

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

<< ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ ΕΝΑΝΤΙ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ ΤΟΥ
ΕΝΔΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΟΥ ΔΙΚΤΥΟΥ ΒΙΡ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ P_bMP1 ΤΟΥ
Plasmodium Berghei>>



ΛΕΩΤΣΑΚΟΣ ΜΙΧΑΗΛ

A.M. 1520

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΥΠΟΔΟΧΗΣ: Τ. ΛΟΥΚΕΡΙΣ LAB FORTH IMBB

ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΕΡΕΥΝΗΤΗΣ: ΛΟΥΚΕΡΗΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ

ΥΠΕΥΘΗΝΟ ΜΕΛΟΣ ΔΕΠ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ Π.Κ.: ΚΟΚΚΙΝΙΔΗΣ ΜΙΧΑΗΛ

ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2012

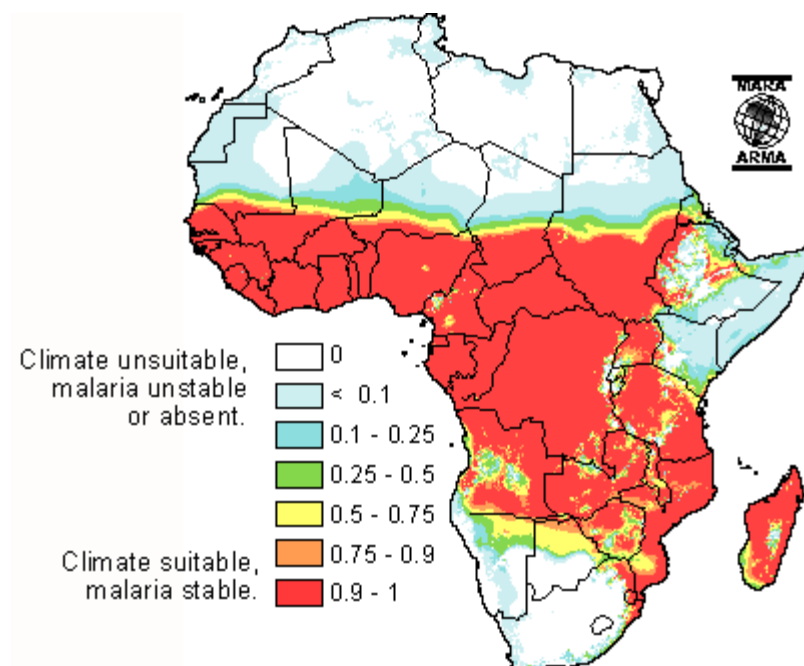
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η Ελονοσία είναι μία μολυσματική ασθένεια των ανθρώπων και άλλων θηλαστικών που προκαλείται από πρώτιστα του γένους *Plasmodium* . Τα πρώτιστα αρχικά

μολύνουν το συκώτι, ενώ στη συνέχεια προσβάλλουν τα ερυθρά κύτταρα προκαλώντας έτσι και τα συμπτώματα της ασθένειας. Συνήθως περιλαμβάνουν πυρετό και πονοκέφαλο και σε πιο σοβαρές περιπτώσεις κώμα και θάνατο. Πέντε είδη του *Plasmodium* μπορούν να μολύνουν και να μεταδοθούν από τους ανθρώπους. Σοβαρή εμφάνιση της **Ελονοσίας** προκαλείται κυρίως από τα παράσιτα του γένους *P.falciparum*, ενώ προκαλείται επίσης από τα *P.vivax*, *P.ovale* και *P. Malariae* χωρίς μοιραία συμπτώματα. Το *P.bergei* είναι μολυσματικό και προσβάλλει μόνο τα τρωκτικά. Η **Ελονοσία** επικρατεί κυρίως σε τροπικές περιοχές, επειδή η μεγάλη συχνότητα βροχών, οι υψηλές θερμοκρασίες και η υψηλή υγρασία σε συνδυασμό με τα στάσιμα νερά που ωριμάζουν οι προνύμφες των κουνουπιών, τους παρέχουν το περιβάλλον που χρειάζονται για συνεχόμενη αναπαραγωγή. Η ασθένεια αυτή αποτελεί απειλή για τις αναπτυσσόμενες χώρες, ειδικότερα για αυτές που βρίσκονται στη περιοχή της υπό-Σαχάριας Αφρικής και της Ασίας, προκαλώντας περίπου ένα εκατομμύριο θανάτους κάθε χρόνο, οι οποίοι αναλογούν κυρίως σε ένα μοναδικό είδος παρασίτου, το *Plasmodium falciparum*. Η πολυπλοκότητα της βιολογίας του παρασίτου της **Ελονοσίας** αποτέλεσε ερέθισμα για την επιστημονική κοινότητα για περίπου έναν αιώνα και αποτελεί ένα σημαντικό εμπόδιο στην κατασκευή ενός πλήρους προστατευτικού εμβολίου. Παρά τη ξεκάθαρη ανάγκη δεν έχει γίνει ακόμη εφικτή η δημιουργία ενός αποτελεσματικού εμβολίου παρά μόνο φάρμακα πρόληψης ενάντια στη Μαλάρια. Ένα σημαντικό μέρος της πολυπλοκότητας που σχετίζεται με το κύκλο ζωής του παρασίτου οφείλεται στην ικανότητα του παρασίτου να α) αλλάζει τη μοριακή και κυτταρική του κάλυψη, η οποία ελέγχεται από περισσότερα από 5000 αναγνωρισμένα γονίδια β) αναπτύσσεται σε ενδοκυτταρικές και εξωκυτταρικές κόγχες στο θηλαστικό-ξενιστή και στο κουνούπι-φορέα.

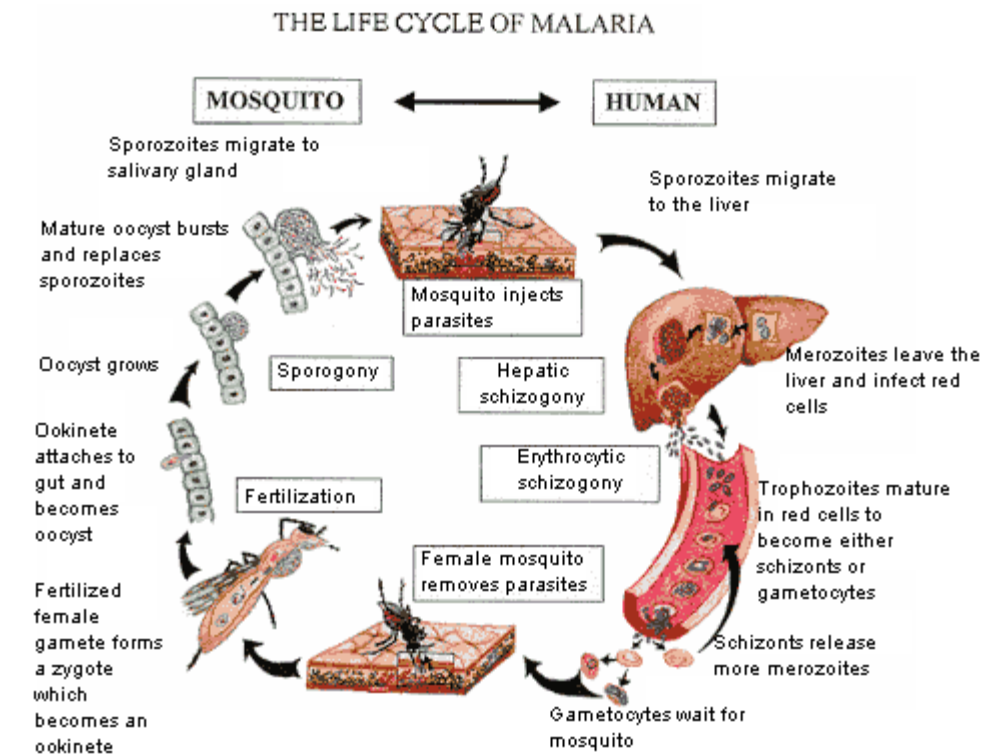
Οι συνεχόμενες εναλλαγές του περιβάλλοντος του ξενιστή από την άλλη μεριά σχετίζονται με σοβαρές απώλειες του παρασίτου της **Ελονοσίας**, οδηγώντας σε μεγάλες διακυμάνσεις στη πληθυσμιακή του πυκνότητα. Αυτό οφείλεται κυρίως στη δράση των αμυντικών μηχανισμών του ξενιστή που ενεργοποιούνται ενάντια στη μόλυνση. Τα στάδια του παρασίτου που υποφέρουν σοβαρές απώλειες είναι

αυτά του ωοκινέτη και του σποροζωιδίου , όπου και τα δύο σχηματίζονται και μεταναστεύουν στο εσωτερικό του φορέα, δηλαδή του εντόμου.(1)



Ο κύκλος ζωής του παρασίτου

Ο κύκλος ζωής του παρασίτου ξεκινά από τα θηλυκά κουνούπια του γένους των ανωφελών, όταν αυτά προσλάβουν αίμα μολυσμένο με παράσιτα. Μέσα στο έντομο αρχίζει ο διπλοειδής κύκλος ζωής του παρασίτου. Τα γαμετοκύτταρα που υπάρχουν στο μολυσμένο αίμα παράγουν θηλυκούς και αρσενικούς μικρογαμέτες. Το προϊόν της γονιμοποίησης ενός θηλυκού από ένα αρσενικό γαμέτη είναι το ζυγωτό το οποίο μετασχηματίζεται σε ωοκινέτες 16-20 ώρες μετά τη λήψη του μολυσμένου αίματος. Ο ωοκινέτης είναι το μόνο στάδιο που δεν προηγείται στάδιο αντιγραφής και γι' αυτό ο αριθμός των ωοκινετών είναι άμεσο προϊόν των γεγονότων γονιμοποίησης. Οι ωοκινέτες έχουν τη δυνατότητα κίνησης και διαπερνούν το εντερικό επιθήλιο του κουνουπιού από την ακραία προς τη βασική πλευρά. Αυτό το στάδιο της εισβολής συνοδεύεται από μεγάλη απώλεια του αριθμού των ωοκινετών εξαιτίας της παρέμβασης των προστατευτικών μηχανισμών του ξενιστή. Οι ωοκινέτες που επιβιώνουν μετατρέπονται σε ωοκύστες. Οι ωοκύστες είναι το μόνο αναπτυξιακό στάδιο του παρασίτου που αυξάνεται εξωκυτταρικά και έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία των σποροζωιδίων μέσω ενός μειωτικού κύκλου και αρκετών μιτωτικών που λαμβάνουν χώρα στις ωοκύστες. Τα σποροζωίδια δέκα μέρες μετά την είσοδο του παρασίτου ελευθερώνονται στο αιμόκοιλο και μεταναστεύουν στους σιελογόνους αδένες όπου και εισβάλλουν. Και σε αυτό το στάδιο παρατηρείται σημαντική απώλεια παρασίτων. Ο κύκλος στο κουνούπι ολοκληρώνεται σε αυτό το στάδιο όπου το κουνούπι με το επόμενο τσίμπημα μεταφέρει παθογόνα σποροζωίδια στο ξενιστή. Μέσα στο ξενιστή λαμβάνει χώρα ο απλοειδής κύκλος ζωής του παρασίτου. Τα σποροζωίδια εισβάλλουν τα ηπατικά κύτταρα και αναπτύσσονται σε schizonts από τα οποία τελικά απελευθερώνονται τα μεροζωίδια, που ελευθερώνονται στη κυκλοφορία του αίματος και προσβάλλουν τα ερυθροκύτταρα. Στα ερυθροκύτταρα τα μεροζωίδια πολλαπλασιάζονται και κάποια από αυτά διαφοροποιούνται σε γαμετοκύτταρα, τα οποία και προσλαμβάνονται από το κουνούπι όταν αυτό τσιμπήσει τον ξενιστή, ξεκινώντας έτσι ξανά το προηγούμενο κύκλο (2).



Ο ρόλος της SOAP protein

Όπως προαναφέρθηκε ένα ζωτικό αλλά όχι τόσο κατανοητό κομμάτι της μετάδοσης της Ελονοσίας από τα κουνούπια είναι η ανάπτυξη των ωοκινετών και ο μετασχηματισμός τους σε ωοκύστες. Για τον επιτυχή σχηματισμό των ωοκύστεων θα πρέπει οι ωοκινέτες να εισβάλουν στο μεσεντερικό επιθήλιο του κουνουπιού. Σημαντικό ρόλο στην παραπάνω διαδικασία παίζουν ειδικά εκκριντικά οργανίδια στη κορυφή των ωοκινετών, τα οποία ονομάζονται μικρονημάτια. Μία πρωτεΐνη των μικροκτηματίων με μεγάλη σημασία για την διείσδυση του ωοκινέτη στο μεσεντερικό επιθήλιο είναι η εκκρινόμενη πρωτεΐνη SOAP. Η απουσία ομόλογων πρωτεϊνών σε άλλους οργανισμούς άλλωστε επισημαίνει τη μοναδικότητα της λειτουργίας της πρωτεΐνης SOAP στο παράσιτο της ελονοσίας. (Dessens et al., 2003). Κυριότερη ωστόσο ένδειξη για τη σημασία του ρόλου της στην ολοκλήρωση του κύκλου ζωής του παράσιτου στο κουνούπι αποτελεί η παραγωγή διαγονιδιακών παρασίτων στα οποία το γονίδιο PbSOAP δεν εκφράζεται. Οι ωοκινέτες που δεν

εκφράζουν SOAP φαίνεται να έχουν μειωμένη κινητικότητα, ενώ παράλληλα δεν μπορούν να διεισδύσουν το μεσεντερικό επιθήλιο και τελικά να μετασηματιστούν σε ωκύστεις. In vitro πειράματα έδειξαν ότι πιθανά η έλλειψη μολυσματικότητας των διαγονιδιακών παρασίτων να οφείλεται στο γεγονός ότι δεν μπορούν να αλληλεπιδράσουν με την λαμινίνη του ξενιστή στην διάρκεια της διείσδυσης του μεσεντερικού επιθηλίου (Ally, Vaughan, & Karpe, 2010).

Περιγραφή και ρόλος της πρωτεΐνης BiP

Το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) παίζει σημαντικό ρόλο στη βιογένεση των πρωτεϊνών, στη μετάδοση σήματος και στην ομοιόσταση του ασβεστίου στα ανθρώπινα κύτταρα. Οι εκκρινόμενες και διαμεμβρανικές πρωτεΐνες πακετάρονται και συναρμολογούνται στο ER και μεταφέρονται στη λειτουργική τοποθεσία τους μέσω κυστιδίων μεταφοράς. Επιπλέον το ER αποτελεί το κυριότερο οργανίδιο συσσώρευσης ασβεστίου και συμμετέχει σε αρκετά μονοπάτια μεταγωγής σήματος. Σημαντικό ρόλο σε όλες τις παραπάνω διαδικασίες παίζουν οι σαπερωνες (chaperones), οι οποίες είναι πρωτεΐνες που βοηθούν στη μη ομοιοπολική αναδίπλωση ή αποδιάταξη πρωτεϊνών και στη σύνδεση ή στο διαχωρισμό τους από άλλες μικρομοριακές δομές (Richardson et al., 2006), (Alekseev et al., 2009). Μία κύρια λειτουργία των σαπερονών είναι να εμποδίσουν ταυτόχρονα τις νεοσυντιθέμενες πολυπεπτιδικές αλυσίδες και τα συνδεδεμένα υποτιμήματα από το να συναθροιστούν σε μη λειτουργικές δομές, όπως για παράδειγμα γίνεται στην περίπτωση θερμικού σοκ (heat shock). Σε αυτή την περίπτωση οι σαπερωνες ονομάζονται σαπερωνες θερμικού σοκ (heat shock chaperones ή hsp). (Kris Pauwels et al., 2007).

