ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ – ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗΣ

Master Report

Θέμα: Μελέτη του ρόλου της λαμινίνης του κουνουπιού *An.gambiae* ως υποψήφιου υποδοχέα για τη μετάδοση του παρασίτου *P.berghei*.

Τερέζα Βογιατζή

Ηράκλειο, 2004

Περιεχόμενα

- **Περιεχόμενα**…...…….……..…….....2
- **Περίληψη**……...…….……..…….....4
- **Abstract**……6
- **Εισαγωγή**…….……..……...7 – 17

  - Το πρόβλημα της ελονοσίας…….……...8
  - Αίτια της ελονοσίας……..……..8
  - Καταπολέμηση της ελονοσίας……...…….……....9
  - Βιολογία του *Plasmodium falciparum*……...……...……..10
  - Σημασία των αλληλεπιδράσεων φορέα – παρασίτου……...……...……...……13

- **Διέλευση ωοκινέτη στο μεσέντερο του κουνουπιού**……...……..……...…….14

  Α) Περιτροφική μεμβράνη – δίκτυο σχετιζόμενο με τις μικρολάχνες……..……..14

  Β) Επιθήλιο……...……..…….14

  Γ) Η βασική λεπίδα……...……..……15

- **Σκοπός της εργασίας**……...……...……17

- **Υλικά & Μέθοδοι**…….18 – 27

  1. Κατακρήμνιση Συγγένειας GST……...……19
     - Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων……19
     - Έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών…….19
     - Λύση βακτηριακής καλλιέργειας σε μη αποδιατακτικές συνθήκες….20
     - Ανοσοανίχνευση με western blot…….20

- Κατακρήμνιση Συγγένειας GST……...22

2. Πειράματα Ανοσοφθορισμού Σε Μεσέντερα Ενήλικων Κουνουπιών……..24

- **Αποτελέσματα**…….....……..27 – 42

1. Μελέτη Πιθανών Αλληλεπιδράσεων Της Λαμινίνης Με Τις Πρωτεΐνες SOAP Και CTRP *in vitro*……...……28 – 37

1$^{\alpha}$. Έκφραση των Πρωτεϊνών CTRP, SOAP και γ1 Υπομονάδας της Λαμινίνης…….……28 – 35

- Η πρωτεΐνη CTRP – GST……..……..……31
- Η πρωτεΐνη SOAP – GST…….……32
- Η πρωτεΐνη p25 – GST…..…….……33
- Η πρωτεΐνη Lam V…….……34

1$^{\beta}$. Κατακρήμνιση Συγγένειας GST……...….35 – 37

2. Μελέτη Πιθανών Αλληλεπιδράσεων Της Λαμινίνης Με Τις Πρωτεΐνες SOAP Και CTRP *in vivo*……..38 – 42

2$^{\alpha}$. Μικροσκοπική Παρατήρηση Μεσεντέρων Μολυσμένων Με Παράσιτα Αγρίου Τύπου Με Χρώση Για Την Λαμινινη……..39 – 40

2$^{\beta}$. Μικροσκοπική Παρατήρηση Μεσεντέρων Μολυσμένων Με Παράσιτα ko για το Γονίδιο p25, p28 και SOAP Με Χρώση Για Την Λαμινίνη……...……..40 – 42

- **Συζήτηση**…….....……...43 – 45
- **Βιβλιογραφία**…….……45 – 47

Περίληψη

Η ελονοσία αποτελεί ένα από τα βασικότερα προβλήματα της παγκόσμιας υγείας, αφού κοστίζει τη ζωή σε περισσότερους από ένα εκατομμύριο θανάτους ετησίως, ενώ 300 εκατομμύρια άνθρωποι νοσούν. Προκαλείται από παράσιτα του γένους Plasmodium και μεταφέρεται από κουνούπια του γένους Anopheles. Η ελονοσία πλήττει κυρίως την Αφρική, νότια της ερήμου Σαχάρας, όπου και παρατηρείται το 90% των περιστατικών και πιστεύεται ότι στα προσεχή χρόνια, το φαινόμενο θα ενταθεί και επεκταθεί και σε άλλες περιοχές της Αφρικής και της Ευρώπης, εφόσον οι παραδοσιακές μέθοδοι καταπολέμησης δεν επαρκούν. Για το λόγο αυτό η επιστήμονες στρέφονται στην ανεύρεση νέων εναλλακτικών μεθόδων.

Είναι γνωστό ότι ο βιολογικός κύκλος του παρασίτου περιλαμβάνει πολλά στάδια, μεταξύ αυτών και του ωοκινέτη, μια κινητής μορφής με την οποία εισβάλλει στο επιθήλιο του μεσεντέρου του κουνουπιού, το διαπερνά και στη συνέχεια, ερχόμενο σε επαφή με την βασική λεπίδα του επιθηλίου, σταματά και διαφοροποιείται σε ωοκύστη. Στο στάδιο αυτό, τα παράσιτο, φυσιολογικά, έχει σημαντικές αριθμητικές απώλειες, επομένως εξυπηρετεί τον σκοπό της καταπολέμησης του. Για το λόγο αυτό πολλές επιστημονικές έρευνες αποσκοπούν στην μελέτη και κατανόηση σε μοριακό και κυτταρικό επίπεδο του βιολογικού κύκλου του παρασίτου μέσα στο κουνούπι, τις αλληλεπιδράσεις με αυτό και την χρήση της πληροφορίας αυτής για την κατασκευή φορέων που δεν μεταδίδουν ελονοσία. Σκοπός και της παρούσας μελέτης είναι:

Α) Η περαιτέρω ανάλυση των αλληλεπιδράσεων των πρωτεϊνών CTRP και SOAP, του παρασίτου της ελονοσίας με την υπομονάδα γ1 της λαμινίνης, *in vitro*, με τη μέθοδο της κατακρήμνισης συγγένειας GST. Αρχικά, οι παρασιτικές πρωτεΐνες εκφράζονται σε βακτηριακές καλλιέργειας, σε σύντηξη με την GST και στη συνέχεια απομονώνονται σε μη αποδιατακτικές συνθήκες. Οι απομονωμένες πρωτεΐνες αφήνονται να αλληλεπιδράσουν με την λαμινίνη, σε κατάλληλες συνθήκες. Η αλληλεπίδραση ανιχνεύεται με ανοσοανίχνευση με western blot. Τα πειράματα κατακρήμνισης συγγένειας GST δείχνουν την ισχυρή αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών CTRP και SOAP του παρασίτου και της λαμινίνης του κουνουπιού.

Β) Επίσης, γίνονται πειράματα ανοσοεντοπισμού της λαμινίνης σε μεσέντερα κουνουπιών μολυσμένα με παράσιτα, στα οποία έχει γίνει λειτουργική

απενεργοποίηση (knock out) των πρωτεϊνών p28, SOAP, p25, καθώς και σύγκριση με παράσιτα αγρίου τύπου. Σε μονιμοποιημένα μεσέντερα γίνεται χρώση για την λαμινίνη και για παρασιτικές πρωτεΐνες και στη συνέχεια ακολουθεί παρατήρηση με συνεστιακή μικροσκοπία. Τα πειράματα αυτά έδειξαν ίδια τοπολογική κατανομή της λαμινίνης σε σχέση με τον ωοκινέτη σε μεσέντερα μολυσμένα με ωοκινέτες αγρίου τύπου και με λειτουργική απενεργοποίηση του γονιδίου SOAP.

Abstract

Malaria is still one the biggest burdens of world health. It causes one million deaths and it is estimated that 300 million people are affected annually. Anopheline mosquitoes transmit the Plasmodium parasites, which cause the disease. The area affected by malaria the most is sub-Saharan Africa, where 90% of the annual cases occur. It is believed that in the future annual malaria cases will increase in sub-Saharan Africa and occurrence will expand in other parts of Africa and Europe, since traditional control methods are currently inadequate. Therefore, scientists are now turning towards new, alternative, methods of control.

The life cycle of the parasite includes a number of different stages, among these, the ookinete stage. The ookinete is a motile form that invades the midgut epithelium and subsequently reaches the basal lamina. After contacting the basal lamina the ookinete stops transforms into an oocyst. During the ookinete stage the parasites undergo severe loses, which make it an ideal candidate for the application of new control methods. As a result, many studies focus on understanding of mosquito-parasite interactions, during the vector stage of the parasite cycle, at a cellular and molecular level, to ultimately use this information to produce genetically modified refractory mosquitoes. The aim of this study is:

A) Further study of the interactions between two parasitic proteins CTRP and SOAP, and the laminin γ1 subunit, *in vitro*, with GST pull downs. For this purpose, CTRP and SOAP are fused to a GST tag and expressed in bacterial cultures and then purified under native conditions. Next, an interaction takes place between the purified proteins and laminin, under the correct conditions. Interactions are recognized with western blot analysis. These GST pull down experiments show a strong interaction between CTRP, SOAP and mosquito laminin.

B) Observation, with confocal microscopy, of fixed midguts stained for laminin and infected with parasites, knock out for p28, SOAP, p25, and comparison with midguts infected with wild type parasites. These experiments show co-staining between the wild type parasites and laminin. The same pattern is observed for SOAP knock out parasites.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το πρόβλημα της ελονοσίας

Οι παρασιτικές ασθένειες μεταφερόμενες από ασπόνδυλους φορείς απετέλεσαν και αποτελούν σημαντική αιτία καταπόνησης της ανθρωπότητας, αν και έχουν γίνει κατά καιρούς σοβαρές προσπάθειες καταπολέμησης τους. Μεταξύ αυτών και η ελονοσία, η οποία σήμερα θεωρείται η σημαντικότερη και απειλητικότερη όλων. Σύμφωνα με τις εκτιμήσεις του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, η ελονοσία ευθύνεται για περισσότερους από ένα εκατομμύριο θανάτους ετησίως, ενώ 300 εκατομμύρια άνθρωποι νοσούν. Το μεγαλύτερο ποσοστό των κρουσμάτων καταγράφεται στις περιοχές των λεγόμενων αναπτυσσομένων χωρών και ιδιαίτερα σε παιδιά ηλικίας κάτω των πέντε ετών. Η ελονοσία πλήττει κυρίως την Αφρική, νότια της ερήμου Σαχάρας, όπου και παρατηρείται το 90% των περιστατικών και πιστεύεται ότι στα προσεχή χρόνια, το φαινόμενο θα ενταθεί και επεκταθεί και σε άλλες περιοχές της Αφρικής και της Ευρώπης, από όπου είχε ήδη εξαλειφθεί, εξαιτίας των μετακινήσεων των πληθυσμών.

Αίτια της ελονοσίας

Η ελονοσία προκαλείται από ενδοκυτταρικά παράσιτα του γένους **Plasmodium**, που είναι μονοκύτταρα πρωτόζωα του φύλου των σπορόζωων (Apicomplexa). Από τα 120 είδη του γένους αυτού έχουν αναγνωριστεί τέσσερα, τα οποία είναι υπεύθυνα για την νόσο της ελονοσίας στον άνθρωπο, τα *P.falciparum, P.ovale, P.malariae* και *P.vivax* (Gilles, H.M., Warrel, D.A. Bruce – Chwatt's Essential Malariology 3rd ed). Τα συνηθέστερα αυτών είναι τα *P.vivax*, το οποίο αντιπροσωπεύει κυρίως τα κρούσματα στην περιοχή της νοτιοανατολικής Ασίας και κεντρικής και νότιας Αμερικής και *P.falciparum,* στο οποίο αποδίδονται τα κρούσματα στην περιοχή της κεντρικής Αφρικής, που είναι και τα πιο σφοδρά και θανατηφόρα.

