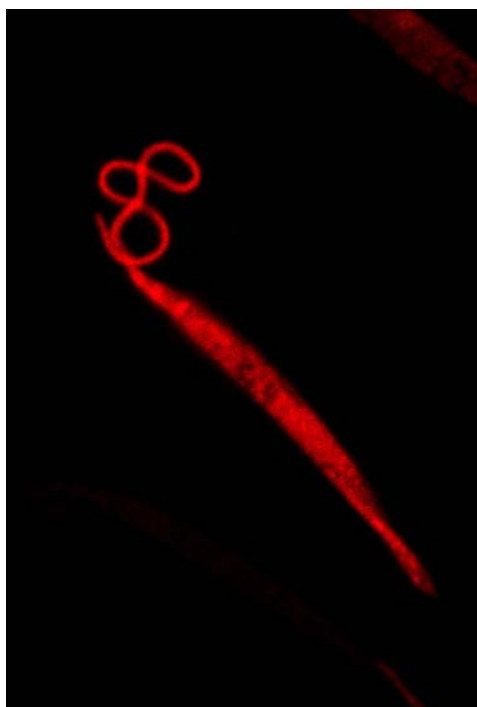




Πανεπιστήμιο Αθηνών-Τμήμα Βιολογίας

Διπλωματική εργασία

Κατασκευή και χαρακτηρισμός διαγονιδιακών παρασίτων *Leishmania donovani* που εκφράζουν την κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη mRFP1 και αντι- mRFP1 πολυκλωνικού αντισώματος



ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ :

Μαρία Παρασκευή Κοτίνη

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΣ ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ:

Μπολέτη Χαραλαμπία, Ερευνήτρια Γ'
Εργαστήριο Μοριακής Παρασιτολογίας
Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

Διαλλινάς Γεώργιος, Αναπ. Καθηγητής
Τομέας Μικροβιολογίας,
Τμήμα Βιολογίας
Ε.Κ.Π.Α.



Περιεχόμενα

1	Εισαγωγή.....	4
1.1	Η νόσος	4
1.1.1	Συστηματική κατάταξη του παρασίτου <i>Leishmania</i>	4
1.1.2	Μορφολογικά στάδια και βιολογικός κύκλος	6
1.1.3	Φαγοκυττάρωση, επιβίωση και πολλαπλασιασμός του παρασίτου <i>Leishmania</i> στο παρασιτόφορο φαγολυσόσωμα του μακροφάγου	10
1.1.4	Φθορίζουσες πρωτεΐνες. Πολύτιμοι βιο-αισθητήρες στην Βιολογία και την Ιατρική	10
1.1.5	Ερωτήματα-Στόχοι της διπλωματικής εργασίας.....	14
2	Τεχνικές.....	15
2.1	Τεχνικές χειρισμού DNA.....	15
2.1.1	Ενίσχυση του ενθέματος με την τεχνική της PCR	15
2.1.2	Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης	15
2.1.3	Καθαρισμός DNA από πήκτωμα αγαρόζης	15
2.1.4	Πέψη (digestion) με περιοριστικά ένζυμα	16
2.1.5	Αποφωσφορυλίωση του DNA	16
2.1.6	Επεξεργασία του προϊόντος PCR με το περιοριστικό ένζυμο Dpn I.....	16
2.1.7	Σύνδεση (ligation) διαφορετικών τμημάτων DNA (φορέας και ένθεμα)	16
2.2	Τεχνικές χειρισμού Πρωτεϊνών.....	17
2.2.1	Επαγωγή της έκφρασης πρωτεϊνών σε βακτήρια και καθαρισμός	17
2.2.2	Ανάλυση πρωτεϊνών με SDS PAGE.....	17
2.2.3	Ανοσοσύτπωση Western Blot	17
2.2.4	Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford (Bradford assay)	18
2.3	Τεχνικές χειρισμού Παρασίτων	19
2.3.1	Καλλιέργεια πρωτοζώων.....	19
2.3.2	Επιμόλυνση προμαστιγωτών <i>L. donovani</i> LG13 με τον πλασμιδιακό φορέα pLexsy-sat-mRFP1.....	20
2.3.3	Επιλογή του διαγονιδιακού φθορίζοντος πληθυσμού των παρασίτων	20
2.3.4	Ταυτοποίηση /καταμέτρηση των κυτταρικών πληθυσμών με κυτταρομετρία ροής (FACS).....	20
2.3.5	Ανοσοφθορισμός-Συνεστιακή Μικροσκοπία Φθορισμού	22
3	Κλωνοποίηση του γονιδίου mRFP1 στον πλασμιδιακό φορέα pLexsy-sat23	
3.1	<i>Πλασμιδιακοί φορείς pRSET-b-mRFP1 και pLEXSY-sat</i>	23
3.1.1	Παραγωγή και απομόνωση των πλασμιδιακών φορέων pRSET-b-mRFP1 και pLEXSY-sat.....	23
3.1.2	Ανάλυση των φορέων με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	23
3.2	<i>Ενίσχυση του ενθέματος mRFP1</i>	25
3.3	<i>Προετοιμασία φορέα και ενθέματος για σύνδεση (ligation)</i>	30
3.3.1	α) Προετοιμασία πλασμιδιακού DNA	30
3.3.2	α) Προετοιμασία ενθέματος	30
3.4	<i>Σύνδεση (ligation) του ενθέματος με το φορέα</i>	30
3.5	<i>Μετασχηματισμός επιδεκτικών βακτηρίων με ανασυνδυασμένο πλασμίδιο</i>	30
3.6	<i>Έλεγχος θετικών κλώνων</i>	32
3.7	Ταυτοποίηση της αλληλουχίας θετικών κλώνων	34
3.8	Παραγωγή διαγονιδιακών παρασίτων <i>L. donovani</i> που εκφράζουν την mRFP1.	35
3.9	Χαρακτηρισμός διαγονιδιακών παρασίτων με συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού..	39
4	Παραγωγή ειδικού πολυκλωνικού αντισώματος anti-RFP από κουνέλι	42
4.1	Απομόνωση αντιγόνου	42
4.1.1	Έκφραση της πρωτεΐνης mRFP ₁ σε βακτηριακά στελέχη BL21 και απομόνωση της πρωτεΐνης	42
4.2	Παραγωγή αντισώματος ειδικού για την πρωτεΐνη mRFP ₁	50
4.2.1	Προετοιμασία αντιγόνου και ανοσοποίηση κουνελιού.....	50
4.2.2	Καθαρισμός αντισώματος	51
4.3	Χαρακτηρισμός αντισώματος ειδικού για την πρωτεΐνη mRFP ₁	51
5	Πρωτόκολλα	58

5.1	Βακτήρια	58
5.1.1	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (miniprep).....	58
5.1.2	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεσαία κλίμακα (midi prep).....	58
5.1.3	Παρασκευή επιδεκτικών βακτηρίων	59
5.2	Τεχνικές χειρισμού DNA.....	59
5.2.1	Ενίσχυση του ενθέματος με PCR (polymerase chain reaction).....	59
5.2.2	Πρωτόκολο PCR	60
5.2.3	Ηλεκτροφόρηση DNA.....	60
5.2.4	Εξαγωγή DNA από πήκτωμα αγαρόζης	60
5.2.5	Συγκέντρωση του DNA με κατακρήμνιση αιθανόλης (ethanol precipitation)	61
5.3	Τεχνικές χειρισμού Πρωτεϊνών.....	61
5.3.1	Έκφραση της κόκκινης φθορίζουσας πρωτεΐνης m RFP1 και απομόνωση.....	61
5.3.2	Ανοσοσύτπωση (Western Blot)	62
5.3.3	Micro-Bradford assay	63
5.3.4	Καθαρισμός αντισώματος με χρωματογραφία συγγενείας από μεμβρανή νιτροκυτταρίνης με το κατάλληλο αντιγόνο.	63
5.4	Παράσιτα	64
5.4.1	Προετοιμασία των δειγμάτων για ανάλυση κυτταρομετρίας ροής	64
5.4.2	Προετοιμασία λείσμανιακών δειγμάτων για παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού.....	64
5.5	Ανοσοποίηση κουνελιού	64
5.5.1	Προετοιμασία του αντιγόνου.....	64
5.5.2	Πρωτόκολλο ανοσοποίησης.....	65
6	Διαλύματα	65
6.1	Θρεπτικά Υλικά βακτηρίων:	65
6.1.1	LB (Luria-Bertani, 1 lt)	65
6.1.2	LB-αγαρ	66
6.2	Διαλύματα απομόνωσης πλασμιδιακού DNA-Μέθοδος Qiagen	66
6.2.1	Διάλυμα αναδιάλυσης P1(resuspension buffer).....	66
6.2.2	Διάλυμα λύσης P2 (lysis buffer).....	66
6.2.3	Διάλυμα εξουδετέρωσης P3 (neutralization buffer).....	66
6.2.4	Διάλυμα εξισορρόπησης QBT (equilibration buffer).....	66
6.2.5	Διάλυμα έκπλυσης QC (wash buffer)	66
6.2.6	Διάλυμα έκλουσης QF (elution buffer)	66
6.3	Διαλύματα ηλεκτροφόρησης DNA:	66
6.3.1	Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης TBE 10x, 1 lt	66
6.3.2	Ρυθμιστικό διάλυμα «φόρτωσης» δείγματος DNA (loading buffer), 6x.....	67
6.4	Διαλύματα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών (SDS-PAGE).....	67
6.4.1	Διάλυμα ακρυλαμίδιου 30% (w/v) (100 ml).....	67
6.4.2	Πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel) 12% (w/v) (5 ml).....	67
6.4.3	Πήκτωμα συσσώρευσης (stacking gel) 4% (w/v) (5 ml).....	67
6.4.4	Διάλυμα «φόρτωσης» δείγματος πρωτεϊνών (3x Laemmli sample buffer)	67
6.4.5	Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Electrode buffer, pH 8,75), 10x, 1 lt.....	67
6.4.6	Διάλυμα χρωματισμού (stain buffer).....	67
6.4.7	Διάλυμα αποχρωματισμού (destain buffer)	68
6.5	Διαλύματα ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών (Western blotting):	68
6.5.1	Διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς πρωτεϊνών (Transfer buffer), 1x, 1 lt	68
6.5.2	Διάλυμα χρώσης νιτροκυτταρίνης Ponceau S	68
6.5.3	TBS pH 7,4 (1 L), 10x	68
6.5.4	Διάλυμα 3',3', διαμινοβενζιδίνης (DAB) για εμφάνιση Western blot.....	68
6.5.5	Διάλυμα λύσης βακτηρίων.....	68
6.5.6	Διάλυμα έκπλυσης βακτηρίων	68
6.5.7	Διάλυμα έκλουσης βακτηρίων	68
6.5.8	PBS pH 7,4 (1L), 10x	68
7	Συμπεράσματα-Συζήτηση	69
8	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	70

1 Εισαγωγή

1.1 Η νόσος

Με τον όρο λείσμανίαση περιγράφεται μια ομάδα νοσημάτων με ευρύ φάσμα κλινικών εκδηλώσεων, που προκαλούνται από τα παράσιτα του γένους *Leishmania*. Πρόκειται για ενδοκυτταρικά παρασιτικά πρωτόζωα που μολύνουν πολλά διαφορετικά είδη θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου, και μεταφέρονται μέσω του νύγματος των ασπώνδουλων ξενιστών (σκνίπα) των γενών *Phlebotomus* και *Lutzomyia*. Οι κλινικές μορφές της λείσμανίασης σχετίζονται άμεσα με το είδος του παρασίτου που έχει προκαλέσει τη μόλυνση και την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή (Solbach and Laskay, 2000). Οι τρεις βασικές κλινικές μορφές λείσμανίασης είναι: η σπλαχνική λείσμανίαση (VL, visceral leishmaniasis) (Εικόνα 1.2), η δερματική λείσμανίαση (CL, cutaneous leishmaniasis) (Εικόνα 1.1 και 1.2) και η βλεννογονοδερματική λείσμανίαση (MCL, muco-cutaneous leishmaniasis) (Herwaldt, 1999).

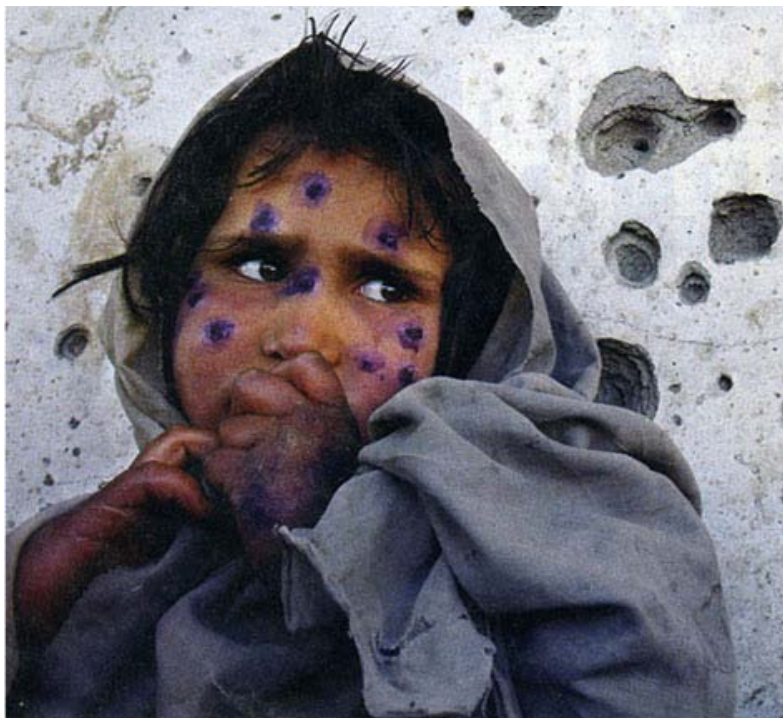
1.2. Το παράσιτο *Leishmania* spp

1.1.1 Συστηματική κατάταξη του παρασίτου *Leishmania*

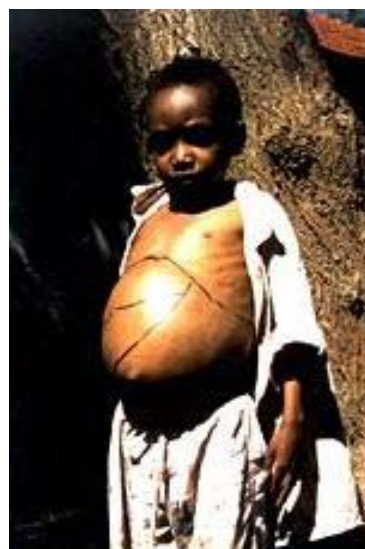
Το παράσιτο *Leishmania* ανήκει στην τάξη των κινητοπλαστοειδών και στην εξελικτικά αρχαία οικογένεια των τρυπανοσωματίδων. Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει παράσιτα διαφόρων οργανισμών, συμπεριλαμβανομένων των φυτών, των εντόμων, των ψαριών, των αμφιβίων, των ερπετών και των θηλαστικών (*Trypanosoma*, *Leishmania*, *Endotrypanum*). Το γένος *Leishmania* περιλαμβάνει περίπου 20 είδη. Τα περισσότερα είναι ικανά να μολύνουν τον άνθρωπο.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1.1 Συστηματική κατάταξη του γένους *Leishmania*

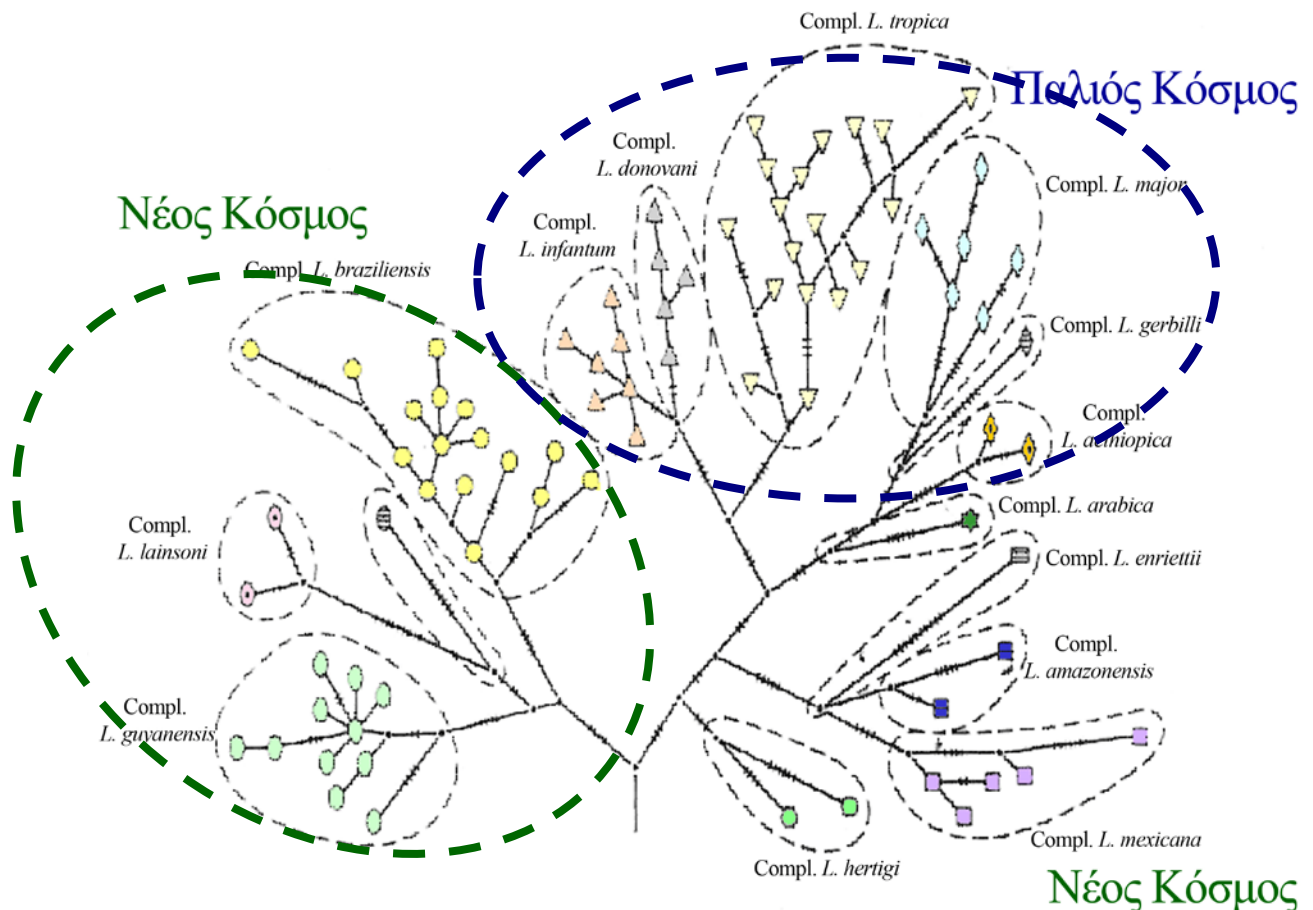
Βασίλειο	Πρώτιστα (Protista)						
Υπο-βασίλειο	Πρωτόζωα (Protozoa)						
Συνομοταξία	Σαρκομαστιγοφόρα (Sarcomastigophora)						
Υπο-συνομοταξία	Μαστιγοφόρα (Mastigophora)						
Κλάση	Ζωομαστιγοφόρα (Zoomastigophorea)						
Τάξη	Κινητοπλαστοειδή (Kinetoplastida)						
Υπο-τάξη	Τρυπανοσωματίνες (Trypanosomatina)						
Οικογένεια	Τρυπανοσωματίδες (Trypanosomatidae)						
Γένος	Λείσμανια (<i>Leishmania</i>)						
Υπό-γένος	<i>Viannia</i>		<i>Leishmania</i>				
Σύμπλεγμα	<i>L. brasiliensis</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. donovani</i>	<i>L. major</i>	<i>L. tropica</i>	<i>L. aethiopica</i>	<i>L. mexicana</i>
Είδος	<i>L. braziliensis</i> <i>L. peruviana</i>	<i>L. guyanensis</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. shawi</i>	<i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i> <i>L. chagasi</i> <i>L. archibaldi</i>	<i>L. major</i>	<i>L. tropica</i> <i>L. killicki</i>	<i>L. aethiopica</i>	<i>L. mexicana</i> <i>L. amazonensis</i> <i>L. pifanoi</i> <i>L. garnhami</i> <i>L. venezuelensis</i>



Εικόνα 1.1 Κορίτσι από την Καμπούλ με δερματική λείσμανίαση.



Εικόνα 1.2 Βλεννογονοδερματική λείσμανίαση (αριστερά) και αγόρι με σπλαχνική λείσμανίαση (δεξιά).(http://wpcontent.answers.com/wikipedia/commons/thumb/6/6e/Leishmaniasis_ulcer.jpg/350px-Leishmaniasis_ulcer.jpg),(http://www.stanford.edu/group/parasites/ParaSites2003/Leishmania/leishmaniasis_boy2.jpg)



Εικόνα 1.3 Κλαδόγραμμα του γένους *Leishmania* βασισμένο σε MLEE ανάλυση [(τυποποίηση 80 στελεχών με 13 ισοένζυμα) (Thomaz-Soccol *et al.*, 1993)]. Στο κλαδόγραμμα παρατηρείται η ομαδοποίηση των ειδών του Παλιού Κόσμου που φαίνεται να έχουν ένα κοινό πρόγονο με τα υπόλοιπα είδη του υπογένους *Leishmania* στον νέο κόσμο. Παρουσιάζεται επίσης ότι τα συμπλέγματα του υπογένους *Viannia* επίσης έχουν κοινή καταγωγή.

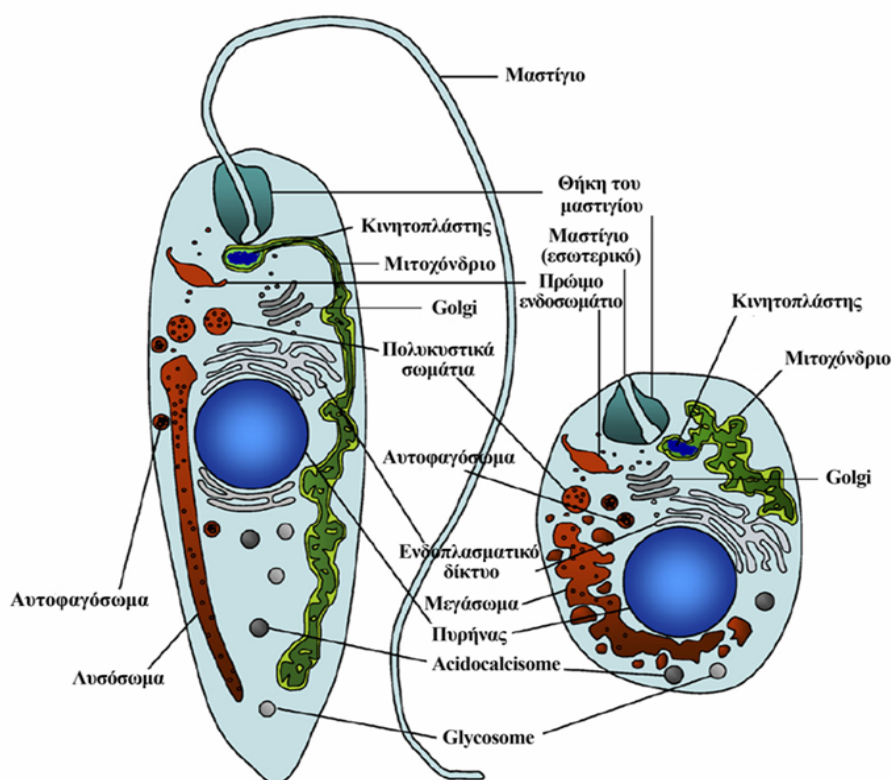
1.1.2 Μορφολογικά στάδια και βιολογικός κύκλος

Τα παράσιτα του γένους *Leishmania* εμφανίζονται σε δύο κύριες μορφές: στην προμαστιγωτή μορφή που απαντάται στον ασπόνδυλο ξενιστή (σκνίπα) και στην αμαστιγωτή μορφή που απαντάται σε επαγγελματίες φαγοκύτταρα (μακροφάγα, ουδετερόφιλα και δενδριτικά) αλλά και σε ινοβλάστες του δέρματος του σπονδυλωτού ξενιστή (Milon, 2009), (Hervas Rodriguez *et al.*, 1996), (Chang and Dwyer, 1976).

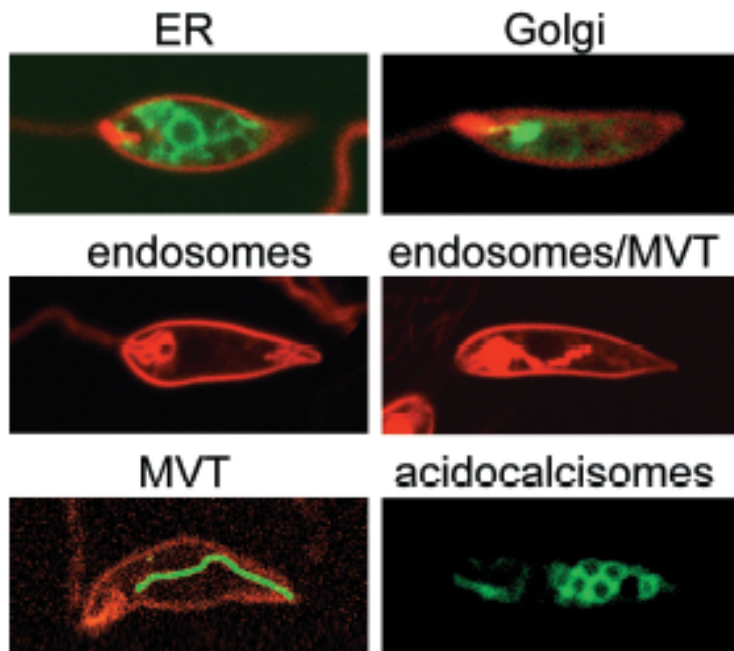
Η προμαστιγωτή μορφή είναι επιμήκης με μέγεθος 9-12μm x 2-3 μm, φέρει μαστίγιο που εκφύεται από το πρόσθιο τμήμα του σώματος και έχει ίσο ή μεγαλύτερο μήκος από αυτό του σώματος του παρασίτου (Killick-Kendrick *et al.*, 1974). Στο κέντρο υπάρχει ένας μεγάλος, σφαιρικός πυρήνας με σαφή πυρηνίσκο και περιφερική χρωματίνη. Στο κυτταρόπλασμα απαντώνται πολυάριθμα ριβοσώματα, συσκευή Golgi, κυστίδια λίπους, κοκκώδες και λείο ενδοπλασματικό δίκτυο και λυσοσώματα. Κοντά στην βάση του μαστιγίου υπάρχει ένας τροποποιημένος τύπος μιτοχονδρίου που περιέχει ένα δισκοειδή κινητοπλάστη, μια χαρακτηριστική δομή των παρασίτων που

ανήκουν στην τάξη των κινητοπλαστοειδών. Αυτός περιέχει δύο τύπους κυκλικών μορίων DNA που είναι γνωστά και ως kDNA. Η αμαστιγωτή μορφή είναι ωοειδής με διάμετρο 2-6 μm x 1,5-2 μm και φέρει έναν έκκεντρο πυρήνα με πυρηνίσκο και έναν κινητοπλάστη που καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο μέρος του κυττάρου. Ο υπόλοιπος χώρος του κυττάρου περιλαμβάνει τα ίδια οργάνδια με τη προμαστιγωτή μορφή του παρασίτου που όμως είναι λιγότερο ανεπτυγμένα. Επιπλέον η αμαστιγωτή μορφή περιέχει ένα ενδοκυτταρικό μαστίγιο (Εικόνα 1.4 & Εικόνα 1.5).

Οι ασπόνδυλοι ξενιστές του γένους *Phlebotomus* ή *Lutzomyia* (Εικόνα 1.6) προσλαμβάνουν, κατά τη λήψη αίματος από σπονδυλωτό ξενιστή, την αμαστιγωτή μορφή του παρασίτου που βρίσκεται είτε σε μακροφάγα, είτε ελεύθερη στο αίμα. Μέσα στο έντερο των εντόμων το παράσιτο μετατρέπεται στην προμαστιγωτή μορφή σε χρονικό διάστημα περίπου μιας 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 στα στοματικά μόρια του εντόμου. Σε επόμενο νύγμα τα μετακυκλικά παράσιτα ενίονται στον τελικό ξενιστή. Στα φαγολυσοσώματα των μονοπύρηνων/μακροφάγων του τελικού ξενιστή τα μετακυκλικά παράσιτα μετατρέπονται σε αμαστιγωτά. Και ο κύκλος ξεκινάει από την αρχή (Εικόνα 1.7)



Εικόνα 1.4 Προμαστιγωτή και αμαστιγωτή μορφή του πρωτοζώου *Leishmania* (Besteiro et al., 2007)



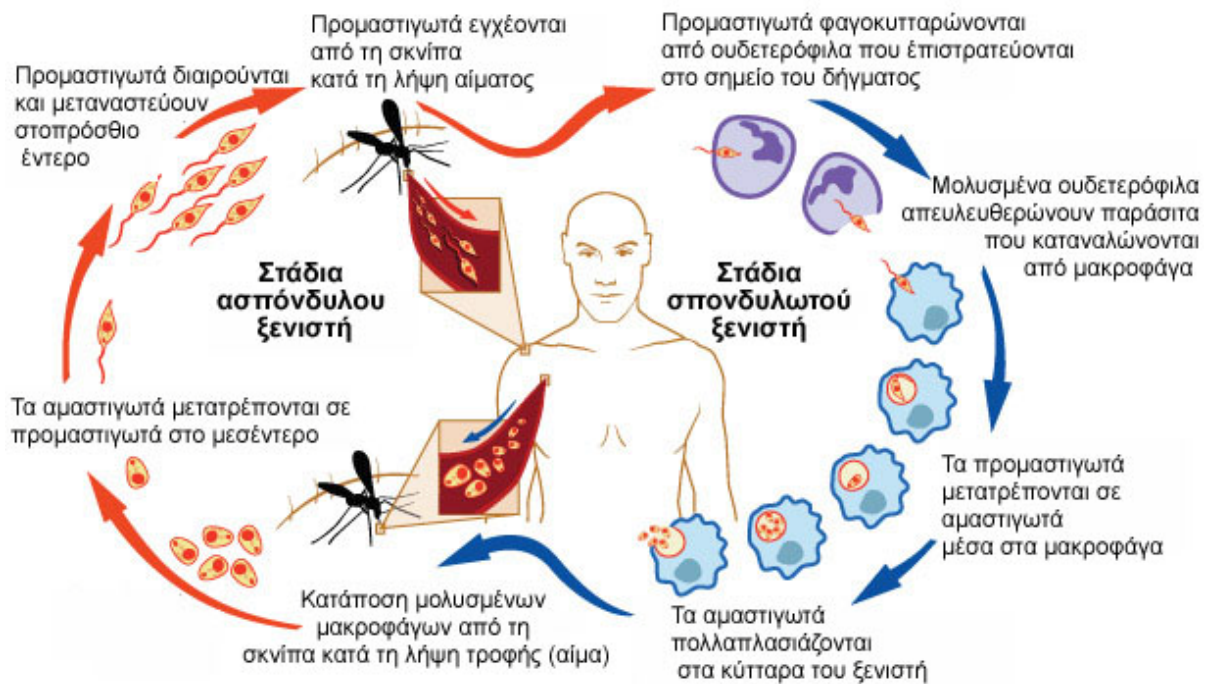
Εικόνα 1.5 Απεικόνιση ενδοκυτταρικής μορφολογίας του πρωτοζώου *Leishmania*. Φωτογραφία από συνεστική μικροσκοπία φθορισμού)



Εικόνα 1.6 Εικόνες των εντόμων *Phlebotomus* (αριστερά) και *Lutzomyia* (δεξιά)

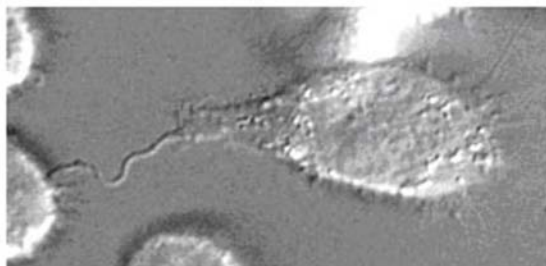
(<http://www.keele.ac.uk/depts/aep/images/rdw%20phleb.jpg>);

(http://www.pragas.com.br/noticias/destaques/images/infeccao_bacteriana01.jpg)

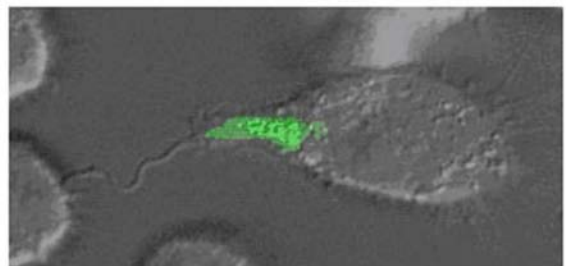


Εικόνα 1.7 Κύκλος ζωής του παρασίτου *Leishmania* στον ασπόνδυλο και στο σπονδυλωτό ξενιστή
<http://www3.niaid.nih.gov/NR/rdonlyres/8D714FC2-800F-455F-B1842B7CC9C4E550/0/leishDiagram1.jpg>

Αντίθεση φάσης



Φθορισμός GFP



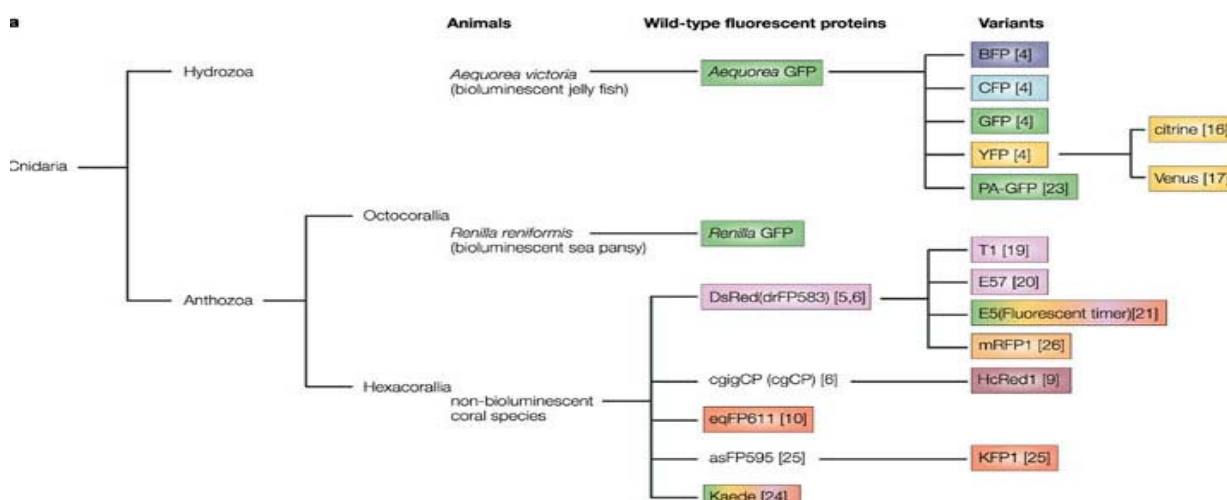
Εικόνα 1.8 Φαγοκυττάρωση διαγονιδιακού παρασίτου *Leishmania*-GFP από μακροφάγα κύτταρα J774. Μικροσκοπία φθορισμού και αντίθεσης φάσης.

