

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

*Διατμηματικό πρόγραμμα μεταπτυχιακών σπουδών
στην Μοριακή Βιολογία και Βιοϊατρική*

ΙΔΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑΣ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ
ΕΝΤΟΜΩΝ

Επιβλέπων καθηγητής : Δρ ΚΙΤΣΟΣ ΛΟΥΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΣ ΤΙΤΛΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ ΣΤΗΝ
ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗ

ΘΕΜΑ : ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ
ΜΕΤΑΞΥ ΤΟΥ ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ ΤΗΣ ΕΛΟΝΟΣΙΑΣ
ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΕΝΤΟΜΩΝ

ΜΙΧΑΛΗΣ ΚΟΤΣΥΦΑΚΗΣ
ΗΡΑΚΛΕΙΟ, ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2000

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

**ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗΣ**

***ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΕΝΤΟΜΩΝ***

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΣ ΤΙΤΛΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ ΣΤΗ
ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗ**

**ΘΕΜΑ : *Μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του παρασίτου της
ελονοσίας και πρωτεϊνών εντόμων***

Επιβλέπων καθηγητής : ΚΙΤΣΟΣ ΛΟΥΗΣ
Δεύτερος εξεταστής : ΧΡΗΣΤΟΣ ΔΕΛΙΔΑΚΗΣ

**ΜΙΧΑΛΗΣ ΚΟΤΣΥΦΑΚΗΣ
ΗΡΑΚΛΕΙΟ, ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2000**

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Από τη θέση αυτή αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Κίτσο Λούη για την ανάθεση του θέματος και τις δυνατότητες που μου έδωσε να προχωρήσω στο χώρο της έρευνας καθώς και την Δρ. Inga Siden-Kiamos για την ουσιαστική καθοδήγηση και επίβλεψη των πρώτων μου αυτών ερευνητικών βημάτων. Ευχαριστώ επίσης ιδιαιτέρως την Δρ. Ντίνα Βλάχου για την επιστημονική συνεισφορά, τις κριτικές υποδείξεις και το συνεχές ενδιαφέρον της που βοήθησαν ουσιαστικά τη μελέτη αυτή.

Επιθυμώ να ευχαριστήσω το Γιώργο Βρέντζο για τη συνεχή και πρόθυμη τεχνική υποστήριξη σε θέματα κυτταροκαλλιιεργειών, το Δρ. Gareth Lycett για τη γόνιμη συνεργασία μας και τη Βάσω Μαχαιράκη για την ευγενική παραχώρηση των πολυκλωνικών αντισωμάτων ενάντια στην Ιντεγκρίνη.

Θα ήταν παράλειψη εάν δεν ευχαριστούσα τον Καθηγητή Χρήστο Δελιδάκη για την αποδοχή συμμετοχής του στη διαδικασία αξιολόγησης της συγκεκριμένης μελέτης, το Δρ. Δημήτρη Καφετζόπουλο για την πρόθυμη συνεργασία και τις πολύτιμες συμβουλές του καθώς και τα μέλη των εργαστηριών τους που με συναδελφικότητα θέλησαν να μοιραστούν μαζί μου τα όποια προβλήματα προέκυψαν όλο αυτό το χρονικό διάστημα.

Θα ήθελα να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ στο Χάρη Χαλαμπαλάκη καθώς και στους Γιάννη Κουκλινό και Νεκτάριο Παπαδάκη για την πολύτιμη υπολογιστική στήριξη που απλόχερα παρείχαν όποτε και αν τους ζητήθηκε.

Σε προσωπικό επίπεδο θα ήθελα να εκφράσω τη βαθιά μου ευγνωμοσύνη στους γονείς μου Γεώργιο και Ειρήνη καθώς και στα αδέρφια μου Στυλιανό και Ανδρονίκη για την πολύτιμη ηθική και όχι μόνο συμπαράσταση που με αγάπη μου προσέφεραν μέχρι σήμερα. Ευχαριστίες ανήκουν επίσης σε όλους εκείνους που βρέθηκαν κοντά μου όλο αυτό το χρονικό διάστημα και με πίστη υπομονή και κατανόηση προσπάθησαν να με στηρίξουν όσο το δυνατόν περισσότερο.

Τελειώνοντας θα ήθελα να αφιερώσω αυτό το πρώτο μου δειλό βήμα στο χώρο της έρευνας στη μνήμη του παππού μου, του οποίου και το όνομα φέρω.

Μιχάλης Κοτσυφάκης
Ηράκλειο, Σεπτέμβριος 2000

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ελονοσία είναι μια από τις πιο θανατηφόρες νόσους των τροπικών χωρών. Προσβάλλει πάνω από 300 εκατομμύρια ανθρώπους παγκοσμίως και σκοτώνει 1-2 εκατομμύρια ανθρώπους κάθε χρόνο, κυρίως παιδιά από την Αφρική. Σε απόλυτους αριθμούς η ελονοσία σκοτώνει 3000 παιδιά κάτω της ηλικίας των 5 ετών την ημέρα και είναι παγκοσμίως από τις μεγαλύτερες παρασιτικές νόσους σκοτώνοντας περισσότερους ανθρώπους από οποιαδήποτε άλλη μεταδοτική νόσο, με εξαίρεση την φυματίωση. Αποτελεί κύριο δημόσιο πρόβλημα υγείας σε περισσότερες από 100 χώρες συνολικού αριθμού κατοίκων 2,4 δις, δηλαδή σχεδόν το μισό του παγκοσμίου πληθυσμού. Σε πολλές αναπτυσσόμενες χώρες κυρίως στην Αφρική η ελονοσία είναι μια νόσος που στοιχίζει ζωές, κόστος νοσηλείας και χαμένες εργατοώρες. Παρά το γεγονός ότι η ελονοσία τυπικά σχετίζεται μονάχα με τον αναπτυσσόμενο κόσμο και τις τροπικές χώρες, η γεωγραφική της κατανομή εκτείνεται πέρα από αυτές τις περιοχές και περιλαμβάνει περιστασιακά μικρά τμήματα της Ευρώπης και της Βορείου Αμερικής (Persidis A., 2000).

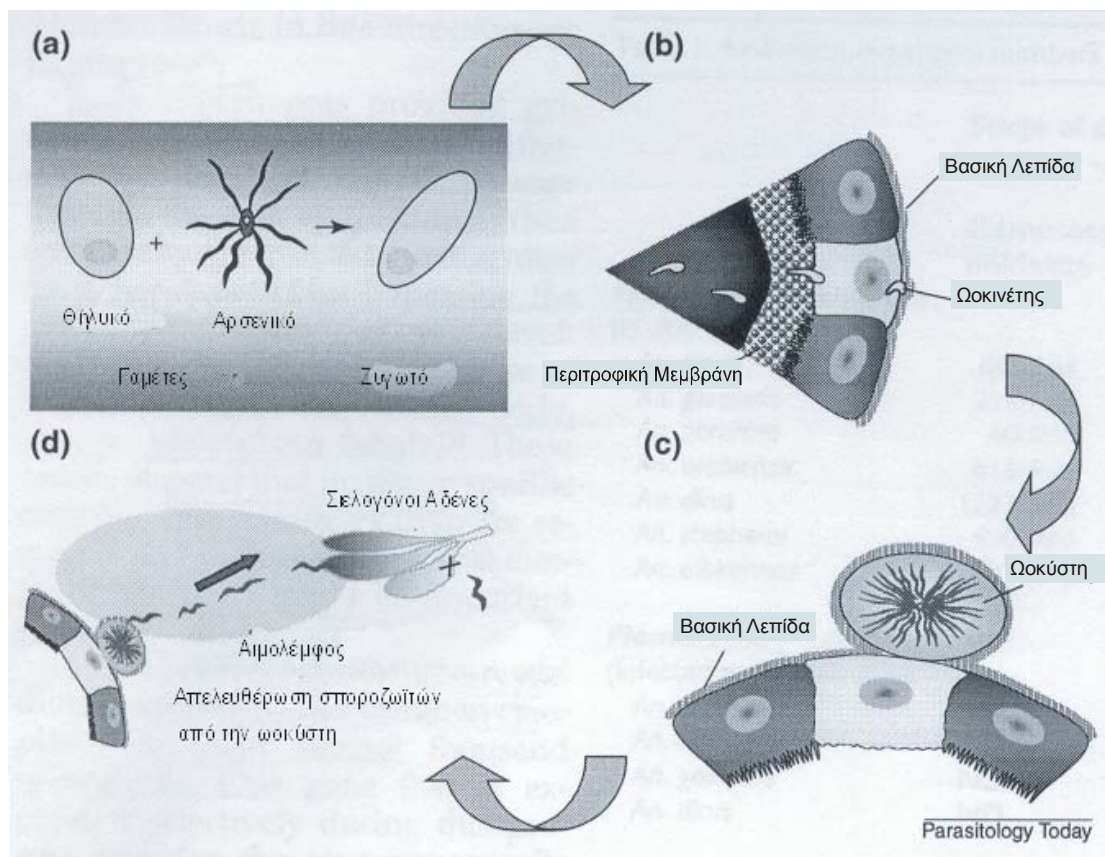
Η ελονοσία προκαλείται στους ανθρώπους από τέσσερα είδη του μονοκύτταρου παρασιτικού πρωτοζώου *Plasmodium*: τα *P.falciparum*, *P.vivax*, *P.ovale*, *P.malariae* με το *P.falciparum* να έχει τον κύριο λόγο σε μολύνσεις και να είναι το πιο θανατηφόρο. Παρά τις προσπάθειες να ελεγχθεί η νόσος τα αποτελέσματα είναι απογοητευτικά. Το παράσιτο έχει γίνει ανθεκτικό όχι μονάχα στα κλασσικά, αλλά και στα καλύτερα διαθέσιμα φάρμακα ενάντια στα παθογόνα της ελονοσίας. Ένας σχετικά μικρός αριθμός φαρμάκων ενάντια στην ελονοσία είναι διαθέσιμος σήμερα. Παρόλο που νέα φάρμακα έχουν εμφανιστεί τα τελευταία 20 χρόνια, όπως τα atovaquone, malarone, halofantrine, mefloquine, proguanil, artemisinin, είναι αναγκαία η ανάπτυξη νέων άκομα πιο δραστικών φαρμάκων με μειωμένο κόστος. Επιπλέον, κάποιο αποτελεσματικό εμβόλιο δεν έχει φτάσει ακόμα στην παραγωγή του. Αυτό

είναι ίσως αναμενόμενο εάν κάποιος σκεφτεί ότι το παράσιτο ζεί σε συνεχή επαφή με το ανοσολογικό σύστημα του ξενιστή και έχει αναπτύξει μηχανισμούς ώστε να καταφέρνει να ξεφεύγει από αυτό.

Μεταξύ των 5 περισσότερο θανατηφόρων μολυσματικών ασθενειών, μονάχα η ελονοσία απαιτεί κάποιο φορέα για να μεταδοθεί. Κατα το παρελθόν προσπάθειες να ελεγχθεί ο πληθυσμός των κουνουπιών είχε ως αποτέλεσμα τη δραματική μείωση των κρουσμάτων ελονοσίας. Όμως, η ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε εντομοκτόνα καθώς και περιβαλλοντικές καταστροφές, ανέστρεψαν αυτά τα πρώτα βήματα επιτυχίας, καθιστώντας πλέον τον έλεγχο του φορέα σε περιοχές εκτός Ευρώπης, αρκετά περίπλοκο. Έτσι εναλλακτικές προσεγγίσεις, όπως η τροποποίηση της ικανότητας μετάδοσης του φορέα πρέπει να ληφθούν σοβαρά υπ' όψη.

Η ελονοσία μεταδίδεται από τον ένα σπονδυλωτό ξενιστή στον άλλο μέσω ενός κουνουπιού φορέα, με τα κουνούπια του γένους *Anopheles* να αποτελούν τους φορείς της ανθρώπινης ελονοσίας. Παράσιτα του γένους *Plasmodium* υφίστανται στο κουνούπι το σεξουαλικό τμήμα της ζωής τους. Η αλληλουχία των γεγονότων ξεκινά όταν ένα κουνούπι, τσιμπώντας κάποιο μολυσμένο σπονδυλωτό, πίνει αίμα πλούσιο σε γαμετοκύτταρα, τα οποία ακολουθούν ένα πολύπλοκο πρόγραμμα διαφοροποίησης σε αυτό (Billingsley et al., 1997). Αυτό περιλαμβάνει διαφοροποίηση σε έξι εντελώς διαφορετικές μορφές, μορφολογικά διακριτές μεταξύ τους: σε αρσενικούς και θηλυκούς γαμέτες, ζυγωτό, ωοκινέτες, ωοκύστεις και σποροζωΐτες. Δηλαδή, αμέσως μετά την αιμοποσία, τα γαμετοκύτταρα διαφοροποιούνται σε αρσενικούς και θηλυκούς γαμέτες, από τους οποίους προκύπτει το ζυγωτό μονάχα μέσα σε μερικές ώρες (Beier JC, 1998, Sinden RE, 1999). Το ζυγωτό με την σειρά του, διαφοροποιείται σε ωοκινέτες στο μεσέντερο του κουνουπιού. Οι ωοκινέτες που προκύπτουν διασχίζουν ένα κάλυμα που περιβάλλει το μεσέντερο και καλείται περιτροφική μεμβράνη. Πρόκειται για ένα παχύ, μη κυτταρικό κάλυμμα που εκκρίνεται από μεσεντερικά επιθηλιακά κύτταρα, ως απόκριση στην κυτταρική διάταξη που προκαλείται μετά την πόση του αίματος. Περιβάλλει τον βόλο του αίματος και είναι φτιαγμένο από ένα δίκτυο χιτίνης,

στο οποίο προστίθενται διάφορες πρωτεΐνες και γλυκοζαμινογλυκάνες (Jacobs-Lorena et al., 1996, Tellam, 1996, Moskalyk, 1996). Το πόσο πορώδες και παχύ είναι αυτό το δίκτυο φαίνεται να καθορίζεται από την ελεγχόμενη έκφραση κουνουπίσιων χιτινασών από τα επιθηλιακά κύτταρα του μεσεντέρου (Shen et al., 1997). Επόμενο βήμα των ωοκινετών είναι να διασχίσουν το μεσεντερικό επιθήλιο και τελικά να καταλήξουν στην πλευρά του επιθηλίου προς το αιμόκοιλο ακριβώς κάτω από τη βασική λεπίδα. Εκεί μεταπίπτουν σε ωοκύστες, οι οποίες υφίστανται 13 γύρους πυρηνικών διαιρέσεων και τελικά παράγουν 3 με 4 χιλιάδες σποροζωΐτες (Rosenberg et al., 1991). Οι σποροζωΐτες απελευθερώνονται στο αιμόκοιλο και με την σειρά τους διεισδύουν στους σιελογόνους αδένες. Στο επόμενο τσίμπημα του κουνουπιού μεταφέρονται με το σάλιο, στο νέο σπονδυλωτό ξενιστή, δύο περίπου εβδομάδες μετά από το τσίμπημα του κουνουπιού στον πρώτο μολυσμένο ξενιστή (Σχήμα 1).



Σχήμα 1: Ο κύκλος ζωής του παρασίτου στο κουνούπι (Parasitology Today vol.16)

Κατά την διάρκεια αυτής της διαδικασίας διαφοροποίησης στο κουνούπι, το παράσιτο πρέπει να ξεπεράσει έναν αριθμό στενωπών (Vaughan, 1992,

1994, 1994, Rosenberg, 1991). Αυτοί οι σημαντικοί στενωποί που περνάει ο πληθυσμός του παρασίτου υποδεικνύουν ότι η διαφοροποίησή του περιορίζεται αυστηρά από το περιβάλλον του κουνουπιού και κατά συνέπεια από τις αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ φορέα και παρασίτου (Sinden, 1999). Συνεπώς η συνολική σπορογονική εξέλιξη του πλασμοδίου εξαρτάται άμεσα από τα αποτελέσματα μιας αμφίδρομης σχέσης αλληλεπίδρασης μεταξύ του παρασίτου και του κουνουπιού φορέα.

Το στάδιο των ωοκινετών (Σχήμα 2) είναι ένα από τα πιο σημαντικά στον κύκλο ζωής του παρασίτου στο κουνούπι. Οι ωοκινέτες είναι μορφολογικά και βιοχημικά διακριτοί από τα προηγούμενα σεξουαλικά στάδια, δηλαδή τα γαμετοκύτταρα και το ζυγωτό και από τα επόμενα στάδια, δηλαδή τις ωοκύστες και τους σποροζωίτες. Είναι αυτό το στάδιο που επιτρέπει στο παράσιτο να αποδράσει από το σφιχτά πακεταρισμένο βόλο αίματος, να διασχίσει τον περιτροφικό υμένα, να είναι προστατευμένο από το πεπτικό περιβάλλον του μεσεντέρου και να διεισδύσει στο μεσεντερικό επιθήλιο. Η επιτυχία κάθε μιας από αυτές τις δραστηριότητες φαίνεται να εξαρτάται από βιοχημικούς και φυσικούς φραγμούς που προβάλλει το κουνούπι, όπως η πυκνότητα του βόλου αίματος, το πάχος του περιτροφικού υμένα, η ενεργότητα πρωτεόλυσης στο μεσέντερο και άλλα. Όμως σπουδαίο ρόλο φαίνεται να διαδραματίζει και η ικανότητα του ωοκινέτη να ξεπερνά αυτούς τους φραγμούς. Η κινητικότητα του ωοκινέτη, η έκκριση χιτινασών, η ανθεκτικότητα έναντι πεπτικών ενζύμων και η αναγνώριση και επακόλουθη διείσδυση του μεσεντερικού επιθηλίου, φαίνεται να παίζουν θεμελιώδη ρόλο στην επίτευξη της τελικής μεταμόρφωσής του σε ωοκύστη (Shahabuddin, 1998).