Οι φυσικοί φορείς του παρασίτου της ελονοσίας είναι θηλυκά κουνούπια του γένους Anopheles, το οποίο αριθμεί 450 είδη, από τα οποία σημαντικότεροι φορείς είναι 40. Μεταξύ αυτών και ο *Anopheles gambiae*, ο αποτελεσματικότερος φορέας του *P.falciparum* στην Αφρική. Τα κουνούπια του γένους Anopheles είναι ιδανικοί φορείς της ελονοσίας εξαιτίας της έντονης ανθρωποφιλικής συμπεριφοράς τους και

του γρήγορου κύκλου ζωής τους. Η μετάδοση του πλασμωδίου γίνεται εφικτή λόγω της οικολογικής συμπεριφοράς των κουνουπιών αυτών. Όταν ένα θηλυκό κουνούπι τσιμπήσει ένα μολυσμένο άτομο μαζί με το αίμα ρουφά και μερικές χιλιάδες παρασίτων τα οποία βρίσκονται στην κυκλοφορία του αίματος του ξενιστή. Στη συνέχεια, τα παράσιτα μέσω μιας πολύπλοκης διαδικασίας αναπαράγονται μέσα στο πεπτικό σύστημα του κουνουπιού και με τρόπο που είναι ακόμα εν μέρει άγνωστος εξέρχονται από αυτό και εισέρχονται στους σιελογόνους αδένες του. Γνωρίζουμε ότι τα κουνούπια όταν τσιμπούν ενύουν και μια ποσότητα σάλιου στον ξενιστή τους, γιατί χρησιμοποιούν τα σάλιο τους σαν τοπικό αναισθητικό και αντιπηκτικό του αίματος. Με τον τρόπο αυτό στην περίπτωση των φορέων παρασίτων της ελονοσίας μεταφέρονται μαζί με το σάλιο και παράσιτα κατευθείαν στην κυκλοφορία του αίματος του επόμενου ξενιστή τους.

Καταπολέμηση της ελονοσίας

Παραδοσιακά η ελονοσία καταπολεμήθηκε στις εύκρατες περιοχές κατά τα μέσα του 20^{ου} με συστηματικές προσπάθειες μέσω μαζικής χρήσης εντομοκτόνων και αποξηράνσεις ελών, που είχαν σαν στόχο την μείωση των πληθυσμών των κουνουπιών και επίσης με την χρήση ανθελονοτικών φαρμάκων. Παρ' όλα αυτά, τα μέτρα αυτά δεν έχουν αποτέλεσμα στην περιοχή της Αφρικής, λόγω του κλίματος της, αλλά κυρίως εξαιτίας της ταχείας ανάπτυξης ανθεκτικότητας του παρασίτου στα υπάρχοντα φάρμακα (Ringwald et al., 2002, Mu et al., 2003) και των φορέων στα εντομοκτόνα (Ranson et al., 2002, Hemingway et al.,2002). Στις τροπικές και υποτροπικές περιοχές, η ελονοσία εξακολουθεί να μαστίζει ένα μεγάλο μέρος της ανθρωπότητας και μάλιστα πιστεύεται ότι τα κρούσματα παιδικής θνησιμότητας θα αυξηθούν μέσα στην επόμενη δεκαετία. Επίσης, υπάρχει φόβος εξάπλωσης της λόγω μετακινήσεων των πληθυσμών (Schlagenhauf et al., 2003).

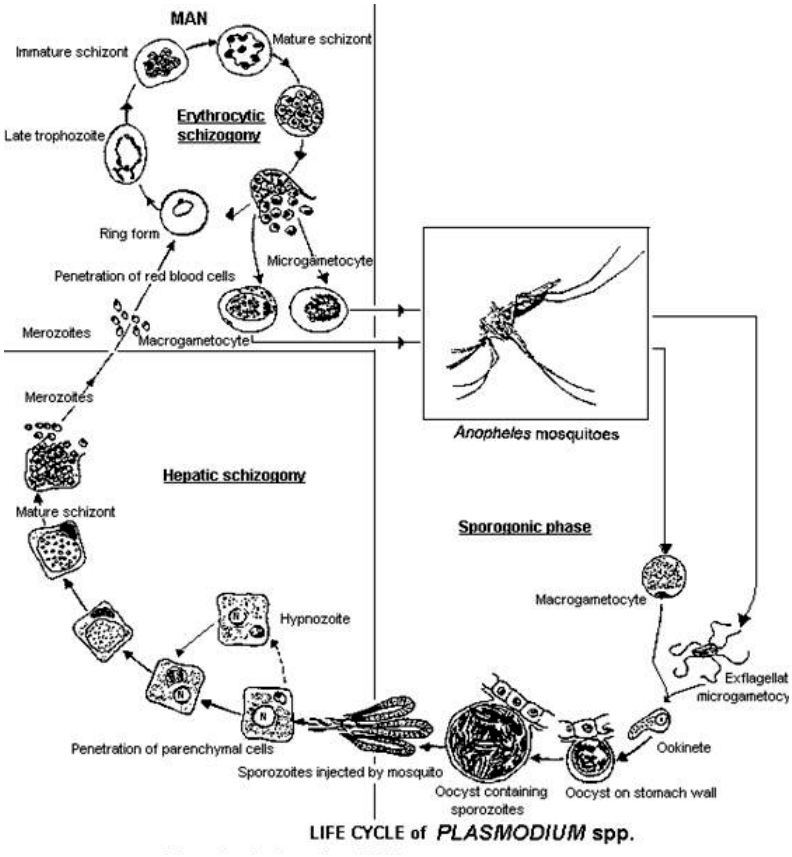
Για όλους τους λόγους που προαναφέρθηκαν η αντιμετώπιση της ελονοσίας, εκατό χρόνια μετά την ανακάλυψη των αιτίων της, γίνεται πιεστική ανάγκη. Η μερική αποτυχία των ως τώρα μέτρων κάνει απαραίτητη την ανάπτυξη νέων φαρμάκων και εντομοκτόνων αλλά και τη χρήση εναλλακτικών οδών. Οι επιστήμονες σήμερα κινούνται προς δυο κατευθύνσεις:

α) με στόχο το παράσιτο, την ανάπτυξη εμβολίων

β) με στόχο τον φορέα, την κατασκευή γενετικά τροποποιημένων φορέων που δεν μεταδίδουν ελονοσία (Alphey et al., 2002)

Η ιδέα της τροποποίησης των φορέων ώστε να μην μεταδίδουν ελονοσία αντιμετωπίζεται με αυξανόμενο ενδιαφέρον. Το ερώτημα που προκύπτει είναι ποιοι μοριακοί μηχανισμοί καθορίζουν το κατά πόσο ένα κουνούπι είναι δεκτικό για το παράσιτο και την μετάδοση της ασθένειας, και σε ποιο στάδιο της ανάπτυξης του παρασίτου δρουν. Οι μηχανισμοί παρεμπόδισης του παράσιτου μπορούν να ειδωθούν από δυο σκοπιές, την περαιτέρω ανάπτυξη και εκμετάλλευση ενδογενών μοριακών και κυτταρικών μηχανισμών που ευθύνονται για την φυσική διαδικασία άμυνας του κουνουπιού (Han Y.S. et al., 2001) ή εναλλακτικά την χρήση εξωγενών γονιδίων που επεμβαίνουν στις αλληλεπιδράσεις παρασίτου και φορέα κατά την εισβολή του μεσεντέρου για το μετασχηματισμό των φορέων, με στόχο την διακοπή της ανάπτυξης του παρασίτου μέσα στον κουνούπι. Σήμερα, πλέον, εφόσον η τεχνολογία μετασχηματισμού κουνουπιών υπάρχει (Grossman et al., 2001), η έρευνα κατευθύνεται στην μελέτη και κατανόηση σε μοριακό και κυτταρικό επίπεδο του βιολογικού κύκλου του παρασίτου μέσα στο κουνούπι, τις αλληλεπιδράσεις με αυτό και την χρήση της πληροφορίας αυτής για την κατασκευή φορέων που δεν μεταδίδουν ελονοσία. Αποσαφήνιση των αλληλεπιδράσεων αυτών θα ανοίξει νέες οδούς στον έλεγχο της ελονοσίας

Βιολογία του *Plasmodium falciparum*



Εικ 1: Βιολογικός κύκλος του Plasmodium

Το *P.falciparum* ανήκει στην οικογένεια των Plasmodiidae, η οποία περιλαμβάνει παράσιτα με βιολογικό κύκλο που είναι περίπου ίδιος σε όλα τα είδη που προκαλούν ελονοσία στον άνθρωπο και περιλαμβάνει δυο τύπους αναπαραγωγής, μια αγενή που ονομάζεται **σχιζογονία** και λαμβάνει χώρα στον τελικό ξενιστή, τον άνθρωπο και μια σεξουαλική που ονομάζεται **σπορογονία** (εικόνα 1), και λαμβάνει χώρα σε συγκεκριμένα είδη του γένους Anopheles (Gilles, H.M., Warrel, D.A. Bruce – Chwatt's Essential Malariology 3rd ed).

Αγενής κύκλος – Σχιζογονία

Το παράσιτο εισέρχεται στην κυκλοφορία του ξενιστή με τη μορφή του **σποροζωΐτη**. Οι σποροζωΐτες έχουν την ικανότητα να κινούνται με χαρακτηριστικό τρόπο που χαρακτηρίζεται ως gliding motility και έτσι μπορούν να προσβάλλουν ενεργά και σε μικρό χρονικό διάστημα τα ηπατικά κύτταρα παίρνοντας μέσα από τα κύτταρα του Kupffer ή ανάμεσα από επιθηλιακά κύτταρα (Mota M. & Rodrieguez A., 2002). Η διαδικασία αυτή ονομάζεται και **εξωερυθροκυτταρική σχιζογονία**. Μέσα στα ηπατικά κύτταρα και κατόπιν διαιρέσεων σχηματίζονται τα **σχιζοζωΐδια**, τα οποία όταν ωριμάσουν διαρρηγνύονται και ελευθερώνουν ένα μεγάλο αριθμό **μεροζωιτών**. Οι μεροζωίτες προσβάλλουν ενεργά τα ερυθρά αιμοσφαίρια και μέσα σε αυτά πολλαπλασιάζονται αγενώς ως το στάδιο του σχιζοζωίτη. Η σφαιρική αυτή μορφή διαρρηγνύεται παράγοντας νέους μεροζωίτες. Οι απόγονοι με ρήξη του κυττάρου απελευθερώνονται στην κυκλοφορία και προσβάλλουν με τη σειρά τους νέα ερυθροκύτταρα, ολοκληρώνοντας το **ενδοερυθροκυτταρικό** μέρος του κύκλου του παρασίτου. Η ρήξη αυτή των ερυθροκυττάρων είναι υπεύθυνη για τα χαρακτηριστικά συμπτώματα της ελονοσίας (παροξυσμοί, πυρετός, αναιμία κτλ.). Κατά την φάση αυτή ένας μικρός αριθμός παρασίτων θα διαφοροποιηθεί προς θηλυκά και αρσενικά γαμετοκύτταρα, σταματημένα στην φάση G_0. Αυτά είναι τα κύτταρα που θα συνεχίσουν τον σπορογονικό κύκλο μέσα στο κουνούπι όταν προσληφθούν από ένα γεύμα με αίμα.

