

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΙΔΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑΣ
(IMBB)**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**«ΓΑΜΕΤΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΚΤΙΝΗΣ 2 ΣΤΑ
ΠΑΡΑΣΙΤΑ ΤΗΣ ΕΛΟΝΟΣΙΑΣ»**

ΜΑΡΙΑ Α.ΑΝΔΡΕΑΔΑΚΗ

Επιβλέπουσα Ερευνήτρια: Ι. ΣΙΔΕΝ-ΚΙΑΜΟΣ
Επιβλέπων Καθηγητής: Χ. ΛΟΥΗΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ, 2015

Αφιερωμένο στον Ιωάννη

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η διεξαγωγή και η περαίωση μιας διδακτορικής διατριβής αποτελεί σκληρή αλλά συγχρόνως εποικοδομητική εμπειρία. Αποτελεί τον καρπό προσωπικού αγώνα, αλλά και συγχρόνως και συνδρομής και υποστήριξης πολλών ανθρώπων, στους οποίους θέλω να εκφράσω την ειλικρινή ευγνωμοσύνη μου.

Αρχικά οφείλω να ευχαριστήσω την υπεύθυνη της διδακτορικής διατριβής μου, Inga Siden-Kiamos, για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον και πρωτότυπο θέμα, τη συνεχή υποστήριξη, γενικότερη συμπαράσταση, καθοδήγηση, επίβλεψη, και την άφογη συνεργασία. Όλα όσα με δίδαξε με όρεξη και ενδιαφέρον και οι πολύτιμες συμβουλές της ήταν και θα είναι για μένα πηγή έμπνευσης.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής μου Χ. Δελιδάκη, Γ. Βόντα και ιδιαίτερα τον Χ. Λούη. Η καθοδήγηση, οι επιστημονικές συμβουλές τους και η άμεση επικοινωνία μας ήταν σημαντική. Με βοήθησαν να ανταπεξέλθω, ιδιαίτερα το πρώτο δύσκολο διάστημα εκπόνησης αυτής της μελέτης. Επιπλέον θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω και στα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής μου επιτροπής: Δ. Αλεξανδράκη, Γ. Χαλεπάκη και Ι. Στρουμπούλη, για την πρόθυμη συμμετοχή τους στην κρίση της διδακτορικής μου διατριβής.

Δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω ιδιαίτερα την Έλενα Δελιγιάννη, για την συνεργασία της, την εκπαίδευση που μου παρείχε, την αμέριστη συμπαράσταση σε δύσκολες στιγμές και την φιλία της. Πολλά ευχαριστώ και στην Chiara Curra για τις επιστημονικές συζητήσεις που κάναμε, τις αστείες στιγμές που μου χάρισε και φυσικά την φιλία της. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την Rhiannon Morgan για την βοήθεια στα πρώτα βήματα, αλλά και τα γλυκά της. Ευχαριστώ τους τεχνικούς μας Λευτέρη Σπανό, για την τεχνική υποστήριξη όλα αυτά τα χρόνια, και την Σοφία Καφόρου που ήρθε πρόσφατα στο εργαστήριο. Η παρουσία τους είναι σημαντική. Ευχαριστώ επίσης όλους τους φοιτητές που ήταν ή είναι στο εργαστήριο, ιδιαίτερα την Φραντζέσκα Νίκα και την Ειρήνη Φακουρέλη.

Ευχαριστώ τους φίλους μου Νένα και Αντώνη που ήταν εκεί σε πολλές ευχάριστες στιγμές στην ζωή μου αλλά και σε δύσκολες στιγμές αποφάσεων.

Όμως, το πιο μεγάλο «ευχαριστώ» δικαιωματικά το οφείλω στην οικογένειά μου. Ευχαριστώ πολύ τους γονείς μου, Αλέκο και Δέσποινα, για την συνεχή συμπαράσταση και την αγάπη τους. Γιάννη μου, ευχαριστώ που με καταλαβαίνεις και πιστεύεις σε μένα, χωρίς εσένα δεν θα είχα την δύναμη να συνεχίσω. Ευχαριστώ!

Πίνακας περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Εισαγωγή.....	4
1.1 Πρωτόζωα.....	5
1.2 <i>Plasmodium</i> : το παρασιτικό πρωτόζωο της ελονοσίας.....	6
1.3 Μετάδοση του <i>Plasmodium</i> μέσω κουνουπιών.....	7
1.4 Η ελονοσία.....	8
1.4.1 Επιδημιολογία της ελονοσίας.....	8
1.4.2 Συμπτώματα.....	9
1.4.3 Θεραπεία.....	10
1.4.4 Πρόληψη.....	10
1.5 Κύκλος ζωής του παρασίτου.....	12
1.5.1 Εξοερυθροκυτταρική φάση.....	13
1.5.2 Ερυθροκυτταρική φάση.....	13
<i>Γαμετοκυτταρογένεση</i>	15
1.5.3 Στάδια ανάπτυξης στο κουνούπι.....	17
<i>Γαμετογένεση</i>	17
<i>Η έξοδος των γαμετοκυττάρων</i>	22
<i>Ζυγωτό</i>	24
<i>Ωοκινέτης</i>	25
<i>Ωοκύστη</i>	28
<i>Σποροζωΐδια</i>	29
1.6 Ακτίνες.....	30
1.6.1 Οι ακτίνες στα παράσιτα της ελονοσίας.....	32
1.6.2 Οι δυο ακτίνες έχουν διαφορετικά χαρακτηριστικά.....	32
1.6.3 Η ακτινή 2 εκφράζεται στα φυλετικά στάδια και στην ωοκινέτη.....	34
1.6.4 Μελέτες για την λειτουργία της ακτίνης στο παράσιτο.....	35
Σκοπός της παρούσας μελέτης.....	38
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Έξοδος γαμετοκυττάρων από τα ερυθροκύτταρα.....	40
2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	41
2.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	42
<i>Η καταγραφή της εξόδου των γαμετοκυττάρων με υψηλή ταχύτητα λήψης αποκαλύπτει την ρήξη των δύο μεμβρανών που περιβάλλουν το παράσιτο και τον σχηματισμό κυστιδίων.....</i>	<i>42</i>
<i>Το άνοιγμα ενός μοναδικού πόρου στην RBCM και ο σχηματισμός των κυστιδίων επιβεβαιώνεται με ανοσοφθορισμό σε ζωντανά δείγματα.....</i>	<i>47</i>
<i>Ανοσοφθορισμός σε μονιμοποιημένα δείγματα επιβεβαιώνει την ύπαρξη κυστιδίων από την RBCM.....</i>	<i>50</i>
<i>Ένας νέος δείκτης για την PVM.....</i>	<i>52</i>
2.3 ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	54
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Αντικατάσταση της ακτίνης 2 με την ακτινή 1.....	62
3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	63
3.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	66
<i>Κατασκευή μετασχηματισμένων παρασίτων για την αντικατάσταση του γονιδίου της ακτίνης 2 με το γονίδιο της ακτίνης 1.....</i>	<i>66</i>
<i>Η ακτινή 1 δεν αντικαθιστά την λειτουργία της ακτίνης 2 στην γαμετογένεση των αρσενικών παρασίτων.....</i>	<i>69</i>
<i>Η αντικατάσταση της ακτίνης 2 με την ακτινή 1 οδηγεί στον σχηματισμό λιγότερων ωοκινετών.....</i>	<i>71</i>
<i>Η αντικατάσταση της ακτίνης 2 από την ακτινή 1 μπλοκάρει την μετάδοση του παρασίτου μέσω των κουνουπιών.....</i>	<i>73</i>
<i>Με την αντικατάσταση της ακτίνης 2 με την ακτινή 1 σχηματίζονται ωοκύστες αλλά δεν αναπτύσσονται.....</i>	<i>75</i>
3.3 ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	79
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Αντικατάσταση της ακτίνης 2 με χιμαιρικά μεταλλάγματα ακτίνης.....	84
4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	85
4.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	88
<i>Η χιμαιρική ακτινή 1 με τον D-βρόγχο της α-ακτίνης αποκαθιστά την γαμετογένεση.....</i>	<i>88</i>

Η παρουσία του D-βρόγχου της α-ακτίνης στην ακτίνη I δεν επαναφέρει τον φαινότυπο στις ωοκύστες.....91

4.3 ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....95

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Προφίλ γονιδιακής έκφρασης στα *act2(-)* και *CDPK4(-)* γαμετοκύτταρα.....98

5.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....99

5.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....101

Το προφίλ της γονιδιακής έκφρασης στα *act2(-)* και *CDPK4(-)* γαμετοκύτταρα.....101

Αξιολόγηση των πειραμάτων με μικροσυστοιχίες με *real-time qRT-PCR*.....102

Ταυτοποίηση και χαρακτηρισμός των γονιδίων με διαφορετικά επίπεδα έκφρασης στα *act2(-)* και *CDPK4(-)* γαμετοκύτταρα.....103

Βιολογικές λειτουργίες των γονιδίων με αρνητική ρύθμιση.....108

Βιολογικές λειτουργίες των γονιδίων με θετική ρύθμιση.....112

5.3 ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....114

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Γενική συζήτηση.....116

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: Υλικά και Μέθοδοι.....122

7.1 Ηθική και δεοντολογία.....123

7.2 Μέθοδοι παρασιτολογίας.....123

7.2.1 Στελέχη παρασίτων.....123

7.2.2 Διατήρηση παρασίτων.....126

7.2.3 Μέτρηση παρασιταϊμίας και ποσοστού γαμετοκυττάρων.....126

7.2.4 Καλλιέργεια σχιζόντων.....127

7.2.5 Καθαρισμός σχιζόντων.....127

7.2.6 Μετασχηματισμός παρασίτων.....128

7.2.7 Κλωνοποίηση παρασίτων.....128

7.2.8 *In vitro* ενεργοποίηση γαμετογένεσης.....129

7.2.9 Καταγραφή της γαμετογένεσης.....129

7.2.10 Καθαρισμός γαμετοκυττάρων.....130

7.2.11 *In vitro* καλλιέργεια ωοκινετών.....131

7.2.12 Καθαρισμός ωοκινετών.....131

7.2.13 Μέτρηση του ποσοστού μετατροπής θηλυκών γαμετών σε ωοκινέτες.....131

7.2.14 *In vitro* έλεγχος της κινητικότητας των ωοκινετών.....132

7.2.15 Απεικόνιση με ανοσοφθορισμό της μεμβράνης μολυσμένων ερυθροκυττάρων σε ζωντανά δείγματα.....132

7.2.16 Απεικόνιση με ανοσοφθορισμό της μεμβράνης μολυσμένων ερυθροκυττάρων σε μονιμοποιημένα δείγματα.....132

7.2.17 Απεικόνιση με ανοσοφθορισμό του πυρήνα απομονωμένων γαμετοκυττάρων σε μονιμοποιημένα δείγματα.....133

7.2.18 Απεικόνιση με ανοσοφθορισμό των ωοκυστών σε μονιμοποιημένα δείγματα.....133

7.2.19 Εντοπισμός των ωοκυστών σε ζωντανό ιστό με οπτικό μικροσκόπιο.....134

7.3 Μέθοδοι κουνουπιών.....134

7.3.1 Εκτροφή κουνουπιών.....134

7.3.2 Μετάδοση παρασίτων στα κουνούπια.....135

7.3.3 Μετάδοση των παρασίτων από τα κουνούπια.....135

7.4 Τεχνικές μοριακής βιολογίας.....136

7.4.1 Κατασκευή πλασμιδίων για τον μετασχηματισμό παρασίτων.....136

7.4.2 Στύπωμα κατά Southern.....139

7.4.3 Απομόνωση γενωμικού DNA.....139

7.4.4 Απομόνωση RNA.....139

7.4.5 Σύνθεση cDNA.....140

7.4.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου.....140

7.4.7 Ανάλυση με μικροσυστοιχίες γονιδίων.....141

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....142

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....154

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η διατριβή έχει ως σκοπό την μελέτη των σταδίων του παράσιτου της ελονοσίας που λαμβάνουν χώρα στο κουνούπι. Τα αποτελέσματα χωρίζονται σε τέσσερα κεφάλαια. Στο πρώτο κεφάλαιο μελετήσαμε τον μηχανισμό της έξοδου του παρασίτου από το κύτταρο ξενιστή κατά την γαμετογένεση. Τα παράσιτα εισβάλουν στα ερυθροκύτταρα του αίματος και αρχίζει ένας κύκλος από μη φυλετικά στάδια, ενώ κάποια θα διαφοροποιηθούν σε αρσενικά και θηλυκά γαμετοκύτταρα. Με την είσοδο των παρασίτων στο κουνούπι ξεκινάει η γαμετογένεση, δηλαδή η δημιουργία αρσενικών και θηλυκών γαμετών. Κρίσιμο σημείο στην γαμετογένεση αποτελεί η έξοδος του παρασίτου από το ερυθροκύτταρο, με την ρήξη των δύο μεμβρανών που περιβάλλουν το παράσιτο, την μεμβράνη του παρασιτοφόρου κενοτοπίου (PVM) και την μεμβράνη του ερυθροκυττάρου (RBCM). Με την καταγραφή της εξόδου των παρασίτων σε πραγματικό χρόνο και με την μέθοδο του ανοσοφθορισμού αποκαλύψαμε τέσσερις διακριτές φάσεις. Αρχικά το ερυθροκύτταρο διογκώνεται, η PVM διαρρηγνύεται και σχηματίζει κυστίδια, ένας μοναδικός πόρος ανοίγει στην RBCM και ακολουθεί η ρήξη της RBCM και ο σχηματισμός κυστιδίων από αυτήν. Το δεύτερο κεφάλαιο έχει ως θέμα τη λειτουργία της ακτίνης 2, της δεύτερης ισομορφής ακτίνης του παρασίτου. Η ακτίνη 1 είναι απαραίτητη για όλα τα στάδια του κύκλου ζωής ενώ η ακτίνη 2 είναι απαραίτητη για την γαμετογένεση των αρσενικών. Με την γενετική αντικατάσταση της ακτίνης 2 με την ακτίνη 1 δείξαμε ότι οι δύο ισομορφές έχουν ξεχωριστές λειτουργίες στην γαμετογένεση και αποκαλύψαμε ένα δεύτερο κρίσιμο ρόλο της ακτίνης 2 στην ανάπτυξη των ωοκυστών στο έντερο του κουνουπιού. Ο πολυμερισμός της ακτίνης είναι σημαντικός για την λειτουργία της. Στο τρίτο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων, η αντικατάσταση της ακτίνης 2 με χιμαιρικές μορφές της ακτίνης 1 έδειξε ότι ο πολυμερισμός της ακτίνης 2 είναι απαραίτητος για την γαμετογένεση των αρσενικών αλλά δεν αρκεί για την ανάπτυξη των ωοκυστών. Στο τέταρτο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων με μικροσυστοιχίες γονιδίων πήραμε το προφίλ της γονιδιακής έκφρασης σε γαμετοκύτταρα όπου απουσιάζει είτε η ακτίνη 2 είτε η ασβεστο-εξαρτώμενη κινάση 4 (CDPK4). Βρέθηκε ένας σημαντικός αριθμός κοινών και διαφορετικών γονιδίων με διαφορά στην έκφραση στα δύο μεταλλάγματα.

ABSTRACT

This study focus in the mosquito stages of malaria parasites. The results are presented in four chapters. The first chapter describes the mechanism of gametocyte egress from the host erythrocyte during gametogenesis. Malaria parasites infect erythrocytes and initiate a series of asexual multiplication cycles or they develop into female and male gametocytes. The production of female and male gametes, known as gametogenesis, takes place after uptake by the mosquito. The parasite egress from the host erythrocyte during gametogenesis involving sequential rupture of the membranes of the parasitophorous vacuole (PVM) and erythrocyte (RBCM). We present detailed observations of these events in real time using high-speed video microscopy and immunofluorescence assays. The first sign of egress is swelling of the host cell. The PVM ruptures and vesiculates. This is followed by the opening of a single stabilized pore of the RBCM. The RBCM is subsequently vesiculated, releasing the gametes. In the second chapter we study actin 2, one of the two actin isoforms in malaria parasites. Actin 1 has a vital role in all developmental stages, whereas actin 2 is essential in male gametogenesis. By genetic replacement of actin 2 with actin 1, we show that the two actin isoforms have distinct functions in male gametogenesis and we found an additional essential role of actin 2 in oocyst development. The function of actins depends on the polymerization properties. In the third chapter, replacement of actin 2 by chimeric actin 1 revealed that polymerization of actin 2 is necessary in gametogenesis but is not enough for the oocyst development. In the fourth chapter, global expression profiling reveals shared and distinct transcript signatures in arrested *act2(-)* and *CDPK4(-)* gametocytes.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Εισαγωγή

1.1 Πρωτόζωα

Τα πρωτόζωα είναι ένα υποσύνολο των μονοκύτταρων ευκαρυωτικών οργανισμών. Δεν φέρουν κυτταρικό τοίχωμα, διαθέτουν ένα τουλάχιστον κινούμενο στάδιο στον κύκλο ζωής τους και τα περισσότερα προσλαμβάνουν έτοιμη την τροφή τους. Πολλά είδη πρωτόζωων ζουν συμβιωτικά με άλλα ζώα, φυτά, ακόμη και πρωτόζωα. Οι σχέσεις τους κυμαίνονται από αμοιβαιότητα, ομοσιτισμό ή παρασιτισμό.

Μια μεγάλη ομάδα παρασιτικών πρωτόζωων αποτελούν τα Apicomplexa. Εισέρχονται στο κύτταρο ξενιστή όπου τρέφονται και πολλαπλασιάζονται και εξέρχονται από αυτό, καταστρέφοντάς το, ώστε να προσβάλλουν νέα κύτταρα. Τα Apicomplexa συμπεριλαμβάνουν περισσότερο από 6000 είδη και παρασιτούν σε πολλά φύλα ζώων (Adl, 2007). Τα παράσιτα αυτά έχουν μοναδικές ενδοκυτταρικές δομές (Levine, 1973) που χαρακτηρίζονται ως ακραίο σύμπλεγμα, βάση του οποίου αποδόθηκε ο όρος Apicomplexa. Αυτές οι δομές είναι υψηλά συντηρημένες μεταξύ των Apicomplexa. Ωστόσο υπάρχουν περιπτώσεις που εμφανίζονται περιοδικά στα διάφορα στάδια του κύκλου ζωής, όπως για παράδειγμα στα μεροζωΐδια και στα σποροζωΐδια (Brockley, 1989, Aikawa, 1967).

Το ακραίο σύμπλεγμα αποτελείται από δομικά και εκκριτικά στοιχεία που βρίσκονται στο εμπρόσθιο τμήμα του κυττάρου και συντελεί στην εισβολή στο κύτταρο ξενιστή (Gubbels, 2012, Baum, 2008). Τα δομικά στοιχεία βοηθούν στον προσανατολισμό του κυττάρου και είναι το επίκεντρο για τα εκκριτικά οργανίδια (μικρονήματα και ρόπτρα) (Carruthers, 1997). Το περιεχόμενο των μικρονημάτων εκκρίνεται πριν την εισβολή και καλύπτει το παράσιτο με πρωτεΐνες που διευκολύνουν την προσκόλληση στο κύτταρο ξενιστή, την κίνηση και συμβάλλουν στην ένωση με την πλασματική μεμβράνη του ξενιστή μέσω της οποίας θα εισέλθει το παράσιτο. Κατά την εισβολή τα ρόπτρα εκκρίνουν και άλλα στοιχεία, όπως πρωτεΐνες για το παρασιτοφόρο κενοτόπιο, μέσα στο οποίο διαμένει το παράσιτο και προστατεύεται από το κύτταρο ξενιστή.

Τα Apicomplexa είναι ενδοκυτταρικά παράσιτα και η ικανότητά τους να πολλαπλασιάζονται μέσα σε διαφορετικά περιβάλλοντα που καθορίζονται από τον

τύπο του κυττάρου ξενιστή, είναι κρίσιμη για την παθογένεια του παρασίτου. Αφού το παράσιτο εισβάλει επιτυχώς στο κύτταρο-ξενιστή, πολλαπλασιάζεται και σχηματίζει θυγατρικά παράσιτα. Ο κύκλος ζωής είναι περίπλοκος και υπάρχουν πολλές διαφορές μεταξύ των Apicomplexa. Κάποια στάδια μπορεί να είναι φυλετικά και κάποια μη φυλετικά, αν και κάποια Apicomplexa μπορεί να παραλείπουν το ένα ή το άλλο. Ξενιστές είναι πολλά είδη σπονδυλωτών και ασπόνδυλων ζώων και σε μερικές περιπτώσεις παρατηρείται εναλλαγή ξενιστών. Ορισμένα στάδια του κύκλου ζωής ολοκληρώνονται σε έναν ξενιστή και κάποια άλλα σε άλλο.

1.2 *Plasmodium*: το παρασιτικό πρωτόζωο της ελονοσίας

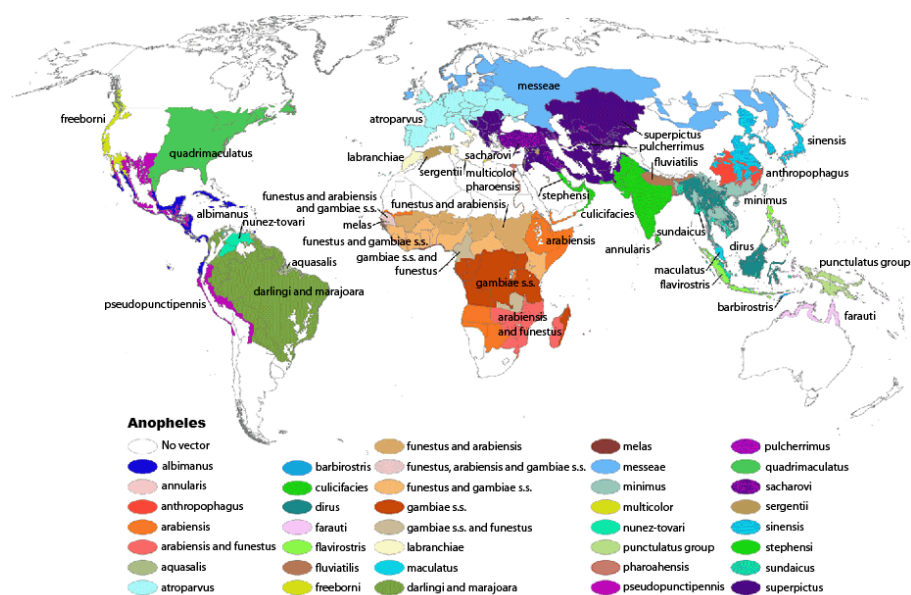
Το πιο γνωστό παρασιτικό πρωτόζωο στα Apicomplexa είναι το γένος *Plasmodium* του οποίου τα είδη προκαλούν μια σημαντική μολυσματική ασθένεια του ανθρώπου, την ελονοσία. Το γένος *Plasmodium* ανήκει στην οικογένεια Plasmodidae, στην τάξη Sporozoa και στο φύλο Apicomplexa. Το γένος *Plasmodium* περιεγράφηκε για πρώτη φορά το 1885 από τους Marchiafava και Celli. Μέχρι σήμερα έχει βρεθεί ότι στο γένος αυτό ανήκουν πάνω από 200 είδη (Chavatte, 2007, Rich, 2006). Τουλάχιστον δέκα είδη μολύνουν τον άνθρωπο. Τα πιο γνωστά είδη που προκαλούν την ελονοσία στον άνθρωπο είναι το *P.falciparum*, το *P.vivax*, το *P.knowlesi* (σπάνια), *P.ovale* και το *P.malariae*. Το *P.falciparum* που εντοπίζεται κυρίως στις υποσαχάριες περιοχές της Αφρικής και το *P.knowlesi* που εντοπίζεται κυρίως στην νοτιοανατολική Ασία είναι εξαιρετικά επικίνδυνα.

Άλλα είδη του γένους *Plasmodium* μολύνουν ζώα, όπως πουλιά, ερπετά και τρωκτικά, ενώ περίπου 30 είδη μολύνουν άλλα είδη πρωτευόντων εκτός του ανθρώπου (Baird, 2009). Τα παράσιτα των θηλαστικών περιορίζονται στις αντιλόπες, τους λεμούριους, τις νυχτερίδες, τα τρωκτικά και τα πρωτεύοντα, ενώ δεν υπάρχουν στα αιλουροειδή, στα κυνοειδή, στα άλογα ή τα βοοειδή για άγνωστους λόγους (Banister, 2009). Δεν υπάρχουν ενδείξεις ότι τα παράσιτα που μολύνουν άλλα είδη πρωτευόντων ή άλλα ζώα είναι μολυσματικά για τον άνθρωπο, εκτός από το *P.knowlesi*. Παράσιτα ελονοσίας που μολύνουν τρωκτικά χρησιμοποιούνται ευρέως ως μοντέλα στον τομέα της έρευνας, όπως το *P.berghei* (Mlambo, 2008).

1.3 Μετάδοση του *Plasmodium* μέσω κουνουπιών

Τα παράσιτα μεταδίδονται από τα ενήλικα κουνούπια του γένους *Anopheles* που αποτελούν ενδιάμεσους ξενιστές του παρασίτου. Τα θηλυκά κουνούπια χρειάζονται γεύματα αίματος που είναι απαραίτητα για την παραγωγή των αυγών τους. Έτσι όταν τσιμπούν ένα μολυσμένο άτομο, το γεύμα αίματος αποτελεί τον συνδετικό κρίκο μεταξύ του ανθρώπου και του κουνουπιού στον κύκλο ζωής του παρασίτου. Τα κουνούπια που φέρουν τα παράσιτα της ελονοσίας δεν υποφέρουν από την ασθένεια.

Το γένος *Anopheles* ολοκληρώνει τον κύκλο ζωής του στα παρακάτω στάδια ανάπτυξης: το στάδιο του αυγού, τέσσερα προνύμφικά στάδια (larva), το στάδιο της νύμφης (pupa) και το ενήλικο. Στα τρία πρώτα (αυγά, προνύμφες, νύμφες), η ανάπτυξη γίνεται στο νερό και διαρκεί 5 με 14 περίπου ημέρες, κάτι που εξαρτάται από το είδος του κουνουπιού και τις συνθήκες που επικρατούν, όπως η θερμοκρασία. Τα θηλυκά ενήλικα κουνούπια που είναι φορείς του παρασίτου της ελονοσίας μπορούν να ζήσουν περισσότερο από ένα μήνα ή και περισσότερο σε συνθήκες εργαστηρίου. Όμως στην φύση η επιβίωση εξαρτάται από την θερμοκρασία και την υγρασία, αλλά και από την ικανότητά τους να εξασφαλίσουν ένα γεύμα αίματος.



Εικόνα 1.1. Γεωγραφική κατανομή φορέων και δυνητικών φορέων της ελονοσίας. (Κέντρα Ελέγχου και πρόληψης νοσημάτων, <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/mosquitoes/>).

Από τα περίπου 430 είδη κουνουπιών που ανήκουν στο γένος *Anopheles*, μόνο 30 με 40 είναι φορείς και δυνητικοί φορείς του παρασίτου στην φύση (εικόνα 1.1, Κέντρα Ελέγχου και πρόληψης νοσημάτων). Η ελονοσία μεταδίδεται από διαφορετικά είδη ανάλογα την περιοχή και το περιβάλλον. Τα κουνούπια που μεταδίδουν το παράσιτο δεν βρίσκονται μόνο σε περιοχές ενδημικές της νόσου, αλλά και σε περιοχές που η ελονοσία έχει εξαλειφθεί. Αυτές οι περιοχές είναι αυξημένου κινδύνου για επανεμφάνιση της νόσου.

1.4 Η ελονοσία

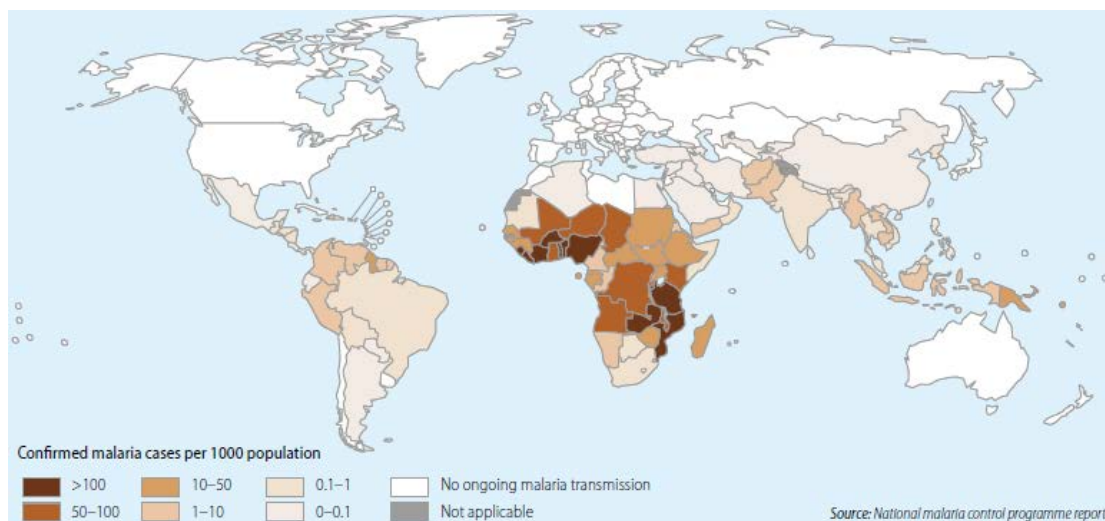
1.4.1 Επιδημιολογία της ελονοσίας

Η ελονοσία αποτελεί την πιο σημαντική παρασιτική λοίμωξη του ανθρώπου με παγκόσμια κατανομή στις τροπικές και υποτροπικές περιοχές, αλλά και ορισμένες εύκρατες ζώνες. Πολλοί είναι οι παράγοντες που καθορίζουν την επιδημιολογική εικόνα της ελονοσίας. Τέτοιες παράμετροι είναι η ανοσία (κληρονομική ή επίκτητη), οι συνθήκες ζωής, οι μετακινήσεις του ανθρώπινου πληθυσμού, τα δημογραφικά δεδομένα κ.λπ.

Στην Ευρώπη υπήρχε ελονοσία σε πολλές περιοχές μέχρι τη δεκαετία του 50. Το 1955 ξεκίνησε μία τεράστια προσπάθεια για την εξάλειψη της νόσου σε πολλές περιοχές του πλανήτη, συμπεριλαμβανόμενης και της Ελλάδας. Η προσπάθεια αυτή οργανώθηκε από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ). Περιελάβανε φαρμακευτική αγωγή για τους ασθενείς και την συστηματική καταπολέμηση των κουνουπιών φορέων. Το πρόγραμμα αυτό στηρίχτηκε στα φτηνά φάρμακα (chloroquine) για τους ασθενείς και την ευρύτατη χρήση του εντομοκτόνου DDT. Αυτή η προσπάθεια ήταν αποτελεσματική και η ασθένεια εκριζώθηκε από την Ευρώπη. Ως αποτέλεσμα η Ελλάδα κηρύχτηκε το 1974 «χώρα ελεύθερη ελονοσίας». Από τότε μόνο εισαχθέντα κρούσματα έχουν εμφανιστεί στην χώρα μας, δηλαδή από άτομα που είχαν μολυνθεί στον εξωτερικό (μετανάστες ή ταξιδιώτες). Όμως τα τελευταία χρόνια επανεμφανίστηκε εγχώρια μετάδοση σε διάφορες περιοχές της χώρας (βλ. <http://www.keelpno.gr>). Οι αιτίες είναι ποικίλες, αλλά η κυριότερη αιτία είναι ότι τα

κουνούπια που μεταδίδουν την νόσο ενδημούν σε όλη την Ελλάδα, και οι κλιματικές αλλαγές και η έλλειψη συστηματικής καταπολέμησης ευνοούν την ανάπτυξή τους.

Σε παγκόσμιο επίπεδο εκτιμάται ότι 3,2 δισεκατομμύρια άνθρωποι σε 97 χώρες και εδάφη έχουν πιθανότητα να μολυνθούν με παράσιτα της ελονοσίας (εικόνα 1.2). 1,2 δισεκατομμύρια άνθρωποι ανήκουν στην ομάδα υψηλού κινδύνου, δηλαδή έχουν πιθανότητα μεγαλύτερη από 1 στα 1000 να νοσήσουν με ελονοσία μέσα σε ένα χρόνο. Σύμφωνα με τις τελευταίες εκτιμήσεις, μέσα στο 2013 υπήρξαν 198 εκατομμύρια περιπτώσεις ελονοσίας παγκοσμίως και η ασθένεια οδήγησε σε 584.000 θανάτους, παρουσιάζοντας μείωση στα ποσοστά εμφάνισης της ελονοσίας και θνησιμότητας από το 2000. Ωστόσο, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, το μεγαλύτερο ποσοστό θανάτων είναι στις περιοχές της Αφρικής και το 78% όλων των θανάτων αφορά παιδιά κάτω των πέντε ετών (World Malaria Report 2014).



Εικόνα 2.2. Χώρες με συνεχή μετάδοση της ελονοσίας το 2013. (World Malaria Report 2014).

1.4.2 Συμπτώματα

Η περίοδος επώασης των παρασίτων στα ηπατικά κύτταρα κυμαίνεται από 8 έως 25 ημέρες (Fairhurst, 2010). Στελέχη του *P. vivax* από ορισμένες γεωγραφικές περιοχές έχουν περίοδο επώασης μέχρι και ένα χρόνο. Τα αρχικά συμπτώματα της

ελονοσίας είναι ο πονοκέφαλος, η ατονία, ο πυρετός, η εφίδρωση, εμέτους, ίκτερος, αιμολυτική αναιμία, αιμοσφαιρίνη στα ούρα, λεύκανση του αμφιβληστροειδούς και ίσως κάποιους πόνους στα οστά και τις αρθρώσεις (Bartoloni, 2012) .

Ο παροξυσμός της ελονοσίας είναι ένα δραματικό γεγονός με κυκλική εμφάνιση των συμπτωμάτων. Αρχίζει με κρυάδες και ρίγος και καταλήγει σε πυρετό και εφίδρωση. Στον τριταίο πυρετό στις λοιμώξεις από τα *P.vivax*, *P.ovale* και *P.falciparum* (κακοήθης τριταίος), η εμφάνιση των συμπτωμάτων γίνεται κάθε δύο μέρες, ενώ στον τεταρταίο πυρετό στις λοιμώξεις από τα *P.malariae* τα συμπτώματα εμφανίζονται κάθε τρεις μέρες (Ferri, 2009). Το *P.falciparum* μπορεί να προσκολλάται στα τοιχώματα των μικρών αιμοφόρων αγγείων. Στην ελονοσία του πλακούντα παρουσιάζεται απόφραξη των μικρών αγγείων (Mens, 2010), ενώ τα συσσωρευμένα ερυθρά αιμοσφαίρια διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και προκαλούν εγκεφαλική ελονοσία (Renia, 2012).

1.4.3 Θεραπεία

Η θεραπεία της ελονοσίας βασίζεται στα ανθελονοσιακά φάρμακα που έχουν στόχο τις ενδοερυθροκυτταρικές μορφές του παρασίτου, τις εξωερυθροκυτταρικές μορφές και τα γαμετοκτόνα. Η πιο αποτελεσματική μέχρι στιγμής θεραπεία για τη μόλυνση από το *P.falciparum* είναι η χρήση της αρτεμισίνης σε συνδυασμό με άλλα ανθελονοσιακά (γνωστή ως ACT) (Kokwaro, 2009). Δυστυχώς η ανθεκτικότητα στα φάρμακα αποτελεί ένα αυξανόμενο πρόβλημα στη θεραπεία της ελονοσίας του 21ου αιώνα (Sinha, 2014).

1.4.4 Πρόληψη

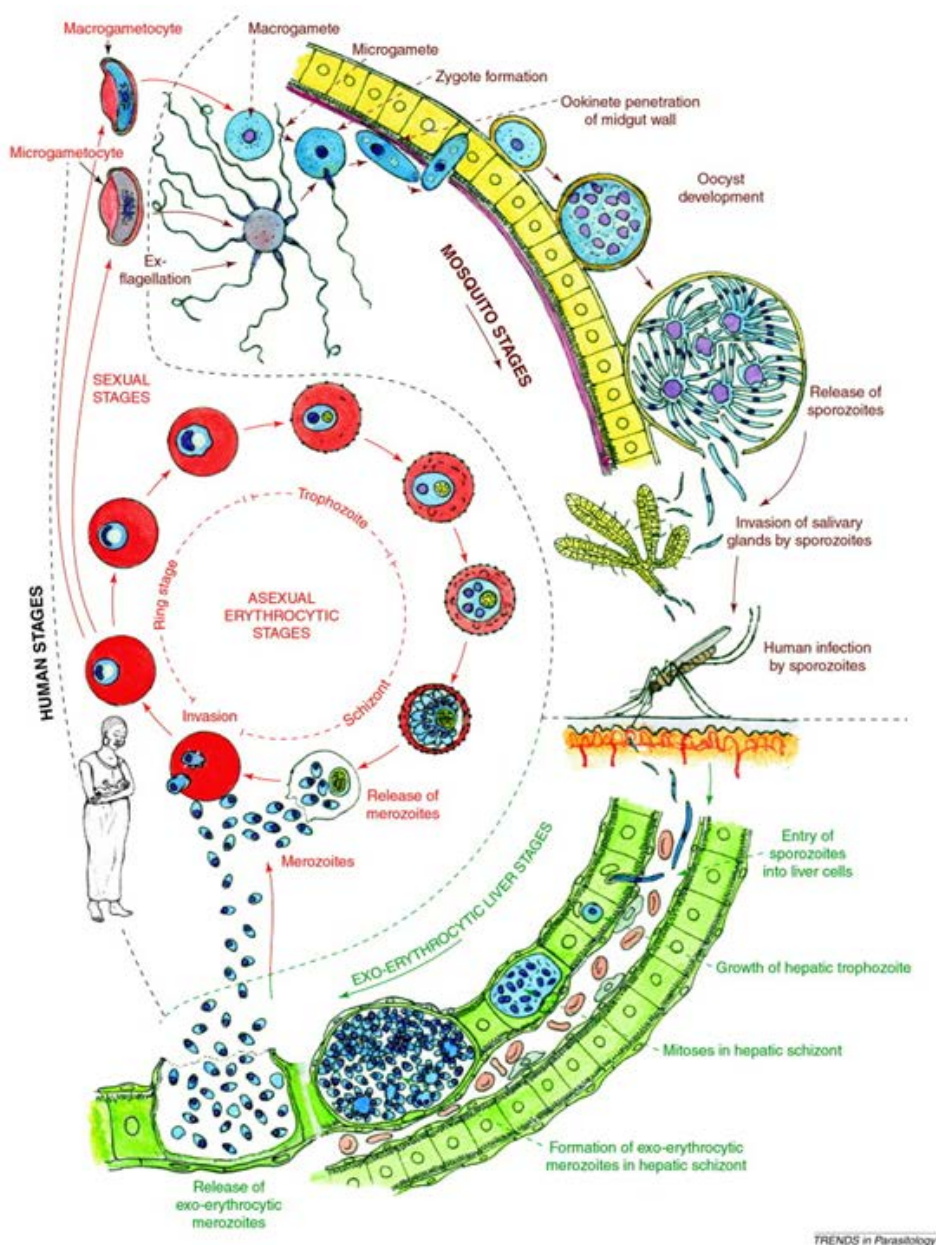
Σημαντικό βάρος δίνεται στην πρόληψη και εφαρμόζονται διάφορα μέτρα για τον έλεγχο της ελονοσίας. Η μαζική θεραπεία έχει ως σκοπό την εξάλειψη του παρασίτου από τον άνθρωπο. Ένα σημαντικό μέτρο είναι ο περιορισμός του πληθυσμού των κουνουπιών. Η καταπολέμηση των κουνουπιών με χημικά, βιολογικά, περιβαλλοντικά μέσα ήταν ικανή να εκριζώσει την ελονοσία σε περιοχές όπου έγινε συστηματικά και μακροχρόνια, αλλά με μειονέκτημα το μεγάλο και συνεχές κόστος. Οι επεξεργασμένες με εντομοκτόνο κουνουπιέρες και ο εσωτερικός

ψεκασμός φαίνονται να είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικές μέθοδοι στην πρόληψη της ελονοσίας (Enayati, 2010). Επίσης γίνονται προσπάθειες για τη μείωση των προνυμφών μέσω της μείωσης της διαθεσιμότητας των στάσιμων νερών στα οποία αναπτύσσονται ή μέσω της προσθήκης ουσιών που δυσκολεύουν την ανάπτυξή τους (Tusting, 2013).

Τα εμβόλια κατά της ελονοσίας αποτελούν ένα δύσκολο στόχο της έρευνας, ο οποίος ακόμα δεν έχει επιτευχθεί. Το πράσινο φως από την ευρωπαϊκή ρυθμιστική αρχή φαρμάκων έλαβε το 2015 το πρώτο εμβόλιο (Mosquirix, RTS-S) με τη σύσταση να χρησιμοποιηθεί για βρέφη στην Αφρική, τα οποία κινδυνεύουν από τη νόσο. Ωστόσο το εμβόλιο παρέχει μόνο μερική προστασία, και έχει υψηλό κόστος.

Μια νέα στρατηγική καταπολέμησης της νόσου είναι η λεγόμενη **παρεμπόδιση της μετάδοσης** (PTM) (The malERA Consultative Group on Drugs, 2011) που βασίζεται στην φαρμακευτική αγωγή (ή εμβολιασμό) στον άνθρωπο με σκευάσματα που θα παρεμποδίσουν το παράσιτο να αναπτυχτεί στο κουνούπι. Από τα αναπτυξιακά στάδια του παρασίτου στο κουνούπι έχει σήμερα χαρακτηριστεί ένας πολύ μικρός αριθμός πρωτεϊνών που μπορούνε θεωρητικά να αποτελέσουν στόχους για τέτοιες μεθόδους PTM. Πειράματα σε πειραματόζωο έχουν επιβεβαιώσει ότι η μέθοδος μπορεί να είναι αποτελεσματική. Όμως για την προώθηση της μεθόδου, χρειάζονται πολύ περισσότερες γνώσεις για τις διεργασίες του παρασίτου, για τα μόρια που εμπλέκονται, καθώς επίσης και η ανάπτυξη αποτελεσματικών δοκιμασιών για την εύρεση αναστολέων.

1.5 Κύκλος ζωής του παρασίτου



Εικόνα 1.3. Κύκλος ζωής του παρασίτου. Ο κύκλος ζωής των παρασίτων της ελονοσίας ολοκληρώνεται σε δύο ξενιστές, τον άνθρωπο και το κουνούπι. Η μετάδοση των παρασίτων γίνεται με το τσίμπημα του μολυσματικού κουνουπιού. Στον άνθρωπο τα παράσιτα περνάνε από τα ηπατικά κύτταρα, πολλαπλασιάζονται και καταλήγουν στην κυκλοφορία του αίματος προσβάλλοντας τα ερυθρά και πολλαπλασιάζονται ξανά. Η ερυθροκυτταρική φάση αποτελείται από μη φυλετικά στάδια και την δημιουργία γαμετοκυττάρων. Στο κουνούπι ξεκινάει η γαμετογένεση, δημιουργείται το ζυγωτό, αυτό μετασχηματίζεται σε ωοκινήτη και έπειτα σε ωοκύστη. Από τις ωοκύστες απελευθερώνονται τα σποροζώδια που καταλήγουν στους σιελογόνους αδένες.

1.5.1 Εξωερυθροκυτταρική φάση

Τα παράσιτα της ελονοσίας έχουν ένα περίπλοκο κύκλο ζωής (εικόνα 1.3). Η μετάδοση ξεκινάει με το τσίμπημα του μολυσματικού θηλυκού κουνουπιού. Μαζί με το γεύμα αίματος, σποροζωΐδια (sporozoites) εισάγονται με το σάλιο στο περιφερειακό κυκλοφορικό σύστημα του ανθρώπου, τα οποία μέσα σε λίγα λεπτά καταλήγουν στα παρεγχυματικά κύτταρα του ήπατος και ξεκινάει η εξωερυθροκυτταρική φάση. Στα κύτταρα του ήπατος τα παράσιτα πολλαπλασιάζονται με σχιζογονία. Στην σχιζογονία ο πυρήνας αρχικά διαιρείται χωρίς διαφοροποίηση του κυτταροπλάσματος και μετά από 4 έως 7 πυρηνικές διαιρέσεις το κυτταρόπλασμα συμπυκνώνεται γύρω από κάθε πυρήνα για τον σχηματισμό των μεροζωιδίων (merozoites).

Η εξωερυθροκυτταρική φάση του παρασίτου διαρκεί 9 έως 30 ημέρες ανάλογα με το είδος του παρασίτου, χαρακτηρίζεται ως περίοδος επώασης και είναι ασυμπτωματική. Χιλιάδες μεροζωΐδια παράγονται που απελευθερώνονται στην κυκλοφορία του αίματος και εισβάλλουν στα ερυθροκύτταρα. Έτσι αρχίζει η ερυθροκυτταρική φάση του κύκλου ζωής. Στα είδη *P.vivax* και *P.ovale*, τα σποροζωΐδια στα ηπατικά κύτταρα παραμένουν αδρανή για ένα διάστημα και εξέρχονται στο αίμα με καθυστέρηση. Τα παράσιτα σε αυτό το στάδιο είναι γνωστά ως υπνοζωΐδια.

1.5.2 Ερυθροκυτταρική φάση

Η ερυθροκυτταρική φάση αποτελείται από μη φυλετικά και φυλετικά στάδια. Τα μεροζωΐδια των ηπατικών κυττάρων όταν βρεθούν στο αίμα εισέρχονται μέσα στα ερυθροκύτταρα αφού συνδεθούν με ειδικούς υποδοχείς στην μεμβράνη τους. Αμέσως μετά την εισβολή το παράσιτο σχηματίζει μια μεμβράνη στο κυτταρόπλασμα του ερυθροκυττάρου (parasitophorous vacuole membrane, PVM) που περικλείει το παρασιτοφόρο κενοτόπιο. Η PVM παίζει σημαντικό ρόλο για την προστασία του παρασίτου από το κύτταρο-ξενιστή και στην απόκτηση θρεπτικών συστατικών από αυτό (de Koning-Ward, 2009). Περιέχει λιπίδια που προέρχονται από το ερυθροκύτταρο-ξενιστή, αλλά μετά την είσοδο η σύσταση αλλάζει από λιπίδια που παράγει το ίδιο το παράσιτο. Ένας περιορισμένος αριθμός πρωτεϊνών που προέρχονται

από το παράσιτο είναι γνωστό ότι βρίσκονται στην PVM, ενώ πρωτεΐνες του ξενιστή δεν υπάρχουν. Κάποιες από τις πρωτεΐνες της PVM είναι κοινές στα μη φυλετικά και φυλετικά στάδια, αλλά επίσης υπάρχουν και σημαντικές διαφορές (Spielmann, 2012). Παράδειγμα αποτελεί η έκφραση διαφορετικών μελών της οικογένειας πρωτεϊνών ETRAMP. Επίσης στο *P.falciparum* αποκλειστικά στην PVM των γαμετοκυττάρων συναντάται η πρωτεΐνη *Pfs16*, που η απαλοιφή της δείχνει τον σημαντικό ρόλο που έχει στην ανάπτυξη των γαμετοκυττάρων (Eksi, 2011, Kongkasuriyachai, 2004). Εκτός από την PVM και την πλασματική μεμβράνη, τα μεροζωΐδια έχουν κάτω από την πλασματική μεμβράνη το εσωτερικό μεμβρανικό σύμπλοκο, το οποίο αποτελείται από δυο μεμβράνες, μικροσωληνίσκους και τον μηχανισμό ακτίνης-μυοσίνης που παίζει ρόλο στην κίνηση και την εισβολή στο κύτταρο-ξενιστή (Banister, 2009)

Τα παράσιτα αναπτύσσονται μέσα στα ερυθροκύτταρα καταναλώνοντας αιμοσφαιρίνη που λαμβάνουν από τα κυτοστόματα (Banister, 2009). Το προϊόν που παράγεται από την πρωτεολυτική πέψη της αιμοσφαιρίνης (Goldberg, 2005) είναι μια σκουρόχρωμη αδιάλυτη χρωστική, η αιμοζωΐνη. Η αιμοζωΐνη συσσωρεύεται στα κύτταρα του ξενιστή και αποβάλλεται, όταν παράγεται η επόμενη γενεά μεροζωΐδιων. Τελικά συσσωρεύεται στο ήπαρ, την σπλήνα ή άλλα όργανα.

Μέσα στα ερυθροκύτταρα, τα μεροζωΐδια μεταβάλλονται σε τροφοζωΐδια (trophozoites) παίρνοντας αρχικά την μορφή δακτυλίου (rings). Τα τροφοζωΐδια εξελίσσονται σε σχίζοντες (schizonts), οι οποίοι ακολουθούν την ίδια διαδικασία σχιζογονίας, όπως αυτή στο ήπαρ για την παραγωγή μεροζωΐδιων. Κάθε μεροζωΐδιο που εισέρχεται στο ερυθροκύτταρο παράγει 6 έως 32 νέα μεροζωΐδια, τα οποία απελευθερώνονται στο αίμα. Τα μεροζωΐδια δεν επιζούν για πολύ έξω από τα ερυθροκύτταρα. Πρέπει σύντομα να βρουν νέα υγιή ερυθροκύτταρα, στα οποία εισβάλλουν για να συνεχίσουν τον κύκλο ζωής τους. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται με περιοδικότητα διαφορετική για κάθε είδος (48 ώρες για το *P.falciparum*).

Γαμετοκυτταρογένεση

Μέσα στην ερυθροκυτταρική φάση του κύκλου ζωής των παρασίτων, κάποια από αυτά θα διαφοροποιηθούν σε αρσενικά και θηλυκά γαμετοκύτταρα, η διαδικασία της γαμετοκυτταρογένεσης. Στα περισσότερα είδη παρασίτων της ελονοσίας, τα γαμετοκύτταρα είναι στρογγυλά και η ωρίμανσή τους διαρκεί λίγες ώρες (26-30 ώρες στο *P.berghei*). Αντίθετα στο *P.falciparum* έχουν σχήμα μισοφέγγαρο και ωριμάζουν σε 8 με 12 μέρες (Liu, 2011). Τα γαμετοκύτταρα περιβάλλονται και αυτά από την PVM και την μεμβράνη του ερυθροκυττάρου (RBCM). Χαρακτηρίζονται όμως και από μια επιπλέον εσωτερική μεμβράνη (subpellicular membrane, SPM) που βρίσκεται κάτω από την πλασματική μεμβράνη του κυττάρου και μαζί με μικροσωληνίσκους παρέχουν επιπλέον σταθερότητα στο κύτταρο (Sinden, 1982). Στο *P.berghei* αυτή η μεμβράνη έχει βρεθεί μόνο στα αρσενικά, αλλά δεν γνωρίζουμε τον ρόλο της.

Έχει δειχθεί ότι η γαμετοκυτταρογένεση επηρεάζεται από διαφορετικού τύπου στρες, όπως η πυκνότητα των παρασίτων, η αναιμία, η απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή ή η φαρμακευτική αγωγή (Kuehn, 2010). Ο μηχανισμός με τον οποίο ένα μεμονωμένο παράσιτο δεσμεύεται να διαφοροποιηθεί σε γαμετοκύτταρο δεν είναι γνωστός. Η επικρατούσα άποψη είναι ότι όλα τα μεροζωΐδια που προέρχονται από ένα σχίζοντα διαφοροποιούνται είτε σε αρσενικά είτε σε θηλυκά γαμετοκύτταρα. Η έκφραση της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης GFP κάτω από υποκινητές γονιδίων που εκφράζονται στα γαμετοκύτταρα (όπως τα *pf14_748*, *pfs16*, *pfg27*, και *set*) υποδεικνύουν το στάδιο του σχίζοντα για αυτήν την δέσμευση (Alano, 2007).

Δεν γνωρίζουμε πολλά για τα γονίδια που ρυθμίζουν την γαμετοκυτταρογένεση. Έχει παρατηρηθεί ότι μειωμένα επίπεδα γαμετοκυττάρων σε καλλιέργειες παρασίτων συνδέονται με την απώλεια γενετικής πληροφορίας όταν χάνεται η υποτελομερική περιοχή στο χρωμόσωμα 9 (Day, 1993). Αυτή η περιοχή περιέχει 15 γονίδια συμπεριλαμβανομένου και του γονιδίου *pfgig* (gene implicated in gametocytogenesis), που η απαλοιφή του οδηγεί σε μικρή παραγωγή γαμετοκυττάρων (Gardiner, 2005). Επιπλέον, μια πρωτεΐνη που προσδένει RNA, η pfPUF2, και ο μεταφορέας NPT1 παίζουν ρόλο στην ρύθμιση της γαμετοκυτταρογένεσης και της φυλετικής διαφοροποίησης (Boisson, 2011, Miao, 2010). Η πρόσφατη ανακάλυψη του

κύριου ρυθμιστή της γαμετοκυτταρογένεσης, του μεταγραφικού ενεργοποιητή AP2-G, δείχνει ότι το πρόγραμμα για την ανάπτυξη των γαμετοκυττάρων ρυθμίζεται σε μεταγραφικό επίπεδο. Η έλλειψη αυτού του παράγοντα έχει ως αποτέλεσμα την αδυναμία δημιουργίας γαμετοκυττάρων (Kafsack, 2014, Sinha, 2014).

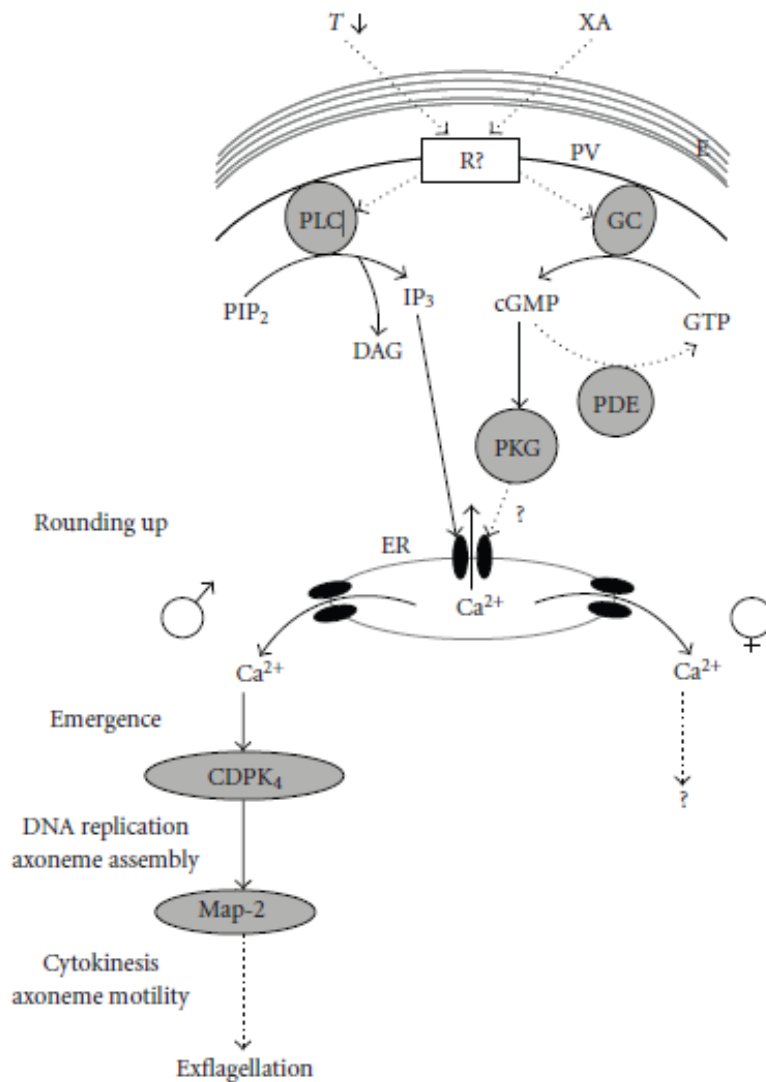
Μελέτες του προφίλ έκφρασης τόσο σε μεταγραφικό όσο και σε πρωτεϊνικό επίπεδο ταυτοποιούν πολλά γονίδια που εκφράζονται στα γαμετοκύτταρα και πολλά από αυτά εμφανίζουν αποκλειστικό ρόλο σε αυτό το στάδιο. Ταυτοποιήθηκαν μετάγραφα που οι αντίστοιχες πρωτεΐνες χρησιμοποιούνται από το παράσιτο για την παραγωγή των γαμετοκυττάρων, ενώ ένας μικρός αριθμός αποθηκεύεται για να χρησιμοποιηθεί μετά την γαμετογένεση και την γονιμοποίηση των γαμετών. Μια πρωτεωμική σύγκριση μεταξύ αρσενικών και θηλυκών γαμετοκυττάρων στο *P.berghei* δείχνει ότι υπάρχουν μεγάλες διαφορές σε μοριακό επίπεδο (Khan, 2005). Από τις 406 πρωτεΐνες που εντοπίζονται αποκλειστικά στα γαμετοκύτταρα, μόνο 69 είναι κοινές και στα δύο φύλα. Το μεγαλύτερο ποσοστό (69%) των πρωτεϊνών που εντοπίζονται στα γαμετοκύτταρα βρίσκεται στα αρσενικά, όπου συμμετέχουν κυρίως στον σχηματισμό και την κινητικότητα των αξονημάτων και στον πολλαπλασιασμό του DNA (βλ. γαμετογένεση αρσενικών), ενώ πολλές πρωτεΐνες που εντοπίζονται στα θηλυκά έχουν μιτοχονδριακές και ριβοσωμικές λειτουργίες.

Ο λόγος θηλυκών/αρσενικών γαμετοκυττάρων είναι υπέρ των θηλυκών, με ένα αρσενικό για περίπου πέντε θηλυκά (Paul, 2002). Αυτό θα μπορούσε να ερμηνευτεί από το γεγονός ότι ένα αρσενικό γαμετοκύτταρο θα δώσει οχτώ γαμέτες, εξισορροπώντας έτσι την αρχική διαφορά (βλ. γαμετογένεση αρσενικών). Στο *P.chabaudi* (ένα παράσιτο των τρωκτικών) φαίνεται ότι ο λόγος αυτός εξαρτάται από την πυκνότητα των παρασίτων και τον αριθμό των παρασιτικών κλώνων που έχουν μολύνει τον ίδιο ξενιστή (Reece, 2008). Για παράδειγμα, ένας πληθυσμός παρασίτων που δεν έχει την τάση να επικρατούν τα θηλυκά έναντι των αρσενικών, αυξάνει την πιθανότητα επιτυχίας στην γονιμοποίηση των θηλυκών από τον αντίστοιχο κλώνο, όταν υπάρχει ανταγωνισμός με άλλους κλώνους παρασίτων (Reece, 2008, Schall, 2009).

1.5.3 Στάδια ανάπτυξης στο κουνούπι

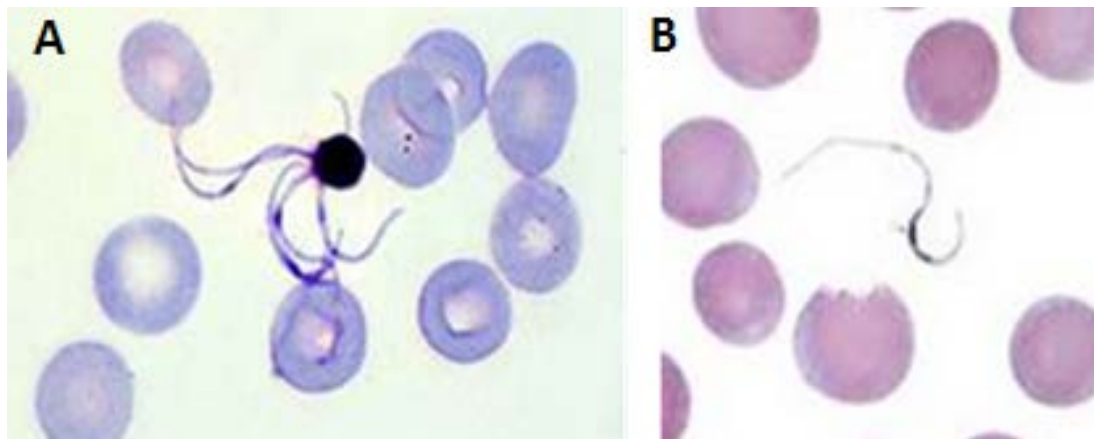
Γαμετογένεση

Όταν τα κουνούπια εισροφούν αίμα από μολυσμένο άτομο, μόνο τα γαμετοκύτταρα επιβιώνουν στον εντερικό σωλήνα του εντόμου. Με την είσοδο στο κουνούπι, τα παράσιτα δέχονται εξωτερικά σήματα που σημαίνουν την αλλαγή από τον ένα ξενιστή στον άλλο. Με αυτά, τα ώριμα γαμετοκύτταρα ενεργοποιούνται και ξεκινάει η διαδικασία της γαμετογένεσης, δηλαδή η παραγωγή αρσενικών γαμετών (μικρογαμέτες) και θηλυκών γαμετών (μακρογαμέτες). Η ενεργοποίηση οφείλεται στην απότομη πτώση της θερμοκρασίας, περίπου 5°C (Bilker, 1997), και την παρουσία του ξανθουρενικού οξέος (xanthurenic acid, XA), ένα μεταβολικό παραπροϊόν στην σύνθεση για την χρώση του ματιού στο κουνούπι (Bilker, 1998, Garcia, 1998). Τα εξωτερικά ερεθίσματα οδηγούν στην ενεργοποίηση της PLC (phospholipase C) και της GC (guanylyl cyclase) που με την σειρά τους οδηγούν στην αύξηση του IP3 (inositol triphosphate) και του cGMP (cyclic guanosine monophosphate) αντίστοιχα. Το cGMP ενεργοποιεί την PKG (cGMP-dependent protein kinase) και το IP3 οδηγεί στην απελευθέρωση ενδοκυτταρικού ασβεστίου από το ενδοπλασματικό δίκτυο. Στα αρσενικά η αύξηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου ενεργοποιεί την CDPK4 (calcium-dependent protein kinase 4) και την Map-2 (Mitogen-activated protein kinase 2) (εικόνα 1.4) (Kuehn, 2010).



Εικόνα 1.4. Μονοπάτια σηματοδότησης στην ενεργοποίηση των γαμετοκυττάρων. Η ενεργοποίηση επάγεται από την μείωση στην θερμοκρασία (T) και την παρουσία του ξανθουρενικού οξέος (XA). Δεν έχει βρεθεί κάποιος υποδοχέας (R) που να συμμετέχει στην ενεργοποίηση. Η ενεργοποίηση επιδρά στις PLC και GC και οδηγεί στην αύξηση των IP₃ και cGMP. Η cGMP ενεργοποιεί την PKG και η IP₃ μεσολαβεί στην απελευθέρωση ενδοκυτταρικού ασβεστίου από το ενδοπλασματικό δίκτυο. Η απελευθέρωση ασβεστίου οδηγεί στην ενεργοποίηση των CDPK₄ και Map-2 στα αρσενικά και τελικά στην εκμαστιγίωση (exflagellation). Στα θηλυκά δεν γνωρίζουμε τι επάγεται από την απελευθέρωση του ασβεστίου. Τα μαύρα βέλη συμβολίζουν άμεσες αλληλεπιδράσεις και τα διακεκομμένα βέλη συμβολίζουν έμμεσες αλληλεπιδράσεις. CDPK (calcium-dependent protein kinase), cGMP (cyclic guanosine monophosphate), DAG (diacylglycerol), E (erythrocyte), ER (endoplasmic reticulum), GC (guanylyl cyclase), GTP (guanosine triphosphate), IP₃ (inositol triphosphate), Map-2 (Mitogen-activated protein kinase 2), PDE (phosphodiesterase), PIP₂ (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate), PKG (cGMP-dependent protein kinase) PLC (phospholipase C), PV (parasitophorous vacuole). (Kuehn, 2010).

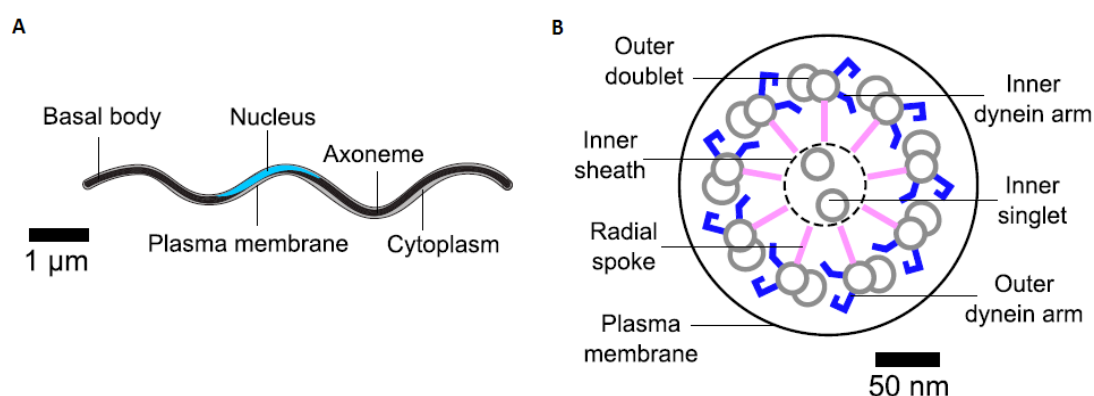
Η γαμετογένεση διαρκεί περίπου 10 με 15 λεπτά και τελικά και οι θηλυκοί και οι αρσενικοί γαμέτες απελευθερώνονται από το ερυθροκύτταρο-ξενιστή τους. Με την έξοδο του θηλυκού γαμέτη από το ερυθροκύτταρο, το παράσιτο είναι έτοιμο για γονιμοποίηση. Αντίθετα, στα αρσενικά γαμετοκύτταρα η διαδικασία είναι αρκετά πιο περίπλοκη. Με την ενεργοποίηση ξεκινάει ο πολλαπλασιασμός του DNA με τρεις μιτωτικές διαιρέσεις και το σχηματισμό 8 αξονημάτων (axonemes) που αποτελούν βασικό στοιχείο των αρσενικών γαμετών. Οι αρσενικοί γαμέτες έχουν έντονη κινητικότητα που οφείλεται στα αξονήματα και εκβάλλουν με την μορφή μαστίγιων από το αρσενικό γαμετοκύτταρο (εικόνα 1.5). Η διαδικασία αυτή αποκαλείται εκμαστιγίωση (exflagellation). Τέλος, αποκόπτονται από αυτό και με γρήγορες κινήσεις ψάχνουν να βρουν και να γονιμοποιήσουν τα θηλυκά σχηματίζοντας τελικά το ζυγωτό.



Εικόνα 1.5. Έξοδος αρσενικών γαμετών. Φωτογραφία από οπτικό μικροσκόπιο με χρώση Giemsa. Α. Οι αρσενικοί γαμέτες με την μορφή μαστιγίων εξέρχονται από το γαμετοκύτταρο (exflagellation). Β. Απεικονίζεται ένας αρσενικός γαμέτης που έχει αποκοπεί από το γαμετοκύτταρο ώστε να αναζητήσει και να γονιμοποιήσει έναν θηλυκό γαμέτη (<http://www.med-chem.com/para-site.php?url=org/plasfalc>).

Πριν την ενεργοποίηση στα ώριμα αρσενικά γαμετοκύτταρα, στην κυτταροπλασματική πλευρά ενός πυρηνικού πόρου, ως μια άμορφη μάζα βρίσκεται το κέντρο οργάνωσης των μικροσωληνίσκων. Από την πυρηνική πλευρά του πόρου υπάρχει το ενδοπυρηνικό σώμα (intranuclear body, INB) στο οποίο βρίσκονται οι κινητοχώροι του απλοειδούς γονιδιώματος. Αμέσως μετά την ενεργοποίηση από την

άμορφη μάζα του κέντρου οργάνωσης των μικροσωληνίσκων δημιουργούνται τα βασικά σώματα στα οποία σχηματίζονται τα αξονήματα. Συνεπώς, τα δύο βασικά συστατικά του αρσενικού γαμέτη (τα αξονήματα και το απλοειδές γονιδίωμα) συνδέονται πριν την ενεργοποίηση (Sinden, 1976). Ο σχηματισμός των αξονημάτων γίνεται παράλληλα με τις τρεις μιτωτικές διαιρέσεις. Μόνο μετά την τελευταία μιτωτική διαίρεση, τα αξονήματα που περιτυλίζουν τον πυρήνα, αρχίζουν να κινούνται έντονα μέσα στο κυτταρόπλασμα του αρχικού κυττάρου (Sinden, 2010). Ο αρσενικός γαμέτης, με μήκος που κυμαίνεται γύρω στα 14μm (Sinden, 2010), είναι ένα πολύ απλό κύτταρο που αποτελείται μόνο από το αξονήμα, τον πυρήνα, το κυτταρόπλασμα και την πλασματική μεμβράνη. Τα αξονήματα έχουν δομικό μοτίβο «9+2»: ένας κύλινδρος που στο κέντρο βρίσκονται δύο μικροσωληνίσκοι και 9 ζεύγη μικροσωληνίσκων στην περιφέρεια, τα οποία συνδέονται με μόρια δυνεΐνης ως κινητήριοις δύναμη (εικόνα 1.6) (Wilson, 2013).



Εικόνα 1.6. Αρσενικός γαμέτης. Α. Η εικόνα βασίζεται σε ηλεκτρονικές μικρογραφίες αρσενικών γαμετών από το *P.berghei* και δείχνει τα βασικά χαρακτηριστικά του κυττάρου: βασικό σώμα (basal body), πυρήνας (nucleus), πλασματική μεμβράνη (plasma membrane), αξονήματα (axonemes), κυτταρόπλασμα (cytoplasm). Β. Εγκάρσια τομή που δείχνει τα στοιχεία ενός τυπικού «9+2» αξονήματος. Η κίνηση οδηγείται από ζεύγη μικροσωληνίσκων που καθοδηγούνται από τους βραχίονες δυνεΐνης. Εξωτερικό ζεύγος μικροσωληνίσκων (outer doublet), εσωτερικοί μικροσωληνίσκοι (inner singlet), εξωτερικός βραχίονας δυνεΐνης (outer dynein arm), εσωτερικός βραχίονας δυνεΐνης (inner dynein arm), εσωτερική θήκη (inner sheath), ακτίνα (radial spoke).

Στην γαμετογένεση των αρσενικών παρασίτων, η κινάση CDPK4 παίζει ρόλο στον πολλαπλασιασμό του DNA και τον σχηματισμό των αξονημάτων (Tewari, 2010) και η κινάση Map-2 συμβάλει στην κυτοκίνηση και την κινητικότητα των αξονημάτων (Bilker, 2004). Εκτός από τις κινάσες και άλλες πρωτεΐνες εμπλέκονται ειδικά στην

γαμετογένεση των αρσενικών. Για παράδειγμα, η απαλοιφή του γονιδίου *pf16* που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη ARM (armadillo repeat motif-protein) η οποία βρίσκεται στα αξονήματα, έχει σαν αποτέλεσμα την μη φυσιολογική κίνηση και την μείωση της γονιμότητας (Straschil, 2010). Αντίθετα, η απαλοιφή των γονιδίων *p48/45* (van Dijk, 2010) και *hap2/gcs1* (Liu, 2008) οδηγεί σε πλήρη στειρότητα καθώς οι αρσενικοί γαμέτες αδυνατούν να προσδεθούν (*p48/45*) ή να συντηχθούν (*hap2/gcs1*) με τους θηλυκούς γαμέτες.

Κατά την αναζήτηση των θηλυκών γαμετών, οι αρσενικοί γαμέτες προσκολλώνται στα γειτονικά ερυθροκύτταρα, σχηματίζοντας τα κέντρα εκμαστιγίωσης (exflagellation centers). Οι αρσενικοί γαμέτες προσκολλώνται στο σιαλικό οξύ και την γλυκοφορίνη A που βρίσκεται στην επιφάνεια των ερυθροκυττάρων (Templeton, 1998). Η πρόσδεση εξαρτάται από μια πρωτεΐνη συγκόλλησης (*Pfs230*) που βρίσκεται σε αφθονία στην επιφάνεια των αρσενικών γαμετών και έχειδειχθεί ότι υφίσταται πρωτεολυτική επεξεργασία κατά την γαμετογένεση (Brooks, 2000).

Γενικά στην επιφάνεια των γαμετών υπάρχει μια πληθώρα διαφορετικών πρωτεϊνών (*Pfs48/45*, *Pfs230*, *Pfs25*, *Pfs28*, *PfCCp*) που βοηθούν στην επαφή των γαμετών ή και στην προστασία τους. Να σημειωθεί ότι σε αυτό το στάδιο (γαμέτες και ζυγωτό) το παράσιτο δεν βρίσκεται μέσα σε κάποιο κύτταρο-ξενιστή για αρκετές ώρες. Παραμένει εκτεθειμένο στο αφιλόξενο περιβάλλον του κουνουπιού, όπως βακτήρια, ένζυμα πέψης και στοιχεία του ανοσοποιητικού συστήματος του αίματος και του εντόμου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα παράσιτα να μειωθούν σχεδόν 300 φορές και αυτή η φάση θεωρείται ως στενωπός στον κύκλο ζωής του παρασίτου.

Δεν είναι γνωστό εάν οι αρσενικοί γαμέτες συναντούν τους θηλυκούς γαμέτες κατά τύχη ή εάν για παράδειγμα οδηγούνται από κάποια ελκτική ουσία που εκκρίνει ο θηλυκός γαμέτης. Ωστόσο πρόσφατα ταυτοποιήθηκαν στην επιφάνεια των γαμετών του *P.falciparum*, προεξοχές ινιδίων που φαίνεται να συμβάλλουν στην επαφή των παρασίτων μέσα στο έντερο του κουνουπιού και σχηματίζονται αμέσως μετά την ενεργοποίηση της γαμετογένεσης (Rupp, 2011). Αυτές οι δομές έχουν τυπικά χαρακτηριστικά των νανοσωληνίσκων, οργανίδια που πρόσφατα ταυτοποιήθηκαν σε

πολλά ζωικά κύτταρα και έχουν μήκος που μπορεί να φτάνει και τα 100μm. Έχει προταθεί ότι μπορούν να σχηματιστούν από σχεδόν όλα τα κύτταρα για την εξερεύνηση του εξωκυττάρου περιβάλλοντος και την επικοινωνία μεταξύ κυττάρων (Davis, 2008, Gerdes, 2008).

Η έξοδος των γαμετοκυττάρων

Η έξοδος των γαμετοκυττάρων από το ερυθροκύτταρο-ξενιστή είναι ένα κρίσιμο σημείο της γαμετογένεσης, προετοιμάζοντας το παράσιτο για την γονιμοποίηση. Οι μοριακοί μηχανισμοί που διέπουν αυτήν την διαδικασία δεν έχουν ακόμη κατανοηθεί πλήρως. Η έξοδος των γαμετοκυττάρων περιλαμβάνει την ρήξη των δύο μεμβρανών που περιβάλλουν το παράσιτο, την RBCM και την PVM. Πρόσφατες μελέτες τόσο στο *P.berghei* όσο και στο *P.falciparum* δείχνουν ότι λίγα λεπτά μετά την ενεργοποίηση των ώριμων γαμετοκυττάρων, γίνεται η ρήξη της PVM και αρκετά λεπτά αργότερα ακολουθεί η ρήξη της RBCM (Deligianni, 2013, Sologub, 2011). Επιπλέον στο *P.falciparum* με την βοήθεια της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, έχει δειχθεί ότι η PVM σπάει σε πολλά σημεία, ενώ στην RBCM έχουμε ένα μοναδικό άνοιγμα (Sologub, 2011).

Πολλές μελέτες για την έξοδο των μεροζωιδίων από το ερυθροκύτταρο ταυτοποιούν πρωτεάσες που προέρχονται από το ίδιο το παράσιτο αλλά και από το κύτταρο-ξενιστή. Έχουν διάφορες λειτουργίες κατά την έξοδο, από την αποσταθεροποίηση του κυτταροσκελετού του ερυθροκυττάρου μέχρι και την ενεργοποίηση μονοπατιών σηματοδότησης. Όμως, δεν έχει κατανοηθεί ο ρόλος τους στην ρήξη των μεμβρανών (Blackman, 2013). Πρωτεάσες που παίζουν ρόλο στην έξοδο των μεροζωιδίων, έχουν βρεθεί και στα γαμετοκύτταρα, όμως οι ρόλοι τους στην έξοδο των γαμετοκυττάρων είναι άγνωστοι (Wu, 2003, Rosenthal, 2004). Μελέτη σε ενεργοποιημένα γαμετοκύτταρα του *P.berghei* αναφέρει ότι η εκβολή των αρσενικών γαμετών από το αρχικό κύτταρο αναστέλλεται από την δράση των αναστολέων πρωτεασών κυστεΐνης/σερίνης, TLCK και TPCK (Torres, 2005). Στο *P.falciparum* η PVM εμφανίζει ευαισθησία στον αναστολέα πρωτεασών κυστεΐνης E-64d. Μετά την ρήξη της PVM ξεκινάει η διάλυση της SPM που αναστέλλεται από τον αναστολέα

πρωτεασών ασπαρτικού EPNP και τον αναστολέα TLCK. Η ρήξη της RBCM αναστέλλεται από τους TLCK και TPCK (Sologub, 2011).

Εκτός από την δράση των πρωτεασών, στο *P.berghei* υπάρχουν πέντε μεταλλάγματα με φαινότυπο αποκλειστικά στην έξοδο των γαμετοκυττάρων και όχι στην έξοδο των μεροζωιδίων (Ponzi, 2009, Deligianni, 2011, Talman, 2011, Deligianni, 2013, Olivieri, 2014). Τα αποτελέσματα αυτά επίσης δείχνουν ότι πρέπει να εμπλέκονται και άλλες πρωτεΐνες διότι σε κάποια από τα μεταλλάγματα ο φαινότυπος είναι ημιτελής. Ένα από αυτά τα γονίδια είναι το γονίδιο που κωδικοποιεί την ακτίνη 2 και περιγράφεται αναλυτικά σε επόμενη ενότητα αυτού του κεφαλαίου.

Τρεις από τις παραπάνω πρωτεΐνες που απουσιάζουν από τα μεταλλάγματα εντοπίζονται στα οσμιοφιλικά σωματίδια. Πρόκειται για μεμβρανικά οργανίδια που παίζουν ρόλο στην έξοδο των γαμετοκυττάρων. Μετά την ενεργοποίηση, τα οργανίδια αυτά μεταναστεύουν κοντά στην πλασματική μεμβράνη του παρασίτου (Aikawa, 1984, Sinden, 1976), συνδέονται με αυτήν και αδειάζουν το περιεχόμενό τους στο παρασιτοφόρο κενοτόπιο, ταυτόχρονα με την ρήξη της PVM (Sologub, 2011).

Απουσία της πρωτεΐνης *Pbg377* που εκφράζεται μόνο στα θηλυκά γαμετοκύτταρα, τα θηλυκά γαμετοκύτταρα αναπτύσσονται φυσιολογικά, αλλά υπάρχει μια δραματική μείωση στον αριθμό και στο μέγεθος των οσμιοφιλικών σωματιδίων καθώς και στο σχήμα τους. Αυτή η αλλαγή συνδέεται με μια μικρή καθυστέρηση στην έξοδο, αλλά όχι στην γονιμότητα των θηλυκών γαμετών (Olivieri, 2014).

Η πρωτεΐνη MDV-1/PEG3 (male development 1/protein of early gametocyte 3) εντοπίζεται στην PVM στο *P.falciparum* (Lanfrancotti, 2007, Furuya, 2005, Silvestrini, 2005), ενώ στο *P.berghei* βρίσκεται αποκλειστικά στα οσμιοφιλικά σωματίδια τόσο στα θηλυκά (Ponzi, 2009) όσο και στα αρσενικά (Olivieri, 2014). Η απουσία της MDV-1/PEG3 μπλοκάρει την έξοδο και στα θηλυκά και στα αρσενικά γαμετοκύτταρα. Οι δύο μεμβράνες που περιβάλλουν το παράσιτο (PVM και RBCM) παραμένουν ανέπαφες, ενώ τα αξονήματα στα αρσενικά γαμετοκύτταρα σχηματίζονται και έχουν κινητικότητα (Ponzi, 2009). Ωστόσο κάποια παράσιτα τα καταφέρνουν και ωοκινέτες σχηματίζονται. Αν και εμφανίζουν 86% μείωση ο κύκλος ζωής συνεχίζεται (Lal, 2009).

Έναν παρόμοιο φαινότυπο έχει και το μετάλλαγμα όπου απουσιάζει η πρωτεΐνη GEST (gamete egress and sporozoite traversal) που έχει ταυτοποιηθεί μόνο στο *P. berghei* και εντοπίζεται στα οσμοφιλικά σωματίδια. Και στα αρσενικά και στα θηλυκά γαμετοκύτταρα, η έξοδος εμποδίζεται καθώς και η PVM και η RBCM δεν διαρρηγνύονται. Σε αντίθεση όμως με το *mdv-1/peg3* μετάλλαγμα, οι αρσενικοί γαμέτες δεν μπορούν να διαχωριστούν μεταξύ τους, ενώ έχουν κινητικότητα. Επιπλέον η πρωτεΐνη αυτή παρουσιάζει και ένα δεύτερο ρόλο στα σποροζωΐδια, τα οποία απουσία της δεν μπορούν να διαπεράσουν τα επιδερμικά κύτταρα μετά το τσίμπημα του κουνουπιού (Talman, 2011).

Μια άλλη πρωτεΐνη που εμπλέκεται στην έξοδο των γαμετοκυττάρων είναι η PPLP2 (*Plasmodium* perforin-like protein). Η έλλειψή της επηρεάζει μόνο τα αρσενικά γαμετοκύτταρα. Όπως και στο *ΔPbGEST* μετάλλαγμα, οι αρσενικοί γαμέτες έχουν κινητικότητα αλλά δεν διαχωρίζονται μεταξύ τους. Σε αντίθεση, όμως, με τα προηγούμενα μεταλλάγματα όπου και οι δύο μεμβράνες παραμένουν ανέπαφες, απουσία της PPLP2, η PVM διαρρηγνύεται. Στο μετάλλαγμα αυτό οι ωοκινέτες μειώνονται κατά 75% σε σχέση με τα αγρίου τύπου παράσιτα, όμως ο κύκλος ζωής ολοκληρώνεται (Deligianni, 2013).

Ζυγωτό

Το *Plasmodium* είναι απλοειδές σχεδόν σε όλα τα στάδια της ζωής του συμπεριλαμβανομένων και των γαμετοκυττάρων. Οι ώριμοι απλοειδής αρσενικοί και θηλυκοί γαμέτες έχουν διαφορετικά προφίλ πρωτεϊνών απουσία φυλετικών χρωμοσωμάτων (Khan, 2005). Με την σύζευξη των δύο γαμετών και την συγχώνευση των πυρήνων σχηματίζεται το ζυγωτό (zygote). Η διαδικασία αυτή συντελείται τις τρεις πρώτες ώρες από την είσοδο του μολυσμένου αίματος στο κουνούπι. Ένας βασικός μηχανισμός που ρυθμίζει την ανάπτυξη του ζυγωτού είναι η μεταφραστική καταστολή. Κάποια γονίδια που μεταγράφονται στα γαμετοκύτταρα βρίσκονται σε μεταφραστική καταστολή, ενώ η μεταφραστική έκφραση λαμβάνει χώρα μετέπειτα στο ζυγωτό. Η απαλοιφή δύο συστατικών του ριβονουκλεο-πρωτεϊνικού συμπλόκου (που αποκρύπτει πολλά είδη mRNA από την μεταφραστική μηχανή), του DOZI (development of zygote inhibited) και CITH (ομόλογο του CAR-I από το σκουλήκι και Trailer Hitch από την

μύγα), έχει ως αποτέλεσμα την αποικοδόμηση εκατοντάδων μεταγράφων που φυσιολογικά θα έπρεπε να βρίσκονται σε μεταφραστική καταστολή για να χρησιμοποιηθούν αργότερα κατά την ανάπτυξη του ζυγωτού (Mair, 2006 και 2010).

Ωοκινέτης

Το διπλοειδές ζυγωτό υφίσταται μια μείωση χωρίς κυτταρική διαίρεση που οδηγεί σε ένα τετραπλοειδές κύτταρο (Mair, 2010). Το κύτταρο αυτό σύντομα επιμηκύνεται, αποκτά κινητικότητα και ονομάζεται ωοκινέτης (ookinete). Ο μετασχηματισμός του ζυγωτού σε ωοκινέτη σηματοδοτεί την λήξη της φυλετικής φάσης ανάπτυξης του παρασίτου (Pradel, 2007). Οι ωοκινέτες, αφού ωριμάσουν μέσα σε 24 ώρες έχουν την ικανότητα, λόγω της κινητικότητάς τους, να φθάσουν και να διαπεράσουν το επιθήλιο του μέσου εντέρου του κουνουπιού (midgut) όπου εγκαθίστανται στην εξωτερική επιφάνεια του επιθηλίου. Στις περισσότερες περιπτώσεις το ποσοστό των ωοκινετών που κατορθώνει να διαπεράσει το κοιλιακό τοίχωμα δεν υπερβαίνει το 1%.

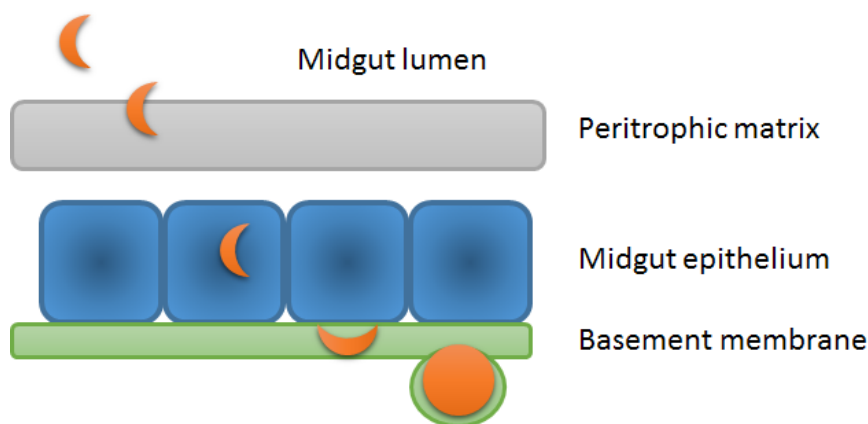
Οι ωοκινέτες έχουν μέγεθος που κυμαίνεται από 10 έως 12 μm μήκος και 2 μm πάχος (Canning and Sinden, 1973). Έχουν σχήμα που μοιάζει με μπανάνα και διατηρούν την βασική αρχιτεκτονική του κυττάρου των Apicomplexa (Vinetz, 2005). Ωστόσο διαθέτουν και μοναδικά χαρακτηριστικά. Σε αντίθεση με τα μεροζωΐδια και τα σποροζωΐδια, οι ωοκινέτες δεν έχουν όλα τα εκκριτικά οργανίδια (μικρονήματα, ρόπτρα, και πυκνά κοκκιώδη οργανίδια), αλλά διατηρούν μόνο τα μικρονήματα (Sinden, 2004, Lal, 2009). Αυτό σχετίζεται με τον τρόπο που ο ωοκινέτης εισβάλλει στο κύτταρο διότι δεν δημιουργεί παρασιτοφόρο κενοτόπιο (Blackman and Banister, 2001).

Ένα άλλο οργανίδιο που συναντάμε μόνο στους ωοκινέτες και στις νεαρές ωοκύστες είναι τα κρυσταλλοειδή. Αυτά είναι συσσωματώματα από μικρά σφαιρικά κομμάτια στο κυτταρόπλασμα. Η διάμετρός τους κυμαίνεται από 25 έως 40 nm και σχηματίζονται στον αναπτυσσόμενο ωοκινέτη ενώ εξαφανίζονται όταν μετατρέπεται σε ωοκύστη (Canning and Sinden, 1973, Sinden, 1985). Έχει προταθεί ότι αποτελούν μια δεξαμενή πρωτεϊνών που συντίθενται στα θηλυκά γαμετοκύτταρα και είναι πηγή

ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη και την μετάδοση των σποροζωιδίων (Dessens, 2011). Πρόσφατα, έγινε ταυτοποίηση μια νέας οικογένειας πρωτεϊνών, που χαρακτηρίζονται από την επικράτεια LCCL (Limulus factor C, Coch-5b2, Lg11 domain) και εντοπίζονται στα κρυσταλλοειδή οργανίδια (Carter, 2008, Saeed, 2010).

Οι ωοκινέτες χαρακτηρίζονται από την κινητικότητά τους. Κινούνται με μέση ταχύτητα 6-8 $\mu\text{m}/\text{min}$ σε *in vivo* συνθήκες (Vlachou, 2004). Η βάση αυτής της κίνησης είναι συντηρημένη σε όλα τα Apicomplexa παράσιτα και ονομάζεται ολισθένουσα κίνηση (King, 1988). Πρόσφατα στοιχεία επιβεβαιώνουν τον ρόλο της μυοσίνης A ως κινητήρα αυτής της κίνησης (Siden-Kiamos, 2011). Επιπλέον, και η ακτίνη παίζει ξεκάθαρα σημαντικό ρόλο, όπως δείχνουν μελέτες που χρησιμοποιήθηκαν αναστολείς της ακτίνης (Siden-Kiamos, 2006b, Angrisano, 2012a).

Για να προχωρήσει στο επόμενο αναπτυξιακό στάδιο, ο ωοκινέτης πρέπει να διαπεράσει από δύο βασικά εμπόδια (εικόνα 1.7). Το πρώτο είναι το περιτροφικό στρώμα που αποτελείται από χιτίνη και άλλες πρωτεΐνες και σχηματίζεται γύρω από το γεύμα αίματος 16-30 ώρες μετά το τσίμπημα (Shahabuddin and Kaslow, 1994). Για να διαπεράσουν αυτό το εμπόδιο, οι ωοκινέτες εκκρίνουν χιτινάσες από τα μικρονήματα (πιθανόν και άλλες πρωτεάσες (Vinetz, 2005)) μέσα στο εξωκυττάριο περιβάλλον, επιτρέποντας το πέρασμα από το περιτροφικό στρώμα στο επιθήλιο του εντέρου (Shahabuddin, 1993, Vinetz, 1999). Το δεύτερο εμπόδιο που πρέπει να περάσει ο ωοκινέτης είναι το ίδιο το επιθήλιο του εντέρου. Τα παράσιτα διαπερνούν μέσα από τα επιθηλιακά κύτταρα προκαλώντας ένα τύπο απόπτωσης (Han, 2000, Vlachou, 2004, Rodrigues, 2012). Απαξ και οι ωοκινέτες διαπεράσουν με επιτυχία το επιθήλιο του εντέρου, κολλάνε με την βασική μεμβράνη κάτω από το επιθήλιο και ξεκινάει η μετατροπή σε ωοκύστες.



Εικόνα 1.7. Πορεία του ωοκινέτη στο έντερο του κουνουπιού. Από τον αυλό του εντέρου (midgut lumen), ο ωοκινέτης διαπερνά πρώτα το περιτροφικό στρώμα (peritrophic matrix) και έπειτα το επιθήλιο του εντέρου (midgut lumen) φτάνοντας στην βασική μεμβράνη όπου μετασχηματίζεται σε ωοκύστη.

Κατά τον πλήρη σχηματισμό του ωοκινέτη από το ζυγωτό, κινάσες που εξαρτώνται από ασβέστιο και την καλμοδοουλίνη εμπλέκονται στην μορφολογική αυτή αλλαγή (Silva-Neto, 2002), ενώ όταν απουσιάζουν οι κινάσες *pk7* και *gak* το παράσιτο δεν προχωράει στο στάδιο του ωοκινέτη (Tewari, 2010).

Η κινητικότητα του ωοκινέτη και η ικανότητα να διαπερνάει το επιθήλιο του εντέρου του κουνουπιού είναι απαραίτητες για να μεταβεί το παράσιτο στο επόμενο αναπτυξιακό στάδιο της ωοκύστης. Αν και η ρύθμιση που χρειάζεται για την κίνηση δεν έχει πλήρως κατανοηθεί, έχει δείχθει ότι εξαρτάται από την δυναμική της ακτίνης και μυοσίνης (Siden-Kiamos, 2006, 2011) και περιλαμβάνει σηματοδοτικά μονοπάτια που εξαρτώνται από το ασβέστιο (Siden-Kiamos, 2006a, 2008), το cGMP (guanosine 3',5'-cyclic monophosphate) (Moon, 2009) και την γουανυλική κυκλάση (Hirai, 2006). Πολλές πρωτεΐνες είναι απαραίτητες για την κινητικότητα του ωοκινέτη, όπως η ασβεστο-εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση 3, CDPK3 (Siden-Kiamos, 2006) και η CTRP (Circumsporozoite and TRAP-related protein) (Dessens, 1999, 2003, Kadota, 2004). Απουσία αυτών των πρωτεϊνών, οι ωοκινέτες έχουν χάσει την κινητικότητά τους και έτσι αδυνατούν να περάσουν το επιθήλιο και να μετασχηματιστούν σε ωοκύστες. Ωστόσο, όταν σε αυτά τα μεταλλάγματα εισαχθούν με ένεση ωοκινέτες, δηλαδή, όταν ο φραγμός του επιθηλίου ξεπεραστεί τεχνικά, τότε σχηματίζονται ωοκύστες. Συνεπώς, η κινητικότητα των ωοκινετών είναι απαραίτητη για να διαπεράσουν το επιθήλιο.