1.1.3 Φαγοκυττάρωση, επιβίωση και πολλαπλασιασμός του παρασίτου *Leishmania* στο παρασιτόφορο φαγολυσόσωμα του μακροφάγου

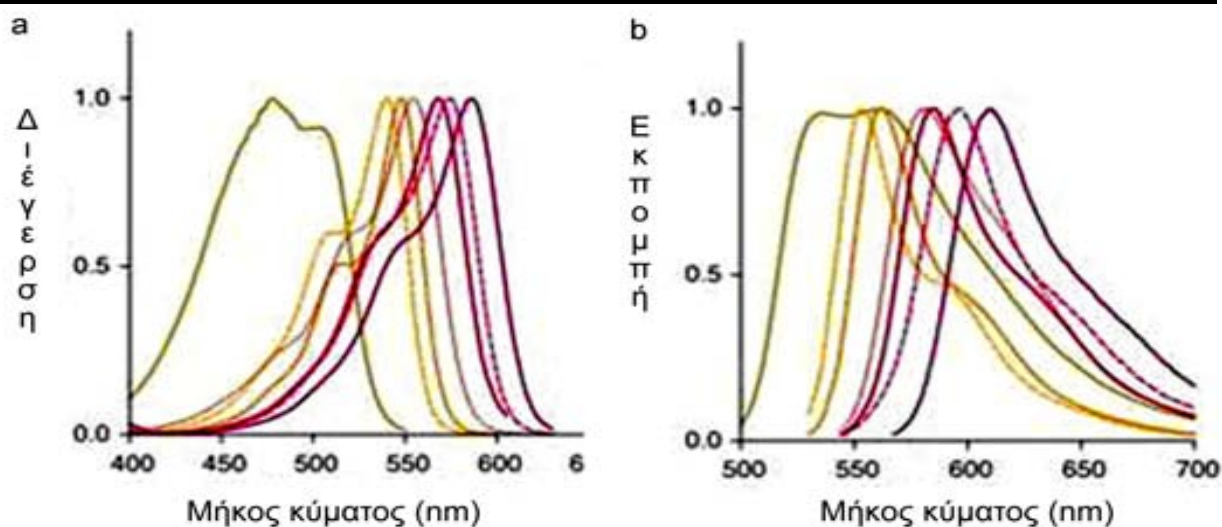
Προμαστιγωτές μορφές του παρασιτικού πρωτοζώου *Leishmania*, όταν εγχυθούν στο σπονδυλωτό ξενιστή από μολυσμένη σκνίπα φαγοκυτταρώνονται από μακροφάγα του ανοσοποιητικού συστήματος (Εικόνα 1.8). Στα μακροφάγα διαφοροποιούνται σε αμαστιγωτές μορφές, που πολλαπλασιάζονται στα φαγολυσοσώματα. Σημαντικό ρόλο στην επιβίωση των παρασίτων παίζουν οι φωσφογλυκάνες που βρίσκονται στην επιφάνεια των παρασίτων. Ειδικότερα, η λιποφωσφογλυκάνη (LPG), που βρίσκεται σε αφθονία στην επιφάνεια προμαστιγωτών στα παράσιτα *Leishmania donovani* εμπλέκεται στην καθυστέρηση της βιογένεσης/ωρίμανσης του Λείσμανιοφόρου φαγοςώματος σε φαγολυσόσωμα δίνοντας έτσι το χρόνο στο παράσιτο να μετατραπεί στην αμαστιγωτή μορφή που είναι ανθεκτική στο όξινο pH και στις υδρολάσες του λυσοσώματος. Η παρεμπόδιση αυτή συνδέεται εν μέρει με τη συσσώρευση F-ακτίνης περιφερικά των παρασιτόφορων φαγοςωμάτων, γεγονός που παρεμποδίζει/καθυστερεί την αλληλεπίδραση με όψιμα ενδοσώματα και λυσοσώματα (Lodge and Descoteaux, 2008).

1.1.4 Φθορίζουσες πρωτεΐνες. Πολύτιμοι βιο-αισθητήρες στην Βιολογία και την Ιατρική

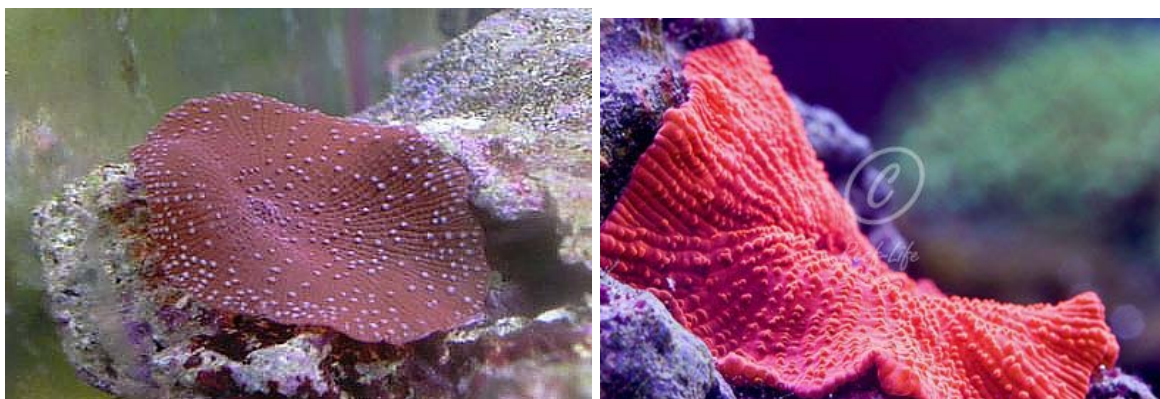
Η ιστορία των φθορίζουσών πρωτεϊνών ξεκινά το 1962 με την εργασία του επιστήμονα Osamu Shimomura και την απομόνωση της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (GFP) από τον οργανισμό *Aequoria victoria* (Shimomura et al., 1962), (Shimomura, 2005). Στη συνέχεια απομονώθηκαν και άλλες φθορίζουσες πρωτεΐνες από θαλάσσιους οργανισμούς (κοράλλια) που δεν έχουν βιοφωταύγεια σε αντίθεση με την *Aequoria victoria* (Shrestha and Deo, 2006) (Εικόνα 1.10). Οι πρωτεΐνες αυτές έχουν φασμασκοπικές ιδιότητες πολύ διαφορετικές από την GFP και εκπέμπουν φως στις περιοχές του κίτρινου και του κόκκινου του φάσματος του ορατού φωτός (Εικόνα 1.11). Μια από αυτές ήταν η DsRed (κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη) από ανθόζωα του γένους *Discosoma* (Εικόνα 1.12). Η DsRed απομονώθηκε ως τετραμερές. Με τυχαίες μεταλλάξεις προέκυψαν η διμερής και μονομερής μορφή όπως η mRFP1 (Εικόνα 1.13). Κατευθυνόμενη μεταλαστογένεση της mRFP1 είχε σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία πρωτεϊνών με τροποποιημένες φασματοσκοπικών ιδιότητες (Πίνακας 1.2)



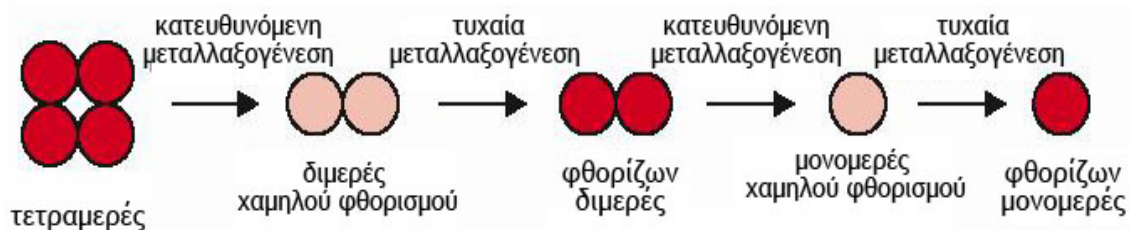
Εικόνα 1.10 Φυλογενετικό κλαδόγραμμα των φθορίζουσών πρωτεϊνών. (Matz *et al.*, 1999)



Εικόνα 1.11 Φάσματα διέγερσης (a) και εκπομπής (b) από μονομερείς κίτρινες, πορτοκαλί και κόκκινες φθορίζουσες πρωτεΐνες που έχουν προκύψει με μεταλαξιογένεση της mRFP1. *Discosoma* sp. {Shaner, 2004 #27}.



Εικόνα 1.12 Εικόνες από θαλάσσιες ανεμώνες του γένους *Discosoma* (http://z.about.com/d/saltaquarium/1/0/2/X/redmushroomtom_400.JPG); (<http://www.reefpedia.com/index.php/Category:Discosoma>)



Εικόνα 1.13 Διαγραμματική απεικόνιση της κατασκευής μονομερούς φθορίζοντος μορίου mRFP1 από τετραμερές DsRed.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1.2 Φασματοσκοπικές ιδιότητες της mRFP1-Σύγκριση με την GFP και DsRed

	Μέγιστο μήκος κύματος διέγερσης (nm)	Μέγιστο μήκος κύματος Εκπομπής (nm)	Απόδοση Φθορισμού	Δομή <i>in vivo</i>
GFP (wt)	395/475	509	0.77	Μονομερές
DsRed	558	583	0.79	Τετραμερές
mRFP ₁	584	607	0.25	Μονομερές

1.1.4.a Δομή της μονομερούς mRFP₁

Η πρωτεΐνη mRFP1 έχει 226 αμινοξέα (Εικόνα 1.14), θεωρητικό μοριακό βάρος Mw=25423.71 και ισοηλεκτρικό σημείο PI=5.65. Η υπερδευτεροταγής δομή της mRFP₁ είναι β-βαρέλι. Έντεκα β-πτυχωτές επιφάνειες εξωτερικά προστατεύουν το χρωμογόνο που δημιουργείται από 3 αμινοξέα (Gln65, Tyr66, Gly67), τα οποία βρίσκονται στο εσωτερικό του μορίου (14) (Εικόνα 1.15). Το καταλυτικό κέντρο και υπόστρωμα εμφανίζονται στο ίδιο μόριο. Η δημιουργία του χρωμογόνου είναι αποτέλεσμα σειράς αντιδράσεων (κυκλοποίησης, οξείδωσης), ύστερα από αναδίπλωση του μορίου, όπου το ενζυμικό κέντρο έρχεται κοντά με το υπόστρωμα (πλευρικές ομάδες αμινοξέων).

```

      10           20           30           40           50           60
MASSDVIKE  FMRFKVRMEG  SVNGHEFEIE  GEGEGRPYEG  TQTAKLKVTK  GGPLPFAWDI

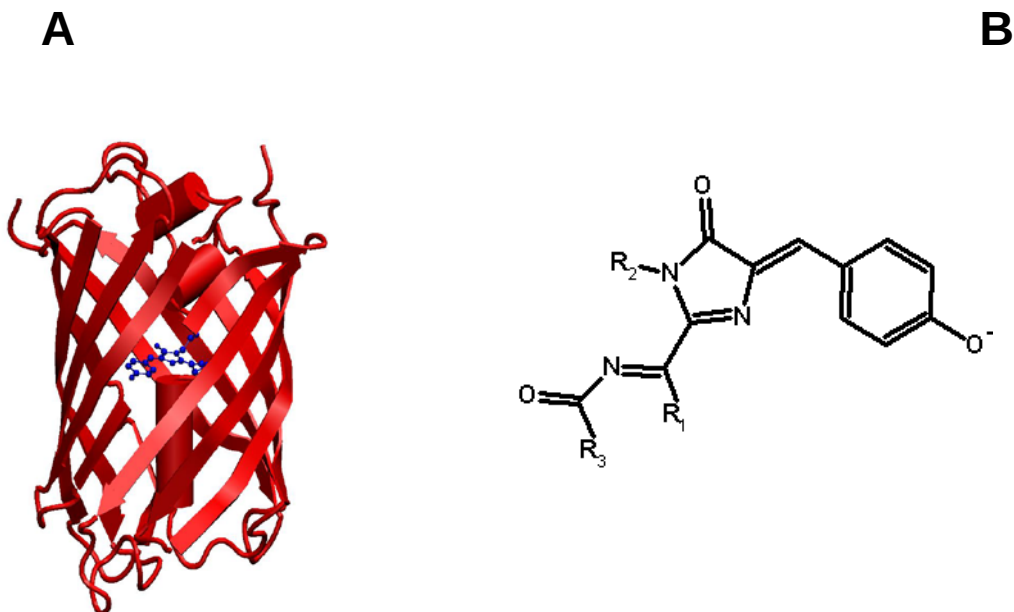
      70           80           90          100          110          120
LSPQFYGSK  AYVKHPADIP  DYKLSPFEG  FKWERVMNFE  DGGVVTVTQD  SSLQDGEFIY

     130          140          150          160          170          180
KVKLRGTNFP  SDGPVMQKKTMGWEASTERMYPEDGALKGEIKMRLKLDGGHYDAEVKTT

     190          200          210          220
YMAKKPVQLP  GAYKTDIKLD ITSHNEDYTI VEQYERAEGR HSTGA

```

Εικόνα 1.14 Πρωτοταγής δομή της mRFP1



Εικόνα 1.15 **A.** Μοντέλο 3D της φθορίζουσας πρωτεΐνης mRFP₁. Με μπλε χρώμα παρουσιάζεται η στερεοχημική δομή του χρωμοφόρου της mRFP₁, που παρουσιάζεται στο **B**.

(http://web.aibn.uq.edu.au/cbn/research_biomolecular_files/dsredmonomer2.jpg)

1.1.4.b Εφαρμογές και χρήσεις των φθορίζουσών πρωτεϊνών στη Βιολογία και την Ιατρική

Οι φθορίζουσες πρωτεΐνες μας επιτρέπουν να δούμε στο εσωτερικό των κυττάρων και να παρατηρήσουμε τις βιολογικές διεργασίες τοπικά και χρονικά *in vivo*. Σε αυτή την κατεύθυνση έχουν μελετηθεί με φθορίζουσες πρωτεΐνες αλλαγές του κυτταροσκελετού ή της χρωματίνης κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, αλλαγή του εντοπισμού ενός σηματοδότη κατά την μεταγωγή σήματος, εντοπισμός της δραστηριότητας γονιδίων και των μεταγράφων τους κατά την εμβρυογένεση, μελέτη της ρύθμισης γονιδίων στην εμβρυακή ανάπτυξη (Χρονομέτρης φθορισμού DsRed-E5), ανάλυση δυναμικής των πρωτεϊνών (χρόνος ημιζωής, πρωτεόλυση), μετακίνηση μεμβρανικών κυστιδίων στο εκκριτικό μονοπάτι και η δυναμική των ενδοκυττάρων μεμβρανικών πρωτεϊνών.

Η μονομερής κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη mRFP₁, αλλά και άλλες φθορίζουσες πρωτεΐνες που εκπέμπουν σε μήκη κύματος στην περιοχή του κόκκινου, είναι ιδανικά μόρια για *in vivo* απεικόνιση διεργασιών σε ολόκληρους οργανισμούς (έμβρυα, μικρά ζώα) γιατί ο φθορισμός στην περιοχή του κόκκινου είναι ορατός από μεγαλύτερο βάθος ιστών. Το φως με μεγαλύτερο μήκος κύματος σκεδάζεται λιγότερο στα βιολογικά δείγματα και για το λόγο αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να γίνει απεικόνιση βαθύτερα μέσα στους ιστούς {Shcherbo, 2007 #28}

Οι φθορίζουσες πρωτεΐνες παρουσιάζουν επίσης το πλεονέκτημα ότι μπορούν να εκφραστούν ως υβριδικές πρωτεΐνες και με αυτό τον τρόπο επιτρέπουν τον εντοπισμό άλλων πρωτεϊνών και την παρακολούθησή τους *in vivo*. Σε αυτή την κατεύθυνση έχουν γίνει πειράματα παρακολούθησης της μόλυνσης κυττάρων ή οργανισμών από παθογόνα μικρόβια που εκφράζουν φθορίζουσες πρωτεΐνες. Μια επίσης πολύ σημαντική εφαρμογή τους στην Ιατρική είναι η παρακολούθηση της ανάπτυξης όγκων

σε πειραματόζωα από καρκινικά κύτταρα που εκφράζουν φθορίζουσες πρωτεΐνες και η ανταπόκρισή τους σε χημειοθεραπευτικά πρωτόκολλα {Hoffman, 2005 #29} .

Τέλος, η συμβολή των φθορίζουσών πρωτεϊνών έχει υπάρξει σημαντική στις τεχνικές μικροσκοπίας φθορισμού όπως η FRAP (ανάκτηση φθορισμού μετά από φωτολεύκανση, FLIP (απώλεια φθορισμού μετά από φωτολεύκανση) και FRET (μεταφορά ενέργειας με συντονισμό φθορισμού). Η φωτολεύκανση και φωτοενεργοποίηση χαρακτηρίζουν τις φθορίζουσες πρωτεΐνες και ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες των κυττάρων με φθορίζουσες ετικέτες και εξυπηρετούν στην παρατήρηση της δυναμικής των πρωτεϊνών και της αλληλεπίδρασης μεταξύ πρωτεϊνών σε ζωντανά κύτταρα.

1.1.5 Ερωτήματα-Στόχοι της διπλωματικής εργασίας

Η διπλωματική αυτή εργασία αποτελεί μέρος ερευνητικού προγράμματος που έχει στόχο τη μελέτη και την κατανόηση των μηχανισμών φαγοκυττάρωσης και επιβίωσης του παρασίτου *Leishmania* στα μακροφάγα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος του σπονδυλωτού ξενιστή και την ταυτοποίηση παραγόντων του παρασίτου και του φαγοκυττάρου που εμπλέκονται στις διαδικασίες αυτές. Μέρος του μηχανισμού επιβίωσης των παρασίτων σχετίζεται με την ωρίμανση του παρασιτοφόρου φαγοσώματος στα κύτταρα ξενιστές (9).

Μια από τις μεθοδολογίες που χρησιμοποιείται για τις μελέτες αυτές είναι η *in vivo* απεικόνιση της φαγοκυττάρωσης και του ενδοκυττάρου κύκλου ζωής του παρασίτου με μικροσκοπία φθορισμού. Στο πλαίσιο αυτών των πειραμάτων χρησιμοποιούνται μακροφάγα κύτταρα που εκφράζουν κυτταρικές πρωτεΐνες με ρυθμιστικό ρόλο στην φαγοκυττάρωση ή την ωρίμανση του φαγοσώματος ως χιμαιρικά πολυτεπτίδια με την GFP. Η χρήση φθορίζοντων βιο-αισθητήρων (bio-sensors) είναι μια πολύ σημαντική θετική εξέλιξη στη μελέτη των μηχανισμών φαγοκυττάρωσης με *in vivo* μικροσκοπική απεικόνιση. Ο εντοπισμός των μορίων αυτών στο Λεϊσμανιοφόρο φαγόσωμα σε διαφορετικά στάδια του ενδοκυττάρου κύκλου ζωής του παρασίτου παρέχει σημαντικές πληροφορίες για τους μηχανισμούς που εμπλέκονται στην επιβίωση του παρασίτου στα φαγοκύτταρα ξενιστές. Για την *in vivo* μικροσκοπική παρατήρηση αυτών των διαδικασιών είναι πολύτιμη η χρήση παρασίτων που εκφράζουν κόκκινες φθορίζουσες πρωτεΐνες.

Στόχος αυτής της διπλωματικής εργασίας ήταν η κατασκευή διαγονιδιακών παρασίτων *Leishmania donovani* (*L.donovani*) που εκφράζουν την μονομερή κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη mRFP1 (monomeric Red Fluorescent protein). Για τον βιοχημικό χαρακτηρισμό των παρασίτων *L. donovani-mRFP1* παρασκευάστηκε πολυκλωνικό αντίσωμα ειδικό για την πρωτεΐνη mRFP₁ μετά από ανοσοποίηση κουνελιών με ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη mRFP1 που παρήχθη σε βακτήρια.

2 Τεχνικές

2.1 Τεχνικές χειρισμού DNA

2.1.1 Ενίσχυση του ενθέματος με την τεχνική της PCR

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) διακρίνεται σε αρχική αποδιάταξη με θέρμανση δίκλωνης αλληλουχίας «μήτρας» DNA που περιέχει την περιοχή που θέλουμε να ενισχύσουμε. Ακολουθεί υβριδοποίηση ολιγονουκλεοτιδίων (εκκινητών) με τις συμπληρωματικές αλυσίδες της μήτρας DNA με πτώση της θερμοκρασίας. Οι εκκινητές λειτουργούν ως εναρκτήρια μόρια του πολυμερισμού του DNA που καταλύεται από θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση. Τα ολιγονουκλεοτίδια πρέπει να έχουν μέγεθος μεγαλύτερο από 17 βάσεις, η θερμοκρασία «τήξης» του δίκλωνου DNA, (T_m), να είναι 50-65°C και η περιεκτικότητά τους σε βάσεις GC να είναι 40-60%. Γενικά, ακολουθείται ο κανόνας $T_a > T_m$, όπου T_a είναι η θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών με τις συμπληρωματικές αλυσίδες της μήτρας DNA. Τέλος, πραγματοποιείται πολυμερισμός των νέων αλυσίδων DNA με την DNA πολυμεράση. Ο κύκλος της αποδιάταξης, υβριδοποίησης και πολυμερισμού επαναλαμβάνεται πολλές φορές και τα προϊόντα κάθε κύκλου χρησιμοποιούνται ως μήτρα DNA στους επόμενους κύκλους. Για την πραγματοποίηση της PCR απαιτούνται: DNA πολυμεράση, «οδηγός» (μήτρα) αλληλουχία, μίγμα τριφωσφορικών νουκλεοτιδίων (dNTPs), εκκινητές 5' (5'-GAAGATCTATGGCCTCCTCCGAGGACG-3') και 3' (5'-GGCCTCGAGTCAAGCTT CGAATTCTTAGGC-3'), ιόντα Mg^{2+} , ρυθμιστικό διάλυμα.

Στη συγκεκριμένη εργασία η τεχνική PCR χρησιμοποιήθηκε για ενίσχυση της αλληλουχίας mRFP1 από το πλασμίδιο pRSET-b-mRFP1. Για την ενίσχυση του γονιδίου της mRFP1 οι αυξομειώσεις της θερμοκρασίας που εφαρμόστηκαν ήταν: για την αποδιάταξη 94°C; για την υβριδοποίηση 60°C και για την επιμήκυνση 72°C σύμφωνα με τα σχετικά πρωτόκολλα (5.2.1 και 5.2.2). Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε για την τεχνική της PCR είναι η MJ Research, PTC-200.

2.1.2 Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Ο διαχωρισμός τμημάτων DNA έγινε με ηλεκτροφόρηση σε οριζόντιο πήκτωμα αγαρόζης. Κατά την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου τα μόρια DNA, τα οποία είναι αρνητικά φορτισμένα λόγω του φορτίου των φωσφορικών ομάδων τους, μετακινούνται προς τον θετικό πόλο του πεδίου με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη προς το μέγεθός τους. Ανάλογα με το μέγεθος των προς διαχωρισμό τμημάτων DNA παρασκευάζεται διαφορετικής συγκέντρωσης πήκτωμα αγαρόζης. Στο διάλυμα αγαρόζης κατά την παρασκευή του προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο, το οποίο επιτρέπει την εμφάνιση του DNA ύστερα από έκθεση σε λάμπα UV.

Η ποσοτικοποίηση των προς μελέτη τμημάτων DNA γίνεται με σύγκριση της έντασης του φθορισμού του βρωμιούχου αιθιδίου που έχει συνδεθεί με αυτά, με αυτήν γνωστής ποσότητας μοριακών μαρτύρων που ηλεκτροφορούνται σε παράλληλες διαδρομές ή με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 260 nm (Πρωτόκολλο 5.2.3 και Διαλύματα 6.3).

2.1.3 Καθαρισμός DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Για τον καθαρισμό και απομόνωση τμημάτων DNA από πήκτωμα αγαρόζης, ύστερα από ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκε το kit NucleoSpin Extract II της Macherey-Nagel. Το επιθυμητό τμήμα DNA αποκόπτεται από το πήκτωμα κατά την παρατήρηση με λάμπα UV. Στη συνέχεια ο καθαρισμός και απομόνωσή του επιτυγχάνεται με χρήση κολώνας Qiagen όπου το DNA προσδένεται εκλεκτικά με χρήση συγκεκριμένων ρυθμιστικών διαλυμάτων που περιέχει το kit (Πρωτόκολλο 5.2.4).

Κλωνοποίηση γονιδίου σε πλασμιδιακό φορέα

2.1.4 Πέψη (digestion) με περιοριστικά ένζυμα

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες αναγνωρίζουν μικρές αλληλουχίες DNA και κόβουν το δίκλωνο DNA σε ειδικές θέσεις στο εσωτερικό ή σε γειτονικό σημείο της αλληλουχίας αναγνώρισης. Για την πέψη ενός πλασμιδίου ή ενός τμήματος DNA πρέπει να γνωρίζουμε την αλληλουχία των βάσεων του τμήματος DNA που θα επεξεργαστούμε, ώστε να γίνει η επιλογή των κατάλληλων περιοριστικών ενζύμων. Για τις ποσότητες που θα χρησιμοποιηθούν πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν ότι 1 unit είναι η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για να κόψει 1 μg DNA σε 1 ώρα στους 37°C. Όσον αφορά τις συνθήκες για την σωστή πέψη σημαντικά στοιχεία είναι η θερμοκρασία, ο χρόνος και ο όγκος που θα πραγματοποιηθεί η αντίδραση.

2.1.5 Αποφωσφορυλίωση του DNA

Μετά την πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα, το γραμμικό πλασμιδιακό DNA αποφωσφορυλιώνεται με τη βοήθεια του ενζύμου αλκαλική φωσφατάση (calf intestinal alkaline phosphatase, CIAP της New England Biolabs) που ύστερα από επώαση μιας ώρας στους 37°C απενεργοποιείται με επώαση στους 75°C (heat inactivation). Με την αποφωσφορυλίωση απομακρύνεται η φωσφορική ομάδα από το 5' άκρο του πλασμιδίου με συνέπεια να μην είναι δυνατή η επανακυκλοποίησή του.

2.1.6 Επεξεργασία του προϊόντος PCR με το περιοριστικό ένζυμο Dpn I

Στην PCR ως «μήτρα» (template) χρησιμοποιείται πλασμιδιακό DNA του φορέα pRSET-b-mRFP1 σε ελάχιστη ποσότητα. Είναι δυνατόν κατά την απομόνωση του προϊόντος της PCR από το πήκτωμα αγαρόζης να περιέχεται ελάχιστη ποσότητα πλασμιδιακού φορέα (κλειστό υπερελικωμένο DNA), που θα μπορούσε να οδηγήσει σε ψευδώς θετικούς κλώνους. Στην περίπτωση αυτή είναι απαραίτητο να απομακρυνθεί όλο το πλασμιδιακό DNA (template) που τυχόν έχει παραμείνει στο προϊόν PCR μετά την πέψη με τα ένζυμα περιορισμού. Αυτό επιτυγχάνεται με το περιοριστικό ένζυμο Dpn I που αναγνωρίζει την παλλίνδρομη αλληλουχία 5'...GATC...3', μόνο όταν οι βάσεις της αδενίνης είναι μεθυλιωμένες. Αυτό συμβαίνει μόνο με δίκλωνο DNA του οποίου ο πολλαπλασιασμός έχει γίνει σε βακτηριακά κύτταρα και όχι *in vitro*. Με αυτό τον τρόπο ενώ κατακερματίζουμε το πλασμιδιακό DNA το προϊόν της PCR, δηλαδή το ένθεμα, παραμένει ανέπαφο.

2.1.7 Σύνδεση (ligation) διαφορετικών τμημάτων DNA (φορέας και ένθεμα)

Η ομοιοπολική σύνδεση δυο κομματιών DNA γίνεται με προετοιμασία με πέψη με τα ίδια περιοριστικά ένζυμα, ώστε τα μονόκλινα άκρα τους να είναι συμπληρωματικά και προσθήκη σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα παρουσία της T4 λιγάσης (T4 ligase της Invitrogen) που καταλύει τη σύνδεση. Η όλη διαδικασία πραγματοποιείται στον ελάχιστο δυνατό όγκο, ώστε ο φορέας και το ένθεμα να βρεθούν γειτονικά, να αλληλεπιδράσουν και να συνδεθούν. Για βέλτιστο αποτέλεσμα προτείνεται η ποσότητα του ενθέματος να είναι δύο ή τρεις φορές μεγαλύτερη έναντι αυτής του φορέα, καθώς και η αναλογία των μονόκλωνων κομματιών να είναι 2:1(ένθεμα:φορέας) {Maniatis, 1982 #25}

2.2 Τεχνικές χειρισμού Πρωτεϊνών

2.2.1 Έπαγωγή της έκφρασης πρωτεϊνών σε βακτήρια και καθαρισμός

Η πρωτεΐνη mRFP1 απομονώθηκε από βακτηριακά εκχυλίσματα που φέρουν τον βακτηριακό φορέα έκφρασης pRSET-b. Χρησιμοποιήθηκε το βακτηριακό στελέχος BL21-pRSET-b-mRFP. Η έπαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης έγινε με προσθήκη σε υγρή καλλιέργεια βακτηρίων του αντιδραστήριου IPTG (ισοπρόπουλ β-D-1-θειογαλακτοπιρανοσιδάση) σύμφωνα με το πρωτόκολλο 5.3.1. Στο τέλος της επώασης τα βακτήρια συλλέγονται με φυγοκέντρηση και ακολουθεί λύση τους μετά από αναδιάλυση σε ειδικό ρυθμιστικό διαλύμα που περιέχει ιμιδαζόλιο. Η λύση επιτυγχάνεται με προσθήκη λυσοζύμης για την πέψη του τοιχώματος της πεπτιδογλυκάνης και σειρά παγώματος/ξεπαγώματος (-160°C/37°C), που ακολουθείται από τη χρήση υπερήχων παρουσία ενζύμων που πέπτουν το βακτηριακό DNA και RNA (DNase I και Rnase A). Μετά το πέρας της λύσης, το εναιώρημα φυγοκεντρείται και συλλέγεται το υπερκείμενο (η επιθυμητή ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη βρίσκεται στο διαλυτό μέρος). Ακολουθεί επώαση του διαλυτού βακτηριακού εκχυλίσματος με σφαιρίδια νικελίου (Ni-NTA beads). Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη προσδένεται στα ιόντα Ni²⁺ λόγω της παρουσίας ετικέτας 6 ιστιδινών (His tag) στο αμινοτελικό της άκρο. Ακολουθούν εκπλύσεις για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών που έχουν προσδεθεί μη ειδικά στα σφαιρίδια νικελίου και τέλος γίνεται έκλουση με ειδικό ρυθμιστικό που περιέχει υψηλή συγκέντρωση ιμιδαζολίου για να συλλεχθεί η πρωτεΐνη.

