



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών



Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ
Hellenic Pasteur Institute

**«Κλωνοποίηση και μοριακός χαρακτηρισμός της
εκκρινόμενης νεξίνης (nexin) *LdPIBPnex* με υποτομέα
πρόσδεσης σε φωσφοϊνοσιτίδια, από το πρωτόζωο
Leishmania donovani»**

Κουρούνης Δρόσος
Βιολόγος

Διπλωματική εργασία

Π.Μ.Σ.
Εφαρμογές της Βιολογίας στην Ιατρική

Αθήνα 2017

Μέλη εξεταστικής επιτροπής

Κωσταντίνος Ε. Βοριάς : Καθηγητής Βιοχημείας

Σραβοπόδης Ι. Δημήτριος : Επίκουρος καθηγητής Βιολογίας κυττάρου και Ανάπτυξης

Μπολέτη Χαραλαμπία : Κύρια Ερευνήτρια , Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, ομάδα Ενδοκυττάριου Παρασιτισμού

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η λείσμανίωση αποτελεί μία από τις παραμελημένες τροπικές ασθένειες που ετησίως προσβάλλει χιλιάδες άτομα και εκτός των μεγάλων προβλημάτων υγείας που προκαλεί (μέχρι και θάνατο) οδηγεί τους νοσούντες σε καταστάσεις έντονου κοινωνικού αποκλεισμού, που δημιουργούν ένα τεράστιο αντίκτυπο στη ζωή αυτών των ανθρώπων. Η συγκεκριμένη νόσος είναι η μόνη από τις παραμελημένες τροπικές ασθένειες που ενδημεί στην Ευρώπη και αποτελεί σημαντικό πρόβλημα της Δημόσιας και της Κτηνιατρικής Υγείας στις χώρες της Μεσογείου. Προκαλείται από τα παρασιτικά πρωτόζωα του γένους *Leishmania* spp., τα οποία έχουν αναπτύξει στρατηγικές, που τους επιτρέπουν να επιβιώνουν στα μακροφάγα κύτταρα του θηλαστικού ξενιστή τους. Το είδος *Leishmania donovani* είναι υπεύθυνο για την πρόκληση της περισσότερο σοβαρής μορφής της νόσου, της ανθρώπινης σπλαχνικής λείσμανίωσης και της επίσης εν δυνάμει θανατηφόρας λείσμανίωσης του σκύλου. Η παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία αφορά τη μελέτη ενός νέου υποθετικού μολυσματικού παράγοντα του παρασίτου που ίσως δρα στα φαγοκύτταρα του θηλαστικού ξενιστή. Την εκκρινόμενη από το παράσιτο πρωτεΐνη *LdPIBPnex* που ανήκει στην οικογένεια των νεξινών.

Η έρευνα πραγματοποιήθηκε εξ' ολοκλήρου στην Ομάδα Ενδοκυττάριου Πρασιτισμού του τμήματος Μικροβιολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ, υπό την επίβλεψη της Ερευνήτριας Β', Δρ. Χαραλαμπίας Μπολέτη.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στη Δρ. Χαραλαμπία Μπολέτη, της οποίας οφείλω ευγνωμοσύνη που μου παρείχε απλόχερα πλούσια εφόδια σε επιστημονικό και προσωπικό επίπεδο, καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας. Επίσης την ευχαριστώ ιδιαίτερα για την ευκαιρία που μου πρόσφερε, να συμμετέχω στο 67^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, που πραγματοποιήθηκε στα Ιωάννινα και όπου προς μεγάλη μας ευχαρίστηση, η παρουσίαση του πόστερ της διπλωματικής μου εργασίας τιμήθηκε με έπαινο. Τέλος, θα ήθελα να την ευχαριστήσω για την βοήθεια που μου πρόσφερε και την υπομονή της στο να μεταβώ από τον κλάδο της Ζωολογίας, με τον οποίο είχα ασχοληθεί προπτυχιακά, σε αυτόν της Μοριακής Βιολογίας.

Με πολλή αγάπη θα ήθελα να ευχαριστήσω την συμφοιτήτριά στο μεταπτυχιακό και καθημερινή συνάδελφο στο εργαστήριο, Ολύβια Τζιουβάρα για τις πολύτιμες συμβουλές της, τη συμπαράσταση και όλες τις όμορφες στιγμές που περάσαμε στο εργαστήριο. Επίσης, ένα μεγάλο ευχαριστώ στη Δρ. Αμαλία Παπαδάκη για τη βοήθεια που μου παρείχε σε ερευνητικούς μου προβληματισμούς, την παροχή αντιδραστηρίων που εκείνη δημιούργησε και για τη συμπαράστασή της σε προσωπικό επίπεδο.

Τέλος, αφιερώνω όλη αυτή την προσπάθεια στους γονείς μου Ηλία και Κονδύλω, που χωρίς εκείνους τίποτα από όλα αυτά δεν θα ήταν εφικτό. Σας ευχαριστώ και σας αγαπώ.

Η παρούσα εργασία χρηματοδοτήθηκε εν μέρει από το πρόγραμμα «**ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΕΣ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΩΝ ΦΟΡΕΩΝ -ΚΡΗΠΙΣ**».

Περίληψη

Τα παράσιτα του γένους *Leishmania* ανήκουν στα διμορφικά πρωτόζωα της οικογένειας των Trypanosomatidae (τάξη Kinetoplastidae) και απαντώνται σε δύο μορφές, την εξωκυττάρια προμαστιγωτή που βρίσκεται στο έντερο του αρθρόποδου ξενιστή (φλεβοτόμοι) και την ενδοκυττάρια αμαστιγωτή, μέσα σε τροποποιημένα φαγολυσσώματα των φαγοκυττάρων του θηλαστικού ξενιστή. Όπως και τα υπόλοιπα ενδοκυττάρια παθογόνα, τα είδη *Leishmania* έχουν αναπτύξει στρατηγικές διαφυγής από τους αμυντικούς μηχανισμούς και επιβίωσης μέσα στα φαγοκύτταρα των θηλαστικών. Στις στρατηγικές αυτές περιλαμβάνεται η έκκριση από το παράσιτο μολυσματικών παραγόντων μέσα στο κυτοσόλιο των κυττάρων ξενιστών. Πρωτεομική ανάλυση των εκκρινόμενων μορίων στο θρεπτικό μέσο καλλιεργούμενων προμαστιγωτών παρασίτων από το είδος *Leishmania donovani* (*L. donovani*) (αιτιολογικός παράγοντας της θανατηφόρας νόσου της σπλαχνικής Λεϊσμανίωσης) ανέδειξε αρκετές πρωτεΐνες, οι οποίες εκκρίνονται στο εξωκυττάριο μικροπεριβάλλον πιθανόν μέσω εξωσωμάτων (Silverman, Chan et al. 2008). Μια από τις εκκρινόμενες πρωτεΐνες (417 a.a. , 46,6 KDa) που ταυτοποιήθηκε σε αυτή τη μελέτη και κωδικοποιείται από το **γονίδιο LdBPK_352470.1**, υψηλά συντηρημένο στα είδη *Leishmania*, περιέχει μια PX δομική αλληλουχία πρόσδεσης σε φωσφοϊνοσιτίδια και δομικά χαρακτηριστικά που την κατατάσσουν στην **οικογένεια πρωτεϊνών Νεξίνες διαλογής (Sorting Nexins)**. Οι τελευταίες αποτελούν μια ομάδα κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών, που προσδένονται στις μεμβράνες είτε μέσω της σύνδεσης τους με λιπίδια, είτε μέσω αλληλεπιδράσεων με μεμβρανικά πρωτεϊνικά συμπλέγματα. Έχει δειχθεί, ότι μέλη της οικογένειας των Νεξινών συμμετέχουν σε ένα μεγάλο εύρος μονοπατιών διαλογής πρωτεϊνών και στους ενδοκυττάριους μηχανισμούς μετακίνησης μακρομορίων (Cullen 2008) (van Weering, Verkade et al. 2010) (Carlton, Bujny et al. 2005). Ονομάσαμε το προϊόν του **γονιδίου LdBPK_352470.1**, **LdPIBPnex**, από το ακρωνύμιο *Leishmania donovani* Phosphoinositide Binding Protein **nexin**. Στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται αποτελέσματα από : α) την κλωνοποίηση του γονιδίου LdBPK_352470.1 σε διαφορετικούς πλασμιδιακούς φορείς, β) την έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης LdPIBPnex σε βακτήρια και κύτταρα θηλαστικών, γ) τον εντοπισμό της ενδογενούς LdPIBPnex σε κύτταρα *Leishmania* και σε μολυσμένα μακροφάγα, χρησιμοποιώντας το ειδικό πολυκλωνικό αντίσωμα anti-LdPIBPnex που παράχθηκε στο εργαστήριο, δ) τον εμπλουτισμό της LdPIBPnex σε διαλυτά πρωτεϊνικά κλάσματα από αξενικά (καλλιεργημένα) προμαστιγωτά παράσιτα *L. donovani* και ε) την έκκριση της LdPIBPnex από καλλιέργεια προμαστιγωτών, στο εξωκυττάριο θρεπτικό μέσο.

Από τις τρεις προσπάθειες κλωνοποίησης του γονιδίου *Ldipbp_{nex}* στα πλασμίδια pEGFP-N3, pGEX4T-1 και pLexsy-mCherry, επιτυχείς ήταν εκείνες στα δύο πρώτα. Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pEGFP-*Ldipbp_{nex}* χρησιμοποιήθηκε για τον υποκυτταρικό εντοπισμό της LdPIBPnex σε επιθηλιακά κύτταρα θηλαστικών HeLa, με μικροσκοπία φθορισμού, όπου παρατηρώντας τον πράσινο φθορισμό της πρωτεΐνης GFP εντοπίσαμε την υβριδική πρωτεΐνη LdPIBPnex-GFP στο κυτταρόπλασμα, στη πλασματική μεμβράνη του επιμολυσμένου κυττάρου HeLa σε συνεντοπισμό με την F-ακτίνη του κυτταρικού φλοιού καθώς και σε περιοχή που θα

αναμενόταν το δίκτυο Golgi, κοντά στον πυρήνα του επιθηλιακού κυττάρου. Όσον αφορά το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pGEX-*ldpibp_{nex}*, θα χρησιμοποιηθεί σε μελλοντική μελέτη, για την ανάλυση της πρόσδεσης της *LdPIBP_{nex}* σε φωσφοϊνοσιτίδια, καθώς και σε πρωτόκολλα ανοσοκατακρήμνισης προκειμένου να εντοπιστούν πιθανοί μοριακοί συνεργάτες της, στο παράσιτο και στα μακροφάγα.

Παράλληλα με τον εντοπισμό της πρωτεΐνης στα κύτταρα HeLa, πραγματοποιήθηκαν και πειράματα υποκυτταρικού εντοπισμού της *LdPIBP_{nex}* τόσο σε παράσιτα *L. donovani*, όσο και σε μολυσμένα, με το παράσιτο, μακροφάγα θηλαστικών. Χρησιμοποιώντας ειδικά πολυκλωνικά αντισώματα έναντι της *LdPIBP_{nex}* με μικροσκοπία φθορισμού, εντοπίσαμε στην προμαστιγωτή μορφή του παρασίτου *L. donovani* επιτόπους της *LdPIBP_{nex}* σε δομές που προσομοιάζουν μεμβρανικά κυστίδια, στο κυτταρικό σώμα του παρασίτου, στη θήκη του μαστιγίου καθώς και κατά μήκος του μαστιγίου. Τέλος σε μακροφάγα κύτταρα μολυσμένα με προμαστιγωτές μορφές *L. donovani* εντοπίσαμε με ανοσοφθορισμό επιτόπους της *LdPIBP_{nex}* κυρίως στην επιφανειακή μεμβράνη των μολυσμένων κυττάρων, σε σημεία φαγοκυτταρικών φαινομένων παρασίτων.

Μετά τα πειράματα εντοπισμού, επιβεβαιώσαμε την έκφραση της *LdPIBP_{nex}* σε προμαστιγωτά παράσιτα *L. donovani* LG13 WT με πειράματα ανοσοστυπώματος Western και μελετήσαμε τα επίπεδα έκφρασης της, κατά τον κυτταρικό κύκλο αξενικής καλλιέργειας προμαστιγωτών. Παρατηρήσαμε ότι η *LdPIBP_{nex}* εκφράζεται στη λογαριθμική και στατική φάση ανάπτυξης, με μία πιο έντονη έκφραση στην αρχή της λογαριθμικής φάσης (lag phase). Στη συνέχεια, θελήσαμε να επιβεβαιώσουμε την έκκριση της πρωτεΐνης *LdPIBP_{nex}* σε αξενικές καλλιέργειες προμαστιγωτών μορφών στους 25°C και στους 37°C. Τα αποτελέσματά μας επιβεβαίωσαν την έκκριση της πρωτεΐνης στους 25°C ενώ τα πειράματα στους 37°C θα πρέπει να επαναληφθούν στο μέλλον. Τέλος, με κλασματοποίηση ολικού εκχυλίσματος προμαστιγωτών κυττάρων *L. donovani* με χρήση του απορρυπαντικού διγλιτονίνη και περαιτέρω ανάλυση των κλασμάτων με SDS-PAGE και Western Blot ανιχνεύσαμε την *LdPIBP_{nex}* στα κλάσματα που είναι εμπλουτισμένα σε διαλυτές πρωτεΐνες του παρασίτου.

ABSTRACT

Leishmania are dimorphic protozoan parasites from the *Trypanosomatidae* family (*kinetoplastid class*) living as extracellular flagellated forms (promastigotes) in their sandfly vector gut and as intracellular aflagellated forms (amastigotes) inside modified phagolysosomes of the mammalian host phagocytes. As other intracellular pathogens, *Leishmania* species have evolved strategies supporting invasion and persistence within the mammalian phagocytes. In some cases the underlying mechanisms involve export of virulence factors into the host cell cytosol. Proteomic analysis of the secretome of *Leishmania donovani*/L. *donovani* (causative agent of the fatal disease visceral Leishmaniasis/VL) revealed several proteins secreted in the extracellular medium of cultured promastigotes, possibly through an exosome-like route (Silverman, Chan et al. 2008). **One of these was the product of the LdBPK_352470.1 gene**, highly conserved in *Leishmania* species, which **encodes for a secreted protein** of 417 a.a. (predicted MW 46,6 kDa) with a PX phosphoinositide binding domain and structural features classifying it in the **Sorting Nexin protein family**, a large group of cytoplasmic proteins that bind to membranes either through their lipid-binding PX domain or through protein-protein interactions with membrane-associated protein complexes. Members of the Nexin family are shown to participate in an increasing array of endosomal sorting and intracellular membrane traffic events (Cullen 2008) (van Weering, Verkade et al. 2010) (Carlton, Bujny et al. 2005). We named the **LdBPK_352470.1 gene** product **LdPIBPnex**, for *Leishmania donovani* Phosphoinositide Binding Protein nexin. Herein we present results from a) cloning of the LDBPK_352470.1 gene in different expression vectors b) expression of the recombinant LdPIBPnex protein in bacteria and mammalian cells, c) localization of the endogenous LdPIBPnex in *Leishmania* cells and infected macrophages using an anti-LdPIBPnex specific pAb that we generated, d) enrichment of LdPIBPnex in soluble protein fractions of *L. donovani* axenic (cultured) promastigotes and e) secretion in the promastigote culture extracellular medium.

Cloning of the *ldpibp_{nex}* gene into the pEGFP-N3, pGEX4T-1 and pLexsy-mCherry plasmids, was successful only in the first two cases. The recombinant pEGFP-*ldpibp_{nex}* plasmid, was used in order to track the sub-cellular localization of LdPIBPnex-GFP in the mammalian epithelial HeLa cells, with fluorescence microscopy, by observing the green fluorescence of the EGFP protein. We localized LdPIBPnex-EGFP in the cytosol, and on the plasma membrane of the transfected HeLa cell where it colocalized with the cortical F-actin. It also showed a polarized perinuclear localization similar to the Golgi apparatus localization. Regarding the recombinant pGEX-*ldpibp_{nex}* plasmid, it will be used in future studies to express the GST-LdPIBPnex recombinant protein in order to analyze biochemically its binding to Phosphoinositides and to identify LdPIBPnex partners in *Leishmania* and macrophage cell extracts by pull down assays.

In parallel we localized LdPIBPnex epitopes in macrophages infected with *L. donovani* promastigotes at macrophage surface membrane site's of phagocytic events. Regarding the localization of the protein in *L. donovani* promastigote cells, we detected LdPIBPnex in vesicle-like structures in the cell-body and the flagellum as well as near the flagellar pocket.

The expression of *Ld*PIBPnex in promastigote parasites was also confirmed biochemically using Western blot, while analysis of the expression levels of *Ld*PIBPnex in axenic promastigote cultures, during the parasite's growth stages showed that the protein is expressed as soluble both at the logarithmic and stationary phases of the promastigote growth in culture, with a higher expression detected at the lag phase. Next, we confirmed the secretion of *Ld*PIBPnex in *L. donovani* promastigote cultures at 25°C while the experiments for analysis of secretion at 37°C will have to be repeated. Lastly, *L. donovani* promastigotes at the stationary phase of growth were fractionated by resuspension in buffers with containing gradually increasing concentration of the detergent digitonin and further analysis with SDS-PAGE and Western Blot. Using the anti-*Ld*PIBPnex specific polyclonal Ab, we detected *Ld*PIBPnex in the fractions, enriched in soluble parasitic proteins.

1 Εισαγωγή

1.1 Η ασθένεια της Λεισμανίωσης

1.1.1 Γενικά στοιχεία

Η λεισμανίωση αποτελεί μια ομάδα λοιμωδών νοσημάτων η οποία προκαλείται από τα μονοκύτταρα παράσιτα του γένους *Leishmania* που προσβάλλουν ανθρώπους και άλλα θηλαστικά ζώα. Η ασθένεια, εμφανίζεται σχεδόν σε όλες τις ηπείρους, εκτός της Αυστραλίας και της Ανταρκτικής, αλλά ενδημεί κυρίως στις οικονομικά ασθενέστερες χώρες της Αφρικής, της Ασίας και της Ν. Αμερικής, γεγονός που της έχει προσδώσει το χαρακτηρισμό «ασθένεια των φτωχών». Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (Π.Ο.Υ.) η λεισμανίωση, ως ασθένεια των ανθρώπων, είναι ενδημική σε 98 χώρες με 2 περίπου εκατομμύρια νέα κρούσματα παγκοσμίως ανά έτος και 20-30.000 θανάτους.

Στην Ευρώπη και ιδιαίτερα στις χώρες της Μεσογείου, λόγω πληθυσμιακών μετακινήσεων, η επιδημιολογία της νόσου εμφανίζει αλλαγές με γρήγορους ρυθμούς, με ετήσια καταγραφή περίπου 700 νέων περιστατικών (WHO, Leishmaniasis, 2015).

Η σπλαχνική μορφή της νόσου χαρακτηρίστηκε για πρώτη φορά το 1901 στην Καλκούτα από τον Σκωτσέζο στρατιωτικό ιατρό Leishman, ο οποίος περιέγραψε την ύπαρξη ενός μικροοργανισμού σε σπλήνα ασθενούς που απεβίωσε από μια ασθένεια γνωστή στους ντόπιους ως Kala-azar (Μαύρος πυρετός). Ο Leishman, βάση των παρατηρήσεών του υπέθεσε πως η νόσος επρόκειτο για μια μορφή Τρυπανοσωμίας. Ο στρατιωτικός γιατρός Donovan, πραγματοποιώντας παρόμοιες μικροσκοπικές παρατηρήσεις, διαπίστωσε πως ο μικροοργανισμός δεν ήταν Τρυπανόσωμα αλλά, ανήκε στην οικογένεια των τρυπανοσωματιδίων. Τελικά, ο ιατρός Ross πραγματοποίησε τη συστηματική κατάταξη του παρασίτου, ορίζοντάς το ως γένος *Leishmania*, υπεύθυνο για το Kala-azar. Το είδος του παρασίτου που προκαλεί τη σπλαχνική λεισμανίωση, ονομάστηκε *Leishmania donovani* (*L. donovani*), προς τιμήν των Leishman και Donovan (Gibson 1983).

1.1.2 Κλινικές μορφές της Λεισμανίωσης

Η λεισμανίωση ανάλογα με το είδος του παρασίτου από το οποίο προκαλείται και με βάση την ανοσολογική απόκριση του ασθενούς, εκδηλώνεται με τρεις κύριες κλινικές μορφές: τη σπλαχνική (VL, Visceral Leishmaniasis), τη δερματική (CL, Cutaneous Leishmaniasis) και τη βλεννογοδερματική λεισμανίωση (MCL, Mucocutaneous Leishmaniasis).

Οι διάφορες μορφές της Λεισμανίωσης προκύπτουν από τον πολλαπλασιασμό των παρασίτων στα φαγολυσσοσώματα των μακροφάγων, στο χόριο, και στο ρινοστοματοφαρυγγικό βλεννογόνο, αντίστοιχα (Herwaldt 1999). Αυτή η ομάδα νοσημάτων προκαλείται από περίπου 21 διαφορετικά είδη του παρασίτου *Leishmania*, τα οποία μεταδίδονται από περίπου 30 είδη σκνίπας των γενών *Phlebotomus* και *Lutzomyia* (Ashford 2000).

Η νόσος έχει χαρακτηριστεί από τον ΠΟΥ ως «παραμελημένη τροπική νόσος» και αυτό διότι, αν και εκτιμάται ότι προκαλεί το ένατο μεγαλύτερο φορτίο νόσου όλων των λοιμωδών νοσημάτων, η σημασία της στη δημόσια υγεία έχει υποεκτιμηθεί σε μεγάλο βαθμό παγκοσμίως, λόγω της πολύπλοκης επιδημιολογίας και οικολογίας της, της έλλειψης εύκολα εφαρμοζόμενων μέτρων αντιμετώπισης και της ανεπαρκούς επιδημιολογικής επιτήρησής της.

1.1.2.1 Σπλαχνική Λεϊσμανίωση (VL)

Προκαλείται από δύο παράσιτα του γένους *Leishmania*, το *L. donovani* (Ινδία, Αφρική) και το *L. infantum* (Μεσόγειο, Αμερική). Ετησίως αναφέρονται 200.000-400.000 περιστατικά VL (WHO, Leishmaniasis 2015), με περίπου 50.000 θανάτους και η θνησιμότητα της νόσου, εάν δεν εφαρμοστεί έγκαιρα η κατάλληλη θεραπευτική αγωγή, κυμαίνεται στο 75-95 %.

Οι αμαστιγωτές μορφές των παρασίτων πολλαπλασιάζονται στα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα των οργάνων του δικτυο-ενδοθηλιακού συστήματος, όπως ο σπλήνας, το ήπαρ και ο χρόνος επώασής τους είναι 2-6 μήνες.

Τα συμπτώματα που εμφανίζουν οι ασθενείς περιλαμβάνουν πυρετό, ρίγος, νυκτερινές εφιδρώσεις, σημαντική απώλεια βάρους, ανορεξία, σπληνομεγαλία (με ή χωρίς ηπατομεγαλία) και πανκυτταροπενία λόγω καταστολής του μυελού των οστών (αναιμία, λευκοπενία, θρομβοπενία). Υπέρχρωση δέρματος προσώπου, άκρων, κοιλίας παρουσιάζεται σπανίως στην Ινδία, εξού και ο όρος «kala-azar», που σημαίνει μαύρος πυρετός στη γλώσσα Hindi. Οι ασθενείς μπορεί να παρουσιάζουν, επίσης, δερματική ή βλεννογονική βλάβη. Σημεία κακής διατροφής (οίδημα, αλλοιώσεις δέρματος και τριχών) παρουσιάζονται με την εξέλιξη της νόσου. Επίσης, υπάρχουν αναφορές κρουσμάτων με ανάπτυξη αιμοφαγοκυτταρικού συνδρόμου. Ασθενείς που έχουν συν-λοίμωξη με HIV μπορεί να έχουν άτυπες εκδηλώσεις, όπως συμμετοχή γαστρεντερικής οδού, αναπνευστικού συστήματος και άλλων συστημάτων (Λεϊσμανίαση, ΚΕΕΛΠΝΟ 2016).



Εικόνα 1.1: Κορίτσι που πάσχει από σπλαχνική λεϊσμανίαση. Οι πράσινες γραμμές στο σώμα της υποδεικνύουν τα συμπτώματα της ηπατομεγαλίας και σπληνομεγαλίας (WHO, Photos of Visceral Leishmaniasis, 2007).

Μερικοί ασθενείς αναπτύσσουν, ως επιπλοκή της VL, ένα σύνδρομο δερματικής λεισμανίωσης (post kala-azar dermal leishmaniasis), που χαρακτηρίζεται από δερματικές βλάβες, πρωτίστως και κυρίως στο πρόσωπο, που εμφανίζονται συνήθως 6 μήνες έως >1 έτη μετά τη φαινομενική ίαση της VL (ή και νωρίτερα). Η μορφή αυτή περιγράφεται κυρίως σε περιπτώσεις λοίμωξης από *L. donovani* και παρατηρείται συνήθως στην ανατολική Αφρική (έως στο 50% των ασθενών με VL) και στη νότια Ασία – Ινδική χερσόνησο (στο 5-10% των ασθενών). Άτομα με αυτήν την επιπλοκή θεωρούνται δυνητική δεξαμενή μετάδοσης της VL (WHO, Clinical forms of the leishmaniasis, 2007).

1.1.2.2 Δερματική λεισμανίωση (CL)

Αποτελεί την πιο διαδεδομένη μορφή της νόσου με περίπου 0,7-1,3 εκατομμύρια περιστατικά ετησίως. Προκαλείται από τα παράσιτα *L. major* και *L. tropica*, καθώς και από αρκετά είδη *Leishmania* του Νέου Κόσμου (*L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. peruviana*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. braziliensis*).

Τα δερματικά συμπτώματα εμφανίζονται στο σημείο του τσιμπήματος από τη σκνίπα και επομένως στα εκτεθειμένα μέρη του σώματος, όπως το πρόσωπο και τα άκρα. Η μορφή αυτή λεισμανίωσης δεν είναι τόσο απειλητική για τη ζωή του ασθενούς, αλλά λόγω των παραμορφώσεων που προκαλεί οδηγεί σε κοινωνικό αποκλεισμό των παθόντων.

Οι βλάβες, συνήθως, εξελίσσονται από βλατίδες σε οζώδεις πλάκες και σε ελκωτικές βλάβες, με επηρμένα άκρα και κεντρικό κρατήρα, με εφελκίδες. Συχνά οι βλάβες είναι πολλαπλές, με συνοδό περιφερική λεμφαδενοπάθεια (ενίοτε προηγείται των δερματικών βλαβών) ή οζώδη λεμφαγγειίτιδα. Οι βλάβες συνήθως -αλλά όχι πάντα- είναι ανώδυνες. Η επούλωση (που πραγματοποιείται συνήθως σε μερικούς μήνες) οδηγεί σε ατροφική ουλή.



Εικόνα 1.2: Δερματική πληγή στον πήχη νοσούντος από δερματική λεισμανίαση (WHO, Photos of Cutaneous Leishmaniasis, 2007).

Η δερματική μορφή είναι συνήθως, εντοπισμένη και πολύ πιο σπάνια διάσπαρτη ή διάχυτη. Η διάχυτη μορφή (από *L. aethiopica*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*) χαρακτηρίζεται από εκτεταμένες, χρόνιες δερματικές βλάβες, που μοιάζουν με της λεπρωματώδους λέπρας, αντιμετωπίζονται δύσκολα και μπορεί να επιπλακούν με θανατηφόρες δευτεροπαθείς λοιμώξεις (Pearson, Hargis et al. 1983).

1.1.2.3 Βλεννογονοδερματική Λεισμανίωση (MCL)

Η μόλυνση προκαλείται από το παράσιτο *L. braziliensis*. Συνήθως προκύπτει ως επακόλουθο της δερματικής μορφής της νόσου, που συναντάται στη Λατινική Αμερική και προέρχεται από τη διασπορά των παρασίτων από το δέρμα στο στοματοφαρυγγικό βλεννογόνο. Συνήθως εμφανίζεται κλινικά μέσα σε αρκετά έτη (έως δεκαετίες) μετά τις αρχικές, ανεπαρκώς θεραπευθείσες, δερματικές βλάβες. Ωστόσο, βλεννογονικές και δερματικές βλάβες μπορεί να παρουσιαστούν ταυτόχρονα, ενώ μερικοί ασθενείς έχουν υποκλινικές δερματικές λοιμώξεις. Οι αρχικές κλινικές εκδηλώσεις της νόσου είναι συνήθως επίμονα, ασυνήθη ρινικά συμπτώματα (ευαισθησία ή αιμορραγία), παρόλο που μερικές φορές εμφανίζονται πρώτα τα στοματικά ή φαρυγγικά συμπτώματα. Αν δε θεραπευθεί, η νόσος εξελίσσεται, με ελκωτική καταστροφή του ρινο-στοματοφαρυγγικού βλεννογόνου και γειτονικών ιστών (π.χ. διάτρηση ρινικού διαφράγματος). Μπορεί να συμβούν θανατηφόρες δευτεροπαθείς λοιμώξεις, ακόμη και εάν χορηγηθεί αγωγή (Pearson, Marcus et al. 1983).

1.2 Ασυμπτωματικός παρασιτισμός και συλλοιμώξεις

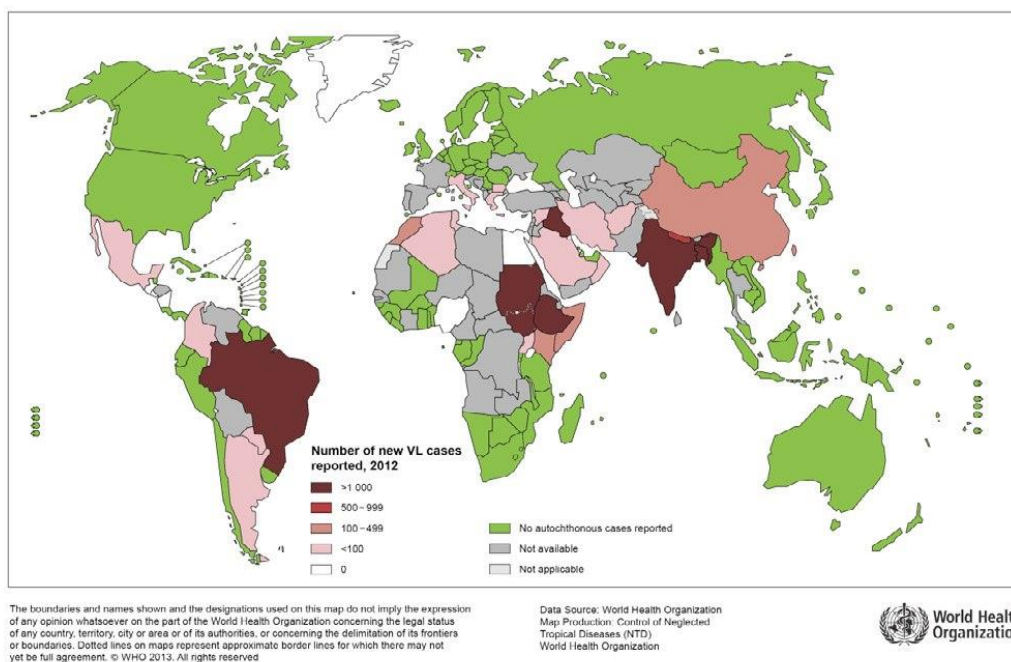
Πρόσφατες μελέτες έδειξαν πως στις ενδημικές χώρες υπάρχει ένας σημαντικός αριθμός νοσούντων από το είδος *L. infantum*, που δεν αναπτύσσει κανένα από τα γνωστά κλινικά συμπτώματα της νόσου (Picado, Ostyn et al. 2014). Υπολογίζεται πως μόνο ένα στα πέντε ή ακόμα και ένα στα δέκα άτομα που μολύνονται από το παράσιτο αναπτύσσουν τη νόσο. Ο ασυμπτωματικός αυτός πληθυσμός δεν επιδέχεται θεραπευτικής αγωγής και η ύπαρξή του συνδέεται με την παραμονή του παρασίτου σε κάποια περιοχή του μακροφάγου και την μετέπειτα εμφάνιση της VL. Κάτι αντίστοιχο εμφανίζεται στις ενδημικές περιοχές της Μεσογείου στους σκύλους, που έχουν υψηλό βαθμό οροθετικότητας, ενώ δεν εμφανίζουν κανένα σύμπτωμα και δεν λαμβάνουν θεραπεία (Picado, Ostyn et al. 2014).

Από τις αρχές της δεκαετίας του 1990, η συν-λοίμωξη HIV/*Leishmania* (ιδίως με *L. infantum*) έχει αναγνωρισθεί ως αναδυόμενο πρόβλημα και έχει αναφερθεί από 35 ενδημικές χώρες παγκοσμίως, κυρίως στη νοτιο-δυτική Ευρώπη. Όταν ασυμπτωματικά άτομα με *L. infantum* λοίμωξη μολύνονται με HIV, αναπτύσσουν σοβαρή μορφή VL, δύσκολα αντιμετωπίσιμη, υποτροπιάζουσα, με υψηλή θνητότητα και υψηλή μολυσματικότητα (Desjeux and Alvar 2003). Ασυνήθεις τρόποι ανθρωπονοτικής μετάδοσης (π.χ. μέσω χρήσης κοινών συρίγγων) αναφέρονται χαρακτηριστικά από αυτούς τους ασθενείς. Από τα τέλη της δεκαετίας του 1990, ο αριθμός νέων κρουσμάτων συλλοιμώξης μειώθηκε στην Ευρώπη, κυρίως λόγω της πρόσβασης σε υψηλής δραστηριότητας αντιρετροϊκή θεραπεία.

1.3 Γεωγραφική κατανομή της νόσου

Εκτιμάται ότι περίπου 200.000-400.000 νέα κρούσματα VL και >20.000 θάνατοι συμβαίνουν ετησίως. Πάνω από το 90% των νέων περιστατικών VL καταγράφονται σε έξι χώρες: Μπαγκλαντές, Βραζιλία, Αιθιοπία, Ινδία, Νότιο Σουδάν, όπου συνολικά 310 εκατομμύρια άτομα θεωρείται ότι κινδυνεύουν να μολυνθούν (WHO, Leishmaniasis 2015) (Εικόνα 1.3).

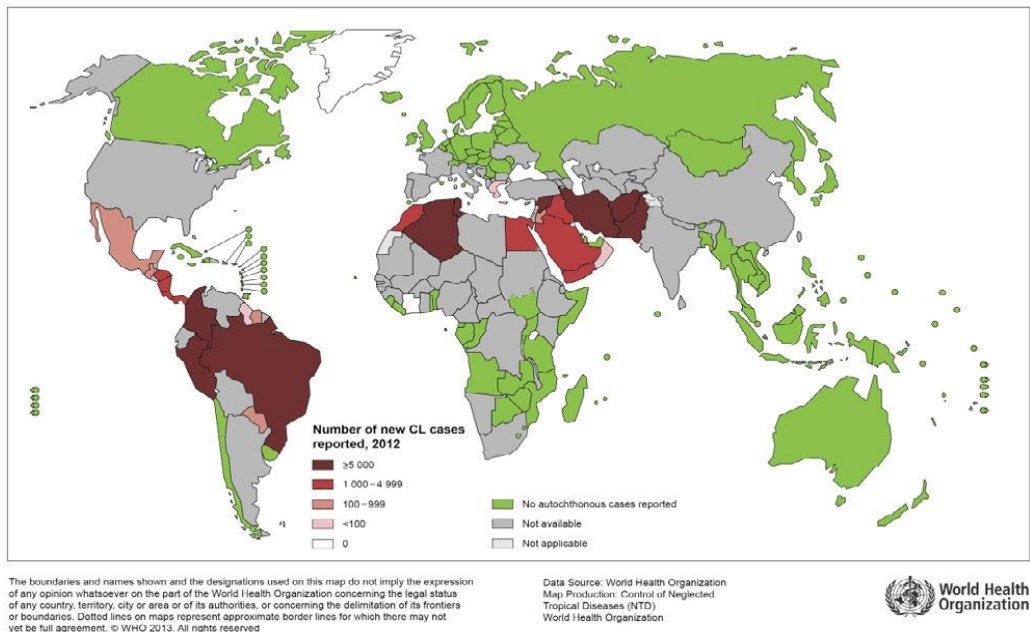
Status of endemicity of visceral leishmaniasis, worldwide, 2012



Εικόνα 1.3: Γεωγραφική κατανομή της VL (Image from WHO web site, http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis_2013_VL.png?ua=1).

Η CL είναι η πιο συχνή μορφή της νόσου. Ο εκτιμώμενος αριθμός των νέων κρουσμάτων CL ανέρχεται σε 0,7-1,2 εκατομμύρια κρούσματα παγκοσμίως κάθε έτος. Περίπου 95% των κρουσμάτων αναφέρονται από τρεις περιοχές: Λατινική Αμερική, Μεσόγειο και Δυτική Ασία (Μέση Ανατολή έως Κεντρική Ασία). Οι δέκα χώρες με τον υψηλότερο αριθμό κρουσμάτων είναι: Αφγανιστάν, Αλγερία, Κολομβία, Βραζιλία, Ιράν, Συρία, Αιθιοπία, Βόρειο Σουδάν, Κόστα Ρίκα και Περού, στις οποίες συνολικά καταγράφεται το 70-75% της παγκόσμιας επίπτωσης της νόσου.

