



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών



Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ
Hellenic Pasteur Institute

**Μοριακός και λειτουργικός χαρακτηρισμός της
φωσφατάσης τυροσίνης/φωσφοϊνοσιτιδίων
LdTyrPIP_22 από το πρωτόζωο *Leishmania donovani***

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης
«Εφαρμογές της βιολογίας στην Ιατρική»

Τζιουβάρα Ολυμπία Παρασκευή

Βιολόγος

Οκτώβριος 2017

Μέλη εξεταστικής επιτροπής

Κωσταντίνος Ε. Βοργιάς, Καθηγητής Βιοχημείας

Στραβοπόδης Ι. Δημήτριος, Επίκουρος καθηγητής Βιολογίας κυττάρου και
Ανάπτυξης

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

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το μονοκύτταρο ευκαρυωτικό παρασιτικό πρωτόζωο *Leishmania donovani* είναι ένας από τους αιτιολογικούς παράγοντες της θανατηφόρου σπλαγχνικής λεισμανίασης (Καλά-Αζάρ). Η εκτροπή του μεταβολισμού των φωσφοϊνοσιτιδίων (phosphoinositides-PIs) αποτελεί σημαντικό μηχανισμό μολυσματικότητας πολλών παθογόνων μικροοργανισμών. Ενώ PI φωσφατάσες που προέρχονται από βακτήρια και ρυθμίζουν το μεταβολισμό των PIs στον ξενιστή αποτελούν ήδη ελκυστικούς στόχους για χημειοθεραπεία, αυτή η οπτική έχει διερευνηθεί ελάχιστα στα ενδοκυττάρια πρωτοζωικά παράσιτα όπως τα πρωτόζωα του γένους *Leishmania*. Το φωσφάτωμα (phosphatome) των Κινητοπλαστίδων περιέχει ένα μεγάλο αριθμό άτυπων φωσφατάσων διπλής ειδικότητας (atypical dual-specificity protein phosphatases -aDSPs) χωρίς ομόλογα ένζυμα στον άνθρωπο. Οι φωσφατάσες αυτές θα μπορούσαν να θεωρηθούν πιθανοί φαρμακευτικοί στόχοι. Μια υποομάδα των aDSPs, που ορίζεται ως άτυπες φωσφατάσες λιπιδίων (atypical lipid phosphatases - ALPS) από τα παράσιτα *Leishmania*, έχει στο καταλυτικό κέντρο παρόμοιο μοτίβο P-loop με τις PI φωσφατάσες MptpB και LipA από το *Mycobacterium tuberculosis* και *Listeria monocytogenes* αντίστοιχα, μολυσματικούς παράγοντες που αποτελούν φαρμακευτικούς στόχους. Ένα μέλος αυτής της οικογένειας από το παράσιτο *Leishmania donovani* είναι το γονιδιακό προϊόν του γονιδίου LDBPK_220120, που ονομάζεται στο έργο μας LdTyrPIP_22. Από τα μέχρι τώρα πειράματά μας έχει επιβεβαιωθεί ότι α) η βακτηριακά εκφρασμένη ανασυνδυασμένη μορφή LdTyrPIP_22-His αποφωσφορυλιώνει φωσφο-τυροσίνη και τα μονοφωσφορυλιωμένα PIs, PI(3)P και PI(4)P, ενώ β) η ενδογενής πρωτεΐνη εντοπίζεται σε δομές που ομοιάζουν με κυστίδια τόσο στο σώμα όσο και στο μαστίγιο προμαστιγωτών παρασίτων και παρουσιάζει μερικό συνεντοπισμό με την Λεισμανιακή ακτίνη (Ldactin).. Στην εργασία αυτή παρουσιάζουμε α) τον εντοπισμό της LdTyrPIP_22 σε φαγοκυτταρωμένα από μακροφάγα προμαστιγωτά μετά από *in vitro* μόλυνση και σε αξενικά αμαστιγωτά με συνεστιακή μικροσκοπία, β) πρωτόκολλο ανάλυσης των εκκρινόμενων πρωτεϊνών στο εξωκυττάριο υλικό αξενικών παρασίτων *Leishmania* και δεδομένα σχετικά με την έκκριση της LdTyrPIP_22, γ) διερεύνηση της δυνατότητας διαγονιδιακών παρασίτων *L. donovani* που υπερεκφράζουν σταθερά την ανασυνδυασμένη LdTyrPIP_22-RFP να μολύνουν μακροφάγα *in vitro* πιο αποτελεσματικά από τα παράσιτα αγρίου τύπου και δ) την κατασκευή πλασμιδίων pLexsysat2.1-LdtyrPIP_22-6his για έκφραση της rLdPIP_22-His σε κύτταρα *Leishmania* ως ενδοκυττάρια ή ως εκκρινόμενη μορφή και ε) τη δημιουργία διαγονιδιακών παρασίτων *L. tarentolae*, με σκοπό την απομόνωση του ενζύμου για περαιτέρω δομικές και λειτουργικές μελέτες.

ABSTRACT

The single celled eukaryotic protozoan pathogen *Leishmania donovani*/*L. donovani* is one of the causative agents of the fatal disease visceral leishmaniasis (Kala azar). The pathogenicity of many microbial pathogens relies on subversion of host cell signaling pathways one of which includes phosphoinositide (PI) metabolism. While pathogenic bacteria PI phosphatases that modulate PI metabolism in the host already constitute attractive chemotherapeutic targets they are poorly studied in intracellular protozoan pathogens. The *Kinetoplastids*' phosphatome contains a subgroup of Atypical Dual Specificity/Lipid Phosphatases with no human homologues sharing a catalytic P-loop motif to the secreted virulence factors MptpB and LipA PI phosphatases from *Mycobacterium tuberculosis* and *Listeria monocytogenes* respectively. The *L. donovani* member of this family, encoded by the LDBPK_220120 gene locus and named in our work *LdTyrPIP_22*, is highly conserved amongst *Leishmania* species and shares significant identity with protein tyrosine and PI phosphatases from pathogenic bacteria two of which (i.e LipA, MptpB) are considered druggable enzyme targets. Our previous work showed that a) recombinant bacterially expressed *LdTyrPIP_22*-His has phosphatase activity and specifically dephosphorylates P_{tyr}, PI(3)P and PI(4)P and b) the endogenous *LdTyrPIP_22* partially colocalizes with *Ldactin* in *L. donovani* promastigotes. We present herein results regarding a) the localization of *LdTyrPIP_22* in promastigotes inside macrophages after *in vitro* infection and in axenic amastigotes by microscopy methods, b) a protocol for analysis of secreted proteins in the extracellular medium of cultured *Leishmania* promastigotes and amastigotes and data about the suspected secretion of *LdTyrPIP_22*, c) exploration of the possibility transgenic *L. donovani* parasites that overexpress the recombinant *LdTyrPIP_22*-RFP infect more efficiently macrophages *in vitro* and d) the construction of *Leishmania* specific expression plasmids pLexsy-sat2.1-*LdtyrPIP_22*-6his for expression of the r*LdTyrPIP_22*-His protein as intracellular or secreted form and e) the construction of transgenic *Leishmania tarentolae* cells (non-human pathogen) overexpressing r*LdTyrPIP_22*-His for isolation of the *Leishmania* produced enzyme forms for structural and further functional analysis.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η λείσμανίαση αποτελεί μία από τις παραμελημένες τροπικές ασθένειες που ετησίως προσβάλλει χιλιάδες άτομα. 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 λείσμανιάσης και της επίσης εν δυνάμει θανατηφόρας λείσμανιάσης του σκύλου. Η παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία αφορά τον υποκυττάριο εντοπισμό, το βιοχημικό και λειτουργικό χαρακτηρισμό της φωσφατάσης διπλής ενεργότητας *LdTyrPIP₂*, ενός πιθανού φαρμακευτικού στόχου του παρασίτου *Leishmania donovani*.

Η έρευνα πραγματοποιήθηκε εξ' ολοκλήρου στην Ομάδα Ενδοκυττάριου Παρασιτισμού του τμήματος Μικροβιολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ, υπό την επίβλεψη της Ερευνήτριας Β', Δρ. Χαραλαμπίας Μπολέτη, και έχει χρηματοδοτηθεί μερικώς από το πρόγραμμα ΠΛΑΤΩΝ, καθώς και τον Ειδικό Λογαριασμό Κονδυλίων Έρευνας του ΕΚΠΑ.

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 εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας. Η υπομονή, κατανόηση και συμπαράσταση που έδειξε κατά τη διάρκεια της συγγραφής της διατριβής αυτής είναι πραγματικά αξιομνημόνευτες. Επίσης την ευχαριστώ ιδιαίτερα για την ευκαιρία που μου πρόσφερε, να συμμετέχω στο σεμινάριο «The new microbiology» που διοργανώθηκε από τα EMBO και FEBS τον Αύγουστο του 2016, καθώς και στο 67ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ. Αμαλία Παπαδάκη για τη βοήθειά της σχετικά με πειραματικά πρωτόκολλα και τις συμβουλές της, την Αναστασία Κοτοπούλη για την παροχή αντιδραστηρίων που εκείνη δημιούργησε στα πλαίσια της διπλωματικής της εργασίας, καθώς και όλα τα μέλη της ομάδας Ενδοκυττάριου Παρασιτισμού που βρεθήκαμε στο ίδιο εργαστηριακό «σπίτι» για τις όμορφες αναμνήσεις. Ιδιαίτερη μνεία θα ήθελα να κάνω στο συμφοιτητή στο μεταπτυχιακό και καθημερινό συνάδελφο στο εργαστήριο Δρόσο Κουρούνη, για όλες τις φορές που γελάσαμε ή διαφωνήσαμε, κάνοντας την καθημερινότητα του εργαστηρίου ξεχωριστή. Επίσης ευχαριστώ τους φίλους μου Ειρήνη και Κωνσταντίνο που με στήριξαν σε όλη αυτή την πορεία μου, που μοιράζονται μαζί μου τις ανησυχίες τους για την έρευνα, εξαιρώντας το ενδιαφέρον μου για τα πεδία ενασχόλησής τους, ενώ σε περιόδους απογοήτευσης με βοηθούν να ανακτήσω το ενδιαφέρον μου για την έρευνα συνολικά. Τέλος, λέω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου, Ελένη, Γιάννη, Κωνσταντίνα, Μίνα, Ολυμπία, Νίκο που χωρίς εκείνους τίποτα από όλα αυτά δεν θα ήταν εφικτό. Σας ευχαριστώ και σας αγαπώ.

Την όλη προσπάθεια αφιερώνω στο θείο μου Ηλία, η απώλεια του οποίου έπαιξε καταλυτικό ρόλο στις επιλογές και τις καταστάσεις που με οδήγησαν εδώ.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Λεϊσμανίαση

1.1.1. Γενικά Στοιχεία

Η λεϊσμανίαση αποτελεί μια ομάδα λοιμωδών νοσημάτων η οποία προκαλείται από τα μονοκύτταρα παράσιτα του γένους *Leishmania* που προσβάλλουν ανθρώπους και άλλα θηλαστικά ζώα. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (Π.Ο.Υ.) η λεϊσμανίαση, 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 γιατρό 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 στρατιωτικός γιατρός Donovan, πραγματοποιώντας μικροσκοπικές παρατηρήσεις, διαπίστωσε πως ο μικροοργανισμός δεν ήταν Τρυπανόσωμα, όπως πίστευε ο Leishman, αλλά ανήκε στην οικογένεια των τρυπανοσωματιδίων. Τελικά, ο γιατρός 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 λεϊσμανίαση, ονομάστηκε *Leishmania donovani* (*L. donovani*), προς τιμήν των Leishman και Donovan (Gibson 1983).

1.1.2. Κλινικές Μορφές

Οι τρεις βασικές κλινικές μορφές Λεϊσμανίασης είναι η σπλαχνική (VL, Visceral Leishmaniasis), η οποία επηρεάζει τα αιμοποιητικά όργανα και προκαλεί θάνατο αν δεν αντιμετωπισθεί με θεραπεία, η δερματική (CL, Cutaneous Leishmaniasis) που προκαλεί παραμορφωτικές δερματικές αλλοιώσεις που μπορούν να αυτοϊαθούν και η βλεννογονοδερματική Λεϊσμανίαση (MCL, Muco-cutaneous Leishmaniasis) που προκαλεί εκτεταμένη καταστροφή των στοματικών και ρινικών βλεννογόνων με παραμορφωτικές βλεννογονοδερματικές αλλοιώσεις (Εικόνα 1.1). Οι διάφορες μορφές της Λεϊσμανίασης

προκύπτουν από τον πολλαπλασιασμό των παρασίτων στα φαγολυσοσώματα των μακροφάγων, στο χόριο, και στο ρινο-στοματοφαρυγγικό 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). (Εικόνα 1.2).

Η σπλαχνική Λεισμανίαση είναι η πιο σοβαρή μορφή της νόσου. Μπορεί να προκληθεί από τα παράσιτα *Leishmania infantum* ή *Leishmania donovani* με διαφορές στην εκδήλωση της ασθένειας, στους ασπόνδυλους ξενιστές (σκνίπα, από την οποία μεταδίδεται), στην γεωγραφική κατανομή αλλά και στους σπονδυλωτούς ξενιστές (ζώα, άνθρωπος) (Lukeš, Mauricio et al. 2007).



Εικόνα Error! No text of specified style in document..1. Κορίτσι με δερματική (αριστερά), αγόρι με σπλαχνική Λεισμανίαση (κέντρο) και βλεννογονοδερματική Λεισμανίαση (δεξιά)



Εικόνα Error! No text of specified style in document..2. Εικόνες των ασπόνδυλων ξενιστών *Phlebotomus* (αριστερά) και *Lutzomyia* (δεξιά)

1.1.3. Επιδημιολογία

Η *L. donovani* προκαλεί σπλαχνική λεισμανίαση (Kala-Azar) και δερματική λεισμανίαση post-kala-azar. Εκτιμάται ότι περίπου 200.000-400.000 νέα κρούσματα σπλαχνικής λεισμανίασης και

>20.000 θάνατοι συμβαίνουν ετησίως. Πάνω από το 90% των νέων περιστατικών σπλαχνικής λεισμανιάσης 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).

Η δερματική λεισμανίαση είναι η πιο συχνή μορφή της νόσου. Ο εκτιμώμενος αριθμός των νέων κρουσμάτων δερματικής λεισμανιάσης 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).



Εικόνα Error! No text of specified style in document..3. Περιοχές με υψηλό κίνδυνο εμφάνισης σπλαχνικής και δερματικής λεισμανιάσης (http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index.html)

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

Παρά τις προσπάθειες που καταβάλλονται σε διάφορα πεδία έρευνας, από την αρχή του περασμένου αιώνα, για τη μελέτη και καταπολέμηση των παρασίτων του γένους *Leishmania*, επιβεβαιώνεται η επανεμφάνιση ή/και εξάπλωσή τους σε νέες περιοχές, όπως η Β. Ιταλία, η Κίνα, η Βραζιλία (στο παρελθόν ήταν ενδημική σε αγροτικές περιοχές, ενώ πλέον υπάρχουν κρούσματα και στις μεγάλες πόλεις) και το κεντρικό Ισραήλ (Arias, Monteiro et al. 1996, Guan, Zuo et al. 2003, Nasereddin, Baneth et al. 2005). Παράγοντες που έχουν συμβάλει σε αυτό το φαινόμενο είναι οι κλιματολογικές και περιβαλλοντικές αλλαγές που ευνοούν τη μετακίνηση των εντόμων-φορέων, η αυξημένη μετανάστευση από ενδημικές χώρες, αλλά και ο αυξημένος

αριθμός ταξιδιωτών παγκοσμίως καθώς και η επέκταση της αστικοποίησης σε αγροτικές και δασικές περιοχές (Dujardin, Campino et al. 2008). Η ταυτόχρονη μόλυνση του ανθρώπου με το παράσιτο *Leishmania* και τον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV) εντείνει το πρόβλημα σε ανεπτυγμένες και αναπτυσσόμενες χώρες (Desjeux 2001, Wolday, Berhe et al. 2001, Desjeux 2004), με αύξηση του κινδύνου ανάπτυξης της σπλαχνικής λεισμανίασης κατά 100-1000 φορές (WHO, Leishmaniasis 2015).

1.1.4. Πρόληψη και Θεραπεία

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.

Οι ενώσεις του πεντασθενούς αντιμονίου ήταν -από τη δεκαετία του 1940 και για μεγάλο χρονικό διάστημα- η φαρμακευτική αγωγή πρώτης επιλογής για τη Λεισμανίωση 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 B, αμφοτερικίνη B, 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 B. 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 λεισμανίωσης (Croft, Sundar et al. 2006).

1.2. Το παράσιτο *Leishmania* spp

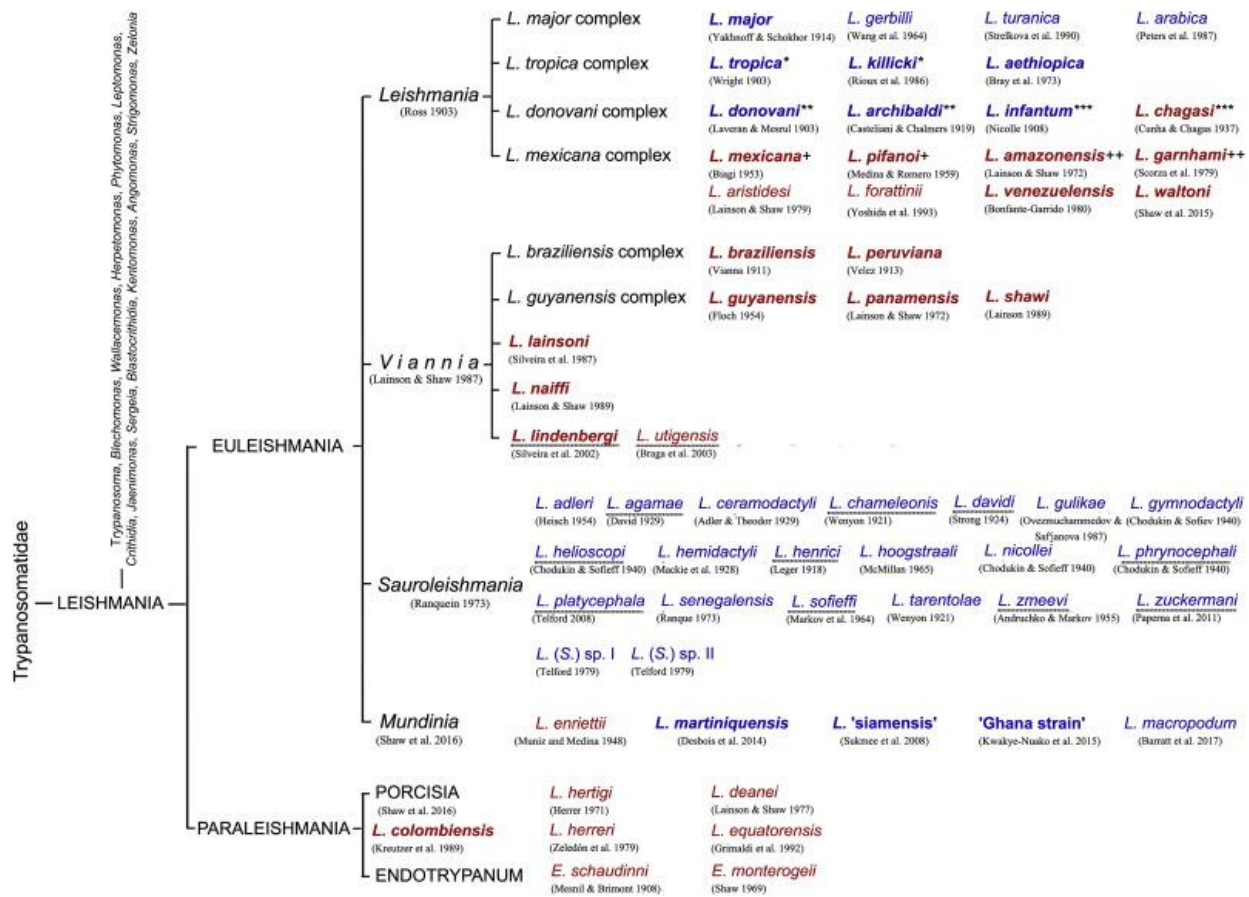
1.2.1. Φυλογένεση

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*, *Vianna* και *Sauroleishmania* (Banuls, Hide et al. 2007). Τα δύο πρώτα είναι εκείνα που μολύνουν τα θηλαστικά και υφίστανται περαιτέρω 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 *Vianna* 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).

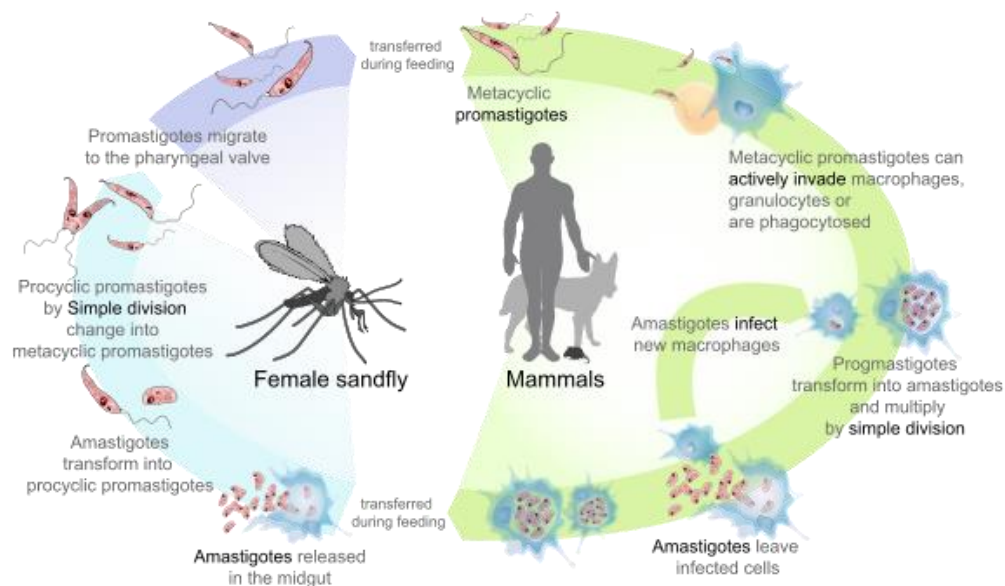
1.2.2. Κύκλος ζωής

Κατά τη διάρκεια του πολύπλοκου κύκλου ζωής του γένους *Leishmania*, τα παράσιτα εναλλάσσονται μεταξύ επιμήκους προμαστιγοφόρας μορφής προσαρμοσμένης στον εξωκυττάριο χώρο της εντερικής κοιλοτήτων του αρθρόποδου ξενιστή (προμαστιγωτά), και ωοειδούς μη μαστιγοφόρας μορφής προσαρμοσμένης να επιβιώνει ενδοκυττάρια σε μακροφάγα κύτταρα θηλαστικού (αμαστιγωτά) (Εικόνα 1.6). Τα μετακυκλικά προμαστιγωτά, δηλαδή το στάδιο που είναι μολυσματικό το παράσιτο, εγχύονται στο θηλαστικό ξενιστή από την προβοσκίδα της σκνίπας κατά τη διάρκεια των γευμάτων αίματος. Λόγω της παρουσίας αρκετών γλυκο-συμπλεγμάτων στην επιφάνειά τους, τα προμαστιγωτά αυτά προσκολλώνται στην πλασματική μεμβράνη των μακροφάγων και επάγουν τη φαγοκυττάρωσή τους (Lodge and Descoteaux 2008). Τα προμαστιγωτά μετά την είσοδο στο κύτταρο παραμένουν μέσα στα παρασιτοφόρα φαγολυσοσώματα, όπου τα παράσιτα βρίσκονται και πολλαπλασιάζονται κατά τη



Εικόνα 1.5: Ταξινόμηση του πρωτόζωου *Leishmania*. (Akhoundi, Downing et al. 2017).

διάρκεια του κύκλου ζωής τους. Στη συνέχεια, τα προμαστιγωτά διαφοροποιούνται σε αμαστιγωτά, τα οποία είναι προσαρμοσμένα να ζουν σε όξινο περιβάλλον, και διαιρούνται. Μετά από πολλές διαιρέσεις, προκύπτει μεγάλος αριθμός αμαστιγωτών και γίνεται λύση των μακροφάγων, απελευθερώνοντας παράσιτα που μπορούν να μολύνουν νέα μακροφάγα ή να προσληφθούν από σκνίπες κατά τη διάρκεια νέων γευμάτων αίματος. Στις σκνίπες, τα αμαστιγωτά μετατρέπονται σε προκυκλικά προμαστιγωτά στο έντερο όπου πολλαπλασιάζονται και εκκινούν τη διαφοροποίησή τους, διαδικασία γνωστή ως μετακυκλογένεση. Οι μη μολυσματικές μορφές διαφοροποιούνται σε μολυσματικούς μετακυκλικά προμαστιγωτά που μεταναστεύουν στην προβοσκίδα, αρχίζοντας έτσι έναν νέο κύκλο μόλυνσης (Bates 1994).



Εικόνα 1.6 Κύκλος ζωής του γένους *Leishmania* ((Χαραλάμπους 2007)Wikipedia)

1.2.3. Ανατομία

Τα παρασιτικά πρωτόζωα της οικογένειας Trypanosomatidae είναι ευκαρυωτικά κύτταρα που έχουν κλασική υποκυτταρική οργάνωση με μερικά από τα ίδια κύρια οργάνδια που βρίσκονται στα κύτταρα των θηλαστικών-ξενιστών. Ωστόσο, έχουν επίσης και ειδικά οργάνδια που απουσιάζουν σε άλλους ευκαρυωτικούς οργανισμούς ή φέρουν χαρακτηριστικά που υπάρχουν αποκλειστικά στα τρυπανοσωματίδια. Μελέτες έχουν δείξει ότι σε αυτά τα οργάνδια εμφανίζονται αρκετές μεταβολικές οδοί, μερικές από τις οποίες είναι εντελώς διαφορετικές από εκείνες που βρίσκονται σε κύτταρα θηλαστικών, υποδεικνύοντας έτσι τη δυνατότητα ανάπτυξης νέων φαρμάκων έναντι νέων θεραπευτικών στόχων που είναι πιο επιλεκτικά και λιγότερο τοξικά για τους ασθενείς (Rodrigues, Godinho et al. 2014).

Προμαστιγωτά

Τα παράσιτα στην προμαστιγωτή μορφή είναι επιμηκυσμένα και φέρουν το μαστίγιο το οποίο εκφύεται από το εμπρόσθιο μέρος. Ο πυρήνας είναι περίπου σφαιρικός και συνήθως στη μέση του μήκους του σώματος του παρασίτου. Σε όλη την έκταση του σώματος διακλαδίζεται το μοναδικό μιτοχόνδριο. Μεταξύ του πυρήνα και του μαστιγίου βρίσκεται μια ραβδοειδής δομή, ο κινητοπλάστης, η θέση του μιτοχονδριακού DNA. Γύρω από τον πυρήνα και σε όλο το σώμα

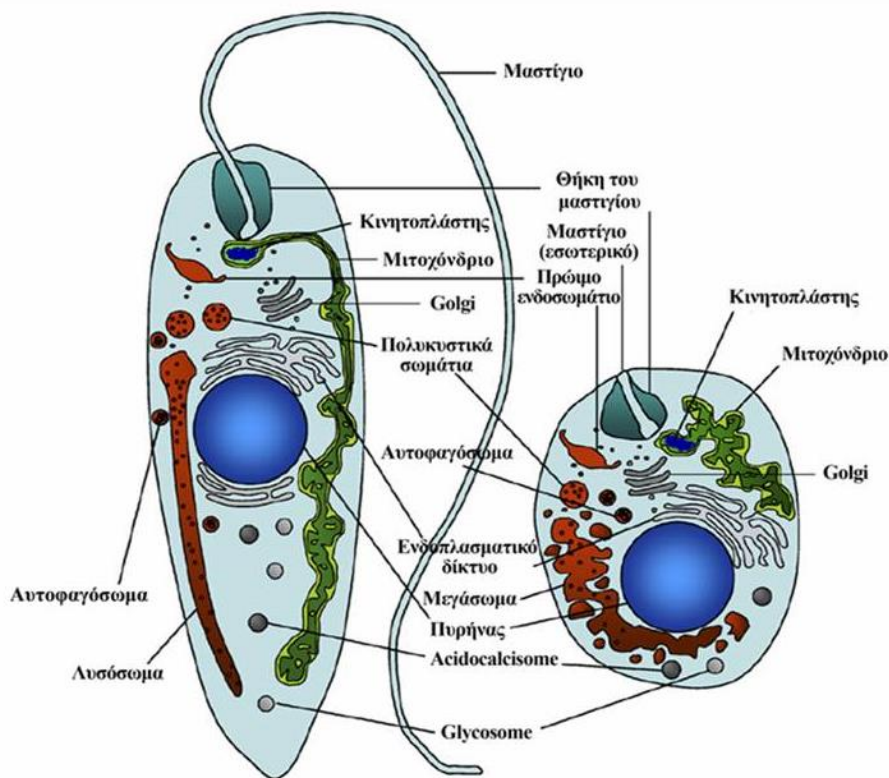
των *Leishmania* εκτείνεται το ενδοπλασματικό δίκτυο, ενώ το σύμπλεγμα Golgi εδράζεται πλησίον του σημείου έκφυσης του μαστιγίου. Το σημείο αυτό πρόκειται για εγκόλπωση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και αποτελεί το κύριο σημείο ενδοκύττωσης και έκκρισης. Στη βάση του μαστιγίου υπάρχει το βασικό σωματίο, απ' όπου και εκκινά το μαστίγιο. Παράλληλα στο μαστίγιο υπάρχει μία δομή που βοηθά στην κίνηση του μαστιγίου, η παραμαστιγιακή ράβδος (paraflagellar rod). Επιπρόσθετα, σε όλο το μήκος του σώματος του του κυττάρου εκτείνεται ένα σύστημα πολλών κυστιδίων που υποστηρίζεται από μικροσωληνίσκους που το περιβάλλουν. Τα κυστίδια αυτά εμπλέκονται στα προμαστιγωτά με τη διαδικασία της ενδοκύττωσης. Ακόμη υπάρχουν οργανίδια με όξινο χαρακτήρα, τα οξυασβεστιοσώματα (acidocalcisomes). Είναι πλούσια σε ασβέστιο και άλλα ιόντα κι παίζουν σημαντικό ρόλο στην ωσμωρρύθμιση. Διάσπαρτα στο κυτταρόπλασμα υπάρχουν αρκετά έγκλειστα λιπιδίων, για τη λειτουργική σημασία των οποίων λίγα είναι γνωστά. Τέλος, σημαντικά ένζυμα μεταβολικών οδών που σε άλλα ευκαρυωτικά κύτταρα υπάρχουν στο κυτταρόπλασμα, βρίσκονται στα παράσιτα *Leishmania* σε συγκεκριμένα οργανίδια που λέγονται γλυκοσώματα (Εικόνα 1.7).

Αμαστιγωτά

Η αμαστιγωτή μορφή είναι σφαιρική και περίπου 10 φορές μικρότερη από την προμαστιγωτή. Ο πυρήνας βρίσκεται στη μέση του κυττάρου με το ενδοπλασματικό δίκτυο να τον περιβάλλει, ενώ το σύμπλεγμα Golgi είναι πλησίον του θύλακα του μαστιγίου. Το μιτοχόνδριο διακλαδίζεται στο σώμα του κυττάρου και ο κινητοπλάστης είναι μεταξύ πυρήνα και μαστιγίου. Στα αμαστιγωτά το μαστίγιο είναι πολύ μικρό σε μήκος και συνήθως δεν εκβάλλει πέρα από το θύλακα. Στα αμαστιγωτά εμφανίζονται μεγάλα κυτταρικά διαμερίσματα, τα μεγασώματα, ο τελικός προορισμός όλων των μακρομορίων που συλλέγει το παράσιτο από το εξωκυττάριο υλικό μέσω ενδοκύττωσης. Εκεί επίσης συγκεντρώνονται ένζυμα που έχει συνθέσει το ίδιο το πρωτόζωο. Οξυασβεστιοσώματα, λιπιδικά έγκλειστα και γλυκοσώματα υπάρχουν επίσης στα αμαστιγωτά (Εικόνα 1.7).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι ο αριθμός των γλυκοσωμάτων και ο όγκος που καταλαμβάνουν στο κυτταρόπλασμα ποικίλλει ανάλογα με το είδος του παρασίτου και το αναπτυξιακό στάδιο, χαρακτηριστικά τα οποία σχετίζονται άμεσα με το μεταβολισμό. Οι μορφές που διαβιούν στο αίμα έχουν μεγάλο αριθμό γλυκοσωμάτων και ενεργητική τη γλυκολιτική οδό,

και είναι διαφορετικές από τις προκυκλικές μορφές, όπου ο αριθμός των γλυκοσωμάτων είναι μικρότερο και ο μιτοχονδριακός μεταβολισμός είναι πολύ ενεργός (Vickerman and Tetley 1977).



Εικόνα 1.7 Σχηματική αναπαράσταση των κύριων ενδοκυτταρικών οργανιδίων ενός προμαστιγωτού (αριστερά) και ενός αμαστιγωτού παρασίτου (δεξιά). Η θήκη του μαστιγίου αποτελεί το πρόσθιο άκρο του κυττάρου

1.2.4. Αλληλεπίδραση παρασίτου και θηλαστικού ξενιστή

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, όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη παράγραφο γίνεται στη συνέχεια 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).

Επιβίωση στο φαγολυσόσωμα του μακροφάγου, ένα απαραίτητο στάδιο του κύκλου ζωής του παρασίτου

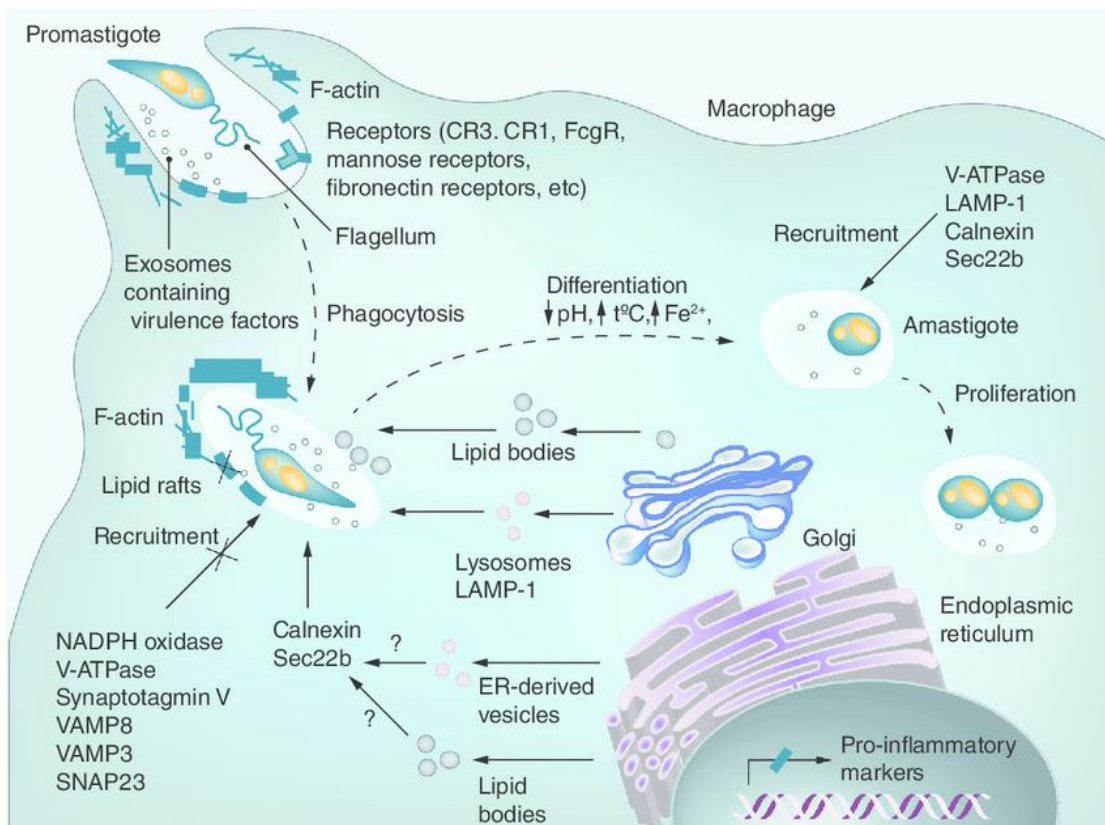
Η φαγοκυττάρωση είναι μία μορφή ενδοκυττάρωσης μεγάλων σωματιδίων, όπως βακτηρίων, πρωτοζωικών παρασίτων ή νεκρών κυττάρων θηλαστικού, κατά την οποία τα φαγοςώματα που φέρουν τα σωματίδια συντήκονται με λυσοσώματα, σχηματίζοντας τα φαγολυσοσώματα (Freeman and Grinstein 2014) στα οποία γίνεται αποικοδόμηση των σωματιδίων. Στην λειτουργία αυτή εξειδικεύονται κυρίως τα φαγοκύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Τα στάδια της φαγοκυττάρωσης μικροοργανισμών διακρίνονται σε: α) πρόσδεσή τους σε

επιφανειακό υποδοχέα του μακροφάγου, β) σχηματισμό προεκβολών της κυτταρικής μεμβράνης του μακροφάγου (ψευδοπόδια) που περιβάλλουν και εγκολπώνουν τον μικροοργανισμό, 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 φαγώσωμα (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 1.8) του μακροφάγου, σχηματίζοντας το φαγολυσώσωμα (Podinovskaia and Descoteaux 2015).

Στην περίπτωση του παρασίτου *Leishmania*, μετά την είσοδό του στα μακροφάγα, οι προμαστιγωτές μορφές του παρασίτου καθυστερούν τη βιογένεση του φαγολυσώματος προκειμένου να γίνει διαφοροποίηση τους σε αμαστιγωτές μορφές πριν η ωρίμανση του παρασιτοφόρου φαγοσώματος προχωρήσει στο τελικό στάδιο του φαγολυσώματος. 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 (Podinovskaia and Descoteaux 2015). Για να αποφευχθεί η έκθεση τους σε οξειδωτικό περιβάλλον, τα αμαστιγωτά παράσιτα αναστέλουν 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 φαγολυσώματος 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 φαγολυσώματος (Desjardins and Descoteaux 1998). Ακόμη, ένας σημαντικός μηχανισμός των μακροφάγων για την αντιμετώπιση των παθογόνων μικροοργανισμών είναι η δημιουργία των ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS=reactive oxygen species), μέσω της οξειδάσης του NADPH. Το παράσιτο *Leishmania donovani*, συγκεκριμένα, αναστέλλει τη λειτουργία του ενζύμου αυτού, μετά από φωσφορυλίωση του παράγοντα p47(phox) που συμμετέχει στην ενεργοποίηση της οξειδάσης του NADPH (Lodge and Descoteaux 2006). Τα παράσιτα που θα επιβιώσουν πολλαπλασιάζονται στο φαγώσωμα 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.



Εικόνα 1.8: Στάδια σχηματισμού και ωρίμανσης του φαγοσώματος. (Podinovskaia and Descoteaux 2015)

Μολυσματικοί παράγοντες του παρασίτου

Το παράσιτο προκειμένου να επιβιώσει στο αφιλόξενο μικροπεριβάλλον του γαστρεντερικού συστήματος της σκνίπας (ασπόνδυλος ξενιστής), του φαγοκυττάρου του μακροφάγου και του ανοσοποιητικού συστήματος του τελικού ξενιστή, έχει αναπτύξει ποικίλες στρατηγικές με τις οποίες καταφέρνει να μολύνει και να πολλαπλασιάζεται εξωκυττάρια στο γαστρεντερικό επιθήλιο του αρθρόποδου ξενιστή καθώς και να εγκαθίσταται, πολλαπλασιάζεται και

εξαπλώνεται στα μονοκύτταρα/μακροφάγα του θηλαστικού ξενιστή (Moradin and Descoteaux 2012).

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 αμαστιγωτό σε προμαστιγωτότην είσοδο και την εγκατάσταση του παρασίτου στο μακροφάγο του θηλαστικού ξενιστή, το νέο στάδιο της διαφοροποίησης από προμαστιγωτό σε αμαστιγωτό, και την διευκόλυνση της ανάπτυξης του μικροοργανισμού στους δύο αυτούς διαφορετικούς ξενιστές.

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 έχειδειχθεί 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 έχειδειχθεί (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 λείσμανιοφόρου 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 δυνείνης 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 αντίστοιχή 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 όξινες 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 φωσφατασών 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)

1.3. Νέοι θεραπευτικοί στόχοι και φάρμακα

1.3.1. Φωσφατάσες ως μοριακοί στόχοι για την ανάπτυξη αντι-παρασιτικών φαρμάκων

Οι κινάσες και οι φωσφατάσες πρωτεϊνών αποτελούν, γενικά, θεραπευτικούς στόχους, μέσω φαρμάκων που δρουν ως αναστολείς τους. Για το λόγο αυτό, η εύρεση πρωτεϊνικών κινασών και φωσφατασών που να αντιπροσωπεύουν στόχους για νέους αντι-παρασιτικούς παράγοντες είναι ελκυστικό πεδίο έρευνας. Οι πρωτεϊνικές κινάσες έχουν γίνει πλέον δημοφιλής στόχος φαρμάκων, αποτελώντας το 30% πολλών ερευνητικών προγραμμάτων στη βιομηχανία των φαρμάκων (Cohen 2002).

