με τη μελέτη τους, η ενζυμική αυτή ενεργότητα εντοπιζόταν στην εξωτερική επιφάνεια ζωντανών προμαστιγωτών μορφών (Εικόνα 1.16), σε αμαστιγωτά παράσιτα που προέρχονταν από μολυσμένους ιστούς αλλά και σε κυτταρικά εκχυλίσματα από *L. donovani*. Ακολούθως, μία σειρά από επακόλουθες μελέτες οδήγησαν στο μερικό βιοχημικό χαρακτηρισμό των μοριακών ιδιοτήτων της ενεργότητας όξινης έξω-φωσφατάσης στην επιφάνεια του παρασίτου *L. donovani*.

Στις μελέτες αυτές, προστέθηκαν καινούργιες που συσχέτιζαν την ενζυμική αυτή δράση με τη μολυσματική ικανότητα του παρασίτου [158-160]. Συγκεκριμένα, η μελέτη των Katakura & Kobayashi, περιέγραψε ότι ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα ιδιαίτερα

«μολυσματικών» κλώνων *L. donovani* είχαν 1,5-2,0 φορές περισσότερη δράση όξινης φωσφατάσης, ανθεκτικής στην αναστολή από τρυγικό οξύ, σε σχέση με μη μολυσματικούς κλώνους [159]. Λίγα χρόνια νωρίτερα δε, είχε δειχθεί ότι η ενζυμική αυτή ενεργότητα στην επιφάνειά των *L. donovani* παρεμπόδιζε την παραγωγή των ελεύθερων ριζών οξυγόνου από τα ουδετερόφιλα προς όφελος της επιβίωσης των παρασίτων [161] και ότι η δράση έξω-φωσφατάσης από στελέχη μολυσματικά ήταν πιο ανθεκτική στην παρουσία του H_2O_2 από αυτή των μη μολυσματικών στελεχών [162], υποδεικνύοντας ένα πιθανό ρόλο στην ικανότητα επιβίωσης των παρασίτων εντός του φαγοκυττάρου.



Εικόνα 1.17 Διαγραμματική απεικόνιση των γονιδίων της οικογένειας των όξινων φωσφατασών ιστιδίνης από το παράσιτο *L. donovani*. Τα μαύρα πλαίσια αντιστοιχούν στην πεπτιδική αλληλουχία έκκρισης (signal peptide) η οποία είναι κοινή και για τα 3 γονίδια. Τα ανοικτά γκρι πλαίσια αντιστοιχούν στα κοινές περιοχές και των 3 γονιδίων. Τα λευκά πλαίσια αντιστοιχούν στις περιοχές με επαναλαμβανόμενες ακολουθίες σερίνης/ θρεονίνης και τέλος, τα πλαίσια με τις διαγραμμίσεις αντιστοιχούν στις περιοχές που κωδικοποιούν για τις καρβοξυ-τελικές υδρόφοβες δομές οι οποίες υπάρχουν μόνο στα γονίδια των *LdSAcP-1* και *LdSAcP-2* (τροποποιημένο [163]).

Το 2002, δημοσιεύτηκε η μοριακή ταυτοποίηση ενός από τα ένζυμα που πιθανά προσδίδουν δράση έξω-φωσφατάσης, ανθεκτική στο τρυγικό οξύ, στα παράσιτα *L. donovani*, της *LdMAcP* (*L. donovani* Membrane Acid Phosphatase, *GenBank* accession number AF149839.1), [164]. Η *LdMAcP* βρέθηκε ομόλογη με τις εκκρινόμενες όξινες φωσφατάσες ιστιδίνης από το ίδιο είδος *Leishmania* (*LdSAcP1* και *LdSAcP2*) (Εικόνα 1.17) [163].

Οι όξινες φωσφατάσες *LdMAcP* και *LdSAcPs* διαθέτουν στο ενεργό κέντρο τους το αμινοξύ Ιστιδίνη που φωσφορυλιώνεται κατά την κατάλυση και ως εκ τούτου κατατάσσονται στην ομάδα των όξινων φωσφατασών Ιστιδίνης [165]. Η πρώτη, σύμφωνα με τα μέχρι τώρα βιβλιογραφικά δεδομένα εντοπίζεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη του παρασίτου [164] με εξωκυττάρια καταλυτική δράση, ενώ οι δεύτερες είναι εκκρινόμενες πρωτεΐνες και έχουν υψηλή ομολογία με την *LdMAcP* στο αμινοτελικό μισό

της πολυπεπτιδικής τους αλυσίδας (Εικόνα 1.17). Τόσο η *LdMAcP* όσο και *LdSAPs* «ενοχοποιούνται», λόγω της εντόπισής τους, για εμπλοκή στην άμεση αλληλεπίδραση του παρασίτου με τους ξενιστές (έντομο ή θηλαστικό). Επιπρόσθετα, παλαιότερη έρευνα έδειξε ότι η επιφανειακή φωσφατάση από την *L. donovani* υδρολύει *in vitro* τα $\text{PtdIns}(4.5)\text{P}_2$ και $\text{PtdIns}(3.4.5)\text{P}_3$ [166], υποδεικνύοντας ένα πιθανό ρόλο των όξινων έξω-φωσφατασών το παρασίτου στη «χειραγώγηση» του μεταβολισμού του φαγοκυττάρου-ξενιστή, μέσω της αποφωσφορυλίωσης PIs με τρόπο ανάλογο των βακτηριακών παθογόνων (βλ. Εισαγωγή Παράγραφος 1.9.2).

Η παραπάνω υπόθεση καθώς και ο πιθανός ρόλος τους στην ικανότητα επιβίωσης του παρασίτου εντός των φαγοκυττάρων, δεν έχει επαληθευθεί μέχρι σήμερα στη βιβλιογραφία.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η λεϊσμανίωση είναι η μόνη από τις παραμελημένες τροπικές ασθένειες που ενδημούν στην Ευρώπη. Ο έλεγχος της νόσου παραμένει μη ικανοποιητικός λόγω των αναποτελεσματικών χημειοθεραπευτικών σχημάτων, της εμφάνισης ανθεκτικότητας στη φαρμακευτική αγωγή και των ισχυρών παρενεργειών που τη συνοδεύουν. Για το λόγο αυτό καθίσταται επιτακτική η ανάγκη για ταυτοποίηση νέων μολυσματικών παραγόντων της *Leishmania*, που πιθανά να αποτελέσουν στόχους για την ανάπτυξη νέων αποτελεσματικότερων και λιγότερο τοξικών φαρμάκων.

Τα πρωτόζωα παράσιτα *Leishmania* επιβιώνουν στα μακροφάγα του θηλαστικού-ξενιστή εντός των φαγολυσωσώματων έχοντας αναπτύξει στρατηγικές που ανατρέπουν τη διαδικασία ωρίμανσής τους και παρακάμπτουν τη μικροβιοκτόνο μηχανή τους. Όπως έχειδειχθεί για βακτηριακά παθογόνα, οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στο παραπάνω φαινόμενο συχνά περιλαμβάνουν φωσφατάσες ή κινάσες του μικροβίου οι οποίες εκκρίνονται στο κύτταρο-ξενιστή μεταβάλλοντας την κυτταρική του μεμβράνη και τις ιδιότητες του κυτταροσκελετού του προς όφελος της επιβίωσης του πρώτου. Επιπλέον, πολλές από αυτές τις στρατηγικές έχουν ειδικά ως στόχο την εκμετάλλευση της δράσης φωσφοϊνοσιτιδίων (PIs) ή την τροποποίηση του μεταβολισμού συγκεκριμένων από αυτά. Ο ρόλος των διαφόρων μολυσματικών παραγόντων της *Leishmania* στους ανωτέρω μηχανισμούς δεν έχει μελετηθεί έως σήμερα.

Όξινες φωσφατάσες ιστιδίνης, εκκρινόμενες ή επιφανειακές, έχουν ενοχοποιηθεί ως πιθανοί παράγοντες που εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση του παρασίτου *Leishmania* με τους ξενιστές του (έντομο ή θηλαστικό) και έχουν βρεθεί να αποφωσφορυλιώνουν και PIs. Η υπόθεση αυτή, καθώς και ο πιθανός ρόλος τους στην επιβίωση του παρασίτου στα μακροφάγα αποτελούν ένα ανοικτό πεδίο έρευνας.

Με βάση τα παραπάνω, ως βασικοί στόχοι της παρούσας εργασίας τέθηκαν:

- Η μελέτη της ωρίμανσης του λεϊσμανιοφόρου φαγοσώματος στα μακροφάγα κύτταρα του θηλαστικού ξενιστή σε ένα *in vitro* κυτταρικό σύστημα που αναπτύχθηκε με σκοπό να ελεγχθούν **α)** η χωροχρονική κατανομή γνωστών μοριακών δεικτών φαγοσωμικής ωρίμανσης και **β)** ο χωροχρονικός εντοπισμός συγκεκριμένων ειδών φωσφοϊνοσιτιδίων στη μεμβράνη του λεϊσμανιοφόρου φαγολυσωσώματος.

- Ο μοριακός χαρακτηρισμός της μεμβρανικής όξινης έξω-φωσφατάσης *LdMAcP* του παρασίτου *L. donovani* και η διερεύνηση του πιθανού ρόλου της ως μολυσματικού παράγοντα και εν δυνάμει νέου φαρμακευτικού στόχου.

Το *in vitro* κυτταρικό σύστημα θα αποτελέσει στο μέλλον σημαντικό εργαλείο για τον έλεγχο του πιθανού ρόλου της *LdMAcP* ή/ και των εκκρινόμενων μορφών της (*LdSACP*s), στην αποφωσφορυλίωση *PIs* του μακροφάγου προς όφελος της επιβίωσης του παρασίτου *L. donovani* και εγκαθίδρυσης της μόλυνσης.

2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Υλικά

2.1.1 Αντιδραστήρια

Χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια:

- Κοινά χημικά αναλυτικού βαθμού καθώς και χημικά υψηλού βαθμού καθαρότητας (99%), τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τις τεχνικές Μοριακής Βιολογίας (B.D.H., VWR International, Merck, Pierce, Promega, Sigma, Applichem BioRad και Fluka)
- Περιοριστικές ενδονουκλεάσες (New England Biolabs, Takara, Roche), Phusion High-Fidelity DNA πολυμεράση (Finnzymes) και KAPA2G Robust PCR Kits (KAPA BIOSYSTEMS), T4 λιγάση (Roche), αλκαλική φωσφατάση CIAP (NEB)
- Πρωτεΐνάση K (Macherey-Nagel), Λυσοζύμη (Sigma), RNase A (Sigma), DNase I (Promega), Απροτινίνη, Πεπστατίνη (Sigma)
- DNA δείκτες μοριακών μεγεθών: 100 bp και 1 Kb DNA ladder (NEB)
- Πρωτεΐνες αναφοράς, χαμηλού μοριακού βάρους (Low Molecular Weight Calibration kit for SDS electrophoresis) (Amersham) και Prestained πρωτεΐνες αναφοράς, χαμηλού μοριακού βάρους (20-120 kDa) (Fermentas)
- DNA πολυμεράση υψηλής μεταγραφικής πιστότητας Phusion DNA polymerase (Finnzymes) και KAPAHiFi PCR Kits (KAPA BIOSYSTEMS)
- Εκκινητές για την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (VBC-Biotech, <http://www.vbc-biotech.at/cms/index.php>)
- Κιτ απομόνωσης γενωμικού DNA από βακτήρια: NucleoBond Xtra Midi kit (Macherey-Nagel)
- Κιτ για τον καθαρισμό των προϊόντων PCR και τον καθαρισμό DNA από πήκτωμα αгарόζης Nucleospin extract II kit (Macherey-Nagel)
- Θρεπτικά υλικά για τις βακτηριακές καλλιέργειες: Bacto-tryptone, Bacto- yeast extract (Applichem) και Bacto-agar (BD Biosciences)

- Θρεπτικά υλικά για τις κυτταροκαλλιέργειες: RPMI (Gibco, Biosera), DMEM (Gibco, Biosera), Schneider's (Sigma, S-9895) και ορός από έμβρυο μόσχου (FBS) (Gibco), απενεργοποιημένος στους 56°C για 30 λεπτά
- Hepes buffer (Biosera)
- Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν για τις κυτταροκαλλιέργειες ήταν πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη (Gibco, Biosera)
- Άλλα αντιβιοτικά: αμπικιλίνη (Applichem), Nourseothricin (Jena Bioscience), Geneticin (Gibco)
- Στήλη νικελίου (Ni-NTA Superflow resin) (Qiagen)
- Αντιδραστήριο της Bradford (BioRad)
- Πρωτεΐνη γνωστής συγκέντρωσης για την καμπύλη αναφοράς, BSA (Pierce)
- Διγιτονίνη (Digitonin, #D5628, Sigma) 100 mM (stock)
- p-νιτροφαινυλοφωσφορικό ανιόν (4-Nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate, pNPP) (#P4744, Sigma)
- Βιοτίνη (EZ-Link Sulfo-NHS-SS-Biotin, #21328, Thermo Scientific)
- Endo F (PNGase F, #P0704S, NEB) & Endo H (#P0702S, NEB)
- Τουνικομυκίνη (Tunicamycin) I (#T7765, Sigma)
- Αντιδραστήρια λιποφεκταμίνης για μετασχηματισμό κυττάρων θηλαστικών, Lipofectamine LTX και Plus (Invitrogen)
- Καρβοξυλιωμένα (carboxylated) σφαιρίδια latex (#09850-5, PolySciences)
- Ανοσοενισχυτικό Freund's adjuvant complete και incomplete (Sigma)
- Αναστολείς πρωτεασών (#P8465, Sigma)
- Διαλύματα φωτογραφικής εμφάνισης (Kodak, Applichem)

2.1.2 Αναλώσιμα υλικά

- Πλαστικά ακρορύγχια (tips) (Greiner)
- Αποστειρωμένες πλαστικές πιπέτες (Sarstedt)
- Δοκιμαστικοί σωλήνες 15 και 50 ml (Sarstedt και Greiner bio-one)
- Πλαστικοί σωλήνες eppendorf 1,5 ml (Greiner)
- Πλαστικοί σωλήνες για PCR 0,2 ml (Kisker)
- Κρυοπροστατευτικοί αποστειρωμένοι σωλήνες φύλαξης κυττάρων 1,7 ml (Nunc)

- Πλαστικοί σωλήνες κυτταρομετρίας ροής των 5 ml (BD Biosciences)
- Πλαστικές κυψελίδες μίας χρήσης (Sarstedt)
- Κυψελίδες 2 mm για ηλεκτροδιάτρηση (Gene Pulser Cuvette, Biorad) για ευκαρυωτικά κύτταρα/ παράσιτα
- Φίλτρα με διάμετρο πόρου 0,2 και 0,45 μm (Sartorius)
- Φίλτρα Centricon (Millipore), 10 & 30 kDa cut-off
- Φλάσκες καλλιέργειας παρασίτων 25 και 50 cm^2 (Nunc)
- Τρυβλία κυτταροκαλλιέργειών και πλάκες 6 και 12 φρεατίων για κυτταροκαλλιέργειες (Nunc και Greiner)
- Τρυβλία Petri για στερεές καλλιέργειες βακτηρίων (Sarstedt)
- Αποστειρωμένες πλαστικές ξύστρες (scrapers) (Sarstedt)
- Αιμοκυτταρόμετρο για τη μέτρηση παρασίτων Malassez (Marienfeld) & για τη μέτρηση κυττάρων θηλαστικών Neubauer
- Αντικειμενοφόροι πλάκες (VWR International)
- Χαρτί διήθησης 3mm (Whatmann)
- Μembrάνη νιτροκυτταρίνης για μεταφορά πρωτεϊνών Parablott (Macherey-Nagel)
- Ημιδιαπερατή μεμβράνη διαπίδυσης (MWCO 3.500, διάμετρος 18 mm, όγκος/μήκος 1,0 ml/cm), Spectra/Por (Biotech)
- Πλαστικοί σωλήνες συμπύκνωσης πρωτεϊνών Amicon (Millipore)
- X-ray Films (Kodak)
- Αποστειρωμένες λεπίδες
- Σύριγγες (5-10 ml και 1-5 ml)
- Βελόνες (21G και 23G, 21G)

2.1.3 Διαλύματα

Για την παρασκευή όλων των διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε δις απεσταγμένο, απιονισμένο νερό (ddH_2O). Τα θρεπτικά υλικά για τις καλλιέργειες των βακτηρίων καθώς και τα ρυθμιστικά διαλύματα για τις μοριακές τεχνικές και τις καλλιέργειες των ευκαρυωτικών κυττάρων αποστειρώθηκαν σε υγρό κλίβανο στους 120°C για 20 λεπτά σε συνθήκες 15 lb/in^2 .

Παρακάτω παρατίθενται τα διαλύματα λύσης κυττάρων (βακτηρίων *E. coli* και *Leishmania*) όπως αυτά διαμορφώθηκαν στο πλαίσιο των πειραμάτων της παρούσας εργασίας.

Διαλύματα λύσης κυττάρων:

Διάλυμα λύσης βακτηρίων BL21 (συνθήκες αποδιάταξης)	
NaH₂PO₄ pH 8	100 mM
Tris-Cl	10 mM
Ιμιδαζόλιο	10 mM
Urea	8 M
PMSF	1 mM
Λυσοζύμη	200 µg/ml
Anti-protease inhibitors	

Διάλυμα λύσης παρασίτων <i>Leishmania</i> για απομόνωση γενωμικού DNA	
NaCl	50 mM
Tris-HCl, pH 7,4	50 mM
EDTA	10 mM

Διάλυμα λύσης παρασίτων <i>Leishmania</i> για απομόνωση γενωμικού RNA (NETS 2X)	
NaCl	100 mM
Tris-HCl, pH 8	10 mM
EDTA	10 mM
SDS	0,2% (w/v)

Διάλυμα λύσης παρασίτων <i>Leishmania</i> για απομόνωση ολικών πρωτεϊνών (pH 8)	
Tris-HCl, pH 7,4	10 mM
Sucrose	125 mM
MgCl₂	3 mM
EDTA	2 mM

Διάλυμα αναδυσασποράς των παρασίτων <i>L. donovani</i> με διγιτονίνη	
Tris-HCl, pH 7,4	75 mM
NaCl	145 mM
KCl	11 mM
Anti-protease inhibitors (Sigma)	
Σακχαρόζη	0,3 M
Διγιτονίνη	100 mM (stock): 0,84 g σε 6,7 ml νερού και 0,35 ml μεθανόλης 100% Αραίωση σε τελικές συγκεντρώσεις 20 µM, 200 µM, 1 mM και 10 mM

2.1.4 Αντισώματα

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν:

- Πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού και ποντικού (α-*LdMAcP*) έναντι της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης *LdMAcP*sol-His (αα 1-274) που παρασκευάστηκε στο εργαστήριο στα πλαίσια αυτής της εργασίας
- Μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού έναντι της πεπτιδικής αλληλουχίας Glu-Phe-Ala-Arg-Ser-Arg-Tyr-Asn-Asp-Leu-Ser-Leu (Glu73-Leu84) του γονιδίου της *LdMAcP* το οποίο παράχθηκε από την Paratopes Ltd, σύμφωνα με το εγκαθιδρυμένο πρωτόκολλο της μονάδας μονοκλωνικών αντισωμάτων του European Molecular Biology Laboratory (EMBL, Heidelberg-Germany)
- Μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού IgG1 His-probe (#SM1639PS, Acris)
- Μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι της α-τουμπουλίνης (#T5168, Sigma)
- Πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι IgG κουνελιού (goat anti-rabbit IgG) συζευγμένο με την πράσινη φθορίζουσα χρωστική Alexa Fluor 488 και την κόκκινη φθορίζουσα χρωστική Alexa Fluor 546 (Molecular probes). Χρησιμοποιήθηκαν ως δεύτερα αντισώματα σε ανοσοφθορισμό
- Πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι IgG ποντικού (goat anti-mouse IgG), συζευγμένο με την πράσινη φθορίζουσα χρωστική Alexa Fluor 488 και την κόκκινη φθορίζουσα χρωστική Alexa Fluor 546 (Molecular probes). Χρησιμοποιήθηκαν ως δεύτερα αντισώματα σε ανοσοφθορισμό
- Πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι της BiP/ GRP78 [167] [ευγενική χορηγία του Dr J. D. Bangs, U. at Buffalo (SUNY)]
- Πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι της calnexin (type I μεμβρανική πρωτεΐνη που εντοπίζεται κυρίως στο ER) (#C-4731, Sigma)
- Phalloidin, συζευγμένη με την κόκκινη φθορίζουσα χρωστική Alexa Fluor 546 (#A22283, Molecular probes)
 - Πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι της Rab7 [ευγενική χορηγία του Δρ. Σ. Χριστοφορίδη, Ινστιτούτο Βιοϊατρικής Έρευνας, ΙΤΕ, Ιωάννινα, παρασκευασμένο στο εργαστήριο του Dr Marino Zerial's (Max -Planck Institute for Cell Biology and Genetics, Dresden, Germany)]

- Συζευγμένα με υπεροξειδάση αντι-ισοτυπικά αντισώματα, έναντι των ανοσοσφαιρινών του κουνελιού και του ποντικού (#41460 και #31230, αντίστοιχα, Pierce)

2.1.5 Φορείς κλωνοποίησης- βακτηριακά στελέχη

2.1.5.1 Πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση της *LdMAcP* ή τμημάτων της

Για έκφραση σε κύτταρα *Leishmania* ή θηλαστικών

- Για την επισωμική έκφραση της *LdMAcP* σε παράσιτα *L. donovani* (στέλεχος LG13), το γονίδιο που την κωδικοποιεί [αμινοξέα (αα) 1-315, GenBank® accession number AIF32067] ενισχύθηκε με PCR και κλωνοποιήθηκε στη θέση BglII του πλασμιδίου pLexsy-sat-mRFP1 το οποίο κατασκευάστηκε στο εργαστήριο τροποποιώντας τον πλασμιδιακό φορέα pLexsy-sat (pF4X1.4sat, Jena Biosciences) ως εξής: Αρχικά, το γονίδιο της mRFP1 ενισχύθηκε με PCR χρησιμοποιώντας ως μήτρα τον πλασμιδιακό φορέα pRSET-b-mRFP1 (MTA-Y.Tsien lab, Howard Hughes Medical Institute, U. California, San Diego) και ακολούθως, το προϊόν της PCR κλωνοποιήθηκε στις θέσεις BglII/XhoI του pLexsy-sat [168]. Το πλασμίδιο που προέκυψε τελικά είναι το pLexsy-sat-r*LdMAcP*-mRFP1.

- Για την επισωμική έκφραση ενός τμήματος της *LdMAcP* (αα 2-280) σε παράσιτα *L. tarentolae* (Parrot, στέλεχος Jena), το γονίδιο που κωδικοποιεί για αυτό ενισχύθηκε με PCR και κλωνοποιήθηκε στις θέσεις KpnI/NcoI του πλασμιδιακού φορέα pLexsy-sat2 (Jena Biosciences), επιτρέποντας την προσθήκη της ετικέτας 6 συνεχών καταλοίπων ιστιδίνης (6 x His tag) στο καρβόξυ-τελικό άκρο της *LdMAcP*sol (r*LdMAcP*sol-His). Το πλασμίδιο που προέκυψε τελικά είναι το pLexsy-sat2-r*LdMAcP*sol.

Τα πλασμίδια pLexsy-sat και pLexsy-sat2 κωδικοποιούν για την streptothricine acetyltransferase που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό Nourseothricin.

- Για την ετερόλογη έκφραση της *LdMAcP* σε κύτταρα θηλαστικών (HeLa), το γονίδιο της *LdMAcP* (αα 1-315) ενισχύθηκε με PCR από γενωμικό DNA *L. donovani* (στέλεχος LG13) και κλωνοποιήθηκε στις θέσεις BglII/XhoI του πλασμιδίου pTriEx1.1 (Novagen) ο οποίος επιτρέπει την προσθήκη της ετικέτας 8 συνεχών καταλοίπων ιστιδίνης (8 x His tag) στο καρβόξυ-τελικό άκρο της *LdMAcP* (r*LdMAcP*-His). Το

πλασμίδιο pTriEx 1.1 φέρει γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμικικιλίνη. Επιπλέον, η παρουσία της αλληλουχίας του υποκινητή της β-ακτίνης από κοτόπουλο (chicken b-actin promoter) επιτρέπει την έκφραση πρωτεϊνών σε ανώτερα ευκαρυωτικά κύτταρα.

Για έκφραση σε βακτήρια

Ο πλασμιδιακός φορέας pTriEx 1.1 χρησιμοποιήθηκε για την ετερόλογη έκφραση ενός μικρότερου τμήματος της *LdMACP* (*LdMACPsol*, αα 1-274) σε βακτήρια. Συγκεκριμένα, το γονίδιο κλωνοποιήθηκε στη θέση BglII/XhoI του πλασμιδιακού φορέα για την προσθήκη της ετικέτας 8 x His tag στο καρβοξυ-τελικό άκρο της *LdMACPsol* (*rLdMACPsol-His*). Το πλασμίδιο pTriEx 1.1 περιέχει τον υποκινητή T7 της λακτόζης ο οποίος επάγεται από το μόριο-επαγωγέα β-ισοπροπυλο-D-θειογαλακτοζίδιο (IPTG), με αποτέλεσμα την έκφραση της *rLdMACPsol-His*. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν βακτήρια *E. coli* του στελέχους BL21(DE3)pLysS.

Η *rLdMACPsol-His* χρησιμοποιήθηκε, στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας, ως αντιγόνο για την παραγωγή πολυκλωνικών αντισωμάτων (*a-LdMACP*) ποντικού και κουνελιού (βλ. Μέθοδοι Παράγραφος 2.2.11).

2.1.6 Εναρκτήρια μόρια για την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)

Τα εναρκτήρια μόρια που χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση της *LdMACP* ή τμημάτων της (βλ. Πίνακα Παράρτημα II), σχεδιάστηκαν με βάση την αλληλουχία της «*L. donovani* Tartrate-resistant membrane acid phosphatase ACP-3.1» (GenBank: AAG01045.1).

Επιπλέον, για την ενίσχυση της αλληλουχίας του γονιδίου της πρωτεΐνης LmjF.36.6460 του στελέχους *L. major* Friedlin (από γενωμικό DNA *L. major* Friedlin) και της LtaP34.3910 του στελέχους *L. tarentolae* Parrot Tarrl [από γενωμικό DNA *L. tarentolae* Parrot (στέλεχος Jena Biosciences)], χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω εκκινητές:

- 5' BglII LmjF.36.6460 For: 5'- GAA GAT CTC CCA AAT ACG GCA ACC ATG -3'
- 3' XhoI LmjF.36.6460 Rev: 5'- CCG CTC GAG CAC AGG TTC ATC TAC AGG AC -3'

- 5' BglII LtaP34.3910 For: 5'- GAAGATCT CC ATG ACC TCG AAG CTC ATC TGC -3'
- 3' XhoI LtaP34.3910 Rev: 5'- CCG CTC GAG CAC GGT GTG TGG CAC AC -3'
- 3' LtaP34.3910 extended Rev: 5'- CGTGTGACAGCTGTCTCAC -3'

2.1.7 Στελέχη παρασίτων – Κυτταρικές σειρές θηλαστικών

Στελέχη παρασίτων αγρίου τύπου:

- *L. donovani*, στέλεχος LG13, MON-31, MHOM/ET/0000/HUSSEN [169]
- *L. infantum*, στέλεχος GH12, MHOM/GR/2001/Athens/VL/MON-1 [170]
- *L. major* Friedlin, στέλεχος αναφοράς, MHOM/IL/80/Friedlin, zymodeme MON-103 (ευγενική προσφορά του Dr P.Volf Dep. of Parasitology, Charles University, Prague, Czech Republic) [82]
- *L. tarentolae* Parrot (στέλεχος Jena Biosciences)

Ανασυνδυασμένοι πληθυσμοί παρασίτων:

- *L. donovani*-Lexsy-sat (στέλεχος LG13) [171]
- *L. donovani*-rLdMAcP-mRFP1 (στέλεχος LG13) [97]
- *L. donovani*-mRFP1 (στέλεχος LG13) [168]
- *L. donovani*-GFP (ευγενική προσφορά της Δρ. Σμυρλή Δ., Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ)

Κυτταρικές σειρές ανώτερων ευκαρυωτικών:

- Μονοκυτταρική σειρά μακροφάγων ποντικού J774 (ATCC, American Type Culture Collection, Manassas, VA)
- Μονοκυτταρική σειρά μακροφάγων ποντικού RAW264.7 (ATCC)
- Μόνιμα επιμολυσμένη κυτταρική σειρά μακροφάγων ποντικού RAW-PX GFP (ευγενική χορηγία του Dr Hawkins P., Inositide Laboratory, The Babraham Institute, Cambridgeshire)
- Καρκινική σειρά κυττάρων κοιλιακού επιθηλίου HeLa (ευγενική χορηγία Unité de Biologie des Interactions Cellulaires, Institut Pasteur, Paris)

2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1 Κλωνοποιήσεις

2.2.1.1 Απομόνωση γενωμικού DNA από παράσιτα *Leishmania*

Για την απομόνωση γενωμικού DNA από παράσιτα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της φαινόλης [172]. Τα παράσιτα φυγοκεντρούνται, ξεπλένονται με παγωμένο PBS και το ίζημα αναμιγνύεται με διάλυμα λύσης παρασίτων (0,5 ml δ/τος λύσης παρασίτων/ 10^8 παράσιτα). Στη συνέχεια προστίθεται SDS 0,5% (w/v), πρωτεΐνάση K 100 µg/ml και RNase A 100 µg/ml και το δείγμα επωάζεται για 16 ώρες στο 37°C . Ακολούθως, προστίθεται ίσος όγκος φαινόλης και το δείγμα φυγοκεντρείται στις 3.500 rpm για 10 λεπτά. Συλλέγεται η ανώτερη υδατική φάση (που περιέχει το DNA) και σε αυτή προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος φαινόλης/ χλωροφορμίου 1:1 (v/v). Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 3.500 rpm για 10 λεπτά, προσθήκη ίσου όγκου χλωροφορμίου και ξανά φυγοκέντρωση στις 3.500 rpm για 10 λεπτά. Συλλέγεται η ανώτερη υδατική φάση και το DNA κατακρημνίζεται με προσθήκη 1/10 του όγκου 3 M οξικού νατρίου pH 5,2 και 2,5 όγκους αιθανόλης 100% (v/v). Σε περίπτωση που το ίζημα (DNA) δεν είναι ορατό αφήνεται το δείγμα στους 4°C για τουλάχιστον 30 λεπτά. Στη συνέχεια το δείγμα φυγοκεντρείται στις 20.000 g για 15 λεπτά, προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος αιθανόλης 70% (v/v) και ξανά φυγοκεντρείται στις 20.000 g για 15 λεπτά. Ακολουθεί εξάτμιση του διαλύτη και αναδιάλυση του DNA σε ddH₂O. Η συγκέντρωση του DNA στο παρασκεύασμα προσδιορίζεται με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 260 nm, με βάση τη σχέση: $1 \text{ O.D.}_{260\text{nm}} = 50\mu\text{g DNA/ml διαλύματος}$.

Η καθαρότητα του DNA στο παρασκεύασμα προσδιορίζεται από το λόγο $\text{O.D.}_{260\text{nm}}/\text{O.D.}_{280\text{nm}}$ με τη χρήση του φασματοφωτόμετρου Nanodrop ND 2000/2000c (Thermo Scientific). Καθαρά παρασκευάσματα DNA έχουν $\text{O.D.}_{260\text{nm}}/\text{O.D.}_{280\text{nm}}=1,8$. Επιπλέον, ο λόγος $\text{O.D.}_{260\text{nm}}/\text{O.D.}_{230\text{nm}}$ πρέπει να είναι μεγαλύτερος από τον προηγούμενο και να κυμαίνεται ανάμεσα στο 2,0-2,2 για να θεωρείται το δείγμα απαλλαγμένο από φαινόλες και άλλα χημικά αντιδραστήρια (π.χ. EDTA) που χρησιμοποιήθηκαν κατά την απομόνωση του DNA. Τέλος, η ποιότητα του DNA ελέγχεται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης.

2.2.1.2 Ενίσχυση με PCR

- A.** Ενίσχυση της αλληλουχίας της *LdMACP* από γενωμικό DNA *L. donovani* για κλωνοποίηση στον pTriEx1.1 (pTriEx1.1-r*LdMACP*)
- B.** Ενίσχυση της αλληλουχίας της *LdMACPsol* από το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pTriEx-1.1-r*LdMACP* για κλωνοποίηση στον pTriEx1.1 (pTriEx1.1-r*LdMACPsol*)
- Γ.** Ενίσχυση της αλληλουχίας της *LdMACP* από πλασμιδιακό DNA (pTriEx1.1-r*LdMACP*) για κλωνοποίηση στον pLexsy-sat-mRFP1
- Δ.** Ενίσχυση της αλληλουχίας της *LdMACPsol* (αα 2-280) από γενωμικό DNA *L. donovani* στον pLexsy-sat2 (pLexsy-sat2-r*LdMACPsol*)
- Ε.** Ενίσχυση της αλληλουχίας της LmjF.36.6460 από γενωμικό DNA *L. major* Friedlin στα πλαίσια της μοριακής μελέτης της *LdMACP*
- Ζ.** Ενίσχυση της αλληλουχίας της LtaP34.3910 από γενωμικό DNA *L. tarentolae* Parrot (στέλεχος Jena Biosciences) στα πλαίσια της μοριακής μελέτης της *LdMACP*

Σε όλες τις περιπτώσεις οι αντιδράσεις PCR περιείχαν τα εξής:

Ρυθμιστικό διάλυμα Phusion DNA πολυμεράσης (5x)	20 μ l	1X
d NTP s (10 mM)	2 μ l	0,5 μM
5' Forward (10 μM)	5 μ l	0,5 μM
3' Reverse (10 μM)	5 μ l	0,5 μM
dd H₂O	59 μ l	
Γενωμικό ή πλασμιδιακό DNA (25 ng/ μl)	8 μ l	200 ng
Phusion DNA πολυμεράση (2U/ μl)	1 μ l	2 U
Τελικός όγκος αντίδρασης	100 μl	

Τα προγράμματα της αντίδρασης PCR για κάθε μία από τις παραπάνω κλωνοποιήσεις καθορίστηκαν ως εξής:

A. Ενίσχυση της αλληλουχίας της *LdMACP* από γενωμικό DNA

Αρχική αποδιάταξη	98°C	1,5 λεπτά
10 κύκλοι ενίσχυσης με τις ακόλουθες συνθήκες:		
Αποδιάταξη	98°C	10 δευτερόλεπτα
Υβριδοποίηση	56°C	30 δευτερόλεπτα
Πολυμερισμός	72°C	1 λεπτό
25 επιπλέον κύκλοι ενίσχυσης με τις ακόλουθες συνθήκες:		
Αποδιάταξη	98°C	10 δευτερόλεπτα
Υβριδοποίηση	70°C	30 δευτερόλεπτα

Πολυμερισμός	72°C	1 λεπτό
Τελικός πολυμερισμός	72°C	10 λεπτά
Η αντίδραση τερματίζεται στους 4°C		

B. Ενίσχυση της αλληλουχίας της LdMAcPsol από το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pTriEx-1.1-rLdMAcP

Αρχική αποδιάταξη	98°C	1,5 λεπτά
5 κύκλοι ενίσχυσης με τις ακόλουθες συνθήκες:		
Αποδιάταξη	98°C	10 δευτερόλεπτα
Υβριδοποίηση	60°C	30 δευτερόλεπτα
Πολυμερισμός	72°C	1 λεπτό
25 επιπλέον κύκλοι ενίσχυσης με τις ακόλουθες συνθήκες:		
Αποδιάταξη	98°C	10 δευτερόλεπτα
Υβριδοποίηση	70°C	30 δευτερόλεπτα
Πολυμερισμός	72°C	1 λεπτό
Τελικός πολυμερισμός	72°C	10 λεπτά
Η αντίδραση τερματίζεται στους 4°C		

Γ. Ενίσχυση της αλληλουχίας της LdMAcP από το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pTriEx-1.1-rLdMAcP για κλωνοποίηση στον pLexsy-sat-mRFP1

Αρχική αποδιάταξη	98°C	30 δευτερόλεπτα
30 κύκλοι ενίσχυσης με τις ακόλουθες συνθήκες:		
Αποδιάταξη	98°C	10 δευτερόλεπτα
Υβριδοποίηση	70°C	30 δευτερόλεπτα
Πολυμερισμός	72°C	1 λεπτό
Τελικός πολυμερισμός	72°C	10 λεπτά
Η αντίδραση τερματίζεται στους 4°C		

Δ. Ενίσχυση της αλληλουχίας της LdMAcPsol από γενωμικό DNA *L. donovani* για κλωνοποίηση στον pLexsy-sat2

Αρχική αποδιάταξη	98°C	1,5 λεπτά
10 κύκλοι ενίσχυσης με τις ακόλουθες συνθήκες:		
Αποδιάταξη	98°C	10 δευτερόλεπτα
Υβριδοποίηση	58°C	30 δευτερόλεπτα
Πολυμερισμός	72°C	1 λεπτό
25 επιπλέον κύκλοι ενίσχυσης με τις ακόλουθες συνθήκες:		
Αποδιάταξη	98°C	10 δευτερόλεπτα
Υβριδοποίηση	68°C	30 δευτερόλεπτα

Πολυμερισμός	72°C	1 λεπτό
Τελικός πολυμερισμός	72°C	10 λεπτά
Η αντίδραση τερματίζεται στους 4°C		

E. Ενίσχυση της αλληλουχίας της LmjF.36.6460 από γενωμικό DNA *L. major* Friedlin

Αρχική αποδιάταξη	98°C	1,5 λεπτά
10 κύκλοι ενίσχυσης με τις ακόλουθες συνθήκες:		
Αποδιάταξη	98°C	10 δευτερόλεπτα
Υβριδοποίηση	62°C	30 δευτερόλεπτα
Πολυμερισμός	72°C	1 λεπτό
25 επιπλέον κύκλοι ενίσχυσης με τις ακόλουθες συνθήκες:		
Αποδιάταξη	98°C	10 δευτερόλεπτα
Υβριδοποίηση	68°C	30 δευτερόλεπτα
Πολυμερισμός	72°C	1 λεπτό
Τελικός πολυμερισμός	72°C	10 λεπτά
Η αντίδραση τερματίζεται στους 4°C		

Z. Ενίσχυση της αλληλουχίας της LtaP34.3910 από γενωμικό DNA *L. tarentolae* Parrot

Αρχική αποδιάταξη	98°C	1,5 λεπτά
10 κύκλοι ενίσχυσης με τις ακόλουθες συνθήκες:		
Αποδιάταξη	98°C	10 δευτερόλεπτα
Υβριδοποίηση	62°C	30 δευτερόλεπτα
Πολυμερισμός	72°C	1 λεπτό
25 επιπλέον κύκλοι ενίσχυσης με τις ακόλουθες συνθήκες:		
Αποδιάταξη	98°C	10 δευτερόλεπτα
Υβριδοποίηση	68°C	30 δευτερόλεπτα
Πολυμερισμός	72°C	1 λεπτό
Τελικός πολυμερισμός	72°C	10 λεπτά
Η αντίδραση τερματίζεται στους 4°C		

2.2.1.3 Ανάλυση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ανάλυση των μορίων του DNA γίνεται με βάση το μέγεθός τους σε οριζόντιο πήκτωμα αγαρόζης με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου. Κατά την ηλεκτροφόρηση τα μόρια DNA τα οποία είναι αρνητικά φορτισμένα και λόγω του φορτίου των φωσφορικών ομάδων τους, μετακινούνται προς το θετικό πόλο με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη του μεγέθους τους. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν οριζόντια πηκτώματα αγαρόζης

0,8-1% (w/v) σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης TBE 1X παρουσία 0,5 µg/ml βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr). Τα δείγματα DNA μετά από προσθήκη διαλύματος «φόρτωσης», ηλεκτροφορούνται σε διάλυμα TBE 1X υπό σταθερό ρεύμα έντασης 90-120 V. Παράλληλα με τα προς εξέταση δείγματα αναλύονταν τμήματα DNA γνωστών μοριακών μεγεθών. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, ο έλεγχος των ζωνών που αντιστοιχούσαν στα μόρια του DNA παρατηρούνται με έκθεση του πηκτώματος σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV) μήκους κύματος 302 nm. Αυτό οφείλεται στην ενσωμάτωση της φθορίζουσας χρωστικής EtBr μεταξύ των αζωτούχων βάσεων του DNA.

2.2.1.4 Καθαρισμός προϊόντων PCR

Για τον καθαρισμό των προϊόντων της αντίδραση PCR που αποκόπτονταν από πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε το σύστημα Nucleospin Extract II (Macherey-Nagel), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συνοπτικά, παρουσία χαοτροπικών αντιδραστηρίων, η πηκτή αγαρόζης αποδομείται και με προσθήκη ελαφρώς όξινου διαλύματος πρόσδεσης (4 M οξικό νάτριο, pH 5,0) το DNA δεσμεύεται σε ειδική στήλη διοξειδίου του πυριτίου. Οι υπόλοιπες ενώσεις (ένζυμα, αγαρόζη και βρωμιούχο αιθίδιο), καθώς δε δεσμεύονται χημικά στη στήλη, απομακρύνονται με έκπλυση με αιθανολικό διάλυμα. Τελικά, το DNA που είχε προσδεθεί στη στήλη εκλύεται με προσθήκη ddH₂O.

Η συγκέντρωση και η ποιότητα του απομονωμένου DNA ελέγχεται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης και με τη χρήση του φασματοφωτόμετρου Nanodrop ND 2000/2000c (Thermo Scientific).

2.2.1.5 Πέψη DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες (ή νουκλεάσες περιορισμού) είναι ένζυμα που αναγνωρίζουν εξειδικευμένα παλίνδρομες αλληλουχίες DNA μήκους 6-12 bp και προκαλούν τομή στη δίκλωνη έλικα διασπώντας δύο φωσφοδιεστερικούς δεσμούς, έναν σε κάθε αλυσίδα. Μία μονάδα (1 U) περιοριστικής ενδονουκλεάσης είναι η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για την πλήρη πέψη 1 µg καθαρού DNA σε χρόνο 60 λεπτών στους 37°C. Στην πράξη, όταν DNA που χρησιμοποιείται για πέψη με περιοριστικά ένζυμα είναι μερικώς καθαρισμένο, απαιτείται συνήθως μεγαλύτερη ποσότητα ενζύμου ή/και μεγαλύτερος χρόνος επώασης. Γενικά η σχέση που χρησιμοποιήθηκε ήταν η παρακάτω:

5-10 U περιοριστικού ενζύμου/1 µg DNA/20 µl (τελικός όγκος αντίδρασης)

Η συγκέντρωση αλάτων και η θερμοκρασία που πραγματοποιείται η πέψη είναι ειδικές για κάθε ένζυμο και αναγράφονται στα συνοδευτικά φυλλάδια των ενζύμων. Τέλος, ο όγκος του περιοριστικού ενζύμου που προστίθεται δεν πρέπει να ξεπερνά το 1/10 του τελικού όγκου της αντίδρασης, γιατί η γλυκερόλη που περιέχεται στο διάλυμα φύλαξης του ενζύμου μπορεί να επηρεάσει την δράση του ενζύμου (star activity).

2.2.1.6 Κλωνοποίηση του προϊόντος PCR σε πλασμιδιακό φορέα

Μετά το πέρας της πέψης με τα περιοριστικά ένζυμα, το γραμμικό πλασμιδιακό DNA αποφωσφορυλιώνεται προκειμένου να αποκλειστεί η πιθανότητα επανασύνδεσης των άκρων του που έχουν προκύψει από τη δράση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης. Για την αποφωσφορυλίωση χρησιμοποιείται η αλκαλική φωσφατάση από έντερο μοσχარიού (calf intestinal alkaline phosphatase, CIAP) η οποία αποφωσφορυλιώνει τα 5' άκρα του γραμμικού πλασμιδιακού DNA. Η αποφωσφορυλίωση του γραμμικού πλασμιδιακού DNA γίνεται με ανάμιξη 10 µg γραμμικού πλασμιδιακού DNA και 10 U CIAP σε ρυθμιστικό διάλυμα αποφωσφορυλίωσης και επώαση στους 37°C για 1 ώρα.

Στη συνέχεια ακολουθεί η αντίδραση σύνδεσης του γραμμικού πλασμιδιακού DNA (φορέας) με το προϊόν της PCR (ένθεμα) με τη χρήση T4 DNA λιγάσης. Η αναλογία μορίων φορέα-ενθέματος συνήθως είναι 1:3. Ανάλογα, όμως, με το μέγεθος του φορέα και του ενθέματος, μπορούν να δοκιμαστούν και μεγαλύτερες αναλογίες. Οι ποσότητες ενθέματος και φορέα που χρησιμοποιούνται μπορούν να υπολογιστούν με τον εξής τύπο:

$$\text{ng ενθέματος} = \frac{\text{ng του φορέα} \times \text{μέγεθος του ενθέματος σε χιλιοστοβάσεις}}{\text{μέγεθος του φορέα σε χιλιοστοβάσεις}} \times \frac{3}{1}$$

Η αντίδραση σύνδεσης γίνεται σε τελικό όγκο 10-20 µl, με την προσθήκη 1 U T4 DNA λιγάσης (Roche) (1 U/µl) και 1-2 µl ρυθμιστικού διαλύματος λιγάσης (10X). Η αντίδραση επωάζεται στους 16°C για 16 ώρες και η επιτυχία της σύνδεσης ελέγχεται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης.

2.2.1.7 Μετασχηματισμός βακτηρίων

Μετασχηματισμός ονομάζεται η διαδικασία κατά την οποία ένα βακτηριακό κύτταρο προσλαμβάνει ξένο γενετικό υλικό το οποίο κληρονομεί στις επόμενες γενιές. Ανάλογα με το είδος των επιδεκτικών βακτηρίων, ο μετασχηματισμός τους είναι είτε χημικός είτε με ηλεκτροδιάτρηση. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα χημειοδεκτικά και συγκεκριμένα, *E. coli* TOP10F' για απομόνωσή του εισαγόμενου DNA από καλλιέργεια μικρής έκτασης (miniprep) ή μεγάλης έκτασης (midiprep) και κύτταρα BL21 για παραγωγή της πρωτεΐνης rLdMAcP_{sol}-His σε μεγάλη κλίμακα.

Η διαδικασία έχει ως εξής: Αναμιγνύονται 200 µl επιδεκτικών βακτηρίων (που φυλάσσονται στους -80°C) με ~50-100 ng DNA από την αντίδραση σύνδεσης και διατηρούνται στον πάγο για 20-30 λεπτά. Ακολουθεί θερμικό σοκ στους 42°C για 90 δευτερόλεπτα. Άμεσα, τα κύτταρα τοποθετούνται στον πάγο για 10 λεπτά και προστίθεται 1 ml προθερμασμένου (στους 37°C) θρεπτικού υλικού LB χωρίς αντιβιοτικό. Τα μετασχηματισμένα βακτήρια επωάζονται σε επωαστικό θάλαμο υπό ανάδευση (200 στροφές/ λεπτό) στους 37°C για 1 ώρα και επιστρώνονται σε στερεό θρεπτικό υλικό που περιέχει αμπικιλίνη (100 µg/ml). Το τρυβλίο επωάζεται στους 37°C για 16 ώρες.

2.2.1.8 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργεια βακτηρίων

Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini prep) χρησιμοποιείται για την εύρεση θετικών κλώνων. Η διαδικασία έχει ως εξής:

Μία αποικία μετασχηματισμένων βακτηρίων εμβολιάζεται σε 4 ml θρεπτικό υλικό παρουσία αντιβιοτικού και ακολουθεί επώαση με ανάδευση στους 37°C για περίπου 16 ώρες. Το ίζημα των βακτηριακών κυττάρων, μετά από φυγοκέντρηση, διαλύεται με έντονη ανάδευση σε 100 µl διαλύματος P1 (50 mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 100 µg/ml RNase, pH 8). Προστίθενται 200 µl διαλύματος P2 (διάλυμα λύσης, 200 mM NaOH, 1% w/v SDS) και ακολουθεί επώαση για το πολύ 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστίθενται 150 µl διαλύματος P3 (3M acetic acid, pH5) και το δείγμα φυγοκεντρείται στις 20000 g για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο περιέχει πλασμιδιακό DNA και RNA, ενώ το μεγαλύτερο χρωμοσωμικό DNA συμπαρασύρεται από τα βακτηριακά υπολείμματα στο ίζημα. Στο υπερκείμενο προστίθεται 1 ml παγωμένης (-20°C) απόλυτης αιθανόλης η οποία κατακρημνίζει το πλασμιδιακό DNA και σύντομη ανάδευση. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 20000 g για 15

λεπτά και απομάκρυνση του υπερκλειμένου. Το ίζημα (DNA) ξεπλένεται με 1 ml αιθανόλη 70% (v/v) και, μετά την εξάτμιση του διαλύτη (με ξήρανση), αναδιαλύεται σε 20 µl ddH₂O. Το πλασμιδιακό DNA πέπτει στην συνέχεια με περιοριστικές ενδονουκλεάσες για τον εντοπισμό των κλώνων που φέρουν το επιθυμητό ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.

Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα (maxi prep) χρησιμοποιείται για την απομόνωση μεγάλης ποσότητας υψηλής καθαρότητας πλασμιδιακού DNA. Σε αυτή την περίπτωση, μία αποικία μετασχηματισμένων βακτηρίων εμβολιάζεται σε 4 ml θρεπτικό υλικό παρουσία αντιβιοτικού και ακολουθεί επώαση με ανάδευση στους 37°C για περίπου 16 ώρες. Όγκος 1 ml από την παραπάνω καλλιέργεια εμβολιάζεται σε 500 ml θρεπτικό υλικό παρουσία κατάλληλου αντιβιοτικού και ακολουθεί επώαση με ανάδευση στους 37°C για περίπου 16 ώρες. Η καλλιέργεια φυγοκεντρείται στις 2700 g για 30 λεπτά στους 4°C. Στη συνέχεια, ακολουθεί η παρακάτω πειραματική διαδικασία, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (NucleoBond Xtra Midi kit, Macherey-Nagel).

Συγκεκριμένα, το βακτηριακό ίζημα αναδιαλύεται με ισχυρή ανάδευση σε 10 ml διαλύματος RES (το οποίο περιέχει και RNάση A) και το δείγμα τοποθετείται σε πάγο. Ακολουθεί προσθήκη 8 ml διαλύματος αλκαλικής λύσης LYS (περιέχει NaOH, SDS), ήπια ανάδευση και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως, το δείγμα μεταφέρεται σε χρωματογραφική στήλη που περιέχει φίλτρο κατακράτησης των πρωτεϊνών, του χρωμοσωμικού DNA και των κυτταρικών θραυσμάτων, ενώ έχει ήδη προηγηθεί η προετοιμασία/ εξισορρόπηση της στήλης με προσθήκη 12 ml διαλύματος EQU. Το φίλτρο και η στήλη εμποτίζονται με 5 ml διαλύματος EQU, το φίλτρο απομακρύνεται και η στήλη εκπλένεται με 8 ml διαλύματος έκπλυσης WASH. Τελικά πραγματοποιείται έκλουση με 5 ml διαλύματος ELU. Στο έκλουσμα, προστίθενται 3,5 ml ισοπροπανόλης και φυγοκεντρείται στις 15000 g για 30 λεπτά στους 4°C, οπότε καθιζάνει το πλασμιδιακό DNA. Το ίζημα ξεπλένεται με 1 ml αιθανόλη 70% (v/v) και μετά την εξάτμιση του διαλύτη αναδιαλύεται σε 150-200 µl ddH₂O.

Η συγκέντρωση του DNA προσδιορίζεται όπως προηγουμένως (βλ. Μέθοδοι Παράγραφος 2.2.1.3).

2.2.1.9 Υγρή και στερεή καλλιέργεια βακτηρίων- Φύλαξη βακτηρίων (cryopreservation)

Τα διάφορα βακτηριακά στελέχη *E. coli* καλλιεργούνται σε υγρό θρεπτικό υλικό LB, παρουσία του απαιτούμενου αντιβιοτικού, σε στείρους σωλήνες των 15 και 50 ml και σε

κωνικές φλάσκες των 500, 1000 και 2000 ml, με συνεχή ανάδευση σε επωαστικούς θαλάμους στους 37°C. Οι στερεές καλλιέργειες γίνονται σε τρυβλία Petri, με θρεπτικό υλικό LB που περιέχει άγαρ 1,5% (w/v) παρουσία του απαραίτητου αντιβιοτικού. Η επώαση πραγματοποιείται για ~16 ώρες στους 37°C.

Τα βακτήρια φυλάσσονται για μεγάλα χρονικά διαστήματα στους -80°C σε θρεπτικό υλικό παρουσία 15% (v/v) γλυκερόλης.

2.2.1.10 Αλληλούχιση του DNA (Sequencing)

Η αλληλούχιση των δειγμάτων πλασμιδιακού DNA πραγματοποιήθηκε από την Εταιρεία VBC Biotech. Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης ελέγχθηκαν για ομολογία με την αλληλουχία του επιθυμητού γονιδίου χρησιμοποιώντας τα προγράμματα ClustalW2 και BioEdit Sequence Alignment Editor (βλ. Μέθοδοι Παράγραφος 2.2.18).

2.2.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής πραγματικού χρόνου (qPCR)

2.2.2.1 Εκχύλιση ολικού RNA από παράσιτα *L. donovani*

Για την εκχύλιση ολικού RNA από προμαστιγωτές μορφές *Leishmania* στατικής φάσης, εφαρμόστηκε η μέθοδος της θερμής όξινης φαινόλης [173]. Η μέθοδος περιγράφεται ως εξής:

Αρχικά παρασκευάζεται μίγμα από 1 όγκο φαινόλης (water stabilized), μισό όγκο NETS 2X (10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100mM NaCl, 0.2% w/v SDS, pH 8) και μισό όγκο οξικού νατρίου 50 mM pH 4.0. Το μίγμα θερμαίνεται μέχρις ότου οι δυο φάσεις του αναμειχθούν και γίνει διαυγές. Σε ίζημα από 10⁹ προμαστιγωτά παράσιτα στατικής φάσης [*L. donovani* (στέλεχος LG13) αγρίου τύπου και διαγονιδιακών *L. donovani*-rLdMAcP-mRFP1] προστίθενται 250 μl του παραπάνω διαλύματος και ακολουθεί έντονη ανάδευση. Το δείγμα φυγοκεντρείται στα 20000 g για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο συλλέγεται σε νέο eppendorf και στην εναπομένουσα κάτω φάση προστίθενται 70 μl NETS 2X. Το δείγμα φυγοκεντρείται ξανά στα 20000 g για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο συλλέγεται και τοποθετείται μαζί με το υπερκείμενο του προηγούμενου βήματος. Σε αυτό το νέο υπερκείμενο προστίθενται 250 μl θερμής όξινης φαινόλης (1 όγκος φαινόλης, 1 όγκος οξικού νατρίου 50 mM pH 4.0) και ακολουθεί έντονη ανάδευση. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται ακόμα μία φορά. Το

υπερκεείμενο συλλέγεται σε νέο erppendorf, προστίθεται σε αυτό ίσος όγκος χλωροφορμίου και φυγοκεντρείται στα 20000 g για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η ανώτερη υδατική φάση συλλέγεται και το RNA τελικά κατακρημνίζεται με προσθήκη 1/10 του όγκου 3M οξικό νάτριο pH 5.2 και διπλάσιο όγκο αιθανόλης 100%. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 20000 g για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου το RNA (με τη μορφή ιζήματος) εκπλένεται με προσθήκη 1 ml αιθανόλης 70% (v/v) και μετά από φυγοκέντρηση στα 20000 g για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και εξάτμιση του διαλύτη το RNA αναδιαλύεται σε αποστειρωμένο ddH₂O και

Η συγκέντρωση του προσδιορίζεται με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 260 nm με βάση τη σχέση: 1 OD₂₆₀=40μg RNA/ml διαλύματος. Η καθαρότητα του RNA ελέγχεται από το λόγο OD₂₆₀/ OD₂₈₀. Καθαρά παρασκευάσματα έχουν τιμή σε αυτό το λόγο ίση με 2. Τέλος το παρασκεύασμα του RNA φυλάσσεται στους -80°C.

2.2.2.2 Σύνθεση του συμπληρωματικού κλώνου DNA (cDNA)

Μετά την απομόνωση ολικού RNA από προμαστιγωτές μορφές *L. donovani* πραγματοποιείται η σύνθεση του συμπληρωματικού κλώνου DNA (cDNA) με χρήση του κιτ Protoscript MmuLV Taq RT-PCR (New England Biolabs), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Για την πρώτη αντίδραση (συνολικός όγκος 16 μl) χρησιμοποιούνται τα παρακάτω

- Ολικό RNA 5 μl (250 ng)
- Εκκινητής dT23VN 2 μl
- Μίγμα dNTPs 4 μl
- H₂O απαλλαγμένο από νουκλεάσες 8 μl

Το παραπάνω μίγμα θερμαίνεται στους 70°C για 5 λεπτά και ακολούθως τοποθετείται στον πάγο. Στο παραπάνω μίγμα προστίθενται τα παρακάτω αντιδραστήρια (τελικός όγκος 20 μl).

- Ρυθμιστικό διάλυμα 10X RT Buffer 2 μl
- Αναστολέας RNase 1 μl
- M-MuLV ανάστροφη μεταγραφάση 1 μl
- H₂O απαλλαγμένο από νουκλεάσες 0.5 μl

Το νέο μίγμα επωάζεται στους 42°C για 1 ώρα και στη συνέχεια το ένζυμο απενεργοποιείται στους 80°C για 5 λεπτά. Ο τελικός συνολικός όγκος είναι 50 μl με την προσθήκη ddH₂O.

2.2.2.3 Υπολογισμός επιπέδων μεταγράφων του γονιδίου *LdMAcP* σε προμαστιγωτά παράσιτα *L. donovani*

Η υπερέκφραση της *LdMAcP* στις προμαστιγωτές μορφές διαγονιδιακών *L. donovani* (*L. donovani*-*rLdMAcP*-mRFP1) σε σύγκριση με τα παράσιτα αγρίου τύπου στατικής φάσης υπολογίζεται από τα σχετικά επίπεδα των μεταγράφων του γονιδίου και σε σύγκριση με το γονίδιο αναφοράς, με την τεχνική qPCR. Η συγκεκριμένη τεχνική αποτελεί ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο για την ποσοτικοποίηση των επιπέδων του mRNA σε βιολογικά δείγματα. Τα πλεονεκτήματά της έναντι των συμβατικών μεθόδων μέτρησης RNA είναι η ευαισθησία της, το μεγάλος εύρος εφαρμογών της και η δυνατότητα για ταχεία, μεγάλης κλίμακας και ακριβούς ποσοτικοποίηση [174]. Ως γονίδιο αναφοράς επιλέχθηκε το glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GADPH, LinJ.36.2480).

Το cDNA (βλ. Παράγραφο 2.2.2.2) χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για τις αντιδράσεις qPCR στη συσκευή Exicycler 96 (BioNEER). Παρακάτω (Πίνακας 4) αναφέρονται τα ζεύγη των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις της qPCR.

Πίνακας 4 Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις qPCR

<i>LdMAcP</i> (F)	5' ATA GCT ACG TGT TGG TCT GC 3'
<i>LdMAcP</i> (R)	5' ATA CAC GCG AAA TGC ATG AAG G 3'
GADPH (F)	5' GGG GCA CTT GTT GTG AAT G 3'
GADPH (R)	5' TGC TCC TGC TTC AAT GTG C 3'

Οι διαφορές στα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη συγκριτική μέθοδο *Ct* [175]. Η τιμή *Ct* αντιπροσωπεύει τον αριθμό κύκλων PCR που απαιτούνται ώστε ο φθορισμός του προϊόντος να ξεπεράσει την τιμή που έχει οριστεί ως «θόρυβος» του μηχανήματος. Στη συνέχεια η γονιδιακή έκφραση για τα 2 δείγματα υπολογίζεται με βάση την παρακάτω εξίσωση:

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = [(Ct \text{ γονίδιο ενδιαφέροντος} - Ct \text{ γονίδιο ελέγχου}) \text{ rLdMAcP-mRFP1} - (Ct \text{ γονίδιο ενδιαφέροντος} - Ct \text{ γονίδιο ελέγχου}) \text{ αγρίου τύπου}]$$

2.2.3 Κυτταροκαλλιέργειες

2.2.3.1 Παράσιτα

Οι προμαστιγωτές μορφές *L. donovani*, *L. infantum* και *L. major* καλλιεργούνται στους 25°C απουσία CO₂, σε θρεπτικό υλικό RPMI 1640 (Life Technologies), εμπλουτισμένο με 10% (v/v) FBS (ορός από έμβρυο μόσχου απενεργοποιημένος για 30 λεπτά στους 56°C), 40 mM Hepes (Gibco) και αντιβιοτικά (0.1 mg/ml στρεπτομυκίνη, 1 U/ml πενικιλίνη). Τα μη παθογόνα παράσιτα *L. tarentolae* καλλιεργούνται στους 25°C απουσία CO₂, σε θρεπτικό υλικό brain heart infusion (Lexsy Broth BHI, Jena Biosciences) που περιέχει αιμίνη (5 μg/ml, Bovine Hemin Chloride, Sigma).

Για την ανακαλλιέργεια των προμαστιγωτών μορφών χρησιμοποιούνται 10⁶ παράσιτα/ ml και ο αριθμός των παρασίτων στην στατική φάση ανάπτυξης (6^η-7^η ημέρα καλλιέργειας) είναι περίπου 2-2,5x10⁷ παράσιτα/ ml. Η περισυλλογή των παρασίτων γίνεται με φυγοκέντρηση (1000 g για 7 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου).

Τα ανασυνδυασμένα παράσιτα *L. donovani*-Lexsy-sat, *L. donovani*-mRFP1 και *L. donovani*-rLdMACP-mRFP1 καλλιεργούνται σε συνθήκες όμοιες με τα παράσιτα αγρίου τύπου με την προσθήκη του αντιβιοτικού επιλογής Nourseothricin (100 μg/ml).

Για τη διατήρηση των διαφόρων στελεχών *Leishmania* (~10⁷ κύτταρα) για μικρό χρονικό διάστημα, τα παράσιτα φυλάσσονται στους -80°C σε ειδικούς κρυοπροστατευτικούς σωλήνες των 1,5 ml σε RPMI/ 20%v/v FBS/ 10%v/v DMSO. Η διατήρησή τους για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα απαιτεί τη μεταφορά τους σε δοχείο που περιέχει υγρό άζωτο.

2.2.3.2 Ανώτερα ενκαρυωτικά κύτταρα

Τα καρκινικά κύτταρα κοιλικού επιθηλίου HeLa καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό DMEM (Biosera) εμπλουτισμένο με 10%v/v FBS και αντιβιοτικά (0.1 mg/ml στρεπτομυκίνη, 1 U/ml πενικιλίνη). Ως διάλυμα έκπλυσης των κυττάρων χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS) pH 7,4. Για την αποκόλληση των κυττάρων από το ειδικό πλαστικό σκεύος της κυτταροκαλλιέργειας (φλάσκα), χρησιμοποιείται διάλυμα Versene [PBS/ 0,1 mM EDTA (0,02% w/v)] που δεσμεύει τα δισθενή κατιόντα Ca²⁺, Mg²⁺ τα οποία βοηθούν τα κύτταρα να παραμένουν συνδεδεμένα στη φλάσκα.

Τα μακροφάγα των σειρών J774 και RAW264.7 καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό RPMI εμπλουτισμένο με 10%v/v FBS, 40 mM Hepes και αντιβιοτικά (0.1 mg/ml στρεπτομυκίνη, 1 U/ml πενικιλίνη). Η μόνιμα επιμολυσμένη κυτταρική σειρά RAW-PX-GFP [176] καλλιεργείται σε θρεπτικό υλικό DMEM εμπλουτισμένο όπως τα παραπάνω, παρουσία του αντιβιοτικού Geneticin (G418, 0.5 mg/ml) [176].

Όλες οι κυτταρικές σειρές μακροφάγων επωάζονται σε επωαστικό κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 37°C, σε ατμόσφαιρα 5% CO₂.

Για τον εμβολιασμό της καλλιέργειας μακροφάγων χρησιμοποιούνται 4x10⁵ μακροφάγα/ ml. Ο αριθμός των μακροφάγων στη στατική φάση ανάπτυξης είναι περίπου 2x10⁶ μακροφάγα/ ml.

Όλες οι σειρές των ανώτερων ευκαρυωτικών κυττάρων διατηρούνται σε 90% v/v FBS/ 10%v/v DMSO για μικρό χρονικό διάστημα στους -80°C και για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε δοχείο που περιέχει υγρό άζωτο.

2.2.4 Επιμολύνσεις της *Leishmania* με πλασμίδια/ Ηλεκτροδιάτρηση παρασίτων

Η επιμόλυνση προμαστιγωτών *L. donovani* (στέλεχος LG13) και *L. tarentolae* (στέλεχος Parrot, Jena biosciences) με ανασυνδυασμένο κυκλικό πλασμίδιο (επισωμική έκφραση) πραγματοποιείται με ηλεκτροδιάτρηση [177, 178] ως εξής: Συλλέγονται παράσιτα που βρίσκονται στο τέλος της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης (2x10⁷ παράσιτα/ ml). Ακολουθεί η πλύση τους με 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροδιάτρησης [21 mM Hepes (pH 7,5), 0,7 mM Na₂HPO₄, 137 mM NaCl, 6 mM γλυκόζη, 5 mM KCl], επώαση στον πάγο για 10 λεπτά και επαναδιάλυση σε 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος. Λαμβάνονται 400 μl τα οποία αναμιγνύονται με το πλασμιδιακό DNA (20-50 μg) και τοποθετούνται στην κυψελίδα ηλεκτροδιάτρησης 0,2 cm. Η συσκευή ηλεκτροδιάτρησης GENE PULSER ρυθμίζεται στα 5 0 μF και 0,45 KV και η συσκευή PULSE CONTROLLER στα 0 Ωhm. Ακολούθως, η κυψελίδα τοποθετείται στο θάλαμο ηλεκτροδιάτρησης και εφαρμόζεται στα άκρα της τάση με την ενεργοποίηση της συσκευής που παράγει τον ηλεκτρικό παλμό. Για να είναι επιτυχής ο μετασχηματισμός των παρασίτων, ο ηλεκτρικός παλμός πρέπει να παρουσιάζει χρόνο εκπόλωσης 4-5 msec. Αμέσως μετά η κυψελίδα τοποθετείται στον πάγο αυστηρά για 10 λεπτά. Τελικά, τα παράσιτα τοποθετούνται σε 10 ml θρεπτικού υλικού RPMI/ 20% v/v FBS (*L. donovani*) ή brain heart infusion (BHI) και αιμίνη (*L. tarentolae*) και επωάζονται στους 25°C για 24

ώρες. Την επόμενη μέρα, στην καλλιέργεια των παρασίτων προστίθεται το αντιβιοτικό Nourseothricin, η συγκέντρωση του οποίου αυξάνεται προοδευτικά μέχρι τα 100 µg/ml.

2.2.5 Επιμόλυνση κυττάρων θηλαστικού

Η επιμόλυνση των κυττάρων θηλαστικού πραγματοποιείται με τη μέθοδο μέσω λιποσωμάτων χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο λιποφεκταμίνη (Lipofectamin Plus[®], Invitrogen), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η μέθοδος στηρίζεται στο ότι η βασική δομή των κατιονικών λιποσωμάτων αποτελείται από μία θετικά φορτισμένη κεφαλή η οποία αλληλεπιδρά με τη φωσφορική ομάδα του νουκλεϊκού οξέος (πλασμίδιο) και δύο αλυσίδες υδρογονανθράκων. Το θετικό επιφανειακό φορτίο των λιποσωμάτων βοηθά στην αλληλεπίδραση του νουκλεϊκού οξέος με τη κυτταρική μεμβράνη, επιτρέποντας τη σύντηξη λιποσώματος/ νουκλεϊκού οξέος (σύμπλοκο DNA-λιποφεκταμίνης) με την αρνητικά φορτισμένη κυτταρική μεμβράνη. Το σύμπλοκο επιμόλυνσης πιθανόν εισέρχεται στο κύτταρο μέσω ενδοκυττάρωσης. Παρακάτω (Πίνακας 5) παρουσιάζονται τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την επιμόλυνση των ευκαρυωτικών κυττάρων.

Πίνακας 5 Αντιδραστήρια επιμόλυνσης ευκαρυωτικών κυττάρων

Συστατικά	Ανά φρεάτιο Τρυβλίου 6 φρεατίων
Κύτταρα	1×10 ⁶
Θρεπτικό υλικό χωρίς FBS	500 µl
DNA	1-3 µg
Αντιδραστήριο Plus	6 µl
Λιποφεκταμίνη	4 µl

Οι πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν για την επιμόλυνση κυττάρων θηλαστικών ήταν:

A. για τη μελέτη της Μεμβρανικής Όξινης Φωσφατάσης Ιστιδίνης του παρασίτου *L.donovani* (*LdMAcP*) οι: pTriEx1,1-*LdMAcP*-His και pDisplay-mcherry (ευγενική χορηγία της Δρ. Isabelle Tardieux, Institut Cochin, Paris, France)

B. για τη μελέτη της χωροχρονικής κατανομής των PIs στη μεμβράνη του παρασιτοφόρου φαγοσώματος του μακροφάγου κατά την αρχική φάση της μόλυνσης οι: pEGFP-C1 PLC-PH, pEYFP Btk-PH, pEYFP LAMP1 [(ευγενική χορηγία της Δρ.

Katarzyna Kwiatkowska (Nencki Institute of Exptl. Biology, Warsaw) και του Δρ. Javier Pizzaro Cedra (Institut Pasteur Paris)].

2.2.6 Μικροσκοπία φθορισμού

2.2.6.1 Μονιμοποίηση κυττάρων και πρωτόκολλα ανοσοφθορισμού

Ο έμμεσος ανοσοφθορισμός χρησιμοποιείται για την παρατήρηση της υποκυτταρικής κατανομής βιομορίων αρχικά με τη σήμανσή τους με ειδικά αντισώματα και ακολούθως, με δεύτερα αντισώματα συζευγμένα με φθορίζουσες χρωστικές. Τα δείγματα για την εφαρμογή του έμμεσου ανοσοφθορισμού προετοιμάζονται ως εξής:

A. Παράσιτα

Τα παράσιτα ($\sim 1 \times 10^7$) φυγοκεντρώνονται στις 1000 g για 7 λεπτά και ξεπλένονται με παγωμένο PBS. Στη συνέχεια μονιμοποιούνται με 2% (w/v) παραφορμαλδεύδη σε PBS 1X (20 λεπτά, θερμοκρασία δωματίου). Τα μονιμοποιημένα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση και επαναδιαλύονται σε 3 όγκους PBS 1X (σε σχέση με τον όγκο του αρχικού δείγματος) και επιστρώνονται 100 μ l εναιωρήματος παρασίτων ανά καλυπτρίδα (οι καλυπτρίδες είναι επεξεργασμένες με 1 mg/ml poly-L-lysine). Μετά από επώαση 16 ωρών σε θερμοκρασία δωματίου και εξασφαλίζοντας τη μη ξήρανση του δείγματος, τα κύτταρα που δεν προσκολλήθηκαν απομακρύνονται με έκπλυση με PBS. Στη συνέχεια, τα προσκολλημένα κύτταρα εκπλένονται για 10 λεπτά σε 50 mM NH_4Cl σε PBS 1X, για την εξουδετέρωση της παραφορμαλδεύδης, και ακολουθεί επώαση με το πρώτο αντίσωμα για 1 ώρα σε PBS που περιέχει 1 mg/ml BSA (για την κάλυψη των μη ειδικών θέσεων σύνδεσης), +/- 0,1% Triton X-100. Το αντίσωμα που δεν έχει δεσμευθεί, απομακρύνεται με έκπλυση της καλυπτρίδας σε διάλυμα PBS 1X 3 φορές. Τέλος, προστίθεται το δεύτερο αντίσωμα σημασμένο με φθορίζουσα ουσία (Alexa Fluor® 546, Alexa Fluor® 488, Alexa Fluor® 633) σε συγκέντρωση 2 μ g/ml για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Το DNA του πυρήνα και του κινητοπλάστη σημαίνεται με 10 μ g/ml προπιδίου του ιωδίου (PI) παρουσία 100 μ g/ml RNάσης A.

Οι καλυπτρίδες εκπλένονται και τελικά μοντάρονται με Mowiol 4-88 [10% (w/v) Mowiol-Calbiochem, 25% (v/v) glycerol, 100 mM Tris-HCl, pH 8.5] σε αντικειμενοφόρες πλάκες.

B. Ανώτερα ευκαρυωτικά κύτταρα

Τα κύτταρα εκπλένονται αρχικά με PBS 1X και στη συνέχεια με PBS 1X που περιέχει Ca^{2+} και Mg^{2+} . Στη συνέχεια, μονιμοποιούνται με 4% (w/v) παραφορμαλδεύδη, εφαρμόζεται η εξουδετέρωση της παραφορμαλδεύδης και τα κύτταρα επώάζονται με τα πρώτα και τα δεύτερα αντισώματα όπως και παραπάνω.

Γ. Σήμανση επιφανειακών επιτόπων σε ζωντανά κύτταρα

Για τη σήμανση επιφανειακών επιτόπων που βρίσκονται στη εξωτερική μεμβράνη των ζωντανών κυττάρων, κύτταρα *Leishmania* αγρίου τύπου (στέλεχος LG13) και θηλαστικών (HeLa) τα οποία εκφράζουν τη χιμαιρική rLdMAcP-His πρωτεΐνη, ξεπλένονται 1 φορά με PBS 1X και στη συνέχεια επώάζονται με το πρώτο αντίσωμα (πολυκλωνικό α-LdMAcP αντίσωμα ποντικού, αραίωση 1:50 σε PBS και 1 mg/ml BSA) για 20 λεπτά στους 4°C . Ακολούθως, τα κύτταρα μονιμοποιούνται, εξουδετερώνεται η παραφορμαλδεύδη και σημαίνονται με τις φθορίζουσες χρωστικές όπως προηγούμενως.

Στην παρούσα εργασία, η παρατήρηση των κυττάρων και η λήψη των ψηφιακών εικόνων φθορισμού έγινε με το συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού Leica TCS SP.

2.2.7 *In vitro* μελέτη της χωροχρονικής κατανομής μορίων-δεικτών της ωρίμανσης του φαγοσώματος και συγκεκριμένων ειδών PIs

Η χωροχρονική κατανομή συγκεκριμένων μορίων-δεικτών της ωρίμανσης του φαγοσώματος και ειδών PIs στη μεμβράνη των παρασιτοφόρων φαγοσωμάτων ελέγχεται με ανοσοφθορισμό και συνεστιακή μικροσκοπία σε μονιμοποιημένα δείγματα.

Συνοπτικά, η μέθοδος περιγράφεται ως εξής: Κύτταρα RAW264.7 επιστρώνονται σε πλάκα 12 φρεατίων (12 well plate) ($\sim 4\text{-}6 \times 10^5$ / φρεάτιο) στην οποία έχουν προηγούμενως τοποθετηθεί καλυπτρίδες διαμέτρου 13-mm (1 καλυπτρίδα/ φρεάτιο). Την επόμενη μέρα τα κύτταρα επιμολύνονται με τα επιθυμητά πλασμίδια με τη μέθοδο των λιποσωμάτων (βλ. Μέθοδοι Παράγραφος 2.2.5) ώστε να εκφράζουν παροδικά περιοχές πρόσδεσης με συγκεκριμένα είδη PIs ή άλλα μόρια ως χιμαιρικές με φθορίζουσες πρωτεΐνες (GFP, YFP). Επίσης, στο πλαίσιο αυτών των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε και η μόνιμα επιμολυσμένη κυτταρική σειρά (RAW-PX GFP).