Μια σημαντική πρωτεΐνη που ανήκει στην παραπάνω οικογένεια είναι η πρωτεΐνη BiP. (Dudek et al., 2009). Η BiP (Binding immunoglobulin protein) αλλιώς 78 kDa glucose-regulated protein (GRP-78) ή heat shock 70 kDa protein είναι ένα HSP70 μόριο σαπερώνης που εντοπίζεται στον αγωγό του ενδοπλασματικού δικτύου σε σημαντικές συγκεντρώσεις που προσεγγίζουν την τάξη των mill molar. Η BiP συμμετέχει στην μεταφορά πρωτεϊνών μέσα στο ενδοπλασματικό δίκτυο, ενώ παίζει και σημαντικό ρόλο στον ολιγομερισμό των νεοσυντιθέμενων πεπτιδίων καθώς αυτά μετατίθενται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στην γλυκοζυλίωση τους.

Παράλληλα η BiP φαίνεται να συμμετέχει και στην ομοιόσταση του ασβεστίου. (Ting, Lee, 1988), (Hendersot et al., 1994).

Όσον αφορά το ρόλο της BiP στη μεταφορά πρωτεϊνών στο ER, η πρωτεΐνη φαίνεται 1) να συμμετέχει στην εισαγωγή πρόδρομων πολυπεπτιδίων στο σύμπλοκο Sec61 2) να προσδένεται στο εισερχόμενο πρόδρομο πολυπεπτίδιο και να λειτουργεί ως μοριακός αναστολέας, διευκολύνοντας την ολοκλήρωση της μετατόπισης. 3) να συμμετέχει στο μπλοκάρισμα του καναλιού Sec61 επηρεάζοντας την εκροή των ιόντων καλίου από το ER κατά τη διάρκεια μετατόπισης της πρωτεΐνης.

Η πρωτεΐνη BiP έχει σημαντικό ρόλο στο πακετάρισμα και στη σύνδεση των πρωτεϊνών που βρίσκονται στο εσωτερικό του ER. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ο ρόλος της BiP ως γ συμπαράγοντας της ανοσογλοβίνης. Στην περίπτωση αυτή η CH1 επικράτεια (domain) της ανοσογλοβίνης επιδιώκει στη πρόσδεση από τη BiP για την επιτυχή αλληλεπίδραση με την ελαφριά αλυσίδα κατά τη σύνδεση της ανοσογλοβίνης.

Παράλληλα ωστόσο με τα παραπάνω η BiP συμβάλει στην εξαγωγή και στην αποδιάταξη των πρωτεϊνών, οι οποίες δεν έχουν υποστεί σωστή αναδίπλωση, από το ενδοπλασματικό δίκτυο στο κυτταρόπλασμα.

Η παρουσία σε μεγάλο ποσοστό αποδιαταγμένων πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο επάγει ένα μηχανισμό στρες στο κύτταρο, που ονομάζεται Unfolded Protein Response (UPR). Στην περίπτωση αυτή η BiP φαίνεται να είναι η πρωτεΐνη που ενεργοποιεί τον παραπάνω μηχανισμό. Συγκεκριμένα σε φυσιολογικές συνθήκες η BiP φαίνεται να αλληλεπιδρά και να κρατά έτσι ανενεργά τα τρία βασικά μόρια-ρυθμιστές της παραπάνω διαδικασίας, τον μεταγραφικό παράγοντα ATF6, και τις κινάσες PERK και IRE1a. Παρουσία ερεθισμάτων στρες ωστόσο η BiP αλληλεπιδρά με τις αποδιαταγμένες πρωτεΐνες του ενδοπλασματικού δικτύου απελευθερώνοντας έτσι τους παραπάνω παράγοντες. Έτσι ο μεταγραφικός παράγοντας ATF6 οδηγείται στο Golgi από όπου και οδηγείται στον πυρήνα μετά από πρωτεόλυση από τις πρωτεάσες S1P και S2P. Η απελευθέρωση κατά αντιστοιχία της PERK κινάσης οδηγεί στην φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση ενός

αλλού μεταγραφικού παράγοντα (elf2a), ενώ η απελευθέρωση της IRE1a κινάσης από την BiP οδηγεί στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα XBP1.

ΡΥΘΜΙΖΟΜΕΝΗ ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΗ ΠΡΩΤΕΟΛΥΣΗ (RIP) ΚΑΙ ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ

ΠΡΩΤΕΑΣΩΝ

Η ρυθμιζόμενη διαμεμβρανική πρωτεόλυση (RIP) αποτελεί ένα μηχανισμό μεταγωγής σήματος, ο οποίος είναι κοινός σε όλες τις μορφές ζωής. Στη διαδικασία του RIP, πρωτεΐνες που είναι ενσωματωμένες στη μεμβράνη διασπών διαμεμβρανικά (TMH) τμήματα σηματοδοτικών πρωτεϊνών απελευθερώνοντας έτσι τμήματα τους στο κυτταρόπλασμα κι επάγοντας με αυτό τον τρόπο ποικίλες βιολογικές αποκρίσεις. Η διαδικασία της RIP ρυθμίζει διαφορετικές διεργασίες σε μία μεγάλη ποικιλία οργανισμών και καταλύεται από διαφορετικές οικογένειες πρωτεασών, τις μεταλλοπρωτεασες τις aspartyl-πρωτεασες και τις σερινοπρωτεασες. Η σημαντικότερη διαφορά ανάμεσα σε αυτές τις πρωτεασες αφορά τον μηχανισμό πρωτεόλυσης τους που καθορίζει και τα υποστρώματα τους . Οι σερινοπρωτεασες πρωτεολύουν διαμεμβρανικές πρωτεΐνες τύπου I (καρβοξυτελικό άκρο βρίσκεται στην μεμβράνη), ενώ οι μεταλλοπρωτεασες πρωτεολύουν διαμεμβρανικές τύπου II (το αμινοτελικό άκρο βρίσκεται στην μεμβράνη). Αντίθετα οι aspartyl-πρωτεασες μπορούν να πρωτεολύουν και τους δυο τύπους διαμεμβρανικών πρωτεϊνών.

Ο σημαντικότερος αντιπρόσωπος των aspartyl-πρωτεασών είναι οι SPP(signal peptide peptidases), που είναι έτσι υπεύθυνες για την ωρίμανση των εκκρινόμενων και των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών μέσω απομάκρυνσης του σηματοδοτικού πεπτιδίου. Δεύτερη αντιπροσωπευτική οικογένεια είναι αυτή των presenilins, ο πιο χαρακτηρισμένος ρόλος των οποίων είναι η πρωτεόλυση του APP (amyloid protein precursor).

Στην οικογένεια των μεταλλοπρωτεασών χαρακτηριστικός αντιπρόσωπος είναι η πρωτεάση S2P. Χαρακτηρίστηκε αρχικά στον άνθρωπο ως η πρωτεάση που ευθύνεται για την απελευθέρωση του παράγοντα SREBP από την μεμβράνη και την ρύθμιση έτσι του μεταβολικού μονοπατιού της χοληστερόλης. Σημαντικό ρόλο έχει και στο μονοπάτι που επάγεται από συνθήκες στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Μάλιστα παρόμοιο ρόλο σε αντίστοιχο μονοπάτι φαίνεται να έχει και στο βακτήριο *E.coli*, όπου η ομόλογη πρωτεάση ονομάζεται RsEP και οδηγεί στην απελευθέρωση του σ μεταγραφικού παράγοντα στο κυτταρόπλασμα του βακτηρίου και την απόκριση τελικά του τελευταίου σε ερεθίσματα στρες.

Στην οικογένεια των σερινοπρωτεασών χαρακτηριστικότεροι αντιπρόσωποι είναι οι πρωτεασες της οικογένειας των rhomboids. Στην *Drosophila* αυτές παίζουν σημαντικό ρόλο σε αναπτυξιακές διαδικασίες που αφορούν την ωρίμανση και απελευθέρωση του παράγοντα ανάπτυξης EGFR.

Ο μηχανισμός της ρυθμιζόμενης διαμεμβρανικής πρωτεόλυσης παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση σημαντικού αριθμού μικροοργανισμών, τόσο προκαρυωτικών όσο και ευκαρυωτικών.

Στην περίπτωση των προκαρυωτών έχουν χαρακτηριστεί σε πολλές περιπτώσεις μονοπάτια ρυθμιζόμενης διαμεμβρανικής πρωτεόλυσης στα οποία συμμετέχουν ομόλογα της S2P πρωτεάσης. Τέτοια παραδείγματα βρίσκει κανείς στο *M. Tuberculosis* και στο *Pseudomonas aeruginosa*. Και στις δυο περιπτώσεις η μεταλλοπρωτεάση φαίνεται να απελευθερώνει μεταγραφικούς παράγοντες στο κυτταρόπλασμα βακτηρίων επάγοντας έτσι την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την παθογονικότητα του οργανισμού. Στην περίπτωση του *Pseudomonas aeruginosa* η ανάπτυξη ανθεκτικών σε αντιβιοτικά στελέχη επιτυγχάνεται με μεταφορά πλασμιδίων από βακτήριο σε βακτήριο. Η ένωση των κυττάρων ενεργοποιείται με την παραγωγή φερομονών που απελευθερώνονται μετά από πρωτεόλυση από την ομόλογη S2P (Kinch, Ginalska, & Grishin, 2006).

Παρόμοιο ρόλο παίζουν και rhomboid πρωτεάσες στο βακτήριο *Providencia stuartii*. Συγκεκριμένα σε αυτή την περίπτωση η πρωτεάση ενεργοποιεί μονοπάτια που μειώνουν ή επάγουν την αύξηση του οργανισμού ανάλογα με την πυκνότητα του συνολικού πληθυσμού (μηχανισμός quorum sensing).

Ο μηχανισμός της ρυθμιζόμενης ενδομεμβρανικής πρωτεόλυσης παίζει σημαντικό ρόλο και στη διείσδυση παρασίτων του φύλου Apicomplexa στο κύτταρο ξενιστή τους. Συγκεκριμένα στην περίπτωση του παρασίτου *Toxoplasma gondii* η πρωτεάση TgROM5 (ανήκει στην οικογένεια των rhomboids) είναι υπεύθυνη για την πρωτεόλυση των adhesins του κυττάρου ξενιστή. Στην περίπτωση του παρασίτου της ελονοσίας *P.falciparum* παρόμοιο ρόλο παίζει κυρίως η PfROM4 στην είσοδο των μεροζωιδίων στο ερυθρό αιμοσφαίριο. Παράλληλα στην παραπάνω διαδικασία σημαντικό ρόλο φαίνεται να παίζει και μια aspartyl-πρωτεάση, που ανήκει στην οικογένεια των presenilins.(K.Lemberg, 2011)

Δεδομένου της σημασίας που φαίνεται να παίζει η RIP στα προκαρυωτικά παθογόνα, άλλα και στα παράσιτα αποφασίσαμε να μελετήσουμε πιθανούς ρόλους του μηχανισμού της S2P πρωτεόλυσης στο παράσιτο *P.berghei*. Αναζήτηση στην αλληλουχία του πλασμίδιου (*P.berghei*) για ομόλογα με το S2P γονίδια έδειξε ότι σε αυτό υπάρχουν δυο ομόλογα γονίδια με κωδικούς πρόσβασης PBANKA_136250 και PBANKA_140410 τα οποία και ονομάσαμε PbMP1 και PbS2P, λόγω της μεγαλύτερης ομολογίας του δεύτερου με S2Ps άλλων οργανισμών. Στο δεύτερο μέρος της παρακάτω εργασίας παρουσιάζεται η ανάπτυξη μιας σειράς μοριακών εργαλείων που θα βοηθήσουν στον χαρακτηρισμό της λειτουργίας του γονιδίου PbMP1. (Urban , 2009)

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Μοριακές τεχνικές

Ανάλυση και απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Τα μόρια DNA διαχωρίστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα 1XTBE σε πήκτωμα αγαρόζης. Με αυτόν τον τρόπο εκτιμήθηκε η ποσότητα και η ποιότητα του DNA καθώς και το μέγεθός τους. Προκειμένου να βρεθεί το μέγεθος των μορίων DNA που αναλύθηκαν στο πήκτωμα συγκρίθηκε το ηλεκτροφορητικό τους πρότυπο με αυτό του λsty1 και puc. Για την απομόνωση τμημάτων DNA μετά από διαχωρισμό τους σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε το ειδικό kit QIAEXII.

Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων

Τα επιδεκτικά κύτταρα έγιναν με την χημική- συμβατική μέθοδο του χλωριούχου ασβεστίου. Χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω βακτηριακά στελέχη *E.coli* : DH5α , και BL21. Τα δύο τελευταία χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή πρωτεϊνών. Το στέλεχος BL21 εκφράζει την T7 πολυμεράση η οποία προσδέεται στον T7 υποκινητή των πλασμιδιακών φορέων έκφρασης.(3)

Μέθοδοι τροποποίησης μορίων DNA

Για τον σχηματισμό πλασμιδιακών κατασκευών που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα που περιγράφηκαν, τα μόρια DNA τροποποιήθηκαν με δύο κυρίως τρόπους. Με αντιδράσεις πέψης με μόρια περιοριστικών ενδονουκλεασών καθώς και με τη σύνδεση μορίων DNA με το ένζυμο T4 DNA λιγάση.

Πλασμίδια	Εκκινητές	Σκοπός
1. PbMP1 in PL001	PbMPK/D5'-F PbMPK/D5'-R PbMPK/D3'-F PbMPK/D3'-R	Παραγωγή διαγονιδιακών παρασίτων που δεν εκφράζουν τη PbMP1
2. PbMP1 in vivo tagging	PbMPin vivo teg- F PbMPin vivo teg- R	Παραγωγή διαγονιδιακών παρασίτων που φέρουν φθορίζον επίτοπο cherry
3. PbMP1 in PGAT2	PbMP1 pGAT1- F PbMP1 pGAT1- R	Έκφραση της PbMP1 σε βακτηριακά κύτταρα
4. PbMP1 IN tetop Link	PbMP1FL For PbMPins.cellexp- R	Έκφραση της PbMP1 σε κυτταρικές σειρές εντόμων
5. PbBiP in pet16b		Έκφραση της PbBiP σε βακτηριακά κύτταρα

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το cDNA από ωοκινέτες παρασίτου , έγιναν αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης σε τελικό όγκο 25 μ l, οι οποίες είχαν την παρακάτω σύσταση : 0,5 units Taq, 25 pmoles από κάθε εκκινιτή, 0,2 mM dNTPs και ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε μαγνήσιο. Το πρόγραμμα που επιλέχτηκε ήταν το παρακάτω :

1. 95 C, 5min : αποδιάταξη μήτρας
2. 95 C,30 sec: αποδιάταξη μήτρας
3. Θερμοκρασία και χρόνος ανάλογη του εκκινιτή
4. 72 C, 30sec/45sec (ανάλογα με το μέγεθος του προϊόντος) : χτίσιμο του μορίου DNA

Τα βήματα 2-4 επαναλήφθηκαν 30 φορές. Τα ζευγάρια των εκκινιτών και η αλληλουχία τους φαίνεται παρακάτω.

