



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ»**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Κλωνοποίηση, μοριακός και λειτουργικός χαρακτηρισμός
της υποθετικής φωσφατάσης φωσφοϊνοσιτιδίων, *LdPIPh22*, του
παρασιτικού πρωτοζώου
Leishmania donovani

Αναστασία Κοτοπούλη

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ

ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2014



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

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Κλωνοποίηση, μοριακός και λειτουργικός χαρακτηρισμός της υποθετικής φωσφατάσης φωσφοϊνοσιτιδίων, *LdPIPh22*, του παρασιτικού πρωτοζώου *Leishmania donovani*

Αναστασία Κοτοπούλη

A.M.: 61101

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ:

Ντία Γαλανοπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ντία Γαλανοπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, ΕΚΠΑ

Μαίρη Μαυρή, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, ΕΚΠΑ

Χαραλαμπία Μπολέτη, Ερευνήτρια Β, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 04/02/2014

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η Λεισμανίαση είναι ομάδα λοιμωδών ανθρωποζωνοσώων, με 1,6 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις σε ανθρώπους ανά έτος. Ο αιτιολογικός της παράγοντας είναι η μόλυνση από παρασιτικά πρωτόζωα του γένους *Leishmania*, τα οποία μεταδίδονται στον άνθρωπο από 30 περίπου είδη σκνίπας (ενδιάμεσος ξενιστής) των γενών *Phlebotomus* και *Lutzomyia*. Πλήττει, συνήθως, τους φτωχότερους ανθρώπους στον πλανήτη και συνδέεται με τον υποσιτισμό, τις μετακινήσεις πληθυσμών, τις κακές συνθήκες στέγασης, το αδύναμο ανοσοποιητικό σύστημα και την έλλειψη πόρων. Η θεραπεία της νόσου παρουσιάζει σοβαρές παρενέργειες, έχει υψηλό κόστος, ενώ η έλλειψη προστατευτικών εμβολίων και η ανάπτυξη αντοχής των παρασίτων σε κάποια από τα μέχρι σήμερα διαθέσιμα φάρμακα έχει ως αποτέλεσμα την ανάγκη για ανάπτυξη νέων και μη τοξικών φαρμάκων και εμβολίων.

Συγκεκριμένες φωσφατάσες του παρασίτου μπορούν να αποτελέσουν στόχο για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων, με αναστολή της δράσης τους. Οι φωσφατάσες, γενικότερα, αποτελούν μοριακούς στόχους σε θεραπείες ασθενειών, μολυσματικών ή μη, όμως στο παράσιτο *Leishmania* δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί η λειτουργία τους και δεν έχει μελετηθεί η ρύθμισή τους.

Το σύνολο των φωσφατασών των κινητοπλαστιδών (οικογένεια στην οποία ανήκουν τα είδη *Leishmania*) συμπεριλαμβάνει μεγάλο αριθμό υποθετικών φωσφατασών διπλής εξειδίκευσης (φωσφατάσες σερίνης/θρεονίνης και τυροσίνης) με σημαντικές, όμως, διαφορές στην προβλεπόμενη δομή τους από τις αντίστοιχες κλασσικές φωσφατάσες των ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών. Μία υποομάδα των φωσφατασών αυτών στα είδη *Leishmania*, που ορίζονται ως άτυπες φωσφατάσες λιπιδίων (ALP) και έχουν παρόμοια αλληλουχία στην περιοχή του βρόγχου P (HCXXGKDR) του καταλυτικού κέντρου με τον παράγοντα παθογένειας MptpB (φωσφατάση φωσφοϊνοσιτιδίων του βακτηρίου *M. tuberculosis*) εντοπίστηκε πρόσφατα με βιοπληροφορική μελέτη. Τα γονίδια των πρωτεϊνών αυτών απαντώνται σε γονιδιώματα βακτηρίων και κατώτερων ευκαρυωτικών, ενώ δεν ανιχνεύονται στα γονιδιώματα ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών.

Στην παρούσα εργασία μελετάται ένα μέλος της οικογένειας των ενζύμων αυτών από το μονοκύτταρο πρωτόζωο *Leishmania donovani* που είναι ο αιτιολογικός παράγοντας της σπλαχνικής Λεισμανίασης (Kala-Azar). Η ορθόλογη πρωτεΐνη στο *M. tuberculosis* είναι

μολυσματικός παράγοντας. Το γεγονός αυτό, καθώς και το ότι η ρύθμιση του μεταβολισμού των φωσφοϊνοσιτιδίων του ξενιστή αποτελεί σημαντικό μηχανισμό παθογένειας πολλών ανθρώπινων βακτηριακών παθογόνων, αποτέλεσε το κίνητρο ώστε να ξεκινήσει η μελέτη της υποθετικής φωσφατάσης φωσφοϊνοσιτιδίων *LdPIPh22* (*L. donovani* **P**hospho**I**nositide **P**hosphatase στο χρωμόσωμα **22**). Οι φωσφατάσες φωσφοϊνοσιτιδίων από βακτηριακά παθογόνα που συμμετέχουν στο μεταβολισμό φωσφοϊνοσιτιδίων του ξενιστή και δρουν ως μολυσματικοί παράγοντες θεωρούνται ελκυστικοί στόχοι αντιμικροβιακών φαρμάκων, κάτι που υπάρχει πιθανότητα να ισχύει και για την πρωτεΐνη *LdPIPh22*. Βιοπληροφορική ανάλυση Blast της αλληλουχίας του γονιδίου του ενζύμου *LdPIPh22* έδειξε την ύπαρξη ορθόλογων πρωτεϊνών σε όλα τα είδη *Leishmania* με υψηλή ομολογία στην αμινοξική αλληλουχία που σημαίνει ότι είναι πρωτεΐνη ζωτικής σημασίας για το παράσιτο. Επιπλέον, ανίχνευσε ορθόλογες πρωτεΐνες σε παθογόνα βακτήρια, όχι όμως σε ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου.

Κύριος στόχος του πειραματικού μέρους αυτής της εργασίας ήταν η δημιουργία μοριακών (πλασμίδια έκφρασης και αντισώματα) και κυτταρικών εργαλείων (διαγονιδιακά παράσιτα) για την μελέτη των βιοχημικών και λειτουργικών ιδιοτήτων της πρωτεΐνης *LdPIPh22*. Το γονίδιο *Ldriph22* ενισχύθηκε με PCR από γενωμικό DNA παρασίτων *Leishmania donovani* (στέλεχος LG13) και κλωνοποιήθηκε σε βακτηριακούς, ευκαρυωτικούς και λείσμανιακούς φορείς έκφρασης για υπερέκφραση σε βακτήρια, παράσιτα *L. donovani* και *L. tarentolae* και κυτταρικές σειρές θηλαστικών κυττάρων. Ο εντοπισμός και η υποκυτταρική κατανομή της πρωτεΐνης *LdPIPh22* έγινε σε κύτταρα *L. donovani* με έμμεσο ανοσοφθορισμό/μικροσκοπία και βιοχημικά με ανοσοαποτύπωση κατά Western πρωτεϊνικών κλασμάτων του παρασίτου. Και στις δύο μεθόδους χρησιμοποιήθηκαν ειδικά αντισώματα που κατασκευάστηκαν σε αυτή τη μελέτη. Με μικροσκοπία η πρωτεΐνη εντοπίστηκε στο σώμα του παρασίτου, περιπυρηνικά, στην περιοχή έκφυσης του μαστιγίου και γύρω από ενδοκυτταρικά κυστίδια καθώς και σε δομές που μοιάζουν με αυτές της ακτίνης. Βιοχημικά η *LdPIPh22* εντοπίστηκε σε πρωτεϊνικά κλάσματα εμπλουτισμένα σε μεμβρανικές και/ή κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες. Η δράση φωσφατάσης της *LdPIPh22* επιβεβαιώθηκε *in vitro* με την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη rN15-*LdPIPh22*-8His (*LdPIPh22* με ένα πρόσθετο 15-πεπτιδίο στο αμινοτελικό της άκρο και 8 ιστιδίνες στο C-τελικό άκρο) που απομονώθηκε από το διαλυτό μέρος βακτηριακού ομογενοποιημένου με χρωματογραφία υψηλής

συγγένειας. Η rN15-LdPIPh22-8His βρέθηκε ότι αποφωσφορυλιώνει το συνθετικό υπόστρωμα p-νιτροφαινυλο-φωσφορικό ανιόν (pNPP) με δραστηριότητα συγκρίσιμη με τιμές της βιβλιογραφίας για ομόλογη πρωτεΐνη. Ετερόλογη έκφρασή της rLdPIPh22-GFP ή rLdPIPh22-8His σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών, έδειξε ότι το ένζυμο εντοπίζεται σε περιοχές με έντονο πολυμερισμό της ακτίνης όπου τα φωσφοϊνοσιτίδια παίζουν σημαντικό ρόλο. Η μελέτη των βιοχημικών ιδιοτήτων της LdPIPh22 θα συνεχιστεί με έλεγχο της δραστηριότητας φωσφατάσης σε φυσικά πεπτιδικά ή λιπιδικά (φωσφοϊνοσιτίδια) υποστρώματα καθώς και έλεγχο της έκκρισής της από τα παράσιτα *L. donovani*.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Βιοχημεία, Παρασιτολογία

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: *Leishmania*, Λείσμανίαση, φωσφατάσες φωσφοϊνοσιτιδίων, αντι-παρασιτικά φάρμακα

ABSTRACT

Leishmaniasis is a group of anthroponozoonotic diseases with 1.6 million new cases per year in humans. The causative agent is the infection by parasitic protozoa of the genus *Leishmania*, which are transmitted by about 30 species of sandflies (vector) of the genus *Phlebotomus* and *Lutzomyia*. This group of diseases affects the poorest people on the planet and is associated with malnutrition, population displacement, poor housing, weak immune system and lack of resources. The treatment of the disease causes serious side effects, it is expensive, while the lack of vaccines and the resistance to some of the currently available drugs are causing the need for developing new and non-toxic drugs and vaccines.

Specific phosphatases of the parasites could be potential drug targets (inhibitors). Phosphatases, in general, are molecular targets in the treatment of different diseases, infectious or not, but in the *Leishmania* parasite their function is not yet clarified and their regulation has not been studied.

The kinetoplastids' (family to which the *Leishmania* species belong) phosphatome contains a large number of hypothetical dual specificity phosphatases (serine/threonine and tyrosine) with considerable divergence from classic dual-specificity phosphatases in higher eucaryotes (aDSPs). A subgroup of the aDSPs from *Leishmania* species with a similar catalytic P-loop to the *M. tuberculosis* virulence factor MptpB phosphoinositide (PI) phosphatase designated as atypical lipid phosphatases (ALPs) was recently described. These proteins are detected in bacteria and lower eukaryote genomes but not in higher eukaryote genomes.

This work studies one member of the ALP enzyme family from the unicellular protozoan parasite *Leishmania donovani*, the causative agent of visceral leishmaniasis (Kala-Azar). The orthologue protein of *M. tuberculosis* is a virulence factor. This and the fact that the interference in the regulation of the phosphoinositide metabolism of the host is an important pathogenicity mechanism of many human bacterial pathogens was the motivation of studying the putative phosphoinositide phosphatase *LdPIPh22* (*L. donovani* **P**hospho**I**nositide **P**hosphatase located in chromosome **22**). The bacterial phosphoinositide phosphatases known to interfere with host phosphoinositide metabolism and act as virulence factors are attractive antimicrobial drug targets and this is something that may also apply to the *LdPIPh22* protein. A Blast analysis of the

Ldpiph22 gene sequence revealed orthologues in all *Leishmania* species with high sequence identity, which means that this protein is vital for the parasite. Additionally, it has orthologues in pathogenic bacteria but not in higher eukaryotes, including the human species.

The main aim of this study was the generation of molecular (plasmids, antibodies) and cellular tools (transgenic parasites) in order to examine the biochemical and functional properties of the *LdPIPh22* protein. The *Ldpiph22* gene was amplified by PCR from the genomic DNA of *Leishmania donovani* parasites (LG13 strain) and cloned into bacterial, eukaryotic and *leishmanial* expression vectors for overexpression in bacterial, leishmanial (*L. donovani* and *L. tarentolae*) and several eukaryotic cell lines. Detection and subcellular localization of the protein in *L. donovani* cells were conducted by indirect immunofluorescence microscopy and biochemically by Western blotting after fractionation of total parasite proteins. The *LdPIPh22* protein was detected by specific antibodies, produced in the context of this study, for both methods, and localized on the parasite body, perinuclearly, on the flagellar pocket, around membrane vesicles and on structures resembling the parasite actin cytoskeleton. Biochemically, the *LdPIPh22* protein was found in protein fractions enriched in membrane and/or cytoskeletal proteins. The recombinant rN15-*LdPIPh22*-8His protein (with an additional 15-peptide in N-terminus and 8 histidines in the C-terminus), which was isolated from bacteria soluble extracts by high affinity chromatography, has phosphatase activity *in vitro*, with the ability to dephosphorylate the generic phosphatase substrate pNPP, with comparable activity values reported in the literature for a protein homologue. When the *LdPIPh22* was ectopically expressed as a GFP or an 8His tagged protein in mammalian tissue culture cells, it was localized on sites of dynamic actin polymerization, where phosphoinositides play important role.

This work is continued towards the exploration of the possibility that *LdPIPh22* is secreted by *L. donovani* parasites and of the biochemical properties of the *LdPIPh22* as a phosphatase, while the natural peptide and lipid (phosphoinositides) substrates and the substrate specificity are under investigation.

SUBJECT AREA: Biochemistry, Parasitology

KEYWORDS: *Leishmania*, Leishmaniasis, phosphoinositide phosphatases, anti-parasitic drugs

Στους γονείς μου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	24
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	26
1.1 Η Λεϊσμανίαση: κλινικές μορφές της ασθένειας - ομάδα ασθενειών	26
1.2 Το παράσιτο <i>Leishmania</i> : μορφολογικά στάδια, κύκλος ζωής και επιβίωση στον ξενιστή.....	28
1.3 Θεραπευτικές προσεγγίσεις της Λεϊσμανίασης – Προβλήματα.....	32
1.4 Νέοι θεραπευτικοί στόχοι και φάρμακα	34
1.4.1 Φωσφατάσες ως μοριακοί στόχοι για την ανάπτυξη αντι-παρασιτικών φαρμάκων	34
1.4.2 Εκκρινόμενες μικροβιακές φωσφατάσες ως μοριακοί στόχοι για την ανάπτυξη αντι-μικροβιακών φαρμάκων.....	36
1.4.3 Φωσφατάσες του παρασίτου <i>Leishmania</i>	38
1.4.4 Φωσφατάσες τυροσίνης, σερίνης/θρεονίνης και διπλής εξειδίκευσης.....	38
1.4.5 Φωσφατάσες φωσφοϊνοσιτιδίων και τριπλής εξειδίκευσης	38
1.4.6 Άτυπες φωσφατάσες λιπιδίων σε βακτήρια και κατώτερα ευκαρυωτικά	42
2. ΣΚΟΠΟΣ	44
3. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ.....	46
3.1 Βιοπληροφορική μελέτη του γονιδίου της πρωτεΐνης <i>LinPIPh22</i>	46
3.2 Απομόνωση γενωμικού DNA από παράσιτα <i>Leishmania donovani</i>	47
3.3 Κλωνοποίηση του γονιδίου της <i>LdPIPh22</i> σε πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης.....	49
3.3.1 Ενίσχυση του γονιδίου της <i>LdPIPh22</i> με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)	49

3.3.2	Μέτρηση της συγκέντρωσης του DNA	51
3.3.3	Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αгарόζης.....	52
3.3.4	Απομόνωση DNA από πηκτή αгарόζης (gel extraction)	54
3.3.5	Απομόνωση του DNA από το διάλυμα της αντίδρασης της PCR (PCR clean up)	56
3.3.6	Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες	56
3.3.7	Αποφωσφορυλίωση του DNA.....	58
3.3.8	Αντίδραση σύνδεσης του πλασμιδιακού φορέα με το ένθεμα (ligation)	59
3.3.9	Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων <i>E. coli</i> (στελέχη TOP10F' και BL21) με τη μέθοδο του θερμικού σοκ	60
3.3.10	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργεια μικρής έκτασης (miniprep).....	62
3.3.11	Αποθήκευση βακτηρίων σε διάλυμα γλυκερόλης (cryopreservation)	64
3.3.12	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργεια μεγάλης έκτασης (midiprep).....	64
3.4	Αλληλούχιση του DNA (Sequencing)	67
3.5	Έκφραση, απομόνωση και καθαρισμός ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών από βακτήρια	67
3.5.1	Έκφραση της <i>LdPIPh22</i> σε βακτήρια έκφρασης BL21.....	67
3.5.2	Επαγωγή της έκφρασης της <i>LdPIPh22</i> σε βακτήρια έκφρασης BL2169	
3.5.3	Απομόνωση και καθαρισμός της <i>LdPIPh22</i> -8His από βακτήρια.....	69
3.6	Ενζυμική δοκιμασία δραστηριότητας φωσφατάσης	72
3.7	Ανοσοαποτύπωση Western (western blot)	74
3.7.1	Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου με SDS (SDS-PAGE)	74

3.7.2	Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης	78
3.7.3	Ανοσοενζυμική ανίχνευση πρωτεϊνών	79
3.8	Αποδέσμευση αντισωμάτων και επαναχρησιμοποίηση της μεμβράνης ..	82
3.9	Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford.....	82
3.10	Κυτταροκαλλιέργειες	83
3.10.1	Παράσιτα	83
3.10.2	Κυτταρικές σειρές ανώτερων ευκαρυωτικών κυττάρων	85
3.11	Ηλεκτροδιάτρηση παρασίτων.....	85
3.12	Κλασμάτωση πρωτεϊνών με τη χρήση του απορρυπαντικού διγιτονίνης (digitonin fractionation)	88
3.13	Απομόνωση του συνόλου των εκκρινόμενων πρωτεϊνών από καλλιέργεια παρασίτων	91
3.14	Επιμόλυνση ανώτερων ευκαρυωτικών κυττάρων	93
3.15	Προετοιμασία των κυττάρων HeLa για έλεγχο με ανοσοαποτύπωση Western (ομογενοποίηση κυττάρων)	95
3.16	Μονιμοποίηση κυττάρων και μικροσκοπία φθορισμού.....	96
3.17	Παραγωγή πολυκλωνικών αντισωμάτων έναντι της rLdPIPh22 από κουνέλι και ποντίκι	99
3.17.1	Ανοσοποίηση.....	99
3.17.2	Καθαρισμός αντισώματος με χρωματογραφία υψηλής συγγένειας από μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.....	101
3.17.3	Καθαρισμός αντισώματος με χρωματογραφία στήλης υψηλής συγγένειας.....	102
4.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	106
4.1	Κλωνοποίηση του γονιδίου της πρωτεΐνης LdPIPh22 από το παράσιτο <i>L. donovani</i> (στέλεχος LG13) σε πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης	106
4.1.1	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	106

4.1.2	Ενσωμάτωση του γονιδίου <i>Ldriph22</i> στους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης	111
4.1.3	Απομόνωση θετικών κλώνων κυττάρων <i>E. coli</i> που περιέχουν τα πλασμίδια pTriex1.1- <i>Ldriph22</i> -8His, pF4X1-4sat- <i>Ldriph22</i> -mRFP και pEGFP-N3- <i>Ldriph22</i>	117
4.1.4	Ταυτοποίηση της αλληλουχίας θετικών κλώνων και βιοπληροφορική ανάλυση της αλληλουχίας του <i>Ldriph22</i>	120
4.2	Έκφραση, έλεγχος της διαλυτότητας και απομόνωση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης r <i>LdPIPh22</i> -8His από κύτταρα <i>E. coli</i>	124
4.3	Προσδιορισμός της δράσης της rN15- <i>LdPIPh22</i> -8His ως φωσφατάσης	131
4.4	Παραγωγή ειδικού πολυκλωνικού αντισώματος anti-rN15 <i>LdPIPh22</i> από κουνέλι και ποντίκια	133
4.5	Διερεύνηση της έκφρασης της ενδογενούς <i>LdPIPh22</i> σε παράσιτα <i>Leishmania donovani</i> και του υποκυτταρικού εντοπισμού της.....	137
4.5.1	Εντοπισμός με έμμεσο ανοσοφθορισμό	137
4.5.2	Κατασκευή διαγονιδιακών παρασίτων <i>L. donovani</i> και <i>L. tarentolae</i> που υπερεκφράζουν την r <i>LdPIPh22</i> -mRFP	139
4.5.3	Βιοχημικός υποκυτταρικός εντοπισμός της ενδογενούς <i>LdPIPh22</i> και της ανασυνδυασμένης r <i>LdPIPh22</i> -mRFP.....	142
4.6	Έλεγχος για έκκριση της πρωτεΐνης <i>LdPIPh22</i> από το παράσιτο	147
4.7	Ετερόλογη έκφραση της r <i>LdPIPh22</i> -GFP σε ανώτερα ευκαρυωτικά κύτταρα.....	148
4.7.1	Βιοχημικός υποκυτταρικός εντοπισμός.....	148
4.7.2	Εντοπισμός της <i>LdPIPh22</i> με έμμεσο ανοσοφθορισμό και μικροσκοπία φθορισμού.....	151
5.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	156
6.	ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ-ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ	162
	ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....	166

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 3.1. Γραφική αναπαράσταση της ενζυμικής αντίδρασης αποφωσφορυλίωσης του υποστρώματος pNPP.....	73
Σχήμα 3.2. Καμπύλη αναφοράς p-νιτροφαινόλης.....	73
Σχήμα 3.3. Καμπύλη ανάπτυξης διαγονιδιακών παρασίτων <i>L. tarentolae</i> συναρτήσει της οπτικής απορρόφησης των κυττάρων στα 600 nm	84
Σχήμα 3.4. Καμπύλη ανάπτυξης διαγονιδιακών παρασίτων <i>L. tarentolae</i> συναρτήσει κυττάρων/mL	85
Σχήμα 3.6. Διάγραμμα Venn που παρουσιάζει τον υποθετικό υποκυτταρικό εντοπισμό των πρωτεϊνών που προκύπτουν από την κλασμάτωση με διγιτονίνη [60]. Στο διαλυτό κλάσμα 1 και 2 ανακτώνται κυρίως διαλυτές πρωτεΐνες. Στο κλάσμα 3 ανακτώνται κυρίως πρωτεΐνες μεμβρανικών οργανιδίων και στο κλάσμα 4 μιτοχονδρίων. Η ανάλυση έγινε με φασματομετρία μάζας	89
Σχήμα 4.1. Έλεγχος της rN15-LdPIPh22-8His για δράση φωσφατάσης σε τιμές pH 4-8. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στους 37° C. Στο pH 6 η αντίδραση πραγματοποιήθηκε και στους 25° C. Η απορρόφηση που παρουσιάζεται για κάθε τιμή pH είναι μέση τιμή από 2 μετρήσεις. Οι τιμές του σφάλματος έχουν προκύψει από 4 διαφορετικά πειράματα που έγιναν με πρωτεΐνη που απομονώθηκε από 3 διαφορετικές παρτίδες.....	132
Σχήμα 4.2. Ποσοτικοποίηση της έντασης της χρώσης της εικόνας 4.35 (A) με το λογισμικό ανάλυσης εικόνας Fiji	145

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1. Εκκρινόμενες φωσφατάσες παθογόνων βακτηρίων και ο ρόλος τους στην αλληλεπίδραση παθογόνου-ξενιστή [55].....	37
Πίνακας 1.2. Φωσφατάσες των φωσφοϊνοσιτιδίων (τα υποστρώματα που θεωρούνται ότι αποφωσφορυλιώνουν οι φωσφατάσες <i>in vivo</i> ή τα φυσιολογικά υποστρώματα παρουσιάζονται με έντονα γράμματα) [72].....	40
Πίνακας 3.1. Μίγμα αντίδρασης PCR.....	51
Πίνακας 3.2. Πηκτή διαχωρισμού	76
Πίνακας 3.3. Πηκτή επιστοίβασης	76
Πίνακας 3.4. Αντιδραστήρια επιμόλυνσης ευκαρυωτικών κυττάρων	95
Πίνακας 4.1. Εκκινητές PCR.....	107
Πίνακας 4.2. Συνολική ποσότητα πρωτεΐνης που απομονώθηκε στα πειράματα έκφρασης της πρωτεΐνης rN15-LdPIPh22-8His σε βακτήρια, σε καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας (2 L). Ο αριθμός των κυττάρων υπολογίστηκε, με βάση την αντιστοίχιση που ορίζεται από το φασματοφωτόμετρο, OD ₆₀₀ =1 αντιστοιχεί σε 5×10^8 κύτταρα. Μέσος όρος από 1) 2 διαφορετικά πειράματα, 2) 5 διαφορετικά πειράματα, 3) ένα πείραμα.....	131
Πίνακας 4.3. Τιμές δραστηριότητας του ενζύμου rN15-LdPIPh22-8His σε δοκιμασίες δράσης φωσφατάσης, σε θερμοκρασία 37° C και pH 6, από 4 διαφορετικά πειράματα απομόνωσης και καθαρισμού του ενζύμου rN15-LdPIPh22-8His.....	133

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1. Κορίτσι με δερματική (αριστερά), αγόρι με σπλαχνική Λείσμανίαση (κέντρο) και βλεννογονοδερματική Λείσμανίαση (δεξιά)	27
Εικόνα 1.2. Εικόνες των ασπόνδυλων ξενιστών <i>Phlebotomus</i> (αριστερά) και <i>Lutzomyia</i> (δεξιά) ...	27
Εικόνα 1.3. Περιοχές με υψηλό κίνδυνο εμφάνισης σπλαχνικής και δερματικής Λείσμανίασης (http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index.html)	27
Εικόνα 1.4. Αλλαγή της μορφής του παρασίτου <i>Leishmania</i> κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής. Α. Εικόνα ηλεκτρονικού μικροσκοπίου των τριών διαφορετικών μορφών του παρασίτου. Τα προμαστιγωτά είναι από καλλιέργεια κυττάρων <i>in vitro</i> και η αμαστιγωτή μορφή είναι απομονωμένη από μολυσμένο ποντίκι. Β. Σχηματική αναπαράσταση των κύριων ενδοκυτταρικών οργανιδίων ενός προμαστιγωτού (αριστερά) και ενός αμαστιγωτού παρασίτου (δεξιά). Η θήκη του μαστιγίου αποτελεί το πρόσθιο άκρο του κυττάρου [18]	29
Εικόνα 1.5. Κύκλος ζωής του παρασίτου <i>Leishmania</i> στον ασπόνδυλο και σπονδυλωτό ξενιστή [19]	30
Εικόνα 1.6. Στάδια σχηματισμού και ωρίμανσης του φαγοσώματος. Ι. Πρόσδεση του μικροοργανισμού στον υποδοχέα, ΙΙ. Σχηματισμός ψευδοποδίων και εγκόλπωση του μικροοργανισμού, ΙΙΙ-VI. Σχηματισμός φαγοσώματος, σύντηξη με το λυσόσωμα, σχηματισμός φαγολυσοσώματος [24]	31
Εικόνα 1.7. Φάρμακα κατά της Λείσμανίασης	34
Εικόνα 1.8. Φάρμακα-αναστολείς πρωτεϊνικών φωσφατάσων	35
Εικόνα 1.9. Μεταβολισμός φωσφοϊνοσιτιδίων [74]	41
Εικόνα 1.10. Το μοτίβο του βρόγχου P [82]	42
Εικόνα 1.11. Οργάνωση υποτομών στις φωσφατάσες λιπιδίων (φωσφοϊνοσιτιδίων). Οι φωσφατάσες τύπου PTEN και MTM περιέχουν τμήμα PTP και πρόσδεσης φωσφοϊνοσιτιδίων, όπως PH-GRAM, C2 και FYVE που προκαλούν αλλοστερικό έλεγχο και βρίσκονται στο τμήμα PTP σε διαφορετικά σημεία της μεμβράνης. Οι ALP και PFA δεν παρουσιάζουν κλασσικά σημεία πρόσδεσης φωσφοϊνοσιτιδίων, εκτός της Lm01800 (LipA) που περιέχει μία προβλεπόμενη αλληλουχία πρόσδεσης φωσφοϊνοσιτιδίων [81]. Η LM1 είναι η ομόλογη φωσφατάση της <i>LdPIPh22</i> που μελετάται στην παρούσα εργασία από το παράσιτο <i>L. major</i>	43
Εικόνα 3.1. Α. Αλληλεπίδραση γειτονικών καταλοίπων ιστιδινών της ετικέτας με το σύμπλοκο Ni-NTA (http://www.chemie.fuberlin.de/chemistry/bio/aminoacid/histidin_en.html), Β. Δομή του NTA προσδεσμένου στο σφαιρίδιο αгарόζης, σε σύμπλοκο με το ιόν του Ni^{2+}	71
Εικόνα 3.2. Το μόριο της διγτονίνης	89
Εικόνα 4.1. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1% των προϊόντων των αντιδράσεων της PCR, με ανάστροφο εκκινητή κατάλληλο για το φορέα 1) pTriex1.1, 2) pF4X1-4sat-mRFP, 3) pEGFP-N3. Μ) μάρτυρας μοριακών μεγεθών	110
Εικόνα 4.2. Οι θέσεις περιορισμού για κλωνοποίηση γονιδίων στον πλασμιδιακό φορέα pTriex1.1 καθώς και ρυθμιστικά στοιχεία για έκφραση των εισαχθέντων γονιδίων σε προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά συστήματα. Παρουσιάζεται επίσης η αλληλουχία που κωδικοποιεί τη μοριακή ετικέτα των 8 ιστιδινών (His-Tag). Σε πλαίσιο είναι η αλληλουχία που κωδικοποιεί το πρόσθετο 15-πεπτίδιο	112
Εικόνα 4.3. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1% w/v των προϊόντων της αντίδρασης σύνδεσης (ligation). Μ) μάρτυρας μοριακών μεγεθών (Kb)	112
Εικόνα 4.4. Χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pTriex1.1	113
Εικόνα 4.5. Πλασμιδιακός φορέας pF4X1-4sat-mRFP και θέσεις κλωνοποίησης. Η αλληλουχία του γονιδίου <i>Ldriph22</i> εισήχθη στη θέση BglII	114

Εικόνα 4.6. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% των προϊόντων της αντίδρασης σύνδεσης (ligation). M) μάρτυρας μοριακών μεγεθών (Kb).....	115
Εικόνα 4.7. Θέσεις κλωνοποίησης στον πλασμιδιακό φορέα pEGFP-N3.....	116
Εικόνα 4.8. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% των προϊόντων της αντίδρασης σύνδεσης (ligation). M) μάρτυρας μοριακών μεγεθών (Kb), N) αρνητικός μάρτυρας (ο φορέας χωρίς ένθεμα), 5/1 και 3/1 οι αναλογίες ενθέματος/φορέα.....	116
Εικόνα 4.9. Πλασμιδιακός φορέας pEGFP-N3.....	117
Εικόνα 4.10. Ηλεκτροφόρηση της αντίδρασης διπλής πέψης με τα ένζυμα BglII/XhoI σε πηκτή αγαρόζης 1%. M) μοριακός μάρτυρας (bp), 1-20) πλασμιδία pTriex1.1-Ldriph22-8His από τις 20 αποικίες μετά από την πέψη. Για αλληλούχηση επιλέχθηκαν οι κλώνοι 5 και 13 από τους συνολικά τρεις θετικούς κλώνους με ένθεμα 782 ζευγών βάσεων	118
Εικόνα 4.11. Αναμενόμενη εμφάνιση των ζωνών του πλασμιδίου pTriex1.1-Ldriph22-8His μετά τη διπλή πέψη, όπως αναφέρεται στην προηγούμενη εικόνα, σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v, σύμφωνα με τον υπολογιστικό αλγόριθμο της εταιρείας New England Biolabs (http://tools.neb.com/NEBcutter2/), M) μοριακός μάρτυρας (Kb).....	118
Εικόνα 4.12. Α. Ηλεκτροφόρηση της αντίδρασης πέψης του πλασμιδίου pF4X1-4sat-Ldriph22-mRFP με το ένζυμο BglII σε πηκτή αγαρόζης 1%. M) μοριακός μάρτυρας (Kb), 1-10) πλασμιδιακό DNA pF4X1-4sat-Ldriph22-mRFP από 10 αποικίες μετά από πέψη. Για αλληλούχηση επιλέχθηκαν οι κλώνοι 2 και 4 από τους συνολικά τέσσερις θετικούς κλώνους (2, 4, 5, 7) με ένθεμα 791 ζευγών βάσεων που αφορά στο ένθεμα του γονιδίου Ldriph22, Β. Αντίδραση διπλής πέψης με τα ένζυμα XhoI/BspHI σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v, 2, 4) οι θετικοί κλώνοι pF4X1-4sat-Ldriph22 2 και 4 που επιλέχθηκαν για αλληλούχηση μετά από πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα BspHI και XhoI	119
Εικόνα 4.13. Αναμενόμενη εμφάνιση των ζωνών του πλασμιδίου pF4X1-4sat-Ldriph22-mRFP μετά την πέψη, όπως αναφέρεται στην εικόνα 4.12, σύμφωνα με τον υπολογιστικό αλγόριθμο της εταιρείας New England Biolabs (http://tools.neb.com/NEBcutter2/). M) μοριακός μάρτυρας (Kb) και (bp)	119
Εικόνα 4.14. Ηλεκτροφόρηση της αντίδρασης διπλής πέψης με τα ένζυμα BglII/EcoRI σε πηκτή αγαρόζης 1%. M) μοριακός μάρτυρας (bp), 1-20) πλασμιδιακό DNA pEGFP-N3-Ldriph22 από 20 αποικίες μετά την πέψη. Για αλληλούχηση επιλέχθηκαν οι κλώνοι 16 και 19 από τους συνολικά οκτώ θετικούς κλώνους με ένθεμα 789 ζευγών βάσεων	120
Εικόνα 4.15. Αναμενόμενη εμφάνιση των ζωνών του πλασμιδίου pEGFP-N3-Ldriph22 μετά τη διπλή πέψη, όπως αναφέρεται στην προηγούμενη εικόνα, σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v, σύμφωνα με τον υπολογιστικό αλγόριθμο της εταιρείας New England Biolabs (http://tools.neb.com/NEBcutter2/), M) μοριακός μάρτυρας (Kb).....	120
Εικόνα 4.16. Σύγκριση των αλληλουχιών των ομόλογων με το γονίδιο Ldriph22 στο στέλεχος BPK282A1 (<i>L. donovani</i>) και στο είδος <i>L. infantum</i> , με το πρόγραμμα ClustalW2 μετά την αλληλούχηση του γονιδίου Ldriph22 του στελέχους LG13 (<i>L. donovani</i>).....	121
Εικόνα 4.17. Σύγκριση των αλληλουχιών των ορθόλογων με την LdPIPh22 πρωτεϊνών, στα είδη <i>L. donovani</i> , <i>L. infantum</i> , <i>L. major</i> Friedlin, <i>L. mexicana</i> , <i>L. tarentolae</i> Parrot-TarII. Σε πλαίσιο παρουσιάζεται η αλληλουχία του βρόγχου P. Οι περιγεγραμμένες περιοχές υποδεικνύουν τις αμινοξικές διαφορές.....	122
Εικόνα 4.18. Σύγκριση αλληλουχιών των ομόλογων με την LdPIPh22 πρωτεϊνών, από τα παθογόνα βακτήρια <i>M. tuberculosis</i> (MtpB), <i>L. monocytogenes</i> (Imo1935 και Imo1800), <i>Y. pestis</i> και <i>B. anthracis</i> . Σε πλαίσιο παρουσιάζεται η αλληλουχία του βρόγχου P. Οι περιγεγραμμένες περιοχές περικλείουν συντηρημένα αμινοξέα	123
Εικόνα 4.19. Πρόβλεψη δραστικότητας φωσφατάσης από το ηλεκτρονικό πρόγραμμα Scan Prosite. Με κίτρινο έχει τονιστεί η περιοχή του ενεργού κέντρου και με έντονα γράμματα η περιοχή του βρόγχου P	124
Εικόνα 4.20. Προσδιορισμός του ποσοστού του διαλυτού κλάσματος της rLdPIPh22-8His σε βακτηριακό ομογενοποίημα <i>E. coli</i> BL21 μετά από επώαση 16 ωρών με επαγωγή (IPTG 0,1 mM), με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 10% (Α) και 12% (Β,Γ), ανοσοαποτύπωση Western και εμφάνιση	

με χρωμομετρική μέθοδο ανάπτυξης με αντιδραστήριο DAB: 1) ολικό ομογενοποίηση βακτηρίων, 2) υπερκείμενο μετά από φυγοκέντρηση του ολικού ομογενοποιημένου, 3) ίζημα μετά τη φυγοκέντρηση. Η ανίχνευση της πρωτεΐνης rLdPIPh22-8His έγινε με επώαση με αντι-LdPIPh22 ορό ποντικού σε αραιώση 1:1200. Ίσος όγκος δείγματος έχει φορτωθεί σε κάθε πηγάδι της πηκτής πολυακρυλαμιδίου. Μ) Μοριακοί μάρτυρες (KDa) 125

Εικόνα 4.21. Προσδιορισμός του ποσοστού του διαλυτού κλάσματος της rN15-LdPIPh22-8His σε βακτηριακό ομογενοποίηση *E. coli* BL21 μετά από επώαση 3 ωρών στους 37° C με επαγωγή. Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 12% και χρώση με Coomassie Blue. Μ) Μοριακοί μάρτυρες (KDa), 1) ολικό ομογενοποίηση βακτηρίων, 2) υπερκείμενο μετά από φυγοκέντρηση του ολικού ομογενοποιημένου, 3) ίζημα μετά τη φυγοκέντρηση (14000×g, 30 λεπτά). Ίσος όγκος δείγματος έχει φορτωθεί σε κάθε πηγάδι της πηκτής πολυακρυλαμιδίου 126

Εικόνα 4.22. Προσδιορισμός του ποσοστού του διαλυτού κλάσματος της rN15-LdPIPh22-8His σε βακτηριακό ομογενοποίηση *E. coli* BL21 μετά από επώαση 16 ωρών στους 25° C χωρίς επαγωγή και προσθήκη του επαγωγέα (IPTG 0,5 mM) (Α, Β) και έλεγχος της διαλυτότητας της rN15LdPIPh22-8His με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE ολικού ομογενοποιημένου βακτηρίων που επωάστηκαν για 4 ώρες στους 25° C, με IPTG (Γ, Δ). Ανοσοαποτύπωση Western από πηκτή πολυακρυλαμιδίου 12%. Η ανίχνευση της πρωτεΐνης rN15-LdPIPh22-8His έγινε με επώαση με το μονοκλωνικό αντίσωμα αντι-His (1,0 μg/mL). Α. Η μεμβράνη με χρώση Ponceau-S, Β. Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης μετά από εμφάνιση με χρωμομετρική μέθοδο ανάπτυξης με αντιδραστήριο DAB. 1) Ολικό ομογενοποίηση βακτηρίων, 2) υπερκείμενο μετά από φυγοκέντρηση του ολικού ομογενοποιημένου, 3) ίζημα μετά τη φυγοκέντρηση, Γ, Δ. 1) πριν την επαγωγή, 2) μετά από 4 ώρες επαγωγής. Ίσος όγκος δείγματος έχει φορτωθεί σε κάθε πηγάδι της πηκτής πολυακρυλαμιδίου. Μ) Μοριακοί μάρτυρες (KDa). Το βέλος υποδεικνύει την ζώνη που αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη rN15-LdPIPh22-8His 127

Εικόνα 4.23. Έλεγχος των παραγόντων θερμοκρασίας και επαγωγής στα επίπεδα έκφρασης της rN15-LdPIPh22-8His. Ανοσοαποτύπωση Western ολικού ομογενοποιημένου βακτηρίων BL21-pTriex-Ldriph22. Η επώαση των βακτηριακών καλλιιεργειών έγινε στους 25° C απουσία (-) ή παρουσία (+) 0,5 mM IPTG από τις 16 ώρες και μετά για τους χρόνους που αναφέρονται. Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών του βακτηριακού ομογενοποιημένου έγινε σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 12%. Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επωάστηκε με αντίσωμα έναντι της ετικέτας των 8 ιστιδινών (1,0 μg/mL) και η εμφάνιση του ανοσοαποτυπώματος έγινε με χρωμομετρική μέθοδο ανάπτυξης με αντιδραστήριο DAB. Το βέλος υποδεικνύει την ζώνη που αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη rN15-LdPIPh22-8His 127

Εικόνα 4.24. Έλεγχος της επίδρασης του χρόνου επαγωγής στη διαλυτότητα της rN15-LdPIPh22-8His σε βακτηριακά ομογενοποιημένα. Ανοσοαποτύπωση Western υπερκείμενου και ιζήματος του ολικού ομογενοποιημένου των βακτηρίων BL21-pTriex-N15-Ldriph22-8His μετά από επώαση στους 25° C για 16 ώρες και προσθήκη IPTG (0,5 mM) για τις ώρες που υποδεικνύονται. Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών έγινε σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 12%. Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επωάστηκε με αντι-His αντίσωμα (1,0 μg/mL) και η εμφάνιση του ανοσοαποτυπώματος έγινε με χρωμομετρική μέθοδο ανάπτυξης με αντιδραστήριο DAB, υπ: υπερκείμενο, Ιζ: ίζημα. Το βέλος υποδεικνύει την ζώνη που αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη rN15-LdPIPh22-8His..... 128

Εικόνα 4.25. Καθαρισμός της πρωτεΐνης rN15-LdPIPh22-8His από βακτηριακά εκχυλίσματα κυττάρων BL21-pTriex-N15-Ldriph22 μετά από επώαση στους 25° C για 16 ώρες και προσθήκη IPTG (0,5 mM) για 4 ώρες. Ανάλυση με SDS-PAGE (12%, χρώση με Coomassie Blue) δειγμάτων που ελήφθησαν στα στάδια έκφρασης της πρωτεΐνης, λύσης των βακτηριακών κυττάρων, απομόνωσης και έκλουσης της πρωτεΐνης από τα σφαιρίδια Ni-NTA, Μ) μοριακός μάρτυρας μεγεθών. Α. 1) ολικό ομογενοποίηση, 2) διαλυτό μέρος βακτηριακού ομογενοποιημένου μετά από την υπερήχηση, 3) αδιάλυτο μέρος (κυτταρικά θραύσματα και σωματίδια εγκλεισμού) του βακτηριακού ομογενοποιημένου, 4) υπερκείμενο μετά την επώαση με τα σφαιρίδια, υλικό που δεν προσδέθηκε, 5) διάλυμα της πρώτης έκπλυσης, 6, 7, 8) εκλούσεις με 250 mM ιμιδαζολίου, 9) σφαιρίδια με την πρωτεΐνη που έχει απομείνει προσδεσμένη, Β. Εκλούσεις (1-5) με 250 mM ιμιδαζολίου, 6) σφαιρίδια με την πρωτεΐνη που έχει απομείνει προσδεσμένη..... 129

Εικόνα 4.26. Α. Ανοσοαποτύπωση Western εκλουσμάτων (1-4) και των σφαιριδίων (5) από την διαδικασία καθαρισμού της πρωτεΐνης (συνθήκες όμοιες με της εικόνας 4.26). Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επωάστηκε με αντι-His αντίσωμα (1,0 μg/mL) και η εμφάνιση του

ανοσοαποτυπώματος έγινε με χρωμομετρική μέθοδο ανάπτυξης με αντιδραστήριο DAB, Β. η μεμβράνη με χρώση Ponceau-S 130

Εικόνα 4.27. Έλεγχος της ειδικότητας και του τίτλου του ορού κουνελιού μετά την τρίτη (Α), τέταρτη (Β) και πέμπτη (Γ) αιμοληψία και έλεγχος της δράσης και ειδικότητας του καθαρισμένου αντισώματος (Δ) με ανοσοαποτύπωση Western. Για την ανάπτυξη χρησιμοποιήθηκε δεύτερο αντίσωμα έναντι ορού κουνελιού (anti-rabbit) συζευγμένο με HRP και χρωμομετρική μέθοδος ανάπτυξης με αντιδραστήριο DAB. Ο έλεγχος έγινε σε ίσες ποσότητες καθαρισμένης πρωτεΐνης rN15-LdPIPh22-8His από βακτηριακά ομογενοποιημένα με σφαιρίδια Ni-NTA (Α) (βλ. εικόνα 4.24, διαδρομή A9 και B6) και ολικά βακτηριακά εκχυλίσματα (Β, Γ, Δ) (βλ. εικόνα 4.24, διαδρομή A1). Μ) μοριακοί μάρτυρες μεγεθών, Α. 1) η μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης με χρώση Ponceau-S, 2) αραίωση ορού 1:1000 και 3) αραίωση ορού 1:5000, Β. 1) αραίωση του ορού 1:1000, 2) αραίωση του ορού 1:5000, 3) αραίωση του ορού 1:10000 4) η μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης με χρώση Ponceau-S, Γ. 1) αραίωση του ορού 1:100, 2) αραίωση του ορού 1:500, 3) αραίωση του ορού 1:5000, 4) αραίωση του ορού 1:10000 5) η μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης με χρώση Ponceau-S, Δ. 1) καθαρισμένο αντίσωμα μετά την πέμπτη αιμοληψία (τελική) με χρωματογραφία υψηλής συγγένειας σε συγκέντρωση 0,2 μg/mL, 2) καθαρισμένο αντίσωμα μετά την πρώτη αιμοληψία με έκλυση από μεμβράνη νιτροκυτταρίνης σε συγκέντρωση 0,1 μg/mL 135

Εικόνα 4.28. Έλεγχος της ειδικότητας και του τίτλου του ορού από ποντίκι ανοσοποιημένο με αντιγόνο rN15-LdPIPh22-8His μετά την τρίτη (Α) και τέταρτη (Β) αιμοληψία. Ο έλεγχος έγινε με ανοσοαποτύπωση Western, όπως προηγουμένως, σε δείγμα rN15-LdPIPh22-8His προσδεσμένης σε σφαιρίδια Ni-NTA (A1, A2) (βλ. εικόνα 4.24, διαδρομή A9 και B6) και ολικού ομογενοποιημένου βακτηρίου BL21-pTriex1.1-Ldriph22 (A3, A4, B) (βλ. εικόνα 4.24, διαδρομή A1). Α. 1) αραίωση του ορού 1:100, 2) αραίωση του ορού 1:1000, 3) αραίωση του ορού 1:100, 4) αραίωση του ορού 1:1000. Β. 1) αραίωση του ορού 1:100, 2) αραίωση του ορού 1:500, 3) αραίωση του ορού 1:1000 136

Εικόνα 4.29. Εντοπισμός της ενδογενούς LdPIPh22 στα προμαστιγωτά παράσιτα *L. donovani* (στέλεχος LG13) στατικής φάσης με συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού (βλ. παράγραφο 3.17). Η χρώση των παρασίτων έγινε με καθαρισμένο πολυκλωνικό αντι-LdPIPh22 αντίσωμα από κουνέλι σε συγκέντρωση 10 μg/mL και στη συνέχεια με δεύτερο αντίσωμα έναντι ορού κουνελιού (anti-rabbit) συζευγμένο με Alexa Fluor 488 (αραίωση 1:750). Η χρώση του DNA έγινε με προπιδίο του ιωδίου (PI). Ο πράσινος (αντι-LdPIPh22/αντι-rabbit-Alexa 488) και ο κόκκινος (PI) φθορισμός παρουσιάζονται χωριστά ως ασπρόμαυρες εικόνες και μαζί στην εικόνα με την λεζάντα “merge”. Η εικόνα των παρασίτων σε αντίθεση φάσης παρουσιάζεται σε απόχρωση γκρι. Scale bar: 4 μm . 138

Εικόνα 4.30. *In vivo* ανάλυση των ινιδίων της ακτίνης. Α. Αντίθεση φάσης, Β. Σήμανση με αντίσωμα έναντι της ακτίνης (LdACT) [90] 139

Εικόνα 4.31. *In vivo* ανάλυση μιτοχονδρίου *L. donovani* προμαστιγωτών παρασίτων. Α. Αντίθεση φάσης, Β. Χρώση του μιτοχονδρίου με τη χρωστική MitoTracker [91] 139

Εικόνα 4.32. Εντοπισμός της διαγονιδιακής rLdPIPh22-mRFP σε προμαστιγωτά παράσιτα στατικής φάσης *L. donovani* (στέλεχος LG13) με συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού (βλ. παράγραφο 3.17). Ο κόκκινος φθορισμός της mRFP (Α) ανιχνεύτηκε με την γραμμή laser Argon, 543 nm (Β). Η ίδια εικόνα παρατίθεται σε ασπρόμαυρη για καλύτερη αντίθεση (Β). Scale bar: 4 μm 140

Εικόνα 4.33. Συνεντοπισμός της διαγονιδιακής rLdPIPh22-mRFP και της ενδογενούς LdPIPh22 σε προμαστιγωτά παράσιτα στατικής φάσης *L. donovani*-LdPIPh22-mRFP με έμμεσο ανοσοφθορισμό και συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού (βλ. παράγραφο 3.17). Για τον έμμεσο ανοσοφθορισμό χρησιμοποιήθηκε καθαρισμένο αντίσωμα αντι-LdPIPh22 (5 μg/mL) από κουνέλι και δεύτερο αντίσωμα anti-rabbit συζευγμένο με την πράσινη φθορίζουσα χρωστική Alexa Fluor 488. Ο κόκκινος (mRFP) (Α) και ο πράσινος (Alexa 488) φθορισμός (Β) παρουσιάζονται χωριστά ως ασπρόμαυρες εικόνες και μαζί στην εικόνα με την λεζάντα “merge1” (Γ). (Δ) Η αλληλεπικάλυψη των δύο χρωστικών με την αντίθεση φάσης. Με βέλος υποδεικνύεται ο πυρήνας. Scale bar: 4 μm ... 141

Εικόνα 4.34. Εντοπισμός της διαγονιδιακής rLdPIPh22-mRFP στα προμαστιγωτά παράσιτα στατικής φάσης *L. donovani* (στέλεχος LG13) με μικροσκόπιο φθορισμού ευρέως πεδίου (βλ. παράγραφο 3.17). Α. Η χρώση της mRFP, Β. Χρώση με αντίσωμα α-τουμπουλίνης (4 μg/mL) και δεύτερο αντι-mouse αντίσωμα Alexa Fluor 488, Γ. Χρώση των πυρήνων με τη χρωστική Hoechst,

Δ. Αλληλεπικάλυψη των χρώσεων των φθορίζουσών χρωστικών mRFP, Alexa 488 και της χρώσης Hoechst. Το βέλος υποδεικνύει την περιοχή έκφυσης του μαστιγίου (flagellar body) 142

Εικόνα 4.35. Ανοσοαποτύπωση Western διαγονιδιακών παρασίτων *L. donovani*-LdPIPh22-mRFP των κλασμάτων 1 έως 5 (5i διαλυτές πρωτεΐνες και 5ii αδιάλυτες πρωτεΐνες, μετά από κατεργασία του κλάσματος 5 με 1% Triton X-100) μετά από κλασμάτωση των πρωτεϊνών με διγτονίνη και ανάλυση με SDS-PAGE 12%. Η μεμβράνη επωάστηκε με αντι-LdPIPh22 ορό ποντικού (Α) σε αραιώση 1:1200 και με καθαρισμένο αντι-mRFP αντίσωμα από κουνέλι (Β) σε συγκέντρωση 0,5 μg/mL και, στη συνέχεια, με δεύτερα αντισώματα έναντι ορού ποντικού (anti-mouse) (Α) και ορού κουνελιού (anti-rabbit) (Β), αντίστοιχα, συζευγμένα με HRP. Η εμφάνιση των ζωνών έγινε με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας. (Μ) Μοριακοί μάρτυρες (KDa). Τα μικρά και μεγάλα βέλη υποδεικνύουν τις μορφές της LdPIPh22 (Α) και της rLdPIPh22-mRFP (Α, Β) αντίστοιχα 143

Εικόνα 4.36. Ανοσοαποτύπωση Western διαγονιδιακών παρασίτων *L. tarentolae*-LdPIPh22-mRFP μετά από κλασμάτωση των πρωτεϊνών με διγτονίνη και ανάλυση με SDS-PAGE 10% των κλασμάτων 1 και 5 (αντιπροσωπευτική εικόνα). Οι μεμβράνες επωάστηκαν με αντι-LdPIPh22 ορού ποντικού σε αραιώση 1:750 και στη συνέχεια με δεύτερο αντίσωμα έναντι ανοσοσφαιρινών ποντικού, από αίγα, συζευγμένο με HRP. Η εμφάνιση των ζωνών έγινε με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας. Ίσες ποσότητες πρωτεΐνης από τα κλάσματα 1 και 5 έχουν αναλυθεί (Μ) Μοριακοί μάρτυρες (KDa). Τα βέλη δείχνουν τις επικρατέστερες ζώνες που ανιχνεύονται και θεωρούνται ειδικές..... 146

Εικόνα 4.37. Ανοσοαποτύπωση Western διαγονιδιακών παρασίτων *L. tarentolae*-LdPIPh22-mRFP μετά από κλασμάτωση των πρωτεϊνών με διγτονίνη και ανάλυση με SDS-PAGE 10% w/v, του κλάσματος 1. Οι μεμβράνες επωάστηκαν με αντι-LdPIPh22 ορό ποντικού (Π) σε αραιώση 1:500 ή με το καθαρισμένο αντι-LdPIPh22 αντίσωμα από κουνέλι (Κ) σε συγκέντρωση 0,2 μg/mL και στη συνέχεια με δεύτερο αντίσωμα anti-mouse (Π) ή anti-rabbit (Κ), αντίστοιχα, συζευγμένα με HRP. Η εμφάνιση των ζωνών έγινε με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας. (Μ) Μοριακοί μάρτυρες (KDa) . 146

Εικόνα 4.38. Έλεγχος της έκκρισης της LdPIPh22 με SDS-PAGE 10%, ανάλυση και ανοσοαποτύπωση Western από παράσιτα LG13 αγρίου τύπου του συνόλου των εκκρινόμενων πρωτεϊνών (βλ. παράγραφο 2.13) δύο διαφορετικών πειραμάτων απομόνωσης. Α. Καθίζηση πρωτεϊνών με ακετόνη. Οι μεμβράνες επωάστηκαν με αντι-LdPIPh22 ορό ποντικού (Π) σε αραιώση 1:1500 ή με το καθαρισμένο αντι-LdPIPh22 αντίσωμα από κουνέλι (Κ) σε συγκέντρωση 0,4 μg/mL και στη συνέχεια με δεύτερο αντίσωμα έναντι ανοσοσφαιρινών ποντικού (Π) ή έναντι ανοσοσφαιρινών κουνελιού (Κ), αντίστοιχα, συζευγμένα με HRP. Η ίδια μεμβράνη επωάστηκε διαδοχικά και με τα δύο αντισώματα μετά από απομάκρυνση των αντισωμάτων και επαναχρησιμοποίησή τους (βλ. παράγραφο 3.8). Β. Καθίζηση πρωτεϊνών με τριχλωροξικό οξύ. Η μεμβράνη επωάστηκε με αντι-LdPIPh22 ορό ποντικού σε αραιώση 1:1200 και με δεύτερο αντίσωμα έναντι ανοσοσφαιρινών ποντικού. Η εμφάνιση των ζωνών έγινε με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας. Μία ζώνη στα ~30 KDa αναγνωρίζεται και από τα δύο διαφορετικά αντισώματα στην περίπτωση του πειράματος Α και μία ζώνη στα ~64 KDa στο πείραμα Β..... 148

Εικόνα 4.39. Κύτταρα HeLa μετά από επιμόλυνση με το πλασμίδιο pEGFP-N3-Ldriph22 για 24 ώρες. Παρατήρηση με μικροσκόπιο φθορισμού ευρέως πεδίου. Α. Αντίθεση φάσης, Β. Πράσινος φθορισμός στα κύτταρα που εκφράζουν την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη rLdPIPh22-GFP, παρουσιάζεται σε ασπρόμαυρη εικόνα 149

Εικόνα 4.40. Ανοσοαποτύπωση Western ομογενοποιημάτων κυττάρων HeLa μετά από επώαση της μεμβράνης με Α. αντι-LdPIPh22 ορό ποντικού σε αραιώση 1:500, Β. αντι-LdPIPh22 ορό ποντικού σε αραιώση 1:500 και αντι-GFP σε συγκέντρωση 0,2 μg/mL, Γ. αντι-LdPIPh22 ορό ποντικού σε αραιώση 1:1000 και αντι-GFP σε συγκέντρωση 0,45 μg/mL, και στη συνέχεια με δεύτερο αντίσωμα έναντι ανοσοσφαιρινών ποντικού (anti-mouse) (Α, Β, Γ) ή έναντι ανοσοσφαιρινών κουνελιού (anti-rabbit) (Β, Γ), αντίστοιχα, συζευγμένα με HRP. Η εμφάνιση των ζωνών έγινε με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας. Στα 1-3 έχει γίνει ανάλυση από ομογενοποίημα κυττάρων HeLa, 1) που δεν έχουν υποστεί επιμόλυνση, 2) μετά από επιμόλυνση με το φορέα έκφρασης pEGFP-N3, 3) μετά από επιμόλυνση με το πλασμίδιο pEGFP-N3-Ldriph22. Στη διαδρομή L έχει γίνει ανάλυση 20 μg πρωτεΐνης ομογενοποιημάτων των διαγονιδιακών παρασίτων *L. donovani*-LdPIPh22-mRFP..... 150

Εικόνα 4.41. Ετερόλογη έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης rLdPIPh22-GFP σε κύτταρα ινοβλαστών μυός NIH3T3 (Α, Γ) και σε επιθηλιακά κύτταρα HeLa (Β, Δ). Εντοπισμός της πρωτεΐνης με συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού. (Αii, Βii, Γi) Απεικόνιση του πράσινου

φθορισμού της *LdPIPh22-GFP*. (Aii, Bii) απεικόνιση του κυτταροσκελετού της ακτίνης μετά από χρώση με φαλοϊδίνη συζευγμένη με τη χρωστική Alexa Fluor 546. Δii. Απεικόνιση της *LdPIPh22-8His* μετά από σήμανση με αντίσωμα έναντι της ετικέτας των 8 ιστιδινών (5 $\mu\text{g/mL}$), και δεύτερο πολυκλωνικό αντίσωμα συζευγμένο με την πράσινη φθορίζουσα χρωστική Alexa Fluor 488. Δiii. Αντίθεση φάσης του κυττάρου που απεικονίζεται στο Δii. (Ai,Bi). Έγχρωμη απεικόνιση της αλληλεπικάλυψης της χρώσης της GFP και της φαλοϊδίνης-Alexa546. Οι εικόνες του πράσινου και κόκκινου φθορισμού παρουσιάζονται ως ασπρόμαυρες για καλύτερη ευκρίνεια. Η περιοχή που περικλείεται στο πλαίσιο στην εικόνα Γ παρουσιάζεται δίπλα σε 1,5 X μεγέθυνση. Scale bar: 8 μm 152

Εικόνα 4.42. Ετερόλογη έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης *rLdPIPh22-GFP* σε επιθηλιακά κύτταρα HeLa και εντοπισμός της με συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού. i. Η αλληλεπικάλυψη της χρώσης της φθορίζουσας πρωτεΐνης GFP και της ακτίνης (Φαλοϊδίνη-Alexa 546). ii. Χρώση της *LdPIPh22-GFP*. iii. Χρώση της φαλοϊδίνης (ακτίνη). Ai, Aii, Aiii και Bi, Bii, Biii Τα τμήματα των κυττάρων εντός πλαισίου σε μεγέθυνση 3X. Scale bar: 8 μm (A), 20 μm (B)..... 153

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε τα τελευταία δύο χρόνια υπό την εποπτεία της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Ντίας Γαλανοπούλου, του Τμήματος Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών και υπό την επίβλεψη της Δρ. Χαραλαμπίας Μπολέτη, στο Εργαστήριο Μοριακής Παρασιτολογίας, Ομάδα Ενδοκυττάριου Παρασιτισμού, του Τμήματος Μικροβιολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ.

Αντικείμενο της εργασίας αυτής αποτελεί η μελέτη μίας φωσφατάσης του παρασιτικού πρωτοζώου *Leishmania donovani*, το οποίο είναι ο αιτιολογικός παράγοντας πρόκλησης σπλαχνικής Λεϊσμανίασης στον άνθρωπο, μίας ιδιαίτερα επικίνδυνης, παραμελημένης (neglected) ασθένειας που ευθύνεται για το θάνατο 60000 ανθρώπων ανά έτος και θέτει σε κίνδυνο 350 εκατομμύρια ανθρώπους.

Με την ολοκλήρωσή της θα ήθελα, καταρχάς, να ευχαριστήσω θερμά τη Δρ. Χαραλαμπία Μπολέτη για την εμπιστοσύνη της και για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω τη διπλωματική μου εργασία στην ομάδα της και να γνωρίσω τι σημαίνει έρευνα. Την ευχαριστώ, επίσης, για το αμείωτο ενδιαφέρον και τη συμπαράστασή της κατά τη διάρκεια της εκπόνησης και συγγραφής της μελέτης μου. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ντία Γαλανοπούλου για την καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές της, οι οποίες ήταν καθοριστικές στο ξεκίνημα, αλλά και στην ολοκλήρωση του μεταπτυχιακού μου διπλώματος ειδίκευσης στη Βιοχημεία. Ακόμη, ευχαριστώ όλα τα νεότερα και παλαιότερα μέλη του εργαστηρίου Μοριακής Παρασιτολογίας για τη βοήθεια που μου προσέφεραν αυτά τα δύο χρόνια, ιδιαίτέρως την υποψήφια διδάκτορα Αμαλία Παπαδάκη, η οποία ήταν πάντα δίπλα μου σε ότι χρειαζόμουν και το μεταπτυχιακό φοιτητή Άρη Δούκα για την ουσιαστική βοήθειά του.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου, Στράτο και Σοφία, καθώς και στην αδερφή μου, Βάσια, που όλα τα χρόνια των σπουδών μου με στηρίζουν τόσο υλικά όσο και ψυχικά σε κάθε μου προσπάθεια.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η Λεϊσμανίαση: κλινικές μορφές της ασθένειας - ομάδα ασθενειών

Η Λεϊσμανίαση είναι μία ομάδα λοιμωδών νόσων, με διαφορετικά κλινικά συμπτώματα, που προκαλούνται από τα παρασιτικά πρωτόζωα του γένους *Leishmania*, μέλη της οικογένειας των πρωτοζώων *Trypanosomatidae* (οικογένεια τρυπανοσωματίδων, τάξη κινητοπλαστιδίων). Προσβάλλει άγρια και κατοικίδια ζώα και τον άνθρωπο και κατανέμεται γεωγραφικά σε όλες τις ηπείρους, σε περιοχές που οι θερμοκρασίες ευνοούν την ανάπτυξη της σκνίπας, η οποία αποτελεί το φορέα του παρασίτου (http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/). Είναι ενδημική σε τροπικές και υποτροπικές περιοχές, όπως τροπικά δάση στην Ν. Αμερική, έρημοι στη Δ. Ασία και Β. Αφρική, αλλά και σε αγροτικές και προάστιες περιοχές της Ασίας, Αφρικής και Ν. Αμερικής (εικόνα 1.3) [1]. Σε παγκόσμιο επίπεδο, πάνω από 350 εκατομμύρια άνθρωποι σε 88 χώρες απειλούνται από εκδήλωση μίας εκ των διαφόρων μορφών της νόσου, ενώ περίπου 12 εκατομμύρια άνθρωποι έχουν μολυνθεί, με 1,6 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις και 60000 θανάτους ανά έτος [2, 3]. Στην Ευρώπη και περισσότερο στις χώρες της Μεσογείου, λόγω περιβαλλοντικών αλλαγών και μετακινήσεων του πληθυσμού η επιδημιολογία της Λεϊσμανίασης αλλάζει με γρήγορους ρυθμούς και περίπου 700 νέα κρούσματα αναφέρονται κάθε χρόνο [4].