2.2.2 Ανάλυση πρωτεϊνών με SDS PAGE

Το SDS (θειϊκό δωδεκυλικό νάτριο) είναι ένα απορρυπαντικό που μετουσιώνει τις πρωτεΐνες, αποδιατάσσοντάς τη δομή τους στο χώρο. Οι πρωτεΐνες παρουσία SDS αποκτούν ευθύγραμμη διάταξη, ενώ παράλληλα περιβάλλονται από αρνητικό φορτίο. Παρουσία ηλεκτρικού πεδίου οι πρωτεΐνες κινούνται προς τον θετικό πόλο. Το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης είναι πολυμερές ακρυλαμίδιου και επιτρέπει στις πρωτεΐνες να διαχωριστούν ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Κατά την ηλεκτροφόρηση τα μόρια κινούνται μέσα από τους πόρους του πολυμερούς ανάλογα με το μέγεθός τους. Η κινητικότητα είναι ανάλογη του μοριακού βάρους των πρωτεϊνών και του συνολικού θετικού ή αρνητικού τους φορτίου. Σύγκριση της ηλεκτροφορητικής τους κινητικότητας με αυτή μοριακών μαρτύρων επιτρέπει τον προσδιορισμό του φαινομενικού (apparent) μοριακού βάρους της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει (15) (Εικόνα 2.1). Μετά την ηλεκτροφόρηση το πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου μπορεί να μονιμοποιηθεί με τη χρήση μεθανόλης και οξικού οξέως (Διαλύματα.6.4) και να γίνει χρώση των πρωτεϊνών με την χρωστική Coomassie Brilliant Blue.

2.2.3 Ανοσοσύτπωση Western Blot

Μετά την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης πραγματοποιείται μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα σε μεμβράνη/φίλτρο νιτροκυταρίνης. Το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης τοποθετείται σε ειδική διάταξη που δημιουργεί ηλεκτρικό πεδίο σε όλη την επιφάνεια του πηκτώματος. Τα αρνητικά φορτισμένα πρωτεϊνικά μόρια μετακινούνται προς τον θετικό πόλο της συσκευής προσκολλώμενα σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης που παρεμβάλλεται (16) (Εικόνα 2.2).

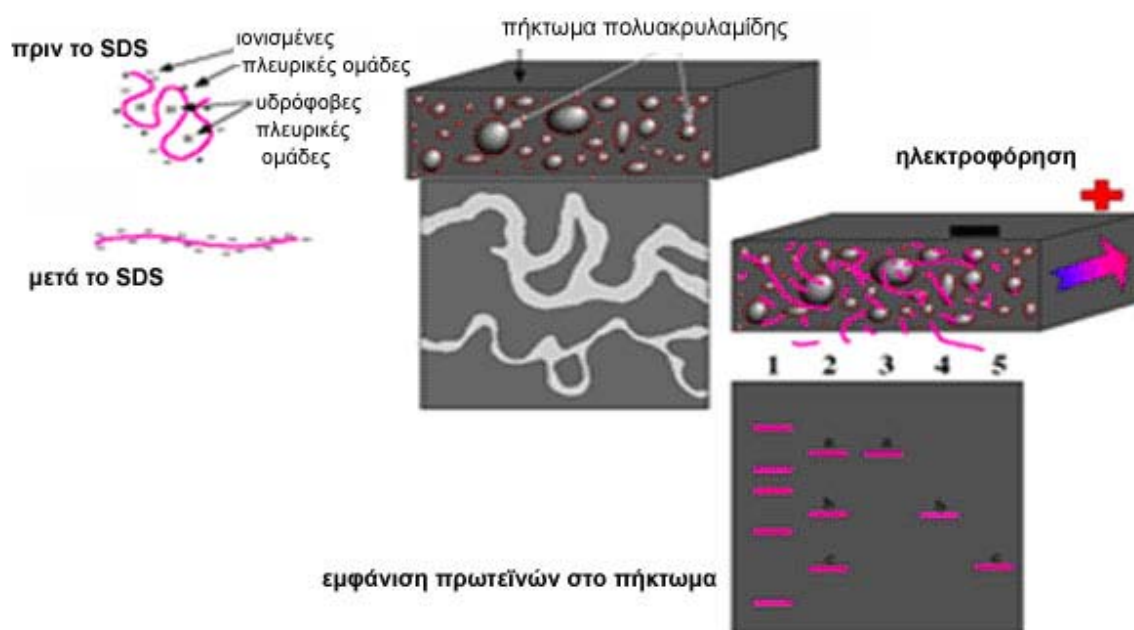
Η νιτροκυταρίνη συγκρατεί μη ειδικά πρωτεΐνες με υδρόφοβες και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Στη συνέχεια η μεμβράνη επωάζεται με αντισώματα ειδικά για τις πρωτεΐνες που μας ενδιαφέρουν να ανιχνεύσουμε παρουσία BSA (αλβουμίνη από ορό βοδιού) ή άπαχο γάλα που εμποδίζουν τη μη ειδική προσκόλληση πρωτεϊνών στη μεμβράνη (blocking). Τα αντισώματα προσδένονται στην πρωτεΐνη-αντιγόνο που μας ενδιαφέρει και η ανίχνευσή τους γίνεται με προσθήκη δεύτερου αντισώματος που

αναγνωρίζει το πρώτο αντίσωμα. Το δεύτερο αντίσωμα είναι συζευγμένο με το ένζυμο υπεροξειδάσης HRP (Horse Radish Peroxidase). Για την ανάπτυξη του ανοσοστυπώματος χρησιμοποιείται το αντιδραστήριο H_2O_2 – DAB που αλληλεπιδρά με την HRP. Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκε ορός από ανοσοποιημένο κουνέλι έναντι της mRFP₁ ή αντίσωμα anti-mRFP καθαρισμένο βάσει της χημικής του συγγένειας προς το αντιγόνο (affinity purified). Το δεύτερο αντίσωμα ήταν αντι-κουνελικός ορός όνου (donkey anti rabbit). (Πρωτόκολλο 5.3.2 και Διαλύματα 6.5.1-6.5.3).

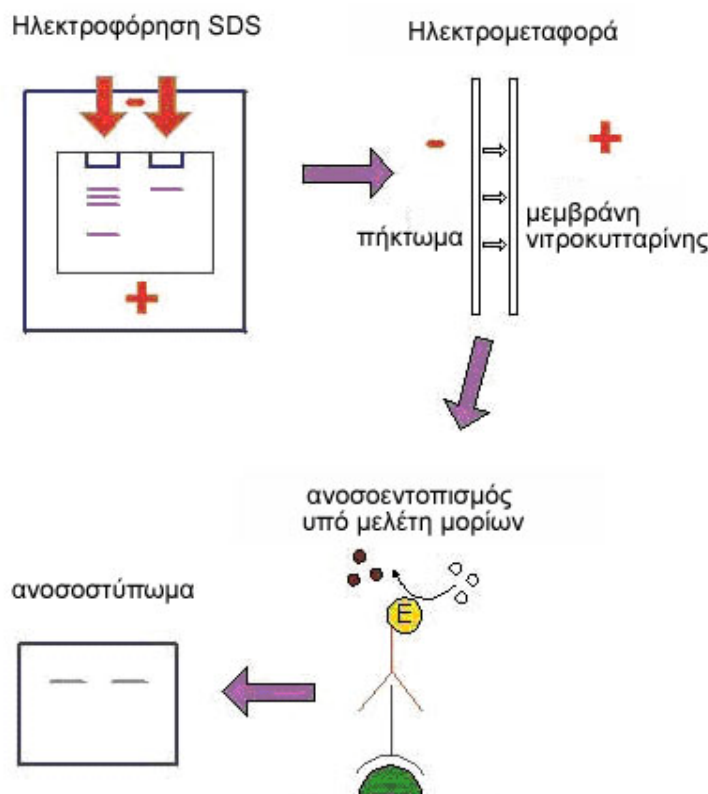
2.2.4 Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford (Bradford assay)

Η δοκιμή Bradford βασίζεται στην άμεση πρόσδεση της χρωστικής Coomassie brilliant blue G-250 (CBBG) σε πρωτεΐνες, στα κατάλοιπα αργινίνης, τρυπτοφάνης, τυροσίνης, ιστιδίνης και φαινυλαλανίνης. Ανιοντικά CBBG προσδεδεμένα σε κατάλοιπα αμινοξέων απορροφούν στα 595 nm, ενώ ελεύθερη χρωστική σε διάλυμα έχει μέγιστη απορρόφηση στα 470 nm. Υπολογίζεται η ποσότητα της ολικής πρωτεΐνης του δείγματος βάσει πρότυπης καμπύλης αναφοράς που εισάγεται στο φωτόμετρο. Η καμπύλη αναφοράς εισάγεται και αποθηκεύεται στο μηχάνημα φωτομετρώντας δείγματα αναφοράς, αντιστοιχίζοντας ουσιαστικά κάθε μέτρηση με την αντίστοιχη συγκέντρωση του διαλύματος.

Ως πρότυπο διάλυμα (standard) χρησιμοποιήθηκε είτε ορός αλβουμίνης βοδιού (BSA) 1 mg/ml, είτε 1 mg/ml BGG (Bovine Gamma Globulin).



Εικόνα 2.1 Διαγραμματική απεικόνιση της μεθόδου SDS-PAGE.



Εικόνα 2.2 Διαγραμματική απεικόνιση των σταδίων της μεθόδου ανοσοσύτπωσης.

2.3 Τεχνικές χειρισμού Παρασίτων

2.3.1 Καλλιέργεια πρωτοζώων

Οι προμαστιγωτές μορφές *L. donovani* LG13 καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό RPMI, εμπλουτισμένο με 10% v/v FBS, 1% w/v HEPES και αντιβιοτικά (5 µg/ml στρεπτομυκίνη, 5 U/ml πενικιλίνη), απουσία CO₂ στους 25°C. Η καμπύλη ανάπτυξης των παρασίτων πραγματοποιήθηκε με καθημερινή καταμέτρηση των παρασίτων κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας. Ενδεικτικά αναφέρεται, ότι όταν για τον εμβολιασμό της καλλιέργειας προμαστιγωτών μορφών χρησιμοποιηθηκαν 10⁶ παράσιτα/ml, ο αριθμός των παρασίτων που συλλέχθηκαν στην στατική φάση ανάπτυξης (5η-6η ημέρα καλλιέργειας) είναι περίπου 2-2,5 x 10⁷ παράσιτα/ml. Η συλλογή των παρασίτων έγινε με φυγοκέντρηση (1.800 rpm σε επιτραπέζια φυγόκεντρο (Thermo), για 10 λεπτά, στους 23°C) και αναδιάλυση του ιζήματος των παρασίτων σε θρεπτικό RPMI με 10% v/v FBS και 1% w/v HEPES.

Τα διάφορα στελέχη *Leishmania* φυλάσσονται στους -80°C σε DMEM/ 30% FBS/10% DMSO σε ειδικούς κρυοπροστατευτικούς σωλήνες του 1,5 ml. Για διατήρηση για μεγάλα χρονικά διαστήματα απαιτείται η μεταφορά τους σε δοχείο που περιέχει υγρό άζωτο.

2.3.2 Επιμόλυνση προμαστιγωτών *L. donovani* LG13 με τον πλασμιδιακό φορέα pLexsy-sat-mRFP1

Η επιμόλυνση προμαστιγωτών παρασίτων *L. donovani* LG13 με πλασμιδιακούς φορείς, πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροδιάτρηση (17). Τα στάδια της μεθόδου είναι τα ακόλουθα.

Αρχικά συλλέγονται παράσιτα που βρίσκονται στο τέλος της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης (2×10^7 παράσιτα/ml). Ακολουθεί έκπλυση των παρασίτων με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροδιάτρησης (21 mM HEPES (pH 7,5), 0,7 mM Na_2HPO_4 , 137 mM NaCl, 6 mM γλυκόζη, 5 mM KCl), ανάμιξη με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο (20 μg) σε κυψελίδα ηλεκτροδιάτρησης (0,2 cm), και επώαση για 10 λεπτά στον πάγο.

Για την ηλεκτροδιάτρηση χρησιμοποιείται το σύστημα Gene Pulser, Pulse Controller, Gene Transformer της Biorad. Η συσκευή GENE PULSER ρυθμίζεται στα 50 μF και 0,45 KV και η συσκευή PULSE CONTROLLER στα 0 Ωhm . Η κυψελίδα, τοποθετείται στο θάλαμο ηλεκτροδιάτρησης και στα άκρα της εφαρμόζεται τάση με ενεργοποίηση της συσκευής που παράγει τον ηλεκτρικό παλμό. Για να είναι επιτυχής ο μετασχηματισμός των παρασίτων, ο ηλεκτρικός παλμός πρέπει να παρουσιάζει χρόνο εκπόλωσης ~ 4 msec. Στη συνέχεια, προστίθενται στα παράσιτα που έχουν υποστεί ηλεκτροδιάτρηση 10 ml θρεπτικού υλικού RPMI/20% v/v FBS και γίνεται επώαση στους 25°C για 16 ώρες. Ακολουθεί η προσθήκη του αντιβιοτικού nourseothricin (στην περίπτωση επιμόλυνσης με το πλασμίδιο pLexsy-sat) σε συγκέντρωση 100 $\mu\text{g/ml}$.

2.3.3 Επιλογή του διαγονιδιακού φθορίζοντος πληθυσμού των παρασίτων

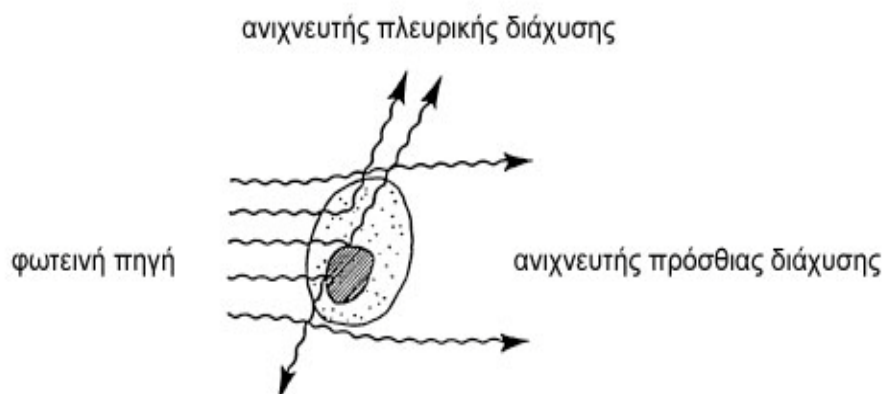
Τα παράσιτα καλλιεργούνται παρουσία του αντιβιοτικού nourseothricin (100 $\mu\text{g/ml}$) σε θρεπτικό υλικό RPMI/20% v/v FCS για >2 εβδομάδες χωρίς ανακαλλιέργεια. Κάθε 5 ημέρες η καλλιέργεια φυγοκεντρείτε (1800rpm/10min) για την απομάκρυνση νεκρών κυττάρων και τμημάτων τους και τα κύτταρα επαναιωρούνται στον ίδιο όγκο θρεπτικού υλικού με αντιβιοτικό. Μετά το πέρας μιας εβδομάδας επιβεβαιώνεται η παρουσία ζωντανών παρασίτων που φθορίζουν με παρατήρηση στο μικροσκόπιο φθορισμού και όταν η καλλιέργεια φθάσει σε μεταλογαριθμική φάση (σε 5 περίπου εβδομάδες) γίνεται πύκνωμα ενός μέρους της καλλιέργειας ($\sim 1/3$). Στη συνέχεια καλλιεργούνται τα παράσιτα σε θρεπτικό υλικό παρουσία 15%v/v FBS και στην επόμενη ανακαλλιέργεια η ποσότητα του FBS μειώνεται στα 10% v/v. Ακολουθεί χαρακτηρισμός των διαγονιδιακών φθορίζοντων παρασίτων με κυτταρομετρία ροής (FACS) και μικροσκοπία φθορισμού.

2.3.4 Ταυτοποίηση /καταμέτρηση των κυτταρικών πληθυσμών με κυτταρομετρία ροής (FACS).

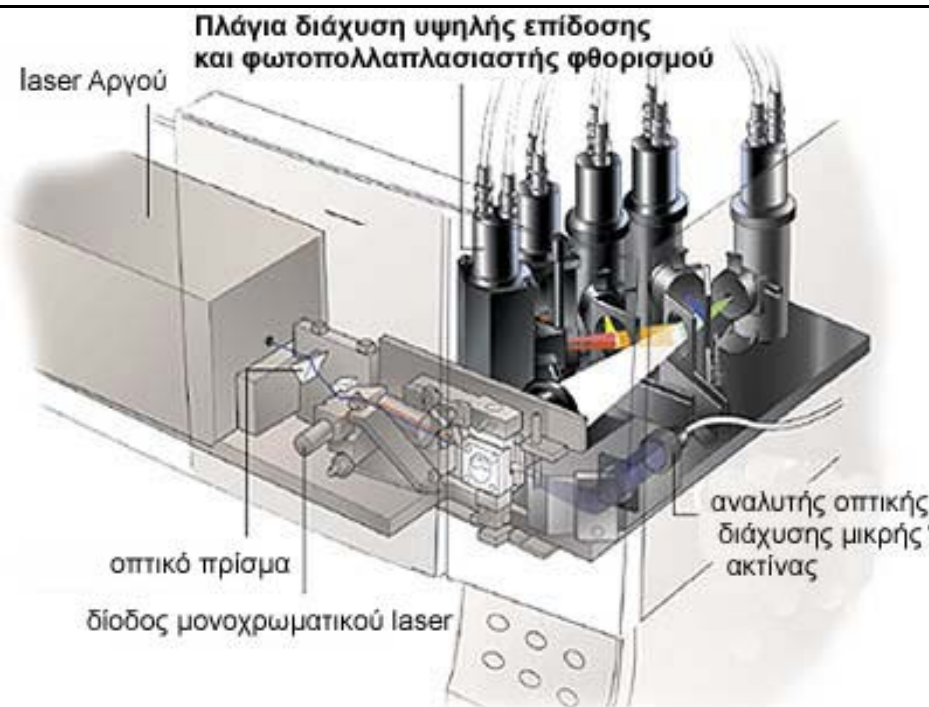
Η κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία για τον ποσοτικό προσδιορισμό του υποπληθυσμού των διαγονιδιακών παρασίτων *Leishmania donovani* που εκφράζουν την πρωτεΐνη mRFP1 (LdmRFP1).

Με την μέθοδο αυτή ο πληθυσμός των κυττάρων που φθορίζει είτε μετά από σήμανση με α) φθορίζουσες χρωστικές (π.χ. ιωδιούχο προπύδιο) ή β) αντισώματα (μονοκλωνικά ή πολυκλωνικά) συζευγμένα με φθοριοχρώματα είτε γιατί εκφράζει φθορίζουσες πρωτεΐνες προσδιορίζεται με βάση την ένταση του φθορισμού που εκπέμπεται ύστερα από διέγερση με μονοχρωματική ακτινοβολία laser που προσπίπτει σε κάθε κύτταρο καθώς αυτά περνούν σε ροή ενός κυττάρου μπροστά από τη γραμμή laser (Εικόνα 2.4). Επιπλέον, είναι δυνατό να προσδιοριστούν μορφολογικά χαρακτηριστικά των κυττάρων; με την παράμετρο του πρόσθιου σκεδασμού (FSC) προσδιορίζεται το μέγεθος των κυττάρων και με αυτήν του πλάγιου σκεδασμού (SSC) η εσωτερική πολυπλοκότητα (κοκκία, οργάνidia) του κυττάρου (Εικόνα 2.3). Οι δύο αυτές παράμετροι απεικονίζονται σε ιστογράμματα και τα δύο

ιστογράμματα συνδυάζονται για την παραγωγή του λεγόμενου «διαγράμματος FSC/SSC» σε δισορθογώνιο σύστημα αξόνων. Στο διάγραμμα αυτό, οι ομάδες κυττάρων απεικονίζονται σαν «νέφη σημείων» (dots), ανάλογα με τα χαρακτηριστικά τους. Κάθε σημείο (dot) αντιστοιχεί στις παραμέτρους ενός κυττάρου. Ο πληθυσμός του κάθε «νέφους» μπορεί να καταμετρηθεί με μεγάλη ακρίβεια από το λογισμικό του υπολογιστή. Η κυτταρομετρία ροής είναι μέθοδος που γρήγορα και με μεγάλη ευαισθησία παρέχει τη δυνατότητα ανάλυσης αρκετών εκατοντάδων κυττάρων ανά δευτερόλεπτο. Στα πειράματά μας έγινε ανάλυση 20.000 γεγονότων (events)/δείγμα πραγματοποιήθηκε στον κυτταρόμετρητή ροής BECTON-DICKINSON FACS Calibur.



Εικόνα 2.3 Πλευρικός και πρόσθιος σκεδασμός του φωτός όταν προσπίπτει σε κύτταρο που ανιχνεύονται από τον κυτταρομετρητή ροής.



Εικόνα 2.4 Απεικόνιση της διάταξης κυτταρομετρητή ροής.
(http://www.bdbiosciences.com/wcmimages/facscalibur_features_dualaser.jpg)

2.3.5 Άνοσοφθορισμός-Συνεστιακή Μικροσκοπία Φθορισμού

Άνοσοφθορισμός είναι η σήμανση αντιγόνων του κυττάρου με αντισώματα συζευγμένα με φθορίζουσες χρωστικές. Αυτή η τεχνική χρησιμοποιείται για την παρατήρηση της υποκυτταρικής κατανομής των βιομορίων. Τμήματα ιστών ή κυττάρων που είναι σημασμένα με της τεχνική του ανοσοφθορισμού μελετώνται με μικροσκόπιο φθορισμού ευρέως πεδίου (wide field) ή με 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), εξάλειψη της μη εστιασμένης ακτινοβολίας (elimination of out-of-focus glare) και η λήψη διαδοχικών οπτικών τομών με τη δυνατότητα ανάλυσης του βάθους δειγμάτων. Εφαρμογές ιδιαίτερα χρήσιμες για την ανάλυση δειγμάτων με μεγάλο πάχος (π.χ. τμημάτων ιστών ή εμβρύων πειραματοζώων).

(<http://www.microscopyu.com/articles/confocal/confocalintrobasics.html>)

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3 Κλωνοποίηση του γονιδίου mRFP1 στον πλασμιδιακό φορέα pLexsy-sat

Το γονίδιο της κόκκινης φθορίζουσας πρωτεΐνης mRFP1 ενισχύθηκε με τη μέθοδο PCR με κατάλληλα ολιγονουκλεοτίδια εκκινητές από το φορέα pRSET-b-mRFP1 (MTA-εργαστήριο του Y. Tsien Howard Hughes Medical Institute, U. of California, San Diego). Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε εισαγωγή του προϊόντος της PCR στο φορέα pLexsy-sat, σύμφωνα με τεχνικές μοριακής βιολογίας, όπως περιγράφονται παρακάτω.

3.1 Πλασμιδιακοί φορείς pRSET-b-mRFP1 και pLEXSY-sat

Ο pLexsy-sat είναι φορέας έκφρασης ειδικός για τα πρωτόζωα της οικογένειας Trypanosomatidae, στην οποία ανήκει και το γένος *Leishmania*. Το πλασμίδιο pLexsy-sat έχει μέγεθος 8206 bp (Χαρτης 3.1). Ο pRSET-b-mRFP1 είναι ο φορέας από όπου απομονώθηκε το γονίδιο της mRFP₁ και παράλληλα είναι και φορέας έκφρασης της πρωτεΐνης mRFP₁ σε βακτήρια. Ο pRSET-b-mRFP₁ έχει μέγεθος 3,6 kb. Το γονίδιο της πρωτεΐνης mRFP1 βρίσκεται ανάμεσα στις θέσεις περιορισμού BamHI και EcoRI (Χαρτης 3.2).

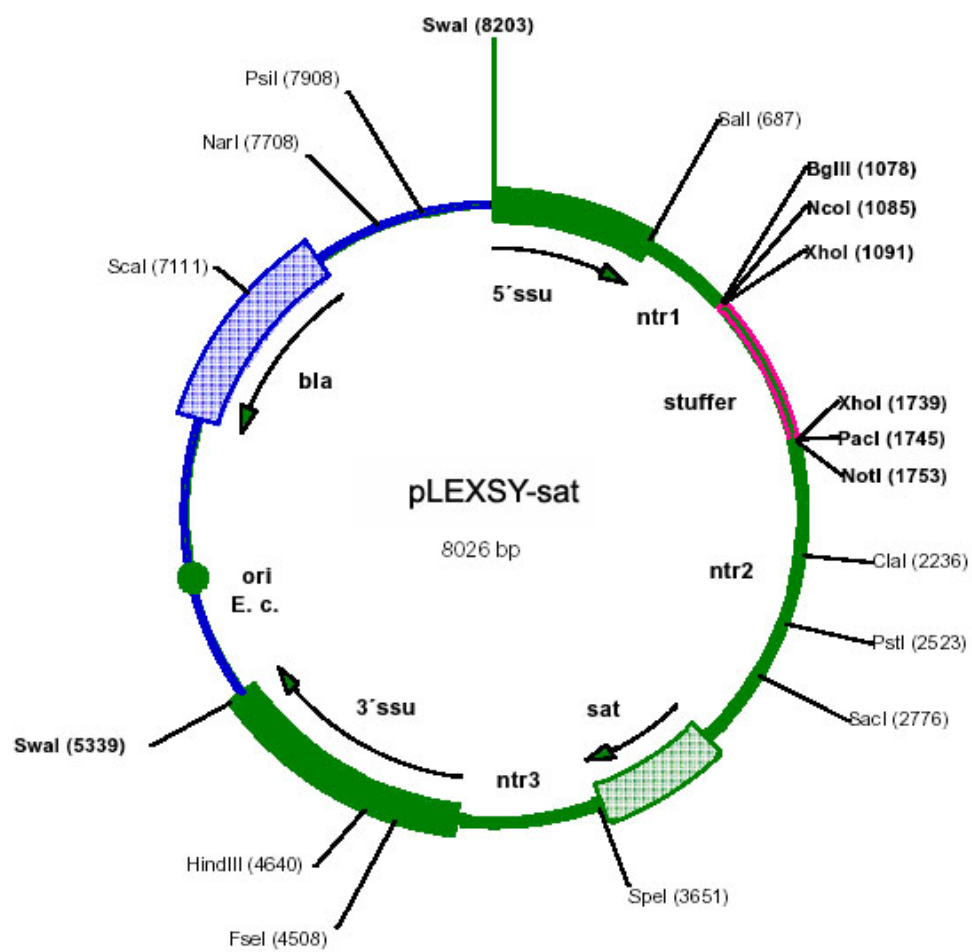
3.1.1 Παραγωγή και απομόνωση των πλασμιδιακών φορέων pRSET-b-mRFP1 και pLEXSY-sat

Αρχικό στάδιο για την κλωνοποίηση της mRFP₁ ήταν η απομόνωση σε μεγάλη κλίμακα (maxi prep) πλασμιδιακού DNA των πλασμιδιακών φορέων που περιγράφησαν στην προηγούμενη παράγραφο.

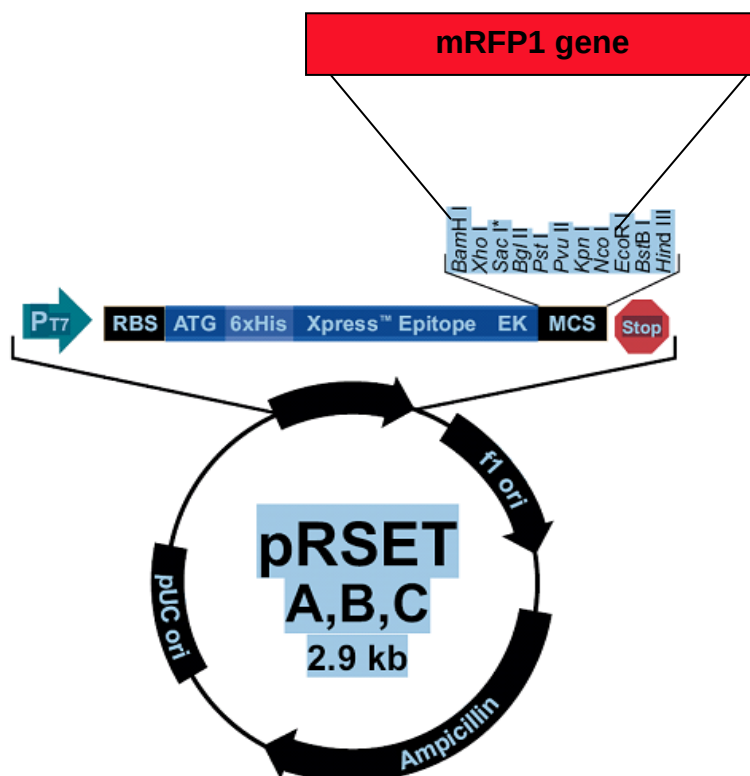
Αρχικά έγινε εισαγωγή των πλασμιδίων σε βακτηριακά κύτταρα *E.coli*. Με μετασχηματισμό του στελέχους *E.coli* BL21 (για τον φορέα pRSET-b-mRFP1) ή DH5a (για τον φορέα pLexsy-sat) (ΤΕΧΝΙΚΕΣ 2.1.3 & ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ 5.1.1) Στη συνέχεια έγινε επιλογή αποικίας θετικού κλώνου και πολλαπλασιασμός της αποικίας σε μικρή υγρή βακτηριακή καλλιέργεια (5ml) που περιείχε αμπικιλίνη (ΤΕΧΝΙΚΕΣ 2.1.4α) για απομόνωση μικρής ποσότητας πλασμιδιακού DNA (mini prep) και έλεγχο των πλασμιδίων με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων και ηλεκτοφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 0.8%w/v. Ακολούθησε απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα (maxi prep) για κάθε φορέα (ΤΕΧΝΙΚΕΣ 2.1.4β)

3.1.2 Ανάλυση των φορέων με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Η καθαρότητα και η ποιότητα του πλασμιδιακού DNA που απομονώθηκε επιβεβαιώθηκε α) με φωτομέτρηση στα 260nm και 280nm. $OD_{260}/OD_{280}=2.8$ για το πλασμίδιο pRSET-b (1,04 μg/μl) και $OD_{260}/OD_{280}=2.5$ για το pLexsy-sat (1,75 μg/μl) και με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1%w/v (ΤΕΧΝΙΚΕΣ 2.2.2 & ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ 5.2.3) (Εικόνα 3.1)



Χάρτης 3.1. Πλασμίδιο pLexsy-sat.



Χάρτης 3.2. Πλασμίδιο pRSET-b

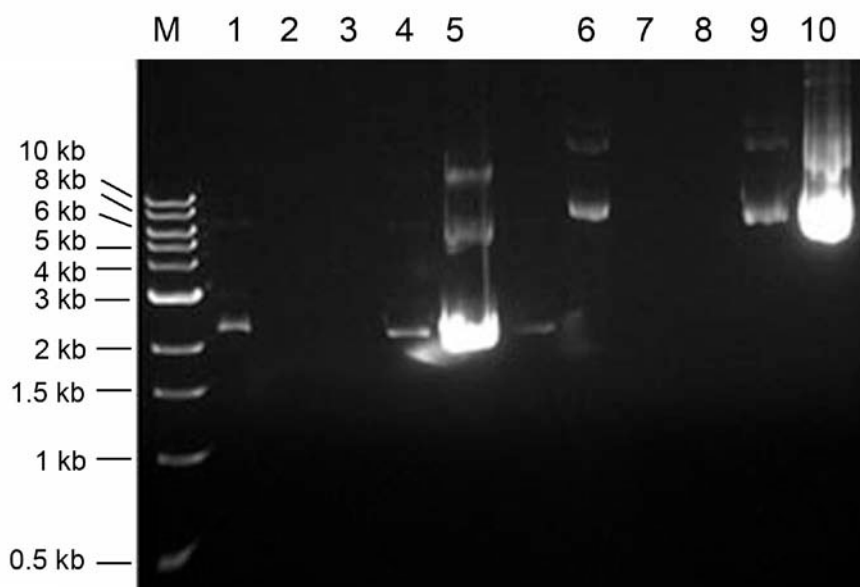
3.2 Ενίσχυση του ενθέματος mRFP1

Ενισχύθηκε το τμήμα DNA που αντιστοιχεί στο γονίδιο της mRFP₁ από το πλασμίδιο pRSET-b με την τεχνική της PCR. Αρχικά πειράματα εκπονήθηκαν για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών. Σε πρώτη φάση χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρα (template) είτε καθαρό πλασμίδιο pRSET-b-mRFP₁ είτε κύτταρα βακτηριακής αποικίας που περιείχαν το πλασμίδιο pRSET-b-mRFP₁ ενώ παράλληλα ελέγχθηκε η δραστηριότητα των πολυμερασών Taq της Invitrogen και recombinant Taq που έχει παρασκευαστεί στο εργαστήριο από βακτηριακά εκχυλίσματα *E.coli*. Στη συνέχεια ελέγχθηκαν η rec-Taq πολυμεράση και η Vent_R πολυμεράση της NEB (New England Biolabs). Το ενζυμο Vent_R επελέγχει λόγω της μεγάλης πιστότητας κατά την προσθήκη νουκλεοτιδίων σε σχέση με την rec-Taq. Τέλος προσδιορίστηκε η βέλτιστη συγκέντρωση ιόντων Mg⁺⁺ για την βέλτιστη λειτουργία της Vent_R με μήτρα καθαρό πλασμιδιακό DNA.

Πρέπει να σημειωθεί ότι ο έλεγχος για την περαιτέρω προσθήκη ιόντων Mg⁺⁺ αφορά την επιπλέον ποσότητα από αυτήν που εμπεριέχεται στο ρυθμιστικό διάλυμα (2 mM Mg⁺). Στην αντίδραση που δεν έχει προστεθεί επιπλέον MgSO₄ η τελική συγκέντρωση των ιόντων Mg⁺⁺ είναι αυτή του ρυθμιστικού διαλύματος. Η συγκέντρωση Mg⁺⁺ των 2 mM επελέγχει ως βέλτιστη για την παραγωγή του προϊόντος του γονιδίου της mRFP₁ δεδομένου ότι με αυτήν παράγεται το επιθυμητό προϊόν χωρίς παραπροϊόντα (Εικόνα 3.4, διαδρομή 1).

