ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
&
ΙΔΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑΣ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Απομόνωση, χαρακτηρισμός και λειτουργική ανάλυση γονιδίων του κουνουπιού *An.gambiae* ως υποψήφιων υποδοχέων για τη μετάδοση του παρασίτου *P.berghei*

Μαχαιράκη Βασιλική

ΗΡΑΚΛΕΙΟ, ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2003

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδες
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	5-22
1. Η ΑΣΘΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΕΛΟΝΟΣΙΑΣ	5
1α. Στρατηγικές καταπολέμησης της ελονοσίας	6
2. Η ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΕΛΟΝΟΣΙΑΣ	9
2α. Συνοπτική περιγραφή του κύκλου ζωής του παρασίτου	9
2β. Ο σπορογονικός κύκλος του παρασίτου στο κουνούπι	11
3. Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΙΝΤΕΓΚΡΙΝΩΝ	13
3α. Οι σηματοδοτικοί μηχανισμοί των ιντεγκρινών	17
4. Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΛΑΜΙΝΙΝΩΝ	19
5. ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	21
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	23-52
ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ	
1. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ	23
Α. Πέψη μορίων DNA με ένζυμα περιορισμού	23
Β. Διαχωρισμός μορίων DNA σε πήκτωμα αγαρόζης και καθαρισμός τους	23
Γ. Υποκλωνοποίηση μορίων DNA	24
α. Κατασκευή μορίων DNA με τυφλά άκρα	
β. Αντίδραση σύνδεσης (ligation) γραμμικών μορίων DNA	24
Δ. Παρασκευή δεκτικών κυττάρων (competent cells)	24
Ε. Μετασχηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων από πλασμιδιακές κατασκευές	25
ΣΤ. Ταυτοποίηση των ανασυνδυασμένων βακτηριακών κλώνων	25

Ζ. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA 26

2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΟΤΑΓΟΥΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗ-ΛΟΥΧΙΑΣ ΜΟΡΙΩΝ DNA (DNA sequencing analysis) 26

3. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR : POLYMERASE CHAIN REACTION) 27

4. ΡΑΔΙΟΣΗΜΑΝΣΗ ΜΟΡΙΩΝ DNA 27

5. ΑΝΑΛΥΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA ΚΑΤΑ SOUTHERN (SOUTHERN BLOT) 28

6. ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ 29

7. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΦΑΓΙΚΗΣ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ 29

8. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΑΓΟΥ ΑΠΟ ΥΓΡΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ 31

ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

5. ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΑ ΠΗΚΤΩΜΑΤΑ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ 32

2. ΑΝΟΣΟΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ (WESTERN BLOTTING) 33

ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ RNA

1. ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ 34

2. ΗΜΙΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (Semiquantitative PCR) 35

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑΣ

1. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ ΕΝΑΝΤΙ ΤΗΣ Β-ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ ΤΗΣ ΙΝΤΕΓΚΡΙΝΗΣ 36

Α. Παρασκευή ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης και καθαρισμός της σε αποδιατακτικές συνθήκες 36

Β. Ανοσοποίηση ποντικών στελέχους BALB/C 38

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΑΝΟΣΟΕΝΤΟΠΙΣΜΟΥ ΜΕ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ 39

2Α. Πειράματα ανοσοφθορισμού σε μεσέντερα ενήλικων κουνουπιών 39

***ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΟΥΝΟΥΠΙΩΝ* 42**

***ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ* 42**

1. ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΗΜΑΝΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ *in vitro* ΜΕ ΦΘΟΡΙΖΟΝΤΑ ΜΙΚΡΟΣΦΑΙΡΙΔΙΑ (*In vitro* microsphere binding assay) 42

Α. Παροδική διαμόλυνση κυτταρικών σειρών 43

Β. Σήμανση με φθορισμό του αντισώματος έναντι του τμήματος Fc IgG1 44

2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΩΝ ΔΥΟ ΥΒΡΙΔΙΩΝ ΣΤΟ ΣΑΚΧΑΡΟΜΥΚΗΤΑ (YEAST TWO HYBRID SYSTEM) 45

Α. Μετασχηματισμός στελεχών *Saccharomyces cerevisiae* 47

Β. Μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας του ενζύμου β-γαλακτοσιδάσης 47

***ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΙ ΦΟΡΕΙΣ* 49**

***ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ* 53-91**

1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ cDNA ΠΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΕΙ ΤΗ Β-ΥΠΟΜΟΝΑΔΑ ΤΗΣ ΙΝΤΕΓΚΡΙΝΗΣ 53

2. ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ Β-ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ ΤΗΣ ΙΝΤΕΓΚΡΙΝΗΣ ΣΤΟ ΚΟΥΝΟΥΠΙ *An.gambiae* 54

3. ΔΟΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ Β-ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ ΤΗΣ ΙΝΤΕΓΚΡΙΝΗΣ ΤΟΥ ΚΟΥΝΟΥΠΙΟΥ 55

4. ΤΟ ΠΡΟΤΥΠΟ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *INTB* 59

5. ΤΟΠΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ Β-ΙΝΤΕΓΚΡΙΝΗΣ 62

α. Μελέτη της έκφρασης της β-ιντεγκρίνης σε κυτταρικές σειρές κουνουπιού 63

β. Διερεύνηση του κυτταρικού εντοπισμού της β-ιντεγκρίνης στο μεσέντερο του κουνουπιού *An.gambiae* 64

6. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΤΗΣ Β-ΙΝΤΕΓΚΡΙΝΗΣ ΣΤΑ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΜΕΣΕΝΤΕΡΟΥ ΜΕΤΑ ΤΟ ΓΕΥΜΑ ΑΙΜΑΤΟΣ 66

7. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΤΗΣ Β-ΙΝΤΕΓΚΡΙΝΗΣ ΣΤΟ ΜΕΣΕΝΤΕΡΙΚΟ ΕΠΙΘΗΛΙΟ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΙΣΟΔΟ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ *P.berghei* 69

8. ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΠΙΘΑΝΩΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΤΗΣ Β-ΙΝΤΕΓΚΡΙΝΗΣ ΜΕ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΤΟΥ ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ **76**

Α. Διερεύνηση *in vivo* των πιθανών αλληλεπιδράσεων της β-υπομονάδας της ιντεγκρίνης με πρωτεΐνες του παρασίτου **77**

Β. Μελέτη *in vitro* των πιθανών αλληλεπιδράσεων της β-αλυσίδας της ιντεγκρίνης με πρωτεΐνες του παρασίτου *P.berghei* **80**

9. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΤΗΣ ΛΑΜΙΝΙΝΗΣ ΣΤΟ ΜΕΣΕΝΤΕΡΟ ΤΟΥ ΚΟΥΝΟΥΠΙΟΥ ΜΕΤΑ ΤΟ ΓΕΥΜΑ ΜΟΛΥΣΜΕΝΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ **83**

10*. In vivo* ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΠΙΘΑΝΩΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΤΗΣ ΛΑΜΙΝΙΝΗΣ ΤΟΥ ΚΟΥΝΟΥΠΙΟΥ ΜΕ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΤΟΥ ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ **88**

ΣΥΖΗΤΗΣΗ **92-108**

1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ, ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ Β-ΙΝΤΕΓΚΡΙΝΗΣ ΤΟΥ ΚΟΥΝΟΥΠΙΟΥ *An.gambiae* **92**

2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΛΑΜΙΝΙΝΗΣ ΤΟΥ ΚΟΥΝΟΥΠΙΟΥ *An.gambiae* ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΟΥ ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ *P.berghei* **105**

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ **109-124**

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ελονοσία αποτελεί ένα από τα βασικότερα προβλήματα υγείας στον κόσμο, με την εμφάνιση 400.000.000 περιπτώσεων ετησίως, από τις οποίες 2.000.000 θα οδηγήσουν στο θάνατο. Οφείλεται στο παράσιτο του γένους *Plasmodium* το οποίο μεταδίδεται μέσω του κουνουπιού φορέα του γένους *Anopheles.* Καθώς ελάχιστα είναι γνωστά όσον αφορά τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ φορέα-παρασίτου, στόχο της παρούσας εργασίας αποτέλεσε η απομόνωση πιθανών υποδοχέων που εμπλέκονται στις διαδικασίες εισόδου του παρασίτου στο μεσεντερικό επιθηλιακό τοίχωμα του κουνουπιού .

Α' ΜΕΡΟΣ : Απομόνωση, χαρακτηρισμός και λειτουργική ανάλυση της β-υπομονάδας της ιντεγκρίνης του κουνουπιού *An.gambiae*

Αρχικά απομονώθηκε το γονίδιο (*INTB)* που κωδικοποιεί τη β-υπομονάδα της ιντεγκρίνης του κουνουπιού-φορέα της ελονοσίας *Anopheles gambiae*. Η πρωτεΐνη του κουνουπιού και το ορθόλογο μόριο βPS της *Drosophila*, έχουν συντηρημένη αρχιτεκτονική δομή καθ' όλο το μήκος των μορίων τους. Τα κύρια κοινά χαρακτηριστικά τους αποτελούν οι περιοχές I/A υπεύθυνες για την αλληλεπίδραση του υποδοχέα με το δεσμευτή, καθώς και οι επαναλήψεις τύπου-EGF (EGF : Epidermal Growth Factor) γνωστές για την εμπλοκή τους σε πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις. Πειράματα προσδιορισμού του προτύπου έκφρασης έδειξαν ότι το γονίδιο *INTB* είναι ενεργό σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια και σε διαφορετικά σωματικά τμήματα, όπως στο κεφάλι, στο θώρακα, στο μεσέντερο και στην κοιλιακή χώρα. Μετά από μελέτη συσχέτισης της έκφρασης της β-ιντεγκρίνης με τη λήψη αίματος από το κουνούπι, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές στην έκφραση της πρωτεΐνης, εκτός στην περίπτωση των 48 ωρών μετά την αιματοφαγία που τα επίπεδα της έκφρασης τριπλασιάζονται.

Με πειράματα ανοσο-ιστοχημείας χρησιμοποιώντας το αντίσωμα που παρασκευάστηκε έναντι της εξωκυττάριας περιοχής, η β-ιντεγκρίνη α-νιχνεύτηκε στη βασική και στις πλευρικές μεμβράνες των επιθηλιακών κυττάρων του μεσεντέρου. Η ανάλυση του υποκυτταρικού εντοπισμού της στο

μεσέντερο του κουνουπιού 24 ώρες μετά την αιματοφαγία έδειξε την ανακατανομή της από την πλασματική μεμβράνη στο κυτταρόπλασμα, πιθανόν λόγω διαδικασιών ενδοκύττωσης. Ακολούθησε εκτεταμένη μελέτη του κυτταρικού εντοπισμού της β-ιντεγκρίνης σε μεσέντερα κουνουπιών που είχαν θανατωθεί σε διαφορετικές χρονικές περιόδους μετά τη χορήγηση αίματος, μολυσμένου με το παράσιτο *P.berghei*. Όπως αποδείχθηκε, η ιντεγκρίνη καλύπτει ολόκληρη την επιφάνεια των οοκινετών και των νεαρών ωοκυστών, ενώ εντοπίζεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στην περιοχή των ωοκυστών κατά τη μετέπειτα ανάπτυξή τους.

Οι μικροσκοπικές παρατηρήσεις αποτέλεσαν το έναυσμα για τη μελέτη, σε μοριακό επίπεδο, των αλληλεπιδράσεων της β-υπομονάδας της ιντεγκρίνης με πρωτεΐνες που εκφράζονται στην επιφάνεια του παρασίτου και προέρχονται από διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια. Με την εφαρμογή του *in vitro* Συστήματος των Δύο Υβριδίων του σακχαρομύκητα που χρησιμοποιήθηκε για το σκοπό αυτό δεν παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση με τις παραπάνω πρωτεΐνες.

Β' ΜΕΡΟΣ : Λειτουργική ανάλυση της λαμινίνης του κουνουπιού *An.gambiae.*

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε αρχικά ο υποκυτταρικός εντοπισμός της λαμινίνης του κουνουπιού, κύριου συστατικού της βασικής λεπίδας του μεσεντερικού επιθηλίου. Στα πειράματα ανοσο-ιστοχημείας που εφαρμόστηκαν σε μεσέντερα κουνουπιών μολυσμένα με διαφορετικά στάδια ανάπτυξης του παρασίτου, η λαμινίνη ανιχνεύθηκε στην επιφάνεια των οοκινετών, ενώ φαίνεται να περιβάλλει τις ώριμες ωοκύστεις καθώς αυτές προεξέχουν από το επιθηλιακό τοίχωμα προς την πλευρά της αιμολέμφου.

Η εκτεταμένη ανάλυση των μοριακών αλληλεπιδράσεων της πρωτεΐνης του κουνουπιού με επιφανειακές πρωτεΐνες του παρασίτου χρησιμοποιώντας το Σύστημα των Δύο Υβριδίων του σακχαρομύκητα απέδειξε την ισχυρή αλληλεπίδραση της υποπεριοχής (V) της γ1-υπομονάδας της λαμινίνης με την παρασιτική πρωτεΐνη CTRP.

ABSTRACT

Malaria is one of the major health problems in the world, leading to about 400,000,000 cases per year, of which 2,000,000 result to death. Anopheline mosquitoes transmit the Plasmodium parasites, which cause the disease. Because only little is known about the interactions between the insect vector and the parasite, the aim of this study was to isolate potential receptors that are involved in the invasion of the mosquito midgut wall by the parasite.

A' PART : Isolation, characterization and functional analysis of the *An.gambiae* integrin β-subunit

Initially the gene that codes for the β integrin subunit of the malaria vector *An.gambiae (INTB)* was cloned. The mosquito and the *Drosophila* (*βPS*) orthologues share extensive structural similarities through-out the entire molecule. The most recognizable ones are the I/A domains which are responsible for the interaction of the receptor with the ligand, and the EGF-like repeats, known for their involvement in protein-protein interactions. Expression profile determination suggested that *INTB* is active during all developmental stages and in distinct body parts, including the head, the thorax, the midgut and the abdomen. The modulation of β integrin expression in different time points after blood meal ingestion, was also studied. No dramatic changes were observed, except at 48 hours after bloodfeeding when a threefold increase in transcript concentration was noted.

Using the β-integrin antibody we produced, the protein was detected at the basolateral membranes of the midgut epithelial cells. The study of subcellular localization of the protein in mosquito midgut 24 hours after bloodfeeding showed the redistribution of integrin, possibly due to endocytosis processes. Also, after extensive analysis of the protein localization in guts dissected from mosquitoes killed at different time points after feeding with

blood infected with *P.berghei*, it was shown that it covers the surface of both ookinetes and young oocysts, and it was also found at high concentrations in the vicinity of the oocysts later in development.

Due to these observations we proceeded to a detailed analysis of the interactions, on the molecular level, of β integrin with *Plasmodium* surface proteins which are expressed in different developmental stages of the parasite. Using the *in vitro* Yeast Two-Hybrid System, no such interactions were detected.

B' PART : Functional analysis of the *An.gambiae* extracellular matrix protein Laminin

Several recent reports have implicated the involvement of the basal lamina surrounding the midgut in the binding of the *Plasmodium* ookinete. Whether this extracellular structure acts as a mere physical barrier that blocks parasite migration, also masking the parasite from the insect's immune system, or whether specific developmental cues are provided through the intimate contact, which eventually lead to the induction of the transformation into an oocyst, is unknown.

Initially, the subcellular localization of the mosquito Laminin protein, the main component of basal lamina was studied. In immunofluorescence microscopy experiments using infected mosquito midgets, laminin was detected covering the ookinete surface. Moreover it coated the mature oocysts protruding towards the haemolymph.

Extensive analysis using Yeast Two-Hybrid System was undertaken in order to elucidate the molecular interactions of mosquito laminin with parasite surface proteins. It was shown that a subdomain (V) of γ1 laminin subunit strongly interacts with the ookinete surface protein CTRP (Circumsporozoite- and Thrombospondin-related adhesive protein [TRAP]-related protein).

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

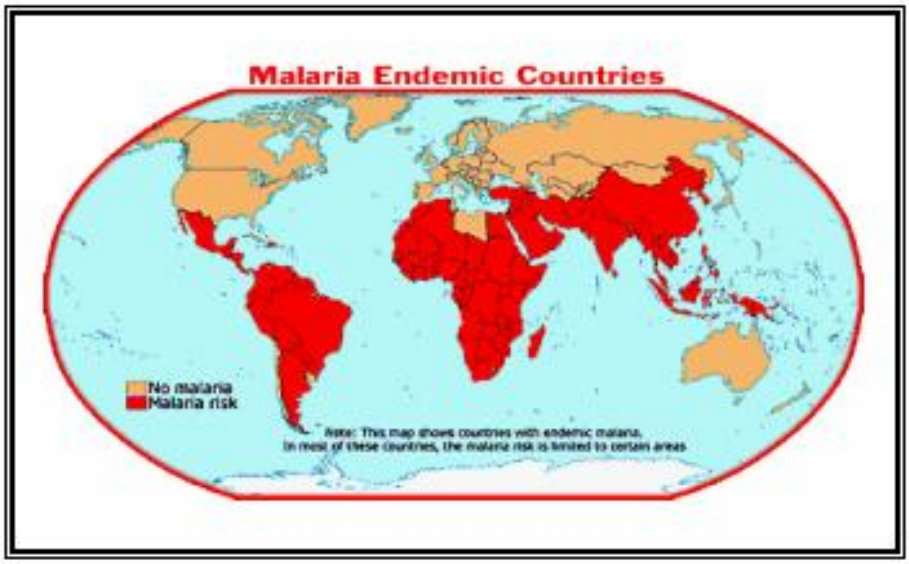
1. Η ΑΣΘΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΕΛΟΝΟΣΙΑΣ

Παρά τις προσπάθειες για περισσότερο από έναν αιώνα να καταπολεμηθεί ή τουλάχιστον να ελεγχθεί η ελονοσία, η ασθένεια αυτή παραμένει μία από τις μεγαλύτερες απειλές για τη δημόσια υγεία και την οικονομική ανάπτυξη χωρών στις τροπικές και υποτροπικές περιοχές του πλανήτη (Εικ.1). Περίπου 40% του παγκόσμιου πληθυσμού διαμένουν σε περιοχές μετάδοσης της ελονοσίας, ενώ 300-500 εκατομμύρια κρούσματα αναφέρονται κάθε χρόνο, 2.7 εκατομμύρια από τα οποία θα οδηγηθούν τελικά σε θάνατο (Greenwood & Mutabingwa, 2002). Τα επίπεδα θνησιμότητας είναι υψηλότερα στην Κεντρική Αφρική, όπου το 90% των θανάτων είναι παιδιά κάτω των 5 ετών (Newman et al., 2003).

Η ελονοσία στον άνθρωπο προκαλείται μετά από μόλυνση με τα ενδοκυτταρικά παράσιτα του γένους *Plasmodium* που μεταδίδονται με τα κουνούπια του γένους *Anopheles*. Τέσσερα είναι τα είδη του παρασίτου *Plasmodium* που προκαλούν την ελονοσία στον άνθρωπο : *P.falciparum*, *P.vivax*, *P.ovale* και *P.malaria* με το πρώτο να είναι υπεύθυνο για την πλειοψηφία των μολύνσεων (Persidis, 2000). Τα είδη του γένους *Anopheles* αριθμούν περίπου τα 450, 40 από τα οποία συγκαταλλέγονται στους σημαντικούς φορείς της ελονοσίας.

Οι ιδιότητες που καθορίζουν την ικανότητα μετάδοσης της ασθένειας από τον εκάστοτε φορέα είναι κυρίως τρεις: η 'υποστήριξη' του παρασιτικού κύκλου, οι διατροφικές συνήθειες και ο μέσος όρος ζωής του ξενιστή. Η ανθεκτικότητα στα ανθελονοσιακά φάρμακα (Ringwald et al., 2002, Mu et al., 2003) και τα εντομοκτόνα (Ranson et al., 2002, Hemingway et al., 2002, Curtis et al., 2001), οι μετακινήσεις των πλυθησμών (Schlagenhauf et al., 2003) και οι αλλαγές στις κλιματολογικές συνθήκες αποτελούν μερικά από τα αίτια εξάπλωσης της ασθένειας (Minakawa et al., 2002, Hay et al., 2002).

Η ελονοσία μπορεί να προκαλέσει μία πληθώρα συμπτωμάτων, μερικά από τα οποία είναι πόνος, πυρετός, ρίγη, αναιμία και στη χειρότερη περίπτωση εγκεφαλική βλάβη και θάνατος (Miller et al., 2002).



Εικόνα 1. Απεικόνιση των χωρών με υψηλό ποσοστό εμφάνισης ελονοσίας.

1α. Στρατηγικές καταπολέμησης της ελονοσίας

.

Οι προσπάθειες ελέγχου των κουνουπιών-φορέων του παρασίτου της ελονοσίας στις χώρες του Τρίτου Κόσμου δεν είχαν ιδιαίτερα αποτελέσματα, κυρίως λόγω της γενετικής ευελιξίας και της αυξημένης ικανότητας

πολλαπλασιασμού των φορέων. Η γενετική τους ευελιξία υποδηλώνεται όχι μόνο από την ταχεία ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα, αλλά και από τη δημιουργία μεγάλου αριθμού οικοτύπων κατά την προσαρμογή τους στο ανθρώπινο περιβάλλον. Βασικά οι στρατηγικές καταπολέμησης της ελονοσίας μπορούν να χωριστούν σε δύο κύριες κατευθύνσεις, έχοντας ως στόχο είτε το παράσιτο, είτε τον ξενιστή. Η πρώτη περιλαμβάνει την ανάπτυξη εμβολίων και φαρμάκων υπεύθυνων για την καταστολή της ανάπτυξης και δράσης του πλασμωδίου στον άνθρωπο-ξενιστή, και η δεύτερη αναφέρεται στις προσπάθειες καταστολής της μετάδοσης του παρασίτου από το κουνούπι-φορέα μέσω καταπολέμησης του φορέα με χημικό, βιολογικό και γενετικό τρόπο.

Όσον αφορά την πρώτη κατεύθυνση, η ανάπτυξη ενός αποτελεσματικού εμβολίου αποτελεί αντικείμενο έρευνας για αρκετές δεκαετίες χωρίς ωστόσο τα επιθυμητά αποτελέσματα. Ένας από τους βασικούς λόγους είναι η γενετική πολυπλοκότητα του παρασίτου, γεγονός που σημαίνει ότι, η έκφραση ενός μεγάλου και ποικίλου αριθμού πρωτεϊνών στα πολλαπλά αναπτυξιακά του στάδια καθιστά την επιλογή κάποιων από αυτών σαν πιθανών στόχων για την ανάπτυξη εμβολίων ιδιαίτερα περίπλοκη (Tsuboi et al., 2003, Long & Hoffman, 2002). Η αλληλούχιση, ωστόσο του γονιδιώματος του παρασίτου και οι νέες τεχνολογίες, όπως οι μικροσυστοιχίες (microarrays) θα συνεισφέρουν σημαντικά στον καθορισμό της διαφορετικής έκφρασης των πρωτεϊνών σε κάθε ένα από τα στάδια του παρασιτικού κύκλου (Hoffman et al., 2002, Carucci & Hoffman, 2000).

Εξίσου δύσκολη και ανεπιτυχής είναι μέχρι σήμερα η προσπάθεια εξάλειψης του πλασμωδίου με την χρήση φαρμάκων. Βασική αιτία αποτελεί η ταχεία ανάπτυξη ανθεκτικότητας του παρασίτου στα περισσότερα από τα υπάρχοντα ανθελονοσιακά φάρμακα (Le Bras & Durand, 2003). Μία σειρά από χημικά φάρμακα έχουν χρησιμοποιηθεί για την καταστολή της δράσης του παρασίτου στον άνθρωπο-ξενιστή με ιστορική αφετηρία το ενεργό συστατικό κινίνο που περιέχεται στη φλοίδα των δένδρων Cinchora. Η χλωροκίνη όμως που αναπτύχθηκε στα μέσα του δευτέρου παγκοσμίου πολέμου και χρησιμοποιείται μέχρι τις μέρες μας αποτέλεσε το πιο

διαδεδομένο φάρμακο λόγω των χαρακτηριστικών του, της αποτελεσματικότητάς του, της χαμηλής τοξικότητας και του χαμηλού κόστους (Wellems 2002, Hastings et al., 2002). Ωστόσο σήμερα, σε μέρη της Νοτιοανατολικής Ασίας, όλα τα στελέχη του *P.falciparum* είναι ανθεκτικά σε σχεδόν όλα τα ανθελονοσιακά φάρμακα, ενώ στελέχη του *P.vivax* ανθεκτικά στη χλωροκίνη έχουν ήδη αρχίσει να εξαπλώνονται (Fryauff et al., 1998, Wellems 2002, Nomura et al., 2001).

Όπως ήδη αναφέρθηκε παραπάνω, μία από τις στρατηγικές που ακολουθείται για την καταπολέμηση της ελονοσίας έχει ως στόχο την παρεμπόδιση της διάδοσης του παρασίτου μέσω του εντόμου-φορέα. Ιδιαίτερης σημασίας και πολλά υποσχόμενη αποτελεί η μέθοδος της γενετικής τροποποίησης του κουνουπιού (Alphey et al., 2002, Moreira et al., 2002). Η βασική ιδέα της μεθόδου που είναι η παραγωγή γενετικά τροποποιημένων στελεχών κουνουπιού με αδυναμία μετάδοσης του παρασίτου και η αντικατάσταση στη φύση του αγρίου τύπου πληθυσμών-φορέων με τους μετασχηματισμένους μη-φορείς αναφέρθηκε για πρώτη φορά εδώ και τρεις δεκαετίες (Curtis, 1968). Οι εξελίξεις στον τομέα αυτόν είναι πραγματικά εκπληκτικές καθώς σε διάστημα μόνο λίγων ετών επιτεύχθηκε η γενετική τροποποίηση των δύο βασικότερων φορέων ελονοσίας, του *Anopheles stephensi* στην Ινδία και του *Anopheles gambiae* στην Αφρική (Catteruccia et al., 2000, Grossman et al., 2001). Πρέπει να σημειωθεί ότι η επιτυχής εφαρμογή της τεχνικής έγινε δυνατή λόγω της ήδη υπάρχουσας γνώσης όσον αφορά την ταυτοποίηση αποτελεσματικών μεταθετών στοιχείων, την ανακάλυψη κατάλληλων δεικτών μετασχηματισμού και τον χαρακτηρισμό ιστοειδικά επαγόμενων υποκινητών (Coates et al., 1998, Coates et al., 1999, Pinkerton et al., 2000, Lobo et al., 2002). Η γενετική τροποποίηση των κουνουπιών δεν αποτελεί παρά το πρώτο βήμα της συγκεκριμένης στρατηγικής ελέγχου της ελονοσίας. Πολλά είναι τα ερωτήματα που θα πρέπει να απαντηθούν τόσο στον τομέα πειραματικών εφαρμογών, όσο και στον ηθικοπολιτικό τομέα όσον αφορά τη μαζική απελευθέρωση γενετικά τροποποιημένων οργανισμών στη φύση (Scott et al., 2002).

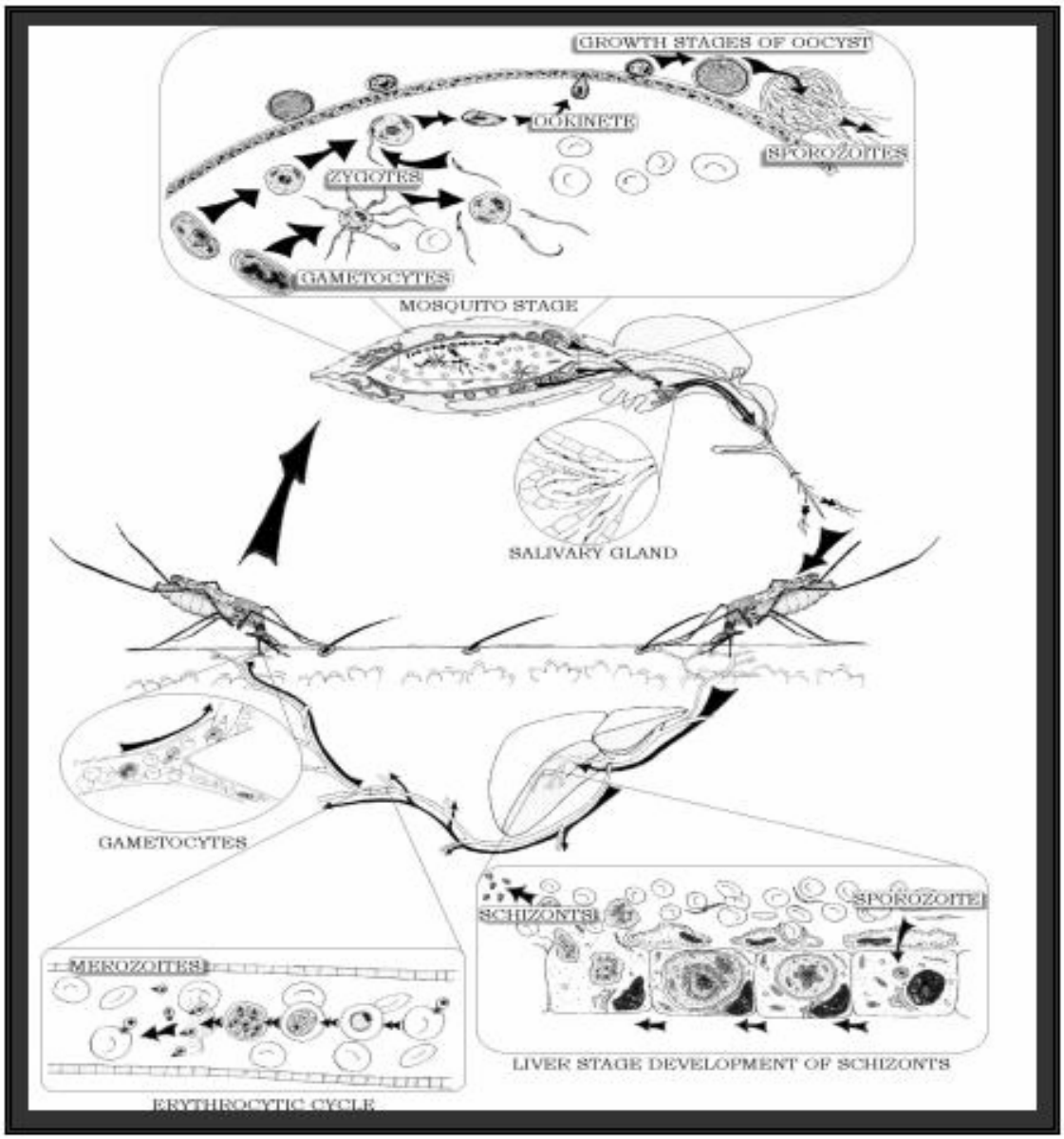
2. Η ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΕΛΟΝΟΣΙΑΣ

2α. Συνοπτική περιγραφή του κύκλου ζωής του παρασίτου

Ο κύκλος του παρασίτου για όλα τα είδη που προκαλούν ελονοσία στον άνθρωπο είναι περίπου ο ίδιος. Περιλαμβάνει μία σεξουαλική φάση (σπορογονία), κατά την οποία πολλαπλασιάζεται σε συγκεκριμένα είδη κουνουπιού του γένους *Anopheles* και μία μη σεξουαλική (σχιζογονία), όπου ο πολλαπλασιασμός λαμβάνει χώρα στον άνθρωπο (Εικ.2). Η τελευταία περιλαμβάνει δύο διακριτές φάσεις, την ανάπτυξη του παρασίτου εντός των ερυθρών κυττάρων του αίματος (ερυθροκυτταρική σχιζογονία), και αυτή εντός των κυττάρων του ήπατος (εξω-ερυθροκυτταρική σχιζογονία).

Οι σποροζωίτες που περιέχονται στο σάλιο του κουνουπιού μεταφέρονται στην κυκλοφορία του θηλαστικού ξενιστή με ένα απλό τσίμπημα (Ghosh et al., 2000). Ακολουθεί η είσοδός τους στα ηπατικά κύτταρα, ο πολλαπλασιασμός τους και η ωρίμανσή τους σε μεροζωίτες (Sinden, 1999). Σε 1 με 2 εβδομάδες ένας σποροζωίτης μπορεί να πολλαπλασιαστεί σε 30.000 μεροζωίτες που στη συνέχεια απελευθερώνονται από τα ηπατοκύτταρα και εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος. Ακολουθεί η έναρξη του μη σεξουαλικού ερυθροκυτταρικού κύκλου , με την είσοδό τους στα ερυθρά κύτταρα του αίματος, όπου συνεχίζεται η αναπτυξιακή διαδικασία. Ο μη σεξουαλικός πολλαπλασιασμός οδηγεί στην παραγωγή 36 μεροζωιτών σε κάθε ερυθροκύτταρο και την απελευθέρωσή τους στο αίμα. Ο κύκλος, διάρκειας 48-72 ωρών ανάλογα με το είδος του παρασίτου, επαναλαμβάνεται, ενώ κάποιοι από τους μεροζωίτες θα διαφοροποιηθούν σε θηλυκά και αρσενικά γαμετοκύτταρα, τα οποία στη συνέχεια θα εισέλθουν στο κουνούπι με το επόμενο γεύμα αίματος (Warburg & Miller, 1992, Sinden, 1999). Ακολουθεί η γονιμοποίησή τους στο μεσέντερο του κουνουπιού και η παραγωγή των ζυγωτών, οι οποίοι θα εξελιχθούν σε κινητικές μορφές με το χαρακτηριστικό σχήμα μπανάνας, καλούμενες οοκινέτες. Περίπου 24 ώρες αργότερα οι οοκινέτες θα διαπεράσουν το επιθηλιακό τοίχωμα του μεσεντέρου και θα μετασχηματιστούν σε ωοκύστεις (Canning & Sinden, 1973), όπου λαμβάνει χώρα η σπορογονία. Η ωρίμανση των ωοκυστών έχει σαν

αποτέλεσμα την παραγωγή και απελευθέρωση χιλιάδων σποροζωιτών στην αιμολέμφο του εντόμου από όπου θα εισχωρήσουν στους σιελογόνους αδένες (Rosenberg, 1992, Wengelnik et al., 1999) και με το επόμενο τσίμπημα θα μεταφερθούν στο νέο θηλαστικό ξενιστή.



Εικόνα 2. Σχηματική αναπαράσταση του κύκλου ζωής του παρασίτου της ελονοσίας στο κουνούπι-φορέα (1) και στον άνθρωπο-ξενιστή (2). Το κουνούπι με τη λήψη αίματος από ένα μολυσμένο άτομο θα πάρει ταυτόχρονα και γαμετοκύτταρα του παρασίτου. Όταν ολοκληρωθεί ο κύκλος ανάπτυξής του, το κουνούπι θα αποτελεί πλέον φορέα της ασθένειας. Με το επόμενο γεύμα αίματος θα μεταδόσει το παράσιτο στον άνθρωπο-ξενιστή (Hurd and Sinden, 2001, σχέδιο του Dr Derric Nimmo, Keele University).

2β. Ο σπορογονικός κύκλος του παρασίτου στο κουνούπι

Ο σπορογονικός κύκλος του παρασίτου αρχίζει μία ώρα μετά τη λήψη αίματος από το κουνούπι με τη διαδικασία της γαμετογένεσης (Warburg & Miller, 1992, Sinden, 1999). Τα αρσενικά γαμετοκύτταρα μετά την απελευθέρωσή τους από τα ερυθρά κύτταρα του αίματος ακολουθούν μία συγκεκριμένη πορεία διαφοροποίησης , η οποία καλείται απομαστίγωση και έχει σαν αποτέλεσμα το σχηματισμό 8 γαμετών (μικρογαμέτες). Η διαφοροποίηση αντίστοιχα των θηλυκών γαμετοκυττάρων περιλαμβάνει την απελευθέρωσή τους από τα κύτταρα του αίματος και την ωρίμανσή τους σε γαμέτες (μακρογαμέτες). Στην περίπτωση αυτή ένα γαμετοκύτταρο διαφοροποιείται σε ένα μακρογαμέτη. Δύο είναι οι παράγοντες που θεωρούνται υπεύθυνοι για την επαγωγή της γαμετογένεσης και κατ΄επέκταση για ολόκληρο τον κύκλο του παρασίτου στο κουνούπι, η πτώση της θερμοκρασίας του αίματος κατά 5°C καθώς και η παρουσία ξανθουρενικού οξέος (Billker et al., 1998, Garcia et al., 1998). Συνέχεια της παραπάνω διαδικασίας αποτελεί η γονιμοποίηση των μακρογαμετών από τους μικρογαμέτες, μία διαδικασία που λαμβάνει χώρα 30-60 λεπτά μετά την λήψη αίματος από το κουνούπι. Οι μοριακοί μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για την έναρξη της γονιμοποίησης και οι πιθανοί χημειοτακτικοί μηχανισμοί μεταξύ των γαμετών δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητοί. Ακολουθεί ο μετασχηματισμός του παρασίτου στην επόμενη αναπτυξιακή μορφή, αυτή του οοκινέτη. Οι οοκινέτες έχουν την ικανότητα της κίνησης, ενώ η επιφάνειά τους καταλαμβάνεται από ένα σχετικά μικρό αριθμό πρωτεϊνών (περίπου 10) με μοριακό βάρος που κυμαίνεται από 20-70 KDa. Δύο δε από αυτές, οι P25 και P28 θεωρούνται πιθανοί στόχοι για την ανάπτυξη εμβολίων ικανών να μπλοκάρουν τη μετάδοση του παρασίτου (Hisaeda et al., 2002). Το παράσιτο με τη μορφή του οοκινέτη θα διαπεράσει στη συνέχεια το τοίχωμα του μεσεντέρου. Όπως ήδη αναφέρθηκε, χιλιάδες σποροζωίτες εισέρχονται στο κουνούπι κατά τη λήψη αίματος, αλλά μόνο ένας μικρός αριθμός τους μετασχηματίζεται σε οοκινέτες, ελάχιστοι από τους οποίους θα καταφέρουν να ξεπεράσουν ένα μεγάλο αριθμό εμποδίων κατά τη διαδικασία διέλευσής τους από το επιθηλιακό τοίχωμα και να ωριμάσουν τελικά σε ωοκύστεις. Το πρώτο

εμπόδιο αποτελεί η περιτροφική μεμβράνη την οποία θα πρέπει να διαπεράσουν προκειμένου να εισέλθουν στο επιθηλιακό τοίχωμα (Huber et al., 1991). Αποτελεί μία δομή πλούσια σε χιτίνη που περιβάλλει το γεύμα αίματος στο μεσέντερο του ξενιστή. Οι οοκινέτες εκκρίνουν μία ή περισσότερες προ-χιτινάσες, οι οποίες μετατρέπονται σε ενεργά ένζυμα (χιτινάσες) από τις θρυψίνες που εκκρίνονται από το κουνούπι (Huber et al., 1991, Shahabuddin & Kaslow, 1994, Billingsley & Hecker, 1991). Αμέσως αφού περάσουν το φράγμα της περιτροφικής μεμβράνης οι οοκινέτες θα πρέπει να εισβάλλουν στο επιθήλιο του μεσεντέρου, διαδικασία που αποτελεί το επίκεντρο εκτεταμένων ερευνών τα τελευταία χρόνια τόσο σε μοριακό, όσο και σε κυτταρικό επίπεδο. Το αν οι οοκινέτες ακολουθούν μία ενδοκυτταρική οδό για να διαπεράσουν το τοίχωμα ή διέρχονται μεταξύ των κυττάρων δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως, ενώ έχει ήδη προταθεί ότι η οδός διέλευσης που ακολουθείται κάθε φορά ίσως να διαφέρει μεταξύ των διαφόρων συνδυασμών ξενιστή-παρασίτου (Sinden and Billingsley, 2001). Η διέλευση του επιθηλιακού τοιχώματος από τον οοκινέτη ακολουθείται από την εγκατάστασή του μεταξύ της βασικής μεμβράνης των επιθηλιακών κυττάρων και του εξωκυττάριου υποστρώματος και το μετασχηματισμό του σε ωοκύστη (Canning & Sinden, 1973). Σύμφωνα με πειραματικά δεδομένα υπάρχουν ενδείξεις ότι αλληλεπιδράσεις με συστατικά της βασικής λεπίδας είναι πιθανόν να επάγουν τη διαφοροποίηση των οοκινετών σε ωοκύστεις (Adini and Warburg, 1999,). Μετά από μία περίοδο ωρίμανσης διάρκειας 10-15 ημερών οι ωοκύστεις διαρρηγνύονται και μερικές χιλιάδες σποροζωιτών απελευθερώνονται στην αιμολέμφο του κουνουπιού (Sinden, 1974). Από αυτούς μόνο ένα μικρό ποσοστό της τάξεως του 10-25 % θα φτάσουν τελικά στους σιελογόνους αδένες, καθώς όπως έχει αποδειχθεί *in vitro*, η έκκριση αντιμικροβιακών πεπτιδίων από το ανοσοποιητικό σύστημα του κουνουπιού έχει σαν αποτέλεσμα τη θανάτωσή τους. Ωστόσο το ποσοστό αυτό είναι αρκετό για την ολοκλήρωση του κύκλου. Επόμενο στάδιο είναι η μόλυνση των σιελογόνων αδένων. Οι σποροζωίτες εισβάλλουν αρχικά στα κύτταρα των αδένων, στη συνέχεια απελευθερώνονται στην εκκριτική κοιλότητα, όπου μπορούν να παραμείνουν για εκτεταμένες χρονικές περιόδους (μέχρι και μερικές εβδομάδες) και τέλος οδηγούνται στην έξοδο του αδένα προκειμένου να μεταφερθούν στο νέο ξενιστή με το επόμενο τσίμπημα (Rosenberg, 1992).

Σε μοριακό επίπεδο, παρά το γεγονός ότι δύο από τις επιφανειακές πρωτεΐνες (CS και TRAP) των σποροζωιτών που εμπλέκονται στη διαδικασία εισόδου των σποροζωιτών στους σιελογόνους αδένες έχουν ήδη ταυτοποιηθεί (Wengelnik et al., 1999), οι υπεύθυνοι υποδοχείς για την αναγνώρισή τους παραμένουν ακόμα άγνωστοι.

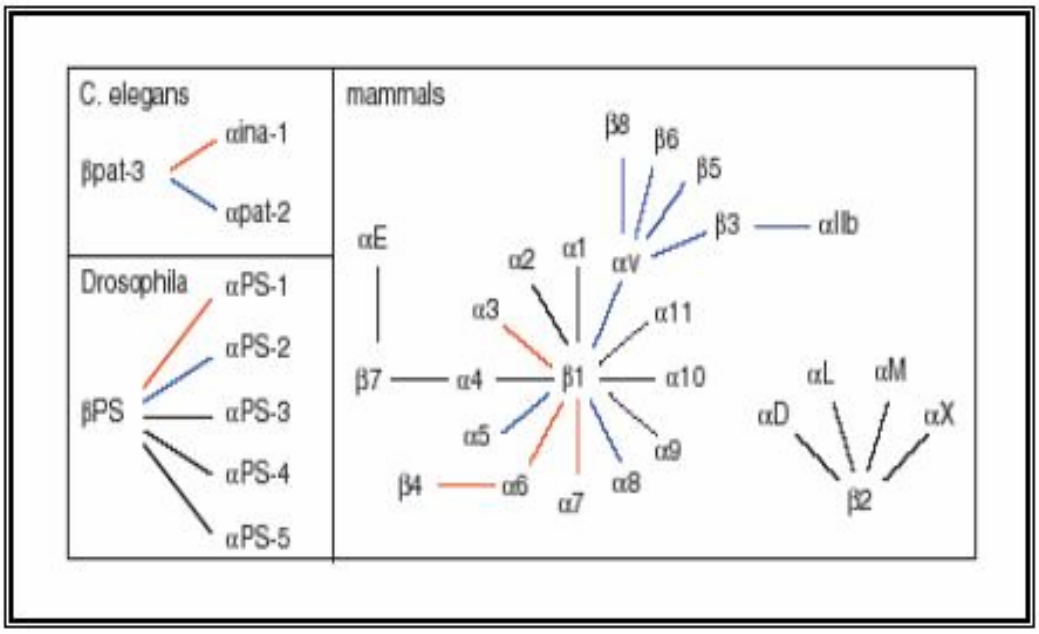
3. Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΙΝΤΕΓΚΡΙΝΩΝ

Η αλληλεπίδραση των κυττάρων με τα γειτονικά τους κύτταρα και με το εξωκυττάριο υπόστρωμα επιτυγχάνεται μέσω διαφόρων τύπων υποδοχέων κυτταρικής συνάφειας, ένας εκ των οποίων είναι η οικογένεια των ιντεγκρινών (Hynes, 1987). Τα μέλη της οικογένειας αυτής περιλαμβάνουν ετεροδιμερείς, διαμεμβρανικούς υποδοχείς, οι οποίοι αποτελούνται από μη ομοιοπολικά συνδεδεμένες α και β υπομονάδες (Hynes, 2002). Κάθε μία από τις αλυσίδες που δομούν τις ιντεγκρίνες αποτελείται από μία μεγάλου μήκους αμινο-τελική εξωκυττάρια περιοχή, ένα διαμεμβρανικό τμήμα και την κυτταροπλασματική περιοχή. Η αλληλεπίδραση με το δεσμευτή πραγματοποιείται μέσω του ακραίου, σφαιρικού τμήματος που σχηματίζουν οι δύο υπομονάδες. Οι κυτταροπλασματικές περιοχές έχουν γενικά περιορισμένο μήκος (30-50 αμινοξέα), με μόνη εξαίρεση την αντίστοιχη περιοχή της β4 υπομονάδας που αποτελείται από 1000 περίπου αμινοξικά κατάλοιπα. Οι εξωκυττάριες περιοχές πολλών από τις α-αλυσίδες περιλαμβάνουν τη χαρακτηριστική περιοχή I/A που αποτελεί μία υποκατηγορία της μεγαλύτερης ομάδας των VWA (VWA: von Willebrand factor A-domain) περιοχών, οι οποίες εντοπίζονται σε μία ευρεία κατηγορία πρωτεϊνών (Tuckwell, 1999, Whittaker and Hynes, 2002, Colombatti et al., 1991). Οι τελευταίες είναι μήκους περίπου 200 αμινοξέων και παίζουν ρόλο σε πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις. Οι I/A περιοχές των ιντεγκρινών συμμετέχουν στη διαμόρφωση της υπεύθυνης δομής για την αλληλεπίδραση των ιντεγκρινών με τον εκάστοτε δεσμευτή (Lee et al., 1995, Mould et al., 2002, Tuckwell & Humphries, 1997). Συγκριτικές μελέτες απέδειξαν την παρουσία χαρακτηριστικής αλληλουχίας πρόσδεσης μεταλλικών ιόντων (MIDAS : metal ion-dependent adhesion site) απαραίτητη για τη

διαδικασία αλληλεπίδρασης του υποδοχέα με το δεσμευτή (Kanazashi et al., 1997, Plow et al., 2000, Lee et al., 1995).