Σχήμα 2

Ωοκινέτης σε σχήμα μπανάνας ανάμεσα σε αιμοκύτταρα.

(Φωτογραφία από την Inga Siden-Kiamos)

Ειδικότερα η κινητικότητα του ωοκινέτη, φαίνεται να εξαρτάται από μόρια της επιφάνειάς του τα οποία έχουν την ικανότητα να συνδέονται και να αλληλεπιδρούν, μέσω της κυτταρικής μεμβράνης, με το δίκτυο ακτίνης-μυοσίνης και μικροσωληνίσκων (Dubremetz et al, 1979, Russel,1983). Για το τρόπο όμως με τον οποίο οι ωοκινέτες βρίσκουν τον δρόμο από το εσωτερικό της μάζας του αίματος προς το επιθήλιο διαθέσιμες πληροφορίες δεν υπάρχουν. Είναι τυχαία ή κατευθυνόμενη η μετακίνησή τους;

Αν και κάποιες πρωτεΐνες της επιφάνειας του ωοκινέτη έχουν ήδη ταυτοποιηθεί, η διαδικασία διείσδυσης στο μεσεντέριο τοίχωμα των ανωφελών από το παράσιτο έχει μόλις αρχίσει να μελετάται (Cociancich et al., 1999, Ramasamy et al., 1997, Zieler et al., 1998). Αιτία αυτής της καθυστέρησης στην άντληση πληροφορίας είναι η δυσκολία να μελετηθούν με λεπτομέρεια τα γεγονότα που λαμβάνουν χώρα στο ή εντός του τοιχώματος του κουνουπίσιου μεσεντέρου. Από την άλλη μεριά έχει αναφερθεί η ικανότητα των ωοκινετών να διεισδύουν σε ένα μεγάλο εύρος κυττάρων *in vitro* όπως ερυθροκύτταρα και κυτταρικές σειρές από έντομα φορείς- μη φορείς της ελονοσίας (Sinden, 1978). Η *in vitro* ανάπτυξη ωοκυστών έχει επίσης παρατηρηθεί σε ανάλογο εύρος κυτταρικών σειρών και έχει περιγραφεί από πολλά εργαστήρια (Warburg et al., 1992, 1993, Beier et al., 1998), ενώ πρόσφατα έχει αναπτυχθεί και ένα *in vitro* σύστημα καλλιέργειας των πρώιμων σπορογονικών σταδίων του *Plasmodium berghei* (Siden-Kiamos et al., 2000). Το συγκεκριμένο σύστημα χρησιμοποιεί κυτταρικές σειρές εντόμων, φορέων ή μη της ελονοσίας, που

έχουν αναπτυχθεί σε συγκεκριμένες συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας και επιτρέπει την μελέτη τόσο της εισόδου των ωοκινετών στο κύτταρο, όσο και της περαιτέρω ανάπτυξής του σε ωοκύστες. Δηλαδή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την μελέτη αναπτυξιακών γεγονότων του παρασίτου που κανονικά λαμβάνουν χώρα στο μεσέντερο του κουνουπιού.

Από όλα τα παραπάνω, είναι δύσκολο να αρνηθεί κανείς ότι υπάρχουν μόρια ειδικά σε κάθε κύτταρο, που έχουν την ικανότητα να συνδέονται και να αλληλεπιδρούν με τον ωοκινέτη. Ειδικότερα η διείσδυση του παρασίτου, πρέπει να καθορίζεται απο αλληλεπιδράσεις τύπου υποδοχέα-προσδέτη μεταξύ μορίων επιφανείας και όχι μόνο, τόσο του παρασίτου, όσο και του εντόμου. Πολύ λίγα είναι γνωστά για αυτές τις αλληλεπιδράσεις παρόλο που φαίνεται οτι ρόλο κατέχουν και σάκχαρα (Miller et al., 1993). Με σκοπό να εντοπισθούν πιθανές αλληλεπιδράσεις των ωοκινετών κατά την επάφη και επακόλουθη διείσδυσή τους σε κύτταρα εντόμων, εφαρμόστηκε η τεχνική του gel overlay. Σύμφωνα με αυτή, φίλτρα που φέρουν το σύνολο των πρωτεϊνών κυττάρων από τρεις διαφορετικές κυτταρικές σειρές εντόμων, επωάζονται με ωοκινέτες, έτσι ώστε να αποκαλυφθούν τελικά μονάχα εκείνες οι πρωτεΐνες που έχουν την ικανότητα αλληλεπίδρασης με ωοκινέτες. Ανάλογη τεχνική έχει εφαρμοστεί με επιτυχία και στο πρωτόζωο *Toxoplasma gondii*, φέρνοντας στο φώς μόρια κλειδιά στην διαδικασία μόλυνσης των κυττάρων του ξενιστή του (Ortega-Barria et al., 1999).

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Κυτταροκαλλιέργειες

Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αυτές στις οποίες είχε παρατηρηθεί από τους Siden-Kiamos et al.(2000), *in vitro* διείσδυση ωοκινετών. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες : η S2 απο *Drosophila melanogaster* (Schneider I.,1972), η Mos 20 από *Aedes aegypti* (Singh KR, 1971), και η 4a- 3A από *Anopheles gambiae* (Muller et al., 1999), που ευγενικά παραχωρήθηκε από τον Δρ.Hans-Michael Muller (EMBL, Χαιδελβέργη). Τα κύτταρα S2 καλλιεργήθηκαν σε Shields and Sang M3 Insect θρεπτικό υλικό, και τα 4a-3A σε Schneider's θρεπτικό υλικό, τα οποία και τα δύο αγοράστηκαν από την Sigma, ενώ το θρεπτικό υλικό 199 για τα Mos 20 είναι της Gibco BRL. Όλες οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε θερμοκρασία 25⁰C.

Διαδικασία παρασκευής φίλτρων, που φέρουν πρωτεΐνες κυττάρων από κυτταρικές σειρές εντόμων.

Ο προσδιορισμός του μεγέθους του πληθυσμού των κυττάρων γίνεται με χρήση αιμοκυτταρόμετρου Neubauer και μικροσκοπίου. Επακολούθως ρυθμίζεται η συγκέντρωση των κυττάρων σε 120.000 κύτταρα/ μl PBS και γίνεται κατεργασία με υπερήχους, εάν και εφόσον απαιτείται ο διαχωρισμός διαλυτών-μη διαλυτών κλασμάτων.Ο διαχωρισμός διαλυτών-μη διαλυτών κλασμάτων επιτυγχάνεται με φυγοκέντρωση σε φυγόκεντρο τύπου Eppendorf , στις 15.000 στροφές για 10 λεπτά. Επόμενο βήμα είναι η προσθήκη ίσου όγκου 2x sample buffer στο οποίο δεν έχει προστεθεί β-μερκαπτοαιθανόλη έτσι ώστε να εξασφαλισθούν όσο το δυνατόν λιγότερο αποδιατακτικές για τις πρωτεΐνες συνθήκες.

Η σύσταση του 2x sample buffer είναι: 0,0625 M Tris-HCl pH 6,8,

20% glycerol

2% SDS

μερικοί κόκκοι bromophenol blue

Στην συνέχεια τα δείγματα βράζονται για 5 λεπτά στους 100°C, και με μια φυγοκέντρηση 10 λεπτών σε φυγόκεντρο τύπου Eppendorf στις 15.000 στροφές απομακρύνεται οτιδήποτε δεν έχει διαλυθεί. Τα δείγματα μπορούν να διατηρηθούν στους -20°C για όσο χρόνο είναι αυτό απαραίτητο, αρκεί κάθε φορά πρό του φορτώματος σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου, να προηγείται ένα σύντομο βράσιμο διάρκειας 5 λεπτών. Το πήκτωμα ακρυλαμιδίου παρασκευάζεται κατά Laemmli, δηλαδή αποτελείται απο 2 διαφορετικές περιοχές. Η πρώτη περιοχή που καλείται πήκτωμα συγκέντρωσης των δειγμάτων έχει σύσταση:

4% acrylamide/bis acrylamide 30 : 0,8

0,03 M Tris-HCl, pH 6,8

0,1% ammonium persulfate

0,2% TEMED

Η δεύτερη περιοχή που καλείται πήκτωμα διαχωρισμού των δειγμάτων έχει σύσταση :

10% acrylamide/bis acrylamide 30 : 0,8

0,375 M Tris-HCl, pH 8,8

0,1% ammonium persulfate

0,05% TEMED

Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε διάλυμα σύστασης :

0,3% Tris base

1,44% glycine

0,1% SDS

και χρησιμοποιείται η συσκευή Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell της BIORAD.

Μέχρι τα δείγματα να ξεπεράσουν το πήκτωμα συγκέντρωσης , η συσκευή διαρρέεται απο ρεύμα εντάσεως 15-20 mA, ενώ στην συνέχεια η ένταση του ρεύματος αυξάνεται στα 25-30 mA.

Ακολουθεί μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF, η οποία έχει προηγουμένως κατεργασθεί για 30 δευτερόλεπτα έως 1 λεπτό με μεθανόλη. Για την μεταφορά των πρωτεϊνών χρησιμοποιείται η συσκευή LKB-NovaBlot

της Pharmacia και η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής : δύο χαρτιά Whatmann πάχους 3 χιλιοστών και επιφανείας 6x9 εκατοστών εμποτίζονται σε διάλυμα συστάσεως

3,625 % Tris base

20% μεθανόλη

και τοποθετούνται στο κάτω μέρος της συσκευής. Πάνω τους τοποθετούνται άλλα δύο χαρτιά Whatmann ίδιου μεγέθους εμποτισμένα σε διάλυμα

συστάσεως 0,3 % Tris base

20% methanol

καθώς και η κατεργασμένη με μεθανόλη μεμβράνη, αφού προηγουμένως έχει εμποτισθεί στο ίδιο διάλυμα. Στην συνέχεια τοποθετείται το πήκτωμα που φέρει τις προς μεταφορά πρωτεΐνες, καθώς και τέσσερα ίδιου μεγέθους χαρτιά Whatmann εμποτισμένα σε διάλυμα συστάσεως :

0,52% ε-αμινοκαπροϊκό οξύ

20% μεθανόλη

Η διάρκεια της μεταφοράς είναι μία ώρα, κατα την οποία η συσκευή διαρρέεται απο ρεύμα εντάσεως 43mA. Η συγκεκριμένη τιμή έντασης προκύπτει σύμφωνα με τον κανόνα ότι κάθε τετραγωνικό εκατοστό της επιφάνειας του φίλτρου πρέπει να πολλαπλασιαστεί με την τιμή 0,8 ώστε να προκύψει η τελική ένταση του ρεύματος που θα διαρρέει την συσκευή. Όταν πλέον η μεταφορά έχει ολοκληρωθεί η μεμβράνη που φέρει τις πρωτεΐνες φυλάσσεται στους 4⁰C.

Διαδικασία παρασκευής φίλτρων που φέρουν μεσεντέριες πρωτεΐνες από τα έντομα *Drosophila melanogaster* και *Anopheles stephensi*.

Με τη βοήθεια στερεοσκοπίου μεσέντερα από *Drosophila melanogaster* και *Anopheles stephensi* απομονώνονται σε PBS με 1mM PMSF. Περίπου 70 μεσέντερα από κάθε οργανισμό διαλύονται σε 140 μl PBS με 1mM PMSF και ακολουθεί προσθήκη ίσου όγκου 2x sample buffer στο οποίο δεν έχει προστεθεί β-μερκαπτοαιθανόλη. Η διαδικασία που ακολουθείται στη

συνέχεια είναι απολύτως όμοια με αυτήν της παρασκευής φίλτρων που φέρουν πρωτεΐνες από κυτταρικές σειρές εντόμων και αναφέρθηκε παραπάνω.

Διαδικασία παρασκευής φίλτρων που φέρουν πρωτεΐνες από ωοκινέτες του παρασίτου *Plasmodium berghei*.

Για να δοκιμασθεί η ικανότητα των αντισωμάτων 12.1 και 13.1 να προσδένονται στην πρωτεΐνη επιφανείας P28 των ωοκινετών του παρασίτου *Plasmodium berghei* είναι απαραίτητη η παρασκευή φίλτρων που φέρουν το σύνολο των πρωτεϊνών τους. Για το σκοπό αυτό 2.000.000 ωοκινέτες διαλύονται σε 100 μl PBS και προστίθεται ίσος όγκος 2x sample buffer στο οποίο δεν έχει προστεθεί β-μερκαπτοαιθανόλη. Η διαδικασία που ακολουθείται στη συνέχεια είναι απολύτως όμοια με αυτήν της παρασκευής φίλτρων που φέρουν πρωτεΐνες από κυτταρικές σειρές εντόμων και αναφέρθηκε παραπάνω.

Δοκιμή ικανότητας πρόσδεσης των μονοκλωνικών αντισωμάτων 12.1 και 13.1 σε φίλτρα που φέρουν πρωτεΐνες από ωοκινέτες του παρασίτου *Plasmodium berghei*.

Προκειμένου να δοκιμασθεί η ικανότητα των αντισωμάτων 12.1 και 13.1 να προσδένονται στον επίτοπο P28 των ωοκινετών, επωάζονται με φίλτρα που φέρουν το σύνολο των πρωτεϊνών από ωοκινέτες του παρασίτου *P. berghei*. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής :

τα φίλτρα μπλοκάρονται για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με 5% άπαχο γάλα σκόνη διαλυμένο σε PBS και επωάζονται με τα αντισώματα για μία ώρα στην ίδια θερμοκρασία. Η επώαση γίνεται σε TTBS, με την βοήθεια αναδεδυμένου επωαστήρα και ακολουθούν τρία 15 λεπτα πλυσίματα με TTBS σε θερμοκρασία δωματίου. Εφόσον το αντίσωμα που δοκιμάζεται είναι το 12.1 συνδεδεμένο με HRP, τότε ακολουθεί η έκθεση του φίλτρου σε φωτογραφικό φιλμ και η εμφάνιση σύμφωνα με όσα αναφέρονται παρακάτω. Διαφορετικά είναι απαραίτητο να προστεθεί και δεύτερο αντίσωμα, goat anti-

mouse IgG το οποίο είναι συνδεδεμένο με HRP(BIORAD), αραιωμένο σε TTBS. Η επώαση διαρκεί 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και ακολουθούν τέσσερα δεκαπεντάλεπτα πλυσίματα με TTBS επίσης στις ίδιες συνθήκες, πριν ξεκινήσει η διαδικασία έκθεσης του φίλτρου σε φωτογραφικό φιλμ.

Καλλιέργειες παρασίτου (Crampton et al., 1997)

Χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος του παρασίτου *P. berghei* με ονομασία κλώνος 2.34. Πρόκειται για στέλεχος αγρίου τύπου που προκαλεί ελονοσία σε ποντικούς και χρησιμοποιείται ευρέως για την πειραματική μελέτη της ανθρώπινης ελονοσίας, δεδομένου ότι είναι εντελώς ακίνδυνο για τον άνθρωπο, παρέχοντας έτσι μεγαλύτερη ασφάλεια σε αυτούς που το χειρίζονται. Επιπλέον πρόκειται για το ίδιο παράσιτο που χρησιμοποιήθηκε από τους Siden-Kiamos et al.(2000) και δείχθηκε ότι στο στάδιο των ωοκινετών *in vitro* διεισδύει και περαιτέρω διαφοροποιείται σε ωοκύστεις στις ανωτέρω αναφερόμενες κυτταρικές σειρές.

Ως πειραματόζωα χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια του στελέχους ΤΟ (Theiler's Original) ηλικίας περίπου 6-8 εβδομάδων και αυτό γιατί ποντίκια μεγαλύτερης ηλικίας δεν επιτρέπουν την επίτευξη υψηλών ποσοστών παρασιταϊμίας και την αυξημένη ανάπτυξη γαμετοκυττάρων (Dyer et al., 2000). Δύο με τρεις μέρες πριν την μόλυνση τους ενίονται ενδοπεριτοναϊκά με 200 μl φαινυλδραζίνης συγκεντρώσεως 6mg/ml. Αυτό γίνεται γιατί το *P.berghei* προτιμάει να προσβάλλει τα δικτυοερυθροκύτταρα του ποντικού. Με τη χορήγηση φαινυλδραζίνης, τα ερυθροκύτταρα του ποντικίου λύνονται, επάγοντας τη δικτυοερυθροκυττάρωση, άρα και την ταχύτερη ανάπτυξη του παρασίτου, με συνέπεια την αυξημένη παρουσία γαμετοκυττάρων στο αίμα του ποντικίου σε μικρότερο χρόνο. Αν και ο συγκεκριμένος χειρισμός μπορεί να γίνει 1-5 μέρες πριν την μόλυνση, η επιλογή της δεύτερης-τρίτης μέρας φαίνεται να δίνει τα καλύτερα αποτελέσματα. Η φαινυλδραζίνη αγοράστηκε από την SIGMA και διαλύθηκε σε PBS στην ανωτέρω συγκέντρωση.