Για την παραγωγή ικανής ποσότητας ενθέματος mRFP1 για την κλωνοποίηση πραγματοποιήθηκε ενίσχυση του ενθέματος mRFP1 με την τεχνική PCR σε 3 αντιδράσεις με συνολικό όγκο 300 μ l (Πίνακας 3.4, *Εικόνα 3.5*).

Το προϊόν (αναμενόμενο μέγεθος 731 bp) και από τις τρεις αντιδράσεις διαχωρίστηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v και απομονώθηκε από το πήκτωμα σύμφωνα με το πρωτόκολλο διαχωρισμού (ΤΕΧΝΙΚΕΣ 2.2.3. και ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ 5.2.4).



Εικόνα3.1. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με χρήση του Maxi Kit της Qiagen και της κολώνας QIAGEN-tip 500. Ανάλυση των κλασμάτων από την διαδικασία της απομόνωσης.

(Διαδρομές 1-5: κλάσματα απομόνωσης του pRSET-b, Διαδρομές 6-10 κλάσματα απομόνωσης του pLexsy-sat. Διαδρομές 1 & 6: υπερκείμενο, 2 & 7: flow-through, 3 & 8:εκπλύσεις, 4 & 9: έκλουση, 5 & 10: Απομονωθέν πλασμίδιο μετά από επαναδιάλυση με dH₂O).

Πίνακας 3.1 Αντίδραση PCR. Έλεγχος Taq πολυμερασών

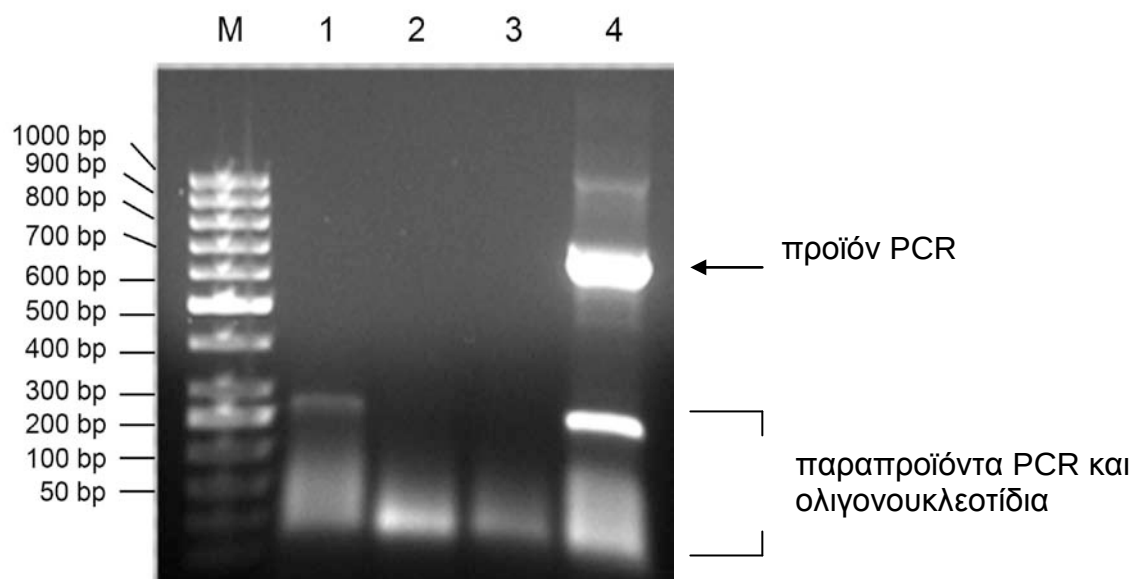
Αντιδραστήρια	1	2	3	4	Τελικές συγκεντρώσεις
Ρυμιστικό,10X	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	1x
MgCl ₂ 50mM	3 μ l	3 μ l	3 μ l	3 μ l	1.5 mM
dNTPs 2mM	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	200 μ M
Oligo 5'	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	1 mM
(Bgl II) 10mM					
Oligo 3'	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	1mM
(Xho I) 10mM					
Μήτρα (template)	Βακτ.κύτταρα	Πλασμίδιο pF mRFP ₁ (5 ng)	Βακτ.κύτταρα	Πλασμίδιο pRSET-b-mRFP ₁ (5 ng)	
Ένζυμο Taq	Taq rec(1 μ l)	Taq rec(1 μ l)	Invitrogen Taq(1 μ l)	Invitrogen Taq(1 μ l)	5units/αντίδραση
dH ₂ O	56 μ l	55 μ l	56 μ l	55 μ l	
Συνολικά	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	

Πίνακας 3.2 Αντίδραση PCR. Έλεγχος Ταq πολυμερασών

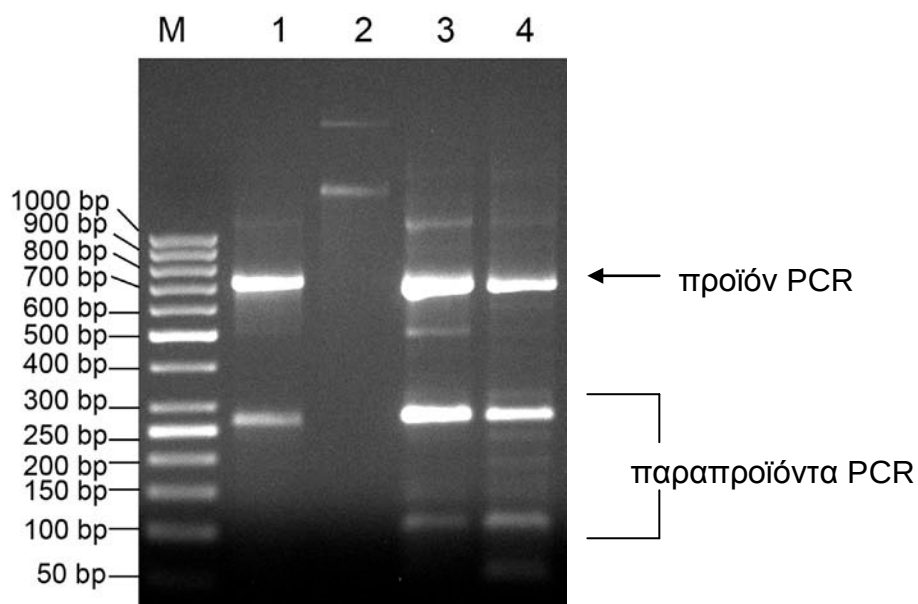
Αντιδραστήρια	Αντίδραση 1	Αντίδραση 2	Αντίδραση 3	Αντίδραση 4	Τελικές Συγκεντρώσεις
Ρυθμιστικό 10x	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	1x
MgCl ₂ 50mM / *MgSO ₄ 100mM	2 µl	2 µl	2 µl	1 µl	2 mM (1,2&4) 4 mM (3)
dNTPs 2mM	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	200 µM
Oligo 5' (Bgl II) 10mM	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	1 mM
Oligo 3' (Xho I) 10mM	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	1mM
Μήτρα (template)	Βακτ. κύτταρα	Πλασμίδιο mRFP ₁ (5 ng)	pF Βακτ. κύτταρα	Πλασμίδιο pRSET-b-mRFP ₁ (5 ng)	
Ένζυμο Ταq	Ταq rec(1µl)	Ταq rec (1µl)	Vent _R (1 µl)	Vent _R (1 µl)	2unit/αντίδραση
dH ₂ O	31.5 µl	31 µl	33.5 µl	32.5 µl	
Συνολικά	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	

Πίνακας 3.3 Αντίδραση PCR. Έλεγχος της επίδρασης της συγκέντρωσης ιόντων Mg⁺⁺ στην δραστηριότητα του ενζύμου Vent_R

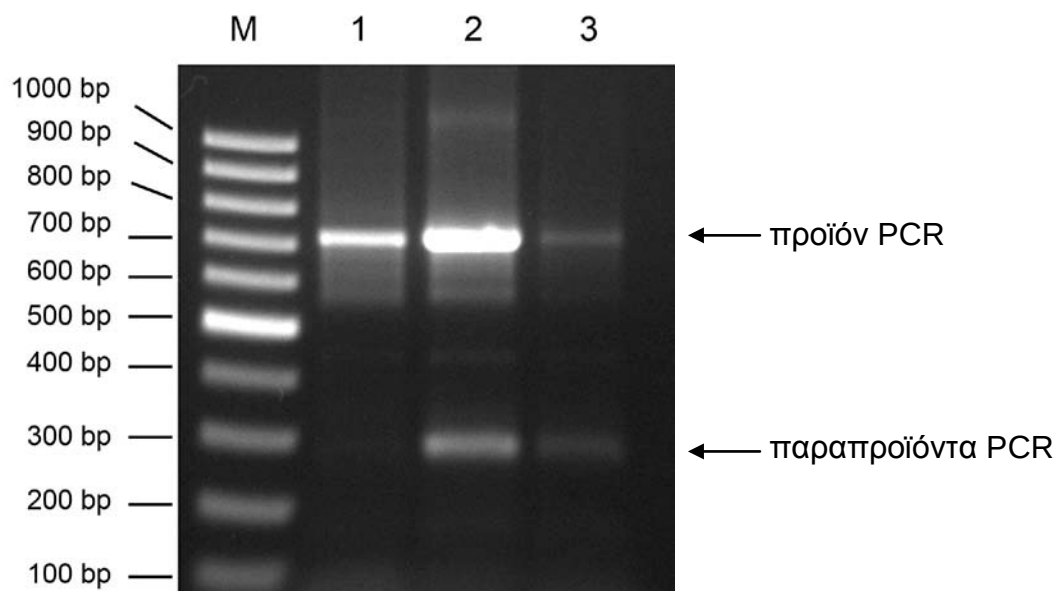
Αντιδραστήρια	Αντίδραση 1	Αντίδραση 2	Αντίδραση 3	Τελικές συγκεντρώσεις
Ρυθμιστικό Thermopol, 10x	10 µl	10 µl	10 µl	1x
MgSO ₄ 100mM	0 µl	1 µl (1mM)	2.5 µl (2.5 mM)	
dNTPs 10mM	2 µl	2 µl	2 µl	200 µM
Oligo 5' (Bgl II) 10mM	10 µl	10 µl	10 µl	1 mM
Oligo 3' (Xho I) 10mM	10 µl	10 µl	10 µl	1mM
Μήτρα (template) : pRSET-b-mRFP ₁	1 µl	1 µl	1 µl	20ng/αντίδραση
Ένζυμο Vent _R	1 µl	1 µl	1 µl	2units/αντίδραση
dH ₂ O	66 µl	65 µl	63.5 µl	
Συνολικά	100 µl	100 µl	100 µl	



Εικόνα 3.2 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v των προϊόντων των αντιδράσεων της PCR από τον Πίνακα 3.1 (1: αντίδραση 1, 2: αντίδραση 2, 3: αντίδραση 3, 4: αντίδραση 4)



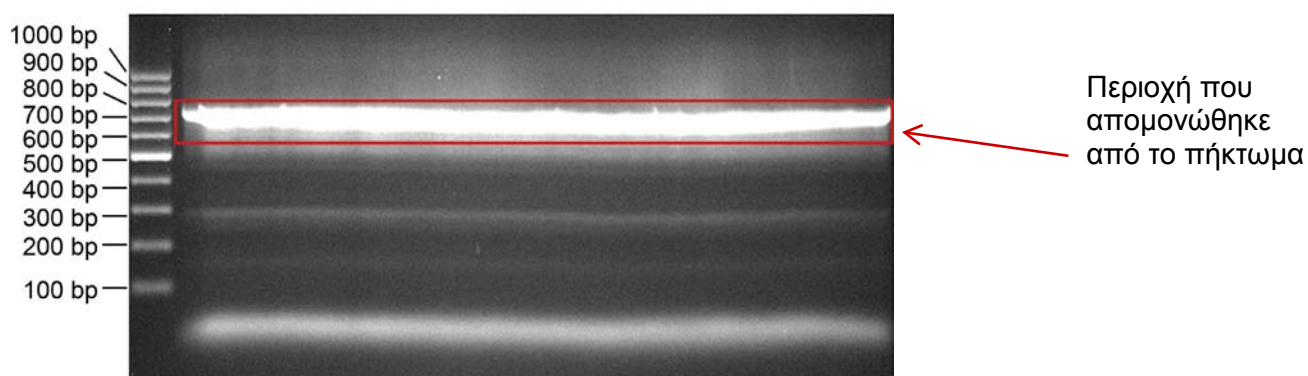
Εικόνα 3.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v των προϊόντων των αντιδράσεων της PCR από τον Πίνακα 3.2 (1: αντίδραση 1; 2: αντίδραση 2; 3: αντίδραση 3; 4: αντίδραση 4).



Εικόνα 3.4. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Από τον Πίνακα 3.3: (1: αντίδραση 1; 2: αντίδραση 2; 3: αντίδραση 3)

Πίνακας 3.4. Ενίσχυση ενθέματος mRFP1 με την τεχνική PCR

Αντιδραστήρια	Αντίδραση	3x αντίδρασης	Τελικές Συγκεντρώσεις
Ρυθμιστικό 10x	10 μ l	30 μ l	1x
dNTPs 10mM	2 μ l	6 μ l	200 μ M
Oligo 5' (Bgl II) 10mM	10 μ l	30 μ l	1 mM
Oligo 3' (Xho I) 10mM	10 μ l	30 μ l	1mM
Μήτρα (template) Πλασμίδιο pRSET-b-mRFP	3 μ l	9 μ l	20 ng/αντίδραση
Ένζυμο Vent Taq	1 μ l	3 μ l	2 units/αντίδραση
dH ₂ O	64 μ l	192 μ l	
Συνολικά	100 μ l	300 μ l	



Εικόνα 3.5. Ενίσχυση ενθέματος mRFP1 με την τεχνική PCR. Ανάλυση με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v των προϊόντων της αντίδρασης.

3.3 Προετοιμασία φορέα και ενθέματος για σύνδεση (ligation)

3.3.1 α) Προετοιμασία πλασμιδιακού DNA

Πραγματοποιήθηκε διπλή πέψη του πλασμιδίου pLexsy-sat με τα περιοριστικά ένζυμα XhoI & Bgl II της NEB. Το ένζυμο Xho I διαθέτει δύο περιοριστικές θέσεις στο πλασμίδιο pLexsy-sat. Η θέση που βρίσκεται στο 5' άκρο είναι κατά 12 νουκλεοτίδια downstream (πιο δεξιά) από την περιοριστική θέση του BglII και ως εκ τούτου δεν επηρεάζει τη δράση του περιοριστικού ενζύμου. Μετά από πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες (12 ώρες στους 37°C) πραγματοποιήθηκε αποφωσφορυλίωση του 5' άκρου του γραμμικού πλασμιδίου. Το τμήμα που αποκόπτεται (stuffer) από τον πλασμιδιακό φορέα έχει μέγεθος 661bp (Χάρτης 3.3).

3.3.2 α) Προετοιμασία ενθέματος

Το προϊόν της PCR επωάστηκε με τα περιοριστικά ένζυμα Xho I και Bgl II (12 ώρες στους 37°C) για πέψη των θέσεων περιορισμού στο 5' και 3' άκρο. Στη συνέχεια έγινε επώαση με το ένζυμο DpnI για να μετατραπούν σε ευθύγραμμα τα υπολείμματα υπερελικομένου πλασμιδιακού DNA, που τυχόν συναπομονώθηκαν με το προϊόν της PCR. Το ένζυμο DpnI πέπτει μόνο δίκλωνο, κλειστό, υπερελικομένο DNA και αφήνει ανέπαφο το ενισχυμένο ένθεμα στο προϊόν PCR. Στη συνέχεια απομονώθηκε το ένθεμα από πήκτωμα αγαρόζης (Εικόνα 3.7)

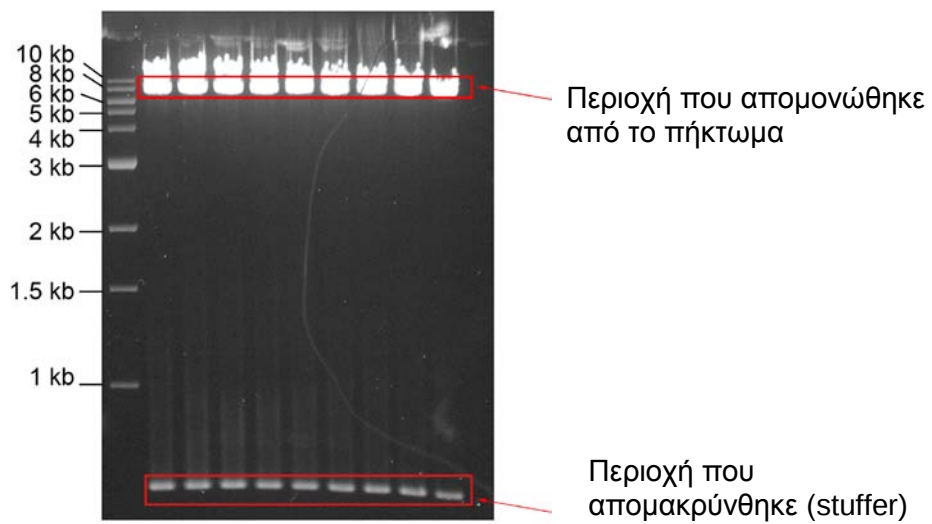
3.4 Σύνδεση (ligation) του ενθέματος με το φορέα

Μετά την πέψη και απομόνωση του πλασμιδιακού φορέα (pLexsy-sat) και του ενθέματος (mRFP1) ηλεκτροφορείται μικρή ποσότητα του ενθέματος και του φορέα σε πήκτωμα αγαρόζης (Εικόνα 3.8) για να ελεγχθεί η καθαρότητα τους και να προσδιορισθούν οι ποσότητες που θα χρησιμοποιηθούν στην αντίδραση της λιγάσης. Υπολογίστηκαν οι ποσότητες του φορέα και του ενθέματος βάσει της αναλογίας των μονόκλωνων άκρων, η οποία πρέπει να είναι 1:2 (φορέα : ένθεμα). Γνωρίζοντας ότι 1 μόριο ευθύγραμμου φορέα pLexsy-sat αντιστοιχεί σε 7,5 kb και ότι 1 μόριο mRFP1, ύστερα από πέψη με Bgl II και XhoI, αντιστοιχεί σε 0,7 kb βρέθηκε ότι σε 1 ng περιέχονται 10,7 περισσότερα μόρια ενθέματος από μόρια φορέα. Επειδή η επιθυμητή ποσότητα μονόκλωνων άκρων είναι διπλάσια για το ένθεμα, και δεδομένου ότι 1 μόριο φορέα και 1 μόριο ενθέματος περιέχουν τον ίδιο αριθμό μονόκλωνων άκρων, αφού έχουν υποστεί περιοριστική πέψη με τα ίδια ένζυμα, στην αντίδραση λιγάσης για κάθε ng ενθέματος προστέθηκαν $10,7/2=5,35$ ng φορέα. Συγκεκριμένα 200 ng ενθέματος αντέδρασαν με 1070 ng φορέα σε όγκο 10 μl για κάθε αντίδραση λιγάσης. Το διάλυμα της αντίδρασης σύνδεσης (ligation) επωάστηκε στους 4°C για 16 ώρες.

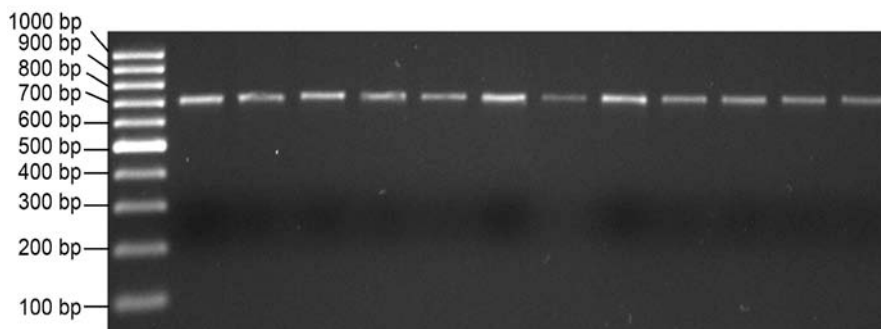
3.5 Μετασχηματισμός επιδεκτικών βακτηρίων με ανασυνδυασμένο πλασμίδιο

Ο πολλαπλασιασμός των πλασμιδίων p-Lexsy-sat-mRFP1 που προέκυψαν από την αντίδραση της λιγάσης έγινε με μετασχηματισμό ηλεκτροδεκτικών στελεχών *E.coli* DH5a και χημειοδεκτικών στελεχών *E.coli* TOP 10 F'. Ο μετασχηματισμός έγινε με 1 μl της αντίδρασης της λιγάσης για τα ηλεκτροδεκτικό στέλεχος και με 5 μl για το χημειοδεκτικό στέλεχος, ενώ παράλληλα χρησιμοποιήθηκαν αρνητικοί και θετικοί μάρτυρες, όπως αναγράφεται στον Πίνακα 3.5.

Για τον μετασχηματισμό ακολουθήθηκαν τα πρωτόκολλα μετασχηματισμού που αφορούν το κάθε στέλεχος (ΤΕΧΝΙΚΕΣ 2.1.2). Είκοσι αποικίες επιλέχθηκαν τυχαία ως πιθανοί θετικοί κλώνοι για περαιτέρω έλεγχο.



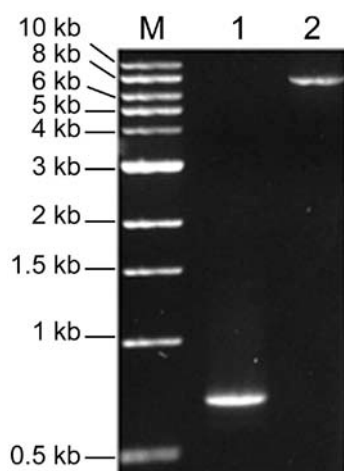
Εικόνα 3.6. Ηλεκτροφόρηση σε αгарόζη 0.8% w/v του πλασμιδιακού φορέα pLexsysat ύστερα από πέψη και αποφωσφορυλίωση



Εικόνα 3.7 Γονίδιο της mRFP1, προϊόν PCR, ύστερα από πέψη με τα ένζυμα XhoI και Bgl II.

Πίνακας 3.5 Αποτελέσματα μετασχηματισμού των βακτηρίων DH5a και TOP 10F' με τα προϊόντα της αντίδρασης της λιγάσης.

	Πλασμίδιο	DH5a	TOP 10F'
Θετικός μάρτυρας	pLexsy-sat κυκλικό	Ελάχιστες	πολλές αποικίες (>100)
Αρνητικός μάρτυρας για πέψη και φωσφατάση	pLexsy-sat ύστερα από πέψη	Καθόλου	Λίγες αποικίες (12)
Αρνητικός μάρτυρας	pLexsy-sat ύστερα από πέψη και σύνδεση	Καθόλου	Λίγες αποικίες (15)
Αντίδραση	pLexsy-sat-mRFP ₁ ύστερα από σύνδεση	2 αποικίες	Αρκετές αποικίες (>50)



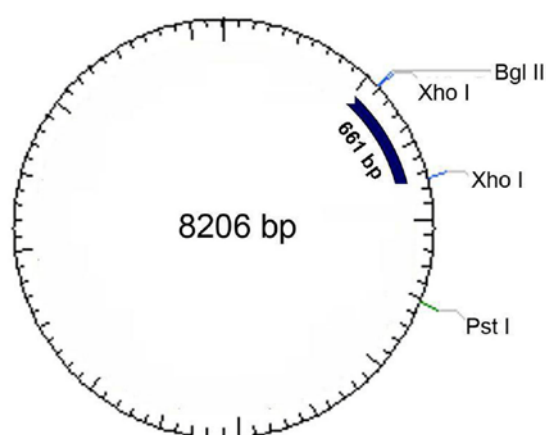
Εικόνα 3.8. Ηλεκτροφόρηση του πλασμιδιακού φορέα (pLexsy-sat) και του ενθέματος (mRFP₁) σε πήκτωμα αгарόζης 0.8% w/v. **M:** μοριακός μάρτυρας 1kb. **1:** (2 μl, 190ng) ένθεμα mRFP₁; **2:**(2 μl , 52ng) φορέας pLexsy-sat.

3.6 Έλεγχος θετικών κλώνων

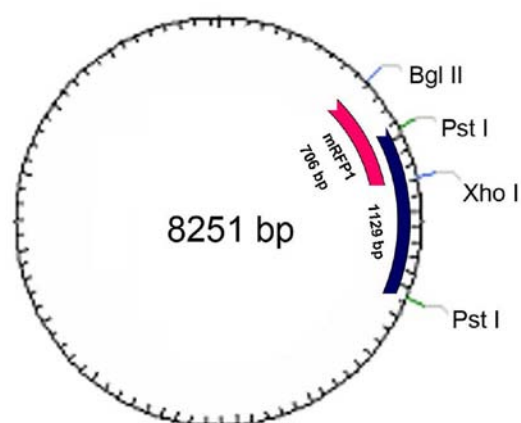
Οι 20 αποικίες καλλιεργήθηκαν (16 ώρες στους 37°C) σε μικρό όγκο (3 ml) υγρού θρεπτικού LB + amr και στη συνέχεια απομονώθηκε πλασμιδιακό DNA από κάθε καλλιέργεια σύμφωνα με πρωτόκολλο για απομόνωση μικρής κλίμακας πλασμιδιακού DNA (*mini prep*, Τεχνικές 2.1.4).

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε πέψη σε πλασμιδιακό DNA κάθε κλώνου με το περιοριστικό ένζυμο Pst I. Το ένζυμο αυτό διαθέτει μια περιοριστική θέση στο πλασμίδιο pLexsy-sat εκτός του τμήματος που αποκόπτεται (stuffer) και άλλη μια θέση εντός του ενθέματος. Επομένως με την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης αναμένεται να εμφανιστούν δυο λωρίδες (bands) για τα δείγματα των θετικών κλώνων. Η μια θα πρέπει να έχει μέγεθος 7122 bp και η άλλη 1129 bp (Χάρτης 3.3 & Εικόνα 3.9).

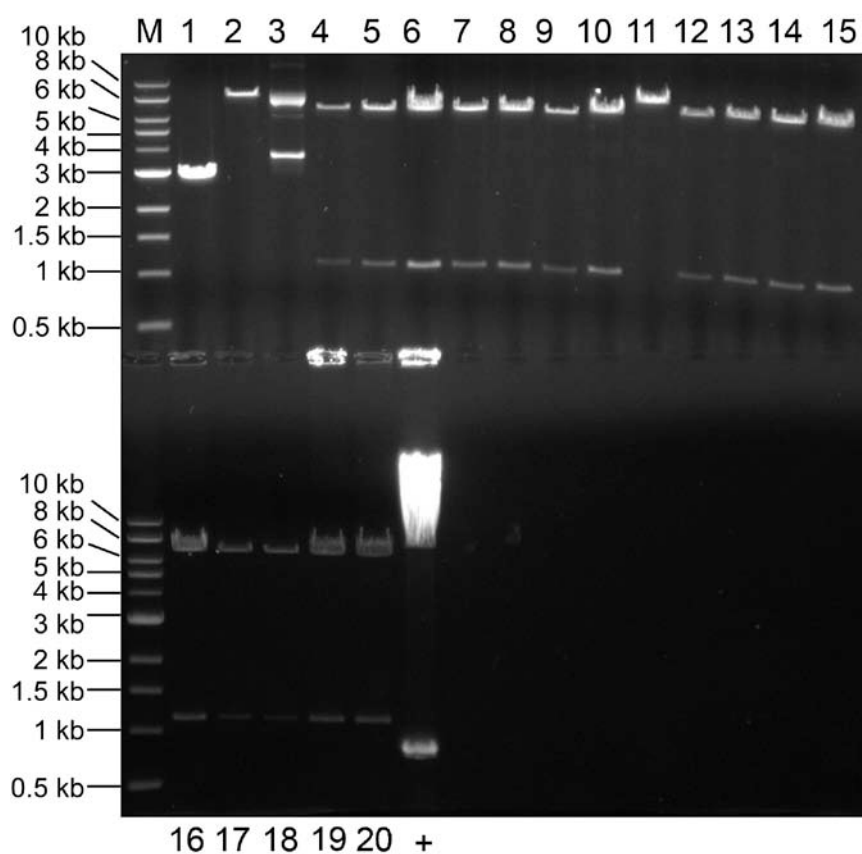
A



B



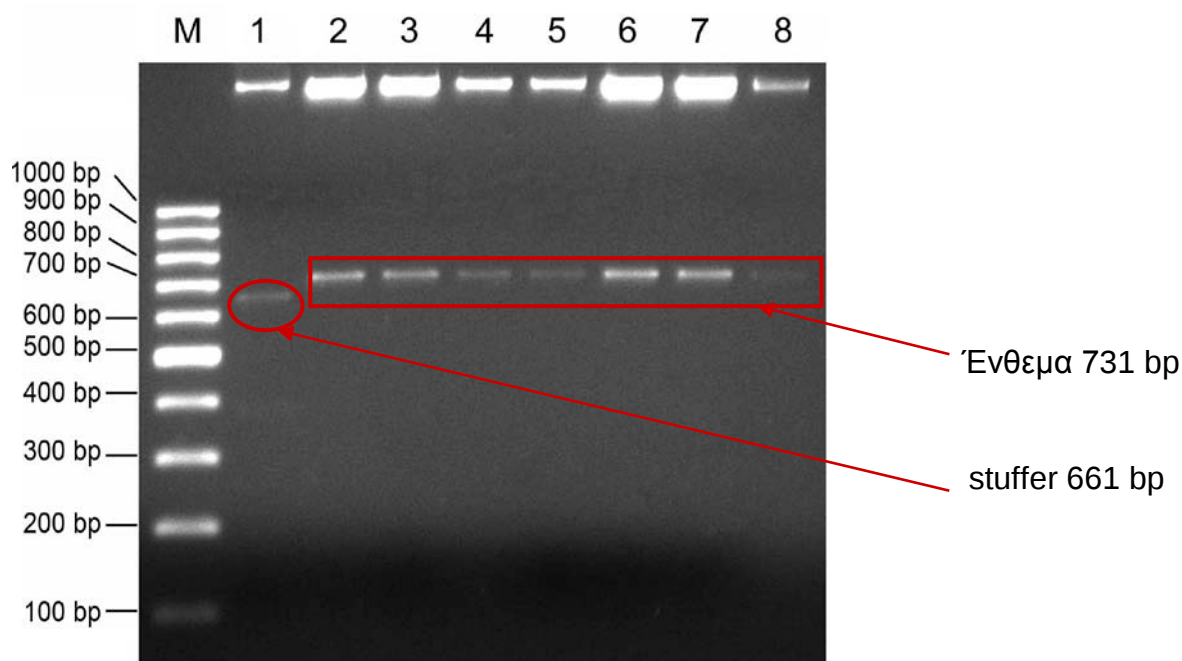
Χάρτης 3.3 Γραμμικός χάρτης του του πλασμιδίου pLexsy-sat όπου φαίνονται οι περιοριστικές θέσεις των ενζύμων Xho I, Bgl II και Pst I χωρίς το ένθεμα (A) και με το ένθεμα (B). Γραμμικός χάρτης του pLexsy-sat με το ένθεμα mRFP1. Παρουσιάζονται οι θέσεις περιοριστικών ενζύμων.



Εικόνα 3.9. M: Ηλεκτροφόρηση της αντίδρασης πέψης με το ένζυμο PstI σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5 % w/v. (M): μοριακός μάρτυρας 1kb; (1-20): πλ αμίδια από τις 20 αποικίες μετά από πέψη με το ένζυμο Pst I; (+): θετικός μάρτυρας για το ένζυμο (πλασμίδιο pLexsy-neo).

Όσοι κλώνοι βρέθηκαν θετικοί με την παραπάνω διαδικασία επιβεβαιώθηκαν για την παρουσία του ενθέματος με πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα Xho I & Bgl II. Στο ηλεκτροφόρημα οι θετικοί κλώνοι παρουσιάζουν δύο λωρίδες, μια μεγέθους 7548 bp και μια μεγέθους 731bp (ένθεμα). Οι αρνητικοί κλώνοι που φέρουν το πλασμίδιο χωρίς ένθεμα παρουσιάζουν επίσης δύο λωρίδες, μια μεγέθους 7545 bp και μια 661 bp (stuffer). (Εικόνα 3.10).

Οι κλώνοι 4-10 και 12-20 (Εικόνα 3.9) παρουσιάζουν δύο λωρίδες με το αναμενόμενο μέγεθος A και B και θεωρούνται θετικοί. Στους κλώνους αυτούς ακολούθησε πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα Bgl II & Xho I. Στην εικόνα 3.10 βλέπουμε ανάλυση 7 από αυτούς τους κλώνους με ηλεκτροφόρηση. Το τμήμα του DNA που αποκόπτεται έχει το αναμενόμενο μέγεθος για το ένθεμα.