Όμως υπάρχουν και οι περιπτώσεις, απουσία κάποιων πρωτεϊνών, όπου ωοκινέτες με ικανότητα κίνησης αδυνατούν να διαπεράσουν το επιθήλιο. Τέτοιες πρωτεΐνες είναι τρεις perforin-like proteins, η PPLP3 (MAOP (membrane attack ookinete protein), η PPLP4 και η PPLP5 (Kadota, 2004, Ecker, 2007, Wirth, 2015, Kaneko, 2015). Άλλες είναι η SOAP (secreted ookinete adhesive protein) που συνδέεται με την λαμινίνη της βασικής μεμβράνης (Mahairaki, 2005, Nacer, 2008a) και η CelTOS (cell traversal protein for ookinetes and sporozoites) (Kariu, 2006). Το ίδιο ισχύει και στα μεταλλάγματα αυτών των πρωτεϊνών, όταν οι ωοκινέτες εισαχθούν με ένεση, τότε σχηματίζονται ωοκύστες.

Ωοκύστη

Στην συνέχεια, ο ωοκινέτης υφίσταται μια εκτενή αναδιοργάνωση, γίνεται σφαιρικός και διαφοροποιείται σε ωοκύστη (oocyst). Η ωοκύστη περιβάλλεται από ένα παχύ εξωτερικό στρώμα που ονομάζεται κάψουλα (ή τοίχωμα της κύστης) που βρίσκεται εξωτερικά της κυτταρικής μεμβράνης (Nacer, 2008b, Srinivasan, 2008). Δημιουργείται πιθανώς με την συμμετοχή από πρωτεΐνες του κουνουπιού. Εκεί βρίσκεται η πρωτεΐνη του παρασίτου Cap380 (oocyst capsule protein) (Nacer, 2008b, Srinivasan, 2008). Η ωοκύστη παίρνει θρεπτικά συστατικά από την αιμολέμφο του κουνουπιού για την ανάπτυξή της. Καθώς αναπτύσσεται μεγαλώνει σε μέγεθος που μπορεί να ξεκινάει από 5μm και να φτάνει στα 50μm διάμετρο γύρω στις 12 μέρες μετά το γεύμα αίματος (Moreno-Garcia, 2014).

Παράλληλα, μια σειρά από περίπου 13 ασύγχρονες μιτωτικές διαιρέσεις οδηγεί στον σχηματισμό χιλιάδων σποροζωιδίων. Η διαδικασία αυτή αποκαλείται σπορογονία (Sinden, 1999) και ξεκινάει με την δημιουργία των σποροβλαστών, που είναι συνκυτιακά λοβίδια που φτιάχνονται από τις εγκοιλώσεις της πλασματικής μεμβράνης της ωοκύστης και κάθε ένα έχει ένα πυρήνα που προκύπτει από τις πολλαπλές μιτωτικές διαιρέσεις. Ο αριθμός των ωοκυστών σε ένα κουνούπι μπορεί να κυμαίνεται από λίγες έως περισσότερες από 1000 και κάθε ωοκύστη μπορεί να περιέχει χιλιάδες σποροζωΐδια. Τέλος, η ωοκύστη σπάει και τα σποροζωΐδια διασκορπίζονται. Μια πρωτεάση, η egress cysteine protease 1 (ECP1), συμβάλει στην έξοδο των μεροζωιδίων μέσω της πρωτεολυτικής της δραστηριότητας (Aly and Matuschewski, 2005).

Αρκετά μεταλλαγμένα παράσιτα εμφανίζουν μη φυσιολογική ανάπτυξη στο στάδιο των ωοκυστών. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον για εμάς παρουσιάζει ένα μετάλλαγμα του *P.berghei* όπου έχει γίνει απαλοιφή του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη C-CAP (Hliscs, 2010). Στο μετάλλαγμα αυτό, οι ωοκύστες παραμένουν μικρές σε μέγεθος και δεν δημιουργούνται σποροζωΐδια. Οι πρωτεΐνες C-CAP παρουσιάζουν ομολογία με την επικράτεια πρόσδεσης ακτίνης στο καρβοξυτελικό τμήμα των CAP (Cyclase Associated Proteins). Αυτές οι πρωτεΐνες προσδένουν μονομερή ακτίνης και εμποδίζουν με αυτόν τον τρόπο τον πολυμερισμό τους. Παρόμοια αποτελέσματα εμφανίζονται όταν λείπει και η αναγωγή της γλουταθειώνης (Pastrana-Mena, 2010). Στο μετάλλαγμα *PbCHT1*, μιας χιτινάσης (Dessens, 2001) ή όταν απουσιάζει ένα από τα γονίδια *psop2*, *psop7* and *psop9* (putative secreted ookinete protein) (Ecker, 2008), ο αριθμός των ωοκυστών μειώνεται σημαντικά, ενώ οι ωοκινέτες δεν παρουσιάζουν κάποιο πρόβλημα. Η πρωτεΐνη MISFIT που εκφράζεται στα αρσενικά γαμετοκύτταρα επηρεάζει το στάδιο μετατροπής του ωοκινέτη σε ωοκύστη έχοντας έναν ρυθμιστικό ρόλο στον κυτταρικό κύκλο (Bushell, 2009). Μέλη της οικογένειας πρωτεϊνών LCCL/lectin adhesive-like (LAP) έχειδειχθεί ότι παίζουν ρόλο στην σπορογονία. Για παράδειγμα, στο *P.berghei* η απαλοιφή του γονιδίου *lap1* οδηγεί σε φυσιολογικό αριθμό ωοκυστών, όμως σποροζωΐδια δεν παράγονται (Claudianos, 2002). Εκτός από αυτές τις πρωτεΐνες, στην δημιουργία σποροζωιδίων βρέθηκε ότι εμπλέκονται και οι τρεις κινάσες PK7 (protein kinase 7), GAK (G-associated kinase) και CDLK (CDPK-like kinase) (Tewari, 2010).

Σποροζωΐδια

Τα περισσότερα σποροζωΐδια, μετά την έξοδό τους από την ωοκύστη δεν κατορθώνουν να επιβιώσουν, αλλά αυτά που φθάνουν στους σιελογόνους αδένες μπορεί να μεταδοθούν στο επόμενο άτομο με το τσίμπημα. Τα παράσιτα εισέρχονται στο δέρμα και από εκεί μεταναστεύουν στα αιμοφόρα αγγεία ή στο λεμφικό σύστημα (Amino, 2006). Μέσα από την κυκλοφορία του αίματος φτάνουν στο ήπαρ και εισβάλλουν στα ηπατοκύτταρα (Kappe, 2003). Τα σποροζωΐδια είναι επιμήκη, ελαφρώς κυρτά κύτταρα, που λεπταίνουν στα δύο άκρα. Ο πυρήνας βρίσκεται κεντρικά

και υπάρχουν εκκριτικά οργανίδια στο ένα άκρο (ρόπτρα και μικρονήματα), ενώ στην περιφέρεια υπάρχει το εσωτερικό μεμβρανικό σύμπλοκο (Cyrklaff, 2007).

Στα οργανίδια του εμπρόσθιου άκρου των σποροζωιδίων υπάρχει απόθεμα πρωτεϊνών που παίζουν ρόλο στην εισβολή στο κύτταρο-ξενιστή: προσκολλητίνες (adhesins) όπως η πρωτεΐνη CSP (circumsporozoite protein) και η TRAP (thrombospondin-related antigen protein), που επιτρέπουν την σύνδεση με τις γλυκοσαμινογλυκάνες του κυττάρου-ξενιστή (Banister, 2009). Η CSP είναι μια συντηρημένη GPI (Glycosylphosphatidylinositol) άγκυρα και καλύπτει ολόκληρη την επιφάνεια του σποροζωιδίου. Αποβάλλεται όταν το παράσιτο κινείται σε στερεή επιφάνεια αφήνοντας ίχνη (Stewart, 1991). Η CSP είναι υπεύθυνη και για την ανάπτυξη των ωοκυστών και για την διαφοροποίηση των σποροζωιδίων. Χρειάζεται για την σύνδεση του δικτύου μικροσωληνίσκων με την εξωτερική μεμβράνη της ωοκύστης (Thathy, 2002). Επίσης, φαίνεται να παίζει ρόλο στην αναγνώριση των σποροζωιδίων από τους σιελογόνους αδένες του κουνουπιού. Η πρωτεΐνη TRAP εκφράζεται κατά την διάρκεια διαφοροποίησης των σποροζωιδίων στην ωοκύστη και συσσωρεύεται στα μικρονήματα. Είναι σημαντική για την κίνηση των σποροζωιδίων και την εισβολή στο κύτταρο-ξενιστή (Sultan, 1997). Κατά την επαφή με το κύτταρο-ξενιστή και την κίνηση, αυτή η πρωτεΐνη απελευθερώνεται από τα μικρονήματα (Gantt, 2000). Η πρωτεΐνη MAEBL βρίσκεται στα μικρονήματα και η απαλοιφή του γονιδίου δείχνει ότι είναι απαραίτητη για την εισβολή στους σιελογόνους αδένες (Kariu, 2002).

1.6 Ακτίνες

Η ακτίνη είναι μια σφαιρική πρωτεΐνη των ευκαρυωτικών κυττάρων γύρω στα 42 kDa. Συναντάται ως μονομερές (G-actin), αλλά η βασική ιδιότητα που την χαρακτηρίζει είναι ο σχηματισμός ινιδίων (F-actin) με τον πολυμερισμό της. Ο πολυμερισμός της ακτίνης είναι μια δυναμική διαδικασία που εξαρτάται χωροχρονικά από μια πληθώρα πρωτεϊνών που συνδέονται με αυτήν (actin-binding proteins, ABPs) (Lee and Dominguez, 2010). Περισσότερες από εκατό πρωτεΐνες παίζουν ρόλο στην ρύθμιση του πολυμερισμού της ακτίνης. Ωστόσο οι περισσότερες από αυτές

απουσιάζουν από το φύλο των Apicomplexa. Μόνο ευθύγραμμα ινίδια ακτίνης βρίσκονται στα Apicomplexa, καθώς απουσιάζει το σύμπλοκο Agr2/3 που είναι υπεύθυνο για τις διακλαδώσεις των ινιδίων στους άλλους οργανισμούς (Goley, 2010). Σημαντικές ABPs στα Apicomplexa είναι οι παράγοντες αποπολυμερισμού ADF1 και ADF2 (actin depolymerizing factor). Ο ADF1 είναι απαραίτητος στα μη φυλετικά στάδια, ενώ ο ADF2 παίζει ρόλο στον μετασχηματισμό των ωοκινετών σε ωοκύστες και στην είσοδο των σποροζωιδίων στο ήπαρ (Doi, 2010, Schuler, 2005). Μια επίσης απαραίτητη πρωτεΐνη για τον πολυμερισμό της ακτίνης στα παράσιτα της ελονοσίας είναι η προφιλίνη (Kursula, 2008). Επιπλέον, η πρωτεΐνη CP (capping protein) που σταθεροποιεί την F-ακτίνη, είναι σημαντική για την κίνηση του παρασίτου στο κουνούπι (Ganter, 2009).

Η ακτίνη είναι κύριο στοιχείο του κυτταροσκελετού και παίζει ρόλο σε πολλές βασικές διεργασίες, όπως στην κίνηση του κυττάρου, την μίτωση και κυτοκίνηση, τον καθορισμό του σχήματος, την σηματοδότηση, την ενδοκυτταρική μεταφορά, την ενδοκύτωση και την έκκριση (Chen, 2000, Carlier, 2003, Pollard, 2009). Εκτός από αυτές τις λειτουργίες, η ακτίνη εμπλέκεται και στην μεταγραφική ρύθμιση, είτε με κυτταροπλασματικές αλλαγές στην δυναμική της κυτταροσκελετικής ακτίνης είτε με τον σχηματισμό ρυθμιστικών συμπλόκων της μεταγραφής (Hofmann, 2009). Η μεταγραφική ρύθμιση που εξαρτάται από την δυναμική της κυτταροσκελετικής ακτίνης, μπορεί να αποδοθεί στην διαμόρφωση της υποκυτταρικής θέσης των μεταγραφικών ρυθμιστών από τις ABPs (Gettemans, 2005). Από την άλλη η πυρηνική ακτίνη έχει ρόλο στην μεταγραφή συμμετέχοντας σε σύμπλοκα με τις τρεις RNA πολυμεράσες, σε σύμπλοκα για την αναδιοργάνωση της χρωματίνης και με ριβονουκλεοπρωτεΐνες (RNPs) με ρόλο στην επεξεργασία του mRNA και την έξοδο RNA και πρωτεϊνών από τον πυρήνα.

Οι ακτίνες συχνά απαντώνται με διαφορετικές ισομορφές στο ευκαρυωτικό κύτταρο που μπορεί να εκφράζονται σε διαφορετικό τόπο και χρόνο κατά την ανάπτυξη του οργανισμού (Wagner, 2002, Tondeleir, 2009, Perrin, 2010). Ο αριθμός των ισομορφών ακτίνης ποικίλει στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Ένας μικρός αριθμός μονοκύτταρων ευκαρυωτικών οργανισμών, όπως οι *Saccharomyces cerevisiae*,

Toxoplasma gondii, και *Trypanosoma brucei* έχουν ένα γονίδιο που κωδικοποιεί ακτίνη (Shortle, 1982, Dobrowolski, 1996, Garcia-Salcedo, 2004). Ωστόσο οι περισσότεροι οργανισμοί έχουν πάνω από μια ισομορφές που κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια. Ένα βασικό ερώτημα στο να κατανοήσουμε την λειτουργία της ακτίνης είναι εάν οι διαφορετικές ισομορφές εξυπηρετούν διαφορετικές λειτουργίες μέσα στο κύτταρο. Οι ακτίνες είναι υψηλά συντηρημένες πρωτεΐνες, με μόνο 10% απόκλιση μεταξύ του σακχαρομύκητα και του ανθρώπου. Τα θηλαστικά έχουν έξι ισομορφές ακτίνης, που δεν διαφέρουν μεταξύ τους σε επίπεδο αλληλουχίας περισσότερο από 6% και μεταξύ των ειδών είναι ουσιαστικά ταυτόσημες. Ωστόσο αυτές οι μικρές διαφορές είναι αρκετές για να προσδώσουν διαφορετικές λειτουργίες στην κάθε ισομορφή (Herman, 1993).

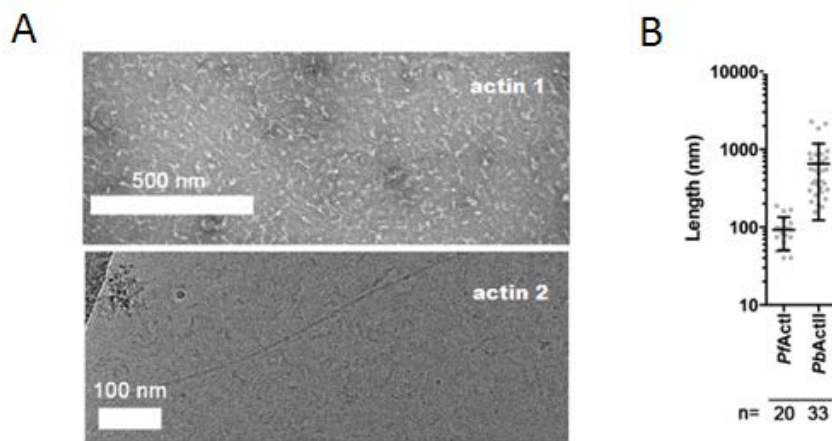
1.6.1 Οι ακτίνες στα παράσιτα της ελονοσίας

Σε αντίθεση με τα υπόλοιπα Apicomplexa, που διαθέτουν μια μόνο ισομορφή ακτίνης, τα παράσιτα της ελονοσίας έχουν δύο γονίδια που κωδικοποιούν δύο διαφορετικές ισομορφές ακτίνης, την ακτίνη 1 ((PBANKA_145930, χρωμόσωμα 14) και την ακτίνη 2 (PBANKA_103010, χρωμόσωμα 10). Σε επίπεδο πρωτεϊνικής αλληλουχίας, οι δύο ακτίνες έχουν ποσοστό ομοιότητας μικρότερο από 80% σε σχέση με άλλες ισομορφές ακτίνης, αλλά και μεταξύ τους έχουν ομοιότητα 78%. Το ποσοστό αυτό θεωρείται μικρό όταν πρόκειται για ισομορφές ακτίνης. Στο γονίδιο *ακτίνης 2*, το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (open reading frame, ORF) κωδικοποιείται από δύο εξόνια που διακόπτονται από ένα ιντρόνιο που βρίσκεται 448 νουκλεοτίδια καθοδικά από το κωδικόνιο έναρξης του γονιδίου. Το γονίδιο *ακτίνης 1* δεν περιέχει κάποιο ιντρόνιο. Συγκρίνοντας τις αλληλουχίες, φαίνεται ότι και οι δύο ισομορφές ακτίνης υπήρχαν στον κοινό πρόγονο του *Plasmodium* πριν την ειδογένεση (Deligianni, 2011).

1.6.2 Οι δυο ακτίνες έχουν διαφορετικά χαρακτηριστικά

Οι περισσότερες μελέτες για τις ακτίνες στα Apicomplexa εστιάζουν στον ρόλο τους στην ολισθένουσα (gliding) κίνηση του παρασίτου, ένα απαραίτητο χαρακτηριστικό για την εισβολή στο κύτταρο ξενιστή. Ωστόσο, όπως και στους υπόλοιπους ευκαρυώτες, οι ακτίνες των παρασίτων πρέπει να συμμετέχουν σε πολλές

διαφορετικές κυτταρικές διεργασίες. Ο πολυμερισμός της ακτίνης είναι απαραίτητος για αυτήν την κίνηση και πιθανόν συμμετέχει στην εισβολή και την έξοδο από το κύτταρο ξενιστή (Sibley, 1995, Heintzelman, 2006, Meissner, 2013). Παρά τα στοιχεία που υπάρχουν για αυτόν τον κρίσιμο ρόλο των ινιδίων ακτίνης, μακριά ινίδια ακτίνης έχουν βρεθεί μόνο στο *Theileria* (Kuhni-Boghenbor, 2012), το οποίο δεν φαίνεται να χρησιμοποιεί ινίδια ακτίνης για την εισβολή στο κύτταρο ξενιστή. Η παρουσία κανονικών ινιδίων ακτίνης στο *Plasmodium* είναι αβέβαιη (Kudryashev, 2010, Siden-Kiamos, 2012, Angrisano, 2012). *In vitro*, οι ακτίνες των Apicomplexa σχηματίζουν κοντά ινίδια περίπου 100nm (Wetzel, 2013, Sahoo, 2006, Schmitz, 2005, Schuler, 2005). Με την χρήση ειδικών αντισωμάτων αποκαλύφθηκαν δομές που μοιάζουν με ινίδια στο *Plasmodium* (Siden-Kiamos, 2012, Angrisano, 2012). Η ακτίνη στο *T.gondii*, που έχει ομοιότητα 93% με την ακτίνη 1 του *Plasmodium*, πολυμερίζεται σε συγκεντρώσεις δέκα φορές μικρότερες από τις υπόλοιπες ακτίνες των ευκαρυωτικών οργανισμών (Sahoo, 2006). Όμως η περισσότερη ποσότητα ακτίνης βρίσκεται ως μονομερή, που σημαίνει ότι τα ινίδια εμφανίζονται μόνο παροδικά και ο πολυμερισμός είναι κάτω από τον αυστηρό έλεγχο ρυθμιστικών πρωτεϊνών, ή καλύπτεται από τις διαφορετικές ιδιότητες του μονομερούς. Από την άλλη, υπολογίζεται ότι τα 2/3 της ακτίνης του *Plasmodium* στα μεροζωΐδια, που εισβάλουν στα ερυθροκύτταρα, αλλά δεν χαρακτηρίζονται από ολισθένουσα κίνηση, θα μπορούσαν να βρίσκονται ως κοντά ινίδια (Field, 1993). Πρόσφατα, με την λύση της κρυσταλλικής δομής των μονομερών της ακτίνης 1 και της ακτίνης 2, βρέθηκε ότι οι δύο ισομορφές διαφέρουν. Επίσης, ηλεκτρονικές μικρογραφίες αποκαλύπτουν ότι η ακτίνη 1 σχηματίζει μικρά και ασταθή ινίδια, ενώ η ακτίνη 2 σχηματίζει μακριά και σταθερά ινίδια *in vitro* με παρόμοιες διαστάσεις με τα ινίδια άλλων ευκαρυωτικών ακτινών (εικόνα 1.8). Και οι δύο ισομορφές ακτίνης υδρολύουν ATP πιο αποτελεσματικά από την α-ακτίνη και σε αντίθεση με άλλες ακτίνες, και οι δύο σχηματίζουν γρήγορα ολιγομερή που επάγονται από το ADP (Vahokoski, 2014).



Εικόνα 1.8. Τα ινίδια των δύο ισομορφών ακτίνης διαφέρουν. Α. Ηλεκτρονικές μικρογραφίες των ινιδίων ακτίνης *in vitro*, απουσία παραγόντων σταθεροποίησης των ινιδίων. Η ακτίνη 1 σχηματίζει κοντά ινίδια χωρίς συμμετρία έλικας σε αντίθεση με την ακτίνη 2. Β. Τα ινίδια της ακτίνης 2 κυμαίνονται από εκατοντάδες nm μέχρι 1-2mm. Ο άξονας Y είναι σε λογαριθμική κλίμακα (Vahokoski, 2014).

1.6.3 Η ακτίνη 2 εκφράζεται στα φυλετικά στάδια και στον ωοκινέτη

Η ακτίνη 1 εκφράζεται σε αφθονία καθ' όλη την διάρκεια του κύκλου ζωής του παρασίτου (Dobrowolski and Sibley, 1996). Το γονίδιο *ακτίνη 2* ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1988 στο *P.falciparum* (Wesseling, 1988) και βρέθηκε ότι μεταγράφεται μόνο στα φυλετικά στάδια (Wesseling, 1989). Στο *P.berghei* με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR), βρέθηκε και εδώ ότι το γονίδιο είναι ανενεργό στα μη φυλετικά στάδια και μετάγραφα ανιχνεύονται και στα αρσενικά και τα θηλυκά γαμετοκύτταρα (Deligianni, 2011). Επιπλέον, τοποθετώντας το γονίδιο που κωδικοποιεί την GFP κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου *ακτίνη 2*, δεν ανιχνεύεται σήμα στα μη φυλετικά στάδια, ενώ εντοπίζεται και στους ενεργοποιημένους αρσενικούς και τους θηλυκούς γαμέτες, με 9 φορές πιο ισχυρό σήμα στα αρσενικά (Deligianni, 2011). Στα μη φυλετικά στάδια του *P.berghei* στο κουνούπι, με RT-PCR μετάγραφα εντοπίζονται στους ωοκινέτες αλλά όχι στις ωοκύστες, ενώ δεν έχει γίνει έλεγχος στα σποροζωΐδια (Andreadaki, 2014).

Η έκφραση της πρωτεΐνης ακτίνης 2 στα διάφορα στάδια του κύκλου ζωής στο *P.berghei* ελέγχθηκε σε παράσιτα που εκφράζουν την GFP-actin 2 από επίσωμα. Η πρωτεΐνη δεν ανιχνεύεται στα μη φυλετικά στάδια της ερυθροκυτταρικής φάσης. Στα γαμετοκύτταρα εντοπίζεται μόνο στα αρσενικά και όχι στα θηλυκά (Deligianni, 2011).

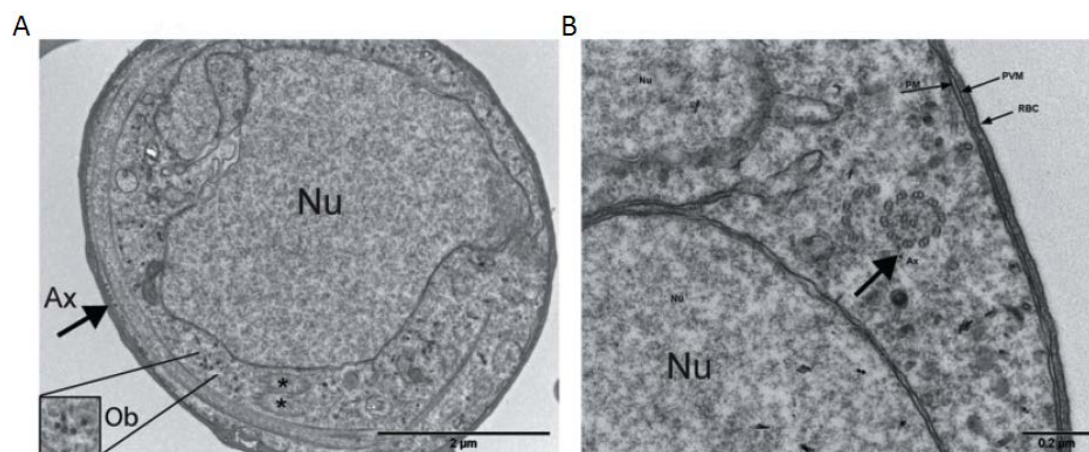
Στους αρσενικούς γαμέτες, ενώ δεν ανιχνεύτηκε σήμα (Deligianni, 2011), φαίνεται τελικά ότι η πρωτεΐνη υπάρχει (μη δημοσιευμένες παρατηρήσεις στο *P.berghei* και στο *P.falciparum* από Rupp, 2010). Στους θηλυκούς γαμέτες η GFP-actin 2 εντοπίζεται (Andreadaki, 2014). Και στο ζυγωτό ανιχνεύεται το σήμα της GFP-actin 2. Σε αυτό το στάδιο, η έκφραση της πρωτεΐνης γίνεται από το γονίδιο που κληρονομήθηκε από τον θηλυκό γαμέτη, ενώ η έκφραση από το αρσενικό σταματάει μετά την γονιμοποίηση (Andreadaki, 2014). Στα μη φυλετικά στάδια του *P.berghei* στο κουνούπι, η GFP-actin 2 εντοπίζεται στους ωοκινέτες αλλά όχι στις ωοκύστες, ενώ δεν έχει γίνει έλεγχος στα σποροζωΐδια (Andreadaki, 2014). Ωστόσο, πρωτεωμική μελέτη στο *P.yoelli* δείχνει την παρουσία της ακτίνης 2 στο στάδιο των σποροζωιδίων (Lindner, 2013).

1.6.4 Μελέτες για την λειτουργία της ακτίνης στο παράσιτο

Η ακτίνη 1 εκφράζεται σε αφθονία καθ' όλη την διάρκεια του κύκλου ζωής του παρασίτου και είναι ζωτικής σημασίας για το κύτταρο (Dobrowolski and Sibley, 1996). Για αυτό τον λόγο δεν έχει μελετηθεί με μεθόδους μοριακής γενετικής. Ωστόσο, μελέτες με αναστολείς ακτίνης δείχνουν ότι αποτελεί ένα σημαντικό μέρος του μηχανισμού κίνησης του παρασίτου και του μηχανισμού εισβολής του στο κύτταρο ξενιστή (Miller, 1979, Dobrowolski and Sibley, 1997). Μέσα στα ερυθροκύτταρα τα παράσιτα προσλαμβάνουν την αιμοσφαιρίνη με ενδοκύτωση και την μεταφέρουν σε υποκυτταρικές θέσεις πέψης (digestive food vacuole), μέσω κυστιδίων. Δεδομένου ότι στους ευκαρυώτες η ακτίνη συμμετέχει στην ενδοκύτωση, μελέτες στο *P.falciparum* με αναστολείς ακτίνης δείχνουν ότι η ακτίνη 1 συμμετέχει σε αυτήν την διαδικασία, έχοντας ρόλο στον σχηματισμό και την μεταφορά των κυστιδίων (Smyth, 2008). Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες στο *P.falciparum* μιλούν για έναν ρόλο της στην γονιδιακή ρύθμιση. Με την χρήση του αναστολέα αποικοδόμησης ινιδίων JAS έχει βρεθεί ότι η ακτίνη που βρίσκεται στον πυρήνα περιορίζεται στην περιφέρεια του πυρήνα και ίσως έχει να κάνει με την γονιδιακή ρύθμιση (Angrisano, 2012). Επίσης, έχει δειχθεί ότι συμμετέχει στην έκφραση των *var* γονιδίων στα μη φυλετικά στάδια, τα οποία είναι σημαντικά για την φαινοτυπική ποικιλομορφία και την παθογένεια των παρασίτων. Τα ιντρόνια των *var* γονιδίων αλληλοεπιδρούν με ένα στοιχείο του πυρήνα που προσδένει πρωτεΐνες. Το στοιχείο αυτό αλληλοεπιδρά με την ακτίνη και τοποθετεί

τα γονίδια *var* από μεταγραφικά ανενεργές σε μεταγραφικά ενεργές περιοχές στην περιφέρεια του πυρήνα (Zhang, 2011).

Προηγούμενες μελέτες στο εργαστήριο μας έδειξαν ότι η καταστροφή του γονιδίου *ακτίνη 2* έχει ως αποτέλεσμα μια σοβαρή βλάβη στην γαμετογένεση του αρσενικού. Η έξοδος του παρασίτου από το ερυθροκύτταρο και η εκβολή των αρσενικών γαμετών (exflagellation) αναστέλλεται, καθιστώντας αδύνατη την γονιμοποίηση του θηλυκού και την μετάδοση μέσω του κουνουπιού. Ενώ τα αξονήματα σχηματίζονται δεν έχουν την δυνατότητα κίνησης και οι δύο μεμβράνες που περιβάλλουν το παράσιτο (PVM και RBCM) παραμένουν ανέπαφες. Το θηλυκό δεν επηρεάζεται από την απουσία της ακτίνης 2, καθώς μπορεί και εξέρχεται από το ερυθροκύτταρο-ξενιστή και γονιμοποιείται από αγρίου τύπου αρσενικούς γαμέτες, χωρίς να υπάρχει πρόβλημα στην συνέχιση του κύκλου ζωής. Επιπλέον, αποδεικνύεται ότι η απουσία της ακτίνης 2 επηρεάζει την υποκυτταρική θέση της ακτίνης 1. Η ακτίνη 1 παραμένει στον πυρήνα, αντί να περιορίζεται στο κυτταρόπλασμα μετά την ενεργοποίηση στα αρσενικά γαμετοκύτταρα (Deligianni, 2011). Αν και τίποτε άλλο δεν ήταν γνωστό μέχρι πρότινος για τον ρόλο που έχει η ακτίνη 2 στο παράσιτο, τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι κατέχει έναν ζωτικής σημασίας ρόλο στην γαμετογένεση του αρσενικού. Ωστόσο, η ακριβής λειτουργία της παραμένει άγνωστη.



Εικόνα 1.9. Αρσενικό ενεργοποιημένο γαμετοκύτταρο απουσία της ακτίνης 2. Εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης ενός αρσενικού γαμετοκυττάρου 15 λεπτά μετά την ενεργοποίηση. Α. Στο κυτταρόπλασμα φαίνεται κατά μήκος ένα αξόνημα (Ax, μαύρο βέλος) και εγκάρσιες τομές από

άλλα δύο (αστερίσκοι), καθώς επίσης και οσμιοφιλικά σωμάτια (Ob). Κλίμακα 2mm. Β. Ενεργοποιημένο αρσενικό γαμετοκύτταρο σε μεγέθυνση. Στην εικόνα φαίνεται η εγκάρσια τομή από ένα αξόνημα (μεγάλο μαύρο βέλος) και ξεχωρίζουν η πλασματική μεμβράνη του παρασίτου (PM), η μεμβράνη του παρασιτοφόρου κενοτοπίου (PVM) και η μεμβράνη του ερυθροκυττάρου (RBC) που παραμένουν ανέπαφες. Κλίμακα 0.2mm. Με Nu συμβολίζεται ο πυρήνας.

Σκοπός της παρούσας μελέτης

Τα στάδια του παρασίτου στο κουνούπι αποτελούν ένα κρίσιμο πεδίο έρευνας για την παρεμπόδιση της μετάδοσης του παρασίτου, στα πλαίσια της γενικότερης εξάλειψης της ελονοσίας. Η γαμετογένεση των παρασίτων είναι ένα κομβικό σημείο στον κύκλο ζωής του παρασίτου, είναι το στάδιο μετάβασης από τον ένα ξενιστή στον άλλο. Ωστόσο, λίγα είναι γνωστά για τους μηχανισμούς που διέπουν αυτή τη διαδικασία. Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν να διευρύνουμε τις γνώσεις μας για αυτά τα αναπτυξιακά στάδια που παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον τόσο για την κατανόηση της βιολογίας των παρασίτων όσο και για την αντιμετώπιση της ασθένειας. Συγκεκριμένα, στο πρώτο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων μελετάμε τον μηχανισμό εξόδου του παρασίτου από το ερυθροκύτταρο, που αποτελεί βασική προϋπόθεση για την ολοκλήρωση της γαμετογένεσης. Στα επόμενα κεφάλαια εστιάζουμε την μελέτη μας στην ακτίνη 2, μια πρωτεΐνη που είναι απαραίτητη στην γαμετογένεση. Σκοπός ήταν να προσεγγίσουμε τον ρόλο που έχει αυτή η πρωτεΐνη σε αυτό το στάδιο, αλλά και στα υπόλοιπα αναπτυξιακά στάδια του παρασίτου στο κουνούπι. Ως μοντέλο οργανισμός χρησιμοποιήθηκε το παράσιτο των τρωκτικών *P.berghei*. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης που περιγράφονται στα επόμενα κεφάλαια, παρουσιάζονται σε 3 δημοσιευμένα άρθρα, ενώ ένα τέταρτο έχει υποβληθεί για δημοσίευση.

Κεφάλαιο 2: Έξοδος γαμετοκυττάρων από τα ερυθροκύτταρα

Andreadaki M, Hanssen E, Deligianni E, Claudet C, Wengelnik K, Koutsouris K, Mollard V, McFadden G, Abkarian M, Braun-Breton C, Siden-Kiamos I. Sequential membrane rupture and vesiculation during *Plasmodium berghei* gametocyte egress from the red blood cell. (Υποβολή για δημοσίευση)

Κεφάλαιο 3: Αντικατάσταση της ακτίνης 2 με την ακτίνη 1

Andreadaki M, Morgan RN, Deligianni E, Kooij TW, Santos JM, Spanos L, Matuschewski K, Louis C, Mair GR, Siden-Kiamos I. Genetic crosses and complementation reveal essential functions for the Plasmodium stage-specific actin2 in sporogonic development. Cell Microbiol. 2014 May;16(5):751-67.

Κεφάλαιο 4: Αντικατάσταση της ακτίνης 2 με χιμαιρικά μεταλλάγματα ακτίνης

Vahokoski J, Bhargav S.P, Desfosses A, Andreadaki M, Kumpula E.P, Martinez SM, Ignatev A, Lepper S, Frischknecht F, Sidén-Kiamos I, Sachse C, Kursula I. Structural differences explain diverse functions of Plasmodium actins. PLoS Pathog. 2014 Apr 17;10(4):e1004091.

Κεφάλαιο 5: Προφίλ γονιδιακής έκφρασης στα *act2(-)* και *CDPK4(-)* γαμετοκύτταρα

Andreadaki M, Mollenkopf HJ, Nika F, Tewari R, Matuschewski K, Siden-Kiamos I. Global expression profiling reveals shared and distinct transcript signatures in arrested *act2(-)* and *CDPK4(-)* *Plasmodium berghei* gametocytes. Mol Biochem Parasitol. 2015 Jul 26;201(2):100-107

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

**Έξοδος γαμετοκυττάρων από τα
ερυθροκύτταρα.**

2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα παράσιτα της ελονοσίας εξέρχονται από το κύτταρο ξενιστή όταν αυτά βρίσκονται σε κρίσιμα μεταβατικά στάδια του κύκλου ζωής. Η απελευθέρωση των μεροζωιδίων αποτελεί ένα σημαντικό βήμα για την ενδο-ερυθροκυτταρική ανάπτυξη και η έξοδος των γαμετοκυττάρων είναι απαραίτητη για την μετάδοση του παρασίτου μέσω των κουνουπιών. Πρόκειται για μια περίπλοκη διαδικασία που περιλαμβάνει αρχικά την ρήξη της μεμβράνης του παρασιτοφόρου κενοτοπίου (PVM) και έπειτα την ρήξη της μεμβράνης του ερυθροκυττάρου (RBCM). Αυτά τα διαδοχικά βήματα χαρακτηρίζουν τόσο την απελευθέρωση των μεροζωιδίων, όσο και την έξοδο των γαμετοκυττάρων από το κύτταρο ξενιστή. Όμως, παρά αυτήν την βασική ομοιότητα, η διαδικασία εξόδου των μεροζωιδίων και η διαδικασία εξόδου των γαμετοκυττάρων δεν είναι ταυτόσημες, διότι έχουν βρεθεί πρωτεΐνες που παίζουν αποκλειστικά ρόλο κατά την έξοδο των γαμετοκυττάρων.

Στην παρούσα μελέτη στόχος ήταν να μελετηθεί εκτενέστερα η έξοδος των γαμετοκυττάρων από το ερυθροκύτταρο ξενιστή και να γίνει σύγκριση με την διαδικασία απελευθέρωσης των μεροζωιδίων από τα ερυθροκύτταρα, για την οποία ήδη έχει γίνει μια πιο λεπτομερής ανάλυση από την ομάδα της Catherine Braun-Breton και του Manouk Abkarian. Η μελέτη αυτή αποκάλυψε ότι η απελευθέρωση των μεροζωιδίων αποτελείται από τρία βασικά βήματα. Στο πρώτο βήμα, ένας μοναδικός πόρος ανοίγει στην RBCM, από τον οποίο εκτινάσσονται προς τα έξω ένα με δύο μεροζωίδια. Στην συνέχεια η RBCM αναδιπλώνει από μέσα προς τα έξω και, τέλος, κάμπτεται απότομα σπρώχνοντας τα υπόλοιπα μεροζωίδια μακριά (Abkarian, 2011).

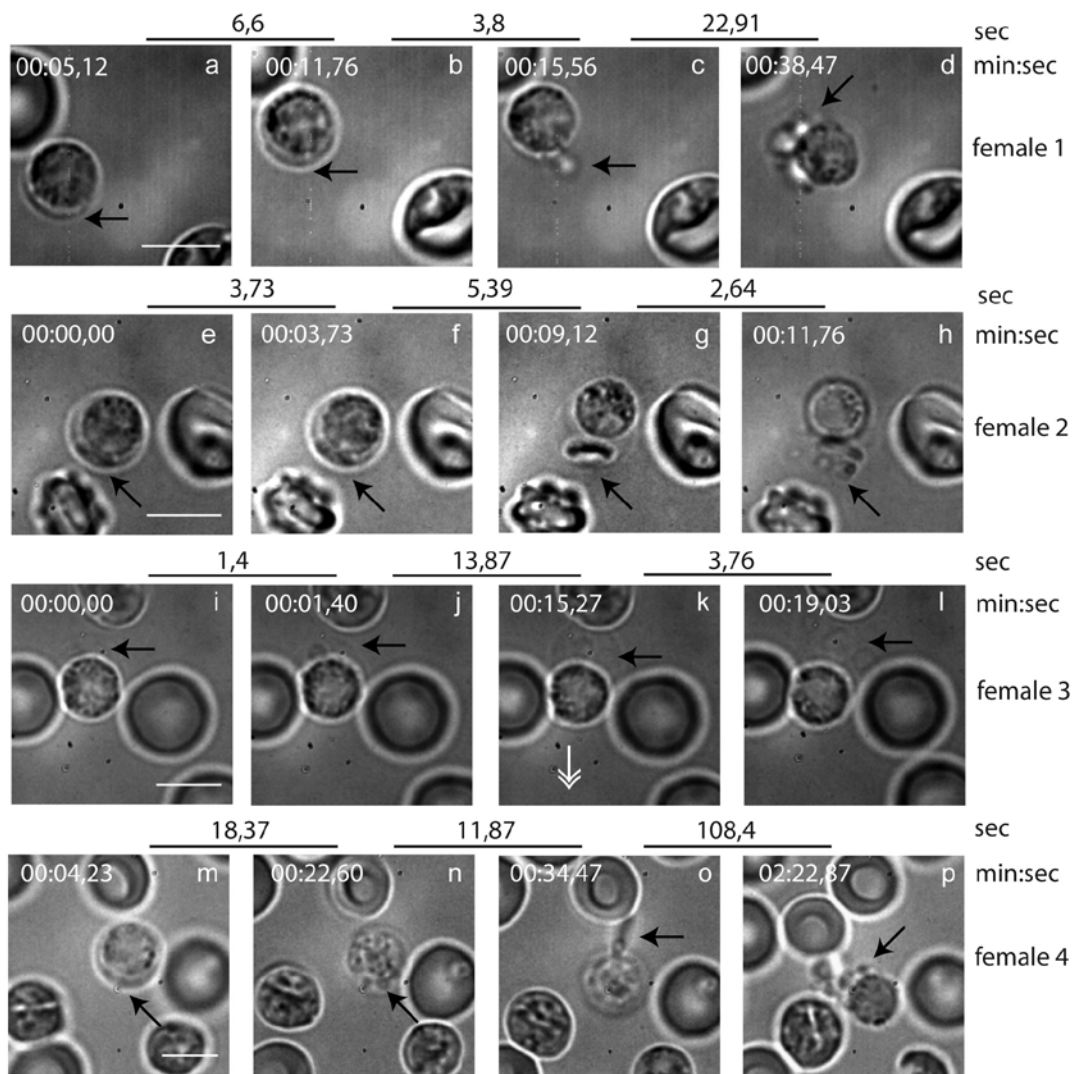
2.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η καταγραφή της εξόδου των γαμετοκυττάρων με υψηλή ταχύτητα λήψης αποκαλύπτει την ρήξη των δύο μεμβρανών που περιβάλλουν το παράσιτο και τον σχηματισμό κυστιδίων

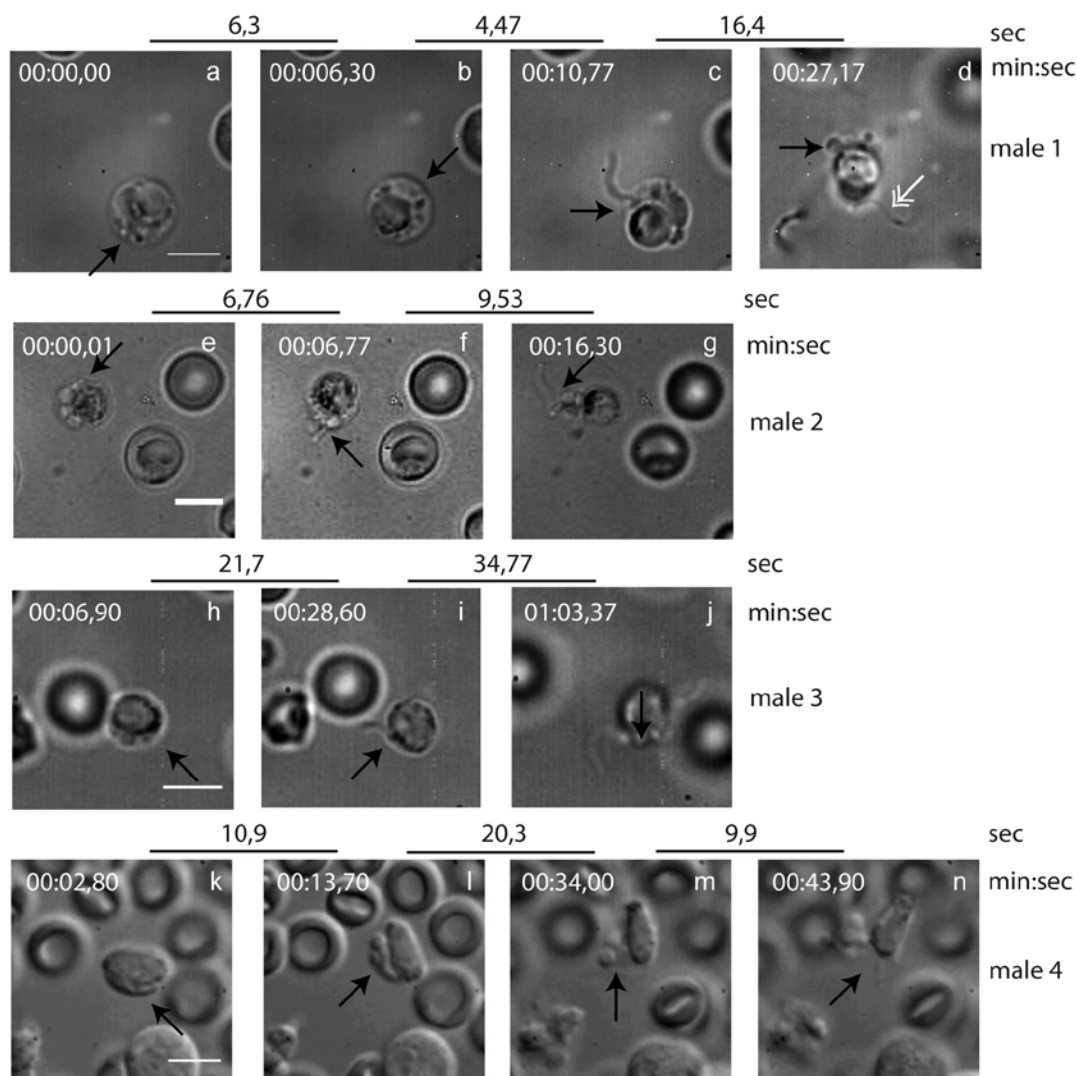
Με την χρήση κάμερας για υψηλή ταχύτητα λήψης, όπως και στην περίπτωση των μεροζωιδίων, έγινε καταγραφή της διαδικασίας εξόδου των γαμετοκυττάρων από το ερυθροκύτταρο σε πραγματικό χρόνο. Μέχρι στιγμής οι καταγραφές (οι λήψεις ταινιών) που υπάρχουν για την γαμετογένεση εστιάζουν στην διαδικασία εκβολής των αρσενικών γαμετών από το αρχικό κύτταρο και όχι στην αρχή της εξόδου, ενώ για τα θηλυκά δεν υπάρχουν καθόλου δεδομένα. Για αυτό, ο σκοπός μας ήταν να βιντεοσκοπήσουμε τα γεγονότα αυτά από την αρχή της διαδικασίας εξόδου. Δείγματα αίματος από μολυσμένα ποντίκια με τα παράσιτα της ελονοσίας αραιώθηκαν σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο για την επαγωγή της γαμετογένεσης και τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες με σκοπό την καταγραφή της εξόδου.

Συνολικά καταγράφηκαν 56 γεγονότα εξόδου εκ των οποίων τα 22 είναι αρσενικά παράσιτα και τα 34 θηλυκά. Ενδεικτικά παρουσιάζονται κάποια αντιπροσωπευτικά στιγμιότυπα από θηλυκά και αρσενικά (εικόνες 2.1 και 2.2). Είναι ξεκάθαρο ότι η έξοδος των αρσενικών και θηλυκών γαμετών από το ερυθροκύτταρο δεν ακολουθεί ένα στερεοτυπικό πρότυπο και υπάρχουν σημαντικές διαφορές σε κάθε περίπτωση. Ωστόσο, σε όλες τις καταγραφές που έχουν γίνει για την έξοδο των γαμετών, η σειρά των γεγονότων παρουσιάζει κάποια κοινά χαρακτηριστικά. Η πρώτη ευδιάκριτη διαδικασία που παρατηρούμε στο κύτταρο μετά την ενεργοποίηση είναι η διόγκωση του ερυθροκυττάρου (εικόνα 2.1a,b,m και 2.2k). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το παράσιτο που βρίσκεται εντός να λαμβάνει μια ασύμμετρη θέση σε μια πλευρά εσωτερικά του ερυθροκυττάρου. Μερικά λεπτά αργότερα ακολουθεί η ρήξη της PVM που καταλήγει στον σχηματισμό κυστιδίων στον ενδιάμεσο χώρο μεταξύ του παρασίτου και της RBCM (εικόνα 2.1e,f,I,j,n και 2.2a,b,e,h,l). Τα κυστίδια μετακινούνται ελεύθερα μέσα στο ερυθροκύτταρο, γεγονός το οποίο θα μπορούσε να σημαίνει ότι έχει γίνει πέψη του κυτταροπλάσματος του ερυθροκυττάρου ή εναλλακτικά το κυτταρόπλασμα έχει διαρρεύσει έξω από το κύτταρο. Αρκετά λεπτά

αργότερα η RBCM ανοίγει σε ένα μοναδικό σημείο, δημιουργώντας έναν σταθεροποιημένο πόρο. Από αυτόν τον μοναδικό πόρο που σχηματίζεται στην RBCM βγαίνουν προς τα έξω κυστίδια της PVM που αρχικά βρίσκονταν εγκλωβισμένα στον ενδιάμεσο χώρο μεταξύ παρασίτου και της RBCM. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται τόσο στα θηλυκά (εικόνα 2.1c,o) όσο και στα αρσενικά παράσιτα. Στα θηλυκά καταγράφεται και η περίπτωση όπου τα κυστίδια της PVM βρίσκονται από την αντίθετη πλευρά από το άνοιγμα του πόρου και έτσι απελευθερώνεται πρώτα ο γαμέτης (εικόνα 2.1g,k). Ωστόσο, στην πλειοψηφία των περιπτώσεων των αρσενικών παρασίτων, η έξοδος των κυστιδίων της PVM γίνεται έπειτα από την εκβολή ενός αρσενικού γαμέτη από τον μοναδικό πόρο (εικόνα 2.2c,i). Στην εικόνα 2.2f φαίνεται το παράδειγμα όπου σε πρώτη φάση ένα κυστίδιο της PVM εξέρχεται από τον πόρο και ακολουθεί η έξοδος του αρσενικού γαμέτη από το ίδιο σημείο. Στην εικόνα 2.2m, η έξοδος των κυστιδίων προηγείται από την έξοδο του αρσενικού γαμέτη. Αμέσως μετά από αυτό το στάδιο, ο μοναδικός πόρος στην RBCM διευρύνεται και οι γαμέτες απελευθερώνονται πλήρως. Το χείλος του πόρου αποσταθεροποιείται και η RBCM κάμπτεται. Τέλος η RBCM τεμαχίζεται δημιουργώντας μικρά κυστίδια. Τα κυστίδια από την RBCM παραμένουν κοντά στον θηλυκό γαμέτη ή αντίστοιχα στο υπόλοιπο σώμα του αρσενικού γαμετοκυττάρου για μεγάλο χρονικό διάστημα (εικόνα 2.1d,h,l,p και 2.2d,g,j,n).



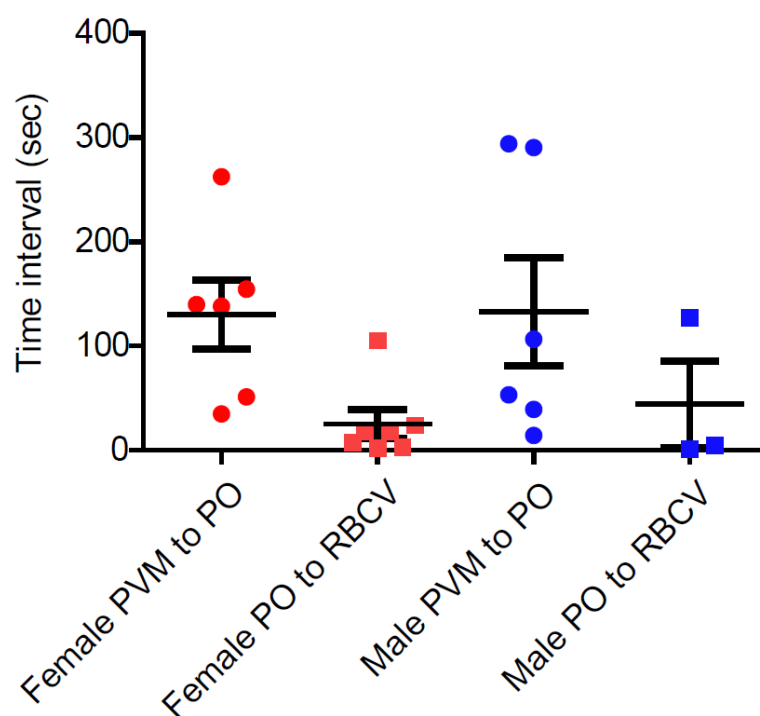
Εικόνα 2.1. Στιγμιότυπα από την έξοδο θηλυκών γαμετών. Η επιλογή των στιγμιότυπων έγινε για να τονίσουμε τα στάδια της εξόδου και όχι για να παρουσιάσουμε τον ακριβή χρόνο της κάθε φάσης. Οι επάνω διακεκομμένες γραμμές δείχνουν τον πραγματικό χρόνο ανάμεσα στα στιγμιότυπα σε κάθε βίντεο. Ο χρόνος για κάθε στιγμιότυπο από την αρχή της λήψης αναγράφεται πάνω από κάθε στιγμιότυπο (min:sec). Για τεχνικούς λόγους, αυτό δεν αντιστοιχεί στον χρόνο που ξεκίνησε η ενεργοποίηση. a-d. πρώτο θηλυκό. a,b. Το ερυθροκύτταρο έχει διογκωθεί. c. Τα κυστίδια της PVM βγαίνουν από ένα μοναδικό πόρο. d. Η έξοδος ολοκληρώνεται. Τα κυστίδια της PVM και της RBCM βρίσκονται κοντά στον θηλυκό γαμέτη. e-h. Δεύτερο θηλυκό. e,f. Τα κυστίδια της PVM περιβάλλονται από την RBCM. g. Η RBCM επεκτείνεται και ο γαμέτης αρχίζει να απελευθερώνεται. h. Η έξοδος ολοκληρώνεται και τα κυστίδια μένουν κοντά στον γαμέτη. i-l. Τρίτο θηλυκό. i-j. Τα κυστίδια της PVM περιβάλλονται από την RBCM. k. Ο γαμέτης βγαίνει από την RBCM με κατεύθυνση που φαίνεται από το άσπρο διπλό βέλος. l. Η έξοδος ολοκληρώνεται και η RBCM μετατρέπεται σε κυστίδια. m-p. Τέταρτο θηλυκό. m. Το ερυθροκύτταρο έχει διογκωθεί. n. Τα κυστίδια της PVM περιβάλλονται από την RBCM. o. Τα κυστίδια της PVM βγαίνουν από έναν μοναδικό πόρο. p. Η έξοδος ολοκληρώνεται. Τα μαύρα βέλη σε κάθε στιγμιότυπο δείχνουν τις περιοχές που μας ενδιαφέρουν. Κλίμακα 5 μ m.



Εικόνα 2.2. Στιγμιότυπα από την έξοδο αρσενικών γαμετοκυττάρων και την εκβολή των γαμετών.

Η επιλογή των στιγμιότυπων έγινε για να τονίσουμε τα στάδια της εξόδου και όχι για να παρουσιάσουμε τον ακριβή χρόνο της κάθε φάσης. Οι επάνω διακεκομμένες γραμμές δείχνουν τον πραγματικό χρόνο ανάμεσα στα στιγμιότυπα σε κάθε βίντεο. Ο χρόνος για κάθε στιγμιότυπο από την αρχή της λήψης αναγράφεται πάνω από κάθε στιγμιότυπο (min:sec). Για τεχνικούς λόγους, αυτό δεν αντιστοιχεί στον χρόνο που ξεκίνησε η ενεργοποίηση. a-d. Πρώτο αρσενικό. a,b. Το ερυθροκύτταρο διογκώνεται και τα κυστίδια της PVM είναι ορατά. c. Ένας αρσενικός γαμέτης εκβάλλει από ένα μοναδικό πόρο στην RBCM. d. Η έξοδος ολοκληρώνεται. Τα κυστίδια των δύο μεμβράνων βρίσκονται κοντά στο σώμα του αρχικού γαμετοκυττάρου. Το διπλό άσπρο βέλος δείχνει έναν αρσενικό γαμέτη. e-g. Δεύτερο αρσενικό. e. Τα κυστίδια της PVM περιβάλλονται από την RBCM. f. Ένας αρσενικός γαμέτης εκβάλλει από έναν μοναδικό πόρο στην RBCM. g. Η έξοδος ολοκληρώνεται. Φαίνονται τα κυστίδια και ένας γαμέτης που βρίσκονται κοντά στο αρχικό γαμετοκύτταρο. h-i. Τρίτο αρσενικό. h. Τα κυστίδια της PVM περιβάλλονται από την RBCM. i. Ένας γαμέτης εκβάλλει από έναν μοναδικό πόρο στην RBCM. j. Η έξοδος ολοκληρώνεται. Φαίνονται τα κυστίδια και ένας γαμέτης που βρίσκονται κοντά στο αρχικό γαμετοκύτταρο. k-n. Τέταρτο αρσενικό. k. Το ερυθροκύτταρο έχει διογκωθεί. l. Έχουν δημιουργηθεί τα κυστίδια από την PVM. m,n. Τα κυστίδια των δύο μεμβράνων βρίσκονται κοντά στο αρχικό γαμετοκύτταρο και η έξοδος ολοκληρώνεται. Τα μαύρα βέλη σε κάθε στιγμιότυπο δείχνουν τις περιοχές που μας ενδιαφέρουν. Κλίμακα 5μm.

Στην συνέχεια, προχωρήσαμε στην δημιουργία ενός κατά προσέγγιση χρονοδιαγράμματος μεταξύ των διαφορετικών φάσεων που κατεγράφησαν στις ταινίες εξόδου των γαμετοκυττάρων. Συνολικά, είχαμε την δυνατότητα να χρονομετρήσουμε ορισμένα από τα γεγονότα εξόδου για δέκα θηλυκά και εννέα αρσενικά. Στις περισσότερες περιπτώσεις η έναρξη και το πέραςμα από την μια φάση στην άλλη δεν είναι ευδιάκριτα. Αυτό οφείλεται, ως επί το πλείστον, στην γωνία λήψης και την κακή εστίαση λόγω περιστροφής του κυττάρου, καθώς πρόκειται για ζωντανό δείγμα, αλλά και της έντονης κινητικότητας που παρουσιάζουν οι γαμέτες των αρσενικών. Μόνο σε δύο γεγονότα εξόδου ήταν δυνατό να διακρίνουμε την έναρξη της πρώτης φάσης, που αφορά την διόγκωση του ερυθροκυττάρου. Η φάση αυτή διήρκησε 66 και 375 δευτερόλεπτα αντίστοιχα μέχρι την ρήξη της PVM και την δημιουργία κυστιδίων από αυτήν. Στο διάγραμμα της εικόνας 2.3 παρουσιάζονται για κάθε γεγονός εξόδου, είτε θηλυκού είτε αρσενικού παρασίτου, το χρονικό διάστημα από την ρήξη της PVM και την δημιουργία των κυστιδίων μέχρι το άνοιγμα του μοναδικού πόρου στην RBCM, καθώς επίσης και το χρονικό διάστημα από το άνοιγμα του μοναδικού πόρου μέχρι την δημιουργία των κυστιδίων από την RBCM. Δεν υπάρχουν αξιοσημείωτες διαφορές συγκρίνοντας την έξοδο των αρσενικών με την έξοδο των θηλυκών παρασίων. Το χρονικό διάστημα μεταξύ της ρήξης της PVM και την δημιουργία των κυστιδίων μέχρι το άνοιγμα του μοναδικού πόρου κυμαίνεται από μερικά δευτερόλεπτα μέχρι και πέντε λεπτά. Ο σχηματισμός των κυστιδίων από την RBCM σε οκτώ περιπτώσεις γίνεται μέσα σε δευτερόλεπτα μετά το άνοιγμα του πόρου, ενώ σε δύο περιπτώσεις αυτό συμβαίνει περίπου δύο λεπτά αργότερα. Καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι τα χρονικά διαστήματα μεταξύ των διαφορετικών αυτών φάσεων που χαρακτηρίζουν την έξοδο των παρασίων παρουσιάζουν μια μεταβλητότητα και δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στην έξοδο των θηλυκών και αρσενικών.



Εικόνα 2.3. Χρονοδιάγραμμα μεταξύ των φάσεων της εξόδου. Ο χρόνος για την ρήξη της PVM, το άνοιγμα του πόρου (pore opening, PO) στην RBCM και την δημιουργία κυστιδίων από την RBCM (Red Blood Cell Vesiculation, RBCV) προσδιορίστηκε από βίντεο, όπου κάθε φάση ήταν ξεκάθαρα ορατή. Στο χρονοδιάγραμμα παρουσιάζονται τα διαστήματα μεταξύ της ρήξης της PVM και το άνοιγμα του πόρου (κόκκινοι και μπλέ κύκλοι για τα θηλυκά και αρσενικά αντίστοιχα), από το άνοιγμα του πόρου και την δημιουργία κυστιδίων από την RBCM (κόκκινα και μπλέ τετράγωνα για τα θηλυκά και αρσενικά αντίστοιχα).

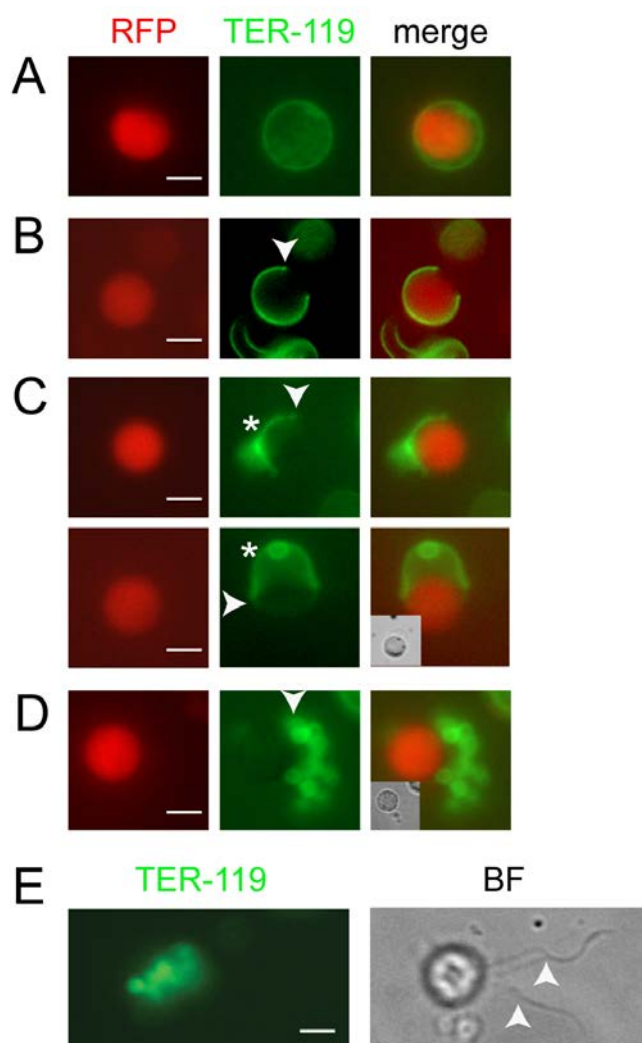
Το άνοιγμα ενός μοναδικού πόρου στην RBCM και ο σχηματισμός των κυστιδίων επιβεβαιώνεται με ανοσοφθορισμό σε ζωντανά δείγματα

Προκειμένου να σημάνουμε την RBCM χρησιμοποιήθηκε το μονοκλωνικό αντίσωμα TER-119, το οποίο αναγνωρίζει την γλυκοφορίνη A, που βρίσκεται στην επιφάνεια των ερυθροκυττάρων (Kina, 2000). Σε αυτά τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν δείγματα μολυσμένου αίματος ποντικών από το στέλεχος *P.berghei* παρασίτων 820, στα οποία τα θηλυκά γαμετοκύτταρα εκφράζουν την κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (Red Fluorescent Protein, RFP), ενώ τα αρσενικά γαμετοκύτταρα εκφράζουν την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (Green Fluorescent Protein, GFP) (Ponzi, 2009). Το αίμα αραιώθηκε σε θρεπτικό μέσο κατάλληλο για την ενεργοποίηση της γαμετογένεσης, στο οποίο προστέθηκε και το αντίσωμα TER-119.

Η παρακολούθηση των κυττάρων έγινε σε μικροσκόπιο φθορισμού. Το σήμα της GFP είναι τόσο ασθενές που δεν ανιχνεύεται σε αυτά τα πειράματα. Επιπλέον, η ενεργοποίηση των αρσενικών γαμετών έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη κινητικότητα του κυττάρου και αυτό εμποδίζει την καλή ποιότητα απεικόνισης του ζωντανού δείγματος. Έτσι, εστιάζουμε καλύτερα στα θηλυκά γαμετοκύτταρα και τους θηλυκούς γαμέτες. Εντούτοις, το παράδειγμα ενός αρσενικού συμπεριλαμβάνεται στα αποτελέσματα αυτών των πειραμάτων (εικόνα 2.4E).

Αμέσως μετά την ενεργοποίηση, τα θηλυκά γαμετοκύτταρα βρίσκονται εντός του ερυθροκυττάρου, στα οποία η μεμβράνη παραμένει ακόμη ανέπαφη και περικλείει πλήρως το παράσιτο (εικόνα 2.4A). Στο επόμενο στάδιο αναμένεται το άνοιγμα ενός μοναδικού πόρου στην RBCM, όπως υποδεικνύεται από τις καταγραφές των ταινιών. Όμως, δεν καταφέραμε να συλλάβουμε το άνοιγμα του πόρου, πιθανόν λόγω του ότι η RBCM παραμένει σε αυτήν την φάση για πολύ σύντομο χρονικό διάστημα και στην συνέχεια ο πόρος διευρύνεται. Ωστόσο, μπορέσαμε να διακρίνουμε την RBCM που έχει ανοίξει μερικώς από ένα σημείο (εικόνα 2.4B). Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει ότι ένας μοναδικός πόρος έχει ανοίξει και στην συνέχεια διευρύνεται ούτως ώστε να επιτευχθεί η έξοδος. Συνήθως, το άνοιγμα της RBCM συνοδεύεται παράλληλα από την δημιουργία των κυστιδίων από την ίδια την μεμβράνη (εικόνα 2.4C, πάνω εικόνα). Όμως, επίσης, καταγράψαμε και έναν θηλυκό γαμέτη που έχει ήδη απελευθερωθεί πλήρως από την RBCM, η οποία έχει ανοίξει μερικώς σε ένα μοναδικό σημείο, αλλά δεν φαίνονται κυστίδια από το ερυθροκύτταρο. Σε αυτήν την περίπτωση, η δημιουργία των κυστιδίων ξεκινάει μετά την έξοδο του γαμέτη, όπως παρατηρήθηκε και στα θηλυκά νούμερο 2 και 3 στην εικόνα 2.1 (εικόνα 2.4C, κάτω εικόνα). Παρά τις πολλές προσπάθειες, δεν καταφέραμε να αναγνωρίσουμε την χαρακτηριστική αναδίπλωση της μεμβράνης από μέσα προς τα έξω, που φαίνεται στην έξοδο των *P.falciparum* μεροζωιδίων (Abkarian, 2011) και *P.falciparum* γαμετοκυττάρων (Suarez-Cortes, 2014), αν και στις εικόνες 2.4B και 2.4C υπάρχει μια μικρή πάχυνση της μεμβράνης κατά το άνοιγμα. Επίσης, η κάμψη της μεμβράνης που παρατηρείται σε κάποια γεγονότα είναι ενδεικτική για την αναδίπλωση στο χείλος του πόρου.

Μετά την ολοκλήρωση της γαμετογένεσης, πάντα βλέπουμε τα κυστίδια που έχουν δημιουργηθεί από την ρήξη και τον τεμαχισμό της RBCM να παραμένουν κοντά στον γαμέτη. Ένα παράδειγμα παρουσιάζεται στην εικόνα 2.4D. Το ίδιο συμβαίνει και στην περίπτωση του αρσενικού, όπου τα κυστίδια και εδώ παραμένουν κοντά στο υπόλοιπο σώμα του αρσενικού γαμετοκυττάρου μετά την εκβολή των γαμετών (εικόνα 2.4E). Οι παρατηρήσεις αυτές επιβεβαιώνουν ότι και στα δύο φύλα η RBCM σχηματίζει κυστίδια μετά την ρήξη. Τα κυστίδια αυτά παραμένουν κοντά στους θηλυκούς γαμέτες, αλλά επίσης φαίνονται να συνδέονται και με το υπόλοιπο σώμα του αρσενικού γαμετοκυττάρου, παρά την έντονη κινητικότητα των αρσενικών γαμετών κατά την προσπάθεια απομάκρυνσής τους.



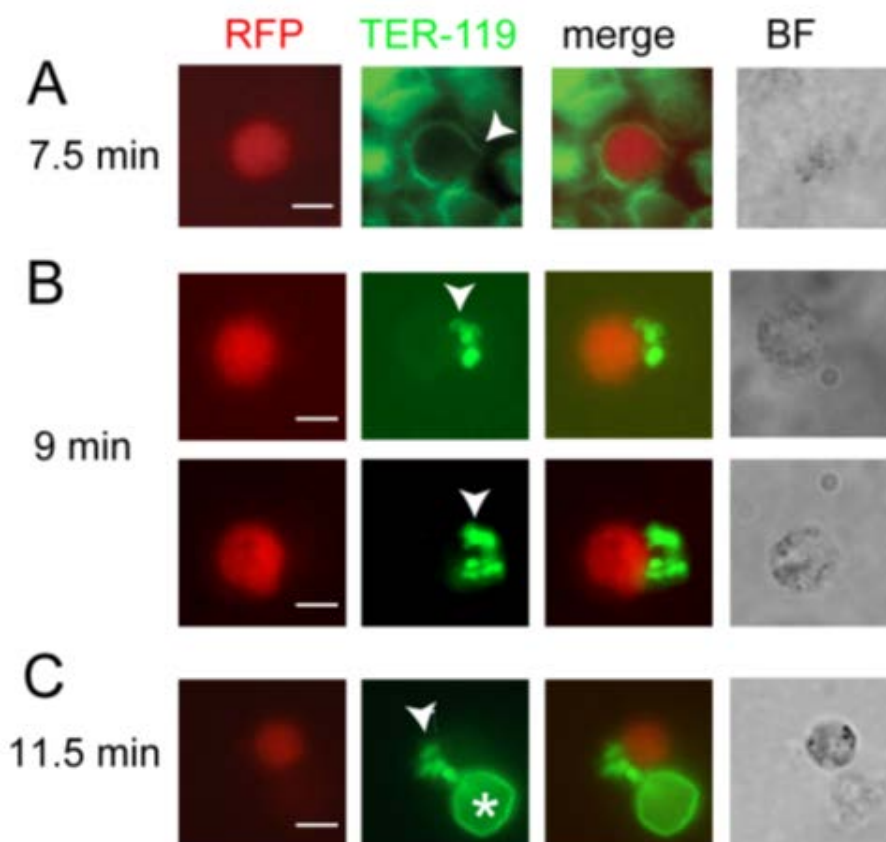
Εικόνα 2.4. Η ζωντανή απεικόνιση του παρασιτικού στελέχους 820 που σημαίνεται με TER-119 αποκαλύπτει την ρήξη της RBCM. Στα δείγματα δεν έγινε μονιμοποίηση. A-D. Τα θηλυκά εκφράζουν την RFP (κόκκινα) και η RBCM σημαίνεται με TER-119 (πράσινο). Οι εικόνες έχουν τοποθετηθεί σύμφωνα με τα διαφορετικά στάδια κατά την έξοδο. Α. Ένα θηλυκό γαμετοκύτταρο που περιβάλλεται από την ακόμη ανέπαφη RBCM. Β. Η RBCM ανοίγει σε ένα μοναδικό σημείο. Τα βέλη δείχνουν μια ελαφριά πάχυνση της RBCM κατά το άνοιγμα. Γ. Δύο θηλυκά κατά την έξοδο. Τα βέλη δείχνουν μια ελαφριά πάχυνση της RBCM κατά το άνοιγμα. Πάνω εικόνα: η RBCM ανοίγει και ταυτόχρονα σχηματίζονται κυστίδια, το οποίο αποτελεί το πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα ρήξης της RBCM που συναντάμε. Ο αστερίσκος δείχνει τα κυστίδια, τα οποία βρίσκονται εκτός εστίασης. Κάτω εικόνα: η RBCM ανοίγει αλλά ο σχηματισμός των κυστιδίων (αστερίσκος) ξεκινάει όταν έχει απομακρυνθεί κάπως ο γαμέτης, όπως για παράδειγμα το τρίτο θηλυκό στην εικόνα 2.1. D. Ολοκληρώνεται η ρήξη της RBCM και τα κυστίδια της RBCM παραμένουν κοντά στον γαμέτη (άσπρο βέλος). E. Έξοδος αρσενικού παρασίτου. Δύο αρσενικοί γαμέτες (άσπρα βέλη) εκβάλλουν από το κύτταρο και τα κυστίδια της RBCM παραμένουν δίπλα. Να σημειωθεί ότι τα κύτταρα κινούνται στο ζωντανό δείγμα κατά την λήψη και για αυτό μπορεί η θέση τους να διαφέρει μεταξύ των εικόνων του ίδιου κυττάρου. Κλίμακα 5μm.

Ανοσοφθορισμός σε μονιμοποιημένα δείγματα επιβεβαιώνει την ύπαρξη κυστιδίων από την RBCM

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοφθορισμού σε μονιμοποιημένα δείγματα, όπου χρησιμοποιήθηκε και πάλι το αντίσωμα TER-119 για την σήμανση της εξωτερικής επιφάνειας της RBCM. Αρχικά γίνεται η ενεργοποίηση των γαμετοκυττάρων του στελέχους 820 και δείγματα που αντιστοιχούν σε διαφορετικές χρονικές στιγμές μετά την ενεργοποίηση μονιμοποιούνται σε φορμαλδεΰδη. Να σημειωθεί ότι στα δείγματα δεν προστίθεται κάποιο απορρυπαντικό που να καθιστά τα κύτταρα διαπερατά από το αντίσωμα. Σκοπός ήταν να δούμε εάν τα κυστίδια από την RBCM δημιουργούνται με τέτοιο τρόπο, ούτως ώστε η αναδίπλωση που γίνεται για τον σχηματισμό τους φέρνει τελικά την εξωτερική επιφάνεια της μεμβράνης εσωτερικά του κυστιδίου ή το αντίστροφο. Δεδομένου ότι τα κύτταρα δεν είναι διαπερατά στο αντίσωμα, στην πρώτη περίπτωση δεν αναμένεται η εμφάνιση σήματος από το αντίσωμα. Αντίθετα, εάν η εξωτερική επιφάνεια της RBCM στα ήδη σχηματισμένα κυστίδια βρίσκεται και πάλι εξωτερικά, τότε το αντίσωμα μπορεί να προσδεθεί. Επιπλέον, θέλαμε να απεικονίσουμε την RBCM κατά το άνοιγμα του πόρου.

Ελάχιστα κύτταρα βρέθηκαν που καταφέραμε να συλλάβουμε το άνοιγμα του πόρου, κάτι το οποίο ήταν αναμενόμενο δεδομένου ότι στα πειράματα απεικόνισης ζωντανών δειγμάτων η φάση αυτή δείχνει να είναι εξαιρετικά σύντομη. Ένα

παράδειγμα παρουσιάζεται στην εικόνα 2.5, όπου η RBCM σε 7,5 λεπτά μετά την ενεργοποίηση έχει ανοίξει μερικώς σε ένα μοναδικό σημείο ενώ δεν έχουν ακόμη σχηματιστεί τα κυστίδια. Τα κυστίδια εντοπίζονται ήδη στα 9 λεπτά μετά την ενεργοποίηση (εικόνα 2.5B), αλλά και αργότερα όπου έχει ολοκληρωθεί ή εξοδος (εικόνα 2.5C). Επίσης, παραμένουν κοντά στους γαμέτες, επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα των προηγούμενων πειραμάτων ανοσοεντοπισμού σε ζωντανά δείγματα. Τέλος, το γεγονός ότι τα κυστίδια ανιχνεύονται με το αντίσωμα δείχνει ότι η εξωτερική επιφάνεια της RBCM παραμένει εξωτερικά των κυστιδίων κατά τον σχηματισμό τους. Ωστόσο, δεν μπορούμε να αποκλείσουμε το ενδεχόμενο να έχουμε παράλληλα και κυστίδια όπου τελικά το εξωτερικό της RBCM βρίσκεται εσωτερικά κατά τον σχηματισμό τους. Όμως, δεν μπορούσαμε να ελέγξουμε αυτήν την πιθανότητα, λόγω της έλλειψης κάποιου δείκτη για την εσωτερική επιφάνεια της RBCM.



Εικόνα 2.5. Μονιμοποιημένα δείγματα του παρασιτικού στελέχους 820 που σημαίνονται με TER-119 αποκαλύπτει την ρήξη της RBCM. A-C. Θηλυκά που εκφράζουν RFP (κόκκινα) μονιμοποιήθηκαν

σε διαφορετικές χρονικές στιγμές μετά την ενεργοποίηση και η RBCM σημαίνεται με TER-119 (πράσινο). Α. Σε 7.5 λεπτά μετά την ενεργοποίηση, η RBCM έχει ανοίξει σε ένα σημείο (βέλος). Β. Δύο θηλυκά έχουν ολοκληρώσει την γαμετογένεση 9 λεπτά μετά την ενεργοποίηση. Τα κυστίδια της RBCM (βέλος) παραμένουν κοντά στους γαμέτες. Γ. Ένα θηλυκό που έχει ολοκληρώσει την γαμετογένεση 11.5 λεπτά μετά την ενεργοποίηση. Τα κυστίδια της RBCM (βέλος) παραμένουν κοντά στους γαμέτες. Ο αστερίσκος δείχνει ένα ερυθροκύτταρο. Κλίμακα 5μm.

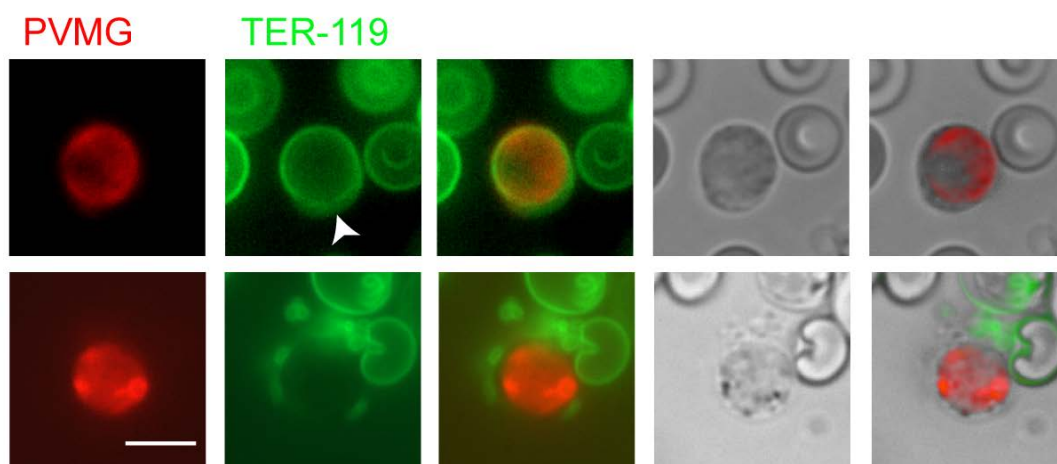
Ένας νέος δείκτης για την PVM

Όπως και με την RBCM, έτσι θέλαμε να παρακολουθήσουμε και την PVM κατά την διαδικασία εξόδου. Για αυτόν τον λόγο αναζητήσαμε έναν νέο δείκτη για την PVM. Το γονίδιο PBANKA_100390 είναι συνταϊνικό με το γονίδιο PF3D7_0406200, το οποίο κωδικοποιεί την καλώς μελετημένη πρωτεΐνη *Pfs16* στο *P.falciparum*, μια πρωτεΐνη 16-kDa που βρίσκεται στην PVM και εκφράζεται στα γαμετοκύτταρα (Eksi, 2011). Όμως, οι δύο πρωτεΐνες εμφανίζουν ομοιότητα μόνο 19%. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί το γονίδιο PBANKA_100390 του *P.berghei* θα αποκαλείται από εδώ και στο εξής PVMG (Parasitophorous Vacuole Membrane of Gametocyte). Όπως και η πρωτεΐνη *Pfs16*, έτσι και η PVMG προβλέπεται να έχει δύο διαμεμβρανικές επικράτειες, εκ των οποίων η μια συμπίπτει με την αλληλουχία σηματοδότησης που βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο. Η PVMG είναι ελαφρώς μεγαλύτερη της *Pfs16*, 177 και 157 αμινοξέα αντίστοιχα.

Από το εργαστήριό μας έχουν κατασκευαστεί μεταλλαγμένα παράσιτα στα οποία έχει αφαιρεθεί το γονίδιο PBANKA_100390. Όμως, τα μεταλλαγμένα αυτά παράσιτα δεν παρουσιάζουν κάποιο ιδιαίτερο φαινότυπο και μπορούν να ολοκληρώσουν τον κύκλο ζωής τους μεταδιδόμενα μέσω των κουνουπιών. Παρόλα αυτά, η PVMG θα μπορούσε να έχει ένα παρόμοιο πρότυπο έκφρασης με την *Pfs16*. Έτσι, με αντίστροφη μεταγραφή και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (RT-PCR) έχει αποδειχθεί ότι το γονίδιο εκφράζεται στα γαμετοκύτταρα. Για τον εντοπισμό της πρωτεΐνης εισήχθη σε αγρίου τύπου παράσιτα ένα επίσωμα που κωδικοποιεί την PVMG συνδεδεμένη στο καρβοξυτελικό της άκρο με την φθορίζουσα πρωτεΐνη mCherry.

Έχοντας τα παράσιτα που εκφράζουν την φθορίζουσα πρωτεΐνη PVMG-mcherry, προχωρήσαμε σε πειράματα απεικόνισης της PVM κατά την διαδικασία

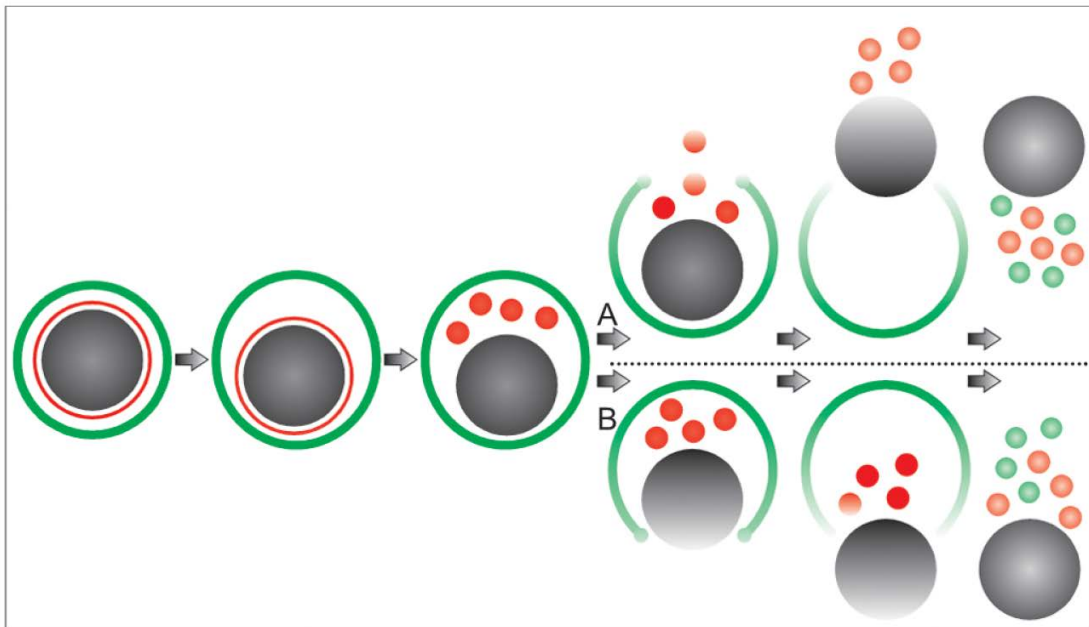
εξόδου σε ζωντανά δείγματα. Παράλληλα η RBCM σημαίνεται με το αντίσωμα TER-119. Στην εικόνα 2.6 παρουσιάζεται ένα παράσιτο στο οποίο δεν έχει ξεκινήσει ακόμη η διαδικασία εξόδου. Η PVMG-mcherry δίνει ένα διάχυτο σήμα που περικλείεται από την RBCM, η οποία παραμένει ακόμη ανέπαφη. Αντίθετα στα παράσιτα όπου έχει ξεκινήσει η διαδικασία εξόδου, λαμβάνοντας υπόψιν την ρήξη της RBCM, η PVMG-mcherry εμφανίζει ένα πρότυπο εντοπισμού παρόμοιο με αυτό των κυστιδίων της PVM που περιγράφεται στα προηγούμενα πειράματα.



Εικόνα 2.6. Ζωντανή απεικόνιση παρασίτων που εκφράζουν PVMG-mCherry και σημαίνονται με TER-119. Πάνω: Το ερυθροκύτταρο είναι διογκωμένο σε μια πλευρά (βέλος) που δείχνει ότι η έξοδος έχει ξεκινήσει αν και η RBCM είναι ακόμη ανέπαφη. Το διάχυτο σήμα από το mCherry δείχνει το παράσιτο. Κάτω: Ένα παράσιτο που έχει ολοκληρώσει την έξοδο. Τα κυστιδία της PVM (κόκκινο) και τα κυστιδία της RBCM (πράσινο) παραμένουν κοντά στο παράσιτο. Να σημειωθεί ότι τα κύτταρα κινούνται στο ζωντανό δείγμα κατά την λήψη και για αυτό μπορεί η θέση τους να διαφέρει μεταξύ των εικόνων του ίδιου κυττάρου. Κλίμακα 5μm.

2.3 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα παράσιτα της ελονοσίας διαθέτουν μοναδικούς μηχανισμούς για να διαφύγουν από τα ερυθροκύτταρα-ξενιστές τους. Σε αυτήν την μελέτη προσπαθούμε να καταγράψουμε με λεπτομέρεια την διαδικασία εξόδου των γαμετοκυττάρων χρησιμοποιώντας διαφορετικές μεθόδους απεικόνισης. Στο σύνολό τους, τα αποτελέσματα μας δείχνουν ότι η διαδικασία εξόδου δεν ακολουθεί ένα στερεοτυπικό πρότυπο και το χρονικό διάστημα που διαρκεί ποικίλει. Ωστόσο, **η έξοδος μπορεί να χωριστεί σε διακριτά βήματα, τα οποία είναι παρόμοια και στα δύο φύλα.** Με βάση τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης προτείνουμε ένα μοντέλο για την έξοδο των *P. berghei* γαμετοκυττάρων, το οποίο παρουσιάζεται στην εικόνα 2.7. Το πρώτο σημάδι ότι η διαδικασία εξόδου έχει ξεκινήσει είναι η διόγκωση του ερυθροκυττάρου. Έπειτα η PVM διαρρηγνύεται και σχηματίζει κυστίδια, τα οποία εντοπίζονται στον ενδιάμεσο χώρο μεταξύ παρασίτου και ερυθροκυττάρου. Ακολουθεί το άνοιγμα ενός μοναδικού πόρου στην RBCM. Στο επόμενο βήμα υπάρχουν δύο διαφορετικοί τύποι. Σε κάποιες περιπτώσεις, τα κυστίδια της PVM εξωθούνται μέσα από το πόρο στην RBCM, η οποία στην συνέχεια σχηματίζει και αυτή κυστίδια. Στις περισσότερες καταγραφές των αρσενικών η έξοδος των κυστιδίων της PVM γίνεται έπειτα από την έξοδο ενός αρσενικού γαμέτη από τον πόρο. Σε άλλες περιπτώσεις που τα κυστίδια της PVM δεν βρίσκονται από την πλευρά δημιουργίας του πόρου, η RBCM ανοίγει και ο γαμέτης εξέρχεται πρώτος. Τα κυστίδια της PVM απελευθερώνονται εν συνεχεία, ενώ η RBCM σχηματίζει και σε αυτές τις περιπτώσεις κυστίδια.

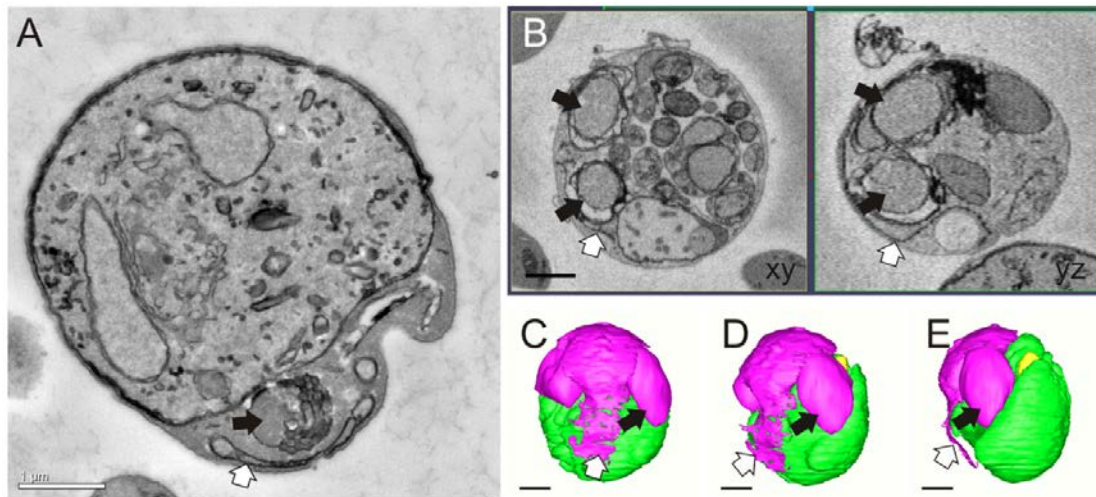


Εικόνα 2.7. Νέο μοντέλο εξόδου. Το γαμετοκύτταρο (γκρι) περιβάλλεται από την PVM (κόκκινο) και την RBCM (πράσινο). Το πρώτο σημάδι της εξόδου είναι η διόγκωση στην μια πλευρά του ερυθροκυττάρου. Ακολουθεί η ρήξη της PVM και ο σχηματισμός κυστιδίων από αυτήν. Έπειτα, ένας μοναδικός πόρος ανοίγει στην RBCM. Το άνοιγμα του πόρου μπορεί να είναι είτε προς την κατεύθυνση των κυστιδίων της PVM, που είναι το πιο σύνηθες στις καταγραφές μας (A), είτε προς την αντίθετη κατεύθυνση, αφήνοντας πρώτα το παράσιτο να απελευθερωθεί (B). Η αναδίπλωση της RBCM στον δακτύλιο του πόρου υποδηλώνεται από την πάχυνση του δακτυλίου που ανιχνεύεται σε ορισμένες καταγραφές. Τέλος, δημιουργούνται κυστιδία από την ρήξη της RBCM και ο θηλυκός γαμέτης ή το αρχικό σώμα του αρσενικού γαμετοκυττάρου απελευθερώνονται.

Η διόγκωση είναι η πρώτη ένδειξη ότι έχει ξεκινήσει η διαδικασία για την έξοδο του γαμέτη από το κύτταρο ξενιστή. Το ίδιο θεωρείται και ως το πρώτο βήμα για την έξοδο των μεροζωιδίων (Abkarian, 2011, Gilson, 2009). Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε στην εισροή νερού στο κύτταρο είτε σε κάποια αλλαγή που υφίσταται η PVM. Έχει δειχθεί ότι η πρωτεΐνη SEP2, η οποία βρίσκεται στην PVM, δεν είναι πλέον ορατή μόλις 30 δευτερόλεπτα μετά την ενεργοποίηση των γαμετοκυττάρων (Deligianni, 2013). Προκύπτει λοιπόν το συμπέρασμα ότι η PVM επιδέχεται απότομες μεταβολές στην φάση αυτή. Συνεπώς, απόρροια μιας τέτοιας αναδιαμόρφωσης θα μπορούσε να είναι ότι η μεμβράνη είναι πλέον διαπερατή σε ιόντα και μικρά μόρια και αυτό οδηγεί στην διόγκωση του ερυθροκυττάρου, λόγω ώσμωσης.