Οι τρεις βασικές κλινικές μορφές Λεϊσμανίασης είναι η σπλαχνική (VL, Visceral Leishmaniasis), η οποία επηρεάζει τα αιμοποιητικά όργανα και προκαλεί θάνατο αν δεν αντιμετωπισθεί με θεραπεία, η δερματική (CL, Cutaneous Leishmaniasis) που προκαλεί παραμορφωτικές δερματικές αλλοιώσεις που μπορούν να αυτοϊαθούν και η βλεννογονοδερματική Λεϊσμανίαση (MCL, Mucocutaneous Leishmaniasis) που προκαλεί εκτεταμένη καταστροφή των στοματικών και ρινικών βλεννογόνων με παραμορφωτικές βλεννογονοδερματικές αλλοιώσεις (εικόνα 1.1). Οι διάφορες μορφές της Λεϊσμανίασης προκύπτουν από τον πολλαπλασιασμό των παρασίτων στα φαгоλυσosώματα των μακροφάγων, στο χόριο, και στο ρινο-στοματοφαρυγγικό βλεννογόνο, αντίστοιχα [1]. Αυτή η ομάδα νοσημάτων προκαλείται από περίπου 21 διαφορετικά είδη του παρασίτου *Leishmania*, τα οποία μεταδίδονται από περίπου 30 είδη σκνίπας των γενών *Phlebotomus* και *Lutzomyia* [5] (εικόνα 1.2).



Εικόνα 1.1. Κορίτσι με δερματική (αριστερά), αγόρι με σπλαχνική Λεισμανίαση (κέντρο) και βλεννογονοδερματική Λεισμανίαση (δεξιά)



Εικόνα 1.2. Εικόνες των ασπόνδυλων ξενιστών *Phlebotomus* (αριστερά) και *Lutzomyia* (δεξιά)



Εικόνα 1.3. Περιοχές με υψηλό κίνδυνο εμφάνισης σπλαχνικής και δερματικής Λεισμανίασης (http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index.html)

Η σπλαχνική Λεισμανίαση είναι η πιο σοβαρή μορφή της νόσου. Μπορεί να προκληθεί από τα παράσιτα *Leishmania infantum* ή *Leishmania donovani* με διαφορές στην εκδήλωση της ασθένειας, στους ασπόνδυλους ξενιστές (σκνίπα, από την οποία μεταδίδεται), στην γεωγραφική κατανομή αλλά και στους σπονδυλωτούς

ξενιστές (ζώα, άνθρωπος) [6]. Η *L. infantum* συναντάται σε χώρες της λεκάνης της Μεσογείου, στην Μέση Ανατολή, στην Κίνα, στην κεντρική Ασία και στη Ν. Αμερική. Είναι υπεύθυνη για ζωνοδόσους και έχει σαν ξενιστή «αποθήκη» το σκύλο. Η *L. donovani* είναι αιτιολογικός παράγοντας ανθρωπονόσων και ζωνοδόσων, προκαλεί σπλαχνική Λεισμανίαση (Kala-Azar) και δερματική Λεισμανίαση post-kala-azar. Συναντάται κυρίως σε χώρες της Ανατολικής Αφρικής (Σουδάν, Κένυα, Αιθιοπία), στη Βορειοανατολική Ινδία, στο Μπαγκλαντές, στο Νεπάλ και στην Κίνα (εικόνα 1.3).

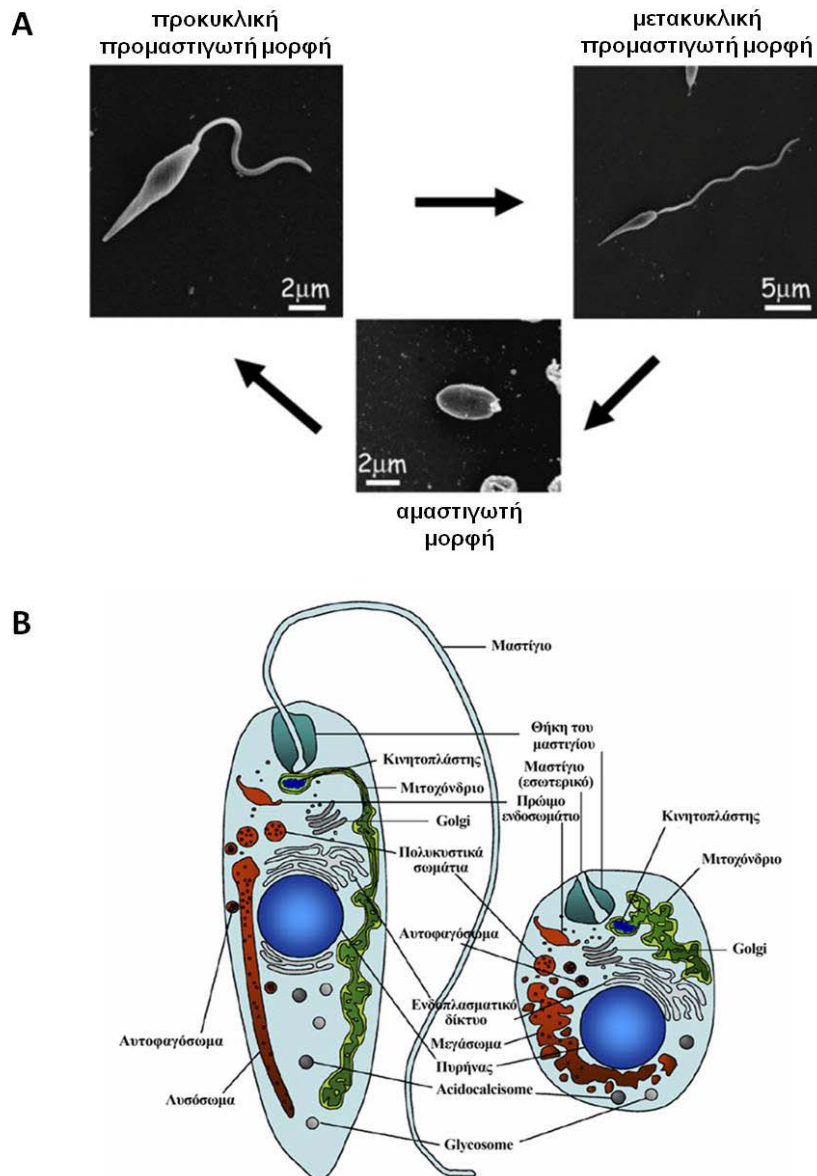
Παρά τις προσπάθειες που καταβάλλονται σε διάφορα πεδία έρευνας, από την αρχή του περασμένου αιώνα, για τη μελέτη και καταπολέμηση των παρασίτων του γένους *Leishmania*, επιβεβαιώνεται η επανεμφάνιση ή/και εξάπλωσή τους σε νέες περιοχές, όπως η Β. Ιταλία, η Κίνα, η Βραζιλία (στο παρελθόν ήταν ενδημική σε αγροτικές περιοχές, ενώ πλέον υπάρχουν κρούσματα και στις μεγάλες πόλεις) και το κεντρικό Ισραήλ [7-9]. Παράγοντες που έχουν συμβάλει σε αυτό το φαινόμενο είναι οι κλιματολογικές και περιβαλλοντικές αλλαγές που ευνοούν τη μετακίνηση των εντόμων-φορέων, η αυξημένη μετανάστευση από ενδημικές χώρες, αλλά και ο αυξημένος αριθμός ταξιδιωτών παγκοσμίως καθώς και η επέκταση της αστικοποίησης σε αγροτικές και δασικές περιοχές [4]. Η ταυτόχρονη μόλυνση του ανθρώπου με το παράσιτο *Leishmania* και τον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV) εντείνει το πρόβλημα σε ανεπτυγμένες και αναπτυσσόμενες χώρες [10-12], με αύξηση του κινδύνου ανάπτυξης της σπλαχνικής Λεισμανίασης κατά 100-1000 φορές [2].

1.2 Το παράσιτο *Leishmania*: μορφολογικά στάδια, κύκλος ζωής και επιβίωση στον ξενιστή

Τα παράσιτα του γένους *Leishmania* εμφανίζονται σε δύο κύριες μορφές: την προμαστιγωτή που απαντάται στον ασπόνδυλο ξενιστή (σκνίπα) και είναι μαστιγοφόρος και τη στρογγυλή αμαστιγωτή μορφή που απαντάται σε φαγοκύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (μακροφάγα, ουδετερόφιλα και δενδριτικά κύτταρα) αλλά και σε ινοβλάστες του δέρματος του σπονδυλωτού ξενιστή [13-15].

Η προμαστιγωτή μορφή είναι επιμήκης με μέγεθος 9-12×2-3 μm, φέρει μαστίγιο που εκφύεται από το πρόσθιο τμήμα του σώματος και έχει ίσο ή μεγαλύτερο μήκος από αυτό του σώματος του παρασίτου (εικόνα 1.4) [16]. Στο κέντρο υπάρχει ένας μεγάλος, σφαιρικός πυρήνας με σαφή πυρηνίσκο και περιφερική χρωματίνη. Στο

κυτταρόπλασμα περιέχονται ριβοσώματα, σύμπλεγμα Golgi, κυστίδια λίπους, αδρό και λείο ενδοπλασματικό δίκτυο και λυσοσώματα.

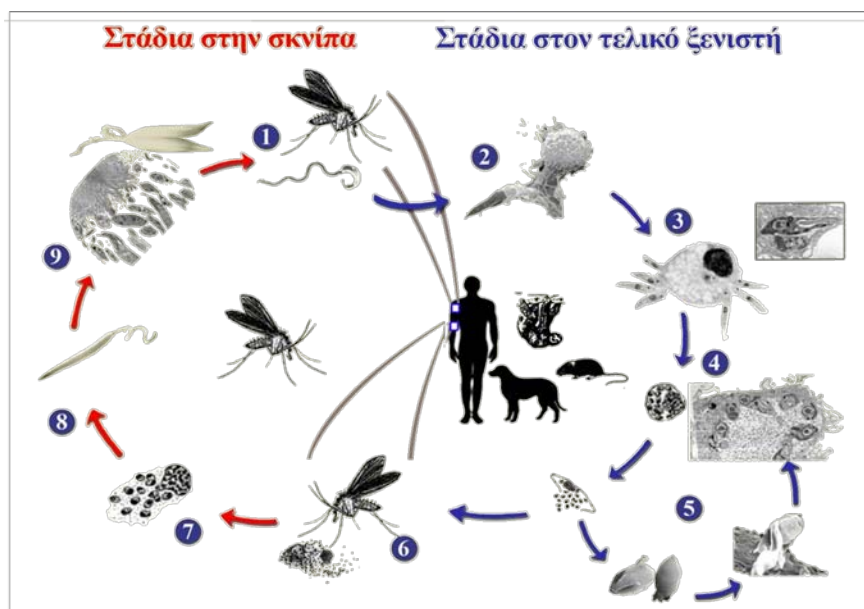


Εικόνα 1.4. Αλλαγή της μορφής του παρασίτου *Leishmania* κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής. **A.** Εικόνα ηλεκτρονικού μικροσκοπίου των τριών διαφορετικών μορφών του παρασίτου. Τα προμαστιγωτά είναι από καλλιέργεια κυτάρων *in vitro* και η αμαστιγωτή μορφή είναι απομονωμένη από μολυσμένο ποντίκι. **B.** Σχηματική αναπαράσταση των κύριων ενδοκυτταρικών οργανιδίων ενός προμαστιγωτού (αριστερά) και ενός αμαστιγωτού παρασίτου (δεξιά). Η θήκη του μαστιγίου αποτελεί το πρόσθιο άκρο του κυττάρου [18]

Κοντά στην βάση του μαστιγίου υπάρχει ένας τροποποιημένος τύπος μιτοχονδρίου, χαρακτηριστική δομή των παρασίτων που ανήκουν στην τάξη των κινητοπλαστιδών, το οποίο περιέχει ένα δισκοειδή κινητοπλάστη [17]. Αυτός περιέχει δύο τύπους

κυκλικών μορίων DNA που είναι γνωστά και ως kDNA. Η αμαστιγωτή μορφή είναι ωοειδής, με διάμετρο 2-6×1,5-2 μm και φέρει έναν έκκεντρο πυρήνα με πυρηνίσκο και έναν κινητοπλάστη που καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο μέρος του κυττάρου. Ο υπόλοιπος χώρος του κυττάρου περιλαμβάνει τα ίδια οργανίδια με τη προμαστιγωτή μορφή του παρασίτου, λιγότερο όμως ανεπτυγμένα. Επιπλέον, η αμαστιγωτή μορφή περιέχει ένα εσωτερικό μαστίγιο [16] (εικόνα 1.4).

Για να ολοκληρώσει τον περίπλοκο κύκλο ζωής της (εικόνα 1.5), η *Leishmania* διέρχεται από διάφορα βιολογικά στάδια που προκύπτουν μέσω μίας διαδικασίας διαφοροποίησης, επιτρέποντας αυστηρή προσαρμογή στις μεταβολές του μικροπεριβάλλοντος.

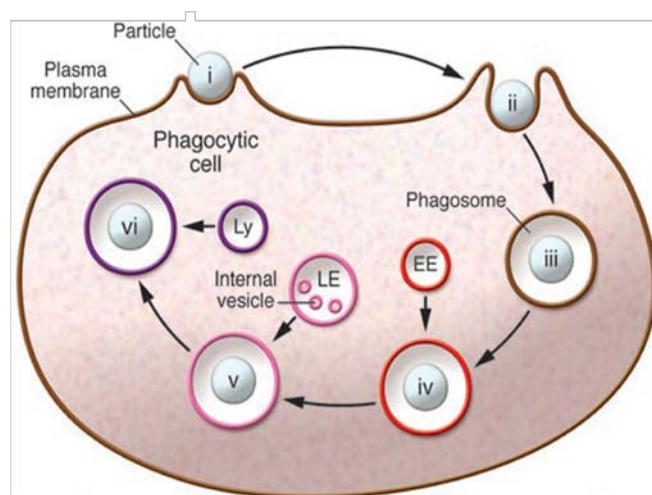


Εικόνα 1.5. Κύκλος ζωής του παρασίτου *Leishmania* στον ασπόνδυλο και σπονδυλωτό ξενιστή [19]

Πιο συγκεκριμένα, μέσα στο έντερο των εντόμων το παράσιτο μετατρέπεται στην προμαστιγωτή μορφή σε χρονικό διάστημα περίπου μίας εβδομάδας. Τα προμαστιγωτά, που βρίσκονται στο έντερο του ασπόνδυλου ξενιστή (σκνίπα), αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται και μεταφέρονται στο πρόσθιο μέρος του εντέρου όπου μετατρέπονται σε μετακυκλικά. Τα μετακυκλικά προμαστιγωτά είναι μικρότερα σε μέγεθος, έχουν χαμηλότερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και είναι περισσότερο μολυσματικά. Η μορφή αυτή διαιρείται γρήγορα και μεταναστεύει στην προβοσκίδα του εντόμου. Τα μετακυκλικά παράσιτα ενίονται στον θηλαστικό (σπονδυλωτό)

ξενιστή με το τσίμπημα του εντόμου-φορέα (ασπόνδυλος ξενιστής) κατά τη λήψη αίματος από αυτόν (νύγμα) (εικόνα 1.5) [20]. Στη συνέχεια, φαγοκυτταρώνονται από δενδριτικά και μακροφάγα κύτταρα (φαγοκύτταρα κατανεμημένα ευρέως σε ιστούς) του σπονδυλωτού ξενιστή και διαφοροποιούνται σε αμαστιγωτές μορφές στο παρασιτόφορο φαγολυσόσωμα [21].

Η φαγοκυττάρωση είναι μία μορφή ενδοκυττάρωσης μεγάλων σωματιδίων, όπως βακτηρίων και πρωτοζωικών παρασίτων, κατά την οποία τα φαγοσώματα που φέρουν τα σωματίδια συντήκονται με λυσοσώματα, σχηματίζοντας τα φαγολυσοσώματα [22]. Τα στάδια της φαγοκυττάρωσης διακρίνονται σε: α) πρόσδεση των μικροοργανισμών σε επιφανειακό υποδοχέα του μακροφάγου, β) σχηματισμό προεκβολών της κυτταρικής μεμβράνης του μακροφάγου (ψευδοπόδια), γ) σύντηξη των άκρων των ψευδοποδίων και σχηματισμό του φαγοσώματος [22]. Σε όλα αυτά τα στάδια συμμετέχει ο κυτταροσκελετός της ακτίνης με γρήγορο πολυμερισμό και αποπολυμερισμό στην περιοχή που δημιουργείται το φαγόσωμα, το οποίο «ωριμάζει» μετά από σύντηξη με πρώιμα και ώριμα ενδοσώματα (εικόνα 1.6, EE & LE) και λυσοσώματα (εικόνα 1.6, Ly) του μακροφάγου, σχηματίζοντας το φαγολυσόσωμα [23].



Εικόνα 1.6. Στάδια σχηματισμού και ωρίμανσης του φαγοσώματος. I. Πρόσδεση του μικροοργανισμού στον υποδοχέα, II. Σχηματισμός ψευδοποδίων και εγκόλπωση του μικροοργανισμού, III-VI. Σχηματισμός φαγοσώματος, σύντηξη με το λυσόσωμα, σχηματισμός φαγολυσοσώματος [24]

Μετά την είσοδό τους στα μακροφάγα, τα προμαστιγωτά παράσιτα καθυστερούν τη βιογένεση του φαγολυσοσώματος προκειμένου να εγκαταστήσουν μόλυνση σε ένα μη οξειδωτικό περιβάλλον. Με διαφοροποίηση σε αμαστιγωτά, η ωρίμανση του

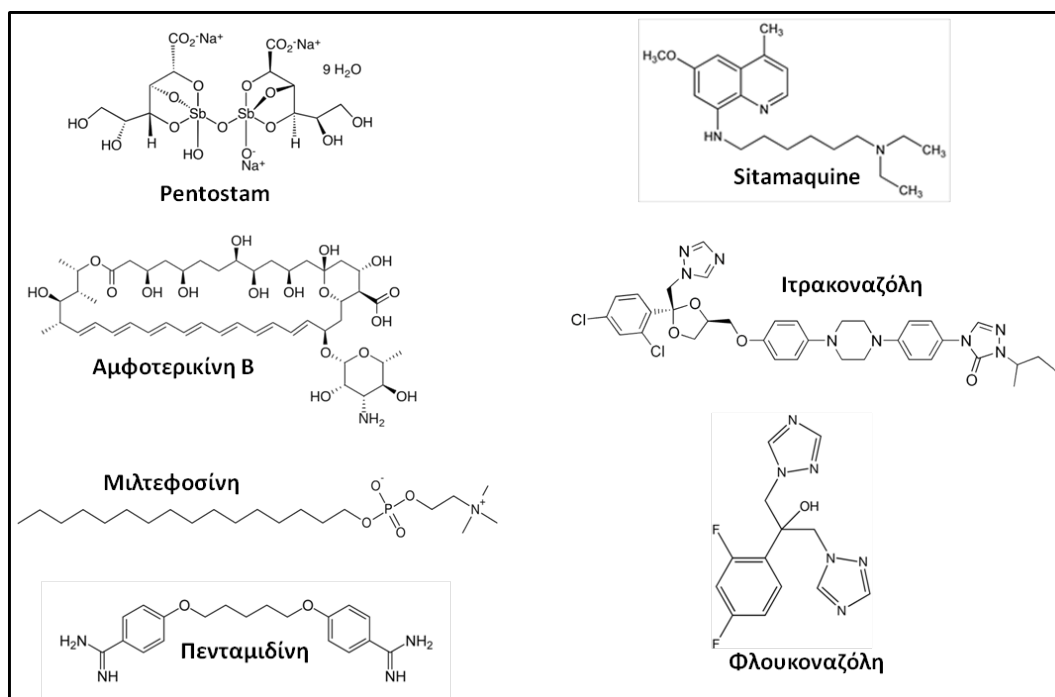
παρασιτοφόρου φαγοσώματος προχωρεί στο στάδιο του φαγολυσοσώματος. Οι αμαστιγωτές μορφές επιζούν σε περιβάλλον με όξινο pH (4,0 και 5,5), που συμφωνεί με τις συνθήκες του βέλτιστου μεταβολισμού τους, σε αντίθεση με το ουδέτερο pH στο οποίο είναι μεταβολικά ενεργές οι προμαστιγωτές μορφές του παρασίτου [25]. Για να αποφευχθεί η έκθεση τους σε οξειδωτικό περιβάλλον, τα αμαστιγωτά παράσιτα αναστέλουν την παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) εντός του παρασιτοφόρου φαγοσώματος [21] με μηχανισμό που θα αναφερθεί στη συνέχεια. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, ο μικροοργανισμός που φαγοκυτταρώνεται δεν μπορεί να επιβιώσει στο περιβάλλον του φαγολυσοσώματος με το χαμηλό pH και τη δράση των υδρολυτικών ενζύμων των λυσοσωμάτων. Όμως, το παράσιτο *Leishmania* διαθέτει μηχανισμό, με τον οποίο μπορεί να επιβιώσει στα μακροφάγα του ξενιστή. Η λιποφωσφογλυκάνη (LPG), βασικό μόριο της κυτταρικής του μεμβράνης, συμβάλλει στην αναστολή της ωρίμανσης του φαγοσώματος και του σχηματισμού του φαγολυσοσώματος [26, 27]. Ακόμη, ένας σημαντικός μηχανισμός των μακροφάγων για την αντιμετώπιση των παθογόνων μικροοργανισμών είναι η δημιουργία των ROS (reactive oxygen species), μέσω της οξειδάσης του NADPH. Το παράσιτο *Leishmania donovani*, συγκεκριμένα, αναστέλλει τη λειτουργία του ενζύμου αυτού, μετά από φωσφορυλίωση του παράγοντα p47(phox) που συμμετέχει στην ενεργοποίηση της οξειδάσης του NADPH [28]. Τα παράσιτα που θα επιβιώσουν πολλαπλασιάζονται στο φαγόσωμα των μακροφάγων και εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος μετά από ρήξη της μεμβράνης του μακροφάγου για να μολύνουν τα γειτονικά με την ίδια διαδικασία [29]. Με ένα νέο τσίμπημα σκνίπας τα αμαστιγωτά προσλαμβάνονται από τον ασπρόνδυλο ξενιστή για να ξεκινήσει ένας νέος κύκλος ζωής του παρασίτου (εικόνα 1.5, στάδιο 6).

1.3 Θεραπευτικές προσεγγίσεις της Λεισμανίασης – Προβλήματα

Η θεραπεία της Λεισμανίασης βασίζεται αποκλειστικά σε χημειοθεραπεία και λόγω των παρενεργειών της θεραπείας όπως πυρετός, νεφρική ανεπάρκεια, εμετοί ή ακόμα και καρδιακή ανακοπή, οξεία ηπατική ανεπάρκεια και σπασμοί, η χορήγηση σε νοσοκομείο καθίσταται αναγκαία [5]. Ως φάρμακα πρώτης γραμμής χορηγούνται κυρίως ενώσεις πεντασθενούς αντιμονίου (εικόνα 1.7) (π.χ. sodium antimony glucolate (Pentostam) και meglumine antimoniate (Glucantime)) [5] που ανακαλύφθηκαν περίπου έναν αιώνα πριν, αλλά παρουσιάζουν παρενέργειες, όπως

καρδιοτοξικότητα, και απαιτούν μακράς διάρκειας θεραπεία με ενδοφλέβια χορήγηση και παραμονή σε νοσοκομείο. Το πεντασθενές αντιμόνιο πρέπει να αναχθεί σε τρισθενές για να εκδηλώσει αντιλειτουργική δράση (σε δερματική και σπλαχνική Λειτουργία). Αν και δεν είναι ακόμη κατανοητός ο μηχανισμός δράσης του, πιστεύεται ότι σε αυτόν συμμετέχουν τα τριπεπτίδια γλουταθειόνη και τρυπανοθειόνη του παρασίτου που παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση. Το Sb^{3+} φαίνεται να προκαλεί κατακερματισμό του DNA του παρασίτου και έκθεση στην επιφάνεια της μεμβράνης φωσφατιδυλοσερίνης [30, 31] που είναι σημάδι κυτταρικού θανάτου με απόπτωση.

Οι ενώσεις αμφοτερικίνη Β και πενταμιδίνη αποτελούν φάρμακα δεύτερης γραμμής και η μιλεφοσίνη (αλκυλοφωσφοχολίνη) (εικόνα 1.7) είναι η πρώτη αναγνωρισμένη θεραπεία για τη σπλαχνική Λειτουργία που χορηγείται από το στόμα [32]. Η αμφοτερικίνη Β απομονώνεται από το βακτήριο *Streptomyces nodosus*, έχει δράση αντιμυκητιακή και αντιπαρασιτική (σπλαχνική Λειτουργία) και δομή πολυενίου [33]. Ο μηχανισμός δράσης της βασίζεται στην πρόσδεση του υδρόφοβου τμήματός της στην εργοστερόλη της κυτταρικής μεμβράνης του παρασίτου και τη δημιουργία καναλιών που αυξάνουν τη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης σε πρωτόνια και μονοσθενή κατιόντα (K^+ , Na^+ , Cl^-), οδηγώντας έτσι σε κυτταρικό θάνατο [34]. Η πενταμιδίνη (Pentacarinat) είναι ένα αρωματικό διαμινικό σύμπλοκο, χορηγείται ενδομυϊκά και καταστρέφει το DNA των πρωτοζώων, προκαλεί όμως παρενέργειες, όπως υπόταση, ταχυκαρδία και εμετό [19]. Ανησυχητικό επιπλέον είναι το γεγονός ότι το παράσιτο *Leishmania* έχει αναπτύξει αντοχή σε κάποια από αυτά τα φάρμακα [35]. Τα τελευταία χρόνια, έχουν ανακαλυφθεί φάρμακα (όπως το Sitamaquine και διάφορες αζόλες, όπως ketonazole, fluconazole, itraconazole) τα οποία προσφέρουν βελτιωμένη θεραπεία [36] όμως, παρά την υψηλή αποτελεσματικότητά τους, μπορεί να παρουσιάσουν και σοβαρές παρενέργειες (εικόνα 1.7). Δεδομένων, λοιπόν, των προβλημάτων τοξικότητας, της ανάγκης για παραμονή και παρακολούθηση του ασθενούς στον χώρο του νοσοκομείου, του υψηλού κόστους, της ανάπτυξης αντοχής σε κάποια από τα μέχρι σήμερα διαθέσιμα φάρμακα και της έλλειψης προστατευτικών εμβολίων για την ανθρώπινη Λειτουργία, είναι απαραίτητη η ανάπτυξη νέων μη τοξικών φαρμάκων και εμβολίων για τον έλεγχο του αυξανόμενου αριθμού των κρουσμάτων Λειτουργίας [37-39].



Εικόνα 1.7. Φάρμακα κατά της Λεισμανίασης

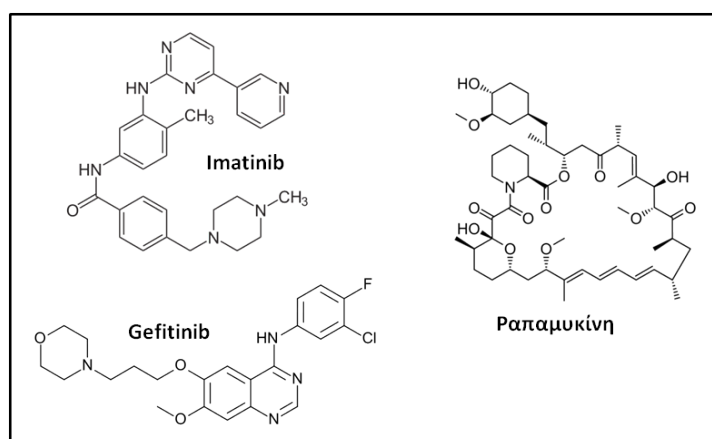
1.4 Νέοι θεραπευτικοί στόχοι και φάρμακα

1.4.1 Φωσφατάσες ως μοριακοί στόχοι για την ανάπτυξη αντι-παρασιτικών φαρμάκων

Οι κινάσες και οι φωσφατάσες πρωτεϊνών αποτελούν, γενικά, θεραπευτικούς στόχους, μέσω φαρμάκων που δρουν ως αναστολείς τους. Για το λόγο αυτό, η εύρεση πρωτεϊνικών κινάσων και φωσφατασών που να αντιπροσωπεύουν στόχους για νέους αντι-παρασιτικούς παράγοντες είναι ελκυστικό πεδίο έρευνας. Οι πρωτεϊνικές κινάσες έχουν γίνει πλέον δημοφιλής στόχος φαρμάκων, αποτελώντας το 30% πολλών ερευνητικών προγραμμάτων στη βιομηχανία των φαρμάκων [40]. 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 (εικόνα 1.8) [41].

Η μέχρι στιγμής έρευνα για παρασιτικές πρωτεϊνικές κινάσες και φωσφατάσες, εν δυνάμει μολυσματικών παραγόντων άρα και πιθανών στόχων φαρμάκων-αναστολέων, έχει ωφεληθεί σε μεγάλο βαθμό από το πρόγραμμα αλληλούχησης EST

για ταυτοποίηση μοριακών στόχων [42]. Η ανάγκη για συνεχιζόμενη έρευνα σε αυτό το πεδίο είναι σταθερή, επιπλέον, λόγω της πιθανής ανάπτυξης ανθεκτικότητας των παρασίτων που μπορεί να καταστήσει γρήγορα ένα πολύ αποτελεσματικό φάρμακο αναποτελεσματικό [43] και παρά την πρόοδο που έχει επιτευχθεί με τους αναστολείς κινασών ως αντι-παρασιτικά φάρμακα, η έρευνα σχετικά με φωσφατάσες, ως στόχων αντι-παρασιτικών φαρμάκων, έχει ελάχιστα προχωρήσει λόγω του ευρέως φάσματος υποστρωμάτων που αποφωσφορυλιώνουν, της ύπαρξης διαφορετικών λειτουργικών υπομονάδων των ολοενζύμων και της έλλειψης αντιδραστηρίων (ειδικότερα αναστολέων) για την μελέτη ειδικά επιλεγμένων φωσφατασών [44, 45]. Παρά τη σημαντική πρόοδο, σχετικά με τη διευκρίνιση της λειτουργίας των φωσφατασών, η κατανόηση της ρύθμισής τους και της αλληλεπίδρασής τους με το υπόστρωμα, απαιτούν περισσότερη δουλειά. Αυτές οι μελέτες είναι σημαντικές, αφού οι διαταραχές σε φυσιολογικές λειτουργίες που σχετίζονται με αποφωσφορυλίωση πρωτεϊνών ή μορίων μεταγωγής σήματος από πρωτεϊνικές φωσφατάσες προκαλούν πολλές ασθένειες στον άνθρωπο, όπως καρκίνο (πρωτεϊνική φωσφατάση PP5, πρωτεϊνική φωσφατάση 2A, πρωτεϊνική φωσφατάση PP6) και διαβήτη (πρωτεϊνική φωσφατάση 2A) [41, 46, 47]. Ακόμη, πρόσφατα σημαντικά αποτελέσματα δείχνουν ότι είναι εφικτό να σχεδιαστούν ισχυροί και εκλεκτικοί ρυθμιστές φωσφατασών με θεραπευτική δυναμική και ενθαρρύνουν την έρευνα με στόχο την επικύρωση των φωσφατασών ως στόχων για ανάπτυξη φαρμάκων [48].



Εικόνα 1.8. Φάρμακα-αναστολείς πρωτεϊνικών φωσφατασών

1.4.2 Εκκρινόμενες μικροβιακές φωσφατάσες ως μοριακοί στόχοι για την ανάπτυξη αντι-μικροβιακών φαρμάκων

Η κυτταρική μεμβράνη των προμαστιγωτών παρασίτων *Leishmania* περιέχει γλυκοπρωτεΐνες, πρωτεογλυκάνες και γλυκολιπίδια. Στα κύτταρα αυτά, η έκκριση πιστεύεται ότι ρυθμίζεται αποκλειστικά στην περιοχή έκφυσης του μαστιγίου (flagellar pocket) (και στα αμαστιγωτά, στο θύλακα του μαστιγίου) [49, 50]. Τα παράσιτα *Leishmania* είναι γνωστό ότι συνθέτουν πολλά μόρια που κατευθύνονται στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης, όπως η λιποφωσφογλυκάνη και η λεισμανιολυσίνη, GP63, κατά μήκος του ενδοπλασματικού δικτύου και του μονοπατιού που το συνδέει με την κυτταρική μεμβράνη [49]. Μέχρι στιγμής δεν έχειδειχθεί αν κάποιος μολυσματικός παράγοντας του παρασίτου εκκρίνεται από την περιοχή έκφυσης του μαστιγίου [49].

Αν και τα παράσιτα του είδους *Leishmania* χρησιμοποιούν την κλασσική αμινοτελική αλληλουχία που αποτελεί σήμα για την έκκριση των πρωτεϊνών, μέσω της περιοχής έκφυσης του μαστιγίου, ο μηχανισμός δεν έχει ακόμα εξακριβωθεί. Οι δύο επιφανειακές γλυκοπρωτεΐνες, η λιποφωσφογλυκάνη και η GP63, αρχικά συντίθενται με αυτή την αλληλουχία-σήμα που στη συνέχεια κόβεται με πρωτεόλυση [49]. Εντούτοις, η συντριπτική πλειοψηφία των χαρακτηρισμένων ως εκκρινόμενων πρωτεϊνών των παρασίτων αυτών δεν έχουν κάποια αναγνωρισμένη αλληλουχία έκκρισης, με εξαίρεση τις πρωτεΐνες που αρχικά δεσμεύονται στη μεμβράνη [49, 51, 52], κάτι που υποδηλώνει την ύπαρξη σημαντικών μη κλασσικών μονοπατιών έκκρισης. Παρά τη μεγάλη δυνητική σημασία της έκκρισης πρωτεϊνών στα παράσιτα *Leishmania*, η οποία θα μπορούσε να βοηθήσει στην κατανόηση της λειτουργίας των παρασίτων, μόνο ένας μικρός αριθμός τους έχει μελετηθεί [53].

Είναι γνωστό ότι φωσφατάσες παθογόνων βακτηρίων (όπως των *Mycobacterium*, *Salmonella*, *Shigella* και *Yersinia*, που στο θηλαστικό ξενιστή δρουν σε μονοπάτια που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο, την κυκλοφορία κυστιδίων ή τη δυναμική του κυτταροσκελετού) εκκρίνονται στα κύτταρα-ξενιστές και αποτελούν μολυσματικούς παράγοντες και πιθανούς φαρμακευτικούς στόχους (πίνακας 1.1). Παράδειγμα αποτελεί η φωσφατάση τυροσίνης και φωσφοϊνοσιτιδίων, LipA, του παθογόνου βακτηρίου *Listeria monocytogenes* και οι φωσφατάσες MptpA (τυροσίνης) και MptpB (τυροσίνης, σερίνης/θρεονίνης και φωσφοϊνοσιτιδίων) του παθογόνου βακτηρίου *Mycobacterium tuberculosis* [54, 55].

Πίνακας 1.1. Εκκρινόμενες φωσφατάσες παθογόνων βακτηρίων και ο ρόλος τους στην αλληλεπίδραση παθογόνου-ξενιστή [55]

Οργανισμός	Φωσφατάση	Υπόστρωμα-στόχος ξενιστή	Λειτουργία
<i>Yersinia sp.</i>	YopH	Κινάση κυτταρικής προσκόλλησης (FAK), paxillin, Lck, p85, πρωτεΐνη πρόσδεσης Fyn (FYB), p130 ^{Cas} , SKAP-HOM, SLP-76, LAT	Αναστολή φαγοκυττάρωσης, ανακατανομή κυτταροσκελετού και παραγωγή ROS
<i>Salmonella enterica</i>	SptP	AAA+ ATPάση που περιέχει valosin (VCP/p97)	Ανακατανομή της ακτίνης, αναστολή σηματοδότησης MAPK και παραγωγή IL-8, δημιουργία κυστιδίων (SCV)
	SopB	PtdIns(3,4,5)P ₃ , PtdIns (3,5)P ₂ , PtdIns (4,5)P ₂	Ενεργοποίηση των Cdc42 και RhoG για διαμόρφωση ανακατανομής της ακτίνης, ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/Akt και της PI3K τάξης III, δημιουργία κυστιδίων (SCV)
<i>Listeria monocytogenes</i>	LipA	Άγνωστα, <i>in vitro</i> φωσφοτυροσίνη και φωσφοϊνοσιτίδια	Άγνωστη, παίζει σημαντικό ρόλο στη μολυσματικότητα στα ποντίκια
<i>Shigella flexneri</i>	IpgD	PtdIns (3,4,5)P ₃ , PtdIns (3,4)P ₂ , PtdIns (4,5)P ₂	Ανακατανομή της ακτίνης, ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/Akt
<i>Francisella tularensis</i>	AcpA	p47 ^{phox} , p40 ^{phox} , p67 ^{phox}	Αναστολή της οξειδάσης του NADPH
<i>Legionella pneumophila</i>	Map	Άγνωστα	Άγνωστη
<i>Legionella micdadei</i>	ACP ₂	Άγνωστα	Αναστολή της παραγωγής ανιόντων σουπεροξειδίου στα ανθρώπινα ουδετερόφιλα
<i>Coxiella burnetii</i>	ACP	p47 ^{phox} , p60 ^{phox}	Αναστολή της οξειδάσης του NADPH
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	PtpA	VPS33B, ATPάση-V υπομονάδα H	Αναστολή ωρίμανσης του φαγοσώματος
	PtpB	Άγνωστα	Αναστολή των μονοπατιών ERK1/2 και p38 και της κασπάσης 3, ενεργοποίηση της Akt
	SapM	PI3P	Αναστολή ωρίμανσης του φαγοσώματος
<i>Pseudomonas syringae</i>	HopAO1	Άγνωστα	Καταστολή απόπτωσης

1.4.3 Φωσφατάσες του παρασίτου *Leishmania*

Ανάλυση του συνόλου των φωσφατασών (phosphatome) των κνητοπλαστιδίων [56] έδειξε ότι τα παράσιτα αυτά διαθέτουν ορθόλογα (orthologues) μόρια πολλών ήδη μελετημένων ευκαρυωτικών φωσφατασών από άλλα είδη αλλά και από τον άνθρωπο. Ωστόσο, πολλές από τις φωσφατάσες των κνητοπλαστιδίων διαθέτουν πρωτότυπη αρχιτεκτονική και ασυνήθιστους συνδυασμούς δομικών στοιχείων, υποδηλώνοντας διακριτούς λειτουργικούς ρόλους. Επομένως, τα διαφορετικά χαρακτηριστικά των φωσφατασών από τα είδη *Leishmania* μπορούν να αξιοποιηθούν για επιλογή νέων στόχων για ανάπτυξη φαρμάκων, χρησιμοποιώντας τη γνώση σχετικά με αναστολείς πρωτεϊνικών φωσφατασών [57, 58].

1.4.4 Φωσφατάσες τυροσίνης, σερίνης/θρεονίνης και διπλής εξειδίκευσης

Μία ενδιαφέρουσα διαφορά του συνόλου των φωσφατασών των παρασιτικών πρωτοζώων *Leishmania* σε σχέση με άλλα ευκαρυωτικά κύτταρα είναι ο μεγάλος αριθμός των μη τυπικών φωσφατασών [59] (πάνω από το ένα τρίτο του συνόλου των φωσφατασών), οι περισσότερες εκ των οποίων ανήκουν στην οικογένεια φωσφατασών διπλής εξειδίκευσης (dual specificity phosphatases, DSP, που αποφωσφορυλιώνουν κατάλοιπα φωσφοτυροσίνης και φωσφοσερίνης/φωσφοθρεονίνης εντός ενός υποστρώματος) με σημαντική, όμως, απόκλιση από τις κλασσικές DSP [60]. Οι πρώτες αναφέρονται ως μη τυπικές DSP (aDSP).

Είναι σημαντικό πως τα καλύτερα αντι-λεϊσμανιακά φάρμακα που έχουν αναπτυχθεί μέχρι σήμερα είναι ενώσεις αρσενικού που αναστέλλουν φωσφατάσες τυροσίνης (PTP) [61].

1.4.5 Φωσφατάσες φωσφοϊννοσιτιδίων και τριπλής εξειδίκευσης

Οι φωσφατιδυλοϊννοσιτόλες (PtdIns) είναι σημαντικοί μεταβολίτες που εμφανίζονται σε μικρά ποσοστά στις μεμβράνες των ευκαρυωτικών κυττάρων. Μπορούν να φωσφορυλιωθούν στις τρεις από τις πέντε ελεύθερες υδροξυλομάδες της ιννοσιτόλης (D-3, 4 και 5) για να δώσουν επτά διαφορετικά φωσφοϊννοσιτίδια (PI) (εικόνα 1.7), σε αντιδράσεις που καταλύονται από εξειδικευμένες κινάσες των φωσφοϊννοσιτιδίων. Τα ένζυμα που καταλύουν την φωσφορυλίωση στις θέσεις 3 και 4 έχουν εντοπιστεί και χαρακτηριστεί, ενώ το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση του PtdIns5P *in*

νίνο δεν είναι ακόμη γνωστό [62]. Σύμφωνα με φυλογενετική μελέτη [63], έχουν βρεθεί παρασιτικές κινάσες (στα είδη *Leishmania*, *Trypanosoma* και *Plasmodium*) που διαφέρουν από τις ανθρώπινες ομόλογες και μπορούν να αποτελέσουν πιθανό στόχο φαρμάκων. Μέσω κατανόησης της εξελικτικής σχέσης των παρασιτικών αυτών κινασών με τις ομόλογες των ανώτερων ευκαρυωτικών μπορεί να διευκολυνθεί η επιλογή του μορίου-στόχου των φαρμάκων στα παράσιτα, αλλά και ο σχεδιασμός δοκιμασιών ανίχνευσης αυτών των κινασών [63].

Οι φωσφατάσες των φωσφοϊνοσιτιδίων είναι ένζυμα που έχουν σημαντικούς ρόλους στα κύτταρα, όπως στη ρύθμιση της σηματοδότησης της ινσουλίνης και του μεταβολισμού της γλυκόζης (π.χ. η SHIP2 στην ομοιόσταση της γλυκόζης και στην παχυσαρκία [64, 65]), στη ρύθμιση αλλεργικών αντιδράσεων, όπως αναφυλαξίας και άσθματος, μέσω των σιτευτικών (SHIP1, [66]), στη διαφοροποίηση των πρόδρομων οστεοκλαστών (SHIP1, [67]), στον έλεγχο της συσσώρευσης αιμοπεταλίων (SHIP1, [68]). Ακόμη, οι φωσφατάσες αυτές συμμετέχουν σε διάφορες ασθένειες, όπως στην εξέλιξη νευροεκφυλιστικών ασθενειών, καρκίνου και μυοπαθειών, ενώ εμπλέκονται στην παθογένεση πολλών άλλων ασθενειών του ανθρώπου [69]. Για παράδειγμα, σε πρόσφατες μελέτες έχει βρεθεί πως σε περιπτώσεις οξείας λευχαιμίας είναι μη λειτουργική η 5-φωσφατάση SHIP1 και η 3-φωσφατάση PTEN [70]. Μία άλλη φωσφατάση φωσφοϊνοσιτιδίων και τυροσίνης, η PRL-3 (phosphatase of regenerating liver 3) αποτελεί δείκτη και στόχο θεραπείας σε διάφορα είδη καρκίνου, ενώ συμμετέχει και σε μεταστάσεις [48].

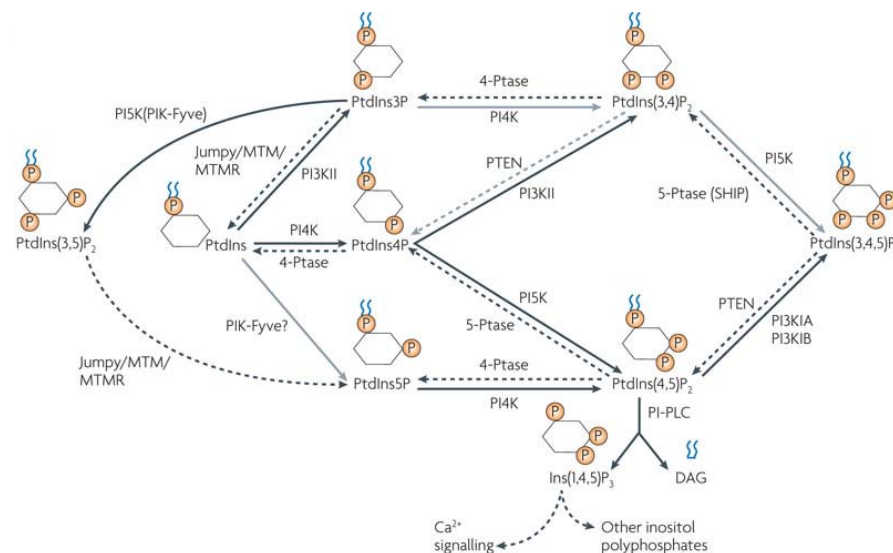
Σε κύτταρα θηλαστικών, έχουν εντοπιστεί πάνω από 35 φωσφατάσες φωσφοϊνοσιτιδίων και κάποιες από αυτές έχουν ήδη χαρακτηριστεί. Διακρίνονται σε τρεις μεγάλες κατηγορίες, 3-, 4- και 5-φωσφατάσες (πίνακας 1.2) ανάλογα με τη θέση του δακτυλίου της ινοσιτόλης που αποφωσφορυλιώνουν [69]. Μη λιπιδικές φωσφατάσες, οι οποίες συμμετέχουν στην αποφωσφορυλίωση των πολυφωσφορυλιωμένων ινοσιτολών, εκτός των 5-φωσφατασών τύπου I που υδρολύουν τις $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ και $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ (εικόνα 1.7), έχουν επίσης χαρακτηριστεί και μελετηθεί, τέτοιες είναι οι 1-φωσφατάσες των πολυφωσφορυλιωμένων ινοσιτολών και η μονοφωσφατάση της ινοσιτόλης η οποία αποτελεί τον κύριο στόχο φαρμάκων Li που χορηγούνται σε περιπτώσεις μανιοκατάθλιψης [71].

Πίνακας 1.2. Φωσφατάσες των φωσφοϊνοσιτιδίων (τα υποστρώματα που θεωρούνται ότι αποφωσφορυλιώνουν οι φωσφατάσες *in vivo* ή τα φυσιολογικά υποστρώματα παρουσιάζονται με έντονα γράμματα) [72]

Φωσφατάσες φωσφοϊνοσιτιδίων	Υποστρώματα/Προϊόντα (<i>in vivo</i> , <i>in vitro</i>)
5-φωσφατάσες τύπου II	
5-φωσφατάση II, OCRL (GIP)	PtdIns(4,5)P₂ , PtdIns(3,4,5)P ₃ , InsPs/PtdIns4P, PtdIns(3,4)P ₂
συναπτογיאίννη 1, 2	PtdIns(4,5)P₂ , InsPs/PtdIns4P
Sjl1p, Sjl2p, Sjl3p	PtdIns(4,5)P₂ , PtdIns(3,5)P ₂ /PtdIns4P, PtdIns
Sac1p, rSac1, Fig4p	PtdIns(3,5)P ₂ , PtdIns3P, PtdIns4P /PtdIns
hSac2	PtdIns(4,5)P ₂ > PtdIns(3,4,5)P ₃ /PtdIns4P
Φαρμπίνη (pharbin), PIP (5-φωσφατάση), SKIP	PtdIns(3,4,5)P ₃ , PtdIns(4,5)P ₂ , PtdIns(3,5)P ₂ , InsPs
5-φωσφατάσες τύπου III	
SHIP 1, 2	PtdIns(3,4,5)P₃ > PtdIns(4,5)P ₂ , InsPs/PtdIns(3,4)P ₂ , PtdIns4P
5-φωσφατάσες τύπου IV	
5-φωσφατάση IV	PtdIns(3,4,5)P₃ > PtdIns(4,5)P ₂ /PtdIns(3,4)P ₂ , PtdIns4P
4-φωσφατάσες	
4-φωσφατάση I, II	PtdIns(3,4)P ₂ /PtdIns3P
3-φωσφατάσες	
PTEN	PtdIns(3,4,5)P₃ > PtdIns(3,4)P ₂ > PtdIns3P, InsPs/PtdIns(4,5)P ₂ , PtdIns4P, PtdIns
μυοτουμπουλαρίνη (MTM),	PtdIns3P /PtdIns
MTMR 3	PtdIns(3,5)P₂ , PtdIns3P/PtdIns5P, PtdIns

Μέσω αλληλεπιδράσεων κατάλληλων πρωτεϊνών με την πολική κεφαλή τους, τα PI παίζουν βασικό ρόλο στον έλεγχο της επικοινωνίας των μεμβρανών του κυττάρου. Τα φωσφοϊνοσιτίδια, εξάλλου, συμμετέχουν σε άμεσες αποκρίσεις του κυττάρου σε ερεθίσματα και επομένως δρουν ως σηματοδοτικά μόρια, ενώ βοηθούν και στον προσδιορισμό της ταυτότητας των οργανιδίων. Οι λειτουργίες τους, εκτός από την κλασσική μεταγωγή σήματος και τη ρύθμιση της κυκλοφορίας των μεμβρανών, περιλαμβάνουν ρύθμιση της οργάνωσης του κυτταροσκελετού και της διαπερατότητας των μεμβρανών [73].

Οι μεταβολικές μετατροπές των PI υπόκεινται σε ξεχωριστή χωρική και χρονική ρύθμιση και εκτελούνται από συστοιχίες κατάλληλων μεταβολικών ενζύμων. Αυτά περιλαμβάνουν, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, κινάσες που οδηγούν σε σύνθεση φωσφοϊνοσιτιδίων, αλλά και φωσφατάσες και φωσφολιπάσες που ρυθμίζουν την αποικοδόμηση των φωσφοϊνοσιτιδίων [67]. Οι λυσοφωσφολιπάσες τύπου C υδρολύουν τα φωσφοϊνοσιτιδία, με τη φωσφολιπάση C (PI-PLC) να αποτελεί ένζυμο κλειδί του κύκλου των φωσφοϊνοσιτιδίων, δηλαδή ενός σημαντικού συστήματος μεταγωγής σήματος των κυττάρων. Οι φωσφολιπάσες C υδρολύουν τις PtdIns, PtdIns4P, PtdIns(4,5)P₂ (όχι τα D3 φωσφοϊνοσιτιδία), παράγοντας τα υδατοδιαλυτά Ins1P, Ins(1,4)P₂, Ins(1,4,5)P₃ (κύριο *in vivo* προϊόν της PI-PLC) αντίστοιχα και τη λιποδιαλυτή διακυλογλυκερόλη (DAG, εικόνα 1.9) [72].



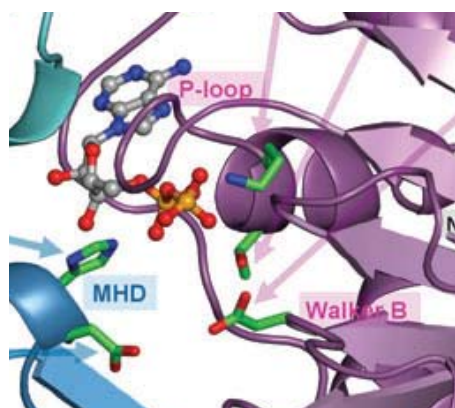
Εικόνα 1.9. Μεταβολισμός φωσφοϊνοσιτιδίων [74]

Την προηγούμενη δεκαετία, οι φωσφατάσες των PI είχαν προσελκύσει το ενδιαφέρον λόγω α) της εκτίμησης πως αποτελούν πρωταρχικούς μηχανισμούς αποικοδόμησης των φωσφοϊνοσιτιδίων και β) της συνεχώς αυξανόμενης σύνδεσής τους με ασθένειες του ανθρώπου [75-77]. Να τονιστεί και πάλι ότι η ρύθμιση του μεταβολισμού των φωσφοϊνοσιτιδίων είναι σημαντική στην παθογένεια και τη μολυσματικότητα πολλών ενδοκυττάρων παθογόνων μικροοργανισμών για τον άνθρωπο, επιτρέποντάς τους να επιζούν και να πολλαπλασιάζονται στα κύτταρα ξενιστές [73, 75, 78]. Οι φωσφατάσες των φωσφοϊνοσιτιδίων από μολυσματικούς βακτηριακούς

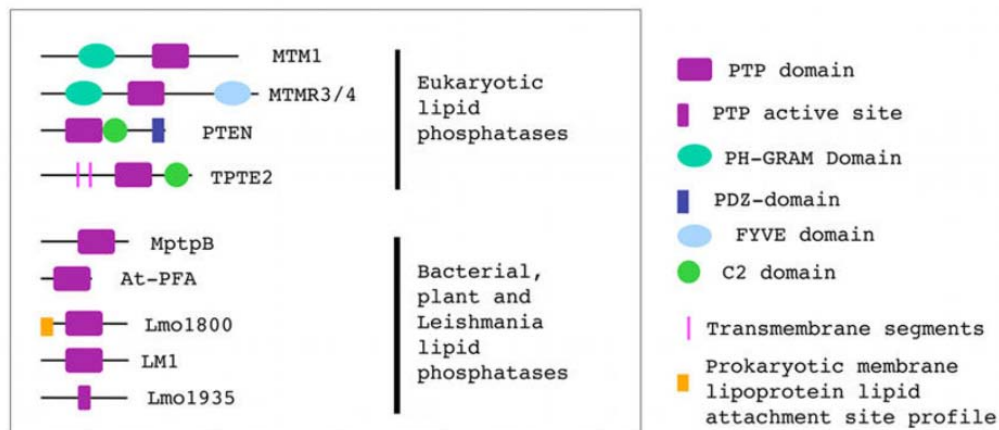
μικροοργανισμούς είναι, επομένως, κλειδιά γι' αυτή τη ρύθμιση και αποτελούν στόχο για χημειοθεραπεία.

1.4.6 Άτυπες φωσφατάσες λιπιδίων σε βακτήρια και κατώτερα ευκαρυωτικά

Μία νέα οικογένεια φωσφατασών των φωσφοϊννοσιτιδίων έχει πρόσφατα περιγραφεί σε βακτήρια και κατώτερα ευκαρυωτικά κύτταρα. Οι φωσφατάσες αυτές ονομάστηκαν άτυπες φωσφατάσες λιπιδίων τριπλής εξειδίκευσης, διότι αποφωσφορυλιώνουν και φωσφοπεπτίδια με φωσφορυλιωμένη τυροσίνη και σερίνη/θρεονίνη [79]. Η οικογένεια αυτών των ενζύμων έχει μία διατηρημένη αλληλουχία βρόγχου P (P-loop) (HCXXGKDR), συντηρημένη αλληλουχία του καταλυτικού κέντρου των φωσφατασών τυροσίνης (εικόνες 1.10 και 1.11) και εμφανίζει παρόμοια βιοχημικά χαρακτηριστικά με κλασσικές ευκαρυωτικές φωσφατάσες λιπιδίων (π.χ. PTEN), χωρίς να έχει όμως ομόλογα ανθρώπινα ένζυμα. Με βάση την αλληλουχία του βρόγχου P ως “μοτίβου αναγνώρισης”, εντοπίστηκαν με βιοπληροφορική ανάλυση σε βακτήρια, μύκητες και πρωτόζωα 200 μη χαρακτηρισμένες υποθετικές αλληλουχίες φωσφατασών με συντηρημένη αλληλουχία βρόγχου P [74], [80]. Στην οικογένεια αυτή των φωσφατασών ανήκει και ο MptpB, ένας παράγοντας παθογένειας από το *Mycobacterium tuberculosis* με δραστικότητα φωσφατάσης φωσφοϊννοσιτιδίων και το διακριτό ενεργό κέντρο με αλληλουχία βρόγχου P (HCXXGKDR) που απαντάται σε ευκαρυωτικές φωσφατάσες λιπιδίων και πρωτεϊνικές φωσφατάσες τυροσίνης [81].



Εικόνα 1.10. Το μοτίβο του βρόγχου P [82]



Εικόνα 1.11. Οργάνωση υποτομών στις φωσφατάσες λιπιδίων (φωσφοϊνοσιτιδίων). Οι φωσφατάσες τύπου PTEN και MTM περιέχουν τμήμα PTP και πρόσδεσης φωσφοϊνοσιτιδίων, όπως PH-GRAM, C2 και FYVE που προκαλούν αλλοστερικό έλεγχο και βρίσκονται στο τμήμα PTP σε διαφορετικά σημεία της μεμβράνης. Οι ALP και PFA δεν παρουσιάζουν κλασικά σημεία πρόσδεσης φωσφοϊνοσιτιδίων, εκτός της Lmo1800 (LipA) που περιέχει μία προβλεπόμενη αλληλουχία πρόσδεσης φωσφοϊνοσιτιδίων [81]. Η LM1 είναι η ομόλογη φωσφατάση της *LdPIPh22* που μελετάται στην παρούσα εργασία από το παράσιτο *L. major*

Το παράσιτο *Leishmania donovani* διαθέτει δύο ALP, με τη διατηρημένη αλληλουχία στην περιοχή του βρόγχου P, ορθόλογες του MptpB που προαναφέρθηκε. Οι φωσφατάσες αυτές δεν έχουν ακόμη μελετηθεί και αποτελούν έναν από τους ερευνητικούς στόχους της Ομάδας Ενδοκυττάριου Παρασιτισμού στο Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ που ασχολείται με την ταυτοποίηση και μελέτη ενζύμων του συγκεκριμένου παρασίτου που θα μπορούσαν να αποτελέσουν εν δυνάμει μοριακούς στόχους για την ανάπτυξη αντι-λεϊσμανιακών φαρμάκων/αναστολέων. Μία εκ των δύο αυτών πρωτεϊνών αποτελεί το αντικείμενο της παρούσας εργασίας.

2. ΣΚΟΠΟΣ

Έναυσμα για τη μελέτη της πρωτεΐνης οριζόμενης ως *LdPIPh22* (*Leishmania donovani* Phosphoinositide Phosphatase του χρωμοσώματος 22) από το παρασιτικό πρωτόζωο *Leishmania donovani* αποτέλεσε μία *in silico* βιοπληροφορική μελέτη του 2010 από τους Beresford et al [81], που ταυτοποιεί μία οικογένεια ALP των βακτηρίων και κατώτερων ευκαρυωτικών κυττάρων. Οι πρωτεΐνες αυτές φέρουν χαρακτηριστική αλληλουχία βρόγχου P (HCXXGKDR) που βρίσκεται στο καταλυτικό κέντρο των φωσφατάσων τυροσίνης [79], ομόλογη με την αλληλουχία βρόγχου P (HCFAGKDR) της φωσφατάσης φωσφοϊνοσιτιδίων MptpB του παθογόνου βακτηρίου *Mycobacterium tuberculosis*. Στην εργασία αυτή γίνεται αναφορά στην ομόλογη πρωτεΐνη από το είδος *Leishmania major*, της οποίας η μέχρι στιγμής μελέτη περιορίζεται σε κλωνοποίηση, έκφραση σε βακτήρια και *in vitro* δοκιμασία της δράσης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης ως φωσφατάσης φωσφοϊνοσιτιδίων [81].

Σκοπός της μελέτης μας ήταν η διερεύνηση της έκφρασης της ομόλογης πρωτεΐνης της *LmjF_22_0250*, στέλεχος *Friedlin*, στο παράσιτο *Leishmania donovani* και η περαιτέρω μελέτη της ως φωσφατάσης στα παράσιτα αλλά και σε ετερόλογα ανώτερα ευκαρυωτικά συστήματα, που θα μας βοηθήσουν στην κατανόηση της λειτουργίας της πρωτεΐνης, στην εύρεση πιθανών υποστρωμάτων, αλλά και στη διερεύνηση πιθανής έκκρισής της από το παράσιτο στο μακροφάγο (βλ. εισαγωγή, παραγράφους 1.4.2, 1.4.3, 1.4.4).

Η πρωτεΐνη *LdPIPh22* εντάσσεται στα ένζυμα που μελετώνται από τη Ομάδα Ενδοκυττάριου Παρασιτισμού στο Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, πρώτον, λόγω της ομολογίας της με τον εκκρινόμενο μολυσματικό παράγοντα MptpB του *Mycobacterium tuberculosis* που επιβιώνει στα μακροφάγα κύτταρα του ξενιστή, όπως και το παράσιτο *Leishmania*, και δεύτερον, επειδή εμφανίζει παρόμοια βιοχημικά χαρακτηριστικά με κλασσικές ευκαρυωτικές φωσφατάσες φωσφοϊνοσιτιδίων, χωρίς όμως να έχει ομόλογα ανθρώπινα ένζυμα, με συνέπεια την πιθανότητα να αποτελέσει μοριακό στόχο για σχεδιασμό αναστολέων/φαρμάκων.

Για τους παραπάνω λόγους το γονίδιο της πρωτεΐνης *LdPIPh22* (*Ldriph22*) κλωνοποιήθηκε, μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, σε τρεις διαφορετικούς φορείς έκφρασης, παρήχθησαν πολυκλωνικά αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης αυτής σε κουνέλι και ποντίκια και η πρωτεΐνη εκφράστηκε ομόλογα σε παράσιτα *L. donovani*

και ετερόλογα σε βακτήρια και κύτταρα ανώτερων ευκαρυωτικών κυτταρικών σειρών για μελέτη της δραστικότητας της φωσφατάσης και του εντοπισμού της.

3. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

3.1 Βιοπληροφορική μελέτη του γονιδίου της πρωτεΐνης *LinPIPh22*

Η βιοπληροφορική ανάλυση ενός καινούργιου γονιδίου αποτελεί ένα πρώτο και εξαιρετικά χρήσιμο βήμα για τη μελέτη του. Με τη χρήση εργαλείων βιοπληροφορικής μπορούμε να εξάγουμε κατευθυντήριες πληροφορίες για την περαιτέρω πειραματική μελέτη του μορίου. Αυτές οι πληροφορίες αφορούν στην έκφραση του μορίου, στην εύρεση μοτίβων με πιθανή λειτουργική σημασία στην αλληλουχία του, στην εύρεση ομολογίας του με άλλες πρωτεΐνες, στην πιθανότητα αλληλεπίδρασης του με άλλες πρωτεΐνες. Γι' αυτό, πριν την έναρξη της πειραματικής μελέτης της πρωτεΐνης *LdPIPh22* ([LDBPK_220120](#)) του παρασίτου *Leishmania donovani*, η οποία είναι ομόλογη της υποθετικής φωσφατάσης φωσφοϊνοσιτιδίων *LinPIPh22* ([LinJ22_V3.0120](#)) από το παράσιτο *Leishmania infantum*, το γονιδίωμα του οποίου έχει χαρτογραφηθεί, προηγήθηκε σύγκριση της αλληλουχίας του γονιδίου που την κωδικοποιεί, αρχικά στα διαφορετικά είδη του παρασίτου *Leishmania* και στη συνέχεια σε γονίδια άλλων παθογόνων μικροοργανισμών, κυρίως βακτηρίων, με ανάλυση Blast και με το πρόγραμμα ClustalW2, στο οποίο έγινε ευθυγράμμιση της αλληλουχίας της συγκεκριμένης πρωτεΐνης με ομόλογές της. Πραγματοποιήθηκε, ακόμη, μελέτη διαφόρων φυσικοχημικών ιδιοτήτων της πρωτεΐνης, όπως έλεγχος υδροφοβικότητας, ύπαρξης διαμεμβρανικών περιοχών ή θέσεων πιθανής φωσφορυλίωσης. Για τα προηγούμενα χρησιμοποιήθηκε το Expasy Bioinformatics Resource (<http://expasy.org/>) και, πιο συγκεκριμένα, οι αλγόριθμοι Translate, Blast, ProtParam, TMHMM, Scan Prosite, TMpred και NetPhos.