Αξιοσημείωτο είναι το υψηλό ποσοστό συντήρησης που παρουσιάζουν καθόλη τη διάρκεια της εξέλιξης παρόλο που η πολυπλοκότητά τους, λόγω των διαφορετικών υπομονάδων και του λειτουργικού εκφυλισμού συνεχώς αυξάνεται (Hynes and Zhao, 2000). Σε μία πρόσφατη επισκόπηση του ανθρώπινου γονιδιώματος ταυτοποιήθηκαν 24α- και 9β- υπομονάδες, γεγονός που σημαίνει 6 νέες α- και 1 νέα β-αλυσίδα (Venter et al., 2001, van der Flier & Sonnenberg, 2001,). Οι 18 α και οι 8 β-αλυσίδες που είχαν μέχρι τώρα αναγνωριστεί είναι γνωστό ότι σχηματίζουν 24 διαφορετικά ετεροδιμερή (Εικ.3). Ο συνδυασμός των α και β-υπομονάδων καθορίζει την εξειδίκευση του υποδοχέα ως προς το δεσμευτή, τον υποκυτταρικό εντοπισμό και το λειτουργικό ρόλο. Κάθε μία από τις 24 ιντεγκρίνες φαίνεται να παίζει ένα συγκεκριμένο ρόλο, γεγονός που υποδηλώνεται από την εξειδίκευσή τους ως προς το δεσμευτή, πολύ δε περισσότερο από τους διαφορετικούς φαινότυπους που προκύπτουν μετά από τη γονιδιακή απενεργοποίηση (knockout) διαφορετικών κάθε φορά αλυσίδων. Οι φαινότυποι αυτοί ποικίλλουν, με ακραία περίπτωση τη θνησιμότητα σε εμβρυϊκό στάδιο ή λίγο μετά τη γέννηση (Hynes, 1996, Darribere et al., 2000, Bouvard et al., 2001).

Όσον αφορά τα ασπόνδυλα (Burke, 1999), οι νηματώδεις εκφράζουν δύο ιντεγκρίνες, αντιπροσωπεύοντας τις δύο διαφορετικές κλάσεις των ιντεγκρινών, αυτές που αλληλεπιδρούν με τη λαμινίνη της βασικής λεπίδας και αυτές που αλληλεπιδρούν με άλλα συστατικά του υποστρώματος που φέρουν την αλληλουχία RGD (Arg-Gly-Asp) (D'Souza et al., 1988), όπως η φιμπρονεκτίνη. Οι δύο παραπάνω κατηγορίες αντιπροσωπεύονται και στη μύγα *Drosophila melanogaster* (Εικ.3).



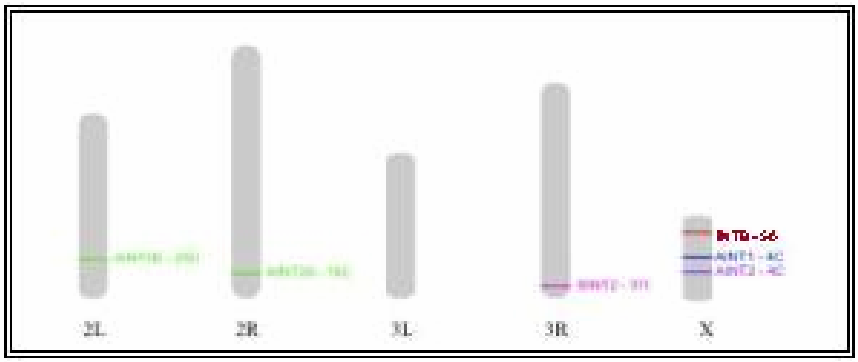
Εικόνα 3. Η οικογένεια των ιντεγκρινών. Με μπλε εικονίζονται οι ιντεγκρίνες που αλληλεπιδρούν με δεσμευτές που φέρουν την αλληλουχία RGD. Με κόκκινο, οι ιντεγκρίνες που αλληλεπιδρούν με λαμινίνη.

Συγκεκριμένα, στη *Drosophila* έχουν εντοπιστεί δύο β- (βPS και βν) και πέντε α-υπομονάδες (αPS1-5) (Mackrell et al., 1988, Yee & Hynes, 1993), οι συνδυασμοί των οποίων σχηματίζουν πέντε PS ιντεγκρίνες (αPS1-5βPS). Μέχρι στιγμής δεν είναι γνωστή η α-υπομονάδα που αλληλεπιδρά με τη βν προκειμένου να σχηματιστεί λειτουργικός υποδοχέας. Ιδιαίτερης σημασίας είναι ο ρόλος που παίζουν οι υποδοχείς αυτοί στον έλεγχο των αναπτυξιακών διαδικασιών των εντόμων (Brown et al., 2000, Leptin et al., 1989). Μυϊκά κύτταρα με ελλατωματική τη βPS υπομονάδα αποτυγχάνουν να έρθουν σε επαφή με το υπόστρωμα του τένοντα με αποτέλεσμα την αποκόλλησή τους από το εξωκυττάριο υπόστρωμα (Bunch et al., 1998, Prokop et al., 1998). Ένα ακόμα παράδειγμα, αποτελεί η ενεργή συμμετοχή τους στη μορφογέννεση του φτερού της *Drosophila*, όπου ο ρόλος των ιντεγκρινών αPS1βPS και αPS2βPS είναι η σύνδεση των δύο επιθηλιακών μεμβρανών (ραχιαίας και κοιλιακής) του φτερού με το εξωκυττάριο υπόστρωμα (Brabant et al., 1998, Brower & Jaffe, 1989). Τέλος, οι ιντεγκρίνες φαίνεται να ελέγχουν και σηματοδοτικούς μηχανισμούς κατά την αναπτυξιακή πορεία του εντόμου, όπως αποδεικνύεται από την ομάδα των Martin-Bermudo και Brown (1999), με την ταυτοποίηση δύο γονιδίων, η έκφραση των οποίων στα εμβρυϊκά

ενδοδερμικά κύτταρα του μεσεντέρου απαιτεί τη συμμετοχή των ιντεγκρινών. Στην ίδια μελέτη, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός του διαχωρισμού της σηματοδοτικής λειτουργίας της ιντεγκρίνης από αυτήν της σύνδεσης, καθώς για την έκφραση των παραπάνω γονιδίων-στόχων της ιντεγκρίνης δεν είναι απαραίτητη η δράση των ιντεγκρινών ως μορίων σύνδεσης μεταξύ των ενδοδερμικών κυττάρων και του σπλαχνικού μεσο-δέρματος. Από τα παραπάνω γίνεται φανερό ότι οι ιντεγκρίνες αποτελούν βασικούς υποδοχείς ελέγχου της διαφοροποίησης κατά την αναπτυξιακή πορεία των εντόμων.

Επιπρόσθετα με το λειτουργικό τους ρόλο σε ένα μεγάλο αριθμό κυτταρικών διαδικασιών, οι ιντεγκρίνες έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκονται σε αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα μεταξύ παθογόνων παραγόντων και ξενιστών. Για παράδειγμα, η είσοδος των *Shigella flexneri* (Watarai et al., 1996), *Gonococcus spp.* (Dehio et al., 1998, van Putten et al., 1998) και *Yersinia spp*. (Isberg & Leong, 1990, Leong et al., 1990) στα κύτταρα θηλαστικών απαιτεί την αλληλεπίδραση των παραπάνω παθογόνων με τις ιντεγκρίνες. Ενδιαφέρον, επίσης, παρουσιάζει το γεγονός ότι οι υποδοχείς αυτοί παίζουν ρόλο στην πρόσδεση και είσοδο παρασίτων, όπως η *Leishmania* (Brittingham et al., 1999) και *Trypanosoma cruzi* (Fernandez et al., 1993) σε ανθρώπινα μακροφάγα.

Το γονιδίωμα του κουνουπιού *An.gambiae* περιλαμβάνει μόνο δύο μέλη της οικογένειας των β-ιντεγκρινών, τα γονίδια *INTB* (Mahairaki et al., 2001) και *BINT2* (Moita et al, unpublished), τα οποία αποτελούν τα ορθόλογα των *βPS* και *βν* αντίστοιχα της *D.melanogaster.* Επίσης, έχουν ταυτοποιηθεί γονίδια για τέσσερις α-υπομονάδες. Από αυτές, οι δύο (AINT1 και AINT2) έχουν ορθόλογα μόρια στη *Drosophila* (PS1και PS2, αντίστοιχα), ενώ τα *AINT3A* και *AINT3B* που κωδικοποιούν τις υπόλοιπες δύο α-αλυσί-δες του ανωφελούς σχηματίζουν μία ομάδα ορθολόγων μορίων μαζί με τρία δροσοφιλικά γονίδια, τα *PS3*, *PS4* και *PS5*. Ως προς τη χρωμοσωμική τους θέση, όλα τα γονίδια που κωδικοποιούν τις α-αλυσίδες διανέμονται σε διαφο-ρετικά χρωμοσώματα του κουνουπιού. Το γονίδιο *INTB* εντοπίζεται στην περιοχή 5A του χρωμοσώματος X (Εικ.4).



Εικόνα 4. Κυτταρογενετικός εντοπισμός των α- και β-υπομονάδων των ιντεγκρινών στο κουνούπι *An.gambiae.*

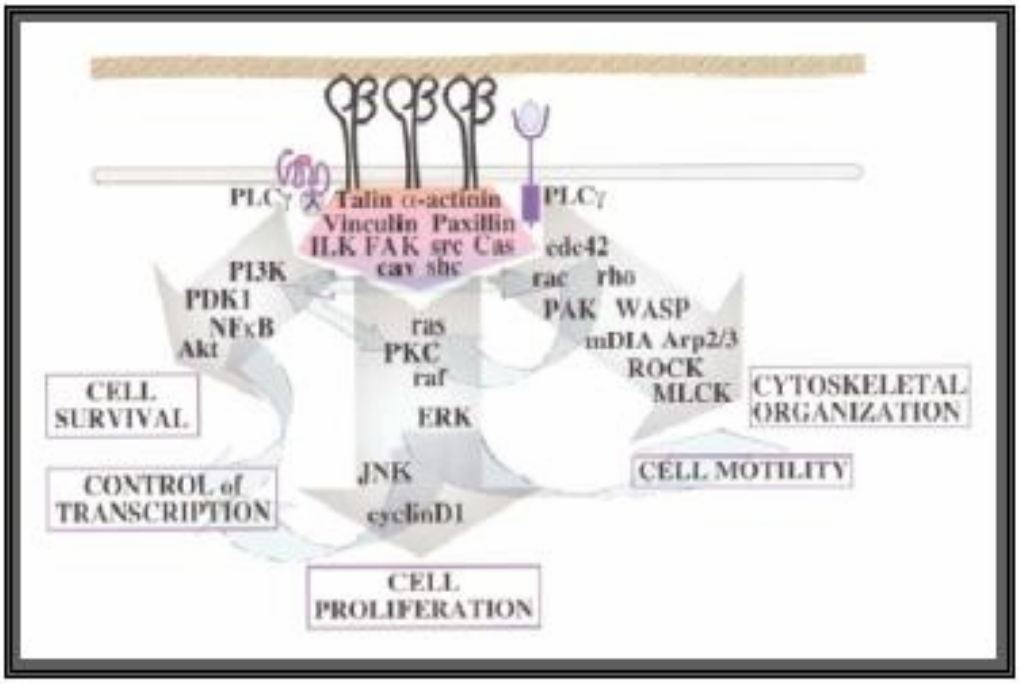
3α. Σηματοδοτικοί μηχανισμοί των ιντεγκρινών

Η επαφή των κυττάρων με το εξωκυττάριο υπόστρωμα παρέχει τα απαραίτητα σήματα που θα συμβάλλουν στον έλεχγο κυτταρικών διαδικασιών, όπως η διαφοροποίηση, ο πολλαπλασιασμός, η επιβίωση και η μετανάστευση. Η κυτταρική σύνδεση επιτυγχάνεται μέσω της αλληλεπίδρασης των ιντεγκρινών με τα συστατικά του εξωκυττάριου υποστρώματος, όπως τη λαμινίνη (Schock & Perrimon, 2003), τη βιτρονεκτίνη (Galbraith et al., 2002), το κολλαγόνο (Xu et al., 2000) και τη φιμπρονεκτίνη, (Sakai et al., 2003). Συνέπεια των αλληλεπιδράσεων αυτών αποτελεί η ομαδοποίηση των ιντεγκρινών, η ενεργοποίησή τους και ο επακόλουθος σχηματισμός πρωτεϊνικών συμπλόκων με τελικό αποτέλεσμα την τοπική αναδιοργάνωση των ινιδίων ακτίνης και το σχηματισμό εξειδικευμένων δομών σύνδεσης, γνωστών ως focal adhesions (Zamir and Geiger, 2001, van der Flier and Sonnenberg, 2001, Schlaepfer et al., 1999). Με τον τρόπο αυτόν οι ιντεγκρίνες δρουν ως διαμεμβρανικοί σύνδεσμοι συνδέοντας το εξωκυττάριο υπόστρωμα με τον κυτταροσκελετό (Liddington et al, 2002, Hynes, 2002).

Οι πρωτεΐνες με τις οποίες οι ιντεγκρίνες αλληλεπιδρούν κυτταροπλασματικά μπορούν να ομαδοποιηθούν σε τρεις κατηγορίες με βάση το

λειτουργικό τους ρόλο : (α) αυτές που σχετίζονται με τον κυτταροσκελετό, μέσω των οποίων επιτυγχάνεται η πρόσδεσή τους σε αυτόν αποτελώντας σημεία συγκέντρωσης σηματοδοτικών μορίων. Πρωτεΐνες που ανήκουν σε αυτή την ομάδα αποτελούν η ταλίνη, η α-ακτινίνη και η φιλαμίνη (Calderwood et al., 2000, Calderwood et al., 2002 (β) πρωτεΐνες με σηματοδοτικό ρόλο που περιλαμβάνουν διάφορες κινάσες, όπως ILK (Integrin-Linked Kinase) (Dedhar et al., 1999, Persad & Dedhar, 2003, Hannigan et al., 1996), FAK (Focal Adhesion Kinase) (Parsons et al., 2000, Hanks et al., 2003, Schaller et al., 1992), κινάσες της οικογένειας Src, καθώς και άλλες με άγνωστη προς το παρόν λειτουργία και (γ) πρωτεΐνες δέσμευσης ασβεστίου που πιθανόν παίζουν ρόλο στην ενεργοποίηση των ιντεγκρινών, όπως και άλλες βοηθητικές, υπεύθυνες για τη σωστή δομική διαμόρφωσή τους (Naik & Naik, 2003). Όσον αφορά τον τρόπο με τον οποίο οι ιντεγκρίνες λειτουργούν σαν σηματοδοτικοί φορείς θα πρέπει να αναφερθεί ότι έχουν την ικανότητα μεταβίβασης σημάτων μέσω της κυτταρικής μεμβράνης και προς τις δύο κατευθύνσεις.

Οι αλληλεπιδράσεις των ιντεγκρινών με τις παραπάνω κατηγορίες πρωτεϊνών οδηγεί στην επαγωγή διαφορετικών σηματοδοτικών μηχανισμών που καθορίζουν μεγάλο εύρος κυτταρικών διαδικασιών, μερικές από τις οποίες αποτελούν ο πολλαπλασιασμός (Assoian et al., 1997), η διαφορο-ποίηση (Edwards et al., 1998, Danen & Sonnenberg, 2003), η γονιδιακή έκφραση (Zhang et al., 1995, Manes et al., 2003) και η μετανάστευση (Baum et al., 1997, Dulabon et al., 2000) (Εικ. 5).



Εικόνα 5. Σηματοδοτικοί μηχανισμοί των ιντεγκρινών. Στην εικόνα παρουσιάζονται τα σημαντικότερα σηματοδοτικά μονοπάτια που επάγονται από τις ιντεγκρίνες και οι κυτταρικές διαδικασίες που ελέγχονται από αυτά. Με ροζ χρώμα εικονίζονται οι βασικοί συνδετικοί κρίκοι μεταξύ των ιντεγκρινών και των μονοπατιών σηματοδότησης.

4. Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΛΑΜΙΝΙΝΩΝ

Παρόλο που η μοριακή δομή των βασικών λεπίδων που προέρχονται από διαφορετικούς ιστούς είναι σε μεγάλο βαθμό ετερογενής, αρκετά από τα χαρακτηριστικά τους είναι κοινά στα περισσότερα από τα εξωκυττάρια υποστρώματα. Όλες σχηματίζονται από δύο ανεξάρτητα πρωτεϊνικά δίκτυα, του κολλαγόνου IV και της λαμινίνης που συνδέονται μεταξύ τους μέσω της πρωτεΐνης nidogen και πιθανόν άλλων, προς το παρόν άγνωστων ακόμα πρωτεϊνών (Yurchenco et al., 1994, Mayer et al., 1998, Timpl, 1996). Οι λαμινίνες είναι ετεροτριμερή μόρια αποτελούμενα από τρεις διαφορετικές υπομονάδες, τις α,β και γ. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί πέντε διαφορετικές α-αλυσίδες (α1 ως α5), τρεις β (β1-β3) και τρεις γ-αλυσίδες (γ1-γ3), οι συνδυασμοί των οποίων έχουν οδηγήσει στο σχηματισμό τουλάχιστον 13 διαφορετικών ισομορφών (Hohenester & Engel, 2002). Από αυτές, η πιο καλά

μελετημένη θεωρείται η λαμινίνη-1(α1β1γ1) έχοντας δομή σχήματος σταυρού σύμφωνα με τα αποτελέσματα εφαρμογής ηλεκτρονικής μικροσκοπίας (Beck et al., 1990, Ohno et al., 1991). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η υπομονάδα γ1 παρουσιάζει την πιο ευρεία κατανομή μεταξύ των διαφόρων ισομορφών, όντας παρούσα σε 11 από αυτές και στις περισσότερες από τις βασικές λεπίδες. Ομόλογο της γ1 υπομονάδας έχει, επίσης, ταυτοποιηθεί σε δύο ισομορφές λαμινίνης που έχουν χαρακτηριστεί μέχρι τώρα στη *Drosophila melanogaster* (Chi et al., 1989, Montell et al., 1989, Chi et al., 1991). Πρόσφατα, επίσης, απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε το γονίδιο *LANB2* που κωδικοποιεί τη γ1-υπομονάδα του κουνουπιού *An.gambiae* και σύμφωνα με μελέτες του προτύπου έκφρασης φαίνεται να εκφράζεται σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια του εντόμου (Vlachou et al.,2001).

‘Οπως έχει ήδη περιγραφεί οι λαμινίνες έχουν δύο διακριτούς ρόλους : (1) αποτελούν το δεσμευτή για υποδοχείς της πλασματικής μεμβράνης, όπως είναι οι ιντεγκρίνες (Ekblom, 1996) και (β) είναι δομικά μόρια που σχηματίζουν πολυμερή και συμμετέχουν στην οργάνωση του εξωκυττάριου υπο-στρώματος, παρέχοντας μηχανική υποστήριξη στα γειτονικά κύτταρα (Colognato & Yurchenco, 2000). Οι διαφορετικοί αυτοί ρόλοι συνδέονται και λειτουργούν συνεργατικά (Colognato et al., 1999) με τελικό αποτέλεσμα την αναδιοργάνωση των ινιδίων ακτίνης στο εσωτερικό του κυττάρου, την επαγωγή σηματοδοτικών μονοπατιών και κατ΄επέκταση τον έλεγχο ποικίλων κυτταρικών μηχανισμών. Σε αυτούς περιλαμβάνονται η διαφοροποίηση (De Arcangelis et al., 1996), η μετανάστευση (Garcia-Alonso et al., 1996) και η επιβίωση του κυττάρου (Fitzakerley, 2001, Esco et al., 2001). Η εκτεταμένη ανάλυση φαινοτύπων που προκύπτουν από τη γονιδιακή απενεργοποίηση (knockout) διαφορετικών αλυσίδων της λαμινίνης αποδεικνύει ότι κάθε μία από τις υπομονάδες παίζει πολλαπλούς αναπτυξιακούς ρόλους σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων επηρεάζοντας τη διαφοροποίηση από το αρχικό στάδιο σχηματισμού της βλαστοκύστης μέχρι τη μετεμβρυϊκή περίοδο (Noakes et al., 1995, Ryan et al. 1999, Shim et al., 1996).

5. ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Οι ακριβείς μοριακοί μηχανισμοί των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των παρασίτων του γένους *Plasmodium* και των κουνουπιών-φορέων του γένους *Anopheles* παραμένουν ακόμα άγνωστοι. Στόχο της παρούσας εργασίας αποτέλεσε η διερεύνηση, σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο, των πολύπλοκων διαδικασιών που εμπλέκονται στην είσοδο του παρασίτου στο μεσέντερο του κουνουπιού και στην αναπτυξιακή πορεία που ακολουθεί κατά την παραμονή του σε αυτό. Λαμβάνοντας υπόψην τα υπάρχοντα βιβλιογραφικά δεδομένα όσον αφορά τη λειτουργία πρωτεϊνών ως θέσεις αναγνώρισης παθογόνων παραγόντων σε άλλους οργανισμούς, η πειραματική προσέγγιση που ακολουθήθηκε ήταν η προσπάθεια απομόνωσης και λειτουργικής ανάλυσης των αντίστοιχων πρωτεϊνών στο κουνούπι ως πιθανούς υποδοχείς επαφής του παρασίτου με το μεσέντερο του εντόμου.

Επιγραμματικά οι στόχοι της παρούσας μελέτης ήταν :

- Η απομόνωση του γονιδίου (*INTB*) που κωδικοποιεί τη β-υπομονάδα της ιντεγκρίνης στο κουνούπι *An.gambiae* και η μελέτη της αρχιτεκτονικής δομής του πολυπεπτιδίου.

- Η μελέτη του προτύπου έκφρασης του γονιδίου *INTB* μετά τη λήψη αίματος από το κουνούπι.

- Η μελέτη του τοπολογικού εντοπισμού του πολυπεπτιδίου στα επιθηλιακά κύτταρα του μεσεντέρου μετά τη χορήγηση μολυσμένου ή μη αίματος.

- Η ανάλυση, σε μοριακό επίπεδο, των αλληλεπιδράσεων της β-υπομονάδας της ιντεγκρίνης με πρωτεΐνες της επιφανείας του παρασίτου *P.berghei*.

- Η ανίχνευση της τοπολογικής κατανομής της λαμινίνης στο μεσέντερο του εντόμου και η συσχέτισή της με την αναπτυξιακή πορεία του παρασίτου.

- Η διερεύνηση των μοριακών αλληλεπιδράσεων της γ1-υπομονάδας της λαμινίνης του κουνουπιού *An.gambiae* με επιφανειακές πρωτεΐνες του παρασίτου *P.berghei*.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

1. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ

Α. Πέψη μορίων DNA με ένζυμα περιορισμού

Για την πέψη μορίων DNA χρησιμοποιήθηκαν 1-5 μονάδες ενδονουκλεάσης ανά 1μgr DNA σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα και θερμοκρασία σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας (New England Biolabs και Minotech).

Β. Διαχωρισμός μορίων DNA σε πήκτωμα αγαρόζης και καθαρισμός τους.

Για τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό μορίων DNA χρησιμοποιήθηκαν πηκτώματα αγαρόζης, των οποίων η συγκέντρωση ήταν ανάλογη με το μέγεθος των υπό ανάλυση μορίων (Sambrook et al., 1989). Ο καθαρισμός των μορίων έγινε με Qiaex II gel extraction kit της εταιρείας Qiagen.

Γ. Υποκλωνοποίηση μορίων DNA

α. Κατασκευή μορίων DNA με τυφλά άκρα

Η υποκλωνοποίηση γραμμικών μορίων DNA σε πλασμιδιακούς φορείς περιλαμβάνει τη συνένωση τμημάτων που έχουν είτε τυφλά είτε προεξέχοντα άκρα. Η κατασκευή τυφλών άκρων στα μόρια DNA επιτεύχθηκε με τη χρήση του ενζυμικού κλάσματος Klenow της DNA πολυμεράσης I που προέρχεται από την *E. coli* (DNA Pol I) (Jacobsen et al., 1974, Joyce and Grindley, 1983). Το ένζυμο «γεμίζει» τα υπολοιπόμενα 3΄ άκρα που δημιουργούν οι περιοριστικές πέψεις, παρουσία δεσόξυ-νουκλεοτιδίων (5΄→ 3΄ ενεργότητα πολυμερισμού). Χρησιμοποιήθηκε, επίσης και η ενεργότητα 3΄→5΄ του ίδιου ενζύμου για την υδρόλυση νουκλεοτιδίων των 5΄ προεξεχόντων άκρων (3΄→ 5΄ ενεργότητα εξωνουκλεάσης).

β. Αντίδραση σύνδεσης (ligation) γραμμικών μορίων DNA

Στις αντιδράσεις σύνδεσης ενθέματος DNA με τον κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε ήταν η λιγάση του βακτηριοφάγου T4 με ελάχιστη ποσότητα φορέα σε κάθε αντίδραση 50ngr (Weiss et al., 1968). Η απαιτούμενη συγκέντρωση του ενθέματος ήταν τέτοια ώστε να διατηρείται η αναλογία 1:3 ή 1:5 (φορέα / ένθεμα). Η ποσότητα του ενζύμου και οι συνθήκες της αντίδρασης (χρόνος επώασης, θερμοκρασία) καθορίζονταν από το αν τα άκρα των μορίων DNA που επρόκειτο να συνδεθούν ήταν συμβατά ή τυφλά. Στην πρώτη περίπτωση, η ποσότητα της λιγάσης ήταν 0.2-1.0 Weiss units και η διάρκεια της αντίδρασης 10-14 ώρες στους 16°C ή 3 ώρες στους 25°C. Όταν τα άκρα ήταν τυφλά, η ποσότητα λιγάσης ήταν 2-4 Weiss units και η αντίδραση παρέμενε για 10-14 ώρες στους 16°C.

Δ. Παρασκευή δεκτικών κυττάρων (competent cells)

Η παρασκευή δεκτικών βακτηριακών κυττάρων έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο $CaCl_2$ - $RbCl_2$ που περιγράφεται στους Sambrook et al., 1989.

Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, 50ml καλλιέργειας κυττάρων *E. coli* DH5a σε θρεπτικό μέσο LB επωάστηκαν σε θερμοκρασία 37°C μέχρι να φτάσουν σε λογαριθμική φάση ανάπτυξης (OD_{595}=0.4-O.45). Στη συνέχεια τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση στις 2000 στροφές για 5 λεπτά στους 4°C και επαναιωρήθηκαν σε 20ml διαλύματος TFB1 (100mM $RbCl_2$, 10mM $CaCl_2$, 30mM CH3COOK, 50mM $MnCl_2$, 15% Γλυκερόλη, pH 5.8). Ακολούθησε επώαση στους 4°C για 20 λεπτά, φυγοκέντρηση και επαναδιάλυση των κυττάρων σε 3ml διαλύματος TFB2 (10mM MOPS, 75mM $CaCl_2$, , 10mM $RbCl_2$, 15% Γλυκερόλη, pH 7.00). Τα κύτταρα διατηρήθηκαν σε ποσότητες των 200μl στους -80°C για 6-8 μήνες. Η απόδοση της μεθόδου , όσον αφορά τη δεκτικότητα των κυττάρων για μετασχηματισμό, κυμαινόταν από 4X10^{7}-5X10^{8} μετασχηματισμένες βακτηριακές αποικίες ανά 1μg πλασμιδιακού υπερελικωμένου DNA.

Ε. Μετασχηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων από πλασμιδιακές κατασκευές

Σε ποσότητα 200μl δεκτικών κυττάρων προστέθηκε ποσότητα από την πλασμιδιακή κατασκευή μετασχηματισμού και τα κύτταρα διατηρήθηκαν στον πάγο για 30 λεπτά. Εφαρμόστηκε θερμικό σοκ (42°C) για 45 δευτερόλεπτα και επανατοποθέτησή τους στον πάγο για 2 λεπτά. Στη συνέχεια προστέθηκαν 800μl θρεπτικού μέσου LB και επωάστηκαν στους 37°C για 1 ώρα. Το κυτταρικό δείγμα επιστρώθηκε σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα που έφερε το κατάλληλο αντιβιοτικό επιλογής. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε κλίβανο επώασης θερμοκρασίας 37°C για 16 ώρες προκειμένου να επιτευχθεί ανάπτυξη των αποικιών.

ΣΤ. Ταυτοποίηση των ανασυνδυασμένων βακτηριακών κλώνων

Η ταυτοποίηση των ανασυνδυασμένων βακτηριακών κλώνων έγινε με δύο διαφορετικές μεθόδους ανάλογα με το φορέα που χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή τους. Στην περίπτωση που ο φορέας έφερε το γονίδιο αναφοράς *lacZ* χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της χρωματικής επιλογής. Σύμφωνα με την τελευταία, το ένθεμα της πλασμιδιακής κατασκευής στα

ανασυνδυασμένα βακτήρια εμποδίζει την παραγωγή του ενζύμου β-γαλακτοσιδάσης από το γονίδιο *lacZ.* Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι αντίστοιχες αποικίες που αναπτύσσονται σε θρεπτικό υπόστρωμα που περιέχει X-gal να μην φέρουν το χαρακτηριστικό μπλε χρώμα της αντίδρασης. Η δεύτερη μέθοδος ταυτοποίησης των ανασυνδυασμένων κλώνων βασίζεται στην υβριδοποίηση των βακτηριακών αποικιών μετά από τη μεταφορά τους σε μεμβράνη υβριδοποίησης (Grunstein and Hogness, 1975). Οι αποικίες μεταφέρθηκαν από το τρυβλίο ανάπτυξης σε μεμβράνες υβριδοποίησης, οι οποίες τοποθετήθηκαν για 5 λεπτά σε διάλυμα λύσης των βακτηρίων που περιείχε 10%SDS. Στη συνέχεια ακολούθησε αποδιάταξη του DNA (0.5N NaOH, 1.5M NaCl) για 5 λεπτά και εξουδετέρωση για 10 λεπτά σε διάλυμα 0.5M Tris-Cl, pH 7.4, 1.5M NaCl. Τέλος, έγινε μία πλύση με 2X SSC για 5 λεπτά και τοποθετήθηκαν στους 80°C για 2 ώρες ώστε να επιτευχθεί η μονιμοποίηση του DNA. Ακολούθησε υβριδοποίησή τους με ραδιενεργά σημασμένο ανιχνευτή, που αναμένεται να υβριδοποιηθε'ι με το επιθυμητό ένθεμα και επιλογή των ανασυνδυασμένων κλώνων.

Ζ. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Για την απομόνωση μικρής ποσότητας πλασμιδιακού DNA εφαρμόσθηκε η μέθοδος της αλκαλικής λύσης που περιγράφεται στους Sambrook et al., 1989. Στην περίπτωση απομόνωσης μεγάλης ποσότητας και υψηλής καθαρότητας DNA χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλες στήλες διαχωρισμού της εταιρείας Qiagen, σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας.

2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΟΤΑΓΟΥΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΜΟΡΙΩΝ DNA (DNA sequencing analysis)

Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος τερματισμού της επιμήκυνσης του DNA, μέσω της ενσωμάτωσης τριφωσφορικών διδεόξυ-νουκλεοτιδίων (Sanger et al., 1977) σημασμένων με κατάλληλες φθορίζουσες χρωστικές.

3. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR : POLYMERASE CHAIN REACTION)

Βασίζεται στον πολλαπλασιασμό τμήματος DNA χρησιμοποιώντας ελάχιστη ποσότητα από αυτό ως μήτρα (Mullis et al., 1987). Πραγματοποιείται με τη χρήση δύο ολιγονουκλεοτιδίων (εκκινητών) συμπληρωματικών για τις αλληλουχίες εκατέρωθεν του τμήματος που πρόκειται να πολλαπλασιασθεί και τη δράση του ενζύμου Taq DNA πολυμεράση. Τα στάδια που περιλαμβάνει η μέθοδος είναι αρχικά η αποδιάταξη του DNA στους 94°C για 5 λεπτά. Ακολουθούν επαναλαμβανόμενοι κύκλοι, καθένας από τους οποίους περιλαμβάνει αποδιάταξη του DNA, υβριδοποίηση των εκκινητών στις αλληλουχίες-στόχους (σε κατάλληλη θερμοκρασία) και επιμήκυνση των νέων αλυσίδων στους 72°C. Τέλος, ολοκληρώνεται ο σχηματισμός των υπαρχόντων αλυσίδων στους 72°C για 10 λεπτά.

Σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν 5ng DNA μήτρας, δεοξυνουκλεοτίδια συγκέντρωσης 0.25mM το καθένα, 1-1.5mM $MgCl_2$, 50mM KCL, 10mM Tris-Cl pH 8.4, ζεύγη εκκινήτων συγκέντρωσης 20pM ο καθένας και 0.5units πολυμεράσης Taq. Η επιλογή των κατάλληλων ζευγών εκκινητών έγινε με το υπολογιστικό πρόγραμμα DNAOligoAnalyzer version2-2.5.

4. ΡΑΔΙΟΣΗΜΑΝΣΗ ΜΟΡΙΩΝ DNA

Η ραδιοσήμανση μορίων DNA πραγματοποιήθηκε με τη χρήση τυχαίων εκκινητών (Random oligo labeling). Μόρια δίκλωνου τμήματος DNA αποδιατάσσονται παροδικά και ακολουθεί ανασύνθεση των συμπληρωματικών αλυσίδων παρουσία τυχαίων εκκινητών που οφείλεται στην πολυμεριστικής δράσης του κλάσματος Klenow της DNA πολυμεράσης I. Για τη σήμανση των μορίων χρησιμοποιούνται ραδιενεργά σημασμένα νουκλεοτίδια (α[^{32}P]-dATP και α[^{32}P]-dCTP). Ποσότητα DNA 50ngr προστέθηκε σε 7.5μl διαλύματος TE και αποδιατάχθηκε με βρασμό για 5 λεπτά. Ακολούθησε η προσθήκη 11.4μl διαλύματος 2X LS, ραδιενεργά σημασμένων νουκλεοτιδίων (20μCi α[^{32}P]-dATP και 20μCi α[^{32}P]-dCTP) και 5u του

κλάσματος Klenow. Η αντίδραση επωάσθηκε για 3 ώρες στους 37°C και τερματίσθηκε με την προσθήκη διαλύματος EDTA τελικής συγκέντρωσης 10Mm. Τα σημασμένα μόρια καθαρίστηκαν για την απομάκρυνση των μη ενσωματωμένων νουκλεοτιδίων με κολώνες Sephadex G-25 όγκου 1ml, αφού προηγουμένως ο όγκος της αντίδρασης είχε αυξηθεί στα 100μl με την προσθήκη διαλύματος ΤΕ. Η ειδική ενεργότητα των σημασμένων μορίων μετρήθηκε σε ειδικό μετρητή σπινθηρισμού. Με τη μέθοδο αυτή των τυχαίων εκκινητών επιτυγχάνεται η παραγωγή σημασμένων ανιχνευτών υψηλής ειδικής ενεργότητας, μεγαλύτερης από 5X10^{8} cpm/μg.

Πίνακας 1. Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση ραδιοσήμανσης με τη μέθοδο των τυχαίων εκκινητών

Διάλυμα DTM	Διάλυμα OL	Διάλυμα 2XLS
250mM Tris-Cl pH 8.0 25mM MgCl2 50mM β-μερκαπτο-αιθανόλη 100μM dGTP 100μM dTTP	1mM Tris-Cl pH 7.5 1mM EDTA 90uOD/ml τυχαία εξανουκλεοτίδια	1M HEPES pH6.6 Διάλυμα DTM Διάλυμα OL Αναλογία 25:25:27

5. ΑΝΑΛΥΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA ΚΑΤΑ SOUTHERN (SOUTHERN BLOT)

Η μέθοδος βασίζεται στη μεταφορά μορίων DNA, τα οποία έχουν διαχωριστεί ηλεκτροφορητικά σε πήκτωμα αγαρόζης, σε μεμβράνες (Southern et al., 1975). Ο ρυθμός μεταφοράς εξαρτάται από το μέγεθος των μορίων και την πυκνότητα του πηκτώματος. Το γονιδιωματικό DNA που επρόκειτο να μελετηθεί επεξεργάσθηκε με κατάλληλα ένζυμα περιορισμού και ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης. Ακολούθησε αποδιάταξή τους με την τοποθέτηση του πηκτώματος σε διάλυμα 0.5N NaOH, 1.5M NaCl για 40 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το πήκτωμα μεταφέρθηκε σε διάλυμα εξουδετέρωσης (0.5M Tris-HCl pH7.4, 1.5M NaCl) στις ίδιες συνθήκες. Τα νουκλεϊκά οξέα μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης χρησι-

μοποιώντας σαν διάλυμα μεταφοράς 2X SSC και μονιμοποιήθηκαν με επώαση της μεμβράνης στους 80°C για 2 ώρες. Ακολούθησαν πειράματα υβριδοποίησης.

6. ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ ΝΟΥΚΛΕΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

Η υβριδοποίηση των μεμβρανών που έφεραν μονιμοποιημένα τα νουκλεϊκά οξέα πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο των Church και Gilbert (Church and Gilbert, 1984). Συγκεκριμένα, η μεμβράνη τοποθετήθηκε σε φωσφορούχο διάλυμα υβριδοποίησης (0.5M Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 pH 7.2, 7% SDS, 1mM EDTA, 1%BSA), στο οποίο προστέθηκε ο ραδιενεργά σημασμένος ανιχνευτής μετά από αποδιάταξή του. Ο χρόνος υβριδοποίησης ήταν 16 ώρες στους 60^{0}C. Ακολούθησαν τρεις πλύσεις χρονικής διάρκειας 20 λεπτών το καθένα σε θερμοκρασία 60°C και με διάλυμα που περιείχε 40mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 pH 7.2, 5% SDS, 1mM EDTA προκειμένου να απομακρυνθεί η περίσσεια του μη δεσμευμένου ανιχνευτή.

7. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΦΑΓΙΚΗΣ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ

Η βιβλιοθήκη που διερευνήθηκε για την απομόνωση των υπό μελέτη γονιδίων ήταν βιβλιοθήκη cDNA από τον οργανισμό *An.gambiae* κλωνο-ποιημένη σε βακτηριοφάγο-φορέα λ/ZAP. Για την ανάπτυξή της χρησιμοποιήθηκε το βακτηριακό στέλεχος *Escherichia coli* XL-1 Blue MRF'. Η πειραματική πορεία της διερεύνησης της βιβλιοθήκης περιλαμβάνει αρχικά την ανάπτυξη μεγάλου αριθμού φαγικών πλακών (1 πλάκα= 10^5 φάγοι που φέρουν το ίδιο ένθεμα) σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα, τη μεταφορά αντιγράφων τους (replica copies) σε νάϋλον μεμβράνες, την υβριδοποίησή τους με τον κατάλληλο ανιχνευτή και τέλος την απομόνωση του θετικού κλώνου. Πιο αναλυτικά, 50ml θρεπτικού μέσου LB (0.8% NaCl, 1% Bacto-Tryptone, 0.5% Yeast Extract, pH 7.00) εμπλουτισμένο με 0.2% μαλτόζη και 10mM $MgSO_4$ διαμολύνθηκε με μοναδιαία αποικία του παραπάνω

βακτηριακού στελέχους και επωάστηκε για 12-16 ώρες στους 37°C. Ακολούθησε κατακρήμνιση των κυττάρων στις 3000 στροφές και επαναιώρησή τους σε 20 ml διαλύματος 10mM Mg_2SO_4. Σε περίπου 2X10^{9} κύτταρα από το δείγμα αυτό προστέθηκαν 2X10^{5} βακτηριοφάγοι της βιβλιοθήκης και επωάστηκαν στους 37°C για 20 λεπτά προκειμένου να ολοκληρωθεί η πρόσδεση των φάγων στα βακτηριακά τοιχώματα. Στη συνέχεια προστέθηκαν 40ml θρεπτικού μέσου NZY (0.5% NaCl, 0.2% $MgSO_4$.7H2O, 0.2% Yeast Extract, 1% NZ Amine, pH 7.00) / 0.8% αγαρόζης και το μίγμα μεταφέρθηκε σε τρυβλία με στερεό NZY μέσο. Ακολούθησε επώαση στους 37°C μέχρι να ολοκληρωθεί ο σχηματισμός των φαγικών πλακών, ένδειξη της λύσης των βακτηρίων και του πολλαπλασιασμού των φάγων.

Οι βακτηριοφαγικές πλάκες που σχηματίστηκαν μεταφέρθηκαν σε νάυλον μεμβράνες Hybond N+ μετά την τοποθέτηση των τελευταίων στην επιφάνεια των τρυβλίων για 1 λεπτό. Κατόπιν μεταφέρθηκαν σε διάλυμα αποδιάταξης (0.5N NaOH, 1.5M NaCl) για 5 λεπτά, μετά σε διάλυμα εξουδετέρωσης (0.5 Tris-Cl pH 7.6, 1.5M NaCl) για το ίδιο χρονικό διάστημα και τέλος πραγματοποιήθηκαν πλύσεις σε 5XSSC. Η μονιμοποίηση του DNA έγινε με έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV cross-linking). Στη συνέχεια υβριδοποιήθηκαν με τον κατάλληλο ραδιενεργά σημασμένο ανιχνευτή, του οποίου η ειδική ενεργότητα ήταν τουλάχιστον 10^{7}cpm/μg.

Οι περιοχές στα τρυβλία ανάπτυξης που αντιστοιχούσαν στα θετικά σήματα της αυτοραδιογραφίας απομονώθηκαν και κάθε μία από αυτές μεταφέρθηκε σε 500μl διαλύματος SM (0.2M NaCl, 10mM $MgSO_4$, 50mM Tris-Cl pH 7.5, 0.01% ζελατίνη) με 20μl $CHCl_3$, όπου διατηρήθηκαν στους 4°C για ολονύκτια επώαση. Κάθε μία από τις περιοχές αυτές αποτελείται από 200 περίπου πλάκες βακτηριοφάγων με διαφορετικά ενθέματα η κάθε μία. Προκειμένου λοιπόν να επιλεχθεί η μεταξύ αυτών μοναδιαία θετική πλάκα-κλώνος συνεχίστηκε η περαιτέρω διερεύνησή τους ακολουθώντας την ίδια πειραματική πορεία (επίστρωση σε τρυβλία άγαρ, μεταφορά σε μεμβράνες νάϋλον και υβριδοποίηση).

8. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΑΓΟΥ ΑΠΟ ΥΓΡΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Θρεπτικό υγρό NZY όγκου 100ml εμβολιάστηκε με μονή αποικία κυττάρων LE392 που είχαν αναπτυχθεί σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα και επωάστηκε στους 37°C ολονυκτίως. Την επόμενη μέρα, ύστερα από μέτρηση της οπτικής πυκνότητας της καλλιέργειας, περίπου 10^{10} κύτταρα απόμακρύνθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν στις 4000 στροφές για 10 λεπτά. Τα κύτταρα που συλλέχθηκαν επαναδιαλύθηκαν σε 3ml διαλύματος SM, επιμολύνθηκαν με 5X10^{7} βακτηριοφαγικές μονάδες (pfus) και επωάστηκαν στους 37°C για 20 λεπτά. Στη συνέχεια το εναιώρημα αυτό μεταφέρθηκε σε 500ml NZY ώστε να επιτευχθεί πλήρης βακτηριακή λύση μετά από 12-14 ώρες στους 37^{0}C. Την επόμενη μέρα προστέθηκαν 10ml $CHCl_3$ και συνεχίστηκε η επώαση για 10 λεπτά στους 37°C με ήπια ανάδευση. Ο αποχωρισμός των φαγικών σωματιδίων από τα κυτταρικά τοιχώματα έγινε με προσθήκη NaCl τελικής συγκέντρωσης 1M στους 4°C για 1ώρα. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 14.000 rpm για 10 λεπτά, ώστε να συλλεχθούν οι φάγοι και επακόλουθη κατακρήμνισή τους στους 4°C ολονυκτίως μετά από προσθήκη 10% πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG 6000). Η συγκέντρωση των βακτηριοφάγων πραγματοποιήθηκε με φυγοκέντρηση στις 10.000 στροφές για 10 λεπτά. Επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε διάλυμα SM όγκου 1ml, όπου προστέθηκε KCl τελικής συγκέντρωσης 1M και διατηρήθηκαν στον πάγο για 15-30 λεπτά. Ακολούθησε συλλογή των φάγων μετά από φυγοκέντρηση στις 10.000 στροφές για 10 λεπτά, προσθήκη δεόξυ-ριβονουκλεάσης I (5μgr/ml) και ριβονουκλεάσης A (1μgr/ml) και επώαση στους 37°C για 30 λεπτά. Η εκχύλιση του DNA των βακτηριοφάγων πραγματοποιήθηκε με φαινόλη-χλωροφόρμιο και για την κατακρήμνισή του με οξικό νάτριο συγκέντρωσης 0.5M και δύο όγκους παγωμένης απόλυτης αιθανόλης. Τέλος επαναδιαλυτοποιήθηκε σε κατάλληλο όγκο νερού ή TE και διατηρήθηκε στους -20°C.

ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

1. ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΑ ΠΗΚΤΩΜΑΤΑ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ

Με τη μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης με βάση το μέγεθός τους παρουσία του ισχυρού ανιονικού απορρυπαντικού SDS (sodium dodecyl sulphate). Το απορρυπαντικό προσδένεται στις πρωτεΐνες κατά ομοιόμορφο τρόπο, περίπου ένα μόριο SDS ανά δύο αμινοξέα, με αποτέλεσμα ο αριθμός των αρνητικών φορτίων να είναι ανάλογος με το μέγεθος ή το μοριακό τους βάρος. Ταυτόχρονα η προσθήκη β-μερκαπτοαιθανόλης, η οποία καταστρέφει τους δισουλφιδικούς δεσμούς μεταξύ των πολυπεπτιδίων επιτρέπει την μελέτη πρωτεϊνικών συμπλόκων στο επίπεδο των υπομονάδων τους.

Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα διαχωρίσθηκαν σε πηκτώματα πολυακρυλαμίδης, τα οποία αποτελούνται από δύο διαφορετικές φάσεις, το πήκτωμα συγκέντρωσης, όπου οι πρωτεΐνες συγκεντρώνονται αρχικά σε ένα κοινό μέτωπο και το πήκτωμα συγκέντρωσης. Για την παρασκευή 5% διαλύματος πηκτώματος ευθυγράμμισης χρησιμοποιήθηκε μίγμα ακρυλαμίδης / δις-ακρυλαμίδης (30%), 125mM Tris pH 6.8, 0.1% SDS. Για το πήκτωμα διαχωρισμού προστέθηκαν 375mM Tris pH 8.8, 0.1% SDS σε διάλυμα ακρυλαμίδης/δις-ακρυλαμίδης συγκέντρωσης από 6% ως 12%, ανάλογα με το μέγεθος των πρωτεϊνών που μελετήθηκαν. Στα παραπάνω διαλύματα προστέθηκαν 0.04% TEMED (N,N,N',N'-tetramethyl-ethylenediamine) και 0.01% Ammonium persulfate. Πριν την ηλεκτροφόρησή τους οι πρωτεΐνες αποδιατάχθηκαν με προσθήκη διαλύματος Laemmli (50mM Tris-Cl pH6.8, 2% SDS, 0.1% Bromophenol blue, 5% β-μερκαπτοαιθανόλη ,10% γλυκερόλη) και βρασμό για 5 λεπτά. Το διάλυμα ηλεκτροφόρησης περιείχε 25mM Tris-Cl pH 8.2, 250mM Γλυκίνη και 0.1% SDS. Μετά το τέλος της διαδικασίας, το πήκτωμα τοποθετήθηκε σε διάλυμα χρωστικής Coomassie Blue (20% μεθανόλη, 0.25% Coomassie Blue R250, 3% γλυκερόλη, 10% οξικό οξύ) για

περίπου 30 λεπτά. Ακολούθησε αποχρωματισμός της σε διάλυμα που περιείχε 20% μεθανόλη, 7% οξικό οξύ.

2. ΑΝΟΣΟΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ (WESTERN BLOTTING)

Η ανάλυση Western περιλαμβάνει τη μεταφορά των πρωτεϊνών που έχουν διαχωρισθεί στο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης, επώασή τους με τα κατάλληλα αντισώματα που αναγνωρίζουν τις πρωτεΐνες που πρόκειται να μελετηθούν και ανίχνευσή τους με τη χρήση σημασμένων δευτερευόντων αντισωμάτων. Για τη σήμανση χρησιμοποιούνται συνήθως ένζυμα, τα οποία μετά τη χορήγηση κατάλληλου υποστρώματος καταλύουν αντιδράσεις που οδηγούν στην παραγωγή χρώματος ή χημειοφωταύγειας.

Η μεταφορά των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε σε ημι-ξηρό σύστημα ηλεκτροφόρησης, σύμφωνα με το οποίο σε κατάλληλη συσκευή σχηματίστηκε η ακόλουθη διάταξη : δύο τμήματα χαρτιού Whatmann κομμένα στο μέγεθος της μεμβράνης και εμποτισμένα σε διάλυμα Anode I (3.625% Tris base, 20% μεθανόλη) τοποθετούνται στη βάση της συσκευής. Πάνω σε αυτά τοποθετούνται δύο ακόμα τμήματα Whatmann και μία μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ίδιου μεγέθους εμποτισμένα σε διάλυμα Anode II (0.3%Tris base, 20% μεθανόλη). Ακολουθεί η τοποθέτηση του πηκτώματος πολυακρυλαμίδης και τεσσάρων επιπλέον φύλλων Whatmann, τα οποία προηγουμένως είχαν εμποτισθεί με διάλυμα Cathode (0.52% ε-αμινοκαπροΪκό οξύ, 20% μεθανόλη). Η μεταφορά των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος, η ένταση του οποίου καθορίζεται από το μέγεθος της μεμβράνης (0.8 mA/cm^2 μεμβράνης).

Μετά τη μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη ακολούθησε επώασή της σε διάλυμα 1X PBS (137mM Nacl, 2.7mM KCl, 4.3mM $Na_2HPO_4.7H2O$, 1.4mM KH_2PO_4, pH 7.3) εμπλουτισμένο με 5% άπαχο γάλα για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε πλύση της μεμβράνης σε διάλυμα TTBS

(20mM Tris-HCl, 500mM NaCl, pH 7.5, 0.1%Tween-20, w/v) για 5 λεπτά και επωάστηκε σε διάλυμα ίδιας σύστασης με το παραπάνω (1XPBS+άπαχο γάλα), στο οποίο είχε προστεθεί το πρωτεύον αντίσωμα στην κατάλληλη αραίωση. Η επώαση με το αντίσωμα διαρκεί 8-12 ώρες στους 4°C ή 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε μία πλύση των 5 λεπτών σε διάλυμα 1X TTBS με ήπια ανάδευση και μεταφορά της μεμβράνης σε διάλυμα 1X TTBS / 1% σκόνη γάλακτος που περιείχε το κατάλληλο δευτερεύον αντίσωμα σημασμένο με περοξειδάση ραπανιού (HRP:Horse Radish Peroxidase). Η μεμβράνη παρέμεινε στο διάλυμα αυτό για διάστημα 60 λεπτών. Μετά το τέλος της διαδικασίας ακολούθησαν 2 πλύσεις με διάλυμα 1X TTBS διάρκειας 20 λεπτών η κάθε μία. Η εμφάνιση των πρωτεϊνών βασίστηκε στη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (Enhanced Chemiluminesence ECL-PIERCE), η οποία χρησιμοποιεί σαν μέθοδο ανίχνευσης το φως που προκαλείται από την αντίδραση οξείδωσης της λουμινόλης από την υπεροξειδάση παρουσία φαινολών. Η ανίχνευση του σήματος έγινε με αυτοραδιογραφία και το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε ήταν σύμφωνο με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρίας.

ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ RNA

1. ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ

Η μέθοδος αυτή συνίσταται στη δημιουργία μονόκλωνου μορίου DNA (cDNA) χρησιμοποιώντας το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση, μία DNA πολυμεράση που χρησιμοποιεί το mRNA, αντί του DNA, σαν μήτρα για τη δημιουργία συμπληρωματικού αντιγράφου. Συγκεκριμένα, πολυμερή δεοξυ-νουκλεοτιδίων, τα οποία μπορεί να είναι είτε ολιγομερή θυμίνης (oligo-dT primers) είτε τυχαία εξαμερή (random primers), χρησιμοποιούνται από την παραπάνω πολυμεράση σαν εκκινητές για την προσθήκη δεοξυνουκλεοτιδίων και τη δημιουργία ακολούθως αλυσίδας DNA συμπληρωματικής προς το RNA.

Για την παρασκευή των δειγμάτων cDNA από κουνούπια σαν εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν ολιγομερή θυμίνης. Αρχικά απομονώθηκε ολικό RNA από ενήλικα κουνούπια χρησιμοποιώντας το RNaid Plus kit (Bio 101). Περίπου 2μgr poly(A)+ RNA αποδιατάχθηκαν στους 65°C για 5 λεπτά και στη συνέχεια προστέθηκαν σε 10 μl κατάλληλου διαλύματος σύνθεσης cDNA, το οποίο περιείχε : ολιγομερή θυμίνης προσδεδεμένα σε μαγνητικά σφαιρίδια (oligo-dT magnetic Dynabeads), 2.5units αντίστροφης μεταγραφάσης MMLV (Gibco-BRL), 20 units RNasin, δεόξυνουκλεοτίδια τελικής συγκέντρωσης 0.5mM το καθένα, 1X ρυθμιστικό διάλυμα δράσης της αντίστροφης μεταγραφάσης (5X MMLV : 200mM Tris-Cl pH 8.3, 375mM KCl, 15mM Mg_2Cl, 50mM DTT). Η αντίδραση επωάστηκε στους 37°C. Δύο ώρες αργότερα, στην αντίδραση προστέθηκαν 90μl νερού και ακολούθησε μεταφορά της σε μαγνητικό στήριγμα ώστε να επιτευχθεί η συγκέντρωση των σφαιριδίων με το προσδεδεμένο νεοσυντεθέν cDNA και η ευκολότερη απομάκρυνση του υπερκείμενου διαλύματος. Στη συνέχεια έγιναν επαναλαμβανόμενες πλύσεις των σφαιριδίων με νερό, επαναδιάλυσή τους σε αυτό και αποθήκευσή τους στους -20°C.

2. ΗΜΙΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (Semiquantitative PCR)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση του προτύπου έκφρασης γονιδίων σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια και ιστούς των κουνουπιών. Το μονόκλωνο cDNA που συντέθηκε από την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής πολλαπλασιάζεται με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιώντας ειδικούς συμπληρωματικούς εκκινητές για την αλληλουχία στόχο. Προκειμένου η ποσοτικοποίηση των προϊόντων να είναι αξιόπιστη, στην ίδια αντίδραση προστίθενται εκκινητές για ένα γονίδιο αναφοράς. Η εφαρμογή ίδιων συνθηκών πολλαπλασιασμού και για τα δύο γονίδια (γονίδιο-στόχος και γονίδιο αναφοράς) επιτρέπει τη σύγκριση των ποσοτήτων των προϊόντων της αντίδρασης και κατ'επέκταση την εκτίμηση της αρχικής συγκέντρωσης μεταγράφων του υπό μελέτη γονιδίου.

Συγκεκριμένα, περίπου 1-5 μl των σφαιριδίων που φέρουν προσδεδεμένο το cDNA μετά την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής χρησιμοποιούνται ως μήτρα στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Σε συνολικό όγκο αντίδρασης 50μl προστέθηκαν εκκινητές ειδικοί για το γονίδιο-στόχο τελικής συκκέντρωσης 20pmol ο καθένας, 200mM δεοξυνουκλεοτιδίων, 1.5mM $MgCl_2$, 1X ρυθμιστικό διάλυμα και 0.1units πολυμεράσης Amplitaq (Roche). Εφαρμόστηκαν 27 κύκλοι καθένας από τους οποίους περιελάμβανε τις ακόλουθες συνθήκες: 30 δευτερόλεπτα στους 94°C, 30 δευτερόλεπτα στους 56°C, 45 δευτερόλεπτα στους 72°C. Μετά το τέλος του 5ου κύκλου προστέθηκαν στην ίδια αντίδραση εκκινητές ειδικοί για το γονίδιο που κωδικοποιεί τη ριβοσωμική πρωτεΐνη S7 του κουνουπιού και αποτελεί το γονίδιο αναφοράς (Salazar et al., 1993). Η ανίδραση συνεχίστηκε για την ολοκλήρωση των υπόλοιπων κύκλων με αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό τόσο του γονιδίου-στόχου όσο και του γονιδίου-αναφοράς. Ακολούθησε ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός των προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης και χρώση με την ευαίσθητη χρωστική SYBR (Molecular Probes), ικανή να χρωματίζει νουκλεϊκά οξέα ελάχιστης συγκέντρωσης, της τάξεως των 20pgr. Το πήκτωμα στη συνέχεια αναλύθηκε σε fluorimager (Fuji).

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑΣ

1. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ ΕΝΑΝΤΙ ΤΗΣ Β-ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ ΤΗΣ ΙΝΤΕΓΚΡΙΝΗΣ

Α. Παρασκευή ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης και καθαρισμός της σε αποδιατακτικές συνθήκες.

Η ανάλυση της δομής, της έκφρασης, της ρύθμισης και λειτουργίας των πρωτεϊνών συχνά απαιτεί την παραγωγή εξειδικευμένων αντισωμάτων για

αυτές τις πρωτεΐνες, τα οποία μπορούν να συμβάλλουν στην ανίχνευσή τους σε διαφορετικά κύτταρα, ιστούς, οργανισμούς και άλλα βιολογικά δείγματα. Η δημιουργία των αντισωμάτων περιλαμβάνει αρχικά την κατασκευή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης, την εισαγωγή της και έκφρασή της σε βακτηριακούς πληθυσμούς κυττάρων, τον καθαρισμό και τη χρησιμοποίησή της για την ανοσοποίηση μικρών ζώων (ποντίκια, κουνέλια κ.λ.π) προκειμένου να παραχθεί το κατάλληλο αντίσωμα.

Η ανασυνδιασμένη πρωτεΐνη που χρησιμοποιήθηκε ως αντιγόνο για την παρασκευή του αντισώματος έναντι της β-ιντεγκρίνης κατασκευάστηκε ύστερα από σύντηξη τμήματος cDNA που κωδικοποιεί την περιοχή-Ι του εξωκυττάριου τμήματος της β-υπομονάδας με τον κατάλληλο βακτηριακό φορέα έκφρασης (pRSET B). Με τους φορείς αυτούς που φέρουν, μεταξύ άλλων, κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης (ATG) και μια σειρά 6 ιστιδινών απαραίτητων για τον καθαρισμό της πρωτεΐνης επιτυγχάνεται η έκφρασή της σε υψηλά επίπεδα μέσα στα βακτηριακά κύτταρα *E.coli.*

Βακτηριακά κύτταρα του στελέχους BL21(DE3) μετασχηματίστηκαν με την παραπάνω πλασμιδιακή κατασκευή και επιλέχθηκαν οι θετικές αποικίες. Στη συνέχεια, δύο βακτηριολογικοί σωλήνες με θρεπτικό υγρό LB όγκου 1.5ml παρουσία των αντιβιοτικών αμπικιλλίνη και χλωραμφενικόλη εμβολιάστηκαν με μονή θετική αποικία ο καθένας και επωάστηκαν στους 37°C για 14-16 ώρες. Ποσότητα αυτής της καλλιέργειας ίση με 500μl χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό νέου προθερμασμένου θρεπτικού μέσου όγκου 1.5ml και ακολούθησε επώαση στους 37°C μέχρι η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας να είναι ίση με 0.7-0.9. Επαγωγή της έκφρασης πραγματοποιήθηκε στη μία από τις καλλιέργειες με προσθήκη IPTG τελικής συγκέντρωσης 1mM, ενώ δεν προστέθηκε IPTG στην καλλιέργεια ελέγχου. Οι καλλιέργειες επωάστηκαν στους 37°C για 3-5 ώρες και ακολούθησε συλλογή των κυττάρων από ποσότητα 1ml της καλλιέργειας μετά από φυγοκέντρηση στις 3000 στροφές. Μετά την απομάκρυνση του υπερκειμένου, τα κύτταρα επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε 200μl διαλύματος λύσης B (100mM NaH_2PO_4, 10mM Tris-Cl, 6M GuHCl, pH 8.0). Τα κυτταρικά κατάλοιπα απομακρύνθηκαν με φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 15000 στροφές και στο υπερκείμενο

προστέθηκαν 50μl Ni-NTA σφαιρίδια (Qiagen). Ακολούθησε ανάδευση του δείγματος και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να γίνει η πρόσδεση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στα σφαιρίδια νικελίου μέσω των επαναλήψεων ιστιδίνης. Μετά από κατακρήμνιση των σφαιριδίων με φυγοκέντρηση στις 15000 στροφές για 10 δευτερόλεπτα ακολούθησαν πλύσεις με διάλυμα C (100mM NaH_2PO_4, 10mM Tris-Cl, 8M ουρία, pH 6.3). Τα σφαιρίδια επαναδιαλύθηκαν σε 20μl διαλύματος C/100mM EDTA και παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά με ήπια ανάδευση, ώστε να γίνει η έκλουση της πρωτεΐνης από τα σφαιρίδια. Μετά από φυγοκέντρηση οι καθαρές πλέον πρωτεΐνες που περιέχονται στο υπερκείμενο διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.

Β. Ανοσοποίηση ποντικών στελέχους BALB/C

Μετά την παρασκευή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σε υψηλή συγκέντρωση (0.6mgr/ml) και τον επακόλουθο καθαρισμό της σύμφωνα με την παραπάνω διαδικασία, ακολούθησε ανοσοποίηση δύο ποντικών του στελέχους BALB/C. Περίπου 500μl πρωτεΐνης συνολικής συγκέντρωσης 50μgr διαλυτοποιημένη σε 1XPBS αναμείχθηκαν με ίσο όγκο complete Freund's adjuvant (Gibco/Life Technologies) και το μείγμα ενέθηκε υποδόρια σε κάθε ένα από τα ποντίκια. Οι ενέσεις επαναλήφθηκαν με την ίδια συγκέντρωση πρωτεΐνης σε incomplete adjuvant ύστερα από 30 μέρες για 3 φορές (boosts). Περίπου 7-10 μέρες μετά από κάθε ένεση γινόταν λήψη μικρής ποσότητας αίματος από την ουρά του ποντικού προκειμένου να ελεγχθεί η παραγωγή και η ειδικότητα των αντισωμάτων.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΑΝΟΣΟΕΝΤΟΠΙΣΜΟΥ ΜΕ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ

Πειράματα ανοσοφθορισμού σε μεσέντερα ενήλικων κουνουπιών

Τα μεσέντερα από ενήλικα κουνούπια απομονώθηκαν σε 1XPBS και μεταφέρθηκαν σε διάλυμα μονιμοποίησης PFA (1M $MgSO_4$, O.5M EGTA, 4% παραφολμαδεύδη, 1XPBS) για 90 λεπτά. Η PFA απομακρύνθηκε με διαδοχικές πλύσεις με 1XPBS και το δείγμα επωάστηκε σε παρεμποδιστικό διάλυμα (1XPBS, 5% normal goat serum, 0.2% σαπονίνη) για 1-2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την απομάκρυνση του τελευταίου διαλύματος προστέθηκε νέο που περιείχε το πρωτεύον αντίσωμα και ακολούθησε επώαση στους 4^oC για 14 περίπου ώρες με ήπια ανάδευση. Η περίσσεια του αντισώματος απομακρύνθηκε με 3 επαναλαμβανόμενες πλύσεις με το παρεμποδιστικό διάλυμα, διάρκειας 20 λεπτών η κάθε μία. Στη συνέχεια, τα μεσέντερα επωάστηκαν με το δευτερεύον αντίσωμα για 1-2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Το μη δεσμευμένο αντίσωμα απομακρύνθηκε κατά τρόπο ανάλογο με το πρωτεύον. Ακολούθησε ένα τελευταίο πλύσιμο με 1XPBS για 5 λεπτά. Προκειμένου να επιτευχθεί χρώση των πυρήνων, οι ιστοί μεταφέρθηκαν σε διάλυμα 1XPBS, στο οποίο είχε γίνει αραίωση της χρωστικής DAPI σε αναλογία 1:1000. Στη συνέχεια, συλλέχθησαν, τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρους, όπου προστέθηκε διάλυμα γλυκερόλης Vectashield (Vector Laboratories), σφραγίστηκαν με καλυπτρίδες και στεγανοποιήθηκαν. Τα δείγματα διατηρήθηκαν στους -20^oC.

Στην περίπτωση που τα μεσέντερα αφαιρέθηκαν 24ώρες μετά το γεύμα μολυσμένου αίματος ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία ανοσοφθορισμού με μερικές τροποποιήσεις. Συγκεκριμένα οι ιστοί μετά την απομάκρυνσή τους μεταφέρθηκαν αρχικά σε διάλυμα μονιμοποίησης 4% PFA για 30 δευτερόλεπτα και ακολούθως σε 1XPBS, όπου πραγματοποιήθηκε η αφαίρεση του περιεχόμενου αίματος με τομή του ιστού κατά μήκος. Η μονιμοποίηση συνεχίστηκε για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τα δείγματα πλύθηκαν 2 φορές με διάλυμα 1XPBS και επωάστηκαν σε παρεμποδιστικό διάλυμα για 2 ώρες στην ίδια θερμοκρασία. Ακολούθησε

αφαίρεση του παραπάνω διαλύματος και προσθήκη νέου με την κατάλληλη αραίωση πρωτεύοντος αντισώματος. Η παραμονή στο διάλυμα αυτό διήρκησε περίπου 14-16 ώρες στους 4°C. Η περίσσεια του αντισώματος απομακρύνθηκε με τρεις εικοσάλεπτες πλύσεις με παρεμποδιστικό διάλυμα. Στη συνέχεια, έγινε επώαση με το δευτερεύον φθορίζον αντίσωμα για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και επακόλουθη απομάκρυνσή του με ανάλογο τρόπο με το πρωτεύον. Ακολούθησε χρώση των ωοκινετών με αντίσωμα έναντι της επιφανειακής πρωτεΐνης P28, το οποίο ήταν ήδη σημασμένο με φθορίζουσα χρωστική. Η διάρκεια της χρώσης ήταν 45 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.Το μη δεσμευμένο αντίσωμα απομακρύνθηκε με δύο εικοσάλεπτες πλύσεις με 1XPBS, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρους και καλύφθηκαν με καλυπτρίδες.

Στην περίπτωση που έχει ήδη ολοκληρωθεί ο σχηματισμός των ωοκυστών στα μεσέντερα των κουνουπιών που πρόκειται να μελετηθούν ακολουθήθηκε η ίδια πορεία, κατά την οποία πραγματοποιήθηκε επιπλέον χρώση των ωοκυστών με τη χρωστική TO-PRO. Η χρωστική αυτή χρησιμοποιείται για την ανίχνευση δίκλωνων νουκλεϊκών οξέων. Συγκε-κριμένα,μετά τις πλύσεις του δευτερευόντος αντισώματος ακολούθησε ε-πώαση των δειγμάτων με RNase A (100μgr/ml) για 20 λεπτά στους 4°C. Στη συνέχεια προστέθηκε η χρωστική TO-PRO διαλυτοποιημένη σε 1XPBS σε αραίωση 1:5000 και τα δείγματα διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 6 λεπτά. Ακολούθησαν 2 πεντάλεπτες πλύσεις με 1XPBS. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η χρώση των νουκλεϊκών οξέων των σποροζωιτών που εμπεριέχονται μέσα στις ωοκύστεις κάνοντας εφικτή την παρατήρησή τους με το μικροσκόπιο φθορισμού.

Σε όλες τις παραπάνω πειραματικές διαδικασίες ο ανοσοεντοπισμός των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με μικροσκοπία φθορισμού και λήψη οπτικών τομών με τη χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου Leica TCS NT/SP. Τα αντισώματα (πρωτεύοντα και δευτερεύοντα) και οι αραιώσεις που χρησιμοποιήθηκαν συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα :

ΠΡΩΤΕΥΟΝΤΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ		
Αντίσωμα	**Αραίωση**	**Προέλευση**
Mouse-anti b-Integrin	1:1000	
Rabbit-anti Laminin	1:500	Abcam
Mouse-anti Soap (polyclonal)	1:250	Hans Dessens (Imperial College of London)
Mouse-anti CTRP (monoclonal)	1:250	Hans Dessens (Imperial College of London)
Mouse-anti Pbs28	1:500	Hans Dessens (Imperial College of London)

ΔΕΥΤΕΡΕΥΟΝΤΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ			
Αντίσωμα	**Αραίωση**	**Χαρακτηριστικά**	**Προέλευση**
Goat anti-mouse IgG-FITC (GaM-FITC)	1:250	Πράσινο μ.κ: 488nm (Fluorescein)	Jackson Immunoresearch
Goat anti-mouse IgG-TRICH (GaM-TRICH)		Ερυθρό μ.κ	
Goat anti-rabbit IgG-Cy3 (GaR-Cy3)		Ερυθρό μ.κ : 568nm (Cyanine-3)	
Donkey anti-rabbit IgG-Cy5 (GaR-Cy5)		Ερυθρό μακρού μ.κ : 647nm (Cyanine-5)	
Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG(H+L)Highly cross-adsorbed	1:1000	Πράσινο μ.κ: 488nm (Alexa Fluor 488)	Molecular Probes
Alexa Fluor 568 goat anti-mouse IgG(H+L) Highly cross-adsorbed	1:1000	Ερυθρό μ.κ: 568nm (Alexa Fluor 568)	Molecular Probes
Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit IgG(H+L) Highly cross-adsorbed			

ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΟΥΝΟΥΠΙΩΝ

Κουνούπια του γένους *Anopheles gambiae* του στελέχους G3 αναπτύχθηκαν σε θερμοκρασία 27°C και σχετική υγρασία 75%. Τα στάδια των προνυμφών και νυμφών μεγάλωσαν σε διάλυμα NaCl περιεκτικότητας 0.1% με χορήγηση γατοτροφής σε μορφή σκόνης. Στα ενήλικα άτομα γινόταν χορήγηση διαλύματος σουκρόζης 10%.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΗΜΑΝΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ *in vitro* ΜΕ ΦΘΟΡΙΖΟΝΤΑ ΜΙΚΡΟΣΦΑΙΡΙΔΙΑ (*In vitro* microsphere binding assay)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να μελετηθούν πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών του κουνουπιού και αυτών του παρασίτου. Συγκεκριμένα, οι πρωτεΐνες που πρόκειται να μελετηθούν αρχικά παράγονται σε διαλυτή μορφή μετά από διαμόλυνση κυτταρικών σειρών, σημαίνονται με φθορίζοντα σφαιρίδια διαφορετικού χρώματος (Molecular Probes, Eugene, OR) και τέλος συνεπωάζονται ώστε να προκύψουν, είτε συσσωματώματα των μικροσφαιριδίων σε περίπτωση αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών, είτε μεμονωμένα σφαιρίδια στην αντίθετη περίπτωση (Buttiglione et al., 1998). Αρχικά τα cDNAs που κωδικοποιούν τις εξωκυττάριες πρωτεϊνικές περιοχές κλωνοποιήθηκαν στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης με τη γονιδιωματική αλληλουχία της περιοχής Fc του IgG1. Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια χρησιμοποιήθηκαν για την παροδική διαμόλυνση κυττάρων COS-7 και η χιμαιρική πρωτεΐνη εκλούστηκε στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας μέσω της περιοχής Fc. Ακολούθησε η σήμανση των πρωτεϊνών με τα φθορίζοντα σφαιρίδια, η οποία επιτυγχάνεται σε δύο στάδια :

α. πρόσδεση των μικροσφαιριδίων στο εξειδικευμένο αντίσωμα έναντι της περιοχής Fc και β. επώαση του σημασμένου, με φθορισμό αντισώματος με το υγρό θρεπτικό μέσο που φέρει τη διαλυτή πρωτεΐνη. Τέλος, οι σημασμένες, με διαφορετικό φθοριόχρωμα πρωτεΐνες συνεπωάζονται με τελικό αποτέλεσμα το σχηματισμό (σε περίπτωση αλληλεπίδρασης) ή μη συσσωματωμάτων, τα οποία μελετώνται με τη χρήση μικροσκοπίου φθορισμού.

Α. Παροδική διαμόλυνση κυτταρικών σειρών

Στόχος της μεθόδου είναι η παραγωγή πρωτεϊνών που πρόκειται να μελετηθούν σε κυτταρικές σειρές μετά τη διαμόλυνσή τους με τις κατάλληλες πλασμιδιακές κατασκευές. Οι κατασκευές αυτές φέρουν τα cDNAs που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες υπό τον έλεγχο ειδικών υποκινητών που καθιστούν δυνατή την έκφρασή τους μέσα στις εκάστοτε κυτταρικές σειρές. Η παραγωγή της πρωτεΐνης πραγματοποιείται σε σύντομο χρονικό διάστημα, ενώ τα επίπεδα παραγωγής της εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την αποδοτικότητα της διαμόλυνσης. Η μέθοδος που εφαρμόσθηκε ήταν αυτή της συγκατακρήμνισης DNA με $Ca_3(PO_4)_2$(Graham and Van der Eb, 1973). Χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα COS-7 που είχαν αναπτυχθεί σε τελική συγκέντρωση 1-1.5X10^4 σε τρυβλία διαμέτρου 100mm με την προσθήκη κατάλληλου θρεπτικού μέσου όγκου 9ml. Το πλασμιδιακό DNA που επρόκειτο να εισαχθεί στα κύτταρα αυτά αναμείχθηκε αρχικά με διάλυμα $CaCl_2$ τελικής συγκέντρωσης 125mM και διάλυμα φωσφορικών αλάτων (HEBS 1X: 140mM NaCl, 5mM KCl, 0.75mM Na_2HPO_4, 6mM Δεξτρόζη, 25mM HEPES pH 7.0) ώστε να σχηματισθεί ένα λεπτόκοκκο κρυσταλλικό ίζημα αποτελούμενο από DNA-$Ca_3(PO_4)_2$. Προκειμένου να σχηματισθούν κρύσταλλοι όσο το δυνατόν μικρότερης διαμέτρου το διάλυμα HEBES προστέθηκε στο μίγμα DNA-$CaCl_2$ σταγόνα-σταγόνα.Το ίζημα που δημιουργήθηκε μεταφέρθηκε στο θρεπτικό μέσο της κυτταρικής καλλιέργειας όπου ακολούθησε η προσκόλλησή του στην κυτταρική επιφάνεια και η επακόλουθη είσοδος του πλασμιδιακού DNA στα κύτταρα. Η ενσωμάτωση αυτή επιτυγχάνεται με την επώαση των κυττάρων στους 37°C και σε ατμόσφαιρα 5-8% CO_2 για 7-14 ώρες. Ακολούθησαν 3

διαδοχικές πλύσεις με 1XPBS ώστε να απομακρυνθούν οι κρύσταλλοι που δεν είχαν ενσωματωθεί, προσθήκη θρεπτικού μέσου DMEM (GIBCO,BRL) και επώαση στους 37°C για 48 ώρες προκειμένου να παραχθεί η πρωτεΐνη στα κύτταρα και να εκλουσθεί στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας. Στη συνέχεια τα κυτταρικά υπολοίματα κατακρημνίστηκαν με φυγοκέντρηση στις 3000 στροφές για 20 λεπτά στους 4°C, ενώ το υπερκείμενο που περιείχε τη διαλυτή πρωτεΐνη συλλέχθηκε και διατηρήθηκε στους 4°C.

Β. Σήμανση με φθορισμό του αντισώματος έναντι του τμήματος Fc IgG1

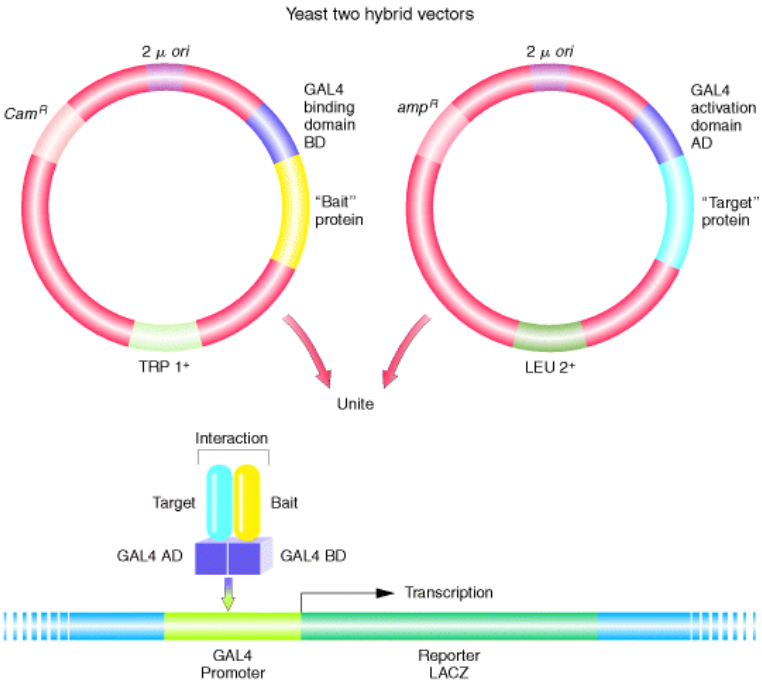
Περίπου 10^{10} μικροσφαιρίδια διαμέτρου 1μm χρησιμοποιήθηκαν για τη σήμανση αντισώματος έναντι του τμήματος Fc Ig. Συγκεκριμένα, 10^{10} μικροσφαιρίδια (περίπου 200μl) φυγοκεντρήθηκε στις 8000 στροφές για 5 λεπτά. Τα μικροσφαιρίδια στη συνέχεια επαναιωρήθηκαν σε 1ml 1XPBS και μεταφέρθηκαν σε υδατόλουτρο με υπέρηχους για 2 λεπτά ώστε να διασπασθούν τα συσσωματώματα που πιθανόν έχουν δημιουργηθεί κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους στους 4°C. Ακολούθησε η προσθήκη του αντισώματος συνολικής συγκέντρωσης (70μgr) και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 16 ώρες με ταυτόχρονη ήπια ανάδευση ώστε να πραγματοποιηθεί η σύνδεση των μικροσφαιριδίων στο αντίσωμα. Στη συνέχεια, το δείγμα φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στις 10.000 στροφές και το σημασμένο αντίσωμα επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 1ml διαλύματος 1XPBS, 5mgr/ml BSA, 10mM NaN_3 και επωάστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Ακολούθως τα μικροσφαιρίδια προστέθηκαν και συνεπωάστηκαν με το θρεπτικό μέσο της κυτταρικής καλλιέργειας που περιέχει τη διαλυτή πρωτεΐνη στους 4°C για 12-16 ώρες με ήπια ανάδευση, προκειμένου το αντίσωμα να προσδεθεί στην πρωτεΐνη και να επιτευχθεί με έμμεσο τρόπο η σήμανσή της. Μετά το πέρας των 16 ωρών η πρωτεΐνη συλλέχθηκε μετά από φυγοκέντρηση του δείγματος στις 4000 στροφές για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C και επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 100μl διαλύματος 1XPBS, 5mgr/ml BSA, 10mM NaN_3.

Παραλλαγή της μεθόδου εφαρμόστηκε για τη μελέτη πιθανόν αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών του κουνουπιού με ζωντανούς οοκινέτες. Οι πρωτεΐνες του κουνουπιού εκφράσθηκαν σε κύτταρα COS-7 και σημάνθηκαν με φθορισμό σύμφωνα με τη διαδικασία που αναφέρθηκε παραπάνω. Αρχικά, καλλιέργεια οοκινετών (~100.000) αναμείχθηκε με κύτταρα (~200.000) προερχόμενα από τη σειρά MOS-20 του κουνουπιού και επωάστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα, ώστε να επιτευχθεί η απομάκρυνση των οοκινετών από τα μαγνητικά σφαιρίδια που είχαν χρησιμοποιηθεί σε προηγούμενη μεθοδολογία για την απομόνωσή τους. Ακολούθησε προσθήκη της φθορίζουσας πρωτεΐνης του κουνουπιού (ιντεγκρίνη ή λαμινίνη), αφού είχε ήδη προηγηθεί αραίωσή της κατά 1:50 – 1:200 φορές σε 1 X PBS. Το δείγμα επωάστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 5 ώρες προκειμένου να επιτραπεί η σύνδεση της πρωτεΐνης στους οοκινέτες (εφόσον υπήρχε αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες της επιφανείας τους) και φυγοκεντρήθηκε για 8 λεπτά στις 3.400 στροφές. Στη συνέχεια επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 10μl 1 X PBS και μεταφέρθηκε σε αντικειμενοφόρο προκειμένου να ακολουθήσει η παρατήρησή του σε μικροσκόπιο φθορισμού.

2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΩΝ ΔΥΟ ΥΒΡΙΔΙΩΝ ΣΤΟ ΣΑΚΧΑΡΟΜΥΚΗΤΑ (YEAST TWO HYBRID SYSTEM)

Η αρχή του συστήματος των δύο υβριδίων στηρίζεται στο γεγονός ότι ένας μεγάλος αριθμός μεταγραφικών παραγόντων φέρουν δύο λειτουργικά διακριτές περιοχές, μία περιοχή πρόσδεσης στο DNA που αναγνωρίζει τις κατάλληλες αλληλουχίες των υποκινητών και μία περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής, υπεύθυνη για την έναρξή της. Ένα από τα καλύτερα μελετημένα συστήματα είναι ο μεταγραφικός ενεργοποιητής GAL4 στη ζύμη. Στο σύστημα των Δύο Υβριδίων χρησιμοποιείται ένα στέλεχος ζύμης, όπου ένας ειδικός υποκινητής συνδέεται με γονίδιο αναφοράς, η ενεργοποίηση του οποίου θα έχει σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη αποικιών ζύμης μπλε χρώματος. Το συγκεκριμένο στέλεχος μετασχηματίζεται με δύο πλασμιδιακές κατασκευές που κωδικοποιούν τις δύο υβριδικές πρωτεΐνες των οποίων μελετώνται οι

πιθανές αλληλεπιδράσεις. Το ένα ανασυνδιασμένο πλασμίδιο αποτελείται από την περιοχή πρόσδεσης στο DNA του μεταγραφικού παράγοντα GAL4 της ζύμης συνδεδεμένη με τη μία "πρωτεΐνη" και το άλλο περιλαμβάνει την περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης του ιδίου παράγοντα (GAL4) σε σύντηξη με τη δεύτερη υπό μελέτη "πρωτεΐνη". Και οι δύο υβριδικές πρωτεΐνες δεν θα πρέπει μεμονωμένα να έχουν τη δυνατότητα της μεταγραφικής ενεργοποίησης του γονιδίου αναφοράς· η πρωτεΐνη με την περιοχή πρόσδεσης στο DNA γιατί δεν έχει δράση ενεργοποίησης και αυτή με την περιοχή ενεργοποίησης επειδή δεν είναι δυνατή η μεταφορά της στις περιοχές πρόσδεσης του GAL4. Η αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών θα έχει σαν αποτέλεσμα την ανακατασκευή ενός λειτουργικού μεταγραφικού παράγοντα GAL4 ικανού να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή του γονιδίου αναφοράς.. Η αρχή του συστήματος των δύο υβριδίων στη ζύμη παρουσιάζεται διαγραμματικά στην Εικόνα 1:



Εικόνα 1 : Η βασική αρχή του Συστήματος των Δύο Υβριδίων. Δύο υβριδικές πρωτεΐνες εκφράζονται στα κύτταρα της ζύμης. Η μία αποτελείται από την περιοχή πρόσδεσης στο DNA του μεταγραφικού παράγοντα GAL4 (BD), στην οποία είναι συνδεδεμένη η μία από τις πρωτεΐνες (bait) που μελετώνται. Η δεύτερη υβριδική πρωτεΐνη φέρει την περιοχή ενεργοποίησης (AD) σε σύντηξη με την άλλη υπό μελέτη πρωτεΐνη (target). Η αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών έχει σαν αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός λειτουργικού μεταγραφικού παράγοντα ικανού να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή του γονιδίου αναφοράς *LACZ.*

Α. Μετασχηματισμός στελεχών *Saccharomyces cerevisiae*

Η παρασκευή δεκτικών κυττάρων ζύμης πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο του χλωριούχου λιθίου. Πιο αναλυτικά, κύτταρα από φρέσκια καλλιέργεια του πατρικού στελέχους PJ694A *MAT*α εμβολιάστηκαν σε θρεπτικό υλικό YEPD (1% εκχύλισμα ζύμης, 2% πεπτόνη, 2% γλυκόζη) και επωάστηκαν στους 30°C μέχρι η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας να είναι ίση ή μικρότερη της μονάδος. Στη συνέχεια, τα κύτταρα συλλέχθηκαν μετά από φυγοκέντρηση στις 3000 στροφές για 5 λεπτά και πλύθηκαν με ποσότητα διαλύματος TE ίση με το 1/2 του όγκου της αρχικής καλλιέργειας. Επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε 1/10 του όγκου διαλύματος 0.5M LiCl και επωάστηκαν στους 30°C για 20 λεπτά με ήπια ανάδευση προκειμένου να επιτευχθεί η διαπερατότητα του κυτταρικού τοιχώματος. Στο διάστημα αυτό πραγματοποιήθηκε η προετοιμασία των δειγμάτων DNA, δηλαδή περίπου 0.5 μg του πλασμιδίου που επρόκειτο να χρησιμοποιηθεί στο μετασχηματισμό αναμείχθηκαν 5-10 μgr φορέα DNA (carrier). Τα κύτταρα κατακρημνίστηκαν και επαναδιαλύθηκαν σε 1/100 του όγκου TE. 100 μl αναμείχθηκαν με το μείγμα DNA–φορέα και διατηρήθηκε στον πάγο για 10-15 λεπτά. Ακολούθησε προσθήκη 1ml διαλύματος παγωμένης πολυαιθυλενικής γλυκόλης 40% (PEG 8000), 0.1M LiCl και διατήρηση στον πάγο για 15-30 λεπτά. Το δείγμα υποβλήθηκε σε θερμοκρασιακό shock στους 42°C για 15 λεπτά και μεταφέρθηκε στον πάγο για τουλάχιστον 20-30 λεπτά. Στη συνέχεια τα κύτταρα κατακρημνίστηκαν και επιστρώθηκαν σε τρυβλία ώστε να επιτευχθεί η ανάπτυξη των αποικιών.

Β. Μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας του ενζύμου β-γαλακτοσιδάσης

Κύτταρα ζύμης αναπτύχθηκαν σε 5ml θρεπτικού μέσου SC* (synthetic complete) μέχρι η OD_{550}<1 και χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας. Αρχικά έγινε συλλογή των κυττάρων μετά από φυγοκέντρησή τους στις 3000 στροφές, αφαίρεση του υπερκειμένου και προσθήκη 1ml διαλύματος Z [60mM φωσφορικό νάτριο (διβασικό), 40mM

φωσφορικό νάτριο (μονοβασικό), 10 mM χλωριούχο κάλιο, 1 mM θειικό μαγνήσιο και 50 mM β-μερκαπτοαιθανόλη, pH 7.00]. Ακολούθησε προσθήκη 3 σταγόνων $CHCl_3$ και 2 σταγόνων 0.1% SDS και τα κύτταρα επαναδιαλυτοποιήθηκαν με έντονη ανάδευση για 20 δευτερόλεπτα. Τα δείγματα επωάστηκαν στους 30°C για περίπου 10 λεπτά, προστέθηκαν 200μl διαλύματος ONPG συγκέντρωσης 4μgr/μl και τοποθετήθηκαν στους 28-30°C. Η εμφάνιση κίτρινου χρώματος σε ένα δείγμα σηματοδοτεί και το χρόνο λήξης της αντίδρασης με την προσθήκη 350μl διαλύματος 1M Na_2CO_3. Μετά το τέλος της αντίδρασης τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 3000 στροφές για 2-3 λεπτά, έγινε συλλογή του υπερκειμένου και μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα (OD) στα 420nm. Η ενεργότητα της β-γαλακτοσιδάσης είναι ανάλογη του βαθμού ενεργοποίησης του γονιδίου αναφοράς *LacZ* και δίνεται από τον τύπο:

$U=1000 \times OD_{420} / T \times V \times OD_{550}$, όπου T αντιπροσωπεύει το χρόνο που πέρασε μέχρι να εμφανιστεί το κίτρινο χρώμα, V είναι ο όγκος της καλλιέργειας που ελέγχθηκε, OD_{420} και OD_{550} οι οπτικές πυκνότητες του υπερκειμένου μετά το τέλος της αντίδρασης.

*Σύσταση θρεπτικού μέσου SC: 6.7% g/l Yeast Nitrogen Base w/o amino acids (Difco), 20g/l γλυκόζη, 2g/l μίγμα αμινοξέων και 20g/l άγαρ αν πρόκειται για παρασκευή στερεού υποστρώματος. Μίγμα αμινοξέων: Αλανίνη 2g, Αργινίνη 2g, Ασπαρτικό οξύ 2g, Ασπαραγίνη 2g, Κυστείνη 2g, Γλουταμινικό οξύ 2g, Γλυκίνη 2g, Ισολευκίνη 2g, Λυσίνη 2g, Μεθειονίνη 2g, Φαινυλαλανίνη 2g, Προλίνη 2g, Σερίνη 2g, Θρεονίνη 2g, Τυροσίνη 2g, Βαλίνη 2g.