Είκοσι-τέσσερις ώρες μετά, προμαστιγωτά παράσιτα *L. donovani* στατικής φάσης (*L. donovani*-mRFP1 και *L. donovani*-GFP) ενοφθαλμίζονται στην πλάκα (αναλογία 20:1,

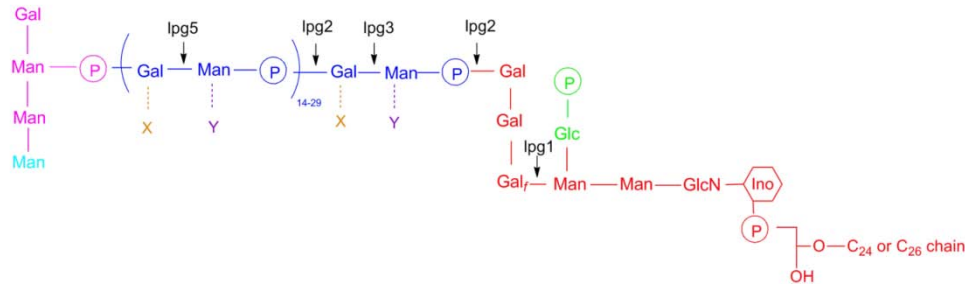
παράσιτα/ μακροφάγο), και το σύστημα αφήνεται στον πάγο για 30-45 λεπτά. Στο διάστημα αυτό, τα παράσιτα προσκολλώνται στην εξωτερική μεμβράνη των μακροφάγων χωρίς να φαγοκυτταρώνονται καθώς η φαγοκυττάρωση αναστέλλεται στους 4°C [179]. Στη συνέχεια, με σχολαστικές πλύσεις με παγωμένο PBS 1X, απομακρύνονται όσα παράσιτα δεν έχουν προσκολληθεί ισχυρά πάνω στα μακροφάγα και στο σύστημα προστίθεται ήδη προθερμασμένο υλικό κυτταροκαλλιέργειας και μεταφέρεται στους 37°C (παρουσία 5% CO₂). Η θερμοκρασία αυτή επιτρέπει τη συγχρονισμένη έναρξη του φαινομένου της φαγοκυττάρωσης η οποία διακόπτεται 5, 15 30, 60, 120 και 180 λεπτά αργότερα με μονιμοποίηση με παραφορμαδεύδη (4% w/v) (βλ. Μέθοδοι Παράγραφος 2.2.6.1).

Παράλληλα, ως ουδέτερος μάρτυρας, μελετήθηκε η φαγοκυττάρωση αδρανών σφαιριδίων latex (3 μm) (Polysciences, Inc.) τα οποία έχουν οψονοποιηθεί (στους 37°C για 30 λεπτά) με ορό ανοσοποιημένου ποντικού έναντι ολικών πρωτεϊνών από *L. donovani* (στέλεχος LG13, βλ. Μέθοδοι Παράγραφος 2.2.11.3).

2.2.7.1 Μελέτη του ρόλου της λιποφωσφογλυκάνης (LPG) παρασίτου *L. donovani* στη χωροχρονική κατανομή συγκεκριμένων ειδών PIs

Η λιποφωσφογλυκάνη (LPG) (Εικόνα 2.1), αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος του εξωτερικού προστατευτικού γλυκοκάλυκα των προμαστιγωτών μορφών της *Leishmania* και έχει μελετηθεί εκτενώς ως ένα σημαντικός μολυσματικός παράγοντας του παρασίτου [104, 180] (βλ. Εισαγωγή Παράγραφος 1.8.1).

Με σκοπό να ελεγχθεί η πιθανή εμπλοκή της LPG στη χωροχρονική κατανομή των PIs πραγματοποιήθηκε ανάλογη μελέτη με παραπάνω (βλ. Μέθοδοι Παράγραφος 2.2.7). Συνοπτικά, πραγματοποιήθηκε φαγοκυττάρωση από μακροφάγα της κυτταρικής σειράς RAW264.7 αδρανών σφαιριδίων latex τα οποία είχαν προηγουμένως οψονοποιηθεί (37°C για 30 λεπτά) με ορό ποντικού ή με καθαρισμένη LPG (25 μg/ 10⁹ σφαιρίδια) από το παράσιτο *L. donovani* (ευγενική χορηγία του Dr S. Turco, University of Kentucky, Lexington, KY, USA). Ακολούθως, μελετήθηκε η χωροχρονική κατανομή των PtdIns(4.5)₂ και PtdIns(3.4.5)P₃ για 5, 15 & 30 λεπτά και του PI3P για 30, 60 & 120 λεπτά από την έναρξη της συγχρονισμένης φαγοκυττάρωσης, σε μονιμοποιημένα δείγματα με συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού.



Εικόνα 2.1 Η δομή της LPG των παρασίτων *L. donovani* [104].

2.2.8 *In vitro* μελέτη φαγοκυττάρωσης παρασίτων στην κυτταρική σειρά μακροφάγων J774

2.2.8.1 *In vivo* ενίσχυση της μολυσματικότητας παρασίτων *L. donovani* (αγρίου τύπου και διαγονιδιακών)

Η μακροχρόνια παραμονή και οι πολλαπλές ανακαλλιέργειες των προμαστιγωτών μορφών του παρασίτου *Leishmania* (αγρίου τύπου και διαγονιδιακών) *in vitro* οδηγεί σε μείωση της μολυσματικότητάς τους [181]. Η διατήρηση ή και ενίσχυση της μολυσματικότητας των πληθυσμών αυτών επιτυγχάνεται με ενοφθαλμισμό τους σε πειραματικά πρότυπα ποντικών BALB/c και ανάκτηση στη συνέχεια των μολυσματικών παρασίτων που έχουν επιβιώσει και πολλαπλασιαστεί ως αμαστιγωτά εντός των μακροφάγων του θηλαστικού ξενιστή [182].

Συνοπτικά, σε ποντίκια BALB/c (ηλικίας 4-6 εβδομάδων) εφαρμόζεται ενδοπεριτοναϊκή άπαξ έγχυση διαλύματος PBS 1X (200 μ l) στο οποίο περιέχονται 1×10^7 προμαστιγωτά παράσιτα στατικής φάσης (αγρίου τύπου και διαγονιδιακά). Παράλληλα, σε ποντίκια ελέγχου γίνεται αντίστοιχη έγχυση μόνο με διάλυμα PBS 1X. Η μόλυνση διακόπτεται στις 20-25 ημέρες (τέλος οξείας φάσης της νόσου και μεταπήδηση στη χρόνια), οπότε και τα ποντίκια θυσιάζονται, λαμβάνονται ο σπλήνας και το ήπαρ και μετά από ήπια σύνθλιψη των οργάνων απελευθερώνονται τα αμαστιγωτά παράσιτα. Τα απελευθερούμενα αμαστιγωτά παράσιτα τοποθετούνται σε υλικό καλλιέργειας Schneider's insect medium (Bio Sera) με 20% (v/v) FBS στους 25°C. Στην περίπτωση των διαγονιδιακών παρασίτων *L. donovani*-sat-mRFP1 & *L. donovani*-sat-rLdMAcP-mRFP1, προστίθεται επιπλέον και το αντιβιοτικό Nourseothicin (100 μ g/ml, βλ. Μέθοδοι Παράγραφος 2.2.3.1). Μετά από περίπου 7 ημέρες ολοκληρώνεται η μεταμόρφωση των

αμαστιγωτών στις προμαστιγωτές μορφές οι οποίες χρησιμοποιούνται στη συνέχεια στις *in vitro* δοκιμασίες επιβίωσης και μολυσματικότητας.

Όλοι οι χειρισμοί των ζωικών προτύπων είχαν έγκριση από την Επιτροπή Βιοηθικής του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ ακολουθώντας την οδηγία της Ε.Ε. 2010/63 και το Νόμο 2013/56.

2.2.8.2 Μελέτη μολυσματικής ικανότητας των παρασίτων μετά από *in vitro* μόλυνση μακροφάγων διάρκειας 24- 72 ωρών (phagocytosis assay)

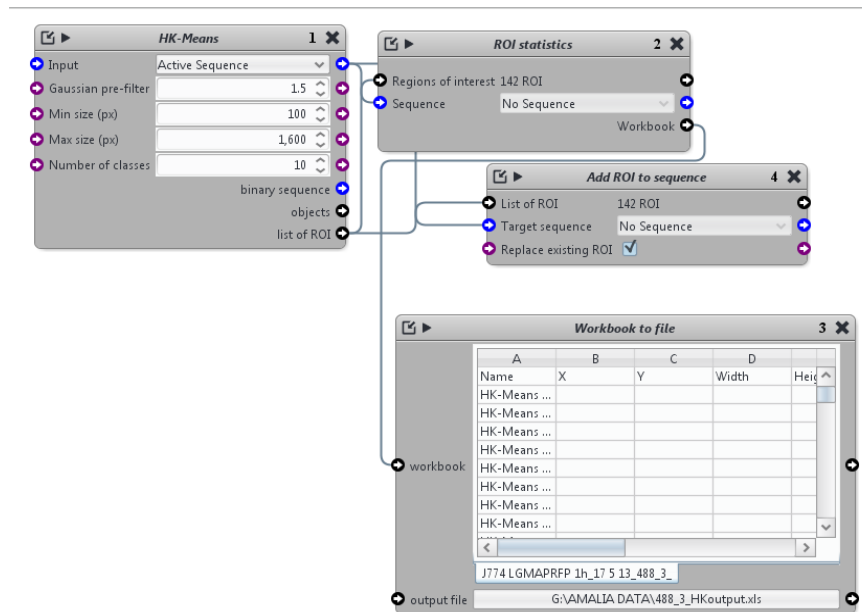
Η μολυσματική ικανότητα των διαγονιδιακών πληθυσμών του παρασίτου *L. donovani* (στέλεχος LG13) (Lexsy-sat & rLdMAcP-mRFP1) ενισχυμένης μολυσματικότητας (βλ. Μέθοδοι Παράγραφος 2.2.8.1) ελέγχθηκε με έμμεσο ανοσοφθορισμό και συνεστιακή μικροσκοπία σε μονιμοποιημένα δείγματα. Οι ποσοτικές μετρήσεις στις ψηφιακές εικόνες (τομές πάχους 1 μm / εικόνα) συνεστιακής μικροσκοπίας έγιναν με ανάλυση με τον αλγόριθμο Icy (digital image analysis software) [183] και ο υπολογισμός του δείκτη μολυσματικότητας και λοιμογόνου ικανότητας έγινε σύμφωνα με προηγούμενη βιβλιογραφία [160], ως εξής:

$$\text{Δείκτης μολυσματικότητας (\%)} = \text{Αρ. μολυσμένων μακροφάγων} / \text{Αρ. όλων των μακροφάγων} \times 100$$

$$\text{Δείκτης λοιμογόνου ικανότητας} = \text{Αρ. φαγοκυτταρωμένων παρασίτων} \times \text{Αρ. μολυσμένων μακροφάγων} / \text{Αρ. όλων των μακροφάγων}$$

Συνοπτικά, η μέθοδος περιγράφεται ως εξής: Κύτταρα J774 επιστρώνονται σε πλάκα 12 φρεατίων (12 well plate) ($\sim 2.5 \times 10^5$ / φρεάτιο) στο οποίο έχουν προηγουμένως τοποθετηθεί καλυπτρίδες διαμέτρου 10-mm (1 καλυπτρίδα/ φρεάτιο). Προμαστιγωτές μορφές του παρασίτου *L. donovani* (Lexsy-sat & rLdMAcP-mRFP1) στατικής φάσης προστίθενται στην πλάκα (αναλογία 20:1, παράσιτα/ μακροφάγο) και το σύστημα αφήνεται στους 37°C (5% CO₂) για 1 ώρα, οπότε και λαμβάνει χώρα αυθόρμητη φαγοκυττάρωση. Ακολουθεί σχολαστική έπλυση των μακροφάγων με PBS 1X ώστε να απομακρυνθούν όσα παράσιτα δεν έχουν εισέλθει στα μακροφάγα και προσθήκη φρέσκου υλικού καλλιέργειας για να ακολουθήσει επιπλέον επώαση στους 37°C για 3, 24 και 48 ώρες. Στο τέλος της εκάστοτε περιόδου επώασης, η φαγοκυττάρωση διακόπτεται με

μονιμοποίηση των κυττάρων με διάλυμα 4% (w/v) παραφορμαλδεύδης και ακολουθεί σήμανση των παρασίτων με ανοσοφθορισμό (βλ. Μέθοδοι Παράγραφος 2.2.6).



Εικόνα 2.2 Σχηματική απεικόνιση του πρωτοκόλλου επεξεργασίας των εικόνων συνεστιακής μικροσκοπίας (max projections) με τον αλγόριθμο Icy, για την αυτοματοποιημένη καταμέτρηση των παρασίτων με βάση το μέγεθος και το είδος σήμανσής τους.

Συγκεκριμένα, τα παράσιτα που παραμένουν εξωκυττάρια ή προσκολλημένα στην επιφάνεια των μακροφάγων επωάζονται με ορό ποντικού a-LG13 (αραίωση 1:250) χωρίς την παρουσία TritonX-100 και ακολούθως, σημαίνονται με κόκκινο φθορισμό με το anti-mouse αντίσωμα Alexa Fluor® 546. Στη συνέχεια, μετά από επανάληψη του σταδίου μονιμοποίησης με παραφορμαλδεύδη και επώαση με τον a-LG13 ορό (αραίωση 1:250) με παρουσία TritonX-100, όλα τα παράσιτα (φαγοκυταρωμένα ή μη) σημαίνονται με πράσινο φθορισμό με το a-mouse αντίσωμα Alexa Fluor® 488. Συνεπώς τα εξωκυττάρια παράσιτα παρουσιάζονται «κόκκινα» και «πράσινα» ενώ τα ενδοκυττάρια μόνο «πράσινα». Η καταμέτρηση των παρασίτων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του αλγόριθμου Icy, αξιοποιώντας το max projection των ληφθέντων εικόνων το οποίο περιλαμβάνει τα παράσιτα από όλο το πάχος του δείγματος σε κάθε πεδίο (πρωτόκολλο αυτοματοποιημένης καταμέτρησης, Εικόνα 2.2). Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε οπτική καταμέτρηση του αριθμού των μακροφάγων ανά οπτικό πεδίο από τις αντίστοιχες εικόνες αντίθεσης φάσης (>500 μακροφάγα ανά περίπτωση). Με βάση τις τιμές που

συγκεντρώθηκαν από 3 ανεξάρτητα πειράματα υπολογίστηκε ο δείκτης μολυσματικότητας και λοιμογόνου ικανότητας των παρασιτικών πληθυσμών.

2.2.9 Κυτταρομετρία ροής (FACS)

Η κυτταρομετρία ροής (FACS) αποτελεί ένα εργαλείο πολυπαραμετρικής ανάλυσης του φαινοτύπου και των ιδιοτήτων του κυττάρου, μέσω της αξιοποίησης των ιδιοτήτων σκεδασμού του φωτός και της εκπομπής φθορισμού από τα κύτταρα που αναλύονται. Ο φθορισμός αυτός οφείλεται σε φθορίζουσες ουσίες που είτε συνδέονται απευθείας στα συστατικά του κυττάρου (DNA, RNA, μεμβράνες, κλπ), είτε σε αντισώματα έναντι μορίων που βρίσκονται στην επιφάνεια του κυττάρου ή στο εσωτερικό του. Η μέθοδος προσδιορίζει την πυκνότητα κάθε δείκτη ανά μονάδα κυτταρικής επιφάνειας με βάση την ένταση του φθορισμού και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των κυττάρων [πρόσθιος σκεδασμός FSC-μέγεθος κυττάρων και πλάγιος σκεδασμός SSC-εσωτερική πολυπλοκότητα (κοκκία, οργανίδια) του κυττάρου]. Όλες αυτές οι μετρήσεις των διαφόρων παραμέτρων πραγματοποιούνται ταυτόχρονα για κάθε κύτταρο, καθιστώντας έτσι δυνατή την ανίχνευση ενός ομογενούς πληθυσμού κυττάρων μέσα σε έναν ετερογενή [184].

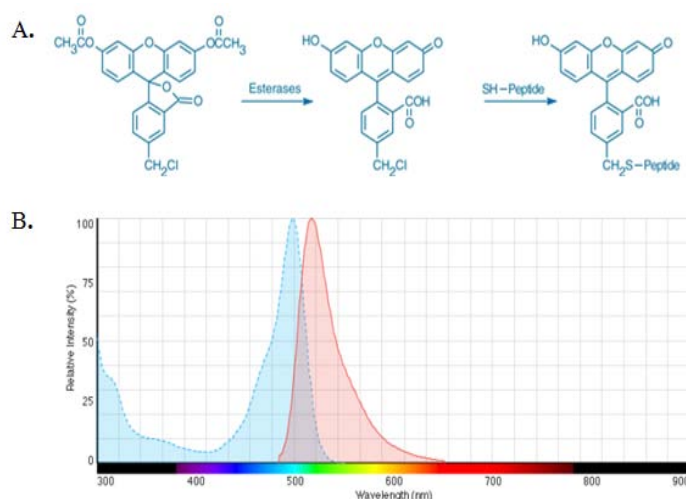
Η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία για τη μελέτη επιβίωσης προμαστιγωτών μορφών *Leishmania* μετά από *in vitro* μόλυνση μακροφάγων με τη βοήθεια του κυτταρομετρητή ροής (Becton Dickinson FACSCalibur). Η ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος CellQuest (BD Biosciences).

2.2.9.1 Μελέτη επιβίωσης των προμαστιγωτών μορφών *Leishmania* μετά από *in vitro* μόλυνση μακροφάγων (survival assay)

Η ικανότητα των προμαστιγωτών μορφών της *L. donovani* στατικής φάσης και ενισχυμένης μολυσματικότητας να επιβιώνουν μέσα στη μονοκυτταρική σειρά μακροφάγων J774 για 24 και 72 ώρες μετά την έναρξη της μόλυνσης, ελέγχεται *in vitro* με τη χρήση του αντιδραστηρίου Cell Tracker Green (CMFDA, Molecular Probes®) και FACS. Το CMTFDA διαπερνά ελεύθερα τη μεμβράνη των κυττάρων και από τη στιγμή της εισόδου του μετατρέπεται σε προϊόν που δεσμεύεται μέσα στο κύτταρο. Η ιδιότητα του CMTFDA να μετατρέπεται από ένα άχρωμο προϊόν σε φθορίζον (απορρόφηση 492 nm, εκπομπή 517 nm), οφείλεται στη δράση των κυτταροπλασματικών εστερασών ενός

μεταβολικά ενεργού κυττάρου οι οποίες απομακρύνουν τις ομάδες του οξικού οξέος από το μόριό του (Εικόνα 2.3). Το γεγονός αυτό το καθιστά χρήσιμο εργαλείο για τον αξιόπιστο προσδιορισμό του πληθυσμού των ζωντανών παρασίτων σε σχέση με αυτόν των αποπτωτικών/ νεκρών. Ο διαχωρισμός των πληθυσμών πραγματοποιήθηκε μετά από πειράματα ελέγχου κατά τα οποία προμαστιγωτά παράσιτα *L. donovani* στατικής φάσης επώαστηκαν με 4 mM H₂O₂ σε PBS 1X για 12 ώρες [185] και εν συνεχεία, σημάνθηκαν με CMFDA.

Μετά τη συλλογή των δεδομένων της κυτταρομετρίας ροής (συλλογή 10.000-20.0000 παρασίτων/ δείγμα), ακολούθησε η ανάλυση των ιστογραμμάτων μίας παραμέτρου τα οποία παρουσιάζουν την κατανομή των κυττάρων με βάση την ένταση του φθορισμού τους και ο προσδιορισμός δύο διακριτών ομάδων παρασίτων. Της M2 και M3 που περιλαμβάνουν τα λιγότερο μεταβολικά ενεργά κύτταρα (αποπτωτικά/ νεκρά) και τα ζωντανά, αντίστοιχα.



Εικόνα 2.3. Σχηματική αναπαράσταση της ένωσης του CMFDA από την ανενεργή κατάσταση στο τελικό φθορίζον προϊόν **Β**. Διαγραμματική αναπαράσταση του εύρους των φασμάτων απορρόφησης και εκπομπής του CMFDA (πηγή: Molecular Probes).

Η μέθοδος περιγράφεται ως εξής: Μακροφάγα κύτταρα ($\sim 2.5 \times 10^6$) επιστρώνονται σε φλάσκα 25 cm² και προμαστιγωτά παράσιτα *L. donovani* στατικής φάσης προσθέτονται σε αναλογία 20:1 (παράσιτα/ μακροφάγο). Το σύστημα παραμένει στους 37°C (5% CO₂) για 1 ώρα οπότε λαμβάνει χώρα αυθόρμητη φαγοκυττάρωση των παρασίτων. Ακολούθως, η διαδικασία ανακόπτεται με σχολαστική έπλυση των μακροφάγων με PBS 1X για την απομάκρυνση όσων παρασίτων δεν έχουν εισέλθει σε αυτά. Στη συνέχεια, προσθέεται φρέσκο υλικό και ακολουθεί επώαση στους 37°C για επιπλέον 24 και 72 ώρες. Στο τέλος

της εκάστοτε περιόδου επώασης πραγματοποιείται θραύση των μακροφάγων με προσθήκη 0,01% (w/v) SDS σε PBS 1X (30 λεπτά, θερμοκρασία δωματίου). Στο διάστημα αυτό τα μακροφάγα λύνονται, ενώ τα παράσιτα που απελευθερώνονται παραμένουν ανέπαφα [177]. Στη συνέχεια, τα θραύσματα των μακροφάγων απομακρύνονται με φυγοκέντρηση (250 g για 5 λεπτά) και τα απελευθερωμένα παράσιτα συγκεντρώνονται (2000 g για 10 λεπτά) και επαναδυναλύνονται σε διάλυμα CMFDA (5 μ M σε PBS 1X) για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από μία έκπλυση με PBS 1X, η ενσωμάτωση του αντιδραστηρίου CMFDA και ο φθορισμός από τα παράσιτα ελέγχεται με FACS, όπως περιγράφεται παραπάνω.

2.2.10 Απομόνωση πρωτεϊνών από βακτήρια και ευκαρυωτικά κύτταρα

2.2.10.1 Επαγωγή των βακτηρίων έκφρασης BL21

Η επαγωγή έκφρασης γονιδίων που βρίσκονται κάτω από το έλεγχο το υποκινητή της λακτόζης (lac operator) σε βακτήρια *E.coli* γίνεται με προσθήκη ισοπροπυλο- β -D-1-θειογαλακτοπυρανόζη (IPTG) στο υλικό της καλλιέργειας ως εξής:

Αρχικά, εμβολιάζεται μία αποικία μετασχηματισμένων βακτηρίων σε υγρή καλλιέργεια (100 ml) και ακολουθεί επώαση στους 37°C για 16 ώρες. Στη συνέχεια, εμβολιάζονται 100 ml από την καλλιέργεια του προηγούμενου σταδίου σε 1000 ml θρεπτικού υλικού LB που περιέχει 100 μ g/ml αμικικιλίνη και ακολουθεί επώαση με ανάδευση στους 37°C μέχρι η οπτική πυκνότητα (O.D._{600nm}) της καλλιέργειας να είναι 0,5-0,6. Στο σημείο αυτό γίνεται προσθήκη του επαγωγέα (IPTG) σε τελική συγκέντρωση 0,1-1 mM και επώαση της καλλιέργειας στους 37°C για 1-3 ώρες, ανάλογα με την εκάστοτε πρωτεΐνη. Στο τέλος της επαγωγής, η καλλιέργεια συλλέγεται και φυγοκεντρείται στις 2700 g για 30 λεπτά στους 4°C και απομακρύνεται το υπερκείμενο. Το ίζημα των βακτηρίων μπορεί να φυλαχθεί στους -80°C. Ακολουθεί λύση των βακτηρίων με προσθήκη διαλύματος λύσης (5 ml/ 1 gr ξηρής ουσίας, με ή χωρίς προσθήκη ουρίας). Το βακτηριακό λύμα διαλυτοποιείται επιπλέον με ψύξη/ απόψυξη (3 διαδοχικές επώσεις σε υγρό άζωτο και στους 37°C) και, στη συνέχεια, με υπερήχηση (6-8 εφαρμογές των 30 δευτερολέπτων έως ενός λεπτού στα 100 W με ενδιάμεσα διαστήματα ψύξης στον πάγο 30 δευτερολέπτων έως 1 λεπτού).

Ακολούθως, συλλέγεται το υπερκείμενο που περιέχει το σύνολο των βακτηριακών πρωτεϊνών σε διαλυτή μορφή και ρυθμίζεται το pH στο 8, ενώ το ίζημα που περιέχει τις

μη διαλυτές πρωτεΐνες (σε σωματίδια εγκλεισμού, inclusion bodies) αναδιαλύεται στον ίδιο όγκο που χρησιμοποιήθηκε για την λύση των κυττάρων ώστε να πραγματοποιηθεί ο έλεγχος διαλυτότητας της προς εξέταση πρωτεΐνης.

2.2.10.2 Απομόνωση της rLdMAcPsoI-His από βακτήρια BL21 υπό αποδιατακτικές συνθήκες

Η αλληλουχία 8 επαναλαμβανόμενων καταλοίπων ιστιδίνης στο καρβοξυλικό άκρο της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης rLdMAcPsoI-His επιτρέπει τον καθαρισμό της με χρωματογραφία συγγένειας σε στήλη νικελίου (Ni^{2+} -NTA-ρητίνη). Η ρητίνη περιέχει το χηλικό υποκαταστάτη *N,N*-δικαρβοξυ-μεθυλο-γλυκίνη (*N,N*-bis(carboxymethyl)glycine, NTA). Ο καθαρισμός περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

Προετοιμασία των σφαιριδίων Ni^{2+} -NTA-ρητίνης (1,5 ml διαλύματος στήλης νικελίου, που περιέχει 50% σφαιρίδια) με 18 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων (100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris-Cl, Urea, 10 mM ιμιδαζόλιο pH 8, βλ. Παράγραφο 2.1.3) και φυγοκέντρωση, στις 800 g για 3 λεπτά. Απομάκρυνση του υπερκειμένου και επανάληψη της διαδικασίας τρεις φορές. Μετά την τελευταία πλύση, ακολουθεί ανάμιξη των σφαιριδίων Ni^{2+} -NTA-ρητίνης με 20 ml βακτηριακού λύματος (προερχόμενου από 1000 ml βακτηριακής καλλιέργειας) και επώασή τους με ήπια ανάδευση για 1,5 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το στάδιο αυτό επαναλαμβάνεται ακόμα μια φορά με νέα σφαιρίδια ρητίνης (1,5 ml). Μετά το πέρας της επώασης (1,5 ώρες & 1,5 ώρες), το μίγμα φυγοκεντρείται στις 800 g για 3 λεπτά και τα σφαιρίδια επανεωρούνται σε 2 όγκους διαλύματος έκπλυσης (100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris-Cl, 20 mM ιμιδαζόλιο (pH 6,3). Τέλος, η πρωτεΐνη εκλύεται σε 1 όγκο διαλύματος έκλυσης (100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris-Cl, 100 mM ιμιδαζόλιο, pH 5,9 και 4,5) επί 3 φορές.

2.2.11 Παραγωγή πολυκλωνικών αντισωμάτων από κουνέλι και ποντίκια

2.2.11.1 Πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της rLdMAcPsoI-His- Πρωτόκολλο ανοσοποίησης

Η rLdMAcPsoI-His, που απομονώθηκε από βακτήρια (βλ. Παράγραφο 2.2.10.2) χρησιμοποιήθηκε για ανοσοποιήσεις σε 1 λευκό κουνέλι Νέας Ζηλανδίας (συνολικά 650 mg πρωτεΐνης) και σε ποντίκια BALB/c (συνολικά 200 μg ανά ποντίκι) σύμφωνα με δημοσιευμένα πρωτόκολλα [186]. Με τον τρόπο αυτό παρασκευάστηκαν ένα

πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού και ένα πολυκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι της rLdMAcPsol-His. Όλοι οι χειρισμοί των ζωικών προτύπων εγκρίθηκαν από την Επιτροπή Βιοηθικής του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ ακολουθώντας την οδηγία της Ε.Ε. 2010/63 και το Νόμο 2013/56. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται ως εξής:

A. Προετοιμασία αντιγόνου για τις ανοσοποιήσεις

- Η απαραίτητη ποσότητα πρωτεΐνης rLdMAcPsol-His η οποία θα χρησιμοποιηθεί ως αντιγόνο έχει απομονωθεί με σφαιρίδια νικελίου και αναλύεται σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 12% (βλ. Παράγραφο 2.2.10.2)
- Η πρωτεΐνη ανιχνεύεται ύστερα από χρώση της πηκτής με τη χρωστική Coomassie R-250 και αποκόπτεται το τμήμα της πηκτής που περιέχει την rLdMAcPsol-His (~32 kDa) με χρήση αποστειρωμένου νυστεριού
- Το πολυακρυλαμίδιο θρυμματίζεται σε κρυοανθεκτικό γουδί μετά από ψύξη σε υγρό άζωτο
- Τα θραύσματα του πολυακρυλαμιδίου μετατρέπονται σε εναιώρημα με προσθήκη PBS 1X και μεταφέρονται σε σωλήνες eppendorf του 1,5 ml
- Το εναιώρημα μπορεί να αποθηκευτεί στους -80°C
- Πριν την ανοσοποίηση προστίθεται 1:1 (v/v) ποσότητα του ανοσοενισχυτικού Freund's adjuvant (complete για την πρώτη ανοσοποίηση και incomplete για τις επόμενες) αναδεύεται ισχυρά για 30 λεπτά έως ότου σχηματισθεί σταθερό γαλάκτωμα

B. Πρωτόκολλο ανοσοποιήσεων

- Ημέρα 0: Λήψη αίματος πριν την ανοσοποίηση και έγχυση αντιγόνου με complete Freund's adjuvant (500 µg πρωτεΐνης/ κουνέλι, υποδόρια) (150 µg/ ποντίκι, ενδοπεριτοναϊκά)
- Ημέρα 20: Δεύτερη ανοσοποίηση (100 µg πρωτεΐνης/ κουνέλι, 25 µg/ ποντίκι)
- Ημέρα 40: Τρίτη ανοσοποίηση (50 µg πρωτεΐνης/ κουνέλι, 25 µg/ ποντίκι)
- Ημέρα 50: Λήψη αίματος και απομόνωση του ορού
- Ημέρα 60: Τέταρτη ανοσοποίηση (50 µg πρωτεΐνης/ κουνέλι, 12,5 µg/ ποντίκι)
- Ημέρα 70: Λήψη αίματος και απομόνωση ορού
- Ημέρα 80: Πέμπτη ανοσοποίηση (50 µg πρωτεΐνης/ κουνέλι, 12,5 µg/ ποντίκι)
- Ημέρα 90: Ολική αφαίμαξη από την καρδιά (ευθανασία)

Γ. Απομόνωση του ορού

Το αίμα αφήνεται στους 4°C για 16 ώρες και την επόμενη ημέρα φυγοκεντρείται στα 170 g για 10 λεπτά, συλλέγεται το υπερκείμενο και φυγοκεντρείται ξανά στα 670 g για 10 λεπτά.

Ο ορός χωρίζεται σε πολλές μικρές ποσότητες και αποθηκεύεται στους 4°C για μικρό χρονικό διάστημα (θα πρέπει να γίνει με προσθήκη 0,01% (w/v) νατραζιδίου (NaN₃) για αποφυγή ανάπτυξης βακτηρίων) ή για μεγάλο χρονικό διάστημα στους -80°C, μετά από γρήγορη ψύξη σε υγρό άζωτο.

2.2.11.2 Πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της rLdMAcPsol-His- Καθαρισμός αντισώματος με χρωματογραφία υψηλής συγγένειας από μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Ο καθαρισμός του α-LdMAcP αντισώματος από τον ορό του κουνελιού έγινε με έκλουσή του σε χαμηλό pH από προσδεμένη σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης rLdMAcPsol-His πρωτεΐνη [187, 188] (βλ. Εισαγωγή Παράγραφος 2.2.13). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

Πραγματοποιείται η απομόνωση και ο καθαρισμός της rLdMAcPsol-His από βακτηριακά κύτταρα BL21 όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.10.2. Στη συνέχεια, εφαρμόζεται ηλεκτροφόρηση σε πηκτή 12% (v/v) SDS-PAGE και μεταφορά των πρωτεϊνών που περιέχονται στα εκλούσματα που προκύπτουν από τον καθαρισμό της rLdMAcPsol-His σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Κατόπιν, η μεμβράνη βάφεται με χρωστική Ponceau-S και αποκόπτεται το τμήμα της που περιέχει την rLdMAcPsol-His (~32 kDa) με χρήση αποστειρωμένου νυστεριού. Ακολούθως, το επιθυμητό τμήμα της μεμβράνης κόβεται σε μικρότερα κομμάτια και εκπλένεται 3 φορές σε PBS 1X (10 λεπτά τη φορά) για να επωαστεί με 5ml από τον κουνελίσιο α-MAcPsol ορό (τελικής αιμοληψίας) για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από νέα έκπλυση των κομματιών της νιτροκυτταρίνης σε PBS 1X (3 φορές, 10 λεπτά τη φορά), το πολυκλωνικό αντίσωμα που έχει προσδεθεί σε αυτά, εκλούεται με 1 ml από 2M glycine/ HCl (pH 2.2) για 5' στους 4°C και γρήγορα το pH του διαλύματος ουδετεροποιείται με 50 μl 2M Tris buffer. Τέλος, ακολουθεί διαπίδυση με PBS 1X (επώαση σε 1 Lt PBS 1X στους 4°C για 2 ώρες και επανάληψη της επώασης στις ίδιες συνθήκες για 16 ώρες με φρέσκο διάλυμα PBS).

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του καθαρισμένου αντισώματος γίνεται είτε με την μέθοδο Bradford με πρότυπη πρωτεΐνη (βλ. Εισαγωγή Παράγραφο 2.2.12), είτε με μέτρηση της απορρόφησης στα 280 nm. $OD_{280} = 1$ αντιστοιχεί σε 1,35 mg/ml αντισώματος.

2.2.11.3 Πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι ολικών πρωτεϊνών *L. donovani* (στέλεχος LG13)

Η παραγωγή πολυκλωνικού αντισώματος έναντι ολικών πρωτεϊνών προμαστιγωτών μορφών *L. donovani* (στέλεχος LG13) πραγματοποιήθηκε συνοπτικά ως εξής:

Παράσιτα ($\sim 6,3 \times 10^8$) εκπλένονται 2 φορές σε PBS 1X και στη συνέχεια επαναδυσαλύονται σε διάλυμα 50mM Tris, pH 7.4 (500 μ l) και τοποθετούνται στον πάγο. Ακολουθεί λύση των κυττάρων με τη χρήση υπερήχων και φυγοκέντρωση στα 20000 g για 20 λεπτά. Γίνεται μέτρηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών που περιέχονται στο υπερκείμενο διάλυμα με τη μέθοδο Bradford (βλ. Εισαγωγή Παράγραφο 2.2.12) και ακολουθεί η ανοσοποίηση ποντικών BALB/c με ενδοπεριτοναϊκές εγχύσεις, ακολουθώντας το πρωτόκολλο των ανοσοποιήσεων όπως περιγράφηκε παραπάνω.

2.2.12 Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford

Η δοκιμή Bradford βασίζεται στην άμεση πρόσδεση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBBG) στα κατάλοιπα αργινίνης, τρυπτοφάνης, τυροσίνης, ιστιδίνης και φαινυλαλανίνης των πρωτεϊνών. Ανιοντικά σύμπλοκα CBBG προσδεδεμένα σε κατάλοιπα αμινοξέων απορροφούν στα 595 nm, ενώ η ελεύθερη χρωστική σε διάλυμα έχει μέγιστη απορρόφηση στα 470 nm. Υπολογίζεται η ποσότητα της ολικής πρωτεΐνης του δείγματος βάσει πρότυπης καμπύλης αναφοράς. Ως πρότυπο διάλυμα χρησιμοποιήθηκε είτε αλβουμίνη βοδινού ορού (BSA), είτε IgG βοδιού (Bovine Gamma Globuline) σε συγκέντρωση 1 mg/ml.

2.2.13 Ανοσοαποτύπωση Western

2.2.13.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου με SDS (SDS-PAGE)

Ο διαχωρισμός και η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών γίνεται με βάση το μοριακό τους βάρος με ηλεκτροφόρηση σε κάθετο πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου παρουσία θειικού

δωδεκακυλικού νατρίου (SDS), σύμφωνα με την μέθοδο του Laemmli [189]. Τα αρνητικά φορτισμένα ιόντα SDS συνδέονται στην πεπτιδική αλυσίδα σε αναλογία 1.4 gr SDS/ gr πρωτεΐνης, και το φορτίο της πρωτεΐνης που προκύπτει είναι ανάλογο με το μοριακό της βάρος. Για τον λόγο αυτό, οι αρνητικά φορτισμένες πεπτιδικές αλυσίδες, μετακινούνται προς το θετικό πόλο με βάση το μοριακό τους βάρος και με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη προς αυτό. Κατά την ηλεκτροφόρηση οι πρωτεΐνες τοποθετούνται αρχικά στο χαμηλής περιεκτικότητας σε ακρυλαμίδιο-πήκτωμα συσώρευσης, και στη συνέχεια μετακινούνται και διαχωρίζονται στο υψηλής περιεκτικότητας σε ακρυλαμίδιο (10%, 12% w/v) πήκτωμα διαχωρισμού. Τα δείγματα αραιώνονται κατάλληλα σε διάλυμα «φόρτωσης» δείγματος και θερμαίνονται στους 95°C για 5 λεπτά. Οι συνθήκες αυτές είναι αποδιατακτικές για τις πρωτεΐνες καθώς, ο βρασμός και η παρουσία του SDS καταστρέφουν τους ασθενείς δεσμούς (υδρογόνου, ιοντικούς, υδρόφοβους, van der Waals) ενώ η παρουσία της β-μερκαπτοαιθανόλης έχει ως αποτέλεσμα την αναγωγή των ισχυρών ομοιοπολικών δισουλφιδικών δεσμών. Παράλληλα με τα δείγματα, γίνεται ανάλυση μίγματος πρωτεϊνών αναφοράς.

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε διάλυμα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών με σταθερή τάση 200 V σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα υπόκειται εναλλακτικά στις εξής διαδικασίες: α) Χρώση των πρωτεϊνικών ζωνών με διάλυμα χρωστικής (stain buffer), β) Μεταφορά των διαχωρισμένων πρωτεϊνών σε νιτροκυτταρίνη. Στην πρώτη περίπτωση, οι ζώνες των πρωτεϊνών εμφανίζονται μετά από χρώση του πηκτώματος για 3-16 ώρες, υπό ανακίνηση. Ακολουθεί αποχρωματισμός της πηκτής, με επανειλημμένες πλύσεις σε διάλυμα αποχρωματισμού (destain buffer).

2.2.13.2 Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Western Blot)

Για τη μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα στη μεμβράνη χρησιμοποιείται διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς πρωτεϊνών και ετοιμάζεται ένα σύστημα sandwich με την εξής σειρά: α) ένα λεπτό φύλλο σφουγγαριού β) δύο φύλλα διηθητικού χαρτιού γ) η πηκτή πολυακρυλαμίδιου, δ) ένα κομμάτι νιτροκυτταρίνης στο μέγεθος του πηκτώματος, ε) ένα φύλλο διηθητικού χαρτιού Whatmann 3MM, στ) ένα λεπτό φύλλο σφουγγαριού. Το σύστημα sandwich, τοποθετείται στην ειδική συσκευή μεταφοράς, έτσι ώστε η νιτροκυτταρίνη να βρίσκεται στην άνοδο. Η μεταφορά των πρωτεϊνών πραγματοποιείται με ρεύμα σταθερής έντασης 300 mA για 1-1,5 ώρα στους 4°C. Μετά τη μεταφορά, η μεμβράνη χρωματίζεται για περίπου 1-5 λεπτά με διάλυμα χρωστικής Ponceau S (βάφει

μη ειδικά όλες τις πρωτεΐνες) και κατόπιν ξεπλένεται με PBS ή TBS για να απομακρυνθεί η περίσσεια της χρωστικής. Οι ζώνες των πρωτεϊνών γίνονται ορατές και ελέγχεται η επιτυχία της μεταφοράς (το όριο της διακριτικής ικανότητας της χρωστικής Ponceau S είναι 250 ng/ml).

2.2.13.3 Ανοσοενζυμική ανίχνευση πρωτεϊνών

Στη συνέχεια, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επωάζεται με διάλυμα 5 % (w/v) λυοφιλιωμένου άπαχου γάλακτος σε PBS ή TBS και 0,05% Tween-20 για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να εμποδιστεί η μη ειδική πρόσδεση των αντισωμάτων. Ακολουθεί επώαση της μεμβράνης με το ειδικό αντίσωμα αραιωμένο σε διάλυμα 5% (w/v) λυοφιλιωμένου άπαχου γάλακτος σε PBS ή TBS και 0,1% Tween-20 για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου ή 16 ώρες στους 4°C, με συνεχή ανακίνηση. Πραγματοποιούνται τρεις διαδοχικές πλύσεις με PBS ή TBS και 0,1% Tween-20 (10 λεπτά/πλύση). Ακολουθεί επώαση της μεμβράνης με δεύτερο αντίσωμα συζευγμένο με το ένζυμο της υπεροξειδάσης HRP (Horse Radish Peroxidase) το οποίο αναγνωρίζει το πρώτο αντίσωμα, σε διάλυμα 5% (w/v) λυοφιλιωμένου γάλακτος σε PBS ή TBS και 0,1% Tween-20 για 1-2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου και συνεχή ανακίνηση. Πραγματοποιούνται τρεις διαδοχικές πλύσεις με TBS (10 λεπτά/πλύση).

Η ανίχνευση της πρωτεΐνης στη μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης γίνεται είτε με τη μέθοδο της 3',3'-διαμινοβενζιδίνης (3,3' DAB) είτε με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας (Electrochemiluminescence ή electrogenerated chemiluminescence (ECL), Η 3,3' DAB οξειδώνεται, παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂), από το ένζυμο της υπεροξειδάσης και παράγει ένα αδιάλυτο προϊόν με έντονο σκούρο καφέ χρώμα. Με τον τρόπο αυτό οι ζώνες των πρωτεϊνών που έχουν προσδέσει ειδικά το αντίσωμα και κατ' επέκταση και το αντι-ισοτυπικό αντίσωμα, εμφανίζονται μετά από 2-3 λεπτά. Η χημειοφωταύγεια, στη δεύτερη περίπτωση, είναι ένα είδος φωταύγειας που παράγεται κατά τη διάρκεια χημικής αντίδρασης, στην οποία δημιουργούνται ενδιάμεσα προϊόντα που διεγείρονται και αποδιεγειρόμενα εκπέμπουν ένα φωτόνιο. Η διέγερση μπορεί να προκληθεί από μεταφορά ηλεκτρονίων σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής, όπως στην περίπτωση του μορίου της 3-αμινοφθαλυδραζίνης που οξειδώνεται (μετατρέπεται σε 3-αμινοφθαλικό οξύ) από το υπεροξείδιο του υδρογόνου και διεγείρεται οπότε, με τη χρήση φωτογραφικών μεθόδων και πιο συγκεκριμένα με X-ray φιλμ οπτικοποιείται η παρουσία της υπεροξειδάσης και κατ' επέκταση της πρωτεΐνης που μελετάται.

2.2.13.4 Αποδέσμευση αντισωμάτων και επαναχρησιμοποίηση μεμβράνης νιτροκυτταρίνης(stripping)

Η ανάπτυξη τεχνικών ανίχνευσης των αντιγόνων στα ανοσοαποτυπώματα που βασίζονται στη μέθοδο της χημειοφωταύγειας παρέχει τη δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης των μεμβρανών με τη χρήση διαφορετικών αντισωμάτων εφόσον δεν έχει πραγματοποιηθεί αλλοίωση της μεμβράνης αλλά και των μεταφερόμενων σε αυτήν αντιγόνων. Κατά τη διαδικασία της αποδέσμευσης των αντισωμάτων (stripping), η μεμβράνη επωάζεται σε διάλυμα γλυκίνης, pH 2,2 (1,5% w/w glycine, 0.1% w/w SDS και 1% v/v Tween-20). Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η διάσπαση του συμπλόκου αντιγόνου-αντισώματος και η απελευθέρωση των αντισωμάτων από την μεμβράνη. Οι ισχυρά δεσμευμένες πρωτεΐνες λόγω των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων κατά την ηλεκτρομεταφορά τους παραμένουν στη μεμβράνη. Στη συνέχεια, η μεμβράνη εκπλένεται και πραγματοποιείται εκ νέου επώασή της με PBS ή TBS + 5% (w/v) άπαχο γάλα + 0,05% Tween-20 για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να εμποδιστεί η μη ειδική προσκόλληση των αντισωμάτων και ακολουθείται η διαδικασία όπως παραπάνω.

2.2.14 Υποκυτταρική κλασμάτωση κυττάρων θηλαστικού και προμαστιγωτών μορφών *Leishmania* με τη χρήση απορρυπαντικών

2.2.14.1 Κλασμάτωση πρωτεϊνών με τη χρήση του απορρυπαντικού TritonX-100

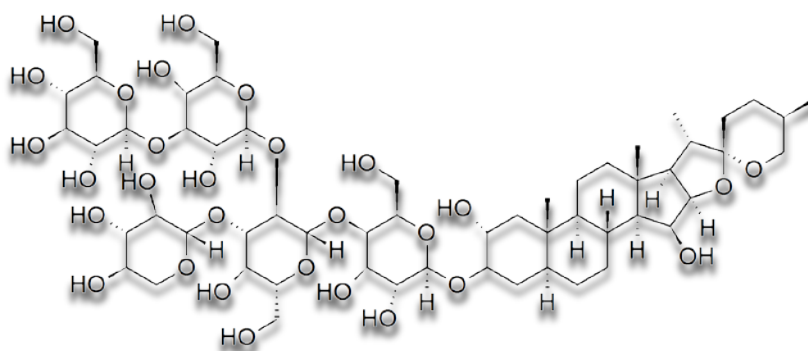
Το TritonX-100 είναι ένα μη-ανιονικό απορρυπαντικό (detergent) το οποίο είναι ευρέως χρησιμοποιούμενο είτε ως συστατικό των διαλυμάτων λύσης βακτηριακών και ευκαρυωτικών κυττάρων είτε ως μέσο διαλυματοποίησης κυτταρικών πρωτεϊνών και υποκυτταρικής κλασμάτωσης.

Για την κλασμάτωση πρωτεϊνών κυττάρων θηλαστικού (HeLa) η μέθοδος εφαρμόστηκε συνοπτικά ως εξής: κύτταρα HeLa ($\sim 5 \times 10^5$) συλλέγονται μετά από προσθήκη διαλύματος Versene 1X (PBS 1X, 0.02% w/v EDTA) (37°C για 5 λεπτά) και φυγοκέντρωση στα 200 g για 5 λεπτά. Στη συνέχεια τα κύτταρα εκπλένονται 2 φορές σε παγωμένο διάλυμα PBS 1X και ακολούθως το ίζημα των κυττάρων διαλύεται σε 200-250 μ l PBS με 0.1-1% (v/v) TritonX-100 και επωάζεται για 1 ώρα στον πάγο. Τελικά, το μίγμα φυγοκεντρείται (18000 g, 25 min, 4°C) και το υπερκείμενο που είναι εμπλουτισμένο σε μεμβρανικές πρωτεΐνες διαλυτές σε 1% (v/v) TritonX-100 συλλέγεται,

ακολουθεί ο προσδιορισμός της συγκέντρωσής του με την μέθοδο Bradford και ανάλυση με τη μέθοδο ανοσοαποτύπωσης κατά Western.

2.2.14.2 Κλασμάτωση των πρωτεϊνών των προμαστιγωτών μορφών *Leishmania* με τη χρήση του απορρυπαντικού διγιτονίνη (digitonin fractionation)

Η διγιτονίνη (Εικόνα 2.4) είναι ένας γλυκοζίτης που λαμβάνεται από το φυτό *Digitalis purpurea*. Το άγλυκο τμήμα του ονομάζεται διγιτονίνη και είναι στεροειδές. Χρησιμοποιείται ως απορρυπαντικό, διαλυτοποιώντας αποτελεσματικά λιπίδια, όπως η χοληστερόλη, καθιστώντας έτσι διαπερατή την κυτταρική μεμβράνη αλλά και τις μεμβράνες των οργανιδίων των κυττάρων. Ανάλογα με τη συγκέντρωσή της στο δείγμα λαμβάνονται πρωτεΐνες από διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα (κλάσματα) ξεκινώντας από τις διαλυτές (κυτταροπλασματικές), τις πρωτεΐνες οργανιδίων και μιτοχονδρίων, τις κυτταροσκελετικές, τις μεμβρανικές και τις πυρηνικές.



Εικόνα 2.4 Το μόριο της διγιτονίνης

Για την κλασμάτωση των πρωτεϊνών από προμαστιγωτές μορφές *Leishmania* με τη χρήση της διγιτονίνης εφαρμόστηκε η μέθοδος των Foucher και Papadopoulos [190]. Συνοπτικά, η μέθοδος περιγράφεται παρακάτω:

Καλλιέργεια προμαστιγωτών παρασίτων *L. donovani* με ($\sim 2 \times 10^9$ κύτταρα) (αγρίου τύπου και διαγονιδιακών) φυγοκεντρείται στα 1000 g στους 4°C για 7 λεπτά και τα κύτταρα εκπλένονται 2 φορές με 10 ml παγωμένου διαλύματος αναδιασποράς (βλ. Διαλύματα Παράγραφος 2.1.3). Τα κύτταρα στη συνέχεια αναδιασπείρονται σε 0,5 ml διαλύματος αναδιασποράς (προθερμασμένο στους 37°C) στο οποίο προστίθενται αναστολείς πρωτεασών και η κλασμάτωση επιτυγχάνεται με την προσθήκη ίσου όγκου (0,5 ml) διαλύματος διγιτονίνης που περιέχει προοδευτικά αυξανόμενη συγκέντρωση του

απορρυπαντικού (20 μ M, 200 μ M, 1 mM or 10 mM) και επώαση στους 37°C για 5 λεπτά. Τέλος, το κάθε κλάσμα συλλέγεται με φυγοκέντρηση στα 18000 g για 5 λεπτά (4° C) αφού πρώτα προστεθούν 200 μ l σακχαρόζης 0,3 M.

Πίνακας 6 Τα πρωτεϊνικά κλάσματα που προκύπτουν κατά την κλασμάτωση κυττάρων *Leishmania* με τη χρήση της διγλιτονίνης

Πρωτεϊνικό κλάσμα (συγκέντρωση διγλιτονίνης)	Χαρακτηριστικά
F1 (20 μ M)	λύση κυττάρων
F2 (200 μ M)	διαλυτές πρωτεΐνες
F3 (1 mM)	πρωτεΐνες οργανιδίων (κάποιες είναι των μιτοχονδρίων)
F4 (10 mM)	πρωτεΐνες οργανιδίων (μιτοχονδρίων, πυρήνα, ενδοπλασματικού δικτύου)
F5 S (διαλυτό σε 1% v/v TritonX-100)	πρωτεΐνες κυτταροπλασματικής μεμβράνης και άλλες διαλυτές
F5 P (αδιάλυτο σε 1% v/v TritonX-100)	αδιάλυτες πρωτεΐνες, μεμβρανικές, πυρηνικές και πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού

Το ίζημα της τελευταίας φυγοκέντρησης (κλάσμα F5, εμπλουτισμένο σε πρωτεΐνες της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και του κυτταροσκελετού των παρασίτων, Πίνακας 6) επαναδιαλύεται σε 500 μ l διαλύματος Triton X-100 1% (v/v) σε PBS 1X, επωάζεται για μία ώρα στους 4°C υπό περιστροφή και στη συνέχεια φυγοκεντρείται στα 20000 g για 20 λεπτά (4° C). Στο υπερκείμενο που περιέχει τις διαλυτές πρωτεΐνες του κλάσματος 5 (F5 S) προστίθεται διάλυμα φόρτωσης πρωτεϊνών Laemmli 6X και παράλληλα στο ίζημα (αδιάλυτες πρωτεΐνες, μεμβρανικές, πυρηνικές και πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού) προστίθεται διάλυμα φόρτωσης πρωτεϊνών Laemmli 1X ίσου όγκου. Στα κλάσματα 1 έως 4 (F1-F4) προστίθεται παγωμένη ακετόνη (1/1, v/v) και τα δείγματα παραμένουν για 16 ώρες στους -20°C ώστε να επιτευχθεί η κατακρίμνηση των πρωτεϊνών που περιέχουν. Με φυγοκέντρηση για 30 λεπτά στα 20000 g (4°C), το υπερκείμενο αποχύνεται και το ίζημα των πρωτεϊνών αφήνεται σε ρεύμα αέρα απαγωγού για να στεγνώσει πλήρως. Τέλος, τα πρωτεϊνικά ιζήματα αναδιαλύονται στον κατάλληλο όγκο διαλύματος φόρτωσης πρωτεϊνών 1X, θερμαίνονται στους 95°C για 5 λεπτά για ανάλυση με τη μέθοδο ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Από όλα τα κλάσματα αποθηκεύεται μικρή ποσότητα για προσδιορισμό πρωτεϊνικής συγκέντρωσης με την μέθοδο Bradford.

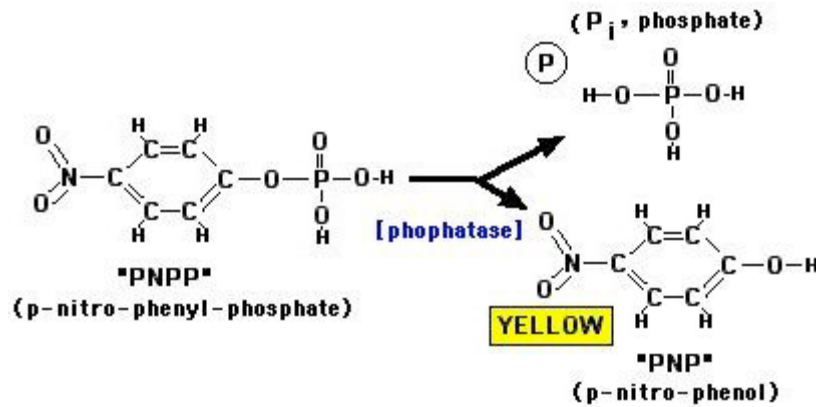
2.2.15 Παρασκευή ολικών μεμβρανών από προμαστιγωτές μορφές *Leishmania*

Καλλιέργεια προμαστιγωτών παρασίτων *L. donovani* με ($\sim 1,5-2 \times 10^9$ κύτταρα) (αγρίου τύπου και διαγονιδιακών) φυγοκεντρείται στα 1000 g για 7 λεπτά και τα κύτταρα εκπλένονται 1 φορά σε 10 ml παγωμένου διαλύματος PBS pH 7.2. Ακολούθως, όλες οι διαδικασίες πραγματοποιούνται στους 4°C. Αρχικά, το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύεται σε υπερτονικό διάλυμα λύσης (βλ. Διαλύματα Παράγραφος 2.1.3) παρουσία αναστολέων πρωτεασών και αφήνεται στον πάγο για 30 λεπτά, ώστε να ακολουθήσει η καταστροφή της ακεραιότητας των κυττάρων με τη χρήση του ομογενοποιητή Dounce. Η αποτελεσματικότητα της κυτταρικής λύσης αξιολογείται με τη χρήση του οπτικού μικροσκοπίου και εφόσον κριθεί ικανοποιητική (>70% των κυττάρων έχει λυθεί), ακολουθεί φυγοκέντρωση (1000 g για 10 λεπτά). Το υπερκείμενο που προκύπτει φυγοκεντρείται στα 200000 g για 1 ώρα στους 4°C (SW41 Beckman rotor) και το ίζημα που προκύπτει και περιέχει το σύνολο των παρασιτικών μεμβρανών, επαναδιαλύεται σε 100-150 μ l διαλύματος 50 mM Tris-HCl (pH 7.4). Τέλος, πραγματοποιείται προσδιορισμός τη συγκέντρωσής του σε πρωτεΐνες με την μέθοδο Bradford και ανάλυση με τη μέθοδο ανοσοαποτύπωσης κατά Western.

2.2.16 Ενζυμολογία

2.2.16.1 Ενζυμική δοκιμή όξινης έξω-φωσφατάσης σε ζωντανά προμαστιγωτά παράσιτα και σε κύτταρα HeLa που εκφράζουν την rLdMAcP-His

Η ενζυμική δραστηριότητα όξινης έξω-φωσφατάσης της ενδογενούς πρωτεΐνης LdMAcP και της ανασυνδυασμένης rLdMAcP-mRFP1 στην εξωτερική επιφάνεια ζωντανών παρασίτων *Leishmania* αλλά και στην επιφάνεια ζωντανών κυττάρων HeLa που εκφράζουν την rLdMAcP-His ελέγχθηκε χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το *p*-νιτροφαινυλοφωσφορικό ανιόν (*p*NPP). Υδρόλυση του εστερικού δεσμού και αποφωσφορυλίωση του *p*NPP μετά από επώαση 30-60 λεπτών στους 37°C παράγει την ένωση *p*-νιτροφαινόλη η οποία μετά την προσθήκη 0,5 N NaOH διίσταται και απορροφά στα 405 nm (Εικόνα 2.5).



Εικόνα 2.5 Γραφική αναπαράσταση της ενζυμικής αντίδρασης αποφωσφορυλίωσης του υποστρώματος pNPP (πηγή: <http://www.science-projects.com/Va-13/Fig4.htm>)

A. Ζωντανές προμαστιγωτές μορφές *Leishmania* spp. στατικής φάσης

Η αντίδραση όξινης φωσφατάσης στην επιφάνεια ζωντανών προμαστιγωτών παρασίτων *Leishmania* (αγρίου τύπου και διαγονιδιακών) πραγματοποιήθηκε σε παράσιτα λογαριθμικής και στατικής φάσης. Η διαδικασία περιγράφεται συνοπτικά ως εξής:

Από μία καλλιέργεια *Leishmania* λαμβάνονται $1-2 \times 10^7$ κύτταρα. Στη συνέχεια, τα κύτταρα εκπλένονται 2 φορές σε διάλυμα 100 mM HEPES και ακολούθως μετρούνται με τη βοήθεια της κυτταρομέτρου Malassez. Το ίζημα των παρασίτων επαναδυναμύεται, μετά από φυγοκέντρηση (1000 g, 7 λεπτά), σε 500 μl διαλύματος δοκιμασίας (10 mM pNPP, pH 4.8) (βλ. Παράγραφος 2.2.16.1) με ή χωρίς την παροχή 5 mM τρυγικού οξέος (sodium tartrate; L(+)-tartaric acid; Merck) στους 37°C για 30-60 λεπτά ώστε να λάβει χώρα η αντίδραση της αποφωσφορυλίωσης του υποστρώματος. Μετά το πέρας του χρόνου αυτού προστίθενται 2 όγκοι (1 ml) διαλύματος 0,5 N NaOH και το δείγμα φωτομετρείται στα 405 nm.

B. Ζωντανά κύτταρα θηλαστικού

Ανώτερα ευκαρυωτικά κύτταρα (HeLa) επιστρώνονται σε πλάκα 6 φρεατίων (6-well plate) και επιμολύνονται με το πλασμίδιο pTriEx1.1-rLdMAcP και το πλασμίδιο-μάρτυρα pTriEx1.1 (βλ. Μέθοδοι Παράγραφος 2.1.5.1). Μετά από 24 ώρες, τα κύτταρα μετρώνται με τη βοήθεια της κυτταρομέτρου Neubauer και ακολούθως υποβάλλονται σε δοκιμασία αντίδρασης όξινης έξω-φωσφατάσης (37°C, 30 λεπτά), όπως περιγράφηκε παραπάνω. Σε αυτή την περίπτωση, ο όγκος της αντίδρασης είναι 1 ml/ φρεάτιο με ή χωρίς την παρουσία 2,5 mM τρυγικού οξέος.

Και για τις δύο κατηγορίες κυττάρων (*Leishmania* και ανώτερα ευκαρυωτικά), η ενζυμική αντίδραση (τιμή απορρόφησης A_{405}) κανονικοποιείται με βάση το μέσο όρο του αριθμού των κυττάρων/ ml αντίδρασης για κάθε ανεξάρτητο πείραμα και εκφράζεται ως $A_{405}/10^7 \text{ cells} \times \text{ml}^{-1}$. Στην περίπτωση των κυττάρων θηλαστικού που εκφράζουν την rLdMAcP-His πραγματοποιείται επιπλέον κανονικοποίηση για κάθε ανεξάρτητο πείραμα με βάση το επίπεδο έκφρασης της διαγονιδιακής πρωτεΐνης που αξιολογείται με ανοσοφθορισμό και χρήση του μονοκλωνικού αντισώματος α-His.

Τέλος, για να ελεγχθεί η πιθανότητα η ενζυμική αντίδραση στην επιφάνεια των ζωντανών κυττάρων (παρασίτων και θηλαστικού) να οφείλεται σε λύση των κυττάρων που πιθανά συμβαίνει κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, τα κύτταρα επωάζονται παράλληλα με ίσο όγκο διαλύματος χωρίς την παρουσία του pNPP (37°C, 30 λεπτά). Μετά το πέρας του χρόνου επώασης, το διάλυμα διαχωρίζεται από τα κύτταρα και προστίθεται σε αυτό pNPP (10 mM). Ακολουθώντας, προσδιορίζεται το επίπεδο αποφωσφορύλωσης του όπως περιγράφεται παραπάνω.

Η ζωτικότητα/ κινητικότητα των κυττάρων ελέγχεται ποιοτικά κάτω από το οπτικό μικροσκόπιο και ποσοτικά με χρώση των παρασίτων με 0,4% (w/v) Trypan Blue.

2.2.16.2 In vitro απογλυκοζυλίωση της rLdMAcP-mRFP1 και rLdMAcP-His

Καλλιέργεια ($\sim 2 \times 10^9$) διαγονιδιακών προμαστιγωτών παρασίτων *L. donovani*-rLdMAcP-mRFP1 πρώιμης στατικής φάσης, επωάζονται παρουσία Τουνικομυκικής (Tunicamycin, 10 $\mu\text{g/ml}$ σε 25mM NaOH) για 24 ώρες στους 25°C ώστε να ελεγχθεί η αναστολή της N-γλυκοζυλίωσης. Παράλληλα, μία αντίστοιχη καλλιέργεια που επωάζεται μόνο με τον διαλύτη (25mM NaOH) και αποτελεί τον αρνητικό μάρτυρα. Μετά το τέλος του χρόνου επώασης, ακολουθεί κλασμάτωση των κυττάρων με το απορρυπαντικό διγλιτονίνη (βλ. Μέθοδοι Παράγραφος 2.2.14.2) και το πλούσιο σε πρωτεΐνες της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και άλλες διαλυτές πρωτεΐνες κλάσμα F5 αναλύεται με ανοσοαποτύπωση Western.

Οι N-γλυκοσιδάσες F (PNGase F) και Endo H χρησιμοποιούνται για τη διάσπαση των N-γλυκοζυτικών δεσμών σε κατάλοιπα ασπαραγίνης. Συγκεκριμένα, $\sim 25 \mu\text{g}$ κλάσματος F5 S από προμαστιγωτά παράσιτα *L. donovani*-rLdMAcP-mRFP1 επωάζονται με προσθήκη 500 units (U) Endo F ή Endo H για 1-2 ώρες στους 37°C, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Αντίστοιχα, ~15 µg διαλυτού σε 1% (v/v) TritonX-100 πρωτεϊνικού κλάσματος κυττάρων HeLa που εκφράζουν την rLdMAcP-His επωάζονται με 500 U Endo F για 2 ώρες στους 37 °C. Ο έλεγχος της απογλυκοζυλίωσης γίνεται με ανοσοαποτύπωσης κατά Western.

2.2.17 Βιοτινυλίωση των πρωτεϊνών της κυτταροπλασματικής μεμβράνης παρασίτων *L. donovani*-rLdMAcP-mRFP1

Για τη βιοτινυλίωση των επιφανειακών πρωτεϊνών ζωντανών προμαστιγωτών μορφών *L. donovani*-rLdMAcP-mRFP1 χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο sulfo-NHS-S-S-biotin (sulfosuccinimidyl-2-[biotinamido]ethyl-1,3-dithiopropionate, Thermo Scientific) το οποίο αντιδρά με την ε-αμινομάδα των καταλοίπων λυσίνης και δημιουργεί ένα σταθερό προϊόν. Συνοπτικά, η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

Προμαστιγωτά παράσιτα *L. donovani*-rLdMAcP-mRFP1 στατικής φάσης ($\sim 2.5 \times 10^9$) εκπλένονται 2 φορές με PBS 1X και στη συνέχεια επωάζονται με 1-1.5 mg/ml sulfo-NHS-S-S-biotin για 1 ώρα στους 4 °C. Ακολουθεί νέα έκπλυση με PBS 1X και προσθήκη 100 mM γλυκίνης η οποία μπλοκάρει τη μη-δεσμευμένη βιοτίνη. Ακολουθώντας, τα κύτταρα υπόκεινται είτε σε διαλυματοποίηση με 0,1% (v/v) TritonX-100 (σε 20 mM Tris, 150 mM NaCl) είτε σε υποκυτταρική κλασμάτωση με διγτονίνη (βλ. Μέθοδοι Παράγραφος 2.2.14.2) και το διαλυτό κλάσμα στο TritonX-100 ή το κλάσμα F5, αντίστοιχα, επωάζεται με στεπταβιδίνη ακινητοποιημένη πάνω σε σφαιρίδια αгарόζης για 16 ώρες στους 4 °C. Οι βιοτινυλιωμένες πρωτεΐνες που έχουν δεσμευτεί πάνω στα σφαιρίδια εκλύονται σε διάλυμα Laemmli 1X και το αποτέλεσμα ελέγχεται με ανοσοαποτύπωσης κατά Western.

2.2.18 Βιοπληροφορική ανάλυση

Η χαρτογράφηση ολόκληρου ή του μεγαλύτερου μέρους του γονιδιώματος διαφόρων ειδών του γένους *Leishmania* παρείχαν τη δυνατότητα για σύγκριση της αλληλουχίας του γονιδίου που κωδικοποιεί την LdMAcP από την *L. donovani* με ομόλογα γονίδια των άλλων ειδών. Οι αλγόριθμοι που χρησιμοποιήθηκαν γι' αυτό το σκοπό καθώς και για τη μελέτη διαφόρων φυσικοχημικών ιδιοτήτων της πρωτεΐνης, όπως έλεγχος υδροφοβικότητας, ύπαρξης διαμεμβρανικών περιοχών ή θέσεων πιθανής φωσφορυλίωσης ήταν οι εξής:

TritypDB

BLAST

(<http://tritrypdb.org/tritrypdb/showQuestion.do?jsessionid=16569DCDE981907D9D1B21D0127473C4?questionFullName=UniversalQuestions.UnifiedBlast>); 2) SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>); 3) ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>); 4) BioEdit Sequence Alignment Editor, version 7.0.9.0 (Ibis Biosciences); 5) TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>); MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, <http://www.megasoftware.net/>).

Το μοντέλο ομολογίας και οι μοριακές προσομοιώσεις έγιναν σε συνεργασία με το εργαστήριο Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και την αν. καθηγήτρια Αναστασία Σ. Πολίτου. Συγκεκριμένα, η κρυσταλλική δομή της ανθρώπινης προστατικής όξινης φωσφατάσης (hPAP, residues 1001-1343, PDB code: 2HPA) χρησιμοποιήθηκε σα δομικό πρότυπο για την κατασκευή των μοντέλων ομολογίας των *LdMAcP* (residues 26–313, GenBank® accession number AIF32067) και *LdSACP1* (residues 26-392, GenBank® accession number AAC79513). Τα μοντέλα δημιουργήθηκαν με τον αλγόριθμο Swiss Model [191] και η πιστότητα του προκύπτοντος μοντέλου ελέγχθηκε με τα προγράμματα PROCHECK [192] and Verify3D [193]. Οι γραφικές απεικονίσεις των δομικών μοντέλων προέκυψαν με τη χρήση του αλγορίθμου PyMol (DeLano Scientific, USA, <http://www.pymol.org/>). Τέλος, η πρόβλεψη καλά οργανωμένων ή μη περιοχών (Disorder predictions) στη δομή των *LdMAcP* και *LdSACP1* έγινε με τη χρήση του PONDR-VXLT [194, 195]. Τα φυλογενετικά δέντρα κατασκευάστηκαν με τον αλγόριθμο Phylip (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>).

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Μελέτη της ωρίμανσης του φαγοσώματος που φέρει *L. donovani* σε μακροφάγα κύτταρα θηλαστικού

Η βιογένεση του φαγολυσοσώματος αποτελεί σημαντικό μηχανισμό ελέγχου της μικροβιακής ανάπτυξης στα φαγοκύτταρα των θηλαστικών [196]. Παρ' όλα αυτά, αρκετοί παθογόνοι μικροοργανισμοί έχουν αναπτύξει στρατηγικές που ανατρέπουν τη διαδικασία ωρίμανσης του φαγοσώματος σε φαγολυσόσωμα, παρακάμπτοντας την μικροβιοκτόνο του μηχανή. Μερικές από τις στρατηγικές αυτές, έχουν ειδικά στόχο την εκμετάλλευση της δράσης των PIs που βρίσκονται στη μεμβράνη του φαγοσώματος ή την τροποποίηση του μεταβολισμού συγκεκριμένων από αυτά [142, 197, 198].

Έχει προταθεί ότι τα πρωτόζωα παράσιτα *Leishmania* τροποποιούν τη βιογένεση του φαγολυσοσώματος των μακροφάγων του θηλαστικού [98-101, 104, 109, 180, 199-202]. Ένας αρκετά μελετημένος μηχανισμός μέσω του οποίου φαίνεται να το επιτυγχάνουν είναι με ενσωμάτωση της λιποφωσφογλυκάνης LPG του επιφανειακού γλυκοκάλυκα των προμαστιγωτών παρασίτων στη μεμβράνη του φαγοσώματος, με αποτέλεσμα την αποδιάταξη των λιπιδικών νανοπεριοχών της (lipid microdomains) [71, 180]. Το γεγονός αυτό, πιθανά να συνδυάζεται με ανακατανομή συγκεκριμένων ειδών PIs στη μεμβράνη του λεισμανιοφόρου φαγοσώματος. Στην παρούσα διατριβή, έγινε προσπάθεια να διερευνηθεί η πιθανότητα το παράσιτο *L. donovani* να ανατρέπει έμμεσα ή άμεσα τη δράση συγκεκριμένων PIs η οποία θα μπορούσε να ανιχνευθεί από μία μεταβολή της χωροχρονικής τους κατανομής στη μεμβράνη του λεισμανιοφόρου φαγοσώματος.

Αρχικά, μελετήθηκε η κινητική συγκεκριμένων δεικτών ωρίμανσης του φαγοσώματος (F-ακτίνης, Rab7 και LAMP1) και στη συνέχεια, η χωροχρονική κατανομή των PtdIns(4.5)P₂, PtdIns(3.4.5)P₃ και PI3P στη μεμβράνη των παρασιτοφόρων φαγοσωμάτων κατά τις 3 πρώτες ώρες μετά την έναρξη φαινομένων φαγοκυττάρωσης προμαστιγωτών μορφών *L. donovani* ή αδρανών σφαιριδίων latex. Η μελέτη αυτή έγινε σε μονιμοποιημένα δείγματα με μικροσκοπία φθορισμού (βλ. Μέθοδοι Παράγραφος 2.2.7).

3.1.1 Χωροχρονική κατανομή συγκεκριμένων δεικτών ωρίμανσης του φαγοσώματος

Με σκοπό τη πραγματοποίηση ενός συστηματικού χαρακτηρισμού του λείσμανιοφόρου φαγοσώματος χρησιμοποιήθηκε ένα *in vitro* σύστημα μελέτης της φαγοκυττάρωσης προμαστιγωτών παρασίτων *L. donovani* στατικής φάσης ή οψονοποιημένων αδρανών σφαιριδίων, από μακροφάγα της κυτταρικής σειράς ποντικού RAW264.7. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η χωροχρονική κατανομή των δεικτών-ρυθμιστών της ωρίμανσης του φαγοσώματος F-ακτίνη, Rab7 και LAMP1 στα 5, 15, 30, 60, 120 και 180 λεπτά από την έναρξη συγχρονισμένης φαγοκυττάρωσης (βλ. Μέθοδοι Παράγραφος 2.2.7).

3.1.1.1 Χωροχρονική κατανομή της F-ακτίνης.

Η σύνδεση του μικροβίου-αντιγόνου με τους ειδικούς υποδοχείς στην επιφάνεια των φαγοκύτταρων του θηλαστικού ξενιστή ενεργοποιεί σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν τη δυναμική ανασυγκρότηση του κυτταροσκελετού της ακτίνης με ταυτόχρονη αναδιαμόρφωση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η εγκόλπωση του σωματιδίου και δημιουργείται το μικροβιοφόρο φαγόσωμα το οποίο ωριμάζει σε φαγολυσόσωμα [203]. Στην αρχή της διαδικασίας αυτής, τα πρώιμα φαγοσώματα περιβάλλονται από μία στιβάδα πολυμερισμένης ακτίνης (F-ακτίνης) η οποία προοδευτικά εξαφανίζεται καθώς τα ινίδια της F-ακτίνης αποπολυμερίζονται ώστε να αποκαλυφθεί η μεμβράνη του φαγοσώματος και να εξελιχθεί η βιογένεση του φαγολυσόσωματος [204].