Διαλυμένη φυλάσσεται στους -20°C για μεγάλο χρονικό διάστημα. Η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος PBS είναι η ακόλουθη:

8 gr NaCl

0,2 gr KCl

1,15 gr Na_2HPO_4

0,2 gr KH_2PO_4

ρύθμιση pH στο 7,2 και προσθήκη νερού μέχρι τελικού όγκου 1 lt.

Το ποντίκι μολύνεται με ενδοπεριτοναϊκή ένεση 100-200 μl μολυσμένου αίματος με παρασιταϊμία τουλάχιστον 5-10%. Εάν η μόλυνση γίνει με χαμηλές δόσεις παρασίτων ελονοσίας, τότε είναι πολύ πιθανόν το ποντίκι να παρουσιάσει εγκεφαλική ελονοσία. Αμέσως μετά τη μόλυνση, το ποντίκι επανέρχεται στο κλουβί και καλύπτεται με ειδικό δίχτυ, έτσι ώστε να αποφευχθεί η τυχαία μετάδοση ελονοσίας στο φυσικό πληθυσμό των ποντικιών από κάποιο ενδεχόμενο τσίμπημα κουνουπιού.

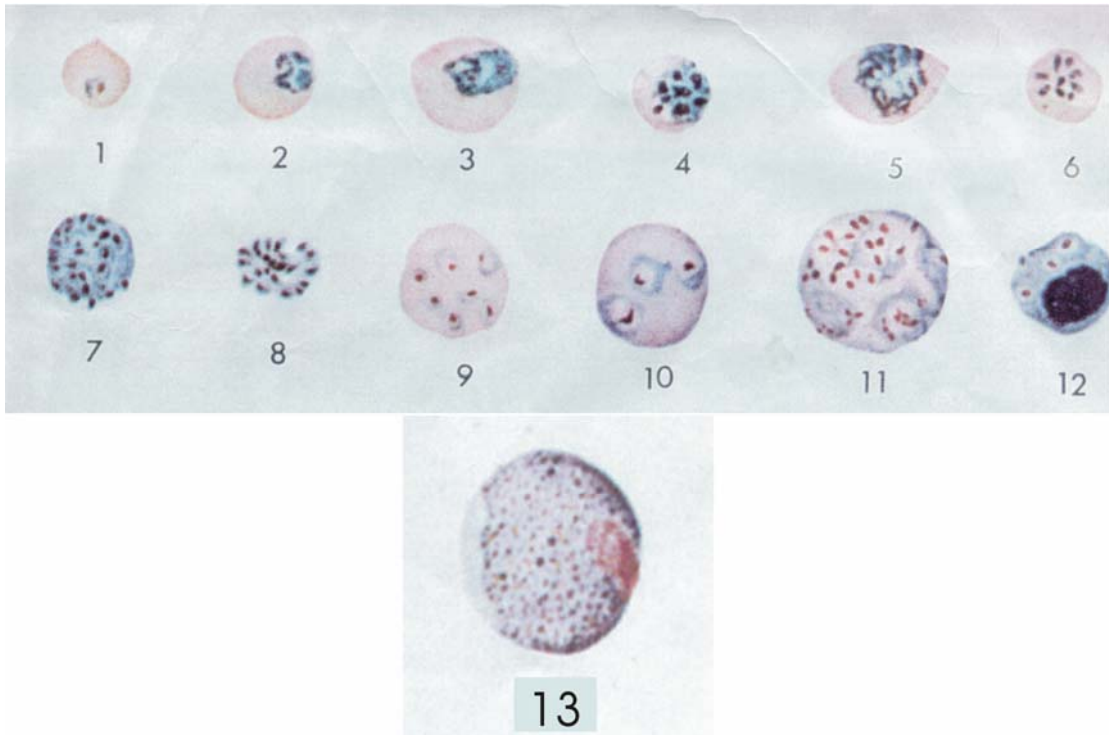
Αφού περάσουν 70-100 ώρες από την στιγμή της μόλυνσης, γίνεται εκτίμηση του βαθμού με τον οποίο το παράσιτο έχει αναπτυχθεί στο ποντίκι. Για αυτό τον σκοπό κόβεται η άκρη της ουράς του ποντικιού και μια σταγόνα αίματος τοποθετείται σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Χρησιμοποιώντας άλλη αντικειμενοφόρο, το στρώμα του αίματος γίνεται όσο το δυνατόν πιο λεπτό. Ακολουθεί μονιμοποίηση με μεθανόλη για 30 sec και έπειτα χρώση με χρωστική Giemsa για 10 λεπτά. Για να γίνει η χρώση Giemsa, χρησιμοποιείται Giemsa stain αραιωμένη 10 φορές σε Giemsa wash buffer σύστασης :

0.1% Na_2HPO_4

0.07% KH_2PO_4

pH 7.2

Τέλος η αντικειμενοφόρος ξεπλένεται με άφθονο νερό βρύσης και αφήνεται να στεγνώσει, ώστε με την προσθήκη κεδρέλαιου να παρατηρηθεί στο μικροσκόπιο σε 1000 φορές μεγέθυνση. Σκοπός της συγκεκριμένης παρατήρησης είναι όχι μόνο να εκτιμηθεί το ποσοστό της παρασιταϊμίας, αλλά να παρατηρηθούν και τα διάφορα στάδια που το παράσιτο περνάει στο σπονδυλωτό ξενιστή του (Σχήμα 3).



Σχήμα 3 : Μη σεξουαλικά στάδια του *P. berghei* σε ώριμα ερυθροκύτταρα (1-8) και σε δικτυοερυθροκύτταρα (9-12) από τους Corradeti – Verolini (1951). Γαμετοκύτταρο του *P. berghei* (13) από την Mme I. Landau

Το αίμα είναι έτοιμο για καλλιέργεια μονάχα εάν περισσότερα από το 20% των ερυθροκυττάρων έχουν μολυνθεί από το παράσιτο και επιπλέον παρατηρείται και ικανοποιητικός αριθμός γαμετοκυττάρων.

Εφ'όσον τηρούνται οι ανωτέρω προϋποθέσεις, τότε ακολουθεί αιμοληψία από το ποντίκι και επακόλουθη καλλιέργεια του αίματος ώστε τελικά να παραχθούν από αυτό ωοκινέτες. Η διαδικασία έχει ως εξής : το ποντίκι αναισθητοποιείται με ενδομυϊκή ένεση στο μηρό 100 μl, αναισθητικού μείγματος Rompun και Vetalar. Το αναισθητικό μείγμα προκύπτει προσθέτοντας σε 1,3 ml αποστειρωμένο νερό 0,5 ml Rompun 2% και 1,2 ml Vetalar συγκεντρώσεως 100 mg/ml και διατηρείται στους 4⁰C για τουλάχιστον 2 εβδομάδες.

Αφού περάσει λίγος χρόνος μέχρι το ποντίκι να κοιμηθεί, αφαιρείται από αυτό περίπου 1ml αίματος απευθείας από την καρδιά με χρήση σύριγγας 1 ml η οποία περιέχει 100 μl ηπαρίνης έτσι ώστε να αποφευχθεί η πήξη του αίματος. Η ηπαρίνη (SIGMA) έχει προηγουμένως διαλυθεί σε 0,9 % PBS ενώ

διατηρείται στους -20°C . Μια καλή αιμοληψία δεν απαιτεί μονάχα χαμηλή θερμοκρασία, περίπου $20-22^{\circ}\text{C}$, αλλά πολλές φορές και περικαρδιακές μαλάξεις, ενώ θα πρέπει να έχει εντοπιστεί και με μεγάλη ακρίβεια ο χώρος της καρδιάς .

Επακολούθως το αίμα περνάει από στήλη κυτταρίνης CF11, όγκου 2 ml. Αυτό το βήμα γίνεται ώστε να απομακρυνθούν τα λευκά αιμοσφαίρια από το αίμα και έτσι να παύσουν να παρεμποδίζουν την περαιτέρω διαφοροποίηση του παρασίτου σε ωοκινέτες. Αφού το αίμα έχει περάσει από τη στήλη, διαλύεται σε 10 ml μέσου καλλιέργειας ωοκινετών RPMI-1640 και καλλιεργείται σε θερμοκρασία 19°C . Η διαδικασία παρασκευής του RPMI είναι η ακόλουθη: σε 900 ml νερού προστίθενται 16,4 gr RPMI-1640 με HEPES (25mM) και γλουταμίνη (2mM), που προμηθεύονται από την SIGMA. Επίσης προστίθενται 2 gr NaHCO_3 , 10 ml Penicilin (5000 units/ml)/ Streptomycin (5 mg/ml) και 50 mg Hypoxanthine. Το pH ρυθμίζεται στο 8 με NaOH και αφού γίνει η απαραίτητη αποστείρωση, προστίθεται 10% του συνολικού όγκου αποστειρωμένο fetal calf serum. Στα πρώτα 20 λεπτά της καλλιέργειας γίνεται δειγματοληψία και επακόλουθη παρατήρηση στο μικροσκόπιο σε 400 φορές μεγέθυνση, ώστε να ελεγχθεί εάν έχει γίνει το φαινόμενο της απομαστίγωσης. Κατά την απομαστίγωση κυρίως παρατηρούνται κέντρα βίαιης κίνησης και ακολουθεί η απελευθέρωση ανεξάρτητων κινούμενων μαστιγίων, σημάδια της παρουσίας βιώσιμων αρσενικών γαμετοκυττάρων. Εάν αυτό παρατηρηθεί, τότε ένα κρίσιμο βήμα για την τελική παραγωγή ωοκινετών έχει επιτευχθεί.

Με τη συμπλήρωση 18-24 ωρών καλλιέργειας γίνεται δεύτερη δειγματοληψία και παρατήρηση στο μικροσκόπιο σε 400 φορές μεγέθυνση, ώστε να διαπιστωθεί εάν υπάρχουν καλά σχηματισμένοι και ώριμοι ωοκινέτες (Σχήμα 2). Είναι η απαραίτητη προϋπόθεση για να ξεκινήσει η διαδικασία απομόνωσής τους. Χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά πρωτόκολλα εργασίας για αυτό τον σκοπό.

Σύμφωνα με το πρώτο, το υλικό της καλλιέργειας φυγοκεντρείται στις 2.000 στροφές σε φυγόκεντρο Beckman για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Αφού απομακρυνθεί το υπερκείμενο, το ίζημα επαναδιαλύεται σε

0,5 ml PBS και μεταφέρεται σε αποστειρωμένο σωληνάκι τύπου erpendorf. Στην συνέχεια προστίθενται 2,5 ml μονοκλωνικού αντισώματος ενάντια στην επιφανειακή πρωτεΐνη του ωοκινέτη P28, το οποίο φέρει και μαγνητικά σφαιρίδια (DynabeadΣ). Γίνεται επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, κατά την διάρκεια της οποίας ο σωλήνας αναδεύεται. Επακολούθως ο σωλήνας τοποθετείται σε μαγνητική θήκη Dynal MPC (Magnetic Particle Concentrator), όπου αφήνεται για 5 λεπτά και μετά το υπερκείμενο απομακρύνεται. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 0,5 ml PBS και τοποθετείται ξανά στην μαγνητική θήκη για 5 λεπτά. Αφού αφαιρεθεί προσεκτικά το υπερκείμενο, το ίζημα επαναδιαλύεται σε 0,25-0,5 ml PBS.

Σύμφωνα με το δεύτερο πρωτόκολλο για την απομόνωση ωοκινετών, το υλικό της καλλιέργειας φυγοκεντρείται στις 2000 στροφές, για 8 λεπτά, στους 4⁰C. Αφού αφαιρεθεί το υπερκείμενο, προστίθενται 10 ml παγωμένου NH₄Cl και διατηρείται στον πάγο για 10-15 λεπτά. Το NH₄Cl συμβάλλει στο να λυθούν τα ερυθροκύτταρα. Στην συνέχεια προστίθενται 10 ml PBS ώστε να σταματήσει η λύση των ερυθροκυττάρων και ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 2000 στροφές για 8 λεπτά στους 4⁰C. Αφού αφαιρεθεί το υπερκείμενο, γίνεται επαναδιάλυση του ιζήματος σε 10 ml PBS και επαναφυγοκέντρωση στις 2000 στροφές για 8 λεπτά στους 4⁰C. Το ίζημα που προκύπτει επαναδιαλύεται σε 2,5 ml PBS και τοποθετείται σε σωλήνα χωρητικότητας 15 ml μαζί με 5 ml Nycodenz. Η τοποθέτηση πρέπει να γίνει αρκετά προσεκτικά ώστε το επαναδιαλυθέν ίζημα να σχηματίσει στοιβάδα στα όρια της επιφάνειας επαφής με το διάλυμα Nycodenz. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 2000 στροφές, για μισή ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου. Όλες οι ανωτέρω αναφερόμενες φυγοκεντρήσεις γίνονται σε φυγόκεντρο Beckman. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης οι ωοκινέτες έχουν μαζευτεί και έχουν σχηματίσει μια καφέ-μαύρη μεσόφαση η οποία πρέπει με μεγάλη προσοχή να αφαιρεθεί με την βοήθεια πιπέτας pasteur και να μεταφερθεί σε καθαρό σωλήνα. Στην συγκεκριμένη μέθοδο το NH₄Cl που χρησιμοποιείται είναι 0,17 M και φυλάσσεται πάντα στους 4⁰C, ενώ για την παρασκευή του διαλύματος Nycodenz η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής : 17 gr σκόνης

Nycodenz (SIGMA) διαλύονται σε 100 ml Nycodenz buffer, αναδεύοντας σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου μία ώρα. Όταν πλέον έχει διαλυθεί καλά φυλάσσεται για όσο χρειαστεί σε θερμοκρασία δωματίου. Το Nycodenz buffer έχει την εξής σύσταση :

0,06 % Tris-HCl

0,0122 % CaNaEDTA

0,022 % KCl

και το pH του ρυθμίζεται στο 7,5.

Είτε χρησιμοποιηθεί η πρώτη είτε η δεύτερη μέθοδος απομόνωσης ωοκινετών, απαιτείται ο προσδιορισμός της τελικής συγκέντρωσης των ωοκινετών. Αυτό γίνεται με την βοήθεια αιμοκυτταρόμετρου Neubauer. Συγκεκριμένα σε 25 διαγραμμισμένα τετράγωνα καταγράφεται ο συνολικός αριθμός ωοκινετών που μπορεί να παρατηρηθεί στο μικροσκόπιο σε 400 φορές μεγέθυνση. Ο συγκεκριμένος αριθμός αντιστοιχεί σε όγκο 0,1 μl διαλύματος. Άρα για να υπολογιστεί η τελική συγκέντρωση ωοκινετών ανα ml διαλύματος πρέπει ο αριθμός αυτός να πολλαπλασιαστεί με το 10^4 .

Πρέπει να τονισθεί ξανά ότι το συγκεκριμένο παράσιτο της ελονοσίας δεν προσβάλλει τον άνθρωπο και το αίμα του ποντικιού θεωρείται επίσης αβλαβές. Παρόλα αυτά τα ποντίκια και οι σύριγγες που χρησιμοποιούνται για όλη την ανωτέρω διαδικασία αποστειρώνονται πριν πεταχτούν, ενώ και μέχρι την αποστείρωση διατηρούνται στους 4°C .

Παρασκευή αντισωμάτων που φέρουν μαγνητικά σφαιρίδια.

Κατά την διαδικασία απομόνωσης των ωοκινετών χρησιμοποιούνται τα μονοκλωνικά αντισώματα 12.1 και 13.1 έναντι της επιφανειακής πρωτεΐνης P28 των ωοκινετών συνδεδεμένα με μαγνητικά σφαιρίδια. Για την παρασκευή τους χρησιμοποιούνται μαγνητικά σφαιρίδια Dynabeads M-450 των οποίων

την επιφάνεια είναι συνδεδεμένα goat anti-Mouse IgG αντισώματα και έτσι έχουν την ικανότητα να συνδέονται με τις βαριές αλυσίδες των 12.1 και 13.1.

Αρχικά τα μαγνητικά σφαιρίδια πλένονται σε μαγνητική θήκη Dynal MPC. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής: τα μαγνητικά σφαιρίδια βρίσκονται διαλυμένα σε PBS με 0.1%BSA (Bovine Serum Albumin) και 0.02% NaN₃. Πριν αρχίσει η διαδικασία πλυσίματος, γίνεται ισχυρή ανάδευσή τους σε συσκευή Vortex, ώστε το διάλυμα να γίνει ομογενές και μία ποσότητα σφαιριδίων μεταφέρεται σε σωλήνα πλυσίματος χωρητικότητας 1.5 ml τύπου Eppendorf. Ο σωλήνας τοποθετείται σε μαγνητική θήκη Dynal MPC για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και απομακρύνεται το υπερκείμενο. Έπειτα απομακρύνεται ο σωλήνας από την θήκη και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος πλυσίματος για να επανέλθει ξανά στην μαγνητική θήκη για 2 λεπτά. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναδιαλύεται σε όγκο ρυθμιστικού διαλύματος πλυσίματος, ίσο με αυτόν που είχαν τα σφαιρίδια πριν αρχίσει η διαδικασία πλυσίματος. Με αυτό τον τρόπο εξασφαλίζεται μία τελική συγκέντρωση σφαιριδίων περίπου 4×10^8 ανά ml ρυθμιστικού διαλύματος πλυσίματος. Η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος πλυσίματος είναι PBS με 0,1% BSA.