Ηλεκτροφορητική ανάλυση πρωτεϊνών και ανοσοεντοπισμός ακινητοποιημένων πρωτεϊνών σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης

Πρωτεϊνικά εκχυλίσματα είτε από παράσιτα , είτε από βακτήρια αναλύθηκαν σύμφωνα με το μοριακό τους μέγεθος σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης παρουσία SDS. Ο προσδιορισμός του μεγέθους της πρωτεΐνης έγινε συγκρίνοντας το ηλεκτροφορητικό πρότυπο των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων με το πρότυπο των πρωτεϊνικών δεικτών . Τα πηκτώματα βιάφτηκαν στη συνέχεια με Coomassie brilliant blue ή ακολούθησε ανοσοεντοπισμός τους. Για τον ανοσοεντοπισμό έγινε ηλεκτροφορητική μεταφορά σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης. Αυτές επώαστηκαν με το πρωτογενές αντίσωμα(anti-GST 1:1000, α HIS 1:200 , BiP ορός 1:5000, α MYC 1:10.000) και κατόπιν με το δευτερογενές αντίσωμα (arab IgG 1:10.000, rabbit IgG 1:10.000), το οποίο είναι συζευγμένο με HRP, επιτρέποντας

έτσι τον ανοσοεντοπισμό τους πάνω στις μεμβράνες με ένα χημειοφωσφορίζον kit (ECL detection system).

Πρωτεϊνικές τεχνικές

Παραγωγή απομόνωση και καθαρισμός βακτηριακά εκφρασμένων πρωτεϊνών

Για τη παραγωγή αντιγόνου, όπως αναφέρθηκε απομονώθηκε με την αλυσιδωτή μέρος του αναγνωστικού πλαισίου των γονιδίων P_bBiP και P_bMP1. Αυτά τα κομμάτια DNA μπήκαν σε φορείς έκφρασης PET16b και PGAT2 αντίστοιχα. Τα πλασμίδια μετασχηματίστηκαν στα βακτηριακά στελέχη BL21. Οι κλώνοι μεγάλωσαν σε υγρή καλλιέργεια παρουσία του αντιβιοτικού χλωραμφαινικόλης και αμπικιλίνης (pGEX) O/N. Η O/N καλλιέργεια αραιώθηκε 1:100 και αφέθηκε να μεγαλώσει στους 30 C και στους 37 C. Όταν αυτή έφτασε σε απορρόφηση (στα 600 nm) 0,5-0,6 έγινε επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης με προσθήκη IPTG 0,2 mM IPTG για 3 ώρες στους 30 C στη περίπτωση P_bBiP και στη περίπτωση του P_bMP1 σε θερμοκρασία 30C παρουσία 0.3 mM IPTG και σε θερμοκρασία 37 C παρουσία 0,1mM IPTG. Το IPTG απενεργοποιεί τον καταστολέα IacI και επιτρέπει έτσι την έκφραση της πρωτεΐνης. Πριν να γίνει η επαγωγή γίνεται λήψη δείγματος κυττάρων 1 ml το οποίο φυγοκεντρείται κι επαναδιαλύεται σε SDS loading buffer. Μετά την επαγωγή τα κύτταρα φυγοκεντρούνται, ενώ κρατάμε και πάλι δείγμα 1 ml.

Το δείγμα επαναδιαλύεται σε SDS loading buffer ενώ η πελλέτα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε, lysis buffer B (50 mM Tris-Cl PH 7,5-8 , 250 mM NaCl, 10% glycerol) για τα κύτταρα που εκφράζουν τη P_bBiP και lysis buffer C(50 mM Tris-Cl PH 8 , 300 mM NaCl, 20% glycerol) για τα βακτηριακά κύτταρα που εκφράζουν τη P_bMP1. Στο lysis buffer προστίθεται επίσης 1 mM PMSF. Στη περίπτωση που θέλω

να επαναδιαλύσω ωοκινέτες παρασίτων χρησιμοποιώ RIPA buffer (20 mM Tris-Cl , 5 mM CHAPS) στο οποίο προσθέτω και 1 mM αναστολείς πρωτεασών. Τα κύτταρα παραμένουν στο πάγο για 40 min και κατόπιν ηχοβολούνται. Στη συνέχεια γίνεται φυγοκέντρηση των κυττάρων και η πελλέτα που αποτελεί το αδιάλυτο μέρος του εκχυλίσματος επαναδιαλύεται στα ίδια buffers με εξαίρεση τη πελέτα της PbMP1 η οποία επαναδιαλύεται σε UREA buffer(50 mM TRIS PH 8, 300 mM NaCl, 5% glycerol, 8M UREA). Ακολουθεί και πάλι φυγοκέντρηση και το υπερκείμενο επωάζεται με κολώνα Νικελίου στη περίπτωση της PbBiP και της PbMP1 .Η απομόνωση των πρωτεϊνών βασίζεται στη τεχνική της χρωματογραφίας συγγένειας . Η χρωματογραφία συγγένειας αποτελεί την πιο εκλεπτυσμένη και αποτελεσματική χρωματογραφική τεχνική διαχωρισμού και καθαρισμού ενζύμων. Η αρχή λειτουργίας της τεχνικής βασίζεται στη βιολογική συγγένεια, η οποία στα ένζυμα εκφράζεται με την ικανότητα τους να αναγνωρίζουν και να δεσμεύουν με εκλεκτικό και αντιστρέψιμο τρόπο συγκεκριμένα μόρια-δεσμευτές (ligand). Αν κάποιος δεσμευτής, π.χ. ενζυμικό υπόστρωμα, αναστολέας, συνένζυμο, αντίσωμα, μέταλλο κ.α., δεσμευθεί χημικά (ακινητοποιηθεί) σε κατάλληλο πολυμερές στερεό υλικό, το οποίο αποκαλείται φορέας, τότε λαμβάνεται ο λεγόμενος προσροφητής συγγένειας (affinity adsorbent). Τέτοιο μόριο-δεσμευτής είναι δυνατόν να είναι κάποια τριαζινο-χρωστική, βιομιμητική ή μη. Σε ορισμένες περιπτώσεις, δεσμευτής και φορέας γεφυρώνονται χημικά από μόριο το οποίο παρεμβάλλεται μεταξύ τους και ονομάζεται βραχίονας (spacer). Όταν ένα βιολογικό δείγμα που περιέχει μίγμα μακρομορίων περάσει από τη χρωματογραφική στήλη που φέρει τον προσροφητή τότε, τυπικά, μόνο το μακρομόριο που παρουσιάζει συγγένεια με τον δεσμευτή θα συγκρατηθεί (προσροφηθεί) στη στήλη, ενώ όλα τα άλλα μόρια θα απομακρυνθούν κατά το επόμενο στάδιο, της έκπλυσης. Ακολούθως, το προσροφημένο μακρομόριο εκλύεται υπό συνθήκες που εξασθενούν τις δυνάμεις μοριακής αναγνώρισης με το δεσμευτή, με αποτέλεσμα τη διάσπαση του συμπλόκου στη στήλη και την παραλαβή του μακρομορίου (4). Η κολώνα που χρησιμοποιείται θα πρέπει να εξισορροπηθεί με το ίδιο Lysis buffer που επαναδιαλύθηκαν οι κυτταρικές πελέτες. Η ποσότητα των σφαιριδίων Νικελίου εξαρτάται από το ποσό της πρωτεΐνης που θα δεσμευτεί. Στη συνέχεια αφήνουμε το υπερκείμενο να περάσει από την κολώνα και ακολουθούν πλυσίματα της κολώνας με Wash buffer. Για τη PbBiP έκανα πέντε

πλύσεις Wash 1(Lysis buffer B + 5 mM imidazole) , Wash 2 (50 mM TRIS, 100 mM NaCl, 10% glycerol, 10 mM imidazole), Wash 3 (50 mM TRIS, 100 mM NaCl, 10% glycerol) Wash 4 (50 mM TRIS, 50 mM NaCl, 10% glycerol, 15 mM imidazole) και Wash 5 (50 mM TRIS, 50 mM NaCl, 10% glycerol). Για τη PbMP1 έκανα πλύσεις με Wash buffer(UREA buffer + imidazole). Η πρωτεΐνη εκλύεται από την κολώνα με elution buffer. Για τη PbBiP πραγματοποιήθηκε έκλυση (50 mM TRIS, mM NaCl, 10% glycerol, 250 mM imidazole). Για τη PbMP1 πραγματοποιήθηκαν εκλύσεις(UREA buffer + 250 mM imidazole). Τα αποτελέσματα της παραγωγής της πρωτεΐνης και του καθαρισμού της ελέγχονται με ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα SDS πολυακρυλαμίδης, το οποίο στη συνέχεια βάφεται με χρωστική Coomassie blue.

Παραγωγή αντισωμάτων

Η παραγωγή όλων των αντισωμάτων έγινε σε εταιρία παραγωγής αντισωμάτων (Custom Hybridoma). Η ανοσοποίηση σε όλες τις περιπτώσεις έγινε σε κουνέλια. Για την ανοσοποίηση ενός ζώου απαιτήθηκαν 1-2 mgr. καθαρού αντιγόνου σε συγκέντρωση 1mgr./ml

Καθαρισμός αντισωμάτων

Ο καθαρισμός όλων των αντισωμάτων έγινε με ακινητοποίηση των αντιγόνων από τα οποία αυτά προήλθαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης κι επώαση των ορών με αυτή. Πιο συγκεκριμένα 1 mgr απομονωμένου αντιγόνου φορτώθηκε σε παρασκευαστικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης της κατάλληλης πυκνότητας, ανάλογα με το μέγεθος του και ηλεκτροφορήθηκε σε αποδιατακτικές συνθήκες. Ακολούθησε μεταφορά της πρωτεΐνης σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και χρώση αυτής με Ponceau S. Το κομμάτι της νιτροκυτταρίνης που είχε συνδεδεμένο το αντιγόνο απομονώθηκε και επώαστηκε με 3% BSA σε διάλυμα TBST (20 mM Tris pH 7.4, 500 mM NaCl, 0.05 % Tween 20) για 1 hr σε θερμοκρασία δωματίου. Ο ορός (περίπου 2 ml) αραιώθηκε σε διάλυμα TBST 1:4 και επώαστηκε με την μεμβράνη νιτροκυτταρίνης για τουλάχιστον 12 hrs στους 4 C. Μετά την επώαση η μεμβράνη

ξεπλύθηκε με διάλυμα TBST και τα ειδικά προς το αντιγόνο αντισώματα εκλούστηκαν από αυτό με διάλυμα έκλουσης (gentle Ag/Ab Elution buffer , Pierce Protein Research products). Η έκλουση έγινε σε τελικό όγκο ίδιο με αυτόν του ορού που χρησιμοποιήθηκε αρχικά και έλαβε χώρα με επώαση της νιτροκυτταρίνης με το διάλυμα έκλουσης 2x10min. Στα καθαρισμένα αντισώματα προστέθηκε NaN₃ και ακολούθησε φύλαξη τους στους -20 C.

Τεχνικές που αφορούν το παράσιτο

Διατήρηση του παρασιτικού στελέχους

Τα παρασιτικά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν, δηλαδή το διαγονιδιακό στέλεχος που φέρει τον επίτοπο Cherry και το στέλεχος που φέρει σίγισση του γονιδίου PbMP1 διατηρούνταν σε ποντίκια 6-10 εβδομάδων, τα οποία μολύνονταν μετά από ενδοπεριτοναϊκή ένεση με μολυσμένο αίμα. Για τη μόλυνση ενός υγιούς ποντικού χρησιμοποιούνταν 100-200 μλ μολυσμένου αίματος. Η παρασιταϊμία των μολυσμένων ποντικών ελεγχόταν με χρώση Giemsa στρώματος αίματος και παρατήρηση σε μικροσκόπιο σε φακό 100 X . Στη συνέχεια το αίμα από τα μολυσμένα ποντίκια χρησιμοποιήθηκε για in-vitro παραγωγή ωοκινετών και χορηγήθηκε ενδοπεριτονιακά στα ποντίκια phenylhydrazine (6 mg/ml, 200 μl) 24 ώρες πριν τη μόλυνση. Η παρασιταϊμία του μολυσμένου ποντικού θα έπρεπε να ξεπερνά το 10-15% και η εμφάνιση αρσενικών γαμετοκυττάρων με μαστίγια έπρεπε να είναι πάνω από 5-6 σε κάθε πεδίο.

Μετασχηματισμός του παρασιτικού στελέχους και γενοτύπηση

Συνοπτικά in vitro παρηγμένα ώριμα schizonts που περιέχουν και μεροζοΐτες απομονώνονταν με μέθοδο κλίσης Nycodenz. Περίπου 0,5-1 X 10⁷ απομονωμένα schizonts μετασχηματίζονταν με 5-10 μg DNA της πλασμιδιακής κατασκευής. Τα μετασχηματισμένα παράσιτα ενύονταν σε ποντίκια. Προκειμένου να επιλεγούν τα μετασχηματισμένα παράσιτα χορηγούνταν στο πόσιμο νερό των ποντικών

pyrimethamine για ένα διάστημα 5-7 ημερών. Τα μετασχηματισμένα παράσιτα φέρουν το γονίδιο ανθεκτικότητας στο συγκεκριμένο φάρμακο. Η παρουσία παρασίτων που έφεραν σίγηση του γονιδίου της PbMP1 και των παρασίτων που έφεραν τον επίτοπο Cherry ελέγχθηκαν με PCR GENOTYPING.

Για το λόγο αυτό απομονώνονταν γενωμικό DNA παρασίτων από το αίμα μολυσμένων ποντικών , χρησιμοποιώντας το QIAmp DNA kit. Το γενωμικό DNA χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα σε αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης. Στη περίπτωση των παρασίτων που έφεραν τον επίτοπο Cherry χρησιμοποιήθηκαν δύο ζεύγη εκκινητών. Το πρώτο ζεύγος (Berghei mettalo-protease F- test1RON) αναγνωρίζει μόνο το γενωμικό DNA του διαγονιδιακού παρασίτου. Το δεύτερο ζεύγος (Berghei mettalo-protease F- PbMP1KD/3PR) αναγνωρίζει μόνο το γενωμικό DNA των παρασίτων αγρίου τύπου. Στη περίπτωση των παρασίτων που έφεραν σίγηση του γονιδίου PbMP1 χρησιμοποιήθηκαν 4 ζεύγη εκκινητών. Τα πρώτα δύο ζεύγη εκκινητών (L695-PbMPK/D 5' F) και (L665-PbMPK/D 3'R) αποκαλύπτουν την ύπαρξη ή όχι διαγονιδιακών παρασίτων. Το τρίτο ζεύγος εκκινητών(PbMPK/D 5' F- PbMPK/D 3'R) αποκαλύπτει την ύπαρξη παρασίτων αγρίου τύπου. Το τέταρτο ζεύγος εκκινητών (L665- L635) αποκαλύπτει την ύπαρξη επισωμικού DNA .