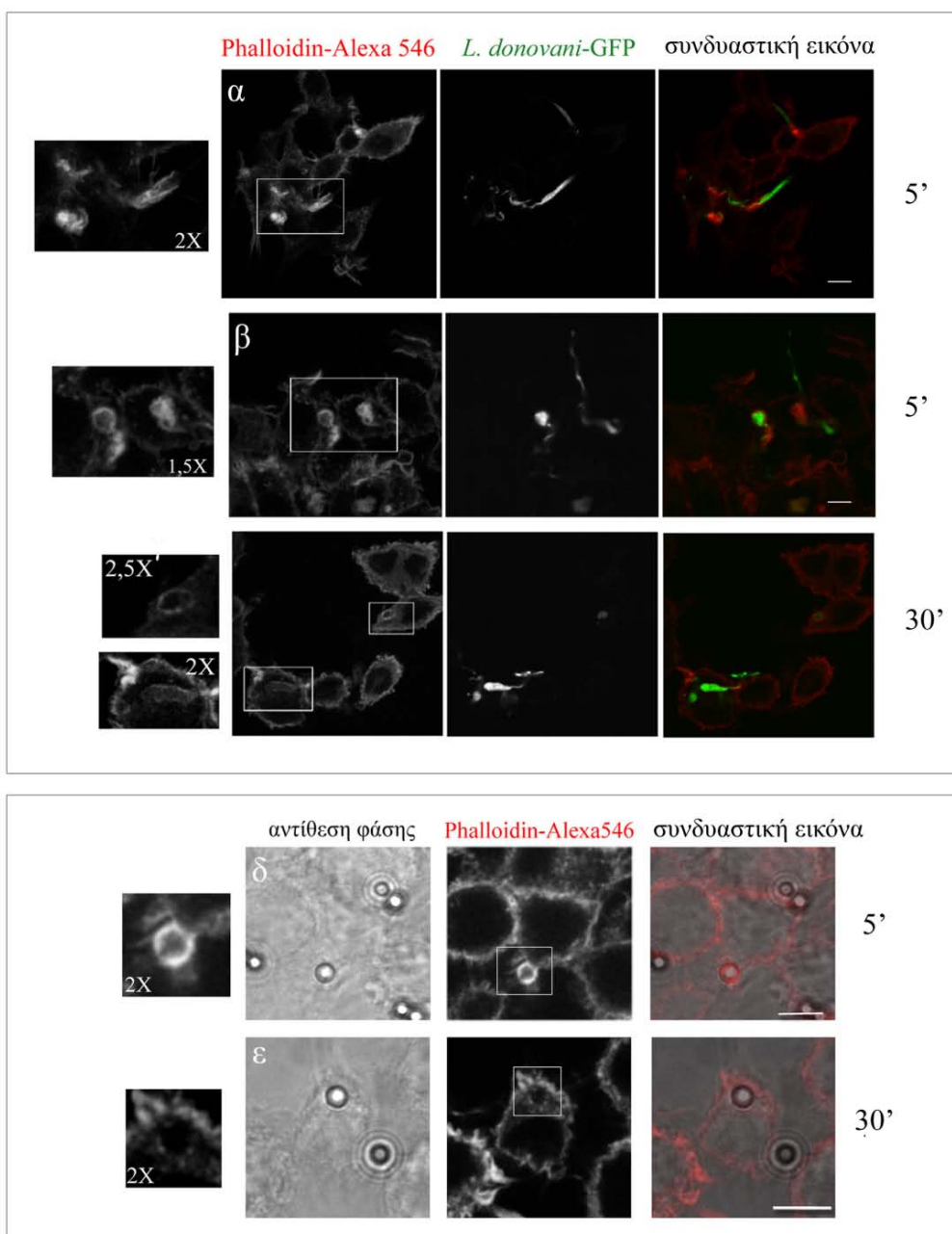
Στην περίπτωση των παρασίτων *Leishmania*, παλαιότερες μελέτες έδειξαν ότι υπάρχει παρατεταμένη παραμονή της F-ακτίνης γύρω από το παρασιτοφόρο φαγόσωμα [108, 205] η οποία προτάθηκε ότι λειτουργεί ως φυσικός φραγμός που παρεμποδίζει τη σύντηξη της μεμβράνης του τελευταίου με τα ώριμα ενδοσώματα και λυσοσώματα, καθυστερώντας την ωρίμανσή του σε φαγολυσόσωμα [71, 110].

Στην προσπάθεια να επιβεβαιώσουμε τις παραπάνω παρατηρήσεις εφαρμόσαμε συγχρονισμένη φαγοκυττάρωση χρησιμοποιώντας μακροφάγα RAW264.7 και διαγονιδιακά παράσιτα *L. donovani* που εκφράζουν την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (*L. donovani*-GFP) παράλληλα με αδρανή σφαιρίδια οψονοποιημένα με ορό ποντικού ήδη ανοσοποιημένου έναντι ολικών πρωτεϊνών από *L. donovani*. Ακολούθησε μονιμοποίηση

των μακροφάγων στα 5, 15, 30, 60 120 και 180 λεπτά από την έναρξή του φαινομένου της φαγοκυττάρωσης, σήμανση των κυττάρων με το αντιδραστήριο Phalloidin-Alexa564 που συνδέεται εκλεκτικά στην F-ακτίνη και παρατήρηση με συνεστιακό μικροσκόπιο (Εικόνα 3.1).

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.1, η F-ακτίνη εντοπίστηκε τόσο στα εκτεινόμενα ψευδοπόδια κατά τη διαδικασία «σύλληψης» του παρασίτου (Εικόνα 3.1 α) ή σφαιριδίου (Εικόνα 3.1 δ) όσο και γύρω από ήδη κλειστά φαγοσώματα (Εικόνα 3.1 β, γ και ε). Η πρώτη περίπτωση επικράτησε, όπως αναμενόταν, στα 5 και 15 λεπτά από την έναρξη της φαγοκυττάρωσης που αποτελεί το χρονικό διάστημα στο οποίο ολοκληρώνεται η διαδικασία της εγκόλπωσης. Στην δεύτερη περίπτωση, η F-ακτίνη απεικονίστηκε είτε σαν ένας ομοιογενής δακτύλιος γύρω από το νεαρό φαγόσωμα (Εικόνα 3.1 β) είτε με σπικτική κατανομή, προφανώς λόγω του αρχόμενου αποπολυμερισμού της και της μετάβασης της φαγοκυττάρωσης σε μεταγενέστερα στάδια (Εικόνα 3.1 γ και ε). Τα αποτελέσματά μας επιβεβαιώνουν προηγούμενες δημοσιευμένες παρατηρήσεις [206].

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η κινητική της F-ακτίνης όπως αυτή προέκυψε μετά από επεξεργασία των εικόνων συνεστιακής μικροσκοπίας και την καταμέτρηση των θετικών φαγοσωμάτων (συγκέντρωση κόκκινου φθορισμού στα εκτεινόμενα ψευδοπόδια και γύρω από κλειστά φαγοσώματα, Εικόνα 3.2). Συγκεκριμένα, τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με παλαιότερες δημοσιεύσεις [201] οι οποίες, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, περιγράφουν μία παρατεταμένη παραμονή F-ακτίνης γύρω από τη μεμβράνη του λείσμανιοφόρου φαγοσώματος, ως αποτέλεσμα της παρέμβασης που ασκούν τα προμαστιγωτά παράσιτα στο σύστημα ανασυγκρότησής της (actin polymerization machinery) και στα μόρια-ρυθμιστές της (RhoA, Cdc42, Rac1, Arp2/3 & WASP complex, myosin, α -actinin) [115]. Συγκεκριμένα, στην παρούσα μελέτη, η F-ακτίνη φαίνεται να παραμένει για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα γύρω από τα λείσμανιοφόρα φαγοσώματα σε σχέση με τα φαγοσώματα που περικλείουν αδρανή σφαιρίδια, ειδικά στα 30 και 60 λεπτά από την έναρξη της φαγοκυττάρωσης. Μάλιστα, ακόμα και 2 ώρες μετά, περίπου το 20% των παρασιτοφόρων φαγοσωμάτων παραμένει θετικό ως προς την F-ακτίνη σε αντίθεση με τα φαγοσώματα που φέρουν σφαιρίδια που είναι λιγότερα από το 10% (Εικόνα 3.2).



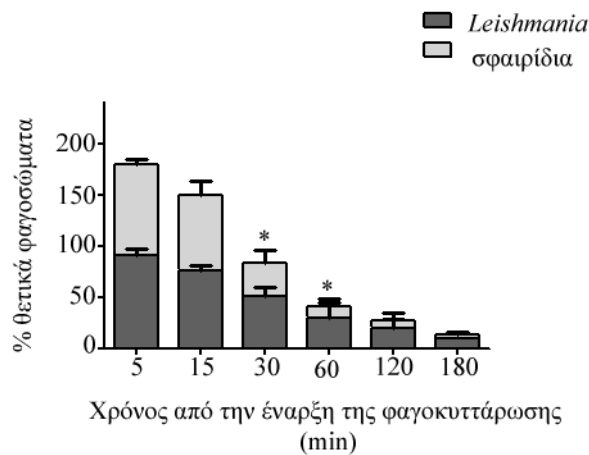
Εικόνα 3.1 Χωροχρονική κατανομή της F-ακτίνης.

Χαρακτηριστικές εικόνες από την κατανομή της F-ακτίνης, 5' και 30' από την έναρξη της φαγοκυττάρωσης προμαστιγωτών παρασίτων *L. donovani*-GFP (άνω πλαίσιο) ή οψονοποιημένων σφαιριδίων (κάτω πλαίσιο) από μακροφάγα RAW246.7. Ο εντοπισμός της F-ακτίνης πραγματοποιήθηκε με σήμανση των κυττάρων με Phalloidin Alexa564.

Ομοιόμορφο έντονο σήμα κόκκινου φθορισμού που υποδηλώνει την παρουσία F-ακτίνης στη μεμβράνη του φαγοκυτταρικού κυπέλλου (α) και ενός κλειστού παρασιτοφόρου φαγοσώματος (β) στα 5' από την έναρξη της φαγοκυττάρωσης. Σε μεταγενέστερο στάδιο της φαγοκυττάρωσης (γ) παρατηρείται ανομοιόμορφη κατανομή της F-ακτίνης στη μεμβράνη κλειστών παρασιτοφόρων φαγοσωμάτων. Ο κόκκινος (Alexa564) και ο πράσινος (GFP) φθορισμός παρουσιάζονται χωριστά ως ασπρόμαυρες εικόνες και σε συνδυαστικές έγχρωμες εικόνες.

Ομοιόμορφη κατανομή έντονου σήματος F-ακτίνης γύρω από τη μεμβράνη ενός σχεδόν σφραγισμένου πρώιμου φαγοσώματος που περιβάλλει σφαιρίδιο latex (δ) και λιγότερο ομοιόμορφη κατανομή σε φαγόσωμα μεταγενέστερου σταδίου φαγοκυττάρωσης (ε). Ο κόκκινος

φθορισμός παρουσιάζεται ως ασπρόμαυρη εικόνα και ως συνδυαστική έγχρωμη εικόνα μαζί με την αντίθεση φάσης.
(αριστερά) Μεγέθυνση της περιοχής που ορίζεται από το πλαίσιο. Size bars 8 μ m.



Εικόνα 3.2 Ποσοτική μείωση των θετικών φαγοσωμάτων ως προς την παρουσία της F-ακτίνης κατά τις 3 πρώτες ώρες από την έναρξη της φαγοκυττάρωσης προμαστιγωτών παρασίτων *L. donovani* ή οψονοποιημένων σφαιριδίων από μακροφάγα RAW246.7, όπως προέκυψε μετά από ανάλυση εικόνων συνεστιακής μικροσκοπίας. Οι τιμές (%) εκφράζουν του μέσους όρους $\pm$ σταθερές απόκλισης (* $P < 0.05$) από 3 ανεξάρτητα πειράματα στα οποία καταμετρήθηκαν 100-150 αριθμός φαινομένων

3.1.1.2 Χωροχρονική κατανομή των μοριακών δεικτών Rab7 και LAMP1 στο λείσμανιοφόρο φαγόσωμα

Όπως ήδη περιγράφηκε παραπάνω, η βιογένεση του φαγολυσοσώματος περιλαμβάνει τη σύντηξη της μεμβράνης του φαγοσώματος αρχικά με πρώιμα και ώριμα ενδοσώματα και τελικά με τα λυσοσώματα [196]. Παρά το γεγονός ότι δεν υπάρχει ένας ειδικός δείκτης για τα λυσοσώματα, η απομάκρυνση της μικρής GTPάσης Rab7 και η ταυτόχρονη επικράτηση του LAMP1 (lysosome-associated membrane protein 1) στη μεμβράνη του φαγοσώματος χρησιμοποιείται συχνά ως κριτήριο ταυτοποίησης του φαγολυσοσώματος [207].

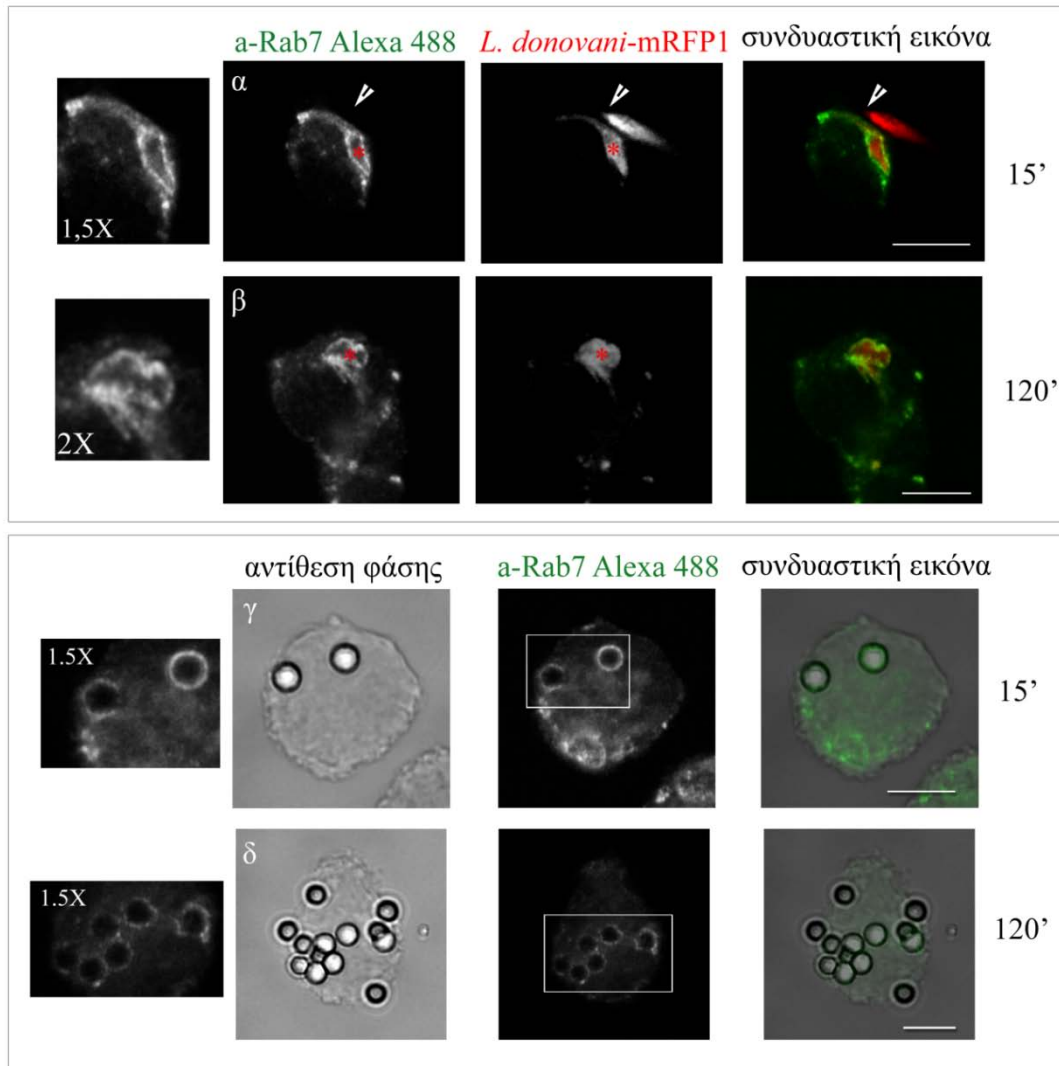
Στην περίπτωση του λείσμανιοφόρου φαγοσώματος έχει περιγραφεί μία καθυστερημένη εμφάνιση της πρωτεΐνης Rab7 στην μεμβράνη του, γεγονός που εν μέρει αποδόθηκε στην μεταφορά και ενσωμάτωση του λιποσακχαρίτη LPG από την επιφάνεια των προμαστιγωτών στη μεμβράνη του φαγοσώματος που τα περικλείει [100, 101]. Το

γεγονός αυτό ερμηνεύτηκε ως μία ακόμα στρατηγική των προμαστιγωτών της *L. donovani* με την οποία κερδίζουν τον απαραίτητο χρόνο για την προοδευτική μετατροπή τους στην αμαστιγωτή μορφή που είναι ανθεκτική στις «αντίξοες» συνθήκες του φαγολυσοσώματος.

Για τη μελέτη της κινητικής της κατανομής του μορίου Rab7 πραγματοποιήθηκε συγχρονισμένη φαγοκυττάρωση από μακροφάγα RAW264.7 διαγονιδιακών προμαστιγωτών *L. donovani* στατικής φάσης που εκφράζουν την κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη mRFP1 (*L. donovani*-mRFP1). Το φαινόμενο διακόπηκε με μονιμοποίηση των κυττάρων στα 5' έως 180' λεπτά από την έναρξη της φαγοκυττάρωσης, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Ακολούθως, ο εντοπισμός του Rab7 πραγματοποιήθηκε με χρήση ειδικού α-Rab7 πολυκλωνικού αντισώματος από κουνέλι το οποίο δεν παρουσίασε διασταυρούμενη αντίδραση με λείσμανιακούς επιτόπους (Εικόνα 3.3 α κεφαλή λευκού βέλους). Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, το Rab7 παρουσίαζε διακεκομμένη, στικτή κατανομή με κατά σημεία μεγαλύτερη ή μικρότερη συγκέντρωση, διαγράφοντας τα όρια της μεμβράνης των φαγοσωμάτων (παρασιτοφόρων ή με σφαιρίδια) (Εικόνα 3.3).

Σε ό,τι αφορά στην κινητική της κατανομής του Rab7 στα φαγοσώματα, χαρακτηριστική είναι η καθυστερημένη εμφάνιση της στη μεμβράνη των παρασιτοφόρων φαγοσωμάτων σε σχέση με αυτά που φέρουν σφαιρίδια, γεγονός που ενισχύει παλαιότερη βιβλιογραφία [101]. Συγκεκριμένα, κατά τα 5 μέχρι τα 15 πρώτα λεπτά της φαγοκυττάρωσης λιγότερα από 10% των λείσμανιοφόρων φαγοσωμάτων βρέθηκαν θετικά στο Rab7 (συγκέντρωση πράσινου φθορισμού γύρω από τα φαγοσώματα). Ακολούθως, 15 έως και 30 λεπτά από την έναρξη της φαγοκυττάρωσης κορυφώθηκε το ποσοστό των Rab7 θετικών λείσμανιοφόρων φαγοσωμάτων (~80%), ενώ στη συνέχεια παρουσίασε προοδευτική μείωση. Στις 3 ώρες, τα Rab7 θετικά φαγοσώματα αποτελούσαν το ~25% του συνολικού αριθμού των παρασιτοφόρων φαγοσωμάτων που αξιολογήθηκαν (Εικόνα 3.4).

Σε αντίθεση με τα φαγοσώματα που φέρουν παράσιτα *Leishmania* και αποκτούν τον μοριακό δείκτη των ώριμων φαγοσωμάτων Rab7 με κάποια καθυστέρηση (10-15 λεπτά), τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι το 50% των φαγοσωμάτων με οψονοποιημένα σφαιρίδια latex είναι θετικά στο δείκτη ήδη από τα πρώτα 5 λεπτά της φαγοκυττάρωσης (Εικόνα 3.4).



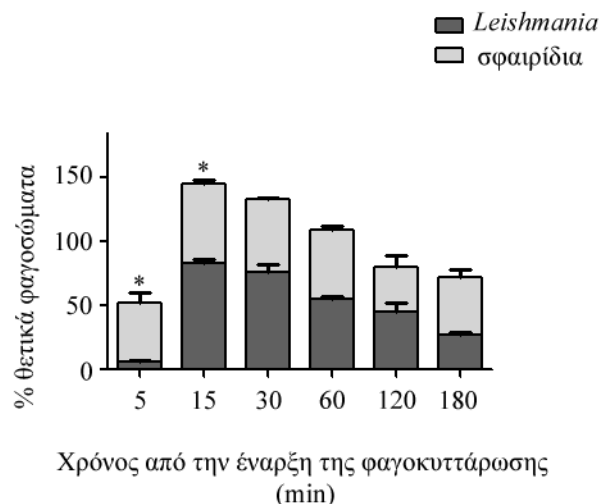
Εικόνα 3.3 Χωροχρονική κατανομή της πρωτεΐνης Rab7.

Χαρακτηριστικές εικόνες από την κατανομή της πρωτεΐνης Rab7, 15' και 120' από την έναρξη της φαγοκυττάρωσης προμαστιγωτών παρασίτων *L. donovani*-mRFP1 (άνω πλαίσιο) ή οψονοποιημένων σφαιριδίων (κάτω πλαίσιο) από μακροφάγα RAW246.7. Ο εντοπισμός της Rab7 πραγματοποιήθηκε μετά από επώαση με το πολυκλωνικό a-Rab7 αντίσωμα.

(άνω πλαίσιο) Κατανομή της Rab7 στη μεμβράνη του ενός κλειστού παρασιτοφόρου φαγοσώματος (15' και 120'). Η λευκή κεφαλή βέλους δείχνει το μη φαγοκυτταρωμένο παράσιτο. Ο κόκκινος (mRFP1) και ο πράσινος (Alexa488) φθορισμός παρουσιάζονται χωριστά ως ασπρόμαυρες εικόνες και σε συνδυαστική έγχρωμη εικόνα.

(κάτω πλαίσιο) Κατανομή της Rab7 στη μεμβράνη κλειστών φαγοσωμάτων που φέρουν σφαιρίδια πρώιμου (γ) ή μεταγενέστερου σταδίου φαγοκυττάρωσης (δ). Ο πράσινος φθορισμός παρουσιάζεται ως ασπρόμαυρη εικόνα και ως συνδυαστική έγχρωμη εικόνα μαζί με την αντίθεση φάσης.

(Αριστερά) Μεγέθυνση της περιοχής που ορίζεται από τους κόκκινους αστερίσκους ή το πλαίσιο. Size bars 8 μm.

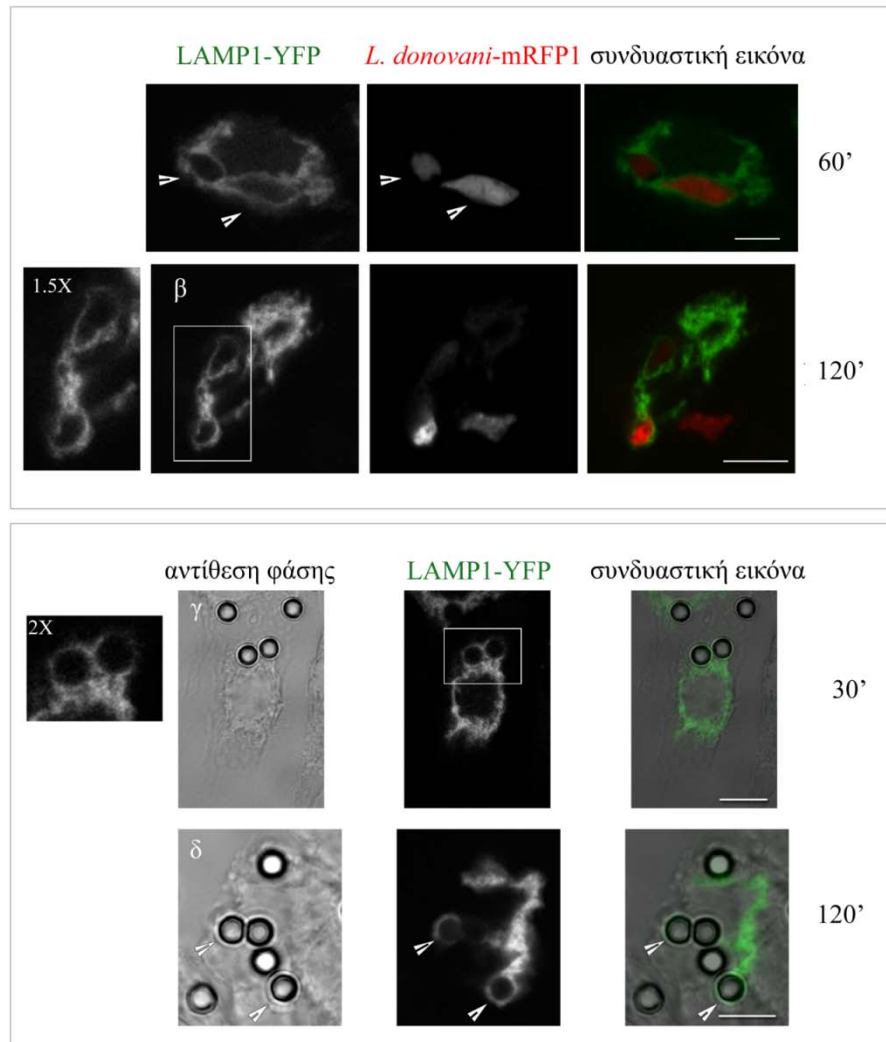


Εικόνα 3.4 Ποσοτικοποίηση των Rab7 θετικών φαγοσωμάτων κατά τις 3 πρώτες ώρες από την έναρξη της φαγοκυττάρωσης προμαστιγωτών παρασίτων *L. donovani* ή οψονοποιημένων σφαιριδίων από μακροφάγα RAW246.7, όπως προέκυψε μετά από ανάλυση εικόνων συνεστιακής μικροσκοπίας. Οι τιμές (%) εκφράζουν του μέσου όρου από 3 ανεξάρτητα πειράματα $\pm$ σταθερές απόκλισης (* $P < 0.05$) στα οποία αξιολογήθηκαν συνολικά 80-120 φαγοσώματα στην κάθε περίπτωση.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, πέραν της καθυστερημένης εμφάνισης του Rab7 στη μεμβράνη των λείσμανιοφόρων φαγοσωμάτων, φαίνεται ότι υπάρχουν δύο «κατηγορίες» ως προς την παρουσία συγκεκριμένου του μοριακού δείκτη. Η παρατεταμένη παραμονή του Rab7 (ακόμα και 3 ώρες από την έναρξη της φαγοκυττάρωσης) στη μεμβράνη μερικών φαγοσωμάτων πιθανά να συνοδεύεται με μεταβολή της χωροχρονικής κατανομής των πρωτεϊνών-ρυθμιστών της (Rab effector proteins) [208, 209] προκαλώντας την εκτροπή της ωρίμανσης του φαγολυσοσώματος [210]. Αντίθετα, σε κάποια από τα φαγοσώματα η διαδικασία της ωρίμανσής τους και η σύντηξη με ώριμα ενδοσώματα και λυσοσώματα φαίνεται να λαμβάνει χώρα πιο γρήγορα [208, 211, 212].

Σε ότι αφορά το δείκτη των ώριμων φαγοσωμάτων/ φαγολυσοσωμάτων LAMP1, η κατανομή του μελετήθηκε σε μακροφάγα RAW264.7 τα οποία εξέφραζαν παροδικά το πλασμίδιο pEYFP-N3-LAMP1 (LAMP1-YFP) και τα οποία επωάστηκαν με προμαστιγωτά παράσιτα *L. donovani*-mRFP1 στατικής φάσης, όπως και προηγουμένως. Στην περίπτωση αυτή, χαρακτηριστική ήταν η παρουσία της LAMP1-YFP γύρω και από τα 2 είδη φαγοσωμάτων (παρασιτοφόρα ή με σφαιρίδια) ξεκινούσε από τα 30 πρώτα

λεπτά και παρέμενε σε υψηλά επίπεδα μέχρι και το τέλος της δοκιμασίας, δηλαδή 3 ώρες από την έναρξη της συγχρονισμένης φαγοκυττάρωσης (Εικόνα 3.5).



Εικόνα 3.5 Χωροχρονική κατανομή του LAMP1-YFP.

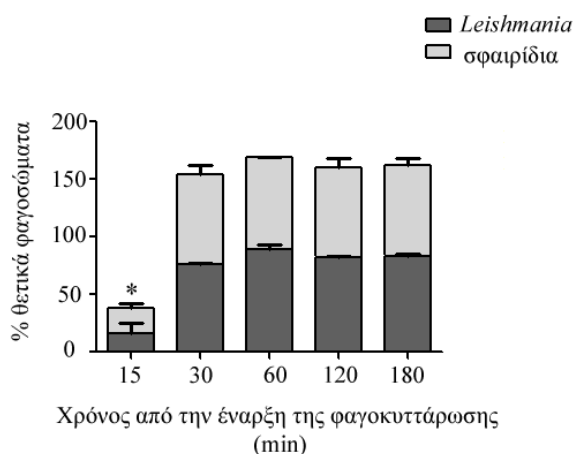
Χαρακτηριστικές εικόνες από την κατανομή του LAMP1-YFP 30', 60' και 120' από την έναρξη της φαγοκυττάρωσης προμαστιγωτών παρασίτων *L. donovani*-mRFP1 (άνω πλαίσιο) ή οψονοποιημένων σφαιριδίων (κάτω πλαίσιο) από μακροφάγα RAW246.7.

(α, β) Κατανομή του LAMP1-YFP στη μεμβράνη δύο κλειστών παρασιτοφόρων φαγοσωμάτων (60' και 120'). Ο κόκκινος (mRFP1) και ο πράσινος (Alexa488) φθορισμός παρουσιάζονται χωριστά ως ασπρόμαυρες εικόνες και σε συνδυαστική έγχρωμη εικόνα. Οι κεφαλές των λευκών βελών δείχνουν τα παράσιτα *L. donovani*-mRFP1 που βρίσκονται εντός των φαγοσωμάτων.

(γ, δ) Κατανομή του LAMP1-YFP στη μεμβράνη κλειστών φαγοσωμάτων που περιβάλλουν σφαιρίδια (30' και 120'). Ο πράσινος φθορισμός παρουσιάζεται ως ασπρόμαυρη εικόνα και σε συνδυαστική έγχρωμη εικόνα μαζί με την αντίθεση φάσης.

(Αριστερά) Μεγέθυνση της περιοχής που ορίζεται από το πλαίσιο. Size bars 8 μ m.

Ως προς την κινητική του LAMP1 σημειώνεται ότι στα 15 πρώτα λεπτά μόλις το ~15% των παρασιτόφορων φαγοσωμάτων βρέθηκαν LAMP1-YFP θετικά (συγκέντρωση του πράσινου φθορισμού γύρω από τα φαγοσώματα, Εικόνα 3.6), αποτέλεσμα που συμφωνεί με την παρατηρούμενη καθυστέρηση της συσσώρευσης του δείκτη Rab7 (Εικόνα 3.4) αλλά και με τη δημοσιευμένη γνώση [206]. Ενδιαφέρον είναι ότι στα 30 λεπτά, το 76% των λείσμανιοφόρων φαγοσωμάτων κρίθηκαν Rab7 και LAMP1 θετικά. Ακολούθως, το ποσοστό των LAMP1-YFP θετικών φαγοσωμάτων (παρασιτοφόρων και μη) παρέμεινε υψηλό (82- 84%) [206] για το υπόλοιπο της μελέτης, ενώ αντίθετα μειώθηκε το ποσοστό των Rab7 θετικών φαγοσωμάτων, γεγονός που συνάδει με τη αναμενόμενη εξέλιξη της βιογένεσης του φαγολυσοςώματος.



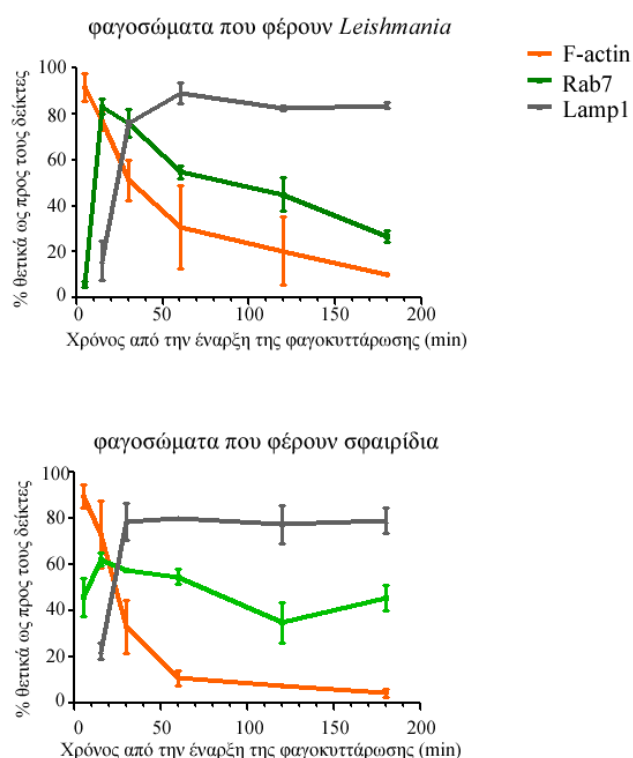
Εικόνα 3.6 Ποσοτικοποίηση των LAMP1-YFP θετικών φαγοσωμάτων κατά τις 3 πρώτες ώρες από την έναρξη της φαγοκυττάρωσης προμαστιγωτών παρασίτων *L. donovani* ή οψονοποιημένων σφαιριδίων από μακροφάγα RAW246.7, όπως προέκυψε μετά από ανάλυση εικόνων συνεστιακής μικροσκοπίας. Οι τιμές (%) εκφράζουν του μέσους όρους από 3 ανεξάρτητα πειράματα $\pm$ σταθερές απόκλισης (* $P < 0.05$), στα οποία αξιολογήθηκαν 150-180 φαγοσώματα ανά περίπτωση.

3.1.1.3 Κινητική της χωροχρονικής κατανομής της F-ακτίνης και των Rab7, LAMP1 στο λείσμανιοφόρο φαγόσωμα

Η γραφική αναπαράσταση της χωροχρονικής κατανομής των 3 μοριακών δεικτών βιογένεσης του φαγολυσοςώματος (Εικόνα 3.7) απεικονίζει τη διαδικασία ωρίμανσης των λείσμανιοφόρων φαγοσωμάτων σε σύγκριση με την αντίστοιχη των φαγοσωμάτων που φέρουν οψονοποιημένα αδρανή σφαιρίδια. Τα κύρια συμπεράσματα που προκύπτουν από την σύγκριση των ανωτέρω διαδικασιών είναι α) η παρατεταμένη παραμονή της πολυμερισμένης ακτίνης σε 2-πλάσιο και 3-πλάσιο αριθμό λείσμανιοφόρων

φαγοσωμάτων στα 30 και 60 λεπτά, αντίστοιχα, από την έναρξη της φαγοκυττάρωσης και β) η μικρή καθυστέρηση (~5-10 λεπτά) της «στρατολόγησης» του Rab7 και της ωρίμανσης του λεισμανιοφόρου φαγολυσοςώματος σε σχέση με το μάρτυρα, όπως αυτή ορίζεται από τη χρονική στιγμή κατά την οποία παρατηρείται ταυτόχρονα μείωση των Rab7 και αύξηση των LAMP1 θετικών φαγοσωμάτων.

Οι πιθανές ερμηνείες των παραπάνω παρατηρήσεων αναλύονται στο κεφάλαιο Συζήτηση.



Εικόνα 3.7 Χωροχρονική κατανομή της F-ακτίνης και των Rab7, LAMP1 κατά τις 3 πρώτες ώρες από την έναρξη της φαγοκυττάρωσης προμαστιγωτών παρασίτων *L. donovani* (πάνω) ή οψονοποιημένων σφαιριδίων (κάτω) από μακροφάγα RAW246.7. Οι τιμές εκφράζουν τους μέσους όρους (%) από 3 ανεξάρτητα πειράματα ± σταθερές απόκλισης για κάθε δείκτη.

3.1.2 Χωροχρονική κατανομή συγκεκριμένων PIs στη μεμβράνη του λεισμανιοφόρου φαγοσώματος

Όπως ήδη αναφέρθηκε παραπάνω (βλ. Εισαγωγή Παράγραφος 1.9.1), τα PIs παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της φαγοκυττάρωσης κυρίως μέσω της «στρατολόγησης» στην κυτταροπλασματική μεμβράνη ή/ και τη μεμβράνη του φαγοσώματος πρωτεϊνών οι οποίες ρυθμίζουν τη δυναμική του κυτταροσκελετού της ακτίνης και τη μεμβρανική

κυκλοφορία [135, 138]. Για το λόγο αυτό, η δράση των PIs αποτελεί στόχο πολλών ενδοκυττάρων παθογόνων βακτηρίων τα οποία έχουν αναπτύξει μηχανισμούς που την ανατρέπουν ή την τροποποιούν με σκοπό να διευκολύνουν την είσοδο ή/ και την ενδοκυττάρια επιβίωσή τους στο τροποποιημένο φαγόσωμα (βλ. Εισαγωγή Παράγραφος 1.9.2). Ενώ για τα βακτήρια τα ερωτήματα αυτά αποτελούν ενεργό πεδίο έρευνας, έχουν ελάχιστα μελετηθεί για τα πρωτόζωα κυρίως λόγω της έλλειψης φαρμακευτικών αναστολέων (πχ. wortmannin [213] και LY29002 [214]) οι οποίοι μπορούν να δρουν εκλεκτικά στα ένζυμα του μεταβολισμού των PIs του θηλαστικού-ξενιστή και όχι των παρασίτων [215].

Παρά το γεγονός αυτό, η πρόσφατη πρόοδος στην ανάπτυξη μοριακών εργαλείων που βοηθούν στη διερεύνηση του τοπικού και χρονικού εντοπισμού των PIs (χιμαιρικές φθορίζουσες πρωτεΐνες με περιοχές πρόσδεσης PIs [216, 217]) και στις τεχνικές μικροσκοπίας φθορισμού σε μονιμοποιημένα ή ζωντανά κύτταρα, έχει επιτρέψει τη μελέτη μοριακών μηχανισμών που ελέγχονται από PIs και που σχετίζονται με την εγκαθίδρυση του μικροπεριβάλλοντος των υποχρεωτικά ενδοκυττάρων παθογόνων.

Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε μία ποιοτική μελέτη της χωροχρονικής κατανομής συγκεκριμένων ειδών PIs [PtdIns(4.5)P₂, PtdIns(3.4.5)P₃ και PtdIns(3)P] στη μεμβράνη του λεϊσμανιοφόρου φαγοσώματος κατά τις 3 πρώτες ώρες από την έναρξη της φαγοκυττάρωσης. Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκε ένα αντίστοιχο σύστημα με αυτό που παρουσιάστηκε παραπάνω (βλ. Αποτελέσματα Παράγραφος 3.1.1). Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε *in vitro* φαγοκυττάρωση διαγονιδιακών παρασίτων *L. donovani* που εκφράζουν την mRFP1 (*L. donovani*-mRFP1) από μακροφάγα RAW264.7 τα οποία προηγουμένως είχαν επιμολυνθεί με πλασμίδια που φέρουν αλληλουχίες που κωδικοποιούν περιοχές πρόσδεσης με PIs ως χιμαιρικές πρωτεΐνες με φθορίζουσες πρωτεΐνες (GFP ή YFP). Η έκφραση των RAW264.7 ήταν παροδική ή σταθερή. Παράλληλα ως μάρτυρας, μελετήθηκε η χωροχρονική κατανομή των συγκεκριμένων ειδών PIs κατά τη φαγοκυττάρωση οψονοποιημένων αδρανών σφαιριδίων latex (βλ. Μέθοδοι Παράγραφος 2.2.7).

3.1.2.1 Χωροχρονική κατανομή του PtdIns(4.5)P₂

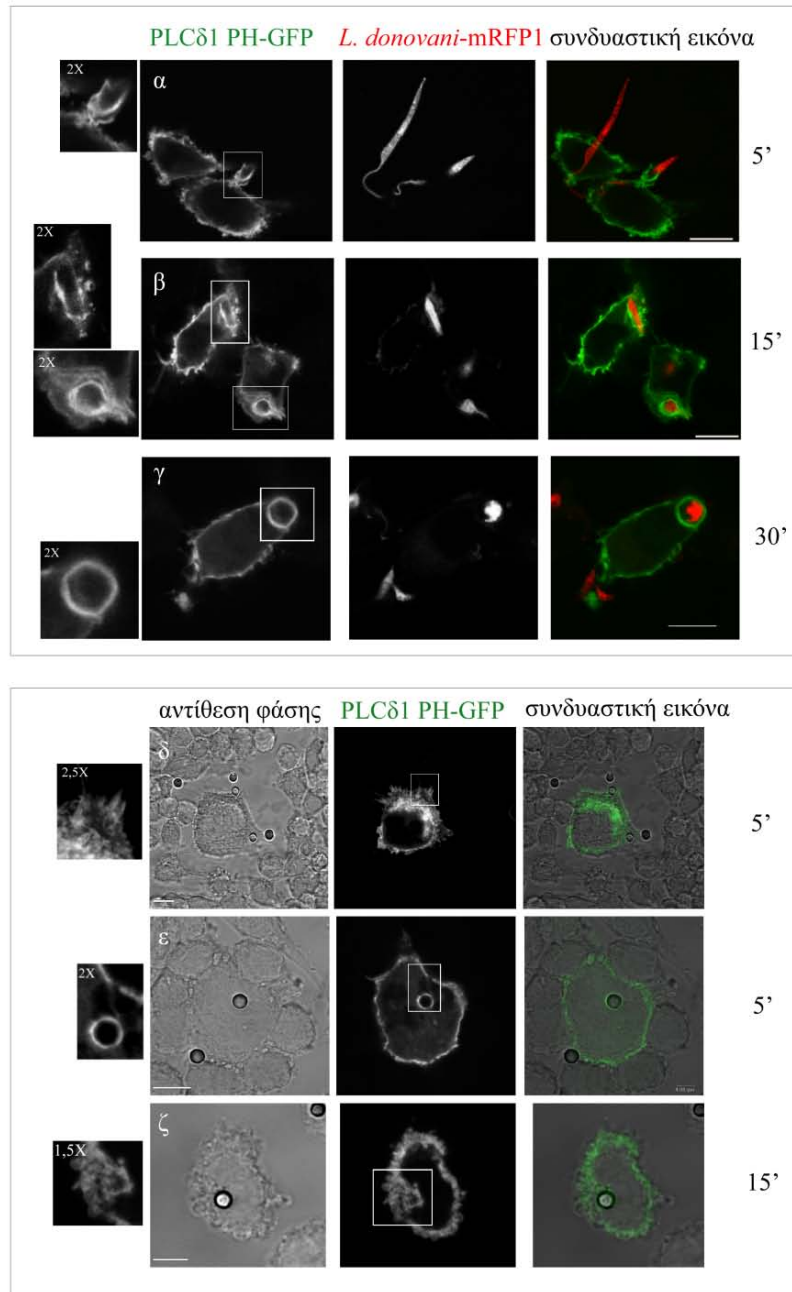
Το PtdIns(4.5)P₂ αποτελεί το 0,3-1,5% του συνόλου των φωσφολιπιδίων της κυτταροπλασματικής μεμβράνης των κυττάρων των θηλαστικών και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο κατά τη φαγοκυττάρωση [218]. Το PtdIns(4.5)P₂ συμμετέχει στην

ανασυγκρότηση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, την ενεργοποίηση των ιντεγκρινών (integrins), τη μεμβρανική κυκλοφορία και την ενεργότητα των ιοντικών καναλιών της κυτταροπλασματικής μεμβράνης [135, 138]. Χωροχρονικά, ο καταβολισμός του $\text{PtdIns}(4.5)\text{P}_2$ συμπίπτει με τον αποπολυμερισμό της F-ακτίνης, που φυσιολογικά λαμβάνει χώρα αμέσως μετά τη «σφράγιση» του φαγοσώματος (phagosome sealing) το οποίο αποτελεί απαραίτητο στάδιο για την πρόοδο της βιογένεσης του φαγολυσοσώματος. Στη διαδικασία αυτή, το συγκεκριμένο PI διαδραματίζει ρυθμιστικό ρόλο [138, 219].

Για τη μελέτη της χωροχρονικής κατανομής του $\text{PtdIns}(4.5)\text{P}_2$, μακροφάγα RAW264.7 επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο pEGFP-C1 PLCδ-PH (phospholipase C $\delta 1$) 24 ώρες πριν τη δοκιμασία της φαγοκυττάρωσης. Η χιμαιρική πρωτεΐνη που περιέχει τον PH προσδέτη της δ υπομονάδας της φωσφολιπάσης (PLC) έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς στη βιβλιογραφία για την έμμεση παρακολούθηση του $\text{PtdIns}(4.5)\text{P}_2$ [217].

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.8, το $\text{PtdIns}(4.5)\text{P}_2$ το οποίο ανιχνεύεται μέσω του φθορισμού του PLCδ-PH-GFP, κατά τα 5 και 15 πρώτα λεπτά από την έναρξη της φαγοκυττάρωσης εντοπίστηκε τόσο στη μεμβράνη των εκτεινόμενων ψευδοποδίων όσο και του φαγοκυτταρικού κυπέλλου (Εικόνα 3.8 α, δ). Επιπρόσθετα, εντοπίστηκε στη μεμβράνη των νεοσχηματισμένων φαγοσωμάτων (Εικόνα 3.8 β, γ, ε, ζ) και κυρίως στη μεμβράνη των μη «σφραγισμένων» στα οποία διακρίνεται ακόμα το χάσμα της μεμβράνης τους (Εικόνα 3.8 β) ή τα ίχνη της σύνδεσής της με την κυτταροπλασματική μεμβράνη του μακροφάγου από την οποία δεν έχουν τελείως αποκοπεί (Εικόνα 3.8 ε, ζ). Σπανιότερα, το $\text{PtdIns}(4.5)\text{P}_2$ εντοπίστηκε στη μεμβράνη φαγοσωμάτων, που σύμφωνα τουλάχιστον με τον τρόπο λήψης της εικόνας, φαίνονται να είναι ήδη κλειστά (Εικόνα 3.8 γ).

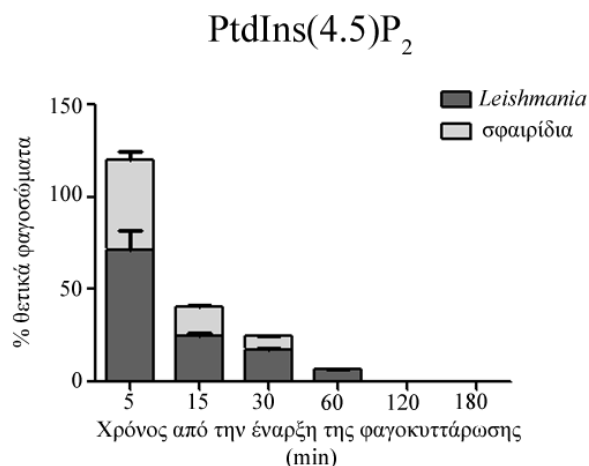
Το ποσοστό των παρασιτοφόρων φαγοσωμάτων τα οποία κρίθηκαν θετικά ως προς το PLCδ-PH-GFP [$\text{PtdIns}(4.5)\text{P}_2$] βρέθηκε κατά ~20% μεγαλύτερο σε σύγκριση με εκείνο φαγοσωμάτων που φέρουν αδρανή σφαιρίδια (Εικόνα 3.9), ειδικά κατά τα πρώτα 15 λεπτά της φαγοκυττάρωσης. Σημειώνεται ότι για τα πρώτα 5 και 15 λεπτά της φαγοκυττάρωσης θετικά φαινόμενα θεωρήθηκαν και τα εκτεινόμενα ψευδοπόδια (φαγοκυτταρικά κύπελλα, αρχόμενα φαγοσώματα) τα οποία συγκέντρωναν έντονο πράσινο φθορισμό. Χαρακτηριστικό δε είναι, ότι μέχρι και μια ώρα μετά την έναρξη της φαγοκυττάρωσης το ποσοστό των PLCδ-PH-GFP θετικών λείσμανιοφόρων φαγοσωμάτων παρέμεινε σταθερά υψηλότερο από αυτό των φαγοσωμάτων με αδρανή σφαιρίδια.



Εικόνα 3.8 Χωροχρονική κατανομή του $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$.

Χαρακτηριστικές εικόνες από την κατανομή του PLCδ PH-GFP [$\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$] κατά τα πρώτα 5'-30' από την έναρξη της φαγοκυττάρωσης προμαστιγωτών παρασίτων *L. donovani*-mRFP1 (α, β, γ) ή οψονοποιημένων σφαιριδίων (δ, ε, ζ) από μακροφάγα RAW246.7, 24 ώρες μετά από παροδική επιμόλυνση με το πλασμίδιο pEGFP-C1 PLC-PH. Φαγοκυτταρικό κύπελλο κατά τη διαδικασία εγκόλπωσης ενός παρασίτου (α) ή σφαιριδίου (δ) από το μακροφάγο. Φαγοσώματα θετικά ως προς το PLCδ PH-GFP μερικώς (β, ε) ή πλήρως σφαγισμένα (γ, ζ).

(α-γ) Ο κόκκινος (mRFP1) και ο πράσινο ζ (GFP) φθορισμός παρουσιάζονται χωριστά ως ασπρόμαυρες εικόνες και σε συνδυαστική έγχρωμη εικόνα. (δ-ζ) Ο πράσινος φθορισμός παρουσιάζεται ως ασπρόμαυρη εικόνα και ως συνδυαστική έγχρωμη εικόνα μαζί με την αντίθεση φάσης. (Αριστερά) Μεγέθυνση της περιοχής που ορίζεται από το πλαίσιο. Size bars 8 μm .

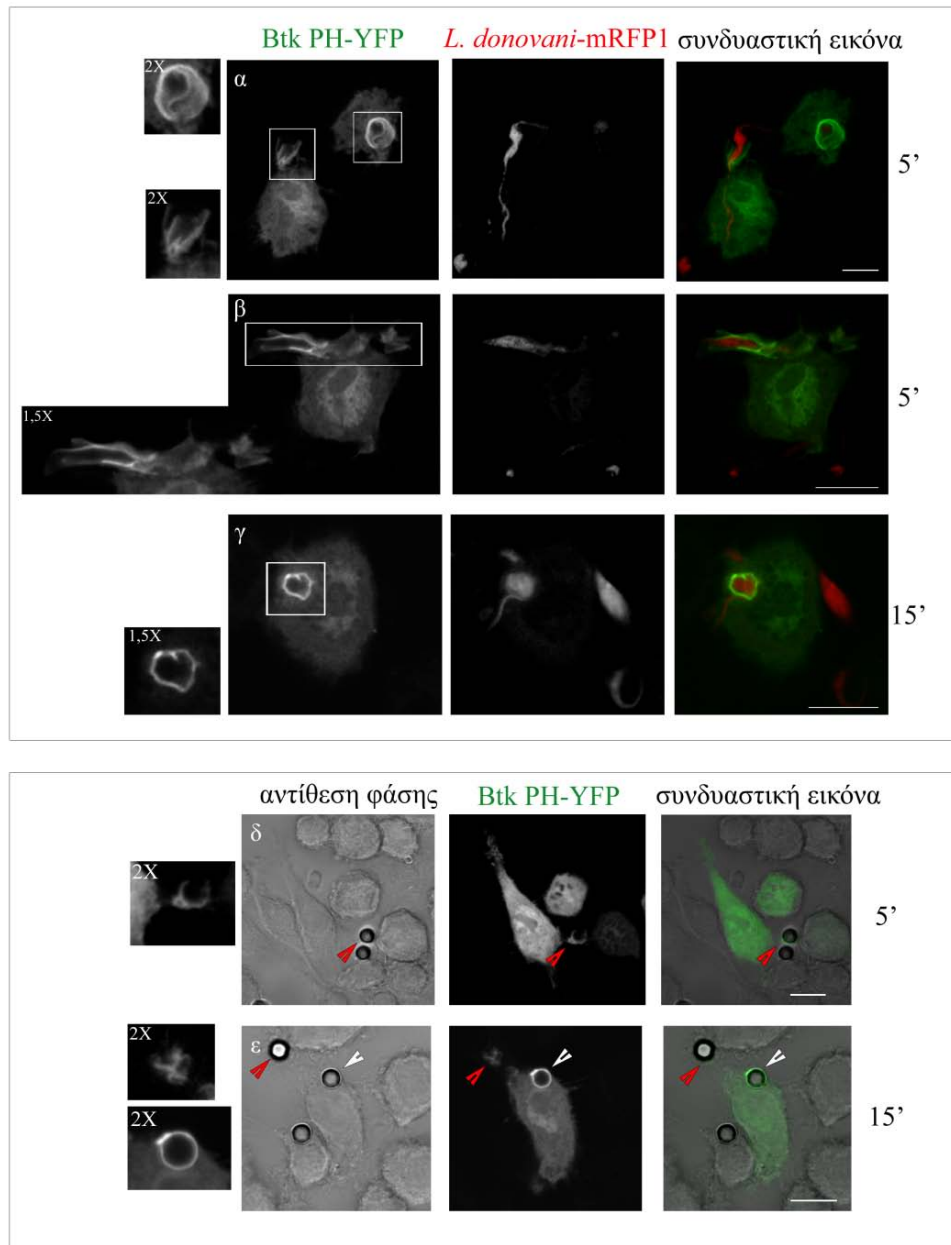


Εικόνα 3.9 Ποσοτικοποίηση των PLCδ-PH-GFP [PtdIns(4,5)P₂] θετικών φαγοσωμάτων κατά τις 3 πρώτες ώρες από την έναρξη της φαγοκυττάρωσης προμαστιγωτών παρασίτων *L. donovani*-mRFP1 ή οψονοποιημένων σφαιριδίων από μακροφάγα RAW246.7, όπως προέκυψε μετά από ανάλυση των εικόνων συνεστιακής μικροσκοπίας. Οι τιμές (%) εκφράζουν του μέσους όρους από 2 ανεξάρτητα πειράματα ± σταθερές απόκλισης στα οποία αξιολογήθηκαν 50-60 φαγοσώματα.

3.1.2.2 Χωροχρονική κατανομή του PtdIns(3,4,5)P₃

Η χωροχρονική δυναμική της σύνθεσης του PtdIns(3,4,5)P₃ κατά τη διάρκεια της φαγοκυττάρωσης συμβαδίζει με την εξαφάνιση του PtdIns(4,5)P₂, γεγονός το οποίο απαιτεί την παρουσία της PtdIns(3)Κινάσης τάξης I στην περιοχή της εγκόλπωσης του υπό φαγοκυττάρωση σωματιδίου. Πιο συγκεκριμένα, ενώ η συγκέντρωση του PtdIns(3,4,5)P₃ είναι σχεδόν μη ανιχνεύσιμη στα μη «ενεργοποιημένα» φαγοκύτταρα, αρχίζει να αυξάνει με την έναρξη της διαδικασίας της εγκόλπωσης και εξακολουθεί να παραμένει υψηλή για μερικά λεπτά (1 έως 2) μετά τη «σφράγιση» του νεοσχηματιζόμενου φαγοσώματος μέχρι τελικά να αποδομηθεί από τη δράση της SHIP φωσφατάσης [135, 138].

Για τη μελέτη της χωροχρονικής κατανομής του PtdIns(3,4,5)P₃ τα μακροφάγα RAW264.7, είκοσι-τέσσερις ώρες πριν τη δοκιμασία της φαγοκυττάρωσης, επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο pEYFP Btk-PH (Bruton's tyrosine kinase) το οποίο συνδέεται εκλεκτικά με το συγκεκριμένο είδος PI με σκοπό την έμμεση παρατήρησή του [217]. Όπως και παραπάνω, στη δοκιμή της φαγοκυττάρωσης χρησιμοποιήθηκαν τα διαγονιδιακά προμαστιγωτά *L. donovani*-mRFP1 στατικής φάσης και ως μάρτυρες οψονοποιημένα αδρανή σφαιρίδια για 5-180 λεπτά (βλ. Μέθοδοι Παράγραφος 2.2.7).



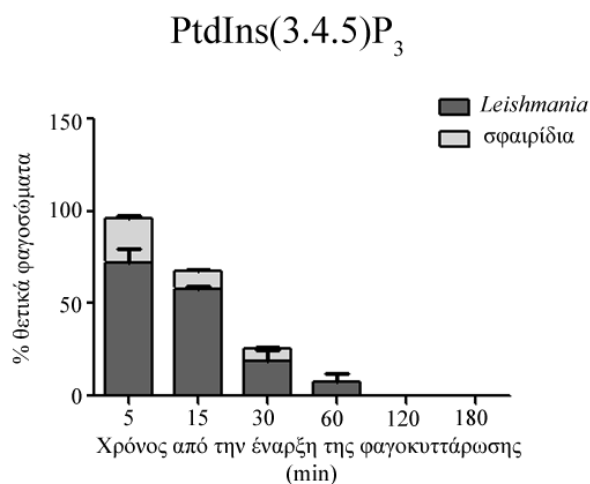
Εικόνα 3.10 Χωροχρονική κατανομή του PtdIns(3,4,5)P₃.

Χαρακτηριστικές εικόνες από την χωροχρονική κατανομή του PtdIns(3,4,5)P₃ κατά τα πρώτα 5'-15' από την έναρξη της φαγοκυττάρωσης προμαστιγωτών παρασίτων *L. donovani*-mRFP1 (άνω πλαίσιο) ή οψονοποιημένων σφαιριδίων (κάτω πλαίσιο) από μακροφάγα RAW246.7, επιμολυσμένα παροδικά με το πλασμίδιο pEYFP Btk-PH. Φαγοκυτταρικό κύπελλο κατά τη διαδικασία εγκόλωσης ενός παρασίτου (α, β) ή σφαιριδίου (δ, ε κόκκινα βέλη) από το μακροφάγο. Κλειστά φαγοσώματα που περικλείουν παράσιτα (α, γ) ή σφαιρίδια (ε, λευκό βέλος) θετικά ως προς το Btk PH-YFP.

(α-γ) Ο κόκκινος (mRFP1) και ο κίτρινος (YFP) φθορισμός παρουσιάζονται χωριστά ως ασπρόμαυρες εικόνες και σε συνδυαστική έγχρωμη εικόνα. (δ-ε) Ο κίτρινος φθορισμός(YFP) παρουσιάζεται ως ασπρόμαυρη εικόνα και ως συνδυαστική έγχρωμη εικόνα μαζί με την αντίθεση φάσης. Στις έγχρωμες εικόνες ο κίτρινος φθορισμός παρουσιάζεται με πράσινο ψευδόχρωμα.

Αριστερά: Μεγέθυνση της περιοχής που ορίζεται από το πλαίσιο ή τα βέλη. Size bars 8 μm.

Όπως φαίνεται χαρακτηριστικά στην Εικόνα 3.10, ο φθορισμός του Btk-PH-YFP και εμμέσως του $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$, εντοπίστηκε τόσο στη βάση του φαγοκυτταρικού κυπέλλου κατά την εγκόλπωση (Εικόνα 3.10 α, β, δ-λευκό βέλος) όσο και στη μεμβράνη των νεοσχηματιζόμενων φαγοσωμάτων (παρασιτοφόρων και με σφαιρίδια) τα οποία εμφανίζονται να είναι «σφραγισμένα» (Εικόνα 3.10 γ, ε-κόκκινο βέλος). Η κατανομή του $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ παρουσιάζεται γενικά ομοιόμορφη με πιο έντονα φθορίζον το σημείο της μεμβράνης του φαγοσώματος το οποίο πιθανά αντιστοιχεί στο σημείο της σφράγισής του (Εικόνα 3.10 γ, ε-λευκό βέλος).



Εικόνα 3.11 Ποσοτικοποίηση των Btk-PH-YFP [$\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$] θετικών φαγοσωμάτων κατά τις 3 πρώτες ώρες από την έναρξη της φαγοκυττάρωσης προμαστιγωτών παρασίτων *L. donovani* ή οηγονοποιημένων σφαιριδίων από μακροφάγα RAW246.7, όπως προέκυψε μετά από ανάλυση εικόνων συνενστιακής μικροσκοπίας. Οι τιμές (%) εκφράζονται του μέσου όρου από 2 ανεξάρτητα πειράματα $\pm$ σταθερές απόκλισης στα οποία καταμετρήθηκαν συνολικά 40-50 φαγοσώματα ανά περίπτωση

Η μελέτη της κινητικής του $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$, όπως προέκυψε μετά από καταμέτρηση των Btk-PH-YFP θετικών φαγοσωμάτων (συγκέντρωση κίτρινου φθορισμού στη μεμβράνη των ψευδοποδίων, των φαγοκυτταρικών κυπέλλων και των φαγοσωμάτων), αποκάλυψε ότι το συγκεκριμένο PI φαίνεται να παραμένει περισσότερο στη μεμβράνη των λείσμανιοφόρων φαγοσωμάτων συγκριτικά με εκείνων που φέρουν σφαιρίδια (Εικόνα 3.11). Μάλιστα η διαφορά αυτή ήταν εντυπωσιακή (~50%) στα 5 και 15 λεπτά από την έναρξη της φαγοκυττάρωσης. Το αποτέλεσμα αυτό συνάδει με τα αποτελέσματα της κινητικής εντοπισμού της F-ακτίνης και του $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ (βλ. Αποτελέσματα Παραγράφους 3.1.1.1 & 3.1.2.1) που δείχνουν μία παρατεταμένη παρουσία τους στη μεμβράνη των παρασιτοφόρων φαγοσωμάτων σε σχέση με των σφαιριδίων. Τέλος, ένα

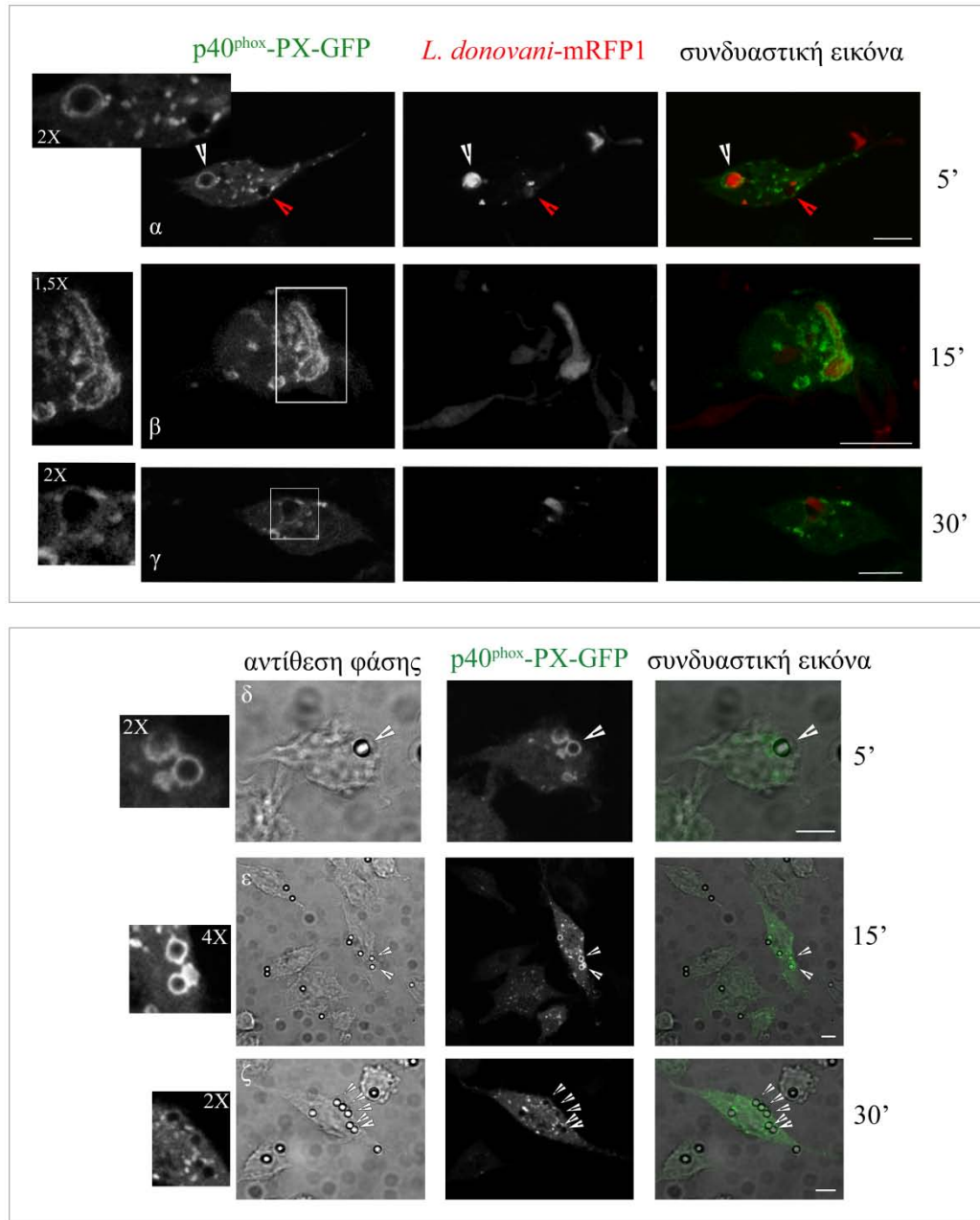
μικρό ποσοστό (~10%) των φαγοσωμάτων που φέρουν παράσιτα κρίθηκε θετικό στο PtdIns(3,4,5)P₃ ακόμα και 1 ώρα μετά την έναρξη της φαγοκυττάρωσης.

3.1.2.3 Χωροχρονική κατανομή του PtdIns(3)P (PI3P)

Το PtdIns(3)P (PI3P) υπό συνθήκες ηρεμίας του φαγοκυττάρου εντοπίζεται ως επί το πλείστον στην κυτταροπλασματική πλευρά της μεμβράνης των ενδοσωμάτων και των πολυκυστιδικών σωμάτων (MVBs) [220]. Κατά τη φαγοκυττάρωση, ενώ αρχικά το συγκεκριμένο είδος PI απουσιάζει από τη μεμβράνη των εκτεινόμενων ψευδοποδίων του μακροφάγου, στη συνέχεια και μετά τον πλήρη σχηματισμό του φαγοσώματος, παρατηρείται μία έντονη και παροδική συγκέντρωσή του στη μεμβράνη του τελευταίου. Η χωροχρονική αυτή κατανομή του PI3P σχετίζεται με τη δράση του στη διαδικασία της ωρίμανσης του φαγοσώματος [138]. Μάλιστα, ο πολυπαραγοντικός ρόλος που διαδραματίζει το PI3P στη διαδικασία μετατροπής του φαγοσώματος σε «μικροβιοκτόνο μηχανή», το έχει καταστήσει στόχο αρκετών ενδοκυττάρων βακτηριακών παθογόνων με πιο μελετημένο, το *Mycobacterium tuberculosis* [221].

Για τη μελέτη της χωροχρονικής κατανομής του PI3P χρησιμοποιήθηκε η σταθερά επιμολυσμένη κυτταρική σειρά μακροφάγων RAW264.7 που εκφράζει μόνιμα την χιμαιρική πρωτεΐνη p40^{phox}-PX-GFP (p40^{phox} υπομονάδα της NADPH οξειδάσης) [217]. Η δοκιμασία της φαγοκυττάρωσης πραγματοποιήθηκε όπως προηγούμενως.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.12, το PI3P εμφανίστηκε με χαρακτηριστική κατανομή στη μεμβράνη των φαγοσωμάτων η οποία άλλοτε ήταν ομοιόμορφη (Εικόνα 3.12 α, γ και δ-άσπρα βέλη) και άλλοτε στικτή, ιδιαίτερα σε μεταγενέστερα στάδια της φαγοκυττάρωσης (Εικόνα 3.12 β, ε). Είναι αξιοσημείωτο ότι πάνω από 40% των φαγοσωμάτων (λείσμανιοφόρων και με σφαιρίδια) αξιολογήθηκαν p40^{phox}-PX-GFP θετικά ήδη από τα 5 πρώτα λεπτά της φαγοκυττάρωσης. Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει ότι τα φαγοσώματα αυτά ήταν ήδη σφραγισμένα εκείνη τη στιγμή. Η διαφορά στο ποσοστό των PI3P θετικών λείσμανιοφόρων φαγοσωμάτων σε σύγκριση με εκείνα που έφεραν αδρανή σωματίδια παρατηρήθηκε από την πρώτη και έως τις δύο ώρες από την έναρξη της συγχρονισμένης φαγοκυττάρωσης, υποδεικνύοντας μια παρατεταμένη παραμονή ή καθυστερημένη απομάκρυνσης του PI3P από τη μεμβράνη των πρώτων, γεγονός που πιθανά να επηρεάζει τη βιογένεση των αντίστοιχων φαγολυσωμάτων (Εικόνα 3.13).

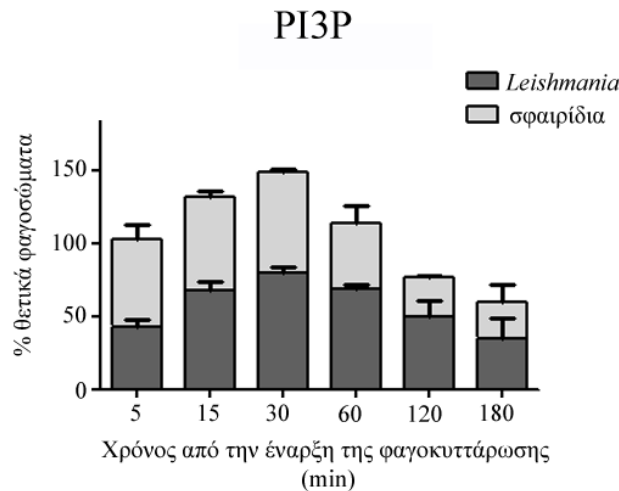


Εικόνα 3.12 Χωροχρονική κατανομή του PtdIns(3)P (PI3P).

Χαρακτηριστικές εικόνες από την κατανομή του PI3P στα φαγοςώματα κατά τα πρώτα 5'-30' από την έναρξη της φαγοκυττάρωσης προμαστιγωτών παρασίτων *L. donovani*-mRFP1 (άνω πλαίσιο) ή οψονοποιημένων σφαιριδίων (κάτω πλαίσιο) από μακροφάγα RAW246.7 που εκφράζουν μόνιμα την p40^{phox}-PX-GFP. Κατανομή του PI3P στη μεμβράνη ενός παρασιτοφόρου φαγοςώματος (α-λευκό βέλος και β) ή φαγοςώματος που περικλείει σφαιρίδιο (γ και δ-λευκά βέλη).

(α-γ) Ο κόκκινος (mRFP1) και ο πράσινος (GFP) φθορισμός παρουσιάζονται χωριστά ως ασπρόμαυρες εικόνες και σε συγχώνευση ως συνδυαστική έγχρωμη εικόνα. (δ-ζ) Ο πράσινος φθορισμός (GFP) παρουσιάζεται ως ασπρόμαυρη εικόνα και ως συνδυαστική έγχρωμη εικόνα μαζί με την αντίθεση φάσης.

(Αριστερά) Μεγέθυνση της περιοχής που ορίζεται από το πλαίσιο ή τα βέλη. Size bars 8 μm.



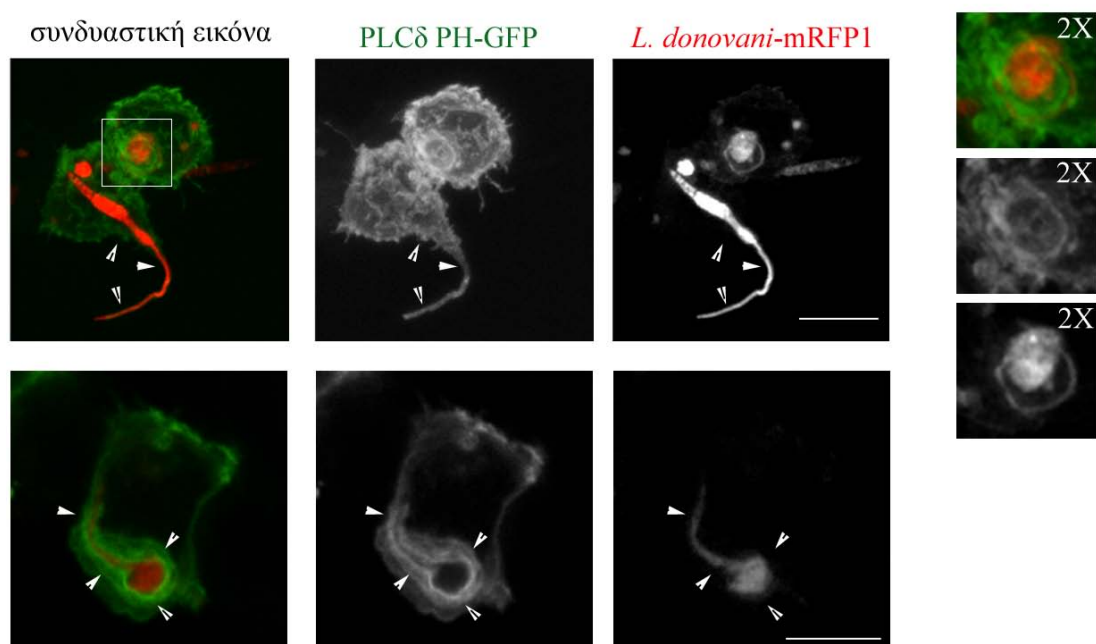
Εικόνα 3.13 Ποσοτικοποίηση των p40^{phox}-PX-GFP (PI3P) θετικών φαγοσωμάτων κατά τις 3 πρώτες ώρες από την έναρξη της φαγοκυττάρωσης προμαστιγωτών παρασίτων *L. donovani*-mRFP ή οψονοποιημένων σφαιριδίων από μακροφάγα RAW246.7, όπως προέκυψε μετά από ανάλυση εικόνων συνενστιακής μικροσκοπίας. Οι τιμές (%) εκφράζονται του μέσου όρου από 2 ανεξάρτητα πειράματα ± σταθερές απόκλισης στα οποία αξιολογήθηκαν συνολικά 50-70 φαγοσώματα ανά περίπτωση

3.1.2.4 Κινητική της χωροχρονικής κατανομής των *PtdIns(4.5)P₂*, *PtdIns(3.4.5)P₃* & *PI3P* στα λείσμανιοφόρα φαγοσώματα

Η γραφική αναπαράσταση (Εικόνα 3.15) της κινητικής της χωροχρονικής κατανομής των *PtdIns(4.5)P₂*, *PtdIns(3.4.5)P₃* και *PI3P* απεικονίζει τη χρονική εναλλαγή των τριών PIs στη μεμβράνη των παρασιτοφόρων φαγοσωμάτων και παράλληλα, στη μεμβράνη των φαγοσωμάτων που φέρουν οψονοποιημένα αδρανή σφαιρίδια. Η πιο ενδιαφέρουσα παρατήρηση που προκύπτει είναι ότι κατά τα 5 και 15 πρώτα λεπτά της φαγοκυττάρωσης, το ποσοστό των λείσμανιοφόρων φαγοσωμάτων θετικών στα *PtdIns(4.5)P₂* και *PtdIns(3.4.5)P₃* είναι σημαντικά μεγαλύτερο από το αντίστοιχο των φαγοσωμάτων με τα οψονοποιημένα σφαιρίδια. Το ίδιο, αλλά σε μικρότερο βαθμό, παρατηρήθηκε και για τα *PI3P* θετικά φαγοσώματα στα 30 και 60 λεπτά από την έναρξη της φαγοκυττάρωσης.

Οι πιθανές ερμηνείες των παραπάνω παρατηρήσεων αναλύονται στο κεφάλαιο Συζήτηση. Μία από αυτές αφορά στην υπόθεση η παρατηρούμενη χωροχρονική «εκτροπή» της παρουσίας των τριών PIs στη μεμβράνη των λείσμανιοφόρων φαγοσωμάτων να οφείλεται σε μηχανική καθυστέρηση της σφράγισής τους και ακολούθως της έναρξης της ωρίμανσής τους, εξαιτίας της κινητικότητας του σώματος και του μαστιγίου των προμαστιγωτών κατά τη διαδικασία της εγκόλπωσης. Το γεγονός αυτό

αποτυπώθηκε στα διαφορετικά σχήματα φαγοσωμάτων που παρατηρήθηκαν στις εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας (Εικόνα 3.14).