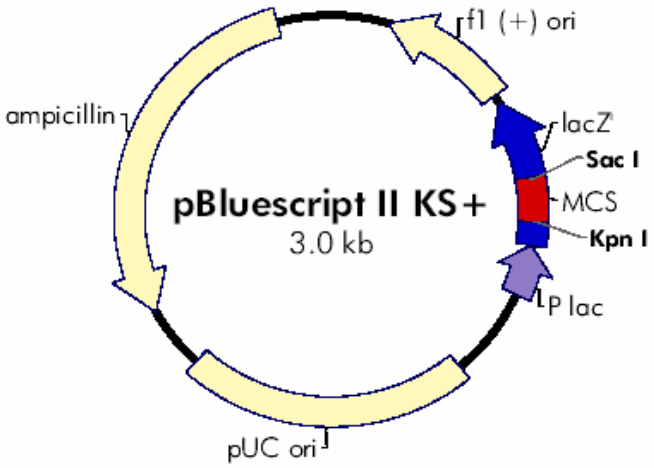
Σύσταση διαλύματος SC+X-Gal : 10X Διάλυμα αλάτων (1M K_2HPO_4, 1M KH_2PO_4) και X- Gal σε τελική συγκέντρωση 80mg/l.

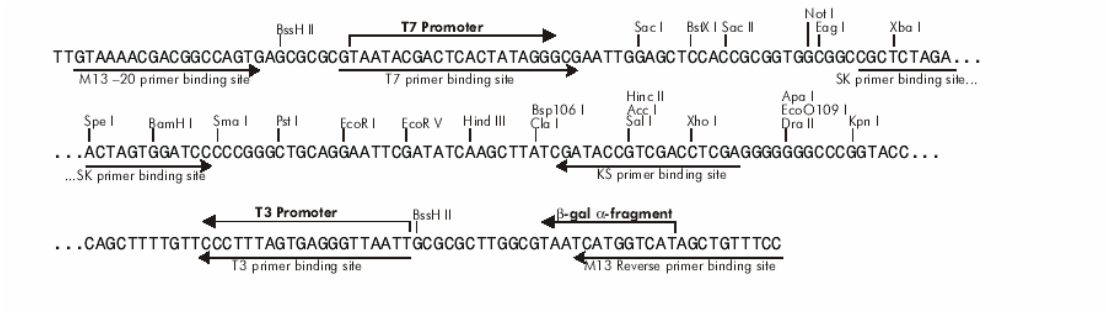
Στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae* που χρησιμοποιήθηκε στην ανάλυση του συστήματος των δύο υβριδίων

Το στέλεχος της ζύμης που χρησιμοποιήθηκε για μετασχηματισμό ήταν το PJ69-4A με γονότυπο : *MAT*α *trp*1-901 *leu*2-3,112 *ura*3-52 *his*3-200 *gal4Δ gal80*Δ UAS*GAL*2-ADE2 *LYS*2::UASGAL1-HIS3 met2::UASGAL7-lacZ.

ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΙ ΦΟΡΕΙΣ

1. **pBluescript KS II +(Stratagene) :** χρησιμοποιείται σε ευρεία κλίμακα για την κλωνοποίηση ενθεμάτων DNA. Φέρει το γονίδιο *lacZ,* το οποίο επιτρέπει την επιλογή των ανασυνδυασμένων βακτηριακών κλώνων μέσω της αντίδρασης β-γαλακτοσιδάσης. Η ύπαρξη υποκινητών T3 και T7 καθιστά δυνατό τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των κλωνοποιημένων ενθεμάτων, με τη χρήση των κατάλληλων εκκινητών.

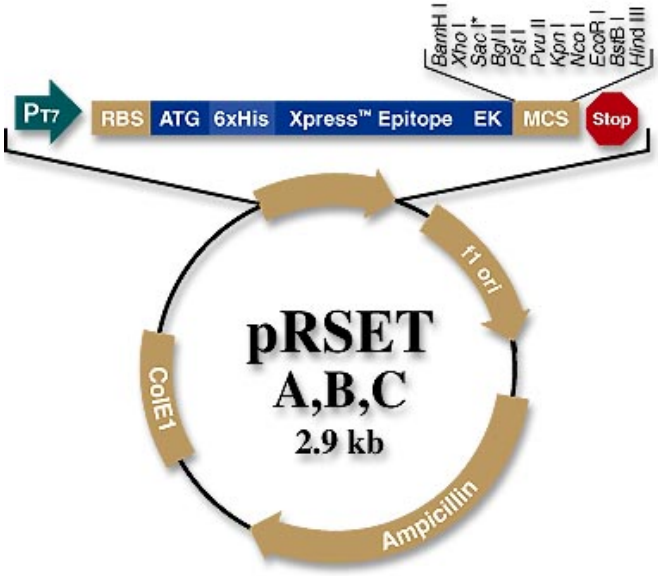


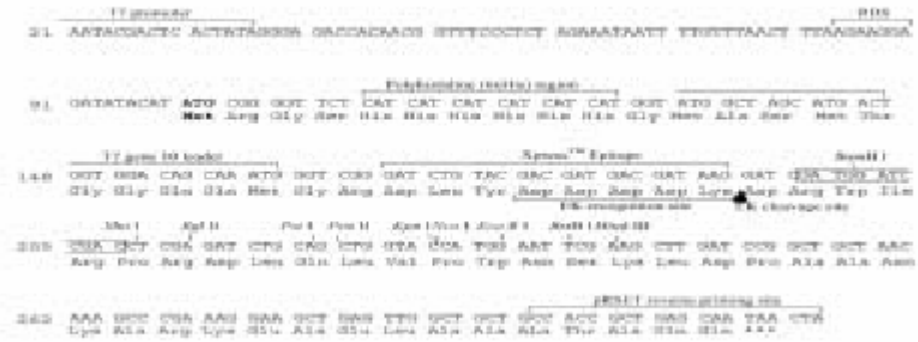


Εικόνα 2. Γραφική αναπαράσταση του πλασμιδιακού φορέα pBluescript KS II + : Η περιοχή κλωνοποίησης ενθεμάτων περιλαμβάνει μεγάλο αριθμό θέσεων αναγνώρισης περιοριστικών ενζύμων, γεγονός που καθιστά το φορέα ιδανικό για την κλωνοποίηση ενθεμάτων DNA. Το πλασμίδιο φέρει κασέτα ανθεκτικότητας στελεχών *E.coli* σε αμπικιλλίνη.

2. **pRSET (Invitrogen)** : ο φορέας αυτός έχει σχεδιαστεί να παρέχει υψηλά επίπεδα έκφρασης σε προκαρυωτικά κύτταρα υπό τον έλεγχο του ισχυρού υποκινητή του βακτηριοφάγου T7. Η έκφραση επάγεται με την παραγωγή T7 RNA πολυμεράσης σε στελέχη *E.coli* BL21 μετά την προσθήκη IPTG. Το

πλασμίδιο φέρει σειρά έξι ιστιδινών στο αμινοτελικό άκρο που επιτρέπουν τον εύκολο και γρήγορο καθαρισμό της παραγόμενης πρωτεΐνης μέσω ειδικών στηλών Ni. Επίσης, υπάρχουν πολλαπλά κωδικόνια έναρξης της μετάφρασης και πολυάριθμες θέσεις κλωνοποίησης, ώστε να είναι δυνατή η μετάφραση του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης οποιουδήποτε ενθέματος cDNA. Υπάρχουν τρεις διαφορετικοί τύποι pRSET(A, B και C).

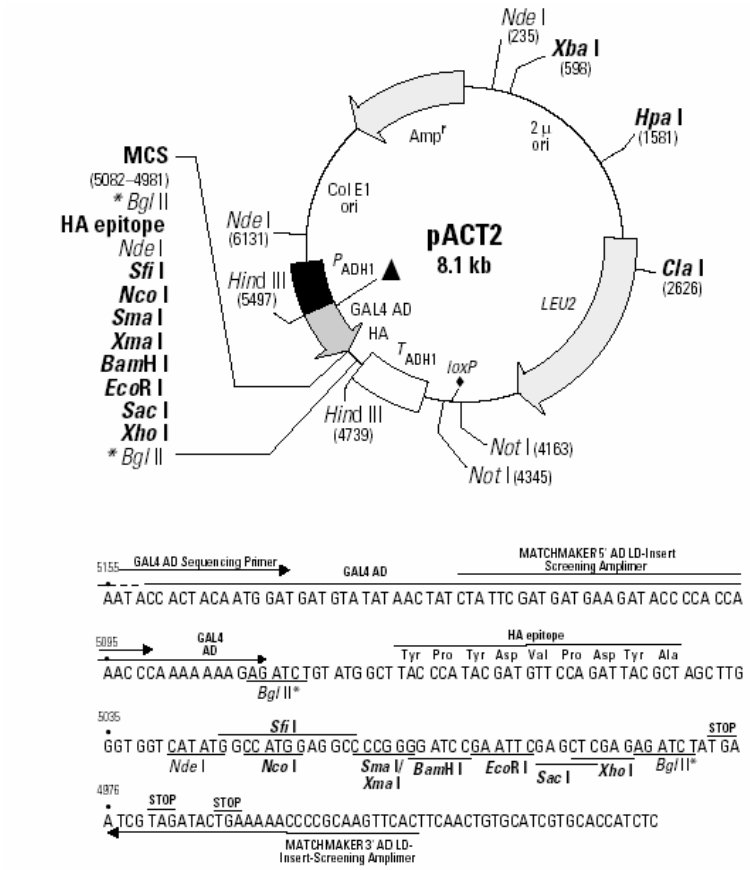




Εικόνα 3. **Γραφική αναπαράσταση του πλασμιδιακού φορέα έκφρασης pRSET :** Ο φορέας διαθέτει τον ισχυρό υποκινητή T7 που προσφέρει υψηλά επίπεδα έκφρασης της επιθυμητής πρωτεΐνης και σειρά 6 ιστιδινών για τον εύκολο καθαρισμό της. Επίσης, όλοι οι πλασμιδιακοί φορείς pRSET φέρουν κασέτα ανθεκτικότητας στελεχών *E.coli* σε αμπικιλλίνη.

3. **pACT2 (Clontech) :** ο φορέας καθιστά δυνατή την παραγωγή ανα-συνδυασμένης πρωτεΐνης, στην οποία η πρωτεΐνη που μελετάται βρίσκεται σε σύντηξη με την περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής του μεταγραφικού παράγοντα GAL4. Η υβριδική πρωτεΐνη εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στα

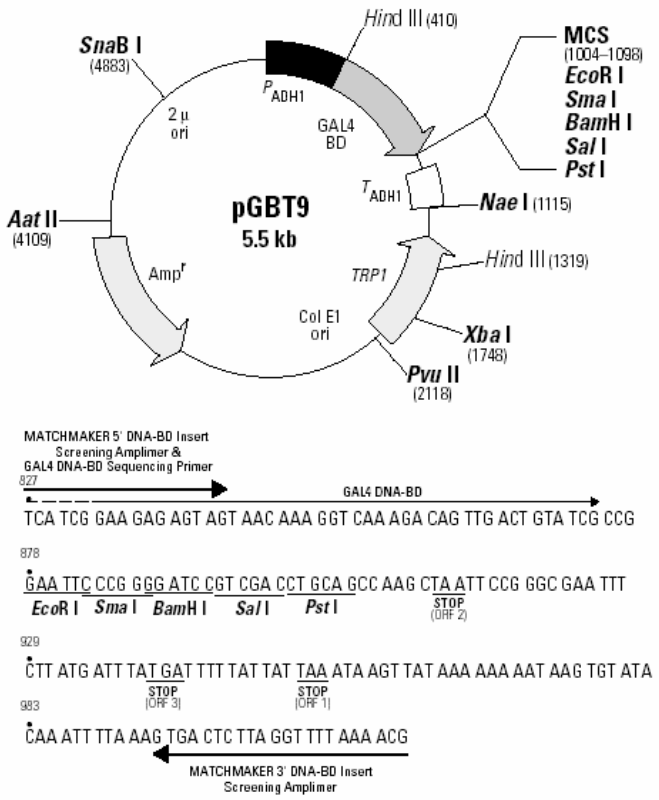
κύτταρα του ζακχαρομύκητα υπό τον έλεγχο του υποκινητή ADH1 και μεταφέρεται στον πυρήνα λόγω της παρουσίας αλληλουχιών πυρηνικού εντοπισμού στο 5΄ άκρο της περιοχής ενεργοποίησης. Ο φορέας pACT2 αναπαράγεται αυτόνομα στα κύτταρα τόσο της *E.coli*, όσο και του *S.cerevisiae*.



Εικόνα 4. Γραφική αναπαράσταση του πλασμιδιακού φορέα έκφρασης pACT2 : ο φορέας διαθέτει την περιοχή ενεργοποίησης (AD) του μεταγραφικού παράγοντα της ζύμης GAL4 και τον ισχυρό υποκινητή ADH1, παρέχοντας υψηλά επίπεδα παραγωγής χιμαιρικών πρωτεϊνών. Επίσης, φέρει το γονίδιο *bla* που προσδίδει ανθεκτικότητα στην αμπικιλλίνη κύτταρα της *E.coli* και επιπρόσθετα το γονίδιο *LEU2,*το οποίο επιτρέπει σε αυξότροφα κύτταρα να μεγαλώνουν σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο χωρίς την παρουσία λευκίνης.

4. **pGBT9 (Clontech)** : ο πλασμιδιακός αυτός φορέας παράγει μία υβριδική πρωτεΐνη που περιλαμβάνει την αλληλουχία του μεταγραφικού παράγοντα GAL4 της ζύμης,η οποία είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση στο DNA (DNA-BD: 1-147αα). Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη εκφράζεται σε κύτταρα σακχαρομύκητα υπό τον έλεγχο του υποκινητή ADH1 και μεταφέρεται στον πυρήνα λόγω αλληλουχιών πυρηνικού εντοπισμού που υπάρχουν στο φορέα.

Αναπαράγεται αυτόνομα στα κύτταρα της *E.coli* και του αναπαράγεται αυτόνομα στα κύτταρα τόσο της *E.coli*, όσο και του *S.cerevisiae*.



Εικόνα 5. Γραφικός χάρτης του πλασμιδίου έκφρασης pGBT9 : ο φορέας φέρει την περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DNA-BD) του μεταγραφικού παράγοντα GAL4 της ζύμης, ενώ οι περιοχές κλωνοποίησης ενθεμάτων (MCS) χαρακτηρίζονται από πολυάριθμες θέσεις αναγνώρισης περιοριστικών ενδονουκλεασών , οι οποίες επιτρέπουν την κλωνοποίηση οποιουδήποτε ενθέματος στο σωστό πλαίσιο ανάγνωσης. Προσδίδει επίσης ανθεκτικότητα στην αμπικιλλίνη στα κύτταρα E.coli, ενώ το γονίδιο αναφοράς *TRP1* επιτρέπει στα αυξότροφα κύτταρα ζύμης που φέρουν το φορέα pGBT9 να μεγαλώνουν σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο απουσία τρυπτοφάνης.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ cDNA ΠΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΕΙ ΤΗ Β-ΥΠΟ-ΜΟΝΑΔΑ ΤΗΣ ΙΝΤΕΓΚΡΙΝΗΣ

Προκειμένου να απομονωθεί η β-υπομονάδα της ιντεγκρίνης του *An. gambiae* εφαρμόστηκε η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιώντας εκφυλισμένους εκκινητές. Οι εκκινητές αυτοί σχεδιάστηκαν με βάση την υψηλή ομοιότητα που παρουσίαζαν περιοχές των β-υπομονάδων της ιντεγκρίνης μεταξύ διαφορετικών οργανισμών, όπως της β_1 των θηλαστικών, β_2 του κοτόπουλου και βPS της *Drosophila.* Ως μήτρα για την παραπάνω αντίδραση χρησιμοποιήθηκε μονόκλωνο μόριο cDNA από ενήλικο κουνούπι. Το προϊόν της αντίδρασης, μεγέθους 330 νουκλεοτιδίων, ύστερα από προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής του αλληλουχίας είχε μεγάλη ομοιότητα με την αντίστοιχη περιοχή της υπομονάδας βPS της *D.melanogaster*. Το τμήμα αυτό στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε ως ανιχνευτής στη σάρωση cDNA βιβλιοθήκης βακτηριοφάγου προερχόμενης από το 4ο στάδιο της νύμφης του κουνουπιού του είδους *An. gambiae* προκειμένου να απόμονωθούν μόρια cDNA που κωδικοποιούν τη β-υπομονάδα της ιντεγκρίνης στο κουνούπι. Διερευνήθηκαν $2X10^5$ βακτηριοφαγικές μονάδες (pfus)-φορείς ενθεμάτων, εκ των οποίων προέκυψε ένας θετικός κλώνος. Το ένθεμα cDNA μεγέθους 3.356bp απομονώθηκε από το DNA του βακτη-ριοφάγου, ύστερα από πέψη με τις ενδονουκλεάσες XhoI / EcoRI και κλωνο-ποιήθηκε σε πλασμιδιακό φορέα pBluescript KS II+ (Stratagene) στις αντί-στοιχες θέσεις

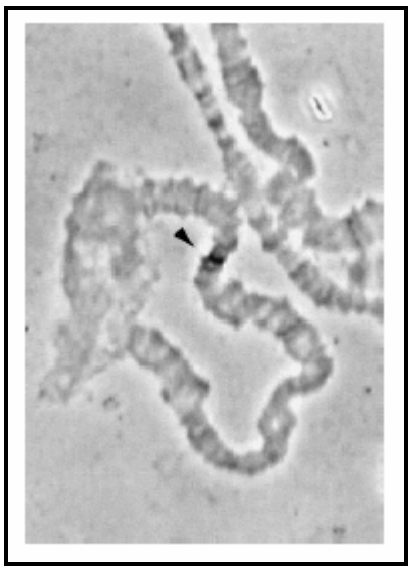
ένθεσης. Ακολούθησε ανάλυση με τη χρήση ποικίλων περιοριστικών ενζύμων και επακόλουθες υποκλωνοποιήσεις προκειμένου να γίνει εφικτός ο προσδιορισμός της πλήρους νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του. Η ανάλυση και η συγκριτική μελέτη της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του κλώνου με το cDNA του ομολόγου γονιδίου στη *Drosophila* πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση των υπολογιστικών προγραμμάτων BESTFIT, GAP και BLAST του υπολογιστικού πακέτου GCG (GCG Winsconsin Package, Accelrys).

Από τις αναλύσεις αυτές διαπιστώθηκε ότι ο κλώνος που απομονώθηκε έφερε ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης, μεγέθους 1934bp, ακολουθούμενο από 1522bp μη μεταφραζόμενης αλληλουχίας του 3' άκρου. Συγκριτική μελέτη με το πλήρους μήκους cDNA της βPS υπομονάδας της ιντεγκρίνης της *Drosophila* έδειξε ότι το 5' άκρο του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης του κλώνου ήταν ελλειπές. Προκειμένου να προσδιοριστεί η απουσιάζουσα νουκλεοτιδική αλληλουχία και να εντοπιστεί το εναρκτήριο κωδικόνιο μετάφρασης πραγματοποιήθηκαν πειράματα 5'RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) σε poly(A)+ RNA, το οποίο είχε απομονωθεί από το στάδιο της προνύμφης του *An.gambiae.* Το προϊόν που προέκυψε μεγέθους 720bp υποκλωνοποιήθηκε στο φορέα Topo TA και προσδιορίστηκε η νουκλεοτιδική του αλληλουχία. Από την ανάλυση αυτή εντοπίστηκε το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης (ATG) και ανιχνεύθηκε μέρος της 5' μη μεταφραζόμενης αλληλουχίας μήκους 141bp. Δημιουργήθηκε έτσι μία πλασμιδιακή κατασκευή με το πλήρες ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης συνολικού μεγέθους 2514bp (Genbank accession No. AJ292755).

2. ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ Β-ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ ΤΗΣ ΙΝΤΕΓΚΡΙΝΗΣ ΣΤΟ ΚΟΥΝΟΥΠΙ *An.gambiae*

Ο θετικός cDNA κλώνος που απομονώθηκε μετά τη διερεύνηση της βιβλιοθήκης χρησιμοποιήθηκε ως ανιχνευτής σε πειράματα υβριδοποίησης *in situ* σε πολυταινικά χρωμοσώματα του *An.gambiae* προκειμένου να χαρτογραφηθεί ο γενετικός τόπος του γονιδίου της β-ιντεγκρίνης. Ο τόπος αυτός

εντοπίστηκε στην περιοχή 5A του χρωμοσώματος X και ονομάστηκε *INTB* (Εικ. 1).



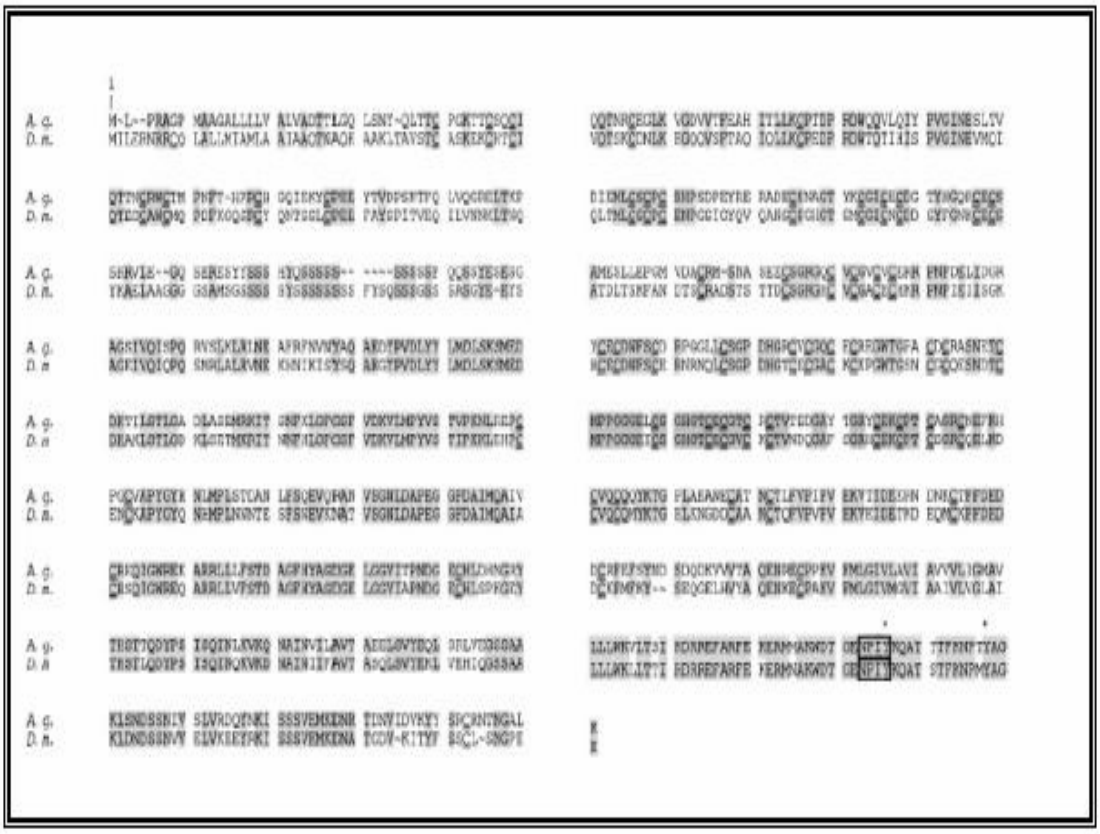
Εικόνα 1. Κυτταρογενετικός εντοπισμός του γονιδίου *INTB*. Η υβριδοποίηση *in situ* πραγματοποιήθηκε σε πολυταινικά χρωμοσώματα με τη χρήση τμήματος cDNA του γονιδίου *INTB* ως ανιχνευτή. Εντοπίστηκε μία θέση υβριδοποίησης στην κυτταρογενετική περιοχή 5A του χρωμοσώματος X (βέλος).

3. ΔΟΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ Β-ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ ΤΗΣ ΙΝΤΕ-ΓΚΡΙΝΗΣ ΤΟΥ ΚΟΥΝΟΥΠΙΟΥ

Επαγόμενη μετάφραση του γονιδίου της β-ιντεγκρίνης έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ενός πολυπεπτιδίου αποτελούμενο από 837 αμινοξικά κατάλοιπα που συγκρινόμενο με την πρωτεΐνη βPS της *Drosophila* είναι μικρότερο σε μέγεθος κατά 13 αμινοξέα (Εικ. 2). Προκειμένου να ανιχνευθούν οι περιοχές υδροφοβικότητας της πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλα υπολογιστικά προγράμματα πρόβλεψης τέτοιου τύπου περιοχών (Kyte & Doolittle, 1982). Εντοπίστηκε μία μικρή περιοχή υδροφοβικότητας στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης, η οποία αποτελείται από τα 26 πρώτα αμινοξέα και αντιπροσωπεύει το πεπτίδιο-σήμα (signal peptide), όπως προβλέπεται από το πρόγραμμα SignalIP (Nielsen *et al*., 1997). Επίσης, περιλαμβάνει μία ακόμη υδροφοβική περιοχή μεγέθους 20 αμινοξικών καταλοίπων που αντιστοιχεί στη διαμεμβρανική περιοχή της πρωτεΐνης. Τα

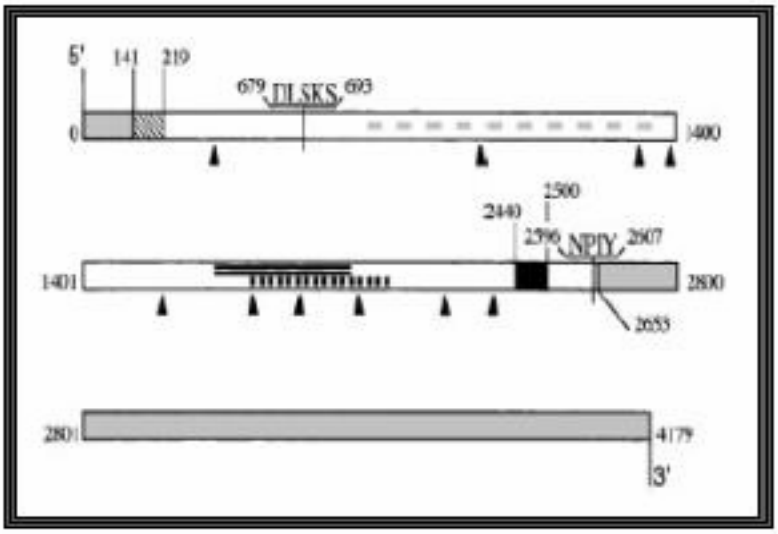
προγράμματα πρόβλεψης δομικής αρχιτεκτονικής πρωτεϊνών που χρησιμοποιήθηκαν (http://smart.embl-heidelberg.de/), υποδεικνύουν ότι η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο *INTB* είναι διαμεμβρανική αποτελούμενη από μία εξωκυττάρια περιοχή μήκους 765 αμινοξέων, ένα διαμεμβρανικό τμήμα και την κυτταροπλασματική περιοχή μήκους 51 αμινοξέων (Εικ. 2).

Συγκριτική μελέτη της πρωτεΐνης β-ιντεγκρίνης του κουνουπιού *An. gambiae* με την ομόλογη της *Drosophila* έδειξε αμινοξική ομολογία 70% και ταυτότητα 56%, σε όλο το μήκος των πολυπεπτιδίων (Εικ. 2). Ωστόσο σύγκριση μεμονωμένων περιοχών είναι δυνατόν να παρουσιάζει πολύ υψηλότερη ομολογία, γεγονός χαρακτηριστικό για το κυτταροπλασματικό της τμήμα, όπου το ποσοστό ομολογίας είναι ιδιαίτερα υψηλό προσεγγίζοντας το 90%. Ανάλογη συγκριτική ανάλυση έγινε με τις αντίστοιχες πρωτεΐνες από διαφορετικούς οργανισμούς όπως κοτόπουλο, *Xenopus* και ποντίκι. Το ποσοστό ταυτότητας μεταξύ των τεσσάρων παραπάνω πρωτεϊνών είναι της τάξεως του 38-39%.



Εικόνα 2. Συγκριτική ανάλυση της αμινοξικής αλληλουχίας της πρωτεΐνης β-ιντεγκρίνης του κουνουπιού *An.gambiae* με την ομόλογή της στη *Drosophila melanogaster.* Τα συντηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα υποδεικνύονται με γκρι χρώμα, ενώ οι κυστεΐνες είναι διπλά υπογραμμισμένες. Τα αμινοξέα που σχηματίζουν την αλληλουχία MIDAS αναγράφονται με πλάγιους χαρακτήρες. Οι δύο θέσεις φωσφορυλίωσης της τυροσίνης υποδεικνύονται με αστερίσκους.

Το χαρακτηριστικό στη δομή της πρωτεϊνικής αλυσίδας της β-ιντεγκρίνης είναι η παρουσία μεγάλου αριθμού κυστεϊνών. Συγκεκριμένα περιλαμβάνει 56 κυστεϊνικά αμινοξικά κατάλοιπα, όλα σε συντηρημένες θέσεις συγκριτικά με το ομόλογο γονίδιο της *Drosophila*. Ο υψηλός αριθμός κυστεϊνών είναι πιθανόν να αντιπροσωπεύει την παρουσία εκτεταμένων δισουλφιδικών δεσμών στην αλυσίδα της β-υπομονάδας. Επίσης, περιλαμβάνει μία ακόμα χαρακτηριστική περιοχή πλούσια σε σερίνες, η ύπαρξη της οποίας ωστόσο παρατηρείται μόνο στο δροσοφιλικό ομόλογο.



Εικόνα 3. Χάρτης του γονιδίου *INTB.* Ο χάρτης αποτελεί μία σχηματική αναπαράσταση της μεταγραφικής μονάδας της β-ιντεγκρίνης (οι αριθμοί αντιστοιχούν στα νουκλεοτίδια). Τα γκρι τμήματα αντιστοιχούν στις 5' και 3' μη-μεταφραζόμενες περιοχές, το μαύρο στη διαμεμβρανική περιοχή της πρωτεΐνης και αυτό μεταξύ των νουκλεοτιδίων 141-219 στο πεπτίδιο-σήμα. Τα μαύρα βέλη υποδεικνύουν πιθανές θέσεις γλυκοσυλίωσης στην προκύπτουσα πρωτεΐνη. Τρεις επιπλέον περιοχές είναι : η περιοχή I (γκρι διακεκομένη), οι επαναλήψεις-EGF (μαύρες τελείες) και η χαρακτηριστική περιοχή των β-υπομονάδων των ιντεγκρινών (διπλή γραμμή). Τέλος, αναγράφονται η θέση πρόσδεσης ιόντων μετάλλου (DLSKS) και το μοτίβο NPIY.

Συγκρίνοντας τις β αλυσίδες της ιντεγκρίνης του κουνουπιού με αυτές διαφορετικών ειδών προκύπτει ότι το εξωκυττάριο τμήμα της αποτελείται από την περιοχή τύπου A του παράγοντα von Willebrand [von Willebrand factor (vWF) type A domain]. Ο παράγοντας αυτός είναι μία πολυμερής γλυκοπρωτεΐνη που εντοπίζεται στο πλάσμα του αίματος και η συγκεκριμένη περιοχή αποτελεί το πρωτότυπο μιας πρωτεϊνικής υπερ-οικογένειας (Girma et al., 1987, Verweij et al., 1986) μεγέθους περίπου 200 αμινοξικών καταλοίπων. Σύμφωνα με τα υπάρχοντα βιβλιογραφικά δεδομένα αντιπροσωπεύεται από ένα ή περισσότερα αντίγραφα σε πρωτεΐνες που παίζουν ρόλο στη σύνδεση των κυττάρων, είτε μεταξύ τους είτε με το εξωκυττάριο υπόστρωμα (Michishita et al., 1993), στη μετανάστευσή τους και σε ποικίλα μονοπάτια σηματοδότησης.

Ο λειτουργικός ρόλος της ιντεγκρίνης επιτυγχάνεται μέσω της πρόσδεσης ιόντων μετάλλου (Mg^{2}+ ή Ca^{2}+) σε συγκεκριμένες θέσεις του εξωκυττάριου τμήματος. Υπάρχουν δύο τέτοιες θέσεις πρόσδεσης, εκ των

οποίων η μία εντοπίζεται στην περιοχή A και ονομάζεται MIDAS (Metal ion-dependent adhesion site), (Lee et al., 1995) και η δεύτερη αποτελεί μία περιοχή πρόσδεσης ιόντων μετάλλου τύπου EF-hand. Τα μεταλλικά ιόντα, τα οποία προσδένονται στις παραπάνω θέσεις σταθεροποιούν τη δομή της πρωτεΐνης και εμπλέκονται στις διαδικασίες αλληλεπίδρασης του υποδοχέα με το δεσμευτή.

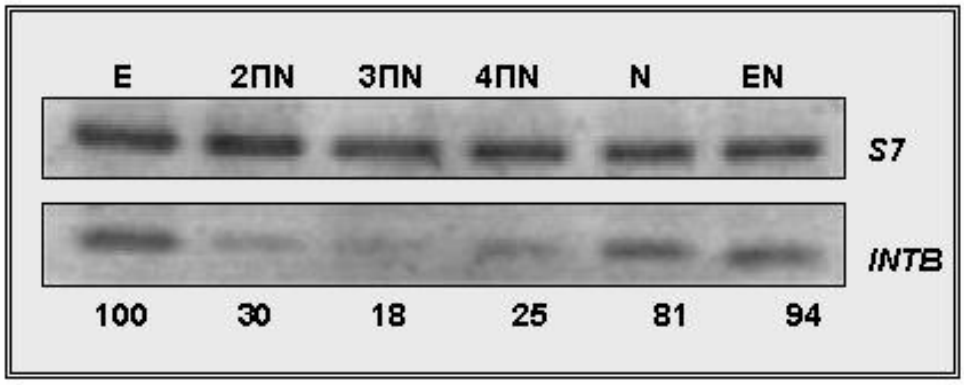
Το καρβοξυτελικό άκρο της εξωκυττάριου τμήματος καταλαμβάνεται από χαρακτηριστική περιοχή, όπου οι κυστεΐνες είναι διαταγμένες σε τρία διακριτά αλληλοεπικαλυπτόμενα μοτίβα. Το πρώτο από αυτά έχει τη δομή : (C-x-[GNQ]-x(1,3)-G-x-C-x-C-x(2)-C-x-C), ενώ τα δύο επόμενα αποτελούν δομές που συναντώνται στον επιδερμικό παράγοντα ανάπτυξης (EGF: Epidermal Growth Factor) και ονομάζονται EGF1 (C-x-C-x(5)-G-x(2)-C) και EGF2 (C-x-C-x(2)-[GP]-[FYN]-x(4,8)-C). Οι επαναλήψεις αυτές είναι γνωστό ότι εμπλέκονται σε έναν μεγάλο αριθμό πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων (Davis, 1990).

Όσον αφορά την κυτταροπλασματική περιοχή της πρωτεΐνης, εντοπίζονται δύο θέσεις φωσφορυλίωσης της τυροσίνης εκ των οποίων η μία περιλαμβάνεται στο μοτίβο NPIY (Tamkun et al., 1986; Tapley et al., 1989). Είναι γνωστό ότι το μοτίβο αυτό που παρουσιάζει υψηλό βαθμό συντήρησης μεταξύ των β αλυσίδων των ιντεγκρινών που μελετήθηκαν και αναφέρθηκαν παραπάνω, εμπλέκεται σε μηχανισμούς μετανάστευσης των κυττάρων (Buttery et al., 1999). Τέλος, οι κυτταροπλασματικές περιοχές των πρωτεϊνών που αναλύθηκαν συγκριτικά παρουσιάζουν το ίδιο σχεδόν μήκος (46-51 αμινοξέα).

4. ΤΟ ΠΡΟΤΥΠΟ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *INTB*

Προκειμένου να μελετηθεί το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου της β-ιντεγκρίνης σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια του κουνουπιού χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ημι-ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδραση πολύ-μεράσης (semi-quantitative PCR). Συγκεκριμένα, poly(A)+RNA απομονώθηκε

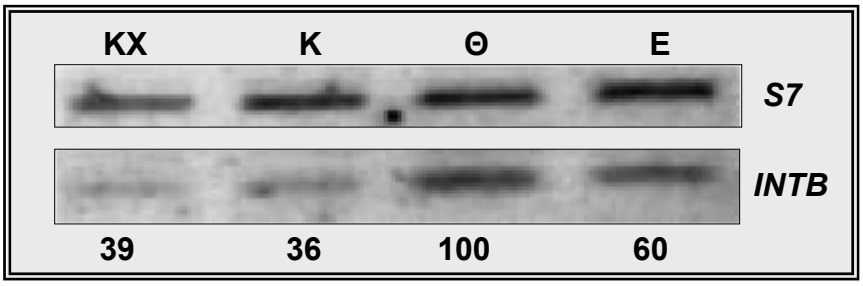
από τα στάδια του εμβρύου, της προνύμφης, νύμφης και ενηλίκου ατόμου. Τα προϊόντα της αντίδρασης διαχωρίστηκαν σε πηκτώματα αγαρόζης, τα οποία υποβλήθηκαν σε χρώση με ειδική χρωστική υψηλής ευαισθησίας για ελάχιστες συγκεντρώσεις νουκλεϊκών οξέων. Η μέτρηση των επιπέδων έκφρασης (πυκνότητα του προϊόντος της αντίδρασης) στα δείγματα πραγματοποιήθηκε με τη χρήση phosphoimager μετά από ποσοτική εξισορρόπισή τους έναντι της έκφρασης του μεταγράφου της ριβοσωμικής πρωτεΐνης S7 (Εικ. 4). Τα επίπεδα της έκφρασης του mRNA στην Εικόνα 4 παρουσιάζονται σε σχετική κλίμακα, με το ποσοστό 100% να αντιστοιχεί στο εμβρυϊκό στάδιο ανάπτυξης, το οποίο είναι το στάδιο εκείνο με το μεγαλύτερο αριθμό μεταγράφων. Όπως φαίνεται, ο ρυθμός μεταγραφής του γονιδίου μειώνεται κατά τη διάρκεια των σταδίων της προνύμφης, ενώ αυξάνεται πάλι στα στάδια της νύμφης και του ενηλίκου.



Εικόνα 4. Αναπτυξιακό πρότυπο έκφρασης του γονιδίου *INTB*. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της ημι-ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (semi-quantitative PCR). Χρησιμοποιώντας το γονίδιο *S7* για δείγμα ελέγχου (πάνω σειρά), μελετήθηκε poly(A)+ RNA από έμβρυα (Ε), δεύτερο (2ΠΝ), τρίτο (3ΠΝ) και τέταρτο (4ΠΝ) προνυμφικό στάδιο νύμφες (Ν) και ενήλικα άτομα (ΕΝ) με τη χρήση ειδικών εκκινητών για το γονίδιο *INTB* (κάτω σειρά). Οι αριθμοί στο κάτω μέρος δείχνουν τη συγκέντρωση των μεταγράφων σε σχετική κλίμακα, με το ποσοστό 100% να αντιστοιχεί στο αναπτυξιακό στάδιο με το μεγαλύτερο αριθμό μεταγράφων (εμβρυϊκό). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο από τρία διαφορετικά πειράματα.

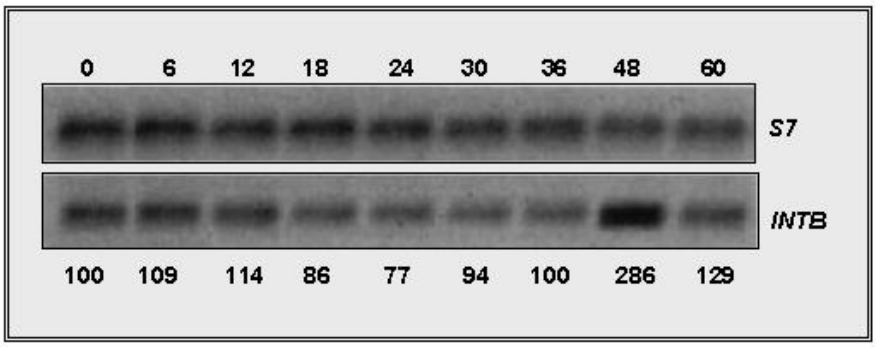
Η ίδια μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη του προτύπου έκφρασης του γονιδίου *INTB* σε διαφορετικούς ιστούς του κουνουπιού (Εικ. 5). Από ενήλικα άτομα αφαιρέθηκαν το κεφάλι, ο θώρακας, το μεσέντερο και η υπόλοιπη κοιλιακή χώρα, απομονώθηκε mRNA από κάθε ένα από τα

σωματικά μέρη και εφαρμόστηκε ημι-ποσοτική PCR. Παρατηρήθηκε έκφραση του γονιδίου σε όλους τους ιστούς με την υψηλότερη να σημειώνεται στο θώρακα.



Εικόνα 5 . Ιστοειδικό πρότυπο έκφρασης του γονιδίου *INTB.* Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της ημι-ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (semi-quantitative PCR). Χρησιμοποιώντας το γονίδιο *S7* για δείγμα ελέγχου (πάνω σειρά), μελετήθηκε poly(A)+ RNA από ιστούς ενήλικου ατόμου (ΚΧ : κοιλιακή χώρα, Κ : κεφάλι, Θ : θώρακας, Ε : έντερο). Οι αριθμοί στο κάτω μέρος δείχνουν τη συγκέντρωση των μεταγράφων σε σχετική κλίμακα, με το ποσοστό 100% να αντιστοιχεί στον ιστό με το μεγαλύτερο αριθμό μεταγράφων (θώρακας). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο από τρία διαφορετικά πειράματα.

Επόμενο βήμα ήταν η διερεύνηση μιας πιθανής συσχέτισης μεταξύ τωνεπιπέδων έκφρασης της β-ιντεγκρίνης και της διαδικασίας πέψης του αίματος που λαμβάνεται από το κουνούπι. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα αντίστροφης μεταγραφής και αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, στα οποία χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα poly(A)+RNA από ενήλικα άτομα που είχαν θανατωθεί σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα μετά τη λήψη αίματος. Το δείγμα ελέγχου αποτέλεσαν κουνούπια που θανατώθηκαν αμέσως μετά τη χορήγηση αίματος (Εικ. 6). Οι αντιδράσεις αλυσιδωτής αντίδρασης πολύ-μεράσης επαναλήφθηκαν τουλάχιστον τρεις φορές προκειμένου να επιβε-βαιωθούν τα αποτελέσματα. Όπως φαίνεται από την εικόνα, το γονίδιο ήταν μεταγραφικά ενεργό σε όλες τις χρονικές περιόδους που μελετήθηκαν τόσο κατά τη διάρκεια της πέψης όσο και μετά το τέλος αυτής, χωρίς ιδιαίτερες διακυμάνσεις στα επίπεδα της μεταγραφής. Μόνη εξαίρεση αποτέλεσε το δείγμα των 48 ωρών μετά τη χορήγηση αίματος, όπου η συγκέντρωση των μεταγράφων που ανιχνεύθηκαν ήταν τρεις φορές περίπου υψηλότερη από αυτή που παρατηρήθηκε στο δείγμα ελέγχου.



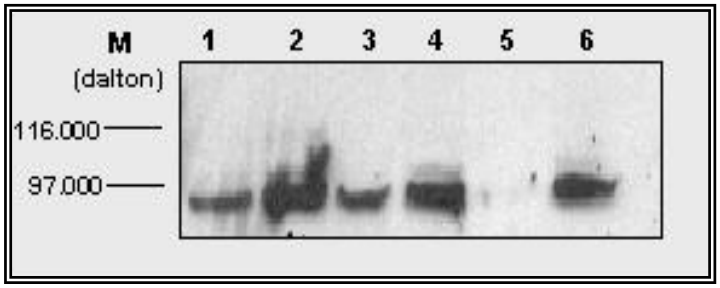
Εικόνα 6. Πρότυπο έκφρασης του γονιδίου *INTB* μετά τη χορήγηση αίματος στο κουνούπι. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της ημι-ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (semi-quantitative PCR). Χρησιμοποιώντας το γονίδιο *S7* σαν δείγμα ελέγχου (πάνω σειρά), μελετήθηκε poly(A)+ RNA από ενήλικα άτομα αμέσως μετά τη λήψη αίματος (0), όπως και μετά την πάροδο 6, 12, 18, 24, 30, 36, 48 και 60 ωρών (κάτω σειρά). Παρατηρείται υψηλή συγκέντρωση μεταγράφων 48 ώρες μετά τη λήψη αίματος. Οι αριθμοί στο κάτω μέρος αντιστοιχούν στον αριθμό των μεταγράφων εκφραζόμενων ως ποσοστό της συγκέντρωσης πριν την λήψη του αίματος (100%). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο από τρία διαφορετικά πειράματα.

5. ΤΟΠΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ Β-ΙΝΤΕΓΚΡΙΝΗΣ

Επόμενος στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη του γονιδίου *INTB* σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Για το σκοπό αυτό κρίθηκε απαραίτητη η παρασκευή αντισωμάτων έναντι της εξωκυττάριας περιοχής της β-υπομονάδας. Το cDNA ένθεμα του αρχικού θετικού κλώνου που είχε απομονωθεί από τη διερεύνηση της βιβλιοθήκης υποβλήθηκε σε πέψη με τις ενδονουκλεάσες BamH I/ Pst I και το τμήμα που προέκυψε, μεγέθους 600bp υποκλωνοποιήθηκε σε πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pRSETB στις αντί-στοιχες θέσεις ένθεσεις. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το τμήμα αυτό περιελάμβανε τη χαρακτηριστική εξωκυττάρια περιοχή των ιντεγκρινών τύπου-Α και χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των πολυκλωνικών αντισωμάτων.

