

Πανεπιστήμιο Κρήτης  
Σχολή Θετικών Επιστημών  
Τμήμα Βιολογίας

## ΤΙΤΛΟΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

*«ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ  
ΜΕΤΑΜΟΤΡΩΤΕΑΣΩΝ ΣΤΟΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟ *An.gambiae*»*

Γουλιέλμακη Ευαγγελία

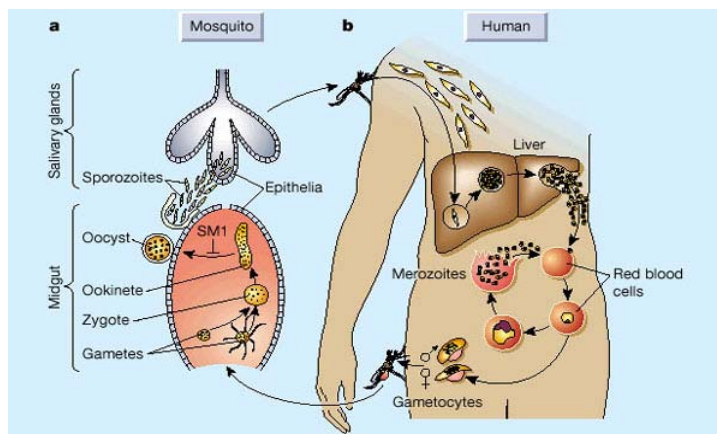
Μεταπτυχιακό τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Βιοιατρικής

# *Εισαγωγή*

## Κύκλος παρασίτου

Τα έντομα εκτίθενται σε μια μεγάλη ποικιλία μικροβίων κατά την διάρκεια της ζωής τους. Μερικά από αυτά μάλιστα προσλαμβάνουν αίμα σπονδυλωτών μολυσμένο με παράσιτα ή ιούς με αποτέλεσμα να αποτελούν φορείς σημαντικών ασθενειών (1).

Μια τέτοια περίπτωση είναι και η ασθένεια της ελονοσίας. Η ελονοσία προκαλείται από παράσιτα του γένους *Plasmodium* που ανήκουν στο φύλο των *Apicomplexa*. Ο κύκλος ζωής του παρασίτου ξεκινάει από τα θηλυκά κουνούπια του γένους των *Ανωφελινών*, όταν αυτά προσλάβουν αίμα μολυσμένο με παράσιτα. Μέσα στο έντομο αρχίζει ο διπλοειδής κύκλος ζωής του παρασίτου. Τα γαμετοκύτταρα, που υπάρχουν στο μολυσμένο αίμα παράγουν γαμέτες. Οι γαμέτες συντήκονται και δίνουν το ζυγωτό το οποίο μετασχηματίζεται σε ωκινέτες 16-20 ώρες μετά τη λήψη του μολυσμένου αίματος. Οι ωκινέτες που έχουν την δυνατότητα κίνησης, διαπερνούν το εντερικό επιθήλιο του κουνουπιού και μετασχηματίζονται σε ωκύστες. Σε κάθε ωκύστη λαμβάνει χώρα ένας μειωτικός κύκλος και αρκετοί μιτωτικοί, με αποτέλεσμα να παράγονται χιλιάδες απλοειδή σποροζωΐδια. Αυτά 10 μέρες μετά την είσοδο του παρασίτου στο κουνούπι ελευθερώνονται στο αιμόκοιλο και μεταναστεύουν στους σιελογόνους αδένες, όπου και εισβάλλουν. Ο κύκλος στο κουνούπι ολοκληρώνεται σε αυτό το στάδιο, όπου το κουνούπι με το επόμενο τσίμπημα ενύει παθογόνα σποροζωΐδια στον ξενιστή. Μέσα στον ξενιστή λαμβάνει χώρα ο απλοειδής κύκλος ζωής του παρασίτου. Τα σποροζωΐδια πολλαπλασιάζονται στο συκώτι και μετασχηματίζονται σε μια μορφή που καλείται *schizont*. Τα *schizonts* δίνουν τα μεροζωΐδια, κύτταρα που ελευθερώνονται στην κυκλοφορία του αίματος και προσβάλλουν τα ερυθροκύτταρα. Στα ερυθροκύτταρα τα μεροζωΐδια πολλαπλασιάζονται και κάποια από αυτά διαφοροποιούνται σε γαμετοκύτταρα, τα οποία και προσλαμβάνονται από το κουνούπι όταν αυτό τσιμπήσει τον ξενιστή, ξεκινώντας έτσι ξανά τον προηγούμενο κύκλο.(2)



Όπως στους περισσότερους συνδυασμούς φορέων με τα παράσιτα τους, έτσι και στην περίπτωση του κουνουπιού με το πλασμώδιο διαπιστώνεται μια συνεξέλιξη τέτοια που να επιτρέπει την επιτυχή ολοκλήρωση του κύκλου ζωής του παρασίτου μέσα στο κουνούπι, χωρίς να απειλείται η ζωή του τελευταίου. Για τον λόγο αυτό το παράσιτο εμφανίζει μεγάλες απώλειες κατά την διάρκεια του κύκλου ζωής του στο κουνούπι (1). Ειδικότερα κατά την εισχώρηση του παρασίτου μέσα από το εντερικό επιθήλιο αυτό φαίνεται να υφίσταται μεγάλες απώλειες, αφού ένα μικρό μέρος μόνο των ωοκινετών καταφέρνει τελικά να περάσει το μεσεντερικό επιθήλιο(3). Επειδή ακριβώς το στάδιο αυτό του παρασιτικού κύκλου αποτελεί ένα ευάλωτο σημείο για το παράσιτο προκαλεί ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον(4).

### Διείσδυση του εντερικού επιθηλίου

Κυτταρολογικές μελέτες που έχουν γίνει για το στάδιο αυτό της εισόδου του παρασίτου μέσα από το εντερικό επιθήλιο έχουν δείξει τα παρακάτω.

A) όσον αφορά το παράσιτο η εισβολή του μέσα από το εντερικό επιθήλιο γίνεται κυρίως μέσα από τα κύτταρα του επιθηλίου κι όχι ανάμεσα από αυτά. Μάλιστα την αρχική εισβολή ενός επιθηλιακού κυττάρου ακολουθεί μερικές φορές η εισβολή κι άλλων επιθηλιακών κυττάρων. Επιπλέον η κίνηση του παρασίτου πιθανόν να οφείλεται σε μόρια συνάφειας του ίδιου, η δέσμευση των οποίων πάνω σε ακίνητα μόρια-υποδοχείς του κουνουπιού δημιουργεί μια δύναμη μετακίνησης για αυτό.(4)

B) όσον αφορά το εντερικό επιθήλιο του κουνουπιού: σε μία πρόσφατη μελέτη, προτάθηκε ότι το πέρασμα του ωοκινέτη μέσα από αυτό έχει δραματικές συνέπειες και για τα προσβαλλόμενα κύτταρα(4). Συγκεκριμένα, το πέρασμα του ωοκινέτη μέσα από τα επιθηλιακά κύτταρα προκαλεί την απόπτωση των τελευταίων και την απομάκρυνση τους από το εντερικό επιθήλιο (4). Επιπλέον τα διπλάνα στα αποπτωτικά κύτταρα φάνηκε στην μελέτη αυτή να ενεργοποιούνται αρχίζοντας έτσι ίσως μια διαδικασία επούλωσης του ιστού με τον σχηματισμό λαμελοποδίων που κλείνουν το κενό που αφήνει το αποπτωτικό κύτταρο.. (4)

Κυτταρολογικά λοιπόν η διείσδυση του παρασίτου μέσα από το εντερικό επιθήλιο φαίνεται να είναι μια πολύπλοκη διαδικασία. Από την άλλη μεριά τώρα οι μοριακοί μηχανισμοί που ενεργοποιούνται σε αυτή την πολύπλοκη διαδικασία δεν είναι γνωστοί.

Πάντως έχει βρεθεί ότι η εισβολή του παρασίτου μέσα από το εντερικό επιθήλιο συνοδεύεται χρονικά από αυξανόμενη μεταγραφή του γονιδίου της

TER4 και της TER1(5,6). Η TER4 και η TER1 των Ανωφελινών παρουσιάζει σημαντική ομολογία με γονίδια που ανήκουν στην οικογένεια του βασικού συμπληρώματος και στην συγγενική οικογένεια των α<sub>2</sub>μακρογλοβουλίνων. Τα γονίδια του συμπληρώματος ενέχονται σε ανοσολογικές αντιδράσεις και η TER1 φαίνεται να έχει τον ίδιο ρόλο στο κουνούπι (6), ενώ η α<sub>2</sub>μακρογλοβουλινη δρα ως αναστολέας πρωτεασών. Εκτός από την TER4 αυξανόμενη μεταγραφή παρατηρείται και στο γονίδιο της σερπίνης 10 (7). Οι σερπίνες δρουν ως αναστολείς πρωτεασών σερίνης, ως αναστολείς σουπτιλισινών που είναι επίσης πρωτεάσες σερίνης και ως αναστολείς πρωτεασών κυστεΐνης, όπως οι κασπάσες και οι καθεψίνες (οι τελευταίες δυο παίζουν βασικό ρόλο στην απόπτωση). Τέλος και σύμφωνα με όσα έχουν προαναφερθεί για την απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων, αυξανόμενη μεταγραφή έχει παρατηρηθεί και στην κασπάση 7 και 3 των Ανωφελινών.(8)

Σε λεπτομερείς μελέτες του προτύπου έκφρασης γονιδίων σε ωοκινέτες δείχθηκε μεταγραφική ενεργοποίηση μιας σουπτιλισίνης, της sub2 (8) καθώς και έκφραση δύο πρωτεΐνων των μικρονηματίων, της CTRP και της WARP (8).

### **Ρόλος των πρωτεασών στην εισβολή του εντερικού επιθηλίου**

Τα παραπάνω δεδομένα τόσο στην κυτταρική βιολογία όσο και στη μοριακή βιολογία της διείσδυσης του παρασίτου θα μπορούσαν να υποστηρίξουν την ενεργή συμμετοχή πρωτεασών στην βιολογική αυτή διαδικασία.

Πρώτα απ' όλα, οι πρωτεάσες παίζουν βασικό ρόλο σε διαδικασίες που απαιτούν αναδιοργάνωση του ιστού, όπως είναι η αύξηση του κυττάρου, η αγγειογένεση, η μετάσταση ή διείσδυση των κυττάρων από μικροοργανισμούς, λευκοκύτταρα ή καρκινικά κύτταρα (9,10). Οι πρωτεάσες εκκρίνονται από τα κύτταρα ή δρουν ως επιφανειακές πρωτεάσες και προκαλούν την αναδιοργάνωση του εξωκυττάρου χώρου έχοντας ως υποστρώματα πρωτεΐνες αυτού, όπως ιντεγκρίνες ή λαμίνες (10). Με αυτόν τον τρόπο τα νευρικά κύτταρα επεκτείνουν το νευράξονά τους και τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να μεταναστεύουν από ιστό σε ιστό (10). Το γεγονός ότι η διείσδυση του ωοκινέτη μέσα από το εντερικό επιθήλιο αποτελεί στην ουσία ένα μοντέλο καταστροφής και αναδιάταξης του ιστού (4) εστιάζει το ενδιαφέρον μας σε πρωτεολυτικούς μηχανισμούς παρόμοιους με αυτούς που ενεργοποιούνται στις παραπάνω περιπτώσεις.

Πέρα από αυτό ο αποπτωτικός φαινότυπος των κυττάρων μέσα από τα οποία διέρχεται ο ωοκινέτης θα μπορούσε επίσης να αποτελέσει ένδειξη ενεργοποίησης πρωτεασών κατά την προσβολή του μεσεντέρου. Ειδικότερα μάλιστα οι πρωτεάσες του εξωκυττάρου στρώματος σε μελέτες της

κυτταρικής απόπτωσης σε άλλα συστήματα έχει δειχθεί ότι παίζουν τον ρόλο effector πρωτεασών (11).

Τέλος η αύξηση της μεταγραφής αναστολέων των πρωτεασών, όπως η σερπίνη 10 είναι ενδεικτική της ενεργοποίησης πρωτεολυτικών μονοπατιών κατά τη διαδικασία της εισβολής του ωοκινέτη μέσα από το επιθήλιο.(7)

### **Πρωτεάσες της εξωκυττάριας στοιβάδας (extracellular matrix, ECM)**

Μέχρι τώρα είναι γνωστός ένας μεγάλος αριθμός μορίων της εξωκυττάριας στοιβάδας με πρωτεολυτική δράση. Αυτές οι πρωτεάσες ανήκουν σε τέσσερις κυρίως μεγάλες οικογένειες:(12)

- 1) Πρωτεάσες σερινών, όπως η ουροκινάση η θρομβίνη, η πλασμίνη και άλλες
- 2) μεταλλοπρωτεάσες. Αυτή η οικογένεια, όπως και η προηγούμενη έχει βρεθεί να δρα σε γεγονότα αποικοδόμησης του εξωκυττάριου στρώματος
- 3) tolloid family of proteases, αυτή η οικογένεια δρα στην ενεργοποίηση παραγόντων αύξησης κ έχει συνδεθεί με την κυτταρική διαφοροποίηση.
- 4) η οικογένεια των ADAMs κι ADAMTSs, αυτές οι δυο κατηγορίες μεταλλοπρωτεασών με επιπλέον δομικά χαρακτηριστικά, όπως η παρουσία περιοχών συνάφειας, έχουν κοινή δομή κι έχει βρεθεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στη συνάφεια μεταξύ κυττάρων και στην πρωτεόλυση.

Η παρακάτω εργασία εστιάζεται στη μελέτη 2 από τις παραπάνω οικογένειες, αυτές των μεταλλοπρωτεασών και των ADAMTSs καθώς κι ενός αναστολέα των πρωτεασών, του TIMP (tissue inhibitor of metalloproteases), στο κουνούπι.