Το επόμενο βήμα είναι η ρήξη της PVM και η δημιουργία των κυστιδίων από αυτήν. Τα κυστιδία εντοπίζονται στον ενδιάμεσο χώρο μεταξύ παρασίτου και της

RBCM. Το γεγονός ότι φαίνονται σχεδόν σε όλες τις καταγραφές με την κάμερα υποδηλώνει ότι αυτό είναι ένα απαραίτητο βήμα κατά την διαδικασία εξόδου. Σε συνεργασία με το πανεπιστήμιο της Μελβούρνης έγινε απεικόνιση των κυττάρων με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης (Transmission Electron Microscopy, TEM) και τρισδιάστατη αναπαράσταση (Gatan 3View (Slice and View)), για να έχουμε μια πιο λεπτομερή εικόνα του κυττάρου στην φάση αυτή. Στην εικόνα 2.8A φαίνεται ένα αρσενικό γαμετοκύτταρο (αναγνωρίζεται από την εσωτερική μεμβράνη, η οποία δεν υπάρχει στα θηλυκά και ο ρόλος της είναι ακόμη άγνωστος) που ακόμη περιβάλλεται από την RBCM. Στον ενδιάμεσο χώρο μεταξύ παρασίτου και RBCM υπάρχει ένα μεμβρανικό κυστίδιο (μαύρο βέλος) και ένα πεπλατυσμένο κυστίδιο (άσπρο βέλος). Στις τομές της εικόνας 2.8B και C, στα δύο από τα τρία κυστίδια, υπάρχουν εσωτερικές μεμβράνες που φαίνονται σαν κυστίδια και περιέχουν ένα ημιδιαφανές υλικό που πιθανόν να πρόκειται για το κυτταρόπλασμα του ερυθροκυττάρου. Το υλικό που βρίσκεται στο τρίτο κυστίδιο δεν καλύπτει όλο τον χώρο αλλά εντοπίζεται σε διάσπαρτα σημεία. Στις εικόνες 2.8C, D και E είναι η τρισδιάστατη αναπαράσταση αυτού του γαμετοκυττάρου. Τα κυστίδια σημαίνονται με ροζ χρώμα, το γαμετοκύτταρο με πράσινο ενώ η RBCM αν και υπάρχει δεν απεικονίζεται στην τρισδιάστατη αναπαράσταση. Το γαμετοκύτταρο εμφανίζει μια πολύπλοκη μορφολογία με προεξοχές και αναδιπλώσεις. Επιπλέον φαίνονται 3 κυστίδια τα οποία συνδέονται με ένα άλλο πεπλατυσμένο κυστίδιο, που έχει την μορφή κορδέλας (εικόνα 2.8B, C, D, E άσπρα βέλη). Το ιδιαίτερο αυτό κυστίδιο, πέρα από το ότι συνδέεται με τα υπόλοιπα κυστίδια της PVM, είναι πιθανό να συνδέεται και με το γαμετοκύτταρο. Υποθέτουμε ότι αυτό θα μπορούσε να αποτελεί μια προέκταση της PVM μέσα στο κύτταρο ξενιστή, παρόμοια με το δίκτυο μεμβρανών που έχει βρεθεί στα μολυσμένα ερυθρά από το *P.falciparum* (Elmendorf, 1994, Hanssen, 2010, Hansenn, 2008). Αυτή η «κορδέλα» θα μπορούσε να εξηγήσει το γιατί τα κυστίδια μετά την έξοδο από τον ξενιστή παραμένουν κοντά στο παράσιτο αλλά και μεταξύ τους.



Εικόνα 2.8. Ανάλυση της εξόδου με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. A. Τομή ενεργοποιημένου αρσενικού γαμετοκυττάρου που ακόμη περιβάλλεται από την RBCM. Έχει γίνει η ρήξη της PVM και ένα μεγάλο κυστίδιο είναι ορατό στον ενδιάμεσο χώρο μεταξύ παρασίτου και RBCM (μαύρο βέλος), καθώς και ένα πεπλατυσμένο κυστίδιο (άσπρο βέλος). B. Τομή από ένα ενεργοποιημένο γαμετοκύτταρο, όπου παρουσιάζονται οι xy και yz όψεις του. Το παράσιτο περιβάλλεται ακόμη από την RBCM. Δύο κυστίδια της PVM είναι ορατά (μαύρα βέλη) με εσωτερικές μεμβράνες που φαίνονται σαν κυστίδια και περιέχουν ένα ημιδιαφανές υλικό που πιθανόν να πρόκειται για το κυτταρόπλασμα του ερυθροκυττάρου. Το άσπρο βέλος δείχνει ένα πεπλατυσμένο κυστίδιο. C-E. Τρισδιάστατη απεικόνιση του γαμετοκυττάρου στην εικόνα 2.8.B. Το παράσιτο είναι πράσινο και τα κυστίδια ροζ (μαύρα βέλη). Το άσπρο βέλος δείχνει το πεπλατυσμένο κυστίδιο σε μορφή κορδέλας.

Η έξοδος των μεροζωιδίων χαρακτηρίζεται από το άνοιγμα ενός μοναδικού πόρου στην RBCM, την σταθεροποίησή του και την αναδίπλωση της μεμβράνης από μέσα προς τα έξω στο χείλος του πόρου. Τέλος, η μεμβράνη κάμπτεται σπρώχνοντας τα μεροζωίδια μακριά, βοηθώντας έτσι την διασπορά τους (Abkarian, 2011). Η έξοδος των γαμετών διαφέρει, καθώς οι αρσενικοί γαμέτες διαθέτουν έντονη κινητικότητα. Κολυμπούν γρήγορα και όταν συναντήσουν τους θηλυκούς γαμέτες, οι οποίοι παραμένουν ακίνητοι, λαμβάνει χώρα η σύντηξη. Συνεπώς δεν υπάρχει ανάγκη υποβοηθούμενης διασποράς κατά την έξοδο. Σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις που παρατηρήσαμε σε αυτήν την μελέτη, έχουμε το **άνοιγμα ενός μοναδικού πόρου στην RBCM**, αλλά στο βήμα που ακολουθεί εμφανίζονται διαφορετικές περιπτώσεις. Τις περισσότερες φορές το άνοιγμα του πόρου είναι αρκετά σύντομο, τα κυστίδια της PVM βγαίνουν προς τα έξω και ο σχηματισμός των κυστιδίων από την RBCM συμβαίνει ταχύτατα απελευθερώνοντας έτσι τον γαμέτη. Όμως, σε κάποιες περιπτώσεις, προηγείται η έξοδος του γαμέτη από το μερικό άνοιγμα της RBCM, η οποία παραμένει

για λίγα δευτερόλεπτα σε αυτήν τη φάση. Έπειτα, σπάει σε μικρά κυστίδια, απελευθερώνοντας παράλληλα και τα κυστίδια της PVM. Η κάμψη της RBCM σε λίγα από τα γεγονότα εξόδου που καταγράψαμε, υποδηλώνει την αναδίπλωση της μεμβράνης στο χείλος του πόρου, όπως στην περίπτωση των μεροζωιδίων και των *P.falciparum* γαμετοκυττάρων (Abkarian, 2011, Suarez-Cortes, 2014). Όμως, δεν καταφέραμε να ανιχνεύσουμε ξεκάθαρα μια αναδίπλωση στο άνοιγμα του πόρου, παρά τις πολλές προσπάθειες απεικόνισης της RBCM με το αντίσωμα TER-119. Σε κάποιες εικόνες φαίνεται μια πάχυνση της μεμβράνης στο άνοιγμα του πόρου, αλλά δεν μπορούμε να αναφερθούμε ευθέως σε αναδίπλωση της μεμβράνης στο άνοιγμα. Η δυσκολία ανίχνευσης της αναδίπλωσης μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι η RBCM παραμένει για πολύ μικρό χρονικό διάστημα σε αυτήν την φάση και προχωράει στον σχηματισμό κυστιδίων πολύ γρήγορα.

Μετά το άνοιγμα της RBCM γίνεται ο σχηματισμός των κυστιδίων, γεγονός το οποίο βλέπουμε σε κάθε περιστατικό εξόδου. Σκοπός ήταν να προσδιορίσουμε εάν τα κυστίδια σχηματίζονται έχοντας την εξωτερική επιφάνεια της RBCM στο εσωτερικό τους ή το αντίστροφο. Μετά την ενεργοποίηση τα δείγματα μονιμοποιούνται σε χρονικές στιγμές όπου έχει ολοκληρωθεί η διαδικασία εξόδου και άρα έχουν ήδη σχηματιστεί τα κυστίδια. Η απουσία απορρυπαντικού δεν επιτρέπει την διέλευση του αντισώματος στο εσωτερικό των κυστιδίων. Πολλά κυστίδια ανιχνεύονται με το αντίσωμα και αυτό σημαίνει ότι η εξωτερική επιφάνεια της RBCM παραμένει εξωτερικά. Η παρατήρηση αυτή δεν έρχεται σε αντιδιαστολή με την αναδίπλωση από μέσα προς τα έξω, που θα μπορούσε να συμβαίνει στο χείλος του πόρου κατά το άνοιγμα της μεμβράνης. Ο λόγος είναι ότι η ήδη αποσταθεροποιημένη μεμβράνη είναι σε μια πολύ «δυναμική κατάσταση» και ενδέχεται να αλλάξει σχήμα (Tiffert, 2014) . Αυτό μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα να ξανακλείσει με το εξωτερικό τμήμα να παραμένει εξωτερικά (outside-out). Η έλλειψη δείκτη για την εσωτερική επιφάνεια της RBCM δεν μας επιτρέπει να καταλήξουμε στο γενικότερο συμπέρασμα ότι όλα τα κυστίδια της RBCM έχουν το εξωτερικό τμήμα εξωτερικά ή αν υπάρχουν διαφορετικές μορφές.

Στα μεροζωΐδια του *P.falciparum*, η δημιουργία κυστιδίων από την RBCM συμβαίνει πολύ αργότερα από την ολοκλήρωση της εξόδου (Glushakova, 2005). Πιθανόν αυτή η διαφορά μπορεί να εξηγηθεί από τις διαφορές στην οργάνωση των μολυσμένων ερυθροκυττάρων ή και άλλα μοριακά γεγονότα που λαμβάνουν χώρα. Η σταθεροποίηση του πόρου και η δημιουργία κυστιδίων διέπεται από την κατάσταση του κυτταροσκελετού που αλλάζει στο μολυσμένο ερυθροκύτταρο (Lalle, 2011). Οι μελέτες που έχουν γίνει για την έξοδο των γαμετοκυττάρων στο *P.falciparum* έχουν δείξει ότι η RBCM διαρρηγνύεται σε ένα μοναδικό σημείο και στο άνοιγμα του πόρου υπάρχει αναδίπλωση της μεμβράνης (Suarez-Cortes, 2014). Ωστόσο, παραμένει έτσι και ένα μέρος της προσδένεται στο γαμετοκύτταρο (Eksi, 2011, Sologub, 2011, Suarez-Cortes, 2014). Αυτό όμως διαφέρει από την δημιουργία κυστιδίων από την RBCM που παρατηρούμε στην παρούσα μελέτη. Λιγότερα είναι γνωστά για την ρήξη της PVM. Μελέτες που έχουν γίνει με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης δείχνουν ότι αρχικά η PVM σπάει σε πολλά σημεία και τα μεμβρανικά τμήματα που δημιουργούνται παραμένουν κολλημένα στο γαμετοκύτταρο. Αργότερα παρουσιάζονται ως πεπλατυσμένα κυστίδια εντός της RBCM (Sologub, 2011), αλλά δεν έχει αναφερθεί ποτέ ότι αυτά τα κυστίδια απελευθερώνονται από την RBCM κατά την έξοδο των *P.falciparum* γαμετοκυττάρων. Δεν αποκλείουμε αυτά τα κυστίδια να αντιστοιχούν με τα κυστίδια της PVM στο *P.berghei*. Όμως, στην παρούσα μελέτη τα κυστίδια δεν είναι πεπλατυσμένα όπως φαίνεται και από την απεικόνιση των ζωντανών δειγμάτων αλλά και από την τρισδιάστατη αναπαράσταση που πήραμε από τις τομές με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης. Επιπλέον, εδώ φαίνεται ότι τα κυστίδια της PVM απελευθερώνονται από το ερυθροκύτταρο κατά την διαδικασία της εξόδου.

Εν κατακλείδι, η παρούσα μελέτη παρέχει νέες γνώσεις για την σημαντική διαδικασία της εξόδου των γαμετοκυττάρων στο *P.berghei*. Επιβεβαιώνει ότι **η έξοδος των γαμετοκυττάρων από το κύτταρο-ξενιστή έχει ομοιότητες, αλλά και βασικές διαφορές από την έξοδο των μεροζωΐδιων, δείχνοντας ότι η κάθε διαδικασία διέπεται από μοναδικά χαρακτηριστικά**. Αυτό ενισχύεται και από το γεγονός ότι στην έξοδο των γαμετοκυττάρων παίρνουν μέρος συγκεκριμένες πρωτεΐνες που δεν έχουν κάποια λειτουργία στην έξοδο των μεροζωΐδιων. Παραμένει ανοιχτό το ερώτημα

εάν η έξοδος των *P.falciparum* γαμετοκυττάρων μοιάζει με την έξοδο των *P.berghei* γαμετοκυττάρων. Πιθανόν οι διαφορές που αναφέρονται να οφείλονται στις διαφορετικές πειραματικές προσεγγίσεις. **Το βασικό πλεονέκτημα της μελέτης μας είναι ότι ακολουθούμε την έξοδο σε πραγματικό χρόνο και με ζωντανά δείγματα, κάτι το οποίο μειώνει τα πλασματικά ευρήματα που μπορεί να προκύψουν από την μονιμοποίηση των δειγμάτων.** Είναι ξεκάθαρο ότι αυτές οι περίπλοκες διαδικασίες πρέπει να μελετηθούν από έναν συνδυασμό μεθόδων. Ιδιαίτερα σημαντικό για την καλύτερη ανάλυση είναι να βρεθούν νέοι δείκτες για το εσωτερικό και το εξωτερικό τμήμα της PVM και της RBCM. Η γαμετογένεση είναι ένα βασικό σημείο στον κύκλο ζωής του παρασίτου και αυτό σημαίνει ότι χρειάζονται περισσότερες μελέτες για να κατανοήσουμε την βιολογία αυτής της σειράς γεγονότων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Αντικατάσταση της ακτίνης 2 με την ακτίνη 1

3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι ακτίνες είναι υψηλά συντηρημένες πρωτεΐνες και παίζουν σημαντικούς ρόλους σε βασικές διαδικασίες στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Όπως σε όλα τα παράσιτα του γένους *Plasmodium*, έτσι και στο *P.berghei* υπάρχουν δυο γονίδια που κωδικοποιούν δύο διαφορετικές ισομορφές ακτίνης, η ακτίνη 1 (PBANKA_145930) και η ακτίνη 2 (PBANKA_103010) (Wesseling, 1988, Schuler and Matuschewski, 2006). Η ακτίνη 1 εκφράζεται καθ' όλη την διάρκεια του κύκλου ζωής του παρασίτου και είναι ζωτικής σημασίας για το κύτταρο (Dobrowolski and Sibley, 1996). Αντίθετα, ο υποκινητής του γονιδίου *ακτίνη 2* βρίσκεται σε καταστολή στα μη φυλετικά στάδια της ερυθροκυτταρικής φάσης (Wesseling, 1989). Στα φυλετικά στάδια, η ακτίνη 2 εντοπίζεται αποκλειστικά στα αρσενικά γαμετοκύτταρα και τους αρσενικούς και θηλυκούς γαμέτες (Deligianni, 2011). Όμως, η λειτουργία της δεν έχει ακόμη κατανοηθεί πλήρως.

Στα παράσιτα της ελονοσίας και οι δύο ισομορφές ακτίνης είναι από τις πιο αποκλίνουσες μεταξύ των ευκαρυωτικών ακτινών. Επιπλέον, συγκρίνοντας τις αμινοξικές αλληλουχίες της ακτίνης 1 και της ακτίνης 2, αυτές παρουσιάζουν ένα ποσοστό ομοιότητας στο 79% (εικόνα 3.1) (Deligianni, 2011). Το ποσοστό αυτό είναι μικρό σε σχέση με το ποσοστό ομοιότητας που έχουν άλλες ισομορφές ακτίνης στο ίδιο είδος οργανισμού. Ένα μακροχρόνιο ερώτημα που παραμένει αναπάντητο είναι εάν οι δύο ισομορφές ακτίνης στο παράσιτο έχουν παρόμοιο ρόλο ή η διαφορά σε επίπεδο αμινοξικής αλληλουχίας αντανακλά και διαφορά στις λειτουργίες μεταξύ των δύο ισομορφών.

τον κρίσιμο ρόλο που έχει η ακτίνη 2 στην γαμετογένεση των αρσενικών, παραμένει ακόμη άγνωστο εάν υπάρχουν και άλλες σημαντικές λειτουργίες στα επόμενα στάδια του κύκλου ζωής. Όμως, η διακοπή που γίνεται στην γαμετογένεση δεν επιτρέπει την περαιτέρω μελέτη.

Το ερώτημα που δημιουργήθηκε βάση αυτών των αποτελεσμάτων είναι το εξής: τι θα γινόταν με τον φαινότυπο της γαμετογένεσης στα *act2(-)* παράσιτα εάν αντικαθιστούσαμε την ακτίνη 1 με την ακτίνη 2; Η απάντηση στο ερώτημα αυτό έχει δύο πιθανά σενάρια. Εάν ο φαινότυπος εκβολής των αρσενικών γαμετών από το αρχικό γαμετοκύτταρο επανέρχονταν σε φυσιολογικά επίπεδα, αυτό θα σήμαινε ότι οι δύο ισομορφές ακτίνης έχουν παρόμοια λειτουργία. Αντίθετα, εάν η γαμετογένεση στα αρσενικά παράσιτα είναι ακόμη μπλοκαρισμένη, τότε η λειτουργία της ακτίνης 2 δεν μπορεί να αντικατασταθεί από την ακτίνη 1, που σημαίνει ότι οι δύο ακτίνες έχουν διαφορετικούς ρόλους στο κύτταρο.

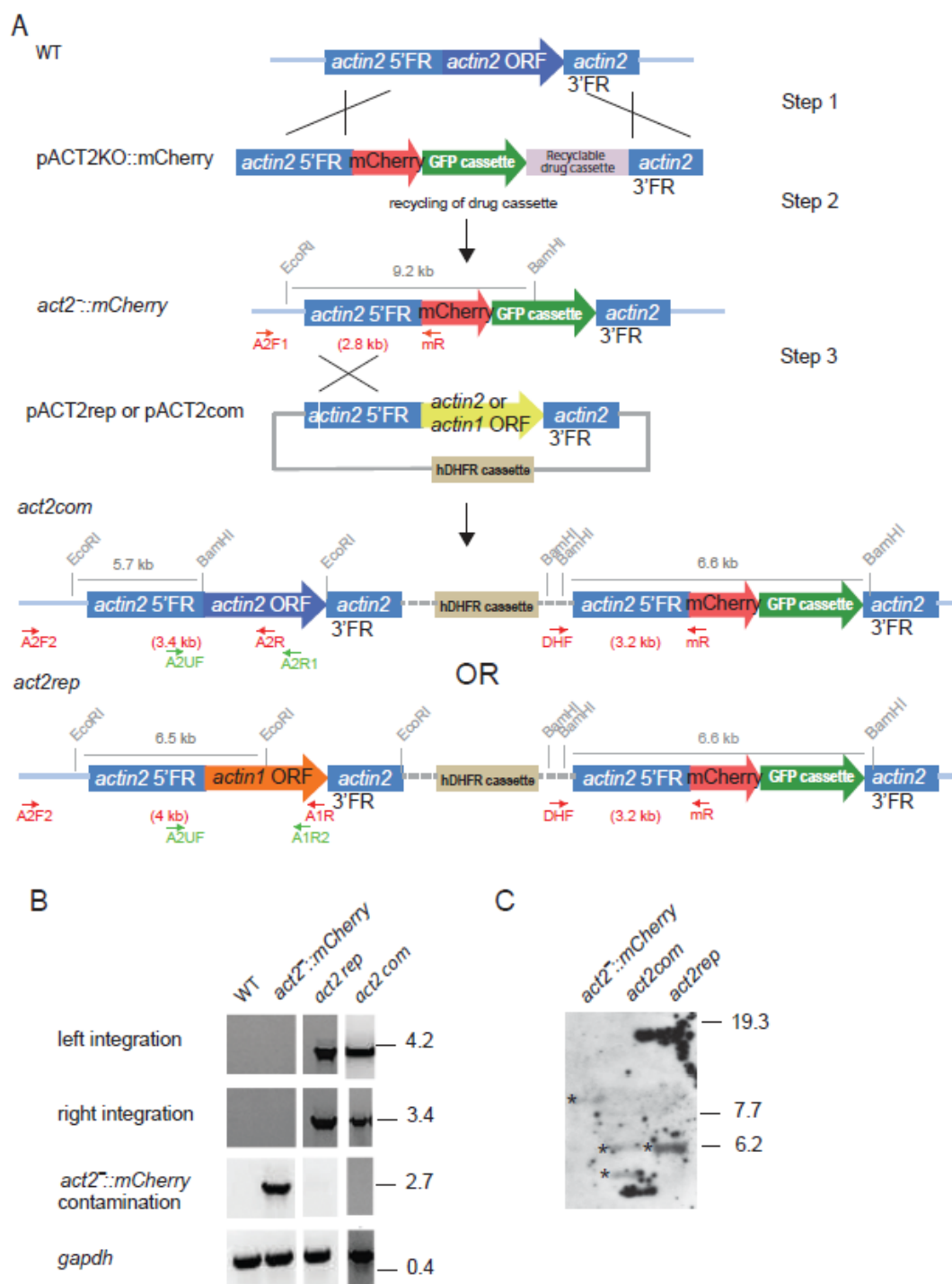
3.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Κατασκευή μετασηματισμένων παρασίτων για την αντικατάσταση του γονιδίου ακτίνη 2 με το γονίδιο ακτίνη 1

Για να απαντήσουμε στο συγκεκριμένο ερώτημα, το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (Open Reading Frame, ORF) του γονιδίου *ακτίνη 2* αντικαταστάθηκε από το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου *ακτίνη 1*, μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού (*act2 rep*). Ο γενετικός μετασηματισμός έγινε σε παράσιτα όπου έχει γίνει απαλοιφή του γονιδίου *ακτίνη 2* (*act2-::mcherry*) (Kooij, 2012). Σε αυτά τα παράσιτα, μεταξύ των 5' και 3' πλευρικών περιοχών (Flanking Regions, FR) που πλαισιώνουν το γονίδιο *ακτίνη 2* βρίσκεται η κωδική περιοχή για την κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη mCherry και μια κασέτα έκφρασης της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης GFP. Στα *act2-::mcherry* παράσιτα (Kooij, 2012), όπως και στα *act2(-)* παράσιτα (Deligianni, 2011), όπου και στις δύο περιπτώσεις το γονίδιο *ακτίνη 2* έχει καταστραφεί, οι αρσενικοί γαμέτες αδυνατούν να εξέλθουν από το ερυθροκύτταρο και η γαμετογένεση μπλοκάρεται. Ωστόσο επιλέξαμε να χρησιμοποιήσουμε τα *act2-::mcherry* παράσιτα αντί για τα *act2(-)* παράσιτα, καθώς στα πρώτα η κασέτα ανθεκτικότητας έχει αφαιρεθεί, όπως περιγράφεται στην εικόνα 3.2A (βήμα 2), ενώ τα δεύτερα παραμένουν ανθεκτικά στο φάρμακο επιλογής (πυριμεθαμίνη). Έτσι, μπορεί να γίνει η επιλογή των νέων μετασηματισμένων παρασίτων (*act2 rep*) τα οποία και αυτά έχουν σχεδιαστεί να είναι ανθεκτικά στην πυριμεθαμίνη.

Ο μετασηματισμός των *act2-::mcherry* παρασίτων έγινε με την κατασκευή πλασμιδίου που περιέχει το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου *ακτίνη 1* (*actin1* ORF), το οποίο πλαισιώνεται από 2700 ζεύγη βάσεων της 5' πλευρικής περιοχής (5' FR) και 728 ζεύγη βάσεων της 3' πλευρικής περιοχής (3' FR) του γονιδίου *ακτίνη 2*. Τελικά, στο γονιδίωμα των μετασηματισμένων παρασίτων, καθοδικά της πλήρους 5'FR του γονιδίου *ακτίνη 2* βρίσκεται το γονίδιο *ακτίνη 1*, η 5'FR του γονιδίου *ακτίνη 2* και ακολουθεί η υπόλοιπη αλληλουχία του πλασμιδίου. Στην συνέχεια, έχουμε ξανά ένα τμήμα της 5'FR του γονιδίου *ακτίνη 2* και η αλληλουχία συνεχίζεται με τα τμήματα που εμπεριέχονται αρχικά στα *act2-::mcherry* παράσιτα, όπως παρουσιάζεται στην

εικόνα 3.2Α. Έτσι, προκύπτουν τα μετασηματισμένα παράσιτα, όπου το γονίδιο *ακτίνη 2* αντικαθίσταται από το γονίδιο *ακτίνη 1* (*act2 rep*).



Εικόνα 3.2. Ενσωμάτωση των ORF του γονιδίου *ακτίνη 1* και *ακτίνη 2* στον γονιδιακό τόπο του γονιδίου *ακτίνη 2*. Α. Σχηματική αναπαράσταση της στρατηγικής που ακολουθήθηκε για την δημιουργία των μετασηματισμένων παρασίτων *act2rep* και *act2com*, τα οποία εκφράζουν την *ακτίνη 1* και την *ακτίνη 2* αντίστοιχα, κάτω από τον έλεγχο των 5' και 3' πλευρικών περιοχών του γονιδίου *ακτίνη 2*. Αρχικά (step 1) ολόκληρο το ORF του αγρίου τύπου γονιδίου *ακτίνη 2* αντικαθίσταται, μέσω διπλού ομόλογου ανασυνδυασμού, με ένα τμήμα που κωδικοποιεί την mCherry, μια κασέτα έκφρασης της GFP και μια κασέτα έκφρασης του υβριδικού γονιδίου ανθεκτικότητας/ευαισθησίας και περιέχει τα γονίδια *hDHFR* (ανθεκτικότητα) και yeast cytosine deaminase-uracil phosphoribosyl transferase (*yFcu*) (ευαισθησία). Σε πρώτη φάση γίνεται η θετική επιλογή των μετασηματισμένων παρασίτων, που είναι ανθεκτικά στο φάρμακο επιλογής λόγω της παρουσίας του *hDHFR*. Έπειτα, γίνεται επιλογή των παρασίτων που έχει χαθεί η κασέτα ανθεκτικότητας (*act2-::mCherry*), καθώς ένα δεύτερο φάρμακο καταστρέφει τα παράσιτα που έχουν ευαισθησία λόγω της παρουσίας του *yFcu* (step 2). Τα *act2-::mCherry* παράσιτα χρησιμοποιήθηκαν για μετασηματισμό με τα πλασμίδια pAct2com και pAct2rep, τα οποία περιέχουν κασέτα ανθεκτικότητας στην πυριμεθαμίνη (*hDHFR*) και το ORF του γονιδίου *ακτίνη 2* και *ακτίνη 1* αντίστοιχα, τα οποία πλασιώνονται από τμήματα των 5' και 3' πλευρικών περιοχών (FR) του γονιδίου *ακτίνη 2*. Η ενσωμάτωση στο γονιδίωμα έγινε με μονό ομόλογο ανασυνδυασμό στην 5'FR του γονιδίου *ακτίνη 2*. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία των μετασηματισμένων παρασίτων *act2rep* και *act2com* (step 3). Κόκκινα βέλη: εκκινητές για τον γονοτυπικό έλεγχο. Πράσινα βέλη: εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση με RT-PCR. Β. Γονοτυπικός έλεγχος με PCR. Τα αναμενόμενα μεγέθη των τμημάτων που πολλαπλασιάζονται με την PCR αναγράφονται με κόκκινο κάτω από τους χάρτες στην εικόνα 3.2A. Χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές για να ελεγχθεί η ποιότητα του απομονωμένου γενωμικού DNA (*gapdh*), εκκινητές για την ενσωμάτωση και των δύο άκρων του εκάστοτε πλασμιδίου στην σωστή θέση στο γονιδίωμα (left, right integration) αλλά και εκκινητές που φανερώνουν την ύπαρξη *act2-::mcherry* παρασίτων (*act2-::mCherry* contamination). Ως δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν γενωμικό DNA από αγρίου τύπου και *act2-::mcherry* παράσιτα. Γ. Ανάλυση με στύπωμα Southern. Το γενωμικό DNA από τα *act2-::mCherry*, *act2com* και *act2rep* κόπηκαν με τα περιοριστικά ένζυμα BamHI και EcoRI. Ως τμήμα υβριδοποίησης χρησιμοποιήθηκε ένα προϊόν PCR που αντιστοιχεί στο 5'FR του γονιδίου *ακτίνη 2*. Οι θέσεις κοπής των περιοριστικών ενζύμων και το μέγεθος των τμημάτων που δημιουργούνται φαίνονται με γκρι στην εικόνα 3.2A. Οι αστερίσκοι δείχνουν τις θετικές ζώνες.

Παράλληλα, θέλαμε να ελέγξουμε εάν μπορούμε να επαναφέρουμε την γαμετογένεση στα *act2-::mcherry* παράσιτα, δημιουργώντας μια ανάλογη πλασμιδιακή κατασκευή με σκοπό την επανατοποθέτηση του ίδιου του γονιδίου *ακτίνη 2* πίσω στον γονιδιακό του τόπο. Η στρατηγική που ακολουθήθηκε για την δημιουργία της πλασμιδιακής κατασκευής και τον μετασηματισμό των *act2-::mcherry* παρασίτων είναι πανομοιότυπη με την στρατηγική που ακολουθήθηκε στην περίπτωση των *act2rep* παρασίτων. Η διαφορά είναι ότι εδώ χρησιμοποιείται το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του ίδιου του γονιδίου *ακτίνη 2* (εικόνα 3.2A). Σκοπός μας ήταν να δημιουργήσουμε αυτά τα μετασηματισμένα παράσιτα (*act2 com*) για να δούμε εάν μπορούμε να επαναφέρουμε την σωστή έκφραση της *ακτίνης 2* και κατ' επέκταση να ελέγξουμε την ορθότητα της στρατηγικής μας. Έτσι, στα πειράματα που ακολουθούν, τα *act2 com* παράσιτα αποτελούν το δείγμα ελέγχου για τα *act2 rep* παράσιτα.

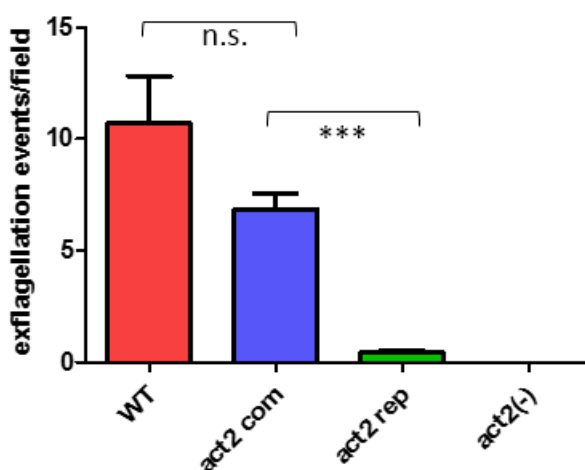
Μετά τον γενετικό μετασχηματισμό των *act2-::mcherry* παρασίτων με τα εκάστοτε πλασμίδια γίνεται κλωνοποίηση των παρασίτων με την μέθοδο της διαδοχικής αραίωσης και γονοτυπικός έλεγχος με PCR. Η ενσωμάτωση του πλασμιδίου στο γονιδίωμα έγινε σωστά και στις δύο περιπτώσεις των *act2 com* και *act2 rep*. Επιπλέον, όταν χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές για την ύπαρξη *act2-::mcherry* παρασίτων δεν εμφανίζεται προϊόν στην αντίδραση, γεγονός που υποδηλώνει έναν καθαρό πληθυσμό από *act2 com* ή *act2 rep* παρασίτων. Ο γονοτυπικός έλεγχος με PCR επαληθεύτηκε και με την ανάλυση του DNA με στύπωμα κατά Southern (εικόνα 3.2B και C). Από κάθε περίπτωση *act2 rep* ή *act2 com* παρασίτων επιλέχθηκε ένας θετικός κλώνος για περαιτέρω μελέτη. Πιο λεπτομερής περιγραφή των μεθόδων που αναφέρθηκαν παραπάνω γίνεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι και στην εικόνα 3.2.

Η ακτίνη 1 δεν αντικαθιστά την λειτουργία της ακτίνης 2 στην γαμετογένεση των αρσενικών παρασίτων

Έχοντας δημιουργήσει τα μετασχηματισμένα *act2 rep* παράσιτα, σκοπός ήταν να απαντήσουμε το ερώτημα εάν η ακτίνη 1 μπορεί να αντικαταστήσει την λειτουργία της ακτίνης 2 κατά την γαμετογένεση των αρσενικών παρασίτων. Στα παράσιτα της ελονοσίας, η γαμετογένεση των αρσενικών παρασίτων είναι ένα μοναδικό γεγονός, που περιλαμβάνει τον σχηματισμό 8 γαμετών και την εκβολή τους από το αρχικό αρσενικό γαμετοκύτταρο με την μορφή μαστιγίων. Η διαδικασία αυτή αναφέρεται ως εκμαστιγίωση (exflagellation). Λόγω της έντονης κινητικότητας των αρσενικών γαμετών κατά την εκβολή τους, το φαινόμενο αυτό μπορεί εύκολα να παρακολουθηθεί με οπτικό μικροσκόπιο. Έτσι, μας δίνεται η δυνατότητα να το χρησιμοποιήσουμε ως μέθοδο ποσοτικοποίησης των αρσενικών παρασίτων που ολοκληρώνουν την γαμετογένεση.

Τα μετασχηματισμένα παράσιτα ελέγχθηκαν για το αν μπορούν να επαναφέρουν τον φαινότυπο εκβολής των γαμετών από το αρσενικό γαμετοκύτταρο (exflagellation), δεδομένου ότι τα *act2-::mcherry* παράσιτα αδυνατούν να το κάνουν. Στα αγρίου τύπου και *act2 com* παράσιτα, ο αριθμός των παρασίτων που

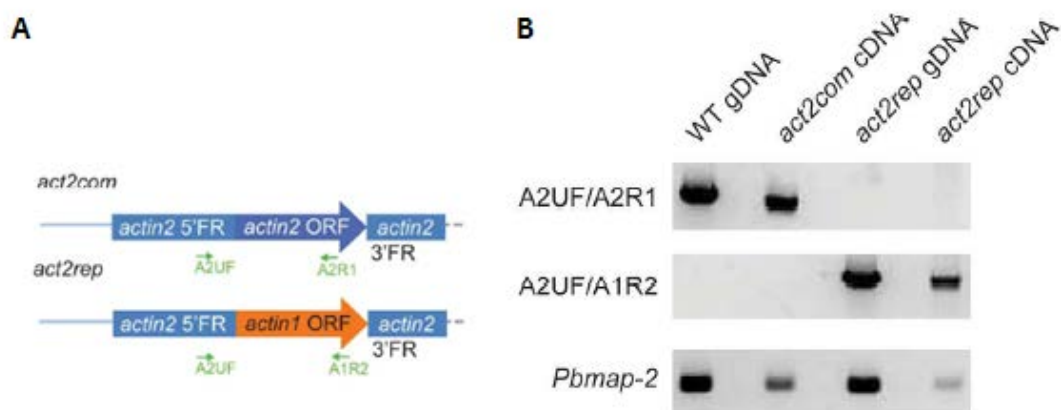
ολοκληρώνουν την γαμετογένεση είναι παρόμοιος και δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά (εικόνα 3.3). Το γεγονός αυτό δείχνει ότι η επανατοποθέτηση του γονιδίου *ακτίνη 2* επαναφέρει ορθώς την έκφραση της ακτίνης 2 στο κύτταρο και επικυρώνει την καταλληλότητα της στρατηγικής του γενετικού μετασχηματισμού που ακολουθήθηκε. Αντίθετα στα *act2 rep* παράσιτα αν και κάποια καταφέρνουν να ολοκληρώσουν την γαμετογένεση, ο αριθμός τους είναι τουλάχιστον δέκα φορές μικρότερος συγκριτικά με τα αγρίου τύπου και τα *act2 com* παράσιτα (εικόνα 3.3). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η ακτίνη 2 έχει ξεχωριστές λειτουργίες τις οποίες δεν μπορεί να εκπληρώσει η ακτίνη 1 κατά την διάρκεια της γαμετογένεσης των αρσενικών.



Εικόνα 3.3. Η ακτίνη 1 δεν αντικαθιστά την λειτουργία της ακτίνης 2 στην γαμετογένεση των αρσενικών παρασίτων. Μέτρηση του αριθμού των αρσενικών παρασίτων που ολοκληρώνουν την γαμετογένεση (exflagellation). Στην εικόνα φαίνεται ο μέσος όρος των γεγονότων ανά πεδίο (exflagellation events/field). Ο έλεγχος γίνεται σε πάνω από 20 πεδία σε κάθε δείγμα. Για το τελικό αποτέλεσμα σε κάθε στέλεχος παρασίτων, χρησιμοποιήθηκαν βιολογικά δείγματα από αίμα διαφορετικών μολυσμένων ποντικών. Βιολογικά δείγματα από αγρίου τύπου (WT) παράσιτα (n=11), *act2com* (n = 11), *act2rep* (n = 15). Ο αριθμός στα *act2com* δεν παρουσιάζει στατιστική διαφορά με τα WT παράσιτα. Στα *act2rep* ελάχιστα παράσιτα καταφέρνουν να ολοκληρώσουν την γαμετογένεση και υπάρχει μεγάλη στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τα *act2com* παράσιτα. *act2(-)* συμβολίζει τα *act2::mcherry* παράσιτα. n.s.(non-significant) συμβολίζει την απουσία στατιστικά σημαντικής διαφοράς, *** σημαίνει P=0.0001 και * σημαίνει P=0.05 (Student's t-test).

Ωστόσο, θα μπορούσε κανείς να πει ότι τα παραπάνω αποτελέσματα μπορεί να οφείλονται στο γεγονός ότι η ακτίνη 1 δεν παράγεται στα ίδια επίπεδα με την ακτίνη 2 όταν βρίσκεται στον γονιδιακό τόπο *ακτίνη 2*. Όμως, δεν μπορούμε να ελέγξουμε τα

επίπεδα σε πρωτεϊνικό επίπεδο καθώς η ακτίνη 1 παράγεται και από τον δικό της γονιδιακό τόπο και επιπλέον οι δύο πρωτεΐνες βρίσκονται στο ίδιο υποκυτταρικό διαμέρισμα (Deligianni, 2011). Έτσι, ελέγξαμε τα επίπεδα έκφρασης των μεταγράφων με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (reverse transcript-PCR) χρησιμοποιώντας τα ζεύγη εκκινητών που φαίνονται στην εικόνα 3.4A και προετοιμάζοντας cDNA από μολυσμένο αίμα ποντικών είτε με *act2 com* είτε με *act2 rep* παράσιτα (εικόνα 3.4B). Τελικά, τα επίπεδα των μεταγράφων της ακτίνης 1 και της ακτίνης 2 είναι παρόμοια και η γονιδιακή έκφραση που εξαρτάται από τα cis ρυθμιστικά στοιχεία στον γονιδιακό τόπο *ακτίνη 2* είναι τελικά ανεξάρτητη από την ταυτότητα του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης (Open Reading Frame, ORF).

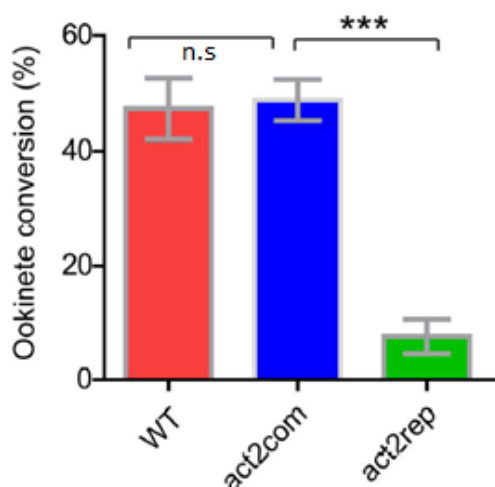


Εικόνα 3.4. Τα μεταγραφικά επίπεδα των γονιδίων *ακτίνη 1* και *ακτίνη 2* από τον γονιδιακό τόπο *ακτίνη 2* είναι παρόμοια. Ο έλεγχος των επιπέδων των μεταγράφων έγινε με RT-PCR σε cDNA από μολυσμένο αίμα με *act2 com* ή *act2 rep* παράσιτα. Α. Με πράσινο συμβολίζονται οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν. Ο εκκινητής A2UF προσδέεται στην 5'FR του γονιδίου *ακτίνη 2* και είναι κοινός και για τα δύο μετάγραφα, ενώ οι εκκινητές A2R1 και A1R2 είναι ειδικοί για το ORF του γονιδίου *ακτίνη 2* και *ακτίνη 1* αντίστοιχα. Β. Τα δύο μετάγραφα έχουν παρόμοια επίπεδα, όπως προκύπτει από την μέτρηση των εντάσεων των ζωνών και την κανονικοποίηση των δύο δειγμάτων cDNA με εκκινητές ειδικούς για το μετάγραφο του γονιδίου *Pbamap2* (PBANKA_093370). Επιπλέον, έγινε κανονικοποίηση των εκκινητών χρησιμοποιώντας γενωμικό DNA από WT και *act2rep* παράσιτα.

Η αντικατάσταση της ακτίνης 2 με την ακτίνη 1 οδηγεί στον σχηματισμό λιγότερων ωοκινετών

Το γεγονός ότι έστω και ελάχιστα *act2 rep* παράσιτα καταφέρνουν να ολοκληρώσουν την γαμετογένεση μας προσέφερε το πλεονέκτημα να ελέγξουμε και τα

επόμενα αναπτυξιακά στάδια του παρασίτου στο κουνούπι απουσία της ακτίνης 2, δεδομένου ότι στα *act2-::mcherry* παράσιτα που απουσιάζει η ακτίνη 2 ο κύκλος ζωής σταματάει στο στάδιο της γαμετογένεσης. Έτσι για να δούμε εάν τα παράσιτα μπορούν να σχηματίσουν ζυγωτό και κατ' επέκταση ωοκινέτες, κάναμε *in vitro* καλλιέργειες ωοκινετών και μετρήθηκε το ποσοστό μετατροπής θηλυκών γαμετών σε ωοκινέτες (εικόνα 3.5). Χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα για την πρωτεΐνη Pbs21, η οποία βρίσκεται στην επιφάνεια των ωοκινετών, των θηλυκών γαμετών και των ζυγωτών. Να σημειωθεί ότι δεν γίνεται κάθε φορά γονιμοποίηση όλων των θηλυκών γαμετών και κατ' επέκταση δημιουργία ζυγωτού, αλλά και ούτε όλα τα ζυγωτά μετασχηματίζονται σε ωοκινέτες. Συνήθως το ποσοστό μετατροπής των αρχικών θηλυκών γαμετών σε ωοκινέτες κυμαίνεται γύρω στο 50% σε αγρίου τύπου παράσιτα.



Εικόνα 3.5. Αρκετά λιγότεροι ωοκινέτες σχηματίζονται από την αντικατάσταση της ακτίνης 2 με την ακτίνη 1. Η έκφραση της ακτίνης 1 από τον γονιδιακό τόπο *ακτίνη 2* έχει σαν αποτέλεσμα να σχηματίζονται αρκετά λιγότεροι ωοκινέτες. Το ποσοστό μετατροπής των θηλυκών/ζυγωτών σε ωοκινέτες (ookinete conversion%) στα *act2 rep* παράσιτα είναι στατιστικά σημαντικά πιο μικρό σε σχέση με τα *act2 com* παράσιτα, τα οποία δεν παρουσιάζουν καμία διαφορά με τα WT παράσιτα. n.s.(non-significant) συμβολίζει την απουσία στατιστικά σημαντικής διαφοράς, *** σημαίνει P=0.0001 (Student's t-test).

Το ποσοστό μετατροπής στα *act2 com* παράσιτα ήταν σε όλες τις επαναλήψεις των πειραμάτων όμοιο με το ποσοστό των αγρίου τύπου παρασίτων, χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνει για ακόμη μια φορά την ορθότητα της στρατηγικής που ακολουθήθηκε για τον γενετικό μετασχηματισμό των

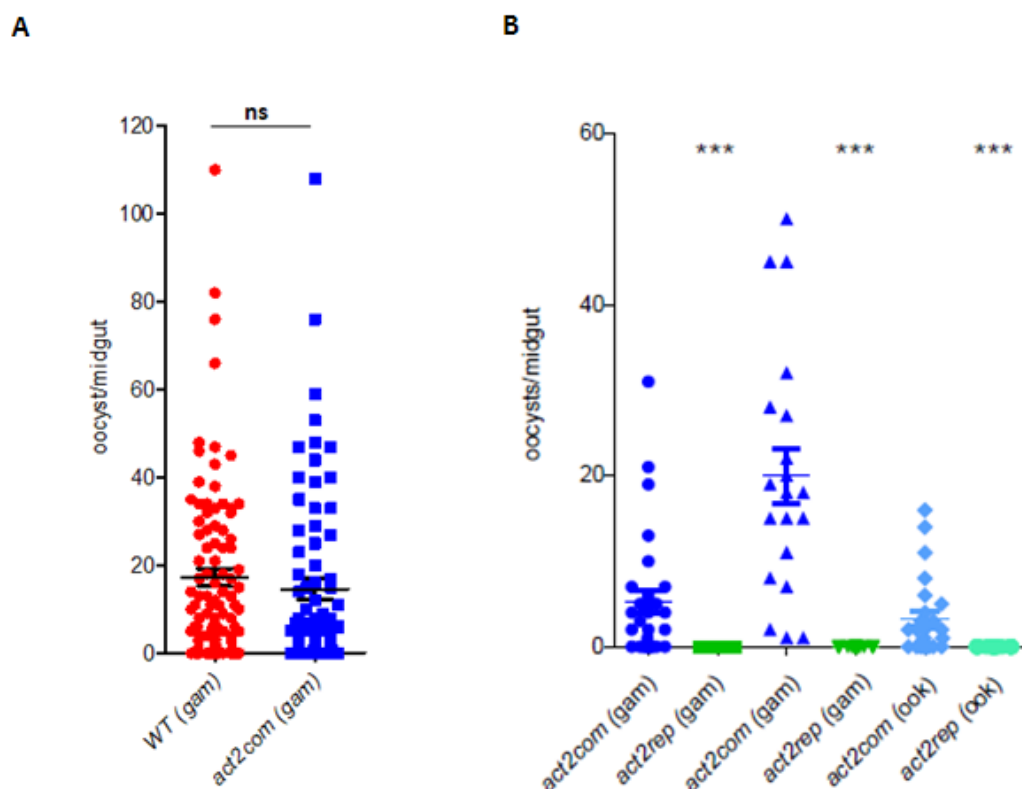
act2-::mcherry παρασίτων σε *act2 com* και *act2 rep* παράσιτα. Αντίθετα, στην περίπτωση των *act2 rep* παρασίτων ο ρυθμός μετατροπής θηλυκών γαμετών σε ωοκινέτες ήταν περισσότερο από έξι φορές μικρότερος σε σχέση με τα *act2 com* παράσιτα. Η διαφορά αυτή είναι στατιστικά σημαντική. Όμως αξίζει να σημειωθεί ότι σε κάθε επανάληψη του πειράματος καταφέραμε να ανιχνεύσουμε ωοκινέτες, έστω και αν αυτοί ήταν λίγοι σε αριθμό. Τα παραπάνω αποτελέσματα μας δείχνουν ότι η ακτίνη 1 μπορεί μόνο μερικώς να αντικαταστήσει τις σημαντικές λειτουργίες της ακτίνης 2 κατά την γαμετογένεση των αρσενικών, όταν το γονίδιο ακτίνη 1 βρίσκεται στον γονιδιακό τόπο ακτίνη 2 και η έκφρασή του ρυθμίζεται από τα *cis* ρυθμιστικά στοιχεία του γονιδίου ακτίνη 2. Το γεγονός ότι στην περίπτωση του *act2 rep* έχουμε τον σχηματισμό έστω και λίγων ωοκινετών μας επιτρέπει να μελετήσουμε τον ρόλο που έχει η ακτίνη 2 και στα επόμενα στάδια του κύκλου ζωής στο κουνούπι.

Η αντικατάσταση της ακτίνης 2 από την ακτίνη 1 μπλοκάρει την μετάδοση του παρασίτου μέσω των κουνουπιών

Το γεγονός ότι τα *act2 rep* παράσιτα σχηματίζουν ωοκινέτες επέτρεψε την μελέτη του ρόλου της ακτίνης 2 και στα υπόλοιπα παρασιτικά στάδια στο κουνούπι. Για να δούμε εάν οι ωοκινέτες έχουν την δυνατότητα να μετατραπούν σε ωοκύστες, *A.gambiae* κουνούπια τάσθηκαν με μολυσμένα ποντίκια από τα *act2 com* ή από τα *act2 rep* παράσιτα. Πραγματοποιήθηκαν δύο ανεξάρτητα πειράματα. 12 μέρες μετά το τάισμα αφαιρείται το έντερο των κουνουπιών και γίνεται έλεγχος για την ύπαρξη ώριμων ωοκυστών, οι οποίες στα αγρίου τύπου παράσιτα είναι ορατές με το οπτικό μικροσκόπιο. Στην περίπτωση του *act2 com* ανιχνεύθηκαν ωοκύστες με αριθμό που δεν εμφανίζει καμία στατιστικά σημαντική διαφορά με τον αριθμό των αγρίου τύπου ωοκυστών ανά κουνούπι (εικόνα 3.6A). Ωστόσο στην περίπτωση του *actin2 rep* δεν ανιχνεύτηκε καμία ωοκύστη (εικόνα 3.6B).

Για να αποκλείσουμε την πιθανότητα ότι αυτό το αποτέλεσμα οφείλεται στον μικρό αριθμό ωοκινετών που σχηματίζονται στο *act2 rep*, έγινε τάισμα των κουνουπιών με ωοκινέτες μέσω μεμβρανών (λεπτομέρειες στο κεφάλαιο Υλικά και

Μέθοδοι). Έτσι, έγινε καλλιέργεια *act2 rep* ωοκινετών από το αίμα δύο ποντικιών για να ενισχύσουμε τον μικρό αριθμό ωοκινετών που δίνουν τα *act2 rep* παράσιτα. Συνολικά πήραμε 285 χιλιάδες ωοκινέτες, ενώ η καλλιέργεια από ένα ποντίκι για το *act2 com* έδωσε πάνω από 5 εκατομμύρια ωοκινέτες. Για να αποκλείσουμε το παραπάνω ενδεχόμενο, τα κουνούπια ταΐστηκαν με τον ίδιο αριθμό ωοκινετών από *act2 rep* και *act2 com* παράσιτα (285.000 ωοκινέτες). Το αποτέλεσμα είναι το ίδιο με τα προηγούμενα πειράματα. Ωοκύστες βρέθηκαν μόνο στην περίπτωση των *act2 com* παρασίτων, ενώ καμία ωοκύστη δεν βρέθηκε στα κουνούπια που ταΐστηκαν με *act2 rep* ωοκινέτες (εικόνα 3.6B). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι οι *act2 rep* ωοκινέτες δεν μπορούν να συνεχίσουν τον κύκλο ζωής του παρασίτου στο κουνούπι.

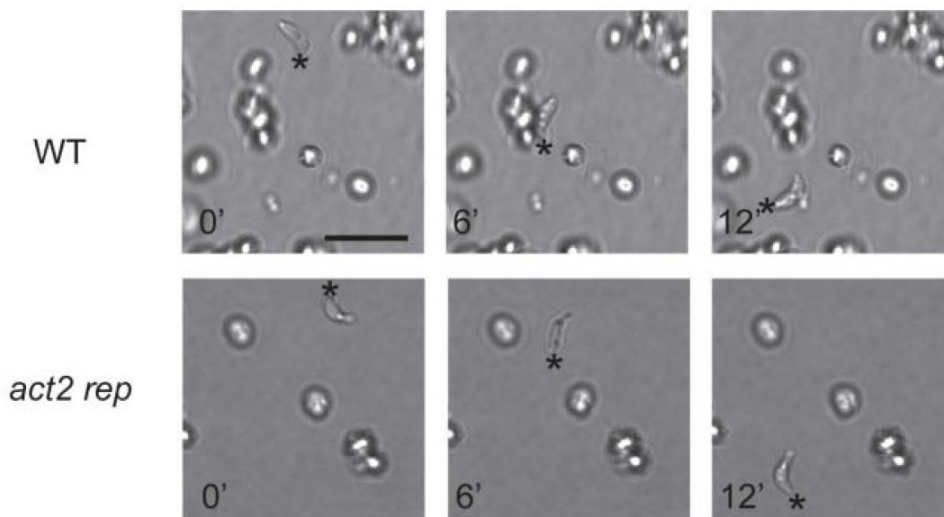


Εικόνα 3.6. Δεν ανιχνεύονται ωοκύστες από την αντικατάσταση της ακτίνης 2 με την ακτίνη 1. Α. Όταν κουνούπια *A.gambiae* ταΐστηκαν με μολυσμένα ποντίκια από αγρίου τύπου (WT (gam)), κόκκινο χρώμα) και *act2 com* (*act2com* (gam)), μπλε σκούρο χρώμα) παράσιτα, ωοκύστες σχηματίζονται και ο αριθμός ωοκυστών ανά έντερο κουνουπιού (oocysts/midgut) είναι παρόμοιος. Ο έλεγχος για ωοκύστες έγινε 12 μέρες μετά το τάισμα και έγιναν τρία ανεξάρτητα πειράματα. Β. Όταν κουνούπια *A.gambiae* ταΐστηκαν με μολυσμένα ποντίκια από *act2 rep* παράσιτα (*act2rep* (gam), πράσινο σκούρο χρώμα), δεν ανιχνεύτηκε καμία ωοκύστη. Ο έλεγχος για ωοκύστες έγινε 12 μέρες μετά το τάισμα και έγιναν δύο

ανεξάρτητα πειράματα. Σε ένα τρίτο ανεξάρτητο πείραμα κουνούπια ταΐστηκαν απευθείας με ίδιο αριθμό ωοκινετών από καλλιέργεια είτε *act2 com* (*act2com* (ook), ανοιχτό μπλέ χρώμα) είτε *act2 rep* (*act2rep*(ook), ανοιχτό πράσινο χρώμα) παρασίτων, αλλά και σε αυτήν την περίπτωση δεν ανιχνεύθηκαν ωοκύστες για το *act2 rep*. Ο έλεγχος για ωοκύστες έγινε 11 μέρες μετά το τάισμα. n.s (non-significant) συμβολίζει την απουσία στατιστικά σημαντικής διαφοράς, *** σημαίνει $P < 0.0001$.

Με την αντικατάσταση της ακτίνης 2 με την ακτίνη 1 σχηματίζονται ωοκύστες αλλά δεν αναπτύσσονται

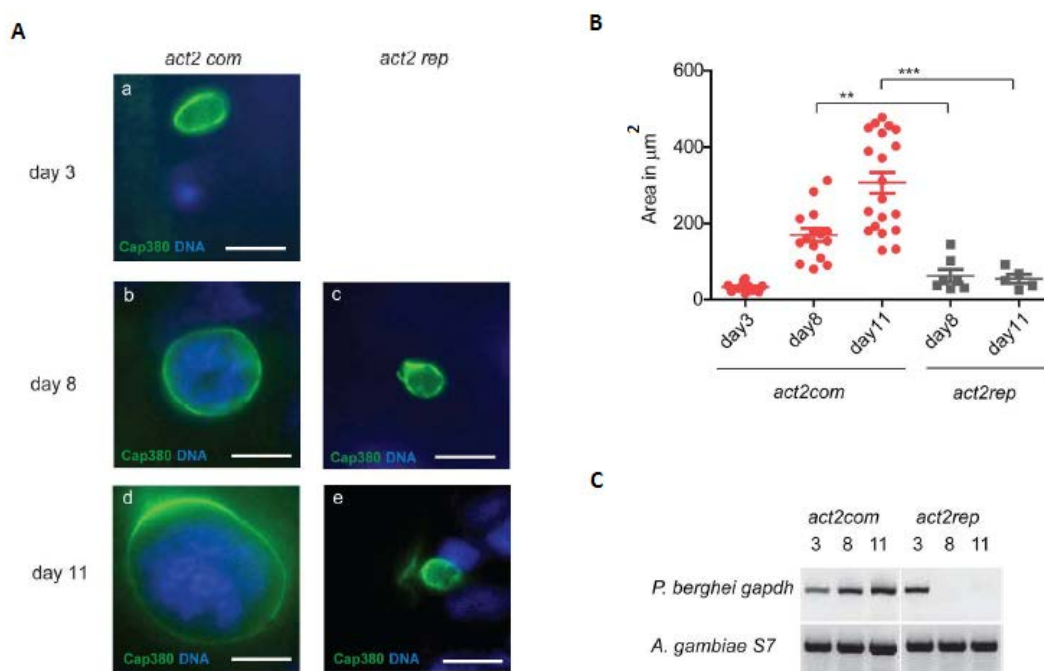
Η αποτυχία του να ανιχνεύσουμε ωοκύστες σε αυτά τα πειράματα μπορεί να οφείλεται είτε στην ανικανότητα των ωοκινετών να διαπεράσουν το επιθήλιο του εντέρου του κουνουπιού είτε σε παύση της ανάπτυξης των ωοκυστών. Είναι γνωστό ότι η κινητικότητα των ωοκινετών είναι απαραίτητη για να διαπεράσουν το επιθήλιο (Dessens, 1999, Vlachou, 2004, Siden-Kiamos, 2006). Για να αποκλείσουμε το ενδεχόμενο οι *act2 rep* ωοκινέτες να έχουν πρόβλημα κινητικότητας, κάναμε έλεγχο της κινητικότητάς τους χρησιμοποιώντας ένα ζελατινώδες πρωτεϊνικό μείγμα (matrigel™). Έτσι ελέγξαμε την κινητικότητα των *act2 rep* ωοκινετών σε σχέση με αγρίου τύπου ωοκινέτες, αλλά δεν βρέθηκε κάποια διαφορά, καθώς οι *act2 rep* ωοκινέτες κινούνται φυσιολογικά (εικόνα 3.7). Ο μέσος όρος ταχύτητας των *act2 rep* ωοκινετών υπολογίστηκε στα 5.7 μικρόμετρα ανά λεπτό και η μέση ταχύτητα των αγρίου τύπου ωοκινετών είναι 6 μικρόμετρα ανά λεπτό. Συνεπώς οι ωοκινέτες αυτοί πιθανώς έχουν την δυνατότητα να διαπεράσουν το επιθήλιο του εντέρου του κουνουπιού, δεδομένο που αποκλείει την πρώτη υπόθεση.



Εικόνα 3.7. Οι *act2 rep* ωοκινέτες δεν έχουν χάσει την ικανότητα κίνησης. *In vitro* σύγκριση της κινητικότητας των *act2 rep* ωοκινετών με WT ωοκινέτες. Απομονωμένοι ωοκινέτες από *in vitro* καλλιέργεια τοποθετούνται σε Matrigel™ και η κινητικότητα καταγράφεται με κάμερα σε οπτικό μικροσκόπιο. Στην εικόνα φαίνονται στιγμιότυπα των ωοκινετών στα 0, 6, 12, λεπτά. Ο αστερίσκος δείχνει το εμπρόσθιο τμήμα του ωοκινέτη. Κλίμακα 20μm.

Για να ανιχνεύσουμε ακόμα και μικρές ωοκύστες χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα για μια πρωτεΐνη στην κάψουλα των ωοκυστών Cap380 (Srinivasan, 2008) και επιπλέον έγινε χρώση του DNA. Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε τρεις, οχτώ και έντεκα μέρες μετά το τάισμα των κουνουπιών είτε με *act2 rep* είτε με *act2 com* παράσιτα. Οι *act2 com* ωοκύστες αναπτύσσονται φυσιολογικά σε μέγεθος και με περιεκτικότητα DNA. Ακόμη και τρεις μέρες μετά το τάισμα των κουνουπιών, βλέπουμε ωοκύστες στην περίπτωση του *act2 com*, αλλά όχι στην περίπτωση του *act2 rep*. Αυτό ίσως να οφείλεται στον πολύ μικρό αριθμό ωοκυστών που αναπτύσσονται γενικά στο *act2 rep* όπως φαίνεται στην συνέχεια (εικόνα 3.8Aa). Οχτώ μέρες μετά το τάισμα, μόνο επτά *act2 rep* ωοκύστες ανιχνεύονται σε έντεκα κουνούπια. Όλες ήταν μικρότερες σε μέγεθος από τις αντίστοιχες ωοκύστες του *act2 com* στις οχτώ μέρες και δεν περιείχαν DNA σε αντίθεση με τις *act2 com* ωοκύστες (εικόνα 3.8Ab,c). Ακόμη και έντεκα ημέρες μετά το τάισμα των κουνουπιών, λιγότερες ωοκύστες ανιχνεύονται για το *act2 rep* (πέντε ωοκύστες σε είκοσι κουνούπια). Οι *act2 rep* ωοκύστες φαίνονται ακόμη πιο μικρές σε μέγεθος από τις *act2 com* ωοκύστες και δεν περιέχουν DNA σε αντίθεση με τις *act2 com* ωοκύστες (εικόνα 3.8A d,e). Για να ποσοτικοποιήσουμε την διαφορά στο μέγεθος των ωοκυστών, μετρήσαμε και συγκρίναμε την επιφάνειά τους

(εικόνα 3.8B). Τα αποτελέσματα φαίνονται στην εικόνα 3.7B. Οι *act2 com* ωοκύστες αυξάνονται σε μέγεθος με το πέρασμα των ημερών. Αντίθετα οι *act2 rep* ωοκύστες παραμένουν μικρές με μέγεθος παρόμοιο με το μέγεθος των *act2 com* ωοκυστών τρεις μέρες μετά το τάισμα. Επιπλέον, η προφανής έλλειψη DNA στις *act2 rep* ωοκύστες επιβεβαιώθηκε και με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Απομονώθηκε γενωμικό DNA από τα έντερα των μολυσμένων κουνουπιών στις τρεις, οχτώ και έντεκα μέρες μετά το τάισμα και χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές αποκλειστικά για παρασιτικό DNA (*P.berghei gapdh*) (εικόνα 3.8C).



Εικόνα 3.8. Τα *act2 rep* παράσιτα σχηματίζουν μη φυσιολογικές ωοκύστες. Α. Οι ωοκύστες από *act2 com* (a,b,d) και οι ωοκύστες από *act2 rep* παράσιτα (c,e) σημαίνονται με το αντίσωμα για την κάψουλα των ωοκυστών Cap380 (πράσινο) και γίνεται χρώση του DNA με Hoechst (μπλε). Στις 3 μέρες μετά το τάισμα κουνουπιών, ανιχνεύονται ωοκύστες μόνο για το *act2 com* (a). Σε 8 μέρες (c) και 11 μέρες (e) ανιχνεύονται *act2 rep* ωοκύστες, αλλά αυτές παραμένουν μικρές και δεν είναι ορατό το DNA, σε αντίθεση με τις *act2 com* ωοκύστες (b,d), οι οποίες μεγαλώνουν σε μέγεθος και το DNA πολλαπλασιάζεται. Κλίμακα 10µm. Β. Το εμβαδό των ωοκυστών (area in µm²) υπολογίζεται στις 3, στις 8 και τις 11 μέρες για τα *act2 com* (κόκκινο) και τα *act2 rep* (γκρι) παράσιτα. Οι *act2 rep* ωοκύστες δεν μεγαλώνουν σε μέγεθος πέρα από τις 3 μέρες. ** σημαίνει P<0.005, ***σημαίνει P<0.001 (Student's t-test). C. Το DNA των *act2 rep* χάνεται. Γονοτυπικός έλεγχος των κουνουπιών που τάιστηκαν με *act2 com* και *act2 rep* παράσιτα. Γενωμικό DNA απομονώθηκε από τα έντερα των μολυσμένων κουνουπιών και ο γονοτυπικός έλεγχος έγινε με PCR χρησιμοποιώντας εκκινητές ειδικούς για το παράσιτο

(*P.berghei gapdh*) και ειδικούς για το κουνούπι, ως δείγμα ελέγχου (*A.gambie S7*). Το DNA απομονώθηκε από κουνούπια 3, 8 και 11 μέρες μετά το τσίγμα.

Τέλος, για να ελεγχθεί η δυνατότητα μετάδοσης, μολυσμένα κουνούπια είτε με *act2 com* είτε με *act2 rep* παράσιτα ταΐστηκαν με υγιή ποντίκια. Όπως ήταν αναμενόμενο, μονό στην περίπτωση του *act2 com* τα κουνούπια εμφάνισαν παρασιταϊμία 5 μέρες μετά. Αντίθετα στην περίπτωση του *act2 rep*, δεν εμφανίστηκαν ποτέ παράσιτα.

Στο σύνολό τους, τα αποτελέσματα αυτά μας δείχνουν ότι οι λειτουργίες της ακτίνης 1 και την ακτίνης 2 στα παρασιτικά στάδια μέσα στο κουνούπι είναι διαφορετικές. Επιπλέον αποδεικνύεται ότι η ακτίνη 2 έχει δύο ξεχωριστές, ανεξάρτητες και ζωτικής σημασίας για το παράσιτο λειτουργίες. Η πρώτη αφορά τον ρόλο της στην γαμετογένεση των αρσενικών και η δεύτερη έχει να κάνει με έναν δεύτερο ρόλο στην ανάπτυξη των ωοκυστών.

3.3 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το πιο σημαντικό αποτέλεσμα που προέκυψε από τα πειράματα αυτής της μελέτης είναι η **ταυτοποίηση του δευτέρου ρόλου που έχει η ακτίνη 2 στην ανάπτυξη των ωοκυστών**. Προηγούμενες μελέτες από το εργαστήριό μας έχουν δείξει ότι η καταστροφή του γονιδίου της ακτίνης 2 στα *P.berghei* παράσιτα οδηγεί στην διακοπή της γαμετογένεσης στα αρσενικά γαμετοκύτταρα ενώ τα θηλυκά δεν αντιμετωπίζουν κάποιο πρόβλημα (Deligianni, 2011). Το αποτέλεσμα αυτό μας αποκαλύπτει τον σημαντικό ρόλο που έχει η ακτίνη 2 στο στάδιο της γαμετογένεσης. Αυτός όμως ο φαινότυπος αποτέλεσε τροχοπέδη για την ανάλυση της ακτίνης 2 και στα επόμενα αναπτυξιακά στάδια, καθώς ο κύκλος ζωής σταματάει εδώ. Στην παρούσα μελέτη ακολουθήσαμε μια στρατηγική που βοήθησε στην περαιτέρω ανάλυση της λειτουργίας της ακτίνης 2, ξεπερνώντας το εμπόδιο που δημιουργήθηκε με την παύση της γαμετογένεσης, απουσία της ακτίνης 2 από τα παράσιτα. **Αντικαθιστώντας το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου ακτίνη 2 με το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου ακτίνη 1 αποδεικνύεται ότι οι δύο ισομορφές ακτίνης έχουν ξεχωριστές λειτουργίες μέσα στο κύτταρο**. Στα πειράματα αυτά, το γονίδιο *ακτίνη 1* βρίσκεται στον γονιδιακό τόπο *ακτίνη 2*, δηλαδή βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο των ρυθμιστικών στοιχείων έκφρασης του γονιδίου *ακτίνη 2*. **Ο έλεγχος της έκφρασης σε επίπεδο μεταγράφων δείχνει ότι η γονιδιακή έκφραση που εξαρτάται από τα *cis* ρυθμιστικά στοιχεία στον γονιδιακό τόπο *ακτίνη 2* είναι τελικά ανεξάρτητη από την ταυτότητα του ORF**.

Η αντικατάσταση του γονιδίου *ακτίνη 2* με το γονίδιο *ακτίνη 1* έγινε σε παράσιτα όπου αρχικά το γονίδιο *ακτίνη 2* έχει αφαιρεθεί. Δεδομένου ότι η απουσία του γονιδίου *ακτίνη 2* έχει ως επακόλουθο την παύση της γαμετογένεσης των αρσενικών παρασίτων, τα παράσιτα όπου το γονίδιο *ακτίνη 1* βρίσκεται στον γονιδιακό τόπο *ακτίνη 2* ελέγχθηκαν για το αν μπορούν να ολοκληρώσουν την γαμετογένεση. Τελικά, ένας πολύ μικρός αριθμός παρασίτων καταφέρνει να συνεχίσει την εκβολή των αρσενικών γαμετών από το αρχικό γαμετοκύτταρο. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η *ακτίνη 2* έχει ξεχωριστές λειτουργίες, τις οποίες δεν μπορεί να εκπληρώσει η *ακτίνη 1* κατά την διάρκεια της γαμετογένεσης των αρσενικών. Ωστόσο, η ύπαρξη

έστω και ελάχιστων αρσενικών που ολοκληρώνουν την γαμετογένεση, μας έδωσε το πλεονέκτημα να μελετήσουμε και τα επόμενα αναπτυξιακά στάδια στο κουνούπι, απουσία της ακτίνης 2. Είδαμε, λοιπόν, ότι οι αρσενικοί αυτοί γαμέτες έχουν την δυνατότητα να γονιμοποιήσουν τους θηλυκούς γαμέτες. Το ζυγωτό δημιουργείται με την σύντηξη των δύο γαμετών και μετασχηματίζεται σε ωοκινέτη. Αποδείξαμε ότι οι ωοκινέτες αυτοί δεν παρουσιάζουν πρόβλημα στην κινητικότητά τους, μια βασική ιδιότητα για να μπορούν να διαπεράσουν το επιθήλιο του εντέρου των κουνουπιών. Τελικά διαπερνούν το επιθήλιο του εντέρου και εγκαθίστανται εκεί, όπου αναπτύσσονται σε ωοκύστες. Αν και έχουμε την δημιουργία ωοκυστών, αυτές δεν αναπτύσσονται περαιτέρω. Ο αριθμός τους είναι πολύ μικρός, παραμένουν μικρές σε μέγεθος και δεν ανιχνεύεται DNA. Τέλος, τα παράσιτα αυτά δεν μεταδίδονται μέσω των κουνουπιών σε υγιή ποντίκια. Προκύπτει λοιπόν το συμπέρασμα ότι **η ακτίνη 2 έχει έναν δεύτερο κρίσιμο ρόλο στην ανάπτυξη των ωοκυστών, πέρα από τον ρόλο που έχει στην γαμετογένεση των αρσενικών παρασίτων.**

Για να εδραιώσουμε το παραπάνω συμπέρασμα πραγματοποιήθηκαν γενετικές διασταυρώσεις ως μια ανεξάρτητη προσέγγιση. Να σημειωθεί ότι τα συγκεκριμένα πειράματα έγιναν στο εργαστήριό μας από την Δρ. R.Morgan. Αρχικά έγιναν διασταυρώσεις μεταξύ αγρίου τύπου γαμετοκυττάρων και *act2(-)* γαμετοκυττάρων, όπου το γονίδιο *ακτίνη 2* έχει καταστραφεί και μόνον τα θηλυκά είναι γόνιμα. Από αυτές τις διασταυρώσεις προκύπτει ένας μεικτός πληθυσμός από αγρίου τύπου και ετερόζυγους (*actin2-/+*) ωοκινέτες, που αναπτύσσονται σε ωοκύστες, αλλά είναι μόνο αγρίου τύπου. Οι ετερόζυγες ωοκύστες που φέρουν το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο χάνονται τελείως κατά την ανάπτυξη. Αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν από ανεξάρτητες διασταυρώσεις που έγιναν μεταξύ *act2(-)* γαμετοκυττάρων και ενός καλά μελετημένου στελέχους παρασίτων που παράγει μόνο γόνιμα αρσενικά, το *Δp47* (van Dijk, 2010). Μια τέτοια διασταύρωση έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία ενός πληθυσμού ετερόζυγων ωοκινετών (*actin2-/+*) που φέρουν όλοι τον ίδιο γονότυπο. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι σε αυτούς τους ωοκινέτες δεν ανιχνεύεται η πρωτεΐνη ακτίνη 2, το οποίο δείχνει ότι η έκφραση της πρωτεΐνης είναι από το αλληλόμορφο που προέρχεται από το θηλυκό. Όταν αυτοί οι ωοκινέτες ταΐστηκαν σε κουνούπια, σχηματίζονται ωοκύστες αρχικά. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνει ότι η

ακτίνη 2 δεν έχει κάποιο σημαντικό ρόλο στην κινητικότητα των ωοκινετών και στην ικανότητά τους να διαπεράσουν το επιθήλιο του εντέρου. Ωστόσο, αν και αυτές οι ωοκύστες σχηματίζονται, παραμένουν μικρές σε μέγεθος και δεν περιέχουν DNA. Τα αποτελέσματα αυτά μας θυμίζουν τα αποτελέσματα από την μελέτη των *act2 rep* παρασίτων όπου το γονίδιο *ακτίνη 2* αντικαθίσταται από το γονίδιο *ακτίνη 1*. Λαμβάνοντας υπόψιν τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τους δύο διαφορετικούς τρόπους προσέγγισης, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η απουσία της ακτίνης 2 οδηγεί στην παύση της ανάπτυξης των ωοκυστών σε πρώιμη ακόμη φάση, κάτι που ίσως τελικά να οφείλεται στην αδυναμία πολλαπλασιασμού του DNA.

Τα παραπάνω πειράματα μας αποκαλύπτουν δύο πτυχές της λειτουργίας της ακτίνης 2. Βλέπουμε ότι η λειτουργία της ακτίνης 2 στην γαμετογένεση των αρσενικών παρασίτων, μπορεί εν μέρει μόνο να αντικατασταθεί από την λειτουργία της ακτίνης 1, όταν αυτή εκφράζεται κάτω από τον έλεγχο των ρυθμιστικών στοιχείων στον γονιδιακό τόπο *ακτίνη 2*. Στα αγρίου τύπου παράσιτα, η ακτίνη 1 και η ακτίνη 2 εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα των αρσενικών γαμετοκυττάρων (Deligianni, 2011). Όμως, στα *act2(-)* παράσιτα όπου έχει καταστραφεί το γονίδιο *ακτίνη 2*, η ενδογενής ακτίνη 1 που παράγεται από τον δικό της γονιδιακό τόπο, είναι παρ' όλα αυτά ανίκανη να επαναφέρει την γαμετογένεση. Αυτό μας δείχνει, πρώτον, ότι η ακτίνη 2 έχει μια πολύ συγκεκριμένη λειτουργία, στον συγκεκριμένο χρόνο και στο υποκυτταρικό διαμέρισμα ή σε μια πολύ καθορισμένη συγκέντρωση και ότι η σωστή ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης είναι σημαντική για την πρωτεΐνη ώστε αυτή να εκτελέσει την ιδιαίτερη λειτουργία της. Μια παρόμοια απαίτηση για την σωστή ρύθμιση της μεταγραφής γονιδίων του παρασίτου, ούτως ώστε να επιτυγχάνεται η σωστή διακίνηση των πρωτεϊνικών προϊόντων τους έχει καταγραφεί για πολλά και σημαντικά γονίδια των παρασίτων. Τέτοια γονίδια είναι για παράδειγμα τα γονίδια που κωδικοποιούν τις παρακάτω πρωτεΐνες: apical membrane antigen-1 (AMA-1) (Kocken, 1998), ring-infected erythrocyte surface antigen (RESA) (Rug, 2004), και subtilisin 2 (SUB2) (Child, 2013). Η δεύτερη λειτουργία της ακτίνης 2 βρίσκεται σε ένα από τα στάδια των παρασίτων στο κουνούπι. Απουσία της ακτίνης 2, η ανάπτυξη των ωοκυστών σταματάει σε πρώιμο στάδιο. Όμως, αυτή η λειτουργία της ακτίνης 2 δεν μπορεί να

αντικατασταθεί από την ακτίνη 1, ακόμη και όταν αυτή εκφράζεται από τον γονιδιακό τόπο ακτίνη 2.

Στο *P.berghei* έχουν γίνει πολλά μεταλλάγματα που παρουσιάζουν πρόβλημα στην ανάπτυξη των ωοκυστών και διακοπή του κύκλου στο στάδιο αυτό, όπως και στην παρούσα μελέτη. Αρκετά ενδιαφέρον είναι ένα μετάλλαγμα παρασίτων στο οποίο έχει γίνει απαλοιφή του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη C-CAP (Hiscs, 2010). Αυτά τα μεταλλαγμένα παράσιτα εμφανίζουν έναν φαινότυπο που μοιάζει με τον φαινότυπο που παρουσιάζουν τα *actin2 rep* παράσιτα. Οι πρωτεΐνες C-CAP έχουν ομολογία με την επικράτεια στο καρβοξυτελικό άκρο των CAP (Cyclase Associated Proteins) πρωτεϊνών που έχει την ιδιότητα πρόσδεσης σε ακτίνη. Οι πρωτεΐνες αυτές προσδένουν τα μονομερή ακτίνης εμποδίζοντας με αυτόν τον τρόπο τον πολυμερισμό τους. Στα μεταλλαγμένα παράσιτα, όπου έχει γίνει απαλοιφή του γονιδίου για την πρωτεΐνη C-CAP, τα παράσιτα δεν παρουσιάζουν κάποιο πρόβλημα στα στάδια του κύκλου ζωής στην ερυθροκυτταρική φάση. Όμως, στα κουνούπια παρατηρήθηκαν μικρές και εκφυλισμένες ωοκύστες, ανίκανες να δημιουργήσουν σποροζωΐδια και ως εκ τούτου να συνεχιστεί η μετάδοση. Θα μπορούσε κανείς να υποθέσει ότι τελικά ο ρόλος της ακτίνης 2 σε αυτήν την φάση εξαρτάται από την λειτουργία της C-CAP πρωτεΐνης. Όμως, δεν υπάρχουν ακόμη πειραματικά δεδομένα που να υποστηρίζουν μια τέτοια υπόθεση.

Ένα αρκετά ενδιαφέρον ερώτημα που παραμένει ακόμη ανοιχτό είναι εάν η ακτίνη 2 σχηματίζει ινίδια σε αυτά τα κύτταρα. Γνωρίζουμε ότι η ακτίνη 2 σχηματίζει ινίδια *in vitro* (Skillman, 2011), αλλά δεν υπάρχουν μέχρι στιγμής ενδείξεις για την δημιουργία ινιδίων *in vivo*. Ούτε γνωρίζουμε κατά πόσο θα ήταν απαραίτητα στα στάδια του κύκλου ζωής που η ακτίνη 2 παίζει κρίσιμο ρόλο. Το ερώτημα αυτό προσπαθούμε να προσεγγίσουμε στην επόμενη ενότητα της παρούσας μελέτης, με την εισαγωγή συγκεκριμένων μεταλλάξεων που έχουν να κάνουν με τον σχηματισμό των ινιδίων.

Πολλές φορές για την έρευνα της λειτουργίας ενός γονιδίου κατασκευάζουμε μεταλλάγματα και ερχόμαστε αντιμέτωποι με έναν φαινότυπο που μας εμποδίζει να προχωρήσουμε την μελέτη και στα επόμενα στάδια. **Η παρούσα μελέτη αποτελεί ένα**

παράδειγμα που μας δείχνει ότι μια κλασσική στρατηγική γενετικής μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να αποκαλύψουμε μια δεύτερη σημαντική λειτουργία ενός γονιδίου που εκδηλώνεται σε επόμενα αναπτυξιακά στάδια του κύκλου ζωής. Στα παράσιτα της ελονοσίας, πρόσφατα έχουν βρεθεί εναλλακτικές στρατηγικές, όπως η στοχευμένη απαλοιφή γονιδίων στο στάδιο των σποροζωιδίων (Lacroix, 2011) και η ανταλλαγή υποκινητών (Laurentino, 2011, Siden-Kiamos, 2011). Όμως, η ελεγχόμενη απαλοιφή ή ρύθμιση των γονιδίων περιορίζεται μέχρι και σήμερα σε γονίδια με λειτουργίες αποκλειστικά στο στάδιο των σποροζωιδίων ή των ωοκινετών αντίστοιχα. Σε προηγούμενες μελέτες έχει χρησιμοποιηθεί η μέθοδος των γενετικών διασταυρώσεων, για να διασωθούν τα παράσιτα από ένα ελλατωματικό φαινότυπο, ούτως ώστε να μπορούν να βρεθούν επιπρόσθετες λειτουργίες και στα επόμενα αναπτυξιακά στάδια (Raine, 2007, Ganter, 2009). Η μέθοδος των γενετικών διασταυρώσεων χρησιμοποιήθηκε και για την περίπτωση της ακτίνης 2 από το εργαστήριό μας όπως περιγράφεται παραπάνω. Με παρόμοιο τρόπο, η μέθοδος της γενετικής αντικατάστασης που εφαρμόσαμε στην παρούσα μελέτη για τις ισομορφές ακτίνης δίνει την δυνατότητα να υπερπηδήσουμε το μπλοκάρισμα της ανάπτυξης από την απουσία του γονιδίου και να μελετήσουμε την λειτουργία του και στα επόμενα αναπτυξιακά στάδια. Αν και αυτή η μέθοδος δεν έχει ακόμη δοκιμαστεί ευρέως, ίσως θα μπορούσε να φανεί χρήσιμη για την μελέτη άλλων γονιδίων όπου αντιμετωπίζεται παρόμοιο πρόβλημα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

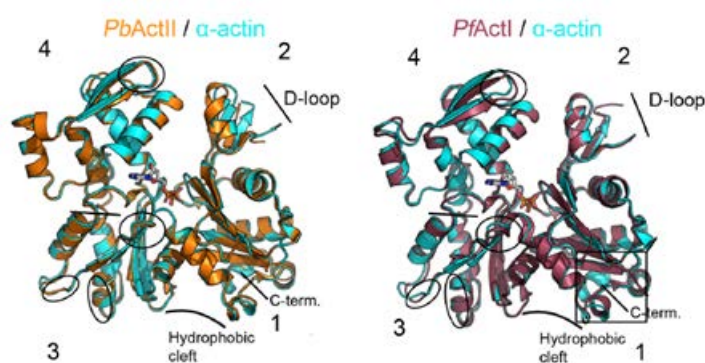
Αντικατάσταση της ακτίνης 2 με χημικώς μεταλλάγματα ακτίνης

4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το γεγονός ότι οι δύο ισομορφές ακτίνης εμφανίζουν διαφορετικές λειτουργίες στο παράσιτο, όπως δείχνει το σύνολο των προηγούμενων πειραμάτων, υποδεικνύει και δομικές διαφορές μεταξύ τους. Σε επίπεδο πρωτεϊνικής αλληλουχίας το ποσοστό ομοιότητας των δύο ισομορφών είναι μικρό σε σχέση με το ποσοστό ομοιότητας που παρουσιάζουν ισομορφές ακτίνης από άλλα είδη οργανισμών, όπως επίσης και το ποσοστό ομοιότητάς τους με τις ακτίνες των ευκαρυωτικών οργανισμών. Ένα κοινό χαρακτηριστικό ανάμεσα σε σχεδόν όλες τις ευκαρυωτικές ακτίνες είναι η ικανότητά τους να σχηματίζουν μακριά ινίδια. Όμως, στα παράσιτα της ελονοσίας, τα ινίδια ακτίνης δεν έχουν άμεσα παρατηρηθεί *in vivo* και επικρατεί η υπόθεση ότι πρόκειται για κοντά και πολύ δυναμικά ινίδια. Ωστόσο, και οι δύο ισομορφές ακτίνης του *Plasmodium* έχουν την δυνατότητα να σχηματίζουν ινίδια ακτίνης *in vitro* (Schmitz, 2005, Schuler, 2005, Skillman, 2011). *In vitro* πειράματα ηλεκτρονικής μικρογραφίας αποκαλύπτουν ότι τα ινίδια ακτίνης που σχηματίζουν οι δύο ισομορφές διαφέρουν κατά πολύ (Vahokoski, 2014). Ενώ η ακτίνη 1 σχηματίζει ασταθή και σχετικά μικρά ινίδια *in vitro*, η ακτίνη 2 σχηματίζει μακριά και σταθερά ινίδια παρόμοια με τα ινίδια F-ακτίνης των ευκαρυωτικών κυττάρων. Πρόσφατα στοιχεία από την λύση της κρυσταλλικής δομής των δύο μονομερών επιβεβαιώνουν την ύπαρξη βασικών δομικών διαφορών (Vahokoski, 2014). Είναι λοιπόν πιθανόν αυτές οι δομικές διαφορές που υπάρχουν στα μονομερή των δύο ισομορφών ακτίνης του παρασίτου να ευθύνονται για τις διαφορές στις ιδιότητες πολυμερισμού των ινιδίων και κατ' επέκταση στις διαφορετικές λειτουργίες που παρουσιάζουν από τα προηγούμενα πειράματα.

Στις ευκαρυωτικές ακτίνες ο D-βρόγχος στην υποεπικράτεια 2 του μονομερούς (DNase I binding (D-) loop) (κατάλοιπα 39-61 στην ακτίνη 1) είναι μια από τις πιο σημαντικές περιοχές για το πολυμερισμό. Κατά τον πολυμερισμό των ινιδίων, ο D-βρόγχος ενός μονομερούς εισάγεται στην υδρόφοβη σχισμή που βρίσκεται μεταξύ των υποεπικρατειών 1 και 3 στο επόμενο μονομερές. Ο D-βρόγχος συμμετέχει στις επαφές μεταξύ των μονομερών κατά τον άξονα του ινιδίου και στις πλευρικές επαφές, οι οποίες είναι κρίσιμες για την σταθερότητα των ινιδίων. Και στις δύο ισομορφές ακτίνης του *Plasmodium*, αμινοξικά κατάλοιπα στον D-βρόγχο που συμμετέχουν στις αξονικές

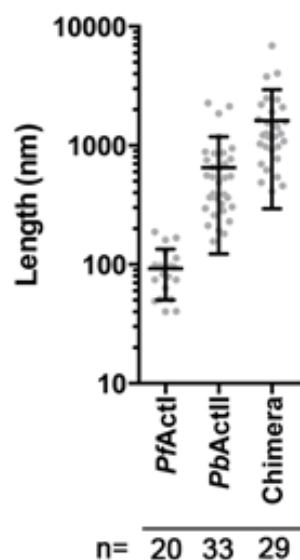
επαφές διαφέρουν το ίδιο από τα αντίστοιχα κατάλοιπα στον D-βρόγχο των ευκαρυωτικών ακτινών. Κατάλοιπα που συμμετέχουν στις πλευρικές επαφές επίσης διαφέρουν από τις ευκαρυωτικές ακτίνες αλλά και μεταξύ των ισομορφών στο *Plasmodium*. Ο D-βρόγχος, και στις δύο ισομορφές, εμφανίζει μια αταξία στις κρυσταλλικές δομές των μονομερών (εικόνα 4.1) και η κορυφή του δεν είναι ορατή στους χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας (Vahokoski, 2014).



Εικόνα 4.1. Σύγκριση κρυσταλλικών δομών των μονομερών της ακτίνης 1 και ακτίνης 2 με την α -ακτίνη. Στην εικόνα παρουσιάζεται η κρυσταλλική δομή του μονομερούς της *PbActII* (ακτίνη 2) και της *PfActI* (ακτίνη 1) σε σχέση με την α -actin (α -ακτίνη) του *O.cuniculis*. Αναγράφονται οι τέσσερις υποεπικράτειες των ακτίνων, το καρβοξυτελικό τμήμα, ο D-βρόγχος (D-loop) στην υποεπικράτεια 2 και η υδρόφοβη περιοχή (hydrophobic cleft) μεταξύ της υποεπικράτειας 1 και 3.

Με βάση τον σημαντικό ρόλο που έχει ο D-βρόγχος για τον πολυμερισμό και τις διαφορές που παρουσιάζονται μεταξύ των ισομορφών, δημιουργήθηκε μια χμιαϊκή μορφή της ακτίνης 1 του *P.berghei* από την συνεργαζόμενη ομάδα του Freddy Frischknecht (Vahokoski, 2014). Η χμιαϊκή ακτίνη 1 του παρασίτου φέρει τον D-βρόγχο της α -ακτίνης του *Oryctolagus cuniculus* αντικαθιστώντας την υποεπικράτεια 2 της ακτίνης 1 με την υποεπικράτεια 2 της α -ακτίνης. Η χμιαϊκή ακτίνη 1 σχηματίζει μακριά ινίδια, μεγαλύτερα από την ακτίνη 1, αλλά και την ακτίνη 2 (εικόνα 4.2). Η συμμετρία των ινιδίων από την χμιαϊκή ακτίνη 1 είναι παρόμοια με την συμμετρία των ινιδίων της αγρίου τύπου ακτίνης 1. Έτσι ο D-βρόγχος της α -ακτίνης παρέχει σταθερότητα στο ινίδιο. Επιπλέον, η κρυσταλλική δομή του μονομερούς της χμιαϊκής ακτίνης 1 έχει σημαντική ομοιότητα με την αγρίου τύπου

ακτίνη 1. Εντούτοις, υπάρχουν αξιοσημείωτες διαφορές, όπως το ότι ο D-βρόγχος δεν παρουσιάζει την αταξία που έχει ο D-βρόγχος στις αγρίου τύπου ακτίνες του παρασίτου.

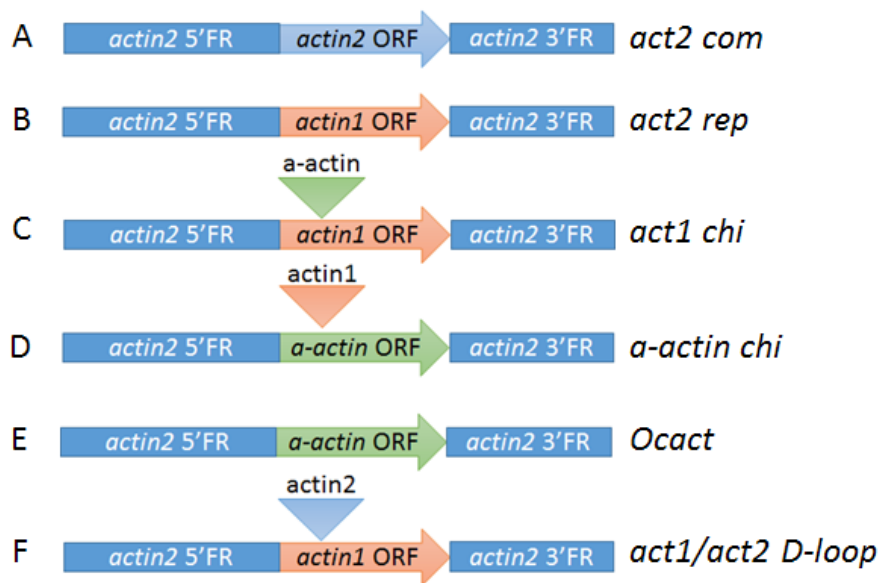


Εικόνα 4.2. Το μήκος των ινιδίων ακτίνης στο *Plasmodium* διαφέρει. Η μέτρηση των ινιδίων ακτίνης έγινε από ηλεκτρονικές μικρογραφίες απουσία παραγόντων σταθεροποίησης. Η ακτίνη 1 σχηματίζει κοντά ινίδια, ενώ η ακτίνη 2 σχηματίζει ινίδια που κυμαίνονται από εκατοντάδες nm μέχρι 1-2mm. Ακόμη μεγαλύτερα ινίδια κατά μέσο όρο σχηματίζει η χιμαιρική ακτίνη 1 όπου ο D-βρόγχος έχει αντικατασταθεί με τον D-βρόγχο από την α -ακτίνη του *O.cuniculus*. Ο Y άξονας είναι σε λογαριθμική κλίμακα.