Η ανθρωπονοτική CL παρατηρείται κυρίως σε αστικές και περιαστικές περιοχές και χαρακτηρίζεται συνήθως από μεγάλες επιδημίες σε πυκνοκατοικημένες πόλεις, ιδιαίτερα σε εμπόλεμες περιοχές, στρατόπεδα προσφύγων και περιοχές με μετακινούμενους πληθυσμούς (π.χ. σε Αφγανιστάν, Συρία, Ιράν, Πακιστάν). Σε αγροτικές περιοχές στο ανατολικό ημισφαίριο, οι άνθρωποι κινδυνεύουν από τη ζωνοτική CL που οφείλεται στη *L. major*, ενώ στο δυτικό ημισφαίριο η νόσος συνήθως περιορίζεται σε αυτούς που ζουν ή εργάζονται σε δασώδεις περιοχές (Εικόνα 1.4).



Εικόνα 1.4: Γεωγραφική κατανομή της CL (Image from WHO web site, http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis_2013_VL.png?ua=1).

Η βλεννογονο-δερματική είναι λιγότερο συχνή μορφή λεισμανιώσεως. Σχεδόν το 90% των περιπτώσεων βλεννογονο-δερματικής λεισμανιάσεως εμφανίζεται στη Βολιβία, Βραζιλία και Περού.

1.4 Πρόληψη έναντι της νόσου

Δεν υπάρχουν διαθέσιμα αποτελεσματικά εμβόλια ανθρώπινης χρήσης μέχρι στιγμής. Η δημιουργία αποτελεσματικού εμβολίου παρουσιάζει πολλές δυσκολίες εξαιτίας της πολυπλοκότητας της ανοσολογικής απάντησης που απαιτείται, ενώ η ανοσοτροποποιητική δράση αντιγόνων από το σάλιο της σκνίπας μπορεί να έχει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη εμβολίων.

Η πρόληψη και αντιμετώπιση της νόσου σε επίπεδο πληθυσμού απαιτεί μία σειρά στρατηγικών παρεμβάσεων (Λεισμανίαση, ΚΕΕΛΠΝΟ 2016):

- έγκαιρη διάγνωση και αποτελεσματική θεραπεία των ανθρωπίνων κρουσμάτων, που βελτιώνει την πρόγνωση και διακόπτει την αλυσίδα μετάδοσης σε περιοχές με ανθρωπονοτική μετάδοση,
- αποτελεσματική επιδημιολογική επιτήρηση της νόσου,
- μέτρα ατομικής προστασίας έναντι των σκνιπών (εντομοαπωθητικά, κουνουπιέρες) – ενημέρωση κοινού
- προγράμματα ελέγχου των σκνιπών (π.χ. υπολειμματικοί ψεκασμοί) και μείωσης των εστιών αναπαραγωγής τους (διαχείριση περιβάλλοντος),
- για την πρόληψη ζωονοτικής μετάδοσης: μέτρα ελέγχου και πρόληψης της νόσου στα ζώα ή ελέγχου των δεξαμενών του παρασίτου (εφαρμογή ειδικών

εντομοαπωθητικών προϊόντων σε δεσποζόμενους και αδέσποτους σκύλους, τακτικός κτηνιατρικός έλεγχός τους για τη νόσο και έγκαιρη αντιμετώπιση των άρρωστων ζώων) ή μέτρα ελέγχου των τρωκτικών, όπου αυτά είναι βασική δεξαμενή της νόσου.

Εμβόλια σκύλων έχουν αναπτυχθεί ήδη, κυρίως για την αντιμετώπιση των σοβαρών εκδηλώσεων της VL, έχουν δοκιμαστεί στη Βραζιλία και την Ευρώπη με αντικρουόμενα αποτελέσματα και εκκρεμεί η αξιολόγησή τους ως μέτρο προστασίας της δημόσιας υγείας (de Oliveira, Nascimento et al. 2009). Η καταπολέμηση της νόσου στους κύριους κομιστές, όπως οι σκύλοι, θα μπορούσε να είναι ένας αποτελεσματικός τρόπος περιορισμού της μετάδοσης στους ανθρώπους.

1.5 Θεραπεία

Οι ενώσεις του πεντασθενούς αντιμονίου ήταν -από τη δεκαετία του 1940 και για μεγάλο χρονικό διάστημα- η φαρμακευτική αγωγή πρώτης επιλογής για τη Λεϊσμανίωση και παραμένουν έτσι σε πολλές ενδημικές τροπικές χώρες. Όμως η ανάπτυξη αντοχής, καθώς και η τοξικότητά τους έχουν περιορίσει τη χρήση τους (Moore and Lockwood 2010). Τις τελευταίες δεκαετίες αναπτύχθηκαν λίγα εναλλακτικά φάρμακα (π.χ. λιποσωμική αμφοτερικίνη Β, αμφοτερικίνη Β, μιλτεφοσίνη, παρομομυκίνη), που αντικαθιστούν σταδιακά τις ενώσεις αντιμονίου, αλλά κανένα δεν αποτελεί την ιδανική θεραπεία λόγω τοξικότητας, θεμάτων αντοχής, αποτελεσματικότητας, απαγορευτικού κόστους για τους πάσχοντες πληθυσμούς των αναπτυσσόμενων χωρών, μεγάλης διάρκειας θεραπείας ή τρόπου χορήγησης. Ως κύριο φάρμακο για τη θεραπεία ασθενών με VL, στις ανεπτυγμένες χώρες, χρησιμοποιείται πλέον η λιποσωμική αμφοτερικίνη Β. Η μιλτεφοσίνη είναι ένα νέο φάρμακο που χορηγείται από το στόμα για τη θεραπεία της VL, χωρίς υψηλή τοξικότητα, μπορεί να είναι ωστόσο τερατογόνος αν χορηγηθεί κατά τη διάρκεια της κύησης (Freitas-Junior, Chatelain et al. 2012). Η θεραπεία με συνδυασμό φαρμάκων αναπτύσσεται ενεργά για χρήση σε ενδημικές περιοχές, για πρόληψη ανάπτυξης αντοχής στα νέα φάρμακα (Oliveira, Schubach et al. 2011).

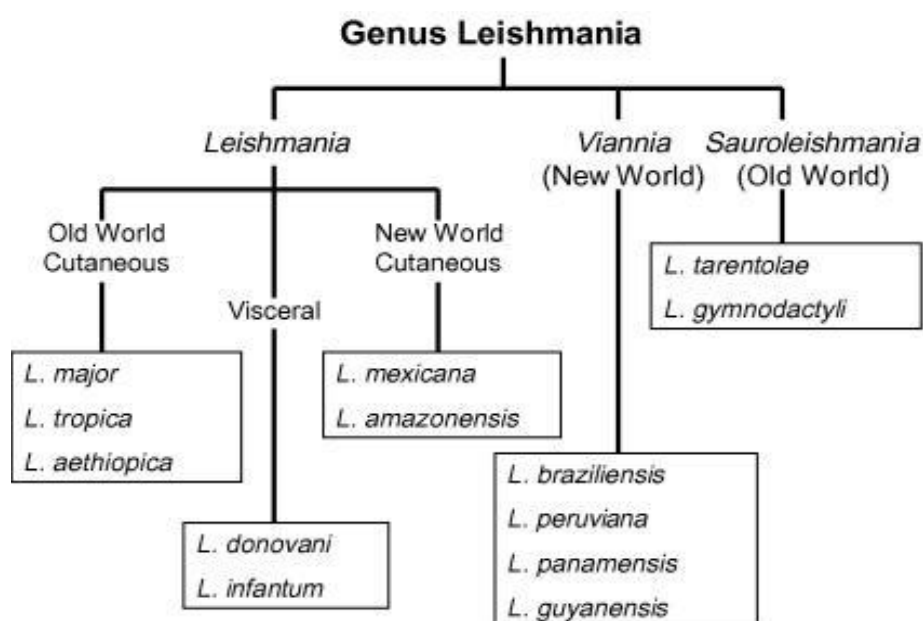
Συμπερασματικά, το υψηλό κόστος θεραπείας, η τοξικότητα και η ανάγκη για παραμονή και παρακολούθηση του ασθενούς στο νοσοκομείο, σε συνδυασμό με την ανάπτυξη αντοχής (Croft, Seifert et al. 2006) και την έλλειψη ενός προστατευτικού εμβολίου έναντι της νόσου, καθιστά αναγκαία την ανακάλυψη νέων μη τοξικών φαρμάκων και εμβολίων για τον έλεγχο και την αντιμετώπιση της λεϊσμανίωσης (Croft, Sundar et al. 2006).

1.6 Το παράσιτο *Leishmania* spp.

1.6.1 Συστηματική κατάταξη

Το γένος *Leishmania* περιλαμβάνει μονοκύτταρα παράσιτα, που ανήκουν στην τάξη των κινητοπλαστοειδών και στην οικογένεια των τρυπανοσωματίδων (*Trypanosomatidae*). Η οικογένεια αυτή αποτελείται από παράσιτα διαφόρων οργανισμών, φυτών, εντόμων, ψαριών, αμφιβίων, ερπετών και θηλαστικών.

Σύμφωνα με τις τρέχουσες φυλογενετικές αναλύσεις, το γένος *Leishmania* αποτελείται από τρία διακριτά υπογένη, τα *Leishmania*, *Viannia* και *Sauroleishmania* (Banuls, Hide et al. 2007). Τα δύο πρώτα είναι εκείνα που μολύνουν τα θηλαστικά και υφίστανται περεταίρω διαφοροποίηση, ανάλογα με το τμήμα του εντέρου που παρασιτούν στον ασπόνδυλο ξενιστή (τα είδη του υπογένους *Leishmania* εντοπίζονται στο πρόσθιο τμήμα και αυτά του υπογένους *Viannia* στο οπίσθιο τμήμα). Τα παράσιτα του υπογένους *Sauroleishmania* απομονώθηκαν από τη σαύρα του είδους *Tarentolae mauritanica* και είναι μη παθογόνα για τον άνθρωπο (Elwasila 1988).



Εικόνα 1.5: Ταξινόμηση του πρωτόζωου *Leishmania*. (Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies (Bates 2007).

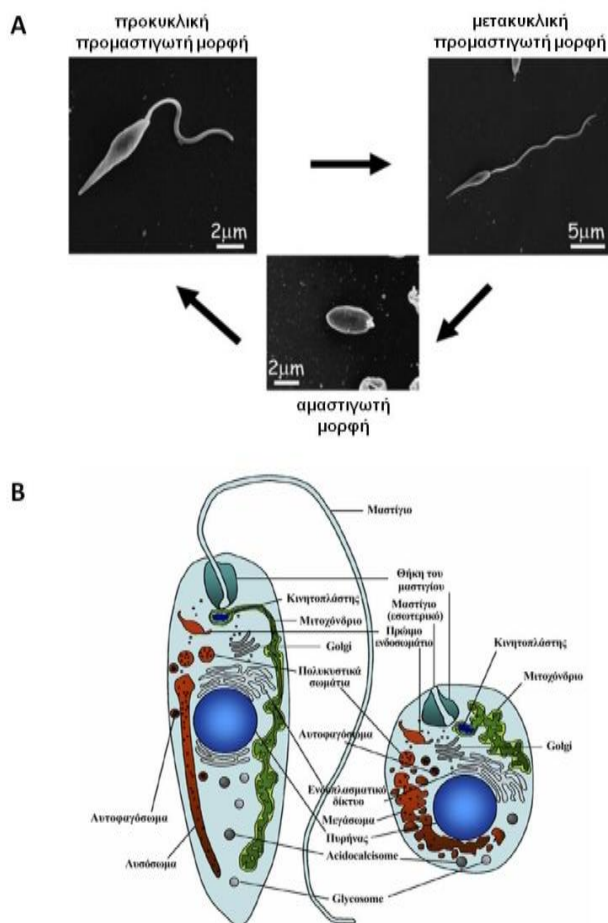
1.6.2 Μορφολογικά στάδια του παρασίτου

Τα παράσιτα *Leishmania* υφίστανται σε δύο μορφές: την προμαστιγωτή, που απαντάται στο πρόσθιο μέρος του εντέρου του ασπόνδυλου ενδιάμεσου ξενιστή (φλεβοτόμος σκνίπα) και η οποία εισάγεται στον σπονδυλωτό ξενιστή με το τσίμπημα της σκνίπας και την αμαστιγωτή μορφή, η οποία αναπτύσσεται και παρασιτεί εντός των μακροφάγων του σπονδυλωτού τελικού ξενιστή.

Η προμαστιγωτή μορφή έχει επίμηκες σώμα, μεγέθους 5-20 μm (ανάλογα με τα αναπτυξιακά στάδια του παρασίτου) και φέρει μαστίγιο, που εκφύεται από το

πρόσθιο τμήμα του σώματος του παρασίτου (Killick-Kendrick, Molyneux et al. 1974). Κεντρικά, υπάρχει ένας μεγάλος σφαιρικός πυρήνας με ευδιάκριτο πυρηνίσκο και περιφερική χρωματίνη. Στο κυτταρόπλασμα υπάρχουν πολλά ριβοσώματα, κυστίδια λίπους, συσκευή Golgi, λείο και αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο και λυσοσώματα. Κοντά στη βάση του μαστιγίου ξεκινά ένας τροποποιημένος τύπος μιτοχονδρίου που περιέχει ένα δισκοειδή κινητοπλάστη και είναι χαρακτηριστικός για την οικογένεια των κινητοπλαστοειδών στην οποία ανήκει και η *Leishmania*.

Οι προμαστιγώτες μορφές, στο έντερο του ενδιάμεσου αρθρόποδου ξενιστή, διέρχονται μιας σειράς αλλαγών μέχρι τελικά να μετατραπούν στις μολύνουσες μετακυκλικές μορφές. Αρχικά, διαφοροποιούνται στις νεκτομονάδες που μεταφέρονται στο πρόσθιο τμήμα του εντέρου της σκνίπας. Έπειτα, μεταβαίνουν στα στάδια της απομονάδας και των παραμαστιγωτών, μέχρι να μετατραπούν τελικά σε λεπτομονάδες, μια πρόδρομη μορφή των μετακυκλικών προμαστιγωτών (Bates and Rogers 2004).



Εικόνα 1.6: Μορφές του παρασίτου *Leishmania* κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής του. **A.** Εικόνα ηλεκτρονικού μικροσκοπίου των τριών διαφορετικών μορφών του παρασίτου. Τα προμαστιγώτα είναι από καλλιέργεια κυττάρων *in vitro* και η αμαστιγώτη μορφή είναι απομονωμένη από μολυσμένο ποντίκι. **B.** Σχηματική αναπαράσταση των κύριων ενδοκυτταρικών οργανιδίων ενός προμαστιγώτου (αριστερά) και ενός αμαστιγώτου παρασίτου (δεξιά). Η θήκη του μαστιγίου αποτελεί το πρόσθιο άκρο του κυττάρου.

Η μετατροπή των μετακυκλικών προμαστιγωτών στις αμαστιγωτές μορφές γίνεται στα φαγολυσσώματα των μακροφάγων του θηλαστικού ξενιστή. Τα αμαστιγωτά παράσιτα έχουν διάμετρο $2-6 \times 1,5-2 \mu\text{m}$ και φέρουν έναν έκκεντρο πυρήνα με πυρηνίσκο και κινητοπλάστη, καθώς και ένα εσωτερικό μικρό μαστίγιο. Στο κυτταρόπλασμα παραμένουν να υπάρχουν τα ίδια οργάνια που υπήρχαν και στην προμαστιγωτή μορφή του κυττάρου (Freitas, Parreiras et al. 2012).

1.6.3 Κύκλος ζωής

Τα παράσιτα του γένους *Leishmania* προκειμένου να ολοκληρώσουν τον βιολογικό τους κύκλο χρειάζονται να εισέλθουν, να επιβιώσουν και να πολλαπλασιαστούν σε δύο διαφορετικούς ξενιστές, τον ενδιάμεσο ασπόνδυλο και τον τελικό σπονδυλωτό. Τα παράσιτα διέρχονται από διαφορετικά στάδια μέσω μιας διαδικασίας διαφοροποίησης με σκοπό την τελική προσαρμογή του παρασίτου.

Οι θηλυκοί φλεβοτόμοι μολύνονται όταν κατά τη διάρκεια γεύματός με αίμα, λάβουν μακροφάγα μολυσμένα με αμαστιγωτές μορφές από μολυσμένο θηλαστικό ή άλλο σπονδυλωτό ξενιστή. Κατά την απομύζηση αίματος, οι αμαστιγωτές μορφές προσλαμβάνονται και σταδιακά μετατρέπονται στις κινητές προμαστιγωτές μορφές. Οι προμαστιγωτές μορφές πολλαπλασιάζονται γρήγορα με διαδική διχοτόμηση («Protozoologia /Protozoa» Goldfus, 1918).

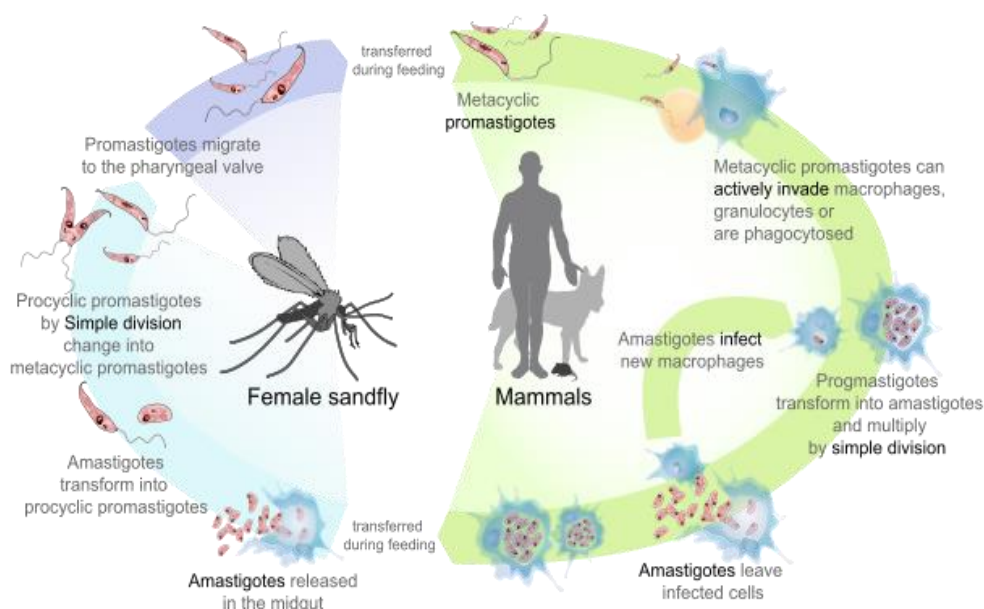


Εικόνα 1.7: Εικόνες των ασπόνδυλων ξενιστών *Phlebotomus* (αριστερά) και *Lutzomyia* (δεξιά) (https://www.google.gr/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&source=images&cd=&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwiCO_v36djRAhXCtRoKHf3XDMsQjRwIBw&url=http%3A%2F%2Fwww.mundo-animal.com%2Fblog%2Fperros%2Fsalud-perro%2Fleishmaniosis-canina%2F&psig=AFQjCNGAXJ8zzUKWu7p7DGv2gICJ4KifMw&ust=1485279689643173).

Το αίμα που απομυζήθηκε περιβάλλεται στον εντερικό αυλό της σκνίπας από περιτροφική μεμβράνη. Τα ένζυμα που παράγονται από τα παράσιτα *Leishmania* καταστρέφουν τη μεμβράνη αυτή και απελευθερώνουν τα παράσιτα, τα οποία προσκολλούνται στο τοίχωμα του εντέρου. Καθώς τα παράσιτα πολλαπλασιάζονται, μετακινούνται κρανιακά προς την οισοφαγική βαλβίδα του θωρακικού μεσεντέρου («Protozoologia /Protozoa» Goldfus, 1918).

Οι μετακυκλικές προμαστιγωτές μορφές παράγονται σε όλη τη διάρκεια αυτού του σταδίου. Αυτή η μορφή του παρασίτου (λεπτομονάδα) είναι ικανή να μολύνει τους σπονδυλωτούς ξενιστές. Οι μετακυκλικές προμαστιγωτές μορφές διαφέρουν μορφολογικά από τις μορφές που πολλαπλασιάζονται και είναι ανθεκτικές στην πέψη από τα μακροφάγα. Οι μετακυκλικές μορφές εισβάλλουν στα στοματικά μόρια της σκνίπας και μπορούν να εντοπιστούν στους σιαλογόνους αδένες του

εντόμου. Υπάρχουν διαφορετικές απόψεις για τη σχέση της ύπαρξης των παρασίτων στις θέσεις αυτές και της μετάδοσής του. Φαίνεται ότι η *Leishmania* μεταδίδεται με αναγωγή από το θωρακικό μεσέντερο στο δέρμα του ξενιστή κατά τη διάρκεια του νύγματος της σκνίπας («Protozoologia /Protozoa» Goldfus, 1918). Όταν ο άνθρωπος μολυνθεί με τις λεπτομονάδες, αυτές προσλαμβάνονται απ' τα μακροφάγα του δικτυο-ενδοθηλιακού συστήματος με φαγοκυττάρωση (Herburn 2000).



Εικόνα 1.8: Ο κύκλος ζωής του παρασίτου *Leishmania donovani* από τον αρθρόποδο ξενιστή στον άνθρωπο (https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Leishmaniasis_life_cycle_diagram_en.svg)

Ακολουθώντας τα μακροφάγα μεταφέρονται στα διάφορα όργανα (ιδίως σπλήνα, συκώτι, λεμφαδένες, μυελό οστών). Εντός των μονοπύρηνων μακροφάγων, τα προμαστιγωτά *Leishmania* μετατρέπονται στα ενδοκυττάρια αμαστιγωτά. Ο πολλαπλασιασμός των παρασίτων εντός των μακροφάγων οδηγεί τελικά στη ρήξη των κυττάρων, στην απελευθέρωση των παρασίτων στην κυκλοφορία, στην προσβολή άλλων μακροφάγων και τελικά στην επέκτασή τους σε όλα τα όργανα του δικτυο-ενδοθηλιακού συστήματος (Herburn 2000).

Ο κύκλος ολοκληρώνεται όταν μια θηλυκή σκνίπα προσλάβει, κατά τη διάρκεια γεύματος αίματος, τα μακροφάγα/μονοπύρηννα κύτταρα που περιέχουν τις αμαστιγωτές μορφές του παρασίτου από τον μολυσμένο τελικό ξενιστή.

1.7 Αλληλεπίδραση παρασίτου και θηλαστικού ξενιστή

1.7.1 Ο ρόλος των κυττάρων του ανοσοποιητικού στην μόλυνση με παράσιτα του γένους *Leishmania*

Όταν τα μετακυκλικά προμαστιγωτά παράσιτα ενοφθαλμίζονται στο δέρμα του θηλαστικού, έρχονται σε επαφή με τα κύτταρα του αίματος με αποτέλεσμα την

φαγοκυττάρωσή τους από τα ουδετερόφιλα του ξενιστή (Peters, Egen et al. 2008). Στη συνέχεια, τα μολυσμένα ουδετερόφιλα φαγοκυτταρώνονται από τα δενδριτικά κύτταρα (DC) και τα μακροφάγα του δέρματος. Από τα DC η μόλυνση μεταφέρεται στους λεμφαδένες, ενώ τα μακροφάγα είναι ο κύριος στόχος των παρασίτων μέσα στα οποία τα προμαστιγωτά διαφοροποιούνται σε αμαστιγωτά και πολλαπλασιάζονται (Walker, Oghumu et al. 2014).

Η είσοδος των προμαστιγωτών στα φαγοκύτταρα του ξενιστή πραγματοποιείται με εγκατάσταση αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μορίων της επιφανείας του παρασίτου και των αντίστοιχων υποδοχέων τους στην επιφάνεια των φαγοκυττάρων. Μόρια του γλυκοκάλυκα των προμαστιγωτών, όπως η LPG και η gr63, συνδέονται με υποδοχείς λεκτίνης στην επιφάνεια των μακροφάγων (Cecilio, Perez-Cabezas et al. 2014) και ακολουθεί φαγοκυττάρωση και εγκλεισμός του παρασίτου στο λεισμανιόφορο φαγόσωμα στο οποίο στη συνέχεια, όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη παράγραφο γίνεται η διαφοροποίηση σε αμαστιγωτές μορφές και πολλαπλασιασμός τους.

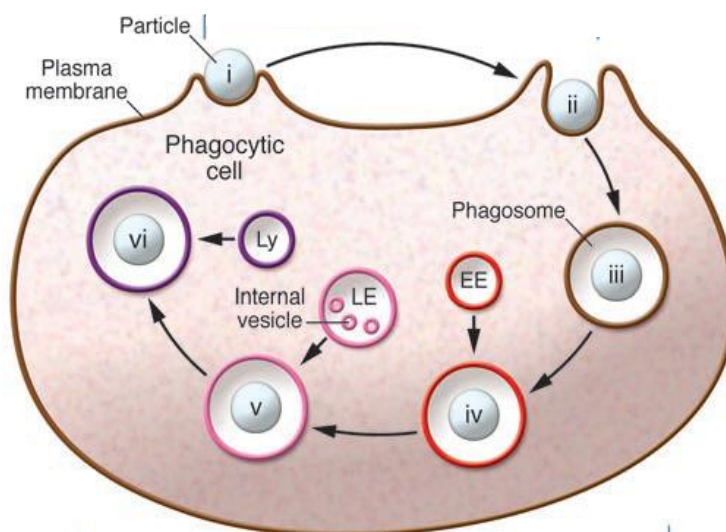
Τα αμαστιγωτά παράσιτα, μετά από την απελευθέρωσή τους από τα μακροφάγα με έναν μέχρι στιγμής μη αποσαφηνισμένο μηχανισμό (Handman and Bullen 2002), προσλαμβάνονται από τα γειτονικά μακροφάγα και δενδριτικά. Στο στάδιο αυτό, η προσκόλληση και η είσοδος των αμαστιγωτών γίνεται με γέφυρες μεταξύ παραγόντων του συμπληρώματος και του υποδοχέα CR3 στην μεμβράνη των μακροφάγων. Τα μόρια επιφανείας gr63 και LPG του παρασίτου συμβάλλουν και αυτά στην είσοδο των αμαστιγωτών, μέσω της σύνδεσής τους με υποδοχείς των μακροφάγων (Bosetto and Giorgio 2007).

Το παράσιτο *Leishmania*, εξασφαλίζει την επιβίωσή του και τον πολλαπλασιασμό του μέσα στο μακροφάγο διεγείροντας την παραγωγή αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών (TGF- β , IL-10) από αυτά. Τα μόρια αυτά, τροποποιούν τον μεταβολισμό άλλων κυτταροκινών, όπως οι IL-1, IL-12, IL-4, TNF α και η τροποποίηση αυτή οδηγεί στην αναστολή παραγόντων που θα κατέστρεφαν το παράσιτο. Επιπλέον, το παράσιτο αποτρέπει την ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων παρεμποδίζοντας τις αντιγονο-παρουσιαστικές ικανότητες των μακροφάγων (Cunningham 2002).

1.7.2 Επιβίωση του παρασίτου στο φαγολυσόσωμα του μακροφάγου

Η φαγοκυττάρωση είναι μία μορφή ενδοκυττάρωσης μεγάλων σωματιδίων, όπως βακτηρίων και πρωτοζωικών παρασίτων, κατά την οποία τα φαγοσώματα που φέρουν τα σωματίδια συντήκονται με λυσοσώματα, σχηματίζοντας τα φαγολυσοσώματα (Freeman and Grinstein 2014). Στην λειτουργία αυτή εξειδικεύονται κυρίως τα φαγοκύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Τα στάδια της φαγοκυττάρωσης διακρίνονται σε: α) πρόσδεση των μικροοργανισμών σε επιφανειακό υποδοχέα του μακροφάγου, β) σχηματισμό προεκβολών της κυτταρικής μεμβράνης του μακροφάγου (ψευδοπόδια), γ) σύντηξη των άκρων των ψευδοποδίων και σχηματισμό του φαγοσώματος. Σε όλα αυτά τα στάδια συμμετέχει ο κυτταροσκελετός της ακτίνης με γρήγορο πολυμερισμό και στην περιοχή της κυτταροπλασματικής μεμβράνης όπου δημιουργείται το φαγόσωμα (φαγοκυτταρικό κύπελλο) και γρήγορο αποπολυμερισμό από τη μεμβράνη του κλειστού φαγοσώματος, το οποίο «ωριμάζει» μετά από σύντηξη με πρώιμα και

ώριμα ενδοσώματα και λυσοσώματα (εικόνα 1.9) του μακροφάγου, σχηματίζοντας το φαγολυσόσωμα (Aderem and Underhill 1999).



Εικόνα 1.9: Στάδια σχηματισμού και ωρίμανσης του φαγοσώματος. I. Πρόσδεση του μικροοργανισμού στον υποδοχέα, II. Σχηματισμός ψευδοποδίων και εγκόλπωση του μικροοργανισμού, III-VI. Σχηματισμός φαγοσώματος, σύντηξη με το λυσόσωμα, σχηματισμός φαγολυσόσωματος

Στην περίπτωση του παρασίτου *Leishmania*, μετά την είσοδό τους στα μακροφάγα, οι προμαστιγωτές μορφές του παρασίτου καθυστερούν τη βιογένεση του φαγολυσόσωματος προκειμένου να γίνει διαφοροποίηση τους σε αμαστιγωτές μορφές πριν η ωρίμανση του παρασιτοφόρου φαγοσώματος προχωρήσει στο τελικό στάδιο του φαγολυσόσωματος. Οι αμαστιγωτές μορφές επιζούν σε περιβάλλον με όξινο pH (4,0 και 5,5), συνθήκες του βέλτιστου μεταβολισμού τους, σε αντίθεση με τις προμαστιγωτές μορφές του παρασίτου που είναι μεταβολικά ενεργές σε ουδέτερο pH (Mukkada, Meade et al. 1985). Για να αποφευχθεί η έκθεση τους σε οξειδωτικό περιβάλλον, τα αμαστιγωτά παράσιτα αναστέλλουν την παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) εντός του παρασιτοφόρου φαγοσώματος (Moradin and Descoteaux 2012) με μηχανισμό που θα αναφερθεί στη συνέχεια.

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, ο μικροοργανισμός που φαγοκυτταρώνεται δεν μπορεί να επιβιώσει στο περιβάλλον του φαγολυσόσωματος με το χαμηλό pH και τη δράση των υδρολυτικών ενζύμων των λυσοσωμάτων. Όμως, το παράσιτο *Leishmania* διαθέτει μηχανισμό, με τον οποίο μπορεί να επιβιώσει στα μακροφάγα του ξενιστή όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη παράγραφο. Η λιποφωσφογλυκάνη (LPG), βασικό μόριο της κυτταρικής του μεμβράνης, συμβάλλει στην αναστολή της ωρίμανσης του φαγοσώματος και του σχηματισμού του φαγολυσόσωματος (Desjardins and Descoteaux 1998). Ακόμη, ένας σημαντικός μηχανισμός των μακροφάγων για την αντιμετώπιση των παθογόνων μικροοργανισμών είναι η δημιουργία των ROS (reactive oxygen species), μέσω της οξειδάσης του NADPH. Το παράσιτο *Leishmania donovani*, συγκεκριμένα, αναστέλλει τη λειτουργία του ενζύμου αυτού, μετά από φωσφορυλίωση του παράγοντα p47(ρhox) που συμμετέχει στην ενεργοποίηση της οξειδάσης του

NADPH (Lodge and Descoteaux 2006). Τα παράσιτα που θα επιβιώσουν πολλαπλασιάζονται στο φαγόσωμα των μακροφάγων και εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος μετά από ρήξη της μεμβράνης του μακροφάγου για να μολύνουν τα γειτονικά με την ίδια διαδικασία. Με ένα νέο τσίμπημα σκνίπας τα αμαστιγωτά προσλαμβάνονται από τον ασπόνδυλο ξενιστή για να ξεκινήσει ένας νέος κύκλος ζωής του παρασίτου.

1.7.3 Μολυσματικοί παράγοντες του παρασίτου

Το παράσιτο προκειμένου να επιβιώσει στο αφιλόξενο μικροπεριβάλλον του γαστρεντερικού συστήματος της σκνίπας (ασπόνδυλος ξενιστής), του φαγολυσοσώματος του μακροφάγου και του ανοσοποιητικού συστήματος του τελικού ξενιστή, έχει αναπτύξει ποικίλες στρατηγικές με τις οποίες καταφέρνει να εγκαθίσταται, πολλαπλασιάζεται και εξαπλώνεται στα μονοκύτταρα/μακροφάγα του θηλαστικού ξενιστή (Moradin and Descoteaux 2012) όπως αναφέρθηκε στα προηγούμενα δύο κεφάλαια (1.7.1-1.7.2).

Στις διαδικασίες αυτές εμπλέκονται διάφορα μόρια που σαν τελικό στόχο έχουν την απενεργοποίηση μονοπατιών ανοσολογικής απόκρισης, τη διαφοροποίηση του παρασίτου στις διάφορες μορφές του προμαστιγωτού (στο μεσεντέριο της σκνίπας), από προμαστιγωτό σε αμαστιγωτό, την είσοδο και την εγκατάσταση του παρασίτου στο μακροφάγο και την διευκόλυνση της ανάπτυξης του μικροοργανισμού.

Οι συστηματικότερα μελετημένοι μολυσματικοί παράγοντες του παρασιτικού πρωτοζώου *Leishmania* είναι οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα A2 γονίδια (Zhang, Charest et al. 1996), η λιποφωσφογλυκάνη LPG (Dermine, Scianimanico et al. 2000) η γλυκοπρωτεΐνη 63 (gp63) (Isnard, Shio et al. 2012), η πρωτεΐνη EF-1a (eukaryotic translation elongation factor) (Torrecilhas, Schumacher et al. 2012) και οι όξινες φωσφατάσες της *L. donovani* (Gomes, Lopes et al. 2011).

Οι πρωτεΐνες, που κωδικοποιούνται από τα ειδικά για τα είδη *L. donovani* και *L. major* A2 γονίδια του χρωμοσώματος 22, έχουν μελετηθεί αρκετά τα τελευταία χρόνια και έχει δειχθεί ότι αποτελούνται από 40-90 επαναλαμβανόμενες αμινοξικές αλληλουχίες της μορφής Val-Gly-Pro-Leu-Ser-Val-Gly-Pro-Gln-Ser, που ακολουθούν μία αμινοτελική εκκριτική σηματοδοτική αλληλουχία (Charest and Matlashewski 1994). Οι A2 πρωτεΐνες εκφράζονται αποκλειστικά στην αμαστιγωτή μορφή του παρασίτου και έχουν συσχετιστεί με την μετατροπή του στην αμαστιγωτή μορφή, την εγκαθίδρυση του παρασίτου στο μακροφάγο και την επαγωγή της μολυσματικότητάς του (Fernandes, Canavaci et al. 2014).

Η LPG έχει δειχθεί (Descoteaux and Turco 2002) ότι συμβάλλει στην απενεργοποίηση συστατικών του συμπληρώματος των φαγοκυττάρων του ξενιστή, που καταστρέφουν τα προμαστιγωτά όταν αυτά ενοφθαλμίζονται στο δέρμα, προστατεύοντας έτσι το παράσιτο από μία αρχική αναγνώριση και καταπολέμησή του από τα προστατευτικά στοιχεία του συμπληρώματος. Ακόμα, σχετίζεται με την καθυστέρηση της ωρίμανσης του λεισμανιοφόρου φαγοσώματος και με το σύστημα ανασυγκρότησης της περιφαγοσωμικής ακτίνης του μακροφάγου, διαδικασίες που διευκολύνουν την επιβίωση του παρασίτου μέσα στο μακροφάγο. Τέλος, παρεμποδίζει την συγκρότηση της NADPH οξειδάσης, που παίζει ρόλο στην έκκριση ριζών οξυγόνου καταστρεπτικών για το παράσιτο και αποδιατάσει τις λιπιδικές μικροπεριοχές (lipid microdomains) στις μεμβράνες του μακροφάγου με

αποτέλεσμα να καθυστερεί η μετακίνηση των φαγοσωμάτων πάνω στους μικροσκοσωλινίσκους με μεσολάβηση της δυνεΐνης και η σύντηξη με τα λυσοσώματα (Rai, Pathak et al. 2016).

Η gr63 πρωτεάση αποδομεί τον παράγοντα C3b και C3bi του συμπληρώματος, που μεσολαβεί στην είσοδο των προμαστιγωτών στα μακροφάγα, μέσω του υποδοχέα CR3, παρεμποδίζοντας έτσι τη λύση των παρασίτων και επίσης, εμπλέκεται στον έλεγχο διαφόρων σηματοδοτικών μονοπατιών όπως ο κυτταρικός κύκλος, η κυκλοφορία των κυστιδίων ή η δυναμική του κυτταροσκελετού του μακροφάγου προς όφελος της επιβίωσης του παρασίτου *Leishmania* εντός αυτού (Olivier, Atayde et al. 2012).