Η μέχρι στιγμής έρευνα για παρασιτικές πρωτεϊνικές κινάσες και φωσφατάσες, εν δυνάμει μολυσματικών παραγόντων άρα και πιθανών στόχων φαρμάκων-αναστολέων, έχει ωφεληθεί σε μεγάλο βαθμό από το πρόγραμμα αλληλούχισης EST για ταυτοποίηση μοριακών στόχων (Canduri, Perez et al. 2007). Η ανάγκη για συνεχιζόμενη έρευνα σε αυτό το πεδίο είναι σταθερή, επιπλέον, λόγω της πιθανής ανάπτυξης ανθεκτικότητας των παρασίτων που μπορεί να καταστήσει γρήγορα ένα πολύ αποτελεσματικό φάρμακο αναποτελεσματικό (Chakravarty and Sundar 2010) και παρά την πρόοδο που έχει επιτευχθεί με τους αναστολείς κινασών ως αντι-παρασιτικά φάρμακα, η έρευνα σχετικά με φωσφατάσες, ως στόχων αντι-παρασιτικών φαρμάκων, έχει ελάχιστα προχωρήσει λόγω του ευρέως φάσματος υποστρωμάτων που αποφωσφορυλιώνουν, της ύπαρξης διαφορετικών λειτουργικών υπομονάδων των ολοενζύμων και της έλλειψης αντιδραστηρίων (ειδικότερα αναστολέων) για την μελέτη ειδικά επιλεγμένων φωσφατασών (Roy and Cyert 2009, Slupe, Merrill et al. 2011). Πρόσφατα σημαντικά αποτελέσματα δείχνουν ότι είναι εφικτό να σχεδιαστούν ισχυροί και εκλεκτικοί ρυθμιστές φωσφατασών με θεραπευτική δυναμική και ενθαρρύνουν την έρευνα με στόχο την επικύρωση των φωσφατασών ως στόχων για ανάπτυξη φαρμάκων (McParland, Varsano et al. 2011).

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

Η κυτταρική μεμβράνη των προμαστιγωτών παρασίτων *Leishmania* περιέχει γλυκοπρωτεΐνες, πρωτεογλυκάνες και γλυκολιπίδια. Στα κύτταρα αυτά, η έκκριση πιστεύεται ότι ρυθμίζεται αποκλειστικά στην περιοχή έκφυσης του μαστιγίου (flagellar pocket) (και στα αμαστιγωτά, στο θύλακα του μαστιγίου) (Overath, Stierhof et al. 1997, 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 λειψμανιολυσίνη, gr63, κατά μήκος του ενδοπλασματικού δικτύου και του μονοπατιού που το συνδέει με την κυτταρική μεμβράνη (McConville, Mullin et al. 2002). Μέχρι στιγμής δεν έχει δειχθεί αν κάποιος μολυσματικός παράγοντας του παρασίτου εκκρίνεται από την περιοχή έκφυσης του μαστιγίου (McConville, Mullin et al. 2002).

Αν και τα παράσιτα του είδους *Leishmania* χρησιμοποιούν την κλασσική αμινοτελική αλληλουχία που αποτελεί σήμα για την έκκριση των πρωτεϊνών, μέσω της περιοχής έκφυσης του μαστιγίου, ο μηχανισμός δεν έχει ακόμα εξακριβωθεί. Οι δύο επιφανειακές γλυκοπρωτεΐνες, η λιποφωσφογλυκάνη και η GP63, αρχικά συντίθενται με αυτή την αλληλουχία-σήμα που στη συνέχεια κόβεται με πρωτεόλυση (McConville, Mullin et al. 2002). Εντούτοις, η συντριπτική πλειοψηφία των χαρακτηρισμένων ως εκκρινόμενων πρωτεϊνών των παρασίτων αυτών δεν έχουν κάποια αναγνωρισμένη αλληλουχία έκκρισης, με εξαίρεση τις πρωτεΐνες που αρχικά δεσμεύονται στη μεμβράνη (Bates and Dwyer 1987, McConville, Mullin et al. 2002, Rogers, Ilg et al. 2004), κάτι που υποδηλώνει την ύπαρξη σημαντικών μη κλασσικών μονοπατιών έκκρισης. Παρά τη μεγάλη δυνητική σημασία της έκκρισης πρωτεϊνών στα παράσιτα *Leishmania*, η οποία θα μπορούσε να βοηθήσει στην κατανόηση της λειτουργίας των παρασίτων, μόνο ένας μικρός αριθμός τους έχει μελετηθεί (Silverman, Chan et al. 2008).

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

φωσφοϊνοσιτιδίων) του παθογόνου βακτηρίου *Mycobacterium tuberculosis* (Kastner, Dussurget et al. 2011, Wong, Chao et al. 2013).

1.3.3. Φωσφατάσες του παρασίτου *Leishmania*

Ανάλυση του συνόλου των φωσφατασών (phosphatome) των κινητοπλαστιδών (Brenchley, Tariq et al. 2007) έδειξε ότι τα παράσιτα αυτά διαθέτουν ορθόλογα (orthologues) μόρια πολλών ήδη μελετημένων ευκαρυωτικών φωσφατασών από άλλα είδη αλλά και από τον άνθρωπο. Ωστόσο, πολλές από τις φωσφατάσες των κινητοπλαστιδών διαθέτουν πρωτότυπη αρχιτεκτονική και ασυνήθιστους συνδυασμούς δομικών στοιχείων, υποδηλώνοντας διακριτούς λειτουργικούς ρόλους. Επομένως, τα διαφορετικά χαρακτηριστικά των φωσφατασών από τα είδη *Leishmania* μπορούν να αξιοποιηθούν για επιλογή νέων στόχων για ανάπτυξη φαρμάκων, χρησιμοποιώντας τη γνώση σχετικά με αναστολείς πρωτεϊνικών φωσφατασών (Heneberg 2009, Sobhia, Paul et al. 2012).

Φωσφατάσες τυροσίνης, σερίνης/θρεονίνης και διπλής εξειδίκευσης

Μία ενδιαφέρουσα διαφορά του συνόλου των φωσφατασών των παρασιτικών πρωτοζώων *Leishmania* σε σχέση με άλλα ευκαρυωτικά κύτταρα είναι ο μεγάλος αριθμός των μη τυπικών φωσφατασών (Sadatomi, Tanimura et al. 2013) (πάνω από το ένα τρίτο του συνόλου των φωσφατασών), οι περισσότερες εκ των οποίων ανήκουν στην οικογένεια φωσφατασών διπλής εξειδίκευσης (dual specificity phosphatases, DSP, που αποφωσφορυλιώνουν κατάλοιπα φωσφοτυροσίνης και φωσφοσερίνης/ φωσφοθρεονίνης εντός ενός υποστρώματος) με σημαντική, όμως, απόκλιση από τις κλασσικές DSP (Wei, Jiao et al. 2013). Οι πρώτες αναφέρονται ως μη τυπικές DSP (aDSP).

Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως τα καλύτερα αντι-λεϊσμανιακά φάρμακα που έχουν αναπτυχθεί μέχρι σήμερα είναι ενώσεις αρσενικού που αναστέλλουν φωσφατάσες τυροσίνης (PTP) (Shio and Olivier 2010).

Πίνακας Error! No text of specified style in document..1. Εκκρινόμενες φωσφατάσες παθογόνων βακτηρίων και ο ρόλος τους στην αλληλεπίδραση παθογόνου-ξενιστή (Wong, Chao et al. 2013)

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

				του NADPH
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	PtpA	VPS33B, υπομονάδα H	ΑΤΡάση-V	Αναστολή ωρίμανσης του φαγοσώματος
	PtpB	Άγνωστα		Αναστολή των μονοπατιών ERK1/2 και p38 και της κασπάσης 3, ενεργοποίηση της Akt
	SapM	PI3P		Αναστολή ωρίμανσης του φαγοσώματος
<i>Pseudomonas syringae</i>	HopAO1	Άγνωστα		Καταστολή απόπτωσης

Φωσφατάσες φωσφοϊνοσιτιδίων και τριπλής εξειδίκευσης

Οι φωσφατιδυλοϊνοσιτόλες (PtdIns) είναι σημαντικοί μεταβολίτες που εμφανίζονται σε μικρά ποσοστά στις μεμβράνες των ευκαρυωτικών κυττάρων. Μπορούν να φωσφορυλιωθούν στις τρεις από τις πέντε ελεύθερες υδροξυλομάδες της ινοσιτόλης (D-3, 4 και 5) για να δώσουν επτά διαφορετικά φωσφοϊνοσιτιδία (PI), σε αντιδράσεις που καταλύονται από εξειδικευμένες κινάσες των φωσφοϊνοσιτιδίων. Τα ένζυμα που καταλύουν την φωσφορυλίωση στις θέσεις 3 και 4 έχουν εντοπιστεί και χαρακτηριστεί, ενώ το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση του PtdIns5P *in vivo* δεν είναι ακόμη γνωστό (Mueller-Roeber and Pical 2002). Σύμφωνα με φυλογενετική μελέτη (Brown and Auger 2011), έχουν βρεθεί παρασιτικές κινάσες (στα είδη *Leishmania*, *Trypanosoma* και *Plasmodium*) που διαφέρουν από τις ανθρώπινες ομόλογες και μπορούν να αποτελέσουν πιθανό στόχο φαρμάκων. Μέσω κατανόησης της εξελικτικής σχέσης των παρασιτικών αυτών κινασών με τις ομόλογες των ανώτερων ευκαρυωτικών μπορεί να διευκολυνθεί η επιλογή του μορίου-στόχου των φαρμάκων στα παράσιτα, αλλά και ο σχεδιασμός δοκιμασιών ανίχνευσης αυτών των κινασών (Brown and Auger 2011).

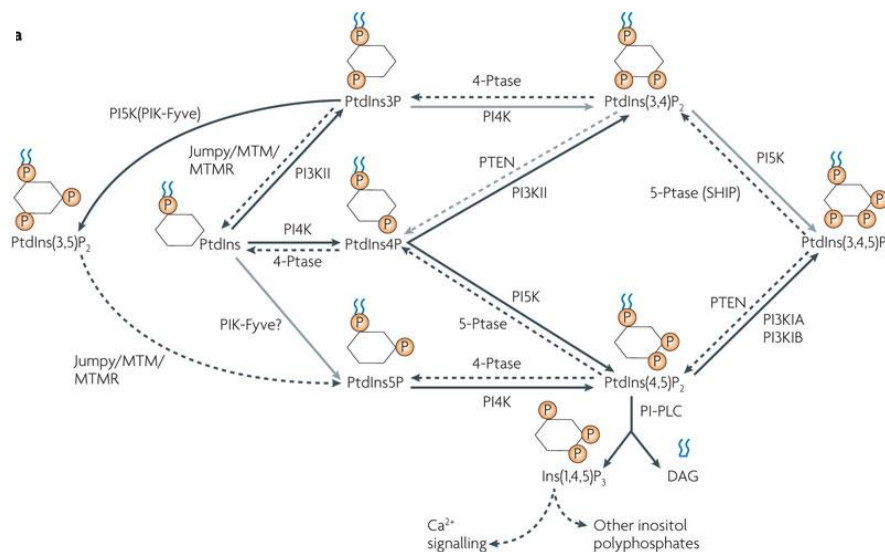
Οι φωσφατάσες των φωσφοϊνοσιτιδίων είναι ένζυμα που έχουν σημαντικούς ρόλους στα κύτταρα, όπως στη ρύθμιση της σηματοδότησης της ινσουλίνης και του μεταβολισμού της γλυκόζης (π.χ. η SHIP2 στην ομοιόσταση της γλυκόζης και στην παχυσαρκία (Clement, Krause et al. 2001, Sleeman, Wortley et al. 2005)), στη ρύθμιση αλλεργικών αντιδράσεων, όπως αναφυλαξίας και άσθματος, μέσω των σιτευτικών (SHIP1, (Galli and Tsai 2010)), στη διαφοροποίηση των πρόδρομων οστεοκλαστών (SHIP1, (Takeshita, Namba et al. 2002)), στον έλεγχο της συσσώρευσης αιμοπεταλίων (SHIP1, (Severin, Gratacap et al. 2007)). Ακόμη, οι φωσφατάσες αυτές συμμετέχουν σε διάφορες ασθένειες, όπως στην

εξέλιξη νευροεκφυλιστικών ασθενειών, καρκίνου και μυοπαθειών, ενώ εμπλέκονται στην παθογένεση πολλών άλλων ασθενειών του ανθρώπου (Dyson, Fedele et al. 2012).

Σε κύτταρα θηλαστικών, έχουν εντοπιστεί πάνω από 35 φωσφατάσες φωσφοϊνοσιτιδίων και κάποιες από αυτές έχουν ήδη χαρακτηριστεί. Διακρίνονται σε τρεις μεγάλες κατηγορίες, 3-, 4- και 5-φωσφατάσες ανάλογα με τη θέση του δακτυλίου της ινοσιτόλης που αποφωσφορυλιώνουν (Dyson, Fedele et al. 2012). Μη λιπιδικές φωσφατάσες, οι οποίες συμμετέχουν στην αποφωσφορυλίωση των πολυφωσφορυλιωμένων ινοσιτολών, εκτός των 5-φωσφατασών τύπου I που υδρολύουν τις $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ και $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$, έχουν επίσης χαρακτηριστεί και μελετηθεί..

Μέσω αλληλεπιδράσεων κατάλληλων πρωτεϊνών με την πολική κεφαλή τους, τα PI παίζουν βασικό ρόλο στον έλεγχο της επικοινωνίας των μεμβρανών του κυττάρου. Τα φωσφοϊνοσιτίδια, εξάλλου, συμμετέχουν σε άμεσες αποκρίσεις του κυττάρου σε ερεθίσματα και επομένως δρουν ως σηματοδοτικά μόρια, ενώ βοηθούν και στον προσδιορισμό της ταυτότητας των οργανιδίων. Οι λειτουργίες τους, εκτός από την κλασσική μεταγωγή σήματος και τη ρύθμιση της κυκλοφορίας των μεμβρανών, περιλαμβάνουν ρύθμιση της οργάνωσης του κυτταροσκελετού της ακτίνης και της διαπερατότητας των μεμβρανών (Di Paolo and De Camilli 2006).

Οι μεταβολικές μετατροπές των PI υπόκεινται σε ξεχωριστή χωρική και χρονική ρύθμιση και εκτελούνται από συστοιχίες κατάλληλων μεταβολικών ενζύμων. Αυτά περιλαμβάνουν, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, κινάσες που οδηγούν σε σύνθεση φωσφοϊνοσιτιδίων, αλλά και φωσφατάσες και φωσφολιπάσες που ρυθμίζουν την αποικοδόμηση των φωσφοϊνοσιτιδίων. Οι λυσοφωσφολιπάσες τύπου C υδρολύουν τα φωσφοϊνοσιτίδια, με τη φωσφολιπάση C (PI-PLC) να αποτελεί ένζυμο κλειδί του κύκλου των φωσφοϊνοσιτιδίων, δηλαδή ενός σημαντικού συστήματος μεταγωγής σήματος των κυττάρων. Οι φωσφολιπάσες C υδρολύουν τις PtdIns , $\text{PtdIns}4\text{P}$, $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ (όχι τα D3 φωσφοϊνοσιτίδια), παράγοντας τα υδατοδιαλυτά $\text{Ins}1\text{P}$, $\text{Ins}(1,4)\text{P}_2$, $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ (κύριο *in vivo* προϊόν της PI-PLC) αντίστοιχα και τη λιποδιαλυτή διακυλογλυκερόλη (DAG, εικόνα 1.9) (Λεονταρίτης 2003).



Εικόνα Error! No text of specified style in document..**4. Μεταβολισμός φωσφοϊνοσιτιδίων** (Bunney and Katan 2010)

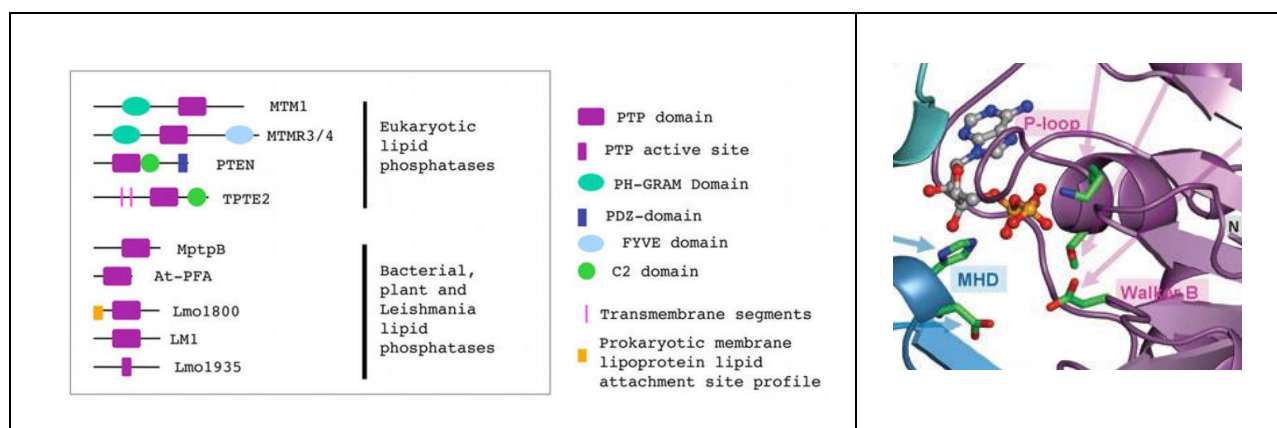
Την προηγούμενη δεκαετία, οι φωσφατάσες των PI είχαν προσελκύσει το ενδιαφέρον λόγω α) της εκτίμησης πως αποτελούν πρωταρχικούς μηχανισμούς αποικοδόμησης των φωσφοϊνοσιτιδίων και β) της συνεχώς αυξανόμενης σύνδεσής τους με ασθένειες του ανθρώπου (Lazar and Saltiel 2006, Krausz and Haucke 2007, Liu and Bankaitis 2010). Να τονιστεί και πάλι ότι η ρύθμιση του μεταβολισμού των φωσφοϊνοσιτιδίων είναι σημαντική στην παθογένεια και τη μολυσματικότητα πολλών ενδοκυττάρων παθογόνων μικροοργανισμών για τον άνθρωπο, επιτρέποντάς τους να επιζούν και να πολλαπλασιάζονται στα κύτταρα ξενιστές (Pizarro-Cerda and Cossart 2004, Roth 2004, Di Paolo and De Camilli 2006, Krausz and Haucke 2007). Οι φωσφατάσες των φωσφοϊνοσιτιδίων από μολυσματικούς βακτηριακούς μικροοργανισμούς είναι, επομένως, κλειδιά γι' αυτή τη ρύθμιση και αποτελούν στόχο για χημειοθεραπεία.

1.3.4. Άτυπες φωσφατάσες λιπιδίων σε βακτήρια και κατώτερα ευκαρυωτικά

Μία νέα οικογένεια φωσφατασών φωσφοϊνοσιτιδίων έχει περιγραφεί σε βακτήρια και κατώτερα ευκαρυωτικά κύτταρα. Οι φωσφατάσες αυτές ονομάστηκαν άτυπες φωσφατάσες λιπιδίων τριπλής εξειδίκευσης, διότι αποφωσφορυλιώνουν και φωσφοπεπτίδια με φωσφορυλιωμένη τυροσίνη και σερίνη/θρεονίνη. Η οικογένεια αυτών των ενζύμων έχει μία διατηρημένη αλληλουχία βρόγχου P (P-loop) (HCXXGKDR), συντηρημένη αλληλουχία του καταλυτικού κέντρου των φωσφατασών τυροσίνης (Εικόνες 1.10 και 1.11) και εμφανίζει παρόμοια βιοχημικά

χαρακτηριστικά με κλασσικές ευκαρυωτικές φωσφατάσες λιπιδίων (π.χ. PTEN), χωρίς να έχει όμως ομόλογα ανθρώπινα ένζυμα. Με βάση την αλληλουχία του βρόγχου P ως “μοτίβου αναγνώρισης”, εντοπίστηκαν με βιοπληροφορική ανάλυση σε βακτήρια, μύκητες και πρωτόζωα διακόσιες (200) μη χαρακτηρισμένες υποθετικές αλληλουχίες φωσφατάσων με συντηρημένη αλληλουχία βρόγχου P. Η διαμόρφωση του μοτίβου αυτού είναι υψηλά συντηρημένη, βρίσκεται κοντά στις καταλυτικά ενεργές κυστεΐνη και αργινίνη και είναι σημαντική για την πρόσδεση της φωσφορικής ομάδας (Tabernero, Aricescu et al. 2008). Στην οικογένεια αυτή των φωσφατάσων ανήκει και ο MptpB, ένας παράγοντας παθογένειας από το *Mycobacterium tuberculosis* με δράση φωσφατάσης φωσφοϊνοσιτιδίων και το διακριτό ενεργό κέντρο με αλληλουχία βρόγχου P (HCXXGKDR) που απαντάται σε πρωτεϊνικές φωσφατάσες τυροσίνης (Beresford, Saville et al. 2010).

Το παράσιτο *Leishmania donovani* διαθέτει δύο ALP, με τη διατηρημένη αλληλουχία στην περιοχή του βρόγχου P, ορθόλογες του MptpB που προαναφέρθηκε. Οι φωσφατάσες αυτές δεν έχουν ακόμη μελετηθεί και αποτελούν έναν από τους ερευνητικούς στόχους της Ομάδας Ενδοκυττάριου Παρασιτισμού στο Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ. Μία εκ των δύο αυτών πρωτεϊνών αποτελεί το αντικείμενο της παρούσας εργασίας.



Εικόνα Error! No text of specified style in document..50. Οργάνωση υποτομέων στις φωσφατάσες λιπιδίων (φωσφοϊνοσιτιδίων). Οι φωσφατάσες τύπου PTEN και MTM περιέχουν τμήμα PTP και πρόσδεσης φωσφοϊνοσιτιδίων, όπως PH-GRAM, C2 και FYVE που προκαλούν αλλοστερικό έλεγχο και βρίσκονται στο τμήμα PTP σε διαφορετικά σημεία της μεμβράνης. Οι ALP και PFA δεν παρουσιάζουν κλασσικά σημεία πρόσδεσης φωσφοϊνοσιτιδίων, εκτός της Lmo1800 (LipA) που περιέχει μία

προβλεπόμενη αλληλουχία πρόσδεσης φωσφοϊνοσιτιδίων (Beresford, Saville et al. 2010). Η LM1 είναι η ομόλογη φωσφατάση της *LdTyrPIP_22* που μελετάται στην παρούσα εργασία από το παράσιτο *L. Major*

1.3.5. Η *LdTyrPIP_22*

Προηγούμενη δουλειά (Papadaki Amalia 2017) που έγινε από την ομάδα Ενδοκυττάριου Παρασιτισμού πάνω στην *LdTyrPIP_22* είχε δώσει αποτελέσματα σχετικά με τη συγκεκριμένη φωσφατάση, για την οποία δεν υπάρχει δημοσιευμένη βιβλιογραφία.

Το γονιδίωμα του στελέχους *L. major* Friedlin περιέχει την περιοχή με ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) *LmjF_22_0250*, που αρχικά είχε κατηγοριοποιηθεί στην οικογένεια των άτυπων φωσφατασών λιπιδίων (Beresford, Saville et al. 2010). Με βάση την αλληλουχία του ορθόλογου γονιδίου από το *L. infantum* (κλώνος JPCM5, MCAN/ES/98/LLM-877, TriTryDB) έγινε κλωνοποίηση του ορθόλογου γονιδίου από το στέλεχος *L. donovani* LG13 (MHOM/ET/0000/HUSSEN). Αυτό βρέθηκε να έχει 99,6% ταυτότητα με το γονίδιο *LDBPK_220120.1* (777 bp) του αλληλουχημένου και καταχωρημένου στη βάση δεδομένων TriTrypDB στελέχους *BPK282A1 L. donovani* Nepalese. Το γονίδιο *LDBPK_220120.1*, από εδώ και κάτω *ldtyrrip_22* (*Leishmania donovani* Tyrosine **PI**Phosphatase on chromosome **22**), βρίσκεται μεταξύ των θέσεων 91159 και 91935 του χρωμοσώματος 22. Μέσα από τη σύγκριση ολόκληρης της αλληλουχίας του προϊόντος του γονιδίου *ldtyrrip_22* από το στέλεχος *L. donovani* LG13 αναγνωρίστηκαν ορθόλογες αλληλουχίες στο γονιδίωμα άλλων ειδών *Leishmania* οι οποίες είναι αυστηρά συντηρημένες υποδεικνύοντας ότι μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στον αναπτυξιακό κύκλο του παρασίτου ή/και στη μολυσματικότητα του. (Εικόνα 1.11).

Σε όλα αυτά τα ορθόλογα μόρια εμφανίζεται η χαρακτηριστική αλληλουχία CX5R στο ενεργό κέντρο, εντός του βρόγχου P των φωσφατασών τυροσίνης, στο μοτίβο του βρόγχου PTP (Εικόνα 1.11A, κόκκινο πλαίσιο)..

Όσον αφορά τα βακτηριακής προέλευσης ομόλογα μόρια (Beresford, Mulhearn et al. 2009) από τα *M. tuberculosis* (MtpB, GenBank: CCC62750.1), *L. monocytogenes* [lmo1800, NP_465325; lmo1935, NP_465459)], *Yersinia pestis* KIM10+ (WP_002228183), και *Bacillus anthracis* στέλεχος Ames (NP_845680), η *LdTyrPIP_22* εμφανίζει ταυτότητα σε όλο το μήκος της αλληλουχίας 19.4%, 29.6%, 36.1%, 27.4% και 32.4% αντίστοιχα. Στην περιοχή του καταλυτικού κέντρου, όπου βρίσκεται και το μοτίβο του βρόγχου P η ταυτότητα μεταξύ της *LdTyrPIP_22* και των αλληλουχιών από τις παραπάνω πρωτεΐνες είναι 73-91% (Εικόνα 1.12).

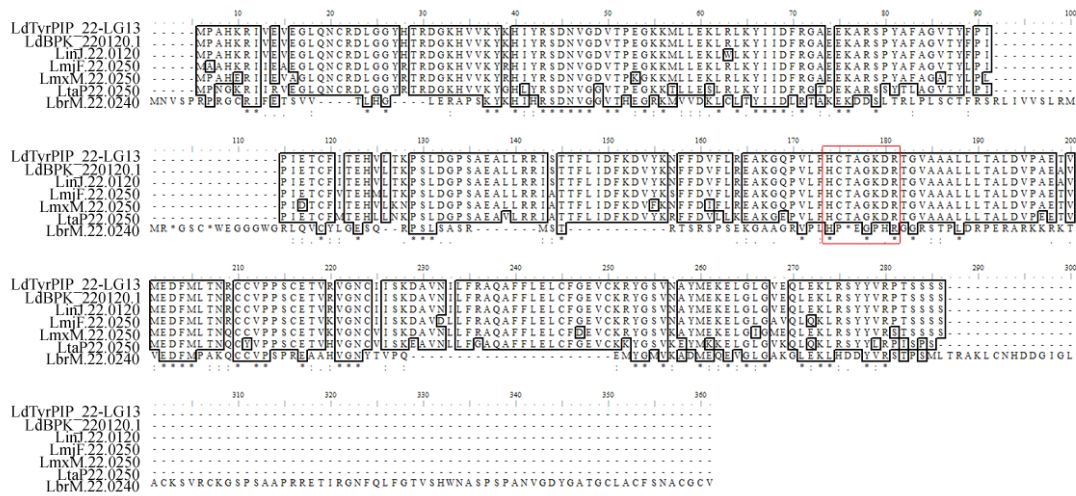
Βιοπληροφορική ανάλυση της αμινοξικής αλληλουχίας της *LdTyrPIP_22* με το λογισμικό SignalP 3.0 δεν ανίχνευσε αλληλουχία σηματοδότησης για έκκριση, ενώ μια κεντρική υδρόφοβη περιοχή (μεταξύ των αμινοξέων 160-220) που περιλαμβάνει και τον P-βρόγχο (142-153) εντοπίστηκε από το πρόγραμμα ExPASy protScale.

Η εκφρασμένη σε βακτήρια *rN15-LdTyrPIP_22-8His* βρέθηκε να έχει δράση φωσφατάσης με το υπόστρωμα p-NPP με βέλτιστη τιμή σε pH=6 που πλησιάζει τις συνθήκες pH στις οποίες βρίσκονται τα παράσιτα στον ασπόνδυλο ξενιστή. Ο προσδιορισμός έγινε αρχικά στους 37° C και στη συνέχεια στους 25° C (Εικόνα 1.13). Οι τιμές που προέκυψαν είναι συγκρίσιμες με αυτές της βιβλιογραφίας (Beresford, Saville et al. 2010). Η τιμή της δραστηριότητας που παρουσιάζεται στη δημοσίευση αυτή και αφορά στην ομόλογη πρωτεΐνη από το παράσιτο *L. major* είναι $45,47 \pm 1,52$ nmol pNP/min/mg ενζύμου και είναι συγκρίσιμη με την τιμή 74,8 nmol pNP/min/mg ενζύμου που υπολογίζεται από εμάς.

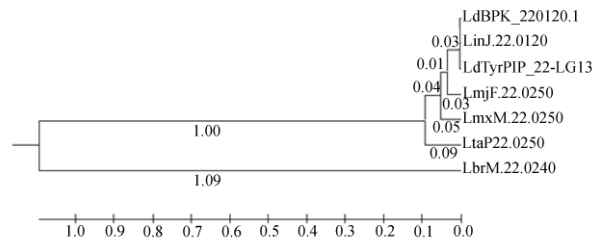
Συγκρίναμε επίσης τη δυνατότητα της *rLdTyrPIP_22* να αποφωσφορυλιώνει διαφορετικά φωσφορυλιωμένα πεπτίδια (φωσφοτυροσίνη και φωσφο-σερίνη/φωσφο-θρεονίνη) ή φωσφοϊνοσιτίδια. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν πως η ανασυνδυασμένη *rLdTyrPIP_22-8His* αποφωσφορυλιώνει κατάλοιπα φωσφο-τυροσίνης και μονοφωσφορυλιωμένων φωσφοϊνοσιτιδίων *PtdIns3P* και *PtdIns4P*. Αυτή η ιδιότητα οδήγησε και στην ονομασία της φωσφατάσης, σε συνάρτηση με τη θέση του γονιδίου *LDBPK_220120.1* στο χρωμόσωμα 22 του γονιδιώματος του παρασίτου *L. donovani*.

Σε προμαστιγωτά παράσιτα *L. donovani*, τόσο το αντίσωμα που έχει παραχθεί από ποντικό όσο και το αντίσωμα που έχει παραχθεί από κουνέλι στο εργαστήριό μας, στο σώμα του κυττάρου εντοπίζουν επιτόπους της *LdTyrPIP_22* σε υποκυττάρια δομές που ομοιάζουν με κυστίδια και άλλες που προσομοιάζουν ινίδια, γύρω από ενδοκυττάρια διαμερίσματα, ενδεχομένως οξυαλκαλοσώματα και κοντά στον κινητοπλάστη στη βάση του σημείου έκφυσης του μαστιγίου.

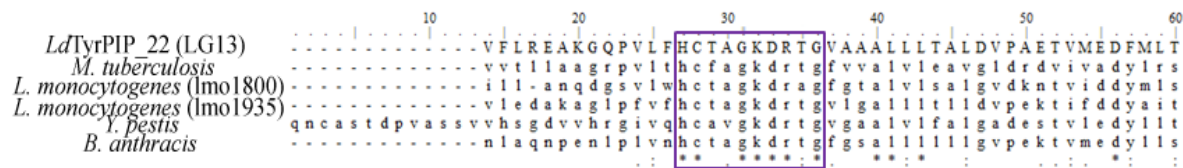
A



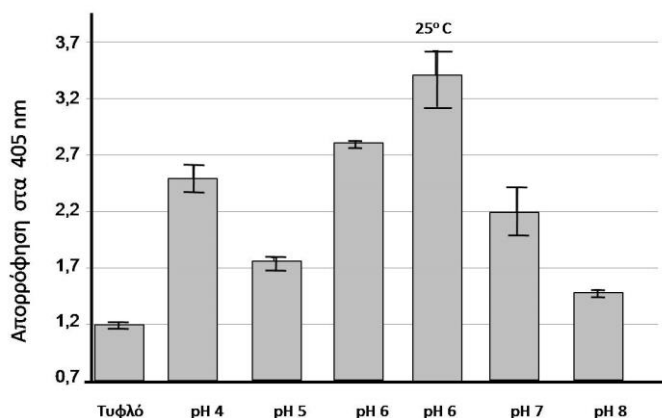
B



Εικόνα 1.11 Σύγκριση της αλληλουχίας αμινοξέων της *LdTyrPIP_22* in *Leishmania* sp. **(Α)** Στοιχίση πολλαπλών αλληλουχιών με τον αλγόριθμο ClustalW των προϊόντων των ορθόλογων γονιδίων του γονδίου *Ldtyrrip_22* σε είδη του γένους *Leishmania*. Η αλληλουχία αμινοξέων της *LdTyrPIP_22* για το στέλεχος *L. donovani* (LG13, MHOM/ET/0000/HUSSEN) (GenBank accession no MF461274) δημιουργήθηκε στη δουλειά αυτή. Οι υπόλοιπες αλληλουχίες, τόσο για το BPK282A1 (LdBPK_220120.1) από το *L. donovani*, όσο και για τα ορθόλογα της *LdTyrPIP_22* από τα *L. infantum* [κλώνος JPCM5 (MCAN/ES/98/LLM-877)] (LinJ.22.0120), *L. major* Friedlin (στέλεχος αναφοράς, MHOM/IL/80/Friedlin, zymodeme MON-103) (LmjF.22.0250), *L. mexicana* (MHOM/GT/2001/U1103) (LmxM.22.0250), *L. braziliensis* (M2904, MHOM/BR/75M2904, LbrM.22.0240) και *L. tarentolae* Parrot-Tarll (LtaP22.0250), ανακτήθηκαν από τη βάση δεδομένων TriTrypDB και αναλύθηκαν/τροποποιήθηκαν με τον πρόγραμμα BioEdit Sequence Alignment Editor. Η αμινοξική αλληλουχία του βρόγχου P είναι σε κόκκινο πλαίσιο. **(Β)** Φυλογενετικό δέντρο (UPGMA) της στοιχίσης πολλαπλών αλληλουχιών ορθόλογων μορίων της *LdTyrPIP_22* από είδη *Leishmania*.



Εικόνα 1.12 Στοίχιση πολλαπλών αλληλουχιών με τον αλγόριθμο ClustalW του ενεργού κέντρου της *LdTyrPIP_22* με τις αντίστοιχες αλληλουχίες μολυσματικών παραγόντων ομόλογων ειδών.



Εικόνα 1.13. Έλεγχος της βακτηριακής *rLdTyrPIP_22* -8His για δράση φωσφατάσης σε τιμές pH 4-8. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στους 37° C. Στο pH 6 η αντίδραση πραγματοποιήθηκε και στους 25° C. Η απορρόφηση που παρουσιάζεται για κάθε τιμή pH είναι μέση τιμή από 2 μετρήσεις. Οι τιμές του σφάλματος έχουν προκύψει από 4 διαφορετικά πειράματα που έγιναν με πρωτεΐνη που απομονώθηκε από 3 διαφορετικές παρτίδες

Στο μαστίγιο, επίτοποι της *LdTyrPIP_22* εντοπίζονται στικτά σε όλο το μήκος του. Παρατηρήθηκε επίσης μερικός συνεντοπισμός της *LdTyrPIP_22* με τη λεϊσμανιακή ακτίνη τόσο στο σώμα του κυττάρου όσο και στο μαστίγιο. (Εικόνα 1.14)

Η υποκυττάρια κατανομή της *LdTyrPIP_22* εξετάστηκε και βιοχημικά μέσω ανοσοαποτύπωσης Western πρωτεϊνικών κλασμάτων που προέκυψαν από κατεργασία *L. donovani*-*LdTyrPIP_22*-mRFP1 προμαστιγωτά στατικής φάσης μέσω κλασμάτωσης με το απορρυπαντικό διγλιτονίνη και περαιτέρω διαλυτοποίηση του 5^{ου} κλάσματος με ‘Fraction 5 (F5)’ με 1% (v/v) Triton X-100 (Υλικά και Μέθοδοι, Παράγραφος 2.2.9, Εικόνα 1.16).

Το ειδικό αντίσωμα από ποντικό έναντι της *LdTyrPIP_22* αναγνώρισε τέσσερις διαφορετικές μορφές της *LdTyrPIP_22* στα κλάσματα F1-F5 insoluble (F5ins) (Εικόνα 1.16A). Η μορφή με τη μικρότερη κινητικότητα αντιστοιχεί με τη χημική πρωτεΐνη *rLdTyrPIP_22-mRFP1* (αναμενόμενη μοριακή μάζα ~ 55000), όπως επιβεβαιώνεται και από την ανίχνευση με το ειδικό αντίσωμα έναντι της *mRFP1* (Εικόνα 1.16B). Ανιχνεύθηκαν άλλα τρία είδη πρωτεϊνών μεταξύ 30-35 kDa. Το θεωρητικό βάρος της *LdTyrPIP_22* είναι 29100 Da, συνεπώς θεωρούμε πως η ζώνη που ανιχνεύεται στα ~30 kDa μάλλον αντιστοιχεί στην ενδογενή πρωτεϊνική μορφή, ενώ η διπλέτα που εμφανίζεται στα ~35000 μπορεί να έχει προκύψει μετά από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Η ίδια διπλέτα εμφανίζεται και σε βακτηριακά εκχυλίσματα από *E.coli* BL21 που φέρουν τον πλασμιδιακό φορέα *pTriex1.1.-LdtyrPIP_22*, υποδεικνύοντας πως οι ίδιες τροποποιήσεις συμβαίνουν και στα βακτήρια.

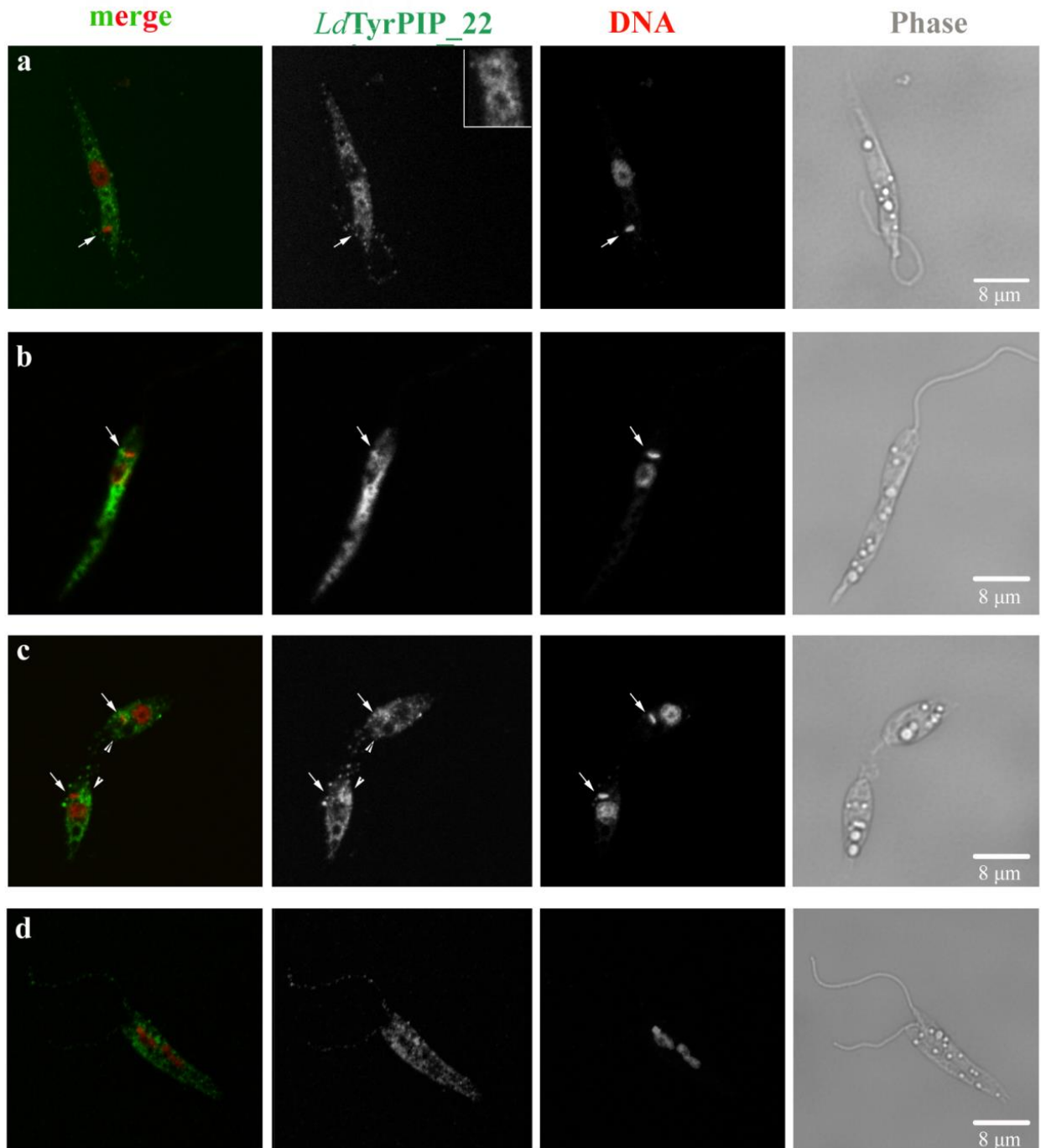
Οι υποθετικές ενδογενείς μορφές της *LdTyrPIP_22* ανιχνεύθηκαν σε κλάσματα εμπλουτισμένα με διαλυτές πρωτεΐνες (F1-F2) και σε κλάσματα εμπλουτισμένα με πρωτεΐνες των ενδοκυττάρων μεμβρανών (F3-F4). Η *rLdTyrPIP_22-mRFP1* ανιχνεύθηκε και στο κλάσμα που είναι εμπλουτισμένο με τις πρωτεΐνες της πλασματικής μεμβράνης (F5s). Μικρό ποσοστό της πρωτεΐνης που βρίσκεται ~30000 Da (ενδογενής *LdTyrPIP_22*) και της ανασυνδυασμένης *rLdTyrPIP_22-mRFP1* ανιχνεύθηκαν ως αχνές ζώνες στο κλάσμα με πρωτεΐνες του πυρήνα και του κυτταροσκελετού, ενώ η διπλέτα ακολουθεί την κατανομή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης χωρίς όμως να ανιχνεύεται στο κλάσμα των πρωτεϊνών της πλασματικής μεμβράνης (F5s). Μονομερής ελεύθερη *mRFP1* (~27000 Da) που υποδεικνύει πρωτεόλυση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης ανιχνεύθηκε μόνο στο κλάσμα F5s (Εικόνα 1.15).