Επόμενο βήμα είναι η μεταφορά 10^7 πλυμένων μαγνητικών σφαιριδίων σε σωλήνα χωρητικότητας 1.5 ml και η προσθήκη 1.5 μg αντισώματος 12.1 ή 13.1. Γίνεται επώαση για μισή ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με ταυτόχρονη ανάδευση και ο σωλήνας τοποθετείται σε μαγνητική θήκη Dynal MPC για 2 λεπτά στην ίδια θερμοκρασία. Ακολούθως και ενώ ο σωλήνας βρίσκεται ακόμα επί της θήκης, αφαιρείται το υπερκείμενο και με προσοχή ώστε να μην διαταραχθούν τα σφαιρίδια. Στη συνέχεια ο σωλήνας απομακρύνεται από την μαγνητική θήκη και τα μαγνητικά σφαιρίδια επαναδιαλύονται σε ρυθμιστικό διάλυμα πλυσίματος με ανάδευση για μερικά δευτερόλεπτα. Ο σωλήνας επανατοποθετείται στην μαγνητική θήκη για δύο λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και ο κύκλος πλυσίματος επαναλαμβάνεται για 4 ακόμα φορές. Με το τέλος των πλυσιμάτων, το αντίσωμα φέρει προσδεδεμένα μαζί του τα

μαγνητικά σφαιρίδια και διαλυμένο σε PBS με 0,1% BSA μπορεί να διατηρηθεί στους 4⁰C για περισσότερες από 15 ημέρες.

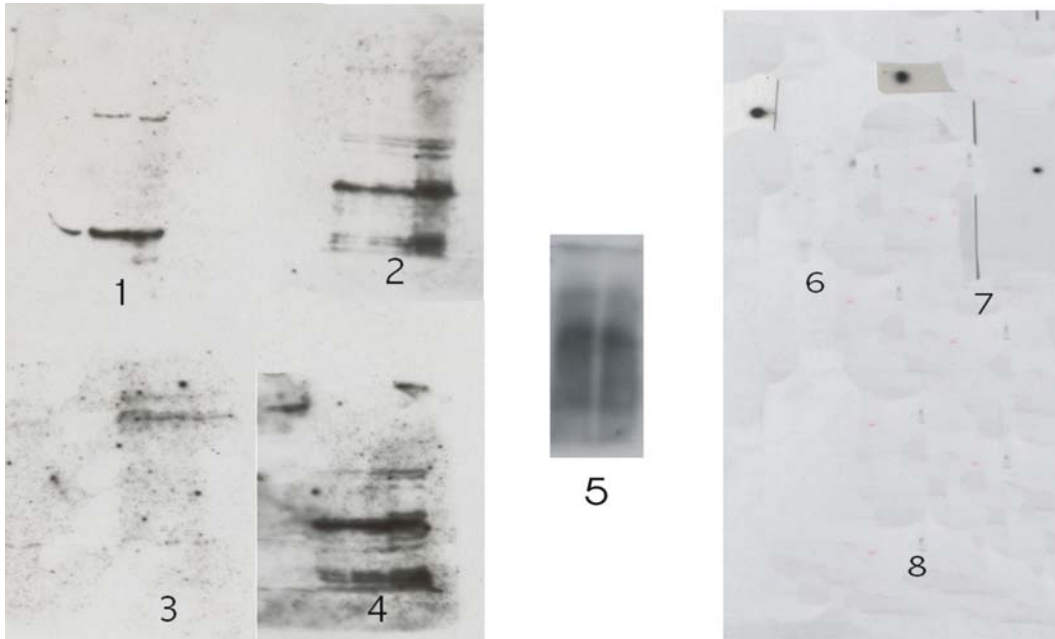
Πρόσδεση ωοκινετών σε φίλτρα που φέρουν πρωτεΐνες από κύτταρα τριών διαφορετικών κυτταρικών σειρών εντόμων και μεσεντέριες πρωτεΐνες από τα έντομα *Drosophila melanogaster* και *Anopheles stephensi*.

Φίλτρα που φέρουν πρωτεΐνες από κύτταρα τριών διαφορετικών κυτταρικών σειρών εντόμων, καθώς και μεσεντέριες πρωτεΐνες από τα έντομα *Drosophila melanogaster* και *Anopheles stephensi*, μπλοκάρονται για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με 5 % άπαχο γάλα σκόνη διαλυμένο σε PBS, στο οποίο έχει προστεθεί 1mM MgCl₂ και 0,5 mM CaCl₂ είτε 1mM EDTA. Αφού γίνει ένα σύντομο ξέπλυμα των φίλτρων με PBS, τοποθετούνται σε σωλήνα Falcon χωρητικότητας 50 ml. Στον ίδιο σωλήνα τοποθετούνται και οι ωοκινέτες. Το διάλυμα στο οποίο βρίσκονται οι ωοκινέτες, ο όγκος του, καθώς και η συγκέντρωση των ωοκινετών σε αυτό, αποτέλεσαν αντικείμενο πειραματισμού. Ποικίλλα διαλύματα δοκιμάστηκαν όπως RPMI 1640, RPMI 1640 χωρίς fetal calf serum, HBSS, PBS με 1mM MgCl₂ και 0,5 mM CaCl₂, PBS με 1mM EDTA. Ο όγκος της επώασης των ωοκινετών με τα φίλτρα κυμάνθηκε από 0,5 ml έως 2 ml, ενώ και η συγκέντρωση των ωοκινετών κυμάνθηκε από 10⁵ ωοκινέτες ανά ml έως 10⁷. Η επώαση είχε μεγαλύτερη επιτυχία όταν το διάλυμα επώασης ήταν το RPMI 1640, είτε το PBS με 1mM MgCl₂ και 0,5 mM CaCl₂, είτε το PBS με 1mM EDTA, ο όγκος του διαλύματος ήταν 1,5 ml και η συγκέντρωση των ωοκινετών σε αυτό ήταν άνω του 10⁶ ανά ml διαλύματος. Οι σωλήνες Falcon έχοντας πλέον τα φίλτρα και το διάλυμα των ωοκινετών, τοποθετούνται σε φούρνο που έχει την δυνατότητα περιστροφής τους. Η διάρκεια της επώασης είναι τρεις ώρες και γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου.

Μετά το τέλος της επώασης τα φίλτρα παρατηρούνται. Ανάλογα με την εμφάνισή τους, ένα σύντομο πλύσιμο μπορεί να προηγηθεί της διαδικασίας μονιμοποίησης των ωοκινετών στα φίλτρα με 4 % παραφορμαλδεΰδη διαλυμένη σε PBS. Ακολουθεί η διαδικασία πρόσδεσης, στους ωοκινέτες, του πρώτου και δεύτερου αντισώματος.

Οι ωοκινέτες εκφράζουν στην επιφάνειά τους, μεταξύ των άλλων και δύο πρωτεΐνες, την P28 και μία πρωτεΐνη μοριακού βάρους 70 kD. Με το δεδομένο αυτό, τρία διαθέσιμα μονοκλωνικά αντισώματα έναντι της P28 - τα 12.1, 13.1 και 17.9- καθώς και ένα μονοκλωνικό έναντι της πρωτεΐνης μοριακού βάρους 70 kD , χρησιμοποιήθηκαν ως πρώτα αντισώματα στην διαδικασία εντοπισμού των σημείων πρόσδεσης των ωοκινετών στα φίλτρα. Ένα πρώτο πρόβλημα που αντιμετωπίστηκε ήταν το γεγονός ότι και τα τέσσερα αντισώματα, στην αρχική συγκέντρωση που δοκιμάστηκαν και η οποία ήταν 1:10.000, εμφάνιζαν πρόβλημα μη ειδικής πρόσδεσης στα φίλτρα (Σχήμα 4). Δηλαδή τα αντισώματα προσδένονταν στα φίλτρα απουσία ωοκινετών. Για να αντιμετωπισθεί το συγκεκριμένο πρόβλημα επιλέχθηκε το αντίσωμα που το εμφάνιζε στον μικρότερο βαθμό και ήταν το 12.1. και επακολούθως αραιώθηκε τόσο, ώστε να εξαλειφθεί εντελώς το πρόβλημα της μη ειδικής πρόσδεσης στα φίλτρα. Η τελική αραιώση στην οποία χρησιμοποιήθηκε το 12.1 αντίσωμα ήταν 1:200.000, αραιώση στην οποία και το 13.1 δεν εμφάνιζε πρόβλημα μη ειδικής πρόσδεσης.

Ένα δεύτερο πρόβλημα που αντιμετωπίστηκε ήταν το γεγονός ότι το δεύτερο αντίσωμα που ήταν goat anti mouse IgG συζευγμένο με HRP (Horse Radish Peroxidase) και αγοράστηκε από την BIORAD, εμφάνιζε επίσης πρόβλημα μη ειδικής πρόσδεσης, δηλαδή προσδενόταν στα φίλτρα παρουσία ωοκινετών αλλά απουσία πρώτου αντισώματος. Για να αντιμετωπισθεί αυτό το πρόβλημα, το αντίσωμα αραιώθηκε τελικά στο 1:500.000, ενώ και το βήμα μονιμοποίησης των ωοκινετών με 4 % παραφορμαλδεΰδη βοήθησε αρκετά προς αυτή την κατεύθυνση.



Σχήμα 4 : Προβλήματα μη ειδικής πρόσδεσης των αντισωμάτων 13.1 (1) - 17.9(2) – 12.1(3) και του αντισώματος ενάντια στην επιφανειακή πρωτεΐνη του ωοκινέτη μοριακού βάρους 70kD (4) καθώς και του δεύτερου αντισώματος (5) στα φίλτρα ξεπεράστηκαν τελικά με αραιώση τους τόσο για το 12.1(6) όσο και για το 13.1 και το δεύτερο αντίσωμα (7 και 8 αντίστοιχα).

Με βάση λοιπόν τα παραπάνω η διαδικασία πρόσδεσης πρώτου και δεύτερου αντισώματος στα φίλτρα, μετά την επώαση έχει ως εξής : την μονιμοποίηση ακολουθούν ένα πλυσίμο διάρκειας 15 λεπτών με PBS και δύο πλυσίματα διάρκειας 15 λεπτών με TTBS όλα σε θερμοκρασία δωματίου. Η σύσταση του διαλύματος TTBS είναι η ακόλουθη:

20 mM Tris-HCl pH 7,5

150 mM NaCl

0,1% Tween

Επόμενο βήμα είναι η επώαση με το 12.1 ή το 13.1 πρώτο αντίσωμα αραιωμένο στο 1:200.000 με TTBS. Η επώαση γίνεται με την βοήθεια αναδεδυμένου επωαστήρα, για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και ακολουθούν τρία 15 λεπτα πλυσίματα με TTBS στις ίδιες συνθήκες. Στην συνέχεια προστίθεται το δεύτερο αντίσωμα το οποίο είναι συνδεδεμένο με

HRP, αραιωμένο στο 1:500.000 με TTBS. Η επώαση διαρκεί 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και ακολουθούν τέσσερα δεκαπεντάλεπτα πλυσίματα με TTBS επίσης στις ίδιες συνθήκες.

Τελευταίο βήμα είναι η διαδικασία εμφάνισης χρησιμοποιώντας το SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate της PIERCE. Πρόκειται για μια αρκετά ευαίσθητη μέθοδο εμφάνισης η οποία χρησιμοποιεί την αντίδραση HRP. Απαραίτητη προϋπόθεση για την χρήση της είναι η υψηλή αραιώση των αντισωμάτων. Η διαδικασία εμφάνισης ξεκινάει με ανάμειξη των δύο αντιδραστηρίων SuperSignal (Luminol/Enhancer Solution, Stable Peroxide Solution) σε ίσους όγκους και ακολουθεί επώαση του φίλτρου στο μείγμα που προκύπτει για 5 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Είναι απαραίτητο να χρησιμοποιηθεί επαρκής όγκος μείγματος έτσι ώστε να είναι απολύτως βέβαιο ότι το φίλτρο είναι καλά εμποτισμένο και δεν πρόκειται να στεγνώσει. Στην συνέχεια το φίλτρο μεταφέρεται σε δύο πλαστικές διαφανείς προστατευτικές μεμβράνες και αφού αφαιρεθούν όλες οι φυσαλίδες που σχηματίζονται, αρχίζει η διαδικασία έκθεσής του σε φίλμ της KODAK και η επακόλουθη εμφάνιση του φίλμ σε μηχανήμα της ίδιας εταιρείας. Η διάρκεια της έκθεσης στο φίλμ ποικίλει, αρχίζοντας από 30 δευτερόλεπτα και φτάνοντας, σε κάποιες περιπτώσεις, έως και την μία ώρα.

Εντοπισμός της Λαμινίνης και της Ιντεγκρίνης σε φίλτρα που φέρουν πρωτεΐνες κυττάρων από τρεις διαφορετικές κυτταρικές σειρές .

Σε φίλτρα που φέρουν πρωτεΐνες κυττάρων από τρεις διαφορετικές κυτταρικές σειρές και στα οποία έχουν προηγουμένως προσδεθεί οι ωοκινέτες, έγινε προσπάθεια να εντοπισθεί η Λαμινίνη και η Ιντεγκρίνη. Με δεδομένες τις πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρούν οι ωοκινέτες, σκοπός του πειράματος είναι να εξακριβωθεί εάν κάποια από αυτές αντιστοιχεί στη Λαμινίνη ή στην Ιντεγκρίνη. Πιο συγκεκριμένα οι ωοκινέτες προσδένονται στα φίλτρα, γίνεται εντοπισμός των θέσεων πρόσδεσής τους, απομακρύνονται από τα φίλτρα και

με χρήση αντισωμάτων γίνεται εντοπισμός της Λαμινίνης και της Ιντεγκρίνης σε αυτά. Εάν το σήμα πρόσδεσης ωοκινετών, ταυτίζεται με αυτό της Λαμινίνης ή της Ιντεγκρίνης, τότε πρόκειται με υψηλές πιθανότητες να έχει εντοπισθεί η αλληλεπίδραση των ωοκινετών με κάποιο από αυτά τα μόρια.

Ο εντοπισμός των ωοκινετών στα φίλτρα γίνεται σύμφωνα με το ανωτέρω αναφερόμενο πρωτόκολλο, ενώ η απομάκρυνση τους από αυτά γίνεται με επώαση των φίλτρων για μισή ώρα στους 50°C σε ρυθμιστικό διάλυμα συστάσεως : 0.0625M Tris-HCl pH 6.7

0.7% β-μερκαπτοαιθανόλη

2% SDS

Ακολουθούν δύο πλυσίματα διάρκειας 10 λεπτών με TTBS σε θερμοκρασία δωματίου και τα φίλτρα μπλοκάρονται στην ίδια θερμοκρασία για μία ώρα σε 5% άπαχο γάλα σκόνη διαλυμένο σε PBS. Στη συνέχεια προστίθεται το αντίσωμα, αραιωμένο σε 5% άπαχο γάλα σκόνη διαλυμένο σε PBS, σε αναλογίες 1:2000 και 1:1000. Για τον εντοπισμό της Ιντεγκρίνης χρησιμοποιούνται πολυκλωνικά αντισώματα ποντικών που είχαν ανοσοποιηθεί με τμήμα της β-αλυσίδας της Ιντεγκρίνης από το κουνούπι *Anopheles gambiae*, ενώ για τον εντοπισμό της Λαμινίνης εμπορικά διαθέσιμα πολυκλωνικά αντισώματα κουνελιών που είχαν ανοσοποιηθεί με ολόκληρο το μόριο της Λαμινίνης ποντικίου και αγοράστηκαν από την εταιρεία abcam. Η διάρκεια επώασης των αντισωμάτων είναι μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και στην συνέχεια ακολουθούν τρία πλυσίματα διάρκειας 5 λεπτών με PBS στην ίδια θερμοκρασία, πριν την προσθήκη του δεύτερου αντισώματος. Για τον εντοπισμό της Ιντεγκρίνης χρησιμοποιήθηκε ως δεύτερο αντίσωμα goat anti-mouse IgG συνδεδεμένο με HRP ενώ για την Λαμινίνη goat anti-rabbit IgG συνδεδεμένο με HRP (BIORAD). Η επώαση του δεύτερου αντισώματος γίνεται σε 5% άπαχο γάλα σκόνη διαλυμένο σε PBS, σε αραιώση 1:50.000 και διαρκεί μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν τρία πλυσίματα διάρκειας 5 λεπτών με PBS στην ίδια θερμοκρασία. Τελευταίο βήμα είναι η διαδικασία εμφάνισης χρησιμοποιώντας

το SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate της PIERCE σύμφωνα με τα όσα έχουν αναφερθεί παραπάνω.

Παραγωγή του 12.1 πρώτου αντισώματος συνδεδεμένου με HRP (horseradish peroxidase)

Ένας από τους βασικούς περιορισμούς στον εντοπισμό πρωτεϊνών που έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με τους ωοκινέτες, είναι η μεγάλη αραίωση με την οποία πρέπει να χρησιμοποιηθούν τόσο το πρώτο όσο και το δεύτερο αντίσωμα, ώστε να αποφευχθούν τα προβλήματα μη ειδικής πρόσδεσής τους. Για να λυθεί το συγκεκριμένο πρόβλημα και επιπλέον ο συνολικός χρόνος του πειράματος να γίνει αρκετά πιο σύντομος, είναι απαραίτητη η σύνδεση HRP στο πρώτο αντίσωμα. Γι'αυτό τον λόγο χρησιμοποιήθηκε το Linx Rapid Protein Conjugation Kit *Version B* της Invitrogen και το αντίσωμα που επιλέχθηκε για να γίνει η σύνδεση HRP ήταν το 12.1.