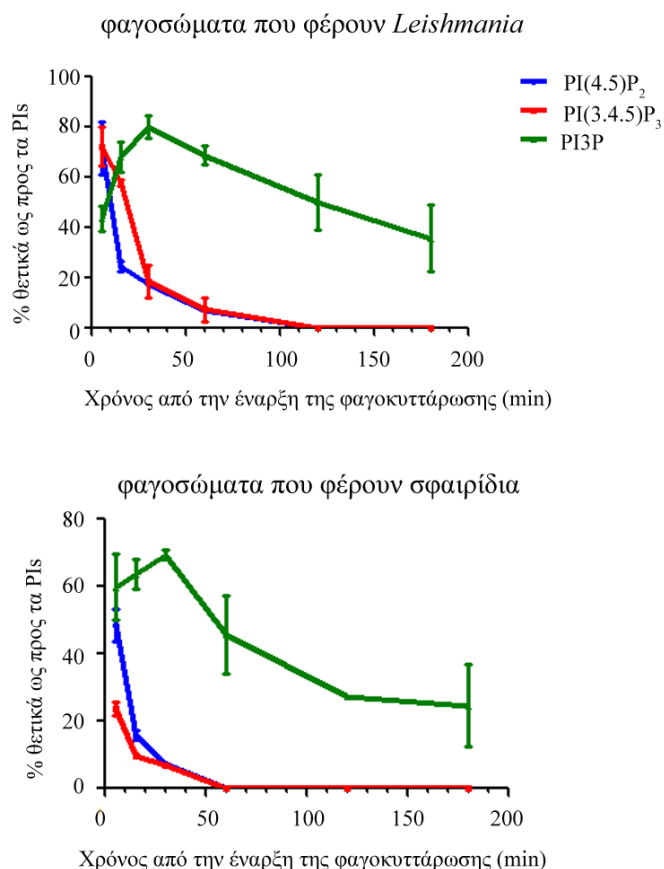


Εικόνα 3.14 Μορφές φαγοσωμάτων τα οποία σημαίνονται από το PLCδ PH-GFP [PtdIns(4,5)P₂]. Χαρακτηριστικές εικόνες κατά τα πρώτα 15' από την έναρξη της φαγοκυττάρωσης προμαστιγωτών παρασίτων *L. donovani*-mRFP1 από μακροφάγα RAW246.7.

(άνω) Εικόνα maximum projection. Ένα φαγόσωμα σφαιρικού σχήματος μέσα στο οποίο εγκλείεται ένα περιτυλιγμένο προμαστιγωτό παράσιτο (πλαίσιο) και ένα φαγόσωμα το οποίο τη στιγμή της μονιμοποίησης των κυττάρων είχε λάβει το σχήμα του παρασίτου περιβάλλοντας το μαστίγιο (κεφαλές βελών) (Δεξιά) Μεγέθυνση της περιοχής που ορίζεται από το πλαίσιο.

(κάτω) Εικόνα από μία τομή πάχους 0,8μm. Φαγόσωμα το οποίο έχει λάβει το χαρακτηριστικό σχήμα του παρασίτου που περικλείει.

Ο κόκκινος (mRFP1) και ο πράσινος (GFP) φθορισμός παρουσιάζονται χωριστά ως ασπρόμαυρες εικόνες και σε συνδυαστική έγχρωμη εικόνα. Size bars 8 μm.

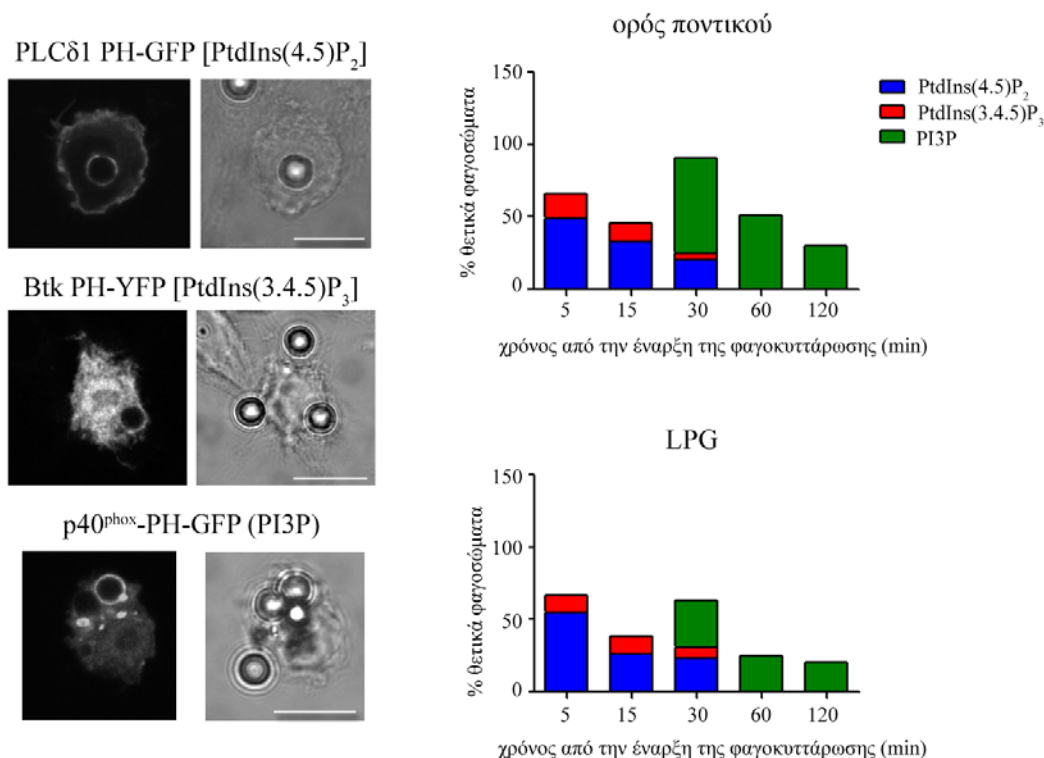


Εικόνα 3.15 Γραφική αναπαράσταση της χωροχρονικής κατανομής των PtdIns(4.5)P₂, PtdIns(3.4.5)P₃ & PI3P στα φαγοςώματα κατά τις 3 πρώτες ώρες από την έναρξη της φαγοκυττάρωσης προμαστιγωτών παρασίτων *L. donovani* (άνω) ή οψονοποιημένων σφαιριδίων (κάτω) από μακροφάγα RAW246.7, όπως προέκυψε μετά από ανάλυση εικόνων συνενστιακής μικροσκοπίας. Οι τιμές εκφράζουν του μέσους όρους (%) από 2 ανεξάρτητα πειράματα ± σταθερές απόκλισης για κάθε δείκτη.

3.1.2.5 Διερεύνηση του πιθανού ρόλου της λιποφωσφογλυκάνης LPG στη χωροχρονική κατανομή των PtdIns(4.5)P₂, PtdIns(3.4.5)P₃ & PI3P

Η λιποφωσφογλυκάνη LPG ως πιθανός μολυσματικός παράγοντας των παρασίτων *L. donovani* έχει μελετηθεί ευρέως (βλ. Εισαγωγή Παράγραφος 1.8.1, [104]). Η ενσωμάτωση της LPG στην κυτταροπλασματική μεμβράνη του μακροφάγου και η αποδιοργάνωση των λιπιδικών νανοπεριοχών της πιθανά να επηρεάζει τη δράση ή το μεταβολισμό των PIs τα οποία εντοπίζονται εκεί. Με σκοπό να προσεγγίσουμε αυτή την υπόθεση πραγματοποιήσαμε μία πρώτη, αδρή μελέτη χρησιμοποιώντας το *in vitro* σύστημα φαγοκυττάρωσης που περιγράφηκε στις προηγούμενες παραγράφους. Στην περίπτωση αυτή δεν χρησιμοποιήθηκαν προμαστιγωτά παράσιτα *L. donovani*, αλλά αδρανή σφαιρίδια latex τα οποία προηγουμένως είχαν οψονοποιηθεί είτε με ορό ποντικού

ανοσοποιημένου έναντι ολικών πρωτεϊνών από *L. donovani* είτε με καθαρισμένη *L. donovani* LPG. Η χωροχρονική κατανομή των PtdIns(4,5)P₂ και PtdIns(3,4,5)P₃ ελέγχθηκε για τα πρώτα 5, 15 και 30 λεπτά από την έναρξη της συγχρονισμένης φαγοκυττάρωσης, ενώ του PI3P για τα 30, 60 και 120 λεπτά. Τα μακροφάγα μετά το τέλος της φαγοκυττάρωσης μονιμοποιήθηκαν και μελετήθηκαν με συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού (βλ. Μέθοδοι Παράγραφος 2.2.7.1).



Εικόνα 3.16 Επίδραση της λιποφωσφογλυκάνης LPG στη χωροχρονική κατανομή των PIs. (Αριστερά) Χαρακτηριστικές εικόνες από την εντόπιση των PLCδ-PH-GFP [PtdIns(4,5)P₂], Btk-PH-YFP [PtdIns(3,4,5)P₃] και p40^{phox}-PX-GFP (PI3P) στη μεμβράνη φαγοσωμάτων που εγκλείουν αδρανή σφαιρίδια οψονοποιημένα με καθαρισμένη LPG. Size bar 8 μm. (Δεξιά) Γραφική αναπαράσταση της χωροχρονικής κατανομής των PtdIns(4,5)P₂, PtdIns(3,4,5)P₃ & PI3P σε φαγοσώματα που εγκλείουν σφαιρίδια latex οψονοποιημένα με ορό ποντικού (άνω) ή καθαρισμένη LPG (κάτω) όπως προέκυψε μετά από ανάλυση των εικόνων συνεστιακής μικροσκοπίας (60-120 φαγοσώματα μετρήθηκαν/ περίπτωση).

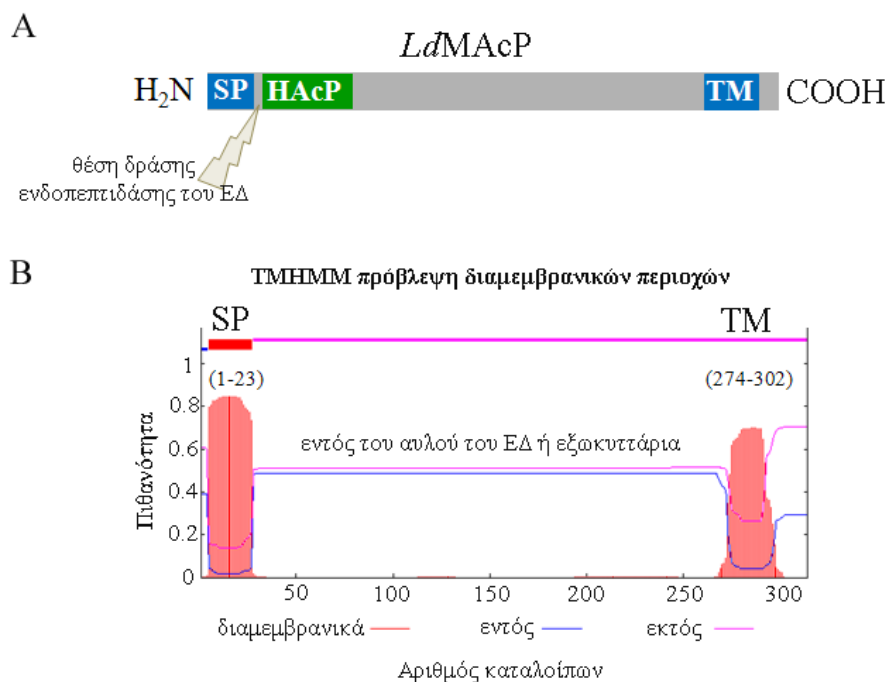
Τα αποτελέσματα ποσοτικοποίησης των θετικών φαγοσωμάτων ως προς τα συγκεκριμένα PIs ανά χρονική στιγμή παρουσιάζονται συνοπτικά στην Εικόνα 3.16. Η κινητική της κατανομής του PtdIns(4,5)P₂ στη μεμβράνη και των 2 ειδών φαγοσωμάτων δεν παρουσιάζει σημαντικές διαφορές. Αντίθετα, η κινητική κατανομής του PtdIns(3,4,5)P₃ και του PI3P δείχνει ότι μεγαλύτερο ποσοστό φαγοσωμάτων που φέρουν

σφαιρίδια οψονοποιημένα με ορό ποντικού είναι θετικά στα συγκεκριμένα PIs, ειδικά στα 30 και 60 λεπτά από την έναρξη της φαγοκυττάρωσης (Εικόνα 3.16). Πιθανές ερμηνείες αυτών των παρατηρήσεων αναλύονται στο κεφάλαιο Συζήτηση.

3.2 Μοριακός και βιοχημικός χαρακτηρισμός της *LdMAcP*. Διερεύνηση του πιθανού ρόλου της ως μολυσματικού παράγοντα του παρασίτου *L. donovani*

Σύμφωνα με τον πρώτο μοριακό χαρακτηρισμό της μεμβρανικής όξινης φωσφατάσης *LdMAcP* (AF149839.1) του παρασίτου *L. donovani*, το γονίδιο που την κωδικοποιεί είναι ενεργό και εκφράζεται σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια [164]. Αποτελείται από 948 ζεύγη βάσεων και κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη μεγέθους 315 αμινοξέων μοριακής μάζας 35.192 Da. Η πρωτεΐνη αυτή περιέχει τη χαρακτηριστική συντηρημένη αλληλουχία των όξινων φωσφατασών ιστιδίνης (HAcPs) μεταξύ των αμινοξέων Val27-Arg39 και μία αλληλουχία 23 αμινοξέων (Met1-Ala23) που κωδικοποιεί για μία σηματοδοτική αλληλουχία έκκρισης (SP) στο ER. Τέλος, στο καρβοξυ-τελικό της άκρο περιέχει μία αλληλουχία 29 υδρόφοβων αμινοξέων (Leu274-Tyr302), με πρόβλεψη λειτουργίας ως 2^η διαμεμβρανική περιοχή, η οποία έχει δειχθεί ότι «αγκυροβολεί» την πρωτεΐνη στη μεμβράνη του ER και πιθανόν να την κατευθύνει τελικά στην επιφανειακή μεμβράνη του παρασίτου [164] (Σχήμα 9 A, B). Με βάση τα παραπάνω, η *LdMAcP* προβλέπεται να έχει τοπολογία διαμεμβρανικής πρωτεΐνης τύπου I, με την καταλυτική περιοχή προσανατολισμένη στην εξωτερική επιφάνεια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης ή στον αυλό του ER. Επίσης, η *LdMAcP* περιλαμβάνει αλληλουχίες με πρόβλεψη για *N*-γλυκοζυλίωση, μυριστοϋλίωση και φωσφορυλίωση. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα πρώτα 274 ζεύγη βάσεων του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης (Open Reading Frame, ORF) του γονιδίου της *LdMAcP* είναι όμοια με την αντίστοιχη περιοχή των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις εκκρινόμενες *LdSACP*-1 (AAC79513) και *LdSACP*-2 (AAC47744) του παρασίτου *L. donovani* [164].

Στην ίδια μελέτη [164] υλικό ανοσοκατακρίμησης, μετά από επώαση εκχυλίσματος παρασίτων εμπλουτισμένο σε πρωτεΐνες της κυτταροπλασματικής μεμβράνης με ειδικό a-MAcP αντίσωμα, είχε ενεργότητα όξινης φωσφατάσης και υδρόλυε το συνθετικό υπόστρωμα *p*-νιτροφαινυλοφωσφορικό ανιόν (*p*NPP). Επιπρόσθετα, η ενεργότητα αυτή παρουσίαζε αντοχή στην αναστολή από τρυγικό οξύ το οποίο είναι γνωστός αναστολέας των όξινων φωσφατασών [222].



Εικόνα 3.17 A. Σχηματική αναπαράσταση των βασικών δομικών χαρακτηριστικών της *LdM*AcP. SP: Σηματοδοτική αλληλουχία έκκρισης; HAcP: Συντηρημένη χαρακτηριστική αλληλουχία του καταλυτικού κέντρου των όξινων φωσφατάσων Ιστιδίνης (Histidine Acid Phosphatase), TM: Διαμεμβρανική περιοχή. **B.** Πρόβλεψη για ύπαρξη διαμεμβρανικών περιοχών στην αμινοξική αλληλουχία της *LdM*AcP με χρήση του αλγόριθμου TMHMM.

Τέλος, στην ίδια εργασία υποστηρίχθηκε, μετά από έκφραση τμημάτων του γονιδίου της *LdM*AcP σε προμαστιγωτές μορφές του παρασίτου ως χίμαιρες με τη GFP, ότι η πρωτεΐνη εντοπίζεται στην εξωτερική επιφάνεια των παρασίτων *L. donovani* [164].

Στην παρούσα έρευνα γίνεται προσπάθεια διαλεύκανσης της εντόπισης, της δομής και της λειτουργίας τόσο της ενδογενούς όσο και ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών *LdM*AcP (*rLdM*AcP-mRFP1 & *rLdM*AcP-His) καθώς και του πιθανού ρόλου της στη μολυσματικότητα του παρασίτου *L. donovani* ως εν δυνάμει λοιμογόνου παράγοντα ή/ και μελλοντικού φαρμακευτικού στόχου.

3.2.1 Μοριακός χαρακτηρισμός της *LdM*AcP

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την *LdM*AcP του είδους *L. donovani* εδράζεται στο χρωμόσωμα 36 και αρχικά απομονώθηκε από το Αιθιοπικής προέλευσης στέλεχος *L. donovani*-1S2D του οποίου η αλληλουχία καταχωρήθηκε στη βάση δεδομένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών *GenBank* ως «AcP-3.1 tartrate resistant MAcP» και κωδικό ένταξης: AF149839.1 [164]. Στο πλαίσιο αυτής της εργασίας, η *LdM*AcP απομονώθηκε

από το γενετικό υλικό του στελέχους *L. donovani*-LG13 (*LdMAcP*-LG13), που προέρχεται από περιστατικό ανθρώπινης VL στο Σουδάν [169] και κατατέθηκε στη *GenBank* με κωδικό ένταξης: AIF32067 [97].

Μετά τον αρχικό μοριακό χαρακτηρισμό της πρωτεΐνης *LdMAcP* το 2002 [164], σε μετέπειτα μελέτη προτάθηκε ότι η αλληλουχία της φωσφατάσης αυτής είναι συντηρημένη μεταξύ των διαφορετικών ειδών του γένους *Leishmania* [163]. Καθώς στις μέρες μας τα γονιδιώματα από αρκετά είδη *Leishmania* έχουν αλληλουχηθεί και είναι διαθέσιμα στις βάσεις δεδομένων EMBL και TriTrypDB, θελήσαμε να ελέγξουμε αυτή την πληροφορία. Για το σκοπό αυτό, η αμινοξική αλληλουχία της *LdMAcP*-LG13 στοιχήθηκε (ClustalW2) με τις ομόλογες της από είδη *Leishmania* τα οποία έχουν γνωστή αλληλουχία γονιδιώματος και εντοπίστηκαν με ανάλυση Blast.

Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η αλληλουχία της *LdMAcP*-LG13 είναι σχεδόν ταυτόσημη (>99% ταυτότητα) με αυτές της *AcP*-3.1 (AF149839.1, tartrate resistant *MAcP*) και *AcP*-3.2 (AAG01046.1, tartrate sensitive *MAcP*) από το στέλεχος *L. donovani*-1S2D, καθώς και με την ορθόλογη της LinJ.36.6740 από το είδος *L. infantum* (στέλεχος GH12) (Εικόνα 3.18, Εικόνα 3.19). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι, στο πρόσφατα αλληλουχημένο γονιδίωμα του στελέχους *L. donovani* LDBPK282A1, η αντίστοιχη ορθόλογη πρωτεΐνη LdBPK_366740.1 έχει μήκος μόλις 93 αμινοξέα από τα οποία τα πρώτα 72 είναι ίδια με τα κατάλοιπα του αμινοτελικού μισού των αντίστοιχων *MAcP*-πρωτεϊνών από τα Αιθιοπικά και Σουδανικά *L. donovani* στελέχη (83,87% ταυτότητα, Εικόνα 3.18).

Σε ό,τι αφορά στο δερμοτρόπο στέλεχος αναφοράς *L. major* Friedlin και στο μη παθογόνο για τα θηλαστικά στέλεχος *L. tarentolae* Parrot-Tarll οι αμινοξικές αλληλουχίες των LmjF.36.6460 και LtaP34.3910, αντίστοιχα οι οποίες είναι ορθόλογες της *LdMAcP*, έχουν 79.2% και 65,4% ταυτότητα με αυτή των ειδών *L. donovani*-LG13 και *L. infantum*-GH12 (Εικόνα 3.18). Το μικρότερο ποσοστό ταυτότητας και οι προβλεπόμενες, από την νουκλεοτιδική αλληλουχία, δομικές διαφορές των *LdMAcP* ομόλογων πρωτεϊνών από τα είδη *L. major* και *L. tarentolae* αντικατοπτρίζεται στην απόσταση των αντίστοιχων κλάδων τους στο φυλογενετικό δενδρόγραμμα UPGMA (Εικόνα 3.19).

Πιο συγκεκριμένα, το γονίδιο LmjF.36.6460 από την *L. major* Friedlin, που εδράζεται στο χρωμόσωμα 36, κωδικοποιεί για μία πρωτεΐνη 224 αμινοξέων με προβλεπόμενη μοριακή μάζα 25,4 kDa. Η πρωτεΐνη αυτή παρουσιάζει δομικές διαφορές σε σχέση με την *LdMAcP*-LG13 καθώς από το αμινοτελικό της άκρο απουσιάζει η προβλεπόμενη αλληλουχία έκκρισης (αλγόριθμος TMHMM) και επιπλέον δε διαθέτει τη προβλεπόμενη

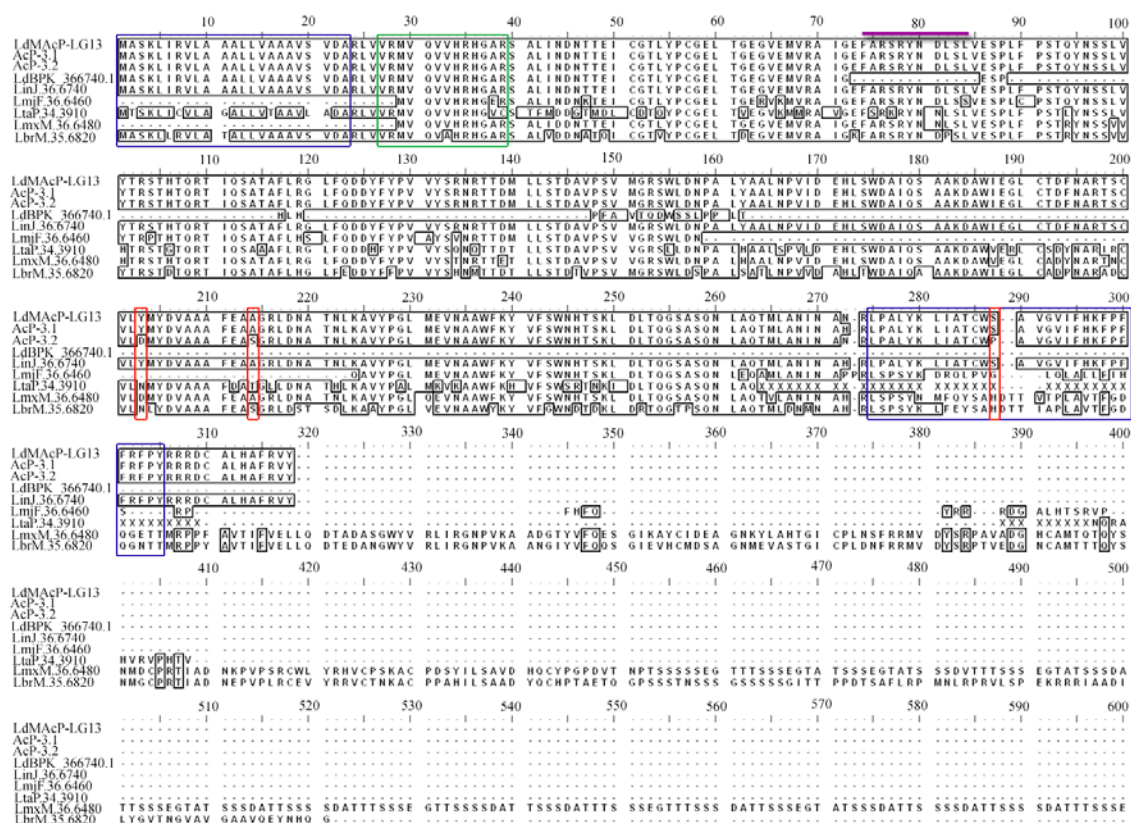
καρβοξυ-τελική διαμεμβρανική περιοχή που υπάρχει στην *LdMACP*, υποδηλώνοντας την πιθανότητα η φωσφατάση αυτή να δρα ως ένα ενδοκυτταρικό διαλυτό ένζυμο. Για να επιβεβαιώσουμε ότι το παραπάνω αποτέλεσμα δεν οφείλεται σε λάθος κατά την αλληλούχιση ή την καταχώρηση της αλληλουχίας του γονιδίου LmjF.36.6460 στη βάση δεδομένων TriTrypDB, ενισχύσαμε με PCR, από γενωμικό DNA *L. major* Friedlin, μία περιοχή που εκτείνεται 96 ζεύγη βάσεων πριν το 5' άκρο του προβλεπόμενου ORF του γονιδίου LmjF.36.6460 έως το κωδικόνιο λήξης αυτού (βλ. Παράγραφο Μέθοδοι 2.1.6). Το κύριο προϊόν της PCR καθαρίστηκε από πηκτή αγαρόζης και στάλθηκε για αλληλούχιση (βλ. Παράγραφο Μέθοδοι 2.2.1.10). Μετά από σύγκριση της αλληλουχίας που προέκυψε με στοίχιση ClustalW2 επιβεβαιώθηκε η ορθότητα της καταχωρημένης αλληλουχίας στη βάση TriTrypDB που αντιστοιχεί στο ORF του γονιδίου LmjF.36.6460. Μάλιστα διαπιστώθηκε ότι η έλλειψη 2 βάσεων, 63 ζεύγη βάσεων μετά από το αντίστοιχο πρώτο ATG κωδικόνιο του ORF της *LdMACP*-LG13, οδηγεί στην αλλαγή του ORF της LmjF.36.6460 με εισαγωγή κωδικονίων λήξης. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα το ORF της LmjF.36.6460 να ξεκινάει από το αντίστοιχο δεύτερο ATG κωδικόνιο της *LdMACP*-LG13 (Met29) (Εικόνα 3.18). Επιπρόσθετα, επιβεβαιώθηκε η απουσία 65 αμινοξικών καταλοίπων (αα 158-223) που αντιστοιχούν στο εξωκυττάριο τμήμα της *LdMACP*-LG13 και στο οποίο περιέχεται το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Πιθανά, η έλλειψη αυτή να επηρεάζει την τελική αναδίπλωση της LmjF.36.6460 με απώλεια της καταλυτικής της δράσης.

Σε ό,τι αφορά στην *L. tarentolae* Parrot-Tarll, το ορθόλογο *LdMACP* γονίδιο (LtaP34.3910) εδράζεται στο χρωμόσωμα 34 κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη 325 αμινοξέων (δηλαδή κατά 10 κατάλοιπα μεγαλύτερη της *LdMACP*-LG13) και έχει προβλεπόμενο μοριακό βάρος 33,1-39,7 kDa. Η διακύμανση στην πρόβλεψη του μοριακού βάρους της πρωτεΐνης *LtaPMAcP* οφείλεται στο ότι η καταχωρημένη στη βάση TriTrypDB DNA αλληλουχία της περιέχει 50 μη ταυτοποιημένα αμινοξέα στο καρβοξυ-τελικό της μισό (Εικόνα 3.18, σύμβολα «X»). Το γεγονός αυτό καθιστά αδύνατη την πραγματοποίηση πρόβλεψης για την ύπαρξη διαμεμβρανικής περιοχής στο τμήμα αυτό της πρωτεΐνης. Με σκοπό να διευκρινιστεί το ερώτημα αυτό, έγινε ενίσχυση με PCR, από γενωμικό DNA *L. tarentolae* (στέλεχος Parrot), του δεύτερου μισού του γονιδίου LtaP34.3910 (βλ. Μέθοδοι Παράγραφο 2.1.6) το οποίο εκτείνεται 97 επιπλέον ζεύγη βάσεων μετά το προβλεπόμενο κωδικόνιο λήξης του συγκεκριμένου γονιδίου. Ακολούθησε καθαρισμός του κύριου PCR προϊόντος από την πηκτή αγαρόζης και αποστολή για αλληλούχιση, όπως και προηγουμένως. Παρά τις επανειλημμένες προσπάθειες μας, τα αποτελέσματα της

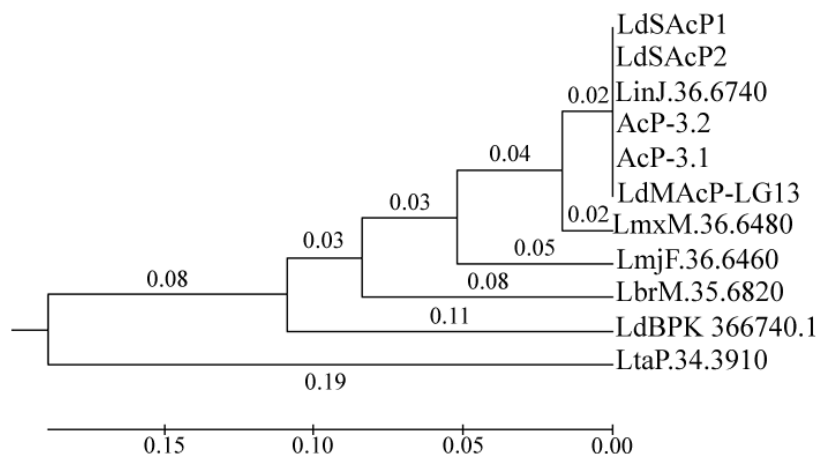
αλληλούχισης δεν ήταν ικανοποιητικά και έτσι δεν έγινε εφικτός ο προσδιορισμός των αμινοξέων που απαρτίζουν το προς εξέταση τμήμα του γονιδίου LtaP34.3910 ούτε και των δομικών χαρακτηριστικών του. Πιθανά η δυσκολία αλληλούχισης του καρβοξυτελικού τμήματος του συγκεκριμένου γονιδίου να οφείλεται σε παράγοντες όπως η ύπαρξη περιοχών πλούσιων σε GC βάσεις ή με επαναλαμβανόμενες ακολουθίες βάσεων ή στην παρουσία «βρόγχου φουρκέτας» (hairpin loop) που εμποδίζουν τη δράση της DNA πολυμεράσης [223].

Τέλος, οι ομόλογες της LdMAcP πρωτεΐνες από τα είδη *L. braziliensis* (LbrM.35.6820) και *L. mexicana* (LmxM.36.6480) τα οποία είναι υπεύθυνα για τη CL και MCL, διαφοροποιούνται σημαντικά από την LdMAcP-LG13 (ταυτότητα 71,75% και 72,7%, αντίστοιχα) (Εικόνα 3.18, Εικόνα 3.19). Συγκεκριμένα, οι πρωτεΐνες αυτές κωδικοποιούνται από γονίδια τα οποία εδράζονται στα χρωμοσώματα 35 και 36, αποτελούνται από 520 και 1280 αμινοξέα (Εικόνα 3.18) και τα προβλεπόμενα μοριακά τους βάρη είναι 56,6 και 127,5 kDa, αντίστοιχα. Οι φωσφατάσες από τα παραπάνω είδη δεν είναι μόνο μεγαλύτερες σε μέγεθος από την ορθολογή τους του στελέχους *L. donovani*, αλλά επιπλέον, παρουσιάζουν δομικές διαφορές. Η αμινοξική αλληλουχία της LbrMAcP δε προβλέπεται να διαθέτει διαμεμβρανική περιοχή στο καρβοξυ-τελικό άκρο της (αλγόριθμος TMHMM), ούσα πιθανά μία εκκρινόμενη πρωτεΐνη, ενώ η LmxMAcP δε διαθέτει επιπλέον τη σηματοδοτική αλληλουχία έκκρισης, υποδηλώνοντας πιθανά μία ενδοκυττάρια εντόπιση.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα μας συνηγορούν στο ότι η LdMAcP, ως ένα ένζυμο με προβλεπόμενη μεμβρανική εντόπιση και εξωκυττάριο προσανατολισμό του ενεργού του κέντρου, είναι παρούσα αποκλειστικά στο σύμπλεγμα *L. donovani* ενώ παρουσιάζει πολυμορφισμούς μεταξύ των στελεχών που το απαρτίζουν. Το παραπάνω εύρημα ανατρέπει την προηγούμενη δημοσιευμένη γνώση, σύμφωνα με την οποία το γονίδιο που κωδικοποιεί την LdMAcP είναι συντηρημένο μεταξύ των ειδών του παρασίτου *Leishmania* [163].



Εικόνα 3.18 Πολλαπλή στοίχιση ορθόλογων αλληλουχιών της LdMacP-LG13 (AIF32067) από παράσιτα *Leishmania* spp. με χρήση του αλγόριθμου ClustalW2: *L. donovani* στέλεχος 1S2D AcP-3.1 (tartrate resistant; AF149839) και AcP-3.2 (tartrate sensitive; AAG01046.1), *L. donovani* στέλεχος BPK282A1 (LdBPK_366740.1), *L. infantum* (LmjF.36.6740), *L. major* Friedlin στέλεχος αναφοράς (LmjF.36.6460), *L. mexicana* στέλεχος (LmxM.36.6480), *L. braziliensis* στέλεχος M2904 (LbrM.35.6820) and *L. tarentolae* Parrot-Tarll (LtaP34.3910). Οι αμινοξικές αλληλουχίες εντοπίστηκαν στις βάσεις EMBL και TriTrypDB και αναλύθηκαν με τη βοήθεια του αλγορίθμου BioEdit Sequence Alignment Editor. Τα πανομοιότυπα κατάλοιπα περιβάλλονται από μαύρα πλαίσια. Με κόκκινα κατακόρυφα πλαίσια περιβάλλονται τα κατάλοιπα των ορθόλογων πρωτεϊνών της LdMacP που διαφέρουν μεταξύ στελεχών *L. donovani*. Τα κατάλοιπα που αντιστοιχούν στη σηματοδοτική αλληλουχία έκκρισης (Met1–Ala23) και την υποθετική διαμεμβρανική περιοχή (Glu73–Leu84) περιβάλλονται με σκούρο μπλε πλαίσιο και το συντηρημένο μοτίβο στο καταλυτικό κέντρο των HAcP με πράσινο. Η μωβ οριζόντια γραμμή αντιστοιχεί στα αμινοξικά κατάλοιπα που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του μονοκλωνικού αντισώματος έναντι της LdMacP. Από την αλληλουχία της *L. mexicana* (LmxM.36.6480) παρουσιάζονται τα πρώτα 600 αμινοξέα.



Εικόνα 3.19. Φυλογενετικό δενδρόγραμμα (Rooted UPGMA που περιλαμβάνει και το μήκος των κλάδων) βασισμένο στην πολλαπλή στοίχιση (ClustalW2) των αμινοξικών αλληλουχιών ορθόλογων της *LdMACP* πρωτεϊνών από διάφορα είδη *Leishmania*. Στην ανάλυση έχουν συμπεριληφθεί οι αλληλουχίες των εκκρινόμενων μορφών της *LdMACP* [*LdSACp1* (AAC79513) & *LdSACp2* (AAC47744)]. Το δενδρόγραμμα κατασκευάστηκε με χρήση του αλγόριθμου MEGA.

3.2.1 Εντοπισμός ομόλογων της *LdMACP* υποθετικών μεμβρανικών φωσφατασών ιστιδίνης και άλλων υποψήφιων έξω-φωσφατασών σε *Leishmania* spp.

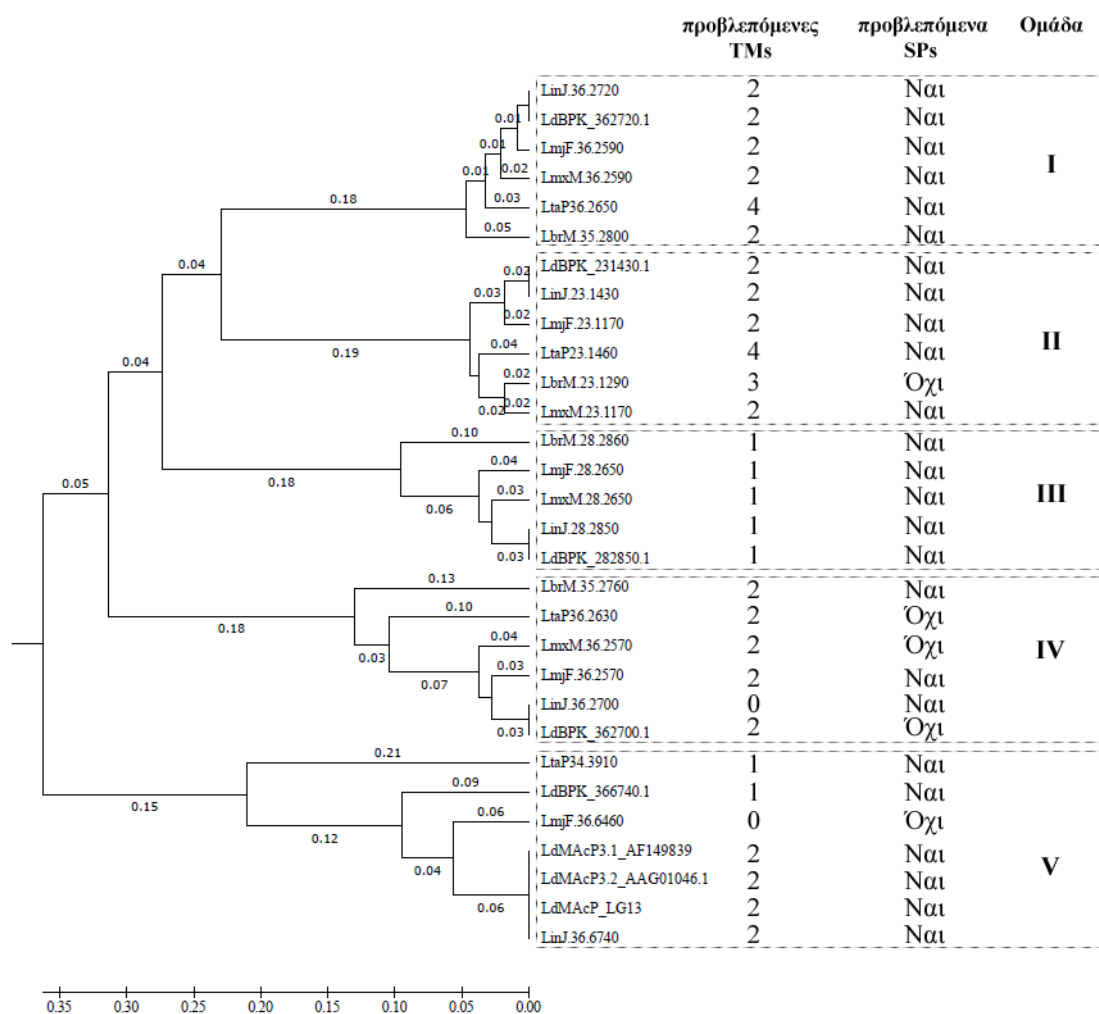
Η παραπάνω ανάλυση Blast η οποία πραγματοποιήθηκε με σκοπό την εύρεση των ορθόλογων της *LdMACP* στα ήδη γνωστά γονιδιώματα από *Leishmania* spp., αποκάλυψε και άλλα ORF που περιέχουν το συντηρημένο μοτίβο RHGXRXR των HACPs [224].

Τα γονίδια αυτά εντοπίστηκαν στα χρωμοσώματα 23, 28 και 36 των γονιδιωμάτων όλων σχεδόν των ειδών που ελέγχθηκαν και τα οποία ομαδοποιήθηκαν σε 5 διακριτές ομάδες (δενδρόγραμμα UPGMA, Εικόνα 3.20, Ομάδες I-V). Μάλιστα, στο γονιδίωμα της *L. donovani* υπάρχουν, πέραν της *LdMACP*, 3 τουλάχιστον υποψήφια γονίδια που κωδικοποιούν για μεμβρανικές όξινης HACPs με πιθανή εξωκυττάρια δράση (*LdBPK_362700.1*, *LdBPK_362720.1* και *LdBPK_231430.1*, Εικόνα 3.20).

Η ταυτότητα των αμινοξικών αλληλουχιών που κωδικοποιούν τα γονίδια που εντοπίσαμε κυμαίνεται, εντός των ομάδων, από 64,5% έως 99,7% και η ανάλυση τους με τη χρήση του αλγόριθμου TMHMM έδειξε ότι οι περισσότερες διαθέτουν, όπως και η *LdMACP*, πρόβλεψη για 2 διαμεμβρανικές περιοχές (Εικόνα 3.20). Οι περιοχές αυτές εντοπίζονται μία στο αμινοτελικό άκρο, με ή χωρίς την ύπαρξη αλληλουχίας έκκρισης (χρήση του αλγόριθμου SignalP 4.1, Εικόνα 3.20) και μία στο καρβοξυ-τελικό μισό.

Η οργάνωση αυτή υποδεικνύει μεμβρανικές πρωτεΐνες τύπου I [225], με προβλεπόμενη εντόπιση είτε στις μεμβράνες του ER ή οργανιδίων (πχ λυσοσώματα) και

προσανατολισμό του καταλυτικού τους κέντρου στον αυλό του ER ή στο εσωτερικό των οργανιδίων αυτών (ενδοκυττάρια εντόπιση) είτε προς την εξωκυττάρια πλευρά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης του παρασίτου. Τέλος, δεν μπορεί να αποκλειστεί η περίπτωση της κυκλοφορίας των μεμβρανικών πρωτεϊνών από την επιφάνεια του παρασιτικού κυττάρου στα λυσοσώματα μέσω ενδοκυττάρωσης [226].



Εικόνα 3.20 Φυλογενετικό δένδρόγραμμα (Rooted UPGMA) βασισμένο στην πολλαπλή στοίχιση (ClustalW2) αμινοξικών αλληλουχιών υποθετικών HAcPs από διάφορα είδη της *Leishmania*. Όλες οι αλληλουχίες προέρχονται από τις βάσεις δεδομένων GenBank, GeneDB ή TriTryp. Δεξιά καταγράφεται ο αριθμός των προβλεπόμενων διαμεμβρανικών περιοχών (TMs) και η πρόβλεψη ύπαρξης (Ναι) ή μη (Όχι) αλληλουχιών έκκρισης (SPs). Χρήση αλγόριθμων TMHMM, SignalP 4.1 και MEGA.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματά μας αναδεικνύουν το γεγονός ότι και άλλες μεμβρανικές όξινες φωσφατάσες ιστιδίνης, εκτός της LdMAcP, πιθανά να προσδίδουν την

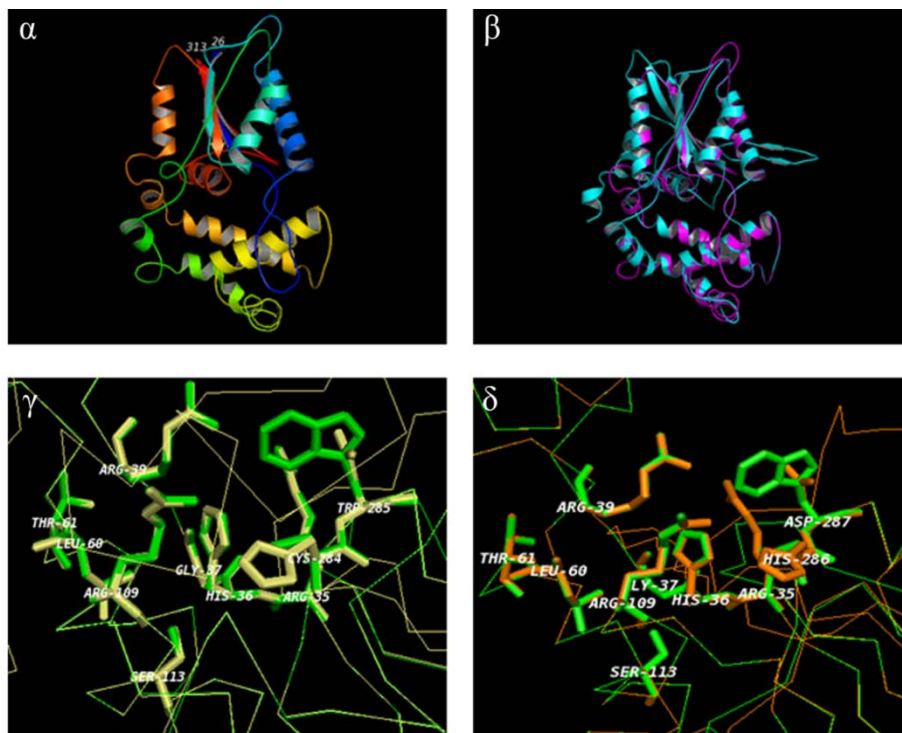
ενεργότητα έξω-φωσφατάσης στα παράσιτα *Leishmania*, ενώ παράλληλα αναδεικνύονται τα παραμένοντα ανοικτά ερωτήματα στο πεδίο.

3.2.2 *In silico* τρισδιάστατο (3D) δομικό μοντέλο της *LdMAcP* και σύγκριση του με τη *LdSACP1* και την ανθρώπινη προστατική όξινη φωσφατάση (hPAP)

Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, η *LdMAcP* είναι μία πρωτεΐνη υψηλής ομολογίας με τις εκκρινόμενες όξινες φωσφατάσες του παρασίτου *L. donovani* (*LdSACP*s) [*LdSACP1* (AAC79513) & *LdSACP2* (AAC47744)] [227]. Οι πρωτεΐνες *LdSACP*s κωδικοποιούνται από 2 γονίδια τοποθετημένα σε σειρά στο χρωμόσωμα 36 και οι αμινοξικές τους αλληλουχίες έχουν εντυπωσιακά μεγάλη ταυτότητα με αυτή της *LdMAcP* μέχρι και τα πρώτα 274 αμινοξέα του αμινοτελικού τους μισού. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει την ύπαρξη πιθανών διακριτών λειτουργικών ρόλων για τα παραπάνω ένζυμα.

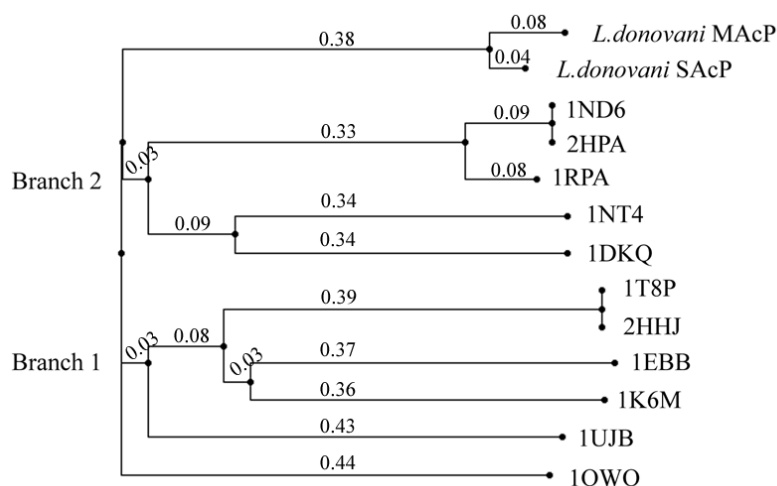
Η σχετικά υψηλή αμινοξική ταυτότητα της *LdMAcP* με την ανθρώπινη προστατική όξινη φωσφατάση (hPAP) (PDB code: 2HPA, κατάλοιπα 33-374) [228], περίπου ~24% για την περιοχή που έχει μελετηθεί κρυσταλλογραφικά, επέτρεψε την κατασκευή ενός αξιόπιστου δομικού μοντέλου αυτής (αα 26–313) αλλά και της *LdSACP1* (αα 26-392) (Εικόνα 3.21). Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με την αν. καθηγήτρια Αναστασία Πολίτου και το εργαστήριο Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Τα μοντέλα προέκυψαν με συγκριτική μοντελοποίηση χρησιμοποιώντας ως δομικό πρότυπο την κρυσταλλική δομή της hPAP και η αξιοπιστία τους ελέγχθηκε και επιβεβαιώθηκε επί τη βάση κριτηρίων που χρησιμοποιούνται ευρέως για την εκτίμηση των ποιοτικών στοιχείων πρωτεϊνικών δομών (structure validity criteria). Οι τυπικές αποκλίσεις (rmsds) μεταξύ του μοντέλου και του προτύπου ήταν 0.32 Å για τη *LdSACP1* και 0.35 Å για τη *LdMAcP* για τα άτομα C_α και 0.47 and 0.51 Å, αντιστοίχως για όλα τα άτομα του πολυπεπτιδικού σκελετού. Περισσότερο από 90% των καταλοίπων βρέθηκαν εντός των επιτρεπτών κατά Ramachandran περιοχών, όσον αφορά τις γωνίες των δεσμών.



Εικόνα 3.21 Τρισδιάστατη απεικόνιση δομικού μοντέλου της *LdMAcP*. (α) Απεικόνιση της *LdMAcP* σε μορφή ταινίας χρωματισμένης ανάλογα με την δευτεροταγή δομή της φωσφατάσης, (β) Υπέρθεση των μοριακών μοντέλων των *LdMAcP* και *LdSACP1* (μωβ *LdMAcP*, κυανό *LdSACP1*), (γ) Απεικόνιση του μοριακού μοντέλου του καταλυτικού κέντρου της *hPAP* (κίτρινο) σε υπέρθεση με το μοριακό μοντέλο του καταλυτικού κέντρου της *LdMAcP* (πράσινο), (δ) Υπέρθεση των μοριακών μοντέλων των καταλυτικών κέντρων των *LdMAcP* (πράσινο) και *LdSACP1* (πορτοκαλί). Σημαίνονται τα κατάλοιπα με ιδιαίτερη σημασία/ ρόλο.

Και οι τρεις παραπάνω πρωτεΐνες (*LdMAcP*, *LdSACP1*, *hPAP*) διαθέτουν στο αμινοτελικό άκρο τους (Val27 έως Arg39) τη χαρακτηριστική συντηρημένη αλληλουχία των όξινων φωσφατασών ιστιδίνης και αποτελούν μέλη της υπερ-οικογένειας των HAcPs [165]. Πιο συγκεκριμένα, από την ανάλυση δενδρογράμματος, προέκυψε ότι τόσο η *LdMAcP* όσο και οι *LdSACP1* ανήκουν στον κλάδο 2 (branch 2) της υπερ-οικογένειας (Εικόνα 3.22) και είναι εξελικτικά πλησιέστερες στην ανθρώπινη *hPAP* και σε αυτή του επίμυος.



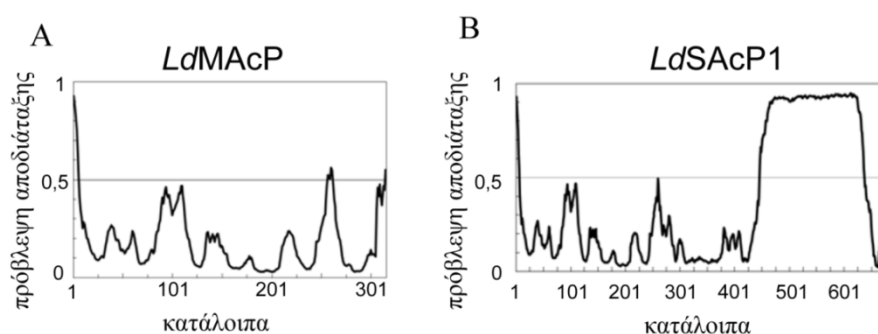
Εικόνα 3.22 Φυλογενετικό δένδρόγραμμα (Consensus tree) βασισμένο στην πολλαπλή στοίχιση (ClustalW2) των αμινοξικών αλληλουχιών της *LdMAcP* (AIF32067) και *LdSACP1* (AAC79513) με άλλα μέλη της υπερ-οικογένειας των HACPs με γνωστές τριτοταγείς δομές. Ο κλάδος 2 περιλαμβάνει σχεδόν αποκλειστικά HACPs και φυτάσεις, ο κλάδος 1 περιλαμβάνει ένζυμα με ποικίλες λειτουργίες, πχ φωσφομοντάσες. Με κεφαλαία γράμματα δηλώνονται οι κωδικοί pdb των τρισδιάστατων δομών. Human Prostatic Acid Phosphatase (1ND6), Human Prostatic Acid Phosphatase Precursor (2HPA), Rat Prostatic Acid Phosphatase (1RPA), E. coli Glucose 1-Phosphatase (1NT4), E. coli Phytase Acid Phosphatase (1DKQ), Human Erythrocyte 2,3 biphosphoglyceratemutase (1T8P), Human biphosphoglyceratemutase (2HHJ), Phosphoglyceratemutase homolog from Bacillus stearothermophilus (1EBB), Human Liver 6-Phosphofructo-2-Kinase/Fructose-2,6-biphosphatase (1K6M), E. coli Histidine Phosphatase SixA (1UJB), A. fumigates Phytase (1QWO). Το δένδρόγραμμα κατασκευάστηκε με χρήση του αλγόριθμου Phylip.

Σύμφωνα με την ανάλυση των 3D μοντέλων της *LdMAcP* και του αμινοτελικού μισού της *LdSACP1*, τα αμινοξέα τα οποία είναι συντηρημένα στην υπερ-οικογένεια των HACPs είναι επίσης συντηρημένα και για τις όξινες αυτές φωσφατάσες του παρασίτου *L. donovani*, με εξαίρεση τα κατάλοιπα His286 και Asp287 που απουσιάζουν από την πρώτη (Εικόνα 3.21 γ). Συγκεκριμένα, στην *LdMAcP* έχουν αντικατασταθεί με τα πιο υδροφοβικά Cys και Trp. Τόσο η His όσο και η Asp πιστεύεται ότι παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση του καταλυτικού κέντρου του ενζύμου και για το λόγο αυτό είναι αυστηρά συντηρημένα στις HACPs. Ειδικότερα, η His286 φαίνεται ότι είναι απαραίτητη για το «κλείσιμο» του καταλυτικού κέντρου, ενώ η Asp287 συνεισφέρει στη ηλεκτροστατική σταθερότητά του ως δότης πρωτονίων στον καταλυτικό κύκλο. Τέλος, αξίζει να τονίσουμε ότι τα κατάλοιπα Cys και Trp βρίσκονται στις θέσεις 286 και 287, δηλαδή στην προβλεπόμενη 2^η διαμεμβρανική περιοχή της *LdMAcP*. Πιθανά, η μεμβρανική εντόπιση του συγκεκριμένου ενζύμου να διευκολύνεται από κατάλοιπα σε

θέσεις σημαντικές για τη διαμόρφωση του καταλυτικού κέντρου και άρα να επιτυγχάνεται εις βάρος της λειτουργικότητας του καταλυτικού κέντρου.

Σε ό,τι αφορά τις δομικές διαφορές μεταξύ της μεμβρανικής όξινης φωσφατάσης ιστιδίνης *LdMAcP* και της εκκρινόμενης *LdSACP1*, οι οποίες προφανώς αντικατοπτρίζουν και λειτουργικές διαφορές των 2 μορίων, προχωρήσαμε σε ανάλυση των αμινοξικών τους αλληλουχιών με τον αλγόριθμο PONDR [194, 195] ο οποίος παρέχει πρόβλεψη για ύπαρξη αποδιαταγμένων περιοχών (Εικόνα 3.23).

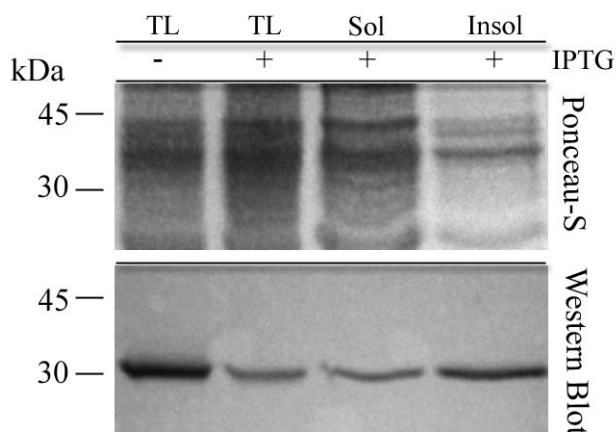
Πράγματι, ενώ τα 2 κοινά μέρη των φωσφατασών (αα 1-274) παρουσιάζουν καλή αναδίπλωση και σταθερή δομή (τιμή PONDR <0.5), τα 300 κατάλοιπα του καρβόξυ-τελικού μισού της *LdSACP1*, που απουσιάζουν από την *LdMAcP*, έχουν υψηλή πιθανότητα να βρίσκονται σε αποδιαταγμένη μορφή (τιμή PONDR ~1).



Εικόνα 3.23 Διάγραμμα PONDR των **A.** *LdMAcP* και **B.** *LdSACP1*. Τα κατάλοιπα με τιμή PONDR >0.5 προβλέπονται να εντοπίζονται σε περιοχές με πιο αποδιαταγμένη δομή, ενώ κατάλοιπα με PONDR <0.5 σε διαταγμένες δομικά περιοχές. Τιμές κοντά στο 1 αποτελούν ισχυρούς δείκτες αποδιάταξης.

3.2.3 Έκφραση της *LdMAcP*sol σε βακτήρια και παραγωγή α-*LdMAcP* αντισωμάτων

Η συστηματική μελέτη του υποκυτταρικού εντοπισμού και των δομικών/λειτουργικών χαρακτηριστικών της *LdMAcP* (ενδογενούς και ανασυνδυασμένης) προϋποθέτει την ανίχνευσή της σε εκχυλίσματα *L. donovani* (αγρίου τύπου και διαγονιδιακών) με ανοσοαποτύπωση Western και ανοσοφθορισμό. Για το σκοπό αυτό, παρασκευάστηκαν πολυκλωνικά αντισώματα κουνελιού και ποντικού έναντι ενός τμήματος της πρωτεΐνης *LdMAcP* το οποίο εκφράστηκε σε βακτήρια *E. coli* (στέλεχος BL21).



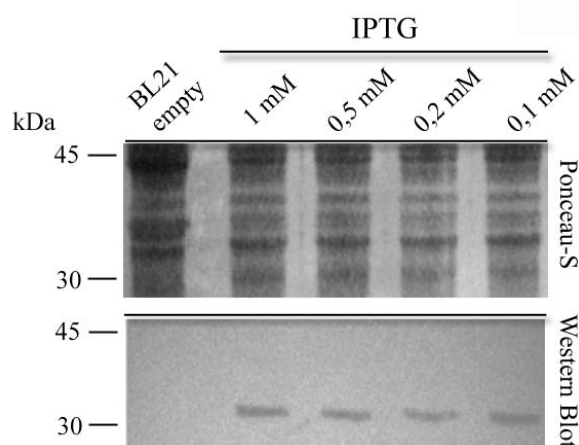
Εικόνα 3.24 Προσδιορισμός του ποσοστού του διαλυτού κλάσματος της rLdMAcPsol-His σε βακτηριακό ομογενοποίημα *E. coli* BL21. Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών του βακτηριακού ομογενοποιήματος μετά από επώαση (3 ώρες, 37°C) και προσθήκη επαγωγέα (IPTG, 1 mM), έγινε σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου 12% (w/v), ακολούθησε ανοσοαποτύπωση Western και εμφάνιση με το αντιδραστήριο DAB. Η ανίχνευση της πρωτεΐνης rLdMAcPsol-His έγινε μετά από επώαση με το μονοκλωνικό αντίσωμα a-His (1 µg/ml). Η μεμβράνη μετά από χρώση Ponceau-S παρατίθεται ως μάρτυρας φόρτωσης. Διαδρομές: TL, ολικό ομογενοποίημα βακτηρίων, Sol, υπερκείμενο μετά από φυγοκέντρηση του ολικού ομογενοποιήματος με IPTG, Insol, ίζημα μετά τη φυγοκέντρηση του ολικού ομογενοποιήματος με IPTG. Μοριακοί μάρτυρες μεγεθών (kDa).

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση του μεγαλύτερου τμήματος του γονιδίου της LdMAcP (1-822 βάσεις, Met1-Leu274) στον πλασμιδιακό φορέα pTriEx1.1 και κατασκευάστηκε το πλασμίδιο pTriEx1.1-LdMAcPsol. Το συγκεκριμένο τμήμα του γονιδίου δεν περιλαμβάνει την αλληλουχία που κωδικοποιεί για την προβλεπόμενη διαμεμβρανική περιοχή στο καρβοξυ-τελικό άκρο της πρωτεΐνης (Leu274- Tyr302) και χρησιμοποιήθηκε με σκοπό την έκφραση και παραγωγή μίας «διαλυτής» μορφής της LdMAcP (επονομαζόμενη ως LdMAcPsol).

Η χημική πρωτεΐνη rLdMAcPsol-His που κωδικοποιείται από το παραπάνω πλασμίδιο φέρει μοριακή ετικέτα 8 x His στο καρβοξυ-τελικό της άκρο (βλ. Μέθοδοι Παράγραφο 2.1.5.1), έχει μήκος 285 αμινοξέα, θεωρητική μοριακή μάζα 31.740.97 Da και ισοηλεκτρικό σημείο (pI) 6.52. Η ετικέτα 8 x His χρησιμοποιήθηκε για τον καθαρισμό της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης με χρωματογραφία χημικής συγγένειας σε στήλη δισθενούς νικελίου (Ni²⁺-NTA-ρητίνη).

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε δοκιμή διαλυτότητας της ετερόλογα εκφρασμένης rLdMAcPsol-His, δηλαδή προσδιορισμός του ποσοστού της πρωτεΐνης που βρισκόταν στο διαλυτό κλάσμα του βακτηριακού ομογενοποιήματος, μετά τη λύση των κυττάρων, σε σχέση με το ποσοστό που παρέμενε στο ίζημα μετά από φυγοκέντρησή του στα 14000 g,

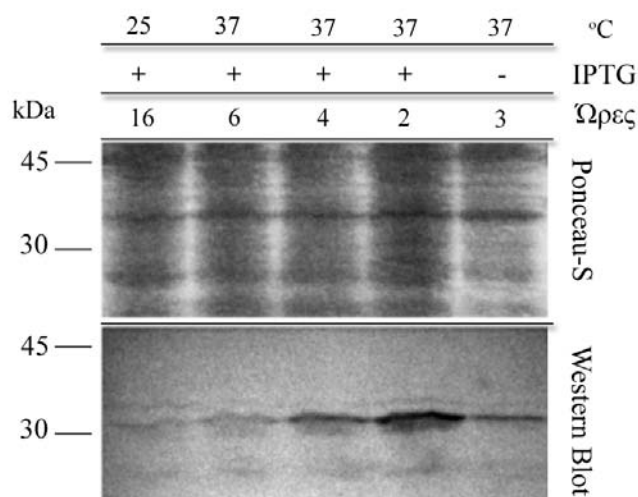
[συλλογή σωματιδίων εγκλεισμού (inclusion bodies)]. Ταυτόχρονα ελέγχθηκε η έκφραση της rLdMAcPsoI-His στους 37°C για 3 ώρες με ή χωρίς την προσθήκη του μορίου-επαγωγέα IPTG (1 mM) (βλ. Μέθοδοι Παράγραφο 2.2.10.2). Διαπιστώθηκε ότι στις συγκεκριμένες συνθήκες, σχεδόν το διπλάσιο ποσοστό της rLdMAcPsoI-His βρισκόταν σε σωματίδια εγκλεισμού από ότι σε διαλυτή μορφή (Εικόνα 3.24, Sol, Insol +IPTG). Επιπλέον, η έκφραση της πρωτεΐνης ήταν καλύτερη στο δείγμα χωρίς την προσθήκη του επαγωγέα (Εικόνα 3.24, TL +/- IPTG).



Εικόνα 3.25 Έλεγχος της επίδρασης του παράγοντα επαγωγής IPTG στα επίπεδα έκφρασης της rLdMAcPsoI-His. Βακτηριακό ομογενοποίημα *E. coli* BL21, μετά από επώαση με IPTG (0,1-1 mM) για 3 ώρες στους 37°C, αναλύθηκε σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 12% (w/v), ακολούθησε ανοσοαποτύπωση Western και εμφάνιση με το αντιδραστήριο DAB. Η χρώση της μεμβράνης με χρώση Ponceau-S παρατίθεται ως μάρτυρας φόρτωσης. Η ανίχνευση της πρωτεΐνης rLdMAcPsoI-His έγινε με επώαση με το μονοκλωνικό αντίσωμα α-His (1 µg/ml). Διαδρομές: BL21 empty, ολικό ομογενοποίημα βακτηρίων BL21 που δεν εκφράζουν τη rLdMAcPsoI-His και ακολούθως, κατά σειρά ολικό ομογενοποίημα βακτηρίων με προσθήκη 1 mM, 0,5 mM, 0,2 mM & 0,1 mM IPTG. Μοριακοί μάρτυρες μεγεθών (kDa).

Στη συνέχεια, έγινε προσπάθεια βελτιστοποίησης των συνθηκών επαγωγής ώστε να επιτευχθεί υψηλότερη έκφραση της rLdMAcPsoI-His από τα βακτηριακά κύτταρα. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε τιτλοδότηση της τελικής συγκέντρωσης του IPTG (0,1-1 mM) στη βακτηριακή καλλιέργεια διατηρώντας σταθερό το χρόνο και τη θερμοκρασία επώασης (3 ώρες στους 37°C). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.25, η έκφραση της rLdMAcPsoI-His παρέμενε στα ίδια χαμηλά επίπεδα για όλες τις συγκεντρώσεις του επαγωγέα που δοκιμάστηκαν και για το λόγο αυτό, στις περαιτέρω δοκιμασίες, χρησιμοποιήθηκε η τελική συγκέντρωση 0,1 mM του επαγωγέα.

Ακολουθώς, ελέγχθηκε ο πιθανός ρόλος των παραγόντων «χρόνος και θερμοκρασία επώασης» στα επίπεδα έκφρασης της rLdMAcPsol-His. Τα πειράματα αυτά έδειξαν ότι διατηρώντας σταθερή την ποσότητα του IPTG (0,1 mM) στους 37°C για 2, 4 και 6 ώρες, τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης μειώνονταν όσο αυξάνονταν η διάρκεια επαγωγής (Εικόνα 3.26), ενώ η επώαση στους 25°C για 16 ώρες δε βελτίωσε την έκφραση ούτε και το ποσοστό διαλυτότητας της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης.



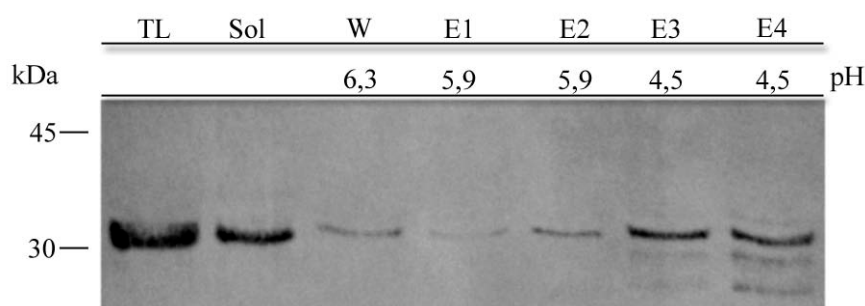
Εικόνα 3.26 Έλεγχος των επιπέδων έκφρασης της rLdMAcPsol-His σε σχέση με το χρόνο επαγωγής από το επαγωγέα IPTG. Το βακτηριακό ομογενοποίημα *E. coli* BL21, μετά από επώαση 2, 4 και 6 ωρών στους 37°C και για 16 ώρες στους 25°C με 0,1 mM IPTG, αναλύθηκε σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου 12% (w/v) και ακολούθησε μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ανοσοαποτύπωση Western. Η ανίχνευση της πρωτεΐνης rLdMAcPsol-His έγινε με επώαση με το μονοκλωνικό αντίσωμα α-His (1 µg/ml) και εμφάνιση με το αντιδραστήριο DAB. Η μεμβράνη μετά από χρώση Ponceau-S παρατίθεται ως μάρτυρας φόρτωσης. Μοριακοί μάρτυρες μεγεθών (kDa).

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, η απομόνωση της rLdMAcPsol-His σε μεγάλη κλίμακα πραγματοποιήθηκε με προσθήκη 0,1 mM IPTG, στους 37°C για 2 ώρες σε συνθήκες αποδιάταξης, με παρουσία ουρίας στα διαλύματα λύσης, έκπλυσης και έκλουσης (βλ. Μέθοδοι Παράγραφος 2.2.10.2). Η πρωτεϊνική ζώνη που ανιχνεύτηκε στα ~32 kDa συμφωνεί με την προβλεπόμενη μοριακή μάζα της rLdMAcPsol-His (Εικόνα 3.27).

Μετά τη συλλογή της rLdMAcPsol-His η οποία εκλούστηκε σε μεγαλύτερο ποσοστό στο κλάσμα με συγκέντρωση ιμιδαζολίου 100 mM pH 4,5 και σε μικρότερη ποσότητα σε αυτό με συγκέντρωση ιμιδαζολίου 100 mM pH 5,9 (Εικόνα 3.27), όλα τα εκλούσματα ενώθηκαν και συμπυκνώθηκαν με τη χρήση των φίλτρων Centricon 10 & 30 kDa cut-off

(Millipore). Στη συνέχεια, η rLdMAcPsol-His διαχωρίστηκε σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 12% (w/v) και ύστερα από χρώση με Coomassie Brilliant-Blue, αποκόπηκε το τμήμα της πηκτής που αντιστοιχούσε στην πρωτεΐνη και χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή πολυκλωνικού αντισώματος κουνελιού και ποντικού (α-LdMAcP) (βλ. Μέθοδοι Παράγραφος 2.2.11).

Το πολυκλωνικό αντίσωμα που παράχθηκε από το κουνέλι, καθαρίστηκε μετά από εκλούσεις σε χαμηλό pH (2,2) από προσδεμένη rLdMAcPsol-His σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης (βλ. Μέθοδοι Παράγραφο 2.2.11.2). Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του καθαρισμένου αντισώματος πραγματοποιήθηκε με μέτρηση της απορρόφησης στα 280 nm. Ο α-LdMAcP ορός από τα ποντίκια χρησιμοποιήθηκε ως έχει.

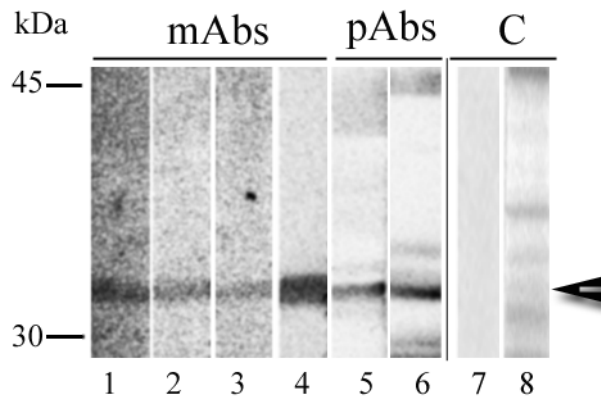


Εικόνα 3.27 Απομόνωση της πρωτεΐνης rLdMAcPsol-His από βακτηριακά εκχυλίσματα κυττάρων BL21. Ανάλυση με ανοσοαποτύπωση Western δειγμάτων που ελήφθησαν στα στάδια απομόνωσης της πρωτεΐνης rLdMAcPsol-His με χρωματογραφία υψηλής συγγένειας από σφαιρίδια Ni-NTA. Η ανίχνευση της rLdMAcPsol-His στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης έγινε με το α-His (1 μg/ml) αντίσωμα, όπως παραπάνω. TL. ολικό βακτηριακό ομογενοποίημα, Sol. διαλυτό μέρος βακτηριακού ομογενοποιήματος μετά την επώαση με σφαιρίδια Ni-NTA, υλικό που δεν προσδέθηκε, W. διάλυμα της πρώτης έκπλυσης (pH 6,3), E1-E4. εκλούσεις pH 5.9 & pH 4,5. Από όλα τα κλάσματα φορτώθηκε το 1:10 του συνολικού τους όγκου. Μοριακοί μάρτυρες μεγεθών (kDa)

Εκτός των πολυκλωνικών αντισωμάτων, στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκαν και μονοκλωνικά αντισώματα (mAb) ποντικού τα οποία κατασκευάστηκαν έναντι της πεπτιδικής αλληλουχίας Glu-Phe-Ala-Arg-Ser-Arg-Tyr-Asn-Asp-Leu-Ser-Leu (Glu73-Leu84) της LdMAcP (Paratopes Ltd) (βλ. Υλικά Παράγραφο 2.1.4).

Η ειδικότητα των πολυκλωνικών (pAbs) και μονοκλωνικών (mAbs) αντισωμάτων έναντι της LdMAcP ελέγχθηκαν σε ολικά βακτηριακά εκχυλίσματα από BL21-pTriEx1.1-

rLdMAcPsol (Εικόνα 3.28) παράλληλα με τον προ-ανοσοποίησης ορό (pre-immune serum) (Εικόνα 3.28, C, Διαδρομές 7, 8).



Εικόνα 3.28 Έλεγχος της ειδικότητας των α-LdMAcP μονοκλωνικών (mAbs) και πολυκλωνικών αντισωμάτων (pAbs), με ανοσοαποτύπωση Western. Ο έλεγχος έγινε σε ίσες ποσότητες καθαρισμένης πρωτεΐνης rLdMAcPsol-His από ολικά βακτηριακά ομογενοποιήματα. Διαδρομές: 1, 2, 3. κλώνοι mAbs 7B7, 17D5, 20C10 (αραίωση 1:100), 4. μονοκλωνικό αντίσωμα α-His (1 µg/ml), 5. ορός ποντικού μετά την τελευταία αιμοληψία (1:500), 6. Καθαρισμένο αντίσωμα από ορό κουνελιού (1 µg/ml), 7, 8. ορός προ ανοσοποίησης ποντικού και κουνελιού, αντίστοιχα. Χρησιμοποιήθηκε η χρωμομετρική μέθοδος ανάπτυξης (DAB). Η κεφαλή του βέλους υποδεικνύει την ζώνη που αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη rLdMAcPsol-His. Μοριακοί μάρτυρες μεγεθών (kDa)

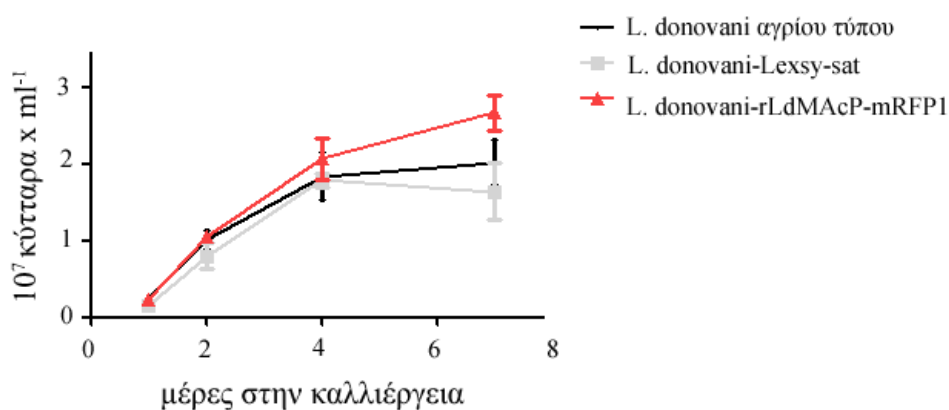
3.2.4 Έκφραση της διαγονιδιακής rLdMAcP-mRFP1 σε παράσιτα *L. donovani*

Προκειμένου να μελετηθεί η υποκυτταρική εντόπιση της LdMAcP και να πραγματοποιηθεί ο βιοχημικός και ο *in vitro* λειτουργικός χαρακτηρισμός της πρωτεΐνης, κατασκευάστηκαν ανασυνδυασμένα παράσιτα *L. donovani* που την υπερεκφράζουν επισωμικά ως χμιαϊκή με την mRFP1 (*L. donovani*-rLdMAcP-mRFP1) (βλ. Μέθοδοι Παράγραφος 2.2.4). Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν παράσιτα που εκφράζουν επισωμικά μόνο τον κενό φορέα (Lexsy-sat) [229].