Ο υποκυττάριος εντοπισμός της *LdTyrPIP_22* στα παράσιτα *Leishmania* ενδέχεται να οφείλεται σε αλληλεπίδραση τόσο με στοιχεία της μεμβράνης όσο και του κυτταροσκελετού.

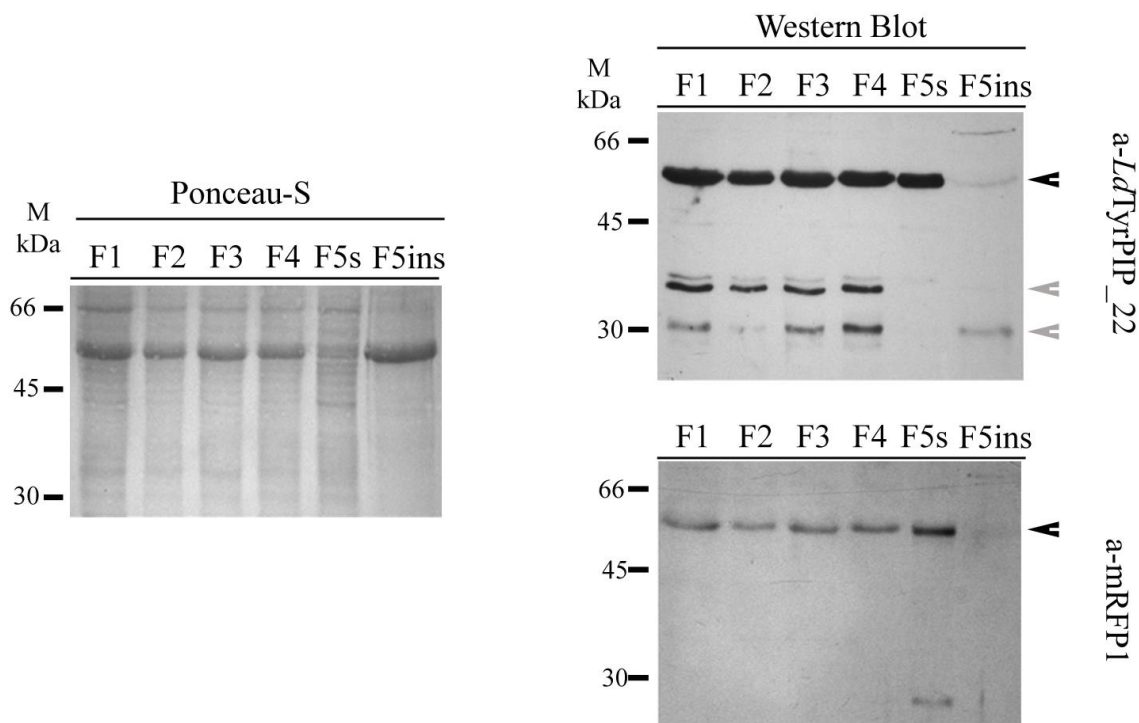
Αυτό το ερώτημα το προσεγγίσαμε με ετερόλογη έκφραση των *rLdTyrPIP_22-GFP* ή *rLdTyrPIP_22-His* σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές θηλαστικών.

Ανάλυση με μικροσκοπία φθορισμού των κυττάρων που έχουν υποστεί διαμόλυνση δείχνει εντοπισμό της διαγονιδιακής ετερόλογα εκφρασμένης *LdTyrPIP_22* στην πλασματική μεμβράνη του κυττάρου και ιδιαίτερα σε σημεία έντονου πολυμερισμού της ακτίνης όπως είναι τα φιλοπόδια και τα σημεία πρόσφυσης των κυττάρων. Όλα τα σημεία που εντοπίστηκε η *LdTyrPIP_22* είναι σημεία εμπλουτισμένα με φωσφοϊνοσιτιδία και τις φωσφατάσες τους, όπου ρυθμίζεται η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης καθοδηγώντας την κίνηση και

την προσκόλληση των κυττάρων. *In vitro* πειράματα δείχνουν μια ασθενή σύνδεση της *Ld*TyrPIP_22 με την F ακτίνη, ενισχύοντας την υπόθεση πως η *Ld*TyrPIP_22 αλληλεπιδρά με την ακτίνη στα παράσιτα *Leishmania*.



Εικόνα 1.14 Μικροσκοπία φθορισμού άξενικών προμαστιγωτών *L. donovani*.



Εικόνα 1.15 Βιοχημικός εντοπισμός της ενδογενούς *LdTygPIP_22* και της ανασυνδυασμένης *rLdTygPIP_22-mRFP1* σε διαγονιδιακά προμαστιγωτά *L. donovani-Ldtyrrip_22-mrfp1* στατικής φάσης. Τα πρωτεϊνικά κλάσματα (F1-F5ins) παράχθηκαν με κλασμάτωση με διγιτονίνη και αναλύθηκαν με SDS-PAGE (12% w/v). Ακολούθησε ανοσοαποτύπωση Western με ειδικό αντίσωμα από ποντικό *a-LdTygPIP_22* (1:1.200) (επάνω) και στη συνέχεια, με ειδικό αντίσωμα *a-mRFP1* (0,5 µg/ml) pAb (κάτω). Στην αντίστοιχη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με χρώση Ponceau-S (αριστερά) φαίνονται οι ίδιες περιοχές της μεμβράνης (ένδειξη της ποσότητας της ολικής πρωτεΐνης). Τα μαύρα βέλη δείχνουν τη θέση της ανασυνδυασμένης *rLdTygPIP_22-mRFP1* και τα γκρι τις διαφορετικές μορφές της *LdTygPIP_22*. Τα μοριακά βάρη δίνονται σε kDa. .

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε σε συνέχεια των παραπάνω δεδομένων και με αρκετά αντιδραστήρια ήδη κατασκευασμένα από τη δουλειά της Α. Κοτοπούλη.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Υλικά

2.1.1. Αντιδραστήρια

Στην μελέτη που παρουσιάζεται χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια

- Κοινά χημικά αναλυτικού βαθμού καθώς και χημικά υψηλού βαθμού καθαρότητας (99%), τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τις τεχνικές Μοριακής Βιολογίας (B.D.H., VWR International, Merck, Pierce, Promega, Sigma, Applichem BioRad και Fluka)
- Περιοριστικές ενδονουκλεάσες (New England Biolabs, Takara, Roche), Taq DNA πολυμεράση (Takara), T4 λιγάση (Takara), αλκαλική φωσφατάση CIAP (NEB)
- Πρωτεΐνάση K (Macherey-Nagel), RNase A (Sigma)
- DNA δείκτες μοριακών μεγεθών 1 kb DNA ladder (NEB)
- Πρωτεΐνες αναφοράς χαμηλού μοριακού βάρους (Low Molecular Weight Calibration kit for SDS electrophoresis) (Amersam)
- Εκκινητές για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (VBC-Biotech, <http://www.vbc-biotech.at/cms/index.php>)
- Κιτ απομόνωσης γενωμικού DNA από βακτήρια: Nucleo Bond Xtra Midi (Macherey-Nagel)
- Κιτ για τον καθαρισμό των προϊόντων PCR και τον καθαρισμό DNA από πήκτωμα αγαρόζης Nucleospin extract II kit (Macherey-Nagel)
- Θρεπτικά υλικά για τις βακτηριακές καλλιέργειες: Bacto-tryptone, Bacto-yeastextract (Applichem) και Bacto-agar (BDBiosciences)
- Θρεπτικά υλικά για τις κυτταροκαλλιέργειες: RPMI (Gibco, Biosera), M199 (Gibco, Biosera), και ορός από έμβρυο μόσχου (FBS) (Gibco), απενεργοποιημένος στους 56°C για 30 λεπτά
- Hepes buffer (Biosera)
- Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν για τις κυτταροκαλλιέργειες ήταν πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη (Gibco, Biosera)
- Άλλα αντιβιοτικά: αμπικιλίνη (Applichem), Nourseothricin (Jena Bioscience), Geneticin (Gibco)
- Αντιδραστήριο της Bradford (BioRad)
- Διγιτονίνη (Digitonin, #D5628, Sigma) 100 mM (stock)

- Αναστολείς πρωτεασών (#P8465, Sigma)
- Διαλύματα φωτογραφικής εμφάνισης (Kodak, Applichem)

2.1.2. Αναλώσιμα υλικά

- Πλαστικά ακρορύγχια (tips) (Greiner)
- Αποστειρωμένες πλαστικές πιπέτες (Sarstedt)
- Δοκιμαστικοί σωλήνες 15 και 50 ml (Sarstedt και Greinerbio-one)
- Πλαστικοί σωλήνες Eppendorf 1,5 ml (Greiner)
- Πλαστικοί σωλήνες για PCR 0,2 ml (Kisker)
- Κρυοπροστατευτικοί αποστειρωμένοι σωλήνες φύλαξης κυττάρων 1,7 ml (Nunc)
- Πλαστικές κυψελίδες μιας χρήσης (Sarstedt)
- Κυψελίδες 2 mm για ηλεκτροδιάτρηση (GenePulserCuvette, Biorad) για ευκαρυωτικά κύτταρα/παράσιτα
- Φίλτρα με διάμετρο πόρου 0,2 μm (Sartorius)
- Φλάσκες καλλιέργειας παρασίτων 25 και 50 cm^2 (Nunc)
- Τρυβλία Petri για στερεές καλλιέργειες βακτηρίων (Sarstedt)
- Αποστειρωμένες πλαστικές ξύστρες (scrapers) (Sarstedt)
- Αιμοκυτταρόμετρο για τη μέτρηση παρασίτων Mallasseuz (Marienfeld) και για τη μέτρηση κυττάρων θηλαστικών Neubauer
- Αντικειμενοφόροι πλάκες (VWR international)
- Χαρτί διήθησης 3mm (Whatmann)
- Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης για μεταφορά πρωτεϊνών Parablot (Macherey-Nagel)
- X-Ray films (Kodak)
- Αποστειρωμένες λεπίδες
- Σύριγγες (5-10 ml)

2.1.2.1. Αντισώματα

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν:

- Πολυκλωνικό αντίσωμα ποντικού (α -LdTygPIP₂₂) έναντι της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης LdTygPIP₂₂-His που παρασκευάστηκε στο εργαστήριο (Papadaki Amalia 2017).

- Πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού (a-LdTyrPIP₂₂) έναντι της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης LdTyrPIP₂₂-His που παρασκευάστηκε στο εργαστήριο (Papadaki Amalia 2017).
- Πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι τμήματος στην καρβοξυ-τελική περιοχή της LdPIBPnex-GST (a-LdPIBPnex) που παρασκευάστηκε στο εργαστήριο από τη Δρ. Παπαδάκη Αμαλία.
- Πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι της GFP (a-GFP) που παρασκευάστηκε από τη Δρ. Μπολέτη Χαραλαμπία (Boleti, Smirlis et al. 2010).
- Πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι της ιστόνης H2B, ευγενική χορηγία της Δρ. Σμυρλή Δέσποινας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ (Smirlis, Bisti et al. 2006).
- Πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι της λεισμανιακής ακτίνης (a-Leish Actin) ευγενική χορηγία του Δρ. Amogh Sahasrabuddhe, Division of Molecular and Structural Biology Central Drug Research Institute Lucknow, India (Sahasrabuddhe, Bajpai et al. 2004).
- Μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι της α-τουμπουλίνης (#T5168, Sigma)
- Πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι IgG κουνελιού (goat anti-rabbit IgG) συζευγμένο με την πράσινη φθορίζουσα χρωστική Alexa Fluor-488 και την κόκκινη φθορίζουσα χρωστική Alexa Fluor -546 (Molecular Probes). Χρησιμοποιήθηκαν ως δεύτερα αντισώματα σε ανοσοφθορισμό.
- Πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι IgG ποντικού (goat anti-mouse IgG) συζευγμένο με την πράσινη φθορίζουσα χρωστική Alexa Fluor-488 και την κόκκινη φθορίζουσα χρωστική Alexa Fluor-546 (Molecular Probes). Χρησιμοποιήθηκαν ως δεύτερα αντισώματα σε ανοσοφθορισμό.
- Συζευγμένα με υπεροξειδάση αντι-ισοτυπικά αντισώματα, έναντι των ανοσοσφαιρινών του κουνελιού και του ποντικού (#41460 και #31230, αντίστοιχα, Pierce)
- Phalloidin, συζευγμένη με την κόκκινη φθορίζουσα χρωστική Alexa Fluor -546

2.1.3. Φορείς κλωνοποίησης

- Για τη χρωμοσωμική έκφραση της LdTyrPIP₂₂-mRFP1 σε παράσιτα *L. donovani* (στέλεχος LG13) χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pLexsy-sat-PIP22-mRFP1 που έχει κατασκευαστεί στο εργαστήριο (Papadaki Amalia 2017). Για την ενσωμάτωση στο χρωμοσωμικό DNA

χρησιμοποιήθηκε το γραμμικό τμήμα του πλασμιδίου που προκύπτει μετά από πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *SwaI* και περιέχει την ανασυνδυασμένη *rLdTyrPIP_22-mRFP1*.

- Για τη χρωμοσωμική έκφραση της *LdTyrPIP_22-His* σε παράσιτα *L. tarentolae* έγινε κλωνοποίηση του γονιδίου *LdTyrPIP_22* σε τροποποιημένο πλασμιδιακό φορέα έκφρασης *pLexsy-sat2*. Ο πλασμιδιακός *pLEXSY-sat2* είναι εμπορικά διαθέσιμος (<http://www.jenabioscience.com>) και φέρει μία αλληλουχία για έκκριση από το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER Signal Peptide), μία μοριακή ετικέτα έξι ιστιδινών (6His-tag), αλληλουχίες που επιτρέπουν την έκφραση το γονιδίου από τα κύτταρα *Leishmania* στο 5' και 3' άκρο της θέσης κλωνοποίησης, καθώς και γονίδια ανθεκτικότητας στην αμικικίνη και τη νουθρεοσίνη για επιλογή θετικών κλώνων. Ο πλασμιδιακός δέκτης *pLEXSY-sat2* έχει τροποποιηθεί στο εργαστήριο (ομάδα Ενδοκυττάριου Παρασιτισμού-Α. Παπαδάκη) έτσι ώστε να φέρει πριν από συγκεκριμένη θέση αναγνώρισης από το περιοριστικό ένζυμο *XbaI* την αλληλουχία που κωδικοποιεί τα αμινοξέα MALD μετά από την αλληλουχία που κωδικοποιεί το πεπτίδιο που σηματοδοτεί την έκκριση από το κύτταρο (Klatt and Konthur 2012). Η αλληλουχία αυτή, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Klatt and Konthur 2012) εξασφαλίζει καλύτερη έκκριση της πρωτεΐνης που εκφράζεται από αυτόν τον πλασμιδιακό φορέα. Μετά τη θέση αναγνώρισης *NheI*, στο 3' άκρο του ενθέματος, ακολουθεί η αλληλουχία αναγνώρισης από την πεπτιδάση (TEV) (Rigaut, Shevchenko et al. 1999) και η αλληλουχία για τη μοριακή ετικέτα 6 ιστιδινών (6His-tag), ώστε αν χρειαστεί σε κάποιο πειραματικό πρωτόκολλο η ετικέτα ιστιδίνης μπορεί να απομακρυνθεί από την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη. Ο τροποποιημένος πλασμιδιακός δέκτης ονομάστηκε *pLEXSY-sat2.1*

Έγιναν οι παρακάτω κλωνοποιήσεις στον πλασμιδιακό δέκτη *pLEXSY-sat2.1* έτσι ώστε η πρωτεΐνη να παράγεται

1. ως εκκρινόμενη με την μοριακή ετικέτα 6His-tag στο C- τελικό άκρο

Εγινε εισαγωγή του γονιδίου της *LdTyrPIP_22* μεταξύ των θέσεων *XbaI* και *NheI*, έτσι ώστε μετά από τη μετάφραση, η αλληλουχία MALD να βρίσκεται στο αμινο-τελικό άκρο της πρωτεΐνης ενώ οι αλληλουχίες TEV και 6His-tag στο καρβοξυ-τελικό. Η πρωτεΐνη που θα προκύψει μετά από έκφραση στα παράσιτα αναμένουμε να εκκρίνεται από αυτά έτσι ώστε να γίνει η απομόνωσή της για περαιτέρω βιοχημικές, δομικές και λειτουργικές μελέτες.

2. ως ενδοκυττάρια (χωρίς την αλληλουχία έκκρισης) με την 6-His-tag στο C-τελικό άκρο

Η κλωνοποίηση αυτή έγινε στη θέση αναγνώρισης BglIII η οποία βρίσκεται στο συγκεκριμένο φορέα πριν από την αλληλουχία έκκρισης και στη θέση αναγνώρισης NheI.

2.1.4. Εναρκτήρια μόρια για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

5' XbaI	5'TGCTCTAGACATGCCCCGCCCAAGCGTATCG 3'
5' BglIII	5'GAAGATCTACCATGCCCCGCCCAAGCGTATCG3'
3' NheI	5' CTAGCTAGCTGAGCTCGATGAGGTCG 3'

2.1.5. Στελέχη παρασίτων-Κυτταρικές σειρές θηλαστικών

Στελέχη παρασίτων αγρίου τύπου:

- *L. donovani*, στέλεχος LG13, MON-31, MHOM/ET/0000/HUSSEN (Zemanova, Jirku et al. 2004)
- *L. tarentolae* Parrot (στέλεχος Jena Biosciences)

Ανασυνδυασμένοι πληθυσμοί παρασίτων

- *L. donovani*-mRFP1 (Kotini 2009)(στέλεχος LG13)
- *L. donovani*-LdTyrPIP_22-mRFP1 (στέλεχος LG13)
- *L. donovani*-GFP(Smirlis, Boleti et al. 2009)

Κυτταρικές σειρές ανώτερων ευκαρυωτικών

- Μονοκυτταρική σειρά μακροφάγων ποντικού J774 (ATCC, American Type Culture Collection, Manassas, VA)

2.2. Μέθοδοι

2.2.1. Κλωνοποιήσεις

2.2.1.1. Απομόνωση γενωμικού DNA από παράσιτα *Leishmania*

Για την απομόνωση γενωμικού DNA από παράσιτα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της φαινόλης. Τα παράσιτα φυγοκεντρούνται, ξεπλένονται με παγωμένο PBS και το ίζημα αναμιγνύεται με

διάλυμα λύσης παρασίτων (0,5 ml δ/τος λύσης παρασίτων/ 10^8 παράσιτα). Στη συνέχεια προστίθεται SDS 0,5% (w/v), πρωτεΐνάση K 100 µg/ml και RNase A 100 µg/ml και το δείγμα επωάζεται για 16 ώρες στους 55 °C. Ακολούθως, προστίθεται ίσος όγκος φαινόλης και το δείγμα φυγοκεντρείται στις 3.500 rpm για 10 λεπτά. Συλλέγεται η ανώτερη υδατική φάση (που περιέχει το DNA) και σε αυτή προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος φαινόλης/ χλωροφορμίου 1:1 (v/v). Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 3.500 rpm για 10 λεπτά, προσθήκη ίσου όγκου χλωροφορμίου και ξανά φυγοκέντρηση στις 3.500 rpm για 10 λεπτά. Συλλέγεται η ανώτερη υδατική φάση και το DNA κατακρημνίζεται με προσθήκη 1/10 του όγκου 3 M οξικού νατρίου pH 5,2 και 2,5 όγκους αιθανόλης 100% (v/v). Σε περίπτωση που το ίζημα (DNA) δεν είναι ορατό αφήνεται το δείγμα στους 4 °C για τουλάχιστον 30 λεπτά. Στη συνέχεια το δείγμα φυγοκεντρείται στις 20.000 g για 15 λεπτά, προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος αιθανόλης 70% (v/v) και ξανά φυγοκεντρείται στις 20.000 g για 15 λεπτά. Ακολουθεί εξάτμιση του διαλύτη και αναδιάλυση του DNA σε ddH₂O. Η συγκέντρωση του DNA στο παρασκεύασμα προσδιορίζεται με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 260 nm, με βάση τη σχέση: 1 O.D._{260nm} = 50µg DNA/ml διαλύματος.

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

2.2.1.2. Ενίσχυση με PCR

Ενίσχυση της αλληλουχίας του γονιδίου που κωδικοποιεί την *LdTyrPIP_22* (*ldtyrpip_22*) από γενωμικό DNA *L. donovani* για κλωνοποίηση

A. στον PLEXSY-sat 2.2 πριν τη σηματοδοτική αλληλουχία έκκρισης

B. στον pPLEXSY-sat2.2 μετά τη σηματοδοτική αλληλουχία έκκρισης

Σε όλες τις περιπτώσεις οι αντιδράσεις PCR περιείχαν τα εξής:

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

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

A. Ενίσχυση της αλληλουχίας της *ldtprp*₂₂ από γενωμικό DNA με άκρα 5' BglIII και 3'

NheI

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

Η αντίδραση τερματίζεται στους 4°C

B. Ενίσχυση της αλληλουχίας της *ldtprp*₂₂ από γενωμικό DNA με άκρα 5' XbaI και 3'

NheI

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

Η αντίδραση τερματίζεται στους 4°C

2.2.1.3. Ανάλυση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ανάλυση των μορίων του DNA γίνεται με βάση το μέγεθός τους σε οριζόντιο πήκτωμα αγαρόζης με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου. Κατά την ηλεκτροφόρηση τα μόρια DNA τα οποία είναι αρνητικά φορτισμένα, λόγω του φορτίου των φωσφορικών ομάδων τους, μετακινούνται προς το θετικό πόλο με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη του μεγέθους τους. Στα πειράματά μας, χρησιμοποιήθηκαν οριζόντια πηκτώματα αγαρόζης 0,8-1% (w/v) σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης TBE 1X παρουσία 0,5 μg/ml της φθορίζουσας χρωστικής βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) που ενσωματώνεται μεταξύ των αζωτούχων βάσεων του DNA και επιτρέπει έτσι την ανίχνευσή της ζώνης του DNA στο πήκτωμα της αγαρόζης με έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV). Τα δείγματα DNA μετά από προσθήκη διαλύματος «φόρτωσης», ηλεκτροφορούνται σε διάλυμα TBE 1X υπό σταθερό ρεύμα έντασης 90-120 V. Παράλληλα με τα προς εξέταση δείγματα, στο ίδιο πήκτωμα αγαρόζης αναλύονταν τμήματα DNA γνωστών μοριακών μεγεθών. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, ακολουθούσε παρατήρηση των ζωνών που αντιστοιχούσαν στα μόρια του DNA με έκθεση του πηκτώματος σε UV μήκους κύματος 302 nm.

2.2.1.4. Καθαρισμός προϊόντων PCR

Για τον καθαρισμό των προϊόντων της αντίδραση PCR, μετά από διαχωρισμό τους σε πηκτή αγαρόζης και αποκοπή της περιοχής που περιέχει τη ζώνη DNA που αντιστοιχεί στο μέγεθος του προϊόντος PCR, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα Nucleospin Extract II (Macherey-Nagel), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συνοπτικά, παρουσία χαοτροπικών αντιδραστηρίων, η πηκτή αγαρόζης αποδομείται και με προσθήκη ελαφρώς όξινου διαλύματος πρόσδεσης (4 M οξικό νάτριο, pH 5,0) το DNA δεσμεύεται σε ειδική στήλη διοξειδίου του πυριτίου (SiO_2). Οι υπόλοιπες ενώσεις (ένζυμα, αγαρόζη και EtBr), καθώς δε δεσμεύονται χημικά στη στήλη, απομακρύνονται με έκπλυση με αιθανολικό διάλυμα. Τελικά, το DNA που είχε προσδεθεί στη στήλη εκλύεται με προσθήκη υπερκάθαρου και αποστειρωμένου H_2O .

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

2.2.1.5. Πέψη DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

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

$$5-10 \text{ U περιοριστικού ενζύμου} / 1 \mu\text{g DNA} / 20 \mu\text{l (τελικός όγκος αντίδρασης)}$$

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

2.2.1.6. Κλωνοποίηση του προϊόντος PCR σε πλασμιδιακό φορέα

Μετά το πέρας της πέψης με τα περιοριστικά ένζυμα, ακολουθεί η αντίδραση σύνδεσης του γραμμικού πλασμιδιακού DNA (φορέας) με το προϊόν της PCR (ένθεμα) με τη χρήση T4 DNA λιγάσης. Ανάλογα με το μέγεθος του φορέα και του ενθέματος, μπορούν να δοκιμαστούν διάφορες αναλογίες. Στην περίπτωση των κλωνοποιήσεων που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η αναλογία 1:5. Οι ποσότητες ενθέματος και φορέα που χρησιμοποιούνται μπορούν να υπολογιστούν με τον εξής τύπο:

$$ng \text{ ενθέματος} = \frac{ng \text{ του φορέα} \times \text{μέγεθος του ενθέματος σε χιλιοστοβάσεις}}{\text{μέγεθος του φορέα σε χιλιοστοβάσεις}} \times \frac{5}{1}$$

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

2.2.1.7. Μετασχηματισμός βακτηρίων

Μετασχηματισμός ονομάζεται η διαδικασία κατά την οποία ένα βακτηριακό κύτταρο προσλαμβάνει ξένο γενετικό υλικό το οποίο κληρονομεί στις επόμενες γενιές. Ανάλογα με το είδος των επιδεκτικών βακτηρίων, ο μετασχηματισμός τους είναι είτε χημικός είτε με ηλεκτροδιάτρηση. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα χημειοδεκτικά και συγκεκριμένα, *E. coli* XL1Blue για απομόνωσή του εισαγόμενου πλασμιδιακού DNA από καλλιέργεια μικρής έκτασης (mini prep) ή μεγάλης έκτασης (midi prep).

Η διαδικασία έχει ως εξής: Αναμιγνύονται 200 μl επιδεκτικών βακτηρίων (που φυλάσσονται στους -80°C) με ~50-100 ng DNA από υλικό της αντίδρασης σύνδεσης ή από καθαρό πλασμίδιο και διατηρούνται στον πάγο για 20-30 λεπτά. Ακολουθεί θερμικό σοκ στους 42 °C για 90 δευτερόλεπτα. Άμεσα, τα κύτταρα τοποθετούνται στον πάγο για 10 λεπτά και προστίθεται 1 ml προθερμασμένου (στους 37°C) θρεπτικού υλικού LB χωρίς αντιβιοτικό. Τα μετασχηματισμένα βακτήρια επωάζονται σε επωαστικό θάλαμο υπό ανάδευση (200 στροφές/

λεπτό) στους 37°C για 1 ώρα και επιστρώνονται σε στερεό θρεπτικό υλικό που περιέχει αμπικιλίνη (100 µg/ml). Το τρυβλίο επωάζεται στους 37°C για 16 ώρες.

2.2.1.8. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργεια βακτηρίων

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

Μία αποικία μετασχηματισμένων βακτηρίων εμβολιάζεται σε 4 ml θρεπτικό υλικό παρουσία αντιβιοτικού και ακολουθεί επώαση με ανάδευση στους 37 °C για 16 περίπου ώρες. Το ίζημα των βακτηριακών κυττάρων, μετά από φυγοκέντρωση, διαλύεται με έντονη ανάδευση σε 100 µl διαλύματος P1 (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase, pH 8). Προστίθενται 200 µl διαλύματος P2 (διάλυμα λύσης, 200 mM NaOH, 1% w/v SDS) και ακολουθεί επώαση για 5 λεπτά το πολύ σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστίθενται 150 µl διαλύματος P3 (3M Οξικό οξύ, pH 5) και το δείγμα φυγοκεντρείται στις 20,000 g για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο περιέχει πλασμιδιακό DNA και RNA, ενώ το μεγαλύτερο χρωμοσωμικό DNA συμπαρασύρεται από τα βακτηριακά υπολείμματα στο ίζημα. Στο υπερκείμενο προστίθεται 1 ml παγωμένης (-20 °C) απόλυτης αιθανόλης η οποία κατακρημνίζει το πλασμιδιακό DNA και ακολουθεί σύντομη ανάδευση. Στη συνέχεια γίνεται φυγοκέντρωση στις 20000 g για 15 λεπτά και απομάκρινεται το υπερκείμενο. Το ίζημα (DNA) ξεπλένεται με 1 ml αιθανόλη 70% (v/v) και, μετά από εξάτμιση του διαλύτη (με ξήρανση υπό κενό), αναδιαλύεται σε 20 µl H₂O. Το πλασμιδιακό DNA πέπτει στη συνέχεια με περιοριστικές ενδονουκλεάσες για εντοπισμό των κλώνων που φέρουν το επιθυμητό ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.

Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα (midi prep) χρησιμοποιείται για την απομόνωση μεγάλης ποσότητας υψηλής καθαρότητας πλασμιδιακού DNA. Σε αυτή την περίπτωση, μία αποικία μετασχηματισμένων βακτηρίων εμβολιάζεται σε 4 ml θρεπτικό υλικό παρουσία αντιβιοτικού και ακολουθεί επώαση με ανάδευση στους 37 °C για περίπου 16 ώρες. Όγκος 1 ml από την παραπάνω καλλιέργεια εμβολιάζεται σε 250 ml θρεπτικό υλικό κατάλληλου αντιβιοτικού και ακολουθεί επώαση με ανάδευση στους 37 °C για περίπου 16 ώρες. Η καλλιέργεια φυγοκεντρείται στις 2700 g για 30 λεπτά στους 4 °C. Στη συνέχεια, ακολουθεί η παρακάτω πειραματική διαδικασία, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (NucleoBond Xtra Midi kit, Macherey-Nagel).

Συγκεκριμένα, το βακτηριακό ίζημα αναδιαλύεται με ισχυρή ανάδευση σε 10 ml διαλύματος RES (το οποίο περιέχει και RNάση A) και το δείγμα τοποθετείται σε πάγο. Ακολουθεί προσθήκη 8 ml διαλύματος αλκαλικής λύσης LYS (περιέχει NaOH, SDS), ήπια ανάδευση και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως, το δείγμα μεταφέρεται σε χρωματογραφική στήλη που περιέχει φίλτρο κατακράτησης των πρωτεϊνών, του χρωμοσωμικού DNA και των κυτταρικών θραυσμάτων, ενώ έχει ήδη προηγηθεί η προετοιμασία/ εξισορρόπηση της στήλης με προσθήκη 12 ml διαλύματος EQU. Το φίλτρο και η στήλη εμποτίζονται με 5 ml διαλύματος EQU, το φίλτρο απομακρύνεται και η στήλη εκπλένεται με 8 ml διαλύματος έκπλυσης WASH. Τελικά πραγματοποιείται έκλουση με 5 ml διαλύματος ELU. Στο έκλουσμα, προστίθενται 3,5 ml ισοπροπανόλης και φυγοκεντρείται στις 15000 g για 30 λεπτά στους 4 °C, οπότε καθιζάνει το πλασμιδιακό DNA. Το ίζημα ξεπλένεται με 1 ml αιθανόλη 70% (v/v) και μετά από εξάτμιση του διαλύτη αναδιαλύεται σε 150-200 μl H₂O.

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

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

Τα διάφορα βακτηριακά στελέχη *E. coli* καλλιεργούνται σε υγρό θρεπτικό υλικό LB, παρουσία του απαιτούμενου αντιβιοτικού, σε στείρους σωλήνες των 15 και 50 ml και σε κωνικές φλάσκες των 500, 1000 και 2000 ml, με συνεχή ανάδευση σε επωαστικούς θαλάμους στους 37°C. Οι στερεές καλλιέργειες γίνονται σε τρυβλία Petri, με θρεπτικό υλικό LB που περιέχει άγαρ 1,5% (w/v) παρουσία του απαραίτητου αντιβιοτικού. Η επώαση πραγματοποιείται για ~16 ώρες στους 37 °C.

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

2.2.1.10. Αλληλούχιση του DNA (Sequencing)

Η αλληλούχιση των δειγμάτων πλασμιδιακού DNA πραγματοποιήθηκε από την Εταιρεία VBCBiotech. Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης ελέγχθηκαν για ομολογία με την αλληλουχία του επιθυμητού γονιδίου χρησιμοποιώντας τα προγράμματα ClustalW2 και Bio Edit Sequence Alignment Editor.

2.2.2. Κυτταροκαλλιέργειες

2.2.2.1. Παράσιτα

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

Για την ανακαλλιέργεια των προμαστιγωτών μορφών χρησιμοποιούνταν 10⁶ παράσιτα/ ml και ο αριθμός των παρασίτων στη στατική φάση ανάπτυξης (6^η-7^η ημέρα καλλιέργειας) είναι περίπου 2-2,5 x 10⁷ παράσιτα/ml. Η περισυλλογή των παρασίτων γίνεται με φυγοκέντρηση (1000 g για 7 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου).

Οι αμαστιγωτές μορφές *L. donovani* καλλιεργούνται στους 37 °C παρουσία CO₂ (5%), σε θρεπτικό υλικό M199 (Life Technologies), εμπλουτισμένο με 20% (v/v) FBS (ορός από έμβρυο μόσχου απενεργοποιημένος για 30 λεπτά στους 56 °C), **ηλεκτρικό οξύ** (succinic acid) ώστε το pH του υλικού να είναι 5.5 και αντιβιοτικά (0.1 mg/ml στρεπτομυκίνη, 1 U/ml πενικιλίνη). Για την διαφοροποίηση προμαστιγωτών μορφών σε αμαστιγωτές χρειάζεται παραμονή τους στο υλικό αυτό για 96 ώρες.

Τα ανασυνδυασμένα παράσιτα *L. donovani*-GFP, *L. donovani*-mRFP1 και *L. donovani*-rLdTygPIP₂₂-mRFP1 καλλιεργούνται σε συνθήκες όμοιες με τα παράσιτα αγρίου τύπου με την προσθήκη του αντιβιοτικού επιλογής Nourseothricin (100 μg/ml).

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

2.2.2.2. Κύτταρα θηλαστικών

Τα μακροφάγα κύτταρα ποντικού, σειρές J774 και RAW264.7, καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό RPMI εμπλουτισμένο με 10% v/v FBS, 40 mM Hepes και αντιβιοτικά (0.1 mg/ml στρεπτομυκίνη, 1 U/ml πενικιλίνη). Η μόνιμα επιμολυσμένη κυτταρική σειρά RAW-PX-GFP

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% CO₂.

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

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

2.2.3. Επιμόλυνσεις κυττάρων *Leishmania* / Ηλεκτροδιάτρηση παρασίτων

Η επιμόλυνση προμαστιγωτών *L. donovani* (στέλεχος LG13) και *L. tarentolae* (στέλεχος Parrot, Jena biosciences) με ανασυνδυασμένο γραμμικό DNA (χρωμοσωμική έκφραση) πραγματοποιείται με ηλεκτροδιάτρηση ως εξής: Παράσιτα που βρίσκονται στο τέλος της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης (2x10⁷ παράσιτα/ ml) συλλέγονται με φυγοκέντρηση, ακολουθεί πλύση τους με 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροδιάτρησης [20 mM Hepes (pH 7,5), 0,7 mM Na₂HPO₄, 137 mM NaCl, 6 mM γλυκόζη, 5 mM KCl], επώαση στον πάγο για 10 λεπτά και επαναδιάλυση σε 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος. Λαμβάνονται 400 μl τα οποία αναμιγνύονται με το DNA (20-50 μg) και τοποθετούνται στην κυψελίδα ηλεκτροδιάτρησης 0,2 cm. Η συσκευή ηλεκτροδιάτρησης GENE PULSER ρυθμίζεται στα 50 μF και 0,45 KV και η συσκευή PULSE CONTROLLER στα 0 Ωhm. Ακολούθως, η κυψελίδα τοποθετείται στο θάλαμο ηλεκτροδιάτρησης και εφαρμόζεται στα άκρα της τάση με την ενεργοποίηση της συσκευής που παράγει τον ηλεκτρικό παλμό. Για να είναι επιτυχής ο μετασχηματισμός των παρασίτων, ο ηλεκτρικός παλμός πρέπει να παρουσιάζει χρόνο εκπόλωσης 4-5 msec. Αμέσως μετά η κυψελίδα τοποθετείται στον πάγο αυστηρά για 10 λεπτά. Τελικά, τα παράσιτα τοποθετούνται σε 10 ml θρεπτικού υλικού RPMI/ 20% v/v FBS (*L. donovani*) ή brain heart infusion (BHI) και αιμίνη (*L. tarentolae*) και επωάζονται στους 25 °C για 24 ώρες. Την επόμενη μέρα, στην καλλιέργεια των παρασίτων προστίθεται το αντιβιοτικό Nourseothricin, η συγκέντρωση του οποίου αυξάνεται προοδευτικά μέχρι τα 100 μg/ml.

2.2.4. Μονιμοποίηση κυττάρων και πρωτόκολλα ανοσοφθορισμού

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

A. Παράσιτα

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

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

B. Κύτταρα θηλαστικών

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

Στην παρούσα εργασία, η παρατήρηση των κυττάρων και η λήψη των ψηφιακών εικόνων φθορισμού έγινε με τα συνεστιακά μικροσκόπια φθορισμού Leica TCS SP και Leica TCS SP5.

2.2.5. *In vitro* μελέτη της μόλυνσης μακροφάγων της κυτταρικής σειράς J774 με παράσιτα *Leishmania*

Η μολυσματική ικανότητα των διαγονιδιακών πληθυσμών του παρασίτου *L. donovani* (στέλεχος LG13) επιμολυσμένων με τα πλασμίδια pLEXSY-*mrfp1* & pLEXSY-*ldtyrrip_22.mrfp1* και πληθυσμού αγρίου τύπου ελέγχθηκε με έμμεσο ανοσοφθορισμό και συνεστιακή μικροσκοπία σε μονιμοποιημένα δείγματα. Οι ποσοτικές μετρήσεις στις ψηφιακές εικόνες (τομές πάχους 1 μm/εικόνα) συνεστιακής μικροσκοπίας έγιναν με ανάλυση με τον αλγόριθμο Icy (digital image analysis software) και ο υπολογισμός του δείκτη μολυσματικότητας και λοιμογόνου ικανότητας έγινε σύμφωνα με προηγούμενη βιβλιογραφία, ως εξής:

Δείκτης μολυσματικότητας (%) =

$$\frac{\text{Αρ. μολυσμένων μακροφάγων}}{\text{Αρ. όλων των μακροφάγων που καταμετρήθηκαν}} \times 100$$

Αρ. όλων των μακροφάγων που καταμετρήθηκαν

Δείκτης λοιμογόνου ικανότητας =

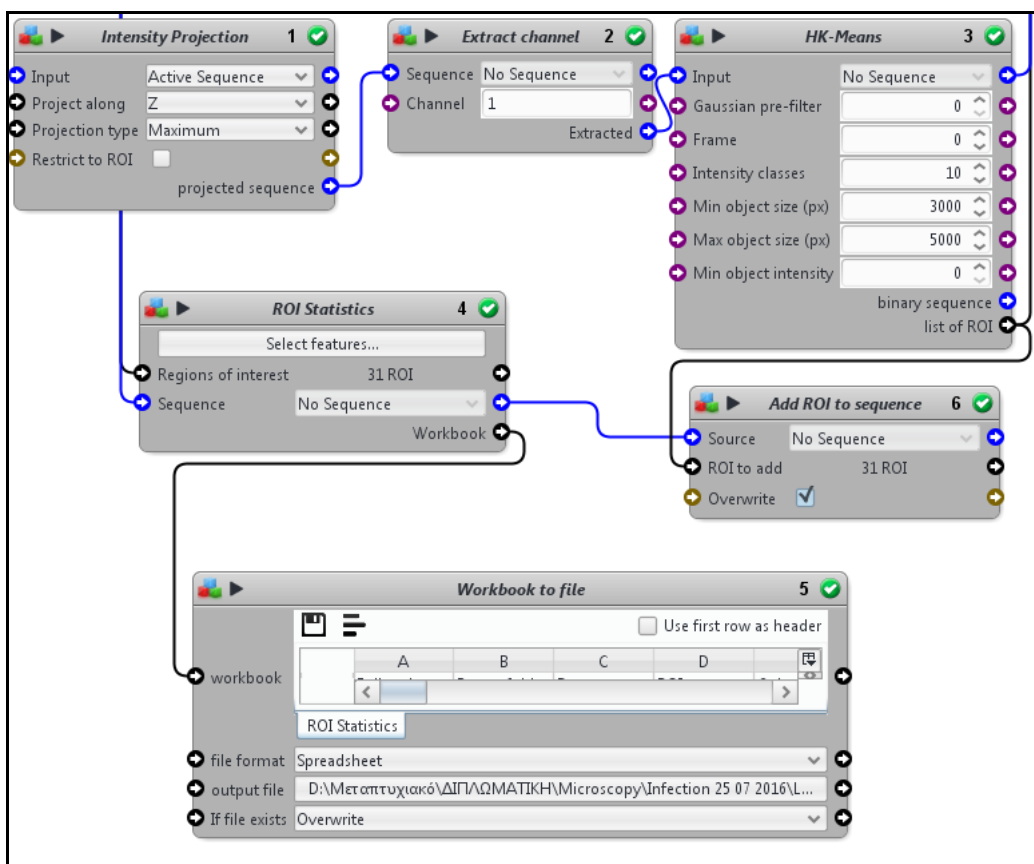
$$\frac{(\text{Αρ. φαγοκυτταρωμένων παρασίτων} \times \text{Αρ. μολυσμένων μακροφάγων})}{\text{Αρ. όλων των μακροφάγων που καταμετρήθηκαν}}$$

Αρ. όλων των μακροφάγων που καταμετρήθηκαν

Συνοπτικά, η μέθοδος περιγράφεται ως εξής: Κύτταρα J774 επιστρώνονται σε πλάκα 12 φρεατίων (12 well plate) ($\sim 2.5 \times 10^5$ / φρεάτιο) στο οποίο έχουν προηγουμένως τοποθετηθεί καλυπτρίδες διαμέτρου 10-mm (1 καλυπτρίδα/ φρεάτιο). Προμαστιγωτές μορφές του παρασίτου *L. donovani* (wild type, pLEXSY-*mrfp1* & pLEXSY-*ldtyrrip_22.mrfp1*) στατικής φάσης προστίθενται στην πλάκα (αναλογία 20:1, παράσιτα/ μακροφάγο) και το σύστημα αφήνεται στους 37 °C (5% CO₂) για 1 ώρα, οπότε και λαμβάνει χώρα αυθόρμητη φαγοκυττάρωση. Ακολουθεί σχολαστική έπλυση των μακροφάγων με PBS 1X ώστε να απομακρυνθούν όσα παράσιτα δεν έχουν εισέλθει στα μακροφάγα και προσθήκη φρέσκου υλικού καλλιέργειας για να ακολουθήσει επιπλέον επώαση στους 37 °C για 3 επιπλέον ώρες. Στο τέλος της περιόδου

επώασης, η φαγοκυττάρωση διακόπτεται με μονιμοποίηση των κυττάρων με διάλυμα 4% (w/v) παραφορμαλδεύδης και ακολουθεί σήμανση των παρασίτων με ανοσοφθορισμό (βλ. Μέθοδοι, παράγραφος 2.2.4).