In vitro καλλιέργειες ωοκινετών

Για τις in vitro καλλιέργειες ωοκινετών και τον καθαρισμό τους ακολούθησε ένα ήδη χαρακτηρισμένο πρωτόκολλο. Συνοπτικά 1ml αίματος από μολυσμένο ποντικό συλλέχτηκε σε σύριγγα που περιείχε ηπαρίνη μετά από διάρρηξη της καρδιάς. Το

αίμα αναμιγνυόταν με θρεπτικό μέσο για καλλιέργεια ωοκινετών σε αναλογία 1 : 10 κι επωαζόταν στους 19 C για 18-24 ώρες.

Για την απομόνωση των ωοκινετών η καλλιέργεια φυγοκεντρούνταν στις 2000rpm για 10min και η πελέτα επαναδιαλυόταν σε 0,5 ml 1X PBS. Η επαναδιαλυμένη πελέτα προστίθενταν σε διάλυμα Am. chloride 0,9 % (w/v). Για κάθε 1ml αίματος χρειαζόταν 50 ml διαλύματος Am chloride. Ακολουθούσε επώαση στο πάγο για 30-40 min και φυγοκέντρηση στις 1500rpm για 5 min. Κατόπιν η πελέτα των ωοκινετών πλένονταν με 1X PBS ανάλογα με το μέγεθος της. Ο αριθμός των ωοκινετών που απομονώνονταν προσδιορίζονταν μετά από μέτρηση σε αιμοκυτταρόμετρο.

Θρεπτικό μέσο για την καλλιέργεια ωοκινετών : Επαναδιάλυση 16,4 gr RPMI-1640 με HEPES (25 mM) και γλουταμίνη (2 mM , Sigma), 2gr NaHCO₃, 10 ml πενικιλίνη (5000U/ml)/ Στρεπτομυκίνη (5 mg/ml), 50 mg hypoxanthine. Ρύθμιση Ph στα 8.0 με NaOH. Ο τελικός όγκος του διαλύματος πρέπει να είναι 1 lt. Ακολουθεί αποστείρωση με φίλτρο διαμέτρου 0,4 μm και προσθήκη 10% FCS.

Ανοσοιστοχημεία ωοκινετών και εκχύλιση πρωτεϊνών από ωοκινέτες

Στα πειράματα ανοσοιστοχημείας ωοκινετών οι απομονωμένοι και καθαρισμένοι σύμφωνα με την προηγούμενη παράγραφο ωοκινέτες τοποθετούνταν πάνω σε micro chamber slides. Κάθε δείγμα περιείχε 1000-5000 ωοκινέτες . Τα δείγματα αφήνονταν να ξεραθούν και στη συνέχεια προστίθενταν διάλυμα 4% φορμαλδεΰδης για 15-20 min. Ακολουθούσαν ξεπλύματα με 1XPBS , 3x5min κι επώαση σε διάλυμα PBT για 30-45 min. Η επώαση των πρώτων αντισωμάτων έγινε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 hr κι επακολούθησε επώαση με δεύτερο αντίσωμα για 1 hr σε θερμοκρασία δωματίου και πάλι. Στο ενδιάμεσο των επωάσεων μεσολαβούσαν ξεπλύματα με PBT. Οι αραιώσεις των πρώτων και των δεύτερων αντισωμάτων γίνονταν σε διάλυμα PBT. Για την εκχύλιση πρωτεϊνών από ωοκινέτες χρησιμοποιήθηκαν και πάλι καθαρισμένοι και απομονωμένοι ωοκινέτες. Για κάθε πρωτεϊνικό δείγμα χρησιμοποιήθηκαν περίπου 1X10⁶ ωοκινέτες επαναδιαλυμένοι σε RIPA buffer (1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate , 0,1 %

SDS, 0,15 M NaCl, 50 mM TRIS-HCL, pH 7.2, Roche complete protease inhibitors cocktail) στους οποίους είχε προστεθεί Laemmli buffer κι είχε ακολουθήσει βρασμός τους.

Τεχνικές που αφορούν τις κυτταρικές σειρές

Διατήρηση καλλιιεργειών

Οι κυτταρικές σειρές εντόμων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι Sua 5.1 και η Sua 5.β. Τα κύτταρα καλλιεργούνταν σε 75 και 25cm(2) φλάσκες παρουσία θρεπτικού μέσου Schneider's (GIBCO) που περιείχε 10% απενεργοποιημένο ορό και 1% Penicillin/streptomycin (D10 Complete) σε θερμοκρασία 28 C . Τα κύτταρα επωάζονται για 3-4 ημέρες μέχρι να καλυφθεί ολόκληρη η επιφάνεια της φλάσκας. Στη συνέχεια τα κύτταρα αποκολλούνται από την επιφάνεια της φλάσκας μηχανικά και τοποθετούνταν σε καινούργιες φλάσκες με αναλογία 1 μέρος κυτταρικού εναιωρήματος 4 μέρη καινούργιου θρεπτικού μέσου.

Μετασχηματισμός κυτταρικών σειρών

Για τον μετασχηματισμό κυτταρικών σειρών τα κύτταρα από μία φλάσκα στην οποία είχε καλυφθεί ικανοποιητικά η επιφάνειά της τοποθετούνταν σε 6 well plates (η αναλογία σε αυτή τη περίπτωση ήταν ένα μέρος κυτταρικού εναιωρήματος/3 μέρη καινούργιου θρεπτικού υλικού) και αφήνονταν στους 28 C για 12-24 ώρες. Για τον μετασχηματισμό των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το Effectene transfection reagent (Qiagen) με μερικές τροποποιήσεις. Συγκεκριμένα για κάθε φρεάτιο χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 4 μgr πλασμιδιακού DNA. Στις περιπτώσεις όπου χρησιμοποιήθηκε το επαγόμενο σύστημα τετρακυκλίνης, ο ενεργοποιητής αντιπροσώπευε το ¼ της συνολικής ποσότητας του πλασμιδιακού DNA, το

πλασμίδιο που έφερε το γονίδιο ενδιαφέροντος μας , το ½ και το πλασμίδιο που έφερε τον δείκτη για την αποδοτικότητα του πειράματος διαμόλυνσης το 1/4 .

Τα κύτταρα αφήνονταν για 24-36 ώρες , οπότε κι ελεγχόταν η αποδοτικότητά του πειράματος διαμόλυνσης παρατηρώντας το ποσοστό των κυττάρων που εξέφραζαν την φθορίζουσα χρωστική που είχε χρησιμοποιηθεί κάθε φορά(). Αν αυτό το ποσοστό κρινόταν ικανοποιητικό τα κύτταρα ξεπλένονταν με διάλυμα 1X PBS και αφήνονταν άλλες 24-36 ώρες παρουσία θρεπτικού μέσου, που δεν περιείχε FBS.

Εξαγωγή πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από κυτταρικές σειρές

Για την εξαγωγή πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από κυτταρικές σειρές τα κύτταρα φυγοκεντρούνταν (1500 rpm, 5 min). Το θρεπτικό μέσο απομονωνόταν μετά τη φυγοκέντρηση και οι πρωτεΐνες του κατακρημνιζόταν με ακετόνη. Η κυτταρική πελέτα ξεπλενόταν 2 φορές με 1XPBS και επαναδιαλυόταν σε διάλυμα RIPA (1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate , 0,1 % SDS, 0,15 M NaCl, 50 mM TRIS-HCL, pH 7.2, Roche complete protease inhibitors cocktail). Ακολουθούσε σπάσιμο των κυτταρικών μεμβρανών με 3 διαδοχικούς κύκλους ψύξης και- απόψυξης και ηχοβολισμό(1X 15sec). Το διαλυτό κλάσμα των κυττάρων διαχωριζόταν από το μεμβρανικό με φυγοκέντρηση (13000 rpm, 30 min) και αναλυόταν σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης. Να σημειωθεί ότι τα κύτταρα από κάθε well ενός 6- well plate επαναδιαλυόταν σε 200-300 μl RIPA buffer από το οποίο χρησιμοποιούνταν το ¼ με 1/5 σε κάθε πείραμα ανοσοαποτύπωσης

Ανοσοιστοχημεία κυττάρων

Τα πειράματα ανοσοιστοχημείας των κυττάρων έγιναν πάνω σε καλυπτρίδες διαμέτρου 13 mm, οι οποίες είχαν πριν επωαστεί με διάλυμα poly-L-lysine. Τα

κύτταρα (περίπου 50 μl κυτταρικού ελαιωρήματος ένα well του 6 well plate) αφήνονταν να προσκολληθούν πάνω στις καλυπτρίδες περίπου 5-10 min. Στη συνέχεια ακολουθούσε πλύσιμο με 1X PBS. Η διάρρηξη των κυτταρικών μεμβρανών και το blocking γίνονταν με επώαση παρουσία διαλύματος PBT για 45 min. Ακολουθούσε επώαση με τα πρώτα αντισώματα (αραιωμένα σε PBT) για 1 hr σε θερμοκρασία δωματίου, πλυσίματα με διάλυμα PBT και επώαση με τα δεύτερα αντισώματα για 1 hr σε θερμοκρασία δωματίου. Οι καλυπτρίδες τοποθετούνταν κατόπιν σε μικροσκοπικά slides πάνω σε διάλυμα διατήρησης του φθορισμού.

Πλασμιδιακές κατασκευές

Πλασμιδιακές κατασκευές για έκφραση σε βακτηριακά κύτταρα

Για το μόριο σαπερώνης BiP χρησιμοποιήθηκε cDNA από ωκινέτες παρασίτου προκειμένου να γίνει παραγωγή μέρους της αλληλουχίας του σε βακτηριακά κύτταρα προκειμένου να αναπτυχθούν αντισώματα έναντι αυτών. Η αλληλουχία στη συνέχεια υποκλωνοποιήθηκε σε φορέα PCR11topo , ο οποίος φέρει ελεύθερες ιστιδίνες που προσδέονται με τις ελεύθερες αδενίνες της εισαγόμενης αλληλουχίας που έχουν δημιουργηθεί μέσω της διαδικασίας dATP extension. Το τμήμα κλωνοποιείται στις θέσεις περιοριστικών ενζύμων EcoR1. Στη συνέχεια η αλληλουχία απομονώθηκε εκ νέου και εισάχθηκε σε φορέα έκφρασης pet16b στις θέσεις των περιοριστικών ενζύμων Nde1 και Xho1. Ο φορέας φέρει έναν επίτοπο 6 His και έναν επαγόμενο προμότορα ο οποίος επηρεάζει την έκφραση της πρωτεΐνης σε συγκεκριμένες συνθήκες και είναι κατάλληλος για έκφραση σε κύτταρα *E.coli* του στελέχους b121.

Για την έκφραση του γονιδίου PbMP1 σε βακτηριακά κύτταρα χρησιμοποιήσαμε αλληλουχία από συνθετικό γονίδιο του PbMP1 στο οποίο τα κωδικόνια έχουν αλλάξει ώστε να διατηρούν το ίδιο μεταφραστικό περιεχόμενο με αλλαγή όμως μέρους των αδενινών και των θυμιδινών σε κυτοσίνες ή γουανίνες. Η ορθότητα της

παραπάνω αλληλουχίας επαληθεύτηκε και προχωρήσαμε με κλωνοποίηση αυτής στον φορέα PGAT2 στις θέσεις περιοριστικών ενζύμων BamH1 και EcoR1.

Πρέπει να σημειωθεί ότι για όλες τις κατασκευές ο σχεδιασμός των εκκινήτων έγινε με τέτοιο τρόπο ώστε τα αντίστοιχα τμήματα των γονιδίων να εκφράζονται στα βακτηριακά κύτταρα με μια ουρά ιστιδίνης στο αμινοτελικό τους άκρο, χωρίς να χαλάσει το αναγνωστικό πλαίσιο.

Πλασμιδιακές κατασκευές για πειράματα σιώπησης

Για τη δημιουργία πλασμιδιακής κατασκευής η οποία θα προκαλεί σίγηση του γονιδίου PbMP1 απομονώθηκαν από πλασμιδιακό γενωμικό DNA δύο περιοχές του γονιδίου στο 3' και στο 5' άκρο αντίστοιχα. Το πρώτο κομμάτι απομονώθηκε με περιοριστικά ένζυμα Xba1 και Sre1 και εισάχθηκε σε φορέα κλωνοποίησης PLOO1 . Το δεύτερο κομμάτι απομονώθηκε με περιοριστικά ένζυμα Kpn1 και HindIII και ενσωματώθηκε στο φορέα κλωνοποίησης PLOO1 που έφερε τις ίδιες θέσεις περιορισμού και περιείχε το πρώτο κομμάτι που ενσωματώσαμε και έτσι ώστε μεταξύ των δυο περιοχών να παρεμβάλλεται το γονίδιο που παρέχει ανθεκτικότητα στο φάρμακο πυριμεθαμίνη. Στη συνέχεια ευθυγραμμίσαμε το φορέα με πέψη με τα ένζυμα περιορισμού Kpn1 και Xba1 και εισάγαμε το πλασμίδιο στα παράσιτα.

Πλασμιδιακές κατασκευές για διαγονιδιακά παράσιτα

Για τη δημιουργία διαγονιδιακών παρασίτων στα οποία η πρωτεΐνη θα εκφράζεται μαζί την φθορίζουσα πρωτεΐνη Cherry χρησιμοποιήσαμε μέρος του ανοιχτού αναγνωστικού πλαισίου της PbMP1 (ORF), χωρίς το κωδικόνια λήξης . Η αλληλουχία κλωνοποιήθηκε σε φορέα κλωνοποίησης PCR11τορο μέσω των ενζύμων BamH1 και Not1. Στη συνέχεια με τα ίδια ένζυμα περιορισμού η αλληλουχία απομονώθηκε εκ νέου και ενσωματώθηκε σε φορέα έκφρασης που φέρει το φθορίζων επίτοπο Cherry.

Πλασμιδιακές κατασκευές για μετασχηματισμό κυτταρικών σειρών

Σε αυτή τη διαδικασία σηκώσαμε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ολόκληρο το ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο του γονιδίου χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το συνθετικό γονίδιο που χρησιμοποιήσαμε και στη βακτηριακή έκφραση. Αρχικά η αλληλουχία κόπηκε με ένζυμο περιορισμού ECORI και ενσωματώθηκε σε φορέα κλωνοποίησης PCR11τορο που φέρει τις αντίστοιχες περιοριστικές θέσεις και στη συνέχεια η αλληλουχία απομονώθηκε εκ νέου μέσω των περιοριστικών ενζύμων Nde1 και Nhe1 και ενσωματώθηκε σε φορέα έκφρασης tetorlink(χιAT-3xmyc) με τον οποίο διαμολύναμε κυτταρικές σειρές εντόμων .