Το συγκεκριμένο σύστημα στηρίζεται στην αντίδραση σύνδεσης του φαινυλδιβροονικού οξέος (PDBA) με το σαλκυκλιδροξαμικό οξύ (SHA). Το PDBA ενωμένο με NHS έχει την ικανότητα να αντιδρά με πρωτοταγείς αμίνες οι οποίες βρίσκονται στο αμινοξύ λυσίνη και στο αμινιτελικό άκρο των πρωτεϊνών. Επομένως με την συγκεκριμένη αντίδραση ένα αντίσωμα μπορεί να συνδεθεί με PDBA. Εάν και η HRP είναι συνδεδεμένη με SHA, τότε SHA και PDBA θα αντιδράσουν, με συνέπεια την σήμανση του αντισώματος με HRP.

Η διαδικασία σύζευξης που ακολουθήθηκε έχει ως εξής : 700 mg αντισώματος 12.1 τοποθετήθηκαν σε σωλήνα χωρητικότητας 1,5 ml σε διάλυμα PBS σε θερμοκρασία δωματίου. Επακολούθως έγινε προσθήκη 70 nM PDBA-NHS, έτσι ώστε τελικά η μοριακή αναλογία PDBA-NHS:αντίσωματος να είναι 15:1. Αφού αναμείχθηκαν τα δύο αντιδραστήρια, έγινε επώαση της αντίδρασης για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια ακολούθησε η απομάκρυνση του ελεύθερου PDBA που δεν είχε αντιδράσει με το αντίσωμα.

Πρόκειται για βήμα απολύτως απαραίτητο δεδομένου ότι το ελεύθερο PDDBA είναι ικανό να αντιδράσει με το SHA-HRP ελαττώνοντας έτσι σημαντικά την επιτυχία με την οποία συνδέεται τελικά το HRP στο αντίσωμα. Για να απομακρυνθεί το ελεύθερο PDDBA από την αντίδραση χρησιμοποιούνται μικροσυγκεντρωτές (Nanoser, Gelman) οι οποίοι επιτρέπουν την απομάκρυνση οποιασδήποτε ουσίας μοριακού βάρους μικρότερου των 30 kDa. Το ελεύθερο PDDBA έχοντας μοριακό βάρος 322 Da απομακρύνεται από τον μικροσυγκεντρωτή, σε αντίθεση με τα αντισώματα, τα οποία έχοντας μοριακό βάρος περίπου 150 kDa, συγκρατούνται από αυτόν.

Η διαδικασία που ακολουθείται έχει ως εξής : 500 μl της αντίδρασης πρόσδεσης PDDBA τοποθετούνται στον μικροσυγκεντρωτή και με φυγοκέντρωση στις 8.000 στροφές, για 8 λεπτά, σε φυγόκεντρο Eppendorf, σε θερμοκρασία δωματίου, τελικά παραμένουν σε αυτόν μονάχα 50-100 μl υγρού, που αποτελείται κυρίως από αντίσωμα συνδεδεμένο με PDDBA. Επακολούθως προστίθενται 500 μl 50 mM sodium bicarbonate, pH 8,5 και επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρωση. Μετά το τέλος και της δεύτερης αυτής φυγοκέντρωσης, ο όγκος επανέρχεται στα 500 μl με προσθήκη 50 mM sodium bicarbonate pH 8,5 και πλέον το αντίσωμα συνδεδεμένο με PDDBA μπορεί να διατηρηθεί στους 4⁰C για περισσότερο από ένα χρόνο.

Επόμενο βήμα είναι η αντίδραση του PDDBA αντισώματος με το SHA-HRP. Η μοριακή αναλογία SHA-ενζύμου : PDDBA-αντισώματος με την οποία έγινε η αντίδραση ήταν 8:1. Στο κάτω μέρος σωλήνα Falcon των 15 ml, τοποθετούνται 5μg PDDBA-αντισώματος και προστίθενται 12,5μg SHA-ενζύμου. Ακολουθεί ανάμειξη των δύο αντιδραστηρίων με συνεχές πιπετάρισμα σε θερμοκρασία δωματίου. Αφού τα αντιδραστήρια έχουν αναμειχθεί καλά επωάζονται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Με το τέλος της επώασης το αντίσωμα, συνδεδεμένο πλέον με HRP, μπορεί να χρησιμοποιηθεί άμεσα ή να φυλαχθεί στους 4⁰C για τουλάχιστον 6 μήνες.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Το κρίσιμο σημείο για την τελική παραγωγή ωοκινετών είναι η λήψη από το ποντίκι αίματος πλούσιου σε γαμετοκύτταρα. Κατά τον κύκλο ζωής του παρασίτου *P. berghei* στα ποντίκια, μονάχα ένας υποπληθυσμός του, που πολλαπλασιάζεται μη σεξουαλικά, παραιτείται από τον κυτταρικό κύκλο για να διαφοροποιηθεί σε γαμετοκύτταρα. Η φυσική επιλογή έχει λαξεύσει μια ισορροπία μεταξύ μη σεξουαλικού πολλαπλασιασμού και σεξουαλικής αναπαραγωγής, δηλαδή διαφοροποίησης σε γαμετοκύτταρα και επακολούθως σε κυτταρικές μορφές με ικανότητα διείσδυσης στα κουνούπια. Μεγάλο ρόλο στη διαμόρφωση αυτής της ισορροπίας φαίνεται να διαδραματίζει ο σπονδυλωτός ξενιστής μέσω του ανοσοποιητικού του συστήματος. Πράγματι σε συμφωνία με παλαιότερες αναφορές, ανοσολογική αντίδραση ενάντια στην μη σεξουαλική παρασιταίμια έχει συσχετισθεί τόσο με υψηλή όσο και με χαμηλή παρουσία γαμετοκυττάρων στο αίμα του ξενιστή (Garnham PCC, 1966). Δηλαδή υψηλή γαμετοκυτταίμια μπορεί να συμβαδίζει αλλά και να μην συμβαδίζει με υψηλή παρασιταίμια. Παράγοντες που επίσης επηρεάζουν θετικά την παρουσία γαμετοκυττάρων στο αίμα είναι η παρουσία φρέσκων νεαρών ερυθροκυττάρων καθώς και η αιμόλυση ερυθροκυττάρων-παρουσία δικτυοκυττάρων (Dyer et al., 2000).

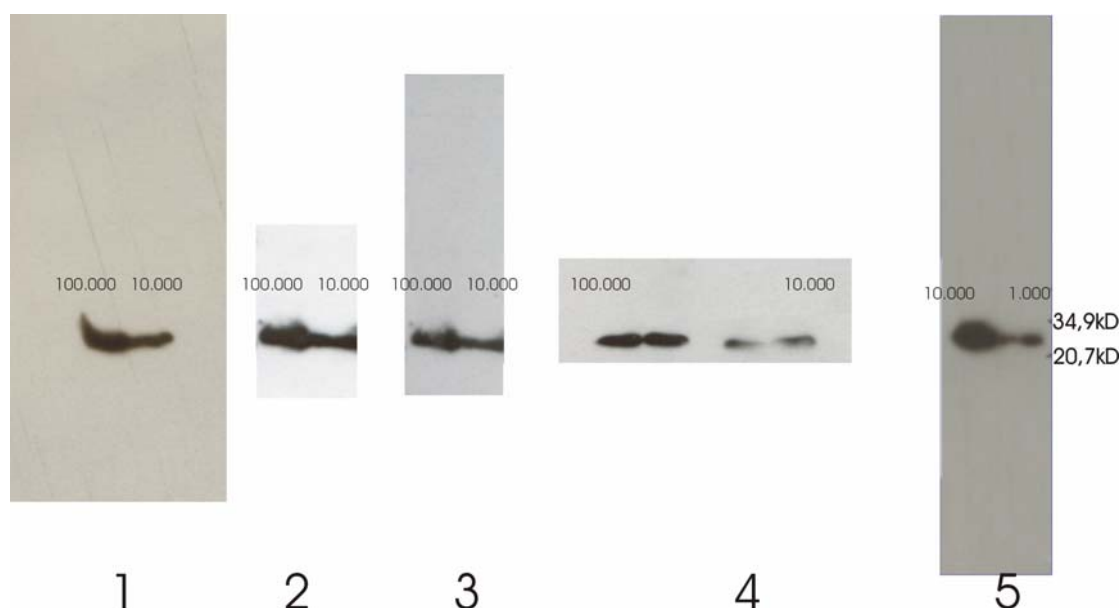
Πριν την καλλιέργεια του αίματος, έχει αναφερθεί (Crampton et al., 1997) ότι αυτό θα πρέπει να περνάει από στήλη κυτταρίνης CF11 ώστε να αφαιρεθούν τα λευκά αιμοσφαίρια τα οποία αναστέλουν την διαφοροποίηση των γαμετοκυττάρων σε ωοκινέτες. Κάτι τέτοιο δεν παρατηρήθηκε στη συγκεκριμένη εργασία, μια και δεν ήταν λίγες οι φορές, που καλλιέργειες αίματος το οποίο δεν είχε περάσει από στήλη κυτταρίνης CF11, έδιναν συγκεντρώσεις ωοκινετών αρκετά μεγαλύτερες σε σύγκριση με αυτές, που το αίμα είχε περάσει από στήλη κυτταρίνης CF11. Έτσι τελικά κάθε φορά γίνονταν παράλληλες καλλιέργειες αίματος, στις οποίες το αίμα είτε είχε περάσει είτε δεν είχε περάσει από στήλη κυτταρίνης CF11.

Αναφορικά με τους δύο εναλλακτικούς τρόπους απομόνωσης των ωοκινετών από τις καλλιέργειες, αυτός που χρησιμοποιεί αντισώματα συνδεδεμένα με μαγνητικά σφαιρίδια φαίνεται να εμφανίζει ισχυρά πλεονεκτήματα. Συγκεκριμένα δίνει τελικά διαλύματα πολύ πιο πλούσια και καθαρά σε ωοκινέτες, δεν παρεμβάλλεται στάδιο λύσης των κυττάρων και ο απαιτούμενος συνολικά χρόνος για την απομόνωση είναι πολύ μικρότερος. Από την άλλη μεριά βέβαια, ο συνολικός αριθμός των ωοκινετών που απομονώνονται είναι μικρότερος σε σύγκριση με την εναλλακτική μέθοδο απομόνωσης, ενώ παραμένει και θωλό αν κάποια από τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διαδικασία απομόνωσης, παραμένουν συνδεδεμένα στους ωοκινέτες για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Σε αρμονία με άλλες αναφορές (Dyer et al., 2000, Crampton et al., 1997) συνεχές μηχανικό–μη σεξουαλικό πέρασμα του παρασίτου από ποντίκι σε ποντίκι χωρίς τη μεσολάβηση κουνουπιού φορέα, έχει ως συνέπεια την βαθμιαία απώλεια της ικανότητας σεξουαλικής διαφοροποίησης του παρασίτου *in vitro*. Αυτό οφείλεται σε χρωμοσωμικά σπασίματα που οδηγούν στην απώλεια γονιδίων βασικών για την παραγωγή γαμετοκυττάρων (Birago et al., 1982, Janse et al., 1991, Frontali, 1994, Ponzi et al., 1990). Έτσι όταν τα μηχανικά περάσματα του παρασίτου από ποντίκι σε ποντίκι ξεπεράσουν τα 15, η παρουσία των γαμετοκυττάρων αρχικά στο αίμα του ποντικού και επακολούθως η παραγωγή ωοκινετών κατά την καλλιέργεια του αίματος, έχουν μειωθεί δραματικά.

Κατά τον εντοπισμό των θέσεων πρόσδεσης των ωοκινετών στα φίλτρα, ένα από τα κύρια προβλήματα είναι η μη ειδική πρόσδεση του πρώτου και δεύτερου αντισώματος σε αυτά. Για να αντιμετωπισθεί, τα αντισώματα χρησιμοποιούνται σε υψηλή αραιώση κατά την διαδικασία εντοπισμού των ωοκινετών στα φίλτρα. Ωστόσο, τόσο τα 12.1 και 13.1 αντισώματα αραιωμένα σε TTBS στο 1: 200000, όσο και το δεύτερο αντίσωμα αραιωμένο σε TTBS στο 1: 500000, μπορούν να ανιχνεύσουν από 10000 ωοκινέτες και άνω. Την ικανότητα αυτή την διατηρούν ακόμα και όταν τα φίλτρα έχουν μονιμοποιηθεί με 4% παραφορμαλδεϋδη διαλυμένη σε PBS. Επίσης το 12.1 αντίσωμα

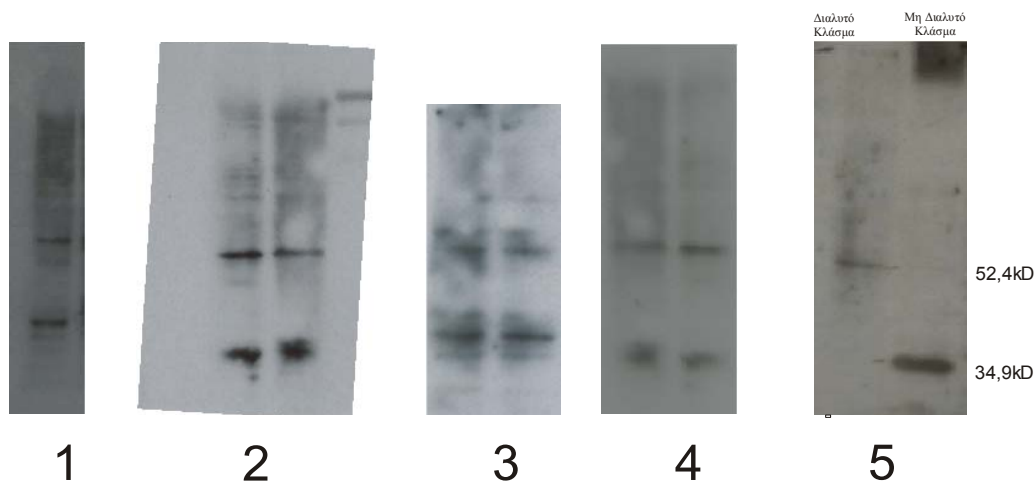
συζευγμένο με HRP, έχει την ικανότητα να ανιχνεύει από 1000 ωοκινέτες και άνω, ακόμα και όταν έχει αραιωθεί 100 φορές σε TTBS (Σχημα 5).



Σχήμα 5: Τόσο το 12.1 αντίσωμα (1) όσο και το 13.1 (2) μπορούν να ανιχνεύσουν από 10.000 ωοκινέτες και πάνω ακόμα και όταν στα φίλτρα έχει γίνει μονιμοποίηση με 4% παραφορμαλδεΰδη (3 και 4 αντίστοιχα). (5): το 12.1 αντίσωμα συνδεδεμένο με HRP μπορεί να ανιχνεύσει από 1000 ωοκινέτες και πάνω σε 100 φορές αραιώση.

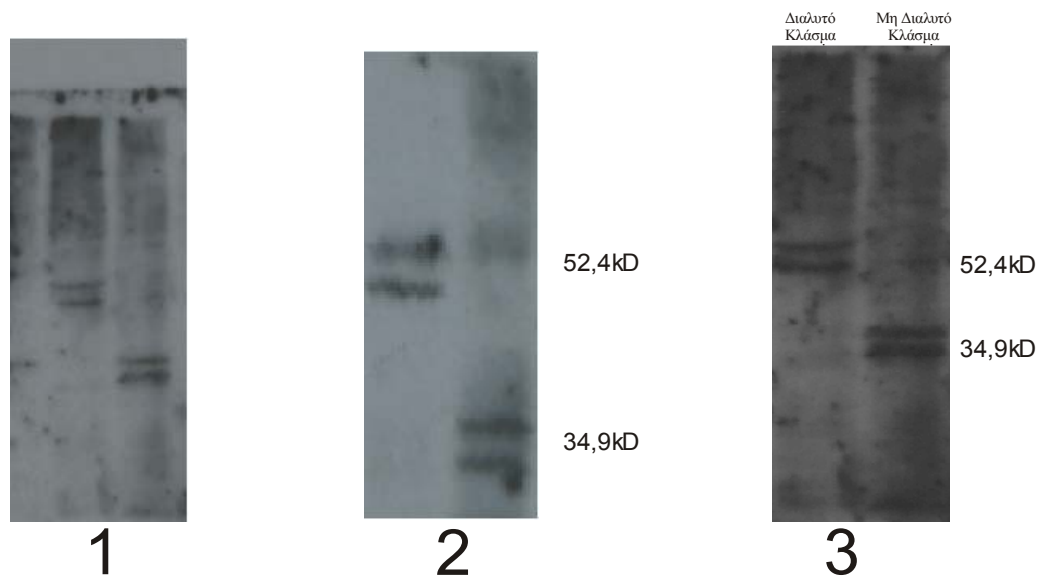
Σε πρωτεϊνικό υλικό που αντιστοιχεί σε 600000 κύτταρα της κυτταρικής σειράς MOS 20 από το κουνούπι *Aedes aegypti* εντοπίστηκαν δύο πρωτεΐνες μοριακού βάρους περίπου 30 και 50 kD να έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με ωοκινέτες. Ο εντοπισμός τους έγινε τόσο με χρήση του 12.1 αντισώματος, όσο και με το 13.1. Είναι γνωστός ο ρόλος των ιόντων Ασβεστίου τόσο στην ομοίωση του παρασίτου όσο και στη σηματοδότηση κατά την επίθεση και επακόλουθη διείσδυσή του στα κύτταρα του ξενιστή (Garcia, 1999). Επίσης είναι γνωστό ότι τα ιόντα Ασβεστίου μεσολαβούν σε μία πλειάδα πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες έδιναν εξίσου ισχυρό σήμα αλληλεπίδρασης με ωοκινέτες, είτε το μέσο επώασης ήταν PBS με ιόντα Ασβεστίου και Μαγνησίου, είτε PBS με EDTA, είτε RPMI, ακόμα και αν οι ωοκινέτες δεν είχαν μονιμοποιηθεί στα φίλτρα με παραφορμαλδεΰδη. Απαραίτητη προϋπόθεση για τον εντοπισμό τους είναι η συγκέντρωση των ωοκινετών στο διάλυμα με το οποίο επωάζονται τα φίλτρα να υπερβαίνει το ένα εκατομμύριο ωοκινέτες ανά ml διαλύματος επώασης.