Για την εύρεση των σημείων πέψης από περιοριστικά ένζυμα, η επεξεργασία της αλληλουχίας των πλασμιδιακών φορέων που χρησιμοποιήθηκαν και του ενθέματος έγινε ηλεκτρονικά με τον αλγόριθμο NEBCutter 2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>).

Τέλος, για τον έλεγχο των ολιγονουκλεοτιδίων που σχεδιάστηκαν ως εκκινήτες στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), για την ενίσχυση του γονιδίου της *LdPIPh22* από γενωμικό DNA της *L. donovani*, χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό OligoAnalyzer 3.1 (<http://eu.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>).

3.2 Απομόνωση γενωμικού DNA από παράσιτα *Leishmania donovani*

Το στέλεχος του παρασίτου *Leishmania donovani* από το οποίο απομονώθηκε το γενωμικό DNA είναι το LG13 αγρίου τύπου (MHOM/ET/0000/HUSSEN, [83]).

Αντιδραστήρια - Όργανα

- Διάλυμα λύσης κυττάρων, pH 7,4
 - Χλωριούχο νάτριο (NaCl) 50 mM, υψηλού βαθμού καθαρότητας (99%), κατάλληλο για τεχνικές μοριακής βιολογίας, Applichem
 - Αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ (EDTA) 10 mM, VWR International
 - Τρις-υδροξυλαμινομεθάνιο (Tris-HCl) 50 mM (Tris ultrapure, Applichem)
 - Υπερκάθαρο νερό (πέρασμα από στήλες ιονανταλλαγής και αντίστροφης όσμωσης)
- Δωδεκυλο-σουλφονικό νάτριο (SDS), Sigma
- Πρωτεΐνάση K, Macherey-Nagel
- RNάση A, Sigma
- Φαινόλη, Applichem
- Χλωροφόρμιο (CHCl_3), Applichem
- Απόλυτη αιθανόλη ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), VWR International
- Οξικό νάτριο (CH_3COONa), VWR International
- PBS (Phosphate Buffer Saline), pH 7,4, το 1 λίτρο περιέχει:
 - ο Χλωριούχο νάτριο 8 g, Applichem
 - ο Na_2HPO_4 1,44 g, Applichem
 - ο Χλωριούχο κάλιο 0,2 g, Merck
 - ο Δισοξινο-φωσφορικό κάλιο (KH_2PO_4) 0,24 g, Merck
- Πεχάμετρο, Orion 2-star pH Benchtop Meter, Thermo scientific
- Μικροφυγόκεντρος, Eppendorf 5417R
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος, Jouan CR3i multifunction, Thermo
- Φασματοφωτόμετρο, Nanodrop ND 2000/2000c, Thermo Scientific

Πειραματική διαδικασία

Η απομόνωση γενωμικού DNA από παράσιτα έγινε με χρήση φαινόλης σύμφωνα με την παρακάτω διαδικασία.

- Τα παράσιτα φυγοκεντρώνται στα 1000×g για 6 λεπτά

- Ακολουθεί έκπλυση με παγωμένο διάλυμα PBS
- Το ίζημα αναδιαλύεται στο διάλυμα λύσης παρασίτων (250 $\mu\text{L}/10\text{ mL}$ καλλιέργειας)
- Προστίθεται SDS (0,5% w/v σε διάλυμα λύσης κυττάρων)
- Προστίθεται πρωτεΐνάση K σε τελική συγκέντρωση 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$
- Το δείγμα επωάζεται για 16 ώρες (overnight) στους 55° C
- Την επόμενη ημέρα προστίθεται ίσος όγκος φαινόλης και το δείγμα φυγοκεντρείται στα 20000 $\times g$ σε μικροφυγόκεντρο για 10 λεπτά (4° C)
- Συλλέγεται η ανώτερη υδατική φάση και σε αυτήν προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος φαινόλης/χλωροφορμίου (1/1, v/v)
- Το δείγμα φυγοκεντρείται όπως προηγουμένως, συλλέγεται πάλι η ανώτερη υδατική φάση και προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος χλωροφορμίου
- Το δείγμα φυγοκεντρείται όπως προηγουμένως και συλλέγεται η ανώτερη υδατική φάση
- Το DNA κατακρημνίζεται με προσθήκη 2,5 όγκων παγωμένης απόλυτης αιθανόλης με ελαφριά ανάδευση με αναστροφή του σωλήνα
- Προστίθεται 1/10 του όγκου οξικό οξύ 3 M (pH 5,2) και ακολουθεί ελαφριά ανάδευση (αν το DNA δεν είναι ορατό αφήνεται το δείγμα στους 4° C για τουλάχιστον 30 λεπτά)
- Το DNA κατακρημνίζεται με φυγοκέντρωση όπως προηγουμένως, αλλά για 15 λεπτά, και αποχύνεται το υπερκείμενο
- Προστίθεται ίσος, με την απόλυτη αιθανόλη, όγκος παγωμένης αιθανόλης 70% v/v, ακολουθεί φυγοκέντρωση στις ίδιες συνθήκες με το προηγούμενο βήμα και απόχυση του υπερκειμένου
- Στη συνέχεια, το DNA αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να στεγνώσει (σε ρεύμα αέρα απαγωγού) ή σε μηχανήμα φυγοκεντρικής εξάτμισης υπό κενό, στους 37° C
- Το DNA αναδιαλύεται σε 50 μL υπερκάθαρου νερού (επιπλέον προσθήκη νερού εξαρτάται από το ιξώδες του διαλύματος)
- Παραμένει στους 4° C για 16 ώρες, ώστε να διαλυθεί καλά
- Η συγκέντρωσή του προσδιορίζεται με μέτρηση οπτικής απορρόφησης στα 260 nm (βλ. παράγραφο 3.3.2)
- Τέλος, η ποιότητα του DNA ελέγχεται σε πηκτή αγαρόζης (βλ. παράγραφο 3.3.3).

Το παρακείμενο του DNA μπορεί να φυλαχθεί στους 4° C για αρκετούς μήνες ή στους -20° C για μεγαλύτερο διάστημα. Πρέπει να αποφεύγονται οι πολλές αποψύξεις.

3.3 Κλωνοποίηση του γονιδίου της *LdPIPh22* σε πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης

3.3.1 Ενίσχυση του γονιδίου της *LdPIPh22* με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

Αντιδραστήρια - Όργανα

- Προκατασκευασμένα αντιδραστήρια KAPA2G Robust PCR Kits (KAPA BIOSYSTEMS), στα οποία περιέχεται η πολυμεράση και τα ρυθμιστικά διαλύματα του ενζύμου
- Διάλυμα τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοζιτών (dNTP), το οποίο περιέχει dATP, dGTP, dTTP και dCTP σε διάλυμα φωσφορικών συγκέντρωσης 10 mM το καθένα, KAPA BIOSYSTEMS
- Εκκινητές (primers), σχεδιάστηκαν στο εργαστήριο και παρηγγέλθηκαν μέσω της εταιρείας Lab Supplies από την εταιρεία VBC-Biotech. Οι αλληλουχίες τους αναφέρονται στο κεφάλαιο των Αποτελεσμάτων (παράγραφος 4.4.1)
- Σωλήνες PCR, Kisker
- Υπερκάθαρο αποστειρωμένο νερό (πέρασμα από στήλες ιονανταλλαγής και αντίστροφης όσμωσης)
- Θερμοκυκλοποιητής, MJ Research, PTC-200

Η PCR είναι μία από τις πιο διαδεδομένες μοριακές τεχνικές και χρησιμοποιείται για πολλαπλασιασμό και απομόνωση τμημάτων DNA. Σε αυτή τη διαδικασία είναι απαραίτητη η χρήση του ενζύμου DNA πολυμεράση του μικροοργανισμού *Thermus aquaticus*. Επειδή ο μικροοργανισμός αυτός είναι θερμοφίλος, τα ένζυμά του είναι ανθεκτικά σε υψηλές θερμοκρασίες, πλεονέκτημα το οποίο αξιοποιείται στις πολύ υψηλές θερμοκρασίες της PCR, χωρίς σημαντική απώλεια της δραστηριότητας του ενζύμου κατά τη διάρκεια της διαδικασίας.

Ως εκμαγείο της DNA πολυμεράσης χρησιμοποιείται μονόκλωνο DNA. Ένας νέος συμπληρωματικός κλώνος συντίθεται με κατεύθυνση $5' \rightarrow 3'$, με τη βοήθεια ενός μικρού τμήματος δίκλωνου DNA (εκκινητή) που υβριδοποιείται στη συμπληρωματική

ακολουθία του εκμαγείου για να γίνει η εκκίνηση της σύνθεσης. Για την ενίσχυση του επιθυμητού γονιδίου, είναι απαραίτητοι δύο εκκινητές (πρόσθιος και ανάστροφος) που υβριδίζονται εκατέρωθεν της επιθυμητής αλληλουχίας στις συμπληρωματικές αλυσίδες του δίκλωνου DNA καθορίζοντας έτσι τα άκρα του επιθυμητού προϊόντος.

Πειραματική διαδικασία

Αρχικά, παρασκευάζεται το μίγμα (master mix), το οποίο περιέχει το εκμαγείο του DNA, το ζεύγος των εκκινητών, τα τέσσερα dNTP και το ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει και ιόντα Mg^{2+} , απαραίτητα για τη δράση της πολυμεράσης. Σε περίπτωση που είναι αναγκαία μεγαλύτερη ποσότητα Mg^{2+} προστίθενται με τη μορφή του χλωριδίου ($MgCl_2$). Στο τέλος προστίθεται η DNA πολυμεράση, η οποία διατηρείται στους $-20^{\circ}C$.

Οι εκκινητές παραλαμβάνονται σε στερεά μορφή και διαλυτοποιούνται με προσθήκη υπερκάθαρου αποστειρωμένου νερού σε τελική συγκέντρωση 100 μM . Μία μικρή ποσότητα αραιώνεται σε τελική συγκέντρωση 10 μM για να χρησιμοποιηθεί στην αντίδραση της PCR. Τα διαλύματα των εκκινητών φυλάσσονται στους $-20^{\circ}C$.

Για να παραχθεί το επιθυμητό προϊόν, το τμήμα του DNA αντιγράφεται από την πολυμεράση σε πολλούς επαναλαμβανόμενους κύκλους ως εξής:

- Οι δύο κλώνοι του DNA διαχωρίζονται με θέρμανση του μίγματος στους $95-98^{\circ}C$ (εξαρτάται από το είδος της πολυμεράσης) για 1 λεπτό και 30 δευτερόλεπτα
- Το βήμα επαναλαμβάνεται για 10 δευτερόλεπτα (**στάδιο αποδιάταξης ή τήξης**)
- Το μίγμα ψύχεται στους $55-65^{\circ}C$ για να υβριδοποιηθούν οι εκκινητές με τις δύο αλυσίδες του μονόκλωνου DNA για 30 δευτερόλεπτα (**στάδιο επαναδιάταξης ή υβριδοποίησης**)
- Η θερμοκρασία αυξάνεται στους $72^{\circ}C$ για 1 λεπτό (βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της πολυμεράσης) και ξεκινά η σύνθεση του DNA (**στάδιο πολυμερισμού ή επέκτασης**)
- Ο κύκλος των τριών τελευταίων σταδίων επαναλαμβάνεται πέντε φορές
- Η αλληλουχία των σταδίων τήξης ($95-98^{\circ}C$), υβριδοποίησης ($55-65^{\circ}C$) και πολυμερισμού ($72^{\circ}C$) επαναλαμβάνεται για ακόμη 25 κύκλους. Προαιρετικά, υπάρχει ένα ακόμη στάδιο μετά το τελευταίο στάδιο του πολυμερισμού, στους $72^{\circ}C$ για 10 λεπτά, για να ολοκληρωθεί η σύνθεση του προϊόντος DNA.

Μετά από n κύκλους λαμβάνονται θεωρητικά 2^n μόρια δίκλωνου προϊόντος DNA. Πρακτικά, όμως, ο αριθμός των μορίων είναι μικρότερος είτε λόγω μερικής μετουσίωσης του ενζύμου είτε επειδή δεν πολλαπλασιάζεται το 100% των μορίων του DNA σε κάθε κύκλο.

Η πιστότητα της αντιγραφής του DNA είναι χαρακτηριστικό ποιότητας της εκάστοτε πολυμεράσης, η οποία αν και έχει διορθωτική δράση εξωνουκλεάσης όπως η Kapa2G πολυμεράση, προκαλεί πολύ λιγότερες μεταλλάξεις λόγω λαθών στην αντιγραφή. Στον πίνακα 3.1 παρουσιάζονται οι τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν.

Πίνακας 3.1. Μίγμα αντίδρασης PCR

Αντιδραστήρια	Ποσότητες	Τελικές συγκεντρώσεις
Ρυθμιστικό διάλυμα 5x (περιέχει 1,5 mM Mg^{2+})	20 μ L	1x
dNTPs 10 mM	2 μ L	200 μ M
Πρόσθιος εκκινητής 10 μ M	5 μ L	0,5 μ M
Ανάστροφος εκκινητής 10 μ M	5 μ L	0,5 μ M
Εκμαγείο DNA (10 ng/ μ L)	2 μ L	5 ng/αντίδραση
Πολυμεράση KAPA2G (5 U/ μ L)	0,5 μ L	2,5 U/αντίδραση
Νερό	67,0 μ L	-
Συνολικά	100 μL	

3.3.2 Μέτρηση της συγκέντρωσης του DNA

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Φασματοφωτόμετρο Nanodrop ND 2000/2000c (Thermo Scientific)

Πειραματική διαδικασία

Ποσότητα 1-2 μ L δείγματος διαλύματος DNA τοποθετείται στο άκρο ενός ινώδους οπτικού καλωδίου. Ένα δεύτερο οπτικό καλώδιο έρχεται σε επαφή με το υγρό δείγμα, οπότε το υγρό δημιουργεί γέφυρα μεταξύ των άκρων των δύο ινωδών οπτικών καλωδίων. Το κενό ρυθμίζεται στα 340 nm. Μία λάμπα παλμικής λάμψης Xe αποτελεί τη φωτεινή πηγή και ένας μετρητής δείκτη διάθλασης, χρησιμοποιώντας μία γραμμική

συστοιχία CCD, αναλύει το φως μετά τη διέλευσή του από το δείγμα. Το μηχάνημα ελέγχεται από ειδικό λειτουργικό πρόγραμμα και είναι συνδεδεμένο με υπολογιστή. Μετά τη μέτρηση αναγράφεται στον υπολογιστή η συγκέντρωση του DNA αλλά και κάποιες παράμετροι που δείχνουν την καθαρότητα του δείγματος. Πιο συγκεκριμένα, μετράται η απορρόφηση του δείγματος στα 230 nm, στα 260 nm και στα 280 nm. Ο λόγος 260/280 πρέπει να κυμαίνεται ανάμεσα στο 1,8-2,0 για να θεωρείται το δείγμα καθαρό και απαλλαγμένο από πρωτεΐνες. Ο λόγος 260/230 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 για την απομόνωση του DNA.

3.3.3 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Αγαρόζη (Agarose Basic, Applichem)
- Βρωμιούχο αιθίδιο, 10 mg/mL, Fluka
- Ρυθμιστικό διάλυμα 10X TBE (0,9 M Tris-HCl, 0,9 M Βορικό οξύ υψηλής καθαρότητας (Applichem), 0,02 M EDTA)
- Ρυθμιστικό διάλυμα 1X TBE (διάλυμα ηλεκτροφόρησης)
- Διάλυμα φόρτωσης 6X (loading dye solution), το οποίο περιέχει 10 mM Tris-HCl (pH 7,6), 0,03% κυανό της βρωμοφαινόλης (Merck), 0,03% κυανό του ξυλενίου (Merck), 60% v/v γλυκερόλη (Applichem) και 60 mM EDTA (VWR International). Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4° C
- Διαλύματα δείκτη μεγέθους 1 kb (500-10000 bp) και 100 bp (100-1500 bp) (New England Biolabs, NEB). Τα διαλύματα περιέχουν τμήματα DNA μεγέθους 500-10000 bp και 100-1500 bp, αντίστοιχα, και φυλάσσονται στους -20° C
- Συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης και συσκευή παροχής ηλεκτρικού ρεύματος (Power Pac), Owl Buffer Puffer™, Model A5 της ThermoFischer Scientific
- Συσκευή εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) συνδεδεμένη με κάμερα, AlphaImager της AlphaInnoteck
- Φούρνος μικροκυμάτων, R.S Concave Reflex System

Η ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης είναι η κυριότερη μέθοδος διαχωρισμού, ταυτοποίησης και απομόνωσης τμημάτων DNA. Στηρίζεται στο γεγονός ότι το DNA, σε ουδέτερο pH, είναι αρνητικά φορτισμένο λόγω των φωσφορικών ομάδων του. Έτσι, με εφαρμογή ρεύματος τα μόρια του DNA κινούνται προς το θετικό ηλεκτρόδιο με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη του λογαρίθμου του αριθμού των βάσεων τους. Τα μεγαλύτερα σε μέγεθος μόρια, λοιπόν, θα κινηθούν βραδύτερα και θα εντοπιστούν στο πάνω μέρος της πηκτής, σε αντίθεση με τα μικρότερα που θα κινηθούν ταχύτερα και θα διανύσουν στον ίδιο χρόνο μεγαλύτερη απόσταση. Επειδή η πηκτή εμποδίζει την τυχαία διάχυση των μορίων, τα μόρια διαφορετικού μήκους διαχωρίζονται σε “ζώνες”. Οι ζώνες αυτές καθίστανται ορατές ύστερα από τη σύνδεση του DNA με ειδικά μόρια, τα οποία είναι χημικές ενώσεις, όπως το βρωμιούχο αιθίδιο, τα SYBR green και SYBR gold κ.α. που έχουν την ικανότητα να παρεμβάλλονται στη διπλή έλικα και να σχηματίζουν φθορίζοντα σύμπλοκα με το DNA μετά από έκθεση στο UV. Με την πηκτή αγαρόζης διαχωρίζονται τμήματα DNA από 100 έως 17000 bp (είναι αποδοτικότερη για 250-10000 bp), ενώ για μικρότερα τμήματα DNA συνιστάται η χρήση πηκτής πολυακρυλαμιδίου.

Η ηλεκτροφόρηση γίνεται στα 100-120 V και παρακολουθείται το μέτωπο της χρωστικής, ώστε να μην περάσει τα κάτω όρια της πηκτής.

Πειραματική διαδικασία

Χρησιμοποιήθηκαν πηκτές αγαρόζης 0,8-1,5% w/v. Για τη δημιουργία τους προστίθενται 0,8-1,5 g αγαρόζης σε 100 mL διαλύματος 1X TBE και το διάλυμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων έως ότου διαυγαστεί και δεν υπάρχουν ορατά στερεά υπολείμματα αγαρόζης. Μετά τη μείωση της θερμοκρασίας στους 50° C προστίθενται 5 μL βρωμιούχου αιθιδίου (σε μεγαλύτερη θερμοκρασία το βρωμιούχο αιθίδιο είναι πολύ πτητικό, οπότε βλαβερό για το χρήστη και, λόγω σημαντικής απώλειας αλλάζει η τελική συγκέντρωση του, ενώ σε χαμηλότερη θερμοκρασία η πηκτή αρχίζει να πήζει). Το διάλυμα αναδεύεται και αποχύνεται αμέσως στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, στην οποία έχει ήδη τοποθετηθεί το κτενάκι που θα δημιουργήσει τα πηγάδια φόρτωσης του DNA. Έπειτα από 30-40 λεπτά η πηκτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί. Το δείγμα του DNA αναμειγνύεται με το διάλυμα φόρτωσης, το οποίο λόγω της γλυκερόλης που περιέχει συγκρατεί το DNA χαμηλά μέσα στο πηγάδι και λόγω των χρωστικών που περιέχει επιτρέπει την παρατήρηση της πορείας της ηλεκτροφόρησης με γυμνό μάτι. Μετά τη φόρτωση του δείγματος του DNA στο

πηγάδι, εφαρμόζεται τάση ηλεκτρικού ρεύματος 100-120 V για 30-60 λεπτά, αναλόγως του μεγέθους του DNA που διαχωρίζεται.

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης η πηκτή τοποθετείται σε συσκευή εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας και πραγματοποιείται παρατήρηση των ζωνών του DNA και φωτογράφιση με ειδική ψηφιακή κάμερα.

3.3.4 Απομόνωση DNA από πηκτή αγαρόζης (gel extraction)

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Προκατασκευασμένα αντιδραστήρια εκχύλισης από πηκτή (Nucleospin extract II kit, Macherey-Nagel). Περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα πρόσδεσης NT (χαοτροπικό αντιδραστήριο), ρυθμιστικό διάλυμα NT3 (αιθανολικό διάλυμα έκπλυσης), διάλυμα έκλουσης (αλκαλικό διάλυμα Tris-HCl που προκαλεί έκλυση του DNA σε χαμηλές ιοντικές συνθήκες, pH 8,5)
- Αποστειρωμένη λεπίδα
- Συσκευή εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) συνδεδεμένη με κάμερα, AlphaImager της AlphaInnoteck
- Υδρόλουτρο, ED13, Julabo
- Κυκλοαναδευτήρας, Labnet VX100
- Μικροζυγός ακριβείας, 430-33, Kern
- Μικροφυγόκεντρος, Eppendorf 5417R

Για την απομόνωση τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης, ύστερα από ηλεκτροφόρηση, η επιθυμητή ζώνη DNA αποκόπτεται από την πηκτή προσεκτικά με αποστειρωμένη λεπίδα με παρατήρηση σε λάμπα UV και τοποθετείται σε σωλήνα erppendorf. Στη συνέχεια, παρουσία χαοτροπικών αντιδραστηρίων, η πηκτή αγαρόζης αποδομείται και με προσθήκη ελαφρώς όξινου διαλύματος πρόσδεσης (pH 5-6), το DNA δεσμεύεται σε ειδική στήλη διοξειδίου του πυριτίου. Οι υπόλοιπες ενώσεις (ένζυμα, αγαρόζη και βρωμιούχο αιθίδιο) δε δεσμεύονται στη στήλη χημικά και απομακρύνονται με έκπλυση με αιθανολικό διάλυμα. Το καθαρό DNA παραλαμβάνεται είτε με προσθήκη ελαφρώς αλκαλικού διαλύματος (pH 8,5) κάτω από συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης αλάτων, είτε με προσθήκη υπερκάθαρου και αποστειρωμένου νερού στην περίπτωση που ακολουθεί πέψη του DNA με ένζυμα που χρειάζονται συγκεκριμένες συνθήκες αλατότητας και pH για να δράσουν.

Πειραματική διαδικασία

Με αποστειρωμένη λεπίδα κόβονται προσεκτικά οι ζώνες από την πηκτή. Η διαδικασία πρέπει να είναι γρήγορη για να μην εκτεθεί πολλή ώρα το DNA στο UV, επειδή υπάρχει κίνδυνος καταστροφής τμημάτων του DNA, όπως με δημιουργία διμερών θυμίνης. Η πηκτή τοποθετείται σε αποστειρωμένο σωλήνα errendorf. Η υπόλοιπη διαδικασία είναι αυτοματοποιημένη και σύμφωνη με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας.

- Προσδιορίζεται το βάρος του τμήματος της πηκτής με ζυγό ακριβείας
- Για κάθε 100 mg πηκτής αгарόξης προστίθενται 200 μ L διαλύματος πρόσδεσης NT (4 M οξικό νάτριο, pH 5,0)
- Για να διαλυθούν πλήρως τα κομμάτια της πηκτής χρειάζονται 5-10 λεπτά στους 50° C (υδρόλουτρο), με περιστασιακή ανακίνηση σε κυκλοαναδευτήρα
- Τα δείγματα μεταφέρονται σε χρωματογραφική στήλη διαχωρισμού, η οποία στη συνέχεια τοποθετείται σε σωλήνα errendorf 2 mL και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στα 11000×g σε θερμοκρασία δωματίου
- Απομακρύνεται το υποκείμενο υγρό
- Προστίθενται 600 μ L αιθανολικού διαλύματος NT3 (96-100% v/v αιθανόλη), ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στα 11000 g σε θερμοκρασία δωματίου (καθαρίζεται η στήλη από προσμίξεις αλάτων και διαλυτών μακρομορίων)
- Απομακρύνεται το υποκείμενο υγρό
- Επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρηση στα 11000×g για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να απομακρυνθεί το NT3 ποσοτικά
- Η στήλη μεταφέρεται σε νέο αποστειρωμένο σωλήνα errendorf 1,5 mL
- Προστίθενται 15-50 μ L νερού ή διαλύματος έκλουσης NE (5 mM Tris-HCl, pH 8,5)
- Γίνεται επώαση για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Το DNA εκλύεται με φυγοκέντρηση στα 11000×g για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και μπορεί να αποθηκευτεί στους -20° C

Κάθε στήλη μπορεί να συγκρατήσει έως και 15 μ g DNA. Η ποσότητα του διαλύματος έκλουσης που χρησιμοποιείται καθορίζει την πυκνότητα της συγκέντρωσης του DNA στο τελικό διάλυμα.

3.3.5 Απομόνωση του DNA από το διάλυμα της αντίδρασης της PCR (PCR clean up)

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Προκατασκευασμένα αντιδραστήρια απομόνωσης DNA από το διάλυμα της PCR (Nucleospin extract II kit, Macherey-Nagel). Περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα πρόσδεσης NT (χαοτροπικό αντιδραστήριο), ρυθμιστικό διάλυμα NT3 (αιθανολικό διάλυμα έκπλυσης), διάλυμα έκλουσης (αλκαλικό διάλυμα Tris-HCl που προκαλεί έκλυση του DNA σε χαμηλές ιοντικές συνθήκες, pH 8,5)
- Υδρόλουτρο, ED13, Julabo
- Κυκλοαναδευτήρας, Labnet VX100
- Μικροφυγόκεντρος, Eppendorf 5417R

Πειραματική διαδικασία

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι σύμφωνη με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας.

- Για κάθε 1 όγκο διαλύματος της PCR προστίθενται 2 όγκοι διαλύματος πρόσδεσης NT (4 M οξικό νάτριο, pH 5,0)
- Τα δείγματα μεταφέρονται σε χρωματογραφική στήλη διαχωρισμού. Η ειδική χρωματογραφική στήλη διαχωρισμού τοποθετείται σε 2 mL σωλήνα και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στα 11000×g σε θερμοκρασία δωματίου

Ακολουθείται, στη συνέχεια, η διαδικασία που αναφέρεται στην παράγραφο 3.3.4.

3.3.6 Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Περιοριστικές ενδονουκλεάσες (New England Biolabs, Roche) που χρησιμοποιήθηκαν
 - ο BglII
 - ο XhoI
 - ο EcoRI
- Συσκευή ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας, Heraeus

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. Τα ένζυμα αυτά παράγονται από βακτήρια και τα προστατεύουν από ιούς, κόβοντας μόνο το ιικό γονιδίωμα και όχι το βακτηριακό, το οποίο είναι προστατευμένο στα σημεία αναγνώρισης των νουκλεασών περιορισμού επειδή είναι μεθυλιωμένο. Οι περισσότερες νουκλεάσες περιορισμού κόβουν τις δύο έλικες σε απόσταση μερικών ζευγών βάσεων, δίνοντας δύο τμήματα με μονόκλωνες προεξοχές (συμπληρωματικά άκρα). Τα συμπληρωματικά άκρα μπορούν, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, να επανενωθούν με την προσθήκη του ενζύμου της λιγάσης. Υπάρχουν, πάντως, και νουκλεάσες περιορισμού που δίνουν τμήματα με τυφλά άκρα, χωρίς μονόκλωνες προεξοχές. Μία τυπική χρήση των νουκλεασών περιορισμού είναι η αποκοπή ενός γονιδίου από ένα τμήμα DNA με σκοπό την ενσωμάτωση του σε κάποιο φορέα κλωνοποίησης. Είναι τόσα πολλά τα διαφορετικά ένζυμα (με το καθένα να έχει διαφορετική ειδικότητα αλληλουχίας), ώστε είναι σχετικά απλό να βρεθούν τα κατάλληλα ένζυμα για την κοπή όλων των επιθυμητών τμημάτων DNA και την κλωνοποίησή τους.

Πειραματική διαδικασία

Η πέψη ενός πλασμιδίου από μία νουκλεάση περιορισμού γίνεται παρουσία του κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος που ρυθμίζει το pH και την συγκέντρωση αλάτων του διαλύματος. Αν και κάποια ένζυμα απαιτούν το δικό τους ξεχωριστό ρυθμιστικό διάλυμα για να δράσουν, τα περισσότερα ένζυμα έχουν κοινά διαλύματα. Αυτό είναι σημαντικό όταν πραγματοποιείται διπλή πέψη, δηλαδή ταυτόχρονη πέψη ενός πλασμιδίου από δύο διαφορετικές νουκλεάσες περιορισμού. Σε αυτή την περίπτωση, αναζητείται ένα κοινό ρυθμιστικό διάλυμα που θα επιτρέπει, αν όχι τη βέλτιστη, τουλάχιστον καλή δραστηριότητα και για τα δύο ένζυμα.

Η θερμοκρασία της πέψης είναι σχεδόν πάντα 37° C για όλα τα ένζυμα περιορισμού, με πολύ σπάνιες εξαιρέσεις ενζύμων που χρειάζονται θερμοκρασία 25° C.

Για τις ποσότητες των ενζύμων που χρησιμοποιούνται πρέπει να λαμβάνεται υπ' όψιν ότι 1 unit είναι η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για να κόψει 1 μg DNA σε 1 ώρα στους 37° C. Η συνιστώμενη ποσότητα ενζύμου είναι 5-10 units/μg DNA όταν η δραστηριότητα του ενζύμου στο χρησιμοποιούμενο ρυθμιστικό διάλυμα είναι 50-100% και όταν υπάρχει μία μόνο θέση κοπής από το ένζυμο στο πλασμίδιο. Όταν η δραστηριότητα στο διάλυμα είναι 25% ή όταν οι θέσεις κοπής είναι περισσότερες από μία, μπορεί τα 10 units/μg DNA να μην επαρκούν για πλήρη πέψη, οπότε ίσως

χρειαστεί να αυξηθούν τα unit του ενζύμου. Υπερβολική περίσσεια ενζύμου, όμως, μπορεί να προκαλέσει μη ειδικές πέψεις στο DNA. Για σωστή πέψη είναι πολύ σημαντικό να επιλέγεται σωστά η θερμοκρασία, ο χρόνος και ο όγκος που θα πραγματοποιηθεί η αντίδραση. Ο συνιστώμενος χρόνος της αντίδρασης, υπό ιδανικές συνθήκες, είναι 1,5 ώρα. Όταν όμως συντρέχουν οι λόγοι που αναφέρονται παραπάνω τότε είναι προτιμότερο, να αυξηθεί ο χρόνος αντίδρασης, παρά να αυξηθεί η ποσότητα ενζύμου στην αντίδραση. Έτσι, μία πέψη μπορεί να διαρκέσει από 1,5 μέχρι και 16 ώρες.

Στις περισσότερες αντιδράσεις απαιτείται η προσθήκη BSA (βλ. παράγραφο 3.9), η οποία κατακρημνίζει άχρηστα πρωτεϊνικά υπολείμματα που παρεμποδίζουν την αντίδραση, ενώ η περίσσεια του BSA δεν επηρεάζει αρνητικά την αντίδραση.

Τέλος, όταν επιδιώκεται πέψη πολύ μεγάλης ποσότητας DNA, πάνω από 3-4 μg, πρέπει η αντίδραση να γίνεται σε μεγαλύτερο όγκο, επειδή υπάρχει κίνδυνος τόσο μη ειδικής πέψης όσο και παραμονής άκοππου DNA. Αυτά τα δύο γεγονότα ακόμη κι αν συμβούν σε χαμηλό ποσοστό, που να μην μπορούν να δώσουν ανιχνεύσιμα προϊόντα, είναι πιθανό να αναστείλουν επακόλουθη κλωνοποίηση του κομμένου DNA σε φορέα κλωνοποίησης, μία εξαιρετικά ευαίσθητη αντίδραση.

3.3.7 Αποφωσφορυλίωση του DNA

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Αλκαλική φωσφατάση (calf intestinal alkaline phosphatase, CIAP της New England Biolabs)
- Συσκευή ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας, Heraeus
- Υδρόλουτρο, ED13, Julabo

Μετά το πέρας της πέψης με τα περιοριστικά ένζυμα το γραμμικό πλασμιδιακό DNA αποφωσφορυλιώνεται με τη βοήθεια του ενζύμου αλκαλική φωσφατάση, το οποίο καταλύει την απομάκρυνση της φωσφορικής ομάδας των 5' άκρων του πλασμιδίου με συνέπεια να μην είναι δυνατή η επανακυκλοποίησή του.

Πειραματική διαδικασία

Στο διάλυμα της πέψης προστίθεται 1 μL του ενζύμου αλκαλική φωσφατάση και ύστερα από επώαση 30 λεπτών στους 37° C το ένζυμο της αλκαλικής φωσφατάσης απενεργοποιείται, με επώαση στους 75° C (heat inactivation).

3.3.8 Αντίδραση σύνδεσης του πλασμιδιακού φορέα με το ένθεμα (ligation)

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Προπαρασκευασμένα αντιδραστήρια τα οποία περιέχουν το ένζυμο T4 DNA λιγάση και το ρυθμιστικό διάλυμα του ενζύμου, Roche
- Συσκευή ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας, Heraeus

Η DNA λιγάση είναι ένα ένζυμο που καταλύει το σχηματισμό ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ της 3'-OH ομάδας στο άκρο μίας αλυσίδας του DNA και της 5'-φωσφορικής ομάδας στο άκρο μίας άλλης. Οι αλυσίδες του DNA που χρησιμοποιούνται ως υπόστρωμα για τη λιγάση πρέπει να είναι δίκλωνες. Η χρήση της λιγάσης είναι ζωτικής σημασίας για την τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA, καθώς η ενσωμάτωση τμημάτων DNA σε πλασμιδιακούς φορείς δε θα μπορούσε να επιτευχθεί χωρίς το ένζυμο αυτό. Μία συνηθισμένη πειραματική πρακτική είναι η λιγάση να ενώνει με φωσφοδιεστερικούς δεσμούς μονόκλωνα συμπληρωματικά άκρα δίκλωνου DNA που έχουν προκύψει από πέψη με την ίδια νουκλεάση περιορισμού. Μπορεί όμως να ενώνει και τυφλά άκρα (ύστερα από την προσθήκη κατάλληλων συνδετικών μορίων) ή και συμπληρωματικά άκρα που δεν προέκυψαν από πέψη με νουκλεάση περιορισμού. Τα προϊόντα της PCR ενσωματώνονται στο φορέα λόγω συμπληρωματικότητας των άκρων και ο φορέας γίνεται κυκλικός. Η λιγάση που προστίθεται σχηματίζει τους απαραίτητους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς. 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 αν και, όταν υπάρχει περίσσεια ενθέματος υπάρχει κίνδυνος δημιουργίας πολυμερισμένων μορίων ενθεμάτων που θα ενσωματωθούν στο φορέα ως πολυμερή. Οι ποσότητες ενθέματος και φορέα που χρησιμοποιούνται μπορούν να υπολογιστούν με τον εξής τύπο:

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

Πειραματική διαδικασία

Ο συνολικός όγκος αντίδρασης πρέπει να είναι περίπου 10 μL , ώστε ο φορέας και το ένθεμα να μπορέσουν να αλληλεπιδράσουν και να συνδεθούν. Αυτό, όμως, μπορεί να τροποποιηθεί ανάλογα με την ιδιαιτερότητα της κάθε αντίδρασης, αλλά πάντα στον ελάχιστο δυνατό όγκο. Το ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης περιέχει και ATP, κάτι

που το καθιστά εξαιρετικά ευαίσθητο καθώς, κάθε φορά που αποψύχεται, ένα ποσοστό του ATP υδρολύεται. Μετά την προσθήκη του ρυθμιστικού διαλύματος, του ενθέματος και της λιγάσης, γίνεται επώαση στους 16° C για 16 ώρες.

Από το συνολικό όγκο του μίγματος της αντίδρασης, 1 μ L χρησιμοποιείται για έλεγχο της επιτυχίας της αντίδρασης (ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης) και 5 μ L για το μετασχηματισμό βακτηρίων. Το υπόλοιπο μίγμα μπορεί να αποθηκευτεί στους -20° C.

3.3.9 Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων *E. coli* (στελέχη TOP10F' και BL21) με τη μέθοδο του θερμικού σοκ

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Κύτταρα *E. coli* (στελέχη TOP10F' ή BL21)
- Θρεπτικό μέσο LB (Luria-Bertani): Το 1 L περιέχει 10 g tryptone (1% w/v) (Tryptone Biochemica, Applichem), 10 g NaCl (0,17 M, Applichem), 5 g ομογενοποιημένου ζύμης (0,5% w/v) (Applichem)
- Άγαρ για βακτηριολογία, Bacto Agar, BD Biosciences
- Διάλυμα αμπικικιλίνης, 100 mg/mL, sodium salt, Applichem
- Διάλυμα LB-άγαρ: 1,5% (w/v) άγαρ σε διάλυμα LB, το οποίο αποστειρώνεται στους 121° C για 30 λεπτά και κατόπιν προστίθεται αμπικικιλίνη σε τελική συγκέντρωση 100 μ g/mL
- Αποστειρωμένα ρύγχη για συλλογή αποικιών, Greiner bio-one
- Τρυβλία Petri για στερεές καλλιέργειες βακτηρίων, Sarstedt
- Επωαστήρας για την καλλιέργεια βακτηρίων υπό ανάδευση, Lab Tech

Μετασχηματισμός ονομάζεται η διαδικασία κατά την οποία ένα βακτηριακό κύτταρο προσλαμβάνει ξένο γενετικό υλικό το οποίο κληρονομεί και στις επόμενες γενιές. Το γενετικό υλικό προσλαμβάνεται από τη μεμβράνη του βακτηρίου, η οποία προηγουμένως πρέπει να γίνει πιο διαπερατή, παρουσία ιόντων ασβεστίου ή β-μερκαπτοαιθανόλης. Τα κύτταρα, αφού επωαστούν στον πάγο, υπόκεινται θερμικό σοκ για να εισέλθει το DNA σε αυτά. Τα πλασμίδια έχουν όλα την ειδική για το βακτήριο θέση έναρξης της αντιγραφής και μπορούν να πολλαπλασιαστούν. Επίσης, περιέχουν γονίδιο αντίστασης σε αντιβιοτικό, ιδιότητα που τη μεταφέρουν στα κύτταρα στα οποία εισέρχονται. Με αυτό τον τρόπο επιλέγονται οι κλώνοι που έχουν

προσλάβει το πλασμίδιο, αφού μόνο αυτοί θα μπορέσουν να επιβιώσουν σε καλλιέργεια παρουσία του συγκεκριμένου αντιβιοτικού.

Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι κύτταρα *E. coli* TOP10F' για χρήση του εισαγόμενου DNA και απομόνωσή του από καλλιέργεια μικρής έκτασης (mini-prep) ή μεγάλης έκτασης (midiprep) και κύτταρα BL21 που περιέχουν το γονίδιο της πολυμεράσης T7 για παραγωγή της πρωτεΐνης LdPIPh22 σε μεγάλη κλίμακα.

Πειραματική διαδικασία

A. Μετασχηματισμός

- Απόψυξη των κυττάρων σε πάγο
- Προσθήκη του πλασμιδιακού DNA (τουλάχιστον 100 ng όταν πρόκειται για καθαρισμένο πλασμιδιακό DNA ή 5 μ L από τα 10 μ L της αντίδρασης σύνδεσης)
- Παραμονή για 20 λεπτά στον πάγο με συχνή ελαφριά ανακίνηση για να μη μένει το δείγμα στον πυθμένα του erpendorf
- Το θερμικό σοκ προκαλείται με παραμονή των κυττάρων για 1 λεπτό και 30 δευτερόλεπτα στους 42° C και, αμέσως μετά, με τοποθέτηση στον πάγο για 10 λεπτά
- Προσθήκη 1 mL θρεπτικού μέσου LB χωρίς αντιβιοτικό
- Επώαση του δείγματος των κυττάρων, στους 37° C για μία ώρα, υπό ανάδευση

B. Επίστρωση τρυβλίων Petri

Μετά τη μία ώρα, για έκφραση του γονιδίου ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη, τα μετασχηματισμένα κύτταρα φυγοκεντρούνται στα 20000×g, το υπερκείμενο αποχύνεται, αναδιαλύονται σε όσο όγκο θρεπτικού μέσου έχει απομείνει και επιστρώνονται σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό μέσο LB που περιέχει αμπικιλίνη (100 μ g/mL). Μόνο τα μετασχηματισμένα κύτταρα που έχουν προσλάβει το πλασμίδιο με το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη θα μπορέσουν να αναπτυχθούν. Οι αποικίες που θα αναπτυχθούν στο τρυβλίο πρέπει να είναι αραιές για να μπορούν να απομονωθούν εύκολα για μεταφορά σε υγρό θρεπτικό μέσο για περαιτέρω ανάπτυξη. Η διαδικασία επίστρωσης είναι η εξής: με αποστειρωμένο ρύγχος και σε ασηπτικές συνθήκες (με χρήση φλόγας), παραλαμβάνεται η ποσότητα του δείγματος και τοποθετείται στο κέντρο του τρυβλίου. Στη συνέχεια, τα κύτταρα «απλώνονται» σε

όλη την επιφάνεια του τρυβλίου με τη βοήθεια γυάλινης ράβδου η οποία κάθε φορά αποστειρώνεται με αιθανόλη και πέρασμα από φλόγα.

Τα τρυβλία τοποθετούνται, στη συνέχεια, στον επωαστήρα στους 37° C χωρίς ανακίνηση, για 16-18 ώρες (αν περάσουν 18 ώρες τα τρυβλία πρέπει να μπουν στο ψυγείο για να σταματήσει η βακτηριακή ανάπτυξη). Την επόμενη μέρα, μονές αποικίες παραλαμβάνονται με τη βοήθεια αποστειρωμένου ρύγχους και ολόκληρο το ρύγχος τοποθετείται σε 4 mL υγρού θρεπτικού μέσου LB. Η ενοφθαλμισμένη καλλιέργεια επωάζεται στους 37° C, με ανάδευση για 16 ώρες.

3.3.10 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργεια μικρής έκτασης (miniprep)

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Διάλυμα αναδιάλυσης P1
 - ο Tris-HCl (pH 8) 50 mM, Applichem
 - ο EDTA 10 mM, VWR International
 - ο RNάση A 100 µg/mL, Sigma
- Διάλυμα λύσης P2
 - ο NaOH 200 mM, Applichem
 - ο SDS 1% w/v, Applichem
- Διάλυμα εξουδετέρωσης P3
 - ο Οξικό κάλιο 3 M (pH 5), VWR International
- Αιθανόλη 70%, παγωμένη (-20° C), VWR International
- Απόλυτη αιθανόλη, παγωμένη (-20° C), VWR International
- Υπερκάθαρο και αποστειρωμένο νερό (πέρασμα από στήλες ιονανταλλαγής και αντίστροφης όσμωσης)
- Μικροφυγόκεντρος, Eppendorf 5417R

Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό θετικών κλώνων. Με τη μέθοδο αυτή απομονώνεται γρήγορα μικρή ποσότητα πλασμιδιακού DNA από υγρές καλλιέργειες εμβολιασμένες με αποικίες μετασχηματισμένων βακτηρίων.

Μικρή ποσότητα υγρού θρεπτικού μέσου (4 mL) ενοφθαλμίζεται με μία αποικία βακτηρίων που περιέχει το πλασμίδιο που μας ενδιαφέρει και επωάζεται για 16 ώρες

στους 37° C. Η καλλιέργεια (1,5 mL) φυγοκεντρείται και παραλαμβάνονται τα βακτηριακά κύτταρα, τα οποία λύνονται σε αλκαλικό διάλυμα με SDS. Στη συνέχεια, γίνεται εξουδετέρωση με οξικό οξύ και καθίζηση των μετουσιωμένων πρωτεϊνών και του γενωμικού DNA με φυγοκέντρηση. Το υπερκείμενο που περιέχει το διαλυτό πλασμιδιακό DNA τοποθετείται σε καθαρό errendorf και προστίθενται σε αυτό 2 όγκοι παγωμένης απόλυτης αιθανόλης. Το πλασμιδιακό DNA υφίσταται καθίζηση με φυγοκέντρηση. Στη συνέχεια, γίνεται έκπλυση του DNA με αιθανόλη 70%, η αιθανόλη απομακρύνεται με ξήρανση και το DNA παραλαμβάνεται με αναδιάλυσή του σε μικρό όγκο (20 µL) υπερκάθαρου και αποστειρωμένου νερού.

Πειραματική διαδικασία

- Απομονώνεται μία βακτηριακή αποικία από τρυβλίο με τη βοήθεια ενός αποστειρωμένου ρύγχους και ολόκληρο το ρύγχος τοποθετείται σε σωλήνα που περιέχει 4 mL υγρού θρεπτικού μέσου LB με αμπικιλίνη (100 µg/mL). Η καλλιέργεια αναπτύσσεται για 16 ώρες στους 37° C υπό ανάδευση και 1,5 mL φυγοκεντρείται στα 20000×g για 15 λεπτά στους 4° C (σε σωλήνα errendorf)
- Το ίζημα αναδιαλύεται με έντονη ανάδευση σε κυκλοαναδευτήρα σε 100 µL του διαλύματος P1
- Προστίθενται 200 µL διαλύματος P2 που περιέχει NaOH και SDS, το δείγμα ανακινείται ελαφρώς με το χέρι και παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά, ώστε να προκληθεί λύση των βακτηριακών κυττάρων
- Προστίθενται 150 µL διαλύματος P3 για εξουδετέρωση του pH, ο σωλήνας ανακινείται ελαφρώς με το χέρι 6-8 φορές και τοποθετείται για 5 λεπτά στον πάγο
- Το δείγμα φυγοκεντρείται (20000×g, 5 λεπτά, 4° C) και επαναλαμβάνεται το στάδιο αυτό αν το υπερκείμενο δεν είναι απόλυτα διαυγές
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καθαρό errendorf
- Προστίθεται 1 mL απόλυτης παγωμένης αιθανόλης για κατακρήμνιση του πλασμιδιακού DNA και το δείγμα φυγοκεντρείται (20000×g, 10 λεπτά, 4° C)
- Αποχύνεται το υπερκείμενο υγρό, προστίθενται 500 µL παγωμένης αιθανόλης 70% και το δείγμα φυγοκεντρείται (20000×g, 10 λεπτά 4° C)
- Αποχύνεται προσεκτικά το υπερκείμενο υγρό και το ίζημα του πλασμιδιακού DNA αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου να στεγνώσει (σε ρεύμα αέρα απαγωγού) ή σε μηχανήμα φυγοκεντρικής εξάτμισης υπό κενό, στους 37° C

- Το πλασμιδιακό DNA αναδιαλύεται σε 20 μL υπερκάθαρου και αποστειρωμένου νερού και μπορεί να αποθηκευτεί στους -20°C

Η ποσότητα του διαλύματος έκλουσης που χρησιμοποιείται καθορίζει και την πυκνότητα της συγκέντρωσης του DNA στο τελικό διάλυμα.

3.3.11 Αποθήκευση βακτηρίων σε διάλυμα γλυκερόλης (cryopreservation)

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Γλυκερόλη 99% v/v, Applichem
- Διάλυμα γλυκερόλης 30% v/v
- Κρυοπροστατευτικοί αποστειρωμένοι σωλήνες φύλαξης κυττάρων, NUNC

Τα περισσότερα στελέχη βακτηρίων μπορούν να αποθηκευτούν για μεγάλα χρονικά διαστήματα, έως και 2 χρόνια, σε κατεψυγμένη μορφή στους -20°C ή ακόμα και για πολλά χρόνια στους -80°C . Στους 4°C , μία υγρή καλλιέργεια διατηρείται για 7 ημέρες και ένα τρυβλίο με αποικίες για ένα μήνα.

Πειραματική διαδικασία

Σε αποστειρωμένα φιαλίδια φύλαξης κυττάρων προστίθενται 500 μL καλλιέργειας βακτηρίων σε ίσο όγκο αποστειρωμένου διαλύματος γλυκερόλης 30% έτσι, ώστε η συγκέντρωση της γλυκερόλης στο τελικό διάλυμα να είναι 15%. Το φιαλίδιο αποθηκεύεται στους -80°C . Η ανάκτηση μικρής ποσότητας από την επιφάνεια των παγωμένων βακτηρίων γίνεται με αποστειρωμένο ρύγχος και μεταφέρεται σε υγρή καλλιέργεια θρεπτικού μέσου LB για επώαση, υπό ανάδευση, στους 37°C για 16 ώρες. Η καλλιέργεια των βακτηρίων σε γλυκερόλη δεν πρέπει να βγαίνει από την κατάψυξη παρά μόνο για ελάχιστο χρονικό διάστημα έτσι, ώστε να μην αποψύχεται.

3.3.12 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργεια μεγάλης έκτασης (midiprep)

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Προκατασκευασμένα αντιδραστήρια καθαρισμού πλασμιδιακού DNA (NucleoBond Xtra Midi kit, Macherey-Nagel). Περιέχει διάλυμα αναδιάλυσης RES (το οποίο περιέχει και RNάση A, αποθηκεύεται στους 4°C), διάλυμα αλκαλικής λύσης LYS (περιέχει NaOH, SDS), διάλυμα εξουδετέρωσης NEU

(περιέχει οξικό κάλιο), διάλυμα εξισορρόπησης EQU, αιθανολικό διάλυμα έκπλυσης WASH, αλκαλικό διάλυμα έκλουσης ELU και στήλες ιονανταλλαγής με βάση το διοξείδιο του πυριτίου (silica)

- Ισοπροπανόλη, Applichem
- Αιθανόλη 70% v/v, VWR International
- Υπερκάθαρο νερό (πέρασμα από στήλες ιονανταλλαγής και αντίστροφης όσμωσης)
- Διάλυμα TE (10 mM Tris/HCl (Applichem), pH 7,5, 1 mM EDTA, VWR International)
- Κυκλοαναδευτήρας, Labnet VX100
- Μικροφυγόκεντρος, Eppendorf 5417R
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος, Jouan CR3i multifunction, Thermo

Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα χρησιμοποιείται για την απομόνωση μεγάλης ποσότητας και υψηλής καθαρότητας πλασμιδιακού DNA που απαιτείται για την κλωνοποίηση τμημάτων DNA, βακτηριακό μετασχηματισμό και επιμόλυνση ανώτερων ευκαρυωτικών κυττάρων.

Οι πρωτεΐνες, το χρωμοσωμικό και το πλασμιδιακό DNA στις αλκαλικές συνθήκες του διαλύματος λύσης παρουσία SDS αποδιατάσσονται, ενώ το RNA αποικοδομείται από την RNάση. Το οξικό κάλιο που περιέχεται στο διάλυμα εξουδετέρωσης καταβυθίζει το SDS με τη μορφή του KDS (δωδεκυλο-σουλφονικού καλίου), συγκαταβυθίζοντας τις πρωτεΐνες, το χρωμοσωμικό DNA και τα κυτταρικά θραύσματα. Ακόμη, το διάλυμα εξουδετερώνεται και το πλασμιδιακό DNA, σε ουδέτερο pH, επανέρχεται στη φυσική υπερελικωμένη μορφή του, παραμένοντας διαλυτό. Η έκλυση πραγματοποιείται κάτω από αλκαλικές συνθήκες (pH 7,0-9,0) έτσι, ώστε η θετικά φορτισμένη στήλη να εξουδετερώνεται και το πλασμιδιακό DNA να απελευθερώνεται, κάτω από συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης αλάτων κατάλληλες για καταβύθιση του DNA με την προσθήκη ισοπροπανόλης. Τέλος, το DNA αναδιαλύεται σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης αλάτων, όπως το TE, ή σε υπερκάθαρο νερό, αν το pH του είναι σίγουρα πάνω από 7.

Πειραματική διαδικασία

Από βακτηριακό stock γλυκερόλης λαμβάνεται μία μικρή ποσότητα βακτηρίων ή από μικρή καλλιέργεια 4 mL λαμβάνεται ποσότητα 500 μ L και εμβολιάζεται σε 200 mL

θρεπτικού μέσου LB παρουσία κατάλληλου αντιβιοτικού σε τελική συγκέντρωση 100 $\mu\text{g/mL}$. Η διαδικασία πραγματοποιείται κοντά σε φλόγα, για διατήρηση στείρων συνθηκών. Η καλλιέργεια αφήνεται να αναπτυχθεί σε επώαστήρα, στους 37° C, υπό ανάδευση, για 16 ώρες. Την επόμενη ημέρα, πραγματοποιείται η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA από τα βακτήρια, με την παρακάτω διαδικασία.

- Η καλλιέργεια φυγοκεντρείται στα 2700×g για 30 λεπτά στους 4° C
- Το βακτηριακό ίζημα αναδιαλύεται με ισχυρή ανάδευση σε 10 mL διαλύματος RES και το δείγμα τοποθετείται σε πάγο
- Ακολουθεί προσθήκη 8 mL διαλύματος LYS, ήπια ανάδευση και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Προστίθενται 8 mL διαλύματος NEU, το δείγμα αναδεύεται ήπια και μεταφέρεται σε χρωματογραφική στήλη που περιέχει φίλτρο κατακράτησης των πρωτεϊνών, του χρωμοσωμικού DNA και των κυτταρικών θραυσμάτων, ενώ έχει ήδη γίνει προετοιμασία/εξισορρόπηση της στήλης με προσθήκη 12 mL διαλύματος EQU
- Το φίλτρο και η στήλη εκπλένονται με 5 mL διαλύματος EQU, το φίλτρο απομακρύνεται και η στήλη εκπλένεται με 8 mL διαλύματος WASH
- Το πλασμιδιακό DNA εκλούεται με 5 mL διαλύματος ELU
- Στο έκλουσμα προστίθενται 3,5 mL ισοπροπανόλης σε θερμοκρασία δωματίου και το δείγμα αναδεύεται ισχυρά σε κυκλοαναδευτήρα
- Το δείγμα φυγοκεντρείται στα 15000×g, για 30 λεπτά, στους 4° C, οπότε καθιζάνει το πλασμιδιακό DNA
- Το ίζημα επλένεται με αιθανόλη 70% και φυγοκεντρείται στα 15000×g, για 5 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου
- Αποχύνεται προσεκτικά το υπερκείμενο υγρό και το DNA αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να στεγνώσει (σε ρεύμα αέρα απαγωγού) ή σε μηχανήμα φυγοκεντρικής εξάτμισης υπό κενό, στους 37° C
- Μετά την εξάτμιση του διαλύτη, το πλασμιδιακό DNA αναδιαλύεται σε 150-200 μL διαλύματος TE ή υπερκάθαρου και απιονισμένου νερού

Η συγκέντρωση του DNA προσδιορίζεται με μέτρηση οπτικής απορρόφησης στα 260 nm (βλ. παράγραφο 3.3.2) και η ποιότητα του ελέγχεται σε πηκτή αγαρόζης (βλ. παράγραφο 3.3.3).

3.4 Αλληλούχιση του DNA (Sequencing)

Η αλληλούχιση δείγματος πλασμιδιακού DNA (10 μ L DNA με συγκέντρωση 4-5 μ g/ μ L) έγινε από την Εταιρεία VBC Biotech (<http://www.vbc-biotech.at/cms/index.php>). Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης ελέγχθηκαν για ομολογία με την αλληλουχία του γονιδίου της *LdPIPh22* με τα προγράμματα ClustalW2 και BioEdit Sequence Alignment Editor (βλ. παράγραφο 3.1).

Ο έλεγχος γίνεται σε δύο αντιδράσεις, με δύο διαφορετικούς εκκινητές, έναν πρόσθιο και έναν ανάστροφο, για διασταύρωση του αποτελέσματος και για κάλυψη ολόκληρης της αλληλουχίας, επειδή η αντίδραση έχει χαμηλή ακρίβεια στην ανάλυση των πρώτων βάσεων.

3.5 Έκφραση, απομόνωση και καθαρισμός ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών από βακτήρια

3.5.1 Έκφραση της *LdPIPh22* σε βακτήρια έκφρασης BL21

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Θρεπτικό μέσο LB (Luria-Bertani) (βλ. παράγραφο 3.3.9)
- Διάλυμα αμπικιλίνης, 100 mg/mL, Applichem
- Διάλυμα λύσης βακτηρίων, pH 8
 - ο Tris-HCl 50 mM, Applichem
 - ο NaCl 300 mM, Applichem
 - ο Ιμιδαζόλιο 10 mM, Invitrogen
 - ο 0,1% v/v Triton X-100, $C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_n$, n=9-10, Sigma
 - ο Αναστολείς πρωτεασών, Sigma
 - ο Λυσοζύμη, Sigma
- Υγρό άζωτο
- Πλαστικές κυψελίδες μίας χρήσης, Sarstedt
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος, Jouan CR3i multifunction, Thermo
- Μικροφυγόκεντρος, Eppendorf 5417R
- Υδρόλουτρο, ED13, Julabo
- Συσκευή υπερήχων, Virsonic 475 Ultrasonic Cell Disrupter, Virtis

Για την ετερόλογη έκφραση της *LdPIPh22* σε βακτήρια με μοριακή ετικέτα οκτώ ιστιδινών (8-His), ενισχύθηκε το γονίδιο της (*Ldriph22*) με τη μέθοδο της PCR από το γενωμικό DNA και κλωνοποιήθηκε στις θέσεις BglIII και XhoI του πλασμιδίου pTriex1.1 (Novagen) (εικόνα 4.3). Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη εκφράστηκε σε βακτήρια BL21, τα οποία φέρουν το γονίδιο της πολυμεράσης T7, ενώ το συγκεκριμένο πλασμίδιο περιέχει τον υποκινητή T7 μετά το οπερόνιο της λακτόζης. Επαγωγή της μεταγραφής του γονιδίου γίνεται με την ισοπροπυλο-β-D-1-θειογαλακτοπυρανόζη (IPTG) (βλ. παράγραφο 3.5.2). Το πλασμίδιο φέρει επίσης γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη.

Πειραματική διαδικασία

- Ανάπτυξη υγρής βακτηριακής καλλιέργειας BL21-pTriex1.1-*Ldriph22*, 100 mL με 100 µg/mL αμπικιλίνη (αρχική καλλιέργεια) για 16 ώρες, στους 37° C, υπό ανάδευση
- Ανάμιξη της αρχικής καλλιέργειας με 1-2 L θρεπτικού μέσου LB και επώαση για 16 ώρες, στους 25° C, υπό ανάδευση
- Μέτρηση της οπτικής πυκνότητας της καλλιέργειας στα 600 nm (OD₆₀₀) μετά τη συλλογή της και πριν τη φυγοκέντρηση, για να είναι γνωστός ο αριθμός των κυττάρων
- Φυγοκέντρηση στα 2700×g για 30 λεπτά στους 4° C. Το ίζημα μπορεί να φυλαχθεί στους -80° C
- Ακολουθεί λύση των βακτηρίων με 40-80 mL ρυθμιστικού διαλύματος κυτταρικής λύσης (pH 8,0), που περιέχει και λυσοζύμη για την πέψη του τοιχώματος των πεπτιδογλυκανών
- Η λύση των βακτηρίων υποβοηθείται με ψύξη/απόψυξη (3 διαδοχικές επωάσεις 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 30 δευτερολέπτων έως 1 λεπτού ψύξης στον πάγο)
 - ο Φυλάσσονται 100 µL από το ολικό ομογενοποίημα, στα οποία προστίθεται διάλυμα φόρτωσης (Laemmli buffer, βλ. παράγραφο 3.7.1) και υποβάλλονται σε βρασμό (95° C, 5 λεπτά)
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση (14000×g, 30 λεπτά, 4° C)
- Συλλέγεται το σύνολο των διαλυτών πρωτεϊνών (υπερκείμενο), φυλάσσονται 100 µL από αυτό (όπως προηγουμένως), 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. Φυλάσσονται 100 μ L (όπως προηγουμένως) στους -20° C για ανάλυση

- Το υπερκείμενο που περιέχει τις διαλυτές πρωτεΐνες μπορεί να αποθηκευτεί προσωρινά στους -80° C με γρήγορη ψύξη σε υγρό άζωτο. Σε περίπτωση απομόνωσης ενζύμου συνιστάται η άμεση απομόνωση της πρωτεΐνης. Ψύξη/απόψυξη του πρωτεϊνικού διαλύματος μειώνει τη δραστηρότητά του λόγω μερικής αποδιάταξης.

3.5.2 Επαγωγή της έκφρασης της *LdPIPh22* σε βακτήρια έκφρασης BL21

Αντιδραστήρια – Όργανα - Μη αποδιατακτικές συνθήκες

- Ισοπροπυλο- β -D-1-θειογαλακτοπυρανόζη (IPTG), Applichem
- Τα υπόλοιπα αντιδραστήρια-όργανα είναι όμοια με αυτά της προηγούμενης παραγράφου

Πειραματική διαδικασία

- Ανάπτυξη υγρής βακτηριακής καλλιέργειας BL21-pTriex1.1-*Ldriph22*, 100 mL που περιέχει αμπικιλίνη 100 μ g/mL (αρχική καλλιέργεια) για 16 ώρες, στους 37° C, υπό ανάδευση
- Ανάμιξη της αρχικής καλλιέργειας με 1-2 L θρεπτικού μέσου LB και επώαση για 16 ώρες, στους 25° C, υπό ανάδευση
- Μέτρηση της οπτικής πυκνότητας της καλλιέργειας στα 600 nm (OD_{600})
- Προσθήκη του επαγωγέα IPTG σε τελική συγκέντρωση 0,5 mM
- Επώαση της καλλιέργειας για 4 ώρες, στους 25° C, υπό ανάδευση
- Μέτρηση OD_{600}
- Στη συνέχεια ακολουθείται η ίδια διαδικασία όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 3.5.1.