4.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

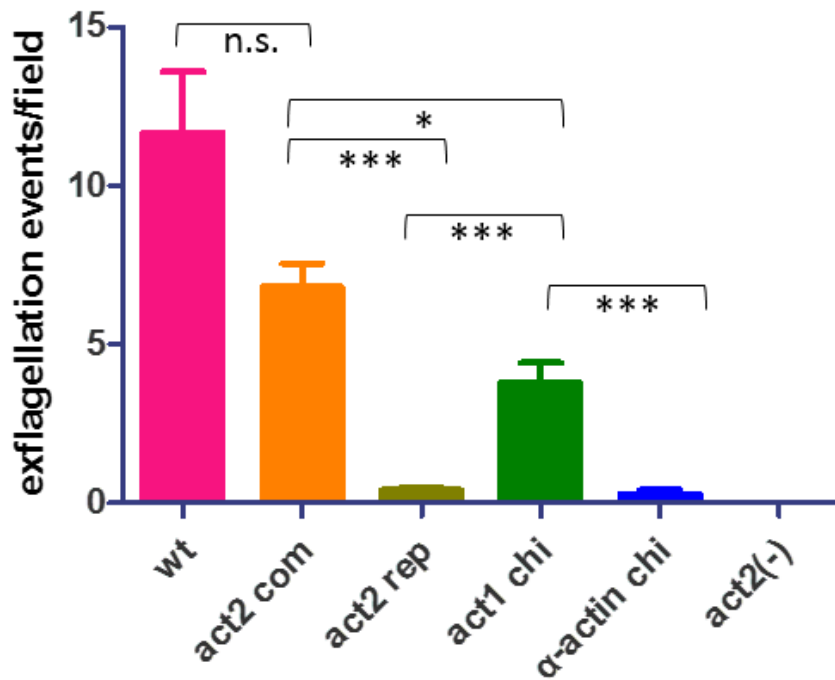
Η χμιαϊρική ακτίνη 1 με τον D-βρόγχο της α-ακτίνης αποκαθιστά την γαμετογένεση

Καθώς έγινε ξεκάθαρο από τους συνεργάτες μας ότι οι ιδιότητες πολυμερισμού της ακτίνης 1 *in vitro* αλλάζουν αντικαθιστώντας τον D-βρόγχο της ακτίνης 1 με τον D-βρόγχο της α-ακτίνης, αποφασίσαμε να μελετήσουμε εάν αυτή η τροποποίηση μπορεί να έχει κάποιο αντίκτυπο και στην λειτουργία της ακτίνης 1 του παρασίτου *in vivo*. Έτσι, δημιουργήσαμε διαγονιδιακά παράσιτα χρησιμοποιώντας την ίδια στρατηγική με αυτή των *act2 com* και *act2 rep* παρασίτων για τον μετασχηματισμό των *act2-::mcherry* παρασίτων. Τα νέα διαγονιδιακά παράσιτα ονομάστηκαν *actin1 chimeric (act1 chi)*. Σε αυτά τα παράσιτα, στον γονιδιακό τόπο ακτίνη 2 τοποθετήθηκε το χμιαϊρικό γονίδιο που κωδικοποιεί την ακτίνη 1 και φέρει τον D-βρόγχο της α-ακτίνης του *O.cuniculus* αντικαθιστώντας την υποεπικράτεια 2 της ακτίνης 1 με την υποεπικράτεια 2 της α-ακτίνης (εικόνα 4.3C). Συμπληρωματικά κατασκευάστηκε και το αντίστροφο μετάλλαγμα διαγονιδιακών παρασίτων *a-actin chimeric (a-act chi)*. Σε αυτήν την περίπτωση στον γονιδιακό τόπο της ακτίνης 2 τοποθετείται το χμιαϊρικό γονίδιο που κωδικοποιεί την α-ακτίνη του *O.cuniculus* και φέρει τον D-βρόγχο της ακτίνης 1 του *P.berghei* αντικαθιστώντας την υποεπικράτεια 2 της α-ακτίνης με την υποεπικράτεια 2 της ακτίνης 1 του παρασίτου (εικόνα 4.3D). Και στην περίπτωση των *act1 chi*, αλλά και στην περίπτωση των *a-act chi* παρασίτων, έγινε κλωνοποίηση με την μέθοδο της διαδοχικής αραίωσης και γονοτυπικός έλεγχος.



Εικόνα 4.3. Σχηματική απεικόνιση νέων μετασηματισμένων παρασίτων για την αντικατάσταση της ακτίνης 2. A,B. Μετασηματισμένα *act2 com* και *act2 rep* παράσιτα που περιγράφονται στο κεφάλαιο 3. C, D, E, F. Μετασηματισμός *act2::mcherry* παρασίτων με νέα μεταλλάγματα για την αντικατάσταση του γονιδίου *ακτίνη 2* στον γονιδιακό τόπο *ακτίνη 2*. Η στρατηγική μετασηματισμού είναι ίδια με αυτήν που ακολουθήσαμε για τα *act2 com* και *act2 rep* (εικόνα 3.2A). C. Χιμαιρικό γονίδιο που κωδικοποιεί την ακτίνη 1 και φέρει τον D-βρόγχο της α-ακτίνης του *O.cuniculus*. D. Χιμαιρικό γονίδιο που κωδικοποιεί την α-ακτίνη με τον D-βρόγχο της ακτίνης 1. E. Γονίδιο που κωδικοποιεί την α-ακτίνη. F. Χιμαιρικό γονίδιο που κωδικοποιεί την ακτίνη 1 με τον D-βρόγχο της ακτίνης 2.

Η αντικατάσταση του D-βρόγχου στην ακτίνη 1 έχει μια αξιοσημείωτη επίδραση στην γαμετογένεση των αρσενικών παρασίτων (εικόνα 4.4). Στα *act1 chi* παράσιτα, ο αριθμός των αρσενικών γαμετοκυττάρων που ολοκληρώνουν την γαμετογένεση είναι μεγαλύτερος, με στατιστικά σημαντική διαφορά, από τα *act2 rep* παράσιτα και πλησιάζει το αριθμό που δίνουν τα *act2 com* παράσιτα. Αντίθετα, στην περίπτωση του *a-act chi*, ελάχιστα αρσενικά παράσιτα καταφέρνουν να ολοκληρώσουν την γαμετογένεση σε επίπεδα παρόμοια με αυτά των *act2 rep* παρασίτων (εικόνα 4.4). Η σύγκριση των δύο χιμαιρικών μεταλλαγμάτων μας δείχνει ότι ο D-βρόγχος της α-ακτίνης είναι ικανός από μόνος του να επαναφέρει την γαμετογένεση (*act1 chi*), ενώ άλλες περιοχές της α-ακτίνης δεν συμβάλλουν σε αυτήν την διαδικασία (*a-act chi*), ή τουλάχιστον ο ρόλος τους δεν είναι τόσο σημαντικός.



Εικόνα 4.4. Η χμαιρική ακτίνη 1 με τον D-βρόγχο από την α -ακτίνη επαναφέρει την γαμετογένεση *in vivo*. Μέτρηση του αριθμού των αρσενικών παρασίτων που ολοκληρώνουν την γαμετογένεση (exflagellation). Στην εικόνα φαίνεται ο μέσος όρος των γεγονότων ανά πεδίο (exflagellation events/field). Ο έλεγχος γίνεται σε πάνω από 20 πεδία σε κάθε δείγμα. Για το τελικό αποτέλεσμα σε κάθε στέλεχος παρασίτων, χρησιμοποιήθηκαν βιολογικά δείγματα από αίμα διαφορετικών μολυσμένων ποντικών. Στα *act1 chi* παράσιτα ο αριθμός των αρσενικών που ολοκληρώνουν την γαμετογένεση είναι μεγαλύτερος από τα *act2 rep* με μεγάλη στατιστικά σημαντική διαφορά. Αντίθετα στα *α -actin chi* ελάχιστα παράσιτα καταφέρνουν να ολοκληρώσουν την γαμετογένεση, όπως και στα *act2 rep*. *act2(-)* συμβολίζει τα *act2::mcherry* παράσιτα. n.s. (non-significant) συμβολίζει την απουσία στατιστικά σημαντικής διαφοράς, *** σημαίνει $P=0.0001$ και * σημαίνει $P=0.05$ (Student's t-test).

Με τον ίδιο τρόπο κατασκευάστηκαν και άλλα δύο διαγονιδιακά παράσιτα. Στην πρώτη περίπτωση (*Ocact* μετάλλαγμα), το αγρίου τύπου γονίδιο α -ακτίνη του *O.cuniculus* τοποθετείται στον γονιδιακό τόπο ακτίνη 2 μετασχηματίζοντας τα παράσιτα (εικόνα 4.3E). Στην δεύτερη περίπτωση (*act1/act2 D-loop* μετάλλαγμα) τοποθετείται το χμαιρικό γονίδιο που κωδικοποιεί την ακτίνη 1 του παρασίτου στο οποίο έχει αντικατασταθεί ο D-βρόγχος με αυτόν της ακτίνης 2 του παρασίτου (εικόνα 4.3F). Μετά την κλωνοποίηση και τον γονοτυπικό έλεγχο επιλέχθηκε ένας θετικός κλώνος σε κάθε περίπτωση για την φαινοτυπική μελέτη. Ωστόσο, ο μετασχηματισμός

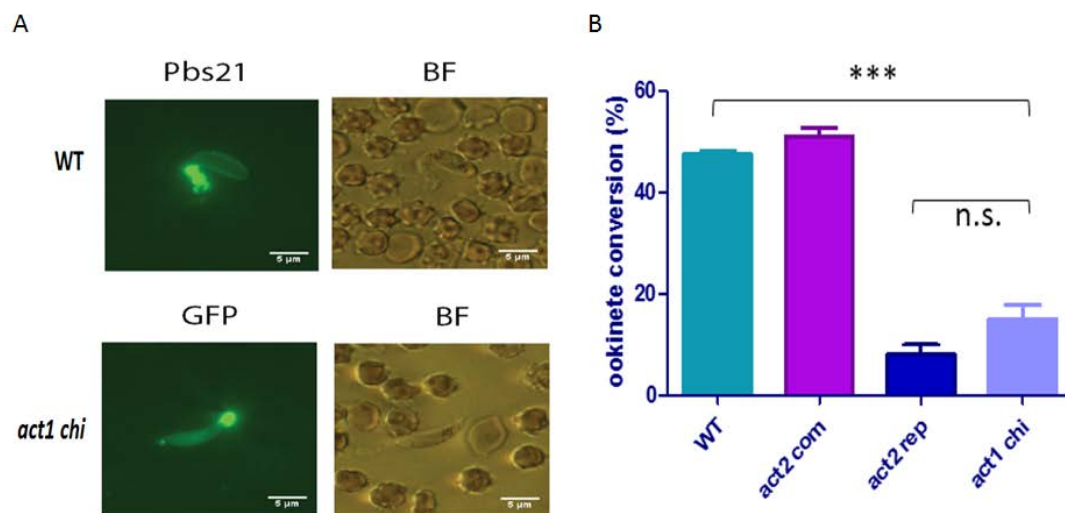
των *act2::mcherry* παρασίτων με αυτές τις αντίστοιχες πλασμιδιακές κατασκευές έγιναν ταυτόχρονα, χρησιμοποιώντας παράσιτα από την ίδια καλλιέργεια, που όμως ήταν ελλείπη σε γαμετοκύτταρα. Αυτό οφείλεται σε τυχαίες μεταλλάξεις (Sinha, 2014). Εφόσον δεν έχουμε γαμετοκύτταρα, δεν μπορούμε να βγάλουμε συμπέρασμα για την γαμετογένεση και έτσι η επανάληψη του μετασχηματισμού των παρασίτων θεωρείται αναγκαία.

Όταν γίνεται αντικατάσταση του D-βρόγχου της ακτίνης 1 με τον D-βρόγχο της α-ακτίνης, σχηματίζονται μακριά ινίδια *in vitro* και *in vivo* αποκαθίσταται η γαμετογένεση των αρσενικών. Επίσης, όπως φαίνεται από τα δεδομένα ανάλυσης της δομής της, η ακτίνη 2 έχει αποκτήσει άλλες ιδιότητες που συμβάλλουν στην σταθερότητα των ινιδίων της. Συνεπώς φαίνεται ότι η μοριακή λειτουργία της ακτίνης 2 ίσως εξαρτάται από την ικανότητα της πρωτεΐνης να σχηματίζει ινίδια. Άρα είναι πιθανόν ο σχηματισμός μακριών ινιδίων από την ακτίνη 2 να είναι απαραίτητος στην διαδικασία της γαμετογένεσης.

Η παρουσία του D-βρόγχου της α-ακτίνης στην ακτίνη 1 δεν επαναφέρει τον φαινότυπο στις ωοκύστες

Το γεγονός ότι τα *act1 chi* παράσιτα επαναφέρουν την γαμετογένεση στα αρσενικά, μας δίνει την δυνατότητα να μελετήσουμε τον φαινότυπο και στα επόμενα αναπτυξιακά στάδια του παρασίτου μέσα στο κουνούπι. Αρχικά έγινε *in vitro* καλλιέργεια ωοκινετών για να δούμε εάν τα *act1 chi* αρσενικά έχουν την ικανότητα να γονιμοποιήσουν τους θηλυκούς γαμέτες. Σχηματίζονται ωοκινέτες, οι οποίοι δεν εμφανίζουν κάποια μορφολογική διαφορά με τους αγρίου τύπου (εικόνα 4.5A). Στην συνέχεια μετρήθηκε το ποσοστό των θηλυκών γαμετών που μετασχηματίζονται σε ωοκινέτες. Βρέθηκε ότι το ποσοστό μετατροπής θηλυκών σε ωοκινέτες στα *act1 chi* παράσιτα είναι μικρότερο από το ποσοστό μετατροπής των αγρίου τύπου παρασίτων, με στατιστικά σημαντική διαφορά. Συγκρίνοντας το αποτέλεσμα αυτό με το ποσοστό μετατροπής των *act2 rep* παρασίτων, βλέπουμε ότι το ποσοστό μετατροπής των *act1*

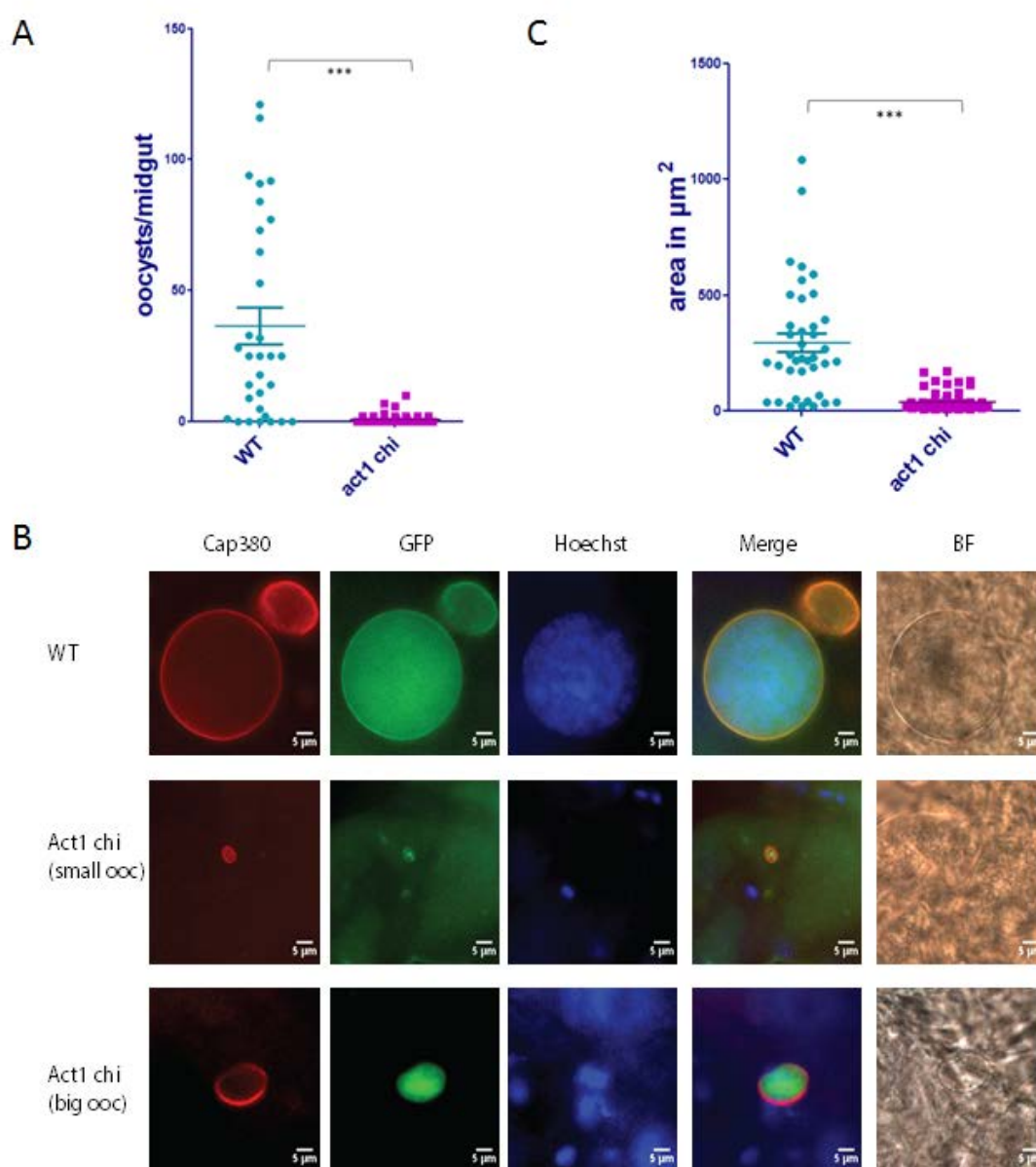
chi είναι λίγο μεγαλύτερο, χωρίς όμως κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά (εικόνα 4.5B).



Εικόνα 4.5. Τα *act1 chi* παράσιτα σχηματίζουν λιγότερους ωοκινέτες από τα WT παράσιτα. Α. Έγινε καλλιέργεια ωοκινετών για WT και *act1 chi* παράσιτα. Η περιφέρεια των WT ωοκινετών σημαίνεται με το αντίσωμα Pbs21. Τα *act1 chi* εκφράζουν σταθερά την GFP κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή *hsp70* σε όλα τα στάδια του παρασίτου. Κλίμακα 5μm. **Β.** Το ποσοστό μετατροπής των θηλυκών/ζυγωτών σε ωοκινέτες (oocyst conversion%) στα *act1 chi* παράσιτα είναι στατιστικά σημαντικά πιο μικρό σε σχέση με τα WT παράσιτα, αλλά με τα *act2 rep* παρουσιάζουν μικρή διαφορά. n.s.(non-significant) συμβολίζει την απουσία στατιστικά σημαντικής διαφοράς, *** σημαίνει P=0.0001 (Student's t-test).

Για να δούμε εάν οι ωοκινέτες έχουν την δυνατότητα να μετατραπούν σε ωοκύστες 10 μέρες μετά από τάισμα σε *A.gambiae*, έγινε απευθείας έλεγχος των ωοκυστών με ανοσοφθορισμό, για τον εντοπισμό ακόμη και μικρών σε μέγεθος ωοκυστών που δεν είναι ορατές στο οπτικό μικροσκόπιο. Έτσι χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα Cap380 και επιπλέον έγινε χρώση του DNA. Τελικά, οι *act1 chi* ωοκινέτες έχουν την δυνατότητα να περάσουν το επιθήλιο του εντέρου και να δώσουν ωοκύστες, αλλά στατιστικά πολύ λιγότερες από τα αγρίου τύπου παράσιτα (εικόνα 4.6A). Με την χρώση του DNA των ωοκυστών φάνηκε ότι μόλις στο 11% των *act1 chi* ωοκυστών ανιχνεύεται σήμα, ενώ στις αγρίου τύπου ωοκύστες το ποσοστό φτάνει στο 80%. Η επανάληψη του πειράματος, όπου έγινε έλεγχος των ωοκυστών στις 8 μέρες μετά το τάισμα, έδειξε το ίδιο αποτέλεσμα.

Οι ωοκύστες των *act1 chi* παρασίτων είναι πολύ μικρές σε μέγεθος. Στην εικόνα 4.6B φαίνεται το χαρακτηριστικό παράδειγμα δύο *act1 chi* ωοκυστών που παρουσιάζουν διαφορά στο μέγεθος, μια μικρή και μια μεγαλύτερη ωοκύστη, οι οποίες όμως είναι πολύ μικρότερες από την μεγάλη αγρίου τύπου ωοκύστη. Για να επιβεβαιώσουμε την παρατήρηση, μετρήσαμε το μέγεθος των ωοκυστών σε *act1 chi* και αγρίου τύπου παράσιτα. Η διαφορά είναι στατιστικά σημαντική και ακόμη και οι «μεγάλες» ωοκύστες των *act1 chi* παρασίτων δεν ξεπερνούν σε μέγεθος τον μέσο όρο μεγέθους των αγρίου τύπου ωοκυστών (εικόνα 4.6C).



Εικόνα 4.6. Τα *act1 chi* σχηματίζουν λίγες και μη φυσιολογικές ωοκύστες. Α. Κουνούπια *A. gambiae* ταΐστηκαν με μολυσμένα ποντίκια από WT (γαλάζιο) και *act1 chi* (ροζ) παράσιτα. Ο έλεγχος για ωοκύστες έγινε 10 μέρες μετά το τσίγμα χρησιμοποιώντας το αντίσωμα Cap380. Τα *act1 chi* σχηματίζουν λιγότερες ωοκύστες με στατιστικά σημαντική διαφορά από τα WT παράσιτα. Β. Ωοκύστες από WT και *act1 chi* παράσιτα σημαίνονται με Cap380 (κόκκινο) και γίνεται χρώση του DNA με Hoechst (μπλε). Και τα WT και τα *act1 chi* παράσιτα εκφράζουν σταθερά GFP. Στα *act1 chi* υπάρχουν μικρές και λίγο μεγαλύτερες ωοκύστες που όμως δεν ξεπερνούν σε μέγεθος τις WT ωοκύστες. Κλίμακα 5μm. Γ. Το εμβαδό των ωοκυστών (area in μm²) υπολογίζεται για τα WT (γαλάζιο) και τα *act1 chi* (ροζ) παράσιτα. Οι *act1 chi* ωοκύστες είναι πολύ μικρότερες από τις WT ωοκύστες. ***σημαίνει P<0.001 (Student's t-test).

Τέλος για να ελεγχθεί η δυνατότητα μετάδοσης, μολυσμένα κουνούπια είτε με *act1 chi* είτε με αγρίου τύπου παράσιτα ταΐστηκαν με υγιή ποντίκια. Όπως ήταν αναμενόμενο, μονό στην περίπτωση των αγρίου τύπου παρασίτων τα ποντίκια εμφάνισαν παρασιταϊμία 5 μέρες μετά. Έγινε επανάληψη τρεις φορές αυτού του πειράματος με το ίδιο αποτέλεσμα.

Συνοπτικά τα *act1 chi* παράσιτα σχηματίζουν ωοκινέτες, με το ποσοστό μετατροπής των θηλυκών σε ωοκινέτες να είναι χαμηλότερο από τα αγρίου τύπου παράσιτα. Οι ωοκινέτες έχουν την δυνατότητα να διαπεράσουν το επιθήλιο του εντέρου των κουνουπιών και να μετατραπούν σε ωοκύστες, που όμως οι ωοκύστες αυτές είναι λιγότερες και μικρότερες από τις αγρίου τύπου. Επίσης, στην πλειοψηφία τους δεν περιέχουν DNA που μπορεί να σημαίνει ότι αυτό πιθανόν χάθηκε λόγω εκφυλισμού. Τέλος τα *act1 chi* παράσιτα δεν μεταδίδονται μέσω των κουνουπιών. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι οι *act1 chi* ωοκύστες δεν αναπτύσσονται φυσιολογικά, ένας φαινότυπος που θυμίζει τις *act2 rep* ωοκύστες. Επιβεβαιώνεται για ακόμη μια φορά ότι η ακτίνη 2 είναι απαραίτητη για την σωστή ανάπτυξη των ωοκυστών. Απουσία της ακτίνης 2 οι ωοκύστες δεν αναπτύσσονται φυσιολογικά, ούτε όταν η ακτίνη 2 έχει αντικατασταθεί με την ακτίνη 1 αλλά και την χιμαιρική ακτίνη 1 με τον D-βρόγχο της α-ακτίνης. Συνεπώς, ακόμη και αν ο πολυμερισμός παίζει κρίσιμο ρόλο στην γαμετογένεση, αυτό το χαρακτηριστικό δεν είναι αρκετό για την λειτουργία της ακτίνης στην ανάπτυξη των ωοκυστών. Αυτό μας δείχνει ότι ο ρόλος της ακτίνης 2 σε αυτό το στάδιο είναι ανεξάρτητος από τον ρόλο που έχει στην γαμετογένεση, γεγονός που υποδηλώνει διαφορετικές λειτουργίες σε κάθε στάδιο.

4.3 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το αρχαίο φύλο των Apicomplexa είναι πιθανόν να διαχωρίστηκε από τα οπισθώκοντα (opisthokonts) πριν από ένα δισεκατομμύρια χρόνια και η παρέκκλιση του *Plasmodium* έλαβε χώρα πριν εκατοντάδες εκατομμύρια χρόνια (Escalante, 1995). Συνεπώς η αναζήτηση των διαφορών μεταξύ των δύο ισομορφών ακτίνης στα παράσιτα της ελονοσίας μας διαφωτίζει σχετικά με τα πρώιμα στάδια εξέλιξης των ακτινών.

Οι δύο ισομορφές ακτίνης διαφέρουν ως προς τις ιδιότητες πολυμερισμού, την σταθερότητα και την συμμετρία της έλικας των ινιδίων, όπως δείχνουν τα αποτελέσματα των συνεργατών μας (Vahokoski, 2014). Η ακτίνη 2 σχηματίζει μακριά ινίδια *in vitro* που η συμμετρία τους θυμίζει την συμμετρία των ινιδίων ακτίνης των άλλων ευκαρυωτικών οργανισμών. Περιέργως, σε επίπεδο αλληλουχίας, η ακτίνη 2 διαφέρει από την ακτίνη 1 όπως και με τις υπόλοιπες ευκαρυωτικές ακτίνες. Από προηγούμενες μελέτες στο εργαστήριό μας (Deligianni, 2011) και από στοιχεία με βάση την δομή (Vahokoski, 2014), ενδέχεται ότι το γονίδιο της ακτίνης 2 προέκυψε μόνο μετά τον διαχωρισμό του *Plasmodium* από τα Apicomplexa. Επίσης η πρωτεΐνη φαίνεται να απέκτησε μεγαλύτερη σταθερότητα στα ινίδια ακτίνης ανεξάρτητα από την εξελικτική πορεία που ακολούθησαν οι υπόλοιπες ακτίνες των ευκαρυωτικών οργανισμών.

Ο D-βρόγχος παίζει σημαντικό ρόλο στην διαμόρφωση του ινιδίου και την σταθερότητά του κατά τον πολυμερισμό (Holmes, 1990, Oda, 2009, Fujii, 2010, Murakami, 2010). Ο D-βρόγχος στις ακτίνες του *Plasmodium* διαφέρει από τις υπόλοιπες ευκαρυωτικές ακτίνες. Διαφορές όμως υπάρχουν και μεταξύ της ακτίνης 1 και της ακτίνης 2 του παρασίτου. *In vitro* πειράματα ηλεκτρονικής μικρογραφίας αποκαλύπτουν διαφορές ως προς την διαμόρφωση της έλικας μεταξύ των ινιδίων της ακτίνης 1 και των ινιδίων ακτίνης των άλλων ευκαρυωτικών οργανισμών. Η ακτίνη 1 σχηματίζει ασταθή και μικρά ινίδια *in vitro*, σε αντίθεση με την ακτίνη 2 και τις ευκαρυωτικές ακτίνες. Όμως ο D-βρόγχος της α -ακτίνης είναι ικανός από μόνος του να δώσει μακριά ινίδια ακτίνης 1 χωρίς να αλλάζει η συμμετρία του ινιδίου. Ενώ λοιπόν ο D-βρόγχος της α -ακτίνης είναι σημαντικός για την σταθερότητα και τον πολυμερισμό

του ινιδίου, το σχήμα και η συμμετρία της έλικας στην ακτίνη 1 καθορίζονται από άλλους παράγοντες. Δεδομένου ότι ο D-βρόγχος της ακτίνης 2 διαφέρει και αυτός από τον D-βρόγχο της α-ακτίνης, ίσως η σταθερότητα και ο πολυμερισμός της ακτίνης 2 επιτυγχάνεται με την συμμετοχή πλευρικών αλληλεπιδράσεων και όχι με τον D-βρόγχο. Θα μπορούσε κανείς να υποθέσει ότι ξεκινώντας από έναν πρόγονο με ασταθή ινίδια, η ακτίνη 2 κατά την εξελικτική της πορεία απέκτησε την ικανότητα σχηματισμού σταθερών ινιδίων, η οποία δεν εξαρτάται από τον D-βρόγχο.

Για να απαντηθούν αυτά τα ερωτήματα, δημιουργήσαμε διαγονιδιακά παράσιτα που εκφράζουν την χμαιρική ακτίνη 1 με τον D-βρόγχο της α-ακτίνης από τον γονιδιακό τόπο *ακτίνη 2*. Βρήκαμε ότι αυτή η χμαιρική ακτίνη 1 μπορούσε να λειτουργήσει σχεδόν τόσο καλά όσο η ακτίνη 2 *in vivo*, επαναφέροντας την γαμετογένεση στα αρσενικά παράσιτα απουσία της ακτίνης 2. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνει τα *in vitro* πειράματα και υποστηρίζει την θεωρία ότι **η μοριακή λειτουργία της ακτίνης 2 ίσως εξαρτάται από την ικανότητα της πρωτεΐνης να πολυμερίζεται. Άρα είναι πιθανόν ο σχηματισμός μακριών και σταθερών ινιδίων από την ακτίνη 2, να είναι απαραίτητος στην διαδικασία της γαμετογένεσης.** Αντίθετα, για τον ρόλο της ακτίνης 2 στην ανάπτυξη των ωοκυστών δεν αρκεί ο πολυμερισμός, καθώς η αντικατάσταση της ακτίνης 2 με την χμαιρική ακτίνη 1 δεν προάγει την ανάπτυξη των ωοκυστών, όπως και στην περίπτωση της αγρίου τύπου ακτίνης 1. Τέλος, μπορούμε να υποθέσουμε ότι ο λόγος που προέκυψαν δύο ισομορφές ακτίνης στα παράσιτα κατά την εξέλιξη ήταν η ανάγκη να υπάρχουν ακτίνες με διαφορετικές ιδιότητες πολυμερισμού, πιθανόν λόγω της έλλειψης ποικιλίας σε πρωτεΐνες που προσδένονται στις ακτίνες. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι οι ιδιότητες πολυμερισμού και στις δύο ισομορφές ακτίνης του παρασίτου είχαν ξεχωριστή εξελικτική πορεία ξεκινώντας από έναν κοινό πρόγονο με ασταθή ινίδια. Θα ήταν ενδιαφέρον να δούμε μελλοντικά εάν οι ισομορφές ακτίνης του παρασίτου μπορούν να αναπληρώσουν ισομορφές ακτίνης είτε φυτών είτε ζώων.

Μια υπόθεση γύρω από την ακτίνη 1 είναι ότι αυτή χρειάζεται στα παράσιτα για την ολισθόνουσα κίνηση και ότι τα ινίδια ακτίνης που συμμετέχουν πρέπει να είναι κοντά και με μικρό χρόνο ζωής (Skillman, 2011). Όπως αποδεικνύεται λοιπόν, η

ακτίνη 1 σχηματίζει μικρά και ασταθή ινίδια ακτίνης. Αντίθετα η ακτίνη 2 έχει την δυνατότητα να σχηματίζει μακριά και σταθερά ινίδια που πιθανόν είναι απαραίτητα για την διαδικασία της γαμετογένεσης, ενώ ίσως να μην είναι αρκετά για την λειτουργία της ακτίνης 2 στην ανάπτυξη των ωοκυστών. Τα παράσιτα της ελονοσίας φαίνεται να είναι τα μόνα παράσιτα από τα παράσιτα του φύλου Apicomplexa που εξελικτικά απέκτησαν μια δεύτερη ισομορφή ακτίνης που σχηματίζει μακριά και σταθερά ινίδια.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

**Προφίλ γονιδιακής έκφρασης στα
act2(-) και *CDPK4(-)* γαμετοκύτταρα**

5.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η γαμετογένεση στα παράσιτα της ελονοσίας είναι μια περίπλοκη διαδικασία διαφοροποίησης και ανάπτυξης του κυττάρου στην οποία πιθανόν συμμετέχουν πολλά γονιδιακά προϊόντα. Η γαμετογένεση ολοκληρώνεται σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα όταν ώριμα γαμετοκύτταρα βρεθούν στο περιβάλλον του κουνουπιού. Δεν υπάρχουν πολλές πληροφορίες για τα διαδοχικά γεγονότα που συμβαίνουν στα παράσιτα κατά την γαμετογένεση. Ωστόσο, έχει βρεθεί ένας αριθμός μεταλλάξεων που μπλοκάρουν μερικώς ή πλήρως την γαμετογένεση, αλλά οι αιτίες που προκαλούν αυτόν τον φαινότυπο δεν έχουν κατανοηθεί σε μοριακό επίπεδο (Akinosoglou, 2014, Bilker, 2004, Deligianni, 2011 and 2013, Kenthirapalan, 2014, Olivieri, 2014, Ponzzi, 2011, Tewari, 2005). Ένα από αυτά τα μεταλλάγματα είναι το *CDPK4(-)* στο οποίο απουσιάζει η ασβεστο-εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση 4 (Calcium Dependent Protein Kinase 4, CDPK4) που ρυθμίζει πρώιμες διαδικασίες στην γαμετογένεση (Bilker, 2004). Απουσία της CDPK4, δεν πραγματοποιούνται οι μιτωτικές διαιρέσεις στην γαμετογένεση των αρσενικών παρασίτων και δεν σχηματίζονται τα αξονήματα, που αποτελούν βασικό στοιχείο των αρσενικών γαμετών. Όμως, η έξοδος του γαμετοκυττάρου από το ερυθροκύτταρο ξενιστή δεν επηρεάζεται. Μια άλλη περίπτωση όπου η γαμετογένεση των αρσενικών παρασίτων μπλοκάρεται είναι η απουσία της ακτίνης 2 (*act2(-)*). Σε αυτό το μετάλλαγμα γίνονται οι μιτωτικές διαιρέσεις και τα αξονήματα σχηματίζονται αλλά δεν έχουν την ικανότητα κίνησης. Επιπλέον, τα αρσενικά γαμετοκύτταρα παραμένουν παγιδευμένα μέσα στο ερυθροκύτταρο ξενιστή με τις δύο μεμβράνες που περιβάλλουν το παράσιτο, την PVM και την RBCM, να παραμένουν ανέπαφες. Να σημειωθεί ότι καμία από αυτές τις δύο πρωτεΐνες δεν θεωρείται ότι συμμετέχει άμεσα στην μεταγραφική ρύθμιση.

Αρχικά πειράματα που είχαν γίνει για την μελέτη του μεταλλάγματος όπου απουσιάζει η ακτίνη 2 έδειξαν ότι τα επίπεδα των μεταγράφων σε κάποια γονίδια αλλάζουν στα μεταλλαγμένα γαμετοκύτταρα. Έτσι, υποθέσαμε ότι η απουσία της ακτίνης 2 ίσως επηρεάζει με έναν έμμεσο τρόπο το προφίλ της μεταγραφής. Για να μελετήσουμε εάν η παύση στην γαμετογένεση συνοδεύεται από την αλλαγή στο προφίλ της γονιδιακής έκφρασης έγινε ανάλυση των *act2(-)* μεταλλαγμένων γαμετοκυττάρων

σε σχέση με αγρίου τύπου γαμετοκύτταρα με μικροσυστοιχίες γονιδίων που αντιπροσωπεύουν ολόκληρο το γονιδίωμα του *P.berghei*. Στην μελέτη αυτή συμπεριλήφθηκε και το *CDPK4(-)* μετάλλαγμα με το σκεπτικό ότι και τα δύο μεταλλάγματα που μπλοκάρουν την γαμετογένεση των αρσενικών παρασίτων σε διαφορετικές χρονικές στιγμές ίσως να έχουν κοινά και διαφορετικά χαρακτηριστικά. Συνεπώς, η συγκριτική ανάλυση των δύο μεταλλαγμάτων σε σχέση με τα αγρίου τύπου παράσιτα ίσως να προσδιόριζε τα διαδοχικά προφίλ της γονιδιακής έκφρασης κατά την γαμετογένεση και να αποκάλυπτε κοινές διεργασίες που συμβαίνουν μέσα στο κύτταρο.

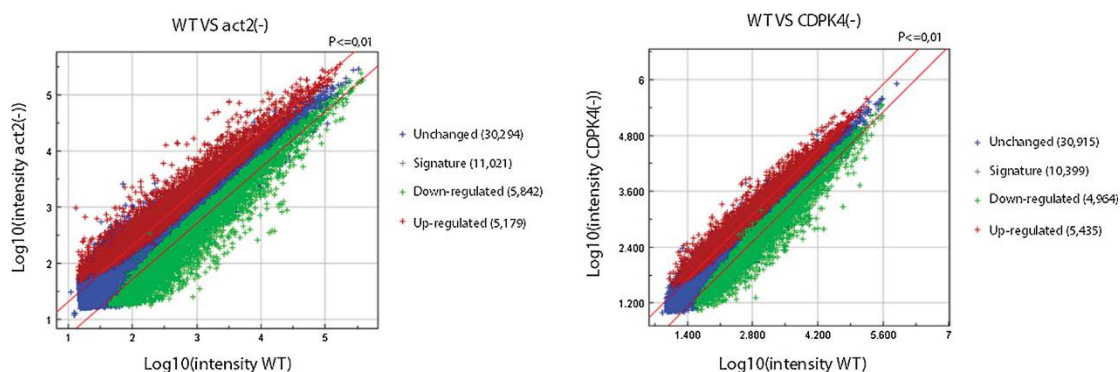
5.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Το προφίλ της γονιδιακής έκφρασης στα *act2(-)* και *CDPK4(-)* γαμετοκύτταρα

Για την ανάλυση του προφίλ της γονιδιακής έκφρασης με μικροσυστοιχίες γονιδίων, αρχικά μολύνθηκαν ποντίκια με είτε με αγρίου τύπου, είτε με *act2(-)*, είτε με *CDPK4(-)* παράσιτα. Από κάθε περίπτωση είχαμε δύο βιολογικές επαναλήψεις. Χορηγήθηκε σουλφαδιαζίνη για να εξαλείψουμε τα μη φυλετικά στάδια (Beetsma, 1998) και στην συνέχεια έγινε καθαρισμός των γαμετοκυττάρων. Όλα τα δείγματα ελέγχθηκαν με Giemsa και ανοσοφθορισμό με το αντίσωμα NAP/SET, το οποίο είναι ενδεικτικό για τα ενεργοποιημένα ώριμα αρσενικά γαμετοκύτταρα (Pace, 2006). Σκοπός ήταν να αποκλείσουμε την περίπτωση τα γαμετοκύτταρα να είναι ενεργοποιημένα, καθώς γνωρίζουμε ότι η ενεργοποίηση οδηγεί σε αλλαγές στο προφίλ έκφρασης (Ngwa, 2013). Τέλος, απομονώθηκε το RNA από τα δείγματα και στάλθηκε στους συνεργάτες μας στο Ινστιτούτο Max Planck στο Βερολίνο για τα πειράματα με μικροσυστοιχίες. Συνοπτικά, έγινε η μετατροπή σε cDNA, η σήμανση με διαφορετικές φθορίζουσες χρωστικές (dual colour labeling), η υβριδοποίηση με τις μικροσυστοιχίες και τέλος η ανάλυση της εικόνας του αποτελέσματος ούτως ώστε να εντοπιστούν τα γονίδια που παρουσιάζουν διαφορά στην έκφραση στα μεταλλάγματα σε σχέση με τα αγρίου τύπου παράσιτα.

Οι μικροσυστοιχίες διαθέτουν αλληλο-επικαλυπτόμενες αλληλουχίες αναφοράς που στο σύνολό τους αντιπροσωπεύουν ολόκληρο το γονιδίωμα του *P.berghei*. Έτσι, για κάθε γονίδιο συνδυάζονται οι τιμές από διαφορετικές αλληλουχίες αναφοράς για να προσδιοριστεί το επίπεδο έκφρασης. Ο πρώτος, λοιπόν, έλεγχος των αποτελεσμάτων έγινε σε επίπεδο αλληλουχιών αναφοράς. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται με διαγράμματα διασποράς στην εικόνα 5.1, όπου γίνεται σύγκριση των εντάσεων από τις φθορίζουσες χρωστικές για κάθε αλληλουχία αναφοράς μεταξύ των αγρίου τύπου παρασίτων και των *act2(-)* ή των *CDPK4(-)* παρασίτων. Και στα δύο διαγράμματα, οι περισσότερες αλληλουχίες αναφοράς βρίσκονται κατά μήκος του διαγώνιου άξονα, ενδεικτικό για την ακρίβεια στην ανάλυση. Περίπου το 30% των αλληλουχιών αναφοράς εμφανίζουν διαφορά και στα δύο μεταλλάγματα σε σχέση με τα αγρίου τύπου παράσιτα. Επιπλέον, ο λόγος ανάμεσα στις αλληλουχίες αναφοράς

που παρουσιάζουν θετική και αρνητική ρύθμιση είναι 1,1 και 0,89 για τα *CDPK4(-)* και τα *act2(-)* παράσιτα αντίστοιχα.

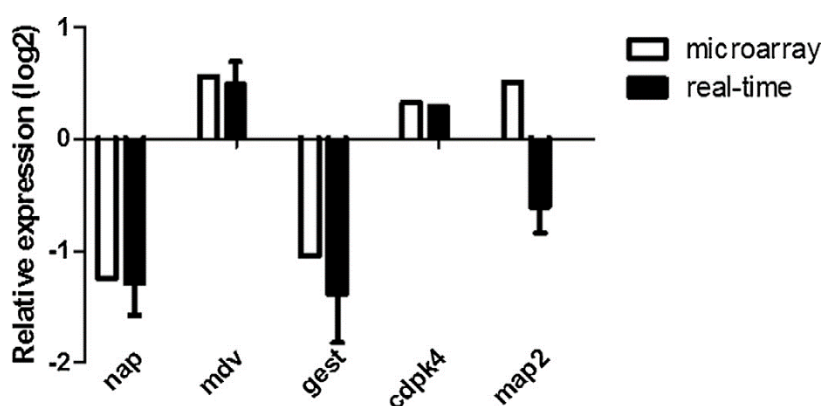


Εικόνα 5.1. Προφίλ γονιδιακής έκφρασης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται με διαγράμματα διασποράς, όπου γίνεται σύγκριση των εντάσεων από τις φθορίζουσες χρωστικές για κάθε αλληλουχία αναφοράς μεταξύ των αγρίου τύπου παρασίτων και των *act2(-)* (αριστερά) ή των *CDPK4(-)* παρασίτων (δεξιά). Μπλε: αλληλουχίες αναφοράς που δεν παρουσιάζουν αλλαγή στα μεταλλάγματα, γκρι: αλληλουχίες αναφοράς που έχουν διαφορετικό προφίλ στα μεταλλάγματα (signatures), πράσινο: αλληλουχίες αναφοράς με αρνητική ρύθμιση, κόκκινο: αλληλουχίες αναφοράς με θετική ρύθμιση. Ο αριθμός των αλληλουχιών αναφοράς για κάθε κατηγορία αναγράφεται δεξιά.

Αξιολόγηση των πειραμάτων με μικροσυστοιχίες με qRT-PCR

Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων από τα πειράματα με μικροσυστοιχίες έγινε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (quantitative real time RT-PCR) απομονώνοντας RNA από *act2(-)* και *CDPK4(-)* γαμετοκύτταρα. Επιλέξαμε πέντε γονίδια που έχει δειχθεί ότι έχουν κρίσιμους ρόλους κατά την γαμετογένεση και αυτά είναι τα εξής: *nar* (PBANKA_081990), *mdv1* (PBANKA_143220), *gest* (PBANKA_131270), *map2* (PBANKA_093370) και *cdpk4* (PBANKA_061520). Οι αλλαγές στα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης μεταξύ αγρίου τύπου και *act2(-)* παρασίτων που προκύπτουν από την qRT-PCR υπολογίζονται με βάση το μαθηματικό μοντέλο σχετικής ποσοτικοποίησης του Pfaffl (Pfaffl, 2001). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα διαγράμματα της εικόνας 5.2 ως τιμές σχετικής έκφρασης για κάθε γονίδιο στα *act2(-)* σε σχέση με τα αγρίου τύπου παράσιτα. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα από την qRT-PCR με τα αποτελέσματα από τα πειράματα μικροσυστοιχιών για αυτά τα γονίδια, παρατηρούμε παρόμοια προφίλ γονιδιακής έκφρασης για τα τέσσερα από τα

πέντε επιλεγμένα γονίδια. Τα γονίδια *nap* και *gest* έχουν μείωση στα επίπεδα έκφρασης στα *act2(-)* παράσιτα και με τις δύο διαφορετικές πειραματικές μεθόδους ποσοτικοποίησης, όπως και τα γονίδια *mdv-1* και *cdpk4*, τα οποία όμως εμφανίζουν αύξηση στα επίπεδα έκφρασης. Το μεταγραφικό επίπεδο του γονιδίου *map2* εμφανίζεται ελαφρώς μειωμένο στα *act2(-)* παράσιτα σε σχέση με τα αγρίου τύπου, όταν αυτό μετρήθηκε με qRT-PCR, ενώ τα αποτελέσματα από τις μικροσυστοιχίες δείχνουν μια μικρή αύξηση.

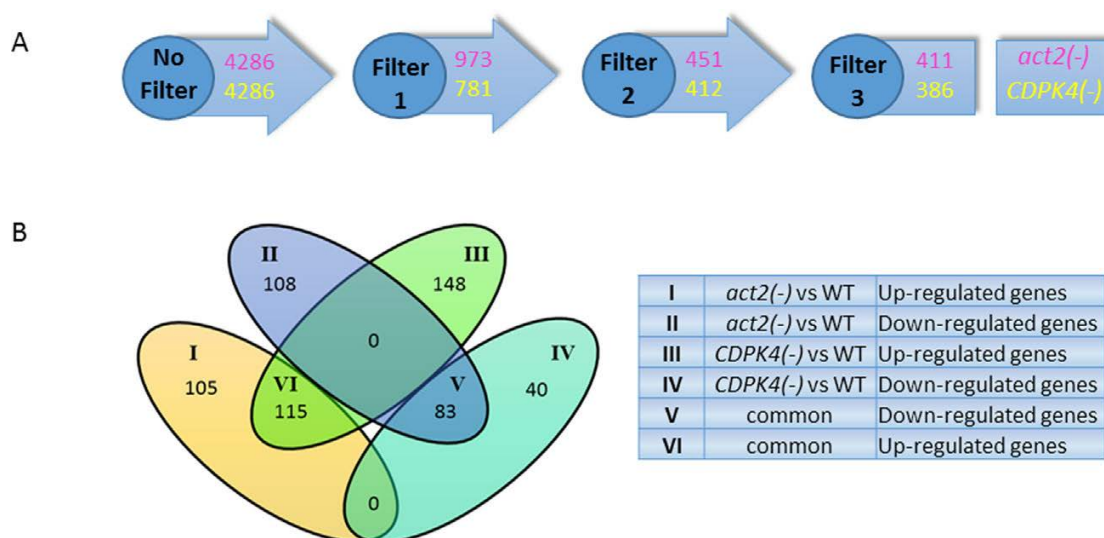


Εικόνα 5.2. Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων από τα πειράματα με μικροσυστοιχίες με qRT-PCR. Στο διάγραμμα, ο Y άξονας συμβολίζει τις τιμές σχετικής έκφρασης για κάθε γονίδιο στα *act2(-)* σε σχέση με τα αγρίου τύπου παράσιτα από τις δύο μεθόδους. Τα γονίδια που επιλέχθηκαν είναι: *nap* (nucleosome assembly protein) (n = 4), *mdv1* (male development gene 1) (n = 6), *gest* (gamete egress and sporozoite traversal) (n = 4), *cdpk4* (calcium dependent protein kinase 4) (n = 1) και *map2* (mitogen activated protein kinase 2) (n = 3).

Ταυτοποίηση και χαρακτηρισμός των γονιδίων με διαφορετικά επίπεδα έκφρασης στα *act2(-)* και *CDPK4(-)* γαμετοκύτταρα

Για την συστηματική ανάλυση των αποτελεσμάτων από τις μικροσυστοιχίες γονιδίων έγινε εφαρμογή τριών φίλτρων στα γονίδια, έτσι ώστε να περιορίσουμε τον αριθμό τους και να διευκολύνουμε την μελέτη τους. Η εικόνα 5.3A μας δείχνει τον αριθμό των εναπομείναντων γονιδίων μετά από την εφαρμογή κάθε φίλτρου και για τις δύο περιπτώσεις των μεταλλαγμένων παρασίτων. Με το πρώτο φίλτρο επιλέξαμε τα γονίδια στα οποία η έκφραση είναι τουλάχιστον δύο φορές μικρότερη ή μεγαλύτερη

από τα αγρίου τύπου παράσιτα. Με το δεύτερο φίλτρο επιλέξαμε γονίδια στα οποία τα αποτελέσματα είναι στατιστικά σημαντικά (P-values ≤ 0.01). Με το τρίτο φίλτρο αποκλείσαμε γονίδια που συμμετέχουν στην σύνθεση ριβοσωμάτων και tRNA και γονίδια που ανήκουν στην οικογένεια BIR (*P.berghei* interspersed repeats), καθώς ο αριθμός τους είναι αρκετά μεγάλος, κάτι που θα περιέπλεκε την ανάλυση. Με την εφαρμογή των φίλτρων έμειναν συνολικά 411 και 386 γονίδια σε κάθε βάση δεδομένων *act2(-)* και *CDPK4(-)* μεταλλάγματων αντίστοιχα. Μετά την αφαίρεση 198 γονιδίων που είναι κοινά και στις δύο βάσεις δεδομένων, έμειναν συνολικά 599 γονίδια που εμφανίζουν διαφορά στην έκφραση και στα δύο μεταλλάγματα σε σχέση με τα αγρίου τύπου παράσιτα.



Εικόνα 5.3. Ανάλυση των γονιδίων με διαφορετική έκφραση. Α. Φιλτράρισμα των αποτελεσμάτων. Στο διάγραμμα ροής απεικονίζεται ο αριθμός των γονιδίων στα *act2(-)* (ροζ) και *CDPK4(-)* (κίτρινο) μετά την εφαρμογή κάθε φίλτρου. Φίλτρο 1: επιλέξαμε τα γονίδια στα οποία η έκφραση είναι τουλάχιστον δύο φορές μικρότερη ή μεγαλύτερη από τα αγρίου τύπου παράσιτα (fold change $\geq |2|$). Φίλτρο 2: επιλέξαμε γονίδια στα οποία τα αποτελέσματα είναι στατιστικά σημαντικά (P-values ≤ 0.01). Φίλτρο 3: αποκλείσαμε γονίδια που συμμετέχουν στην σύνθεση ριβοσωμάτων και tRNA και γονίδια που ανήκουν στην οικογένεια BIR (*P.berghei* interspersed repeats). Β. Σύγκριση του προφίλ γονιδιακής έκφρασης μεταξύ των δύο μεταλλάγματων. Τα γονίδια οργανώνονται σε ένα διάγραμμα τύπου Venn που αποτελείται από έξι ομάδες (πίνακας δεξιά), οι οποίες αναγράφονται με λατινικό νούμερο και απεικονίζονται με διαφορετικό χρώμα.

Στην συνέχεια τα 599 γονίδια που έμειναν και πληρούν τα παραπάνω κριτήρια χωρίζονται σε έξι διαφορετικές ομάδες που φαίνονται σε ένα διάγραμμα τύπου Venn

στην εικόνα 5.3B. Στην πρώτη ομάδα έχουμε γονίδια που εμφανίζουν θετική ρύθμιση (upregulated genes) στα *act2(-)* γαμετοκύτταρα, στην δεύτερη ομάδα είναι γονίδια που εμφανίζουν αρνητική ρύθμιση (downregulated genes) στα *act2(-)* γαμετοκύτταρα, στην τρίτη και τέταρτη ομάδα είναι γονίδια με θετική και αρνητική ρύθμιση αντίστοιχα στο *CDPK4(-)*, ενώ στην πέμπτη και έκτη ομάδα είναι κοινά γονίδια μεταξύ των δύο μεταλλάξεων, με αρνητική και θετική ρύθμιση αντίστοιχα. Αυτή η ανάλυση των αποτελεσμάτων αποκαλύπτει έναν σημαντικό αριθμό κοινών γονιδίων με θετική και αρνητική ρύθμιση και στα δύο μεταλλάγματα, που πιθανόν να οφείλεται στην παύση της ανάπτυξης πριν ξεκινήσει η γαμετογένεση. 115 γονίδια έχουν θετική ρύθμιση και στα δύο μεταλλάγματα, αντανακλώντας το 52% και 44% των γονιδίων με θετική ρύθμιση στο *act2(-)* και το *CDPK4(-)* αντίστοιχα. Ενώ 83 γονίδια έχουν θετική ρύθμιση και στα δύο μεταλλάγματα, αντανακλώντας το 43,5% και 67,5% των γονιδίων με θετική ρύθμιση στο *act2(-)* και το *CDPK4(-)* αντίστοιχα. Στα *act2(-)* μεταλλαγμένα παράσιτα, 105 και 108 γονίδια εμφανίζουν αποκλειστικά θετική και αρνητική ρύθμιση αντίστοιχα και όχι στα *CDPK4(-)*. Στα *CDPK4(-)*, 148 και 40 γονίδια εμφανίζουν αποκλειστικά θετική και αρνητική ρύθμιση αντίστοιχα. Αυτά τα γονίδια ίσως αντανακλούν την διαφορά που υπάρχει στον φαινότυπο των δύο μεταλλαγμάτων.

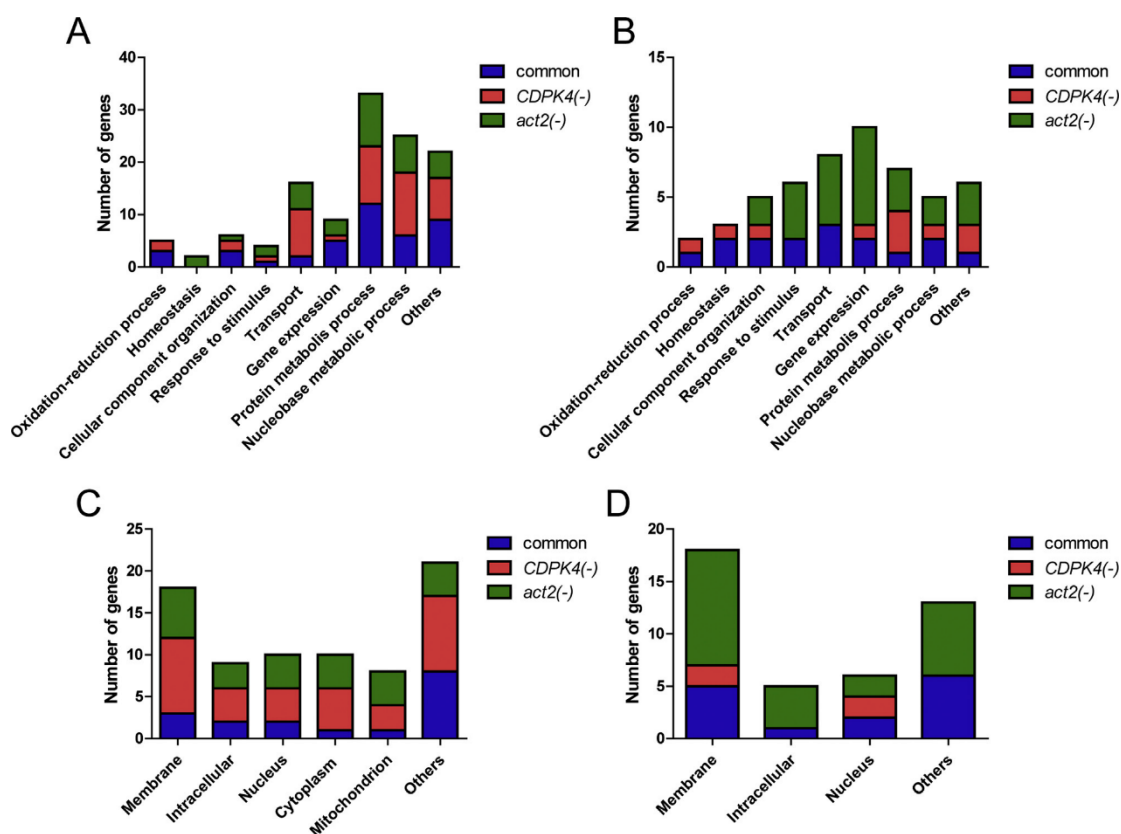
Για να μελετήσουμε περαιτέρω και τα 599 γονίδια που παρουσιάζουν διαφορά στην έκφραση και στα δύο μεταλλάγματα, χρησιμοποιήσαμε τις πληροφορίες που δίνονται από την γονιδιωματική βάση δεδομένων του *Plasmodium* (PlasmoDB) (Aurrecochea, 2009). Πληροφορίες σχετικά με την κυτταρική διαδικασία (annotated GO process) στην οποία συμμετέχουν τα γονιδιακά προϊόντα ήταν διαθέσιμες για περίπου το 29% των γονιδίων αυτής της μελέτης, συγκριτικά με την ανάλυση ολόκληρου του γονιδιώματος, στην οποία για το 56% όλων των γονιδίων υπάρχουν πληροφορίες (Otto, 2014). Για το υπόλοιπο 71% των γονιδίων και στα δύο μεταλλάγματα, δεν υπάρχουν καθόλου πληροφορίες, γεγονός που αντανακλά την έλλειψη γνώσεων για πολλά από τα γονίδια που υπάρχουν στα παράσιτα της ελονοσίας.

Για τα γονίδια αυτής της μελέτης, που είναι γνωστή η κυτταρική διαδικασία, βρέθηκαν συνολικά 101 διαφορετικοί όροι που χαρακτηρίζουν τις κυτταρικές διαδικασίες στις οποίες συμμετέχουν. Έτσι, θέλοντας να απλουστεύσουμε αυτά τα

αποτελέσματα, έγινε αναζήτηση κοινών προγονικών όρων στην οντολογία γονιδίων (Gene Ontology, GO) για τους 101 διαφορετικούς όρους που βρέθηκαν αρχικά. Τα γονίδια οργανώθηκαν σε εννέα διαφορετικές τάξεις σύμφωνα με τους προγονικούς όρους: 1) οξειδωαναγωγικές διαδικασίες, 2) ομοιόσταση, 3) οργάνωση των κυτταρικών στοιχείων, 4) απόκριση σε σήματα, 5) μεταφορά, 6) γονιδιακή έκφραση, 7) διαδικασίες στον μεταβολισμό πρωτεϊνών, 8) μεταβολικές διαδικασίες που συμμετέχουν στοιχεία που περιέχουν νουκλεοτίδια, 9) άλλες διαδικασίες. Στην συνέχεια σε κάθε μια από τις έξι ομάδες γονιδίων που παρουσιάστηκαν στο διάγραμμα τύπου Venn, τα γονίδια ταξινομήθηκαν με βάση τις εννιά διαφορετικές τάξεις. Και στα δύο μεταλλάγματα βρέθηκε ότι τα περισσότερα γονίδια που έχουν θετική ρύθμιση είναι στην τάξη «διαδικασίες στον μεταβολισμό πρωτεϊνών» (εικόνα 5.4A). Αντίθετα, τα περισσότερα γονίδια που έχουν αρνητική ρύθμιση ανήκουν στις τάξεις «γονιδιακή έκφραση» και «μεταφορά» (εικόνα 5.4B). Τα γονίδια που έχουν αρνητική ρύθμιση και είναι γνωστή η κυτταρική διαδικασία είναι περισσότερα στο *act2(-)* σε σχέση με το *CDPK4(-)* μετάλλαγμα. Όμως αυτό ίσως να αντανακλά το γεγονός ότι 40 μόνο γονίδια με αρνητική ρύθμιση βρέθηκαν στο *CDPK4(-)* ενώ στο *act2(-)* βρέθηκαν 108 .

Ακολούθησε η ταξινόμηση των γονιδίων με βάση το κυτταρικό στοιχείο που βρίσκεται το γονιδιακό προϊόν (annotated GO component). Για το 80% των γονιδίων της παρούσας μελέτης αυτή η πληροφορία είναι άγνωστη. Ελέγχοντας τα γονίδια για τα οποία είναι διαθέσιμη αυτή η πληροφορία βρέθηκαν συνολικά 46 διαφορετικοί όροι. Αναζητώντας τους προγονικούς όρους στην οντολογία γονιδίων, τα γονίδια τελικά ταξινομήθηκαν στις εξής έντεκα τάξεις: 1) μεμβράνες, 2) ενδοκυτταρικά, 3) πυρήνας, 4) κυτταρόπλασμα, 5) κυτταρόπλασμα και πυρήνας, 6) μιτοχόνδρια, 7) ενδοπλασματικό δίκτυο, 8) πρωτεάσωμα, 9) μικροσωληνίσκοι, 10) χρωμόσωμα, 11) άλλα κυτταρικά στοιχεία. Και εδώ τα γονίδια σε κάθε ομάδα του διαγράμματος τύπου Venn ταξινομήθηκαν με βάση τις παραπάνω τάξεις. Επειδή μόνο για το 20% από το σύνολο των γονιδίων είναι γνωστή αυτή η πληροφορία, στην εικόνα δεν παρουσιάζονται όλες οι τάξεις. Και στα δύο μεταλλάγματα, τα περισσότερα γονίδια με θετική ρύθμιση αλλά και τα περισσότερα γονίδια με αρνητική ρύθμιση (εικόνα 5.4C και D αντίστοιχα), ανήκουν στην τάξη των «μεμβρανών». Να σημειωθεί ότι και εδώ

τα γονίδια με αρνητική ρύθμιση είναι περισσότερα στο *act2(-)* σε σχέση με το *CDPK4(-)* μετάλλαγμα.

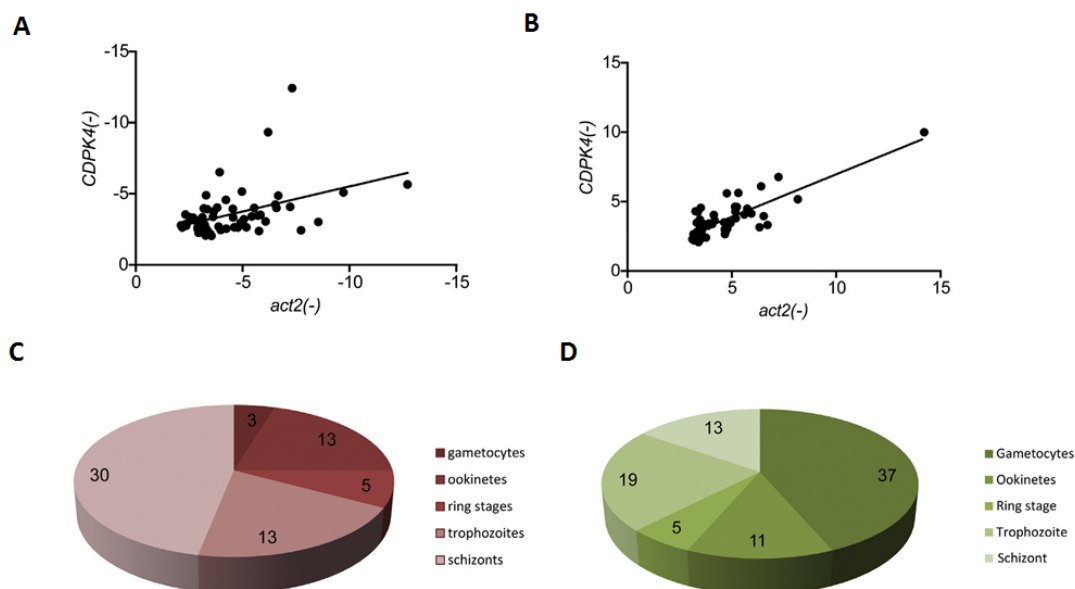


Εικόνα 5.4. Ταξινόμηση των γονιδίων με διαφορετική έκφραση με βάση την οντολογία γονιδίων (Gene Ontology, GO). Α,Β. Οργάνωση των γονιδίων σε 9 διαφορετικές τάξεις, για τα οποία είναι γνωστή η κυτταρική διαδικασία στην οποία συμμετέχουν τα γονιδιακά προϊόντα τους. Η ταξινόμηση έγινε σε κάθε ομάδα του διαγράμματος Venn. Μπλε: γονίδια που βρέθηκαν και στα δύο μεταλλάγματα, πράσινο: γονίδια που βρέθηκαν αποκλειστικά στο *act2(-)*, κόκκινο: γονίδια που βρέθηκαν αποκλειστικά στο *CDPK4(-)*. Α. Γονίδια με θετική ρύθμιση. Β. Γονίδια με αρνητική ρύθμιση. C,D. Οργάνωση των γονιδίων σε 11 διαφορετικές τάξεις, για τα οποία είναι γνωστό το κυτταρικό στοιχείο στο οποίο βρίσκονται τα γονιδιακά προϊόντα τους. Η ταξινόμηση έγινε σε κάθε ομάδα του διαγράμματος Venn. Μπλε: γονίδια που βρέθηκαν και στα δύο μεταλλάγματα, πράσινο: γονίδια που βρέθηκαν αποκλειστικά στο *act2(-)*, κόκκινο: γονίδια που βρέθηκαν αποκλειστικά στο *CDPK4(-)*. Επειδή μόνο για το 20% από το σύνολο των γονιδίων είναι γνωστή αυτή η πληροφορία, στα διαγράμματα δεν παρουσιάζονται όλες οι τάξεις. C. Γονίδια με θετική ρύθμιση. D. Γονίδια με αρνητική ρύθμιση. Να σημειωθεί ότι η κλίμακα διαφέρει μεταξύ των διαγραμμάτων.

Βιολογικές λειτουργίες των γονιδίων με αρνητική ρύθμιση

Παράλληλα πραγματοποιήθηκε και στα δύο μεταλλάγματα μια πιο λεπτομερής ανάλυση στα 50 πρώτα γονίδια με μεγαλύτερη μείωση στην έκφραση σε σχέση με τα αγρίου τύπου παράσιτα. Όπως ήταν αναμενόμενο, το *cdpk4* ήταν αυτό με την μεγαλύτερη μείωση στα *CDPK4(-)* παράσιτα, οπότε και εξαιρέθηκε από την ανάλυση. Τα 50 πρώτα γονίδια σε κάθε μετάλλαγμα χωρίστηκαν σε τρεις κατηγορίες: 1) γονίδια που βρέθηκαν στα 50 πρώτα και στα δύο μεταλλάγματα (24 γονίδια), 2) γονίδια που δεν βρέθηκαν στα 50 πρώτα στο δεύτερο μετάλλαγμα αλλά βρίσκονται γενικά στην λίστα των γονιδίων με αρνητική ρύθμιση στο δεύτερο μετάλλαγμα (11 στο *act2(-)* και 13 στο *CDPK4(-)*), 3) γονίδια που δεν βρέθηκαν καθόλου στα γονίδια με αρνητική ρύθμιση στο δεύτερο μετάλλαγμα (15 στο *act2(-)* και 13 στο *CDPK4(-)*). Συνολικά λοιπόν βρέθηκαν 76 γονίδια και από τα δύο μεταλλάγματα.

Συγκρίνοντας τις τιμές σχετική έκφρασης (fold of change) μεταξύ των δύο μεταλλαγμάτων για τα γονίδια με αρνητική ρύθμιση που ανήκουν στις δύο πρώτες κατηγορίες, δεν βρέθηκε κάποια σχέση ανάμεσα στα μεταλλάγματα. Αυτό ήταν ιδιαίτερα εμφανές για τα γονίδια που είχαν τις μεγαλύτερες τιμές σχετικής έκφρασης (εικόνα 5.5A). Επιπλέον, έγινε ταξινόμηση κάθε γονιδίου με βάση το στάδιο του κύκλου ζωής που εμφανίζει μεγαλύτερη έκφραση, σύμφωνα με δεδομένα που υπάρχουν από αλληλούχιση RNA (RNAseq data) (Otto, 2014). Για 64 από τα γονίδια υπήρχαν διαθέσιμες πληροφορίες. Τα γονίδια ταξινομήθηκαν για τα εξής στάδια του κύκλου ζωής στα οποία έχει γίνει η αλληλούχιση RNA: στάδιο δακτυλίου, τροφοζώδια, σχίζοντες, γαμετοκύτταρα και ωοκινέτες. Ως αποτέλεσμα προκύπτει ότι το 75% των υπό μελέτη γονιδίων εμφανίζουν μεγαλύτερη έκφραση στα μη φυλετικά στάδια (εικόνα 5.5C).



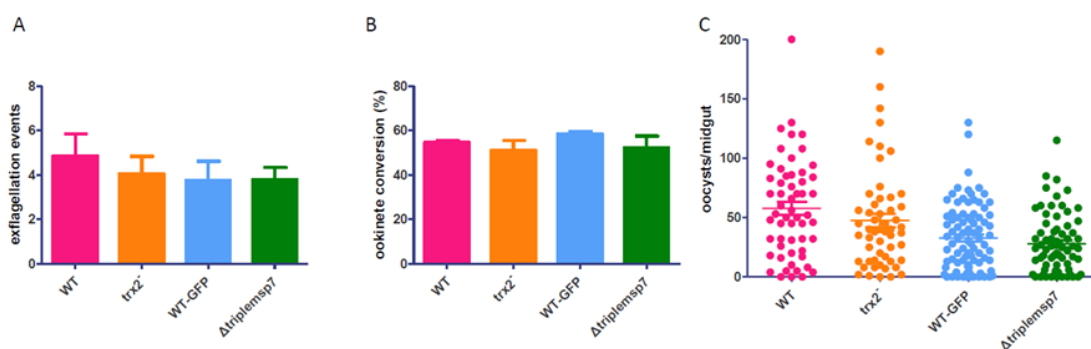
Εικόνα 5.5. Ανάλυση γονιδίων με μεγαλύτερη διαφορά στην έκφραση σε σχέση με το WT. A,B. Σύγκριση των τιμών σχετικής έκφρασης (fold of change) μεταξύ των *act2(-)* και *CDPK4(-)*. A. 35 γονίδια με αρνητική ρύθμιση που βρίσκονται και στα δύο μεταλλάγματα. B. 42 γονίδια με θετική ρύθμιση που βρίσκονται και στα δύο μεταλλάγματα. C, D. Ταξινόμηση γονιδίων με βάση τα στάδια του κύκλου ζωής στα οποία έχει γίνει η αλληλούχιση RNA. C Γονίδια με αρνητική ρύθμιση (64/76 γονίδια). D. Γονίδια με θετική ρύθμιση (85/85 γονίδια).

Στην συνέχεια έγινε αναζήτηση για τις βιολογικές λειτουργίες σε κάθε γονίδιο από την βάση δεδομένων του *Plasmodium* (PlasmoDB) (Aurrecoechea, 2009). Από το σύνολο των 76 γονιδίων με αρνητική ρύθμιση, τα 26 γονίδια κωδικοποιούν συντηρημένες πρωτεΐνες αγνώστου λειτουργίας, 10 γονίδια κωδικοποιούν αγνώστου λειτουργίας πρωτεΐνες που εξάγονται από το κύτταρο και 3 γονίδια δίνουν απροσδιόριστα προϊόντα. Τα υπόλοιπα 37 γονίδια ομαδοποιήθηκαν σύμφωνα με την λειτουργία της πρωτεΐνης που κωδικοποιούν (Andreadaki, 2015 table S1). Δέκα γονίδια πιθανόν συμμετέχουν στις διαδικασίες αναδίπλωσης DNA, σχηματισμού της χρωματίνης και αντιγραφής, μεταγραφής, μετάφρασης. Τρία γονίδια κωδικοποιούν πρωτεΐνες-μεταφορείς και ένα γονίδιο κωδικοποιεί για προϊόν που συμμετέχει στην μεταφορά κυστιδίων. Επιπλέον δέκα ένζυμα συμπεριλαμβάνονται, δύο από τα οποία είναι απαραίτητα για την σύνθεση «άγκυρας» γλυκολιπιδίων (GPI anchor). Για 8 γονίδια έχει γίνει επιτυχώς καταστροφή τους. Όμως για 7 από αυτά δεν έχουν αναφερθεί φαινότυποι στα φυλετικά στάδια. Η καταστροφή του ορθόλογου γονιδίου στο *P.yoelii* του γονιδίου PBANKA_136010 που κωδικοποιεί τον μεταφορέα

νουκλεοσιδίων 1 (Nucleoside Transporter 1, NT1) εμφανίζει πρόβλημα στην εκβολή των αρσενικών γαμετών από το παράσιτο (exflagellation). Αναφέρεται ότι υπάρχει κάποια χρονική καθυστέρηση και τα αρσενικά παρασίτα που ολοκληρώνουν την διαδικασία είναι λιγότερα. Όμως τα δεδομένα αυτών των πειραμάτων δεν παρουσιάζονται στο δημοσιευμένο άρθρο (Aly, 2010).

Από την παραπάνω αναζήτηση βρέθηκαν 13 γονίδια που εντοπίζονται αποκλειστικά στα παράσιτα της ελονοσίας. Από αυτά ξεχωρίσαμε τρία γονίδια που ανήκουν στην μικρή οικογένεια των MSP7-like πρωτεϊνών. Η MSP7 είναι μια πρωτεΐνη στην επιφάνεια των μεροζωιδίων (Merozoite Surface Protein, MSP), η οποία μεσολαβεί για την πρώτη αλληλεπίδραση που έχει το παράσιτο με το ερυθροκύτταρο. Στο *P. berghei* το γονίδιο *msp7* μαζί με τα γονίδια *msrp1* και *msrp2* (MSP7-like) αποτελούν μια μικρή οικογένεια γονιδίων που βρίσκονται στον ίδιο τόπο στο γονιδίωμα (Mello, 2004). Και τα τρία αυτά γονίδια βρέθηκαν να έχουν αρνητική ρύθμιση και στα δύο μεταλλάγματα της παρούσας μελέτης (τιμές σχετικής έκφρασης στο *act2(-)*: -4.21, -3.54, -6.19 αντίστοιχα και στο *CDPK4(-)*: -4.56, -2.03, -9.32 αντίστοιχα). Ένα άλλο γονίδιο που επίσης βρέθηκε να έχει αρνητική ρύθμιση με μεγάλη διαφορά και στα δύο μεταλλάγματα σε σχέση με τα αγρίου τύπου γαμετοκύτταρα είναι το γονίδιο θειορεδοξίνης *trx2* (τιμές σχετικής έκφρασης στο *act2(-)*: -9.71 και στο *CDPK4(-)*: -5.08). Επαληθεύσαμε την αρνητική ρύθμιση που εμφανίζει το *trx2* και το *msrp2* στα πειράματα με τις μικροσυστοιχίες κάνοντας qRT-PCR συγκρίνοντας τα *act2(-)* με αγρίου τύπου γαμετοκύτταρα. Η έκφραση του *trx2* βρέθηκε να είναι 4,3 φορές μικρότερη από τα αγρίου τύπου και η έκφραση του *msrp2* βρέθηκε να είναι 6.7 φορές μικρότερη. Από προηγούμενες μελέτες που έχουν γίνει σε παράσιτα που δεν εκφράζουν την MSP7 ή την TRX2 φαίνεται ότι αυτά τα παράσιτα έχουν χαμηλό ρυθμό ανάπτυξης των μη φυλετικών σταδίων στα ποντίκια, αλλά δεν εστιάζουν στο αν αυτές οι πρωτεΐνες έχουν κάποιο ρόλο στα επόμενα στάδια του κύκλου ζωής (Matz, 2013, Tewari, 2005). Για να ελέγξουμε εάν η αρνητική ρύθμιση αυτών των γονιδίων στα δύο μεταλλάγματα σχετίζεται με την παύση της γαμετογένεσης επεκτείναμε την μελέτη μας. Έγινε λοιπόν φαινοτυπική ανάλυση παρασίτων που απουσιάζει το γονίδιο *trx2* (*trx2⁻*) και παρασίτων που έχει γίνει παράλληλα απαλοιφή και των τριών γονιδίων *msp7*, *msrp1*, *msrp2* (*Δtriplemsp7*). Τα

τρία γονίδια *msp7*, *msrp1*, *msrp2* βρίσκονται το ένα δίπλα στο άλλο στο χρωμόσωμα 13. Με ομόλογο ανασυνδυασμό, στοχεύοντας τις περιοχές ανοδικά του *msrp1* και καθοδικά του *msrp2*, και τα τρία γονίδια αντικαταστάθηκαν με μια κασέτα ανθεκτικότητας στην πυριμεθαμίνη (Andreadaki, 2015 εικόνα S1). Να σημειωθεί ότι τα *trx2*⁻ παράσιτα μας χορηγήθηκαν από την συνεργαζόμενη ομάδα του K.Matuschewski και τα *Δtriplemsp7* παράσιτα από την συνεργαζόμενη ομάδα της R.Tewari. Ως δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν τα αντίστοιχα αγρίου τύπου παράσιτα στα οποία έγινε ο μετασχηματισμός και δημιουργήθηκαν τα δύο μεταλλάγματα, *trx2*⁻ και *Δtriplemsp7*, ANKA και παράσιτα που εκφράζουν GFP, αντίστοιχα. Αρχικά έγινε έλεγχος της γαμετογένεσης των αρσενικών (exflagellation). Δεν βρέθηκαν διαφορές μεταξύ των μεταλλαγμένων και των αγρίου τύπου παρασίτων (εικόνα 5.6A). Έπειτα, ελέγξαμε τα επόμενα στάδια του κύκλου ζωής στο κουνούπι. Όμως, δεν βρέθηκαν διαφορές, ούτε στην μετατροπή σε ωοκινέτες, ούτε στον αριθμό ωοκυστών μετά από τάισμα σε κουνούπια (εικόνα 5.6B,C). Επιπλέον, τα μεταλλαγμένα παράσιτα πέρασαν σε υγιή ποντίκια με το τσίμπημα των κουνουπιών. Στο σύνολό τους, τα αποτελέσματα αυτά μας δείχνουν ότι αυτές οι πρωτεΐνες δεν έχουν κάποια κρίσιμη λειτουργία στην γαμετογένεση και στα στάδια του παρασίτου στο κουνούπι.



Εικόνα 5.6. Φαινοτυπική ανάλυση των *trx2*⁻ και *Δtriplemsp7* μεταλλαγμάτων. Στα διαγράμματα της εικόνας γίνεται σύγκριση του *trx2*⁻ (πορτοκαλί) με WT (ροζ) παράσιτα και του *Δtriplemsp7* (πράσινο) με WT-GFP (γαλάζιο) παράσιτα. Α. Μέσος όρος των αρσενικών που ολοκληρώνουν την γαμετογένεση (exflagellation) ανά οπτικό πεδίο. WT (n=5), *trx2*⁻ (n=14), WT-GFP (n=7), *Δtriplemsp7* (n=21). Β. Ποσοστό μετατροπής σε ωοκινέτες. WT (n=2), *trx2*⁻ (n=3), WT-GFP (n=2), *Δtriplemsp7* (n=3). C. Μέτρηση ωοκυστών με ανοσοφθορισμό (Cap380) μετά το τάισμα *A. gambiae* κουνουπιών με μολυσμένα ποντίκια από κάθε στέλεχος. WT (n=2), *trx2*⁻ (n=2), WT-GFP (n=3), *Δtriplemsp7* (n=3).

Βιολογικές λειτουργίες των γονιδίων με θετική ρύθμιση

Όπως στα γονίδια με αρνητική ρύθμιση, έτσι και στα γονίδια με θετική ρύθμιση έγινε παρόμοια ανάλυση για τις βιολογικές λειτουργίες των 50 πρώτων γονιδίων με μεγαλύτερη αύξηση στην έκφραση σε σχέση με τα αγρίου τύπου παράσιτα. Τα 50 πρώτα γονίδια σε κάθε μετάλλαγμα χωρίστηκαν σε τρεις κατηγορίες: 1) γονίδια που βρέθηκαν στα 50 πρώτα και στα δύο μεταλλάγματα (15 γονίδια), 2) γονίδια που δεν βρέθηκαν στα 50 πρώτα στο δεύτερο μετάλλαγμα αλλά βρίσκονται γενικά στην λίστα των γονιδίων με θετική ρύθμιση στο δεύτερο μετάλλαγμα (17 στο *act2(-)* και 10 στο *CDPK4(-)*), 3) γονίδια που δεν βρέθηκαν καθόλου στα γονίδια με θετική ρύθμιση στο δεύτερο μετάλλαγμα (18 στο *act2(-)* και 25 στο *CDPK4(-)*). Συνολικά λοιπόν βρέθηκαν 85 γονίδια και από τα δύο μεταλλάγματα.

Συγκρίνοντας τις τιμές σχετική έκφρασης (fold of change) μεταξύ των δύο μεταλλαγμάτων για τα γονίδια με αρνητική ρύθμιση που ανήκουν στις δύο πρώτες κατηγορίες, εμφανίζεται κάποια συσχέτιση ανάμεσα στα μεταλλάγματα (εικόνα 5.5B). Το γεγονός αυτό μας δείχνει ότι πιθανόν να υπάρχει μια κοινή έκβαση και στα δύο μεταλλάγματα. Ωστόσο υπάρχουν αρκετά γονίδια που βρίσκονται αποκλειστικά σε ένα από τα δύο μεταλλάγματα, δείχνοντας ότι υπάρχουν και ομοιότητες και διαφορές μεταξύ των δύο μεταλλαγμάτων, κάτι που δεν είναι μη αναμενόμενο καθώς η παύση στην γαμετογένεση και στα δύο μεταλλάγματα έχει διαφορετικό φαινότυπο. Επιπλέον, έγινε ταξινόμηση κάθε γονιδίου με βάση το στάδιο του κύκλου ζωής που εμφανίζει μεγαλύτερη έκφραση, σύμφωνα με δεδομένα που υπάρχουν από αλληλούχιση RNA (RNAseq data) (Otto, 2014). Για περισσότερα από τα μισά γονίδια, η κορύφωση της έκφρασης εντοπίζεται στο στάδιο των γαμετοκυττάρων και των ωοκινετών σε αντίθεση με τα γονίδια που έχουν αρνητική ρύθμιση (εικόνα 5.5D).

Από το σύνολο των 85 γονιδίων, για τα 42 γονίδια υπάρχουν πληροφορίες σχετικά με την λειτουργία των γονιδιακών προϊόντων, ενώ τα υπόλοιπα 43 κωδικοποιούν πρωτεΐνες με άγνωστες λειτουργίες. Τα 42 γονίδια ομαδοποιήθηκαν με βάση την λειτουργία των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν (Andreadaki, 2015 table S5). Έξι γονιδιακά προϊόντα συμμετέχουν στην αναδίπλωση και την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών, τρεις πρωτεΐνες πιθανόν συμμετέχουν στην αποικοδόμηση των πρωτεϊνών

από το πρωτεάσωμα και μια είναι σαπερόνη. Αυτή η ομάδα πρωτεϊνών ίσως να παίζει ρόλο στην παρατεταμένη αναδιοργάνωση του κυττάρου που γίνεται κατά τον μετασχηματισμό των γαμετοκυττάρων σε ζυγωτό και μετά σε ωοκινέτη. Επίσης, βρέθηκαν γονίδια που κωδικοποιούν δύο τοποϊσομεράσες που ίσως έχουν ρόλο κατά τις μιτωτικές διαιρέσεις που συμβαίνουν στην γαμετογένεση. Στο *CDPK4(-)* μετάλλαγμα, το γονίδιο που κωδικοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα AP2-G έχει θετική ρύθμιση. Και στα δύο μεταλλάγματα υπάρχουν γονίδια που κωδικοποιούν τέσσερα ένζυμα και μια πρωτεΐνη-μεταφορέας που σχετίζονται με την γλυκόλυση και τον κύκλο του κιτρικού οξέος. Αυτό ίσως να αντανάκλα αλλαγές στον μεταβολισμό που συμβαίνουν στην γαμετογένεση. Το γονίδιο που εμφανίζει την μεγαλύτερη αύξηση στην έκφραση σε σχέση με τα αγρίου τύπου παράσιτα και στα δύο μεταλλάγματα κωδικοποιεί την N6-αδενινο-μεθυλάση (N6-adenine-specific methylase). Αυτή η πρωτεΐνη έχει κυρίως μελετηθεί στους προκαρυωτικούς οργανισμούς, όπου έχει ρόλο να μεθυλιώνει το DNA, προστατεύοντάς το έτσι από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Όμως, επίσης, βρίσκεται και στους κατώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, όπου έχει προταθεί ένας διαφορετικός ρόλος στην ρύθμιση των αλληλεπιδράσεων DNA-πρωτεϊνών και στην προστασία του DNA κατά τον πολλαπλασιασμό του (Wion, 2006). Επιπλέον υπάρχουν τρεις πρωτεΐνες που βρίσκονται αποκλειστικά στα παράσιτα της ελονοσίας και μια στα Apicomplexa. Και τα τέσσερα γονίδια αυτών των πρωτεϊνών εκφράζονται στα γαμετοκύτταρα ή τους ωοκινέτες. Επίσης, έχουν αρνητική ρύθμιση στο μετάλλαγμα μιας RNA-ελικάσης (DOZI) που παίζει ρόλο για την ισορροπία του mRNA στα θηλυκά γαμετοκύτταρα και απουσία της τα ζυγωτά δεν μετασχηματίζονται σε ωοκινέτες (Mair, 2010). Σε πέντε γονίδια έχει γίνει επιτυχώς απαλοιφή, αλλά μόνο στην περίπτωση του AP-2G αναφέρεται πρόβλημα στα φυλετικά στάδια. Σε αυτό το μετάλλαγμα δεν μπορούν να σχηματιστούν ώριμα γαμετοκύτταρα (Sinha, 2014). Ωστόσο δεν είναι ξεκάθαρο εάν η αύξηση των μεταγράφων αυτού του γονιδίου έχει κάποια επίδραση στην ανάπτυξη των γαμετοκυττάρων, όπως αυτή στο *act2(-)* μετάλλαγμα.

5.3 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στο σύνολό τους τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η απουσία της ακτίνης 2 και της CDPK4 οδηγεί σε μια γενικότερη διαταραχή των μεταγραφικών επιπέδων μιας πληθώρας γονιδίων που αντιστοιχούν περίπου στο 12% του γονιδιώματος των παρασίτων (599/4979). Αυτό ήταν μη αναμενόμενο, δεδομένου ότι καμία από τις δύο πρωτεΐνες δεν φαίνεται να σχετίζεται άμεσα με την μεταγραφική ρύθμιση. Μια αξιοσημείωτη παρατήρηση είναι ότι σε καμία περίπτωση δεν βρέθηκε κάποιο γονίδιο να έχει θετική ρύθμιση στο ένα μετάλλαγμα και αρνητική ρύθμιση στο άλλο. Περιορίζοντας την ανάλυση στα 50 πρώτα γονίδια που παρουσιάζουν την μεγαλύτερη διαφορά στην έκφραση στα δύο μεταλλάγματα, σε σχέση με τα αγρίου τύπου παράσιτα, βρέθηκαν κοινά γονίδια με θετική ή αρνητική ρύθμιση και στις δύο περιπτώσεις. Ωστόσο, υπάρχουν και γονίδια που παρουσιάζουν διαφορά στα επίπεδα έκφρασης αποκλειστικά σε ένα από τα δύο μεταλλάγματα. Επίσης, ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα περισσότερα γονίδια με αρνητική ρύθμιση στα δύο μεταλλάγματα εμφανίζουν μέγιστα επίπεδα έκφρασης στα αγρίου τύπου παράσιτα στα μη φυλετικά στάδια. Το αντίθετο συμβαίνει για τα γονίδια με θετική ρύθμιση, που εμφανίζουν μέγιστα επίπεδα έκφρασης στο στάδιο των γαμετοκυττάρων ή των ωοκινετών.

Στα παράσιτα της ελονοσίας, η γνώση που έχουμε για την μεταγραφική ρύθμιση και το πώς αυτή ρυθμίζεται στα διαφορετικά στάδια του κύκλου ζωής είναι περιορισμένη. Η πρόσφατη ανακάλυψη του μεταγραφικού παράγοντα AP2-G δείχνει ότι η προγραμματισμένη φυλετική ανάπτυξη ρυθμίζεται σε επίπεδο μεταγραφής (Sinha, 2014, Kafsack, 2014). Στην παρούσα μελέτη έγινε ανάλυση των γαμετοκυττάρων δύο μεταλλαγμάτων, όπου υπάρχει παύση στην διαδικασία της γαμετογένεσης. Ενώ οι φαινότυποι των δύο μεταλλαγμάτων έχουν περιγραφεί με μεγάλη λεπτομέρεια σε κυτταρικό επίπεδο, δεν γνωρίζουμε την λειτουργία αυτών των δύο πρωτεϊνών σε μοριακό επίπεδο, με ποιες άλλες πρωτεΐνες μπορεί να αλληλοεπιδρούν ή την χρονική στιγμή που είναι απαραίτητες. Και τα δύο γονίδια μεταγράφονται νωρίς στην ανάπτυξη των γαμετοκυττάρων. Έτσι, μια πιθανότητα είναι ότι έχουν δράση πολύ πριν την έναρξη της γαμετογένεσης. Έχει βρεθεί ότι η ακτίνη 1 εντοπίζεται στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα των αρσενικών γαμετοκυττάρων,

αλλά μετά την ενεργοποίηση της γαμετογένεσης ανιχνεύεται αποκλειστικά στο κυτταρόπλασμα (Deligianni, 2011). Στα παράσιτα που απουσιάζει η ακτίνη 2, η ακτίνη 1 παραμένει στον πυρήνα. Επίσης έχει δείχτει ότι η ακτίνη 1 έχει ρόλο στην έκφραση των γονιδίων στα μη φυλετικά στάδια (Zhang, 2011). Συνεπώς υπάρχει μια πιθανότητα η ακτίνη 2 να έχει έναν έμμεσο ρόλο στην ρύθμιση της μεταγραφής στα γαμετοκύτταρα μέσω της ακτίνης 1. Ωστόσο δεν υπάρχουν ακόμη πειραματικά δεδομένα που να το επιβεβαιώνουν.

Από τα γονίδια με αρνητική ρύθμιση επιλέχθηκαν τέσσερα στα οποία η έκφραση είναι πολύ μικρότερη από τα αγρίου τύπου παράσιτα. Ακολούθησε φαινοτυπική ανάλυση των μεταλλαγμάτων *trx2* και *Δtriplemsp7* στα οποία απουσιάζουν τα γονίδια αυτά. Όμως δεν εντοπίσαμε κάποιο ιδιαίτερο φαινότυπο στα στάδια του παρασίτου στο κουνούπι, σε σχέση με τα αγρίου τύπου παράσιτα. Για δεκαεπτά γονίδια που εμφανίζουν διαφορά στην έκφραση στην παρούσα μελέτη, έχει γίνει επιτυχώς η καταστροφή τους. Από αυτά, τα επτά δεν έχουν φαινότυπο στα φυλετικά στάδια, ενώ για δύο δεν υπάρχουν πληροφορίες σχετικά με τα στάδια αυτά. Η καταστροφή δύο γονιδίων έχει φαινότυπο στα φυλετικά στάδια. Αναφέρεται ότι η απαλοιφή του γονιδίου *nti* έχει φαινότυπο στην γαμετογένεση (Aly, 2010) και η απώλεια του μεταγραφικού παράγοντα AP2-2 έχει ως αποτέλεσμα την απουσία γαμετοκυττάρων (Sinha, 2014, Kafsa, 2014). Όμως στην περίπτωση που απουσιάζει η ακτίνη 2 ή η CDPK4, σχηματίζονται ώριμα γαμετοκύτταρα και το πρόβλημα εστιάζεται στην ολοκλήρωση της γαμετογένεσης. Έτσι, καταρρίπτεται η αρχική υπόθεση ότι η παύση στην γαμετογένεση συνοδεύεται από την αρνητική ρύθμιση γονιδίων με σημαντικές λειτουργίες στα φυλετικά στάδια, τουλάχιστον για τις περιπτώσεις που υπάρχουν διαθέσιμα δεδομένα. Συνεπώς θα μπορούσαμε να πούμε ότι **η απώλεια της ακτίνης 2 ή της ασβεστο-εξαρτώμενη κινάσης 4 που οδηγούν στην παύση της γαμετογένεσης, δεν επηρεάζει άμεσα συγκεκριμένα γονίδια με σημαντικές λειτουργίες αλλά οδηγεί σε διαταραχή πολλών μεταγράφων του κυττάρου (12% του γονιδιώματος).**

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

Γενική συζήτηση

Τα παράσιτα της ελονοσίας έχουν ένα περίπλοκο κύκλο ζωής που αποτελείται από πολλά διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια. Τα τελευταία χρόνια η έρευνα σε αυτό το πεδίο εστιάζει στα στάδια του παρασίτου στο κουνούπι στα πλαίσια της παρεμπόδισης της μετάδοσης της νόσου. Η επιβίωση του παρασίτου στον φορέα μετάδοσης της νόσου ξεκινάει με την γαμετογένεση.