Εικόνα 3.10. Ηλεκτροφόρηση της αντίδρασης πέψης με τα ένζυμα PstI σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5 % w/v. **M:** μοριακός μάρτυρας 100bp; **(2-8):** πιθανοί κλώνοι ύστερα από πέψη με Bgl II & XhoI; **(1):** pLexsy-sat πλασμίδιο ύστερα από πέψη με Bgl II & XhoI)

3.7 Ταυτοποίηση της αλληλουχίας θετικών κλώνων

Η σωστή αλληλουχία του ενθέματος στο πλασμιδιακό DNA που απομονώθηκε από δύο θετικούς κλώνους (A και B) αλληλουχίστηκε (sequencing) σύμφωνα με πρωτόκολλα της Εταιρείας VBC Biotech (<http://www.vbc-biotech.at/cms/index.php>). Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης ελέγχθηκαν για ομολογία με την αλληλουχία του γονιδίου της mRFP1 (πρόγραμμα CLUSTALW, Η αλληλουχία του ενθέματος στον κλώνο A είχε 100% ομολογία με την

αλληλουχία του γονιδίου mRFP₁ ενώ του B είχε διαφορά σε 3 βάσεις. Ο κλώνος A επελέγει για απομόνωση μεγάλης ποσότητας πλασμιδιακού DNA από υγρή καλλιέργεια 100 ml που αναπτύχθηκε από το glycerol stock (-80°C) των βακτηρίων με το συγκεκριμένο πλασμίδιο. Πλασμιδιακό DNA απομονώθηκε με τη μέθοδο της εταιρείας Qiagen (midi prep).

3.8 Παραγωγή διαγονιδιακών παρασίτων *L.donovani* που εκφράζουν την mRFP1.

Παρασιτικά στελέχη *L.donovani* LG13 στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο pLexsy-mRFP₁ όπως αναφέρεται στις τεχνικές (4.1). Τα επιμολυσμένα κύτταρα διατηρήθηκαν σε συνθήκες καλλιέργειας όπως και οι προμαστιγώτες μορφές των παρασίτων αγρίου τύπου με μόνη διαφορά την προσθήκη στην καλλιέργεια α) του αντιβιοτικού nourseothricin (100 µg/ml) για την επιλογή διαγονιδιακών παρασίτων και β) 20% v/v ορού (FBS) για να ευνοηθεί η επιβίωση και η ανάπτυξη των διαγονιδιακών παρασίτων *L.donovani*-mRFP1 στα αρχικά στάδια μετά το θάνατο της πλεονότητας των παρασίτων λόγω της παρουσίας του αντιβιοτικού. Όταν έγινε εύκολος ο εντοπισμός αρκετών ζωντανών παρασίτων στην καλλιέργεια (~3 εβδομάδες μετά την επιμόλυνση) η ύπαρξη διαγονιδιακών παρασίτων *L.donovani*-mRFP1 επιβεβαιώθηκε με παρατήρηση σε ανάστροφο μικροσκόπιο φθορισμού για να πιστοποιηθεί η έκφραση της mRFP1.

Στη συνέχεια ελέγχθηκε με κυτταρομετρία ροής το ποσοστό των διαγονιδιακών παρασίτων *L.donovani*-mRFP1 στην λογαριθμική ή μεταλογαριθμική φάση ανάπτυξης της καλλιέργειας καθώς και τα επίπεδα έκφρασης της mRFP1 στα διαγονιδιακά παράσιτα. Αυτό έγινε προδιορίζοντας το επι τοις εκατό (%) ποσοστό παρασίτων με κόκκινο φθορισμό μεγαλύτερο από τον αυτοφθορισμό των παρασίτων LG13 αγρίου τύπου στο κανάλι FL2 και με υπολογισμό της μέσης τιμής έντασης του κόκκινου φθορισμού στον πληθυσμό αυτό. Για αντιπροσωπευτική στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων οι μετρήσεις αυτές πραγματοποιήθηκαν με ανάλυση 20.000 κυττάρων/ δείγμα. Τα παράσιτα LG13 αγρίου τύπου και *L.donovani*-GFP χρησιμοποιήθηκαν ως πληθυσμοί μάρτυρες. Τα τελευταία χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες για τον αυτοφθορισμό των παρασίτων LG13 στο κανάλι FL2 και για τον έλεγχο του φθορισμού των παρασίτων *L.donovani*-mRFP1 στο κανάλι FL1 αντίστοιχα. Οι τιμές των παραμέτρων FSC (πρόσθιος σκεδασμός), SSC (πλάγιος σκεδασμός) FL1 (πράσινος φθορισμός) και FL2 (κόκκινος φθορισμός) που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση αναγράφονται στον πίνακα 3.6.

Το ποσοστό των παρασίτων με κόκκινο φθορισμό (περιοχή M1 *Εικόνα 3.11/A*) στο δείγμα *L.donovani*-mRFP1 είναι ίσο με 75% του ολικού πληθυσμού. Η περιοχή M2 (*Εικόνα 3.11/A*) αντιστοιχεί σε «θόρυβο» (background) όπως προκύπτει από ανάλυση του μάρτυρα LG13 αγρίου τύπου (*Εικόνα 3.11*). Τα παράσιτα LG13-GFP βρέθηκαν θετικά για φθορισμό στο κανάλι FL1 κατά 92,94% όταν αφαιρεθεί ο πληθυσμός που αντιστοιχεί στον αυτοφθορισμό των κυττάρων (M2, *Εικόνα 3.12/A*). Είναι πιθανόν ένα ποσοστό κυττάρων *L.donovani*-mRFP1 με χαμηλό φθορισμό να μην ανιχνεύεται επειδή το μέγιστο του φάσματος διέγερσης της mRFP1 είναι στα 584 nm, αρκετά μακριά από το μήκος κύματος 488 nm της ακτινοβολίας του πράσινου laser αλλά και αυτού του κόκκινου laser (633 nm), με αποτέλεσμα να μην διεγείρονται αποτελεσματικά τα μόρια της RFP. Το μέγιστο του φάσματος διέγερσης της GFP 475 nm είναι πιο κοντά στο μήκος κύματος του πράσινου laser του κυτταρομετρητή 488 nm και ως εκ τούτου τα μόρια της GFP διεγείρονται πιο αποτελεσματικά. Επίσης, η χαμηλότερη μέση

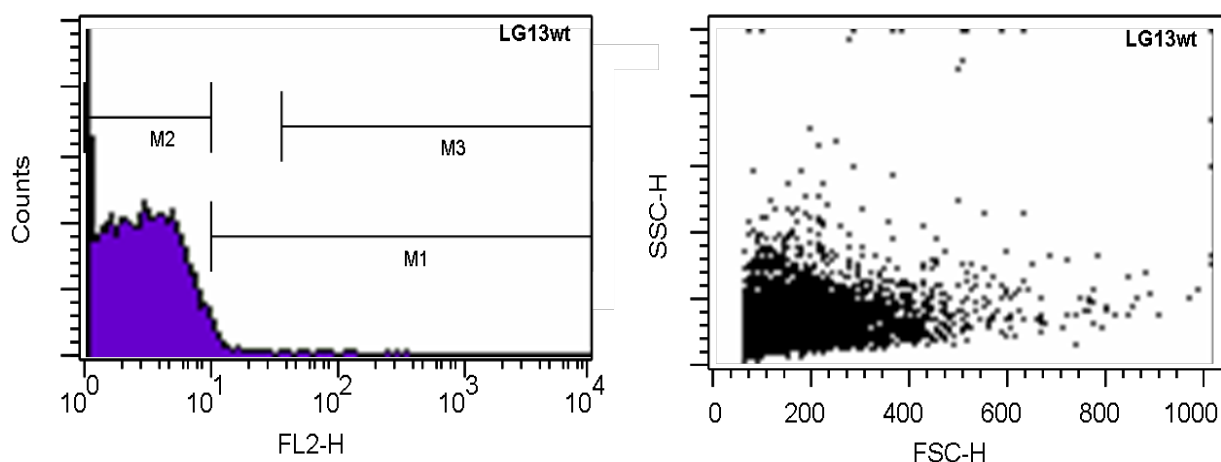
ένταση φθορισμού που παρατηρούμε στα παράσιτα *L.donovani*-mRFP1 σε σχέση με αυτή των παρασίτων *L.donovani*-GFP προφανώς οφείλεται στην κατά 3 φορές χαμηλότερη απόδοση φθορισμού (quantum yield) της πρωτεΐνης mRFP1 σε σύγκριση με αυτή της GFP (Πίνακας 1.2).

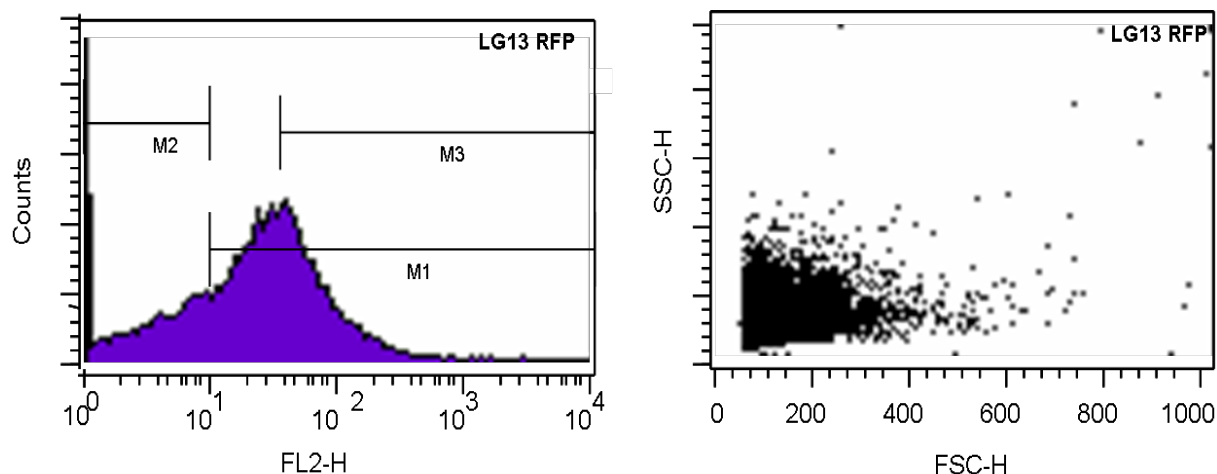
Εξέταση των γραφικών παραστάσεων FSC και SSC δείχνει ότι οι πληθυσμοί των LG13 αγρίου τύπου και *L.donovani*-mRFP1 παρουσιάζουν μια ανομοιογένεια στο μέγεθος (FSC τιμές μεταξύ 20-500) που δηλώνει την ταυτόχρονη παρουσία προκυκλικών και μετακυκλικών μορφών, διαιρούμενων κυττάρων καθώς επίσης και συσσωματωμάτων σε μορφές «ροζέτας» που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των παρασίτων στην καλλιέργεια (Εικόνα 3.13)

Το μεγαλύτερο μέρος του πληθυσμού πάντως έχουν ομοιόμορφο μέγεθος όπως δηλώνεται από τη συσσώρευση παρασίτων γύρω από την τιμή 200 στην παράμετρο FSC-H και στα δύο δείγματα (Εικόνα 3.11). Σύμφωνα με στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων (Πίνακας 3.8) τα παράσιτα *L.donovani*-mRFP1 δείχνουν να σχηματίζουν λιγότερα συσσωματώματα στην καλλιέργεια.

Τα παράσιτα *L.donovani*-GFP παρουσιάζουν μεγαλύτερη ανομοιογένεια στο μέγεθος με αύξηση του πληθυσμού που βρίσκεται στην περιοχή όπου ανιχνεύονται τα συσσωματώματα των παρασίτων (ροζέτες, Εικόνα 3.13). Αυτό ίσως να εξηγεί το ότι η καλλιέργεια των παρασίτων *L.donovani*-GFP ήταν πιο πυκνή και στην μεταλογαριθμική φάση ανάπτυξης οπότε και υπάρχουν πολύ περισσότερα συσσωματώματα παρασίτων ή στο ότι τα παράσιτα *L.donovani*-GFP τείνουν να σχηματίζουν περισσότερες ροζέτες. Η παράμετρος SSC υποδεικνύει αρκετά μεγάλη ομοιομορφία στη μορφολογία των κυττάρων (Εικόνα 3.12)

Πίνακας 3.6 Παράμετροι που εφαρμόστηκαν στον κυτταρομετρητή ροής για τα λείσμανιακά δείγματα και <i>L.donovani</i> -mRFP1	FSC	E01/2.12	<i>L.donovani</i>
	SSC	570	
	FL1	600	
	FL2	800	

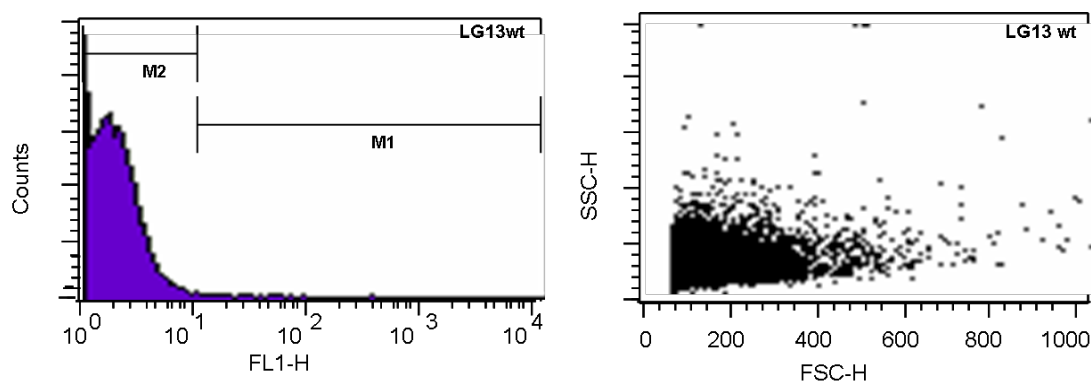


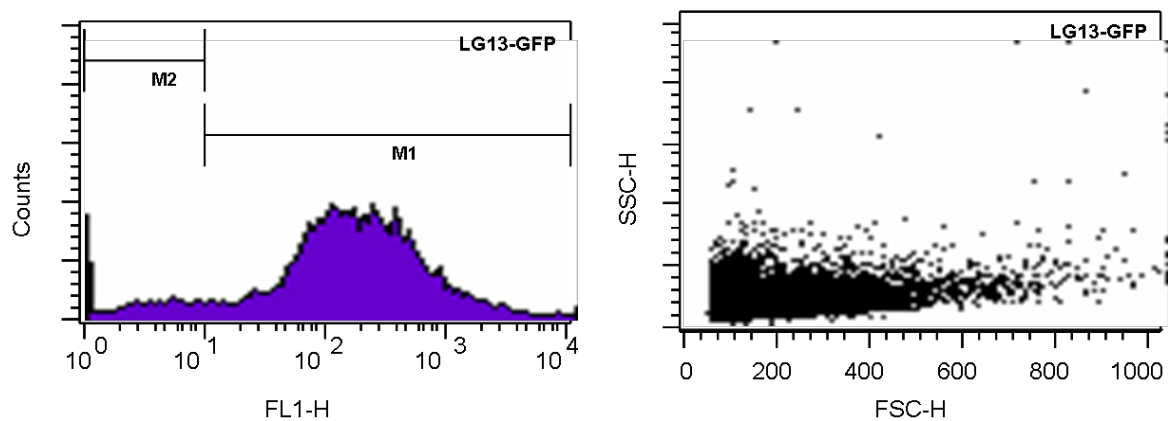


Εικόνα 3.11. Ανάλυση με FACS των παρασίτων *L. donovani* (LG13wt) και *L. donovani*-mRFP1 (LG13 RFP). Εγινε ανάλυση 20,000 κυτάρων για κάθε δείγμα. **A.**(αριστερά) ιστογράμματα των παραμέτρων FL2/FSC και FL1/FSC; **B.**(δεξιά): dot plots των παραμέτρων FSC-H και SSC. Τα αποτελέσματα ελήφθησαν με τις ρυθμίσεις: FSC=E01 2.12; SSC=570; FL1=600; FL2=800

Πίνακας 3.7 Παράμετροι που εφαρμόστηκαν στον κυτταρομετρητή ροής για τα λείσμανιακά δείγματα Lg13 wt και LG13-GFP

FSC	E01/2.12
SSC	570
FL1	600
FL2	490





Εικόνα 3.12 Ανάλυση με FACS των παρασίτων *L. donovani* (LG13wt) και *L. donovani*-GFP (LG13 GFP). Εγινε ανάλυση 20,000 κυττάρων για κάθε δείγμα. **A** (αριστερά): ιστογράμματα των παραμέτρων FL2/FSC και FL1/FSC; **B**(δεξιά): dot plots των παραμέτρων FSC-H και SSC. Τα αποτελέσματα ελήφθησαν με τις ρυθμίσεις FSC=E01 2.12; SSC=570; FL1=600; FL2=490

Πίνακας 3.8 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της Εικόνας 3.11

<i>L.donovani</i> (μάρτυρας για τα <i>L.donovani</i> -RFP)	Γεγονότα (κύτταρα)	%συνόλου	Μέσος όρος έντασης φθορισμού
Όλα	20000	100.00	2,84
M1	152	0.76	27,74
M2	19853	99.27	2,65
M3	27	0.14	93,35
<i>L.donovani</i> -RFP			
Όλα	20000	100.000	36.02
M1	14999	75.00	46.46
M2	5041	25.20	4.74
M3	6759	33.79	75.98

Πίνακας 3.9 Στατιστική ανάλυση της εικόνας 3.12

<i>L.donovani</i> -wt (μάρτυρας για τα <i>L.donovani</i> -GFP)	Γεγονότα (κύτταρα)	%συνόλου	Μέσος όρος έντασης φθορισμού
Όλα	20000	100.00	1.73.
M1	34	0.17	33.74
M2	19966	99.83	1.68
<i>L.donovani</i> -GFP			
Όλα	20000	100.000	36.02
M1	18588	92.94	278.27
M2	1422	7.11	4.63



Εικόνα 3.13 Παράσιτα *Leishmania* σε σχηματισμό ροζέτας.

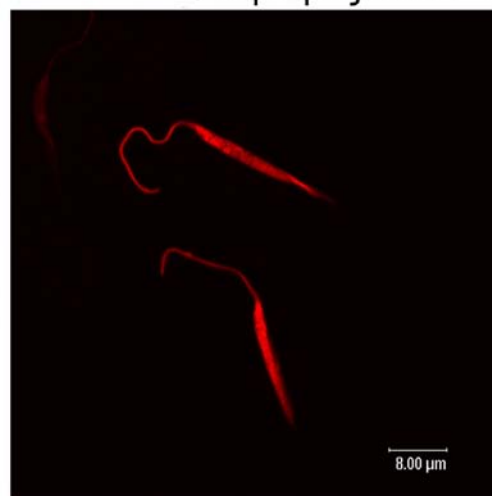
3.9 Χαρακτηρισμός διαγονιδιακών παρασίτων με συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού

Η έκφραση της πρωτεΐνης mRFP1 στα διαγονιδιακά παράσιτα LG13-sat-mRFP₁ επιβεβαιώθηκε με μικροσκοπία φθορισμού. Η mRFP₁ εντοπίστηκε σε όλο το σώμα και το μαστίγιο προμαστιγωτών μορφών του παρασίτου (Εικόνα 3.14). Τα επίπεδα έκφρασης παρουσιάζουν αρκετές διαφορές από παράσιτο σε παράσιτο (Εικόνα 3.15). Ταυτόχρονη χρώση των παρασίτων με έμμεσο ανοσοφθορισμό με την χρήση anti-mouse αντισώματος που αναγνωρίζει Λεϊσμανιακά αντιγόνα (Εικόνα 3.16) επιβεβαιώνει τα παραπάνω.

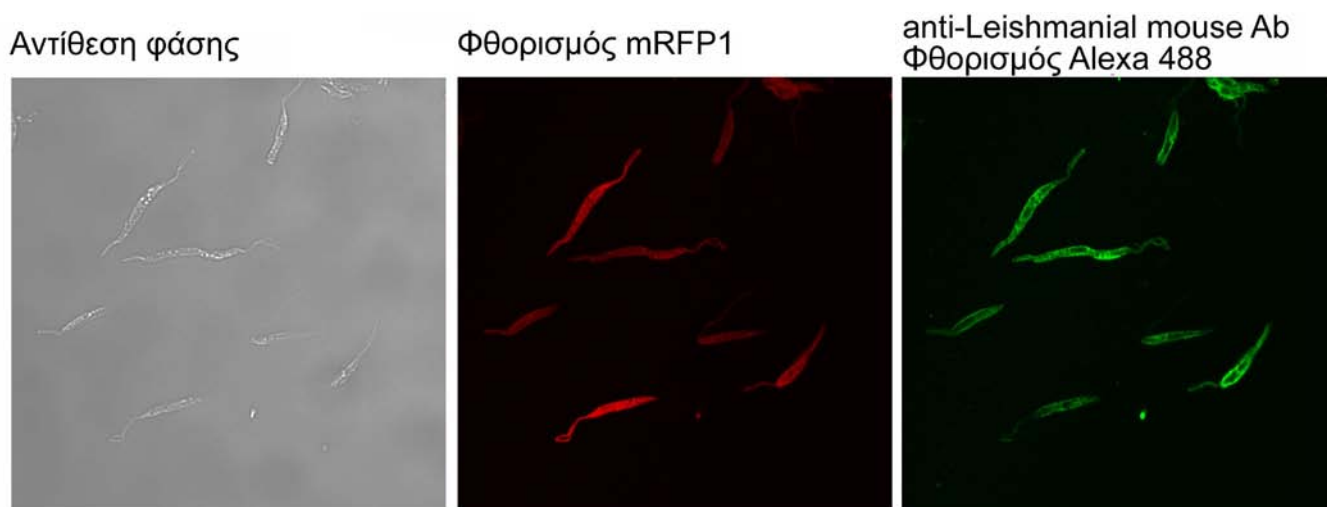
Αντίθεση φάσης



Φθορισμός mRFP1



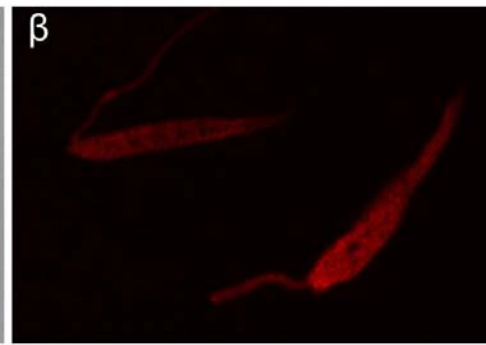
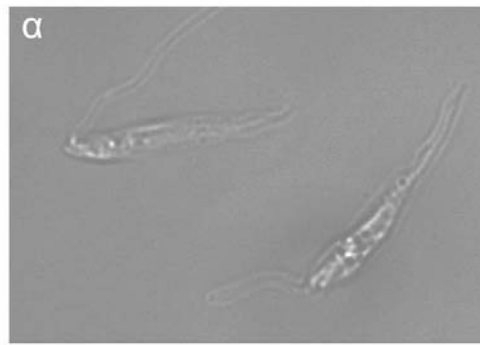
Εικόνα 3.14 Διαγονιδιακά παράσιτα *L.donovani-mRFP1*. Φωτογραφίες από συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού.



Εικόνα 3.15 Διαγονιδιακά παράσιτα *L.donovani-mRFP1*. Φωτογραφίες από συνεστιακό μικροσκόπιο. Στην Εικόνα δεξιά τα παράσιτα έχουν υποστεί χρώση με έμμεσο ανοσοφθορισμό με ποντικίσιο αντι-Λεϊσμανιακό αντίσωμα και δεύτερο αντίσωμα anti-mouse συζευγμένο με τη χρωστική Alexa488 που εκπέμπει πράσινο φθορισμό.

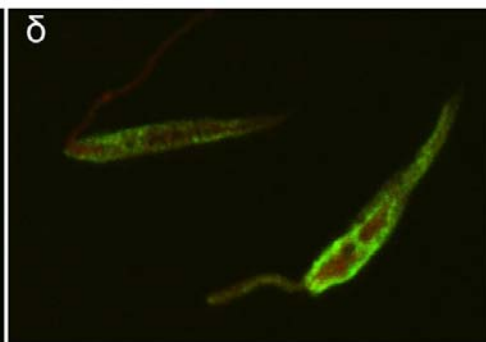
Αντίθεση φάσης

Φθορισμός mRFP1



anti-Leishmanial mouse Ab
Φθορισμός Alexa 488

Συγχώνευση φθορισμού
mRFP1 και Alexa 488



Εικόνα 3.16 Διαγονιδιακά παράσιτα *L.donovani-mRFP1*. Φωτογραφίες από συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού. Λεπτομέρεια από την εικόνα 3.15. Στην Εικόνα γ τα παράσιτα έχουν υποστεί χρώση με έμμεσο ανοσοφθορισμό με ποντικίσιο αντι-Λεϊσμανιακό αντίσωμα και δεύτερο anti-mouse αντίσωμα συζευγμένο με την χρωστική Alexa488 (Molecular Probes) που εκπέμπει πράσινο φθορισμό. Η εικόνα κάτω δεξιά παρουσιάζει την αλληλεπικάλυψη των δύο χρωμάτων.

4 Παραγωγή ειδικού πολυκλωνικού αντισώματος anti-RFP από κουνέλι

4.1 Απομόνωση αντιγόνου

4.1.1 Έκφραση της πρωτεΐνης mRFP₁ σε βακτηριακά στελέχη BL21 και απομόνωση της πρωτεΐνης

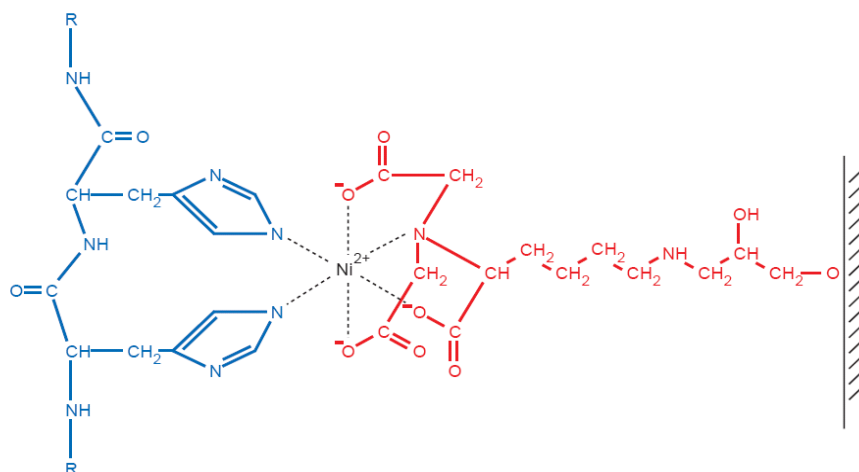
Η απομόνωση της πρωτεΐνης mRFP₁ έγινε με χρωματογραφία υψηλής συγγένειας απο βακτηριακά εκχυλίσματα ύστερα από επαγωγή της έκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Η πρωτοταγής δομή της mRFP₁ που εκφράζεται από τον φορέα pRSET-b περιέχει μια πρόσθετη αλληλουχία 33 αμινοξέων στο N-τελικό άκρο της mRFP₁ (MRGSHHHHHHGMASMTGGGQQMGRDLYDDDDKDP) που αποτελείται από μοριακή ετικέτα με 6 μόρια ιστιδίνης, μια αλληλουχία 23 αμινοξέων που παρεμβάλλονται ανάμεσα στις 6 ιστιδίνες και την αλληλουχία της mRFP καθώς και 4 αμινοξέα upstream της ετικέτας των Ιστιδινών με την Μεθειονίνη ως αρχικό κωδικόνιο μετάφρασης. Τα 33 επιπλέον αμινοξέα προσθέτουν στο θεωρητικό μοριακό βάρος της mRFP 3,740 Dalton (θεωρητικό Mw της ανασυνδυασμένης 6-His-mRFP₁=29163.72). Η ετικέτα των 6 Ιστιδινών επιτρέπει την εκλεκτική πρόσδεση σε χρωματογραφικό υλικό με ιόντα Ni²⁺ προσδεδεμένα σε NTA (νιτριλο-τρι-οξικό οξύ) (Εικόνα 4.1). Στο πειραματικό πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε χρησιμοποιήθηκαν σφαιρίδια Ni-NTA της QIAGEN. Η έκλυση της πρωτεΐνης από το χρωματογραφικό υλικό έγινε με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος που περιέχει ιμιδαζόλιο.

Για την έκφραση της πρωτεΐνης mRFP₁ χρησιμοποιήθηκε το βακτηριακό στέλεχος BL21 που εκφράζει την T7 RNA πολυμεράση. Το ένζυμο αυτό είναι απαραίτητο για την μεταγραφή γονιδίων από τον υποκινητή T7 του φορέα pRSET-b και δεν εκφράζεται από τα στελέχη DH5a και Top10F, βακτήρια που χρησιμοποιήθηκαν ανωτέρω για την κλωνοποίηση του γονιδίου της mRFP₁. Χημειοδεκτικά κύτταρα BL21 μετασχηματίσθηκαν με τον φορέα pRSET-mRFP₁ και ελέγχθηκε η έκφραση του γονιδίου mRFP₁ με επαγωγή της έκφρασης της T7 RNA πολυμεράσης με IPTG. (isopropyl β-D-thiogalactoside). Το IPTG επάγει την έκφραση γονιδίων που είναι κάτω από τον έλεγχο του lac οπερονίου. Κάτω από αυτό το σύστημα εκφράζεται και η T7 RNA πολυμεράση.

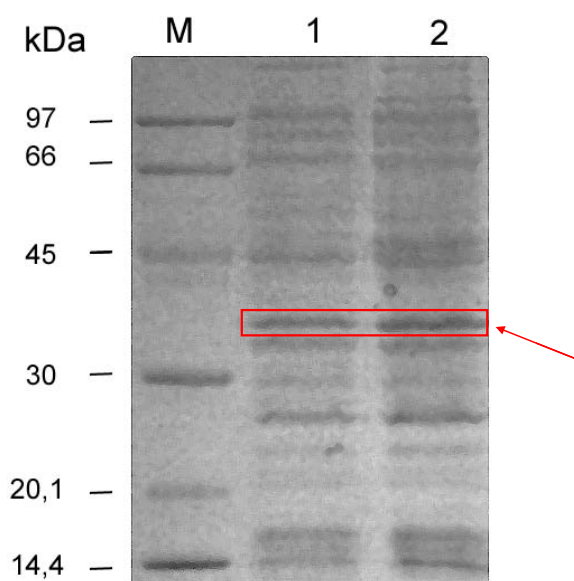
Αρχικά η καλλιέργεια BL21-pRSET-mRFP₁ αναπτύχθηκε μέχρι την εκθετική φάση ανάπτυξης (οπτική πυκνότητα OD₆₀₀=0,6), οπότε προστέθηκε στην καλλιέργεια IPTG σε τελική συγκέντρωση 1mM για επαγωγή της έκφρασης της T7 RNA πολυμεράσης και ως επακόλουθο και της πρωτεΐνης mRFP₁. Η καλλιέργεια επώαστηκε για ακόμα 2,5 ώρες και έγινε έλεγχος για την επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης σε βακτηριακά εκχυλίσματα με SDS-PAGE. Η πρωτεΐνη 6xHis-mRFP₁ αναμένεται να μεταναστεύσει στο ίδιο ύψος με την λωρίδα (band) του μοριακού μάρτυρα των 30 kDa, όπως αναμένεται από το θεωρητικό μοριακό βάρος της που είναι 29163.72. Παρατηρήσαμε ότι μετά την επαγωγή με IPTG, η διαφορά στην έκφραση πρωτεϊνών με την αναμενόμενη ηλεκτροφορητική κινητικότητα για την 6His-mRFP₁ ήταν μόνο ~2 φορές μεγαλύτερη από ότι στην καλλιέργεια που δεν είχε προστεθεί IPTG (Εικόνα 4.2). Αυτό πιθανά σημαίνει ότι υπάρχει κάποια κύρια πρωτεΐνη των βακτηριακών κύτταρων στο αντίστοιχο μοριακό βάρος ή ότι ο υποκινητής της T7 πολυμεράσης είναι αρκετά leaky και υπάρχει αρκετή ποσότητα της 6His-mRFP₁ που εκφράζεται απουσία IPTG.

Στη συνέχεια έγινε έλεγχος των συνθηκών απομόνωσης της πρωτεΐνης από τα βακτηριακά εκχυλίσματα μετά από πρόσδεση σε σφαιρίδια νικελίου. Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε με βακτήρια από μικρού όγκου (10 ml) καλλιέργειες σύμφωνα με το πρωτόκολλο 5.3.1 Παράρτημα Ι. Η σύσταση των ρυθμιστικών

διαλυμάτων λύσης, έκπλυσης και έκλουσης ελέγχθηκε σε σειρά διαδοχικών πειραμάτων. Αρχικά χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά διαλύματα λύσης και έκπλυσης. Συγκεκριμένα ελέγχθηκαν τα ρυθμιστικά διαλύματα φωσφορικών αλάτων ή Tris και η περιεκτικότητά τους σε ιμιδαζόλιο σε συγκεντρώσεις 5 mM, 10 mM και 20 mM. Στα διαλύματα έκπλυσης χρησιμοποιήθηκε συγκέντρωση ιμιδαζολίου 70 mM. Σε αυτή τη σειρά πειραμάτων το πρωτόκολλο διακόπηκε στο σημείο όπου η πρωτεΐνη mRFP₁ προσδέθηκε στα σφαιρίδια (beads) νικελίου (Παράρτημα Ι, πρωτόκολλο 5.3.1). Η σύσταση των διαλυμάτων φωσφορικού και Tris παρουσιάζεται στο παράρτημα των διαλυμάτων (6.5.5-6.5.7).