Εγγενής κύκλος – Σπορογονία

Μια ώρα μετά τη λήψη μολυσμένου αίματος από το κουνούπι ξεκινάει ο σπορογονικός κύκλος. Σε πρώτη φάση, με μια διαδικασία που ονομάζεται γαμετογένεση, (Warburg & Miller, 1992) από τα αρσενικά γαμετοκύτταρα προεκβάλλει μαστίγιο που τα καθιστά ικανά για κίνηση για λίγα δευτερόλεπτα (απομαστίγωση) και κατόπιν, διαιρούνται σχηματίζοντας οκτώ αρσενικούς γαμέτες ή **μικρογαμέτες.** Ταυτόχρονα κάθε θηλυκό γαμετοκύτταρα διαφοροποιούνται προς ένα θηλυκό γαμέτη ή **μακρογαμέτη.** Η γαμετογένεση εξαρτάται από την πτώση της θερμοκρασίας του αίματος κατά $5C^0$ καθώς και από την παρουσία ξανθουρενικού οξέος (Billker et al., 1998). Στη συνέχεια πραγματοποιείται η γονιμοποίηση των μακρογαμετών από τους μικρογαμέτες, μία διαδικασία που λαμβάνει χώρα 30-60 λεπτά μετά την λήψη αίματος από το κουνούπι και ο σχηματισμός του διπλοειδούς **ζυγωτού** μέσα στο μεσέντερο του κουνουπιού. Ο σχηματισμός αυτός αρχικά είναι ακίνητος, αλλά κατόπιν 18 – 24 ωρών σταδιακά επιμηκύνεται, αποκτά κυτταρικό σκελετό και μπορεί να κινείται. Αυτό είναι το στάδιο του **ωοκινέτη** που περιέχει τέσσερις απλοειδής πυρήνες λόγω των δυο μειώσεων που έχουν λάβει χώρα. Με τη μορφή του ωοκινέτη το παράσιτο διέρχεται από το τοίχωμα του μεσεντέρου. Πρώτα, οι ωοκινέτες διαπερνούν την περιτροφική μεμβράνη, (Huber et al., 1991) μία δομή πλούσια σε χιτίνη που περιβάλλει το γεύμα αίματος στο μεσέντερο του κουνουπιού (Shao et al., 2001). Στη συνέχεια, οι ωοκινέτες εισβάλλουν στο επιθήλιο του μεσεντέρου και εγκαθίστανται στην περιοχή μεταξύ της βασικής λεπίδας των επιθηλιακών κυττάρων και της εξωκυττάριας ουσίας, όπου διαφοροποιούνται σε σφαιρικούς σχηματισμούς, τις **ωοκύστεις**. Ο τρόπος εισβολής και διέλευσης μέσα από την στοιβάδα του επιθηλίου (ενδοκυτταρικά – εξωκυτταρικά) του μεσεντέρου δεν έχει ακόμα ξεκαθαριστεί (Sinden & Billingsley, 2001, Zieler et al., 2000). Καθώς ωριμάζουν οι ωοκύστεις γίνονται συνεχείς πυρηνικές διαιρέσεις με αποτέλεσμα τη δημιουργία συγκυτιακών κυττάρων που ονομάζονται σε **σποροβλάστες** και ταυτόχρονα παρατηρείται έκταση της βασικής μεμβράνης. Οι πυρήνες των σποροβλαστών διαιρούνται προς πολυάριθμους **σποροζωίτες**. Τελικά, μετά από διάστημα 10 – 15 ημερών γίνεται διάρρηξη του τοιχώματος της ωοκύστης και απελευθέρωση των σποροζωιτών στο αιματόκοιλο, οι οποίοι μέσω της αιμολέμφου

φτάνουν στους σιελογόνους αδένες. Από εκεί μεταφέρονται με κάποιο τσίμπημα στον επόμενο ξενιστή (Rosenberg R., 1992).

Σημασία των αλληλεπιδράσεων φορέα – παρασίτου

Κατά τη διάρκεια του σπορογονικού κύκλου μεγάλοι αριθμοί παρασίτων δεν καταφέρνουν να περάσουν στο επόμενο αναπτυξιακό στάδιο μέσα στο φορέα. Οι πληθυσμοί του παρασίτου διέρχονται από στενωπούς κατά τις οποίες εμφανίζουν σημαντικές αριθμητικές απώλειες. Η διαφοροποίηση σε ωοκινέτη, είναι το πρώτο αναπτυξιακό στάδιο, όπου παρατηρούνται οι μεγαλύτερες απώλειες, πιθανόν εξαιτίας του ιδιαίτερα αφιλόξενου περιβάλλοντος που δημιουργείται τόσο από το μεσέντερο του κουνουπιού όσο και του αίματος των σπονδυλωτών. Σε ένα επόμενο στάδιο, ο ωοκινέτης αρχικά πρέπει να εισβάλλει στο μεσέντερο, όπου συναντά ένα αριθμό εμποδίων, και κατόπιν να σταματήσει στον εξωκυτταρικό χώρο για να διαφοροποιηθεί σε ωοκύστη. Φαίνεται ότι μικρός αριθμός ωοκινετών καταφέρνει να εισβάλλει στο επιθήλιο και να διαφοροποιηθεί σε ωοκύστεις. Τέλος, απώλειες παρατηρούνται κατά την κίνηση προς τους σιελογόνους αδένες μέσω της αιμολέμφου. Ωστόσο, το παράσιτο έχει αναπτύξει πολύπλοκους μηχανισμούς, ώστε τελικά ικανός αριθμός σποροζωιτών φτάνει στους σιελογόνους αδένες και μολύνει με επιτυχία τον επόμενο ξενιστή.

Με το αυξανόμενο ενδιαφέρον για την ιδέα της διακοπής της μετάδοσης της ελονοσίας κατά τη διέλευση του παρασίτου από τον ασπόνδυλο φορέα, η ερώτηση που προκύπτει είναι ποιοι μοριακοί και κυτταρικοί μηχανισμοί καθορίζουν τις αλληλεπιδράσεις του φορέα με το παράσιτο. Απώτερος σκοπός είναι η αναγνώριση γονίδιων στόχων σε σημεία του βιολογικού του κύκλου που το παράσιτο είναι πιο ευάλωτο και μπορεί ευκολότερα να καταπολεμηθεί. Τέτοια σημεία είναι εκείνα που και φυσιολογικά παρουσιάζουν μείωση του αριθμού των παρασίτων και επομένως εξυπηρετούν τον σκοπό της καταπολέμησης του παρασίτου. Όπως προαναφέρθηκε, ένα τέτοιο στάδιο είναι του ωοκινέτη, στο οποίο επικεντρώνονται πολλές επιστημονικές μελέτες.

Διέλευση ωοκινέτη στο μεσέντερο του κουνουπιού

Α) Περιτροφική μεμβράνη – δίκτυο σχετιζόμενο με τις μικρολάχνες

Από τη στιγμή που θα σχηματιστεί ο ωοκινέτης, καλείται να διαπεράσει το μεσέντερο για να καταλήξει στην περιοχή μεταξύ της βασικής λεπίδας και του εξωκυττάριου χώρου, όπου διαφοροποιείται σε ωοκύστη. Ένα πρώτο εμπόδιο που συναντά είναι μεμβράνη, την οποία διαπερνά με την βοήθεια εκκρινόμενων προχιτινασών, οι οποίες μετατρέπονται σε ενεργές χιτινάσες, εξαιτίας των θρυψινών που εκκρίνονται στο έντερο του κουνουπιού (Huber et al., 1991, Shahabuddin & Kaslow, 1993, Billingsley & Hecker, 1991). Ένα επιπλέον εμπόδιο αποτελεί πιθανόν και το δίκτυο σχετιζόμενο με τις μικρολάχνες που καλύπτει την επιφάνεια του επιθηλίου. Αν και δεν γνωρίζουμε την ακριβή σύσταση και λειτουργία του, κατά τη διέλευση τους οι ωοκινέτες εμφανίζουν συσφίξεις, οπότε εικάζεται ότι το δίκτυο αυτό λειτουργεί σαν μηχανικό εμπόδιο στην κίνηση τους. Μικρός αριθμός ωοκινετών καταφέρνει να εισβάλλει στο επιθήλιο του μεσεντέρου και να διαφοροποιηθεί σε ωοκύστη.

Β) Επιθήλιο

Το επιθήλιο του μεσεντέρου είναι μια μονή στοιβάδα κυττάρων την οποία διασχίζουν οι ωοκινέτες, πριν διαφοροποιηθούν σε ωοκύστεις. Στην κορυφαία πλευρά (apical) η κυτταρική μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων, σχηματίζει πολυάριθμες μικρολάχνες που καλύπτονται από γλυκοκάλυκα, με πολύπλοκο πρότυπο γλυκοζυλίωσης (Wilkins and Billingsley, 2001). Οι ωοκινέτες αναγνωρίζουν τους υδρογονάνθρακες (Zieler et al., 1999), οι οποίοι πιθανώς δρουν ως υποδοχείς πρόσδεσης. Εξίσου σημαντική για την εισβολή του επιθηλίου είναι η αναγνώριση και των λιπιδίων, γιατί, όπως φάνηκε σε πειράματα, αφαίρεση τους οδηγεί στην σημαντική μείωση του αριθμού των ωοκυστών (Zieler et al., 2001, Ghosh et al., 2001). Φαίνεται ότι ο ωοκινέτης αρχικά κινείται αργά μέσω του δικτύου σχετιζόμενου με τις μικρολάχνες και στη συνέχεια, μόλις αναγνωρίσει την κορυφαία

πλευρά των κυττάρων κινείται με gliding motility για περίπου 30΄ μέχρι να την ουσιαστική εισβολή τους. Η εισβολή γίνεται από την κορυφαία πλευρά, κοντά στους κυτταρικούς συνδέσμους πολύ γρήγορα, και στην συνέχεια οι ωοκινέτες κατευθύνονται προς την πλάγια βασική πλευρά, από όπου διαπερνούν προς γειτονικά κύτταρα, μια διαδικασία που επάγει φαινόμενα παρόμοια με την απόπτωση στα επιθηλιακά κύτταρα (Han et al., 2000, Zieler & Dvorak, 2000, Vlachou et al., 2004). Τελικά, οι ωοκινέτες εξέρχονται στον βασικό λαβύρινθο και από εκεί καταλήγουν στην βασική λεπίδα. Όπως προαναφέρθηκε, στην περιοχή μεταξύ της βασικής λεπίδας των επιθηλιακών κυττάρων και της εξωκυττάριας ουσίας, οι ωοκινέτες διαφοροποιούνται σε ωοκύστεις.

Γ) Η βασική λεπίδα

Η βασική λεπίδα είναι μια λεπτή στοιβάδα εξωκυττάριας μήτρας, που ακουμπά σε επιθήλια, μυϊκά κύτταρα κτλ., και παίζει ρόλο στην διαφοροποίηση, πολικότητα και διαίρεση των κυττάρων. Η μοριακή δομή της είναι αρκετά ετερογενής, ανάλογα με τον ιστό από τον οποίο προέρχεται, αλλά αρκετά από τα χαρακτηριστικά της είναι κοινά στα περισσότερα από τα εξωκυττάρια υποστρώματα. Αποτελείται από πρωτεογλυκάνες από δύο ανεξάρτητα πρωτεϊνικά δίκτυα, του κολλαγόνου IV και της οικογένειας των λαμινινών που συνδέονται μεταξύ τους μέσω της πρωτεΐνης nidogen, και συντίθονται από τα κύτταρα που ακουμπούν σε αυτή. Οι λαμινίνες είναι ετεροτριμερή μόρια αποτελούμενα από τρεις διαφορετικές υπομονάδες, τις α (α1 ως α5),β (β1 ως β3) και γ (γ1 ως γ3). Συνολικά σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί 13 ισομορφές σε σπονδυλωτά, που προκύπτουν από συνδυασμούς των παραπάνω αλυσίδων (Hohenester & Engel, 2002). Από αυτές, η πιο καλά μελετημένη είναι η λαμινίνη-1 (α1β1γ1), η οποία έχει σχήμα σταυρού, με τρεις κοντούς και ένα μακρύ βραχίονα, σύμφωνα με τα αποτελέσματα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας (Beck et al., 1990). Η αλυσίδα που συναντάται συχνότερα στις περισσότερες από τις βασικές λεπίδες και ισομορφές (σε 11 από τις 13 ισομορφές) είναι η γ1. Πρόσφατα, απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε το γονίδιο LANB2 που κωδικοποιεί την ομόλογη γ1 του *An.gambiae* που φαίνεται να εκφράζεται σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια (Vlachou et al.,2001). Οι λαμινίνες δρουν ως δεσμευτές για υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης, όπως οι ιντεγκρίνες καθώς και σχηματίζουν πολυμερή που συμμετέχουν

στην οργάνωση του εξωκυττάριου υποστρώματος και παρέχουν μηχανική υποστήριξη στα γειτονικά κύτταρα (Colognato & Yurchenco, 2000).