Ανάμεσα στις πρωτεΐνες που βρέθηκαν να εκκρίνονται από το παράσιτο, υπήρχε και η EF-1a, η οποία δείχθηκε (Nandan, Yi et al. 2002) ότι προσδένεται στην φωσφατάση SHP-1 του μακροφάγου και οδηγεί σε ενεργοποίησή της. Αυτή με τη σειρά της οδηγεί στην απενεργοποίηση της ανοσολογικής απάντησης των μακροφάγων, στα παράσιτα που έχουν φαγοκυτταρώσει. Με βάση την παρατήρηση ότι μόνο η EF-1a του παρασίτου- και όχι η αντίστοιχέ της που παράγεται από το μακροφάγο- έχει την ικανότητα να προσδένεται στην SHP-1 και να την ενεργοποιεί, οι ερευνητές οδηγήθηκαν στο συμπέρασμα ότι η EF-1a πρωτεΐνη αποτελεί έναν από τους κύριους μολυσματικούς παράγοντες του παρασίτου, που πρέπει να μελετηθεί και να αποσαφηνιστεί πλήρως ο ρόλος της στην ανθρεκτικότητα που εμφανίζει το παράσιτο *Leishmania* έναντι των αμυντικών μηχανισμών του ανοσοποιητικού συστήματος.

Όσον αφορά τις όξινης φωσφατάσες, αυτές κατηγοροποιούνται με βάση την εντόπισή τους στο παρασιτικό κύτταρο. Οι έξω-φωσφατάσες βρίσκονται στην επιφανειακή μεμβράνη του παρασίτου με το ενεργό τους κέντρο στραμμένο προς την εξωτερική πλευρά της. Λόγω αυτού του εντοπισμού αναμένεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδρασή του με το θηλαστικό-ξενιστή. Αρκετές μελέτες έχουν συνδέσει την ομάδα αυτή των ενζύμων με διαδικασίες όπως τη διαφοροποίησης του παρασίτου, την θρέψη μέσω της υδρόλυσης οργανικών φωσφορικών υποστρωμάτων (Cosentino-Gomes and Meyer-Fernandes 2011), καθώς και με την αναστολή της οξειδωτικής καταστροφής από τα δραστικά μόρια O_2^+ , υποδεικνύοντας ότι οι φωσφατάσες αυτές μπορεί να δρουν και ως παράγοντες μολυσματικότητας. Τέλος, σύμφωνα με νεότερα δεδομένα (Singla, Khuller et al. 1992), που συσχετίζουν την ενζυμική δράση των φωσφατάσων με την μολυσματικότητα του παρασίτου, φαίνεται πως ολικά εκχυλίσματα μολυσματικών κλώνων *L. donovani* είχαν 1.5-2.0 φορές περισσότερη δράση όξινης φωσφατάσης, σε σχέση με μη μολυσματικούς κλώνους. Τέλος, μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριό μας, κατά την εκτέλεση της διδακτορικής διατριβής της Αμαλίας Παπαδάκη, έδειξαν ότι η όξινη φωσφατάση LdMAcP του παρασίτου *Leishmania donovani*, όταν υπερεκφράζεται σε διαγονιδιακά παράσιτα,, οδηγεί σε μια αυξημένη επιβίωση του παρασίτου στο περιβάλλον του μολυσμένου με παράσιτα μακροφάγου, σε σχέση με παράσιτα μάρτυρες (Papadaki, Politou et al. 2015).

1.7.4 Νέοι υποθετικοί μολυσματικοί παράγοντες, που μπορεί να επηρεάζουν την χειραγώγηση του ξενιστή από το παράσιτο

Στα παράσιτα του γένους *Leishmania*, η έκκριση μέσω της κλασσικής εκκριτικής οδού, πιστεύεται ότι πραγματοποιείται αποκλειστικά στην περιοχή έκφυσης του μαστιγίου στα προμαστιγωτά (flagellar pocket) και στα αμαστιγωτά, στο θύλακα του μαστιγίου (McConville, Mullin et al. 2002). Τα παράσιτα *Leishmania* είναι γνωστό ότι συνθέτουν πολλά μόρια που κατευθύνονται στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης, όπως η λιποφωσφογλυκάνη και η λείσμανιολυσίνη, GP63, κατά μήκος του ενδοπλασματικού δικτύου και του μονοπατιού που το συνδέει με την κυτταρική μεμβράνη. Παρά τη μεγάλη δυναμική σημασία της έκκρισης πρωτεϊνών στα παράσιτα *Leishmania*, η οποία θα μπορούσε να βοηθήσει στην κατανόηση της λειτουργίας των παρασίτων, μόνο ένας μικρός αριθμός εκκρινόμενων λείσμανιακών πρωτεϊνών έχει μελετηθεί.

Το 2008, πραγματοποιήθηκε από την επιστημονική ομάδα του J.Maxwell Silverman (Silverman, Chan et al. 2008) μια μελέτη των εκκρινόμενων πρωτεϊνών του παρασίτου *L. donovani* με πρωτεομική ανάλυση. Μέχρι τότε όμως, το γονιδίωμα του *L. donovani* δεν είχε αλληλουχιστεί, επομένως οι αλληλουχίες των γονιδίων των πιθανών εκκρινόμενων πρωτεϊνών που εντοπίστηκαν κατά την πρωτεομική ανάλυση συγκρίθηκαν με τα γονίδια του παρασίτου *L. major*, η αλληλουχία του γονιδιώματος του οποίου είχε δημοσιευτεί τον προηγούμενο χρόνο (The *Leishmania major* Genome Database. 2007 [<http://www.genedb.org/genedb/leish/>]). Τα αποτελέσματα έδειξαν πως το παράσιτο είναι ικανό να εκκρίνει αρκετές πρωτεΐνες που δεν έχουν την εκκριτική σηματοδοτική αλληλουχία μέσω κυστιδίων των εξωσωμάτων. Κάποιες από αυτές τις πρωτεΐνες είναι πολύ πιθανό να δρουν ως μολυσματικοί παράγοντες που βοηθούν το παράσιτο να επιβιώσει στο μακροφάγο. Οι πρωτεΐνες αυτές κατηγοριοποιήθηκαν, ανάλογα με το αν : α) εμπλέκονται στην ενδοκυττάρια επιβίωση, β) εάν αποτελούν πρωτεΐνες με γνωστή ανοσοκατασταλτική λειτουργία, γ) πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη μετάδοση σήματος και δ) πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε διαδικασίες μεταφοράς άλλων μορίων.. Ανάμεσα, σε εκείνες που θα μπορούσαν να συμμετέχουν στη μετάδοση σήματος, βρέθηκε και μία πρωτεΐνη με περιοχή πρόσδεσης σε φωσφοϊνοσιτίδια που κωδικοποιείται από το γονίδιο LmjF35.2420 (Silverman, Chan et al. 2008). Η πρωτεΐνη αυτή βρέθηκε να είναι κατά 3,5 φορές περισσότερο εμπλουτισμένη στο εξωκυττάριο από ότι στο ενδοκυττάριο κλάσμα των πρωτεϊνών του παρασίτου και να αποτελεί μια από τις περισσότερο εμπλουτισμένες πρωτεΐνες στο secretome της *L. donovani*. Είναι πιθανό, η πρωτεΐνη αυτή, να επηρεάζει τη μετάδοση σήματος του μακροφάγου, μέσω της ικανότητας πρόσδεσης της σε φωσφοϊνοσιτίδια, που εμπλέκονται σε σηματοδοτικά μονοπάτια. Είναι ενδιαφέρον ότι GO (Genome Ontology, https://en.wikipedia.org/wiki/Gene_ontology) ανάλυση χαρακτήρισε την υποθετική αυτή πρωτεΐνη (GeneDB : LmjF35.2420), ως μια πρωτεΐνη ομόλογη της πρωτεΐνης «sorting nexin 4». Οι πρωτεΐνες της οικογένειας των «Sorting nexins» είναι γνωστό ότι εμπλέκονται στο συντονισμό της ενδοκυττάριας μετακίνησης κυστιδίων, όπως η ενδοκύτωση και η εξωκύτωση. Επομένως, η συγκεκριμένη υποθετική sorting nexin μπορεί να αποτελεί έναν νέο πιθανό μολυσματικό παράγοντα του παρασίτου *Leishmania* εάν εκκρίνεται στο μολυσμένο μακροφάγο του θηλαστικού ξενιστή.

Highly enriched leishmania secreted proteins

GeneDB accession number	Protein identification ^a	Mean Cm/CA ratio ^b	Function ^c	Predicted location ^c
LmjF14.1360	Myo-inositol-1-phosphate synthase	3.93	Inositol biosynthesis [50]	Cytosol
LmjF23.0200	Endoribonuclease L-PSP (pb5), putative	3.91	Nuclease, mRNA cleavage	Cytosol
LmjF15.1203	60S acidic ribosomal protein P2	3.73	Translation [102]	Ribosome ^d
LmjF35.2420	Phosphoinositide-binding protein, putative	3.51	Phosphoinositol binding, signal transduction	Cytosol ^d
LmjF16.0140	Eukaryotic translation initiation factor 1A, putative	3.26	Translation	Cytosol, exosomes [24,38,39]
LmjF32.2180	Hypothetical protein, conserved	3.08	Translation initiation	Nucleus
LmjF11.0630	Aminopeptidase, putative, metallo-peptidase, Clan MF, Family M17	3.05	Proteolysis	Cytosol
LmjF35.3340	6-Phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating, putative	3.01	Glucose catabolism	Cytosol
LmjF04.0310	Beta-fructofuranosidase, putative	2.93	Carbohydrate metabolism	Cytosol ^d
LmjF36.3840	Glycyl tRNA synthetase, putative	2.87	Translation	Cytosol

^aThe Mascot algorithm (2008 609/id) was used to identify the protein names and the GeneDB accession numbers [29]. ^bMean of normalized, log normal (Ln) transformed conditioned medium (Cm)/cell associated (CA) peptide ratios for at least three of four experiments. ^cPutative functions and locations are derived from the GeneDB database (2007 238/id) unless otherwise noted. ^dProtein sequence contains an amino-terminal secretion signal peptide according to SignalP.

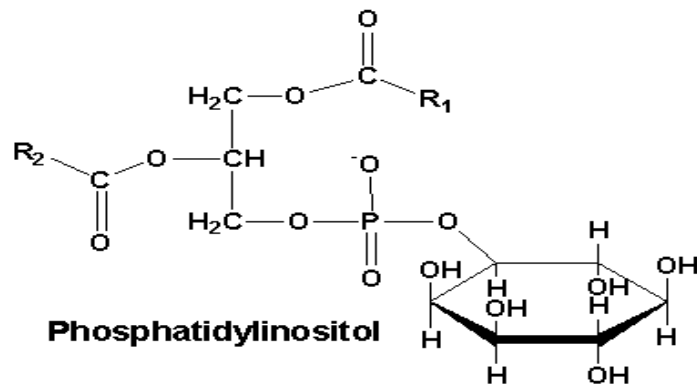
Εικόνα 1.10: Λίστα με τις περισσότερες εκκρινόμενες πρωτεΐνες από το παράσιτο *L. donovani*, με βάση το γονιδίωμα του παρασίτου *L. major*. Με κόκκινο πλαίσιο έχει εντοπιστεί στον πίνακα η πληροφορία για την υποψήφια νεξίνη.

1.8 Φωσφοϊνοσιτίδια, Sorting Nexins και η πρωτεΐνη *LdPIBPnex*

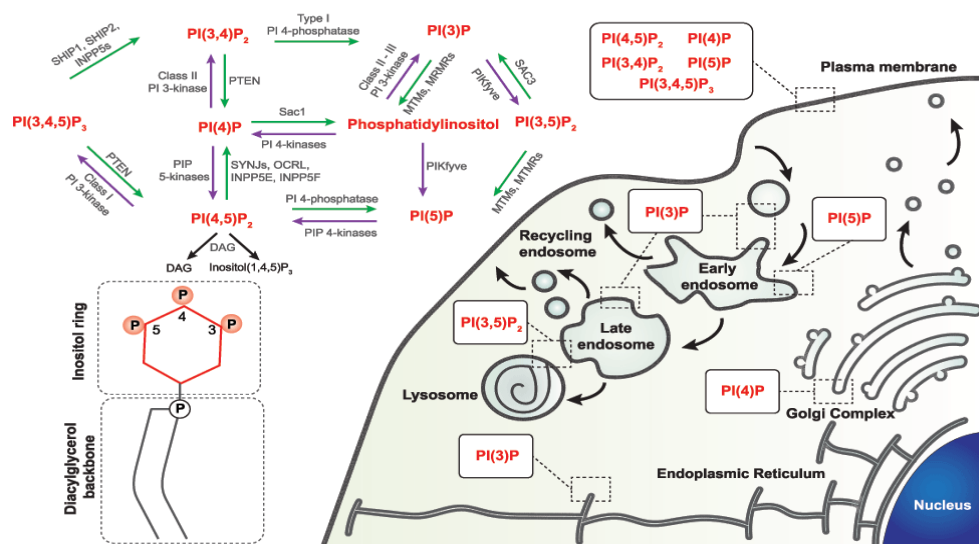
1.8.1 Φωσφοϊνοσιτίδια

Τα φωσφοϊνοσιτίδια (PIs) είναι φωσφολιπίδια που ελέγχουν, άμεσα ή έμμεσα, πολλαπλές κυτταρικές λειτουργίες, όπως η μετάδοση σήματος, η κυτταρική ανάπτυξη, η δυναμική του κυτταροσκελετού, η ανταλλαγή λιπιδίων μεταξύ των οργανιδίων και η ρύθμιση της μεταφοράς φορτίου μέσω των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών (Di Paolo and De Camilli 2006).

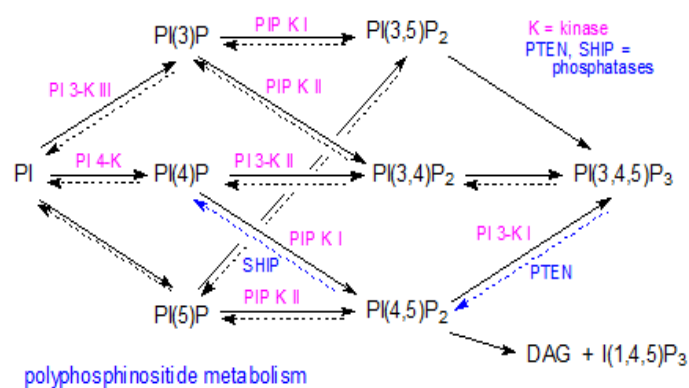
Τα PIs είναι τα φωσφορυλιωμένα προϊόντα της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (Εικόνα 1.11). Η αντιστρεπτή φωσφορυλίωση στις θέσεις 3, 4 και 5 του δακτυλίου της ινοσιτόλης δημιουργεί τις επτά μορφές φωσφοϊνοσιτιδίων που αναγνωρίζονται στα ευκαρυωτικά κύτταρα και οι αλληλομετατροπές της φωσφορικής ομάδας/-δων πραγματοποιούνται από ειδικές φωσφατάσες και κινάσες (Balla 2013). Αυτός ο ενεργός μεταβολισμός των PIs είναι στενά συνδεδεμένος με το ρόλο τους στη δημιουργία δευτερογενών κυτταρικών μηνυμάτων κατά τη διάρκεια της μετάδοσης ενός σήματος (Berridge and Irvine 1989). Επίσης, η συσσώρευση διαφορετικών ειδών φωσφοϊνοσιτιδίων στην μεμβράνη συγκεκριμένων μεμβρανικών διαμερισμάτων συσχετίζεται με το ρόλο τους στη διακίνηση μεμβρανικών κυστιδίων σε διαδικασίες όπως αυτές της εξωκύτωσης και της ενδοκύτωσης, της δυναμικής της βιογένεσης του ενδοσώματος και φαγοσώματος και στη μεταφορά κυστιδίων από και προς το σύστημα Golgi (De Matteis and Godi 2004).



Εικόνα 1.11: Η δομή του χημικού μορίου της φωσφατιδυλοϊνσιτόλης (<http://oregon.state.edu/dept/biochem/hhmi/hhmiclasses/bb450/winter2002/ch10/phtinos.htm>).



Εικόνα 1.12: Οι επτά αναγνωρισμένες μορφές φωσφοϊνσιτιδίων στα ευκαρυωτικά κύτταρα αποτελούν φωσφορυλιωμένα παράγωγα των φωσφοϊνσιτολών, που μπορούν να μεταβολιστούν από διάφορες φωσφατάσες και κινάσες.



Εικόνα 1.13: Ο μεταβολισμός και οι μεταβάσεις στις διάφορες μορφές των φωσφοϊνσιτιδίων (<http://lipid.library.aocs.org/Primer/content.cfm?ItemNumber=39357>)

Πρωτεΐνες με διαφορετικούς ρόλους στη διαλογή των πρωτεϊνών (sorting) προσδένονται σε διαφορετικά μεμβρανικά οργανίδια, βάσει της επιλεκτικής αναγνώρισης των PIs που βρίσκονται στις μεμβράνες των οργανιδίων αυτών από τη δομική περιοχή πρόσδεσης PIs, που περιέχουν στη δομή τους. Η κατανομή των πρωτεϊνικών καταλοίπων στην τρισδιάστατη δομή των μοτίβων πρόσδεσης σε φωσφοϊνοσιτίδια δημιουργεί έναν κώδικα αναγνώρισης της εκάστοτε στερεοειδικής οργάνωσης της φωσφορικής ομάδας γύρω από το δακτύλιο της ινσιτόλης (Kutateladze 2010). Υπάρχουν τουλάχιστον 11 διαφορετικά δομικά μοτίβα πρόσδεσης σε PIs με ένα μεγάλο εύρος συνάφειας και ειδικότητας για τα διαφορετικά PIs. Μερικά από αυτά είναι τα PH (pleckstrin homology), τα FYVE (Fab1, YOTB, Vac1, και EEA1), τα PX (Phox homology), τα ANTH και ENTH (AP180 και Epsin N-terminal homology) και τα FERM (4.1, ezrin, radixin, moesin) μοτίβα (Εικόνα 1.14).

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

Φωσφοϊνοσιτίδια	Περιοχές (μοτίβα) που στοχοποιούνται (invivo)
PtdIns(3)P	FYVE, PX (PH?)
PtdIns(4)P	PH (78)
PtdIns(5)P	Μη αναγνωρισμένο
PtdIns(3,4)P ₂	PH (PX?)
PtdIns(3,5)P ₂	Μη αναγνωρισμένο
PtdIns(4,5)P ₂	PH, FERM, ANTH, ENTH, tubby (PX?), AP2-a, και διάφορες άλλες κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες
PtdIns(3,4,5)P ₃	PH

Εικόνα 1.14: Οι επτά μορφές των φωσφοϊνοσιτιδίων και τα αντίστοιχα μοτίβα πρόσδεσης τους (Mark, A. Lemmon 2003. Phosphoinositide Recognition Domains).

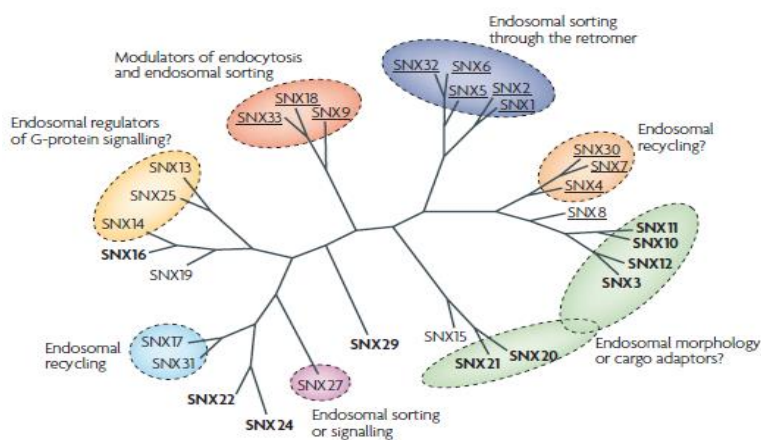
1.8.2 Η οικογένεια πρωτεϊνών Sorting Nexins (SNXs)

Στην πρωτεϊνική οικογένεια των Νεξινών, ανήκουν πρωτεΐνες, που χαρακτηρίζονται από την παρουσία μιας PX δομικής αλληλουχίας πρόσδεσης (Lemmon 2003) σε PIs. Μελέτες πάνω στις SNX-PX πρωτεΐνες έδειξαν πως όλες περιέχουν μοτίβα πρόσδεσης σε PIs, τα οποία βοηθούν στον προσανατολισμό των SNXs σε σημεία των μεμβρανών, πλούσια σε φωσφοϊνοσιτίδια (Carlton, Bujny et al. 2005).

Οι Νεξίνες αποτελούν μια οικογένεια ολιγομερικών πρωτεϊνών, που εντοπίζονται σε ενδοκυττάριας μεμβράνες και το κυτταρόπλασμα και έχουν την ιδιότητα να προσδένονται είτε σε άλλες πρωτεΐνες ή/και σε ΡIs λόγω της ΡΧ δομικής αλληλουχίας που περιέχουν. Μέχρι σήμερα, έχουν ταυτοποιηθεί 33 SNXs σε κύτταρα θηλαστικών και 10 σε μύκητες, όμως λίγα είναι γνωστά για τις λειτουργικές ιδιότητες των περισσοτέρων. Σύμφωνα με νεότερα δεδομένα, έχει προταθεί ότι οι SNXs διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στο σχηματισμό πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων (Pourcher, Santambrogio et al. 2010) που εμπλέκονται στη διαλογή των πρωτεϊνών και σε σηματοδοτικά μονοπάτια (Cullen 2008).

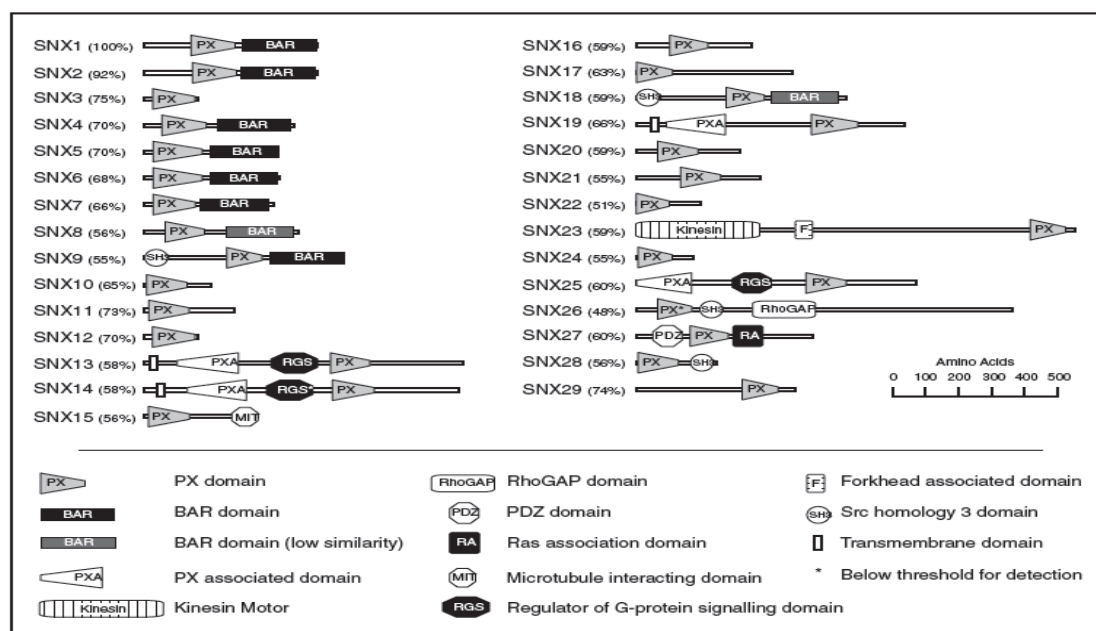
Στην οικογένεια των νεξινών ανήκει και μια υποοικογένεια πρωτεϊνών, που εκτός του ΡΧ domain περιέχουν και μια δομική αλληλουχία πρόσδεσης σε άλλες πρωτεϊνικές δομές, που ονομάζεται «BAR domain» (Bin–Amphiphysin–Rvs domain). Οι SNX–BARs είναι περιφερικές μεμβρανικές πρωτεΐνες, δομημένες σε διπλή α-έλικα, με ελλειπτικό σχήμα και θεωρείται πως έχουν την ικανότητα να ανιχνεύουν σημεία κύρτωσης της μεμβράνης και να επάγουν αναδόμηση της μεμβράνης με σκοπό τη δημιουργία μιας σωληνοειδούς μεμβρανικής προεκβολής (van Weering, Verkade et al. 2010). Αυτή η ικανότητα των SNX–BARs είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα δεδομένου ότι, τα στοιχεία των σωληνοειδών δομών του πρώιμου ενδοκυτταρικού συστήματος αποτελούν μοριακές πλατφόρμες διαλογής πρωτεϊνών. Η δομική αλληλουχία πρόσδεσης BAR φαίνεται να αποτελεί έναν από τους κύριους συνδέσμους ανάμεσα στη μεμβράνη και στον κυτταροσκελετό της ακτίνης. Ακόμα, η περιοχή «BAR» είναι υψηλά συντηρημένη εξελικτικά και έχει βρεθεί σε διάφορες πρωτεΐνες που παίζουν κάποιο ρόλο στη δυναμική των μεμβρανών.

Μέχρις στιγμής, από τις 33 νεξίνες των θηλαστικών, 12 έχουν χαρακτηριστεί ως SNX–BARs (Dawson, Legg et al. 2006), έχοντας στο καρβοξυτελικό άκρο ένα «BAR domain » (SNX1, SNX2, SNX4, SNX5, SNX6, SNX7, SNX8, SNX9, SNX18, SNX30, SNX32 και SNX33). Για τις μελετημένες SNX–BARs, γνωρίζουμε ότι εντοπίζονται σε μεμβρανικές προεκβολές και στις μεμβράνες κυστιδίων σε όλο το εύρος του ενδοκυτταρικού συστήματος και έχουν συσχετιστεί με κλαθρινο-εξαρτώμενα και μη μονοπάτια ενδοκύτωσης, καθώς και με μία ποικιλία διαδικασιών διαλογής πρωτεϊνών (van Weering, Verkade et al. 2010).



Εικόνα 1.15: Φυλογενετικό δέντρο των SNXs θηλαστικών, βασιζόμενο στην αμινοξική τους αλληλουχία, καθώς και ο ρόλος που κάθε μια αναμένεται να έχει, στα ενδοκυττάρια μονοπάτια διαλογής πρωτεϊνών.

Παρότι όλες οι SNXs-BAR έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν σημεία κύρτωσης της μεμβράνης, είναι η ποικιλομορφία στη φωσφοϊνοσιτιδική σύνδεση εκείνη που βοηθάει στο να στοχοποιηθούν οι κατάλληλες πρωτεΐνες στα αντίστοιχα μεμβρανικά διαμερίσματα.

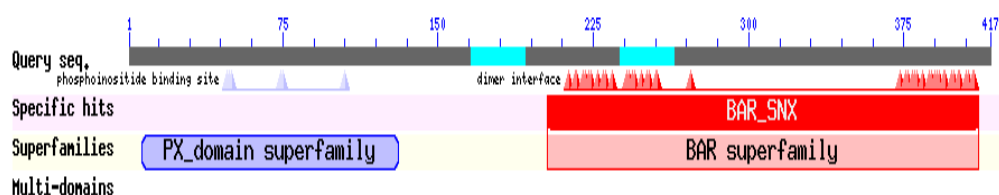


Εικόνα 1.16 : Ανάλυση των δομικών χαρακτηριστικών μερικών πρωτεϊνών της οικογένειας των νεξινών από θηλαστικά (Carlton, J. et al, 2005).

1.8.3 Η πρωτεΐνη *LdPIBPnex*

Στο σύνολο των πρωτεϊνών που βρέθηκαν να εκκρίνονται από το παράσιτο *L. donovani* με πρωτεομική ανάλυση (secretome) (Silverman, Chan et al. 2008), όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 1.7.4, εντοπίστηκε μια πρωτεΐνη με PX δομική αλληλουχία πρόσδεσης σε φωσφοϊνοσιτίδια, ομόλογη με πρωτεΐνες από την οικογένεια των Νεξινών (Sorting Nexins).

Έπειτα από ανάλυση της προβλεπόμενης αμινοξικής αλληλουχίας της ορθόλογης πρωτεΐνης από το παράσιτο *L. donovani* που κωδικοποιείται από το γονίδιο *LdBPK_352470.1*, βρήκαμε πως περιέχει και την επιπλέον περιοχή πρόσδεσης BAR, όπως και μερικές άλλες πρωτεΐνες της οικογένειας των νεξινών.

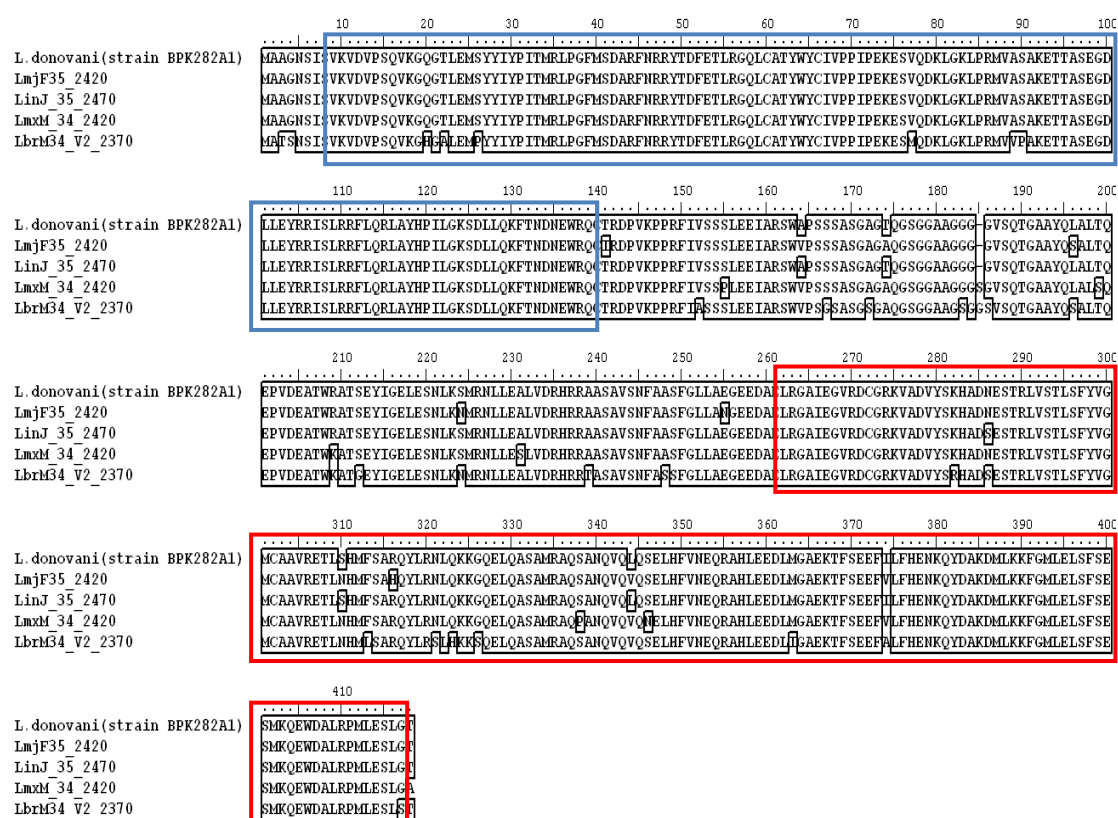


Εικόνα 1.17: Πρόβλεψη μοριακών χαρακτηριστικών της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από το γονίδιο *LdBPK_352470.1*

Η ύπαρξη των δύο αυτών περιοχών πρόσδεσης, υποδηλώνει πως η συγκεκριμένη πρωτεΐνη, δεδομένου ότι εκκρίνεται στο παράσιτο *L. donovani* όπως αναφέρθηκε παραπάνω (Κεφάλαιο 1.7.4), μπορεί να έχει παρόμοια δράση με τις ομόλογες SNX-BARs, στα ενδοκυττάρια μονοπάτια διαλογής πρωτεϊνών του φαγοκυττάρου του θηλαστικού ξενιστή και να χειραγωγεί αμυντικούς μηχανισμούς του, γεγονός που προκαλεί το ενδιαφέρον για περαιτέρω ανάλυση του μορίου ως υποψήφιου μολυσματικού παράγοντα.

Το γονίδιο *LdBPK_352470.1* κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη με 417α.α. και υπολογιζόμενη μοριακή μάζα 46,6 KDa. Την πρωτεΐνη αυτή, λαμβάνοντας υπ' όψιν τα προβλεπόμενα από την αλληλουχία της δομικά χαρακτηριστικά, την ονομάσαμε *LdPIBPnex* (**P**hopshoinositide **B**inding **P**rotein **n**exin like, από το παράσιτο *L. donovani*).

Σύγκριση της αλληλουχίας της *LdPIBPnex* με τις ομόλογες αλληλουχίες από τα *L. infantum*, *L. major*, *L. braziliensis* και *L. mexicana* (Μπολέτη Χ., αδημοσίευτα αποτελέσματα) έδειξε ότι η πρωτεΐνη είναι αυστηρά συντηρημένη (>90% ταυτότητα) σε 5 διαφορετικά είδη *Leishmania*, γεγονός που ενισχύει την υπόθεση ότι είναι ένα μόριο απαραίτητο για τον κύκλο ζωής του παρασίτου ή την επιβίωσή του στον ξενιστή.



Εικόνα 1.18: Σύγκριση της αμινοξικής αλληλουχίας της πρωτεΐνης *LdPIBPnex* με ομόλογές της από άλλα είδη *Leishmania* (Μπολέτη, Χ., αδημοσίευτα αποτελέσματα). Με μπλε πλαίσιο υποδεικνύεται η περιοχή που αντιστοιχεί στο PX μοτίβο και με κόκκινο στην BAR δομική περιοχή. Παρατηρείται ένα μεγάλο ποσοστό ομοιότητας των πρωτεϊνών στο σύνολο των αμινοξικών τους αλληλουχιών.

Σύμφωνα με όσα αναφέρθηκαν σε προηγούμενο κεφάλαιο, η *LdPIBPnex* είχε χαρακτηριστεί αρχικά ως μια sorting nexin-4 ομοιάζουσα πρωτεΐνη, η οποία υπάρχει στα θηλαστικά, αλλά και σε μύκητες. Ο λειτουργικός ρόλος της SNX4p (στους μύκητες), θεωρείται πως έχει να κάνει με τον έλεγχο της ανάκτησης της πρωτεΐνης-συνοδού SNARE Snc1p, από τα ενδοσώματα, που βρίσκονται μετά την TGN πλευρά του συστήματος Golgi, πίσω στο TGN (Carlton, Bujny et al. 2005). Υπό την απουσία της Snx4p, η Snc1p δεν μπορεί να προσανατολιστεί σωστά προς το Golgi. Δημιουργείται λοιπόν το ερώτημα, εάν και η *LdPIBPnex* εμφανίζει κάποιον παρόμοιο ρόλο στα μονοπάτια διαλογής των πρωτεϊνών στο μακροφάγο (Skanland, Walchli et al. 2009).

2 Υλικά και μέθοδοι

2.1 Βιοπληροφορική μελέτη της αλληλουχίας του γονιδίου της πρωτεΐνης *LdPIBPnex*

Η βιοπληροφορική ανάλυση ενός νέου γονιδίου αποτελεί ένα πρώτο και εξαιρετικά χρήσιμο βήμα για τη μελέτη της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από αυτό. Με τη χρήση εργαλείων βιοπληροφορικής μπορούμε να εξάγουμε κατευθυντήριες πληροφορίες για την περαιτέρω πειραματική μελέτη του μορίου. Αυτές οι πληροφορίες αφορούν στην έκφραση του, στην εύρεση μοτίβων στην αλληλουχία της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από αυτό με πιθανή λειτουργική σημασία, στην εύρεση ομολογίας με άλλες πρωτεΐνες με γνωστή δράση, στην πιθανότητα αλληλεπίδρασης του με άλλες πρωτεΐνες. Γι' αυτό, πριν την έναρξη της πειραματικής μελέτης της πρωτεΐνης *LdPIBPnex* (LdBPK_352470.1), προηγήθηκε σύγκριση της αλληλουχίας του γονιδίου *ldpibp_{nex}* που την κωδικοποιεί, αρχικά στα διαφορετικά είδη του παρασίτου *Leishmania* των οποίων το γονιδίωμα έχει αλληλουχθεί και στη συνέχεια σε γονίδια άλλων παθογόνων μικροοργανισμών της οικογένειας των Τρυπανοσωματιδίων, με τα πρόγραμμα ClustalW (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>) και Bioedit, με τα οποία γίνεται σύγκριση και ευθυγράμμιση της αλληλουχίας της συγκεκριμένης πρωτεΐνης με ομόλογές της. Για την εύρεση των σημείων πέψης από περιοριστικά ένζυμα, η επεξεργασία της αλληλουχίας των πλασμιδιακών φορέων που χρησιμοποιήθηκαν και του ενθέματος έγινε με τον αλγόριθμο NEBCutter 2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>).