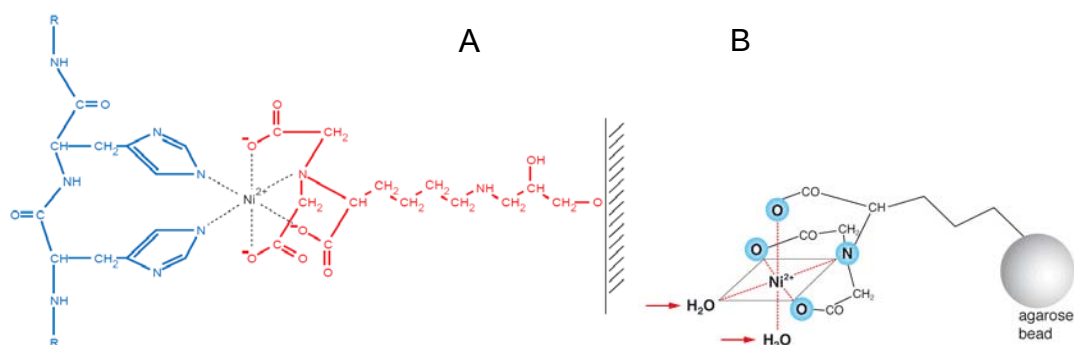
3.5.3 Απομόνωση και καθαρισμός της *LdPIPh22-8His* από βακτήρια

Αντιδραστήρια – Όργανα - Μη αποδιατακτικές συνθήκες

- Διάλυμα λύσης βακτηρίων, pH 8 (βλ. παράγραφο 3.5.1)
- Σφαιρίδια νικελίου (Ni-NTA agarose beads), Qiagen

- Διάλυμα έκπλυσης, pH 8
 - ο Tris-HCl 50 mM, Applichem
 - ο NaCl 300 mM, Applichem
 - ο Ιμιδαζόλιο 40 mM, Invitrogen
- Διάλυμα έκλουσης, pH 8
 - ο Tris-HCl 50 mM, Applichem
 - ο NaCl 300 mM, Applichem
 - ο Ιμιδαζόλιο 250 mM, Invitrogen
 - ο 0,1% v/v Triton X-100, Sigma
- Διάλυμα διαπίδυσης, pH 7,5
 - ο Tris-HCl 20 mM, Applichem
 - ο NaCl 30 mM, Applichem
 - ο Διθειοθρεϊτόλη (DTT) 4 mM, Applichem
- Ημιδιαπερατή μεμβράνη διαπίδυσης (MWCO 3.500, διάμετρος 18 mm, όγκος/μήκος 1,0 mL/cm), Spectra/Por της Biotech
- Περιστροφικός αναδευτήρας, Selecta Movil ROD
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος, Jouan CR3i multifunction, Thermo
- Μικροφυγόκεντρος, Eppendorf 5417R
- Μαγνητικός αναδευτήρας, SB162 της Stuart
- Μηχάνημα φυγοκεντρικής εξάτμισης υπό κενό, Centrifugal Evaporator, Labconco CentriVap Concentrator

Η αλληλουχία οκτώ συνεχών καταλοίπων ιστιδίνης στο καρβοξυτελικό άκρο της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης επιτρέπει τον καθαρισμό της με χρωματογραφία υψηλής συγγένειας, με σφαιρίδια νικελίου (Ni-NTA agarose beads, εικόνα 3.1), τα οποία περιέχουν το χηλικό υποκαταστάτη *N,N*-δικαρβοξυ-μεθυλο-γλυκίνη (*N,N*-bis(carboxymethyl)glycine, NTA), σε pH 8, καθώς σε αυτή την τιμή pH τα κατάλοιπα ιστιδίνης φορτίζονται αρνητικά και προσδένονται ηλεκτροστατικά στο κατιόν νικελίου. Με εκπλύσεις απομακρύνονται οι πρωτεΐνες που έχουν προσδεθεί μη ειδικά στα σφαιρίδια νικελίου και η *LdPIPh22-8His* εκλύεται με ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει υψηλή συγκέντρωση ιμιδαζολίου. Για απομάκρυνση του ιμιδαζολίου και αλλαγή του ρυθμιστικού διαλύματος της πρωτεΐνης πραγματοποιείται μοριακή διαπίδυση και στη συνέχεια ακολουθεί συμπύκνωση του πρωτεϊνικού διαλύματος σε μηχάνημα φυγοκεντρικής εξάτμισης υπό κενό.



Εικόνα 3.1. Α. Αλληλεπίδραση γειτονικών καταλοίπων ιστιδινών της ετικέτας με το σύμπλοκο Ni-NTA (http://www.chemie.fu-berlin.de/chemistry/bio/aminoacid/histidin_en.html), **Β.** Δομή του NTA προσδεσμένου στο σφαιρίδιο αгарόζης, σε σύμπλοκο με το ιόν του Ni^{2+}

Πειραματική διαδικασία

- Πρόσθεση των σφαιριδίων Ni-NTA στο ομογενοποίημα που βρίσκονται οι διαλυτές πρωτεΐνες. Τα σφαιρίδια νικελίου έχουν εξισορροπηθεί πρώτα με το ρυθμιστικό διάλυμα λύσης της προηγούμενης διαδικασίας (επώαση για 5 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου, υπό περιστροφή)
- Ήπια ανάδευση για 2 ώρες, στους 4°C , υπό περιστροφή
- Φυγοκέντρηση στα $1000\times g$ για 6 λεπτά
- Μεταφορά του υπερκλειμένου σε νέο σωλήνα και φύλαξη $100\ \mu\text{L}$ για ανάλυση
- Έκπλυση των σφαιριδίων με ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης ίσου όγκου με το ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (5 λεπτά, θερμοκρασία δωματίου, υπό περιστροφή). Φύλαξη $100\ \mu\text{L}$ από την πρώτη έκπλυση για ανάλυση
- Επανάληψη της έκπλυσης
- Έκλουση της πρωτεΐνης με προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης ίσου όγκου με το εναιώρημα των σφαιριδίων που χρησιμοποιήθηκε αρχικά (επώαση για 15 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου, υπό περιστροφή). Η έκλουση επαναλαμβάνεται 4 φορές
- Φυλάσσονται $50\ \mu\text{L}$ από κάθε έκλουση για ανάλυση
- Τα εκλούσματα συλλέγονται και μεταφέρονται σε ημιδιαπερατή μεμβράνη για το στάδιο της διαπίδυσης που πραγματοποιείται σε ποτήρι ζέσεως, με όγκο διαλύματος διαπίδυσης 100 φορές μεγαλύτερο του όγκου του διαλύματος των πρωτεϊνών
- Η διαπίδυση γίνεται σε 3 στάδια:
 - 1^ο στάδιο: 2 ώρες στους 4°C με μαγνητική ανάδευση

2^ο στάδιο: αλλαγή του διαλύματος διαπίδυσης και συνέχιση της διαδικασίας για 16 ώρες, στους 4^ο C, με μαγνητική ανάδευση

3^ο στάδιο: αλλαγή του διαλύματος διαπίδυσης και συνέχιση της διαδικασίας για άλλες 2 ώρες, στους 4^ο C, με μαγνητική ανάδευση

- Ακολουθεί μείωση κατά 5 φορές του όγκου του διαλύματος σε μηχάνημα φυγοκεντρικής εξάτμισης υπό κενό, στους 35^ο C (οι συγκεντρώσεις των συστατικών του διαλύματος διαπίδυσης είναι πέντε φορές μικρότερες από τις τελικές επιθυμητές συγκεντρώσεις μετά την εξάτμιση)

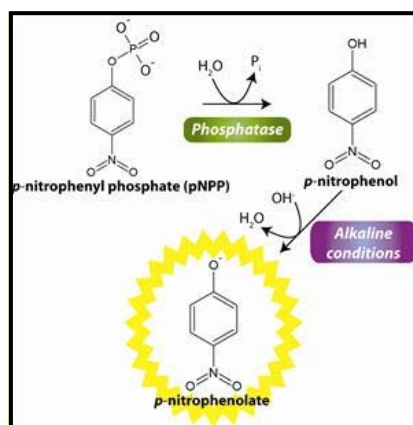
Ένα μικρό δείγμα από το διάλυμα της καθαρής πρωτεΐνης αναλύεται μαζί με τα δείγματα από τα διάφορα στάδια καθαρισμού σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 12% w/v με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (παράγραφος 3.7.1).

3.6 Ενζυμική δοκιμασία δραστηριότητας φωσφατάσης

Αντιδραστήρια – Όργανα

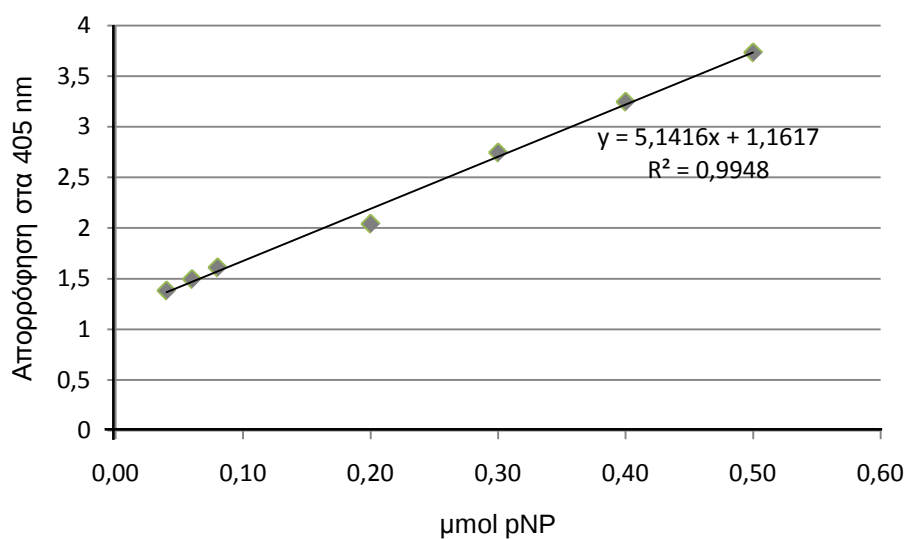
- Διάλυμα δοκιμασίας, pH 6
 - ο Tris-HCl 100 mM, Applichem
 - ο NaCl 150 mM, Applichem
 - ο DTT 4 mM, Applichem
- p-νιτροφαινυλοφωσφορικό ανιόν (pNPP) 1,8 mM, Sigma
- Διάλυμα της LdPIPh22-8His μετά τη διαπίδυση, 50 ή 100 μg
- NaOH 0,5 M, Applichem
- Αναλυτικός ζυγός, AE50, Mettler
- Πλαστικές κυψελίδες μίας χρήσης, Sarstedt
- Φασματοφωτόμετρο, SmartSpec Plus Spectrophotometer, 170-2525, BioRad

Η πρωτεΐνη LdPIPh22-8His, που απομονώθηκε από τα βακτήρια ελέγχεται, για την ενζυμική δραστηριότητά της ως φωσφατάση, σε *in vitro* πειράματα. Το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται είναι το p-νιτροφαινυλοφωσφορικό ανιόν (pNPP) στο διάλυμα του οποίου, μετά από επώαση 30-60 λεπτών στους 37^ο C, παράγεται η ένωση p-νιτροφαινόλη, η οποία μετά την προσθήκη NaOH 0,5 M για αύξηση του pH (και για διακοπή της αντίδρασης αποφωσφορυλίωσης), δίσταται και απορροφά στα 405 nm (σχήμα 3.1).



Σχήμα 3.1. Γραφική αναπαράσταση της ενζυμικής αντίδρασης αποφωσφορυλίωσης του υποστρώματος pNPP

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του προϊόντος της αντίδρασης έγινε σύμφωνα με καμπύλη αναφοράς με δείγματα γνωστής συγκέντρωσης p-νιτροφαινόλης (pNP) (σχήμα 3.2).



Σχήμα 3.2. Καμπύλη αναφοράς p-νιτροφαινόλης

Πειραματική διαδικασία

- Ζυγίζονται 0,7 mg pNPP και διαλύονται στο διάλυμα δοκιμασίας (pH 6)
- Προστίθεται τόσος όγκος διαλύματος πρωτεΐνης, ώστε να περιέχονται 50 ή 100 μg
- Το διάλυμα, με τελικό όγκο 1 mL, αφήνεται στους 37° C για μία ώρα για να γίνει η αντίδραση αποφωσφορυλίωσης

- Προστίθενται 2 mL διαλύματος NaOH 0,5 M και το δείγμα φωτομετρείται στα 405 nm.

3.7 Ανοσοαποτύπωση Western (western blot)

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

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Πηκτή διαχωρισμού (10% ή 12% w/v), pH 8,8
 - ο Υπερκάθαρο νερό
 - ο Ακρυλαμίδιο, Applichem
 - ο *N,N'*-μεθυλενο-δισ-ακρυλαμίδιο, Sigma
 - ο Tris-HCl 1,5 M, Applichem
 - ο SDS 10% w/v, Applichem
 - ο Υπερθειικό αμμώνιο (APS) 10% w/v, BioRad
 - ο Τετραμεθυλενο-αιθυλενο-διαμίνη (TEMED), BioRad
- Πηκτή επιστοίβασης (4% w/v), pH 6,8
 - ο Υπερκάθαρο νερό
 - ο Ακρυλαμίδιο, Applichem
 - ο *N,N'*-μεθυλενο-δισ-ακρυλαμίδιο, Sigma
 - ο Tris-HCl 1,0 M, Applichem
 - ο SDS 10% w/v, Applichem
 - ο APS 10% w/v, BioRad
 - ο TEMED, BioRad
- Διάλυμα ηλεκτροφόρησης (electrode buffer, pH 8,3), 1x, 500 mL
 - ο Trisma base 1,5 g, Applichem
 - ο Γλυκίνη 7 g, Applichem
 - ο SDS σε τελική συγκέντρωση 10% v/v, Applichem
- Διάλυμα φόρτωσης δείγματος πρωτεϊνών 1x (Laemmli buffer)
 - ο Γλυκερόλη 10% v/v, Applichem
 - ο β-μερκαπτοαιθανόλη 50 μ L, Sigma
 - ο Κυανό της βρωμοφαινόλης 0,01% w/v BBB, Merck
 - ο Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8, Applichem

- ο SDS 2% w/v, Applichem
- Coomassie Brilliant Blue R-250, BioRad
- Διάλυμα αποχρωματισμού σε νερό
 - ο Μεθανόλη (CH_3OH) 40% v/v, Applichem
 - ο Οξικό οξύ (CH_3COOH) 10% v/v, υψηλού βαθμού καθαρότητας, Applichem
- Πρωτεΐνες αναφοράς, Amersham / Heath care
- Γυάλινες πλάκες για ρύθμιση του πάχους της πηκτής (0,75 ή 1,5 mm), BioRad
- Ειδική κτένα (comb) για το σχηματισμό των θέσεων τοποθέτησης δείγματος (wells) στην πηκτή (10 θέσεις)
- Συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης Mini-Protean II, Biorad
- Συσκευή παροχής ηλεκτρικού ρεύματος Model 1000/500, Biorad

Με τη μέθοδο SDS-PAGE γίνεται διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση τη διαφορετική μοριακή μάζα τους. Το παρασκεύασμα της πρωτεΐνης αντιδρά με περίσσεια μίας διαλυτής θειόλης (β-μερκαπτοαιθανόλη) και SDS (που βρίσκονται στο διάλυμα φόρτωσης). Η β-μερκαπτοαιθανόλη ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς των πρωτεϊνών, ενώ το απορρυπαντικό SDS καταστρέφει τους μη ομοιοπολικούς δεσμούς και αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες έτσι ώστε να προκύψουν οι υπομονάδες τους ως ανιοντικές αλυσίδες πολυπεπτιδίων. Το SDS δίνει ένα σταθερό λόγο αρνητικού φορτίου προς μάζα στις πολυπεπτιδικές αλυσίδες, ενώ η πηκτή δρα σαν μοριακό κόσκινο. Έτσι, η σχετική κινητικότητα κάθε πολυπεπτιδικής αλυσίδας είναι λογαριθμική συνάρτηση του μοριακού βάρους της [84].

Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου σχηματίζεται με αντίδραση συμπολυμερισμού ακρυλαμιδίου και *N,N'*-μεθυλενο-δισ-ακρυλαμιδίου (αντιδραστήριο διασταύρωσης). Ο πολυμερισμός γίνεται παρουσία υπερθειικού αμμωνίου, που παρέχει ελεύθερες ρίζες, και TEMED, που καταλύει την αντίδραση σχηματισμού των ελευθέρων ριζών. Οι ελεύθερες ρίζες καταλύουν την αντίδραση πολυμερισμού και δημιουργούν την πηκτή. Η SDS-PAGE είναι μία μη συνεχής ηλεκτροφόρηση πηκτής αφού η πηκτή αποτελείται από δύο τμήματα: την πηκτή επιστοίβασης και την πηκτή διαχωρισμού. Ο ρόλος της πηκτής επιστοίβασης, που έχει μεγαλύτερο μέγεθος πόρων και μικρότερο pH από την πηκτή διαχωρισμού, είναι να συσσωρεύει τις πρωτεΐνες σε μία στενή ζώνη, ώστε να εισέλθουν στην πηκτή διαχωρισμού ως μία λεπτή ταινία και να επιτευχθεί καλύτερος

διαχωρισμός. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε διάλυμα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών με σταθερή τάση 200 V σε θερμοκρασία δωματίου.

Μετά την ηλεκτροφόρηση, μπορεί να γίνει: α) ανίχνευση των διαχωρισμένων πρωτεϊνών με χρώση με Coomassie Blue. Η χρώση αυτή γίνεται σε ελαφρώς όξινο περιβάλλον, που ευνοεί τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στη χρωστική και τις αμινομάδες των πρωτεϊνών, ενώ αναπτύσσονται και αλληλεπιδράσεις χρωστικής-πρωτεϊνών μέσω δυνάμεων van der Waals, β) μεταφορά των διαχωρισμένων πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Η πηκτή πολυακρυλαμίδιου τοποθετείται σε ειδική διάταξη που δημιουργεί ηλεκτρικό πεδίο σε όλη την επιφάνεια της. Στους πίνακες 3.2 και 3.3 παρουσιάζονται οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των πηκτών διαχωρισμού και επιστοίβασης, αντίστοιχα.

Πίνακας 3.2. Πηκτή διαχωρισμού

Αντιδραστήρια	10% w/v	12% w/v
Μίγμα ακρυλαμίδιου	3,3 mL	4,0 mL
Tris-HCl, 1,5 M	2,5 mL	2,5 mL
SDS 10%	0,1 mL	0,1 mL
APS 10%	0,1 mL	0,1 mL
TEMED	0,004 mL	0,004 mL
Νερό	4,0 mL	3,3 mL

Πίνακας 3.3. Πηκτή επιστοίβασης

Αντιδραστήρια	4% w/v
Μίγμα ακρυλαμίδιου	0,67 mL
Tris-HCl, 1,5 M	0,5 mL
SDS 10%	0,04 mL
APS 10%	0,04 mL
TEMED	0,004 mL
Νερό	2,7 mL

Πειραματική διαδικασία

- Το διάλυμα της πηκτής διαχωρισμού τοποθετείται στο χώρο μεταξύ των δύο γυάλινων πλακών, επικαλύπτεται με μία στοιβάδα νερού και αφήνεται να πολυμεριστεί
- Αποχύνεται το νερό και προστίθεται το διάλυμα της πηκτής επιστοίβασης, που έχει ήδη προετοιμαστεί, μέχρι να πληρωθεί τελείως ο χώρος ανάμεσα στις πλάκες
- Τοποθετείται η ειδική κτένα, με προσοχή, ώστε να μην εγκλωβίσει φυσαλίδες αέρα
- Αφού πολυμεριστεί η πηκτή επιστοίβασης, απομακρύνεται η κτένα. Τα φρεάτια που έχουν δημιουργηθεί είναι οι θέσεις, στις οποίες θα τοποθετηθούν στη συνέχεια τα δείγματα, στα οποία έχει προστεθεί ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης και έχουν υποστεί βρασμό (95° C, 5 λεπτά)
- Τοποθέτηση των δειγμάτων:
ο με το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης πληρούται η άνω μονάδα της συσκευής ηλεκτροφόρησης, επομένως και τα φρεάτια. Εφόσον δεν παρατηρηθούν διαρροές, τοποθετείται το υπόλοιπο ρυθμιστικό διάλυμα στην κάτω μονάδα της συσκευής
ο στα φρεάτια της πηκτής επιστοίβασης τοποθετούνται μέχρι 25 μL (για πάχος 0,75 mm) ή μέχρι 40 μL (για πάχος 1,5 mm) από κάθε δείγμα και 12 μL από τα πρότυπα
- Ηλεκτροφόρηση: συνδέεται το ηλεκτρόδιο της άνω μονάδας της συσκευής με την κάθοδο (-) και το ηλεκτρόδιο της κάτω μονάδας με την άνοδο (+) της συσκευής παροχής ηλεκτρικού ρεύματος
- Ρυθμίζεται η τάση στα 200 V
- Εμφάνιση των πρωτεϊνών στην πηκτή: μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, αποσυνδέονται τα ηλεκτρόδια από τους πόλους της πηγής ρεύματος και απομακρύνεται η πηκτή από τη συσκευή. Διαχωρίζονται οι δύο πλάκες με προσοχή, αποκολλάται η πηκτή και τοποθετείται στο διάλυμα της χρωστικής για 16 ώρες, υπό ανακίνηση. Στη συνέχεια, γίνεται αποχρωματισμός του υποβάθρου της πηκτής με διαδοχικές εκπλύσεις σε διάλυμα αποχρωματισμού υπό ανακίνηση και τελικά τοποθετείται σε υπερκάθαρο νερό και οξικό οξύ 4% για να διατηρηθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα.

3.7.2 Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Πηκτή πολυακρυλαμίδιου (βλ. παράγραφο 3.7.1)
- Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, Amersham, Macherey-Nagel
- Διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς πρωτεϊνών (transfer buffer)
 - ο Trisma base 3 g, Applichem
 - ο Γλυκίνη 14 g, Applichem
 - ο Μεθανόλη 20% v/v, Applichem
- Διάλυμα χρώσης νιτροκυτταρίνης Ponceau-S
 - ο Ponceau-S, 1 mg/mL, Sigma
 - ο Οξικό οξύ (CH_3COOH) 7% v/v, υψηλού βαθμού καθαρότητας, Applichem
- Λεπτά σφουγγάρια
- Χαρτί διήθησης Whatmann 3MM
- Συσσκευή μεταφοράς πρωτεϊνών σε νιτροκυτταρίνη Mini Trans-Blot, BioRad

Για τη μεταφορά πρωτεϊνών από την πηκτή στη μεμβράνη χρησιμοποιείται διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς πρωτεϊνών. Τα αρνητικά φορτισμένα πρωτεϊνικά μόρια μετακινούνται προς τον θετικό πόλο της συσκευής προσκολλώμενα στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης που παρεμβάλλεται και συγκρατεί ειδικά τις πρωτεΐνες με υδρόφοβες και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις [85].

Ετοιμάζεται μία «κατασκευή» με την εξής σειρά: α) ένα λεπτό φύλλο σφουγγαριού, β) δύο φύλλα διηθητικού χαρτιού Whatmann 3MM, γ) η πηκτή πολυακρυλαμίδιου, δ) ένα κομμάτι νιτροκυτταρίνης στο μέγεθος της πηκτής, ε) δύο φύλλα διηθητικού χαρτιού και στ) ένα λεπτό φύλλο σφουγγαριού.

Πειραματική διαδικασία

- Το σύστημα τοποθετείται στην ειδική συσκευή μεταφοράς έτσι, ώστε η νιτροκυτταρίνη να βρίσκεται προς την πλευρά της ανόδου
- Η μεταφορά πρωτεϊνών πραγματοποιείται με ρεύμα σταθερής έντασης 300 mA για μία ώρα και 30 λεπτά.
- Μετά τη μεταφορά, η μεμβράνη χρωματίζεται με διάλυμα χρωστικής Ponceau-S και ξεπλένεται με υπερκάθαρο νερό για να απομακρυνθεί η περίσσεια της χρωστικής και να γίνουν ορατές οι ζώνες των πρωτεϊνών.

3.7.3 Ανοσοενζυμική ανίχνευση πρωτεϊνών

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Μembrάνη νιτροκυτταρίνης, Amersham, Macherey-Nagel
- PBS (βλ. παράγραφο 3.2)
- Άπαχο γάλα σε σκόνη, Regilait
- Απορρυπαντικό Tween-20, Applichem
- Πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού (καθαρισμένο) έναντι της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης *LdPIPh22-8His* (παρασκευάστηκε στο εργαστήριο, βλ. παραγράφους 3.14.1 και 3.14.3)
- Πολυκλωνικό αντίσωμα ποντικού (ορός) έναντι της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης *LdPIPh22-8His* (παρασκευάστηκε στο εργαστήριο, βλ. παράγραφο 3.14.1)
- Πολυκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι της ετικέτας των οκτώ ιστιδινών (8His)
- Πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (GFP)
- Πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι της μονομερούς κόκκινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (mRFP)
- Συζευγμένα με υπεροξειδάση αντισώματα αίγας έναντι των IgG ανοσοσφαιρινών κουνελιού και ποντικού, Pierce (41460 και 31230 αντίστοιχα)
- Διάλυμα 3',3'-διαμινοβενζιδίνης (DAB)
 - ο PBS 1X
 - ο DAB 1:1000, Sigma
 - ο Χλωρίδιο του νικελίου(II) ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), Merck
 - ο Διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) 30% v/v, Applichem
- Διάλυμα ECL
 - ο Υπερκάθαρο νερό (για τα διαλύματα 1 και 2) (πέρασμα από στήλες ιονανταλλαγής και αντίστροφης όσμωσης)
 - ο Tris-HCl 1 M, pH 8,8 (περιέχεται στο διάλυμα 1 και 2), Applichem
 - ο Κουμαρικό οξύ (περιέχεται στο διάλυμα 1), Sigma
 - ο 3-αμινοφθαλκυδραζίνη (Luminol), $\text{C}_8\text{H}_7\text{N}_3\text{O}_2$ (περιέχεται στο διάλυμα 1), Sigma
 - ο Διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου 30% v/v (περιέχεται στο διάλυμα 2), Applichem

- Διαλύματα φωτογραφικής εμφάνισης, Applichem
- X-ray φιλμ
- Συσκευή οριζόντιας κυκλικής ανακίνησης, 3005 GLF, Buch & Holm

Η ανίχνευση της πρωτεΐνης στη μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης γίνεται είτε με τη μέθοδο της 3',3'-διαμινοβενζιδίνης (για πρωτεΐνες απομονωμένες από βακτήρια) είτε με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας (Electrochemiluminescence ή electrogenerated chemiluminescence (ECL), για πρωτεΐνες απομονωμένες από τα παράσιτα). Η μεμβράνη, μετά το πέρας της ηλεκτρομεταφοράς, επωάζεται με αντίσωμα που αναγνωρίζει την προς ανίχνευση πρωτεΐνη και, στη συνέχεια, επωάζεται με δεύτερο αντίσωμα συζευγμένο με το ένζυμο της υπεροξειδάσης HRP (Horse Radish Peroxidase), το οποίο αναγνωρίζει το πρώτο αντίσωμα.

Υποστρώματα της HRP αποτελούν, στην πρώτη περίπτωση, το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και η 3',3'-διαμινοβενζιδίνη, η οποία οξειδώνεται δίνοντας ένα σκούρο καφέ χρώμα που μπορεί να ενισχυθεί με την προσθήκη χλωριδίου του νικελίου(II). Για 10 mL διαλύματος DAB, σε 10 mL PBS 1X προστίθενται 100 μ L DAB (η 3',3'-διαμινοβενζιδίνη διατηρείται διαλυμένη σε υπερκάθαρο νερό, στους $-20^\circ C$, σε συγκέντρωση 0,7 mg/mL), 3 μ L H_2O_2 30% και 0,3% w/v $NiCl_2 \cdot 6H_2O$.

Η χημειοφωταύγεια, για τη 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-αμινοφθαλιδραζίνης 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.

Πειραματική διαδικασία

- Επώαση της μεμβράνης της νιτροκυτταρίνης στην οποία έχουν μεταφερθεί οι πρωτεΐνες σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα με PBS + 5% άπαχο γάλα σε σκόνη + 0,05% Tween-20, ώστε να εμποδιστεί η μη ειδική προσκόλληση των αντισωμάτων

- Προσθήκη πρώτου αντισώματος: επώαση με το πρώτο αντίσωμα σε PBS + 2% γάλα σε σκόνη + 0,05% Tween-20 στην κατάλληλη αραιώση σε θερμοκρασία δωματίου για 1-2 ώρες, υπό ανακίνηση ή στους 4° C για 16 ώρες (για πιο ειδική πρόσδεση)
- Εκπλύσεις: διαδοχικές εκπλύσεις της μεμβράνης της νιτροκυτταρίνης με PBS που περιέχει 0,1% Tween-20 (3×5 λεπτά)
- Δεύτερο αντίσωμα: επώαση της μεμβράνης με δεύτερο αντίσωμα αντι-IgG σε διάλυμα PBS + 1% γάλα σε σκόνη + 0,05% Tween-20 στην κατάλληλη αραιώση (1:1000) σε θερμοκρασία δωματίου για 1-2 ώρες, υπό ανακίνηση. Το αντίσωμα αυτό φέρει ομοιοπολικά συνδεδεμένο το ένζυμο της υπεροξειδάσης (DAKO Code No PO214)
- Διαδοχικές εκπλύσεις της μεμβράνης της νιτροκυτταρίνης με 0,3% Tween-20 σε PBS (5 λεπτά), με 0,2% Tween-20 σε PBS (5 λεπτά), με 0,1% v/v Tween-20 σε PBS (5 λεπτά) και, τέλος, με PBS 1X
- Εμφάνιση:
 - ο Μέθοδος DAB: προσθέτουμε στην νιτροκυτταρίνη το διάλυμα εμφάνισης και περιμένουμε την ανάπτυξη του χρώματος. Η πορεία της αντίδρασης διακόπτεται με έκπλυση με νερό βρύσης και στέγνωμα.
 - ο Μέθοδος ECL: σε θάλαμο εμφάνισης, α) αναμιγνύονται τα διαλύματα 1 και 2, μία ποσότητα του υγρού απλώνεται στη μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης και αφήνεται για 2 λεπτά, ώστε να ολοκληρωθεί η αντίδραση, β) αφού απομακρυνθεί το υγρό, η μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης καλύπτεται με πλαστική μεμβράνη για να μην έρχεται σε απευθείας επαφή με το φιλμ που τοποθετείται πάνω από αυτή, γ) αφήνεται για χρονικό διάστημα λίγων δευτερολέπτων έως και αρκετών λεπτών, ανάλογα με την ποσότητα της πρωτεΐνης που ανιχνεύουμε, δ) το φιλμ αφαιρείται και εμβαπτίζεται στο υγρό ανάπτυξης μέχρι να εμφανιστούν οι ζώνες των πρωτεϊνών, στη συνέχεια ξεπλένεται με νερό και εμβαπτίζεται στο υγρό σταθεροποίησης.

3.8 Αποδέσμευση αντισωμάτων και επαναχρησιμοποίηση της μεμβράνης

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Μembrάνη νιτροκυτταρίνης
- Διάλυμα γλυκίνης 0,2 M σε υπερκάθαρο νερό, pH 2,6
- Τα υπόλοιπα αντιδραστήρια είναι όμοια με αυτά της προηγούμενης παραγράφου

Πειραματική διαδικασία

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, καθώς 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 2,6. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η διάσπαση του συμπλόκου αντιγόνου-αντισώματος και η απελευθέρωση των αντισωμάτων από την μεμβράνη. Οι μοναδικές πρωτεΐνες που παραμένουν στη μεμβράνη είναι εκείνες, οι οποίες είναι ισχυρά δεσμευμένες λόγω των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων κατά την ηλεκτρομεταφορά τους. Στη συνέχεια, η μεμβράνη εκπλένεται και πραγματοποιείται εκ νέου επώασή της με PBS + 5% άπαχο γάλα σε σκόνη + 0,05% Tween-20 για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να εμποδιστεί η μη ειδική προσκόλληση των αντισωμάτων και ακολουθείται η διαδικασία όπως περιγράφηκε στην προηγούμενη παράγραφο.

3.9 Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Αντιδραστήριο της Bradford, BioRad
- Πρωτεΐνη γνωστής συγκέντρωσης για την καμπύλη αναφοράς, BSA ή BGG, PIERCE
- Υπερκάθαρο νερό (πέρασμα από στήλες ιονανταλλαγής και αντίστροφης όσμωσης)
- Πλαστικές κυψελίδες μίας χρήσης, Sarstedt
- Φασματοφωτόμετρο, SmartSpec Plus Spectrophotometer, 170-2525, BioRad

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) 1 mg/mL, είτε IgG βοδινού (Bovine Gamma Globuline) 1 mg/mL.

Πειραματική διαδικασία

- Προετοιμασία των πρωτεϊνικών δειγμάτων που περιέχουν BSA ή BGG (PIERCE) σε ποσότητες από 1 έως 20 μg σε συνολικό όγκο 800 μL (σε νερό)
- Προετοιμασία αγνώστων πρωτεϊνικών δειγμάτων σε ποσότητες από 1 έως 20 μL σε συνολικό όγκο 800 μL (σε νερό)
- Προσθήκη 200 μL αντιδραστηρίου Bradford. Ανάδευση των δειγμάτων και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Φωτομέτρηση στα 595 nm.

3.10 Κυτταροκαλλιέργειες

3.10.1 Παράσιτα

Οι προμαστιγωτές μορφές *Leishmania donovani* LG13 ([83], βλ. εισαγωγή, παράγραφο 1.2) καλλιεργούνται στους 25° C (επωαστήρας Shel-lab), απουσία CO₂, σε θρεπτικό υλικό RPMI 1640 (Life Technologies), εμπλουτισμένο με 10% v/v FBS (Gibco) (ορός από έμβρυο μόσχου απενεργοποιημένος για 30 λεπτά στους 56° C), 40 mM διάλυμα HEPES 1% w/v (Gibco) και αντιβιοτικά (στρεπτομυκίνη 5 μg/mL και πενικιλίνη 5 U/mL, Biosera).

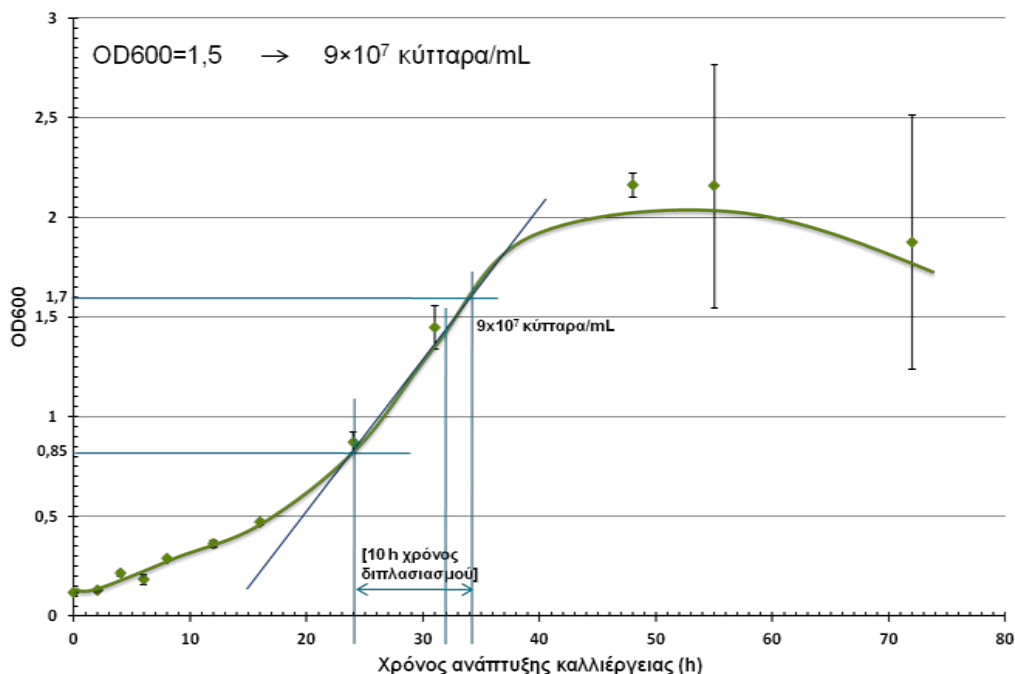
Τα μη παθογόνα παράσιτα *Leishmania tarentolae* καλλιεργούνται στους 25° C, απουσία CO₂, σε θρεπτικό υλικό brain heart infusion (Lexsy Broth BHI) που περιέχει και αιμίνη (Bovine Hemin Chloride, Sigma).

Κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας πραγματοποιείται μέτρηση των παρασίτων, ώστε να παρακολουθείται ο ρυθμός ανάπτυξής τους. Ενδεικτικά, όταν για τον εμβολιασμό της καλλιέργειας χρησιμοποιηθούν 10⁶ παράσιτα/mL, ο αριθμός των παρασίτων που συλλέγονται στη στατική φάση ανάπτυξης (5^η-6^η ημέρα καλλιέργειας) είναι περίπου 2-

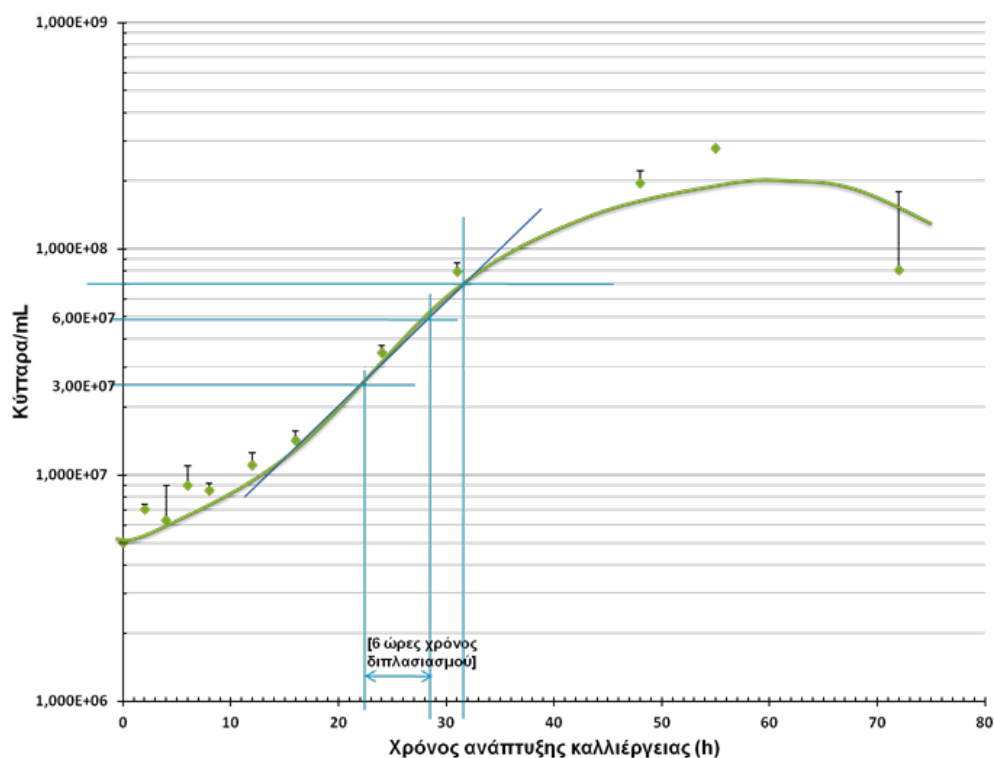
$2,5 \times 10^7$ παράσιτα/mL. Η συλλογή των παρασίτων πραγματοποιείται με φυγοκέντρηση στα $1000 \times g$ για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου σε επιτραπέζια φυγόκεντρο (Thermo). Το ίζημα των παρασίτων αναδιασπείρεται στο ρυθμιστικό διάλυμα PBS και ακολουθούν 2-3 εκπλύσεις στις ίδιες συνθήκες φυγοκέντρησης.

Ο έλεγχος του ρυθμού ανάπτυξης των παρασίτων στην καλλιέργεια *in vitro* πραγματοποιείται και με καμπύλη ανάπτυξης (growth curve), στην οποία φαίνεται ο χρόνος διπλασιασμού των κυττάρων. Στα σχήματα 3.3 και 3.4 που ακολουθούν παρουσιάζονται οι καμπύλες ανάπτυξης των παρασίτων *L. tarentolae* συναρτήσει της μέτρησης της οπτικής απορρόφησης στα 600 nm και της μέτρησης των κυττάρων σε αιματοκυτόμετρο (Malassez), αντίστοιχα.

Για τη διατήρηση των παρασίτων *L. donovani* για μικρό χρονικό διάστημα φυλάσσονται $\sim 10^7$ παράσιτα σε 1,5 mL RPMI, 20% FBS, 10% DMSO (διμεθυλοσουλφοξείδιο, Applichem), σε ειδικούς κρυοπροστατευτικούς σωλήνες 1,5 mL (NUNC), στους -80°C . Τα παράσιτα *L. tarentolae* φυλάσσονται σε 80% BHI, 20% γλυκερόλη ($\sim 10^7$ παράσιτα/mL). Για να διατηρηθούν μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, απαιτείται η μεταφορά τους σε δοχείο που περιέχει υγρό άζωτο.



Σχήμα 3.3. Καμπύλη ανάπτυξης διαγονιδιακών παρασίτων *L. tarentolae* συναρτήσει της οπτικής απορρόφησης των κυττάρων στα 600 nm



Σχήμα 3.4. Καμπύλη ανάπτυξης διαγονιδιακών παρασίτων *L. tarentolae* συναρτήσει κυττάρων/mL

3.10.2 Κυτταρικές σειρές ανώτερων ευκαρυωτικών κυττάρων

Τα καρκινικά κύτταρα κοιλιακού επιθηλίου (HeLa, ATCC), και τα κύτταρα NIH3T3 (σταθερή αθανатоποιημένη κυτταρική σειρά ινοβλαστών μυός) καλλιεργούνται στους 37° C, παρουσία 5% CO₂, προκειμένου να διατηρείται το pH σταθερό, σε θρεπτικό υλικό RPMI εκτός από τα κύτταρα HeLa που καλλιεργούνται σε DMEM (Biosera), εμπλουτισμένο με 10% FBS και αντιβιοτικά (στρεπτομυκίνη 5 µg/mL και πενικιλίνη 5 U/mL).

Ως διάλυμα έκπλυσης των κυττάρων χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS), pH 7,2. Για την αποκόλληση των κυττάρων από το ειδικό πλαστικό σκεύος της κυτταροκαλλιέργειας χρησιμοποιείται διάλυμα PBS/ 0,1 mM EDTA (0,02% w/v) για τη δέσμευση των δισθενών κατιόντων Ca²⁺, Mg²⁺ που βοηθούν τα κύτταρα να παραμένουν συνδεδεμένα στην πλαστική φιάλη καλλιέργειας.

3.11 Ηλεκτροδιάτρηση παρασίτων

Επιμόλυνση των προμαστιγωτών παρασίτων *L. donovani* (στέλεχος LG13) και *L. tarentolae* (στέλεχος LEXSY) με τον πλασμιδιακό φορέα pF4X1-4sat-Ldriph22-mRFP

προϋποθέτει ηλεκτροδιάτρηση των παρασίτων. Ο πλασμιδιακός φορέας pF4X1-4sat (pF4X1.4sat, Jena Bioscience) (κεφάλαιο αποτελεσμάτων, εικόνα 4.5) χρησιμοποιήθηκε για την επισωμική έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης rLdPIPh22 με τη μοριακή ετικέτα της μονομερούς κόκκινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (rLdPIPh22-mRFP). Το γονίδιο κλωνοποιήθηκε στις θέσεις BglII και XhoI. Το πλασμίδιο αυτό κωδικοποιεί την ακετυλοτρασφεράση της στρεπτοθρισίνης (streptothricine acetyltransferase) που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό Nourseothricin.

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Διάλυμα ηλεκτροδιάτρησης:
 - ο HEPES 21 mM, pH 7,5, Gibco
 - ο Na₂HPO₄ 0,7 mM, Applichem
 - ο NaCl 137 mM, Applichem
 - ο Γλυκόζη 6 mM, Applichem
 - ο KCl 5 mM, Merck
- Αντιβιοτικό Nourseothricin,
- Απαγωγός κάθετης νηματικής ροής, laminar flow hood, Eurocyt 120
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος, Jouan CR3i multifunction, Thermo
- Συσκευή ηλεκτροδιάτρησης: σύστημα τριών συσκευών Gene Pulser, Pulse Controller, Gene Transformer της BioRad
- Κυψελίδες ηλεκτροδιάτρησης 0,1 cm, BioRad
- Αποστειρωμένοι σωλήνες falcon (Greiner bio-one)
- Αιματοκυτόμετρο Malassez, Marienfeld
- Ανάστροφο μικροσκόπιο, Axiovert 40 C, Zeiss
- Συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού, TCS-SP Leica

Το ηλεκτρικό ρεύμα που παράγεται στη συσκευή ηλεκτροδιάτρησης ανοίγει οπές στις μεμβράνες των κυττάρων από όπου εισέρχεται το πλασμιδιακό DNA στα κύτταρα.

Πειραματική διαδικασία

- Συλλογή παρασίτων από 10 mL καλλιέργειας που βρίσκεται στο τέλος της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης (2×10^7 κύτταρα/mL) με φυγοκέντρηση στα 1000×g για 6 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Απόχυση του υπερκειμένου σε ασηπτικές συνθήκες

- Αναδιασπορά των κυττάρων σε ίσο όγκο (10 mL) διαλύματος ηλεκτροδιάτρησης και παραμονή στον πάγο για 10 λεπτά
- Φυγοκέντρωση στα 1000×g για 6 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και απόχυση του υπερκειμένου σε ασηπτικές συνθήκες
- Αναδιασπορά των παρασίτων σε 1 mL διαλύματος ηλεκτροδιάτρησης
- Προσθήκη 400 µL σε, ήδη τοποθετημένο στον πάγο, σωλήνα errendorf που περιέχει 20-50 µg DNA διαλυμένο σε 50 µL νερού (μέγιστη ποσότητα), ανάμιξη και μεταφορά σε παγωμένη κυψελίδα ηλεκτροδιάτρησης
- Ηλεκτροδιάτρηση των παρασίτων στις συνθήκες: 450 V, 450 µF, ένταση πεδίου 2,25 KV/cm. Η κυψελίδα τοποθετείται στο θάλαμο ηλεκτροδιάτρησης και στα άκρα της εφαρμόζεται τάση με ενεργοποίηση της συσκευής που παράγει τον ηλεκτρικό παλμό
- Επανατοποθέτηση της κυψελίδας στον πάγο για ακριβώς 10 λεπτά
- Μεταφορά των κυττάρων σε 10 mL RPMI + 20% ορού από έμβρυο μόσχου (FBS) (για τα κύτταρα *L. donovani*) ή 10 mL brain heart infusion (BHI) + αιμίνη (για τα κύτταρα *L. tarentolae*)
- Επώαση στους 25° C για 16 ώρες
- Προσθήκη την επόμενη μέρα έτσι, ώστε τα κύτταρα να έχουν ανακάμψει από το σοκ του ηλεκτρικού ρεύματος, αντιβιοτικού Nourseothricin (50 µg/mL). Για την επιλογή των διαγονιδιακών παρασίτων αυξάνεται σταδιακά η συγκέντρωση του αντιβιοτικού μέχρι τα 100 µg/mL. Για να επιβεβαιωθεί η παρουσία ζωντανών παρασίτων που φθορίζουν (αν υπάρχουν κύτταρα που έχουν επιβιώσει στο αντιβιοτικό, τότε αυτά έχουν προσλάβει το πλασμίδιο οπότε εκφράζουν και την κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη), τα κύτταρα παρατηρούνται στο μικροσκόπιο φθορισμού και όταν η καλλιέργεια φθάσει σε μεταλογαριθμική φάση γίνεται ψύξη ενός μέρους της σε υγρό άζωτο
- Τα παράσιτα στη συνέχεια καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό παρουσία 15% FBS που σταδιακά μειώνεται στα 10%. Το αντιβιοτικό προστίθεται σε κάθε ανακαλλιέργεια με μέγιστη συγκέντρωση 100 µg/mL
- Ακολουθεί χαρακτηρισμός των διαγονιδιακών φθορίζοντων παρασίτων με μικροσκοπία φθορισμού

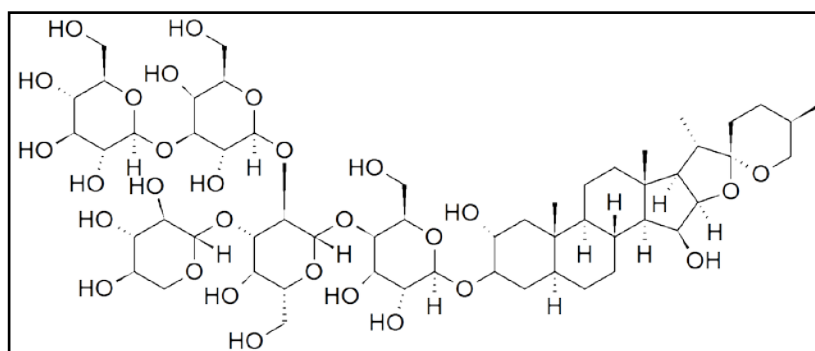
Για να είναι επιτυχής ο μετασχηματισμός των παρασίτων, ο ηλεκτρικός παλμός πρέπει να παρουσιάζει χρόνο εκπόλωσης ~4 msec.

3.12 Κλασμάτωση πρωτεϊνών με τη χρήση του απορρυπαντικού διγιτονίνη (digitonin fractionation)

Αντιδραστήρια – Όργανα

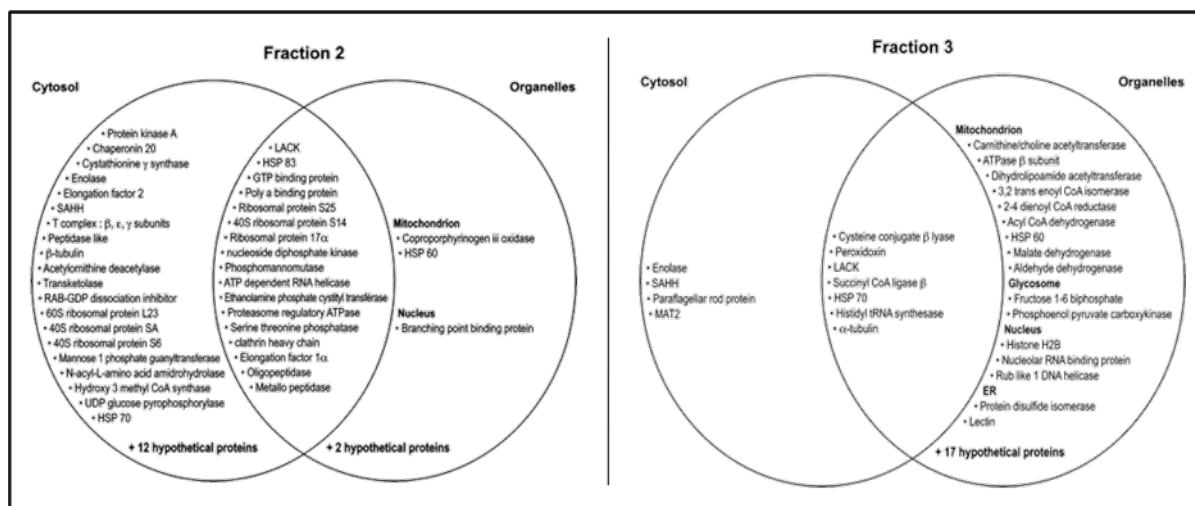
- Καλλιέργεια προμαστιγωτών παρασίτων *L. donovani* (LG13)
- Διάλυμα PBS 1X (βλ. παράγραφο 3.2)
- Διάλυμα αναδιασποράς (διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου)
 - ο Tris-HCl 75 mM, pH 7,4, Applichem
 - ο NaCl 145 mM, Applichem
 - ο KCl 11 mM, Merck
- Διάλυμα διγιτονίνης (Sigma) 100 mM (stock): 0,84 g σε 6,7 mL νερού και 0,35 mL μεθανόλης 100%
 - ο Αραίωση με υπερκάθαρο νερό σε τελικές συγκεντρώσεις διγιτονίνης 20 μ M, 200 μ M, 1 mM και 10 mM
- Αναστολείς πρωτεασών, Sigma
- Διάλυμα σακχαρόζης 0,3 M: 5,13 g σε 50 mL νερού
- Διάλυμα Triton X-100 1% σε PBS 1X
- Ακετόνη 100%, Applichem
- Διάλυμα φόρτωσης πρωτεϊνών (Laemmli buffer), (βλ. παράγραφο 3.7.1)
- Μικροφυγόκεντρος, Eppendorf 5417R
- Κυκλοαναδευτήρας, Labnet VX100
- Υδρόλουτρο, ED13, Julabo

Η διγιτονίνη (εικόνα 3.2) είναι ένας γλυκοζίτης που λαμβάνεται από το φυτό *Digitalis purpurea*. Το άγλυκο τμήμα του ονομάζεται διγιτογενίνη 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 τμήματα του κυττάρου (κλάσματα) ξεκινώντας από τις διαλυτές (κυτταροπλασματικές), στη συνέχεια τις πρωτεΐνες οργανιδίων, μιτοχονδρίων, τις κυτταροσκελετικές, και τέλος, τις μεμβρανικές και πυρηνικές.



Εικόνα 3.2. Το μόριο της διγιτονίνης

Στο σχήμα 3.3 παρουσιάζεται διάγραμμα Venn του υποκυτταρικού εντοπισμού πρωτεϊνών μετά την κλασμάτωση. Ένα διάγραμμα Venn δείχνει όλες τις πιθανές λογικές σχέσεις μεταξύ ενός πεπερασμένου συνόλου πραγμάτων (συνυπολογισμός πραγμάτων). Τέτοια διαγράμματα σχεδιάστηκαν γύρω στο 1880 από τον John Venn και χρησιμοποιούνται για να διδάξουν στοιχειώδη θεωρία των συνόλων, καθώς και να απεικονίσουν απλές σχέσεις συνόλων πιθανότητας, στατιστικών στοιχείων, γλωσσολογίας και επιστήμης των υπολογιστών.



Σχήμα 3.5. Διάγραμμα Venn που παρουσιάζει τον υποθετικό υποκυτταρικό εντοπισμό των πρωτεϊνών που προκύπτουν από την κλασμάτωση με διγιτονίνη [60]. Στο διαλυτό κλάσμα 1 και 2 ανακτώνται κυρίως διαλυτές πρωτεΐνες. Στο κλάσμα 3 ανακτώνται κυρίως πρωτεΐνες μεμβρανικών οργανιδίων και στο κλάσμα 4 μιτοχονδρίων. Η ανάλυση έγινε με φασματομετρία μάζας

Πειραματική διαδικασία

- Καλλιέργεια προμαστιγωτών παρασίτων *L. donovani* με OD₆₀₀ ~0,5 φυγοκεντρείται στα 1000×g, στους 18° C, για 5 λεπτά
- Τα κύτταρα εκπλένονται με 10 mL παγωμένου PBS 1X και φυγοκεντρούνται
- Αναδιασπείρονται σε 0,5 mL διαλύματος αναδιασποράς, προστίθενται αναστολείς πρωτεασών και 0,5 mL διαλύματος διγιτονίνης σε συγκέντρωση 20 μM (τα κύτταρα σε αυτή τη συγκέντρωση δε λύνονται)
- Το δείγμα, μετά από ισχυρή ανάδευση, επωάζεται στους 37° C για 5 λεπτά
- Λαμβάνονται 10-20 μL για προσδιορισμό πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford
- Προστίθενται 200 μL σακχαρόζης 0,3 M και ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 18000×g για 5 λεπτά, στους 4° C
- Το υπερκείμενο αποτελεί το κλάσμα 1 (κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες)
- Το ίζημα αναδιασπείρεται στο διάλυμα αναδιασποράς και ακολουθεί η ίδια διαδικασία (προσθήκη διγιτονίνης 200 μM)
- Το κλάσμα αυτού του βήματος (κλάσμα 2) περιέχει διαλυτές πρωτεΐνες
- Το ίζημα αναδιασπείρεται στο διάλυμα αναδιασποράς και ακολουθεί η ίδια διαδικασία (προσθήκη διγιτονίνης 1 mM)
- Το κλάσμα αυτού του βήματος (κλάσμα 3) περιέχει πρωτεΐνες οργανιδίων (κάποιες είναι των μιτοχονδρίων)
- Το ίζημα αναδιασπείρεται στο διάλυμα αναδιασποράς και ακολουθεί η ίδια διαδικασία (προσθήκη διγιτονίνης 10 mM)
- Το κλάσμα αυτού του βήματος (κλάσμα 4) περιέχει πρωτεΐνες οργανιδίων (μιτοχονδρίων, πυρήνα, ενδοπλασματικού δικτύου)
- Το ίζημα της τελευταίας φυγοκέντρωσης (κλάσμα 5) αναδιασπείρεται σε 50 μL διαλύματος Triton X-100 1% σε PBS 1X και επωάζεται για μία ώρα στους 4° C, υπό περιστροφή, στη συνέχεια φυγοκεντρείται στα 1000×g, στους 4° C, για 20 λεπτά
- Το υπερκείμενο περιέχει τις διαλυτές πρωτεΐνες του κλάσματος 5, ενώ το ίζημα που αναδιασπείρεται σε διάλυμα φόρτωσης πρωτεϊνών 1X ίσου όγκου με το υπερκείμενο και θερμαίνεται στους 95° C, περιέχει αδιάλυτες πρωτεΐνες, μεμβρανικές, πυρηνικές και πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού
- Στο υπερκείμενο προστίθεται διάλυμα φόρτωσης πρωτεϊνών 6X

- Προστίθεται στα κλάσματα 1 έως 4 ίσος όγκος παγωμένης ακετόνης 100% και τα δείγματα επωάζονται για 16 ώρες στους -20° C
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30 λεπτά, στους 4° C, στα 18000×g, το υπερκείμενο αποχύνεται και το ίζημα των πρωτεϊνών αφήνεται σε ρεύμα αέρα απαγωγού για να στεγνώσει πλήρως
- Αναδιαλύονται οι πρωτεΐνες στον κατάλληλο όγκο διαλύματος φόρτωσης πρωτεϊνών 1X, θερμαίνονται στους 95° C για 5 λεπτά και αποθηκεύονται στους -20° C.

3.13 Απομόνωση του συνόλου των εκκρινόμενων πρωτεϊνών από καλλιέργεια παρασίτων

A. Καθίζηση πρωτεϊνών με ακετόνη

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Καλλιέργεια προμαστιγωτών παρασίτων *L. donovani* (αγρίου τύπου ή διαγονιδιακών)
- Θρεπτικό υλικό RPMI 1640, Life Technologies
- Διάλυμα PBS - 0,1 mM EDTA
- Ακετόνη 100%, Applichem
- Διάλυμα φόρτωσης πρωτεϊνών (βλ. παράγραφο 3.7.1)
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος, Jouan CR3i multifunction, Thermo
- Μικροφυγόκεντρος, Eppendorf 5417R
- Επωαστήρας 25° C για την καλλιέργεια παρασίτων (Shel-lab)

Πειραματική διαδικασία

- Καλλιέργεια προμαστιγωτών παρασίτων (OD₆₀₀ ~0,5) φυγοκεντρείται στα 1000×g και τα κύτταρα εκπλένονται τρεις φορές με θρεπτικό υλικό χωρίς ορό και αναδιασπείρονται σε όγκο θρεπτικού υλικού (χωρίς ορό) ίσο με τον αρχικό της καλλιέργειας
- Αφήνονται στους 25° C για 24 ώρες
- Τα παράσιτα φυγοκεντρούνται στα 300×g για 10 λεπτά, στους 4° C
- Το ίζημα των κυττάρων εκπλένεται με διάλυμα PBS-0,1 mM EDTA και μπορεί να αποθηκευτεί για μικρό χρονικό διάστημα στους -20° C

- Το υπερκείμενο ξαναφυγοκεντρείται στα 700×g για 30 λεπτά, στους 4° C
- Το νέο υπερκείμενο φυγοκεντρείται πάλι στα 15000×g και προσδιορίζεται η ποσότητα της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford
- Προστίθεται ίσος όγκος παγωμένης ακετόνης 100% και αφήνεται στους -20° C για 16 ώρες για να καταβυθιστούν οι πρωτεΐνες
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30 λεπτά, στους 4° C, στα 18000×g, το υπερκείμενο αποχύνεται και το ίζημα των πρωτεϊνών αφήνεται σε ρεύμα αέρα απαγωγού για να στεγνώσει πλήρως
- Αναδιαλύονται οι πρωτεΐνες στον κατάλληλο όγκο διαλύματος φόρτωσης πρωτεϊνών 1X, θερμαίνονται στους 95° C για 5 λεπτά και αποθηκεύονται στους -20° C.

B. Καθίζηση πρωτεϊνών με τριχλωροξικό οξύ

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Καλλιέργεια προμαστιγωτών παρασίτων *L. donovani* (αγρίου τύπου ή διαγονιδιακών)
- Θρεπτικό υλικό RPMI 1640, Life Technologies
- Διάλυμα PBS - 0,1 mM EDTA
- Τριχλωροξικό οξύ (TCA) διάλυμα 100% (αποθηκεύεται στους 4° C) Applichem
- Ακετόνη 100% (παγωμένη), Applichem
- Διάλυμα φόρτωσης πρωτεϊνών (βλ. παράγραφο 3.7.1)
- Κυκλοαναδευτήρας, Labnet VX100
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος, Jouan CR3i multifunction, Thermo
- Μικροφυγόκεντρος, Eppendorf 5417R
- Επωαστήρας 25° C για την καλλιέργεια παρασίτων (Shel-lab)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για συμπύκνωση αραιών δειγμάτων πρωτεϊνών.

Πειραματική διαδικασία

- Καλλιέργεια προμαστιγωτών παρασίτων (OD₆₀₀ ~0,5) φυγοκεντρείται στα 1000×g και τα κύτταρα εκπλένονται τρεις φορές με θρεπτικό υλικό χωρίς ορό και αναδιασπείρονται σε όγκο θρεπτικού υλικού (χωρίς ορό) ίσο με τον αρχικό της καλλιέργειας
- Αφήνονται στους 25° C για 24 ώρες

- Τα παράσιτα φυγοκεντρούνται στα 300×g για 10 λεπτά, στους 4° C
- Το ίζημα των κυττάρων εκπλένεται με διάλυμα PBS-0,1 mM EDTA και μπορεί να αποθηκευτεί για μικρό χρονικό διάστημα στους -20° C
- Το υπερκείμενο ξαναφυγοκεντρείται στα 700×g για 30 λεπτά, στους 4° C
- Το νέο υπερκείμενο φυγοκεντρείται πάλι στα 15000×g και προσδιορίζεται η ποσότητα της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford
- Προστίθεται TCA από το διάλυμα αποθήκευσης με τελική συγκέντρωση 20%
- Το διάλυμα πρωτεϊνών ανακινείται σε κυκλοαναδευτήρα και αφήνεται στον πάγο για 30 λεπτά για να καταβυθιστούν οι πρωτεΐνες
- Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 30 λεπτά, στους 4° C, στα 18000×g, το υπερκείμενο αποχύνεται, προστίθενται 500 mL παγωμένης ακετόνης (για απομάκρυνση του TCA) και το διάλυμα ανακινείται ελαφρώς σε κυκλοαναδευτήρα
- Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 15 λεπτά, στους 4° C, στα 18000×g, το υπερκείμενο αποχύνεται και το ίζημα των πρωτεϊνών αφήνεται σε ρεύμα αέρα απαγωγού για να στεγνώσει πλήρως
- Αναδιαλύονται οι πρωτεΐνες στον κατάλληλο όγκο διαλύματος φόρτωσης πρωτεϊνών 1X, θερμαίνονται στους 95° C για 5 λεπτά και αποθηκεύονται στους -20° C.