Τα διαγονιδιακά παράσιτα που κατασκευάστηκαν καλλιεργούνταν στις ίδιες συνθήκες με τα προμαστιγωτά αγρίου τύπου. Επιπλέον, οι προμαστιγωτές μορφές και των 2 διαγονιδιακών πληθυσμών (*L. donovani*-rLdMAcP-mRFP1 & *L. donovani*-Lexsy-sat), πριν τη χρησιμοποίησή τους σε περαιτέρω πειράματα, υποβλήθηκαν σε διαδικασία ελέγχου και ενίσχυσης της μολυσματικής τους ικανότητας (βλ. Μέθοδοι Παράγραφος 2.2.8.1) με μόλυνση ποντικών BALB/c ευαίσθητων σε μόλυνση από *Leishmania* [230].

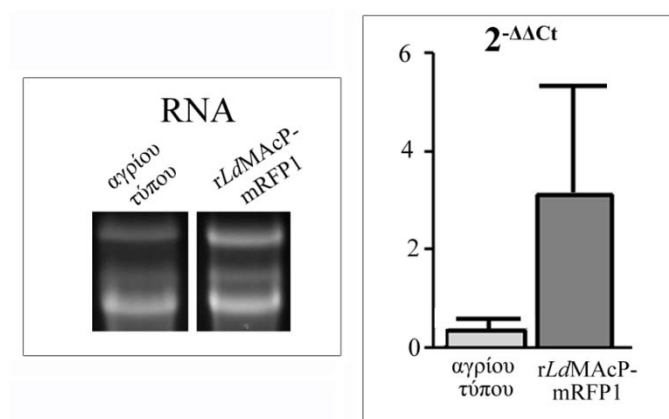
Αρχικά, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των χαρακτηριστικών ανάπτυξης των διαγονιδιακών παρασίτων *L. donovani*-rLdMAcP-mRFP1 και *L. donovani*-Lexsy-sat με

τις καλλιέργειες παρασίτων αγρίου τύπου (Εικόνα 3.29). Διαπιστώθηκε ότι και οι τρεις πληθυσμοί μέχρι και την 4^η ημέρα της καλλιέργειας παρουσίαζαν ανάλογο αυξητικό ρυθμό και συγκρίσιμο μέσο όρο αριθμού παρασίτων ανά ημέρα. Χαρακτηριστική διαφορά παρατηρήθηκε κατά την 7^η ημέρα της καλλιέργειας οπότε τα προμαστιγωτά βρίσκονται στη στατική φάση ανάπτυξης. Συγκεκριμένα, τα παράσιτα που υπερεκφράζουν τη *rLdMAcP-mRFP1* παρουσίασαν ένα αριθμητικό πλεονέκτημα το οποίο προσεγγίζει το ~10% σε σχέση με τον πληθυσμό αγρίου τύπου και το ~25% σε σχέση με τον άλλο διαγονιδιακό πληθυσμό (*Lexsy-sat*) που επίσης υπόκειται στην ίδια πίεση λόγω της παρουσίας του αντιβιοτικού Nourseothricin στο θρεπτικό υλικό.



Εικόνα 3.29 Ο ρυθμός ανάπτυξης των προμαστιγωτών παρασίτων *L. donovani* αγρίου τύπου, *L. donovani-Lexsy-sat* & *L. donovani-rLdMAcP-mRFP1* στην καλλιέργεια. Αποτελέσματα από 3 ανεξάρτητα πειράματα $\pm$ σταθερές απόκλισης.

Επιπρόσθετα, ελέγχθηκε με τη μέθοδο της qPCR η έκφραση του γονιδίου της *LdMAcP* στο επίπεδο του mRNA σε προμαστιγωτά παράσιτα *L. donovani* στατικής φάσης, αγρίου τύπου και *L. donovani-rLdMAcP-mRFP1*, μετά από απομόνωση ολικού RNA (βλ. Μέθοδοι Παράγραφος 2.2.2). Για τη σύγκριση χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς το γονίδιο της Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που συγκεντρώσαμε από 2 ανεξάρτητα πειράματα, τα *L. donovani-rLdMAcP-mRFP1* διαθέτουν κατά μέσο όρο 3-4 φορές περισσότερα μετάγραφα του γονιδίου από ότι τα παράσιτα αγρίου τύπου (Εικόνα 3.30).



Εικόνα 3.30 Ανάλυση με qPCR της έκφρασης του γονιδίου της *LdMAcP*. (Αριστερά) Έλεγχος σε πηκτική αгарόζης/ παραφολμαδεΰδης των παρασκευασμάτων RNA από παράσιτα *L. donovani* αγρίου τύπου και διαγονιδιακών (*rLdMAcP-mRFP1*) στατικής φάσης. (Δεξιά) Συγκεντρωτικά αποτελέσματα του υπολογισμού των μεταγράφων του γονιδίου της *LdMAcP* στους παραπάνω πληθυσμούς, μετά από qPCR και εφαρμόζοντας τη συγκριτική μέθοδο *Ct* σε 2 ανεξάρτητα πειράματα $\pm$ σταθερές απόκλισης.

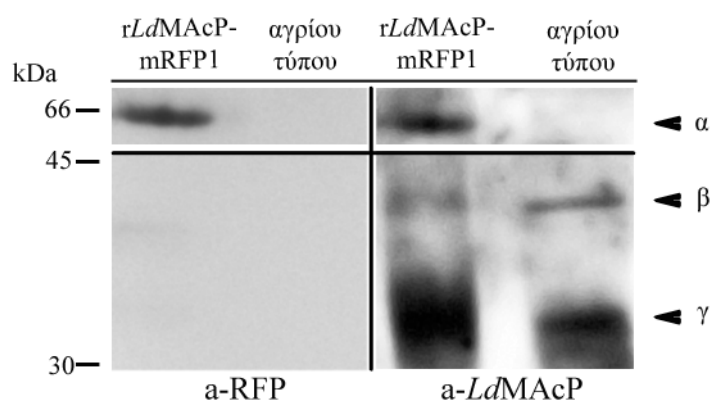
3.2.5 Βιοχημική μελέτη της διαγονιδιακής *rLdMAcP-mRFP1* και της ενδογενούς *LdMAcP* σε παράσιτα *L. donovani*

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της έκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης *rLdMAcP-mRFP1* με ανοσοαποτύπωση Western σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα ολικών μεμβρανών από τα διαγονιδιακά προμαστιγωτά παράσιτα *L. donovani-rLdMAcP-mRFP1* στατικής φάσης (βλ. Μέθοδοι Παράγραφος 2.2.15), χρησιμοποιώντας το καθαρισμένο πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού a-RFP (Εικόνα 3.31, a-RFP, αριστερά). Παράλληλα, ελέγχθηκαν τα επίπεδα έκφρασης της *rLdMAcP-mRFP1* και της ενδογενούς *LdMAcP* με χρήση του μονοκλωνικού αντισώματος ποντικού a-*LdMAcP* (Εικόνα 3.31, a-*LdMAcP*, δεξιά).

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.31, στο πρωτεϊνικό εκχύλισμα ολικών μεμβρανών από τα παράσιτα *L. donovani-rLdMAcP-mRFP1* ανιχνεύεται μία ζώνη στα ~66 kDa (Εικόνα 3.31 α) η οποία απουσιάζει από το ολικό μεμβρανικό εκχύλισμα των παρασίτων αγρίου τύπου και επομένως, αντιστοιχεί στην ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη (υπολογιζόμενη μοριακή μάζα με το SP 61.706 Da και χωρίς το SP 59.470 Da). Η ανίχνευσή της έγινε τόσο έμμεσα, με εντοπισμό της mRFP1 από το ειδικό πολυκλωνικό αντίσωμα a-RFP, όσο και με το ειδικό μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της *LdMAcP* στην ίδια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Με το a-*LdMAcP* ανιχνεύτηκαν δύο ακόμη ζώνες τόσο στα διαγονιδιακά παράσιτα όσο και στα αγρίου τύπου. Μία έντονη και ευρεία ζώνη στα ~35

kDa η οποία αντιστοιχεί στην υπολογιζόμενη μοριακή μάζα της ενδογενούς *LdMACP* (υπολογιζόμενη μοριακή μάζα με το SP 35.192 Da και χωρίς το SP 32.956 Da) και μία στα ~40 kDa (Εικόνα 3.31 α-*LdMACP*, β & γ).

Επιπρόσθετα, η έκφραση της *rLdMACP-mRFP1* επαληθεύτηκε βιοχημικά μετά από κλασμάτωση των ολικών πρωτεϊνών από προμαστιγωτά παράσιτα *L. donovani-rLdMACP-mRFP1* με χρήση του απορρυπαντικού διγτιονίνη [190] (Μέθοδοι Παράγραφος 2.2.14.2) (Εικόνα 3.32). Η παραπάνω τεχνική επιτρέπει τον εμπλουτισμό ενός κλάσματος (F5) σε μεμβρανικές πρωτεΐνες της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και άλλων ενδοκυττάρων μεμβρανών. Το κλάσμα αυτό αναμένεται να είναι εμπλουτισμένο σε *LdMACP*.

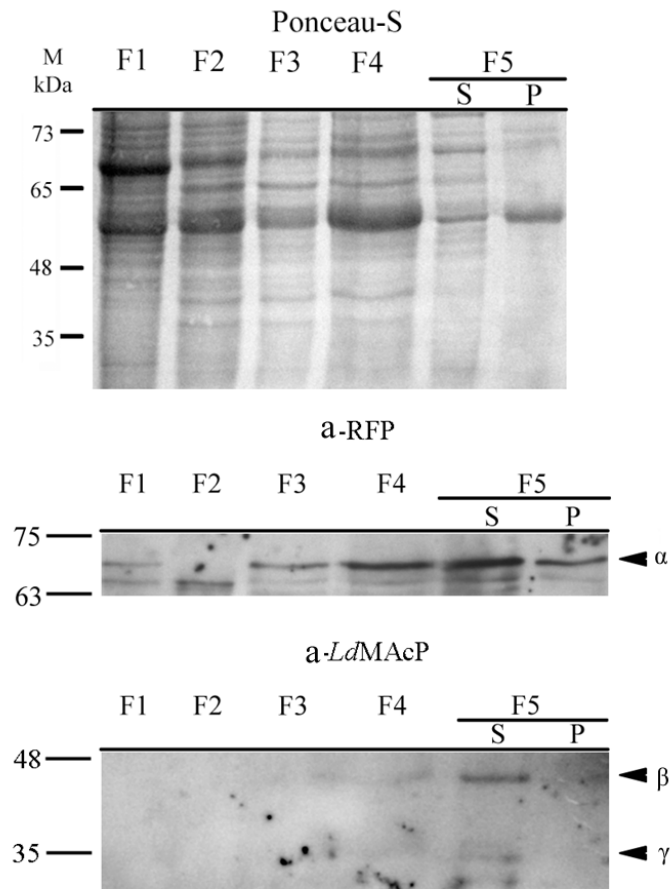


Εικόνα 3.31 Ανάλυση των πρωτεϊνών από ολικές μεμβράνες από προμαστιγωτά παράσιτα *L. donovani* στατικής φάσης, αγρίου τύπου και *L. donovani-rLdMACP-mRFP1*. Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών (~15 μg/ διαδρομή) έγινε σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου 10% (w/v) και ακολούθησε μεταφορά αυτών σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης.

(Αριστερά) Ανίχνευση της πρωτεΐνης *rLdMACP-mRFP1* με επώαση με το καθαρισμένο πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού a-RFP (0,4 μg/ml). (Δεξιά) Ανίχνευση της πρωτεΐνης *LdMACP* (διαγονιδιακής και ενδογενούς) με επώαση με το μονοκλωνικό αντίσωμα a-*LdMACP* (αραίωση 1:20). Η εμφάνιση των αντιδράσεων έγινε με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας (ECL). Οι κεφαλές των μαύρων βελών στα δεξιά δείχνουν τις ζώνες που αντιστοιχούν στην *rLdMACP-mRFP1* (α) και την ενδογενή *LdMACP* (β, γ). Μοριακοί μάρτυρες μεγεθών (kDa).

Πράγματι, παρ' όλο που με το ειδικό a-RFP αντίσωμα ανιχνεύθηκε η ζώνη των 66 kDa που αντιστοιχεί στην *rLdMACP-mRFP1* σε όλα τα κλάσματα (Εικόνα 3.32, a-RFP, α), η συγκέντρωσή της παρουσιάζεται αυξανόμενη από το κλάσμα 1 μέχρι το διαλυτό στο 1% (v/v) Triton X-100 κλάσμα 5 (F5 S) το οποίο ήταν το πιο εμπλουτισμένο σε πρωτεΐνες της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Τέλος, ένα μικρότερο μέρος της ανιχνεύεται στο κυτταροσκελετικό/ αδιάλυτο κλάσμα (F5 P). Ζώνες μικρότερου μοριακού μεγέθους οι οποίες πιθανότατα αποτελούν πρωτεολυτικά προϊόντα της *rLdMACP-mRFP1*

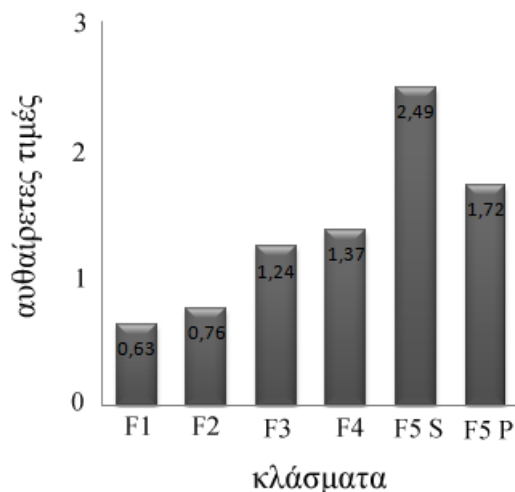
ανιχνεύτηκαν σε όλα τα κλάσματα. Σε ό,τι αφορά στην ενδογενή *LdMAcP*, οι ζώνες που αντιστοιχούν σε αυτήν ανιχνεύονται κυρίως στα κλάσματα εμπλουτισμένα σε μεμβράνες (κυτταροπλασματική, ER) (Εικόνα 3.32, α-*LdMAcP*, F4, F5 S, β, γ).



Εικόνα 3.32 Ανάλυση πρωτεϊνικών κλασμάτων από διαγονιδιακά παράσιτα *L. donovani*-*rLdMAcP-mRFP1* μετά από κλασμάτωση με διγλιτονίνη και ανοσοαποτύπωση Western. S: διαλυτές πρωτεΐνες και P: αδιάλυτες πρωτεΐνες, μετά από κατεργασία του κλάσματος 5 με 1% (v/v) Triton X-100. Η μεμβράνη επώαστηκε με καθαρισμένο α-RFP αντίσωμα από κουνέλι σε συγκέντρωση 0,4 μg/ml και ακολούθως, μετά από απομάκρυνση των πρώτων αντισωμάτων με το μονοκλωνικό α-*LdMAcP* ποντικού σε αραιώση 1:20. Η εμφάνιση των ζωνών έγινε με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας (ECL).

(Επάνω) Χρώση Ponceau-S ως μάρτυρας φόρτωσης. Οι κεφαλές των μαύρων βελών στα δεξιά δείχνουν τις ζώνες που αντιστοιχούν στη *rLdMAcP-mRFP1* (α) και την ενδογενή *LdMAcP* (β, γ). Μοριακοί μάρτυρες μεγεθών (kDa).

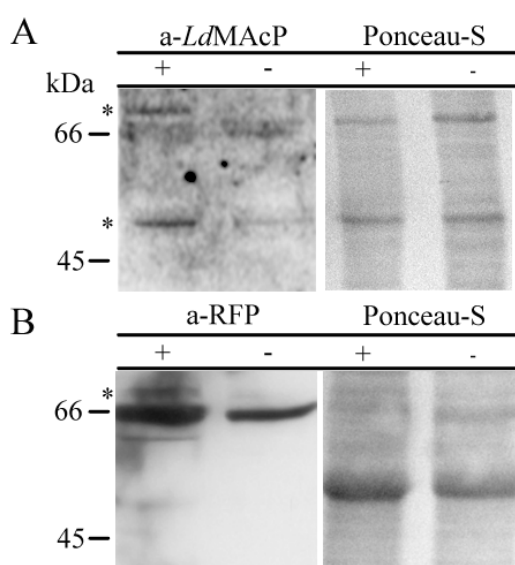
Η ένταση των ανιχνευόμενων πρωτεϊνικών ζωνών που αντιστοιχούν στην *rLdMAcP-mRFP1* αναλύθηκε με σάρωση της πυκνότητας/ έντασης (scanning densitometry) χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Fiji και μετά από κανονικοποίηση σε σχέση με το σύνολο των ζωνών που εμφανίστηκαν με τη χρώση της μεμβράνης με Ponceau-S για κάθε κλάσμα (Εικόνα 3.33).



Εικόνα 3.33 Σχηματική αναπαράσταση της κατανομής της rLdMACP-mRFP1 μετά από ποσοτικοποίηση της έντασης της χρώσης της Εικόνα 3.32 (a-RFP) με το λογισμικό ανάλυσης εικόνας Fiji (<http://fiji.sc/Fiji>).

Τέλος, με σκοπό να ελεγχθεί βιοχημικά η εξωκυττάρια τοπολογία της ανασυνδυασμένης rLdMACP-mRFP1 στην επιφάνεια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης των προμαστιγωτών *L. donovani*-rLdMACP-mRFP1 στατικής φάσης, πραγματοποιήθηκε βιοτινυλίωση των επιφανειακών πρωτεϊνών με χρήση του αντιδραστηρίου sulfo-NHS-S-S-biotin σε ζωντανά παράσιτα στους 4°C (βλ. Μέθοδοι Παράγραφος 2.2.17). Ακολούθως, τα παράσιτα υποβλήθηκαν είτε σε διαλυματοποίηση 0.1% (v/v) TritonX-100 (Εικόνα 3.34 A) είτε σε κλασμάτωση με χρήση διγτιονίνης (Εικόνα 3.34 B), όπως περιγράφηκε παραπάνω. Οι βιοτινυλιωμένες πρωτεΐνες συγκεντρώθηκαν με τη βοήθεια μαγνητικών σφαιριδίων που φέρουν συνδεδεμένη στρεπταβιδίνη (streptavidin) και ακολούθησε ανάλυση με ανοσοαποτύπωση Western και επώαση με το πολυκλωνικό αντίσωμα ποντικού α-LdMACP ή το καθαρισμένο πολυκλωνικό αντίσωμα α-RFP (Εικόνα 3.34).

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.34, στα δείγματα από τα *L. donovani*-rLdMACP-mRFP1 που επώαστηκαν με τη sulfo-NHS-S-S-βιοτίνη εντοπίζεται, και με τα δύο είδη πολυκλωνικών αντισωμάτων, μία πρωτεϊνική ζώνη με φαινομενικό μοριακό βάρος λίγο πάνω από τα 66 kDa. Η ζώνη αυτή πιθανότατα αντιστοιχεί στο βιοτινυλιωμένο LdMACP-mRFP1 πολυπεπίδιο. Ταυτόχρονα τόσο στο βιοτινυλιωμένο όσο και στο μη βιοτινυλιωμένο δείγμα ανιχνεύεται η πρωτεϊνική ζώνη των 66 kDa, γεγονός που υποδηλώνει μη ειδική σύνδεση της πρωτεΐνης rLdMACP-mRFP1 στην επιφάνεια των σφαιριδίων. Με το ειδικό α-LdMACP αντίσωμα στο βιοτινυλιωμένο πρωτεϊνικό εκχύλισμα ανιχνεύεται επίσης μία ζώνη στα ~50 kDa (Εικόνα 3.34 A, κάτω αστερίσκος).



Εικόνα 3.34 Βιοτινυλίωση επιφανειακών πρωτεϊνών των παρασίτων *L. donovani*-rLdMAcP-mRFP1. Οι συνδεδεμένες σε σφαιρίδια στρεπταβιδίνης πρωτεΐνες που περιέχονται σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από βιο τινυλιωμένα (+) ή μη (-) προμαστιγωτά στατικής φάσης αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση. Ακολούθησε επώαση με **A.** a-LdMAcP ορό ποντικού και **B.** το καθαρισμένο πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού a-RFP.

Η χρώση Ponceau-S παρατίθεται ως μάρτυρας φόρτωσης. Οι αστερίσκοι δείχνουν στις πιθανές βιοτινυλιωμένες μορφές της rLdMAcP-mRFP1 και της ενδογενούς LdMAcP. Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα από 2 ανεξάρτητα πειράματα.

Συμπερασματικά, η παραπάνω βιοχημική προσέγγιση επιβεβαιώνει την έκφραση της ενδογενούς πρωτεΐνης LdMAcP και της ανασυνδυασμένης rLdMAcP-mRFP1 στα παράσιτα *L. donovani* καθώς και την τυπική υποκυτταρική τους εντόπιση ως τύπου I μεμβρανικές πρωτεΐνες που ακολουθούν την εκκριτική οδό του παρασίτου προς την κυτταροπλασματική μεμβράνη.

3.2.5.1 Η ανασυνδυασμένη rLdMAcP-mRFP1 είναι N-γλυκοζυλιωμένη

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα η δημιουργία των N-ολιγοσακχαριτών ξεκινά με προσθήκη ενός προδρόμου μορίου με 14-μονοσακχαρίτες σε μια ασπαραγίνη (Asn) στην πολυπεπτιδική αλυσίδα της πρωτεΐνης στόχου. Η δομή αυτού του προδρόμου μορίου είναι κοινή σε όλα τα ευκαρυωτικά και περιέχει 3 μόρια γλυκόζης, 9 μαννόζης, and 2 N-ακετυλγλυκοζαμίνης. Μετά από μία σειρά σύνθετων αντιδράσεων η δικεραιωτή αυτή αλυσίδα προσδένεται σε ένα μόριο μεταφορέα, τη δολιχόλη, η οποία είναι γλυκολιπίδιο στον αυλό του ER, και στη συνέχεια μεταφέρεται στην πλευρική αμινομάδα του

αμινοξέος Ασπαραγίνη (Asn) και συγκεκριμένα στην αλληλουχία N-X-S/T της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Μετά την απομάκρυνση μορίων γλυκόζης και μερικών μορίων μαννόζης στο αδρό ER, η πρωτεΐνη φτάνει στο cis Golgi ως ολιγοσακχαρίτης υψηλής μαννόζης, και εκεί, στο medial και trans Golgi, μετατρέπεται σε ολιγοσακχαρίτη σύνθετου τύπου και άλλες υβριδικές μορφές.

Οι γλυκοπρωτεΐνες που εκφράζονται στα διάφορα είδη της *Leishmania* με *N*-γλυκοζυλίωση είναι παρόμοιες με αυτές των θηλαστικών, δηλαδή διαθέτουν σύνθετου τύπου ολιγοσακχαρίτες με α -γαλακτόζη και μόρια φουκόζης και επίσης, χαρακτηρίζονται από ένα πολύ ομοιογενές σύνθετο πρότυπο *N*-γλυκοζυλίωσης (κατά 90% Man₃Glc₂NAc₂), με δι-κεραιωτές γλυκάνες το οποίο απουσιάζει τόσο από τους ζυμομύκητες όσο και από τα κύτταρα των εντόμων [231, 232].

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της Παραγράφου 3.1.6, η φαινομενική μοριακή μάζα (~66 kDa) της διαγονιδιακής rLdMAcP-mRFP1 διαφέρει ως προς την υπολογιζόμενη (61.273.64 Da) κατά ~5-6 kDa. Η διαφορά αυτή θα μπορούσε να δικαιολογηθεί από την ύπαρξη μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, όπως πχ. η *N*-γλυκοζυλίωση, μία υπόθεση η οποία ενισχύεται από το γεγονός ότι στην αμινοξική αλληλουχία της LdMAcP προβλέπονται 5 πιθανές θέσεις *N*-γλυκοζυλίωσης (Asn44, Asn96, Asn135, Asn219, and Asn245) [164].

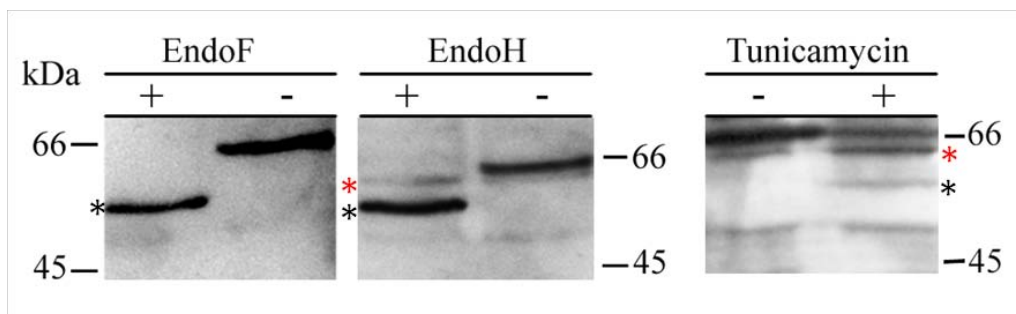
Αρχικά, ελέγχθηκε το κατά πόσο οι παραπάνω θέσεις γλυκοζυλίωσης είναι λειτουργικές επωάζοντας καλλιέργεια ζωντανών προμαστιγωτών *L. donovani*-rLdMAcP-mRFP1 αρχόμενης στατικής φάσης με τουνικομυκίνη (Tunicamycin) η οποία προέρχεται από το *Streptomyces* spp. και εξαιτίας της δράσης της ως αναστολέας της *N*-γλυκοζυλίωσης χρησιμοποιείται ως αντιβακτηριδιακό και αντιμυκητιακό φάρμακο [233]. Η επώαση πραγματοποιήθηκε για 24 ώρες με τελική συγκέντρωση τουνικομυκίνης στην καλλιέργεια 10 µg/ml (βλ. Μέθοδοι Παράγραφο 2.2.16.2). Ακολούθως, τα διαγονιδιακά προμαστιγωτά υποβλήθηκαν σε κλασμάτωση με διγιτονίνη και το εμπλουτισμένο σε μεμβρανικές, διαλυτές και αδιάλυτες πρωτεΐνες ολικό κλάσμα 5 (F5) αναλύθηκε με ανοσοαποτύπωση Western και χρήση του α-RFP αντισώματος.

Παράλληλα, προμαστιγωτά *L. donovani*-rLdMAcP-mRFP1 στατικής φάσης υποβλήθηκαν σε κλασμάτωση με διγιτονίνη και ακολούθως, το διαλυτό κλάσμα F5 S επώαστηκε με τις ενδογλυκοσιδάσες F και H (EndoF, EndoH, βλ. Μέθοδοι Παράγραφος 3.1.6.1). Η EndoF είναι μία ενδογλυκοσιδάση η οποία απομακρύνει όλους τους *N*-γλυκοζίτες των γλυκοπρωτεϊνών, ενώ η EndoH απομακρύνει μόνο τους *N*-

ολιγοσακχαρίτες υψηλής περιεκτικότητας σε μαννόζη και μερικούς υβριδικούς τύπους *N*-ολιγοσακχαριτών, αλλά όχι τους ώριμους/σύνθετους ολιγοσακχαρίτες.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.35, η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη rLdMAcP-mRFP1 παρουσιάζει βραδύτερη ηλεκτροφορητική κινητικότητα κατά ~5-7 kDa στο SDS-PAGE (Εικόνα 3.35, μαύροι αστερίσκοι) σε σχέση με το δείγμα χωρίς την προσθήκη του αναστολέα της γλυκοζυλίωσης, αποδεικνύοντας ότι είναι *N*-γλυκοζυλιωμένη. Πιο συγκεκριμένα, στην περίπτωση της επώασης με EndoH παρατηρείται και μία δεύτερη ζώνη στα ~63 kDa (Εικόνα 3.35, EndoH, κόκκινος αστερίσκος) που υποδεικνύει πως στη *Leishmania* πιθανά να υπάρχουν μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις με μικτούς τύπους υδατανθράκων και πως μόνο η ανθεκτική μορφή στην ενδογλυκοσιδάση είναι η «ώριμη» που τελικά καταλήγει στην επιφανειακή μεμβράνη του παρασίτου. Μία αντίστοιχη μορφή γλυκοζυλιωμένης rLdMAcP-mRFP1 παρατηρείται και στην περίπτωση της επώασης ζωντανών προμαστιγωτών με τουνικομυκίνη (Εικόνα 3.35, Tunicamycin, κόκκινος αστερίσκος). Μάλιστα, στα κύτταρα που έχουν επωαστεί με τουνικομυκίνη παρατηρούνται πάνω από μία μορφές της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης, με διαφορετικές ηλεκτροφορητικές κινητικότητες, πιθανά εξαιτίας άλλου τύπου/ επίπεδου γλυκοζυλίωσης (Εικόνα 3.35, Tunicamycin). Αξίζει να αναφερθεί, ότι επώαση με τουνικομυκίνη προκαλούσε κυτταρικό θάνατο και μείωση του αριθμού των παρασίτων (~20% σε κάθε ένα από τα ανεξάρτητα πειράματα), επιβεβαιώνοντας τη σημασία του μηχανισμού της *N*-γλυκοζυλίωσης στην επιβίωση του παρασίτου.

Συμπερασματικά, με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, θεωρείται ότι η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη rLdMAcP-mRFP1 *N*-γλυκοζυλιώνεται και η ιδιότητά της αυτή πιθανώς εξασφαλίζει τη σταθερότητά του ενζύμου και να ρυθμίζει την επιτυχημένη μεταφορά του στην κυτταροπλασματική μεμβράνη του παρασίτου. Αντίστοιχα, και η ενδογενής LdMAcP αναμένεται να γλυκοζυλιώνεται. Παρά ταύτα, δεν αποκλείεται η περίπτωση η υποκυτταρική εντόπιση και η λειτουργία της να ρυθμίζεται και από κάποιο άλλο είδος μετα-μεταφραστικής τροποποίησης, όπως πχ. φωσφορυλίωση. Πράγματι, με βάση την *in silico* ανάλυση (Nepos), στην αμινοξική αλληλουχία της LdMAcP προβλέπονται θέσεις φωσφορυλίωσης (Ser77, Ser83, Ser154, Tyr95, Tyr101, Tyr126, Tyr240, Thr61, Thr105) οι οποίες μένει να επιβεβαιωθεί ότι είναι λειτουργικές.



Εικόνα 3.35 Έλεγχος γλυκοζυλίωσης της rLdMAcP-mRFP1. Ανοσοαποτύπωση Western πρωτεϊνών από διαγονιδιακά παράσιτα *L. donovani*-rLdMAcP-mRFP1 στατικής φάσης που περιέχονται στο κλάσμα F5 S από κλασματοποίηση με διγτονίνη και 1% w/v TritonX-100. (αριστερά) μετά από επώαση (+) ή μη (-) με 500U EndoF ή 500U EndoH και (δεξιά) αφότου είχε προηγηθεί επώαση των παρασίτων *L. donovani*-rLdMAcP-mRFP1 με 10 µg/ml Tunicamycin (+) ή με αντίστοιχη ποσότητα του διαλύτη (25mM NaOH) (-) στην καλλιέργεια και ανάλυση με SDS-PAGE 10% (w/v). Σε κάθε περίπτωση, η μεμβράνη επώαστηκε με το α-RFP αντίσωμα (0,4 µg/ml). Η εμφάνιση των ζωνών έγινε με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας (ECL). Οι μαύροι αστερίσκοι δείχνουν τις ζώνες που αντιστοιχούν στη μη γλυκοζυλιωμένη rLdMAcP-mRFP1. Οι κόκκινοι αστερίσκοι αντιστοιχούν σε ειδικούς τύπους γλυκοζυλιώσεων. Μοριακοί μάρτυρες μεγεθών (kDa).

3.2.6 Υποκυτταρική εντόπιση της ανασυνδυασμένης rLdMAcP-mRFP1 και της ενδογενούς LdMAcP σε παράσιτα *L. donovani*

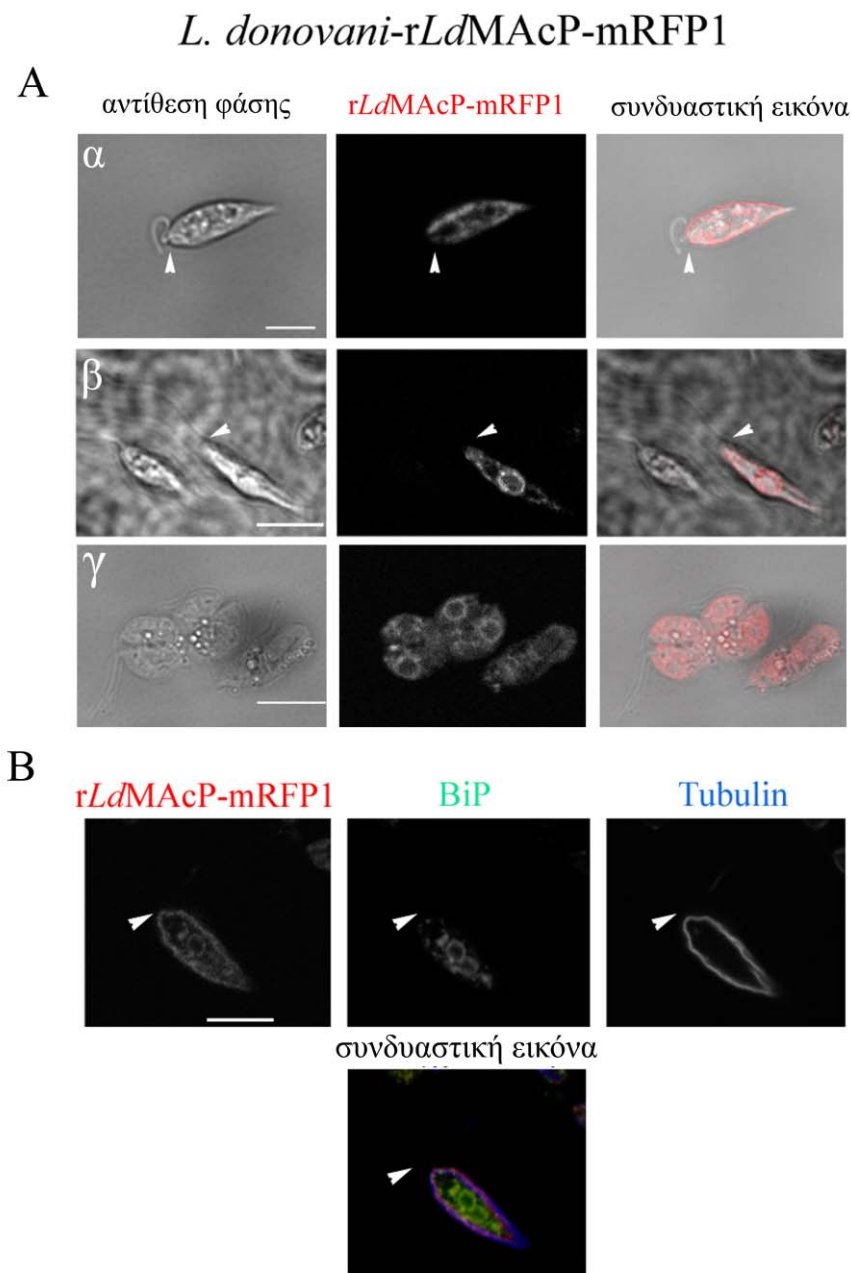
Σε συνέχεια της βιοχημικής μελέτης της LdMAcP (ενδογενούς και ανασυνδυασμένης) πραγματοποιήθηκε η επιβεβαίωση της υποκυτταρικής της εντόπισης σε προμαστιγωτά παράσιτα *L. donovani* με μικροσκοπία φθορισμού.

Αρχικά, μελετήθηκε η εντόπιση της rLdMAcP-mRFP1 σε διαγονιδιακά προμαστιγωτά παράσιτα στατικής και λογαριθμικής φάσης με συνεστιακό μικροσκόπιο και απεικόνιση του κόκκινου φθορισμού της mRFP1 (βλ. Μέθοδοι Παράγραφος 2.2.6) (Εικόνα 3.36 α, β, γ). Παρατηρήθηκε, ότι στα μεν προμαστιγωτά παράσιτα στατικής φάσης η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη εντοπιζόταν περιφερειακά, στην επιφάνεια του κυττάρου όσο και περιπυρηνικά σε υποκυτταρικές δομές τύπου ER, στα δε παράσιτα λογαριθμικής φάσης εντοπιζόταν κυρίως σε περιπυρηνικές δομές μέσα στο κύτταρο (Εικόνα 3.36 γ). Ακολούθως, έγινε προσπάθεια ελέγχου της παρατηρούμενης εντόπισης της rLdMAcP-mRFP1 στην επιφάνεια του κυττάρου και σε δομές τύπου ER με έμμεσο ανοσοφθορισμό. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκαν πειράματα συνεντοπισμού σε προμαστιγωτά παράσιτα στατικής φάσης με α) την α-Τουμπουλίνη (Tubulin) που αποτελεί το κύριο συστατικό των μικροσωληνίσκων που βρίσκονται κάτω από την εσωτερική επιφάνεια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης του παρασίτου (subpellicular microtubules) και β) την

λεϊσμανιακή πρωτεΐνη συνοδό (chaperon) BiP/ GRP78, που βρίσκεται στις μεμβράνες του αδρού ER [167], (Εικόνα 3.36, κάτω μέρος). Τα αποτελέσματα αυτά έδειξαν ότι η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη συνεντοπίζεται σε μεγάλο ποσοστό με τις δομές στις οποίες κυριαρχούν οι επίτοποι των α -Tubulin και α -BiP αντισωμάτων επιβεβαιώνοντας την παρουσία της rLdMAcP-mRFP1 στην επιφανειακή μεμβράνη και το ER των προμαστιγωτών παρασίτων. Τέλος, η rLdMAcP-mRFP1 εντοπίστηκε στην περιοχή έκφυσης του μαστιγίου (flagellar pocket) (Εικόνα 3.36, άσπρα βέλη), ενώ δεν παρατηρήθηκε ιδιαίτερη χρώση στο μαστίγιο του παρασίτου.

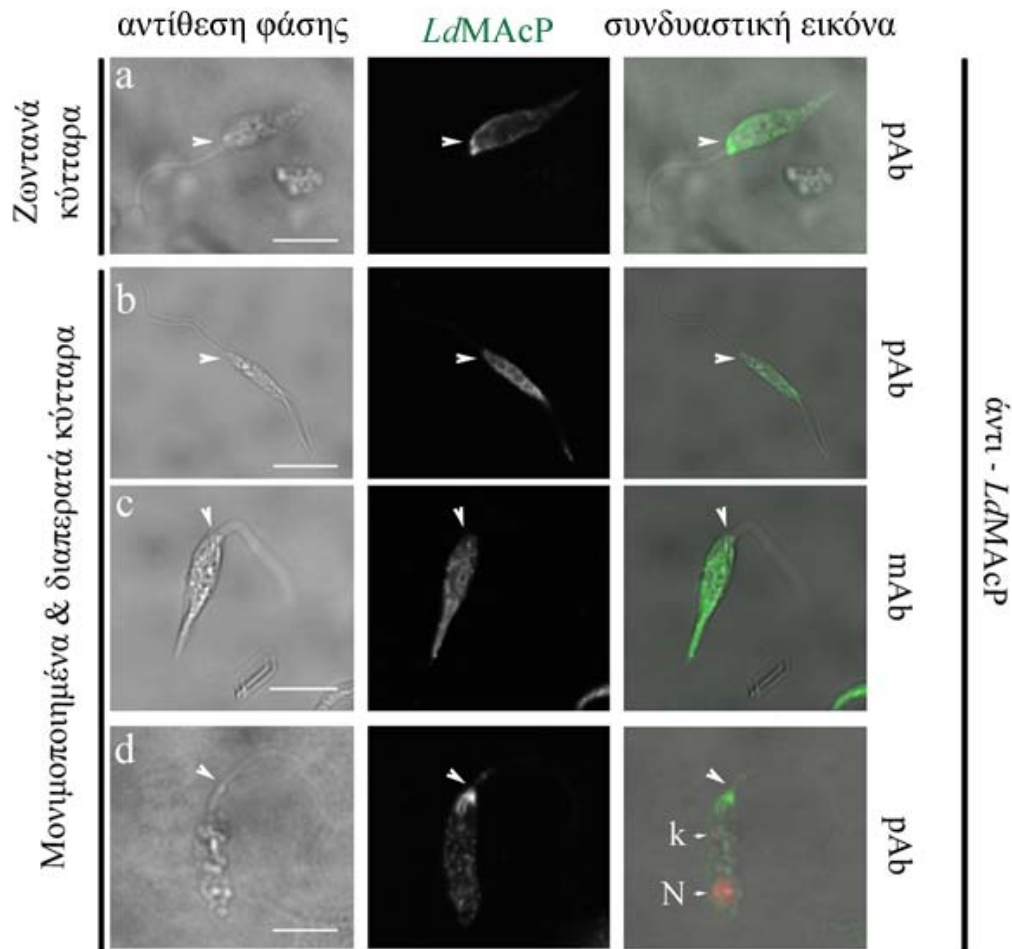
Παράλληλα, εξετάστηκε η εντόπιση της ενδογενούς πρωτεΐνης LdMAcP σε προμαστιγωτά παράσιτα *L. donovani* (στέλεχος LG13) στατικής φάσης με έμμεσο ανοσοφθορισμό και χρήση του μονοκλωνικού (mAb) και των πολυκλωνικών (pAb) α -LdMAcP αντισωμάτων ποντικού και κουνελιού. Στην περίπτωση αυτή, τα κύτταρα είχαν προηγουμένως επωαστεί με 0,1% (v/v) TritonX-100 για διάτρηση της κυτταροπλασματικής τους μεμβράνης (βλ. Μέθοδοι Παράγραφος 2.2.6.1) (Εικόνα 3.37 β-ε). Οι πυρήνες και το DNA των κινητοπλαστών σημάνθηκαν με την κόκκινη φθορίζουσα χρωστική προπύδιο του ιωδίου (PI). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.37, η ενδογενής πρωτεΐνη εντοπίστηκε στα παρασιτικά κύτταρα σε θέσεις αντίστοιχες με αυτές της rLdMAcP-mRFP1. Αξίζει να σημειωθεί, ότι η περιοχή έκφυσης του μαστιγίου ήταν εντονότερα σημασμένη όταν πριν από τη μονιμοποίηση των κυττάρων προηγήθηκε επώαση στους 37°C, δηλαδή στη θερμοκρασία σώματος του θηλαστικού ξενιστή (Εικόνα 3.37 δ).

Σε ακολουθία των παραπάνω παρατηρήσεων, έγινε προσπάθεια επιβεβαίωσης του επιφανειακού εντοπισμού της ενδογενούς LdMAcP και συγκεκριμένα της εξωκυττάριας περιοχής της στην οποία βρίσκεται το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν προμαστιγωτά παράσιτα *L. donovani* αγρίου τύπου τα οποία αρχικά επώαστηκαν ζωντανά στους 4°C για 20 λεπτά με α -LdMAcP ορό ποντικού και στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε έμμεσο ανοσοφθορισμό, δηλαδή μονιμοποιήθηκαν και επώαστηκαν με το δεύτερο αντίσωμα (Alexa Fluor 488) χωρίς την παρουσία TritonX-100 (διατήρηση της ακεραιότητας της κυτταροπλασματικής μεμβράνης). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.37 α, το αντίσωμα αναγνωρίζει επιτόπους σε ολόκληρη την επιφάνεια του παρασίτου και στη μεμβράνη της περιοχής έκφυσης του μαστιγίου, επιβεβαιώνοντας την προβλεπόμενη εξωκυτταρική εντόπιση του τμήματος της LdMAcP (αα 1-274) έναντι της οποίας κατασκευάστηκαν τα α -LdMAcP πολυκλωνικά αντισώματα.



Εικόνα 3.36 Υποκυτταρική εντόπιση της rLdMAcP-mRFP1 σε προμαστιγωτές μορφές *L. donovani*-rLdMAcP-mRFP1 με συνεστιακό μικροσκόπιο. **A.** (**α**, **β**) προμαστιγωτά στατικής φάσης (**γ**) προμαστιγωτά λογαριθμικής φάσης. Ο κόκκινος φθορισμός της mRFP1 ανιχνεύτηκε με την γραμμή laser Argon 543 nm και παρατίθεται σε ασπρόμαυρη εικόνα για καλύτερη αντίθεση. **B.** Για τον έμμεσο ανοσοφθορισμό χρησιμοποιήθηκε το καθαρισμένο πολυκλωνικό αντίσωμα a-BiP (1:500) από κουνέλι και δεύτερο αντίσωμα anti-rabbit συζευγμένο με την πράσινη φθορίζουσα χρωστική Alexa Fluor 488 και ταυτόχρονα, το μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού a-Tubulin (1:300) και δεύτερο αντίσωμα anti-mouse συζευγμένο με τη μπλέ φθορίζουσα χρωστική Alexa Fluor 633. Ο κόκκινος (mRFP1), ο πράσινος (Alexa 488) και ο μπλέ (Alexa 633) φθορισμός παρουσιάζονται χωριστά ως ασπρόμαυρες εικόνες και σε συνδυαστική έγχρωμη εικόνα. Οι κεφαλές των βελών υποδεικνύουν την περιοχή έκφυσης του μαστιγίου (flagellar pocket). Scale bar: 4 μm.

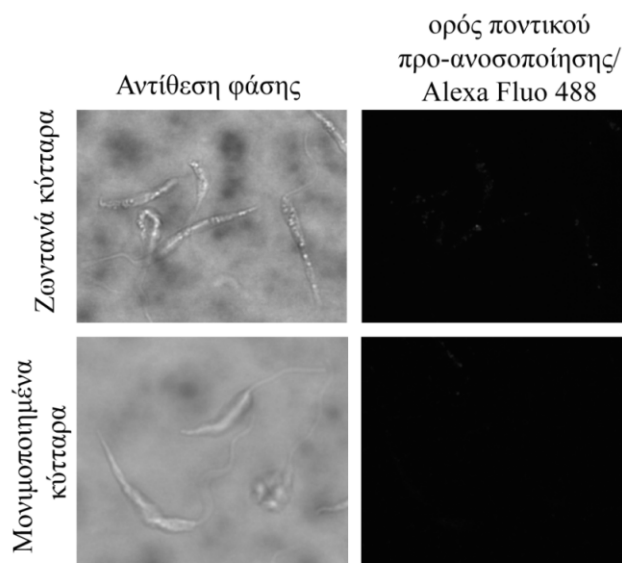
L. donovani αγρίου τύπου



Εικόνα 3.37 Εντοπισμός της ενδογενούς *LdMACP* σε ζωντανά (α) και μονιμοποιημένα (β-ε) προμαστιγωτά παράσιτα *L. donovani* (στέλεχος LG13) στατικής φάσης, με συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού. Η χρώση των παρασίτων έγινε με μονοκλωνικό α-*LdMACP* αντίσωμα ποντικού [mAb (m) αραίωση 1:2], με πολυκλωνικό αντίσωμα ποντικού [pAb(m), αραίωση 1:50] και με καθαρισμένο αντίσωμα κουνελιού [pAb (R) 1 µg/ml]. Η χρώση του DNA έγινε με προπίδιο του ιωδίου (PI).

Ο πράσινος φθορισμός παρουσιάζεται ως ασπρόμαυρη εικόνα και ως συνδυαστική έγχρωμη εικόνα μαζί με την αντίθεση φάσης. Οι κεφαλές των βελών υποδεικνύουν την περιοχή έκφυσης του μαστιγίου (flagellar pocket). k: κινητοπλάστης, N: πυρήνας. Scale bar: 4 µm.

Τέλος, για την πιστοποίηση της ειδικότητας των αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη αυτή, πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονη επώαση προμαστιγωτών παρασίτων (ζωντανών και μονιμοποιημένων) με ορό ποντικού προ-ανοσοποίησης (Εικόνα 3.38) χρησιμοποιώντας τις ίδιες παραμέτρους λήψης εικόνων όπως για τις παραπάνω (Εικόνα 3.36 και Εικόνα 3.37).



Εικόνα 3.38 Έλεγχος της ειδικότητας των αντισωμάτων. Έμμεσος ανοσοφθορισμός σε προμαστιγωτά παράσιτα *L. donovani* (στέλεχος LG13) στατικής φάσης. Η χρώση των παρασίτων (ζωντανά ή μονιμοποιημένα) έγινε με ορό ποντικού προ-ανοσοποίησης (αραίωση 1:50) και στη συνέχεια με δεύτερο αντίσωμα anti-mouse Alexa Fluor 488. Ο πράσινος φθορισμός παρουσιάζεται ως ασπρόμαυρη εικόνα. Οι φωτογραφίες ελήφθησαν στις ίδιες συνθήκες PMT και ένταση laser λήψης εικόνων με τις παραπάνω εικόνες (Εικόνα 3.36 και Εικόνα 3.37). Scale bar: 4 μ m.

Συνοψίζοντας, τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώνουν την προβλεπόμενη μεμβρανική εντόπιση της *LdMAcP* τόσο στην εξωτερική επιφάνεια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης όσο και σε μεμβράνες του ER, ενισχύοντας το συμπέρασμα της βιοχημικής μελέτης σύμφωνα με το οποίο η *LdMAcP* παρουσιάζει την τυπική εντόπιση των μεμβρανικών πρωτεϊνών τύπου I.

3.2.7 Ενζυμικός χαρακτηρισμός της ενδογενούς *LdMAcP* και της ανασυνδυασμένης *rLdMAcP*-mRFP1

3.2.7.1 Δοκιμή όξινης έξω-φωσφατάσης σε ζωντανά προμαστιγωτά παράσιτα στατικής φάσης

Στη συνέχεια θελήσαμε να επιβεβαιώσουμε εάν η εντόπιση της ανασυνδυασμένης *rLdMAcP*-mRFP1 στην εξωτερική πλευρά της επιφάνειας των διαγονιδιακών προμαστιγωτών *L. donovani*- *rLdMAcP*-mRFP1 όντως συμβάλλει στη δράση όξινης έξω-φωσφατάσης, όπως έχει καταγραφεί σε παλαιότερες μελέτες για τα παράσιτα *L. donovani* [158-161, 164]. Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε με δοκιμή αποφωσφορυλίωσης του συνθετικού υποστρώματος *p*-νιτροφαινυλοφωσφορικό ανιόν (*p*NPP) σε pH 4.8 στους

37°C, δηλαδή στη θερμοκρασία σώματος του θηλαστικού ξενιστή, με ή χωρίς την παρουσία τρυγικού οξέος (βλ. Μέθοδοι Παράγραφος 2.2.16.1) [234]. Η αντοχή στο τρυγικό οξύ χρησιμοποιείται ως κριτήριο στο χαρακτηρισμό των όξινων φωσφατασών (εκκρινόμενης και μεμβρανικής) από τα παράσιτα *L. donovani* ήδη από τη δεκαετία του 1980 [235].

Αρχικά, έγινε προσδιορισμός της δράσης έξω-φωσφατάσης στην επιφάνεια ζωντανών *L. donovani*-rLdMAcP-mRFP1 σε σύγκριση με αυτή των *L. donovani*-Lexsy-sat στη στατική και τη λογαριθμική φάση ανάπτυξης. Διαπιστώθηκε ότι και στις 2 περιπτώσεις τα παράσιτα που εκφράζουν επισωμικά τον κενό πλασμιδιακό φορέα παρουσίασαν σχεδόν 10 φορές μικρότερη δράση από αυτή των *L. donovani*-rLdMAcP-mRFP1 (Πίνακας 7). Από κλινικό ενδιαφέρον, τα αποτελέσματα που θα παρουσιαστούν στη συνέχεια αφορούν πειράματα με προμαστιγωτά παράσιτα στατικής φάσης, ο πληθυσμός των οποίων είναι εμπλουτισμένος στις μετακυκλικές μορφές του παρασίτου που είναι και οι μολύνουσες για τα θηλαστικά.

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε σύγκριση της δράσης έξω-φωσφατάσης ζωντανών *L. donovani*-rLdMAcP-mRFP1 στατικής φάσης και των προμαστιγωτών αγρίου τύπου. Στην περίπτωση αυτή, ο διαγονιδιακός πληθυσμός παρουσίασε ~2,5 φορές υψηλότερη δράση όξινης έξω-φωσφατάσης από ότι ο δεύτερος (Πίνακας 7 και Πίνακας 8). Η διαφορά αυτή θα μπορούσε να αποδοθεί στην υπερέκφραση από τα διαγονιδιακά παράσιτα της LdMAcP που επιβεβαιώθηκε προηγουμένως και στο επίπεδο του mRNA (βλ. Αποτελέσματα Παράγραφος 3.1.5, Εικόνα 3.30).

Επιπλέον, για να επιβεβαιώσουμε ότι η ενζυμική δραστηριότητα που μετρήθηκε στα παραπάνω πειράματα δεν οφειλόταν σε πρωτεΐνες που προέρχονται από κύτταρα που είχαν υποστεί λύση κατά τη διάρκεια της επώασής το η μέσα στο διάλυμα της αντίδρασης, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ελέγχου όπως περιγράφεται στην Παράγραφο 2.2.16.1 τα οποία βασίστηκαν στη βιβλιογραφία [236]. Με τον τρόπο αυτό διαπιστώθηκε ότι η μετρούμενη δράση όξινης φωσφατάσης στα διαλύματα ελέγχου ήταν στα επίπεδα των τιμών «θορύβου» ($3,5 \pm 2$ για τα *L. donovani*-Lexsy-sat και 17 ± 10 για τα *L. donovani*-rLdMAcP-mRFP1), επιβεβαιώνοντας ότι οι τιμές των εξεταζόμενων δειγμάτων οφείλονταν σχεδόν αποκλειστικά στη δράση έξω-φωσφατάσης στην επιφάνεια των ζωντανών κυττάρων.

Τέλος, βασιζόμενοι στη βιοπληροφορική μελέτη της LdMAcP (βλ. Αποτελέσματα Παράγραφος 3.1.1) η οποία ανέδειξε τις σημαντικές διαφορές που υπάρχουν μεταξύ αυτής και των ορθόλογων μορίων της από τα άλλα είδη του γένους *Leishmania* (Εικόνα 3.18),

θελήσαμε να διαπιστώσουμε εάν οι διαφορές αυτές αντικατοπτρίζονται στη δράση έξω-φωσφατάσης στην επιφάνεια ζωντανών προμαστιγωτών (με ή χωρίς την παρουσία τρυγικού οξέος). Στο πλαίσιο αυτό χρησιμοποιήσαμε παράσιτα στατικής φάσης από τα είδη *L. donovani*-LG13, *L. major* Friedlin, *L. infantum* (στέλεχος GH12) και *L. tarentolae* (στέλεχος Parrot, Jena Biosciences).

Πίνακας 7 Δράση έξω-φωσφατάσης ζωντανών διαγονιδιακών προμαστιγωτών στατικής και λογαριθμικής φάσης με ή χωρίς την παρουσία 5 mM τρυγικού οξέος.

Πληθυσμοί <i>L. donovani</i>	Αντίδραση έξω-φωσφατάσης ($A_{405}/10^7$ κύτταρα x ml ⁻¹)	
	- 5 mM τρυγικό οξύ	+ 5 mM τρυγικό οξύ
Προμαστιγωτά στατικής φάσης		
<i>L. donovani</i> -Lexsy-sat	42 ± 15	22 ± 11
<i>L. donovani</i> -rLdMAcP-mRFP1	455 ± 216 *	275 ± 192 *
Προμαστιγωτά λογαριθμικής φάσης		
<i>L. donovani</i> -Lexsy-sat	31 ± 1,6	18,9 ± 0,13
<i>L. donovani</i> -rLdMAcP-mRFP1	440 ± 120 *	263 ± 162 *

Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος από 5 ανεξάρτητα πειράματα ± σταθερές απόκλισης. * P < 0.05 σημαντική στατιστική διαφορά συγκρίνοντας με τις τιμές ελέγχου (*L. donovani*-Lexsy-sat), two-tailed paired Student's t test.

Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι τα παράσιτα *L. infantum* είχαν στην επιφάνειά τους δράση έξω-φωσφατάσης, με ανθεκτικότητα στην αναστολή από τρυγικό οξύ ανάλογη των *L. donovani*, γεγονός αναμενόμενο, καθώς οι ορθόλογες πρωτεΐνες των 2 αυτών στελεχών έχουν 100% ταυτότητα (Πίνακας 8). Εντυπωσιακό, από την άλλη πλευρά, είναι το γεγονός ότι τα προμαστιγωτά του δερμοτρόπου στελέχους *L. major* Friedlin παρουσίασαν μέχρι και 7-8 φορές μεγαλύτερη αντίδραση όξινης έξω-φωσφατάσης στην επιφάνειά τους σε σχέση με τα σπλαγχνοτρόπα στελέχη *L. infantum* and *L. donovani* που ήταν μάλιστα ~90% ανθεκτική στην αναστολή από τρυγικό οξύ (Πίνακας 8).

Τέλος, όσον αφορά στο μη παθογόνο για τα θηλαστικά είδος *L. tarentolae*, τα προμαστιγωτά παράσιτα παρουσίασαν συστηματικά πολύ χαμηλότερα επίπεδα αντίδρασης όξινης έξω-φωσφατάσης σε σχέση με τα παθογόνα για τον άνθρωπο και τα ζώα, είδη *L. infantum* and *L. donovani* (~0,3 φορές, Πίνακας 8).

Πίνακας 8 Δράση έξω-φωσφατάσης ζωντανών προμαστιγωτών *Leishmania* spp. στατικής φάσης με ή χωρίς την παρουσία τρυγικού οξέος.

Στελέχη αγρίου τύπου	Αντίδραση έξω-φωσφατάσης ($A_{405}/10^7$ κύτταρα $\times$ ml ⁻¹)	
	- 5 mM τρυγικό οξύ	+ 5 mM τρυγικό οξύ
<i>L. donovani</i> (στέλεχος LG13)	142 $\pm$ 57	63 $\pm$ 26
<i>L. infantum</i> (στέλεχος GH12)	168 $\pm$ 49	88 $\pm$ 16
<i>L. major</i> Friedlin	1113 $\pm$ 188 **	925 $\pm$ 87 **
<i>L. tarentolae</i> (στέλεχος Paroll)	46 $\pm$ 26 *	27 $\pm$ 14 *

Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος από 3 ανεξάρτητα πειράματα $\pm$ σταθερές απόκλισης. *, ** P < 0.05, 0.01, αντίστοιχα, σημαντική στατιστική διαφορά συγκρίνοντας με τις τιμές ελέγχου (*L. donovani* στέλεχος LG13), two-tailed paired Student's t test.

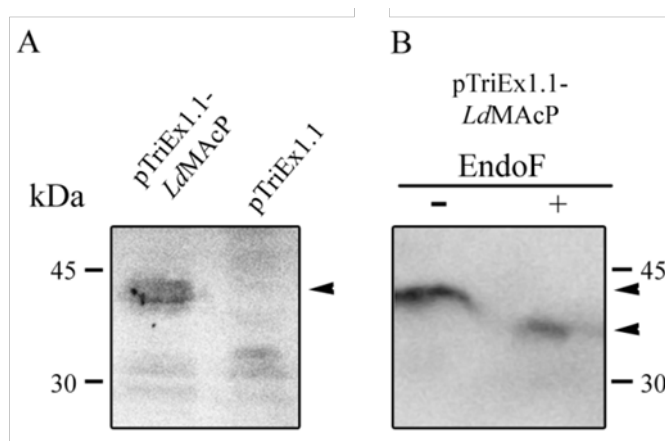
Συμπερασματικά, τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώνουν ότι η έκφραση της rLdMAcP-mRFP1 στην επιφάνεια των διαγονιδιακών παρασίτων συμβάλλει και ενισχύει τη δράση όξινης έξω-φωσφατάσης με αντοχή στο τρυγικό οξύ, ενισχύοντας την υπόθεση ότι και η ενδογενής LdMAcP είναι μία έξω-φωσφατάση με αντίστοιχα χαρακτηριστικά. Επιπρόσθετα, συμπληρώνουν την ήδη δημοσιευμένη γνώση στο ότι τα είδη του γένους *Leishmania* παρουσιάζουν στελεχο-εξαρτώμενες διαφοροποιήσεις στη δράση όξινης έξω-φωσφατάσης [163].

3.2.8 Ετερόλογη έκφραση της LdMAcP σε ανώτερα ευκαρυωτικά κύτταρα και ταυτοποίηση της ενζυμικής ενεργότητας του ανασυνδυασμένου ενζύμου

Με σκοπό την περαιτέρω μελέτη της εντόπισης και της ενζυμικής δράσης της LdMAcP, το γονίδιο που την κωδικοποιεί κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pTriEx 1.1 και εν συνεχεία, εκφράστηκε ετερόλογα ως χμαιοική πρωτεΐνη με την ετικέτα των 8 ιστιδινών στην καρκινική σειρά ανθρώπινων επιθηλιακών κυττάρων HeLa (HeLa-rLdMAcP-His).

Αρχικά, η ετερόλογη έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης rLdMAcP-His ελέγχθηκε με ανοσοαποτύπωση Western και εντοπισμό της σε διαλυτά στο TritonX-100 (1% v/v) πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από κύτταρα HeLa-rLdMAcP-His. Παράλληλα,

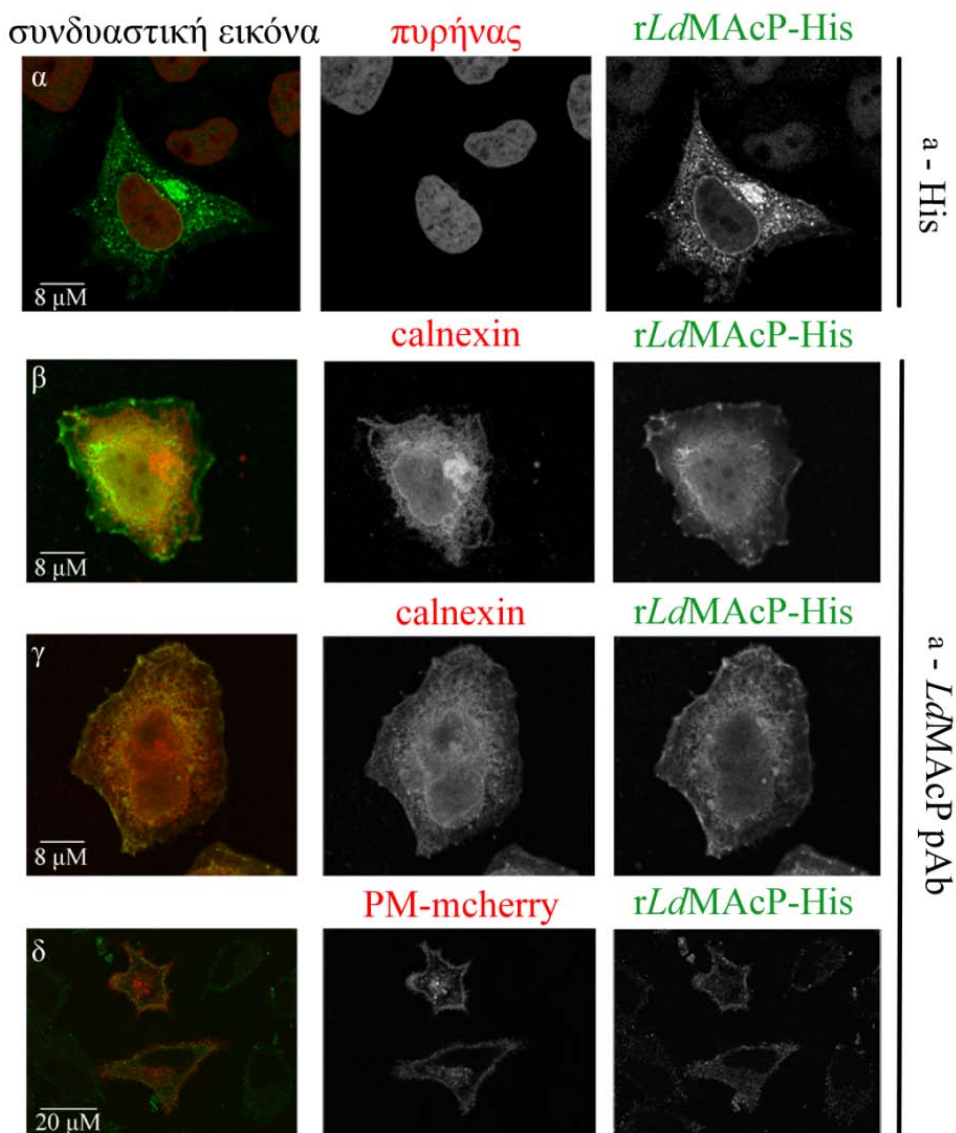
ελέγχθηκαν εκχυλίσματα από κύτταρα HeLa που εκφράζουν μόνο τον κενό πλασμιδιακό φορέα pTriEx 1.1 (Εικόνα 3.39 Α). Πράγματι, με χρήση του ειδικού μονοκλωνικού αντισώματος α-His, στο πρωτεϊνικό εκχύλισμα από τα κύτταρα HeLa-rLdMAcP-His εντοπίστηκε μία ζώνη στα ~42 kDa η οποία απουσίαζε από το εκχύλισμα των HeLa-pTriEx 1.1 κυττάρων. Το μέγεθος της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης βρέθηκε κατά ~7 kDa μεγαλύτερο από τη θεωρητική μοριακή μάζα που μετά από απομάκρυνση της αλληλουχίας του SP είναι 34,5 kDa, γεγονός που υποδηλώνει ότι η rLdMAcP-His υφίσταται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, πχ. *N*-γλυκοζυλίωση.



Εικόνα 3.39 Ανάλυση πρωτεϊνών διαλυτών στο 1% (v/v) TritonX-100 κυττάρων HeLa. Ανοσοαποτύπωση Western A. HeLa επιμολυσμένα με τα πλασμίδια pTriEx1.1-rLdMAcP και pTriEx1.1 B. HeLa επιμολυσμένα με το πλασμίδιο pTriEx1.1-rLdMAcP μετά από επώαση (+) ή μη (-) με 500U EndoF. Η εμφάνιση έγινε με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας (ECL) μετά από επώαση με το μονοκλωνικό αντίσωμα α-His (1 µg/ml).

Η παραπάνω υπόθεση ελέγχθηκε με πέψη εκχυλισμάτων από κύτταρα HeLa-rLdMAcP-His με την ενδογλυκοσιδάση EndoF (βλ. Μέθοδοι Παράγραφος 2.2.16.2), οπότε η φαινομενική μοριακή μάζα της rLdMAcP-His μειώθηκε στα ~35 kDa (Εικόνα 3.39 B). Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνει πως η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη rLdMAcP-His, ετερόλογα εκφρασμένη σε κύτταρα θηλαστικών είναι *N*-γλυκοζυλιωμένη.

Επιπρόσθετα, θελήσαμε να μελετήσουμε τον εντοπισμό της rLdMAcP-His με έμμεσο ανοσοφθορισμό και μικροσκοπία φθορισμού (βλ. Παράγραφο 2.2.6.1). Πράγματι, με χρήση των αντισωμάτων α-His και α-LdMAcP (pAb ποντικού), η rLdMAcP-His εντοπίστηκε τόσο σε δομές τύπου ER όσο και στην κυτταροπλασματική μεμβράνη κυττάρων HeLa-rLdMAcP-His (Εικόνα 3.40 α).



Εικόνα 3.40 Εντοπισμός της rLdMAcP-His σε κύτταρα HeLa που την εκφράζουν με συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού. Η χρώση των κυττάρων έγινε (α) με μονοκλωνικό a-His αντίσωμα (β, γ) με πολυκλωνικό a-calnexin κουνελιού (4 μg/ml) και (δ) σήμανση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης ζωντανών κυττάρων μετά από συν-επιμόλυνση με το πλασμίδιο pDisplay-mcherry και στη συνέχεια χρώση με το πολυκλωνικό a-LdMAcPH αντίσωμα ποντικού (αραίωση 1:50). Η χρώση του DNA έγινε με προπύδιο του ιωδίου (PI).

Ο πράσινος φθορισμός παρουσιάζεται ως ασπρόμαυρη εικόνα και ως συνδυαστική έγχρωμη εικόνα με την αντίθεση φάσης.

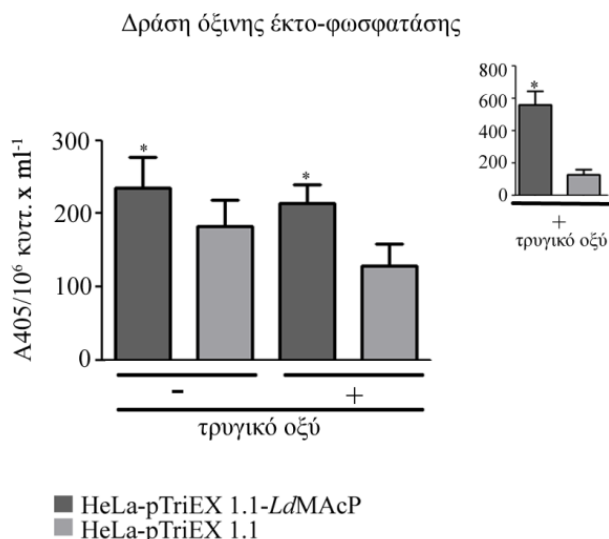
Η επιβεβαίωση του εντοπισμού της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε είτε με ταυτόχρονη επώαση των κυττάρων που την υπερεκφράζουν με το αντίσωμα έναντι της καλνεξίνης (calnexin) [237] η οποία είναι πρωτεΐνη-συνοδός (chaperon) του ER είτε με ταυτόχρονη επιμόλυνση των κυττάρων HeLa με τα πλασμίδια pTriEx1.1.-LdMAcP και pDisplay-mcherry (Εικόνα 3.40 β, γ). Το τελευταίο κωδικοποιεί για μία μορφή της

κόκκινης φθορίζουσας πρωτεΐνης mcherry [238] που κατευθύνεται την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Παράλληλα, η επιβεβαίωση της παρουσίας επιτόπων της rLdMAcP-His στην εξωτερική επιφάνεια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης των κυττάρων HeLa που την εκφράζουν επιβεβαιώθηκε μετά από επώαση ζωντανών κυττάρων με το πολυκλωνικό α-LdMAcP (pAb) (βλ. Μέθοδοι Παράγραφος 2.2.6.1, Εικόνα 3.40 δ).

Ακολούθως, για να επιβεβαιώσουμε την παρουσία του ενεργού κέντρου της rLdMAcP-His στην εξωτερική πλευρά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης των κυττάρων HeLa-rLdMAcP-His πραγματοποιήθηκε δοκιμή δράσης όξινης έξω-φωσφατάσης σε ζωντανά κύτταρα τα οποία εκφράζουν είτε την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη είτε τον κενό πλασμιδιακό φορέα. Όπως και στην περίπτωση των κυττάρων *Leishmania*, για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα το pNPP και πραγματοποιήθηκε στους 37°C με ή χωρίς την παρουσία 2.5 mM τρυγικού οξέος (βλ. Μέθοδοι Παράγραφος 2.2.16.1).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι, όπως και στην περίπτωση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης rLdMAcP-mRFP1, η ετερόλογα εκφρασμένη rLdMAcP-His προσέδωσε υψηλότερη ενεργότητα όξινης φωσφατάσης στην επιφάνεια των κυττάρων που την εκφράζουν σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα και ήταν ανθεκτική στην αναστολή από τρυγικό οξύ (Εικόνα 3.41). Αξίζει να τονιστεί, ότι όταν έγινε αναγωγή στο ποσοστό των κυττάρων που εκφράζουν την rLdMAcP-His τα αποτελέσματα της δοκιμασίας έγιναν ακόμα πιο εμφανή (4-5X υψηλότερη δράση έξω-φωσφατάσης) (Εικόνα 3.41, ένθετο γράφημα).

Συνολικά, με τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώθηκε και με έμμεσο τρόπο η εντόπιση και η δράση της LdMAcP ως όξινη έξω-φωσφατάση, καθώς η ετερόλογα εκφρασμένη πρωτεΐνη rLdMAcP-His κατευθύνεται επιτυχώς στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των κυττάρων θηλαστικού και έχει την καταλυτική της περιοχή προσανατολισμένη προς τον εξωκυττάριο περιβάλλον. Προφανώς, οι λεϊσμανιακές σηματοδοτικές αλληλουχίες διαλογής για κατεύθυνση στην κυτταροπλασματική μεμβράνη αναγνωρίζονται από το εκκριτικό σύστημα των κυττάρων θηλαστικού.



Εικόνα 3.41 Δράση όξινης έξω-φωσφατάσης ζωντανών επιμολυσμένων κυττάρων HeLa-rLdMAcP-His με ή χωρίς την παρουσία τρυγικού οξέος. Το ένθετο ραβδόγραμμα στο πλαίσιο επάνω δεξιά δείχνει τη δράση έξω-φωσφατάσης παρουσία τρυγικού οξέος μετά από κανονικοποίηση (normalization) για το ποσοστό των κυττάρων που εκφράζουν τη διαγονιδιακή πρωτεΐνη. * $P < 0.05$ στατιστικά σημαντική διαφορά συγκρίνοντας με τις τιμές αρνητικού μάρτυρα (pTriEx 1.1), two-tailed paired Student's t test.

3.2.9 *In vitro* μελέτη της LdMAcP ως πιθανού μολυσματικού παράγοντα

3.2.9.1 Μελέτη της μολυσματικότητας/ λοιμογόνου ικανότητας των διαγονιδιακών προμαστιγωτών *L. donovani*-rLdMAcP-mRFP1 και *L. donovani*-pLexsy-sat στη κυτταρική σειρά μακροφάγων J774

Προηγούμενες μελέτες προτείνουν ότι η ενεργότητα έξω-φωσφατάσης στα παράσιτα *Leishmania* spp. παίζει ρόλο στην εκτροπή της μικροβιοκτόνου μηχανής των μακροφάγων του θηλαστικού, πιθανά μέσω της μεταβολής των επιπέδων φωσφορυλιωμένων σηματοδοτικών μορίων τα οποία βρίσκονται στην επιφάνεια ή στο εσωτερικό των κυττάρων-ξενιστών [119]. Ακόμα παλαιότερες μελέτες [159, 160] συνέδεαν την ενεργότητα αυτή στην επιφάνεια των *L. donovani* με τη μολυσματικότητα των παρασίτων, βασιζόμενες στη μέτρησή της σε ολικά ή μεμβρανικά παρασιτικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα. Σε συνέχεια των μελετών αυτών, θελήσαμε να εξετάσουμε την πιθανότητα η παρουσία της LdMAcP στην επιφάνεια των προμαστιγωτών *L. donovani* να συνεισφέρει στη χειραγώγηση του αμυντικού συστήματος των μακροφάγων προς όφελος της εισόδου των παρασίτων σε αυτά ή/ και της εγκαθίδρυσης της μόλυνσης.