Εικόνα 4.1 Αλληλεπίδραση μεταξύ γειτονικών καταλοίπων στη μοριακή ετικέτα 6xHis και της μήτρας Ni-NTA
(http://www.chemie.fuberlin.de/chemistry/bio/aminoacid/histidin_en.html)



Εικόνα 4.2 Έλεγχος επαγωγής της έκφρασης της 6His-mRFP₁ σε βακτηριακές καλλιέργειες BL21-pRSET-mRFP₁. SDS-PAGE (πήκτωμα 12% w/v) ύστερα από χρώση με Coomassie Brilliant Blue. (1) Κύτταρα από καλλιέργεια χωρίς επαγωγή

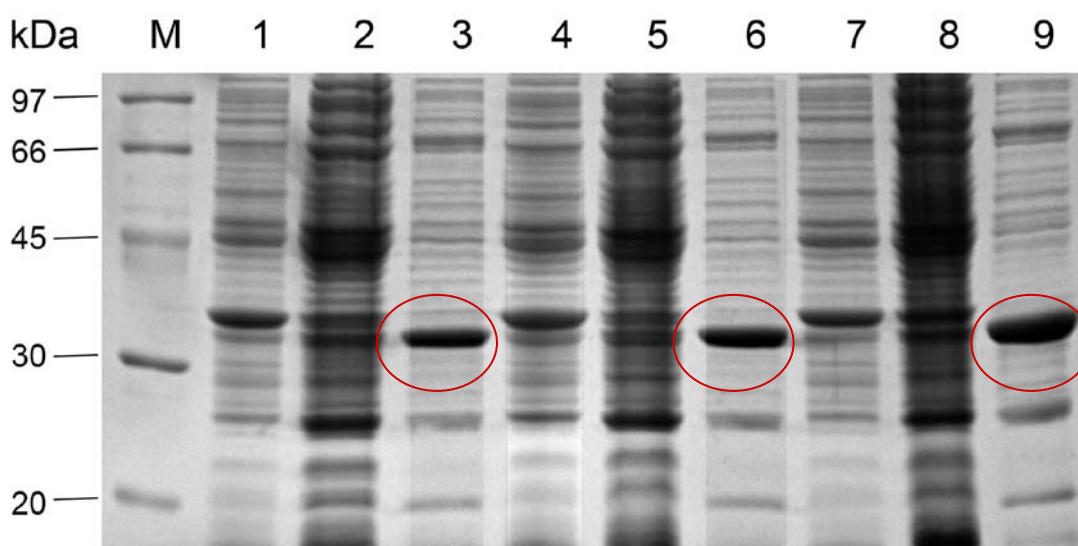
Διαλύματα έκπλυσης	φωσφορικό δ/μα	δ/μα Tris	ιμιδαζόλιο	(1:1000 από τα 10 ml της αρχικής καλλιέργειας)
i	✓		70mM	00
ii		✓	70mM	απ

ό τα 10 ml της αρχικής καλλιέργειας) και (2) ύστερα από επαγωγή με IPTG (αντίστοιχη ποσότητα κυττάρων όπως στο (1) όπως προκύπτει από μέτρηση του OD₆₀₀). Η πρωτεΐνη mRFP₁ βρίσκεται πάνω από τη λωρίδα (band) των 30 kDa.

Πίνακας 4.1 Διαλύματα λύσης των βακτηρίων

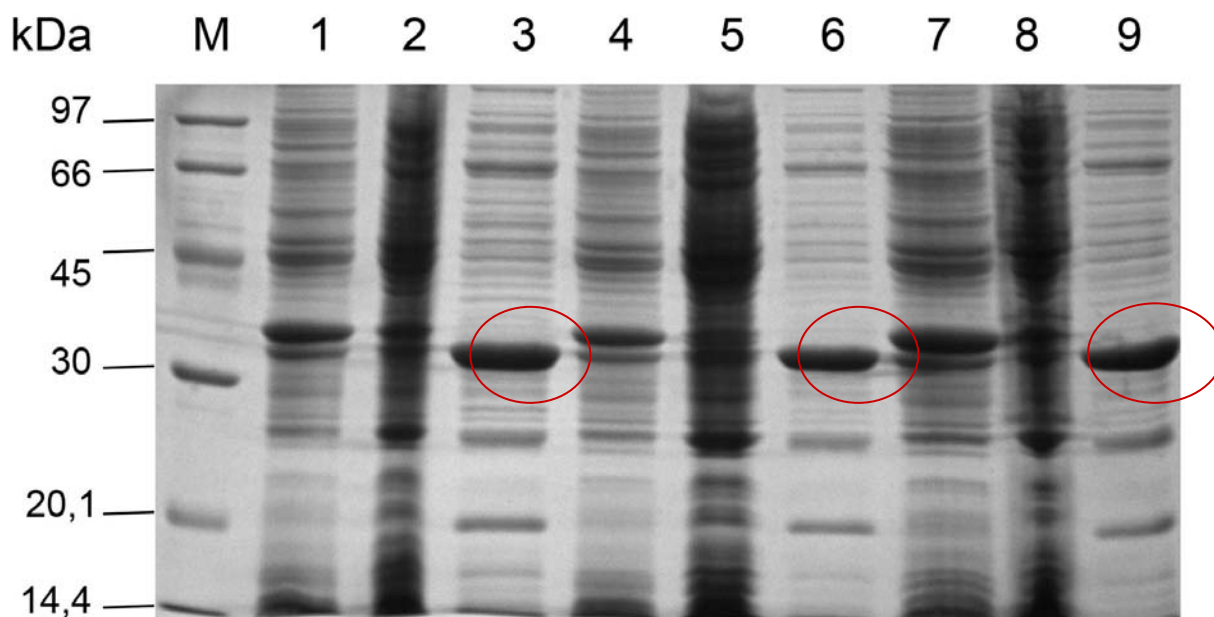
Διαλύματα λύσης	φωσφορικό δ/μα	δ/μα Tris	ιμιδαζόλιο
α	✓		5mM
β	✓		10mM
γ	✓		20mM
δ		✓	5mM
ε		✓	10mM
στ		✓	20mM

Πίνακας 4.2 Διαλύματα έκπλυσης



Εικόνα 4.3 Έλεγχος των συνθηκών απομόνωσης της 6His-mRFP₁ από τα βακτηριακά εκχυλίσματα μετά από πρόσδεση σε σφαιρίδια Ni²⁺. Έλεγχος **φωσφορικών διαλυμάτων** (Πίνακας 4.1). SDS PAGE πήκτωμα 12% w/v ύστερα από χρώση με Coomassie Brilliant Blue. (1,4,7): μη διαλυτό μέρος του βακτηριακού εκχυλίσματος (1/1000 αρχικής καλλιέργειας); (2,5,8): διαλυτό μέρος

του βακτηριακού εκχυλίσματος (1/1000 της αρχικής καλλιέργειας); (3,6,9): υλικό που έχει προσδεθεί σε σφαιρίδια Ni^{2+} (ποσότητα αντίστοιχη του 1/100 της αρχικής καλλιέργειας). Η λύση των βακτηρίων και η έκπλυση των σφαιριδίων νικελίου μετά την πρόσδεση έγιναν με φωσφορικά διαλύματα ιμιδαζολίου (1-3) διάλυμα α ; (4-6) διάλυμα β ; (7-9), διάλυμα γ . Η σύσταση των διαλυμάτων α, β, γ αναγράφεται στον Πίνακα 4.1. Με κόκκινο κύκλο δηλώνεται η θέση της 6xHis-mRFP1.



Εικόνα 4.4 Έλεγχος των συνθηκών απομόνωσης της 6His-mRFP₁ από τα βακτηριακά εκχυλίσματα μετά από πρόσδεση σε σφαιρίδια Ni^{2+} . Έλεγχος διαλυμάτων Tris (Πίνακας 4.1). SDS PAGE πήκτωμα 12% w/v ύστερα από χρώση με Coomassie Brilliant Blue. (1,4,7): μη διαλυτό μέρος του βακτηριακού εκχυλίσματος (1/1000 αρχικής καλλιέργειας); (2,5,8): διαλυτό μέρος του βακτηριακού εκχυλίσματος (1/1000 αρχικής καλλιέργειας); (3,6,9): υλικό που έχει προσδεθεί σε σφαιρίδια Ni^{2+} (1/1000 αρχικής καλλιέργειας). Η λύση των βακτηρίων και η έκπλυση των σφαιριδίων νικελίου μετά την πρόσδεση έγιναν με διαλύματα Tris-ιμιδαζολίου. (1-3) διάλυμα δ ; (4-6) διάλυμα ϵ ; (7-9) διάλυμα $\sigma\tau$. Τα διαλύματα $\delta, \epsilon, \sigma\tau$ αναγράφονται στον πίνακα 4.1. Με κόκκινο κύκλο δηλώνεται η 6xHis-mRFP1.

Μια κύρια πρωτεΐνη ανιχνεύεται μετά από πρόσδεση στα σφαιρίδια Ni^{2+} με την αναμενόμενη ηλεκτροφορητική κινητικότητα για την 6His-mRFP₁ (Εικόνες 4.3 & 4.4 διαδρομές 3,6,9). Ως βέλτιστες συνθήκες λύσης και έκπλυσης επελέγησαν αυτή του ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων με συγκέντρωση ιμιδαζολίου 20 mM (διάλυμα γ) για την λύση των κωπάρων και 70 mM ιμιδαζολίου (διάλυμα ι) για την έκπλυση, διότι στην περίπτωση αυτή ανιχνεύεται η μεγαλύτερη ποσότητα πρωτεΐνης 6His-mRFP₁ στα σφαιρίδια Ni^{2+} (Εικόνα 4.3. διαδρομή 9) και η μικρότερη ποσότητα αδιάλυτης πρωτεΐνης στο βακτηριακό εκχύλισμα (Εικόνα 4.3 διαδρομή 7).

Στη συνέχεια ακολούθησε πείραμα για τον προσδιορισμό των συνθηκών έκλουσης της 6His-mRFP₁ από τα σφαιρίδια Ni²⁺. Η σύσταση σε ιμιδαζόλιο και οι ιδιότητες (pH) των διαλυμάτων που εξετάστηκαν αναγράφονται στον πίνακα 4.3. Ο έλεγχος έγινε με πρωτεΐνη που απομονώθηκε απο βακτηριακές καλλιέργειες μικρού όγκου (10 ml). Η λύση του βακτηριακού ιζήματος έγινε σε όγκο ρυθμιστικού 4ml ανά 2g ξηρής βακτηριακής καλλιέργειας. Ο όγκος των εκλούσεων διατηρήθηκε σταθερός και ίσος του 1/8 του όγκου λύσης και έκπλυσης.

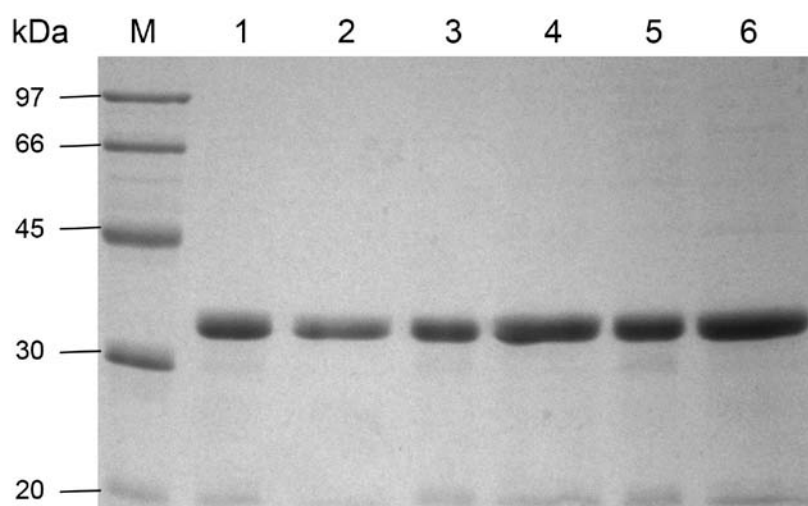
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στις εικόνες 4.5 και 4.6, επελέγη το διάλυμα β₃ (250 mM ιμιδαζόλιο, pH 8.0) για έκλουση της πρωτεΐνης, γιατί με αυτό επιτυγχάνεται έκλουση της μεγαλύτερης ποσότητας πρωτεΐνης από αυτή που παραμένει στα σφαιρίδια νικελίου.

Με τις συνθήκες που προσδιορίστηκαν από τα παραπάνω πειράματα και σύμφωνα με το πρωτόκολλο 5.3.1 πραγματοποιήθηκε έκφραση της 6His-mRFP₁ από βακτηριακή καλλιέργεια 1L κυττάρων BL21-pRSET-b-mRFP₁ και απομόνωση της πρωτεΐνης από βακτηριακά εκχυλίσματα. Η επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης έγινε με 1mM IPTG για 2,5 ώρες στους 37°C.

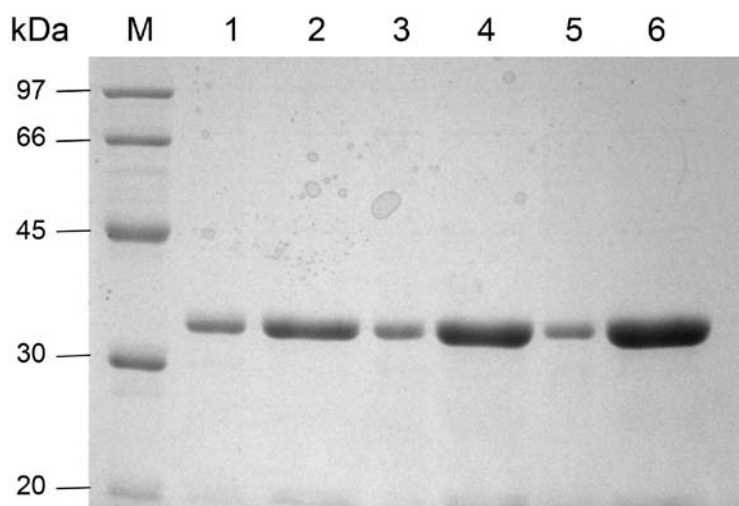
Ο Υπολογισμός της ποσότητας της πρωτεΐνης που απομονώθηκε έγινε με τη μέθοδο Bradford (πρωτόκολλο 5.3.3 /Πίνακες 4.4, 4.5, 4.6).

Πίνακας 4.3 Διαλύματα έκλουσης της 6His-mRFP₁ απο σφαιρίδια Ni²⁺

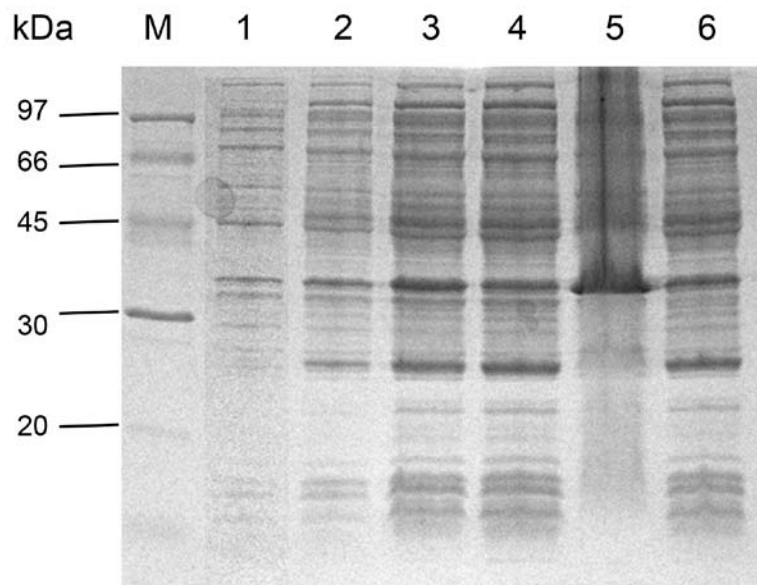
Φωσφορικά διαλύματα έκλουσης	ιμιδαζόλιο	pH
α ₁	100mM	6.0
α ₂	200mM	6.0
α ₃	250mM	6.0
β ₁	100mM	8.0
β ₂	200mM	8.0
β ₃	250mM	8.0



Εικόνα 4.5 Έλεγχος των συνθηκών έκλουσης της 6His-mRFP₁ από σφαιρίδια Ni²⁺. SDS PAGE 12%w/v ύστερα από χρώση με Coomassie Brilliant Blue. (1,3,5): Υλικό προσδεμένο σε σφαιρίδια Ni²⁺; (2,4,6): υλικό ύστερα από έκλουση. Χρησιμοποιήθηκαν φωσφορικά διαλύματα έκλουσης με **pH 6.0**. (1-2): διάλυμα α₁; (3-4) διάλυμα α₂; (5-6) διάλυμα α₃. Τα διαλύματα α₁, α₂, α₃ αναγράφονται στον πίνακα 4.3. Ίσοι όγκοι δείγματος ελέγχθηκαν σε κάθε διαδρομή.

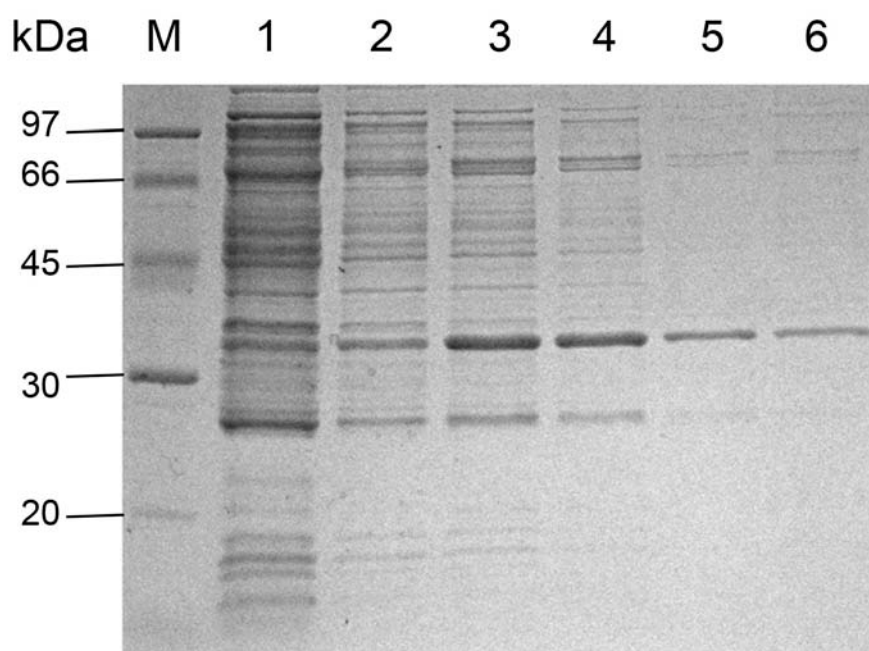


Εικόνα 4.6 Έλεγχος των συνθηκών έκλουσης της 6His-mRFP₁ από σφαιρίδια Ni²⁺. SDS PAGE 12%w/v ύστερα από χρώση με Coomassie Brilliant Blue. (1,3,5): Υλικό προσδεμένο σε σφαιρίδια Ni²⁺; (2,4,6): υλικό ύστερα από έκλουση. Χρησιμοποιήθηκαν φωσφορικά διαλύματα έκλουσης με **pH 8.0**. (1-2) διάλυμα β₁; (3-4) διάλυμα β₂; (5-6) διάλυμα β₃. Τα διαλύματα β₁, β₂, β₃ αναγράφονται στον πίνακα 4.3. Ίσοι όγκοι δείγματος ελέγχθηκαν σε κάθε διαδρομή.



Εικόνα 4.6 Έκφραση της πρωτεΐνης 6-His-mRFP₁ σε βακτηριακά κύτταρα BL21-rRSET-b-mRFP₁. Ανάλυση με SDS PAGE (12%w/v) δειγμάτων που λήφθηκαν στα στάδια έκφρασης της πρωτεΐνης και λύσης των βακτηριακών κυττάρων.

(1): βακτήρια πριν την επαγωγή [15 μl από 100 μl (1/10,000 της αρχικής καλλιέργειας)]; (2): βακτήρια μετά την επαγωγή [5 μl από 100 μl (1/10,000 της αρχικής καλλιέργειας)]; (3): ολικό βακτηριακό εκχύλισμα (1/3000 από 18 ml όγκου λύσης); (4): Διαλυτό μέρος του βακτηριακού εκχυλίσματος μετά την εφαρμογή υπερήχων (1/3000 από τελικό 18 ml όγκου λύσης); (5): αδιάλυτο μέρος (κυτταρικά θραύσματα και inclusion bodies) του βακτηριακού εκχυλίσματος (1/3000 από 18 ml όγκου λύσης); (6): υπερκείμενο μετά την επώαση με τα σφαιρίδια Ni²⁺ (1/3000 από 18 ml όγκου λύσης). Υλικό που δεν προσδέθηκε στα σφαιρίδια Ni²⁺. Τα 18 ml όγκου λύσης αντιστοιχούν σε 1 L αρχικού όγκου καλλιέργειας.



Εικόνα 4.7 Απομόνωση της 6-His-mRFP₁ με έκλυση από σφαιρίδια Ni²⁺.SDS PAGE 12%w/v ύστερα από χρώση με Coomassie Brilliant Blue. Ανάλυση δειγμάτων (10 µl) από τα στάδια έκπλυσης των σφαιριδίων Ni²⁺ και έκλυσης της πρωτεΐνης από τα σφαιρίδια. Κάθε έκπλυση έγινε με 18 ml φωσφορικού διαλύματος i και κάθε έκλυση με 2,5 ml διαλύματος β3. (1) 1^η έκπλυση; (2) 2^η έκπλυση;(3) 1^η έκλυση;(4) 2^η έκλυση;(5) 3^η έκλυση; (6) σφαιρίδια Ni²⁺ μετά από 3 διαδοχικές εκλούσεις της πρωτεΐνης. Κάθε δείγμα αντιστοιχεί 1/1800 του τελικού όγκου έκπλυσης και σε 1/250 του τελικού όγκου έκλυσης και τα σφαιρίδια σε 1/250 συνολικού όγκου που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση; (M): Μοριακοί μάρτυρες.

Πίνακας 4.4 Προσδιορισμός πρωτεΐνης με μέθοδο Bradford. Αγαγράφονται οι ποσότητες πρωτεΐνης και οι τιμές οπτικής απορρόφησης πρότυπων διαλυμάτων

1mg/ml προτύπου	H ₂ O (µl)	Αντιδραστήριο Bradford (µl)	BSA (µg)	A ₅₉₅
0	800	200	0	
1	799	200	1	0.053
2	798	200	2	0.087
5	795	200	5	0.148
10	790	200	10	0.292
15	785	200	15	0.408
20	780	200	20	0.584

Πίνακας 4.5. Προσδιορισμός της ποσότητας ολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford στα δείγματα έκλυσης από την απομόνωση της πρωτεΐνης 6His-mRFP1 από βακτηριακά κύτταρα BL21-p/RSET-b-mRFP1 με έκλυση από σφαιρίδια Ni²⁺ (Εικόνα 4.7).

Δείγματα	Άγνωστο	H ₂ O (µl)	Αντιδραστήριο Bradford (µl)	A ₅₉₅	Ποσότητα (µg)	Συγκέντρωση (µg/µl)
1 ^ο έκλουσμα	1	799	200	0,053	1,147	1,147
1 ^ο έκλουσμα	2	798	200	0,066	1,625	0,813
1 ^ο έκλουσμα	5	795	200	0,182	5,890	1,178
1 ^ο έκλουσμα	10	790	200	0,325	11,147	1,115

2° έκλουσμα	1	799	200	0,034	0,449	
2° έκλουσμα	2	798	200	0,058	1,331	0,665
2° έκλουσμα	5	795	200	0,077	2,029	0,406
2° έκλουσμα	10	790	200	0,357	12,324	1,232
3° έκλουσμα	1	799	200	0,008	-0,507	
3° έκλουσμα	2	798	200	0,019	-0,103	
3° έκλουσμα	5	795	200	0,057	1,294	0,259
3° έκλουσμα	10	790	200	0,106	3,096	0,310

Πίνακας 4.6. Συγκέντρωση και ολική ποσότητα πρωτεΐνης που απομονώθηκε στα 3 εκλούσματα όπως προσδιορίστηκε από τη μέθοδο Bradford.

Δείγματα	Συγκέντρωση (μg/μl)	Ολικός όγκος (ml)	Ολική ποσότητα (mg)
1° έκλουσμα	1,063	2	2,126
2° έκλουσμα	0,768	2	1,536
3° έκλουσμα	0,284	2	0,568

Οι παραπάνω ποσότητες αναφέρονται σε ολική πρωτεΐνη του δείγματος (έκλουσμα) και όχι στην ποσότητα της 6-His-mRFP1. Η ποσότητα της mRFP1 προσδιορίστηκε με βάση τη σύγκριση της έντασης της χρώσης με Coomassie Brilliant Blue με αυτή του μοριακού μάρτυρα των 30 KDa (γνωστής ποσότητας) που ηλεκτροφορήθηκε παράλληλα στην πρώτη διαδρομή της γέλης που παρουσιάζεται στην *Εικόνα 4.7*. Ο προσδιορισμός αυτός είναι προσεγγιστικός μιας και είναι γνωστό ότι πρωτεΐνες διαφορετικής αμινοξικής σύστασης προσροφούν διαφορετική ποσότητα χρωστικής Coomassie Brilliant Blue. Με αυτή την προσέγγιση βρέθηκε ότι για την 1^η έκλουση η ποσότητα 6-His-mRFP1 είναι ~1μg στα 10μl, δηλαδή έχουμε 0.1μg/μl ή 0.094μg mRFP1 /μg ολικής πρωτεΐνης. Στη 2^η έκλουση έχουμε ~0.9μg στα 10μl, δηλαδή έχουμε 0.09μg/μl ή 0.11 μg mRFP1 /μg ολικής πρωτεΐνης και στην 3^η ~0.07μg στα 10μl, δηλαδή έχουμε 0.06μg/μl ή 0.21 μg mRFP1 /μg ολικής πρωτεΐνης. Συνολικά υπολογίζεται ότι απομονώθηκαν 0.49 mg (0.2+0.17+0.12) mRFP1 από 1L βακτηριακής καλλιέργειας.

4.2 Παραγωγή αντισώματος ειδικού για την πρωτεΐνη mRFP₁

4.2.1 Προετοιμασία αντιγόνου και ανοσοποίηση κουνελιού

Αρχικά απομονώθηκε το αντιγόνο (πρωτεΐνη mRFP₁) από πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 12% w/v και ύστερα από χρώση Coomassie Brilliant-Blue

σύμφωνα με το πρωτόκολλο 5.5.1. Για την πρώτη ανοσοποίηση κουνελιού ηλικίας 8 μηνών και βάρους 1,5 Kg χρησιμοποιήθηκαν 500 µg καθαρής πρωτεΐνης. Για τις επόμενες ανοσοποιήσεις χρησιμοποιήθηκαν 100µg (δεύτερη) και 50 µg (τρίτη). Το πρωτόκολλο ανοσοποίησης αναφέρεται στο παράστημα I (πρωτόκολλο 5.5.2)

4.2.2 Καθαρισμός αντισώματος

Ο καθαρισμός του αντισώματος από τον ορό του ανοσοποιημένου κουνελιού έγινε με έκλουση αντισώματος από μεμβράνη νιτροκυτταρίνης στην οποία είχε μεταφερθεί η πρωτεΐνη mRFP₁ (Πρωτόκολλο 5.3.4). Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του αντισώματος έγινε με την μέθοδο Bradford και φασματοσκοπικά (μέτρηση σε OD₂₈₀, Πρωτόκολλο 5.3.3).

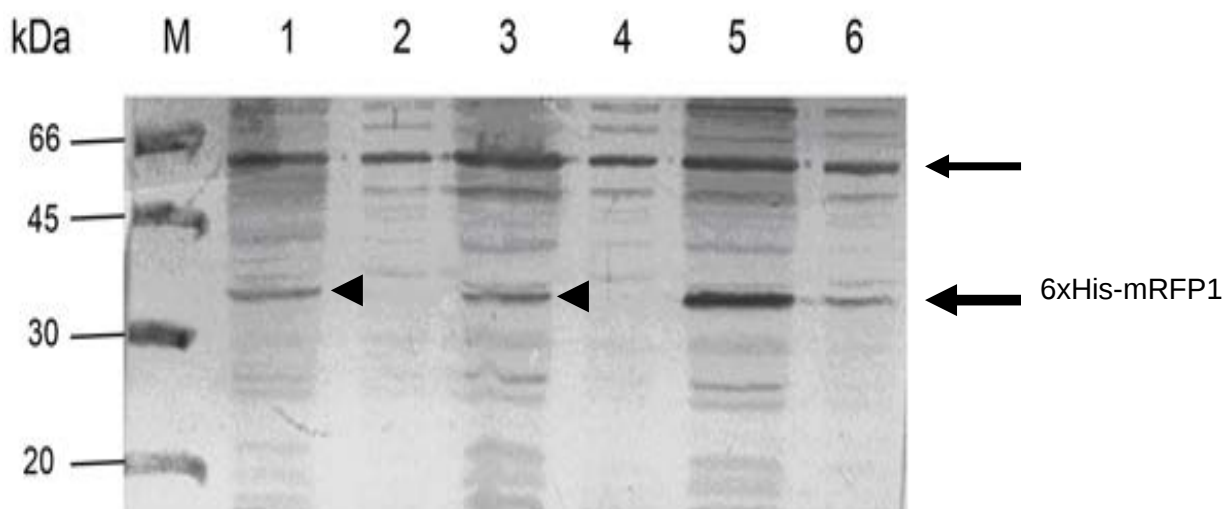
4.3 Χαρακτηρισμός αντισώματος ειδικού για την πρωτεΐνη mRFP₁

Ο έλεγχος του τίτλου των ορών από τις διαφορετικές αιμοληψίες και της ειδικότητας/ δραστηριότητας του καθαρισμένου αντισώματος έγινε με ανοσοσύτρωμα (Western Blot) σε πρωτεΐνες από βακτηριακά εκχυλίσματα BL21-pRSET-B-mRFP1 που είχαν επαχθεί για έκφραση της πρωτεΐνης mRFP1, σε λείσμανιακά εκχυλίσματα από διαγονιδιακά παράσιτα LG13-mRFP1 και σε εκχυλίσματα κυτταροκαλλιέργειας ανθρώπινων ηπατοκυττάρων WRL68 που εκφράζουν την πρωτεΐνη DsRed. Παράλληλα, καθαρισμένο αντίσωμα ελέγχθηκε με ανοσοφθορισμό και συνεστιακή μικροσκοπία σε διαγονιδιακά παράσιτα *L.donovani* -mRFP1

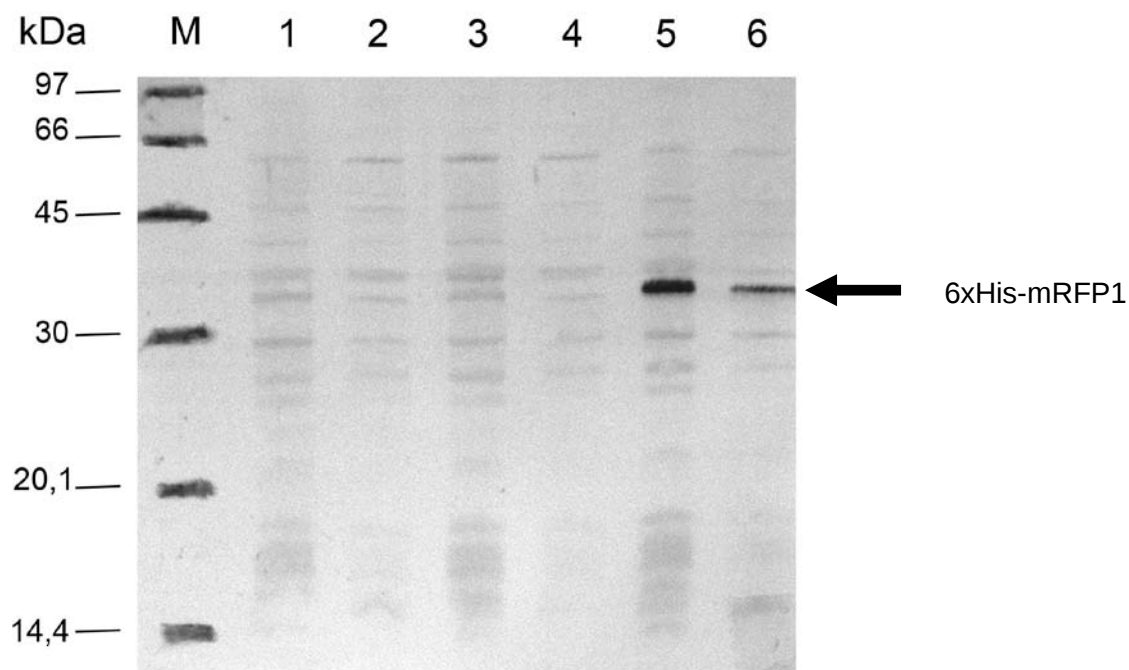
Τα βακτηριακά δείγματα BL21 και BL21-pRSET-b χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες για το χαρακτηρισμό του anti-mRFP1 αντισώματος σε Western Blot. Με τη μέθοδο Western Blot πιστοποιήθηκε η ειδικότητα του αντισώματος έναντι πρωτεΐνης που έχει το αναμενόμενο μοριακό βάρος με την βακτηριακή πρωτεΐνη mRFP1 που εκφράζεται από το στέλεχος BL21-pREST-b-mRFP1 (Εικόνα 4.8, διαδρομές 5,6 βέλος). Η πρωτεΐνη αυτή ανιχνεύθηκε στο διαλυτό (Εικόνα 4.8, διαδρομή 5) και στο αδιάλυτο κλάσμα (Εικόνα 4.8, διαδρομή 6) των βακτηριακών εκχυλισμάτων. Ο ορός φαίνεται να αναγνωρίζει επίσης μη ειδικά πρωτεΐνες του ίδιου μοριακού βάρους στο διαλυτό κλάσμα εκχυλισμάτων από βακτηριακά στελέχη BL21 και BL21-pRSET-b που δεν περιέχουν το πλασμίδιο έκφρασης της πρωτεΐνης mRFP1 ή το γονίδιο της mRFP1 αντίστοιχα (Εικόνα 4.8, διαδρομές 1&3, τρίγωνο) καθώς και άλλες πρωτεΐνες μεγαλύτερου μοριακού βάρους (Εικόνα 4.8, λεπτό βέλος). Η αντίδραση αυτή ελαχιστοποιείται όταν χρησιμοποιείται καθαρισμένο αντίσωμα (Εικόνα 4.9). Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην εικόνα 4.9 επιβεβαιώνουν ότι ο ορός κουνελιού που παρήχθη μετά από ανοσοποίηση με την πρωτεΐνη 6His-mRFP1 περιέχει ειδικά anti-mRFP1 αντισώματα. Τα αποτελέσματα αυτά επίσης υποδεικνύουν ότι το μεγαλύτερο μέρος της πρωτεΐνης 6His-mRFP1 στα βακτηριακά εκχυλίσματα βρίσκεται στο διαλυτό κλάσμα (Εικόνα 4.9, διαδρομή 5).