### **Μεταλλοπρωτεάσες**

Οι μεταλλοπρωτεάσες (MMPs) είναι μια μεγάλη οικογένεια πρωτεασών (~20 στον άνθρωπο). Τις χαρακτηρίζει το μοτίβο H<sub>2</sub>X<sub>2</sub>H<sub>2</sub>X<sub>2</sub>G<sub>2</sub>X<sub>2</sub>H<sub>2</sub> πάνω στο οποίο προσδένεται ένα μόριο Zn. Η πρόσδεση αυτή είναι σημαντική για την ενζυματική τους δραστηριότητα. Υπάρχουν δυο τύποι μεταλλοπρωτεασών, αυτές που εκκρίνονται στον εξωκυττάριο χώρο κι αυτές που παραμένουν προσδεμένες στην κυτταρική μεμβράνη MTMMPs. Στον άνθρωπο η μη ελεγχόμενη δράση των μεταλλοπρωτεασών συνδέεται με ασθένειες, όπως για παράδειγμα ο καρκίνος.(13)

Στην Drosophila υπάρχουν δυο μεταλλοπρωτεάσες η MMP1 και η MMP2. Καμία από αυτές δεν χρειάζεται στην εμβρυογένεση. Χρειάζονται όμως για αναδιοργάνωση της εξωκυττάριας στοιβάδας σε μετέπειτα εξελικτικά στάδια. Η MMP1 είναι σημαντική για την ανάπτυξη της τραχείας στις λάρβες, μια διαδικασία που περιλαμβάνει πρωτεόλυση της εξωκυττάριας στοιβάδας, ενώ η MMP2 εμπλέκεται στην λύση των ιστών κατά την μεταμόρφωση, όπως του

ιστού του εντέρου. Μάλιστα κατά τη λύση του εντέρου λαμβάνει χώρα σε εκτεταμένο βαθμό απόπτωση των κυττάρων, στην οποία εμπλέκεται και η MMP2, αλλά δεν είναι γνωστό με ποιον τρόπο.(14)

Στη βάση δεδομένων ENSEMBL υπάρχουν τρία καταχωρημένα γονίδια ως MMPs, δύο από τα οποία είναι ορθόλογα της MMP1 και MMP2 της *Drosophila melanogaster*. Εμείς δουλέψαμε με το ένα από αυτά με αριθμό καταχώρησης ENSANGG00000019238, το οποίο και ονομάσαμε AgMMP1, λόγω μεγαλύτερης ορθολογίας με την DmMMP1.

## **ADAMTSs**

Η οικογένεια των ADAMTSs είναι μια πρόσφατα μελετημένη οικογένεια πρωτεασών με 19 μέλη στον άνθρωπο. Η βασική δομή τους είναι η εξής: έχουν ένα μοτίβο πρόσδεσης Zn, όπως και οι MMPs, που αποτελεί το καταλυτικό τους κέντρο και ακολουθείται από ένα disintegrin domain. Στη συνέχεια ακολουθούν thrombospondin repeats (TSR), τα οποία συνδέονται μέσω περιοχών πλούσιων σε κυστεΐνη. (12)

Η λειτουργία των ADAMTSs έχει συνδεθεί με πρωτεόλυση δομών πρωτεογλυκάνης της εξωκυττάριας στοιβάδας (hADAMTS4,5) καθώς και με μετανάστευση κυττάρων, όπως των μελανοκυττάρων στο ποντίκι (17) ή του leader cell κατά τον σχηματισμό της γονάδας στο *C.elegans* (15). Μια ακόμη ενδιαφέρουσα λειτουργία των ADAMTSs (hADAMTS13) είναι αυτή της πρωτεόλυσης του παράγοντα vWF, ο οποίος είναι σημαντικός για την πήξη του αίματος (16). ADAMTSs δεν έχουν μελετηθεί στα έντομα και στην εργασία αυτή επικεντρωθήκαμε στην μελέτη δυο καταχωρημένων στη βάση δεδομένων ως ADAMTSs. Αυτές έχουν αριθμό καταχώρησης ENSANGG0000003307 (AgADAMTS1) και ENSANGG00000010390 (AgADAMTS2).

Ένα ακόμη ενδιαφέρον μόριο της εξωκυττάριας στοιβάδας που έχει συγγενική δομή με τις ADAMTSs είναι η rapillin. Η rapillin δεν έχει καταλυτικό domain, αλλά έχει την χαρακτηριστική κασέτα των ADAMTSs, δηλαδή ένα TSR, που ακολουθείται από ένα ή περισσότερα TSRs, μέσω μιας περιοχής πλούσιας σε κυστεΐνη. Επιπλέον μετά από τα TSRs ακολουθεί μια περιοχή επίσης πλούσια σε κυστεΐνες που τη διαδέχονται πολλαπλά Kunitz domains, ένα μοτίβο RGD και μια μοναδική πλούσια σε κυστεΐνες αλληλουχία, που καλείται lacunin domain. Η rapillin έχει βρεθεί στον άνθρωπο, την *Drosophila* και το *C.elegans*. Στην *Drosophila* είναι βασικό συστατικό της περιτροφικής μεμβράνης του εντέρου. Η δράση της rapillin δεν είναι ακόμη γνωστή. Πάντως λόγω ομοιότητας στη δομή με τις ADAMTSs είναι πιθανό να υπάρχουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δυο μορίων. Ίσως μάλιστα μέσω αυτών των αλληλεπιδράσεων να κατευθύνεται η δράση των ADAMTSs σε

συγκεκριμένα σημεία του εξωκυττάριου στρώματος (18). Στην βάση δεδομένων Ensembl υπάρχει ένα καταχωρημένο γονίδιο ως rapillin με αριθμό ENSANGG00000019572.

### *TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteases).*

Η οικογένεια πρωτεϊνών TIMP είναι ενδογενείς αναστολείς μεταλλοπρωτεασών. Στα θηλαστικά υπάρχουν 4 γονίδια που κωδικοποιούν αναστολείς μεταλλοπρωτεασών, ενώ στην *Drosophila* 1. Πρόσφατα δείχθηκε ότι εκτός από MMPs οι πρωτεΐνες αυτές αναστέλλουν και άλλες πρωτεάσες, τις ADAMs και τις ADAMTSs(19). Καταστολή της έκφρασης του γονιδίου TIMP στην *Drosophila* έχει σαν συνέπεια τα ενήλικα άτομα να παρουσιάζουν *inflated wings*, διασταλμένα μεσέντερα και αυτόλυση των ιστών τους, ενώ πεθαίνουν πρόωρα. Αυτοί οι φαινότυποι θα μπορούσαν να αποδοθούν σε κακή συνάφεια μεταξύ των κυττάρων και σε μη ικανοποιητική αναδιοργάνωση του εξωκυττάριου ιστού. Τα παραπάνω θα μπορούσαν να οφείλονται, όπως προτείνουν οι ερευνητές, σε ανεξέλεγκτη δράση μεταλλοπρωτεασών, λόγω της μη έκφρασης του αναστολέα τους (20). Αυτό στηρίζεται επιπλέον από το γεγονός ότι αν η MMP1 ή η MMP2 εκφραστεί εκτοπικά δίνει ένα συγκεκριμένο φαινότυπο, ο οποίος αναστρέφεται με συνέκφραση του TIMP (14). Στην βάση δεδομένων έχει χαρακτηριστεί ένα γονίδιο ως υποψήφιος αναστολέας κι έχει αριθμό καταχώρησης ENSANGG00000012010 (AgTIMP).



# *Αποτελεσματα*

Επιλέξαμε να κλωνοποιήσουμε γονίδια μέλη των οικογενειών που προαναφέρθηκαν. Για τον σκοπο αυτό χρησιμοποιώντας την γενομική πληροφορία που είναι καταχωρημένη στην βάση δεδομένων σχεδιάσαμε κατάλληλους εκκινητές για να χρησιμοποιηθούν σε αλυσιδωτες αντιδράσεις πολυμερισμού. Υπόστρωμα για τις αντιδράσεις αυτές ήταν cDNA συνθεμένο από συνολικό RNA με αντίστροφη μεταγραφή. Για τον σχεδιασμό των εκκινητών ακολουθήσαμε τα παρακάτω κριτήρια:

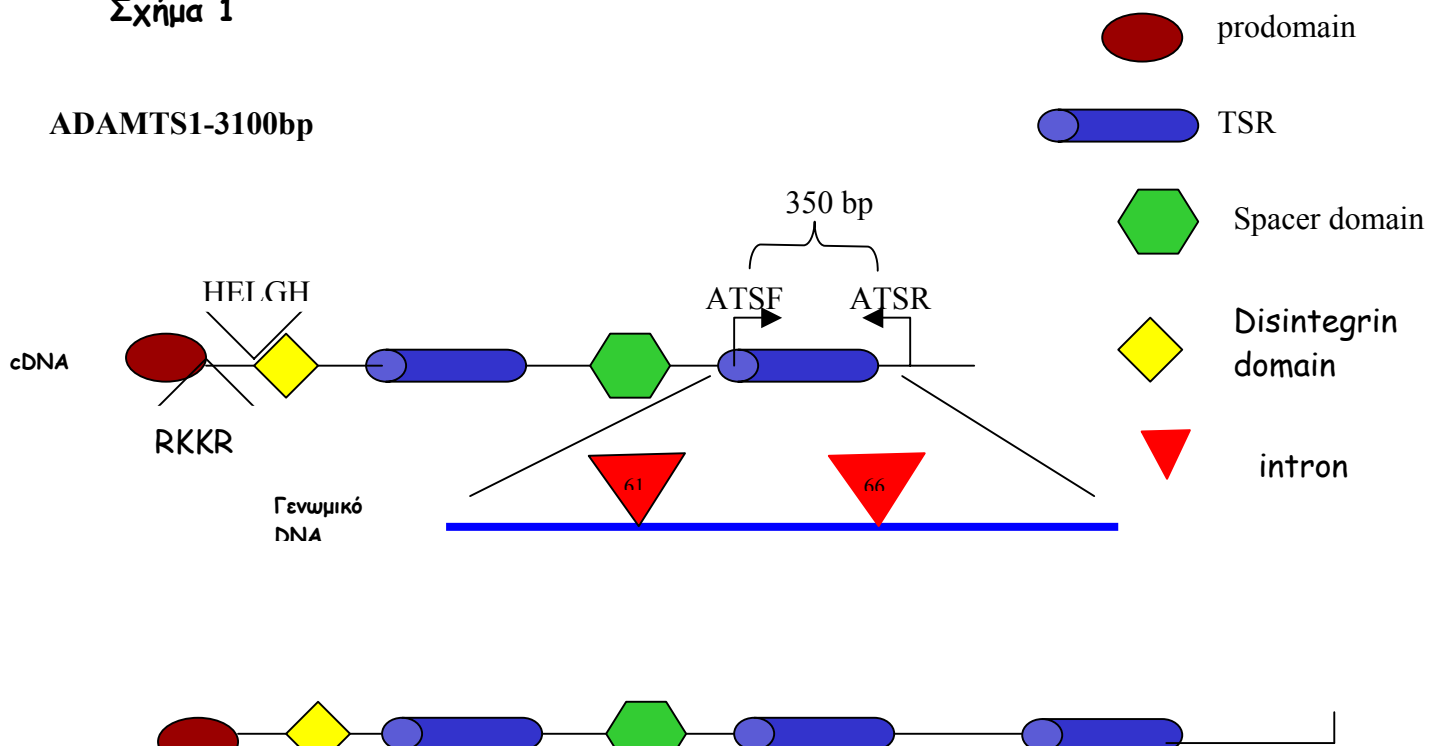
- 1) να βρίσκονται μέσα σε εξόνια που να διαχωρίζονται από μεγάλα ιντρόνια. Κατι τέτοιο θα επέτρεπε τον διαχωρισμό προϊόντων που προέρχονταν από γενομικό DNA από προϊόντα που προέρχονταν από το cDNA
- 2) να μην βρίσκονται στα όρια εξονίου -ιντρονίου
- 3) επειδή σαν υπόστρωμα για την απομόνωση χρησιμοποιήθηκε cDNA και επειδή τα γονίδια είναι μεγάλα σε μέγεθος και η αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής πολλές φορές δεν συνθέτει μεγάλα σε μήκος cDNA, επιλέξαμε τους εκκινητές έτσι ώστε να οριοθετούν περιοχές προς το 3' άκρο του γονιδίου.

Τα προϊόντα των αντιδράσεων πολυμερισμού υποκλωνοποιήθηκαν σε πλασμιδιακό φορέα και αλληλουχήθηκαν. Τα αποτελέσματα των αλληλουχιών συγκρίθηκαν με την αλληλουχία που δίνεται στη βάση δεδομένων για κάθε γονίδιο προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ταυτότητα του.

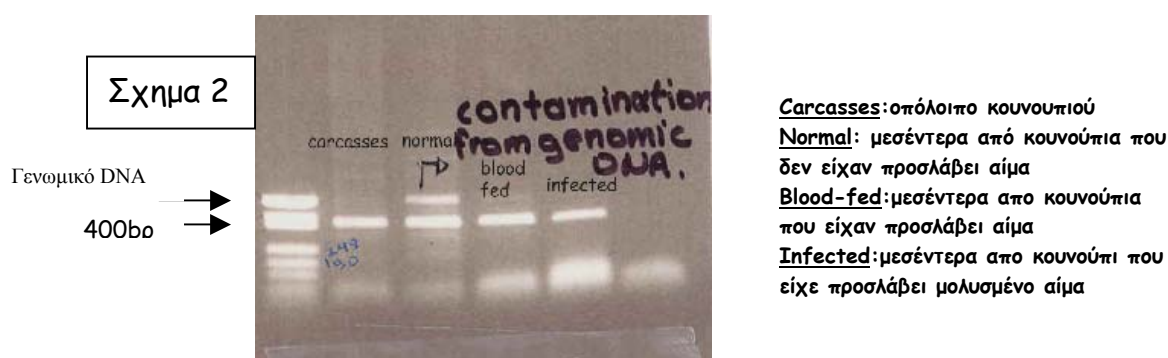
#### A) *AgADAMTS1*

Σύμφωνα με την αλληλουχία που δίνεται στην βάση δεδομένων το γονίδιο που ονομάσαμε *AgADAMTS1* έχει την παρακάτω οργάνωση. Ένα prodomain που χωρίζεται απο το υπόλοιπο μόριο μέσω ενός μοτίβου πιθανής αναγνώρισης φουρίνης (RKKR), ακολουθεί ένα disintegrin domain, στην αρχή του οποίου βρίσκεται μία θέση πρόσδεσης Zn (HELGH). Μετά από αυτό υπάρχουν δύο TSRs που χωρίζονται μεταξύ τους μέσω ενός spacer domain. Η δομή του μορίου φαίνεται στο Σχήμα 1, όπου και σημειώνονται τα ζευγάρια εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν και η περιοχή του μορίου που αυτοί οριοθετούν.