Η βασική λεπίδα φαίνεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο κατά τη διαφοροποίηση του ωοκινέτη σε ωοκύστη, αν και ο μηχανισμός δεν είναι πλήρως εξακριβωμένος. Η χρήση μίας τεχνητής μορφής βασικής μεμβράνης, γνωστής σαν Matrigel, σε in vitro συστήματα καλλιέργειας οδήγησε στην επιτυχή σπορογονική ανάπτυξη των παρασίτων Plasmodium falciparum (Warburg et al., 1993) και Plasmodium gallinaceum (Warburg et al., 1992). Ωστόσο, η παρατήρηση σχηματισμού ωοκυστών χωρίς την προσθήκη συστατικών του εξωκυττάριου υποστρώματος σε *in vitro* συστήματα καλλιέργειας ωοκινετών με κύτταρα προερχόμενα είτε από τη *D.melanogaster* είτε από το κουνούπι, αποδεικνύει ότι ο ακριβής ρόλος του εξωκυττάριου υποστρώματος στην αναπτυξιακή πορεία του παρασίτου μέσα στον ξενιστή είναι ακόμα άγνωστος. Υπάρχοντα πειραματικά δεδομένα, που αναφέρονται στη βιβλιογραφία, αποτελούν ενδείξεις για την εμπλοκή συστατικών της βασικής λεπίδας του επιθηλίου και ιδιαίτερα της λαμινίνης και του κολλαγόνου στη διαδικασία της διαφοροποίησης (Adini et al., 1999, Arrighi & Hurd, 2002, Vlachou et al., 2001). Επίσης, πειράματα συστήματος δυο υβριδίων έδειξαν την αλληλεπίδραση της λαμινίνης του κουνουπιού με παρασιτικές πρωτεΐνες (Dessens et al., 2003; Vlachou et al., 2001, Mahairaki, unpublished data). Ως τώρα, έχουν αναγνωριστεί τέσσερις πρωτεΐνες του παρασίτου που αλληλεπιδρούν απευθείας με την λαμινίνη, δυο που συναντώνται αποκλειστικά στο στάδιο του ωοκινέτη, η πρωτεΐνη SOAP και η πρωτεΐνη CTRP, και δυο που συναντώνται στο στάδιο του ωοκινέτη και της ωοκύστης, η επιφανειακές πρωτεΐνες P25 και P28 (Arrighi & Hurd, 2002, Vlachou et al., 2001). Όλες οι παραπάνω πρωτεΐνες φαίνεται ότι παίζουν ρόλο τόσο στην εισβολή στο μεσέντερο, όσο και στην διαφοροποίηση σε ωοκύστεις. Διπλά knock out των πρωτεϊνών P25 και P28 έχουν δραστικά μειωμένη ικανότητα διαφοροποίησης, ενώ μονά knock out έχουν πολύ πιο ήπιο φαινότυπο (Tomas et al., 2001), οπότε πιθανόν να έχουν μερικώς πλεονάζουσες λειτουργίες. Η πρωτεΐνη CTRP (circumsporozoite protein and TRAP (thrombospondin-Related adhesive protein)) είναι μια εκκρινόμενη (Limviroj et al., 2002) διαμεμβρανική πρωτεΐνη που παράγεται καθ' όλη τη διάρκεια του σταδίου του ωοκινέτη (Yuda M et al., 1999). Εντοπίζεται στο εμπρόσθιο κυτταρόπλασμα του ώριμου ωοκινέτη, σε μια δομή που ονομάζεται microneme και στην περιοχή επαφής του ωοκινέτη με τη βασική λεπίδα (Limviroj et al., 2002). Πειράματα knock out έχουν δείξει ότι οι ωοκινέτες, αν και αναπτύσσονται

κανονικά, έχουν αισθητά μειωμένη ικανότητα κίνησης, και δεν διαφοροποιούνται σε ωοκύστεις (Templeton et al., 2000, Yuda et al., 1999). Τέλος, η πρωτεΐνη SOAP (secreted ookinete adhesive protein), που εντοπίστηκε σε micronemes του *P.berghei*, του παρασίτου της ελονοσίας των τρωκτικών της δυτικής Αφρικής, φαίνεται ότι παίζει ρόλο στη διαφοροποίηση προς ωοκύστη γιατί πειράματα με ωοκινέτες knock out για SOAP έχουν μειωμένο ποσοστό διαφοροποίησης, αν και ο φαινότυπος αυτών που τελικά διαφοροποιούνται είναι φυσιολογικός (Dessens, et al., 2003).

Σκοπός της εργασίας

Στην παρούσα μελέτη γίνεται περαιτέρω ανάλυση των αλληλεπιδράσεων των πρωτεϊνών CTRP και SOAP, του παρασίτου της ελονοσίας με την υπομονάδα γ1 της λαμινίνης, *in vitro*, με τη μέθοδο της κατακρήμνισης συγγένειας GST. Επίσης, γίνονται πειράματα ανοσοεντοπισμού της λαμινίνης σε μεσέντερα κουνουπιών μολυσμένα με παράσιτα, στα οποία έχει γίνει λειτουργική απενεργοποίηση (knock out) των πρωτεϊνών p28, SOAP, p25, καθώς και σύγκριση με παράσιτα αγρίου τύπου. Με τον τρόπο αυτό μπορεί να μελετηθεί, *in vivo*, το αποτέλεσμα που προκαλείται από την έλλειψη της κάθε πρωτεΐνης στην αλληλεπίδραση με την λαμινίνη, σε σύγκριση με παράσιτα αγρίου τύπου. Ως μοντέλο σύστημα μελέτης χρησιμοποιείται το *P.berghei,* που ευθύνεται για την ελονοσία των τρωκτικών της δυτικής Αφρικής. Τα γονίδια p28, CTRP και SOAP του παρασίτου *P.berghei* είναι συντηρημένα στο *P.falciparum*. Επιγραμματικά οι στόχοι της παρούσας μελέτης είναι:

- Η διερεύνηση των μοριακών αλληλεπιδράσεων της γ1-υπομονάδας της λαμινίνης του κουνουπιού *An.gambiae* με τις επιφανειακές πρωτεΐνες CTRP και SOAP του παρασίτου *P.berghei, in vitro*.

- Η μελέτη των διαφορών της τοπολογικής κατανομής της λαμινίνης σε μεσέντερα που έχουν μολυνθεί από παράσιτα knock out για τις πρωτεΐνες p28, p25 και SOAP με παράσιτα αγρίου τύπου, *in vivo*, με τη χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας.

ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Κατακρήμνιση Συγγένειας GST

Οι κατασκευές που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο αλληλεπιδράσεων είναι (όλες οι βακτηριακές κατασκευές κατασκευάστηκαν από την Δρ Β. Μαχαιράκη):

	Όνομα	**Φορέας Κλωνοποίησης**	**Γονίδιο**	**Περιοχή**	**Αμινοξέα**
GST fusions	**p25 – GST**	pGEX- 4T-1 (amersham)	p25 *(P.berghei)*	εξωκυττάρια	20 – 196
	CTRP – GST	pGEX- 4T-1 (amersham)	CTRP *(P.berghei)*	TSP	1384 – 1812
	Soap – GST	pGEX- 4T-1 (amersham)	Soap *(P.berghei)*	whole gene	20 – 167
Prey	**LamV**	pET-32 (merck)	Laminin γ1 *(An.gambiae)*	domain V	266 – 505

1) Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων

Σε 100μl δεκτικών κυττάρων προστίθονται 50-100ng DNA και τα κύτταρα διατηρούνται στον πάγο για 30΄. Στη συνέχεια υποβάλλονται σε θερμικό σοκ (42^0C) για 45΄΄. Κατόπιν αυτού προστίθονται 900μl θρεπτικού μέσου LB και ακολουθεί επώαση στους 37^0C για 45΄. Τα κύτταρα επιστρώνονται σε τρυβλίο με στερεό θρεπτικό μέσο και κατάλληλο αντιβιοτικό (ampicillin 100μg/ml) και επωάζονται για 12ώρες στους 37^0C.

2) Έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών

Δεκτικά κύτταρα BL21pLys μετασχηματίστηκαν με τις πλασμιδιακές κατασκευές και έγινε εμβολιασμός καλλιεργειών 2ml LB + ampicillin με μετασχηματισμένους κλώνους. Οι καλλιέργειες επωάστηκαν στους 37^0C για 12ώρες. Μετά την επώαση, οι

καλλιέργειες αραιώθηκαν σε όγκο 1/10 (O.D. = 0.1) και επωάστηκαν στους 37^0C μέχρι O.D. = 0.6 – 0.8. Στη συνέχεια, η παραγωγή της πρωτεΐνης επάγεται με προσθήκη IPTG και τα επώαση στην κατάλληλη θερμοκρασία (πίνακας 1).

Όνομα	Θερμοκρασία Επαγωγής	Συγκέντρωση IPTG
p25 – GST	25^0C	0.5mM
CTRP – GST	37^0C	0.5mM
Soap – GST	30^0C	0.5mM
GST (negative control)	37^0C	0.5mM
Lam V	25^0C	0.5mM

Πίνακας 1 Θερμοκρασίες επαγωγής ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών

3) Λύση βακτηριακής καλλιέργειας σε μη αποδιατακτικές συνθήκες

Η καλλιέργεια λύνεται, αφού αφαιρεθεί το υπερκείμενο, παρουσία διαλύματος λύσης (10% glycerol, 1mM PMSF in 1xPBS) σε όγκο τέτοιο ώστε για κάθε 1ml αρχικής καλλιέργειας προστίθονται 50μl διαλύματος. Η λύση των κυττάρων γίνεται με sonication για 6x10΄΄ σε πάγο. Στη συνέχεια, η λυμένη καλλιέργεια φυγοκεντρείται στις 13.000rpm για 30΄ και το υπερκείμενο και η πελέτα διατηρούνται στους -80^0C.

4) Ανοσοανίχνευση με western blot

Μέρος του υπερκειμένου βράζεται για 10΄ παρουσία διαλύματος φόρτωσης 2x (0.09M Tris-Cl ph 6.8, 20% glycerol, 2% SDS, 0.02% bromophenol blue) και ηλεκτροφορείται σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Ακολουθεί μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης σε συνθήκες semi-dry. Η μεμβράνη επωάζεται σε 5% αποβουτυρωμένο γάλα σε TTBS (20mM Tris-Cl ph 7.5, 150mM NaCl , 0.1% Tween) για 1ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί επώαση με το πρωτεύων αντίσωμα για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου (πίνακας 2).