α. Μελέτη της έκφρασης της β-ιντεγκρίνης σε κυτταρικές σειρές κουνουπιού

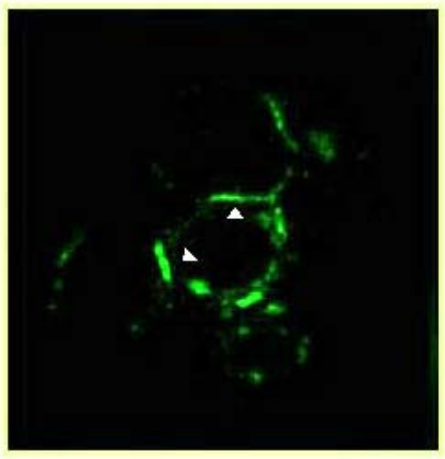
Το πολυκλωνικό αντίσωμα (M13) χρησιμοποιήθηκε αρχικά για τη διερεύνηση της έκφρασης του γονιδίου *INTB* σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές προερχόμενες από κουνούπι του είδους *An.gambiae*. Περίπου $2.5X10^6$ κύτταρα από κάθε σειρά συλλέχθησαν, λύθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα ανοσοϋβριδισμού. Πρωτεΐνη μεγέθους 93KD ανιχνεύθηκε σε όλες τις κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν εκτός από τη σειρά Mos-20 που προέρχεται από το κουνούπι του γένους *Aedes (*Εικ. 7*)*. Το γεγονός αυτό δεν μπορεί να ερμηνευθεί ως απουσία έκφρασης της πρωτεΐνης στα κύτταρα του κουνουπιού *Aedes,* καθώς οι ιντεγκρίνες αποτελούν υψηλά συντηρημένα μόρια, αλλά ως υψηλή εξειδίκευση του αντισώματος που χρησιμοποιήθηκε, το οποίο παρασκευάστηκε έναντι πρωτεΐνης που προέρχεται από κουνούπι διαφορετικού είδους.



Εικόνα 7 . Ανοσοανίχνευση της πρωτεΐνης β-ιντεγκρίνης σε εκχυλίσματα κυτταρικών σειρών κουνουπιού. Για την ανοσοανίχνευση της πρωτεΐνης β-ιντεγκρίνης στα κυτταρικά εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα M13. 1: L3-5A. 2 : 4a-3a. 3 : Sua4. 4 : Sua5a. 5 : Mos20. 6 : Sua5-1. Η πρωτεΐνη (μεγέθους 93KD) ανιχνεύθηκε σε όλες κυτταρικές σειρές που προέρχονται από κουνούπι του είδους *An.Gambiae*, εκτός από τη σειρά Mos-20 του γένους *Aedes*. Οι ποσότητες των ηλεκτροφορημένων δειγμάτων αντιστοιχούν στον ίδιο αριθμό κυττάρων ($2X10^6$).

Ακολούθησε η τοπολογική διερεύνηση της έκφρασης της β-ιντεγκρίνης σε κύτταρα της σειράς 4a3A του είδους *An.gambiae* με πειράματα ανοσοφθορισμού**.** Υψηλή συσσώρευση της πρωτεΐνης παρατηρήθηκε στα σημεία που τα κύτταρα βρίσκονται σε άμεση επαφή μεταξύ τους (Εικ. 8). Στα πειράματα ελέγχου (control), στα οποία χρησιμοποιήθηκε ορός που είχε απομονωθεί από το ποντίκι πριν την ανοσοποίηση δεν παρατηρήθηκε καμία

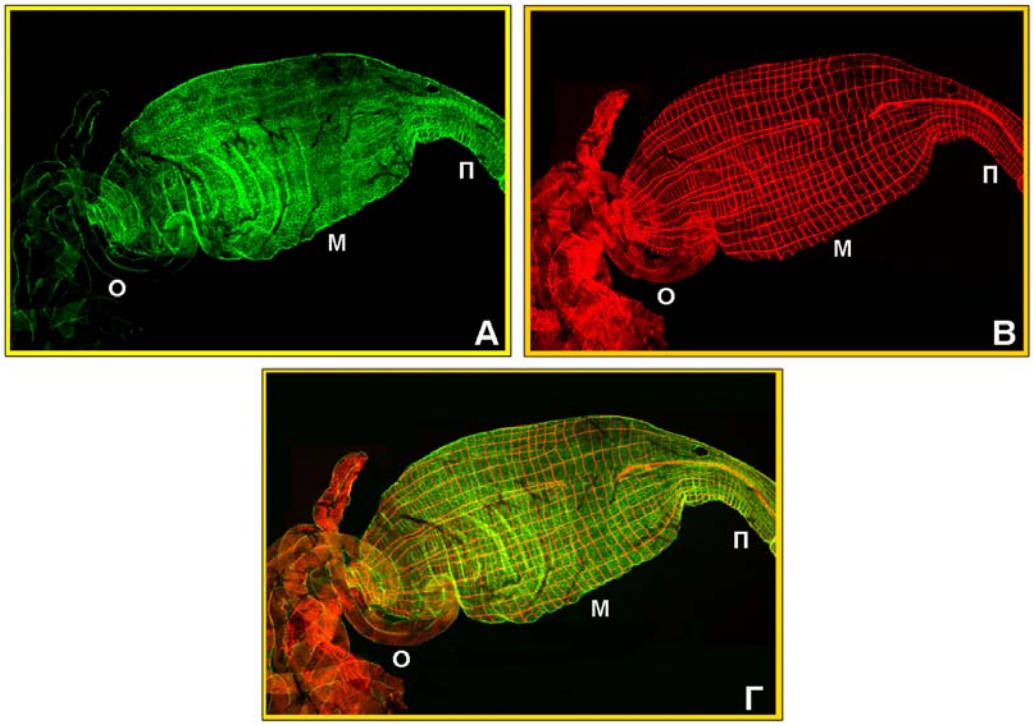
χρώση στα κύτταρα, γεγονός που αποτελεί ένδειξη της εξειδίκευσης του αντισώματος που παρήχθη.



Εικόνα 8. Ανοσοεντοπισμός της πρωτεΐνης β-ιντεγκρίνης σε κυτταρική σειρά κουνουπιού του είδους *An.gambiae*. Η εκφραζόμενη πρωτεΐνη (πράσινο) ανιχνεύθηκε στην κυτταρική μεμβράνη με υψηλότερα επίπεδα συγκέντρωσης στα σημεία επαφής των κυττάρων (βέλη).

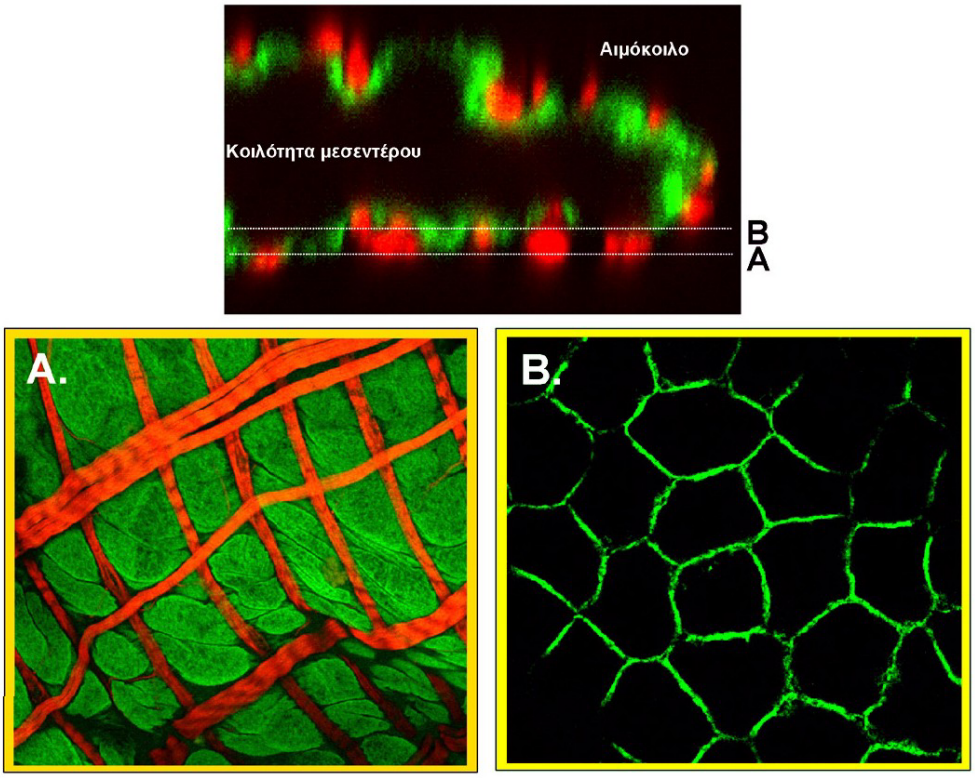
β. Διερεύνηση του κυτταρικού εντοπισμού της β-ιντεγκρίνης στο μεσέντερο του κουνουπιού *An.gambiae*

Το πρώτο στάδιο στην προσπάθεια διερεύνησης του ρόλου της ιντεγκρίνης στο κουνούπι αποτέλεσε η μελέτη αρχικά της τοπολογικής της κατανομής στο μεσέντερο του εντόμου. Μεσέντερα από ενήλικα άτομα αφαιρέθηκαν, μονιμοποιήθηκαν κατάλληλα, επεξεργάστηκαν με τεχνικές ανοσοφθορισμού χρησιμοποιώντας το αντίσωμα M13 και τα δείγματα πα-ρατηρήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού. Η υπό μελέτη πρωτεΐνη εντοπίζεται στο μονόστιβο επιθήλιο του εντέρου, αλλά ο εντοπισμός αυτός όπως αποδεικνύεται περιορίζεται μόνο στο πρόσθιο έντερο (foregut) και στο μεσέντερο (midgut), αλλά όχι στο οπίσθιο (hindgut) (Εικ. 9).



Εικόνα 9 . Εντοπισμός της πρωτεΐνης β-ιντεγκρίνης στο μεσέντερο του κουνουπιού. Οπτική τομή συνεστιακού μικροσκοπίου από έντερο ενήλικου ατόμου. Π: πρόσθιο έντερο. Μ: μεσέντερο. Ο: οπίσθιο έντερο. **Α:** ανίχνευση της β-ιντεγκρίνης στα επιθηλιακό τοίχωμα του προσθίου και μεσαίου εντέρου (πράσινο). Δεν παρατηρείται στο οπίσθιο τμήμα του εντέρου (Ο). **Β:** εικονίζονται οι μύες του εντέρου, κυλινδρικοί και επιμήκεις με τη χρήση αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης F-ακτίνης (κόκκινο). **Γ:** συμπροβολή των εικόνων Α και Β.

Με πιο λεπτομερειακή μελέτη του δείγματος παρατηρήθηκε η ομοιόμορφη έκφραση της πρωτεΐνης σε όλη την επιφάνεια της βασικής πλευράς των επιθηλιακών κυττάρων**.** Συσσώρευση της πρωτεΐνης ανιχνεύτηκε και στις πλευρικές πλασματικές μεμβράνες, όπου υπάρχει άμεση επαφή και σύνδεση των κυττάρων μεταξύ τους. Ο μεμβρανικός αυτός εντοπισμός της πρωτεΐνης που αρχίζει από τη βασική επιθηλιακή μεμβράνη επεκτείνεται μέχρι το ένα τρίτο περίπου του μήκους της στοιβάδας του επιθηλίου προς την κοιλότητα του μεσεντέρου (Εικ. 10).

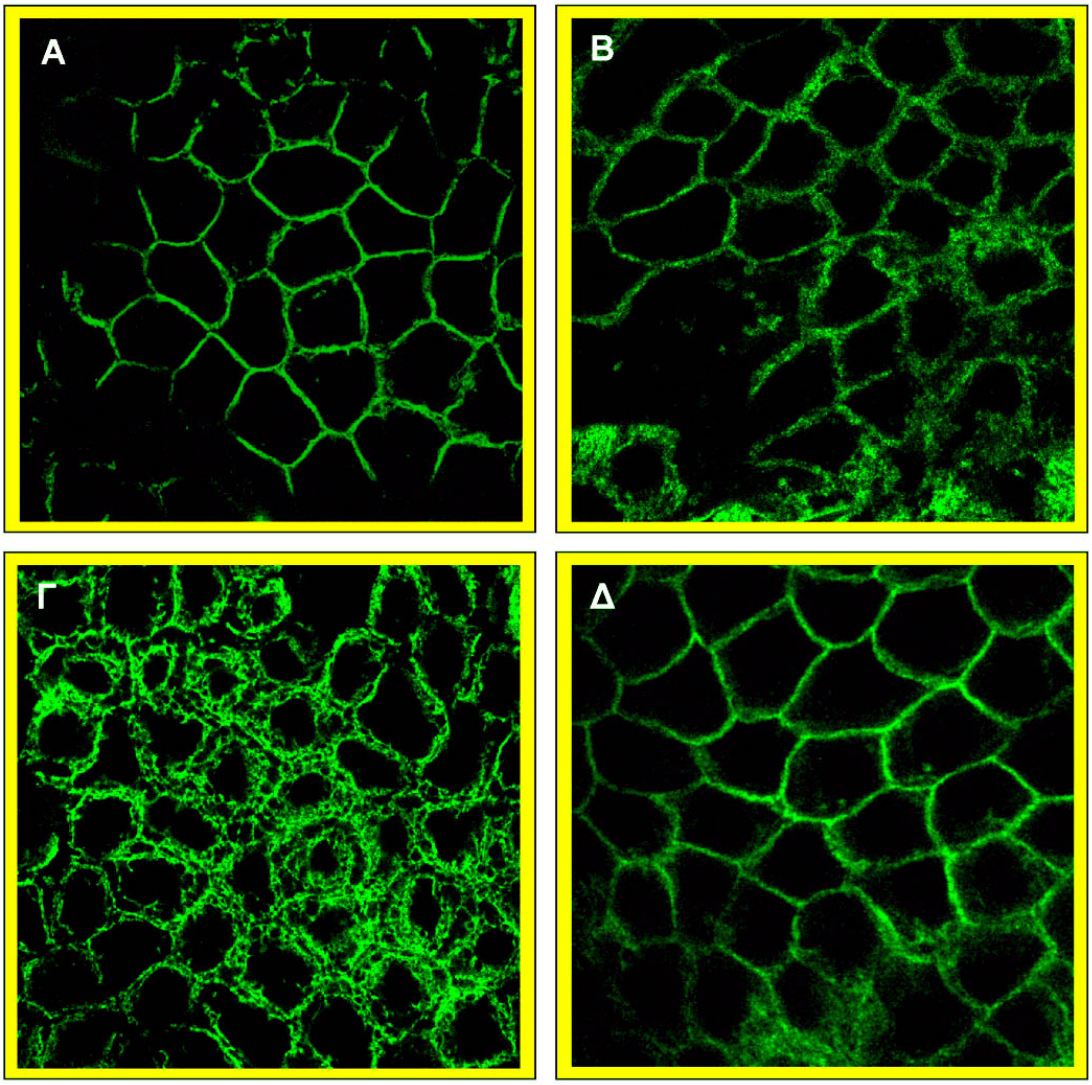


Εικόνα 10. Ανοσοεντοπισμός της β-ιντεγκρίνης στα επιθηλιακά κύτταρα του μεσεντέρου. Κορυφαία φωτογραφία: εγκάρσια οπτική τομή μεσεντέρου. Η πρωτεΐνη ανιχνεύεται στο μονόστιβο επιθήλιο του μεσεντέρου (πράσινο) που περιβάλλεται από τους μύες (κόκκινο). Ταυτόχρονα εικονίζεται διαγραμματικά η περιοχή λήψης των οπτικών τομών που αντιστοιχούν στις εικόνες Α και Β (διακεκομμένες γραμμές). **Α:** οπτική τομή πλησίον της βασικής περιοχής των επιθηλιακών κυττάρων. Παρατηρείται ομοιόμορφη κατανομή της β-ιντεγκρίνης (πράσινο). **Β:** ανίχνευση της πρωτεΐνης στις πλευρικές περιοχές της πλασματικής μεμβράνης.

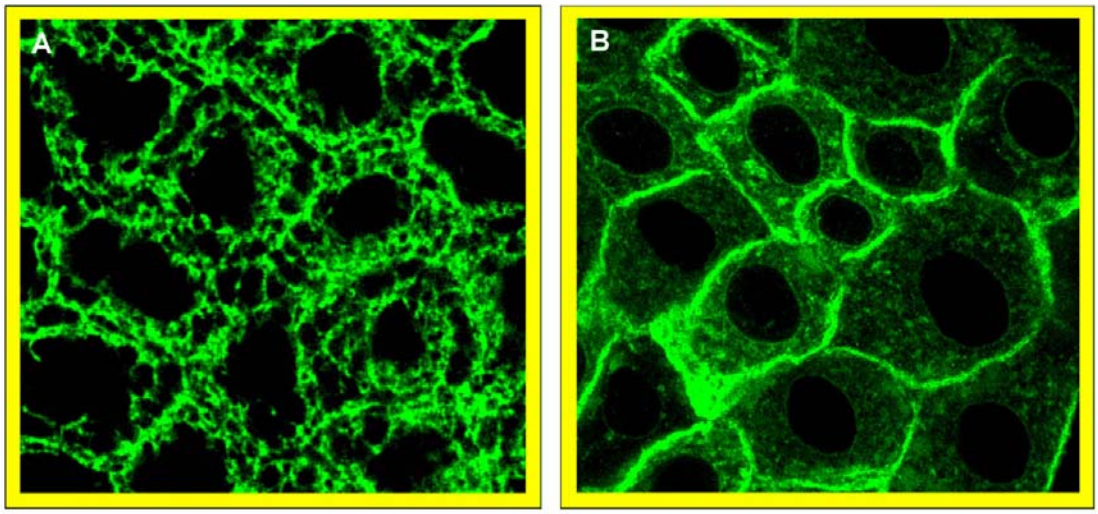
6. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΤΗΣ Β-ΙΝΤΕΓΚΡΙΝΗΣ ΣΤΑ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΜΕΣΕΝΤΕΡΟΥ ΜΕΤΑ ΤΟ ΓΕΥΜΑ ΑΙΜΑΤΟΣ

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, κατά τη διερεύνηση της έκφρασης της β-ιντεγκρίνης στο κουνούπι παρατηρήθηκαν υψηλά επίπεδα μεταγράφων περίπου 24-48 ώρες μετά τη λήψη αίματος. Προκειμένου να μελετήσουμε τις πιθανές μεταβολές στην τοπολογική κατανομή της πρωτεΐνης στα επιθηλιακά κύτταρα του μεσεντέρου πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοεντοπισμού σε ιστούς ατόμων που θανατώθηκαν 24-48 ώρες μετά το γεύμα αίματος. Εφαρμόστηκε η ίδια πειραματική πορεία με μόνη διαφορά ότι μετά την αφαίρεση των ιστών από τα κουνούπια ακολούθησε η απομάκρυνση του

αίματος. Αμέσως μετά το γεύμα αίματος, η χρώση που παρατηρείται χρησιμοποιώντας το αντίσωμα M13 είναι ελαφρώς πιο διάχυτη από ότι αναμένεται, ενώ μερικές φορές παρατηρείται ενδοκυτταρικά (Εικ. 11). Ο ενδοκυτταρικός αυτός εντοπισμός της ιντεγκρίνης είναι πιο εμφανής 24 ώρες αργότερα. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκαν δύο χαρακτηριστικά 'πρότυπα' χρώσης σε διαφορετικές ομάδες επιθηλιακών κυττάρων στο ίδιο ωστόσο δείγμα ιστού (Εικ. 12). Στην μία περίπτωση, η κατανομή της πρωτεΐνης είναι ομοιόμορφη σε όλη την έκταση του κυτταροπλάσματος. Στη δεύτερη ομάδα κυττάρων, το πρότυπο της χρώσης διαφέρει, δίνοντας την εντύπωση εντοπισμού της ιντεγκρίνης σε κυστικές δομές του κυτταροπλάσματος που βρίσκονται σε άμεση γειτνίαση με την κυτταρική μεμβράνη. Πρέπει να σημειωθεί ότι η παρατήρηση των δύο διαφορετικών τύπων υποκυτταρικού εντοπισμού που αναφέρθηκαν παραπάνω είναι ανεξάρτητη από τη θέση που καταλαμβάνουν οι αντίστοιχες ομάδες κυττάρων μέσα στο μεσέντερο του κουνουπιού. Τέλος, 48 ώρες μετά το γεύμα αίματος από τα κουνούπια, το φυσιολογικό πρότυπο κατανομής της πρωτεΐνης στο κύτταρο επανέρχεται, με υψηλότερη συσσώρευσή της να παρατηρείται στις πλασματικές μεμβράνες των κυττάρων.



Εικόνα 11. Τοπολογική κατανομή της β-ιντεγκρίνης στα επιθηλιακά κύτταρα του μεσεντέρου μετά το γεύμα αίματος από το κουνούπι. Οπτικές τομές από μεσέντερο κουνουπιού στο επίπεδο των πλευρικών περιοχών της κυτταρικής μεμβράνης. Για τον εντοπισμό της πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα M13 έναντι της εξωκυττάριας περιοχής της β-ιντεγκρίνης. **Α:** πριν το γεύμα αίματος, η ιντεγκρίνη ανιχνεύεται στις πλευρικές περιοχές της πλασματικής μεμβράνης των επιθηλιακών κυττάρων. **Β:** αμέσως μετά τη λήψη αίματος από το κουνούπι, η πρωτεΐνη εντοπίζεται τόσο στην κυτταρική μεμβράνη, όσο και στο κυτταρόπλασμα. **Γ:** 24 ώρες μετά την αιματοφαγία παρατηρούνται υψηλά επίπεδα ενδοκυτταρικού εντοπισμού της ιντεγκρίνης, ενώ 48 ώρες αργότερα **(Δ)**, παρατηρείται το φυσιολογικό πρότυπο έκφρασης (ανίχνευση στην κυτταρική μεμβράνη).



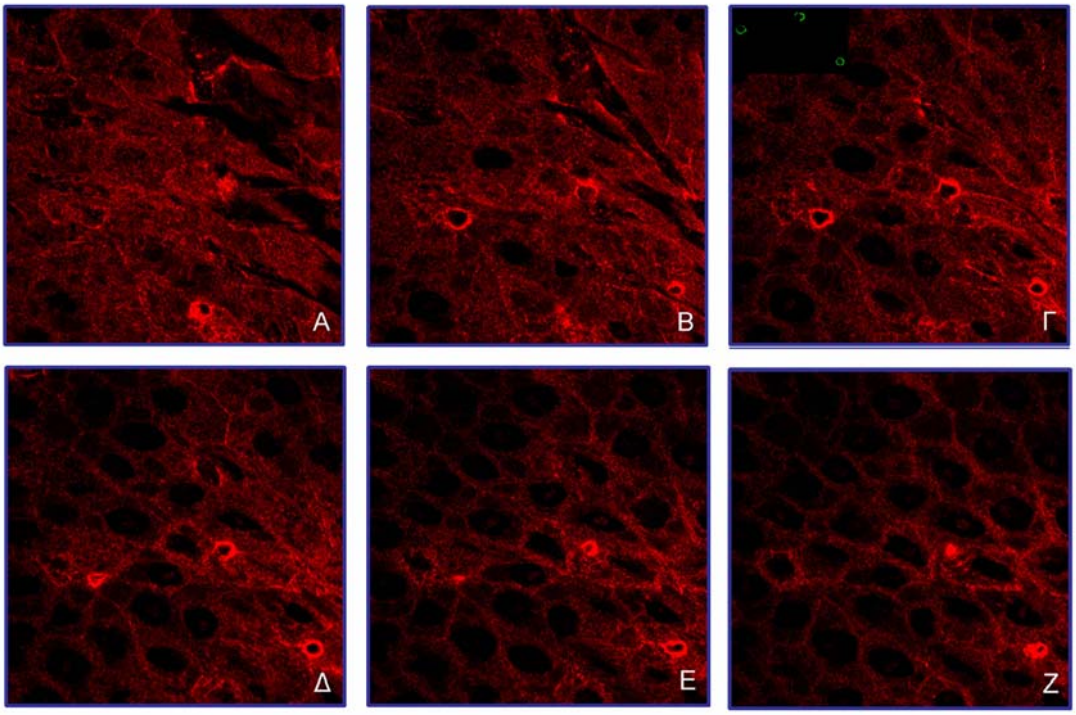
Εικόνα 12. Πρότυπα υποκυτταρικού εντοπισμού της πρωτεΐνης β-ιντεγκρίνης στα επιθηλιακά κύτταρα του μεσεντέρου μετά το γεύμα αίματος. 24 ώρες μετά την αιματοφαγία η πρωτεΐνη ανιχνεύεται ενδοκυτταρικά είτε με τη μορφή στικτών δομών **(Α)**, είτε ομοιόμορφα σε όλη την έκταση του κυτταροπλάσματος **(Β)**. Τα δύο διαφορετικά πρότυπα υποκυτταρικού εντοπισμού της β-ιντεγκρίνης παρατηρούνται στο ίδιο δείγμα ιστού.

7. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΤΗΣ Β-ΙΝΤΕΓΚΡΙΝΗΣ ΣΤΟ ΜΕΣΕΝΤΕΡΙΚΟ ΕΠΙΘΗΛΙΟ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΙΣΟΔΟ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ *P.berghei*

Προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος που πιθανόν παίζει η ιντεγκρίνη κατά την είσοδο του παρασίτου στο επιθήλιο του εντέρου, το πρώτο βήμα ήταν να μελετηθεί αν και κατά ποιό τρόπο μεταβάλλεται η κυτταρική της κατανομή στα επιθηλιακά κύτταρα κατά τη διάρκεια της διαδικασίας εισόδου και ανάπτυξής του στον ξενιστή. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοανίχνευσης χρησιμοποιώντας, παράλληλα με το αντίσωμα M13 και έναν αριθμό άλλων αντισωμάτων έναντι πρωτεϊνών που εντοπίζονται στην επιφάνεια του πλασμωδίου. Η επιλογή των αντισωμάτων γινόταν κάθε φορά ανάλογα με την πορεία ανάπτυξης στο οποίο βρίσκεται το παράσιτο αμέσως μετά την είσοδό του στο μεσέντερο του ξενιστή.

Αρχικά, μελετήθηκε ο υποκυτταρικός εντοπισμός της πρωτεΐνης σε μεσέντερα κουνουπιών που θανατώθηκαν 24 ώρες μετά το γεύμα μολυσμένου αίματος. Κατά τη χρονική αυτή περίοδο τα παράσιτα με τη μορφή

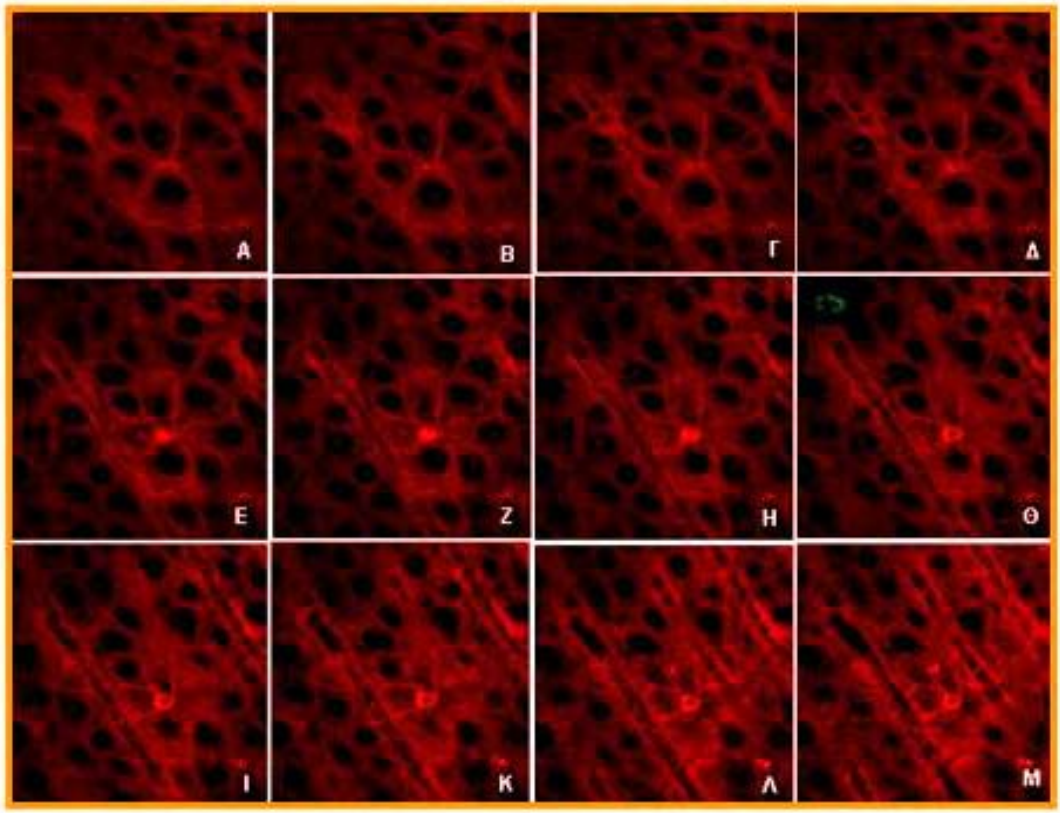
του οοκινέτη, βρίσκονται στη διαδικασία διαπέρασης του επιθηλιακού τοιχώματος του μεσεντέρου. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα ένα ποσοστό τους να εντοπίζεται στην περιοχή της κοιλότητας του εντέρου, ένα άλλο κατά τη διάρκεια διέλευσής τους είτε μεταξύ είτε εντός των επιθηλιακών κυττάρων, ενώ κάποια από αυτά να έχουν ήδη φτάσει στη βασική πλευρά του επιθηλίου. Για την ανίχνευσή τους χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης P28, η έκφραση της οποίας εντοπίζεται στην επιφάνεια των οοκινετών σε υψηλά επίπεδα και παραμένει μέχρι και 17 μέρες μετά την είσοδό τους στον ξενιστή μέσω του αίματος. Η κατανομή της ιντεγκρίνης προσδιορίστηκε με ταυτόχρονη χρώση με το αντίσωμα M13. Υψηλά επίπεδα συσσώρευσης της ιντεγκρίνης παρατηρήθηκαν όχι μόνο στα κύτταρα, αλλά και σε όλο το μήκος της επιφάνειας οοκινετών που είχαν ήδη διαπεράσει το επιθηλιακό τοίχωμα και παρέμεναν στο κάτω μέρος των κυττάρων, προς την πλευρά της αιμολέμφου (Εικ.13). Η ίδια παρατήρηση έγινε μετά από λεπτομερέστερη μελέτη ενός μεγάλου αριθμού οοκινετών που βρίσκονται σε διαφορετικά στάδια κατά τη διαδικασία εισχώρησης στην επιθηλιακή στιβάδα. Κατά κανόνα δηλαδή η πρωτεΐνη εντοπίστηκε στην επιφάνεια τόσο αυτών που ανιχνεύονται εντός όσο και αυτών που βρίσκονται μεταξύ των κυττάρων. Ωστόσο, σε ένα μικρό ποσοστό του πληθυσμού των ενδοκυτταρικών οοκινετών (λιγότερο από 1%) δεν παρατηρήθηκε καμία χρώση στην επιφάνεια των παρασίτων. Το ότι η δομή αυτή που ανιχνεύεται αποτελεί πράγματι οοκινέτη, επιβεβαιώνεται με τον ταυτόχρονο συν-εντοπισμό του αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης του οοκινέτη P28. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η εξειδίκευση του αντισώματος M13 ακολούθησε μία σειρά πειραμάτων ελέγχου. Το γεγονός ότι ο ορός που απομονώθηκε από τα ποντίκια πριν την ανοσοποίησή τους με το αντιγόνο (υβριδική πρωτεΐνη της β-ιντεγκρίνης) δεν έδωσε θετικά αποτελέσματα όταν επιχειρήθηκε χρώση σε μεσέντερα κουνουπιών αποτέλεσε μία ακόμη επιβεβαίωση της απόλυτης εξειδίκευσης του αντισώματος M13.



Εικόνα 13. Ανοσοεντοπισμός της β-ιντεγκρίνης στο μεσέντερο κουνουπιού 24 ώρες μετά το γεύμα αίματος. Α-Ζ: σειρά οπτικών τομών συνεστιακού μικροσκοπίου από μεσέντερο κουνουπιού ξεκινώντας από την περιοχή πλησίον της βασικής επιφανείας των επιθηλιακών κυττάρων (Α) προς την περιοχή πλησίον της μεσεντερικής κοιλότητας (Ζ). Η πρωτεΐνη ανιχνεύεται στα επιθηλιακά κύτταρα, αλλά και στην επιφάνεια των ookινετών που διαπερνούν το επιθηλιακό τοίχωμα. Ο εντοπισμός των ookινετών γίνεται με ταυτόχρονη χρώση με αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης P28 του παρασίτου *P.berghei* (ένθετη εικόνα στην οπτική τομή Γ).

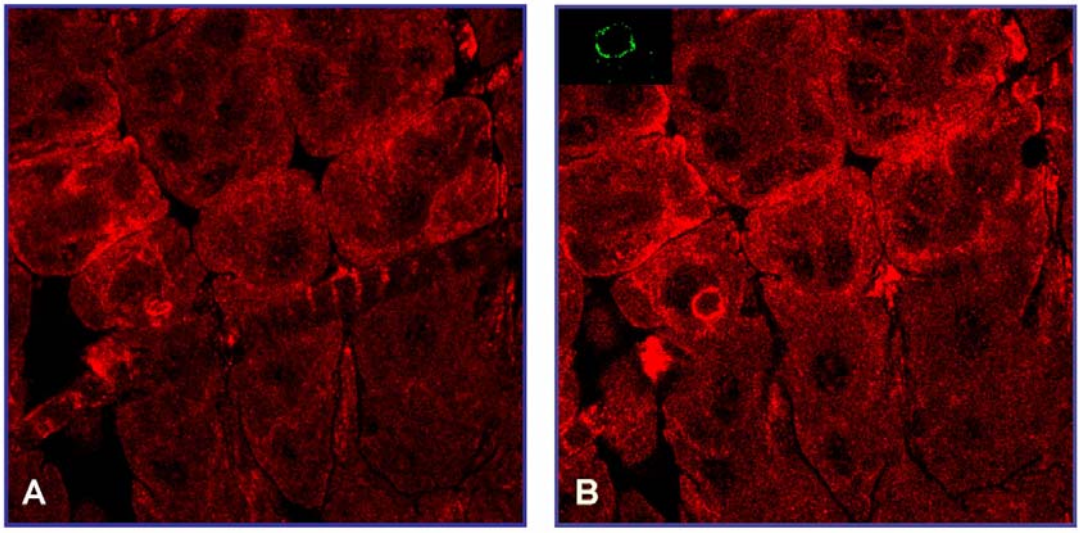
Στο σημείο αυτό θα πρέπει να καταγραφούν οι παρατηρήσεις που έγιναν όσον αφορά τη μορφολογία των κυττάρων που περιβάλλουν το παράσιτο κατά τη διέλευσή του από το επιθηλιακό τοίχωμα του μεσεντέρου. Στα δείγματα των μεσεντέρων που απομονώθηκαν 24ώρες μετά τη λήψη μολυσμένου αίματος, η κατανομή της πρωτεΐνης στα επιθηλιακά κύτταρα είναι τέτοια ώστε αυτά που βρίσκονται στην περιοχή διέλευσης του παρασίτου να είναι εύκολα αναγνωρίσιμα λόγω της ιδιαίτερης μορφολογίας τους. Στο συγκεκριμένο σημείο φαίνεται ο χαρακτηριστικός σχηματισμός ροζέτας, ενώ ταυτόχρονα τα επίπεδα συσσώρευσης της ιντεγκρίνης στις μεμβράνες τους είναι υψηλότερα σε σύγκριση με αυτά που παρατηρούνται στα υπόλοιπα απομεμακρυσμένα κύτταρα. Επίσης, χαρακτηριστική είναι η θέση των πυρήνων της κυτταρικής αυτής ομάδας, καθώς παρουσιάζονται

μετατοπισμένοι καταλαμβάνοντας το τμήμα εκείνο του κυττάρου που βρίσκεται προς την κοιλότητα του μεσεντέρου (Εικ. 14).



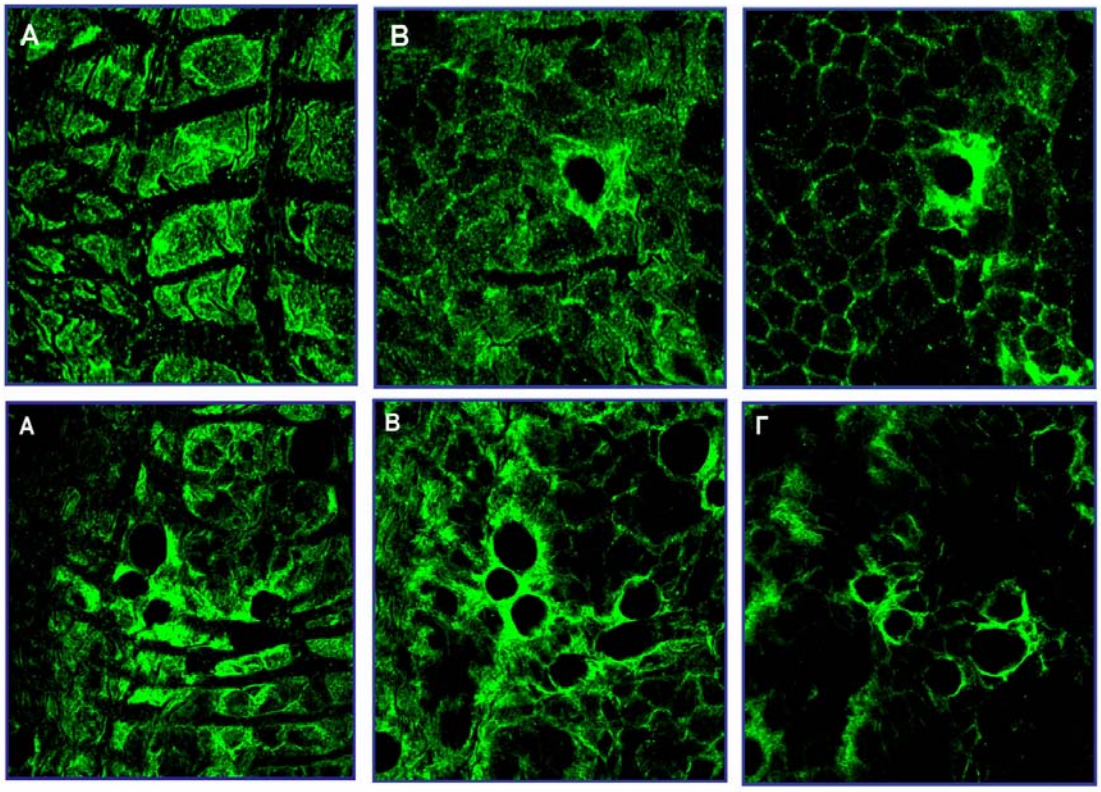
Εικόνα 14. Υποκυτταρικός εντοπισμός της β-ιντεγκρίνης στην περιοχή διέλευσης του ωοκινέτη από το επιθηλιακό τοίχωμα του μεσεντέρου. Α-Μ: σειρά οπτικών τομών από μεσέντερο κουνουπιού 24 ώρες μετά τη χορήγηση μολυσμένου αίματος. **Α:** τομή πλησίον της βασικής επιφανείας των επιθηλιακών κυττάρων. **Μ:** τομή πλησίον της μεσεντερικής κοιλότητας. Παρατηρείται αυξημένη συσσώρευση της πρωτεΐνης στα κύτταρα που περιβάλλουν τον ωοκινέτη συγκριτικά με τα πιο απομεμακρυσμένα, ενώ φέρουν χαρακτηριστικό σχηματισμό ροζέτας. **Κόκκινο:** αντίσωμα έναντι της β-ιντεγκρίνης. **Πράσινο**: αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης P28 του παρασίτου *P.berghei* (ένθετη εικόνα στην τομή Θ).

Στην προσπάθεια πραγματοποίησης μιας ολοκληρωμένης μελέτης της τοπολογικής κατανομής της β-αλυσίδας της ιντεγκρίνης στο μεσεντερικό επιθήλιο κατά τη διάρκεια ανάπτυξης του παρασίτου, ακολουθήθηκε η προαναφερόμενη πειραματική πορεία ανοσοϊστοχημείας σε ιστούς ατόμων που αφαιρέθηκαν από τα άτομα 3, 5, 8, 10 και 15 μέρες μετά τη λήψη μολυσμένου αίματος. Στις 3 μέρες, συνεχίζεται ο ανοσοεντοπισμός της πρωτεΐνης στην επιφάνεια των 'νεαρών' ωοκυστών που έχουν ήδη σχηματισθεί (Εικ. 15).

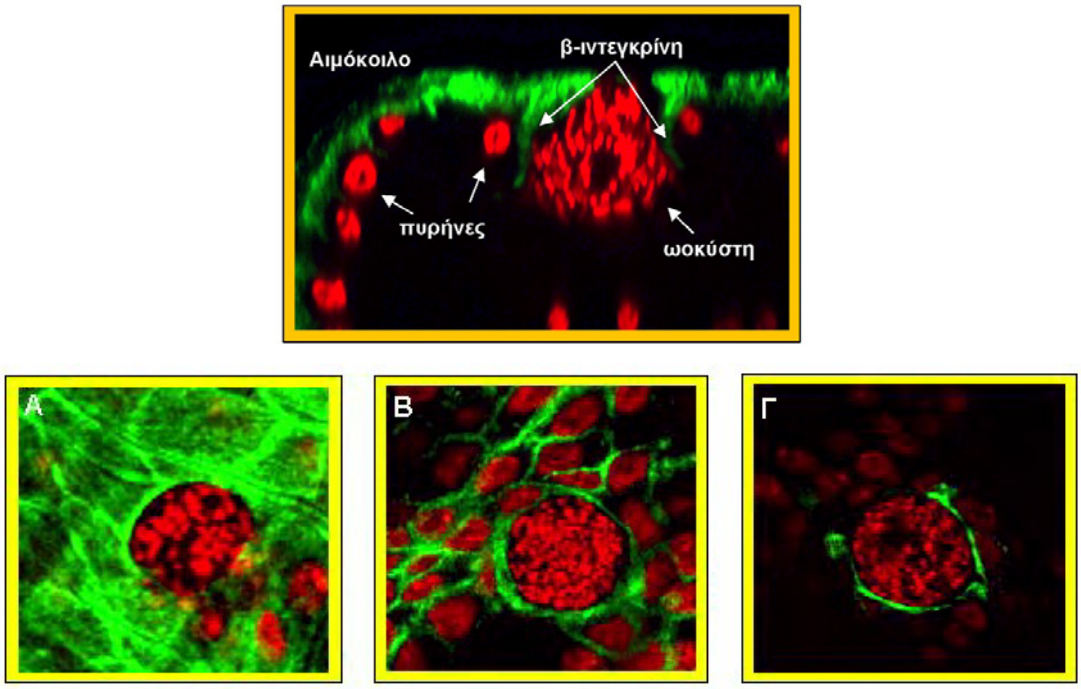


Εικόνα 15. Τοπολογικός εντοπισμός της β-ιντεγκρίνης στο μεσέντερο κουνουπιού τρεις μέρες μετά το γεύμα μολυσμένου αίματος. Α-Β: οπτικές τομές μεσεντέρου από τη βασική πλευρά του επιθηλίου με κατεύθυνση τη μεσεντερική κοιλότητα. Εκτός από τον αναμενόμενο υποκυτταρικό εντοπισμό της πρωτεΐνης συνεχίζεται ο ανοσοεντοπισμός της στην επιφάνεια των νεαρών ωοκυστών (η ωοκύστη εικονίζεται με πράσινο στην ένθετη εικόνα της τομής Β μετά από ταυτόχρονη ανοσοανίχνευση με το αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης P28 του παρασίτου).

Επίσης, μετά την πάροδο 5 και 8 ημερών, όταν ήδη έχει αρχίσει η διαφοροποίηση των σποροζωιτών εντός τους, η ιντεγκρίνη φαίνεται να συσσωρεύεται στις περιοχές γύρω από τις ωοκύστεις, δίνοντας την εικόνα μιας πιο διάχυτης χρώσης στα περιβάλλοντα κύτταρα κατά την παρατήρηση στο μικροσκόπιο (Εικ. 16). Το ίδιο πρότυπο ανοσοανίχνευσης λαμβάνεται έως και 10 μέρες αργότερα (Εικ. 17).

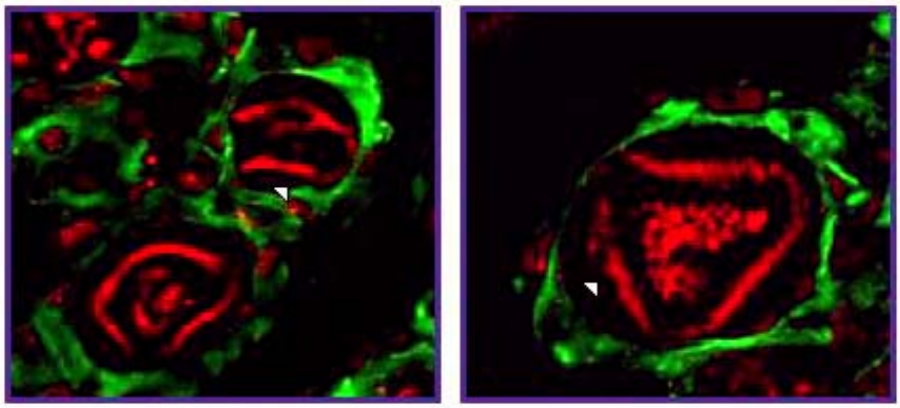


Εικόνα 16. Τοπολογικός εντοπισμός της β-ιντεγκρίνης στο μεσέντερο κουνουπιού πέντε και οκτώ μέρες μετά το γεύμα μολυσμένου αίματος. Α-Γ: οπτικές τομές μεσεντέρου μολυσμένων με ωοκύστεις πέντε (πάνω σειρά) και οκτώ ημερών (κάτω σειρά). Η λήψη των τομών πραγματοποιήθηκε με κατεύθυνση από τη βασική περιοχή του επιθηλίου (Α) προς τη μεσεντερική κοιλότητα (Β). Παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα συσσώρευσης της πρωτεΐνης στα κύτταρα που περιβάλλουν τις ωοκύστεις.