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1) ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

ΠΑΡΓΩΓΗ BIP ΟΡΟΥ (r – BIP production)

Σε αυτή τη πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε cDNA από ωοκινέτες παρασίτου προκειμένου να πολλαπλασιαστεί μέρος της αλληλουχίας του ομολόγου στο BIP γονίδιο το οποίο και ονομάστηκε PbBiP με μέθοδο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (βλέπε εικόνα 5). Η ορθότητα της αλληλουχίας του προϊόντος που προέκυψε με PCR επιβεβαιώθηκε και προχωρήσαμε με κλωνοποίηση του στον φορέα pet16_BiP. Αυτός φέρει ένα επίτοπο HIS ο οποίος προστίθεται στο 5' άκρο της ανασυνδεμένης πρωτεΐνης (εικόνα **πλασμιδιακές κατασκευές**) Με τον ανασυνδυασμένο φορέα pet16_BiP μετασηματίστηκαν κύτταρα bl21pLys. Η επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης έγινε σε συνθήκες 0,2 mM IPTG και θερμοκρασία 30 C. Ανάλυση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων με SDS page σε gel ακρυλαμίδης και χρώση με Coomassie brilliant blue δεν κατάφερε να αναδείξει τις καταλληλότερες συνθήκες επαγωγής λόγω χαμηλών επιπέδων έκφρασης της ανασυνδιασμένης πρωτεΐνης (εικόνα 6). Western blot με αντίσωμα anti-His έναντι των βακτηριακών εκχυλισμάτων ωστόσο έδειξε ότι η πρωτεΐνη του βακτηρίου εκφράζεται τόσο στο διαλυτό μέρος του βακτηρίου όσο και στις μεμβράνες (εικόνα 7). Προτιμήσαμε να περιοριστούμε στην απομόνωση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης από το διαλυτό μέρος των βακτηρίων. Ο καθαρισμός της πρωτεΐνης έγινε με χρήση κολώνας Νικελίου. Αυτή η διαδικασία καθαρισμού βασίζεται στην ισχυρή συγγένεια του νικελίου έναντι των καταλοίπων ιστοιδίνης που φέρει η ανασυνδιασμένη πρωτεΐνη στο αμινοτελικό άκρο της. Η έκλουση της πρωτεΐνης γίνεται με τη προσθήκη υψηλής συγκέντρωσης ιμιδαζολίου το οποίο δρα ανταγωνιστικά προς το νικέλιο ως προς τη πρόσδεση των καταλοίπων ιστοιδίνης. Ο έλεγχος της διαδικασίας καθαρισμού της πρωτεΐνης έγινε πάλι σε SDS page ηλεκτροφόρηση και χρώση με Coomassie brilliant blue (εικόνα 8). Φάνηκε ότι η πρωτεΐνη δεσμεύεται ικανοποιητικά στην κολώνα Νικελίου και εκλύεται στο μεγαλύτερο μέρος της στην ποσότητα ιμιδαζολίου που χρησιμοποιήθηκε (250 Mm). Μέρος της πρωτεΐνης χάνεται και στις πλύσεις αλλά αυτό κρίθηκε ότι δεν είναι σημαντικό. Τα εκλούσματα που φάνηκε να φέρουν τη μεγαλύτερη ποσότητα ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης βάσει των παραπάνω ενώθηκαν σε ένα. Σε αυτό έγινε ποσοτικοποίηση με Bradford assay (εικόνα 9). Η απαραίτητη ποσότητα

χρησιμοποιήθηκε για την ανοσοποίηση ενός ζώου. Ο αρχικός έλεγχος του BiP- ορού που προέκυψε έδειξε ότι αναγνωρίζει σε παρασιτικά εκχυλίσματα ένα πρωτεϊνικό προϊόν αναμενόμενου μοριακού μεγέθους. Παράλληλα όμως αναγνωρίζει κι ένα μεγάλο αριθμό πρωτεϊνικών προϊόντων που δεν φαίνεται να σχετίζονται βάσει μοριακού μεγέθους με την πρωτεΐνη rbBiP. Για τον λόγο αυτό προχωρήσαμε σε καθαρισμό του ορού έναντι της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης που χρησιμοποιήθηκε ως αντιγόνο. Για τον λόγο αυτό επαναλήφθηκε η διαδικασία παραγωγής και απομόνωσης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Η τελευταία ακινητοποιήθηκε σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και επώαστηκε με τον ορό. Η έκλουση των ειδικών ως προς το BiP αντιγόνων IgG έγινε με χρήση διαλύματος υψηλής αλατότητας. Προκειμένου να διαπιστωθεί η αποτελεσματικότητα της παραπάνω διαδικασίας ελέγχθηκε με Western blot η ίδια η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη που φαίνεται να αναγνωρίζεται τόσο από τον αρχικό ορό όσο και από τον καθαρισμένο. Ωστόσο ανάλυση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων παρασίτων με Western δεν έδειξε καμία διαφοροποίηση ανάμεσα στους δύο ορούς. Παράλληλα έγινε ανοσοφθορισμός έναντι ωκινετών με τους δύο ορούς. Παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού δεν αποκάλυψε κάποια διαφορά ανάμεσα τους. Τόσο τα αποτελέσματα του Western όσο και τα αποτελέσματα ανοσοφθορισμού δείχνουν ότι η προσπάθεια καθαρισμού του BiP ορού με τον παραπάνω τρόπο δεν απέδωσε (εικόνες 10, 11, 12,13) .

Marker Bip PET

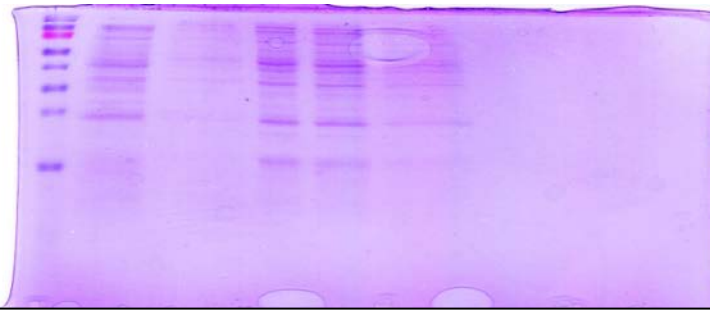


Εικόνα 5: Για την απομόνωση του ενθέματος Bip και του φορέα κλωνοποίησης pet χρησιμοποιήθηκε 2% agarose gel .

ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΠΕΛΕΤΕΣ

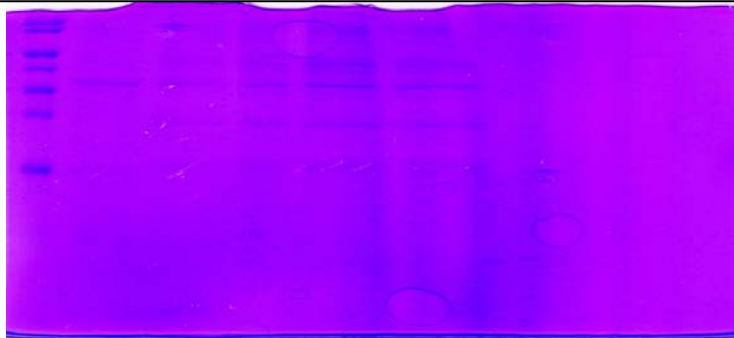
Marker (-)IPTG 0.1Mm 0.2mM0.4 mM 1Mm

IPTG IPTG IPTG IPTG

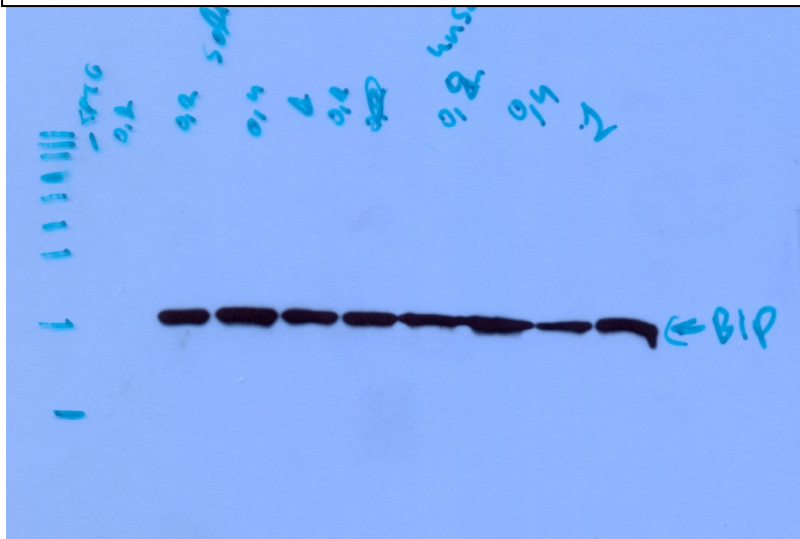


ΔΙΑΛΥΤΟ ΜΕΡΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Marker (-)IPTG 0,1mM 0,2mM 0,4 mM 1Mm

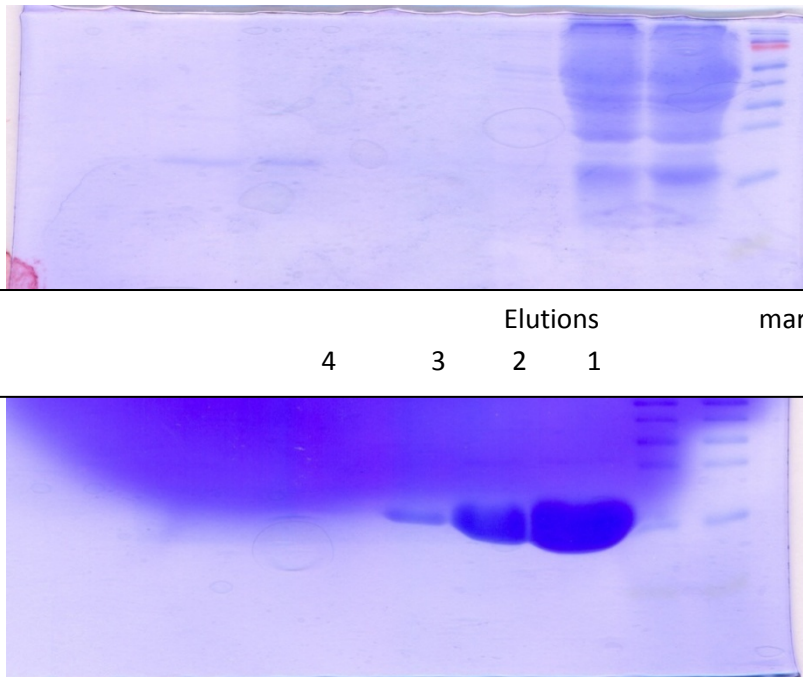


Εικόνα 6 : Η πρωτεΐνη BiP παράγεται τόσο στο διαλυτό όσο και στο αδιάλυτο μέρος του βακτηρίου και εμφανίζεται στο 19 kD και όχι στα αναμενόμενα 15 kD και το ποίο μάλλον οφείλεται στη στερεοδιάταξη της πρωτεΐνης .



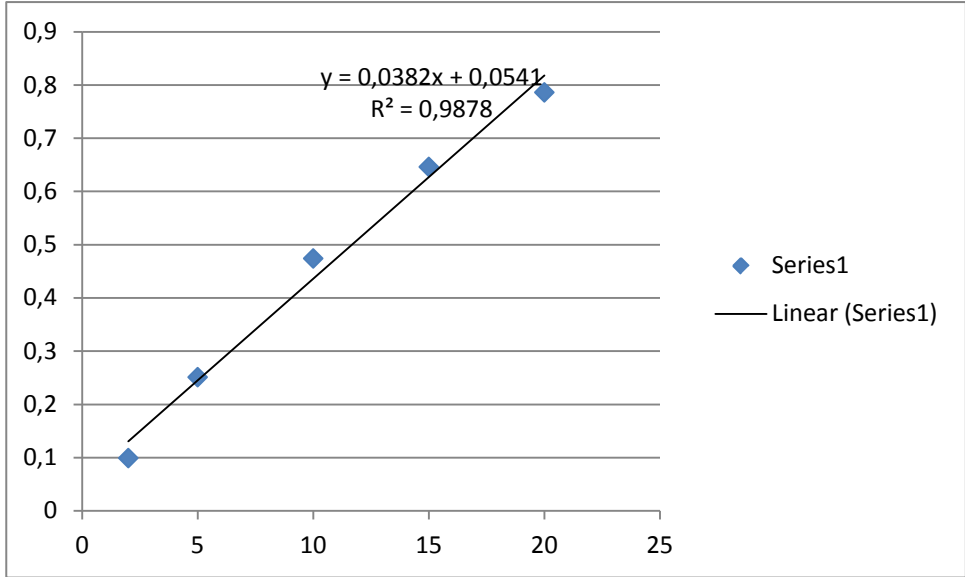
Εικόνα 7 : Η πρωτεΐνη BiP παράγεται τόσο στο αδιάλυτο όσο και στο υδροδιαλυτό μέρος των κυττάρων μόνο παρουσία του απαγωγέα έκφρασης IPTG

Wash5 Wash4 Wash3 Wash2 Wash 1 FT Protein marker



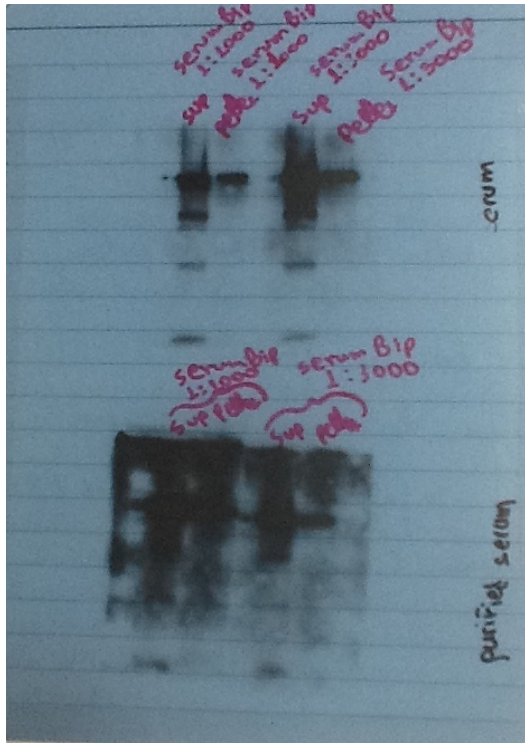
4
3
2
1
Elutions
marker

Εικόνα 8 : ανάλυση δειγμάτων από τη διαδικασία καθαρισμού της ανασυνδυασμένη πρωτεΐνης BiP. Φαίνεται ότι η πρωτεΐνη εκλούεται σε σημαντικές ποσότητες στα δυο πρώτα εκλούσματα

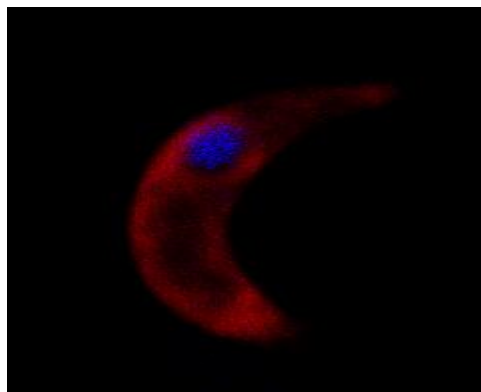


bip10ul 0,66 15,86126 1,586126mgr/ml

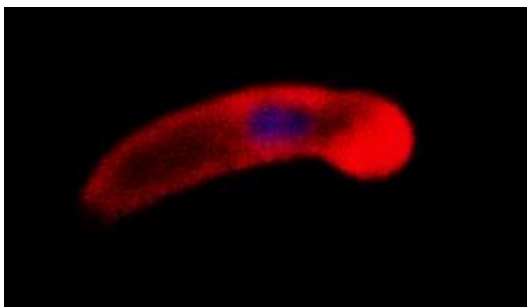
Εικόνα 9 : Ποσοτικοποίηση της BiP και άλλων πρωτεϊνών με Bradford assay.