Στο πρώτο κεφάλαιο μελετήσαμε την έξοδο των θηλυκών και αρσενικών παρασίτων από το ερυθροκύτταρο-ξενιστή κατά την γαμετογένεση. Η έξοδος και στα θηλυκά και τα αρσενικά έχει κοινά χαρακτηριστικά και αποτελείται από τέσσερις διακριτές φάσεις. Σε σχέση με την έξοδο των μεροζωιδίων υπάρχουν ομοιότητες, αλλά και βασικές διαφορές. Στο σύνολό τους τα αποτελέσματα αποκαλύπτουν μια δυναμική αναδιοργάνωση των δύο μεμβρανών που περιβάλλουν το παράσιτο (PVM και RBCM) μέσα σε αυτήν την σύντομη διαδικασία της εξόδου. Το μοντέλο εξόδου των γαμετοκυττάρων που παρουσιάζουμε σε αυτήν την μελέτη, δίνει τη δυνατότητα να ανατρέξουμε στα μεταλλάγματα που η διαδικασία της εξόδου μπλοκάρεται και να δούμε σε ποια από τις φάσεις εξόδου υπάρχει πρόβλημα. Ιδιαίτερα σημαντικό για την περαιτέρω ανάλυση είναι να βρεθούν νέοι δείκτες για το εσωτερικό και το εξωτερικό τμήμα της PVM και της RBCM. Η γαμετογένεση είναι ένα βασικό σημείο στον κύκλο ζωής του παρασίτου και αυτό σημαίνει ότι χρειάζονται περισσότερες μελέτες για να κατανοήσουμε την βιολογία αυτής της σειράς γεγονότων.

Στα επόμενα κεφάλαια εστιάζουμε την μελέτη μας στην ακτίνη 2, μια πρωτεΐνη που είναι απαραίτητη στην γαμετογένεση. Προηγούμενες μελέτες από το εργαστήριό μας έδειξαν ότι, απουσία της ακτίνης 2, η γαμετογένεση των αρσενικών παρασίτων μπλοκάρεται, οι αρσενικοί γαμέτες δεν εκβάλλουν από το κύτταρο και οι δύο μεμβράνες που περιβάλλουν το παράσιτο παραμένουν ανέπαφες (Deligianni, 2011). Θέλοντας να εμβαθύνουμε στον ρόλο που έχουν οι δύο διαφορετικές isoμορφές ακτίνης στο παράσιτο, προχωρήσαμε σε μια σειρά πειραμάτων. Έγινε αντικατάσταση του γονιδίου *ακτίνη 2* με το γονίδιο *ακτίνη 1* στον γονιδιακό τόπο *ακτίνη 2*. Ο έλεγχος της έκφρασης σε επίπεδο μεταγράφων δείχνει παρόμοια επίπεδα και φανερώνει ότι η γονιδιακή έκφραση που εξαρτάται από τα *cis* ρυθμιστικά στοιχεία στον γονιδιακό τόπο *ακτίνη 2* είναι τελικά ανεξάρτητη από την ταυτότητα του ORF. Με την αντικατάσταση της

ακτίνης 2 με την ακτίνη 1, ελάχιστα αρσενικά παράσιτα ολοκληρώνουν την γαμετογένεση, που δείχνει ότι οι δύο ισομορφές έχουν διαφορετικές λειτουργίες σε αυτό το στάδιο. Η τοποθέτηση της χμαιρικής ακτίνης 1, που σχηματίζει, όπως και η ακτίνη 2, μακριά ινίδια *in vitro*, επαναφέρει την γαμετογένεση *in vivo*, υποδηλώνοντας την αναγκαιότητα πολυμερισμού της ακτίνης 2 στην γαμετογένεση. Ένας δεύτερος ζωτικής σημασίας ρόλος της ακτίνης 2 βρέθηκε στην ανάπτυξη των ωοκυστών. Ο ρόλος αυτός είναι ανεξάρτητος από τον ρόλο που έχει η ακτίνη 2 στην γαμετογένεση, και η λειτουργία της πιθανώς δεν εξαρτάται από τον πολυμερισμό. Τέλος το προφίλ γονιδιακής έκφρασης σε γαμετοκύτταρα που απουσιάζει είτε η ακτίνη 2 είτε η CDPK4 παρουσιάζει διαταραχή. Αυτό ήταν μη αναμενόμενο δεδομένου ότι καμία από τις δύο πρωτεΐνες δεν φαίνεται να σχετίζεται άμεσα με την μεταγραφική ρύθμιση.

Στα παράσιτα της ελονοσίας η γνώση που έχουμε για την μεταγραφική ρύθμιση και το πώς αυτή ρυθμίζεται στα διαφορετικά στάδια του κύκλου ζωής είναι περιορισμένη. Έχει βρεθεί ότι η ακτίνη 1 εντοπίζεται στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα των αρσενικών γαμετοκυττάρων, αλλά μετά την ενεργοποίηση της γαμετογένεσης ανιχνεύεται αποκλειστικά στο κυτταρόπλασμα (Deligianni, 2011). Στα παράσιτα που απουσιάζει η ακτίνη 2, η ακτίνη 1 παραμένει στον πυρήνα. Επίσης έχειδειχτεί ότι η ακτίνη 1 έχει ρόλο στην έκφραση των γονιδίων στα μη φυλετικά στάδια (Zhang, 2011). Συνεπώς, υπάρχει το ενδεχόμενο η ακτίνη 2 να έχει έναν έμμεσο ρόλο στην ρύθμιση της μεταγραφής στα γαμετοκύτταρα μέσω της ακτίνης 1. Σαν ένα επόμενο βήμα θα μπορούσε να γίνει έλεγχος της παρουσίας της ακτίνης 1 στον πυρήνα των *act2 rep* και των χμαιρικών μεταλλαγμάτων.

Η ρύθμιση του ίδιου του γονιδίου *ακτίνη 2* είναι σημαντική. Στα μη φυλετικά στάδια, το γονίδιο *ακτίνη 2* είναι μεταγραφικά ανενεργό, ενώ στα αρσενικά και θηλυκά γαμετοκύτταρα είναι ενεργό. Όμως, στα θηλυκά γαμετοκύτταρα υπάρχει μεταφραστική αναστολή του μεταγράφου και μόνο στα αρσενικά εντοπίζεται η πρωτεΐνη. Στους γαμέτες, το γονίδιο είναι μεταγραφικά ενεργό και στα δύο φύλα και η πρωτεΐνη εντοπίζεται τόσο στα αρσενικά όσο και στα θηλυκά (Deligianni, 2011). Στο ζυγωτό, η έκφραση της πρωτεΐνης γίνεται από το γονίδιο που κληρονομήθηκε από τον θηλυκό γαμέτη, ενώ η έκφραση από το αρσενικό σταματάει μετά την γονιμοποίηση. Η

υπερέκφραση GFP::*actin 2* από επίσωμα αναστέλλει την λειτουργία της ενδογενούς ακτίνης 2, έχοντας ως αποτέλεσμα την αναστολή της ανάπτυξης του ζυγωτού σε ωοκινέτη. Αυτή η τοξική επίδρασή της οφείλεται στο GFP, αφού η υπερέκφραση της ακτίνης 2 από επίσωμα χωρίς το GFP οδηγεί στον σχηματισμό ωοκινετών (Andreadaki, 2014). Τα παραπάνω πειράματα που έχουν γίνει από το εργαστήριό μας σε προηγούμενες μελέτες αλλά και τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης φανερώνουν την ανάγκη για σωστή ρύθμιση του γονιδίου *ακτίνη 2* στον κατάλληλο χρόνο και τόπο.

Η αναγκαιότητα για σωστή ρύθμιση του γονιδίου *ακτίνη 2* φαίνεται και από δεδομένα από πειράματα που δεν έχουν ολοκληρωθεί και για αυτό δεν παρουσιάζονται ως κύρια εργασία. Η γονιδιακή κατασκευή που χρησιμοποιήθηκε για την δημιουργία των *act2 com* παρασίτων στην παρούσα μελέτη τοποθετήθηκε σε άλλο πλασμιδιακό φορέα και ενσωματώθηκε στο γονιδίωμα των *act2-::mcherry* παρασίτων σε άλλη θέση και όχι στον γονιδιακό τόπο *ακτίνη 2*, όπως κάναμε στα *act2 com* παράσιτα. Η άλλη θέση είναι το C/D SSU που κωδικοποιεί την μικρή υπομονάδα του ριβοσωμικού RNA. Αυτός ο γονιδιακός τόπος έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για έκφραση γονιδίων (Franke-Fayard, 2004). Και στις δύο περιπτώσεις στόχος ήταν να επαναφέρουμε το γονίδιο *ακτίνη 2* στα *act2-::mcherry* από όπου και απουσιάζει οδηγώντας σε παύση της γαμετογένεσης. Τα *act2 com* μετασχηματισμένα παράσιτα είδαμε ότι συμπεριφέρονται σαν αγρίου τύπου και ο κύκλος ζωής συνεχίζεται φυσιολογικά. Ωστόσο στα νέα μετασχηματισμένα *act2 com* (SSU) παράσιτα, ο αριθμός των αρσενικών που ολοκληρώνουν την γαμετογένεση είναι μικρότερος και παρατηρήσαμε έναν ιδιαίτερο φαινότυπο στις ωοκύστες. Πολλές ωοκύστες παραμένουν μικρές και εκφυλισμένες, ενώ σε αυτές που φαίνεται να αναπτύσσονται και να ολοκληρώνουν την σπορογονία, τα σποροζωίδια έχουν χάσει την κινητικότητά τους. Τα πρώτα αυτά αποτελέσματα δείχνουν ότι η σωστή έκφραση από τον ίδιο τον γονιδιακό τόπο *ακτίνη 2* είναι απαραίτητη.

Μια πρωτεωμική ανάλυση στα σποροζωίδια του *P.yoelli* δείχνει την παρουσία της ακτίνης 2 στα σποροζωίδια των σιελογόνων αδένων του κουνουπιού (Lindner, 2013). Προκύπτει λοιπόν το ερώτημα εάν αυτή η πρωτεΐνη έχει δράση και σε αυτό το μεταβατικό στάδιο από τον ένα ξενιστή στον άλλο. Θα μπορούσε μελλοντικά να γίνει

στοχευμένη απαλοιφή του γονιδίου της ακτίνης 2 στο στάδιο των σποροζωιδίων, όπως περιγράφεται στα *P. berghei* σποροζωΐδια με την τεχνολογία ανασυνδιασμού FLP/FRT (Lacroix, 2011).

Η δύο ισομορφές ακτίνης διαφέρουν τόσο σε επίπεδο αλληλουχίας και δομής, όσο και στις ιδιότητες πολυμερισμού και τον ρόλο τους μέσα στο κύτταρο. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης δείχνουν ότι η ακτίνη 2 έχει διαφορετικούς και κρίσιμους ρόλους σε διάφορα στάδια του κύκλου ζωής που διαφέρουν από την ακτίνη 1. Όμως η ακριβής λειτουργία των δύο ισομορφών δεν έχει ακόμη αποσαφηνιστεί. Μελλοντικές μελέτες που να στοχεύουν στην ταυτοποίηση πρωτεϊνών που προσδένονται στην ακτίνη 2 ή και την ακτίνη 1, θα βοηθούσαν στην κατανόηση της λειτουργίας τους. Πιθανόν να βοηθούσαν και στην σύνδεση με άλλα μεταλλάγματα που παρουσιάζουν παρόμοιους φαινότυπους, όπως αυτό της πρωτεΐνης C-CAP (Hliscs, 2010). Τέλος χρειάζεται η επανάληψη του μετασχηματισμού των *Ocact* και *act1/act2 D-loop* χμιαρικών μεταλλαγμάτων. Τα αποτελέσματα αυτά σε συνδυασμό με δομικές μελέτες θα μας βοηθήσουν στην κατανόηση των δύο ρόλων της ακτίνης 2.

Μια νέα στρατηγική καταπολέμησης της νόσου είναι η παρεμπόδιση της μετάδοσης (ΠΤΜ) που στοχεύει στα αναπτυξιακά στάδια του παρασίτου στο κουνούπι. Όμως, για την προώθηση της μεθόδου, χρειάζονται πολύ περισσότερες γνώσεις για τις διεργασίες του παρασίτου και τα μόρια που εμπλέκονται. Στην παρούσα μελέτη αποκαλύπτεται ο διπλός ρόλος που έχει η ακτίνη 2, τόσο στην γαμετογένεση, όσο και στην ανάπτυξη των ωοκυστών στο κουνούπι, δύο βασικά αναπτυξιακά στάδια. Τα αποτελέσματα αυτά θα μπορούσαν να βοηθήσουν στις προσπάθειες που γίνονται για τον έλεγχο μετάδοσης της ελονοσίας. Η κατασκευή φαρμάκων που να στοχεύουν τις ακτίνες του παρασίτου δεν είναι μια εύκολη διαδικασία, καθώς ακτίνες υπάρχουν και στα ανθρώπινα κύτταρα. Όμως η ανεύρεση πρωτεϊνών που αλληλοεπιδρούν με τις παρασιτικές ακτίνες σε αυτά τα δύο κρίσιμα αναπτυξιακά στάδια, θα μπορούσαν να είναι πιθανοί φαρμακευτικοί στόχοι.

Κεφάλαιο 7

Υλικά και μέθοδοι

7.1 Ηθική και δεοντολογία

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τους ελληνικούς κανόνες που αποτελούνται από το προεδρικό διάταγμα (160/91) και τον νόμο (2015/92) και εκτελούν την οδηγία 86/609/EEC από την ευρωπαϊκή ένωση και την ευρωπαϊκή σύμβαση για την προστασία των σπονδυλωτών ζώων που χρησιμοποιούνται για πειραματικούς και άλλους επιστημονικούς σκοπούς και την νέα νομοθεσία του προεδρικού διατάγματος 56/2013. Τα πειράματα διεξήχθησαν σε εγκαταστάσεις ζώων με πιστοποιημένη άδεια (EL91-BIOexp-02) και το πρωτόκολλο έχει εγκριθεί από την επιτροπή αξιολόγησης πειραμάτων σε πειραματόζωα του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας (6740/8/10/2014) και την νομαρχία της Κρήτης (αριθμός άδειας #27290,15/12/2014).

7.2 Μέθοδοι παρασιτολογίας

7.2.1 Στελέχη παρασίτων

Τα αγρίου τύπου *P.berghei* στελέχη παρασίτων που χρησιμοποιήθηκαν συνολικά σε αυτήν την μελέτη είναι το ANKA 2.34, το ANKA 820clm1cl1 (RMgm-164) και το WT-GFP. Το ευρέως χρησιμοποιούμενο στέλεχος ANKA 2.34 χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη εξόδου των γαμετοκυττάρων από το ερυθροκύτταρο-ξενιστή, την μελέτη αντικατάστασης του γονιδίου *ακτίνη 2* και την μελέτη του προφίλ της γονιδιακής έκφρασης στα γαμετοκύτταρα (κεφάλαια 2, 3, 4, 5 αντίστοιχα). Το αγρίου τύπου στέλεχος ANKA 820clm1cl1 (RMgm-164), που εδώ αποκαλούμε στέλεχος 820, χρησιμοποιήθηκε στην μελέτη εξόδου των γαμετοκυττάρων από το ερυθροκύτταρο-ξενιστή (κεφάλαιο 2), στο οποίο αποκλειστικά τα θηλυκά γαμετοκύτταρα εκφράζουν την κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (Red Fluorescent Protein, RFP), ενώ τα αρσενικά γαμετοκύτταρα εκφράζουν την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (Green Fluorescent Protein, GFP) (Ponzi, 2009). Το στέλεχος WT-GFP (Janse, 2006) που εκφράζει σταθερά την GFP, χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα ελέγχου στην φαινοτυπική μελέτη του μεταλλάγματος *Δtriplemsp7* (κεφάλαιο 5), καθώς ήταν αυτό που μετασχηματίστηκε για την δημιουργία του *Δtriplemsp7*. Η έκφραση των φθορίζοντων πρωτεϊνών σε αυτά τα στελέχη δεν έχει κάποια επίπτωση στην

αρμοστικότητα των παρασίτων. Επιπλέον, για τα πειράματα απεικόνισης της μεμβράνης του παρασιτοφόρου κενωτοπίου κατά την διαδικασία της εξόδου σε ζωντανά δείγματα χρησιμοποιήθηκαν αγρίου τύπου παράσιτα στα οποία έχει εισαχθεί επίσωμα για την έκφραση η φθορίζουσα πρωτεΐνη PVMG-mcherry (κεφάλαιο 2). Η κατασκευή έγινε από την μεταπτυχιακή φοιτήτρια Χαρίκλεια Σπανού.

Δύο μεταλλάγματα υπάρχουν στα οποία έχει καταστραφεί το γονίδιο *ακτίνη 2* και παρουσιάζουν τον ίδιο φαινότυπο αδυναμίας εκβολής των αρσενικών γαμετών από το γαμετοκύτταρο και το ερυθροκύτταρο-ξενιστή του. Το μετάλλαγμα *act2(-)* έχει κατασκευαστεί στο εργαστήριό μας, όπου το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου *ακτίνη 2* έχει διακοπεί από την ένθεση κασέτας ανθεκτικότητας στην πυριμεθαμίνη (Deligianni, 2011). Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη του προφίλ της γονιδιακής έκφρασης στα γαμετοκύτταρα απουσία της ακτίνης 2 (κεφάλαιο 5). Το μετάλλαγμα *act2::mCherry* έχει κατασκευαστεί από ομάδα συνεργατών μας με πλήρη απαλοιφή του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης του γονιδίου *ακτίνη 2* με διπλό ομόλογο ανασυνδυασμό (Kooij, 2012). Σε αυτά τα παράσιτα, μεταξύ των 5' και 3' πλευρικών περιοχών (Flanking Regions, FR) που πλαισιώνουν το γονίδιο *ακτίνη 2* βρίσκεται η κωδική περιοχή για την κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη mCherry και μια κασέτα έκφρασης της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης GFP, ενώ η κασέτα ανθεκτικότητας έχει φύγει με ομόλογο ανασυνδυασμό και την μέθοδο της ανακύκλωσης μέσω θετικής/αρνητικής επιλογής (λεπτομέρειες εικόνα 3.2) (Kooij, 2012). Τα *act2::mCherry* παράσιτα χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη αντικατάστασης του γονιδίου *ακτίνη 2* (κεφάλαια 3, 4) για τον μετασχηματισμό, αφού φέρουν το πλεονέκτημα απουσίας ανθεκτικότητας.

Στην μελέτη του προφίλ της γονιδιακής έκφρασης στα γαμετοκύτταρα χρησιμοποιήθηκε και το μετάλλαγμα που απουσιάζει η ασβεστο-εξαρτώμενη κινάση 4, *CDPK4(-)* (κεφάλαιο 5) (Bilker, 2004). Περαιτέρω ανάλυση έγινε για τέσσερα γονίδια που εμφανίζουν αρνητική ρύθμιση στην μελέτη του προφίλ γονιδιακής έκφρασης (κεφάλαιο 5) και στα δύο μεταλλάγματα *act2(-)* και *CDPK4(-)*. Τα γονίδια αυτά είναι τα εξής: *trx2*, *mSP7*, *mSP1*, *mSP2*, όπου τα τρία τελευταία ανήκουν στην ίδια οικογένεια γονιδίων και στον ίδιο γενετικό τόπο. Κατασκευάστηκε το τριπλό

μετάλλαγμα *Δtriplemsp7* παρασίτων όπου έχει γίνει απαλοιφή ολόκληρου του γενετικού τόπου που περιλαμβάνει και τα τρία γονίδια *msp7*, *msrp1*, *msrp2* μέσω διπλού ομόλογου ανασυνδιασμού και αντικατάστασής του με κασέτα ανθεκτικότητας. Το τριπλό μετάλλαγμα χορηγήθηκε για φαινοτυπική μελέτη από την συνεργαζόμενη ομάδα της R. Tewari. Φαινοτυπική ανάλυση έγινε και στο *trx2⁻* μετάλλαγμα, το οποίο χορηγήθηκε από την συνεργαζόμενη ομάδα του K. Matuschewski. Η απαλοιφή του γονιδίου *trx2* έγινε με διπλό ομόλογο ανασυνδιασμό όπως και στην περίπτωση των *act2⁻::mCherry* (Matz, 2013).

Για την μελέτη αντικατάστασης της ακτίνης 2 συνολικά κατασκευάστηκαν έξι διαφορετικά μεταλλάγματα *act2⁻::mCherry* μετασχηματισμένων παρασίτων (κεφάλαια 3, 4). Στα μεταλλάγματα αυτά, στον γονιδιακό τόπο *ακτίνη 2*, όπου έχει αφαιρεθεί το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου *ακτίνη 2*, γίνεται αντικατάσταση με έξι διαφορετικά γονίδια. Αυτά είναι τα εξής: το ίδιο το γονίδιο *ακτίνη 2*, το γονίδιο *ακτίνη 1*, το γονίδιο *α-ακτίνη* από το *O.cuniculus* και άλλα τρία χιμαιρικά γονίδια. Τα αντίστοιχα μεταλλαγμένα παράσιτα που προκύπτουν έπειτα από αυτούς τους μετασχηματισμούς είναι τα *act2 com*, τα *act2 rep*, τα *Ocact* και τα τρία χιμαιρικά *act1 chi*, *a-act chi*, *act1/act2 D-loop*. Η στρατηγική που ακολουθήθηκε για την κατασκευή των μεταλλαγμένων παρασίτων παρουσιάζεται παρακάτω.

Πίνακας 1. Στελέχη παρασίτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

Στέλεχος παρασίτου	Τύπος μετάλλαξης	Κεφάλαιο
ANKA 2.34	αγρίου τύπου	2, 3, 4, 5
ANKA 820clm1cl1	έκφραση διαγονιδίου φθορίζουσας πρωτεΐνης	2
WT-GFP	έκφραση διαγονιδίου φθορίζουσας πρωτεΐνης	5
PVMG-mcherry	έκφραση διαγονιδίου φθορίζουσας πρωτεΐνης	2
<i>act2(-)</i>	καταστροφή γονιδίου	5
<i>act2⁻::mCherry</i>	καταστροφή γονιδίου	3, 4
<i>CDPK4(-)</i>	καταστροφή γονιδίου	5
<i>Δtriplemsp7</i>	καταστροφή γονιδίου	5
<i>trx2⁻</i>	καταστροφή γονιδίου	5
<i>act2 com</i>	συμπλήρωση γονιδίου	3
<i>act2 rep</i>	αντικατάσταση γονιδίου	3
<i>Ocact</i>	αντικατάσταση γονιδίου	4
<i>act1 chi</i>	αντικατάσταση γονιδίου	4
<i>a-act chi</i>	αντικατάσταση γονιδίου	4
<i>act1/act2 D-loop</i>	αντικατάσταση γονιδίου	4

7.2.2 Διατήρηση παρασίτων

Τα στελέχη των παρασίτων διατηρούνται σε ποντίκια Theiler's original ηλικίας 6-10 εβδομάδων με ενδοπεριτοναϊκή ένεση με μολυσμένο αίμα. Να σημειωθεί ότι στα πειράματα βιντεοσκόπησης της εξόδου των γαμετοκυττάρων από το ερυθροκύτταρο ξενιστή χρησιμοποιήθηκαν Swiss ποντίκια, καθώς τα συγκεκριμένα πειράματα διεξήχθησαν στο εργαστήριο δυναμικής των μεμβρανικών αλληλεπιδράσεων στο Université Montpellier 2 (UM2), στην Γαλλία. Μέχρι δέκα συνεχόμενες μεταγίσεις γίνονται, έτσι ώστε να αποφευχθεί η πιθανότητα τυχών χρωμοσωμικών αλλαγών. Το αίμα συλλέγεται από το μολυσμένο ποντίκι με καρδιακή παρακέντηση, στο οποίο πρώτα έχει χορηγηθεί ένα μείγμα αναισθητικού και αναλγητικού. Για την αποφυγή πήξης του αίματος χρησιμοποιείται σύριγγα με ηπαρίνη.

Για την αύξηση των γαμετοκυττάρων στο μολυσμένο αίμα, δύο μέρες πριν την μόλυνση σε κάθε ποντίκι χορηγούνται ενέσιμα 200μl από 6 mg/ml διάλυμα φαινυλδραζίνη σε 0,9% NaCl. Στα παράσιτα της ελονοσίας *P.berghei* έχειδειχθεί ότι ο αριθμός των γαμετοκυττάρων αυξάνεται με την επαγωγή αναιμίας στο ποντίκι, χρησιμοποιώντας το φάρμακο φαινυλδραζίνη. Αυτό οδηγεί σε μια αυξημένη ερυθροποίηση, η οποία ευνοεί την ανάπτυξη των γαμετοκυττάρων λόγω της προτίμησής τους στα ανώριμα ερυθροκύτταρα (reticulocytes). Γενικά, πολλές μελέτες αποδεικνύουν την προτίμηση και του *P.berghei* και του *P.falciparum* για τα ανώριμα ερυθροκύτταρα (Cromer, 2006, McNally, 1992, Trager, 1992, Trager, 1999). Επιπλέον, στα ποντίκια που έχει χορηγηθεί το φάρμακο φαινυλδραζίνη, ο αριθμός των ερυθροκυττάρων που έχουν μολυνθεί με πάνω από ένα παράσιτα είναι μικρότερος. Στα πολλαπλά μολυσμένα ερυθροκύτταρα, τα παράσιτα δεν αναπτύσσονται φυσιολογικά σε υγιείς ώριμους σχίζοντες (Janse, 2004 μέθοδοι παρασιτολογίας).

7.2.3 Μέτρηση παρασιταιμίας και ποσοστού γαμετοκυττάρων

Η μέτρηση της παρασιταιμίας, δηλαδή το ποσοστό των μολυσμένων ερυθροκυττάρων στα κύτταρα του αίματος, και η μέτρηση του ποσοστού των γαμετοκυττάρων στο σύνολο των μολυσμένων κυττάρων, γίνεται με χρώση Giemsa. Η χρώση Giemsa προσδέεται ειδικά στις φωσφορικές ομάδες του DNA, έτσι τα απύρρινα

ερυθροκύτταρα ξεχωρίζουν από τα μολυσμένα με παράσιτα ερυθροκύτταρα. Για τον έλεγχο με χρώση Giemsa, μια μικρή σταγόνα μολυσμένου αίματος απλώνεται σε αντικειμενοφόρο πλάκα και η καταμέτρηση των παρασίτων του δείγματος γίνεται σε οπτικό μικροσκόπιο.

7.2.4 Καλλιέργεια σχιζόντων

Η καλλιέργεια των σχιζόντων χρησιμοποιείται για την μόλυνση των ποντικών με συγχρονισμένα παράσιτα και στον μετασχηματισμό των παρασίτων. Τα παράσιτα διατηρούνται *in vitro* για μόνο έναν κύκλο ανάπτυξης. Τα παράσιτα στο στάδιο του δακτυλίου και οι νέοι τροφοζώιτες μπορούν να αναπτυχθούν σε ώριμους σχιζόντες σε 16-23 ώρες. Συλλέγεται αίμα από μολυσμένο ποντίκι όταν η παρασιταιμία βρίσκεται γύρω στο 1-3% και αναμιγνύεται με θρεπτικό μέσο καλλιέργειας RPMI1640 (pH 7,3) που περιέχει FCS (foetal calf serum) και 0,05 mg/ml τελική συγκέντρωση νεομυκίνης. Στην καλλιέργεια προστίθεται για δύο λεπτά μείγμα αερίων 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ και γίνεται επώαση για 20-24 ώρες στους 36,5-37°C. Η θερμοκρασία της καλλιέργειας είναι κρίσιμη, καθώς ο ρυθμός ανάπτυξης των παρασίτων εξαρτάται από την καλλιέργεια. Σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες τα παράσιτα καταστρέφονται και σε μικρότερες θερμοκρασίες απαιτείται περισσότερος χρόνος για να φτάσουν στο ώριμο στάδιο του σχιζόντα. Για τον ποιοτικό έλεγχο της καλλιέργειας, ένα δείγμα παρατηρείται στο οπτικό μικροσκόπιο μετά από χρώση με Giemsa. Οι υγιείς και ώριμοι σχιζόντες διακρίνονται από την παρουσία 12-24 μεροζωιδίων μέσα στο ερυθροκύτταρο.

7.2.5 Καθαρισμός σχιζόντων

Οι σχιζόντες απομονώνονται από τα υπόλοιπα μη μολυσμένα κύτταρα με διαβάθμιση συγκέντρωσης Nycodenz 27,6% σε διάλυμα που περιέχει 5 mM Tris/HCl, 3 mmol/L KCl, 0.3 mmol/L CaNa₂EDTA, pH 7,2. Αναμιγνύονται 5,5 ml διαλύματος Nycodenz με 4,5 ml PBS και από πάνω τοποθετούνται 25ml καλλιέργειας. Ακολουθεί φυγοκέντρηση 1500 rpm για 25-30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου χωρίς φρένο. Με την φυγοκέντρηση δημιουργείται ένας ενδιάμεσος καφέ δακτύλιος στον οποίον βρίσκονται οι σχιζόντες, τα μη μολυσμένα κύτταρα βρίσκονται στον πυθμένα. Ο καφέ

δακτύλιος συλλέγεται και ακολουθούν δύο διαδοχικά ξεπλύματα με το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας. Τέλος, ένα μικρό μέρος ελέγχεται με χρώση Giemsa για την ποιότητα του δείγματος.

7.2.6 Μετασηματισμός παρασίτων

Στην παρούσα μελέτη *act2::mCherry* παράσιτα μετασηματίστηκαν με τις αντίστοιχες πλασμιδιακές κατασκευές. Η διαδικασία του μετασηματισμού γίνεται σύμφωνα με προηγούμενες περιγραφές (Janse, 2006). Συνοπτικά, καθαρισμένοι σχίζοντες αναμειγνύονται με διάλυμα Nucleofactor 88A6 (Amaxa, GmbH) και 10μg πλασμιδιακού φορέα που έχει ευθυγραμμιστεί με πέψη περιοριστικού ενζύμου σε μια θέση του φορέα. Τα πλασμίδια εισάγονται στα παράσιτα με ηλεκτροδιάτρηση χρησιμοποιώντας το σύστημα Amaxa GmbH, πρόγραμμα U-33. Οι μετασηματισμένοι σχίζοντες εισάγονται άμεσα σε δύο ποντίκια με ενδοφλέβια ένεση στην ουρά. Τα παράσιτα αφήνονται να πολλαπλασιαστούν για 24 ώρες και στην συνέχεια χορηγείται πυριμεθαμίνη για την θετική επιλογή των μετασηματισμένων παρασίτων από τα *act2::mCherry* παράσιτα. Η χορήγηση γίνεται με ένεση ενδοπεριτοναϊκά για τρεις συνεχόμενες ημέρες, με ημερήσια δόση 100μl από διάλυμα των 2,5 mg/ml. Όταν η παρασιταϊμία φτάσει κοντά στο 5%, αφαιρείται το μολυσμένο αίμα από το ποντίκι και ένα μέρος διατηρείται στο υγρό άζωτο για επόμενη μόλυνση ποντικού, ενώ ένα άλλο μέρος χρησιμοποιείται για γονοτυπικό έλεγχο. Για να βεβαιωθούμε για την επιτυχία του μετασηματισμού, γίνεται πάντα γονοτυπικός.

7.2.7 Κλωνοποίηση παρασίτων

Τα παράσιτα κλωνοποιούνται με την μέθοδο της διαδοχικής αραιώσης, όταν βρίσκονται στην ερυθροκυτταρική φάση ανάπτυξης. Στόχος είναι να προκύψει ένας κλώνος μετασηματισμένων παρασίτων. Αρχικά ένα ποντίκι μολύνεται με τον μεικτό πληθυσμό παρασίτων. Όταν η παρασιταϊμία φτάσει μεταξύ 0,3% και 1% το αίμα αφαιρείται. Η μέτρηση της παρασιταϊμίας γίνεται με την καταμέτρηση των μολυσμένων και μη μολυσμένων ερυθροκυττάρων σε πάνω από είκοσι πεδία στο οπτικό μικροσκόπιο. Επιπλέον η συγκέντρωση των κυττάρων στο αίμα υπολογίζεται στο αιμοκυτταρόμετρο. Υπολογίζεται ο όγκος αίματος που απαιτείται, έτσι ώστε το

κάθε ποντίκι να μολυνθεί με λιγότερα από ένα παράσιτο και γίνονται διαδοχικές αραιώσεις του αίματος. Συνολικά χρησιμοποιούνται δέκα ποντίκια για την μέθοδο της διαδοχικής αραιώσης. Η μόλυνση γίνεται με ενδοφλέβια ένεση στην ουρά των ποντικών. Μετά από περίπου 8 μέρες γίνεται έλεγχος παρασιταϊμίας σε κάθε ποντίκι. Θεωρείται ότι σύμφωνα με την κατανομή Poisson υπάρχει μεγαλύτερη πιθανότητα η κλωνοποίηση να είναι επιτυχής όταν το 20-50% των ποντικών εμφανίζουν παρασιταϊμία 0,3-1% την όγδοη μέρα (Janse, 2004 μέθοδοι παρασιτολογίας). Τέλος, το αίμα αφαιρείται από τα μολυσμένα ποντίκια και γίνεται γονοτυπικός έλεγχος για να βρεθεί ένας καθαρός πληθυσμός μετασηματισμένων παρασίτων.

7.2.8 *In vitro* ενεργοποίηση γαμετογένεσης

Αρχικά γίνεται έλεγχος με χρώση Giemsa σε μολυσμένα ποντίκια για την ύπαρξη γαμετοκυττάρων. Έπειτα, μια σταγόνα αίμα από την ουρά του ποντικίου αραιώνεται δέκα φορές σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο για την ενεργοποίηση (RPMI1640 with L-glutamine, 25 mM HEPES, 2 g/L NaHCO₃, 10% FBS, pH8.0). Στο θρεπτικό μέσο προστίθεται 50 nM ξανθουρενικό οξύ, ένα παραπροϊόν μεταβολισμού στο κουνούπι, που έχει δειχθεί ότι συμβάλει στην ενεργοποίηση. Το δείγμα επωάζεται για περίπου δέκα λεπτά στους 19°C. Η γαμετογένεση ολοκληρώνεται μέσα σε δέκα με δεκαπέντε λεπτά και η παρατήρηση του δείγματος γίνεται στο οπτικό μικροσκόπιο. Η καταμέτρηση των αρσενικών παρασίτων, που ολοκληρώνουν την γαμετογένεση με την εκβολή των αρσενικών γαμετών από το ώριμο ενεργοποιημένο γαμετοκύτταρο γίνεται εύκολα αντιληπτή, καθώς οι αρσενικοί γαμέτες έχουν έντονη κινητικότητα. Η καταμέτρηση γίνεται σε πάνω από είκοσι πεδία και παρουσιάζεται ως μέσος όρος ανά πεδίο (exflagellation events/ field).

7.2.9 Καταγραφή της γαμετογένεσης

Για τα πειράματα καταγραφής της εξόδου των αρσενικών και των θηλυκών γαμετών από το ερυθροκύτταρο με λήψη βίντεο, έγινε *in vitro* ενεργοποίηση. Σε αυτά τα πειράματα, μια σταγόνα αίματος από τα μολυσμένα ποντίκια αραιώνεται εκατό φορές και η παρατήρηση του δείγματος ξεκινάει περίπου δύο λεπτά μετά την ενεργοποίηση. Για την παρατήρηση της εξόδου χρησιμοποιήθηκε μικροσκόπιο

αντίθεσης διαφορικής συμβολής (differential interference contrast, DIC) με μεγεθυντικό φακό 100x. Για την καταγραφή χρησιμοποιήθηκε κάμερα με υψηλή ταχύτητα λήψης Phantom V7 (Vision Research Inc.). Η ανάλυση των εικόνων έγινε με τα προγράμματα Moviemaker και ImageJ.

7.2.10 Καθαρισμός γαμετοκυττάρων

Ο καθαρισμός των γαμετοκυττάρων από το αίμα γίνεται με διαβάθμιση συγκέντρωσης. Για την αύξηση των γαμετοκυττάρων στο μολυσμένο αίμα, δύο μέρες πριν την μόλυνση σε κάθε ποντίκι χορηγούνται με ένεση ενδοπεριτοναϊκά 200 μl από 6 mg/ml διάλυμα φαινυλδραζίνη σε 0,9% NaCl. Ο έλεγχος για τον σχηματισμό των γαμετοκυττάρων γίνεται με χρώση Giemsa. Όταν παρουσιαστούν γαμετοκύτταρα στο αίμα του ποντικού, χορηγείται στο ποντίκι σουλφαδιαζίνη για δύο συνεχόμενες μέρες. Η σουλφαδιαζίνη διαλύεται στο νερό του ποντικού με τελική συγκέντρωση 0,03 mg/ml και το νερό αυτό ανανεώνεται καθημερινά. Το φάρμακο αυτό αναστέλει την ανάπτυξη στα μη φυλετικά στάδια του παρασίτου στο αίμα, ενώ τα ώριμα γαμετοκύτταρα δεν επηρεάζονται. Μετά τις δύο ημέρες χορήγησης της σουλφαδιαζίνης, γίνεται έλεγχος της παρασιταϊμίας, του ποσοστού των γαμετοκυττάρων και έλεγχος της ικανότητάς τους να ολοκληρώνουν την γαμετογένεση με *in vitro* ενεργοποίηση. Εάν το ποσοστό των γαμετοκυττάρων στο σύνολο των παρασίτων είναι μεγαλύτερο από 1% γίνεται πλήρης αφαίμαξη στο ποντίκι. Να σημειωθεί ότι τα γαμετοκύτταρα επιβιώνουν μόνο 26 με 30 ώρες και είναι σημαντικό να γίνει η συλλογή τους άμεσα. Αμέσως μετά την αφαίμαξη, το αίμα αναμιγνύεται με το θρεπτικό μέσο RPMI1640 with L-glutamine, 25 mM HEPES, 0,5 M NaHCO₃, 1 mg/ml BSA, pH 7,2. Στην συνέχεια το αίμα τοποθετείται πάνω σε μείγμα 4,5 ml 1x PBS και 5,5 ml διαλύματος 27,6% Nycodenz, όπως περιγράφεται παραπάνω. Γίνεται έλεγχος του πυρήνα με αντίσωμα στα αρσενικά γαμετοκύτταρα, για το αν αυτά έχουν τυχόν ενεργοποιηθεί κατά την διαδικασία καθαρισμού. Η διαδικασία αυτή περιγράφεται παρακάτω. Τα απομονωμένα γαμετοκύτταρα φυλάσσονται άμεσα στους -20°C ή χρησιμοποιούνται για την εξαγωγή του RNA.

7.2.11 *In vitro* καλλιέργεια ωοκινετών

Η *in vitro* καλλιέργεια των ωοκινετών γίνεται σύμφωνα με προηγούμενες περιγραφές (Siden, 1997). Αίμα από μολυσμένο ποντίκι αραιώνεται δέκα φορές στο θρεπτικό μέσο για την ενεργοποίηση της γαμετογένεσης, όπως αυτό περιγράφεται παραπάνω και επωάζεται στους 19°C για περίπου 24 ώρες. Η παρατήρηση των ωοκινετών γίνεται σε οπτικό μικροσκόπιο. Το χαρακτηριστικό σχήμα τύπου μπανάνας των ωοκινετών, τους καθιστά εύκολα αναγνωρίσιμους στο ζωντανό δείγμα από την καλλιέργεια. Η μέτρηση του αριθμού των ωοκινετών γίνεται στο αιμοκυτταρόμετρο.

7.2.12 Καθαρισμός ωοκινετών

Καθαρισμός των ωοκινετών από *in vitro* καλλιέργεια μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους. Ένας τρόπος είναι με χλωριούχο αμμώνιο. Η καλλιέργεια ωοκινετών φυγοκεντρείται με 1500 rpm για δέκα λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και η πελέτα των ωοκινετών αναμειγνύεται με 50 ml διαλύματος 0,17% χλωριούχου αμμωνίου σε θερμοκρασία 0°C. Το μείγμα αφήνεται στον πάγο για είκοσι λεπτά έτσι ώστε να γίνει η λύση των ερυθροκυττάρων. Το μείγμα φυγοκεντρείται στις 1500 rpm για δέκα λεπτά. Ακολουθούν δύο διαδοχικά ξεπλύματα της πελέτας των ωοκινετών με PBS. Μια δεύτερη μέθοδος καθαρισμού των ωοκινετών συμπεριλαμβάνει μαγνητικά σφαιρίδια (Dynabeads). Στα μαγνητικά σφαιρίδια είναι προσδεμένο το αντίσωμα 13.1 το οποίο ανιχνεύει το αντιγόνο Pbs21 που βρίσκεται στην επιφάνεια των ωοκινετών, αλλά και των ζυγωτών και θηλυκών γαμετών (Siden-Kiamos, 2000). Η καλλιέργεια ωοκινετών αναμειγνύεται με τα μαγνητικά σφαιρίδια και με την βοήθεια μαγνήτη οι ωοκινέτες, τα ζυγωτά και τα θηλυκά απομακρύνονται. Ακολουθούν δύο διαδοχικά ξεπλύματα με PBS.

7.2.13 Μέτρηση του ποσοστού μετατροπής θηλυκών γαμετών σε ωοκινέτες

Για να μετρηθεί το ποσοστό των θηλυκών γαμετών που μετασχηματίζονται σε ωοκινέτες χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα 13.1. Προστίθεται το αντίσωμα 13.1 και δευτερογενές αντίσωμα συνδεδεμένο με το Alexa Fluor® 555 σε αραιώση 1/100. Η επώαση διαρκεί περίπου μια ώρα. Στο μικροσκόπιο φθορισμού γίνεται καταμέτρηση των θηλυκών και των ζυγωτών που έχουν σφαιρικό σχήμα ενώ οι ωοκινέτες

ξεχωρίζουν λόγω του σχήματος μπανάνα. Σε κάθε πείραμα γίνεται καταμέτρηση τουλάχιστον 100 κυττάρων και υπολογίζεται το ποσοστό μετατροπής των θηλυκών γαμετών σε ωοκινέτες.

7.2.14 *In vitro* έλεγχος της κινητικότητας των ωοκινετών

Για να μελετήσουμε την κινητικότητα των ωοκινετών χρησιμοποιήθηκε ένα ζελατινώδες πρωτεϊνικό μείγμα (matrigel™). Καλλιέργεια ωοκινετών αναμιγνύεται με ίσο όγκο από αυτό το υλικό. Το δείγμα τοποθετείται σε αντικειμενοφόρο πλάκα και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου. Η καταγραφή της κίνησης γίνεται με οπτικό μικροσκόπιο συνδεδεμένο με κάμερα λήψης ταινιών. Οι ωοκινέτες καταγράφονται για δέκα λεπτά και κάθε πέντε δευτερόλεπτα αποθηκεύεται μια εικόνα. Η ταχύτητα κίνησης κάθε ξεχωριστού ωοκινέτη μετρήθηκε διαιρώντας την απόσταση που διένυσε ο ωοκινέτης με τα δέκα λεπτά που διήρκεσε η καταγραφή.

7.2.15 Απεικόνιση με ανοσοφθορισμό της μεμβράνης μολυσμένων ερυθροκυττάρων σε ζωντανά δείγματα

Η απεικόνιση της μεμβράνης των ερυθροκυττάρων σε ζωντανό δείγμα έγινε χρησιμοποιώντας το μονοκλωνικό αντίσωμα TER-119 που αναγνωρίζει την γλυκοφορίνη A που βρίσκεται στην επιφάνεια των ερυθροκυττάρων (Kina, 2000). Το αντίσωμα είναι ήδη συνδεδεμένο με το Alexa Fluor® 488. Ένα μολυσμένο δείγμα αίματος επαναδιαλύεται στο κατάλληλο μέσο ενεργοποίησης της γαμετογένεσης το οποίο περιέχει το παραπάνω αντίσωμα. Το δείγμα επωάζεται για 15 με 20 λεπτά στους 37°C. Η απεικόνιση των κυττάρων γίνεται σε μικροσκόπιο φθορισμού και σε θερμοκρασία 19°C, στην οποία γίνεται η ενεργοποίηση των γαμετοκυττάρων.

7.2.16 Απεικόνιση με ανοσοφθορισμό της μεμβράνης μολυσμένων ερυθροκυττάρων σε μονιμοποιημένα δείγματα

Για την απεικόνιση της εξωτερικής επιφάνειας της μεμβράνης των ερυθροκυττάρων σε μονιμοποιημένα δείγματα χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα TER-119. Δείγματα από διαφορετικά χρονικά διαστήματα μετά την ενεργοποίηση της γαμετογένεσης μονιμοποιούνται σε 4% φορμαλδεΰδη. Δεν γίνεται χρήση κάποιου απορρυπαντικού που να καθιστά διαπερατή την μεμβράνη στο αντίσωμα. Όλα τα

βήματα διεξάγονται σε θερμοκρασία δωματίου. Τα παράσιτα τοποθετούνται σε καλυπτρίδες που καλύπτονται με poly-L-lysine για την προσκόλληση των κυττάρων και τοποθετούνται σε πιάτα 24 θέσεων. Τα δείγματα φυγοκεντρώνται στις 500xg για 15 λεπτά χωρίς φρένο, αφαιρείται το διάλυμα μονιμοποίησης και ακολουθούν δύο διαδοχικά ξεπλύματα με PBS. Το αντίσωμα TER-119 προστίθεται σε PBS με αραιώση 1/200 και με 2% φυσιολογικό ορό κατσίκας (NGS). Η επώαση διαρκεί μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου ή στους 4°C για περίπου 12 ώρες. Τα δείγματα ξεπλένονται δύο φορές με PBS και τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρο πλάκα μέσα σε Vectashield (Vector laboratories). Η παρατήρηση των κυττάρων γίνεται σε μικροσκόπιο φθορισμού και η ανάλυση των εικόνων πραγματοποιείται με το ImageJ.

7.2.17 Απεικόνιση με ανοσοφθορισμό του πυρήνα απομονωμένων γαμετοκυττάρων σε μονιμοποιημένα δείγματα

Τα γαμετοκύτταρα απομονώνονται όπως περιγράφεται παραπάνω. Ο έλεγχος για το αν τα γαμετοκύτταρα έχουν τυχόν ενεργοποιηθεί κατά την διαδικασία του καθαρισμού γίνεται παρατηρώντας το μέγεθος του πυρήνα των αρσενικών γαμετοκυττάρων με την χρήση του αντισώματος NAP (Nucleosome Assembly Protein) που παλαιότερα ονομάζονταν SET (Pace, 2006). Τα δείγματα μονιμοποιούνται όπως περιγράφεται παραπάνω. Στην συνέχεια προστίθεται 0,5% Triton για 30 δευτερόλεπτα. Ακολουθούν δύο διαδοχικά ξεπλύματα με PBS. Το αντίσωμα NAP/SET προστίθεται σε PBS με αραιώση 1/1000 και με 2% φυσιολογικό ορό κατσίκας (NGS). Ακολουθεί επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα συνδεδεμένο με Alexa Fluor® 555 που διαρκεί μια ώρα. Μόνο τα δείγματα που περιέχουν λιγότερο από 2% ενεργοποιημένα γαμετοκύτταρα χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

7.2.18 Απεικόνιση με ανοσοφθορισμό των ωοκυστών σε μονιμοποιημένα δείγματα

Για να παρακολουθήσουμε την ανάπτυξη των ωοκυστών στα έντερα των μολυσμένων κουνουπιών χρησιμοποιήθηκε ειδικό αντίσωμα για τις ωοκύστες που αναγνωρίζει μια πρωτεΐνη στην κάψουλα των ωοκυστών Cap380 (Srinivasan, 2008). Ο εντοπισμός των ωοκυστών γίνεται με ανοσοφθορισμό καθώς οι ωοκύστες δεν είναι ορατές με το οπτικό μικροσκόπιο σε λιγότερο από δέκα μέρες μετά το γεύμα αίματος.

Τα μολυσμένα κουνούπια ανατέμνονται σε PBS και τα έντερα άμεσα τοποθετούνται σε διάλυμα μονιμοποίησης 4% φορμαλδεΰδη και 0,2% σαπωνίνη σε PBS και επωάζονται στον πάγο για 45 λεπτά με μία ώρα. Όλα τα ακόλουθα βήματα διεξάγονται σε θερμοκρασία δωματίου και το δείγμα είναι τοποθετημένο πάνω σε πλάκα ανάδευσης σε χαμηλή ταχύτητα. Μετά από δύο ξεπλύματα σε PBS, 0,2% σαπωνίνη για 15 λεπτά, το δείγμα επωάζεται για μισή ώρα σε PBS 0,2% σαπωνίνη, 5% NGS (διάλυμα παρεμπόδισης, ΔΠ). Το πρωτογενές αντίσωμα α-Car380 προστίθεται σε αραιώση 1/250 σε ΔΠ και επωάζεται για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου ή 12 ώρες στους 4°C. Ακολουθούν δύο πλύσεις με ΔΠ για 15 λεπτά. Η επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα συνδεδεμένο με το Alexa Fluor® 555 για μια ώρα σε αραιώση 1/1000 σε ΔΠ. Ακολουθούν δύο διαδοχικά ξεπλύματα με PBS για 15 λεπτά και προστίθεται η χρωστική Hoechst 33342 για το DNA σε αραιώση 1/2000 σε PBS. Τα δείγματα επεξεργάστηκαν όπως περιγράφεται παραπάνω.

7.2.19 Εντοπισμός των ωοκυστών σε ζωντανό ιστό με οπτικό μικροσκόπιο

Σε περισσότερες από δέκα μέρες μετά το γεύμα αίματος οι ωοκύστες είναι ορατές με το οπτικό μικροσκόπιο. Τα μολυσμένα κουνούπια ανατέμνονται και παρατηρούνται σε οπτικό μικροσκόπιο. Να σημειωθεί ότι κάποιες φορές τα σποροζωΐδια που αναπτύσσονται μέσα στις ωοκύστες είναι ορατά όταν αυτές βρίσκονται σε προχωρημένο στάδιο ανάπτυξης.

7.3 Μέθοδοι κουνουπιών

7.3.1 Εκτροφή κουνουπιών

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη G3 και Ngusso από *Anopheles gambiae* κουνούπια. Οι πληθυσμοί των κουνουπιών διατηρούνται στο εντομοτροφείο σε σταθερή θερμοκρασία 28°C, με 80% υγρασία και σε κύκλο εναλλαγής ανά 12 ωρών από φως σε σκοτάδι. Τα θηλυκά ενήλικα κουνούπια ταΐζονται μόνο μια φορά με υγιή ποντίκια για την παραγωγή των αυγών τους. Οι προνύμφες διατηρούνται σε απεσταγμένο νερό που περιέχει τροφή γάτας σε σκόνη. Τα ενήλικα κουνούπια ταΐζονται με 10% διάλυμα γλυκόζης σε εμποτισμένο βαμβάκι που τοποθετείται πάνω στο δίκτυο του κλουβιού.

7.3.2 Μετάδοση παρασίτων στα κουνούπια

Τα κουνούπια τοποθετούνται σε επωαστήρα που βρίσκεται στους 19°C και στερούνται γλυκόζης για 3-4 ώρες πριν το τάισμά τους. Μετά το πρώτο εικοσιτετράωρο από το τάισμα με μολυσμένο αίμα, τα θηλυκά κουνούπια που δεν έχουν πιεί το αίμα αφαιρούνται. Τα κουνούπια παραμένουν στον επωαστήρα με συνεχή διατήρηση της υγρασίας για όσο χρονικό διάστημα απαιτεί το πείραμα και τρέφονται με διάλυμα γλυκόζης που ανανεώνεται κάθε δύο ημέρες.

Η μετάδοση των παρασίτων στα κουνούπια έγινε με δύο διαφορετικούς τρόπους. Στη μία περίπτωση τα κουνούπια ταΐζονται απευθείας σε μολυσμένα ποντίκια μετά από αναισθησία. Ο άλλος τρόπος τάισματος είναι *in vitro* τάισμα των κουνουπιών σε μεμβράνες με *in vitro* καλλιέργεια ωοκινετών μετά από αραίωση με αίμα από υγιές ποντίκι. Το μείγμα αυτό τοποθετείται πάνω σε λεπτή μεμβράνη (Parafilm) και με ειδική κατασκευή διατηρείται σε φυσιολογική θερμοκρασία σώματος 36,6°C. Σε κάθε κατασκευή τάισματος τοποθετούνται 200 με 300 μl μείγμα (Siden, 1997).

7.3.3 Μετάδοση των παρασίτων από τα κουνούπια

Για τον έλεγχο της δυνατότητας ολοκλήρωσης του κύκλου ζωής των παρασίτων γίνεται έλεγχος για την ικανότητα μετάδοσης των παρασίτων από τα μολυσμένα κουνούπια σε υγιή ποντίκια. Τα κουνούπια διατηρούνται για 21 μέρες μετά το γεύμα αίματος στους 19°C. Αυτό το χρονικό διάστημα είναι απαραίτητο για να σχηματιστούν τα σποροζωΐδια μέσα στις ωοκύστες και έπειτα να μεταναστεύσουν στους σιελογόνους αδένες των κουνουπιών έτσι ώστε να μεταδοθούν στο επόμενο άτομο με το τσίμπημα. Μετά από τις 21, μέρες ταΐζονται με υγιή ποντίκια C57BL/6. Αυτό το στέλεχος ποντικίων χρησιμοποιείται στα συγκεκριμένα πειράματα γιατί είναι πιο επιδεκτικό στην μόλυνση από τα σποροζωΐδια που εισάγονται από το τσίμπημα του μολυσμένου κουνουπιού (Scheller, 1994). Δείγμα αίματος από τα ποντίκια ελέγχεται καθημερινά για την παρουσία παρασίτων με χρώση Giemsa. Συνήθως με τα αγρίου τύπου παράσιτα της ελονοσίας η παρασιταϊμία εμφανίζεται πέντε με έξι μέρες μετά το τσίμπημα του κουνουπιού.

7.4 Τεχνικές μοριακής βιολογίας

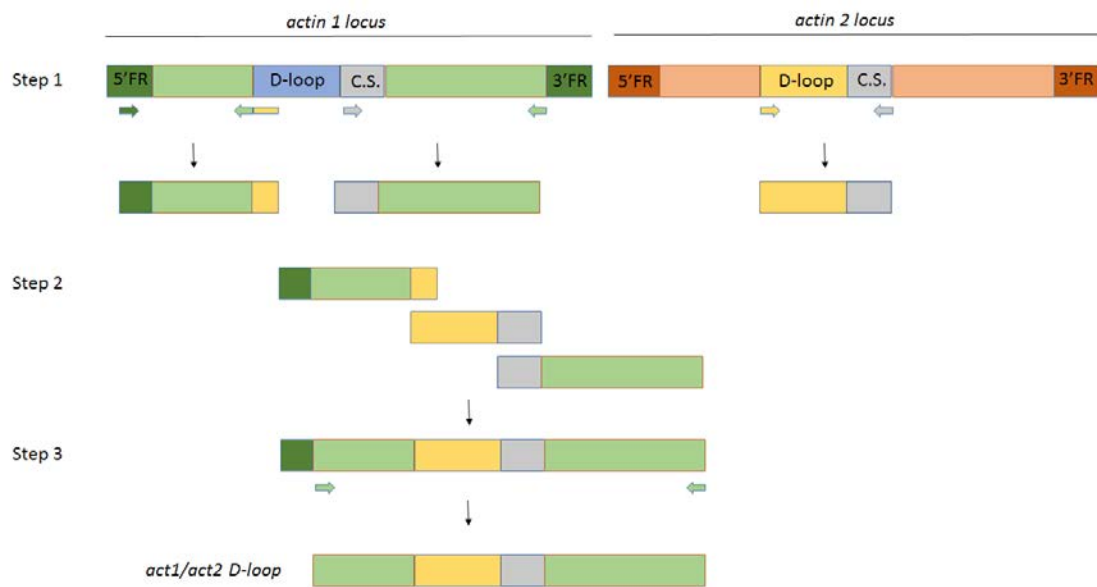
7.4.1 Κατασκευή πλασμιδίων για τον μετασχηματισμό παρασίτων

Για την παρούσα μελέτη κατασκευάστηκαν έξι νέα στελέχη μετασχηματισμένων παρασίτων. Στα μεταλλάγματα αυτά, στον γονιδιακό τόπο *ακτίνη 2* όπου έχει αφαιρεθεί το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου *ακτίνη 2* (*act2::mCherry* παράσιτα) γίνεται αντικατάσταση με έξι διαφορετικά γονίδια: το ίδιο το γονίδιο *ακτίνη 2*, το γονίδιο *ακτίνη 1*, το γονίδιο *α-ακτίνη* από το *Oryctolagus cuniculus* και άλλα τρία χμιαϊρικά γονίδια. Στο πρώτο χμιαϊρικό γονίδιο έχει γίνει αντικατάσταση της κωδικής περιοχής της υποεπικράτειας 2 που περιέχει τον D-βρόγχο στο γονίδιο *ακτίνη 1* με την αντίστοιχη περιοχή από το γονίδιο *α-ακτίνη* του *O.cuniculus*. Η αντίστροφη περίπτωση είναι το δεύτερο χμιαϊρικό γονίδιο όπου έχει γίνει αντικατάσταση της κωδικής περιοχής της υποεπικράτειας 2 που περιέχει τον D-βρόγχο στο γονίδιο *α-ακτίνη* του *O.cuniculus* με την αντίστοιχη περιοχή από το γονίδιο *ακτίνη 1* από το *P.berghei*. Το τρίτο χμιαϊρικό γονίδιο κωδικοποιεί την *ακτίνη 1* από το *P.berghei* στο οποίο έχει γίνει αντικατάσταση του D-βρόγχου με τον D-βρόγχο της *ακτίνης 2* από το *P.berghei*. Τα αντίστοιχα μεταλλαγμένα παράσιτα που προκύπτουν έπειτα από αυτούς τους μετασχηματισμούς είναι τα *actin2 com*, τα *actin2 rep*, τα *Oact* και τα τρία χμιαϊρικά *act1 chi*, *a-act chi*, *act1/act2 D-loop*.

Η στρατηγική που ακολουθήθηκε για την κατασκευή των μεταλλαγμένων παρασίτων είναι κοινή. Ένα απλοποιημένο σχήμα για τα *actin2 com* και τα *actin2 rep* παρουσιάζεται στην εικόνα 3.2Α. Οι πλασμιδιακές κατασκευές για τον μετασχηματισμό των *act2::mCherry* παρασίτων φτιάχτηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pSD141, παράγωγο του πλασμιδιακού φορέα pL0006 που κωδικοποιεί το ανθρώπινο γονίδιο της αναγωγής του διυδροφυλικού οξέος (*hdhfr*) που προσδίδει ανθεκτικότητα στο φάρμακο WR99210 και την πυριμεθαμίνη (de Koning-Ward, 2000, Billker, 2004). 2700 ζεύγη βάσεων από την 5' πλευρική περιοχή και 728 ζεύγη βάσεων από την 3' πλευρική περιοχή του γονιδίου *ακτίνη 2* του *P.berghei* πολλαπλασιάστηκαν από το γενωμικό DNA χρησιμοποιώντας τους κατάλληλους εκκινητές σε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Τα τμήματα κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα μεταξύ των περιοχών αναγνώρισης από τα περιοριστικά ένζυμα KpnI και NheI και NotI

και EcoRI αντίστοιχα. Μεταξύ των περιοχών αναγνώρισης από τα περιοριστικά ένζυμα NheI και NotI τοποθετήθηκαν τα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης των εκάστοτε γονιδίων σε κάθε πλασμιδιακή κατασκευή. Τα τμήματα αυτά είχαν αρχικά πολλαπλασιαστεί από το γενωμικό DNA του παρασίτου χρησιμοποιώντας τους κατάλληλους εκκινητές.

Για τα μεταλλάγματα *act1 chi* και *a-act chi*, από τα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης των γονιδίων *ακτίνη 1* από το *P.berghei* και *α-ακτίνη* από το *O.cuniculus* αφαιρέθηκε η υποεπικράτεια 2 που περιέχει τον D-βρόγχο αντίστοιχα. Στην θέση αυτή εισήχθη η υποεπικράτεια 2 που περιέχει τον D-βρόγχο από το *P.berghei* στο πρώτο και το *O.cuniculus* στο δεύτερο. Οι νέες περιοχές ενσωματώθηκαν στα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης των γονιδίων μεταξύ των θέσεων των περιοριστικών ενζύμων AatII και NruI. Για το χμιαρικό μετάλλαγμα *act1/act2 D-loop* για την αντικατάσταση του D-βρόγχου της ακτίνης 1 με τον D-βρόγχο της ακτίνης 2 στο γονίδιο *ακτίνη 1* χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με αλληλο-επικαλυπτόμενα τμήματα. Αρχικά, ένα τμήμα που ξεκινάει από την 5' πλευρική περιοχή του γονιδίου *ακτίνη 1* και τελειώνει πριν την έναρξη της αλληλουχίας του D-βρόγχου πολλαπλασιάζεται από γενωμικό DNA με τους κατάλληλους εκκινητές. Το τμήμα αυτό στο τέλος του φέρει επιπρόσθετη αλληλουχία, αλληλο-επικαλυπτόμενη με αλληλουχία που βρίσκεται στην αρχή της περιοχής που κωδικοποιεί τον D-βρόγχο της ακτίνης 2. Μετά την αλληλουχία που κωδικοποιεί τον D-βρόγχο (νουκλεοτίδια 112 έως 183 στο γονίδιο της ακτίνης 1) η αλληλουχία των 81 νουκλεοτιδίων που ακολουθεί είναι όμοια και στα δύο γονίδια που κωδικοποιούν τις ακτίνες στο *P.berghei*. Η περιοχή που κωδικοποιεί τον D-βρόγχο της ακτίνης 2 και η αλληλο-επικαλυπτόμενη περιοχή μεταξύ των δύο ισομορφών πολλαπλασιάζεται με ζεύγος κατάλληλων εκκινητών. Μια τρίτη περιοχή πολλαπλασιάζεται που ξεκινάει από την αλληλο-επικαλυπτόμενη περιοχή μετά την περιοχή που κωδικοποιεί τον D-βρόγχο και τελειώνει στο τέλος του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης του γονιδίου *ακτίνη 1*. Τα τρία προϊόντα αναμειγνύονται και υβριδοποιούνται μεταξύ τους στην ίδια αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χωρίς την παρουσία άλλων εκκινητών. Το προϊόν αυτής της αντίδρασης χρησιμοποιείται ως μήτρα σε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με κατάλληλους εκκινητές για τον πολλαπλασιασμό του χμιαρικού γονιδίου.



Εικόνα 7.1. Κατασκευή χμαιοικού γονιδίου *act1/act2 D-loop*. Πρώτο βήμα (step 1): από τον γονιδιακό τόπο *ακτίνη 1* πολλαπλασιάζονται με PCR δύο τμήματα με τους εκκινητές που φαίνονται στην εικόνα. Το ένα τμήμα ξεκινάει από το 5'FR και τελειώνει πριν την αλληλουχία που κωδικοποιεί τον D-βρόγχο (D-loop) της ακτίνης 1. Καθοδικά φέρει μέρος από την αρχή της αλληλουχίας που κωδικοποιεί τον D-βρόγχο της ακτίνης 2, το οποίο προστέθηκε από τον εκκινητή. Το δεύτερο τμήμα ξεκινάει από την κοινή αλληλουχία (common sequence, C.S.) στα δύο γονίδια που βρίσκεται μετά τον D-βρόγχο και τελειώνει στο τέλος του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης του γονιδίου *ακτίνη 1*. Από τον γονιδιακό τόπο *ακτίνη 2* πολλαπλασιάζεται με τους κατάλληλους εκκινητές ένα τμήμα που συμπεριλαμβάνει την αλληλουχία του D-βρόγχου της ακτίνης 2 και την κοινή αλληλουχία. Δεύτερο βήμα (step 2): τα τρία τμήματα αποτελούν μήτρα το ένα με το άλλο σε μια κοινή αντίδραση PCR χωρίς προσθήκη άλλων εκκινητών. Βήμα 3 (step 3): από το προϊόν της προηγούμενης αντίδρασης πολλαπλασιάζεται το *act1/act2 D-loop* χμαιοικό γονίδιο με τους εκκινητές που φαίνονται στην εικόνα.

Όλα τα πλασμίδια κόβονται σε μια μοναδική θέση που βρίσκεται στην 5' πλευρική περιοχή με το περιοριστικό ένζυμο *ClaI*. Στην συνέχεια τα πλασμίδια χρησιμοποιούνται για τον μετασηματισμό των *act2-::mCherry* παρασίτων στα οποία απουσιάζει η κασέτα ανθεκτικότητας (Kooij, 2012). Τα παράσιτα κλωνοποιούνται και η ενσωμάτωση της πλασμιδιακής κατασκευής στην σωστή θέση στο γονιδίωμα ταυτοποιείται με γονοτυπικό έλεγχο με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιώντας τους κατάλληλους εκκινητές. Στην περίπτωση των *actin2 com* και *actin2 rep* παρασίτων έγινε γονοτυπικός έλεγχος και με στύπωμα κατά Southern, όπως αυτό περιγράφεται παρακάτω.

7.4.2 Στύπωμα κατά Southern

Για το στύπωμα κατά Southern, το γενωμικό DNA κόβεται με τα περιοριστικά ένζυμα BamHI και EcoRI. Το γενωμικό DNA από *act2-::mcherry* παράσιτα χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα ελέγχου. Τα θραύσματα που προκύπτουν διαχωρίζονται σε πήκτωμα αγαρόζης. Μετά την ηλεκτροφόρηση, το DNA μεταφέρεται σε νάιλον φίλτρο και υβριδίζεται με ένα τμήμα 2700 ζεύγη βάσεων από την 5' πλευρική περιοχή του γονιδίου ακτίνη 2, το οποίο έχει αρχικά πολλαπλασιαστεί με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Το τμήμα αυτό σημαίνεται και ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας το εμπορικό παρασκεύασμα DIG (digoxigenin) High Prime DNA Labelling and Detection Starter Kit II (Roche) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Οι συμπληρωματικές αλληλουχίες αποκαλύπτονται σε φίλμ ακτίνων X μετά από ανοσοεντοπισμό της διοξυγενίνης.

7.4.3 Απομόνωση γενωμικού DNA

Γενωμικό DNA απομονώθηκε είτε από αίμα μολυσμένων ποντικών είτε από τα έντερα κουνουπιών. Στην πρώτη περίπτωση στο αίμα γίνεται επεξεργασία με χλωριούχο αμμώνιο, όπως και στην περίπτωση των ωοκινετών που περιγράφεται σε παραπάνω ενότητα. Στην δεύτερη περίπτωση τα έντερα των κουνουπιών πολτοποιούνται μηχανικά. Και στις δύο περιπτώσεις οι πελέτες των δειγμάτων επαναδιαλύονται σε 700μl διαλύματος TNE (10 mM Tris pH 8.0, 5 mM EDTA pH 8.0, 100 mM NaCl). Σε αυτό προστίθενται RNase 200 μg/ml και 1% (όγκο κατ' όγκο) SDS. Τα δείγματα επωάζονται για δέκα λεπτά στους 37°C. Γίνεται προσθήκη πρωτεϊνάσης K συγκέντρωσης 200 μg/ml και τα δείγματα επωάζονται για άλλη μια ώρα στους 37°C. Η απομόνωση γίνεται με φαινόλη, με μείγμα phenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1) και τέλος με χλωροφόρμιο. Το DNA κατακρημνίζεται με απόλυτη αιθανόλη, ξεπλένεται με 70% αιθανόλη και επαναδιαλύεται στον επιθυμητό όγκο απεσταγμένου και απιονισμένου νερού.

7.4.4 Απομόνωση RNA

200 μl μολυσμένου αίματος αναμιγνύονται με 750μl TRI® reagent BD και 50 μl οξικού οξέος. Προστίθεται χλωροφόρμιο και το μείγμα αναδεύεται έντονα για 15

δευτερόλεπτα. Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου δέκα λεπτά. Το δείγμα φυγοκεντρείται σε 19 000xg για 15 λεπτά στους 4°C. Η επάνω υδάτινη φάση που περιέχει το RNA κατακρημνίζεται με ισοπροπανόλη, η πελέτα ξεπλένεται με 75% αιθανόλη, στεγνώνεται στον αέρα και επαναδιαλύεται σε 20μl νερό που περιέχει Diethylpyrocarbonate (DEPC).

7.4.5 Σύνθεση cDNA

Γίνεται επεξεργασία του απομονωμένου RNA με το ένζυμο DNase (Qiagen) για την απαλλαγή του δείγματος από τυχόν υπολείμματα γενωμικού DNA κατά την απομόνωση. Ακολουθεί καθαρισμός του δείγματος με το RNeasy MinElute Cleanup (Qiagen). Η σύνθεση του cDNA γίνεται σύμφωνα με το πρωτόκολλο Thermoscript™ system. Παράλληλα προστίθενται και ο αναστολέας για RNase, Superase™ inhibitor (Invitrogen). Να σημειωθεί ότι για να είναι συγκρίσιμα τα δείγματα, η σύνθεση γίνεται με την ίδια ποσότητα RNA. Ο έλεγχος του cDNA γίνεται με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR). Η απουσία γενωμικού DNA ελέγχεται με εκκινητές (*gapdh* intron primers) που στο γενωμικό DNA πλαισιώνουν ένα ιντρόνιο στο γονίδιο *gapdh*.

7.4.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qRT-PCR) χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης συγκεκριμένων μεταγράφων. Η σύνθεση των δειγμάτων cDNA που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα αυτά έγινε με 2 μg συνολικού RNA από κάθε δείγμα. Για την ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης έγινε χρήση του KAPA SYBR FAST qPCR Kit Master Mix (2x) ABI Prism. Για κάθε βιολογικό δείγμα, η αντίδραση επαναλήφθηκε τρεις φορές. Η ανάλυση έγινε με το μαθηματικό μοντέλο σχετικής ποσοτικοποίησης του Pfaffl (Pfaffl, 2001). Οι τιμές έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων κανονικοποιούνται με τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου αναφοράς δεϋδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης (GAPDH) (Boysen, 2011).

7.4.7 Ανάλυση με μικροσυστοιχίες γονιδίων

Τα πειράματα με μικροσυστοιχίες γονιδίων έγιναν με υβριδοποίηση δύο χρωμοφόρων. Για να εξασφαλίσουμε στατιστικά σημαντικά δεδομένα λαμβάνοντας υπόψιν τα αποτελέσματα που δίνει κάθε χρωμοφόρο, εφαρμόστηκε η μέθοδος με εναλλαγή στην υβριδοποίηση με κάθε χρωμοφόρο (color-swap dye-reversal hybridizations) (Churchill, 2002). Η σήμανση του RNA έγινε με το two-color Quick Amp Labeling Kit (Agilent Technologies) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συνοπτικά, το RNA απομονώνεται και γίνεται ποσοτικός και ποιοτικός έλεγχος με τα συστήματα Agilent 2100 Bioanalyzer με RNA Nano 6000 microfluidics kit (Agilent Technologies) και NanoDrop 1000 UV-Vis spectrophotometer (Kisker). Ακολουθεί αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής και πολλαπλασιασμού με oligo-dT-T7 promoter εκκινήτες και σήμανση με Cyanine 3-CTP ή Cyanine 5-CTP. Μετά την κατακρήμνιση, τον καθαρισμό και την ποσοτικοποίηση, 1,25 μg από κάθε σημασμένο cDNA υβριδοποιείται με μικροσυστοιχίες ολόκληρου του γονιδιώματος του *P.berghei* (Design ID Agilent-024169) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η σάρωση στις μικροσυστοιχίες γίνεται με ανάλυση 5 μm με την χρήση του σαρωτή λέιζερ για μικροσυστοιχίες G2565CA (Agilent Technologies). Τα δεδομένα από τις εικόνες αναλύονται με το πρόγραμμα Image Analysis/Feature Extraction software G2567AA v. A.11.0.1.1 (Agilent Technologies) χρησιμοποιώντας τις αρχικές ρυθμίσεις και το πρωτόκολλο GE2_1100_Jul11. Τα αρχεία MAGE-ML αναλύονται με το Rosetta Resolver, Build 7.2.2 SP1.31 (Rosetta Biosoftware). Το προφίλ γονιδιακής έκφρασης σε επίπεδο αλληλουχιών αναφοράς περιορίζεται σε αυτά που η έκφραση είναι 1,5 φορές μεγαλύτερη ή μικρότερη στα μεταλλάγματα σε σχέση με τα αγρίου τύπου παράσιτα και που υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0,01$). Τα αποτελέσματα αυτής της ανάλυσης έχουν κατατεθεί στο NCBI's Gene Expression Omnibus και είναι προσβάσιμα μέσω των κωδικών GSE65032 και GPL19614. Να σημειωθεί ότι η παραπάνω ανάλυση έγινε από τον συνεργάτη μας Hans-Joachim Mollenkopf στο Ινστιτούτο Max Planck στο Βερολίνο.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abkarian M, Massiera G, Berry L, Roques M, Braun-Breton C. A novel mechanism for egress of malarial parasites from red blood cells. *Blood*. 2011 Apr 14;117(15):4118-24.

Adl SM, Leander BS, Simpson AG, Archibald JM, Anderson OR, Bass D, Bowser SS, Brugerolle G, Farmer MA, Karpov S, Kolisko M, Lane CE, Lodge DJ, Mann DG, Meisterfeld R, Mendoza L, Moestrup P, Mozley-Standridge SE, Smirnov AV, Spiegel F. Diversity, nomenclature, and taxonomy of protists. *Syst Biol*. 2007 Aug;56(4):684-9.

Aikawa M, Carter R, Ito Y, Nijhout MM. New observations on gametogenesis, fertilization, and zygote transformation in *Plasmodium gallinaceum*. *J Protozool*. 1984 Aug;31(3):403-13.

Aikawa M. Ultrastructure of the pellicular complex of *Plasmodium fallax*. *J Cell Biol*. 1967 Oct;35(1):103-13.

Akinosoglou KA, Bushell ES, Ukegbu CV, Schlegelmilch T, Cho JS, Redmond S, Sala K, Christophides GK, Vlachou D. Characterization of *Plasmodium* developmental transcriptomes in *Anopheles gambiae* midgut reveals novel regulators of malaria transmission. *Cell Microbiol*. 2015 Feb;17(2):254-68.

Alano P. *Plasmodium falciparum* gametocytes: still many secrets of a hidden life. *Mol Microbiol*. 2007 Oct;66(2):291-302. Review.

Aly AS, Downie MJ, Mamoun CB, Kappe SH. Subpatent infection with nucleoside transporter 1-deficient *Plasmodium* blood stage parasites confers sterile protection against lethal malaria in mice. *Cell Microbiol*. 2010 Jul;12(7):930-8.

Aly AS, Matuschewski K. A malarial cysteine protease is necessary for *Plasmodium* sporozoite egress from oocysts. *J Exp Med*. 2005 Jul 18;202(2):225-30.

Amino R, Thiberge S, Shorte S, Frischknecht F, Menard R. Quantitative imaging of *Plasmodium* sporozoites in the mammalian host. *C R Biol*. 2006 Nov;329(11):858-62.

Andreadaki M, Mollenkopf HJ, Nika F, Brady D, Tewari R, Matuschewski K, Siden-Kiamos I. Global expression profiling reveals shared and distinct transcript signatures in arrested act2(-) and CDPK4(-) *Plasmodium berghei* gametocytes. *Mol Biochem Parasitol*. 2015 Jul 26;201(2):100-107.

Andreadaki M, Morgan RN, Deligianni E, Kooij TW, Santos JM, Spanos L, Matuschewski K, Louis C, Mair GR, Siden-Kiamos I. Genetic crosses and complementation reveal essential functions for the *Plasmodium* stage-specific actin2 in sporogonic development. *Cell Microbiol*. 2014 May;16(5):751-67.

Angrisano F, Riglar DT, Sturm A, Volz JC, Delves MJ, Zuccala ES, Turnbull L, Dekiwadia C, Olshina MA, Marapana DS, Wong W, Mollard V, Bradin CH, Tonkin CJ, Gunning PW, Ralph SA, Whitchurch CB, Sinden RE, Cowman AF, McFadden GI, Baum J. Spatial localisation of actin filaments across developmental stages of the malaria parasite. *PLoS One*. 2012;7(2):e32188.

Aurrecochea C, Brestelli J, Brunk BP, Dommer J, Fischer S, Gajria B, Gao X, Gingle A, Grant G, Harb OS, Heiges M, Innamorato F, Iodice J, Kissinger JC, Kraemer E, Li W, Miller JA, Nayak V, Pennington C, Pinney DF, Roos DS, Ross C, et al. PlasmoDB: a functional genomic database for malaria parasites. *Nucleic Acids Res*. 2009 Jan;37(Database issue):D539-43.

Baird JK. Malaria zoonoses. *Travel Med Infect Dis*. 2009 Sep;7(5):269-77. Review.

Bartoloni A, Zammarchi L. Clinical aspects of uncomplicated and severe malaria. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2012;4(1):e2012026.

Baum J, Gilberger TW, Frischknecht F, Meissner M. Host-cell invasion by malaria parasites: insights from *Plasmodium* and *Toxoplasma*. *Trends Parasitol*. 2008 Dec;24(12):557-63.

Beetsma AL, van de Wiel TJ, Sauerwein RW, Eling WM. *Plasmodium berghei* ANKA: purification of large numbers of infectious gametocytes. *Exp Parasitol*. 1998 Jan;88(1):69-72.

Billker O, Dechamps S, Tewari R, Wenig G, Franke-Fayard B, Brinkmann V. Calcium and a calcium-dependent protein kinase regulate gamete formation and mosquito transmission in a malaria parasite. *Cell*. 2004 May 14;117(4):503-14.

Billker O, Lindo V, Panico M, Etienne AE, Paxton T, Dell A, Rogers M, Sinden RE, Morris HR. Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito. *Nature*. 1998 Mar 19;392(6673):289-92.

Billker O, Shaw MK, Margos G, Sinden RE. The roles of temperature, pH and mosquito factors as triggers of male and female gametogenesis of *Plasmodium berghei* in vitro. *Parasitology*. 1997 Jul;115 (Pt 1):1-7.

Blackman MJ, Bannister LH. Apical organelles of Apicomplexa: biology and isolation by subcellular fractionation. *Mol Biochem Parasitol*. 2001 Sep 28;117(1):11-25. Review.

Blackman MJ, Carruthers VB. Recent insights into apicomplexan parasite egress provide new views to a kill. *Curr Opin Microbiol*. 2013 Aug;16(4):459-64. Review.

Boisson B, Lacroix C, Bischoff E, Gueirard P, Bargieri DY, Franke-Fayard B, Janse CJ, Menard R, Baldacci P. The novel putative transporter NPT1 plays a critical role in early stages of *Plasmodium berghei* sexual development. *Mol Microbiol*. 2011 Sep;81(5):1343-57.

Boysen KE, Matuschewski K. Arrested oocyst maturation in *Plasmodium* parasites lacking type II NADH:ubiquinone dehydrogenase. *J Biol Chem*. 2011 Sep 16;286(37):32661-71.

Brockley Paterson W, Desser SS. The polar ring complex in ookinetes of *Leucocytozoon simondi* (Apicomplexa: Haemosporina) and evidence for a conoid in haemosporidian ookinetes. *Eur J Protistol*. 1989 Apr 14;24(3):244-51

Brooks SR, Williamson KC. Proteolysis of *Plasmodium falciparum* surface antigen, Pfs230, during gametogenesis. *Mol Biochem Parasitol*. 2000 Feb 25;106(1):77-82.

Bushell ES, Ecker A, Schlegelmilch T, Goulding D, Dougan G, Sinden RE, Christophides GK, Kafatos FC, Vlachou D. Paternal effect of the nuclear formin-like protein MISFIT on *Plasmodium* development in the mosquito vector. *PLoS Pathog*. 2009 Aug;5(8):e1000539.

Canning EU, Sinden RE. The organization of the ookinete and observations on nuclear division in oocysts of *Plasmodium berghei*. *Parasitology*. 1973 Aug;67(1):29-40.

Carlier MF, Le Clainche C, Wiesner S, Pantaloni D. Actin-based motility: from molecules to movement. *Bioessays*. 2003 Apr;25(4):336-45. Review.

Carruthers VB, Sibley LD. Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. *Eur J Cell Biol*. 1997 Jun;73(2):114-23.

Carter V, Shimizu S, Arai M, Dessens JT. PbSR is synthesized in macrogametocytes and involved in formation of the malaria crystalloids. *Mol Microbiol*. 2008 Jun;68(6):1560-9.

Chavatte JM, Chiron F, Chabaud A, Landau I. Probable speciations by "host-vector" fidelity": 14 species of *Plasmodium* from magpies. *Parasite*. 2007 Mar;14(1):21-37.

Chen H, Bernstein BW, Bamburg JR. Regulating actin-filament dynamics in vivo. *Trends Biochem Sci*. 2000 Jan;25(1):19-23. Review.

Child MA, Harris PK, Collins CR, Withers-Martinez C, Yeoh S, Blackman MJ. Molecular determinants for subcellular trafficking of the malarial sheddase PfSUB2. *Traffic*. 2013 Oct;14(10):1053-64.

Churchill GA. Fundamentals of experimental design for cDNA microarrays. *Nat Genet*. 2002 Dec;32 Suppl:490-5. Review.

Claudiano C, Dessens JT, Trueman HE, Arai M, Mendoza J, Butcher GA, Crompton T, Sinden RE. A malaria scavenger receptor-like protein essential for parasite development. *Mol Microbiol*. 2002 Sep;45(6):1473-84.

Cromer D, Evans KJ, Schofield L, Davenport MP. Preferential invasion of reticulocytes during late-stage *Plasmodium berghei* infection accounts for reduced circulating reticulocyte levels. *Int J Parasitol*. 2006 Nov;36(13):1389-97.

Cyrklaff M, Kudryashev M, Leis A, Leonard K, Baumeister W, Menard R, Meissner M, Frischknecht F. Cryoelectron tomography reveals periodic material at the inner side of subpellicular microtubules in apicomplexan parasites. *J Exp Med*. 2007 Jun 11;204(6):1281-7.

Davis DM, Sowinski S. Membrane nanotubes: dynamic long-distance connections between animal cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Jun;9(6):431-6.

Day KP, Karamalis F, Thompson J, Barnes DA, Peterson C, Brown H, Brown GV, Kemp DJ. Genes necessary for expression of a virulence determinant and for transmission of *Plasmodium falciparum* are located on a 0.3-megabase region of chromosome 9. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Sep 1;90(17):8292-6.

De Koning-Ward TF, Gilson PR, Boddey JA, Rug M, Smith BJ, Papenfuss AT, Sanders PR, Lundie RJ, Maier AG, Cowman AF, Crabb BS. A newly discovered protein export machine in malaria parasites. *Nature*. 2009 Jun 18;459(7249):945-9.

Deligianni E, Morgan RN, Bertuccini L, Kooij TW, Laforge A, Nahar C, Poulakakis N, Schuler H, Louis C, Matuschewski K, Siden-Kiamos I. Critical role for a stage-specific actin in male exflagellation of the malaria parasite. *Cell Microbiol*. 2011 Nov;13(11):1714-30.

Deligianni E, Morgan RN, Bertuccini L, Wirth CC, Silmon de Monerri NC, Spanos L, Blackman MJ, Louis C, Pradel G, Siden-Kiamos I. A perforin-like protein mediates disruption of the erythrocyte membrane during egress of *Plasmodium berghei* male gametocytes. *Cell Microbiol*. 2013 Aug;15(8):1438-55.

Dessens JT, Beetsma AL, Dimopoulos G, Wengelnik K, Crisanti A, Kafatos FC, Sinden RE. CTRP is essential for mosquito infection by malaria ookinetes. *EMBO J*. 1999 Nov 15;18(22):6221-7.

Dessens JT, Mendoza J, Claudianos C, Vinetz JM, Khater E, Hassard S, Ranawaka GR, Sinden RE. Knockout of the rodent malaria parasite chitinase pbCHT1 reduces infectivity to mosquitoes. *Infect Immun*. 2001 Jun;69(6):4041-7.

Dessens JT, Saeed S, Tremp AZ, Carter V. Malaria crystalloids: specialized structures for parasite transmission? *Trends Parasitol*. 2011 Mar;27(3):106-10.

Dessens JT, Siden-Kiamos I, Mendoza J, Mahairaki V, Khater E, Vlachou D, Xu XJ, Kafatos FC, Louis C, Dimopoulos G, Sinden RE. SOAP, a novel malaria ookinete protein involved in mosquito midgut invasion and oocyst development. *Mol Microbiol*. 2003 Jul;49(2):319-29.

Dobrowolski JM, Sibley LD. Toxoplasma invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. *Cell*. 1996 Mar 22;84(6):933-9.

Doi Y, Shinzawa N, Fukumoto S, Okano H, Kanuka H. ADF2 is required for transformation of the ookinete and sporozoite in malaria parasite development. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Jul 9;397(4):668-72.

Ecker A, Bushell ES, Tewari R, Sinden RE. Reverse genetics screen identifies six proteins important for malaria development in the mosquito. *Mol Microbiol*. 2008 Oct;70(1):209-20.

Ecker A, Pinto SB, Baker KW, Kafatos FC, Sinden RE. Plasmodium berghei: plasmodium perforin-like protein 5 is required for mosquito midgut invasion in Anopheles stephensi. *Exp Parasitol*. 2007 Aug;116(4):504-8.

Eksi S, Williamson KC. Protein targeting to the parasitophorous vacuole membrane of Plasmodium falciparum. *Eukaryot Cell*. 2011 Jun;10(6):744-52.

Elmendorf HG, Haldar K. Plasmodium falciparum exports the Golgi marker sphingomyelin synthase into a tubovesicular network in the cytoplasm of mature erythrocytes. *J Cell Biol*. 1994 Feb;124(4):449-62.

Enayati A, Hemingway J. Malaria management: past, present, and future. *Annu Rev Entomol*. 2010;55:569-91. Review.

Escalante AA, Ayala FJ. Evolutionary origin of Plasmodium and other Apicomplexa based on rRNA genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Jun 20;92(13):5793-7.

Field SJ, Pinder JC, Clough B, Dluzewski AR, Wilson RJ, Gratzer WB. Actin in the merozoite of the malaria parasite, Plasmodium falciparum. *Cell Motil Cytoskeleton*. 1993;25(1):43-8.

Franke-Fayard B, Trueman H, Ramesar J, Mendoza J, van der Keur M, van der Linden R, Sinden RE, Waters AP, Janse CJ. A Plasmodium berghei reference line that constitutively expresses GFP at a high level throughout the complete life cycle. *Mol Biochem Parasitol*. 2004 Sep;137(1):23-33.

Fujii T, Iwane AH, Yanagida T, Namba K. Direct visualization of secondary structures of F-actin by electron cryomicroscopy. *Nature*. 2010 Oct 7;467(7316):724-8.

Furuya T, Mu J, Hayton K, Liu A, Duan J, Nkrumah L, Joy DA, Fidock DA, Fujioka H, Vaidya AB, Wellems TE, Su XZ. Disruption of a Plasmodium falciparum gene linked to male sexual development causes early arrest in gametocytogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Nov 15;102(46):16813-8.

Ganter M, Schuler H, Matuschewski K. Vital role for the Plasmodium actin capping protein (CP) beta-subunit in motility of malaria sporozoites. *Mol Microbiol*. 2009 Dec;74(6):1356-67.

Gantt S, Persson C, Rose K, Birkett AJ, Abagyan R, Nussenzweig V. Antibodies against thrombospondin-related anonymous protein do not inhibit Plasmodium sporozoite infectivity in vivo. *Infect Immun*. 2000 Jun;68(6):3667-73.

Garcia GE, Wirtz RA, Barr JR, Woolfitt A, Rosenberg R. Xanthurenic acid induces gametogenesis in Plasmodium, the malaria parasite. *J Biol Chem*. 1998 May 15;273(20):12003-5.

Garcia-Salcedo JA, Perez-Morga D, Gijon P, Dilbeck V, Pays E, Nolan DP. A differential role for actin during the life cycle of Trypanosoma brucei. *EMBO J*. 2004 Feb 25;23(4):780-9.

Gardiner DL, Dixon MW, Spielmann T, Skinner-Adams TS, Hawthorne PL, Ortega MR, Kemp DJ, Trenholme KR. Implication of a Plasmodium falciparum gene in the switch between asexual reproduction and gametocytogenesis. *Mol Biochem Parasitol*. 2005 Apr;140(2):153-60.

Gerdes HH, Carvalho RN. Intercellular transfer mediated by tunneling nanotubes. *Curr Opin Cell Biol*. 2008 Aug;20(4):470-5. Review.

Gettemans J, Van Impe K, Delanote V, Hubert T, Vandekerckhove J, De Corte V. Nuclear actin-binding proteins as modulators of gene transcription. *Traffic*. 2005 Oct;6(10):847-57. Review.

Gilson PR, Crabb BS. Morphology and kinetics of the three distinct phases of red blood cell invasion by *Plasmodium falciparum* merozoites. *Int J Parasitol.* 2009 Jan;39(1):91-6.

Glushakova S, Yin D, Li T, Zimmerberg J. Membrane transformation during malaria parasite release from human red blood cells. *Curr Biol.* 2005 Sep 20;15(18):1645-50.

Goldberg DE. Hemoglobin degradation. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2005;295:275-91. Review.

Goley ED, Rammohan A, Znameroski EA, Firat-Karalar EN, Sept D, Welch MD. An actin-filament-binding interface on the Arp2/3 complex is critical for nucleation and branch stability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 May 4;107(18):8159-64.

Gubbels MJ, Duraisingh MT. Evolution of apicomplexan secretory organelles. *Int J Parasitol.* 2012 Nov;42(12):1071-81. Review.

Han YS, Thompson J, Kafatos FC, Barillas-Mury C. Molecular interactions between *Anopheles stephensi* midgut cells and *Plasmodium berghei*: the time bomb theory of ookinete invasion of mosquitoes. *EMBO J.* 2000 Nov 15;19(22):6030-40.

Hanssen E, Carlton P, Deed S, Klonis N, Sedat J, DeRisi J, Tilley L. Whole cell imaging reveals novel modular features of the exomembrane system of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Int J Parasitol.* 2010 Jan;40(1):123-34.

Hanssen E, Sougrat R, Frankland S, Deed S, Klonis N, Lippincott-Schwartz J, Tilley L. Electron tomography of the Maurer's cleft organelles of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes reveals novel structural features. *Mol Microbiol.* 2008 Feb;67(4):703-18.

Heintzelman MB. Cellular and molecular mechanics of gliding locomotion in eukaryotes. *Int Rev Cytol.* 2006;251:79-129. Review.

Herman IM. Actin isoforms. *Curr Opin Cell Biol.* 1993 Feb;5(1):48-55. Review.

Hirai M, Arai M, Kawai S, Matsuoka H. PbGCbeta is essential for *Plasmodium* ookinete motility to invade midgut cell and for successful completion of parasite life cycle in mosquitoes. *J Biochem.* 2006 Nov;140(5):747-57.

Hliscs M, Sattler JM, Tempel W, Artz JD, Dong A, Hui R, Matuschewski K, Schuler H. Structure and function of a G-actin sequestering protein with a vital role in malaria oocyst development inside the mosquito vector. *J Biol Chem.* 2010 Apr 9;285(15):11572-83.

Hofmann WA. Cell and molecular biology of nuclear actin. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2009;273:219-63.

Holmes KC, Popp D, Gebhard W, Kabsch W. Atomic model of the actin filament. *Nature.* 1990 Sep 6;347(6288):44-9.

Janse CJ, Franke-Fayard B, Waters AP. Selection by flow-sorting of genetically transformed, GFP-expressing blood stages of the rodent malaria parasite, *Plasmodium berghei*. *Nat Protoc.* 2006;1(2):614-23.

Janse CJ, Ramesar J, Waters AP. High-efficiency transfection and drug selection of genetically transformed blood stages of the rodent malaria parasite *Plasmodium berghei*. *Nat Protoc.* 2006;1(1):346-56.

Kadota K, Ishino T, Matsuyama T, Chinzei Y, Yuda M. Essential role of membrane-attack protein in malarial transmission to mosquito host. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Nov 16;101(46):16310-5.

Kafsack BF, Rovira-Graells N, Clark TG, Bancells C, Crowley VM, Campino SG, Williams AE, Drought LG, Kwiatkowski DP, Baker DA, Cortes A, Llinas M. A transcriptional switch underlies commitment to sexual development in malaria parasites. *Nature.* 2014 Mar 13;507(7491):248-52.

Kaneko I, Iwanaga S, Kato T, Kobayashi I, Yuda M. Genome-Wide Identification of the Target Genes of AP2-O, a *Plasmodium* AP2-Family Transcription Factor. *PLoS Pathog.* 2015 May;11(5):e1004905.

Kappe SH, Kaiser K, Matuschewski K. The *Plasmodium* sporozoite journey: a rite of passage. *Trends Parasitol.* 2003 Mar;19(3):135-43. Review.

Kariu T, Ishino T, Yano K, Chinzei Y, Yuda M. CelTOS, a novel malarial protein that mediates transmission to mosquito and vertebrate hosts. *Mol Microbiol.* 2006 Mar;59(5):1369-79.