Εικόνα 17. Τοπολογικός εντοπισμός της β-ιντεγκρίνης σε μεσέντερο κουνουπιού δέκα μέρες μετά το γεύμα μολυσμένου αίματος. Πάνω σειρά: εγκάρσια τομή μεσεντέρου. **Κάτω σειρά (Α-Γ):** οπτικές τομές από τη βασική επιθηλιακή περιοχή προς τη μεσεντερική κοιλότητα. Η έκφραση της β-ιντεγκρίνης (πράσινο) στην περιοχή γύρω από την ωοκύστη δεν περιορίζεται στη βασο-πλευρική επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων, αλλά συνεχίζει σε μεγαλύτερη έκταση προς την κοιλότητα του μεσεντέρου. Με κόκκινο εικονίζονται οι πυρήνες των επιθηλιακών κυττάρων και των σποροζωιτών εντός της ωοκύστης.

Στο τελευταίο στάδιο ανάπτυξης που εξετάστηκε, αυτό των 15 ημερών μετά το γεύμα αίματος, όταν έχουν πλέον ωριμάσει και αρχίζει η απελευθέρωση των σποροζωιτών, η κατανομή της β-ιντεγκρίνης παραμένει η ίδια με αυτή που προαναφέρθηκε (Εικ. 18).



Εικόνα 18. Ανοσοανίχνευση της β-ιντεγκρίνης σε μεσέντερο κουνουπιού δεκαπέντε μέρες μετά το γεύμα μολυσμένου αίματος. Οπτικές τομές μεσεντέρου μολυσμένου με ώριμες ωοκύστεις λίγο πριν την απελευθέρωση των σποροζωιτών. Παρατηρείται υψηλή συγκέντρωση της β-ιντεγκρίνης (πράσινο) στην περιοχή γύρω από τις ωοκύστεις. Κόκκινο: πυρήνες των επιθηλιακών κυττάρων και των σποροζωιτών (βέλη).

8. ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΠΙΘΑΝΩΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΤΗΣ Β-ΙΝΤΕ-ΓΚΡΙΝΗΣ ΜΕ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΤΟΥ ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ

Τα δεδομένα που προέκυψαν από τα πειράματα ανοσοεντοπισμού της ιντεγκρίνης αποτέλεσαν το έναυσμα για τη μελέτη, σε μοριακό επίπεδο, πιθανών αλληλεπιδράσεων της πρωτεΐνης με πρωτεΐνες του παρασίτου. Δύο από αυτές είναι οι P25 και P28 που εκφράζονται σε αφθονία στην επιφάνεια των παρασίτων του είδους *Plasmodium* και σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια όπως στους μακρογαμέτες, στο ζυγωτό, στους οοκινέτες και στις ωοκύστεις μέχρι και 17 μέρες μετά το γεύμα αίματος (Simonetti et al,1993). Σύμφωνα με τα υπάρχοντα πειραματικά δεδομένα αποτελούν τους κύριους υποψήφιους δεσμευτές για πιθανούς υποδοχείς στο ξενιστή, τόσο λόγω της παρατεταμένης τους παρουσίας στην επιφάνεια των παρασίτων, όσο κυρίως γιατί είναι ήδη αποδεδειγμένο ότι αντισώματα έναντι του Pbs21 (το ομόλογο του P28 στο *P.berghei)* είναι δυνατό να εμποδίσουν τη μετάδοση του παρασίτου. Μία ακόμη πρωτεΐνη που χρησιμοποιήθηκε για τη διερεύνηση πιθανής αλληλεπίδρασής της με τη β-ιντεγκρίνη είναι η πρωτεΐνη CTRP. Εκφράζεται στο αναπτυξιακό στάδιο του οοκινέτη και φαίνεται ότι παίζει σημαντικό λειτουργικό ρόλο τόσο στην επαφή του, όσο και στην εισχώρησή του στο επιθήλιο. Τέλος,

λαμβάνοντας υπόψην την ύπαρξη ήδη γνωστών πρωτεϊνών που εκφράζονται στο στάδιο των σποροζωιτών και εμπλέκονται στη διαδικασία εισόδου τους στους σιελογόνους αδένες, μελετήθηκαν οι αλλη-λεπιδράσεις τις ιντεγκρίνης με τις πρωτεΐνες TRAP και CS.

Α. Διερεύνηση *in vivo* των πιθανών αλληλεπιδράσεων της β-υπομονάδας της ιντεγκρίνης με πρωτεΐνες του παρασίτου

Η μέθοδος που εφαρμόστηκε για την ανάλυση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτεϊνών που αναφέρθηκαν ήταν η *in vivo* μέθοδος των Δύο Υβριδίων, μία ευρέως εφαρμοζόμενη μέθοδος για την ανίχνευση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων (Fields and Song, 1989). Στο σύστημα αυτό χρησιμοποιήθηκαν πλασμιδιακές κατασκευές που περιλαμβάνουν είτε ολόκληρη την εξωκυττάρια περιοχή της β-ιντεγκρίνης, είτε υποπεριοχές αυτής που φέρουν χαρακτηριστικά μοτίβα, γνωστά για την εμπλοκή τους σε αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών (Πίνακας 1). Συγκεκριμένα, μελετήθηκε τόσο το εξωκυττάριο τμήμα που περιλαμβάνει την περιοχή-Ι της πρωτεΐνης, γνωστή για το ρόλο της στις αλληλεπιδράσεις με διάφορους δεσμευτές, όσο και το τμήμα εκείνο που περιλαμβάνει τις επαναλήψεις τύπου EGF. Οι παραπάνω περιοχές συνεκφράστηκαν με την περιοχή πρόσδεσης στο DNA του μεταγραφικού παράγοντα GAL4 της ζύμης μετά από υποκλωνοποίησή τους στο φορέα pGBT9. Αντίστοιχα, από τις πρωτεΐνες του παρασίτου, ολόκληρο το εξωκυττάριο τμήμα συνεκφράστηκε με την περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης του ιδίου παράγοντα που βρίσκεται στο φορέα pACT2. Εξαίρεση αποτελεί η πρωτεΐνη CTRP, από την οποία χρησιμοποιήθηκε το τμήμα εκείνο που φέρει μόνο τις επαναλήψεις τύπου TSP. Οι αλληλεπιδράσεις της β-υπομονάδας της ιντεγκρίνης με αυτές του παρασίτου μελετήθηκαν τόσο ποιοτικά με την παραγωγή ή μη αποικιών μπλε χρώματος, όσο και ποσοτικά με τις υγρές καλλιέργειες ενεργοποίησης του γονιδίου *LacZ.* Πρέπει να αναφερθεί ότι από τις πλασμιδιακές κατασκευές της ιντεγκρίνης, αυτή που φέρει το τμήμα με τις επαναλήψεις τύπου EGF δεν ήταν εφικτό να μελετηθεί με το σύστημα των Δύο Υβριδίων, καθώς σε πειράματα ελέγχου που πραγματοποιήθηκαν παρουσίασε υψηλά επίπεδα αυτο-ενεργοποίησης.

Πίνακας1. Περιγραφή των πλασμιδιακών κατασκευών που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα διερεύνησης πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων με την εφαρμογή του Συστήματος των Δύο Υβριδίων.

Γονίδιο	Φορέας	Περιοχή	Αμινοξέα	Εκκινητές(5'→ 3')
INTB	pGBT9	εξωκυττάρια	28 -762	**F(EcoRI)** : CCGGAATTCCGG - CTG TCC AAC TAT CAG CTC AC **R(BamHI)** : CGGATCCG - GCA CTC GCG GTT CTC CTG
		(I)	173 - 401	**F(EcoRI)** : CCGGAATTCCGG- GTC GAC CTG TAC TAT CTG ATG **R(BamHI)** : CGGATCCG – GTC GCG CAC CAG CGA CAC
		EGF1-4	509 - 674	**F(EcoRI)** : CCGGAATTCCGG – GCG GAC GAG TGC AGC AAC **R(BamHI)** : CGGATCCG – GCA CTT CTC GCA GTA CCG
Πρωτεΐνες του παρασίτου *Plasmodium berghei*				
P25	pACT2	εξωκυττάρια	20-196	**F(BamHI)** : CGGGATCCCG – TAT AAC GCA GCA ATT TCA CCA **R(XhoI)** : CCTCGAGG – TGA ATG TGA TAT ACA TTT
P28		εξωκυττάρια	20-191	**F(BamHI)** : CGGGATCCCG - AAT AAT GCA AAG ATC ACT GTA **R(XhoI)** : CCTCGAGG – GCT ATT TGA TGG CGT TTC GCT
CTRP		TSP	1384-1812	**F(BamHI)** : CGGGATCCCG – GAA TGG GGA GAA TGG AGT GCA **R(XhoI)** : CCTCGAGG – ACA AGC AGG AAC ATT ACA AGC
CS		εξωκυττάρια	29-305	**F(BamHI)** : CGGGATCCCG – AAA ATC ATC CAA GCC CAA AGG **R(XhoI)** : CCTCGAGG – ATC TTC TAA GGT CAA ATC TTC
TRAP		εξωκυττάρια	26-542	**F(BamHI)** : CGGGATCCG- GAA ATT CTT GAC GAA ATA AAG **R(XhoI)** : CCTCGAGG – ATA TCC GTT ATT AGA TTT AGA

Πίνακας 2. Πειράματα μελέτης των πιθανών αλληλεπιδράσεων υποπεριοχών της β-ιντεγκρίνης του κουνουπιού *An.gambiae* με πρωτεΐνες του παρασίτου *P.berghei*.

	Δολώματα (Baits)	**Θηράματα (Preys)**
Υπό μελέτη πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις	INTB (περιοχή εξωκυττάρια)	P25 P28 CTRP (περιοχή TSP) CS TRAP
	INTB (περιοχή I)	
	INTB (περιοχή EGF1-4)	
Πειράματα ελέγχου	pGBT9 (φορέας χωρίς ένθεμα)	pACT2 (φορέας χωρίς ένθεμα)
	pGBT9 (φορέας χωρίς ένθεμα)	Θηράματα (Preys)
	Δολώματα (Baits)	pACT2 (φορέας χωρίς ένθεμα)
	LamB2 (περιοχή V)	P25

Προκειμένου να ελεγχθεί η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από την εφαρμογή του συστήματος των Δύο Υβριδίων, πραγματοποιήθηκε μία σειρά πειραμάτων αρνητικού ελέγχου, όπως φαίνεται στον παραπάνω πίνακα, στα οποία μελετήθηκαν τα επίπεδα ενεργοποίησης της μεταγραφής όταν συνεκφράζονται είτε οι φορείς (χωρίς ένθεμα) μεταξύ τους, είτε με τα αντίστοιχα θηράματα (preys) ή δολώματα (baits). Πείραμα θετικού ελέγχου αποτέλεσε η γνωστή από τα βιβλιογραφικά δεδομένα ισχυρή αντίδραση αλληλεπίδρασης μεταξύ της λαμινίνης του κουνουπιού και της παρασιτικής πρωτεΐνης P25. Όπως διαπιστώθηκε από τα αποτελέσματα που

προέκυψαν η β-υπομονάδα της ιντεγκρίνης δεν αλληλεπιδρά, τουλάχιστον κατά την εφαρμογή του συστήματος των Δύο Υβριδίων, με καμία από τις πρωτεΐνες του παρασίτου που μελετήθηκαν.

Β. Μελέτη *in vitro* των πιθανών αλληλεπιδράσεων της β-αλυσίδας της ιντεγκρίνης με πρωτεΐνες του παρασίτου *P.berghei*

Η εφαρμογή ενός διαφορετικού συστήματος μελέτης πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων κρίθηκε απαραίτητη για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από την εφαρμογή του 'Συστήματος των Δύο Υβριδίων'. Πραγματοποιήθηκε, λοιπόν, ανάλυση *in vitro* με τη μέθοδο πρόσδεσης φθοριζόντων μικροσφαιριδίων στις υπό μελέτη πρωτεΐνες. Εν συντομία, οι πρωτεΐνες παράγονται σε διαλυτή μορφή σαν χιμαιρικά μόρια με το Fc του IgG, μετά από διαμόλυνση κυτταρικών σειρών COS-7. Μικροσφαιρίδια διαφορετικού φθοριοχρώματος προσδένονται σε κάθε μία από αυτές και στη συνέχεια, οι σημασμένες πλέον πρωτεΐνες αναμειγνύονται, συν-επωάζονται και παρατηρούνται με μικροσκόπιο φθορισμού. Η δημιουργία ή μη συσσωματωμάτων υποδηλώνει την ύπαρξη ή την απουσία αλληλεπίδρασης, αντίστοιχα.

Δημιουργήθηκαν πλασμιδιακές κατασκευές τόσο της ιντεγκρίνης, όσο και των παρασιτικών πρωτεϊνών, στις οποίες οι εξωκυττάριες περιοχές τους υποκλωνοποιήθηκαν στις κατάλληλες θέσεις ένθεσης του φορέα έκφρασης PCDNA3-IG.1 (Πίνακας 3). Ο φορέας αυτός φέρει την περιοχή που κωδικοποιεί το τμήμα Fc του IgG κάνοντας δυνατή την έκφραση και παραγωγή των πρωτεϊνών σε διαλυτή μορφή στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης των κυττάρων Cos-7 μετά τη διαμόλυνσή τους με τις παραπάνω κατασκευές. Στον πίνακα 3 παρουσιάζονται οι περιοχές των πρωτεϊνών και οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση και κλωνοποίησή τους στο φορέα έκφρασης.

Πίνακας 3. Περιγραφή των πλασμιδιακών κατασκευών που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα διερεύνησης *in vitro* των πιθανών αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών της β-ιντεγκρίνης με πρωτεΐνες του παρασίτου.

Γονίδιο	Περιοχή	Αμινοξέα	Εκκινητές (5' → 3')
INTB	εξωκυττάρια	1-722	**F(Hind III)** :CAA GCT TGC GAA AGA TGC TAC CGA GA **R(BamHI)** : CGC GGA TCC GCG GTC GAT CGT CAC CTT CTC
Πρωτεΐνες του παρασίτου *P.berghei*			
P25	εξωκυττάρια	1-196	**F(Hind III)** :CCA AGC TTG GAA TGA ATA CTT ATT ACA GTG **R(Bgl II)** : GGA AGA TCT TCC TGA ATG TGA TAT ACA TTT
P28	εξωκυττάρια	1-192	**F(Hind III)** : CCA AGC TTG GAA TGA ATT TTA AAT ACA GTT **R(Bgl II)** : CAG ATC TGA AAC TGC TAT TTG ATG GC
CTRP	(TSP)	1381-1812	**F(Sma I)** : CCC CGG GGA TGG AAT GGG GAG AAT GGA GT **R(BamHI)** : CGC GGA TCC GCG ACA AGC AGG AAC ATT ACA AG
	(I)	1-706	**F(Sma I)** : CCC CCG GGG GCA AAT GAA CAA AAA ATT TGT GTT **R(BamHI)** :CGC GGA TCC GCG TGG CAA TAT TGA TCC TGT G
CS	εξωκυττάρια	1-307	**F(Hind III)** : CCA AGC TTG GAA TGA AGA AGT GTA CCA TTT **R(Bgl II)** : GAA GAT CTT CTA TCA ATA TCT TCT AAG GTC
TRAP	εξωκυττάρια	1-608	**F(Hind III)** :CCA AGC TTG GAT ATG AAG CTC TTA GGA AAT **R(BamHI)** :CGC GGA TCC GCG TCC AGT CAT TAT CTT CAG G

Μετά τη συλλογή του θρεπτικού μέσου της κυτταρικής καλλιέργειας ακολούθησε ανάλυση τύπου Western ανάλυση προκειμένου να ελεγχθεί η επιτυχής παραγωγή των πρωτεϊνών μετά τη διαμόλυνση των κυττάρων. Ωστόσο, τα αποτελέσματα που προέκυψαν δεν ήταν τα αναμενόμενα, καθώς

από τις υβριδικές κατασκευές που χρησιμοποιήθηκαν μόνο η πρωτεΐνη του κουνουπιού παράγεται και απελευθερώνεται στο θρεπτικό μέσο, χωρίς όμως να ισχύει το ίδιο για αυτές του παρασίτου. Ακόμη και μετά τη συνεχή επανάληψη της πειραματικής διαδικασίας κυτταρικής διαμόλυνσης δεν έγινε εφικτή η αποτελεσματική έκφραση των παρασιτικών πρωτεϊνών, γεγονός που έκανε αδύνατη τη διερεύνηση των πιθανών αλληλεπιδράσεών τους με το *in vitro* σύστημα πρόσδεσης μικροσφαιριδίων. Μία πιθανή εξήγηση αποτελεί το υψηλό ποσοστό βάσεων AT που παρουσιάζει το γονιδίωμα του παρασίτου κάνοντας δύσκολη την πρωτεϊνική έκφραση σε ετερόλογα συστήματα.

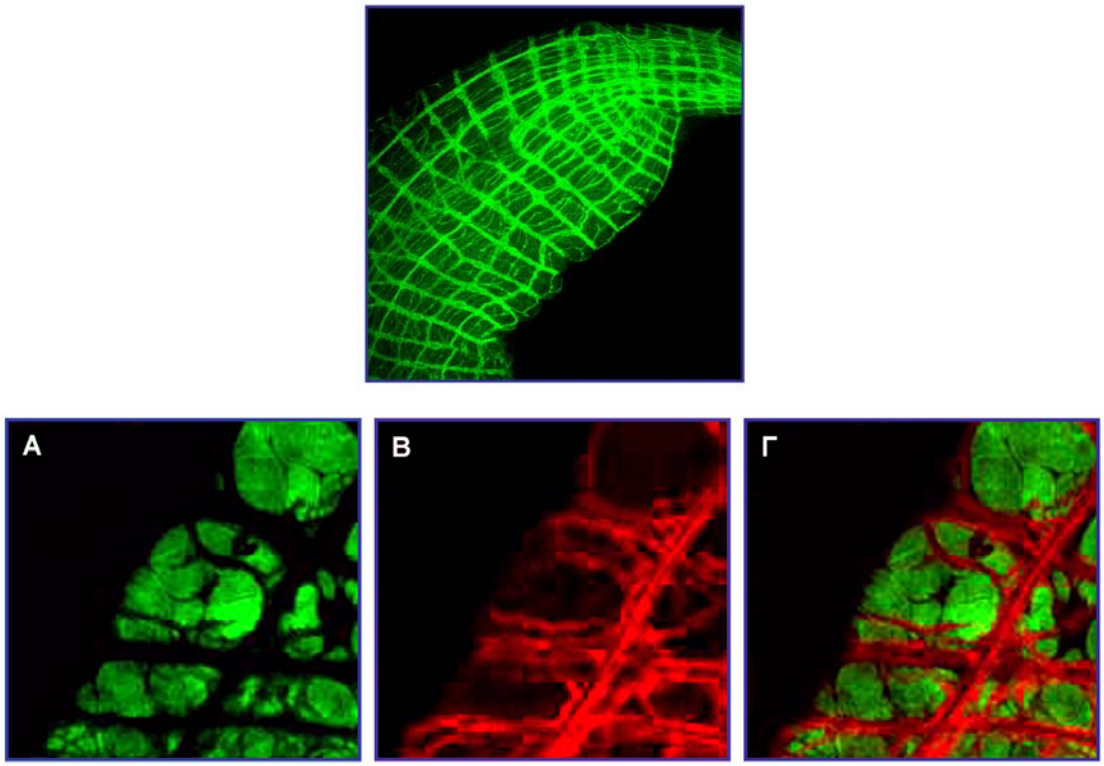
Η αδυναμία έκφρασης των παρασιτικών πρωτεϊνών δεν αποτέλεσε ωστόσο εμπόδιο για την εφαρμογή παραλλαγής της παραπάνω μεθόδου, σύμφωνα με την οποία μελετήθηκε η δυνατότητα δέσμευσης της χιμαιρικής πρωτεΐνης της β-αλύσίδας, στη διαλυτή της μορφή, στην επιφάνεια του οοκινέτη. Το γεγονός αυτό θα αποτελούσε μία πρώτη ένδειξη για την ικανότητα αλληλεπίδρασής της με πρωτεΐνες που εκφράζονται στην επιφάνεια του παρασίτου. Μία τέτοιου είδους προσέγγιση, ωστόσο, δεν θα οδηγούσε στην εξαγωγή περισσότερων πληροφοριών και συμπερασμάτων όσον αφορά τόσο την ταυτότητα όσο και τον αριθμό των πρωτεϊνών που μετέχουν στις διαδικασίες αλληλεπίδρασης. Σύμφωνα, λοιπόν, με την πειραματική αυτή προσέγγιση οι χιμαιρικές διαλυτές πρωτεΐνες διασυνδέονται μετά την προ-σθήκη αντισώματος έναντι της περιοχής Fc (rabbit IgG)τους 37°C για 1 ώρα. Στη συνέχεια το θρεπτικό μέσο με τις διαλυτές προ-συσσωματωμένες χιμαιρικές πρωτεΐνες προστίθεται σε καλλιέργεια οοκινετών και διατηρείται στους 37°C για 1 ώρα προκειμένου να επιτευχθεί η πρόσδεσή τους (εφόσον υπάρχουν αλληλεπιδράσεις) με την επιφάνεια του οοκινέτη. Η παρατήρηση των πιθανών αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών και επιφανείας του οοκινέτη πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας φθορίζον αντίσωμα anti-rabbit IgG. Κατά την εφαρμογή της παραπάνω πειραματικής διαδικασίας έχοντας σαν μόριο μελέτης τη β-αλυσίδα ιντεγκρίνης, δεν παρατηρήθηκε καμία δέσμευσή της στην επιφάνεια των οοκινετών. Η συνεχής επανάληψη της παραπάνω πειραματικής πορείας, εφαρμόζοντας κάθε φορά τροποποιήσεις όσον αφορά το χρόνο συν-επώασης της καλλιέργειας των οοκινετών με την υβριδική πρωτεΐνη, τη χρησιμοποιούμενη συγκέντρωσή της και τον αριθμό

των οοκινετών δεν οδήγησε στην παρατήρηση σύνδεσης της β-υπομονάδας στην επιφάνεια των οοκινετών.

9. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΤΗΣ ΛΑΜΙΝΙΝΗΣ ΣΤΟ ΜΕΣΕΝΤΕΡΟ ΤΟΥ ΚΟΥΝΟΥΠΙΟΥ ΜΕΤΑ ΤΟ ΓΕΥΜΑ ΜΟΛΥΣΜΕΝΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ

Στα πλαίσια της γενικότερης προσπάθειας κατανόησης της αναπτυξιακής πορείας του παρασίτου στο μεσέντερο του ξενιστή και των εμπλεκόμενων σε αυτή παραγόντων, η παρούσα εργασία συνεχίστηκε με τη διερεύνηση του ρόλου που διαδραματίζει η λαμινίνη του κουνουπιού στην παραπάνω διαδικασία ανάπτυξης. Τα ήδη υπάρχοντα πειραματικά δεδομένα που αναφέρονται στη βιβλιογραφία αποτελούν ισχυρές ενδείξεις για την εμπλοκή συστατικών της βασικής μεμβράνης του επιθηλίου, όπως η λαμινίνη και το κολλαγόνο στη διαδικασία ωρίμανσης του παρασίτου από το στάδιο του οοκινέτη σε αυτό της ωοκύστης (Adini et al., 1999, Vlachou et al., 2001).

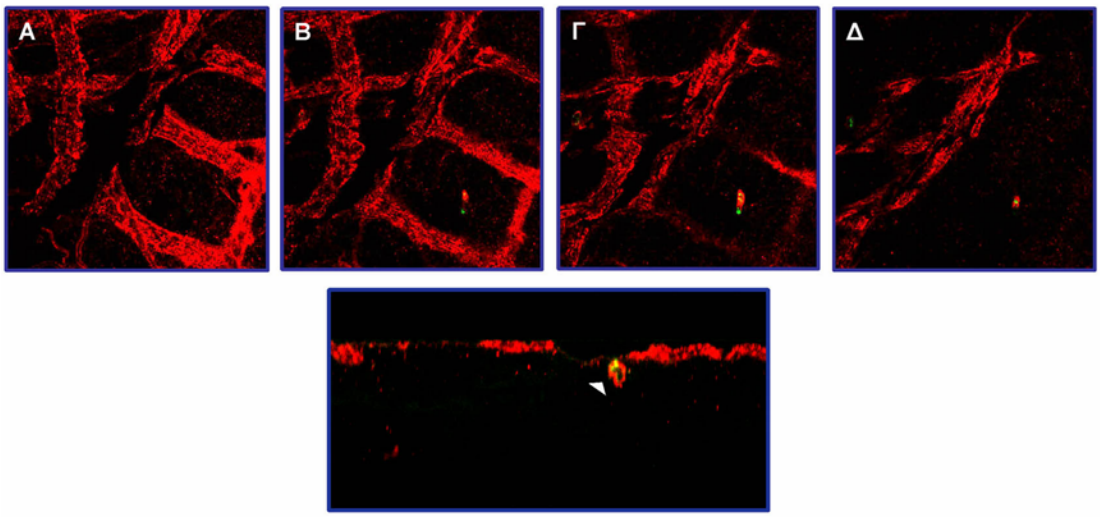
Το πρώτο βήμα ήταν η ανάλυση της τοπολογικής κατανομής της λαμινίνης στο μεσεντερικό επιθήλιο του ξενιστή με την εφαρμογή πειραμάτων ανοσοϊστοχημείας χρησιμοποιώντας εμπορικό αντίσωμα έναντι της λαμινίνης (Abcam). Σύμφωνα με το πρότυπο χρώσης που λαμβάνεται σε διάφορες τομές του μεσεντέρου, η πρωτεΐνη ανιχνεύεται με τη μορφή ενός λεπτού ομοιόμορφου υμένα που καλύπτει το επιθηλιακό τοίχωμα προς την πλευρά της αιμολέμφου και περιβάλλει ταυτόχρονα τους μύες που το συγκρατούν (Εικόνα 19). Η εικόνα αυτή είναι αναμενόμενη καθώς η λαμινίνη αποτελεί ένα από τα κύρια συστατικά της βασικής μεμβράνης του μεσεντέρου, κύριος ρόλος της οποίας είναι η διατήρηση της συνοχής του επιθηλιακού ιστού και ο διαχωρισμός του από την αιμολέμφο.



Εικόνα 19. Εντοπισμός της λαμινίνης στο μεσέντερο του κουνουπιού. Πάνω φωτογραφία: ανίχνευση της λαμινίνης (πράσινο) στο μεσέντερο. Κάτω σειρά: οπτικές τομές μεσεντέρου στο επίπεδο της βασικής περιοχής του επιθηλίου. **Α**: χρώση των επιθηλιακών κυττάρων με αντίσωμα έναντι της β-ιντεγκρίνης (πράσινο). **Β**: χρώση της λαμινίνης του επιθηλίου (κόκκινο). **Γ**: συμπροβολή των Α και Β. Η λαμινίνη παρουσιάζει τη μορφή λεπτού υμένα που καλύπτει την επιθηλιακή κυτταρική στοιβάδα και τους μύες που την περιβάλλουν.

Προκειμένου να μελετηθεί ο εντοπισμός της λαμινίνης παρουσία του παρασίτου, απομονώθηκαν μεσέντερα κουνουπιών που θανατώθηκαν σε διαφορετικές χρονικές στιγμές μετά τη λήψη μολυσμένου αίματος, όπως μία, τρεις, οχτώ και δεκαπέντε μέρες αργότερα. Σε κάθε μία από τις παραπάνω χρονικές περιόδους, το παράσιτο βρίσκεται, όπως ήδη έχει αναφερθεί, σε διαφορετικό αναπτυξιακό στάδιο, εκφράζοντας τις ανάλογες πρωτεΐνες. Για την ανίχνευση των οοκινετών χρησιμοποιήθηκαν μονοκλωνικά αντισώματα έναντι πρωτεϊνών της επιφανείας τους, όπως είναι οι P28, CTRP και SOAP. Ο εντοπισμός της λαμινίνης πραγματοποιήθηκε με ταυτόχρονη χρώση με το κατάλληλο εμπορικό αντίσωμα (Εικ. 20). Με εξαίρεση την πρωτεΐνη P28 που εκφράζεται στην επιφάνεια των οοκινετών, οι άλλες δύο εντοπίζονται και κυτταροπλασματικά. Συγκεκριμένα, ανιχνεύονται στο κορυφαίο άκρο του οοκινέτη, στην περιοχή των μικρονηματίων που αποτελούν τα ειδικά

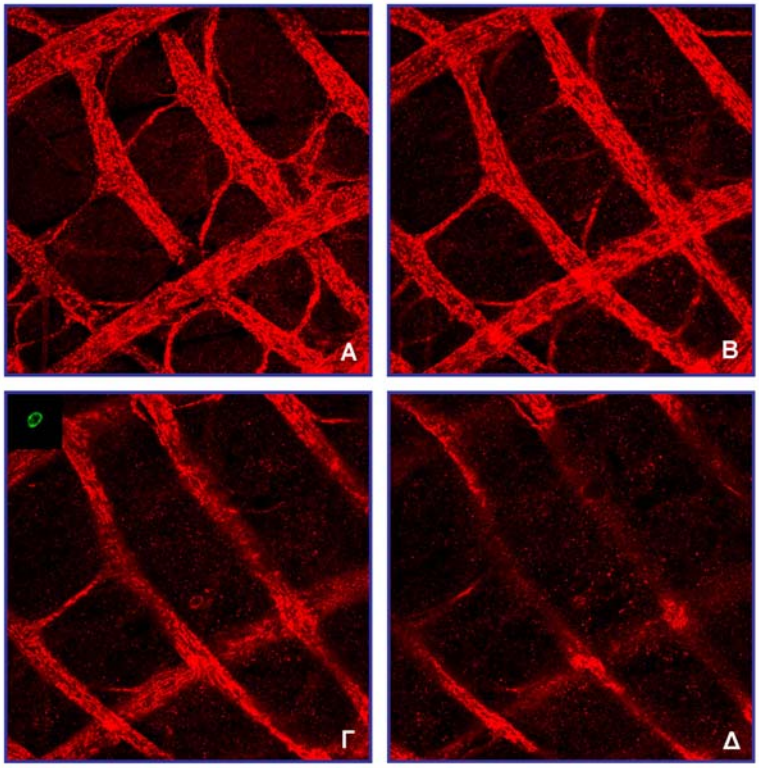
οργανίδια έκκρισης πρωτεϊνών του οοκινέτη. Για τη λαμινίνη παρατηρήθηκε το αναμενόμενο πρότυπο ανίχνευσης, δηλαδή στο εξωκυττάριο υπόστρωμα του επιθηλίου και γύρω από τους μυς του μεσεντέρου. Ωστόσο, μετά από λεπτομερή μελέτη των δειγμάτων, διαπιστώθηκε ότι η λαμινίνη παρουσιάζει επίσης υψηλά επίπεδα συσσώρευσης σε όλο το μήκος της επιφάνειας των οοκινετών. Η μεμβρανική αυτή συσχέτιση της πρωτεΐνης παρατηρείται στα παράσιτα που εντοπίζονται στις πλευρικές περιοχές των επιθηλιακών κυττάρων κατά την πορεία διέλευσής τους από το επιθηλιακό τοίχωμα, καθώς επίσης και σε αυτά που βρίσκονται μεταξύ της βασικής πλευράς του επιθηλιακού τοιχώματος και του εξωκυττάριου υποστρώματος. Ακολούθησε επανάληψη των πειραμάτων και πειράματα ελέγχου προκειμένου να επιβεβαιωθεί η αξιοπιστία των παραπάνω αποτελεσμάτων.



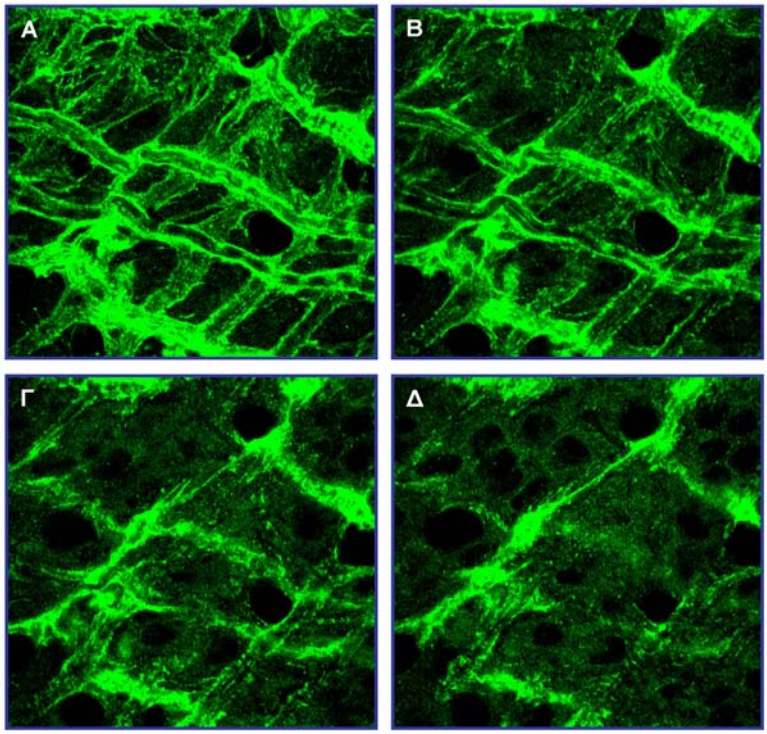
Εικόνα 20. Ανοσοεντοπισμός της λαμινίνης στα επιθηλιακά κύτταρα του μεσεντέρου 24 ώρες μετά το γεύμα μολυσμένου αίματος. Πάνω σειρά (Α-Δ): σειρά οπτικών τομών μεσεντέρου ξεκινώντας από το επίπεδο των μυών και του εξωκυττάριου υποστρώματος. Κάτω σειρά: εγκάρσια τομή μεσεντέρου. Η λαμινίνη (κόκκινο) περιβάλλει τους μυς του εντέρου (εγκάρσιους και επιμήκεις) και το επιθηλιακό τοίχωμα. Ταυτόχρονα εντοπίζεται σε όλο το μήκος της επιφάνειας του οοκινέτη που βρίσκεται προς τη βασική περιοχή του επιθηλίου (βέλος). Πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονη ανοσοανίχνευση του οοκινέτη με αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης Soap του παρασίτου *P.berghei* (πράσινο).

Οι παραπάνω παρατηρήσεις αποτέλεσαν το έναυσμα για τη συνέχιση ανάλογων πειραμάτων ανοσοανίχνευσης της πρωτεΐνης σε ιστούς που απομονώθηκαν τρεις, οκτώ και δεκαπέντε μέρες μετά τη χορήγηση μολυσμένου αίματος στα κουνούπια, προκειμένου να ολοκληρωθεί η μελέτη

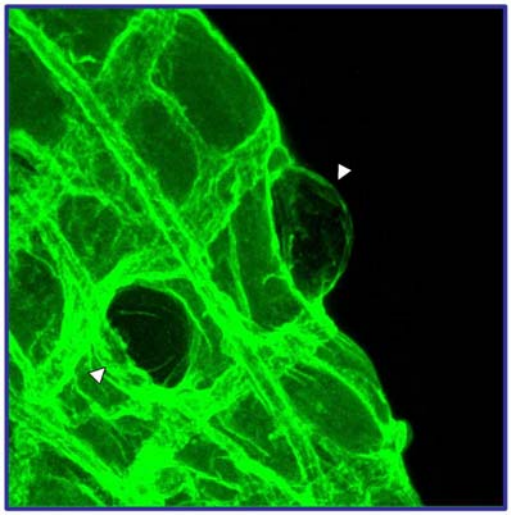
συσχέτισης του τοπολογικού εντοπισμού της λαμινίνης με την πορεία ανάπτυξης του παρασίτου μέσα στον ξενιστή. Στις τρεις μέρες, όταν έχουν σχηματιστεί πλέον οι «νεαρές» ωοκύστεις, ο ανοσοεντοπισμός της λαμινίνης στην επιφάνειά τους παραμένει (Εικ. 21). Ωστόσο, κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης των ωοκυστών (10 ημερών) και μετά το τέλος αυτής (15 ημερών), το πρότυπο ανοσοανίχνευσης της πρωτεΐνης σε σχέση με τις ωοκύστεις φαίνεται να αλλάζει (Εικ. 22) καθώς δεν είναι πλέον δυνατή η ανίχνευση υψηλών επιπέδων συσσώρευσης της πρωτεΐνης στην επιφάνεια των ώριμων ωοκυστών. Στα παραπάνω στάδια, καθώς λόγω του μεγέθους τους προεξέχουν από το επιθηλιακό τοίχωμα προς την πλευρά της αιμολέμφου, η λαμινίνη δίνει την εικόνα ενός λεπτού υμένα που καλύπτει την επιφάνεια της ωοκύστης (Εικ. 23).



Εικόνα 21. Τοπολογική κατανομή της λαμινίνης στο μεσέντερο 3 μέρες μετά το γεύμα μολυσμένου αίματος. Α-Δ: σειρά οπτικών τομών μεσεντέρου ξεκινώντας από το επίπεδο των μυών (Α) προς το επιθηλιακό τοίχωμα του εντέρου.Παρατηρείται το αναμενόμενο πρότυπο έκφρασης της λαμινίνης (κόκκινο), ενώ συνεχίζεται η ανίχνευσή της στην επιφάνεια των νεαρών ωοκυστών (ένθετη εικόνα στην τομή Γ). Για τον εντοπισμό των ωοκυστών χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της επιφανειακής πρωτεΐνης P28 του παρασίτου.



Εικόνα 22. Τοπολογική κατανομή της λαμινίνης δέκα μέρες μετά την είσοδο του παρασίτου στο μεσέντερο του κουνουπιού. Α-Δ: σειρά οπτικών τομών μεσεντέρου μολυσμένου με ωοκύστεις στο στάδιο ωρίμανσης των δέκα ημερών. Οι τομές ξεκινούν από το επίπεδο των μυών (Α) με κατεύθυνση το επιθηλιακό τοίχωμα. Το πρότυπο ανίχνευσης της λαμινίνης (πράσινο) μεταβάλλεται, καθώς η πρωτεΐνη δεν εντοπίζεται πλέον στην επιφάνεια των ώριμων ωοκυστών.



Εικόνα 23. Ανοσοεντοπισμός της λαμινίνης στο μεσέντερο του κουνουπιού δεκαπέντε μέρες μετά την είσοδο του παρασίτου. Οπτική τομή μεσεντέρου στο οποίο οι ωοκύστεις (βέλη) προεξέχουν από το επιθηλιακό τοίχωμα του μεσεντέρου προς την πλευρά της αιμολέμφου. Η λαμινίνη ανιχνεύεται με τη μορφή λεπτού υμένα να καλύπτει την επιφάνεια των ωοκυστών (φωτογραφία του Dr.G.Lycett).

10. *In vivo* ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΠΙΘΑΝΩΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΤΗΣ ΛΑΜΙΝΙΝΗΣ ΤΟΥ ΚΟΥΝΟΥΠΙΟΥ ΜΕ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΤΟΥ ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ

Οι παρατηρήσεις που πραγματοποιήθηκαν από τη μελέτη των δειγμάτων με τη χρήση μικροσκοπίας φθορισμού έθεσαν ερωτηματικά όσον αφορά τη συμμετοχή της λαμινίνης σε αντιδράσεις αλληλεπίδρασης με πρωτεΐνες του παρασίτου. Στη βιβλιογραφία έχουν ήδη αναφερθεί τέτοιου είδους αλληλεπιδράσεις, όπως αυτή της λαμινίνης του κουνουπιού του γένους *An.gambiae* με τις πρωτεΐνες P25 και P28 του παρασίτου *P.berghei* (Vlachou et al., 2001). Προκειμένου να μελετηθούν ενδεχόμενες αλληλεπιδράσεις της με επιπλέον παρασιτικές πρωτεΐνες, όπως είναι οι CTRP, TRAP και CS, τα χαρακτηριστικά των οποίων αναφέρθηκαν σε προηγούμενη ενότητα, ακολουθήθηκε η μέθοδος του Συστήματος των Δύο Υβριδίων. Η πλασμιδιακή κατασκευή που χρησιμοποιήθηκε για την πρωτεΐνη του ξενιστή, αποτελείται από την περιοχή V, το εξωκυττάριο τμήμα της αλυσίδας γ1 που περιλαμβάνει τις 4 επαναλήψεις τύπου EGF, κλωνοποιημένη στο φορέα έκφρασης pGBT9 που φέρει την περιοχή πρόσδεσης στο DNA του μεταγραφικού παράγοντα GAL4 της ζύμης (Πίνακας 4). Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια των παρασιτικών πρωτεϊνών είναι τα ίδια με αυτά που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίστοιχη μελέτη των αλληλεπιδράσεών τους με την ιντεγκρίνη του ξενιστή.

Πίνακας 4. Πλασμιδιακή κατασκευή της λαμινίνης του κουνουπιού *An.gambiae* που χρησιμοποιήθηκε στην μελέτη *in vivo* των πιθανών αλληλεπιδράσεών της με πρωτεΐνες του παρασίτου.

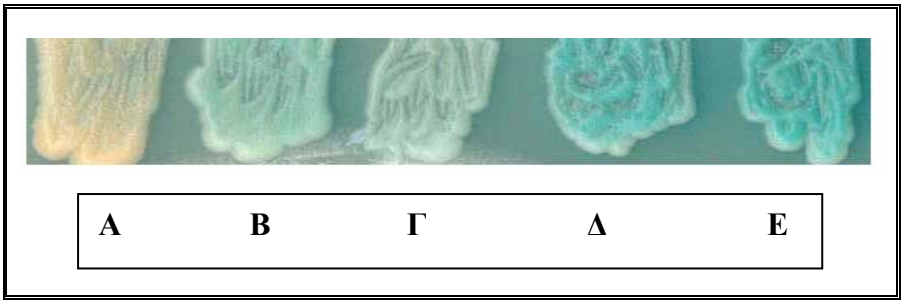
Γονίδιο	Φορέας	Αμινοξέα	Εκκινητές (5'→3')
LamB2 (περιοχή V)	pGBT9	267-505	**F (EcoRI)** : CCGGAATTCCGG - AAG TCG TAC TTC TAC GCG **R (BamHI)** : CGGATCCG – CTC GAG CGT ATG CCC GTA

Πίνακας 5. Πειράματα μελέτης των πιθανών αλληλεπιδράσεων της λαμινίνης του κουνουπιού *An.gambiae* με πρωτεΐνες του παρασίτου *P.berghei* με το Σύστημα των Δύο Υβριδίων.

	Δολώματα (Baits)	**Θηράματα (Preys)**
Υπό μελέτη πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις	BlamV	CTRP(TSP)
		CS
		TRAP
Πειράματα Ελέγχου	pGBT9	pACT2
	pGBT9	Θηράματα (Preys)
	BlamV	pACT2
	BlamV	P25

Οι αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών αναλύθηκαν ποιοτικά με την παρατήρηση ή μη μπλε χρώματος σε πιάτα επιλογής X-gal και ποσοτικά σε υγρές καλλιέργειες *lacZ* (Εικ. 26). Η παρουσία έντονου μπλε χρώματος στα πιάτα επιλογής στην περίπτωση του πρωτεϊνικού συνδυασμού λαμινίνης-CTRP αποτέλεσε ένδειξη της ισχυρής αλληλεπίδρασης της περιοχής V στην υπομονάδα γ1 της λαμινίνης με την περιοχή TSP της πρωτεΐνης CTRP του πλασμωδίου. Η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με μετρήσεις των μονάδων β-γαλακτοσιδάσης στις υγρές καλλιέργειες (Πίνακας 6). Η συνέκφραση της λαμινίνης και του CTRP οδήγησαν σε επίπεδα μεταγραφικής ενεργοποίησης του γονιδίου *lacZ* τα οποία ήταν περίπου 10 φορές υψηλότερα από αυτά που παρατηρήθηκαν σε ένα από τα πειράματα αρνητικού ελέγχου, όπου η λαμινίνη συνεκφράζεται με το φορέα κλωνοποίησης pACT2 (χωρίς το ένθεμα.). Το σημαντικό ωστόσο είναι ότι τα επίπεδα μεταγραφικής ενεργοποίησης είναι σχεδόν τα ίδια με αυτά που παρατηρήθηκαν για την ήδη αποδεδειγμένη ισχυρή αλληλεπίδραση της

λαμινίνης με την πρωτεΐνη P25 του παρασίτου στο θετικό πείραμα ελέγχου. Αντίθετα, δεν υπήρξε καμία ένδειξη μεταγραφικής ενεργοποίησης συγκριτικά με τα πειράματα ελέγχου όταν ελέγχθηκαν οι δύο άλλες παρασιτικές πρωτεΐνες, TRAP και CS. Οι παραπάνω παρατηρήσεις αποτελούν αποδείξεις για την ισχυρή και εξειδικευμένη αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης CTRP του πλασμωδίου με την συγκεκριμένη περιοχή (V) της γ1 αλυσίδας της λαμινίνη



Εικόνα 26. Ποιοτική ανάλυση της αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης Laminin του κουνουπιού *An.gambiae* με την πρωτεΐνη CTRP του παρασίτου *P.berghei*. Η ποιοτική μελέτη των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων με το Σύστημα των Δύο Υβριδίων γίνεται σε πιάτα επιλογής X-gal. Η εμφάνιση μπλε χρώματος υποδηλώνει την αντίδραση αλληλεπίδρασης μεταξύ των υπό μελέτη πρωτεϊνών. Τα γράμματα στην κάτω σειρά αντιστοιχούν στους συνδιασμούς των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων που μελετήθηκαν και παρουσιάζονται αναλυτικά παρακάτω στον Πίνακα 6. **Α-Δ:** πειράματα ελέγχου. **Ε:** αντίδραση αλληλεπίδρασης της λαμινίνης του κουνουπιού με την πρωτεΐνη CTRP του παρασίτου.