Σχήμα 1

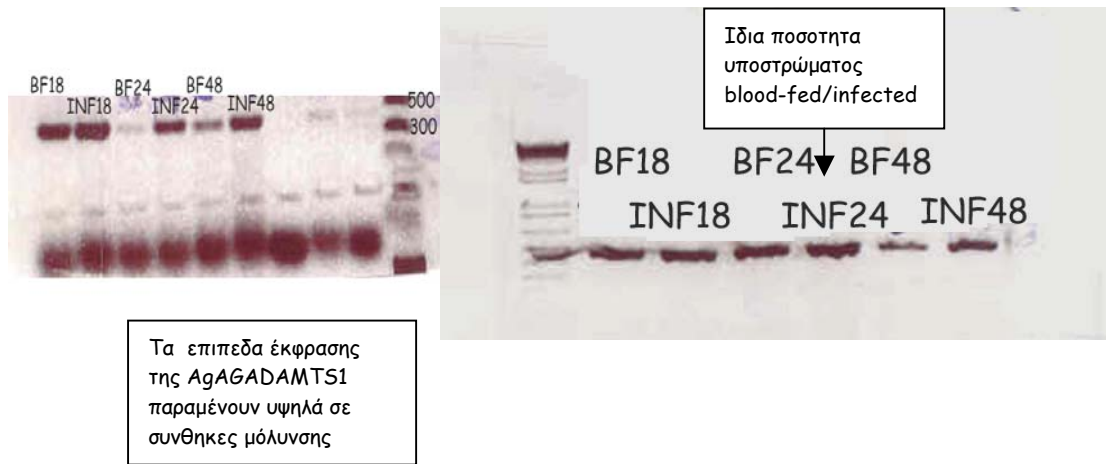


Χρησιμοποιώντας λοιπόν για την AgAGADAMTS1 τους εκκινητές ATSF/ATSR, που οριοθετούν το δεύτερο thrombospondin domain (σχήμα 1), και υπόστρωμα cDNA απομονωμένο από μεσέντερα κουνουπιού μολυσμένο από το παράσιτο, μεσέντερα κουνουπιού που είχε προσλάβει αίμα (μη μολυσμένο), και μεσέντερα κουνουπιού που δεν είχε προσλάβει αίμα καθώς και cDNA από υπόλοιπο κουνουπιού έγιναν αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμερισμού. Αυτές οι αντιδράσεις έδωσαν το αναμενόμενο προϊόν 400bp για την περίπτωση που το γονίδιο εκφραζόταν και τα αντίστοιχα ιντρόνια εκτέμνονταν (σχήμα 2). Το κομμάτι αυτό απομονώθηκε και μπήκε σε T-φορέα και το πλασμίδιο αλληλουχήθηκε. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αλληλουχία που απομονώθηκε συμφωνεί με την αλληλουχία που δίνει η βάση δεδομένων.



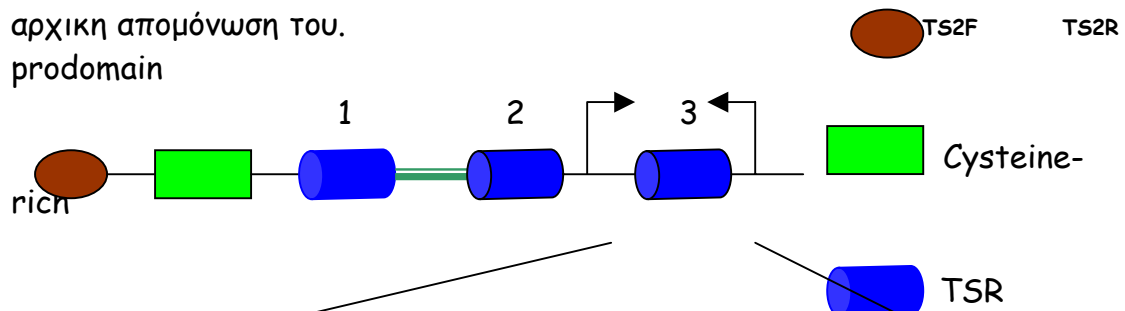
Για να μελετηθούν αλλαγές στο πρότυπο έκφρασης του γονιδίου AgAGADAMTS1 σε συνθήκες μόλυνσης με το παράσιτο, μεσέντερα κουνουπιού απομονώθηκαν σε διαφορετικές χρονικές στιγμές μετά την πρόσληψη ή μη μολυσμένου ή μη αίματος. Από τα μεσέντερα απομονώθηκε συνολικό RNA και συντέθηκε cDNA με αντίστροφη μεταγραφή. Τα cDNA χρησιμοποιήθηκαν σε αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμερισμού, χρησιμοποιώντας και πάλι τους εκκινητές ATSF και ATSR. Στις αντιδράσεις ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές S<sub>7</sub>, προϊόν των οποίων είναι μία περιοχή του γονιδίου της S<sub>7</sub>, μιας ριβοσωμικής πρωτεΐνης υψηλά και σταθερά περαγόμενης και της οποίας το πρότυπο δεν αλλάζει στις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες. Όπως δείχνει το σχήμα 3 τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου μεταξύ 24-48 ωρών, όπου και σημειώνεται το πέρασμα του κύριου όγκου των οοκινετών από το μεσέντερο διατηρούνται υψηλά στα μολυσμένα μεσέντερα σε σχέση με τα μεσέντερα που απομονώνονται από κουνούπια που έχουν προσλάβει μη μολυσμένο αίμα

Σχήμα 3

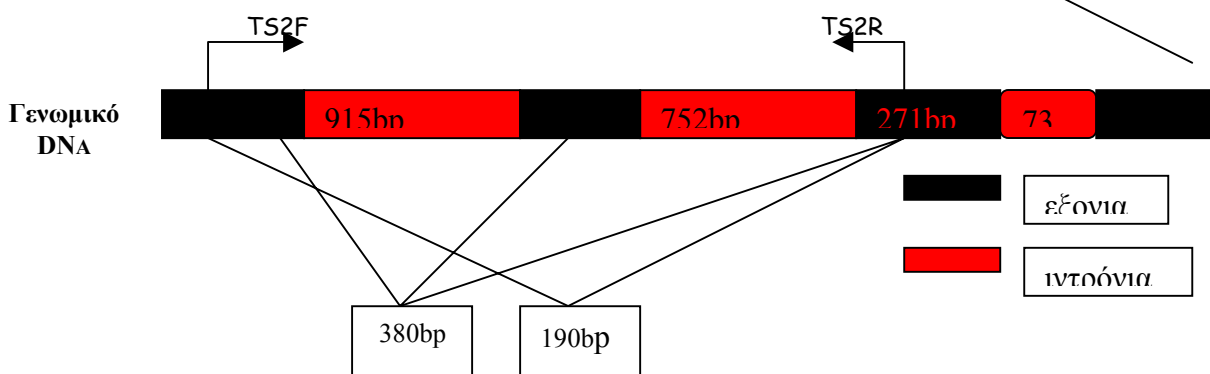


**B) AgADAMTS2**

Η δομή που έχει το γονίδιο της AgADAMTS2 σύμφωνα με την αλληλουχία που δίνεται στην βάση δεδομένων είναι η παρακάτω: όπως η AgADAMTS1 έτσι και η 2 έχει ένα prodomain, που το χωρίζει απο την υπόλοιπη πρωτεΐνη ένα πιθανό μοτίβο αναγνώρισης φουρίνης RRRR. Ακολουθεί μια περιοχή πλούσια σε κυστεΐνη που ξεκινάει με ένα μοτίβο πρόσδεσης Zn (HELGH). Στη συνέχεια ακολουθούν 3 TSR που χωρίζονται με περιοχές spacer. Η δομή του γονιδίου φαίνεται σχηματικά παρακάτω, όπου και σημειώνονται τα ζευγάρια εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν για την αρχική απομόνωση του.

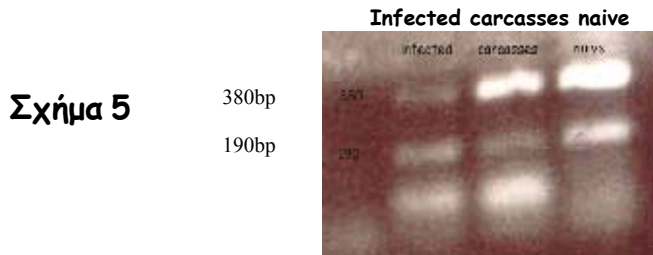


Σχήμα 4



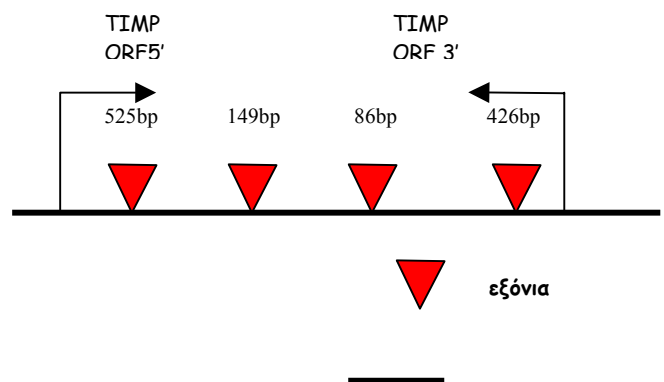
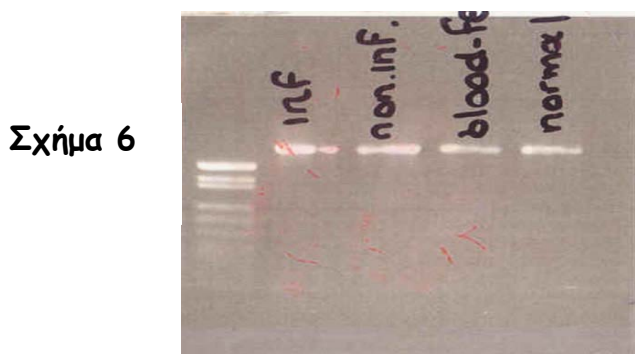
Χρησιμοποιώντας για την AgADAMTS2 τους εκκινήτες TS2F/TS2R που οριοθετούν το τρίτο thrombospondin domain και το ίδιο υπόστρωμα όπως

πριν έγιναν αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης. Αυτές έδωσαν μαζί με το αναμενόμενο σε μέγεθος κομμάτι (380bp) κι ένα μικρότερο (190bp) (σχήμα 5). Τα κομμάτια αυτά απομονώθηκαν, μπήκαν σε T-φορέα και αλληλουχηθήκαν. Η μελέτη αυτών των αλληλουχιών και η σύγκρισή τους με την βάση δεδομένων Ensembl έδειξε ότι και τα δύο προϊόντα προέρχονται από cDNA AgADAMTS2, αλλά στην περίπτωση του μικρότερου κομματιού το cDNA προέρχεται από εναλλακτικό μετάγραφο. Άρα το γονίδιο της AgADAMTS2 εκφράζεται και με εναλλακτικό μάτισμα δίνει δύο τύπους μεταγράφων.



### Β) AgTIMP

Σύμφωνα με την βάση δεδομένων Ensembl το TIMP είναι σχετικά μικρό γονίδιο, του οποίου το ανοιχτό πλαίσιο διαβάσματος (ORF) αντιστοιχεί σε 629bp. Γι αυτό τον λόγο σχεδιάστηκαν εκκινητές που υβριδοποιούνται στην αρχή και το τέλος του ORF. Αυτοί οι εκκινητές ονομάστηκαν TIMPORF5'-TIMPORF3'. Οι αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης έγιναν όπως και στην περίπτωση των ADAMTSs με τα ίδια υποστρώματα, και το κομμάτι που απομονώθηκε καθώς και η σχηματική απεικόνιση του γονιδίου φαίνεται στο σχήμα 6.



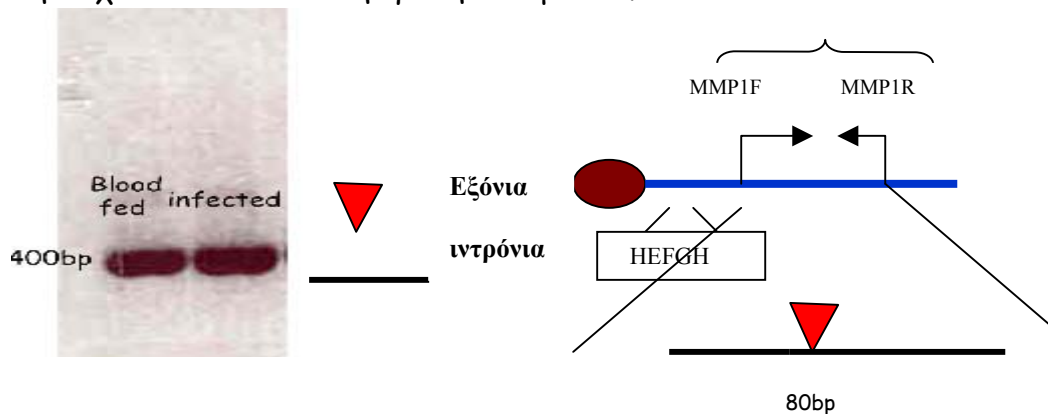
ιντρόνια

### Γ) AgMMP1

Η χαρακτηρισμένη ως AgMMP1 στην βάση δεδομένων είναι ένα μετάγραφο μήκους 1400bp. Σύμφωνα με την αλληλουχία που δίνεται το γονίδιο της

AgMMP1 έχει την παρακάτω οργάνωση: ένα prodomain, που το ακολουθεί ένα καταλυτικά ενεργό κέντρο, με μια θέση πρόσδεσης Zn. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση μέρους του μεταγράφου αυτού του γονιδίου ήταν η MMP1F-MMP1R, οι οποίοι οριοθετούν μια περιοχή λίγο πιο κάτω από το ενεργό κέντρο της μεταλλοπρωτεάσης. Σχηματικά η οργάνωση του μορίου και η θέση των εκκινητών φαίνεται παρακάτω. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης έγινε όπως και στην περίπτωση των παραπάνω μορίων κι έδωσε ένα κομμάτι 400bp, όπως αναμενόταν (σχήμα 7). Το κομμάτι κλωνοποιήθηκε σε T-φορέα και η αλληλούχηση του πλασμιδίου συμφώνησε με την αλληλουχία που δίνεται στην βάση δεδομένων.

Σχήμα 7



### Λειτουργική ανάλυση των γονιδίων I

Μετά τον χαρακτηρισμό των γονιδίων το δεύτερο βήμα στην μελέτη τους ήταν μία πρώτη λειτουργική τους ανάλυση. Στην περίπτωση του κουνουπιού δεν υπάρχουν πολλά εργαλεία μελέτης της λειτουργίας των γονιδίων. Μία μεθοδολογία που εφαρμόστηκε πρόσφατα στον συγκεκριμένο οργανισμό είναι αυτή του RNA interference. Προκειμένου να προχωρήσουμε σε τέτοια πειράματα θα έπρεπε να παράγουμε δίκλωνο RNA. Για τον σκοπό αυτό τα κομμάτια των γονιδίων που απομονώθηκαν έπρεπε να κλωνοποιηθούν σε κατάλληλο φορέα (pI10).