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

2.2 Κλωνοποίηση του γονιδίου της *LdPIPBnex* σε πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης

2.2.1 Ενίσχυση του γονιδίου της *LdPIPBnex* (*ldpibp_{nex}*) με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

Αντιδραστήρια - Όργανα

- Προκατασκευασμένα αντιδραστήρια KAPA2GRobustPCRkits (KAPABIOSYSTEMS), στα οποία περιέχεται η πολυμεράση και τα ρυθμιστικά διαλύματα του ενζύμου
- Διάλυμα τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοζιτών (dNTP), το οποίο περιέχει dATP, dGTP, dTTP και dCTP σε διάλυμα φωσφορικών συγκέντρωσης 10 mM το καθένα, KAPABIOSYSTEMS
- Εκκινητές (primers), σχεδιάστηκαν στο εργαστήριο και παρηγγέλθησαν μέσω της εταιρείας LabSupplies από την εταιρεία VBC-Biotech. Οι αλληλουχίες τους αναφέρονται στο κεφάλαιο των Αποτελεσμάτων (παράγραφος 4.4.1).
- Σωλήνες PCR, Kisker
- Υπερκάθαρο αποστειρωμένο νερό (πέρασμα από στήλες ιονανταλλαγής και αντίστροφης όσμωσης)
- Θερμοκυκλοποιητής, MJ Research, PTC-200

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

Ως εκμαγείο της DNA πολυμεράσης χρησιμοποιείται μονόκλωνο DNA. Ένας νέος συμπληρωματικός κλώνος συντίθεται με κατεύθυνση 5'→3', με τη βοήθεια ενός μικρού τμήματος δίκλωνου DNA (εκκινητή) που υβριδοποιείται στη συμπληρωματική ακολουθία του εκμαγείου για να γίνει η εκκίνηση της σύνθεσης. Για την ενίσχυση του επιθυμητού γονιδίου, είναι απαραίτητοι δύο εκκινητές (πρόσθιος και ανάστροφος) που υβριδίζονται εκατέρωθεν της επιθυμητής αλληλουχίας στις συμπληρωματικές αλυσίδες του δίκλωνου DNA καθορίζοντας έτσι τα άκρα του επιθυμητού προϊόντος.

Πειραματική διαδικασία

Αρχικά, παρασκευάζεται το μίγμα (mastermix), το οποίο περιέχει το εκμαγείο του DNA, το ζεύγος των εκκινητών, τα τέσσερα dNTPs και το ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει και ιόντα Mg^{2+} , απαραίτητα για τη δράση της πολυμεράσης. Σε περίπτωση

που είναι αναγκαία μεγαλύτερη ποσότητα Mg^{2+} προστίθενται με τη μορφή του χλωριδίου ($MgCl_2$). Στο τέλος προστίθεται η DNA πολυμεράση, η οποία διατηρείται στους $-20^{\circ}C$.

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

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

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

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

Η πιστότητα της αντιγραφής του DNA είναι χαρακτηριστικό ποιότητας της εκάστοτε πολυμεράσης, η οποία αν και έχει διορθωτική δράση εξωνουκλεάσης όπως η Kapa2G πολυμεράση, προκαλεί πολύ λιγότερες μεταλλάξεις λόγω λαθών στην αντιγραφή. Στον πίνακα 2.1 παρουσιάζονται οι τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν.

dH ₂ O	36,4 ul	35,4 ul	33,9 ul
Buffer KAPA Hifi 5x	5 ul	5 ul	5 ul
dNTPs	1 ul (10 μM)	1 ul (10 μM)	1 ul (10 μM)
Mg ²⁺	3 ul (1.5 mM)	4 ul (2.0 mM)	3 ul (1.5 mM)
DMSO	-	-	2,5 μl
Enzyme KAPA Hifi	0.2 ul	0.2 ul	0.2 ul
Total volume	50ul	50ul	50ul

Εικόνα 2.1: Πίνακας με τις τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση της PCR, πλην του υποστρώματος DNA (γενωμικό DNA από το παράσιτο *L. donovani*) και των εκκινητών.

2.2.2 Μέτρηση της συγκέντρωσης του DNA

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Φασματοφωτόμετρο Nanodrop ND 2000/2000c (ThermoScientific)

Πειραματική διαδικασία

Ποσότητα 1-2 μl δείγματος διαλύματος DNA τοποθετείται στο άκρο ενός ινώδους οπτικού καλωδίου. Ένα δεύτερο οπτικό καλώδιο έρχεται σε επαφή με το υγρό δείγμα, οπότε το υγρό δημιουργεί γέφυρα μεταξύ των άκρων των δύο ινωδών οπτικών καλωδίων. Το κενό ρυθμίζεται στα 340 nm. Μία λάμπα παλμικής λάμψης Xe αποτελεί τη φωτεινή πηγή και ένας μετρητής δείκτη διάθλασης, χρησιμοποιώντας μία γραμμική συστοιχία CCD, αναλύει το φως μετά τη διέλευσή του από το δείγμα. Το μηχάνημα ελέγχεται από ειδικό λειτουργικό πρόγραμμα και είναι συνδεδεμένο με υπολογιστή. Μετά τη μέτρηση αναγράφεται στον υπολογιστή η συγκέντρωση του DNA αλλά και κάποιες παράμετροι που δείχνουν την καθαρότητα του δείγματος. Πιο συγκεκριμένα, μετράται η απορρόφηση του δείγματος στα 230 nm, στα 260 nm και στα 280 nm. Ο λόγος 260/280 πρέπει να κυμαίνεται ανάμεσα στο 1,8-2,0 για να θεωρείται το δείγμα καθαρό και απαλλαγμένο από πρωτεΐνες. Ο λόγος 260/230 πρέπει να είναι μεγαλύτερος από τον προηγούμενο και να κυμαίνεται ανάμεσα στο 2,0-2,2 για να θεωρείται το δείγμα απαλλαγμένο από φαινόλες και άλλα χημικά αντιδραστήρια (π.χ. EDTA) που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του DNA.

2.2.3 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Αγαρόζη (AgaroseBasic, Applichem)
- Βρωμιούχο αιθίδιο, 10 mg/mL, Fluka

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

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

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

Πειραματική διαδικασία

Χρησιμοποιήθηκαν πηκτές αγαρόζης 0,8-1,5% w/v. Για τη δημιουργία τους προστίθενται 0,8-1,5 g αγαρόζης σε 100 mL διαλύματος 1X TBE και το διάλυμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων έως ότου διαυγαστεί και δεν υπάρχουν ορατά στερεά υπολείμματα αγαρόζης. Μετά τη μείωση της θερμοκρασίας στους 50°C προστίθενται 5 mL βρωμιούχου αιθιδίου (σε μεγαλύτερη θερμοκρασία το

βρωμιούχο αιθίδιο είναι πολύ πτητικό, οπότε βλαβερό για το χρήστη και, λόγω σημαντικής απώλειας αλλάζει η τελική συγκέντρωση του, ενώ σε χαμηλότερη θερμοκρασία η πηκτή αρχίζει να πήζει). Το διάλυμα αναδεύεται και αποχύνεται αμέσως στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, στην οποία έχει ήδη τοποθετηθεί το κτενάκι που θα δημιουργήσει τα πηγάδια φόρτωσης του DNA. Έπειτα από 30-40 λεπτά η πηκτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί. Το δείγμα του DNA αναμειγνύεται με το διάλυμα φόρτωσης, το οποίο λόγω της γλυκερόλης που περιέχει συγκρατεί το DNA χαμηλά μέσα στο πηγάδι και λόγω των χρωστικών που περιέχει επιτρέπει την παρατήρηση της πορείας της ηλεκτροφόρησης με γυμνό μάτι. Μετά τη φόρτωση του δείγματος του DNA στο πηγάδι, εφαρμόζεται τάση ηλεκτρικού ρεύματος 100-120 V για 30-60 λεπτά, αναλόγως του μεγέθους του DNA που διαχωρίζεται.

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

2.2.4 Απομόνωση DNA από πηκτή αγαρόζης (gelextraction)

Αντιδραστήρια – Όργανα

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

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

Πειραματική διαδικασία

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

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

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

2.2.5 Απομόνωση του DNA από το διάλυμα της αντίδρασης της PCR (PCRcleanup)

Αντιδραστήρια – Όργανα

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

Πειραματική διαδικασία

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

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

Ακολουθείται, στη συνέχεια, η διαδικασία που αναφέρεται στην παράγραφο 2.4.

2.2.6 Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Περιοριστικές ενδονουκλεάσες (NewEnglandBiolabs, Roche) που χρησιμοποιήθηκαν
 - BglII
 - BamHI
 - EcoRI
- Συσσκευή ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας, Heraeus

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες (ή νουκλεάσες περιορισμού) είναι ένζυμα που αναγνωρίζουν εξειδικευμένα παλίνδρομες αλληλουχίες DNA μήκους 6-12 bp και προκαλούν τομή στη δίκλωνη έλικα διασπώντας δύο φωσφοδιεστερικούς δεσμούς, έναν σε κάθε αλυσίδα. Τα ένζυμα αυτά παράγονται από βακτήρια και τα προστατεύουν από ιούς, κόβοντας μόνο το ιικό γονιδίωμα και όχι το βακτηριακό, το οποίο είναι προστατευμένο στα σημεία αναγνώρισης των νουκλεασών περιορισμού επειδή είναι μεθυλιωμένο. Οι περισσότερες νουκλεάσες περιορισμού κόβουν τις

δύο έλικες σε απόσταση μερικών ζευγών βάσεων, δίνοντας δύο τμήματα με μονόκλωνες προεξοχές (συμπληρωματικά άκρα). Τα συμπληρωματικά άκρα μπορούν, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, να επανενωθούν με την προσθήκη του ενζύμου της λιγάσης. Υπάρχουν, πάντως, και νουκλεάσες περιορισμού που δίνουν τμήματα με τυφλά άκρα, χωρίς μονόκλωνες προεξοχές. Μία τυπική χρήση των νουκλεασών περιορισμού είναι η αποκοπή ενός γονιδίου από ένα τμήμα DNA με σκοπό την ενσωμάτωση του σε κάποιο φορέα κλωνοποίησης. Είναι τόσα πολλά τα διαφορετικά ένζυμα (με το καθένα να έχει διαφορετική ειδικότητα αλληλουχίας), ώστε είναι σχετικά απλό να βρεθούν τα κατάλληλα ένζυμα για την κοπή όλων των επιθυμητών τμημάτων DNA και την κλωνοποίησή τους.

Πειραματική διαδικασία

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

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

Για τις ποσότητες των ενζύμων που χρησιμοποιούνται πρέπει να λαμβάνεται υπ' όψιν ότι 1 unit είναι η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για να κόψει 1 μg DNA σε 1 ώρα στους 37°C. Η συνιστώμενη ποσότητα ενζύμου είναι 5 units/μg DNA όταν η δραστηριότητα του ενζύμου στο χρησιμοποιούμενο ρυθμιστικό διάλυμα είναι 50-100% και όταν υπάρχει μία μόνο θέση κοπής από το ένζυμο στο πλασμίδιο. Όταν η δραστηριότητα στο διάλυμα είναι 25% ή όταν οι θέσεις κοπής είναι περισσότερες από μία, χρειάζεται να αυξηθούν ανάλογα τα units του ενζύμου. Υπερβολική περίσσεια ενζύμου, όμως, μπορεί να προκαλέσει μη ειδικές πέψεις στο DNA. Επίσης επειδή τα ένζυμα φυλάσσονται σε διάλυμα γλυκερόλης είναι σημαντικό το % της γλυκερόλης να μην υπερβαίνει το 10% στο τελικό διάλυμα της αντίδρασης γιατί κάποια ένζυμα μπορεί σε αυτές τις συνθήκες να προκαλέσουν μη ειδική πέψη (star activity). Για σωστή πέψη είναι πολύ σημαντικό να επιλέγεται σωστά η θερμοκρασία, ο χρόνος και ο όγκος που θα πραγματοποιηθεί η αντίδραση. Ο συνιστώμενος χρόνος της αντίδρασης, υπό ιδανικές συνθήκες, είναι 1,5 ώρα. Όταν όμως συντρέχουν οι λόγοι που αναφέρονται παραπάνω τότε είναι προτιμότερο, να αυξηθεί ο χρόνος αντίδρασης, παρά να αυξηθεί η ποσότητα ενζύμου στην αντίδραση. Έτσι, μία πέψη μπορεί να διαρκέσει από 1,5 μέχρι και 16 ώρες.

Τέλος, όταν επιδιώκεται πέψη πολύ μεγάλης ποσότητας DNA, πάνω από 3-4 μg, πρέπει η αντίδραση να γίνεται σε μεγαλύτερο όγκο, επειδή υπάρχει κίνδυνος τόσο μη ειδικής πέψης όσο και παραμονής άκοπου DNA. Αυτά τα δύο γεγονότα ακόμη κι αν συμβούν σε χαμηλό ποσοστό, που να μην μπορούν να δώσουν ανιχνεύσιμα

προϊόντα, είναι πιθανό να αναστείλουν επακόλουθη κλωνοποίηση του κομμένου DNA σε φορέα κλωνοποίησης, μία εξαιρετικά ευαίσθητη αντίδραση.

2.2.7 Αποφωσφορυλίωση του DNA

Αντιδραστήρια – Όργανα

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

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

Πειραματική διαδικασία

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

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

Αντιδραστήρια – Όργανα

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

Η DNA λιγάση είναι ένα ένζυμο που καταλύει το σχηματισμό ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ της 3'-OH ομάδας στο άκρο μίας αλυσίδας του DNA και της 5'-φωσφορικής ομάδας στο άκρο μίας άλλης. Οι αλυσίδες του DNA που χρησιμοποιούνται ως υπόστρωμα για τη λιγάση πρέπει να είναι δίκλωνες. Η χρήση της λιγάσης είναι ζωτικής σημασίας για την τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA, καθώς η ενσωμάτωση τμημάτων DNA σε πλασμιδιακούς φορείς δε θα μπορούσε να επιτευχθεί χωρίς το ένζυμο αυτό. Μία συνηθισμένη πειραματική πρακτική είναι η λιγάση να ενώνει με φωσφοδιεστερικούς δεσμούς μονόκλωνα συμπληρωματικά άκρα δίκλωνου DNA που έχουν προκύψει από πέψη με την ίδια νουκλεάση περιορισμού. Μπορεί όμως να ενώνει και τυφλά άκρα (ύστερα από την προσθήκη κατάλληλων συνδετικών μορίων) ή και συμπληρωματικά άκρα που δεν προέκυψαν από πέψη με νουκλεάση περιορισμού. Τα προϊόντα της PCR ενσωματώνονται στο φορέα λόγω συμπληρωματικότητας των άκρων και ο φορέας γίνεται κυκλικός. Η λιγάση που προστίθεται σχηματίζει τους απαραίτητους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς. Η αναλογία μορίων φορέα-ενθέματος συνήθως είναι 1:3. Ανάλογα, όμως,

με το μέγεθος του φορέα και του ενθέματος, μπορούν να δοκιμαστούν και μεγαλύτερες αναλογίες αν και, όταν υπάρχει περίσσεια ενθέματος υπάρχει κίνδυνος δημιουργίας πολυμερισμένων μορίων ενθεμάτων που θα ενσωματωθούν στο φορέα ως πολυμερή. Οι ποσότητες ενθέματος και φορέα που χρησιμοποιούνται μπορούν να υπολογιστούν με τον εξής τύπο:

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

Πειραματική διαδικασία

Ο συνολικός όγκος αντίδρασης πρέπει να είναι περίπου 10 μL, ώστε ο φορέας και το ένθεμα να μπορέσουν να αλληλεπιδράσουν και να συνδεθούν. Αυτό, όμως, μπορεί να τροποποιηθεί ανάλογα με την ιδιαιτερότητα της κάθε αντίδρασης, αλλά πάντα στον ελάχιστο δυνατό όγκο. Το ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης περιέχει και ATP, κάτι που το καθιστά εξαιρετικά ευαίσθητο καθώς, κάθε φορά που αποψύχεται, ένα ποσοστό του ATP υδρολύεται. Μετά την προσθήκη του ρυθμιστικού διαλύματος, του ενθέματος και της λιγάσης, γίνεται επώαση στους 16°C για 16 ώρες.

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

2.2.9 Μετασχηματισμός επιδεικτικών κυττάρων *E. coli* (στελέχη XL1-Blue, BL-21) με τη μέθοδο του θερμικού σοκ

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Κύτταρα *E. coli* (στελέχη XL1-Blue, BL-21)
- Θρεπτικό μέσο LB (Luria-Bertani): Το 1 L περιέχει 10 g tryptone (1% w/v) (Tryptone Biochemica, Applichem), 10 g NaCl (0,17 M, Applichem), 5 g ομογενοποιημένου ζύμης (0,5% w/v) (Applichem)
- Άγαρ για βακτηριολογία, Bacto Agar, BDBiosciences
- Διάλυμα αμπικιλίνης, 100 mg/mL, sodium salt, Applichem
- Διάλυμα LB-άγαρ: 1,5% (w/v) άγαρ σε διάλυμα LB, το οποίο αποστειρώνεται στους 121°C για 30 λεπτά και κατόπιν προστίθεται αμπικιλίνη σε τελική συγκέντρωση 100 μg/mL
- Αποστειρωμένα ρύγχη για συλλογή αποικιών, Greiner bio-one
- Τρυβλία Petri για στερεές καλλιέργειες βακτηρίων, Sarstedt
- Επωαστήρας για την καλλιέργεια βακτηρίων υπό ανάδευση, LabTech

Μετασχηματισμός ονομάζεται η διαδικασία κατά την οποία ένα βακτηριακό κύτταρο προσλαμβάνει ξένο γενετικό υλικό το οποίο κληρονομεί και στις επόμενες γενιές. Το γενετικό υλικό προσλαμβάνεται από τη μεμβράνη του βακτηρίου, η

οποία προηγουμένως πρέπει να γίνει πιο διαπερατή, παρουσία ιόντων ασβεστίου ή β-μερκαπτοαιθανόλης. Τα κύτταρα, αφού επωαστούν στον πάγο, υπόκεινται θερμικό σοκ για να εισέλθει το DNA σε αυτά. Τα πλασμίδια έχουν όλα την ειδική για το βακτήριο θέση έναρξης της αντιγραφής και μπορούν να πολλαπλασιαστούν. Επίσης, περιέχουν γονίδιο αντίστασης σε αντιβιοτικό, ιδιότητα που τη μεταφέρουν στα κύτταρα στα οποία εισέρχονται. Με αυτό τον τρόπο επιλέγονται οι κλώνοι που έχουν προσλάβει το πλασμίδιο, αφού μόνο αυτοί θα μπορέσουν να επιβιώσουν σε καλλιέργεια παρουσία του συγκεκριμένου αντιβιοτικού.

Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι κύτταρα *E. coli* XL1-Blue για χρήση του εισαγόμενου DNA και απομόνωσή του από καλλιέργεια μικρής έκτασης (mini-prep) ή μεγάλης έκτασης (midi-prep) και κύτταρα BL21 που περιέχουν το γονίδιο της πολυμεράσης T7 για παραγωγή της πρωτεΐνης LdPIBP_{hex} σε μεγάλη κλίμακα.

Πειραματική διαδικασία

A. Μετασχηματισμός

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

B. Επίστρωση τρυβλίων Petri

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

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

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

2.2.10 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργεια μικρής έκτασης (mini prep)

Αντιδραστήρια – Όργανα

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

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

Μικρή ποσότητα υγρού θρεπτικού μέσου (4 mL) ενοφθαλμίζεται με μία αποικία βακτηρίων που περιέχει το πλασμίδιο που μας ενδιαφέρει και επωάζεται για 16 ώρες στους 37°C. Η καλλιέργεια (1,5 mL) φυγοκεντρείται και παραλαμβάνονται τα βακτηριακά κύτταρα, τα οποία λύνονται σε αλκαλικό διάλυμα με SDS. Στη συνέχεια, γίνεται εξουδετέρωση με οξικό οξύ και καθίζηση των μετουσιωμένων πρωτεϊνών και του γενωμικού DNA με φυγοκέντρηση. Το υπερκείμενο που περιέχει το διαλυτό πλασμιδιακό DNA τοποθετείται σε καθαρό eppendorf και προστίθενται σε αυτό 2 όγκοι παγωμένης απόλυτης αιθανόλης. Το πλασμιδιακό DNA υφίσταται καθίζηση με φυγοκέντρηση. Στη συνέχεια, γίνεται έκπλυση του DNA με αιθανόλη 70% v/v, η αιθανόλη απομακρύνεται με ξήρανση και το DNA παραλαμβάνεται με αναδιάλυσή του σε μικρό όγκο (20 µL) υπερκάθαρου και αποστειρωμένου νερού.

Πειραματική διαδικασία

- Απομονώνεται μία βακτηριακή αποικία από τρυβλίο με τη βοήθεια ενός αποστειρωμένου ρύγχους και ολόκληρο το ρύγχος τοποθετείται σε σωλήνα που περιέχει 4 mL υγρού θρεπτικού μέσου LB με αμπικιλίνη (100 µg/mL). Η καλλιέργεια αναπτύσσεται για 16 ώρες στους 37°C υπό ανάδευση και 1,5 mL φυγοκεντρείται στα 20000×g για 15 λεπτά στους 4°C (σε σωλήνα erpendorf)
- Το ίζημα αναδιαλύεται με έντονη ανάδευση σε κυκλοαναδευτήρα σε 100 µL του διαλύματος P1
- Προστίθενται 200 µL διαλύματος P2 που περιέχει NaOH και SDS, το δείγμα ανακινείται ελαφρώς με το χέρι και παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά, ώστε να προκληθεί λύση των βακτηριακών κυττάρων
- Προστίθενται 150 µL διαλύματος P3 για εξουδετέρωση του pH, ο σωλήνας ανακινείται ελαφρώς με το χέρι 6-8 φορές και τοποθετείται για 5 λεπτά στον πάγο
- Το δείγμα φυγοκεντρείται (20000×g, 5 λεπτά, 4°C) και επαναλαμβάνεται το στάδιο αυτό αν το υπερκείμενο δεν είναι απόλυτα διαυγές
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καθαρό erpendorf
- Προστίθεται 1 mL απόλυτης παγωμένης αιθανόλης για κατακρήμνιση του πλασμιδιακού DNA και το δείγμα φυγοκεντρείται (20000×g, 10 λεπτά, 4°C)
- Αποχύνεται το υπερκείμενο υγρό, προστίθενται 500 µL παγωμένης αιθανόλης 70% και το δείγμα φυγοκεντρείται (20000×g, 10 λεπτά 4°C)
- Αποχύνεται προσεκτικά το υπερκείμενο υγρό και το ίζημα του πλασμιδιακού DNA αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου να στεγνώσει (σε ρεύμα αέρα απαγωγού) ή σε μηχανήμα φυγοκεντρικής εξάτμισης υπό κενό, στους 37°C
- Το πλασμιδιακό DNA αναδιαλύεται σε 20 µL υπερκάθαρου και αποστειρωμένου νερού και μπορεί να αποθηκευτεί στους -20° C

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

2.2.11 Αποθήκευση βακτηρίων σε διάλυμα γλυκερόλης (cryopreservation)

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Γλυκερόλη 99% v/v, Applichem
- Διάλυμα γλυκερόλης 30%v/v σε θρεπτικό υλικό LB.
- Κρυοπροστατευτικοί αποστειρωμένοι σωλήνες φύλαξης κυττάρων, NUNC

Τα περισσότερα στελέχη βακτηρίων μπορούν να αποθηκευτούν για μεγάλα χρονικά διαστήματα, έως και 2 χρόνια, σε κατεψυγμένη μορφή στους -20°C ή ακόμα

και για πολλά χρόνια στους -80°C . Στους 4°C , μία υγρή καλλιέργεια διατηρείται για 7 ημέρες και ένα τρυβλίο με αποικίες για ένα μήνα.

Πειραματική διαδικασία

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

2.2.12 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργεια μεγάλης έκτασης (midi prep)

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Προκατασκευασμένα αντιδραστήρια καθαρισμού πλασμιδιακού DNA (NucleoBondXtraMidikit, Macherey-Nagel). Περιέχει διάλυμα αναδιάλυσης RES (το οποίο περιέχει και RNάση A, αποθηκεύεται στους 4°C), διάλυμα αλκαλικής λύσης LYS (περιέχει NaOH, SDS), διάλυμα εξουδετέρωσης NEU (περιέχει οξικό κάλιο), διάλυμα εξισορρόπησης EQU, αιθανολικό διάλυμα έκπλυσης WASH, αλκαλικό διάλυμα έκλουσης ELU και στήλες ιονανταλλαγής με βάση το διοξείδιο του πυριτίου (silica)
- Ισοπροπανόλη, Applichem
- Αιθανόλη 70% v/v, VWR International
- Υπερκάθαρο νερό (πέρασμα από στήλες ιονανταλλαγής και αντίστροφης όσμωσης)
- Διάλυμα TE (10 mM Tris/HCl (Applichem), pH 7,5, 1 mM EDTA, VWR International)
- Κυκλοαναδευτήρας, Labnet VX100
- Μικροφυγόκεντρος, Eppendorf 5417R
- Επιτραπέζιαφυγόκεντρος, Jouan CR3i multifunction, Thermo

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

Οι πρωτεΐνες, το χρωμοσωμικό και το πλασμιδιακό DNA στις αλκαλικές συνθήκες του διαλύματος λύσης παρουσία SDS αποδιατάσσονται, ενώ το RNA αποικοδομείται από την RNάση. Το οξικό κάλιο που περιέχεται στο διάλυμα εξουδετέρωσης καταβυθίζει το SDS με τη μορφή του K^+DS^- (δωδεκυλο-σουλφονικού

καλίου), συγκαταβυθίζοντας τις πρωτεΐνες, το χρωμοσωμικό DNA και τα κυτταρικά θραύσματα. Ακόμη, το διάλυμα εξουδετερώνεται και το πλασμιδιακό DNA, σε ουδέτερο pH, επανέρχεται στη φυσική υπερελικωμένη μορφή του, παραμένοντας διαλυτό. Η έκλουση πραγματοποιείται κάτω από αλκαλικές συνθήκες (pH 7,0-9,0) έτσι, ώστε η θετικά φορτισμένη στήλη να εξουδετερώνεται και το πλασμιδιακό DNA να απελευθερώνεται, κάτω από συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης αλάτων κατάλληλες για καταβύθιση του DNA με την προσθήκη ισοπροπανόλης. Τέλος, το DNA αναδιαλύεται σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης αλάτων, όπως το TE, ή σε υπερκάθαρο νερό, αν το pH του είναι σίγουρα πάνω από 7.

Πειραματική διαδικασία

Από βακτηριακό stock γλυκερόλης λαμβάνεται μία μικρή ποσότητα βακτηρίων ή από μικρή καλλιέργεια 4 mL λαμβάνεται ποσότητα 500 μ L και εμβολιάζεται σε 200 mL θρεπτικού μέσου LB παρουσία κατάλληλου αντιβιοτικού σε τελική συγκέντρωση 100 μ g/mL. Η διαδικασία πραγματοποιείται κοντά σε φλόγα, για διατήρηση στειρών συνθηκών. Η καλλιέργεια αφήνεται να αναπτυχθεί σε επωαστήρα, στους 37°C, υπό ανάδευση, για 16 ώρες. Την επόμενη ημέρα, πραγματοποιείται η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA από τα βακτήρια, με την παρακάτω διαδικασία:

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

- Μετά την εξάτμιση του διαλύτη, το πλασμιδιακό DNA αναδιαλύεται σε 150-200 μL διαλύματος TE ή υπερκάθαρου και απιονισμένου νερού

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

2.3 Αλληλούχιση του DNA (Sequencing)

Η αλληλούχιση δείγματος πλασμιδιακού DNA (10 μL DNA με συγκέντρωση 4-5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) έγινε από την Εταιρεία VBC Biotech (<http://www.vbc-biotech.at/cms/index.php>). Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης ελέγχθηκαν για ομολογία με την αλληλουχία του γονιδίου της *LdPIBPnec* με τα προγράμματα ClustalW και BioEdit Sequence Alignment Editor (βλ. παράγραφο 2.1).

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

2.4 Ανοσοαποτύπωση Western (WesternBlot)

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

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Πηκτή διαχωρισμού (10% ή 12% w/v), pH 8,8
 - Υπερκάθαρο νερό
 - Ακρυλαμίδιο, Applichem
 - *N,N'*-μεθυλενο-δισ-ακρυλαμίδιο, Sigma
 - Tris-HCl 1,5 M, Applichem
 - SDS 10% w/v, Applichem
 - Υπερθειικό αμμώνιο (APS) 10% w/v, BioRad
 - Τετραμεθυλενο-αιθυλενο-διαμίνη (TEMED), BioRad
- Πηκτή επιστοίβασης (4% w/v), pH 6,8
 - Υπερκάθαρο νερό
 - Ακρυλαμίδιο, Applichem
 - *N,N'*-μεθυλενο-δισ-ακρυλαμίδιο, Sigma
 - Tris-HCl 1,0 M, Applichem
 - SDS 10% w/v, Applichem
 - APS 10% w/v, BioRad
 - TEMED, BioRad
- Διάλυμα ηλεκτροφόρησης (electrodebuffer, pH 8,3), 1x, 500 mL
 - Trisma base 1,5 g, Applichem

- Γλυκίνη 7 g, Applichem
- SDS σε τελική συγκέντρωση 10% v/v, Applichem
- Διάλυμα φόρτωσης δείγματος πρωτεϊνών 1x (Laemmli buffer)
 - Γλυκερόλη 10% v/v, Applichem
 - β-μερκαπτοαιθανόλη 50 μL, Sigma
 - Κυανότηςβρωμοφαινόλης 0,01% w/v (Bromophenol Blue), Merck
 - Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8, Applichem
 - SDS 2% w/v, Applichem
- Coomassie Brilliant Blue R-250, BioRad
- Διάλυμα αποχρωματισμού σε νερό
 - Μεθανόλη (CH₃OH) 40% v/v, Applichem
 - Οξικό οξύ (CH₃COOH) 10% v/v, υψηλού βαθμού καθαρότητας, Applichem
- Πρωτεΐνες αναφοράς, Amersham/Heath care
- Γυάλινες πλάκες για ρύθμιση του πάχους της πηκτής (0,75 ή 1,5 mm), BioRad
- Ειδική κτένα (comb) για το σχηματισμό των θέσεων τοποθέτησης δείγματος (wells) στην πηκτή (10 θέσεις)
- Συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης Mini-Protean II, Biorad
- Συσκευή παροχής ηλεκτρικού ρεύματος Model 1000/500, Biorad

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

Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου σχηματίζεται με αντίδραση συμπολυμερισμού ακρυλαμιδίου και *N,N'*-μεθυλενο-δις-ακρυλαμιδίου (αντιδραστήριο διασύνδεσης-cross linker). Ο πολυμερισμός γίνεται παρουσία υπερθειικού αμμωνίου, που παρέχει ελεύθερες ρίζες, και TEMED, που καταλύει την αντίδραση σχηματισμού των ελευθέρων ριζών. Οι ελεύθερες ρίζες καταλύουν την αντίδραση πολυμερισμού και δημιουργούν την πηκτή.

Η SDS-PAGE είναι μία μη συνεχής ηλεκτροφόρηση πηκτής αφού η πηκτή αποτελείται από δύο τμήματα: την πηκτή επιστοίβασης και την πηκτή διαχωρισμού. Ο ρόλος της πηκτής επιστοίβασης, που έχει μεγαλύτερο μέγεθος πόρων και μικρότερο pH από την πηκτή διαχωρισμού, είναι να συσσωρεύει τις πρωτεΐνες σε μία στενή ζώνη, ώστε να εισέλθουν στην πηκτή διαχωρισμού ως μία λεπτή ταινία και να επιτευχθεί καλύτερος διαχωρισμός. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε διάλυμα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών με σταθερή τάση 200 V σε θερμοκρασία δωματίου.

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

Πίνακας Error! No text of specified style in document..1. Πηκτή διαχωρισμού

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

Πίνακας Error! No text of specified style in document..2. Πηκτή επιστοίβασης

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

Πειραματική διαδικασία

- Το διάλυμα της πηκτής διαχωρισμού τοποθετείται στο χώρο μεταξύ των δύο γυάλινων πλακών, επικαλύπτεται με μία στοιβάδα νερού και αφήνεται να πολυμεριστεί
- Αποχύνεται το νερό και προστίθεται το διάλυμα της πηκτής επιστοίβασης, που έχει ήδη προετοιμαστεί, μέχρι να πληρωθεί τελείως ο χώρος ανάμεσα στις πλάκες
- Τοποθετείται η ειδική κτένα, με προσοχή, ώστε να μην εγκλωβίσει φυσαλίδες αέρα
- Αφού πολυμεριστεί η πηκτή επιστοίβασης, απομακρύνεται η κτένα. Τα φρεάτια που έχουν δημιουργηθεί είναι οι θέσεις, στις οποίες θα

τοποθετηθούν στη συνέχεια τα δείγματα, στα οποία έχει προστεθεί ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης και έχουν υποστεί βρασμό (95°C, 5 λεπτά)

- Τοποθέτηση των δειγμάτων:
 - με το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης πληρούται η άνω μονάδα της συσκευής ηλεκτροφόρησης, επομένως και τα φρεάτια. Εφόσον δεν παρατηρηθούν διαρροές, τοποθετείται το υπόλοιπο ρυθμιστικό διάλυμα στην κάτω μονάδα της συσκευής
 - στα φρεάτια της πηκτής επιστοίβασης τοποθετούνται μέχρι 25 μL (για πάχος 0,75 mm) ή μέχρι 40 μL (για πάχος 1,5 mm) από κάθε δείγμα και 12 μL από τα πρότυπα
- Ηλεκτροφόρηση: συνδέεται το ηλεκτρόδιο της άνω μονάδας της συσκευής με την κάθοδο (-) και το ηλεκτρόδιο της κάτω μονάδας με την άνοδο (+) της συσκευής παροχής ηλεκτρικού ρεύματος
- Ρυθμίζεται η τάση στα 200 V
- Εμφάνιση των πρωτεϊνών στην πηκτή: μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, αποσυνδέονται τα ηλεκτρόδια από τους πόλους της πηγής ρεύματος και απομακρύνεται η πηκτή από τη συσκευή. Διαχωρίζονται οι δύο πλάκες με προσοχή, αποκολλάται η πηκτή και τοποθετείται στο διάλυμα της χρωστικής για 16 ώρες, υπό ανακίνηση. Στη συνέχεια, γίνεται αποχρωματισμός του υποβάθρου της πηκτής με διαδοχικές εκπλύσεις σε διάλυμα αποχρωματισμού υπό ανακίνηση και τελικά τοποθετείται σε υπερκάθαρο νερό και οξεικό οξύ 4% v/v για να διατηρηθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα.

2.4.2 Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Αντιδραστήρια – Όργανα

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

Για τη μεταφορά πρωτεϊνών από την πηκτή στη μεμβράνη χρησιμοποιείται διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς πρωτεϊνών. Τα αρνητικά φορτισμένα πρωτεϊνικά μόρια μετακινούνται προς τον θετικό πόλο της συσκευής προσκολλώμενα στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης που παρεμβάλλεται και συγκρατεί ειδικά τις πρωτεΐνες με υδρόφοβες και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις (Burnette, W.N., 1981).

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

Πειραματική διαδικασία

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

2.4.3 Ανοσοενζυμική ανίχνευση πρωτεϊνών

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, Amersham, Macherey-Nagel
- PBS (βλ. παράγραφο 3.2)
- Άπαχο γάλα σε σκόνη, Regilait
- Απορρυπαντικό Tween-20, Applichem
- Πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού (καθαρισμένο) έναντι της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης LdPIBP-MBP (παρασκευάστηκε στο εργαστήριο στο πλαίσιο της διδακτορικής διατριβής της Αμαλίας Παπαδάκη)
- Συζευγμένα με υπεροξειδάση αντισώματα αίγας έναντι των IgG ανοσοσφαιρινών κουνελιού και ποντικού, Pierce (41460 και 31230 αντίστοιχα)
- Διάλυμα 3',3'-διαμινοβενζιδίνης (DAB)
 - PBS 1X
 - DAB 1:1000, Sigma
 - Χλωρίδιο του νικελίου(II) ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), Merck
 - Διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) 30% v/v, Applichem
- Διάλυμα ECL
 - Υπερκάθαρο νερό (για τα διαλύματα 1 και 2) με πέρασμα από στήλες ιονανταλλαγής και αντίστροφης όσμωσης

- Tris-HCl 1 M, pH 8,8 (περιέχεται στο διάλυμα 1 και 2), Applichem
- Κουμαρικό οξύ (περιέχεται στο διάλυμα 1), Sigma
- 3-αμινοφθαλυδραζίνη (Luminol), $C_8H_7N_3O_2$ (περιέχεται στο διάλυμα 1), Sigma
- Διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου 30% v/v (περιέχεται στο διάλυμα 2), Applichem
- Διαλύματα φωτογραφικής εμφάνισης, Applichem
- X-ray φιλμ
- Συσκευή οριζόντιας κυκλικής ανακίνησης, 3005 GLF, Buch & Holm

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

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

Η χημειοφωταύγεια, για τη δεύτερη περίπτωση, είναι ένας είδος φωταύγειας που παράγεται κατά τη διάρκεια χημικής αντίδρασης, στην οποία δημιουργούνται ενδιάμεσα προϊόντα που διεγείρονται και, αποδιεγειρόμενα, εκπέμπουν ένα φωτόνιο. Η διέγερση μπορεί να προκληθεί από μεταφορά ηλεκτρονίων σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής, όπως στην περίπτωση του μορίου της 3-αμινοφθαλυδραζίνης που οξειδώνεται (μετατρέπεται σε 3-αμινοφθαλικό οξύ) από το υπεροξείδιο του υδρογόνου και διεγείρεται οπότε, με τη χρήση φωτογραφικών μεθόδων και πιο συγκεκριμένα με X-ray φιλμ, οπτικοποιείται η παρουσία της υπεροξειδάσης και κατ' επέκταση της πρωτεΐνης που μελετάται.