Συγκεκριμένα, τα παράσιτα που παραμένουν εξωκυττάρια ή προσκολλημένα στην επιφάνεια των μακροφάγων επωάζονται με ορό ποντικού αντι-LG13 (αραίωση 1:250) χωρίς την παρουσία Triton X-100 και ακολούθως, σημαίνονται με πράσινο φθορισμό με το anti-mouse αντίσωμα Alexa Fluor® 488. Στη συνέχεια, μετά από επανάληψη του σταδίου μονιμοποίησης με παραφορμαλδεύδη και επώαση με τον αντι-LG13 ορό (αραίωση 1:250) με παρουσία Triton X-100, όλα τα παράσιτα (φαγοκυταρωμένα ή μη) σημαίνονται με κόκκινο φθορισμό με το anti-mouse αντίσωμα Alexa Fluor®-546. Συνεπώς τα εξωκυττάρια παράσιτα παρουσιάζονται «κόκκινα» και «πράσινα» ενώ τα ενδοκυττάρια μόνο «πράσινα». Η καταμέτρηση των παρασίτων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του αλγόριθμου Icy, αξιοποιώντας το max projection των ληφθέντων εικόνων το οποίο περιλαμβάνει τα παράσιτα από όλο το πάχος του δείγματος σε κάθε πεδίο (πρωτόκολλο αυτοματοποιημένης καταμέτρησης-Εικόνα 2.1). Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε οπτική καταμέτρηση του αριθμού των μακροφάγων ανά οπτικό πεδίο μέσα από χρώση των πυρήνων τους με TOPRO 3, (~300 μακροφάγα ανά περίπτωση). Με βάση τις τιμές που συγκεντρώθηκαν από 3 ανεξάρτητα πειράματα υπολογίστηκε ο δείκτης μολυσματικότητας και λοιμογόνου ικανότητας των παρασιτικών πληθυσμών.



Εικόνα 2.1 Σχηματική απεικόνιση του πρωτοκόλλου επεξεργασίας των εικόνων συνεστιακής μικροσκοπίας (max projections) με τον αλγόριθμο Icy, για την αυτοματοποιημένη καταμέτρηση των παρασίτων με βάση το μέγεθος και το είδος σήμανσής τους.

2.2.6. Κυτταρομετρία ροής (FACS)

Η κυτταρομετρία ροής (FACS) αποτελεί ένα εργαλείο πολυπαραμετρικής ανάλυσης του φαινοτύπου και των ιδιοτήτων του κυττάρου, μέσω της αξιοποίησης των ιδιοτήτων σκεδασμού του φωτός και της εκπομπής φθορισμού από τα κύτταρα που αναλύονται. Ο φθορισμός αυτός οφείλεται σε φθορίζουσες ουσίες που είτε συνδέονται απευθείας στα συστατικά του κυττάρου (DNA, RNA, μεμβράνες, κλπ), είτε σε αντισώματα έναντι μορίων που βρίσκονται στην επιφάνεια του κυττάρου ή στο εσωτερικό του. Η μέθοδος προσδιορίζει την πυκνότητα κάθε δείκτη ανά μονάδα κυτταρικής επιφάνειας με βάση την ένταση του φθορισμού και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των κυττάρων [πρόσθιος σκεδασμός FSC-μέγεθος κυττάρων και

πλάγιος σκεδασμός SSC-εσωτερική πολυπλοκότητα (κοκκία, οργανίδια) του κυττάρου]. Όλες αυτές οι μετρήσεις των διαφόρων παραμέτρων πραγματοποιούνται ταυτόχρονα για κάθε κύτταρο, καθιστώντας έτσι δυνατή την ανίχνευση ενός ομογενούς πληθυσμού κυττάρων μέσα σε έναν ετερογενή.

Η μέθοδος χρησιμοποιείται στην παρούσα εργασία για τη μελέτη της επιβίωσης των παρασίτων κατά την έκθεση σε συνθήκες μειωμένου pH και αυξημένης θερμοκρασίας κατά την κατασκευή αξενικών αμαστιγωτών. Για την ανίχνευση νεκρών κυττάρων χρησιμοποιείται χρώση με Ιωδιούχο προπίδιο (Propidium Iodide-PI). Το PI δεν μπορεί να διαπεράσει τις μεμβράνες, κι έτσι δεν μπορεί να βρεθεί σε ζωντανά κύτταρα. Συνδέεται με νουκλεϊκά οξέα με μέγιστο διέγερσης για φθορισμό τα 535 nm και μέγιστο εκπομπής τα 617 nm.

Η προετοιμασία των δειγμάτων για ανάλυση με FACS γίνεται ως εξής: *L. donovani* αξενικά αμαστιγωτά (κατασκευασμένα όπως στο κεφάλαιο 2.2.2) φυγοκεντρούνται και το κυτταρικό ίζημα εκπλένεται δύο φορές με παγωμένο FBS. Συνολικά 10^6 κύτταρα αραιώνονται σε PBS, PI 5μg/ml και ακολουθεί επώαση στο σκοτάδι για 15' σε πάγο, πριν γίνει η ανάλυση των δειγμάτων με κυτταρομετρία ροής. Ως θετικός μάρτυρας για τη νέκρωση χρησιμοποιούνται κύτταρα που επεξεργάστηκαν με 0,1% v/v Triton X-100 για 5 λεπτά, ενώ ως αρνητικός κύτταρα αναδιελυμένα σε PBS χωρίς PI. Τέλος, ως μάρτυρας της επιβίωσης των παρασίτων κατά την τεχνική της χρώσης χρησιμοποιήθηκαν προμαστιγωτά παράσιτα. Είκοσι χιλιάδες παράσιτα ανά δείγμα μελετήθηκαν και τα δεδομένα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Cell Quest. Τα αποτελέσματα είναι ενδεικτικά τριών ξεχωριστών πειραμάτων.

2.2.7. Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford

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

2.2.8. Ανοσοαποτύπωση Western

2.2.8.1. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου με SDS (SDS-PAGE)

Ο διαχωρισμός και η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών γίνεται με βάση το μοριακό τους βάρος με ηλεκτροφόρηση σε κάθετο πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου παρουσία θειϊκού δωδεκακυλικού νατρίου (SDS), σύμφωνα με την μέθοδο του Laemmli. Τα αρνητικά φορτισμένα ιόντα SDS συνδέονται στην πεπτιδική αλυσίδα σε αναλογία 1.4 gr SDS/ gr πρωτεΐνης, και το φορτίο της πρωτεΐνης που προκύπτει είναι ανάλογο με το μοριακό της βάρος. Για τον λόγο αυτό, οι αρνητικά φορτισμένες πεπτιδικές αλυσίδες, μετακινούνται προς το θετικό πόλο με βάση το μοριακό τους βάρος και με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη προς αυτό. Κατά την ηλεκτροφόρηση οι πρωτεΐνες τοποθετούνται αρχικά στο χαμηλής περιεκτικότητας σε ακρυλαμίδιο (4% w/v) πήκτωμα συσσώρευσης, και στη συνέχεια μετακινούνται και διαχωρίζονται στο υψηλής περιεκτικότητας σε ακρυλαμίδιο (10%, 12% w/v) πήκτωμα διαχωρισμού. Τα δείγματα αραιώνονται κατάλληλα σε διάλυμα «φόρτωσης» δείγματος και θερμαίνονται στους 95 °C για 5 λεπτά. Οι συνθήκες αυτές είναι αποδιατακτικές για τις πρωτεΐνες καθώς, ο βρασμός και η παρουσία του SDS καταστρέφουν τους ασθενείς δεσμούς (υδρογόνου, ιοντικούς, υδρόφοβους, van der Waals) ενώ η παρουσία της β-μερκαπτοαιθανόλης έχει ως αποτέλεσμα την αναγωγή των ισχυρών ομοιοπολικών δισουλφιδικών δεσμών. Παράλληλα με τα δείγματα, γίνεται ανάλυση μίγματος πρωτεϊνών αναφοράς.

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

2.2.8.2. Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Για τη μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα στη μεμβράνη χρησιμοποιείται διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς πρωτεϊνών και ετοιμάζεται ένα σύστημα sandwich με την εξής σειρά: α) ένα

λεπτό φύλλο σφουγγαριού, β) δύο φύλλα διηθητικού χαρτιού, γ) η πηκτή πολυακρυλαμιδίου, δ) ένα κομμάτι νιτροκυτταρίνης στο μέγεθος του πηκτώματος, ε) ένα φύλλο διηθητικού χαρτιού Whatmann 3MM, στ) ένα λεπτό φύλλο σφουγγαριού. Το σύστημα sandwich, τοποθετείται στην ειδική συσκευή μεταφοράς, έτσι ώστε η νιτροκυτταρίνη να βρίσκεται στην άνοδο. Η μεταφορά των πρωτεϊνών πραγματοποιείται με ρεύμα σταθερής έντασης 300 mA για 1-1,5 ώρα στους 4 °C. Μετά τη μεταφορά, η μεμβράνη χρωματίζεται για περίπου 1-5 λεπτά με διάλυμα χρωστικής Ponceau S (βάφει μη ειδικά όλες τις πρωτεΐνες) και κατόπιν ξεπλένεται με PBS ή TBS για να απομακρυνθεί η περίσσεια της χρωστικής. Οι ζώνες των πρωτεϊνών γίνονται ορατές και ελέγχεται η επιτυχία της μεταφοράς (το όριο της διακριτικής ικανότητας της χρωστικής Ponceau S είναι 100 ng/ml).

2.2.8.3. Ανοσοενζυμική ανίχνευση πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Western Blot)

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

Η ανίχνευση της πρωτεΐνης στη μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης γίνεται είτε με τη μέθοδο της 3',3'-διαμινοβενζιδίνης (3,3' DAB) είτε με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας (Electro chemiluminescence ή electro-generated chemiluminescence (ECL)). Η 3,3' DAB οξειδώνεται, παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂), από το ένζυμο της υπεροξειδάσης και παράγει ένα αδιάλυτο προϊόν με έντονο σκούρο καφέ χρώμα. Με τον τρόπο αυτό οι ζώνες των πρωτεϊνών που έχουν προσδέσει ειδικά το αντίσωμα και κατ' επέκταση και το αντι-ισοτυπικό αντίσωμα, εμφανίζονται μετά από 2-3 λεπτά. Η χημειοφωταύγεια, στη δεύτερη περίπτωση, είναι

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

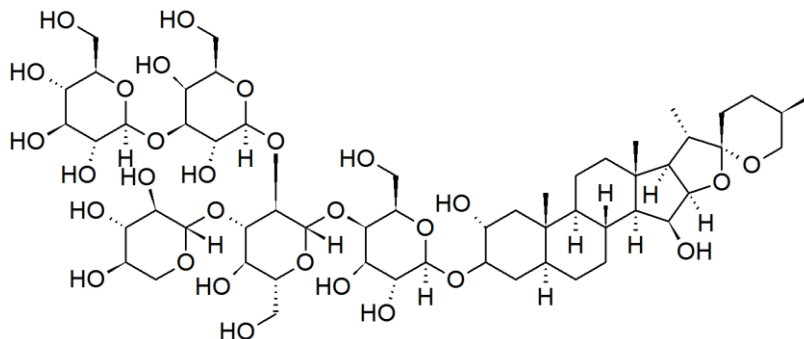
2.2.8.4. Αποδέσμευση αντισωμάτων και επαναχρησιμοποίηση μεμβράνης νιτροκυτταρίνης (stripping)

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

2.2.9. Κλασμάτωση των πρωτεϊνών των προμαστιγωτών μορφών *Leishmania* με τη χρήση των απορρυπαντικών διγιτονίνη (digitonin fractionation) και Triton X-100

Η διγιτονίνη (Εικόνα 2.2) είναι ένας γλυκοζίτης που λαμβάνεται από το φυτό *Digitalis purpurea*. Το άγλυκο τμήμα του ονομάζεται διγιτονίνη και είναι στεροειδές. Χρησιμοποιείται ως απορρυπαντικό, διαλυτοποιώντας αποτελεσματικά λιπίδια, όπως η χοληστερόλη, καθιστώντας έτσι διαπερατή την κυτταρική μεμβράνη αλλά και τις μεμβράνες των οργανιδίων των κυττάρων. Ανάλογα με τη συγκέντρωσή της στο δείγμα λαμβάνονται πρωτεϊνικά κλάσματα από

διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα αρχικά διαλυτές (κυτταροπλασματικές), στη συνέχεια πρωτεΐνες οργανιδίων και μιτοχονδρίων, και τέλος κυτταροσκελετικές, πρωτεΐνες της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και πυρηνικές (Foucher, Papadopoulou et al. 2006). Μπορούμε να εφαρμόσουμε ένα επιπλέον βήμα κλασμάτωσης με Triton X-100, ώστε να διαχωρίσουμε πρωτεΐνες της κυτταροπλασματικής μεμβράνης από τις πυρηνικές και αυτές του κυτταροσκελετού.



Εικόνα2.2 Το μόριο της διγιτονίνης

Καλλιέργεια προμαστιγωτών παρασίτων *L. donovani* με $\sim 2 \times 10^9$ κύτταρα (αγρίου τύπου ή διαγονιδιακών) φυγοκεντρείται στα 1000 g στους 4°C για 7 λεπτά και τα κύτταρα εκπλένονται 2 φορές με 10 ml παγωμένου διαλύματος αναδιασποράς (145 mM NaCl, 11 mM KCl, 75 mM Tris-HCl, pH 7.4). Τα κύτταρα στη συνέχεια αναδιασπείρονται σε 0,5 ml διαλύματος αναδιασποράς (προθερμασμένο στους 37 °C) στο οποίο προστίθενται αναστολείς πρωτεασών και η κλασμάτωση επιτυγχάνεται με την προσθήκη ίσου όγκου (0,5 ml) διαλύματος διγιτονίνης που περιέχει προοδευτικά αυξανόμενη συγκέντρωση του απορρυπαντικού (20 μ M, 200 μ M, 1 mM ή 10 mM) και επώαση στους 37 °C για 5 λεπτά. Τέλος, το κάθε κλάσμα συλλέγεται με φυγοκέντρηση στα 18000 g για 5 λεπτά (4 °C) αφού πρώτα προστεθούν 200 μ l σακχαρόζης 0,3 M. Το ίζημα της τελευταίας φυγοκέντρωσης (κλάσμα F5, εμπλουτισμένο σε πρωτεΐνες της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και του κυτταροσκελετού των παρασίτων, επαναδιαλύεται σε 500 μ l διαλύματος Triton X-100 1% (v/v) σε PBS 1X, επώάζεται για μία ώρα στους 4 °C υπό περιστροφή και στη συνέχεια φυγοκεντρείται στα 20000 g για 20 λεπτά (4 °C). Στο υπερκείμενο που περιέχει τις διαλυτές πρωτεΐνες του κλάσματος 5 (F5 S) προστίθεται διάλυμα φόρτωσης πρωτεϊνών Laemmli 6X και παράλληλα στο ίζημα (αδιάλυτες πρωτεΐνες, μεμβρανικές, πυρηνικές και πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού) προστίθεται διάλυμα φόρτωσης πρωτεϊνών Laemmli 1X ίσου όγκου. Στα κλάσματα 1 έως 4 (F1-F4) προστίθεται παγωμένη ακετόνη (1/1, v/v) και τα δείγματα παραμένουν για 16 ώρες στους -20 °C ώστε να επιτευχθεί η κατακρήμνιση των πρωτεϊνών που περιέχουν. Με

φυγοκέντρωση για 30 λεπτά στα 20000 g (4 °C), το υπερκείμενο αποχύνεται και το ίζημα των πρωτεϊνών αφήνεται σε ρεύμα αέρα απαγωγού για να στεγνώσει πλήρως. Τέλος, τα πρωτεϊνικά ιζήματα αναδιαλύονται στον κατάλληλο όγκο διαλύματος φόρτωσης πρωτεϊνών 1X, θερμαίνονται στους 95°C για 5 λεπτά για ανάλυση με τη μέθοδο ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Από όλα τα κλάσματα αποθηκεύεται μικρή ποσότητα για προσδιορισμό πρωτεϊνικής συγκέντρωσης με την μέθοδο Bradford.

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

Πίνακας 2.1 Τα πρωτεϊνικά κλάσματα που προκύπτουν κατά την κλασμάτωση κυττάρων *Leishmania* με τη χρήση της διγιτονίνης

2.2.10. Μελέτη έκκρισης πρωτεϊνών από το παράσιτο *Leishmania*

Καλλιέργεια προμαστιγωτών παρασίτων *Leishmania* στατικής φάσης ($\sim 10^8$ κύτταρα) 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 το 1/5 του αρχικού της καλλιέργειας. Τα παράσιτα επωάζονται στους 25 °C ή στους 37 °C για 6 ώρες και στη συνέχεια φυγοκεντρώνονται στα 1000×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 21000×g για 30 λεπτά, στους 4 °C. Το νέο

υπερκείμενο φιλτράρεται με φίλτρο 0.2μm. Προστίθεται όγκος παγωμένης ακετόνης 100% ώστε στο τελικό διάλυμα να έχει συγκέντρωση ακετόνης 80% v/v και αφήνεται στους -20 °C για 16 ώρες για να κατακρημνιστούν οι πρωτεΐνες. Ακολουθεί φυγοκέντρωση 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 (~30 λεπτά). Αναδιαλύονται οι πρωτεΐνες στον κατάλληλο όγκο διαλύματος φόρτωσης πρωτεϊνών 1X, θερμαίνονται στους 95°C για 5 λεπτά και αποθηκεύονται στους -20 °C. Εναλλακτικά, το υπερκείμενο συμπυκνώνεται μέσω φίλτρων 10 kDa (10 kDa cutoff centrifugal filters-Merck) και αλλάζει το ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH=9. Το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιείται για την εξισορρόπηση της κολώνας Superdex 200 10/300 που χρησιμοποιήθηκε για την κλασμάτωση. Μετά το τέλος της κλασμάτωσης τα δείγματα συμπυκνώθηκαν μέσω φίλτρων (10 kDa cutoff) και φυλάχθηκαν στους -20 °C μέχρι την ανάλυση με SDS-PAGE και Western Blot.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Όπως αναφέρθηκε και στο 1.3.5 της Εισαγωγής, η παρούσα διπλωματική εργασία αποτελεί συνέχεια προηγούμενης ερευνητικής δουλειάς του εργαστηρίου. Στόχος της ήταν η κατασκευή μοριακών και κυτταρικών εργαλείων για περαιτέρω μελέτη της φωσφατάσης *LdTyrPIP_22*, αλλά και για τη βελτίωση πειραματικών πρωτοκόλλων για τη μελέτη των βιοχημικών ιδιοτήτων και του λειτουργικού ρόλου του συγκεκριμένου ενζύμου.

3.1. Κλωνοποίηση του γονιδίου της πρωτεΐνης *LdTyrPIP_22* από το παράσιτο *L. donovani* (στέλεχος LG13) σε πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης σε Λεϊσμανιακά κύτταρα

Μέχρι τώρα, η μελέτη της δράσης φωσφατάσης της *LdTyrPIP_22* έγινε με την ανασυνδυασμένη *rLdTyrPIP_22*-8His πρωτεΐνη που είχε παραχθεί σε βακτήρια και είχε τροποποιημένο το αμινοτελικό της άκρο με προσθήκη 15-πεπτιδίου. Έλεγχος με ανοσοαποτύπωση Western υποκυτταρικών κλασμάτων *L. donovani* που είχαν ληφθεί με διαδοχική κλασμάτωση με διγιτονίνη ανέδειξε εκτός από την μορφή στο αναμενόμενο μοριακό βάρος της *LdTyrPIP_22* (~30 kDa) και 2 μορφές με μεγαλύτερο μοριακό βάρος (~35 kDa), μορφές που δεν ανιχνεύονται όταν η φωσφατάση εκφράζεται ετερόλογα από βακτήρια με τροποποιημένο το αμινοτελικό άκρο. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η *LdTyrPIP_22* πιθανόν να υφίσταται μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις στο παράσιτο *Leishmania*. Οι τροποποιήσεις αυτές μπορεί να επηρεάζουν τη δράση της ή την εξειδίκευση για συγκεκριμένα υποστρώματα.

Με στόχο να μελετήσουμε αυτό το ερώτημα σχεδιάσαμε δύο πλασμίδια για έκφραση της ανασυνδυασμένης *rLdTyrPIP_22*-His σε κύτταρα *Leishmania* α) ενδοκυττάρια, χωρίς τροποποιήσεις στο αμινοτελικό της άκρο και β) ως εκκρινόμενη (Εικόνα 3.1). Κατά τον σχεδιασμό της κατασκευής αυτών των πλασμιδίων προβλέφθηκε η εισαγωγή θέσης πέψης της ετικέτας 6His από την καθαρισμένη πρωτεΐνη με την πρωτεάση TEV σε περίπτωση που μελλοντικά θα θέλαμε να προχωρήσουμε σε κρυστάλλωση της καθαρισμένης φωσφατάσης για δομικές μελέτες. Επίσης στον σχεδιασμό της κατασκευής για έκφραση της εκκρινόμενης πρωτεΐνης προσθέσαμε την αλληλουχία που κωδικοποιεί την αμινοξική αλληλουχία MALD μετά την σηματοδοτική αλληλουχία έκκρισης (SP) στο N-τελικό άκρο που περιέχεται στο πλασμίδιο pLEXSY-sat2). Η αλληλουχία αυτή, σύμφωνα με την βιβλιογραφία (Klatt and

Konthur 2012) συμβάλει στην ποσοτική έκκριση ανασυνδιασμένων πρωτεϊνών από παράσιτα *Leishmania*.

α. Ενδοκυττάρια έκφραση της rLdTyrPIP₂₂-His

Για την κατασκευή του πλασμιδίου για ενδοκυττάρια έκφραση της rLdTyrPIP₂₂-His έγινε κλωνοποίηση του γονιδίου *LdtyrPIP₂₂* στη θέση αναγνώρισης BglII η οποία βρίσκεται στο συγκεκριμένο φορέα πριν από την αλληλουχία έκκρισης και στη θέση αναγνώρισης NheI. Με αυτόν τον τρόπο η έκφραση της πρωτεΐνης γίνεται χωρίς κάποια τροποποίηση στο αμινο-τελικό της άκρο, ενώ στο καρβοξυ-τελικό άκρο θα φέρει τις αλληλουχίες TEV και 6His-tag. Η απομόνωση και μελέτη αυτής της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης μπορεί να μας δώσει πληροφορίες για μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις στο αμινο-τελικό άκρο της πρωτεΐνης που σε προηγούμενη κλωνοποίηση σε βακτήρια ενδεχομένως απουσιάζουν λόγω της ύπαρξης της αλληλουχίας του 15-πεπτιδίου αλλά και λόγω στόχευσης/εντοπισμού της ανασυνδιασμένης πρωτεΐνης σε ενδοκυττάρια διαμερίσματα όπου εντοπίζεται και η ενδογενής πρωτεΐνη.

β. Έκφραση της rLdTyrPIP₂₂-His ως εκκρινόμενη

Για την κατασκευή του πλασμιδίου για εκκρινόμενη έκφραση της rLdTyrPIP₂₂-His έγινε εισαγωγή του γονιδίου *LdtyrPIP₂₂* μεταξύ των θέσεων XbaI και NheI, έτσι ώστε μετά από τη μετάφραση, η αλληλουχία MALD να βρίσκεται στο αμινο-τελικό άκρο της πρωτεΐνης ενώ οι αλληλουχίες TEV και 6His-tag στο καρβοξυ-τελικό. Η πρωτεΐνη που θα προκύψει μετά από έκφραση στα παράσιτα αναμένουμε να εκκρίνεται έτσι ώστε να γίνει εφικτή η απομόνωσή της από το εξωκυττάριο υλικό για περαιτέρω βιοχημικές, δομικές και λειτουργικές μελέτες. Οι πλασμιδιακοί αυτοί φορείς ονομάστηκαν pLEXSY-sat2.1.-intr (intracellular) και pLEXSY-sat2.1.-secr (secreted).

3.1.1. Ενίσχυση του γονιδίου *ldtyrPIP₂₂* με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

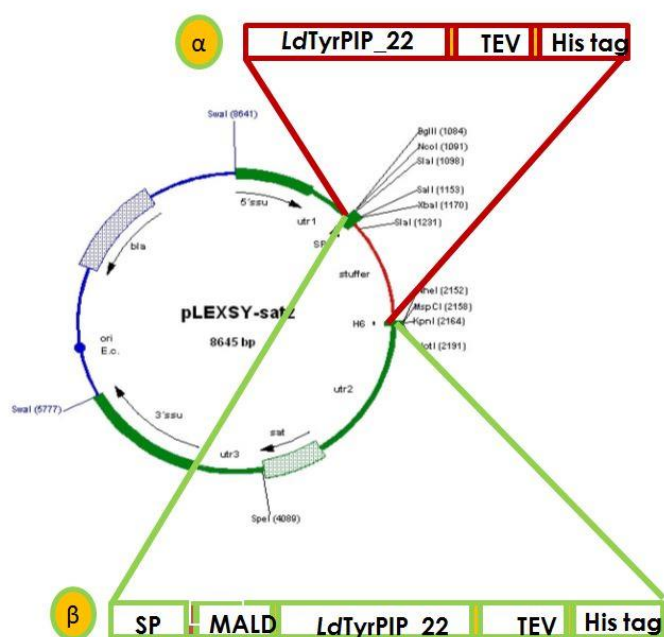
Το γονίδιο που κωδικοποιεί την *LdTyrPIP₂₂* απομονώθηκε και ενισχύθηκε με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), από γενωμικό DNA *L. donovani* του στελέχους LG13.

Ως ολιγονουκλεοτίδια ενισχυτές χρησιμοποιήθηκαν:

α) Για εισαγωγή στο πλασμίδιο pLEXSY sat2.1 χωρίς τροποποιήσεις στο αμινοτελικό άκρο, ως πρόσθιος (forward) εκκινητής το **5'-GAAGATCTACCATGCCCGCCCAAGCGTATCG-3'** με αλληλουχία στο 5' άκρο που αναγνωρίζεται από το ένζυμο BglII και ως ανάστροφος (reverse)

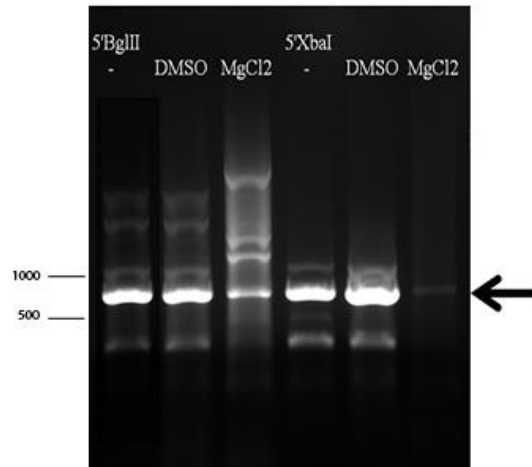
εκκινητής το ολιγονουκλεοτίδιο **5'-CTAGCTAGCTGAGCTCGATGAGGTCTG-3'** με αλληλουχία στο 3' που αναγνωρίζεται από το ένζυμο NheI.

β) Για εισαγωγή στο πλασμίδιο pLexsy-sat2 ως εκκρινόμενη μορφή, ως πρόσθιος (forward) εκκινητής το **5'-TGCTCTAGACATGCCCCGCCACAAGCGTATCTG-3'** με αλληλουχία στο 5' άκρο που αναγνωρίζεται από το ένζυμο XbaI και ως ανάστροφος (reverse) εκκινητής το ολιγονουκλεοτίδιο **5'-CTAGCTAGCTGAGCTCGATGAGGTCTG-3'** με αλληλουχία στο 3' που αναγνωρίζεται από το ένζυμο NheI.



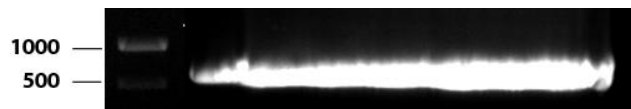
Εικόνα 3.1: Ο πλασμιδιακός φορέας έκφρασης pLEXSY-sat2.1.-intr και pLEXSYsat2.1.-secr με τις τροποποιήσεις και το ένθεμα του γονιδίου της α) pLEXSY-sat2.1. *LdtyrPIP_22* -intr και β) pLEXSY-sat2.1. *LdtyrPIP_22* -secr.

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 (Εικόνα 3.2). Τελικά οι αντιδράσεις διαμορφώθηκαν όπως στο πρωτόκολλο της Παραγράφου 2.2.1.



Εικόνα 3.2 Βελτιστοποίηση των συνθηκών της ενίσχυσης με PCR της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου που κωδικοποιεί την *LdTyrPIP_22* με υπόστρωμα μήτρα DNA γενωμικό υλικό από προμαστιγωτά *L. donovani* (στέλεχος LG13).

Μετά την αντίδραση PCR τα προϊόντα αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v, από την οποία απομονώθηκαν και καθαρίστηκαν σύμφωνα με τα πρωτόκολλα της παραγράφου 2.2.1. (Εικόνα 3.3)



Εικόνα 3.3 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v του ενθέματος *Ldtyrrip_22*

3.1.2. Ενσωμάτωση του γονιδίου *ldtyrrip_22* στον πλασμιδιακό φορέα pLEXSY-sat2.1

Τόσο ο πλασμιδιακός φορέας pLEXSY-sat2.1 όσο και τα ενθέματα πέφθηκαν με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού (*Bgl*III και *Nhe*I για την ενδοκυττάρια έκφραση, *Xba*I και *Nhe*I για την εκκρινόμενη). Ακολούθησε αντίδραση λιγάσης, όπως περιγράφεται στις μεθόδους (παράγραφος 2.2.1) (Εικόνα 3.4)

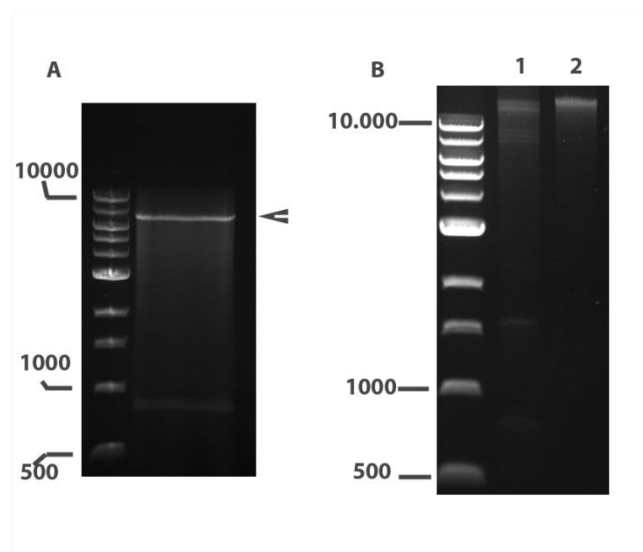
3.1.3. Απομόνωση θετικών κλώνων κυττάρων *E.coli* που φέρουν τα πλασμίδια pLEXSY-sat2.1-Ldtyrrip₂₂-intr και pLEXSY-sat2.1-Ldtyrrip₂₂-secr

Η επιλογή θετικών κλώνων *E. coli* που φέρουν το πλασμίδιο pLEXSY-sat2.1-Ldtyrrip₂₂-intr και pLEXSY-sat2.1-Ldtyrrip₂₂-secr έγινε με μετασχηματισμό επιλεκτικών στελεχών *E. coli* XL1Blue με υλικό από τις αντιδράσεις λιγάσης όπως περιγράφηκε ήδη στις μεθόδους (παράγραφος 2.2.1). 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 (αμπικιλίνη) και επωάστηκαν για 16 ώρες στους 37°C.

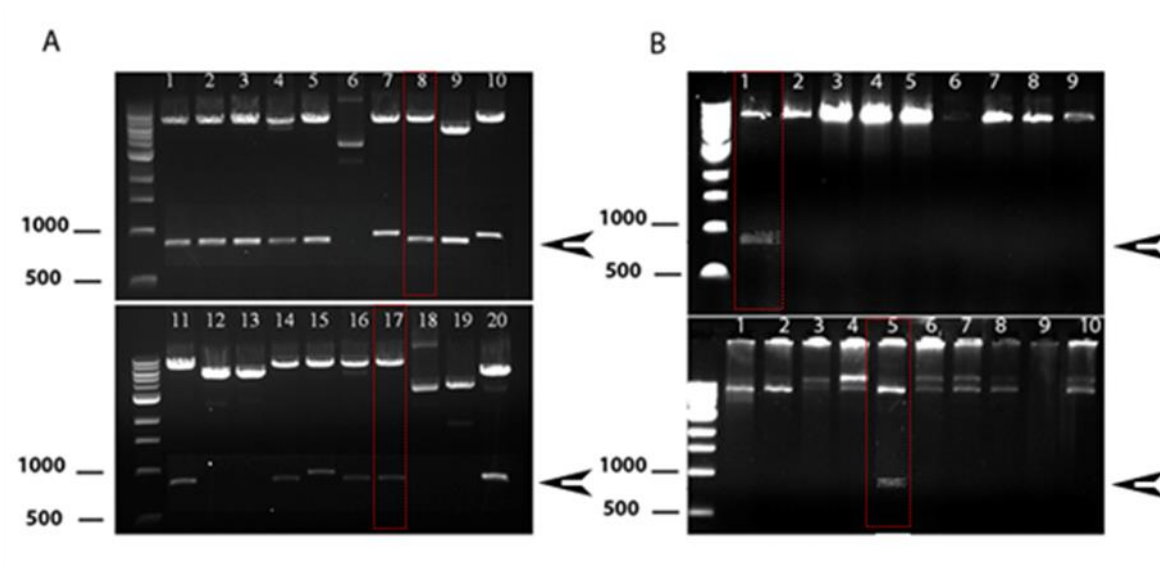
Από κάθε υποψήφια θετική καλλιέργεια απομονώθηκε πλασμιδιακό DNA σύμφωνα με πρωτόκολλο για απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας (Μέθοδοι, παράγραφος 2.2.1). Ο έλεγχος του πλασμιδίου για παρουσία του σωστού ενθέματος έγινε με διπλή πέψη του πλασμιδιακού DNA κάθε κλώνου με τα ένζυμα περιορισμού BglII και NheI για την ενδοκυττάρια έκφραση ή XbaI και NheI για την εκκρινόμενη (παράγραφος 2.2.1). 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 3.5). Τα αναμενόμενα μεγέθη (αριθμός ζευγών βάσεων) του φορέα και του ενθέματος για την ενδοκυττάρια έκφραση είναι 7537 bp και 838 bp αντίστοιχα ενώ για την εκκρινόμενη 7617 bp και 836 bp, μετά την πέψη του πλασμιδίου με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες BglII και NotI.

3.1.4. Ταυτοποίηση της αλληλουχίας θετικών κλώνων

Μετά την επιλογή δύο θετικών βακτηριακών αποικιών για κάθε πλασμίδιο (pLEXSY-sat2.1-Ldtyrrip₂₂-intr κλώνοι 8, 17, pLEXSY-sat2.1-Ldtyrrip₂₂-secr κλώνοι 1, 5) απομονώθηκε πλασμιδιακό DNA από μικρής κλίμακας καλλιέργειες αυτών των κλώνων και δείγματα στάλθηκαν για αλληλούχιση με 3 διαφορετικούς εκκινητές: τον πρόσθιο και ανάστροφο εκκινητή που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση PCR για την παραγωγή του ενθέματος *Ldtyrrip₂₂* και εκκινητή που υβριδίζεται σε αλληλουχία ανοδικά του σημείου ένθεσης του γονιδίου, 5'-CAACACCGACTGCAACAAG-3'. Τα τελικά αποτελέσματα από την αλληλούχιση των κλώνων παρατίθενται στην εικόνα 3.6.



Εικόνα 3.4: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 0,8 % w/v **A)** πλασμιδίου pLEXSY-sat2.1 μετά την πέψη με ένζυμα περιορισμού BglII/NheI, **B)** προϊόντος της αντίδρασης λιγάσης. (1) και αρνητικός μάρτυρας (2).



Εικόνα 3.5: Έλεγχος για ενσωμάτωση του ενθέματος σε πηκτή αгарόζης 1%. Πέψη πλασμιδιακών κλώνων με τα ένζυμα περιορισμού (A) BglII και NotI, (B) XbaI και NotI

Οι αλληλουχίες DNA όλων των κλώνων για το γονίδιο της *LdTyrPIP_22* βρέθηκαν να είναι ταυτόσημες με την αναμενόμενη (GenBank accession no MF461274). Για την κατασκευή των παρασίτων επιλέχθηκε για την ενδοκυττάρια έκφραση (α) ο κλώνος 17 και για την εκκρινόμενη (β) ο κλώνος 1.