Πίνακας 6. Ποσοτική ανάλυση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων με τη μέτρηση μονάδων ενεργότητας β-γαλακτοσιδάσης σε υγρές καλλιέργειες.

	Δόλωμα (Bait)	**Θήραμα (Prey)**	**Μονάδες ενεργότητας β-γαλακτοσιδάσης**
Ε	BlamV (γονίδιο *λαμινίνη γ1)* (περιοχή V)	CTRP (γονίδιο*PbCTRP*) (περιοχή TSP)	191 ± 9.5
Πειράματα ελέγχου			
Α	pGBT9 (φορέας χωρίς ένθεμα)	pACT2 (φορέας χωρίς ένθεμα)	4 ± 2
Β	pGBT9 (φορέας χωρίς ένθεμα)	CTRP (γονίδιο *PbCTRP)* (περιοχή TSP)	34 ± 3.5
Γ	BlamV (γονίδιο *λαμινίνη γ1)* (περιοχή V)	pACT2 (φορέας χωρίς ένθεμα)	20 ± 1.5
Δ	BlamV (γονίδιο *λαμινίνη γ1)* (περιοχή V)	P25 (γονίδιο *Pb25*) (περιοχή εξωκυττάρια)	229 ± 3.5

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ, ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ Β-ΙΝΤΕΓΚΡΙΝΗΣ ΤΟΥ ΚΟΥΝΟΥΠΙΟΥ *An.gambiae*

Το γονίδιο *INTB* του κουνουπιού κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη μεγέθους 837 αμινοξέων, η οποία χαρακτηρίζεται από την ίδια αρχιτεκτονική δομή που παρουσιάζουν και τα υπόλοιπα ταυτοποιημένα ορθόλογα μόρια, αποτελούμενη από μία εκτενή εξωκυττάρια περιοχή, ένα διαμεμβρανικό τμήμα και μία μικρού μεγέθους κυτταροπλασματική περιοχή. Χαρακτηριστικό των β-αλυσίδων της ιντεγκρίνης είναι ο μεγάλος αριθμός κυστεϊνικών καταλοίπων, γεγονός που υποδηλώνει την παρουσία εκτενών δισουλφιδικών δεσμών εντός της αλυσίδας. Χαρακτηριστική επίσης, είναι μία περιοχή πλούσια σε σερίνες, η οποία ωστόσο έχει παρατηρηθεί μόνο στο ορθόλογο μόριο της *Drosophila melanogaster*. Σε σύγκριση με το τελευταίο, η πρωτεΐνη παρουσιάζει 56% αμινοξική ταυτότητα και 70% ομολογία σε όλο το μήκος. Σε αντίστοιχες συγκριτικές μελέτες της αμινοξικής αλληλουχίας της β ιντεγκρίνης με τις ορθόλογες πρωτεΐνες στο κοτόπουλο και στο ποντίκι παρατηρείται ταυτότητα που κυμαίνεται μεταξύ 38-39% σε όλο το μήκος των πολυπεπτιδίων.

Ωστόσο, θα πρέπει να αναφερθεί ότι στο γονιδίωμα του *An.gambiae* έχει εντοπιστεί ένα ακόμα γονίδιο, που κωδικοποιεί μια διαφορετική β-υπομονάδα της ιντεγκρίνης και ονομάζεται *BINT2* (# Q8T5U7, EMBL acc. No. AF492464). Το γονίδιο αυτό που χαρτογραφείται στην περιοχή 4C του χρωμοσώματος X του *An.gambiae* κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη μεγέθους 803 αμινοξέων, η οποία αποτελεί το ορθόλογο μόριο της δροσοφιλικής πρωτείνης β_v (beta –neu) (Yee et al., 1993). Χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα CLUSTAL_X από τη συγκριτική μελέτη μεταξύ των δύο παραπάνω πρωτεϊνών προέκυψε ταυτότητα 39% και ομοιότητα 57%.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η έκφραση του δροσοφιλικού γονιδίου *Dmβv* είναι αυστηρά εξειδικευμένη, τόσο χρονικά, με υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στο εμβρυικό στάδιο, όσο και ιστοειδικά, με εντοπισμό του αποκλειστικά στο μεσέντερο του εντόμου. Προς το παρόν, δεν έχουν πραγματοποιηθεί αντίστοιχες μελέτες για την αναπτυξιακή και ιστοειδική έκφραση του ορθολόγου γονιδίου στο *An.gambiae*, ενώ ιδιαίτερο ενδιαφέρον θα αποτελούσε η συγκριτική μελέτη του λειτουργικού ρόλου που παίζουν οι δύο διαφορετικές β-υπομονάδες της ιντεγκρίνης στις βιολογικές διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα στο μεσέντερο του κουνουπιού.

Χαρακτηριστικό των μελών της οικογένειας των ιντεγκρινών αποτελεί η περιοχή I στο εξωκυττάριο τμήμα του μορίου. Μελετήθηκε αρχικά στις α-αλυσίδες, ανιχνεύθηκε στη συνέχεια και σε αυτές τύπου β με αντίστοιχη λειτουργική δράση. Αποτελείται από περίπου 200 αμινοξέα και εντοπίζεται σε ένα μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών που εμπλέκονται σε αλληλεπιδράσεις τόσο μεταξύ κυττάρων, όσο και μεταξύ κυττάρων με το εξωκυττάριο υπόστρωμα (Michishita *et al*., 1993). Πολλά μέλη της υπερ-οικογένειας αυτής, μέσω της περιοχής I, παίζουν καθοριστικό ρόλο σε βιολογικές διαδικασίες, όπως είναι η μορφογένεση, η κυτταρική μετανάστευση, η ανοσία και η επιδιόρθωση ιστών που έχουν υποστεί ζημιά (wound healing). Έχει εντοπιστεί σε πρωτεΐνες, όπως στα κολλαγόνα VI (Colombatti & Bonaldo, 1991) και XII (Yamagata et al., 1991), στις ουντουλίνες (Just et al., 1991) και στις ιντεγκρίνες (Colombatti & Bonaldo, 1991). Ο ρόλος της συγκεκριμένης περιοχής, όπως αποδεικνύεται από τα πειραματικά δεδομένα, είναι η πρόσδεση του δεσμευτή από τον

υποδοχέα της ιντεγκρίνης (Calderwood et al., 1997, Champe et al., 1995). Η ικανότητα αυτή επιτυγχάνεται μέσω συγκεκριμένης αλληλουχίας αμινοξέων (DXSXS, όπου X αντιπροσωπεύει οποιοδήποτε αμινοξύ), υπεύθυνη για την πρόσδεση δισθενών μεταλλικών ιόντων (Mg^{2+},Mn^{2+}) και γνωστή ως περιοχή MIDAS (Metal Ion-Dependent Adhesion Site) (Lee et al., 1995). Αν και λεπτομέρειες της αλληλεπίδρασης των μεταλλικών ιόντων με την περιοχή I είναι ήδη γνωστές όσον αφορά το δομικό μέρος, ο ακριβής ρόλος τους στη διαδικασία της πρόσδεσης του δεσμευτή από την περιοχή αυτή δεν είναι ακόμα γνωστός. Σύμφωνα με τις ήδη υπάρχουσες μελέτες, η πρόσδεση των ιόντων μετάλλου στο συγκεκριμένο μοτίβο είναι απαραίτητη όχι μόνο για τη σταθεροποίησή του, αλλά και για τη σταθεροποίηση της δευτεροταγούς και τριτοταγούς δομής ολόκληρης της περιοχής I (Gotwals et al., 1999).

Μετά την ολοκλήρωση των παραπάνω συγκριτικών μελετών, το υψηλό ποσοστό συντήρησης που παρατηρείται όσον αφορά τη δομή των επιμέρους περιοχών της β-αλυσίδας των ιντεγκρινών, ίσως να αποτελεί μία σοβαρή ένδειξη ότι οι περισσότερες, αν όχι όλες, από τις λειτουργίες που μέχρι τώρα είναι γνωστό ότι παίζει αυτή η οικογένεια πρωτεϊνών στη *Drosophila* και σε άλλους οργανισμούς, να διατηρούνται και στο κουνούπι. Είναι γνωστό για παράδειγμα, ότι και τα δύο δροσοφιλικά μόρια της οικογένειας των ιντεγκρινών, PS1 και PS2, αποτελούν υποδοχείς της λαμινίνης (Gotwals et al, 1994). Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με το ότι η λαμινίνη του κουνουπιού αλληλεπιδρά με τις επιφανειακές πρωτεΐνες του παρασίτου P25 και P28, παίζοντας πιθανόν κάποιο ρόλο στη διαδικασία διαφοροποίησής του κατά την παραμονή του στο μεσέντερο (Vlachou et al., 2001), ίσως να αποτελεί μία πρώτη ένδειξη για μία έμμεση εμπλοκή της ιντεγκρίνης στην παραπάνω διαδικασία. Η απόδειξη βέβαια για έναν τέτοιο λειτουργικό ρόλο απαιτεί περαιτέρω πειραματική διερεύνηση πιθανών αλληλεπιδράσεων της ιντεγκρίνης στο κουνούπι με συστατικά της βασικής λεπίδας του επιθηλίου, όπως έχει ήδη περιγραφεί τόσο για το ποντίκι (Aumailley et al., 2000), όσο και για τη *Drosophila* (Bunch et al.,1998).

Από τα πειράματα ανίχνευσης της έκφρασης του γονιδίου *INTB* κατά τη διάρκεια ανάπτυξης του κουνουπιού διαπιστώθηκε ότι το γονίδιο είναι μεταγραφικά ενεργό από τα αρχικά στάδια της ανάπτυξής του, με το υψηλό-

τερο ποσοστό ενεργοποίησης να παρατηρείται σε αυτό του εμβρύου. Η αυξημένη μεταγραφική ενεργότητα του γονιδίου υποδηλώνει ενδεχομένως ένα σημαντικό ρόλο στις αναπτυξιακές διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα κατά την εμβρυογένεση, αντίστοιχες με αυτές στις οποίες συμμετέχει το ορθόλογο μόριο βPS στη *Drosophila*. Συγκεκριμένα, αναλύσεις μεταλλαγών στο γονίδιο *myospheroid* που κωδικοποιεί την βPS υπομονάδα έχουν δείξει ότι εμπλέκεται σε δύο βασικές εμβρυϊκές διαδικασίες μορφογένεσης. Η μία από αυτές είναι ο σχηματισμός του μεσεντέρου, με το να είναι υπέυθυνη για τη σωστή σύνδεση των δύο κυτταρικών στοιβάδων από τις οποίες αποτελείται, του σπλαχνικού μεσοδέρματος και του μεσεντερικού ενδοδέρματος (Martin-Bermudo et al., 1999). Η δεύτερη αποτελεί τη διαμόρφωση του μυϊκού συστήματος με τη συμμετοχή της στην επαφή των μυών τόσο μεταξύ τους, όσο και με την επιδερμίδα (Brown et al., 1993). Εξίσου υψηλή συγκέντρωση μεταγράφων του γονιδίου *BINT* παρατηρείται και στο αναπτυξιακό στάδιο της νύμφης, υποδηλώνοντας πιθανόν τη *de novo* σύνθεση των περισσοτέρων από τους ιστούς.

Στα πλαίσια της μελέτης του προτύπου έκφρασης της ιντεγκρίνης στο μεσέντερο του κουνουπιού διερευνήθηκαν οι πιθανές μεταβολές των επίπεδων έκφρασής της κατά τη διαδικασία της πέψης μετά τη λήψη αίματος. Όπως ήδη αναφέρθηκε στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων, τα επίπεδα μεταγραφικής ενεργοποίησης δεν παρουσίασαν δραματικές αλλαγές στις διαφορετικές χρονικές στιγμές που μελετήθηκαν, με μόνη εξαίρεση αυτή των 48 ωρών μετά τη λήψη αίματος, όπου παρατηρήθηκε τρεις φορές μεγαλύτερη συγκέντρωση μεταγράφων. Είναι πολύ πιθανόν η παρατήρηση αυτή να υποδηλώνει την εμπλοκή της πρωτεΐνης στη διαδικασία της πέψης, γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα πειραμάτων που δημοσιεύτηκαν από τους Martin-Bermudo & Brown (1999). Συγκεκριμένα, η ομάδα αυτή παρατήρησε ότι σε διαγονιδιακά έμβρυα της μύγας *D.melanogaster,* η βPS υπομονάδα της ιντεγκρίνης είναι υπεύθυνη για την επαγωγή ενός γονιδίου αναφοράς που βρίσκεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου της θρυψίνης *Antryp1* (Skavdis et al., 1996). Το γονίδιο αυτό ανήκει στην ευρύτερη οικογένεια των θρυψινών του κουνουπιού *An.gambiae* (Muller et al., 1993) και όπως έχει αποδειχθεί, η έκφρασή του

επάγεται από τη λήψη αίματος, ενώ η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην αποικοδόμηση των πρωτεϊνών κατά τη διαδικασία της πέψης. Είναι λοιπόν πολύ πιθανόν οι ιντεγκρίνες κατά τη διάρκεια της αιματοφαγίας να λειτουργούν σαν φορείς σηματοδότησης με τελικό αποτέλεσμα την έκφραση γονιδίων και την παραγωγή πεπτικών ενζύμων, όπως αυτό που ήδη αναφέρθηκε.

Επίσης, το γεγονός της ιδιαίτερα αυξημένης συγκέντρωσης μεταγράφων στις 48 ώρες μετά τη λήψη αίματος θα μπορούσε να αντανακλά την ανάγκη που έχει ο ιστός για την παραγωγή της συγκεκριμένης πρωτεΐνης τη δεδομένη χρονική στιγμή. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφερθεί ότι το γεύμα αίματος στο κουνούπι προκαλεί εκτεταμένες δομικές μεταβολές στο επιθήλιο του μεσεντέρου, καθώς στον ελάχιστο χρόνο μερικών λεπτών θα πρέπει να δεχθεί ένα μεγάλο όγκο αίματος και στη συνέχεια, μετά τη διαδικασία της πέψης να επανέλθει στο φυσιολογικό του μέγεθος. Κατά τη διάρκεια λοιπόν αυτής της δομικής αναδιοργάνωσης του μεσεντέρου είναι πολύ πιθανόν να απαιτείται η αυξημένη παραγωγή ιντεγκρινών προκειμένου να ενδυναμωθεί η συνάφεια τόσο των επιθηλιακών κυττάρων μεταξύ τους όσο και με το εξωκυττάριο υπόστρωμα διασφαλίζοντας με αυτόν τον τρόπο ανέπαφη την ακεραιότητα του ιστού.

Το επόμενο ερώτημα που τέθηκε στην παρούσα εργασία ήταν κατά πόσο η έκφραση της β-υπομονάδας επηρεάζεται με το γεύμα αίματος, όχι μόνο σε επίπεδο μεταγράφων αλλά και σε επίπεδο υποκυτταρικής κατανομής εφαρμόζοντας μεθόδους ανοσοϊστοχημείας. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των πειραμάτων, διαπιστώθηκε μία τοπολογική ανακατανομή της πρωτεΐνης από την περιοχή της μεμβράνης των επιθηλιακών κυττάρων προς το κυτταρόπλασμα. Αυτό που αξίζει να σημειωθεί είναι η παρατηρούμενη εκτεταμένη ενδοκυτταρική συσσώρευση της πρωτεΐνης 24 ώρες μετά την είσοδο του αίματος στο μεσέντερο του κουνουπιού. Είναι πολύ πιθανόν το γεγονός αυτό να σηματοδοτεί την έναρξη του μηχανισμού ενδοκύττωσης των ιντεγκρινών από τις περιοχές των κυτταρικών συνδέσεων, όπου φυσιολογικά βρίσκονται, προς το εσωτερικό του κυττάρου. Η διαδικασία αυτή έχει ήδη περιγραφεί αρκετά χρόνια νωρίτερα για ένα μεγάλο αριθμό ιντεγκρινών

(Bretscher et al., 1989, , Poumay et al., 1993, Gaietta et al., 1994) και έχει α-πο-δειχθεί ότι συνδέεται με διάφορα φαινόμενα, όπως κυτταρική μετανάστευση (Poumay et al., 1993) και αναδιοργάνωση των συστατικών του εξω-κυττάριου υποστρώματος (Grinnel et al., 1980, Mueller and Chen, 1991). Οι ανοσοϊστοχημικές παρατηρήσεις ενδυναμώνουν την πιθανή εξήγηση του μηχανισμού ενδοκύττωσης των ιντεγκρινών καθώς το πρότυπο υποκυτταρικής κατανομής της πρωτεΐνης που ανιχνεύεται στο μεγαλύτερο αριθμό επιθηλιακών κυττάρων έχει τη μορφή κυστιδίων εντοπισμένων κοντά στην πλασματική μεμβράνη. Εξάλλου η παρουσία ιντεγκρινών στα ενδοκυτταροπλασματικά κυστίδια έχει ήδη αναφερθεί από τους Poumay et al. (1993), οι οποίοι με τη χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας παρατήρησαν την ύπαρξη ιντεγκρινών τύπου α6β4 στα παραπάνω οργανίδια μαζί με συστατικά των ημιδεσμοσωμάτων.

Προκειμένου όμως να επιβεβαιωθεί μία τέτοια υπόθεση απαιτείται εκτενέστερη μελέτη χρησιμοποιώντας πειραματικές τεχνικές εξειδικευμένες για το μηχανισμό της ενδοκύττωσης. Η βασική αρχή των μεθόδων αυτών είναι η παρακολούθηση της διαδικασίας εισόδου εξωγενών συστατικών σε ζωντανά κύτταρα μέσω των μονοπατιών ενδοκύττωσης χρησιμοποιώντας σαν δείκτες (markers) πολυσακχαρίτες, όπως είναι οι φθορίζουσες δεξτράνες. Η εφαρμογή, ωστόσο, της μεθόδου σε ολόκληρα μεσέντερα κουνουπιών δεν βοήθησε ιδιαίτερα στην εξαγωγή συμπερασμάτων, καθώς οι εικόνες που ελήφθησαν δεν είχαν την απαραίτητη ευκρίνεια που απαιτείται για να οδηγηθούμε σε αξιόπιστα συμπεράσματα σχετικά με το αν η β-υπομονάδα υπόκειται ενδοκύττωση 24 ώρες μετά τη λήψη αίματος. Το γεγονός αυτό είναι πιθανόν να οφείλεται στην παρουσία δεικτών στο εσωτερικό των κυττάρων του μεσεντερικού τοιχώματος.

Συμπερασματικά, θα μπορούσαμε να πούμε ότι το γεγονός ότι η β-ιντεγκρίνη του κουνουπιού παρουσιάζει μεγάλο ποσοστό συντήρησης μεταξύ διαφορετικών οργανισμών αυξάνει την πιθανότητα οι περισσότεροι από τους λειτουργικούς ρόλους στη διαδικασία ανάπτυξης του οργανισμού που έχουν περιγραφεί για αυτή την οικογένεια πρωτεϊνών να διατηρούνται και στο

κουνούπι. Για να αποδειχθεί όμως κάτι τέτοιο απαιτείται η εφαρμογή εκτενέστερων γενετικών και βιοχημικών μελετών στο συγκεκριμένο οργανισμό.

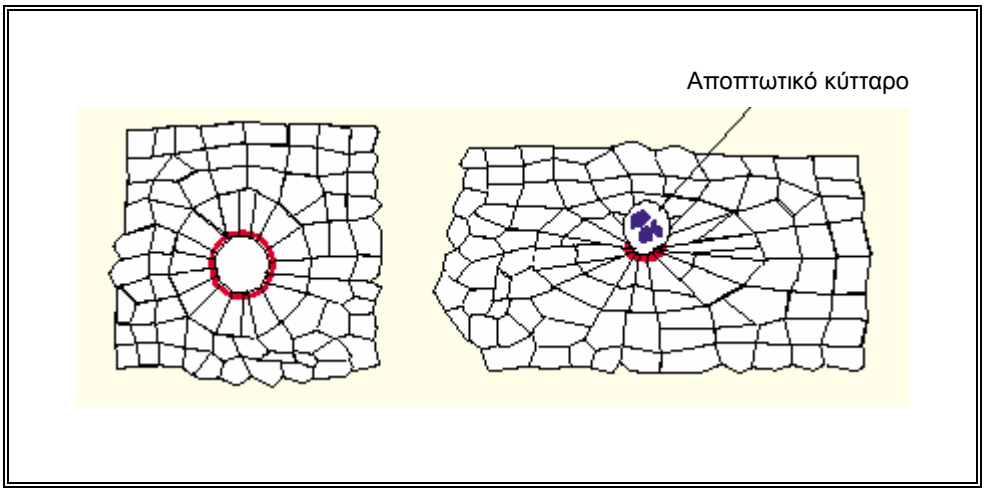
Προκειμένου να διερευνηθεί το πρότυπο έκφρασης της β-ιντεγκρίνης στο μεσέντερο μετά το γεύμα αίματος από το κουνούπι και ο ρόλος που παίζει στην αναπτυξιακή πορεία του παρασίτου μετά την είσοδό του στο ξενιστή, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοϊστοχημείας σε ιστούς που απομονώθηκαν σε διαφορετικές χρονικές στιγμές μετά το γεύμα. Σύμφωνα με μικροσκοπικές μελέτες των δειγμάτων που ακολούθησαν, 24 ώρες μετά την είσοδο του παρασίτου, ενώ η τοπολογική κατανομή της πρωτεΐνης στα επιθηλιακά κύτταρα παρέμενε η ίδια, ιδιαίτερης σημασίας ήταν η παρατήρηση του ταυτόχρονου εντοπισμού της πρωτεΐνης στην επιφάνεια ενός μεγάλου αριθμού ookινετών που βρίσκονται είτε μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων, είτε μεταξύ αυτών και του εξωκυττάριου υποστρώματος του επιθηλίου.

Όλα τα παραπάνω δεδόμενα είναι πιθανόν να υποδηλώνουν, έμμεσα βέβαια, την ενεργή συμμετοχή της πρωτεΐνης β-ιντεγκρίνης στη διαδικασία ανάπτυξης των παρασίτων του γένους *Plasmodium.* Το συμπέρασμα αυτό ενισχύεται από την υπάρχουσα βιβλιογραφία, σύμφωνα με την οποία ο λειτουργικός ρόλος της ιντεγκρίνης στην είσοδο άλλων παρασίτων σε κύτταρα θηλαστικών έχει ήδη αποδειχθεί πειραματικά. Ενδεικτικά αναφέρουμε την περίπτωση του παρασίτου *Trypanosoma cruzi* (Brittingham et al., 1999), όπως και του παρασίτου του γένους *Leishmania* (Fernandez et al., 1993), η είσοδος των οποίων εντός των ανθρώπινων μακροφάγων κυττάρων επιτυγχάνεται μέσω των συγκεκριμένων υποδοχέων. Γενικότερα, αξίζει να σημειωθεί ότι τα μέλη της οικογένειας αυτής που φέρουν την β1-υπομονάδα αποτελούν βασικούς υποδοχείς εισόδου σε θηλαστικά κύτταρα μιας ευρείας κατηγορίας παθογόνων βακτηρίων, όπως για παράδειγμα των εντερικών παθογόνων βακτηρίων του γένους *Yersinia* (Saltman et al., 1996). Στα πλαίσια της διερεύνησης του πιθανού ρόλου που διαδραματίζουν οι ιντεγκρίνες στη μετάδοση του παρασίτου μέσω του ξενιστή τους , θα πρέπει να αναφερθεί η μελέτη των Matuschewski et al. (2002) που αποδεικνύει ότι στη διαδικασία εισόδου των παρασίτων του γένους *Plasmodium* σε κύτταρα τόσο ανθρώπου, όσο και εντόμου εμπλέκεται η περιοχή-Α τύπου ιντεγκρίνης (integrin-like A-

domain) της παρασιτικής πρωτεΐνης TRAP (Robson et al., 1988, Wengelnik et al., 1999). Επίσης, όπως ήδη έχει αναφερθεί η επιφανειακή πρωτεΐνη CTRP του οοκινέτη περιλαμβάνει όλες τις περιοχές σύνδεσης της πρωτεΐνης TRAP μέσω των οποίων πραγματοποιείται η εισβολή του οοκινέτη στο μεσεντερικό επιθήλιο (Yuda et al.,1999, Dessens et al.,1999). Ωστόσο, καθώς η ιντεγκρίνη δεν εντοπίζεται στην κορυφαία πλευρά των επιθηλιακών κυττάρων, προς το μέρος δηλαδή της μεσεντερικής κοιλότητας, αποκλείεται η εκδοχή η πρωτεΐνη να δρα ως υποδοχέας μέσω του οποίου επιτυγχάνεται η αρχική είσοδος του παρασίτου στο επιθηλιακό τοίχωμα. Οι παρατηρήσεις μας επίσης από τα πειράματα ανοσοϊστοχημείας μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το πιθανότερο είναι η ιντεγκρίνη να εμπλέκεται στη διαδικασία διαπέρασης του επιθηλιακού τοιχώματος από το παράσιτο αφού έχουν ήδη ολοκληρωθεί τα αρχικά γεγονότα επαφής του οοκινέτη με τα επιθηλιακά κύτταρα. Η κάλυψη της επιφάνειας του οοκινέτη με ιντεγκρίνη είναι δυνατό να προκύπτει από την επαφή του με τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη όταν έχει ήδη εισέλθει στο εσωτερικό του κυττάρου ή ακόμα, όταν περίσσεια ενδοκυτταρική πρωτεΐνη έχει απελευθερωθεί μετά τον κυτταρικό θάνατο που προκαλεί η είσοδος του παρασίτου σε αυτό. Οι ήδη γνωστές αλληλεπιδράσεις της ιντεγκρίνης με τη λαμινίνη (Sonnenberg, 1993) σε συνδυασμό με το ότι ο οοκινέτης περιβάλλεται με λαμινίνη αμέσως μετά την είσοδό του στο επιθήλιο, μία πρωτεΐνη που έχει αποδειχθεί ότι αλληλεπιδρά με τις επιφανειακές παρασιτικές πρωτεΐνες (P25, P28, CTRP), μας επιτρέπει να κάνουμε την υπόθεση ότι η λαμινίνη πιθανόν δρα σαν ένας ενδιάμεσος παράγοντας ικανός να φέρει σε άμεση επαφή το παράσιτο με την ιντεγκρίνη ή το αντίστροφο.

Παρόλο που τα δεδομένα που προέκυψαν από τα ανοσοϊστοχημικά πειράματα είναι προς το παρόν περιορισμένα, ωστόσο αποτελούν ενδείξεις ικανές να μας οδηγήσουν στην υπόθεση ότι ο εντοπισμός της β-ιντεγκρίνης στην επιφάνεια των οοκινετών και γενικότερα ο ρόλος της στη διαδικασία εισβολής του παρασίτου στο επιθήλιο ίσως σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό τόσο με την διαδικασία επιδιόρθωσης των κακώσεων που παθαίνει το επιθήλιο κατά τη διέλευση του παρασίτου (wound healing), όσο και με την ανασυγκρότηση του εξωκυττάριου υποστρώματος του επιθηλίου (ECM reorganization). Σύμφωνα με τα πειραματικά δεδομένα, η εισβολή του

οοκινέτη στο επιθήλιο είναι δυνατό να προκαλέσει δραματικές αλλαγές στη μορφολογία ενός ή και περισσοτέρων κυττάρων και να τα οδηγήσει κατ'επέκταση σε άμεσο θάνατο (Zieler et al., 2000). Η απάντηση του ιστού σε αυτήν την εκτεταμένη καταστροφή είναι ένας μηχανισμός επιδιόρθωσης που ξεκινάει με την ανακατανομή της ακτίνης από την κορυφαία πλευρά του μολυσμένου επιθηλιακού κυττάρου προς την βασική και το σχηματισμό ενός δακτυλίου ακτίνης στη συγκεκριμένη περιοχή. Καθώς ο δακτύλιος συστέλλεται τα νεκρά κύτταρα αποβάλλονται από το επιθήλιο προς την κοιλότητα του μεσεντέρου, ενώ ταυτόχρονα τα περιβάλλοντα επιμηκύνονται ώστε να αυξήσουν την επιφάνειά τους και να καλύψουν το κενό που δημιουργείται μετά την αποβολή των κατεστραμμένων (Han at al., 2000). Ο μηχανισμός επιδιόρθωσης είναι άμεσος και αποτελεσματικός καθώς 48 ώρες μετά το γεύμα αίματος από τον ξενιστή το επιθήλιο έχει ήδη επανέλθει στην αρχική του μορφή. Παρόμοιοι μηχανισμοί έχουν περιγραφεί στα θηλαστικά, όπως κατά τη διάρκεια επιδιόρθωσης ανθρώπινου βλεννογόνου ιστού (Basson et al., 2001), επιδερμικού ιστού (Noszczyk et al., 2002). Στο σημείο αυτό αξίζει να υπενθυμίσουμε τη χαρακτηριστική μορφολογία και διάταξη που παρουσιάζει η ομάδα των κυττάρων που βρίσκεται σε άμεση γειτνίαση με τον οοκινέτη. Φέρουν τον ιδιαίτερο σχηματισμό ροζέττας, με την κυτταροπλασματική τους επιφάνεια ελαφρώς επιμηκυσμένη και τους πυρήνες μετατοπισμένους προς την πλευρά της κοιλότητας του μεσεντέρου. Χαρακτηριστικός επίσης είναι και ο ανοσοεντοπισμός της β-ιντεγκρίνης, καθώς τα επίπεδα συσσώρευσής της στις μεμβράνες της παραπάνω κυτταρικής ομάδας είναι ιδιαίτερα αυξημένα σε σύγκριση με αυτά που παρατηρούνται στις αντίστοιχες περιοχές των πιο απομεμακρυσμένων, από τον οοκινέτη, κυττάρων. Πρέπει να αναφερθεί ότι ενώ δεν μελετήθηκε εκτενέστερα η πιθανή συσχέτιση του παραπάνω προτύπου κυτταρικής διάταξης με επιδιορθωτικούς μηχανισμούς του επιθηλίου, ωστόσο είναι εμφανείς οι ομοιότητες του μοντέλου που προτείνεται από τον Bement WM., (2002) σχετικά με τη μορφολογία που αποκτούν τα περιβάλλοντα κύτταρα ενός αποπτωτικού κυττάρου κατά την αποβολή του από το επιθήλιο και της δομής των κυττάρων του μεσεντέρου που ανιχνεύθηκε στα δικά μας δείγματα (Εικ.).



Εικόνα. Σχηματικό διάγραμμα της διαδικασίας επιδιόρθωσης του επιθηλιακού ιστού (αριστερά) και της αποβολής ενός αποπτωτικού κυττάρου (δεξιά). Με κόκκινο εικονίζονται οι δακτύλιοι ακτίνης και με μπλε το DNA.

Αξίζει να επισημανθεί ότι η αναδιάταξη των συστατικών του εξωκυττάριου υποστρώματος του ιστού, συμπεριλαμβανομένου και των δεσμών σύνδεσης τόσο μεταξύ των κυττάρων μεταξύ τους όσο και μεταξύ αυτών και του υποστρώματος, αποτελούν χαρακτηριστικές διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια των μηχανισμών επιδιόρθωσης των κακώσεων του επιθηλιακού ιστού στα θηλαστικά. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα πειραματικά δεδομένα σύμφωνα με τα οποία, κατά τη διάρκεια των παραπάνω μηχανισμών παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα έκφρασης της β1 υπομονάδας των ιντεγκρινών και άλλων αλυσίδων που εμπλέκονται στην ανακατανομή των συστατικών του εξωκυττάριου υποστρώματος στην περιοχή των επιθηλιακών κακώσεων (Noszczyk et al., 2002, Sheetz et al., 1998). Στα θηλαστικά η ανακατανομή αυτή επιτελείται μέσω πρωτεασών ικανών να κόβουν σε συγκεκριμένες θέσεις τόσο υποδοχείς κυτταρικής συνάφειας απελευθερώνοντας τους από την πλασματική μεμβράνη, όσο και συστατικά του εξωκυττάριου υποστρώματος. Μία τέτοια κατηγορία πρωτεασών αποτελεί η οικογένεια των μεταλλο-πρωτεασών του υποστρώματος (MMP : matrix metalloproteases) (Streuli et al., 1999).

Όλα τα στοιχεία που αναφέρθηκαν, σε συνδυασμό με τις δικές μας παρατηρήσεις, μας οδηγούν στην υπόθεση ότι για τη διέλευση του παρασίτου

μέσω του επιθηλιακού τοιχώματος πιθανόν να απαιτείται η ικανότητα παραγωγής πρωτεϊνών με δράση πρωτεασών από τον οοκινέτη, ανάλογων με αυτές που εμπλέκονται στις διαδικασίες διακοπής και επανασχηματισμού των κυτταρικών συνδέσεων μεταξύ τους και με το εξωκυττάριο υπόστρωμα κατά τη διάρκεια του μηχανισμού επιδιόρθωσης. Η παραγωγή αυτού του τύπου των πρωτεϊνών θα είχε πιθανόν ως αποτέλεσμα την αποδιοργάνωση των δομικών συστατικών του εξωκυττάριου υποστρώματος που περιβάλλει το μεσέντερο και των κυτταρικών δεσμών συνάφειας διευκολύνοντας με αυτόν τον τρόπο τη διαπέραση του επιθηλιακού τοιχώματος από τα παράσιτο. Η έκφραση επίσης από τον οοκινέτη μιας πρωτεάσης με ενεργότητα παρόμοια με αυτή της ομάδας των dis-ιντεγκρινών (ADAMs) θα μπορούσε να αποτελέσει μία πιθανή εξήγηση για τον εντοπισμό της ιντεγκρίνης στην επιφάνεια των οοκινετών. Οι dis-ιντεγκρίνες αποτελούν μία οικογένεια διαμεμβρανικών γλυκοπρωτεϊνών με ποικίλους λειτουργικούς ρόλους, ένας εκ των οποίων είναι και η πέψη μορίων συνάφειας, όπως οι ιντεγκρίνες και άλλων πρωτεϊνών του εξωκυττάριου υποστρώματος (Schlondorff et al., 1999, Wu et al., 2003, Smith et al., 2002). Είναι λοιπόν πολύ πιθανό η παραγωγή αυτών των πρωτείνων από τον οοκινέτη να προκαλεί την αποκοπή των ιντεγκρινών του μεσεντερικού επιθηλίου, οι οποίες στη συνέχεια συμπαρασύρονται στην επιφάνειά του κατά τη διέλευση του μέσω των κυττάρων.

Όλα όσα αναφέρθηκαν αποτελούν υποθέσεις που θα μπορούσαν να γίνουν προκειμένου να ερμηνευθεί το σύνολο των παρατηρήσεων που προέκυψαν από τα ανοσο-ιστοχημικά πειράματα. Η περαιτέρω διερεύνηση και η ταυτοποίηση μορίων που εμπλέκονται στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παρασίτων με τα επιθηλιακά κύτταρα και το εξωκυττάριο υπόστρωμα του ξενιστή, όπως για παράδειγμα πρωτεασών τύπου μεταλλοπρωτεασών θα συμβάλλει σημαντικά στην κατανόηση των δομικών και λειτουργικών μεταβολών που επιτελούνται στο μεσεντερικό επιθήλιο κατά τη διέλευση του οοκινέτη. Έχει ήδη αποδειχθεί ότι οι παρασιτικές πρωτεΐνες P25 και P28 προσδένονται σε συστατικά της βασικής λεπίδας του επιθηλίου όπως είναι η λαμινίνη και το κολλαγόνο IV (Adini et al., 1999, Vlachou et al., 2001). Η παραγωγή επίσης μιας εκκρινόμενης πρωτεάσης τύπου σουπτισιλίνης από

τον οοκινέτη, όπως έχει αναφερθεί από τους Han et al. (2000) είναι πιθανόν να εμπλέκεται στην αναδιοργάνωση των συστατικών της βασικής λεπίδας κατά την διαδικασία εισβολή των επιθηλιακών κυττάρων του μεσεντέρου.

Για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από την εφαρμογή του συστήματος των Δύο Υβριδίων, χρησιμοποιήθηκε η *in situ* τεχνική των φθοριζόντων μικροσφαιριδίων (Buttiglione et al., 1998, Pavlou et al., 2002). Όπως ήδη αναφέρθηκε στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων, η μελέτη των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων με τη μέθοδο αυτή δεν έγινε εφικτή καθώς στάθηκε αδύνατη η παραγωγή των υπό μελέτη πρωτεϊνών που προέρχονται από το παράσιτο μετά την παροδική διαμόλυνση κυτταρικών σειρών Cos-7. Η δυσκολία παραγωγής παρασιτικών πρωτεϊνών, κυρίως αυτών που προέρχονται από το πλασμώδιο, σε ετερόλογα συστήματα δεν αποτελεί σπάνιο φαινόμενο. Για παράδειγμα, η υπερέκφραση γονιδίων του παρασίτου *Plasmodium falciparum* στο βακτήριο *E.coli* παρουσιάζει ιδιαίτερες δυσκολίες, γεγονός που οφείλεται στο διαφορετική χρήση κωδικονίων (codon usage). Το υψηλό ποσοστό των βάσεων AT που παρουσιάζει το γονιδίωμα του παρασίτου (περίπου 80%), κάνει την ετερόλογη έκφραση των γονιδίων στην *E.coli* πολύ δύσκολη, καθώς συγκεκριμένα κωδικόνια τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως από το πλασμώ-διο χρησιμοποιούνται ωστόσο σπανίως από το *E.coli* (Baca et al., 2000). Η παρουσία ενός μεγάλου αριθμού κωδικονίων των παραπάνω τύπων σε τυχαίες θέσεις μέσα στο γονιδίωμα μπορεί να προκαλέσει μετατόπιση του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης ή πρόωρη διακοπή της γονιδιακής έκφρασης (Kurland et al., 1996). Είναι λοιπόν πολύ πιθανόν η αδυναμία παραγωγής παρασιτικών πρωτεϊνών στα κύτταρα Cos-7 να οφείλεται σε αντίστοιχο φαι-νόμενο, δηλαδή στη διαφορετική χρήση κωδικονίων που χρησιμοποιεί το παράσιτο σε σχέση με αυτό των θηλαστικών κυττάρων.

Οι παρατηρήσεις που προέκυψαν κατά την μελέτη του τοπολογικού εντοπισμού της β-υπομονάδας σε ιστούς μολυσμένους με το παράσιτο οδήγησαν στο επόμενο πειραματικό στάδιο που ήταν η διερεύνηση των πιθανών αλληλεπιδράσεων της υπό μελέτη πρωτεΐνης με ήδη γνωστές πρωτεΐνες του παρασίτου. Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από

την εφαρμογή του Συστήματος των Δύο Υβριδίων, προκειμένου να επιτευχθεί ο παραπάνω στόχος, δεν παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση της β-ιντεγκρίνης με τις παρασιτικές πρωτεΐνες που μελετήθηκαν. Οι παρατηρήσεις αυτές βέβαια δεν σημαίνει ότι ανταποκρίνονται σε αυτό που ενδεχομένως συμβαίνει στην πραγματικότητα καθώς είναι πολύ πιθανόν οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες να αλληλεπιδρούν μεν μέσα στον οργανισμό (ξενιστή), αλλά η εφαρμογή της πειραματικής πορείας που ακολουθήθηκε να καθιστά αδύνατη τη διαπίστωσή τους. Θα πρέπει στο σημείο αυτό να υπενθυμίσουμε ότι το τμήμα της πρωτεΐνης που χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη των πρωτεϊνικών άλληλεπιδράσεων δεν αποτελεί παρά μια υποπεριοχή (περιοχή Ι) της μίας εκ των δύο αλυσίδων του υποδοχέα της ιντεγκρίνης. Όπως είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία, η περιοχή αυτή της β-υπομονάδας αν και είναι απαραίτητη για την πρόσδεση του δεσμευτή από τον υποδοχέα, δεν είναι όμως αρκετή. Τουλάχιστον ακόμα δύο περιοχές των ιντεγκρινών φαίνεται να εμπλέκονται στην παραπάνω διαδικασία, όπως η αντίστοιχη Ι-περιοχή της α-αλυσίδας (Lee et al., 1995), καθώς και μία σειρά από εφτά επαναλαμβανόμενα μοτίβα στην ίδια αλυσίδα που σχηματίζουν δομή β-έλικας (Xiong et al., 2002). Επίσης, όπως ήδη αναφέρθηκε στο κεφάλαιο της εισαγωγής η πρόσδεση του δεσμευτή στον υποδοχέα δεν αποτελεί μια απλή διαδικασία που εξαρτάται μόνο από τη διαθεσιμότητα του δεσμευτή, αλλά αντίθετα ελέγχεται από πολύπλοκους μηχανισμούς σηματοδότησης, όπως είναι η μέσα-έξω σηματοδότηση (inside-out signaling). Σύμφωνα με τον τελευταίο μηχανισμό, η αλληλεπίδραση ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών, τόσο κυτταροσκελετικών (π.χ ταλίνη) όσο και ρυθμιστικών, με το κυτταροπλασματικό τμήμα της β-υπομονάδας προκαλεί την κατάλληλη δομική αλλαγή στη διαμόρφωση της εξωκυττάριας περιοχής της πρωτεΐνης αυξάνοντας με αυτόν τον τρόπο την συνάφεια των ιντεγκρινών για τους δεσμευτές τους (Hughes et al., 1998, Oxvig et al., 1999). Η αλληλεπίδραση επίσης των κυτταροπλασματικών περιοχών των δύο αλυσίδων όχι μόνο με ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες αλλά και μεταξύ τους αποτελεί καθοριστικό παράγοντα ρύθμισης της ενεργοποποίησης του υποδοχέα (Liddington et al., 2002, Vinogradova et al., 2002, Lu et al., 2001). Όσα αναφέρθηκαν παραπάνω σχετικά με την πολυπλοκότητα της διαδικασίας αλληλεπίδρασης του δεσμευτή με τον υποδοχέα και τους παράγοντες που εμπλέκονται σε αυτή είναι πιθανόν να αποτελούν μία πιθανή

εξήγηση για την αδυναμία παρατήρησης των αλληλεπιδράσεων της β-υπομονάδας της ιντεγκρίνης με πρωτεΐνες του παρασίτου κατά την εφαρμογή του Συστήματος των Δύο Υβριδίων.

2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΛΑΜΙΝΙΝΗΣ ΤΟΥ ΚΟΥΝΟΥΠΙΟΥ *An.gambiae* ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΟΥ ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ *P.berghei*

Η μελέτη των αλληλεπιδράσεων της λαμινίνης του κουνουπιού *An.gambiae* με συγκεκριμένες πρωτεΐνες του παρασίτου έγκειται στα πλαίσια της ευρύτερης προσπάθειας κατανόησης του τρόπου διέλευσης του παρασίτου μέσω του επιθηλιακού τοιχώματος του μεσεντέρου και γενικότερα της διαδικασίας ωρίμανσής του μέσα στον ξενιστή. Ο πιθανός ρόλος του εξωκυττάριου υποστρώματος και των συστατικών του κατά την ανάπτυξη του παρασίτου έχει αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες. Η χρησιμοποίηση μίας τεχνητής μορφής βασικής μεμβράνης, γνωστής σαν Matrigel σε *in vitro* συστήματα καλλιέργειας οδήγησε στην επιτυχή σπορογονική ανάπτυξη των παρασίτων *Plasmodium falciparum* (Warburg et al., 1993) και *Plasmodium gallinaceum* (Warburg et al., 1992). Μία προηγούμενη επίσης μελέτη απέδειξε την εξειδικευμένη αλληλεπίδραση των οοκινετών και ωοκυστών του *Plasmodium gallinaceum* με δύο συστατικά της βασικής λεπίδας του επιθηλίου, το κολλαγόνο IV και τη λαμινίνη (Adini et al., 1999). Ωστόσο, η παρατήρηση σχηματισμού ωοκυστών χωρίς όμως την προσθήκη συστατικών του εξωκυττάριου υποστρώματος σε *in vitro* συστήματα καλλιέργειας οοκινετών με κύτταρα προερχόμενα είτε από τη *D.melanogaster* είτε από το κουνούπι, αποδεικνύει ότι ο ακριβής ρόλος του εξωκυττάριου υποστρώματος στην αναπτυξιακή πορεία του παρασίτου μέσα στον ξενιστή είναι ακόμα άγνωστος.