Πειραματική διαδικασία

- Επώαση της μεμβράνης της νιτροκυτταρίνης στην οποία έχουν μεταφερθεί οι πρωτεΐνες σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα με PBS + 5% w/v άπαχο γάλα σε σκόνη + 0,05% v/v Tween-20, ώστε να εμποδιστεί η μη ειδική προσκόλληση των αντισωμάτων
- Προσθήκη πρώτου αντισώματος: επώαση με το πρώτο αντίσωμα σε PBS + 2% w/v γάλα σε σκόνη + 0,05% v/v Tween-20 στην κατάλληλη αραιώση σε

- θερμοκρασία δωματίου για 1-2 ώρες, υπό ανακίνηση ή στους 4°C για 16 ώρες (για πιο ειδική πρόσδεση)
- Εκπλύσεις: διαδοχικές εκπλύσεις της μεμβράνης της νιτροκυτταρίνης με PBS που περιέχει 0,1% v/vTween-20 (3×5 λεπτά)
 - Δεύτερο αντίσωμα: επώαση της μεμβράνης με δεύτερο αντίσωμα αντι-IgG σε διάλυμα PBS + 1% w/vγάλα σε σκόνη + 0,05% v/vTween-20 στην κατάλληλη αραιώση (1:1000) σε θερμοκρασία δωματίου για 1-2 ώρες, υπό ανακίνηση. Το αντίσωμα αυτό φέρει ομοιοπολικά συνδεδεμένο το ένζυμο της υπεροξειδάσης (DAKOCODENoPO214)
 - Διαδοχικές εκπλύσεις της μεμβράνης της νιτροκυτταρίνης με 0,3% v/vTween-20 σε PBS (5 λεπτά), με 0,2%v/vTween-20 σε PBS (5 λεπτά), με 0,1% v/vTween-20 σε PBS (5 λεπτά) και, τέλος, με PBS 1X
 - Εμφάνιση:
 - Μέθοδος DAB: προσθέτουμε στην νιτροκυτταρίνη το διάλυμα εμφάνισης και περιμένουμε την ανάπτυξη του χρώματος. Η πορεία της αντίδρασης διακόπτεται με έκπλυση με νερό βρύσης και στέγνωμα.
 - Μέθοδος ECL: σε θάλαμο εμφάνισης, α) αναμιγνύονται τα διαλύματα 1 και 2, μία ποσότητα του υγρού απλώνεται στη μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης και αφήνεται για 2 λεπτά, ώστε να ολοκληρωθεί η αντίδραση, β) αφού απομακρυνθεί το υγρό, η μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης καλύπτεται με πλαστική μεμβράνη για να μην έρχεται σε απευθείας επαφή με το φιλμ που τοποθετείται πάνω από αυτή, γ) αφήνεται για χρονικό διάστημα λίγων δευτερολέπτων έως και αρκετών λεπτών, ανάλογα με την ποσότητα της πρωτεΐνης που ανιχνεύουμε, δ) το φιλμ αφαιρείται και εμβαπτίζεται στο υγρό ανάπτυξης μέχρι να εμφανιστούν οι ζώνες των πρωτεϊνών, στη συνέχεια ξεπλένεται με νερό και εμβαπτίζεται στο υγρό σταθεροποίησης.

2.4.4 Αποδέσμευση αντισωμάτων και επαναχρησιμοποίηση της μεμβράνης

Αντιδραστήρια – Όργανα

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

Πειραματική διαδικασία

Η ανάπτυξη τεχνικών ανίχνευσης των αντιγόνων στα ανοσοαποτυπώματα που βασίζονται στη μέθοδο της χημειοφωταύγειας παρέχει τη δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης των μεμβρανών με τη χρήση διαφορετικών αντισωμάτων,

καθώς δεν έχει πραγματοποιηθεί αλλοίωση της μεμβράνης αλλά και των μεταφερόμενων σε αυτήν αντιγόνων. Κατά τη διαδικασία της αποδέσμευσης των αντισωμάτων (stripping), η μεμβράνη επώζεται σε διάλυμα γλυκίνης, pH 2,6. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η διάσπαση του συμπλόκου αντιγόνου-αντισώματος και η απελευθέρωση των αντισωμάτων από την μεμβράνη. Οι μοναδικές πρωτεΐνες που παραμένουν στη μεμβράνη είναι εκείνες, οι οποίες είναι ισχυρά δεσμευμένες λόγω των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων κατά την ηλεκτρομεταφορά τους. Στη συνέχεια, η μεμβράνη εκπλένεται και πραγματοποιείται εκ νέου επώασή της με PBS + 5%w/v άπαχο γάλα σε σκόνη + 0,05%v/vTween-20 για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να εμποδιστεί η μη ειδική προσκόλληση των αντισωμάτων και ακολουθείται η διαδικασία όπως περιγράφηκε στην προηγούμενη παράγραφο.

2.5 Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford

Αντιδραστήρια – Όργανα

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

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

Πειραματική διαδικασία

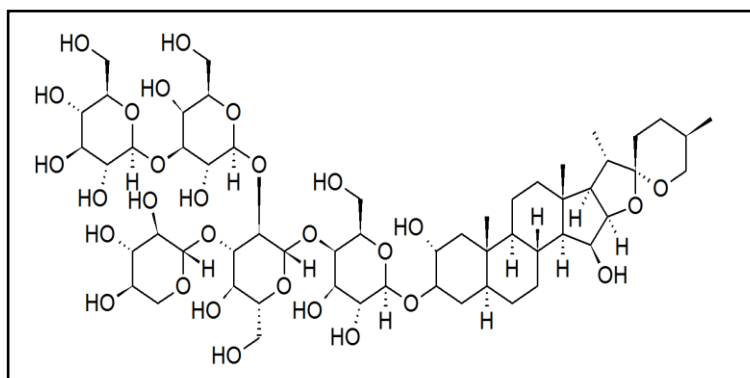
- Προετοιμασία των πρωτεϊνικών δειγμάτων που περιέχουν BSA ή BGG (PIERCE) σε ποσότητες από 1 έως 20 µg σε συνολικό όγκο 800 µL (σε νερό)
- Προετοιμασία αγνώστων πρωτεϊνικών δειγμάτων σε ποσότητες από 1 έως 20 µL σε συνολικό όγκο 800 µL (σε νερό)
- Προσθήκη 200 µL αντιδραστηρίου Bradford. Ανάδευση των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

2.6 Κλασμάτωση πρωτεϊνών με τη χρήση του απορρυπαντικού διγιτονίνη (digitoninfractionation)

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Καλλιέργεια προμαστιγωτών παρασίτων *L. donovani*(LG13)
- Διάλυμα PBS 1X
- Διάλυμα αναδιασποράς (διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου)
 - Tris-HCl 75 mM, pH 7,4 (Applichem)
 - NaCl 145 mM (AppliChem)
 - KCl 11 mM (Merck)
- Διάλυμα διγιτονίνης (Sigma, CASNumber 11024-24-1) 100 mM (stock): 0,84 g σε 6,7 mL νερού και 0,35 mL μεθανόλης 100%
 - Αραίωση με υπερκάθαρο νερό σε τελικές συγκεντρώσεις διγιτονίνης 20 μM, 200 μM, 1 mM και 10 mM
- Αναστολείς πρωτεασών, Sigma, P 8465
- Διάλυμα σακχαρόζης 0,3 M: 5,13 g σε 50 mL νερού
- Διάλυμα TritonX-100 1%v/v σε PBS 1X
- Ακετόνη 100% (Applichem)
- Διάλυμα φόρτωσης πρωτεϊνών (Laemmli buffer)
- Μικροφυγόκεντρος, Eppendorf 5417R
- Κυκλοαναδευτήρας, Labnet VX100
- Υδρόλουτρο, ED13, Julabo

Η διγιτονίνη (εικόνα 2.2) είναι ένας γλυκοζίτης που λαμβάνεται από το φυτό *Digitalis purpurea*. Το άγλυκο τμήμα του ονομάζεται διγιτογενίνη και είναι στεροειδές. Χρησιμοποιείται ως απορρυπαντικό, διαλυτοποιώντας αποτελεσματικά λιπίδια, όπως η χοληστερόλη, καθιστώντας έτσι διαπερατή την κυτταρική μεμβράνη αλλά και τις μεμβράνες των οργανιδίων των κυττάρων. Ανάλογα με τη συγκέντρωσή της στο δείγμα λαμβάνονται πρωτεΐνες από διαφορετικά τμήματα του κυττάρου (κλάσματα) ξεκινώντας από τις διαλυτές (κυτταροπλασματικές), στη συνέχεια τις πρωτεΐνες οργανιδίων, μιτοχονδρίων, τις κυτταροσκελετικές, και τέλος, τις μεμβρανικές και πυρηνικές.



Εικόνα 2.1. Το μόριο της διγιτονίνης

Πειραματική διαδικασία

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

- Το υπερκείμενο περιέχει τις διαλυτές πρωτεΐνες του κλάσματος 5, ενώ το ίζημα που αναδιασπείρεται σε διάλυμα φόρτωσης πρωτεϊνών 1X ίσου όγκου με το υπερκείμενο και θερμαίνεται στους 95°C, περιέχει αδιάλυτες πρωτεΐνες, μεμβρανικές, πυρηνικές και πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού
- Στο υπερκείμενο προστίθεται διάλυμα φόρτωσης πρωτεϊνών 6X
- Προστίθεται στα κλάσματα 1 έως 4 ίσος όγκος παγωμένης ακετόνης 100% και τα δείγματα επωάζονται για 16 ώρες στους -20°C
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30 λεπτά, στους 4°C, στα 18000×g, το υπερκείμενο αποχύνεται και το ίζημα των πρωτεϊνών αφήνεται σε ρεύμα αέρα απαγωγού για να στεγνώσει πλήρως
- Αναδιαλύονται οι πρωτεΐνες στον κατάλληλο όγκο διαλύματος φόρτωσης πρωτεϊνών 1X, θερμαίνονται στους 95°C για 5 λεπτά και αποθηκεύονται στους -20°C.

2.7 Απομόνωση του συνόλου των εκκρινόμενων πρωτεϊνών από καλλιέργεια παρασίτων

Καθίζηση πρωτεϊνών με ακετόνη

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Καλλιέργεια προμαστιγωτών παρασίτων *L. donovani* (αγρίου τύπου ή διαγονιδιακών)
- Θρεπτικούλικό RPMI 1640, Life Technologies
- Διάλυμα PBS - 0,1 mM EDTA
- Ακετόνη 100% (Applichem)
- ΔιάλυμαφόρτωσηςπρωτεϊνώνSample Buffer
- Επιτραπέζιαφυγόκεντρος, Jouan CR3i multifunction, Thermo
- Μικροφυγόκεντρος, Eppendorf 5417R
- Επωαστήρας 25°C για την καλλιέργεια παρασίτων (Shel-lab)

Πειραματική διαδικασία

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

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

2.8 Επιμόλυνση ανώτερων ευκαρυωτικών κυττάρων

Αντιδραστήρια – Όργανα

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

Χρησιμοποιείται η μέθοδος επιμόλυνσης μέσω λιποσωμάτων και πιο συγκεκριμένα της λιποφεκταμίνης, η οποία είναι ένα κατιοντικό λιπόσωμα. Η βασική δομή των κατιοντικών λιποσωμάτων αποτελείται από μία θετικά φορτισμένη κεφαλή και δύο αλυσίδες υδρογονανθράκων. Η φορτισμένη ομάδα αλληλεπιδρά με τη φωσφορική ομάδα του νουκλεϊκού οξέος (πλασμίδιο). Το θετικό επιφανειακό φορτίο των λιποσωμάτων βοηθά επίσης στην αλληλεπίδραση του νουκλεϊκού οξέος με τη κυτταρική μεμβράνη, επιτρέποντας τη σύντηξη του λιποσώματος / νουκλεϊκού οξέος (σύμπλοκο DNA-λιποφεκταμίνης) με την αρνητικά φορτισμένη κυτταρική μεμβράνη. Το σύμπλοκο επιμόλυνσης πιθανόν εισέρχεται στο κύτταρο μέσω ενδοκυττάρωσης. Ο πλασμιδιακός φορέας που χρησιμοποιήθηκε για την έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης *LdPIBP_{nex}* με τη μοριακή ετικέτα της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης GFP (*LdPIBP_{nex}-GFP*) είναι ο pEGFP-N3 (Clontech, κεφάλαιο αποτελεσμάτων, 3.1.1). Το γονίδιο κλωνοποιήθηκε στις θέσεις BglII και BamHI.

Πειραματική διαδικασία

Για τρυβλίο 24 φρεατίων:

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

Πίνακας Error! No text of specified style in document..3. Αντιδραστήρια επιμόλυνσης ευκαρυωτικών κυττάρων

Συστατικά	Τρυβλίο 24 φρεατίων
Κύτταρα	1×10^6
Θρεπτικό υλικό	50 μ L
DNA	250/500 ng
Αντιδραστήριο Plus	5 μ L
Λιποφεκταμίνη LTX	1,5 μ L

2.9 Μονιμοποίηση κυττάρων και μικροσκοπία φθορισμού

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Παραφολμαλδεΰδη (PFA)
 - Διάλυμα 4% w/v, τελικού όγκου 100 mL, παρασκευάζεται ως εξής: 4 gPFA διαλύονται σε 60 mL υπερκάθαρου νερού και θερμαίνονται στους 60-70°C με μαγνητική ανάδευση. Προστίθενται σταγόνες υδροξειδίου του νατρίου (NaOH 1 N, Applichem) που βοηθούν στη διαύγαση του διαλύματος, 10 mL PBS 10X και 4

g σακχαρόζης που βοηθά στη διατήρηση της μεμβράνης των κυττάρων. Το διάλυμα φιλτράρεται, μοιράζεται σε erpendorf ανά 1 mL και φυλάσσεται στους -20°C

- TritonX-100 0,1% v/v (Sigma) σε διάλυμα PBS 1X, pH 7,4
- RNάση A, Sigma, CAS Number 9001-99-4
- Ιωδιούχοπροπίδιο (propidiumiodide, PI), Sigma, CAS Number 25535-16-4
- TOPRO (TO-PRO-3, Molecular Probes by ThermoFisherScientif, T3605)
- Hoechst 33258, Sigma, CAS Number 23491-45-4
- Διάλυμααντιδραστηρίουμονιμοποίησης Mowiol 4-88, Calbiochem, catalog number 475904 (περιέχει 10% w/v Mowiol, 25% v/v γλυκερόλη, 100 mMTris-HCl, pH 8,5)
- Αντικειμενοφόροι πλάκες (VWRInternational) και καλυπτρίδες επεξεργασμένες με 1 mg/mLpoly-L-λυσίνη (Sigma)
- Χλωριούχο αμμώνιο (NH₄Cl, Sigma) 50 mM σε PBS 1X
- Αλβουμίνη βόειου ορού (BSA)
- Πρώτα αντισώματα:
 - Πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης rLdPIPBnex (παρασκευάστηκε στο εργαστήριο)
 - Μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι της α-τουμπουλίνης, MolecularProbes (A11126)

Φαλοϊδίνησυζευγμένημεπολυκλωνικόαντίσωμααίγαςanti-rabbitIgG, συζευγμένο με την κόκκινη φθορίζουσα χρωστική AlexaFluor 546, MolecularProbes (A22283)

- Δεύτερα αντισώματα:
 - Πολυκλωνικό αντίσωμα αίγας anti-rabbitIgG, συζευγμένο με την πράσινη φθορίζουσα χρωστική AlexaFluor 488, MolecularProbes (A11008)
 - Πολυκλωνικό αντίσωμα αίγας anti-rabbitIgG, συζευγμένο με την κόκκινη φθορίζουσα χρωστική AlexaFluor 546, MolecularProbes (A11010)
 - Πολυκλωνικό αντίσωμα αίγας anti-mouseIgG, συζευγμένο με την πράσινη φθορίζουσα χρωστική AlexaFluor 488, MolecularProbes (A11001)
 - Πολυκλωνικό αντίσωμα αίγας anti-mouseIgG, συζευγμένο με την κόκκινη φθορίζουσα χρωστική AlexaFluor 546, MolecularProbes (A11002)

- Συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού, TCS-SP Leica
- Μικροσκόπιο ευρέως πεδίου Olympus X81
- Μικροφυγόκεντρος, Eppendorf 5417R

Ο έμμεσος ανοσοφθορισμός περιλαμβάνει τη σήμανση επιτόπων του κυττάρου με ειδικά αντισώματα και δεύτερα αντισώματα συζευγμένα με φθορίζουσες χρωστικές

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

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

Πειραματική διαδικασία

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

A. Παράσιτα

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

τον τελικό όγκο του διαλύματος και 10%w/vBSA για “μπλοκάρισμα” των μη ειδικών θέσεων. Για κάθε καλυπτρίδα χρησιμοποιείται συνολικός όγκος 50-100 μ LPBS 1X, με TritonX-100 1% v/v

- Ακολουθούν 3 εκπλύσεις με διάλυμα PBS 1X, 0,1%v/vTritonX-100
 - Τα παράσιτα επώζονται για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με το δεύτερο αντίσωμα, το διάλυμα του οποίου περιέχει σε συγκέντρωση 1:1000 το αντίσωμα με τη φθορίζουσα ουσία και 10%w/vBSA, σε συνολικό όγκο 50-100 μ LPBS 1X, 0,1% v/vTritonX-100
 - Ακολουθεί μία έκπλυση με PBS 1X, 0,1% TritonX-100 και δύο με PBS 1X
 - Αν χρειάζεται οι πυρήνες των παρασίτων να είναι εμφανείς, τότε προστίθεται:
- Η κόκκινη φθορίζουσα χρωστική PI (propidiumiodide) σε συγκέντρωση 10 μ g/mL για 10 λεπτά, αφού έχει γίνει πρώτα κατεργασία με RNάση, σε συγκέντρωση 100 μ g/mL για 10 λεπτά
 - Ή η μπλε φθορίζουσα χρωστική TOPRO (απορρόφηση στα 633 nm) σε αραιώση 1:1000 για 20 λεπτά
 - Σε αντικειμενοφόρο πλάκα τοποθετούνται 10 μ L αντιδραστηρίου επικάλυψης Mowiol και στη συνέχεια η καλυπτρίδα με τα κύτταρα προς την πλευρά της αντικειμενοφόρου πλάκας. Άσκηση μικρής πίεσης είναι απαραίτητη, ώστε να εφάπτεται πλήρως η καλυπτρίδα με την πλάκα και ακολουθεί επώαση για 16 ώρες στους 4 °C για να πολυμεριστεί το Mowiol
 - Την επόμενη μέρα πραγματοποιείται αεροστεγής έγκλειση του δείγματος με βερνίκι
 - Το δείγμα των παρασίτων παρατηρείται με μικροσκόπιο φθορισμού

B. Ανώτερες ευκαρυωτικές κυτταρικές σειρές

Για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν καρκινικά κύτταρα κοιλικού επιθηλίου (HeLa).

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

2.11 Κυτταροκαλλιέργειες

2.11.1 Παράσιτα

Οι προμαστιγωτές μορφές *L. donovani*, καλλιεργούνται στους 25°C απουσία CO_2 , σε θρεπτικό υλικό RPMI 1640 (LifeTechnologies, Catalognumber: 11875093), εμπλουτισμένο με 10% v/vFBS (ορός από έμβρυο μόσχου απενεργοποιημένος για 30 λεπτά στους 56°C), 40 mM HEPES (Gibco, CAT 15630080) και αντιβιοτικά (0.1 mg/ml στρεπτομυκίνη, 1 U/ml πενικιλίνη).

Για την ανακαλλιέργεια των προμαστιγωτών μορφών χρησιμοποιούνται 10^6 παράσιτα/ ml και ο αριθμός των παρασίτων στην στατική φάση ανάπτυξης ($6^{\text{η}}$ - $7^{\text{η}}$ ημέρα καλλιέργειας) είναι περίπου $2-2,5 \times 10^7$ παράσιτα/ ml. Η συλλογή των παρασίτων γίνεται με φυγοκέντρηση (1000 g για 7 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου).

Για τη διατήρηση των κυττάρων *Leishmania* ($\sim 10^7$ κύτταρα) για μικρό χρονικό διάστημα, τα παράσιτα φυλάσσονται στους -80°C σε ειδικούς κρυοπροστατευτικούς σωλήνες των $1,5 \text{ ml}$ σε RPMI/ $20\% \text{ v/v FBS}$ / $10\% \text{ v/v DMSO}$. Η διατήρησή τους για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα απαιτεί τη μεταφορά τους σε δοχείο που περιέχει υγρό άζωτο.

2.11.2 Ανώτερα ευκαρυωτικά κύτταρα

Τα καρκινικά κύτταρα κοιλικού επιθηλίου HeLa καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό DMEM (Biosera, Catalog number: 11965084) εμπλουτισμένο με $10\% \text{ v/v FBS}$ και αντιβιοτικά (0.1 mg/ml στρεπτομυκίνη, 1 U/ml πενικιλίνη). Ως διάλυμα έκπλυσης των κυττάρων χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS) pH $7,4$. Για την αποκόλληση των κυττάρων από το ειδικό πλαστικό σκεύος της κυτταροκαλλιέργειας (φλάσκα), χρησιμοποιείται διάλυμα Versene [PBS/ $0,1 \text{ mM EDTA}$ ($0,02\% \text{ w/v}$)] που δεσμεύει τα δισθενή κατιόντα Ca^{2+} , Mg^{2+} τα οποία βοηθούν τα κύτταρα να παραμένουν συνδεδεμένα στη φλάσκα.

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

Όλες οι κυτταρικές σειρές μακροφάγων επωάζονται σε επωαστικό κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 37°C , σε ατμόσφαιρα $5\% \text{ CO}_2$.

Για τον εμβολιασμό της καλλιέργειας μακροφάγων χρησιμοποιούνται 4×10^5 μακροφάγα/ml. Ο αριθμός των μακροφάγων στη στατική φάση ανάπτυξης είναι περίπου 2×10^6 μακροφάγα/ ml.

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

3 Αποτελέσματα

3.1 Κλωνοποίηση του γονιδίου της πρωτεΐνης *LdPIBPnex* από το παράσιτο *L. donovani* (στέλεχος LG13) στους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης pEGFP-N3, pGEX4T-1 και pLexsy-sat-mCherry

Η μελέτη της πρωτεΐνης *LdPIBPnex* με προβλεπόμενα δομικά χαρακτηριστικά της οικογένειας των νεξινών (sorting nexins) και δομική περιοχή πρόσδεσης σε φωσφοϊνοσιτίδια (PI binding domain), απαιτεί την κατασκευή μοριακών εργαλείων για έκφραση και ταυτοποίησή της σε ομόλογα και ετερόλογα κυτταρικά συστήματα, για παραγωγή και καθαρισμό ειδικού anti-*LdPIBPnex* αντισώματος και για επαλήθευση της δράσης της για πρόσδεση σε φωσφοϊνοσιτίδια.

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την *LdPIBPnex* του είδους *L. donovani* απομονώθηκε και ενισχύθηκε με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), από γενωμικό DNA *L. donovani* του στελέχους LG13, MHOM/ET/0000/HUSSEN, που προέρχεται από ανθρώπινο περιστατικό VL στο Σουδάν (Zemanova, Jirku et al. 2004).

Ως ολιγονουκλεοτίδια ενισχυτές χρησιμοποιήθηκαν:

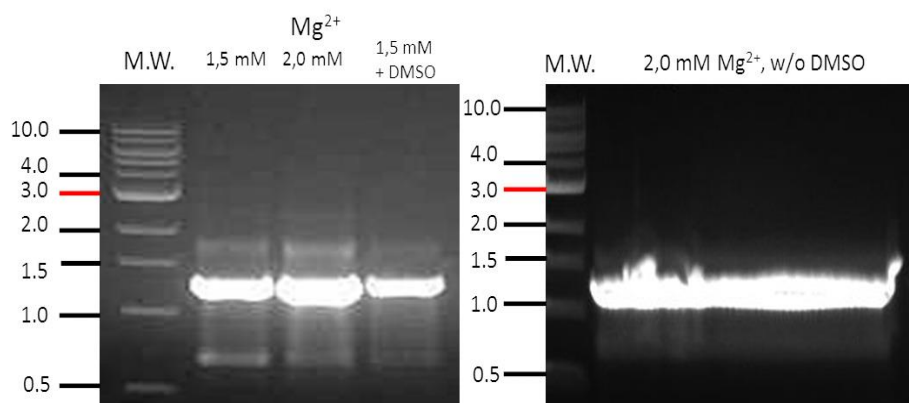
- Για εισαγωγή στο πλασμίδιο pEGFP-N3, ως πρόσθιος (forward) εκκινητής το ολιγονουκλεοτίδιο 5'-GAAGATCTACCATGGCCGCCGGCAACTCC-3' με αλληλουχία στο 5' άκρο που αναγνωρίζεται από το ένζυμο BglII και ως ανάστροφος (reverse) εκκινητής το ολιγονουκλεοτίδιο 5'-CGGGATCCAGGTCCTGTGCCAAGGGACTCCAAC-3' με αλληλουχία στο 3' που αναγνωρίζεται από το ένζυμο BamHI.
- Για την εισαγωγή στο πλασμίδιο pGEX4T-1: ως πρόσθιος (forward) εκκινητής το ολιγονουκλεοτίδιο 5' CCGGAATTCATGGCCGCCGGCAACTCC 3' με αλληλουχία στο 5' άκρο που αναγνωρίζεται από το ένζυμο EcoRI και ως ανάστροφος (reverse) εκκινητής το ολιγονουκλεοτίδιο 5'-CCGGAATTCCTATGTGCCAAGGGACTCCAAC-3' με αλληλουχία στο 3' που αναγνωρίζεται από το ένζυμο EcoRI.
- Για την κλωνοποίηση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της *LdPIBPnex* στο πλασμίδιο pLexsy-sat-mCherry απαιτήθηκαν ολιγονουκλεοτίδια με αλληλουχίες που αναγνωρίζονται από το ένζυμο περιορισμού BglII, τόσο στην 5' θέση εισαγωγής, όσο και στην 3' (5'-GAAGATCTACCATGGCCGCCGGCAACTCC-3', ο πρόσθιος και 5'-GAAGATCTTCCTGATCCTGATGATCCTGTGCCAAGGGACTC-3', ο ανάστροφος).

Παράλληλα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα βελτιστοποίησης των συνθηκών της αντίδρασης PCR ως προς την βέλτιστη συγκέντρωση των ιόντων Mg^{2+} και την προσθήκη ή μη, του αντιδραστήριου DMSO.

3.1.1 Κλωνοποίηση στο πλασμίδιο pEGFP-N3

Αρχικά, τα προϊόντα της PCR αναλύθηκαν σε πηκτή αгарόζης συγκέντρωσης 0,8% w/v και αφού επιλέχθηκε η βέλτιστη συνθήκη ενίσχυσης του γονιδίου (2,0 mM Mg^{2+} , w/o DMSO), η διαδικασία της PCR επαναλήφθηκε για παραγωγή μεγαλύτερης ποσότητας σε ηg ενθέματος, το οποίο στη συνέχεια καθαρίστηκε από τα υπόλοιπα

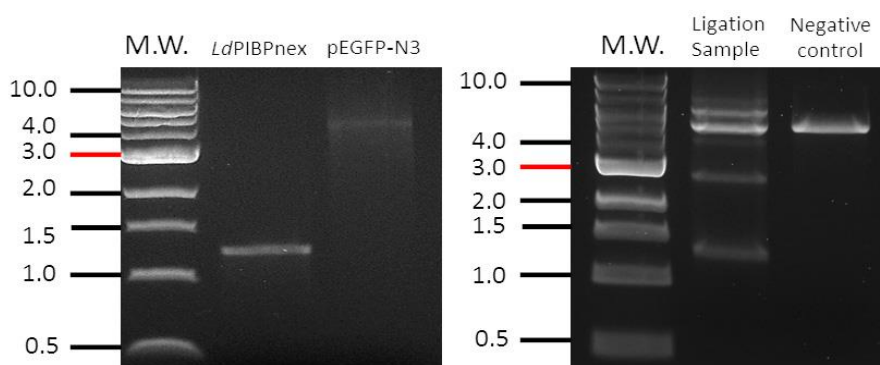
μόρια της αντίδρασης, με χρήση του kit PCR purification (Υλικά κ' Μέθοδοι, κεφ.:2.2.4) και η συγκέντρωσή του προσδιορίστηκε με Nanodrop 2000.



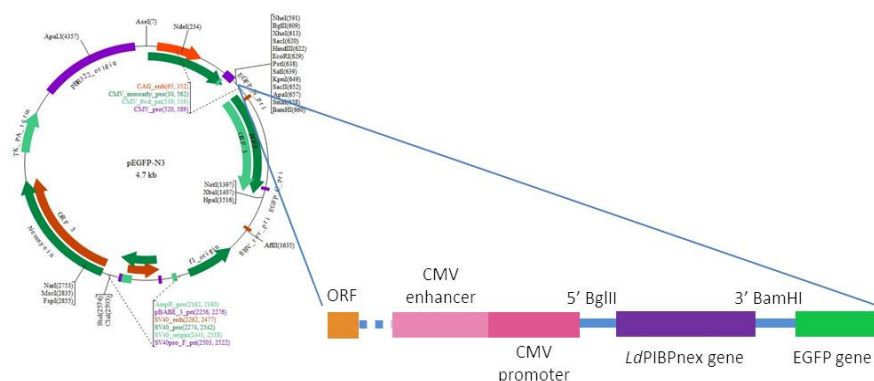
Εικόνα 3.1: (Αριστερά) Βελτιστοποίηση των συνθηκών της ενίσχυσης με PCR της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου που κωδικοποιεί την *LdPIBPnex* με υπόστρωμα μήτρα DNA γενωμικό υλικό από προμαστιγωτά *L. donovani* (στέλεχος LG13). (Δεξιά) Παρασκευαστική PCR με τις βέλτιστες συνθήκες ενίσχυσης του γονιδίου που κωδικοποιεί την *LdPIBPnex*, για απομόνωση και καθαρισμό του ενθέματος.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε πέψη του πλασμιδιακού φορέα pEGFP-N3, καθώς και του καθαρισμένου ενθέματος του γονιδίου της *LdPIBPnex* που απομονώθηκε από την αντίδραση PCR, με τα περιοριστικά ένζυμα κοπής BglII (5' άκρο) και BamHI (3' άκρο), προκειμένου οι αλληλουχίες του πλασμιδίου και του ενθέματος να αποκτήσουν κοινά άκρα κοπής/συρραφής.

Τα επόμενα βήματα για την πραγματοποίηση της κλωνοποίησης ήταν: α) αποφωσφορυλίωση του 5' άκρου του πλασμιδίου μετά από την πέψη με τα ένζυμα BglII και BamHI ώστε να αποφευχθεί επανασύνδεση των δύο ανοικτών άκρων του σε περίπτωση που δεν έχει γίνει ποσοτική πέψη και με τα δύο ένζυμα και β) σύνδεση του ενθέματος με το «ανοικτό» αποφωσφορυλιωμένο πλασμίδιο, με χρήση του ενζύμου T4 DNA λιγάσης (Υλικά κ' Μέθοδοι, κεφ.: 2.7.5 -6 -7 -8).



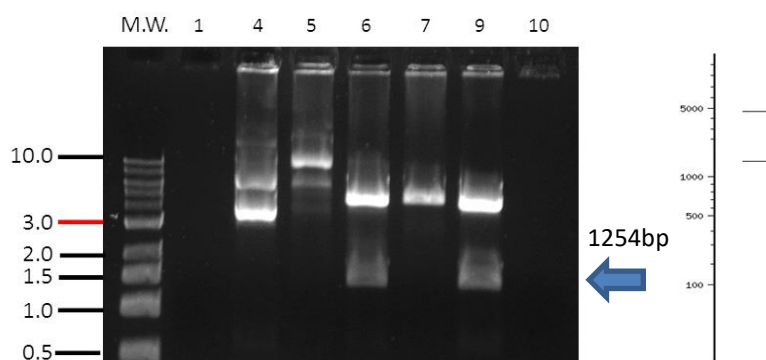
Εικόνα 3.2: (Αριστερά) Πέψη του ενθέματος του γονιδίου της *LdPIBPnex* και του πλασμιδίου pEGFP-N3 με τα ένζυμα περιορισμού BglII και BamHI. (Δεξιά) Αντίδραση σύνδεσης (ligation) του τμήματος DNA με την αλληλουχία του *ldpibp_{nex}* με το αποφωσφορυλιωμένο ανοικτό πλασμίδιο pEGFP-N3 και σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα (η αντίδραση σύνδεσης έγινε απουσία ενθέματος).



Εικόνα 3.3: Πλασμίδιο pEGFP-N3-*LdPIBPnex*. Η περιοχή ένθεσης του γονιδίου της *LdPIBPnex* (*LdPIBPnex*) παρουσιάζεται με σκούρο μωβ χρώμα.

Η επιλογή θετικών κλώνων *E. Coli* που φέρουν το πλασμίδιο pEGFP-N3-*LdPIBPnex* έγινε με μετασχηματισμό επιδεικτικών στελεχών *E. coli* TOP10F' με υλικό από τις αντιδράσεις λιγάσης όπως περιγράφηκε ήδη στις μεθόδους (παράγραφος 2.2.8). Περίπου 20 αποικίες επιλέχθηκαν από κάθε τρυβλίο με μετασχηματισμένα βακτηριακά κύτταρα και με αυτές ενοφθαλμίστηκαν 20 υγρές καλλιέργειες μικρού όγκου (3 mL) θρεπτικού μέσου LB με το κατάλληλο αντιβιοτικό (καναμυκίνη) και επώασθηκαν για 16 ώρες στους 37°C.

Από κάθε υποψήφια θετική καλλιέργεια απομονώθηκε πλασμιδιακό DNA σύμφωνα με πρωτόκολλο για απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας (παράγραφος 2.2.10). Ο έλεγχος του πλασμιδίου για παρουσία του σωστού ενθέματος έγινε με διπλή πέψη του πλασμιδιακού DNA κάθε κλώνου με τα ένζυμα περιορισμού BglII και BamHI (Μέθοδοι, παράγραφος 2.2.6). Με την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης αναμένεται να εμφανιστούν δυο ζώνες για κάθε δείγμα θετικού κλώνου. Μία που αντιπροσωπεύει τον πλασμιδιακό φορέα και μία το ένθεμα (εικόνα 3.4). Τα αναμενόμενα μεγέθη (αριθμός ζευγών βάσεων) του φορέα και του ενθέματος, μετά την πέψη του πλασμιδίου με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες BglII και BamHI, προβλέπονται από τον υπολογιστικό αλγόριθμο NEBcutter2, σύμφωνα με τη θεωρητική αλληλουχία του κάθε πλασμιδίου.



Εικόνα 3.4: (Αριστερά) Πέψη πλασμιδιακών κλώνων με τα ένζυμα περιορισμού BglII και BamHI και έλεγχος για ενσωμάτωση του ενθέματος *LdPIBPnex*. (Δεξιά) Γραφική αναπαράσταση των αναμενόμενων μεγεθών του πλασμιδιακού φορέα και του ενθέματος, μετά την πέψη του πλασμιδίου με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες BglII και BamHI.

Μετά την επιλογή δύο θετικών βακτηριακών αποικιών (κλώνοι 6, 9) απομονώθηκε πασμιδιακό DNA από μικρής κλίμακας καλλιέργειες αυτών των κλώνων (Μέθοδοι παράγραφος 2.2.10) και δείγματα στάλθηκαν για αλληλούχιση με 3 διαφορετικούς εκκινητές: τον πρόσθιο και ανάστροφο εκκινητή που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση PCR για την παραγωγή του ενθέματος *LdPIBP_{nex}* και τον εκκινητή EcoRI (TCGAAGGGGTGC) που υβριδίζεται σε αλληλουχία που ξεκινά από την βάση 794 του γονιδίου *LdPIBP_{nex}*. Τα τελικά αποτελέσματα από την αλληλούχιση των δύο κλώνων παρατίθενται στην εικόνα 3.5. Μετάφραση της αλληλουχίας DNA των δύο θετικών κλώνων παρατίθεται στην Εικόνα 3.6 .

Οι αλληλουχίες DNA των κλώνων 6 και 9 για το γονίδιο της *LdPIBP_{nex}* βρέθηκαν να είναι ταυτόσημες με την αναμενόμενη.