Για το σκοπό αυτό αναπτύχθηκε ένα σύστημα *in vitro* μελέτης της μολυσματικότητας των διαγονιδιακών προμαστιγωτών παρασίτων *L. donovani*-rLdMAcP-mRFP1 τα οποία, όπως περιγράφηκε στην Παράγραφο 3.1.8.1, παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά στην ενεργότητα έξω-φωσφατάσης ανθεκτικής σε αναστολή από τρυγικό οξύ (Πίνακας 7). Η μολυσματικότητα ελέγχθηκε σε σύγκριση με την αντίστοιχη των διαγονιδιακών παρασίτων *L. donovani*-Lexsy-sat χρησιμοποιώντας τη μονοκυτταρική σειρά μακροφάγων J774 (βλ. Μέθοδοι Παράγραφος 2.2.8.2). Τα προμαστιγωτά παράσιτα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα αυτά είχαν ενισχυμένη μολυσματικότητα (βλ. Μέθοδοι Παράγραφος 2.2.8.1) και βρίσκονταν στη στατική φάση ανάπτυξης, δηλαδή ο πληθυσμός ήταν εμπλουτισμένος στις μετακυκλικές- μολύνουσες μορφές του παρασίτου.

Πίνακας 9 Το παρασιτικό φορτίο μακροφάγων J774 μολυσμένων με διαγονιδιακά προμαστιγωτά *L. donovani*-rLdMAcP-mRFP1 και *L. donovani*-Lexsy-sat στατικής φάσης για 4, 24, 48 ώρες.

Αριθμός ενδοκυτταρωμένων παρασίτων ανά 100 μακροφάγα		
Ώρες	<i>L. donovani</i>- Lexsy-sat	<i>L. donovani</i>- rLdMAcP-mRFP1
4	144 ± 4.50	144 ± 3.50
24	142 ± 6.00	160 ± 4.00
48	131 ± 3.00	158 ± 5.70 *

Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος από 3 ανεξάρτητα πειράματα ± σταθερές απόκλισης. * P <0.05, σημαντική στατιστικά διαφορά συγκρίνοντας με τις τιμές αρνητικού μάρτυρα (Lexsy-sat), two-tailed paired Student's t test.

Τα διαγονιδιακά προμαστιγωτά και των 2 πληθυσμών κατά τις 4 πρώτες ώρες της επώασης με τα μακροφάγα παρουσίασαν αντίστοιχο δείκτη μολυσματικότητας (infectivity index) μολύνοντας το ~90% των μακροφάγων σε κάθε περίπτωση (Πίνακας 9). Είκοσι-τέσσερις ώρες αργότερα, τα *L. donovani*-rLdMAcP-mRFP1 παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά του δείκτη μολυσματικότητας σε σχέση με τα παράσιτα ελέγχου η οποία έγινε πιο χαρακτηριστική 48 ώρες μετά την έναρξη της μόλυνσης (Πίνακας 10). Τα αποτελέσματα αυτά έγιναν ακόμα πιο προφανή, όταν οι δείκτες των *L. donovani*-rLdMAcP-mRFP1 εκφράστηκαν ως σχετική βελτίωση/ ενίσχυση (fold enhancement) των αντίστοιχων από τα *L. donovani*-Lexsy-sat (αυθαίρετη τιμή=1, Εικόνα 3.42). Στην περίπτωση αυτή προκύπτει ότι 48 ώρες μετά τη μόλυνση τα πρώτα παρουσιάζουν 2 φορές

υψηλότερο δείκτη μολυσματικότητας και 5 φορές υψηλότερο δείκτη λοιμογόνου ικανότητας.

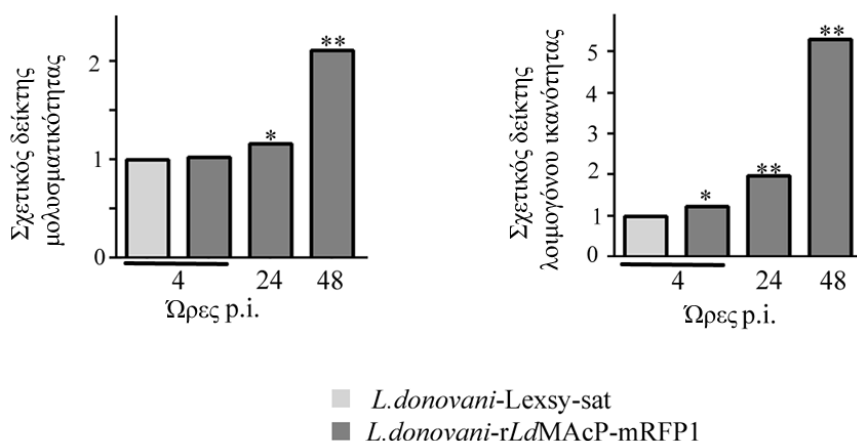
Πίνακας 10 Ο μέσος όρος του δείκτη μολυσματικότητας (πάνω) και του δείκτη λοιμογόνου ικανότητας (% , κάτω) προμαστιγωτών *L. donovani*-rLdMAcP-mRFP1 και *L. donovani*-Lexsy-sat στατικής φάσης που μόλυναν μακροφάγα J774 για 4, 24 και 48 ώρες.

Μέση τιμή του δείκτη μολυσματικότητας (infectivity index)		
Ώρες	<i>L. donovani</i>- Lexsy-sat	<i>L. donovani</i>- rLdMAcP-mRFP1
4	27,97	34,23 *
24	11,16	22,03 **
48	0,94	5,025 **

% Μέση τιμή του δείκτη λοιμογόνου ικανότητας (virulence index)		
Ώρες	<i>L. donovani</i>- Lexsy-sat	<i>L. donovani</i>- rLdMAcP-mRFP1
4	83,4	86,42
24	41,97	49,28 *
48	9,44	19,91 **

Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος από 3 ανεξάρτητα πειράματα $\pm$ σταθερές απόκλισης. Πάνω από 500 μακροφάγα ελέγχθηκαν ανά περίπτωση. * $P < 0.05$, σημαντική στατιστικά διαφορά, two-tailed paired Student's t test.

Συνολικά, τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι στο συγκεκριμένο *in vitro* σύστημα που χρησιμοποιήσαμε, η αύξηση των επιπέδων της ενεργούς LdMAcP λόγω έκφρασης της ανασυνδυασμένης rLdMAcP-mRFP1 συμβάλλει στην αύξηση της μολυσματικότητας/ λοιμογόνου ικανότητας των διαγονιδιακών παρασίτων, υποδεικνύοντας ένα πιθανό ρόλο της ενδογενούς LdMAcP ως μολυσματικού παράγοντα του παρασίτου *L. donovani*.



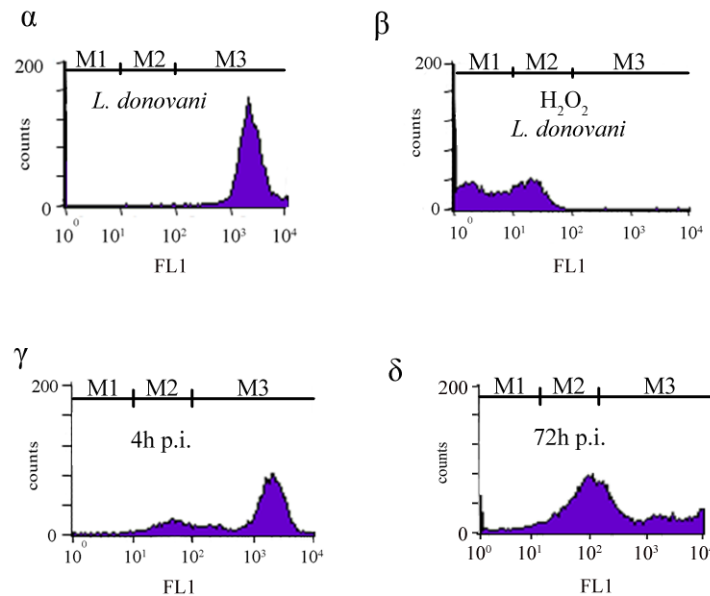
Εικόνα 3.42 Ο σχετικός δείκτης μολυσματικότητας και λοιμογόνου ικανότητας διαγονιδιακών προμαστιγωτών *L. donovani-rLdMAcP-mRFP1* σε σχέση με τα *L. donovani-Lexsy-sat* στατικής φάσης που μόλυναν μακροφάγα J774 για 4, 24 και 48 ώρες. Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος από 3 ανεξάρτητα πειράματα $\pm$ τυπικές αποκλίσεις. Ελέγχθηκαν περισσότερα από 500 μακροφάγα ανά περίπτωση. Ο δείκτης παρουσιάζεται ως σχετική ενίσχυση σε σχέση με τις τιμές αρνητικού μάρτυρα (Lexsy-sat) που λαμβάνει την αυθαίρετη τιμή 1. * $P < 0.05$, σημαντική στατιστικά, two-tailed paired Student's t test.

3.2.9.2 Μελέτη επιβίωσης των παρασίτων μετά από *in vitro* μόλυνση μακροφάγων

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της προηγούμενης παραγράφου, τα παράσιτα που υπερεκφράζουν την *LdMAcP* παρουσιάζουν αυξημένη μολυσματικότητα/ λοιμογόνο ικανότητα σε σχέση με τον πληθυσμό-μάρτυρα. Το γεγονός αυτό πιθανά αντικατοπτρίζει την ικανότητα των παρασίτων *L. donovani-rLdMAcP-mRFP1* να επιβιώνουν καλύτερα στο φαγολυσόσωμα των J774 από ότι τα *L. donovani-Lexsy-sat*. Η υπόθεση αυτή ελέγχθηκε σε ένα *in vitro* σύστημα αντίστοιχο με εκείνο που περιγράφηκε παραπάνω, με τη χρήση του αντιδραστηρίου Cell Tracker Green (CMFDA) και FACS (βλ. Μέθοδοι Παράγραφος 2.2.9.1).

Στην Εικόνα 3.43 παρουσιάζονται χαρακτηριστικά ιστογράμματα με την κατανομή του φθορισμού που εκπέμπεται μετά από ενσωμάτωση του CMTDA από ζωντανά (α) και αποπτωτικά/ νεκρά (β) παράσιτα. Με βάση αυτές τις κατανομές-ελέγχου, ορίστηκαν οι δύο διακριτές ομάδες M2 και M3 των ζωντανών και αποπτωτικών/ νεκρών παρασίτων, αντίστοιχα, που απελευθερώθηκαν από τα μακροφάγα μετά από ρήξη των τελευταίων με SDS (Εικόνα 3.43 γ, δ). Όπως φαίνεται στον Πίνακα 11, στις 24 και 72 ώρες μετά την έναρξη της μόλυνσης, τα ζωντανά (ομάδα M3) *L. donovani-rLdMAcP-mRFP1*

παρουσιάζουν μία μικρή (~5%), αλλά συστηματική και στατιστικά σημαντική διαφορά έναντι των παρασίτων *L. donovani*-Lexsy-sat.



Εικόνα 3.43 Προσδιορισμός με ανάλυση FACS των ζωντανών και αποπτωτικών/ νεκρών παρασίτων *L. donovani* (στέλεχος LG13) τα οποία απελευθερώθηκαν από μακροφάγα J774 στις 4 και 72 ώρες p.i.. (α) ζωντανά προμαστιγωτά *L. donovani* σημασμένα με CMFDA (πληθυσμός θετικού ελέγχου), (β) αποπτωτικά νεκρωτικά προμαστιγωτά *L. donovani* σημασμένα με CMFDA μετά από 12 ώρες επώαση παρουσία 4 mM H_2O_2 , (γ, δ) απελευθερωμένα από τα μακροφάγα παράσιτα 4 και 72 ώρες μετά τη μόλυνση σημασμένα με CMFDA. M1: θόρυβος FL1 φθορισμού; M2: αποπτωτικά/ νεκρά παράσιτα; M3: ζωντανά παράσιτα.

Πίνακας 11 Μέσοι όροι (%) του αριθμού των απελευθερωμένων ζωντανών παρασίτων (ομάδα M3) των διαγονιδιακών *L. donovani*-rLdMAcP-mRFP1 και *L. donovani*-Lexsy-sat 24 και 72 ώρες p.i.

Μέση τιμή (%) του αριθμού των απελευθερωμένων ζωντανών παρασίτων (ομάδα M3)		
Ώρες p.i.	<i>L. donovani</i> -Lexsy-sat	<i>L. donovani</i> -rLdMAcP-mRFP1
24	77,75 ± 7	88 ± 9
72	71,51 ± 8,5	77,35 ± 9,6*

Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος από 3 ανεξάρτητα πειράματα ± σταθερές απόκλισης. * $P < 0.05$ στατιστικά σημαντική διαφορά συγκρίνοντας με τις τιμές του αρνητικού μάρτυρα (Lexsy-sat), two-tailed paired Student's t test.

Το παρατηρούμενο πλεονέκτημα της επιβίωσης των παρασίτων που υπερεκφράζουν την rLdMAcP-mRFP1, ενισχύει την υπόθεσή μας παρά το γεγονός ότι είναι συγκριτικά μικρότερο από τη διαφορά που παρουσίασαν τα εν λόγω παράσιτα ως προς τη λοιμογόνου τους ικανότητας σε σχέση με τον πληθυσμό των *L. donovani*-Lexsy-sat.

3.2.9.3 Εντοπισμός επιτόπων της LdMAcP σε μακροφάγα J774 μολυσμένα με προμαστιγωτές μορφές *Leishmania*

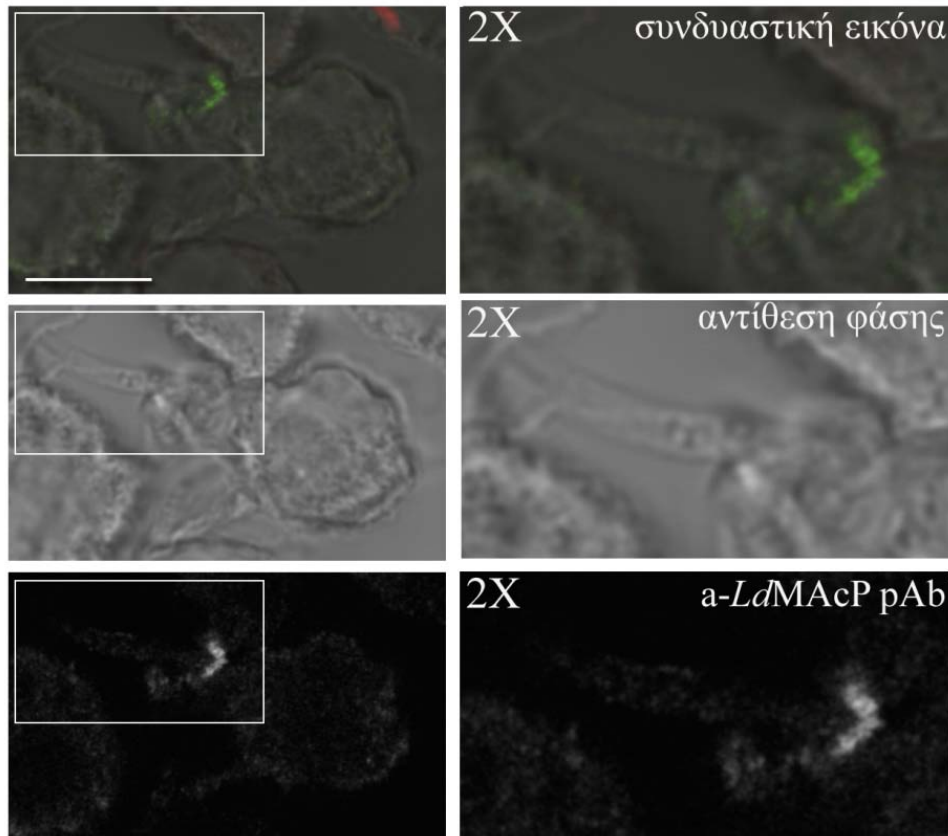
Η εντόπιση της LdMAcP σε μολυσμένα μακροφάγα δεν έχει ελεγχθεί μέχρι στιγμής, με εξαίρεση μία παλαιότερη μελέτη που μελετούσε την ομόλογή της εκκρινόμενη LdSACP [239]. Με σκοπό να ελεγχθεί η ύπαρξη επιτόπων της LdMAcP σε μακροφάγα J774 που είχαν προηγουμένως επωαστεί με προμαστιγωτά παράσιτα *L. donovani* στατικής φάσης (βλ. Μέθοδοι Παράγραφος 2.2.6) για 1 και 3 ώρες, πραγματοποιήθηκε μελέτη με έμμεσο ανοσοφθορισμό και συνεστιακή μικροσκοπία.

Μετά από μονιμοποίηση των παρασκευασμάτων έγινε σήμανση με το μονοκλωνικό ή πολυκλωνικό α-LdMAcP αντίσωμα ποντικού και δεύτερο αντίσωμα anti-mouse συζευγμένο με τη χρωστική Alexa 488. Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι επίτοποι της LdMAcP αναγνωρίστηκαν και με τα δύο είδη αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν (Εικόνα 3.44, Εικόνα 3.45 και Εικόνα 3.46). Συγκεκριμένα, ειδικός φθορισμός με στικτή κατανομή εντοπίστηκε τόσο σε σημεία προσκόλλησης/ εισόδου του προμαστιγωτού παρασίτου στην επιφάνεια του μακροφάγου (Εικόνα 3.44, πλαίσιο και μεγέθυνση), όσο και στη μεμβράνη των εκτεινόμενων ψευδοποδίων κατά την έναρξη της εγκόλπωσης του πρώτου (Εικόνα 3.44 & Εικόνα 3.45 βέλος). Ταυτόχρονα, και με τα 2 αντισώματα παρατηρήθηκε στικτή διάχυτη χρώση ακόμα και σε σημεία του μακροφάγου αρκετά απομακρυσμένα από το παράσιτο (Εικόνα 3.44 και Εικόνα 3.45). Η ειδικότητα των α-LdMAcP αντισωμάτων επιβεβαιώθηκε με χρώση των μολυσμένων μακροφάγων με προ-ανοσοποίησης ορό ποντικού (pre-immune serum), αλλά και χρώση μη μολυσμένων μακροφάγων με το πολυκλωνικό α-LdMAcP αντίσωμα (Εικόνα 3.46).

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να σχολιαστεί ότι πιθανά τα α-LdMAcP αντισώματα να αναγνωρίζουν επιτόπους και των εκκρινόμενων LdSACP, καθώς η αμινοξική αλληλουχία του αμινοτελικού τους μισού, στο τμήμα που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή τους, ταυτίζεται με αυτήν της LdMAcP [163].

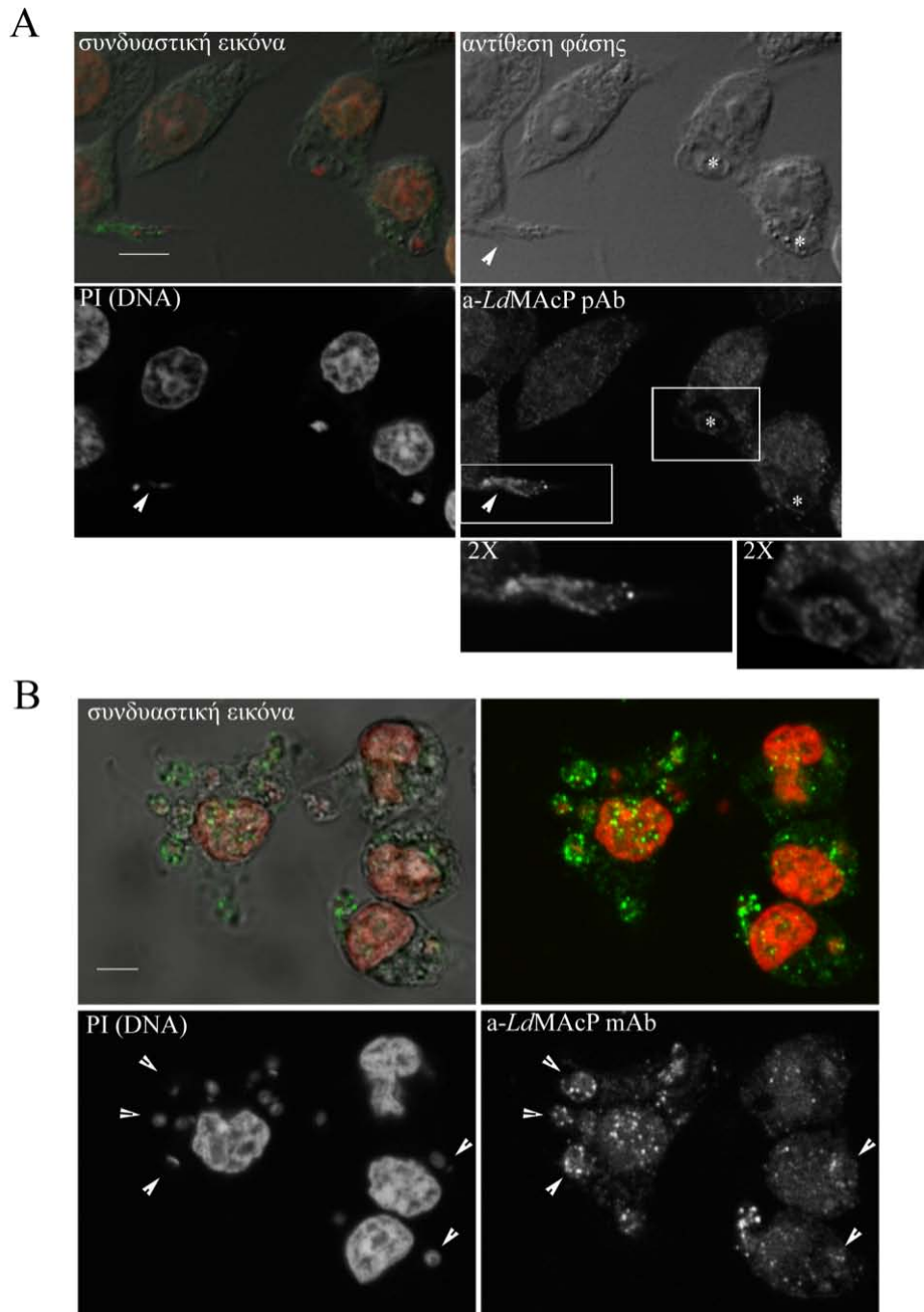
Συμπερασματικά, η παρουσία επιτόπων της LdMAcP σε μολυσμένα μακροφάγα με παράσιτα *Leishmania* ενισχύει την υπόθεση η έξω-φωσφατάση αυτή να μεταφέρεται στα

σημεία επαφής των δύο κυττάρων, πιθανά μετά από πρωτεόλυση ή με απευθείας σύντηξη των μεμβρανών τους, όπως έχει ήδηδειχθεί για άλλα επιφανειακά μεμβρανικά μόρια του παρασίτου (π.χ. gr63, LPG) [105, 240, 241].

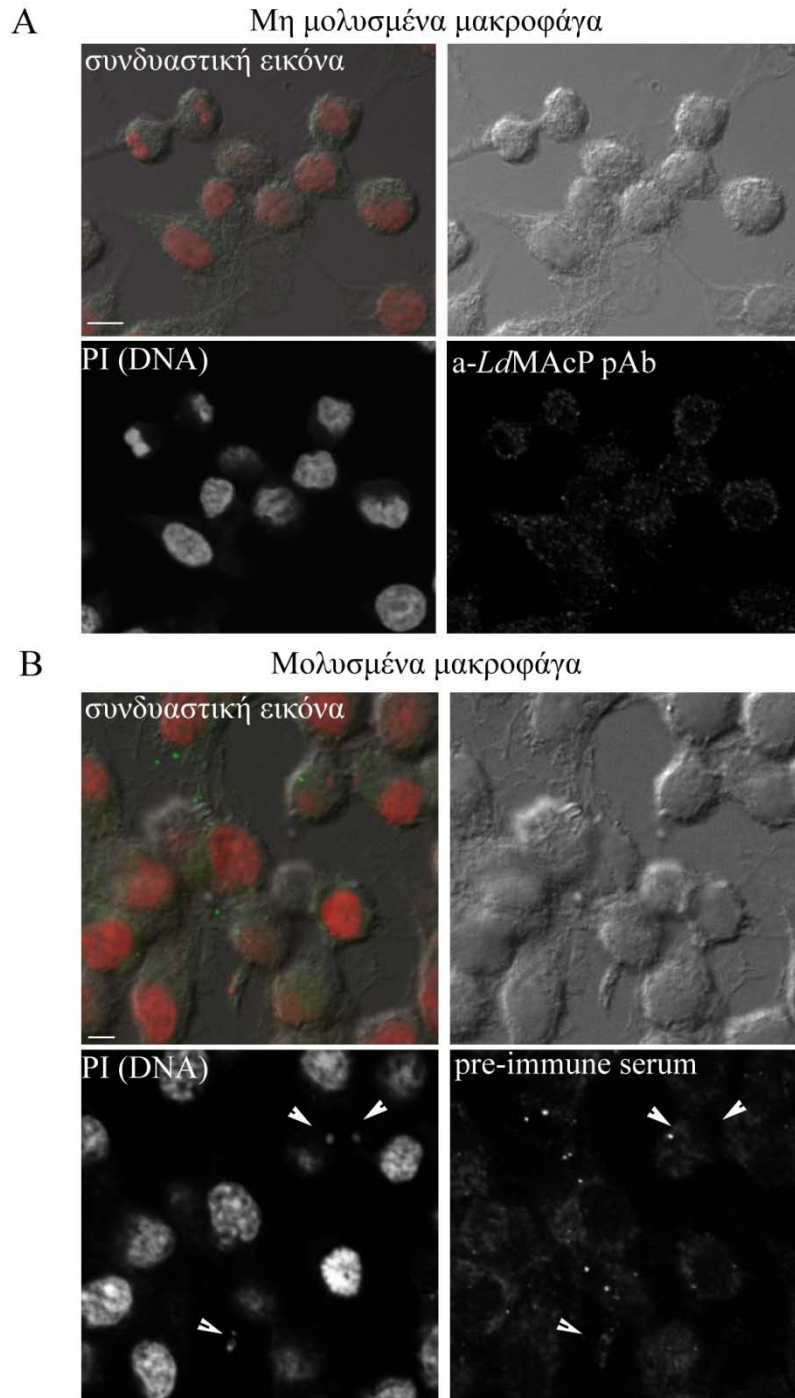


Εικόνα 3.44 Εντοπισμός επιτόπων της *LdMAcP* στα μακροφάγα J774 κατά την αρχική φάση της μόλυνσης (έναρξη διαδικασίας εγκόλπωσης). Μετά τη μονιμοποίηση τα κύτταρα επώαστηκαν με το πολυκλωνικό αντίσωμα ποντικού *a-LdMAcP* (1:50). Η παρατήρηση των δειγμάτων έγινε με μικροσκοπία φθορισμού και συνεστιακό μικροσκόπιο. Σήμανση της μεμβράνης της φαγοκυτταρικού κυπέλλου. Το λευκό πλαίσιο ορίζει την περιοχή επαφής παρασίτου-μακροφάγου που παρουσιάζεται σε 2X μεγέθυνση δεξιά.

Ο πράσινος παρουσιάζεται σε ασπρόμαυρη εικόνα ενώ ο συνεντοπισμός αντίθεσης φάσης και φθορισμού σε έγχρωμη εικόνα. Scale bar 8 μm .



Εικόνα 3.45 Εντοπισμός επιτόπων της *LdMAcP* στα μακροφάγα J774. Η παρατήρηση των δειγμάτων έγινε με μικροσκοπία φθορισμού **A**. Τα κύτταρα μία ώρα p.i. επώαστηκαν με το πολυκλωνικό αντίσωμα ποντικού *a-LdMAcP* (1:50). Η κεφαλή του βέλους δείχνει εκτεινόμενο ψευδοπόδιο κατά την εγκόλπωση ενός προμαστιγωτού. Οι αστερίσκοι δείχνουν δύο ήδη φαγοκυτταρωμένα παράσιτα εντός των φαγοσωμάτων. **B**. Τα κύτταρα 3 ώρες p.i. επώαστηκαν με το μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού *a-LdMAcP* (1:2). Οι αστερίσκοι δείχνουν φαγοκυτταρωμένα παράσιτα εντός των φαγοσωμάτων. Η χρώση του DNA έγινε με προπίδιο του ιωδίου (PI). Ο πράσινος και κόκκινος φθορισμός και η αντίθεση φάσης παρουσιάζονται σε ασπρόμαυρες εικόνες και ως συνδυαστική έγχρωμη εικόνα. Scale bar 4 μ m.



Εικόνα 3.46 A. Έλεγχος ειδικότητας αντισωμάτων. Μακροφάγα J774 τα οποία επώαστηκαν με το πολυκλωνικό αντίσωμα ποντικού -*Ld*MAcP (1:50) και **B.** Μακροφάγα J774 μία ώρα p.i. τα οποία επώαστηκαν με ορό ποντικού προ-ανοσοποίησης (1:50). Οι φωτογραφίες ελήφθησαν στις ίδιες συνθήκες παραμέτρους PMT (gain και offset) και έντασης laser με τις φωτογραφίες στην Εικόνα 3.44 και Εικόνα 3.45. Scale bar: 4 μ m.

4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Μελέτη της ωρίμανσης του φαγοσώματος που φέρει *L. donovani* σε μολυσμένα μακροφάγα κύτταρα θηλαστικού

Σύμφωνα με παλαιότερη αλλά και πρόσφατη βιβλιογραφία, τα κυριότερα χαρακτηριστικά του φαγοσώματος που φέρει το παράσιτο *L. donovani* είναι α) η παρατεταμένη παραμονή της πολυμερισμένης ακτίνης γύρω από τη μεμβράνη του [109, 110, 180, 201], β) η καθυστέρηση της οξίνισής του λόγω της παρεμπόδισης της πρόσληψης cathepsin D και της αντλίας πρωτονίων V-ATPase [102, 202], γ) η αναστολή της λειτουργίας της NADPH οξειδάσης, λόγω φωσφορυλίωσης του παράγοντα p47^{phox} που συμμετέχει στην ενεργοποίησή της και αναστολή της οξειδωτικής καταστροφής των φαγοκυτταρωμένων προμαστιγωτών [111], δ) η παρεμπόδιση της παραγωγής του ενζύμου iNOS και ακολούθως των καταστροφικών NO [119, 129] και ε) η παρεμπόδιση της παραγωγής ελεύθερων ριζών οξυγόνου, ως αποτέλεσμα της αντίδρασης όξινης φωσφατάσης στην επιφάνεια των προμαστιγωτών *L. donovani* [161]. Σημειώνεται ότι τα παραπάνω συμπεράσματα προέκυψαν μετά από πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν από τους ερευνητές διαφορετικά κυτταρικά εργαλεία, όσον αφορά στα είδη των φαγοκυττάρων [κυτταρικές σειρές ή πρωτογενείς καλλιέργειες (primary)] και των παρασίτων *Leishmania* (αγρίου τύπου ή γενετικά τροποποιημένων).

Στην παρούσα εργασία, επικεντρωθήκαμε στη μελέτη της χωροχρονικής κατανομής των PIs, PtdIns(4,5)P₂, PtdIns(3,4,5)P₃ και PI3P στη μεμβράνη του φαγοσώματος που φέρει παράσιτα *L. donovani*, αντίστοιχη της οποίας δεν έχει πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα. Της μελέτης αυτής προηγήθηκε χαρακτηρισμός του λειψμανιοφόρου φαγοσώματος με βάση τη χωροχρονική κατανομή συγκεκριμένων μοριακών δεικτών της ωρίμανσής του. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ένα κυτταρικό σύστημα *in vitro* μελέτης της φαγοκυττάρωσης βασισμένο στη χρήση α) της κυτταρικής σειράς μακροφάγων RAW264.7 από ποντικό, β) προμαστιγωτών παρασίτων *L. donovani* (στέλεχος LG13) στατικής φάσης (αγρίου τύπου και διαγονιδιακών) και γ) οψονοποιημένων αδρανών σφαιριδίων latex 3 μm, ως ουδέτεροι μάρτυρες. Η μελέτη εστιάστηκε στα 5 πρώτα μέχρι και τα 180 λεπτά από την έναρξη συγχρονισμένης φαγοκυττάρωσης και πραγματοποιήθηκε σε μονιμοποιημένα δείγματα που αναλύθηκαν με συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού.

Αρχικά, μελετήθηκε η χωροχρονική κατανομή της F-ακτίνης και των μοριακών δεικτών Rab7 και LAMP1 στη μεμβράνη των φαγοσωμάτων που φέρουν προμαστιγωτά *L. donovani* η οποία συγκρίθηκε με την αντίστοιχη αυτών που φέρουν αδρανή σφαιρίδια οψονοποιημένα με ορό ποντικού που είχε προηγουμένως ανοσοποιηθεί με ολικές πρωτεΐνες από *L. donovani* (Εικόνα 3.7). Από τη μελέτη της κινητικής των τριών μορίων, στο συγκεκριμένο κυτταρικό σύστημα φαγοκυττάρωσης, προέκυψαν τρία κύρια συμπεράσματα σχετικά με τα χαρακτηριστικά της βιογένεσης του λείσμανιοφόρου φαγοσώματος. Συνοπτικά, είναι τα εξής α) η παρατεταμένη παραμονή της F-ακτίνης σε 2-πλάσιο και 3-πλάσιο αριθμό λείσμανιοφόρων φαγοσωμάτων σε σχέση με τα αδρανή σφαιρίδια κατά τα 30 και 60 λεπτά από την έναρξη της φαγοκυττάρωσης, αντίστοιχα, β) η μικρή καθυστέρηση (~5-10 λεπτά) της «στρατολόγησης» του Rab7 που αποτελεί μάρτυρα των ώριμων ενδοσωμάτων στη μεμβράνη των λείσμανιοφόρων φαγοσωμάτων και γ) η καθυστέρηση κατά 15 λεπτά, για την περίπτωση της φαγοκυττάρωσης των *L. donovani*, της χρονικής στιγμής όπου σημειώνεται ταυτόχρονα μείωση του ποσοστού των Rab7 θετικών φαγοσωμάτων και αύξηση αυτού των LAMP1 υποδεικνύοντας μία σχετικά μικρή καθυστέρηση στη μετάβαση του φαγοσώματος σε φαγολυσόσωμα [203].

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η χωροχρονική κατανομή των PtdIns(4.5)P₂, PtdIns(3.4.5)P₃ και PI3P στη μεμβράνη των παρασιτοφόρων φαγοσωμάτων και αντιστοίχως στη μεμβράνη των φαγοσωμάτων που φέρουν οψονοποιημένα αδρανή σφαιρίδια (Εικόνα 3.15). Από τη μελέτη της κινητικής των τριών PIs προέκυψε η πολύ ενδιαφέρουσα παρατήρηση ότι μέχρι και τα 15 πρώτα λεπτά της συγχρονισμένης φαγοκυττάρωσης, το ποσοστό των λείσμανιοφόρων φαγοσωμάτων θετικών στο PtdIns(4.5)P₂ και ιδιαίτερα στο PtdIns(3.4.5)P₃, είναι σημαντικά μεγαλύτερο από το αντίστοιχο των φαγοσωμάτων που φέρουν οψονοποιημένα σφαιρίδια. Το ίδιο, αλλά σε μικρότερο βαθμό, παρατηρήθηκε και για τα PI3P θετικά φαγοσώματα στα 30 και 60 λεπτά από την έναρξη της φαγοκυττάρωσης, δηλαδή στο στάδιο του ώριμου πια φαγοσώματος.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε ένα πρώτο πείραμα για τη διερεύνηση του πιθανού ρόλου της λιποφωσφογλυκάνης LPG του παρασίτου *L. donovani* στην εκτροπή της χωροχρονικής κατανομής των PtdIns(4.5)P₂, PtdIns(3.4.5)P₃ και PI3P στη μεμβράνη των φαγοσωμάτων. Όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, η LPG είναι ένας από τους σημαντικότερους και πλέον μελετημένους μολυσματικούς παράγοντες της *Leishmania* η οποία ενσωματώνεται στη μεμβράνη του φαγοσώματος που περικλείει το παράσιτο αποδιατάσσοντας λιπιδικές νανοπεριοχές της [71, 180]. Το γεγονός αυτό δημιουργεί την υπόθεση η αποδιάταξη αυτή να συνδυάζεται με ανακατανομή στη μεμβράνη του

φαγοσώματος συγκεκριμένων μορίων-ρυθμιστών της ωρίμανσής του και των PIs του μακροφάγου [142]. Στην περίπτωση αυτή, δε χρησιμοποιήθηκαν προμαστιγωτά παράσιτα *L. donovani*, αλλά αδρανή σφαιρίδια latex, τα οποία είχαν προηγουμένως οψονοποιηθεί με καθαρισμένη *L. donovani* LPG. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν αδρανή σφαιρίδια οψονοποιημένα με ορό ποντικού ανοσοποιημένου έναντι ολικών πρωτεϊνών από *L. donovani*, όπως και προηγουμένως.

Είναι ενδιαφέρον ότι οι πληθυσμοί των φαγοσωμάτων που προέκυψαν στην κάθε περίπτωση παρουσίασαν διαφορές κυρίως στη μισή ώρα από την έναρξη της συγχρονισμένης φαγοκυττάρωσης (Εικόνα 3.16). Συγκεκριμένα, στα 30 λεπτά, το ποσοστό των θετικών PI3P φαγοσωμάτων που έφεραν αδρανή σφαιρίδια οψονοποιημένα με ορό ποντικού ήταν μεγαλύτερο από αυτών που είχαν στην επιφάνεια τους προσκολλημένη LPG, ενώ τα τελευταία την ίδια χρονική στιγμή είχαν περισσότερα θετικά ως προς το PtdIns(3,4,5)P₃ σε σχέση με τα πρώτα. Η παρατήρηση αυτή αποτελεί ένδειξη τροποποίησης ή καθυστέρησης της μετάβασης των φαγοσωμάτων που φέρουν αδρανή σφαιρίδια οψονοποιημένα με καθαρισμένη LPG προς φαγολυσosώματα, καθώς φαίνεται να διατηρούν τα χαρακτηριστικά των πρώιμων φαγοσωμάτων για περισσότερη ώρα σε σχέση με τα σφαιρίδια-μάρτυρες (↑ PtdIns(3,4,5)P₃ και ↓ PI3P). Τα πρώτα αυτά αποτελέσματα, αν και συμφωνούν, δεν μπορούν να ερμηνευτούν κατ' αναλογία με τα δεδομένα από τη μελέτη της χωροχρονικής κατανομής των PtdIns(4,5)P₂, PtdIns(3,4,5)P₃ και PI3P κατά τη φαγοκυττάρωση προμαστιγωτών *L. donovani* (Εικόνα 3.15), καθώς ελέγχθηκε αποκλειστικά ένας μολυσματικός παράγοντας των προμαστιγωτών παρασίτων, η καθαρισμένη LPG. Αντίθετα, όπως σχολιάζεται παρακάτω, κατά την φαγοκυττάρωση ζωντανών προμαστιγωτών *L. donovani* εμπλέκονται επιπλέον παράμετροι, όπως η δράση μεμβρανικών και εκκρινόμενων μορίων, το μέγεθος και η κινητικότητα των παρασίτων.

Συνολικά τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, φανερώνουν χαρακτηριστικές χρονικές «εκτροπές» στην παρουσία των μοριακών δεικτών ωρίμανσης και των τριών PIs που μελετήθηκαν στη μεμβράνη των λείσμανιοφόρων φαγοσωμάτων. Οι «εκτροπές» αυτές υποδεικνύουν, όπως έχει ήδη καταγραφεί στη βιβλιογραφία [71, 108, 206], την καθυστέρηση της βιογένεσης του φαγολυσosώματος ή/ και την τροποποίησή του από το παράσιτο *L. donovani*, όπως έχει δειχθεί ότι κάνει το επίσης υποχρεωτικά ενδοκυττάριο παθογόνο *Mycobacterium tuberculosis* [144, 242].

Οι παρατηρούμενες διαφορές στη χωροχρονική κατανομή των PtdIns(4,5)P₂, PtdIns(3,4,5)P₃ και PI3P στη μεμβράνη των φαγοσωμάτων που φέρουν *L. donovani* σε σύγκριση με τους μάρτυρες δικαιολογούν την υπόθεση της ύπαρξης μηχανισμών των

παρασίτων που περιλαμβάνουν τη δράση μεμβρανικών ή εκκρινόμενων παραγόντων τους οι οποίοι επεμβαίνουν ειδικά στο μεταβολισμό των PIs του μακροφάγου. Το γεγονός αυτό έχει μελετηθεί εκτενώς για ενδοκυττάρια βακτηριακά παθογόνα [142, 144, 147]. Σε ότι αφορά στην *L. donovani*, παλαιότερη δημοσιευμένη μελέτη εμπλέκει τη μεμβρανική αντίδραση όξινης φωσφατάσης στην αποφωσφορυλίωση των PtdIns(4,5)P₂ και PtdIns(3,4,5)P₃ [166], μία παρατήρηση που μένει να επαληθευτεί σε συνδυασμό με τη μοριακή ταυτοποίηση των παραγόντων του παρασίτου που εμπλέκονται το φαινόμενο [97]. Τέλος, υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι παράσιτα *Leishmania* (*L. major*, *L. amazonensis*), μέσω μη αποσαφηνισμένων μηχανισμών, ενεργοποιούν σηματοδοτικά μονοπάτια (πχ. PI3K/Akt) ή μόρια (πχ. φωσφορυλίωση του ERK 1/2) του μακροφάγου-ξενιστή με σκοπό την εκτροπή της διαδικασίας απόπτωσής του και την εξασφάλιση μίας παρατεταμένης και ασφαλούς διαμονής εντός του [120, 243-245].

Ένας ακόμα σημαντικός παράγοντας που χρειάζεται να ληφθεί υπ' όψιν στην ερμηνεία των παραπάνω αποτελεσμάτων, είναι ο τύπος των υποδοχέων του μακροφάγου που επικράτησαν κατά τη φαγοκυττάρωση των προμαστιγωτών παρασίτων και των οψονοποιημένων αδρανών σφαιριδίων. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η φαγοκυττάρωση μέσω CR3, σε αντίθεση με αυτήν μέσω FcγR, φαίνεται να συνοδεύεται από τη συγκέντρωση ενός δεύτερου «κύματος» F-ακτίνης (actin tails) γύρω από το νεαρό φαγώσωμα και την *de novo* σύνθεση των PtdIns(4,5)P₂ και PtdIns(3,4,5)P₃ στη μεμβράνη του μέσω της παρατεταμένης δράσης της PI(5)κινάσης. Έμμεσο ρόλο φαίνεται ότι παίζει και η PI(3)κινάση III, που είναι υπεύθυνη για τη συγκέντρωση του PI3P το οποίο με τη σειρά του εμποδίζει τη δράση της φωσφατάσης Inpp5B που φυσιολογικά θα αποδομούσε τα PtdIns(4,5)P₂ και PtdIns(3,4,5)P₃ από τη μεμβράνη του φαγώσματος [246].

Στην περίπτωση των προμαστιγωτών *L. donovani*, τα μόρια του γλυκοκάλυκά τους (LPG, gp63, glycosylinositolphosphates-GILPs & high mannose glycans) εξασφαλίζουν την επιτυχή προσκόλληση και εγκόλπωση των παρασίτων μέσω των υποδοχέων CR1, CR3, Fibronectins και Fucose-Mannose Receptors (FMR) του μακροφάγου, αντίστοιχα [115]. Από την άλλη πλευρά, τα αδρανή σφαιρίδια, λόγω της υδρόφιλης φύσης τους και του αρνητικού φορτίου της επιφάνειάς τους, απαιτείται να οψονοποιηθούν πριν τη χρησιμοποίησή τους. Στο παρόν σύστημα φαγοκυττάρωσης, τα αδρανή σφαιρίδια που αποτέλεσαν τους μάρτυρες επώαστηκαν με ορό ποντικού ο οποίος είχε ανοσοποιηθεί έναντι ολικών πρωτεϊνών της *L. donovani* και είχε αναπτύξει αντισώματα έναντι αυτών. Κατ' επέκταση, οψονοποιήθηκαν τόσο με παράγοντες του συμπληρώματος (C3b, C3bi) του ορού του ζώου όσο και με το τμήμα Fc των αντισωμάτων (IgG), ενεργοποιώντας τους

CR3 αλλά και FcγR υποδοχείς, αντίστοιχα. Στην περίπτωση οψονοποίησης των αδρανών σφαιριδίων με καθαρισμένη LPG από *L. donovani* (Εικόνα 3.16), η φαγοκυττάρωσή τους έγινε κυρίως μέσω των FMR και λιγότερο μέσω των CR3 υποδοχέων [115]. Η επικράτηση διαφορετικού τύπου υποδοχέων κατά τα φαινόμενα φαγοκυττάρωσης των προμαστιγωτών παρασίτων (κυρίως CR3 και FMR) σε σχέση με αυτά των σφαιριδίων (CR3 και FcγR) πιθανά να συμβάλλει στην παρατηρούμενη παρατεταμένη παρουσία των PtdIns(4,5)P₂ και PtdIns(3,4,5)P₃ στη μεμβράνη των λείσμανιοφόρων φαγοσωμάτων.

Τέλος, ένας ακόμα παράγοντας που πιθανά να συμβάλλει στην παρατηρούμενη καθυστέρηση της βιογένεσης του λείσμανιοφόρου φαγοσώματος στο παρόν σύστημα μελέτης, είναι η διαφορά μεγέθους και σχήματος των προμαστιγωτών παρασίτων *L. donovani* σε σχέση με τα αδρανή σφαιρίδια-μάρτυρες. Είναι γνωστό ότι, η ταχύτητα και η επιτυχία της ενσωμάτωσης του εκάστοτε προς φαγοκυττάρωση σωματιδίου εξαρτώνται, εκτός από το είδος των υποδοχέων που εμπλέκονται, από τη μέγιστη επιφάνεια επαφής με τη μεμβράνη του φαγοκυττάρου η οπού με τη σειρά της καθορίζεται από το σχήμα (ελλειψοειδές, ραβδόμορφο ή σφαιρικό) σε συνδυασμό με το μέγεθός του [247-249].

Οι προμαστιγωτές μορφές των παρασίτων *L. donovani*, όπως ήδη περιγράφηκε, έχουν ελλειψοειδές σώμα μήκους 5-20 μm. Η επιλογή των αδρανών σφαιριδίων διαμέτρου 3 μm έγινε καθώς η διάσταση αυτή ανταποκρίνεται στη μέση διάμετρο των παρασίτων (1-4 μm) και επιπλέον, έχειδειχθεί ότι το μέγεθος και το σχήμα αυτό ευνοεί την προσκόλληση στην επιφάνεια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης του μακροφάγου [249]. Παρ' όλα αυτά, δε μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα το μεγαλύτερο μέγεθος και ελλειψοειδές σχήμα των προμαστιγωτών να αποτελεί μία συμπληρωματική αιτία επιβράδυνσης της εγκόλπωσής τους από το μακροφάγο η οποία, όμως, έχει σαν συνέπεια την καθυστέρηση της έναρξης της ωρίμανσης του λείσμανιοφόρου φαγοσώματος σε σχέση με αυτή των σφαιριδίων [250]. Η επανάληψη των αντίστοιχων πειραμάτων σε μονιμοποιημένα δείγματα και χρήση ως «εναλλακτικών» μαρτύρων νεκρών προμαστιγωτών παρασίτων *L. donovani*, που είτε έχουν προηγουμένως μονιμοποιηθεί με παραφολμαδεΰδη είτε έχουν νεκρωθεί με επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας (UV), θα παρουσίαζε το πλεονέκτημα του μεγέθους και του σχήματος έναντι των σφαιριδίων. Από την άλλη πλευρά, η χρήση των σφαιριδίων ή/ και νεκρών παρασίτων, αποκλείει τους υπόλοιπους παράγοντες που εμπλέκονται στη διαδικασία της φαγοκυττάρωσης και της βιογένεσης του λείσμανιοφόρου φαγοσώματος, όπως είναι η δράση εκκρινόμενων μορίων [251], η ενζυμική ενεργότητα της επιφάνειάς τους [97, 166] και η κινητικότητα. Η τελευταία φαίνεται, σε πειράματα που πραγματοποιήσαμε αλλά και από τη βιβλιογραφία, ότι συμβάλλει στην ενεργητική

αλληλεπίδραση με το φαγοκύτταρο [252]. Επιπρόσθετα, στην περίπτωση των προμαστιγωτών παρασίτων έχει καταγραφεί ότι η κίνησή τους συνεχίζεται καθ' όλη τη διάρκεια της εγκόλπωσης και εισόδου τους στο νεοσχηματιζόμενο φαγόσωμα [73]. Η ενεργητική κινητικότητα των προμαστιγωτών και του μαστιγίου τους επιβεβαιώθηκαν έμμεσα, στο πλαίσιο αυτής της εργασίας, με την παρατήρηση λείσμανιοφόρων φαγοσωμάτων ποικίλων σχημάτων (Εικόνα 3.14). Πιθανά, η διαδικασία της αναδίπλωσης του μαστιγίου μέσα στο φαγόσωμα να αποτελεί μία επιπρόσθετη αιτία μηχανικής καθυστέρησης της σφράγισής του και της έναρξης της ωρίμανσής του [203].

Προς διαλεύκανση της παραπάνω υπόθεσης και ως συνέχεια της παρούσας μελέτης, προτείνεται ο έμμεσος προσδιορισμός του χρόνου που απαιτείται για τη σφράγιση του λείσμανιοφόρου φαγοσώματος σε σχέση με αυτού που φέρει σφαιρίδια, με ποσοτικοποίηση των κλειστών και μη φαγοσωμάτων κατά τα πρώτα λεπτά της συγχρονισμένης φαγοκυττάρωσης (5 και 15 λεπτά). Τεχνικά, προτείνεται η χρησιμοποίηση του ίδιου κυτταρικού συστήματος *in vitro* μελέτης της φαγοκυττάρωσης με επώαση των κυττάρων, λίγα λεπτά πριν την μονιμοποίησή τους στις επιθυμητές χρονικές στιγμές, με το αντιδραστήριο FM4-64 [N-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(p-diethylaminophenyl)-hexatrienyl) pyridinium dibromide] [253, 254]. Το FM4-64 αποτελεί ένα μη ειδικό μάρτυρα της ενδοκυττάρωσης που ενσωματώνεται γρήγορα στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και ακολούθως στα διάφορα τμήματα της ενδοκυτταρικής οδού του κυττάρου. Στην περίπτωση αυτή, τα φαγοσώματα που δε θα φέρουν στη μεμβράνη τους το FM4-64, δηλαδή όσα θα έχουν αποκοπεί πλήρως από την κυτταροπλασματική μεμβράνη του μακροφάγου, θα θεωρούνται σφαγισμένα. Ακολούθως, η παρατηρούμενη καθυστέρηση της χωροχρονικής κατανομής των μορίων-δεικτών της ωρίμανσης του φαγοσώματος και των PIs υπολογίζεται σε αναλογία με το ποσοστό των κλειστών φαγοσωμάτων, ενισχύοντας ή αποκλείοντας τη συμμετοχή του συγκεκριμένου παράγοντα στο φαινόμενο.

Τέλος, προτείνεται η επανάληψη των αντίστοιχων πειραμάτων με μικροσκοπία φθορισμού πραγματικού χρόνου (live cell imaging) η οποία παρέχει τη δυνατότητα της άμεσης καταγραφής της διάρκειας και της κατανομής των εκάστοτε μορίων στη μεμβράνη του φαγοσώματος. Η τεχνική αυτή παρουσιάζει δυσκολίες, με κυριότερη αυτή της ακριβούς εστίασης και παρατήρησης των συγκεντρώσεων των φθορίζουσών ουσιών γύρω από τα φαγοσώματα, εξαιτίας της έντονης κινητικότητας των προμαστιγωτών παρασίτων (εκτός και εντός φαγοσώματος).

Συνολικά, παρά το γεγονός ότι δεν μπορούν να γίνουν ακριβείς αντιστοιχίσεις των αποτελεσμάτων όλων των προηγούμενων μελετών με την παρούσα, εξαιτίας των διαφορετικών α) ειδών και στελεχών *Leishmania* που χρησιμοποιήθηκαν, β) ουδέτερων ή μη μαρτύρων (πχ. αδρανή σφαιρίδια, ζυμομύκητες ή διαγονιδιακά παράσιτα) και γ) ανάλυσης των δεδομένων (οπτική μικροσκοπία ή βιοχημικές μέθοδοι), το κυτταρικό σύστημα *in vitro* μελέτης της φαγοκυττάρωσης προμαστιγωτών παρασίτων *Leishmania*, που χρησιμοποιήθηκε στα πλαίσια της διατριβής αυτής, αποδείχτηκε ως ένα αξιόπιστο κυτταρικό εργαλείο το οποίο θα μπορούσε να αξιοποιηθεί για περαιτέρω μελέτες μορίων και μηχανισμών εν δυνάμει εμπλεκόμενων στη φαγοκυττάρωση του παρασίτου *L. donovani*. Οι κυριότεροι περιορισμοί της συγκεκριμένης μεθοδολογίας που θα μπορούσαν να σημειωθούν είναι α) το χαμηλό ποσοστό επιτυχούς επιμόλυνσης των μακροφάγων RAW264.7 (~20%), με αποτέλεσμα ένας μικρός αριθμός κυττάρων να εκφράζει τους φθορίζοντες PI-προσδέτες ανά πείραμα, β) η μη δυνατότητα αυτοματοποιημένης καταμέτρησης των «θετικών» ή μη φαγοσωμάτων με βάση τον φθορισμό της περιφέρειάς τους λόγω του ανομοιόμορφου σχήματος και μεγέθους τους, παρά την πρόοδο των αλγόριθμων επεξεργασίας εικόνας (πχ ICY, Imaris) και γ) η κριτική που υπάρχει στη βιβλιογραφία σχετικά με το βαθμό που η έκφραση των «εξωγενών» PI-προσδετών επηρεάζει τη φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων, κυρίως λόγω ανταγωνισμού με τους ενδογενείς προσδέτες [217]. Καθοριστικές απαντήσεις θα έδινε ο βιοχημικός προσδιορισμός του επιπέδου των ενδογενών ειδών PIs των μακροφάγων που έχουν μολυνθεί με παράσιτα της *Leishmania* (αγρίου τύπου και διαγονιδιακά), με τεχνικές όπως HPLC [255] και φασματοσκοπία μάζας (mass spectrometry) [256] οι οποίες βέβαια με τη σειρά τους έχουν υψηλό κόστος και απαιτούν εξειδικευμένο προσωπικό και εργαστηριακό εξοπλισμό.

Συνοψίζοντας, στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά μελέτη της πιθανότητας τα παράσιτα *L. donovani* να επεμβαίνουν στο μεταβολισμό συγκεκριμένων ειδών PIs κατά τις πρώτες ώρες της βιογένεσης του λείσμανιοφόρου φαγοσώματος με καταγραφή της χωροχρονικής τους κατανομής στη μεμβράνη του. Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε, με χρησιμοποίηση μονιμοποιημένων δειγμάτων από μολυσμένα με *L. donovani* μακροφάγα τα οποία εξέφραζαν PI-προσδέτες ως χίμαιρες με φθορίζουσες πρωτεΐνες, ανοίγει το πεδίο για τη διερεύνηση του πιθανού ρόλου των σημαντικών αυτών μορίων στη βιογένεση του λείσμανιοφόρου φαγοσώματος και την ανακάλυψη παραγόντων του παρασίτου που δρουν πάνω στον μεταβολισμό των PIs του κυττάρου-ξενιστή.

4.2 Μοριακός και βιοχημικός χαρακτηρισμός της *LdMAcP*. Διερεύνηση του πιθανού ρόλου της ως μολυσματικός παράγοντας του παρασίτου *L. donovani*

Η ενεργότητα όξινης φωσφατάσης στην εξωτερική επιφάνεια των παρασίτων *L. donovani* έχει προταθεί ότι συμβάλλει στην υδρόλυση οργανικών φωσφορικών υποστρωμάτων (διατροφικός ρόλος), ενώ συσχετίστηκε και με τη μολυσματικότητα συνεισφέροντας στην ανθεκτικότητά στην παρουσία του H_2O_2 και την οξειδωτική καταστροφή μέσα στο φαγολυσόσωμα των φαγοκυττάρων [159, 161, 162, 235].

Οι πρώτες μελέτες ταυτοποίησης της πρωτεΐνης ή των πρωτεϊνών που συνεισφέρουν στη δράση όξινης φωσφατάσης στην εξωτερική επιφάνεια της μεμβράνης προμαστιγωτών παρασίτων *L. donovani* πραγματοποιήθηκαν στις αρχές της δεκαετίας του 1980 από τους Gottlieb and Dwyer [155, 257]. Η ενζυμική αυτή ενεργότητα εντοπίστηκε τόσο με δοκιμές σε ζωντανά προμαστιγωτά παράσιτα όσο και σε μεμβρανικά εκχυλίσματα στα οποία ταυτοποιήθηκε αρχικά μία κύρια πρωτεΐνη με μοριακή μάζα 170 kDa που έφερε ενζυμική δράση όξινης φωσφατάσης. Λίγο αργότερα, το 1985, ανιχνεύτηκαν βιοχημικά τρεις όξινες φωσφατάσες σε μεμβρανικά κλάσματα προμαστιγωτών *L. donovani*, οι ACP1, ACP2 και ACP3 από τις οποίες η ACP1 (με φαινομενική μοριακή μάζα 128 kDa, ως διμερές 2 υπομονάδων 65 και 68 kDa) θεωρήθηκε ότι είναι εκείνη που κυρίως συμβάλλει στην παρατηρούμενη επιφανειακή αντίδραση όξινης φωσφατάσης με αντίσταση στην αναστολή από το τρυγικό οξύ [258]. Ταυτόχρονα, υπήρξαν αρκετές εργασίες που χαρακτήρισαν τη δράση όξινης φωσφατάσης και στο υλικό καλλιέργειας *L. donovani* (εκκρινόμενη, SAcP) [239, 259-261].

Παρά το γεγονός ότι οι Shakarian et al (2002) ταυτοποίησαν τη φωσφατάση *LdMAcP* (AF149839.1) ως ένα υπονήφιο μόριο που συμβάλλει στην παραπάνω ενεργότητα [164], παρέμειναν ανοιχτά ερωτήματα σε σχέση με την εντόπισή της στο παρασιτικό κύτταρο καθώς και τα δομικά και λειτουργικά της χαρακτηριστικά.

4.2.1 Η *LdMAcP* υπάρχει μόνο στο σύμπλεγμα παρασίτων *L. donovani* που προκαλούν VL

Η πρώτη ταυτοποίηση της *LdMAcP* [164] ακολουθήθηκε από μελέτη που πρότεινε ότι η αλληλουχία της συγκεκριμένης φωσφατάσης είναι συντηρημένη στα παθογόνα είδη *Leishmania* [163]. Στην παρούσα εργασία, σύγκριση Blast της αμινοξικής αλληλουχίας

της *LdMACP* από το είδος *L. donovani* (στέλεχος LG13) (AIF32067) με τις αναδεικνυόμενες από την βιοπληροφορική ανάλυση αλληλουχίες ορθόλογων πρωτεϊνών από άλλα είδη *Leishmania* (βάση δεδομένων TriTrypDB) έδειξε ότι η αλληλουχία της *LdMACP* από το στέλεχος LG13 είναι σχεδόν ίδια (>99%) με αυτές από το στέλεχος *L. donovani*-1S2D, (AcP-3.1 και AcP-3.2) και το είδος *L. infantum* (LinJ.36.6740) (Εικόνα 3.18, Εικόνα 3.19). Με έκπληξη διαπιστώσαμε ότι στο πρόσφατα αλληλουχημένο γονιδίωμα του στελέχους *L. donovani* LDBPK282A1, η αλληλουχία της αντίστοιχης *LdMACP* ορθόλογης πρωτεΐνης LdBPK_366740.1 έχει μήκος μόλις 93 αμινοξέα και παρουσιάζει 83,87% ταυτότητα με αυτές των MACP-πρωτεϊνών από τα Αιθιοπικά και Σουδανικά *L. donovani* στελέχη (Εικόνα 3.18), γεγονός που υποδεικνύει ότι υπάρχει πολυμορφισμός στα διαφορετικά στελέχη ακόμα και του ίδιου είδους *Leishmania*. Είναι δε ιδιαίτερα ενδιαφέρον ότι το γονίδιο που κωδικοποιεί την LdBPK_366740.1, εντοπίζεται σε ένα κυκλικό πλασμίδιο του παρασίτου το οποίο εμπλέκεται στην ανθεκτικότητά του στο φάρμακο πρώτης γραμμής SSG (sodium stibogluconate) για την αντιμετώπιση της ανθρώπινης VL (gene dosage effect). Το γεγονός αυτό, στηρίζει την υπόθεση ότι η έκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου ρυθμίζεται από μηχανισμούς που ελέγχονται από περιβαλλοντικούς παράγοντες [84].

Η ίδια ανάλυση Blast αποκάλυψε ότι οι *LdMACP* ορθόλογες αλληλουχίες από τα είδη *L. major* Friedlin (LmjF.36.6460), *L. tarentolae* Parrot-Tarll (LtaP34.3910), *L. braziliensis* (LbrM.35.6820) και *L. mexicana* (LmxM.36.6480) έχουν πολύ χαμηλότερη αμινοξική ταυτότητα 79,2-65,4% και παρουσιάζουν δομικές διαφορές που υποδεικνύουν ότι οι πρωτεΐνες αυτές λειτουργούν ως ενδοκυττάρια ένζυμα ή εκκρίνονται ή δεν είναι καν ενεργά και κωδικοποιούνται από ψευδογονίδια (πχ το γονίδιο LmjF.36.6460) (Εικόνα 3.20).

Τα παραπάνω ευρήματα, αναθεωρούν την προηγούμενη γνώση και αποδεικνύουν ότι η *LdMACP* είναι ειδική για το σύμπλεγμα *L. donovani* εντός του οποίου παρουσιάζει πολυμορφισμούς. Η νέα αυτή πληροφορία υποδεικνύει ότι η *LdMACP* θα μπορούσε να αποτελέσει ένα εν δυνάμει μοριακό εργαλείο για τη διάγνωση της VL.

Κατά την παραπάνω βιοπληροφορική ανάλυση εντοπίστηκαν επιπλέον ORF που κωδικοποιούν για μεμβρανικές φωσφατάσες ομόλογες της *LdMACP* με το συντηρημένο μοτίβο RHGXRRP των HACPs [224]. Σε όλα τα γονιδιώματα των ειδών *Leishmania* που ελέγξαμε (*L. donovani*, *L. infantum*, *L. major* Friedlin, *L. tarentolae* Parrot-Tarll, *L. braziliensis* και *L. mexicana*), βρέθηκαν γονίδια με τα παραπάνω δομικά στοιχεία που ομαδοποιήθηκαν σε 5 διακριτές ομάδες, κάθε μία από τις οποίες περιλαμβάνει πρωτεΐνες

με υψηλή φυλογενετική συγγένεια (δενδρόγραμμα UPGMA, Εικόνα 3.20, Ομάδες I-V). Αξίζει δε να τονιστεί ότι, στο γονιδίωμα της *L. donovani* βρέθηκαν τρία τουλάχιστον γονίδια, πέραν της *LdMAcP*, που κωδικοποιούν προβλεπόμενες μεμβρανικές HAcPs τοπολογίας τύπου I [225] με πιθανό εξωκυττάριο προσανατολισμό του καταλυτικού τους κέντρου (*LdBPK_362700.1*, *LdBPK_362720.1*, *LdBPK_231430.1*) (Εικόνα 3.20). Δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα οι μεμβρανικές αυτές πρωτεΐνες να μετακινούνται στα λυσοσώματα του πρωτοζώου είτε κατ' ευθείαν είτε μέσω της επιφανειακής μεμβράνης με ενδοκυττάρωση [226], όπως άλλωστε μπορεί να ισχύει και στην περίπτωση της *LdMAcP*. Παραδείγματα μεμβρανικών πρωτεϊνών που ακολουθούν αυτό το μονοπάτι μεμβρανικής κυκλοφορίας έχουν μελετηθεί σε άλλα παρασιτικά πρωτόζωα της οικογένειας των *Trypanosomatidae* (π.χ. *Trypanosoma brucei* και *L. mexicana*) και των *Apicomplexa* (*Plasmodium falciparum*) [228, 262-265].

Συνοπτικά, τα αποτελέσματά μας αναδεικνύουν την πιθανότητα ότι και άλλες μεμβρανικές HAcPs, πέραν της *LdMAcP*, συνεισφέρουν στην ενεργότητα έξω-φωσφατάσης στην επιφάνεια των παρασίτων *L. donovani*, ενισχύοντας παλαιότερες μελέτες στις οποίες απομονώθηκαν βιοχημικά όξινης μεμβρανικές φωσφατάσες με τρία τουλάχιστον διαφορετικά μοριακά βάρη [258]. Επιπλέον, ενθαρρύνουν νέες μελέτες για την μοριακή ταυτοποίηση αυτών των πρωτεϊνών και αναδεικνύουν την αναγκαιότητα για περαιτέρω μελέτη των μεμβρανικών όξινων φωσφατασών στα είδη *Leishmania* και τη διερεύνηση της εμπλοκής κάθε μιας από αυτές στην μολυσματικότητα των παρασίτων.

4.2.2 *In silico* μελέτη δομικών χαρακτηριστικών της *LdMAcP* και των *LdSAcPs*

Όπως ήδη αναφέρθηκε παραπάνω, η *LdMAcP* βρέθηκε ομόλογη με τις εκκρινόμενες HAcPs από το παράσιτο *L. donovani* (*LdSAcP1* και *LdSAcP2*) [163] (Εικόνα 1.17 και Εικόνα 3.19). Παράλληλα, φυλογενετικό δενδρόγραμμα (Consensus tree, ClustalW2) των αμινοξικών αλληλουχιών της *LdMAcP* (AIF32067) και *LdSAcP1* (AAC79513) με άλλα μέλη της υπερ-οικογένειας των HAcPs που διαθέτουν λυμένες 3D δομές, έδειξε ότι τόσο η *LdMAcP* όσο και η *LdSAcP1* ανήκουν στον κλάδο 2 (branch 2) των HAcPs [165] (Εικόνα 3.22). Στον κλάδο αυτό ανήκουν πρωτεΐνες που εντοπίζονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, το ER και εμπλέκονται στο εκκριτικό σύστημα του κυττάρου [266, 267], όπως πιθανά συμβαίνει και με την *LdMAcP*.

Είναι ενδιαφέρον να αναφερθεί ότι το παθογόνο βακτήριο *Francisella tularensis* διαθέτει επίσης μία πρωτεΐνη που ανήκει στην κατηγορία των HAcPs (FtHAP) και

θεωρείται ότι εμπλέκεται στη μολυσματικότητα του βακτηρίου και την ικανότητα του να επιβιώνει εντός του μακροφάγου. Η FtHAP ανήκει στον κλάδο 2 των HAcPs [268] και έχει στη δομή της έναν βρόγχο διμερισμού, όπως και η hPAP άλλα και μέλη των HAcPs. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με το ότι η ομόλογη της *LdSACP1* από την *L. mexicana* έχει ήδη δειχθεί ότι διμερίζεται και αποτελείται από δύο μορφές (175 και ~83 kDa [269]), ενθαρρύνουν τη μελέτη της πιθανότητας η *LdMAcP* να παρουσιάζει τάση για διμερισμό. Αν όντως συμβαίνει αυτό, θα μπορούσε να αποτελέσει μία ερμηνεία για τα υψηλότερα μοριακά βάρη των όξινων μεμβρανικών φωσφατασών που απομονώθηκαν βιοχημικά παλαιότερα (128, 132 και 108 kDa) (Remaley, Das et al. 1985).

Η ανάλυση των 3D μοντέλων της *LdMAcP* και του αμινοτελικού μισού της *LdSACP1* (Εικόνα 3.21 α, β) πραγματοποιήθηκε από την αν. καθηγήτρια κ. Πολίτου (Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων) στο πλαίσιο συνεργασίας μας [97]. Η μελέτη αυτή ανέδειξε το γεγονός, ότι παρά την υψηλή τους ομοιότητα, οι δύο φωσφατάσες παρουσιάζουν διαφορές στην καταλυτική τους περιοχή (Εικόνα 3.21 γ) οι οποίες πιθανά να είναι κριτικής σημασίας για την ειδικότητα υποστρώματος και της καταλυτική τους ενεργότητα. Τα κατάλοιπα His286 και Asp287 που έχουν αντικατασταθεί στην αλληλουχία της *LdMAcP* με τα πιο υδρόφοβα αμινοξέα Cys και Trp, πιστεύεται ότι παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση του καταλυτικού κέντρου και είναι αυστηρά συντηρημένα στις HAcPs. Η αντικατάστασή τους πιθανά να οδηγεί τη δομή της *LdMAcP* σε ένα πιο «ανοικτό» και λιγότερα φορτισμένο καταλυτικό κέντρο το οποίο δύναται να αλληλεπιδρά με πιο ογκώδη υποστρώματα, όπως φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες ή/ και με τα πλέον υδροφιλικά τμήματα του εκάστοτε υποστρώματος. Επιπρόσθετα, το γεγονός ότι τα κατάλοιπα Cys286 και Trp287 βρίσκονται στην προβλεπόμενη διαμεμβρανική περιοχή της *LdMAcP* σημαίνει ότι πιθανά η μεμβρανική εντόπιση του συγκεκριμένου ενζύμου να έγινε σε βάρος απαραίτητων καταλοίπων του καταλυτικού κέντρου με επιπτώσεις την καταλυτική του ενεργότητα.

Τέλος, η δομική ανάλυση των αμινοξικών αλληλουχιών των *LdMAcP* και *LdSACP1* για αποδιαταγμένες περιοχές με τον αλγόριθμο PONDR, έδειξε ότι οι κοινές περιοχές των φωσφατασών (αα 1-274) παρουσιάζουν πρόβλεψη για σταθερή δομή και αναδίπλωση σε δευτεροταγή δομικά στοιχεία α-έλικας και β-πτυχωτών δομών. Αντίθετα, το καρβοξυτελικό μισό των *LdSACP1* έχει υψηλή πιθανότητα για αποδιαταγμένη στερεοχημική διαμόρφωση (Εικόνα 3.23). Τα δύο εξεταζόμενα ένζυμα λοιπόν, πέρα από τις διαφορές στην ειδικότητα των υποστρωμάτων τους, προφανώς ενέχονται και σε διαφορετικής φύσης αλληλεπίδραση με αυτά. Πιθανά η *LdSACP1* έχει τη δυνατότητα να αλληλεπιδρά

με ειδικό τρόπο και χαμηλή συγγένεια με πολλαπλούς μοριακούς εταίρους, μέσα και έξω από το κύτταρο-ξενιστή και να συνδέεται με ευρύτερο φάσμα υποστρωμάτων, σε αντίθεση με την *LdMAcP* που φαίνεται να αναγνωρίζει πιο περιορισμένο πλήθος υποστρωμάτων. Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι υπάρχουν ιοί οι οποίοι καταφέρνουν να χειραγωγούν τα κύτταρα-ξενιστές χρησιμοποιώντας την εγγενή αποδιάταξη (intrinsic disorder) και το λειτουργικό πλεονέκτημα της διαμορφωσιακής προσαρμοστικότητας που διαθέτουν, ώστε να μιμούνται τη δράση σημαντικών πρωτεϊνών-ρυθμιστών οι οποίες επίσης παρουσιάζουν αποδιαταγμένες δομές [270].

Συνολικά τα παραπάνω αποτελέσματα τονίζουν τη σπουδαιότητα της αναζήτησης των φυσικών υποστρωμάτων της μεμβρανικής και των εκκρινόμενων λεισμανιακών HAcPs από τα παράσιτα *L. donovani*, μία γνώση που θα προσέφερε απαντήσεις για την πιθανή δράση τους υπέρ της εγκαθίδρυσης της μόλυνσης στα μακροφάγα του θηλαστικού-ξενιστή.

4.2.3 Εντοπισμός της *LdMAcP* στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των παρασίτων *L. donovani* και η ενεργότητα όξινης έξω-φωσφατάσης

Στη μελέτη των Shakarian et al. (2002), παρουσιάστηκε με έμμεσο τρόπο ο εντοπισμός της *LdMAcP* στην εξωτερική επιφάνεια προμαστιγωτών παρασίτων *L. donovani* τα οποία επιμολύνθηκαν με πλασμίδια ώστε να εκφράζουν συγκεκριμένα τμήματα της πρωτεΐνης ως χίμαιρες με τη GFP [164]. Στην παρούσα εργασία, πραγματοποιήθηκε επιβεβαίωση της προβλεπόμενης εντόπισης ακέραιας της *LdMAcP* στην εξωτερική επιφάνεια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης των παρασίτων *L. donovani*, τόσο βιοχημικά όσο και με οπτική μικροσκοπία. Επιπλέον, επιβεβαιώθηκε η πρόβλεψη για προσανατολισμό του καταλυτικού της κέντρου προς τον εξωκυττάριο χώρο.

Για το σκοπό αυτό, κατασκευάστηκαν δύο είδη πολυκλωνικών αντισωμάτων έναντι του μεγαλύτερου τμήματος της *LdMAcP* (αα 1-274) και ένα μονοκλωνικό αντι-πεπτιδικό αντίσωμα έναντι επιτόπων που βρίσκονται στην προβλεπόμενη εξωκυττάρια περιοχή της πρωτεΐνης (Εικόνα 3.28). Ως αντιγόνο για την παραγωγή των πολυκλωνικών αντισωμάτων χρησιμοποιήθηκε η χιμαιρική ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη r*LdMAcP*sol-His. Αξίζει να αναφερθεί ότι η απόδοση της έκφρασης της r*LdMAcP*sol-His ήταν χαμηλή, γεγονός αναμενόμενο για μεμβρανικές πρωτεΐνες, ενώ υψηλά επίπεδα έκφρασής της αποδείχθηκαν τοξικά για τα βακτήρια BL21 [271]. Για το λόγο αυτό, η επαγωγή έγινε με χαμηλή συγκέντρωση IPTG και για μικρά χρονικά διαστήματα [272, 273]. Στο σημείο

αυτό σημειώνεται, ότι λάβαμε υπ' όψιν ό τ τα *a-LdMACP* αντισώματα, κυρίως τα πολυκλωνικά, πιθανόν να αναγνωρίζουν επιτόπους των εκκρινόμενων *LdSACPs*, καθώς η αλληλουχία του αμινο-τελικού τους μισού ταυτίζεται με αυτή της *LdMACP* (Εικόνα 1.17). Με βάση όμως τη βιβλιογραφία που δείχνει ότι τα επίπεδα των ενδοκυτταρικών μορφών των *LdSACPs* είναι πολύ χαμηλά [239, 274] θεωρούμε ότι στα παράσιτα *L. donovani*, με τον ανοσοφθορισμό, ανιχνεύουμε κυρίως την πρωτεΐνη *LdMACP*.