Όνομα	Πρωτεύων αντίσωμα	Αραίωση	Προέλευση
p25 – GST	mouse anti – p25	1/25 in TTBS	I. Siden-Kiamos
CTRP – GST	mouse anti - CTRP	1/1000 in TTBS	M. Yuda Mie University School of Medicine, Tsu Japan
Soap – GST	mouse anti - Soap	1/2000 in 1%skimm milk	I. Siden-Kiamos
Lam V	rabbit anti - laminin	1/2000 in TTBS	Abcam

Πίνακας 2

Στη συνέχεια, η μεμβράνη πλένεται 3 φορές για 10΄ με TTBS. Ακολουθεί επώαση με το δευτερεύων αντίσωμα για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου (πίνακας 3).

Όνομα	Δευτερεύων Αντίσωμα	Αραίωση	Προέλευση
p25 – GST	anti – mouse HRP	1/20.000 in TTBS	Biorad
CTRP – GST	anti – mouse HRP	1/20.000 in TTBS	Biorad
Soap – GST	anti – mouse HRP	1/20.000 in TTBS	Biorad
Lam V	anti – rabbit HRP	1/20.000 in TTBS	Biorad

Πίνακας 3

Η μεμβράνη πλένεται 3 φορές για 10΄ με TTBS.

Η μεμβράνη εμφανίζεται με την μέθοδο ECL (enhanced chemiluminescence – Pierce).

5) Κατακρήμνιση Συγγένειας GST

1° Βήμα: Πρόσδεση GST fused πρωτεΐνης σε σφαιρίδια γλουταθειόνης

Το υπερκείμενο από την λύση της βακτηριακής καλλιέργειας επωάζεται μαζί με σφαιρίδια αγαρόζης, στην επιφάνεια των οποίων υπάρχει ακινητοποιημένη γλουταθειόνη, (sigma) σε ελαφριά ανάδευση στους 4^{0}C σε θερμοκρασία δωματίου. Οι όγκοι που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον πίνακα 4:

Όνομα	Όγκος υπερκειμένου	Όγκος beads
p25 – GST	700μl	50μl
CTRP – GST	700μl	50μl
Soap – GST	500μl	50μl
GST (negative control)	50μl	20μl + 500μl PBS/glycerol (10%)

Πίνακας 4

2^{ο} Βήμα: Πλυσίματα

Τα σφαιρίδια φυγοκεντρούνται στις 5000rpm στους 4^{0}C για 5΄ και αφαιρείται το υπερκείμενο. Στη συνέχεια, πλένονται με 1ml διαλύματος λύσης, φυγοκεντρούνται στις 5000rpm στους 4^{0}C για 5΄ και αφαιρείται το υπερκείμενο. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται τρεις φορές.

3^{ο} Βήμα: Αλληλεπίδραση με Λαμινίνη

Τα σφαιρίδια από το 2^{ο} βήμα επωάζονται στον πάγο για 1 ώρα μαζί με 100μl υπερκειμένου Lam V (από την λύση της βακτηριακής καλλιέργειας) παρουσία 50μl 5x interaction buffer (250mM NaCl, 100mM Hepes, 2.5mM DDT, 25mM $MgCl_2$, 1% NP40, 1% BSA), 50μl 50% glycerol, 10μl PMSF σε τελικό όγκο 250μl. Κατά τη διάρκεια της επώασης οι δοκιμαστικοί σωλήνες πρέπει να ανακινούνται ανά τακτά χρονικά διαστήματα.

4^{ο} Βήμα: Πλυσίματα

Τα σφαιρίδια φυγοκεντρούνται στις 5000rpm στους 4^{0}C για 5΄ και αφαιρείται το υπερκείμενο. Στη συνέχεια, πλένονται με 1ml διαλύματος πλύσης (250mM NaCl,

20mM Hepes, 5mM $MgCl_2$, 0.2% NP40, 4mM PMSF), φυγοκεντρούνται στις 5000rpm στους 4^0C για 5΄ και αφαιρείται το υπερκείμενο. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται τρεις φορές.

5° Βήμα: Ανοσοανίχνευση Με Western Blot

Τα σφαιρίδια από το βήμα βράζονται με 2x διάλυμα φόρτωσης για 5΄ και ακολουθεί ανίχνευση με western blot για την Lam V, σύμφωνα με την μέθοδο που αναφέρεται παραπάνω.

2. Πειράματα Ανοσοφθορισμού Σε Μεσέντερα Ενήλικων Κουνουπιών

Τα μεσέντερα από ενήλικα κουνούπια απομονώθηκαν σε 1xPBS και μεταφέρθηκαν σε διάλυμα μονιμοποίησης 4%PFA (1M MgSO4, O.5M EGTA, 4% παραφολμαδεΰδη, 1XPBS) για 30΄΄. Στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε 1xPBS, όπου πραγματοποιήθηκε η αφαίρεση του περιεχόμενου αίματος με τομή του ιστού κατά μήκος. Η μονιμοποίηση συνεχίστηκε για 30 λεπτά σε PFA σε θερμοκρασία δωματίου. Η PFA απομακρύνθηκε με διαδοχικές πλύσεις με 1xPBS (2x5΄, 1x30΄) και το δείγμα επωάστηκε σε διάλυμα παρεμπόδισης PBT (1xPBS, 5% normal goat serum, 0.2% saponin) για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την απομάκρυνση του διαλύματος παρεμπόδισης προστίθεται το πρωτεύον αντίσωμα και ακολουθεί επώαση παρουσία διαλύματος παρεμπόδισης στους 4^oC σε θερμοκρασία δωματίου με ήπια ανάδευση (πίνακας 5).

Πρωτεύων αντίσωμα	Αραίωση	Προέλευση
mouse anti – p28 conjugated with Cy3 (568nm)	1/100 in PBT	R. Sinden Lab (Imperial College of London)
mouse anti – Pb70	1/1000 in PBT	I. Siden-Kiamos
rabbit anti - laminin	1/250 in PBT	Abcam

Πίνακας 5

Ακολουθούν πλύσεις με PBT για 3x20΄ με ήπια ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου και επώαση με το δεύτερο αντίσωμα (φθορίζων) για 1.5 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (πίνακας 6).

Δευτερεύων αντίσωμα	Αραίωση	Χαρακτηριστικά	Προέλευση
Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG(H+L) Highly cross-adsorbed	1/1000 in PBT	Πράσινο μ.κ: 488nm (Alexa Fluor 488)	Molecular Probes
Alexa Fluor 568 goat anti-mouse IgG(H+L) Highly cross-adsorbed	1/1000 in PBT	Ερυθρό μ.κ: 568nm (Alexa Fluor 568)	I. Siden-Kiamos

Πίνακας 6

Στη συνέχεια, ακολουθούν πλύσεις με PBT για 2x20΄ με ήπια ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Η τελευταία πλύση γίνεται παρουσία RNaseA (100mg/μl in PBT) στους 4^0C για 20΄. Για την χρώση των πυρήνων χρησιμοποιείται η χρωστική TO – PRO (1:5000 in PBS) για 6΄ σε θερμοκρασία δωματίου με ήπια ανάδευση. Ακολουθούν δυο σύντομες πλύσεις (2x5΄ in PBS) και συλλογή των δειγμάτων. Τα δείγματα τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρο, όπου προστίθεται διάλυμα γλυκερόλης Vectashield (Vector Laboratories), σφραγίζονται με καλυπτρίδες και στεγανοποιούνται. Τα δείγματα διατηρούνται στους -20^oC.

Σε όλες τις παραπάνω πειραματικές διαδικασίες ο ανοσοεντοπισμός των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με μικροσκοπία φθορισμού και λήψη οπτικών τομών με τη χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου Leica TCS NT/SP.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Μελέτη Πιθανών Αλληλεπιδράσεων Της Λαμινίνης Με Τις Πρωτεΐνες SOAP Και CTRP *in vitro*

1α. Έκφραση των Πρωτεϊνών CTRP, SOAP και γ1 Υπομονάδας της Λαμινίνης

Σύμφωνα με υπάρχοντα πειραματικά δεδομένα, οι πρωτεΐνες SOAP και CTRP αλληλεπιδρούν με την λαμινίνη, όπως φάνηκε από πειράματα δυο υβριδίων (Dessens et al., 2003, Mahairaki unpublished data). Όπως προαναφέρθηκε, οι πρωτεΐνες αυτές συναντώνται αποκλειστικά στο στάδιο του ωοκινέτη και παίζουν ρόλο στην εισβολή στο μεσέντερο και στη διαφοροποίηση του προς ωοκύστεις. Προκειμένου να διαπιστωθεί η αλληλεπίδραση τους με την λαμινίνη και *in vitro* ακολουθήθηκε η μέθοδος της κατακρήμνισης συγγένειας GST.

Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν πλασμιδιακές κατασκευές που περιέχουν την περιοχή των επαναλήψεων TSP του γονιδίου CTRP και το γονίδιο SOAP του *P.berghei* σε σύντηξη (fused) με το γονίδιο της θειοτρανσφεράσης της γλουταθείονης, που βρίσκεται στον φορέα pGEX4T-1. Αντίστοιχα, χρησιμοποιήθηκε πλασμιδιακή κατασκευή που περιέχει την περιοχή V της αλυσίδας γ1 της λαμινίνης, κλωνοποιημένη στο φορέα έκφρασης pET32. Η περιοχή αυτή περιλαμβάνει 4 επαναλήψεις τύπου EGF και αποτελεί το εξωκυττάριο τμήμα του γονιδίου LANB2 του *An.gambiae*. Ως positive control χρησιμοποιήθηκε η πρωτεΐνη p25, η οποία έχει ήδη αποδειχθεί ότι αλληλεπιδρά με την περιοχή V του γονιδίου LANB2 με κατακρήμνιση συγγένειας GST. Επίσης, για να αποδειχθεί ότι τυχόν θετικά αποτελέσματα οφείλονται σε αλληλεπιδράσεις της λαμινίνης με τις παρασιτικές πρωτεΐνες και όχι με την θειοτρανσφεράσης της γλουταθείονης (GST), σαν negative control χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pGEX4T-1, χωρίς fusion (οι πλασμιδιακές κατασκευές κατασκευάστηκαν από την Δρ Β. Μαχαιράκη – πίνακας 1).

	Όνομα	Φορέας Κλωνοποίησης	Γονίδιο	Περιοχή	Αμινοξέα
GST fusions	p25 – GST	pGEX- 4T-1	p25 *(P.berghei)*	εξωκυττάρια	20 – 196
	CTRP – GST	pGEX- 4T-1	CTRP *(P.berghei)*	TSP	1384 – 1812
	Soap – GST	pGEX- 4T-1	Soap *(P.berghei)*	whole gene	20 – 167
Prey	LamV	pET-32	Laminin γ1 *(An.gambiae)*	domain V	266 – 505

Πίνακας 1: Πλασμιδιακή κατασκευή της λαμινίνης του κουνουπιού *An.gambiae* και πρωτεϊνών του παρασίτου *P.berghei* που χρησιμοποιήθηκε στην μελέτη των πιθανών αλληλεπιδράσεών τους με κατακρήμνιση συγγένειας GST

Οι πλασμιδιακές κατασκευές χρησιμοποιήθηκαν για τον μετασχηματισμό δεκτικών κυττάρων BL21pLys. Στη συνέχεια εμβολιάστηκαν καλλιέργειες, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για την έκφραση των πρωτεϊνών. Για να μπορέσουν να χρησιμοποιηθούν οι πρωτεΐνες για το πείραμα κατακρήμνισης συγγένειας GST πρέπει να επιτευχθεί η έκφραση τους σε διαλυτή μορφή και με όχι τη μορφή αδιάλυτων συσσωματωμάτων (inclusion bodies). Για το σκοπό αυτό, έγιναν προσπάθειες έκφρασης της κάθε πρωτεΐνης σε διαφορετικές θερμοκρασίες επαγωγής και διαφορετικές συγκεντρώσεις IPTG (πίνακας 2).