Επακολούθως έγινε διαχωρισμός των κυτταρικών πρωτεϊνών σε διαλυτές-μη διαλυτές και διαπιστώθηκε ότι η πρωτεΐνη των 50 kD είναι διαλυτή, ενώ η πρωτεΐνη των 30 kD είναι μη διαλυτή (Σχήμα 6).



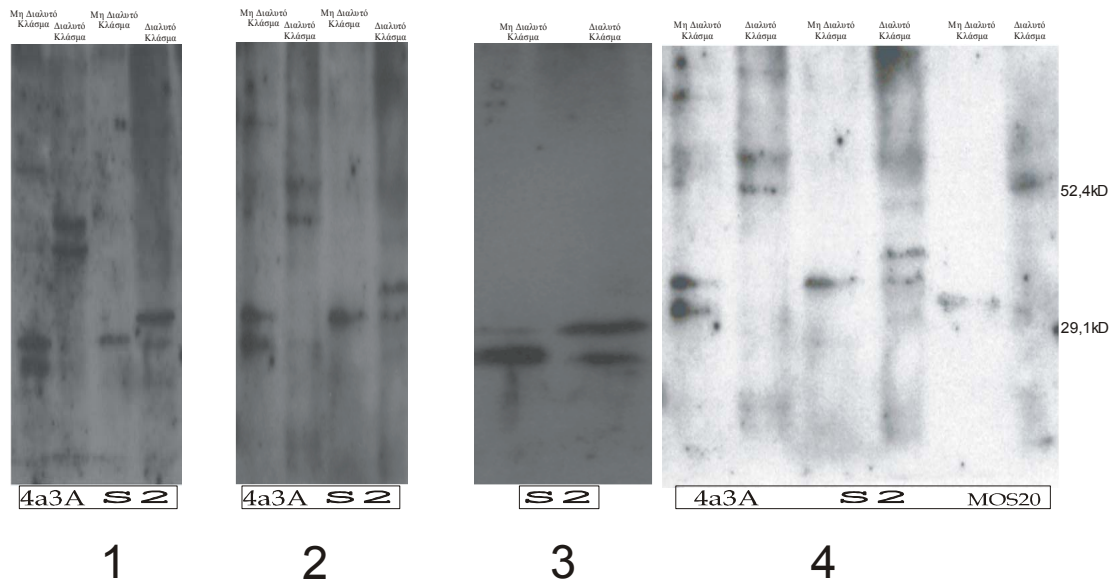
Σχήμα 6: Δύο πρωτεΐνες των 30 και 50 kD της κυτταρικής σειράς MOS20 εντοπίστηκαν να αλληλεπιδρούν με ωοκινέτες χρησιμοποιώντας το 12.1 μονοκλωνικό αντίσωμα, είτε όταν το μέσο επώασης ήταν PBS με ιόντα ασβεστίου και μαγνησίου (1) είτε PBS με EDTA (2) είτε RPMI (3), ακόμα και όταν χρησιμοποιηθεί το μονοκλωνικό αντίσωμα 13.1 για τον εντοπισμό τους (4). Η πρωτεΐνη των 50 kD είναι διαλυτή ενώ των 30 kD είναι μη διαλυτή (5).

Σε πρωτεϊνικό υλικό που αντιστοιχεί σε 600000 κύτταρα της κυτταρικής σειράς 4a-3A από το κουνούπι *Anopheles gambiae* έγινε διαχωρισμός διαλυτών-μη διαλυτών πρωτεϊνών και εντοπίστηκαν δύο πρωτεΐνες μοριακού βάρους περίπου 30 kD και δύο πρωτεΐνες μοριακού βάρους περίπου 50 kD να έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με ωοκινέτες. Ο εντοπισμός τους έγινε τόσο με χρήση του 12.1 αντισώματος, όσο και με το 13.1. Οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες έδιναν εξίσου ισχυρό σήμα αλληλεπίδρασης με ωοκινέτες, είτε το μέσο επώασης ήταν PBS με ιόντα Ασβεστίου και Μαγνησίου, είτε PBS με EDTA. Η μόνη απαραίτητη προϋπόθεση για τον εντοπισμό τους είναι η συγκέντρωση των ωοκινετών στο διάλυμα με το οποίο επάζονται τα φίλτρα να υπερβαίνει το ένα εκατομμύριο ωοκινέτες ανά ml διαλύματος επώασης. Οι δύο πρωτεΐνες των 50 kD είναι διαλυτές, ενώ οι δύο πρωτεΐνες των 30 kD είναι μη διαλυτές (Σχήμα 7).



Σχήμα 7 : Διαλυτές πρωτεΐνες 50kD περίπου καθώς και μη διαλυτές 30kD περίπου της κυτταρικής σειράς 4a 3A εντοπίστηκαν να αλληλεπιδρούν με ωοκινέτες χρησιμοποιώντας το 12.1 μονοκλωνικό αντίσωμα είτε το μέσο επώασης ήταν PBS με EDTA (1) είτε PBS με ιόντα ασβεστίου και μαγνησίου (2) ακόμα και όταν χρησιμοποιηθεί το μονοκλωνικό αντίσωμα 13.1 για τον εντοπισμό τους (3).

Σε πρωτεϊνικό υλικό που αντιστοιχεί σε 600000 κύτταρα της κυτταρικής σειράς S2 της *Drosophila melanogaster*, έγινε διαχωρισμός διαλυτών- μη διαλυτών πρωτεϊνών και εντοπίστηκαν τρεις πρωτεΐνες μοριακού βάρους περίπου 30 kD να έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με ωοκινέτες. Από αυτές οι δύο είναι διαλυτές, ενώ η τρίτη μη διαλυτή. Ο εντοπισμός τους έγινε τόσο με χρήση του 12.1 αντισώματος, όσο και με το 13.1. Οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες έδιναν εξίσου ισχυρό σήμα αλληλεπίδρασης με ωοκινέτες είτε το μέσο επώασης ήταν PBS με ιόντα Ασβεστίου και Μαγνησίου, είτε PBS με EDTA. Η μόνη απαραίτητη προϋπόθεση στον εντοπισμό τους και αυτή τη φορά είναι η συγκέντρωση των ωοκινετών στο διάλυμα με το οποίο επώαζονται τα φίλτρα, να υπερβαίνει το ένα εκατομμύριο ωοκινέτες ανά ml διαλύματος επώασης (Σχήμα 8).

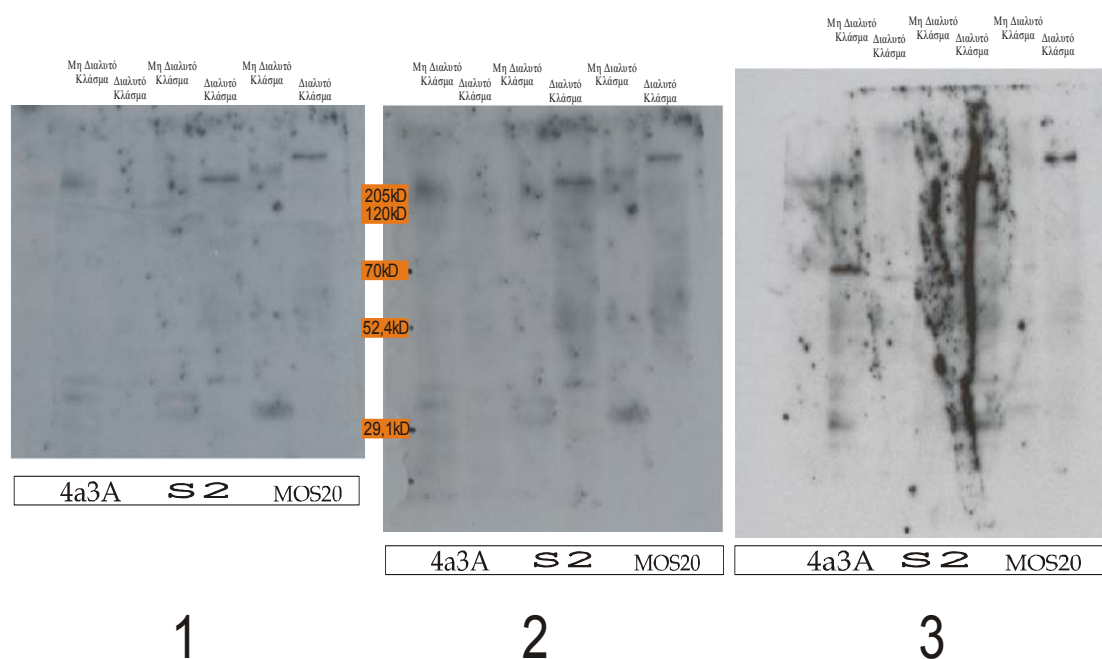


Σχήμα 8 : Πρωτεΐνες των 30kD από την κυτταρική σειρά S2 διαλυτές και μη διαλυτές εντοπίστηκαν να αλληλεπιδρούν με ωοκινέτες χρησιμοποιώντας το 12.1 μονοκλωνικό αντίσωμα είτε το διάλυμα επώασης είναι PBS με ιόντα ασβεστίου και μαγνησίου(1) είτε PBS με EDTA (2) ακόμα και όταν χρησιμοποιηθεί το μονοκλωνικό αντίσωμα 13.1 για τον εντοπισμό τους (3). Στα (1) και (2) φαίνονται οι ανωτέρω αναφερόμενες πρωτεΐνες μαζί με αυτές από την κυτταρική σειρά 4a3A ενώ στο (4) και αυτές της κυτταρικής σειράς MOS20.

Η αλληλεπίδραση των ωοκινετών με όλες τις ανωτέρω αναφερόμενες πρωτεΐνες και στις τρεις κυτταρικές σειρές είναι ορατή ακόμα και με γυμνό μάτι, εφόσον η συγκέντρωση των ωοκινετών στο διάλυμα με το οποίο επωάζονται τα φίλτρα, υπερβαίνει τα πέντε εκατομμύρια ωοκινέτες ανά ml διαλύματος επώασης, είτε αυτό είναι PBS με ιόντα Ασβεστίου και Μαγνησίου, είτε PBS με EDTA. Πιο συγκεκριμένα πάνω στη λευκή PVDF μεμβράνη μπορούν να παρατηρηθούν στις θέσεις των συγκεκριμένων πρωτεϊνών, καφέ-μαύρες ζώνες, ενδεικτικές της παρουσίας ωοκινετών. Με λήψη υλικού από αυτές τις καφέ-μαύρες ζώνες και επακόλουθη παρατήρηση στο μικροσκόπιο σε 400 φορές μεγέθυνση, διαπιστώνεται ότι πράγματι πρόκειται για ωοκινέτες οι οποίοι έχουν συγκεντρωθεί και έχουν σχηματίσει τις συγκεκριμένες ζώνες.

Παράλληλα εντοπίστηκαν και πρωτεΐνες υψηλότερου μοριακού βάρους και στις τρεις κυτταρικές οι οποίες αλληλεπιδρούν ασθενέστερα με ωοκινέτες. Πρόκειται για διαλυτές πρωτεΐνες μοριακού βάρους άνω των 200 kD τόσο στα S2 όσο και στα MOS20 κύτταρα, καθώς και δύο μη διαλυτές

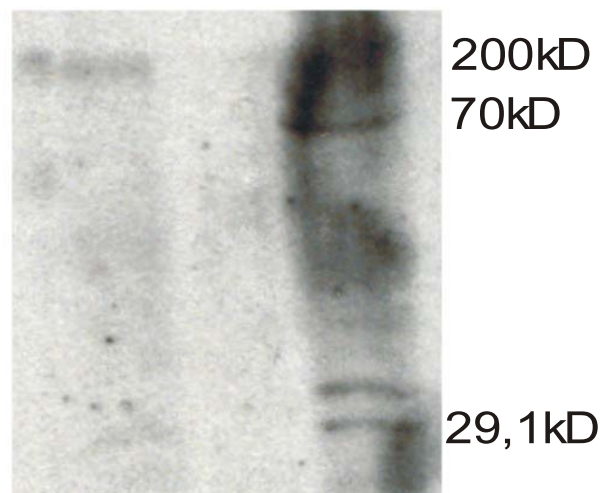
πρωτεΐνες μοριακού βάρους περίπου 80 και 200 kD στα 4a-3A κύτταρα. Κατά τον εντοπισμό των συγκεκριμένων πρωτεϊνών, ως μέσο επώασης των φίλτρων με ωοκινέτες χρησιμοποιήθηκε PBS με ιόντα Ασβεστίου και Μαγνησίου, συγκεντρώσεως σε ωοκινέτες δύο εκατομμύρια ωοκινέτες ανά ml διαλύματος επώασης και ως πρώτο αντίσωμα για την ανίχνευση των θέσεων πρόσδεσης των ωοκινετών στα φίλτρα το 12.1. Όταν το μέσο επώασης είναι PBS με EDTA, τότε το σήμα πρόσδεσης των ωοκινετών στις συγκεκριμένες πρωτεΐνες γίνεται ασθενέστερο (Σχήμα 9).



Σχήμα 9 : Η έκθεση του ίδιου φίλτρου για πέντε και δέκα λεπτά σε φωτογραφικό φιλμ και η επακόλουθη εμφάνιση αποκαλύπτει την ύπαρξη πρωτεϊνών υψηλότερου μοριακού βάρους και στις τρεις κυτταρικές σειρές που έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με ωοκινέτες (1 και 2 αντίστοιχα). Παράλληλα φαίνονται και οι πρωτεΐνες μικρότερου μοριακού βάρους αλλά με πολύ πιο αχνό σήμα. (3): Επανάληψη του ίδιου πειράματος αποκαλύπτει επιπλέον και μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους περίπου 70kD της κυτταρικής σειράς 4a3A παρά την αυξημένη μη ειδική πρόσδεση ωοκινετών σ' αυτό.

Προσπάθειες να διαπιστωθεί εάν κάποια από τις παραπάνω πρωτεΐνες είναι Ιντεγκρίνη ή Λαμινίνη δεν απέδωσαν, αφού τα αντισώματα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για αυτό το σκοπό, έδωσαν μονάχα ένα αδύνατο σήμα, το οποίο δεν φαινόταν να ταυτίζεται με κάποιο από τα σήματα πρόσδεσης ωοκινετών σε πρωτεΐνες.

Επόμενο βήμα ήταν η προσπάθεια εντοπισμού πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με ωοκινέτες, σε μεσέντερα από *Drosophila melanogaster* και *Anopheles stephensi*. Σε μεσέντερα από *Drosophila melanogaster* τα αποτελέσματα δεν ήταν θετικά μια και δεν παρατηρήθηκε πρόσδεση ωοκινετών σε οποιαδήποτε πρωτεΐνη. Αντίθετα σε μεσέντερα από *Anopheles stephensi*, σε πρωτεϊνικό υλικό που αντιστοιχεί σε πέντε μεσέντερα, εντοπίστηκαν τόσο πρωτεΐνες των 30 kD, όσο και πρωτεΐνες των 80 και 200 kD να αλληλεπιδρούν με ωοκινέτες (Σχήμα 10). Για τον εντοπισμό των συγκεκριμένων πρωτεϊνών, ως μέσο επώασης των φίλτρων με ωοκινέτες χρησιμοποιήθηκε PBS με ιόντα Ασβεστίου και Μαγνησίου, συγκεντρώσεως σε ωοκινέτες πέντε εκατομμύρια ωοκινέτες ανά ml διαλύματος επώασης και ως πρώτο αντίσωμα για την ανίχνευση των θέσεων πρόσδεσης των ωοκινετών στα φίλτρα, το 12.1. Θα πρέπει επίσης να τονισθεί ότι η πρόσδεση των ωοκινετών στις πρωτεΐνες των 30 kD είναι ορατή και αυτή τη φορά, ακόμα και με γυμνό μάτι.