Kariu T, Yuda M, Yano K, Chinzei Y. MAEBL is essential for malarial sporozoite infection of the mosquito salivary gland. *J Exp Med.* 2002 May 20;195(10):1317-23.

Kenthirapalan S, Waters AP, Matuschewski K, Kooij TW. Copper-transporting ATPase is important for malaria parasite fertility. *Mol Microbiol.* 2014 Jan;91(2):315-25.

Khan SM, Franke-Fayard B, Mair GR, Lasonder E, Janse CJ, Mann M, Waters AP. Proteome analysis of separated male and female gametocytes reveals novel sex-specific *Plasmodium* biology. *Cell.* 2005 Jun 3;121(5):675-87.

Kina T, Ikuta K, Takayama E, Wada K, Majumdar AS, Weissman IL, Katsura Y. The monoclonal antibody TER-119 recognizes a molecule associated with glycophorin A and specifically marks the late stages of murine erythroid lineage. *Br J Haematol*. 2000 May;109(2):280-7.

King CA. Cell motility of sporozoan protozoa. *Parasitol Today*. 1988 Nov;4(11):315-9.

Kocken CH, van der Wel AM, Dubbeld MA, Narum DL, van de Rijke FM, van Gemert GJ, van der Linde X, Bannister LH, Janse C, Waters AP, Thomas AW. Precise timing of expression of a *Plasmodium falciparum*-derived transgene in *Plasmodium berghei* is a critical determinant of subsequent subcellular localization. *J Biol Chem*. 1998 Jun 12;273(24):15119-24.

Kokwaro G. Ongoing challenges in the management of malaria. *Malar J*. 2009 Oct 12;8 Review.

Kongkasuriyachai D, Fujioka H, Kumar N. Functional analysis of *Plasmodium falciparum* parasitophorous vacuole membrane protein (Pfs16) during gametocytogenesis and gametogenesis by targeted gene disruption. *Mol Biochem Parasitol*. 2004 Feb;133(2):275-85.

Kooij TW, Rauch MM, Matuschewski K. Expansion of experimental genetics approaches for *Plasmodium berghei* with versatile transfection vectors. *Mol Biochem Parasitol*. 2012 Sep;185(1):19-26.

Kudryashev M, Lepper S, Baumeister W, Cyrklaff M, Frischknecht F. Geometric constraints for detecting short actin filaments by cryogenic electron tomography. *PMC Biophys*. 2010 Mar 5;3(1):6.

Kuehn A, Pradel G. The coming-out of malaria gametocytes. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:976827.

Kuhni-Boghenbor K, Ma M, Lemgruber L, Cyrklaff M, Frischknecht F, Gaschen V, Stoffel M, Baumgartner M. Actin-mediated plasma membrane plasticity of the intracellular parasite *Theileria annulata*. *Cell Microbiol*. 2012 Dec;14(12):1867-79.

Kursula I, Kursula P, Ganter M, Panjekar S, Matuschewski K, Schuler H. Structural basis for parasite-specific functions of the divergent profilin of *Plasmodium falciparum*. *Structure*. 2008 Nov 12;16(11):1638-48.

Lacroix C, Giovannini D, Combe A, Bargieri DY, Spath S, Panchal D, Tawk L, Thiberge S, Carvalho TG, Barale JC, Bhanot P, Menard R. FLP/FRT-mediated conditional mutagenesis in pre-erythrocytic stages of *Plasmodium berghei*. *Nat Protoc*. 2011 Aug 25;6(9):1412-28.

Lal K, Delves MJ, Bromley E, Wastling JM, Tomley FM, Sinden RE. *Plasmodium* male development gene-1 (*mdv-1*) is important for female sexual development and identifies a polarised plasma membrane during zygote development. *Int J Parasitol*. 2009 Jun;39(7):755-61.

Lal K, Prieto JH, Bromley E, Sanderson SJ, Yates JR 3rd, Wastling JM, Tomley FM, Sinden RE. Characterisation of *Plasmodium* invasive organelles; an ookinete microneme proteome. *Proteomics*. 2009 Mar;9(5):1142-51.

Lalle M, Curra C, Ciccarone F, Pace T, Cecchetti S, Fantozzi L, Ay B, Breton CB, Ponzi M. Dematin, a component of the erythrocyte membrane skeleton, is internalized by the malaria parasite and associates with *Plasmodium* 14-3-3. *J Biol Chem*. 2011 Jan 14;286(2):1227-36.

Lanfrancotti A, Bertuccini L, Silvestrini F, Alano P. *Plasmodium falciparum*: mRNA co-expression and protein co-localisation of two gene products upregulated in early gametocytes. *Exp Parasitol*. 2007 Aug;116(4):497-503.

Laurentino EC, Taylor S, Mair GR, Lasonder E, Bartfai R, Stunnenberg HG, Kroeze H, Ramesar J, Franke-Fayard B, Khan SM, Janse CJ, Waters AP. Experimentally controlled downregulation of the histone chaperone FACT in *Plasmodium berghei* reveals that it is critical to male gamete fertility. *Cell Microbiol*. 2011 Dec;13(12):1956-74.

Lee SH, Dominguez R. Regulation of actin cytoskeleton dynamics in cells. *Mol Cells*. 2010 Apr;29(4):311-25. Review.

Lindner SE, Swearingen KE, Harupa A, Vaughan AM, Sinnis P, Moritz RL, Kappe SH. Total and putative surface proteomics of malaria parasite salivary gland sporozoites. *Mol Cell Proteomics*. 2013 May;12(5):1127-43.

Liu Y, Tewari R, Ning J, Blagborough AM, Garbom S, Pei J, Grishin NV, Steele RE, Sinden RE, Snell WJ, Billker O. The conserved plant sterility gene HAP2 functions after attachment of fusogenic membranes in *Chlamydomonas* and *Plasmodium* gametes. *Genes Dev*. 2008 Apr 15;22(8):1051-68.

Liu Z, Miao J, Cui L. Gametocytogenesis in malaria parasite: commitment, development and regulation. *Future Microbiol*. 2011 Nov;6(11):1351-69.

Mahairaki V, Voyatzis T, Siden-Kiamos I, Louis C. The *Anopheles gambiae* gamma1 laminin directly binds the *Plasmodium berghei* circumsporozoite- and TRAP-related protein (CTRP). *Mol Biochem Parasitol*. 2005 Mar;140(1):119-21.

Mair GR, Braks JA, Garver LS, Wiegant JC, Hall N, Dirks RW, Khan SM, Dimopoulos G, Janse CJ, Waters AP. Regulation of sexual development of *Plasmodium* by translational repression. *Science*. 2006 Aug 4;313(5787):667-9.

Mair GR, Lasonder E, Garver LS, Franke-Fayard BM, Carret CK, Wiegant JC, Dirks RW, Dimopoulos G, Janse CJ, Waters AP. Universal features of post-transcriptional gene regulation are critical for *Plasmodium* zygote development. *PLoS Pathog*. 2010 Feb 12;6(2):e1000767.

Matz JM, Matuschewski K, Kooij TW. Two putative protein export regulators promote *Plasmodium* blood stage development in vivo. *Mol Biochem Parasitol*. 2013 Sep;191(1):44-52.

McNally J, O'Donovan SM, Dalton JP. *Plasmodium berghei* and *Plasmodium chabaudi chabaudi*: development of simple in vitro erythrocyte invasion assays. *Parasitology*. 1992 Dec;105 (Pt 3):355-62.

Meissner M, Ferguson DJ, Frischknecht F. Invasion factors of apicomplexan parasites: essential or redundant? *Curr Opin Microbiol*. 2013 Aug;16(4):438-44. Review.

Mello K, Daly TM, Long CA, Burns JM, Bergman LW. Members of the merozoite surface protein 7 family with similar expression patterns differ in ability to protect against *Plasmodium yoelii* malaria. *Infect Immun*. 2004 Feb;72(2):1010-8.

Mens PF, Bojtor EC, Schallig HD. Molecular interactions in the placenta during malaria infection. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2010 Oct;152(2):126-32. Review.

Miao J, Li J, Fan Q, Li X, Li X, Cui L. The Puf-family RNA-binding protein PfPuf2 regulates sexual development and sex differentiation in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Cell Sci*. 2010 Apr 1;123(Pt 7):1039-49.

Miller LH, Aikawa M, Johnson JG, Shiroishi T. Interaction between cytochalasin B-treated malarial parasites and erythrocytes. Attachment and junction formation. *J Exp Med*. 1979 Jan 1;149(1):172-84.

Mlambo G, Kumar N. Transgenic rodent *Plasmodium berghei* parasites as tools for assessment of functional immunogenicity and optimization of human malaria vaccines. *Eukaryot Cell*. 2008 Nov;7(11):1875-9. Review.

Moon RW, Taylor CJ, Bex C, Schepers R, Goulding D, Janse CJ, Waters AP, Baker DA, Billker O. A cyclic GMP signalling module that regulates gliding motility in a malaria parasite. *PLoS Pathog*. 2009 Sep;5(9):e1000599.

Moreno-Garcia M, Recio-Totoro B, Claudio-Piedras F, Lanz-Mendoza H. Injury and immune response: applying the danger theory to mosquitoes. *Front Plant Sci*. 2014;5:451.

Murakami K, Yasunaga T, Noguchi TQ, Gomibuchi Y, Ngo KX, Uyeda TQ, Wakabayashi T. Structural basis for actin assembly, activation of ATP hydrolysis, and delayed phosphate release. *Cell*. 2010 Oct 15;143(2):275-87.

Nacer A, Underhill A, Hurd H. The microneme proteins CTRP and SOAP are not essential for *Plasmodium berghei* ookinete to oocyst transformation in vitro in a cell free system. *Malar J*. 2008 May 19;7:82.

Nacer A, Walker K, Hurd H. Localisation of laminin within *Plasmodium berghei* oocysts and the midgut epithelial cells of *Anopheles stephensi*. *Parasit Vectors*. 2008 Sep 22;1(1):33.

Ngwa CJ, Scheuermayer M, Mair GR, Kern S, Brugi T, Wirth CC, Aminake MN, Wiesner J, Fischer R, Vilcinskis A, Pradel G. Changes in the transcriptome of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* during the initial phase of transmission from the human to the mosquito. *BMC Genomics*. 2013 Apr 15;14:256.

Oda T, Iwasa M, Aihara T, Maeda Y, Narita A. The nature of the globular- to fibrous-actin transition. *Nature*. 2009 Jan 22;457(7228):441-5. doi: 10.1038/nature07685. Erratum in: *Nature*. 2009 Sep 24;461(7263):550.

Olivieri A, Bertuccini L, Deligianni E, Franke-Fayard B, Curra C, Siden-Kiamos I, Hanssen E, Grasso F, Superti F, Pace T, Fratini F, Janse CJ, Ponzi M. Distinct properties of the egress-related osmiophilic bodies in male and female gametocytes of the rodent malaria parasite *Plasmodium berghei*. *Cell Microbiol*. 2015 Mar;17(3):355-68.

Otto TD, Bohme U, Jackson AP, Hunt M, Franke-Fayard B, Hoeijmakers WA, Religa AA, Robertson L, Sanders M, Ogun SA, Cunningham D, Erhart A, Billker O, Khan SM, Stunnenberg HG, Langhorne J, Holder AA, Waters AP, Newbold CI, Pain A, Berriman M, Janse CJ. A comprehensive evaluation of rodent malaria parasite genomes and gene expression. *BMC Biol*. 2014 Oct 30;12:86.

Pace T, Olivieri A, Sanchez M, Albanesi V, Picci L, Siden Kiamos I, Janse CJ, Waters AP, Pizzi E, Ponzi M. Set regulation in asexual and sexual *Plasmodium* parasites reveals a novel mechanism of stage-specific expression. *Mol Microbiol*. 2006 May;60(4):870-82.

Pastrana-Mena R, Dinglasan RR, Franke-Fayard B, Vega-Rodriguez J, Fuentes-Caraballo M, Baerga-Ortiz A, Coppens I, Jacobs-Lorena M, Janse CJ, Serrano AE. Glutathione reductase-null malaria parasites have normal blood stage growth but arrest during development in the mosquito. *J Biol Chem*. 2010 Aug 27;285(35):27045-56.

Paul RE, Brey PT, Robert V. *Plasmodium* sex determination and transmission to mosquitoes. *Trends Parasitol*. 2002 Jan;18(1):32-8. Review.

Perrin BJ, Ervasti JM. The actin gene family: function follows isoform. *Cytoskeleton (Hoboken)*. 2010 Oct;67(10):630-4. Review.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001 May 1;29(9):e45.

Pollard TD, Cooper JA. Actin, a central player in cell shape and movement. *Science*. 2009 Nov 27;326(5957):1208-12.

Ponzi M, Siden-Kiamos I, Bertuccini L, Curri C, Kroeze H, Camarda G, Pace T, Franke-Fayard B, Laurentino EC, Louis C, Waters AP, Janse CJ, Alano P. Egress of *Plasmodium berghei* gametes from their host erythrocyte is mediated by the MDV-1/PEG3 protein. *Cell Microbiol*. 2009 Aug;11(8):1272-88.

Pradel G. Proteins of the malaria parasite sexual stages: expression, function and potential for transmission blocking strategies. *Parasitology*. 2007 Dec;134(Pt.14):1911-29. Epub 2007 Aug 23. Review.

Raine JD, Ecker A, Mendoza J, Tewari R, Stanway RR, Sinden RE. Female inheritance of malarial lap genes is essential for mosquito transmission. *PLoS Pathog*. 2007 Mar;3(3):e30.

Reece SE, Drew DR, Gardner A. Sex ratio adjustment and kin discrimination in malaria parasites. *Nature*. 2008 May 29;453(7195):609-14.

Renia L, Howland SW, Claser C, Charlotte Gruner A, Suwanarusk R, Hui Teo T, Russell B, Ng LF. Cerebral malaria: mysteries at the blood-brain barrier. *Virulence*. 2012 Mar-Apr;3(2):193-201. Review.

Rodrigues J, Oliveira GA, Kotsyfakis M, Dixit R, Molina-Cruz A, Jochim R, Barillas-Mury C. An epithelial serine protease, AgESP, is required for *Plasmodium* invasion in the mosquito *Anopheles gambiae*. *PLoS One*. 2012;7(4):e35210.

Rosenthal PJ. Cysteine proteases of malaria parasites. *Int J Parasitol*. 2004 Dec;34(13-14):1489-99. Review.

Rug M, Wickham ME, Foley M, Cowman AF, Tilley L. Correct promoter control is needed for trafficking of the ring-infected erythrocyte surface antigen to the host cytosol in transfected malaria parasites. *Infect Immun*. 2004 Oct;72(10):6095-105.

Rupp I, Sologub L, Williamson KC, Scheuermayer M, Reininger L, Doerig C, Eksi S, Kombila DU, Frank M, Pradel G. Malaria parasites form filamentous cell-to-cell connections during reproduction in the mosquito midgut. *Cell Res*. 2011 Apr;21(4):683-96.

Saeed S, Carter V, Tremp AZ, Dessens JT. *Plasmodium berghei* crystalloids contain multiple LCCL proteins. *Mol Biochem Parasitol*. 2010 Mar;170(1):49-53.

Sahoo N, Beatty W, Heuser J, Sept D, Sibley LD. Unusual kinetic and structural properties control rapid assembly and turnover of actin in the parasite *Toxoplasma gondii*. *Mol Biol Cell*. 2006 Feb;17(2):895-906.

Schall JJ. Do malaria parasites follow the algebra of sex ratio theory? *Trends Parasitol*. 2009 Mar;25(3):120-3.

Scheller LF, Wirtz RA, Azad AF. Susceptibility of different strains of mice to hepatic infection with *Plasmodium berghei*. *Infect Immun*. 1994 Nov;62(11):4844-7.

Schmitz S, Grainger M, Howell S, Calder LJ, Gaeb M, Pinder JC, Holder AA, Veigel C. Malaria parasite actin filaments are very short. *J Mol Biol*. 2005 May 27;349(1):113-25.

Schuler H, Mueller AK, Matuschewski K. A *Plasmodium* actin-depolymerizing factor that binds exclusively to actin monomers. *Mol Biol Cell*. 2005 Sep;16(9):4013-23.

Schuler H, Mueller AK, Matuschewski K. Unusual properties of *Plasmodium falciparum* actin: new insights into microfilament dynamics of apicomplexan parasites. *FEBS Lett*. 2005 Jan 31;579(3):655-60.

Shahabuddin M, Kaslow DC. *Plasmodium*: parasite chitinase and its role in malaria transmission. *Exp Parasitol*. 1994 Aug;79(1):85-8. Review.

Shahabuddin M, Toyoshima T, Aikawa M, Kaslow DC. Transmission-blocking activity of a chitinase inhibitor and activation of malarial parasite chitinase by mosquito protease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 May 1;90(9):4266-70.

Shortle D, Haber JE, Botstein D. Lethal disruption of the yeast actin gene by integrative DNA transformation. *Science*. 1982 Jul 23;217(4557):371-3.

Sibley LD. Invasion of vertebrate cells by *Toxoplasma gondii*. *Trends Cell Biol*. 1995 Mar;5(3):129-32.

Siden-Kiamos I, Ecker A, Nyback S, Louis C, Sinden RE, Billker O. *Plasmodium berghei* calcium-dependent protein kinase 3 is required for ookinete gliding motility and mosquito midgut invasion. *Mol Microbiol*. 2006 Jun;60(6):1355-63.

Siden-Kiamos I, Ganter M, Kunze A, Hliscs M, Steinböchel M, Mendoza J, Sinden RE, Louis C, Matuschewski K. Stage-specific depletion of myosin A supports an essential role in motility of malarial ookinetes. *Cell Microbiol*. 2011 Dec;13(12):1996-2006.

Siden-Kiamos I, Louis C, Matuschewski K. Evidence for filamentous actin in ookinetes of a malarial parasite. *Mol Biochem Parasitol.* 2012 Feb;181(2):186-9.

Siden-Kiamos I, Louis C. Intracellular calcium levels in the *Plasmodium berghei* ookinete. *Parasitology.* 2008 Oct;135(12):1355-62.

Siden-Kiamos I, Pinder JC, Louis C. Involvement of actin and myosins in *Plasmodium berghei* ookinete motility. *Mol Biochem Parasitol.* 2006 Dec;150(2):308-17.

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

Silva-Neto MA, Atella GC, Shahabuddin M. Inhibition of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase blocks morphological differentiation of *Plasmodium gallinaceum* zygotes to ookinetes. *J Biol Chem.* 2002 Apr 19;277(16):14085-91.

Silvestrini F, Bozdech Z, Lanfrancotti A, Di Giulio E, Bultrini E, Picci L, Derisi JL, Pizzi E, Alano P. Genome-wide identification of genes upregulated at the onset of gametocytogenesis in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol.* 2005 Sep;143(1):100-10.

Sinden RE, Canning EU, Spain B. Gametogenesis and fertilization in *Plasmodium yoelii nigeriensis*: a transmission electron microscope study. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1976 Mar 30;193(1110):55-76.

Sinden RE, Hartley RH, Winger L. The development of *Plasmodium* ookinetes in vitro: an ultrastructural study including a description of meiotic division. *Parasitology.* 1985 Oct;91 (Pt 2):227-44.

Sinden RE, Talman A, Marques SR, Wass MN, Sternberg MJ. The flagellum in malarial parasites. *Curr Opin Microbiol.* 2010 Aug;13(4):491-500. Review.

Sinden RE. A proteomic analysis of malaria biology: integration of old literature and new technologies. *Int J Parasitol.* 2004 Dec;34(13-14):1441-50. Review.

Sinden RE. Gametocytogenesis of *Plasmodium falciparum* in vitro: an electron microscopic study. *Parasitology.* 1982 Feb;84(1):1-11.

Sinha A, Hughes KR, Modrzynska KK, Otto TD, Pfander C, Dickens NJ, Religa AA, Bushell E, Graham AL, Cameron R, Kafsack BF, Williams AE, Llinas M, Berriman M, Billker O, Waters AP. A cascade of DNA-binding proteins for sexual commitment and development in *Plasmodium*. *Nature.* 2014 Mar 13;507(7491):253-7.

Sinha S, Medhi B, Sehgal R. Challenges of drug-resistant malaria. *Parasite.* 2014;21:61.

Skillman KM, Diraviyam K, Khan A, Tang K, Sept D, Sibley LD. Evolutionarily divergent, unstable filamentous actin is essential for gliding motility in apicomplexan parasites. *PLoS Pathog.* 2011 Oct;7(10):e1002280.

Smythe WA, Joiner KA, Hoppe HC. Actin is required for endocytic trafficking in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Cell Microbiol.* 2008 Feb;10(2):452-64.

Sologub L, Kuehn A, Kern S, Przyborski J, Schillig R, Pradel G. Malaria proteases mediate inside-out egress of gametocytes from red blood cells following parasite transmission to the mosquito. *Cell Microbiol.* 2011 Jun;13(6):897-912.

Spielmann T, Montagna GN, Hecht L, Matuschewski K. Molecular make-up of the *Plasmodium* parasitophorous vacuolar membrane. *Int J Med Microbiol.* 2012 Oct;302(4-5):179-86. Review.

Srinivasan P, Fujioka H, Jacobs-Lorena M. PbCap380, a novel oocyst capsule protein, is essential for malaria parasite survival in the mosquito. *Cell Microbiol.* 2008 Jun;10(6):1304-12.

Stewart MJ, Vanderberg JP. Malaria sporozoites release circumsporozoite protein from their apical end and translocate it along their surface. *J Protozool.* 1991 Jul-Aug;38(4):411-21.

Straschil U, Talman AM, Ferguson DJ, Bunting KA, Xu Z, Bailes E, Sinden RE, Holder AA, Smith EF, Coates JC, Rita Tewari. The Armadillo repeat protein PF16 is essential for flagellar structure and function in *Plasmodium* male gametes. *PLoS One.* 2010 Sep 23;5(9):e12901.

Suarez-Cortes P, Silvestrini F, Alano P. A fast, non-invasive, quantitative staining protocol provides insights in *Plasmodium falciparum* gamete egress and in the role of osmiophilic bodies. *Malar J.* 2014 Oct 1;13:389.

Sultan AA, Thathy V, Frevert U, Robson KJ, Crisanti A, Nussenzweig V, Nussenzweig RS, Mitchell R. TRAP is necessary for gliding motility and infectivity of *Plasmodium* sporozoites. *Cell.* 1997 Aug 8;90(3):511-22.

Talman AM, Lacroix C, Marques SR, Blagborough AM, Carzaniga R, Menard R, Sinden RE. PbGEST mediates malaria transmission to both mosquito and vertebrate host. *Mol Microbiol.* 2011 Oct;82(2):462-74.

- Templeton TJ, Keister DB, Muratova O, Procter JL, Kaslow DC. Adherence of erythrocytes during exflagellation of *Plasmodium falciparum* microgametes is dependent on erythrocyte surface sialic acid and glycoporphins. *J Exp Med*. 1998 May 18;187(10):1599-609.
- Tewari R, Ogun SA, Gunaratne RS, Crisanti A, Holder AA. Disruption of *Plasmodium berghei* merozoite surface protein 7 gene modulates parasite growth in vivo. *Blood*. 2005 Jan 1;105(1):394-6.
- Tewari R, Straschil U, Bateman A, Bohme U, Cherevach I, Gong P, Pain A, Billker O. The systematic functional analysis of *Plasmodium* protein kinases identifies essential regulators of mosquito transmission. *Cell Host Microbe*. 2010 Oct 21;8(4):377-87.
- Thathy V, Fujioka H, Gantt S, Nussenzweig R, Nussenzweig V, Menard R. Levels of circumsporozoite protein in the *Plasmodium* oocyst determine sporozoite morphology. *EMBO J*. 2002 Apr 2;21(7):1586-96.
- Tiffert T, Lew VL. Dynamic morphology and cytoskeletal protein changes during spontaneous inside-out vesiculation of red blood cell membranes. *Pflugers Arch*. 2014 Dec;466(12):2279-88.
- Tondeleir D, Vandamme D, Vandekerckhove J, Ampe C, Lambrechts A. Actin isoform expression patterns during mammalian development and in pathology: insights from mouse models. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2009 Oct;66(10):798-815. Review.
- Torres JA, Rodriguez MH, Rodriguez MC, de la Cruz Hernandez-Hernandez F. *Plasmodium berghei*: effect of protease inhibitors during gametogenesis and early zygote development. *Exp Parasitol*. 2005 Dec;111(4):255-9.
- Trager W, Gill GS, Lawrence C, Nagel RL. *Plasmodium falciparum*: enhanced gametocyte formation in vitro in reticulocyte-rich blood. *Exp Parasitol*. 1999 Feb;91(2):115-8.
- Trager W, Gill GS. Enhanced gametocyte formation in young erythrocytes by *Plasmodium falciparum* in vitro. *J Protozool*. 1992 May-Jun;39(3):429-32.
- Tusting LS, Thwing J, Sinclair D, Fillinger U, Gimnig J, Bonner KE, Bottomley C, Lindsay SW. Mosquito larval source management for controlling malaria. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013 Aug 29;8:CD008923.
- Vahokoski J, Bhargav SP, Desfosses A, Andreadaki M, Kumpula EP, Martinez SM, Ignatov A, Lepper S, Frischknecht F, Sidenkiamos I, Sachse C, Kursula I. Structural differences explain diverse functions of *Plasmodium* actins. *PLoS Pathog*. 2014 Apr;10(4):e1004091.
- van Dijk MR, van Schaijk BC, Khan SM, van Dooren MW, Ramesar J, Kaczanowski S, van Gemert GJ, Kroeze H, Stunnenberg HG, Eling WM, Sauerwein RW, Waters AP, Janse CJ. Three members of the 6-cys protein family of *Plasmodium* play a role in gamete fertility. *PLoS Pathog*. 2010 Apr 8;6(4):e1000853.
- Vinetz JM, Dave SK, Specht CA, Brameld KA, Xu B, Hayward R, Fidock DA. The chitinase PfCHT1 from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* lacks proenzyme and chitin-binding domains and displays unique substrate preferences. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Nov 23;96(24):14061-6.
- Vinetz JM. *Plasmodium* ookinete invasion of the mosquito midgut. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2005;295:357-82. Review.
- Vlachou D, Zimmermann T, Cantera R, Janse CJ, Waters AP, Kafatos FC. Real-time, in vivo analysis of malaria ookinete locomotion and mosquito midgut invasion. *Cell Microbiol*. 2004 Jul;6(7):671-85.
- Wagner CR, Mahowald AP, Miller KG. One of the two cytoplasmic actin isoforms in *Drosophila* is essential. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Jun 11;99(12):8037-42.
- Wesseling JG, Smits MA, Schoenmakers JG. Extremely diverged actin proteins in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*. 1988 Aug;30(2):143-53.
- Wesseling JG, Snijders PJ, van Someren P, Jansen J, Smits MA, Schoenmakers JG. Stage-specific expression and genomic organization of the actin genes of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*. 1989 Jun 15;35(2):167-76.
- Wetzel DM, Hakansson S, Hu K, Roos D, Sibley LD. Actin filament polymerization regulates gliding motility by apicomplexan parasites. *Mol Biol Cell*. 2003 Feb;14(2):396-406.
- Wilson LG, Carter LM, Reece SE. High-speed holographic microscopy of malaria parasites reveals ambidextrous flagellar waveforms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Nov 19;110(47):18769-74.
- Wion D, Casadesus J. N6-methyl-adenine: an epigenetic signal for DNA-protein interactions. *Nat Rev Microbiol*. 2006 Mar;4(3):183-92. Review.
- Wirth CC, Bennink S, Scheuermayer M, Fischer R, Pradel G. Perforin-like protein PPLP4 is crucial for mosquito midgut infection by *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*. 2015 Jul 9;201(2):90-99.

Wu Y, Wang X, Liu X, Wang Y. Data-mining approaches reveal hidden families of proteases in the genome of malaria parasite. *Genome Res.* 2003 Apr;13(4):601-16.

Zhang Q, Huang Y, Zhang Y, Fang X, Claes A, Duchateau M, Namane A, Lopez-Rubio JJ, Pan W, Scherf A. A critical role of perinuclear filamentous actin in spatial repositioning and mutually exclusive expression of virulence genes in malaria parasites. *Cell Host Microbe.* 2011 Nov 17;10(5):451-63.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Genetic crosses and complementation reveal essential functions for the *Plasmodium* stage-specific actin2 in sporogonic development

Maria Andreadaki,^{1,2†} Rhiannon N. Morgan,^{1,2†}
Elena Deligianni,¹ Taco W. A. Kooij,³
Jorge M. Santos,⁴ Lefteris Spanos,¹
Kai Matuschewski,³ Christos Louis,^{1,2}
Gunnar R. Mair⁴ and Inga Siden-Kiamos^{1*}

¹*Institute of Molecular Biology and Biotechnology, FORTH, Heraklion, Greece.*

²*Department of Biology, University of Crete, Heraklion, Greece.*

³*Parasitology Unit, Max Planck Institute for Infection Biology, Berlin, Germany.*

⁴*Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, 1649-028 Lisbon, Portugal.*

Summary

Malaria parasites have two actin isoforms, ubiquitous actin1 and specialized actin2. Actin2 is essential for late male gametogenesis, prior to egress from the host erythrocyte. Here, we examined whether the two actins fulfil overlapping functions in *Plasmodium berghei*. Replacement of actin2 with actin1 resulted in partial complementation of the defects in male gametogenesis and, thus, viable ookinetes were formed, able to invade the midgut epithelium and develop into oocysts. However, these remained small and their DNA was undetectable at day 8 after infection. As a consequence sporogony did not occur, resulting in a complete block of parasite transmission. Furthermore, we show that expression of actin2 is tightly controlled in female stages. The *actin2* transcript is translationally repressed in female gametocytes, but translated in female gametes. The protein persists until mature ookinetes; this expression is strictly dependent on the maternally derived expression. Genetic crosses revealed that actin2 functions at an early stage of ookinete formation and that parasites lacking actin2 are unable to

undergo sporogony in the mosquito midgut. Our results provide insights into the specialized role of actin2 in *Plasmodium* development in the mosquito and suggest that the two actin isoforms have distinct biological functions.

Introduction

Transmission of malarial parasites to the mosquito and the ensuing differentiation and population expansion phases in the vector represent a very complex developmental programme in the *Plasmodium* life cycle, which requires the initiation of sexual stage development in the blood of the vertebrate host. Although the duration of gametocytogenesis within the red blood cell differs between *Plasmodium* species, the cell cycle of mature gametocytes is suspended until taken up by a mosquito host with a blood meal (Baker, 2010). Immediately after uptake, the male and female gametocytes are activated and develop into fertile gametes, which fuse to form a zygote about 1 h later. An unusual aspect is that meiosis immediately follows zygote formation, resulting in the development of a cell containing four haploid genomes. The round zygote is then remodelled: a microtubule organizing centre (MTOC) is laid down close to the cell membrane and from this, microtubules are nucleated and an elongation of the cell is initiated through their extension. This form of the cell is called a retort. Gradual elongation results in the formation of the polar ookinete within the next ~ 15 h (Sinden, 1999). The ookinete is a motile cell, using gliding motility to traverse midgut epithelial cells (Vlachou *et al.*, 2004). Once it reaches the basal side of the epithelial cell, extensive reorganization of the parasite follows, resulting in the formation of the round oocyst, which is surrounded by a capsule. In this cell, a series of synchronous mitotic divisions (~ 13) in a syncytium lead to the formation of several thousand nuclei in each oocyst (Sinden, 1999). The apicoplast and mitochondrion are also replicated (Stanway *et al.*, 2009) and massive protein synthesis takes place followed by the formation of secretory organelles. During the final phases, about 10–12 days after the blood meal, budding produces the individual sporozoites. Breakdown of the oocyst capsule

Received 8 October, 2013; revised 18 December, 2013; accepted 22 January, 2014. *For correspondence. E-mail inga@imbb.forth.gr; Tel. (+30) 2810 391118; Fax (+30) 2810 391104.

†These authors contributed equally to this work.

finally results in the release of the sporozoites into the haemocoel (Aly and Matuschewski, 2005).

As all *Plasmodium* parasites, *P. berghei* expresses two conventional actin isoforms, the ubiquitous actin1 (PBANKA_145930) and a specialized actin2 (PBANKA_103010) (Wesseling *et al.*, 1988; Gardner *et al.*, 2002; Schuler and Matuschewski, 2006). [The gene PBANKA_103010, was previously referred to as *actin II* (Deligianni *et al.*, 2011) and *actin 2* (Kooij *et al.*, 2012); it will be named *actin2* in this article. Ubiquitous actin, PBANKA_145930, called *actin I*, will be named *actin1*]. Both actin isoforms have the ability to form actin filaments *in vitro* (Schmitz *et al.*, 2005; 2010; Schuler *et al.*, 2005; Skillman *et al.*, 2011). While the *actin1* gene is essential, *actin2* can be deleted in *P. berghei* (Deligianni *et al.*, 2011). Our previous detailed genetic and cell biological analysis revealed that actin2 has a critical role in male gametogenesis. Mutant male gametocytes were severely blocked in egress, and, while axonemes were formed, these were not activated. As a result exflagellation was reduced to almost undetectable levels, and only a very small number of ookinetes were occasionally formed. However, not a single oocyst was ever detected after feeding the mutant to mosquitoes (Deligianni *et al.*, 2011). While this study employing classical gene deletion revealed critical roles for actin2 in male gametogenesis, additional important functions later in the *Plasmodium* life cycle, for example during the stages in the mosquito vector, remain unknown.

Here, we investigated whether open reading frame (ORF) swapping with that of ubiquitous *actin1* could restore the function of actin2. Using this isoform complementation approach we could show that resulting parasites were able to form ookinetes, albeit at reduced numbers. Surprisingly, the resulting oocysts were completely blocked in sporogony. To study this second function of actin2 we employed genetic crosses. We demonstrate that in addition to its role in male gametogenesis

actin2 has an essential function during early ookinete formation, and lack of actin2 ultimately manifests as a complete block in sporogony.

Results

Replacement of actin2 with actin1 leads to a reduction of ookinete formation

A longstanding question is whether the two *Plasmodium* actin isoforms have related molecular functions or whether they play distinct roles in the cell. Because of the critical function of actin1 for the growth of asexual blood stages, the phase of the life cycle where transfection is performed, we focused our study on modifying the *actin2* gene. Our strategy aimed at replacing the *actin2* ORF with that of *actin1*. For this we used a recipient line where the complete ORF of *actin2* had been deleted and the mutant strain had been recycled to remove the resistance cassette (Kooij *et al.*, 2012) (Fig. S1). Similar to our original *act11(-)* mutant (Deligianni *et al.*, 2011) this strain was incapable of exflagellation.

The recipient line was transfected with a construct containing the *actin1* ORF under the control of the *actin2* 5'- and 3'-flanking regions (FR) resulting in the *act2rep* mutant. Because the recipient *actin2::mCherry* mutant already contained several kbp of foreign DNA, we also verified that we could complement the *actin2* deletion by an analogous construct, containing the *actin2* ORF under its own 5' and 3'FR, thus restoring the correct expression of the gene in the *act2com* mutant (Fig. 1A, Fig. S1). For both constructs recombinant parasites harbouring the predicted genetic modifications were obtained and cloned using limiting dilution (Fig. S1).

We then investigated the fertility of the two lines. Exflagellation of the *act2rep* parasites was roughly 10-fold reduced compared to the *act2 com* strain (J. Vahakoski

Fig. 1. Expression of *actin1* cannot replace the function of actin2 in oocyst development.

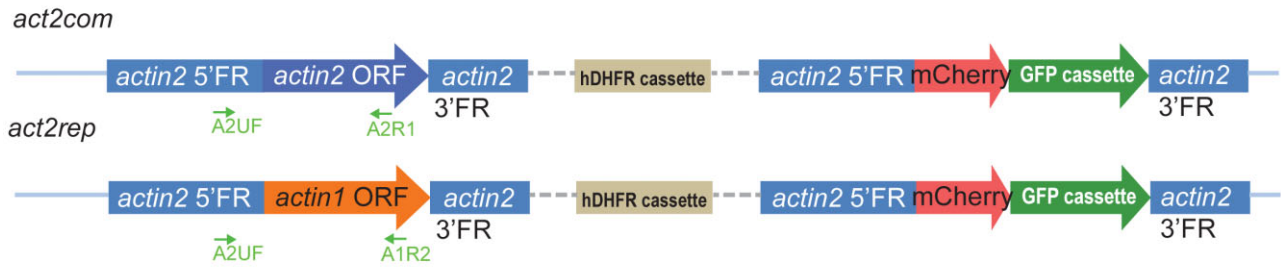
A. Schematic representation of the complementation (*act2com*) and replacement constructs (*act2rep*). The recipient strain where the ORF of the *actin2* gene had been deleted contained the *actin2* 5'FR directly upstream of the coding region of mCherry, a GFP cassette followed by *actin2* 3'FR. This strain was transfected with two identical constructs except for the ORF, which was *actin2* (blue arrow) and *actin1* (orange arrow) in *act2com* and *act2rep* respectively. The ORF was inserted between 2.7 kb of the *actin2* 5'FR and 728 bp of the *actin2* 3'FR and the vector in addition contained the human DHFR encoding gene. A single cross-over integration in the 5'FR of the deleted *actin2* gene resulted in integration of the transgenes in the *actin2* locus, followed by the hDHFR cassette and the duplicated *actin2* 5'FR. For full description of the strategy and the verification of the mutants see Fig. S1B.

B. Expression of actin1 under *actin2* regulatory elements results in significantly less efficient ookinete formation compared to WT and the *act2com* strain. *** $P < 0.0001$ Student's *t*-test.

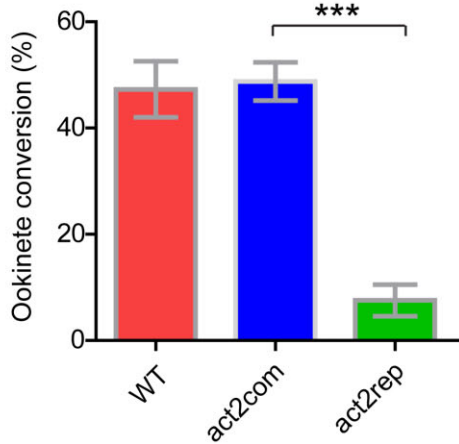
C. Expression of actin1 under *actin2* regulatory elements leads to a complete block in oocyst formation. Experiments 1 and 2 were performed by feeding *A. gambiae* mosquitoes on infected mice (darker blue and green). The oocysts were counted at day 12. In experiment 3 ookinetes (3×10^5 of each strain) from *in vitro* cultures were fed using a membrane feeder (lighter blue and green) and oocysts scored at day 11. No oocysts were detected in the *act2rep* fed mosquitoes. *Act2com* blue circles, *act2 rep* green squares. *** $P < 0.0001$ Kruskal-Wallis non-parametric test.

D. RT-PCR of cDNA originating from *act2com* and *act2rep* mixed blood stages. The A2UF primer binding to the *actin2* 5'FR was used in both samples while the reverse primers were specific for each ORF (green arrows in A). The *act2rep*-specific fragment was amplified slightly more efficiently (1.6-fold) than the *act2com* fragment, determined by measuring the intensity of the bands and normalizing the two cDNA samples with primers specific for *Pbmap2* (PBANKA_093370). The primers were normalized using WT and *act2rep* gDNA respectively.

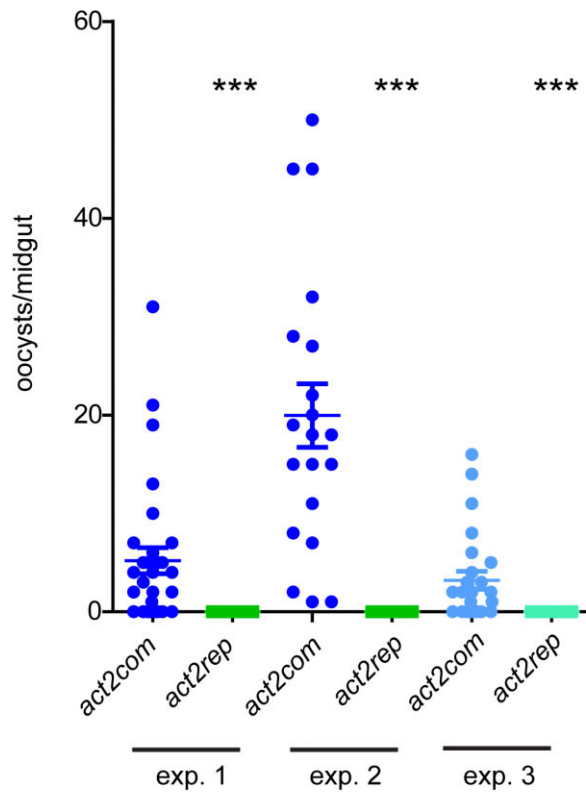
A



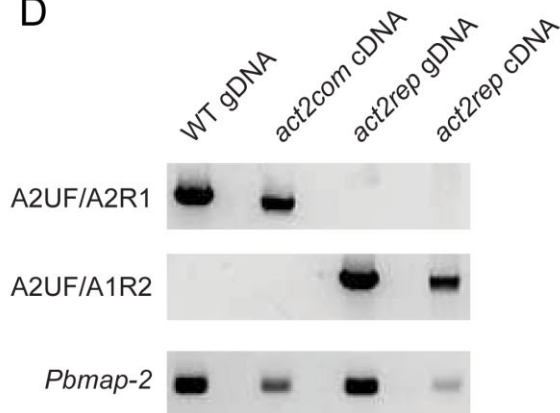
B



C



D



et al., unpublished). Ookinete conversion of the *act2com* strain was restored to WT numbers (Fig. 1B), confirming that the complementation was successful. The conversion of the *act2rep* strain, on the other hand, was reduced more than sixfold, but ookinetes were always detected, and we were able to obtain moderate numbers of ookinetes from *act2rep*. This is in contrast to the *actin2* deletion mutants where only occasionally very few ookinetes were detected (Deligianni *et al.*, 2011). These findings show that *actin1* can partially restore the essential functions of *actin2* during male exflagellation when its expression is controlled by the

actin2 regulatory elements. The fact that the *act2rep* mutant formed ookinetes allowed us to investigate the role of *actin2* in the mosquito midgut stages.

Replacement of actin2 with actin1 blocks transmission through the mosquito

To determine whether the ookinetes were able to develop into oocysts we fed mosquitoes on *act2com*- and *act2rep*-infected mice. In two independent experiments oocysts were detected in mosquitoes fed with *act2com*, while we

did not detect a single oocyst in the *act2rep*-infected mosquitoes (Fig. 1C). We confirmed this result by feeding mosquitoes on equal numbers of *in vitro* cultured ookinetes, to exclude the possibility that the results were due to substantially fewer ookinetes having formed in the *act2rep* strain. Again, oocysts were only found in the *act2com*-infected midguts and no oocysts were detected in the mosquitoes fed with *act2rep* ookinetes (Fig. 1C). Taken together, these data suggested that the *act2rep* ookinetes were not able to complete sporogony.

One interpretation of these results is that *actin1* is not produced in amounts similar to *actin2*. It is not possible to directly determine the amount of *actin1* protein produced from the *actin2* locus, due to the fact that it is also produced from the WT *actin1* gene and is present in the same cellular compartment (Deligianni *et al.*, 2011). We therefore performed RT-PCR (reverse transcription PCR) experiments to determine whether both transgenes are equally transcribed into mRNA (Fig. 1D). cDNA was prepared from mixed blood stages of the two strains, and specific primers were used to amplify fragments corresponding to each of the two transgenes. The results indicate that transcript levels of the *actin2* and *actin1* transgenes are similar in the *act2com* and *act2rep* strains respectively. Thus gene expression regulated by the *actin2* cis-elements is, at least in this case, independent of the identity of the ORF.

Act2rep oocysts are formed but do not undergo sporogony

The failure to detect *act2rep* oocysts in these experiments could be due either to a failure of the ookinetes to traverse the midgut epithelium or to arrested oocyst development. It is known that motility of the ookinete is necessary for traversal of the epithelium (see for example Dessens *et al.*, 1999; Vlachou *et al.*, 2004; Siden-Kiamos *et al.*, 2006). To exclude that the *act2rep* ookinetes were affected in their motility, we used a motility assay employing matrigel (Moon *et al.*, 2009). Our results show that there is no detectable difference in the motility of the *act2rep* ookinetes compared to WT (Fig. 2A, Movies S1 and S2). The speed was measured and found to be $5.7 \mu\text{m min}^{-1}$ (mean of nine ookinetes) which is similar to that of WT ookinetes ($6 \mu\text{m min}^{-1}$). In order to recognize even small oocysts, we labelled the oocysts with an antibody against the oocyst capsule protein Cap380 (Srinivasan *et al.*, 2008) and stained the nuclei for DNA. Mosquitoes were fed on mice infected with the two strains. Oocysts were detected as early as day 3 after feeding in the *act2com* but not in the *act2rep*-fed mosquitoes, a result possibly due to the very small number of oocysts developing in this strain (Fig. 2B,a). At day 8, very few oocysts (7 in 11 midguts) were detected, which were

all significantly smaller than the developing *act2com* oocysts and which contained no detectable DNA (Fig. 2B,b,d). Eleven days after blood feeding, a few *act2rep* oocysts (5 in 20 midguts) were detected; the difference in size of the oocysts of the two strains was even more pronounced (Fig. 2B,c,e), which was verified by measurements of the area of the oocyst (Fig. 2C). We confirmed the apparent loss of the genomic DNA in the *act2rep* oocysts by performing PCR of infected midguts using primers for the *gapdh* gene, which specifically amplifies parasite DNA. This showed that the *act2rep* DNA was lost while, as expected, *act2com* DNA was present at all three time points (Fig. 2D).

We also fed naïve mice on mosquitoes infected with these two strains. As expected, no infection was established from the *act2rep*-infected mosquitoes, while the *act2com*-infected mosquitoes repeatedly produced infections in all mice with an average pre-patent period of 5 days (data not shown).

Taken together, these results suggest that the functions of *actin1* and *actin2* in the mosquito vector are distinct. Furthermore, it also suggests that *actin2* has two consecutive essential functions. In addition to the previously described role in male gametogenesis (Deligianni *et al.*, 2011), this *actin* isoform is also critical for sporogony and, importantly, this second function is independent of the role in gametogenesis.

Actin2 is expressed during ookinete development

We previously reported that the *actin2* gene was specifically transcribed in gametocytes of both sexes and not in asexual forms during the blood stages, and that the protein is present only in male gametocytes (Deligianni *et al.*, 2011). Our new experiments indicated that *actin2* was expressed during additional stages of the parasite life cycle. To investigate this we performed RT-PCR analysis on mature ookinetes, and mosquito midguts containing oocysts (Fig. 3A). The *actin2* transcript was detected in the ookinete sample, but not in oocysts. *Actin1*, on the other hand, was constitutively transcribed during oocyst maturation.

We next performed immunofluorescence assays (IFA) of ookinetes to determine the localization of *actin2*. We made use of a strain expressing a GFP-*actin2* fusion protein encoded by an episomal construct as previously described (Deligianni *et al.*, 2011). The episome also carries a gene conferring resistance to the antifolate pyrimethamine, as a positive selection for its presence in the parasites. Ookinetes of this strain developed normally from parasites cultivated in the presence of a low concentration of the antifolate and expressed the GFP-*actin2* fusion protein, visualized by labelling with an antibody against GFP. In addition, an antiserum directed against

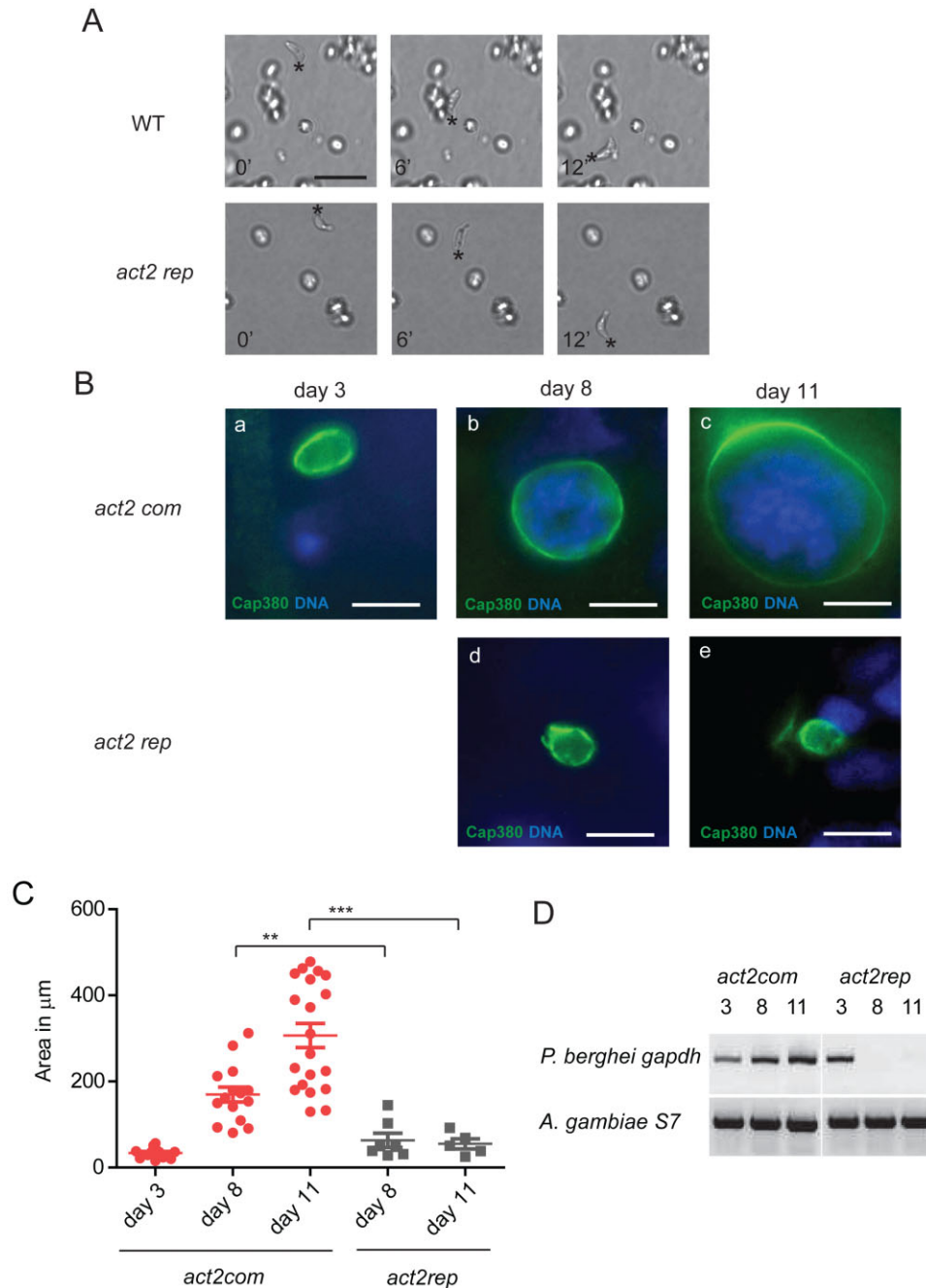


Fig. 2. The *act2rep* strain forms abnormal oocysts.

A. Gliding of WT and *act2rep* ookinetes in Matrigel™ is illustrated with representative frames from time-lapse videos (Movies S1 and S2). The black asterisk marks the apical end of the ookinete. Scale bar, 20 μm .

B. *act2com* (a,b,c) and *act2rep* (d,e) oocysts labelled with the Cap380 (green) antibody and stained for DNA (blue). At 3 days (a) only *act2com* oocysts were detected. At 8 (b,d) and 11 days (c,e) the *act2 rep* oocysts are small and their DNA hardly visible comparable to the developed *act2com* oocysts. *Act2com* oocysts have developed into big oocysts at day 11 and the DNA has replicated. Scale bar, 10 μm .

C. The area of the oocysts at day 3, 8 and 11. *Act2 com*: red circles, *act2rep*: grey squares. The *act2rep* oocysts do not grow in size beyond 3 days. ** $P < 0.005$, *** $P < 0.001$, Student's *t*-test.

D. The *act2rep* is lost during oocyst development. Genotyping of mosquitoes fed with the two strains separately. PCR was performed on genomic DNA isolated from dissected mosquito midguts using primers specific for the *P. berghei gapdh* gene and the ribosomal S7 gene of *A. gambiae* as control. Samples correspond to mosquitoes dissected 3, 8 and 11 days after blood feeding.

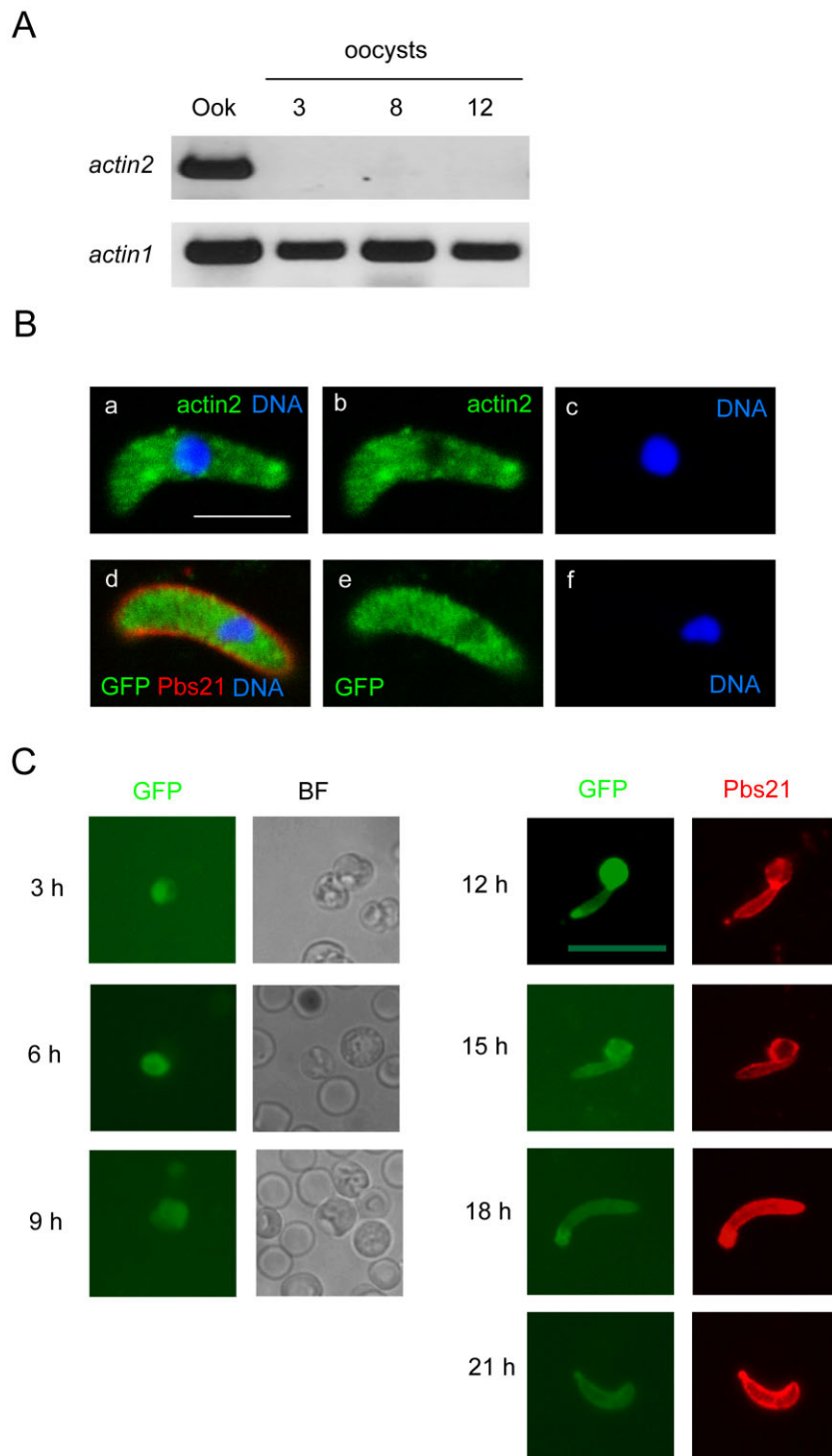


Fig. 3. Expression of *actin2* in mosquito midgut stages.

A. Reverse transcription PCR analysis of expression of *actin2* in ookinetes (ook) and oocyst containing midguts at 3, 8 and 12 days after blood feeding. Primers specific for ubiquitous *actin1* was used for normalization.

B. Actin2 is localized in the cytoplasm of mature ookinetes. (a–c) IFA of a WT ookinete using the *actin2* antiserum (a, b, green). (d–f) Labelling of an ookinete expressing the GFP–actin2 fusion protein with anti-GFP antibody (d,e, green) and the 13.1 antibody recognizing Pbs21 (d, red). DNA was stained with TO-PRO (a,c,d,f, blue). Images are projections from confocal stacks. Scale bar, 5 μ m.

C. GFP–actin2 expression during zygote to ookinete development. Left panel: live imaging of GFP and corresponding bright-field images (BF). Brightness of signal has been adjusted for clarity and is not comparable between images. Right panel: Developing ookinetes were fixed and labelled with antibodies recognizing GFP and Pbs21. The time of each sample is indicated on the left of each panel (h after seeding of the culture). Pictures were taken using an epifluorescence microscope.

actin2 was also employed. In both cases the protein was detected in the cytoplasm, in a diffuse pattern with no obvious discrete localization, and it was excluded from the nucleus (Fig. 3B).

We next followed expression of the GFP–actin2 fusion protein during development from zygotes to ookinetes. Samples from an ookinete culture were removed at differ-

ent time points after seeding. At the early time points (3, 6, 9 h) live cells were imaged using an epifluorescence microscope. At later time points (12, 15, 18, 21 h) the samples were fixed and labelled with antibodies directed against GFP and the surface protein Pbs21 (Fig. 3C). The protein was detected already at 3 h after the seeding of the culture. In the retort forms (12 and 15 h after seeding

the culture) the fusion protein was mainly present in the round residual cell, while comparatively less was present in the extension of the cell. At later stages the label was detected in the cytoplasm of the cell, with no discrete localization.

Attempts to detect the protein in oocysts using either the GFP fusion strain or the antiserum were unsuccessful (data not shown). In conclusion, *actin2* is expressed during the first critical phase of mosquito colonization, i.e. maturation of *Plasmodium* ookinetes.

Parasites lacking actin2 are lost during oocyst development

We previously characterized a knockout mutant of *actin2*, named *act11(-)*, which was blocked in male gametogenesis and thus formed negligible numbers of ookinetes and no oocysts upon transmission to mosquitoes (Deligianni *et al.*, 2011). This mutant was used to investigate the function of *actin2* in midgut stages by performing genetic crosses to WT parasites. In these experiments the male and female gametocytes will form a mixture of WT ookinetes and heterozygous ookinetes, resulting from a cross between WT male gametocytes and *act11(-)* females (Fig. 4A). Mosquitoes were fed on mice, which had been double-infected with WT and *act11(-)* parasites. In parallel, an *in vitro* culture of ookinetes was seeded with blood from the same animal. Diagnostic PCR was performed to follow the presence of the mutant during oocyst development (Fig. 4B). As expected, both WT and mutant were detected in the ookinete sample, while oocysts bearing the mutant *act11(-)* gene were only present at the initial phase of oocyst development; the mutant genotype was no longer detected in oocysts at day 8 or in salivary gland sporozoites. Consequently, when infected mosquitoes were fed to naïve mice, only the WT genotype was detected (data not shown).

Oocysts derived from heterozygous ookinetes are blocked in sporogony

Since in these experiments normal proliferation of WT oocysts obscured any phenotype of the mutant oocysts we next performed an *in vitro* genetic cross of the *act11(-)* strain with the strain $\Delta p47$, which only produces fertile males (van Dijk *et al.*, 2010). An ookinete culture was seeded with blood from mice infected with each strain separately, and the culture was then fed to mosquitoes, as it has been observed that the $\Delta p47$ strain can inefficiently develop into oocysts when gametocytes are fed to mosquitoes (van Dijk *et al.*, 2010). All ookinetes resulting from the cross *act11(-)* $\times\Delta p47$ are heterozygous for the *actin2* gene (*actin2*^{+/-}, in the following the female genotype is

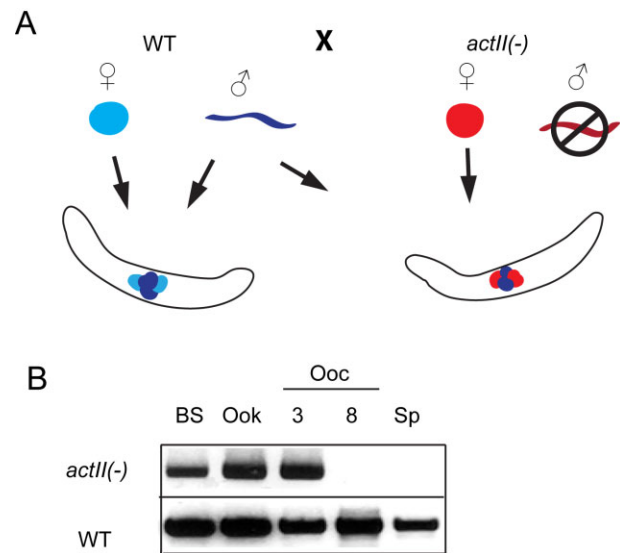


Fig. 4. Genetic cross between WT and *act11(-)* mutant gametocytes and genotyping of resulting oocysts reveals the loss of the *actin11* genomic DNA during oocyst development. **A.** Schematic of the cross between WT (blue) and *act11(-)* gametocytes (red), of which only the females are fertile. WT male gametocytes can fertilize either WT or *act11(-)* females. Two populations of ookinetes are formed, those being homozygous WT for the *actin2* locus and those being heterozygous *actin2*^{+/-}. Mosquitoes were fed on mice double infected with both strains. Females are depicted as filled circles and the males as a wavy line. **B.** Genotyping with primers specific for mutant *act11(-)* locus (top) and for WT *actin2* locus as control (bottom). Samples were: blood of a double infected mouse (BS); an *in vitro* ookinete culture seeded from the same mouse (Ook); midguts dissected at 3 and 8 days after feeding mosquitoes on infected mice (Ooc); salivary gland sporozoites at day 21 after feeding (Sp).

always listed first in crosses and progeny), as the *act11(-)* mutants form very few fertile male gametocytes (Deligianni *et al.*, 2011). Parallel cultures of the individual strains were used to verify that these two strains were unable to form ookinetes on their own (data not shown).

The ookinetes from the cross *act11(-)* $\times\Delta p47$ were fed to mosquitoes in parallel with WT ookinetes. At day 3 post feeding the oocysts were labelled with the Cap380 antibody and stained for DNA. The numbers of oocysts were comparable (WT: mean 17 oocysts/midgut, prevalence 90%, $n = 19$; *act11(-)* $\times\Delta p47$ mean 12 oocysts/midgut, prevalence 78%, $n = 18$). The heterozygous oocysts were of equivalent size to the WT (Fig. 5A), but substantial variations in the DNA content of these oocysts were noted, ranging from values similar to the WT to others with very weak DNA. At day 10 the heterozygous oocysts were considerably smaller than WT (Fig. 5A and B); DNA was not detectable or the amount was significantly less than in WT oocysts of the same age (Fig. 5A,e, inset and Fig. 5C) suggesting that DNA replication was affected in the heterozygous oocysts. This is consistent with the result

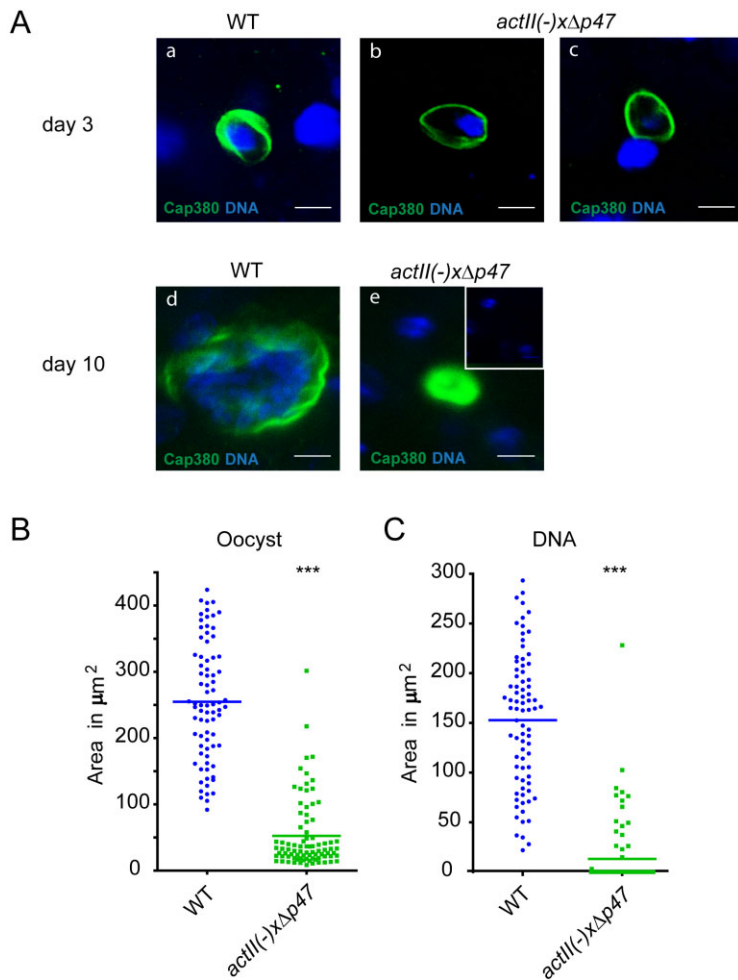


Fig. 5. Genetic cross between $\Delta p47$ and *act11(-)* mutant gametocytes results in aborted oocyst development.

A. Comparison of WT and *act11(-)Δp47* oocysts at after feeding of an *in vitro* ookinete culture. Oocysts were labelled with the Cap380 antibody and DNA was stained with TO-PRO. The sizes of the oocysts are similar at day 3 after feeding (a–c). DNA content was variable in the oocysts derived from the genetic cross, two extreme cases are shown with almost WT level (left) and hardly any visible DNA (right). Scale bar, 5 μm . (d,e) Comparison at day 10 after feeding. The *act11(-)Δp47* oocysts have remained small and the DNA is not visible (inset in e). Scale bar, 10 μm .

B. Size of oocysts measured as the area of the largest section of each oocyst imaged in the confocal microscope. *** $P < 0.0001$ Student's *t*-test.

C. DNA content measured as the area of DNA of the largest section of each oocyst imaged in the confocal microscope.

*** $P < 0.0001$ Student's *t*-test. The number of oocyst measured in B, C: WT $n = 82$ and *act11(-)Δp47* $n = 80$, pooled data from four independent experiments.

from the cross of the mutant to the WT where the genomic DNA of the mutant was lost during oocyst development (Fig. 4B).

Mosquitoes harbouring these abnormal oocysts were allowed to feed on naïve mice. As expected, in none of the four independent experiments was an infection established, whereas the transmission of WT parasites was normal with a pre-patent period of 5 days (data not shown).

act11(-)Δp47 heterozygous ookinetes contain the tetraploid value of DNA

One explanation for the above results could be that meiosis in the zygote had been aberrant, similar to what has been described for the *nek-2* (Reininger *et al.*, 2009), *nek-4* (Reininger *et al.*, 2005) and *misfit* (Bushell *et al.*, 2009) deletion mutants. Therefore, we measured the DNA content of ookinetes from the *act11(-)Δp47* cross (Fig. 6A and B). The values were found to be equal to WT. Hence, the abnormal DNA values in the oocysts were not a direct result of a failed meiosis in the zygote.

act11(-)Δp47 heterozygous ookinetes lack actin2

Next, we investigated whether the heterozygous ookinetes that resulted from the *act11(-)Δp47* cross (*actin2*^{+/+}) expressed actin2 at levels comparable to the WT. For this we probed a Western blot containing extracts of the ookinete populations with the antiserum directed against actin2. Actin2 was not detected in the progeny ookinetes from the cross, while it was detected in the WT (Fig. 6C). This result was unexpected as the WT *actin2* allele carried by the $\Delta p47$ males is present in these ookinetes. These results suggest that actin2 in ookinetes is encoded specifically by the maternal gene.

Overexpression of GFP–actin2 blocks female development

Preliminary experiments in our laboratory had suggested that overexpression of the GFP–actin2 fusion protein had a negative effect on zygote development. The fusion protein is encoded by an episome containing the standard *tgdhfr/ts* gene providing resistance against pyrimethamine in the WT background; this line is called *gfp::actin2*.

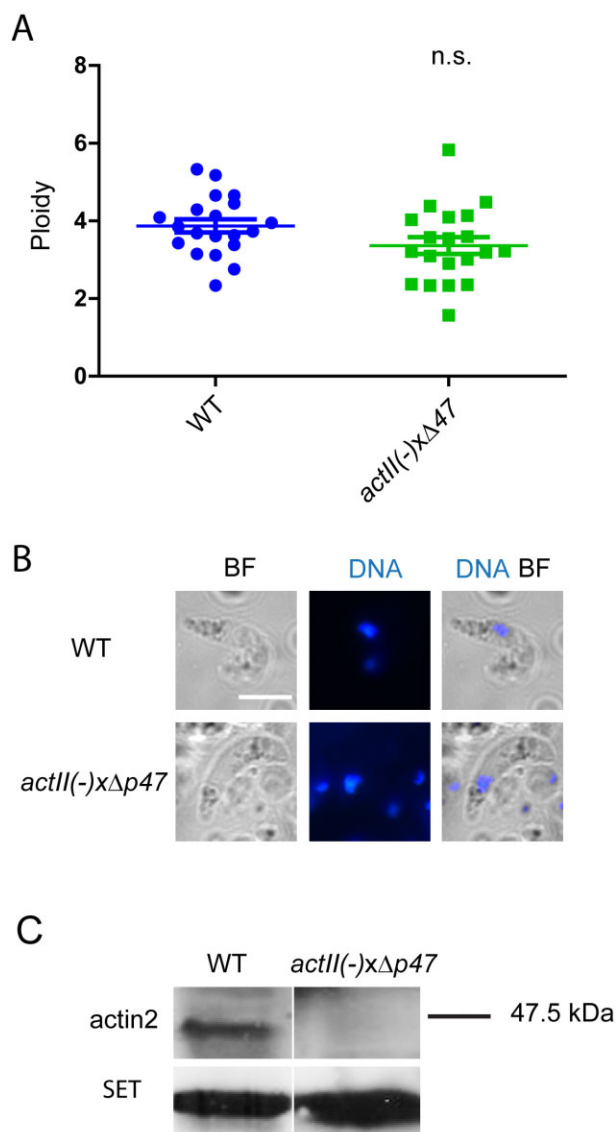


Fig. 6. *act11(-)xΔp47* heterozygous ookinetes have normal DNA content but lack actin2.

A. Measurement of DNA ploidy. Fixed WT and *act11(-)xΔp47* ookinetes were stained with Hoechst 33342. Fluorescence intensities were measured using Image J and normalized to haploid parasites in the same field. $n = 20$. n.s., non-significant, Student's *t*-test.

B. Representative examples of WT and $\Delta p47xact11(-)$ ookinetes. DNA was stained with Hoechst 33342. Scale bar, 5 μ m.

C. Actin2 is absent from ookinetes lacking the female derived *actin2* gene. Western blot analysis of extracts of WT and *act11(-)xΔp47* ookinetes. The blot was probed with the antiserum against actin2 and, as a loading control, with the antiserum against the SET protein.

By increasing the concentration of antifolate in the mice, in which the parasites are maintained, there are more copies of the episome and thus the expression of the fusion protein is increased (Fig. S2). When ookinete cultures were seeded with blood from mice treated with a

high concentration of the drug, here named HE (high expression, for details see *Experimental procedures*), ookinetes did not develop (Table S1). However, when the antifolate concentration was reduced ookinetes developed. Notably, under the HE conditions exflagellation was normal, indicating that GFP-actin2 overexpression does not affect male gametogenesis. Ookinete formation could be rescued by crossing the HE *gfp::actin2* gametocytes to the $\Delta p48/45$ strain which produces fertile females, but infertile males (van Dijk *et al.*, 2010). In marked contrast, no ookinetes were formed after crossing the HE *gfp::actin2* line to the $\Delta p47$ mutant producing fertile males only (Table S1). Taken together these results indicated that the overexpression of the fusion protein negatively affects the female gametocytes or gametes.

Overexpression of GFP-actin2 inhibits zygote development

The negative effect of overexpression of GFP-actin2 on ookinete development in the female cell could be due to (i) failure of egress, (ii) an inability of the female gamete to be fertilized by the male or (iii) to defects in zygote maturation to ookinetes. To distinguish between these possibilities, we used a combination of the antibody labelling of Pbs21, a surface antigen on female gametes and zygotes, and the nuclear dye TO-PRO, which permits distinction between the small haploid nucleus of the activated female and the considerably larger diploid nucleus of the zygote. Samples from a culture seeded with the *gfp::actin2* HE line were labelled with these reagents and an antibody recognizing GFP (Fig. 7A). Activated females, labelled with both antibodies and having a small nucleus were detected along with zygotes characterized by their bigger nuclei and strong GFP signal. These observations suggest that overexpression of GFP-actin2 permits development of female gametes and that zygotes are also formed. However, the latter do not develop into the retort form (Fig. 7A) and thus ookinete development is arrested at this stage.

Actin2 is encoded by the maternally derived gene

We next performed a genetic cross of the *gfp::actin2* strain HE (producing fertile males) to the *act11(-)* mutant (producing fertile females) (Table S1). The resulting ookinetes have a paternal *actin2*⁻ allele and a male-derived GFP-actin2 episome. In parallel we crossed the same males to the $\Delta p45/48$ females, yielding ookinetes homozygous for the WT allele of *actin2*. We carried out IFA using the anti-GFP antibody and the actin2 antiserum. The ookinetes from the *act11(-)xgfp::actin2* cross (with the genotype *actin2*^{-/+}, *gfp::actin2*) lacked both actin2 and GFP, suggesting that the paternal *actin2* allele was not

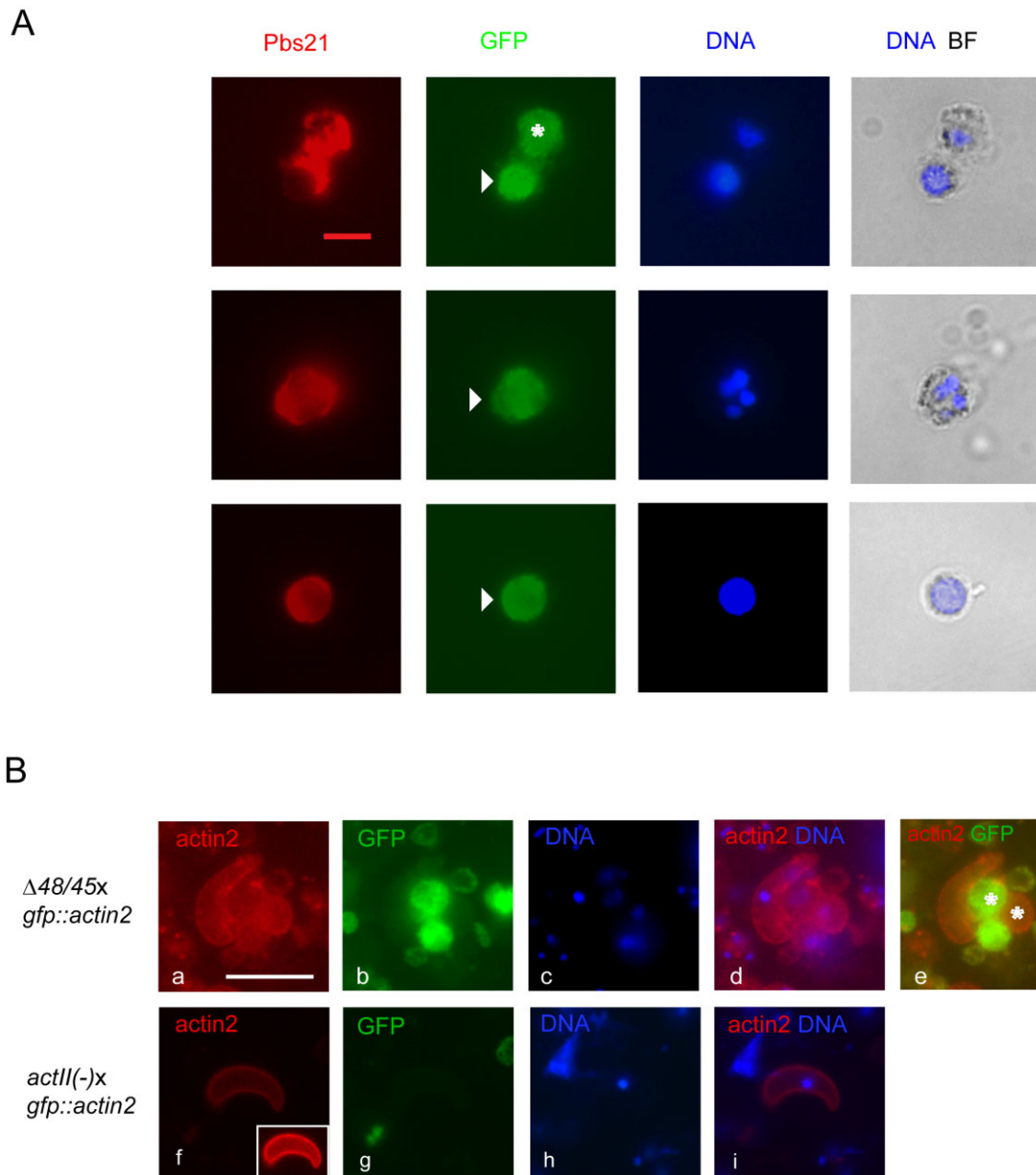


Fig. 7. A. Overexpression of GFP-actin2 causes development arrest at the zygote stage. Samples of an *in vitro* ookinete culture were fixed 3 h after seeding and labelled with the 13.1 antibody, recognizing the Pbs21 surface protein of female gametes and zygotes, and the anti-GFP antibody. The DNA was stained with TO-PRO and the size of the nucleus is an indicator of the stage of the cell. Top row: one female gamete (asterisk) and one zygote (arrowhead). Middle row: Zygote (arrowhead) with four distinct nuclei, suggesting that meiosis has taken place. Bottom row: Zygote (arrowhead). No retorts or ookinetes were detected in this culture after overnight incubation.

B. Immunolabelling of ookinetes resulting from the crosses of $\Delta p45/48xgfp::actin2$ (a–e) and $act11(-)xgfp::actin2$ (f–i) with the antiserum against actin2 and with anti-GFP. The $gfp::actin2$ strain was under HE conditions, and therefore homozygous zygotes of this strain do not develop to ookinetes. (a–e) One ookinete is in a cluster with a female gamete $\Delta p45/48$, which does not express GFP, and one $gfp::actin2$ female gamete and one zygote expressing GFP. Gametes are indicated with an asterisk in panel e. All cells express actin2. (f–i) One ookinete resulting from the $act11(-)xgfp::actin2$ cross. No cytoplasmic actin2 labelling is detectable, although background label of the secondary antibody at the cell periphery is present. Inset: enhanced intensity of peripheral label of (f). (a) and (f) were taken with the same exposure time in an epifluorescence microscope. Scale bar, 10 μ m.

expressed. In contrast, actin2 was detectable in the $\Delta p45/48xgfp::actin2$ ($actin2^{+/+},gfp::actin2$) ookinetes. Again, expression of the paternally inherited $gfp::actin2$ episome could not be revealed in these ookinetes (Fig. 7B). These

results are consistent with our results from the $act11(-)x\Delta p47$ cross, and strengthen the notion that actin2 is encoded by the maternal copy of the gene. These findings also indicate either that episomes are not segre-

gated into the male microgametes or that no expression of the male-derived gene takes place after fertilization, as the fusion protein was undetectable in these heterozygous cells. In conclusion, our genetic data show that maternally inherited *actin2* is essential for efficient zygote to ookinete conversion.

We previously showed that the *actin2* promoter is active in female gametocytes, although the protein was not detectable in these cells (Deligianni *et al.*, 2011). Together with the data in the present study the possibility arose that *actin2* transcripts in the female gametocyte are translationally repressed, as has been shown for a number of target genes that are transcribed in the gametocyte but are translated only in the zygote or ookinete (Mair *et al.*, 2006; 2010). We investigated this possibility by RT-PCR of total bound RNA bound to immunoprecipitated DOZI and CITH, two central factors involved in translational repression in gametocytes (Fig. 8). In two parasite lines DOZI::GFP and CITH::GFP (Mair *et al.*, 2006; 2010) we found that a proportion of *actin2* mRNA is bound to DOZI and CITH, similar to *p25*, a known target of translational repression. *DOZI*, which is expressed in gametocytes to exert its function, served as a negative control. Together, these results are consistent with translational repression of the *actin2* transcript in female gametocytes, a hallmark of maternally encoded genes that exert critical functions in the zygote and/or ookinete.

Discussion

The most important finding from our study is the identification of a second critical function of the *actin2* isoform in ookinete formation and sporogony. We had previously determined that a knockout mutant of *P. berghei actin2* was arrested in male gametogenesis, and therefore this strain produced very few ookinetes (Deligianni *et al.*, 2011). Using two complementary approaches, we could extend our analysis of the function of *actin2* and overcome the first developmental defect, i.e. the block in male gametogenesis of the knockout mutant (Deligianni *et al.*, 2011). By replacing the *actin2* ORF with that of *actin1* we provide genetic evidence that the two actin isoforms have distinct cellular functions. Unexpectedly, *actin1* under the control of the regulatory elements of *actin2* could, at least partially, complement the observed defects in male gametogenesis, resulting in formation of motile ookinetes. These ookinetes were able to traverse the midgut epithelium and form oocysts, but these did not develop into sporogonic oocysts and there was no transmission to naïve mice, revealing that *actin2* is also essential for sporogonic development of the oocysts. To consolidate these findings we performed genetic crosses to produce heterozygous ookinetes, lacking one copy of the *actin2*

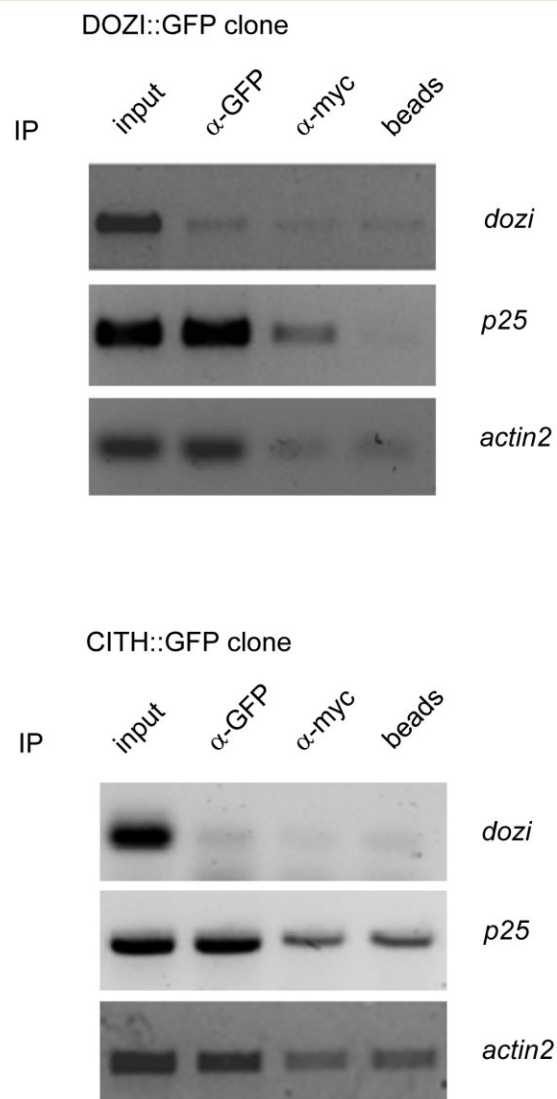


Fig. 8. RNA immunoprecipitation RT-PCR of *actin2* suggests translational repression in gametocytes. Immunoprecipitation of DOZI::GFP (top panel) and CITH::GFP (bottom panel) reveals association of *actin2* mRNA with both translational repressors in gametocytes. *p25* mRNA served as an established translationally repressed transcript, while *dozi* mRNA was used as a negative association control; it is translated in gametocytes. IP = immunoprecipitation. The lanes are: RT-PCR of mRNA isolated from gametocyte lysates (input), of immunoprecipitated material using antibodies against GFP and, as negative control, myc, or of material binding to beads only.

gene. We could show that in this cross ookinetes do develop and they are able to cross the epithelium when fed to mosquitoes. Although oocysts are formed, these do not undergo sporogony, most likely because of a defect in DNA replication. This resulted in a complete block in transmission of the parasite by the mosquito.

These experiments reveal two aspects of *actin2* function. First, the function in male gametogenesis can, to some extent, be executed by *actin1*, if this isoform is

expressed under control of the *actin2* cis-regulatory elements. In WT parasites *actin1* and *actin2* are expressed in the cytoplasm of male gametocytes (Deligianni *et al.*, 2011). However, in *act11(-)* parasites the endogenous *actin1* isoform is nevertheless unable to rescue the block in gametogenesis. This suggests, first, that *actin2* has a very specific function, at a precise time point, in a specific cellular localization, or at a very distinct concentration, and that correct regulation of gene expression is critical for the protein to carry out this unique function. A similar requirement for faithful regulation of transcription of *Plasmodium* genes for the correct trafficking of the protein product has been described for several important *Plasmodium* genes, such as apical membrane antigen-1 (AMA-1) (Kocken *et al.*, 1998), ring-infected erythrocyte surface antigen (RESA) (Rug *et al.*, 2004), and subtilisin 2 (SUB2) (Child *et al.*, 2013). Second, the function of *actin2* in the mosquito stages leading to arrested oocyst formation cannot be substituted by expressing *actin1* in its place. Taken together, these data indicate that the function of *actin2* is distinct in the two different cell environments where it is required; in the male gametocytes the requirement is less stringent than at the zygote stage.

As the *act11(-)* knockout parasites formed only negligible numbers of ookinetes, we used genetic crosses as an independent approach to consolidate these findings. First, we performed gametocyte crosses between the mutant *act11(-)* and WT. This results in a mixed population of heterozygous ookinetes (*actin2*^{+/+}) and WT ookinetes. After feeding to mosquitoes, oocysts developed, but those oocysts carrying the mutant allele were shown to be completely lost during development. These findings were corroborated by independent crosses using a well-studied strain which produces only fertile males, the $\Delta p47$ strain (van Dijk *et al.*, 2010). Such a cross results in a population of heterozygous ookinetes (*actin2*^{+/+}), all with an identical genotype. Interestingly, in these ookinetes the *actin2* protein was not detected, suggesting that the protein is expressed from the female derived copy of the gene; therefore these ookinetes are phenotypically null mutants. When these ookinetes were fed to mosquitoes, oocysts were initially formed. This observation provides evidence that *actin2* has no important role in ookinete gliding motility and cell invasion. Similarly to the phenotype of the *act2rep* mutant, these oocysts did not undergo sporulation and nor did transmission to naïve mice occur. These results, together with those of the *act2rep* mutant, suggest that the absence of functional *actin2* results in aborted oocyst development at an early time point and is possibly due to failed DNA replication.

In addition to our previous study, in which *actin2* was shown to be abundantly expressed in the male gametocyte (Deligianni *et al.*, 2011) we determined that the protein is also present in the first mosquito midgut stages,

i.e. female gametes, zygotes and ookinetes. We have not been able to detect the protein in oocysts while the *actin2* transcript was detected in ookinetes but not in oocysts. Interestingly, a proteomic analysis of *Plasmodium yoelii* sporozoites detected the protein in salivary gland sporozoites (Lindner *et al.*, 2013), leaving the question open for whether this protein has yet another function, perhaps again during host switch. Specific targeting of sporozoites by a site-specific recombination system, such as FLP/FRT mutagenesis (Lacroix *et al.*, 2011), could reveal potential additional functions of *actin2* during pre-erythrocytic development of the malarial parasite.

The critical time at which *actin2* is needed was also investigated. We made use of an overexpression approach, in which we expressed a GFP-*actin2* fusion protein regulated by the *actin2* promoter region. The fusion protein was encoded by an episome and we could regulate its copy number, and thus the amount of protein produced, by varying the concentration of the antifolate pyrimethamine used for treatment of the infected mice. This method for varying the expression of a protein encoded by an episome has also been used in experiments of *Plasmodium falciparum* (Epp *et al.*, 2008). At the standard drug concentration (here called HE) ookinetes were not formed. This was due to the loss of female fertility, as ookinete formation could be rescued by crossing to the $\Delta p48/45$ strain, which produces fertile females and infertile males. The HE parasites produced female gametes, but the resulting zygotes did not develop to the retort form. We interpret these data such that expressing high amounts of the GFP-*actin2* protein inhibits the function of endogenous *actin2*, resulting in abortion of further zygote development. This toxic effect is due to the GFP tag, as experiments using an episome expressing *actin2* without any tag resulted in completely normal ookinete development even in HE conditions (data not shown). A similar negative effect of expression of a tagged copy of a gene in addition to the WT copy has also been observed in the case of *alpha-tubulin 2* (Kooij *et al.*, 2005). In the cross *act11(-)xgfp::actin2*, on the other hand, where *actin2* is not produced in the female gamete, zygotes do form. These develop into motile ookinetes able to form oocysts, whose development, however, is aborted early.

Our experiments also supported the notion that the *actin2* found in ookinetes is derived from the female copy of the parental genome, as described above. This was apparent in two independent genetic crosses. In the *act11(-)x $\Delta p47$* no *actin2* was detectable in the ookinetes, despite the fact that the $\Delta p47$ males carry the WT allele. When the HE gametocytes, carrying a WT allele of the gene in the fertile males, were crossed to *act11(-)* parasites, producing female gametes only, no *actin2* was detected. On the other hand, when crossing the HE parasites to the $\Delta p48/45$ strain, producing females carrying the

WT allele, *actin2* was detected in the ookinetes. There is precedence for dependence on gene expression derived from only one of the parental genomes. LAP (or PCCp) proteins are encoded by the female-derived allele and are critical for subsequent oocyst development (Raine *et al.*, 2007; Lavazec *et al.*, 2009), while MISFIT (Bushell *et al.*, 2009) was found to be expressed by the paternal allele. Interestingly, in all previous cases and similar to what we found here, the function of the protein is required in the gamete or zygote stages but the phenotype of the mutation is manifested during oocyst development. In the case of the LAP genes the sex-specific expression of the gene has been shown to be dependent upon translational repression (Mair *et al.*, 2006; 2010; Saeed *et al.*, 2013) in the female gametocyte. Here, we provide data suggesting that the *actin2* transcript is also translationally repressed in the female gametocyte, thus explaining the strict requirement on the maternal gene for *actin2* expression in female gametes, zygotes and ookinetes.

A number of *P. berghei* mutant parasites have been described with a block in oocyst development. Of particular interest is the *P. berghei* mutant carrying a deletion of the gene encoding the C-CAP protein (Hliscs *et al.*, 2010). This mutant has a phenotype resembling the one we describe here. C-CAP proteins have homology to the C-terminal actin-binding domain of Cyclase Associated Proteins. These proteins bind actin monomers and prevent actin polymerization. The *P. berghei* mutant was viable in the blood stages but after transmission to the mosquito, small, degenerate oocysts were formed which did not sporulate (Hliscs *et al.*, 2010). It is tempting to speculate that *actin2* in the zygote has a role dependent upon the regulatory function of C-CAP; however, experimental data to support this hypothesis are currently lacking.

Our work here has shed new light on the function of the stage-specific actin isoform *actin2*. The protein has at least two distinct functions during the mosquito stages of the life cycle of the parasite, in male gametogenesis, as we have previously reported (Deligianni *et al.*, 2011), and in oocyst development. An intriguing open question is whether *actin2* forms filaments in these cells. Actin2 can form filaments *in vitro* (Skillman *et al.*, 2011) but we have no evidence that actin filaments are required at the stages studied here. This issue may be investigated by introducing specific mutations in the *actin2* gene which will interfere with filament formation. Future studies should also aim at identifying proteins binding *actin2* in the stages of interest, since they may be shared between the two actin isoforms or fulfil rather specific regulatory functions.

Our study also provides an example, of how additional essential gene functions, which manifest further down the *Plasmodium* life cycle, can be revealed by two complementary classical genetic approaches. While alternative

strategies, including sporozoite-specific targeted deletion (Lacroix *et al.*, 2011) and promoter swap (Laurentino *et al.*, 2011; Siden-Kiamos *et al.*, 2011), have been established recently, controlled excision or downregulation of genes presently remain restricted to targets that are vital for asexual blood-stage growth and have shared functions in sporozoites or ookinetes respectively. In previous studies, genetic crosses to rescue defects of mutant parasites were employed to support distinct gene functions at specific life cycle checkpoints and to exclude additional defects later in development (e.g. Raine *et al.*, 2007; Ganter *et al.*, 2009). The identification of consecutive critical roles of *actin2* encourages systematic assessment of the growing collection of mutant parasite lines displaying defects in mammal-to-mosquito transmission (Janse *et al.*, 2011) through multiple comparative genetic crosses, as described here. Similarly, gene complementation remains under-utilized (Goldberg *et al.*, 2011) and, as shown here for the partial rescue of the male gamete function of *actin2* by the *actin1* isoforms, may offer opportunities to gain a better understanding of parasite gene functions beyond the first developmental defect.