3.14 Επιμόλυνση ανώτερων ευκαρυωτικών κυττάρων

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Αντιδραστήρια λιποφεκταμίνης, Lipofectamine LTX και Plus, Invitrogen
- Πλασμιδιακό DNA
- Θρεπτικό υλικό DMEM (Biosera) με και χωρίς FBS (Gibco)
- Διάλυμα PBS (βλ. παράγραφο 3.2) αποστειρωμένο
- Τρυβλίο 6 φρεατίων, Greiner
- Επωαστήρας για την καλλιέργεια ευκαρυωτικών κυττάρων, Heraeus Hera cell 150

Χρησιμοποιείται η μέθοδος επιμόλυνσης μέσω λιποσωμάτων και πιο συγκεκριμένα της λιποφεκταμίνης, η οποία είναι ένα κατιοντικό λιπόσωμα. Η βασική δομή των κατιοντικών λιποσωμάτων αποτελείται από μία θετικά φορτισμένη κεφαλή και δύο αλυσίδες υδρογονανθράκων. Η φορτισμένη ομάδα αλληλεπιδρά με τη φωσφορική

ομάδα του νουκλεϊκού οξέος (πλασμίδιο). Το θετικό επιφανειακό φορτίο των λιποσωμάτων βοηθά επίσης στην αλληλεπίδραση του νουκλεϊκού οξέος με τη κυτταρική μεμβράνη, επιτρέποντας τη σύντηξη του λιποσώματος / νουκλεϊκού οξέος (σύμπλοκο DNA-λιποφεκταμίνης) με την αρνητικά φορτισμένη κυτταρική μεμβράνη. Το σύμπλοκο επιμόλυνσης πιθανόν εισέρχεται στο κύτταρο μέσω ενδοκυττάτωσης. Ο πλασμιδιακός φορέας που χρησιμοποιήθηκε για την έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης rLdPIPh22 με τη μοριακή ετικέτα της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης GFP (rLdPIPh22-GFP) είναι ο pEGFP-N3 (Clontech, κεφάλαιο αποτελεσμάτων, εικόνα 4.9). Το γονίδιο κλωνοποιήθηκε στις θέσεις BglII και EcoRI.

Πειραματική διαδικασία

Για τρυβλίο 6 φρεατίων

- Τα κύτταρα HeLa ή NIH3T3 επιστρώνονται έτσι, ώστε τη στιγμή της επιμόλυνσης να είναι σε πυκνότητα 70% (περίπου 1×10^6 κύτταρα/φρεάτιο)
- Το πλασμιδιακό DNA διαλύεται στο θρεπτικό υλικό (DMEM, χωρίς ορό) και στη συνέχεια προστίθεται το αντιδραστήριο Plus που περιέχεται στη συσκευασία της λιποφεκταμίνης
- 3 μ L λιποφεκταμίνης προστίθενται στο παραπάνω μίγμα, το οποίο αναδεύεται ελαφρώς και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 25 λεπτά, ώστε να σχηματιστεί το σύμπλοκο DNA-λιποφεκταμίνης
- Απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό από τα κύτταρα, γίνεται έκπλυση δύο φορές με PBS και προστίθενται 500 μ L του διαλύματος του συμπλόκου DNA-λιποφεκταμίνης απευθείας πάνω στα κύτταρα. Το τρυβλίο ανακινείται σταυρωτά για να περάσει το υγρό σε όλη την επιφάνεια της κυτταρικής στοιβάδας
- Τα κύτταρα επωάζονται για μία ώρα στους 37° C, στη συνέχεια προστίθενται 2 mL θρεπτικού υλικού με 5% FBS ανά φρεάτιο, αφήνονται στους 37° C σε ατμόσφαιρα CO₂ και ελέγχονται σε μικροσκόπιο φθορισμού στις 24 και 48 ώρες
- Τα κύτταρα μελετώνται για ανοσοφθορισμό σε συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού (βλ. παράγραφο 3.17, B). Στον πίνακα 3.4 παρουσιάζονται τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην επιμόλυνση των ευκαρυωτικών κυττάρων.

Πίνακας 3.4. Αντιδραστήρια επιμόλυνσης ευκαρυωτικών κυττάρων

Συστατικά	Τρυβλίο 6 φρεατίων
Κύτταρα	1×10 ⁶
Θρεπτικό υλικό	500 µL
DNA	1,25 µg
Αντιδραστήριο Plus	14 µL
Λιποφεκταμίνη LTX	3,0 µL

3.15 Προετοιμασία των κυττάρων HeLa για έλεγχο με ανοσοαποτύπωση Western (ομογενοποίηση κυττάρων)

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Διάλυμα PBS/EDTA
- Διάλυμα λύσης κυττάρων
 - ο Tris-HCl 20 mM, pH 8,8, Applichem
 - ο Χλωριούχο ασβέστιο (CaCl₂) 2 mM, Merck
 - ο SDS 3% w/v, Applichem
 - ο Μερκαπτοαιθανόλη 10% v/v, Sigma
- DNάση I, Promega
- Διάλυμα φόρτωσης πρωτεϊνών (βλ. παράγραφο 3.7.1)
- Μικροφυγόκεντρος, Eppendorf 5417R

Πειραματική διαδικασία

- Τα κύτταρα αποκολλώνται από το τρυβλίο με προσθήκη διαλύματος PBS/EDTA και φυγοκεντρούνται στα 200×g για 5 λεπτά
- Προστίθεται το διάλυμα λύσης κυττάρων
- Τα σπασμένα κύτταρα θερμαίνονται στους 95° C για 5 λεπτά και τοποθετούνται στον πάγο για να ψυχθούν (λαμβάνεται μία μικρή ποσότητα για προσδιορισμό της ποσότητας πρωτεΐνης)
- Προστίθεται DNάση I, 5-10 U και το δείγμα παραμένει στον πάγο για 15 λεπτά
- Προστίθεται το διάλυμα φόρτωσης 6X, το δείγμα θερμαίνεται στους 95° C για 5 λεπτά και φορτώνεται σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου. Μπορεί να αποθηκευτεί στους -20° C, αν δεν αναλυθεί αμέσως.

3.16 Μονιμοποίηση κυττάρων και μικροσκοπία φθορισμού

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Παραφολμαλδεΐδη (PFA)
 - ο Διάλυμα 4% w/v, τελικού όγκου 100 mL, παρασκευάζεται ως εξής: 4 g PFA διαλύονται σε 60 mL υπερκάθαρου νερού και θερμαίνονται στους 60-70° C με μαγνητική ανάδευση. Προστίθενται σταγόνες υδροξειδίου του νατρίου (NaOH 1 N, Applichem) που βοηθούν στη διαύγαση του διαλύματος, 10 mL PBS 10X και 4 g σακχαρόζης που βοηθά στη διατήρηση της μεμβράνης των κυττάρων. Το διάλυμα φιλτράρεται, μοιράζεται σε erpendorf ανά 1 mL και φυλάσσεται στους -20° C
- Triton X-100 0,1% (v/v) (Sigma) σε διάλυμα PBS 1X (βλ. παράγραφο 3.2), pH 7,4
- RNάση A, Sigma
- Ιωδιούχο προπίδιο (propidium iodide, PI), Sigma
- TOPRO (TO-PRO-3, Molecular Probes)
- Hoechst 33258, Sigma
- Διάλυμα αντιδραστηρίου μονιμοποίησης Mowiol 4-88, Calbiochem (περιέχει 10% w/v Mowiol, 25% v/v γλυκερόλη, 100 mM Tris-HCl, pH 8,5)
- Αντικειμενοφόροι πλάκες (VWR International) και καλυπτρίδες επεξεργασμένες με 1 mg/mL poly-L-λυσίνη (Sigma)
- Χλωριούχο αμμώνιο (NH₄Cl, Sigma) 50 mM σε PBS 1X
- Αλβουμίνη βόειου ορού (BSA)
- Πρώτα αντισώματα:
 - ο Πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης rLdPIPh22-8His (παρασκευάστηκε στο εργαστήριο, βλ. παράγραφο 3.18.1)
 - ο Πολυκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης rLdPIPh22-8His (παρασκευάστηκε στο εργαστήριο, βλ. παράγραφο 3.18.1)
 - ο Πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι της ακτίνης, Santa Cruz
 - ο Μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι της α-τουμπουλίνης, Molecular Probes (A11126)
 - ο Φαλοϊδίνη συζευγμένη με πολυκλωνικό αντίσωμα αίγας anti-rabbit IgG, συζευγμένο με την κόκκινη φθορίζουσα χρωστική Alexa Fluor 546, Molecular Probes (A22283)

- Δεύτερα αντισώματα:
 - ο Πολυκλωνικό αντίσωμα αίγας anti-rabbit IgG, συζευγμένο με την πράσινη φθορίζουσα χρωστική Alexa Fluor 488, Molecular Probes (A11008)
 - ο Πολυκλωνικό αντίσωμα αίγας anti-rabbit IgG, συζευγμένο με την κόκκινη φθορίζουσα χρωστική Alexa Fluor 546, Molecular Probes (A11010)
 - ο Πολυκλωνικό αντίσωμα αίγας anti-mouse IgG, συζευγμένο με την πράσινη φθορίζουσα χρωστική Alexa Fluor 488, Molecular Probes (A11001)
 - ο Πολυκλωνικό αντίσωμα αίγας anti-mouse IgG, συζευγμένο με την κόκκινη φθορίζουσα χρωστική Alexa Fluor 546, Molecular Probes (A11002)
- Συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού, TCS-SP Leica
- Μικροσκόπιο ευρέως πεδίου Olympus X81
- Μικροφυγόκεντρος, Eppendorf 5417R

Ο έμμεσος ανοσοφθορισμός περιλαμβάνει τη σήμανση επιτόπων του κυττάρου με ειδικά αντισώματα και δεύτερα αντισώματα συζευγμένα με φθορίζουσες χρωστικές και χρησιμοποιείται για την παρατήρηση της υποκυτταρικής κατανομής των βιομορίων. Η γενική αρχή της μεθόδου είναι σχετικά απλή: το πρώτο βήμα περιλαμβάνει την επώαση των κυττάρων με ειδικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης που θέλουμε να ανιχνεύσουμε ενώ, κατά το δεύτερο βήμα, πραγματοποιείται επώαση με ειδικό δεύτερο φθορίζον αντίσωμα, το οποίο αναγνωρίζει το πρώτο αντίσωμα. Τμήματα ιστών ή κυττάρων που είναι σημασμένα μελετώνται με την τεχνική του ανοσοφθορισμού σε μικροσκόπιο φθορισμού ευρέως πεδίου ή σε συνεστιακό μικροσκόπιο.

Το συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού προσφέρει πλεονεκτήματα έναντι των κοινών οπτικών μικροσκοπίων ευρέως πεδίου. Σε αυτά περιλαμβάνονται το επιφανειακό βάθος πεδίου (including shallow depth of field), η εξάλειψη της μη εστιασμένης ακτινοβολίας (elimination of out-of-focus glare) και η λήψη διαδοχικών οπτικών τομών με τη δυνατότητα ανάλυσης του βάθους των δειγμάτων, εφαρμογές ιδιαίτερα χρήσιμες για την ανάλυση δειγμάτων με μεγάλο πάχος (π.χ. τμημάτων ιστών ή εμβρύων πειραματόζων).

Πειραματική διαδικασία

Εφαρμόστηκε ο έμμεσος ανοσοφθορισμός με χρήση αντισωμάτων ειδικών για την υπό μελέτη πρωτεΐνη και δεύτερων αντισωμάτων σημασμένων με φθορίζουσα ουσία.

A. Παράσιτα

- Παράσιτα από μεταλογαριθμική φάση ανάπτυξης φυγοκεντρούνται στα 1000×g για 6 λεπτά και εκπλένονται με παγωμένο PBS 1X
- Το υπερκείμενο αποχύνεται, τα κύτταρα μονιμοποιούνται με αναδιάλυση σε PBS, 2% PFA, επωάζονται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρούνται όπως προηγουμένως
- Η PFA εξουδετερώνεται με χλωριούχο αμμώνιο, αρχικά με μία γρήγορη έκπλυση και στη συνέχεια με επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τα παράσιτα συλλέγονται κάθε φορά με φυγοκέντρηση
- Τα παράσιτα αναδιαλύονται σε 1 mL PBS 1X και 300 μL από αυτά αραιώνονται σε 1 mL PBS 1X (αραίωση 1:3) για να μειωθεί ο αριθμός των κυττάρων που θα επιστρωθούν στην καλυπτρίδα. Ένα δείγμα με μεγάλη πυκνότητα παρασίτων είναι δύσκολο να μελετηθεί
- 50 μL εναιωρήματος παρασίτων επιστρώνονται στην καλυπτρίδα και αφήνονται να προσκολληθούν σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι την επόμενη ημέρα
- Ακολουθούν δύο εκπλύσεις με PBS 1X και μία με Triton X-100 0,1% σε διάλυμα PBS 1X για να γίνει διαπερατή η κυτταρική μεμβράνη
- Χρώση με φθορίζουσες ουσίες
 - ο Τα παράσιτα επωάζονται για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με το πρώτο αντίσωμα, το διάλυμα του οποίου περιέχει: 1-10 μg/mL καθαρισμένου αντισώματος ή, αν πρόκειται για ορό, ποσότητα 1:50 έως 1:1000 σε σχέση με τον τελικό όγκο του διαλύματος και 10% BSA για “μπλοκάρισμα” των μη ειδικών θέσεων. Για κάθε καλυπτρίδα χρησιμοποιείται συνολικός όγκος 50-100 μL PBS 1X, με Triton X-100 1%
 - ο Ακολουθούν 3 εκπλύσεις με διάλυμα PBS 1X, 0,1% Triton X-100
 - ο Τα παράσιτα επωάζονται για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με το δεύτερο αντίσωμα, το διάλυμα του οποίου περιέχει σε συγκέντρωση 1:1000 το αντίσωμα με τη φθορίζουσα ουσία και 10% BSA, σε συνολικό όγκο 50-100 μL PBS 1X, 0,1% Triton X-100
 - ο Ακολουθεί μία έκπλυση με PBS 1X, 0,1% Triton X-100 και δύο με PBS 1X
 - ο Αν χρειάζεται οι πυρήνες των παρασίτων να είναι εμφανείς, τότε προστίθεται

- Η κόκκινη φθορίζουσα χρωστική PI (propidium iodide) σε συγκέντρωση 10 $\mu\text{g/mL}$ για 10 λεπτά, αφού έχει γίνει πρώτα κατεργασία με RNάση, σε συγκέντρωση 100 $\mu\text{g/mL}$ για 10 λεπτά
- Ή η μπλε φθορίζουσα χρωστική TOPRO (απορρόφηση στα 633 nm) σε αραίωση 1:1000 για 20 λεπτά
- Ή η φθορίζουσα χρωστική Hoechst, η οποία απορροφά στο UV, σε αραίωση 1:1000 για 5-10 λεπτά
- Σε αντικειμενοφόρο πλάκα τοποθετούνται 10 μL αντιδραστηρίου επικάλυψης Mowiol και στη συνέχεια η καλυπτρίδα με τα κύτταρα προς την πλάκα της αντικειμενοφόρου πλάκας. Άσκηση μικρής πίεσης είναι απαραίτητη, ώστε να εφάπτεται πλήρως η καλυπτρίδα με την πλάκα και ακολουθεί επώαση για 16 ώρες στους 4° C για να πολυμεριστεί το Mowiol
- Την επόμενη μέρα πραγματοποιείται αεροστεγής έγκλειση του δείγματος με βερνίκι
- Το δείγμα των παρασίτων παρατηρείται με μικροσκόπιο φθορισμού

B. Ανώτερες ευκαρυωτικές κυτταρικές σειρές

Για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν καρκινικά κύτταρα κοιλιακού επιθηλίου (HeLa) και ινοβλάστες NIH3T3.

- Τα κύτταρα εκπλένονται αρχικά με PBS 1X και στη συνέχεια με PBS 1X που περιέχει Ca^{2+} και Mg^{2+}
- Τα κύτταρα μονιμοποιούνται, εξουδετερώνεται η παραφορμαλδεύδη και “βάφονται” με τις φθορίζουσες χρωστικές όπως προηγουμένως

3.17 Παραγωγή πολυκλωνικών αντισωμάτων έναντι της rLdPIPh22 από κουνέλι και ποντίκι

3.17.1 Ανοσοποίηση

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Αντιδραστήρια και όργανα όπως αυτά των παραγράφων 3.7.1 για ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου
- Διάλυμα PBS 1X (βλ. παράγραφο 3.2)
- Ανοσοενισχυτικό Freund's adjuvant complete και incomplete, Sigma
- Αποστειρωμένο νυστέρι

- Κρυοανθεκτικό γουδί/γουδοχέρι
- Σύριγγες (5-10 mL για κουνέλι και 1-5 mL για ποντίκι)
- Βελόνες (21G για κουνέλι και 23G, 21G για ποντίκι)
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος, Jouan CR3i multifunction, Thermo

Πειραματική διαδικασία

A. Προετοιμασία αντιγόνου για τις ανοσοποιήσεις

- Ηλεκτροφορεύεται η απαραίτητη ποσότητα πρωτεΐνης rLdPIPh22-8His, η οποία θα χρησιμοποιηθεί ως αντιγόνο και έχει απομονωθεί με σφαιρίδια νικελίου (βλ. παράγραφο 3.5.3), σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 12%
- Εντοπίζεται η πρωτεΐνη ύστερα από χρώση της πηκτής με τη χρωστική Coomassie R-250 (βλ.παράγραφο 3.7.1)
- Αποκόπτεται το τμήμα της πηκτής που περιέχει την rLdPIPh22 (~30 kDa) με χρήση αποστειρωμένου νυστεριού
- Θρυμματίζεται το πολυακρυλαμίδιο σε κρυοανθεκτικό γουδί μετά από ψύξη σε υγρό άζωτο
- Τα θραύσματα του πολυακρυλαμιδίου μετατρέπονται σε εναιώρημα με πρόσθεση PBS 1X και μεταφέρονται σε σωλήνες erpendorf του 1,5 mL
- Το εναιώρημα μπορεί να αποθηκευτεί στους -80° C αν δε χρησιμοποιηθεί αμέσως
- Πριν την ανοσοποίηση προστίθεται ποσότητα του ανοσοενισχυτικού Freund's adjuvant (complete για την πρώτη ανοσοποίηση και incomplete για τις επόμενες) τόση, ώστε η αναλογία adjuvant:διάλυμα αντιγόνου να είναι 1:1 και
- αναδεύεται ισχυρά για 30 λεπτά έως ότου σχηματισθεί σταθερό γαλάκτωμα

B. Πρωτόκολλο ανοσοποιήσεων

- ο Ημέρα 0: Λήψη αίματος πριν την ανοσοποίηση, ένεση με complete Freund's adjuvant και αντιγόνο (500 µg πρωτεΐνης για κουνέλι, 150 µg για ποντίκι)
- ο Ημέρα 20: Δεύτερη ανοσοποίηση (100 µg πρωτεΐνης για κουνέλι, 25 µg για ποντίκι)
- ο Ημέρα 40: Τρίτη ανοσοποίηση (50 µg πρωτεΐνης για κουνέλι, 12,5 µg για ποντίκι)
- ο Ημέρα 50: Λήψη αίματος (κάθε 10-14 ημέρες μετά την ανοσοποίηση) και απομόνωση του ορού
- ο Ημέρα 60: Τέταρτη ανοσοποίηση (50 µg πρωτεΐνης, κουνέλι)

- ο Ημέρα 70: Λήψη αίματος και απομόνωση ορού
- ο Ημέρα 80: Πέμπτη ανοσοποίηση (50 μ g πρωτεΐνης, κουνέλι)
- ο Ημέρα 90: Ολική αφαίμαξη από την καρδιά (ευθανασία) (στο ποντίκι η διαδικασία της αφαίμαξης πραγματοποιείται μετά την τρίτη ανοσοποίηση και εφόσον έχει κριθεί απαραίτητη μετά τον έλεγχο με ανοσοαποτύπωση Western)

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.

3.17.2 Καθαρισμός αντισώματος με χρωματογραφία υψηλής συγγένειας από μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Αντιδραστήρια και όργανα όπως των παραγράφων 3.7.1 και 3.7.2 για ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου και ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης
- Διάλυμα PBS 1X (βλ. παράγραφο 3.2)
- Γλυκίνη-HCl 0,2 M, Applichem
- Tris-HCl 2 M, Applichem
- Άπαχο γάλα σε σκόνη, Regilait
- Ημιδιαπερατή μεμβράνη διαπίδυσης, Spectra/Por της Biotech
- Περιστροφικός αναδευτήρας, Selecta Movil ROD
- Συσκευή οριζόντιας κυκλικής ανακίνησης, 3005 GLF

Πειραματική διαδικασία

- Ηλεκτροφόρηση του αντιγόνου (rLdPIPh22) σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 12% και μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης
- Χρώση της μεμβράνης με Ponceau-S και απομόνωση της περιοχής που περιέχει το αντιγόνο

- Έκπλυση τρεις φορές με PBS για 10 λεπτά
- Επώαση του επιλεγμένου τμήματος της νιτροκυτταρίνης για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με PBS, 3% w/v άπαχου γάλακτος σε σκόνη
- Επώαση του τμήματος της νιτροκυτταρίνης για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου ή για 16 ώρες στους 4° C με 50-100 μ L ορού
- Έκπλυση τρεις φορές με PBS για 10 λεπτά
- Στη συνέχεια, το τμήμα της νιτροκυτταρίνης τοποθετείται σε eppendorf (1,5 mL) και εκλούεται το προσδεδεμένο αντίσωμα με προσθήκη 1 mL 0,2 M γλυκίνης/HCl, pH 2,2, για 5 λεπτά, στους 4° C, υπό περιστροφή
- Το έκλουσμα εξουδετερώνεται με 150 μ L 2 M Tris-HCl
- Ακολουθεί διαπίδυση με PBS (διαδικασία όμοια με αυτή της παραγράφου 3.5.3). Μεταφέρεται το έκλουσμα σε ημιδιαπερατή μεμβράνη και επωάζεται σε 1 L PBS στους 4° C για 2 ώρες. Στη συνέχεια, επωάζεται 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, είτε με μέτρηση της απορρόφησης στα 280 nm.

3.17.3 Καθαρισμός αντισώματος με χρωματογραφία στήλης υψηλής συγγένειας

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Σεφαρόζη 4B ενεργοποιημένη με βρωμίδιο του κυανίου (Protein A - Sepharose from *Staphylococcus aureus*, Sigma)
- Υδροχλωρικό οξύ (HCl), Applichem
- Διάλυμα πρόσδεσης (coupling buffer), pH 8,5
 - ο Όξινο ανθρακικό νάτριο (NaHCO_3) 0,2 M, Applichem
 - ο Χλωριούχο νάτριο (NaCl) 0,5 M, Applichem
- Διάλυμα γλυκίνης 0,2 M, pH 8,5, Applichem
- Διάλυμα 0,1 M $\text{CH}_3\text{COONa/HCl}$, 0,5 M NaCl, pH 4
- Διάλυμα PBS (βλ. παράγραφο 3.2)
- Διάλυμα νατραζιδίου (NaN_3) 0,02 M, Sigma

- Διάλυμα εξουδετέρωσης: Χλωριούχο κάλιο (KCl, Merck) και 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 (Applichem)
- Διάλυμα έκλουσης: γλυκίνη-HCl 100 mM, pH 2,8
- BSA 100 mg/ml, PIERCE
- Γυάλινος ηθμός
- Στήλη χρωματογραφίας
- Ημιδιαπερατή μεμβράνη διαπίδυσης, Spectra/Por της Biotech
- Περιστροφικός αναδευτήρας, Selecta Movil ROD
- Μικροφυγόκεντρος, Eppendorf 5417R
- Φασματοφωτόμετρο Nanodrop ND 2000/2000c (Thermo Scientific)

Ο καθαρισμός αντισωμάτων γίνεται, ακόμη, με χρωματογραφία υψηλής συγγένειας. Το αντιγόνο ακινητοποιείται σε σεφαρόζη που έχει ενεργοποιηθεί με βρωμίδιο του κυανίου (CNBr-activated Sepharose 4B), το οποίο αντιδρά με τις ομάδες υδροξυλίου της αγαρόζης και σχηματίζει εστέρες και ιμιδοκαρβονικές ενώσεις. Αυτές οι ομάδες αντιδρούν με πρωτοταγείς αμίνες των πρωτεϊνών που χρειάζεται να απομονωθούν, π.χ. αντισωμάτων από ορό. Η απομάκρυνση της πρωτεΐνης από την στήλη σεφαρόζης γίνεται με έκλουση με ρυθμιστικό διάλυμα pH 2,2.

Πειραματική διαδικασία

A. Πρόσδεση αντιγόνου στη σεφαρόζη

- Ενεργοποίηση: Ζυγίζεται η κατάλληλη ποσότητα της CNBr-activated Sepharose 4B, ξεπλένεται πάνω σε γυάλινο ηθμό με 200 mL 1 mM HCl/g σκόνης σεφαρόζης. Η σεφαρόζη έχει πλέον εμφάνιση γέλης
- Πρόσδεση: α) Η πρωτεΐνη-αντιγόνο, 1-10 mg για κάθε mL της γέλης, διαλύεται στο διάλυμα πρόσδεσης (το διάλυμα δεν πρέπει να περιέχει δραστικές πρωτοταγείς αμίνες), β) η γέλη εκπλένεται με το διάλυμα πρόσδεσης, γ) αναμιγνύεται το διάλυμα της πρωτεΐνης με τη γέλη της σεφαρόζης και το μίγμα επωάζεται για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου και, στη συνέχεια, για 16 ώρες στους 4° C, υπό περιστροφή (όχι μαγνητική ανάδευση)
- Έκπλυση: α) Τα σφαιρίδια της σεφαρόζης φυγοκεντρούνται για 3 λεπτά στα 1000×g και το υπερκείμενο φυλάσσεται, β) η περίσσεια της πρωτεΐνης απομακρύνεται με αναδιάλυση των σφαιριδίων σε 10 όγκους του διαλύματος πρόσδεσης και φυγοκέντρωση, όπως προηγουμένως. Τα δύο διαφορετικά

υπερκεείμενα ενώνονται και μετράται η απορρόφηση στα 280 nm. Έτσι ελέγχεται η απόδοση της πρόσδεσης. Οι δραστικές ομάδες που απομένουν «μπλοκάρονται» με επώαση των σφαιριδίων με 0,2 M γλυκίνης, pH 8,5, για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου ή για 16 ώρες στους 4° C (10 όγκοι γλυκίνης για κάθε 1 mL γέλης (σφαιριδίων) σεφαρόζης)

- Έκπλυση: η περίσσεια της γλυκίνης και της πρωτεΐνης που πιθανόν αποδεσμεύτηκε απομακρύνεται από τα σφαιρίδια με α) τρεις εκπλύσεις με το διάλυμα πρόσδεσης και φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στα 1000×g, στους 4° C, β) μία έκπλυση με διάλυμα 0,1 M CH₃COONa/HCl, 0,5 M NaCl, pH 4 και γ) τρεις εκπλύσεις με διάλυμα PBS
- Αποθήκευση των σφαιριδίων σεφαρόζης και του αντιγόνου: τα σφαιρίδια αναδιαλύονται σε PBS και 0,01% νατραζιδίου (NaN₃) και αποθηκεύονται στους 4° C ή τοποθετούνται σε στήλη για τον καθαρισμό του ορού

B. Καθαρισμός ορού

- Πρόσδεση αντισώματος: τα σφαιρίδια με το αντιγόνο επωάζονται με τον ορό σε διάλυμα PBS για 16 ώρες, στους 4° C, υπό ανακίνηση (ο ορός περνά από τη στήλη 2-3 φορές και αυτός που απομένει φυλάσσεται για έλεγχο απορρόφησης)
- Έκπλυση: γίνεται με 10 όγκους PBS μέχρι η απορρόφηση στα 280 nm να είναι μικρότερη από 0,050
- Έκλουση: α) ετοιμάζονται πριν την έκλουση σωλήνες errendorf που περιέχουν 100 μL KCl και 22,5 μL 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8, β) γίνεται έκλουση του αντισώματος με 2-3 όγκους γλυκίνης-HCl 100 mM, pH 2,8 και τα εκλούσματα συλλέγονται στους έτοιμους σωλήνες errendorf ανά 1 mL εκλούσματος (το τελικό pH πρέπει να είναι 7,0), γ) μετράται η απορρόφηση των εκλουσμάτων στα 280 nm και φυλάσσονται τα κλάσματα με απορρόφηση πάνω από 0,1
- Διαπίδυση: αλλαγή του διαλύματος του συνολικού εκλούσματος με 100 όγκους διαλύματος PBS (διαδικασία όμοια με της παραγράφου 3.5.3)

Γ. Αποθήκευση

- το διάλυμα του αντισώματος χωρίζεται σε σωλήνες errendorf σε όγκο 100 μL ανά σωλήνα και προστίθεται BSA σε τελική συγκέντρωση 1 mg/mL. Οι

σωλήνες αποθηκεύονται στους 4° C προσωρινά και για μεγάλο χρονικό διάστημα στους -80° C, μετά από γρήγορη ψύξη σε υγρό άζωτο

- Η στήλη εκπλένεται με το διάλυμα της γλυκίνης μέχρι η απορρόφηση στα 280 nm να είναι μηδενική. Στη συνέχεια, εκπλένεται με διάλυμα PBS και τα σφαιρίδια σεφαρόζης αποθηκεύονται με PBS και NaN₃ 0,01%, στους 4° C.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Κλωνοποίηση του γονιδίου της πρωτεΐνης *LdPIPh22* από το παράσιτο *L. donovani* (στέλεχος LG13) σε πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης

Η *in vitro* και *in vivo* μελέτη της υποθετικής φωσφατάσης *LdPIPh22* απαιτεί την κατασκευή μοριακών εργαλείων, για την έκφραση της πρωτεΐνης σε ομόλογα και ετερόλογα κυτταρικά συστήματα, για την ταυτοποίησή της σε ομόλογα κυτταρικά συστήματα και για τη μελέτη της δράσης της ως φωσφατάσης *in vitro* και *in vivo*. Για την έκφραση του γονιδίου *Ldriph22* επελέγησαν οι πλασμιδιακοί φορείς pTriex 1.1, pEGFP-N3 και pF4X1-4sat. Οι δύο πρώτοι επιτρέπουν την έκφραση της πρωτεΐνης σε προκαρυωτικούς (pTriex 1.1) και ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς (pTriex 1.1, pEGFP-N3) με μοριακές ετικέτες, ενώ ο pF4X1-4sat επιτρέπει την έκφραση του γονιδίου αποκλειστικά σε κύτταρα *Leishmania*.

Αρχικά, το γονίδιο *Ldriph22* ενισχύθηκε με τη μέθοδο της PCR από γενωμικό DNA του στελέχους LG13 του παρασίτου *L. donovani* με κατάλληλα ολιγονουκλεοτίδια-εκκινητές για κάθε διαφορετικό πλασμιδιακό φορέα. Η αλληλουχία που επελέγη για τη σύνθεση των εκκινητών βασίστηκε στην αλληλουχία του ομόλογου γονιδίου *Linriph22* [(*LinJ22_V3.0120*, (http://tritrypdb.org/tritrypdb/showRecord.do?name=GeneRecordClasses.GeneRecordClass&source_id=LinJ.22.0120&project_id=TriTrypDB)] από το είδος *Leishmania infantum*. Αυτό έγινε για τους εξής λόγους: α) το γονιδίωμα του *L. infantum* έχει αλληλουχιθεί και είναι προσβάσιμο στη βάση δεδομένων TriTrypdb (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>) και β) το παράσιτο *L. infantum* είναι το πιο συγγενές γενετικά με το παράσιτο *L. donovani* με ελάχιστες έως μηδενικές διαφορές στην αλληλουχία της πλειοψηφίας των γονιδίων του.

Στη συνέχεια, το προϊόν της PCR εισήχθη στους πλασμιδιακούς φορείς pTriex 1.1, pF4X1-4sat και pEGFP-N3 σύμφωνα με τις τεχνικές της μοριακής βιολογίας που περιγράφηκαν (βλ. παράγραφο 3.3).

4.1.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Για την κλωνοποίηση του γονιδίου *Ldriph22* με τη μέθοδο της PCR στους τρεις πλασμιδιακούς φορείς pTriex1.1, pF4X1-4sat-mRFP και pEGFP-N3

πραγματοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές αντιδράσεις ανάλογα με τα επιθυμητά άκρα του γονιδίου, δηλαδή, ανάλογα με τα ένζυμα περιορισμού που απαιτούνται για την πέψη του προϊόντος PCR προκειμένου αυτό να εισαχθεί στον επιλεγμένο πλασμιδιακό φορέα έκφρασης. Πιο συγκεκριμένα, οι εκκινητές της PCR (σχεδιάστηκαν στο εργαστήριο, σύμφωνα με πρωτόκολλα της εταιρείας New England Biolabs και παραγγέλθηκαν από την εταιρεία Lieferschein, μέσω της εταιρείας Lab Supplies) περιείχαν την αλληλουχία που αναγνωρίζει το ένζυμο περιορισμού BglII, στο 5' άκρο, και τις αλληλουχίες που αναγνωρίζουν τα ένζυμα περιορισμού XhoI, BglII και EcoRI, στο 3' άκρο, για σύνδεση με τους πλασμιδιακούς φορείς pTriex1.1, pF4X1-4sat-mRFP και pEGFP-N3, αντίστοιχα, και είναι αυτοί που περιγράφονται στον πίνακα 4.1.

Πίνακας 4.1. Εκκινητές PCR

Πλασμιδιακοί φορείς έκφρασης	Εκκινητές	Αλληλουχία	Αριθμός βάσεων	Tm
α) pTriex 1.1	Πρόσθιος 1	5' <u>GAAGATCT</u> ACCATGCCCGCCCACAAGCGTATCG3'	33	74,4
	Πρόσθιος 2	5' <u>GAAGATCT</u> CCATGCCCGCCCACAAGCGTATCG3'	32	75,4
	Ανάστροφος	5' <u>CCGCTCGAGT</u> GAGCTCGATGAGGTCG3'	26	69,4
β) pF4X1-4sat-mRFP	Πρόσθιος	5' <u>GAAGATCT</u> CCATGCCCGCCCACAAGCGTATCG3'	32	74,4
	Ανάστροφος	5' <u>GAAGATCT</u> TCCTGATCCTGAGCTCGATGAGGTCG3'	34	70,8
γ) pEGFP-N3	Πρόσθιος	5' <u>GAAGATCT</u> CCATGCCCGCCCACAAGCGTATCG3'	32	74,4
	Ανάστροφος	5' <u>GGAATTC</u> CCTGAGCTCGATGAGGTCG3'	26	65,6

Οι υπογραμμισμένες βάσεις αποτελούν τις αλληλουχίες δράσης των ενζύμων περιορισμού ενώ, εκατέρωθεν των αλληλουχιών αυτών και πριν τα κωδικόνια έναρξης και λήξης, είναι απαραίτητο να υπάρχουν κάποιες βάσεις που βοηθούν στην αναγνώρισή τους από τα περιοριστικά ένζυμα και την ποσοτική πέψη από αυτά. Θα πρέπει πάντα να ελέγχεται το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης στην περίπτωση που το γονίδιο που μας ενδιαφέρει κλωνοποιείται στο 5' ή στο 3' αλληλουχίας που κωδικοποιεί τη μοριακή ετικέτα (π.χ. 8His, GFP ή RFP) και να προστίθενται ή να

αφαιρούνται μία ή δύο βάσεις στο ολιγονουκλεοτίδιο για να διατηρείται το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης για τη χιμαιρική αλληλουχία.

Οι αλληλουχίες που κωδικοποιούν τις χιμαιρικές (ανασυνδυασμένες) πρωτεΐνες *rLdPIPh22-8His*, *rLdPIPh22-mRFP* και *rLdPIPh22-GFP* όπως προκύπτουν μετά την ενίσχυση και κλωνοποίηση σε πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης που περιέχουν αλληλουχίες για τη μοριακή ετικέτα των 8 ιστιδινών (pTriex1.1), της κόκκινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (pF4X1-4sat-mRFP) και της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (pEGFP-N3), αντίστοιχα, είναι οι εξής:

α) Στο πλασμίδιο pTriex 1.1-*Ldriph22*

Με το ζευγάρι των εκκινητών πρόσθιος 1-ανάστροφος (πίνακας 4.1)

AGATCTACC**ATG**CCCGCCCCACAAGCGTATCGTCGAAGTCGAGGGGCTGCAGAACTGCCGCGACC
TCGGCGGTTACCATACACGGGATGGCAAGCACGTCGTCAAGTACAAGCACATCTACCGCTCCGAC
AACGTTGGTGACGTCACGCCTGAGGGCAAGAAGATGCTCTTGGAGAAGCTGTGGCTCAAGTACAT
CATCGACTTTCGTGGTGCGGAGGAAAAGGCTCGCTCGCCGTACGCGTTCGCGGGTGTACGTAC
TTCCCAGATCCCGATCGAAACCTGCTTCATTACCGAGCACGTGTTGACGAAGCCGTCGCTGGACGG
GCCATCTGCAGAGGCGCTGCTTCGGCGAATCTCAACAACCTTTCTCATCGACTTCAAGGACGTCT
ACAAGAACTTCTTCGACGTTTTTCTCAGGGAAGCAAAAGGGCAGCCGGTCTTGTTCCACTGCACA
GCTGGCAAGGACCGCACCGGCGTGGCCGCGCGCTCCTCTTGACCGCTCTGGACGTGCCCGCA
GAAGCTGTGATGGAGGATTTTCATGCTGACGAACCGGTGCTGCGTGCCGCCATCGTGCGAAACGG
TGAGAGTGGGCAACTGCATCATCTCGAAGGATGCTGTCAACATACTGTTCCGCGCCCCAAGCCTTC
TTCCTGGAGCTGTGCTTTGGCGAGGTGTGCAAGAGGTATGGCTCGGTAAACGCGTACATGGAGA
AAGAGCTTGGGCTAGGTGTGGAGCAGCTAGAGAAGCTGCGCAGCTACTACGTCCGCCCCGACCTC
ATCGAGCTCA**CTCGAG****CACCACCATCACCATCACCATCACTAA**

Σύνολο 816 ζεύγη βάσεων που κωδικοποιούν την πρωτεΐνη *rLdPIPh22-8His*.

Με το ζευγάρι των εκκινητών πρόσθιος 2-ανάστροφος το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης στο φορέα pTriex1.1 μπορεί επίσης να ξεκινά από τη θέση του ενζύμου περιορισμού NcoI (εικόνα 4.2) του πλασμιδίου προσθέτοντας στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης ένα πεπτίδιο 15 αμινοξέων. Το πλασμίδιο αυτό ονομάστηκε pTriex1.1-N15-*Ldriph22-8His*, όπου το N15 αντιστοιχεί στα 15 πρόσθετα αμινοξέα που προστίθενται στο αμινοτελικό άκρο της *LdPIPh22-8His* με έκφραση από αυτή την κατασκευή. Ο σχεδιασμός αυτός, όπως θα εξηγηθεί στη συνέχεια (βλ. παράγραφο 4.2), έγινε για να παρακαμφθούν προβλήματα που αντιμετωπίστηκαν στη διαλυτότητα της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης *rLdPIPh22-8His* κατά την έκφρασή της σε βακτήρια BL21.

β) Στο πλασμίδιο pF4X1-4sat-mRFP-*Ldriph22*

AGATCTCC**ATG**CCCGCCCCACAAGCGTATCGTCGAAGTCGAGGGGCTGCAGAACTGCCGCGACCT
CGGCGGTTACCATACACGGGATGGCAAGCACGTCGTCAAGTACAAGCACATCTACCGCTCCGAC
AACGTTGGTGACGTCACGCCTGAGGGCAAGAAGATGCTCTTGGAGAAGCTGTGGCTCAAGTACAT
CATCGACTTTCGTGGTGCGGAGGAAAAGGCTCGCTCGCCGTACGCGTTCGCGGGTGTACGTAC

TTCCCGATCCCGATCGAAACCTGCTTCATTACCGAGCACGTGTTGACGAAGCCGTCGCTGGACGG
GCCATCTGCAGAGGCGCTGCTTCGGCGAATCTCAACAACCTTTCTCATCGACTTCAAGGACGTCT
ACAAGAACTTCTTCGACGTTTTCTCAGGGGAAGCAAAAGGGCAGCCGGTCTTGTTCCACTGCACA
GCTGGCAAGGACCGCACCGGCGTGGCCGCCGCGCTCCTCTTGACCGCTCTGGACGTGCCCCGA
GAAGCTGTGATGGAGGATTTTCATGCTGACGAACCGGTGCTGCGTGCCGCCATCGTGCGAAACGG
TGAGAGTGGGCAACTGCATCATCTCGAAGGATGCTGTCAACATACTGTTCCGCGCCCCAAGCCTTC
TTCCTGGAGCTGTGCTTTGGCGAGGTGTGCAAGAGGTATGGCTCGGTAAACGCGTACATGGAGA
AAGAGCTTGGGCTAGGTGTGGAGCAGCTAGAGAAGCTGCGCAGCTACTACGTCCGCCCCGACCTC
ATCGAGCTCAGGATCAGGAAGATCTATGCGCTCCTCCGAGGACGTCAAGGAGTTTCATGCGCT
TCAAGGTGCGCATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGG
GCCGCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGCGGCCCTGCCCCT
TCGCCTGGGACATCCTGTCCCCTCAGTTCAGTACGGCTCCAAGGCCTACGTGAAGCACCCCGC
CGACATCCCCGACTATTGAAGCTGTCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTATGAAGT
TCGAGGACGGCGGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCGAGTTCATCTA
CAAGGTGAAGCTGCGCGGCACCAACTTCCCCTCCGACGGCCCCGTAATGCAGAAGAAGACCATG
GGCTGGGAGGCCTCCACCGAGCGGATGTACCCCGAGGACGGCGGCCCTGAAGGGCGAGATCAAG
ATGAGGCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACGACGCCGAGGTCAAGACCACCTACATGGCCA
AGAAGCCCGTGACGCTGCCCGGCGCCTACAAGACCGACATCAAGCTGGACATCACCTCCACAA
CGAGGACTACACCATCGTGGAACAGTACGAGCGCGCCGAGGGCCGCCACTCCACCGGCGCCGA
ATTCTGAAGCTTGA**CTCGAG**

Σύνολο 1.493 ζεύγη βάσεων που κωδικοποιούν τη χιμαιρική πρωτεΐνη rLdPIPh22-mRFP.

γ) Στο πλασμίδιο pEGFP-N3-Ldriph22

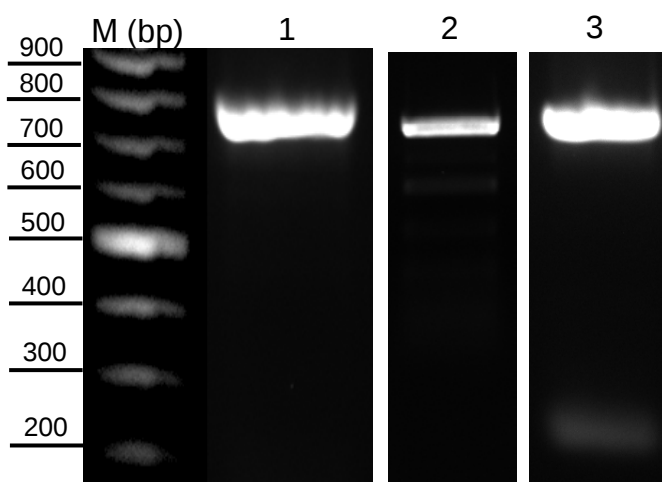
AGATCTCC**ATG**CCCCGCCACAAGCGTATCGTCAAGTCGAGGGGCTGCAGAACTGCCGCGACCT
CGGCGGTTACCATACACGGGATGGCAAGCACGTGCTCAAGTACAAGCACATCTACCGCTCCGAC
AACGTTGGTGACGTACGCCTGAGGGCAAGAAGATGCTCTTGAGAAAGCTGTGGCTCAAGTACAT
CATCGACTTTTCGTGGTGCGGAGGAAAAGGCTCGCTCGCCGTACGCGTTCGCGGGTGTCACGTAC
TTCCCGATCCCGATCGAAACCTGCTTCATTACCGAGCACGTGTTGACGAAGCCGTCGCTGGACGG
GCCATCTGCAGAGGCGCTGCTTCGGCGAATCTCAACAACCTTTCTCATCGACTTCAAGGACGTCT
ACAAGAACTTCTTCGACGTTTTCTCAGGGGAAGCAAAAGGGCAGCCGGTCTTGTTCCACTGCACA
GCTGGCAAGGACCGCACCGCGCTGGCCGCGCGCTCCTCTTGACCGCTCTGGACGTGCCCGCA
GAAGCTGTGATGGAGGATTTTCATGCTGACGAACCGGTGCTGCGTGCCGCCATCGTGCGAAACGG
TGAGAGTGGGCAACTGCATCATCTCGAAGGATGCTGTCAACATACTGTTCCGCGCCCCAAGCCTTC
TTCCTGGAGCTGTGCTTTGGCGAGGTGTGCAAGAGGTATGGCTCGGTAAACGCGTACATGGAGA
AAGAGCTTGGGCTAGGTGTGGAGCAGCTAGAGAAGCTGCGCAGCTACTACGTCCGCCCCGACCTC
ATCGAGCTCAGG**GAATTC****TGCAGTCGACGGTACCGCGGGCGGGATCCATCGCCACC**ATGGT
GAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGT
AAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGAC
CCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCTG
ACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTC
CGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAG
ACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATC
GACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAACG
TCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAAGCGCATCAAGGTGAAGTTCAGATCCGCCACAACATC
GAGGACGGCAGCGTGACGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCC
GTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGA
AGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGA
GCTGTACAAG**TAA**

Σύνολο 1.150 ζεύγη βάσεων που κωδικοποιούν την χιμαιρική πρωτεΐνη rLdPIPh22-GFP.

Με υπογράμμιση και έντονα γράμματα παρουσιάζονται οι αλληλουχίες των ενζύμων περιορισμού, με υπογράμμιση και κόκκινο χρώμα τα κωδικόνια έναρξης και λήξης και

με πλάγια γράμματα, πράσινο χρώμα και έντονα γράμματα οι συνδέτες (linkers) μεταξύ του *LdripH22* και των μοριακών ετικετών.

Οι αντιδράσεις της PCR πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του ενζύμου KAPA2G Robust και αντιδραστήρια PCR της εταιρείας KAPA BIOSYSTEMS (βλ. παράγραφο 3.3.1). Στην παράγραφο 3.3.1, παρουσιάζεται το πρωτόκολλο της PCR που χρησιμοποιήθηκε. Οι δοκιμαστικές αντιδράσεις είχαν συνολικό όγκο 25 μ L, ενώ για τις κλωνοποιήσεις που απαιτείται ποσότητα της τάξεως των 500 μ g DNA, το προϊόν PCR που χρησιμοποιήθηκε προήλθε από 3-4 αντιδράσεις των 100 μ L. Οι τελικές συγκεντρώσεις των εκκινητών, dNTP και $MgCl_2$ (αν είναι απαραίτητη επιπλέον ποσότητα) καθώς και η ποσότητα εκμαγείου DNA που χρησιμοποιήθηκε αναγράφονται στον πίνακα 1 στην παράγραφο 3.3.1. Στην εικόνα 4.1 παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της αντίδρασης PCR για το ένθεμα, που χρησιμοποιήθηκε στους τρεις διαφορετικούς φορείς έκφρασης.



Εικόνα 4.1. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% των προϊόντων των αντιδράσεων της PCR, με ανάστροφο εκκινητή κατάλληλο για το φορέα **1)** pTriex1.1, **2)** pF4X1-4sat-mRFP, **3)** pEGFP-N3. **M)** μάρτυρας μοριακών μεγεθών

Το μέγεθος των προϊόντων της PCR συμφωνεί με τα αναμενόμενα μεγέθη για τα 3 προϊόντα: 1) 782 bp, 2) 791 bp, 3) 784 bp. Λόγω του ότι και οι τρεις αντιδράσεις PCR έδωσαν μόνο ένα κύριο προϊόν κρίθηκε ότι δεν ήταν απαραίτητη η δημιουργία παρασκευαστικής πηκτής αγαρόζης και καθαρισμός του προϊόντος DNA της PCR από αυτή, αλλά πραγματοποιήθηκε απευθείας καθαρισμός των προϊόντων από το διάλυμα της PCR με τα προπαρασκευασμένα αντιδραστήρια Nucleospin extract II kit, Macherey-Nagel (βλ. παράγραφο 3.3.5).

4.1.2 Ενσωμάτωση του γονιδίου *Ldriph22* στους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης

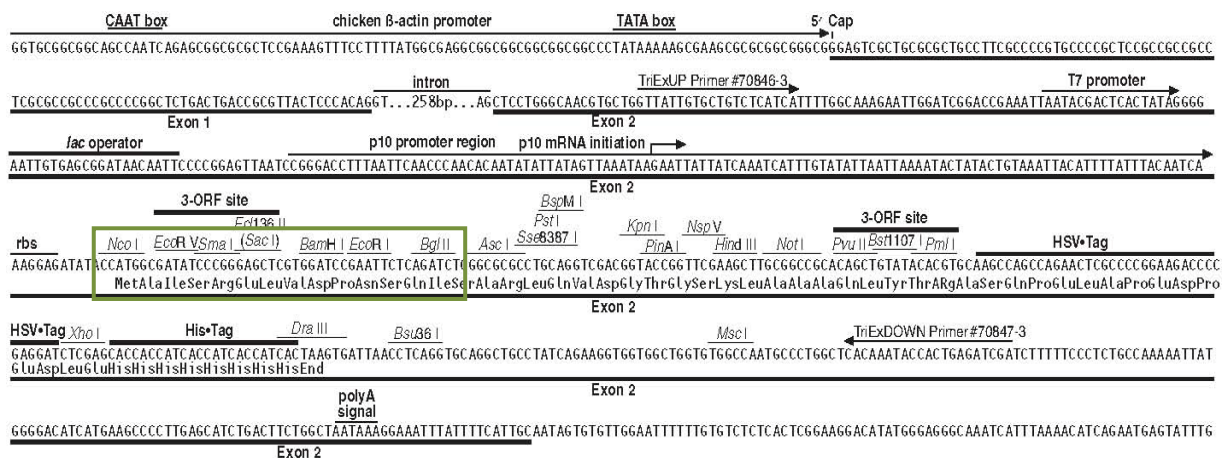
Για την εισαγωγή του γονιδίου *Ldriph22* στους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης πραγματοποιήθηκε, αρχικά, διπλή πέψη του φορέα για 16 ώρες στους 37° C με τα κατάλληλα για την κάθε κλωνοποίηση περιοριστικά ένζυμα και, στη συνέχεια, έγινε αποφωσφορυλίωση του 5' άκρου του γραμμικού πλασμιδίου με το ένζυμο της αλκαλικής φωσφατάσης (βλ. παραγράφους 3.3.6 και 3.3.7). Τα προϊόντα της PCR επωάστηκαν με τα ίδια περιοριστικά ένζυμα, όπως οι αντίστοιχοι πλασμιδιακοί φορείς, για 16 ώρες στους 37° C, για πέψη των θέσεων περιορισμού στο 5' και 3' άκρο τους. Ο φορέας και το ένθεμα καθαρίστηκαν μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης (βλ. παράγραφο 3.3.4). Το κάθε ένθεμα ενσωματώθηκε στον αντίστοιχο φορέα λόγω συμπληρωματικότητας των θέσεων πέψης των περιοριστικών ενζύμων ενώ, με τη βοήθεια της λιγάσης που έχει προστεθεί στο διάλυμα της αντίδρασης, σχηματίζονται ομοιοπολικοί φωσφοδιεστερικοί δεσμοί δημιουργώντας κυκλικά πλασμίδια (βλ. παράγραφο 3.3.8). Η αντίδραση της σύνδεσης έγινε για 16 ώρες στους 16° C σε τελικό όγκο 10 μ L και με αναλογία φορέα-ενθέματος 1:5 ή 1:3 (εικόνες 4.3, 4.6 και 4.8).

A) pTriex-*Ldriph22*-8His

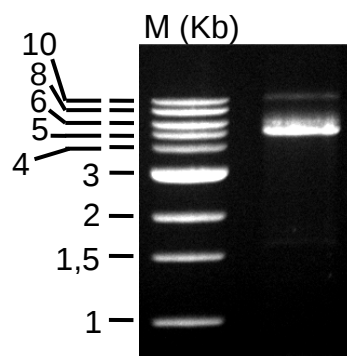
Ο pTriex1.1 (εικόνα 4.4) είναι πλασμιδιακός φορέας με ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη, κατάλληλος για παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά κυτταρικά συστήματα. Περιέχει την αλληλουχία που κωδικοποιεί την μοριακή ετικέτα των οκτώ ιστιδινών και την αλληλουχία του υποκινητή της πολυμεράσης T7. Όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 3.5.1, χρησιμοποιήθηκε για παραγωγή σε μεγάλη κλίμακα της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης r*LdPIPh22*-8His σε στέλεχος BL21 κυττάρων *E. coli* που εκφράζουν την πολυμεράση T7. Η ανασυνδυασμένη βακτηριακή πρωτεΐνη r*LdPIPh22*-8His χρησιμοποιήθηκε σε αυτή τη μελέτη ως αντιγόνο για την παραγωγή πολυκλωνικών αντισωμάτων και για τη δομική και λειτουργική της μελέτη ως φωσφατάσης (βλ. παράγραφο 3.6). Ακόμη, το πλασμίδιο pTriex1.1-*Ldriph22*-8His χρησιμοποιήθηκε στην επιμόλυνση ανώτερων ευκαρυωτικών κυττάρων (HeLa και NIH3T3, βλ. παράγραφο 3.14) για μελέτη του εντοπισμού της πρωτεΐνης στα κύτταρα αυτά με συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού. Η παρουσία της αλληλουχίας του υποκινητή της β-ακτίνης από κοτόπουλο (chicken b-

actin promoter) επιτρέπει την έκφραση πρωτεϊνών από αυτό το πλασμίδιο σε ανώτερα ευκαρυωτικά κύτταρα.

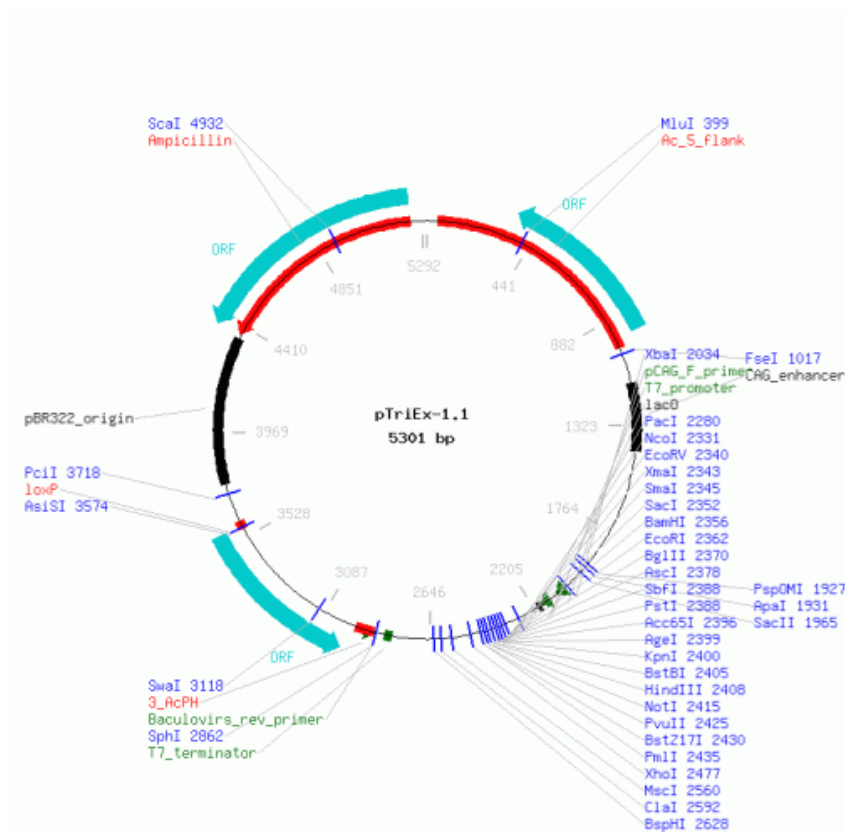
Για τη δημιουργία των πλασμιδίων pTriex1.1-*Ldriph22-8His* και pTriex1.1-N15-*Ldriph22-8His*, τα δύο διαφορετικά ενθέματα που προέκυψαν από τις αντιδράσεις PCR με τα δύο διαφορετικά ζεύγη εκκινητών (βλ. πίνακα 4.1) εισήχθησαν ανάμεσα στις θέσεις περιορισμού BglII και XhoI του πλασμιδίου pTriex1.1 (εικόνες 4.2, 4.3).



Εικόνα 4.2. Οι θέσεις περιορισμού για κλωνοποίηση γονιδίων στον πλασμιδιακό φορέα pTriex1.1 καθώς και ρυθμιστικά στοιχεία για έκφραση των εισαχθέντων γονιδίων σε προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά συστήματα. Παρουσιάζεται επίσης η αλληλουχία που κωδικοποιεί τη μοριακή ετικέτα των 8 ιστιδινών (His-Tag). Σε πλαίσιο είναι η αλληλουχία που κωδικοποιεί το πρόσθετο 15-πεπτιδίδιο



Εικόνα 4.3. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1% w/v των προϊόντων της αντίδρασης σύνδεσης (ligation). **M)** μάρτυρας μοριακών μεγεθών (Kb)



Εικόνα 4.4. Χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pTriex1.1

Η αναμενόμενη αλληλουχία της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης rLdPIPh22-8His είναι η:

MPAHKRIVEVEGLQNCRDLGGYHTRDGKHHVVKYKHIYRSDNVGDVTPEGKKMLLEKLWLKYIIDFRGA
EEKARSPYAFAGVTYFPIPIETCFITEHVLTKPSLDGPSEALLRRISTTFLIDFKDVYKNFFDVFLREAKG
QPVLHFCTAGKDRTGVAAALLLTALDVPAAEAVMEDFMLTNRCCVPPSCETVRVGNCCIISKDAVNILFRA
QAFFLELCFGEVCKRYGSVNAYMEKELGLGVEQLEKLSYYVRPTSSSSLEHHHHHHHHH

με 268 αμινοξέα, θεωρητικό μοριακό βάρος 30421,09 και ισοηλεκτρικό σημείο 8,04.

Η αναμενόμενη αλληλουχία της πρωτεΐνης rN15-LdPIPh22-8His είναι η:

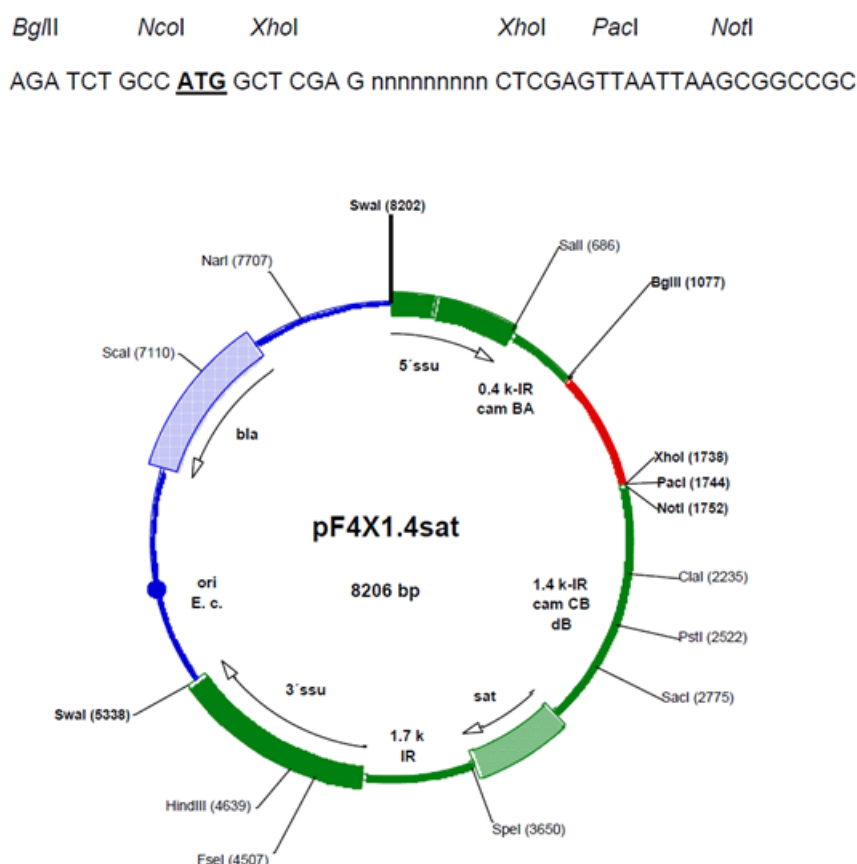
MAISRELVDPNSQISMPAHKRIVEVEGLQNCRDLGGYHTRDGKHHVVKYKHIYRSDNVGDVTPEGKKM
LLEKLWLKYIIDFRGAEEKARSPYAFAGVTYFPIPIETCFITEHVLTKPSLDGPSEALLRRISTTFLIDFK
DVYKNFFDVFLREAKGQPVLHFCTAGKDRTGVAAALLLTALDVPAAEAVMEDFMLTNRCCVPPSCETV
RVGNCCIISKDAVNILFRAQAFFLELCFGEVCKRYGSVNAYMEKELGLGVEQLEKLSYYVRPTSSSSLE
HHHHHHHHH

με 283 αμινοξέα, θεωρητικό μοριακό βάρος 32062,95 και ισοηλεκτρικό σημείο 7,22.

Τα 15 αμινοξέα στο αμινοτελικό άκρο αυξάνουν το αναμενόμενο μοριακό βάρος κατά 1641,86 Da και αλλάζουν το ισοηλεκτρικό σημείο. Το πεπτίδιο αυτό έχει 3 φορτισμένα αμινοξέα και 5 πολικά.

B) pF4X1-4sat-Ldpirh22-mRFP

Ο pF4X1-4sat (εικόνα 4.5) αποτελεί ένα φορέα έκφρασης ειδικό για τα πρωτόζωα της οικογένειας *Trypanosomatidae*, στην οποία ανήκει και το γένος *Leishmania*. Περιέχει γονίδιο που προσδίδει στα κύτταρα *E. coli* που φέρουν αυτό το πλασμίδιο ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη και, όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 3.11, φέρει επίσης αλληλουχία του ενζύμου που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό Nourseothricin στα κύτταρα *Leishmania* που φέρουν αυτό το πλασμίδιο. Ο συγκεκριμένος φορέας που χρησιμοποιήθηκε είχε τροποποιηθεί στο εργαστήριο [86] έτσι, ώστε να περιέχει το γονίδιο της μονομερούς κόκκινης φθορίζουσας πρωτεΐνης, mRFP [87], ανάμεσα στις θέσεις περιορισμού BglII και XhoI. Το γονίδιο *Ldpirh22* εισήχθη στη θέση περιορισμού BglII πριν το 5' άκρο του γονιδίου της mRFP έτσι, ώστε το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου *Ldpirh22* να συνεχίζει στο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης της mRFP με αποτέλεσμα να κωδικοποιείται η υβριδική πρωτεΐνη rLdPIPh22-mRFP.