Για την παραγωγή δίκλωνου RNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν κομμάτια cDNA μήκους 350-1200bp. Εμείς επιλέξαμε τα μικρότερα κομμάτια από αυτά που είχαν ήδη υποκλωνοποιηθεί σε T-φορέα, δηλαδή για τη AgADAMTS1 το κομμάτι που οριοθετούν οι εκκινητές ATSF-ATSR, για την ADAMTS2 το κομμάτι που οριοθετούν οι εκκινητές TS2F-TS2R, ενώ για το AgTIMP χρησιμοποιήθηκε όλο το μετάγραφο του γονιδίου που είναι ούτως ή άλλως μικρό. Έτσι τα κομμάτια αυτά κόπηκαν από τον T-φορέα χρησιμοποιώντας θέσεις περιοριστικών ενζύμων που είχαν σχεδιαστεί στους εκκινητές και κλωνοποιήθηκαν στον pI10 φορέα στη θέση πολλαπλής κλωνοποίησης (multiple cloning site). Η θέση αυτή βρίσκεται ανάμεσα σε δυο

Θέσεις υποκινητων T7 πολυμεράσης, πράγμα που επέτρεψε την παραγωγή δίκλωνου RNA (σχήμα 8). Σχηματικά τα βήματα κλωνοποίησης φαίνονται παρακάτω (σχήμα 9).

Σχήμα 8

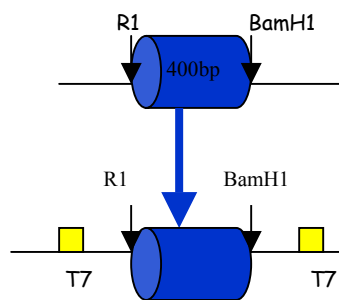
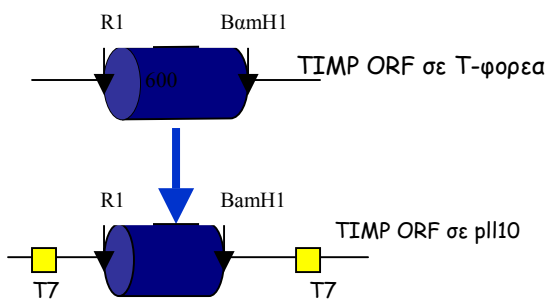


Τα δίκλινα RNA που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα RNAi. Φαίνεται το διαφορετικό ηλεκτροφορητικό πρότυπο σε σχέση με τα μονόκλινα RNA

Σχήμα 9

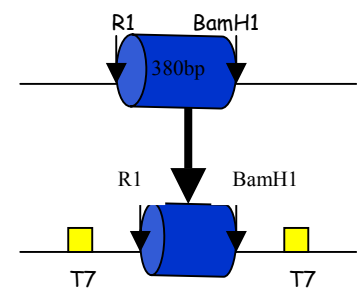
AgTIMP

AgADAMTS2



ATSF/ATSR κομμάτι σε p110 φορέα

AgADAMTS1



TSP3F/TSP3R κομμάτι σε p110 φορέα

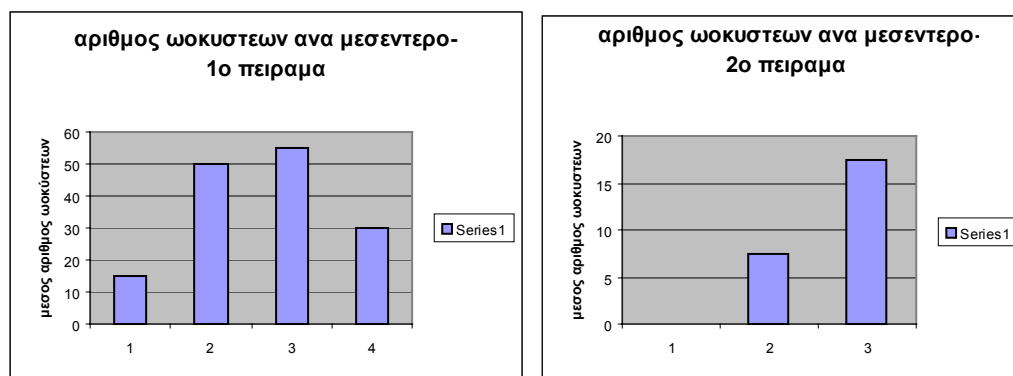
### Πειράματα RNAi

Τα δίκλινα RNA που φαίνονται στο σχήμα 8 ενέθηκαν σε ενήλικα θηλυκά κουνούπια προκειμένου να ξεκινήσει ο μηχανισμός του RNA interference. Μετά από 4 μέρες, όπως περιγράφεται στα υλικά και μέθοδοι, τα κουνούπια μολύνθηκαν με ένα γενετικά επιλεγμένο στέλεχος του παρασίτου της ελονοσίας, το οποίο εκφράζει GFP στο στάδιο της ωκύστης. Ως control σε αυτά τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν κουνούπια τα οποία είχαν ενεθεί με δίκλινο RNA της green fluorescent protein (GFP). Έξι ημέρες μετά την μόλυνση με το παράσιτο μετρήθηκαν οι ωκύστες στα μεσέντερα των κουνουπιών. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων φαίνεται στο σχήμα 10. Από το πρώτο και το δεύτερο πείραμα γίνεται εμφανές ότι όταν μειώνεται η παραγωγή της AgADAMTS1 και AgADAMTS2, λόγω RNAi, ο αριθμός των ωκύστεων που μετράμε στα μεσέντερα αυξάνεται κατα μέσο όρο (από τα δύο πειράματα) 5 φορές σε σχέση με το control για την AgADAMTS1 και 5-15



φορές κατά μέσο όρο και πάλι για την AgADAMTS2. Για το TIMP έχουμε αποτελέσματα μόνο από το πρώτο πείραμα, λόγω θνησιμότητας των κουνουπιών, μετά την ένεση dsRNA TIMP.

Σχήμα  
10



- 1: αριθμος ωοκυστεων σε μεσεντερα κουνουπιων, που ενεθηκε dsGFP (control)
- 2: αριθμος ωοκυστεων σε μεσεντερα κουνουπιων, που ενεθηκε dsAGADAMTS1
- 3: αριθμος ωοκυστεων σε μεσεντερα κουνουπιων, που ενεθηκε dsADAMTS2
- 4: αριθμος ωοκυστεων σε μεσεντερα κουνουπιων, που ενεθηκε dsTIMP

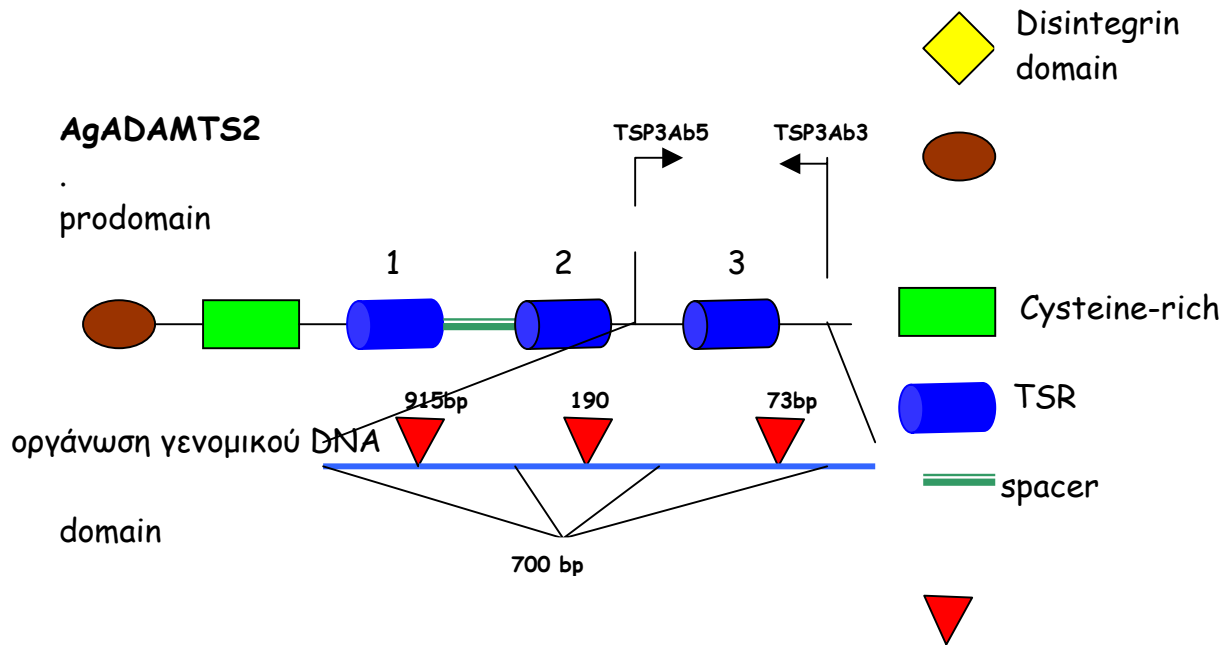
### *Παραγωγή αντισωμάτων για την παραπέρα λειτουργική ανάλυση των γονιδίων.*

Εκτός από την μεθοδολογία RNAi σημαντικό εργαλείο για την λειτουργική ανάλυση των γονιδίων είναι και η παραγωγή αντισωμάτων. Για να γίνει αυτό θα έπρεπε να παραχθούν τμήματα των πρωτεϊνών αυτών και να ενεθούν σε ζώα για

την παραγωγή αντισωμάτων. Για τον σκοπό αυτό σχεδιάστηκαν οι εκκινητές TIMPAb5-TIMPAb3 για το AgTIMP, TSP3Ab5-TSP3Ab3 για την AgADAMTS2, και AbADAMTS5-ATSF για την AgADAMTS1. Επειδή οι πρωτεΐνες παρήχθησαν σαν υβρίδια είτε με His-πεπτιδίο (AgADAMTS1) είτε με GST και His-πεπτιδίο (AgADAMTS2, AgTIMP) υπήρχε μέριμνα ώστε να διατηρηθεί το σωστό αναγνωστικό πλαίσιο. Επιπλέον στους εκκινητές σχεδιάστηκαν θέσεις περιοριστικών ενζύμων, προκειμένου να διευκολυνθούν τα παρακάτω βήματα κλωνοποίησης. Χρησιμοποιώντας τους παραπάνω εκκινητες και υποστρώματα ίδια με αυτά που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση των αρχικών κλώνων η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης έδωσε τα αναμενόμενα σε μέγεθος προϊόντα. Αυτά στη συνέχεια υποκλωνοποιήθηκαν σε T-φορέα και αλληλουχήθηκαν. Αφού επιβεβαιώθηκε η αλληλουχία τους το επόμενο βήμα ήταν η κλωνοποίηση των κομματιών αυτών σε φορείς έκφρασης (pQE30 για AgADAMTS1 και pGAT2 για AgADAMTS2 και TIMP) και η παραγωγή πρωτεϊνών. Σχηματικά οι περιοχές



που οριοθετούν οι παραπάνω εκκινητές και τα βήματα κλωνοποίησης φαίνονται παρακάτω.



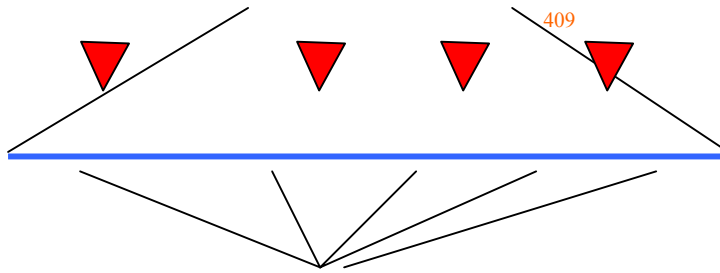
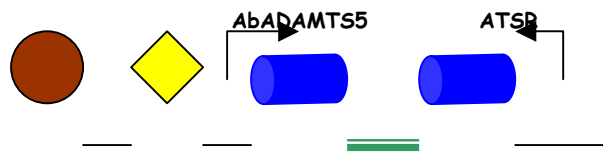
**ιντρόνια**



**εξόνια**



# AgADAMTS1



68 61 66

1400bp

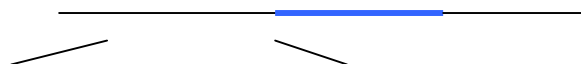


pQE30ADAMTS1

BamH1

Sal1

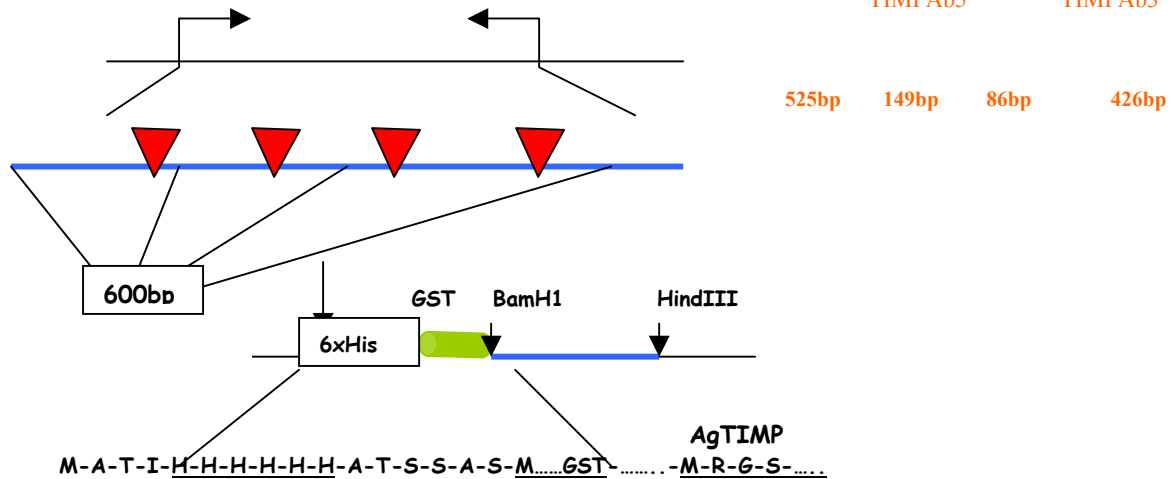
6XHis



ADAMTS1  
M-R-G-S-H-H-H-H-H-T-L-A-H.....