Experimental procedures

Parasite strains and methods

The WT strain used was ANKA 2.34. The two mutants where *actin2* had been deleted have been described; *act11(-)* strain (Deligianni *et al.*, 2011) and *act2::mCherry* (Kooij *et al.*, 2012). Genetic crosses were carried out using knockout mutants which only produced healthy males or females, $\Delta p47$ and $\Delta p45/48$ respectively (van Dijk *et al.*, 2001; Khan *et al.*, 2005). The parasites harbouring the episomal *gfp::actin2* construct was described earlier (Deligianni *et al.*, 2011).

Ookinetes were cultured *in vitro* as described before (Sinden, 1997). Ookinete conversion was assessed as previously described (Deligianni *et al.*, 2011). Briefly, ookinetes, female gametes and zygotes were labelled with an anti-Pbs21 antibody and at least 100 cells were counted in each experiment.

Sporozoites were isolated from dissected salivary glands at day 21 after feeding. The salivary glands were crushed with a pestle and the sporozoites collected by centrifugation.

Mosquitoes used were *Anopheles gambiae* strain G3 and membrane feedings were done according to Sinden (1997). Alternatively, mosquitoes were fed directly on anaesthetized infected mice. Infected mosquitoes were kept at 19°C until dissection or feeding to naïve C57BL/6 mice.

The *act2::mCherry* (Kooij *et al.*, 2012) was used as recipient strain for transfection of plasmids constructs, and transfection was carried out as described previously (Janse *et al.*, 2006).

All animal work was carried out in full conformity with Greek regulations and the protocols approved by the Ethics committee of FORTH, Crete.

Complementation and replacement constructs of actin2

Act2com and *act2rep* constructs were made in the vector pSD141, a derivative of the pL0006 vector (de Koning-Ward

et al., 2000; Billker *et al.*, 2004). A simplified scheme of the strategy is shown in Fig. S1A. 2.7 kb of the 5'FR and 728 bp of the 3'FR of the *P. berghei actin2* gene were amplified from gDNA using the primers indicated in Table S2. The fragments were cloned into the KpnI and NheI sites and the NotI and EcoRI sites respectively. For the *act2rep* construct, the *P. berghei actin1* ORF was amplified from gDNA and cloned into NheI and NotI sites between the *actin2* 5' and 3'FR of *actin2*. For the *act2com* construct a fragment comprising the *actin2* ORF and the 728 bp *actin2* 3'FR was inserted downstream of the *actin2* 5'FR. Both plasmids were linearized with ClaI before transfection of the *act2::mCherry* parasite strain, which had been recycled to remove the resistance cassette (Kooij *et al.*, 2012). Parasites were cloned by limiting dilution (Janse *et al.*, 2006). Correct integration was verified by PCR genotyping (Fig. S1B, Table S2) and Southern blot analysis (Fig. S1C). For Southern blot genomic DNA was digested with BamHI and EcoRI. After electrophoresis, the DNA was transferred to a nylon filter and probed with a 2.7 kb *actin2* 5'FR PCR fragment. Probe labelling and detection was done using the DIG High Prime DNA Labelling and Detection Starter Kit II (Roche) according to the manufacturer's instructions.

Antibodies and antiserum against *actin2*

The anti-GFP antibody was purchased from Invitrogen. The 13.1 monoclonal antibody (Winger *et al.*, 1988) and the antibody recognizing Cap380 (Srinivasan *et al.*, 2008) have been described. An antiserum recognizing the SET protein was used as a loading control in Western blot (Pace *et al.*, 2006). The blocking antibody AffiniPure Fab Fragment Donkey Anti-mouse IgG was from Jackson Immuno Research.

The antiserum recognizing *actin2* was produced in mice immunized with protein purified from *Escherichia coli*. The complete ORF of *actin2* was cloned in plasmid pET23d and expression was done in *E. coli* BL21(DE3)pLysS containing the plasmid pMICO (Christopherson *et al.*, 2004). The protein was isolated from insoluble inclusion bodies. The antiserum was pre-adsorbed for 15 min with a crude extract of *act11(-)* gametocytes before use.

Secondary antibodies were anti-mouse (Alexa-488, Alexa-555) and anti-rabbit (Alexa-488, Alexa-546) conjugated to Alexa Fluor (Invitrogen) or anti-rabbit conjugated to Cy-3 (Jackson Research).

Immunofluorescence assays of in vitro cultured ookinetes using the *actin2* antiserum

All steps were carried out at RT unless otherwise stated, and all washes were in phosphate-buffered saline (PBS). A total of $1-5 \times 10^4$ ookinetes were diluted in 400 μ l of PBS and the samples were collected on poly-L-lysine-coated coverslips by centrifugation at 500 *g* for 10 min. The supernatant was removed and the samples incubated in 500 μ l of fixative [4% formaldehyde, 0.1% Triton in microtubule stabilizing buffer (MTSB, 10 mM MES, 150 mM NaCl, 5 mM EGTA, 5 mM glucose, 5 mM MgCl₂ pH 6.9)] for 10 min. After removal of the supernatant 200 μ l of ice-cold methanol was added to each well and incubated at -20°C for 2 min. This was followed by two washes before blocking with Fab Fragment Donkey Anti-mouse IgG diluted 1:50 in

PBS with 5% NGS (Normal Goat Serum) for 1 h at 37°C . After two washes the sample was incubated with the *actin2* antiserum diluted 1:200 overnight at 4°C . For controls samples were incubated in parallel only in PBS with NGS. The samples were washed twice in PBS, before the secondary antibody anti-mouse Alexa-488 was added and incubated for 1 h. DNA was stained using either TO-PRO or Hoechst 33342. The samples were mounted in Vectashield. When stained with Hoechst the samples were viewed with a Zeiss Axioskop 2 plus microscope fitted with an Axiovert CCD camera (Zeiss). TOP-RO samples were analysed using a Zeiss LSM 510 confocal laser scanning microscope with Biorad lasers. Images were analysed with ImageJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

Regulation of GFP-*actin2* expression and imaging of *gfp::actin2* parasites

The mice harbouring parasites transfected with the episomal *gfp::actin2* construct were treated continuously with pyrimethamine to avoid the loss of the episome during schizogony. Two different concentrations of pyrimethamine were used, called HE (14 $\mu\text{g ml}^{-1}$ diluted in drinking water, pH 3.5–5) and LE (2.8 $\mu\text{g ml}^{-1}$ diluted in drinking water, pH 3.5–5). Forty hours prior to the IFA the water containing pyrimethamine was replaced by sulfadiazine (2.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$) to enrich for gametocytes (Beetsma *et al.*, 1998). To maintain the episome 100 μ l pyrimethamine (2.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$) was injected i.p. once.

For LE experiments, samples of an ookinete culture were removed at 3, 6 and 9 h after seeding and imaged without prior fixation. Samples at later time points as well as samples of HE experiments were fixed for 15 min in 4% paraformaldehyde and labelled with an anti-GFP (Invitrogen) and the 13.1 antibodies to distinguish the developing ookinetes from the other parasite stages. DNA was visualized with Hoechst 33342. The samples were viewed as described above.

Determination of DNA content in ookinetes

Photographs of fixed ookinete samples stained with Hoechst 33342 were analysed with ImageJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Fluorescence intensities were normalized to haploid parasites in the same fields.

IFA of dissected midguts containing oocysts

Mosquitoes were dissected in PBS and their midguts immediately placed in fixative [4% formaldehyde (Polysciences), 0.2% saponin (Sigma) in PBS] and incubated on ice for 45–60 min. All following steps were carried out at room temperature, unless specifically mentioned. Washes and antibody dilutions were done in PBS with 0.2% saponin and 5% NGS. The midguts were washed twice for 15 min on a rocking platform and then incubated for 30 min. After addition of the primary antibody the midguts were kept at 4°C overnight. The guts were washed three times for 15 min and then incubated with the secondary antibodies for 1 h. DNA was stained with TO-PRO (Invitrogen) or Hoechst33342. The guts were mounted and viewed as described above.

RT-PCR analysis

cDNA was prepared as previously described (Deligianni *et al.*, 2011). The primers used for RT-PCR analysis of WT ookinetes and oocysts are described in Table S2. The primers used to detect expression of *actin2* and *actin1* in *act2com* and *act2rep* parasites were a common forward primer binding to the 5'FR and specific primers for *actin2* and *actin1* ORF respectively. For details see Fig. 1A and Fig. S1A (green arrows) and Table S2.

Western blot

Enriched ookinetes were sonicated on ice, and the extracts loaded on a 12% SDS-PAGE gel. After gel electrophoresis the proteins were transferred to nitrocellulose membrane filters by electroblotting. The membrane filters were incubated with the primary antiserum directed against actin2, followed by anti-mouse antibodies conjugated with horseradish peroxidase. The signal was detected using the SuperSignal West Pico solution (Pierce Biotechnology).

RNA immunoprecipitation RT-PCR

Plasmodium berghei DOZI::GFP and CITH::GFP lines have been described before, they behave as WT lines and express exclusively the C-terminally GFP-tagged protein (Mair *et al.*, 2010). RNA immunoprecipitations were performed as described in Mair *et al.* (2010); briefly, gametocytes were enriched using a 49% Nycodenz cushion. Following parasite lysis, a monoclonal anti-GFP antibody was used to immunoprecipitate DOZI::GFP or CITH::GFP. Controls included a monoclonal α -myc antibody and a 'no antibody' control. Antibody-protein-RNA complexes were finally recovered with protein G-sepharose beads. RNA isolation was done with TRIzol, followed by cDNA synthesis using oligo dT oligonucleotides. PCR primers used for *dozi* (PBANKA_121770) were g0907 (TGTGGCTTTGGCTGGAAAA) and g0908 (AGCGCCAATTCCCTTGTG); primers for *p25* (PBANKA_051500) were g0830 (ATGTACTATGCATGAAGTCGG) and g0831 (TGAACATGGGGTATCTCC); primers for *actin2* (PBANKA_103010) were g1217 (TTTTTTAATGAATTAAGGGTAT) and g1218 (TCAAGAACGATACCTGTG).

Acknowledgements

We thank Dr I. Kursula and Dr F. Frischknecht for stimulating discussions. G. Vrentzos provided technical support and Anthei Georgopoulou assisted in producing the actin2 antiserum.

R.M. was funded by Internal, a Marie Curie Initial Training Consortium (Grant No. PITN-GA-2008-215281 to I.S.-K.). K.L. and K.M. are members of the EVIMalaR network [Grant #201588 of the FP7 (HEALTH) programme of the European Commission] which funded in part this work. T.W.A.K. was supported by a Max Planck fellowship. G.R.M. was supported by FCT grant projects PTDC/BIA-BCM/105610/2008 and PTDC/SAU-MIC/122082/2010.

References

Aly, A.S., and Matuschewski, K. (2005) A malarial cysteine protease is necessary for *Plasmodium* sporozoite egress from oocysts. *J Exp Med* **202**: 225–230.

- Baker, D.A. (2010) Malaria gametocytogenesis. *Mol Biochem Parasitol* **172**: 57–65.
- Beetsma, A.L., van de Wiel, T.J., Sauerwein, R.W., and Eling, W.M. (1998) *Plasmodium berghei* ANKA: purification of large numbers of infectious gametocytes. *Exp Parasitol* **88**: 69–72.
- Billker, O., Dechamps, S., Tewari, R., Wenig, G., Franke-Fayard, B., and Brinkmann, V. (2004) Calcium and a calcium-dependent protein kinase regulate gamete formation and mosquito transmission in a malaria parasite. *Cell* **117**: 503–514.
- Bushell, E.S., Ecker, A., Schlegelmilch, T., Goulding, D., Dougan, G., Sinden, R.E., *et al.* (2009) Paternal effect of the nuclear formin-like protein MISFIT on *Plasmodium* development in the mosquito vector. *PLoS Pathog* **5**: e1000539.
- Child, M.A., Harris, P.K., Collins, C.R., Withers-Martinez, C., Yeoh, S., and Blackman, M.J. (2013) Molecular determinants for subcellular trafficking of the malarial sheddase PfSUB2. *Traffic* **14**: 1053–1064.
- Christopherson, R.I., Cinquin, O., Shojaei, M., Kuehn, D., and Menz, R.I. (2004) Cloning and expression of malarial pyrimidine enzymes. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **23**: 1459–1465.
- Deligianni, E., Morgan, R.N., Bertuccini, L., Kooij, T.W., Laforge, A., Nahar, C., *et al.* (2011) Critical role for a stage-specific actin in male exflagellation of the malaria parasite. *Cell Microbiol* **13**: 1714–1730.
- Dessens, J.T., Beetsma, A.L., Dimopoulos, G., Wengelnik, K., Crisanti, A., Kafatos, F.C., and Sinden, R.E. (1999) CTRP is essential for mosquito infection by malaria ookinetes. *EMBO J* **18**: 6221–6227.
- van Dijk, M.R., Janse, C.J., Thompson, J., Waters, A.P., Braks, J.A., Dodemont, H.J., *et al.* (2001) A central role for P48/45 in malaria parasite male gamete fertility. *Cell* **104**: 153–164.
- van Dijk, M.R., van Schaijk, B.C., Khan, S.M., van Dooren, M.W., Ramesar, J., Kaczanowski, S., *et al.* (2010) Three members of the 6-cys protein family of *Plasmodium* play a role in gamete fertility. *PLoS Pathog* **6**: e1000853.
- Epp, C., Raskolnikov, D., and Deitsch, K.W. (2008) A regulatable transgene expression system for cultured *Plasmodium falciparum* parasites. *Malar J* **7**: 86.
- Ganter, M., Schuler, H., and Matuschewski, K. (2009) Vital role for the *Plasmodium* actin capping protein (CP) beta-subunit in motility of malaria sporozoites. *Mol Microbiol* **74**: 1356–1367.
- Gardner, M.J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R.W., *et al.* (2002) Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* **419**: 498–511.
- Goldberg, D.E., Janse, C.J., Cowman, A.F., and Waters, A.P. (2011) Has the time come for us to complement our malaria parasites? *Trends Parasitol* **27**: 1–2.
- Hliscs, M., Sattler, J.M., Tempel, W., Artz, J.D., Dong, A., Hui, R., *et al.* (2010) Structure and function of a G-actin sequestering protein with a vital role in malaria oocyst development inside the mosquito vector. *J Biol Chem* **285**: 11572–11583.
- Janse, C.J., Franke-Fayard, B., Mair, G.R., Ramesar, J., Thiel, C., Engelmann, S., *et al.* (2006) High efficiency

- transfection of *Plasmodium berghei* facilitates novel selection procedures. *Mol Biochem Parasitol* **145**: 60–70.
- Janse, C.J., Kroeze, H., van Wigcheren, A., Mededovic, S., Fonager, J., Franke-Fayard, B., *et al.* (2011) A genotype and phenotype database of genetically modified malaria-parasites. *Trends Parasitol* **27**: 31–39.
- Khan, S.M., Franke-Fayard, B., Mair, G.R., Lasonder, E., Janse, C.J., Mann, M., and Waters, A.P. (2005) Proteome analysis of separated male and female gametocytes reveals novel sex-specific *Plasmodium* biology. *Cell* **121**: 675–687.
- Kocken, C.H., van der Wel, A.M., Dubbeld, M.A., Narum, D.L., van de Rijke, F.M., van Gemert, G.J., *et al.* (1998) Precise timing of expression of a *Plasmodium falciparum*-derived transgene in *Plasmodium berghei* is a critical determinant of subsequent subcellular localization. *J Biol Chem* **273**: 15119–15124.
- de Koning-Ward, T.F., Fidock, D.A., Thathy, V., Menard, R., van Spaendonk, R.M., Waters, A.P., and Janse, C.J. (2000) The selectable marker human dihydrofolate reductase enables sequential genetic manipulation of the *Plasmodium berghei* genome. *Mol Biochem Parasitol* **106**: 199–212.
- Kooij, T.W., Franke-Fayard, B., Renz, J., Kroeze, H., van Dooren, M.W., Ramesar, J., *et al.* (2005) *Plasmodium berghei* alpha-tubulin II: a role in both male gamete formation and asexual blood stages. *Mol Biochem Parasitol* **144**: 16–26.
- Kooij, T.W., Rauch, M.M., and Matuschewski, K. (2012) Expansion of experimental genetics approaches for *Plasmodium berghei* with versatile transfection vectors. *Mol Biochem Parasitol* **185**: 19–26.
- Lacroix, C., Giovannini, D., Combe, A., Bargieri, D.Y., Spath, S., Panchal, D., *et al.* (2011) FLP/FRT-mediated conditional mutagenesis in pre-erythrocytic stages of *Plasmodium berghei*. *Nat Protoc* **6**: 1412–1428.
- Laurentino, E.C., Taylor, S., Mair, G.R., Lasonder, E., Bartfai, R., Stunnenberg, H.G., *et al.* (2011) Experimentally controlled downregulation of the histone chaperone FACT in *Plasmodium berghei* reveals that it is critical to male gamete fertility. *Cell Microbiol* **13**: 1956–1974.
- Lavazec, C., Moreira, C.K., Mair, G.R., Waters, A.P., Janse, C.J., and Templeton, T.J. (2009) Analysis of mutant *Plasmodium berghei* parasites lacking expression of multiple PbCCp genes. *Mol Biochem Parasitol* **163**: 1–7.
- Lindner, S.E., Swearingen, K.E., Harupa, A., Vaughan, A.M., Sinnis, P., Moritz, R.L., and Kappe, S.H. (2013) Total and putative surface proteomics of malaria parasite salivary gland sporozoites. *Mol Cell Proteomics* **12**: 1127–1143.
- Mair, G.R., Braks, J.A., Garver, L.S., Wiegant, J.C., Hall, N., Dirks, R.W., *et al.* (2006) Regulation of sexual development of *Plasmodium* by translational repression. *Science* **313**: 667–669.
- Mair, G.R., Lasonder, E., Garver, L.S., Franke-Fayard, B.M., Carret, C.K., Wiegant, J.C., *et al.* (2010) Universal features of post-transcriptional gene regulation are critical for *Plasmodium* zygote development. *PLoS Pathog* **6**: e1000767.
- Moon, R.W., Taylor, C.J., Bex, C., Schepers, R., Goulding, D., Janse, C.J., *et al.* (2009) A cyclic GMP signalling module that regulates gliding motility in a malaria parasite. *PLoS Pathog* **5**: e1000599.
- Pace, T., Olivieri, A., Sanchez, M., Albanesi, V., Picci, L., Siden Kiamos, I., *et al.* (2006) Set regulation in asexual and sexual *Plasmodium* parasites reveals a novel mechanism of stage-specific expression. *Mol Microbiol* **60**: 870–882.
- Raine, J.D., Ecker, A., Mendoza, J., Tewari, R., Stanway, R.R., and Sinden, R.E. (2007) Female inheritance of malarial lap genes is essential for mosquito transmission. *PLoS Pathog* **3**: e30.
- Reininger, L., Billker, O., Tewari, R., Mukhopadhyay, A., Fennell, C., Dorin-Semblat, D., *et al.* (2005) A NIMA-related protein kinase is essential for completion of the sexual cycle of malaria parasites. *J Biol Chem* **280**: 31957–31964.
- Reininger, L., Tewari, R., Fennell, C., Holland, Z., Goldring, D., Ranford-Cartwright, L., *et al.* (2009) An essential role for the *Plasmodium* Nek-2 Nima-related protein kinase in the sexual development of malaria parasites. *J Biol Chem* **284**: 20858–20868.
- Rug, M., Wickham, M.E., Foley, M., Cowman, A.F., and Tilley, L. (2004) Correct promoter control is needed for trafficking of the ring-infected erythrocyte surface antigen to the host cytosol in transfected malaria parasites. *Infect Immun* **72**: 6095–6105.
- Saeed, S., Carter, V., Tremp, A.Z., and Dessens, J.T. (2013) Translational repression controls temporal expression of the *Plasmodium berghei* LCCL protein complex. *Mol Biochem Parasitol* **189**: 38–42.
- Schmitz, S., Grainger, M., Howell, S., Calder, L.J., Gaeb, M., Pinder, J.C., *et al.* (2005) Malaria parasite actin filaments are very short. *J Mol Biol* **349**: 113–125.
- Schmitz, S., Schaap, I.A., Kleinjung, J., Harder, S., Grainger, M., Calder, L., *et al.* (2010) Malaria parasite actin polymerization and filament structure. *J Biol Chem* **285**: 36577–36585.
- Schuler, H., and Matuschewski, K. (2006) Regulation of apicomplexan microfilament dynamics by a minimal set of actin-binding proteins. *Traffic* **7**: 1433–1439.
- Schuler, H., Mueller, A.K., and Matuschewski, K. (2005) Unusual properties of *Plasmodium falciparum* actin: new insights into microfilament dynamics of apicomplexan parasites. *FEBS Lett* **579**: 655–660.
- Siden-Kiamos, I., Ecker, A., Nyback, S., Louis, C., Sinden, R.E., and Billker, O. (2006) *Plasmodium berghei* calcium-dependent protein kinase 3 is required for ookinete gliding motility and mosquito midgut invasion. *Mol Microbiol* **60**: 1355–1363.
- Siden-Kiamos, I., Ganter, M., Kunze, A., Hliscs, M., Steinbüchel, M., Mendoza, J., *et al.* (2011) Stage-specific depletion of myosin A supports an essential role in motility of malarial ookinetes. *Cell Microbiol* **13**: 1996–2006.
- Sinden, R.E. (1997) Infection of mosquitoes with rodent malaria. In *The Molecular Biology of Insect Disease Vectors A Methods Manual*. Crampton, J.M., Beard, C.B., and Louis, C. (eds). London: Chapman and Hall, pp. 67–91.
- Sinden, R.E. (1999) *Plasmodium* differentiation in the mosquito. *Parassitologia* **41**: 139–148.
- Skillman, K.M., Diraviyam, K., Khan, A., Tang, K., Sept, D., and Sibley, L.D. (2011) Evolutionarily divergent, unstable

filamentous actin is essential for gliding motility in apicomplexan parasites. *PLoS Pathog* **7**: e1002280.

- Srinivasan, P., Fujioka, H., and Jacobs-Lorena, M. (2008) PbCap380, a novel oocyst capsule protein, is essential for malaria parasite survival in the mosquito. *Cell Microbiol* **10**: 1304–1312.
- Stanway, R.R., Witt, T., Zobiak, B., Aepfelbacher, M., and Heussler, V.T. (2009) GFP-targeting allows visualization of the apicoplast throughout the life cycle of live malaria parasites. *Biol Cell* **101**: 415–430, 415 p following 430.
- Vlachou, D., Zimmermann, T., Cantera, R., Janse, C.J., Waters, A.P., and Kafatos, F.C. (2004) Real-time, *in vivo* analysis of malaria ookinete locomotion and mosquito midgut invasion. *Cell Microbiol* **6**: 671–685.
- Wesseling, J.G., Smits, M.A., and Schoenmakers, J.G. (1988) Extremely diverged actin proteins in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **30**: 143–153.
- Winger, L.A., Tirawanchai, N., Nicholas, J., Carter, H.E., Smith, J.E., and Sinden, R.E. (1988) Ookinete antigens of *Plasmodium berghei*. Appearance on the zygote surface of an Mr 21 kD determinant identified by transmission-blocking monoclonal antibodies. *Parasite Immunol* **10**: 193–207.

Supporting information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site:

Fig. S1. Integration of *actin2* and *actin1* ORF in the *actin2* locus. A. Schematic representation of strategy used to obtain the *act2com* and *act2rep* strains expressing *actin2* and *actin1*, respectively, under the control of *actin2* 5' and 3'FR. In step 1 (reported previously, Kooij *et al.*, 2012) the complete ORF of the WT *actin2* gene was exchanged via a cross-over/ends-out homologous recombination with a fragment encoding a red fluorescence protein (mCherry), a GFP cassette and the hybrid resistance gene allowing positive–negative selection consisting of *hDHFR* and yeast cytosine deaminase-uracil phosphoribosyl

transferase (*yFcu*) yielding the strain *act2::mCherry*. Next, parasites were selected to recycle the resistance cassette (Step 2). These parasites were used as a recipient strain for transfection of the plasmids *pAct2com* and *pAct2rep*. Integration was achieved via a single cross-over/ends-in homologous recombination in the *actin2* 5'FR. This resulted in the integration of the *actin2* or *actin1* ORF in the *actin2* locus (Step 3). Red arrows: primers for genotyping of transfectants. Green arrows: Primers used for RT-PCR analysis of transfectants.

B. Genotyping using PCR. The primers are depicted as red arrows in A and the expected sizes of the fragments are indicated (red colour below map). Left and right integration was tested as well as possible contamination of *act2::mCherry* parasites. Primers specific for *gapdh* were used for quality control of the gDNA.

C. Southern blot analysis. Genomic DNA of the recipient strain *act2::mCherry*, and the *act2com* and *act2rep* was digested with BamHI and EcoRI and processed for Southern blot. A PCR fragment corresponding to *actin2* 5'FR was used as a probe. The restriction sites and the theoretical sizes of the fragments are indicated in A (grey colour above map). The positive bands are indicated with asterisks.

Fig. S2. Expression of GFP–*actin2* encoded by the episomal construct. Blood-stage parasites were selected using two different concentrations of anti-folate (14 and 2.8 $\mu\text{g ml}^{-1}$).

A. Representative pictures of gametocytes originating from mice treated with the high anti-folate concentration (a–c), and with the low concentration (d–f).

B. Measurement of the intensity of the GFP signal in gametocytes from mice treated with the two concentrations of anti-folate. The difference in intensity is significant ($P < 0.0001$ Student's *t*-test).

Movie S1. Movie of gliding WT ookinete. The movie represents a time-lapse video of 20 min.

Movie S2. Movie of gliding *act2rep* ookinete. The movie represents a time-lapse video of 18 min.

Table S1. Genetic crosses of *gfp::actin2* strain under LE and HE conditions.

Table S2. Primers used for DNA constructs, genotyping and RT-PCR.



Structural Differences Explain Diverse Functions of *Plasmodium* Actins

Juha Vahokoski¹, Saligram Prabhakar Bhargav^{1,9}, Ambroise Desfosses^{2,9}, Maria Andreadaki^{3,9}, Esa-Pekka Kumpula^{1,4,9}, Silvia Muñico Martinez¹, Alexander Ignatov¹, Simone Lepper⁵, Friedrich Frischknecht⁵, Inga Sidén-Kiamos³, Carsten Sachse², Inari Kursula^{1,4*}

1 Faculty of Biochemistry and Molecular Medicine, University of Oulu, Oulu, Finland, **2** European Molecular Biology Laboratory, Structural and Computational Biology Unit, Heidelberg, Germany, **3** Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Foundation for Research and Technology – Hellas, Heraklion, Crete, Greece, **4** Centre for Structural Systems Biology, Helmholtz Centre for Infection Research and German Electron Synchrotron, Hamburg, Germany, **5** Parasitology – Department of Infectious Diseases, University of Heidelberg Medical School, Heidelberg, Germany

Abstract

Actins are highly conserved proteins and key players in central processes in all eukaryotic cells. The two actins of the malaria parasite are among the most divergent eukaryotic actins and also differ from each other more than isoforms in any other species. Microfilaments have not been directly observed in *Plasmodium* and are presumed to be short and highly dynamic. We show that actin I cannot complement actin II in male gametogenesis, suggesting critical structural differences. Cryo-EM reveals that *Plasmodium* actin I has a unique filament structure, whereas actin II filaments resemble canonical F-actin. Both *Plasmodium* actins hydrolyze ATP more efficiently than α -actin, and unlike any other actin, both parasite actins rapidly form short oligomers induced by ADP. Crystal structures of both isoforms pinpoint several structural changes in the monomers causing the unique polymerization properties. Inserting the canonical D-loop to *Plasmodium* actin I leads to the formation of long filaments *in vitro*. *In vivo*, this chimera restores gametogenesis in parasites lacking actin II, suggesting that stable filaments are required for exflagellation. Together, these data underline the divergence of eukaryotic actins and demonstrate how structural differences in the monomers translate into filaments with different properties, implying that even eukaryotic actins have faced different evolutionary pressures and followed different paths for developing their polymerization properties.

Citation: Vahokoski J, Bhargav SP, Desfosses A, Andreadaki M, Kumpula E-P, et al. (2014) Structural Differences Explain Diverse Functions of *Plasmodium* Actins. PLoS Pathog 10(4): e1004091. doi:10.1371/journal.ppat.1004091

Editor: Michael J. Blackman, MRC National Institute for Medical Research, United Kingdom

Received: October 9, 2013; **Accepted:** March 11, 2014; **Published:** April 17, 2014

Copyright: © 2014 Vahokoski et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study has been funded by the Academy of Finland (IK), the Sigrid Jusélius Foundation (IK), the German Ministry of Education and Research (IK), an EMBL interdisciplinary postdoctoral fellowship (AD), the Human Frontier Science Program (FF), the Chica and Heinz Schaller Foundation (FF), and the European Research Council (FF). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: inari.kursula@helmholtz-hzi.de

9 These authors contributed equally to this work.

Introduction

Actins are the most abundant and among the most conserved proteins in eukaryotic cells and play indispensable roles in a plethora of key cellular events, including muscle contraction, cell division, shape determination, transport, and cell motility [1,2]. Actins are highly conserved in opisthokonts with <10% divergence between yeast and man. The six mammalian actin isoforms differ from each other by a maximum of 6% of the sequence, and are virtually identical across species. Nevertheless, these subtle differences are enough to determine isoform-specific functions [3]. Common to most actins is their capacity to form long filaments. However, in a number of phylogenetically distinct organisms, such as *Trypanosoma* and *Plasmodium spp.*, actin filaments have not been observed [4,5]. Unlike other members of the phylum *Apicomplexa*, which comprises single-celled eukaryotic intracellular parasites, the malaria parasites have two actin isoforms, which at the sequence level are <80% identical with canonical (opisthokont) actins and each other. This is a remarkable difference, considering the near identity among canonical actins

(**Fig. S1**). An important question is how this divergence at the amino-acid level translates into different structures – and how this, in turn, influences polymerization.

Most studies on apicomplexan actins have concentrated on their role in gliding motility, a unique mode of migration, essential for the parasite to infect new cells. However, like in other eukaryotes, parasite actins must have several cellular functions. Actin polymerization is indispensable for gliding and likely involved in host cell invasion and egress [6–8]. Despite evidence for this crucial role of filamentous actin, long filaments have only been visualized in *Theileria* [9], which appears not to use actin filaments for host cell invasion [10]. The presence of regular actin filaments in *Plasmodium* is uncertain [11–13]. *In vitro*, apicomplexan actins form short, ~100-nm long filaments, which undergo rapid treadmilling [14–17]. Recently, specific antibodies revealed filament-like structures in motile forms of *Plasmodium* [12,13]. *Toxoplasma gondii* actin, which is 93% identical to *Plasmodium* actin I, has been reported to polymerize at concentrations 10-fold lower than canonical actins [15], and most recently, it has been proposed to polymerize in an isodesmic manner without a lag phase or a critical concentration, which is unique

Author Summary

Malaria parasites have two actin isoforms, which are among the most divergent within the actin family that comprises highly conserved proteins, essential in all eukaryotic cells. In *Plasmodium*, actin is indispensable for motility and, thus, the infectivity of the deadly parasite. Yet, actin filaments have not been observed *in vivo* in these pathogens. Here, we show that the two *Plasmodium* actins differ from each other in both monomeric and filamentous form and that actin I cannot replace actin II during male gametogenesis. Whereas the major isoform actin I cannot form stable filaments alone, the mosquito-stage-specific actin II readily forms long filaments that have dimensions similar to canonical actins. A chimeric actin I mutant that forms long filaments *in vitro* also rescues gametogenesis in parasites lacking actin II. Both *Plasmodium* actins rapidly hydrolyze ATP and form short oligomers in the presence of ADP, which is a fundamental difference to all other actins characterized to date. Structural and functional differences in the two *Plasmodium* actin isoforms compared both to each other and to canonical actins reveal how the polymerization properties of eukaryotic actins have evolved along different avenues.

among all actins or actin homologs studied to date [18]. Yet, most of the cellular actin is present as monomers [19], implying that filaments occur only transiently, and polymerization is under tight control of regulatory proteins or governed by distinct properties of the monomer. On the other hand, it has been estimated that 2/3 of *Plasmodium* actin in merozoites – the infective blood stage form, which does not exhibit gliding motility – could be present as short filaments [20].

Plasmodium actin I is abundant and expressed throughout the life cycle of the parasite, whereas actin II is present only in the gametocytes and mosquito stages [21–24], including sporozoites [25], the highly motile form of the parasite, transmitted to the vertebrate by the mosquito. Actin I is an indispensable part of the parasite motor machinery responsible for the unique gliding motility of the parasite. Actin II has at least two functions in the mosquito stages, as revealed by reverse genetics analyses. It is required both during male gametogenesis and in the zygote stage [23,24]. However, no clear molecular function has been assigned for actin II.

To understand the properties of the divergent *Plasmodium* actins, we have determined their monomer crystal structures and analyzed their filament assembly using electron microscopy (EM). We show that, unlike in any other cell reported so far, the two isoforms differ substantially from each other in their ability to form filaments and that both oligomerize in the presence of ADP. Their functional uniqueness is further highlighted by the finding that *Plasmodium* actin II has a distinct role in male gametogenesis that cannot be complemented by actin I. Finally, we show that a chimera of *Plasmodium* actin I and canonical actin can form long filaments and, importantly, restores the function of actin II in gametogenesis.

Results

The two *Plasmodium* actins have different filament structures

The most peculiar property of apicomplexan actins is their apparent inability to form long, stable filaments. This is a fundamental difference to all actins studied so far, and in the lack of structural information, the reasons for the poor polymeriz-

ability are not understood. It has been shown by atomic force microscopy that the dimensions of jasplakinolide (JAS)-stabilized *P. falciparum* actin I filaments, purified from merozoites, are different with respect to their helical symmetry from canonical actins [26]. However, the structure of actin II filaments has not been studied before. We visualized the structures formed by both *Plasmodium* actin isoforms using EM (**Fig. 1**). When polymerized in the presence of ATP in high-salt conditions at room temperature overnight, actin I forms only short, irregular structures of approximately 100 nm in length (**Fig. 1 A and F**), while actin II forms significantly longer filaments (average length 650 nm) (**Fig. 1 B,C,F**). In the presence of JAS, which *in vitro* stabilizes actin filaments, both actin I and II form long, rather straight filaments (**Fig. 1 D–F**).

To evaluate whether the helical assemblies of the two *Plasmodium* actins are different, we used cryo-EM. Filaments of both parasite actins were embedded in vitreous ice (**Fig. 2**). First, we inspected the averaged power spectra derived from segments of 330 and 56 filaments for actin I and II, respectively. These look virtually identical because they can only be compared at $1/60 \text{ \AA}^{-1}$ resolution (**Fig. 2 A**). We then characterized the structure of the filaments in real space and performed k-means classification of helical segments [27]. Inspection of the classes allows a direct measurement of the cross overs or half-pitch of the two-start helix, which represent the distance the filament requires to undergo a 180° rotation. For actin I and II, cross-over distances cluster around $406 \pm 16 \text{ \AA}$ and $364 \pm 10 \text{ \AA}$, respectively (**Fig. 2 B**), which is confirmed from Eigen images that represent the half-pitch of the two-start helix (**Fig. 2 C**). Hence, actin II has symmetry parameters identical to α -actin, for which a cross-over distance of 371 \AA has been reported [28], while actin I possesses a significantly longer cross-over distance, which is in agreement with the earlier work performed on actin I using atomic force microscopy [26].

To understand whether the longer cross-over distance is a result of a change in the helical rise and/or the helical rotation, we determined the low-resolution 3D structure of actin I (**Fig. 3 A**) using single-particle based helical reconstruction [29,30]. We refined the helical symmetry (**Fig. 3 B**) and determined the low-resolution filament structure at 25-\AA resolution (at FSC 0.5 cutoff, **Fig. 3 C**). This showed that the cross-over distance change is mainly due to a change of helical rotation from -166.6° [28] to -167.5° , which corresponds to the predicted rotation change if the helical rise remains constant at 27.7 \AA . Despite the obvious difference in helical symmetry, at the current resolution, the cryo-EM structure of the actin I subunit looks very similar to the canonical actin filament (**Fig. 3 A**). This is the first time that such large differences in the properties of filaments have been observed for actin isoforms of any species. Thus, higher resolution is needed to further characterize the molecular interactions giving rise to the different polymerization propensities and the observed helical rotation changes.

Interface regions are the most divergent in *Plasmodium* actin monomers

The divergent polymerization properties of *Plasmodium* actins *in vivo* may be partly accounted for by differences in the activities of the actin-binding proteins, which in these parasites are also poorly conserved and have partially divergent functions compared to canonical counterparts [31–38]. However, differences in the actin monomer structure must be responsible for the observed differences in filament structure *in vitro* and also for interactions with regulatory proteins and, thus, functional differences *in vivo*. Therefore, high-resolution structures are required for understanding the biological and molecular differences of the parasite actins compared to their

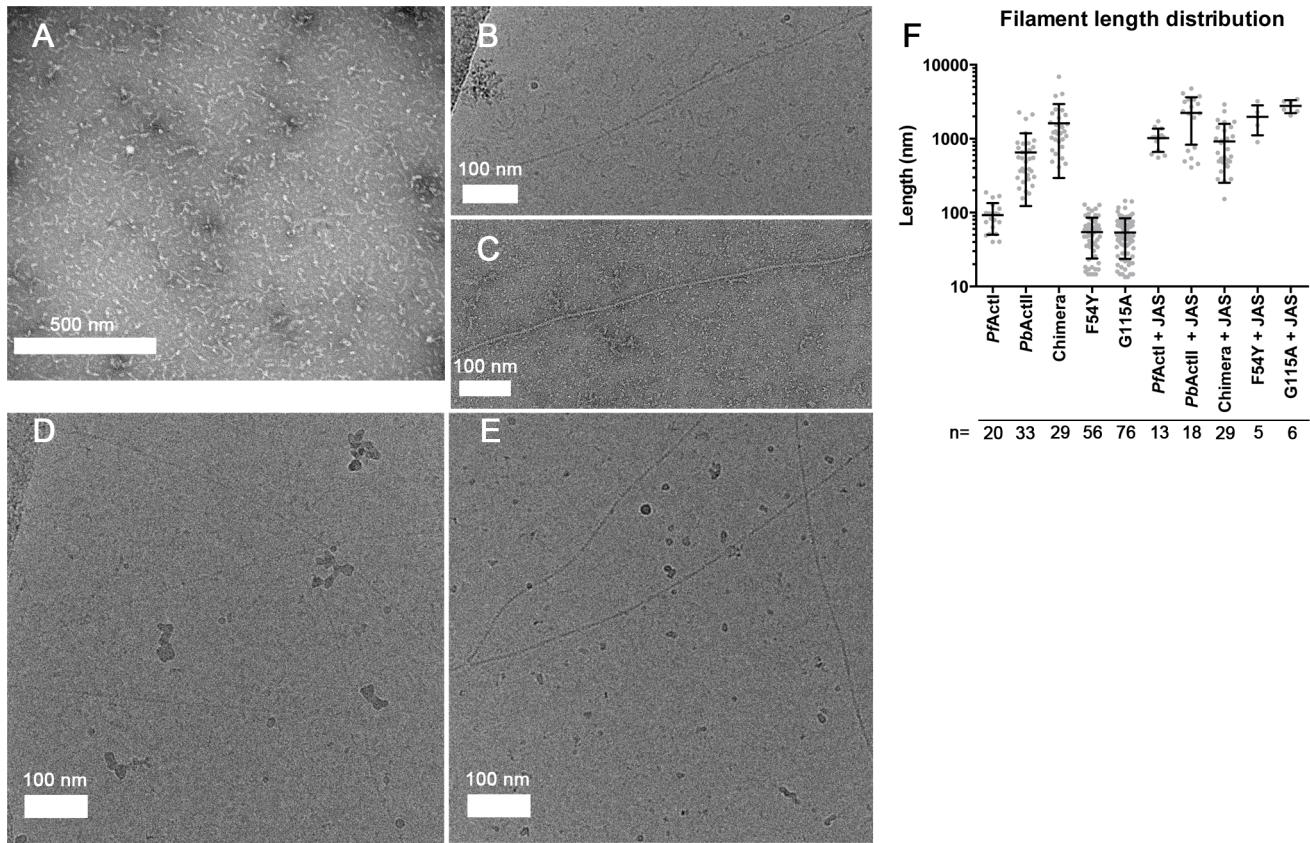


Figure 1. Electron micrographs of *Plasmodium* actin filaments. (A) In the absence of stabilizing agents, actin I forms only short structures lacking helical symmetry. (B,C) Actin II readily forms filaments varying from hundreds of nm to 1–2 μm in length. (D,E) In the presence of JAS, both parasite actins form long helical filaments. (F) Length distributions of two *Plasmodium* actin isoforms and three actin I mutants. Note the logarithmic scale of the Y axis.

doi:10.1371/journal.ppat.1004091.g001

canonical homologs. Such information will also aid us in evaluating the suitability of *Plasmodium* actins as drug targets.

We set out to determine the crystal structures of *P. falciparum* actin I and *P. berghei* actin II. The sequence identities between the counterparts from *P. falciparum* and *P. berghei* are 99% for actin I and 92% for actin II. The gelsolin G1 domain was used to stabilize the monomers and facilitate crystallization of both actins [39,40]. The actin I structure was refined to a resolution of 1.3 \AA and actin II to 2.2 \AA . These high-resolution structures allow for a very detailed comparison of the *Plasmodium* actins with each other and with other actins (Figs. 4, S2, and S3). Although *Plasmodium* lacks a gelsolin homolog, the mammalian G1 is bound between subdomains 1 and 3 in both *Plasmodium* actins, similarly to other actin–G1 complexes [39,41] (Fig. S2 D and E). For all comparisons, we have used canonical actin structures that have also been determined in complex with G1, in order to rule out structural rearrangements caused by gelsolin binding.

In most canonical actin structures, the C terminus is folded as an α -helix, which interacts with the bottom part of subdomain 1. This is true also for *Plasmodium* actin II (Fig. 4 A). In actin I, however, the C terminus turns towards solvent and is disordered (Fig. 4 B). The large hydrophobic cleft between subdomains 1 and 3 is defined as a ‘hotspot’ for regulatory protein binding [42] (Fig. 4 A and B). A smaller hydrophobic patch in the direct vicinity of the C terminus is, in addition, involved in binding at least profilin [43]. In actin I, the large hydrophobic residues in this smaller cleft, including Trp357, have adopted different

conformations compared to canonical actins (Fig. 4 B), possibly influencing the binding of profilin, which we have previously proposed to bind actin in a different manner in *Plasmodium* compared to opisthokonts [31]. In actin II, these hydrophobic residues, like the C terminus, are in the canonical conformations. All in all, despite the obvious similarity to other actins, especially actin I shows appreciable structural deviations, in particular in the regions involved in binding of regulatory proteins [42]. This may provide possibilities for structure-based drug design targeted at the *Plasmodium* actin–regulatory protein interfaces.

Residues involved in longitudinal contacts in F-actin differ equally from canonical actins in both parasite actins

A key question concerning the properties of the major *Plasmodium* actin isoform, as well as other apicomplexan actins, is why they, unlike all the extensively studied actins, form only short, unstable filaments. Comparing the crystal structures of the monomers to the recently determined high-resolution cryo-EM structures of canonical actin filaments [28,44–46] can provide clues to answer this question. In canonical F-actin, the axial interactions, meaning the longitudinal contacts between the actin monomers in each of the two protofilaments, are tight and mainly electrostatic, as revealed by cryo-EM studies [28,45]. The most important axial interactions are discussed below.

The DNase I binding (D)-loop in subdomain 2 (residues 39–61 in actin I) is one of the most important regions for polymerization

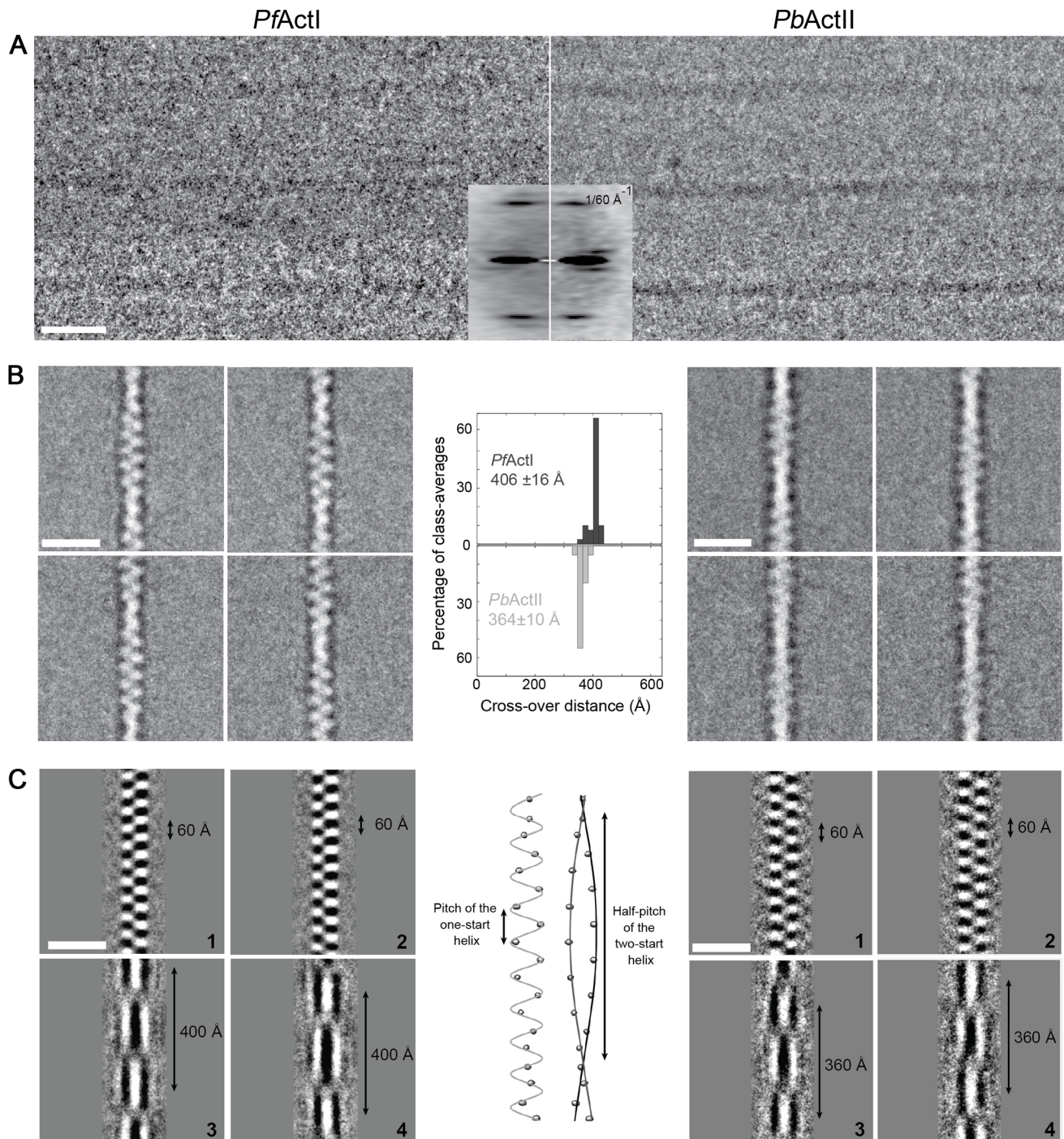


Figure 2. Cryo-EM image analysis of actin I and II. (A) Electron cryo-micrographs of actin I and II (left and right, respectively). Side-by-side average power spectrum of actin I and II. (B) Representative class averages from k-means clustering. Center: Histograms of measured cross-over distances reveal a larger half pitch for actin I. (C) Eigen images 1–2 from actin I and II k-means clustering reveal a constant pitch of the one-start helix, whereas Eigen images 3–4 confirm the difference in cross-over distance of actin I and II. doi:10.1371/journal.ppat.1004091.g002

and, in the filament, inserts into the hydrophobic cleft between subdomains 1 and 3 of the neighboring monomer [28,45,47,48]. In both *Plasmodium* actin crystal structures, the D-loop is disordered, and the tip of it is not visible in the electron density maps (Figs. 4 and S3). Interestingly, the most notable changes in the D-loop sequence concern the first and the last residues of a segment (residues 42–49) that forms a short α -helix in some

G-actin structures with ADP bound [49] and has been modeled as a helix also in one of the recent F-actin structures [45]. This part of the D-loop inserts deep into the neighboring monomer in the filament, contacting the so-called proline-rich loop (residues 109–115). Residue 42, which is a glutamine or threonine in most other actins, is a proline in both *Plasmodium* actins. A proline restricts the conformation of the chain and, although also known as a ‘helix

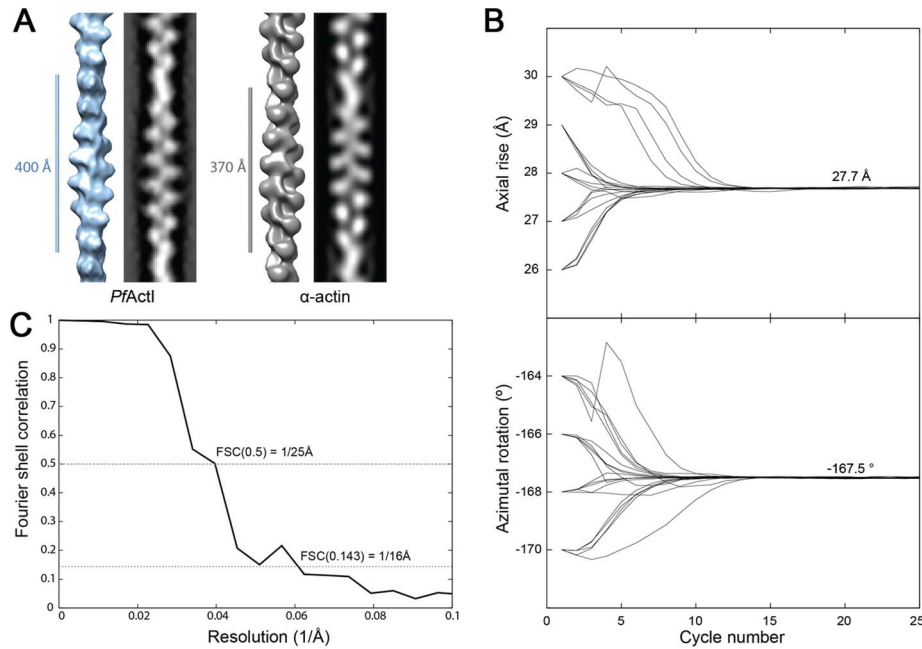


Figure 3. Filament structure of *Plasmodium* actin I compared to α -actin. (A) The cryo-EM structure of actin I filament at 25 Å resolution (left) in comparison with rabbit skeletal muscle α -actin filtered to a comparable resolution (right; EM database entry EMD-5168 [28]). (B) Symmetry refinement of actin I confirms that the change in cross-over distance is caused mainly by a change in helical rotation when compared with actin II and canonical rabbit α -actin. (C) Fourier Shell correlation of actin I half data sets used for 3D reconstruction. The resolution can be estimated at 25 Å based on the 0.5 criterion.

doi:10.1371/journal.ppat.1004091.g003

breaker³, is often also seen as the first residue in α -helices. At the C terminus of this segment, residue 49, which is a glycine in canonical actins, is a glutamate in both *Plasmodium* actins. These replacements at both ends of this segment would be expected to increase the helical propensity of the tip of the D-loop.

In canonical F-actin, Thr325 in the loop between α -helix 11 and β -strand 18 (residues 323–327; **Fig. 4 A and B**) in subdomain 3 of one monomer interacts with Glu242 in the loop connecting β -strands 15 and 16 in subdomain 4 (residues 242–247; **Fig. 4 A and B**) of the neighboring monomer [28]. In actin I, this loop and the threonine side chain have turned away from the optimal position for this interaction (**Figs. 4 B and S3**). In actin II, Ser325 is positioned such that hydrogen bonding to the apposing glutamate can be easily achieved. The difference in the conformation can be explained by the substitutions Y280F and M284K in actin I compared to canonical actins and actin II.

The third main site contributing to axial interactions is formed by the loop connecting helices 9 and 10 (residues 284–290 in subdomain 3; **Fig. 4 A**) inserting between subdomains 2 and 4 of the neighboring monomer. This area is almost fully conserved in both parasite actins, the only substitution being that of Met283 by a lysine (284) in actin I.

All in all, the largest differences in the axial contacts concentrate to the D-loop and concern equally both *Plasmodium* actins. Smaller differences in subdomain 3 may, however, partly explain the different polymerization propensities of the two parasite actin isoforms.

Filament lateral contact areas display the largest differences between the parasite actins

The lateral contacts between the two protofilaments concern mainly interactions between subdomains 1 and 4 and the beginning of the D-loop in subdomain 2 interacting with the so-called

hydrophobic loop (residues 263–275) (**Figs. 4 A–B, S1, and S2 D–E**) between subdomains 3 and 4 of the apposing monomer [28,45,48]. In a recent high-resolution cryo-EM filament structure [45], Arg206 in subdomain 4 interacts with Ser271 of a neighboring monomer. In actin I, Ser271 is replaced by Ala272, and Lys207 and Glu188 are involved in a short hydrogen bond with salt-bridge character (**Fig. 4 C**). A similar interaction occurs between Arg206 and Asp187 in Latrunculin A-bound α -actin [50]. In the absence of latrunculin, the distance between these residues in α -actin is longer and the geometry suboptimal for a salt bridge (**Fig. 4 C**). Latrunculins prevent actin polymerization, presumably by limiting the flexibility of subdomains 2 and 4 [50,51], and the salt bridge seen in the latrunculin-actin structure, similar to *Plasmodium* actin I, may be one reason for this. The longer side chain of Glu188 in actin I compared to Asp187 in canonical actins may facilitate the interaction with Lys207. Actin II has Tyr187 in place of Asp187/Glu188, which affects the orientation of Arg206. Actin II, furthermore, has Cys272 in the place of Ser271 of canonical actins, allowing for hydrogen bonding upon polymerization.

At the N terminus of the D-loop, Arg40 and His41 of canonical actins are replaced by lysine and asparagine in actin I and lysine and methionine in actin II. In the filament, Arg40 forms a salt bridge with Glu271 [28], and the replacement to lysine can subtly weaken this interaction. His41, in turn, interacts with Ser266 [28]. Although the asparagine in actin I can also contribute to a hydrogen bond, the interaction may be weaker due to the shorter side chain. In F-actin, Lys114 in the proline-rich loop (residues 109–115 in subdomain 1, following actin I numbering) forms a salt bridge with Glu196 of a neighboring monomer [28]. Uniquely, the neighboring residue is Gly115 in actin I (**Fig. 4 D**), which can have a large effect on the mobility of the proline-rich loop. Actin II has a non-glycine residue (threonine) at this position, similarly to canonical actins (alanine or serine).

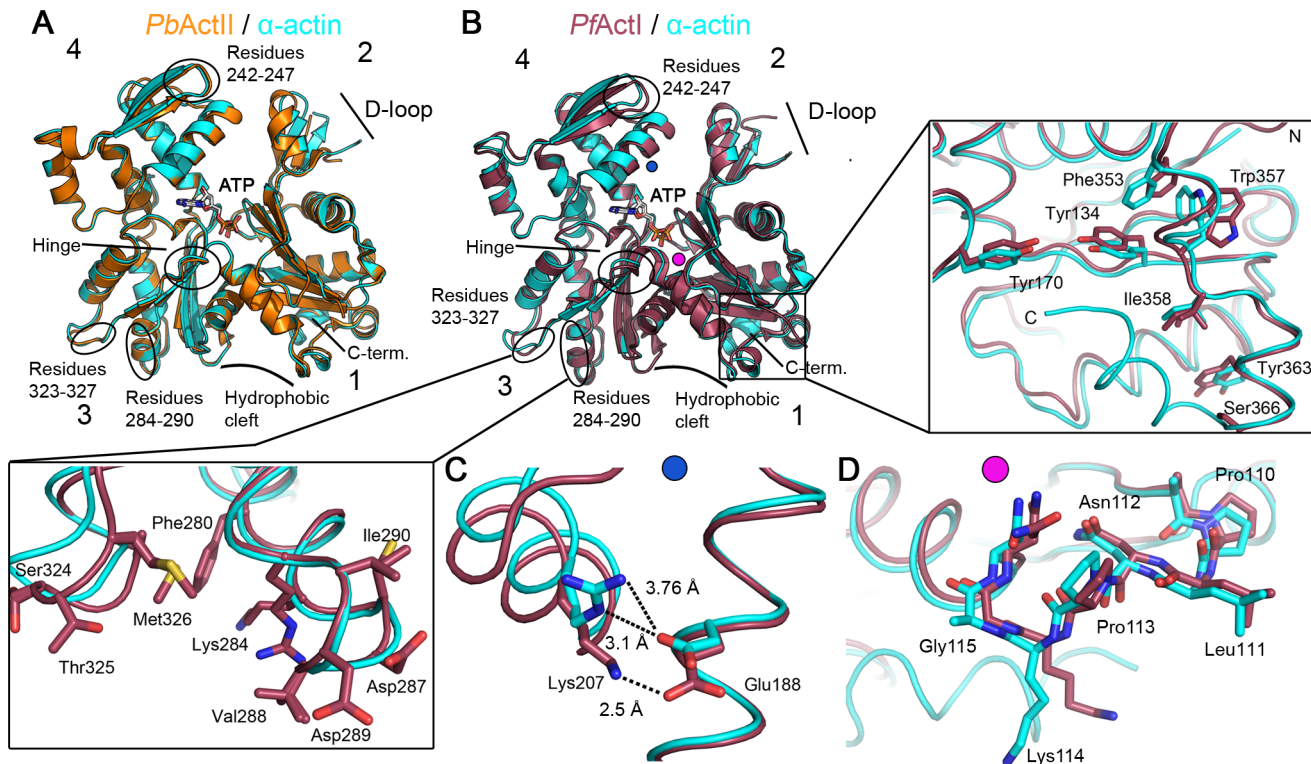


Figure 4. Crystal structures of *Plasmodium* actin I and II. (A) *P. berghei* actin II (PbActII; yellow) superimposed on α -actin (1eqy [39]; cyan). (B) *P. falciparum* actin I (PfActI; red) superimposed on α -actin. In both (A) and (B), ATP, subdomains 1–4, and several regions discussed in the text are indicated. Both N and C termini reside in subdomain 1; the N terminus is visible at the front, and the C-terminal helix is on the back side. Note that the C-terminal helix is not visible in actin I. The C-terminal part and the nearby hydrophobic cluster with Trp357 are shown in the zoomed view on the right and the region involved in intra-filament contacts in subdomain 3 in the box at the lower left corner. The blue and pink dots in (B) indicate the approximate positions of the structural elements shown in detail in (C) and (D), respectively. (C) Lys 207 and Glu188 are at an intimate distance in actin I. A similar salt bridge is present between the corresponding residues in latrunculin-bound α -actin, but the hydrogen-bonding distance is longer without the drug. (D) The proline-rich loop with Gly115 in actin I superimposed on that of α -actin. Note the bending of the loop in actin I, due to the more flexible glycine residue.
doi:10.1371/journal.ppat.1004091.g004

Taken together, especially residues involved in lateral contacts, crucial for the stability of the filaments, are altered in *Plasmodium* actin I but more conserved in actin II. The most important differences concern subdomain 4, the D-loop, and the proline-rich loop. The conformations of all these affect each other allosterically and can also modulate the ATPase activity [52–54].

α -actin D-loop rescues polymerization of *Plasmodium* actin I

Because of the observed differences in sequence, conformation, and helical symmetry between *Plasmodium* and canonical actins and the importance of the D-loop-mediated contacts for polymerization, we constructed a chimera, in which the entire D-loop of actin I was replaced with that of α -actin. Strikingly, this chimera in the absence of any stabilizing agents forms filaments with an average length of 1.6 μm , which is longer than either actin I or II filaments (Figs. 5 A–B and 1 F). However, the appearance of the chimera filaments is not as regular as the filaments formed by canonical actins or actin II.

To further characterize the filaments formed by the actin I– α -actin chimera, we analyzed electron cryo-micrographs of JAS-stabilized chimera filaments and subjected them to the same classification and symmetry analysis as outlined above (Fig. S4). Based on the determined half-pitch distance and the symmetry analysis, we conclude that the symmetry parameters of the

chimera filaments are in close agreement with the wild-type actin I filaments. Therefore, the symmetry parameters appear to be retained from the wild-type actin I, and thus, the D-loop of canonical actin merely confers increased filament stability.

The crystal structure reveals that the 3D structure of the chimera in monomeric form is very similar to that of wild-type actin I (Figs. 5 C and S3). However, there are some notable differences. The D-loop in the chimera is slightly more ordered. In addition, the C-terminal helix is visible and can be superimposed with the C terminus of actin II and most canonical actins. The Trp357 side chain in the hydrophobic patch is not flipped as in wild-type actin I (Figs. 4 B and 5 C). This observation is in line with earlier reports on allostery between the conformations of the D-loop and the C terminus [55,56] and demonstrates the ability of even large residues in the hydrophobic core of actin to move, which is a requirement for the rearrangements taking place in the monomer upon polymerization.

In addition to residues already discussed, a notable difference between the D-loop of *Plasmodium* actin I and canonical actins is at position 54, which has a tyrosine in opisthokont actins and *Plasmodium* actin II but phenylalanine in actin I. In the chimera, the OH group of Tyr54 is hydrogen bonded to the main chain of Lys51 and could also interact with the tip of Lys62 (Fig. 5 C). In wild-type actin I, Phe54 has moved away from Lys62 and seems to push Lys51 to a slightly different conformation. In actin II, Tyr53 (corresponding to Phe54 in actin I) is able to interact with Lys61

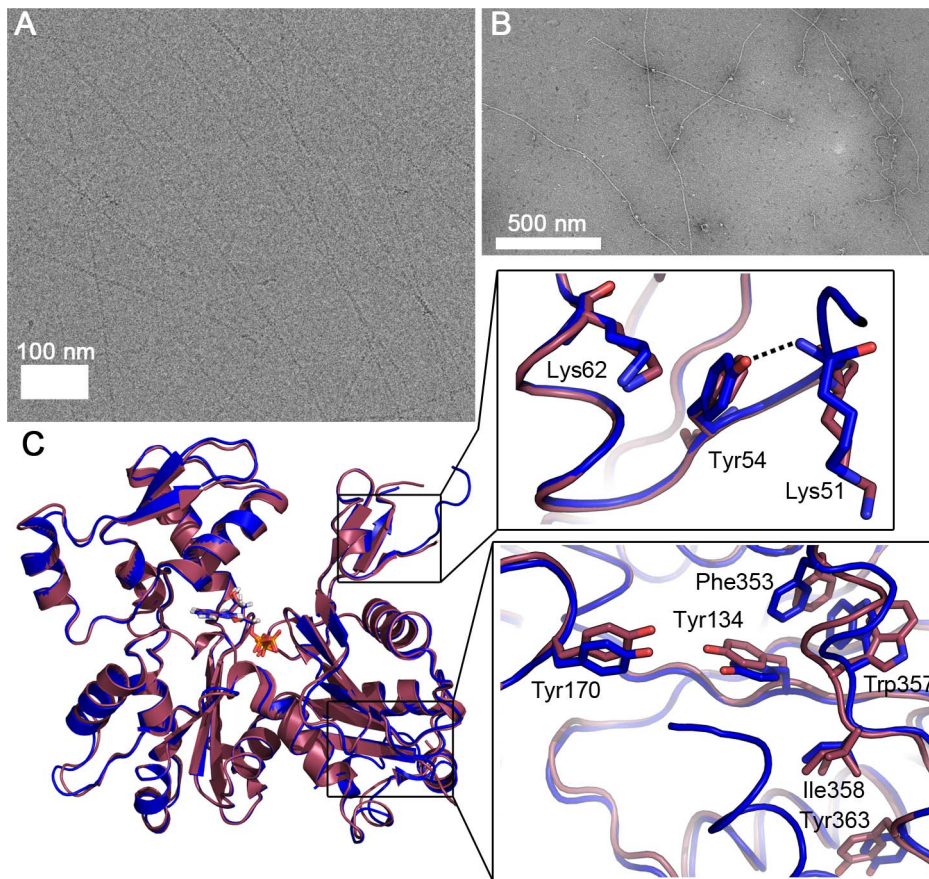


Figure 5. *Plasmodium* actin I- α -actin chimera forms long filaments. (A) Electron cryo-micrograph of the chimera filaments. (B) Negatively stained chimera filaments. (C) The crystal structure of the chimera (blue) resembles that of wild-type actin I (red). The zoomed views show the differences in the D-loop around Tyr54 (above) and the C-terminal helix and the hydrophobic residues nearby, which are in the canonical orientation in the chimera, unlike in actin I (below).
doi:10.1371/journal.ppat.1004091.g005

(Lys62 in actin I), but otherwise, this region is rather different in conformation compared to both actin I and canonical actins. This is due to conformational changes in subdomain 4, involving Thr203, Arg206, and seemingly originating from the bulky side chain of Tyr187, which is replaced by aspartate in canonical actins and glutamate in actin I, as discussed above. According to a recent filament structure [45], Tyr54 becomes stacked between the side chains of Asp52 and Lys62 of the same monomer and its only possible rotamers would allow an OH- π interaction with the phenyl ring of Tyr170 of the neighboring monomer. The side chain of Phe54 in actin I is not able to participate in this kind of an interaction due to the missing hydroxyl group. Thus, the replacement of tyrosine by phenylalanine at this position may affect both the rigidity of the D-loop in the monomeric state as well as the stability of the filament.

Implications for catalysis

The state of the nucleotide-binding pocket can be described using two parameters: (i) the “phosphate clamp”, which is the distance between the C α atoms of Gly15 and Asp157, and (ii) the “mouth”, which is the distance between the C α atoms of Gln59 and Glu207 [46]. The phosphate clamp distance in *Plasmodium* actins does not differ significantly from other actins. However, the mouth of the binding pocket is significantly more closed in both parasite actins: 9.85 Å in actin I and 9.04 Å in actin II, compared

to an average of 10.87 ± 0.4 Å in 9 other actin-G1 structures used for comparison. In three recent high-resolution F-actin structures [28,45,48], the mouth distance varies between 7.88 and 9.66 Å. Both parasite actins reach the more closed conformation by slightly different means. In actin I, the largest differences in conformation to canonical actins are in subdomain 4 and in actin II, subdomain 2 (Figs. 4 and S3).

Both structures reported here have calcium and ATP bound to the nucleotide-binding cleft between subdomains 2 and 4 (Figs. 4 and 6). In the nucleotide-binding residues, there is one interesting difference in actin I compared to canonical actins and actin II; residue 17, which is hydrophobic (methionine/leucine) in all canonical actins and actin II, is an asparagine in actin I (Fig. 6 A and B) and also *T. gondii* actin. This side chain is close to the α - and β -phosphates of ATP. In actin I, the distance of the Asn17 N δ 2 atom to the β -phosphate O1 atom (~ 3.75 Å) is too long for hydrogen bonding in this conformation. However, together with its own main chain N, that of Gly16, and N ζ of Lys19, the Asn17 side chain could form an oxyanion hole to stabilize a negative charge on the β -phosphate O1 atom (Fig. 6 A). In addition, it could interact with the α -phosphate. The Asn17 side chain is flexible in the crystal structure, as evident from the electron density maps and B factors, and based on the shape of the electron density as well as anisotropic ellipsoids, seems to move in concert with active-site water molecules as well as the nearby Tyr338, which is in a double conformation.

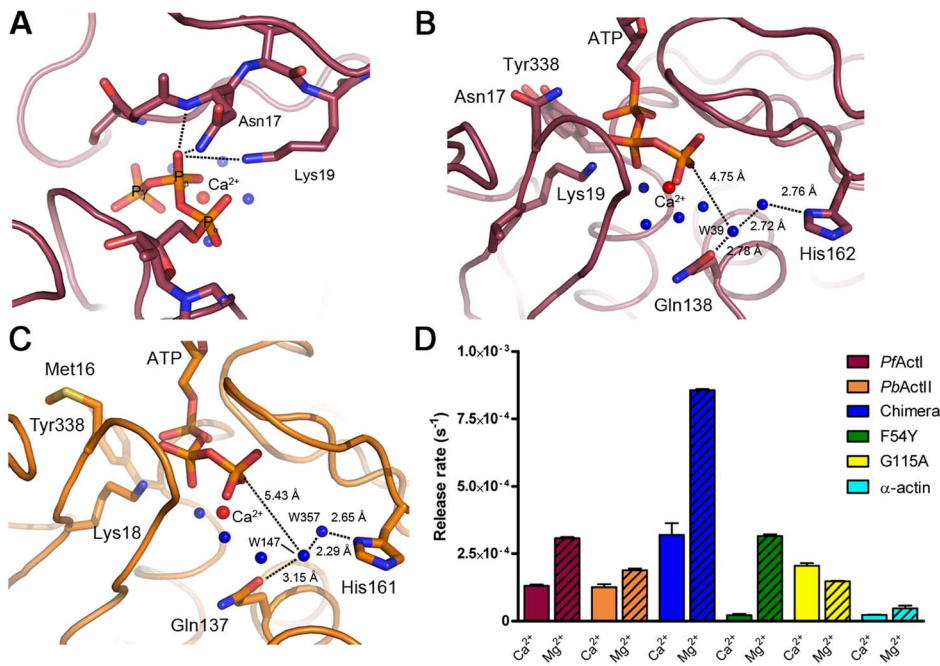


Figure 6. ATP binding sites of actin I and II. (A) The Asn17 side chain in actin I is part of a cluster formed by the Asn17 N δ and main chain N atoms as well as N ζ of Lys19. Together, they could form an oxyanion hole for stabilizing a negative charge on one of the β -phosphate oxygen atoms in a reaction intermediate. (B) The active-site water structure in actin I is conserved, and W39 is in an almost inline position for a nucleophilic attack to the ATP γ -phosphate. (C) The catalytic water in actin II has moved further away from the ATP γ -phosphate, is mobile, and is likely a double conformation of the water bound directly to His161. (D) Phosphate release rates of the wild-type *Plasmodium* actins in the calcium- or magnesium-bound states compared to α -actin, the actin I- α -actin chimera and the actin I mutants F54Y and G115A. Error bars represent standard deviation (n=3).

doi:10.1371/journal.ppat.1004091.g006

A catalytic mechanism based on a nucleophilic attack of a water molecule activated by His162 and Gln138 has been proposed for ATP hydrolysis in actin [57]. The reaction itself is rather simple, containing only proton transfer steps. The complication arises from the fact that G-actin – currently the only form of which atomic-resolution information can be achieved – is a poor catalyst, and conformational changes upon polymerization are needed for achieving the catalytically competent conformation of the active site. Water 39 (actin I numbering) has been proposed to be the nucleophile initiating the reaction, and depending on the bound metal, the position of this water changes [57]. In actin I, this water is 4.75 Å away from the γ -phosphate, and the angle between the β - γ bridging O, P γ , and water 39 is 152.4°, which is amenable for a nucleophilic attack (Fig. 6 B). The catalytic site water structure in actin II is different compared to actin I (Fig. 6 C), as the presumed catalytic water (147 in the actin II structure) has moved towards His161 and Pro109 and has weak electron density and a high *B* factor. The distance of this water to P γ is 5.43 Å, and it is in an almost in-line position (162.4°). In fact, according to the electron density and the distances to neighboring atoms, this water may be a second conformation of water 357, which is directly hydrogen bonded to His161. Together, these differences in the active site architectures between the two parasite actins and compared to other actins indicate that the catalytic activity and the exact mechanism of ATP hydrolysis may differ in them, likely resulting also in differences in polymerization.

Given the structural differences in the catalytic sites, we set out to test if the *Plasmodium* actins differ from each other and canonical actins in their ability to hydrolyze ATP and/or release phosphate. We first measured phosphate release in the presence of Mg²⁺ (Fig. 6 D). It should be noted that, as phosphate release at least in

canonical actins is much slower than hydrolysis, this method gives only indirect information about the hydrolysis rate. In these conditions, both parasite actins release phosphate faster than α -actin. Of the two parasite actins, actin I has a slightly higher rate (~2 times higher than actin II). Curiously, the chimera with the α -actin D-loop is approximately 3-fold more active than wild-type actin I and 23-fold more active than α -actin. We also made two point mutations to actin I; G115A, which we predicted to affect the flexibility of the proline-rich loop and, thus, the rate of hydrolysis, and F54Y, which we hypothesized might affect the rigidity of the D-loop in monomeric state. Neither of these mutants formed long filaments without JAS (Fig. 1 F). In the presence of Mg²⁺, the F54Y mutant shows identical behavior to wild-type actin I. G115A, however, has a reduced rate, similar to actin II. Also the kinetics differ from each other in the different actins. Whereas actin I and the point mutants release phosphate in a linear way, α -actin, actin II, and the chimera display more complex kinetics, having an initial very short, faster, non-linear phase, followed by a linear phase.

We next measured phosphate release in the Ca²⁺-bound, presumably mainly monomeric, forms (Fig. 6 D). As expected, α -actin showed an even lower release of phosphate in the Ca²⁺-bound compared to the Mg²⁺-bound form. Both actin I and actin II have activities equal compared to each other and approximately 5-fold higher than α -actin. The chimera releases phosphate 3-fold less in the presence of Ca²⁺ than with Mg²⁺, but the rate is still significantly higher than that of muscle actin or both wild-type parasite actins with Ca²⁺. Of the point mutants, F54Y has practically no activity with Ca²⁺ (identical to α -actin), whereas G115A is slightly more efficient in the presence of Ca²⁺ than Mg²⁺. Altogether, these data show that the *Plasmodium* actins have

a different mechanism of ATP hydrolysis and/or subsequent phosphate release compared to canonical actins, which are poor catalysts in the monomeric form and adopt the catalytic conformation only upon polymerization, which is a prerequisite for non-equilibrium polymerization kinetics enabling directional growth [58]. We were also able to pinpoint amino acid residues responsible for these differences.

Plasmodium actins have a unique response to ADP

In order to evaluate the oligomeric state of the parasite actins in the presence of ATP/ADP and different ions, we used native PAGE. With ATP bound, actin I spontaneously forms short polymers (from tetramers up to 11–12-mers) in ~48 h when stored on ice (**Figs. 7 and S5**). Actin II stays mainly monomeric over the same period of time, although minute amounts of oligomers (dimers–octamers) appear. Interestingly, in the presence of ADP, oligomerization starts instantly, and the majority of both actins is oligomeric (dimers–10-mers) immediately after a 1-h hexokinase treatment at 298 K to remove ATP. After incubation of the actins at 298 K for 1 h without hexokinase, only minute amounts of oligomers can be visualized for actin I, and no visible oligomerization of actin II takes place (data not shown). After 48 h, the proportion of larger oligomers of the ADP forms is much higher, and monomers as well as lower oligomers are practically nonexistent. The formation of oligomers is not caused by oxidation, as using even a large excess of the reducing agent TCEP in the sample does not reduce the amount of oligomerization (**Fig. 7 A**). Both ATP and ADP forms of α -actin remain monomeric in the same conditions. However, short oligomers of ATP- α -actin have been reported below the critical concentration for polymerization [59].

Because the distribution, when separated on a gel, does not necessarily reflect the equilibrium between different species in solution, we also used dynamic light scattering (DLS) to visualize the size distribution and polydispersity of the actin mono- and oligomers in solution over time (**Fig. S6**). The resolution of DLS is far from that of the native gel assay, and it is only possible to detect size differences of approximately 5–6 fold. Therefore, *e.g.* monomers, dimers, and trimers will appear as a single, polydisperse peak. 6 h after purification, actin I is seen in mainly two separate peaks of average hydrodynamic radii of approximately 2 and 6 nm (**Fig. S6 A**). 2 nm would be very close to the expected hydrodynamic radius of the monomer. After 11 h, nearly all of actin I is in particles with a radius of ~5 nm (**Fig. S6 B**). As time goes by, the distribution becomes divided between particles of below 3 nm (close to a monomer) and larger oligomers with an average radius of 11–12 nm (**Fig. S6 C and D**). The polydispersity of the sample after 11 h is very high, indicating that the sample contains a mixture of monomers and small oligomers, and the polydispersity diminishes again, as the sample gains a multimodal distribution, indicating that the smallest oligomers disappear over time, leaving behind a pool of monomers in addition to the higher oligomers, consistent with our native PAGE data. As seen also in the native gels, actin II retains a higher fraction of monomers over 48 h, but also gains a fraction of significantly higher oligomers, which are, however, infrequent and very heterogeneous in size (**Fig. S6 E–H**).

In order to probe the effects of Mg^{2+} and K^+ ions on the oligomerization behavior, we also performed native PAGE in the presence of two concentrations (1 and 5 mM) of $MgCl_2$ as well as 5 mM $MgCl_2$ and 50 mM KCl (**Fig. S7**). In the presence of ATP, Mg^{2+} slightly reduces the amount of the short oligomers for both actin I and II compared to the Ca^{2+} forms (**Fig. S7 A and B**). However, some actin I is visible at the bottom of the well at the top

of the gel, which would imply filaments too long to enter the gel. This could not be seen in the Ca^{2+} gels for either the *Plasmodium* proteins or α -actin, but was much more pronounced for α -actin with Mg^{2+} . In the presence of ADP, there is a clear shift towards longer oligomers in actin I, and after 48 h, part of actin I stays in the well, not entering the gel in the presence of 5 mM $MgCl_2$ both with and without KCl (**Fig. S7 C and D**). Thus, Mg^{2+} alone seems to be sufficient for polymerization.

Actin I cannot replace actin II in male gametogenesis

We used genetically modified parasites to address the question whether the observed structural differences translate into different properties of the proteins *in vivo*. While it is not possible to delete actin I due to its essential functions, a knock-out of the *actin2* gene has been done, resulting in a block of male gametogenesis [23,60]. We reasoned that a replacement of *actin2* with *actin1* would display the mutant phenotype if the two actin isoforms have different biological functions, while restoration of gametocyte development would indicate a similar function.

Male gametogenesis in the malaria parasite is a unique event, involving the formation of flagellar gametes. This event, called exflagellation (**Fig. 8 A and Video S1**), is easily scored under the microscope, allowing us to use it as a quantitative method. In our approach, *actin1* was expressed under the control of the *actin2* flanking regions. We used a recipient line, in which the complete open reading frame (ORF) of *actin2* had been deleted. Therefore, these parasites do not exflagellate [60]. This line was separately transfected with two constructs, both aiming at integration into the *actin2* locus. The complementation construct (*act2com*) restored the *actin2* ORF, which allowed expression of the cognate gene comparable to wild type. In the replacement construct (*act2rep*), a fragment corresponding to the *actin1* ORF was used instead of the *actin2* ORF. The constructs were otherwise identical and were integrated in the locus *via* a single crossover homologous recombination event in the 5' flanking region of *actin2* (**Fig. 8 B**). In both cases, clonal lines were obtained. We compared the *act2com* and *act2rep* parasite lines with wild-type parasites in the exflagellation assay (**Fig. 8 C**). In the wild-type and *act2com* parasites, the number of exflagellation events was similar, indicating that complementation with *actin2* restored the function of the gene. However, while some normal exflagellation events were detected also in the *act2rep* parasites, the numbers were significantly reduced compared to the *act2com* parasites (**Fig. 8 C**), strongly suggesting that actin II has unique functions, which actin I cannot fulfill during male gametogenesis.

The actin I- α -actin D-loop chimera restores gametogenesis

As it became apparent that actin I polymerization properties *in vitro* could be altered by exchanging its D-loop to that of α -actin, we decided to investigate if this modification would also have an impact on the *in vivo* function of actin I. We produced transgenic parasites using the same strategy as described above; inserting the actin I- α -actin D-loop chimera into the *actin2* locus, producing the *act1chi* parasites (**Fig. 8 B**). Surprisingly, this revealed that the exchange of the D-loop had a remarkable impact on exflagellation (**Fig. 8 C**). In the *act1chi* parasites, exflagellation was significantly increased compared to the *act2rep* strain and restored to values close to the *act2com* strain. These data show that the D-loop has a critical role in the function of these actins, but actin II, as shown by the structural data, has acquired other properties that contribute to its higher filament stability. Furthermore, and to our surprise, it seems that the molecular function of actin II may be dependent on the ability of the protein to form filaments.

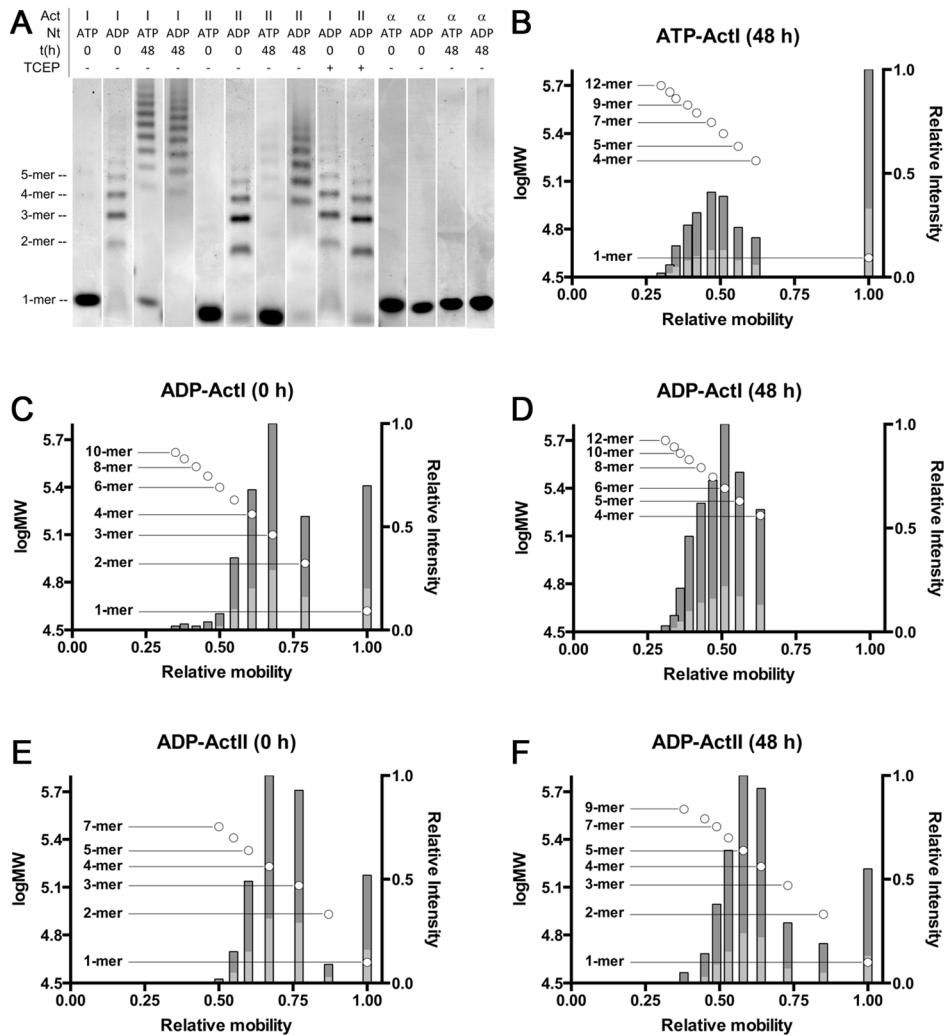


Figure 7. Native PAGE analysis of the *Plasmodium* actins and α -actin. (A) *Plasmodium* actins I (lanes 1–4 and 9) and II (lanes 5–8 and 10) form small oligomers upon storage and after exchange of ATP to ADP. Both parasite actins were studied by native PAGE immediately and 48 h after purification in both ATP and ADP forms. Treatment of ADP-exchanged *Plasmodium* actins with a high concentration of reducing agent (10 mM TCEP) has no effect on the behavior of either of the actins. Exchange of ATP to ADP in α -actin (lanes 11–14) does not result in changes in the oligomeric state. Nt denotes the nucleotide. TCEP - and + denote either the normal 1 mM or an excessive 10 mM concentration, respectively. The approximate position of the different oligomers, corresponding to lane 2, are given on the left. Note that actin I and II run slightly differently on the gel. (B–F) The relative mobility vs. log MW (circles with the oligomeric state indicated on the side) and relative intensities of bands (bars) extracted from gel images of Coomassie-stained native PAGE gels containing ATP or ADP *Plasmodium* actin I (B–D) and ADP actin II (E and F) immediately or 48 h after purification. The dark grey bars denote the relative intensity of the bands compared to the most intense band and the light grey bars the relative intensity of the bands compared to the sum of all band intensities.
doi:10.1371/journal.ppat.1004091.g007

Discussion

An actin cytoskeleton was long thought to be a feature unique to eukaryotic cells, and this view was revisited only two decades ago upon the discovery of the first bacterial actin and tubulin homologs [61–64]. The ancient phylum *Apicomplexa* is likely separated from opisthokonts by an evolutionary distance of a billion years, and the diversification of *Plasmodium* spp. took place hundreds of millions of years ago [65]. Therefore, looking at the divergent properties of *Plasmodium* actins provides us with insight into the early stages of actin evolution. The ability of actin to polymerize must have evolved very early – before its involvement as tracks for molecular motors [66]. This may explain some features of both the polymerization propensity and the divergent actin-myosin motor in *Apicomplexa*. Also the minimal set of actin-binding proteins in *Apicomplexa* suggests that a common ancestor had a limited

polymerization propensity, and the various regulatory proteins in higher eukaryotes have evolved as the polymerization properties of actin itself have been fine-tuned, creating a need for additional regulation. For the biological functions of actin in *Apicomplexa*, the development of similar polymerization properties has strikingly not been of importance.

Different polymerization properties provide evolutionary cues

The two *Plasmodium* actins differ in their polymerization propensities, filament stability, and filament helical symmetry – the hallmark of canonical F-actin. The second, stage-specific actin isoform of *Plasmodium* that forms long filaments with canonical F-actin symmetry is unique among *Apicomplexa*. Curiously, at the sequence level, actin II is as divergent from *Plasmodium* actin I as it

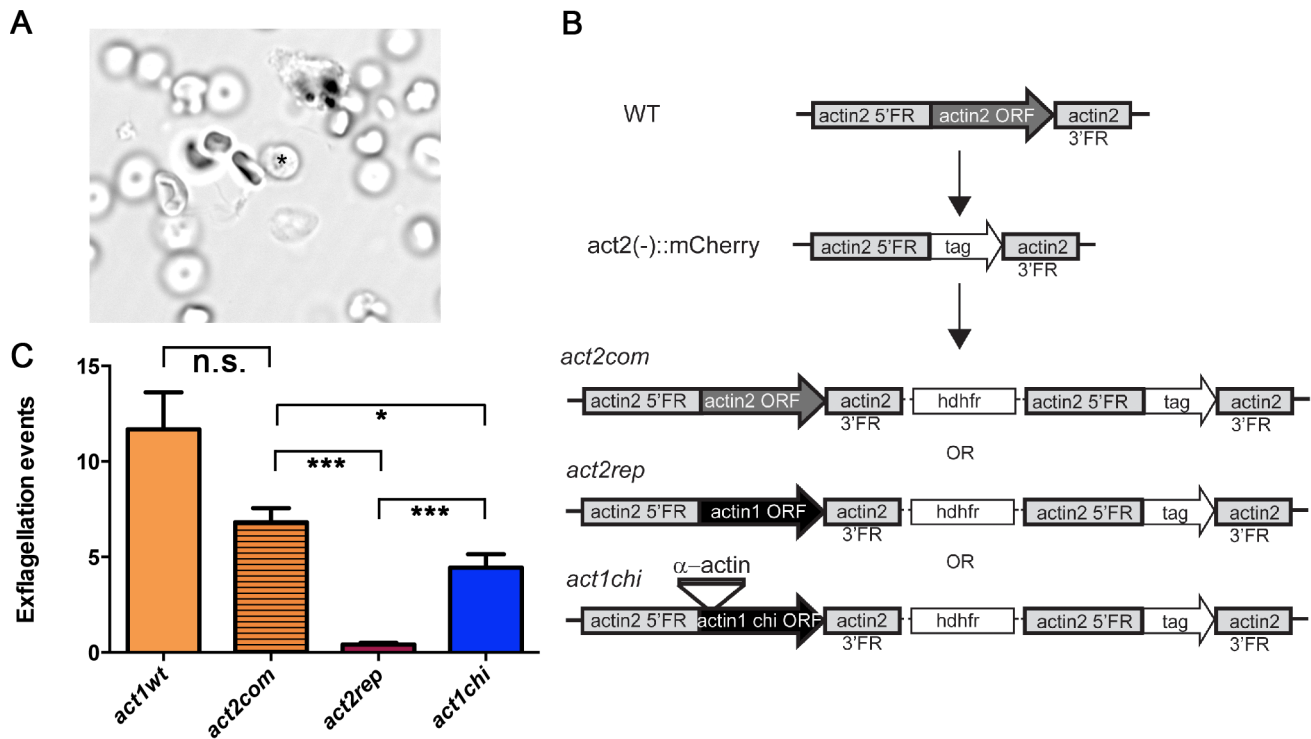


Figure 8. The D-loop chimera but not wild-type actin I rescues the phenotype of the *actin2* deletion mutant. (A) Exflagellation of a male gametocyte. The residual *P. berghei* gametocyte is indicated with an asterisk. The flagellar male gametes beat rapidly. The picture is the first frame of **Video S1**. (B) Schematic picture of the *actin2* gene in wild-type parasites, the recipient strain *act2⁻::mCherry*, and the final genotypes of the *act2com*, *act2rep*, and *act1chi* strains. The same experimental strategy was used for all constructs. The *act1chi* strain expresses a chimeric actin, where the D-loop (amino acids 39–61) has been swapped with the D-loop of α -actin (C) Exflagellation assays comparing wild-type (n = 11), *act2com* (n = 11), *act2rep* (n = 15) and *act1chi* (n = 14) parasites. The *act2com* functionally complemented the mutant, resulting in almost wild-type levels of exflagellation. The *act2rep* parasites had a significantly smaller number of exflagellation events, while swapping the D-loop of actin I with that of α -actin in the *act1chi* mutant results in significant restoration of exflagellation. n.s. means non significant, *** stands for P < 0.0001, * for P < 0.05 (Student's t-test).

doi:10.1371/journal.ppat.1004091.g008

is from all other actins. It has been suggested [23], and our structural data support the view, that the *actin2* gene has arisen only after the diversion of *Plasmodium* from other *Apicomplexa*, and the protein seems to have gained a higher filament stability independent of the evolution of higher eukaryotic actins.

In canonical actins, polymerization is tightly coupled to ATP hydrolysis, such that structural rearrangements upon polymerization enable the active site to adopt a conformation optimal for catalysis [67]. Two key factors have been described necessary for achieving the catalytically competent conformation upon the transition from monomeric to filamentous state. These are: (i) a rotation of the outer domain (subdomains 1 and 2), resulting in flattening of the monomer and (ii) bending down of the proline-rich loop in subdomain 1 [45,48]. The *Plasmodium* actins hydrolyze ATP also in the monomeric form, releasing phosphate more efficiently than canonical actins, and oligomerize readily in the presence of ADP, which is a fundamental difference to all other actins characterized, and must be a result of different atomic structures.

Interestingly, *Plasmodium* actin I has a unique glycine at the end of the proline-rich loop. This allows more flexibility for this loop, which apparently increases the catalytic rate in the presence of magnesium but, surprisingly, has an opposite effect in the calcium-bound form (**Fig. 6 D**). Also the more closed conformations of subdomains 2 and 4 in the parasite actins may facilitate ATP hydrolysis but also reduce the conformational change – or flattening – required upon insertion of the monomer into the

filament. An interesting difference that may also contribute to catalysis is Asn17 close to the α - and β -phosphates of ATP in the active site. Intriguingly, the bacterial actin homolog MreB [68] shares this residue with *Plasmodium* actin I, whereas canonical actins and also *Plasmodium* actin II have a hydrophobic residue at this position. Thus, this asparagine may be a relict from an early, polymerization incompetent ancestor.