Η ισχυρή αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης CTRP του *Plasmodium berghei* με την υπομονάδα γ1 της λαμινίνης του κουνουπιού στο σύστημα

των Δύο Υβριδίων υποδηλώνει ότι η πρωτεΐνη στην επιφάνεια του παρασίτου πιθανόν να αλληλεπιδρά με τη βασική λεπίδα του επιθηλίου του κουνουπιού. Ενδεχομένως κάτι τέτοιο να αντανακλά την εμπλοκή του CTRP στη διαδικασία μετάβασης του παρασίτου από το στάδιο του οοκινέτη σε αυτό της ωοκύστης, ένας ακόμη ρόλος εκτός από τον ήδη γνωστό, της διαπέρασης του επιθηλιακού τοιχώματος (Dessens et al., 1999). Το γεγονός έχει αναφερθεί σε ανάλογες μελέτες, όπως στην περίπτωση των πρωτεϊνών P28 και P25 που αλληλεπιδρούν μεν με τη λαμινίνη, ενώ ταυτόχρονα έχουν λειτουργικό ρόλο στην εισβολή του μεσεντέρου από τον οοκινέτη (Vlachou et al., 2001). Σύμφωνα επίσης με μικροσκοπικές παρατηρήσεις ιστών από κουνούπια *A.stephensi* μολυσμένα με το παρασίτο, η πρωτεΐνη CTRP εντοπίζεται στην περιοχή επαφής μεταξύ του οοκινέτη και της βασικής λεπίδας υποδηλώνοντας ότι πιθανόν δρα σαν μόριο σύνδεσης διευκολύνοντας όχι μόνο την κίνηση του οοκινέτη στο μεσέντερο αλλά και την επαφή του με τη βασική μεμβράνη, καθώς επίσης και το μετασχηματισμό του σε ωοκύστη (Limviroj et al., 2002). Θα πρέπει να αναφερθεί ότι ενδείξεις για την αλληλεπίδραση του CTRP με τη λαμινίνη και το κολλαγόνο IV έχουν αναφερθεί στην εργασία των Arrighi et al. (2001), αλλά τα αποτελέσματα που προέκυψαν στην παρούσα εργασία από το σύστημα των Δύο υβριδίων αποδεικνύουν για πρώτη φορά την άμεση και ισχυρή αλληλεπίδραση του CTRP με τη λαμινίνη, ενώ ταυτόχρονα υποδεικνύουν και την υπεύθυνη περιοχή που εμπλέκεται σε αυτήν την αντίδραση (TSP-περιοχή).

Προς το παρόν μόνο υποθέσεις μπορούμε να κάνουμε σχετικά με τη λειτουργική σημασία της αλληλεπίδρασης της λαμινίνης του κουνουπιού με την πρωτεΐνη CTRP του παρασίτου. Είναι πολύ πιθανόν η γ1 υπομονάδα της λαμινίνης να δρα σαν ένα μόριο-υποδοχέας ικανό να σταματήσει το ταξίδι του οοκινέτη και να εμποδίσει την είσοδό του στην αιμολέμφο , δρώντας με αυτόν τον τρόπο είτε σαν ένα φυσικό εμπόδιο είτε σαν ένα σημείο πρόσδεσης για το παράσιτο. Η άφιξη ωστόσο στο εξωκυττάριο υπόστρωμα ακολουθείται από το μετασχηματισμό του οοκινέτη σε ωοκύστη. Η επαφή επομένως του παρασίτου με τα συστατικά του υποστρώματος και η αλληλεπίδραση των δύο παραπάνω πρωτεϊνών θα μπορούσε να εμπλέκεται στην ενεργοποίηση ενός σηματοδοτικού μηχανισμού ικανού να επάγει τη διαδικασία μετάβασης του

ωοκινέτη στο επόμενο αναπτυξιακό στάδιο. Η υπόθεση συμφωνεί με τη χαρακτηριστική δομή της πρωτεΐνης CTRP, καθώς περιλαμβάνει περιοχές όπως αυτές τύπου-TSP που είναι γνωστό ότι παίζουν ρόλο σε μηχανισμούς σηματοδότησης (Yuda et al., 1999). Τα παραπάνω αποτελέσματα των μοριακών αλληλεπιδράσεων της λαμινίνης σε συνδυασμό με τις παρατηρήσεις από τη μικροσκοπία φθορισμού, όπου η λαμινίνη φαίνεται να καλύπτει την ωοκύστη, αποτελούν ίσως ενδείξεις, ώστε να μην αποκλείσουμε την πιθανότητα ο λειτουργικός ρόλος της λαμινίνης κατά την ανάπτυξη του παρασίτου να είναι προστατευτικός. Είναι δυνατόν η κάλυψη των ωοκυστών με συστατικά του εξωκυττάριου υποστρώματος να εμποδίζει την αναγνώρισή τους από το ανοσοποιητικό σύστημα του κουνουπιού επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο την ανάπτυξή τους για εκτεταμένες χρονικές περιόδους μέσα στην μεσεντερική κοιλότητα χωρίς τον κίνδυνο της επίθεσης και απόρριψής τους από το αμυντικό σύστημα του ξενιστή.

Η εκτενής μελέτη της συσχέτισης της αναπτυξιακής πορείας του παρασίτου και του τοπολογικού εντοπισμού της β-ιντεγκρίνης στο μεσέντερο του κουνουπιού έχουν δώσει σημαντικές πληροφορίες που μπορούμε να βασιστούμε και να σχεδιάσουμε πειραματικές διαδικασίες προκειμένου να διαπιστώσουμε τον ακριβή λειτουργικό ρόλο της πρωτεΐνης. Έχουν ήδη ξεκινήσει πειράματα για την *in vivo* λειτουργική απενεργοποίηση (knockout) του γονιδίου τόσο της ιντεγκρίνης όσο και της λαμινίνης. Για το σκοπό αυτό θα χρησιμοποιηθεί η μέθοδος RNAi, σύμφωνα με την οποία δίκλωνο RNA των παραπάνω γονιδίων ενύεται ενδοθωρακικά σε ενήλικα άτομα *A.gambiae*, με στόχο την αποσιώπηση των γονιδίων. Ο αριθμός των ωοκυστών που θα σχηματιστούν μετά τη χορήγηση μολυσμένου με το παράσιτο αίμα στα άτομα αυτά, θα βοηθήσει στην εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με το ρόλο των υπό μελέτη πρωτεϊνών στην αναπτυξιακή πορεία του παρασίτου. Η μέθοδος RNAi έχει ήδη εφαρμοστεί σε αντίστοιχες μελέτες γονιδίων του ανοσοποιητικού συστήματος του κουνουπιού (Blandin et al., 2002).

Ιδιαίτερα ενδιαφέροντα θα ήταν πειράματα ανοσοεντοπισμού της λαμινίνης και της ιντεγκρίνης σε μεσέντερα κουνουπιών μολυσμένα με παράσιτα, στα οποία έχει γίνει λειτουργική απενεργοποίηση (knockout)

συγκεκριμένων πρωτεϊνών της επιφανείας τους όπως οι P25, P28 και CTRP προκειμένου να μελετηθούν οι πιθανές μεταβολές στην τοπολογική κατανομή των υπό μελέτη πρωτεϊνών στην επιφάνεια των παρασίτων και στο επιθηλιακό τοίχωμα του μεσεντέρου.

Επιπλέον, σημαντική πληροφορία θα μπορούσε να αντληθεί και από πειράματα *in vitro*, συνεπώασης οοκινετών με κυτταρικές σειρές κουνουπιού, στις οποίες εκφράζεται ο υποδοχέας της ιντεγκρίνης στη διμερή του κατάσταση (α και β υπομονάδα) μετά από παροδική ταυτόχρονη διαμόλυνσή τους με τις κατάλληλες πλασμιδιακές κατασκευές για τις δύο υπομονάδες. Στο ίδιο σύστημα, η εφαρμογή πειραμάτων αναστολής με την προσθήκη του αντισώματος έναντι της β-αλυσίδας, την επακόλουθη επώαση των κυττάρων με τους οοκινέτες και τη συγκριτική μελέτη της εισόδου των παρασίτων στα κύτταρα πριν και μετά την προσθήκη του αντισώματος θα μας έδινε τη δυνατότητα να διευκρινήσουμε το κατά πόσο η ιντεγκρίνη δρα σαν υποδοχέας υπεύθυνος για την είσοδο του παρασίτου στο κύτταρο.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Adini, A. and Warburg, A. (1999). Interaction of Plasmodium gallinaceum ookinetes and oocysts with extracellular matrix proteins. *Parasitology* **119 (Pt 4)**, 331-6.

Alphey, L., Beard, C. B., Billingsley, P., Coetzee, M., Crisanti, A., Curtis, C., Eggleston, P., Godfray, C., Hemingway, J., Jacobs-Lorena, M. et al. (2002). Malaria control with genetically manipulated insect vectors. *Science* **298**, 119-21.

Arrighi, R. B. and Hurd, H. (2002). The role of Plasmodium berghei ookinete proteins in binding to basal lamina components and transformation into oocysts. *Int J Parasitol* **32**, 91-8.

Assoian, R. K. and Zhu, X. (1997). Cell anchorage and the cytoskeleton as partners in growth factor dependent cell cycle progression. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 93-8.

Aumailley, M., Pesch, M., Tunggal, L., Gaill, F. and Fassler, R. (2000). Altered synthesis of laminin 1 and absence of basement membrane component deposition in (beta)1 integrin-deficient embryoid bodies. *J Cell Sci* **113 Pt 2**, 259-68.

Baca, A. M. and Hol, W. G. (2000). Overcoming codon bias: a method for high-level overexpression of Plasmodium and other AT-rich parasite genes in Escherichia coli. *Int J Parasitol* **30**, 113-8.

Basson, M. D. (2001). In vitro evidence for matrix regulation of intestinal epithelial biology during mucosal healing. *Life Sci* **69**, 3005-18.**Baum, P. D. and**

Garriga, G. (1997). Neuronal migrations and axon fasciculation are disrupted in ina-1 integrin mutants. *Neuron* **19**, 51-62.

Beck, K., Hunter, I. and Engel, J. (1990). Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain glycoprotein. *Faseb J* **4**, 148-60.

Bement, W. M. (2002). Actomyosin rings: the riddle of the sphincter. *Curr Biol* **12**, R12-4.

Billingsley, P. F. and Hecker, H. (1991). Blood digestion in the mosquito, Anopheles stephensi Liston (Diptera: Culicidae): activity and distribution of trypsin, aminopeptidase, and alpha-glucosidase in the midgut. *J Med Entomol* **28**, 865-71.

Billker, O., Lindo, V., Panico, M., Etienne, A. E., Paxton, T., Dell, A., Rogers, M., Sinden, R. E. and Morris, H. R. (1998). Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito. *Nature* **392**, 289-92.

Blandin, S., Moita, L. F., Kocher, T., Wilm, M., Kafatos, F. C. and Levashina, E. A. (2002). Reverse genetics in the mosquito Anopheles gambiae: targeted disruption of the Defensin gene. *EMBO Rep* **3**, 852-6.

Bouvard, D., Brakebusch, C., Gustafsson, E., Aszodi, A., Bengtsson, T., Berna, A. and Fassler, R. (2001). Functional consequences of integrin gene mutations in mice. *Circ Res* **89**, 211-23.

Brabant, M. C., Fristrom, D., Bunch, T. A., Baker, S. E. and Brower, D. L. (1998). The PS integrins are required for a regulatory event during Drosophila wing morphogenesis. *Ann N Y Acad Sci* **857**, 99-109.

Bretscher, M. S. (1989). Endocytosis and recycling of the fibronectin receptor in CHO cells. *Embo J* **8**, 1341-8.

Brittingham, A., Chen, G., McGwire, B. S., Chang, K. P. and Mosser, D. M. (1999). Interaction of Leishmania gp63 with cellular receptors for fibronectin. *Infect Immun* **67**, 4477-84.

Brower, D. L. and Jaffe, S. M. (1989). Requirement for integrins during Drosophila wing development. *Nature* **342**, 285-7.

Brown, N. H., Bloor, J. W., Dunin-Borkowski, O. and Martin-Bermudo, M. D. (1993). Integrins and morphogenesis. *Dev Suppl*, 177-83.

Brown, N. H., Gregory, S. L. and Martin-Bermudo, M. D. (2000). Integrins as mediators of morphogenesis in Drosophila. *Dev Biol* **223**, 1-16.

Bunch, T. A., Graner, M. W., Fessler, L. I., Fessler, J. H., Schneider, K. D., Kerschen, A., Choy, L. P., Burgess, B. W. and Brower, D. L. (1998). The PS2 integrin ligand tiggrin is required for proper muscle function in Drosophila. *Development* **125**, 1679-89.

Burke, R. D. (1999). Invertebrate integrins: structure, function, and evolution. *Int Rev Cytol* **191**, 257-84.

Buttery, P. C., Mallawaarachchi, C. M., Milner, R., Doherty, P. and ffrench-Constant, C. (1999). Mapping regions of the beta1 integrin cytoplasmic domain involved in migration and survival in primary oligodendrocyte precursors using cell-permeable homeopeptides. *Biochem Biophys Res Commun* **259**, 121-7.

Buttiglione, M., Revest, J. M., Pavlou, O., Karagogeos, D., Furley, A., Rougon, G. and Faivre-Sarrailh, C. (1998). A functional interaction between the neuronal adhesion molecules TAG-1 and F3 modulates neurite outgrowth and fasciculation of cerebellar granule cells. *J Neurosci.* **17,** 6853-70.

Calderwood, D. A., Yan, B., de Pereda, J. M., Alvarez, B. G., Fujioka, Y., Liddington, R. C. and Ginsberg, M. H. (2002). The phosphotyrosine binding-like domain of talin activates integrins. *J Biol Chem* **277**, 21749-58.

Calderwood, D. A., Shattil, S. J. and Ginsberg, M. H. (2000). Integrins and actin filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signaling. *J Biol Chem* **275**, 22607-10.

Calderwood, D. A., Tuckwell, D. S., Eble, J., Kuhn, K. and Humphries, M. J. (1997). The integrin alpha1 A-domain is a ligand binding site for collagens and laminin. *J Biol Chem* **272**, 12311-7.

Canning, E. U. and Sinden, R. E. (1973). The organization of the ookinete and observations on nuclear division in oocysts of Plasmodium berghei. *Parasitology* **67**, 29-40.

Catteruccia, F., Nolan, T., Loukeris, T. G., Blass, C., Savakis, C., Kafatos, F. C. and Crisanti, A. (2000). Stable germline transformation of the malaria mosquito Anopheles stephensi. *Nature* **405**, 959-62.

Champe, M., McIntyre, B. W. and Berman, P. W. (1995). Monoclonal antibodies that block the activity of leukocyte function-associated antigen 1 recognize three discrete epitopes in the inserted domain of CD11a. *J Biol Chem* **270**, 1388-94.

Chi, H. C. and Hui, C. F. (1989). Primary structure of the Drosophila laminin B2 chain and comparison with human, mouse, and Drosophila laminin B1 and B2 chains. *J Biol Chem* **264**, 1543-50.

Chi, H. C., Juminaga, D., Wang, S. Y. and Hui, C. F. (1991). Structure of the Drosophila gene for the laminin B2 chain. *DNA Cell Biol* **10**, 451-66.
Church, G. M. and Gilbert, W. (1984). Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 1991-5.

Coates, C. J., Jasinskiene, N., Pott, G. B. and James, A. A. (1999). Promoter-directed expression of recombinant fire-fly luciferase in the salivary glands of Hermes-transformed Aedes aegypti. *Gene* **226**, 317-25.

Coates, C. J., Jasinskiene, N., Miyashiro, L. and James, A. A. (1998). Mariner transposition and transformation of the yellow fever mosquito, Aedes aegypti. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 3748-51.

Colognato, H. and Yurchenco, P. D. (2000). Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev Dyn* **218**, 213-34.

Colognato, H., Winkelmann, D. A. and Yurchenco, P. D. (1999). Laminin polymerization induces a receptor-cytoskeleton network. *J Cell Biol* **145**, 619-31.

Colombatti, A. and Bonaldo, P. (1991). The superfamily of proteins with von Willebrand factor type A-like domains: one theme common to components of extracellular matrix, hemostasis, cellular adhesion, and defense mechanisms. *Blood* **77**, 2305-15.

Curtis, C. F. (1968). A possible genetic method for the control of insect pests, with special reference to tsetse flies (Glossina spp.). *Bull Entomol Res* **57**, 509-23.

Curtis, C. F. and Davies, C. R. (2001). Present use of pesticides for vector and allergen control and future requirements. *Med Vet Entomol* **15**, 231-5.

Danen, E. H. and Sonnenberg, A. (2003). Integrins in regulation of tissue development and function. *J Pathol* **200**, 471-80.

Darribere, T., Skalski, M., Cousin, H. L., Gaultier, A., Montmory, C. and Alfandari, D. (2000). Integrins: regulators of embryogenesis. *Biol Cell* **92**, 5-25.
Davis, C. G. (1990). The many faces of epidermal growth factor repeats. *New Biol* **2**, 410-9.

De Arcangelis, A., Neuville, P., Boukamel, R., Lefebvre, O., Kedinger, M. and Simon-Assmann, P. (1996). Inhibition of laminin alpha 1-chain expression leads to alteration of basement membrane assembly and cell differentiation. *J Cell Biol* **133**, 417-30.

Dedhar, S. (1999). Integrins and signal transduction. *Curr Opin Hematol* **6**, 37-43.

Dehio, M., Gomez-Duarte, O. G., Dehio, C. and Meyer, T. F. (1998). Vitronectin-dependent invasion of epithelial cells by Neisseria gonorrhoeae involves alpha(v) integrin receptors. *FEBS Lett* **424**, 84-8.

Dessens, J. T., Beetsma, A. L., Dimopoulos, G., Wengelnik, K., Crisanti, A., Kafatos, F. C. and Sinden, R. E. (1999). CTRP is essential for mosquito infection by malaria ookinetes. *Embo J* **18**, 6221-7.

D'Souza, S. E., Ginsberg, M. H., Burke, T. A., Lam, S. C. and Plow, E. F. (1988). Localization of an Arg-Gly-Asp recognition site within an integrin adhesion receptor. *Science* **242**, 91-3.

Dulabon, L., Olson, E. C., Taglienti, M. G., Eisenhuth, S., McGrath, B., Walsh, C. A., Kreidberg, J. A. and Anton, E. S. (2000). Reelin binds alpha3beta1 integrin and inhibits neuronal migration. *Neuron* **27**, 33-44.

Edwards, G. M., Wilford, F. H., Liu, X., Hennighausen, L., Djiane, J. and Streuli, C. H. (1998). Regulation of mammary differentiation by extracellular matrix involves protein-tyrosine phosphatases. *J Biol Chem* **273**, 9495-500.

Ekblom, P. (1996). Receptors for laminins during epithelial morphogenesis. *Curr Opin Cell Biol* **8**, 700-6.

Esco, M. A., Wang, Z., McDermott, M. L. and Kurpakus-Wheater, M. (2001). Potential role for laminin 5 in hypoxia-mediated apoptosis of human corneal epithelial cells. *J Cell Sci* **114**, 4033-40.

Fernandez, M. A., Munoz-Fernandez, M. A. and Fresno, M. (1993). Involvement of beta 1 integrins in the binding and entry of Trypanosoma cruzi into human macrophages. *Eur J Immunol* **23**, 552-7.

Fields, S. and Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245-6.

Fitzakerley, J. L. (2001). Survival and differentiation of neurons cultured from the mouse cochlear nucleus on extracellular matrix components. *Neurosci Lett* **316**, 183-7.

Fryauff, D. J., Soekartono, Tuti, S., Leksana, B., Suradi, Tandayu, S. and Baird, J. K. (1998). Survey of resistance in vivo to chloroquine of Plasmodium falciparum and P. vivax in North Sulawesi, Indonesia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **92**, 82-3.

Gaietta, G., Redelmeier, T. E., Jackson, M. R., Tamura, R. N. and Quaranta, V. (1994). Quantitative measurement of alpha 6 beta 1 and alpha 6 beta 4 integrin internalization under cross-linking conditions: a possible role for alpha 6

cytoplasmic domains. *J Cell Sci* **107 (Pt 12)**, 3339-49.

Galbraith, C. G., Yamada, K. M. and Sheetz, M. P. (2002). The relationship between force and focal complex development. *J Cell Biol* **159**, 695-705.

Garcia, G. E., Wirtz, R. A., Barr, J. R., Woolfitt, A. and Rosenberg, R. (1998). Xanthurenic acid induces gametogenesis in Plasmodium, the malaria parasite. *J Biol Chem* **273**, 12003-5.

Garcia-Alonso, L., Fetter, R. D. and Goodman, C. S. (1996). Genetic analysis of Laminin A in Drosophila: extracellular matrix containing laminin A is required for ocellar axon pathfinding. *Development* **122**, 2611-21.

Ghosh, A., Edwards, M. J. and Jacobs-Lorena, M. (2000). The journey of the malaria parasite in the mosquito: hopes for the new century. *Parasitol Today* **16**, 196-201.

Girma, J. P., Meyer, D., Verweij, C. L., Pannekoek, H. and Sixma, J. J. (1987). Structure-function relationship of human von Willebrand factor. *Blood* **70**, 605-11.

Gotwals, P. J., Fessler, L. I., Wehrli, M. and Hynes, R. O. (1994). Drosophila PS1 integrin is a laminin receptor and differs in ligand specificity from PS2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 11447-51.

Gotwals, P. J., Chi-Rosso, G., Ryan, S. T., Sizing, I., Zafari, M., Benjamin, C., Singh, J., Venyaminov, S. Y., Pepinsky, R. B. and Koteliansky, V. (1999). Divalent cations stabilize the alpha 1 beta 1 integrin I domain. *Biochemistry* **38**, 8280-8.

Graham, F. L. and van der Eb, A. J. (1973). Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. *Virology* **54**, 536-9.

Greenwood, B. and Mutabingwa, T. (2002). Malaria in 2002. *Nature* **415**, 670-2.

Grinnel, F. (1980). Fibroblast cell-substratum interactions: role of cold insoluble globulin (plasma fibronectin). *Experientia* **36**, 505-7.

Grossman, G. L., Rafferty, C. S., Clayton, J. R., Stevens, T. K., Mukabayire, O. and Benedict, M. Q. (2001). Germline transformation of the malaria vector, Anopheles gambiae, with the piggyBac transposable element. *Insect Mol Biol* **10**, 597-604.

Grunstein, M. and Hogness, D. S. (1975). Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 3961-5.

Han, Y. S., Thompson, J., Kafatos, F. C. and Barillas-Mury, C. (2000). Molecular interactions between Anopheles stephensi midgut cells and Plasmodium berghei: the time bomb theory of ookinete invasion of mosquitoes. *Embo J* **19**, 6030-40.

Hanks, S. K., Ryzhova, L., Shin, N. Y. and Brabek, J. (2003). Focal adhesion kinase signaling activities and their implications in the control of cell survival and motility. *Front Biosci* **8**, d982-96.

Hannigan, G. E., Leung-Hagesteijn, C., Fitz-Gibbon, L., Coppolino, M. G., Radeva, G., Filmus, J., Bell, J. C. and Dedhar, S. (1996). Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase. *Nature* **379**, 91-6.

Hastings, I. M., Bray, P. G. and Ward, S. A. (2002). Parasitology. A requiem for chloroquine. *Science* **298**, 74-5.

Hay, S. I., Rogers, D. J., Randolph, S. E., Stern, D. I., Cox, J., Shanks, G. D. and Snow, R. W. (2002). Hot topic or hot air? Climate change and malaria resurgence in East African highlands. *Trends Parasitol* **18**, 530-4.

Hemingway, J., Field, L. and Vontas, J. (2002). An overview of insecticide resistance. *Science* **298**, 96-7.

Hisaeda, H. and Yasutomo, K. (2002). Development of malaria vaccines that block transmission of parasites by mosquito vectors. *J Med Invest* **49**, 118-23.

Hoffman, S. L. and Carucci, D. J. (2000). Plasmodium falciparum: from genomic sequence to vaccines and drugs. *Novartis Found Symp* **229**, 94-100; discussion 100-4.

Hoffman, S. L., Subramanian, G. M., Collins, F. H. and Venter, J. C. (2002). Plasmodium, human and Anopheles genomics and malaria. *Nature* **415**, 702-9.

Hohenester, E. and Engel, J. (2002). Domain structure and organisation in extracellular matrix proteins. *Matrix Biol* **21**, 115-28.

Huber, M., Cabib, E. and Miller, L. H. (1991). Malaria parasite chitinase and penetration of the mosquito peritrophic membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 2807-10.

Hughes, P. E. and Pfaff, M. (1998). Integrin affinity modulation. *Trends Cell Biol* **8**, 359-64.

Hynes, R. O. and Zhao, Q. (2000). The evolution of cell adhesion. *J Cell Biol* **150**, F89-96.

Hynes, R. O. (1987). Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* **48**, 549-54.

Hynes, R. O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**, 673-87.

Hynes, R. O. (1996). Targeted mutations in cell adhesion genes: what have we learned from them? *Dev Biol* **180**, 402-12.

Hynes, R. O., Lively, J. C., McCarty, J. H., Taverna, D., Francis, S. E., Hodivala-Dilke, K. and Xiao, Q. (2002). The diverse roles of integrins and their ligands in angiogenesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **67**, 143-53.

Hurd, H. and Sinden, R. E. (2001). Malaria : an example of a vector transmitted parasite. *Practical exercises in parasitology. Cambridge University Press.*

Isberg, R. R. and Leong, J. M. (1990). Multiple beta 1 chain integrins are receptors for invasin, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Cell* **60**, 861-71.

Jacobsen, H., Klenow, H. and Overgaard-Hansen, K. (1974). The N-terminal amino-acid sequences of DNA polymerase I from Escherichia coli and of the large and the small fragments obtained by a limited proteolysis. *Eur J Biochem* **45**, 623-7.

Joyce, C. M. and Grindley, N. D. (1983). Construction of a plasmid that overproduces the large proteolytic fragment (Klenow fragment) of DNA polymerase I of Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 1830-4.

Just, M., Herbst, H., Hummel, M., Durkop, H., Tripier, D., Stein, H. and Schuppan, D. (1991). Undulin is a novel member of the fibronectin-tenascin family of extracellular matrix glycoproteins. *J Biol Chem* **266**, 17326-32.

Kanazashi, S. I., Sharma, C. P. and Arnaout, M. A. (1997). Integrin-ligand interactions: scratching the surface. *Curr Opin Hematol* **4**, 67-74.

Kurland, C. and Gallant, J. (1996). Errors of heterologous protein expression. *Curr Opin Biotechnol* **7**, 489-93.

Kyte, J. and Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* **157**, 105-32.

Le Bras, J. and Durand, R. (2003). The mechanisms of resistance to antimalarial drugs in Plasmodium falciparum. *Fundam Clin Pharmacol* **17**, 147-53.

Lee, J. O., Bankston, L. A., Arnaout, M. A. and Liddington, R. C. (1995). Two

conformations of the integrin A-domain (I-domain): a pathway for activation? *Structure* **3**, 1333-40.

Leong, J. M., Fournier, R. S. and Isberg, R. R. (1990). Identification of the integrin binding domain of the Yersinia pseudotuberculosis invasin protein. *Embo J* **9**, 1979-89.

Leptin, M., Bogaert, T., Lehmann, R. and Wilcox, M. (1989). The function of PS integrins during Drosophila embryogenesis. *Cell* **56**, 401-8.

Liddington, R. C. and Ginsberg, M. H. (2002). Integrin activation takes shape. *J Cell Biol* **158**, 833-9.

Limviroj, W., Yano, K., Yuda, M., Ando, K. and Chinzei, Y. (2002). Immuno-electron microscopic observation of Plasmodium berghei CTRP localization in the midgut of the vector mosquito Anopheles stephensi. *J Parasitol* **88**, 664-72.

Lobo, N. F., Hua-Van, A., Li, X., Nolen, B. M. and Fraser, M. J., Jr. (2002). Germ line transformation of the yellow fever mosquito, Aedes aegypti, mediated by transpositional insertion of a piggyBac vector. *Insect Mol Biol* **11**, 133-9.

Long, C. A. and Hoffman, S. L. (2002). Parasitology. Malaria--from infants to genomics to vaccines. *Science* **297**, 345-7.

Lu, C., Takagi, J. and Springer, T. A. (2001). Association of the membrane proximal regions of the alpha and beta subunit cytoplasmic domains constrains an integrin in the inactive state. *J Biol Chem* **276**, 14642-8.

MacKrell, A. J., Blumberg, B., Haynes, S. R. and Fessler, J. H. (1988). The lethal myospheroid gene of Drosophila encodes a membrane protein homologous to vertebrate integrin beta subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 2633-7.

Mahairaki, V., Lycett, G., Blass, C. and Louis, C. (2001). Beta-integrin of Anopheles gambiae: mRNA cloning and analysis of structure and expression. *Insect Mol Biol* **10**, 217-23.

Manes, T., Zheng, D. Q., Tognin, S., Woodard, A. S., Marchisio, P. C. and Languino, L. R. (2003). Alpha(v)beta3 integrin expression up-regulates cdc2, which modulates cell migration. *J Cell Biol* **161**, 817-26.

Martin-Bermudo, M. D. and Brown, N. H. (1999). Uncoupling integrin adhesion and signaling: the betaPS cytoplasmic domain is sufficient to regulate gene expression in the Drosophila embryo. *Genes Dev* **13**, 729-39.

Matuschewski, K., Nunes, A. C., Nussenzweig, V. and Menard, R. (2002).

Plasmodium sporozoite invasion into insect and mammalian cells is directed by the same dual binding system. *Embo J* **21**, 1597-606.

Mayer, U., Kohfeldt, E. and Timpl, R. (1998). Structural and genetic analysis of laminin-nidogen interaction. *Ann N Y Acad Sci* **857**, 130-42.

Michishita, M., Videm, V. and Arnaout, M. A. (1993). A novel divalent cation-binding site in the A domain of the beta 2 integrin CR3 (CD11b/CD18) is essential for ligand binding. *Cell* **72**, 857-67.

Miller, L. H., Baruch, D. I., Marsh, K. and Doumbo, O. K. (2002). The pathogenic basis of malaria. *Nature* **415**, 673-9.

Minakawa, N., Sonye, G., Mogi, M., Githeko, A. and Yan, G. (2002). The effects of climatic factors on the distribution and abundance of malaria vectors in Kenya. *J Med Entomol* **39**, 833-41.

Montell, D. J. and Goodman, C. S. (1989). Drosophila laminin: sequence of B2 subunit and expression of all three subunits during embryogenesis. *J Cell Biol* **109**, 2441-53.

Moreira, L. A., Ghosh, A. K., Abraham, E. G. and Jacobs-Lorena, M. (2002). Genetic transformation of mosquitoes: a quest for malaria control. *Int J Parasitol* **32**, 1599-605.

Mould, A. P., Askari, J. A., Barton, S., Kline, A. D., McEwan, P. A., Craig, S. E. and Humphries, M. J. (2002). Integrin activation involves a conformational change in the alpha 1 helix of the beta subunit A-domain. *J Biol Chem* **277**, 19800-5.

Mu, J., Ferdig, M. T., Feng, X., Joy, D. A., Duan, J., Furuya, T., Subramanian, G., Aravind, L., Cooper, R. A., Wootton, J. C. et al. (2003). Multiple transporters associated with malaria parasite responses to chloroquine and quinine. *Mol Microbiol* **49**, 977-89.

Mueller, S. C. and Chen, W. T. (1991). Cellular invasion into matrix beads: localization of beta 1 integrins and fibronectin to the invadopodia. *J Cell Sci* **99 (Pt 2)**, 213-25.

Muller, H. M., Vizioli, I., della Torre, A. and Crisanti, A. (1993). Temporal and spatial expression of serine protease genes in Anopheles gambiae. *Parassitologia* **35 Suppl**, 73-6.

Mullis, K. B. and Faloona, F. (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalysed chain reaction. *Methods Enzymol*. **155**, 335-350.

Naik, M. U. and Naik, U. P. (2003). Calcium- and integrin-binding protein regulates focal adhesion kinase during platelet spreadingof immobilized fibrinogen. *Blood* [Epub ahead of print].

Newman, R. D., Parise, M. E., Slutsker, L., Nahlen, B. and Steketee, R. W. (2003). Safety, efficacy and determinants of effectiveness of antimalarial drugs during pregnancy: implications for prevention programmes in Plasmodium falciparum-endemic sub-Saharan Africa. *Trop Med Int Health* **8**, 488-506.

Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. and von Heijne, G. (1997). A neural network method for identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Int J Neural Syst* **8**, 581-99.

Noakes, P. G., Miner, J. H., Gautam, M., Cunningham, J. M., Sanes, J. R. and Merlie, J. P. (1995). The renal glomerulus of mice lacking s-laminin/laminin beta 2: nephrosis despite molecular compensation by laminin beta 1. *Nat Genet* **10**, 400-6.

Nomura, T., Carlton, J. M., Baird, J. K., del Portillo, H. A., Fryauff, D. J., Rathore, D., Fidock, D. A., Su, X., Collins, W. E., McCutchan, T. F. et al. (2001). Evidence for different mechanisms of chloroquine resistance in 2 Plasmodium species that cause human malaria. *J Infect Dis* **183**, 1653-61.

Noszczyk, B. H., Klein, E., Holtkoetter, O., Krieg, T. and Majewski, S. (2002). Integrin expression in the dermis during scar formation in humans. *Exp Dermatol* **11**, 311-8.

Ohno, M., Ohno, N. and Kefalides, N. A. (1991). Studies on human laminin and laminin-collagen complexes. *Connect Tissue Res* **25**, 251-63.

Oxvig, C., Lu, C. and Springer, T. A. (1999). Conformational changes in tertiary structure near the ligand binding site of an integrin I domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2215-20.

Parsons, J. T., Martin, K. H., Slack, J. K., Taylor, J. M. and Weed, S. A. (2000). Focal adhesion kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement. *Oncogene* **19**, 5606-13.

Persad, S. and Dedhar, S. (2003). The role of integrin-linked kinase (ILK) in cancer progression. *Cancer Metastasis Rev* **22**, 375-84.
Persidis, A. (2000). Malaria. *Nat Biotechnol* **18**, 111-2.

Pinkerton, A. C., Michel, K., O'Brochta, D. A. and Atkinson, P. W. (2000). Green fluorescent protein as a genetic marker in transgenic Aedes aegypti. *Insect Mol Biol* **9**, 1-10.

Plow, E. F., Haas, T. A., Zhang, L., Loftus, J. and Smith, J. W. (2000). Ligand binding to integrins. *J Biol Chem* **275**, 21785-8.

Poumay, Y., Leclercq-Smekens, M., Grailly, S., Degen, A. and Leloup, R. (1993). Specific internalization of basal membrane domains containing the integrin alpha 6 beta 4 in dispase-detached cultured human keratinocytes. *Eur J Cell Biol* **60**, 12-20.

Prokop, A., Martin-Bermudo, M. D., Bate, M. and Brown, N. H. (1998). Absence of PS integrins or laminin A affects extracellular adhesion, but not intracellular assembly, of hemiadherens and neuromuscular junctions in Drosophila embryos. *Dev Biol* **196**, 58-76.

Ranson, H., Claudianos, C., Ortelli, F., Abgrall, C., Hemingway, J., Sharakhova, M. V., Unger, M. F., Collins, F. H. and Feyereisen, R. (2002). Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. *Science* **298**, 179-81.

Ringwald, P., Sukwa, T., Basco, L. K., Bloland, P. and Mendis, K. (2002). Monitoring of drug-resistant malaria in Africa. *Lancet* **360**, 875-6.

Robson, K. J., Hall, J. R., Jennings, M. W., Harris, T. J., Marsh, K., Newbold, C. I., Tate, V. E. and Weatherall, D. J. (1988). A highly conserved amino-acid sequence in thrombospondin, properdin and in proteins from sporozoites and blood stages of a human malaria parasite. *Nature* **335**, 79-82.

Rosenberg, R. (1992). Ejection of malaria sporozoites by feeding mosquitoes. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **86**, 109.

Ryan, M. C., Christiano, A. M., Engvall, E., Wewer, U. M., Miner, J. H., Sanes, J. R. and Burgeson, R. E. (1996). The functions of laminins: lessons from in vivo studies. *Matrix Biol* **15**, 369-81.

Sakai, T., Larsen, M. and Yamada, K. M. (2003). Fibronectin requirement in branching morphogenesis. *Nature* **423**, 876-81.

Salazar, C. E., Mills-Hamm, D., Kumar, V. and Collins, F. H. (1993). Sequence of a cDNA from the mosquito Anopheles gambiae encoding a homologue of human ribosomal protein S7. *Nucleic Acids Res* **21**, 4147.

Saltman, L. H., Lu, Y., Zaharias, E. M. and Isberg, R. R. (1996). A region of the Yersinia pseudotuberculosis invasin protein that contributes to high affinity binding to integrin receptors. *J Biol Chem* **271**, 23438-44.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning : A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press* **second edition.**

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-7.

Schaller, M. D., Borgman, C. A., Cobb, B. S., Vines, R. R., Reynolds, A. B. and Parsons, J. T. (1992). pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 5192-6.

Schlaepfer, D. D., Hauck, C. R. and Sieg, D. J. (1999). Signaling through focal adhesion kinase. *Prog Biophys Mol Biol* **71**, 435-78.

Schlagenhauf, P., Steffen, R. and Loutan, L. (2003). Migrants as a major risk group for imported malaria in European countries. *J Travel Med* **10**, 106-7.

Schlondorff, J. and Blobel, C. P. (1999). Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding. *J Cell Sci* **112 (Pt 21)**, 3603-17.

Schock, F. and Perrimon, N. (2003). Retraction of the Drosophila germ band requires cell-matrix interaction. *Genes Dev* **17**, 597-602.

Scott, A. (2002). Legal responses to some of the new developments in reproductive technologies. Part 3: the future of reproductive technologies and the law. *Hum Reprod Genet Ethics* **8**, 24-8.

Shahabuddin, M. and Kaslow, D. C. (1994). Plasmodium: parasite chitinase and its role in malaria transmission. *Exp Parasitol* **79**, 85-8.

Sheetz, M. P., Felsenfeld, D. P. and Galbraith, C. G. (1998). Cell migration: regulation of force on extracellular-matrix-integrin complexes. *Trends Cell Biol* **8**, 51-4.

Shim, C., Kwon, H. B. and Kim, K. (1996). Differential expression of laminin chain-specific mRNA transcripts during mouse preimplantation embryo development. *Mol Reprod Dev* **44**, 44-55.

Siden-Kiamos, I., Vlachou, D., Margos, G., Beetsma, A., Waters, A. P., Sinden, R. E. and Louis, C. (2000). Distinct roles for pbs21 and pbs25 in the in vitro ookinete to oocyst transformation of Plasmodium berghei. *J Cell Sci* **113 Pt 19**, 3419-26.

Simonetti, A. B., Billingsley, P. F., Winger, L. A. and Sinden, R. E. (1993). Kinetics of expression of two major Plasmodium berghei antigens in the mosquito vector, Anopheles stephensi. *J Eukaryot Microbiol* **40**, 569-76.

Sinden, R. E. (1974). Excystment by sporozoites of malaria parasites. *Nature* **252**, 314.

Sinden, R. E. (1999). Gametogenesis in Plasmodium. *Bull Soc Pathol Exot* **92**, 437.

Sinden, R. E. (1999). Plasmodium differentiation in the mosquito. *Parassitologia* **41**, 139-48.

Sinden, R. E. and Billingsley, P. F. (2001). Plasmodium invasion of mosquito cells: hawk or dove? *Trends Parasitol* **17**, 209-12.

Skavdis, G., Siden-Kiamos, I., Muller, H. M., Crisanti, A. and Louis, C. (1996). Conserved function of anopheles gambiae midgut-specific promoters in the fruitfly. *Embo J* **15**, 344-50.

Smith, K. M., Gaultier, A., Cousin, H., Alfandari, D., White, J. M. and DeSimone, D. W. (2002). The cysteine-rich domain regulates ADAM protease function in vivo. *J Cell Biol* **159**, 893-902.

Sonnenberg, A. (1993). Integrins and their ligands. *Curr Top Microbiol Immunol* **184**, 7-35.

Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**, 503-17.

Streuli, C. (1999). Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 634-40.

Tamkun, J. W., DeSimone, D. W., Fonda, D., Patel, R. S., Buck, C., Horwitz, A. F. and Hynes, R. O. (1986). Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. *Cell* **46**, 271-82.

Tapley, P., Horwitz, A., Buck, C., Duggan, K. and Rohrschneider, L. (1989). Integrins isolated from Rous sarcoma virus-transformed chicken embryo fibroblasts. *Oncogene* **4**, 325-33.

Timpl, R. (1996). Macromolecular organization of basement membranes. *Curr Opin Cell Biol* **8**, 618-24.

Tsuboi, T., Tachibana, M., Kaneko, O. and Torii, M. (2003). Transmission-blocking vaccine of vivax malaria. *Parasitol Int* **52**, 1-11.

Tuckwell, D. (1999). Evolution of von Willebrand factor A (VWA) domains. *Biochem Soc Trans* **27**, 835-40.

Tuckwell, D. S. and Humphries, M. J. (1997). A structure prediction for the ligand-binding region of the integrin beta subunit: evidence for the presence of a von Willebrand factor A domain. *FEBS Lett* **400**, 297-303.

van der Flier, A. and Sonnenberg, A. (2001). Structural and functional aspects of filamins. *Biochim Biophys Acta* **1538**, 99-117.

van Putten, J. P., Duensing, T. D. and Cole, R. L. (1998). Entry of OpaA+ gonococci into HEp-2 cells requires concerted action of glycosaminoglycans, fibronectin and integrin receptors. *Mol Microbiol* **29**, 369-79.

Venter, J. C. Adams, M. D. Myers, E. W. Li, P. W. Mural, R. J. Sutton, G. G. Smith, H. O. Yandell, M. Evans, C. A. Holt, R. A. et al. (2001). The sequence of the human genome. *Science* **291**, 1304-51.

Verweij, C. L., Diergaarde, P. J., Hart, M. and Pannekoek, H. (1986). Full-length von Willebrand factor (vWF) cDNA encodes a highly repetitive protein considerably larger than the mature vWF subunit. *Embo J* **5**, 1839-47.

Vinogradova, O., Velyvis, A., Velyviene, A., Hu, B., Haas, T., Plow, E. and Qin, J. (2002). A structural mechanism of integrin alpha(IIb)beta(3) "inside-out" activation as regulated by its cytoplasmic face. *Cell* **110**, 587-97.

Vlachou, D., Lycett, G., Siden-Kiamos, I., Blass, C., Sinden, R. E. and Louis, C. (2001). Anopheles gambiae laminin interacts with the P25 surface protein of Plasmodium berghei ookinetes. *Mol Biochem Parasitol* **112**, 229-37.

Warburg, A. and Schneider, I. (1993). In vitro culture of the mosquito stages of Plasmodium falciparum. *Exp Parasitol* **76**, 121-6.

Warburg, A. and Miller, L. H. (1992). Sporogonic development of a malaria parasite in vitro. *Science* **255**, 448-50.

Watarai, M., Funato, S. and Sasakawa, C. (1996). Interaction of Ipa proteins of Shigella flexneri with alpha5beta1 integrin promotes entry of the bacteria into mammalian cells. *J Exp Med* **183**, 991-9.

Weiss, B., Jacquemin-Sablon, A., Live, T. R., Fareed, G. C. and Richardson, C. C. (1968). Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. VI. Further purification and properties of polynucleotide ligase from Escherichia coli infected with bacteriophage T4. *J Biol Chem* **243**, 4543-55.

Wellems, T. E. (2002). Plasmodium chloroquine resistance and the search for a replacement antimalarial drug. *Science* **298**, 124-6.

Wengelnik, K., Spaccapelo, R., Naitza, S., Robson, K. J., Janse, C. J., Bistoni, F., Waters, A. P. and Crisanti, A. (1999). The A-domain and the thrombospondin-related motif of Plasmodium falciparum TRAP are implicated in the invasion process of mosquito salivary glands. *Embo J* **18**, 5195-204.

Whittaker, C. A. and Hynes, R. O. (2002). Distribution and evolution of von Willebrand/integrin A domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere. *Mol Biol Cell* **13**, 3369-87.

Wu, W. B. and Huang, T. F. (2003). Activation of MMP-2, cleavage of matrix proteins, and adherens junctions during a snake venom metalloproteinase-induced endothelial cell apoptosis. *Exp Cell Res* **288**, 143-57.

Xiong, Y. M., Haas, T. A. and Zhang, L. (2002). Identification of functional segments within the beta2I-domain of integrin alphaMbeta2. *J Biol Chem* **277**, 46639-44.

Xu, Y., Gurusiddappa, S., Rich, R. L., Owens, R. T., Keene, D. R., Mayne, R., Hook, A. and Hook, M. (2000). Multiple binding sites in collagen type I for the integrins alpha1beta1 and alpha2beta1. *J Biol Chem* **275**, 38981-9.

Yamagata, M., Yamada, K. M., Yamada, S. S., Shinomura, T., Tanaka, H., Nishida, Y., Obara, M. and Kimata, K. (1991). The complete primary structure of type XII collagen shows a chimeric molecule with reiterated fibronectin type III motifs, von Willebrand factor A motifs, a domain homologous to a noncollagenous region of type IX collagen, and short collagenous domains with an Arg-Gly-Asp site. *J Cell Biol* **115**, 209-21.

Yee, G. H. and Hynes, R. O. (1993). A novel, tissue-specific integrin subunit, beta nu, expressed in the midgut of Drosophila melanogaster. *Development* **118**, 845-58.

Yuda, M., Sakaida, H. and Chinzei, Y. (1999). Targeted disruption of the plasmodium berghei CTRP gene reveals its essential role in malaria infection of the vector mosquito. *J Exp Med* **190**, 1711-6.

Yurchenco, P. D. and O'Rear, J. J. (1994). Basal lamina assembly. *Curr Opin Cell Biol* **6**, 674-81.

Zamir, E. and Geiger, B. (2001). Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci* **114**, 3583-90.

Zhang, Z., Vuori, K., Reed, J. C. and Ruoslahti, E. (1995). The alpha 5 beta 1 integrin supports survival of cells on fibronectin and up-regulates Bcl-2 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 6161-5.

Zieler, H. and Dvorak, J. A. (2000). Invasion in vitro of mosquito midgut cells by the malaria parasite proceeds by a conserved mechanism and results in death of the invaded midgut cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11516-21.