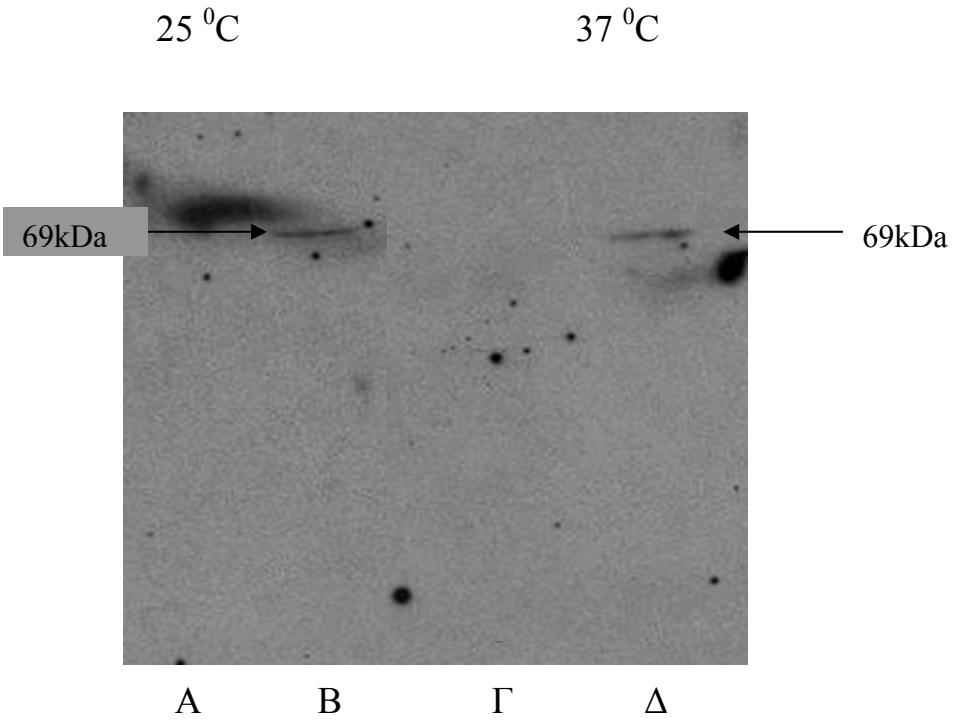
Όνομα	Θερμοκρασία	Συγκέντρωση IPTG
CTRP – GST1	37^0C	1mM
CTRP – GST	37^0C	0.5mM
CTRP – GST	30^0C	0.5mM
CTRP – GST	25^0C	0.5mM
SOAP – GST	37^0C	1mM
SOAP – GST	37^0C	0.5mM
SOAP – GST	30^0C	0.5mM
SOAP – GST	25^0C	0.5mM
p25 – GST	37^0C	0.5mM
p25 – GST	25^0C	0.5mM
LamV	37^0C	0.5mM
LamV	25^0C	0.5mM
GST	37^0C	0.5mM

Πίνακας 2: Συνθήκες επαγωγής που χρησιμοποιήθηκαν για την επαγωγή των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών

Για την εξαγωγή της πρωτεΐνης οι καλλιέργειες λύθηκαν σε μη αποδιατακτικές συνθήκες και το προϊόν της λύσης φυγοκεντρήθηκε σε υψηλές στροφές. Μέρος του υπερκειμένου καθώς και η πελέτα που προέκυψε χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση της παρουσίας της εκφρασμένης πρωτεΐνης. Η ανίχνευση έγινε με τη μέθοδο της ανισοανίχνευσης με western blot με το κατάλληλο για κάθε πρωτεΐνη αντίσωμα, όπως αναφέρεται αναλυτικότερα παρακάτω (εικόνα 1 – 5).

Η πρωτεΐνη CTRP – GST

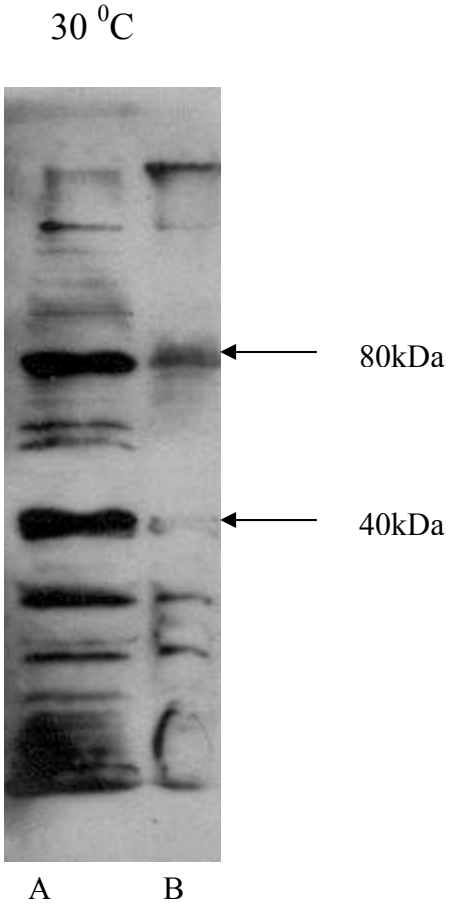
Το αναμενόμενο μέγεθος της πρωτεΐνης CTRP – GST είναι 69kDa. Από ανίχνευση για την ύπαρξη της πρωτεΐνης με πολυκλονικό αντίσωμα για την πρωτεΐνη CTRP προκύπτουν δυο μπάντες στο σωστό μέγεθος σε δυο συνθήκες επαγωγής, σε θερμοκρασία 25^0C και σε θερμοκρασία 37^0C, με συγκέντρωση IPTG 0.5mM. Επιπλέον, οι μπάντες αυτές βρίσκονται στο υπερκείμενο της λυμένης βακτηριακής καλλιέργειας. Επομένως, η πρωτεΐνη CTRP – GST έχει εκφραστεί σε διαλυτή μορφή, όπως ήταν επιθυμητό. Τέλος, η πρωτεΐνη δεν εκφράστηκε σε θερμοκρασία 37^0C σε συγκέντρωση IPTG 1mM (εικόνα 1).



Εικόνα 1: Western blot για την πρωτεΐνη CTRP – GST. Α: πελέτα που προέρχεται από λύση καλλιέργειας που έχει επαχθεί σε θερμοκρασία 25^0C με συγκέντρωση IPTG 0.5mM, Β: υπερκείμενο που προέρχεται από λύση καλλιέργειας που έχει επαχθεί σε θερμοκρασία 25^0C με συγκέντρωση IPTG 0.5mM, Γ: πελέτα που προέρχεται από λύση καλλιέργειας που έχει επαχθεί σε θερμοκρασία 37^0C με συγκέντρωση IPTG 0.5mM, Δ: υπερκείμενο που προέρχεται από λύση καλλιέργειας που έχει επαχθεί σε θερμοκρασία 37^0C με συγκέντρωση IPTG 0.5mM

Η πρωτεΐνη SOAP – GST

Το αναμενόμενο μέγεθος της πρωτεΐνης SOAP – GST είναι 40kDa. Η πρωτεΐνη SOAP – GST δεν εκφράστηκε σε θερμοκρασία 37^0C με συγκέντρωση IPTG 1mM, σε θερμοκρασία 37^0C με συγκέντρωση IPTG 0.5mM και σε θερμοκρασία 25^0C με συγκέντρωση IPTG 0.5mM, όπως φάνηκε με ανίχνευση με πολυκλονικό αντίσωμα για την πρωτεΐνη SOAP. Αντίθετα, στην περίπτωση επαγωγής της βακτηριακής καλλιέργειας σε θερμοκρασία 30^0C με συγκέντρωση IPTG 0.5mM ανάλυση western blot, έδειξε ότι η πρωτεΐνη εκφράζεται, όπως φαίνεται από την μπάντα που βρίσκεται στο σωστό μέγεθος. Μια δεύτερη μπάντα που προκύπτει σε μέγεθος διπλάσιο από το αναμενόμενο πιθανόν να αντιπροσωπεύει διμερή της πρωτεΐνης. Ένα μεγάλο μέρος της πρωτεΐνης είναι σε διαλυτή μορφή, ενώ ένα μικρότερο εμφανίζεται σε κατακρημνίζεται στην πελέτα σε αδιάλυτη μορφή (εικόνα 2).



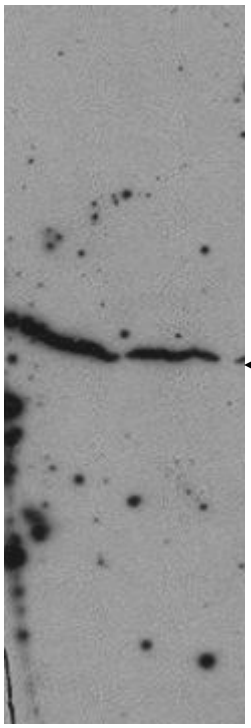
Εικόνα 2: Western blot για την πρωτεΐνη SOAP – GST. A: υπερκείμενο που προέρχεται από λύση καλλιέργειας που έχει επαχθεί σε θερμοκρασία 30^0C με

συγκέντρωση IPTG 0.5mM, B: πελέτα που προέρχεται από λύση καλλιέργειας που έχει επαχθεί σε θερμοκρασία 30^0C με συγκέντρωση IPTG 0.5mM

Η πρωτεΐνη p25 – GST

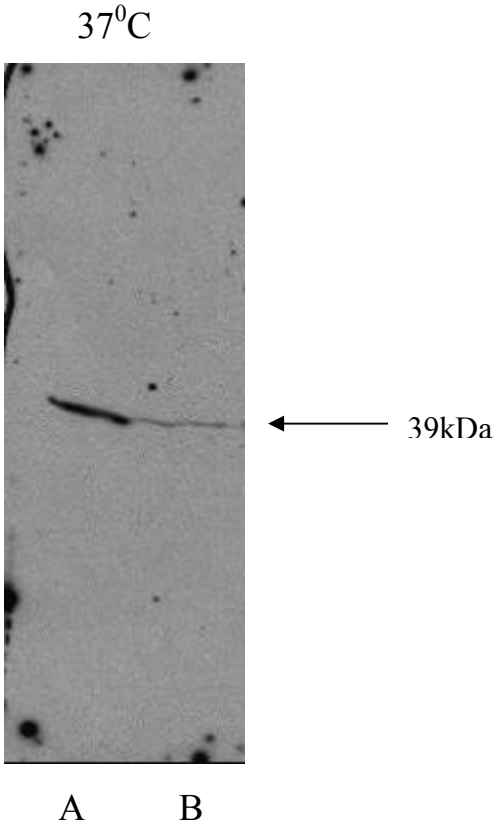
Το αναμενόμενο μέγεθος της πρωτεΐνης p25 – GST είναι 39kDa. Η πρωτεΐνη εκφράζεται και στις δυο συνθήκες επαγωγής, δηλαδή σε θερμοκρασία 25^0C (εικόνα 3) με συγκέντρωση IPTG 0.5mM και σε θερμοκρασία 37^0C (εικόνα 4) με συγκέντρωση IPTG 0.5mM, όπως φάνηκε με ανίχνευση με πολυκλονικό αντίσωμα για την πρωτεΐνη p25. Η μισή ποσότητα της εκφρασμένης πρωτεΐνης είναι διαλυτή, ενώ η άλλη μισή αδιάλυτη και στις δυο περιπτώσεις.