# AgTIMP

TIMPAb5'      TIMPAb3'



## Έκφραση πρωτεϊνών

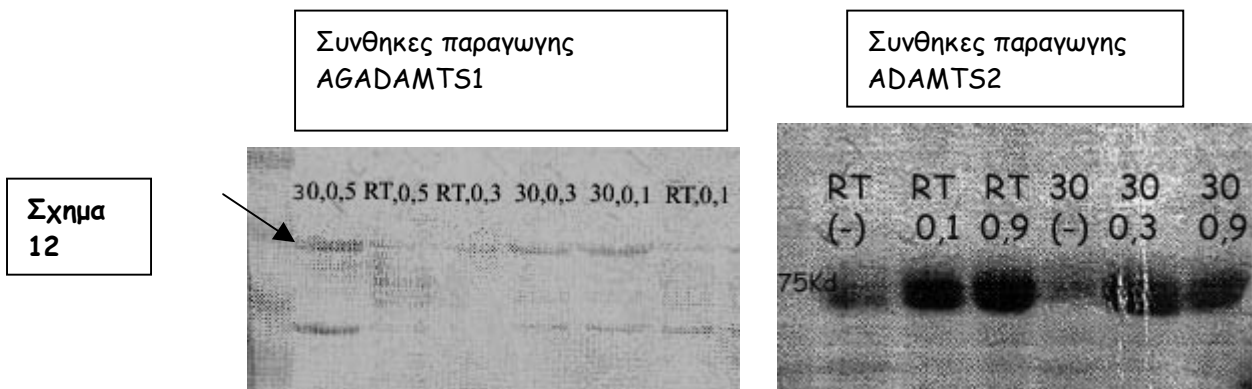
Βακτηριακά στελέχη κατάλληλα για την παραγωγή πρωτεϊνών μετασχηματίστηκαν με τα παραπάνω πλασμίδια. Συγκεκριμένα το πλασμίδιο PQE30 AGADAMTS1 και pGAT2 TIMP μετασχηματίστηκε στο βακτηριακό στέλεχος SGE13009 [pREP4] ενώ το πλασμίδιο pGAT2 ADAMTS2 στο βακτηριακό στέλεχος BL21, Η παραγωγή των υβριδικών πρωτεϊνών επάγεται με προσθήκη IPTG και στις δύο περιπτώσεις. Η παραγωγή πρωτεϊνών στα μετασχηματισμένα στελέχη ελέγχθηκε σε συνθήκες επαγωγής και μη επαγωγής. Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Η σύγκριση των δυο συνθηκών (επαγωγή -μη επαγωγή) έδειξε αν η πρωτεΐνη του αναμενόμενου μοριακού βάρους παρήχθη ή όχι. Για την His-ADAMTS1 το αναμενόμενο μοριακό βάρος της υβριδικής πρωτεΐνης είναι 50kd, για το GST-TIMP είναι 55kd και για την GST-ADAMTS2 το αναμενόμενο μέγεθος της πρωτεΐνης είναι 75kd.

Όπως φαίνεται από το σχήμα 12 είδαμε παραγωγή πρωτεΐνης His-ADAMTS1 σε διαφορετικές συνθήκες επαγωγής (0,3, 0,9mM IPTG) και σε διαφορετικές θερμοκρασίες (RT, 30°C). Ως συνθήκες παραγωγής για την His-ADAMTS1 επιλέχθηκαν οι 30°C κι επαγωγή με 0,3mM IPTG για 3 ώρες.

Πρέπει να σημειωθεί ότι η υβριδική πρωτεΐνη παρήχθη σε σωματίδια έγκλισης (inclusion bodies).

Στο σχήμα 12 φαίνεται επίσης η παραγωγή της ADAMTS2. Και πάλι χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συνθήκες παραγωγής (0,3/0,5/1mM IPTG κι επαγωγή για διαφορετικά χρονικά διαστήματα σε διαφορετικές θερμοκρασίες -30°C, RT). Η πρωτεΐνη που παρήχθη εντοπιζόταν επίσης σε σωματίδια έγκλισης. Ως καταλληλότερες συνθήκες παραγωγής επιλέχθηκαν η επαγωγή με 0,5mM IPTG για 5 ώρες στους 30°C.

Όσον αφορά το TIMP δεν καταφέραμε να παράγουμε πρωτεΐνη, παρόλο που δοκιμάστηκαν διαφορετικές συνθήκες παραγωγής.



### Καθαρισμός των πρωτεϊνών

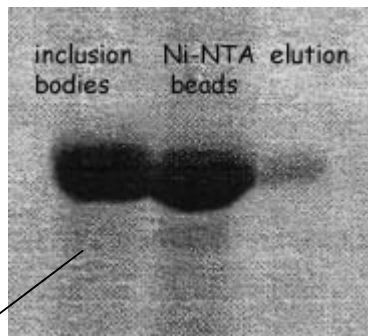
Λόγω του ότι οι πρωτεΐνες είναι σημασμένες με 6 μόρια ιστιδίνης, μπορούν να καθαριστούν με χρωματογραφία συγγένειας χρησιμοποιώντας κολώνα νικελίου. Επειδή όμως όπως προαναφέρθηκε οι παραγόμενες υβριδικές πρωτεΐνες εντοπιζόταν μόνο σε inclusion bodies ο καθαρισμός τους μπορούσε να γίνει μόνο σε συνθήκες αποδιάταξης. Αυτό έγινε για την His-ADAMTS1 και την GST-ADAMTS2.

Στην περίπτωση της GST-ADAMTS2, η πρωτεΐνη δέθηκε σε κολώνα νικελίου και μέρος της εκλούστηκε από την κολώνα. Οι συνθήκες που επιλέχθηκαν για την έκλυση της πρωτεΐνης ήταν σε χαμηλότερες συνθήκες pH, pH 4.5. Οι εκλούσεις των πρωτεϊνών φαίνονται στο σχήμα 13. Η πρωτεΐνη αυτή που εκλούστηκε χρησιμοποιήθηκε για την ανοσοποίηση 2 κουνελιών.

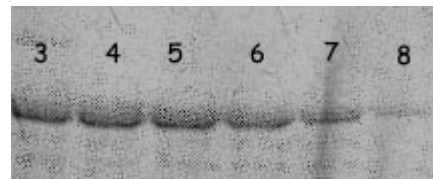
Εκλούση His-ADAMTS1

Σχημα  
13

Αντιγόνο για  
ανοσοποίηση



Εκλουσεις GST-  
ADAMTS2

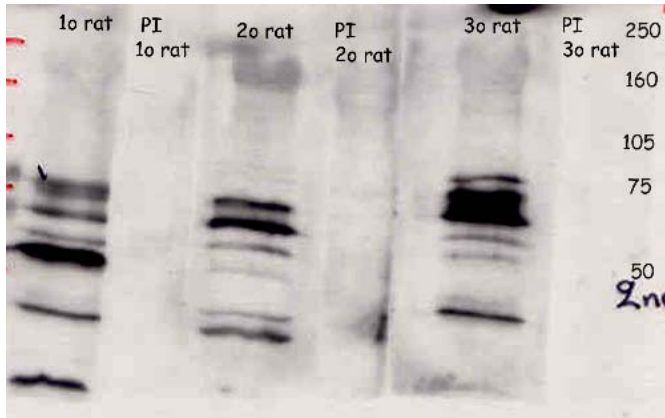


Στην περίπτωση της His-ADAMTS1 δεν καταφέραμε να εκλούσουμε ικανοποιητικά την πρωτεΐνη παρόλο που δοκιμάστηκαν διαφορετικές συνθήκες. Για αυτό τον λόγο απομονωμένα σωματίδια έγκλισης εμπλουτισμένα σε ADAMTS1 κι όχι η καθαρισμένη πρωτεΐνη χρησιμοποιήθηκε για την ανοσοποίηση 3 αρουραίων. Στο σχήμα 13 φαίνεται η μη επιτυχημένη έκλουση από την κολώνα νικελίου (η πρωτεΐνη που εκλούστηκε δεν ήταν αρκετή για ανοσοποίηση ) καθώς και η πρωτεΐνη που χρησιμοποιήθηκε τελικά για παραγωγή αντισώματος.

### Ελεγχος των αντισωμάτων

Τα αντισώματα που παρήχθησαν δοκιμάστηκαν στη συνέχεια σε πειράματα ανοσοεντοπισμού σε εκχυλίσματα πρωτεϊνών από ολόκληρα ενήλικα κουνούπια και από μεσέντερα κουνουπιών. Ως control στα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκε ορός από τα ζώα πριν αυτά ανοσοποιηθούν ( preimmune serum-PI). Το αναμενόμενο μέγεθος πρωτεΐνης με βάση την αμινοξική τους σύσταση και αλληλουχία είναι 160Kd για την ADAMTS2 και 120kd για την ADAMTS1. Παρόλα αυτά πρέπει να σημειωθεί ότι οι ADAMTSs υφίστανται γενικά εκτεταμένες πρωτεολυτικές τροποποιήσεις. Πέρα από το γεγονός ότι το προπεπτίδιο απομακρύνεται ενδοκυττάρια μέσω δράσης φουρίνης, με την έκκριση τους στον περικυττάριο χώρο πολλές από τις ADAMTSs υφίστανται επιπλέον τροποποιήσεις, οι οποίες μάλιστα αλλάζουν και την ενζυμική τους δράση (21).

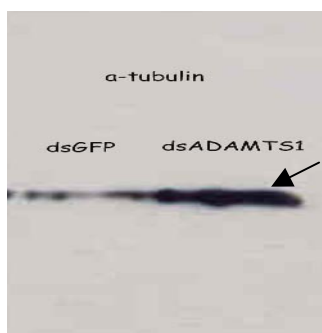
Στο σχήμα 14 φαίνονται τα πειράματα ανοσοεντοπισμού χρησιμοποιώντας ως πρώτο αντίσωμα αυτό που παρήχθη στους αρουραίους για την AGADAMTS1. Όπως φαίνεται τα αντισώματα και από τα τρία ζώα αναγνωρίζουν πρωτεΐνες μικρότερου μοριακού μεγέθους, την οποία όμως δεν αναγνωρίζει ο ορός πριν την ανοσοποίηση.



Σχημα 14

Για να ελέγξουμε αν οι πρωτεΐνες αυτές που αναγνωρίζει το αντίσωμα ανταποκρίνονται στην ενδογενή AGADAMTS1 ενέσαμε σε κουνούπια δίκλωνο RNA για την ADAMTS1, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Θεωρητικά λόγω RNAi τα επίπεδα πρωτεΐνης που αναγνωρίζουν τα αντισώματα θα έπρεπε να είναι μειωμένα στα ζώα που έχουν ενεθεί με δίκλωνο RNA, εφόσον τόσο το RNAi όσο και τα αντισώματα είναι ειδικά. Και πάλι ως control χρησιμοποιήθηκαν κουνούπια ενεμένα με dsGFP, στα οποία το αντίσωμα θα πρέπει να εντοπίζει την φυσιολογική ποσότητα πρωτεΐνης. Μόνο στο πείραμα που χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα από τον δεύτερο αρουραίο τα αποτελέσματα συμφωνούν με τα προσδοκώμενα. Τα επίπεδα της πρωτεΐνης που αναγνωρίζει το αντίσωμα μειώνονταν σημαντικά σε εκχυλίσματα μεσεντέρων από κουνούπια ενεμένα με dsADAMTS1 σε σύγκριση με τα εκχυλίσματα από κουνούπια ενεμένα με dsGFP. Επειδή όμως αυτό μπορεί να οφείλεται σε άνισο φόρτωμα των δειγμάτων στο πήκτωμα, έγινε stripping της μεμβράνης από το πρώτο αντίσωμα ( $\alpha$ -AGADAMTS1) και ανοσοεντοπισμός με αντίσωμα εναντίον της τουμπουλίνης που είναι ένα γονίδιο που μεταγράφεται και μεταφράζεται σταθερά και υψηλά. Όπως φαίνεται στο σχημα 15 περισσότερο πρωτεϊνικό εκχύλισμα είναι φορτωμένο από κουνούπια ενεμένα με dsADAMTS1, γεγονός που δείχνει ότι πράγματι η πρωτεΐνη που αναγνωρίζει το αντίσωμα μειώνεται σε συγκέντρωση ή και εξαφανίζεται σε κουνούπια στα οποία έχει ενεθεί dsRNA έναντι της AGADAMTS1.

Σχημα 15



Περισσότερη πρωτεΐνη είναι φορτωμένη στο δείγμα dsADAMTS1

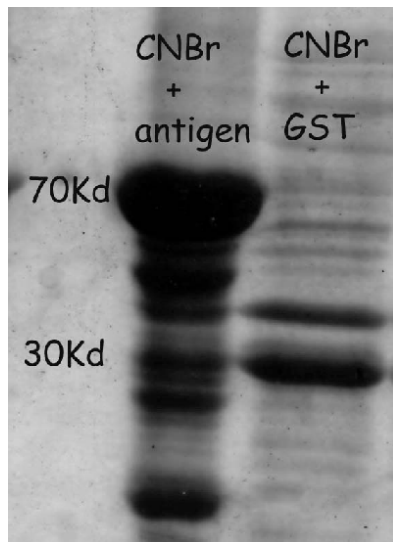


Η πρωτεΐνη που αναγνωρίζει το αντιγόνο μειώνεται σημαντικά

Ο έλεγχος του αντισώματος για την ADAMTS2 έγινε με τον ίδιο τρόπο, δηλαδή με πειράματα ανοσοεντοπισμού σε εκχυλίσματα από ολόκληρα κουνούπια και από μεσέντερα. Ως control χρησιμοποιήθηκε και πάλι ορός των ζώων πριν την ανοσοποίηση τους με ADAMTS2 αντιγόνο. Το αντίσωμα αναγνωρίζει μια διπλή μπάντα πρωτεϊνών στην περιοχή των 160 kd στα ενήλικα άτομα ενώ στα μεσέντερα μία πρωτεΐνη ~130Kd (σχήμα 17A). Αυτή η πρωτεΐνη δεν αναγνωρίζεται από τον preimmune serum. Πρέπει να σημειωθεί ότι το αντίσωμα αναγνωρίζει και πεπτίδια μικρότερου μοριακού μεγέθους. Ωστόσο πρέπει να σημειωθεί ότι η εικόνα που δίνει το αντίσωμα δεν είναι καθαρή. Για αυτό τον λόγο αποφασίστηκε να το καθαρίσουμε.