A	c1.17 LdTyrPIP_22 GCCTTCGCTCGCTGCGACGCTCTTACGCTCCTGCTTCTTGTGTGCTTGCACCA ----- c1.17 LdTyrPIP_22 GATCTACCATGCCGCCCAAGCGTATCGTCGAAGTCGAGGGGCTGCAAGACTGCCGCG -----ATGCCGCCCAAGCGTATCGTCGAAGTCGAGGGGCTGCAAGACTGCCGCG ***** c1.17 LdTyrPIP_22 ACCTCGCGGTATACCATACACGGGATGGCAAGCACGTCGTCAGTACAAGCACATCTACC ACCTCGCGGTATACCATACACGGGATGGCAAGCACGTCGTCAGTACAAGCACATCTACC ***** c1.17 LdTyrPIP_22 GTCTCGGCAACGTGTGTGACGTACGCTGAGGGCAAGAAGTGTCTTGGAGAAGCTGT GTCTCGGCAACGTGTGTGACGTACGCTGAGGGCAAGAAGTGTCTTGGAGAAGCTGT ***** c1.17 LdTyrPIP_22 GGCTCAAGTACATCATCGACTTTCGTGTGCGGAGGAAAGGCTCGCTCGCCGTACGCGT GGCTCAAGTACATCATCGACTTTCGTGTGCGGAGGAAAGGCTCGCTCGCCGTACGCGT ***** c1.17 LdTyrPIP_22 TGCGGGTGTACGACTTCCGATCCGATCGAACTGCTTATTACGAGCAGTGT TGCGGGTGTACGACTTCCGATCCGATCGAACTGCTTATTACGAGCAGTGT ***** c1.17 LdTyrPIP_22 TGACGAAGCCGTGCTGGACGGGCATCTGACAGAGCGCTGCTTGGCGAATCTCAACA TGACGAAGCCGTGCTGGACGGGCATCTGACAGAGCGCTGCTTGGCGAATCTCAACA ***** c1.17 LdTyrPIP_22 CCCTTCTCATCGACTTCAAGGACGTCTACAAGAACTTCTTGCAGCTTTTCTCAAGGAA CCCTTCTCATCGACTTCAAGGACGTCTACAAGAACTTCTTGCAGCTTTTCTCAAGGAA ***** c1.17 LdTyrPIP_22 CAAAAGGCGAGCGCTTGTTCACCTGCACAGCTGGCAAGGACCGACCGCTGGCGG CAAAAGGCGAGCGCTTGTTCACCTGCACAGCTGGCAAGGACCGACCGCTGGCGG ***** c1.17 LdTyrPIP_22 CCGCGCTCTCTTGAACGCTTGGAGTGGCGGAGAAAGTGTGATGGAGATTTCATGC CCGCGCTCTCTTGAACGCTTGGAGTGGCGGAGAAAGTGTGATGGAGATTTCATGC ***** c1.17 LdTyrPIP_22 TGACGAACCGGTGCTGCTGCGCCATCGTGGCAAGCGTGGAGTGGCAACTGCATCA TGACGAACCGGTGCTGCTGCGCCATCGTGGCAAGCGTGGAGTGGCAACTGCATCA ***** c1.17 LdTyrPIP_22 TCTGGAAGGATGCTGTCAACATACTGTTCGCGGCCAAGCCTTCTTCTGGAGCTGTGCT TCTGGAAGGATGCTGTCAACATACTGTTCGCGGCCAAGCCTTCTTCTGGAGCTGTGCT ***** c1.17 LdTyrPIP_22 TTGGCGAGGTGTGCAAGAGGTATGGCTCGTAAACGCGTACATGGAGAAAGGCTTGGGC TTGGCGAGGTGTGCAAGAGGTATGGCTCGTAAACGCGTACATGGAGAAAGGCTTGGGC ***** c1.17 LdTyrPIP_22 TAGGTGTGGAGAGCTAGAGAAGCTGCGAGCTACTACGTCGCGCCGACCTCATCGAGCT TAGGTGTGGAGAGCTAGAGAAGCTGCGAGCTACTACGTCGCGCCGACCTCATCGAGCT ***** c1.17 LdTyrPIP_22 CACACCACCATCACCACTAG CA----- **	B	c1.1 LdTyrPIP_22 CTCTTCACGCTCCTCTTCTTCTTGTGCTGTGCTTGCACCAAGATCTGCTATGCTTCGAGG ----- c1.1 LdTyrPIP_22 CTCGTCCGTGTGCTGCGCGCCGCAATGCTGTTGCAAGCGGCGTGTGCTGACATGCT ----- c1.1 LdTyrPIP_22 CTAGACATGCCGCCCAAGCGTATCGTCGAAGTCGAGGGGCTGCAAGACTGCCGCGAC -----ATGCCGCCCAAGCGTATCGTCGAAGTCGAGGGGCTGCAAGACTGCCGCGAC ***** c1.1 LdTyrPIP_22 CTCGCGGTATACCATACACGGGATGGCAAGCACGTCGTCAGTACAAGCACATCTACCG CTCGCGGTATACCATACACGGGATGGCAAGCACGTCGTCAGTACAAGCACATCTACCG ***** c1.1 LdTyrPIP_22 TCCGACAACGTTGTGTGACGTACGCTGAGGGCAAGAAGTGTCTTGGAGAAGCTGTG TCCGACAACGTTGTGTGACGTACGCTGAGGGCAAGAAGTGTCTTGGAGAAGCTGTG ***** c1.1 LdTyrPIP_22 CTCAAGTACATCATCGACTTTCGTGTGCGGAGGAAAGGCTCGCTCGCCGTACGCGTTC CTCAAGTACATCATCGACTTTCGTGTGCGGAGGAAAGGCTCGCTCGCCGTACGCGTTC ***** c1.1 LdTyrPIP_22 GCGGGTGTACGACTTCCGATCCGATCGAACTGCTTATTACGAGCAGCTGTG GCGGGTGTACGACTTCCGATCCGATCGAACTGCTTATTACGAGCAGCTGTG ***** c1.1 LdTyrPIP_22 ACGAAGCCGTGCTGGACGGGCATCTGACAGAGCGCTGCTTGGCGAATCTCAACAACC ACGAAGCCGTGCTGGACGGGCATCTGACAGAGCGCTGCTTGGCGAATCTCAACAACC ***** c1.1 LdTyrPIP_22 TTTCTCATCGACTTCAAGGACGTCTACAAGAACTTCTTGCAGCTTTTCTCAAGGAA TTTCTCATCGACTTCAAGGACGTCTACAAGAACTTCTTGCAGCTTTTCTCAAGGAA ***** c1.1 LdTyrPIP_22 AAAGGGCAGCGCTTGTTCACCTGCACAGCTGGCAAGGACCGACCGCTGGCGCC AAAGGGCAGCGCTTGTTCACCTGCACAGCTGGCAAGGACCGACCGCTGGCGCC ***** c1.1 LdTyrPIP_22 GCCTCTCTTGAACGCTTGGAGTGGCGGAGAAAGTGTGATGGAGATTTCATGCTG GCCTCTCTTGAACGCTTGGAGTGGCGGAGAAAGTGTGATGGAGATTTCATGCTG ***** c1.1 LdTyrPIP_22 ACGAACCGGTGCTGCTGCGCCATCGTGGCAAGCGTGGAGTGGCAACTGCATATC ACGAACCGGTGCTGCTGCGCCATCGTGGCAAGCGTGGAGTGGCAACTGCATATC ***** c1.1 LdTyrPIP_22 TGGAAGGATGCTGTCAACATACTGTTCGCGGCCAAGCCTTCTTCTGGAGCTGTGCTTT TGGAAGGATGCTGTCAACATACTGTTCGCGGCCAAGCCTTCTTCTGGAGCTGTGCTTT ***** c1.1 LdTyrPIP_22 GGCGAGGTGTGCAAGAGGTATGGCTCGTAAACGCGTACATGGAGAAAGGCTTGGGCTA GGCGAGGTGTGCAAGAGGTATGGCTCGTAAACGCGTACATGGAGAAAGGCTTGGGCTA ***** c1.1 LdTyrPIP_22 GGTGTGGAGAGCTAGAGAAGCTGCGAGCTACTACGTCGCGCCGACCTCATCGAGCTCA GGTGTGGAGAGCTAGAGAAGCTGCGAGCTACTACGTCGCGCCGACCTCATCGAGCTCA ***** c1.1 LdTyrPIP_22 TGAGGAGCTAGCGAGAATCTTTATTTTCAAGGTACCCACCACCTACCCACCTAGGGC -----
----------	---	----------	---

Εικόνα 3.6: ClustalW συσχέτιση με την αλληλουχία του γονιδίου της *LdTyrPIP_22* (GenBank accession no MF461274) των αλληλουχιών του γονιδίου της *LdTyrPIP_22* στον κλώνο 17 του pLEXSY-sat2.1-*Ldtyrrip_22*-intr (α) και στον κλώνο 1 του pLEXSY-sat2.1-*Ldtyrrip_22*-secr (β) όπως προέκυψαν μετά από αλληλούχιση.

3.2. Κατασκευή διαγονιδιακών παρασίτων *Leishmania tarentolae* που εκφράζουν την r*LdTyrPIP_22*-His α) ως ενδοκυττάρια και β) ως εκκρινόμενη

Όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο 3.1, η ενδογενής *LdTyrPIP_22* υφίσταται μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις που θα πρέπει να λάβουμε υπ' όψιν προκειμένου να μελετήσουμε τη δομή και τις βιοχημικές ιδιότητες της πρωτεΐνης καθώς και για δοκιμές *in vitro* που αφορούν τη λειτουργία της. Για τις μελέτες αυτές χρειαζόμαστε επαρκή ποσότητα του

ενζύμου που θα πρέπει να απομονώσουμε από καλλιέργειες παρασίτων *Leishmania* μεγάλης κλίμακας. Κάτι τέτοιο δεν επιτρέπεται από τους κανόνες βιοασφάλειας για καλλιέργεια παθογόνων στελεχών του παρασίτου *L. donovani*. Εναλλακτικά, για την έκφραση της rLdTygPIP₂₂-His επιλέχθηκε ο οργανισμός *L. tarentolae* που δεν είναι παθογόνος για τον άνθρωπο (Raymond et al, 2011) και κατασκευάστηκαν δαγονιδιακά παράσιτα *L. tarentolae* που εκφράζουν σταθερά το διαγονίδιο *Ldtyrrip₂₂-6his*. Βασικό πλεονέκτημα του *L. tarentolae* είναι ότι εξασφαλίζει μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις αντίστοιχες των θηλαστικών στις ετερόλογα εκφραζόμενες πρωτεΐνες (Phan et al., 2009), στην δε συγκεκριμένη περίπτωση είναι ένας οργανισμός του ιδίου γένους με τον οργανισμό *L. donovani*. Ανήκει στο υπογένος *Sauroleismania* (Εικόνα 1.5) με το οποίο το υπογένος *Leishmania* έχει μεγάλες γενετικές ομοιότητες. Επι πλέον, έχει σχετικά μικρό χρόνο αναδιπλασιασμού (6-10 ώρες), η διαδικασία κατασκευής των δαγονιδιακών παρασίτων είναι απλή κι εύκολη, ο χρόνος κατασκευής σταθερής κυτταρικής σειράς κυμαίνεται από 14-30 ημέρες και μπορεί να αναπτυχθεί σε οικονομικά θρεπτικά υλικά (Basile G. & Petica M., 2012).

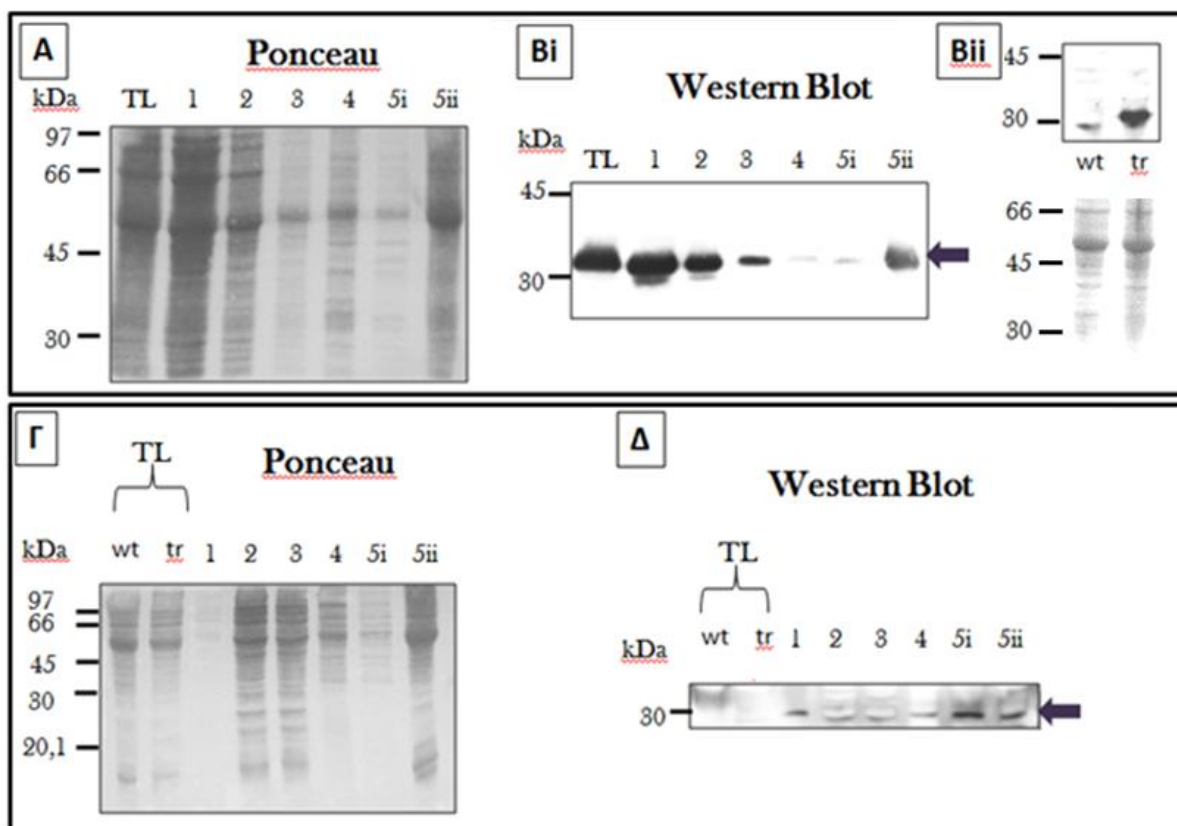
Για την κατασκευή των δαγονιδιακών στελεχών *L. tarentolae-Ldtyrrip₂₂-6his* χρησιμοποιήθηκαν τα πλασμίδια pLEXSY-sat2.1-*Ldtyrrip₂₂*-intr (α) και pLEXSY-sat2.1-*Ldtyrrip₂₂*-secr (β). Τα πλασμίδια αυτά περιέχουν δύο αλληλουχίες που αναγνωρίζονται από την περιοριστική ενδονουκλεάση *SwaI*, καθώς και δύο θέσεις ομόλογου ανασυνδυασμού με συγκεκριμένες αλληλουχίες στο γενωμικό DNA των παρασίτων *Leishmania*, αντικαθιστώντας ένα από τα αντίγραφα του γονιδίου που εκφράζει την υπομονάδα S του ριβοσώματος. Για την ενσωμάτωση του τμήματος των πλασμιδίων (α) και (β) που περιέχουν το διαγονίδιο και τις ρυθμιστικές αλληλουχίες έκφρασης έγινε πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση *SwaI* για 20 ώρες, διαχωρισμός των τμημάτων μέσω πηκτώματος 1% w/v αгарόζης και καθαρισμός του τμήματος που περιέχει το ανασυνδυασμένο γονίδιο που κωδικοποιεί για την *LdTygPIP₂₂-His*. Στη συνέχεια έγινε εισαγωγή του τμήματος αυτού του ευθύγραμμου DNA σε παράσιτα *L. tarentolae* με ηλεκτροδιάτρηση. Τα παράσιτα στη συνέχεια αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό BHI με βιοπτερίνη, ένα σημαντικό συμπράγοντα για την υδροξυλίωση φαινυλαλανίνης, τυροσίνης, τρυπτοφάνης και στερολών, καθώς και για τον αποκορεσμό (desaturation) λιπαρών οξέων που είναι απαραίτητος για την ανάπτυξη των παρασίτων στην καλλιέργεια.

Τα δύο στελέχη δαγονιδιακών παρασίτων *L. tarentolae-Ldtyrrip₂₂-his* (intr) και *L. tarentolae-Ldtyrrip₂₂-his* (secr) μελετήθηκαν στη συνέχεια με βιοχημικές μεθόδους για την επιβεβαίωση

της έκφρασης των πρωτεϊνών *Ld*TyrPIP₂₂-His (ενδοκυττάρια ή εξωκυττάρια εκκρινόμενη μορφή). Για την λήψη κλασμάτων του κυτταρικού εκχυλίσματος προμαστιγωτών παρασίτων *L. tarentolae* εμπλουτισμένων σε διαλυτές και μεμβρανικές πρωτεΐνες έγινε προσθήκη διαδοχικά αυξανόμενων συγκεντρώσεων του απορρυπαντικού διγλιτονίνη (Μέθοδοι, παράγραφος 2.2.9). Τα κλάσματα που συλλέχθηκαν αναλύθηκαν στη συνέχεια με ανοσοαποτύπωση Western (Μέθοδοι, παράγραφος 2.2.8) Εικόνα 3.7.

Παρατηρούμε πως σε ολικά εκχυλίσματα από διαγονιδιακά προμαστιγωτά παράσιτα που εκφράζουν την *rLd*TyrPIP₂₂-His ως ενδοκυττάρια ανιχνεύουμε με Western Blot στο αναμενόμενο μοριακό βάρος πολύ μεγαλύτερη ποσότητα πρωτεΐνης για τον ίδιο αριθμό παρασίτων σε σύγκριση με τα παράσιτα αγρίου τύπου. Σημειώτεον ότι στα ανασυνδιασμένα παράσιτα η ανιχνευόμενη πρωτεϊνική ζώνη έχει λίγο μεγαλύτερο φαινόμενο μοριακό βάρος όπως θα αναμέναμε. Η διαφορά στο μοριακό βάρος που εντοπίζουμε μεταξύ των ζωνών της ενδογενούς και ανασυνδιασμένης πρωτεΐνης (Εικόνα 3.7, Bii) μπορεί να οφείλεται στην ετικέτα ιστιδίνης. Η υπολογιζόμενη μοριακή μάζα της ενδογενούς *Ltar*TyrPIP₂₂ είναι 28830 Da ενώ η υπολογιζόμενη μοριακή μάζα της *rLd*TyrPIP₂₂-His είναι 31016 Da.

Είναι ενδιαφέρον ότι η κύρια ποσότητα της *rLd*TyrPIP₂₂-His βρίσκεται σε κλάσματα διαλυτών πρωτεϊνών του κυταροπλάσματος. Παρ' όλ' αυτά μικρές ποσότητες της πρωτεΐνης ανιχνεύονται και σε κλάσματα εμπλουτισμένα σε μεμβρανικές και κυταροσκελετικές πρωτεΐνες χωρίς να μπορούμε όμως να διαχωρίσουμε αν πρόκειται για την ενδογενή *Ltar*TyrPIP₂₂ ή την ανασυνδιασμένη *rLd*TyrPIP₂₂-6His πρωτεΐνη. Επειδή οι δύο πρωτεΐνες έχουν ποσοστό ομοιότητας 83.66% αναμένουμε ότι το αντίσωμα που έχουμε κατασκευάσει έναντι της *Ld*TyrPIP₂₂ από το παράσιτο *L. donovani* αναγνωρίζει και την ορθόλογη πρωτεΐνη από το παράσιτο *L. tarentolae*.



Εικόνα 3.7: Εντοπισμός της *rLdTygPIP_22-His* σε υποκυτταρικά πρωτεϊνικά κλάσματα διαγονιδιακών στελεχών *L. tarentolae*. WB σε υποκυτταρικά πρωτεϊνικά κλάσματα από παράσιτα *L. tarentolae* που εκφράζουν την ενδοκυττάρια (**Bi**) ή την εκκρινόμενη (**Δ**) μορφή της *rLdTygPIP_22-His*. Τα πρωτεϊνικά κλάσματα αναλύθηκαν σε 12% SDS-PAGE. (**Bii**) Επίπεδα έκφρασης της *LdTygPIP_22* σε αγρίου τύπου και διαγονιδιακά *L. tarentolae* (πάνω) και η χρώση Ponceau (κάτω) της αντίστοιχης μεμβράνης νιτροκυτταρίνης. Η ίδια ποσότητα ολικού εκχυλίσματος από παράσιτα *L. tarentolae* αγρίου τύπου (wt) ή διαγονιδιακά (tr) φορτώθηκε στην κάθε διαδρομή. Για ανίχνευση της ενδογενούς μορφής της *LdTygPIP_22* και της ανασυνδιασμένης *rLdTygPIP_22-His* χρησιμοποιήθηκε ειδικό αντίσωμα anti-*LdTygPIP_22* (ορός ποντικού 1:2500). (**Α, Γ**) Χρώση Ponceau των μεμβρανών νιτροκυτταρίνης που παρουσιάζονται στα WB στα (**Bi**) και (**Δ**). TL=ολικό εκχύλισμα. Τα κλάσματα 1,2 περιέχουν διαλυτές κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες, τα κλάσματα 3,4 πρωτεΐνες οργανιδίων, το κλάσμα 5i πρωτεΐνες της πλασματικής μεμβράνης, το κλάσμα 5ii κυτταροσκελετικές και πυρηνικές πρωτεΐνες.

Είναι ενδιαφέρον ότι στην Εικόνα 3.7 Bi, στα διαλυτά κλάσματα 1 και 2 εκτός από την κύρια ζώνη ~31 kDa, που προφανώς αντιπροσωπεύει την ανασυνδιασμένη *rLdTygPIP_22-His*, ανιχνεύεται και μια αχνή ζώνη σε λίγο χαμηλότερο MW όπως βλέπουμε στην Εικόνα 3.7 Bii

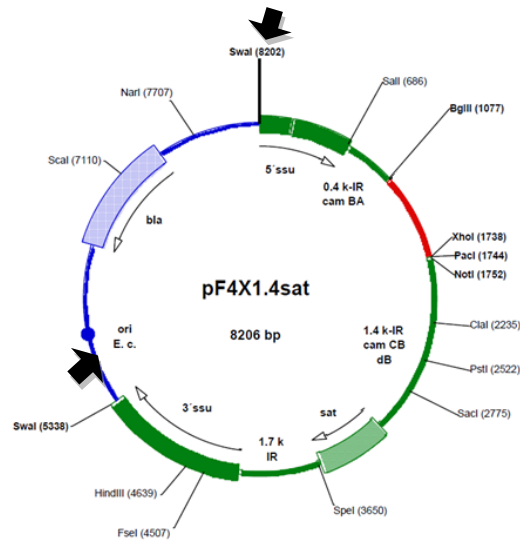
στην διαδρομή με τα εκχυλίσματα από παράσιτα αγρίου τύπου. Η ζώνη αυτή θα μπορούσε να αντιστοιχεί στην ενδογενή *LtarTyrPIP_22*.

Στο στέλεχος των διαγονιδιακών παρασίτων που αναμένονται να εκφράζουν την *rLdTyrPIP_22-6His* ως εκκρινόμενη, δεν καταφέραμε να ανιχνεύσουμε την πρωτεΐνη σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα κάτι που θα μπορούσε να υποδηλώνει την αποτελεσματική έκκρισή της (Εικόνα 3.7, Δ). Μετά από κλασμάτωση ολικών εκχυλισμάτων από διαγονιδιακά παράσιτα με διγιτονίνη (Εικόνα 3.7, Γ) μικρή ποσότητα πρωτεΐνης στο αναμενόμενο μοριακό βάρος της *LdTyrPIP_22* ανιχνεύθηκε σε κλάσματα με πρωτεΐνες ενδοκυττάρων μεμβρανικών οργανιδίων και σε κλάσματα εμπλουτισμένα σε πλασματική μεμβράνη και στοιχεία του κυτταροσκελετού (Εικόνα 3.7, Δ). Οσον αφορά το κλάσμα συνδεδεμένο με μεμβράνες θα μπορούσε να αντιπροσωπεύει την ποσότητα της πρωτεΐνης που υπάρχει στο εσωτερικό του ενδοπλασματικού δικτύου του παρασίτου κατά τη διάρκεια της σύνθεσής της και πριν την έκκρισή της. Οσον αφορά το κυτταροσκελετικό κλάσμα, θα μπορούσε να αντιπροσωπεύει την ενδογενή πρωτεΐνη που συνδέεται με στοιχεία του κυτταροσκελετού.

Συνεπώς, η κατασκευή των διαγονιδιακών παρασίτων *L. tarentolae-LdtyrPIP_22-6his* επιβεβαιώθηκε αφ' ενός μεν με επιλογή του πληθυσμού για ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό *nurcethricin* και με έλεγχο της έκφρασης της πρωτεΐνης *LdTyrPIP_22-His* σε υποκυτταρικά κλάσματα η/και ολικά εκχυλίσματα των παρασίτων.

3.3. Κατασκευή διαγονιδιακών παρασίτων *L. donovani* που εκφράζουν χρωμοσωμικά την *LdTyrPIP_22-mRFP1*

Προηγούμενη δουλειά στο εργαστήριο είχε οδηγήσει στη κατασκευή πλασμιδιακού φορέα έκφρασης *pF4X1-4sat-LdtyrPIP_22-mrfp1* για έκφραση της ανασυνδυασμένης *LdTyrPIP_22-mRFP1* ως υβριδική πρωτεΐνη με την κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη *mRFP1* (Kotopoulou 2014). Με το πλασμίδιο αυτό κατασκευάστηκαν διαγονιδιακά παράσιτα *L. donovani* που εκφράζουν την *LdTyrPIP_22-mRFP1* επισωμικά. Για να μελετηθεί η δράση της *LdTyrPIP_22* σε *in vivo* πειράματα μόλυνσης πειραματοζώων με παράσιτα που την υπερεκφράζουν χρειάζεται να κατασκευαστούν παράσιτα *L. donovani* που να εκφράζουν την ανασυνδυασμένη *LdTyrPIP_22-mRFP1* σταθερά μετά από ενσωμάτωση του αντίστοιχου γονιδίου στο χρωμοσωμικό DNA του παρασίτου.

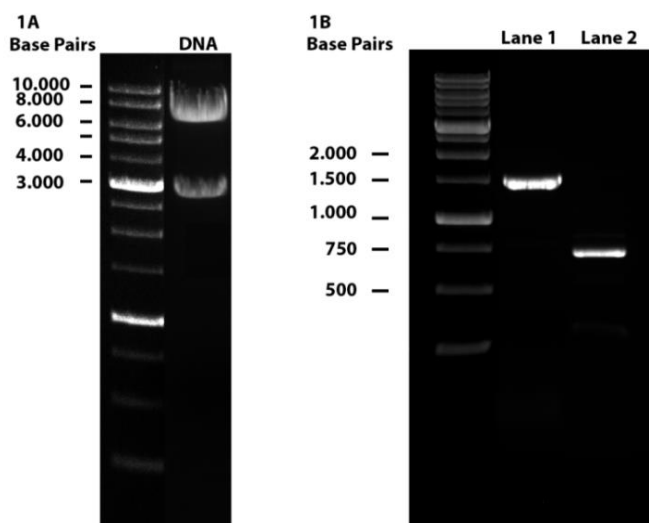


Εικόνα 3.8: Χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pF4X1-4sat-*Ldtyrrip_22-mrfp1*. Στις θέσεις που υποδεικνύουν τα βέλη γίνεται πέψη με το ένζυμο περιορισμού *SwaI*. Τα έντονα πράσινα πλαίσια απεικονίζουν τις θέσεις ομόλογου ανασυνδυασμού με το χρωμοσωμικό DNA των παρασίτων *Leishmania*.

Ο πλασμιδιακός φορέας pF4X1-4sat-*Ldtyrrip_22-mrfp1* περιέχει δύο περιοχές (Εικόνα 3.8) που επιτρέπουν ομόλογο ανασυνδυασμό με το χρωμοσωμικό DNA των παρασίτων *Leishmania* όπως και ο πλασμιδιακός φορέας pLEXSY-sat2 που περιγράφηκε στις παραγράφους 2.1.4 και 3.1. Μέσω πέψης με την περιοριστική ενδονουκλεάση *SwaI*, απομονώθηκε ένα γραμμικό τμήμα DNA (6116 bp) που περιέχει το ανασυνδυασμένο γονίδιο για την έκφραση της *rLdTyRPIP_22-mRFP1*, τις θέσεις ανασυνδυασμού και το γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό επιλογής (nucethricin). Το DNA αυτό εισήχθη σε λογαριθμικής φάσης προμαστιγωτά παράσιτα με ηλεκτροδιάτρηση σύμφωνα με το πρωτόκολλο που αναφέρεται στην παράγραφο 2.2.3 (Μέθοδοι). Ακολούθησε επιλογή του πληθυσμού των παρασίτων που έχουν ενσωματώσει στο χρωμόσωμά τους την κασσέτα έκφρασης της *rLdTyRPIP_22-mRFP1* μέσω προσθήκης αυξανόμενης συγκέντρωσης αντιβιοτικού (nucethricin).

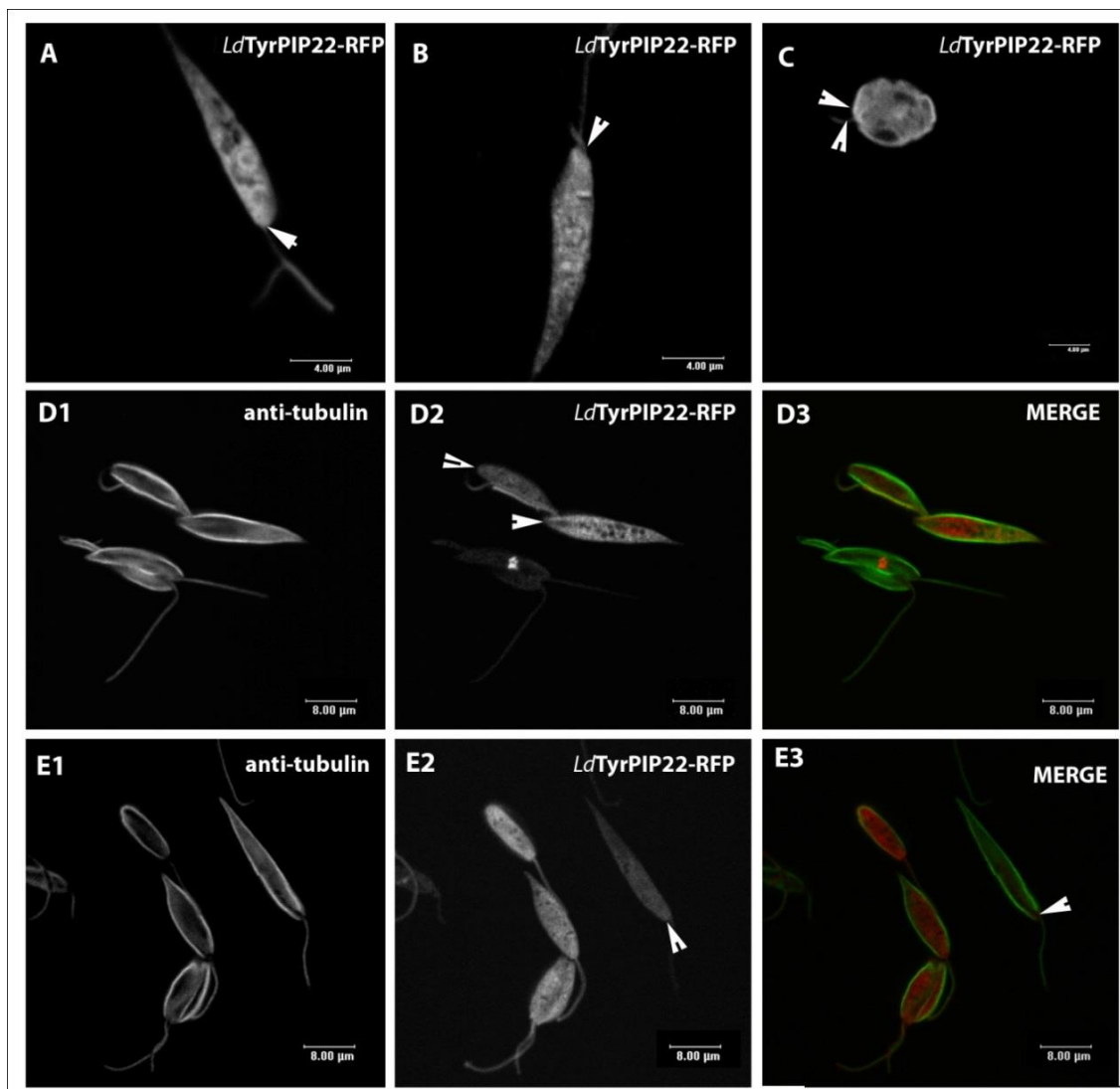
Η ενσωμάτωση του DNA στο χρωμοσωμικό DNA του επιλεγέντος πληθυσμού των διαγονιδιακών παρασίτων επιβεβαιώθηκε μέσω PCR με χρήση μήτρας DNA γενωμικό υλικό απομονωμένο από τα διαγονιδιακά παράσιτα. (Εικόνα 3.9-1Α). Πραγματοποιήθηκαν δύο αντιδράσεις PCR. Μία αντίδραση με ζεύγος εκκινητών που υβριδίζονται στο 5' άκρο του

γονιδίου *Ldtyrrip₂₂-mrfp1* και στο 3' άκρο του γονιδίου *mrfp1*, και μία αντίδραση με ζευγάρι εκκινητών που υβριδίζονται στο 5' και 3' άκρο του *mrfp1*. Τα προϊόντα που προέκυψαν από τις δύο αντιδράσεις είχαν τα αναμενόμενα μοριακά μεγέθη για τα γονίδια *Ldtyrrip₂₂-mrfp1* (1356 bp) και *mrfp1* (678 bp) αντίστοιχα (Εικόνα 3.9 1B διαδρομές 1, 2).



Εικόνα 3.9: **1A.** Ανάλυση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v των γραμμικών τμημάτων DNA μετά από πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση *SwaI*. Το τμήμα που περιέχει το ανασυνδυασμένο γονίδιο *Ldtyrrip₂₂-mrfp1* αναμένεται να έχει μέγεθος 6.5 kbp **1B.** Ανάλυση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v των προϊόντων PCR με μήτρα γενωμικό DNA που απομονώθηκε από διαγονιδιακά παράσιτα *L. donovani-LdTyRPIP₂₂-mRFP1*. Lane 1: Προϊόντα PCR με εκκινητές που υβριδίζονται στο 5' άκρο της κωδικής αλληλουχίας του *Ldtyrrip₂₂* και στο 3' άκρο της αλληλουχίας του *mrfp1* (αναμενόμενο μέγεθος προϊόντος 1452 bp). Lane 2: Προϊόντα PCR με εκκινητές που υβριδίζονται στο 5' και στο 3' άκρο του *mrfp1* (αναμενόμενο μέγεθος 675 bp). Στην αριστερή πλευρά κάθε εικόνας παρουσιάζονται οι μοριακοί μάρτυρες.

Η έκφραση της *rLdTyRPIP22-mRFP1* και ο εντοπισμός της μελετήθηκαν με μικροσκοπία φθορισμού (Εικόνα 3.10). Παρατηρήθηκε ότι ο κόκκινος φθορισμός εντοπίζεται στο μαστίγιο και σε δομές που μοιάζουν με κυστίδια στο σώμα του παρασίτου. Σε διαιρούμενο κύτταρο (Εικόνα 3.10 C) ο κόκκινος φθορισμός εντοπίστηκε επίσης στην επιφάνεια των παρασίτων. Στις εκόνες D1 και E1 έχει γίνει επίσης χρώση με αντίσωμα ειδικό για την τουμπουλίνη των παρασίτων (2.2.4).



Εικόνα 3.10: Προμαστιγωτά παράσιτα *L. donovani*-*Ldtyrrip*₂₂-*mrfp1*. Εικόνες από μικροσκοπία φθορισμού **A, B, C**: απεικόνιση του φθορισμού της mRFP1. **D& E**: Εικόνες διπλού φθορισμού από παράσιτα που έχουν σημανθεί με ανοσοφθορισμό με αντίσωμα ειδικό για την τουμπουλίνη και δεύτερο anti-mouse Alexa488 αντίσωμα. Ο φθορισμός του φθοριοχρώματος Alexa488 και της mRFP1 παρουσιάζονται ξεχωριστά σε ασπρόμαυρες εικόνες. Αλληλοεπικάλυψη των εικόνων και των δύο φθορισμών φαίνεται στις έγχρωμες εικόνες δεξιά (merge). Το βέλος υποδεικνύει τη θέση έκφυσης του μαστιγίου.

Συμπερασματικά, η κατασκευή της σταθερής διαγονιδιακής σειράς των παρασίτων *L. donovani*-*Ldtyrrip*₂₂-*mrfp1* επιβεβαιώθηκε τόσο λόγω της επιβίωσης των παρασίτων σε θρεπτικό υλικό με αντιβιοτικό, όσο και από τα προϊόντα της PCR με γενωμικό DNA από τα διαγονιδιακά επιλεγέντα παρασίτων. Αυτό δείχνει επιτυχή ένθεση του γονιδίου *Ldtyrrip*₂₂-*mrfp1* στο

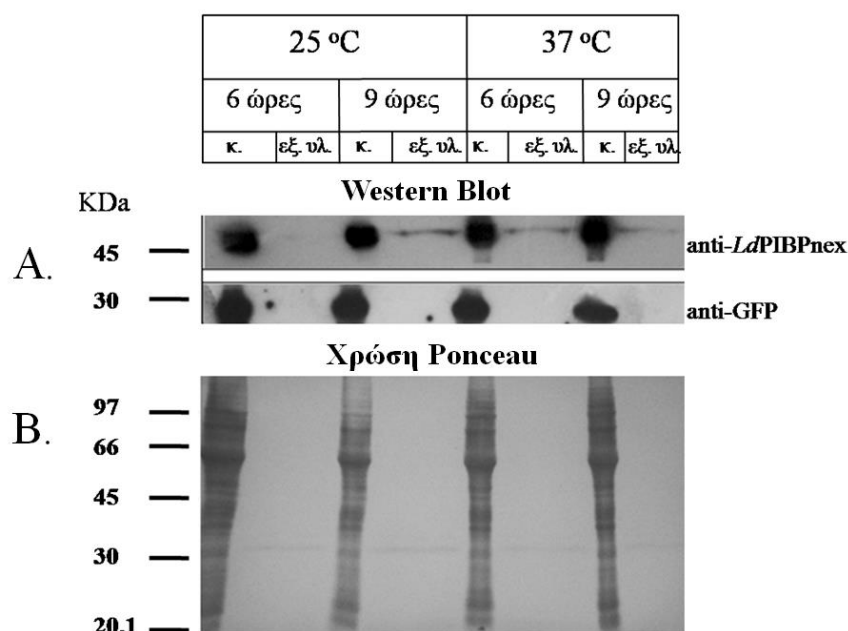
χρωμοσωμικό DNA. Τέλος η έκφραση της υβριδικής φθορίζουσας πρωτεΐνης *LdTyrPIP_22-mRFP1* στα διαγονιδιακά παράσιτα *L. donovani-Ldtyrrip_22-mrfp1* επιβεβαιώθηκε με μικροσκοπία φθορισμού.

3.4. Έλεγχος έκκρισης της ενδογενούς *LdTyrPIP_22* από αξενικές καλλιέργειες προμαστιγωτών *L. donovani*

Η έκκριση μιας πρωτεΐνης από τα παράσιτα *Leishmania* ενδεχομένως να σχετίζεται με την επιβίωση του παρασίτου στο θηλαστικό ξενιστή ή/και την εγκαθίδρυση της μόλυνσης. Οι ομόλογες πρωτεΐνες της *LdTyrPIP_22* που έχουν επιβεβαιωθεί ως μολυσματικοί παράγοντες από το *Mycobacterium tuberculosis* και το *Listeria monocytogenes* είναι εκκρινόμενες (Singh, Rao et al. 2003, Kastner, Dussurget et al. 2011). Θελήσαμε να διερευνήσουμε αν η ενδογενής *LdTyrPIP_22* ή η ανασυνδιασμένη μορφή της *rLdTyrPIP_22-mRFP1* εκκρίνονται σε αξενικές καλλιέργειες προμαστιγωτών κυττάρων *L. donovani* αγρίου τύπου ή διαγονιδιακών στελεχών *L. donovani-Ldtyrrip_22-mrfp1*. Ο έλεγχος της έκκρισης έγινε σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας, στους 25°C (θερμοκρασία του ασπόνδυλου ξενιστή), και τους 37°C (θερμοκρασία με την οποία έρχονται αντιμέτωπα τα παράσιτα κατά την είσοδό τους στο θηλαστικό). Η συλλογή του εκκρινόμενου κλάσματος των πρωτεϊνών έγινε μετά από παραμονή των μετακυκλικών προμαστιγωτών κυττάρων στην καλλιέργεια για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό. Στη συνέχεια, μετά από φυγοκέντρηση των κυττάρων οι πρωτεΐνες στο εξωκυττάριο υγρό καταβυθίστηκαν με ακετόνη (2.2.10), διαχωρίστηκαν με SDS-PAGE και μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης για περαιτέρω μελέτη με ανοσοαποτύπωμα Western με χρήση ειδικού anti-*LdTyrPIP_22* αντισώματος. Παράλληλα έγινε ανάλυση του ενδοκυττάρου κλάσματος πρωτεϊνών της ίδιας καλλιέργειας. Στη μελέτη αυτή έγινε παράλληλα προσδιορισμός της ενδοκυττάριας ή εκκρινόμενης εντόπισης και άλλων πρωτεϊνών του παρασίτου των οποίων ο υποκυτταρικός εντοπισμός είναι γνωστός.

Αρχικά έγινε έλεγχος των βέλτιστων συνθηκών για τη συλλογή του εξωκυττάρου υλικού. Οι συνθήκες ελέγχθηκαν με καλλιέργεια διαγονιδιακού στελέχους παρασίτων *L. donovani* που εκφράζουν τη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP (*L. donovani*-GFP, στέλεχος LG13) σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό για 6 και 9 ώρες. Η επιλογή του συγκεκριμένου στελέχους έγινε ώστε να υπάρχει μια κυτταροπλασματική διαλυτή πρωτεΐνη μάρτυρας, η ανίχνευση της οποίας στο εξωκυττάριο υλικό να δηλώνει τη λύση των κυττάρων κατά την εξέλιξη του πρωτοκόλλου και, συνεπώς, την

ύπαρξη ανιχνεύσιμων με τη συγκεκριμένη μέθοδο ποσών ενδοκυττάρων πρωτεϊνών στο εξωκυττάριο υλικό χωρίς αυτό να οφείλεται σε έκκρισή τους. Η GFP δεν έχει ομόλογα τμήματα με πρωτεΐνες από το παράσιτο *Leishmania* που θα μπορούσαν να αλληλεπιδρούν με το ειδικό έναντι αυτής αντίσωμα κατά την ταυτοποίηση με ανοσοαποτύπωμα Western, γεγονός που της προσφέρει ένα ακόμη πλεονέκτημα ως ενδοκυττάρια πρωτεΐνη μάρτυρα.

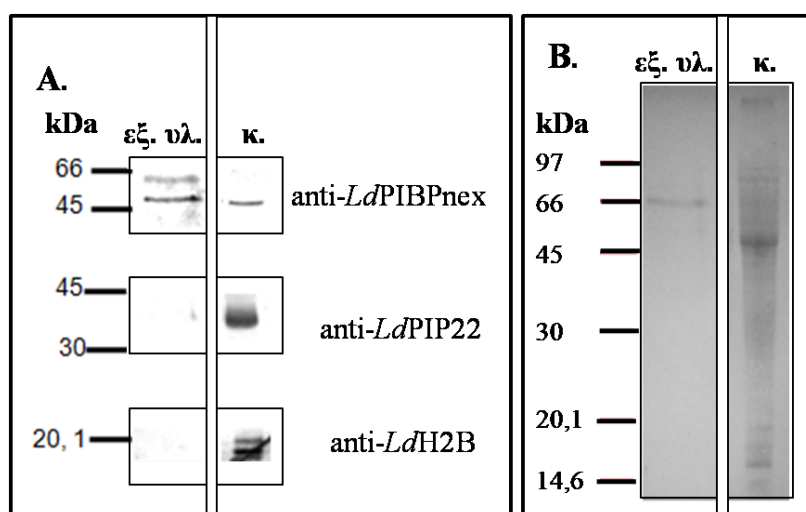


Εικόνα 3.11 : Έλεγχος συνθηκών πρωτοκόλλου έκκρισης με κύτταρα *L. donovani*-GFP. **(A).** Ανοσοαποτύπωση Western ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων (κ.) και εξωκυττάρου υλικού (εξ. υλ.) σε τέσσερις διαφορετικές συνθήκες (επώαση για 6 και 9 ώρες σε θρεπτικό υλικό RPMI, 10 mM Hepes χωρίς ορό σε 25 °C και 37 °C όπως αναγράφονται στο συνοδευτικό πίνακα. Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης κόπηκε σε δύο τμήματα ένα με πρωτεΐνες μικρότερες των 35 kDa και ένα με πρωτεΐνες μεγαλύτερες των 35 kDa. Στη συνέχεια αυτά τα τμήματα των μεμβρανών επώαστηκαν με αντι-GFP (0.4 μg/mL) ή αντι-LdPIBPnex αντίσωμα (0.1 μg/mL) αντίστοιχα, και στη συνέχεια, με δεύτερα αντισώματα έναντι ορού κουνελιού (anti-rabbit) συζευγμένα με HRP. Η εμφάνιση των ζωνών έγινε με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας. **(B).** Ολόκληρη η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης μετά από χρώση Ponceau-S. Σε κάθε περίπτωση το εξωκυττάριο υλικό αντιστοιχεί σε 10πλάσιο αριθμό κυττάρων από το αντίστοιχο ολικό κυτταρικό εκχύλισμα.