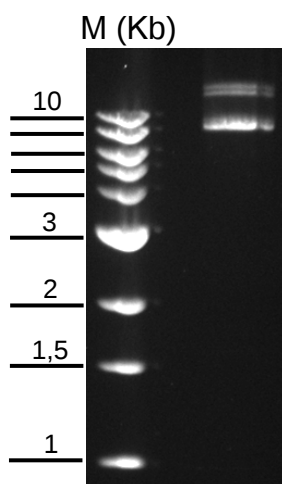
Εικόνα 4.5. Πλασμιδιακός φορέας pF4X1-4sat-mRFP και θέσεις κλωνοποίησης. Η αλληλουχία του γονιδίου *Ldpirh22* εισήχθη στη θέση BglII

Η αναμενόμενη αλληλουχία της πρωτεΐνης rLdPIPh22-mRFP είναι η:

MPAHKRIVEVEGLQNCRD LGGYHTRD GKHVVYK KHIYRSD NVGDVTPE GKKMLLEKLWLKYIIDFRGA
EEKARSPYAFAGVTYFPIPIETCFITEHVLTKPSLDGPSAEALLRRISTTFLIDFKDVYKNFFDVFLREAKG
QPVLFHCTAGKDRTGVAAALLLTALDVP AEAVMEDFMLTNRCCVPPSCETVRVGNCIISKDAVNILFRA
QAFFLELCFGEVCKRYGSVNAYMEKELGLGVEQLEKLSYYVRPTSSSSGSGRS **MASSEDVIKEFMR**
FKVRMEGSVNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPFAWDILSPQFQYGSKAYVKHPADIP
DYKLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPDGPVMQKKTMGWEAS
TERMPEDGALKGEIKMRLKLKDGGHYDAEVKTTYMAKKPVQLPGAYKTDIKLDITSHNEDYTIVEQYE
RAEGRHSTGAEFEA

με 492 αμινοξέα, θεωρητικό μοριακό βάρος 55408,31 και ισοηλεκτρικό σημείο 6,32.

Το πλασμίδιο pF4X1-4sat-Ldriph22-mRFP χρησιμοποιήθηκε στην επιμόλυνση παρασίτων *L. donovani* και *L. tarentolae*, μέσω ηλεκτροδιάτρησης (παράγραφο 3.11), για δημιουργία παρασίτων που θα υπερεκφράζουν το υπό μελέτη ένζυμο για παρατήρηση με μικροσκοπία φθορισμού του εντοπισμού της rLdPIPh22-mRFP (βλ. παράγραφο 3.17) και περαιτέρω λειτουργικές μελέτες του.

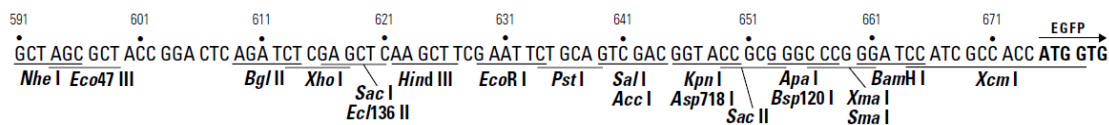


Εικόνα 4.6. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1% των προϊόντων της αντίδρασης σύνδεσης (ligation). **M)** μάρτυρας μοριακών μεγεθών (Kb)

Γ) pEGFP-N3-Ldriph22

Ο pEGFP-N3 (εικόνες 4.7, 4.9) είναι πλασμιδιακός φορέας για έκφραση πρωτεϊνών σε ανώτερα ευκαρυωτικά κύτταρα και φέρει το γονίδιο της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (GFP, [88, 89]). Χρησιμοποιείται για την έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με την GFP, σε ομόλογα ή ετερόλογα κυτταρικά συστήματα, για τον κυτταρικό τους εντοπισμό με μικροσκοπία φθορισμού ή για τη σήμανση κυττάρων με

φθορισμό για μελέτη πλήθους κυτταρικών λειτουργιών. Το πλασμίδιο έχει ανθεκτικότητα στην καναμυκίνη και ρυθμιστικές αλληλουχίες για αντιγραφή σε κύτταρα *E. coli*. Στη μελέτη μας χρησιμοποιήθηκε για την έκφραση της πρωτεΐνης rLdPIPh22-GFP σε κύτταρα θηλαστικών προκειμένου να μελετηθεί ο εντοπισμός της. Στο πλασμίδιο pEGFP-N3-Ldriph22, η αλληλουχία του γονιδίου της GFP βρίσκεται μετά το 3' άκρο του γονιδίου *Ldriph22* μετά από μία αλληλουχία 39 βάσεων (που κωδικοποιεί συνδέτη 13 αμινοξέων), η οποία επιτρέπει στις δύο πρωτεΐνες που θα προκύψουν από την μετάφραση του γονιδίου να λάβουν την τριτοταγή τους δομή στο χώρο χωρίς να παρεμποδίζει η μία την αναδίπλωση της άλλης.

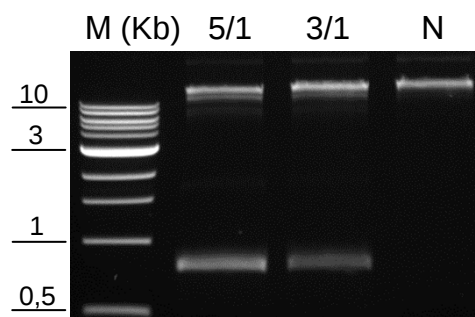


Εικόνα 4.7. Θέσεις κλωνοποίησης στον πλασμιδιακό φορέα pEGFP-N3

Το γονίδιο *Ldriph22* εισήχθη ανάμεσα στις θέσεις περιορισμού BglII και EcoRI. Η αναμενόμενη αλληλουχία της πρωτεΐνης rLdPIPh22-GFP είναι η:

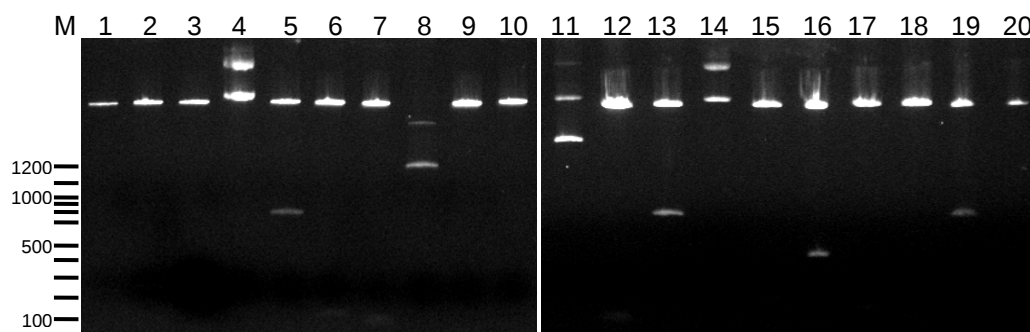
MPAHKRIVEVEGLQNCRD LGGYHTRD GKHVVKYKHIYRSDNVGDVTPEGKKMLLEKLWLKYIIDFRGA
EEKARSPYAFAGVTYFPIIETCFITEHVLT KPSLDGPSAEALLRRISTTFLIDFKDVYKNFFDVLREAKG
QPVLHFCTAGKDRTGVAAALLLTALDVPAEAVMEDFMLTNRCCVPPSCETVRVGNCIISKDAVNILFRA
QAFFLELCFGEVCKRYGSVNAYMEKELGLGVEQLEKLRSYYVRPTSSSSGNSAVDGTAGPGSIATMV
SKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLT LKFICTTGKLPVPWPTLVTTLT YGVQC
FSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGN YKTRAEV KFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILG
HKLEYNYN SHNVYIMADKQKNGIKVNF KIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSAL
SKDPNEKRDH MVLLFVTAAGITLGMDELYK

με 513 αμινοξέα, θεωρητικό μοριακό βάρος 57361,56 και ισοηλεκτρικό σημείο 6,14.

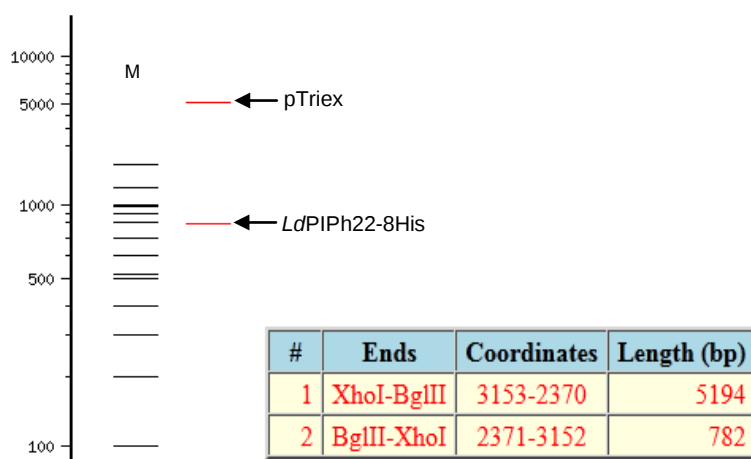


Εικόνα 4.8. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1% των προϊόντων της αντίδρασης σύνδεσης (ligation). **Μ)** μάρτυρας μοριακών μεγεθών (Kb), **Ν)** αρνητικός μάρτυρας (ο φορέας χωρίς ένθεμα), **5/1** και **3/1** οι αναλογίες ενθέματος/φορέα

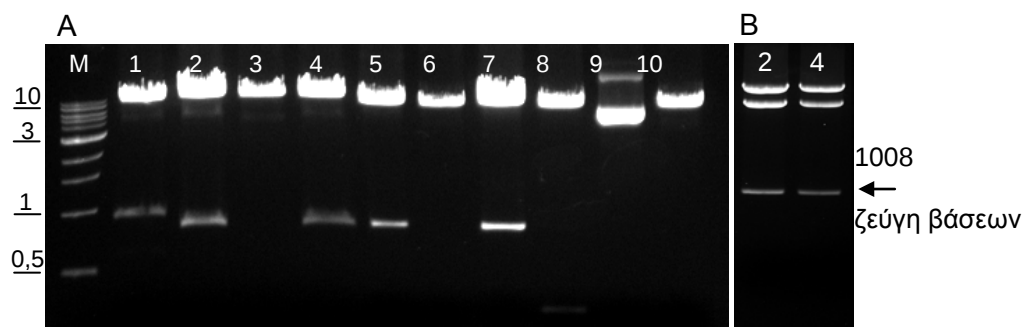
Τα αναμενόμενα μεγέθη (αριθμός ζευγών βάσεων) του φορέα και του ενθέματος μετά την πέψη των πλασμιδίων pTriex1.1-Ldriph22-8His, pF4X1-4sat-Ldriph22-mRFP και pEGFP-N3-Ldriph22 με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες προβλέπονται από τον υπολογιστικό αλγόριθμο NEBcutter2 (εικόνες 4.11, 4.13, 4.15), σύμφωνα με τη θεωρητική αλληλουχία του κάθε πλασμιδίου.



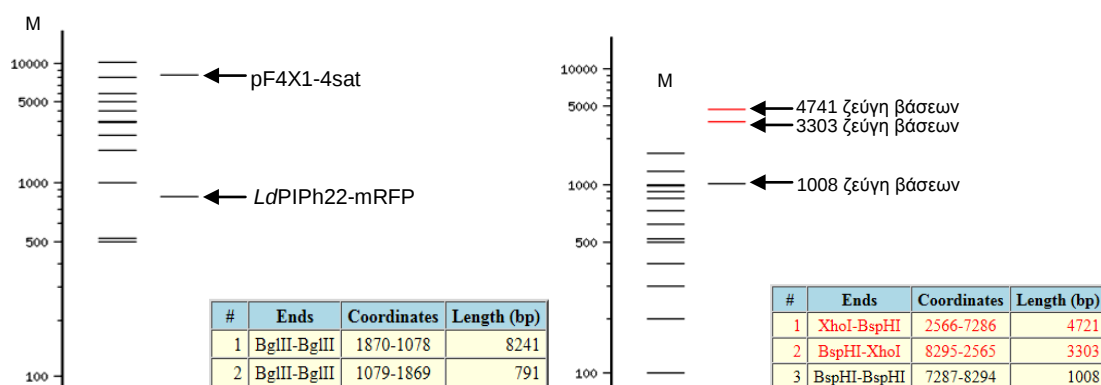
Εικόνα 4.10. Ηλεκτροφόρηση της αντίδρασης διπλής πέψης με τα ένζυμα BglII/XhoI σε πηκτή αгарόζης 1%. **M)** μοριακός μάρτυρας (bp), **1-20)** πλασμίδια pTriex1.1-Ldriph22-8His από τις 20 αποικίες μετά από την πέψη. Για αλληλούχιση επιλέχθηκαν οι κλώνοι 5 και 13 από τους συνολικά τρεις θετικούς κλώνους με ένθεμα 782 ζευγών βάσεων



Εικόνα 4.11. Αναμενόμενη εμφάνιση των ζωνών του πλασμιδίου pTriex1.1-Ldriph22-8His μετά τη διπλή πέψη, όπως αναφέρεται στην προηγούμενη εικόνα, σε πηκτή αгарόζης 1% w/v, σύμφωνα με τον υπολογιστικό αλγόριθμο της εταιρείας New England Biolabs (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>), **M)** μοριακός μάρτυρας (Kb)

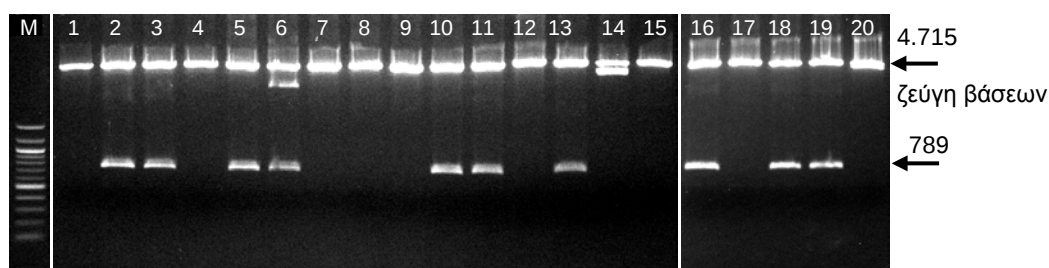


Εικόνα 4.12. Α. Ηλεκτροφόρηση της αντίδρασης πέψης του πλασμιδίου *pF4X1-4sat-Ldriph22-mRFP* με το ένζυμο *Bgl*III σε πηκτική αгарόζης 1%. **Μ)** μοριακός μάρτυρας (Kb), **1-10)** πλασμιδιακό DNA *pF4X1-4sat-Ldriph22-mRFP* από 10 αποικίες μετά από πέψη. Για αλληλούχηση επιλέχθηκαν οι κλώνοι 2 και 4 από τους συνολικά τέσσερις θετικούς κλώνους (2, 4, 5, 7) με ένθεμα 791 ζευγών βάσεων που αφορά στο ένθεμα του γονιδίου *Ldriph22*, **Β.** Αντίδραση διπλής πέψης με τα ένζυμα *Xho*I/*Bsp*HI σε πηκτική αгарόζης 1% w/v, **2, 4)** οι θετικοί κλώνοι *pF4X1-4sat-Ldriph22* 2 και 4 που επιλέχθηκαν για αλληλούχηση μετά από πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα *Bsp*HI και *Xho*I

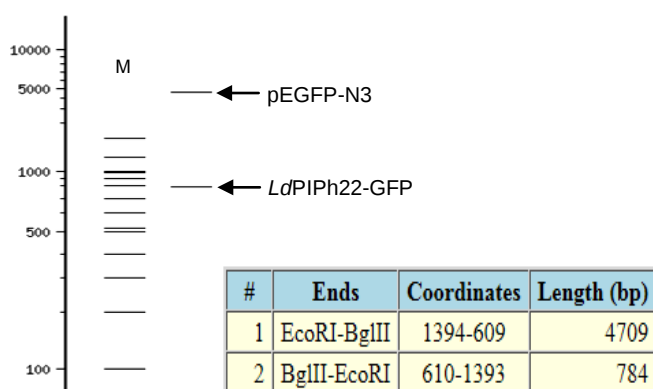


Εικόνα 4.13. Αναμενόμενη εμφάνιση των ζωνών του πλασμιδίου *pF4X1-4sat-Ldriph22-mRFP* μετά την πέψη, όπως αναφέρεται στην εικόνα 4.12, σύμφωνα με τον υπολογιστικό αλγόριθμο της εταιρείας New England Biolabs (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>). **Μ)** μοριακός μάρτυρας (Kb) και (bp)

Η πέψη του πλασμιδίου *pF4X1-4sat-Ldriph22-mRFP* με τα ένζυμα περιορισμού *Bsp*HI και *Xho*I έγινε για να επιβεβαιωθεί το μέγεθος του πλασμιδίου, κάτι που δεν ελέγχεται με την αλληλούχηση, αφού μόνο το ένθεμα αλληλουχείται. Με τον τρόπο αυτό ελέγχονται πιθανές απώλειες ή προσθήκες τμήματος του πλασμιδίου από γενετικούς ανασυνδυασμούς που μπορεί να λάβουν χώρα κατά την αντιγραφή του πλασμιδίου στα κύτταρα *E. coli*. Ακόμη, με την πέψη επιβεβαιώνεται η τοποθέτηση του ενθέματος με τη σωστή φορά. Σε περίπτωση λάθους στην κλωνοποίηση ή στη σύνδεση (ligation) αλλάζει το ύψος της εμφάνισης των αναμενόμενων ζωνών του DNA στην ηλεκτροφόρηση μετά από την πέψη με τα ένζυμα περιορισμού.



Εικόνα 4.14. Ηλεκτροφόρηση της αντίδρασης διπλής πέψης με τα ένζυμα BglIII/EcoRI σε πηκτή αγαρόζης 1%. **M)** μοριακός μάρτυρας (bp), **1-20)** πλασμιδιακό DNA pEGFP-N3-*Ldriph22* από 20 αποικίες μετά την πέψη. Για αλληλούχηση επιλέχθηκαν οι κλώνοι 16 και 19 από τους συνολικά οκτώ θετικούς κλώνους με ένθεμα 789 ζευγών βάσεων

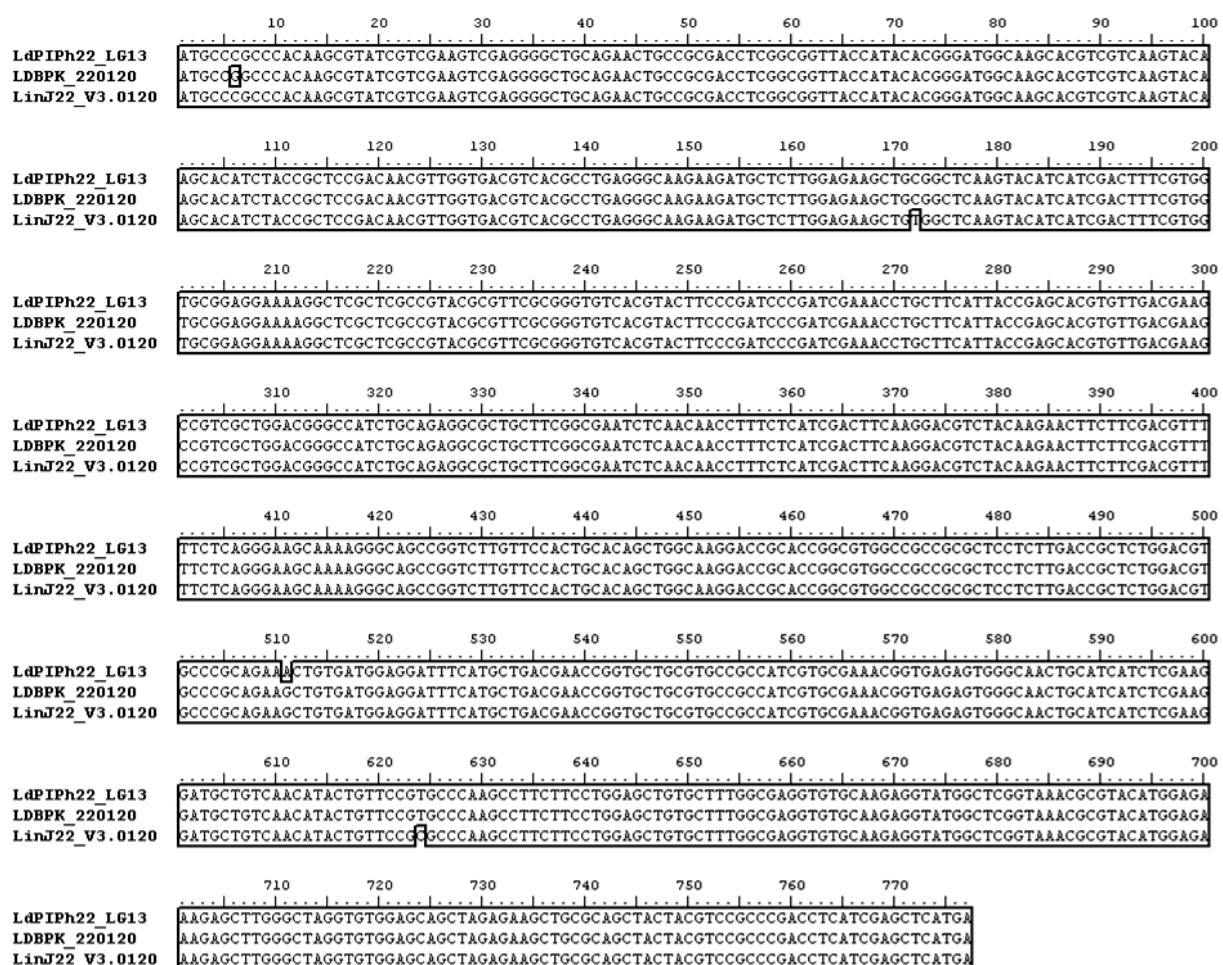


Εικόνα 4.15. Αναμενόμενη εμφάνιση των ζωνών του πλασμιδίου pEGFP-N3-*Ldriph22* μετά τη διπλή πέψη, όπως αναφέρεται στην προηγούμενη εικόνα, σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v, σύμφωνα με τον υπολογιστικό αλγόριθμο της εταιρείας New England Biolabs (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>), **M)** μοριακός μάρτυρας (Kb)

4.1.4 Ταυτοποίηση της αλληλουχίας θετικών κλώνων και βιοπληροφορική ανάλυση της αλληλουχίας του *Ldriph22*

Η ταυτοποίηση της αλληλουχίας του ενθέματος *Ldriph22* (από το στέλεχος LG13, *Leishmania donovani*) στο πλασμιδιακό DNA που απομονώθηκε από δύο θετικούς κλώνους έγινε για κάθε διαφορετικό πλασμίδιο σύμφωνα με πρωτόκολλα της εταιρείας VBC Biotech (<http://www.vbc-biotech.at/>). Το πλασμίδιο απομονώθηκε από καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας (midi prep, βλ. παράγραφο 3.3.12). Η ταυτοποίηση της αλληλουχίας του ενθέματος έγινε με σκοπό να εντοπιστούν πιθανές μεταλλάξεις που θα μπορούσαν να έχουν προκληθεί κατά την αντιγραφή του DNA στις αντιδράσεις PCR ή από πιθανές μεταλλάξεις κατά την αντιγραφή του πλασμιδίου στα βακτήρια.

Παρόλο που η πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε (KAPA2G Robust, KAPA BIOSYSTEMS) έχει δράση εξωνουκλεάσης, είναι απαραίτητη η επιβεβαίωση της αλληλουχίας του ενθέματος ως μέρους του υποχρεωτικού πρωτοκόλλου ελέγχου των θετικών κλώνων. Η αλληλούχιση έγινε με τους εκκινητές (πρόσθιος και ανάστροφος, βλ. παράγραφο 4.1.1, πίνακας 4.1) που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του ενθέματος στην αντίδραση PCR. Οι αλληλουχίες που προέκυψαν ελέγχθηκαν για ομολογία με την αλληλουχία του γονιδίου *Linriph22* (όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 3.4).



Εικόνα 4.16. Σύγκριση των αλληλουχιών των ομόλογων με το γονίδιο *Ldriph22* στο στέλεχος BPK282A1 (*L. donovani*) και στο είδος *L. infantum*, με το πρόγραμμα ClustalW2 μετά την αλληλούχιση του γονιδίου *Ldriph22* του στελέχους LG13 (*L. donovani*)

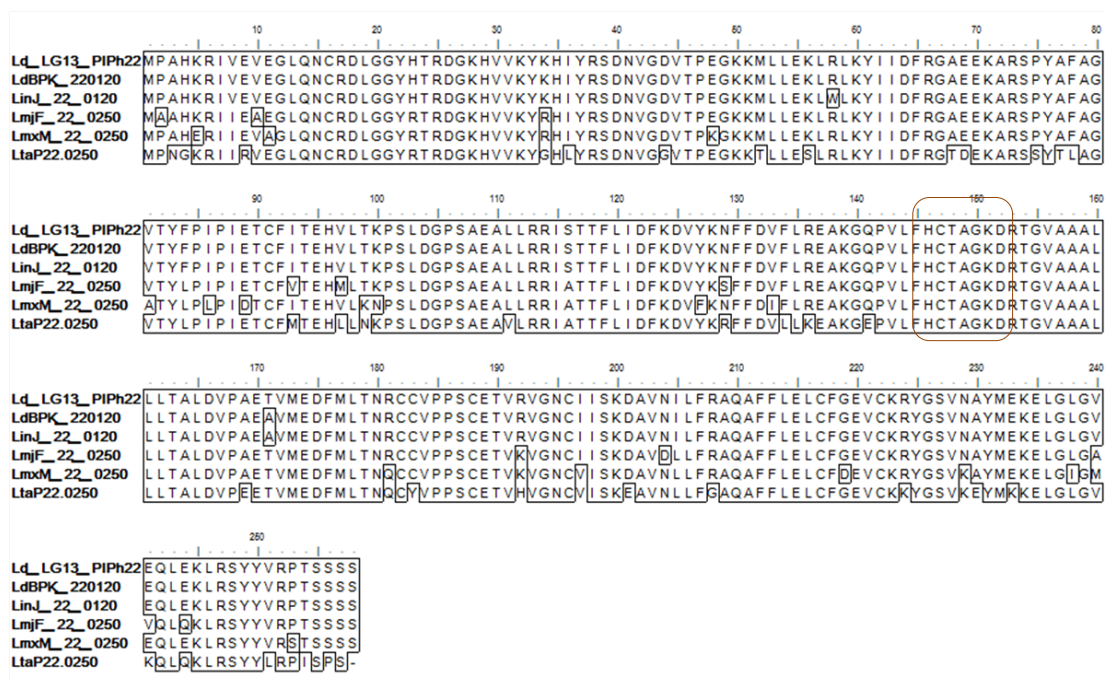
Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης είναι κοινά για όλους τους κλώνους που ελέγχθηκαν. Όπως παρατηρείται και στο αποτέλεσμα της σύγκρισης αλληλουχιών με το πρόγραμμα ClustalW2 (εικόνα 4.16), σε προϊόντα από τρεις διαφορετικές αντιδράσεις PCR ανιχνεύτηκαν τρεις σημειακές μεταλλάξεις, σε σχέση με την

αλληλουχία της *LinPIPh22*, με αλλαγή των βάσεων που οδηγούν σε δύο διαφορετικά κατάλοιπα αμινοξέων (W58/R58 και A171/T171), με τη δεύτερη αλλαγή κοντά στην περιοχή του καταλυτικού κέντρου, ενώ σε σχέση με το στέλεχος LDBPK_220120 (διαφορετική ονομασία καταγραφής στη βάση δεδομένων) (Gene ID: 13389327) του παρασίτου *Leishmania donovani* (BPK282A1) υπάρχει διαφορά στο κατάλοιπο 171.

Η αμινοξική αλληλουχία *LdPIPh22* που κωδικοποιείται από το γονίδιο που κλωνοποιήσαμε είναι η:

MPAHKRIVEVEGLQNCRD LGGYHTRDGKHHVVKYKHIYRSDNVGDVTP EGKKMLLEKLRLKYIIDFRGA
EEKARSPYAFAGVTYFPIETCFITEHVLTKPSLDGPSAEALLRRI STTFLIDFKDVYKNFFDVLREAKG
QPVLFHCTAGKDR TGVAALLLTALDVP AETVMEDFMLTNRCCVPPSCETVRVGNCCI SKDAVNILFRA
QAFFLELCFGEVCKRYGGSVNAYMEKELGLGVEQLEKLSYVVRPTSSSS

Η πρωτεΐνη προβλέπεται να έχει 258 αμινοξέα, θεωρητικό μοριακό βάρος 29081,69 Da και ισοηλεκτρικό σημείο 8,30 (http://web.expasy.org/compute_pi/). Η αλληλουχία του γονιδίου που κωδικοποιεί την *LdPIPh22* είναι υψηλά συντηρημένη στα διάφορα είδη του παρασίτου *Leishmania*.



Εικόνα 4.17. Σύγκριση των αλληλουχιών των ορθόλογων με την *LdPIPh22* πρωτεϊνών, στα είδη *L. donovani*, *L. infantum*, *L. major* Friedlin, *L. mexicana*, *L. tarentolae* Parrot-TarII. Σε πλαίσιο παρουσιάζεται η αλληλουχία του βρόγχου P. Οι περιγεγραμμένες περιοχές υποδεικνύουν τις αμινοξικές διαφορές

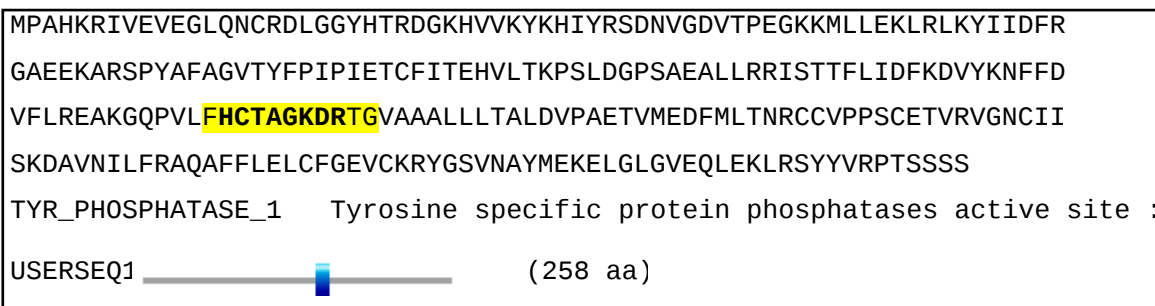
Στην εικόνα 4.17 παρατίθεται σύγκριση της πρωτοταγούς δομής της πρωτεΐνης *Ld*PIPh22 με τις ορθόλογες αλληλουχίες από τα παράσιτα *L. donovani* (στέλεχος LDBPK_220120), *L. infantum* (*LinJ*_22_0120), *L. major* (στέλεχος *Friedlin*, *LmjF*_22_0250), *L. mexicana* (στέλεχος MHOM, *LmxM*_22_0250) και *L. tarentolae* (στέλεχος *Parrot-TarII*, *LtaP*22.0250) που έγινε με το πρόγραμμα ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). Η ανάλυση αυτή έδειξε ότι υπάρχει >99% ομοιότητα των ορθόλογων αλληλουχιών στα στελέχη LDBPK_220120 και *LinJ*_22_0120, ενώ υπάρχει >95% ομοιότητα της ορθόλογης αλληλουχίας στην *L. major* με διαφορά σε 11 αμινοξέα, >93% ομοιότητα της ορθόλογης αλληλουχίας στην *L. mexicana* με διαφορά σε 18 αμινοξέα και >85% ομοιότητα της ορθόλογης αλληλουχίας στην *L. tarentolae* με διαφορά σε 38 αμινοξέα. Ανάλυση Blast δεν ανέδειξε ομόλογη πρωτεΐνη της *Ld*PIPh22 στα συγγενή είδη του παρασίτου *Trypanosoma* που ανήκουν στην οικογένεια των κινητοπλαστιδών. Αυτό το αποτέλεσμα επιβεβαιώνεται και από την βιβλιογραφία [51].



Εικόνα 4.18. Σύγκριση αλληλουχιών των ομόλογων με την *Ld*PIPh22 πρωτεϊνών, από τα παθογόνα βακτήρια *M. tuberculosis* (*MtpB*), *L. monocytogenes* (*lmo1935* και *lmo1800*), *Y. pestis* και *B. anthracis*. Σε πλαίσιο παρουσιάζεται η αλληλουχία του βρόγχου P. Οι περιγεγραμμένες περιοχές περικλείουν συντηρημένα αμινοξέα

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει, όπως προαναφέρθηκε, η υψηλή ομοιότητα της LdPIPh22 με τις αλληλουχίες πρωτεϊνών από παθογόνα βακτήρια (εικόνα 4.18), όπως το *Mycobacterium tuberculosis* (MptpB, CCC62750.1, 15,1% ομοιότητα), το *Listeria monocytogenes* (στέλεχος lmo1800, NP_465325, 29% ομοιότητα και στέλεχος lmo1935, NP_465459, 24% ομοιότητα), το *Yersinia pestis* (KIM10+, NP_667783.1, 19% ομοιότητα) και το *Bacillus anthracis* (στέλεχος Ames, NP_845680, 25,2% ομοιότητα) (βλ. Εισαγωγή, παράγραφο 1.4).

Περαιτέρω ανάλυση της πρωτοταγούς δομής της πρωτεΐνης LdPIPh22 με το πρόγραμμα Scan Prosite (<http://prosite.expasy.org/scanprosite/>) για πρόβλεψη πιθανών λειτουργιών της πρωτεΐνης με βάση την αλληλουχία των αμινοξέων έδειξε ότι η πρωτεΐνη LdPIPh22 προβλέπεται να έχει δράση φωσφατάσης τυροσίνης με ενεργό κέντρο το FHCTAGKDRTG, στο οποίο όπως φαίνεται στην εικόνα 4.19 περιλαμβάνεται η αλληλουχία του βρόγχου P. Στην αποφωσφορυλίωση προβλέπεται να συμμετέχει ένα κατάλοιπο κυστεΐνης (147) που βρίσκεται στο καταλυτικό κέντρο.

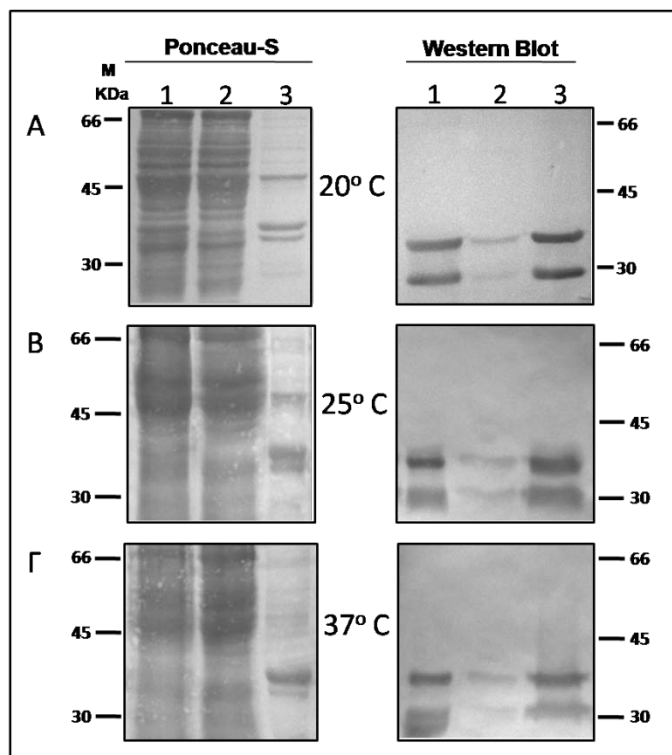


Εικόνα 4.19. Πρόβλεψη δραστικότητας φωσφατάσης από το ηλεκτρονικό πρόγραμμα Scan Prosite. Με κίτρινο έχει τονιστεί η περιοχή του ενεργού κέντρου και με έντονα γράμματα η περιοχή του βρόγχου P

4.2 Έκφραση, έλεγχος της διαλυτότητας και απομόνωση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης rLdPIPh22-8His από κύτταρα *E. coli*

Η πρωτεΐνη rLdPIPh22-8His εκφράστηκε αρχικά σε κύτταρα *E. coli*, στελέχους BL21 (βλ. παράγραφο 3.5.1). Η έκφραση δοκιμάστηκε σε συνθήκες επαγωγής με την προσθήκη του μορίου-επαγωγέα IPTG (βλ. παράγραφο 3.5.2), αλλά και χωρίς επαγωγή. Προσπαθήσαμε να βελτιστοποιήσουμε τις συνθήκες έκφρασης για να αυξήσουμε το ποσοστό της πρωτεΐνης στο διαλυτό κλάσμα του βακτηριακού ομογενοποιημένου αλλά ακόμα και μετά από έκφραση στους 20° C τα αποτελέσματα δεν ήταν ενθαρρυντικά (εικόνα 4.20). Επιπλέον, παρατηρήσαμε ότι ανιχνεύονται 2

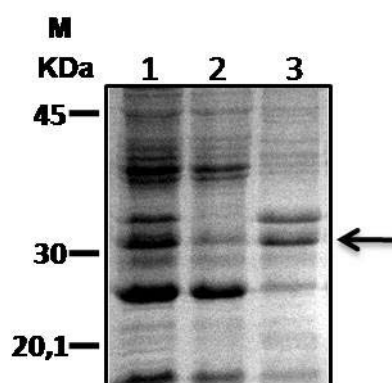
ζώνες από το αντίσωμα. Πιθανές ερμηνείες γι' αυτό είναι ότι η πρωτεΐνη υπόκειται σε κάποια μεταμεταφραστική τροποποίηση στα βακτήρια ή ότι ανιχνεύεται μη ειδικά κάποια άλλη βακτηριακή πρωτεΐνη.



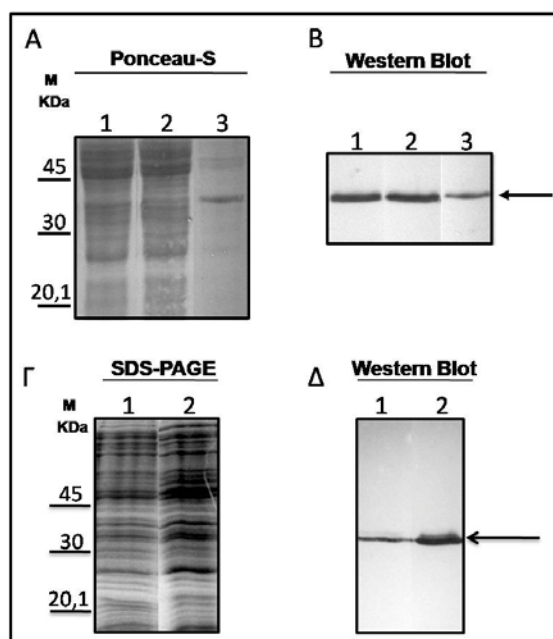
Εικόνα 4.20. Προσδιορισμός του ποσοστού του διαλυτού κλάσματος της *rLdPIPh22-8His* σε βακτηριακό ομογενοποίημα *E. coli* BL21 μετά από επώαση 16 ωρών με επαγωγή (IPTG 0,1 mM), με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 10% (**A**) και 12% (**B,Γ**), ανοσοαποτύπωση Western και εμφάνιση με χρωμομετρική μέθοδο ανάπτυξης με αντιδραστήριο DAB: **1**) ολικό ομογενοποίημα βακτηρίων, **2**) υπερκείμενο μετά από φυγοκέντρηση του ολικού ομογενοποιήματος, **3**) ίζημα μετά τη φυγοκέντρηση. Η ανίχνευση της πρωτεΐνης *rLdPIPh22-8His* έγινε με επώαση με αντι-*LdPIPh22* ορό ποντικού σε αραιώση 1:1200. Ίσος όγκος δείγματος έχει φορτωθεί σε κάθε πηγάδι της πηκτής πολυακρυλαμιδίου. **M**) Μοριακοί μάρτυρες (kDa)

Παράλληλα, πειράματα με έκφραση της πρωτεΐνης *rN15-LdPIPh22-8His* από το πλασμίδιο *pTriex1.1-N15-Ldpirh22-8His* είχαν πιο θετικά αποτελέσματα στη διαλυτότητά της. Στις εικόνες 4.21 έως 4.26 παρουσιάζονται αποτελέσματα των πειραμάτων βελτιστοποίησης των συνθηκών έκφρασης της πρωτεΐνης *rN15-LdPIPh22-8His* όσον αφορά στη διάρκεια της επαγωγής και στη θερμοκρασία επώασης των βακτηρίων. Ακολούθησε έλεγχος της διαλυτότητας της πρωτεΐνης, δηλαδή προσδιορίστηκε το ποσοστό της πρωτεΐνης που βρίσκεται στο διαλυτό κλάσμα του βακτηριακού ομογενοποιήματος μετά τη λύση των κυττάρων και το ποσοστό που παραμένει στο ίζημα μετά από φυγοκέντρηση του βακτηριακού

ομογενοποιήματος (14000×g, σωματίδια εγκλεισμού (inclusion bodies)). Για να πραγματοποιηθεί ο έλεγχος, αρχικά έγινε αναδιασπορά των κυττάρων σε διάλυμα λύσης, ακολούθησε διαδοχική ψύξη/απόψυξη του κυτταρικού εναιωρήματος σε υγρό άζωτο/υδρολούτρο (37° C) και τέλος έγινε υπερήχηση, όπως αναφέρεται στις παραγράφους 3.5.1 και 3.5.2. Περισσότερο από το 75% της ποσότητας της πρωτεΐνης rN15-LdPIPh22-8His ανιχνεύθηκε στο αδιάλυτο κλάσμα, όταν η επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης rN15-LdPIPh22-8His έγινε με επώαση των βακτηρίων στους 37° C για τρεις ώρες, παρουσία 0,5 mM IPTG (εικόνα 4.21). Η μεγαλύτερη ποσότητα της πρωτεΐνης, με το αναμενόμενο μοριακό βάρος της rN15-LdPIPh22-8His (~32 KDa), ανακτάται στο ίζημα του πρωτεϊνικού ομογενοποιήματος (εικόνα 4.21, διαδρομή 3, βέλος). Η διαλυτότητα της πρωτεΐνης βελτιώθηκε σημαντικά όταν τα βακτήρια επωάστηκαν στους 25° C για 16 ώρες, χωρίς επαγωγή (περισσότερο από 75% στο διαλυτό κλάσμα, εικόνα 4.22). Με τις συνθήκες όμως αυτές, τα επίπεδα της παραχθείσας ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης ήταν χαμηλά. Για να αυξηθεί η απόδοση στην παραγωγή της rN15-LdPIPh22-8His προστέθηκε, μετά τις 16 ώρες επώασης της καλλιέργειας στους 25° C, IPTG (0,5 mM) και συνεχίστηκε η επώαση στους 25° C για 4 ώρες. Στις συνθήκες αυτές, τα επίπεδα έκφρασης της διαλυτής πρωτεΐνης βελτιώθηκαν σε σχέση με την έκφραση στους 37° C (εικόνες 4.23 και 4.24). Η πρωτεΐνη rN15-LdPIPh22-8His σε όλες τις εικόνες ανιχνεύεται στα ~32 KDa, όπως αναμένεται από το θεωρητικό της βάρος (32,1 KDa).

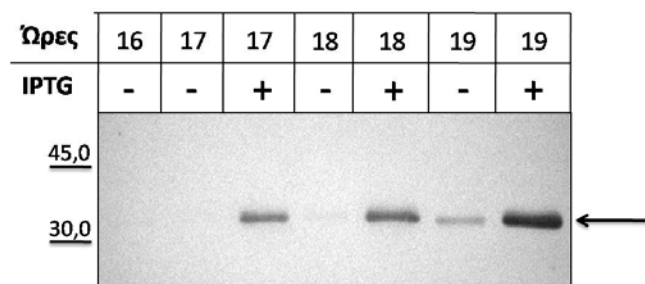


Εικόνα 4.21. Προσδιορισμός του ποσοστού του διαλυτού κλάσματος της rN15-LdPIPh22-8His σε βακτηριακό ομογενοποίημα *E. coli* BL21 μετά από επώαση 3 ωρών στους 37° C με επαγωγή. Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου 12% και χρώση με Coomassie Blue. **M)** Μοριακοί μάρτυρες (KDa), **1)** ολικό ομογενοποίημα βακτηρίων, **2)** υπερκείμενο μετά από φυγοκέντρηση του ολικού ομογενοποιήματος, **3)** ίζημα μετά τη φυγοκέντρηση (14000×g, 30 λεπτά). Ίσος όγκος δείγματος έχει φορτωθεί σε κάθε πηγάδι της πηκτής πολυακρυλαμίδιου

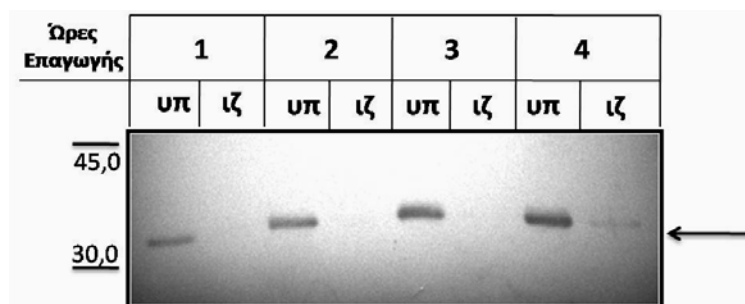


Εικόνα 4.22. Προσδιορισμός του ποσοστού του διαλυτού κλάσματος της rN15-LdPIPh22-8His σε βακτηριακό ομογενοποίημα *E. coli* BL21 μετά από επώαση 16 ωρών στους 25° C χωρίς επαγωγή και προσθήκη του επαγωγέα (IPTG 0,5 mM) (**A, B**) και έλεγχος της διαλυτότητας της rN15-LdPIPh22-8His με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE ολικού ομογενοποιημάτος βακτηρίων που επώαστηκαν για 4 ώρες στους 25° C, με IPTG (**Γ, Δ**). Ανοσοαποτύπωση Western από πηκτή πολυακρυλαμιδίου 12%. Η ανίχνευση της πρωτεΐνης rN15-LdPIPh22-8His έγινε με επώαση με το μονοκλωνικό αντίσωμα αντι-His (1,0 µg/mL). **A.** Η μεμβράνη με χρώση Ponceau-S, **B.** Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης μετά από εμφάνιση με χρωμομετρική μέθοδο ανάπτυξης με αντιδραστήριο DAB. **1)** Ολικό ομογενοποίημα βακτηρίων, **2)** υπερκείμενο μετά από φυγοκέντρηση του ολικού ομογενοποιημάτος, **3)** ίζημα μετά τη φυγοκέντρηση, **Γ, Δ.** **1)** πριν την επαγωγή, **2)** μετά από 4 ώρες επαγωγής. Ίσος όγκος δείγματος έχει φορτωθεί σε κάθε πηγάδι της πηκτής πολυακρυλαμιδίου. **M)** Μοριακοί μάρτυρες (kDa). Το βέλος υποδεικνύει την ζώνη που αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη rN15-LdPIPh22-8His

Στις επόμενες εικόνες παρατηρείται η αύξηση της ποσότητας της πρωτεΐνης ανάλογα με το χρόνο επαγωγής της έκφρασης, μετά την προσθήκη IPTG.



Εικόνα 4.23. Έλεγχος των παραγόντων θερμοκρασίας και επαγωγής στα επίπεδα έκφρασης της rN15-LdPIPh22-8His. Ανοσοαποτύπωση Western ολικού ομογενοποιημάτος βακτηρίων BL21-pTriex-LdPIPh22. Η επώαση των βακτηριακών καλλιιεργειών έγινε στους 25° C απουσία (-) ή παρουσία (+) 0,5 mM IPTG από τις 16 ώρες και μετά για τους χρόνους που αναφέρονται. Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών του βακτηριακού ομογενοποιημάτος έγινε σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 12%. Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επώαστηκε με αντίσωμα έναντι της ετικέτας των 8 ιστιδινών (1,0 µg/mL) και η εμφάνιση του ανοσοαποτυπώματος έγινε με χρωμομετρική μέθοδο ανάπτυξης με αντιδραστήριο DAB. Το βέλος υποδεικνύει την ζώνη που αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη rN15-LdPIPh22-8His



Εικόνα 4.24. Έλεγχος της επίδρασης του χρόνου επαγωγής στη διαλυτότητα της rN15-LdPIPh22-8His σε βακτηριακά ομογενοποιήματα. Ανοσοαποτύπωση Western υπερκειμένου και ιζήματος του ολικού ομογενοποιήματος των βακτηρίων BL21-pTriex-N15-Ldriph22-8His μετά από επώαση στους 25° C για 16 ώρες και προσθήκη IPTG (0,5 mM) για τις ώρες που υποδεικνύονται. Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών έγινε σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου 12%. Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επώαστηκε με αντι-His αντίσωμα (1,0 µg/mL) και η εμφάνιση του ανοσοαποτυπώματος έγινε με χρωμομετρική μέθοδο ανάπτυξης με αντιδραστήριο DAB, **υπ**: υπερκείμενο, **ιζ**: ίζημα. Το βέλος υποδεικνύει την ζώνη που αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη rN15-LdPIPh22-8His

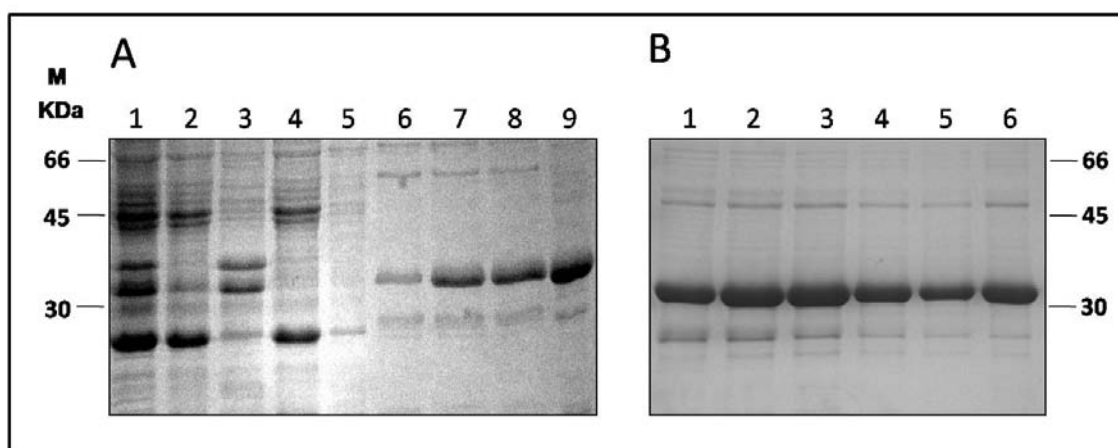
Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, αποφασίσαμε να απομονώσουμε, από το διαλυτό βακτηριακό ομογενοποιήμα και να μελετήσουμε *in vitro* την αντίδραση φωσφατάσης της υποθετικής φωσφατάσης LdPIPh22, την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη rN15-LdPIPh22-8His, ελπίζοντας ότι η προσθήκη των 15 αμινοξέων στο αμινοτελικό της άκρο δεν θα επηρέαζε σημαντικά την ενζυμική δραστηριότητα του μορίου.

Η απομόνωση της πρωτεΐνης rN15-LdPIPh22-8His έγινε από το διαλυτό κλάσμα του ομογενοποιήματος 2 λίτρων βακτηριακής καλλιέργειας του κλώνου 5 (εικόνα 4.10, διαδρομή 5) που επώαστηκε για 16 ώρες στους 25° C και στη συνέχεια για 3 ώρες στους 25° C, παρουσία 0,5 mM IPTG. Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία υψηλής συγγένειας με εκλεκτική πρόσδεση της μοριακής ετικέτας των 8 ιστιδινών σε χρωματογραφικό υλικό με ιόντα Ni²⁺ προσδεδεμένα σε NTA (βλ. παράγραφο 3.5.3 και εικόνα 3.1). Η έκλυση της πρωτεΐνης από το χρωματογραφικό υλικό έγινε με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος που περιέχει ιμιδαζόλιο σε διάφορες συγκεντρώσεις (εικόνα 4.25).

Πιο συγκεκριμένα, το διαλυτό κλάσμα των βακτηριακών ομογενοποιημάτων, μετά τη λύση των κυττάρων, επωάζεται με τα σφαιρίδια αγαρόζης έτσι, ώστε να δημιουργηθεί το σύμπλοκο της εικόνας 3.1 (κεφάλαιο μεθόδων και υλικών). Μετά την επώαση, τα σφαιρίδια εκπλένονται με ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει μικρή ποσότητα ιμιδαζολίου (40 mM) και στη συνέχεια γίνεται έκλυση της πρωτεΐνης με ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει μεγαλύτερη ποσότητα ιμιδαζολίου (250-500 mM). Στα πειράματά μας δοκιμάστηκε έκλυση με αυξανόμενη συγκέντρωση ιμιδαζολίου στο

ρυθμιστικό διάλυμα (250, 350 και 500 mM). Παρατηρήθηκε ότι για την ποσοτική έκλουση της πρωτεΐνης από τα σφαιρίδια, χρειάζεται να γίνουν αρκετές επαναλήψεις του σταδίου αυτού και αρκεί συγκέντρωση ιμιδαζολίου 250 mM. Ακόμα και μετά από 5 διαδοχικές εκλούσεις σημαντική ποσότητα της rN15-LdPIPh22-8His εξακολουθεί να παραμένει προσδεσμένη στα σφαιρίδια αгарόζης. Τελευταίο στάδιο της διαδικασίας καθαρισμού της πρωτεΐνης αποτελεί η αλλαγή του διαλύματος έκλουσης, ώστε να μην περιέχει ιμιδαζόλιο, με ρυθμιστικό διάλυμα κατάλληλο για τη δοκιμασία της φωσφατάσης, με τη μέθοδο της διαπίδυσης και στη συνέχεια συμπύκνωση του πρωτεϊνικού διαλύματος σε μηχανήμα φυγοκεντρικής εξάτμισης υπό κενό (βλ. παράγραφο 3.5.3).

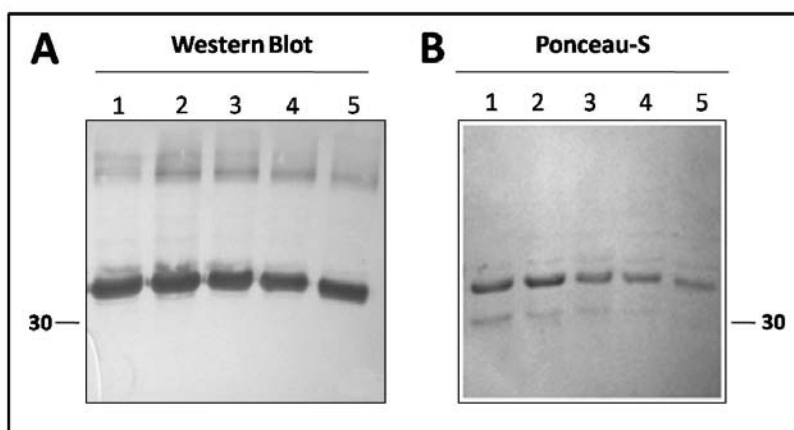
Στις εικόνες 4.25 και 4.26 παρουσιάζονται όλα τα στάδια της έκφρασης, της απομόνωσης και του καθαρισμού της πρωτεΐνης rN15-LdPIPh22-8His.



Εικόνα 4.25. Καθαρισμός της πρωτεΐνης rN15-LdPIPh22-8His από βακτηριακά εκχυλίσματα κυττάρων BL21-pTriex-N15-LdPIPh22 μετά από επώαση στους 25° C για 16 ώρες και προσθήκη IPTG (0,5 mM) για 4 ώρες. Ανάλυση με SDS-PAGE (12%, χρώση με Coomassie Blue) δειγμάτων που ελήφθησαν στα στάδια έκφρασης της πρωτεΐνης, λύσης των βακτηριακών κυττάρων, απομόνωσης και έκλουσης της πρωτεΐνης από τα σφαιρίδια Ni-NTA, **M**) μοριακός μάρτυρας μεγεθών. **A. 1)** ολικό ομογενοποίημα, **2)** διαλυτό μέρος βακτηριακού ομογενοποιήματος μετά από την υπερήχηση, **3)** αδιάλυτο μέρος (κυτταρικά θραύσματα και σωματίδια εγκλεισμού) του βακτηριακού ομογενοποιήματος, **4)** υπερκείμενο μετά την επώαση με τα σφαιρίδια, υλικό που δεν προσδέθηκε, **5)** διάλυμα της πρώτης έκπλυσης, **6, 7, 8)** εκλούσεις με 250 mM ιμιδαζολίου, **9)** σφαιρίδια με την πρωτεΐνη που έχει απομείνει προσδεσμένη, **B.** Εκλούσεις (1-5) με 250 mM ιμιδαζολίου, **6)** σφαιρίδια με την πρωτεΐνη που έχει απομείνει προσδεσμένη

Όπως φαίνεται στην εικόνα 4.25 (A και B), στα κλάσματα της εκλουσμένης από τα σφαιρίδια Ni²⁺-πρωτεΐνης, η ζώνη της πρωτεΐνης στα ~32 KDa δεν είναι η μοναδική που αναγνώριζεται από το αντίσωμα έναντι της ετικέτας των 8 ιστιδινών, αλλά

αναγνωρίζονται και μικρότερου μοριακού βάρους πρωτεΐνες (πιθανόν πρωτεολυτικά κλάσματα) και μεγαλύτερου μοριακού βάρους πρωτεΐνες. Αυτή η εικόνα βελτιώθηκε σημαντικά όταν η διαδικασία της απομόνωσης και του καθαρισμού της rN15-*LdPIPh22-8His* (βλ. παράγραφο 3.5) πραγματοποιήθηκε στη διάρκεια μίας ημέρας και δε χρειάστηκε να αποθηκευτεί κάποιο ενδιάμεσο στάδιο (εικόνα 4.26).



Εικόνα 4.26. A. Ανοσοαποτύπωση Western εκλουσμάτων (1-4) και των σφαιριδίων (5) από την διαδικασία καθαρισμού της πρωτεΐνης (συνθήκες όμοιες με της εικόνας 4.26). Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επώαστηκε με αντι-His αντίσωμα (1,0 $\mu\text{g/mL}$) και η εμφάνιση του ανοσοαποτυπώματος έγινε με χρωμομετρική μέθοδο ανάπτυξης με αντιδραστήριο DAB, **B.** η μεμβράνη με χρώση Ponceau-S

Ακόμη, στα πρώτα πειράματα απομόνωσης της πρωτεΐνης, η συμπύκνωση του πρωτεϊνικού διαλύματος και η απομάκρυνση του ρυθμιστικού διαλύματος που περιείχε ιμιδαζόλιο έγινε με φίλτρα που συγκρατούν μόρια με μοριακό βάρος άνω των 10000 Da. Όμως, με αυτή τη μέθοδο η απόδοση της απομόνωσης της πρωτεΐνης (μg) και η δραστηότητά της στις δοκιμασίες αποφωσφορυλίωσης που αναφέρεται στην παράγραφο 4.3 ήταν σε χαμηλά επίπεδα. Έτσι, δοκιμάστηκε η μέθοδος της μοριακής διαπίδωσης για την αλλαγή του διαλύματος της πρωτεΐνης, ώστε να είναι κατάλληλο για τη δοκιμασία φωσφατάσης, και ακολούθησε συμπύκνωση του διαλύματος σε μηχανήμα φυγοκεντρικής εξάτμισης υπό κενό (βλ. παράγραφο 3.5.3).

Ο υπολογισμός της ποσότητας της πρωτεΐνης που απομονώθηκε σε κάθε πείραμα έγινε είτε με τη μέθοδο Bradford (βλ. παράγραφο 3.9), είτε με μέτρηση της απορρόφησης του δείγματος στα 280 nm σε φασματοφωτόμετρο Nanodrop ND 2000/2000c. Στον πίνακα 4.2 συσχετίζεται ο αριθμός των βακτηρίων με τη συνολική πρωτεΐνη που απομονώθηκε σε κάθε πείραμα.

Πίνακας 4.2. Συνολική ποσότητα πρωτεΐνης που απομονώθηκε στα πειράματα έκφρασης της πρωτεΐνης rN15-LdPIPh22-8His σε βακτήρια, σε καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας (2 L). Ο αριθμός των κυττάρων υπολογίστηκε, με βάση την αντιστοίχιση που ορίζεται από το φασματοφωτόμετρο, OD₆₀₀=1 αντιστοιχεί σε 5×10^8 κύτταρα. Μέσος όρος από **1)** 2 διαφορετικά πειράματα, **2)** 5 διαφορετικά πειράματα, **3)** ένα πείραμα

Κύτταρα ($\times 10^{10}$)	Συνολική ποσότητα πρωτεΐνης (μg)	Επαγωγή	μg πρωτεΐνης / 10^{10} κύτταρα
1) 150 ($\pm 0,08$)	1.330 (± 370)	IPTG 0,5 mM για 3 ώρες, 37° C	$8,87 \times 10^{-10}$
2) 24,6 ($\pm 0,17$)	986 (± 493)	Χωρίς επαγωγή για 20 ώρες στους 25° C	$40,01 \times 10^{-10}$
3) 25,4	1.000	25° C για 16 ώρες χωρίς επαγωγή και 4 ώρες παρουσία 0,5 mM IPTG	$39,4 \times 10^{-10}$

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον πίνακα 4.2, ο αριθμός των κυττάρων είναι 6 φορές μεγαλύτερος όταν η επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης γίνεται στους 37° C. Όταν, όμως, η έκφραση της πρωτεΐνης πραγματοποιείται στους 25° C με ή χωρίς προσθήκη IPTG, παρά τον μικρότερο αριθμό των κυττάρων, η πρωτεΐνη που απομονώνεται είναι κατά ~40 φορές περισσότερη από εκείνη που απομονώνεται με έκφραση στους 37° C. Στην περίπτωση 3 δεν υπάρχει η στατιστική αξιολόγηση που έγινε στις περιπτώσεις 1 και 2, επειδή πραγματοποιήθηκε μόνο ένα πείραμα.

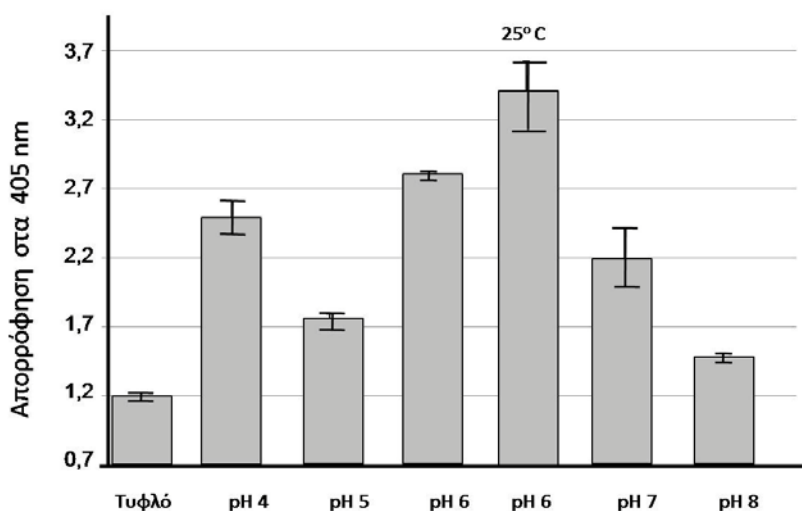
Στο σημείο αυτό αποφασίσαμε να προχωρήσουμε στον προσδιορισμό της δράσης φωσφατάσης της LdPIPh22 με χρήση της καθαρισμένης ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης rN15-LdPIPh22-8His και να προσπαθήσουμε σε μεταγενέστερη φάση της πειραματικής δουλειάς την παραγωγή της rLdPIPh22-8His στο πρωτεϊνικό σύστημα έκφρασης *Leishmania tarentolae* (βλ. παράγραφο 3.10.1), που είναι συγγενής ευκαρυωτικός οργανισμός με το πρωτόζωο *Leishmania donovani* και χρησιμοποιείται ως εναλλακτικό σύστημα έκφρασης ευκαρυωτικών πρωτεϊνών.