Παράλληλα, με τη χρήση των αντισωμάτων, διερευνήθηκε η έκφραση και η εντόπιση της ενδογενούς *LdMACP* σε διαγονιδιακά παράσιτα *L. donovani* που κατασκευάστηκαν να υπερεκφράζουν επισωμικά την χιμαιρική πρωτεΐνη *LdMACP-mRFP1* (*L. donovani-rLdMACP-mRFP1*, Εικόνα 3.36 Α, Β). Τα παράσιτα αυτά συγκρίθηκαν με την πατρική σειρά *L. donovani* (στέλεχος LG13) ή/ και τα επίσης διαγονιδιακά παράσιτα που εκφράζουν επισωμικά μόνο τον κενό φορέα *L. donovani-Lexsy-sat* [171]. Η έκφραση του γονιδίου της *LdMACP* ελέγχθηκε αρχικά στο επίπεδο του mRNA σε προμαστιγωτά παράσιτα *L. donovani-rLdMACP-mRFP1* και *L. donovani* αγρίου τύπου στατικής φάσης με τη μέθοδο της qPCR. Τα διαγονιδιακά παράσιτα βρέθηκαν να διαθέτουν κατά μέσο όρο 3-4 φορές περισσότερα μετάγραφα του γονιδίου της *LdMACP* (Εικόνα 3.30) που προφανώς οφείλονται στην έκφραση του διαγονιδίου *ldmacp-mrfp1*. Η παρατηρούμενη αυτή διαφορά έκφρασης της *LdMACP* στο επίπεδο του mRNA δεν αντιστοιχεί κατ' αναλογία και στο επίπεδο έκφρασης της πρωτεΐνης *LdMACP-mRFP1* σε σχέση με την ενδογενή πρωτεΐνη (Εικόνα 3.31) ούτε με την ενεργότητα έξω-φωσφατάσης (Πίνακας 7 και Πίνακας 8), καθώς, όπως περιγράφηκε στην Εισαγωγή, στις τρυπανοσωματίδες ο μεταφραστικός και μετα-μεταφραστικός έλεγχος παίζουν σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της έκφρασης μιας πρωτεΐνης [92, 93]. Στο σημείο αυτό, θα επανέλθουμε παρακάτω κατά το σχολιασμό των αποτελεσμάτων από τον βιοχημικό χαρακτηρισμό της *LdMACP*.

Υποκυτταρική εντόπιση με μικροσκοπία φθορισμού

Η υποκυτταρική εντόπιση της *rLdMACP-mRFP1* και της ενδογενούς *LdMACP* στο ER και την επιφανειακή μεμβράνη του παρασίτου (Εικόνα 3.36 α, β & Εικόνα 3.37 β-ε), που πραγματοποιήθηκε είτε με απ' ευθείας απεικόνιση του φθορισμού της mRFP1 είτε με ανοσοφθορισμό χρησιμοποιώντας τα ειδικά *a-LdMACP* αντισώματα (pAb και mAb), συμφώνησε με την προβλεπόμενη για μεμβρανική πρωτεΐνη τύπου I.

Στα προμαστιγωτά στατικής φάσης τόσο η ενδογενής όσο και η ανασυνδυασμένη *LdMACP* εντοπίστηκαν, όπως θα αναμενόταν, περιπυρηνικά στο ER και στην επιφανειακή

μεμβράνη (Εικόνα 3.36 α, β και Εικόνα 3.37 β-ε). Στα παράσιτα λογαριθμικής φάσης και ιδιαίτερα στα διαιρούμενα κύτταρα η επικράτηση της περιπυρηνικής (Εικόνα 3.36 γ) εντόπισης, που δηλώνει ότι το μεγαλύτερο ποσοστό της πρωτεΐνης βρίσκεται στο ER, ίσως οφείλεται σε μειωμένη εκκριτική ικανότητα των παρασίτων στην συγκεκριμένη φάση ανάπτυξης.

Η επιφανειακή και ER εντόπιση της *LdMAcP* επιβεβαιώθηκε με έμμεσο ανοσοφθορισμό και συνεντοπισμό με την α -Τουμπουλίνη (Tubulin) των μικροσωληνίσκων που βρίσκονται κάτω από την κυτταροπλασματική μεμβράνη και τη λείσμανιακή πρωτεΐνη του ER BiP/ GRP78 [167] (Εικόνα 3.36, κάτω μέρος), αντίστοιχα. Χαρακτηριστικό είναι, ότι σε όλες τις περιπτώσεις, η *rLdMAcP-mRFP1* εντοπίστηκε στην περιοχή έκφυσης του μαστιγίου (flagellar pocket) (Εικόνα 3.36, άσπρα βέλη). Αυτή είναι η περιοχή του κυττάρου όπου επιτελείται έντονη εκκριτική δραστηριότητα και η οποία λειτουργεί ως «σταθμός» από τον οποίο διαχέονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη οι μεμβρανικές πρωτεΐνες άλλα και μόρια προσδεδεμένα σε αυτήν (π.χ. λιποσακχαρίτες) [263, 275-277]. Επιβεβαίωση του προσανατολισμού της καταλυτικής περιοχής της *LdMAcP* προς τον εξωκυττάριο χώρο έγινε σε ζωντανά προμαστιγωτά παράσιτα *L. donovani* αγρίου τύπου με επώασή τους με το πολυκλωνικό α -*LdMAcP* ποντικού στους 4°C (Εικόνα 3.37 α). Το πρωτόκολλο αυτό επιτρέπει τη σύνδεση των α -*LdMAcP* αντισωμάτων ως επί το πλείστον με τους επιτόπους που βρίσκονται στην εξωτερική πλευρά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης των παρασίτων, καθώς σε τόσο χαμηλή θερμοκρασία μειώνεται η ρευστότητα της μεμβράνης και η ενδοκυττάρωση περιορίζεται ή/ παρεμποδίζεται. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.37 (α), το αντίσωμα αναγνωρίζει επιτόπους σε ολόκληρη την επιφάνεια του παρασίτου αλλά και στη περιοχή έκφυσης του μαστιγίου. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνει την προβλεπόμενη εξωκυττάρια εντόπιση του τμήματος της *LdMAcP* έναντι της οποίας κατασκευάστηκαν τα α -*LdMAcP* πολυκλωνικά αντισώματα. Τέλος, σε παράσιτα που είχαν επωασθεί για 1 ώρα στους 37°C, δηλαδή τη θερμοκρασία του σώματος του θηλαστικού-ξενιστή, εντοπίστηκαν επίτοποι της *LdMAcP* κυρίως στην περιοχή έκφυσης του μαστιγίου. Η παρατήρηση αυτή μπορεί αφ' ενός να αντικατοπτρίζει μία εντονότερη εκκριτική δραστηριότητα που παρουσιάζουν τα παράσιτα σε αυτή τη θερμοκρασία [277, 278] με εντόπιση αρκετών επιτόπων των *LdSACPs* στην περιοχή, αφ' ετέρου δεν αποκλείεται η περίπτωση στους 37°C να υπάρχουν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης της ίδιας της *LdMAcP*, γεγονός που θα ενίσχυε την υπόθεση ότι η τελευταία διαδραματίζει ρόλο-«κλειδί» κατά την ενδοκυττάρια ζωή των παρασίτων [97, 159, 160].

Τέλος, ενδιαφέρον αποτελεί ότι η ετερόλογα εκφραζόμενη *LdMAcP* σε κύτταρα θηλαστικού (HeLa) εντοπίστηκε τόσο στο ER (Εικόνα 3.40 β, γ) όσο και στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, έχοντας την καταλυτική της περιοχή προσανατολισμένη προς τον εξωκυττάριο χώρο (Εικόνα 3.40 δ). Το αποτέλεσμα αυτό αποδεικνύει ότι οι λεισμανιακές σηματοδοτικές αλληλουχίες διαλογής για κατεύθυνση στην κυτταροπλασματική μεμβράνη αναγνωρίζονται και από το εκκριτικό σύστημα των κυττάρων θηλαστικού.

Βιοχημική υποκυτταρική εντόπιση

Η παρατηρούμενη με μικροσκοπία φθορισμού επιφανειακή εντόπιση της *LdMAcP* στα προμαστιγωτά παράσιτα *L. donovani* στατικής φάσης επιβεβαιώθηκε στη συνέχεια βιοχημικά με ανίχνευση της ανασυνδυασμένης *rLdMAcP-mRFP1* και της ενδογενούς *LdMAcP*, με ανοσοαποτύπωση Western σε πρωτεϊνικά κλάσματα α) ολικών μεμβρανών ή β) εμπλουτισμένων με μεμβρανικές πρωτεΐνες της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και του ER τα οποία προέκυψαν μετά από κλασματοποίηση προμαστιγωτών *L. donovani-rLdMAcP-mRFP1* χρησιμοποιώντας το απορρυπαντικό διγλιτονίνη (Εικόνα 3.31 και Εικόνα 3.32). Συγκεκριμένα, με τη χρήση του α-RFP και του μονοκλωνικού α-*LdMAcP* αντισώματος, ανιχνεύτηκε μία πρωτεϊνική ζώνη στα ~66 kDa (Εικόνα 3.31, α), ~7 kDa μεγαλύτερη σε μέγεθος από το αναμενόμενο για την *rLdMAcP-mRFP1* (59,5 kDa, χωρίς το SP). Η ζώνη αυτή απουσίαζε από τα αντίστοιχα δείγματα παρασίτων αγρίου τύπου και προφανώς αντιστοιχεί στην *rLdMAcP-mRFP1*. Με το α-*LdMAcP* μονοκλωνικό αντίσωμα, ανιχνεύτηκαν στα πρωτεϊνικά δείγματα τόσο των διαγονιδιακών παρασίτων όσο και των παρασίτων αγρίου τύπου, δύο ακόμη ζώνες. Μία πλατιά και έντονη στα ~35 kDa κοντά στην προβλεπόμενη μοριακή μάζα της ενδογενούς *LdMAcP* (32,956 kDa, χωρίς το SP) και μία στα ~40 kDa (Εικόνα 3.31, α-*LdMAcP*, β & γ, Εικόνα 3.32). Οι ζώνες αυτές θεωρήσαμε ότι αντιστοιχούν σε μορφές της ενδογενούς *LdMAcP*. Ενδιαφέρον είναι ότι και η ανασυνδυασμένη *rLdMAcP-His* (προβλεπόμενη μοριακή μάζα 34,5 kDa) που εκφράστηκε ετερόλογα στα κύτταρα HeLa είχε μοριακό βάρος ~42 kDa, συμφωνώντας με το παραπάνω συμπέρασμά μας.

Στο σημείο αυτό, χρειάζεται να τονισθεί ότι η βιοχημική ανίχνευση της *rLdMAcP-mRFP1* αλλά και της ενδογενούς πρωτεΐνης *LdMAcP* έγινε δυνατή μόνο σε πρωτεϊνικά κλάσματα εμπλουτισμένα σε μεμβρανικές πρωτεΐνες που είχαν απομονωθεί από μεγάλη καλλιέργεια προμαστιγωτών παρασίτων *L. donovani*. Προφανώς, το επίπεδο έκφρασης

και των δύο πρωτεϊνών, ιδιαίτερα δε της ενδογενούς *LdMAcP*, είναι χαμηλό σε σχέση με το σύνολο των πρωτεϊνών του παρασίτου.

Τέλος, η επιφανειακή εντόπιση της *LdMAcP-mRFP1* και κατ' αναλογία της *LdMAcP*, επιβεβαιώθηκε με βιοτινυλίωση των επιφανειακών πρωτεϊνών προμαστιγωτών *L. donovani*-*rLdMAcP-mRFP1* και χρήση του αντιδραστηρίου sulfo-NHS-S-S-biotin. Οι βιοτινυλιωμένες πρωτεΐνες, μετά από λύση των κυττάρων, απομονώθηκαν με τη βοήθεια μαγνητικών σφαιριδίων που φέρουν προσκολλημένη στρεπταβιδίνη. Σημειώνεται ότι η αμινοξική αλληλουχία της *LdMAcP*, που προβλέπεται να έχει εξωκυττάρια εντόπιση (aa 24-273), περιλαμβάνει 25 κατάλοιπα Λυσίνης (Lys) στα οποία και αναμένεται η ειδική πρόσδεση των μορίων της βιοτίνης (Εικόνα 3.34). Στα πειράματά μας εντοπίστηκε μία πρωτεϊνική ζώνη με φαινομενικό μοριακό βάρος λίγο μεγαλύτερο των 66 kDa τόσο με το *a-LdMAcP* όσο και με το *a-RFP* πολυκλωνικό αντίσωμα η οποία πιθανά αντιστοιχεί στο βιοτινυλιωμένο πολυπεπτίδιο της *rLdMAcP-mRFP1*.

Ανίχνευση μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων της *LdMAcP*

Η *rLdMAcP-mRFP1* βρέθηκε να έχει φαινομενική μοριακή μάζα μεγαλύτερη της υπολογιζόμενης, αποτέλεσμα που υποδεικνύει ότι η πρωτεΐνη υπόκειται σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις μία από τις οποίες θα μπορούσε να είναι η *N*-γλυκοζυλίωση. Η παραπάνω υπόθεση ενισχύεται από το γεγονός ότι στην αλληλουχία της *LdMAcP* υπάρχει πρόβλεψη για ύπαρξη 5 θέσεων *N*-γλυκοζυλίωσης (Asn44, Asn96, Asn135, Asn219, and Asn245) [164]. Η μετα-μεταφραστική αυτή τροποποίηση, που απαντάται ευρέως στα ευκαρυωτικά και στα αρχαία, επηρεάζει τις ιδιότητες και τη σταθερότητα των γλυκοπρωτεϊνών και επομένως καθορίζει το βιολογικό τους ρόλο, όπως πιθανά να συμβαίνει και με την *LdMAcP*.

Ο έλεγχος της *N*-γλυκοζυλίωσης πραγματοποιήθηκε α) με επώαση καλλιέργειας προμαστιγωτών *L. donovani*-*rLdMAcP-mRFP1* με τον αναστολέα του νικομυκίνη σε συνθήκες μη τοξικές για τα κύτταρα *Leishmania* (10 µg/ml, για 24 ώρες) [42, 279, 280], κλασμάτωση των ολικών πρωτεϊνών των παρασίτων με διγιτονίνη και ανάλυση του εμπλουτισμένου σε μεμβρανικές πρωτεΐνες της κυτταροπλάσματικής μεμβράνης (κλάσμα F5) με ανοσοαποτύπωση Western (Εικόνα 3.35, Tunicamycin) ή β) με επώαση διαλυτού πρωτεϊνικού κλάσματος F5 S προμαστιγωτών *L. donovani*-*rLdMAcP-mRFP1* με τις ενδογλυκοσιδάσες F και H (Εικόνα 3.35, Endo F, Endo H).

Συνοπτικά, και με τις δύο πειραματικές προσεγγίσεις, επιβεβαιώθηκε ότι η πρωτεΐνη rLdMAcP-mRFP1 είναι *N*-γλυκοζυλιωμένη. Η ενδογενής LdMAcP αναμένεται επίσης να γλυκοζυλιώνεται, δεν μπορέσαμε όμως να ανιχνεύσουμε την απογλυκοζυλιωμένη πρωτεΐνη με ανοσοαποτύπωση Western. Πιθανά, η πρωτεΐνη είναι ασταθής μετά την απογλυκοζυλίωση και λόγω των ήδη χαμηλών επιπέδων της να μην μπορεί να εντοπιστεί με τη συγκεκριμένη μέθοδο. Ενδιαφέρον είναι ότι η ετερόλογα εκφρασμένη στα κύτταρα HeLa rLdMAcP-His επίσης *N*-γλυκοζυλιώνεται με αντίστοιχου μοριακού βάρους ολιγοσακχαρίτη με την rLdMAcP-mRFP1 (Εικόνα 3.40), γεγονός που επιβεβαιώνει την ομοιότητα του μηχανισμού της *N*-γλυκοζυλίωσης ανάμεσα σε κύτταρα *Leishmania* και κύτταρα θηλαστικών [281, 282].

Η παρουσία των ολιγοσακχαριτών στο μόριο της rLdMAcP-mRFP1 μπορεί να του εξασφαλίζει σταθερότητα και να ρυθμίζει την επιτυχημένη μετακίνηση της πρωτεΐνης στην κυτταροπλασματική μεμβράνη του παρασίτου. Τέλος, το γεγονός ότι η rLdMAcP-mRFP1 και κατ' αναλογία και η ενδογενής LdMAcP είναι γλυκοζυλιωμένες, αποτελεί μια επιπλέον επιβεβαίωση της εντόπισής τους στην επιφάνεια του παρασιτικού κυττάρου. Παρ' όλα αυτά, η πιθανότητα ο υποκυτταρικός εντοπισμός και η λειτουργία της να ρυθμίζονται και από κάποιο άλλο είδος μετα-μεταφραστικής τροποποίησης, πχ. φωσφορυλίωση ή μυριστοζυλίωση δεν μπορεί να αποκλεισθεί. Την απάντηση για το είδος όλων των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων που υφίσταται η LdMAcP μπορεί να δώσει η φασματομετρία μάζας (mass spectrometry) [283] μετά από μία σειρά απαιτητικών πειραμάτων απομόνωσης και καθαρισμού της.

Συνολικά, τα αποτελέσματα που αφορούν τον εντοπισμό της LdMAcP επιβεβαιώνουν τις *in silico* αναλύσεις μας, καθώς αποδεικνύουν ότι η ακέραια LdMAcP παρουσιάζει την τυπική υποκυτταρική εντόπιση των μεμβρανικών πρωτεϊνών τύπου I που ακολουθούν την εκκριτική οδό προς την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Στο σημείο αυτό αναφέρεται, ότι στα ανώτερα ευκαρυωτικά κύτταρα οι λυσοσωμικές όξινες φωσφατάσες που ανήκουν στον κλάδο 2 των HAcPs, όπως η LdMAcP, ενίοτε μεταφέρονται μέσω της κυτταροπλασματικής μεμβράνης από το ER στο λυσόσωμα [267], όπου το τμήμα τους που βρίσκεται προς τον αυλό του οργανιδίου τελικά αποκόπτεται από τη μεμβράνη με πρωτεόλυση. Το φαινόμενο της κυκλοφορίας μεμβρανικών ενζύμων από την κυτταροπλασματική μεμβράνη προς τα λυσοσώματα ή άλλα οργανίδια που έχουν τα χαρακτηριστικά των λυσοσωμάτων [πχ όξινα ασβεστοσώματα (acidocalcisomes)], έχει ήδη αρχίσει να μελετάται για μέλη του γένους *Leishmania* και άλλων μελών της οικογένειας των Τρυπανοσωματίδων [262, 263]. Τέλος, σε ένα ακόμα πρωτόζωο, το

Plasmodium falciparum, μετά από πρωτεομική ανάλυση ταυτοποιήθηκαν επιφανειακές πρωτεΐνες της κυτταροπλασματικής του μεμβράνης μέσα στο τροφικό κυστίδιο (food vacuole) το οποίο είναι ένα οργανίδιο του κυττάρου με χαρακτηριστικά λυσοσώματος [284].

Συμπερασματικά, δεν μπορούμε να αποκλείσουμε την πιθανότητα η *LdMACP* να ακολουθεί ένα παρόμοιο μονοπάτι μέσα στο κύτταρο της *L. donovani*, από την κυτταροπλασματική μεμβράνη και την περιοχή έκφυσης του μαστιγίου προς τα λυσοσώματα ή/ και άλλα οργανίδια με χαρακτηριστικά των λυσοσωμάτων [276, 285, 286].

4.2.4 Η *LdMACP* προσδίδει ενεργότητα όξινης έξω-φωσφατάσης στην επιφάνεια ζωντανών προμαστιγωτών παρασίτων *Leishmania*

Η ενεργότητα όξινης έξω-φωσφατάσης της *LdMACP* επιβεβαιώθηκε έμμεσα, με μέτρηση της ενεργότητάς της στην επιφάνεια ζωντανών προμαστιγωτών *L. donovani*-*rLdMACP*-mRFP1 σε όξινο pH. Τόσο στη στατική όσο και τη λογαριθμική φάση ανάπτυξης (Πίνακας 7 και Πίνακας 8) η συνολική ενεργότητα έξω-φωσφατάσης στα παράσιτα *L. donovani*-*rLdMACP*-mRFP1 βρέθηκε ~2,5 και 10 φορές υψηλότερη από αυτή των παρασίτων αγρίου τύπου και των *L. donovani*-Lexsy-sat, αντίστοιχα. Η διαφορά αυτή προφανώς αποδίδεται στην υπερέκφραση της *LdMACP* από τα διαγονιδιακά παράσιτα, όπως δείχθηκε και στο επίπεδο του mRNA (Εικόνα 3.30).

Η αυξημένη αυτή ενζυμική ενεργότητα στην επιφάνεια των *L. donovani*-*rLdMACP*-mRFP1 πιθανά να τους προσδίδει πλεονεκτήματα ανάπτυξης σε σχέση με τα παράσιτα αγρίου τύπου και τα Lexsy-sat, ένας ρόλος που έχει ήδη αποδοθεί σε έξω-φωσφατάσες από το συγγενικό παράσιτο *L. amazonensis* [157, 287]. Μάλιστα, προς ενίσχυση αυτής της υπόθεσης, σημειώνεται ότι τα *L. donovani*-*rLdMACP*-mRFP1 παρουσίασαν μέχρι και 25% μεγαλύτερο μέσο αριθμό παρασίτων ανά ml καλλιέργειας από τη μέση της λογαριθμικής μέχρι και τη αρχή της στατικής φάσης (4^η-7^η ημέρα στην καλλιέργεια) (Εικόνα 3.29).

Τέλος, χρειάζεται να σχολιαστεί ότι τα επίπεδα της ενεργότητας έξω-φωσφατάσης στην επιφάνεια ζωντανών προμαστιγωτών διέφεραν από μέτρηση σε μέτρηση, παρουσία ή απουσία τρυγικού οξέος, γεγονός που αποτυπώνεται στις τιμές των τυπικών αποκλίσεων (Πίνακας 7 και Πίνακας 8). Στις συγκεκριμένες δοκιμασίες χρησιμοποιήθηκαν προμαστιγωτά παράσιτα που βρίσκονταν στην κυτταροκαλλιέργεια για 5 με 9 περάσματα

(passages) και πιθανά η μεταβλητότητα αυτή των τιμών να οφείλεται σε γονοτυπικές και φαινοτυπικές αλλαγές που έχει δειχθεί ότι συμβαίνουν στους πληθυσμούς των παρασίτων που συντηρούνται στην κυτταροκαλλιέργεια [181, 288]. Από την άλλη πλευρά, δεν μπορούμε να δώσουμε μια πιο άμεση ερμηνεία για τα πολύ χαμηλά επίπεδα όξινης έξω-φωσφατάσης των προμαστιγωτών παρασίτων *L. donovani*-Lexsy-sat σε σχέση με αυτών του αγρίου τύπου και τα *L. donovani*-rLdMAcP-mRFP1, πέρα από τις παρατηρούμενες διαφορές στη συγκεκριμένη ενζυμική ενεργότητα που παρουσιάζουν τα παράσιτα *L. donovani* από στέλεχος σε στέλεχος.

Συμπερασματικά, η έκφραση της rLdMAcP-mRFP1 στην επιφάνεια των προμαστιγωτών παρασίτων συνεισφέρει στην δράση όξινης έξω-φωσφατάσης ανθεκτικής σε αναστολή από τρυγικό οξύ, υποδεικνύοντας αντίστοιχη δράση και για την ενδογενή LdMAcP. Θα ήταν ενδιαφέρον, σε συνέχεια της παρούσας εργασίας, να διερευνηθεί η ενεργότητα του ενζύμου αυτού στην επιφάνεια αμαστιγωτών της *L. donovani* τα οποία αποτελούν τις ανθεκτικές μορφές του παρασίτου που διαβιούν στο όξινο περιβάλλον του φαγολυσοσώματος. Μέχρι στιγμής, έχει δημοσιευτεί μία μελέτη που συνδέει την αντίδραση έξω-φωσφατάσης με την ικανότητα επιβίωσης των αμαστιγωτών του είδους *L. amazonensis* στα μακροφάγα [289].

Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε δοκιμή όξινης έξω-φωσφατάσης, στην επιφάνεια ζωντανών προμαστιγωτών παρασίτων αγρίου τύπου στατικής φάσης των ειδών *L. major* Friedlin, *L. infantum* (στέλεχος GH12) και *L. tarentolae* (στέλεχος Parrot) σε σύγκριση με αυτήν των *L. donovani* (στέλεχος LG13). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ενώ στα *L. donovani* και *L. infantum* η ενεργότητα όξινης έκτο-φωσφατάσης ήταν παρόμοια, όπως θα αναμενόταν για συγγενικά είδη παρασίτων από το σύμπλεγμα *L. donovani*, στα προμαστιγωτά *L. major* Friedlin ήταν εντυπωσιακά υψηλότερη και σχεδόν 90% ανθεκτική στην αναστολή από το τρυγικό οξύ. Αντίθετα, στα *L. tarentolae* ήταν πολύ χαμηλή, στα επίπεδα του τυφλού δείγματος (background) (Πίνακας 8).

Δεδομένου ότι η ορθόλογη της LdMAcP από την *L. major* (LmjF.36.6460) δεν προβλέπεται να εντοπίζεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των παρασίτων *L. major* (Εικόνα 3.18), δεν αναμένεται να είναι εκείνη που συμβάλλει στη μετρούμενη ενεργότητα όξινης έξω-φωσφατάσης. Επομένως, μπορούμε να υποθέσουμε πως τα παράσιτα του συγκεκριμένου είδους, εκφράζουν κάποιο άλλο/ άλλα ένζυμα τα οποία προσδίδουν στη συγκεκριμένη ενζυμική ενεργότητα στην επιφάνειά τους. Άλλωστε, από την *in silico* ανάλυση που πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας, βρέθηκαν στο γονιδίωμα της *L. major* Friedlin 3 αλληλουχίες μεμβρανικών HAcPs (LmjF.36.2570,

LmjF.36.2590 και LmjF.23.1170) με πρόβλεψη εξωκυττάριου προσανατολισμού που θα μπορούσαν να έχουν δράση έξω-φωσφατάσης. Τα παραπάνω επιβεβαιώνουν ότι η δράση όξινης έξω-φωσφατάσης στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των παρασίτων *Leishmania* spp. καθορίζεται και από άλλες μεμβρανικές όξινες φωσφατάσες, πέραν της παρουσίας ενεργούς LdMAcP ή των ορθολόγων της.

Από την άλλη πλευρά, τα προμαστιγωτά του μη παθογόνου για τα θηλαστικά είδους *L. tarentolae* φαίνεται ότι τη στερούνται. Το συγκεκριμένο αποτέλεσμα ενισχύει παλαιότερες αναφορές που συνδέουν τη συγκεκριμένη ενζυμική ενεργότητα με τη μολυσματικότητα των πρωτοζώων του γένους *Leishmania* [159, 161, 162]. Πρόσφατη μελέτη [290] που βασίστηκε στα αποτελέσματα της αλληλούχισης του γονιδιώματος του στελέχους *L. tarentolae* Parrot-Tarll, κατέγραψε την απουσία γονιδίων που κωδικοποιούν για επιφανειακές πρωτεΐνες ή/ και πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην ενδοκυττάρωση ή την εξωκυττάρωση. Πιθανά, η απουσία των πρωτεϊνών αυτών, ανάμεσα στις οποίες μπορεί να συγκαταλέγονται και όξινες έξω-φωσφατάσες, να καθορίζει την αδυναμία των παρασίτων *L. tarentolae* να επιβιώνουν εντός των μακροφάγων των θηλαστικών και να εγκαθιδρύουν μόλυνση.

4.2.5 Πιθανή σύνδεση της ενεργότητας της rLdMAcP με τη μολυσματικότητα και λοιμογόνο ικανότητα των προμαστιγωτών *L. donovani*

Η παρουσία αντίδρασης έξω-φωσφατάσης στην εξωτερική επιφάνεια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης ζωντανών προμαστιγωτών *L. donovani* γεννά την υπόθεση η ενζυμική αυτή ενεργότητα να αποτελεί μέρος των μηχανισμών που έχει αναπτύξει το παράσιτο ώστε να επηρεάζει τα επίπεδα φωσφορυλιωμένων σηματοδοτικών μορίων των μακροφάγων προς όφελος της επιβίωσής του.

Στην παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκε μόλυνση της κυτταρικής σειράς μακροφάγων J774 με στατικής φάσης διαγονιδιακά προμαστιγωτά *L. donovani*-rLdMAcP-mRFP1 και τα *L. donovani*-Lexsy-sat. Τα παράσιτα και των δύο στελεχών πριν χρησιμοποιηθούν επαληθεύτηκε ότι διατηρούν τη μολυσματικότητά τους η οποία και ενισχύθηκε με βάση γνωστά πρωτόκολλα σε ποντίκισιο πειραματικό μοντέλο VL [230]. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, τα *L. donovani*-rLdMAcP-mRFP1 παρουσιάζουν 2 φορές υψηλότερο δείκτη μολυσματικότητας και 5 φορές υψηλότερο δείκτη λοιμογόνου ικανότητας σε σχέση με *L. donovani*-Lexsy-sat (Πίνακας 10 και Εικόνα 3.42). Αυτό υποδεικνύει ότι στο συγκεκριμένο *in vitro* κυτταρικό σύστημα μόλυνσης που

χρησιμοποιήσαμε, η αύξηση των επιπέδων ενεργού *LdMAcP* λόγω έκφρασης της ανασυνδυασμένης *rLdMAcP-mRFP1*, συμβάλλει στην αύξηση της μολυσματικότητας/λοιμογόνου ικανότητας των διαγονιδιακών παρασίτων ενισχύοντας τις παλαιότερες παρατηρήσεις [159, 160]. Η αύξηση δε, ήταν προφανέστερη στις 48 ώρες μετά τη μόλυνση, οπότε έχει προχωρήσει η διαδικασία μετατροπής των προμαστιγωτών στις αμαστιγωτές μορφές στο φαγολυσόσωμα του μακροφάγου [291], ενισχύοντας την υπόθεση για ύπαρξη πιθανού ρόλου της *LdMAcP* κατά τη φάση αυτή της ενδοκυττάριας ζωής των *L. donovani*.

Ακολουθώς, ελέγχθηκε το ερώτημα σχετικά με το εάν τα παράσιτα *L. donovani-rLdMAcP-mRFP1* παρουσιάζουν πλεονέκτημα επιβίωσης σε σχέση με τα *L. donovani-Lexsy-sat* εντός των μακροφάγων J774, γεγονός που θα μπορούσε να συνεισφέρει στην ερμηνεία του παραπάνω αποτελέσματος. Με μόλυνση μακροφάγων αντίστοιχη με προηγούμενως, ο ενδοκυττάριος πληθυσμός των παρασίτων που παρέμεινε ζωντανός στις 24 και 72 ώρες μετά την έναρξη της φαγοκυττάρωσης σημάνθηκε με το αντιδραστήριο Cell Tracker Green (CMFDA) και ποσοτικοποιήθηκε με FACS. Είναι ενδιαφέρον ότι τα παράσιτα που υπερεκφράζουν την *LdMAcP* (Εικόνα 3.43 και Πίνακας 11) παρουσιάζουν ένα μικρό πλεονέκτημα επιβίωσης. Η μικρότερη διαφορά που βρέθηκε στη μελέτη της επιβίωσης των παρασίτων σε σχέση με τη λοιμογόνο τους ικανότητα και σε σύγκριση με τον πληθυσμό *L. donovani-Lexsy-sat*, πιθανά να οφείλεται στους διαφορετικούς πληθυσμούς παρασίτων που αξιολογήθηκαν με την κάθε μεθοδολογία. Στην μεν περίπτωση του πρωτοκόλλου της μελέτης της μολυσματικής ικανότητας, στην καταμέτρηση των ενδοκυτταρωμένων παρασίτων δεν ήταν δυνατός ο αποκλεισμός εκείνων που ήταν ήδη νεκρά ή αποπτωτικά αλλά διατηρούσαν το σχήμα τους, στη δε περίπτωση της μελέτης της επιβίωσης, η επιλογή της ομάδας M3 των ζωντανών έγινε με πιο αυστηρά κριτήρια.

Στη βάση των ενθαρρυντικών αυτών αποτελεσμάτων με τη χρησιμοποίηση του παρόντος κυτταρικού συστήματος *in vitro* μόλυνσης, κρίνεται σημαντική η συνέχιση της εργασίας με τη χρήση πρωτογενών μακροφάγων (primary mouse macrophages) από ποντίκια BALB/c και διαγονιδιακών παρασίτων *L. donovani* που θα έχουν υποστεί απαλοιφή (Knock out) των 2 αντιγράφων του γονιδίου της *LdMAcP*, με την προϋπόθεση ότι αυτή δεν είναι απαραίτητη για την επιβίωσή τους. Επιπλέον, προτείνεται η επιβεβαίωση των *in vitro* δοκιμασιών με *in vivo* πειράματα χρησιμοποιώντας διαγονιδιακά παράσιτα που εκφράζουν χρωμοσωμικά το διαγονίδιο *pLexsy-sat-rLdMAcP-mRFP1* στο ποντικίσιο πειραματικό μοντέλο της VL. Η χρωμοσωμική έκφραση εξασφαλίζει τη

μακροχρόνια έκφραση του διαγονιδίου χωρίς την παρουσία του κατάλληλου αντιβιοτικού επιλογής [292]. Αντίθετα, σε πρωταρχικά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με τα παράσιτα που το εκφράζουν επισωμικά την *rLdMAcP-mRFP1*, διαπιστώθηκε απώλεια του διαγονιδίου στις 3 εβδομάδες από τη μόλυνση του πειραματικού προτύπου.

Συμπερασματικά, ο ρόλος της *LdMAcP* στην εξωτερική επιφάνεια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης των προμαστιγωτών *L. donovani* και η δράση της ως πιθανού λοιμογόνου παράγοντα απαιτεί επιπλέον διερεύνηση. Καθώς η *LdMAcP* φαίνεται να εκφράζεται ως έξω-φωσφατάση μόνο στα παράσιτα του συμπλέγματος *L. donovani*, πιθανά να εμπλέκεται σε μοριακό/ούς μηχανισμό/ούς του παρασίτου που ενέχονται στην χειραγωγή της ανοσολογικής απάντησης από το θηλαστικού-ξενιστή και την εκδήλωση της παθοφυσιολογίας της VL.

4.2.6 Επίτοποι της *LdMAcP* εντοπίζονται σε μακροφάγα J774 μολυσμένα με προμαστιγωτές μορφές *Leishmania*

Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, η εντόπιση της *LdMAcP* και η ενεργότητα ως έξω-φωσφατάσης στην επιφάνεια των προμαστιγωτών παρασίτων *L. donovani*, την ενοχοποιεί για άμεση αλληλεπίδραση με τα κύτταρα-ξενιστές. Μέχρι την πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης, η εντόπιση της *LdMAcP* σε μολυσμένα μακροφάγα δεν είχε ελεγχθεί.

Συγκεκριμένα, εξετάστηκε η ύπαρξη *LdMAcP* επιτόπων σε μακροφάγα J774 που είχαν προηγουμένως επωασθεί με προμαστιγωτά *L. donovani* στατικής φάσης για 1 ή 3 ώρες. Τα μολυσμένα κύτταρα σημάνθηκαν με ανοσοφθορισμό με το μονοκλωνικό ή πολυκλωνικό *a-LdMAcP* αντίσωμα ποντικού και εξετάστηκαν με συνεστιακό μικροσκόπιο. Είναι εξαιρετικά ενδιαφέρον ότι επίτοποι της *LdMAcP* εντοπίστηκαν και με τα δύο είδη αντισωμάτων τόσο στη μεμβράνη των εκτεινόμενων ψευδοποδίων του μακροφάγου που βρίσκονται σε επαφή με το υπό εγκόλπωση παράσιτο όσο και σε σημεία επαφής προμαστιγωτού-φαγοκυττάρου (Εικόνα 3.44, Εικόνα 3.45 και Εικόνα 3.46) καθώς και στα φαγοσώματα που φέρουν παράσιτα. Στο σημείο αυτό, όπως και παραπάνω στον έμμεσο ανοσοφθορισμό των προμαστιγωτών παρασίτων, χρειάζεται να σχολιαστεί ότι τα *a-LdMAcP* αντισώματα πιθανόν να αναγνωρίζουν επιτόπους και των εκκρινόμενων *LdSACPs* που σε παλαιότερη μελέτη είχαν εντοπιστεί διάσπαρτα μέσα στο λεϊσμανιοφόρο φαγολυσόσωμα [239].

Η παρουσία επιτόπων της *LdMAcP* σε μολυσμένα μακροφάγα με παράσιτα *Leishmania*, ενισχύει την υπόθεση η έξω-φωσφατάση αυτή να μεταφέρεται στα σημεία

επαφής των δύο κυττάρων, είτε μετά από πρωτεόλυση ή με απευθείας σύντηξη των επιφανειακών μεμβρανών παρασίτου και ξενιστή, όπως έχει ήδηδειχθεί για άλλα επιφανειακά μεμβρανικά μόρια του παρασίτου (πχ. gr63, LPG) [105, 240, 241]. Τέλος, τα αποτελέσματά μας, και σε βάση παλαιότερης δημοσίευσης, σύμφωνα με την οποία η μεμβρανική όξινη φωσφατάση ACP1 του παρασίτου *L. donovani* υδρολύει το φωσφοϊνοσιτιδίο PtdIns(4,5)P₂ [166], αναδεικνύουν την σημασία της διερεύνησης της πιθανής λειτουργικής σχέσης μεταξύ της LdMAcP και μορίων «κλειδιών» του μακροφάγου, όπως είναι τα PIs, που θα μπορούσαν να αποτελούν υποψήφια υποστρώματα/εταίρους της.

Ήδη, ως συνέχεια της παρούσας διατριβής, έχει αρχίσει η προσπάθεια απομόνωσης μίας ανασυνδυασμένης μορφής της LdMAcP (rLdMAcPsol-His, αα 2-280) σε καθαρή/διαλυτή μορφή, από το υπερκείμενο καλλιέργειας διαγονιδιακών παρασίτων *L. tarentolae*, τα οποία εκφράζουν επισωμικά το πλασμίδιο pLexsy-sat2-rLdMAcPsol-His (βλ. Μέθοδοι Παράγραφος 2.1.5.1). Το μη παθογόνο αυτό είδος της *Leishmania* έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως τα τελευταία χρόνια σαν εναλλακτικό κυτταρικό σύστημα παραγωγής ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, καθώς παρουσιάζει πλεονεκτήματα έναντι των ήδη γνωστών συστημάτων (βακτήρια, μύκητες, κύτταρα εντόμων και θηλαστικών) [293, 294], με κυριότερο την δυνατότητα πραγματοποίησης μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων στις παραγόμενες πρωτεΐνες ανάλογων με αυτές στα κύτταρα θηλαστικού. Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη rLdMAcPsol-His θα αποτελέσει χρήσιμο εργαλείο τόσο για τις *in vitro* δοκιμασίες εντοπισμού των φυσικών και συνθετικών υποστρωμάτων της όσο και για πειράματα συν-κατακρίμνησης με πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από μολυσμένα μακροφάγα, με σκοπό την ανακάλυψη υποψήφιων εταίρων της στο κύτταρο-ξενιστή.

5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Μελέτη της ωρίμανσης του φαγοσώματος που φέρει *L. donovani* σε μολυσμένα μακροφάγα κύτταρα θηλαστικού

Στην παρούσα διατριβή διερευνήθηκε, για πρώτη φορά, η πιθανότητα το παράσιτο *L. donovani* να ανατρέπει έμμεσα ή άμεσα τη δράση συγκεκριμένων PIs η οποία θα μπορούσε να ανιχνευθεί από μία μεταβολή της χωροχρονικής τους κατανομής στη μεμβράνη του λείσμανιοφόρου φαγοσώματος σε σύγκριση με την αντίστοιχη των φαγοσωμάτων που φέρουν αδρανή σφαιρίδια οψονοποιημένα με ορό ποντικού.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε μελέτη της χωροχρονικής κατανομής συγκεκριμένων μοριακών δεικτών της ωρίμανσης του φαγοσώματος (F-ακτίνης, Rab7 και LAMP1) και ακολούθως των PIs PtdIns(4,5)P₂, PtdIns(3,4,5)P₃ και PI3P. Τα κυριότερα συμπεράσματα που προέκυψαν είναι τα εξής:

Καθυστέρηση ή τροποποίηση της ωρίμανσης του λείσμανιοφόρου φαγοσώματος που χαρακτηρίζεται από:

- παρατεταμένη παραμονή της F-ακτίνης σε 2-πλάσιο και 3-πλάσιο αριθμό λείσμανιοφόρων φαγοσωμάτων σε σχέση με τα αδρανή σφαιρίδια κατά τα 30 και 60 λεπτά από την έναρξη της φαγοκυττάρωσης, αντίστοιχα
- μικρή καθυστέρηση (~5-10 λεπτά) της εμφάνισης του δείκτη των ώριμων ενδοσωμάτων Rab7 στη μεμβράνη των λείσμανιοφόρων φαγοσωμάτων
- καθυστέρηση κατά 15 λεπτά, για την περίπτωση της φαγοκυττάρωσης των *L. donovani*, της χρονικής στιγμής που σημειώνεται ταυτόχρονα μείωση του ποσοστού των Rab7 και αύξηση αυτού των LAMP1 θετικών φαγοσωμάτων, υποδεικνύοντας μία καθυστέρηση στη μετάβαση του φαγοσώματος σε φαγολυσόσωμα
- εμφάνιση μεγάλου ποσοστού θετικών στο PtdIns(4,5)P₂ και ιδιαίτερα στο PtdIns(3,4,5)P₃ λείσμανιοφόρων φαγοσωμάτων 15 λεπτά από την έναρξη της συγχρονισμένης φαγοκυττάρωσης
- εμφάνιση μεγαλύτερου ποσοστού θετικών στο PI3P λείσμανιοφόρων φαγοσωμάτων κατά τα 30 και 60 λεπτά από την έναρξη της φαγοκυττάρωσης

- η καθαρισμένη LPG από *L. donovani* φαίνεται να συμβάλλει στην καθυστέρηση της ωρίμανσης του λείσμανιοφόρου φαγοσώματος ($\uparrow$ PtdIns(3,4,5) P_3 και $\downarrow$ PI3P 30 λεπτά από την έναρξη της φαγοκυττάρωσης)

Παράγοντες που πιθανά να εμπλέκονται στο φαινόμενο είναι:

- μηχανισμοί των προμαστιγωτών παρασίτων οι οποίοι περιλαμβάνουν τη δράση μεμβρανικών ή εκκρινόμενων παραγόντων που επεμβαίνουν ειδικά στο μεταβολισμό των PIs του μακροφάγου
- η επικράτηση διαφορετικού τύπου υποδοχέων κατά τα φαινόμενα φαγοκυττάρωσης των προμαστιγωτών παρασίτων (CR3 και FMR) σε σχέση με αυτά των σφαιριδίων (CR3 και FcγR) πιθανά να συμβάλλει στην παρατηρούμενη παράταση της παρουσίας των PtdIns(4,5) P_2 και PtdIns(3,4,5) P_3 στη μεμβράνη των λείσμανιοφόρων φαγοσωμάτων
- το μέγεθος του σώματος των προμαστιγωτών παρασίτων, η κινητικότητα τους (ακόμα και κατά τη διαδικασία της εγκόλπωσης) καθώς και το μικρό αλλά καθοριστικό χρονικό διάστημα που χρειάζεται για την ακινητοποίηση και αναδίπλωση του μαστιγίου μέσα στο λείσμανιοφόρο φαγόσωμα, πιθανά να αποτελούν μία επιπλέον αιτία μηχανικής καθυστέρησης της «σφράγισής» του (sealing) και κατ' επέκταση της προόδου της ωρίμανσής του προς φαγολυσόσωμα.

Συνολικά, η διερεύνηση των πολύπλοκων αλληλεπιδράσεων που διέπουν την επιβίωση του παρασίτου *L. donovani* στα φαγοκύτταρα του θηλαστικού-ξενιστή και οδηγούν στην εγκαθίδρυση της μόλυνσης καθώς και η κατανόηση των διαδικασιών μέσω των οποίων το παράσιτο τροποποιεί τους φυσιολογικούς μηχανισμούς του φαγοκυττάρου, είναι μείζονος σημασίας. Ο εντοπισμός μορίων του παρασίτου που εμπλέκονται σε αυτές τις διαδικασίες, ο χαρακτηρισμός της χωροχρονικής έκφρασής τους και της σχέσης δομής-λειτουργίας θα επικουρήσει την διερεύνηση του ρόλου τους ως εν δυνάμει μολυσματικών παραγόντων ή/ και μοριακών στόχων για την ανάπτυξη νέων στοχευμένων αντιλειτουργικών φαρμάκων.

Μοριακός και βιοχημικός χαρακτηρισμός της *LdMAcP*. Διερεύνηση του πιθανού ρόλου της ως μολυσματικού παράγοντα του παρασίτου *L. donovani*

Οι πρώτες μελέτες ταυτοποίησης της πρωτεΐνης ή των πρωτεϊνών που συνεισφέρουν στην ενεργότητα όξινης φωσφατάσης στην εξωτερική επιφάνεια της μεμβράνης προμαστιγωτών *L. donovani* παρασίτων πραγματοποιήθηκαν αρχές της δεκαετίας του 1980 από τους Gottlieb and Dwyer [155, 257]. Παρά το γεγονός ότι οι Shakarian et al (2002) ταυτοποίησαν τη φωσφατάση *LdMAcP* (AF149839.1) ως ένα υποψήφιο μόριο που συμβάλλει στην παραπάνω ενζυμική ενεργότητα [164], παρέμειναν ανοιχτά ερωτήματα σε σχέση την εντόπισή της στο παρασιτικό κύτταρο και τα δομικά και λειτουργικά της χαρακτηριστικά. Στην παρούσα διδακτορική έρευνα, έγινε προσπάθεια διαλεύκανσης της εντόπισης, της δομής και της λειτουργίας τόσο της ενδογενούς όσο και ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών *LdMAcP* (r*LdMAcP*-mRFP1 & r*LdMAcP*-His) καθώς και του πιθανού ρόλου της στη μολυσματικότητα του παρασίτου *L. donovani*. Τα κυριότερα συμπεράσματα που προέκυψαν είναι τα εξής:

- η *LdMAcP* ανήκει αποκλειστικά στο σύμπλεγμα *L. donovani* που είναι υπεύθυνο για την πρόκληση της ανθρώπινης σπλαχνικής λεισμανίασης, εντός του οποίου παρουσιάζει πολυμορφισμούς
- στο γονιδίωμα της *L. donovani* βρέθηκαν τρία τουλάχιστον γονίδια, πέραν της *LdMAcP*, που κωδικοποιούν για προβλεπόμενες μεμβρανικές HAcPs τύπου I με πιθανό εξωκυττάριο προσανατολισμό του καταλυτικού τους κέντρου
- ORFs που κωδικοποιούν για μεμβρανικές φωσφατάσες, ομόλογες της *LdMAcP*, με το συντηρημένο μοτίβο RHGXRRP των HAcPs εντοπίστηκαν στα γονιδιώματα των *L. infantum*, *L. major* Friedlin, *L. tarentolae* Parrot-Tarll, *L. braziliensis* και *L. mexicana*
- η *LdMAcP* ανήκει στον κλάδο 2 των HAcPs και παρουσιάζει με την ομόλογή της εκκρινόμενη (*LdSACP1*) από το είδος *L. donovani* δομικές διαφορές στην καταλυτική της περιοχή που πιθανά να είναι κριτικής σημασίας για την ειδικότητα υποστρώματος και της καταλυτική τους ενεργότητα
- η r*LdMAcP*-mRFP1 και η ενδογενής *LdMAcP* εντοπίζονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των παρασίτων *L. donovani* με το καταλυτικό κέντρο τους προσανατολισμένο προς τον εξωκυττάριο χώρο

- η rLdMAcP-mRFP1 και η ενδογενής LdMAcP παρουσιάζουν δράση όξινης έξω-φωσφατάσης, με αντοχή στην αναστολή από τρυγικό οξύ, χωρίς να αποκλείεται το γεγονός η ενζυμική αυτή ενεργότητα στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των παρασίτων *Leishmania* spp. να οφείλεται και σε άλλες μεμβρανικές όξινες φωσφατάσες, πέραν της ενεργούς LdMAcP ή των ορθόλογων αυτής
- η rLdMAcP-mRFP1 και η ενδογενής LdMAcP εντοπίζονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και το ER των προμαστιγωτών παρασίτων, παρουσιάζοντας την τυπική υποκυττάρια εντόπιση των μεμβρανικών πρωτεϊνών τύπου I που ακολουθούν την εκκριτική οδό προς την κυτταροπλασματική μεμβράνη και είναι *N*-γλυκοζυλιωμένη
- η εντόπιση και η ενζυμική ενεργότητα της LdMAcP επιβεβαιώθηκε ως ετερόλογα εκφρασμένη (rLdMAcP-His) σε κύτταρα θηλαστικού (HeLa), υποδεικνύοντας ότι οι λεϊσμανιακές σηματοδοτικές αλληλουχίες διαλογής για κατεύθυνση στην κυτταροπλασματική μεμβράνη αναγνωρίζονται και από το εκκριτικό σύστημα κυττάρων θηλαστικού. Επίσης, η rLdMAcP-His *N*-γλυκοζυλιώνεται με αντίστοιχου μοριακού βάρους ολιγοσακχαρίτη με την rLdMAcP-mRFP1, επιβεβαιώνοντας την ομοιότητα του μηχανισμού της *N*-γλυκοζυλίωσης ανάμεσα στα κύτταρα *Leishmania* και των θηλαστικών
- η εντόπιση της LdMAcP και η ενεργότητα έξω-φωσφατάσης που προσδίδει στην επιφάνεια των προμαστιγωτών παρασίτων *L. donovani* την ενοχοποιεί για άμεση αλληλεπίδραση με τα κύτταρα-ξενιστές
- σε κυτταρικό σύστημα *in vitro* μόλυνσης η αύξηση των επιπέδων ενεργού LdMAcP, λόγω έκφρασης της ανασυνδυασμένης rLdMAcP-mRFP1, συμβάλλει στην αύξηση της μολυσματικότητας/ λοιμογόνου ικανότητας των διαγονιδιακών παρασίτων (*L. donovani*-rLdMAcP-mRFP1), ειδικά 48 ώρες μετά την έναρξη της μόλυνσης σε σύγκριση με τα επίσης διαγονιδιακά παράσιτα-μάρτυρες που εκφράζουν μόνο τον κενό πλασμιδιακό φορέα, ενισχύοντας παλαιότερες παρατηρήσεις
- τα παράσιτα που υπερεκφράζουν την LdMAcP παρουσιάζουν μικρό αλλά σημαντικό πλεονέκτημα επιβίωσης έναντι των παρασίτων-μαρτύρων, ειδικά 72 ώρες από την έναρξη της φαγοκυττάρωσης, ενισχύοντας την υπόθεση ότι η LdMAcP διαδραματίζει κάποιο ρόλο κατά τη φάση της ενδοκυττάριας ζωής των *L. donovani*

- η παρουσία επιτόπων της *LdMAcP* σε μολυσμένα μακροφάγα με παράσιτα *Leishmania* ενθαρρύνουν τη διερεύνηση της πιθανής λειτουργικής σχέσης μεταξύ της *LdMAcP* και στοιχείων του μακροφάγου που θα μπορούσαν να αποτελούν υποψήφια υποστρώματα/ εταίρους της.

Συνολικά, η παρούσα εργασία συνεισφέρει σημαντική πληροφορία στο πεδίο των όξινων φωσφατασών ιστιδίνης του παρασίτου *Leishmania*. Τα ενδιαφέροντα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μελέτη της *LdMAcP* ενθαρρύνουν για τη συνέχιση της έρευνας σχετικά με τους πιθανούς ρόλους και άλλων μελών της πολύ ενδιαφέρουσας οικογένειας των όξινων φωσφατασών του παρασίτου *L. donovani*, με σκοπό την ταυτοποίηση νέων μολυσματικών παραγόντων του παρασίτου και εξ' αυτών νέων φαρμακευτικών στόχων για την καταπολέμηση της νόσου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η λεισμανίωση είναι μία σοβαρή ανθρωποζωνόσος η οποία οφείλεται στα πρωτόζωα του γένους *Leishmania* που μεταδίδονται στον άνθρωπο και τα ζώα μέσω του αρθρόποδου ενδιάμεσου ξενιστή (σκνίπα). Η θεραπεία της νόσου παρουσιάζει σοβαρές παρενέργειες, έχει υψηλό κόστος, τα παράσιτα έχουν αναπτύξει αντοχή σε κάποια από τα διαθέσιμα φάρμακα και ταυτόχρονα υπάρχει έλλειψη ειδικών προστατευτικών εμβολίων. Για τους λόγους αυτούς, καθίσταται αναγκαία η διερεύνηση των κυτταρικών και μοριακών μηχανισμών που αναπτύσσονται στο θηλαστικό-ξενιστή κατά τη μόλυνση, με σκοπό να ταυτοποιηθούν νέοι μολυσματικοί παράγοντες του παρασίτου και εν δυνάμει νέοι φαρμακευτικοί στόχοι για την καταπολέμηση της λεισμανίωσης.

Τα πρωτόζωα παράσιτα *Leishmania* spp επιβιώνουν μέσα στο φαγολυσόσωμα των μακροφάγων του θηλαστικού-ξενιστή έχοντας αναπτύξει μηχανισμούς που ανακόπτουν την παρασιτοκτόνο δράση του. Ένας μηχανισμός μέσω του οποίου φαίνεται να το επιτυγχάνουν είναι η ενσωμάτωση παραγόντων της επιφάνειάς τους (πχ. λιποφωσφογλυκάνη LPG) στη μεμβράνη του φαγοσώματος που τα περικλείει, με αποτέλεσμα την αποδιάταξη των λιπιδικών νανοπεριοχών της [71, 180]. Το γεγονός αυτό πιθανά να συνδυάζεται με ανακατανομή συγκεκριμένων ειδών φωσφοϊνσιτιδίων (PIs) στη μεμβράνη του λεισμανιοφόρου φαγοσώματος και εκτροπή της βιογένεσης του φαγολυσόσωματος, όπως έχει αποδειχθεί για αρκετά ενδοκυττάρια παθογόνα βακτήρια [142, 144]. Για τα ενδοκυττάρια πρωτόζωα *Leishmania* δεν έχουν διαλευκανθεί ανάλογοι μοριακοί μηχανισμοί.

Στην παρούσα διατριβή, θελήσαμε να μελετήσουμε σε ένα κυτταρικό σύστημα *in vitro* μόλυνσης με *L. donovani* συγκεκριμένα χαρακτηριστικά της βιογένεσης του λεισμανιοφόρου φαγοσώματος κατά τα πρώιμα στάδια της φαγοκυττάρωσης, ώστε να συμβάλλουμε στην διερεύνηση και κατανόηση των μηχανισμών επιβίωσης του παρασίτου μέσα στο φαγολυσόσωμα του μακροφάγου. Επικεντρωθήκαμε στη μελέτη της χωροχρονικής κατανομής συγκεκριμένων μοριακών δεικτών ωρίμανσης του φαγοσώματος (F-actin, Rab7 και LAMP1) συμπεριλαμβανομένων των PtdIns(4,5)P₂, PtdIns(3,4,5)P₃ και PI3P, καθώς αντίστοιχη μελέτη στο λεισμανιοφόρο φαγόσωμα δεν έχει πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα. Επίσης, έγινε μια πρώτη μελέτη του πιθανού ρόλου της λιποφωσφογλυκάνης LPG στην εκτροπή της χωροχρονικής κατανομής των τριών ειδών PIs στη μεμβράνη των φαγοσωμάτων που φέρουν *L. donovani*. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν μακροφάγα της κυτταρικής σειράς ποντικού RAW264.7,

προμαστιγωτά παράσιτα *L. donovani* στατικής φάσης και παράλληλα οψονοποιημένα αδρανή σφαιρίδια ως ουδέτεροι μάρτυρες. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε μονιμοποιημένα δείγματα με συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού.

Συνολικά, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης παρουσιάζουν χρονικές «εκτροπές» στην παρουσία των μοριακών δεικτών ωρίμανσης και των τριών PIs στη μεμβράνη των λείσμανιοφόρων φαγοσωμάτων σε σχέση με αυτά των σφαιριδίων-μαρτύρων. Οι παρατηρούμενες διαφορές στην χωροχρονική κατανομή των μορίων που μελετήθηκαν υποδεικνύουν μία καθυστέρηση της βιογένεσης του φαγολυσοσώματος, όπως έχει ήδη καταγραφεί στη βιβλιογραφία [71, 108, 206], ή/ και τροποποίησή του από το παράσιτο, όπως έχει δείχθει για το επίσης υποχρεωτικά ενδοκυττάριο παθογόνο *Mycobacterium tuberculosis* [144, 242]. Οι ερμηνείες γύρω από το παρατηρούμενο φαινόμενο αφορούν α) στην πιθανή δράση κάποιου/ων παράγοντα/ων του παρασίτου στο μεταβολισμό των PIs του μακροφάγου [166], β) στον πιθανό ρόλο του τύπου των υποδοχέων (πχ. FcγR, CR3, Mannose Receptor) που συμμετέχουν στη φαγοκυττάρωση της *Leishmania* σε σχέση με το μάρτυρα [246], γ) στο ρόλο του μεγέθους και του σχήματος των προμαστιγωτών παρασίτων σε σχέση με τα αδρανή σφαιρικά στην καθυστερημένη εγκόλπωση των πρώτων και ακολούθως στην ωρίμανση των λεισμανιοφόρων φαγοσωμάτων [250], και δ) στο ρόλο της κινητικότητας του παρασίτου και του μαστιγίου του, ακόμα και εντός του νεοσχηματιζόμενου λείσμανιοφόρου φαγοσώματος [73], κινητικότητα η οποία πιθανά να αποτελεί μία επιπλέον μηχανική αιτία καθυστέρησης της σφράγισης του φαγοσώματος και της βιογένεσης του φαγολυσοσώματος [203].

Παράλληλα, στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής, προχωρήσαμε σε βιοχημικό και λειτουργικό χαρακτηρισμό ενός εν δυνάμει μολυσματικού παράγοντα του παρασίτου *L. donovani*, τη μεμβρανική όξινη φωσφατάση ιστιδίνης LdMAcP. Η LdMAcP λόγω του εντοπισμού της στην εξωτερική επιφάνεια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης του παρασίτου «ενοχοποιείται» για εμπλοκή στην άμεση αλληλεπίδραση του με το κύτταρο-ξενιστή, ενώ παλαιότερη δημοσιευμένη μελέτη εμπλέκει την ενεργότητα όξινης φωσφατάσης του παρασίτου *L. donovani* στην αποφωσφορυλίωση των PtdIns(4,5)P₂ και PtdIns(3,4,5)P₃ [166]. Παρά το γεγονός ότι οι Shakarian et al (2002) ταυτοποίησαν, πάνω από μια δεκαετία πριν τη φωσφατάση LdMAcP (AF149839.1) ως ένα υποψήφιο μόριο που συμβάλλει στην παραπάνω ενζυμική ενεργότητα [164], εξακολούθησαν να παραμένουν ανοιχτά τα ερωτήματα σε σχέση με την εντόπισή της στο παρασιτικό κύτταρο, τα δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά της. Στην παρούσα διδακτορική

έρευνα, έγινε προσπάθεια διαλεύκανσης της εντόπισης, της δομής και της λειτουργίας τόσο της ενδογενούς *LdMACP* όσο και ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών (*rLdMACP-mRFP1* & *rLdMACP-His*).

Αρχικά πραγματοποιήθηκε *in silico* ανάλυση τα αποτελέσματα της οποίας αναθεωρούν την προηγούμενη γνώση και αποδεικνύουν ότι η *LdMACP* είναι ειδική για το σύμπλεγμα *L. donovani*, εντός του οποίου παρουσιάζει πολυμορφισμούς. Η νέα αυτή πληροφορία υποδεικνύει ότι η *LdMACP* θα μπορούσε να αποτελέσει ένα εν δυνάμει μοριακό εργαλείο για τη διάγνωση της ανθρώπινης σπλαχνικής λεισμανίασης. Επιπρόσθετα, στο γονιδίωμα της *L. donovani* βρέθηκαν τρία τουλάχιστον γονίδια, πέραν της *LdMACP*, που κωδικοποιούν προβλεπόμενες μεμβρανικές HAcPs τοπολογίας τύπου I, με πιθανό εξωκυττάριο προσανατολισμό του καταλυτικού τους κέντρου, αναδεικνύοντας την πιθανότητα και άλλες μεμβρανικές HAcPs να συνεισφέρουν στη δράση έξω-φωσφατάσης στην επιφάνεια των παρασίτων *L. donovani*. Τέλος, η κατασκευή *in silico* τρισδιάστατου μοντέλου της *LdMACP* και της ομόλογής της εκκρινόμενης από το παράσιτο *L. donovani* (*LdSACP1*), χρησιμοποιώντας ως δομικό πρότυπο τη λυμένη αλληλουχία της ανθρώπινης προστατικής φωσφατάσης με τις οποίες έχει ταυτότητα 24% στην αλληλουχία του καταλυτικού κέντρου, έδειξε ότι οι δύο φωσφατάσες παρουσιάζουν δομικές διαφορές στην καταλυτική τους περιοχή οι οποίες πιθανά να είναι κριτικής σημασίας για την ειδικότητα υποστρώματος και την καταλυτική τους ενεργότητα. Η παραπάνω υπόθεση αξίζει περαιτέρω διερεύνησης.

Ακολούθως, σε προμαστιγωτά παράσιτα *L. donovani* αγρίου τύπου και διαγονιδιακά, που υπερεκφράζουν επισωμικά την *LdMACP* ως χίμαιρα με την *mRFP1* (*L. donovani-rLdMACP-mRFP1*), αποδείχτηκε ότι η *LdMACP* έχει προβλεπόμενη εντόπιση των μεμβρανικών HAcPs τύπου I στην εξωτερική επιφάνεια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης των *L. donovani*. Επιπλέον, αποδείχτηκε ότι η *LdMACP* είναι *N*-γλυκοζυλιωμένη. Όσον αφορά στην ενζυμική της ενεργότητα, αποδείχθηκε ότι έχει δράση όξινης έξω-φωσφατάσης με αντίσταση στην παρουσία του τρυγικού οξέος.

Επιπρόσθετα, η εντόπιση και η ενζυμική ενεργότητα της *LdMACP* επιβεβαιώθηκε όταν εκφράστηκε ετερόλογα (*rLdMACP-His*) σε κύτταρα θηλαστικού (HeLa), υποδεικνύοντας ότι οι λεισμανιακές σηματοδοτικές αλληλουχίες διαλογής για κατεύθυνση στην κυτταροπλασματική μεμβράνη αναγνωρίζονται από το εκκριτικό σύστημα κυττάρων θηλαστικού. Τέλος, η *rLdMACP-His* *N*-γλυκοζυλιώνεται, όπως και η *rLdMACP-mRFP1*, γεγονός που επιβεβαιώνει τις ομοιότητες του μηχανισμού της *N*-γλυκοζυλίωσης ανάμεσα σε κύτταρα της *Leishmania* και των θηλαστικών.

Η εντόπιση της *LdMAcP* και η δράση της έξω-φωσφατάσης που προσδίδει στην επιφάνεια των προμαστιγωτών παρασίτων *L. donovani* την ενοχοποιεί για άμεση αλληλεπίδραση με τα κύτταρα-ξενιστές. Πράγματι, σε κυτταρικό σύστημα *in vitro* μόλυνσης, η αύξηση των επιπέδων ενεργού *LdMAcP* λόγω έκφρασης της ανασυνδυασμένης *rLdMAcP-mRFP1*, έδειξε ότι συμβάλλει στην αύξηση της μολυσματικότητας/ λοιμογόνου ικανότητας των παρασίτων *L. donovani-rLdMAcP-mRFP1*, ειδικά 48 ώρες μετά την έναρξη της μόλυνσης σε σύγκριση με τα επίσης διαγονιδιακά παράσιτα-μάρτυρες που εκφράζουν μόνο τον κενό πλασμιδιακό φορέα, ενισχύοντας παλαιότερες παρατηρήσεις [159, 160]. Επιπλέον, τα *L. donovani-rLdMAcP-mRFP1* επέδειξαν μικρό αλλά σημαντικό πλεονέκτημα επιβίωσης έναντι των παρασίτων-μαρτύρων ειδικά 72 ώρες από την έναρξη της φαγοκυττάρωσης, ενισχύοντας την υπόθεση για ύπαρξη πιθανού ρόλου της *LdMAcP* κατά τη φάση αυτή της ενδοκυττάριας ζωής των *L. donovani*. Τέλος, η παρουσία επιτόπων της *LdMAcP* σε μολυσμένα μακροφάγα με παράσιτα *Leishmania* ενθαρρύνουν τη διερεύνηση της πιθανής λειτουργικής σχέσης μεταξύ της *LdMAcP* και στοιχείων του μακροφάγου που θα μπορούσαν να αποτελούν υποψήφια υποστρώματα/ εταίρους της.

Συνολικά, η παρούσα εργασία συνεισφέρει σημαντική πληροφορία στο πεδίο των όξινων φωσφατασών ιστιδίνης του παρασίτου *Leishmania*. Τα ενδιαφέροντα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μελέτη της *LdMAcP* ενθαρρύνουν για τη συνέχιση της έρευνας σχετικά με τους πιθανούς ρόλους και άλλων μελών της πολύ ενδιαφέρουσας οικογένειας των όξινων φωσφατασών του παρασίτου *L. donovani*, με σκοπό την ταυτοποίηση νέων μολυσματικών παραγόντων του παρασίτου και εξ'αυτών νέων φαρμακευτικών στόχων για την καταπολέμηση της νόσου.

SUMMARY

Study of molecular mechanisms underlying *Leishmania* spp. survival within the phagocytes of the mammalian host

Amalia Papadaki

Leishmaniasis, a major anthroponozoonotic disease, is caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania* when transmitted to the mammalian host by the bite of the insect intermediate vector (sand flies of the genus *Phlebotomus* or *Lutzomyia*). Given that the chemotherapeutic treatment of the disease causes serious side effects, it is expensive and there is a lack of vaccines and emergence of resistance to some of the mostly commonly used anti-leishmanial drugs, there is an urgent need for the discovery of more effective non-toxic drugs and vaccines. To this end, research on the cellular and molecular mechanisms that take place in the mammalian host is of great importance as it is expected to lead to the identification of new parasitic virulence factors and putative drug targets for effective control of Leishmaniasis.

The protozoan parasites of the *Leishmania* genus survive in the phagolysosomal compartment of the mammalian host macrophages by developing strategies subverting its parasitocidal properties. One strategy believed to contribute to the intra-phagosomal survival of the *Leishmania* promastigote form is the transfer of its major surface glycoconjugate, lipophosphoglycan (LPG), to the inner leaflet of the phagosomal membrane. Insertion of LPG alters the biophysical properties of the membrane and disturbs its lipid microdomains [71, 180]. This could result to a redistribution of specific phosphoinositides (PIs) in the parasitophorous phagosome membrane leading to subversion of the phagolysosome biogenesis, already proven to take place in infections by intracellular bacterial pathogens [142, 144]. The molecular mechanism underlying this process has not been confirmed and clarified for the *Leishmania* parasites.

The present PhD research project, aimed to contribute to a) the exploration of specific features of the biogenesis of *L. donovani* bearing phagosomes during the initial stages of phagocytosis by macrophages and b) the understanding of the molecular mechanisms underlying the parasite's survival in the phagolysosome.

Our study focused on the spatial-temporal distribution of specific molecular markers of phagosome maturation as F-actin, Rab7 and LAMP1 as well as the PIs PtdIns(4,5)P₂, PtdIns(3,4,5)P₃ and PI3P for which no relevant study relating them to parasitophorous

phagosomes has been performed to date. Furthermore, we performed preliminary experiments concerning the possible role of LPG in the subversion of the spatio-temporal distribution of the three PIs in the membrane of *L. donovani* bearing phagosomes. For these studies, we set up an *in vitro* cellular system using transiently or stably transfected RAW264.7 cells expressing GFP or YFP fusions of certain PI-binding domains that we infected with transgenic red fluorescent *Leishmania*-mRFP parasites. Experiments with opsonised inert particles were performed in parallel to detect differences in the temporal or spatial distribution of the specific PIs that could indicate subversion in PI metabolism by *Leishmania* during its phagocytic uptake by macrophages. The analysis was performed by confocal microscopy in fixed samples.

Overall, our results demonstrated a time deflection in the presence of the three molecular markers of phagosome maturation and the PIs on the parasitophorous phagosome membrane as compared with those bearing control beads. The observed differences in the temporal and spatial distribution of these molecules, suggest a delay of biogenesis of the parasitophorous phagosome, as already reported in the literature for *L. donovani* [71, 108, 206] and previously shown for the also obligatory intracellular pathogen *Mycobacterium tuberculosis* [144, 242]. The above described observed phenomenon could be due to a) the action of parasite's molecules in the macrophage's PIs metabolism [166]; b) the role of the different receptor type (e.g. FcγR, CR3, Mannose Receptor) involved in the phagocytosis of *Leishmania* as compared to opsonised beads [246]; c) the role that differences in the size and shape of *Leishmania* promastigotes as compared to spherical beads could play in a delay in parasite's engulfment and maturation of the parasitophorous phagosome [250]; and d) the role that the parasite's and flagellum's motility could play in the sealing of the newly formed phagosome [73] and an additional mechanical retardation of the phagosome maturation to phagolysosome [203].

Additionally, we studied a putative *L. donovani* virulence factor, the membrane acid phosphatase *LdMAcP*. Because of its predicted extracellular orientation at the parasitic plasma membrane, *LdMAcP* could be implicated in a direct interaction of the parasite with the host cell. Moreover, a previous study had shown that semi-purified membrane acid phosphatase(s) from *L. donovani* dephosphorylate PtdIns(4.5)P₂ and PtdIns(3.4.5)P₃ [166]. Despite the fact that acid ecto-phosphatase activity was identified in *Leishmania* more than 30 years ago [164], its precise localization at the parasitic cell and the role of this activity in parasite infectivity and virulence still remains to be elucidated. In the current study we wished to elucidate the localization and structural/ functional properties

of *LdMacP* by studying the endogenous enzyme and the recombinant *rLdMacP*-mRFP1 and *rLdMacP*-His chimeras in *L. donovani* promastigotes and mammalian cells.

The original identification of the *LdMacP* protein [164] was followed by a study indicating that its sequence is conserved amongst all pathogenic *Leishmania* spp. [163]. We conducted a search for *LdMacP* homologues in the available genome sequences of several *Leishmania* spp. that contrary to the earlier claims, *LdMacP*, as a membrane bound ecto-enzyme, seems to be present only in the *L. donovani* complex in which it additionally presents strain polymorphisms. This new piece of information suggests that *LdMacP* could become a useful tool for the diagnosis of Visceral Leishmaniasis.

Additionally, in the *L. donovani* genome were found at least three genes, besides that of *LdMacP*, coding for predicted HAcPs with membrane proteins type I topology, and extracellular orientation of their predicted catalytic domain. This indicated that other membrane HAcPs, may also contribute to the acid ecto-phosphatase activity on the *L. donovani* parasite surface.

Finally, the high sequence identity of *LdMacP* with the human hPAP (~24% for the region with resolved crystal structure (residues 33-374), allowed the construction of reliable 3D structure models for the *LdMacP* (AIF32067) (residues 26–313) and its homologous secreted *LdSAcPs* (AAC79513) (residues 26-392) [163, 227]. The *in silico* structural analysis of *LdMacP*'s and *LdSAcPs*' sequences revealed structural differences suggesting differences in the substrate specificity and functionality of the two enzymes, hypothesis that deserves further investigation.

The predicted localization of *LdMacP* on the parasite surface membrane [164] on which it could act as acid ecto-phosphatase, was confirmed both by confocal microscopy and biochemically. The localization of *LdMacP* was followed in wild type promastigotes (endogenous form) by indirect immunofluorescence with the anti-*LdMacP* mouse mAb or pAb generated in this study or in transgenic promastigotes episomally expressing a recombinant C-terminally tagged *LdMacP*-mRFP1 chimera, by direct visualization of the mRFP1 fluorescence. Subsequently, the expression of recombinant and endogenous *LdMacP* polypeptides was detected biochemically in membrane fractions from transgenic *L. donovani*-*rLdMacP*-mRFP1 and wt *L. donovani* promastigotes. Cumulatively, we conclude that the full length *LdMacP* shows typical localization for type I membrane proteins following the secretory pathway. Additionally, we confirmed that *LdMacP* is N-glycosylated, a post-translation modification that could regulate its transport to the plasma membrane and/or its stability. As far as the enzymatic activity of *LdMacP* is concerned,

we showed that it confers to the acid ecto-phosphatase activity of the *L. donovani* promastigotes and that is tartrate resistant. It would be extremely interesting, to investigate the *LdMacP* activity in *L. donovani* amastigotes that reside and multiply within the acidic host cell phagolysosome.

The *LdMacP* localization and enzymatic activity were also confirmed upon its transient expression as r*LdMacP*-His in mammalian cells. In this case, the recombinant protein was N-glycosylated and successfully targeted by the HeLa secretory system to the cell plasma membrane with an active catalytic domain facing the extracellular milieu.

All the above results raise the intriguing possibility that the presence of the acid ecto-phosphatase activity in intact *L. donovani* promastigotes may be part of the pathogen's mechanism to manipulate a signal recognition system of the host macrophages in order to gain access and survive in its intracellular niche. To investigate this hypothesis we set up an *in vitro* macrophage cell culture infection system to examine whether the *L. donovani*-r*LdMacP*-mRFP1 presented an infectivity advantage over a mock transfected *L. donovani* population. Overall, these experiments indicated that overexpression of r*LdMacP*-mRFP1 improves the ability of the transgenic parasites to survive within macrophages in culture at least in the first 48 to 72 h post-infection, suggesting a possible similar role for the endogenous *LdMacP*. This finding supports earlier reports linking the tartrate resistant acid phosphatase activity to *Leishmania* infectivity and virulence [159, 160]. It worth's mentioning that the tartrate sensitive secreted acid phosphatase activity has also been linked to *Leishmania* infectivity [251, 295]. Finally, the presence of *LdMacP* epitopes in infected macrophages with *Leishmania* parasites favors further investigation on the possible functional relationship between this ecto-phosphatase and macrophage molecules, which could serve as candidate substrates/partners.