Τα αποτελέσματα του συγκεκριμένου πειράματος παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.11 και δείχνουν ότι με τη μέθοδο αυτή τόσο μετά από 6 ώρες όσο και μετά από 9 ώρες επώασης στο

θρεπτικό υλικό χωρίς ορό, δεν ανιχνεύεται η ενδοκυττάρια GFP στο εξωκυττάριο υλικό, ενώ η γνωστή ως εκκρινόμενη από τη βιβλιογραφία (Silverman, Chan et al. 2008) όσο και από πειράματα στο εργαστήριό μας (Kourounis 2017) *LdPIBPnex* ανιχνεύεται με το ειδικό αντι-*LdPIBPnex* αντίσωμα.

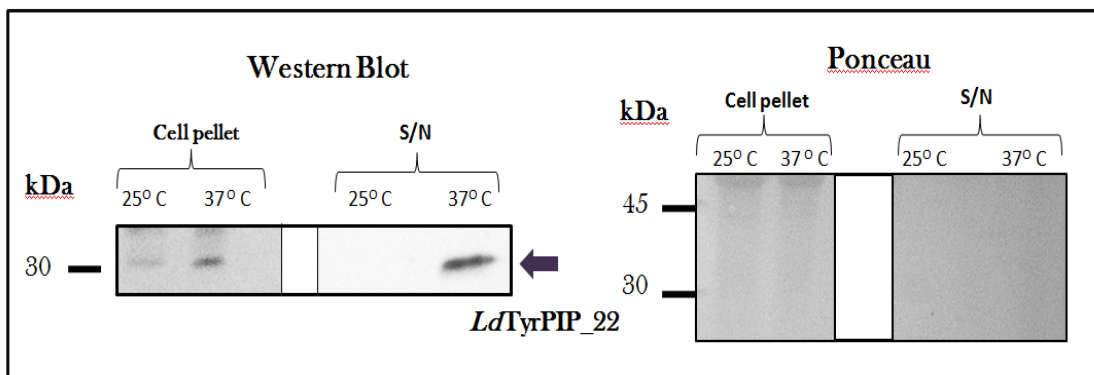
Με βάση τα παραπάνω επιλέχθηκε ως χρόνος επώασης των δειγμάτων οι 6 ώρες και πραγματοποιήθηκε έλεγχος της έκκρισης της *LdTyrPIP_22* σε παράσιτα *L. donovani* αγρίου τύπου στους 25 °C. Στην περίπτωση αυτή η έκκριση της *LdTyrPIP_22* δεν επιβεβαιώθηκε, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.12.



Εικόνα 3.12: **A.** Ανοσοαποτύπωση Western ολικών κυτταρικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων (κ.) και εξωκυττάριου υλικού (εξ. υλ.) από προμαστιγωτά παράσιτα *L. donovani* (στέλεχος LG13) μετά από επώαση στους 25 °C για 6 ώρες σε θρεπτικό υλικό RPMI, 10 mM Hepes χωρίς ορό. Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επώαστηκε με αντι-*LdPIBPnex* αντίσωμα (0.1 µg/mL), αντι-*LdH2B* (ορός κουνελιού, 1:1000) αντι-*LdTyrPIP_22* (ορός ποντικού, 1:2500) και στη συνέχεια, με δεύτερα αντισώματα έναντι ορού κουνελιού (anti-rabbit, 50 µg/ml) και έναντι ορού ποντικού (anti-mouse, 50 µg/ml), αντίστοιχα, συζευγμένα με HRP. Η εμφάνιση των ζωνών έγινε με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας. **B.** η μεμβράνη με χρώση Ponceau-S. Το εξωκυττάριο υλικό αντιστοιχεί σε 10πλάσιο αριθμό κυττάρων από το αντίστοιχο ολικό εκχύλισμα.

Αντίστοιχα πειράματα έγιναν και στους 37°C, χωρίς να εμφανίζουν σαφή αποτελέσματα. Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε η διαγονιδιακή σειρά παρασίτων *L. donovani-LdtyrPIP_22-mrpf1* (χρωμοσωμική έκφραση).

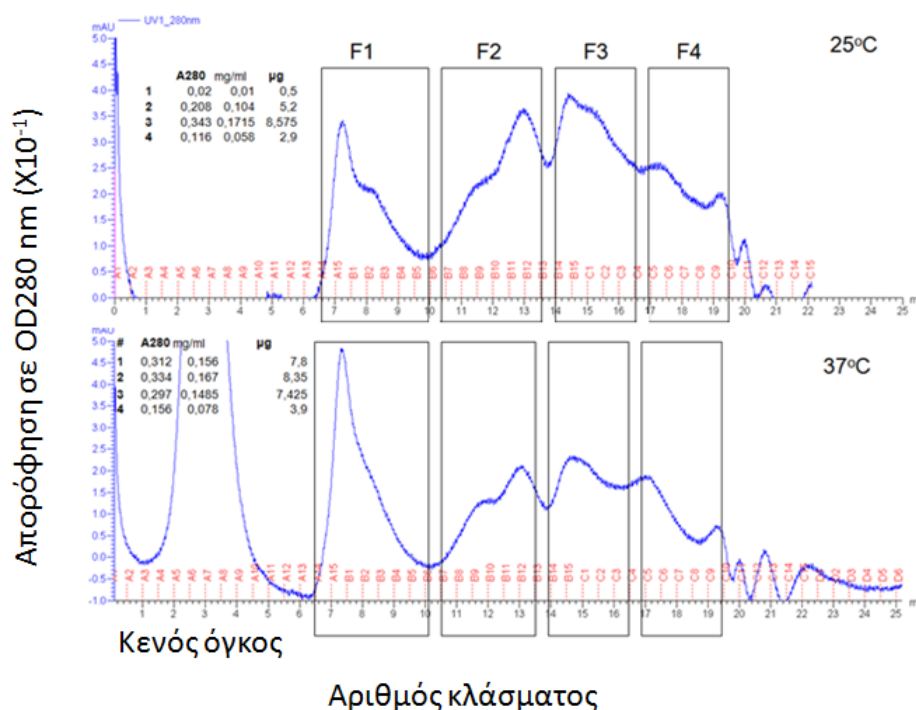
Στη συγκεκριμένη σειρά πειραμάτων υπάρχει ένδειξη για έκκριση της *LdTyrPIP_22* στους 37 °C (Εικόνα 3.13) με εντοπισμό της ζώνης περίπου στα 30kDa. Το αποτέλεσμα αυτό όμως δεν είναι επαναλήψιμο.



Εικόνα 3.13: Α. Ανοσοαποτύπωση Western ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων (cell pellet) και εξωκυττάριου υλικού (S/N) από παράσιτα *L. donovani-LdtyrPIP_22-mrfp1* μετά από επώαση στους 37°C για 6 ώρες σε θρεπτικό υλικό RPMI, 10 mM HEPES χωρίς ορό. Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επωάστηκε με αντι-*LdTyrPIP_22* (ορός ποντικού, 1:2500) και στη συνέχεια, με δεύτερο αντίσωμα έναντι ορού ποντικού (anti-mouse, 50 µg/ml), συζευγμένο με HRP. Η εμφάνιση των ζωνών έγινε με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας Β. η μεμβράνη με χρώση Ponceau-S. Το εξωκυττάριο υλικό αντιστοιχεί σε 10πλάσιο αριθμό κυττάρων από το αντίστοιχο ολικό εκχύλισμα.

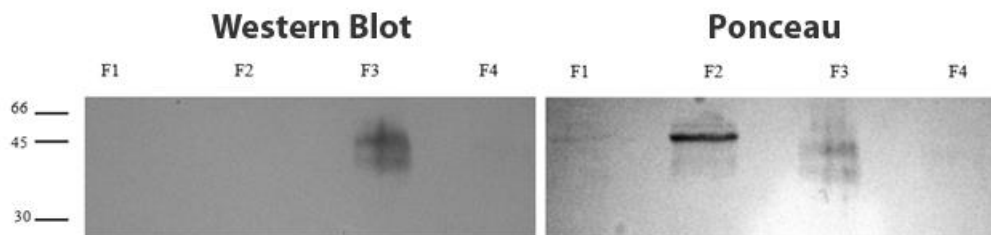
Σε όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, το σύνολο των εκκρινόμενων πρωτεϊνών που ανακτήθηκαν από το θρεπτικό υλικό της κυτταροκαλλιέργειας είναι μικρής ποσότητας με αποτέλεσμα το ποσό της πρωτεΐνης που φορτώθηκε στην πηκτή πολυακρυλαμίδιου συχνά να μην ανιχνεύεται με χρώση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με τη χρωστική Ponceau-S. Προφανώς, η ποσότητα πρωτεΐνης στις αναλυθείσες πρωτεϊνικές ζώνες είναι χαμηλότερη της διακριτικής ικανότητας της μεθόδου χρώσης με Ponceau-S. Με την ευαισθησία της ανίχνευσης της χημειοφωταύγειας μετά από εμφάνιση σε φιλμ X-ray, (βλ. παράγραφο 2.2.8) στην ανοσοαποτύπωση κατά Western μπορέσαμε να διακρίνουμε τις ζώνες που αναφέρονται παραπάνω, δηλαδή των *LdPIBPnex* και *LdTyrPIP_22*. Επιπρόσθετα, σε όλα τα πειράματα υπήρξε δυσκολία διαλυτοποίησης του συνόλου του ιζήματος που προέκυπτε μετά την καθίζηση με ακετόνη όπου ενδεχομένως υπήρχε απώλεια ποσοστού της ολικής πρωτεΐνης.

Παρά τις αρκετές τροποποιήσεις που έγιναν σύμφωνα και με τη βιβλιογραφία, για την καλύτερη ανάκτηση του συνόλου του ιζήματος, αυτό δεν κατέστη δυνατό. Για το λόγο αυτό αλλάξαμε το πρωτόκολλο χειρισμού του υλικού της κυτταροκαλλιέργειας, με την συγκέντρωσή του σε μικρότερο όγκο και κλασμάτωση με FPLC στήλη SUPERDEX 200 και συγκέντρωση των κλασμάτων με φίλτρα (2.2.10). Με τη συγκεκριμένη μέθοδο αναλύθηκε υλικό από ένα πείραμα στους 25°C και 37°C, σε δύο κλασματώσεις. Για την ανάλυση ενώθηκε το υλικό των κλασμάτων όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.14 και στη συνέχεια προχωρήσαμε σε ανάλυση με ανοσοαποτύπωμα Western.



Εικόνα 3.14 Απεικόνιση της απορρόφησης στα 280nm των πρωτεϊνικών κλασμάτων που προέκυψαν από τον διαχωρισμό με χρωματογραφία Μοριακής Διήθησης FPLC με στήλη Superdex 200. Εντός των πλαισίων, τα κλάσματα που ενώθηκαν για περαιτέρω ανάλυση με ανοσοαποτύπωμα Western.

Τα αποτελέσματα από το πείραμα αυτό πάλι δεν επιβεβαιώνουν έκκριση στους 25°C, αλλά στο ένα πείραμα έκκρισης στους 37°C ανιχνεύουμε στο κλάσμα με τις πρωτεΐνες όπου αναμένουμε την έκλυση της *LdTygPIP*_22 μια πρωτεϊνική ζώνη με μεγαλύτερο όμως φαινόμενο MW από αυτό της *LdTygPIP*_22 (Εικόνα 3.15).



Εικόνα 3.15: Ανοσοαποτύπωση Western εξωκυττάριου υλικού καλλιέργειας παρασίτων *L. donovani* μετά από επώαση στους 37°C για 6 ώρες σε θρεπτικό υλικό RPMI, 10mM Hepes χωρίς ορό. Το υλικό υπέστη κλασμάτωση με πέρασμα από στήλη Superdex 200 και 4 κλάσματα που προέκυψαν από συνένωση ομάδων 4 διαφορετικών κλασμάτων αναλύθηκαν με SDS PAGE (10%) και Ανοσοαποτύπωση Western. Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επώαστηκε με αντι-*LdTyrPIP*_22 (ορός ποντικού, 1:2500) και στη συνέχεια, με δεύτερο αντίσωμα έναντι ορού ποντικού (anti-mouse, 50 µg/ml), συζευγμένο με HRP. Η εμφάνιση των ζωνών έγινε με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας. Δεξιά η μεμβράνη με χρώση Ponceau-S. Συμπερασματικά, δοκιμάσαμε δύο διαφορετικές μεθόδους επεξεργασίας του υλικού της κυτταροκαλλιέργειας και έχουμε ενδείξεις για την έκκριση της *LdTyrPIP*_22 σε αξενικά προμαστιγωτά παράσιτα στους 37°C. Παρ' όλ' αυτά, λόγω απουσίας επαναληψιμότητας και ενδεχομένως λόγω των τεχνικών δυσκολιών που αντιμετωπίσαμε δεν μπορούμε να ισχυριστούμε ότι η *LdTyrPIP*_22 εκκρίνεται. Τα πειράματα θα πρέπει να συνεχιστούν με βελτίωση του πρωτοκόλλου και πιθανόν με ανάλυση εξωκυττάριου υλικού από μεγαλύτερο όγκο καλλιέργεια προμαστιγωτών αλλά και αμαστιγωτών παρασίτων.

3.5. Δημιουργία αξενικών αμαστιγωτών μορφών *L. donovani* σε κυτταροκαλλιέργεια και χαρακτηρισμός τους με FACS

Τα παράσιτα του είδους *Leishmania donovani* κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής τους περνούν από δύο διακριτά στάδια, την εξωκυττάρια προμαστιγωτή μορφή στο μεσέντερο του ασπόνδυλου ξενιστή και την ενδοκυττάρια αμαστιγωτή μορφή στο φαγολυσόσωμα των μακροφάγων κυττάρων του θηλαστικού ξενιστή (Εισαγωγή 1.2.2).

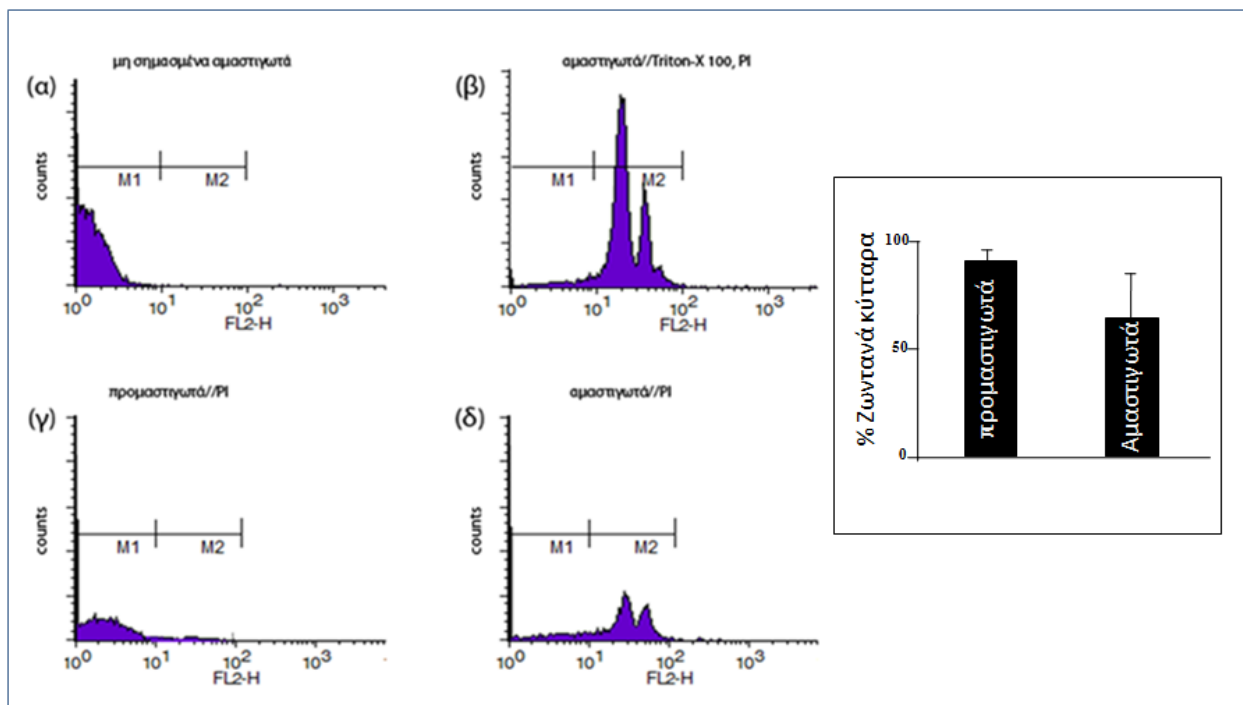
Για να μελετήσουμε τον εντοπισμό της *LdTyrPIP*_22 σε αμαστιγωτά παράσιτα αλλά και το ερώτημα σχετικά με την έκκριση αυτής της πρωτεΐνης από αυτή την αναπτυξιακή μορφή, χρησιμοποιήσαμε το πρωτόκολλο που περιγράφηκε στην παράγραφο (2.2.2) για να

κατασκευάσουμε αξενικές *L. donovani* αμαστιγωτές μορφές. Τα αξενικά αμαστιγωτά παράσιτα έχειδειχθεί (Li, Zhao et al. 2008) πως έχουν ορισμένες διαφορές σε σχέση με αυτά που απομονώνονται από μακροφάγα. Παρ' όλ' αυτά είναι πιο εύκολος ο χειρισμός της καλλιέργειας των αξενικών αμαστιγωτών και επιλέξαμε αυτά για τα αρχικά πειράματα της παρούσας εργασίας.

Τα προμαστιγωτά παράσιτα κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησής τους σε αμαστιγωτά υπόκεινται στο στρες τόσο της αλλαγής της θερμοκρασίας (από 25°C σε 37°C) όσο και του χαμηλού pH (5,5). Για να ελέγξουμε το ποσοστό των παρασίτων που παραμένει ζωντανό και συνεπώς μπορεί να δώσει αξιόπιστα αποτελέσματα στη μελέτη έκκρισης της *LdTygPIP_22* προχωρήσαμε σε χρώση των ζωντανών παρασίτων με ιωδιούχο προπίδιο και μελέτη με κυτταρομετρία ροής (Μέθοδοι, παράγραφος 2.2.6). Η μεμβράνη των ζωντανών κυττάρων δεν διαπερνάται από το Ιωδιούχο προπίδιο και μόνο τα νεκρά κύτταρα θα υποστούν χρώση.

Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που είχαν υποστεί διάτρηση μετά από επώαση για 5 min με το απορρυπαντικό Triton-X 100 (1% v/v). Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα χωρίς χρώση. Επιπλέον, η ίδια κατεργασία εφαρμόστηκε σε προμαστιγωτά παράσιτα ώστε να ελεγχθεί το ίδιο πρωτόκολλο χρώσης και με άλλη κυτταρική ομάδα του παρασίτου. Στην εικόνα 3.16 παρουσιάζονται οι γραφικές παραστάσεις της κατανομής της χρώσης FL2 (PI) του πληθυσμού των παρασίτων που αναλύθηκε με το FACS και διάγραμμα του ποσοστού των ζωντανών κυττάρων προμαστιγωτών και αμαστιγωτών από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι στην καλλιέργεια των αμαστιγωτών έχουμε κατά μέσο όρο 63,1% ζωντανά κύτταρα.

Συμπερασματικά, με το πρωτόκολλο δημιουργίας αμαστιγωτών στην καλλιέργεια, τα δύο τρίτα του πληθυσμού των κυττάρων μας είναι ζωντανά μετά από 3 ημέρες από την εφαρμογή των συνθηκών στρες (37°C και pH 5.5).



Εικόνα 3.16: (α-δ) Προσδιορισμός με κυτταρομετρία ροής (FACS) των ζωντανών και νεκρών παρασίτων *L. donovani* (στέλεχος LG13). Αντιπροσωπευτικές γραφικές παραστάσεις της έντασης φθορισμού με χρώση PI (FL2) σε σχέση με τον πληθυσμό των παρασίτων (α) μη σημειωμένα με PI αξενικά αμαστιγωτά, (β) αξενικά αμαστιγωτά σημειωμένα με PI μετά από κατεργασία με Triton-X 100, (γ) σημειωμένα με PI αξενικά ζωντανά προμαστιγωτά χωρίς κατεργασία με TritonX-100, (δ) σημειωμένα με PI αξενικά αμαστιγωτά χωρίς κατεργασία με TritonX-100. M1: ζωντανά παράσιτα, M2: παράσιτα. **Ένθετο:** Διάγραμμα απεικόνισης του ποσοστού ζωντανών κυττάρων σε αξενικές καλλιέργειες προμαστιγωτών και αμαστιγωτών κυττάρων *L. donovani* μετά από χρώση με ιωδιούχο προπίδιο και ανάλυση με κυτταρομετρία ροής (Figure 3.16). Το ποσοστό ζωντανών προμαστιγωτών είναι 89.5% (τυπική απόκλιση 3,2) και των αμαστιγωτών 63,1% (τυπική απόκλιση 15,2) από 3 ανεξάρτητα πειράματα.

3.6. Εντοπισμός της *LdTyrPIP_22* σε αξενικά αμαστιγωτά παράσιτα

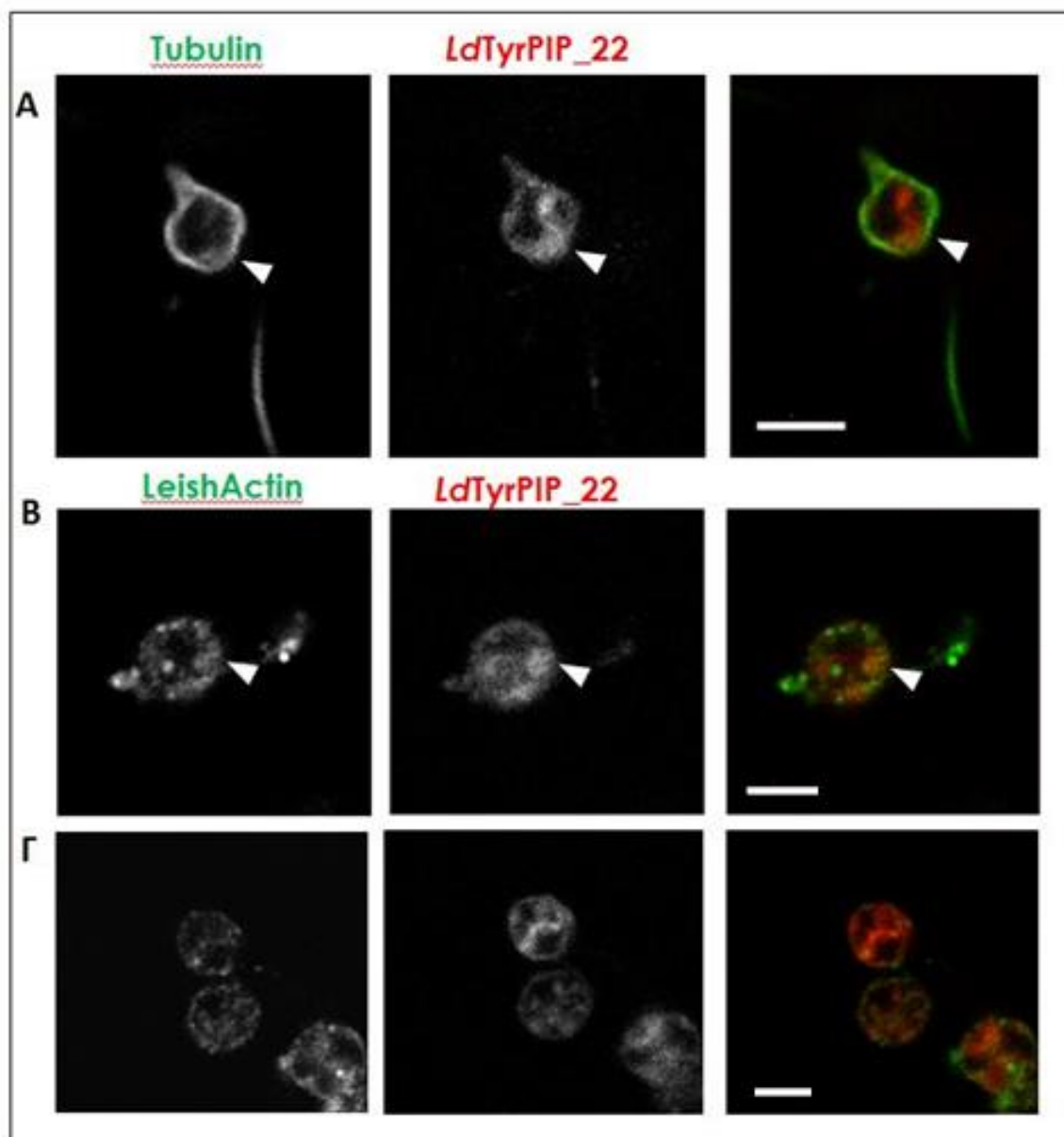
L. donovani με έμμεσο ανοσοφθορισμό και μικροσκοπία φθορισμού

Στο πλαίσιο της διερεύνησης του λειτουργικού ρόλου της *LdTyrPIP_22* στην εγκαθιδρυμένη μόλυνση μελέτησαμε αρχικά τον εντοπισμό της με ανοσοφθορισμό και μικροσκοπία φθορισμού στην αμαστιγωτή μορφή του παρασίτου.

Καλλιέργεια προμαστιγωτών παρασίτων *L. donovani* στη στατική φάση ανάπτυξης μεταφέρθηκε σε συνθήκες παρόμοιες με αυτές που συναντούν τα παράσιτα στο φαγολυσόσωμα των μακροφάγων (37 °C, pH 5,5) (αξενικά αμαστιγωτά, Μέθοδοι, παράγραφος 2.2.2 και 3.5) και επώαστηκε για 96 ώρες μέχρις ότου τα κύτταρα διαφοροποιηθούν στην οωειδή αμαστιγωτή (amastigote-like) μορφή. Τα παράσιτα στη συνέχεια μονιμοποιήθηκαν με παραφορμαλδεύδη και έγινε χρώση με αντισώματα ειδικά για την *LdTyrPIP_22*, την τουμπουλίνη και τη λεισμανιακή ακτίνη, ανά ζεύγη, όπως περιγράφεται στην Εικόνα 3.17. Τα παράσιτα στη συνέχεια, μετά από κατάλληλη κατεργασία (Μέθοδοι παράγραφος) απεικονίστηκαν με συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού.

Όπως αναφέρεται και στο κεφάλαιο της Εισαγωγής 1.3.5, στα προμαστιγωτά παράσιτα, επίτοποι της *LdTyrPIP_22* εντοπίζονται τόσο στο σώμα του προμαστιγωτού κυττάρου, όσο και στο μαστίγιο, ενώ με μικροσκοπία υψηλής ανάλυσης STED ανιχνεύτηκε μερικός συνεντοπισμός της *LdTyrPIP_22* με τη λεισμανιακή ακτίνη.

Στα αξενικά αμαστιγωτά η *LdTyrPIP_22* εντοπίζεται στην επιφανειακή μεμβράνη των παρασίτων, σε σημεία όπου εντοπίζονται τόσο η ακτίνη όσο και η τουμπουλίνη. Ο συνεντοπισμός της *LdTyrPIP_22* με τη λεισμανιακή ακτίνη είναι ακόμη πιο εμφανής στην περιφέρεια του κυττάρου όσο και σε υποκυττάρια δομές. Σε παράσιτα της ίδιας καλλιέργειας που ακόμη δεν έχουν χάσει εντελώς τη δομή του μαστιγίου, ανιχνεύθηκε μια συγκέντρωση επιτόπων της *LdTyrPIP_22* στην περιοχή έκφυσης του μαστιγίου, που είναι η κύρια εκκριτική οδός στα παράσιτα *Leishmania*.



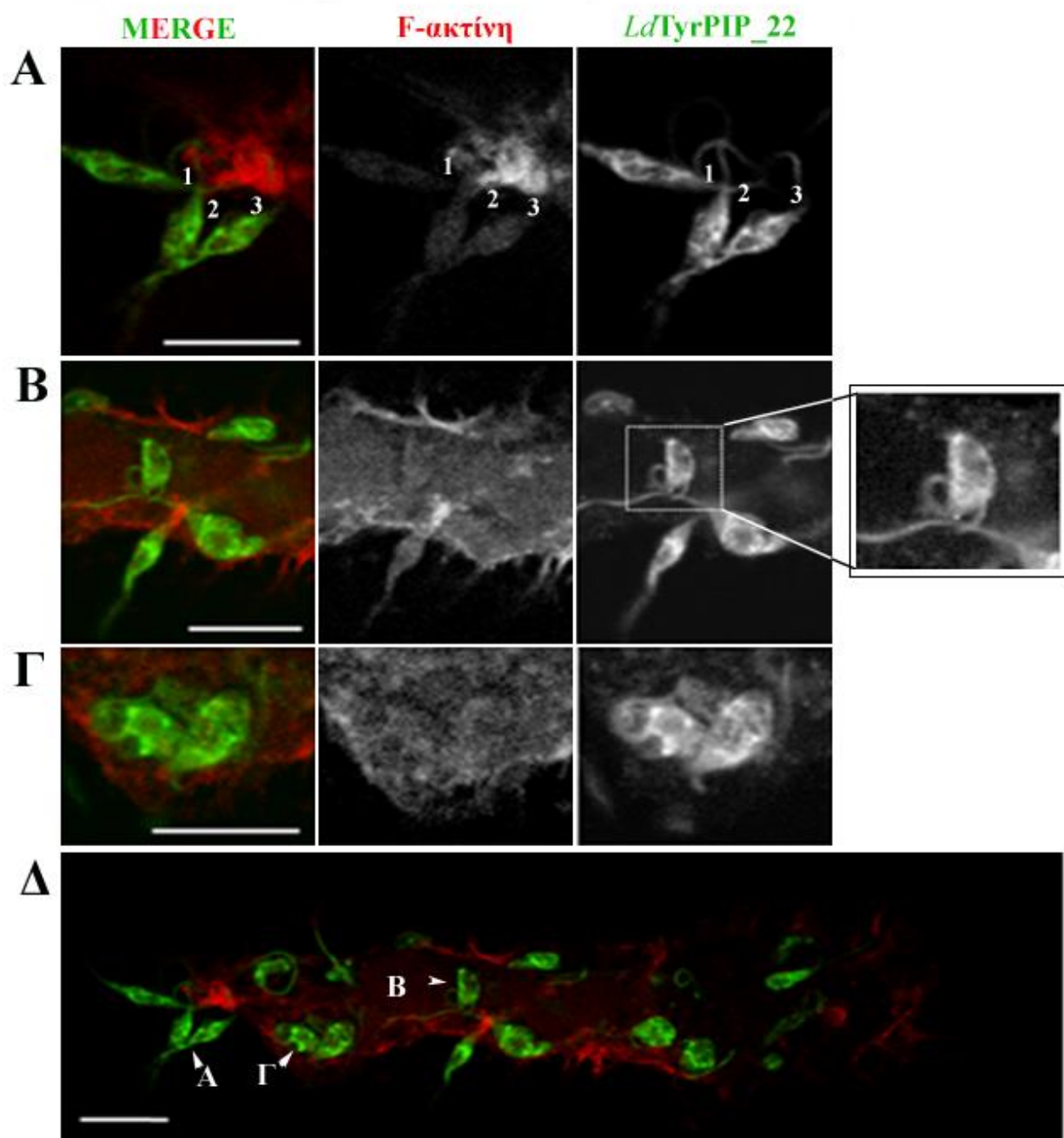
Εικόνα 3.17: Εντοπισμός της *LdTyrPIP_22* με ανοσοφθορισμό και συνεστιακή μικροσκοπία σε αζενικά παράσιτα *L. donovani* αγρίου τύπου σε συνθήκες 37 °C, pH 5,5. Η χρώση των παρασίτων έγινε με ειδικό μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι της τουμπουλίνης (1:2000), ειδικό πολυκλωνικό αντίσωμα από ορό κουνελιού έναντι της λεισμανιακής ακτίνης (1:1000) και ειδικά πολυκλωνικά αντισώματα έναντι της *LdTyrPIP_22* από ορό κουνελιού (1:?) και ποντικού (1:250) αντίστοιχα. **A, B** : Παράσιτα σε μέγεθος αμαστιγωτού με ορατό μαστίγιο. **Γ**: αμαστιγωτά παράσιτα χωρίς μαστίγιο. Το βέλος υποδεικνύει το σημείο έκφυσης του μαστιγίου. Ο κόκκινος και πράσινος φθορισμός απεικονίζονται σε ασπρόμαυρες φωτογραφίες και ο συνεντοπισμός τους σε έγχρωμες εικόνες δεξιά. Η μπάρα μεγέθους είναι 2 μm.

3.7. Εντοπισμός της *LdTyrPIP_22* σε παράσιτα *L. donovani* μέσα σε μακροφάγα μετά από 3 ώρες μόλυνσης

Σε μια προσπάθεια να δούμε τον εντοπισμό της *LdTyrPIP_22* σε συνθήκες που να ομοιάζουν περισσότερο με αυτές των παρασίτων στο εσωτερικό του ξενιστή, μολύναμε μακροφάγα της κυτταρικής σειράς J774 με παράσιτα και μονιμοποιήσαμε τα κύτταρα μετά από 3 ώρες επώασης στους 37°C 5% CO₂, 95% υγρασία (Μέθοδοι, Παράγραφος 2.2.4-2.2.5). Μετά από χρώση με το ειδικό αντίσωμα για την *LdTyrPIP_22*, καθώς και με φαλλοϊδίνη (ουσία που προσδένεται στην πολυμερισμένη ακτίνη των μακροφάγων) συζευγμένη με το φθοριόχρωμα Alexa-546, προκύπτει ο εντοπισμός όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.19.

Διαπιστώσαμε ότι η κατανομή της *LdTyrPIP_22* ακολουθεί το ίδιο πρότυπο που έχουμε παρατηρήσει στα αζενικά παράσιτα, τόσο στο σώμα των προμαστιγωτών κυττάρων όσο και στο μαστίγιο. Ακόμη, στα μολυσμένα μακροφάγα εντοπίσαμε επίτοπους της *LdTyrPIP_22* σε σημεία του μακροφάγου γύρω από παράσιτα (Εικόνα 3.18, Γ ενθετο και Δ). Σε μη μολυσμένα μακροφάγα δεν παρατηρήσαμε αντίστοιχη χρώση με το αντίσωμα έναντι της *LdTyrPIP_22*. Ενδεχομένως ο φθορισμός που ανιχνεύουμε να οφείλεται σε έκκριση της *LdTyrPIP_22*.

Τα δεδομένα από τη μικροσκοπία φθορισμού στα αζενικά παράσιτα όσο και σε αυτά στο εσωτερικό των μακροφάγων συμφωνούν σχετικά με τον εντοπισμό της *LdTyrPIP_22* στο σώμα και στο μαστίγιο των προμαστιγωτών όσο και στην θέση έκφυσης του μαστιγίου. Επίσης διακρίνουμε ενδοκυττάρειες δομές (Εικόνα 3.18 Β, Γ) που προσομοιάζουν με τις δομές που παρατηρήσαμε να έχουν σημανθεί με το ειδικό αντίσωμα έναντι της Λεϊσμανιακής ακτίνης στα αζενικά αμαστιγωτά παράσιτα (Εικόνα 3.17 Γ). Στην εικόνα 3.19 παρουσιάζεται ένα μακροφάγο κύτταρο (Εικόνα 3.18 Δ) το οποίο έχει φαγοκυτταρώσει αρκετά παράσιτα και σε διαφορετικές χρονικές στιγμές. Έτσι μπορούμε στον ίδιο κύτταρο να απεικονήσουμε παράσιτα σε διαφορετικά στάδια ζωής τους μετά την είσοδό τους στο μακροφάγο (Εικόνα 3.18 Β, Γ) ή και κατά τη διάρκεια εισόδου τους (Εικόνα 3.18 Α)



Εικόνα 3.18: Εντοπισμός επιτόπων της *LdTyrPIP_22* σε J774 μακροφάγα κύτταρα μολυσμένα με παράσιτα *L. donovani* αγρίου τύπου για 3 ώρες. Μετά τη μονιμοποίηση των κυττάρων ακολούθησε χρώση με το αντι- *LdTyrPIP_22* αντίσωμα από ορό ποντικού 1:250, δεύτερο αντίσωμα συζευγμένο με Alexa488 (Πράσινος φθορισμός) και φαλλοϊδίνη συζευγμένη με Alexa 546 (κόκκινος φθορισμός, F-ακτίνη). Δ. Απεικονιση του μολυσμένου μακροφάγου από το οποίο προέρχονται οι εικόνες Α-Γ. Α.

Αρχικά στάδια εισόδου των παρασίτων. Έναρξη φαγοκυτταρικού φαινομένου. Διακρίνουμε την πολυμερισμένη ακτίνη (έντονος φθορισμός) γύρω από το μαστίγιο στο σημείο εισόδου του κάθε μακροφάγου (1, 2, 3). **B, Γ.** Παράσιτα που έχουν ήδη υποστεί φαγοκυττάρωση (όψιμα γεγονότα). Ο πράσινος και κόκκινος φθορισμός παρουσιάζεται σε ασπρόμαυρες φωτογραφίες ενώ αριστερά και κάτω (**Δ**) απεικονίζεται ο συνεντοπισμός τους. Μέγεθος μπάρας 10 μm . Τα βέλη στο **Δ** δείχνουν τα κύτταρα που έχουν απεικονισθεί σε μεγέθυνση στα **A, B, Γ**.

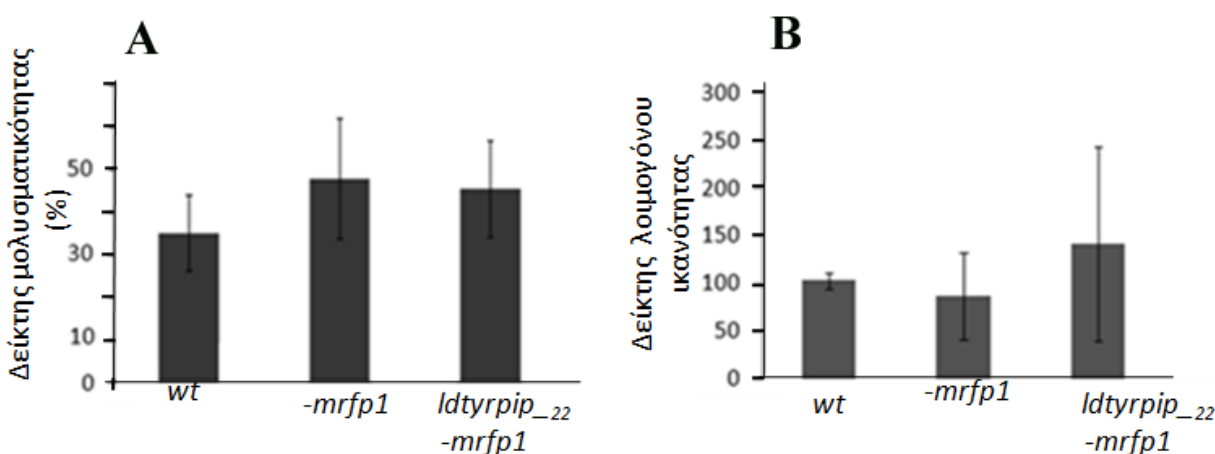
3.8. *In vitro* έλεγχος της μολυσματικότητας διαγονιδιακών παρασίτων *L. donovani-Ldtyrpi₂₂-mrfp1* σε μακροφάγα της κυτταρικής σειράς J774 κατά τις πρώτες ώρες της μόλυνσης

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η *LdTyRPIP₂₂* είναι ομόλογη με τις φωσφατάσες *MptpB* και *LiPA* από τα παθογόνα βακτήρια *Mycobacterium tuberculosis* και *Listeria monocytogenes* αντίστοιχα, οι οποίες έχουν επιβεβαιωθεί ως μολυσματικοί παράγοντες. Ο εντοπισμός της *LdTyRPIP₂₂* στο μαστίγιο του παρασίτου, που είναι και το πρώτο σημείο επαφής με το μακροφάγο για την είσοδο του παρασίτου, θα μπορούσε να υποδεικνύει κάποιο ρόλο στην είσοδο/φαγοκυττάρωση των παρασίτων, όπως και τα δεδομένα από τον συνεντοπισμό με την ακτίνη σε κύτταρα θηλαστικών, αλλά και *in vitro* ασθενή σύνδεση με την F-ακτίνη από θηλαστικά.

Θελήσαμε να μελετήσουμε αν η υπερέκφραση της *LdTyRPIP₂₂-mRFP1* επηρεάζει τη μολυσματικότητα των διαγονιδιακών παρασίτων σε πρώτη φάση κατά τις 4 πρώτες ώρες της μόλυνσης. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το σύστημα *in vitro* μελέτης της μολυσματικότητας των διαγονιδιακών παρασίτων *L. donovani-Ldtyrpi₂₂-mrfp1* (χρωμοσωμική έκφραση) όπως περιγράφηκε στις Μεθόδους (παράγραφος 2.2.5). Η μολυσματικότητα ελέγχθηκε σε σύγκριση με την αντίστοιχη παρασίτων *L. donovani* αγρίου τύπου και *L. donovani-mrfp1*. Τα προμαστιγωτά παράσιτα που χρησιμοποιήθηκαν βρίσκονταν στη στατική φάση της ανάπτυξης, δηλαδή ο πληθυσμός ήταν εμπλουτισμένος στις μετακυκλικές-μολύνουσες μορφές του παρασίτου.

Τα διαγονιδιακά παράσιτα και των 3 πληθυσμών κατά τις 4 πρώτες ώρες της επώασης με τα μακροφάγα παρουσίασαν τις τιμές των δεικτών μολυσματικότητας και λοιμογόνου ικανότητας όπως φαίνονται στον Πίνακα 3.1. Είναι ενδιαφέρον ότι ο δείκτης λοιμογόνου ικανότητας των διαγονιδιακών παρασίτων που υπερεκφράζουν την *rLdTyRPIP₂₂-mRFP1* είναι κατά 1,5 φορά μεγαλύτερος από αυτούς των παρασίτων *L. donovani* αγρίου τύπου και *L.*

donovani-mrfp1. Αυτό σημαίνει ότι η έκφραση της *Ld*TyrPIP₂₂-mRFP1 με μηχανισμό που θα ήταν ενδιαφέρον να διερευνηθεί ευνοούν τη φαγοκυττάρωση περισσότερων παρασίτων/μακροφάγο. Πιθανή έκκριση της *Ld*TyrPIP₂₂ στο ήδη μολυσμένο μακροφάγο μπορεί να ευνοεί την φαγοκυττάρωση περισσότερων παρασίτων στη συνέχεια. Μελέτες σε πιο προχωρημένα στάδια της μόλυνσης (24-96 ώρες) όταν το παράσιτο θα έχει μετατραπεί στην αμαστιγωτή μορφή του, θα επιτρέψουν την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με το ρόλο της *Ld*TyrPIP₂₂ ως μολυσματικού παράγοντα.



Εικόνα 3.19 Γραφική απεικόνιση των δεικτών μολυσματικότητας (infectivity) (A) και λοιμογόνου ικανότητας (virulence) διαγονιδιακών προμαστιγωτών *L. donovani*-ldtyrpip₂₂-mrfp1 σε σχέση με τα *L. donovani* αγρίου τύπου (wt) και το διαγονιδιακό στέλεχος *L. donovani*-mrfp1 στατικής φάσης που μόλυναν μακροφάγα κύτταρα J774 για 4 ώρες όπως υπολογίστηκαν με βάση το πρωτόκολλο που περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.5 των Μεθόδων. Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος από 3 ανεξάρτητα πειράματα, ενώ απεικονίζεται και η τυπική απόκλιση. Ελέγχθηκαν πάνω από 300 μακροφάγα ανά περίπτωση.

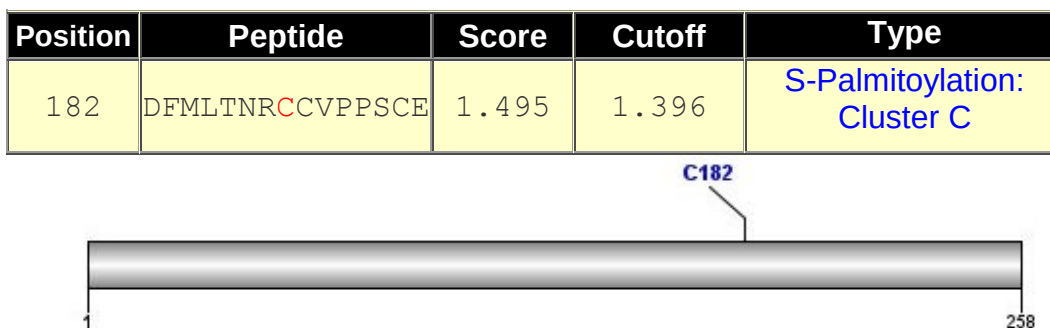
	<i>L. donovani</i> wt	<i>L. donovani</i> -mrfp1	<i>L. donovani</i> -ldtyrpip ₂₂ -mrfp1
% Δείκτης Μολυσματικότητας	35,15 ± 7,29	47,91 ± 16,63	45,54 ± 6,14
Δείκτης Λοιμογόνου ικανότητας	76,31 ± 8,13	71,53 ± 45,50	121,50 ± 102,08

Πίνακας 3.1 Ο μέσος όρος του δείκτη μολυσματικότητας και του δείκτη λοιμογόνου ικανότητας διαγονιδιακών προμαστιγωτών *L. donovani*-ldtyrrip₂₂-mrfrp1 σε σχέση με τα *L. donovani* αγρίου τύπου και *L. donovani*-mrfrp1 στατικής φάσης που μόλυναν μακροφάγα J774 για 4 ώρες. Τα αποτελέσματα είναι μέσος όρος από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Ελέγχθηκαν πάνω από 300 μακροφάγα ανά περίπτωση.

3.9. Βιοπληροφορική ανάλυση για μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις

Οι μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις είναι ένας από τους τρόπους του κυττάρου να ρυθμίσει τη λειτουργικότητα ή/και το σημείο όπου δρα ένα ένζυμο. Μιας και οι διαφορετικές μορφές της *LdTyrPIP₂₂* που ανιχνεύουμε θα μπορούσαν να υποδεικνύουν ότι και η φωσφατάση αυτή υπόκειται σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, και σε συνέχεια της εύρεσης 6 πιθανών θέσεων φωσφορυλίωσης, διερευνήσαμε το ενδεχόμενο αυτό για τροποποιήσεις προσθήκης λιπιδικών ομάδων.

Η αλληλουχία της *LdTyrPIP₂₂* (GenBank accession no MF461274) ελέγχθηκε για μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις με τον αλγόριθμο GPS-Lipid (<http://lipid.biocuckoo.org/>). Ο αλγόριθμος υποδεικνύει υψηλή πιθανότητα παλμιτοϋλίωσης σε κατάλοιπο κυστεΐνης, γεγονός που, αν συμβαίνει, αλλάζει τη στερεοδιαμόρφωση της πρωτεΐνης αλλά και τη συγγενεία της με τις μεμβράνες του κυττάρου.



Εικόνα 3.20 Αποτέλεσμα του αλγόριθμου GPS-Lipid για την αλληλουχία της *LdTyrPIP₂₂*. Η μόνη τροποποίηση που ανιχνεύει ο αλγόριθμος είναι παλμιτοϋλίωση στο 182^ο αμινοξύ με πολύ υψηλή πιθανότητα. Η προσθήκη του μορίου παλμιτικού οξέος γίνεται υποθετικά όπως φαίνεται στο σχήμα.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η Λεϊσμανίαση 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 η χορήγηση της οποίας καθίσταται αναγκαίο να γίνεται σε νοσοκομείο λόγω των παρενεργειών της που περιλαμβάνουν πυρετό, νεφρική ανεπάρκεια, εμετούς ή ακόμα και καρδιακή ανακοπή, οξεία ηπατική ανεπάρκεια και σπασμούς.

Τα ένζυμα που εμπλέκονται στις διαδικασίες φωσφορυλίωσης και αποφωσφορυλίωσης πρωτεϊνών (κινάσες και φωσφατάσες αντίστοιχα) αποτελούν ήδη στόχους φαρμάκων στη θεραπεία διαφόρων ασθενειών, και είναι πιθανό να αποτελέσουν στόχους φαρμάκων και σε ασθένειες που προκαλούνται από παθογόνους μικροοργανισμούς, όπως βακτήρια και πρωτόζωα. Είναι γνωστό ότι βακτηριακές φωσφατάσες συμμετέχουν στη μολυσματικότητα παθογόνων μικροοργανισμών και αποτελούν ήδη στόχους φαρμάκων που δρουν ως αναστολείς τους. Ένα πρόσφατο σχετικό παράδειγμα είναι μία φωσφατάση τριπλής εξειδίκευσης (αποφωσφορυλιώνει κατάλοιπα φωσφοτυροσίνης, φωσφοσερίνης / φωσφοθρεονίνης και φωσφοϊνοσιτίδια) του παθογόνου βακτηρίου *Mycobacterium tuberculosis* (Beresford, Patel et al. 2007). Με βάση μία αλληλουχία του καταλυτικού κέντρου του συγκεκριμένου ενζύμου (περιοχή βρόγχου P) έχουν αναγνωριστεί με βιοπληροφορική ανάλυση (Beresford, Saville et al. 2010) αντίστοιχες φωσφατάσες και σε άλλα παθογόνα βακτήρια, όπως τα *Listeria monocytogenes*, *Yersinia pestis* και *Bacillus anthracis*. Στο βακτήριο *Listeria monocytogenes* η φωσφατάση με την ομόλογη αλληλουχία με αυτή του *M. tuberculosis* ονομάζεται LipA, είναι διπλής εξειδίκευσης (αποφωσφορυλιώνει κατάλοιπα φωσφοτυροσίνης και φωσφοϊνοσιτίδια) και συμμετέχει στην παθογένεια του βακτηρίου (Kastner, Dussurget et al. 2011).

Αυτή η οικογένεια φωσφατασών με τη χαρακτηριστική αλληλουχία της περιοχής του βρόγχου P στο καταλυτικό τους κέντρο ταυτοποιήθηκε σε βακτήρια και κατώτερα ευκαρυωτικά κύτταρα με μία *in silico* μελέτη από τους (Beresford, Saville et al. 2010) . Οι φωσφατάσες αυτές, που ονομάστηκαν άτυπες φωσφατάσες λιπιδίων (ALP), απαντώνται και στο είδος των παρασιτικών πρωτοζώων *Leishmania major* του γένους *Leishmania*. Σημαντικό χαρακτηριστικό αυτών των ενζύμων είναι ότι δεν υπάρχουν ανθρώπινες ομόλογες πρωτεΐνες, γεγονός που τις

καθιστά πιθανούς μοριακούς στόχους φαρμάκων. Σκοπός της εργασίας αυτής ήταν να συνεχιστεί η μελέτη της ομόλογης πρωτεΐνης (με τη χαρακτηριστική αλληλουχία βρόγχου P) του παρασίτου *Leishmania donovani*, αιτιολογικού παράγοντα της σπλαχνικής λεισμανιάσης (kala azar).

Μέσω βιοπληροφορικής ανάλυσης δείξαμε (Papadaki Amalia 2017) ότι η πρωτεΐνη αυτή παρουσιάζει πολύ υψηλή ομοιότητα στην αμινοξική της αλληλουχία, 85-99%, με τις ορθόλογες πρωτεΐνες από αρκετά είδη του παρασίτου (*L. infantum*, *L. major*, *L. mexicana*, *L. tarentolae*), ενώ η ετερόλογα εκφρασμένη σε βακτήρια πρωτεΐνη εμφανίζει δραστικότητα φωσφατάσης με εξειδίκευση σε κατάλοιπα φωσφο-τυροσίνης και τα φωσφοϊνοσιτιδία PtdIns3P και PtdIns4P. Το γεγονός πως η συγκεκριμένη φωσφατάση είναι συντηρημένη στα διάφορα είδη του παρασίτου επιτρέπει την υπόθεση ότι αποτελεί μόριο απαραίτητο για τη ζωή ή/και τη μολυσματικότητά του. Ακόμη, η ομοιότητά της με τις φωσφατάσες LipA και MrtpB από τα παθογόνα βακτήρια *L. monocytogenes* και *M. tuberculosis* αντίστοιχα που συντελούν στην παθογένεια των συγκεκριμένων βακτηρίων μέσω έκκρισης στο κύτταρο ξενιστή και εμπλοκής τους στον μεταβολισμό συγκεκριμένων φωσφοϊνοσιτιδίων ή στην φωσφορυλίωση πρωτεϊνικών υποστρωμάτων του μολυσμένου κυττάρου, υποδεικνύει πιθανές δράσεις και για την Λεισμανιακή ομόλογη φωσφατάση *LdTyrPIP_22*.

Σαν συνέχεια της ερευνητικής δουλειάς που είχε ήδη πραγματοποιηθεί από την ομάδα Ενδοκυττάριου Παρασιτισμού, θελήσαμε να ελέγξουμε αν η *LdTyrPIP_22* εκκρίνεται, όπως και οι μολυσματικοί παράγοντες MrtpB και LipA. Η έκκριση της *LdTyrPIP_22* σε παράσιτα *L. donovani* αγρίου τύπου στους 25 °C δεν επιβεβαιώθηκε, ενώ στα πειράματα που έγιναν μετά από παραμονή προμαστιγωτών παρασίτων για 6 ώρες στους 37 °C, τα αποτελέσματα δεν ήταν σαφή. Με χρήση της διαγονιδιακής σειράς παρασίτων *L. donovani*-*LdTyrPIP_22*-mRFP1 (χρωμοσωμική έκφραση) υπήρξε ένδειξη για έκκριση της *LdTyrPIP_22* στους 37°C, το αποτέλεσμα όμως αυτό δεν είχε συνεπή επαναληψιμότητα. Οι τεχνικές δυσκολίες που αντιμετωπίσαμε κατά τη διεξαγωγή αυτών των πειραμάτων επέβαλλαν την τροποποίηση του πρωτοκόλλου, όπου τα αποτελέσματα από το πείραμα αυτό πάλι δεν επιβεβαίωσαν έκκριση στους 25°C. Στο ένα πείραμα για έλεγχο έκκρισης στους 37°C ανιχνεύσαμε μια πρωτεϊνική ζώνη με μεγαλύτερο όμως φαινόμενο MW από αυτό της *LdTyrPIP_22*.

Στο πλαίσιο της διερεύνησης του λειτουργικού ρόλου της *LdTyrPIP_22* πραγματοποιήσαμε πειράματα εντοπισμού της *LdTyrPIP_22* με έμμεσο ανοσοφθορισμό και μικροσκοπία

φθορισμού. Σε παράσιτα αγρίου τύπου που έχουν μολύνει μακροφάγα θηλαστικού, μετά από χρώση με ειδικό αντίσωμα έναντι της *LdTyrPIP_22* εμφανίζεται στικτός φθορισμός στα μολυσμένα μακροφάγα σε σημεία όπου δεν υπάρχουν παράσιτα, αλλά κοντά στο παρασιτοφόρο κυστίδιο. Το σήμα αυτό δεν εντοπίστηκε σε μη μολυσμένα μακροφάγα, γεγονός που συνηγορεί στην ειδικότητα του σήματος.

Τα πειράματα για περαιτέρω διερεύνηση της πιθανότητας έκκρισης της πρωτεΐνης *LdTyrPIP_22* συνεχίζονται. Αν αυτό ισχύει, ο εντοπισμός σημαντικού μέρους της ολικής *LdTyrPIP_22* σε μεμβρανικά κλάσματα (Papadaki Amalia 2017) του παρασίτου θα μπορούσε να ερμηνεύεται ως πακετάρισμα της σε εξωσώματα προς έκκριση (Torrecilhas, Schumacher et al. 2012).

Όπως αναφέρεται και στην παράγραφο 1.3.5, στα προμαστιγωτά παράσιτα, επίτοποι της *LdTyrPIP_22* εντοπίζονται τόσο στο σώμα του προμαστιγωτού κυττάρου, όσο και στο μαστίγιο, ενώ ανιχνεύτηκε μερικός συνεντοπισμός της *LdTyrPIP_22* με τη λεϊσμανιακή ακτίνη. Για την περαιτέρω διερεύνηση του λειτουργικού της ρολου, εκθέσαμε αξενικά προμαστιγωτά σε συνθήκες παρόμοιες με αυτές που συναντούν τα παράσιτα στο φαγολυσόσωμα των μακροφάγων (37°C, pH 5,5) για 96 ώρες. Σε παράσιτα που ακόμη δεν έχουν χάσει εντελώς τη δομή του μαστιγίου, ανιχνεύθηκε μια συγκέντρωση επιτόπων της *LdTyrPIP_22* στην περιοχή έκφυσης του μαστιγίου, που είναι η κύρια εκκριτική οδός στα παράσιτα *Leishmania*. Στα αξενικά αμαστιγωτά η *LdTyrPIP_22* εντοπίζεται στην επιφανειακή μεμβράνη των παρασίτων, σε σημεία όπου εντοπίζονται τόσο η ακτίνη όσο και η τουμπουλίνη. Ο συνεντοπισμός της *LdTyrPIP_22* με τη λεϊσμανιακή ακτίνη είναι ακόμη πιο εμφανής στην περιφέρεια του κυττάρου όσο και σε υποκυττάρια δομές. Σε παράσιτα που έχουν μολύνει μακροφάγα της κυτταρικής σειράς J774 διαπιστώσαμε ότι η κατανομή της *LdTyrPIP_22* ακολουθεί το ίδιο πρότυπο που έχουμε παρατηρήσει στα αξενικά παράσιτα, τόσο στο σώμα των προμαστιγωτών κυττάρων όσο και στο μαστίγιο.

Η λειτουργία και εντοπισμός της *LdTyrPIP_22* είναι πιθανόν να ρυθμίζεται από μετα μεταφραστικές τροποποιήσεις. Από βιοπληροφορική ανάλυση της αλληλουχίας της *LdTyrPIP_22* προκύπτει ότι έχει 6 πιθανές θέσεις φωσφορυλίωσης και μία θέση παλμιτοϋλίωσης. Μπορούμε λοιπόν να υποθέσουμε πως η ενεργότητά της υφίσταται ρύθμιση, μέσω αλλαγής της στερεοδομής της με φωσφορυλίωση ή/και μετακίνησή της σε άλλη περιοχή του παρασίτου μέσω παλμιτοϋλίωσης. Η παλμιτοϋλίωση μεσολαβεί στη συσχέτιση

συγκεκριμένων πρωτεϊνών με το εξειδικευμένο εκκριτικό οργάνιδιο rhoptry που εμπλέκεται στην εισβολή του ξενιστή στην περίπτωση του *Plasmodium sp*, ή σε αναδιπλώσεις της μεμβράνης του μαστιγίου στο *T. Brucei*, όπως σύμφωνα με τις calflagins, πρωτεΐνες δέσμησης ασβεστίου που συμβάλουν στη μολυσματικότητα του παρασίτου. Η παλμιτοϋλίωση βρέθηκε επίσης ότι οδηγεί τις πρωτεΐνες στο λεγόμενο IMC (σύμπλεγμα της εσωτερικής μεμβράνης), ένα περιφερειακό μεμβρανικό σύστημα που βρίσκεται κάτω από την πλασματική μεμβράνη των παρασίτων του φύλου Apicomplexa και το οποίο εμπλέκεται στην εισβολή σε κυττάρους του ξενιστή και την αναπαραγωγή των παρασίτων (Blanc, Blaskovic et al. 2013). Ο εντοπισμός της *LdTygPIP_22* στην περιοχή έκφυσης του μαστιγίου σε παράσιτα που έχουν βρεθεί σε συνθήκες παρόμοιες με αυτές που συναντώνται στο θηλαστικό ξενιστή (τόσο σε καλλιέργεια αξενικών όσο και στην *in vitro* μόλυνση μακροφάγων) είναι μια ένδειξη πως μπορεί και η *LdTygPIP_22* να έχει ανάλογη δράση.

Εξαιρετικά ενδιαφέροντα είναι τα ευρήματα πρόσφατης δημοσίευσης σύμφωνα με τα οποία κατά τη διάρκεια της μετακυκλογένεσης τόσο σε αξενικά προμαστιγωτά όσο και σε προμαστιγωτά σε φλεβοτόμους, το mRNA του ορθόλογου της *LdTygPIP_22* γονιδίου στο παράσιτο *L. major* αυξήθηκε από 2,63-5,92 φορές αντίστοιχα (Rochette, Raymond et al. 2009). Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει μια πιθανή συμμετοχή αυτού του ενζύμου στη διαφοροποίηση του παρασίτου από το αναπτυξιακό στάδιο των προκυκλικών σε αυτό των μετακυκλικών. Επιπλέον, η μεγαλύτερη αύξηση (5,92 φορές έναντι 2,63 φορές) αυτού του mRNA στα μετακυκλικά που αναπτύσσονται στο πεπτικό των φλεβοτόμων (Inbar, Hughitt et al. 2017) υποδεικνύει τη σημασία του στην επιβίωση του παρασίτου κάτω από συνθήκες στρες και ανεπάρκειας θρεπτικών στο πρόσθιο μεσέντερο της φλεβοτόμου όπου λαμβάνει χώρα η μετακυκλογένεση. Εναλλακτικά, η αύξηση αυτή μπορεί να αποδοθεί στη σημασία του μορίου αυτού στην προετοιμασία για το επόμενο στάδιο του κύκλου ζωής του παρασίτου, την είσοδο δηλαδή στο θηλαστικό ξενιστή. Υψηλός ρυθμός μεταγραφής και μετάφρασης του γονιδίου οδηγεί σε υψηλότερα ποσά της *LdTygPIP_22*, τα οποία θα μπορούσαν να εκκρίνονται ή να αλλάζουν περιοχή στο παράσιτο όταν αυτό βρεθεί σε συνθήκες στρες αλλαγής θερμοκρασίας ή/και pH, κάτι το οποίο συνάδει με την ανίχνευση ζώνης της *LdTygPIP_22* κατά την ανοσοαποτύπωση κατά Western εξωκυττάριου υλικού καλλιέργειας προμαστιγωτών παρασίτων στους 37°C (Παράγραφος 3.4) και την αλλαγή στον εντοπισμό της που διαπιστώνουμε με ανοσοφθορισμό (Παράγραφοι 3.6-3.7).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο εντοπισμός της *LdTyrPIP_22* στο μαστίγιο του παρασίτου θα μπορούσε να υποδεικνύει κάποιο ρόλο στην είσοδο/φαγοκυττάρωση των παρασίτων, όπως και τα δεδομένα από τον συνεντοπισμό με την ακτίνη σε κύτταρα θηλαστικών, αλλά και *in vitro* ασθενή σύνδεση με την F-ακτίνη (Papadaki Amalia 2017). Για τη διερεύνηση της αλληλεπίδρασης με την ακτίνη μπορεί να διεξαχθεί πείραμα μετανάστευσης μακροφάγων καρκινικών κυττάρων ποντικού Raw 246.7 που θα υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη *rLdTyrPIP_22*-GFP με μικροσκοπία απεικόνισης ζωντανών κυττάρων (Olympus Cell R σύστημα) και χρήση του ειδικού kit OrisTM Cell Migration Assay. Με συλλογή videos μπορεί στη συνέχεια να γίνει ποσοτική ανάλυση των ταχυτήτων και των αποστάσεων που έχουν διανυθεί από κύτταρα που εκφράζουν την *LdTyrPIP22*-GFP σε σύγκριση με κύτταρα που δεν την εκφράζουν.

Με την κατασκευή της διαγονιδιακής σειράς παρασίτων *L. donovani*-*LdTyrPIP_22*-mRFP1 με ένθεση του διαγονιδίου στο χρωμοσωμικό DNA των παρασίτων είναι δυνατή η διεξαγωγή πειραμάτων σε ζωϊκούς οργανισμούς με παράσιτα που εκφράζουν υψηλότερα επίπεδα της *LdTyrPIP_22*, λόγω της έκφρασης της *LdTyrPIP_22*-mRFP1. Η μολυσματικότητα των διαγονιδιακών αυτών παρασίτων ελέγχθηκε σε σύγκριση με την αντίστοιχη των παρασίτων *L. donovani* αγρίου τύπου και *L. donovani*-mRFP1. Τα αποτελέσματά μας για παράσιτα στατικής φάσης μετά από 4 ώρες μόλυνσης παρέχουν ενδείξεις πως η έκφραση της *LdTyrPIP_22*-mRFP1 ευνοεί τη φαγοκυττάρωση παρασίτων/μακροφάγο. Σε αυτό μπορεί να συμβάλει η πιθανή έκκριση της *LdTyrPIP_22* στο ήδη μολυσμένο μακροφάγο και να ευνοεί την φαγοκυττάρωση περισσότερων παρασίτων στη συνέχεια. Για επιβεβαίωση αυτού του αποτελέσματος θα μπορούσε να γίνει μόλυνση μακροφάγων Raw246.7 που εκφράζουν ετερόλογα την *LdTyrPIP_22* και σύγκριση του αριθμού των παρασίτων που έχουν φαγοκυτταρωθεί από αυτά σε σχέση με τον αριθμό παρασίτων που φαγοκυταρώθηκαν από μολυσμένα μακροφάγα αγρίου τύπου. Μελέτες σε πιο προχωρημένα στάδια της μόλυνσης (24-96 ώρες) όταν το παράσιτο θα έχει μετατραπεί στην αμαστιγωτή μορφή του, θα επιτρέψουν εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με το ρόλο της *LdTyrPIP_22* ως μολυσματικού παράγοντα.

Το σύστημα CRISPR/Cas9 (Zhang, Lypaczewski et al. 2017) έχει ήδη χρησιμοποιηθεί σε κύτταρα *Leishmania*, δίνοντας τη δυνατότητα κατασκευής knock-out παρασίτων για την *LdTyrPIP_22*. Με την απαλοιφή του γονιδίου LDBPK_220120.1 από το DNA των παρασίτων και την επακόλουθη απώλεια της *LdTyrPIP_22*, μπορούμε να έχουμε πιο σαφή αποτελέσματα για το αν η φωσφατάση παίζει ρόλο ζωτικής σημασίας στην ανάπτυξη ή/και στην εγκαθίδρυση

της μόλυνσης του παρασίτου, ακολουθώντας το ίδιο πρωτόκολλο μελέτης της μολυσματικότητας. Στην περίπτωση που τα πειραματικά δεδομένα το επιτρέπουν, μπορεί να γίνει μελέτη του λειτουργικού ρόλου της *LdTygPIP_22* με πειράματα *in vivo*, τόσο σε φλεβοτόμους, όπου κατά τη μετάβαση από προκυκλικά προμαστιγωτά σε μετακυκλικά υπάρχει 6 σχεδόν φορές αύξηση της μεταγραφής του ορθόλογου γονιδίου για την *LdTygPIP_22*, όσο και σε ποντικούς τύπου BALB/c.

Προκειμένου να μελετήσουμε τη δομή και τις βιοχημικές ιδιότητες της πρωτεΐνης *LdTygPIP_22* χρειάζεται να απομονώσουμε επαρκή ποσότητα του ενζύμου από καλλιέργειες παρασίτων *Leishmania* μεγάλης κλίμακας. Για το σκοπό αυτό κατασκευάσαμε δύο κυτταρικές σειρές διαγονιδιακών παρασίτων *L. tarentolae* που εκφράζουν σταθερά το διαγονίδιο *Ldtygrip_22-6his*, αφενός χωρίς τροποποιήσεις στο αμινο-τελικό άκρο του πολυπεπτιδίου που προκύπτει, αφετέρου με την προσθήκη σηματοδοτικού μορίου για έξοδο στο εξωκυττάριο υλικό μέσω της εκκριτικής οδού. Με τα κυτταρικά αυτά εργαλεία μπορούμε να μελετήσουμε τόσο τη δράση φωσφατάσης της *LdTygPIP_22-6His* και την εξειδίκευση υποστρώματος, όσο και να πραγματοποιήσουμε μελέτες για τη δομή της πρωτεΐνης και τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που φέρει.

Μολυσματικοί παράγοντες των παθογόνων οργανισμών είναι πιθανό να αποτελέσουν στόχους φαρμάκων. Εάν αποδειχθεί πως η *LdTygPIP_22* παίζει ζωτικό ρόλο στον κύκλο ζωής ή/και στην εγκαθίδρυση της μόλυνσης του παρασίτου, έχοντας πληροφορίες για τη δομή του μορίου μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε είτε *in silico* μοντέλα για το σχεδιασμό υποθετικών αναστολέων της δράσης της είτε ήδη υπάρχουσες βιβλιοθήκες μορίων.

Η πειραματική αυτή εργασία αποτελεί συνέχεια του χαρακτηρισμού της δράσης της πρωτεΐνης *LdTygPIP_22* που ξεκίνησε στο εργαστήριό μας με την διπλωματική εργασία της Αναστασίας Κοτοπούλη (Kotopouli 2014) και στόχευσε σε περαιτέρω μελέτη των λειτουργικών ιδιοτήτων της καθώς και της σημασίας της για τη μολυσματικότητα του παρασίτου. Στα πλαίσιά της κατασκευάστηκαν νέα μοριακά και κυτταρικά εργαλεία που θα χρησιμοποιηθούν και σε μελλοντικές μελέτες της φωσφατάσης *LdTygPIP_22*, βελτιστοποιήθηκαν πειραματικά πρωτόκολλα και μελετήθηκαν αρκετά ερωτήματα σε σχέση με το λειτουργικό ρόλο του συγκεκριμένου ενζύμου. Τα μέχρι τώρα ευρήματα του εργαστηρίου υποδεικνύουν πως η *LdTygPIP_22* είναι ένα σημαντικό μόριο για τα παράσιτα *L. donovani*. Ήδη η ομάδα μας σχεδιάζει μελέτες για να απαντηθεί το αν η *LdTygPIP_22* μπορεί να θεωρηθεί ως πιθανός στόχος

για έλεγχο ουσιών-αναστολέων φωσφατάσης για αξιοποίησή τους σε σχήματα αντι-λεϊσμаниκής
θεραπείας.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Akhoundi, M., T. Downing, J. Votypka, K. Kuhls, J. Lukes, A. Cannet, C. Ravel, P. Marty, P. Delaunay, M. Kasbari, B. Granouillac, L. Gradoni and D. Sereno (2017). "Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis." Mol Aspects Med **57**: 1-29.
- Arias, J. R., P. S. Monteiro and F. Zicker (1996). "The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil." Emerg Infect Dis **2**(2): 145-146.
- Ashford, R. W. (2000). "The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses." International Journal for Parasitology **30**(12-13): 1269-1281.
- 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.
- Bates, P. A. (1994). "The developmental biology of Leishmania promastigotes." Exp Parasitol **79**(2): 215-218.
- Bates, P. A. and D. M. Dwyer (1987). "Biosynthesis and secretion of acid phosphatase by Leishmania donovani promastigotes." Mol Biochem Parasitol **26**(3): 289-296.
- Beresford, N., S. Patel, J. Armstrong, B. Szöör, A. P. Fordham-skelton and L. Tabernero (2007). "MptpB, a virulence factor from Mycobacterium tuberculosis, exhibits triple-specificity phosphatase activity." Biochemical Journal **406**(1): 13-18.
- Beresford, N., C. Saville, H. Bennett, I. Roberts and L. Tabernero (2010). "A new family of phosphoinositide phosphatases in microorganisms: identification and biochemical analysis." BMC Genomics **11**(1): 457.
- Beresford, N. J., D. Mulhearn, B. Szczepankiewicz, G. Liu, M. E. Johnson, A. Fordham-Skelton, C. Abad-Zapatero, J. S. Cavet and L. Tabernero (2009). "Inhibition of MptpB phosphatase from Mycobacterium tuberculosis impairs mycobacterial survival in macrophages." J Antimicrob Chemother **63**(5): 928-936.
- Beresford, N. J., C. Saville, H. J. Bennett, I. S. Roberts and L. Tabernero (2010). "A new family of phosphoinositide phosphatases in microorganisms: identification and biochemical analysis." BMC Genomics **11**: 457.
- Blanc, M., S. Blaskovic and F. G. van der Goot (2013). "Palmitoylation, pathogens and their host." Biochem Soc Trans **41**(1): 84-88.
- Boleti, H., D. Smirlis, G. Dalagiorgou, E. F. Meurs, S. Christoforidis and P. Mavromara (2010). "ER targeting and retention of the HCV NS4B protein relies on the concerted action of multiple structural features including its transmembrane domains." Mol Membr Biol **27**(1): 50-74.
- 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.
- Brenchley, R., H. Tariq, H. McElhinney, B. Szoor, J. Huxley-Jones, R. Stevens, K. Matthews and L. Tabernero (2007). "The TriTryp phosphatome: analysis of the protein phosphatase catalytic domains." BMC Genomics **8**: 434.
- Brown, J. R. and K. R. Auger (2011). "Phylogenomics of phosphoinositide lipid kinases: perspectives on the evolution of second messenger signaling and drug discovery." BMC Evol Biol **11**: 4.
- Bunney, T. D. and M. Katan (2010). "Phosphoinositide signalling in cancer: beyond PI3K and PTEN." Nat Rev Cancer **10**(5): 342-352.

- Canduri, F., P. C. Perez, R. A. Caceres and W. F. de Azevedo, Jr. (2007). "Protein kinases as targets for antiparasitic chemotherapy drugs." Curr Drug Targets **8**(3): 389-398.
- 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.
- Chakravarty, J. and S. Sundar (2010). "Drug resistance in leishmaniasis." J Glob Infect Dis **2**(2): 167-176.
- 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.
- Clement, S., U. Krause, F. Desmedt, J.-F. Tanti, J. Behrends, X. Pesesse, T. Sasaki, J. Penninger, M. Doherty, W. Malaisse, J. E. Dumont, Y. Le Marchand-Brustel, C. Erneux, L. Hue and S. Schurmans (2001). "The lipid phosphatase SHIP2 controls insulin sensitivity." Nature **409**(6816): 92-97.
- Cohen, P. (2002). "Protein kinases the major drug targets of the twenty-first century?" Nat Rev Drug Discov **1**(4): 309-315.
- 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.
- Croft, S. L., K. Seifert and V. Yardley (2006). "Current scenario of drug development for leishmaniasis." Indian J Med Res **123**(3): 399-410.
- Croft, S. L., S. Sundar and A. H. Fairlamb (2006). "Drug resistance in leishmaniasis." Clin Microbiol Rev **19**(1): 111-126.
- Cunningham, A. C. (2002). "Parasitic adaptive mechanisms in infection by leishmania." Exp Mol Pathol **72**(2): 132-141.
- 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.
- 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.
- Descoteaux, A. and S. J. Turco (2002). "Functional aspects of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan during macrophage infection." Microbes Infect **4**(9): 975-981.
- Desjardins, M. and A. Descoteaux (1998). "Survival strategies of *Leishmania donovani* in mammalian host macrophages." Res Immunol **149**(7-8): 689-692.
- Desjeux, P. (2001). "The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide." Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene **95**(3): 239-243.
- Desjeux, P. (2004). "Leishmaniasis: current situation and new perspectives." Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases **27**(5): 305-318.
- Di Paolo, G. and P. De Camilli (2006). "Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics." Nature **443**(7112): 651-657.
- Dujardin, J. C., L. Campino, C. Canavate, J. P. Dedet, L. Gradoni, K. Soteriadou, A. Mazeris, Y. Ozbek and M. Boelaert (2008). "Spread of vector-borne diseases and neglect of Leishmaniasis, Europe." Emerg Infect Dis **14**(7): 1013-1018.
- Dyson, J. M., C. G. Fedele, E. M. Davies, J. Becanovic and C. A. Mitchell (2012). "Phosphoinositide phosphatases: just as important as the kinases." Subcell Biochem **58**: 215-279.

- Elwasila, M. (1988). "Leishmania tarentolae Wenyon, 1921 from the gecko Tarentola annularis in the Sudan." Parasitol Res **74**(6): 591-592.
- 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.
- Foucher, A. L., B. Papadopoulou and M. Ouellette (2006). "Prefractionation by digitonin extraction increases representation of the cytosolic and intracellular proteome of Leishmania infantum." J Proteome Res **5**(7): 1741-1750.
- Freeman, S. A. and S. Grinstein (2014). "Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton." Immunol Rev **262**(1): 193-215.
- 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.
- Galli, S. J. and M. Tsai (2010). "Mast cells in allergy and infection: Versatile effector and regulatory cells in innate and adaptive immunity." European Journal of Immunology **40**(7): 1843-1851.
- Gibson, M. E. (1983). "The identification of kala-azar and the discovery of Leishmania donovani." Med Hist **27**(2): 203-213.
- 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.
- Guan, L. R., X. P. Zuo and Yimamu (2003). "[Reemergence of visceral leishmaniasis in Kashi Prefecture, Xinjiang]." Zhongguo ji sheng chong xue yu ji sheng chong bing za zhi = Chinese journal of parasitology & parasitic diseases **21**(5): 285.
- Handman, E. and D. V. Bullen (2002). "Interaction of Leishmania with the host macrophage." Trends Parasitol **18**(8): 332-334.
- Heneberg, P. (2009). "Use of protein tyrosine phosphatase inhibitors as promising targeted therapeutic drugs." Curr Med Chem **16**(6): 706-733.
- Herwaldt, B. L. (1999). "Leishmaniasis." The Lancet **354**(9185): 1191-1199.
- Inbar, E., V. K. Hughitt, L. A. Dillon, K. Ghosh, N. M. El-Sayed and D. L. Sacks (2017). "The Transcriptome of Leishmania major Developmental Stages in Their Natural Sand Fly Vector." MBio **8**(2).
- Isnard, A., M. T. Shio and M. Olivier (2012). "Impact of Leishmania metalloprotease GP63 on macrophage signaling." Front Cell Infect Microbiol **2**: 72.
- Kastner, R., O. Dussurget, C. Archambaud, E. Kernbauer, D. Soulat, P. Cossart and T. Decker (2011). "LipA, a tyrosine and lipid phosphatase involved in the virulence of Listeria monocytogenes." Infect Immun **79**(6): 2489-2498.
- Klatt, S. and Z. Konthur (2012). "Secretory signal peptide modification for optimized antibody-fragment expression-secretion in Leishmania tarentolae." Microbial Cell Factories.
- Kotini, M. (2009). Διπλωματική εργασία.
- Kotopouli, A. (2014). Διπλωματική Εργασία.
- Kourounis, D. (2017). Διπλωματική εργασία.
- Krausz, M. and V. Haucke (2007). "Phosphoinositide-metabolizing enzymes at the interface between membrane traffic and cell signalling." EMBO Rep **8**(3): 241-246.
- Lazar, D. F. and A. R. Saltiel (2006). "Lipid phosphatases as drug discovery targets for type 2 diabetes." Nat Rev Drug Discov **5**(4): 333-342.

- Li, Q., Y. Zhao, B. Ni, C. Yao, Y. Zhou, W. Xu, Z. Wang and Z. Qiao (2008). "Comparison of the expression profiles of promastigotes and axenic amastigotes in *Leishmania donovani* using serial analysis of gene expression." Parasitol Res **103**(4): 821-828.
- Liu, Y. and V. A. Bankaitis (2010). "Phosphoinositide phosphatases in cell biology and disease." Progress in Lipid Research **49**(3): 201-217.
- 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.
- Lodge, R. and A. Descoteaux (2008). "Leishmania invasion and phagosome biogenesis." Subcell Biochem **47**: 174-181.
- Lukeš, J., I. L. Mauricio, G. Schöniar, J.-C. Dujardin, K. Soteriadou, J.-P. Dedet, K. Kuhls, K. W. Q. Tintaya, M. Jirků, E. Chocholová, C. Haralambous, F. Pratlong, M. Oborník, A. Horák, F. J. Ayala and M. A. Miles (2007). "Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy." Proceedings of the National Academy of Sciences **104**(22): 9375-9380.
- McConville, M. J., K. A. Mullin, S. C. Ilgoutz and R. D. Teasdale (2002). "Secretory Pathway of Trypanosomatid Parasites." Microbiology and Molecular Biology Reviews **66**(1): 122-154.
- McParland, V., G. Varsano, X. Li, J. Thornton, J. Baby, A. Aravind, C. Meyer, K. Pavic, P. Rios and M. Kohn (2011). "The metastasis-promoting phosphatase PRL-3 shows activity toward phosphoinositides." Biochemistry **50**(35): 7579-7590.
- Moore, E. M. and D. N. Lockwood (2010). "Treatment of visceral leishmaniasis." J Glob Infect Dis **2**(2): 151-158.
- Moradin, N. and A. Descoteaux (2012). "Leishmania promastigotes: building a safe niche within macrophages." Front Cell Infect Microbiol **2**: 121.
- Mueller-Roeber, B. and C. Pical (2002). "Inositol phospholipid metabolism in Arabidopsis. Characterized and putative isoforms of inositol phospholipid kinase and phosphoinositide-specific phospholipase C." Plant Physiol **130**(1): 22-46.
- 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.
- Nasereddin, A., G. Baneth, G. Schöniar, M. Kanaan and C. L. Jaffe (2005). "Molecular Fingerprinting of *Leishmania infantum* Strains following an Outbreak of Visceral Leishmaniasis in Central Israel." Journal of Clinical Microbiology **43**(12): 6054-6059.
- 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.
- 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.
- Overath, P., Y.-D. Stierhof and M. Wiese (1997). "Endocytosis and secretion in trypanosomatid parasites Tumultuous traffic in a pocket." Trends in cell biology **7**(1): 27-33.
- 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.

- Papadaki Amalia, K. A., Tziouvara Olympia, Doukas Anargyros, Rios Pablos, Tardieux Isabelle, Köhn Maja, Boleti Haralabia (2017). "LdTyrPIP₂₂ Tyrosine and Phosphoinositide Phosphatase from *Leishmania donovani*, a prozoan homolog of pathogenic bacteria virulence factors." Under Revision.
- 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.
- Pizarro-Cerda, J. and P. Cossart (2004). "Subversion of phosphoinositide metabolism by intracellular bacterial pathogens." Nat Cell Biol **6**(11): 1026-1033.
- Podinovskaia, M. and A. Descoteaux (2015). "Leishmania and the macrophage: a multifaceted interaction." Future Microbiol **10**(1): 111-129.
- 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.
- Rigaut, G., A. Shevchenko, B. Rutz, M. Wilm, M. Mann and B. Seraphin (1999). "A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration." Nat Biotechnol **17**(10): 1030-1032.
- Rochette, A., F. Raymond, J. Corbeil, M. Ouellette and B. Papadopoulou (2009). "Whole-genome comparative RNA expression profiling of axenic and intracellular amastigote forms of *Leishmania infantum*." Mol Biochem Parasitol **165**(1): 32-47.
- Rodrigues, J. C., J. L. Godinho and W. de Souza (2014). "Biology of human pathogenic trypanosomatids: epidemiology, lifecycle and ultrastructure." Subcell Biochem **74**: 1-42.
- Rogers, M. E., T. Ilg, A. V. Nikolaev, M. A. Ferguson and P. A. Bates (2004). "Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG." Nature **430**(6998): 463-467.
- Roth, M. G. (2004). "Phosphoinositides in Constitutive Membrane Traffic." Physiological Reviews **84**(3): 699-730.
- Roy, J. and M. S. Cyert (2009). "Cracking the Phosphatase Code: Docking Interactions Determine Substrate Specificity." Sci. Signal. **2**(100): re9-.
- Sadatom, D., S. Tanimura, K. Ozaki and K. Takeda (2013). "Atypical protein phosphatases: emerging players in cellular signaling." Int J Mol Sci **14**(3): 4596-4612.
- Sahasrabudhe, A. A., V. K. Bajpai and C. M. Gupta (2004). "A novel form of actin in *Leishmania*: molecular characterisation, subcellular localisation and association with subpellicular microtubules." Mol Biochem Parasitol **134**(1): 105-114.
- Severin, S., M. P. Gratacap, N. Lenain, L. Alvarez, E. Hollande, J. M. Penninger, C. Gachet, M. Plantavid and B. Payrastre (2007). "Deficiency of Src homology 2 domain-containing inositol 5-phosphatase 1 affects platelet responses and thrombus growth." J Clin Invest **117**(4): 944-952.
- Shio, M. T. and M. Olivier (2010). "Editorial: *Leishmania* survival mechanisms: the role of host phosphatases." J Leukoc Biol **88**(1): 1-3.
- Silverman, J. M., S. Chan, D. Robinson, D. Dwyer, D. Nandan, L. Foster and N. Reiner (2008). "Proteomic analysis of the secretome of *Leishmania donovani*." Genome Biology **9**(2): R35.
- Singh, R., V. Rao, H. Shakila, R. Gupta, A. Khera, N. Dhar, A. Singh, A. Koul, Y. Singh, M. Naseema, P. R. Narayanan, C. N. Paramasivan, V. D. Ramanathan and A. K. Tyagi (2003). "Disruption of

- mptpB impairs the ability of Mycobacterium tuberculosis to survive in guinea pigs." Molecular Microbiology **50**(3): 751-762.
- 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.
- Sleeman, M. W., K. E. Wortley, K. M. Lai, L. C. Gowen, J. Kintner, W. O. Kline, K. Garcia, T. N. Stitt, G. D. Yancopoulos, S. J. Wiegand and D. J. Glass (2005). "Absence of the lipid phosphatase SHIP2 confers resistance to dietary obesity." Nat Med **11**(2): 199-205.
- Slupe, A. M., R. A. Merrill and S. Strack (2011). "Determinants for Substrate Specificity of Protein Phosphatase 2A." Enzyme Res **2011**: 398751.
- Smirlis, D., S. N. Bisti, E. Xingi, G. Konidou, M. Thiakaki and K. P. Soteriadou (2006). "Leishmania histone H1 overexpression delays parasite cell-cycle progression, parasite differentiation and reduces Leishmania infectivity in vivo." Mol Microbiol **60**(6): 1457-1473.
- Smirlis, D., H. Boleti, M. Gaitanou, M. Soto and K. Soteriadou (2009). "Leishmania donovani Ran-GTPase interacts at the nuclear rim with linker histone H1." Biochem J **424**(3): 367-374.
- Sobhia, M. E., S. Paul, R. Shinde, M. Potluri, V. Gundam, A. Kaur and T. Haokip (2012). "Protein tyrosine phosphatase inhibitors: a patent review (2002 - 2011)." Expert Opin Ther Pat **22**(2): 125-153.
- Taberner, L., A. R. Aricescu, E. Y. Jones and S. E. Szedlacsek (2008). "Protein tyrosine phosphatases: structure-function relationships." FEBS J **275**(5): 867-882.
- Takeshita, S., N. Namba, J. J. Zhao, Y. Jiang, H. K. Genant, M. J. Silva, M. D. Brodt, C. D. Helgason, J. Kalesnikoff, M. J. Rauh, R. K. Humphries, G. Krystal, S. L. Teitelbaum and F. P. Ross (2002). "SHIP-deficient mice are severely osteoporotic due to increased numbers of hyper-resorptive osteoclasts." Nat Med **8**(9): 943-949.
- 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.
- Vickerman, K. and L. Tetley (1977). "Recent ultrastructural studies on trypanosomes." Ann Soc Belg Med Trop **57**(4-5): 441-457.
- 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.
- Wei, W., Y. Jiao, A. Postlethwaite, J. M. Stuart, Y. Wang, D. Sun and W. Gu (2013). "Dual-specificity phosphatases 2: surprising positive effect at the molecular level and a potential biomarker of diseases." Genes Immun **14**(1): 1-6.
- Wolday, D., N. Berhe, H. Akuffo, P. Desjeux and S. Britton (2001). "Emerging Leishmania/HIV co-infection in Africa." Medical Microbiology and Immunology **190**(1-2): 65-67.
- Wong, D., J. D. Chao and Y. Av-Gay (2013). "Mycobacterium tuberculosis-secreted phosphatases: from pathogenesis to targets for TB drug development." Trends in microbiology **21**(2): 100-109.
- 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.
- 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.

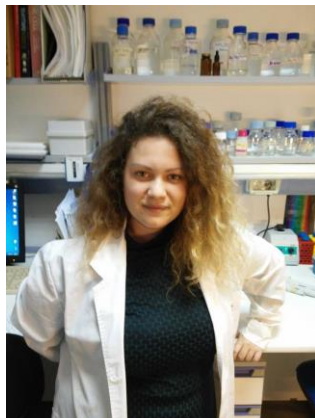
Zhang, W. W., P. Lypaczewski and G. Matlashewski (2017). "Optimized CRISPR-Cas9 Genome Editing for Leishmania and Its Use To Target a Multigene Family, Induce Chromosomal Translocation, and Study DNA Break Repair Mechanisms." mSphere 2(1).

Λεονταρίτης, Γ. (2003). Μελέτη των φωσφοϊνοσιτιδίων του μονοκύτταρου ευκαρυωτικού οργανισμού tetrahymena: συμμετοχή στη μεταγωγή σήματος και την κυκλοφορία μεμβρανών, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ).

Χαραλάμπους, Χ. (2007). Γονοτυπικός προσδιορισμός ειδών και υποειδών του παρασίτου Leishmania, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

ΠΡΟΣΩΠΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Τζιουβάρα Ολυμπία



📍 Ομάδα Ενδοκυττάριου παρασιτισμού, Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur,
Λεωφ. Βασ. Σοφίας 127, 11521, Αθήνα, Ελλάδα
☎️ +302106478827 📠 6973472513
✉️ oltziouvara@gmail.com

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

2015-2017

Διπλωματική Εργασία Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης
“Μοριακός και λειτουργικός χαρακτηρισμός της φωσφατάσης τυροσίνης/φωσφοϊνοσιπιδίων LdTygPIP₂ από το πρωτόζωο *Leishmania donovani*”

Ομάδα Ενδοκυττάριου παρασιτισμού, Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur,
http://www.pasteur.gr/?page_id=3569

Τεχνικές:

- Χειρισμός DNA [απομόνωση γενομικού genomic από κύτταρα *Leishmania* (*L. tarentolae* και *L. donovani*), απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτήρια, ανάλυση DNA με ηλεκτροφόρηση σε πηκτώμα αгарόζης και καθαρισμός τμημάτων DNA, αντίδραση πέψης με ένζυμα περιορισμού, αντίδραση αποφωσφυλίνωσης, αντίδραση λιγάσης]
- Κλωνοποίηση μέσω PCR
- Χειρισμός πρωτεϊνών (SDS-PAGE, Western Blot, ποσοτικοποίηση συγκέντρωσης πρωτεΐνης, Bradford Assay)
- Καλλιέργειες βακτηρίων (προετοιμασία θρεπτικών υλικών, ασηπτική τεχνική)
- Μετασχηματισμός χημειοδεκτικών βακτηρίων
- Επιμόλυνση κυττάρων *Leishmania* με ηλεκτροδιάρθρωση
- Επιμόλυνση κυττάρων θηλαστικών με τη χρήση λιποσωμάτων
- Καλλιέργεια κυττάρων *Leishmania* (*L. tarentolae* και *L. donovani*) θηλαστικών (HeLa, J774) (προετοιμασία θρεπτικών υλικών, χρήση θαλάμου νηματικής ροής, διατήρηση καλλιεργειών σε συνθήκες χαμηλής θερμοκρασίας)
- Πρωτόκολλα για τη μελέτη του εκκρινόμενου υλικού από κυτταροκαλλιέργεια παρασίτων
- Πρωτόκολλα *in vitro* μόλυνσης μακροφάγων θηλαστικών με παράσιτα
- Χρώση για ανοσοφθορισμό σε κύτταρα *Leishmania* και κύτταρα θηλαστικών
- Χρήση συνεστιακού Μικροσκοπίου
- FACS
- Χειρισμός ζώων (Wistar rat)

Διδακτική εμπειρία: Κατά τη διάρκεια της εργασίας μου στο Ε.Ι.Π. ανέλαβα την εκπαίδευση ενός Μεταπτυχιακού φοιτητή και τριών προπτυχιακών φοιτητριών σε τεχνικές του εργαστηρίου.

2013-2014

Εθελοντική Ερευνητική Εργασία

Μοριακές τεχνικές και τεχνικές κυτταρικής βιολογίας για τη μελέτη αλληλεπιδράσεων παρασίτων *Leishmania*/θηλαστικού ξενιστή.

Ομάδα Ενδοκυττάριου παρασιτισμού, Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur,
http://www.pasteur.gr/?page_id=3569

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ

2014-2017	Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης «Εφαρμογές της Βιολογίας στην Ιατρική», Τμήμα Βιολογίας και Σχολή Ιατρικής, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθήνας, Ελλάδα	Επίπεδο 7
2009-2014	Πτυχίο Βιολογίας, βαθμός πτυχίου Λίαν Καλώς, 7.04 (2009-2014) Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πάτρας, Ελλάδα	Επίπεδο 6
2006-2009	Απολυτήριο Γενικού Λυκείου, βαθμός απολυτηρίου Άριστα, 19.1 Γενικό Λύκειο Άμφισσας, Ελλάδα	Επίπεδο 4

ΑΤΟΜΙΚΕΣ ΔΕΞΙΟΤΗΤΕΣ

Μητρική γλώσσα Ελληνικά

Λοιπές γλώσσες

	ΚΑΤΑΝΟΗΣΗ		ΟΜΙΛΙΑ		ΓΡΑΦΗ
	Προφορική	Γραπτή (ανάγνωση)	Επικοινωνία	Προφορική έκφραση	
Αγγλικά	Έμπειρος χρήστης	Έμπειρος χρήστης	Έμπειρος χρήστης	Έμπειρος χρήστης	Έμπειρος χρήστης
	Certificate of Proficiency in English, University of Michigan (C2)				
Γερμανικά	Ανεξάρτητος χρήστης	Ανεξάρτητος χρήστης	Ανεξάρτητος χρήστης	Ανεξάρτητος χρήστης	Ανεξάρτητος χρήστης
	Goethe Zertifikat (B1)				

Επικοινωνιακές και οργανωτικές δεξιότητες

Οι παρουσιάσεις εργασιών κατά τη διάρκεια των σπουδών με βοήθησαν να αναπτύξω αυτοπεποίθηση όταν μιλώ σε κοινό για επιστημονικά θέματα και δυνατότητα συνεισφοράς στη συζήτηση, αναπτύσσοντας επιχειρήματα. Η παρουσία μου σε εργαστήριο τόσο κατά τη διάρκεια της διεξαγωγής των πειραμάτων της Διπλωματικής μου εργασίας αλλά και το διάστημα που εργάστηκα εθελοντικά στο Ε.Ι.Π., έχει δείξει πως λειτουργώ πολύ καλά στα πλαίσια μιας ομάδας, λαμβάνοντας γνώση από τους πιο έμπειρους αλλά και συνεισφέροντας σύμφωνα με τις δυνατότητές μου στις ανάγκες που προκύπτουν, διατηρώντας θετικό κλίμα. Η μέχρι τώρα εμπειρία μου στα πλαίσια της λειτουργίας ενός εργαστηρίου μου επιτρέπει να παίρνω πρωτοβουλίες και να φροντίζω για βασικές ανάγκες για την εύρυθμη λειτουργία του εργαστηρίου. +διδασκαλία

Ψηφιακή δεξιότητα

ΑΥΤΟΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ				
Επεξεργασία δεδομένων	Επικοινωνία	Δημιουργία Περιεχομένου	Ασφάλεια	Επίλυση προβλημάτων
Έμπειρος χρήστης	Έμπειρος χρήστης	Βασικός χρήστης	Ανεξάρτητος χρήστης	Βασικός χρήστης
ECDL				

- καλή γνώση λογισμικού επεξεργασίας φωτογραφιών (Icy, ImageJ, Photoshop)

Άλλες δεξιότητες

- Ζωγραφική
- Βιολί

ΠΡΟΣΘΕΤΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Δημοσιεύσεις

“LdTyroPIP₂₂ Tyrosine and Phosphoinositide Phosphatase from *Leishmania donovani*, a prozoan homolog of pathogenic bacteria virulence factors.” (under revision)
Συγγραφείς: A. Papadaki, A. Kotopoulou, O. Tziouvara, A. Doukas, P. Rios, I. Tardieux, M. Köhn, H. Boleti

Παρουσιάσεις

“Study of LdTyroPIP₂₂, a Tyrosine and Phosphoinositide Phosphatase from *Leishmania donovani*”
 67ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρίας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Ιωάννινα 25-27/11/2016
Συγγραφείς: O. Tziouvara, A. Kotopoulou, A. Papadaki, H. Boleti
 “Biochemical Characterization and Subcellular Localization of the Tyrosine and Phosphoinositide Dual Specificity Phosphatase LdTyroPIP₂₂, a potential drug target from *Leishmania donovani*”
 66ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρίας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Αθήνα 11-13/12/2015
Συγγραφείς: A. Papadaki, A. Kotopoulou, A. Doukas, P. Rios, O. Tziouvara, M. Köhn, H. Boleti

Σεμινάρια

“The new microbiology” EMBO/ FEBS, Αύγουστος 2016, Σπέτσες, Ελλάδα
 “Cell Biology and infection: Digital Image Processing/Analysis tools for Quantitative Light Microscopy Imaging”, RIIP international course, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Αθήνα, Ελλάδα

Structural and functional studies of a *Leishmania donovani* Phosphotyrosine Phosphoinositide Phosphatase homologue of bacterial secreted virulence factors

Amalia Papadaki¹, Olympia Tziouvara¹, Anastasia Kotopoulou¹, Anargyros Doukas¹, Pablos Rios^{2,3,4}, Maja Köhn^{2,3,4}, Haralabia BOLETI¹

¹Intracellular Parasitism group, Department of Microbiology, Hellenic Pasteur Institute, Greece

²Genome Biology Research Unit, European Molecular Biology Laboratory, ³Centre for Biological Signaling Studies (BIOSS) & ⁴Faculty of Biology, University of Freiburg, Germany

Introduction

Modulation of the host phosphoinositide (PI, Fig. 1) metabolism is an important strategy used by many pathogens to suppress the host cell's defense mechanisms. PIs are important second messengers that regulate in eukaryotic cells many functions including membrane and actin cytoskeleton dynamics. While PI bacterial phosphatases interfering with PI metabolism in the host are already attractive drug targets, this aspect is poorly explored for intracellular protozoan parasites like *Leishmania*.

The Leishmania's phosphatase contains a subgroup of atypical dual-specificity protein phosphatases (ADSPs) [Swerdlow et al. BMC Genomics, 2007, 26:2-434, Fig. 2] with no human homologue that are homologous to the protein and P1 phosphatases MpppP and Lppa from *Mycobacterium tuberculosis* and *Leishnae monocytogenes*, respectively which are both essential bacterial virulence factors. These phosphatases are also found in other members of the Leishmania genus. The ADSPs are found in *M. leishmania* (BMC Genomics, 2010, 11:47-57). All members of the family share the unique active site Asp102-Plo motif (CXSR) of MpppP/HCN49GHD, strictly conserved in other mycobacterial species, where the Asp102 is an essential catalytic residue and Lys164 is important for P1 binding [Swerdlow et al., Biochem J, 2007, 406 (10): 101-110]. The ADSPs are also found in *Leishmania* species, where they are the catalytic site of protein tyrosine phosphatases (PTPase) [Zhang et al. Acc Chem Res, 2003, 36(6):385-392].

The *Leishmania donovani* (*L. donovani*) LDSPK_220120 gene product, member of this ALP family, is highly conserved amongst the *Leishmania* sp. (Fig. 3A). This protein is expressed in both the promastigote and amastigote stages of the *L. donovani* sp. and dipephosphorylated pTyr peptides and monophosphorylated Pte. We therefore named it *Ld*TyrPIP_22 for *L. donovani*, Tyrosine and Pi Phosphatase with gene locus at chromosome 22.

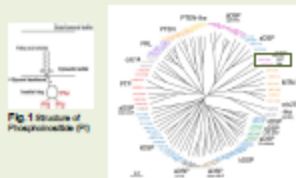


Fig. 2 Radial phylogenetic tree of Tif1yp GTP & Protein Tyrosine Phosphatases (PTP) (Shawcross et al., 2012)

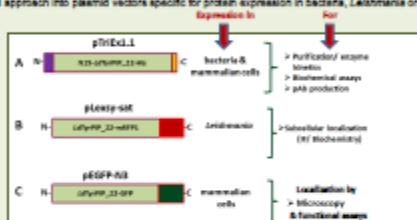
[illegible]

Table 1 Species classification of sequences of ALPs identified through Blast analysis and BlastProfile (hereafter of a)

Aim: We study the LDBPK_220120 gene product from *L. donovani*, member of the ALP enzyme family, unique for prokaryotic and lower eukaryotic cells, as potential molecular target for the development of new anti-leishmanial drugs.

Methodology

The LDBPK_220120 gene ortholog from the *L. donovani* LG13 (MHOM/ET/0000/HUGSEN) strain was cloned by a PCR based approach into plasmid vectors specific for protein expression in bacteria, *Leishmania* or mammalian cells.

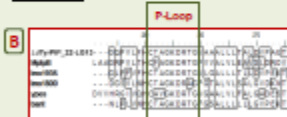


1 Bioinformatics analysis

Leishmania spp	Prevalence
L. donovani (SLMPP_201002)	98.8%
L. infanzprandi (SLMPP_201002)	98.2%
L. major (SLMPP_201002)	93.8%
L. mexicana (SLMPP_201002)	90.7%
L. bertrandi (SLMPP_201002)	83.7%
L. braziliensis (SLMPP_201002)	21.2%

Fig 3 (A) ClustalW alignment of the LORFV_202125 gene product from *L. disjunctus* LB93 (*LpfYPP_22*) with orthologs from *L. disjunctus* strain LORFV_202125, *I. dentatus* [JGI_22_076], *C. major* Fideles [JGI_P2_028], *L. mediane* WH-Com [JGI_M_22_020], *S. brevistipes* Panoz [JGI_S2_020] and *L. disjunctus* gene identified in the table % identity (B) Clustad alignment of the *Pinkus* *ccr1* sequence from *LpfYPP_22* with the corresponding sequence from homologues from *Mycosphaerella fabae* MAFab, GenBank accession CCNC375.1, 18.6% identity; *Lathyrus monogasteris* [JGI_LMO_1P_020], 23.8% identity; *Insectifera* [JGI_I_1P_020], 30.1% identity; *Nectria haemaphysalis* [JGI_NH_1P_020], 27.6% identity; and *Rhizoctonia solani* strain Arima [JGI_RS_020], 22.6% identity. Percentages are indicated for the entire length of the protein sequences.

Results



CONCLUSIONS

[illegible]

2 Subcellular localization of LdTyrPIP₂₂ in *L. donovani* cells by microscopy

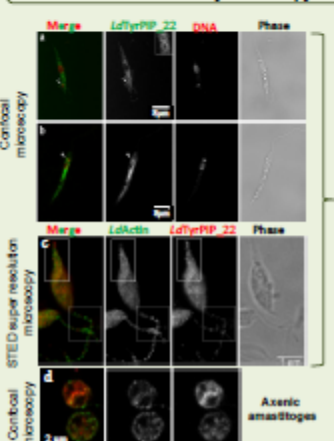


Fig. 4 (a, b) Confocal microscopy of axons in *A. dorsalis* parasitoides. (a) Staining of axons with parasiticide with 0.1% (a) Thioflavin-T (b) performed with an e-LysyPep 2000 (c) (d) (e) (f) (g) (h) (i) (j) (k) (l) (m) (n) (o) (p) (q) (r) (s) (t) (u) (v) (w) (x) (y) (z) (aa) (ab) (ac) (ad) (ae) (af) (ag) (ah) (ai) (aj) (ak) (al) (am) (an) (ao) (ap) (aq) (ar) (as) (at) (au) (av) (aw) (ax) (ay) (az) (ba) (bb) (bc) (bd) (be) (bf) (bg) (bh) (bi) (bj) (bk) (bl) (bm) (bn) (bo) (bp) (bq) (br) (bs) (bt) (bu) (bv) (bw) (bx) (by) (bz) (ca) (cb) (cc) (cd) (ce) (cf) (cg) (ch) (ci) (cj) (ck) (cl) (cm) (cn) (co) (cp) (cq) (cr) (cs) (ct) (cu) (cv) (cw) (cx) (cy) (cz) (da) (db) (dc) (dd) (de) (df) (dg) (dh) (di) (dj) (dk) (dl) (dm) (dn) (do) (dp) (dq) (dr) (ds) (dt) (du) (dv) (dw) (dx) (dy) (dz) (ea) (eb) (ec) (ed) (ee) (ef) (eg) (eh) (ei) (ej) (ek) (el) (em) (en) (eo) (ep) (eq) (er) (es) (et) (eu) (ev) (ew) (ex) (ey) (ez) (fa) (fb) (fc) (fd) (fe) (ff) (fg) (fh) (fi) (fj) (fk) (fl) (fm) (fn) (fo) (fp) (fq) (fr) (fs) (ft) (fu) (fv) (fw) (fx) (fy) (fz) (ga) (gb) (gc) (gd) (ge) (gf) (gg) (gh) (gi) (gj) (gk) (gl) (gm) (gn) (go) (gp) (gq) (gr) (gs) (gt) (gu) (gv) (gw) (gx) (gy) (gz) (ha) (hb) (hc) (hd) (he) (hf) (hg) (hh) (hi) (hj) (hk) (hl) (hm) (hn) (ho) (hp) (hq) (hr) (hs) (ht) (hu) (hv) (hw) (hx) (hy) (hz) (ia) (ib) (ic) (id) (ie) (if) (ig) (ih) (ii) (ij) (ik) (il) (im) (in) (io) (ip) (iq) (ir) (is) (it) (iu) (iv) (iw) (ix) (iy) (iz) (ja) (jb) (jc) (jd) (je) (jf) (jg) (jh) (ji) (jj) (jk) (jl) (jm) (jn) (jo) (jp) (jq) (jr) (js) (jt) (ju) (jv) (jw) (jx) (jy) (jz) (ka) (kb) (kc) (kd) (ke) (kf) (kg) (kh) (ki) (kj) (kk) (kl) (km) (kn) (ko) (kp) (kq) (kr) (ks) (kt) (ku) (kv) (kw) (kx) (ky) (kz) (la) (lb) (lc) (ld) (le) (lf) (lg) (lh) (li) (lj) (lk) (ll) (lm) (ln) (lo) (lp) (lq) (lr) (ls) (lt) (lu) (lv) (lw) (lx) (ly) (lz) (ma) (mb) (mc) (md) (me) (mf) (mg) (mh) (mi) (mj) (mk) (ml) (mm) (mn) (mo) (mp) (mq) (mr) (ms) (mt) (mu) (mv) (mw) (mx) (my) (mz) (na) (nb) (nc) (nd) (ne) (nf) (ng) (nh) (ni) (nj) (nk) (nl) (nm) (nn) (no) (np) (nq) (nr) (ns) (nt) (nu) (nv) (nw) (nx) (ny) (nz) (oa) (ob) (oc) (od) (oe) (of) (og) (oh) (oi) (oj) (ok) (ol) (om) (on) (oo) (op) (oq) (or) (os) (ot) (ou) (ov) (ow) (ox) (oy) (oz) (pa) (pb) (pc) (pd) (pe) (pf) (pg) (ph) (pi) (pj) (pk) (pl) (pm) (pn) (po) (pp) (pq) (pr) (ps) (pt) (pu) (pv) (pw) (px) (py) (pz) (qa) (qb) (qc) (qd) (qe) (qf) (qg) (qh) (qi) (qj) (qk) (ql) (qm) (qn) (qo) (qp) (qq) (qr) (qs) (qt) (qu) (qv) (qw) (qx) (qy) (qz) (ra) (rb) (rc) (rd) (re) (rf) (rg) (rh) (ri) (rj) (rk) (rl) (rm) (rn) (ro) (rp) (rq) (rr) (rs) (rt) (ru) (rv) (rw) (rx) (ry) (rz) (sa) (sb) (sc) (sd) (se) (sf) (sg) (sh) (si) (sj) (sk) (sl) (sm) (sn) (so) (sp) (sq) (sr) (ss) (st) (su) (sv) (sw) (sx) (sy) (sz) (ta) (tb) (tc) (td) (te) (tf) (tg) (th) (ti) (tj) (tk) (tl) (tm) (tn) (to) (tp) (tq) (tr) (ts) (tt) (tu) (tv) (tw) (tx) (ty) (tz) (ua) (ub) (uc) (ud) (ue) (uf) (ug) (uh) (ui) (uj) (uk) (ul) (um) (un) (uo) (up) (uq) (ur) (us) (ut) (uu) (uv) (uw) (ux) (uy) (uz) (va) (vb) (vc) (vd) (ve) (vf) (vg) (vh) (vi) (vj) (vk) (vl) (vm) (vn) (vo) (vp) (vq) (vr) (vs) (vt) (vu) (vv) (vw) (vx) (vy) (vz) (wa) (wb) (wc) (wd) (we) (wf) (wg) (wh) (wi) (wj) (wk) (wl) (wm) (wn) (wo) (wp) (wq) (wr) (ws) (wt) (wu) (wv) (ww) (wx) (wy) (wz) (xa) (xb) (xc) (xd) (xe) (xf) (xg) (xh) (xi) (xj) (xk) (xl) (xm) (xn) (xo) (xp) (xq) (xr) (xs) (xt) (xu) (xv) (xw) (xx) (xy) (xz) (ya) (yb) (yc) (yd) (ye) (yf) (yg) (yh) (yi) (yj) (yk) (yl) (ym) (yn) (yo) (yp) (yq) (yr) (ys) (yt) (yu) (yv) (yw) (yx) (yy) (yz) (za) (zb) (zc) (zd) (ze) (zf) (zg) (zh) (zi) (zj) (zk) (zl) (zm) (zn) (zo) (zp) (zq) (zr) (zs) (zt) (zu) (zv) (zw) (zx) (zy) (zz)

3 Biochemical subcellular localization of LdTyroP22 in *L. donovani* promastigotes

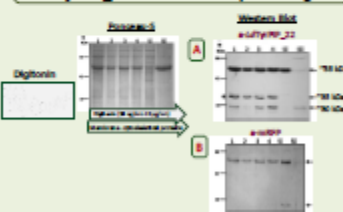


Fig. 5 Protein fractions (F1-F5) from transgenic *S. dicoccos* *myrPP2_2::mRFP* promoterless. The protein fractions produced by treating cell pellets with gradual increasing diglycine concentrations (protocol Foucher & Papadopoulos & S. M. Chabot, *J. Proteome Res.*, 2008, 5 [7], pp 1741-1750) were analyzed by SDS-PAGE (5% w/v) and immunoblotted with the mouse *antiPP2_2* (A) and the rabbit *antiPP1* (2.5 µg/ml) (B) pAbs. The same membrane was probed first with the *antiPP2_2* pAb and then, after stripping, with the *antiPP1* pAb. Proteomic & respective membrane regions (pR) are shown as loading indicators on the left.

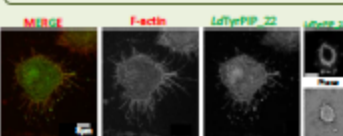
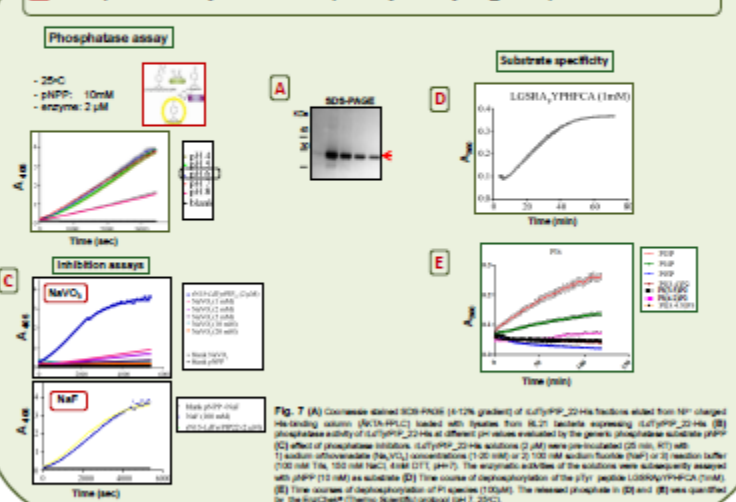
Ectopic expression of LaTyrPIP₂ in mammalian cells

Fig. 6 Heterologous expression of *GLYTPP_22-His* was performed in HeLa cells by transfection (2X 10⁵) with the pGFP1-*GLYTPP_22* plasmid. F-actin was detected by phalloidin-Alexa 568 and *GLYTPP_22-His* by β -staining with a monoclonal α -His Ab and a 2 μ anti-mouse-Alexa 488 Ab. Images were acquired with a TCS-SP1 Laser confocal microscope.

5 Phosphatase activity and substrate specificity of rLTyrPIP₂₂-His produced in bacteria

[illegible]

Funding:

1) The Green Secretariat for Research and Technology's (GSRRT) "Development Proposals of Research Organizations (KOPRO)" is financed by the Federal Republic and the European Union-European Regional Development Fund in the context of the D.F. Competitiveness and Entrepreneurship (EFW) and the KOPRO Mandate in Thuringe

Biochemical and functional characterization of the Phosphatase *Ld*TyrPIP₂₂ from *Leishmania donovani*

Olympia Tziouvara¹, Amalia Papadaki¹, Anastasia Kotopoulou¹, Anargyros Doukas¹, Pablos Rios³, Maja Köhn³, Haralabia Boleti^{1,2}

¹ Intracellular Parasitism group, Laboratory of Molecular Parasitology, Microbiology Dep., Hellenic Pasteur Institute, Athens, Greece

² Light Microscopy unit, Hellenic Pasteur Institute, Athens, Greece

³ Köhn Group, Genome Biology Research Unit, European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, Germany

Introduction

The protozoan pathogen *Leishmania donovani* (class: kinetoplastida) is one of the causative agents of visceral leishmaniasis (kala-azar), a disease that affects the hematopoietic organs liver, spleen and bone marrow and is fatal if not treated. The disease is transmitted to humans through the bite of infected phlebotomine sandflies.

Many human pathogens' pathogenicity and virulence depends on the modulation of the host phospholipase (PL) metabolism. While PL phosphatases from bacterial pathogens that modulate PL metabolism in the host constitute already attractive targets for chemotherapy [1] this aspect is poorly addressed for intracellular protozoan pathogens.

The *Leishmania* phosphatome contains a subgroup of Atypical Dual Specificity and Lipid Phosphatases with no human homologues that share similar catalytic Hisp motif and are homologous to the virulence factors Mplp1 and LpA. PL phosphatases from *Mycobacterium tuberculosis* and *Leishmania* protozoans respectively [2,3,4]. A member of this family from *L. donovani*, is the gene product of the *LD8P_220120* gene, which is named in our work as *Ld*TyrPIP₂₂.

The *LD8P_220120* gene product is highly conserved amongst *Leishmania* species (85-99% identity) and shares significant identity (15-29%) with protein tyrosine phosphatases and PL phosphatases from pathogenic bacteria two of which (LpA from *Leishmania* protozoans & Mplp1 from *Mycobacterium tuberculosis*) are considered druggable enzyme targets.

Work by Kotopoulou et al. and Papadaki et al. [5,6] in our lab has shown that the endogenous *Ld*TyrPIP₂₂ is located in soluble, membrane and cytoskeleton enriched protein fractions from *L. donovani* and partially colocalizes with lactacin in the cell body and flagellum of *L. donovani* promastigotes.

*Ld*TyrPIP₂₂ when ectopically expressed in mammalian cells is located in the plasma membrane and colocalizes with actin in labelipodia and filopodia (Fig 3).

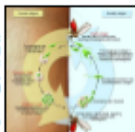


Fig. 1. *Leishmania* life cycle (Schnitzler/Blumen)

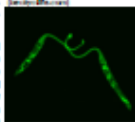


Fig. 2. *L. donovani* promastigotes immunolabeled for *Ld*TyrPIP₂₂ with specific anti-*Ld*TyrPIP₂₂ Ab (confocal microscopy images by G. Boleti)

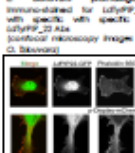


Fig. 3. Heterologous expression of *Ld*TyrPIP₂₂-GFP in mammalian cells (confocal microscopy data by A. Kotopoulou & A. Boleti)

Does *Ld*TyrPIP₂₂ overexpression lead to higher parasite infectivity? In vitro infectivity assays

We constructed transgenic parasites stably overexpressing *Ld*TyrPIP₂₂ tagged with RFP (Fig. 5). The *L. donovani*-*Ld*TyrPIP₂₂-RFP parasites were used to infect J774 mouse macrophages to examine a possible role of *Ld*TyrPIP₂₂ in parasite infectivity.

Methodology
L. donovani promastigote cultures of stationary phase of growth were incubated with macrophages for 1 hr at 37°C in 20:1 parasite:macrophage ratio. The parasites were then removed and the macrophages further incubated at 37°C for 3 hrs. Intracellular and extracellular parasites were stained with different fluorochromes with the use of Triton-X 100 [7]. The icy software was used to count macrophages and intracellular parasites. Preliminary results of the infectivity assay are shown in Fig. 6.

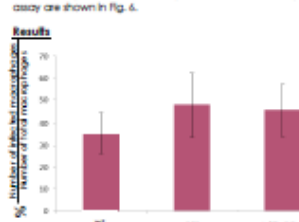


Fig. 6. The infectivity index was calculated by counting more than 200 macrophages per case in 3 independent experiments. Error bars are S.D. Two-tailed paired Student's t test was performed. The differences were not statistically significant.

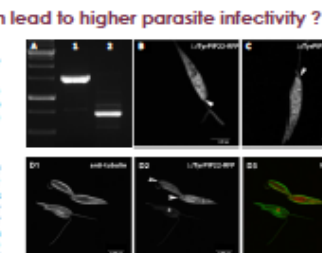


Fig. 7. Confocal microscopy images of *Ld*TyrPIP₂₂-RFP parasites. The images show the localization of the protein in the cell body and flagellum.



Fig. 8. Schematic representation of the infectivity assay protocol.

Is *Ld*TyrPIP₂₂ a phosphatase? Phosphatase activity-Substrate specificity

Recombinant bacterially expressed *Ld*TyrPIP₂₂-His has phosphatase activity and specifically dephosphorylates Phyr, P[3]P and P[4]P

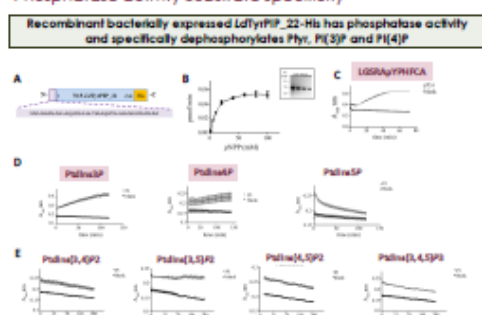


Fig. 9. Kinetic analysis of recombinant bacterially expressed *Ld*TyrPIP₂₂. (A) Schematic representation of the *Ld*TyrPIP₂₂ recombinant protein structure used in the study. (B) Michaelis-Menten saturation curve for the enzymatic reaction (25°C, pH 7) of the His-LdTyrPIP₂₂ (2 μM) using the pNPP (0.3-100 mM) as substrate. (C) Lineweaver-Burk plot of the His-LdTyrPIP₂₂ (2 μM) using the pNPP (0.3-100 mM) as substrate. (D) Phosphatase activity of His-LdTyrPIP₂₂ (2 μM) using specific Phosphatase (Phyr) substrate (2 μM) in reaction buffer (100 mM NaCl, 100 mM NaHCO₃, 100 mM Tris, pH 7), at 25°C. (E) Phosphatase activity of His-LdTyrPIP₂₂ (2 μM) using Phyr (100 μM) in the same reaction conditions. The assays were performed by using the method of [8] (data from A. Papadaki, A. Kotopoulou and A. Boleti).

Construction of plasmids for expression of recombinant *Ld*TyrPIP₂₂-His in *Leishmania* cells

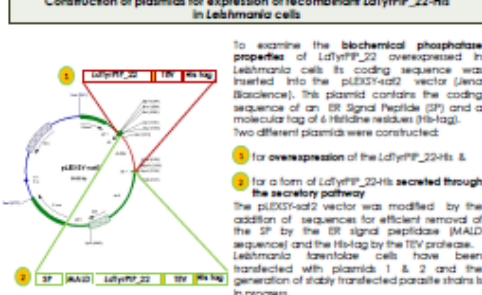


Fig. 10. Schematic representation of the *Ld*TyrPIP₂₂ recombinant protein structure.

Is *Ld*TyrPIP₂₂ secreted in promastigote culture? Secretion Assay

Part of the functional characterization of *Ld*TyrPIP₂₂ was to determine whether or not it is secreted from the parasite.

Methodology (A)
L. donovani promastigotes in stationary phase of growth were incubated at 25°C for 6 hrs in medium w/o PBS. The supernatant containing material secreted from the parasites was separated from the cells via centrifugation and the proteins were precipitated with acetone. (B) Protein samples were analyzed by SDS-PAGE and WB using specific Abs.

Results
*Ld*TyrPIP₂₂ was detected as secreted. Additionally, an *L. donovani* secreted (according to the literature) protein was detected as secreted in our assay. A nuclear protein, H2B, was detected as expected only in the cell pellet fraction.

Future work

Secretion assays with promastigote cultures of 37°C and acidic amastigote cultures are in progress.

Is *Ld*TyrPIP₂₂ secreted in promastigote culture? Secretion Assay

Part of the functional characterization of *Ld*TyrPIP₂₂ was to determine whether or not it is secreted from the parasite.

Methodology (A)
L. donovani promastigotes in stationary phase of growth were incubated at 25°C for 6 hrs in medium w/o PBS. The supernatant containing material secreted from the parasites was separated from the cells via centrifugation and the proteins were precipitated with acetone. (B) Protein samples were analyzed by SDS-PAGE and WB using specific Abs.

Results
*Ld*TyrPIP₂₂ was detected as secreted. Additionally, an *L. donovani* secreted (according to the literature) protein was detected as secreted in our assay. A nuclear protein, H2B, was detected as expected only in the cell pellet fraction.

Future work

Secretion assays with promastigote cultures of 37°C and acidic amastigote cultures are in progress.

Conclusions-Future Prospects

- Bacterially expressed *Ld*TyrPIP₂₂ is an active phosphatase that dephosphorylates Phyr, P[3]P & P[4]P.
- Transgenic *L. tarentolae* *Ld*TyrPIP₂₂-His generation is in progress. The recombinant *Ld*TyrPIP₂₂-His will be used for further structural and biochemical characterization of this phosphatase.
- Overexpression of *Ld*TyrPIP₂₂ does not result in increased infectivity in vitro cell based infection assays.
- Endogenous *Ld*TyrPIP₂₂ was not detected as secreted in *L. donovani* promastigote cultures at 25°C. The possibility of secretion in infected macrophages is under investigation.
- Design and generation of *Ld*TyrPIP₂₂ knock out parasites is planned.

Literature cited

1. Chen, L., et al. "Identification and characterization of novel inhibitors of mPPE, an essential lipid phosphatase from *Leishmania* kinetoplasts." *PLoS ONE* 11 (2016): e0155555.
2. Borek, M., et al. "A new family of phosphatidyl phosphatases in *Leishmania* kinetoplasts and *Trypanosoma* mitochondria." *BMC Genomics* 11 (2010): 1.
3. Borek, M., et al. "The *Leishmania* phosphatase family: a new family of phosphatidyl phosphatases in *Leishmania* kinetoplasts and *Trypanosoma* mitochondria." *BMC Genomics* 11 (2010): 1.
4. Geller, R., et al. "A new family of phosphatidyl phosphatases in *Leishmania* kinetoplasts and *Trypanosoma* mitochondria." *BMC Genomics* 11 (2010): 1.
5. Papadaki, A., et al. "Biochemical characterization and substrate specificity of the *Leishmania* phosphatase *Ld*TyrPIP₂₂ in infected macrophages." *PLoS ONE* 12 (2017): e0171111.
6. Papadaki, A., et al. "The *Leishmania* phosphatase *Ld*TyrPIP₂₂ in infected macrophages." *PLoS ONE* 12 (2017): e0171111.
7. Papadaki, A., et al. "The *Leishmania* phosphatase *Ld*TyrPIP₂₂ in infected macrophages." *PLoS ONE* 12 (2017): e0171111.
8. Papadaki, A., et al. "The *Leishmania* phosphatase *Ld*TyrPIP₂₂ in infected macrophages." *PLoS ONE* 12 (2017): e0171111.