### Καθαρισμός του αντισώματος α-ADAMTS2

Εκχυλίσματα από βακτήρια στα οποία έχει επαχθεί η παραγωγή του αντιγόνου ADAMTS2 σε υβρίδιο με GST δέθηκαν σε κολώνα βρωμιούχου κυανίου. Επίσης παρήχθησαν εκχυλίσματα από βακτήρια που εκφράζανε μόνο GST (μετασχηματισμένα με το αρχικό πλασμίδιο pGAT2) και τα οποία είχαν επαχθεί με τον ίδιο τρόπο. Αυτά τα εκχυλίσματα δέθηκαν επίσης σε κολώνα βρωμιούχου κυανίου. Ελέγξαμε αν το δέσιμο ήταν επιτυχές στις δυο κολώνες. Σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης έγινε ηλεκτροφόρηση σε συνθήκες αποδιάταξης (SDS-PAGE) ενός μικρού μέρους της κολώνας. Όπως φαίνεται (σχήμα16) η κολώνα του αντιγόνου έχει πράγματι δέσει το αντιγόνο, ενώ στην GST κολώνα το μεγαλύτερο μέρος της πρωτεΐνης που έχει προσδεθεί είναι η GST (MB ~30Kd).



Σχημα 16

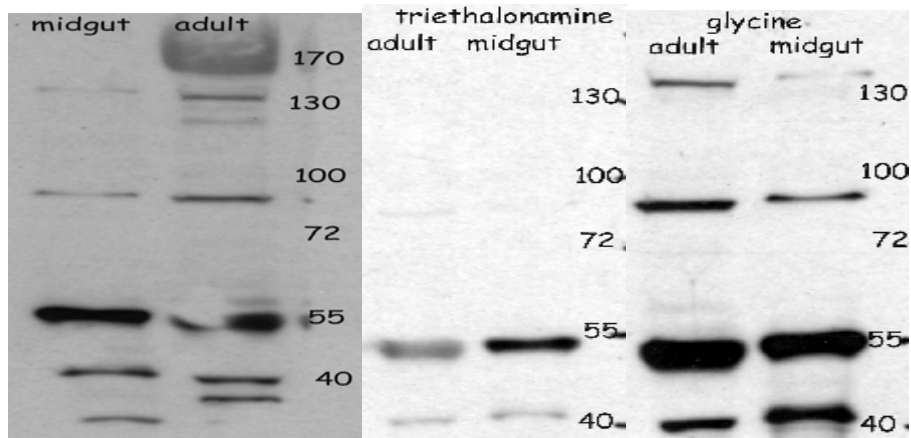
Κατόπιν μέρος του ορού του αντισώματος πέρασε από την GST κολώνα, προκειμένου να δεθούν σε αυτή τα μη ειδικά αντισώματα που περιείχε ο ορός. Για επιπλέον καθαρισμό του ορού αυτός πέρασε κατόπιν από την κολώνα του αντιγόνου. Κατόπιν έγινε έκλουση του αντισώματος με διάλυμα τριαιθανολαμίνης (pH11) και στη συνέχεια με ένα διάλυμα γλυκίνης (pH3). Τόσο το έκλουσμα τριαιθανολαμίνης όσο και το έκλουσμα γλυκίνης δοκιμάστηκε σε πειράματα ανοσοεντοπισμού με εκχυλίσματα πρωτεϊνών από ολόκληρα κουνούπια και από μεσέντερα κουνουπιών (σχημα17). Όπως φαίνεται το αντίσωμα που παίρνουμε με το έκλουσμα γλυκίνης είναι σχετικά πιο καθαρό και αναγνωρίζει πεπτίδια περίπου ίδιου μοριακού μεγέθους όπως ο αρχικός ορός.

Το πείραμα αυτό πέρα από το ότι μας έδωσε ένα σχετικά καθαρότερο αντίσωμα από τον αρχικό ορό, αποτελεί και μία επιπλέον ένδειξη ότι ο ορός είναι ειδικός για την AgADAMTS2. αυτό στηρίζεται από το γεγονός ότι το αντίσωμα πέρασε από την κολώνα του αντιγόνου και δεσμεύτηκε σε αυτό

A. Πριν τον καθαρισμό

B. Μετά τον καθαρισμό





Σχῆμα 17

# Συζήτηση

## Κλωνοποίηση-χαρακτηρισμός γονιδίων

Συγκεντρώσαμε ικανοποιητικά δεδομένα που υποστηρίζουν ότι τα προβλεπόμενα με μεθόδους βιοπληροφορικής γονίδια που επιλέξαμε να μελετήσουμε εκφράζονται. Τα γονίδια αυτά τα ονομάσαμε *AgADAMTS1*, *AgADAMTS2*, *AgMMP1* και *AgTIMP*. Και από τα τέσσερα αυτά γονίδια απομονώθηκαν τμήματα τους, τα οποία αντιστοιχούν σε ώριμο εκφραζόμενο μήνυμα. Για την απομόνωση τους χρησιμοποιήθηκε η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με υπόστρωμα cDNA και εκκινητές κατάλληλα σχεδιασμένους.

Ειδικότερα για την *ADAMTS2* η αλληλούχηση των κλώνων έδειξε να υπάρχει εναλλακτικό ματίσμα του εξονίου το οποίο προβλέπεται ότι κωδικοποιεί το τρίτο thrombospondin domain. Η φυσιολογική σημασία αυτού του εναλλακτικού ματίσματος πρέπει να διερευνηθεί μια και τα TSP repeats (η αλληλουχία, η θέση τους και ο αριθμός τους) είναι σημαντικά για την λειτουργικότητα των *ADAMTSs*.

### Λειτουργική ανάλυση των γονιδίων

Τον αρχικό χαρακτηρισμό των παραπάνω γονιδίων ακολούθησε μία πρώτη λειτουργική ανάλυση τριών από αυτά, της *AgADAMTS1*, *AgADAMTS2* και *AgTIMP*. Η λειτουργική ανάλυση έγινε με πειράματα RNAi και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής, ενώ προσπαθήσαμε να παράγουμε και αντισώματα που θα χρησιμεύσουν ως εργαλείο σε μελλοντικά πειράματα.

### *RNAi* πειράματα

Η αρχική μας υπόθεση ήταν ότι οι μεταλλοπρωτεάσες και ο αναστολέας τους πιθανόν παίζουν ρόλο στην αναδιοργάνωση του επιθηλιακού ιστού του εντέρου όταν το παράσιτο περνάει μέσα από αυτόν.

Τα αποτελέσματα που έχουμε από τα πρώτα RNAi πειράματα δείχνουν ότι μειώνοντας τα επίπεδα των *ADAMTSs* μέσω ενέσεων dsRNA έχουμε μια σημαντική αύξηση των wokύστεων που μετράμε στο μεσέντερο σε σχέση με το control. Μια μικρότερη αν και εμφανής αύξηση στον αριθμό των wokύστεων παρατηρείται και όταν ενύουμε dsRNA έναντι του *TIMP*.

Αναζητήσαμε βιβλιογραφικά δεδομένα τα οποία να σχετίζονται με λειτουργίες των *ADAMTSs* σε άλλους οργανισμούς. Η ανθρώπινη *ADAMTS13* ευθύνεται για την πρωτεόλυση του von Willebrand factor του αίματος (16). Το παράσιτο κατά την εισβολή του στο μεσέντερο εκφράζει δυο πρωτεΐνες των μικρονηματίων, την *CTRP* και την *WARP* (8). Αυτές ανήκουν στην ίδια οικογένεια με την πρωτεΐνη *TRAP* του παρασίτου, που εκφράζεται

στο στάδιο των σποροζωιδίων και σχετίζεται με την εισβολή τους στους σιελογόνους αδένες (22). Οι πρωτεΐνες αυτές χαρακτηρίζονται από την παρουσία vWFA domains καθώς και περιοχές συγγενικές με τα thrombospondin domains. Ειδικότερα η CTRP έχει 6 vWFA domains και 7 thrombospondin domains (23), ενώ η WARP έχει δομή εκκρινόμενης πρωτεΐνης και ένα vWFA domain (24). Έχει δειχθεί ότι όταν δεν εκφράζεται η CTRP ο ωοκινέτης δεν μπορεί να περάσει το εντερικό επιθήλιο (25). Επιπλέον και η WARP φαίνεται να εμπλέκεται στην είσοδο του ωοκινέτη μέσα από το εντερικό επιθήλιο, αφού η έκφραση της είναι ειδική για το στάδιο του ωοκινέτη (23). Μια υπόθεση εργασίας που έχει προταθεί είναι ότι η WARP μπορεί να σχηματίζει ολιγομερή μέσω του vWFA domain (όπως κι έχει δειχθεί) προκειμένου να σχηματίζονται δίκτυα ανάμεσα στα επιθηλιακά κύτταρα και στο παράσιτο. Επιπλέον η WARP μπορεί να αλληλεπιδρά και με την CTRP προάγοντας έτσι την εισβολή του παρασίτου (23).

Προκύπτει συνεπώς το ερώτημα αν και οι ADAMTSs κατά αναλογία με την ADAMTS13 που είναι ένζυμο που αναγνωρίζει τον vWFA στον άνθρωπο μπορούν να αναγνωρίζουν στο κουνούπι σαν υπόστρωμα μόρια του παρασίτου που περιέχουν vWFA domains. Μια τέτοια υπόθεση θα μπορούσε να εξηγήσει τα αποτελέσματα των RNAi περαμάτων μας. Δεν πρέπει να αποκλείουμε βέβαια το γεγονός ότι οι ADAMTSs του κουνουπιού θα μπορούσαν να παίζουν ρόλο στην αναδιοργάνωση του επιθηλιακού ιστού κι έτσι να επηρεάζουν έμμεσα την εισβολή του παρασίτου, χωρίς να αλληλεπιδρούν με το ίδιο το παράσιτο.

Πάντως τα δυο μέχρι τώρα RNAi πειράματα δεν είναι αρκετά για να βγάλουμε συμπεράσματα για την λειτουργία αυτών των πρωτεϊνών στο κουνούπι και την εμπλοκή τους ή όχι στην εισβολή του παρασίτου και τα επαναλαμβάνουμε με επιπλέον πειράματα ελέγχου. Στα πειράματα αυτά τα αντισώματα που έχουμε παράγει θα αποτελέσουν σημαντικό εργαλείο μια και επιτρέπουν την διερεύνηση της RNAi τεχνολογίας για την καταστολή της έκφρασης των AgADAMTSs. Επιπλέον είναι σημαντικό να διερευνηθεί πόσο η διπλή καταστολή της έκφρασης των δύο γονιδίων ( double dsRNA Knock downs) θα επηρεάσει το πέρασμα του ωοκινέτη. Είναι πιθανό στα αποτελέσματα της διπλής καταστολής να είναι πιο δραματικά μια και οι δύο πρωτεάσες μπορεί να είναι λειτουργικά συμπληρωματικές (functional redundant).

### *Παραγωγή αντισωμάτων και ελεγχος τους*

Ο έλεγχος των δυο αντισωμάτων που έχουμε μέχρι τώρα έδειξε ότι αυτά αναγνωρίζουν σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κουνουπιών και μικρότερα από το

αναμενόμενο μοριακό μέγεθος πεπτίδια. Αν και δεν μπορεί να αποκλειστεί το γεγονός αυτά τα πεπτίδια να μην αντιστοιχούν σε AgADAMTSs, εντούτοις θα μπορούσαμε να υποστηρίξουμε ότι μπορεί να είναι προϊόντα πρωτεόλυσης των αρχικών πρωτεϊνών, μια και τόσο οι διάφορες ενδείξεις που παραθέτουμε στα αποτελέσματα υποστηρίζουν ότι τα αντισώματα είναι μάλλον ειδικά, όσο και τα βιβλιογραφικά δεδομένα συνηγορούν υπέρ του γεγονότος ότι οι ADAMTSs υφίστανται εκτεταμένες πρωτεολυτικές τροποποιήσεις.

Θα μπορούσαμε λοιπόν να ισχυριστούμε ότι τα πεπτίδια που αναγνωρίζουν τα αντισώματα μας αντιστοιχούν πράγματι σε AgADAMTSs, αλλά είναι προϊόντα πρωτεόλυσης των αρχικών πρωτεϊνών. Στην περίπτωση βέβαια της ADAMTS1 προβληματίζει το γεγονός ότι το αντίσωμα δεν αναγνωρίζει καμία πρωτεΐνη 160kd, το αναμενόμενο MB της ADAMTS1, αλλά αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι η πρωτεάση είναι πολύ ευαίσθητη και πρωτεολύεται κατά την παρασκευή των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων ή στο ότι η ADAMTS1 πρωτεολύεται αμέσως μετά την παραγωγή της.

Η κλωνοποίηση των γονιδίων και η έκφραση τους σε ετερόλογα συστήματα π.χ κυτταρικές σειρές στα οποία δεν εκφράζονται ενδογενώς θα δώσει επιπλέον ενδείξεις για την ειδικότητα των αντισωμάτων.

### *Μελλοντικοί στόχοι*

Πρέπει να σημειωθεί ότι αν και οι ADAMTSs είναι μορια εξαιρετικής σημασίας κι έχουν μελετηθεί εκτεταμένα στον άνθρωπο δεν γνωρίζουμε τίποτα για τη λειτουργία τους στα έντομα, ακόμη και στην Δροσόφιλα. Έτσι είναι ενδιαφέρον να μελετηθεί και η συμμετοχή τους σε αναπτυξιακές διαδικασίες. Επειδή κατά την ανάπτυξη λαμβάνει χώρα εκτεταμένη αναδιοργάνωση των ιστών κι επειδή οι μεταλλοπρωτεάσες εμπλέκονται σε τέτοιες διαδικασίες είναι πιθανόν να βρεθούν ενδιαφέροντες ρόλοι των γονιδίων σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια.

Ειδικότερα για το κουνούπι μας ενδιαφέρει ο ρόλος τους κατά την εισβολή του παρασίτου. Είναι πιθανό η εισβολή του παρασίτου μέσα από τον επιθηλιακό ιστό του μεσεντέρου να ενεργοποιεί τις μεταλλοπρωτεάσες.

Επόμενο βήμα θα είναι να εξακριβωθεί η λειτουργία των παραπάνω γονιδίων. Γι αυτό τον λόγο σχεδιάζουμε να απομονώσουμε full-length κλώνους των ADAMTSs και να τις εκφράσουμε στην ενεργή μορφή τους για να βρούμε τα υποστρώματα τους με βιοχημικά πειράματα.