4.3 Προσδιορισμός της δράσης της rN15-LdPIPh22-8His ως φωσφατάσης

Η πρωτεΐνη LdPIPh22 σύμφωνα με την πρωτοταγή δομή της προβλέπεται να έχει δράση φωσφατάσης (βλ. παράγραφο 4.1.4) τυροσίνης. Εξάλλου, η ομόλογη

πρωτεΐνη *LmjF_22_0250*, από το παράσιτο *Leishmania major*, εκφρασμένη σε βακτήρια έχει δράση φωσφατάσης [81]. Θελήσαμε να διερευνήσουμε αν η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη rN15-LdPIPh22-His που απομονώθηκε και καθαρίστηκε από καλλιέργεια βακτηρίων BL21-pTrieX1.1-rN15-Ldriph22 έχει δράση φωσφατάσης. Αρχικά χρησιμοποιήσαμε *in vitro* δοκιμασίες με το συνθετικό υπόστρωμα p-νιτροφαινυλοφωσφορικό ανιόν (pNPP, βλ. παράγραφο 3.6).

Η πρωτεΐνη rN15-LdPIPh22-8His βρέθηκε να έχει δράση φωσφατάσης με το συγκεκριμένο υπόστρωμα με βέλτιστη τιμή σε pH 6 που είναι το pH στο οποίο βρίσκονται τα παράσιτα στον ασπώνδυλο ξενιστή. Ο προσδιορισμός έγινε αρχικά στους 37° C και στη συνέχεια στους 25° C (σχήμα 4.1).



Σχήμα 4.1. Έλεγχος της rN15-LdPIPh22-8His για δράση φωσφατάσης σε τιμές pH 4-8. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στους 37° C. Στο pH 6 η αντίδραση πραγματοποιήθηκε και στους 25° C. Η απορρόφηση που παρουσιάζεται για κάθε τιμή pH είναι μέση τιμή από 2 μετρήσεις. Οι τιμές του σφάλματος έχουν προκύψει από 4 διαφορετικά πειράματα που έγιναν με πρωτεΐνη που απομονώθηκε από 3 διαφορετικές παρτίδες

Παρατηρήθηκε ότι η rN15-LdPIPh22-8His υδρολύει το p-νιτροφαινυλοφωσφορικό ανιόν με υψηλότερη δραστηριότητα σε pH 6 και στους 25° C [θερμοκρασία του ασπώνδουλου ξενιστή του παρασίτου (σκνίπα)]. Στα πειράματα που ακολούθησαν επελέγη ο έλεγχος της δραστηριότητας στους 37° C, επειδή αυτή είναι η θερμοκρασία στο σπονδυλωτό ξενιστή (ζώα, άνθρωπο) του παρασίτου *Leishmania* και επειδή μας ενδιαφέρει μελλοντικά να μελετήσουμε τη δράση του ενζύμου στη φάση ζωής του παρασίτου μέσα στο μακροφάγο του θηλαστικού ξενιστή.

Η δραστικότητα του ενζύμου rN15-LdPIPh22-8His υπολογίστηκε αρχικά ως προς την απορρόφηση και στη συνέχεια ως προς την ποσότητα (nmol) του παραγόμενου προϊόντος (σύμφωνα με την καμπύλη αναφοράς, σχήμα 3.2, παράγραφος 3.6). Για τον υπολογισμό της δραστικότητας χρησιμοποιήθηκαν οι εξής τύποι:

$$\text{δραστικότητα} = \frac{(\text{απορρόφηση δείγματος} - \text{απορρόφηση τυφλού}) \times 3}{18,3 \times \text{χρόνος αντίδρασης (λεπτά)} \times \text{mg ενζύμου}} \times 10^3$$

για την πρώτη περίπτωση (το 3 δηλώνει το συνολικό όγκο της αντίδρασης σε mL και το 18,3 είναι ο συντελεστής γραμμομοριακής απορρόφησης της p-νιτροφαινόλης) και

$$\text{δραστικότητα} = \frac{\text{nmol παραγόμενου προϊόντος (p-νιτροφαινόλη)}}{\text{χρόνος αντίδρασης (λεπτά)} \times \text{mg ενζύμου}} \times 10^6$$

στη δεύτερη περίπτωση.

Πίνακας 4.3. Τιμές δραστικότητας του ενζύμου rN15-LdPIPh22-8His σε δοκιμασίες δράσης φωσφατάσης, σε θερμοκρασία 37° C και pH 6, από 4 διαφορετικά πειράματα απομόνωσης και καθαρισμού του ενζύμου rN15-LdPIPh22-8His

Δραστικότητα ενζύμου (U/mg ενζύμου)	6,53 × 10 ⁻² (±0,97) (n=4)
Δραστικότητα ενζύμου (ως προς την καμπύλη αναφοράς, nmol pNP/min/mg ενζύμου)	74,8 (±1,01) (n=4)

Οι τιμές που προέκυψαν είναι συγκρίσιμες με αυτές της βιβλιογραφίας και συγκεκριμένα της μελέτης που αναφέρεται στο κεφάλαιο 2 (σκοπός της εργασίας, [81]). Η τιμή της δραστικότητας που παρουσιάζεται στη δημοσίευση αυτή και αφορά στην ομόλογη πρωτεΐνη από το παράσιτο *L. major* είναι 45,47 ± 1,52 nmol pNP/min/mg ενζύμου και είναι συγκρίσιμη με την τιμή 74,8 nmol pNP/min/mg ενζύμου που υπολογίζεται στην εργασία μας.

4.4 Παραγωγή ειδικού πολυκλωνικού αντισώματος anti-rN15LdPIPh22 από κουνέλι και ποντίκια

Η ταυτοποίηση της ύπαρξης του γονιδίου που κωδικοποιεί την LdPIPh22 στα παράσιτα *L. donovani* (στέλεχος LG13) δεν αποδεικνύει την έκφραση της πρωτεΐνης στα παράσιτα. Η έκφρασή της, επίσης, μπορεί να υπόκειται σε αυστηρή ρύθμιση ανάλογα με τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου ή του κύκλου ζωής του παρασίτου. Για

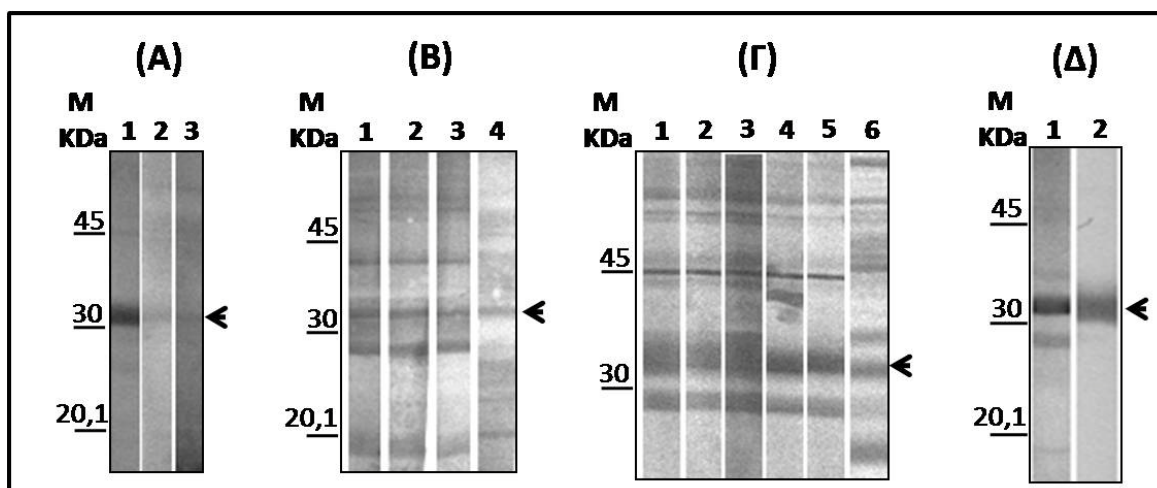
να γίνει ανίχνευση της ενδογενούς πρωτεΐνης *LdPIPh22* σε εκχυλίσματα *L. donovani* με την τεχνική του ανοσοαποτυπώματος Western και ο υποκυτταρικός εντοπισμός της με ανοσοφθορισμό χρειάζονται ειδικά αντισώματα που να αναγνωρίζουν την πρωτεΐνη.

Για την κατασκευή των πολυκλωνικών αντισωμάτων, η πρωτεΐνη *rN15-LdPIPh22-8His* (αντιγόνο) απομονώθηκε από πηκτή πολυακρυλαμιδίου 12% w/v ύστερα από χρώση με Coomassie Brilliant-Blue, σύμφωνα με την μέθοδο που περιγράφεται στην παράγραφο 3.18.1. Για την 1^η ανοσοποίηση κουνελιού ηλικίας τριών μηνών χρησιμοποιήθηκαν 500 μg καθαρής πρωτεΐνης, για τη 2^η 150 μg, για την 3^η 100 μg και από 50 μg για τις επόμενες ανοσοποιήσεις. Η σταδιακή μείωση του ποσού του αντιγόνου που ενίεται έγινε για την σταδιακή επιλογή Β λεμφοκυττάρων που παράγουν αντισώματα με υψηλή χημική συγγένεια με το αντιγόνο. Για τις ανοσοποιήσεις ποντικού (BALB/c) ηλικίας τεσσάρων εβδομάδων χρησιμοποιήθηκαν αρχικά (1^η ανοσοποίηση) 100 μg καθαρής πρωτεΐνης, 25 μg για τη 2^η ανοσοποίηση και από 12,5 μg για τις επόμενες.

Ο καθαρισμός του αντισώματος από τον ορό του ανοσοποιημένου κουνελιού έγινε είτε με έκλουση αντισώματος από μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, στην οποία είχε μεταφερθεί με ηλεκτρομεταφορά η πρωτεΐνη *rN15-LdPIPh22-8His* που χρησιμοποιήθηκε ως αντιγόνο (βλ. παράγραφο 3.18.2), είτε με χρωματογραφία στήλης υψηλής συγγένειας (παράγραφο 3.18.3). Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του αντισώματος έγινε με την μέθοδο Bradford (βλ. παράγραφο 3.9) και φασματοσκοπικά (μέτρηση απορρόφησης στα 280 nm).

Ο έλεγχος του τίτλου του ορού από τις διαφορετικές αιμοληψίες και της ειδικότητας του καθαρισμένου αντισώματος έγινε με ανοσοαποτύπωση Western έναντι πρωτεΐνης-αντιγόνου από βακτηριακά ομογενοποιημένα από κλώνο *BL21-pTriex1.1-rN15-Ldriph22*. Παράλληλα, καθαρισμένο αντίσωμα ελέγχθηκε με ανοσοφθορισμό και συνεστιακή μικροσκοπία σε διαγονιδιακά παράσιτα *L. donovani* (παράγραφο 4.5).

Με τη μέθοδο του ανοσοαποτυπώματος πιστοποιήθηκε η ειδικότητα του αντισώματος έναντι πρωτεΐνης που έχει το αναμενόμενο μοριακό βάρος με την βακτηριακή πρωτεΐνη *rN15-LdPIPh22-8His* εκφρασμένη από το στέλεχος *BL21-pTriex1.1-rN15-Ldriph22*.

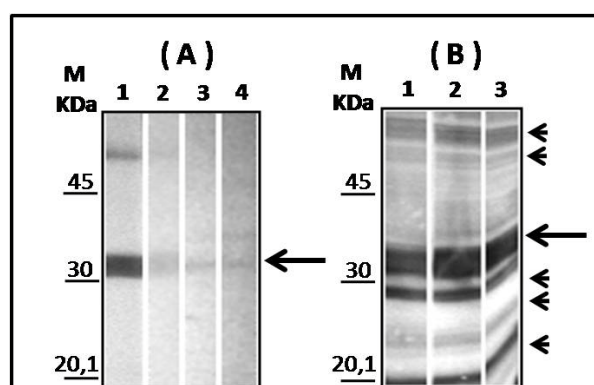


Εικόνα 4.27. Έλεγχος της ειδικότητας και του τίτλου του ορού κουνελιού μετά την τρίτη (A), τέταρτη (B) και πέμπτη (Γ) αιμοληψία και έλεγχος της δράσης και ειδικότητας του καθαρισμένου αντισώματος (Δ) με ανοσοαποτύπωση Western. Για την ανάπτυξη χρησιμοποιήθηκε δεύτερο αντίσωμα έναντι ορού κουνελιού (anti-rabbit) συζευγμένο με HRP και χρωμομετρική μέθοδος ανάπτυξης με αντιδραστήριο DAB. Ο έλεγχος έγινε σε ίσες ποσότητες καθαρισμένης πρωτεΐνης rN15-LdPIPh22-8His από βακτηριακά ομογενοποιηήματα με σφαιρίδια Ni-NTA (A) (βλ. εικόνα 4.24, διαδρομή A9 και B6) και ολικά βακτηριακά εκχυλίσματα (B, Γ, Δ) (βλ. εικόνα 4.24, διαδρομή A1). M) μοριακοί μάρτυρες μεγεθών, A. 1) η μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης με χρώση Ponceau-S, 2) αραίωση ορού 1:1000 και 3) αραίωση ορού 1:5000, B. 1) αραίωση του ορού 1:1000, 2) αραίωση του ορού 1:5000, 3) αραίωση του ορού 1:10000 4) η μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης με χρώση Ponceau-S, Γ. 1) αραίωση του ορού 1:100, 2) αραίωση του ορού 1:500, 3) αραίωση του ορού 1:5000, 4) αραίωση του ορού 1:10000 5) η μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης με χρώση Ponceau-S, Δ. 1) καθαρισμένο αντίσωμα μετά την πέμπτη αιμοληψία (τελική) με χρωματογραφία υψηλής συγγένειας σε συγκέντρωση 0,2 μg/mL, 2) καθαρισμένο αντίσωμα μετά την πρώτη αιμοληψία με έκλουση από μεμβράνη νιτροκυτταρίνης σε συγκέντρωση 0,1 μg/mL

Όπως παρατηρείται στην εικόνα 4.27, μετά την τέταρτη ανοσοποίηση υπάρχει βελτίωση στην ειδικότητα και τον τίτλο του αντισώματος (σύγκριση μεταξύ εικόνων 4.27, A και B), ενώ μετά την πέμπτη ανοσοποίηση (εικόνα 4.27, Γ) που είναι και η τελική, το αντίσωμα αναγνωρίζει το αντιγόνο σε αραίωση 1:10000. Το μη ειδικό σήμα μειώνεται αισθητά με τις αραιώσεις του ορού. Επειδή, όμως, ακόμα και στην μεγάλη αραιώση εξακολουθούμε να ανιχνεύουμε κάποιες ζώνες πρωτεϊνών μικρότερου και μεγαλύτερου μοριακού βάρους που ίσως να αντιπροσωπεύουν πρωτεολυτικά θραύσματα της πρωτεΐνης rN15-LdPIPh22-8His (μικρότερου μοριακού βάρους ζώνες) αλλά και άλλες πρωτεΐνες (μεγαλύτερου μοριακού βάρους ζώνες), προχωρήσαμε σε καθαρισμό του ορού ώστε το αντίσωμα που θα πάρουμε να αναγνωρίζει ειδικά την πρωτεΐνη rN15-LdPIPh22-8His (εικόνα 4.27, Δ). Είναι σημαντικό ότι το καθαρισμένο αντίσωμα παρουσιάζει πολύ καλό και ειδικό σήμα σε δείγμα ολικού

ομογενοποιήματος βακτηρίων και όχι μόνο σε δείγμα πρωτεΐνης προσδεσμένης στα σφαιρίδια Ni^{2+} που θεωρητικά περιέχουν προσδεμένο μόνο το αντιγόνο rN15-LdPIPh22-8His (εικόνα 4.27, διαδρομή Δ2).

Στην περίπτωση του αντισώματος που παράχθηκε σε ποντικό, μετά την τρίτη ανοσοποίηση του ζώου, έγινε έλεγχος της ειδικότητας και του τίτλου του ορού σε δείγμα σφαιριδίων Ni-NTA που είχαν προσδεμένο αντιγόνο rN15-LdPIPh22-8His από ομογενοποίηση βακτηρίων BL21-pTriex1.1-N15-Ldpirh22, όπως αναφέρθηκε παραπάνω στην περίπτωση του ελέγχου του αντισώματος από το κουνέλι. Όπως φαίνεται στην εικόνα 4.28 (A), το αντίσωμα παρουσιάζει υψηλή ειδικότητα για το αντιγόνο αλλά έχει χαμηλό τίτλο και μόνο σε μικρή αραιώση του ορού (1:100) αναγνωρίζεται το αντιγόνο (εικόνα 4.28 διαδρομή A1). Μετά την τέταρτη ανοσοποίηση, που είναι και η τελική, ο τίτλος των ειδικών αντισωμάτων στον ορό έχει βελτιωθεί σημαντικά (σύγκριση του σήματος στις διαδρομές A4 και B3, εικόνα 4.28). Η μη ειδική αντίδραση ανιχνεύτηκε και πάλι σε κάποιες ζώνες πρωτεϊνών μικρότερου αλλά και μεγαλύτερου μοριακού βάρους (μικρά βέλη). Η μη ειδική αντίδραση μειώθηκε με περαιτέρω αραιώση του ορού. Αποφασίσαμε να χρησιμοποιήσουμε τον ορό σε υψηλές αραιώσεις (1:1000) χωρίς να επιχειρήσουμε καθαρισμό του αντισώματος διότι οι ποσότητες που λαμβάνονται από τις αιμοληψίες των ποντικών είναι πολύ μικρές (συνολικός όγκος ορού 400 μL από κάθε ποντίκι).



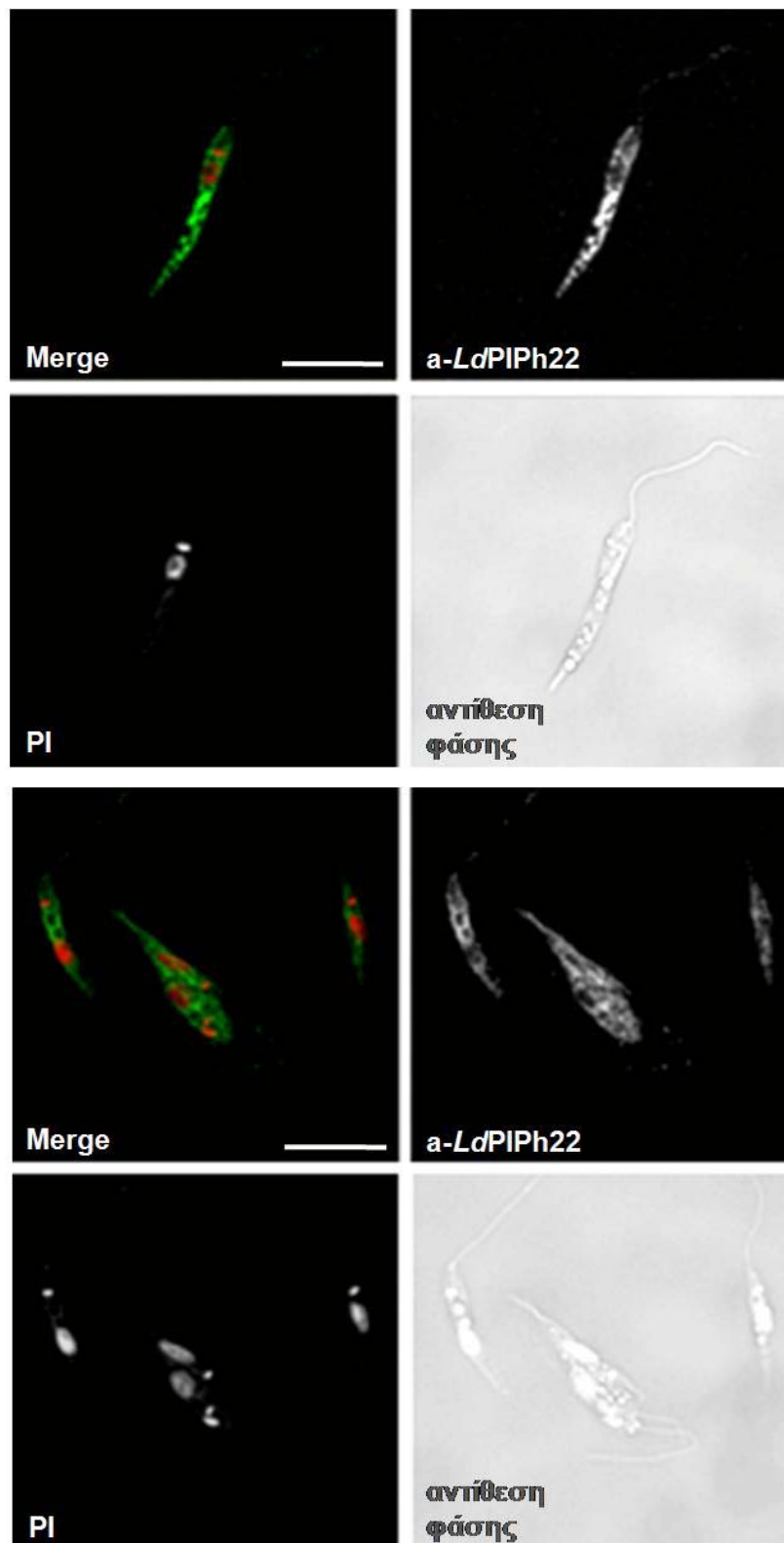
Εικόνα 4.28. Έλεγχος της ειδικότητας και του τίτλου του ορού από ποντίκι ανοσοποιημένο με αντιγόνο rN15-LdPIPh22-8His μετά την τρίτη (A) και τέταρτη (B) αιμοληψία. Ο έλεγχος έγινε με ανοσοαποτύπωση Western, όπως προηγουμένως, σε δείγμα rN15-LdPIPh22-8His προσδεμένης σε σφαιρίδια Ni-NTA (A1, A2) (βλ. εικόνα 4.24, διαδρομή A9 και B6) και ολικού ομογενοποιήματος βακτηρίων BL21-pTriex1.1-Ldpirh22 (A3, A4, B) (βλ. εικόνα 4.24, διαδρομή A1). **A. 1)** αραιώση του ορού 1:100, **2)** αραιώση του ορού 1:1000, **3)** αραιώση του ορού 1:100, **4)** αραιώση του ορού 1:1000. **B. 1)** αραιώση του ορού 1:100, **2)** αραιώση του ορού 1:500, **3)** αραιώση του ορού 1:1000

4.5 Διερεύνηση της έκφρασης της ενδογενούς *LdPIPh22* σε παράσιτα *Leishmania donovani* και του υποκυτταρικού εντοπισμού της

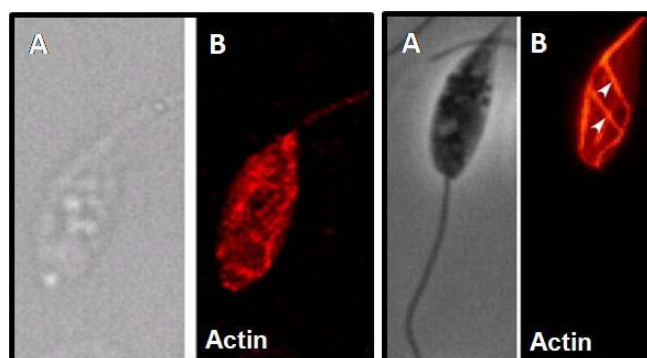
Η έκφραση της ενδογενούς πρωτεΐνης *LdPIPh22* στα παράσιτα *L. donovani* (στέλεχος LG13) διερευνήθηκε με την τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού (βλ. παράγραφο 3.17) και συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού, και μελετήθηκε ο υποκυτταρικός εντοπισμός της.

4.5.1 Εντοπισμός με έμμεσο ανοσοφθορισμό

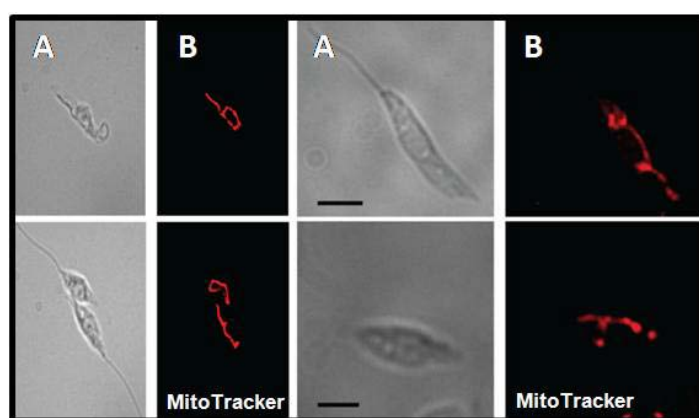
Ο εντοπισμός της ενδογενούς πρωτεΐνης *LdPIPh22* στα προμαστιγωτά παράσιτα *L. donovani* (στέλεχος LG13) στατικής φάσης με έμμεσο ανοσοφθορισμό έγινε με χρήση του πολυκλωνικού αντισώματος από ορό κουνελιού καθαρισμένου με χρωματογραφία υψηλής συγγένειας (βλ. παράγραφο 3.18.1, 3.18.3 και 4.4). Ως δεύτερο αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι ορού κουνελιού συζευγμένο με την πράσινη φθορίζουσα χρωστική Alexa Fluor 488, οι πυρήνες και το DNA των κινητοπλαστών (μιτοχονδριακό DNA του παρασίτου *Leishmania*) σημάνθηκαν με την κόκκινη φθορίζουσα χρωστική προπύδιο του ιωδίου (PI). Η ενδογενής πρωτεΐνη *LdPIPh22*, όπως φαίνεται στην εικόνα 4.29 εντοπίζεται κυρίως στο σώμα του παρασίτου και ελάχιστα στο μαστίγιο όπου παρουσιάζει σπικτική κατανομή που υποδηλώνει ότι μπορεί να βρίσκεται σε κυστίδια. Στο σώμα του παρασίτου η *LdPIPh22* είναι κυτταροπλασματική και παρουσιάζει σπικτό περιπυρηνικό εντοπισμό, ενώ απουσιάζει από τον πυρήνα. Φαίνεται να έχει επιφανειακή κατανομή στην περιοχή έκφυσης του μαστιγίου (flagellar pocket). Στο υπόλοιπο σώμα ο εντοπισμός της *LdPIPh22* συγκεντρώνεται σε δομές που μοιάζουν με αυτές του μιτοχονδρίου ή των ινιδίων της ακτίνης. Στις εικόνες 4.30 και 4.31 παρατίθεται χαρακτηριστική χρώση ακτίνης και μιτοχονδρίου σε παράσιτα *Leishmania* προς σύγκριση. Επίσης, η *LdPIPh22* φαίνεται να περιβάλλει ενδοκυτταρικά κυστίδια.



Εικόνα 4.29. Εντοπισμός της ενδογενούς *LdPIPh22* στα προμαστιγωτά παράσιτα *L. donovani* (στέλεχος LG13) στατικής φάσης με συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού (βλ. παράγραφο 3.17). Η χρώση των παρασίτων έγινε με καθαρισμένο πολυκλωνικό αντι-*LdPIPh22* αντίσωμα από κουνέλι σε συγκέντρωση 10 $\mu\text{g/mL}$ και στη συνέχεια με δεύτερο αντίσωμα έναντι ορού κουνελιού (anti-rabbit) συζευγμένο με Alexa Fluor 488 (αραίωση 1:750). Η χρώση του DNA έγινε με προπύδιο του ιωδίου (PI). Ο πράσινος (αντι-*LdPIPh22*/αντι-rabbit-Alexa 488) και ο κόκκινος (PI) φθορισμός παρουσιάζονται χωριστά ως ασπρόμαυρες εικόνες και μαζί στην εικόνα με την λεζάντα “merge”. Η εικόνα των παρασίτων σε αντίθεση φάσης παρουσιάζεται σε απόχρωση γκρι. Scale bar: 4 μm



Εικόνα 4.30. *In vivo* ανάλυση των ινιδίων της ακτίνης. **A.** Αντίθεση φάσης, **B.** Σήμανση με αντίσωμα έναντι της ακτίνης (LdACT) [90]



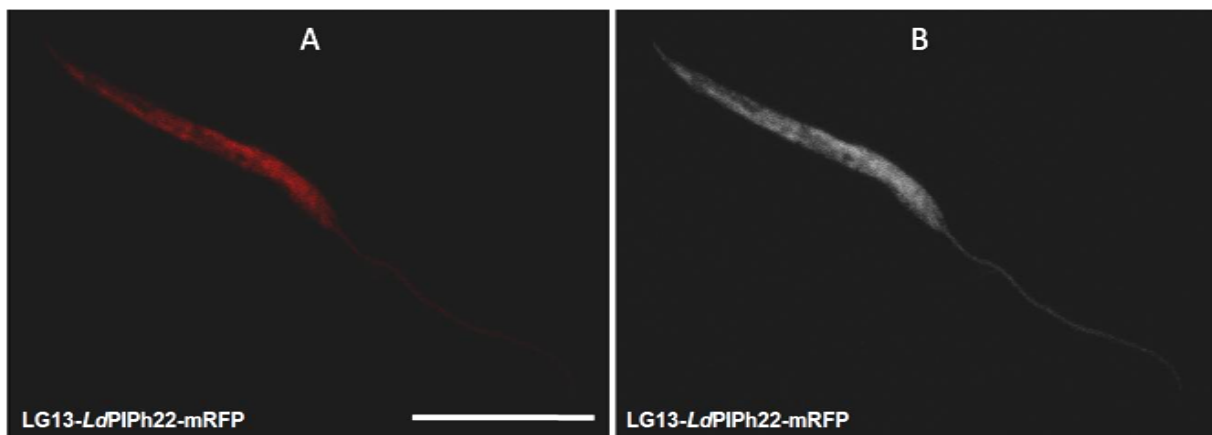
Εικόνα 4.31. *In vivo* ανάλυση μιτοχονδρίου *L. donovani* προμαστιγωτών παρασίτων. **A.** Αντίθεση φάσης, **B.** Χρώση του μιτοχονδρίου με τη χρωστική MitoTracker [91]

4.5.2 Κατασκευή διαγονιδιακών παρασίτων *L. donovani* και *L. tarentolae* που υπερεκφράζουν την rLdPIPh22-mRFP

Δημιουργία διαγονιδιακών παρασίτων που υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη που θέλουμε να μελετήσουμε αποτελούν σημαντικό κυτταρικό εργαλείο για λειτουργικές και βιοχημικές μελέτες, καθώς και για μελέτη του υποκυτταρικού εντοπισμού της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης που μπορεί να βοηθήσει στην κατανόηση της λειτουργίας της ενδογενούς πρωτεΐνης.

Στελέχη των παρασίτων *L. donovani* (LG13) στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο pF4X1-4sat-Ldriph22-mRFP μέσω ηλεκτροδιάτρησης, όπως αναφέρεται στην παράγραφο 3.11 [92]. Τα επιμολυσμένα κύτταρα διατηρήθηκαν σε συνθήκες καλλιέργειας όπως και οι προμαστιγωτές μορφές των παρασίτων αγρίου τύπου με μόνη διαφορά την αυξανόμενη προσθήκη του αντιβιοτικού Nourseothricin (μέχρι τελικής συγκέντρωσης 100 µg/mL) για την επιλογή

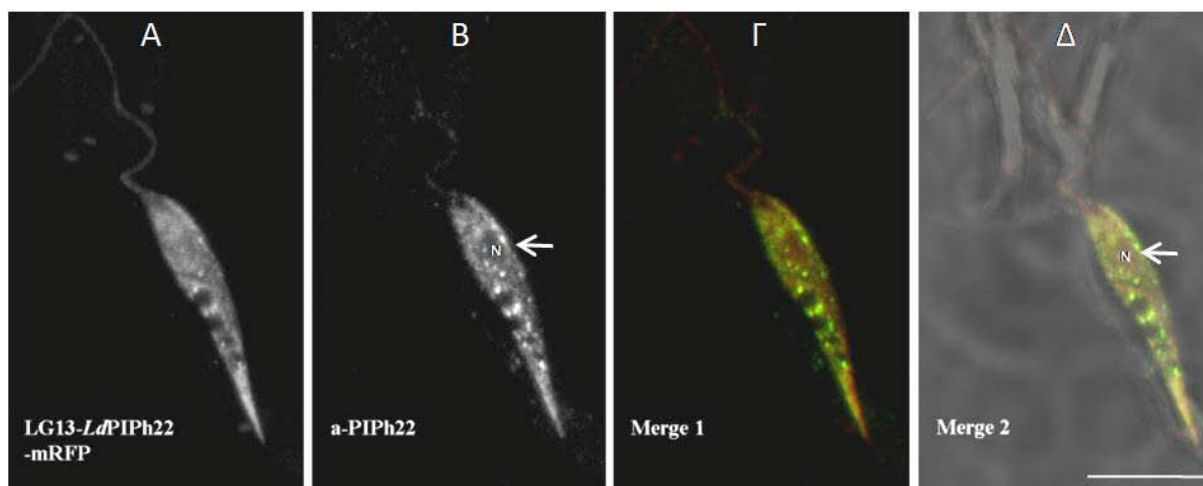
παρασίτων που φέρουν το πλσμίδιο, άρα αυτών που εκφράζουν την *rLdPIPh22-mRFP*. Όταν έγινε εύκολος ο εντοπισμός αρκετών ζωντανών παρασίτων στην καλλιέργεια (~3 εβδομάδες μετά την επιμόλυνση), η ύπαρξη διαγονιδιακών παρασίτων επιβεβαιώθηκε με παρατήρηση σε μικροσκόπιο (εικόνα 4.32) για να πιστοποιηθεί η έκφραση της *rLdPIPh22-mRFP* από το φθορισμό της κόκκινης φθορίζουσας πρωτεΐνης mRFP.



Εικόνα 4.32. Εντοπισμός της διαγονιδιακής *rLdPIPh22-mRFP* σε προμαστιγωτά παράσιτα στατικής φάσης *L. donovani* (στέλεχος LG13) με συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού (βλ. παράγραφο 3.17). Ο κόκκινος φθορισμός της mRFP (**A**) ανιχνεύτηκε με την γραμμή laser Argon, 543 nm (**B**). Η ίδια εικόνα παρατίθεται σε ασπρόμαυρη για καλύτερη αντίθεση (**B**). Scale bar: 4 μ m

Η *rLdPIPh22-mRFP* πρωτεΐνη εντοπίζεται κυρίως στο σώμα αλλά και στο μαστίγιο του παρασίτου. Η κατανομή της πρωτεΐνης στο σώμα του παρασίτου μοιάζει με την κατανομή της ενδογενούς *LdPIPh22* όπως ανιχνεύθηκε με ανοσοφθορισμό (εικόνα 4.29).

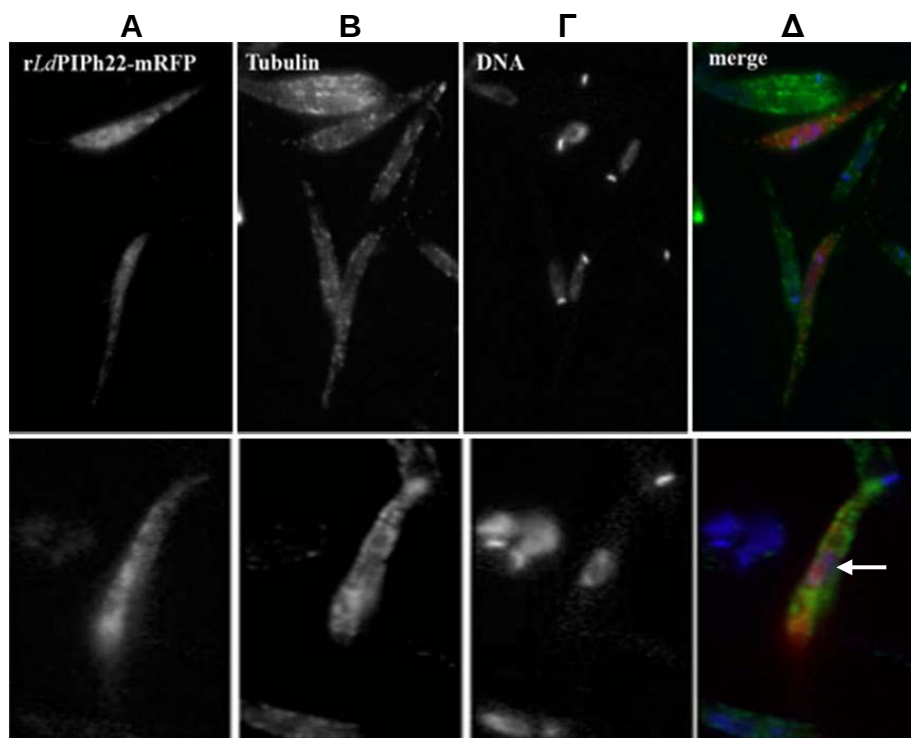
Ο εντοπισμός της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης *rLdPIPh22-mRFP* επιβεβαιώθηκε με έμμεσο ανοσοφθορισμό με καθαρισμένο αντίσωμα αντι-*LdPIPh22* από ορό κουνελιού. Το αντίσωμα αυτό αναμένεται να αναγνωρίζει την ανασυνδυασμένη αλλά και την ενδογενή πρωτεΐνη *LdPIPh22*. Όπως φαίνεται στην εικόνα 4.33, ο κόκκινος και ο πράσινος φθορισμός συνεντοπίζονται σε μεγάλο βαθμό. Ο κόκκινος φθορισμός παρουσιάζει επίσης μία διάχυτη κατανομή στην περιοχή του πυρήνα που δεν απαντάται στη χρώση με το αντι-*LdPIPh22* αντίσωμα. Αυτή η χρώση πιθανόν να οφείλεται σε μονομερή πρωτεΐνη mRFP που έχει προκύψει ως προϊόν πρωτεόλυσης της *rLdPIPh22-mRFP*. Η πρωτεΐνη mRFP είναι γνωστό ότι εισέρχεται στον πυρήνα των κυττάρων στα οποία εκφράζεται ετερόλογα [93].



Εικόνα 4.33. Συνεντοπισμός της διαγονιδιακής *rLdPIPh22-mRFP* και της ενδογενούς *LdPIPh22* σε προμαστιγωτά παράσιτα στατικής φάσης *L. donovani*-*LdPIPh22-mRFP* με έμμεσο ανοσοφθορισμό και συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού (βλ. παράγραφο 3.17). Για τον έμμεσο ανοσοφθορισμό χρησιμοποιήθηκε καθαρισμένο αντίσωμα αντι-*LdPIPh22* (5 $\mu\text{g/mL}$) από κουνέλι και δεύτερο αντίσωμα anti-rabbit συζευγμένο με την πράσινη φθορίζουσα χρωστική Alexa Fluor 488. Ο κόκκινος (mRFP) (Α) και ο πράσινος (Alexa 488) φθορισμός (Β) παρουσιάζονται χωριστά ως ασπρόμαυρες εικόνες και μαζί στην εικόνα με την λεζάντα “merge1” (Γ). (Δ) Η αλληλεπικάλυψη των δύο χρωστικών με την αντίθεση φάσης. Με βέλος υποδεικνύεται ο πυρήνας. Scale bar: 4 μm

Προκειμένου να εξεταστεί αν η *rLdPIPh22-mRFP* συνεντοπίζεται με τον κυτταροσκελετό της τουμπουλίνης στο παράσιτο *L. donovani* έγινε σήμανση των διαγονιδιακών παρασίτων με αντίσωμα έναντι της α -τουμπουλίνης (βλ. παράγραφο 3.17) και ταυτόχρονα έγινε χρώση των πυρήνων με την χρωστική Hoechst που απορροφά στο UV (εικόνα 4.34). Για την απεικόνιση των κυτάρων αυτών χρησιμοποιήθηκε το μικροσκόπιο ευρέως πεδίου Olympus X81 με φίλτρο DAPI δεδομένου ότι το συνεστιακό μικροσκόπιο TCS-SP δεν διαθέτει γραμμή laser που να διεγείρει τη χρωστική Hoechst.

Στο πλαίσιο των ορίων που θέτει το μικροσκόπιο ευρέως πεδίου για τη μελέτη συνεντοπισμού δύο πρωτεϊνών μπορούμε να πούμε ότι η χρώση της *rLdPIPh22-mRFP* δεν συνεντοπίζεται με τη χρώση της α -τουμπουλίνης (βέλος) έτσι, ώστε να υποδηλώνεται πιθανή πρόσδεση της *rLdPIPh22-mRFP* στον κυτταροσκελετό της τουμπουλίνης.



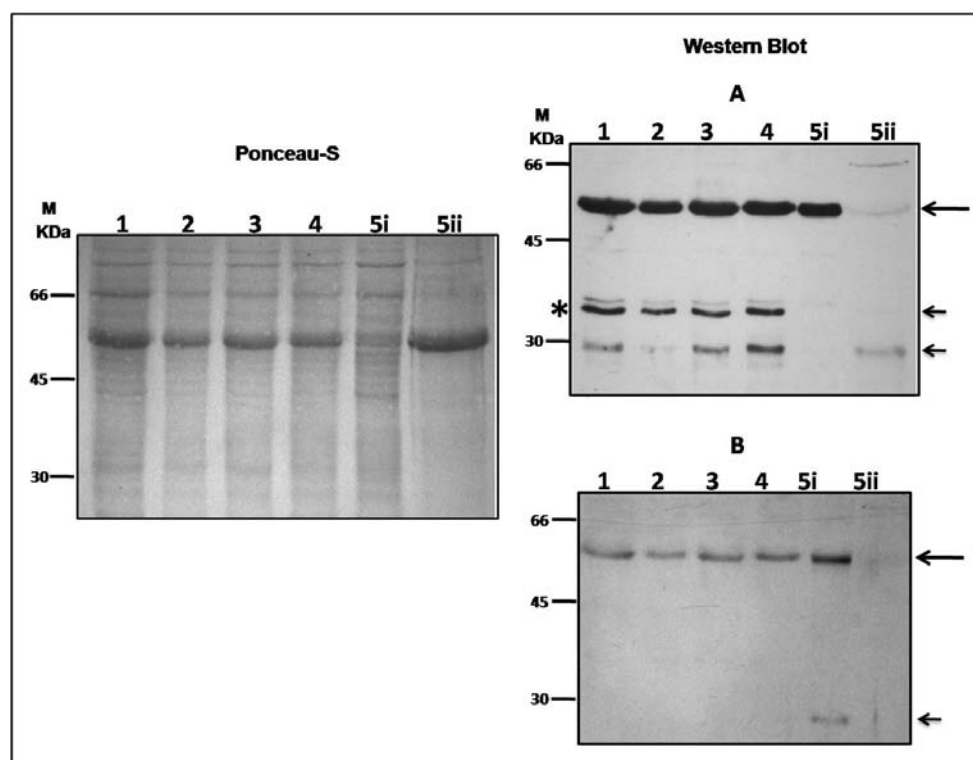
Εικόνα 4.34. Εντοπισμός της διαγονιδιακής *rLdPIPh22-mRFP* στα προμαστιγωτά παράσιτα στατικής φάσης *L. donovani* (στέλεχος LG13) με μικροσκόπιο φθορισμού ευρέως πεδίου (βλ. παράγραφο 3.17). **A.** Η χρώση της mRFP, **B.** Χρώση με αντίσωμα α-τουμπουλίνης (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) και δεύτερο αντι-mouse αντίσωμα Alexa Fluor 488, **Γ.** Χρώση των πυρήνων με τη χρωστική Hoechst, **Δ.** Αλληλεπικάλυψη των χρώσεων των φθορίζουσών χρωστικών mRFP, Alexa 488 και της χρώσης Hoechst. Το βέλος υποδεικνύει την περιοχή έκφυσης του μαστιγίου (flagellar body)

4.5.3 Βιοχημικός υποκυτταρικός εντοπισμός της ενδογενούς *LdPIPh22* και της ανασυνδυασμένης *rLdPIPh22-mRFP*

Κλασμάτωση των παρασιτικών πρωτεϊνών με επώαση των παρασίτων σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης που περιέχει 24 ng/mL διγτονίνης, που σταδιακά αυξάνεται στα 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$, οδηγεί σε 5 διαφορετικά κλάσματα με διαφορετική σύσταση πρωτεϊνών. Μετά από κάθε στάδιο επώασης, το αδιάλυτο κλάσμα συλλέγεται με φυγοκέντρηση (βλ. παράγραφο 3.12) και υποβάλλεται σε νέα διαλυτοποίηση με διάλυμα που περιέχει υψηλότερη συγκέντρωση διγτονίνης. Το τελικό αδιάλυτο κλάσμα 5 που περιέχει μεμβρανικές, πρωτεΐνες της πλασματικής μεμβράνης, των οργανιδίων και πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού και του πυρήνα υποβάλλεται σε ένα τελικό στάδιο διαλυτοποίησης με 1% v/v Triton X-100 για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Στο τελικό αυτό στάδιο διαλυτοποίησης παραλαμβάνονται στο διαλυτό κλάσμα οι μεμβρανικές πρωτεΐνες, ενώ τα ινίδια του κυτταροσκελετού και οι πυρηνικές πρωτεΐνες συλλέγονται με φυγοκέντρηση στο ίζημα. Η ανίχνευση της πρωτεΐνης που

μας ενδιαφέρει σε ένα συγκεκριμένο κλάσμα μας επιτρέπει να κάνουμε λογικές υποθέσεις για τον υποκυτταρικό εντοπισμό της συγκεκριμένης πρωτεΐνης.

Η έκφραση της διαγονιδιακής πρωτεΐνης rLdPIPh22-mRFP επαληθεύτηκε βιοχημικά στα διαγονιδιακά παράσιτα *L. donovani* και *L. tarentolae*, με ανοσοαποτύπωση Western, μετά από κλασμάτωση των ολικών πρωτεϊνών του παρασίτου με χρήση του απορρυπαντικού διγτονίνη, όπως περιγράφηκε παραπάνω και στην παράγραφο 3.12.



Εικόνα 4.35. Ανοσοαποτύπωση Western διαγονιδιακών παρασίτων *L. donovani*-LdPIPh22-mRFP των κλασμάτων 1 έως 5 (5i διαλυτές πρωτεΐνες και 5ii αδιάλυτες πρωτεΐνες, μετά από κατεργασία του κλάσματος 5 με 1% Triton X-100) μετά από κλασμάτωση των πρωτεϊνών με διγτονίνη και ανάλυση με SDS-PAGE 12%. Η μεμβράνη επώαστηκε με αντι-LdPIPh22 ορό ποντικού (**A**) σε αραιώση 1:1200 και με καθαρισμένο αντι-mRFP αντίσωμα από κουνέλι (**B**) σε συγκέντρωση 0,5 µg/mL και, στη συνέχεια, με δεύτερα αντισώματα έναντι ορού ποντικού (anti-mouse) (**A**) και ορού κουνελιού (anti-rabbit) (**B**), αντίστοιχα, συζευγμένα με HRP. Η εμφάνιση των ζωνών έγινε με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας. (**M**) Μοριακοί μάρτυρες (kDa). Τα μικρά και μεγάλα βέλη υποδεικνύουν τις μορφές της LdPIPh22 (**A**) και της rLdPIPh22-mRFP (**A, B**) αντίστοιχα

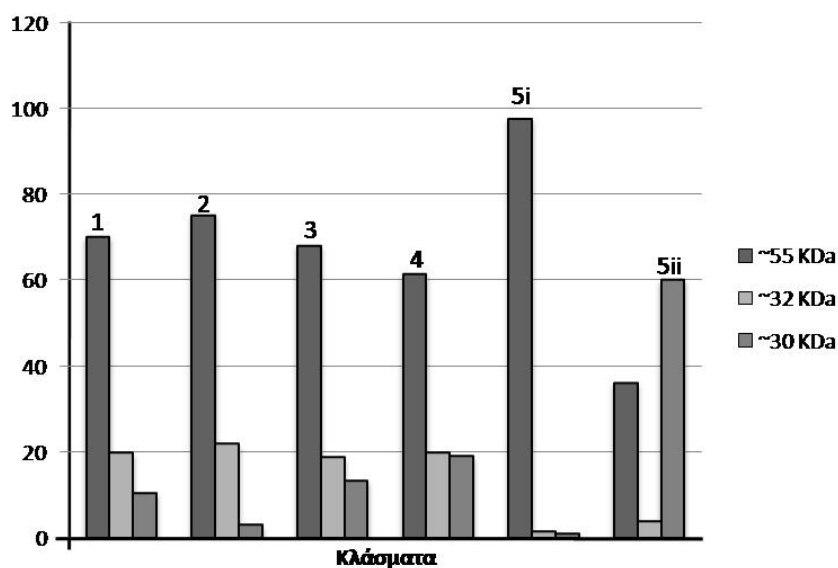
Με τον αντι-rN15LdPIPh22-8His ορό ποντικού ανιχνεύτηκαν 2 ζώνες (εικόνα 4.35) στα κλάσματα 1 έως 5 που θεωρούμε ότι αντιστοιχούν στη διαγονιδιακή rLdPIPh22-mRFP (αναμενόμενο μοριακό βάρος ~55 kDa) και στην ενδογενή πρωτεΐνη (~30 kDa). Η ζώνη των ~55 kDa επιβεβαιώθηκε πως αντιστοιχεί στην rLdPIPh22-mRFP

με ανίχνευση της πρωτεΐνης mRFP στην ίδια μεμβράνη, με το ειδικό αντίσωμα έναντι της mRFP. Με το αντι-LdPIPh22 αντίσωμα ανιχνεύεται και μία τρίτη ζώνη (εικόνα 4.35, A,*) που δεν γνωρίζουμε αν πρόκειται για πρωτεολυτικό κλάσμα της rLdPIPh22-mRFP πρωτεΐνης από την οποία έχει αποκοπεί η mRFP ή για άλλη μορφή της ενδογενούς LdPIPh22 πρωτεΐνης που έχει υποστεί μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις, κάτι που χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Η κατανομή της rLdPIPh22-mRFP είναι σχεδόν ισόποση στα διαλυτά και μεμβρανικά κλάσματα (1-5i) και ένα μικρότερο μέρος της ανιχνεύεται στο κυτταροσκελετικό κλάσμα (5ii), όπως επιβεβαιώνεται από την χρώση της μεμβράνης με Ponceau-S και μετά από ποσοτικοποίηση της έντασης της χρώσης με το λογισμικό ανάλυσης εικόνας Fiji (<http://fiji.sc/Fiji>) (εικόνα 4.35 και σχήμα 4.2).

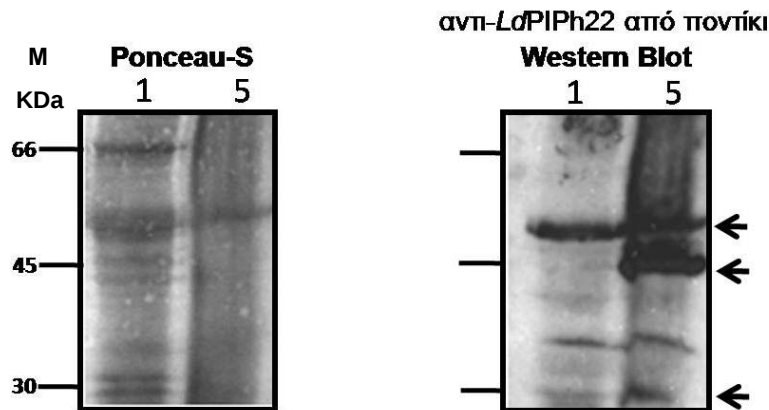
Από την άλλη πλευρά, η κατανομή της ενδογενούς πρωτεΐνης (ζώνη ~30KDa) εντοπίζεται κυρίως στα κλάσματα 1, 3 και 4 (διαλυτό και μεμβρανικά κλάσματα) και ένα σημαντικό μέρος της ανιχνεύεται στο κυτταροσκελετικό κλάσμα (5ii). Η πρωτεΐνη mRFP που έχει προφανώς πρωτεολυθεί (~27 KDa) ανιχνεύεται κυρίως στο κλάσμα 5i (εικόνα 4.34, B) που περιέχει και τις πυρηνικές πρωτεΐνες. Είναι γνωστό ότι οι πρωτεΐνες mRFP και GFP εισέρχονται στον πυρήνα. Η διπλή ζώνη στα 35 KDa ακολουθεί την κατανομή της διαγονιδιακής πρωτεΐνης με τη μόνη διαφορά ότι δεν ανιχνεύεται στο κλάσμα 5.

Μετά από σύγκριση της έντασης των ζωνών που αντιστοιχούν στην ενδογενή LdPIPh22 και τη διαγονιδιακή πρωτεΐνη rLdPIPh22-mRFP με ποσοτικοποίηση με το πρόγραμμα Fiji συμπεραίνουμε ότι η rLdPIPh22-mRFP στα κλάσματα 1 έως 4 υπερεκφράζεται κατά 6 φορές, κατά μέσο όρο, σε σχέση με την ενδογενή (~30 KDa) πρωτεΐνη (69% της συνολικής πρωτεΐνης, $\pm 5,7\%$), ενώ στο κλάσμα 5i είναι σχεδόν η μοναδική που ανιχνεύεται (σχήμα 4.2). Συνολικά, με βάση τον υπολογισμό από το συγκεκριμένο πείραμα, η διαγονιδιακή πρωτεΐνη rLdPIPh22-mRFP υπερεκφράζεται κατά 4 φορές σε σχέση με την ενδογενή πρωτεΐνη.



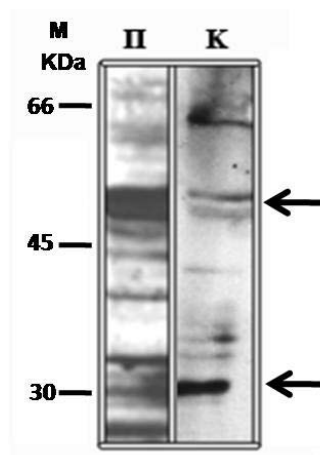
Σχήμα 4.2. Ποσοτικοποίηση της έντασης της χρώσης της εικόνας 4.35 (A) με το λογισμικό ανάλυσης εικόνας Fiji

Παράλληλα έγινε ανίχνευση της ομόλογης πρωτεΐνης *LdPIPh22* σε παράσιτα *Leishmania tarentolae*, μη παθογόνο είδος *Leishmania*, τα οποία εκφράζουν επισωμικά την πρωτεΐνη *rLdPIPh22-mRFP*. Η *LtaPIPh22* από την βιοπληροφορική ανάλυση που πραγματοποιήσαμε (βλ. παράγραφο 4.1.4) έχει 85% ομοιότητα με την *LdPIPh22* στην πρωτοταγή της δομή και αναμένουμε να αναγνωρίζεται από τα αντισώματα που κατασκευάσαμε έναντι της *LdPIPh22*. Η *rLdPIPh22-mRFP* στα παράσιτα *L. tarentolae* ανιχνεύεται κυρίως στα κλάσματα 1 και 5 ως ζώνη ~55 KDa (εικόνα 4.36) και ως μία μικρότερου μοριακού βάρους πρωτεΐνη μεγαλύτερη από 45 KDa, όπως και στα διαγονιδιακά παράσιτα *L. donovani-LdPIPh22-mRFP*. Ανιχνεύονται σε μικρότερη ποσότητα η ζώνη στα ~30KDa, που θεωρούμε ότι αφορά στην ενδογενή πρωτεΐνη *LtaPIPh22* και στα ~35KDa, όπως στα παράσιτα *L. donovani*. Είναι ενδιαφέρον ότι η ζώνη των 45 KDa ανιχνεύεται μόνο στο μεμβρανικό-κυτταροσκελετικό κλάσμα (διαδρομή 5).



Εικόνα 4.36. Ανοσοαποτύπωση Western διαγονιδιακών παρασίτων *L. tarentolae*-LdPIPh22-mRFP μετά από κλασμάτωση των πρωτεϊνών με διγτονίνη και ανάλυση με SDS-PAGE 10% των κλασμάτων 1 και 5 (αντιπροσωπευτική εικόνα). Οι μεμβράνες επώαστηκαν με αντι-LdPIPh22 ορού ποντικού σε αραιώση 1:750 και στη συνέχεια με δεύτερο αντίσωμα έναντι ανοσοσφαιρινών ποντικού, από αίγα, συζευγμένο με HRP. Η εμφάνιση των ζωνών έγινε με τη μέθοδο της χημιοφωταύγειας. Ίσες ποσότητες πρωτεΐνης από τα κλάσματα 1 και 5 έχουν αναλυθεί (M) Μοριακοί μάρτυρες (KDa). Τα βέλη δείχνουν τις επικρατέστερες ζώνες που ανιχνεύονται και θεωρούνται ειδικές

Προσέξαμε ότι τα δύο διαφορετικά αντισώματα που παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο (βλ. παράγραφο 3.18) έναντι της rN15LdPIPh22-8His αναγνωρίζουν με διαφορετική ειδικότητα την ενδογενή πρωτεΐνη LdPIPh22 και την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη rLdPIPh22-mRFP. Δύο κ ρίες ζώνες, στα 30 κ α στα 50-55 KDa, αναγνωρίζονται και από τα δύο αντισώματα γεγονός που μας επιβεβαιώνει ότι αυτές οι ζώνες (εικόνα 4.37, βέλη) αφορούν στην ενδογενή και στην ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη.

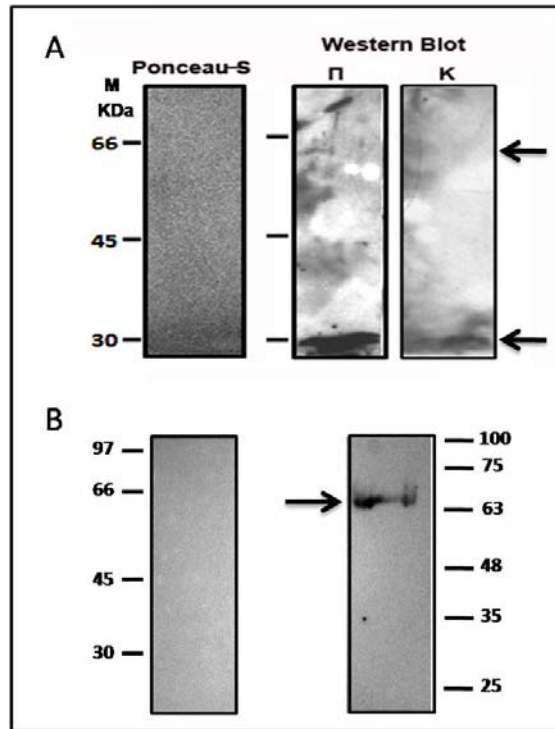


Εικόνα 4.37. Ανοσοαποτύπωση Western διαγονιδιακών παρασίτων *L. tarentolae*-LdPIPh22-mRFP μετά από κλασμάτωση των πρωτεϊνών με διγτονίνη και ανάλυση με SDS-PAGE 10% w/v, του κλάσματος 1. Οι μεμβράνες επώαστηκαν με αντι-LdPIPh22 ορό ποντικού (Π) σε αραιώση 1:500 ή με το καθαρισμένο αντι-LdPIPh22 αντίσωμα από κουνέλι (Κ) σε συγκέντρωση 0,2 μg/mL και στη συνέχεια με δεύτερο αντίσωμα anti-mouse (Π) ή anti-rabbit (Κ), αντίστοιχα, συζευγμένα με HRP. Η εμφάνιση των ζωνών έγινε με τη μέθοδο της χημιοφωταύγειας. (M) Μοριακοί μάρτυρες (KDa)

Παρόμοια εικόνα με τις δύο προηγούμενες παρουσιάζει η ανοσοαποτύπωση κατά Western παρασίτων *L. donovani* αγρίου τύπου μετά από κλασμάτωση των συνολικών πρωτεϊνών.

4.6 Έλεγχος για έκκριση της πρωτεΐνης *LdPIPh22* από το παράσιτο

Θελήσαμε να ελέγξουμε αν η ενδογενής πρωτεΐνη των παρασίτων εκκρίνεται. Ένα θετικό αποτέλεσμα θα ήταν σημαντικό για τη διερεύνηση του τρόπου δράσης της στο κύτταρο ξενιστή (βλ. εισαγωγή 1.4.1). Από καλλιέργεια προμαστιγωτών παρασίτων *L. donovani*, στέλεχος LG13, αγρίου τύπου απομονώθηκε το σύνολο των εκκρινόμενων πρωτεϊνών με καθίζηση με χρήση ακετόνης ή τριχλωροξικού οξέος (βλ. παράγραφο 3.13), από το εξωκυττάριο θρεπτικό υλικό παρασίτων που είχαν καλλιεργηθεί για 16 ώρες χωρίς ορό, και ελέγχθηκε με ανοσοαποτύπωση Western η παρουσία της ενδογενούς πρωτεΐνης *LdPIPh22*. Όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 4.38, μετά από δύο διαφορετικά πειράματα απομόνωσης των εκκρινόμενων πρωτεϊνών (στο Α, η καθίζηση των πρωτεϊνών έγινε με ακετόνη, στο Β με τριχλωροξικό οξύ, βλ. παράγραφο 3.13) των παρασίτων η ενδογενής πρωτεΐνη αρχικά ανιχνεύεται στο αναμενόμενο μοριακό βάρος (~30 KDa) και με τα δύο διαφορετικά αντισώματα (εικόνα 4.38, Α) που παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο έναντι αυτής, ενώ ανιχνεύεται επίσης σε μοριακό βάρος ~60 KDa, κάτι που πιθανόν υποδηλώνει ενδεχόμενο διμερισμό της πρωτεΐνης μετά από έκκριση στο υλικό της καλλιέργειας των παρασίτων *L. donovani*. Και από τα δύο πειράματα φαίνεται ότι το σύνολο των εκκρινόμενων πρωτεϊνών που ανακτήθηκαν από το θρεπτικό υλικό της κυτταροκαλλιέργειας είναι μικρής ποσότητας με αποτέλεσμα το ποσό της πρωτεΐνης που φορτώθηκε στην πηκτή πολυακρυλαμίδιου να μην ανιχνεύεται με χρώση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με τη χρωστική Ponceau-S. Προφανώς, η ποσότητα πρωτεΐνης στις αναλυθείσες πρωτεϊνικές ζώνες είναι χαμηλότερη της διακριτικής ικανότητας της μεθόδου χρώσης με Ponceau-S. Με την ευαισθησία της ανίχνευσης της χημειοφωταύγειας μετά από εμφάνιση σε φιλμ X-ray, (βλ. παράγραφο 3.7.3) στην ανοσοαποτύπωση κατά Western μπορέσαμε να διακρίνουμε τις δύο ζώνες που αναφέρθηκαν παραπάνω. Φυσικά, το ερώτημα για το αν η πρωτεΐνη *LdPIPh22* εκκρίνεται χρειάζεται επιβεβαίωση και πειράματα έχουν σχεδιαστεί προς αυτή την κατεύθυνση.