Αφότου επαληθεύτηκε η σωστή ενσωμάτωση του ενθέματος με το γονίδιο *LdPIBP_{nex}* στο πλασμίδιο pEGFP-N3, οι βακτηριακές καλλιέργειες που περιείχαν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, όσο και τα διαλύματα καθαρισμένου πλασμιδίου, αποθηκεύθηκαν στους -80 °C και στους -20 °C αντίστοιχα. Ο απώτερος στόχος της ένθεσης του γονιδίου της *LdPIBP_{nex}* στο pEGFP-N3 είναι η χρήση του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου σε πειράματα διαμόλυνσης κυτταρικών σειρών θηλαστικών, προκειμένου να γίνει εντοπισμός της ετερόλογα έκφρασμένης πρωτεΐνης. Από τον εντοπισμό θα μπορούσαμε να κάνουμε κάποιες υποθέσεις για την λειτουργία της *LdPIBP_{nex}* και έτσι να σχεδιάσουμε πειράματα για την μελέτη της δράσης της.

Κλώνος 6

ATG**G**CCCGCCGGCAACTCCATCTCTGTAAAGGTGGATGTGCCGT
CCCAGGTGAAGGGCCAGGGCACTCTGGAGATGTCGTAACATACAT
CTACCCCATCAGCATGCGCTTGGCTTTATGAGCGATGCTC
GGTTCAACCGGCGGTACACCGACTTTGAGACTCTGCGCGGCCA
GCTGTGTGCGACCTACTGGTACTGCATTGTGCCACCCATTCCAG
AGAAGGAGTCCGGTGAGGATAAGCTGGGAAAGCTGCCACGCA
TGGTGGCGTCCGGGAAGGAGACGACCGCTCCGAGGGCGACC
TGCTCGAGTACCGTCTGTATCAGCTGCGGCGCTTCTCGACGG
GCTTGCTACCCATCCTGGGCAAGTCTGACCTTTCTACAGA
AGTTACGAAACGATAACGAGTGGCGCCAGTGCCTCGCGACCC
GGTGAAGCGCCTCGCTTTATCGTGTCTGCTGCTGGAGGAG
ATCGCAGATCATGGGCTCCGTCAAGCAGTGCCTTGGCGCCG
GTACTCAAGGTAGCGGTGGCGCTGCGGGGGTGGTGGCGTTA
GCCAAACCGGAGCGGCGTATCAGTTGGCACTGACTCAAGAGCC
AGTGGATGAGCGACGTGGAGGGCGACAAGCGAGTACATTGG
TGAGCTGGAGTCTAACCTCAAGAGCATGCGCAACCTGCTGGAG
GCACTCGTGGATCGTACCGGCGCGCCGCTCCGCGGTGAGCA
ACTTCGCGCGCTCTTTGGGCTGCTTGGGAAGGCGAAGAGGA
TGCCGAGCTGCGCGCGCCATCGAAGGGGTGCGCACTGCGG
TCGCAAAAGTGGCAGATGTCTACAGCAAAACGCTGACAG**A**CGAG
TCGACGCGGCTTGTACGACGCTTAAGCTTTACGTGGGTATGTG
TGCCGCCGTGCGGGAGACTCTGAGCCACATGTTACGCGCCGCG
CAGTATCTGCGCAACTTGAGAAGAAGGGCCAGGAAGTGCAG
GCGTGGCGATGCGGGCACAGTGGCCAAACAGGTGCAGCTG
CAGAGCGAGCTGCACTTCTGTAATGAGCAGCGGGCCACCTCG
AGGAAGACCTCATGGGCGCCGAGAAGACCTTCAGCGAGGAAT
TTATTCTCTCCACGAAAACAAGCAATATGACGCCAAGGATATG
CTGAAGAAGTTTGGCATGCTGGAGCTCAGCTTCTCGAGTCTGAT
GAAGCAGGAGTGGGACGCCCTGCGGCAATGTTGGAGTCCCTT
GGCACAGGACCTGGAT**CC**

Κλώνος 9

ATG**G**CCCGCCGGCAACTCCATCTCTGTAAAGGTGGATGTGCCGT
CCCAGGTGAAGGGCCAGGGCACTCTGGAGATGTCGTAACATACAT
CTACCCCATCAGCATGCGCTTGGCTTTATGAGCGATGCTC
GGTTCAACCGGCGGTACACCGACTTTGAGACTCTGCGCGGCCA
GCTGTGTGCGACCTACTGGTACTGCATTGTGCCACCCATTCCAG
AGAAGGAGTCCGGTGAGGATAAGCTGGGAAAGCTGCCACGCA
TGGTGGCGTCCGGGAAGGAGACGACCGCTCCGAGGGCGACC
TGCTCGAGTACCGTCTGTATCAGCTGCGGCGCTTCTCGACGG
GCTTGCTACCCATCCTGGGCAAGTCTGACCTTTCTACAGA
AGTTACGAAACGATAACGAGTGGCGCCAGTGCCTCGCGACCC
GGTGAAGCGCCTCGCTTTATCGTGTCTGCTGCTGGAGGAG
ATCGCAGATCATGGGCTCCGTCAAGCAGTGCCTTGGCGCCG
GTACTCAAGGTAGCGGTGGCGCTGCGGGGGTGGTGGCGTTA
GCCAAACCGGAGCGGCGTATCAGTTGGCACTGACTCAAGAGCC
AGTGGATGAGCGACGTGGAGGGCGACAAGCGAGTACATTGG
TGAGCTGGAGTCTAACCTCAAGAGCATGCGCAACCTGCTGGAG
GCACTCGTGGATCGTACCGGCGCGCCGCTCCGCGGTGAGCA
ACTTCGCGCGCTCTTTGGGCTGCTTGGGAAGGCGAAGAGGA
TGCCGAGCTGCGCGCGCCATCGAAGGGGTGCGCACTGCGG
TCGCAAAAGTGGCAGATGTCTACAGCAAAACGCTGACAG**A**CGAG
TCGACGCGGCTTGTACGACGCTTAAGCTTTACGTGGGTATGTG
TGCCGCCGTGCGGGAGACTCTGAGCCACATGTTACGCGCCGCG
CAGTATCTGCGCAACTTGAGAAGAAGGGCCAGGAAGTGCAG
GCGTGGCGATGCGGGCACAGTGGCCAAACAGGTGCAGCTG
CAGAGCGAGCTGCACTTCTGTAATGAGCAGCGGGCCACCTCG
AGGAAGACCTCATGGGCGCCGAGAAGACCTTCAGCGAGGAAT
TTATTCTCTCCACGAAAACAAGCAATATGACGCCAAGGATATG
CTGAAGAAGTTTGGCATGCTGGAGCTCAGCTTCTCGAGTCTGAT
GAAGCAGGAGTGGGACGCCCTGCGGCAATGTTGGAGTCCCTT
GGCACAGGACCTGGAT**CC**

Εικόνα 3.5: Οι αναγνωσμένες αλληλουχίες του γονιδίου της *LdPIBP_{nex}* στους δύο θετικούς κλώνους (6 και 9). Με πράσινο bold έχουν σημειωθεί οι διαφορετικές βάσεις σε σύγκριση με την αναμενόμενη αλληλουχία του γονιδίου της *LdPIBP_{nex}* (*LdBP_K_352470.1*, TriTrypDB). Με bold έχουν σημειωθεί το έναρκτηριο κωδικώνιο και το κωδικώνιο λήξης.

MAAGNSISVKVDVPSQVKGQGTLE MSYYIYPITMRLPGFMSDARFNRRY TDFETLRGQLCATYWYCIVPIPEKE SVQDKLGKLP RMVASAKETTASEGD LLEYRRISLRRFLQRLAYHPILGKSDL LQKFTNDNEWQCTRD PVKPPRFIV SSSLEEIARSWAPSSSASGAGTQGS GGAAGGGGV SQTGAAYQLALTQEP VDEATWRATSEYIGELESNLKSMRN LLEALVDRHRRRAASAVSNFAASFGL LAEGEEDAELRGAIEGVRDCGRKVA DVYSKHADNESTRLVSTLSFYVGM AAVRETLSHMF SARQYLRNLQKKGQ ELQASAMRAQSANQVQLQSELHFV NEQRAHLEEDL Met GA E K T F S E E F I L F H E N K Q Y D A K D M L K K F G M L E L S F S E S M K Q E W D A L R P M L E S L G T	MAAGNSISVKVDVPSQVKGQGTLE MSYYIYPITMRLPGFMSDARFNRRY TDFETLRGQLCATYWYCIVPIPEKE SVQDKLGKLP RMVASAKETTASEGD LLEYRRISLRRFLQRLAYHPILGKSDL LQKFTNDNEWQCTRD PVKPPRFIV SSSLEEIARSWAPSSSASGAGTQGS GGAAGGGGV SQTGAAYQLALTQEP VDEATWRATSEYIGELESNLKSMRN LLEALVDRHRRRAASAVSNFAASFGL LAEGEEDAELRGAIEGVRDCGRKVA DVYSKHADNESTRLVSTLSFYVGT AAVRETLSHMF SARQYLRNLQKKG QELQASAMRAQSANQVQLQSELHF VNEQRAHLEEDLMGA E K T F S E E F I L F H E N K Q Y D A K D M L K K F G M L E L S F S E S M K Q E W D A L R P M L E S L G T
--	--

Εικόνα 3.6: Αλληλουχίες των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από το ένθεμα στους κλώνους 6 και 9 pEGFP-N3-*ldpib*_{nex}.

LdPIB _{nex} c1.6	MAAGNSISVKVDVPSQVKGQGTLEMSYYIYPITMRLPGFMSDARFNRRYTDFETLRGQLC MAAGNSISVKVDVPSQVKGQGTLEMSYYIYPITMRLPGFMSDARFNRRYTDFETLRGQLC *****	LdPIB _{nex} c1.9	MAAGNSISVKVDVPSQVKGQGTLEMSYYIYPITMRLPGFMSDARFNRRYTDFETLRGQLC MAAGNSISVKVDVPSQVKGQGTLEMSYYIYPITMRLPGFMSDARFNRRYTDFETLRGQLC *****
LdPIB _{nex} c1.6	ATYWYCIVPIPEKESVQDKLGKLP RMVASAKETTASEGDLLEYRRISLRRFLQRLAYHP ATYWYCIVPIPEKESVQDKLGKLP RMVASAKETTASEGDLLEYRRISLRRFLQRLAYHP *****	LdPIB _{nex} c1.9	ATYWYCIVPIPEKESVQDKLGKLP RMVASAKETTASEGDLLEYRRISLRRFLQRLAYHP ATYWYCIVPIPEKESVQDKLGKLP RMVASAKETTASEGDLLEYRRISLRRFLQRLAYHP *****
LdPIB _{nex} c1.6	ILGKSOLLQKFTNDNEWQCTRD PVKPPRFIVSSSLEEIARSWAPSSSASGAGTQSGGGA ILGKSOLLQKFTNDNEWQCTRD PVKPPRFIVSSSLEEIARSWAPSSSASGAGTQSGGGA *****	LdPIB _{nex} c1.9	ILGKSOLLQKFTNDNEWQCTRD PVKPPRFIVSSSLEEIARSWAPSSSASGAGTQSGGGA ILGKSOLLQKFTNDNEWQCTRD PVKPPRFIVSSSLEEIARSWAPSSSASGAGTQSGGGA *****
LdPIB _{nex} c1.6	AGGGGV SQTGAAYQLALTQEPVDEATWRATSEYIGELESNLKSMRN LLEALVDRHRRRAAS AGGGGV SQTGAAYQLALTQEPVDEATWRATSEYIGELESNLKSMRN LLEALVDRHRRRAAS *****	LdPIB _{nex} c1.9	AGGGGV SQTGAAYQLALTQEPVDEATWRATSEYIGELESNLKSMRN LLEALVDRHRRRAAS AGGGGV SQTGAAYQLALTQEPVDEATWRATSEYIGELESNLKSMRN LLEALVDRHRRRAAS *****
LdPIB _{nex} c1.6	AVSNFAASFGL LAEGEEDAELRGAIEGVRDCGRKVADVYSKHADNESTRLVSTLSFYVGM AVSNFAASFGL LAEGEEDAELRGAIEGVRDCGRKVADVYSKHADNESTRLVSTLSFYVGM *****	LdPIB _{nex} c1.9	AVSNFAASFGL LAEGEEDAELRGAIEGVRDCGRKVADVYSKHADNESTRLVSTLSFYVGM AVSNFAASFGL LAEGEEDAELRGAIEGVRDCGRKVADVYSKHADNESTRLVSTLSFYVGT *****
LdPIB _{nex} c1.6	CAAVRETLSHMF SARQYLRNLQKKGQELQASAMRAQSANQVQLQSELHFVNEQRAHLEED CAAVRETLSHMF SARQYLRNLQKKGQELQASAMRAQSANQVQLQSELHFVNEQRAHLEED *****	LdPIB _{nex} c1.9	CAAVRETLSHMF SARQYLRNLQKKGQELQASAMRAQSANQVQLQSELHFVNEQRAHLEED CAAVRETLSHMF SARQYLRNLQKKGQELQASAMRAQSANQVQLQSELHFVNEQRAHLEED *****
LdPIB _{nex} c1.6	LMGA E K T F S E E F I L F H E N K Q Y D A K D M L K K F G M L E L S F S E S M K Q E W D A L R P M L E S L G T LMGA E K T F S E E F I L F H E N K Q Y D A K D M L K K F G M L E L S F S E S M K Q E W D A L R P M L E S L G T *****	LdPIB _{nex} c1.9	LMGA E K T F S E E F I L F H E N K Q Y D A K D M L K K F G M L E L S F S E S M K Q E W D A L R P M L E S L G T LMGA E K T F S E E F I L F H E N K Q Y D A K D M L K K F G M L E L S F S E S M K Q E W D A L R P M L E S L G T *****

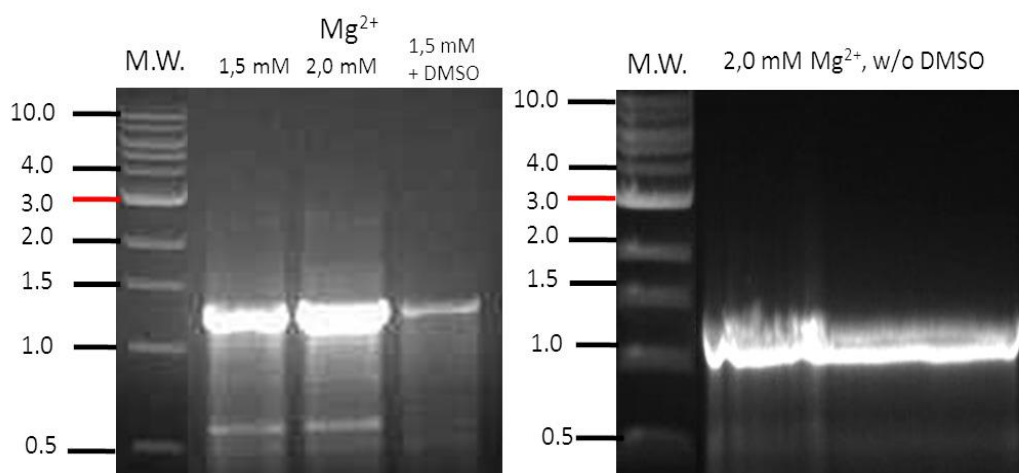
Εικόνα 3.7 : ClustalW σύγκριση της αμινοξικής αλληλουχίας της κλωνοποιημένης LdPIB_{nex}, με την αλληλουχία που προκύπτει από μετάφραση του γονιδίου LDBK_352470.1.

3.1.2 Κλωνοποίηση στο πλασμίδιο pLexsy-mCherry

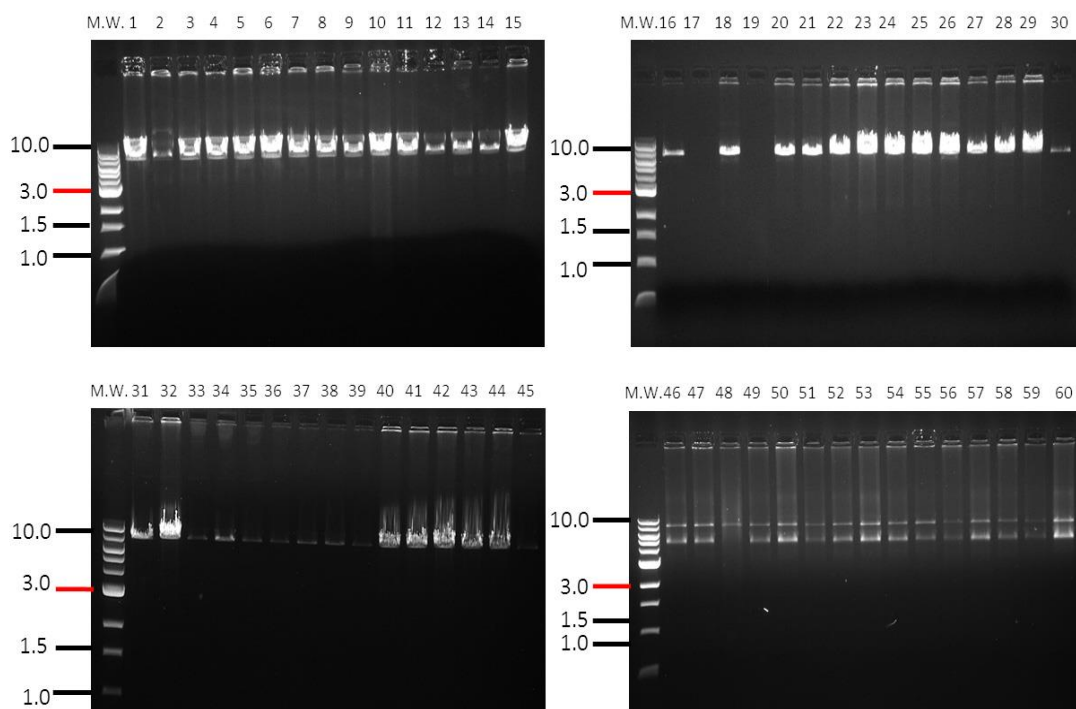
Προκειμένου να εκφραστεί η *LdPIBP_{nex}* σε παράσιτα *L. donovani* αγρίου τύπου έγινε προσπάθεια εισαγωγής του γονιδίου *ldpibp_{nex}* στο πλασμίδιο pLexsy-mCherry έτσι ώστε μετά από εισαγωγή του πλασμιδίου pLexsy-*ldpibp_{nex}*-mCherry στα προμαστιγωτά παράσιτα (Υλικά κ' Μέθοδοι κεφ.:2.8) να εκφραστεί η *LdPIBP_{nex}* ως υβριδική πρωτεΐνη με την mCherry στο C-τελικό της άκρο για εντοπισμό της με συνεστιακή μικροσκοπία σε προμαστιγωτά και αμαστιγωτά παράσιτα.

Ο απώτερος σκοπός της εισαγωγής και της κλωνοποίησης του ενθέματος της *LdPIBP_{nex}* στο πλασμίδιο pLexsy-mCherry, ήταν η μεταφορά του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου σε παράσιτα *L. donovani* αγρίου τύπου με πειράματα διαμόλυνσης (Υλικά κ' Μέθοδοι κεφ.:2.8) και η παρατήρηση με συνεστιακή μικροσκοπία της κατανομής της υπερεκφρασμένης πρωτεΐνης σε κύτταρα παρασίτων, μέσω της σύνδεσης της *LdPIBP_{nex}* με τη φθορίζουσα πρωτεΐνη mCherry. Όπως και προηγουμένως, αρχικά, πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση των συνθηκών της PCR για ενίσχυση του γονιδίου της *LdPIBP_{nex}* με τους κατάλληλους εκκινητές και αφότου επιλέχθηκαν οι βέλτιστες, παρασκευάστηκε μεγαλύτερη ποσότητα του ενθέματος, το οποίο καθαρίστηκε από τα ένζυμα πολυμερισμού και μετρήθηκε η συγκέντρωσή του (Υλικά κ' Μέθοδοι, παρ.:2.2.2).

Στη συνέχεια, η πέψη του πλασμιδιακού φορέα pLexsy-mCherry, καθώς και του καθαρισμένου ενθέματος του γονιδίου της *LdPIBP_{nex}*, πραγματοποιήθηκε με το περιοριστικό ένζυμο κοπής BglII στο 5' και στο 3' άκρο, προκειμένου οι αλληλουχίες του πλασμιδίου και του ενθέματος να αποκτήσουν συμπληρωματικά άκρα.



Εικόνα 3.8: (Αριστερά) Βελτιστοποίηση των συνθηκών της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) με υπόστρωμα την νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου της *LdPIBP_{nex}*. (Δεξιά) Παρασκευαστική PCR για την παραγωγή, απομόνωση και καθαρισμό του ενθέματος *ldpibp_{nex}*, με τις βέλτιστες συνθήκες της αντίδρασης.



Εικόνα 3.11: Πέψη των πλασμιδιακών κλώνων με το ένζυμο περιορισμού BglIII και έλεγχος για την ύπαρξη ενσωματωμένου ενθέματος της *LdPIBP_{nex}*.

Συνολικά εξετάστηκαν άνω από 100 κλώνοι χωρίς να βρεθεί κανένας θετικός για το ένθεμα *ldpibp_{nex}*.

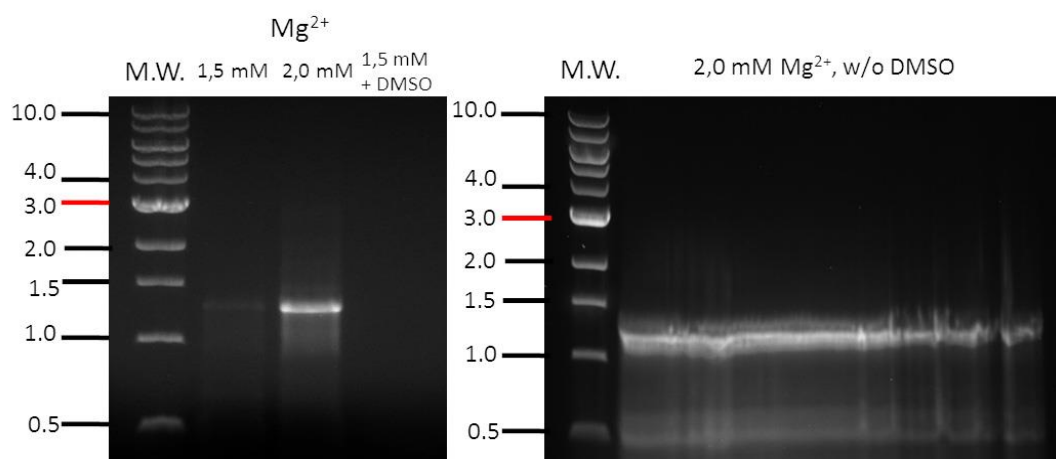
Λόγω της ανεπιτυχούς προσπάθειας δημιουργίας του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου *pLexsy-ldpibp_{nex}-mCherry* αποφασίσαμε να μελετήσουμε την κατανομή της ομόλογα εκφρασμένης *LdPIBP_{nex}* σε κύτταρα παρασίτων, με πειράματα ανοσοφθορισμού (Υλικά κ' Μέθοδοι κεφ.: 2.10) με χρήση ειδικού πολυκλωνικού αντισώματος (παρασκευασμένου στο εργαστήριο μας) έναντι του καρβοξυτελικού μισού της *LdPIBP_{nex}* εκφρασμένης σε βακτήρια ως υβριδική πρωτεΐνη με την Maltose binding protein (Α. Παπαδάκη, Χ. Μπολέτη, αδημοσίευτα αποτελέσματα)

3.1.3 Κλωνοποίηση στο πλασμίδιο pGEX4T-1

Προκειμένου να επαληθευτεί η ιδιότητα πρόσδεσης της *LdPIBP_{nex}* σε φωσφοϊνοσιτίδια αποφασίστηκε να γίνει κλωνοποίηση του γονιδίου *ldpibp_{nex}* στο πλασμίδιο pGEX4T-1 στο 3' άκρο του γονιδίου της πρωτεΐνης GST έτσι ώστε να εκφραστεί η GST-*LdPIBP_{nex}* πρωτεΐνη σε βακτήρια και να απομονωθεί με χρωματογραφία υψηλής συγγένειας. Αυτή η υβριδική πρωτεΐνη θα χρησιμοποιηθεί, σε μελλοντικές μελέτες πρόσδεσης της *LdPIBP_{nex}* σε φωσφοϊνοσιτίδια (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3786563/>) και σε πρωτόκολλα ανοσοκατακρήμνισης (pull down assays) προκειμένου να εντοπιστούν πιθανοί μοριακοί συνεργάτες της, στο παράσιτο ή/και στα μακροφάγα.

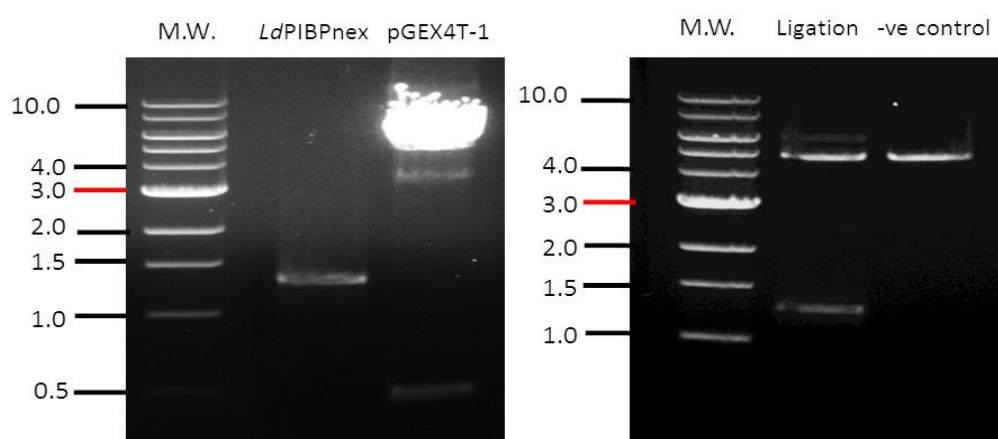
Ομοίως και σε αυτή τη σειρά πειραμάτων κλωνοποίησης του γονιδίου *ldpibp_{nex}*, αρχικά πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση των συνθηκών ενίσχυσης του γονιδίου

με τους κατάλληλους εκκινητές, που θα επιτρέψουν την εισαγωγή του στο πλασμίδιο pGEX4T-1. Μετά την επιλογή της βέλτιστης συνθήκης πολυμερισμού (2,0 mM Mg^{2+} , w/o DMSO), πραγματοποιήθηκε παρασκευαστική PCR, καθαρισμός του ενθέματος από τα ένζυμα πολυμερισμού και μέτρηση της συγκέντρωσης του σε ng/μl.



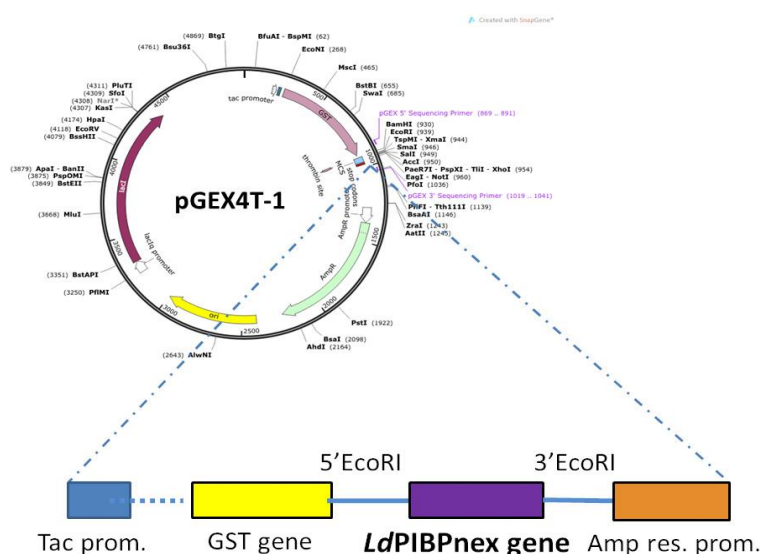
Εικόνα 3.12 : (Αριστερά) Βελτιστοποίηση των συνθηκών της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) με υπόστρωμα γενωμικό DNA από παράσιτα *L.donovani*, στελέχους LG13 WT. (Δεξιά) Παρασκευαστική PCR για την παραγωγή, απομόνωση και καθαρισμό του ενθέματος με το γονίδιο *ldpibpnex*, με τις βέλτιστες συνθήκες εκτέλεσης της αντίδρασης.

Στη συνέχεια, ακολούθησαν οι πέψεις του προϊόντος PCR με το γονίδιο *ldpibpnex* και του πλασμιδιακού φορέα pGEX4T-1 με το ένζυμο περιορισμού EcoRI στις θέσεις 5' και 3', προκειμένου το ένθεμα και το πλασμίδιο να αποκτήσουν συμπληρωματικά άκρα.



Εικόνα 3.13 : (Αριστερά) Πέψη του ενθέματος του γονιδίου της *LdPIBPnex* και του πλασμιδίου pGEX4T-1 με το ένζυμο περιορισμού EcoRI. (Δεξιά) Αντίδραση σύνδεσης (ligation) του τμήματος DNA της *LdPIBPnex* με το αποφωσφορυλιωμένο ανοικτό πλασμίδιο pGEX4T-1 και δίπλα ο αρνητικός μάρτυρας της αντίδρασης χωρίς το ένθεμα του γονιδίου της *LdPIBPnex*.

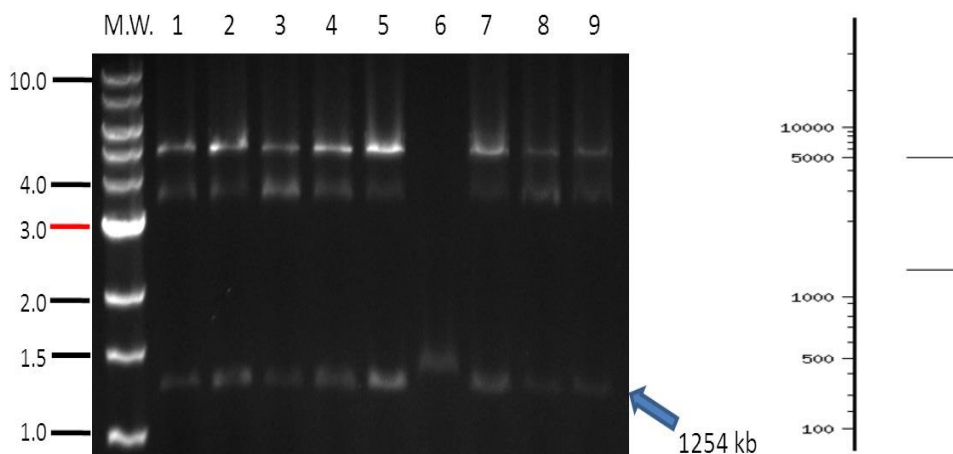
Έπειτα έγινε αποφωσφορυλίωση του 5' άκρου του πλασμιδίου, προς αποφυγή επανασύνδεσης των δύο ανοικτών άκρων του και ακολούθως, πραγματοποιήθηκε σύνδεση του ενθέματος με το πλασμίδιο, με χρήση του ενζύμου T4 DNA λιγάσης.



Εικόνα 3.14: Δομικά χαρακτηριστικά του πλασμιδίου pGEX4T-1 και της περιοχής ένθεσης του γονιδίου της *LdPIBPnex*.

Στη συνέχεια, ακολούθησε ο μετασχηματισμός (Υλικά κ' Μέθοδοι, παρ.:2.2.9) χημικά επιδεκτικών στελεχών *E. coli* TOP10F' με το ανασυνδιασμένο πλασμίδιο pGEX4T-1-*ldripbnex* με υλικό από τις αντιδράσεις λιγάσης. Περίπου 20 αποικίες επιλέχθηκαν από κάθε τρυβλίο με μετασχηματισμένα βακτηριακά κύτταρα και με αυτές ενοφθαλμίστηκαν 20 υγρές καλλιέργειες μικρού όγκου (3 mL) θρεπτικού μέσου LB με το κατάλληλο αντιβιοτικό (καναμυκίνη) και επωάσθηκαν για 16 ώρες στους 37°C.

Από κάθε υποψήφια θετική καλλιέργεια απομονώθηκε πλασμιδιακό DNA με πρωτόκολλο για απομόνωση μικρής κλίμακας πλασμιδιακού DNA. Ο έλεγχος του πλασμιδίου για παρουσία του σωστού ενθέματος έγινε με διπλή πέψη του πλασμιδιακού DNA κάθε κλώνου με το ένζυμο των θέσεων σύνδεσης του φορέα και του ενθέματος, EcoRI. Με την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης αναμένεται να εμφανιστούν δυο ζώνες για κάθε δείγμα θετικού κλώνου. Μία που αντιπροσωπεύει τον πλασμιδιακό φορέα και μία το ένθεμα. Τα αναμενόμενα μεγέθη (αριθμός ζευγών βάσεων) του φορέα και του ενθέματος, μετά την πέψη του πλασμιδίου με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI, προβλέπονται από τον υπολογιστικό αλγόριθμο NEBcutter2, σύμφωνα με τη θεωρητική αλληλουχία του κάθε πλασμιδίου.



Εικόνα 3.15: (Αριστερά) Πέψεις των πλασμιδίων pGEX4T-1-*ldpibp*_{nex} από καλλιέργειες θετικών βακτηριακών αποικιών με το ένζυμο EcoRI. (Δεξιά) Τα αναμενόμενα μεγέθη του φορέα και του ενθέματος (pGEX4T-1 και *ldpibp*_{nex} αντίστοιχα, μετά την πέψη του πλασμιδίου με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες.

Μετά την επιλογή του θετικού κλώνου 2, πασμιακό DNA που απομονώθηκε από μικρής κλίμακας βακτηριακή καλλιέργεια αυτού του κλώνου (Μέθοδοι παράγραφος 2.2.10) στάλθηκε για αλληλούχιση με 3 διαφορετικούς εκκινητές: τον πρόσθιο 5' pGEX4T-1 FOR, που υβριδίζεται με την αλληλουχία TATAGCATGGCCTTTGCAGG του πλασμιδίου pGEX4T-1, τον ανάστροφο εκκινητή 3' pGEX4T-1 REV, που υβριδίζεται στην CAGAGGTTTTACCGTTCATC αλληλουχία του πλασμιδίου και τον ενδιάμεσο εκκινητή EcoRI, που υβριδίζεται στην αλληλουχία CCGGAATTCATGGCCGCCGGCAACTCC του πλασμιδίου (936-962 bp). Τα τελικά αποτελέσματα από την αλληλούχιση του κλώνου και η μετάφραση της DNA αλληλουχίας του, παρατίθενται στις εικόνες 3.16 και 3.17.

```

ATGGCCGCCGCAACTCCATCTCTGTAAAGGTGGATGTGCCGTCCAGGTGAAGGGCCAGGGCACTCTGGAGATGTCGTACT
ACATCTACCCCATCAGATGCGCTTGCCTGGCTTTATGAGCGATGCTCGGTTCAACCGGCGGTACACCGACTTTGAGACTCTG
CGCGGCCAGCTGTGTGCGACCTACTGGTACTGCATTGTGCCACCCATTCCAGAGAAGGAGTCGGTGCAGGATAAGCTGGGAA
AGCTGCCACGCATGGTGGCGTCGGCGAAGGAGACGACCGCCTCCGAGGGCGACCTGCTCGAGTACCGTCTGATCAGCCTGC
GGCGCTTCTGACAGCGGCTTGCCTACACCCCATCCTGGGCAAGTCTGACCTTCTACAGAAATTACGAACGATAACGAGTGG
CGCCAGTGCACCTCGCGACCCGGTGAAGCCGCCTCGCTTTATCGTGTCTGCTGCTGGAGGAGATCGCCAGATCATGGGCTC
CGTCAAGCAGTGCCTCTGGCGCCGCTACTCAAGGTAGCGGTGGCGCTGCCGGGGGTGGTGGCGTTAGCCAAACCGGAGCGG
CGTATCAGTTGGCACTGACTCAAGAGCCAGTGGATGAGGCGACGTGGAGGGCGACAAGCGAGTACATTGGTGAGCTGGAGT
CTAACCTCAAGAGCATGCGCAACCTGCTGGAGGCACTCGTGGATCGTCACCGGCGCGCCGCTCCGCCGTGAGCAACTTCGC
CGCCTCTTTGGGCTGCTTGCAGGAAGGCGAAGGAGTGGCGAGCTGCGCGGCCCATCGAAGGGGTGCGCGACTGCGGTGCG
CAAAGTGGCAGATGTCTACAGCAAACACGCTGACAGGAGTTCGACGCGGCTTGTGACGACGTTAAGCTTTACGTGGGTATG
TGTGCCGCCGTGCGGGGACTCTGAGCCACATGTTACGCGCCCGCCAGTATCTGCGCAACTTGCAGAAAGGGCCAGGAAC
TGCAGGCGTCGGCGATGCGGGCACAGTCGGCCAACAGGTGCAGCTGCAGAGCGAGCTGCACTTCGTGAATGAGCAGCGG
GCCACCTCGAGGAAGACCTCATGGGCGCCGAGAAGACCTTCAGCGAGGAATTTATTCTTCCACGAAACAAGCAATATG
ACGCCAAGGATATGCTGAAGAAGTTTGGCATGCTGGAGCTCAGCTTCTGAGTCGATGAAGCAGGAGTGGGACGCCCTGC
GGCAATGTTGGAGTCCCTTGGCACA

```

Εικόνα 3.16: Η αλληλουχία του κλωνοποιημένου *ldpibp*_{nex} στο πλασμίδιο pGEX4T-1. Με πράσινο και κόκκινο είναι σημειωμένες οι διαφορετικές βάσεις σε σύγκριση με την αλληλουχία του γονιδίου της *LdPIBP*_{nex} από την βιβλιογραφία (TriTryp DB, LdBPK_352470.1).