Επιπλέον αφού βεβαιωθούμε για τα αντισώματα που έχουμε θα προχωρήσουμε σε πειράματα μικροσκοπίας για να βρούμε το πρότυπο έκφρασης τους στο μεσεντερικό επιθήλιο.

Βέβαια μας ενδιαφέρει και η μελέτη των υπόλοιπων πρωτεασών που αναφέρθηκαν στην εισαγωγή, rarpilin, MMP1/2 και του TIMP. Η ανάλυση της

λειτουργίας και αυτών των πρωτεασών θα μας δώσει μια πιο ξεκάθαρη άποψη για την δράση των πρωτεασών του εξωκυττάριου στρώματος στο κουνούπι και την συμμετοχή τους ή όχι στην εισβολή του παρασίτου μέσα από το εντερικό επιθήλιο του κουνουπιού.

# *Υλικά και μεθοδοι*

## Μοριακές τεχνικές

### *Αναλυση και απομονωση DNA απο πηκτωμα αγαροζης*

Τα μόρια DNA διαχωρίστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα 1XTBE σε πήκτωμα αγαρόζης. Με αυτόν τον τρόπο εκτιμήθηκε η ποσότητα και η ποιότητα του DNA καθώς και το μέγεθος τους. Προκείμενου να βρεθεί το μέγεθος των μορίων DNA που αναλύθηκαν στο πήκτωμα συγκρίθηκε το ηλεκτροφορητικό τους πρότυπο με αυτό του δείκτη λ Sty1. Για την απομόνωση τμημάτων DNA μετά από διαχωρισμό τους σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε το ειδικό kit QIAEXII.

### Μετασχηματισμος επιδεκτικων κυτταρων

Τα επιδεκτικά κύτταρα έγιναν με την χημική- συμβατική μέθοδο του χλωριούχου ασβεστίου. Χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω βακτηριακά στελέχη *E.coli* : DH5α, SGE13009 [pREP4] και BL21. Τα δύο τελευταία χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή πρωτεϊνών. Το στέλεχος SGE13009 [pREP4] φέρει το πλασμίδιο pREP4 το οποίο προσδίδει αντίσταση στην καναμυκίνη και εκφράζει τον καταστολέα Iac I. Το στέλεχος BL21 εκφράζει την T<sub>7</sub> πολυμεράση η οποία προσδένεται στον T<sub>7</sub> υποκινητή των πλασμιδιακών φορέων έκφρασης.

### *Μεθοδοι τροποποιησης μοριων DNA*

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

### *Σύνθεση cDNA*

Η σύνθεση του cDNA έγινε από ολικό RNA που εκχυλίστηκε από ολόκληρα κουνούπια ή από μεσέντερα κουνουπιών χρησιμοποιώντας εκκινητές oligo-dT ακινητοποιημένους πάνω σε μαγνητικά σφαιρίδια. Το ολικό RNA (συνολική ποσότητα 5 $\mu$ g) αποδιατάσσεται στους 65<sup>0</sup>C για 5 λεπτά μαζί με τον εκκινητή oligo-dT και dNTPs (10mM απο το καθένα). Στη συνέχεια έγινε προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος 5x, 0,1 M DTT, 40 units Rnase inhibitor και 200



units MMLV αντίστροφη μεταγραφάση. Η αντίδραση επωάζεται για 50min στους 37°C και ακολούθως τοποθετείται σε ένα μαγνητικό stand. Το μαγνητικό υπόστρωμα πάνω στο οποίο είναι δεσμευμένο το νεοσυντιθέμενο cDNA επαναδιαλύεται τελικά σε νερό μετά από δυο ξεπλύματα.

### **Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής.**

Χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το cDNA που συντέθηκε, όπως περιγράφηκε πιο πάνω έγιναν αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης σε τελικό όγκο 25λ, οι οποίες είχαν την παρακάτω σύσταση: 0,5 units Taq, 25pmoles από κάθε εκκινήτη, 0,2mM dNTPs και ρυθμιστικό διάλυμα, που περιείχε μαγνήσιο. Το πρόγραμμα που επιλέχτηκε ήταν το παρακάτω :

1.95°C, 5min: αποδιάταξη της μητρας

2.95°C, 30sec: αποδιάταξη της μητρας

3.55°C, 30sec: υβριδοποίηση εκκινήτων

4.72°C, 30sec/45sec (ανάλογα με το μέγεθος προϊόντος): χτίσιμο του μορίου DNA.

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

Ηλεκτροφορητική ανάλυση πρωτεϊνών και ανοσοεντοπισμός ακινητοποιημένων πρωτεϊνών σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης

Πρωτεϊνικά εκχυλίσματα είτε από κουνούπια είτε από βακτήρια αναλύθηκαν σύμφωνα με το μοριακό τους μέγεθος σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης παρουσία SDS. Ο προσδιορισμός του μεγέθους της πρωτεΐνης έγινε συγκρίνοντας το ηλεκτροφορητικό πρότυπο των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων με το πρότυπο πρωτεϊνικών δεικτών. Τα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης βάφτηκαν στη συνέχεια σε διάλυμα Coomassie blue ή ακολούθησε ανοσοεντοπισμός τους. Για τον ανοσοεντοπισμό έγινε ηλεκτροφορητική μεταφορά σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης. Αυτές επωάστηκαν με το πρωτογενές αντίσωμα (αADAMTS1 1:1000, αADAMTS2 1:1000, αtubulin 1:1000) και κατόπιν με το δευτερογενές αντίσωμα (arat IgG 1:10000, αρabbit IgG 1:10000), το οποίο είναι συζευγμένο με HRP, επιτρέποντας έτσι τον εντοπισμό τους πάνω στις μεμβράνες με ένα χημειοφωσφορίζον kit (ECL detection system).

## Παραγωγή και καθαρισμός πρωτεϊνών

Για την παραγωγή αντιγόνου, όπως αναφέρθηκε απομονώθηκε με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης μέρος του αναγνωστικού πλαισίου των γονιδίων ADAMTS1, ADAMTS2 και TIMP. Αυτά τα κομμάτια DNA μπήκαν σε φορείς έκφρασης, pQE30ADAMTS1, pGAT2ADAMTS2 και pGAT2TIMP. Τα πλασμίδια μετασχηματίστηκαν στα βακτηριακά στελέχη BL21 (pGAT2ADAMTS2) και SGE13009[Prep4] (pQE30ADAMTS1, pGAT2TIMP). Οι κλώνοι μεγάλωσαν σε υγρή καλλιέργεια παρουσία αντιβιοτικού αμικικιλίνης και καναμυκίνης, στην περίπτωση των SGE13009[pREP4] κυττάρων O/N. Η O/N καλλιέργεια αραιώθηκε 1/100 και αφέθηκε να μεγαλώσει στους 30°C. Όταν αυτή έφτασε σε απορρόφηση (στα 600nm) 0,5-0,6 έγινε επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης με προσθήκη IPTG 0,3mM για 3ωρες στην περίπτωση της ADAMTS1 και 0,5mM για 5 ωρες στην περίπτωση της ADAMTS2. Το IPTG απενεργοποιεί τον καταστολέα lacI και επιτρέπει έτσι την έκφραση της πρωτεΐνης. Πριν να γίνει η επαγωγή γίνεται λήψη δείγματος κυττάρων 1ml το οποίο φυγοκεντρείται κι επαναδιαλύεται σε SDS loading buffer. Μετά την επαγωγή τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται, ενώ κρατάμε και πάλι δείγμα 1ml.

Το δείγμα επαναδιαλύεται σε SDS loading buffer ενώ η πελλέτα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε lysis buffer (50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300mM NaCl) στο οποίο προστίθεται 100μg/ml lysozyme και 1mM PMSF. Τα κύτταρα παραμένουν στον πάγο για 40min και κατόπιν ηχοβολούνται. Στη συνέχεια γίνεται φυγοκέντρηση των κυττάρων και η πελλέτα που αποτελεί το αδιάλυτο μέρος του εκχυλίσματος επαναδιαλύεται σε buffer A (100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10mM Tris-Cl, 6M GuCl) για την ADAMTS2 ή σε buffer B (100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10mM Tris-Cl, 8M Urea, pH 8) για την ADAMTS1. Ακολουθεί και πάλι φυγοκέντρηση και το υπερκείμενο επωάζεται με κολώνα νικελίου η οποία έχει προηγούμενα εξισορροπηθεί με το ίδιο buffer (A ή B). Η ποσότητα των σφαιριδίων νικελίου εξαρτάται από το ποσό της πρωτεΐνης που θα δεσμευτεί. Στη συνέχεια αφήνουμε το υπερκείμενο να περάσει από την κολώνα και ακολουθούν πλυσίματα της κολώνας με wash buffer C (100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10mM Tris-Cl, 8M Urea, pH 6.3) και wash buffer D (100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10mM Tris-Cl, 8M Urea, pH 5,9). Η πρωτεΐνη εκλύεται από την κολώνα με elution buffer (100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10mM Tris-Cl, 8M Urea, pH 4,5). Τα αποτελέσματα της παραγωγής της πρωτεΐνης και του καθαρισμού της ελέγχονται με ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα SDS-

πολυακρυλαμίδης, το οποίο στη συνέχεια βάφεται με χρωστική Coomassie blue.

### *Παραγωγή αντισωμάτων και καθαρισμός τους*

#### **Παραγωγή αντισωμάτων**

Για την παραγωγή αντισώματος για την ADAMTS1 το αδιάλυτο μέρος των βακτηριακών εκχυλισμάτων (inclusion bodies) αναμίχθηκε με Ribi adjuvant system, το οποίο είναι ένα μίγμα νερού και λαδιού (squalene) που περιέχει μη τοξικές ενδοτοξίνες και συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος μυκοβακτηρίων. Το adjuvant επάγει την ανοσολογική αντίδραση του ζώου. Στην περίπτωση μας αναμίχθηκε με 100μgr βακτηριακού εκχυλίσματος και ενέθηκε σε αρουραίους. Το 1<sup>ο</sup> boost έγινε 14 μέρες μετά την αρχική ένεση, το 2<sup>ο</sup> 28 μέρες μετά την αρχική ένεση και τα υπόλοιπα boost έγιναν με διαφορά 28 ημερών μεταξύ τους. Λήψη αίματος γινόταν μετά από κάθε boost, προκειμένου να εκτιμηθεί η ποιότητα η ισχυρότητα και η περιεκτικότητα του αντισώματος. Μετά το 5<sup>ο</sup> boost οπότε και εκτιμήθηκε ότι η περιεκτικότητα του αντισώματος δεν αυξάνεται άλλο έγινε η τελική αφαίμαξη του ζώου.

Για την ADAMTS2 η καθαρή πρωτεΐνη αναμίχθηκε και πάλι με RIBI adjuvant system και ενέθηκε σε κουνέλια. Σε κάθε κουνέλι ενέθηκαν 200μgr καθαρής πρωτεΐνης με κάθε boost. Το πρόγραμμα των boost ήταν το ίδιο, δηλαδή τα δυο πρώτα έγιναν με διαφορά 14 ημερών μεταξύ τους και τα επόμενα έγιναν με διαφορά 28 ημερών μεταξύ τους. Συνολικά έγιναν 6 boosts.

#### ***Καθαρισμός αντισώματος ADAMTS2***

Για τον καθαρισμό του αντισώματος αAgADAMTS1 ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα. Σε βακτήρια BL21 μετασχηματίστηκε είτε ο φορέας pGAT2 είτε ο φορέας pGAT2ADAMTS2. Ο pGAT2 εκφράζει την πρωτεΐνη GST, ενώ ο pGAT2ADAMTS2 την υβριδική πρωτεΐνη GST-AgADAMTS2. Οι βακτηριακές καλλιέργειες επάχθηκαν με IPTG 0,5mM για 5 ώρες, φυγοκεντρήθηκαν και η πελεττα επαναδιαλύθηκε σε lysis buffer, ακολούθησε ηχοβόλιση και φυγόκεντρης. Η πελεττα (inclusion bodies) επαναδιαλύθηκε σε buffer NaHCO<sub>3</sub> (NaHCO<sub>3</sub> 0,1M, pH 8,3, NaCl 0,5M). Το ίδιο έγινε και με βακτηριακές καλλιέργειες BL21 που περιέχουν το

πλασμιδιο pGAT2ADAMTS2. Η πελέττα των inclusion bodies επαναδιαλύθηκε και πάλι στο ίδιο buffer. Αυτά τα βακτηριακά εκχυλίσματα επωάστηκαν με ενεργοποιημένες κολώνες CNBr O/N στους 4°C. Η ενεργοποίηση των κολώνων είχε γίνει με επαναδιαλυση και πλύσιμο με 1mM HCl. Μετά την επώαση τα βακτηριακά εκχυλίσματα πέρασαν από τις κολώνες και οι κολώνες που είχαν δεσμεύσει πλέον τις πρωτεΐνες των βακτηριακών εκχυλισμάτων (κυρίως την GST στην μια περίπτωση και το αντιγόνο στην άλλη) πλύθηκαν με buffer NaHCO<sub>3</sub>. Ακολούθησε blocking της κολώνας O/N σε γλυκίνη, 0,2M, pH 8,0. Κατόπιν η κολώνα πακεταρίστηκε και πλύθηκε τρεις φορές με δυο διαλύματα κάθε φορά που είχαν όξινο και αλκαλικό pH. Το ένα διάλυμα ήταν το acetate buffer (0,1 M acetate buffer, 0,5M NaCl, pH4) και το άλλο ήταν ένα Tris-buffer (0,1M Tris, pH 8,0, 0,5M NaCl). Οι κολώνες διατηρούνται σε buffer TSA (0.01M Tris-HCl, pH 8,0, 0,14M NaCl, 0,025% sodium azide).

2ml όρου αναμείχθηκαν με 3ml Tris buffer (50mM Tris, 150mM NaCl, 0,05% Triton, 1mMPMSF). Το παραπάνω αναμείχθηκε με την GST κολώνα του βρωμιούχου κυανίου και επωαστηκε για 1hr σε RT. Κατόπιν αυτός ο ορός πέρασε από την GST κολώνα κι επωαστηκε με την κολώνα που έχει δεσμευμένο το αντιγόνο O/N στους 4°C. Ο ορός πέρασε από την κολώνα και η έκλουση του δεσμευμένου στην κολώνα αντισώματος έγινε σε δυο συνθήκες, οξινού και αλκαλικού pH. Το διάλυμα έκλουσης οξινού pH ήταν ένα διάλυμα γλυκίνης (100mM glycine, 350mM NaCl, pH 3,0) και το διάλυμα έκλουσης αλκαλικού pH ήταν ένα διάλυμα τριαιθανολαμίνης (50mM triethanolamine pH 11,5, 0,1% Triton, 0,15M NaCl). Η έκλουση έγινε σε τελικό όγκο 1ml και το pH του καθαρού ορού του αντισώματος ουδετεροποιήθηκε με προσθήκη 70λ διαλύματος Tris-HCl, pH 8,0 στην περίπτωση της έκλουσης με γλυκίνη και 150λ διαλύματος Tris-HCl, pH 6,7 στην περίπτωση της έκλουσης με τριαιθανολαμίνη.