Σχήμα 10 : Πρωτεΐνες των 30, 70 και 200 kD περίπου από μεσέντερα του κουνουπιού *Anopheles stephensi* εντοπίστηκαν να αλληλεπιδρούν με ωοκινέτες.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η μορφή και η λειτουργία των σταδίων στα οποία το παράσιτο της ελονοσίας διεισδύει σε ιστούς και κύτταρα ξενιστή και καλείται στάδιο των ζωϊτών (μεροζωΐτες, σποροζωΐτες, ωοκινέτες) καθαρά τοποθετεί το Πλασμώδιο στο φύλο των Αποικόμπλεξων. Όπως και τα υπόλοιπα μέλη (Toxoplasma, Eimeria, Gregarina) φέρουν χαρακτηριστικά πλευρικά οργανίδια που χρησιμοποιούνται για να διεισδύουν ή να μεταναστεύουν στα κύτταρα του ξενιστή. Σπουδαίο ρόλο όμως στις συγκεκριμένες διαδικασίες φαίνεται να διαδραματίζει και ο ιδιαίτερος τρόπος με τον οποίο τα Αποικόμπλεξα μετακινούνται, διατηρώντας την προσθιοπίσθια πολικότητα χωρίς να μεταβάλλεται το σχήμα τους. Εδώ και είκοσι περίπου χρόνια έχει προταθεί ότι αυτό το επιτυγχάνουν με μία συνεχή ανακατανομή από εμπρός προς τα πίσω, μέσω του κυτταροσκελετού ακτίνης, επιφανειακών τους μορίων που έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν είτε με το υπόστρωμα, με συνέπεια την μετακίνηση του παρασίτου, είτε με την επιφάνεια των κυττάρων με συνέπεια την επακόλουθη διείσδυση σε αυτά (King, 1998, Russel, 1983, Russel et al., 1981). Ποικίλα μόρια επιφανείας των ζωϊτών φαίνεται να εμπλέκονται σε αυτές τις διαδικασίες, όπως μέλη της οικογένειας της θρομβοσπονδίνης TRAP/MIC2 (thrombospondin-related protein /micronemal 2 family of secretory adhesins) (Sibley, 1998, Naitza, 1998).

Κατά τη διείσδυση των ερυθρών αιμοσφαιρίων από μεροζωΐτες σπουδαίο ρόλο φαίνεται να παίζει η στενή αλληλεπίδραση υποδοχέων του παρασίτου με ειδικά μόρια προσδέτες στην επιφάνεια των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Είναι γνωστό ότι το σιαλικό οξύ συμμετέχει στις συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις (Orlandi et al., 1992). Πρωτεΐνες επιφάνειας των μεροζωϊτών όπως η MSP1 (merozoite surface protein 1) καθώς και εκκρινόμενες πρωτεΐνες όπως η

AMA1 (apical merozoite antigen) και η EBA175 (erythrocyte-binding antigen 175 KDa) έχουν βρεθεί, αλλά ο ακριβής τους ρόλος δεν έχει ακόμα διαλευκανθεί (Pinder et al., 2000). Δεν ισχύει όμως το ίδιο για τη μεμβρανική πρωτεΐνη PfEMP1 (*P. falciparum* erythrocyte membrane protein1), η οποία φαίνεται να προσδένεται σε μία ποικιλία μορίων στα ερυθροκύτταρα όπως PECAM-1 (platelet-endothelial cell adhesion molecule 1) / CD 31, το αντίγονο A του συστήματος ABO, ανοσοσφαιρίνες IgM, CD36, γλυκοζαμινογλυκάνη όμοια με σουλφυλιωμένη ηπαρίνη και τρεις άλλες επιφανειακές πρωτεΐνες υποδοχείς (Chen et al., 2000). Οι συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις της PfEMP1 φαίνεται να παίζουν ρόλο τόσο στην προσκόλληση όσο και στην διείσδυση του παρασίτου (Cooke et al., 1999). Κατά την διείσδυση των μεροζωϊτών στο ερυθροκύτταρο σχηματίζεται παρασιτοφόρος θάλαμος (parasitophorous vacuole) (Gratzer et al., 1993, Ward, 1993). Η μοριακή βάση σχηματισμού της συγκεκριμένης δομής καθώς και η συμβολή της στην διαδικασία διείσδυσης παραμένει ακόμα αρκετά θολή.

Κατά την διείσδυση των σποροζωϊτών του *Plasmodium falciparum* σε ηπατοκύτταρα *in vitro*, η πρωτεΐνη TRAP των σποροζωϊτών έχει δειχθεί ότι προσδένεται σουλφατίδια και σουλφυλιωμένη ηπαρίνη (McCormick et al., 1999, Muller et al., 1993). Η εμπλοκή δύο πρωτεϊνών μοριακού βάρους 20 και 55 kD της επιφάνειας των κυττάρων συκωτιού έχει εντοπισθεί από μία άλλη ερευνητική ομάδα (van Pelt et al., 1997) με την πρωτεΐνη των 55 kD τελικά, να είναι μια καρβοξυλεστεράση.

Κατά τη διείσδυση των σποροζωϊτών στους σιελογόνους αδένες του κουνουπιού μόρια της επιφάνειας των σποροζωϊτών όπως το CSP και το TRAP φαίνεται να παίζουν ρόλο αναγνωρίζοντας μόρια του κουνουπιού όμοια της ιντεγκρίνης (Sinden, 1999). Επίσης Λεκτίνες όπως η WGA και η succinyl-WGA φαίνεται να παίζουν ρόλο στην διαδικασία διείσδυσης (Barreau et al., 1995) όμως ακόμα η έρευνα σε μοριακό επίπεδο της διείσδυσης των σιελογόνων αδενών από σποροζωΐτες βρίσκεται σε πρώιμα στάδια.

Υπάρχουν ενδείξεις ότι *Leishmania* και *Plasmodium* χρησιμοποιούν ειδικές αλληλεπιδράσεις τύπου υποδοχέα – συνδέτη τόσο για να προσδεθούν

όσο και για να μεταναστεύσουν στον φορέα τους και φαίνεται πιθανόν ότι οι αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται από τα τρυπανοσώματα και άλλα παρασιτικά πρωτόζωα με τους φορείς τους είναι παρόμοιες (Miller et al., 1993). Στο *Toxoplasma* μία φωσφογλυκοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 72 kDa εμπλέκεται στην αναγνώριση λεκτινών των κυττάρων του μεσεντέρου εντόμων (Snary, 1985) και αλληλεπιδράσεις λεκτινών του παρασίτου με σάκχαρα των κυττάρων του ξενιστή κατέχουν θεμελιώδη ρόλο στην πορεία διαφοροποίησης του παρασίτου σε αυτόν (Ortega-Barría et al., 1999). Στην *Leishmania* μία λιποφωσφογλυκάνη είναι πιθανόν να αλληλεπιδρά με λεκτίνες και σελεκτίνες του μεσεντέρου εντόμων καθώς και άλλα μόρια της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών όπως καδερίνες και ιντεγκρίνες (Miller et al., 1993). Βέβαια εδώ πρέπει να αναφερθεί ότι η γλυκοσυλίωση μορίων της επιφάνειας του ωοκινέτη είναι περιορισμένη, υποδεικνύοντας ότι ίσως, μία αναγνώριση σακχάρων του τοιχώματος του μεσεντέρου από λεκτίνες του ωοκινέτη είναι πιο πιθανή, παρά το αντίθετο (Billingsley et al., 1997).

Οι ωοκινέτες του *P. berghei* χαρακτηρίζονται από την κυρίαρχη έκφραση στην επιφάνειά τους δύο αντιγόνων μικρού μοριακού βάρους (<30KD) των P25 και P28 (Paton et al., 1993, Shaw et al., 1996, Thompson et al., 1994), μορίων στόχων για την παραγωγή εμβολίων που μπλοκάρουν την μετάδοση της ελονοσίας. Πράγματι μονοκλωνικά αντισώματα, όπως το 13.1, ενάντια στην P28, αναστέλλουν την ανάπτυξη ωοκυστών σε κουνούπια ενώ και μονάχα η παρουσία της μίας αλυσίδας του συγκεκριμένου αντισώματος είναι αρκετή για εξίσου θεαματικά αποτελέσματα στην αναστολή της ανάπτυξης του παρασίτου στο κουνούπι (Yoshida et al., 1999). Πάντως πρόσφατα έχει αναφερθεί ότι τόσο η P28 όσο και η P25 δεν φαίνεται να διαδραματίζουν ρόλο προσδέτη για κάποιο υποθετικό υποδοχέα που ίσως μεσολαβεί κατά την *in vitro* διείσδυση κυττάρων εντόμων από ωοκινέτες (Siden-Kiamos et al., 2000). Από την άλλη μεριά έχει δειχθεί ότι μόριο ανάλογο του TRAP των σποροζωϊτών, το CTRP, εντοπίζεται και στους ωοκινέτες και αναστολή της έκφρασης του μπλοκάρει την ανάπτυξη του παρασίτου (Templeton et al., 2000, Dessens et al., 1999). Δεν είναι όμως ξεκάθαρο εάν η λειτουργία του

συγκεκριμένου μορίου εμπλέκεται σε διεργασίες κινητικότητας των ωοκινετών ή αναγνώρισης και διείσδυσης του κουνουπίσιου μεσεντέρου. Είναι λοιπόν φανερό ότι ο εντοπισμός γονιδίων του πλασμοδίου, τα οποία εκφράζονται ειδικά στα αναπτυξιακά στάδια διείσδυσης του μεσεντέρου από το παράσιτο, είναι αυξημένης σημασίας και πολλά υπόσχεται σε αυτό τον τομέα μια νέα μέθοδος, η SSH (suppression subtractive hybridization) (Dessens et al., 2000).

Εάν λίγα είναι γνωστά για τη μοριακή βιολογία του πρώτου από τα συμβαλλόμενα μέρη στις αλληλεπιδράσεις Πλασμοδίου–Μεσεντέρου κουνουπιού, τότε ακόμα λιγότερα είναι γνωστά για αυτές καθεαυτές τις αλληλεπιδράσεις. Η σύνδεση των ωοκινετών με το μεσεντέριο επιθήλιο του κουνουπιού φαίνεται να εξαρτάται από σάκχαρα του μεσεντέρου που μοιάζουν του σιαλικού οξέος, αλλά όχι από το ίδιο το σιαλικό οξύ (Zieler et al., 1999). Ένα υποψήφιο μόριο για συμμετοχή στις συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις είναι και μία μουκίνη που κλωνοποιήθηκε από το κουνούπι *Anopheles gambiae* (Shen et al., 1999). Πρόκειται για μία πρωτεΐνη που συνδέεται στην κυτταρική μεμβράνη, γλυκοσυλιώνεται και φαίνεται να βρίσκεται σε αφθονία στην επιφάνεια του μεσεντέρου επιθηλίου.

Έχοντας κάνει την πρώτη επαφή με το μεσέντερο οι ωοκινέτες διεγείρονται ώστε να διεισδύσουν στα επιθηλιακά κύτταρα. Η πορεία αυτή μετανάστευσης και παράλληλα διαφοροποίησης του παρασίτου εξαρτάται από τη συγγένεια που αυτό αναπτύσσει με στοιχεία του επιθηλιακού ιστού μεμβρανικά ή εκκρινόμενα όπως ο γλυκοκάλυκας και η βασική λεπίδα (Miller et al., 1993). Πράγματι, η διαφοροποίηση του ωοκινέτη σε ωοκύστη *in vivo* διεγείρεται με την αλληλεπίδραση του παρασίτου με τη βασική λεπίδα του μεσεντέρου (Sinden, 1999, Warburg et al., 1992, Weathersby, 1952). Αυτή κυρίως αποτελείται από Λαμινίνη και Κολαγόνο IV (Fessler et al., 1989) Πρόσφατα έχει δειχθεί από δύο ερευνητικές ομάδες ότι οι P25-P28 πρωτεΐνες του ωοκινέτη αλληλεπιδρούν τόσο με Λαμινίνη όσο και με Κολαγόνο IV (Vlachou et al., 2000, Adini et al., 1999). Τέλος πρέπει να τονισθεί ότι τόσο η *Leishmania* όσο και το *Trypanosoma* έχουν ομοίως με τον ωοκινέτη την

ικανότητα να προσδένονται σε Λαμινίνη (Ghosh et al., 1996, 1999, Giordano et al., 1994, 1999).

Οι ωοκινέτες δεν εμφανίζουν αλλαγές στη μορφή τους ως συνέπεια της διείσδυσης ή μετανάστευσης στα κύτταρα του μεσεντέρου εκτός και εάν το κουνούπι αναπτύξει μία ανοσολογική επίθεση εναντίον τους. Δύο μηχανισμοί φαίνεται να κυριαρχούν σε αυτή την επίθεση: ένας λυτικός μηχανισμός (Vernick et al., 1995) ο οποίος μπορεί να σχετίζεται και με την έκφραση ανοσοπεπτιδίων από το κουνούπι και ένας μηχανισμός μελάνωσης (Paskewitz et al., 1988). Αλλαγές που παρατηρούνται στο μεσεντέριο επιθήλιο κατά την διείσδυση των ωοκινετών περιλαμβάνουν την έκφραση ανοσοπεπτιδίων όπως defensins, GNBP και συνθάση νιτρικού οξειδίου (Dimopoulos et al., 1999, Luckhart et al., 1998). Άλλα ανοσοπεπτίδια που έχουν εντοπισθεί περιλαμβάνουν την cecropin (Vizioli et al., 2000) και την metchnikovin, με το αναπτυξιακό στάδιο του παρασίτου στο οποίο δρουν να παραμένει θολό (Sinden, 1999). Όψιμες αποκρίσεις ενάντια στον ωοκινέτη, καθώς αυτός εγκαταλείπει το επιθήλιο περιλαμβάνουν τον καταρράκτη φαινολοξειδασών (Paskewitz, 1989, Collins, 1986, Ahmed et al., 1999, Lee et al., 1998, Muller et al., 1999) με ένα εύρος σχετιζόμενων, με αυτό πρωτεασών (Chun et al., 2000, Gorman et al., 2000, Danielli et al., 2000, Paskewitz et al., 1999, Han et al., 1997) και αναστολέων τους (σερπινών) καθώς και μη ειδικές εστεράσες (Vernick et al., 1989). Και ο κατάλογος των ανοσοπεπτιδίων φαίνεται ότι μπορεί να μεγαλώσει ακόμη αρκετά καθώς ένα πιλοτικό πρόγραμμα εντοπισμού γονιδίων στο κουνούπι *Anopheles gambiae* υπόσχεται να φέρει στο φως μερικές δεκάδες ακόμα γονιδίων που εμπλέκονται στην ανοσολογική απόκρισή του (Dimopoulos et al., 2000).

Η συγκεκριμένη μελέτη φέρνει στο φως κάποιες από τις αλληλεπιδράσεις των ωοκινετών με κυτταρικές πρωτεΐνες κατά τη διαδικασία διείσδυσής τους σε κύτταρα τριών διαφορετικών κυτταρικών σειρών. Κάποιες από τις αλληλεπιδράσεις των ωοκινετών με πρωτεΐνες κυττάρων της κυτταρικής σειράς 4a-3A από *Anopheles gambiae* φαίνεται να αναπτύσσονται κατά εντελώς ανάλογο τρόπο και με μεσεντέριες πρωτεΐνες του κουνουπιού *Anopheles*

stephensi αν και το βιολογικό υλικό από μεσέντερα που χρησιμοποιήθηκε, είναι σαφώς λιγότερο από το κυτταρικό, καθώς και πολύ πιο πλούσιο σε πρωτεάσες. Η 4a-3A, είναι μία κυτταρική σειρά κυττάρων που μοιάζουν με αιμοκύτταρα και είναι γνωστό ότι εκφράζουν μία πλειάδα ανοσοπεπτιδίων (Muller et al., 1999), χωρίς όμως η συγκεκριμένη πληροφορία να είναι ικανή από μόνη της, είτε σε συνδυασμό με τη γνώση του μεγέθους και της διαλυτότητας των πρωτεϊνών που εντοπίστηκαν, να μας οδηγήσει σε ασφαλή συμπεράσματα για τη λειτουργία και πολύ περισσότερο για την ταυτότητα των συγκεκριμένων πρωτεϊνών.

Τα κουνούπια του είδους *Aedes aegypti* μεταδίδουν μία ποικιλία παθογόνων στον άνθρωπο και σε άλλα σπονδυλωτά, καθιστώντας το έντερό τους - το πρώτο σημείο επαφής με τα παθογόνα- μοντέλο μελέτης της διαδικασίας πέψης στα έντομα που θρέφονται με αίμα. Μια ποικιλία λεκτινών έχουν την ικανότητα να προσδένονται στην επιφάνεια του εντέρου, με κάποιες από αυτές να μπλοκάρουν μερικώς την *in vitro* πρόσδεση ωοκινετών σε αυτό (Zieler et al., 2000), καταδεικνύοντας τη σημασία επιφανειακών υδατανθράκων στην πρόσδεση των παθογόνων στην επιφάνεια του εντέρου. Είναι λοιπόν πιθανό οι πρωτεΐνες που εντοπίστηκαν στην κυτταρική σειρά MOS 20 να έχουν την ικανότητα πρόσδεσης υδατανθράκων ή αλληλεπίδρασης με υδατάνθρακες, αλλά προς το παρόν η μόνη γνώση που έχουμε για αυτές, δηλαδή του μεγέθους τους και της διαλυτότητάς τους, μας επιτρέπει μονάχα κάποιες τέτοιες εικασίες για το λειτουργικό τους ρόλο.