Η αλληλουχία DNA του γονιδίου της *LdPIBPnex* στον κλώνο 2 είναι σχεδόν ταυτόσημη με την αναμενόμενη με μόνο 3 διαφορετικές βάσεις (εικόνα 3.16, δίνοντας ένα προϊόν 1264 βάσεων που μεταφράζεται σε αμινοξική αλληλουχία που παρουσιάζεται στην εικόνα 3.17 αριστερά.

	LdPIBPnex c1.2	MAAGNSISVKVDVPSQVKGGQTLEMSYYIYPITMRLPGFMSDARFNRRYDFETLRGQLC MAAGNSISVKVDVPSQVKGGQTLEMSYYIYPITMRLPGFMSDARFNRRYDFETLRGQLC *****
MAAGNSISVKVDVPSQVKGGQTLE MSYYIYPITMRLPGFMSDARFNRRY TDFETLRGQLCATYWYCIVPPIPEKE SVQDKLGKLP RMVASAKETTASEG DLLEYRRISLRRLQRLAYHPILGKS DLLQKFTNDNEWRQCTRDVPKPPR FIVSSSLEEIARSWAPSSASGAGTQ GSGGAAGGGVSGTGAAYQLALTQ EPVDEATWRATSEYIGELSNLKS RNLLEALVDRHRAASAVSNFAASF GLLAEGDEDAELRGAIEGVDRDCGRK VADVSKHADSESTRLVSTLSFYVG MCAAVRVTLSHMFARQYLRLNLQK KGQELQASAMRAQSANQVQLQSEL HFNVEQRAHLEEDLMGAECTFSEEF ILFHENKQYDAKMDLKKFGMLELSF SESMKQEWDAALRPMLES LGT	LdPIBPnex c1.2	ATYWCIVPPIPEKESVQDKLGKLP RMVASAKETTASEGDLLEYRRISLRRLQRLAYHP ATYWCIVPPIPEKESVQDKLGKLP RMVASAKETTASEGDLLEYRRISLRRLQRLAYHP *****
	LdPIBPnex c1.2	ILGKSDLLQKFTNDNEWRQCTRDVPKPPRFIVSSSLEEIARSWAPSSASGAGTQSGGGA ILGKSDLLQKFTNDNEWRQCTRDVPKPPRFIVSSSLEEIARSWAPSSASGAGTQSGGGA *****
	LdPIBPnex c1.2	AGGGGVSGTGAAYQLALTQEPVDEATWRATSEYIGELSNLKS MRNLLEALVDRHRAAS AGGGGVSGTGAAYQLALTQEPVDEATWRATSEYIGELSNLKS MRNLLEALVDRHRAAS *****
	LdPIBPnex c1.2	AVSNFAASFGLLAEGDEDAELRGAIEGVDRDCGRKVADVSKHADSESTRLVSTLSFYVG AVSNFAASFGLLAEGDEDAELRGAIEGVDRDCGRKVADVSKHADSESTRLVSTLSFYVG *****
	LdPIBPnex c1.2	CAAVRETLSHMFARQYLRLNLQKKGQELQASAMRAQSANQVQLQSELHFNVEQRAHLEED CAAVRVTLSHMFARQYLRLNLQKKGQELQASAMRAQSANQVQLQSELHFNVEQRAHLEED *****
	LdPIBPnex c1.2	LMGAECTFSEEFILFHENKQYDAKMDLKKFGMLELSFSESMKQEWDAALRPMLES LGT LMGAECTFSEEFILFHENKQYDAKMDLKKFGMLELSFSESMKQEWDAALRPMLES LGT *****

Εικόνα 3.17: (Αριστερά) Η αμινοξική αλληλουχία της κλωνοποιημένης *LdPIBPnex* από το στέλεχος *L. donovani* LG13. (Δεξιά) Σύγκριση των αμινοξικών αλληλουχιών της κλωνοποιημένης *LdPIBPnex* με την αντίστοιχη από τη βάση δεδομένων (TriTryp DB, LdBPK_352470.1).

Σύμφωνα με την βιοπληροφορική ανάλυση της σύγκρισης των αμινοξικών αλληλουχιών του κλωνοποιημένου μορίου της *LdPIBPnex* με την αντίστοιχη από την βιβλιογραφία (LDBK_352470.1), παρατηρήθηκαν τρεις διαφορές στην αμινοξική αλληλουχία (D^{256} αντί για E^{256} , S^{285} αντί για N^{285} και V^{306} αντί για E^{306}). Οι αλλαγές αυτές μάλλον οφείλονται σε λάθη στην αλληλούχιση του DNA του συγκεκριμένου κλώνου ή της πολυμεράσης κατά την ενίσχυση του γονιδίου *ldpibp_{nex}* με την PCR. Η αλλαγή από γλουταμινικό σε ασπαραγινικό (D^{256} αντί για E^{256}) δεν μας ανησυχεί ιδιαίτερα, λόγω του ότι και τα δύο αμινοξέα έχουν όξινες πλευρικές αλυσίδες και επιπλέον η αλλαγή αυτή βρίσκεται εκτός των περιοχών των μοτίβων PX και SNX-BAR. Όμως, οι αλλαγές S^{285} σε N^{285} και V^{306} σε E^{306} είναι ιδιαίτερης σημασίας καθώς και οι δύο αλλαγές βρίσκονται στην περιοχή του SNX-BAR μοτίβου και επίσης τα διαφορετικά αμινοξέα περιέχουν πλευρικές αλυσίδες με διαφορετικές ιδιότητες, σε σχέση με τις πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων που τροποποιούν και μπορεί κάτι τέτοιο να επιδρά στις λειτουργικές ικανότητες της πρωτεΐνης *LdPIBPnex*. Επαλήθευση της αλληλούχισης του DNA του κλώνου αυτού θα γίνει πριν το πλασμίδιο χρησιμοποιηθεί σε πειράματα έκφρασης της πρωτεΐνης για λειτουργικές της μελέτες.

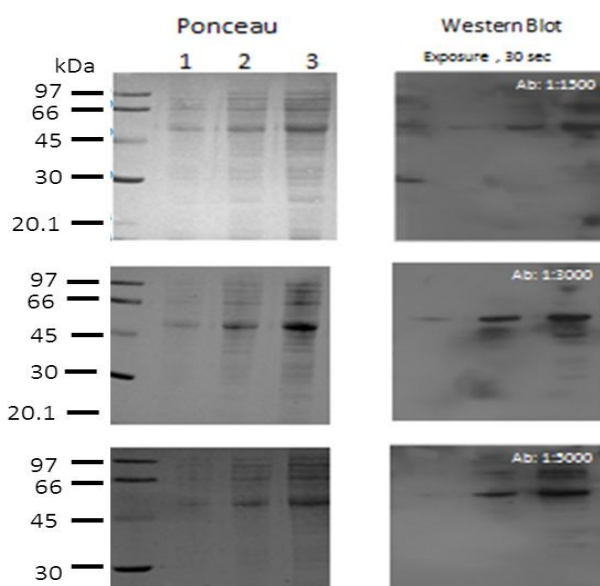
Αφότου επαληθεύτηκε η σωστή ενσωμάτωση του ενθέματος της *LdPIBPnex* στο πλασμίδιο pGEX4T-1, οι βακτηριακές καλλιέργειες που περιείχαν το

ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, όσο και τα διαλύματα καθαρισμένου πλασμιδίου, αποθηκεύτηκαν στους -80 °C και στους -20 °C αντίστοιχα.

3.2 Μοριακός και βιοχημικός χαρακτηρισμός της *LdPIBPnex*. Διερεύνηση της έκφρασης και έκκρισής της σε καλλιέργειες προμαστιγωτών κυττάρων του παρασίτου *Leishmania donovani*

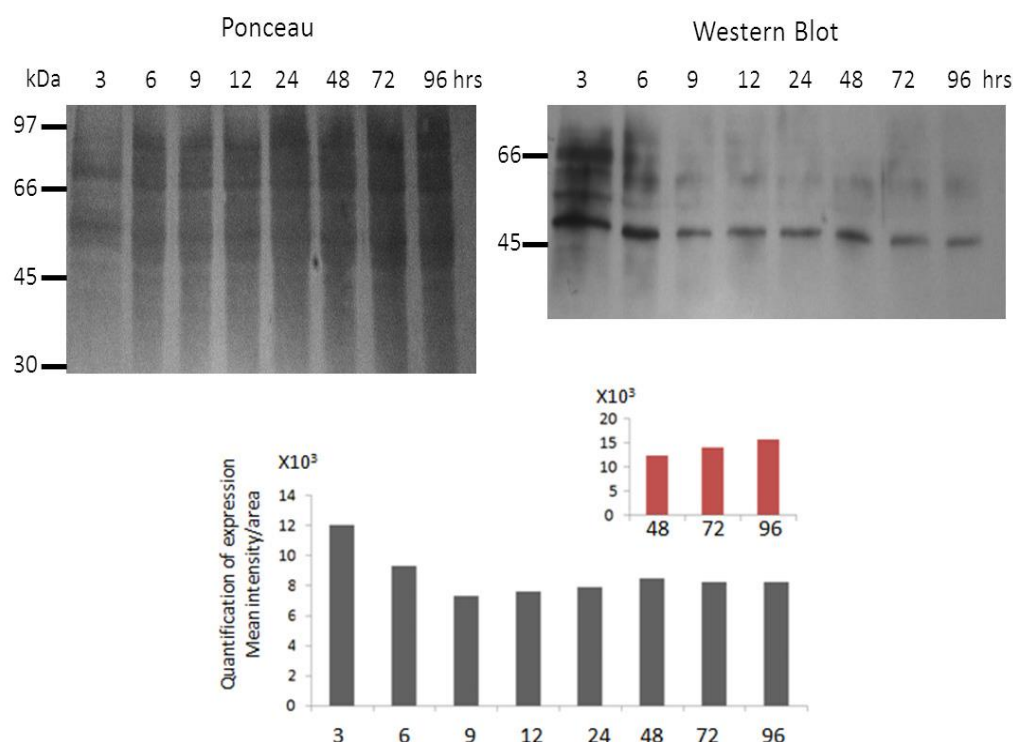
3.2.1 Επιβεβαίωση έκφρασης της πρωτεΐνης *LdPIBPnex* από προμαστιγωτά παράσιτα *Leishmania donovani*

Το πρωτεϊνικό προϊόν του γονιδίου *LdBPK_352470.1* που εντοπίστηκε σε πρωτεομική μελέτη για την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών που εκκρίνονται από το παράσιτο *Leishmania donovani* (J.Maxwell Silverman et al., 2008), κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη με 417 α.α. και υπολογιζόμενη μοριακή μάζα 46,6 KDa. Θελήσαμε να επαληθεύσουμε την έκφραση της πρωτεΐνης αυτής από προμαστιγωτά *L. donovani* του στελέχους LG13 με βιοχημικές μεθόδους. Αρχικά έγινε έλεγχος με ανοσοαποτύπωση Western σε ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα από προμαστιγωτά κύτταρα του παρασίτου. Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκε ειδικό πολυκλωνικό αντίσωμα από κουνέλι που είχε παρασκευαστεί ήδη στο εργαστήριο (Α. Παπαδάκη, αδημοσίευτα αποτελέσματα) έναντι του καρβοξυτελικού μισού της *LdPIBPnex*. Σαν πρώτο βήμα ελέγχθηκε η βέλτιστη συγκέντρωση του αντισώματος μετά από καθαρισμό του ορού για τα πειράματα ανοσοαποτύπωσης (Υλικά κ' Μέθοδοι, κεφ.: 2.4).



Εικόνα 3.18: Ανοσοαποτύπωση Western τριών δειγμάτων ολικού εκχυλίσματος προμαστιγωτών κυττάρων *L. donovani* από $3,7 \times 10^6$ (1) $7,5 \times 10^6$ (2), 15×10^6 (3) κύτταρα αντίστοιχα. Τα ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν σε 12% w/v SDS PAGE και οι πρωτεΐνες στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Υλικά κ' Μέθοδοι, κεφ.: 2.4). Οι διαφορετικές αραιώσεις αντισώματος α-*LdPIBPnex* συγκέντρωσης 110 ng/μl (1/1500, 1/3000 και 1/5000) που χρησιμοποιήθηκαν αναγράφονται στις εικόνες των blots. Η ανίχνευση της αντίδρασης του αντισώματος έγινε με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας ECL με έκθεση του φιλμ για 30 sec.

Αφότου επαληθεύτηκε η έκφραση της πρωτεΐνης και προσδιορίστηκε η βέλτιστη αραίωση χρήσης του αντισώματος (1/3000), στη συνέχεια έγινε έλεγχος των επιπέδων έκφρασης της *LdPIBPnex*, από προμαστιγωτά παράσιτα *L. donovani* LG13 WT, κατά τα διάφορα στάδια ανάπτυξης του παρασίτου. Δείγματα από καλλιέργειες παρασίτων συλλέχθηκαν ανά συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα μετά από αραίωση 1:10 στατικής καλλιέργειας προμαστιγωτών, φωτομετρήθηκαν προκειμένου να προσδιορισθεί ο αριθμός των κυττάρων που περιέχουν και αναλύθηκαν σε πηκτή ακρυλαμιδίου (SDS PAGE) για ανοσοαποτύπωση Western.



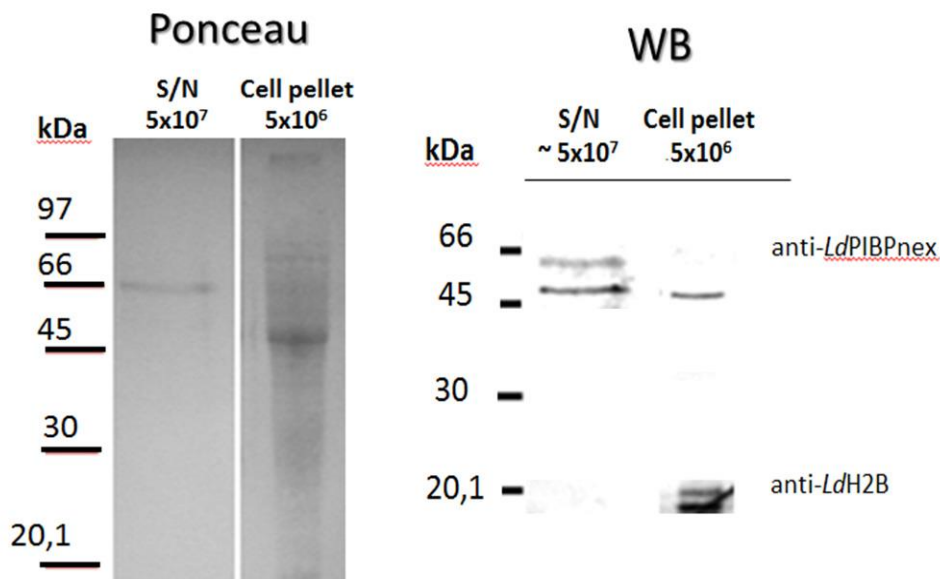
Εικόνα 3.20: Ανοσοαποτύπωση Western ολικών εκχυλισμάτων προμαστιγωτών κυττάρων *L. donovani*, από διαφορετικές φάσεις ανάπτυξης του στην καλλιέργεια. Η ανάλυση των πρωτεϊνών έγινε με SDS-PAGE 12% w/v και WB. Αριστερά, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης μετά από χρώση με Ponceau. Δεξιά, η μεμβράνη μετά από επώαση με το anti-*LdPIBPnex* αντίσωμα (αραίωση 1/3000) και ανίχνευση της αντίδρασης με ECL. Κάτω, η ποσοτικοποίηση της έκφρασης του γονιδίου της *LdPIBPnex*, με μέτρηση της μέσης έντασης του σήματος ανά δείγμα με τον υπολογιστικό αλγόριθμο Fiji.

Παρατηρήθηκε ότι η *LdPIBPnex* εκφράζεται στη λογαριθμική και στη στατική φάση ανάπτυξης του προμαστιγωτού παρασίτου στην καλλιέργεια, με μία πιο έντονη έκφραση στην αρχή της ανάπτυξης (lag phase), κάτι που θα συνηγορούσε για έναν πιθανό ρόλο στην S φάση του κυτταρικού κύκλου του παρασίτου στην κυτταροκαλλιέργεια.

3.2.2 Επιβεβαίωση της έκκρισης της πρωτεΐνης *LdPIBPnex* από παράσιτα *L. donovani*

Γνωρίζουμε από την βιβλιογραφία (J.Maxwell Silverman et al., 2008), ότι η πρωτεΐνη *LdPIBPnex* αποτελεί μια από τις πρωτεΐνες του συνόλου των εκκρινόμενων πρωτεϊνών του παρασίτου *L. donovani* (secretome) που εκκρίνεται αρκετά αποτελεσματικά. Θελήσαμε να επιβεβαιώσουμε αυτά τα αποτελέσματα με το στέλεχος *L. donovani* LG13 σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες. Τη θερμοκρασία των 25 °C που παρομοιάζει τις συνθήκες στο σώμα του ασπόνδυλου ξενιστή όπου το παράσιτο βρίσκεται στην προμαστιγωτή εξωκυττάρια μορφή του και εκείνη των 37 °C, θερμοκρασία του ανθρώπου ξενιστή στα αρχικά στάδια της λοίμωξης, όταν το παράσιτο βρίσκεται ακόμα στην προμαστιγωτή μορφή του.

Προμαστιγωτά κύτταρα *L. donovani* σε καλλιέργεια συλλέχθηκαν σε στατική φάση ανάπτυξης και επώαστηκαν στους 25 °C για 6 ώρες σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS. Μέσω φυγοκέντρησης, διαχωρίστηκε και απομονώθηκε το υπερκείμενο διάλυμα, που περιέχει το εκκρινόμενο υλικό του παρασίτου και οι πρωτεΐνες του υπερκείμενου κατακρημνίστηκαν με χρήση διαλύματος ακετόνης (Υλικά κ' Μέθοδοι, κεφ.:2.7). Το πρωτεϊνικό δείγμα αναλύθηκε με SDS-PAGE και Western Blot χρησιμοποιώντας το πολυκλωνικό anti-*LdPIBPnex* αντίσωμα και αντίσωμα για μια πυρηνική (ενδοκυττάρια) πρωτεΐνη την Ιστονίνη H2B για να ελέγξουμε αν υπάρχει λύση κυττάρων και αν ενδοκυττάρια πρωτεΐνες συλλέγονται στο υπερκείμενο λόγω λύσης των κυττάρων.



Εικόνα 3.21: Ανοσοστύπωμα Western του υπερκείμενου/εκκρινόμενου υλικού καλλιέργειας *L. donovani* LG13 έπειτα από επώαση προμαστιγωτών κυττάρων στους 25 °C για 6 ώρες απουσία FBS. Η μεμβράνη νιτροκυταρίνης επώαστηκε με το καθαρισμένο αντίσωμα anti-*LdPIBPnex* (αραίωση 1/3000) και με τον ορό anti-*LdH2B* (αραίωση 1/1000) ως μάρτυρα.

Στη θερμοκρασία των 25 °C, σε συνθήκες δηλαδή όπου το παράσιτο βρίσκεται στην εξωκυττάρια προμαστιγωτή του μορφή, παρατηρήθηκε πως η πρωτεΐνη *LdPIBPnex*

εμφανίζεται στο αναμενόμενο μοριακό βάρος ~ 46 kDa, στο υπερκείμενο διάλυμα ως εκκρινόμενη. Παράλληλα, η *LdPIBPnex*, όπως αναμενόταν ανιχνεύτηκε και ως ενδοκυττάρια στο κυτταρικό κλάσμα.

Αντίστοιχα πειράματα για τον έλεγχο έκκρισης της *LdPIBPnex* από την προμαστιγωτή μορφή στους 37 °C, δεν έδωσαν κάποιο αξιόπιστο αποτέλεσμα. Η μελέτη έκκρισης στους 37 °C θα επαναληφθεί μελλοντικά.

3.3 Υποκυτταρικός εντοπισμός της πρωτεΐνης στο παράσιτο

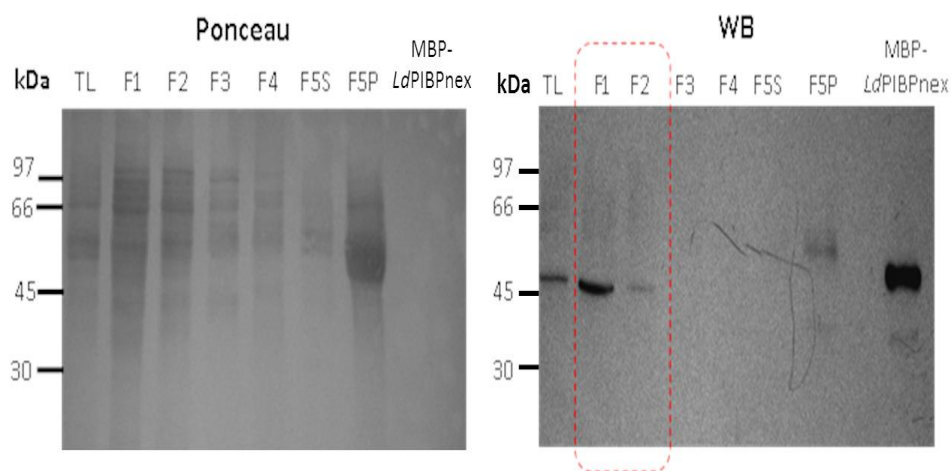
***L. donovani*, στην προμαστιγωτή μορφή του αναπτυξιακού του κύκλου**

3.3.1 Εντοπισμός της *LdPIBPnex* σε υποκυτταρικά κλάσματα μετά από κλασματοποίηση με διγινονίνη

Ένα επιπλέον ερώτημα που τέθηκε στην παρούσα διατριβή αφορά τον υποκυτταρικό εντοπισμό της πρωτεΐνης *LdPIBPnex*. Ένας πρώτος τρόπος απάντησης του ερωτήματος είναι η κλασματοποίηση ολικού εκχυλίσματος προμαστιγωτών κυττάρων *L. donovani* (στέλεχος LG13 WT) με χρήση του απορρυπαντικού διγινονίνη. Έχει δειχθεί, ότι η επεξεργασία κυττάρων με διγινονίνη διαλυτοποιεί αποτελεσματικά λιπίδια, όπως η χοληστερόλη, καθιστώντας έτσι διαπερατή την κυτταρική μεμβράνη αλλά και τις μεμβράνες των οργανιδίων των κυττάρων.

Ανάλογα με τη συγκέντρωσή της στο δείγμα λαμβάνονται πρωτεΐνες από διαφορετικά τμήματα του κυττάρου (κλάσματα) ξεκινώντας από τις διαλυτές (κυτταροπλασματικές), στη συνέχεια τις πρωτεΐνες οργανιδίων, μιτοχονδρίων, τις κυτταροσκελετικές, και τέλος, τις μεμβρανικές και πυρηνικές.

Ακολουθώντας την πειραματική τεχνική που περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά κ' Μέθοδοι, κεφ.:2.6, προμαστιγωτές μορφές του παρασίτου κατά την στατική φάση ανάπτυξής τους μετά από φυγοκέντρηση και αναδιάλυση σε ρυθμιστικό διάλυμα με σταδιακά αυξανόμενη συγκέντρωση διγινονίνης (20 μM, 200 μM, 1 mM και 10 mM) διαχωρίστηκαν σε πέντε κλάσματα, F1-F5. Τα κλάσματα F1 και F2 είναι εμπλουτισμένα σε διαλυτές πρωτεΐνες, τα F3 και F4 σε ενδοκυττάρια μεμβράνες και το F5 σε πρωτεΐνες της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, του κυτταροσκελετού και του πυρήνα. Το κλάσμα F5 μετά από επώαση με Triton X-100 διαχωρίζεται περαιτέρω στο διαλυτό κλάσμα F5S και στο αδιάλυτο ίζημα F5P. Περαιτέρω ανάλυση των κλασμάτων αυτών με SDS-PAGE και Western Blot με χρήση του ειδικού anti-*LdPIBPnex* αντισώματος έδειξε ότι η *LdPIBPnex* ανιχνεύεται στα κλάσματα F1 και F2 που είναι εμπλουτισμένα σε διαλυτές πρωτεΐνες του παρασίτου.

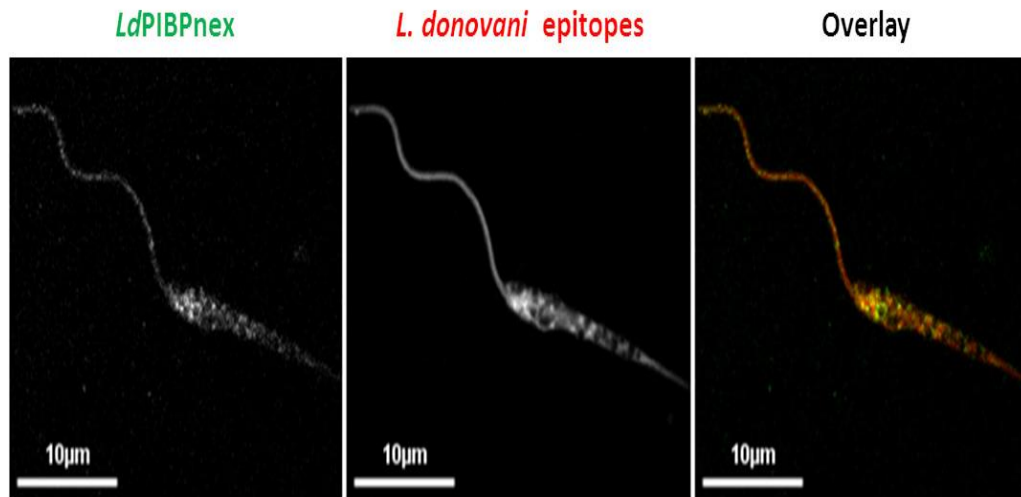


Εικόνα 3.22: Ανοσοστύπωμα Western των πρωτεϊνικών κλασμάτων διαλυμάτων προμαστιγωτών κυττάρων *L. donovani*, μετά από επεξεργασία με το απορρυπαντικό διγλιτονίνη. Η ανάλυση των πρωτεϊνών έγινε με SDS-PAGE 12% w/v και η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επώαστηκε με το καθαρισμένο αντίσωμα anti-*LdPIBPnex* (αραίωση 1/3000), ενώ παράλληλα χρησιμοποιήθηκε δείγμα καθαρισμένης πρωτεΐνης MBP-*LdPIBPnex*, ως θετικός μάρτυρας.

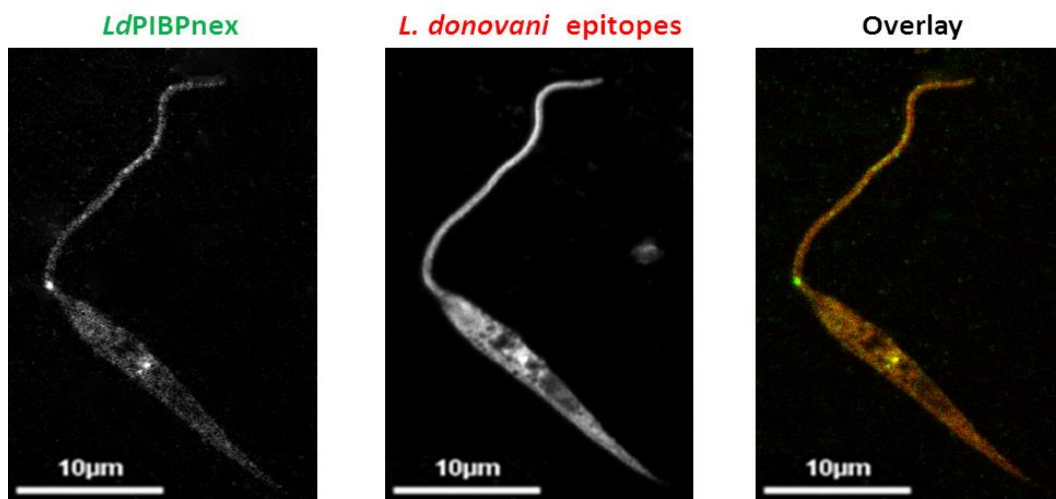
Ενδιαφέρον είναι ότι στο κλάσμα F5P που αναμένεται να είναι εμπλουτισμένο σε κυτταροσκελετικές και πυρηνικές πρωτεΐνες ανιχνεύουμε μια πρωτεϊνική ζώνη με μεγαλύτερο μοριακό βάρος και μια αχνή με αρκετά μικρότερο μοριακό βάρος από το αναμενόμενο για την *LdPIBPnex*. Η πρώτη, ίσως να αφορά μια μορφή της πρωτεΐνης που έχει υποστεί μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις ενώ η δεύτερη ένα πρωτεολυτικό της κλάσμα που περιέχει τμήμα από το μισό καρβόξυ-τελικό τμήμα του μορίου που αναγνωρίζει το πολυκλωνικό αντίσωμα anti-*LdPIBPnex*.

3.3.2 Υποκυτταρικός εντοπισμός της *LdPIBPnex* με ανοσοφθορισμό σε προμαστιγωτά παράσιτα *L. donovani*

Ένας δεύτερος τρόπος απάντησης του ίδιου ερωτήματος που τέθηκε βιοχημικά για τον υποκυτταρικό εντοπισμό της *LdPIBPnex*, είναι η τεχνική του ανοσοφθορισμού και η παρατήρηση στο μικροσκόπιο φθορισμού (Υλικά κ' Μέθοδοι, κεφ.:2.10). Για την πραγματοποίηση του πειράματος, προμαστιγωτά κύτταρα *L. donovani* (στέλεχος LG13 WT) στη στατική φάση ανάπτυξης, μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα παραφορμαλδεΰδης και στη συνέχεια στρώθηκαν σε καλυπτρίδες με επίστρωση πολυλυσίνης. Ακολούθησε επώαση των προμαστιγωτών κυττάρων με πολυκλωνικό anti-*LdPIBPnex* αντίσωμα (από κουνέλι) και με το πολυκλωνικό anti-LG13 αντίσωμα (από ποντικό), που αναγνωρίζει επιτόπους κυττάρων *L. donovani* και στη συνέχεια με δεύτερα αντισώματα συνδεδεμένα με φθορίζουσες χρωστικές σύμφωνα με πειραματικό πρωτόκολλο που περιγράφεται στα Υλικά και Μεθόδους, κεφ.: 2.10. Τέλος, έγινε μονιμοποίηση των καλυπτρίδων σε αντικειμενοφόρο πλάκα προκειμένου να γίνει παρακολούθηση στο μικροσκόπιο φθορισμού.



Εικόνα 3.23 (α): Προμαστιγωτά κύτταρα *L. Donovanii* ανοσοσημασμένα με τα α) anti-*LdPIBPnex* (πολυκλωνικό αντίσωμα από κουνέλι, αραίωση 1/400) και β) anti-*L. donovani* (πολυκλωνικό αντίσωμα από ποντικό, αραίωση 1/250) ειδικά πρώτα αντισώματα και με τα δεύτερα anti-rabbit Alexa 488 (αραίωση 1/1000) και anti-mouse Alexa 546 (αραίωση 1/1000) αντισώματα αντίστοιχα. Οι εικόνες αποτελούν οπτική τομή από σειρά οπτικών τομών που συλλέχτηκαν με το Leica TCS-SP συνεστιακό μικροσκόπιο με 63X φακό. Scale bar: 10 µm με 63X φακό.



Εικόνα 3.23 (β): Προμαστιγωτά κύτταρα *L. Donovanii* ανοσοσημασμένα με τα α) anti-*LdPIBPnex* (πολυκλωνικό αντίσωμα από κουνέλι, αραίωση 1/400) και β) anti-*L. donovani* (πολυκλωνικό αντίσωμα από ποντικό, αραίωση 1/250) ειδικά πρώτα αντισώματα και με τα δεύτερα anti-rabbit Alexa 488 (αραίωση 1/1000) και anti-mouse Alexa 546 (αραίωση 1/1000) αντισώματα αντίστοιχα. Οι εικόνες αποτελούν οπτική τομή από σειρά οπτικών τομών που συλλέχτηκαν με το Leica TCS-SP συνεστιακό μικροσκόπιο. Scale bar: 10 µm με 63X φακό.

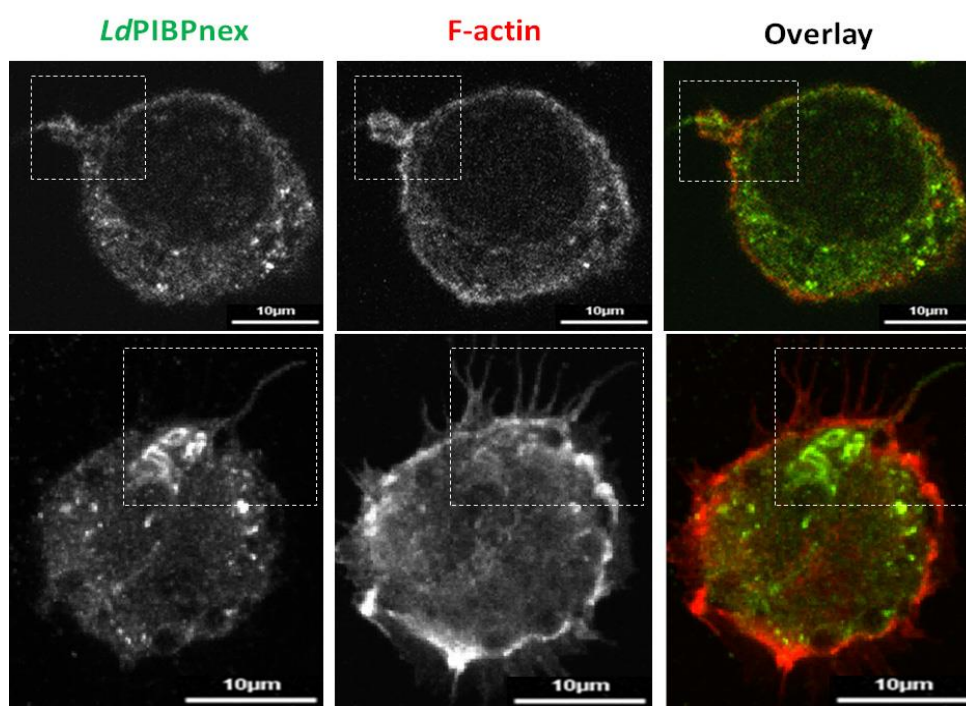
Παρατηρήθηκε ότι η *LdPIBPnex* εντοπίζεται σε δομές που προσομοιάζουν μεμβρανικά κυστίδια στο κυτταρικό σώμα του προμαστιγωτού παρασίτου *L. donovani*, καθώς και στη θήκη του μαστιγίου και κατά μήκος του. Γνωρίζουμε από τη βιβλιογραφία (Webster and Russell 1993), πως η περιοχή της θήκης του μαστιγίου αποτελεί μία από τις κύριες περιοχές ένδο-/εξωκύττωσης του παρασίτου, κάτι που μπορεί, αφ' ενός μεν να συνδέεται με την έκκριση της *LdPIBPnex*, αλλά και με κάποιον πιθανό ρόλο του μέρους της πρωτεΐνης που δεν εκκρίνεται από το

παράσιτο στην ενδοκύττωση από την περιοχή έκφυσης του μαστιγίου. Τέλος, επίτοποι της *LdPIBPnex* ανιχνεύθηκαν και στο μαστίγιο της προμαστιγωτής μορφής με σπικτική κατανομή. Ίσως η πρωτεΐνη να παίζει κάποιο ρόλο στην ενδομαστιγιακή μεταφορά κυστιδίων. Όλες αυτές οι υποθέσεις θα βοηθήσουν στο μέλλον σε σχεδιασμό πειραμάτων για την επιβεβαίωσή τους.

3.4 Εντοπισμός της *LdPIBPnex* σε κυτταρικές σειρές μακροφάγων θηλαστικών μολυσμένων με παράσιτα *Leishmania*

Σε συνέχεια των προηγούμενων πειραμάτων εντοπισμού, θελήσαμε να εξετάσουμε τον εντοπισμό της *LdPIBPnex* σε μακροφάγα θηλαστικών (κυτταρική σειρά J774) μολυσμένα με προμαστιγωτά παράσιτα *L. donovani* για 1 ώρα στους 37 °C.

Στο τέλος της μόλυνσης οι καλυπτρίδες με τα μολυσμένα μακροφάγα σημάνθηκαν με ανοσοφθορισμό (Υλικά κ' Μέθοδοι, κεφ.: 2.10), προκειμένου να γίνει παρατήρηση τους στο συνεστιακό μικροσκόπιο και εντοπισμός επιτόπων της *LdPIBPnex* στα μακροφάγα. Η σήμανση έγινε με το anti-*LdPIBPnex* και δεύτερο το anti-rabbit pAb συζευγμένο με Alexa 488 ενώ η F-ακτίνη του κυτταροσκελετού του μακροφάγου σημάνθηκε με το αντιδραστήριο phalloidin Alexa 548.