The structural features described above may explain the parasite actins' unconventional response to ADP. Surprisingly, the state of the nucleotide seems to determine polymerization propensity, but not in the same way as in canonical actins. The tight link between ATP hydrolysis and polymerization in higher eukaryotes has probably been refined during the hundreds of millions of years after the diversion of *Apicomplexa*. Our data and a recent report proposing an isodesmic polymerization mode for apicomplexan actins [18] suggest that the same has also happened for allosteric regulation of conformational changes taking place upon polymerization. However, it is clear that higher resolution data on the *Plasmodium* actin filaments are needed in order to find out what kind of conformational changes the parasite actins undergo upon polymerization and what is the arrangement of the protomers in the filament, leading to the altered symmetry compared to canonical F-actin. On the other hand, the distribution of oligomers, as seen on the native gels and DLS (**Figs. 7, S5, and S6**), suggests that polymerization may involve a nucleation step, the nucleus being either a dimer or trimer, which are the species that disappear early in the process. Thus, we

hypothesize that the ADP state may favor nucleation, making ATP hydrolysis a rate-limiting step for polymerization.

Importance of the D-loop for polymerization

The D-loop plays a key role in the conformational changes upon polymerization as well as the conformation and stability of F-actin [28,45,47,48]. Both previous work [26] and our EM analyses reveal differences in the helical architecture of actin I compared to α -actin. In the crystal structures, several regions important for intra-filament contacts in canonical actin filaments show substantial differences between the parasite and opisthokont actins, and the polymerization propensity and filament stability are overall likely a sum of numerous atomic details in the monomers. Yet, the sequence of the α -actin D-loop alone is sufficient to restore the ability of actin I to form long filaments, without altering the symmetry compared to the JAS-stabilized wild-type actin I filaments. Thus, whereas the longitudinal contacts by the D-loop are important for stability, the shape and symmetry of the filaments are determined by other factors.

Actin II shows us that stability can be obtained by other means than the D-loop, probably involving lateral interactions. In addition to the differences we have described in the residues involved in lateral contacts, a candidate responsible for increased stability is residue 200, which is a glycine in *Plasmodium* actin I and *T. gondii* actin [69] but serine or threonine in canonical actins as well as *Plasmodium* actin II and *Theileria* actin [9], all of which form long filaments. It has been reported that the double mutant G200S/K270M in *T. gondii* actin leads to an increased filament length when using phalloidin-labeled filaments [69]. However, we were not able to visualize long filaments of this mutant of *Plasmodium* actin I in polymerizing conditions without JAS (data not shown), indicating that several small changes are cumulatively responsible for the increased stability of actin II filaments.

The tip of the D-loop can adopt a helical conformation, albeit it is disordered in the vast majority of all G-actin structures, and appears mainly intrinsically disordered in solution in all nucleotide states of G-actin [70]. The likely higher helical propensity of the D-loop in *Plasmodium* actins may affect polymerization and filament stability in at least two different ways. If the helical conformation is more likely to occur in the filamentous form, this might actually facilitate polymerization, which would be in line with the proposed low critical concentration [15] or isodesmic model for polymerization of parasite actins [18]. However, it has also been proposed that the helical form occurs only transiently in the filament or that it is favored in the ADP form and leads to filament destabilization [54,70]. In this way, a higher helical propensity would contribute to the lower stability of the parasite actin filaments.

Tyrosine hydrogen bonds can contribute substantially to protein stability [71]. Tyr54 is a phosphorylation target and plays a regulatory role in many actins [72–74]. For *Dictyostelium* actin, phosphorylation of this tyrosine increases the critical concentration and controls cell shape changes and spore formation [72–74]. In *Mimosa pudica* L., a contact sensitive plant, where actin is heavily phosphorylated, tyrosine phosphatase inhibitors inhibit the fragmentation of actin filaments during leaf bending [75]. In addition to affecting binding to other proteins, phospho-Tyr54 stabilizes the D-loop conformation [74]. Upon polymerization, this region undergoes a large conformational change, and it seems that the OH group of Tyr54 may be involved in stabilizing interactions [45] that the Phe54 side chain could not fully compensate for. Only 11 of over 300 known actin sequences contain a phenylalanine at this position, and no other substitutions are known. Most of these 11 sequences are actins from *Plasmodium* or

Trypanosoma, both species where actin filaments have not been observed *in vivo*. Despite the apparent importance of tyrosine at this position for normal actins, a single mutation to phenylalanine in *Dictyostelium* actin does not affect its polymerization properties [74]. In line with this, we also could not observe long filaments of the actin I F54Y mutant (**Fig. 1 F**). However, the large effect of the F54Y mutation on the phosphate release rate of actin I (**Fig. 6 D**) suggests that this residue, indeed, may significantly affect the conformation and flexibility of the D-loop.

Together, the above described structural properties may lead to a higher polymerization propensity but also lower filament stability in the parasite actins by lowering the energy barrier of the transition between monomeric and filamentous forms. Yet, the fact that the replacement of the D-loop alone is sufficient for stabilizing the filaments formed by actin I, while retaining their unique symmetry, is surprising, taking into account how similar the D-loops of the two *Plasmodium* actins with different stabilities are. This implies that, starting from an unstable filament forming ancestor, actin II has reached its present form mainly using other means than the D-loop for gaining additional filament stability.

Roles of the two actins *in vivo*

Male gametogenesis is a complex, rapid series of cellular events including escape from the host cell, three mitotic divisions, and axoneme assembly, leading to the formation of eight flagellar and highly motile gametes from each gametocyte within 10–20 min from activation. Both actin isoforms are present in male gametocytes of *P. berghei* [23], but their function in these events is not understood. Actin II is not expressed in the asexual blood stages [23]. Its deletion blocks male gametogenesis, and therefore, these mutant parasites cannot be transmitted through the mosquito [23]. Still, it has not been possible to pinpoint the exact role of actin II. We show that the function of actin II cannot be complemented by actin I, proving distinct molecular functions for the two actins and suggesting that their unique structures and the differences in their ability to form filaments directly translate into different functional characteristics *in vivo*. By generating transgenic parasites expressing the actin I- α -actin chimera, we found that this mutant protein was able to function almost as well as actin II *in vivo*. This strongly confirms the *in vitro* experiments and supports the notion that the D-loop has a significant role in determining the polymerization properties of the parasite actins. Furthermore, we can hypothesize that the reason two actins evolved in *Plasmodium*, was the need to have actins with different propensities to polymerize in cells lacking a large repertoire of actin-binding proteins.

Another example of distinct general and reproductive actin isoforms can be found in plants, where it was recently shown that animal cytoplasmic but not muscle actins can take over the functions of the plant vegetative actins [76]. Remarkably, also three actins from single-celled protists could carry out the same tasks, suggesting that the properties required for fulfilling the cytoplasmic actin functions during spatial development in multicellular organisms were present already early on in the evolutionary history. However, it seems that the polymerization properties of both *Plasmodium* and all other actins have evolved separately, starting from a poorly polymerizing ancestor. It would be interesting to see if either of the *Plasmodium* actins can support spatial development in either plants or animals.

The current hypothesis is that actin I in *Plasmodium* is required for gliding motility, and the filaments involved need to be short and short-lived. Our data support this, as actin I forms only very short polymers. For the suggested role of actin I in gliding, the formation of long, stable filament seems undesirable [69]. Actin II

clearly is able to form long filaments, which may be needed for functions specific to actin II within the mosquito stages, although such functions have not yet been specified. Intriguingly, *Plasmodium* appears to be the only apicomplexan parasite that has faced the evolutionary pressure for acquiring a second actin isoform that forms stable, long filaments.

Concluding remarks

Our data provide a structural basis for understanding the different functional properties of the two actin isoforms of *Plasmodium* spp. These structures represent the, so far, most divergent and primitive actins characterized, and we show that the two isoforms have the most unique biochemical properties, structures, and biological functions of all known actin isoforms. High-resolution structural information will serve as a starting point for understanding these functions in detail and for evaluating the suitability of parasite actins and actin-binding proteins as drug targets.

Materials and Methods

Protein expression, purification, and biochemistry

Purification of G1 was performed as described [40]. Endogenous pig skeletal muscle α -actin was purified as described [36,77]. *P. falciparum* actin I (PlasmoDB PF3D7_1246200) and *P. berghei* actin II (PlasmoDB PBANKA_103010) were expressed in Sf21 cells at 300 K, as described before [36]. A chimera, where residues 40–61 of the *P. berghei* actin I were replaced by the corresponding residues from α -actin, was cloned into pFastBac HT A (Invitrogen) and expressed in the same way as the wild-type actins. Two point mutations (G115A and F54Y) were introduced to actin I by incorporating the corresponding mutation to the 5' end of the primers. The parental plasmid was cleaved with DpnI and recirculated with the T4 DNA ligase. The protein coding sequences were confirmed by DNA sequencing. The purification of the wild-type actin–G1 complexes was performed as described [40]. The chimera–G1 was also purified as described before for the two wild-type actins [40], except that HEPES (pH 7.5) was used in the lysis buffer, and size exclusion chromatography was performed in 10 mM HEPES (pH 7.5), 50 mM NaCl, 5 mM dithiothreitol (DTT), 0.2 mM CaCl₂ and 0.5 mM ATP. Peak fractions containing the chimera–G1 were pooled and concentrated to 5.6 mg ml⁻¹ for crystallization.

The purification of all the actin variants without G1 was performed essentially as described [40] except for a few modifications, as listed. For actin I, the lysis was carried out in 10 mM HEPES (pH 7.5), 5 mM CaCl₂, 250 mM NaCl, 1 mM ATP, 5 mM β -mercaptoethanol, 15 mM imidazole, and size exclusion chromatography was performed in 15 mM HEPES (pH 7.0), 0.5 mM ATP, 5 mM DTT, and 0.2 mM CaCl₂. The pH of the lysis buffer for actin II was 8.7, and size exclusion chromatography was performed in 25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 mM ATP, 5 mM DTT, and 0.2 mM CaCl₂. For the chimera, lysis was carried out in 20 mM HEPES (pH 7.5), 5 mM CaCl₂, 250 mM NaCl, 1 mM ATP, 5 mM β -mercaptoethanol, 15 mM imidazole, and size exclusion chromatography was performed in 15 mM HEPES (pH 7.0), 0.5 mM ATP, 5 mM DTT, and 0.2 mM CaCl₂. For DLS and filament length measurements, size exclusion chromatography was performed in 5 mM HEPES (pH 7.5), 0.5 mM ATP, 2 mM DTT, and 0.2 mM CaCl₂. DLS was measured using a Wyatt DynaPro platerreader-II and 15 or 30 μ l of actin I and II at concentrations between 8.5–24 μ M at 298 K. The measurements were performed in triplicate and the samples stored at room temperature between the measurements.

ADP-actin was prepared by incubating 50 μ l of 10 μ M actin with 1–2 mg of hexokinase-agarose beads (Sigma-Aldrich, #H-2653) in 15 mM HEPES pH 7.5, 1 mM ATP, 1 mM tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP), 0.2 mM CaCl₂, 2 mM D-glucose for 1 h at 298 K. As a control reaction, *Plasmodium* actins I and II were incubated in identical conditions without D-glucose and hexokinase and subsequently run on native PAGE. The residual ATP contamination in ADP stocks was removed by treating them in a similar fashion.

Native PAGE was performed using a running buffer of 25 mM Tris-HCl (pH 8.5), 195 mM glycine, 0.5 mM ATP or ADP, and 0.1 mM CaCl₂ or MgCl₂. The sample buffer consisted of 25 mM Tris-HCl (pH 8.5), 195 mM glycine, 10% (v/v) glycerol (final concentrations). Actin samples were loaded at a concentration of 6.7 μ M in a volume of 10 μ l. Commercial TGX 4–20% gradient gels (Biorad) were pre-run for 30 min at 277 K, 100 V before applying the samples. Samples were run for 7 h using the same voltage settings and temperature, with corresponding nucleotides and divalent cations in the running buffer. The gels were stained the next day with Coomassie Brilliant Blue R250.

Relative mobilities were determined by measuring the distance of the bands from the top of the image and dividing this value by that of the monomeric band. In the absence of a reference monomeric band in ADP-ActI (48 h), the absolute value from ATP-ActI (0 h) was used as a reference. The absolute mobilities of the other visible bands in these images had a difference of <2.5%. Gel images were processed and band intensities extracted using ImageJ [78]. A rolling ball background subtraction was applied before manually extracting the intensities.

Actin samples were prepared for the phosphate release assay by treating 10–15 μ M purified actin with DOWEX 1X8 to remove nucleotides and free phosphate. After the removal of the nucleotide and phosphate, ATP was replenished by adding a small volume of a concentrated stock solution. Buffer controls were treated in a similar fashion, in order to reset the level of free phosphate and nucleotide compared to the samples. The concentration to be used for determining the release rate was measured from the nucleotide-free solutions in order to reduce the effect of pipetting errors. After the DOWEX treatment, samples were divided in triplicate wells of a UV-transparent 96-well plate (Corning) containing reagents from the EnzChek Phosphate Release Assay (Molecular Probes) without using the reaction buffer, which contains MgCl₂ at a final concentration of 1 mM. For calcium measurements, the final reaction contained 1 mM CaCl₂ and 0.1 mM MgCl₂. The total omission of MgCl₂ was not possible, since the coupled enzyme requires magnesium. For magnesium measurements, the respective concentrations were 0.13 mM CaCl₂ and 1 mM MgCl₂. Formation of the 2-amino-6-mercapto-7-methylpurine from the coupled reaction was measured as absorbance at 360 nm with a kinetic interval of 60 s over a period of 5 h at 298 K. The total measurement volume was 200 μ l. Phosphate release rates were calculated from linear parts of the plot (100 to 200 min) using GraphPad PRISM 5.03.

Crystallization, diffraction data collection, structure determination, and refinement

Crystallization and diffraction data collection of both wild-type actin–G1 complexes has been described [40]. The chimera–G1 complex was crystallized similarly, and the final crystallization condition contained 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 8% (w/v) polyethylene glycol (PEG) 20 000, and 2% (v/v) dioxane. Before flash-cooling in liquid nitrogen, the crystal was shortly soaked in 100 mM Tris-HCl (pH 8.5), 14% (w/v) PEG 20 000, 2% (v/v) dioxane, 0.5 mM ATP, 50 mM NaCl, 0.2 mM CaCl₂, and 10% (w/v) PEG

400. A diffraction data set to 2.5-Å resolution was collected on a Pilatus 6M detector at the beamline P11, PETRA III (DESY), Hamburg, using a wavelength of 0.92 Å at 100 K. The data (**Table 1**) were integrated with XDS [79] and scaled with XSCALE [79] using XDSi [80]. The actin II–G1 structure was solved by molecular replacement with Phaser [81] using the α -actin–G1 complex as a search model (PDB code 1P8Z [82]). For actin I–G1 and chimera–G1, the actin II and actin I in complex with gelsolin, respectively, were used as molecular replacement models. The refinement was carried out with PHENIX.refine [83] and manual model building in Coot [84], and structure validation using the MOLPROBITY server [85]. For actin I, actin II, and chimera–G1 complexes, 99.8%, 99.8%, and 99.4% of the amino acids, respectively, were in the allowed regions of the Ramachandran plot. The final electron density maps as well as data and refinement statistics are presented in **Fig. S2 A–C** and **Table 1**. The structure figures were prepared using PyMOL and Chimera [86].

Electron microscopy

Actin (7–13 μ M) was polymerized overnight at room temperature. Polymerization was induced by adding 1/10 volume of 10 \times polymerization buffer [50 mM Tris-HCl (pH 8.0) or HEPES

(pH 7.5), 500 mM KCl, 20 mM MgCl₂ (in cryo-EM 40 mM MgCl₂), 50 mM DTT, and 10 mM ATP] with or without 5–7 μ M JAS. In order to concentrate the filaments, actin II and the chimera in F-buffer were spun for 45 min at 435,000 g, and remaining pellet was resuspended into polymerization buffer. 2–3- μ l aliquots of the samples were diluted in the polymerization buffer before applying them on glow-discharged grids (CF-300CU, Electron Microscopy Sciences) and stained with 1% (w/v) uranyl acetate or potassium phospho-tungstate (pH 7.0). The grids were examined with Tecnai G2 Spirit (100 kV) or FEI Tecnai F20 microscopes (200 kV). Filament lengths were measured using ImageJ [78]. Many of the longest (>1 μ m) measured filaments are fragments, as both ends were not always visible in the images.

Electron cryo-microscopy

Polymerized samples were applied in 3- μ l aliquots onto freshly glow-discharged holey carbon grids (Quantifoil R 2/2) at 295 K and 70% humidity and vitrified in liquid ethane using a Leica EM GP vitrification robot. Specimens were held in a Gatan 626 cryoholder maintained at 93 K for imaging in a FEI Tecnai F20 microscope operated at 200 kV. Micrographs were recorded under low dose conditions on a Gatan Ultrascan 4000 CCD

Table 1. Data collection and refinement statistics.

	Actin I–G1	Actin II–G1	Chimera–G1
Data collection*			
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2	P2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Cell dimensions			
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	40.34, 57.90, 11.59	64.25, 60.91, 75.52	54.24, 69.53, 178.83
α , β , γ (°)	90, 90, 90	90, 97.24, 90	90, 90, 90
Resolution (Å)	45–1.19 (1.25–1.19)	31.9–2.20 (2.25–2.20)	40–2.5 (2.6–2.50)
$R_{meas}^{\#}$	0.126 (1.194)	0.156 (0.786)	0.157 (1.601)
$CC_{1/2}^{\dagger}$	0.999 (0.383)	0.986 (0.568)	0.998 (0.365)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	10.9 (1.07)	5.6 (0.9)	9.2 (0.9)
Completeness (%)	100 (100)	99.4 (95.2)	99.6 (96.9)
Redundancy	7.2 (6.8)	3.6 (2.3)	6.7 (4.1)
Refinement*			
Resolution (Å)	55.2–1.30 (1.35–1.30)	31.91–2.20 (2.28–2.20)	38.58–2.50 (2.60–2.50)
No. reflections	134,201 (13,159)	29,446 (2,810)	22,903 (2,454)
R_{work}/R_{free}	0.121 (0.230)/0.154 (0.263)	0.196 (0.255)/0.228 (0.270)	0.211 (0.412)/0.264 (0.459)
No. atoms			
Protein	4,417	3,940	3,860
Ligand/ion	34	50	40
Water	774	348	56
<i>B</i> factors (Å ²)			
Protein	15.6	36.2	75.0
Ligand/ion	9.7	41.0	69.5
Water	20.6	39.9	51.6
rms deviations			
Bond lengths (Å)	0.011	0.002	0.003
Bond angles (°)	1.45	0.67	0.68

*Values in parentheses are for the highest-resolution shell.

[#] R_{meas} is the redundancy-independent *R* factor [94,95].

[†] $CC_{1/2}$ is defined as the correlation coefficient between two random half data sets [96].

doi:10.1371/journal.ppat.1004091.t001

camera at a magnification of 69,000 to give a final pixel size of 2.21 Å.

Image processing

The contrast transfer function (CTF) of the micrographs was determined using CTFIND [87]. A total of 330 (actin I), 56 (actin II) and 457 (chimera) filaments were selected using e2helixboxer.py from the EMAN2 suite [88]. For classification, segments were excised using a mean step size of 30 Å and an additional random shift along the helix between -15 and 15 Å to avoid high-resolution artifacts in the class average power spectra introduced by regularly shifted images. The segments were further corrected for their CTF by phase flipping, and aligned to the vertical axis. This resulted in 4,581 segments for actin I, 968 for actin II, and 8,052 for the chimera actin. Two-dimensional (2D) classification of helical segments was performed using the SPARX k-means algorithm [27]. The segments were iteratively classified and aligned against a subset of class-averages chosen based on their quality with a total of four iterations. At each cycle, multiple copies of the chosen references were created by applying integer y-shifts ranging from -15 Å to +15 Å in order to be able to reduce the Y-shift search range during alignment to less than half of the step size in order to avoid summation of successive images on a filament shifted at the same axial position. The total number of class averages used to measure the cross-over distance was 40 for actin I and the chimera actin, and 20 for actin II. In addition, Eigen images were calculated and the corresponding pitch distances were measured. For 3D structure determination of actin I filaments, 2,182 segments were excised using a regular step size of 70 Å, convolved by their respective CTF and further reconstructed as described [30] using the software SPRING [89]. In addition, symmetry refinement was performed using the IHRSR method [90] by systematically varying the initial helical rises and azimuthal rotations from 26 to 30 Å (step 1 Å) and from 164 to 170° (step 1°), respectively. More specifically, 25 iterations of refinement were computed with SPIDER, using a solid cylinder of 100 Å in diameter as a starting model. The symmetry parameters were refined with the *hsearch* program after the second refinement iteration, using a step size of 0.03 Å for helical rise and of 0.05° for azimuthal rotation.

Genetic replacement of actin II with actin I in *Plasmodium berghei*

The *actin2* complementation and replacement constructs were made in a derivative of the pL0006 vector, which encodes human DHFR conferring resistance to the drug WR99210 [91,92]. The design of the constructs is described in detail elsewhere [24], and the three different constructs were produced following the same strategy. Briefly, 2.7 kilobase pairs of the promoter and 728 base pairs of the 3'-flanking region of the *P. berghei actin2* gene were amplified from gDNA and cloned into the vector. For the *act2rep* construct, *P. berghei actin I* complete ORF including start and stop codon was amplified from gDNA and cloned between the *actin2* promoter and the 3' flanking region of *actin2*. The same strategy was followed for the *act2com* construct using the *P. berghei actin2* ORF and the *act1chi* construct. The plasmids were linearized before transfection of the recipient *act2⁻::mCherry* parasite line [60]. Parasites were cloned as described [93]. Correct integration was verified by PCR genotyping and Southern blotting. Exflagellation was scored after diluting blood from an infected mouse in exflagellation medium [23] and incubating the samples for 10–20 min at 292 K. The exflagellation events were counted under a light microscope.

Accession numbers

The structure factors and coordinates for all three crystal structures have been submitted to the PDB under the codes 4cbu, 4cbw, and 4cbx. The actin I EM map has been deposited to the EMDB under the accession code EMD-2572.

Online supplemental material

Figure S1 shows an alignment of apicomplexan and canonical actin sequences. **Figure S2** shows the electron density maps around the ATP-binding site of the *Plasmodium* actins and the chimera and the gelsolin complexes for actin I and II in two orientations. **Figure S3** depicts root mean square deviations between *Plasmodium* and canonical actin structures. **Figure S4** shows the cryo-EM analysis of the actin I- α -actin chimera filaments. **Figure S5** shows native PAGE analysis of the *Plasmodium* actins in the calcium-bound form. **Figure S6** shows the DLS analysis of the oligomerization of the parasite actins over time. **Figure S7** shows native gels of the *Plasmodium* actins in the magnesium-bound form. **Video S1** shows an exflagellation event of a male *P. berghei* gametocyte.

Supporting Information

Figure S1 Sequence alignment of selected apicomplexan and canonical actins. The following sequences were used for the alignment: *P. falciparum* actin I (*PfActI*), *P. berghei* actin II (*PbActII*), *T. gondii* actin (*TgAct*), *Dictyostelium discoideum* actin (*DdAct*), *Saccharomyces cerevisiae* actin (*ScAct*), *Arabidopsis thaliana* actin (*AtAct*), *Homo sapiens* skeletal muscle α -actin (*HsAct_alpha_sk*), *H. sapiens* cytoplasmic β -actin (*HsAct_beta_cp*), and *H. sapiens* smooth muscle γ -actin (*HsAct_gamma_sm*). The numbering refers to, and the secondary structure assignment is based on, *P. falciparum* actin I. The black coils indicate α -helices and black arrows β -strands. Residues identical in all sequences are colored blue, and residues in red boxes are either identical or have similar properties. The yellow, pink, and orange highlights denote the D-loop (residues 39–61), the proline-rich loop (residues 109–115), and the hydrophobic loop (residues 263–275), respectively. Residues marked with blue and green stars are those discussed in the text as being involved in intra-protofilament or inter-protofilament contacts, respectively. Cyan stars indicate residues implicated in catalysis and pink ones those discussed in the context of Tyr54 in the D-loop. Trp357 in the hydrophobic cleft is indicated by a black star, the hinge region (prolines 333–334) with orange stars, and Ser366, where the C terminus makes a turn in actin I by a red triangle. (PDF)

Figure S2 Quality of the electron density maps around the ATP-binding sites and visualization of G1 binding to the *Plasmodium* actins. (A) Actin I-G1, (B) actin II-G1, and (C) chimera-G1. The electron density is contoured at 2 σ . ATP and surrounding residues are labeled. (D) Cartoon representation of actin I in complex with G1 (red) superimposed on an α -actin-G1 complex (cyan; 1eqy [39]). Actin is above, gelsolin below, as indicated. The right-hand panel is rotated by 90° compared to the left panel. The hydrophobic loop is indicated in the right panel. (E) Cartoon representation of actin II in complex with G1 (orange) superimposed on α -actin (cyan). The orientation and labeling are as in (D). (TIF)

Figure S3 Root mean square deviations (rmsd) between *Plasmodium* actin and canonical actin structures. The structures were superimposed using the Matchmaker tool in Chimera [86]. The gray-colored ribbons have been excluded from

the rmsd calculation. The color panel below presents the rmsd, which is also highlighted with the thickness of the ribbon. The *Plasmodium* actin structures are compared against each other and canonical muscle and non-muscle actin–G1 complexes (1eqy [39]; rabbit α -actin–G1 and 3cip [72]; *Dictyostelium discoideum* actin–G1). (TIF)

Figure S4 Summary of the symmetry analysis of the actin I– α -actin chimera filaments. (A) Filaments embedded in vitreous ice. (B) Histogram of half-pitch distances from measurements of (C) class averages. (D) Eigen images. (E) Symmetry analysis. (TIF)

Figure S5 Native PAGE analysis. The relative mobility *vs.* log MW (circles) and relative intensities of bands (bars) extracted from gel images of Coomassie-stained native gels containing the ATP forms of *Plasmodium* actin I immediately after purification (A) and actin II 0 and 48 h after purification (B,C). The dark grey bars denote the relative intensity of the bands compared to the most intense band, and the light grey bars the relative intensity of the bands compared to the sum of all band intensities. (TIF)

Figure S6 Hydrodynamic radii and polydispersity of actins I and II over time as measured by dynamic light scattering. (A–D) *P. falciparum* actin I. (E–H) *P. berghei* actin II. The average hydrodynamic radius (in nm) of each species and its standard deviation ($n = 3$) are shown close to the bars in all panels. The larger particles, for which no standard deviations are given, were only observed in one of the triplicate measurements and represent only a very small fraction of the total mass. Note the different (and logarithmic) scale of the X axis in (A–D) compared to (E–H). (TIF)

References

- Pollard TD, Cooper JA (2009) Actin, a central player in cell shape and movement. *Science* 326: 1208–1212.
- Dominguez R, Holmes KC (2011) Actin structure and function. *Annu Rev Biophys* 40: 169–186.
- Herman IM (1993) Actin isoforms. *Curr Opin Cell Biol* 5: 48–55.
- García-Salcedo JA, Pérez-Morga D, Gijón P, Dilbeck V, Pays E, et al. (2004) A differential role for actin during the life cycle of *Trypanosoma brucei*. *EMBO J* 23: 780–789.
- Schüler H, Matuschewski K (2006) *Plasmodium* motility: actin not actin' like actin. *Trends Parasitol* 22: 146–147.
- Sibley LD (1995) Invasion of vertebrate cells by *Toxoplasma gondii*. *Trends Cell Biol* 5: 129–132.
- Heintzelman MB (2006) Cellular and molecular mechanics of gliding locomotion in eukaryotes. *Int Rev Cytol* 251: 79–129.
- Meissner M, Ferguson DJ, Frischknecht F (2013) Invasion factors of apicomplexan parasites: essential or redundant? *Curr Opin Microbiol* 16: 438–444.
- Kuhni-Boghenbor K, Ma M, Lemgruber L, Cyrklaff M, Frischknecht F, et al. (2012) Actin-mediated plasma membrane plasticity of the intracellular parasite *Theileria annulata*. *Cell Microbiol* 14: 1867–1879.
- Shaw MK (1999) *Theileria parva*: sporozoite entry into bovine lymphocytes is not dependent on the parasite cytoskeleton. *Exp Parasitol* 92: 24–31.
- Kudryashev M, Lepper S, Baumeister W, Cyrklaff M, Frischknecht F (2010) Geometric constraints for detecting short actin filaments by cryogenic electron tomography. *PMC Biophys* 3: 6.
- Sidén-Kiamos I, Louis C, Matuschewski K (2012) Evidence for filamentous actin in ookinetes of a malarial parasite. *Mol Biochem Parasitol* 181: 186–189.
- Angrisano F, Riglar DT, Sturm A, Volz JC, Delves MJ, et al. (2012) Spatial localisation of actin filaments across developmental stages of the malaria parasite. *PLoS One* 7: e32188.
- Wetzel DM, Håkansson S, Hu K, Roos D, Sibley LD (2003) Actin filament polymerization regulates gliding motility by apicomplexan parasites. *Mol Biol Cell* 14: 396–406.
- Sahoo N, Beatty W, Heuser J, Sept D, Sibley LD (2006) Unusual kinetic and structural properties control rapid assembly and turnover of actin in the parasite *Toxoplasma gondii*. *Mol Biol Cell* 17: 895–906.
- Schmitz S, Grainger M, Howell S, Calder IJ, Gaeb M, et al. (2005) Malaria parasite actin filaments are very short. *J Mol Biol* 349: 113–125.
- Schüler H, Mueller AK, Matuschewski K (2005) Unusual properties of *Plasmodium falciparum* actin: new insights into microfilament dynamics of apicomplexan parasites. *FEBS Lett* 579: 655–660.
- Skillman KM, Ma CI, Fremont DH, Diraviyam K, Cooper JA, et al. (2013) The unusual dynamics of parasite actin result from isodesmic polymerization. *Nat Commun* 4: 2285.
- Dobrowolski JM, Niesman IR, Sibley LD (1997) Actin in the parasite *Toxoplasma gondii* is encoded by a single copy gene, ACT1 and exists primarily in a globular form. *Cell Motil Cytoskeleton* 37: 253–262.
- Field SJ, Pinder JC, Clough B, Dluzewski AR, Wilson RJ, et al. (1993) Actin in the merozoite of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Cell Motil Cytoskeleton* 25: 43–48.
- Wesseling JG, de Ree JM, Ponnudurai T, Smits MA, Schoenmakers JG (1988) Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of a *Plasmodium falciparum* actin gene. *Mol Biochem Parasitol* 27: 313–320.
- Wesseling JG, Smits MA, Schoenmakers JG (1988) Extremely diverged actin proteins in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 30: 143–153.
- Deligianni E, Morgan RN, Bertuccini L, Kooij TW, Laforge A, et al. (2011) Critical role for a stage-specific actin in male exflagellation of the malaria parasite. *Cell Microbiol* 13: 1714–1730.
- Andreadaki M, Morgan RN, Deligianni E, Kooij TW, Santos JM, et al. (2014) Genetic crosses and complementation reveal essential functions for the *Plasmodium* stage-specific actin2 in sporogonic development. *Cell Microbiol* [pub ahead of print]
- Lindner SE, Swearingen KE, Harupa A, Vaughan AM, Sinnis P, et al. (2013) Total and putative surface proteomics of malaria parasite salivary gland sporozoites. *Mol Cell Proteomics* 12: 1127–1143.
- Schmitz S, Schaap IA, Kleinjung J, Harder S, Grainger M, et al. (2010) Malaria parasite actin polymerization and filament structure. *J Biol Chem* 285: 36577–36585.
- Hohn M, Tang G, Goodyear G, Baldwin PR, Huang Z, et al. (2007) SPARX, a new environment for Cryo-EM image processing. *J Struct Biol* 157: 47–55.
- Fujii T, Iwane AH, Yanagida T, Namba K (2010) Direct visualization of secondary structures of F-actin by electron cryomicroscopy. *Nature* 467: 724–728.

Figure S7 Behavior of *Plasmodium* actins and α -actin in native PAGE in the presence of magnesium and potassium. Native PAGE gels showing *Plasmodium* actins and α -actin in ATP (A, C) and ADP (B, D) forms 0 and 48 h after purification with either 1 mM MgCl₂, 5 mM MgCl₂ and 0.5 mM EGTA, or 5 mM MgCl₂, 0.5 mM EGTA, and 50 mM KCl in the sample. (TIF)

Video S1 Exflagellation of a male gametocyte. The flagellar *P. berghei* male gametes are seen beating rapidly. Images were recorded using a light microscope at 1 frame/s, and the video is playing at 5 frames/s. (AVI)

Acknowledgments

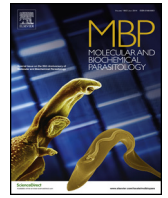
We are grateful to Drs. Ross Douglas, Petri Kursula, Kitsos Louis, and Alex Mogilner for valuable discussions on the manuscript and Dr. Juha Kallio for help with X-ray data collection. We thank Dr. Sarah Butcher and the National Biocenter Finland Cryo-Electron Microscopy Unit as well as the Biocenter Oulu Electron Microscopy Core Facility for use of their facilities and Eevakaisa Vesanen and Dr. Ilkka Miinalainen for skillful technical assistance with preparing and imaging the EM samples. The movie of an exflagellating male gametocyte was provided by Dr. Elena Deligianni. We would also like to acknowledge the access to beam time for crystallographic data collection and excellent user support at MAX-Lab I911-3, BESSY BL14.1, and PETRA III (DESY) P11 beam lines.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JV SPB AD MA EPK SL FF ISK CS IK. Performed the experiments: JV SPB AD MA EPK AI SMM. Analyzed the data: JV SPB AD MA EPK FF ISK CS IK. Contributed reagents/materials/analysis tools: AI SMM SL. Wrote the paper: JV SPB AD EPK FF ISK CS IK.

29. Egelman EH (2000) A robust algorithm for the reconstruction of helical filaments using single-particle methods. *Ultramicroscopy* 85: 225–234.
30. Sachse C, Chen JZ, Coureux PD, Stroupe ME, Fandrich M, et al. (2007) High-resolution electron microscopy of helical specimens: a fresh look at tobacco mosaic virus. *J Mol Biol* 371: 812–835.
31. Kursula I, Kursula P, Ganter M, Panjikar S, Matuschewski K, et al. (2008) Structural basis for parasite-specific functions of the divergent profilin of *Plasmodium falciparum*. *Structure* 16: 1638–1648.
32. Baum J, Tonkin CJ, Paul AS, Rug M, Smith BJ, et al. (2008) A malaria parasite formin regulates actin polymerization and localizes to the parasite-erythrocyte moving junction during invasion. *Cell Host Microbe* 3: 188–198.
33. Wong W, Skau CT, Marapana DS, Hanssen E, Taylor NL, et al. (2011) Minimal requirements for actin filament disassembly revealed by structural analysis of malaria parasite actin-depolymerizing factor 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 9869–9874.
34. Wong W, Webb AI, Olshina MA, Infusini G, Tan YH, et al. (2014) A Mechanism for actin filament severing by malaria parasite actin depolymerizing factor 1 via a low-affinity binding interface. *J Biol Chem* 289: 4043–4054.
35. Sattler JM, Ganter M, Hliscs M, Matuschewski K, Schüller H (2011) Actin regulation in the malaria parasite. *Eur J Cell Biol* 90: 966–971.
36. Ignatov A, Bhargav SP, Vahokoski J, Kursula P, Kursula I (2012) The lasso segment is required for functional dimerization of the *Plasmodium* formin 1 FH2 domain. *PLoS ONE* 7: e33586.
37. Schüller H, Mueller AK, Matuschewski K (2005) A *Plasmodium* actin-depolymerizing factor that binds exclusively to actin monomers. *Mol Biol Cell* 16: 4013–4023.
38. Singh BK, Sattler JM, Chatterjee M, Huttu J, Schüller H, et al. (2011) Crystal structures explain functional differences in the two actin depolymerization factors of the malaria parasite. *J Biol Chem* 286: 28256–28264.
39. McLaughlin PJ, Gooch JT, Mannherz HG, Weeds AG (1993) Structure of gelsolin segment 1-actin complex and the mechanism of filament severing. *Nature* 364: 685–692.
40. Bhargav SP, Vahokoski J, Kumpula EP, Kursula I (2013) Crystallization and preliminary structural characterization of the two actin isoforms of the malaria parasite. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 69: 1171–1176.
41. Matsuura Y, Stewart M, Kawamoto M, Kamiya N, Saeiki K, et al. (2000) Structural basis for the higher Ca(2+)-activation of the regulated actin-activated myosin ATPase observed with *Dicystelium/Tetrahymena* actin chimeras. *J Mol Biol* 296: 579–595.
42. Dominguez R (2004) Actin-binding proteins—a unifying hypothesis. *Trends Biochem Sci* 29: 572–578.
43. Schutt CE, Myslik JC, Rozycki MD, Goonesekere NC, Lindberg U (1993) The structure of crystalline profilin-beta-actin. *Nature* 365: 810–816.
44. Galkin VE, Orlova A, Schröder GF, Egelman EH (2010) Structural polymorphism in F-actin. *Nat Struct Mol Biol* 17: 1318–1323.
45. Murakami K, Yasunaga T, Noguchi TQ, Gomibuchi Y, Ngo KX, et al. (2010) Structural basis for actin assembly, activation of ATP hydrolysis, and delayed phosphate release. *Cell* 143: 275–287.
46. Oda T, Maeda Y (2010) Multiple Conformations of F-actin. *Structure* 18: 761–767.
47. Holmes KC, Popp D, Gebhard W, Kabsch W (1990) Atomic model of the actin filament. *Nature* 347: 44–49.
48. Oda T, Iwasa M, Aihara T, Maeda Y, Narita A (2009) The nature of the globular- to fibrous-actin transition. *Nature* 457: 441–445.
49. Otterbein LR, Graceffa P, Dominguez R (2001) The crystal structure of uncomplexed actin in the ADP state. *Science* 293: 708–711.
50. Morton WM, Ayscough KR, McLaughlin PJ (2000) Latrunculin alters the actin-monomer subunit interface to prevent polymerization. *Nat Cell Biol* 2: 376–378.
51. Spector I, Shochet NR, Kashman Y, Groweiss A (1983) Latrunculins: novel marine toxins that disrupt microfilament organization in cultured cells. *Science* 219: 493–495.
52. Strzelecka-Golaszewska H, Mossakowska M, Wozniak A, Moraczewska J, Nakayama H (1995) Long-range conformational effects of proteolytic removal of the last three residues of actin. *Biochem J* 307: 527–534.
53. Pfäendner J, Branduardi D, Parrinello M, Pollard TD, Voth GA (2009) Nucleotide-dependent conformational states of actin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 12723–12728.
54. Pfäendner J, Lyman E, Pollard TD, Voth GA (2010) Structure and dynamics of the actin filament. *J Mol Biol* 396: 252–263.
55. Khaitlina SY, Strzelecka-Golaszewska H (2002) Role of the DNase-I-binding loop in dynamic properties of actin filament. *Biophys J* 82: 321–334.
56. Kuznetsova I, Antropova O, Turoverov K, Khaitlina S (1996) Conformational changes in subdomain I of actin induced by proteolytic cleavage within the DNase I-binding loop: energy transfer from tryptophan to AEDANS. *FEBS Lett* 383: 105–108.
57. Vorobiev S, Strokopytov B, Drubin DG, Frieden C, Ono S, et al. (2003) The structure of nonvertebrate actin: implications for the ATP hydrolytic mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 5760–5765.
58. Wegner A (1976) Head to tail polymerization of actin. *J Mol Biol* 108: 139–150.
59. Atri AK, Lewis MS, Korn ED (1991) The formation of actin oligomers studied by analytical ultracentrifugation. *J Biol Chem* 266: 6815–6824.
60. Kooij TW, Rauch MM, Matuschewski K (2012) Expansion of experimental genetics approaches for *Plasmodium berghei* with versatile transfection vectors. *Mol Biochem Parasitol* 185: 19–26.
61. de Boer PA, Crossley RE, Rothfield LI (1992) Roles of MinC and MinD in the site-specific septation block mediated by the MinCDE system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 174: 63–70.
62. RayChaudhuri D, Park JT (1992) *Escherichia coli* cell-division gene *ftsZ* encodes a novel GTP-binding protein. *Nature* 359: 251–254.
63. Mukherjee A, Dai K, Lutkenhaus J (1993) *Escherichia coli* cell division protein FtsZ is a guanine nucleotide binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 1053–1057.
64. Bork P, Sander C, Valencia A (1992) An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin, and hsp70 heat shock proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 7290–7294.
65. Escalante AA, Ayala FJ (1995) Evolutionary origin of *Plasmodium* and other *Apicomplexa* based on rRNA genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 5793–5797.
66. Mitchison TJ (1995) Evolution of a dynamic cytoskeleton. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 349: 299–304.
67. Schüller H, Karlsson R, Schutt CE, Lindberg U (2006) The connection between actin ATPase and polymerization. *Advances in Molecular and Cell Biology* 37: 49–65.
68. van den Ent F, Amos LA, Lowe J (2001) Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton. *Nature* 413: 39–44.
69. Skillman KM, Diraviyam K, Khan A, Tang K, Sept D, et al. (2011) Evolutionarily divergent, unstable filamentous actin is essential for gliding motility in apicomplexan parasites. *PLoS Pathog* 7: e1002280.
70. Durer ZA, Kudryashov DS, Sawaya MR, Altenbach C, Hubbell W, et al. (2012) Structural states and dynamics of the D-loop in actin. *Biophys J* 103: 930–939.
71. Pace CN, Horn G, Hebert EJ, Bechert J, Shaw K, et al. (2001) Tyrosine hydrogen bonds make a large contribution to protein stability. *J Mol Biol* 312: 393–404.
72. Baek K, Liu X, Ferron F, Shu S, Korn ED, et al. (2008) Modulation of actin structure and function by phosphorylation of Tyr-53 and profilin binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 11748–11753.
73. Jungbluth A, Eckerskorn C, Gerisch G, Lottspeich F, Stocker S, et al. (1995) Stress-induced tyrosine phosphorylation of actin in *Dicystelium* cells and localization of the phosphorylation site to tyrosine-53 adjacent to the DNase I binding loop. *FEBS Lett* 375: 87–90.
74. Liu X, Shu S, Hong MS, Yu B, Korn ED (2010) Mutation of actin Tyr-53 alters the conformations of the DNase I-binding loop and the nucleotide-binding cleft. *J Biol Chem* 285: 9729–9739.
75. Kameyama K, Kishi Y, Yoshimura M, Kanzawa N, Sameshima M, et al. (2000) Tyrosine phosphorylation in plant bending. *Nature* 407: 37.
76. Kandasamy MK, McKinney EC, Roy E, Meagher RB (2012) Plant vegetative and animal cytoplasmic actins share functional competence for spatial development with protists. *Plant Cell* 24: 2041–2057.
77. Pardec JD, Spudich JA (1982) Purification of muscle actin. *Methods Enzymol* 85 Pt B: 164–181.
78. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9: 671–675.
79. Kabsch W (2010) XDS. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66: 125–132.
80. Kursula P (2004) XDS: a graphical interface for the data processing program XDS. *Journal of applied crystallography* 37: 347–348.
81. McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD, Winn MD, Storoni LC, et al. (2007) Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr* 40: 658–674.
82. Irobi E, Burtnick LD, Urosov D, Narayan K, Robinson RC (2003) From the first to the second domain of gelsolin: a common path on the surface of actin? *FEBS Lett* 552: 86–90.
83. Afonine PV, Grosse-Kunstleve RW, Echols N, Headd JJ, Moriarty NW, et al. (2012) Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 68: 352–367.
84. Emsley P, Cowtan K (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60: 2126–2132.
85. Chen VB, Arendall WB, Headd JJ, Keedy DA, Immormino RM, et al. (2010) MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66: 12–21.
86. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, et al. (2004) UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25: 1605–1612.
87. Mindell JA, Grigorieff N (2003) Accurate determination of local defocus and specimen tilt in electron microscopy. *J Struct Biol* 142: 334–347.
88. Tang G, Peng L, Baldwin PR, Mann DS, Jiang W, et al. (2007) EMAN2: an extensible image processing suite for electron microscopy. *J Struct Biol* 157: 38–46.
89. Desfosses A, Ciuffa R, Gutsche I, Sachse C (2014) SPRING - An image processing package for single-particle based helical reconstruction from electron cryomicrographs. *J Struct Biol* 185: 15–26.
90. Egelman EH (2010) Reconstruction of helical filaments and tubes. *Methods Enzymol* 482: 167–183.
91. de Koning-Ward TF, Fidock DA, Thathy V, Menard R, van Spaendonck RM, et al. (2000) The selectable marker human dihydrofolate reductase enables sequential genetic manipulation of the *Plasmodium berghei* genome. *Mol Biochem Parasitol* 106: 199–212.
92. Billker O, Dechamps S, Tewari R, Wenig G, Franke-Fayard B, et al. (2004) Calcium and a calcium-dependent protein kinase regulate gamete formation and mosquito transmission in a malaria parasite. *Cell* 117: 503–514.

93. Janse CJ, Ramesar J, Waters AP (2006) High-efficiency transfection and drug selection of genetically transformed blood stages of the rodent malaria parasite *Plasmodium berghei*. *Nat Protoc* 1: 346–356.
94. Diederichs K, Karplus PA (1997) Improved R-factors for diffraction data analysis in macromolecular crystallography. *Nat Struct Biol* 4: 269–275.
95. Weiss MS, Hilgenfeld R (1997) On the use of the merging R factor as a quality indicator for X-ray data. *Journal of applied crystallography* 30: 203–205.
96. Karplus PA, Diederichs K (2012) Linking crystallographic model and data quality. *Science* 336: 1030–1033.



Global expression profiling reveals shared and distinct transcript signatures in arrested *act2(-)* and *CDPK4(-)* *Plasmodium berghei* gametocytes

Maria Andreadaki^{a,b}, Hans-Joachim Mollenkopf^c, Frantzeska Nika^{a,b}, Declan Brady^d, Rita Tewari^d, Kai Matuschewski^{c,e}, Inga Siden-Kiamos^{a,*}

^a Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Foundation for Research and Technology - Hellas, Heraklion, Greece

^b Department of Biology, University of Crete, Heraklion, Greece

^c Max Planck Institute for Infection Biology, Berlin, Germany

^d Centre for Genetics and Genomics, School of Life Sciences, Queens Medical Centre, University of Nottingham, Nottingham, UK

^e Institute of Biology, Humboldt University, Berlin, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 January 2015

Received in revised form 13 July 2015

Accepted 16 July 2015

Available online 26 July 2015

Keywords:

Malaria
Mosquito
Gametogenesis
Transcriptome
Whole genome microarray

ABSTRACT

Gametocytogenesis and gametogenesis in malaria parasites are complex processes of cell differentiation and development likely involving many gene products. Gametocytes develop in the blood of the vertebrate host but mature gametocytes are not activated until taken up by the mosquito vector. Several distinct mutants have been described that block gametogenesis but the detailed molecular causes for the mutant phenotypes are not understood. To investigate whether a block in gametogenesis also results in a changed transcriptional profile we studied two gene deletions mutants; *act2(-)* lacking stage-specific actin II and *CDPK4(-)* lacking calcium-dependent protein kinase 4. Whole genome microarray analysis was performed from RNA of mature gametocytes to compare the transcriptomes of the mutants with wild-type *Plasmodium berghei*. The microarray analysis identified ~12% of all genes being differentially expressed in either or both mutants compared to normal gametocytes, as defined by at least two-fold change in transcript abundance. A large proportion of the differentially expressed genes overlapped in the two mutants, consistent with a related outcome of gametocyte arrest. Distinct profiles in each mutant were also observed. Among the down-regulated genes were thioredoxin 2 and members of the merozoite surface protein 7 family. Generation and characterization of a *msp7-⁻/mspr1⁻/mspr2⁻* triple mutant and re-analysis of *trx2⁻* parasites revealed no impairment of life cycle progression. Together, our analysis provides a resource for molecular signatures of *Plasmodium berghei* gametogenesis and exemplifies the potential of expression profiling of distinct genetically arrested parasites.

© 2015 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

In the malaria parasite *Plasmodium berghei*, gametocytogenesis is initiated in the rodent host (for a detailed review on the sexual stages see [1]). Sexually committed trophozoites differentiate into gametocytes that can first be distinguished by morphological and molecular criteria at ~16 h after invasion of the red blood cell. Roughly 10 h later, mature gametocytes circulating in the blood are ready to be transmitted to the mosquito in a blood meal.

* Corresponding author at: Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Foundation for Research and Technology - Hellas N. Plastira 100, Vassilika Vouton, GR-700 13 Heraklion, Crete, Greece. Fax: +30 2810 391104.

E-mail address: inga@imbb.forth.gr (I. Siden-Kiamos).

Immediately after uptake, male and female gametocytes egress from the host cell. In the male, gametocytes undergo additional steps before release of eight male flagellar gametes from each gametocyte [2]. These are the result of three mitotic divisions of the haploid genome and the assembly of eight axonemes. The flagellar gametes exit the cell, locate and enter the female gametes leading to formation of the zygote. These events are essential for establishment of an infection in mosquitoes.

The very rapid events during gametogenesis are not well understood although a number of *P. berghei* mutants have been described which results in partial or complete block of gametogenesis [3–11]. Of these, *CDPK4(-)* is lacking calcium dependent protein kinase 4 (CDPK4) that controls early events during male gametogenesis [4]. In its absence mitotic divisions are blocked and axonemes are no longer formed. However, egress of the gametocytes from the

host cells is not affected. Another mutant, lacking stage-specific actin II [5], is blocked in male gametogenesis at a later stage. In this mutant, mitotic divisions take place normally and axonemes assemble but they remain immotile. In addition the male gametocytes are trapped within the host cell. Importantly, neither of the two genes is thought to be directly involved in transcriptional regulation.

Preliminary experiments during the course of investigation of the actin II knockout mutant surprisingly indicated that transcript levels of some genes were altered in this mutant. We reasoned that the mutation may have an indirect effect on transcription and that transcriptional profiles will likely represent the steady state transcript levels at the time of developmental arrest. We therefore performed a whole genome microarray analysis of samples derived from gametocytes of WT and *act2(-)* mutant parasites. We also included in our analysis the *CDPK4(-)* mutant, reasoning that the two mutants that arrest at different time points in male gamete maturation could have common and distinct effects. Therefore, the analysis could possibly define sequential expression profiles and reveal common processes in gametocytes.

2. Materials and methods

2.1. Ethics statement

All animal work was carried out in strict compliance with the Greek Presidential Decree 56/2013 implementing the EU Directive 2010/63/EE on the protection of animals used for scientific purposes. The protocol has been approved by Committee for Evaluation of Research Protocols at FORTH (protocol number 6740/08/10/2014 to Inga Siden-Kiamos).

2.2. Parasites and parasitology methods

WT parasites were *P. berghei* strains ANKA 2.34 and WT-GFP [12]. The *act2(-)* and *CDPK4(-)* mutant parasites have been previously described [4,5], as well as the *trx2⁻* mutant [13]. *P. berghei* parasites were maintained in Theiler's Original mice. Gametocytes were isolated from sulfadiazine treated mice [14] using the method described in [5]. The samples were monitored using Giemsa stained blood smears and immunolabelling using the NAP antibody (previously called SET) [15]. Only samples, which contained <1% asexual blood stages and <2% activated gametocytes as determined by the NAP immunolabelling, were included in the analysis.

2.3. Preparation of RNA

Total RNA was isolated with TRIzol (Life Technologies) according to the supplier's protocol using Glycogen as carrier. Quality control and quantification of total RNA was assessed using an Agilent 2100 Bioanalyzer with a RNA Nano 6000 microfluidics kit (Agilent Technologies) and a NanoDrop 1000 UV–vis spectrophotometer (Kisker).

2.4. Microarray analysis

Microarray experiments were performed as dual-color hybridizations. In order to compensate dye specific effects and to ensure statistically relevant data, color-swap dye-reversal hybridizations were performed [16]. RNA labeling was done with a two-color Quick Amp Labeling Kit according to the supplier's recommendations (Agilent Technologies). In brief, mRNA was reverse transcribed and amplified using an oligo-dT-T7 promoter primer, and labeled with Cyanine 3-CTP or Cyanine 5-CTP. After precipitation, purification, and quantification, 1.25 µg of each labeled cRNA was fragmented and hybridized to custom designed

P. berghei whole genome 4 × 44 K multipack microarrays (Design ID Agilent-024169) according to the manufacturer's protocol (Agilent Technologies). Scanning of microarrays was performed with 5 µm resolution using a G2565CA high-resolution laser microarray scanner (Agilent Technologies) with XDR extended range. Microarray image data were analyzed and extracted with the Image Analysis/Feature Extraction software G2567AA v. A.11.0.1.1 (Agilent Technologies) using default settings and the protocol GE2.1100.Jul11. The extracted MAGE-ML files were subsequently analyzed with the Rosetta Resolver, Build 7.2.2 SP1.31 (Rosetta Biosoftware). Ratio profiles comprising single hybridizations were combined in an error-weighted fashion to create ratio experiments. A 1.5-fold change expression cut-off for ratio experiments was applied together with anti-correlation of ratio profiles, rendering the microarray analysis highly significant ($P < 0.01$), robust, and reproducible. The data discussed in this publication have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus and are accessible through GEO Series accession numbers GSE65032 and GPL19614.

2.5. Real time PCR

RNA was isolated from whole blood using the TRI Reagent BD according to manufacturer's instructions (Sigma). The resulting RNA was treated with DNase I (Promega) and cleaned up using the RNeasy MinElute Clean up Kit (Qiagen). 2 µg of total RNA was used in reverse transcription reactions (Thermoscript RT-PCR System, Invitrogen). Gene expression was quantified by SYBR green PCR using KAPA SYBR FAST qPCR Kit Master Mix (2x) ABI Prism. qPCR for each sample was carried out in triplicates. The relative quantification in mutant lines was determined using the Pfaffl mathematical model [17]. All data were normalized to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA levels [18]. The following primers were used: *nap* (forward TATAATTAAGACTATATGTAATATCC-CAGTT, reverse AATTCGAAATAAATTTGCATTTTCTGGAATATTTTC), *mdv1* (forward TATGTAGGTTAAAAGCCGAGACTTA, reverse CAATTTCTTCTCAGGGTCTTCATCG), *gapdh* (forward AATTAAGAAGCATCTGAGGGTCCAC, reverse TTGAATATCCCCATTTCATTGTCATACC), *map2* (forward TTTAAGCATGCAAAATGATGATAGCACATA, reverse TCTCGGATGCATTGTATTCTTTTTTCG), *cdpk4* (forward GGATGTCCAC-CITTTAATGGATCTAA, reverse TCTTGCTGATATTCTCACAGCACTT), *gest* (forward TCTTGAAATGGTGACACAGTTCCGA, reverse TATTTACGCGTCATTCTCAAGAAGAG).

2.6. Construction and genotypic analysis of triple knockout (Δ triplemsp7) parasites

The gene knockout targeting vector for the triple knockout lacking *msrp1*, *msp7* and *msrp2* was constructed using the pBS-HFDR vector with a polylinker site flanking a *T. gondii dhfr/ts* expression cassette conveying resistance to pyrimethamine (Supplementary Fig. 1A). PCR primers N0461 (5'-CCCCGGCCCCGACTCTCAATACTAGGTATAAGGTACAG-3') and N0462 (5'-GGGGAAGCTTTTTTTTAAACAAAATTGAGAAAAAATAATA-3') were used to generate a 937 bp fragment of 5' upstream sequence (immediately upstream of the ATG start codon) of *msrp1* from genomic DNA, which was inserted into Apal and HindIII restriction sites upstream of the *dhfr/ts* cassette of pBS-DHFR. A 895 bp fragment generated with primers N0463 (5'-CCCCGAATTCTGTTTAATCGCTTATTTTCATTTATC-3') and N0464 (5'-GGGGTCTAGAGATTTATTAGCAGAAGCTCAAATTGTTG-3') from the 3' flanking region of *msrp2* was then inserted downstream of the *dhfr/ts* cassette using EcoRI and XbaI restriction sites. The linear targeting sequence was released using Apal/XbaI. *P. berghei* ANKA line 2.34 was then transfected by electroporation [12]. Briefly,

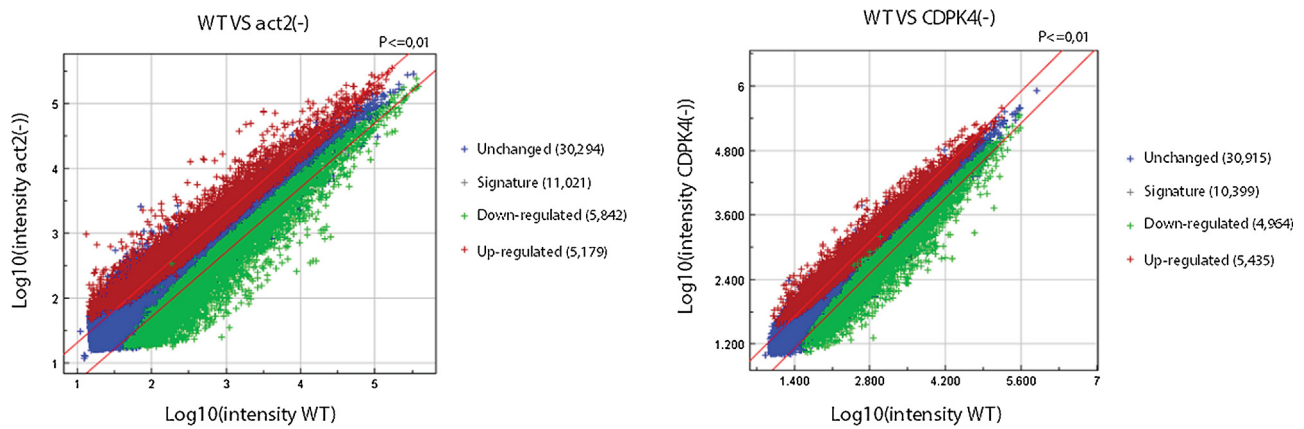


Fig. 1. Summary of microarray expression profiling data. Scatterplots of log-intensity values of wild-type (WT) versus *act2(-)* (left) and of WT versus *CDPK4(-)* (right). Color coding denotes unchanged (blue), signature (grey), downregulated (green), and upregulated (red). The number of reporters for each category is shown to the right. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

electroporated parasites were mixed immediately with 100 μ l of reticulocyte-rich blood from a phenylhydrazine (Sigma) treated, naïve mouse, incubated at 37 °C for 20 min and then injected intraperitoneally. From day 1 post infection pyrimethamine (70 μ g/ml) (Sigma) was supplied in the drinking water for four days. Mice were monitored for 15 days and drug selection was repeated after passage to a second mouse. Resistant parasites were then used for cloning by limiting dilution and subsequent genotyping.

Four diagnostic PCR reactions were used (Supplementary Fig. 1B). Primer 1 (IntN46 5'- CCTAACAGGTTTAAACACGAAGAAAAG-3') and primer 2 (248 5'- GATGTGTTATGTGATTAATTCATACAC-3') were used to determine if successful integration of the selectable marker at the targeted locus had occurred. Primers 3 (N55 KO1 5'- GACATACCTAACGATTCAAATGACATAAGC-3') and primer 4 (N55 KO2 5'- GGGCTTAGTATATTTATTACACCATCTTC-3') were used to verify deletion of *msrp1*, primer 5 (MSP7 KO1 5'- CCAAATTGATCAAATGAACAAATATGAAAAGG-3') and primer 6 (MSP7 KO2 5'-GTTCAATTAAGAATCTCATCAAAAATGTGCC-3') were used to verify deletion of *msp7* and primer 7 (N54 KO1 5'- ACAATGACGAAGTGAAGGAATGCCGAACC-3') and primer 8 (N54 KO2 5'- GGAGGGATGCTGGAGCAGGTGGTGGTG-3') were used to verify deletion of *msrp2*.

3. Results

3.1. Global expression profiling in arrested *act2(-)* and *CDPK4(-)* gametocytes by microarray

For the microarray analyses, mice were infected with wild-type (WT) and the two mutant parasite lines. Two biological replicates from independent infections of each strain were included in the analyses. Infected mice were treated with sulfadiazine [14], to eliminate the asexual stages, while leaving gametocytes unaffected. Only samples that had <1% asexual blood stages, as determined by Giemsa staining of blood smears, were included for further analysis. The gametocytes were purified using Nycodenz gradient centrifugation. All samples were verified by immunolabeling with the NAP/SET antibody, which is indicative of activated male gametocytes [15]. This test excluded that the gametocytes had been inadvertently activated during purification, as it has been shown that activation leads to a change in the transcriptional profile [19]. RNA was extracted and used for the microarray experiments employing dual colour labeling.

Microarrays were custom-designed and had a "tiling like" design with 36,025 custom designed and 5198 *P. berghei*

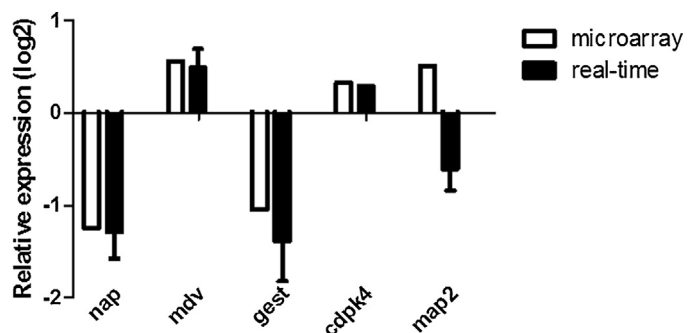


Fig. 2. Quantitative real-time PCR confirms the microarray data. Y-axis indicates the Log₂ relative fold change expression between *act2(-)* and WT using real-time PCR compared to the results from the microarray analysis. The selected genes were *nap* ($n = 4$), *mdv1* ($n = 6$), *Pbgest* ($n = 4$), *cdpk4* ($n = 1$) and *map2* ($n = 3$). Data are presented as means of all experiments. Error bar for RT-PCR data represent S.E.M.

reporters representing the whole genome sequence. For each gene, values of several reporters were combined to quantify expression levels. The first screening of the results was done on reporter level.

The dual color expression profiling data are displayed in scatter plots, where the log-intensity in the WT sample are plotted against the log-intensities in the *act2(-)* and *CDPK4(-)* samples (Fig. 1). In both scatterplots the majority of reporters are centered along the diagonal axis, indicative of the overall very good precision of the analyses. ~30% of reporters display different expression signatures (Fig. 1). The ratio between the up- and down-regulated reporters was 1.1 and 0.89 for *CDPK4(-)* and *act2(-)* parasites, respectively.

3.2. Validation of expression profiling by qRT-PCR

We next validated the microarray experiments by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) using RNA from *act2(-)* and WT gametocytes (Fig. 2). We selected five genes with reported critical functions during gametogenesis, *nap* (PBANKA.081990), *mdv1* (PBANKA.143220), *gest* (PBANKA.131270), *map2* (PBANKA.093370) and *cdpk4* (PBANKA.061520).

The change in gene expression comparing WT and *act2(-)* were calculated from the qRT-PCR values using a standard mathematical model [17] and the results are represented as relative expression. Comparing the qRT-PCR and microarray data, we observed similar expression profiles for four out of the five selected genes. *map2* transcripts were slightly, but significantly, decreased in the *act2(-)* when measured by qRT-PCR while the microarray results showed a small increase, i.e., <1.5 fold change. *nap* and *gest* expression were

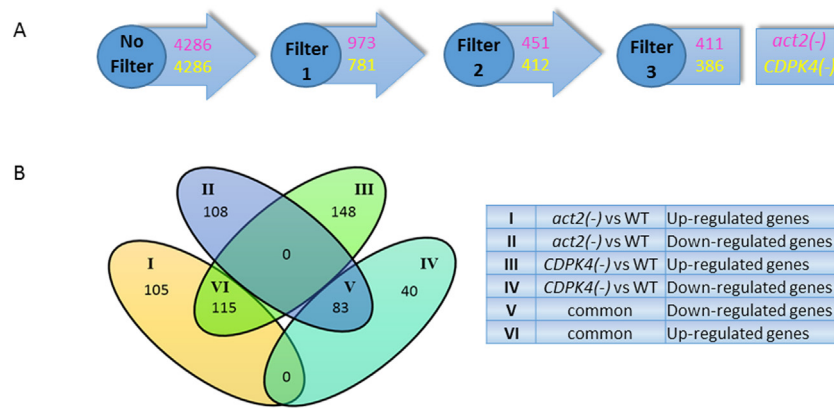


Fig. 3. Analysis of the transcriptomes. (A). Data filtering. The flowchart illustrates the number of genes in *act2(-)* (pink) and *CDPK4(-)* (yellow) after the application of each filter. Filter 1: fold change ≥ 2 , Filter 2: p -value ≤ 0.01 , Filter 3: exclusion of *P. berghei* interspersed repeats (BIR) and genes involved in ribosome and tRNA synthesis. (B). Comparison of differential gene expression patterns of the two knock-out mutants. The six groups of the Venn diagram represent the common (intersections) and unique numbers of up-regulated and down-regulated genes between *act2(-)* and *CDPK4(-)* versus WT gametocytes. Each group is depicted with different color and Latin number. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

consistently decreased in *act2(-)* gametocytes, while *mdv-1* and *cdpk4* showed an up-regulation by both methods.

3.3. Identification and characterization of genes differentially regulated in the mutants

For systematic comparison between WT and the *act2(-)* and *CDPK4(-)* gametocytes we applied thresholds, including 3 filters (Fig. 3A). First, an expression cut-off of twofold change was applied. Next, only genes which had significant P -values ($P \leq 0.01$) were included in the analysis. We excluded *P. berghei* interspersed repeats (BIR), and genes involved in ribosome and tRNA synthesis. The result of this filtering yielded a total of 411 and 386 genes that were differentially expressed in the *act2(-)* and *CDPK4(-)* mutants, respectively. The total number was 599, after removing 198 genes which were present in both datasets.

Comparisons of the genes of both knock-out mutants fulfilling these criteria are presented in a Venn diagram (Fig. 3B). This analysis revealed a substantial overlap of up- and down-regulated genes in both mutants, most likely due to the developmental arrest prior to male exflagellation. 83 genes were down-regulated in *act2(-)* and *CDPK4(-)* parasites, 115 genes were up-regulated in both mutants, reflecting 52% and 44% of all up-regulated transcripts in *act2(-)* and *CDPK4(-)* parasites, respectively. In *act2(-)* arrested gametocytes mutant, 105 and 108 genes were specifically up- and down-regulated, respectively. Similarly, in *cdpk4(-)* gametocytes, the transcription of 148 and 40 distinct genes were increased and decreased, respectively. These genes might be representative of the consecutive arrests with *cdpk4(-)* parasites arresting earlier than *act2(-)* mutants.

To further analyze the complete dataset of the 599 differentially expressed genes we made use of the annotation in the *Plasmodium* genomics database [20]. Functional annotation was available for 29% of all genes comparable to the whole genome analysis for which 2781 (56%) genes had functional annotation [21]. A search of the annotated GO process was carried out for each gene in the data-lists. For 71% of the genes in both knock-out mutants, annotations are lacking completely, reflecting the current lack of understanding gene function in malaria parasites. These are referred to as genes with unknown processes.

For genes with known processes 101 different terms were found. Therefore, we simplified the results by organizing the data in 9 different classes based on the GO ancestor's terms of the known processes (Fig. 4A and B). The classification was done in the six groups of the Venn diagram. The major classes

of up-regulated genes were “protein metabolic process” and “nucleobase-containing compound metabolic process” in both knock-out mutants. In contrast, the dominant classes of down-regulated genes are “gene expression” and “transport”. The number of down-regulated genes with a GO annotation was more pronounced in the *act2(-)* mutant, but this may simply reflect the fact that much fewer genes were found down-regulated in the *CDPK4(-)* mutant (108 and 40, respectively).

A classification based on the annotated GO component was also performed. The percentage of genes with unknown annotated GO term is $\sim 80\%$. Screening the genes with known component, a total of 46 different terms was found, which could be assigned to 11 classes. However, as few genes were annotated only 5 and 3 classes are shown in Fig. 4C and D. The major class is “membrane” in both knock-out mutants. Again we noted that the *act2(-)* mutant was over-represented among the down-regulated genes in comparison to the *CDPK4(-)* mutant.

3.4. Biological functions of down-regulated genes

A more detailed analysis was performed on the 50 genes with the greatest decrease of expression in *act2(-)* and *CDPK4(-)*, respectively. As expected, *cdpk4* was the most highly down-regulated in the cognate mutant but not further included in the analysis. The pooled genes were divided in three categories: (1) genes which were found among the 50 top hits in both datasets (24 genes), (2) genes which were not found in the top hits in the other mutant but still present in the list of down-regulated genes (*act2(-)* 11 genes; *cdpk4(-)* 13 genes), and (3) genes which were not found in the down-regulated genes in the other mutant (*act2(-)* 15 genes, *cdpk4(-)* 13 genes). Thus, 76 genes were uniquely represented in the pooled data. Comparing the fold down-regulation of the *act2(-)* genes with that of *CDPK4(-)*, restricted to the categories 1 and 2 above, did not reveal any correlation between the two mutants. This was especially noticeable for genes, which had the largest difference in expression compared to WT (Fig. 5A). We used recent RNAseq data [21] to characterize the mRNA expression profiles of the 64 genes, for which transcription data were available. We categorized peak expression of each gene in ring stages, trophozoites, schizonts, gametocytes or ookinetes, the stages for which RNAseq data are currently available. 75% of the genes have a peak of expression in the asexual stages (Fig. 5B).

Functional annotation for each encoded protein was then extracted from the *Plasmodium* database [20]. Of the 76 genes with decreased expression, 26 genes were annotated as coding

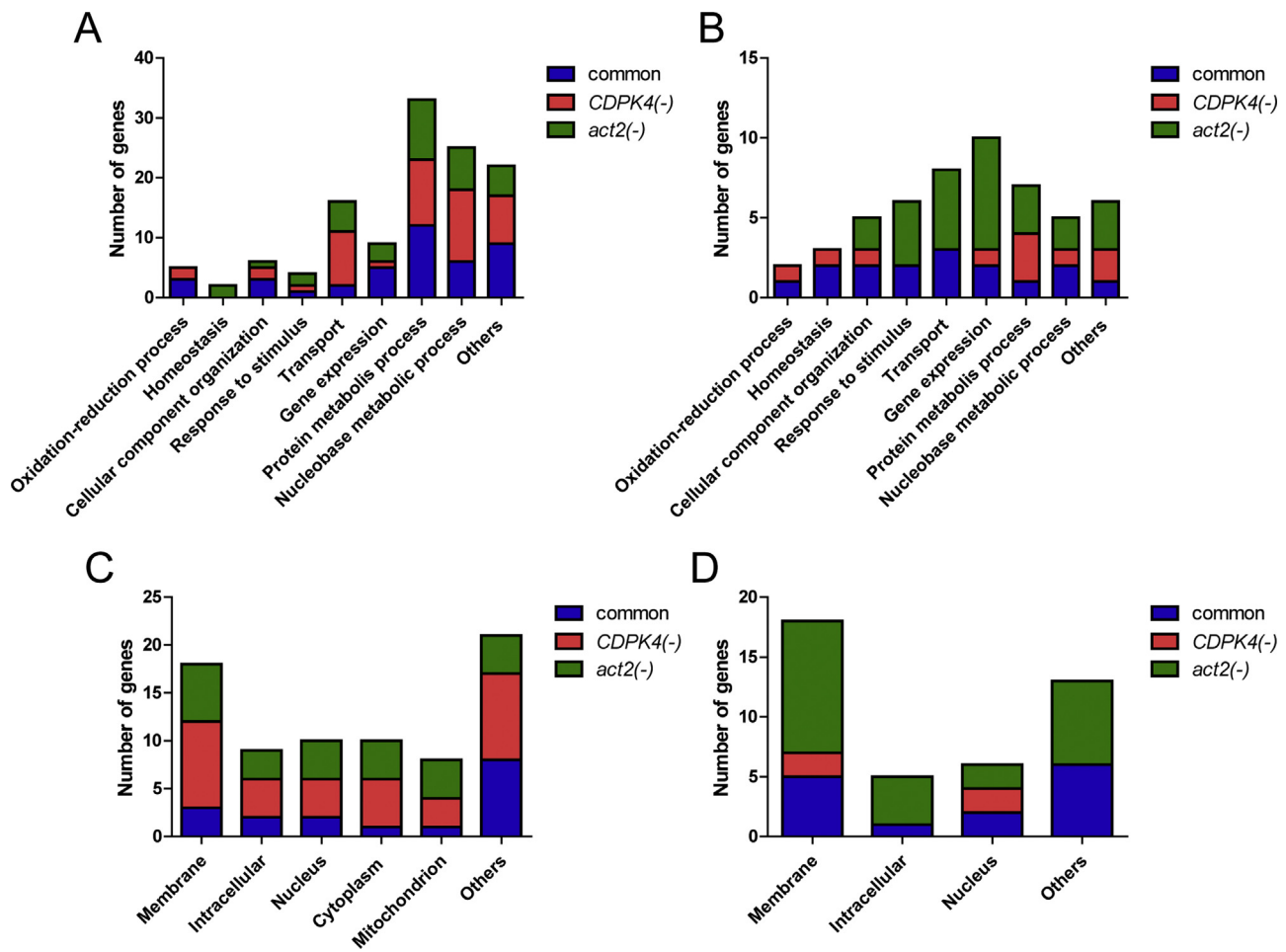


Fig. 4. Gene ontology (GO) analysis of differentially expressed genes. (A, B) Gene ontology analysis based on the annotated GO process. The differentially expressed genes were categorized in 9 different classes. The classification was separate for each group in in the Venn diagram: genes found in both datasets (common, blue), differentially regulated in *act2(-)* (green) or in *CDPK4(-)* (red), respectively. Shown are numbers of up-regulated (A) and down-regulated (B) genes in each class. (C, D) Gene ontology (GO) analysis based on the annotated GO component. The differentially regulated genes were categorized in 11 different classes, but only those with more than 4 genes are shown in the graphs. The classification was separate for each group in in the Venn diagram: genes found in both datasets (common, blue), and differentially regulated in *act2(-)* (green) or in *CDPK4(-)* (red), respectively. Shown are numbers of up-regulated (C) and down-regulated (D) genes in each class. Note that scales differ between graphs. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

for conserved “*Plasmodium* proteins with unknown function”, 10 genes encoded “*Plasmodium* exported proteins with unknown function” and three unspecific products. The remaining 37 genes were grouped according to the function of the encoded protein (Supplementary Table S1). Ten genes are likely involved in DNA folding, chromatin assembly and replication, in transcription and in translation. Three genes encoded transporters, and one product appears to be involved in vesicular trafficking. Ten enzymes were included in the list, two of which are enzymes necessary for GPI anchor synthesis. Successful gene disruptions had been reported for eight genes (Supplementary Table S1, bold and underlined). For seven of these no analysis of the sexual stages have been reported, while a gene disruption of the *P. yoelii* orthologue of PBANKA_136010 encoding nucleoside transporter 1 was suggested to have a possible phenotype in male gametogenesis [22].

Of the 13 genes only found in apicomplexan parasites, we particularly noted the presence of the three members of the small family of MSP7-like proteins. MSP7 is a protein on the merozoite surface (merozoite surface protein, MSP), which mediates the first interaction between parasite and erythrocyte. In rodent parasites *msp7* together with *msrp1* and *msrp2* constitute a small family of related genes located at the same locus [23]. All three genes in this family were found to be highly down-regulated in both mutants

(Supplementary Table S1). Another gene which expression was highly down-regulated in both mutants was *TRX2*. We validated the down-regulation of *TRX2* and *msrp2* by quantitative real-time PCR using the RNA samples from *act2(-)* and WT purified gametocytes. This confirmed the microarray results, since *TRX2* expression was 4.3 fold and *msrp2* expression 6.7 fold down-regulated as compared to WT. Parasites lacking expression of MSP7 and TRX2, respectively, were shown to have reduced asexual growth rate in mice, but the previous studies had not specifically addressed whether these genes had a function in the mosquito stages [13,24]. To test whether down-regulation of these genes could partially phenocopy the developmental arrests seen in *act2(-)* and *CDPK4(-)* gametocytogenesis, we investigated the transmission phenotype of parasites lacking thioredoxin (*trx2*). In addition, we generated a triple mutant lacking merozoite surface protein 7 (*msp7*) Msp7-like protein (*msrp1*) and Msp7-like protein (*msrp2*), called Δ triplemsp7. The three genes are located next to each other on chromosome 13 (Supplementary Fig. S2). By targeting the region upstream of *msrp1* and downstream of *msrp2*, respectively, the three genes were replaced with one cassette encoding resistance to the antifolate pyrimethamine using standard gene targeting methods. As controls we used the cognate WT parasite lines, namely WT strain ANKA and WT expressing GFP. Blood samples containing gametocytes

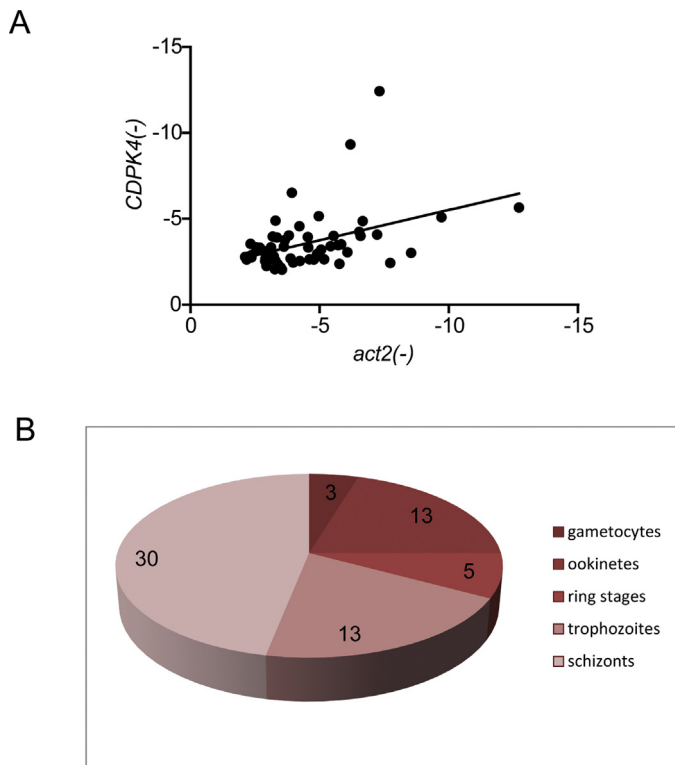


Fig. 5. Analysis of highly down-regulated genes. (A) Comparison of fold down-regulation of genes in the *CDPK4(-)* and *act2(-)* mutants. 35 genes, for which data exists for both mutants, were included. (B) Classification of the genes based on published RNAseq data [21] (64/76 genes). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

were activated *in vitro* to quantify exflagellation (Supplementary Fig. S2A, Supplementary Table S2). No difference was detected comparing the mutant parasites and the corresponding controls. Next, we followed the life cycle of the parasites in the mosquito stages. *In vitro* ookinete cultures were used to measure the ookinete conversion rate, staining the females, zygotes and ookinetes with Pbs21 antibody (Supplementary Fig. S2B, Supplementary Table S3). Again, no difference was detected between the different strains. We also fed mosquitoes on infected mice to determine whether the mutants could develop into oocysts. The numbers of oocysts were comparable to WT parasites (Supplementary Fig. S2C, Supplementary Table S4) and the parasites were normally transmitted to naïve mice when fed on infected mosquitoes. Taken together, our results show that these proteins are not critical for successful host switch.

3.5. Biological functions of up-regulated genes

We next analyzed the 50 genes that were most highly up-regulated in each of the two arrested mutant parasites. Similarly to the analysis of the down-regulated genes the pooled genes were divided in three categories: (1) genes which were found among the 50 top hits in both mutants (15 genes), (2) genes which were not found in the top hits in the other mutant but still present in the list of up-regulated genes (*act2(-)* 17 genes; *cdpk4(-)* 10 genes), and (3) genes which were not found in the up-regulated genes in the other mutant (*act2(-)* 18 genes; *cdpk4(-)* 25 genes). Plotting the fold up-regulation of the *CDPK4(-)* mutant against the *act2(-)* for those genes present in both datasets (categories 1 and 2 above) showed that the expression levels of these genes were correlated in the two strains, suggesting a similar outcome in the two different mutants (Fig. 6A). However, it should be noted that there are also many genes that were present in the filtered dataset of only

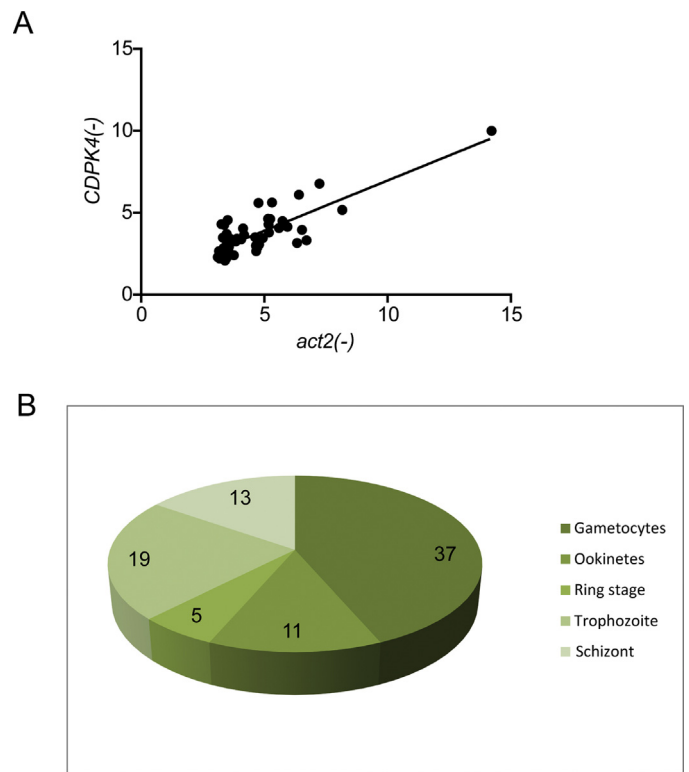


Fig. 6. Analysis of highly up-regulated genes. (A) Comparison of fold up-regulation of genes in the *CDPK4(-)* and *act2(-)* mutants. 42 genes, for which data exists for both mutants, were included. (B) Classification of the genes based on published RNAseq data [21] (85/85 genes). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

one of the mutants. These observations suggest that there are both similar and distinct effects of the two mutations, as expected for the different phenotype in each mutant. We categorized the peak of expression, as described above. In this case the peak of transcription of more than half of the genes was found to be in the gametocytes and ookinetes, which is in contrast to the finding of the down-regulated genes (Fig. 6B).

Of the 85 genes present in the pooled dataset 42 genes had a function assigned. The remaining 43 encoded proteins were expressed genes of unknown functions. The 42 genes were grouped based on the assigned function (Supplementary Table S5). Five gene products were involved in protein folding and degradation; three proteins are putatively involved in the degradation of proteins by the proteasome and one is a chaperone. This group of proteins may have a role in the extensive remodeling of the cells taking place in the transformation of gametocytes to zygotes and then to ookinetes. Two topoisomerases, which resolve intermediates during DNA replication, were among the proteins whose genes were up-regulated, which might have a role during the mitotic divisions during male gametogenesis. Notably, the gene encoding AP2-2G transcription factor was up-regulated in the *CDPK4(-)* mutant. Four enzymes and one transporter related to glycolysis and the TCA cycle were also present in the dataset. This could possibly reflect the changes in metabolism during transition from the blood to the insect. The most highly up-regulated gene in both mutants encoded a N6-adenine-specific methylase. This protein has mostly been studied in prokaryotes, where its role is to methylate DNA and, thus, protect it from digestion by restriction endonucleases, but it is also found in lower eukaryotes. Here, its role is suggested to be different and possibly involved in regulating DNA-protein interaction and/or protecting the DNA during its replication [25]. Three proteins restricted to *Plasmodium* and one to Apicomplexa were

found in the dataset. All four had their peak of transcription in gametocytes or ookinetes and their expression is down-regulated in the DOZI mutant [26]. Five successful gene disruptions have been reported, but only in the case of the mutant lacking AP2-2G was a phenotype in the sexual stages reported; these mutants were unable to form mature gametocytes [27]. However, it is not obvious if increased transcription, as detected in the *act2(-)* mutant, would have any effect on the development of the gametocytes.

4. Discussion

Taken together our results suggest that a block in male gametogenesis in the absence of actin II or CDPK4 result in a differentiated transcriptional response including ~12% of all parasite genes (599/4979). This was unexpected given that none of the two proteins were expected to be directly involved in transcriptional regulation. Clearly the cellular perturbations in the absence of any of the two proteins are more profound than what could be deduced from the previously published phenotypical analyses of gene deletion mutants lacking either of the two proteins [4,5]. One important observation was that in no case was a gene up-regulated in one mutant and down-regulated in the other. After restricting the analysis to the most highly regulated genes, we found that there was a group of genes which had a broadly similar transcriptional response in both mutants, although there were also genes which were found to be regulated in only one of the two mutants. A finding of interest is that in the WT the transcripts of the majority of the down-regulated genes peak in the asexual stages, while the reverse is true for the up-regulated genes, that is most of these genes display peak expressions in the gametocyte or ookinete stages.

Our knowledge of transcriptional regulation in malaria parasites and how it is regulated in different stages of the life cycle is very limited. The recent discovery of a master regulator, the AP2-G transcriptional activator [27,28], indicates that the program of sexual development is controlled on the level of transcription. In our analysis we studied gametocytes, which are blocked in their final developmental step towards mature male gametes. While the phenotypes of the two mutants are well described on the cellular level we don't know their detailed molecular function, their interacting partners, or the timing of their critical function. Both genes are transcribed early in gametocyte development ([5] and unpublished observation). Hence, one possibility is that the phenotype can be explained by functions hours before the commencement of gametogenesis. One observation, which may provide a clue to these unexpected results of the *act2(-)* mutants, is that ubiquitous actin I is observed in the nucleus of male gametocytes, but after commencement of gametogenesis this actin isoform is detected exclusively in the cytoplasm [5]. In the *act2(-)* mutant, actin I remains in the nucleus instead. Actin I has been shown to have a role in gene expression in asexual parasites [29]. Therefore, an indirect role of actin II in regulation of transcription in gametocytes via actin I is possible, but in the absence of experimental data to support this hypothesis this remains entirely speculative. Another interpretation of our results is that these mutations lead to a general disruption of cellular organization which also relaxes transcriptional control.

Our attempts to phenocopy the phenotype of the two mutants studied here, by re-analyzing a single and a triple mutant were not successful. None of the two had a phenotype in the mosquito stages. For another seventeen of the differentially expressed genes that we identified here, successful gene disruption have been carried out. Of these, seven were shown to have no phenotype in the sexual stages, while for two no data on these stages was available. Two gene disruptions had a phenotype in the sexual stages: for the *nti* knockout a possible phenotype in gametogenesis was reported [22], while the

lack of AP2-G2 resulted in an almost complete absence of gametocytes [27,28]. However, this latter observation is not consistent with the phenotype of the two mutants studied here as they form normal mature gametocytes. Thus, our original hypothesis that the arrest of gametogenesis in the *act2(-)* and *CDPK4(-)* mutants would indirectly lead to down-regulation of genes with an important function in the sexual stages did not hold true, at least in the cases for which data is available. Taken together, our results support the notion that the arrest of gametocytes in these two mutants leads to a general disruption of organization of the cell, rather than specific effects on genes necessary for gametogenesis.

Acknowledgements

This work was performed in the framework of the BIOSYS research project, Action KRIPIS, project No MIS-448301 (2013SE01380036) that was funded by the General Secretariat for Research and Technology, Ministry of Education, Greece and the European Regional Development Fund (Sectoral Operational Programme: Competitiveness and Entrepreneurship, NSRF 2007-2013)/European Commission. Support was also provided by a grant from the program Bilateral research and technology cooperation Greece-France, The General Secretariat for Research and Technology, Ministry of Education, Greece (grant number 2013SE01380004) and by the Max Planck Society. Support in RT lab is provided by MRC grant (MR/K011782), and we thank Dr Richard Wall for his assistance.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2015.07.001>

References

- [1] Janse C, Waters AP. Sexual development of malaria parasites. In: Waters AP, Janse C, editors. *Malaria Parasites: Genomes and Molecular Biology*. Wymondham, UK: Caister Academic Press; 2004. p. 445–74.
- [2] Sinden RE, et al. The flagellum in malarial parasites. *Curr Opin Microbiol* 2010;13(4):491–500.
- [3] Akinosoglou KA, et al. Characterization of Plasmodium developmental transcriptomes in Anopheles gambiae midgut reveals novel regulators of malaria transmission. *Cell Microbiol* 2015;17(2):254–68.
- [4] Billker O, et al. Calcium and a calcium-dependent protein kinase regulate gamete formation and mosquito transmission in a malaria parasite. *Cell* 2004;117(4):503–14.
- [5] Deligianni E, et al. Critical role for a stage-specific actin in male exflagellation of the malaria parasite. *Cell Microbiol* 2011;13(11):1714–30.
- [6] Deligianni E, et al. A perforin-like protein mediates disruption of the erythrocyte membrane during egress of Plasmodium berghei male gametocytes. *Cell Microbiol* 2013;15(8):1438–55.
- [7] Kenthirapalan S, et al. Copper-transporting ATPase is important for malaria parasite fertility. *Mol Microbiol* 2014;91(2):315–25.
- [8] Olivieri A, et al. Distinct properties of the egress-related osmiophilic bodies in male and female gametocytes of the rodent malaria parasite Plasmodium berghei. *Cell Microbiol* 2015;17(3):355–68.
- [9] Ponzi M, et al. Egress of Plasmodium berghei gametes from their host erythrocyte is mediated by the MDV-1/PEG3 protein. *Cell Microbiol* 2009;11(8):1272–88.
- [10] Talman AM, et al. PbGEST mediates malaria transmission to both mosquito and vertebrate host. *Mol Microbiol* 2011;82(2):462–74.
- [11] Tewari R, et al. An atypical mitogen-activated protein kinase controls cytokinesis and flagellar motility during male gamete formation in a malaria parasite. *Mol Microbiol* 2005;58(5):1253–63.
- [12] Janse CJ, Ramesar J, Waters AP. High-efficiency transfection and drug selection of genetically transformed blood stages of the rodent malaria parasite Plasmodium berghei. *Nat Protoc* 2006;1(1):346–56.
- [13] Matz JM, Matuschewski K, Kooij TW. Two putative protein export regulators promote Plasmodium blood stage development in vivo. *Mol Biochem Parasitol* 2013;191(1):44–52.
- [14] Beetsma AL, et al. Plasmodium berghei ANKA: purification of large numbers of infectious gametocytes. *Exp Parasitol* 1998;88(1):69–72.

- [15] Pace T, et al. Set regulation in asexual and sexual *Plasmodium* parasites reveals a novel mechanism of stage-specific expression. *Mol Microbiol* 2006;60(4):870–82.
- [16] Churchill GA. Fundamentals of experimental design for cDNA microarrays. *Nat Genet* 2002;32:490–5. Suppl.
- [17] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29(9):e45.
- [18] Boysen KE, Matuschewski K. Arrested oocyst maturation in *Plasmodium* parasites lacking type II NADH:ubiquinone dehydrogenase. *J Biol Chem* 2011;286(37):32661–71.
- [19] Ngwa CJ, et al. Changes in the transcriptome of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* during the initial phase of transmission from the human to the mosquito. *BMC Genomics* 2013;14:256.
- [20] Aurrecochea C, et al. PlasmoDB: a functional genomic database for malaria parasites. *Nucleic Acids Res* 2009;37:D539–43 (Database issue).
- [21] Otto TD, et al. A comprehensive evaluation of rodent malaria parasite genomes and gene expression. *BMC Biol* 2014;12(1):86.
- [22] Aly AS, et al. Subpatent infection with nucleoside transporter 1-deficient *Plasmodium* blood stage parasites confers sterile protection against lethal malaria in mice. *Cell Microbiol* 2010;12(7):930–8.
- [23] Mello K, et al. Members of the merozoite surface protein 7 family with similar expression patterns differ in ability to protect against *Plasmodium yoelii* malaria. *Infect Immun* 2004;72(2):1010–8.
- [24] Tewari R, et al. Disruption of *Plasmodium berghei* merozoite surface protein 7 gene modulates parasite growth in vivo. *Blood* 2005;105(1):394–6.
- [25] Wion D, Casadesus J. N6-methyl-adenine: an epigenetic signal for DNA-protein interactions. *Nat Rev Microbiol* 2006;4(3):183–92.
- [26] Mair GR, et al. Universal features of post-transcriptional gene regulation are critical for *Plasmodium* zygote development. *PLoS Pathog* 2010;6(2):e1000767.
- [27] Sinha A, et al. A cascade of DNA-binding proteins for sexual commitment and development in *Plasmodium*. *Nature* 2014;507(7491):253–7.
- [28] Kafsack BF, et al. A transcriptional switch underlies commitment to sexual development in malaria parasites. *Nature* 2014;507(7491):248–52.
- [29] Zhang Q, et al. A critical role of perinuclear filamentous actin in spatial repositioning and mutually exclusive expression of virulence genes in malaria parasites. *Cell Host Microbe* 2011;10(5):451–63.