25^0C



A B

Εικόνα 3: Western blot για την πρωτεΐνη p25 – GST. A: υπερκείμενο που προέρχεται από λύση καλλιέργειας που έχει επαχθεί σε θερμοκρασία 25^0C με συγκέντρωση IPTG 0.5mM, B: πελέτα που προέρχεται από λύση καλλιέργειας που έχει επαχθεί σε θερμοκρασία 25^0C με συγκέντρωση IPTG 0.5mM

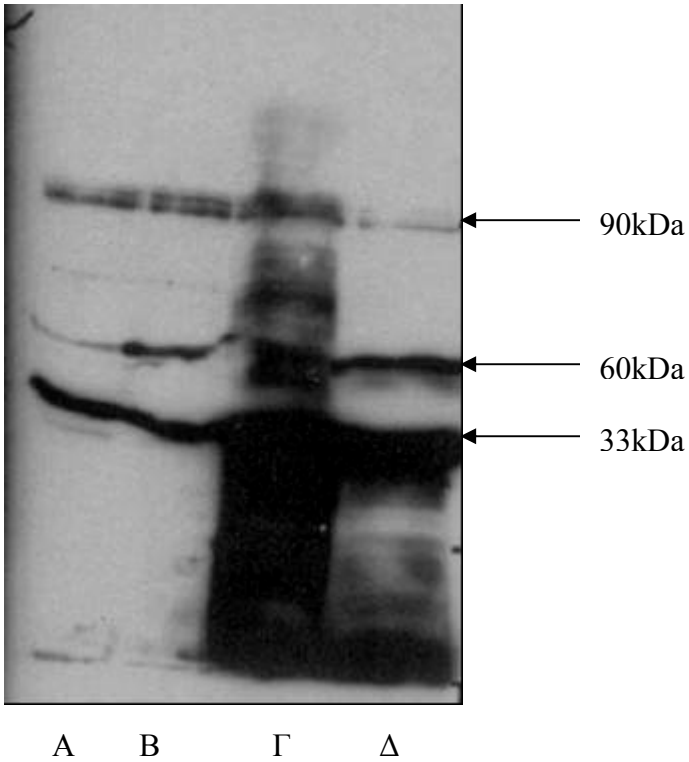


Εικόνα 4: Western blot για την πρωτεΐνη p25 – GST. A: υπερκείμενο που προέρχεται από λύση καλλιέργειας που έχει επαχθεί σε θερμοκρασία 37^0C με συγκέντρωση IPTG 0.5mM, B: πελέτα που προέρχεται από λύση καλλιέργειας που έχει επαχθεί σε θερμοκρασία 37^0C με συγκέντρωση IPTG 0.5mM

Η πρωτεΐνη LamV

Η υπομονάδα V του γονιδίου LanB2 έχει μέγεθος 33kDa. Ανίχνευση με western blot με πολυκλονικό αντίσωμα έδειξε ότι εκφράζεται στις δυο συνθήκες επαγωγής που δοκιμάστηκαν, σε θερμοκρασία 37^0C με συγκέντρωση IPTG 0.5Mm και σε θερμοκρασία 25^0C με συγκέντρωση IPTG 0.5Mm. Αν και ένα μεγάλο μέρος της πρωτεΐνης παραμένει αδιάλυτο, μικρή ποσότητα εκφράζεται και σε διαλυτή μορφή. Μπάντες που εμφανίζονται σε μέγεθος περίπου 60kDa πιθανόν να αποτελούν

διμερή της πρωτεΐνης και μπάντες μεγέθους περίπου 90kDa πιθανόν να αποτελούν τριμερή της πρωτεΐνης (εικόνα 5).

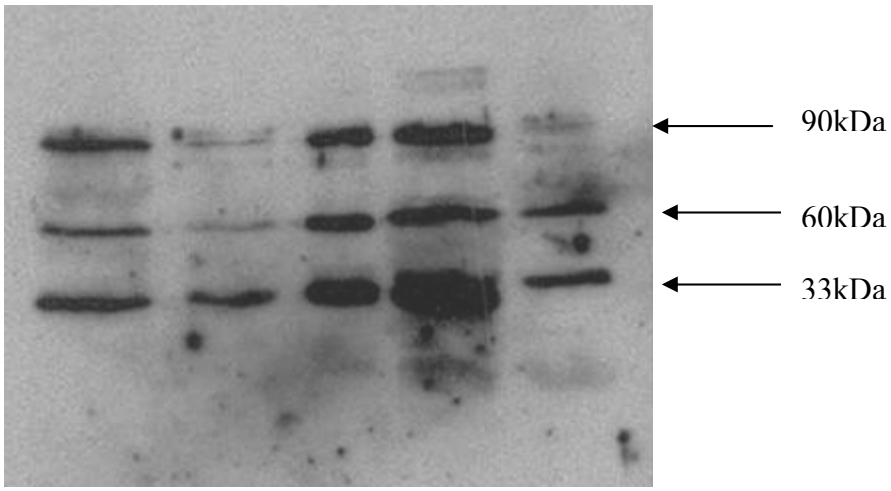


Εικόνα 5: Western blot για την πρωτεΐνη Lam V. Α: υπερκείμενο που προέρχεται από λύση καλλιέργειας που έχει επαχθεί σε θερμοκρασία 37^0C με συγκέντρωση IPTG 0.5mM, Β: υπερκείμενο που προέρχεται από λύση καλλιέργειας που έχει επαχθεί σε θερμοκρασία 25^0C με συγκέντρωση IPTG 0.5mM, Γ: πελέτα που προέρχεται από λύση καλλιέργειας που έχει επαχθεί σε θερμοκρασία 37^0C με συγκέντρωση IPTG 0.5mM, Δ: πελέτα που προέρχεται από λύση καλλιέργειας που έχει επαχθεί σε θερμοκρασία 25^0C με συγκέντρωση IPTG 0.5mM

Η έκφραση της GST έγινε σε θερμοκρασία 37^0C με συγκέντρωση IPTG 0.5mM, όπως έδειξε παρατήρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης με χρώση coomasie.

1$^{\beta}$. Κατακρήμνιση Συγγένειας GST

Οι παρασιτικές πρωτεΐνες CTRP – GST, SOAP – GST, p25 – GST καθώς και η GST, που περιέχονται στο υπερκείμενο της λύσης της βακτηριακής καλλιέργειας επωάστηκαν με σφαιρίδια GST και ακολούθησαν πλυσίματα. Οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες παραμένουν προσδεδεμένες στα σφαιρίδια, εξαιτίας της ισχυρής αλληλεπίδρασης της θειοτρανσφεράσης της γλουταθείονης με την γλουταθειόνη των σφαιριδίων, ενώ με τα πλυσίματα καθαρίζονται από τα υπολείμματα των λυμένων βακτηρίων. Οι όγκοι της λυμένης βακτηριακής καλλιέργειας που επωάστηκαν σε κάθε περίπτωση είναι τέτοιοι ώστε να περιέχουν ίδια ποσότητα της κάθε ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Στη συνέχεια, προστέθηκε η λαμινίνη, που περιέχεται στο υπερκείμενο της λυμένης βακτηριακής καλλιέργειας. Οι πρωτεΐνες αφέθηκαν να αλληλεπιδράσουν. Ακολούθησαν νέα πλυσίματα. Εφόσον, η λαμινίνη αλληλεπιδρά με τις παρασιτικές πρωτεΐνες παραμένει, μέσω αυτών, προσδεδεμένη πάνω στα σφαιρίδια. Επομένως, τα πλυσίματα απομακρύνουν μόνο τα υπολείμματα της λυμένης καλλιέργειας και όση από την πρωτεΐνη δεν έχει προσδεθεί. Τέλος, έγινε ηλεκτροφόρηση των σφαιριδίων σε πήκτωμα ακρυλαμίδης σε αποδιατακτικές συνθήκες. Πιθανή αλληλεπίδραση των παρασιτικών πρωτεϊνών με την λαμινίνη ανιχνεύτηκε με ανασοανίχνευση western blot για την λαμινίνη (εικόνα 6).



Α Β Γ Δ Ε

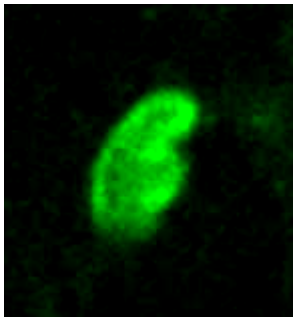
Εικόνα 6: Αποτελέσματα κατακρήμνισης συγγένειας GST. Α: αλληλεπίδραση Lam V με p25 – GST (που έχει επαχθεί σε θερμοκρασία 25^0C), Β: αλληλεπίδραση Lam V με CTRP – GST (που έχει επαχθεί σε θερμοκρασία 25^0C), Γ: αλληλεπίδραση Lam V με CTRP – GST(που έχει επαχθεί σε θερμοκρασία 37^0C), Δ: αλληλεπίδραση Lam V με SOAP – GST, Ε: αλληλεπίδραση Lam V με GST

Από τα αποτελέσματα της ανοσοανίχνευσης με western blot για την λαμινίνη, φαίνεται ότι και οι τρεις υπό μελέτη πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με αυτή. Και στην περίπτωση αυτή, η λαμινίνη εμφανίζει το ίδιο πρότυπο πιθανού διμερισμού ή τριμεριμού. Ισχυρότερη αλληλεπίδραση με από όλες παρουσιάζει η πρωτεΐνη SOAP – GST (στήλη Δ), συγκρίνοντας με την GST και με τις υπόλοιπες πρωτεΐνες. Καλή αλληλεπίδραση παρουσιάζει, επίσης, και η πρωτεΐνη CTRP – GST (στήλη Γ), που έχει επαχθεί σε θερμοκρασία 37^0C, όπως και η πρωτεΐνη p25 – GST (positive control), αν και φαίνεται πως αλληλεπιδρά ασθενέστερα από τις υπόλοιπες (στήλη Α). Τέλος, η πρωτεΐνη CTRP – GST, που έχει επαχθεί σε θερμοκρασία 25^0C (στήλη Β), φαίνεται ότι δεν αλληλεπιδρά εφόσον το πρότυπο που προκύπτει είναι πιο ασθενές από την GST (negative control).

2. Μελέτη Πιθανών Αλληλεπιδράσεων Της Λαμινίνης Με Τις Πρωτεΐνες SOAP Και CTRP *in vivo*

Μέχρι στιγμής στη βιβλιογραφία υπάρχει ένας αριθμός μελετών που αποδεικνύουν την αλληλεπίδραση της λαμινίνης με τις παρασιτικές πρωτεΐνες p25 και p28, *in vitro* (Arrighi & Hurd, 2002, Vlachou et al., 2001, Dessens, et al., 2003). Επίσης, η παρούσα μελέτη αποδεικνύει την αλληλεπίδραση της λαμινίνης με την παρασιτική πρωτεΐνη SOAP, *in vitro*. Για την καλύτερη κατανόηση των αλληλεπιδράσεων που προαναφέρθηκαν έγινε μελέτη αυτών και *in vivo* με τη πειράματα ανοσοεντοπισμού της λαμινίνης σε μεσέντερα κουνουπιών μολυσμένα με παράσιτα, στα οποία έχει γίνει λειτουργική απενεργοποίηση (knock out) των πρωτεϊνών p28, p25, SOAP καθώς και παράσιτα αγρίου τύπου.