Ο καθαρισμένος ορός anti-mRFP1 αναγνωρίζει επίσης την πρωτεΐνη mRFP1 σε εκχυλίσματα από τα διαγονιδιακά παράσιτα *L.donovani* -mRFP1 με την τεχνική του Western Blot. Στον έλεγχο αυτό χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας δείγμα από βακτηριακό εκχύλισμα κυττάρων BL21-pRSET-b-mRFP1 (Εικόνα 4.10, διαδρομή 1). Στις διαδρομές 1 και 3 φορτώθηκαν ίσες ποσότητες ολικής πρωτεΐνης από βακτηριακά και παρασιτικά εκχυλίσματα αντίστοιχα (Εικόνα 4.10). Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην εικόνα 4.11 πιστοποιούν την

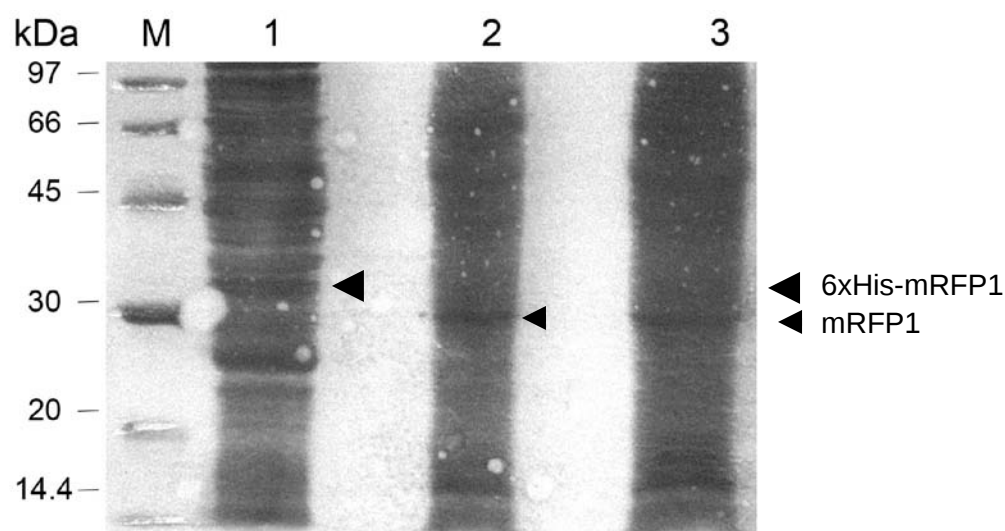
ειδικότητα του καθαρισμένου αντισώματος anti-mRFP1 έναντι της mRFP1 που παράγεται από παράσιτα *L. donovani*-mRFP1. Στα Λεϊσμανιακά εκχυλίσματα η πρωτεΐνη mRFP1 παρουσιάζει το αναμενόμενο χαμηλότερο μοριακό βάρος που οφείλεται στο ότι είναι κατά 33 αμινοξέα μικρότερη στο N-τελικό άκρο (pRSET-b αλληλουχία με την ετικέτα των 6 Ιστιδινών, **4.11**) από την βακτηριακή 6His-mRFP1. Παρατηρούμε επίσης ότι η ποσότητα της πρωτεΐνης 6His-mRFP1 αποτελεί μεγαλύτερο ποσοστό της ολικής πρωτεΐνης των βακτηριακών εκχυλισμάτων σε σχέση με την mRFP1 που ανιχνεύεται στα παρασιτικά εκχυλίσματα. Σε αυτό πιθανόν συμβάλει η μεγαλύτερης αποτελεσματικότητας έκφραση (ισχυρός υποκινητής και υπερέκφραση του mRFP1) που έχει το σύστημα pRSET-b στα βακτήρια από αυτό του φορέα pLEXSY-sat στη *Leishmania*. Είναι επίσης πιθανόν το anti-mRFP1 αντίσωμα να αναγνωρίζει με υψηλότερη χημική συγγένεια την βακτηριακή πρωτεΐνη λόγω της παρουσίας anti-His αντισωμάτων. Όσον αφορά τα λεϊσμανιακά εκχυλίσματα *L. donovani*-mRFP1 (*Εικόνες 4.10 & 4.11*) η ποσότητα mRFP1 που εντοπίζεται από το anti-mRFP1 αντίσωμα φαίνεται να είναι η ίδια στα δυο δείγματα που αναλύθηκαν στις διαδρομές 2 και 3 της *Εικόνας 4.11*, ενώ η ποσότητα ολικής πρωτεΐνης που φορτώθηκε είναι διπλάσια για την διαδρομή 3. Αυτό πιθανά οφείλεται στη μεγάλη ποσότητα ολικής πρωτεΐνης που αναλύθηκε και στο γεγονός ότι σε αυτό το μοριακό βάρος υπάρχουν και άλλες λεϊσμανιακές πρωτεΐνες σε συνδυασμό, έτσι ώστε κατά την ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη νιτροκυταρίνης να υπήρξε κορεσμός και να μην μεταφέρθηκαν ποσοτικά τα μόρια της mRFP1.



Εικόνα 4.8 Έλεγχος της δράσης και του τίτλου του κουνελικού ορού anti-mRFP1 (2η αιμοληψία, αραίωση 1:10.000) με τη μέθοδο Western Blot. Για την ανάπτυξη χρησιμοποιήθηκε αντι-κουνελικό αντίσωμα συζευγμένο με HRP και χρωμομετρική μέθοδος ανάπτυξης με αντιδραστήριο DAB. Ο έλεγχος έγινε σε ίσες ποσότητες από βακτηριακά εκχυλίσματα από στελέχη BL21 (1-2) ; BL21-pRSET-b (3-4) και BL21-pRSET-b-mRFP1 (5-6). Οι διαδρομές 1, 3, 5 αφορούν το διαλυτό μέρος των βακτηριακών εκχυλισμάτων, ενώ οι διαδρομές 2, 4, 6 αφορούν το αδιάλυτο μέρος (insoluble) και inclusion bodies; (M): Μοριακοί μάρτυρες.

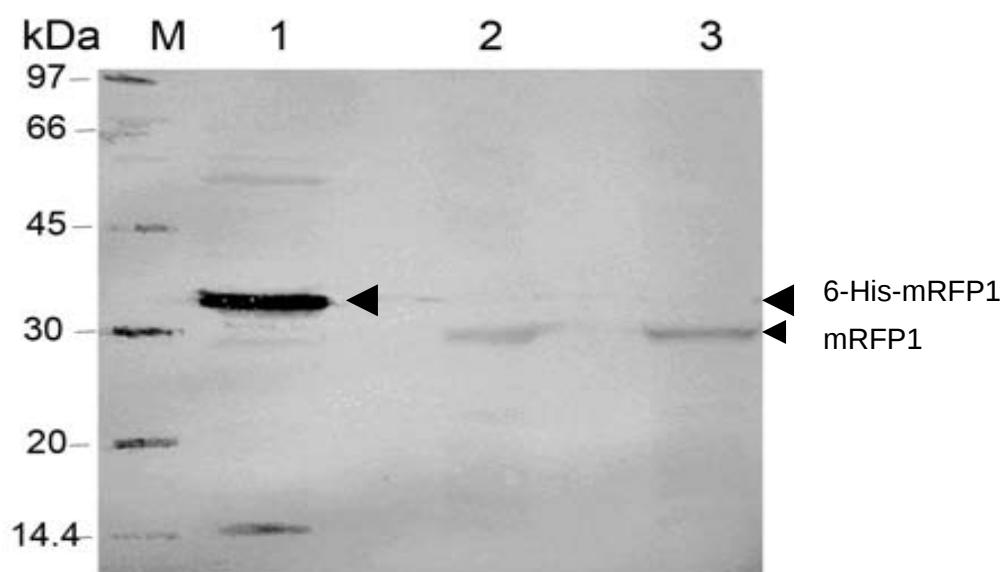


Εικόνα 4.9 Έλεγχος της δράσης και ειδικότητας του καθαρισμένου αντίσωματος anti-mRFP1 από τη 2^η αιμοληψία με τη μέθοδο Western Blot. Το αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Για την ανάπτυξη χρησιμοποιήθηκε αντι-κουνελικό αντίσωμα συζευγμένο με HRP και χρωμομετρική μέθοδος ανάπτυξης με αντιδραστήριο DAB. Ο έλεγχος έγινε σε ίσες ποσότητες από βακτηριακά εκχυλίσματα από στελέχη BL21 (1-2); BL21-pRSET-b (3-4) ; και BL21-pRSET-b-mRFP1 (5-6). Οι διαδρομές 1, 3, 5 αφορούν το διαλυτό μέρος των βακτηριακών εκχυλισμάτων, ενώ οι διαδρομές 2, 4, 6 αφορούν το αδιάλυτο μέρος (insoluble και inclusion bodies); (M): Μοριακοί μάρτυρες.



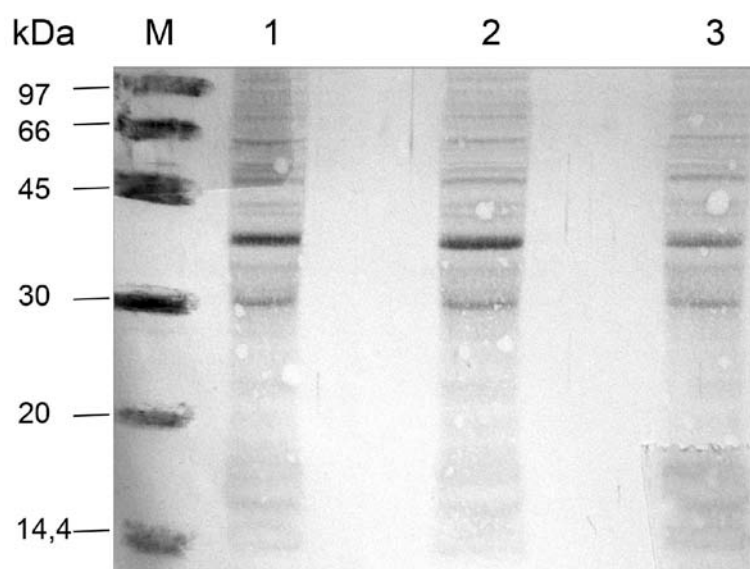
Εικόνα 4.10 Ανάλυση με ηλεκτροφόρηση ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από βακτήρια BL21-pRSET-b-mRFP1 και παράσιτα *L. donovani*-mRFP1. Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ύστερα από χρώση με Ponceau-S. Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών έγινε σε 12% w/v γέλη πολυακρυλαμίδης και ακολούθησε μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. (1): βακτηριακά εκχυλίσματα BL21-pRSET-b-mRFP1 (148.8 μg ολικής πρωτεΐνης); (2):

λεϊσμανιακά εκχυλίσματα *L.donovani*-mRFP1 (75,4 μ g ολικής πρωτεΐνης); (3): λεϊσμανιακά εκχυλίσματα *L.donovani*-mRFP1 (150,8 μ g ολικής πρωτεΐνης). Τα βέλη δείχνουν τις θέσεις που αναμένονται οι πρωτεΐνες 6His-mRFP1 και mRFP1 στις διαδρομές 1 και 3 αντίστοιχα; (M): Μοριακοί μάρτυρες.

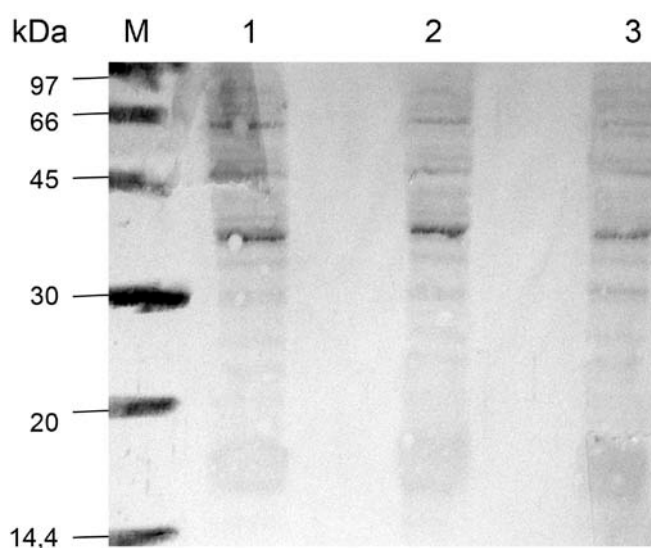


Εικόνα 4.11 Έλεγχος της δράσης και ειδικότητας καθαρισμένου αντίσωματος anti-mRFP1 από τη 2^η αιμοληψία με τη μέθοδο Western Blot σε εκχυλίσματα από παράσιτα LG13-mRFP1. Το αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 0,5 μ g/ μ l. Για την ανάπτυξη χρησιμοποιήθηκε αντι-κουνελικό αντίσωμα συζευγμένο με HRP και χρωμομετρική μέθοδος ανάπτυξης με αντιδραστήριο DAB. (1): βακτηριακά εκχυλίσματα BL21-pRSET-b-mRFP1 (148.8 μ g ολικής πρωτεΐνης); (2): λεϊσμανιακά εκχυλίσματα LG13-mRFP1 (75,4 μ g ολικής πρωτεΐνης); (3): λεϊσμανιακά εκχυλίσματα LG13-mRFP1 (150,8 μ g ολικής πρωτεΐνης); (M): Μοριακοί μάρτυρες.

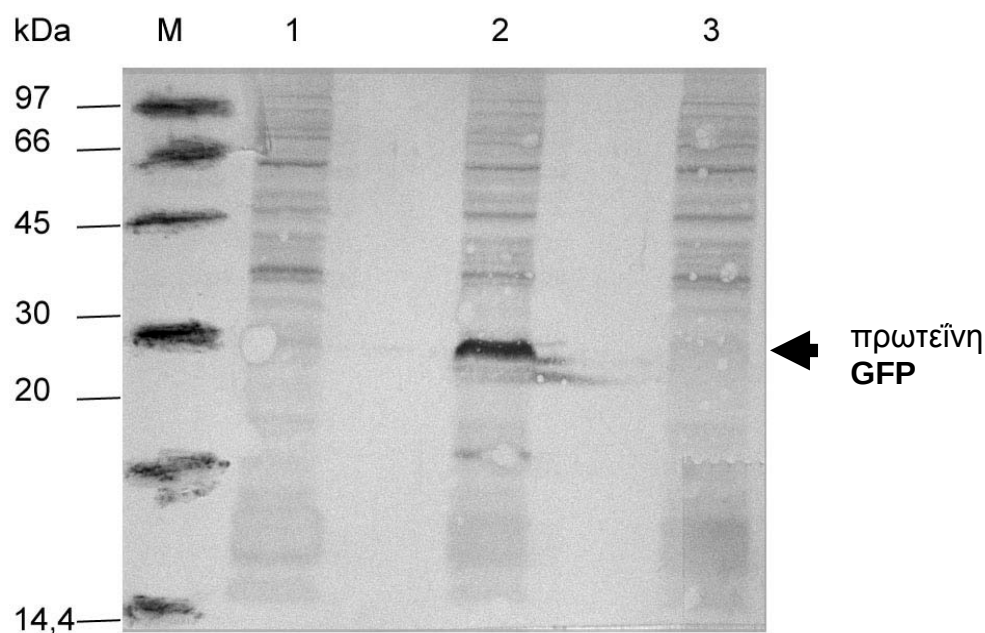
Τέλος ελέγχθηκε αν ο ορός ή το καθαρισμένο anti-mRFP1 αντίσωμα (Εικόνα 4.12 & 4.13) αναγνωρίζει την πρωτεΐνη DsRed (τετραμερής μορφή της mRFP1) σε εκχυλίσματα από ηπατικά κύτταρα WRL68 που είχαν επιμολυνθεί με πλασμίδιο έκφρασης της DsRed. Κύτταρα WRL68 που είχαν επιμολυνθεί με πλασμίδιο έκφρασης της πρωτεΐνης GFP (~30% ομόλογη με την RFP) ή που δεν είχαν επιμολυνθεί με κανένα πλασμίδιο χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες για το χαρακτηρισμό του αντισώματος. Παράλληλα, ελέγχθηκε η δράση ειδικού καλά χαρακτηρισμένου anti-GFP αντισώματος στα ίδια κυτταρικά εκχυλίσματα. Στις συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στο συγκεκριμένο πείραμα, το αντίσωμα anti-mRFP1 δεν αναγνώρισε την πρωτεΐνη DsRed που εκφράζεται από τα ανθρώπινα κύτταρα WRL68 (Εικόνες 4.12 και 4.13, διαδρομή 3). Η έκφραση της DsRed στα επιμολυσμένα κύτταρα είχε προηγουμένως επιβεβαιωθεί με παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού. Αντίθετα, το αντίσωμα anti-GFP αναγνώρισε την πρωτεΐνη GFP στα επιμολυσμένα κύτταρα WRL68 (Εικόνα 4.14).



Εικόνα 4.12 Ελεγχος της δράσης και ειδικότητας anti-mRFP1 ορού με τη μέθοδο Western Blot σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από ανθρώπινα κύτταρα WRL68. Ο ορός από τη 2^η αιμοληψία χρησιμοποιήθηκε σε αραιώση 1:1000. Για την ανάπτυξη χρησιμοποιήθηκαν αντι-κουνελικό αντίσωμα συζευγμένο με HRP και χρωμομετρική μέθοδος ανάπτυξης με αντιδραστήριο DAB. (1): Μη επιμολυσμένα WRL68 κύτταρα; (2): WRL68 επιμολυσμένα με πλασμίδιο pEGFP-N3. (3) WRL68 επιμολυσμένα με pDsRed πλασμίδιο. (M): Μοριακοί μάρτυρες. Ισος αριθμός κυττάρων φορτώθηκαν σε κάθε διαδρομή [1/2 των κυττάρων από ένα πηγαδάκι από πλάκα κυτταροκαλλιέργειας 12 θέσεων (12-well plate)].

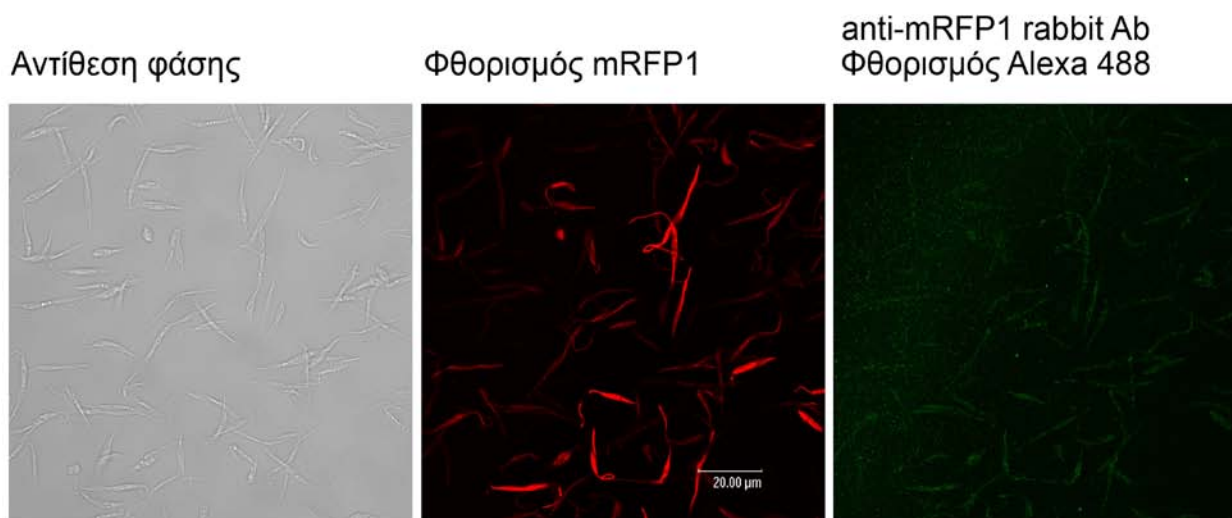


Εικόνα 4.13 Ελεγχος της δράσης και ειδικότητας anti-mRFP1 καθαρισμένου αντισώματος από με τη μέθοδο Western Blot σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από ανθρώπινα κύτταρα WRL68 όπως στην εικόνα 4.12. Καθαρισμένος ορός από τη 2^η αιμοληψία χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 0.5 μg/ml. Για την ανάπτυξη χρησιμοποιήθηκαν αντι-κουνελικό αντίσωμα συζευγμένο με HRP και χρωμομετρική μέθοδος ανάπτυξης με αντιδραστήριο DAB. (1): Μη επιμολυσμένα WRL68 κύτταρα; (2): WRL68 επιμολυσμένα με πλασμίδιο pEGFP N3. (3: WRL68 επιμολυσμένα με pDsRED πλασμίδιο. (M): Μοριακοί μάρτυρες.



Εικόνα 4.14 Έλεγχος της δράσης και ειδικότητας **anti-GFP** καθαρισμένου αντισώματος με τη μέθοδο Western Blot σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από ανθρώπινα κύτταρα WRL68 όπως στην εικόνα 4.12. Καθαρισμένος anti-GFP ορός χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 0.45 $\mu\text{g/ml}$. Για την ανάπτυξη χρησιμοποιήθηκαν αντι-κουνελικό αντίσωμα συζευγμένο με HRP και χρωμομετρική μέθοδος ανάπτυξης με αντιδραστήριο DAB. (1): Μη επιμολυσμένα WRL68 κύτταρα; (2): WRL68 κύτταρα επιμολυσμένα με πλασμίδιο pEGFP N3; (3): WRL68 κύτταρα επιμολυσμένα με pDsRed πλασμίδιο. (M): Μοριακοί μάρτυρες.

Τέλος ελέγχθηκε αν το anti-mRFP1 αντίσωμα αναγνωρίζει την πρωτεΐνη mRFP1 στα παράσιτα *L.donovani*-mRFP1 με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού. Διαγονιδιακά παράσιτα μονιμοποιήθηκαν σε καλυπτρίδες όπως περιγράφεται στο ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ 5.4.2 και στη συνέχεια υπέστησαν χρώση με το αντίσωμα anti-mRFP1 και δεύτερο αντίσωμα που φέρει χρωστική που εκπέμπει πράσινο φθορισμό. Η παρατήρηση των παρασίτων έγινε με συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού (Leica TCS SP). Η ανίχνευση της mRFP1 έγινε μετά από διέγερση με τη γραμμή του Laser 543 nm και της χρωστικής Alexa 488 με τη γραμμή του Laser 488. Όπως παρουσιάζουν τα αποτελέσματα στην Εικόνα 4.17 το αντίσωμα anti-mRFP1 παρουσιάζει μόνο μη ειδική (background) αντίδραση με τα κύτταρα *L.donovani*-mRFP1 σε ανοσοφθορισμό.



Εικόνα 4.15 Έλεγχος της δράσης και ειδικότητας του anti-mRFP1 αντισώματος σε ανοσοφθορισμό με συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού. Διαγονιδιακά παράσιτα *L.donovani*-mRFP1 μονιμοποιήθηκαν με φορμαλδεΰδη και υπέστησαν χρώση με καθαρισμένο anti-mRFP1 αντίσωμα (5 $\mu\text{g/ml}$) παρουσία απορυπαντικού Triton X-100 (0.1% v/v) σύμφωνα με το (ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ 5.4.2). Ως δεύτερο αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε αντι-κουνελικό αντίσωμα συζευγμένο με τη φθορίζουσα χρωστική Alexa488 (Molecular Probes/Invitrogen).

Παράρτημα Ι :

5 Πρωτόκολλα

5.1 Βακτήρια

5.1.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (miniprep)

1. Εμβολιασμός υγρής καλλιέργειας 3ml με αποικία βακτηρίων
2. Επώαση υπο συνεχή ανάδευση σε επωαστικό κλίβανο(16 ώρες, 37°C).
3. Φυγοκέντρηση (4000 rpm, 20 λεπτά, 4°C) 1.5 ml υγρής καλλιέργειας
4. Απόχυση υπερκείμενου
5. Αναδιάλυση του βακτηριακού ίζηματος με 100μl P1 (Διαλύματα 6.1)
6. Πρόσθεση 200μl P2 (Διαλύματα 6.2). Ανάμειξη με αναποδογύρισμα του σωλήνα errendorf 3-5 φορές (το βήμα αυτό δεν πρέπει να ξεπερνά τα 5 λεπτά).
7. Πρόσθεση 150μl P3 (Διαλύματα 6.3) και ήπια.ανάδευση
8. Φυγοκέντρηση (11000 rpm, 5 λεπτά) και μεταφορά του υπερκείμενου (500μl) σε καινούριο errendorf.
9. Κατακρήμνιση του DNA με 1ml 100% v/v αιθανόλη και οξικό νάτριο (0.3M).
10. Έκπλυση για απομάκρυνση των αλάτων με 70% v/v αιθανόλη (500μl).
11. Ξήρανση του ιζήματος
12. Αναδιάλυση του ιζήματος του DNA με 20-40μl ddH₂O.

5.1.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεσαία κλίμακα (midi prep)

- :
1. Μία αποικία βακτηρίων εμβολιάζεται σε 2-5ml θρεπτικό υλικό παρουσία αντιβιοτικού
 2. Ακολουθεί επώαση με ανάδευση στους 37°C για ~ 8 ώρες.
 3. Η αρχική καλλιέργεια εμβολιάζεται σε 500 ml θρεπτικό υλικό και ακολουθεί επώαση με ανάδευση στους 37°C για 16 ώρες.
 4. Η καλλιέργεια φυγοκεντρείται στις 4.000 rpm για 15 λεπτά στους 4°C.
 5. Το βακτηριακό ίζημα αναδιαλύεται με ισχυρή ανάδευση σε 10 ml διαλύματος P1 και το δείγμα τοποθετείται σε πάγο (4°C).
 6. Ακολουθεί προσθήκη 10 ml διαλύματος P2, ήπια ανάδευση και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
 7. Προστίθενται 10 ml διαλύματος P3 και το δείγμα επωάζεται στον πάγο για 20λεπτά
 8. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καθαρό σωλήνα.
 9. Ταυτόχρονα, γίνεται προετοιμασία της κολώνας, με προσθήκη 10 ml διαλύματος QBT.
 10. Στην κολώνα τοποθετείται το υπερκείμενο και στη συνέχεια διάλυμα QC (2 x 30 ml) για έκπλυση.
 11. έκλυση με 15 ml διαλύματος QF.
 12. Στο εκλούόμενο διάλυμα προστίθενται 10,5 ml ισοπροπανόλης

13. Φυγοκεντρείται στις 14.000 rpm για 30 λεπτά στους 4°C, οπότε καθιζάνει το π्लाσμιδιακό DNA.
14. Το ίζημα ξεπλένεται με αιθανόλη 70% (v/v)
15. Μετά την εξάτμιση του διαλύτη αναδιαλύεται σε 50-100 µl ddH₂O.

5.1.3 Παρασκευή επιδεκτικών βακτηρίων

5.1.3.a Χημειοδεκτικά κύτταρα DH5a

1. Εμβολιασμός τρυβλίων LB με stock γλυκερόλης κυττάρων DH5a και επώαση στους 37°C, 16 ώρες.
 2. Εμβολιασμός υγρής καλλιέργειας 20 ml LB με μονή αποικία. Επώαση στους 37°C, 16 ώρες.
 3. Εμβολιασμός υγρής καλλιέργειας 200 ml LB με 1ml της υγρής καλλιέργειας και επώαση με ανάδευση στους 37°C μέχρι να λάβει η οπτική πυκνότητα την τιμή OD₆₀₀=0.6 (0.5-0.7).
 4. Μεταφορά της καλλιέργειας σε αποστειρωμένους, παγωμένους δοκιμαστικούς σωλήνες πολυπροπυλενίου και ψύξη για 10 λεπτά στον πάγο (4°C).
 5. Φυγοκέντρωση στις 4000 rpm σε φυγόκεντρο Sorvall στους 4°C.
 6. Απόχυση του υπερκειμένου και τοποθέτηση των δοκιμαστικών σωλήνων ανάποδα για 1 λεπτό, ώστε να απομακρυνθεί όλο το υλικό.
 7. Αναδιάλυση του ιζήματος σε 4 ml (ανά 50 ml καλλιέργειας) παγωμένου διαλύματος FSB.
- Μοίρασμα μικρών όγκων (200 µl) επιδεκτικών κυττάρων σε eppendorfs, πάγωμα σε υγρό άζωτο και αποθήκευση στους -80°C.

5.1.3.b Ηλεκτροδεκτικά κύτταρα DH5a

1. Εμβολιασμός 10 ml υγρού θρεπτικού LB με μονή αποικία από τρυβλίο. Επώαση στους 37°C για 16 ώρες.
2. Μεταφορά της καλλιέργειας των 10 ml σε 1L LB και επώαση με ανάδευση στους 37°C μέχρι η οπτική πυκνότητα να λάβει την τιμή OD₆₀₀=0.6 (0.5-0.7).
3. Φυγοκέντρωση των κυττάρων στις 4000 rpm στους 4°C για 15 λεπτά.
4. Απόχυση του υπερκειμένου και αναδιάλυση του ιζήματος σε 250 ml παγωμένου δις απιονισμένου νερού.
5. Φυγοκέντρωση των κυττάρων στις 4000 rpm στους 4°C για 15 λεπτά και έκπλυση, όπως στο βήμα 4.
6. Φυγοκέντρωση των κυττάρων και προσθήκη 10 ml παγωμένης γλυκερόλης 10%v/v.
7. Φυγοκέντρωση και απομάκρυνση του υπερκειμένου.
8. Προσθήκη γλυκερόλης 10%v/v.
9. Μεταφορά των κυττάρων σε δοκιμαστικούς σωλήνες (50 µl εναιωρήματος στον καθένα) σε ξηρό πάγο + μεθανόλη.

5.2 Τεχνικές χειρισμού DNA

5.2.1 Ενίσχυση του ενθέματος με PCR (polymerase chain reaction)

Αντιδραστήρια:

Για αντίδραση 100 µl

dNTPs	: 2 μl από 10 mM (τελική συγκέντρωση 200 μM)
Oligo 1 (5')	: 10 μl από 10 μM (τελική συγκέντρωση 1 μM)
Oligo 2 (3')	: 10 μl από 10 μM (τελική συγκέντρωση 1 μM)
DNA template	: 10 – 50 ng πλασμιδίου pRSET-b
MgCl ₂	: 6 μl από 1.5mM (τελική συγκέντρωση 200 μM)
Buffer 10X	: 10 μl
Taq polymerase	: 1 μl

5.2.2 Πρωτόκολο PCR

Βήμα 1:	94°C	5 λεπτά
Βήμα 2:	94°C	1 λεπτό
Βήμα 3:	46°C	1 λεπτό
Βήμα 4:	74°C	1 λεπτό
<i>5 κύκλοι</i>		
Βήμα 5:	94°C	1 λεπτό
Βήμα 6:	60°C	1 λεπτό
Βήμα 7:	72°C	1 λεπτό
<i>29 κύκλοι</i>		
Βήμα 8:	72°C	3 λεπτά
Βήμα 9:	4°C	παύση

5.2.3 Ηλεκτροφόρηση DNA

α. Πήκτωμα αгарόζης

Για 0.8%w/v πήκτωμα αгарόζης, 100ml:

- 10ml TBE (10X)
- 90ml ddH₂O
- 0.8g αгарόζη
- 10μl βρωμιούχο αιθίδιο (10mg/ml)

Ανάλογα με τα μεγέθη των τμημάτων DNA που θέλουμε να ηλεκτροφορήσουμε παρασκευάζουμε πήκτωμα αгарόζης διαφορετικής συγκέντρωσης. Όσο μεγαλύτερο μοριακό βάρος έχουν τα τμήματα DNA τόσο πιο αραιό το πήκτωμα που χρησιμοποιούμε. Η ανάλυση τμημάτων DNA πραγματοποιήθηκε σε συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης Owl Buffer Puffer™, Model A5 της ThermoFischer Scientific. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται στα 100 V παρακολουθώντας το μέτωπο της χρωστικής (κυανού της βρωμοθυμόλης) ώστε να μην περάσει τα κάτω όρια του πηκτώματος.