Εικόνα 3.25: Μακροφάγα J774, μολυσμένα με παράσιτα *L. donovani*, μονιμοποιημένα (4% PFA) και ανοσοσημασμένα για την *LdPIBPnex* (anti-*LdPIBPnex*, 1/300 και anti-rabbit-Alexa 488, 1/1000) και για την F-ακτίνη (phalloidin-Alexa 546, 1/700). Οεικόνες είναι οπτικές τομές από σειρά τομών που συλήχτηκαν με το LeicaTCS-SP συνεστιακό μικροσκόπιο με 63X φακό (scale bar: 10 μm). Οι περιοχές σημασμένες με πλαίσιο είναι αυτές όπου εντοπίζεται πιο έντονα η σήμανση με το anti-*LdPIBPnex* αντίσωμα.

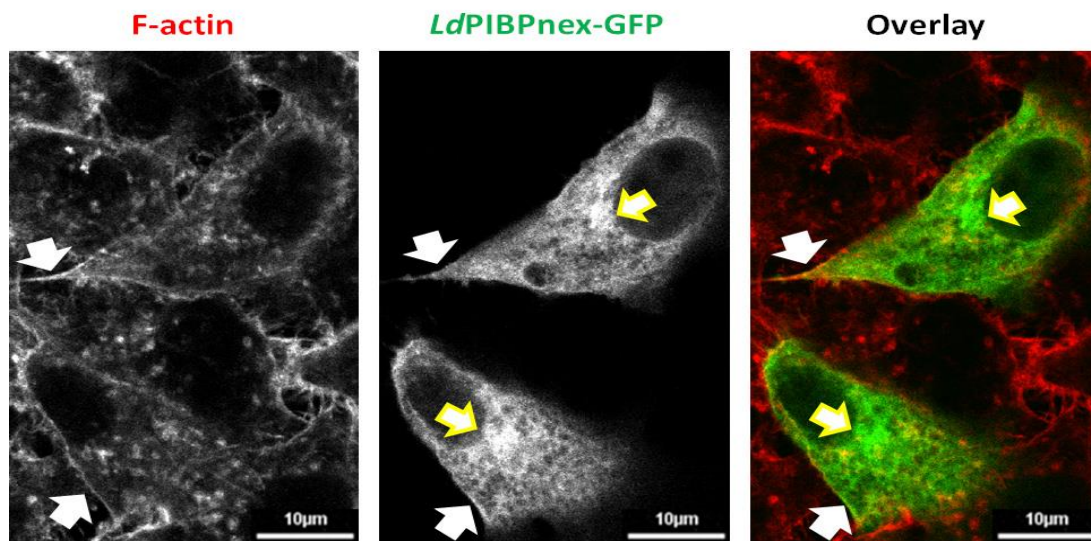
Παρατηρήθηκε ότι επίτοποι της *LdPIBPnex* βρίσκονται κυρίως στην επιφανειακή μεμβράνη του μακροφάγου, στα σημεία των φαγοκυτταρικών φαινομένων των προμαστιγωτών μορφών *L. donovani*.

3.5 Ετερόλογη έκφραση και υποκυτταρικός εντοπισμός της *LdPIBPnex* σε κύτταρα θηλαστικών

Έκφραση της *LdPIBPnex* σε ένα ετερόλογο ευκαρυωτικό σύστημα και μελέτη του υποκυτταρικού της εντοπισμού θα μπορούσε να παρέχει πληροφορίες για πιθανούς μοριακούς εταίρους της στο μακροφάγο κύτταρο ξενιστή και πιθανές δράσεις της. Επιλέξαμε να εκφράσουμε την *LdPIBPnex* αρχικά σε καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα HeLa (Puck and Marcus 1955), που παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα επιμόλυνσης. Για την επιμόλυνση (Υλικά κ' Μέθοδοι, κεφ.:2.8) χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pEGFP-N3-*ldpibpnex* για έκφραση της πρωτεΐνης *LdPIBPnex* ως υβριδική πρωτεΐνη με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη EGFP (Cinelli, Ferrari et al. 2000). Με μικροσκοπία φθορισμού μπορούμε με παρατήρηση του φθορισμού της GFP να ακολουθήσουμε τον εντοπισμό της υβριδικής πρωτεΐνης *LdPIBPnex*-GFP.

Η επιμόλυνση των κυττάρων HeLa έγινε με χρήση λιποσωμάτων με το αντιδραστήριο λιποφεκταμίνης (Lipofectamine® LTXwithPlus™ Reagent, by Thermo Fisher Scientific) που είναι ένα κατιοντικό λιπόσωμα. Η βασική δομή των κατιοντικών λιποσωμάτων αποτελείται από μία θετικά φορτισμένη κεφαλή και δύο αλυσίδες υδρογονανθράκων. Η φορτισμένη ομάδα αλληλεπιδρά με τη φωσφορική ομάδα του νουκλεϊκού οξέος του πλασμιδίου και βοηθά στην αλληλεπίδραση του νουκλεϊκού οξέος με την κυτταρική μεμβράνη, επιτρέποντας τη σύντηξη του συμπλόκου λιπόσωμα/DNA με την αρνητικά φορτισμένη κυτταρική μεμβράνη (Shneider and Pekker 2014). Το σύμπλοκο επιμόλυνσης εισέρχεται στο κύτταρο μέσω ενδοκυττάρωσης. Η όλη διαδικασία της επιμόλυνσης πραγματοποιείται σε καλυπτρίδες μέσα σε 12-well plate και τα μακροφάγα-παράσιτα επώαστηκαν για 24 ώρες στους 37 °C, 5% CO₂ (Υλικά κ' Μέθοδοι, κεφ.:2.10).

Είκοσι τέσσερες ώρες μετά την επιμόλυνση, έγινε μονιμοποίηση με παραφορμαλδεΰδη και η F-ακτίνη σημάνθηκε με **phalloidin-Alexa 546**. Η παρατήρηση των δειγμάτων έγινε με το Leica TCS-SP συνεστιακό μικροσκόπιο με χρήση δύο γραμμών laser: Την γραμμή 488nm (Ar), για απεικόνιση του φθορισμού της EGFP και την γραμμή 546nm (Ne) για απεικόνιση της χρωστικής Alexa-546. Η *LdPIBPnex*-EGFP εντοπίστηκε στο κυτταρόπλασμα αλλά και στην επιφανειακή μεμβράνη των κυττάρων όπου είχε μερικό συνεντοπισμό με την F-ακτίνη του κυτταρικού φλοιού. Επίσης, η *LdPIBPnex*-EGFP φαίνεται να εντοπίζεται στην περιοχή της συσκευής Golgi. Η μελέτη αυτή θα πρέπει να συνεχιστεί με περισσότερους μοριακούς μάρτυρες κυτταρικών δομών έτσι ώστε να διευκρινιστεί με μεγαλύτερη λεπτομέρεια ο εντοπισμός της *LdPIBPnex*.



Εικόνα 3.26: Κύτταρα HeLa επιμολυσμένα με το $\text{pEGFP-}Ld\text{pibp}_{\text{nex}}$ πλασμίδιο για 24 ώρες. Τα κύτταρα έχουν μονιμοποιηθεί με PFA 4% w/v και έχουν σημανθεί για την F-ακτίνη με τη χρωστική **phalloidin-Alexa 546**, 1/700. Η $Ld\text{PIBPnex-GFP}$ εμφανίζει μια κυτοπλασματική-μεμβρανική εντόπιση και συνεντοπίζεται μερικώς με την F-ακτίνη (άσπρα βέλη). Τα κίτρινα βέλη υποδεικνύουν τον εντοπισμό της $Ld\text{PIBPnex-GFP}$ σε περιοχή που εντοπίζεται η συσκευή Golgi (scalebar: 10 μm).

4 Συζήτηση-Συμπεράσματα

Η Λεϊσμανίωση αποτελεί μια ομάδα λοιμωδών νοσημάτων που προκαλούνται από τα ενδοκυττάρια παράσιτα του γένους *Leishmania*. Παρότι, το παράσιτο και η ασθένεια έχουν χαρακτηριστεί από τις αρχές του 20^{ου} αιώνα, οι αιτιολογικοί παράγοντες της παθογένειας των διαφόρων μορφών της ασθένειας παραμένουν ακόμα μερικώς αποσαφηνισμένοι, με αποτέλεσμα η θεραπεία της Λεϊσμανίασης να βασίζεται αποκλειστικά στη χημειοθεραπεία ή χορήγηση της οποίας λόγω των παρενεργειών της, όπως πυρετός, νεφρική ανεπάρκεια, εμετοί ή ακόμα και καρδιακή ανακοπή, οξεία ηπατική ανεπάρκεια και σπασμοί, η καθίσταται αναγκαίο να γίνεται σε νοσοκομείο.

Αρκετά επιφανειακά και εκκρινόμενα μόρια του παρασίτου που εμπλέκονται στην παθογένεια της νόσου έχουν ήδη ταυτοποιηθεί και μελετηθεί, όπως οι πρωτεΐνες που εκφράζονται από τα A2 γονίδια, η γλυκοπρωτεΐνη gr63, η λιποφωσφογλυκάνη LPG κ.α. (Εισαγωγή, κεφ.:1.7.3). Τα τελευταία χρόνια έχει δημιουργηθεί ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τα μακρομόρια, που τα παράσιτα του γένους *Leishmania* εκκρίνουν στο εξωκυττάριο περιβάλλον τους και πιστεύεται πως στο σύνολο των εκκρινόμενων πρωτεϊνών υπάρχουν και αρκετές που αποτελούν πιθανούς μολυσματικούς παράγοντες του παρασίτου (Silverman, Chan et al. 2008) με το εκκρινόμενο κλάσμα τους μεγαλύτερο από το ενδοκυττάριο.

Η παρούσα διπλωματική διατριβή είχε ως στόχο την μελέτη μιας εκκρινόμενης πρωτεΐνης από το παράσιτο *Leishmania donovani*, η οποία ονομάστηκε *LdPIBP_{nex}* (λόγω της ικανότητας πρόσδεσης της σε φωσφοϊνοσιτίδια, και την κατάταξή της με βάση την αλληλουχία της στην πρωτεϊνική οικογένεια των νεξινών (βλ. Εισαγωγή, κεφ.: 1.8.2). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ερευνητικής ομάδας του J. Maxwell Silverman (Silverman, Chan et al. 2008), φάνηκε ότι η πρωτεΐνη αυτή είναι κατά 3,5 φορές περισσότερο εμπλουτισμένη στο εξωκυττάριο κλάσμα σε σχέση με το ενδοκυττάριο, γεγονός που επιτρέπει την υπόθεση ότι πιθανόν να παίζει ρόλο στην αλληλεπίδραση του παρασίτου με τα κύτταρα ξενιστές.

Για να μελετηθεί η δομή και δράση της πρωτεΐνης *LdPIBP_{nex}* χρειάζονται κατάλληλα μοριακά εργαλεία, στην κατασκευή των οποίων εστιάστηκε το μεγαλύτερο μέρος αυτής της εργασίας. Αρχικά έγινε κλωνοποίηση του του γονιδίου *ldpibp_{nex}* μετά από ενίσχυση με PCR της αντίστοιχης αλληλουχίας από γενωμικό DNA παρασίτων *Leishmania donovani* (στέλεχος LG13) με κατάλληλους εκινητές. Προσπαθήσαμε να εισάγουμε την αλληλουχία του γονιδίου στους κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς pEGFP-N3, pLexsy-mCherry και pGEX4T-1, χρησιμοποιώντας ολιγονουκλεοτίδια που αναγνωρίζουν τα ένζυμα κοπής BglII-BamHI, BglII και EcoRI, αντίστοιχα για κάθε πλασμίδιο. Από αυτές τις τρεις προσπάθειες κλωνοποίησης του ενθέματος με την αλληλουχία του γονιδίου *ldpibp_{nex}*, επιτυχείς ήταν εκείνες στα πλασμίδια pEGFP-N3 και pGEX4T-1, ενώ η κλωνοποίηση στο πλασμίδιο pLexsy-mCherry δεν μας έδωσε κάποιο θετικό αποτέλεσμα (Αποτελέσματα, κεφ.:3.1). Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pEGFP-*ldpibp_{nex}* θα χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της κατανομής της ετερόλογα εκφρασμένης *LdPIBP_{nex}* σε κύτταρα θηλαστικών. Αρχικά πειράματα αυτής της μελέτης πραγματοποιήθηκαν στη διάρκεια αυτής της εργασίας (Αποτελέσματα, κεφ. : 3.5). Το πλασμίδιο pGEX4T-1-*ldpibp_{nex}* θα χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση της πρόσδεσης της GST-*LdPIBP_{nex}* σε φωσφοϊνοσιτίδια με

μεθοδολογία αντίστοιχη του ανοσοστύπωματος (PIP strips <http://www.echelon-inc.com/index.php?module=Products&func=detail&id=355>) που χρησιμοποιεί μεμβράνες νιτροκυτταρίνης εμποτισμένες με φωσφοϊνοσιτίδια καθώς και σε πρωτόκολλα ανοσοκατακρήμνισης προκειμένου να εντοπιστούν πιθανοί μοριακοί συνεργάτες της, στο παράσιτο ή/και στα μακροφάγα (σε μελλοντική μελέτη).

Η έκφραση της *LdPIBPnex* σε ένα ετερόλογο ευκαρυωτικό σύστημα και η μελέτη του υποκυτταρικού της εντοπισμού θα μπορούσε να παρέχει πληροφορίες για πιθανούς μοριακούς εταίρους της στο μακροφάγο κύτταρο ξενιστή και πιθανές δράσεις της. Αρχικά επιλέξαμε, να εκφράσουμε την *LdPIBPnex* σε καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα HeLa (Puck and Marcus 1955) που παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα επιμόλυνσης, χρησιμοποιώντας το πλασμίδιο *pEGFP-N3-ldpibp_{nex}* για παροδική έκφραση της πρωτεΐνης *LdPIBP_{nex}* ως υβριδική πρωτεΐνη με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη EGFP (Cinelli, Ferrari et al. 2000). Με μικροσκοπία φθορισμού αναλύθηκε ο φθορισμός της GFP και σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, η υβριδική πρωτεΐνη *LdPIBPnex-GFP* εντοπίστηκε στο κυτταρόπλασμα αλλά και στην επιφανειακή μεμβράνη των κυττάρων, όπου είχε μερικό συνεντοπισμό με την F-ακτίνη του κυτταρικού φλοιού. Επίσης, η *LdPIBPnex-EGFP*, φαίνεται να εντοπίζεται στην περιοχή της συσκευής Golgi (Αποτελέσματα, κεφ: 3.5). Η μελέτη αυτή θα πρέπει να συνεχιστεί με χρήση αντισωμάτων ειδικών για μοριακούς μάρτυρες κυτταρικών δομών έτσι ώστε από τον συνεντοπισμό της *LdPIBPnex-EGFP* με κάποιους από αυτούς τους μάρτυρες να διευκρινιστεί με μεγαλύτερη λεπτομέρεια ο εντοπισμός της *LdPIBPnex*.

Παράλληλα με το προηγούμενο πείραμα εντοπισμού της *LdPIBPnex* σε ετερόλογο σύστημα έκφρασης, πραγματοποιήθηκαν και πειράματα εντοπισμού της πρωτεΐνης στην προμαστιγωτή μορφή του παρασίτου *Leishmania donovani*, με χρήση ειδικών πολυκλωνικών αντισωμάτων *anti-LdPIBPnex* και *anti-LG13* (που αναγνωρίζει επιτόπους κυττάρων *L. donovani*) και στη συνέχεια με δεύτερα αντισώματα, συνδεδεμένα με φθορίζουσες χρωστικές, σύμφωνα με πειραματικό πρωτόκολλο που περιγράφεται στα Υλικά και Μεθόδους, κεφ.: 2.10. Τα αποτελέσματά μας από την παρατήρηση στο μικροσκόπιο φθορισμού, υποδεικνύουν ότι η πρωτεΐνη *LdPIBPnex* εντοπίζεται σε δομές που προσομοιάζουν μεμβρανικά κυστίδια στο κυτταρικό σώμα του προμαστιγωτού παρασίτου *L. donovani*, καθώς και στη θήκη του μαστιγίου και κατά μήκος του (Αποτελέσματα, κεφ:3.3.2). Γνωρίζουμε από τη βιβλιογραφία (Webster and Russell 1993), πως η περιοχή της θήκης του μαστιγίου αποτελεί μία από τις κύριες περιοχές ένδο-/εξωκύττωσης του παρασίτου, κάτι που μπορεί, αφ' ενός μεν να συνδέεται με την έκκριση της *LdPIBPnex*, αλλά και με κάποιον πιθανό ρόλο του μέρους της πρωτεΐνης που δεν εκκρίνεται από το παράσιτο στην ενδοκύττωση από την περιοχή έκφυσης του μαστιγίου. Τέλος, επίτοποι της *LdPIBPnex* ανιχνεύτηκαν και στο μαστίγιο της προμαστιγωτής μορφής με στικτή κατανομή. Ίσως η πρωτεΐνη να παίζει κάποιο ρόλο στην ενδομαστιγιακή μεταφορά κυστιδίων. Όλες αυτές οι υποθέσεις θα βοηθήσουν στο μέλλον σε σχεδιασμό πειραμάτων για την επιβεβαίωσή τους.

Ένα τελευταίο πείραμα εντοπισμού της *LdPIBPnex* που πραγματοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή με τη βοήθεια της μικροσκοπίας φθορισμού, αφορά τον εντοπισμό της *LdPIBPnex* σε μακροφάγα θηλαστικών (κυτταρική σειρά J774) μολυσμένων με προμαστιγωτά *L. donovani*. Αρχικά, είχαμε ως στόχο να πραγματοποιήσουμε την κλωνοποίηση της πρωτεΐνης στο πλασμίδιο *pLexsy-*

mCherry, προκειμένου να δημιουργήσουμε διαγονιδιακά παράσιτα *L. donovani* που θα εκφράζουν την φθορίζουσα LdPIBPnex-mCherry, με τα οποία θα μολύναμε μακροφάγα θηλαστικών και εκεί θα μελετούσαμε τον εντοπισμό του εκκρινόμενου κλάσματος της φθορίζουσας LdPIBPnex-mRFP πρωτεΐνης. Λόγω, όμως, της ανεπιτυχούς προσπάθειας κλωνοποίησης του γονιδίου *IdpiBPnex*, ο παραπάνω εντοπισμός πραγματοποιήθηκε με μόλυνση μακροφάγων θηλαστικών με προμαστιγωτά παράσιτα LG13 αγρίου τύπου και χρήση του ειδικού πολυκλωνικού αντισώματος anti-LdPIBPnex και του δεύτερου anti-rabbit pAb, συζευγμένο με Alexa 488, ενώ παράλληλα σημάνθηκε και η F-ακτίνη του κυτταροσκελετού του μακροφάγου με το αντιδραστήριο phalloidinAlexa 548. Οι εικόνες από το μικροσκόπιο φθορισμού εμφανίζουν επίτοπους της LdPIBPnex, οι οποίοι βρίσκονται κυρίως στην επιφανειακή μεμβράνη του μακροφάγου, στα σημεία των φαγοκυτταρικών φαινομένων των προμαστιγωτών μορφών, γεγονός που συνηγορεί για ένα ρόλο της πρωτεΐνης στην αλληλεπίδραση του παρασίτου με το μακροφάγο κύτταρο ξενιστή (Αποτελέσματα, κεφ: 3.4). Θα μπορούσε βέβαια το αντίσωμα anti-LdPIBPnex να αναγνωρίζει επιτόπους κάποιας ομόλογης νεξίνης των θηλαστικών. Μια σειρά πειραμάτων θα πρέπει να επιβεβαιώσει την αναγνώριση επιτόπων LdPIBPnex στα μακροφάγα.

Στη συνέχεια, θελήσαμε να μελετήσουμε τον υποκυτταρικό εντοπισμό της πρωτεΐνης LdPIBPnex και βιοχημικά, με πειράματα κλαματοποίησης ολικού εκχυλίσματος προμαστιγωτών κυττάρων *L. donovani* (στέλεχος LG13 WT) με χρήση του απορρυπαντικού διγτονίνης. Η ανάλυση των δειγμάτων με ανοσοσύτρωμα Western και το anti-LdPIBPnex αντίσωμα μας έδειξε πως η πρωτεΐνη εμφανίζεται κυρίως στα κλάσματα F1 και F2, τα οποία είναι εμπλουτισμένα σε διαλυτές πρωτεΐνες του παρασίτου, κάτι το οποίο μπορεί να σχετίζεται με την πιθανή δράση της ως πρωτεΐνης-συνοδού, απαραίτητη για την ολοκλήρωση μονοπατιών διαλογής πρωτεϊνικών μορίων. Ενδιαφέρον είναι ότι στο κλάσμα F5P που αναμένεται να είναι εμπλουτισμένο σε κυτταροσκελετικές και πυρηνικές πρωτεΐνες ανιχνεύουμε μια πρωτεϊνική ζώνη με μεγαλύτερο μοριακό βάρος και μια αχνή με αρκετά μικρότερο μοριακό βάρος από το αναμενόμενο για την LdPIBPnex. Η πρώτη, ίσως να αφορά μια μορφή της πρωτεΐνης που έχει υποστεί μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις ενώ η δεύτερη ένα πρωτεολυτικό της κλάσμα που περιέχει τμήμα από το μισό καρβόξυ-τελικό τμήμα του μορίου που αναγνωρίζει το πολυκλωνικό αντίσωμα anti-LdPIBPnex (Αποτελέσματα, κεφ: 3.3.1).

Στα πλαίσια του βιοχημικού χαρακτηρισμού της πρωτεΐνης LdPIBPnex, θελήσαμε να ελέγξουμε τα επιπέδα έκφρασης της LdPIBPnex, από προμαστιγωτά παράσιτα *L. donovani* LG13 WT, κατά τα διάφορα στάδια ανάπτυξης του παρασίτου. Συλλέξαμε δείγματα παρασίτων από συγκεκριμένες χρονικές φάσεις της ανάπτυξής τους και έπειτα από ανάλυσή τους με πηκτή ακρυλαμιδίου (SDSPAGE) και ανοσοαποτύπωση Western, παρατηρήθηκε ότι η LdPIBPnex εκφράζεται στη λογαριθμική και στη στατική φάση ανάπτυξης του προμαστιγωτού παρασίτου στην καλλιέργεια, με μία πιο έντονη έκφραση στην αρχή της ανάπτυξης (lag phase), κάτι που θα συνηγορούσε για έναν πιθανό ρόλο της πρωτεΐνης στην S φάση του κυτταρικού κύκλου του παρασίτου στην κυτταροκαλλιέργεια των προμαστιγοτών μορφών (Αποτελέσματα, κεφ: 3.2.1).

Τέλος, θέσαμε ως στόχο να επιβεβαιώσουμε την έκκριση της πρωτεΐνης LdPIBPnex, η οποία σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα (Silverman, Chan et al.

2008), βρέθηκε να βρίσκεται αρκετά ψηλά στη λίστα με τα περισσότερο εκκρινόμενα μόρια από το παράσιτο *L. donovani*, σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες: τη θερμοκρασία των 25°C που προσομοιάζει τις συνθήκες στο σώμα του ασπόνδυλου ξενιστή όπου το παράσιτο βρίσκεται στην προμαστιγωτή εξωκυττάρια μορφή του και εκείνη των 37°C, θερμοκρασία του ανθρώπου ξενιστή στα αρχικά στάδια της λοίμωξης, όταν το παράσιτο βρίσκεται ακόμα στην προμαστιγωτή μορφή του. Στη θερμοκρασία των 25°C, παρατηρήθηκε πως η πρωτεΐνη *LdPIBPnex* εμφανίζεται στο αναμενόμενο μοριακό βάρος ~46 kDa, στο υπερκείμενο διάλυμα ως εκκρινόμενη (Αποτελέσματα, κεφ: 3.2.2). Παράλληλα, η *LdPIBPnex*, όπως αναμενόταν ανιχνεύτηκε και ως ενδοκυττάρια στο κυτταρικό κλάσμα. Αντίστοιχα πειράματα για τον έλεγχο έκκρισης της *LdPIBPnex* από την προμαστιγωτή μορφή στους 37°C, δεν έδωσαν κάποιο αξιόπιστο αποτέλεσμα. Η μελέτη έκκρισης στους 37°C θα επαναληφθεί μελλοντικά.

Η πειραματική αυτή εργασία έχει δημιουργήσει τις βάσεις και τα μοριακά εργαλεία για τον βιοχημικό χαρακτηρισμό της δράσης της πρωτεΐνης *LdPIBPnex* και την περαιτέρω μελέτη των λειτουργικών ιδιοτήτων της καθώς και της σημασίας της για την μολυσματικότητα του παρασίτου. Οι μελέτες αυτές θα απαντήσουν για το αν η *LdPIBPnex* μπορεί να θεωρηθεί ως πιθανός στόχος σε σχήματα αντι-λεϊσμανιακής θεραπείας.

Βιβλιογραφία

1. Aderem, A. and D. M. Underhill (1999). "Mechanisms of phagocytosis in macrophages." *Annu Rev Immunol* **17**: 593-623.
2. Ashford, R. W. (2000). "The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses." *Int J Parasitol* **30**(12-13): 1269-1281.
3. Balla, T. (2013). "Phosphoinositides: tiny lipids with giant impact on cell regulation." *Physiol Rev* **93**(3): 1019-1137.
4. Banuls, A. L., M. Hide and F. Prugnolle (2007). "Leishmania and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans." *Adv Parasitol* **64**: 1-109.
5. Bates, P. A. (2007). "Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies." *Int J Parasitol* **37**(10): 1097-1106.
6. Bates, P. A. and M. E. Rogers (2004). "New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of Leishmania." *Curr Mol Med* **4**(6): 601-609.
7. Berridge, M. J. and R. F. Irvine (1989). "Inositol phosphates and cell signalling." *Nature* **341**(6239): 197-205.
8. Bosetto, M. C. and S. Giorgio (2007). "Leishmania amazonensis: multiple receptor-ligand interactions are involved in amastigote infection of human dendritic cells." *Exp Parasitol* **116**(3): 306-310.
9. Carlton, J., M. Bujny, A. Rutherford and P. Cullen (2005). "Sorting nexins--unifying trends and new perspectives." *Traffic* **6**(2): 75-82.
10. Cecilio, P., B. Perez-Cabezas, N. Santarem, J. Maciel, V. Rodrigues and A. Cordeiro da Silva (2014). "Deception and manipulation: the arms of leishmania, a successful parasite." *Front Immunol* **5**: 480.

11. Charest, H. and G. Matlashewski (1994). "Developmental gene expression in *Leishmania donovani*: differential cloning and analysis of an amastigote-stage-specific gene." Mol Cell Biol **14**(5): 2975-2984.
12. Cinelli, R. A., A. Ferrari, V. Pellegrini, M. Tyagi, M. Giacca and F. Beltram (2000). "The enhanced green fluorescent protein as a tool for the analysis of protein dynamics and localization: local fluorescence study at the single-molecule level." Photochem Photobiol **71**(6): 771-776.
13. Cosentino-Gomes, D. and J. R. Meyer-Fernandes (2011). "Ecto-phosphatases in protozoan parasites: possible roles in nutrition, growth and ROS sensing." J Bioenerg Biomembr **43**(1): 89-92.
14. Croft, S. L., K. Seifert and V. Yardley (2006). "Current scenario of drug development for leishmaniasis." Indian J Med Res **123**(3): 399-410.
15. Croft, S. L., S. Sundar and A. H. Fairlamb (2006). "Drug resistance in leishmaniasis." Clin Microbiol Rev **19**(1): 111-126.
16. Cullen, J. (2008). "An approximate diatomics in molecules formulation of generalized valence bond theory." J Comput Chem **29**(4): 497-504.
17. Cunningham, A. C. (2002). "Parasitic adaptive mechanisms in infection by leishmania." Exp Mol Pathol **72**(2): 132-141.
18. Dawson, J. C., J. A. Legg and L. M. Machesky (2006). "Bar domain proteins: a role in tubulation, scission and actin assembly in clathrin-mediated endocytosis." Trends Cell Biol **16**(10): 493-498.
19. De Matteis, M. A. and A. Godi (2004). "PI-loting membrane traffic." Nat Cell Biol **6**(6): 487-492.
20. de Oliveira, C. I., I. P. Nascimento, A. Barral, M. Soto and M. Barral-Netto (2009). "Challenges and perspectives in vaccination against leishmaniasis." Parasitol Int **58**(4): 319-324.
21. Dermine, J. F., S. Scianimanico, C. Prive, A. Descoteaux and M. Desjardins (2000). "Leishmania promastigotes require lipophosphoglycan to actively modulate the fusion properties of phagosomes at an early step of phagocytosis." Cell Microbiol **2**(2): 115-126.
22. Descoteaux, A. and S. J. Turco (2002). "Functional aspects of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan during macrophage infection." Microbes Infect **4**(9): 975-981.
23. Desjardins, M. and A. Descoteaux (1998). "Survival strategies of *Leishmania donovani* in mammalian host macrophages." Res Immunol **149**(7-8): 689-692.
24. Desjeux, P. and J. Alvar (2003). "Leishmania/HIV co-infections: epidemiology in Europe." Ann Trop Med Parasitol **97** Suppl 1: 3-15.
25. Di Paolo, G. and P. De Camilli (2006). "Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics." Nature **443**(7112): 651-657.
26. Elwasila, M. (1988). "*Leishmania tarentolae* Wenyon, 1921 from the gecko *Tarentola annularis* in the Sudan." Parasitol Res **74**(6): 591-592.
27. Fernandes, A. P., A. M. Canavaci, L. I. McCall and G. Matlashewski (2014). "A2 and other visceralizing proteins of *Leishmania*: role in pathogenesis and application for vaccine development." Subcell Biochem **74**: 77-101.
28. Freeman, S. A. and S. Grinstein (2014). "Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton." Immunol Rev **262**(1): 193-215.
29. Freitas-Junior, L. H., E. Chatelain, H. A. Kim and J. L. Siqueira-Neto (2012). "Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it?" Int J Parasitol Drugs Drug Resist **2**: 11-19.

30. Freitas, V. C., K. P. Parreiras, A. P. Duarte, N. F. Secundino and P. F. Pimenta (2012). "Development of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in its natural sandfly vector *Lutzomyia longipalpis*." Am J Trop Med Hyg **86**(4): 606-612.
31. Gibson, M. E. (1983). "The identification of kala-azar and the discovery of *Leishmania donovani*." Med Hist **27**(2): 203-213.
32. Gomes, M. T., A. H. Lopes and J. R. Meyer-Fernandes (2011). "Possible roles of ectophosphatases in host-parasite interactions." J Parasitol Res **2011**: 479146.
33. Handman, E. and D. V. Bullen (2002). "Interaction of *Leishmania* with the host macrophage." Trends Parasitol **18**(8): 332-334.
34. Hepburn, N. C. (2000). "Cutaneous leishmaniasis." Clin Exp Dermatol **25**(5): 363-370.
35. Herwaldt, B. L. (1999). "Leishmaniasis." Lancet **354**(9185): 1191-1199.
36. Isnard, A., M. T. Shio and M. Olivier (2012). "Impact of *Leishmania* metalloprotease GP63 on macrophage signaling." Front Cell Infect Microbiol **2**: 72.
37. Killick-Kendrick, R., D. H. Molyneux and R. W. Ashford (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**(1089): 409-419.
38. Kutateladze, T. G. (2010). "Translation of the phosphoinositide code by PI effectors." Nat Chem Biol **6**(7): 507-513.
39. Lemmon, M. A. (2003). "Phosphoinositide recognition domains." Traffic **4**(4): 201-213.
40. Lodge, R. and A. Descoteaux (2006). "Phagocytosis of *Leishmania donovani* amastigotes is Rac1 dependent and occurs in the absence of NADPH oxidase activation." Eur J Immunol **36**(10): 2735-2744.
41. McConville, M. J., K. A. Mullin, S. C. Ilgoutz and R. D. Teasdale (2002). "Secretory pathway of trypanosomatid parasites." Microbiol Mol Biol Rev **66**(1): 122-154; table of contents.
42. Moore, E. M. and D. N. Lockwood (2010). "Treatment of visceral leishmaniasis." J Glob Infect Dis **2**(2): 151-158.
43. Moradin, N. and A. Descoteaux (2012). "Leishmania promastigotes: building a safe niche within macrophages." Front Cell Infect Microbiol **2**: 121.
44. Mukkada, A. J., J. C. Meade, T. A. Glaser and P. F. Bonventre (1985). "Enhanced metabolism of *Leishmania donovani* amastigotes at acid pH: an adaptation for intracellular growth." Science **229**(4718): 1099-1101.
45. Nandan, D., T. Yi, M. Lopez, C. Lai and N. E. Reiner (2002). "Leishmania EF-1 α activates the Src homology 2 domain containing tyrosine phosphatase SHP-1 leading to macrophage deactivation." J Biol Chem **277**(51): 50190-50197.
46. Oliveira, L. F., A. O. Schubach, M. M. Martins, S. L. Passos, R. V. Oliveira, M. C. Marzochi and C. A. Andrade (2011). "Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World." Acta Trop **118**(2): 87-96.
47. Olivier, M., V. D. Atayde, A. Isnard, K. Hassani and M. T. Shio (2012). "Leishmania virulence factors: focus on the metalloprotease GP63." Microbes Infect **14**(15): 1377-1389.
48. Papadaki, A., A. S. Politou, D. Smirlis, M. P. Kotini, K. Kourou, T. Papamarcaki and H. Boleti (2015). "The *Leishmania donovani* histidine acid ecto-phosphatase LdMAcP: insight into its structure and function." Biochem J **467**(3): 473-486.
49. Pearson, R. D., J. L. Harcus, D. Roberts and G. R. Donowitz (1983). "Differential survival of *Leishmania donovani* amastigotes in human monocytes." J Immunol **131**(4): 1994-1999.
50. Peters, N. C., J. G. Egen, N. Secundino, A. Debrabant, N. Kimblin, S. Kamhawi, P. Lawyer, M. P. Fay, R. N. Germain and D. Sacks (2008). "In vivo imaging reveals an

- essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies." Science **321**(5891): 970-974.
51. Picado, A., B. Ostyn, S. P. Singh, S. Uranw, E. Hasker, S. Rijal, S. Sundar, M. Boelaert and F. Chappuis (2014). "Risk factors for visceral leishmaniasis and asymptomatic *Leishmania donovani* infection in India and Nepal." PLoS One **9**(1): e87641.
 52. Pourcher, M., M. Santambrogio, N. Thazar, A. M. Thierry, I. Fobis-Loisy, C. Miege, Y. Jaillais and T. Gaude (2010). "Analyses of sorting nexins reveal distinct retromer-subcomplex functions in development and protein sorting in *Arabidopsis thaliana*." Plant Cell **22**(12): 3980-3991.
 53. Puck, T. T. and P. I. Marcus (1955). "A Rapid Method for Viable Cell Titration and Clone Production with Hela Cells in Tissue Culture: The Use of X-Irradiated Cells to Supply Conditioning Factors." Proc Natl Acad Sci U S A **41**(7): 432-437.
 54. Rai, A., D. Pathak, S. Thakur, S. Singh, A. K. Dubey and R. Mallik (2016). "Dynein Clusters into Lipid Microdomains on Phagosomes to Drive Rapid Transport toward Lysosomes." Cell **164**(4): 722-734.
 55. Shneider, M. N. and M. Pekker (2014). "Initiation and blocking of the action potential in an axon in weak ultrasonic or microwave fields." Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys **89**(5): 052713.
 56. Silverman, J. M., S. K. Chan, D. P. Robinson, D. M. Dwyer, D. Nandan, L. J. Foster and N. E. Reiner (2008). "Proteomic analysis of the secretome of *Leishmania donovani*." Genome Biol **9**(2): R35.
 57. Singla, N., G. K. Khuller and V. K. Vinayak (1992). "Acid phosphatase activity of promastigotes of *Leishmania donovani*: a marker of virulence." FEMS Microbiol Lett **73**(3): 221-225.
 58. Skanland, S. S., S. Walchli, A. Brech and K. Sandvig (2009). "SNX4 in complex with clathrin and dynein: implications for endosome movement." PLoS One **4**(6): e5935.
 59. Torrecilhas, A. C., R. I. Schumacher, M. J. Alves and W. Colli (2012). "Vesicles as carriers of virulence factors in parasitic protozoan diseases." Microbes Infect **14**(15): 1465-1474.
 60. van Weering, J. R., P. Verkade and P. J. Cullen (2010). "SNX-BAR proteins in phosphoinositide-mediated, tubular-based endosomal sorting." Semin Cell Dev Biol **21**(4): 371-380.
 61. Walker, D. M., S. Oghumu, G. Gupta, B. S. McGwire, M. E. Drew and A. R. Satoskar (2014). "Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites." Cell Mol Life Sci **71**(7): 1245-1263.
 62. Webster, P. and D. G. Russell (1993). "The flagellar pocket of trypanosomatids." Parasitol Today **9**(6): 201-206.
 63. Zemanova, E., M. Jirku, I. L. Mauricio, M. A. Miles and J. Lukes (2004). "Genetic polymorphism within the *leishmania donovani* complex: correlation with geographic origin." Am J Trop Med Hyg **70**(6): 613-617.
 64. Zhang, W. W., H. Charest, E. Ghedin and G. Matlashewski (1996). "Identification and overexpression of the A2 amastigote-specific protein in *Leishmania donovani*." Mol Biochem Parasitol **78**(1-2): 79-90.