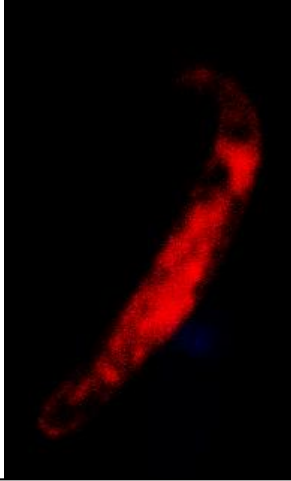
Εικόνα 10: Η εικόνα του gel που επώαστηκε με το αντίσωμα του ορού (πάνω εικόνα) δίνει μια αρκετά καθαρή εικόνα ενώ το gel που επώαστηκε με το καθαρισμένο αντίσωμα (κάτω εικόνα) παρουσιάζει μια εικόνα πολύ βρώμικη και με μπάντες περίπου της ίδιας έντασης που εμφανίζει και το gel με τον ορό. Αυτό σημαίνει ότι ο καθαρισμός του ορού δεν ήταν



Εικόνα 11: Ανοσοφθορισμός με χρήση του καθαρισμένου αντισώματος



Εικόνα 12: Ανοσοφθορισμός με χρήση του ορού ΒiP



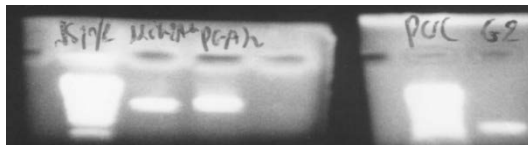
Εικόνα 13 : Ανοσοφθορισμός με χρήση του καθαρισμένου αντισώματος

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ P_bMP1 (PBANKA 136250)

A) ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ P_BMP1 ΣΕ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

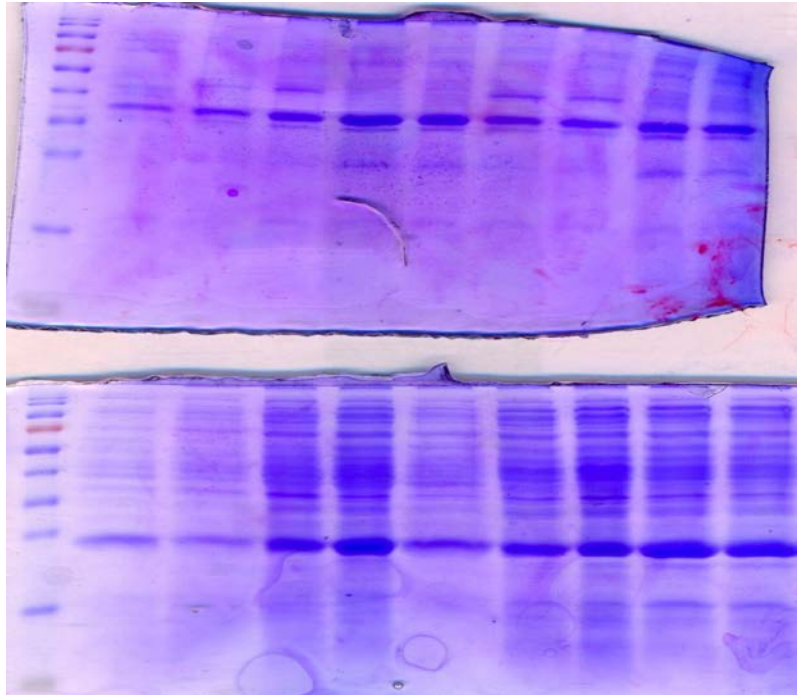
Συνθετικό πεπτίδιο που αντιστοιχούσε σε αλληλουχία της πρωτεΐνης P_bMP1 είχε χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν για την ανοσοποίηση ζώου από το εργαστήριο. Η ειδικότητα αυτού του ορού δεν μπόρεσε να επιβεβαιωθεί. Σε αυτό συνέβαλλε και το γεγονός ότι απόπειρες έκφρασης έστω και μέρους του γονιδίου που περιείχε την αλληλουχία που κωδικοποιούσε το συνθετικό πεπτίδιο που χρησιμοποιήθηκε ως αντιγόνο είχαν αποτύχει. Θεωρήσαμε ότι αυτό είναι πιθανό να οφείλεται και στο γεγονός ότι γενικότερα στο πλασμωδιακό γένωμα και ειδικότερα στο συγκεκριμένο γονίδιο είναι πολύ έντονη η παρουσία αδενινών και θυμιδινών. Για το λόγο αυτό απομονώσαμε την παραπάνω αλληλουχία από συνθετικό γονίδιο του P_bMP1 στο οποίο τα κωδικόνια έχουν αλλάξει ώστε να διατηρούν το ίδιο μεταφραστικό περιεχόμενο με αλλαγή όμως μέρους των αδενινών και των θυμιδινών σε κυτοσίνες ή γουανίνες. Η ορθότητα της παραπάνω αλληλουχίας επαληθεύτηκε και

προχωρήσαμε με κλωνοποίηση αυτής στον φορέα PGAT2(εικόνα 14,πλασμιδιακές κατασκευές) και μετασχηματισμό κύτταρων bl21 . Οι θετικοί κλώνοι ονομάστηκαν G2 και G3. Η επαγωγή της παραγωγής της πρωτεΐνης έγινε τελικά σε θερμοκρασία 30C παρουσία 0.3 mM IPTG και σε θερμοκρασία 37 C παρουσία 0,1mM IPTG. Ανάλυση των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων με SDS page ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και πραγματοποίηση Western blot με αντίσωμα α-his επιβεβαιώνει τις παραπάνω συνθήκες και δείχνει ότι η ανασυνδασμένη πρωτεΐνη συγκεντρώνεται στο μη διαλυτό μέρος των βακτηρίων (εικόνας 15, 16) .Στη συνέχεια προχωρήσαμε σε καθαρισμό της πρωτεΐνης με χρήση κολώνας νικελίου(Ni-NTA) και σε ανάλυση των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων σε SDS page ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και πραγματοποίηση Western blot με αντίσωμα α-his και του ορού PbMP1 όπου παρατηρήθηκε ότι η πρωτεΐνη αναγνωρίζεται από το anti-His αντίσωμα αλλά όχι και από τον ορό (εικόνα 17).



Εικόνα 14: Ευθυγράμμιση του φορέα κλωνοποίησης PGAT2 και απομόνωση της αλληλουχίας του PbMP1 για τον σχηματισμό του ανασυνδασμένου φορέα κλωνοποίησης.

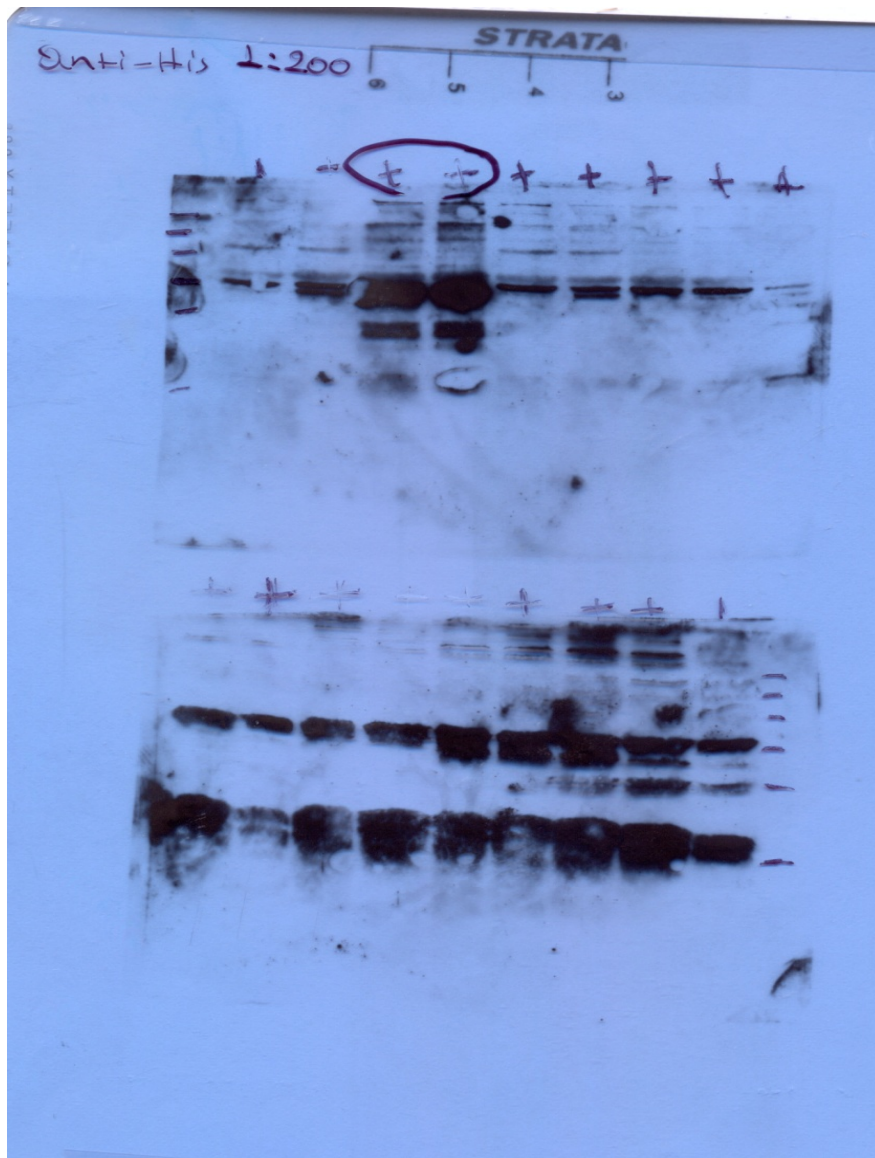
ΠΕΛΕΤΕΣ									
Marker	(-)	30 C	30 C	37 C	37 C	30 C	30 C	37 C	37 C
		0.1	0.3	0.1	0.3	0.1	0.3	0.1	0.3



Marker	(-)	30 C	30 C	37 C	37 C	30 C	30 C	37 C	37 C
		0.1	0.3	0.1	0.3	0.1	0.3	0.1	0.3
ΔΙΑΛΥΤΟ ΜΕΡΟΣ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΥ									

Εικόνα 15 : Η επαγωγή της παραγωγής της πρωτεΐνης έγινε τελικά σε θερμοκρασία 30C παρουσία 0.3 mM IPTG και σε θερμοκρασία 37 C παρουσία 0,1mM IPTG

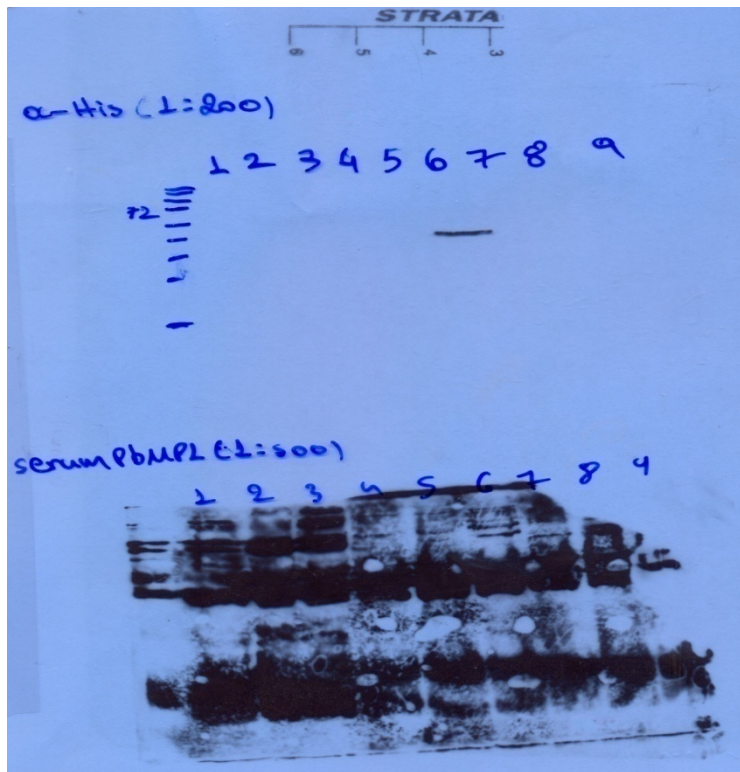
ΠΕΛΕΤΕΣ									
Marker	(-)	30 C	30 C	37 C	37 C	30 C	30 C	37 C	37 C
		0.1	0.3	0.1	0.3	0.1	0.3	0.1	0.3



37 C	37 C	30 C	30 C	37 C	37 C	30 C	30 C	(-) Marker
0.3	0.1	0.3	0.1	0.3	0.1	0.3	0.1	

ΔΙΑΛΥΤΟ ΜΕΡΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ Κ ΥΤΤΑΡΩΝ

Εικόνα 16 : Η επαγωγή της παραγωγής της πρωτεΐνης έγινε τελικά σε θερμοκρασία 30C παρουσία 0.3 mM IPTG και σε θερμοκρασία 37 C παρουσία 0,1mM IPTG



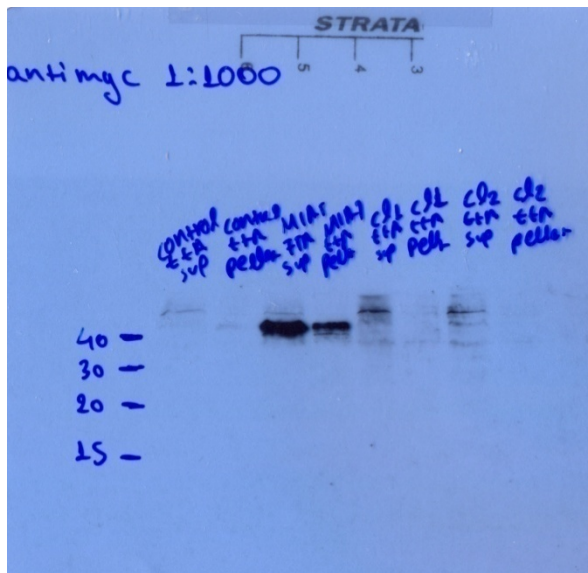
1. Υδατοδιαλυτό τμήμα βακτηρίων πληθυσμού G2
2. Υδατοδιαλυτό τμήμα βακτηρίων πληθυσμού G3
3. Υδατοδιαλυτό τμήμα φορέα PGAT2
4. Διάλυμα ουρίας G2
5. Διάλυμα ουρίας G3
6. Διάλυμα ουρίας φορέα PGAT2
7. Κυτταρικές πελέτες G2
8. Κυτταρικές πελέτες G3
9. Κυτταρικές πελέτες φορέα PGAT2

Εικόνα 17: Φωτογραφία των gel με έκθεση Pico. Το anti-His αντίσωμα αναγνωρίζει τη πρωτεΐνη PbMP1 ενώ ο ορός δεν φαίνεται να είναι ειδικός για την πρωτεΐνη.