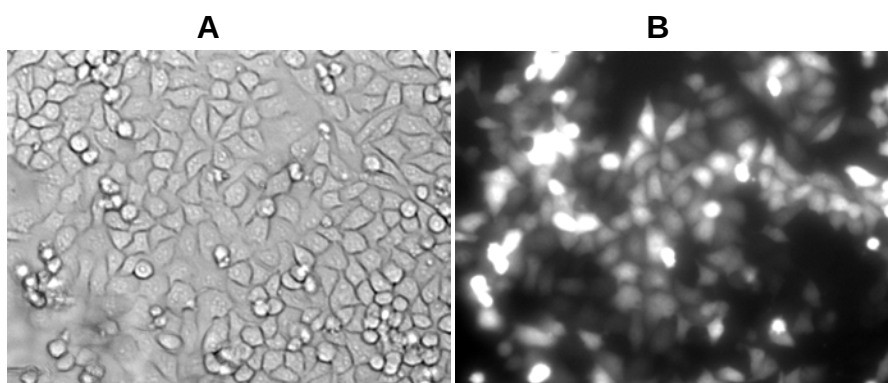
Εικόνα 4.38. Έλεγχος της έκκρισης της *LdPIPh22* με SDS-PAGE 10%, ανάλυση και ανοσοαποτύπωση Western από παράσιτα LG13 αγρίου τύπου του συνόλου των εκκρινόμενων πρωτεϊνών (βλ. παράγραφο 2.13) δύο διαφορετικών πειραμάτων απομόνωσης. **A.** Καθίζηση πρωτεϊνών με ακετόνη. Οι μεμβράνες επωάστηκαν με αντι-*LdPIPh22* ορό ποντικού (Π) σε αραιώση 1:1500 ή με το καθαρισμένο αντι-*LdPIPh22* αντίσωμα από κουνέλι (Κ) σε συγκέντρωση 0,4 μg/mL και στη συνέχεια με δεύτερο αντίσωμα έναντι ανοσοσφαιρινών ποντικού (Π) ή έναντι ανοσοσφαιρινών κουνελιού (Κ), αντίστοιχα, συζευγμένα με HRP. Η ίδια μεμβράνη επωάστηκε διαδοχικά και με τα δύο αντισώματα μετά από απομάκρυνση των αντισωμάτων και επαναχρησιμοποίησή τους (βλ. παράγραφο 3.8). **B.** Καθίζηση πρωτεϊνών με τριχλωροξικό οξύ. Η μεμβράνη επωάστηκε με αντι-*LdPIPh22* ορό ποντικού σε αραιώση 1:1200 και με δεύτερο αντίσωμα έναντι ανοσοσφαιρινών ποντικού. Η εμφάνιση των ζωνών έγινε με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας. Μία ζώνη στα ~30 KDa αναγνωρίζεται και από τα δύο διαφορετικά αντισώματα στην περίπτωση του πειράματος **A** και μία ζώνη στα ~64 KDa στο πείραμα **B**

4.7 Ετερόλογη έκφραση της *rLdPIPh22*-GFP σε ανώτερα ευκαρυωτικά κύτταρα

4.7.1 Βιοχημικός υποκυτταρικός εντοπισμός

Τα πρώτα αποτελέσματα που δείχνουν ότι η πρωτεΐνη *LdPIPh22* εκκρίνεται από το παράσιτο *L. donovani* μας κατηύθυναν σε έλεγχο του εντοπισμού της πρωτεΐνης *LdPIPh22* σε ανώτερα ευκαρυωτικά κύτταρα έτσι, ώστε να συλλέξουμε πληροφορίες σχετικά με τα φυσικά της υποστρώματα στα κύτταρα-ξενιστές και να οδηγηθούμε σε λογικές υποθέσεις σχετικά με την λειτουργία της. Για την μελέτη αυτή επιλέξαμε αρχικά την κυτταρική σειρά επιθηλιακών κυττάρων HeLa, λόγω της ευκολίας με την οποία επιμολύνονται και εκφράζουν ετερόλογες πρωτεΐνες σε υψηλά επίπεδα. Το πλασμίδιο *rEGFP-N3-Ldriph22*, από το οποίο εκφράζεται η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη *rLdPIPh22*-GFP, χρησιμοποιήθηκε για την ετερόλογη έκφραση της

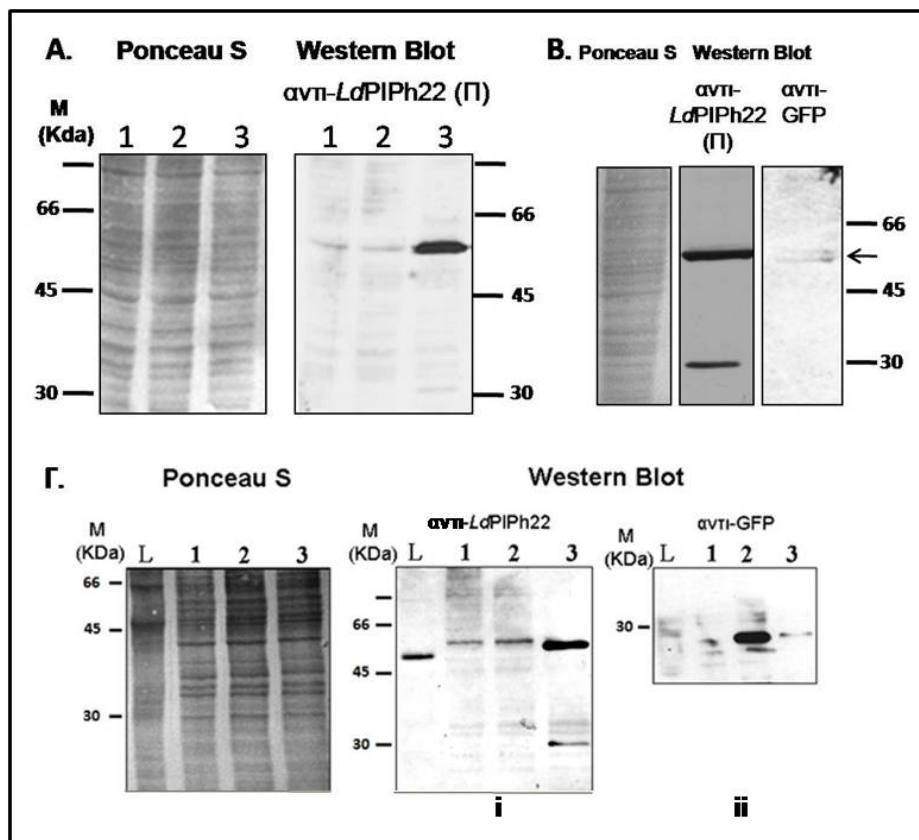
πρωτεΐνης στις κυτταρικές σειρές ανώτερων ευκαρυωτικών κυττάρων που χρησιμοποιήσαμε στη μελέτη μας (βλ. παράγραφο 3.14) [88, 89]. Η έκφραση της πρωτεΐνης, μετά από επιμόλυνση για 24 και 48 ώρες, ταυτοποιήθηκε με ανίχνευση του πράσινου φθορισμού που εκπέμπεται από την πρωτεΐνη GFP μετά από παρατήρηση με μικροσκόπιο φθορισμού ευρέως πεδίου. Επελέγησαν συνθήκες επιμόλυνσης που δίνουν ποσοστό επιμόλυνσης ~70% (εικόνα 4.39 και παράγραφος 3.14).



Εικόνα 4.39. Κύτταρα HeLa μετά από επιμόλυνση με το πλασμίδιο pEGFP-N3-*LdPIPh22* για 24 ώρες. Παρατήρηση με μικροσκόπιο φθορισμού ευρέως πεδίου. **A.** Αντίθεση φάσης, **B.** Πράσινος φθορισμός στα κύτταρα που εκφράζουν την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη *rLdPIPh22*-GFP, παρουσιάζεται σε ασπρόμαυρη εικόνα

Ο έλεγχος του μοριακού βάρους της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης *rLdPIPh22*-GFP σε ομογενοποίηση κυττάρων HeLa μετά από επιμόλυνση με το πλασμίδιο pEGFP-*LdPIPh22* έγινε με ανοσοαποτύπωση Western (βλ. παράγραφο 3.15) είτε με αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης GFP [94], είτε έναντι της πρωτεΐνης *LdPIPh22* (από ορό ποντικού ή καθαρισμένο αντίσωμα από κουνέλι). Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη *rLdPIPh22*-GFP ανιχνεύτηκε να μεταναστεύει με φαινόμενο μοριακό βάρος γύρω στα 55-57 KDa που είναι και το αναμενόμενο μοριακό βάρος (29 KDa και 27 KDa για τις *LdPIPh22* και GFP αντίστοιχα), όπως φαίνεται και στην εικόνα 4.40. Με το αντι-GFP αντίσωμα η *LdPIPh22*-GFP ανιχνεύεται ως μία διπλέτα. Με το αντίσωμα αντι-*LdPIPh22* ενίοτε ανιχνεύεται και μία δεύτερη πρωτεϊνική ζώνη στα ~30 KDa που προφανώς αντιστοιχεί στην *LdPIPh22* που προκύπτει από πρωτεόλυση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης *rLdPIPh22*-GFP (εικόνα 4.40. Β, Γ). Η πρωτεΐνη αυτή δεν ανιχνεύεται με το αντι-GFP αντίσωμα (Β), το οποίο ανιχνεύει μία ζώνη κάτω από τα 30 KDa που προφανώς αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη GFP που προκύπτει ως προϊόν

πρωτεόλυσης της *LdPIPh22*-GFP. Η πρωτεΐνη GFP ανιχνεύεται επίσης σε κύτταρα που έχουν επιμολυνθεί με πλασμίδιο pEGFP-N3. Στην διαδρομή L στην εικόνα 4.40 (Γ), στην οποία έχουν αναλυθεί 20 μg πρωτεΐνης διαγονιδιακών παρασίτων *L.donovani*-*LdPIPh22*-mRFP (βλ. παράγραφο 4.6) ανιχνεύεται η *rLdPIPh22*-mRFP ως μία ζώνη με μία μικρή διαφορά στο μοριακό βάρος λόγω διαφοράς στα μοριακά βάρη των mRFP και GFP.



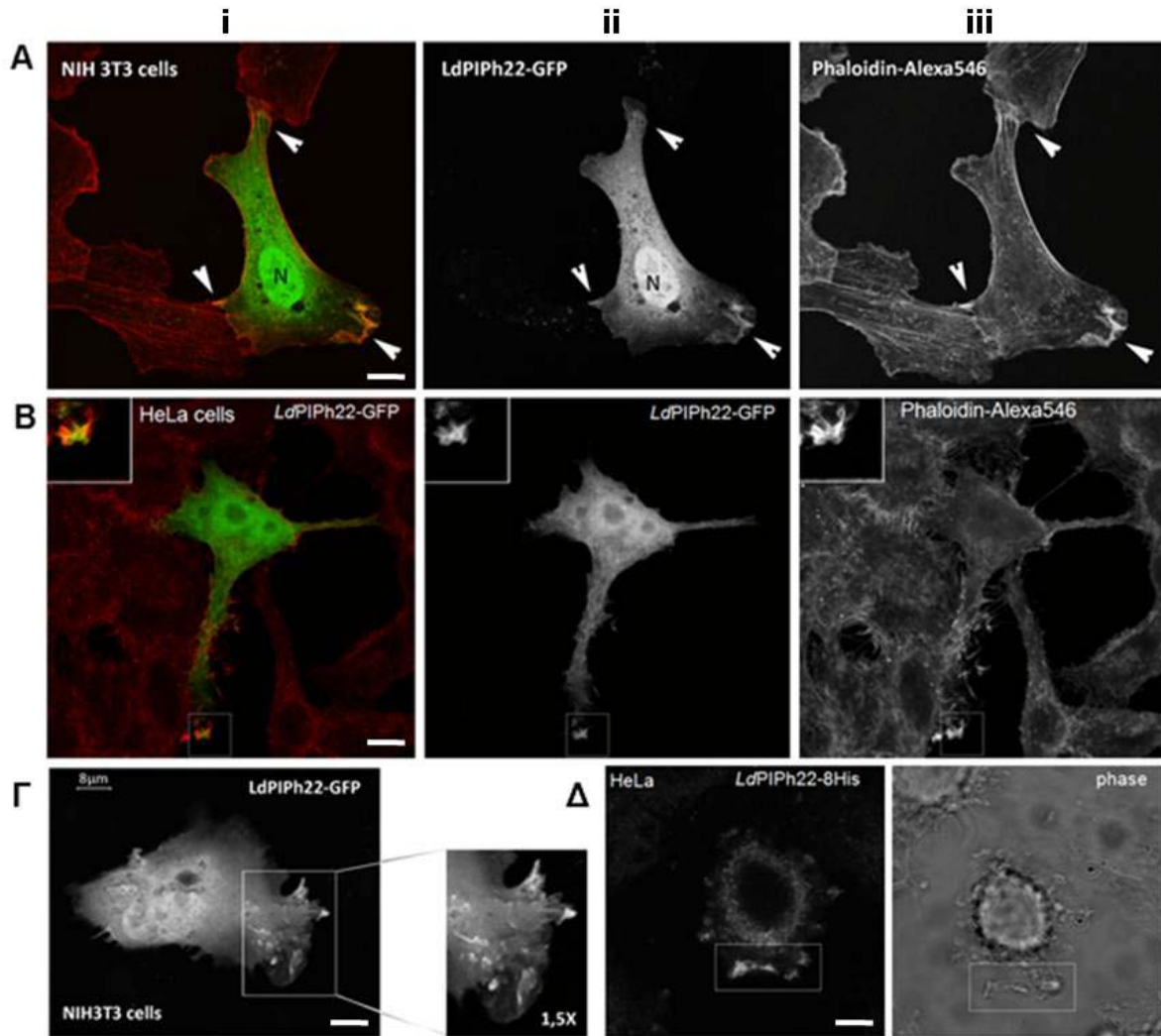
Εικόνα 4.40. Ανοσοαποτύπωση Western ομογενοποιημάτων κυττάρων HeLa μετά από επώαση της μεμβράνης με **A.** αντι-*LdPIPh22* ορό ποντικού σε αραιώση 1:500, **B.** αντι-*LdPIPh22* ορό ποντικού σε αραιώση 1:500 και αντι-GFP σε συγκέντρωση 0,2 μg/mL, **Γ.** αντι-*LdPIPh22* ορό ποντικού σε αραιώση 1:1000 και αντι-GFP σε συγκέντρωση 0,45 μg/mL, και στη συνέχεια με δεύτερο αντίσωμα έναντι ανοσοσφαιρινών ποντικού (anti-mouse) (**A**, **B**, **Γ**) ή έναντι ανοσοσφαιρινών κουνελιού (anti-rabbit) (**B**, **Γ**), αντίστοιχα, συζευγμένα με HRP. Η εμφάνιση των ζωνών έγινε με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας. Στα **1-3** έχει γίνει ανάλυση από ομογενοποίημα κυττάρων HeLa, **1)** που δεν έχουν υποστεί επιμόλυνση, **2)** μετά από επιμόλυνση με το φορέα έκφρασης pEGFP-N3, **3)** μετά από επιμόλυνση με το πλασμίδιο pEGFP-N3-*LdPIPh22*. Στη διαδρομή L έχει γίνει ανάλυση 20 μg πρωτεΐνης ομογενοποιημάτων των διαγονιδιακών παρασίτων *L.donovani*-*LdPIPh22*-mRFP

Θεωρούμε ότι οι ασθενείς ζώνες στις διαδρομές 1 και 2 της εικόνας 4.40 (Γ), που μετακινούνται στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου λίγο πιο αργά από την κύρια ζώνη της *LdPIPh22*-GFP στην ζώνη 3 της ίδιας εικόνας, ανιχνεύονται μη ειδικά από το αντι-

LdPIPh22 αντίσωμα. Στην εικόνα 4.40 (Γ,ii) διακρίνουμε τη ζώνη της πρωτεΐνης GFP στα κύτταρα που έχουν επιμολυνθεί με το πλασμίδιο *pEGFP-N3* (2) και το πλασμίδιο *pEGFP-N3-Ldriph22* (3). Η μικρή ποσότητα της GFP στην διαδρομή (3) οφείλεται προφανώς σε πρωτεόλυση της *rLdPIPh22-GFP* και επιβεβαιώνει την παρουσία της ελεύθερης *LdPIPh22* στη διαδρομή 3 της εικόνας 4.40 (διαδρομή Γ,i).

4.7.2 Εντοπισμός της *LdPIPh22* με έμμεσο ανοσοφθορισμό και μικροσκοπία φθορισμού

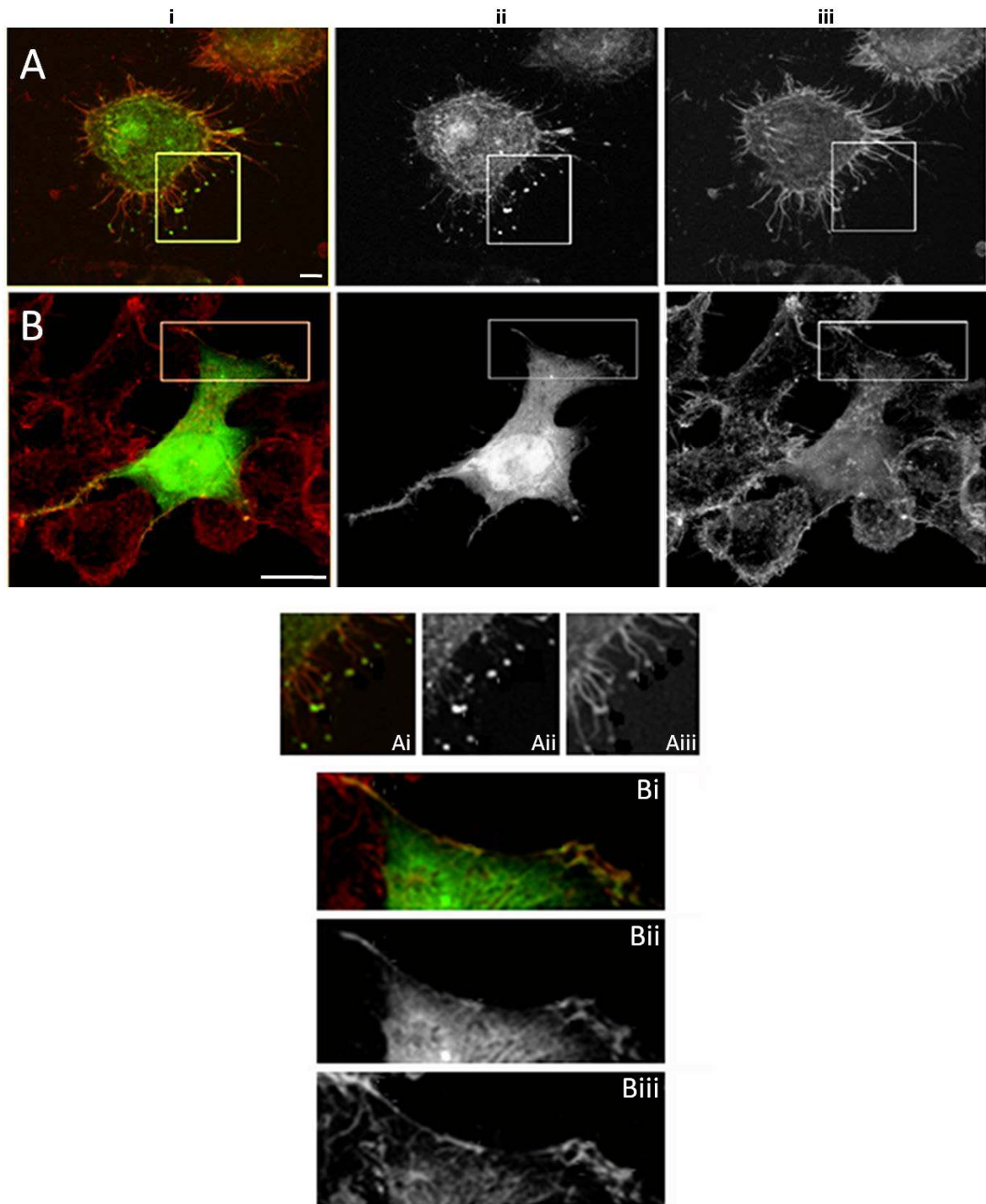
Ο υποκυτταρικός εντοπισμός της πρωτεΐνης *LdPIPh22* μελετήθηκε σε ετερόλογα κυτταρικά συστήματα από θηλαστικά με μικροσκοπία φθορισμού. Ο εντοπισμός της πρωτεΐνης *LdPIPh22* συγκεκριμένων υποκυτταρικών δομών θα οδηγήσει σε λογικές υποθέσεις σχετικά με τα μοριακά υποστρώματά της σε ανώτερα ευκαρυωτικά κύτταρα και, επομένως και τις πιθανές κυτταρικές λειτουργίες του θηλαστικού κυττάρου-ξενιστή, στις οποίες μπορεί να εμπλέκεται αυτό το ένζυμο. Η μελέτη έγινε αρχικά σε επιθηλιακά κύτταρα HeLa και στη συνέχεια στην κυτταρική σειρά ινοβλαστών από ποντίκι NIH3T3 (εικόνες 4.41 και 4.42) που είχαν επιμολυνθεί με τα πλασμίδια *pEGFP-N3-Ldriph22* ή *pTriex1.1-Ldriph22*. Τα κύτταρα των ινοβλαστών επιλέχθηκαν για να επιβεβαιωθεί ο εντοπισμός της *LdPIPh22* σε σημεία έντονου πολυμερισμού της ακτίνης, όπως φαίνεται στα επιθηλιακά κύτταρα HeLa, επειδή οι ινοβλάστες είναι μεγάλα κύτταρα, με εκτεταμένο δίκτυο του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Η ανάλυση έγινε 24 ώρες μετά την επιμόλυνση με συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού (βλ. παράγραφο 3.17). Στις εικόνες 4.41 και 4.42 έχει γίνει χρώση των κυττάρων με φαλοϊδίνη-Alexa 546 (*phalloidin-Alexa 546*) για σήμανση της ακτίνης (η φαλοϊδίνη προσδένεται στην πολυμερισμένη ακτίνη). Ο εντοπισμός της *LdPIPh22-GFP* έγινε με απεικόνιση του πράσινου φθορισμού της GFP ενώ της *LdPIPh22-8His* με ανοσοφθορισμό με χρήση του καθαρισμένου αντισώματος αντι-*LdPIPh22* από ορό κουνελιού (βλ. παραγράφους 3.18.1, 3.18.3 και 4.4) ή αντισώματος έναντι της ετικέτας των 8 ιστιδινών και δεύτερο πολυκλωνικό αντίσωμα συζευγμένο με την κόκκινη φθορίζουσα χρωστική Alexa 546 (εικόνα 4.41, Δ).



Εικόνα 4.41. Ετερόλογη έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης rLdPIPh22-GFP σε κύτταρα ινοβλαστών μυός NIH3T3 (**A**, **Γ**) και σε επιθηλιακά κύτταρα HeLa (**B**, **Δ**). Εντοπισμός της πρωτεΐνης με συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού. (**Aii**, **Bii**, **Γi**) Απεικόνιση του πράσινου φθορισμού της LdPIPh22-GFP. (**Aii**, **Bii**) απεικόνιση του κυτταροσκελετού της ακτίνης μετά από χρώση με φαλοϊδίνη συζευγμένη με τη χρωστική Alexa Fluor 546. **Δii**. Απεικόνιση της LdPIPh22-8His μετά από σήμανση με αντίσωμα έναντι της ετικέτας των 8 ιστιδινών (5 μg/mL), και δεύτερο πολυκλωνικό αντίσωμα συζευγμένο με την πράσινη φθορίζουσα χρωστική Alexa Fluor 488. **Δiii**. Αντίθεση φάσης του κυττάρου που απεικονίζεται στο Δii. (**Ai**, **Bi**). Έγχρωμη απεικόνιση της αλληλεπικάλυψης της χρώσης της GFP και της φαλοϊδίνης-Alexa546. Οι εικόνες του πράσινου και κόκκινου φθορισμού παρουσιάζονται ως ασπρόμαυρες για καλύτερη ευκρίνεια. Η περιοχή που περικλείεται στο πλαίσιο στην εικόνα Γ παρουσιάζεται δίπλα σε 1,5 X μεγέθυνση. Scale bar: 8 μm

Όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 4.41, η πρωτεΐνη εντοπίζεται σε περιοχές του κυττάρου όπου υπάρχει έντονος πολυμερισμός της ακτίνης π.χ. νηματοπόδια (filopodia), ελασματοπόδια (lamellipodia) (**B**, **Γ**, περιοχές μεγεθυμένες 1,5X σε πλαίσιο), προεκβολές μετώπου και οδηγά άκρα (leading edges) (**B**, **Δ**, περιοχές σε πλαίσιο και **A**, βέλη), καθώς και σε σημεία κυτταρικής προσκόλλησης (cell adhesion

points) (**A**, βέλη). Παρόμοιος εντοπισμός παρατηρείται και στην εικόνα 4.42 (περιοχές μεγεθυμένες 3X σε πλαίσιο και μικρά βέλη)



Εικόνα 4.42. Ετερόλογη έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης *rLdPIPh22-GFP* σε επιθηλιακά κύτταρα HeLa και εντοπισμός της με συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού. **i.** Η αλληλεπικάλυψη της χρώσης της φθορίζουσας πρωτεΐνης GFP και της ακτίνης (Φαλοΐδίνη-Alexa 546). **ii.** Χρώση της *LdPIPh22-GFP*. **iii.** Χρώση της φαλοΐδίνης (ακτίνη). **Ai, Aii, Aiii** και **Bi, Bii, Biii** Τα τμήματα των κυττάρων εντός πλαισίου σε μεγέθυνση 3X. Scale bar: 8 μm (**A**), 20 μm (**B**)

Σε κύτταρα που έχουν επιμολυνθεί με το πλασμίδιο pEGFP-N3-*LdPIPh22* παρατηρείται εντοπισμός της *LdPIPh22*-GFP και στον πυρήνα. Στα κύτταρα όμως που επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο pTriex1.1-*LdPIPh22* και εκφράζουν την *LdPIPh22*-8His δεν παρατηρείται, με έμμεσο ανοσοφθορισμό, εντοπισμός της πρωτεΐνης στον πυρήνα (εικόνα 4.41, Δ). Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι η χρώση αυτή οφείλεται σε ελεύθερα μόρια GFP που προκύπτουν από πρωτεόλυση της *LdPIPh22*-GFP, όπως συνηγορεί και η ανοσοαποτύπωση Western σε ολικό ομογενοποίημα κυττάρων HeLa επιμολυσμένων με το πλασμίδιο pEGFP-*LdPIPh22* (εικόνα 4.41, Γα).

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η φωσφορυλίωση και η αποφωσφορυλίωση πρωτεϊνών αποτελούν ζωτικής σημασίας βιοχημικές αντιδράσεις του κυττάρου και πραγματοποιούνται από κινάσες και φωσφατάσες αντίστοιχα. Τα ένζυμα αυτά αποτελούν ήδη στόχους φαρμάκων στη θεραπεία διαφόρων ασθενειών, όπως στον καρκίνο και στο διαβήτη [46, 47], και είναι πιθανό να αποτελέσουν στόχους φαρμάκων και σε ασθένειες που προκαλούνται από παθογόνους μικροοργανισμούς, όπως βακτήρια και πρωτόζωα. Είναι γνωστό ότι βακτηριακές φωσφατάσες συμμετέχουν στη μολυσματικότητα παθογόνων μικροοργανισμών και αποτελούν ήδη στόχους φαρμάκων που δρουν ως αναστολείς τους. Ένα πρόσφατο σχετικό παράδειγμα είναι μία φωσφατάση τριπλής εξειδίκευσης (αποφωσφορυλιώνει κατάλοιπα φωσφοτυροσίνης, φωσφοσερίνης / φωσφοθρεονίνης και φωσφοϊννοσιτίδια) του παθογόνου βακτηρίου *Mycobacterium tuberculosis* [79]. Με βάση μία αλληλουχία του καταλυτικού κέντρου του συγκεκριμένου ενζύμου (περιοχή βρόγχου P) έχουν αναγνωριστεί αντίστοιχες φωσφατάσες και σε άλλα παθογόνα βακτήρια, όπως τα *Listeria monocytogenes*, *Yersinia pestis* και *Bacillus anthracis*. Στο βακτήριο *Listeria monocytogenes* η φωσφατάση με την ομόλογη αλληλουχία με αυτή του *M. tuberculosis* ονομάζεται LipA, είναι διπλής εξειδίκευσης (αποφωσφορυλιώνει κατάλοιπα φωσφοτυροσίνης και φωσφοϊννοσιτίδια) και συμμετέχει στην παθογένεια του βακτηρίου [54].

Με μία *in silico* μελέτη από τους Beresford et al [81], ταυτοποιήθηκε, το 2010, αυτή η οικογένεια φωσφατασών με τη χαρακτηριστική αλληλουχία της περιοχής του βρόγχου P στο καταλυτικό τους κέντρο σε βακτήρια και κατώτερα ευκαρυωτικά κύτταρα. Οι φωσφατάσες αυτές, που ονομάστηκαν άτυπες φωσφατάσες λιπιδίων (ALP), απαντώνται και σε παρασιτικά πρωτόζωα του γένους *Leishmania*. Σημαντικό χαρακτηριστικό αυτών των ενζύμων είναι ότι δεν υπάρχουν ανθρώπινες ομόλογες πρωτεΐνες, γεγονός που τις καθιστά πιθανούς μοριακούς στόχους φαρμάκων. Σκοπός της εργασίας αυτής ήταν να μελετηθεί η ομόλογη πρωτεΐνη (με τη χαρακτηριστική αλληλουχία βρόγχου P) του παρασίτου *Leishmania donovani* που προκαλεί σπλαχνική Λεϊσμανίαση στον άνθρωπο [1]. Η δεύτερη πρωτεΐνη με την ίδια χαρακτηριστική αλληλουχία που υπάρχει στη βιβλιογραφία [65] μελετάται στο εργαστήριό μας, αλλά βρίσκεται ακόμη στο στάδιο της κλωνοποίησης.

Βιοπληροφορική ανάλυση της θεωρητικής αλληλουχίας της πρωτεΐνης που ανακτήθηκε από τη βάση δεδομένων TriTryp (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>)

υποδεικνύει ότι η πρωτεΐνη αυτή παρουσιάζει πολύ υψηλή ομοιότητα στην αμινοξική της αλληλουχία, 85-99%, με τις ορθόλογες πρωτεΐνες από αρκετά είδη του παρασίτου (*L. infantum*, *L. major*, *L. mexicana*, *L. tarentolae*) με 95% ομοιότητα με την πρωτεΐνη από το παράσιτο *L. major* που έχει δειχθεί από τους Beresford et al. 2010 [81] ότι παρουσιάζει δράση φωσφατάσης. Τα δεδομένα αυτά της βιοπληροφορικής ανάλυσης υποδεικνύουν ότι η συγκεκριμένη φωσφατάση είναι συντηρημένη στα διάφορα είδη του παρασίτου, και πιθανόν αποτελεί μόριο απαραίτητο για τη ζωή ή/και τη μολυσματικότητά του. Ακόμη, η αλληλουχία της περιοχής του βρόγχου P του καταλυτικού κέντρου της πρωτεΐνης βρέθηκε να είναι ταυτόσημη με την αντίστοιχη αλληλουχία πρωτεϊνών από τα παθογόνα βακτήρια *L. monocytogenes* και *M. tuberculosis*. Οι βακτηριακές αυτές πρωτεΐνες παρουσιάζουν δράση φωσφατάσης διπλής και τριπλής εξειδίκευσης αντίστοιχα και συντελούν στην παθογένεια των συγκεκριμένων βακτηρίων μέσω έκκρισης στο κύτταρο ξενιστή και εμπλοκής τους στον μεταβολισμό συγκεκριμένων φωσφοϊνोσιτιδίων ή στην φωσφορυλίωση πρωτεϊνικών υποστρωμάτων του μολυσμένου κυττάρου. Επίσης, η πρωτεΐνη *LdPIPh22* του παρασίτου *L. donovani* έχει ομόλογα ένζυμα και σε άλλα βακτήρια με υψηλότερη ομολογία στις πρωτεΐνες από τα παθογόνα βακτήρια *L. monocytogenes* (29% και 24% ομοιότητα με δύο διαφορετικές αλληλουχίες φωσφατασών) και *B. anthracis* (25% ομοιότητα).

Στην παρούσα εργασία, αρχικά μελετήθηκε η δραστικότητα φωσφατάσης μίας μορφής της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης *LdPIPh22* με έκφραση και παραγωγή της σε βακτήρια. Η μορφή αυτή (*rN15LdPIPh22-8His*) έχει στο καρβοξυτελικό άκρο μία ετικέτα 8 καταλοίπων ιστιδίνης και στο αμινοτελικό άκρο ένα πρόσθετο πεπτίδιο 15 αμινοξέων. Η ετικέτα 8His διευκολύνει την απομόνωσή της με χρωματογραφία υψηλής συγγένειας και το πεπτίδιο στο αμινοτελικό άκρο προσθέτει διαλυτότητα στην ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη έτσι, ώστε να μπορούμε να την απομονώσουμε από το διαλυτό κλάσμα βακτηριακού ομογενοποιημένου.

Η *rN15LdPIPh22-8His* βρέθηκε να υδρολύει το υπόστρωμα p-νιτροφαινυλοφωσφορικό ανιόν με δραστικότητα αντίστοιχη με τη δημοσιευμένη για την ανασυνδυασμένη ορθόλογη πρωτεΐνη από το παράσιτο *L. major* [81]. Η δραστικότητα φωσφατάσης θα ελεγχθεί σαν συνέχεια αυτής της μελέτης με άλλα υποστρώματα (φωσφοπεπτίδια και φωσφοϊνοσιτίδια), ώστε να χαρακτηριστεί η εξειδίκευσή της.

Παράλληλα, επιβεβαιώθηκε βιοχημικά η έκφραση της ενδογενούς πρωτεΐνης *LdPIPh22* στα παράσιτα *L. donovani* με ανοσοαποτύπωση Western και ειδικό πολυκλωνικό αντίσωμα που παρασκευάστηκε στο πλαίσιο αυτής της εργασίας έναντι της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης rN15*LdPIPh22*-8His. Για να επιτευχθεί αυτό, λόγω του ότι τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης είναι χαμηλά, χρειάστηκε να καταφύγουμε σε βιοχημική κλασμάτωση του συνόλου των πρωτεϊνών μεγάλης καλλιέργειας παρασίτων βάσει πρωτοκόλλου που διαχωρίζει διαλυτές, μεμβρανικές και κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η *LdPIPh22* υπάρχει σε διαλυτή αλλά και σε άλλες μορφές, προσκολλημένη σε μεμβράνες και στον κυτταροσκελετό. Αυτό επιβεβαιώθηκε και για την ανασυνδυασμένη r*LdPIPh22*-mRFP σε διαγονιδιακά παράσιτα *L. donovani* και *L. tarentolae* που την εκφράζουν. Τα αποτελέσματα αυτά έχουν εξαιρετικό ενδιαφέρον αφού η *LdPIPh22* δεν διαθέτει διαμεμβρανικές περιοχές που να την αγκυροβολούν σε μεμβράνες. Αξίζει να διερευνηθεί αν η *LdPIPh22* υφίσταται μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις που προσθέτουν λιπαρά οξέα σε συγκεκριμένα αμινοξέα της που θα μπορούσαν να δράσουν σαν μεμβρανικές άγκυρες (π.χ. μυριστιλίωση, πρενυλίωση ή παλμιτιλίωση, [95], [96-98]). Συγκεκριμένα, η παλμιτιλίωση είναι αμφίδρομη μεταμεταφραστική τροποποίηση που χρησιμοποιείται από τα κύτταρα για να αλλάξουν τον εντοπισμό και τη θέση δράσης μίας πρωτεΐνης καθώς και την αλληλεπίδρασή της με άλλες πρωτεΐνες [99, 100]. Γίνεται συνήθως στο καρβοξυτελικό άκρο σε κατάλοιπα κυστεΐνης και λιγότερο σερίνης και θρεονίνης. Είναι ενδιαφέρον ότι τα 5 τελευταία αμινοξέα στο καρβοξυτελικό άκρο της *LdPIPh22* είναι μία θρεονίνη και 4 σερίνες και αξίζει να διερευνηθεί αρχικά *in vitro* αν η πρωτεΐνη υφίσταται παλμιτιλίωση.

Ως ολοκλήρωση της βιοχημικής μελέτης κατανομής της *LdPIPh22*, έγινε έλεγχος για το αν η πρωτεΐνη εκκρίνεται στο υπερκείμενο καλλιέργειας εργαστηριακού στελέχους του παρασίτου *L. donovani*. Με το ειδικό αντίσωμα κατά της *LdPIPh22* ανιχνεύουμε μία πρωτεΐνη με μοριακό βάρος ~30KDa, αλλά και ~60 KDa, διπλάσιο από αυτό της *LdPIPh22*, που θα μπορούσε να αντιπροσωπεύει διμερισμένη πρωτεΐνη *LdPIPh22*. Τα πειράματα συνεχίζονται για επαλήθευση και περαιτέρω διερεύνηση, των πρώτων ενδείξεων που συνηγορούν στην έκκριση της πρωτεΐνης *LdPIPh22*. Αν αυτό ισχύει, ο εντοπισμός σημαντικού μέρους της ολικής πρωτεΐνης *LdPIPh22* σε μεμβρανικά κλάσματα του παρασίτου θα μπορούσε να ερμηνεύεται ως πακετάρισμα της σε εξωσώματα προς έκκριση [53]. Επειδή αυτό αποτελεί εξαιρετικά σημαντική

πληροφορία για τη λειτουργία της πρωτεΐνης *LdPIPh22* στη φάση ζωής του παρασίτου μέσα στα μακροφάγα του θηλαστικού ξενιστή, ένας αριθμός πειραμάτων έχει σχεδιαστεί για να επιβεβαιωθούν τα αρχικά αυτά αποτελέσματα.

Η μελέτη εντοπισμού της *LdPIPh22* συνεχίστηκε με ανοσοφθορισμό και απεικόνιση με μικροσκοπία φθορισμού της ενδογενούς *LdPIPh22* σε παράσιτα *L. donovani* αγρίου τύπου, αλλά και της ανασυνδυασμένης υβριδικής πρωτεΐνης *rLdPIPh22-mRFP*, με τη βοήθεια της κόκκινης φθορίζουσας πρωτεΐνης, σε διαγονιδιακά παράσιτα. Η ενδογενής *LdPIPh22* εντοπίστηκε κυρίως στο σώμα του παρασίτου και ελάχιστα στο μαστίγιο (στική κατανομή), ενώ η ανασυνδυασμένη εντοπίστηκε κυρίως στο σώμα, όπως η ενδογενής, αλλά και στο μαστίγιο του παρασίτου. Στο σώμα του παρασίτου, η *LdPIPh22* είναι κυτταροπλασματική, παρουσιάζοντας στικό περιπυρηνικό εντοπισμό, ενώ απουσιάζει από τον πυρήνα. Εντοπίζεται, επίσης, στην περιοχή έκφυσης του μαστιγίου και φαίνεται να περιβάλλει ενδοκυτταρικά κυστίδια. Ακόμη, η πρωτεΐνη φαίνεται να συγκεντρώνεται σε δομές που μοιάζουν με αυτές της ακτίνης, κάτι που συμφωνεί με τη βιοχημική ανίχνευση της πρωτεΐνης στο κυτταροσκελετικό κλάσμα των πρωτεϊνών του παρασίτου και πειράματα έχουν σχεδιαστεί για να μελετηθεί η πρόσδεσή της στον κυτταροσκελετό της παρασιτικής ακτίνης. Τα μέχρι τώρα αποτελέσματά μας δε δείχνουν συνεντοπισμό με τον κυτταροσκελετό της τουμπουλίνης που θα συνηγορούσε σε πιθανή πρόσδεση σε αυτό το τμήμα του κυτταροσκελετού.

Ο υποκυτταρικός εντοπισμός της *LdPIPh22* μελετήθηκε και σε ετερόλογα συστήματα κυτταρικών σειρών από θηλαστικά. Μελέτη του εντοπισμού των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών *rLdPIPh22-GFP* και *rN15LdPIPh22-8His* με μικροσκοπία φθορισμού και ανοσοφθορισμό σε επιθηλιακά κύτταρα (HeLa) και σε ινοβλάστες (NIH3T3) έδειξε ότι οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες βρίσκονται σε σημεία των κυττάρων που υπάρχει έντονος πολυμερισμός της ακτίνης, όπως είναι τα νηματοπόδια (filopodia), τα ελασματοπόδια (lamellipodia), οι προεκβολές μετώπου, τα οδηγά άκρα (leading edges) και τα σημεία κυτταρικής προσκόλλησης (cell adhesion). Σε όλα αυτά τα σημεία του πολυμερισμού και αποπολυμερισμού της ακτίνης έχουν σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο τα φωσφοϊνοσιτίδια [101, 102]. Τα αποτελέσματα αυτά μας οδηγούν στην υπόθεση ότι η *LdPIPh22* μπορεί να έχει δράση φωσφατάσης φωσφοϊνοσιτιδίων και η παρουσία της σε αυτές τις κυτταρικές περιοχές να οφείλεται σε βιοχημική αναγνώριση συγκεκριμένων φωσφοϊνοσιτιδίων. Το χρονικό πλαίσιο αυτής της

μελέτης δεν επέτρεψε τη διερεύνηση αυτού του ερωτήματος αλλά τα πειράματα έχουν σχεδιαστεί και θα εκτελεστούν στο εγγύς μέλλον.

Τα μοριακά εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν στις τεχνικές που αναφέρθηκαν, όπως και τα διαγονιδιακά παράσιτα και τα αντισώματα για την ανίχνευση της πρωτεΐνης, παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας. Επίσης, δημιουργήθηκαν πρωτόκολλα σύμφωνα με τις ανάγκες και τις δυσκολίες των πειραμάτων, όπως για την έκφραση της πρωτεΐνης στο διαλυτό κλάσμα κυττάρων *E. coli* και την ανίχνευση της πρωτεΐνης σε πρωτεϊνικό ομογενοποίημα παρασίτων *L. donovani*, μετά από κλασμάτωση του συνόλου των πρωτεϊνών με χρήση διγιτονίνης και εμπλουτισμό συγκεκριμένων κλασμάτων στην πρωτεΐνη *LdPIPh22*.

Η πειραματική αυτή εργασία έχει δημιουργήσει τις βάσεις και τα μοριακά εργαλεία για τον πλήρη χαρακτηρισμό της ενζυμικής δράσης της πρωτεΐνης *LdPIPh22* και την περαιτέρω μελέτη των λειτουργικών ιδιοτήτων της καθώς και της σημασίας της για την μολυσματικότητα του παρασίτου. Οι μελέτες αυτές θα απαντήσουν για το αν η *LdPIPh22* μπορεί να θεωρηθεί πιθανός στόχος για μελέτες που αφορούν σε έλεγχο ουσιών-αναστολέων φωσφατάσης για αξιοποίησή τους σε σχήματα αντι-λεϊσμανικής θεραπείας.

6. ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ-ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους

LdPIPh22	Φωσφατάση φωσφοϊνοσιτιδίων στο χρωμόσωμα 22 του παρασίτου <i>Leishmania donovani</i>
MptpB	Πρωτεϊνική φωσφατάση τυροσίνης B του βακτηρίου <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
DSP	Λιπιδικές φωσφατάσες διπλής εξειδίκευσης
aDSP	Μη τυπικές λιπιδικές φωσφατάσες διπλής εξειδίκευσης
PTP	Πρωτεϊνική φωσφατάση τυροσίνης
PtdIns	Φωσφατιδυλοϊνοσιτόλες
PI	Φωσφοϊνοσιτίδιο
ALP	Μη τυπικές φωσφατάσες λιπιδίων
EDTA	Αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ
SDS	Δωδεκακυλοθειικό νάτριο
Tris-HCl	Τρις-υδρολαρυμινομεθάνιο
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
Kb	Χίλια ζεύγη βάσεων
bp	Ζεύγη βάσεων
BSA	Αλβουμίνη βοδινού ορού
BGG	γ-σφαιρίνη βοδινού ορού
IgG	γ-ανοσοσφαιρίνη
LB	Θρεπτικό μέσο Luria-Bertani
IPTG	Ισοπροπυλο-β-D-1-θειογαλακτοπυρανόζη

NTA	N,N-δικαρβοξυ-μεθυλο-γλυκίνη
pNPP, pNP	p-νιτροφαινυλοφωσφορικό ανιόν, p-νιτροφαινόλη
DAB	3',3'-διαμινοβενζιδίνη
GFP	Πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη
mRFP	Μονομερής κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη
dNTP	Τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια
HRP	Υπεροξειδάση horseradish
anti-rabbit	Αντίσωμα έναντι ορού κουνελιού
anti-mouse	Αντίσωμα έναντι ορού ποντικού

Συντμήσεις αμινοξέων και ανάπτυξή τους

A, Ala	αλανίνη
C, Cys	κυστεΐνη
D, Asp	ασπαραγινικό οξύ
E, Glu	γλουταμινικό οξύ
F, Phe	φαινυλαλανίνη
G, Gly	γλυκίνη
H, His	ιστιδίνη
I, Ile	ισολευκίνη
K, Lys	λυσίνη
L, Leu	λευκίνη
M, Met	μεθειονίνη
N, Asn	ασπαραγίνη

P, Pro	προλίνη
Q, Gln	γλουταμίνη
R, Arg	αργινίνη
S, Ser	σερίνη
T, Thr	θρεονίνη
V, Val	βαλίνη
W, Trp	τρυπτοφάνη
Y, Tyr	τυροσίνη

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Herwaldt, B.L., *Leishmaniasis*. The Lancet, 1999. **354**(9185): p. 1191-1199.
2. WHO. 2013; Available from: <http://www.who.int/en/>.
3. Boité, M.C., et al., *New Insights on Taxonomy, Phylogeny and Population Genetics of <italic>Leishmania (Viannia)</italic> Parasites Based on Multilocus Sequence Analysis*. PLoS Negl Trop Dis, 2012. **6**(11): p. e1888.
4. Dujardin, J.C., et al., *Spread of vector-borne diseases and neglect of Leishmaniasis, Europe*. Emerg Infect Dis, 2008. **14**(7): p. 1013-8.
5. Ashford, R.W., *The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses*. International Journal for Parasitology, 2000. **30**(12–13): p. 1269-1281.
6. Lukeš, J., et al., *Evolutionary and geographical history of the Leishmania donovani complex with a revision of current taxonomy*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007. **104**(22): p. 9375-9380.
7. Arias, J.R., P.S. Monteiro, and F. Zicker, *The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil*. Emerg Infect Dis, 1996. **2**(2): p. 145-6.
8. Nasereddin, A., et al., *Molecular Fingerprinting of Leishmania infantum Strains following an Outbreak of Visceral Leishmaniasis in Central Israel*. Journal of Clinical Microbiology, 2005. **43**(12): p. 6054-6059.
9. Guan, L.R., X.P. Zuo, and Yimamu, *[Reemergence of visceral leishmaniasis in Kashi Prefecture, Xinjiang]*. Zhongguo ji sheng chong xue yu ji sheng chong bing za zhi = Chinese journal of parasitology & parasitic diseases, 2003. **21**(5): p. 285.
10. Desjeux, P., *The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 2001. **95**(3): p. 239-243.
11. Desjeux, P., *Leishmaniasis: current situation and new perspectives*. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 2004. **27**(5): p. 305-318.
12. Wolday, D., et al., *Emerging Leishmania/HIV co-infection in Africa*. Medical Microbiology and Immunology, 2001. **190**(1-2): p. 65-67.
13. Milon, G., *Perpetuation of Leishmania: some novel insight into elegant developmental programs*. Vet Res, 2009. **40**(2): p. 38.
14. Hervas Rodriguez, J., et al., *Leishmania infection of canine skin fibroblasts in vivo*. Vet Pathol, 1996. **33**(4): p. 469-73.
15. Chang, K.P. and D.M. Dwyer, *Multiplication of a human parasite (Leishmania donovani) in phagolysosomes of hamster macrophages in vitro*. Science, 1976. **193**(4254): p. 678-80.
16. Killick-Kendrick, R., D.H. Molyneux, and R.W. Ashford, *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, 1974. **187**(1089): p. 409-19.

17. Englund, P.T., *Kinetoplast DNA*. In: *Biochemistry and Physiology of Protozoa*, ed. L.P.a.M.L. (S.H. Hutner, eds.). Vol. 4, 2nd edition. 1981, New York: Academic Press, New York.
18. Besteiro, S., et al., *Protein turnover and differentiation in Leishmania*. International Journal for Parasitology, 2007. **37**(10): p. 1063-1075.
19. Χαραλάμπους, Χ., *Γονοτυπικός προσδιορισμός ειδών και υποειδών του παρασίτου Leishmania*, in *Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ). Σχολή Επιστημών Υγείας. Τμήμα Ιατρικής. Τομέας Κλινικοεργαστηριακός. Εργαστήριο Μικροβιολογίας* 2007, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών: Αθήνα, Ελλάδα.
20. K. Nussbaum, J.H., C. M. C.v.C. Cadmus and T. Efferth *Trypanosomatid parasites causing neglected diseases*. Current Medicinal Chemistry. Vol. 17. 2010, Germany: Institute of Pharmacy and Molecular Biotechnology, Ruprecht-Karls University Heidelberg. 24.
21. Moradin, N. and A. Descoteaux, *Leishmania promastigotes: building a safe niche within macrophages*. Front Cell Infect Microbiol, 2012. **2**: p. 121.
22. B. Alberts, D.B., A. Johnson, N. Lewis, M. Raff, K. Roberts and P. Walter, *Essential Cell Biology: An Introduction to the Molecular Biology of the Cell*. 1998, New York: Garland Publishing Inc.
23. Aderem, A. and D.M. Underhill, *Mechanisms of phagocytosis in macrophages*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 593-623.
24. Steinberg, B.E. and S. Grinstein, *Pathogen destruction versus intracellular survival: the role of lipids as phagosomal fate determinants*. The Journal of Clinical Investigation, 2008. **118**(6): p. 2002-2011.
25. Mukkada, A.J., et al., *Enhanced metabolism of Leishmania donovani amastigotes at acid pH: an adaptation for intracellular growth*. Science, 1985. **229**(4718): p. 1099-101.
26. Mauel, J., *Mechanisms of survival of protozoan parasites in mononuclear phagocytes*. Parasitology, 1984. **88**(04): p. 579-592.
27. Desjardins, M. and A. Descoteaux, *Survival strategies of Leishmania donovani in mammalian host macrophages*. Research in Immunology, 1998. **149**(7-8): p. 689-692.
28. Lodge, R. and A. Descoteaux, *Phagocytosis of Leishmania donovani amastigotes is Rac1 dependent and occurs in the absence of NADPH oxidase activation*. Eur J Immunol, 2006. **36**(10): p. 2735-44.
29. Descoteaux, A. and S.J. Turco, *Glycoconjugates in Leishmania infectivity*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1455**(2-3): p. 341-52.
30. Sudhandiran, G. and C. Shaha, *Antimonial-induced Increase in Intracellular Ca²⁺ through Non-selective Cation Channels in the Host and the Parasite Is Responsible for Apoptosis of Intracellular Leishmania donovani Amastigotes*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(27): p. 25120-25132.
31. Sereno, D., et al., *Antimonial-mediated DNA fragmentation in Leishmania infantum amastigotes*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(7): p. 2064-9.

32. Pink, R., et al., *Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery*. Nat Rev Drug Discov, 2005. **4**(9): p. 727-40.
33. Czub, M.B.a.J., *Amphotericin B and Its New Derivatives – Mode of Action*. Vol. 10. 2009, Gdansk, Poland: Department of Pharmaceutical Technology, and Biochemistry, Faculty of Chemistry, Gdansk University of Technology. 11.
34. Laniado-Laborin, R. and M.N. Cabrales-Vargas, *Amphotericin B: side effects and toxicity*. Rev Iberoam Micol, 2009. **26**(4): p. 223-7.
35. Croft, S.L., S. Sundar, and A.H. Fairlamb, *Drug Resistance in Leishmaniasis*. Clinical Microbiology Reviews, 2006. **19**(1): p. 111-126.
36. Bunney, T.D. and M. Katan, *PLC regulation: emerging pictures for molecular mechanisms*. Trends in Biochemical Sciences, 2011. **36**(2): p. 88-96.
37. Alvar, J., S. Yactayo, and C. Bern, *Leishmaniasis and poverty*. Trends Parasitol, 2006. **22**(12): p. 552-7.
38. Croft, S.L., S. Sundar, and A.H. Fairlamb, *Drug resistance in leishmaniasis*. Clin Microbiol Rev, 2006. **19**(1): p. 111-26.
39. Croft, S.L., K. Seifert, and V. Yardley, *Current scenario of drug development for leishmaniasis*. Indian J Med Res, 2006. **123**(3): p. 399-410.
40. Cohen, P., *Protein kinases the major drug targets of the twenty-first century?* Nat Rev Drug Discov, 2002. **1**(4): p. 309-315.
41. McConnell, J.L. and B.E. Wadzinski, *Targeting Protein Serine/Threonine Phosphatases for Drug Development*. Molecular Pharmacology, 2009. **75**(6): p. 1249-1261.
42. Canduri, F., et al., *Protein kinases as targets for antiparasitic chemotherapy drugs*. Curr Drug Targets, 2007. **8**(3): p. 389-98.
43. Chakravarty, J. and S. Sundar, *Drug resistance in leishmaniasis*. J Glob Infect Dis, 2010. **2**(2): p. 167-76.
44. Roy, J. and M.S. Cyert, *Cracking the Phosphatase Code: Docking Interactions Determine Substrate Specificity*. Sci. Signal., 2009. **2**(100): p. re9-.
45. Slupe, A.M., R.A. Merrill, and S. Strack, *Determinants for Substrate Specificity of Protein Phosphatase 2A*. Enzyme Res, 2011. **2011**: p. 398751.
46. Zhang, Z.Y., *Protein tyrosine phosphatases: structure and function, substrate specificity, and inhibitor development*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2002. **42**: p. 209-34.
47. Shi, Y., *Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure*. Cell, 2009. **139**(3): p. 468-84.
48. McParland, V., et al., *The metastasis-promoting phosphatase PRL-3 shows activity toward phosphoinositides*. Biochemistry, 2011. **50**(35): p. 7579-90.
49. McConville, M.J., et al., *Secretory Pathway of Trypanosomatid Parasites*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2002. **66**(1): p. 122-154.
50. Overath, P., Y.-D. Stierhof, and M. Wiese, *Endocytosis and secretion in trypanosomatid parasites Tumultuous traffic in a pocket*. Trends in cell biology, 1997. **7**(1): p. 27-33.

51. Bates, P.A. and D.M. Dwyer, *Biosynthesis and secretion of acid phosphatase by Leishmania donovani promastigotes*. Mol Biochem Parasitol, 1987. **26**(3): p. 289-96.
52. Rogers, M.E., et al., *Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG*. Nature, 2004. **430**(6998): p. 463-7.
53. Silverman, J.M., et al., *Proteomic analysis of the secretome of Leishmania donovani*. Genome Biology, 2008. **9**(2): p. R35.
54. Kastner, R., et al., *LipA, a tyrosine and lipid phosphatase involved in the virulence of Listeria monocytogenes*. Infect Immun, 2011. **79**(6): p. 2489-98.
55. Wong, D., J.D. Chao, and Y. Av-Gay, *Mycobacterium tuberculosis-secreted phosphatases: from pathogenesis to targets for TB drug development*. Trends in microbiology, 2013. **21**(2): p. 100-109.
56. Brenchley, R., et al., *The TriTryp phosphatome: analysis of the protein phosphatase catalytic domains*. BMC Genomics, 2007. **8**: p. 434.
57. Sobhia, M.E., et al., *Protein tyrosine phosphatase inhibitors: a patent review (2002 - 2011)*. Expert Opin Ther Pat, 2012. **22**(2): p. 125-53.
58. Heneberg, P., *Use of protein tyrosine phosphatase inhibitors as promising targeted therapeutic drugs*. Curr Med Chem, 2009. **16**(6): p. 706-33.
59. Sadatomi, D., et al., *Atypical protein phosphatases: emerging players in cellular signaling*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(3): p. 4596-612.
60. Wei, W., et al., *Dual-specificity phosphatases 2: surprising positive effect at the molecular level and a potential biomarker of diseases*. Genes Immun, 2013. **14**(1): p. 1-6.
61. Shio, M.T. and M. Olivier, *Editorial: Leishmania survival mechanisms: the role of host phosphatases*. J Leukoc Biol, 2010. **88**(1): p. 1-3.
62. Mueller-Roeber, B. and C. Pical, *Inositol phospholipid metabolism in Arabidopsis. Characterized and putative isoforms of inositol phospholipid kinase and phosphoinositide-specific phospholipase C*. Plant Physiol, 2002. **130**(1): p. 22-46.
63. Brown, J.R. and K.R. Auger, *Phylogenomics of phosphoinositide lipid kinases: perspectives on the evolution of second messenger signaling and drug discovery*. BMC Evol Biol, 2011. **11**: p. 4.
64. Clement, S., et al., *The lipid phosphatase SHIP2 controls insulin sensitivity*. Nature, 2001. **409**(6816): p. 92-97.
65. Sleeman, M.W., et al., *Absence of the lipid phosphatase SHIP2 confers resistance to dietary obesity*. Nat Med, 2005. **11**(2): p. 199-205.
66. Galli, S.J. and M. Tsai, *Mast cells in allergy and infection: Versatile effector and regulatory cells in innate and adaptive immunity*. European Journal of Immunology, 2010. **40**(7): p. 1843-1851.
67. Takeshita, S., et al., *SHIP-deficient mice are severely osteoporotic due to increased numbers of hyper-resorptive osteoclasts*. Nat Med, 2002. **8**(9): p. 943-9.

68. Severin, S., et al., *Deficiency of Src homology 2 domain-containing inositol 5-phosphatase 1 affects platelet responses and thrombus growth*. J Clin Invest, 2007. **117**(4): p. 944-52.
69. Dyson, J.M., et al., *Phosphoinositide phosphatases: just as important as the kinases*. Subcell Biochem, 2012. **58**: p. 215-79.
70. Lo, T.C.T., et al., *Inactivation of SHIP1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia due to mutation and extensive alternative splicing*. Leukemia Research, 2009. **33**(11): p. 1562-1566.
71. Majerus, P.W., M.V. Kisseleva, and F.A. Norris, *The Role of Phosphatases in Inositol Signaling Reactions*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(16): p. 10669-10672.
72. Λεονταρίτης, Γ., *Μελέτη των φωσφοϊνοσιπιδίων του μονοκύτταρου ευκαρυωτικού οργανισμού tetrahymena: συμμετοχή στη μεταγωγή σήματος και την κυκλοφορία μεμβρανών*, in *Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ). Σχολή Θετικών Επιστημών. Τμήμα Χημείας* 2003, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ): Αθήνα, Ελλάδα. p. 260.
73. Di Paolo, G. and P. De Camilli, *Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics*. Nature, 2006. **443**(7112): p. 651-657.
74. Bunney, T.D. and M. Katan, *Phosphoinositide signalling in cancer: beyond PI3K and PTEN*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(5): p. 342-352.
75. Krausz, M. and V. Haucke, *Phosphoinositide-metabolizing enzymes at the interface between membrane traffic and cell signalling*. EMBO Rep, 2007. **8**(3): p. 241-246.
76. Liu, Y. and V.A. Bankaitis, *Phosphoinositide phosphatases in cell biology and disease*. Progress in Lipid Research, 2010. **49**(3): p. 201-217.
77. Lazar, D.F. and A.R. Saltiel, *Lipid phosphatases as drug discovery targets for type 2 diabetes*. Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(4): p. 333-342.
78. Roth, M.G., *Phosphoinositides in Constitutive Membrane Traffic*. Physiological Reviews, 2004. **84**(3): p. 699-730.
79. Beresford, N., et al., *MptpB, a virulence factor from Mycobacterium tuberculosis, exhibits triple-specificity phosphatase activity*. Biochemical Journal, 2007. **406**(1): p. 13-18.
80. Armstrong, J.A. and P.D. Hart, *Response of cultured macrophages to Mycobacterium tuberculosis, with observations on fusion of lysosomes with phagosomes*. J Exp Med, 1971. **134**(3 Pt 1): p. 713-40.
81. Beresford, N., et al., *A new family of phosphoinositide phosphatases in microorganisms: identification and biochemical analysis*. BMC Genomics, 2010. **11**(1): p. 457.
82. van Ooijen, G., et al., *Transcomplementation, but not Physical Association of the CC-NB-ARC and LRR Domains of Tomato R Protein Mi-1.2 is Altered by Mutations in the ARC2 Subdomain*. Molecular Plant, 2008. **1**(3): p. 401-410.
83. ZEMANOVÁ, E., et al., *GENETIC POLYMORPHISM WITHIN THE LEISHMANIA DONOVANI COMPLEX: CORRELATION WITH GEOGRAPHIC*

- ORIGIN. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 2004. **70**(6): p. 613-617.
84. Jensen, K., *A SIMPLE METHOD FOR PROTEIN ELECTROPHORESIS IN POLYACRYLAMIDE GEL*. Scand J Clin Lab Invest, 1965. **17**: p. 192-4.
 85. Burnette, W.N., "Western Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. Analytical Biochemistry, 1981. **112**(2): p. 195-203.
 86. Κοτίνη, Μ.Π., *Κατασκευή και χαρακτηρισμός διαγονιδιακών παρασίτων Leishmania donovani που εκφράζουν την κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη mRFP1* 2009, Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Μικροβιολογίας, ΕΚΠΑ: Αθήνα.
 87. Campbell, R.E., et al., *A monomeric red fluorescent protein*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002. **99**(12): p. 7877-7882.
 88. Zhang, G., V. Gurtu, and S.R. Kain, *An Enhanced Green Fluorescent Protein Allows Sensitive Detection of Gene Transfer in Mammalian Cells*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1996. **227**(3): p. 707-711.
 89. Shimomura, O., *The discovery of aequorin and green fluorescent protein*. Journal of Microscopy, 2005. **217**(1): p. 3-15.
 90. Kapoor, P., et al., *An Unconventional Form of Actin in Protozoan Hemoflagellate, Leishmania*. Journal of Biological Chemistry, 2008. **283**(33): p. 22760-22773.
 91. Gannavaram, S., et al., *Mitochondrial associated ubiquitin fold modifier-1 mediated protein conjugation in Leishmania donovani*. PLoS One, 2011. **6**(1): p. e16156.
 92. Beverley, S.M. and C.E. Clayton, *Transfection of Leishmania and Trypanosoma brucei by electroporation*. Methods Mol Biol, 1993. **21**: p. 333-48.
 93. Khrameeva, E.E., et al., *Mutants of monomeric red fluorescent protein mRFP1 at residue 66: structure modeling by molecular dynamics and search for correlations with spectral properties*. Biochemistry (Mosc), 2008. **73**(10): p. 1085-95.
 94. Boleti, H., et al., *ER targeting and retention of the HCV NS4B protein relies on the concerted action of multiple structural features including its transmembrane domains*. Mol Membr Biol, 2010. **27**(1): p. 50-74.
 95. Karve, T.M. and A.K. Cheema, *Small Changes Huge Impact: The Role of Protein Posttranslational Modifications in Cellular Homeostasis and Disease*. Journal of Amino Acids, 2011. **2011**.
 96. Wold, F., *In Vivo Chemical Modification of Proteins (Post-Translational Modification)*. Annual Review of Biochemistry, 1981. **50**(1): p. 783-814.
 97. Deschenes, R.J., *Protein Palmitoylation*, in *Encyclopedia of Biological Chemistry*, J.L. Editors-in-Chief: William and M.D. Lane, Editors. 2013, Academic Press: Waltham. p. 645-647.
 98. Robbins, S.M., N.A. Quintrell, and J.M. Bishop, *Myristoylation and differential palmitoylation of the HCK protein-tyrosine kinases govern their attachment to*

- membranes and association with caveolae*. Molecular and Cellular Biology, 1995. **15**(7): p. 3507-15.
99. Dunphy, J.T. and M.E. Linder, *Signalling functions of protein palmitoylation*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids, 1998. **1436**(1–2): p. 245-261.
 100. Kacar, B. and E.A. Gaucher, *Experimental evolution of protein-protein interaction networks*. Biochem J, 2013. **453**(3): p. 311-9.
 101. Yin, H.L. and P.A. Janmey, *PHOSPHOINOSITIDE REGULATION OF THE ACTIN CYTOSKELETON*. Annual Review of Physiology, 2003. **65**(1): p. 761-789.
 102. Takenawa, T. and T. Itoh, *Phosphoinositides, key molecules for regulation of actin cytoskeletal organization and membrane traffic from the plasma membrane*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1533**(3): p. 190-206.