Κουνούπι-κυτταρικές καλλιέργειες

Αποικία κουνουπιών και κυτταρικές σειρές

*Η αποικία των κουνουπιών αποτελείται από κουνούπια της γενετικά επιλεγμένης σειράς G3. Αυτά μεγαλώνουν στους 27°C και με σχετική υγρασία 75%. Για την ωογένεση τρέφονται με αίμα από αναισθητοποιημένα ποντίκια. Τα ενήλικα άτομα τρέφονται με βαμβάκι εμποτισμένο με 15% διάλυμα σουκρόζης. Οι λάρβες μεγαλώνουν σε νερό που περιέχει 0,1% NaCl.*

*Οι μολύνσεις των κουνουπιών έγιναν με ποντίκια μολυσμένα με ένα γενετικά επιλεγμένο παράσιτο το *P.berghei* που εκφράζει GFP υπό τον έλεγχο του υποκινητή *CTRP*, στο στάδιο της ωοκυστής. Έτσι μπορεί να μετρηθεί ο αριθμός των ωοκύστεων στο μεσέντερο του κουνουπιού.*

*Χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές Sua 5.1 και Sua 5.β οι οποίες καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο Schneider με 10% fetal calf serum.*

Μετασχηματισμός κυτταρικών σειρών

*Οι κυτταρικές σειρές Sua 5.1 και Sua 5.β μετασχηματίστηκαν με τα πλασμίδια που περιγράφηκαν στα αποτελέσματα με την μέθοδο *lipofection*, χρησιμοποιώντας *effectene* αντιδραστήριο (QIAGEN), όπως συμβουλεύουν οι κατασκευαστές. Χρησιμοποιήθηκαν 4γ από κάθε πλασμίδιο για κάθε μετασχηματισμό.*

Πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από κουνούπια ή ιστούς κουνουπιών

*Τα κουνούπια ή οι απομονωμένοι ιστοί τους (μεσέντερα στην περίπτωση μας) ομογενοποιούνται σε διάλυμα R25 (1,3M NaCl, 0,07M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,03M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) που περιέχει ένα μίγμα αναστολέων πρωτεασών. Κατοπιν προστίθεται στα δείγματα SDS-loading buffer και τα δείγματα φορτώνονται σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης ή διατηρούνται στους -20°C.*

RNA interference

*Για τα πειράματα RNA interference σχεδιάστηκαν τα πλασμίδια που περιγράφονται στα αποτελέσματα. Με τον σχεδιασμό κατάλληλων εκκινητών απομονώθηκαν τμήματα των γονιδίων *ADAMTS1*, *ADAMTS2* και *TIMP* και κλωνοποιήθηκαν σε φορέα *pI10*. Ο φορέας αυτός περιέχει δυο εκκινητές T7 πολυμεράσης σε αντίθετη κατεύθυνση ο ένας προς τον άλλο επιτρέποντας έτσι τον σχηματισμό δίκλωνου RNA. Η κατασκευή του δίκλωνου RNA γίνεται όπως περιγράφεται παρακάτω.*

*Τα πλασμίδια πέπτονται με 2 περιοριστικές ενδονουκλεάσες (σε ξεχωριστές αντιδράσεις ή καθεμία) έτσι ώστε σε κάθε ευθυγραμμισμένο πλασμίδιο να παράγεται RNA μόνο από τη μία θέση T<sub>7</sub> που να αντιστοιχεί στο κλωνοποιημένο κομμάτι. Κατοπιν τα πλασμίδια καθαρίζονται από πρωτεΐνες (χρησιμοποιώντας πρωτεϊνάση K). 1γ από κάθε ευθυγραμμισμένο πλασμίδιο χρησιμοποιείται για την αντίδραση σύνθεσης*

του δίκλωνου RNA, η οποία περιέχει επίσης 8λ NTPs, 2λ ρυθμιστικού διαλύματος και 2λ ενζύμου (T7 RNA πολυμεράση). Η αντίδραση επωάζεται στους 37°C για 10hr. Το δίκλωνο RNA καθαρίζεται από DNA. Η ποιότητα και η ποσότητα του dsRNA ελέγχεται σε πήκτωμα αγαρόζης (σχημα20) και με φωτομέτρηση. Η τελική συγκέντρωση του δίκλωνου RNA ρυθμίζεται, ώστε να είναι 3μg/μl. Το δίκλωνο RNA ενύεται κατόπιν στον θώρακα ενήλικων θηλυκών κουνουπιών. Μετά από τέσσερις μέρες τα κουνούπια μολύνονται με το παράσιτο *P. berghei* CTRP-GFP, που εκφράζει δηλαδή GFP υπο τον υποκινητή CTRP, ένα γονίδιο που εκφράζεται ειδικά στο στάδιο του ωοκινέτη. Διαφορετικά χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση πρωτεϊνών και στη συνέχεια τον ανοσοεντοπισμό τους. Έξι μέρες μετά την μόλυνση των κουνουπιών μετρείται ο αριθμός των ωοκύστεων στα μεσέντερα τους. Ως control, όπως ειπώθηκε, χρησιμοποιούνται κουνούπια στα οποία έχει ενεθεί δίκλωνο RNA του γονιδίου GFP. Αυτά μολύνονται επίσης, μετρείται ο αριθμός των ωοκύστεων στα μεσέντερα τους και συγκρίνεται με τον αριθμό των ωοκύστεων στα κουνούπια στα οποία έχει γίνει RNA interference εναντίον των γονιδίων που μας ενδιαφέρουν. Έχει βρεθεί ότι το δίκλωνο GFP δεν επηρεάζει το GFP γονίδιο που εκφράζουν τα παράσιτα.

Τεχνική lac-Z σε κυτταρικές σειρές κουνουπιών

Η πελεττα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε PM2 (66mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 33mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1mM MnCl<sub>2</sub>, 2mM MgSO<sub>4</sub>, 400mM β-μερκαπταιθανολη) ρυθμιστικό διάλυμα (10<sup>6</sup> κυτταρα σε 0,5-1ml διαλύματος). Η διάρρηξη των κυττάρων γίνεται με 5 κύκλους παγώματος-ξεπαγώματος. Η ποσότητα της πρωτεΐνης που περιέχεται υπολογίζεται με την μέθοδο ποσοτικοποίησης Bradford. Ίσα ποσά πρωτεΐνης διαλύονται σε PM2 buffer σε τελικό όγκο 800λ. Κατόπιν προστίθενται 200λ ONPG (4mg/ml) και οι αντιδράσεις επωάζονται στους 37°C. Το ONPG διασπάται από το προϊόν του γονιδίου lacZ σε γαλακτόζη και Ο-νιτροφαινόλη. Η Ο-νιτροφαινόλη είναι κίτρινη και η απορρόφηση της μπορεί να μετρηθεί στα 420nm. Όταν οι αντιδράσεις πάρουν κίτρινο χρώμα προστίθενται 500λ 1M NaHCO<sub>3</sub>. Ο χρόνος που χρειάζεται να ολοκληρωθεί η αντίδραση σημειώνεται και η δράση του ενζύμου lac-Z υπολογίζεται με τον τύπο:

$$\text{Units ενζυμου} = (380 \times A_{420}) / t$$

Ολιγονουκλεοτιδία

ADAMTS1

*BamH1*  
AbADAMTS5': CGGGATCCACCCTGGCGCATACGATA  
*BamH1*  
ATSF: CGGGATCCCTCCACTGGAAACGAATG  
*EcoR1*  
ATSR: CCGAATTCGCTCCTCCTTAGCCACTC

ADAMTS2

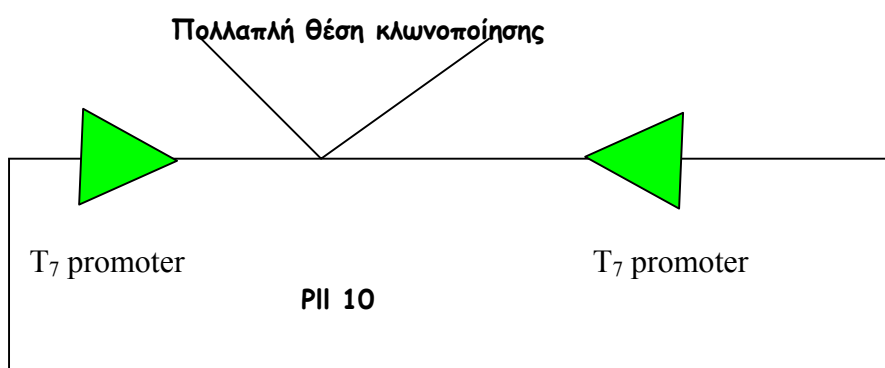
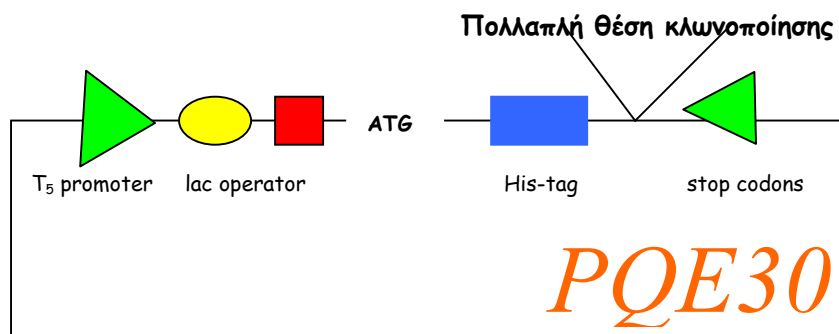
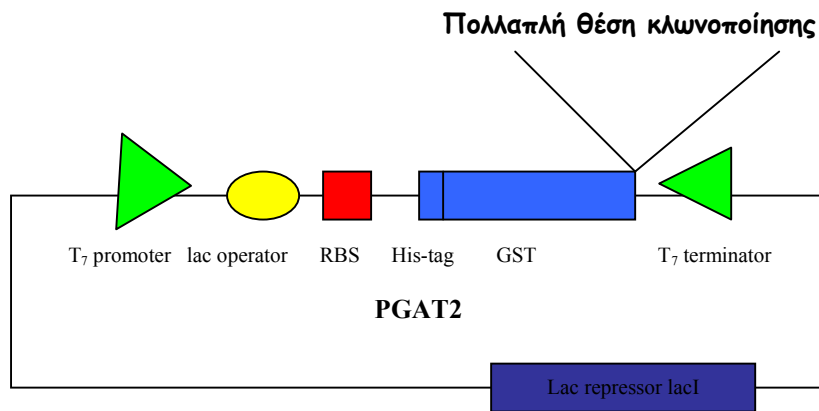
*BamH1*  
TS2F: CGGGATCCCGCCAGCCAAGCTGA  
*EcoR1*  
TS2R: CCGAATTCTTGCTCGGCCGTGTG  
*Nco I*  
TSP3Ab5: CCCATGGATACGCCAGCCAAGCTGA  
  
TSP3Ab3: GTTCGAATTACCGGATCTTGCGGTAATG

TIMP

*EcoR1* \_\_\_\_\_  
TIMPORF5': CGGAATTCCATGGAGACGAACCGTCTG  
\_\_\_\_\_ *BamH1*  
TIMPORF3': CGGGATCCAAGCTTTTATTCTCGGCGACACACT  
\_\_\_\_\_ *BamH1*  
TIMPAb5': CGGGATCCATGAAGACGAACCGTCTGCTA  
\_\_\_\_\_ *HindIII*  
TIMPAb3': CCCAAGCTTGCGGGTACTTGGGAACTATT

MMP1

*BamH1*  
MMP1F: CGGATCCGACGGTAGCACCTACGC  
  
MMP1R: GGAATTCACACCCTCCAGTTCGAG





# *Βιβλιογραφία*

1. Dimopoulos G., (2003) *Cellular Microbiology* 5(1), 3-14
2. Lycett G and Kafatos F. (2002) *Nature*
3. Sinden, R.E (2002) *Cell Microbiol* 4, 713-724
4. Kafatos et al (2004) *Cellular Microbiology* 6(7), 671-685
5. Blandin S, et al (2004) *Cell* 116, 661-670
6. Danielli A., et al, (2003) *The Journal Of Biological Chemistry* 278, 4184-4193
7. Abraham E. G., et al (2004) *The Journal Of Biological Chemistry*, 279, 5573-5580
8. Han, Y.S et al (2000) *EMBO J* 19, 6030-6040
9. Leroy A, (2000) *Microbes And Infection* 2, 923-931
10. Chieh C and Werb Z (2001) *Trends In Cell Biology* 11, 37-43
11. Leist M. and Jaatela, (2001) *Molecular Cell Biology*, 2, 589-598
12. Bor Luen Tang, (2001) *The International Journal Of Biochemistry And Cell Biology* 33, 33-44
13. Nagase Hand Woessner J. (1999) *The Journal Of Biological Chemistry* 274, 21491-21494
14. Lopez-Otin et al (2000) *The Journal Of Biological Chemistry* 277, 23321-23329
15. Kimble et al (1999) *Nature* 399, 586-590
16. Chung D.W.and Fujikawa K. (2002) *Biochemistry*, 41, 11055-11070
17. Rao C., et al, (2003) *Development*, 130, 4665-4672
18. Fessler H. et al (2003) *The International Journal Of Biochemistry And Cell Biology* 36, 1079-1084
19. Wei Shuo et al (2003) *Biochemistry*, 42, 12200-12207
20. Godenschwege TA et al (2000) *Eur J Cell Biol*, 79(7), 495-501
21. Kashiwagi M et al (2004) *The Journal Of Biological Chemistry* 279, 10109-10119
  
22. Wengelnik K., et al, (1999) *EMBO*, 18, 5195-5204
23. Dessens J. T., et al (1999) *EMBO* 18, 6221-6227
24. Yuda M., et al, (2001) *Molecular and Biochemical Parasitology*, 116, 65-72
25. Templeton T.J., et al, (2000) *Molecular Microbiology*, 36, 1-9
26. Kashiwagi M et al (2004) *The Journal Of Biological Chemistry* 279, 10109-10119