5.2.4 Εξαγωγή DNA από πήκτωμα αгарόζης

(χρήση του Kit της Qiagen)

1. Αποκοπή του τμήματος του πηκτώματος που περιέχει το επιθυμητό τμήμα DNA με με νυστέρι μιας χρήσης μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης.
2. Προσδιορισμός του βάρους του τμήματος του πηκτώματος με ζυγό ακριβείας.
3. Λύση του πηκτώματος. Για κάθε 100 mg πηκτώματος αгарόζης προστίθενται 200 μl ρυθμιστικού διαλύματος NT (του kitNucleoSpin Extract)

4. Επώαση στους 50°C για 5 λεπτά μέχρι να διαλυθούν όλα τα κομμάτια του πηκτώματος.
5. Πρόσδεση του DNA σε χρωματογραφική στήλη διαχωρισμού. Η ειδική χρωματογραφική στήλη διαχωρισμού τοποθετείται σε 2ml σωλήνα και σε αυτήν τοποθετείται το δείγμα. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στα 11,000 x g και απομακρύνεται το εκλούσμα.
6. Έκπλυση της μεμβράνης.
7. Πρόσθεση 600 μl ρυθμιστικού διαλύματος NT3. Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στα 11,000 x g και απομάκρυνση του εκλούσματος.
8. Επανάληψη της φυγοκέντρωσης στα 11,000 x g για 2 λεπτά, ώστε να απομακρυνθεί το NT3 ποσοτικά.
9. Έκλουση του DNA
10. Τοποθέτηση της κολώνας σε καθαρό σωλήνα eppendorf 1.5 ml, προσθήκη 15-50 μl απιονισμένου νερού και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στα 11,000 x g.

5.2.5 Συγκέντρωση του DNA με κατακρήμνιση αιθανόλης (ethanol precipitation)

1. Πρόσθεση των ακόλουθων αντιδραστηρίων στο υδατικό διάλυμα του πασμιδιακού DNA:
 - 2-3 όγκους 100% v/v αιθανόλη (EtOH)
 - 1/10 όγκου 3M οξικό νάτριο (CH₃COONa), pH 5.2
2. Ανάμιξη και πάγωμα στους -80°C για 20 λεπτά (ανάλογα με το μέγεθος του νουκλεϊκού οξέος και τον όγκο και τη συγκέντρωση του διαλύματος επωάζουμε στους -80°C από 20 λεπτά ως 1 ώρα).
3. Φυγοκέντρηση στους 4°C για 15 λεπτά.
4. Απομακρυνση του υπερκειμένου προσεκτικά.
5. Στέγνωμα του ίζηματος είτε με επώαση σε θερμοκρασία δωματίου με ανοιχτό καπάκι για ~15 λεπτά είτε χρησιμοποιώντας τη συσκευή speedvac.
6. Αναδιαλυση του ίζηματος στην κατάλληλη ποσότητα ddH₂O.

5.3 Τεχνικές χειρισμού Πρωτεϊνών

5.3.1 Έκφραση της κόκκινης φθορίζουσας πρωτεΐνης m RFP1 και απομόνωση

Επαγωγή

1. Ανάπτυξη υγρής βακτηριακής καλλιέργειας BL21-pRSET-mFRP, 10 ml (16 ώρες, 37°C starter culture).
2. Ανάμιξη της αρχικής καλλιέργειας με 1 L LB και επώαση στους 37 °C.
⇒ φυλάσσεται 1ml καλλιέργειας πριν την επαγωγή (δείγμα 1)
3. Μέτρηση της οπτικής πυκνότητας της καλλιέργειας στα 600 nm (OD₆₀₀).
4. Πρόσθεση 1mM IPTG όταν το OD₆₀₀ = 0.6 (0.5-0.7).
5. Επαγωγή της έκφρασης για 4 ώρες
⇒ φυλάσσεται 1ml καλλιέργειας μετά την επαγωγή (δείγμα 2)

Απομόνωση της πρωτεΐνης

6. Συλλογή των κύτταρων με φυγοκέντρηση στα 4,000 x g για 30 λεπτά.

7. Απομακρύνση του υπερκλειμένου και αναδιάλυση σε ρυθμιστικό διάλυμα κυτταρικής λύσης (φωσφορικό ρυθμιστικό, ιμιδαζόλιο 20 mM, pH 8.0). Προστίθενται 2-5 ml για κάθε 1 gr ξηρού βάρους.
8. Πρόσθεση λυσοζύμης (τελική συγκέντρωση 1 mg/ml) και επώαση στον πάγο για 30 λεπτά.
9. Κυτταρική λύση με πάγωμα/ξεπάγωμα (διαδοχικές επωάσεις σε υγρό άζωτο και στους 37°C) και στη συνέχεια χρήση υπερήχων (sonication) (8 εφαρμογές των 10 δευτερολέπτων στα 100 W με ενδιάμεσα διαστήματα 10 δευτερολέπτων ψύξης στον πάγο)
⇒ φυλάσσονται 100 μl από το εκχύλισμα (δείγμα3)
10. Πρόσθεση του ενζύμου RNase A (10 μg/ml τελική συγκέντρωση) και DNase I (5μg/ml τελική συγκέντρωση) και επώαση των δειγμάτων στον πάγο για 15 min.
11. Φυγοκέντρωση στις 14,000 rpm για 10 min στους 4°C.
⇒ φυλάσσονται 100 μl από το υπερκείμενο του εκχυλίσματος (δείγμα4)
⇒ φυλάσσεται το ίζημα (δείγμα 5)
12. Πρόσθεση σφαριδίων Ni-NTA στο εκχύλισμα (1 ml slurry σε κάθε 4 ml lysate)
13. Ήπια ανάμιξη στους 4°C για 1 ώρα
14. Φυγοκέντρωση στα 1,000 x g για 30 s.
15. Μεταφορά του υπερκλειμένου σε νέους σωλήνες
⇒ φύλαξη του υπερκλειμένου (δείγμα 6)
16. Έκπλυση της ρητίνης με ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης όγκου ίσου με τον όγκο του ρυθμιστικού διαλύματος λύσης. (διάλυμα φωσφορικών, ιμιδαζόλιο 70 mM, pH 8.0).
⇒ φυλάσσεται η 1^η έκπλυση(δείγμα7)
⇒ φυλάσσεται η 2^η έκπλυση(δείγμα 8)
17. Έκλουση της πρωτεΐνης με προσθήκη 0.5 ml ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης (ρυθμιστικό έκλουσης: phosphate buffer, ιμιδαζόλιο 250 mM, pH 8.0) για κάθε 4 ml εκχυλίσματος. Η έκλουση επαναλαμβάνεται 4 φορές.
⇒ φυλάσσεται η 1^η έκλουση(δείγμα 9)
⇒ φυλάσσεται η 2^η έκλουση(δείγμα 10)
⇒ φυλάσσεται η 3^η έκλουση(δείγμα 11)
⇒ φυλάσσονται τα beads (δείγμα 12)

Φόρτωση των δειγμάτων σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 12% w/v και ηλεκτροφόρηση (SDS-PAGE).

5.3.2 Ανοσοσύτρωση (Western Blot)

1. Blocking step

Επώαση της μεμβράνης της νιτροκυταρίνης στην οποία έχουν μεταφερθεί οι πρωτεΐνες που μας ενδιαφέρουν με PBS + 5% w/v γάλα σε σκόνη + 0,05% v/v Tween-20 στους 4°C για 16 περίπου ώρες ή σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα

2. Προσθήκη πρώτου αντίσωματος

Επώαση με το πρώτο αντίσωμα σε PBS + 1% w/v γάλα σε σκόνη + 0,05% v/v Tween-20 στην κατάλληλη αραιώση για 1-2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου ή για 16 ώρες στους 4°C (για πιο ειδική πρόσδεση).

3. Εκπλύσεις

Διαδοχικές εκπλύσεις της μεμβράνης της νιτροκυτταρίνης με TBS που περιέχει 0,3% v/v Tween-20 (1x για 5min) (0,3% TTBS) στη συνέχεια με 0,2% TTBS (1x για 5min) και τέλος με 0,1% TTBS (1x για 5min). (TTBS=TBS + Tween 20)

4. Δεύτερο αντίσωμα

Ως δεύτερο αντίσωμα χρησιμοποιείται anti-rabbit IgG που έχει προσδεσμένη υπεροξειδάση (DAKO Code No PO214).

Το αντίσωμα χρησιμοποιείται σε αραιώση 1:1000 σε PBS ή TBS + 1% w/v γ α α σε σκ όη + 0.1% Tween-20 σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας.

5. Εκπλύσεις

Διαδοχικές εκπλύσεις της μεμβράνης της νιτροκυτταρίνης με 0,3%v/v TTBS (1x) για 5 min, με 0,2% TTBS (1x για 5 min) και τέλος με 0,1% v/v TTBS (1x για 5 min). Τέλος πραγματοποιείται μια ακόμα έκπλυση με TBS.

6. Εμφάνιση

Προσθέτουμε στην νιτροκυτταρίνη το διάλυμα εμφάνισης: 100 μl H₂O₂ + 10 μl DAB σε PBS και περιμένουμε για την ανάπτυξη του χρώματος. Η πορεία της αντίδρασης διακόπτεται με έκπλυση με H₂O και στέγνωμα. Η εμφάνιση μπορεί να γίνει και με τη Μέθοδο ECL (Amersham).

5.3.3 Micro-Bradford assay

1. Προετοιμασία των πρωτεϊνικών δειγμάτων που περιέχουν BSA ή BGG σε ποσότητες από 1 έως 20 μg ορού σε συνολικό όγκο 800 μl, συμπληρώνοντας με dd H₂O.

2. Προετοιμασία πρωτεϊνικών δειγμάτων του αγνώστου σε ποσότητες από 1 έως 10 μl σε συνολικό όγκο 800 μl, συμπληρώνοντας με ddH₂O.

3. Προσθήκη 200 μl αντιδραστηρίου Bradford. Ανάδευση των δειγμάτων και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

4. Φωτομέτρηση στα 595 nm.

5.3.4 Καθαρισμός αντισώματος με χρωματογραφία συγγενείας από μεμβρανή νιτροκυτταρίνης με το κατάλληλο αντιγόνο.

1. Ηλεκτροφόρηση του αντιγόνου σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 12% w/v και μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

2. Χρώση του ανοσοστυπώματος με Ponceau-S και απομόνωση της περιοχής που περιέχει το αντιγόνο.

3. Έκπλυση με PBS για 10 λεπτά (3X).

4. Επώαση του τμήματος της νιτροκυτταρίνης για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (23°C) με μικρή ποσότητα ορού (0.5-1 ml) σε πηγαδάκι από 6-well τρυβλίο κυτταροκαλλιέργειας.

5. Έκπλυση με PBS για 10 λεπτά (3X).

6. Τα τμήματα της νιτροκυτταρίνης τοποθετούνται σε αποστειρωμένο κύλινδρο και εκλούεται το αντίσωμα που έχει προσδεθεί με 1ml 0.2M γλυκίνης/HCl pH 2.2 για 5 λεπτά στους 4°C

7. Εξουδετέρωση με 150 μl 2M Tris-Base.

8. Διαπήδηση με PBS (Χρήση μεμβράνης Spectra/Por της Biotech).

Εγχύονται τα εκλούσματα στη μεμβράνη και επωάζονται σε 1L PBS στους 4°C για 2 ώρες. Στη συνέχεια επωάζονται 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 bovine IgG ή με

φωτομέτρηση σε OD 280. 1 μονάδα OD280 αντιστοιχεί σε συγκέντρωση αντι σώματος 1,35 mg/ml

5.4 Παράσιτα

5.4.1 Προετοιμασία των δειγμάτων για ανάλυση κυτταρομετρίας ροής

1. Λήψη της επιθυμητής ποσότητας από την κυτταροκαλλιέργεια των παρασίτων
2. Έκπλυση των κυττάρων από το θρεπτικό μέσο με φυγοκέντρηση στις 1800 rpm για 10 λεπτά σε επιτραπέζια φυγόκεντρο Thermo.
3. Αναδιάλυση του ιζήματος που περιέχει τα παράσιτα σε 1 ml φιλτραρισμένου (φίλτρο Minisart Plus, 0.20 μ m)–αποστειρωμένου διαλύματος 1XPBS σε δοκιμαστικούς σωλήνες FACS.

5.4.2 Προετοιμασία λείσμανιακών δειγμάτων για παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού

1. Λήψη της επιθυμητής ποσότητας από την κυτταροκαλλιέργεια των παρασίτων.
2. Φυγοκέντρηση στα 1800 rpm για 10 λεπτά.
3. Αναδιάλυση του ιζήματος σε 500 μ l PBS 1X συν 500 μ l PFA 4% w/v (τελική συγκέντρωση PFA 2% w/v).
4. Επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Απομάκρυνση του υπερκείμενου με φυγοκέντρηση στις 2000 rpm για 5 λεπτά.
6. Αναδιάλυση του ιζήματος σε 1ml PBS 1X.
7. Λήψη 300 μ l από το παραπάνω διάλυμα και αναδιάλυση σε 700 μ l PBS 1X (τελική αναλογία 1:3).
8. Διασπορά 50 μ l από το παραπάνω διάλυμα σε καλυπτρίδα πολυλυσίνης.
9. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 16 ώρες μέχρι να στεγνώσει.
10. Έκπλυση με PBS 1X, 3 φορές.
11. Μονιμοποίηση: Προσθήκη 10 μ l Mowiol σε κάθε καλυπτρίδα.
12. Τοποθέτηση της καλυπτρίδας με τα κύτταρα προς την πλευρά της αντικειμενοφόρου πλάκας. Άσκηση μικρής πίεσης, ώστε να εφάπτονται πλήρως η καλυπτρίδα και η αντικειμενοφόρος.
13. Επώαση για 16 ώρες στους 4 °C για να πολυμεριστεί το Mowiol.

5.5 Ανοσοποίηση κουνελιού

5.5.1 Προετοιμασία του αντιγόνου

1. Ηλεκτροφόρηση της απαραίτητης ποσότητας πρωτεΐνης 6-His-mRFP₁ που έχει απομονωθεί από σφαιρίδια Ni²⁺ σε 12% w/v SDS PAGE.
2. Εντοπισμός του αντιγόνου ύστερα από χρώση του πηκτώματος με τη χρωστική Coomassie R-250.
3. Αποκοπή του τμήματος του πηκτώματος που περιέχει την 6His-mRFP1 (~34kDa) με χρήση αποστειρωμένου νυστεριού.
4. Θρυματισμός του πολυακρυλαμιδίου σε κρυσταλλικό γουδί μετά από πάγωμα σε υγρό N₂.
5. Μετατροπή των θραυσμάτων του πολυακρυλαμιδίου σε εναιώρημα με πρόσθεση 700 μ l 1 X PBS και μεταφορά σε δυο μικρούς δοκιμαστικούς σωλήνες (eppendorfs) του 1,5 ml (350 μ l στον καθένα).

6. Προσθήκη ποσότητας από complete Freund's adjuvant, τόσης ώστε η αναλογία adjuvant : διάλυμα αντιγόνου να είναι 1:1.
7. Ισχυρή ανάδευση για 30 λεπτά έως ότου σχηματισθεί σταθερό γαλάκτωμα.

5.5.2 Πρωτόκολλο ανοσοποίησης

- a. Ημέρα 0 : λήψη αίματος πριν την ανοσοποίηση
- b. 1^η ημέρα : ένεση με complete Freund's adjuvant και αντιγόνο (500 µg)
- c. 33^η ημέρα: 1^ο boost με complete Freund's adjuvant και αντιγόνο (100 µg)
- d. 56^η ημέρα: 2^ο boost με incomplete Freund's adjuvant και αντιγόνο (50 µg)
- e. 68^η ημέρα: λήψη αίματος και απομόνωση ορού.
- f. 83^η ημέρα: 3^ο boost με incomplete Freund's adjuvant και αντιγόνο (50 µg)
- g. 97^η ημέρα: λήψη αίματος και απομόνωση ορού
- h. 130^η ημέρα: 4^ο boost με incomplete Freund's adjuvant και αντιγόνο (50 µg)
- i. 140^η ημέρα: λήψη όλου του αίματος από τον οργανισμό και απομόνωση ορού.

Απομόνωση ορού: αφού συλλεχθεί αίμα που έχει ληφθεί από την περιοχή του αυτιού σε αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα, αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 45 λεπτά – 1 ώρα και στη συνέχεια φυγοκεντρείται στις 3,000 x g. Μικρές ποσότητες του ορού φυλάσσονται στους 4°C για ανάλυση εντός μιας εβδομάδας και στους -20°C -80°C για φύλαξη για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

Παράρτημα II:

6 Διαλύματα

Για την παρασκευή όλων των διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε δις-απεσταγμένο και απιονισμένο H₂O (dd H₂O). Τα θρεπτικά υλικά για τις καλλιέργειες των βακτηρίων και τα ρυθμιστικά διαλύματα για τις διάφορες τεχνικές DNA και τις καλλιέργειες των ευκαρυωτικών κυττάρων, αποστειρώθηκαν σε αυτόκαυστο (υδρατμοί 121°C, πίεση 1,2 Atm) για 20 λεπτά ή φιλτραρίστηκαν μέσα από φίλτρα με διάμετρο πόρων 0,2 µm.

6.1 Θρεπτικά Υλικά βακτηρίων:

6.1.1 LB (Luria-Bertani, 1 lt)

NaCl 10 g (0.17M)

Bacto-tryptone 10 g (1% w/v)

Yeast-extract 5 g (0.5% w/v)

1L ddH₂O

Το pH του δ/τος ρυθμίζεται σε 7.

6.1.2 LB-αγαρ

Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού υλικού προστίθεται στο διάλυμα LB 1,5% (w/v) άγαρ.

6.2 **Διαλύματα απομόνωσης πλασμιδιακού DNA-Μέθοδος Qiagen**

6.2.1 Διάλυμα αναδιάλυσης P1 (resuspension buffer)

Tris- HCl (pH 8) 50 mM

EDTA 10 mM

RNase A 100 µg/ml

6.2.2 Διάλυμα λύσης P2 (lysis buffer)

NaOH 200 mM

SDS 1% (w/v)

6.2.3 Διάλυμα εξουδετέρωσης P3 (neutralization buffer)

Οξικό κάλιο (pH 5) 3 M

6.2.4 Διάλυμα εξισορρόπησης QBT (equilibration buffer)

NaCl 750 mM

Mops (pH 7) 50 mM

Isopropanol 15% (v/v)

TritonX-100 0 15% (v/v)

6.2.5 Διάλυμα έκπλυσης QC (wash buffer)

NaCl 1 M

Mops (pH 7) 50 mM

Isopropanol 15% (v/v)

6.2.6 Διάλυμα έκλουσης QF (elution buffer)

NaCl 1,25 M

Tris- HCl (pH 8,5) 50 mM

Isopropanol 15% (v/v)

6.3 **Διαλύματα ηλεκτροφόρησης DNA:**

6.3.1 Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης TBE 10x, 1 lt

Tris-Base	108 g (10.8% w/v)
Βορικό οξύ	55 g (5.5% w/v)
EDTA(0,5 M), pH 8	40 ml (4% v/v)

6.3.2 Ρυθμιστικό διάλυμα «φόρτωσης» δείγματος DNA (loading buffer), 6x

Tris, 50 mM

Χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης 0,25% (w/v)

Σουκρόζη 40% (w/v)

6.4 Διαλύματα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών (SDS-PAGE)

6.4.1 Διάλυμα ακρυλαμιδίου 30% (w/v) (100 ml)

Ακρυλαμίδιο 29,2 g (29.2% w/v)

N,N-μεθυλεν-δισακρυλαμίδιο 0,8 g (0.8% w/v)

6.4.2 Πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel) 12% (w/v) (5 ml)

1,5 M Tris-HCl pH 8,8 1,3 ml

SDS 10% (w/v) 0,05 ml

Διάλυμα ακρυλαμιδίου 30% (w/v) 2 ml

Υπερθεϊκό αμμώνιο 10% (w/v) (APS) 50 μ l

TEMED 2 μ l

dd H₂O 1,7 ml

6.4.3 Πήκτωμα συσσώρευσης (stacking gel) 4% (w/v) (5 ml)

1 M Tris-HCl pH 6,8 0,63 ml (12.6% v/v)

SDS 10% (w/v) 0,05 ml (1% v/v)

Διάλυμα ακρυλαμιδίου 30% (w/v) 0,83 ml (16.6% v/v)

APS 10% (v/v) 50 μ l (0.1% v/v)

TEMED 5 μ l (0.1% v/v)

dd H₂O 3,4 ml

6.4.4 Διάλυμα «φόρτωσης» δείγματος πρωτεϊνών (3x Laemmli sample buffer)

SDS 2% (w/v)

Tris- HCl, pH 6,8 100 mM

β - μερκαπτοαιθανόλη 5% (v/v)

Γλυκερόλη 15% (v/v)

Μπλε της Βρωμοφαινόλης 0,1% (w/v)

dd H₂O 4 ml

6.4.5 Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Electrode buffer, pH 8,75), 10x, 1 lt

Tris-base 30,3 g (3.03% w/v)

Γλυκίνη 144,16 g (14.4% w/v)

SDS 10% (w/v) 1% (w/v)

6.4.6 Διάλυμα χρωματισμού (stain buffer)

Χρωστική Coomassie R-250 0,25% (w/v)

Μεθανόλη 40% (v/v)

Οξικό οξύ 10% (v/v)
ddH₂O

6.4.7 Διάλυμα αποχρωματισμού (destain buffer)

Μεθανόλη 40% (v/v)
ΙΟξικό οξύ 10% (v/v)

6.5 Διαλύματα ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών (Western blotting):

6.5.1 Διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς πρωτεϊνών (Transfer buffer), 1x, 1 lt

Tris-base 2,4 g (0.24% w/v)
Γλυκίνη 11,5 g (0,115% w/v)
Μεθανόλη 20% (v/v)

6.5.2 Διάλυμα χρώσης νιτροκυταρίνης Ponceau S

Ponceau S 1 mg/ml
Οξικό οξύ 7% (v/v)

6.5.3 TBS pH 7,4 (1 L), 10x

Tris 60,57 g
NaCl 87,66 g
ddH₂O 1 L

6.5.4 Διάλυμα 3',3', διαμινοβενζιδίνης (DAB) για εμφάνιση Western blot

TBS 1x 10 ml
DAB (Sigma Cat# D8001) 100 µl
Διάλυμα H₂O₂ 30% (v/v) 6 µl

6.5.5 Διάλυμα λύσης βακτηρίων

NaH₂PO₄ 50 mM , pH 8.0
NaCl 300 mM
Ιμιδαζόλιο 20 mM

6.5.6 Διάλυμα έκπλυσης βακτηρίων

NaH₂PO₄ 50 mM , pH 8.0
NaCl 300 mM
Ιμιδαζόλιο 70 mM

6.5.7 Διάλυμα έκλουσης βακτηρίων

NaH₂PO₄ 50 mM , pH 8.0
NaCl 300 mM
Ιμιδαζόλιο 250 mM

6.5.8 PBS pH 7,4 (1L), 10x

NaCl 80 g

NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	12 g	
KCl		2g
KH ₂ PO ₄	2 g	
ddH ₂ O	1 L	

7 Συμπεράσματα-Συζήτηση

Η διπλή φασματική αυτή εργασία είχε διπλό στόχο, α) την κατασκευή διαγονιδιακών παρασίτων *Leishmania donovani* (*L.donovani-mRFP1*) που εκφράζουν την κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη mRFP₁ (monomeric Red Fluorescent protein) και β) την παρασκευή πολυκλωνικού αντισώματος ειδικού για την πρωτεΐνη mRFP₁ μετά από ανοσοποίηση κουνελιών με ανασυνδιασμένη πρωτεΐνη mRFP₁ που παρήχθη σε βακτήρια για βιοχημική μελέτη των διαγονιδιακών παρασίτων. Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων υποδεικνύει ότι οι παραπάνω στόχοι επιτεύχθηκαν.

Αρχικά κατασκευάστηκε το πλασμίδιο pLexsy-sat-mRFP1, με εισαγωγή του γονιδίου της mRFP στον ειδικό Λείσμανιακό φορέα pLexsy-sat. Κατά την κλωνοποίηση προέκυψε τεχνική δυσκολία για τον έλεγχο των θετικών κλώνων. Αυτή οφειλόταν στην μικρή διαφορά μεγέθους του ενθέματος (γονίδιο mRFP= 731 bp) και του αφαιρούμενου κομματιού (stuffer=661 bp) από τον φορέα κλωνοποίησης μετά από πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα Bgl II και XhoI (θέσεις κλωνοποίησης του ενθέματος)(Χάρτης 3.3). Η δυσκολία αυτή προσπεράστηκε με επιλογή του Pst I ως περιοριστικού ενζύμου κατάλληλου για την επιλογή θετικών κλώνων. Οι θετικοί κλώνοι έχουν δύο θέσεις περιορισμού PstI, μια μέσα στο ένθεμα και μια στον πλασμιδιακό φορέα. Αντίθετα οι αρνητικοί κλώνοι έχουν μόνο μια θέση (Εικόνα 3.9) γεγονός που οδήγησε στην χωρίς αμφιβολία αναγνώριση των θετικών κλώνων από την παρουσία 2 κομματιών DNA μετά την πέψη σε αντίθεση με τους αρνητικούς κλώνους που παρουσίαζαν ένα κομμάτι DNA.

Τα διαγονιδιακά παράσιτα *L.donovani-mRFP1* που κατασκευάστηκαν μετά από επιμόλυνση του στελέχους LG13 *L.donovani* με το πλασμίδιο pLexsy-sat-mRFP1, παρουσιάζουν την αναμενόμενη φασματοσκοπική ιδιότητα του κόκκινου φθορισμού που προσδίδει η έκφραση της πρωτεΐνης mRFP χωρίς να παρουσιάζουν μορφολογικές διαφορές από τον πληθυσμό αγρίου τύπου από τον οποίο προήλθαν, όπως φάνηκε από τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής αλλά και από την μελέτη με μικροσκοπία φθορισμού. Ο χαρακτηρισμός των παρασίτων συνεχίζεται με μελέτες α) του χρόνου διπλασιασμού τους στην κυτταροκαλλιέργεια στους 25°C; β) της ικανότητάς τους να διαφοροποιούνται σε αμαστιγωτές μορφές στην κυτταροκαλλιέργεια σε θερμοκρασία 37°C και όξινο pH 5.5; γ) της ικανότητάς τους να επιβιώνουν σε μακροφάγα κύτταρα στην κυτταροκαλλιέργεια μετά από φαγοκυττάρωση και δ) στην ικανότητά τους να μολύνουν πειραματικά μοντέλα ποντικών. Τέλος, επειδή η καλλιέργεια των διαγονιδιακών παρασίτων *L.donovani-mRFP1* είναι ανομοιογενής όσον αφορά τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης RFP, θα γίνει επιλογή με τη μέθοδο FACS του πληθυσμού των παρασίτων με συγκεκριμένα επίπεδα φθορισμού.

Το αντίσωμα anti-mRFP₁ αναγνωρίζει την πρωτεΐνη mRFP₁ σε εκχυλίσματα από παράσιτα *L. donovani-mRFP1* με ανάλυση Western αλλά όχι με την μέθοδο του ανοσοφθορισμού και μικροσκοπία φθορισμού (Εικόνες 4.11 και 4.15). Επίσης, δεν αναγνωρίζει σε ανάλυση Western την πρωτεΐνη DsRed σε εκχυλίσματα ηπατοκυττάρων επιμολυσμένων με πλασμίδιο pDsRed (Εικόνες

4.13 & 4.14). Είναι γνωστό ότι η πρωτεΐνη mRFP1 έχει προκύψει από την πρωτεΐνη DsRed μετά από συνδυασμό τυχαίων και κατευθυνόμενων μεταλλάξεων με σύνολο 33 υποκαταστάσεις (18),(19)

Είναι πιθανόν το αντίσωμα που παρήχθη να αναγνωρίζει επιτόπους που περιέχουν αυτά τα αμινοξέα και συνεπώς να έχει χαμηλή ή ελάχιστη συγγένεια για την πρωτεΐνη DsRed που σε συνδυασμό με ποσοτικούς περιορισμούς (μικρή ποσότητα ηπατοκυττάρων που αναλύθηκαν με Western Blot στο συγκεκριμένο πείραμα) να οδήγησε σε αρνητικό αποτέλεσμα.

Το αντίσωμα μπορεί επίσης να αναγνωρίζει επιτόπους που δεν είναι προσβάσιμοι όταν το μόριο της mRFP1 αναδιπλώνεται στο χώρο ή μετά από επώαση με παραφορμαλδεύδη και για τους λόγους αυτούς να μην αναγνωρίζει την mRFP1 σε ανοσοφθορισμό. Πιο εξαντλητικός χαρακτηρισμός του αντισώματος (τιτλοδότηση) είναι απαραίτητος για να προσδιορισθούν με ακρίβεια οι συνθήκες στις οποίες μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην κάθε μέθοδο και στα διαφορετικά κυτταρικά συστήματα.

Μελλοντικές προοπτικές των αποτελεσμάτων και των εργαλείων αυτής της έρευνας.

Το πλασμιδιακό όχημα pLexsy-sat-mRFP1 που κατασκευάστηκε μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως φορέας κλωνοποίησης γονιδίων που εκφράζονται στην *Leishmania donovani* ή σε άλλα είδη και στελέχη του παρασίτου για τον εντοπισμό τους και τη λειτουργική τους μελέτη ως χιμαιρικές πρωτεΐνες με την RFP. Τα διαγονιδιακά παράσιτα *L.donovani-mRFP1* είναι χρήσιμο κυτταρικό εργαλείο για την *in vivo* απεικόνιση της μόλυνσης κυττάρων σε κυτταροκαλλιέργεια αλλά και σε πειραματόζωα με μικροσκοπία φθορισμού. Τα παράσιτα αυτά είναι ιδιαίτερα χρήσιμα για μελέτες μηχανισμών σηματοδότησης κατά την είσοδο και εδραίωση των παρασίτων σε φαγοκύτταρα ξενιστές που εκφράζουν μόρια κλειδιά για σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην διαδικασία αυτή ως χιμαιρικές πρωτεΐνες με την πράσινη ή με την κίτρινη φθορίζουσα πρωτεΐνη. Τέλος το αντίσωμα anti-mRFP1 που παρασκευάστηκε αποτελεί επίσης πολύτιμο εργαλείο για βιοχημικές μελέτες των παρασίτων *L.donovani-mRFP1* αλλά και των χιμαιρικών mRFP πρωτεϊνών που θα εκφραστούν με χρήση του πλασμιδίου pLexsy-sat-mRFP1.

8 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) Solbach, W., and Laskay, T. (2000) The host response to Leishmania infection. *Adv Immunol* 74, 275-317.
- (2) Herwaldt, B. L. (1999) Leishmaniasis. *Lancet* 354, 1191-9.
- (3) Thomaz-Soccol, V., Lanotte, G., Rioux, J. A., Pratlong, F., Martini-Dumas, A., and Serres, E. (1993) Phylogenetic taxonomy of New World Leishmania. *Ann Parasitol Hum Comp* 68, 104-6.
- (4) Milon, G. (2009) Perpetuation of Leishmania: some novel insight into elegant developmental programs. *Vet Res* 40, 38.
- (5) Hervas Rodriguez, J., Mozos, E., Mendez, A., Perez, J., and Gomez-Villamandos, J. C. (1996) Leishmania infection of canine skin fibroblasts in vivo. *Vet Pathol* 33, 469-73.

- (6) Chang, K. P., and Dwyer, D. M. (1976) Multiplication of a human parasite (*Leishmania donovani*) in phagolysosomes of hamster macrophages in vitro. *Science* 193, 678-80.
- (7) Killick-Kendrick, R., Molyneux, D. H., and Ashford, R. W. (1974) *Leishmania* in phlebotomid sandflies. I. Modifications of the flagellum associated with attachment to the mid-gut and oesophageal valve of the sandfly. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 187, 409-19.
- (8) Besteiro, S., Williams, R. A., Coombs, G. H., and Mottram, J. C. (2007) Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *Int J Parasitol* 37, 1063-75.
- (9) Lodge, R., and Descoteaux, A. (2008) *Leishmania* invasion and phagosome biogenesis. *Subcell Biochem* 47, 174-81.
- (10) Shimomura, O., Johnson, F. H., and Saiga, Y. (1962) Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* 59, 223-39.
- (11) Shimomura, O. (2005) The discovery of aequorin and green fluorescent protein. *J Microsc* 217, 1-15.
- (12) Shrestha, S., and Deo, S. K. (2006) Anthozoa red fluorescent protein in biosensing. *Anal Bioanal Chem* 386, 515-24.
- (13) Matz, M. V., Fradkov, A. F., Labas, Y. A., Savitsky, A. P., Zaraisky, A. G., Markelov, M. L., and Lukyanov, S. A. (1999) Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat Biotechnol* 17, 969-73.
- (14) Wall, M. A., Socolich, M., and Ranganathan, R. (2000) The structural basis for red fluorescence in the tetrameric GFP homolog DsRed. *Nat Struct Biol* 7, 1133-8.
- (15) Jensen, K. (1965) A Simple Method for Protein Electrophoresis in Polyacrylamide Gel. *Scand J Clin Lab Invest* 17, 192-4.
- (16) Burnette, W. N. (1981) "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112, 195-203.
- (17) Beverley, S. M., and Clayton, C. E. (1993) Transfection of *Leishmania* and *Trypanosoma brucei* by electroporation. *Methods Mol Biol* 21, 333-48.
- (18) Campbell, R. E., Tour, O., Palmer, A. E., Steinbach, P. A., Baird, G. S., Zacharias, D. A., and Tsien, R. Y. (2002) A monomeric red fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 7877-82.
- (19) Khrameeva, E. E., Drutsa, V. L., Vrzheschch, E. P., Dmitrienko, D. V., and Vrzheschch, P. V. (2008) Mutants of monomeric red fluorescent protein mRFP1 at residue 66: structure modeling by molecular dynamics and search for correlations with spectral properties. *Biochemistry (Mosc)* 73, 1085-95.