Overall, this study contributes important information in the field of histidine acid phosphatases of the *Leishmania* parasite. The interesting results obtained from the study of *LdMacP*, encourage the continuation of research on the possible roles of other members of the very interesting family of acid phosphatases, in order to identify new virulence factors of the parasite and thus, new drug targets to control the disease.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1 WHO. (2015) Leishmaniasis. Fact sheet N°375
- 2 WHO/PAHO. (2014) Leishmaniasis. Communication materials/ Fact sheets
- 3 Dujardin, J. C., Campino, L., Canavate, C., Dedet, J. P., Gradoni, L., Soteriadou, K., Mazeris, A., Ozbek, Y. and Boelaert, M. (2008) Spread of vector-borne diseases and neglect of Leishmaniasis, Europe. *Emerg Infect Dis.* **14**, 1013-1018
- 4 Choi, C. M. and Lerner, E. A. (2001) Leishmaniasis as an emerging infection. *J Invest Dermatol Symp Proc.* **6**, 175-182
- 5 Gibson, M. E. (1983) The identification of kala-azar and the discovery of *Leishmania donovani*. *Med Hist.* **27**, 203-213
- 6 Bray, R. S. (1974) *Leishmania*. *Annu Rev Microbiol.* **28**, 189-217
- 7 Chappuis, F., Sundar, S., Hailu, A., Ghalib, H., Rijal, S., Peeling, R. W., Alvar, J. and Boelaert, M. (2007) Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol.* **5**, 873-882
- 8 Guerin, P. J., Olliaro, P., Sundar, S., Boelaert, M., Croft, S. L., Desjeux, P., Wasunna, M. K. and Bryceson, A. D. (2002) Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect Dis.* **2**, 494-501
- 9 WHO. Clinical forms of the leishmaniasis. http://www.who.int/leishmaniasis/clinical_forms_leishmaniasis/en/index2.html
- 10 Pearson, R. D., Marcus, J. L., Roberts, D. and Donowitz, G. R. (1983) Differential survival of *Leishmania donovani* amastigotes in human monocytes. *J Immunol.* **131**, 1994-1999
- 11 Ives, A., Ronet, C., Prevel, F., Ruzzante, G., Fuertes-Marraco, S., Schutz, F., Zangger, H., Revaz-Breton, M., Lye, L. F., Hickerson, S. M., Beverley, S. M., Acha-Orbea, H., Launois, P., Fasel, N. and Masina, S. (2011) *Leishmania* RNA virus controls the severity of mucocutaneous leishmaniasis. *Science.* **331**, 775-778
- 12 Quinnell, R. J. and Courtenay, O. (2009) Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology.* **136**, 1915-1934
- 13 Millan, J., Ferroglio, E. and Solano-Gallego, L. (2014) Role of wildlife in the epidemiology of *Leishmania infantum* infection in Europe. *Parasitol Res.* **113**, 2005-2014
- 14 Ready, P. D. (2010) Leishmaniasis emergence in Europe. *Euro Surveill.* **15**, 19505
- 15 Alvar, J., Yactayo, S. and Bern, C. (2006) Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol.* **22**, 552-557
- 16 Cruz, I., Morales, M. A., Nogueira, I., Rodriguez, A. and Alvar, J. (2002) *Leishmania* in discarded syringes from intravenous drug users. *Lancet.* **359**, 1124-1125
- 17 Huda, M. M., Rudra, S., Ghosh, D., Bhaskar, K. R., Chowdhury, R., Dash, A. P., Bhattacharya, S. K., Haque, R. and Mondal, D. (2013) Low prevalence of *Leishmania donovani* infection among the blood donors in kala-azar endemic areas of Bangladesh. *BMC Infect Dis.* **13**, 62
- 18 Mansueto, P., Seidita, A., Vitale, G. and Cascio, A. (2014) Transfusion transmitted leishmaniasis. What to do with blood donors from endemic areas? *Travel Med Infect Dis.* **12**, 617-627
- 19 Lindoso, J. A., Cota, G. F., da Cruz, A. M., Goto, H., Maia-Elkhoury, A. N., Romero, G. A., de Sousa-Gomes, M. L., Santos-Oliveira, J. R. and Rabello, A. (2014) Visceral leishmaniasis and HIV coinfection in Latin America. *PLoS Negl Trop Dis.* **8**, e3136

- 20 Monge-Maillo, B., Norman, F. F., Cruz, I., Alvar, J. and Lopez-Velez, R. (2014) Visceral leishmaniasis and HIV coinfection in the Mediterranean region. *PLoS Negl Trop Dis.* **8**, e3021
- 21 Diro, E., Lynen, L., Ritmeijer, K., Boelaert, M., Hailu, A. and van Griensven, J. (2014) Visceral Leishmaniasis and HIV coinfection in East Africa. *PLoS Negl Trop Dis.* **8**, e2869
- 22 Gouzelou, E., Haralambous, C., Antoniou, M., Christodoulou, V., Martinkovic, F., Zivcinkjak, T., Smirlis, D., Pratlong, F., Dedet, J. P., Ozbek, Y., Toz, S. O., Presber, W., Schonian, G. and Soteriadou, K. (2013) Genetic diversity and structure in *Leishmania infantum* populations from southeastern Europe revealed by microsatellite analysis. *Parasit Vectors.* **6**, 342
- 23 Stauch, A., Duerr, H. P., Picado, A., Ostyn, B., Sundar, S., Rijal, S., Boelaert, M., Dujardin, J. C. and Eichner, M. (2014) Model-based investigations of different vector-related intervention strategies to eliminate visceral leishmaniasis on the Indian subcontinent. *PLoS Negl Trop Dis.* **8**, e2810
- 24 Alvar, J., Canavate, C., Gutierrez-Solar, B., Jimenez, M., Laguna, F., Lopez-Velez, R., Molina, R. and Moreno, J. (1997) *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin Microbiol Rev.* **10**, 298-319
- 25 Picado, A., Ostyn, B., Singh, S. P., Uranw, S., Hasker, E., Rijal, S., Sundar, S., Boelaert, M. and Chappuis, F. (2014) Risk factors for visceral leishmaniasis and asymptomatic *Leishmania donovani* infection in India and Nepal. *PLoS One.* **9**, e87641
- 26 Solano-Gallego, L., Morell, P., Arboix, M., Alberola, J. and Ferrer, L. (2001) Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *J Clin Microbiol.* **39**, 560-563
- 27 Christodoulou, V., Antoniou, M., Ntais, P., Messaritakis, I., Iovic, V., Dedet, J. P., Pratlong, F., Dvorak, V. and Tselentis, Y. (2012) Re-emergence of visceral and cutaneous leishmaniasis in the Greek Island of Crete. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **12**, 214-222
- 28 Desjeux, P. and Alvar, J. (2003) *Leishmania/HIV* co-infections: epidemiology in Europe. *Ann Trop Med Parasitol.* **97 Suppl 1**, 3-15
- 29 Alvar, J., Aparicio, P., Aseffa, A., Den Boer, M., Canavate, C., Dedet, J. P., Gradoni, L., Ter Horst, R., Lopez-Velez, R. and Moreno, J. (2008) The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev.* **21**, 334-359, table of contents
- 30 WHO. (1996) "The leishmaniasis and leishmania/HIV co-infections." (Zoon., I. C.-W. M. and Cent.40:11-13., C., ed.)^eds.)
- 31 Tselentis, Y., Gikas, A. and Chaniotis, B. (1994) Kala-azar in Athens basin. *Lancet.* **343**, 1635
- 32 Garifallou, A., Schnur, L. F., Stratigos, J. D., Hadziandoniou, M., Savigos, M., Stavrianeas, N. and Serie, C. (1984) Leishmaniasis in Greece II. Isolation and identification of the parasite causing cutaneous leishmaniasis in man. *Ann Trop Med Parasitol.* **78**, 369-375
- 33 Tzamouranis, N., Schnur, L. F., Garifallou, A., Pateraki, E. and Serie, C. (1984) Leishmaniasis in Greece I. Isolation and identification of the parasite causing human and canine visceral leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol.* **78**, 363-368
- 34 Ntais, P., Sifaki-Pistola, D., Christodoulou, V., Messaritakis, I., Pratlong, F., Poupalos, G. and Antoniou, M. (2013) Leishmaniasis in Greece. *Am J Trop Med Hyg.* **89**, 906-915

- 35 ΚΕΕΛΠΝΟ. (2011) ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΙΑ ΤΗ ΛΕΙΣΜΑΝΙΑΣΗ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ (2005-2009).
- 36 Athanasiou, L. V., Kontos, V. I., Saridomichelakis, M. N., Rallis, T. S. and Diakou, A. (2012) A cross-sectional sero-epidemiological study of canine leishmaniasis in Greek mainland. *Acta Trop.* **122**, 291-295
- 37 Papadopoulou, C., Kostoula, A., Dimitriou, D., Panagiou, A., Bobojianni, C. and Antoniadis, G. (2005) Human and canine leishmaniasis in asymptomatic and symptomatic population in Northwestern Greece. *J Infect.* **50**, 53-60
- 38 Sundar, S. and Rai, M. (2002) Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol.* **9**, 951-958
- 39 Kobets, T., Grekov, I. and Lipoldova, M. (2012) Leishmaniasis: prevention, parasite detection and treatment. *Curr Med Chem.* **19**, 1443-1474
- 40 Otranto, D. and Dantas-Torres, F. (2013) The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. *Trends Parasitol.* **29**, 339-345
- 41 McCall, L. I., Zhang, W. W., Ranasinghe, S. and Matlashewski, G. (2013) Leishmanization revisited: immunization with a naturally attenuated cutaneous *Leishmania donovani* isolate from Sri Lanka protects against visceral leishmaniasis. *Vaccine.* **31**, 1420-1425
- 42 Moreno, J., Vouldoukis, I., Schreiber, P., Martin, V., McGahie, D., Gueguen, S. and Cuisinier, A. M. (2014) Primary vaccination with the LiESP/QA-21 vaccine (CaniLeish) produces a cell-mediated immune response which is still present 1 year later. *Vet Immunol Immunopathol.* **158**, 199-207
- 43 Ashford, R. W. (2000) The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol.* **30**, 1269-1281
- 44 Moore, E. M. and Lockwood, D. N. (2010) Treatment of visceral leishmaniasis. *J Glob Infect Dis.* **2**, 151-158
- 45 Freitas-Junior, L. H., Chatelain, E., Kim, H. A. and Siqueira-Neto, J. L. (2012) Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it? *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* **2**, 11-19
- 46 Oliveira, L. F., Schubach, A. O., Martins, M. M., Passos, S. L., Oliveira, R. V., Marzochi, M. C. and Andrade, C. A. (2011) Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. *Acta Trop.* **118**, 87-96
- 47 Pink, R., Hudson, A., Mouries, M. A. and Bendig, M. (2005) Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* **4**, 727-740
- 48 Croft, S. L., Sundar, S. and Fairlamb, A. H. (2006) Drug Resistance in Leishmaniasis. *Clinical Microbiology Reviews.* **19**, 111-126
- 49 Bunney, T. D. and Katan, M. (2011) PLC regulation: emerging pictures for molecular mechanisms. *Trends in Biochemical Sciences.* **36**, 88-96
- 50 Croft, S. L., Sundar, S. and Fairlamb, A. H. (2006) Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev.* **19**, 111-126
- 51 Croft, S. L., Seifert, K. and Yardley, V. (2006) Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Indian J Med Res.* **123**, 399-410
- 52 McConnell, J. L. and Wadzinski, B. E. (2009) Targeting Protein Serine/Threonine Phosphatases for Drug Development. *Molecular Pharmacology.* **75**, 1249-1261
- 53 Roy, J. and Cyert, M. S. (2009) Cracking the Phosphatase Code: Docking Interactions Determine Substrate Specificity. *Sci. Signal.* **2**, re9-
- 54 Slupe, A. M., Merrill, R. A. and Strack, S. (2011) Determinants for Substrate Specificity of Protein Phosphatase 2A. *Enzyme research.* **2011**, 398751

- 55 McParland, V., Varsano, G., Li, X., Thornton, J., Baby, J., Aravind, A., Meyer, C., Pavic, K., Rios, P. and Kohn, M. (2011) The Metastasis-Promoting Phosphatase PRL-3 Shows Activity toward Phosphoinositides. *Biochemistry*. **50**, 7579-7590
- 56 Rios, P., Nunes-Xavier, C. E., Tabernero, L., Kohn, M. and Pulido, R. (2014) Dual-specificity phosphatases as molecular targets for inhibition in human disease. *Antioxid Redox Signal*. **20**, 2251-2273
- 57 Beverley, S. M., Ismach, R. B. and Pratt, D. M. (1987) Evolution of the genus *Leishmania* as revealed by comparisons of nuclear DNA restriction fragment patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **84**, 484-488
- 58 Rioux, J. A., Lanotte, G., Serres, E., Pratlong, F., Bastien, P. και Perieres, J. (1990) Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann Parasitol Hum Comp*. **65** 111-125
- 59 Rioux, J. A. κ. L., G. (1993) Contribution of cladistics to analysis of the *Leishmania* genus Ross, 1903 (Kinetoplastida-Trypanosomatidae). *Biosystema* **8**, 79-90
- 60 Rioux, J. A., Lanotte, G., Serres, E., Pratlong, F., Bastien, P. and Perieres, J. (1990) Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann Parasitol Hum Comp*. **65**, 111-125
- 61 Schonian, G., Kuhls, K. and Mauricio, I. L. (2011) Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. *Parasitology*. **138**, 405-425
- 62 Banuls, A. L., Hide, M. and Prugnolle, F. (2007) *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Adv Parasitol*. **64**, 1-109
- 63 Elwasila, M. (1988) *Leishmania tarentolae* Wenyon, 1921 from the gecko *Tarentola annularis* in the Sudan. *Parasitol Res*. **74**, 591-592
- 64 Lukes, J., Mauricio, I. L., Schonian, G., Dujardin, J. C., Soteriadou, K., Dedet, J. P., Kuhls, K., Tintaya, K. W., Jirku, M., Chocholova, E., Haralambous, C., Pratlong, F., Obornik, M., Horak, A., Ayala, F. J. and Miles, M. A. (2007) Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **104**, 9375-9380
- 65 Killick-Kendrick, R., Molyneux, D. H. and Ashford, R. W. (1974) *Leishmania* in phlebotomid sandflies. I. Modifications of the flagellum associated with attachment to the mid-gut and oesophageal valve of the sandfly. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. **187**, 409-419
- 66 Shapiro, T. A. and Englund, P. T. (1995) The structure and replication of kinetoplast DNA. *Annu Rev Microbiol*. **49**, 117-143
- 67 Bates, P. A. and Rogers, M. E. (2004) New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. *Curr Mol Med*. **4**, 601-609
- 68 Freitas, V. C., Parreiras, K. P., Duarte, A. P., Secundino, N. F. and Pimenta, P. F. (2012) Development of *Leishmania (Leishmania) infantum* chagasi in its natural sandfly vector *Lutzomyia longipalpis*. *Am J Trop Med Hyg*. **86**, 606-612
- 69 Besteiro, S., Williams, R. A., Coombs, G. H. and Mottram, J. C. (2007) Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *Int J Parasitol*. **37**, 1063-1075
- 70 K. Nussbaum, J. H., C. M. C.v.C. Cadmus and T. Efferth (2010) Trypanosomatid parasites causing neglected diseases. Institute of Pharmacy and Molecular Biotechnology, Ruprecht-Karls University Heidelberg, Germany
- 71 Moradin, N. and Descoteaux, A. (2012) *Leishmania* promastigotes: building a safe niche within macrophages. *Front Cell Infect Microbiol*. **2**, 121
- 72 Handman, E. and Bullen, D. V. (2002) Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends Parasitol*. **18**, 332-334

- 73 Forestier, C. L. (2013) Imaging host-Leishmania interactions: significance in visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol.* **35**, 256-266
- 74 Meddeb-Garnaoui, A., Zrelli, H. and Dellagi, K. (2009) Effects of tropism and virulence of Leishmania parasites on cytokine production by infected human monocytes. *Clin Exp Immunol.* **155**, 199-206
- 75 Kumar, R. and Engwerda, C. (2014) Vaccines to prevent leishmaniasis. *Clin Transl Immunology.* **3**, e13
- 76 Kamhawi, S., Modi, G. B., Pimenta, P. F., Rowton, E. and Sacks, D. L. (2000) The vectorial competence of *Phlebotomus sergenti* is specific for *Leishmania tropica* and is controlled by species-specific, lipophosphoglycan-mediated midgut attachment. *Parasitology.* **121 (Pt 1)**, 25-33
- 77 Sacks, D. and Kamhawi, S. (2001) Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol.* **55**, 453-483
- 78 Bates, P. A. (2007) Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol.* **37**, 1097-1106
- 79 Abdeladhim, M., Kamhawi, S. and Valenzuela, J. G. (2014) What's behind a sand fly bite? The profound effect of sand fly saliva on host hemostasis, inflammation and immunity. *Infect Genet Evol*
- 80 Kamhawi, S., Belkaid, Y., Modi, G., Rowton, E. and Sacks, D. (2000) Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. *Science.* **290**, 1351-1354
- 81 Oliveira, F., Jochim, R. C., Valenzuela, J. G. and Kamhawi, S. (2009) Sand flies, *Leishmania*, and transcriptome-borne solutions. *Parasitol Int.* **58**, 1-5
- 82 Ivens, A. C., Peacock, C. S., Worthey, E. A., Murphy, L., Aggarwal, G., Berriman, M., Sisk, E., Rajandream, M. A., Adlem, E., Aert, R., Anupama, A., Apostolou, Z., Attipoe, P., Bason, N., Bauser, C., Beck, A., Beverley, S. M., Bianchetti, G., Borzym, K., Bothe, G., Bruschi, C. V., Collins, M., Cadag, E., Ciarloni, L., Clayton, C., Coulson, R. M., Cronin, A., Cruz, A. K., Davies, R. M., De Gaudenzi, J., Dobson, D. E., Duesterhoeft, A., Fazelina, G., Fosker, N., Frasch, A. C., Fraser, A., Fuchs, M., Gabel, C., Goble, A., Goffeau, A., Harris, D., Hertz-Fowler, C., Hilbert, H., Horn, D., Huang, Y., Klages, S., Knights, A., Kube, M., Larke, N., Litvin, L., Lord, A., Louie, T., Marra, M., Masuy, D., Matthews, K., Michaeli, S., Mottram, J. C., Muller-Auer, S., Munden, H., Nelson, S., Norbertczak, H., Oliver, K., O'Neil, S., Pentony, M., Pohl, T. M., Price, C., Purnelle, B., Quail, M. A., Rabinowitsch, E., Reinhardt, R., Rieger, M., Rinta, J., Robben, J., Robertson, L., Ruiz, J. C., Rutter, S., Saunders, D., Schafer, M., Schein, J., Schwartz, D. C., Seeger, K., Seyler, A., Sharp, S., Shin, H., Sivam, D., Squares, R., Squares, S., Tosato, V., Vogt, C., Volckaert, G., Wambutt, R., Warren, T., Wedler, H., Woodward, J., Zhou, S., Zimmermann, W., Smith, D. F., Blackwell, J. M., Stuart, K. D., Barrell, B. and Myler, P. J. (2005) The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science.* **309**, 436-442
- 83 Galanti, N., Galindo, M., Sabaj, V., Espinoza, I. and Toro, G. C. (1998) Histone genes in trypanosomatids. *Parasitol Today.* **14**, 64-70
- 84 Downing, T., Imamura, H., Decuyper, S., Clark, T. G., Coombs, G. H., Cotton, J. A., Hilley, J. D., de Doncker, S., Maes, I., Mottram, J. C., Quail, M. A., Rijal, S., Sanders, M., Schonian, G., Stark, O., Sundar, S., Vanaerschot, M., Hertz-Fowler, C., Dujardin, J. C. and Berriman, M. (2011) Whole genome sequencing of multiple *Leishmania donovani* clinical isolates provides insights into population structure and mechanisms of drug resistance. *Genome Res.* **21**, 2143-2156
- 85 Cano, M. I., Dungan, J. M., Agabian, N. and Blackburn, E. H. (1999) Telomerase in kinetoplastid parasitic protozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**, 3616-3621

- 86 Myler, P. J., Sisk, E., McDonagh, P. D., Martinez-Calvillo, S., Schnauffer, A., Sunkin, S. M., Yan, S., Madhubala, R., Ivens, A. and Stuart, K. (2000) Genomic organization and gene function in *Leishmania*. *Biochem Soc Trans.* **28**, 527-531
- 87 Ernest, I., Callens, M., Opperdoes, F. R. and Michels, P. A. (1994) Pyruvate kinase of *Leishmania mexicana mexicana*. Cloning and analysis of the gene, overexpression in *Escherichia coli* and characterization of the enzyme. *Mol Biochem Parasitol.* **64**, 43-54
- 88 Requena, J. M. (2011) Lights and shadows on gene organization and regulation of gene expression in *Leishmania*. *Front Biosci (Landmark Ed).* **16**, 2069-2085
- 89 Bastien, P., Blaineau, C. and Pages, M. (1992) *Leishmania*: sex, lies and karyotype. *Parasitol Today.* **8**, 174-177
- 90 Martinez-Calvillo, S., Vizuet-de-Rueda, J. C., Florencio-Martinez, L. E., Manning-Cela, R. G. and Figueroa-Angulo, E. E. (2010) Gene expression in trypanosomatid parasites. *J Biomed Biotechnol.* **2010**, 525241
- 91 McNicoll, F., Muller, M., Cloutier, S., Boilard, N., Rochette, A., Dube, M. and Papadopolou, B. (2005) Distinct 3'-untranslated region elements regulate stage-specific mRNA accumulation and translation in *Leishmania*. *J Biol Chem.* **280**, 35238-35246
- 92 Brotherton, M. C., Racine, G., Foucher, A. L., Drummelsmith, J., Papadopolou, B. and Ouellette, M. (2010) Analysis of stage-specific expression of basic proteins in *Leishmania infantum*. *J Proteome Res.* **9**, 3842-3853
- 93 Nardelli, S. C., Avila, A. R., Freund, A., Motta, M. C., Manhaes, L., de Jesus, T. C., Schenkman, S., Fragoso, S. P., Krieger, M. A., Goldenberg, S. and Dallagiovanna, B. (2007) Small-subunit rRNA processome proteins are translationally regulated during differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Eukaryot Cell.* **6**, 337-345
- 94 Cruz, A. K., Titus, R. and Beverley, S. M. (1993) Plasticity in chromosome number and testing of essential genes in *Leishmania* by targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**, 1599-1603
- 95 Leprohon, P., Legare, D., Raymond, F., Madore, E., Hardiman, G., Corbeil, J. and Ouellette, M. (2009) Gene expression modulation is associated with gene amplification, supernumerary chromosomes and chromosome loss in antimony-resistant *Leishmania infantum*. *Nucleic Acids Res.* **37**, 1387-1399
- 96 Ubeda, J. M., Legare, D., Raymond, F., Ouameur, A. A., Boisvert, S., Rigault, P., Corbeil, J., Tremblay, M. J., Olivier, M., Papadopolou, B. and Ouellette, M. (2008) Modulation of gene expression in drug resistant *Leishmania* is associated with gene amplification, gene deletion and chromosome aneuploidy. *Genome Biol.* **9**, R115
- 97 Papadaki, A., Politou, A. S., Smirlis, D., Kotini, M. P., Kourou, K., Papamarcaki, T. and Boleti, H. (2015) The *Leishmania donovani* histidine acid ecto-phosphatase LdMAcP: insight into its structure and function. *Biochem J*
- 98 Dermine, J. F., Scianimanico, S., Prive, C., Descoteaux, A. and Desjardins, M. (2000) *Leishmania* promastigotes require lipophosphoglycan to actively modulate the fusion properties of phagosomes at an early step of phagocytosis. *Cell Microbiol.* **2**, 115-126
- 99 Descoteaux, A. and Turco, S. J. (2002) Functional aspects of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan during macrophage infection. *Microbes Infect.* **4**, 975-981
- 100 Desjardins, M. and Descoteaux, A. (1997) Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. *J Exp Med.* **185**, 2061-2068
- 101 Scianimanico, S., Desrosiers, M., Dermine, J. F., Meresse, S., Descoteaux, A. and Desjardins, M. (1999) Impaired recruitment of the small GTPase rab7 correlates with the inhibition of phagosome maturation by *Leishmania donovani* promastigotes. *Cell Microbiol.* **1**, 19-32

- 102 Vinet, A. F., Fukuda, M., Turco, S. J. and Descoteaux, A. (2009) The *Leishmania donovani* lipophosphoglycan excludes the vesicular proton-ATPase from phagosomes by impairing the recruitment of synaptotagmin V. *PLoS Pathog.* **5**, e1000628
- 103 Winberg, M. E., Holm, A., Sarndahl, E., Vinet, A. F., Descoteaux, A., Magnusson, K. E., Rasmusson, B. and Lerm, M. (2009) *Leishmania donovani* lipophosphoglycan inhibits phagosomal maturation via action on membrane rafts. *Microbes Infect.* **11**, 215-222
- 104 Forestier, C. L., Gao, Q. and Boons, G. J. (2014) *Leishmania* lipophosphoglycan: how to establish structure-activity relationships for this highly complex and multifunctional glycoconjugate? *Front Cell Infect Microbiol.* **4**, 193
- 105 Isnard, A., Shio, M. T. and Olivier, M. (2012) Impact of *Leishmania* metalloprotease GP63 on macrophage signaling. *Front Cell Infect Microbiol.* **2**, 72
- 106 Olivier, M., Atayde, V. D., Isnard, A., Hassani, K. and Shio, M. T. (2012) *Leishmania* virulence factors: focus on the metalloprotease GP63. *Microbes Infect.* **14**, 1377-1389
- 107 Spath, G. F., Garraway, L. A., Turco, S. J. and Beverley, S. M. (2003) The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania* major infections in mammalian hosts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**, 9536-9541
- 108 Holm, A., Tejle, K., Magnusson, K. E., Descoteaux, A. and Rasmusson, B. (2001) *Leishmania donovani* lipophosphoglycan causes periphagosomal actin accumulation: correlation with impaired translocation of PKC α and defective phagosome maturation. *Cell Microbiol.* **3**, 439-447
- 109 Lodge, R. and Descoteaux, A. (2005) *Leishmania donovani* promastigotes induce periphagosomal F-actin accumulation through retention of the GTPase Cdc42. *Cell Microbiol.* **7**, 1647-1658
- 110 Liebl, D. and Griffiths, G. (2009) Transient assembly of F-actin by phagosomes delays phagosome fusion with lysosomes in cargo-overloaded macrophages. *J Cell Sci.* **122**, 2935-2945
- 111 Lodge, R., Diallo, T. O. and Descoteaux, A. (2006) *Leishmania donovani* lipophosphoglycan blocks NADPH oxidase assembly at the phagosome membrane. *Cell Microbiol.* **8**, 1922-1931
- 112 Brittingham, A., Morrison, C. J., McMaster, W. R., McGwire, B. S., Chang, K. P. and Mosser, D. M. (1995) Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. *J Immunol.* **155**, 3102-3111
- 113 Gomez, M. A., Contreras, I., Halle, M., Tremblay, M. L., McMaster, R. W. and Olivier, M. (2009) *Leishmania* GP63 alters host signaling through cleavage-activated protein tyrosine phosphatases. *Sci Signal.* **2**, ra58
- 114 Halle, M., Gomez, M. A., Stuibler, M., Shimizu, H., McMaster, W. R., Olivier, M. and Tremblay, M. L. (2009) The *Leishmania* surface protease GP63 cleaves multiple intracellular proteins and actively participates in p38 mitogen-activated protein kinase inactivation. *J Biol Chem.* **284**, 6893-6908
- 115 Walker, D. M., Oghumu, S., Gupta, G., McGwire, B. S., Drew, M. E. and Satoskar, A. R. (2014) Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites. *Cell Mol Life Sci.* **71**, 1245-1263
- 116 Peters, N. C., Egen, J. G., Secundino, N., Debrabant, A., Kimblin, N., Kamhawi, S., Lawyer, P., Fay, M. P., Germain, R. N. and Sacks, D. (2008) In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science.* **321**, 970-974

- 117 Laskay, T., van Zandbergen, G. and Solbach, W. (2003) Neutrophil granulocytes--Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends Microbiol.* **11**, 210-214
- 118 Pina-Vazquez, C., Reyes-Lopez, M., Ortiz-Estrada, G., de la Garza, M. and Serrano-Luna, J. (2012) Host-parasite interaction: parasite-derived and -induced proteases that degrade human extracellular matrix. *J Parasitol Res.* **2012**, 748206
- 119 Olivier, M., Gregory, D. J. and Forget, G. (2005) Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin Microbiol Rev.* **18**, 293-305
- 120 Cecilio, P., Perez-Cabezas, B., Santarem, N., Maciel, J., Rodrigues, V. and Cordeiro da Silva, A. (2014) Deception and manipulation: the arms of leishmania, a successful parasite. *Front Immunol.* **5**, 480
- 121 Bosetto, M. C. and Giorgio, S. (2007) *Leishmania amazonensis*: multiple receptor-ligand interactions are involved in amastigote infection of human dendritic cells. *Exp Parasitol.* **116**, 306-310
- 122 Alexander, J., Satoskar, A. R. and Russell, D. G. (1999) *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *J Cell Sci.* **112 Pt 18**, 2993-3002
- 123 Peters, C., Aebischer, T., Stierhof, Y. D., Fuchs, M. and Overath, P. (1995) The role of macrophage receptors in adhesion and uptake of *Leishmania mexicana* amastigotes. *J Cell Sci.* **108 (Pt 12)**, 3715-3724
- 124 Cunningham, A. C. (2002) Parasitic adaptive mechanisms in infection by leishmania. *Exp Mol Pathol.* **72**, 132-141
- 125 Alexander, J. and Brombacher, F. (2012) T helper1/t helper2 cells and resistance/susceptibility to leishmania infection: is this paradigm still relevant? *Front Immunol.* **3**, 80
- 126 Hunter, T. (1995) Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell.* **80**, 225-236
- 127 Parsons, M., Worthey, E. A., Ward, P. N. and Mottram, J. C. (2005) Comparative analysis of the kinomes of three pathogenic trypanosomatids: *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. *BMC Genomics.* **6**, 127
- 128 Brenchley, R., Tariq, H., McElhinney, H., Szoor, B., Huxley-Jones, J., Stevens, R., Matthews, K. and Taberner, L. (2007) The TriTryp phosphatome: analysis of the protein phosphatase catalytic domains. *BMC Genomics.* **8**, 434
- 129 Gregory, D. J. and Olivier, M. (2005) Subversion of host cell signalling by the protozoan parasite *Leishmania*. *Parasitology.* **130 Suppl**, S27-35
- 130 Gomes, M. T., Lopes, A. H. and Meyer-Fernandes, J. R. (2011) Possible roles of ectophosphatases in host-parasite interactions. *J Parasitol Res.* **2011**, 479146
- 131 Di Paolo, G. and De Camilli, P. (2006) Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature.* **443**, 651-657
- 132 King-Keller, S., Moore, C. A., Docampo, R. and Moreno, S. N. (2015) Ca²⁺ Regulation of *Trypanosoma brucei* Phosphoinositide Phospholipase C. *Eukaryot Cell*
- 133 Moreno, S. N., Docampo, R. and Vercesi, A. E. (1992) Calcium homeostasis in procyclic and bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. Lack of inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca²⁺ release. *J Biol Chem.* **267**, 6020-6026
- 134 Huang, G., Bartlett, P. J., Thomas, A. P., Moreno, S. N. and Docampo, R. (2013) Acidocalcisomes of *Trypanosoma brucei* have an inositol 1,4,5-trisphosphate receptor that is required for growth and infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **110**, 1887-1892
- 135 Swanson, J. A. (2014) Phosphoinositides and engulfment. *Cell Microbiol.* **16**, 1473-1483

- 136 Helms, J. B., de Vries, K. J. and Wirtz, K. W. (1991) Synthesis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in the endoplasmic reticulum of Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* **266**, 21368-21374
- 137 Bunney, T. D. and Katan, M. (2010) Phosphoinositide signalling in cancer: beyond PI3K and PTEN. *Nat Rev Cancer.* **10**, 342-352
- 138 Levin, R., Grinstein, S. and Schlam, D. (2014) Phosphoinositides in phagocytosis and macropinocytosis. *Biochim Biophys Acta*
- 139 Cullen, P. J., Cozier, G. E., Banting, G. and Mellor, H. (2001) Modular phosphoinositide-binding domains--their role in signalling and membrane trafficking. *Curr Biol.* **11**, R882-893
- 140 Brown, J. R. and Auger, K. R. (2011) Phylogenomics of phosphoinositide lipid kinases: perspectives on the evolution of second messenger signaling and drug discovery. *BMC Evol Biol.* **11**, 4
- 141 Vicinanza, M., D'Angelo, G., Di Campli, A. and De Matteis, M. A. (2008) Function and dysfunction of the PI system in membrane trafficking. *EMBO J.* **27**, 2457-2470
- 142 Pizarro-Cerda, J. and Cossart, P. (2004) Subversion of phosphoinositide metabolism by intracellular bacterial pathogens. *Nat Cell Biol.* **6**, 1026-1033
- 143 Bohdanowicz, M. and Grinstein, S. (2013) Role of phospholipids in endocytosis, phagocytosis, and macropinocytosis. *Physiol Rev.* **93**, 69-106
- 144 Pizarro-Cerda, J., Kuhbacher, A. and Cossart, P. (2014) Phosphoinositides and host-pathogen interactions. *Biochim Biophys Acta*
- 145 Le Roy, C. and Wrana, J. L. (2005) Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **6**, 112-126
- 146 Kutateladze, T. G. (2010) Translation of the phosphoinositide code by PI effectors. *Nat Chem Biol.* **6**, 507-513
- 147 Saleh, M. T. and Belisle, J. T. (2000) Secretion of an acid phosphatase (SapM) by *Mycobacterium tuberculosis* that is similar to eukaryotic acid phosphatases. *J Bacteriol.* **182**, 6850-6853
- 148 Mallo, G. V., Espina, M., Smith, A. C., Terebiznik, M. R., Aleman, A., Finlay, B. B., Rameh, L. E., Grinstein, S. and Brumell, J. H. (2008) SopB promotes phosphatidylinositol 3-phosphate formation on *Salmonella* vacuoles by recruiting Rab5 and Vps34. *J Cell Biol.* **182**, 741-752
- 149 Sadatomi, D., Tanimura, S., Ozaki, K. and Takeda, K. (2013) Atypical protein phosphatases: emerging players in cellular signaling. *Int J Mol Sci.* **14**, 4596-4612
- 150 Wei, W., Jiao, Y., Postlethwaite, A., Stuart, J. M., Wang, Y., Sun, D. and Gu, W. (2013) Dual-specificity phosphatases 2: surprising positive effect at the molecular level and a potential biomarker of diseases. *Genes Immun.* **14**, 1-6
- 151 Beresford, N., Saville, C., Bennett, H., Roberts, I. and Tabernero, L. (2010) A new family of phosphoinositide phosphatases in microorganisms: identification and biochemical analysis. *BMC Genomics.* **11**, 457
- 152 Sobhia, M. E., Paul, S., Shinde, R., Potluri, M., Gundam, V., Kaur, A. and Haokip, T. (2012) Protein tyrosine phosphatase inhibitors: a patent review (2002 - 2011). *Expert Opin Ther Pat.* **22**, 125-153
- 153 Heneberg, P. (2009) Use of protein tyrosine phosphatase inhibitors as promising targeted therapeutic drugs. *Curr Med Chem.* **16**, 706-733
- 154 Freitas-Mesquita, A. L. and Meyer-Fernandes, J. R. (2014) Ecto-nucleotidases and Ecto-phosphatases from *Leishmania* and *Trypanosoma* Parasites. *Subcell Biochem.* **74**, 217-252

- 155 Gottlieb, M. and Dwyer, D. M. (1981) Protozoan parasite of humans: surface membrane with externally disposed acid phosphatase. *Science*. **212**, 939-941
- 156 Fonseca-de-Souza, A. L., Dick, C. F., Dos Santos, A. L. and Meyer-Fernandes, J. R. (2008) A Mg(2+)-dependent ecto-phosphatase activity on the external surface of *Trypanosoma rangeli* modulated by exogenous inorganic phosphate. *Acta Trop*. **107**, 153-158
- 157 Cosentino-Gomes, D. and Meyer-Fernandes, J. R. (2011) Ecto-phosphatases in protozoan parasites: possible roles in nutrition, growth and ROS sensing. *J Bioenerg Biomembr*. **43**, 89-92
- 158 Glew, R. H., Czuczman, M. S., Diven, W. F., Berens, R. L., Pope, M. T. and Katsoulis, D. E. (1982) Partial purification and characterization of particulate acid phosphatase of *Leishmania donovani* promastigotes. *Comp Biochem Physiol B*. **72**, 581-590
- 159 Katakura, K. and Kobayashi, A. (1988) Acid phosphatase activity of virulent and avirulent clones of *Leishmania donovani* promastigotes. *Infect Immun*. **56**, 2856-2860
- 160 Singla, N., Khuller, G. K. and Vinayak, V. K. (1992) Acid phosphatase activity of promastigotes of *Leishmania donovani*: a marker of virulence. *FEMS Microbiol Lett*. **73**, 221-225
- 161 Remaley, A. T., Glew, R. H., Kuhns, D. B., Basford, R. E., Waggoner, A. S., Ernst, L. A. and Pope, M. (1985) *Leishmania donovani*: surface membrane acid phosphatase blocks neutrophil oxidative metabolite production. *Exp Parasitol*. **60**, 331-341
- 162 Saha, A. K., Das, S., Glew, R. H. and Gottlieb, M. (1985) Resistance of leishmanial phosphatases to inactivation by oxygen metabolites. *J Clin Microbiol*. **22**, 329-332
- 163 Shakarian, A. M., Joshi, M. B., Yamage, M., Ellis, S. L., Debrabant, A. and Dwyer, D. M. (2003) Members of a unique histidine acid phosphatase family are conserved amongst a group of primitive eukaryotic human pathogens. *Mol Cell Biochem*. **245**, 31-41
- 164 Shakarian, A. M., Joshi, M. B., Ghedin, E. and Dwyer, D. M. (2002) Molecular dissection of the functional domains of a unique, tartrate-resistant, surface membrane acid phosphatase in the primitive human pathogen *Leishmania donovani*. *J Biol Chem*. **277**, 17994-18001
- 165 Rigden, D. J. (2008) The histidine phosphatase superfamily: structure and function. *Biochem J*. **409**, 333-348
- 166 Das, S., Saha, A. K., Remaley, A. T., Glew, R. H., Dowling, J. N., Kajiyoshi, M. and Gottlieb, M. (1986) Hydrolysis of phosphoproteins and inositol phosphates by cell surface phosphatase of *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol*. **20**, 143-153
- 167 Bangs, J. D., Brouch, E. M., Ransom, D. M. and Roggy, J. L. (1996) A soluble secretory reporter system in *Trypanosoma brucei*. Studies on endoplasmic reticulum targeting. *J Biol Chem*. **271**, 18387-18393
- 168 Kotini, M., Papadaki, A., Smirlis, D., Soteriadou, K. and Boleti, H. (2009) Generation of transgenic *Leishmania donovani* expressing Red Fluorescent Protein: a tool for in vivo imaging of the parasite-host interaction. 60th Conference of Hellenic Society for Biochemistry and Molecular Biology. Athens, Greece
- 169 Zemanova, E., Jirku, M., Mauricio, I. L., Miles, M. A. and Lukes, J. (2004) Genetic polymorphism within the *leishmania donovani* complex: correlation with geographic origin. *Am J Trop Med Hyg*. **70**, 613-617
- 170 Haralambous, C., Antoniou, M., Pratlong, F., Dedet, J. P. and Soteriadou, K. (2008) Development of a molecular assay specific for the *Leishmania donovani* complex

- that discriminates *L. donovani*/Leishmania infantum zymodemes: a useful tool for typing MON-1. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **60**, 33-42
- 171 Smirlis, D., Boleti, H., Gaitanou, M., Soto, M. and Soteriadou, K. (2009) *Leishmania donovani* Ran-GTPase interacts at the nuclear rim with linker histone H1. *Biochem J.* **424**, 367-374
- 172 Kink, J. A. and Chang, K. P. (1988) N-glycosylation as a biochemical basis for virulence in *Leishmania mexicana amazonensis*. *Mol Biochem Parasitol.* **27**, 181-190
- 173 Brown, N. H. and Kafatos, F. C. (1988) Functional cDNA libraries from *Drosophila* embryos. *J Mol Biol.* **203**, 425-437
- 174 Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S. and Zumla, A. (2005) Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun.* **6**, 279-284
- 175 Schmittgen, T. D. and Livak, K. J. (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc.* **3**, 1101-1108
- 176 Ellson, C. D., Anderson, K. E., Morgan, G., Chilvers, E. R., Lipp, P., Stephens, L. R. and Hawkins, P. T. (2001) Phosphatidylinositol 3-phosphate is generated in phagosomal membranes. *Curr Biol.* **11**, 1631-1635
- 177 Papageorgiou, F. T. and Soteriadou, K. P. (2002) Expression of a novel *Leishmania* gene encoding a histone H1-like protein in *Leishmania* major modulates parasite infectivity in vitro. *Infect Immun.* **70**, 6976-6986
- 178 Beverley, S. M. and Clayton, C. E. (1993) Transfection of *Leishmania* and *Trypanosoma brucei* by electroporation. *Methods Mol Biol.* **21**, 333-348
- 179 Fratti, R. A., Chua, J. and Deretic, V. (2002) Cellubrevin alterations and *Mycobacterium tuberculosis* phagosome maturation arrest. *J Biol Chem.* **277**, 17320-17326
- 180 Lodge, R. and Descoteaux, A. (2008) *Leishmania* invasion and phagosome biogenesis. *Subcell Biochem.* **47**, 174-181
- 181 Moreira, D., Santarem, N., Loureiro, I., Tavares, J., Silva, A. M., Amorim, A. M., Ouassii, A., Cordeiro-da-Silva, A. and Silvestre, R. (2012) Impact of continuous axenic cultivation in *Leishmania infantum* virulence. *PLoS Negl Trop Dis.* **6**, e1469
- 182 de Sa Pinheiro, A. A., Amazonas, J. N., de Souza Barros, F., De Menezes, L. F., Batista, E. J., Silva, E. F., De Souza, W. and Meyer-Fernandes, J. R. (2007) *Entamoeba histolytica*: an ecto-phosphatase activity regulated by oxidation-reduction reactions. *Exp Parasitol.* **115**, 352-358
- 183 de Chaumont, F., Dallongeville, S., Chenouard, N., Herve, N., Pop, S., Provoost, T., Meas-Yedid, V., Pankajakshan, P., Lecomte, T., Le Montagner, Y., Lagache, T., Dufour, A. and Olivo-Marin, J. C. (2012) Icy: an open bioimage informatics platform for extended reproducible research. *Nat Methods.* **9**, 690-696
- 184 Macey, M. G., Jawad, N., McCarthy, D. A., Newland, A. C. and Brown, K. A. (2000) Flow cytometric analysis of different adhesion molecules expression on circulating CD14- and CD64- human dendritic cell precursors. *Immunobiology.* **202**, 59-67
- 185 Das, M., Mukherjee, S. B. and Shaha, C. (2001) Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *J Cell Sci.* **114**, 2461-2469
- 186 Harlow, E. and Lane, D. (1988) *Antibodies. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory.
- 187 Smirlis, D., Bisti, S. N., Xingi, E., Konidou, G., Thiakaki, M. and Soteriadou, K. P. (2006) *Leishmania* histone H1 overexpression delays parasite cell-cycle progression, parasite differentiation and reduces *Leishmania* infectivity in vivo. *Mol Microbiol.* **60**, 1457-1473
- 188 Voyiatzaki, C. S. and Soteriadou, K. P. (1992) Identification and isolation of the *Leishmania* transferrin receptor. *J Biol Chem.* **267**, 9112-9117

- 189 Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**, 680-685
- 190 Foucher, A. L., Papadopoulou, B. and Ouellette, M. (2006) Prefractionation by digitonin extraction increases representation of the cytosolic and intracellular proteome of *Leishmania infantum*. *J Proteome Res.* **5**, 1741-1750
- 191 Arnold K, B. L., Kopp J, Schwede T. (2006) The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*. **22**, 195-201
- 192 Laskowski, R. A., Moss, D. S. and Thornton, J. M. (1993) Main-chain bond lengths and bond angles in protein structures. *J Mol Biol.* **231**, 1049-1067
- 193 Luthy, R., Bowie, J. U. and Eisenberg, D. (1992) Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature*. **356**, 83-85
- 194 Romero, P., Obradovic, Z. and Dunker, A. K. (1997) Sequence data analysis for long disordered regions prediction in the Calcineurin family. . *Genome Inform. Ser. Workshop*. **8**, 110-124
- 195 Romero, P., Obradovic, Z., Li, X., Garner, E. C., Brown, C. J. and Dunker, A. K. (2001) Sequence complexity of disordered protein. *Proteins*. **42**, 38-48
- 196 Desjardins, M., Huber, L. A., Parton, R. G. and Griffiths, G. (1994) Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. *J Cell Biol.* **124**, 677-688
- 197 Steinberg, B. E. and Grinstein, S. (2008) Pathogen destruction versus intracellular survival: the role of lipids as phagosomal fate determinants. *J Clin Invest.* **118**, 2002-2011
- 198 Weber, S. S., Ragaz, C. and Hilbi, H. (2009) Pathogen trafficking pathways and host phosphoinositide metabolism. *Mol Microbiol.* **71**, 1341-1352
- 199 Descoteaux, A. and Turco, S. J. (1999) Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochim Biophys Acta.* **1455**, 341-352
- 200 Gabriel, C., McMaster, W. R., Girard, D. and Descoteaux, A. (2010) *Leishmania donovani* Promastigotes Evade the Antimicrobial Activity of Neutrophil Extracellular Traps. *J Immunol*
- 201 Lodge, R. and Descoteaux, A. (2005) Modulation of phagolysosome biogenesis by the lipophosphoglycan of *Leishmania*. *Clin Immunol.* **114**, 256-265
- 202 Vinet, A. F., Fukuda, M. and Descoteaux, A. (2008) The exocytosis regulator synaptotagmin V controls phagocytosis in macrophages. *J Immunol.* **181**, 5289-5295
- 203 Botelho, R. J. and Grinstein, S. (2011) Phagocytosis. *Curr Biol.* **21**, R533-538
- 204 Greenberg, S., el Khoury, J., di Virgilio, F., Kaplan, E. M. and Silverstein, S. C. (1991) Ca(2+)-independent F-actin assembly and disassembly during Fc receptor-mediated phagocytosis in mouse macrophages. *J Cell Biol.* **113**, 757-767
- 205 Lerm, M., Holm, A., Seiron, A., Samdahl, E., Magnusson, K. E. and Rasmusson, B. (2006) *Leishmania donovani* requires functional Cdc42 and Rac1 to prevent phagosomal maturation. *Infect Immun.* **74**, 2613-2618
- 206 Courret, N., Frehel, C., Gouhier, N., Pouchelet, M., Prina, E., Roux, P. and Antoine, J. C. (2002) Biogenesis of *Leishmania*-harbouring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites. *J Cell Sci.* **115**, 2303-2316
- 207 Rabinowitz, S., Horstmann, H., Gordon, S. and Griffiths, G. (1992) Immunocytochemical characterization of the endocytic and phagolysosomal compartments in peritoneal macrophages. *J Cell Biol.* **116**, 95-112
- 208 Grosshans, B. L., Ortiz, D. and Novick, P. (2006) Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**, 11821-11827

- 209 Gillingham, A. K., Sinka, R., Torres, I. L., Lilley, K. S. and Munro, S. (2014) Toward a comprehensive map of the effectors of rab GTPases. *Dev Cell*. **31**, 358-373
- 210 Zhang, M., Chen, L., Wang, S. and Wang, T. (2009) Rab7: roles in membrane trafficking and disease. *Biosci Rep*. **29**, 193-209
- 211 Vieira, O. V., Bucci, C., Harrison, R. E., Trimble, W. S., Lanzetti, L., Gruenberg, J., Schreiber, A. D., Stahl, P. D. and Grinstein, S. (2003) Modulation of Rab5 and Rab7 recruitment to phagosomes by phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Cell Biol*. **23**, 2501-2514
- 212 Harrison, R. E., Bucci, C., Vieira, O. V., Schroer, T. A. and Grinstein, S. (2003) Phagosomes fuse with late endosomes and/or lysosomes by extension of membrane protrusions along microtubules: role of Rab7 and RILP. *Mol Cell Biol*. **23**, 6494-6506
- 213 Powis, G., Bonjouklian, R., Berggren, M. M., Gallegos, A., Abraham, R., Ashendel, C., Zalkow, L., Matter, W. F., Dodge, J., Grindey, G. and et al. (1994) Wortmannin, a potent and selective inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase. *Cancer Res*. **54**, 2419-2423
- 214 Vlahos, C. J., Matter, W. F., Hui, K. Y. and Brown, R. F. (1994) A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem*. **269**, 5241-5248
- 215 Bain, J., Plater, L., Elliott, M., Shpiro, N., Hastie, C. J., McLauchlan, H., Klevernic, I., Arthur, J. S., Alessi, D. R. and Cohen, P. (2007) The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem J*. **408**, 297-315
- 216 Lemmon, M. A. (2008) Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **9**, 99-111
- 217 Halet, G. (2005) Imaging phosphoinositide dynamics using GFP-tagged protein domains. *Biol Cell*. **97**, 501-518
- 218 Saarikangas, J., Zhao, H. and Lappalainen, P. (2010) Regulation of the actin cytoskeleton-plasma membrane interplay by phosphoinositides. *Physiol Rev*. **90**, 259-289
- 219 Hilpela, P., Vartiainen, M. K. and Lappalainen, P. (2004) Regulation of the actin cytoskeleton by PI(4,5)P2 and PI(3,4,5)P3. *Curr Top Microbiol Immunol*. **282**, 117-163
- 220 Gillooly, D. J., Morrow, I. C., Lindsay, M., Gould, R., Bryant, N. J., Gaullier, J. M., Parton, R. G. and Stenmark, H. (2000) Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells. *EMBO J*. **19**, 4577-4588
- 221 Beresford, N. J., Mulhearn, D., Szczepankiewicz, B., Liu, G., Johnson, M. E., Fordham-Skelton, A., Abad-Zapatero, C., Cavet, J. S. and Tabernero, L. (2009) Inhibition of MptpB phosphatase from *Mycobacterium tuberculosis* impairs mycobacterial survival in macrophages. *J Antimicrob Chemother*. **63**, 928-936
- 222 Abul-Fadl, M. A. and King, E. J. (1948) The inhibition of acid phosphatase by D-tartrate. *Biochem J*. **42**, xxviii
- 223 Kieleczawa, J. (2006) Fundamentals of sequencing of difficult templates--an overview. *J Biomol Tech*. **17**, 207-217
- 224 Van Etten, R. L., Davidson, R., Stevis, P. E., MacArthur, H. and Moore, D. L. (1991) Covalent structure, disulfide bonding, and identification of reactive surface and active site residues of human prostatic acid phosphatase. *J Biol Chem*. **266**, 2313-2319
- 225 von Heijne, G. (2006) Membrane-protein topology. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **7**, 909-918
- 226 Chou, K. C. and Elrod, D. W. (1999) Prediction of membrane protein types and subcellular locations. *Proteins*. **34**, 137-153
- 227 Shakarian, A. M., Ellis, S. L., Mallinson, D. J., Olafson, R. W. and Dwyer, D. M. (1997) Two tandemly arrayed genes encode the (histidine) secretory acid phosphatases of *Leishmania donovani*. *Gene*. **196**, 127-137

- 228 Wiese, M., Berger, O., Stierhof, Y. D., Wolfram, M., Fuchs, M. and Overath, P. (1996) Gene cloning and cellular localization of a membrane-bound acid phosphatase of *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol.* **82**, 153-165
- 229 Sui, X. F., Kiser, T. D., Hyun, S. W., Angelini, D. J., Del Vecchio, R. L., Young, B. A., Hasday, J. D., Romer, L. H., Passaniti, A., Tonks, N. K. and Goldblum, S. E. (2005) Receptor protein tyrosine phosphatase micro regulates the paracellular pathway in human lung microvascular endothelia. *Am J Pathol.* **166**, 1247-1258
- 230 Agallou, M., Margaroni, M. and Karagouni, E. (2011) Cellular vaccination with bone marrow-derived dendritic cells pulsed with a peptide of *Leishmania infantum* KMP-11 and CpG oligonucleotides induces protection in a murine model of visceral leishmaniasis. *Vaccine.* **29**, 5053-5064
- 231 Basile, G. and Peticca, M. (2009) Recombinant protein expression in *Leishmania tarentolae*. *Mol Biotechnol.* **43**, 273-278
- 232 Cosentino-Gomes, D., Russo-Abraham, T., Fonseca-de-Souza, A. L., Ferreira, C. R., Galina, A. and Meyer-Fernandes, J. R. (2009) Modulation of *Trypanosoma rangeli* ecto-phosphatase activity by hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med.* **47**, 152-158
- 233 Takatsuki, A., Arima, K. and Tamura, G. (1971) Tunicamycin, a new antibiotic. I. Isolation and characterization of tunicamycin. *J Antibiot (Tokyo).* **24**, 215-223
- 234 LaCount, M. W., Handy, G. and Lebiada, L. (1998) Structural origins of L(+)-tartrate inhibition of human prostatic acid phosphatase. *J Biol Chem.* **273**, 30406-30409
- 235 Gottlieb, M. and Dwyer, D. M. (1981) *Leishmania donovani*: surface membrane acid phosphatase activity of promastigotes. *Exp Parasitol.* **52**, 117-128
- 236 Cedro Fernandes, E., Mauro Granjeiro, J., Mikio Taga, E., Meyer-Fernandes, J. R. and Aoyama, H. (2003) Phosphatase activity characterization on the surface of intact bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *FEMS Microbiol Lett.* **220**, 197-206
- 237 Schrag, J. D., Bergeron, J. J., Li, Y., Borisova, S., Hahn, M., Thomas, D. Y. and Cygler, M. (2001) The Structure of calnexin, an ER chaperone involved in quality control of protein folding. *Mol Cell.* **8**, 633-644
- 238 Shaner, N. C., Campbell, R. E., Steinbach, P. A., Giepmans, B. N., Palmer, A. E. and Tsien, R. Y. (2004) Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol.* **22**, 1567-1572
- 239 Bates, P. A., Hermes, I. and Dwyer, D. M. (1989) *Leishmania donovani*: immunochemical localization and secretory mechanism of soluble acid phosphatase. *Exp Parasitol.* **68**, 335-346
- 240 Gomez, M. A. and Olivier, M. (2010) Proteases and phosphatases during *Leishmania*-macrophage interaction: paving the road for pathogenesis. *Virulence.* **1**, 314-318
- 241 Handman, E. (1990) Study of *Leishmania* major-infected macrophages by use of lipophosphoglycan-specific monoclonal antibodies. *Infect Immun.* **58**, 2297-2302
- 242 Welin, A., Winberg, M. E., Abdalla, H., Sarndahl, E., Rasmusson, B., Stendahl, O. and Lerm, M. (2008) Incorporation of *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan into macrophage membrane rafts is a prerequisite for the phagosomal maturation block. *Infect Immun.* **76**, 2882-2887
- 243 Ruhland, A., Leal, N. and Kima, P. E. (2007) *Leishmania* promastigotes activate PI3K/Akt signalling to confer host cell resistance to apoptosis. *Cell Microbiol.* **9**, 84-96
- 244 Kamir, D., Zierow, S., Leng, L., Cho, Y., Diaz, Y., Griffith, J., McDonald, C., Merk, M., Mitchell, R. A., Trent, J., Chen, Y., Kwong, Y. K., Xiong, H., Vermeire, J., Cappello, M., McMahon-Pratt, D., Walker, J., Bernhagen, J., Lolis, E. and Bucala, R. (2008) A *Leishmania* ortholog of macrophage migration inhibitory factor modulates host macrophage responses. *J Immunol.* **180**, 8250-8261

- 245 Lambertz, U., Silverman, J. M., Nandan, D., McMaster, W. R., Clos, J., Foster, L. J. and Reiner, N. E. (2012) Secreted virulence factors and immune evasion in visceral leishmaniasis. *J Leukoc Biol.* **91**, 887-899
- 246 Bohdanowicz, M., Cosio, G., Backer, J. M. and Grinstein, S. (2010) Class I and class III phosphoinositide 3-kinases are required for actin polymerization that propels phagosomes. *J Cell Biol.* **191**, 999-1012
- 247 Champion, J. A. and Mitragotri, S. (2006) Role of target geometry in phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**, 4930-4934
- 248 Champion, J. A. and Mitragotri, S. (2009) Shape induced inhibition of phagocytosis of polymer particles. *Pharm Res.* **26**, 244-249
- 249 Doshi, N. and Mitragotri, S. (2010) Macrophages recognize size and shape of their targets. *PLoS One.* **5**, e10051
- 250 Sharma, G., Valenta, D. T., Altman, Y., Harvey, S., Xie, H., Mitragotri, S. and Smith, J. W. (2010) Polymer particle shape independently influences binding and internalization by macrophages. *J Control Release.* **147**, 408-412
- 251 Fernandes, A. C., Soares, D. C., Saraiva, E. M., Meyer-Fernandes, J. R. and Souto-Padron, T. (2013) Different secreted phosphatase activities in *Leishmania amazonensis*. *FEMS Microbiol Lett.* **340**, 117-128
- 252 Forestier, C. L., Machu, C., Loussert, C., Pescher, P. and Spath, G. F. (2011) Imaging host cell-*Leishmania* interaction dynamics implicates parasite motility, lysosome recruitment, and host cell wounding in the infection process. *Cell Host Microbe.* **9**, 319-330
- 253 Vida, T. A. and Emr, S. D. (1995) A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *J Cell Biol.* **128**, 779-792
- 254 Mullin, K. A., Foth, B. J., Ilgoutz, S. C., Callaghan, J. M., Zawadzki, J. L., McFadden, G. I. and McConville, M. J. (2001) Regulated degradation of an endoplasmic reticulum membrane protein in a tubular lysosome in *Leishmania mexicana*. *Mol Biol Cell.* **12**, 2364-2377
- 255 Jones, D. R., Ramirez, I. B., Lowe, M. and Divecha, N. (2013) Measurement of phosphoinositides in the zebrafish *Danio rerio*. *Nat Protoc.* **8**, 1058-1072
- 256 Kielkowska, A., Niewczas, I., Anderson, K. E., Durrant, T. N., Clark, J., Stephens, L. R. and Hawkins, P. T. (2014) A new approach to measuring phosphoinositides in cells by mass spectrometry. *Adv Biol Regul.* **54**, 131-141
- 257 Gottlieb, M. and Dwyer, D. M. (1982) Identification and partial characterization of an extracellular acid phosphatase activity of *Leishmania donovani* promastigotes. *Mol Cell Biol.* **2**, 76-81
- 258 Remaley, A. T., Das, S., Campbell, P. I., LaRocca, G. M., Pope, M. T. and Glew, R. H. (1985) Characterization of *Leishmania donovani* acid phosphatases. *J Biol Chem.* **260**, 880-886
- 259 Lovelace, J. K., Dwyer, D. M. and Gottlieb, M. (1986) Purification and characterization of the extracellular acid phosphatase of *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol.* **20**, 243-251
- 260 Doyle, P. S. and Dwyer, D. M. (1993) *Leishmania*: immunochemical comparison of the secretory (extracellular) acid phosphatases from various species. *Exp Parasitol.* **77**, 435-444
- 261 Shakarian, A. M. and Dwyer, D. M. (2000) Structurally conserved soluble acid phosphatases are synthesized and released by *Leishmania* major promastigotes. *Exp Parasitol.* **95**, 79-84
- 262 den Hertog, J., Groen, A. and van der Wijk, T. (2005) Redox regulation of protein-tyrosine phosphatases. *Arch Biochem Biophys.* **434**, 11-15

- 263 Waller, R. F. and McConville, M. J. (2002) Developmental changes in lysosome morphology and function *Leishmania* parasites. *Int J Parasitol.* **32**, 1435-1445
- 264 Pal, A., Hall, B. S., Nesbeth, D. N., Field, H. I. and Field, M. C. (2002) Differential endocytic functions of *Trypanosoma brucei* Rab5 isoforms reveal a glycosylphosphatidylinositol-specific endosomal pathway. *J Biol Chem.* **277**, 9529-9539
- 265 Lamarque, M., Tastet, C., Poncet, J., Demetree, E., Jouin, P., Vial, H. and Dubremetz, J. F. (2008) Food vacuole proteome of the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Proteomics Clin Appl.* **2**, 1361-1374
- 266 Ortlund, E., LaCount, M. W. and Lebioda, L. (2003) Crystal structures of human prostatic acid phosphatase in complex with a phosphate ion and alpha-benzylaminobenzylphosphonic acid update the mechanistic picture and offer new insights into inhibitor design. *Biochemistry.* **42**, 383-389
- 267 Prill, V., Lehmann, L., von Figura, K. and Peters, C. (1993) The cytoplasmic tail of lysosomal acid phosphatase contains overlapping but distinct signals for basolateral sorting and rapid internalization in polarized MDCK cells. *Embo J.* **12**, 2181-2193
- 268 Singh, H., Felts, R. L., Schuermann, J. P., Reilly, T. J. and Tanner, J. J. (2009) Crystal Structures of the histidine acid phosphatase from *Francisella tularensis* provide insight into substrate recognition. *J Mol Biol.* **394**, 893-904
- 269 Stierhof, Y. D., Wiese, M., Ilg, T., Overath, P., Haner, M. and Aebi, U. (1998) Structure of a filamentous phosphoglycoprotein polymer: the secreted acid phosphatase of *Leishmania mexicana*. *J Mol Biol.* **282**, 137-148
- 270 Ward, J. J., Sodhi, J. S., McGuffin, L. J., Buxton, B. F. and Jones, D. T. (2004) Prediction and functional analysis of native disorder in proteins from the three kingdoms of life. *J Mol Biol.* **337**, 635-645
- 271 Ferreira, G. C. and Pedersen, P. L. (1992) Overexpression of higher eukaryotic membrane proteins in bacteria. Novel insights obtained with the liver mitochondrial proton/phosphate symporter. *J Biol Chem.* **267**, 5460-5466
- 272 Wagner, S., Bader, M. L., Drew, D. and de Gier, J. W. (2006) Rationalizing membrane protein overexpression. *Trends Biotechnol.* **24**, 364-371
- 273 Wagner, S., Baars, L., Ytterberg, A. J., Klussmeier, A., Wagner, C. S., Nord, O., Nygren, P. A., van Wijk, K. J. and de Gier, J. W. (2007) Consequences of membrane protein overexpression in *Escherichia coli*. *Mol Cell Proteomics.* **6**, 1527-1550
- 274 Silverman, J. M., Chan, S. K., Robinson, D. P., Dwyer, D. M., Nandan, D., Foster, L. J. and Reiner, N. E. (2008) Proteomic analysis of the secretome of *Leishmania donovani*. *Genome Biol.* **9**, R35
- 275 Landfear, S. M. and Ignatushchenko, M. (2001) The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids. *Mol Biochem Parasit.* **115**, 1-17
- 276 Overath, P., Stierhof, Y. D. and Wiese, M. (1997) Endocytosis and secretion in trypanosomatid parasites - Tumultuous traffic in a pocket. *Trends Cell Biol.* **7**, 27-33
- 277 McConville, M. J., Mullin, K. A., Ilgoutz, S. C. and Teasdale, R. D. (2002) Secretory pathway of trypanosomatid parasites. *Microbiol Mol Biol Rev.* **66**, 122-154; table of contents
- 278 Hassani, K., Antoniak, E., Jardim, A. and Olivier, M. (2011) Temperature-induced protein secretion by *Leishmania mexicana* modulates macrophage signalling and function. *PLoS One.* **6**, e18724
- 279 Gannavaram, S., Dey, R., Avishek, K., Selvapandiyan, A., Salotra, P. and Nakhasi, H. L. (2014) Biomarkers of safety and immune protection for genetically modified live attenuated leishmania vaccines against visceral leishmaniasis - discovery and implications. *Front Immunol.* **5**, 241

- 280 Kink, J. A. and Chang, K. P. (1987) Tunicamycin-resistant *Leishmania mexicana amazonensis*: expression of virulence associated with an increased activity of N-acetylglucosaminyltransferase and amplification of its presumptive gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **84**, 1253-1257
- 281 Manna, P. T., Boehm, C., Leung, K. F., Natesan, S. K. and Field, M. C. (2014) Life and times: synthesis, trafficking, and evolution of VSG. *Trends Parasitol.* **30**, 251-258
- 282 Guha-Niyogi, A., Sullivan, D. R. and Turco, S. J. (2001) Glycoconjugate structures of parasitic protozoa. *Glycobiology*. **11**, 45R-59R
- 283 Witze, E. S., Old, W. M., Resing, K. A. and Ahn, N. G. (2007) Mapping protein post-translational modifications with mass spectrometry. *Nat Methods*. **4**, 798-806
- 284 Ilg, T., Overath, P., Ferguson, M. A., Rutherford, T., Campbell, D. G. and McConville, M. J. (1994) O- and N-glycosylation of the *Leishmania mexicana*-secreted acid phosphatase. Characterization of a new class of phosphoserine-linked glycans. *J Biol Chem*. **269**, 24073-24081
- 285 de Souza, W. (2002) Special organelles of some pathogenic protozoa. *Parasitol Res*. **88**, 1013-1025
- 286 Besteiro, S., Tonn, D., Tetley, L., Coombs, G. H. and Mottram, J. C. (2008) The AP3 adaptor is involved in the transport of membrane proteins to acidocalcisomes of *Leishmania*. *J Cell Sci*. **121**, 561-570
- 287 de Almeida-Amaral, E. E., Belmont-Firpo, R., Vannier-Santos, M. A. and Meyer-Fernandes, J. R. (2006) *Leishmania amazonensis*: characterization of an ecto-phosphatase activity. *Exp Parasitol*. **114**, 334-340
- 288 Lei, S. M., Romine, N. M. and Beetham, J. K. (2010) Population changes in *Leishmania chagasi* promastigote developmental stages due to serial passage. *J Parasitol*. **96**, 1134-1138
- 289 Martiny, A., Meyer-Fernandes, J. R., de Souza, W. and Vannier-Santos, M. A. (1999) Altered tyrosine phosphorylation of ERK1 MAP kinase and other macrophage molecules caused by *Leishmania amastigotes*. *Mol Biochem Parasitol*. **102**, 1-12
- 290 Raymond, F., Boisvert, S., Roy, G., Ritt, J. F., Legare, D., Isnard, A., Stanke, M., Olivier, M., Tremblay, M. J., Papadopoulou, B., Ouellette, M. and Corbeil, J. (2012) Genome sequencing of the lizard parasite *Leishmania tarentolae* reveals loss of genes associated to the intracellular stage of human pathogenic species. *Nucleic Acids Res*. **40**, 1131-1147
- 291 Tsigankov, P., Gherardini, P. F., Helmer-Citterich, M., Spath, G. F., Myler, P. J. and Zilberstein, D. (2014) Regulation dynamics of *Leishmania* differentiation: deconvoluting signals and identifying phosphorylation trends. *Mol Cell Proteomics*. **13**, 1787-1799
- 292 Roberts, S. C. (2011) The genetic toolbox for *Leishmania* parasites. *Bioeng Bugs*. **2**, 320-326
- 293 Fritsche, C., Sitz, M., Weiland, N., Breitling, R. and Pohl, H. D. (2007) Characterization of the growth behavior of *Leishmania tarentolae*: a new expression system for recombinant proteins. *J Basic Microbiol*. **47**, 384-393
- 294 Klatt, S. and Konthur, Z. (2012) Secretory signal peptide modification for optimized antibody-fragment expression-secretion in *Leishmania tarentolae*. *Microb Cell Fact*. **11**, 97
- 295 Vannier-Santos, M. A., Martiny, A., Meyer-Fernandes, J. R. and de Souza, W. (1995) Leishmanial protein kinase C modulates host cell infection via secreted acid phosphatase. *Eur J Cell Biol*. **67**, 112-119

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ I

Γενικά διαλύματα

PBS pH 7,4 (1 Lt), 10X	
NaCl	80 g
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	12 g
KCl	2 g
KH ₂ PO ₄	2 g

Versene pH 7,4 (1 Lt), 1X	
NaCl	8.0 g
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	1.2 g
KCl	0.2 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
EDTA	0.2 g

Διαλύματα ηλεκτροφόρησης DNA

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης TBE 10X, 1 Lt	
Tris	108 g
βορικό οξύ	55 g
0,5 M EDTA, pH 8	40 ml

Ρυθμιστικό διάλυμα «φόρτωσης» δείγματος DNA (loading buffer), 6X	
χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης	0,25% (w/v)
σουκρόζη	40% (w/v)

Διαλύματα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών (SDS-PAGE)

Διάλυμα ακρυλαμίδιου 30% (w/v) (100 ml)	
ακρυλαμίδιο	29,2 g
N,N-μεθυλεν-δισακρυλαμίδιο	0,8 g

Πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel) 10% ή 12% (w/v) (10 ml)	
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	2.5 ml
SDS 10% (w/v)	0,1 ml
διάλυμα ακρυλαμίδιου 30% (w/v)	3,3 ml (10%) ή 4 ml (12%)
υπερθειϊκό αμμώνιο 10% (w/v) (APS)	0,1 ml
TEMED	4 μl
dd H ₂ O	4 ml

Πήκτωμα συσσώρευσης (stacking gel) 4% (w/v) (5 ml)	
1 M Tris-HCl pH 6,8	0,63 ml
SDS 10% (w/v)	0,05 ml
διάλυμα ακρυλαμιδίου 30% (w/v)	0,83 ml
APS 10% (v/v)	50 µl
TEMED	5 µl
dd H ₂ O	3,4 ml

Διάλυμα «φόρτωσης» δείγματος πρωτεϊνών (5X Laemmli sample buffer)	
SDS	10% (w/v)
Tris- HCl, pH 6,8	300 mM
β- μερκαπτοαιθανόλη ή DTT	5% (v/v) ή 0.5M
γλυκερόλη	50% (v/v)
Μπλε της Βρωμοφαινόλης	0,005% (w/v)
dd H ₂ O	

Διάλυμα επαναχρησιμοποίησης μεμβράνης νιτροκυτταρίνης (stripping buffer, pH 2.2) (100 ml)	
Γλυκίνη	1,5 g
SDS	0.1 g
Tween-20 (100%)	1 ml
ddH ₂ O	

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Electrode buffer, pH 8,75), 10X, 1 Lt	
Tris-base	30,3 g
Γλυκίνη	144,16 g
SDS 10% (w/v)	1% (w/v)

Διάλυμα χρωματισμού (stain buffer)	
χρωστική Coomassie R-250	0,25% (w/v)
μεθανόλη	40% (v/v)
οξικό οξύ	10% (v/v)

Διάλυμα αποχρωματισμού (destain buffer)	
μεθανόλη	25% (v/v)
οξικό οξύ	7% (v/v)

Διαλύματα ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών (Western blotting)

Διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς πρωτεϊνών (Transfer buffer), 1X, 1 Lt	
Tris-base	2,4 g
Γλυκίνη	11,5 g
Μεθανόλη	20% (v/v)

Διάλυμα χρώσης νιτροκυτταρίνης Ponceau S	
Ponceau S	1 mg/ml
Οξικό οξύ	7% (v/v)

TBS pH 7,4, 10X, 1 Lt	
Tris	60,57g
NaCl	87,66g

Διάλυμα 3',3', διαμινοβενζιδίνης (DAB) για εμφάνιση Western blot	
TBS 1x	10 ml
DAB	100 μ l
Διάλυμα H ₂ O ₂ 30% (v/v)	6 μ l

Θρεπτικό Υλικό βακτηρίων

LB (Luria-Bertani, 1 Lt)	
NaCl	10 g
Bacto-tryptone	10 g
Yeast-extract	5 g

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II

Τα εναρκτήρια μόρια που χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση της *LdMacP* ή τμημάτων της.

Εναρκτήρια μόρια	Μήτρα DNA	Μέγεθος (bp)	Πλασμιδιακός φορέας	Είδος κυττάρου που εκφράστηκε
<u>5' BglII Forward:</u> 5'- GAA GAT CT CC ATG GCC TCG AAG CTC ATC CGT G -3' <u>3' XhoI 315 Reverse:</u> 5'- CTC GAG ATA CAC GCG AAA TGC ATG AAG -3'	<i>L. donovani</i> (στέλεχος LG13, MHOM/ET/00 00/HUSSEN)	963	pTriEx 1.1 (pTriEx-1,1-rLdMacP)	HeLa
<u>5' BglII Forward:</u> 5'- GA AGATCT CC ATGGCCTCGAAGCTCATCCG TG -3' <u>3' BglII Reverse:</u> 5'- GA AGATCT TCC TGA TCC TGA TGA TCC ATA CAC GCG AAA TGC ATG AAG -3'	pTriEx-1.1-rLdMacP	976	pLexsy-sat-mRFP1 (pLexsy-sat-rLdMacP-mRFP1)	<i>L. donovani</i>
<u>5' BglII Forward:</u> 5'- GA AGATCT CC ATG GCC TCG AAG CTC ATC CGT G -3' <u>3' XhoI 274 Reverse:</u> 5'- CCG CTC GAG GAG GCG GTT GGC GTT GAT GTT G -3'	pTriEx-1.1-rLdMacP	836	pTriEx 1.1 (pTriEx-1.1-rLdMacPsol)	<i>E. coli</i> (BL21)
<u>5' NcoI Forward:</u> 5' CCC ATG GCC TCG AAG CTC ATC CGT GTG 3' <u>3' KpnI Reverse:</u> 5' CGG GGTACC GCC CAA TTT ATA TAA GGC GGG GAG 3	<i>L. donovani</i> (στέλεχος LG13, MHOM/ET/00 00/HUSSEN)	872	pLexsy-sat2 (pLexsy-sat2-rLdMacPsol)	<i>L. tarentolae</i> (Parrot, στέλεχος Jena)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ - ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

a-	αντίσωμα
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
ATCC	American Type Culture Collection
bp	base pair
BSA	αλβουμίνη βοδινού ορού
Btk	Bruton's tyrosine kinase
CDC	Center of Control and Disease
CL	Cutaneous Leishmaniasis
DAB	3',3'-διαμινοβενζιδίνη
DALYs:	Disability Adjusted Life Years
DAT	άμεση συγκόλληση
DC	dendritic cells
dNTP	τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια
DSP	λιπιδικές φωσφατάσες διπλής εξειδίκευσης
ELISA	ανοσοενζυμική δοκιμή
Endo F	endonucleasidase F
Endo H	endonucleasidase H
ER	Ενδοπλασματικό Δίκτυο
FBS	fetal bovine serum
FSC	forward scattering
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GFP	Green fluorescent protein
HAcP	Histidine Acid Phosphatase
HIV	Human Immunodeficiency Virus
hPAP	Human Prostate Acid phosphatase
IFA	έμμεσος ανοσοφθορισμός
IFN-γ	Interferon gamma
IgG	γ-ανοσοσφαιρίνη
IL-10	interleukin 10
IPTG	ισοπροπυλο-β-D-1-θειογαλακτοπυρανόζη
Kb	1000 base pairs
LdMAcP	<i>Leishmania donovani</i> Membrane Acid Phosphatase
LPG	lipophosphoglycan
MAPK	mitogen activated protein kinases
MCL	Mucocutaneous Leishmaniasis

MLEE	Multilocus Enzyme Electrophoresis
MLMT	Multilocus Microsatellite Typing
MLST	Multilocus sequence typing
mRFP1	Red fluorescent protein
ORF	Open Reading Frame
p.i.	post infection
p40 ^{phox}	p40 ^{phox} υπομονάδα της NADPH οξειδάσης
PBS	phosphate buffer saline
PCR	αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
PGG	phoshoglycan
PI	phosphoinositide
pI	isoelectric point
PI	propidium iodide
PKDL	post-kala-azar dermal leishmaniasis
PLCδ	PLCδ phospholipase C δ1
PMSF	phenylmethanesulfonylfluoride
pNPP, pNP	p-νιτροφαινυλοφωσφορικό ανιόν, p-νιτροφαινόλη
PtdIns	phosphatidylinositol
qPCR	real time PCR
RLFP	restriction fragment length polymorphism
ROS	reactive oxygen species
rRNA	ribosomal RNA
SHIP	Src homology 2 domain phosphotyrosine phosphatase 1
SP	signal sequence
SSC	side scattering
V-ATPase	vesicular proton-ATPase
VL	Visceral Leishmaniasis
YFP	yellow fluorescent protein
αα	amino acids
KEEΛΠNO	Κέντρου Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων
MVBs	multivesicular bodies
Π.Ο.Υ	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας
TM	transmembrane
3D	3-dimensions, τρισδιάστατο μοντέλο

Συντμήσεις αμινοξέων

Ala	αλανίνη
Cys	κυστεΐνη
Asp	ασπαραγινικό οξύ
Glu	γλουταμινικό οξύ
Phe	φαινυλαλανίνη
Gly	γλυκίνη
His	ιστιδίνη
Ile	ισολευκίνη
Lys	λυσίνη
Leu	λευκίνη
Met	μεθειονίνη
Asn	ασπαραγίνη
Pro	προλίνη
Gln	γλουταμίνη
Arg	αργινίνη
Ser	σερίνη
Thr	θρεονίνη
Val	βαλίνη
Trp	τρυπτοφάνη
Tyr	τυροσίνη

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ