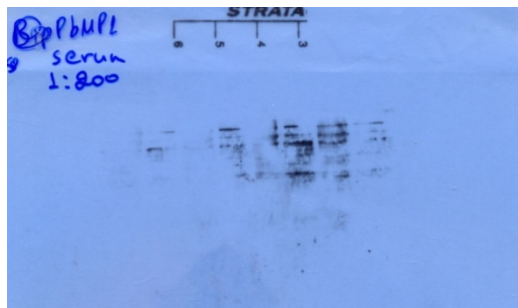
Β) ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ PbMP1 ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ENTOMOY(MOSQUITO CELLS)

Δεδομένης της αδυναμίας να πάρουμε διαγονιδιακό παράσιτο που δεν εκφράζει το γονίδιο PbMP1 αποφασίσαμε να εκφράσουμε έκτοπα το γονίδιο σε αιμοκυτταρική σειρά εντόμου (κουνουπιού) sua 4.0. Για τον λόγο αυτό σηκώσαμε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ολόκληρο το ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο του γονιδίου χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το συνθετικό γονίδιο που χρησιμοποιήσαμε και παραπάνω (βακτηριακή έκφραση). Η ορθότητα της αλληλουχίας επαληθεύτηκε και προχωρήσαμε σε κλωνοποίηση του γονιδίου σε φορέα επαγόμενης έκφρασης μέσω του συστήματος τετρακυκλίνης (tetor_a1AT_3xmyc). Με αυτό τον τρόπο σχηματίσαμε ένα τεχνητό μίνι-γονίδιο στο οποίο η πλασμιδιακή PbMP1 συνδέθηκε αμινοτελικά με το σηματοδοτικό πεπτίδιο της α1-αντιτρυψίνης και με τρεις επαναλήψεις επιτόπου που αναγνωρίζεται από το myc αντίσωμα (εικόνα πλασμιδιακές κατασκευές). Ακολούθησε συνδιαμόλυνση της αιμοκυτταρικής σειράς κουνουπιού με τον παραπάνω φορέα καθώς και με φορέα έκφρασης του συνεργοποιητή tTA2. Ο συνεργοποιητής βρίσκεται υπό τον μεταγραφικό έλεγχο του

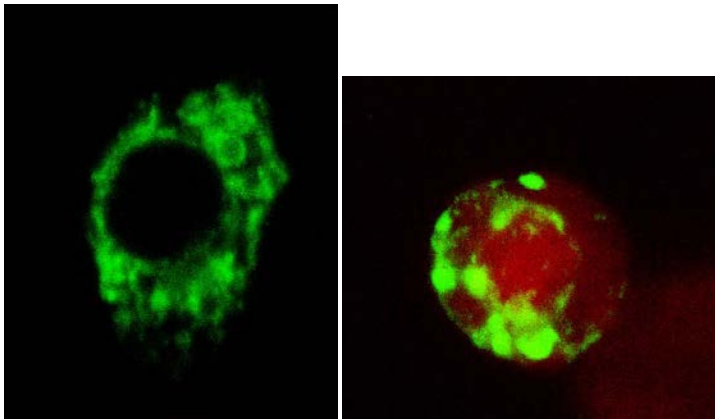
υποκινητή του γονιδίου SRPN10 σερπίνης ή ακτίνης και καταστέλλεται παρουσία δοξυκυκλίνης. Ανάλυση των κυτταρικών εκχυλισμάτων με πειράματα ανοσοαποτύπωσης έδειξε ότι τόσο το αντίσωμα α-myc όσο και ο ορός έναντι PbMP1, που είχε χρησιμοποιηθεί και στην βακτηριακή έκφραση δεν κατάφερε να αναγνωρίσει την έκτοπα υπερεκφρασμένη πρωτεΐνη (εικόνα 18 ,19). Παράλληλα με τα πειράματα ανοσοαποτύπωσης πραγματοποιήθηκαν και πειράματα ανοσοφθορισμού στα οποία χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα α-myc. Μικροσκοπική παρατήρηση των δειγμάτων έδειξε ότι το αντίσωμα αναγνωρίζει στα διαμολυσμένα με tetop_a1AT_3xmyc_PbMP1 πρωτεϊνικό προϊόν το οποίο απουσιάζει από το δείγμα αναφοράς (control) και φαίνεται να εντοπίζεται κυρίως στην κυτταρική μεμβράνη των διαμολυσμένων κυττάρων. (εικόνα 20,21,22,23,24)



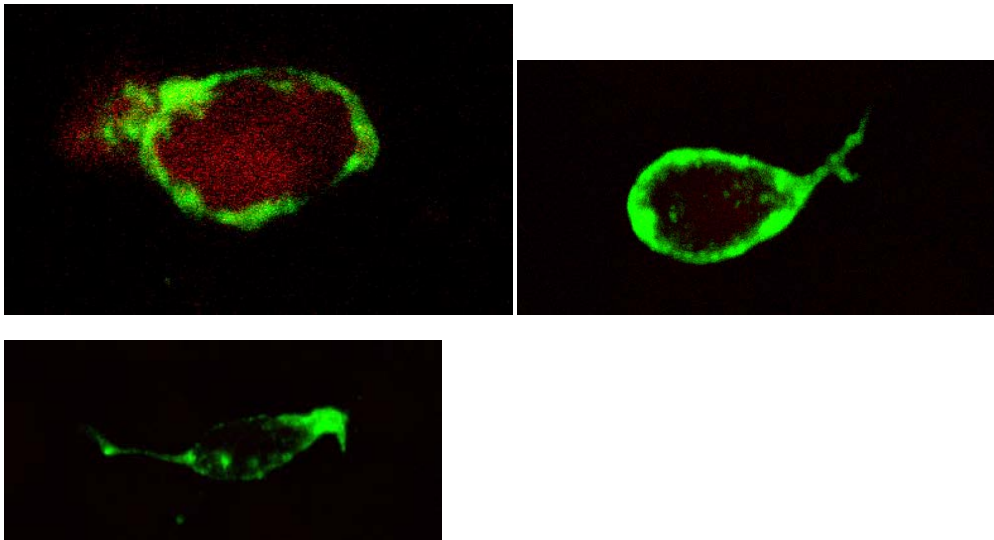
Εικόνα 18 : το αντίσωμα anti-myc δεν αναγνωρίζει τη πρωτεΐνη PbMP1 παρά μόνο την υπερεκφρασμένη πρωτεΐνη στο δείγμα αναφοράς (control)



Εικόνα 19: ο ορός έναντι PbMP1, που είχε χρησιμοποιηθεί και στην βακτηριακή έκφραση δεν κατάφερε να αναγνωρίσει την έκτοπα υπερεκφρασμένη πρωτεΐνη.



Εικόνες 20,21 : Ανοσοφθορισμός σε δείγμα αναφοράς M1ATNTAG με αντίσωμα anti-myc.



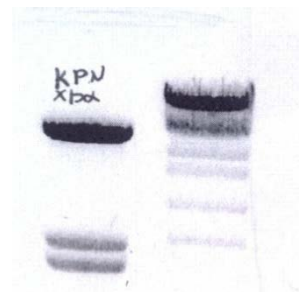
Εικόνες 22, 23, 24 : Ανοσοφθορισμός σε κυτταρικές σειρές εντόμου που εκφράζουν τη RbMP1. Παρατηρούμε ένα διαφορετικό πρότυπο έκφρασης. Η πρωτεΐνη φαίνεται να εκφράζεται περισσότερο στις μεμβράνες των κυττάρων κάτι το οποίο είναι λογικό αφού η πρωτεΐνη είναι διαμεμβρανική.

B) Κατασκευή διαγονιδιακών παρασίτων που δεν εκφράζουν τη PBMP1

Προκειμένου να αποκαλυφθεί πιθανός λειτουργικός ρόλος του γονιδίου PBMP1 επιχειρήσαμε εξουδετέρωση της έκφρασης του με διπλό ομόλογο ανασυνδιασμό. Για αυτό τον λόγο απομονώθηκαν με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης δύο περιοχές του γονιδίου στο 5' και στο 3' άκρο του αντίστοιχα. Και στις δύο περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα στις αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης πλασμωδιακό γενωμικό DNA. Η αλληλουχία αυτών των περιοχών του γονιδίου επαληθεύτηκε και ακολούθησε κλωνοποίηση τους στον φορέα pI001 έτσι ώστε μεταξύ των δυο περιοχών να παρεμβάλλεται το γονίδιο που παρέχει ανθεκτικότητα στο φάρμακο πυριμεθαμίνη. (εικόνα 25 και **πλασμωδιακές κατασκευές**) Ο φορέας pI001_PbMP1 χρησιμοποιήθηκε, αφού είχε πρώτα κοπεί με τα περιοριστικά ένζυμα KpnI και XbaI για την διαμόλυνση απομονωμένων παρασίτων που βρίσκονται στο αναπτυξιακό στάδιο schizonts (εικόνα 26) . Τα διαμολυσμένα παράσιτα χρησιμοποιήθηκαν για να επιμολύνουν ποντίκι στο οποίο χορηγούνταν με το νερό το φάρμακο της πυριμεθαμίνης. Η γονοτύπηση του πληθυσμού των ανασυνδυασμένων παρασίτων έγινε με PCR (εικόνα 27). Σε αυτή οι Εκκινητές που πολλαπλασιάζουν τον μη ανασυνδιασμένο γενετικό τόπο έδειξαν την παρουσία παρασίτων αγρίου τύπου. Οι διαγνωστικοί Εκκινητές για το 5p άκρο της κασέτας πολλαπλασιάζουν προϊόντα μικρότερου μεγέθους από το αναμενόμενο, ενώ οι διαγνωστικοί Εκκινητές για το 3p άκρο της κασέτας πολλαπλασιάζουν σε έναν από τους δυο πληθυσμούς, που πρόεκυψε μια επιθυμητού μεγέθους μπάντα. Πιθανά αυτό υποδεικνύει ότι ανασυνδιασμος έγινε μονό από το 3p άκρο της

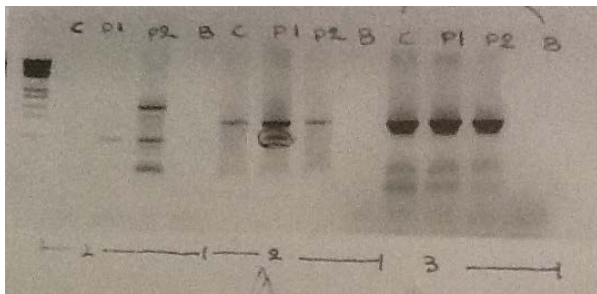


κασέτας.

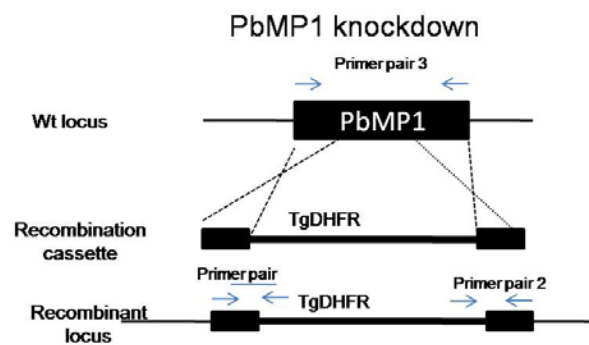


Εικόνα 25: Οριζόντια ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης 1,5 % του φορέα pI001 και των ενθεμάτων A, B του PbMP1. Ο φορέας έχει υποστεί πέψη από τα ένζυμα SpeI και XbaI. Το ένθεμα A έχει υποστεί πέψη από HindIII και KpnI. Το ένθεμα B έχει υποστεί πέψη από SpeI και XbaI

Εικόνα26 : Πέψη του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου φορέα pI001 με τα περιοριστικά ένζυμα KpnI και XbaI προκειμένου να εισαχθεί στα απομονωμένα schizonts παρασίτων.



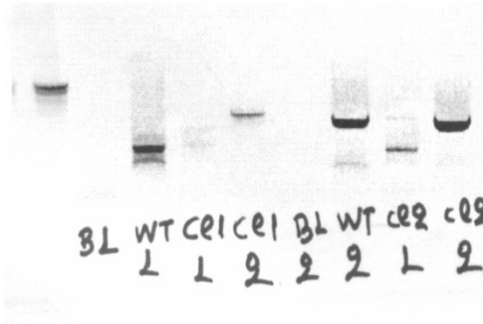
Εικόνα 27 : 4 αντιδράσεις PCR μας δείχνουν τα εξής :
 1,2) αν έχω διαγονιδιακό παράσιτο3)αν έχω παράσιτα αγρίου τύπου. Στο 1) εμφανίστηκαν μπάντες στους πληθυσμούς 1 και 2 των παρασίτων ενώ το control και το blank δείγμα δεν έδωσαν. Στο 2) στο πληθυσμό 1 υπάρχει επιθυμητή μπάντα. Στο 3) παρατηρώ ότι υπάρχουν αναμιγνυόμενοι πληθυσμοί αγρίου τύπου και ανασυνδυασμένων ωοκινετών.



Γ) In vivo Παραγωγή της PbMP1 με φθορίζων επίτοπο

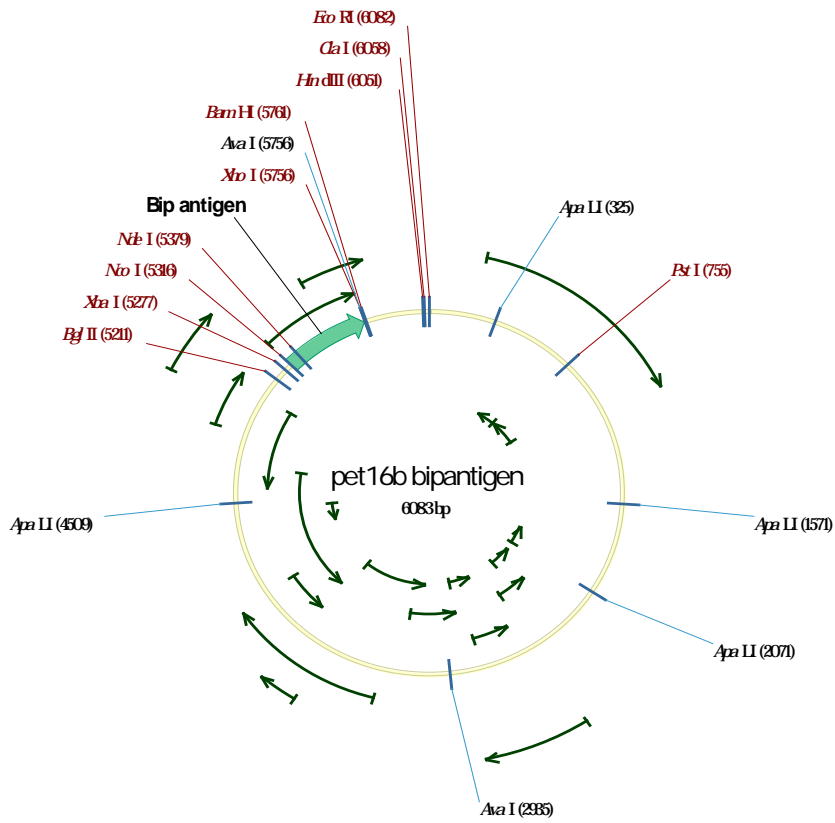
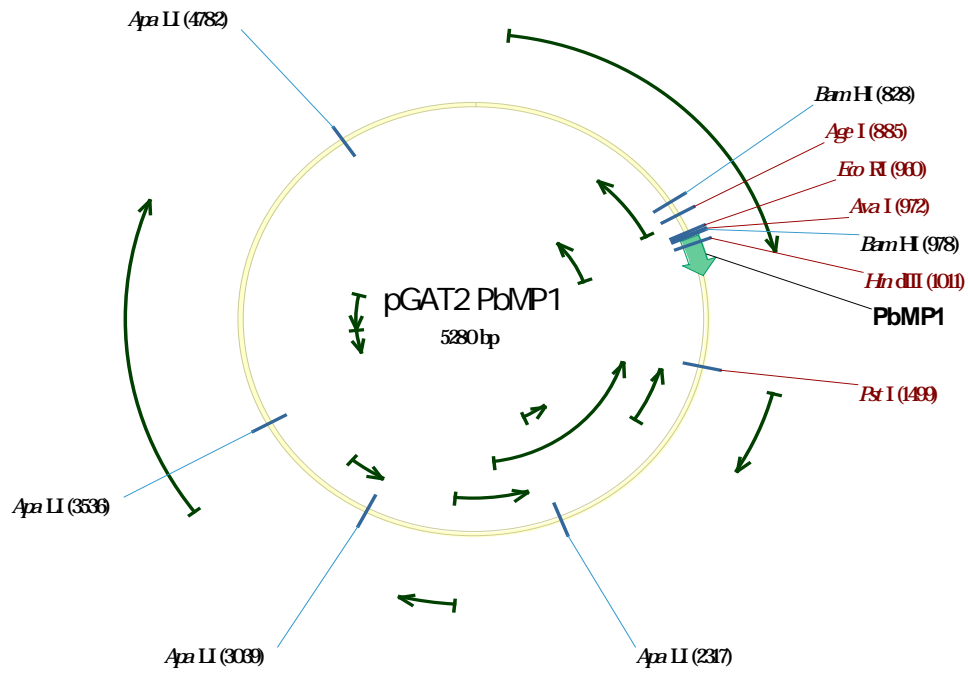
Προκειμένου να γίνει πιο εύκολο να παρακολουθήσουμε το πρότυπο έκφρασης της PbMP1 αποφασίσαμε να προχωρήσουμε στη δημιουργία διαγονιδιακών παρασίτων στα οποία η πρωτεΐνη θα εκφράζεται μαζί με την φθορίζουσα πρωτεΐνη Cherry. Για τον λόγο αυτό μέρος του ανοιχτού αναγνωστικού πλαισίου της PbMP1 (ORF), χωρίς τα κωδικόνια λήξης κλωνοποιήθηκε σε φορέα στο 5' άκρο του ORF της πρωτεΐνης cherry. Με αυτό τον τρόπο σχηματίσαμε ένα τεχνητό μίνι-γονίδιο στο οποίο η πλασμιδιακή PbMP1 συνδέθηκε καρβοξυτελικά με την πρωτεΐνη Cherry, χωρίς να διαφοροποιείται το μεταφραστικό μήνυμα της μιας ή της άλλης. Στην περίπτωση αυτή ο φορέας κόπηκε μια φορά με τη χρήση μοναδικού περιοριστικού ενζύμου στο 5p άκρο της PbMP1 αλληλουχίας και χρησιμοποιήθηκε για τη διαμόλυνση απομονωμένων παρασίτων που βρίσκονταν στο αναπτυξιακό στάδιο των schizonts. Τα διαμολυσμένα παράσιτα χρησιμοποιήθηκαν για να επιμολύνουν ποντίκι στο οποίο χορηγούνταν με το νερό το φάρμακο της πυριμεθαμίνης. Σε αντίθεση με παραπάνω η ενσωμάτωση του φορέα μετά από την διαμόλυνση στο παρασιτικό γενωμα γίνεται με ένα γεγονός ανασυνδιασμού, όπως φαίνεται στο παρακάτω σχεδιάγραμμα. Και πάλι μετά τη διαμόλυνση αναπτύχθηκαν στο ποντίκι πληθυσμοί ανθεκτικοί στην πυριμεθαμίνη. Από αυτούς έγινε απομόνωση γενωμικού DNA γενοτύπηση με PCR. Χρησιμοποιήθηκαν δύο ζεύγη εκκινητών που φαίνονται και στο διάγραμμα. Τα ζεύγος εκκινητών 1 μπορεί να αποκαλύψει την ενσωμάτωση του φορέα ανασυνδιασμού , ενώ το τρίτο ζεύγος εκκινητών αποκαλύπτει το μη

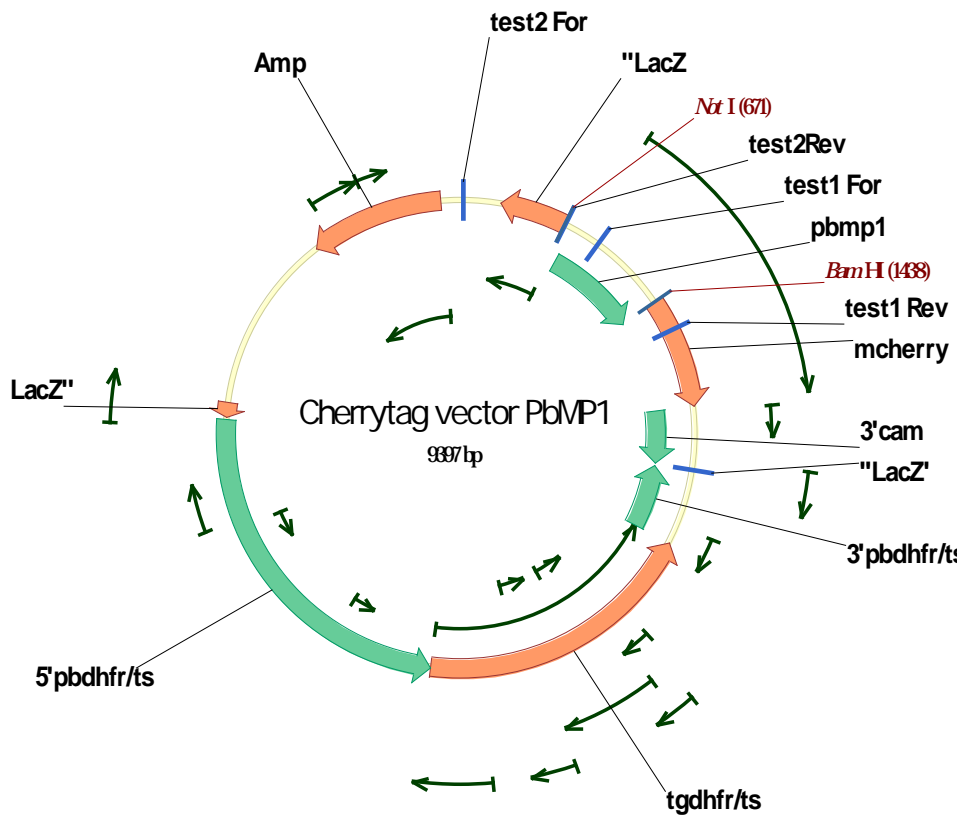
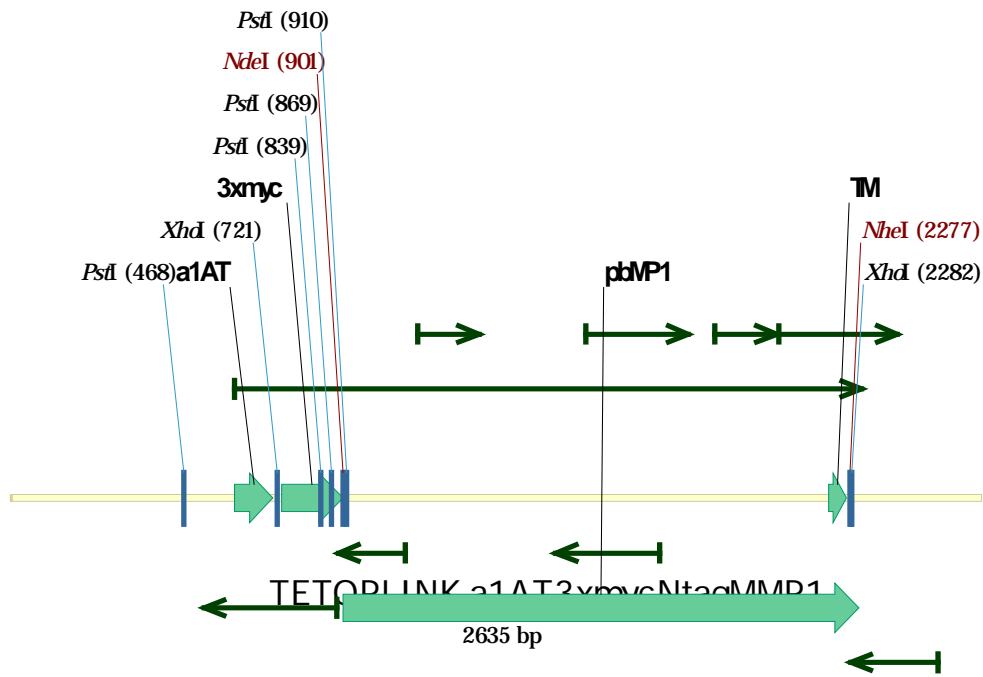
ανασυνδιασμένο γενετικό τόπο (locus) και την παρουσία παρασίτων αγρίου τύπου. Τα αποτελέσματα της PCR έδειξαν την παρουσία μονό παρασίτων αγρίου τύπου, όπως φαίνεται και από την (εικόνα 28)

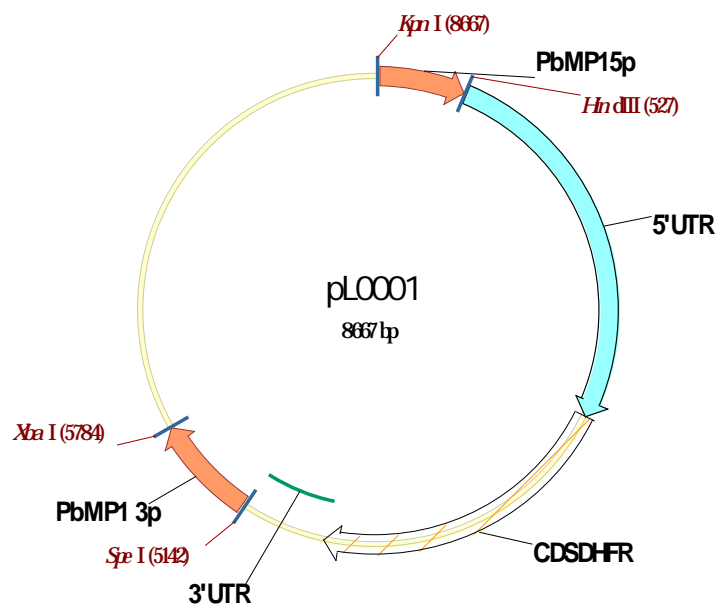


Εικόνα 28: Από την αντίδραση PCR που πραγματοποιήθηκε σε 1,5 % agarose gel παρουσία δείκτη *lady1* δεν παρατηρείται η ύπαρξη διαγονιδιακού παρασίτου διότι οι εκκινητές του πρώτου ζεύγους(1) που αναγνωρίζουν μόνο το διαγονιδιακό δεν είναι λειτουργικοί σε κανένα από τους δύο πληθυσμούς και οι εκκινητές που αναγνωρίζουν μόνο τις αλληλουχίες των παρασίτων αγρίου τύπου είναι λειτουργικοί τόσο στα αγρίου τύπου όσο και στους πληθυσμούς των διαγονιδιακών.

Πλασμιδιακες κατασκευες







Ολιγονουκλεοτίδια

PbMP1

Not1

PbMP1in vivo teg F : 5'- GCGGCCGCGTAAATATCATATGGAAATG- 3'

BamH1

PbMP1in vivo teg R : 5'- GGATCCGTTTTCAAATGGCTTTAC-3'

KPN1

PbMPK/D5'- F : 5'- GGTACCTTTTCTCATGCATCCGCTTGT-3'

HindIII

PbMPK/D5'- R : 5'- AAGCTTTACACCAATCCCCATGC-3'

SPE1

PbMPK/D3'- F : 5'- ACTAGTACAAGAACAACACCAGAATC-3'

Xba1

PbMPK/D3'- R : 5'- TCTAGAGCGACTTGTTTCCAAACA- 3'

Nde1

PbMPins.cellexpr-R : 5'- GCTAGCTTAATTTTCAAACGGTTTCA-3'

EcoR1

PbMPins.cellexpr-R : 5'- GCTAGCTTAATTTTCAAACGGTTTCA-3'

PbMP1FL For :

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) (PDF) [World Malaria Report 2011 summary](#) (Report). World Health Organization.

(2) "Malaria symptoms". [WebMD](#). April 20, 2011. Retrieved 2012-05-09.

Malaria Parasite Development in the Mosquito and Infection of the Mammalian Host

Ahmed S.I. Aly¹, Ashley M. Vaughan¹, and Stefan H.I. Kappe^{1,2}

Joseph G. Sklara^{a,e}, Hideki Makinoshima^{d,e}, Jessica Schneider^c, and Michael S. Glickman^{a,b,c}, (2010)* "*M. tuberculosis* intramembrane protease Rip1 controls transcription through three anti-sigma factor substrates"

Alekseev OM, Richardson RT, Alekseev O, O'Rand MG (2009). "[Analysis of gene expression profiles in HeLa cells in response to overexpression or siRNA-mediated depletion of NASP](#)"

Kris Pauwels and other (2007). "[Chaperoning Anfinsen: The Steric Foldases](#)". *Molecular Microbiology*

(3) <http://www.bio.davidson.edu/courses/molbio/molstudents/spring2003/causey/pet.html>

(4) <http://www.aua.gr/gr/dep/bio/lab/enzym/hp9b.htm>

Intramembrane Proteolysis in Regulated Protein Trafficking

Marius K. Lemberg

Ar [Nat Rev Microbiol](#). 2009 Jun;7(6):411-23.

Making the cut: central roles of intramembrane proteolysis in pathogenic microorganisms.

[Urban S.](#)

icle first published online: 13 JUN 2011

Dudek, J., Benedix, J., Cappel, S., Greiner, M., Jalal, C., Müller, L., & Zimmermann, R. (2009). Functions and pathologies of BiP and its interaction partners. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 66(9), 1556-69. doi:10.1007/s00018-009-8745-y

Ellermeier, C. D., & Losick, R. (2006). Evidence for a novel protease governing regulated intramembrane proteolysis and resistance to antimicrobial peptides in *Bacillus subtilis*. *Genes & Development*, 1911-1922. doi:10.1101/gad.1440606.mals

Kinch, L. N., Ginalski, K., & Grishin, N. V. (2006). Site-2 protease regulated intramembrane proteolysis : Sequence homologs suggest an ancient signaling cascade, 84-93. doi:10.1110/ps.051766506.in

Zhou, R., Cusumano, C., Sui, D., Garavito, R. M., & Kroos, L. (2009). Intramembrane proteolytic cleavage of a membrane-tethered transcription factor by a metalloprotease depends on ATP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(38), 16174-9. doi:10.1073/pnas.0901455106