Η μύγα των φρούτων *Drosophila melanogaster* μπορεί να διευκολύνει πολύ την πειραματική ανάλυση των σταδίων που περνάει το παράσιτο της ελονοσίας σε έντομα. Αν και η μύγα έχει εντελώς διαφορετικό τρόπο ζωής από τα κουνούπια, εντούτοις ανήκουν στην ίδια φυλογενετική τάξη και έτσι αναμένεται να παρουσιάζουν ομοιότητες στη φυσιολογία τους. Πράγματι πρόσφατα έχει αναφερθεί η ικανότητα ωοκινετών του *P. gallinaceum* να διαφοροποιηθούν έως και σε μολυσματικούς σποροζωίτες, εφόσον ενεθούν στο αιμόκοιλο ενήλικων μυγών (Schneider et al., 2000). Βέβαια στη συγκεκριμένη μελέτη οι ωοκινέτες παρουσίασαν μια πλήρη ανικανότητα να

διασχίσουν το μεσέντερο, κάτι που ίσως είναι ικανό από μόνο του να εξηγήσει και την αδυναμία αυτής εδώ της μελέτης στον εντοπισμό μεσεντέριων πρωτεϊνών της *Drosophila melanogaster* που έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με ωοκινέτες. Επιπλέον έρχεται να δώσει ακόμα μεγαλύτερη αξία στο *in vitro* σύστημα διείσδυσης δροσοφιλικών κυττάρων, ως το μοναδικό ικανό να μελετήσει τη διείσδυση ωοκινετών σε έναν οργανισμό μοντέλο όπως είναι η *Drosophila melanogaster*. Πράγματι, η ανάπτυξη τεχνολογίας μεταφοράς γονιδίων στο συγκεκριμένο οργανισμό έχει οδηγήσει σε μία τεράστια ροή λειτουργικής πληροφορίας για γονίδια που εμπλέκονται στην εμβρυογένεση, στο σχηματισμό ιστών, στην ενδοκυττάρια σηματοδότηση, στην οργάνωση των νευρώνων, στην ανοσία, καθώς και στην διαλεύκανση της μοριακής βάσης της συμπεριφοράς. Από την άλλη μεριά το ολοκληρωμένο γονιδίωμά της, θα αποτελέσει μοναδικό εργαλείο στη συγκεκριμένη προσπάθεια ταυτοποίησης των δροσοφιλικών πρωτεϊνών που έχουν εντοπισθεί να έχουν την ικανότητα αλληλεπίδρασης με ωοκινέτες.

Ένα άλλο ενδιαφέρον στοιχείο είναι ότι η πρωτεΐνη P28 η οποία χρησιμοποιήθηκε για τον εντοπισμό των θέσεων πρόσδεσης του παρασίτου στα φίλτρα των πρωτεϊνών, εκφράζεται σε ένα πλήθος αναπτυξιακών του σταδίων. Πράγματι έχει αναφερθεί από τους Simonetti et al. (1993) ότι η P28 ανιχνεύεται για πρώτη φορά στο στάδιο των μακρογαμετών και εξακολουθεί να εκφράζεται μέχρι και την ανάπτυξη ωοκυστών. Επομένως δεν μπορεί να αποκλεισθεί το γεγονός ότι με κάποιες από τις πρωτεΐνες που εντοπίστηκαν, αλληλεπιδρούν και ή ίσως μονάχα παράσιτα αναπτυξιακού σταδίου διαφορετικού από αυτό των ωοκινετών.

Διαλεύκανση της διαδικασίας αλληλεπίδρασης του ωοκινέτη με μοριακά στοιχεία του κουνουπιού μπορεί να οδηγήσει στον σχεδιασμό νέων στρατηγικών για τον έλεγχο της μετάδοσης της ελονοσίας. Είναι αναμενόμενο ότι μέσω της καλύτερης κατανόησης της μοριακής βάσης ανάπτυξης του παρασίτου στον φορέα θα δοθεί η ευκαιρία να αναπτυχθούν νέες στρατηγικές βασισμένες στην ικανότητα α) να επαχθεί μεγαλύτερη ανθεκτικότητα-ανοσία του φορέα έναντι του παρασίτου, β) να σχεδιαστούν φορείς οι οποίοι δεν θα

παρέχουν βασικά μόρια μεσολαβητές για την ανάπτυξη του παρασίτου, γ) να σχεδιαστούν έντομα τα οποία να μπορούν να φέρουν αντιπαρασιτικούς παράγοντες έτσι ώστε να σκοτώνουν το παράσιτο στον ίδιο τον φορέα ή στο σπονδυλωτό ξενιστή του (Crampton et al., 1999). Τέτοιες στρατηγικές θα απαιτήσουν όχι μονάχα την κατανόηση των μοριακών αλληλεπιδράσεων παρασίτου και φορέα αλλά επιπλέον και την εύρεση του τρόπου με τον οποίο κάποιοι τέτοιοι γενετικοί χαρακτήρες θα καταφέρουν να φτάσουν έως τους φυσικούς πληθυσμούς του φορέα.

Κουνούπια του γένους *Anopheles* αποτελούν τους φορείς της ανθρώπινης ελονοσίας. Προσφάτως (Catteruccia et al., 2000) δείχθηκε ότι ένα μεταθετό στοιχείο βασισμένο στο μεταθετό στοιχείο Minos, φέροντας εξωγενές DNA, μπορεί να ενσωματωθεί με αρκετή επιτυχία και σταθερότητα στο γενετικό υλικό κουνουπιών του είδους *Anopheles stephensi* που αποτελεί έναν από τους φορείς ανθρώπινης ελονοσίας. Πρόκειται για το πρώτο αξιόπιστο σύστημα γενετικού μετασχηματισμού Ανωφελών και είναι πολύ πιθανό η ίδια τεχνική να επεκταθεί και στον κύριο φορέα της ανθρώπινης ελονοσίας που είναι ο *Anopheles gambiae*. Άλλωστε κυτταροκαλλιέργειες του *A. gambiae* μπορούν να μετασχηματισθούν χρησιμοποιώντας ένα παρόμοιο μεταθετό στοιχείο (Catteruccia et al., 2000). Παράλληλα και άλλα μεταθετά στοιχεία όπως το piggyBac (Grossman et al., 2000) και το Moose (Biessmann et al., 1999) ίσως είναι ικανά να λειτουργήσουν σε ικανοποιητικό βαθμό στον *A. gambiae*. Επόμενο βήμα θα είναι η απελευθέρωση τέτοιων γενετικά τροποποιημένων κουνουπιών στις ενδημικές περιοχές του φορέα. Τα συγκεκριμένα λοιπόν βήματα προόδου ίσως ανοίξουν το δρόμο για τη γενετική τροποποίηση Ανωφελών, έτσι ώστε σε ένα πρώτο στάδιο πειράματα αντίστροφης γενετικής να μπορούν πλέον να εκτελεστούν, με απώτερο μελλοντικό στόχο τελικά οι Ανωφελείς να γίνουν «αφιλόξενοι» πλέον για το παράσιτο της ελονοσίας .

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Adini A, Warburg A (1999) *Parasitology* **119**, 331-336
2. Ahmed A, Martin D, Manetti AG, Han SJ, Lee WJ, Mathiopoulos KD, Muller HM, Kafatos FC, Raikhel A, Brey PT (1999) *PNAS* **96**, 14795
3. Barreau C, Touray M, Pimenta PF, Miller LH, Vernick KD (1995) *Exp. Parasitol.* **81**,332-343
4. Beier JC (1998) *Annu. Rev. Entomol.* **43**, 519-543
5. Beier JC, Vanderberg JP (1998) *Malaria parasite biology, pathogenesis and protection (Sherman IW, ed) ASM Press Washington DC, USA* 49-61
6. Biessmann H, Walter MF, Le D, Chuan S, Yao JG (1999) *Insect Mol. Biol.* **8**, 201-212
7. Billingsley PF, Sinden RE (1997) *Parasitol. Today* **8**, 297-301
8. Birago C, Bucci A, Dore E, Frontali C, Zenobi P (1982) *Molec. Biochem. Parasitol.* **6**, 1-12
9. Catteruccia F, Nolan T, Blass C, Muller H-M, Crisanti A, Kafatos FC, Loukeris T (2000) *PNAS* **97**, 2157-2162
10. Catteruccia F, Nolan T, Loukeris TG, Blass C, Savakis C, Kafatos FC, Crisanti A (2000) *Nature* **405**, 959-962
11. Chen Q, Hedding A, Barragan A, Fernandez V, Pearce SF, Wahlgren M (2000) *J. Exp.Med.* **192**, 1-10
12. Chun J, McMaster J, Han Y, Schwartz A, Paskewitz SM (2000) *Insect Mol. Biol.* **9**, 39-45
13. Cociancich SO, Park SS, Fidock DA, Shahabuddin M, (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 12650-12655

14. Collins FH (1986) *Science* **234**, 607-610
15. Cooke BM, Tilley L,(1999) *Parasitol. Today* **15**, 176-178
16. Crampton JM, Beard CB, Louis C (1997) *The Molecular Biology of Insect disease vectors, A methods Manual (Chapman &Hall)* 67-91
17. Crampton JM, Stowell SL, Karras M, Sinden RE (1999) *Parassitologia* **41**, 473-477
18. Danielli A, Loukeris TG, Lagueux M, Muller HM, Richman A, Kafatos FC (2000) *PNAS* **97**, 7136-7141
19. Dessens JT, Beetsma AL, Dimopoulos G, Wengelnik K, Crisanti A, Kafatos FC, Sinden RE (1999) *EMBO J.* **18**, 6221-6227
20. Dessens JT, Margos G , Rodriguez MC, Sinden RE (2000) *Parasitol. Today* **16**, 354-356
21. Dimopoulos G ,Muller H-M, Kafatos FC(1999)*Parassitologia* **41**, 169-175
22. Dimopoulos G, Casavant TL, Chang S, Scheetz T, Roberts C, Donohue M, Schultz J, Benes V, Bork P, Ansorge W, Soares MB, Kafatos FC (2000) *PNAS* **97**, 6619-6624
23. Dubremetz JF, Torpier G, Maurois P, Prensier G, Sinden RE (1979) *CR Acad Sci Paris* **288**, 623-626
24. Dyer M, Day KP (2000) *Parasitol. Today* **16**, 102-107
25. Fessler JH, Fessler LI (1989) *Ann. Rev. Cell Biol.* **5**, 309-339
26. Frontali C (1994) *Genetica* **94**, 91-100
27. Garcia CRS (1999) *Parasitol. Today* **15**, 488-491
28. Garnham PCC (1966) *Malaria Parasites and Other Haemosporidia*, Blackwell
29. Ghosh A, Bandyopadhyay K, Kole L, Das PK (1999) *Biochem. J.* **337**, 551-558
30. Ghosh A, Edwards MJ, Jacobs- Lorena M (2000) *Parasitol. Today* **16**, 196-201

31. Ghosh A, Kole L, Bandyopadhyay K, Sarkar K, Das PK (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **226**, 101-106
32. Giordano R, Chammas R, Veiga SS, Colli W, Alves MJ (1994) *Braz. J. Med. Biol. Res.* **27**, 2315-2318
33. Giordano R, Fouts DL, Tewari D, Colli W, Manning JE, Alves MJ (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 3461-3468
34. Gorman MJ, Andreeva OV, Paskewitz SM (2000) *Insect Biochem. Mol. Biol.* **30**, 35-46
35. Gratzer WB, Dluzewski AR (1993) *Semin. Hematol.* **30**, 232-247
36. Grossman GL, Rafferty CS, Fraser MJ, Benedict MQ (2000) *Insect Biochem. Mol. Biol.* **30**, 909-914
37. Han YS, Salazar CE, Reese-Stardy SR, Cornel A, Gorman MJ, Collins FH, Paskewitz SM (1997) *Insect Mol. Biol.* **6**, 385-395
38. Jacobs-Lorena M, Oo M-M (1996) *The Biology of Disease Vectors (Beaty B Marquardt W, eds) University Press of Colorado*, 318-332
39. Janse CJ, Ponzi M, Pace T, Dore E, Mons B (1991) *Acta Leidensia* **60**, 43-48
40. King CA (1988) *Parasitol. Today* **4**, 315-319
41. Lee WJ, Ahmed A, della Torre A, Kobayashi A, Ashida M, Brey PT (1998) *Insect Mol. Biol.* **7**, 41-50
42. Luckhart S. et al. (1998) *PNAS U.S.A.* **95**, 5700-5705
43. McCormick CJ, Tuckwell DS, Crisanti A, Humphries MJ, Hollingdale MR (1999) *Mol. Biochem. Parasitol.* **100**, 111-124
44. Miller N, Lehane MJ (1993) *Parasitol. Today* **9**, 45-50
45. Moskalyk LA, (1996) *Insect Mol. Biol.* **5**, 261-268
46. Muller HM, Dimopoulos G, Blass C, Kafatos FC (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 11727-11735
47. Muller HM, Reckmann I, Hollingdale MR, Bujard H, Robson KJ, Crisanti A (1993) *EMBO J.* **7**, 2881-2889
48. Naitza S (1998) *Parasitol. Today* **14**, 479-484
49. Orlandi PA, Klotz FW, Haynes JD (1992) *J. Cell Biol.* **116**, 901-909

50. Ortega-Barria E, Boothroyd JC (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 1267-1276
51. Paskewitz SM (1989) *J. Parasitol.* **75**, 594-600
52. Paskewitz SM, Brown MR, Lea AO, Collins FH(1988) *J. Parasitol.* **74**, 432-439
53. Paskewitz SM, Reese-Stardy S, Gorman MJ (1999) *Insect Mol. Biol.* **8**, 329-337
54. Paton MG, Barker GC, Matsuoka H, Ramesar J, Janse CJ, Waters AP, Sinden RE (1993) *Mol. Biochem. Parasitol.* **59**,263-275
55. Persidis A. (2000) *Nat. Biotechnol.* **18**, 237-238
56. Pinder JC, Fowler RE, Bannister LH, Dluzewski AR, Mitchell G (2000) *Parasitol. Today* **16**, 240-245
57. Ponzi M, Janse CJ, Dore E, Scotti R, Pace T, Reterink TJF, Vanderberg FM, Mons B (1990) *Molec. Biochem. Parasitol.* **41**, 73-82
58. Ramasamy MS, Kulasekera R, Wanniarachchi IC, Srikrishnaraj KA, Ramasamy R (1997) *Med. Vet. Entomol.* **11**, 290-296
59. Rosenberg R, Rungsiwongse J (1991) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **45**, 574-577
60. Russel DG (1983) *Parasitology* **87**, 199-209
61. Russel DG, Sinden RE (1981) *J. Cell Scie.* **50**, 345-359
62. Schneider D, Shahabuddin M (2000) *Science* **288**, 2376-2379
63. Schneider I (1972) *J. Embryol. Exp. Morpho.* **27**, 353-365
64. Shahabuddin M, (1998) *Parasitology* **116** S83-93
65. Shaw MK, Thompson J, Sinden RE (1996) *Eur. J. Cell Biol.* **71**, 270-276
66. Shen Z, Dimopoulos G, Kafatos FC, Jacobs-Lorena M (1999) *PNAS* **96**, 5610-5615
67. Shen Z, Jacobs-Lorena M (1997) *J.Biol.Chem* **272**, 28895-28900
68. Sibley LD (1998) *Curr. Biology* **8**, R12-R14

69. Sinden- Kiamos I, Vlachou D, Margos G, Beetsma A, Waters AP, Sinden RE, Louis C (2000) *J. Cell Science in press*
70. Simonetti AB, Billingsley PF, Winger LA, Sinden RE (1993) *J. Eukaryot. Microbiol.* **40**, 569-576
71. Sinden RE (1978) *Rodent malaria (Killick- Kendrick R, Peters WA, eds) Academic Press, New York, USA*, 85- 186
72. Sinden RE (1999) *Parassitologia* **41**, 139-148
73. Singh KR (1971) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **55**, 127-133
74. Snary D (1985) *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **79**, 587-590
75. Tellam RL (1996) *Biology of the Insect Midgut (Lehane MJ, Billingsley PF, eds), Chapman & Hall*, 86-114
76. Templeton TJ, Kaslow DC, Fidock DA (2000) *Mol. Microbiol.* **36**, 1-9
77. Thompson J, Sinden RE (1994) *Mol. Biochem. Parasitol.* **68**, 189-196
78. van Pelt JF, Moshage HJ, Depla E, Verhave JP, Yap SH (1997) *J. Hepatol.* **27**, 688-698
79. Vaughan JA (1992) *J. Parasitol.* **78**, 716-724
80. Vaughan JA (1994) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **51**, 233-243
81. Vaughan JA (1994) *J. Parasitol.* **80**, 674-681
82. Vernick KD, Collins FH (1989) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **40**, 593-597
83. Vernick KD, Fujioka H, Seeley DC, Tandler B, Aikawa M, Miller LH (1995) *Exp. Parasitol.* **80**, 583-595
84. Vizioli J, Bulet P, Charlet M, Lowenberger C, Blass C, Muller HM, Dimopoulos G, Hoffmann J, Kafatos FC, Richman A (2000) *Insect Mol. Biol.* **9**, 75-84
85. Vlachou D, Lycett G, Sinden-Kiamos I, Sinden RE, Louis C (2000) *sub. Mol. Biochem. Parasitology*
86. Warburg A, Miller LH (1992) *Science* **255**, 448-450
87. Warburg A, Schneider I, (1993) *Exp. Parasitol.* **76**, 121-126
88. Ward GE (1993) *J. Cell Scie.* **106**, 237-248

89. Weathersby AB (1952) *J. Infect. Dis.* **91**, 198-205
90. Yoshida S, Matsuoka H, Luo E, Iwai K, Arai M, Sinden RE, Ishii A (1999) *Mol. Biochem. Parasitol.* **104**, 195-204
91. Zieler H, Garon CF, Fischer ER, Shahabuddin M (1998) *J. Eukaryot. Microbiol.* **45** 512-520
92. Zieler H, Garon CF, Fischer ER, Shahabuddin M (2000) *J.Exp.Biol* **203**, 1599-1611
93. Zieler H, Nawrocki JP, Shahabuddin M (1999) *J. Exp. Biol.* **202**, 485-495