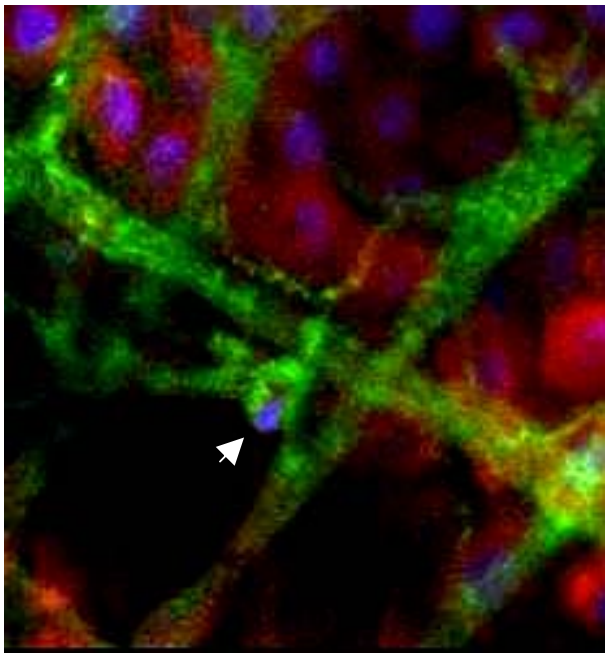
Για το σκοπό αυτό, απομονώθηκαν μεσέντερα κουνουπιών που θανατώθηκαν μια μέρα μετά τη λήψη μολυσμένου αίματος, τη στιγμή δηλαδή που το παράσιτο βρίσκεται στο αναπτυξιακό στάδιο του ωοκινέτη. Τα μεσέντερα που χρησιμοποιήθηκαν είχαν μολυνθεί με παράσιτα knock out για τις πρωτεΐνες p25, p28, SOAP και παράσιτα αγρίου τύπου (control). Τα μεσέντερα μονιμοποιήθηκαν και έγινε χρώση για την λαμινίνη με εμπορικό αντίσωμα (Abcam). Προηγούμενα πειράματα ανάλυσης της τοπολογικής κατανομής της λαμινίνης στο μεσέντερο του ξενιστή έδειξαν ότι η πρωτεΐνη ανιχνεύεται με τη μορφή ενός λεπτού ομοιόμορφου υμένα που καλύπτει το επιθηλιακό τοίχωμα προς την πλευρά της αιμολέμφου και περιβάλλει ταυτόχρονα τους μύες που το συγκρατούν (Μαχαιράκη διδακτορική διατριβή). Για την ανίχνευση των ωοκινετών χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης Pb70 του κυτταροσκελετού, που εντοπίζεται κυτταροπλασματικά (εικόνα 7) ή έναντι της p28 συντηγμένο με την κόκκινη χρωστική Cy3, ανάλογα με την κάθε περίπτωση. Η παρατήρηση των μονιμοποιημένων μεσεντέρων έγινε με συνεστιακή μικροσκοπία σε διαφορετικές μεγενθύσεις (τα μεσέντερα των κουνουπιών knock out για τις p25, p28, SOAP παραχωρήθηκαν από τον Dr H.Dessens).



Εικόνα 7: Φωτογραφία ωοκινέτη με χρώση για την Pb70

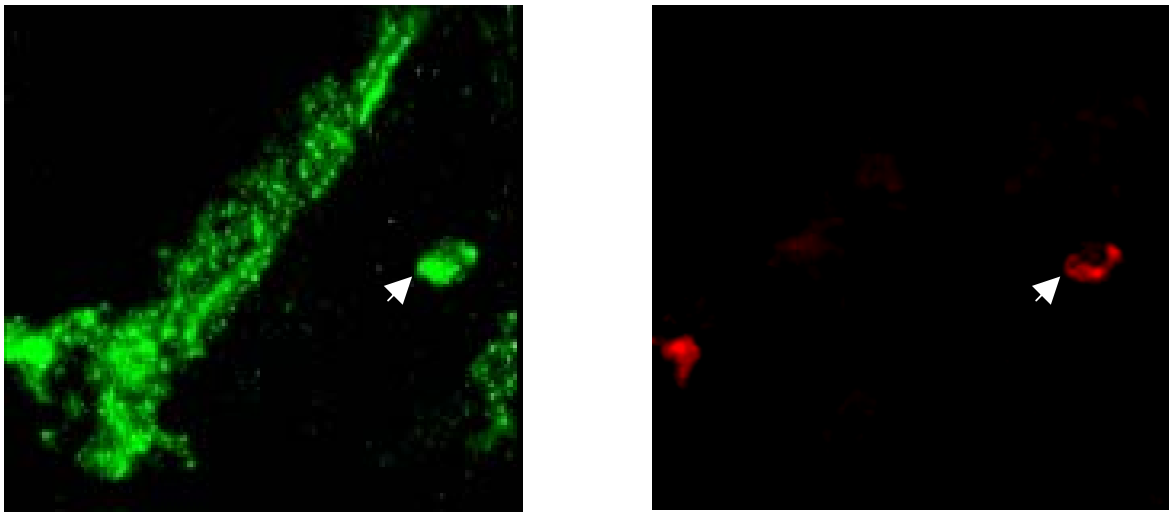
2α. Μικροσκοπική Παρατήρηση Μεσεντέρων Μολυσμένων Με Παράσιτα Αγρίου Τύπου Με Χρώση Για Την Λαμινινη

Για το πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκαν μεσέντερα κουνουπιών του είδους *An.stephensi* μολυσμένα με *P.berghei*. Έγινε χρώση για την λαμινίνη, τους ωοκινέτες και τους πυρήνες.



Εικόνα 8: Φωτογραφία βασικής λεπίδας μεσεντέρου με χρώση για την λαμινίνη (πράσινο), ωοκινέτες (κόκκινο), πυρήνες (μπλε). Με βέλος σημειώνεται ο ωοκινέτης (αγρίου τύπου).

Παρατήρηση με συνεστιακή μικροσκοπία έδειξε το αναμενόμενο πρότυπο ανίχνευσης για τη λαμινίνη και τον ωοκινέτη. Όπως φαίνεται (εικόνα 8), υπάρχει συνεντοπισμός της λαμινίνης και του ωοκινέτη. Με αυτό και άλλα πειράματα διαπιστώθηκε ότι η λαμινίνη παρουσιάζει υψηλά επίπεδα συσσώρευσης σε όλο το μήκος της επιφάνειας των ωοκινετών (εικόνα 9, 10).



Εικόνα 9, 10: Συνεντοπισμός χρώσης λαμινίνης (πράσινο) πάνω στην επιφάνεια του ωοκινέτη (κόκκινο). Η λαμινίνη συσσωρεύεται στην επιφάνεια του ωοκινέτη. Με βέλος σημειώνεται ο ωοκινέτης (αγρίου τύπου).

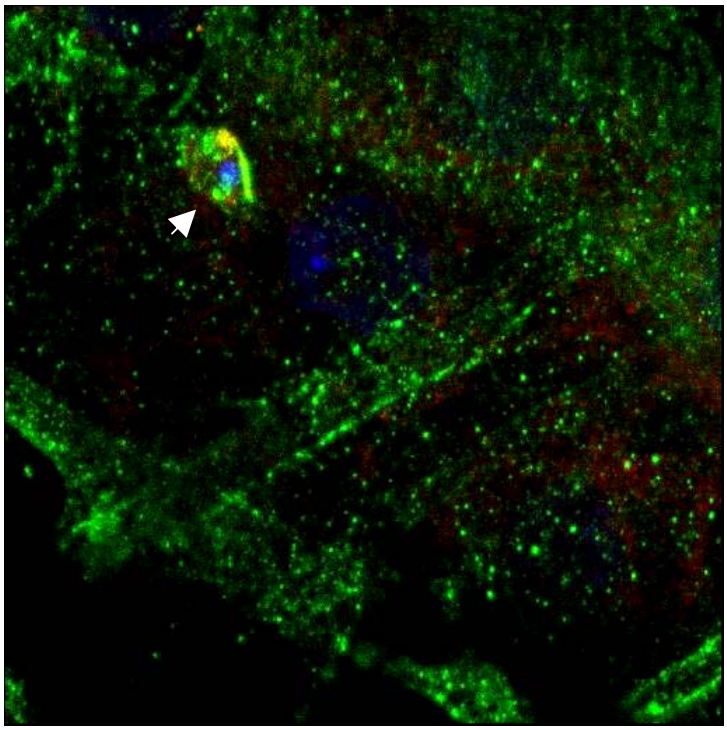
2$^{\beta}$. Μικροσκοπική Παρατήρηση Μεσεντέρων Μολυσμένων Με Παράσιτα ko για το Γονίδιο p25, p28 και SOAP Με Χρώση Για Την Λαμινίνη

Προηγούμενα πειράματα μελέτης παρασίτων knock out για τις p28 και p25, έδειξαν ότι η παραγωγή ωοκινετών είναι ελάχιστα μειωμένη σε σχέση με παράσιτα αγρίου τύπου. Οι ωοκινέτες αυτού έχουν την ικανότητα να διαπερνούν το επιθήλιο και τελικά σχηματίζουν ένα σημαντικό αριθμό ωοκυστών, αν και μειωμένο σε σχέση με παράσιτα αγρίου τύπου. Οι ωοκύστεις αυτές παράγουν φυσιολογικό αριθμό σποροζωϊτών, τα οποία μπορούν να μεταδώσουν αποτελεσματικά. Παράσιτα διπλά

knock out για τις πρωτεΐνες αυτές έχουν πιο έντονο φαινότυπο, δηλαδή αν και διαπερνούν το επιθήλιο, η διαφοροποίηση σε ωοκύστεις μειώνεται κατά 99%. Επομένως, είναι πιθανό οι πρωτεΐνες αυτές να έχουν μερικώς πλεονάζουσες λειτουργίες (Tomas et al., 2001).

Παράσιτα knock out για την πρωτεΐνη SOAP είναι μορφολογικά ίδια με παράσιτα αγρίου τύπου, όπως έδειξε παρατήρηση με χρώση Giemsa. Ωστόσο, σχηματίζουν μειωμένο αριθμό ωοκυστών, οι οποίες όμως είναι μορφολογικά όμοιες με αγρίου τύπου και παράγουν μεγάλο αριθμό σποροζωϊτών (Dessens, et al., 2003).

Προκειμένου να μελετηθούν οι πιθανές μεταβολές στην κατανομή της λαμινίνης στην επιφάνεια παρασίτων knock out για τις πρωτεΐνες p25, p28 και SOAP, έγινε χρώση για την λαμινίνη, μεσεντέρων *An.stephensi*, μολυσμένα με knock out παράσιτα *P.berghei* (εικόνα 11).



Εικόνα 11: Φωτογραφία βασικής λεπίδας μεσεντέρου με χρώση για την λαμινίνη (πράσινο) μολυσμένο με ωοκινέτη (κόκκινο) knock out για την SOAP μεσεντέρου, πυρήνες (μπλε). Με βέλος σημειώνεται ο ωοκινέτης.

Όπως φαίνεται, στην περίπτωση του ωοκινέτη knock out για την πρωτεΐνη SOAP δεν υπάρχει διαφορά στην τοπολογία της λαμινίνης. Και εδώ φαίνεται ότι ο ωοκινέτης έχει συσσωρευμένη λαμινίνη στην επιφάνεια του.

Η εξαγωγή αποτελεσμάτων για την κατανομή της λαμινίνης σε μεσέντερα κουνουπιών μολυσμένα με παράσιτα knock out για τις πρωτεΐνες p28 και p25 δεν ήταν δυνατή. Σημαντικό πρόβλημα υπήρξε η κακή κατάσταση των ιστών, αν και αυτοί διατηρούνταν σε κατάψυξη -80°C, καθώς ο μικρός αριθμός των διαθέσιμων δειγμάτων. Από απόπειρες χρώσης που έγιναν, προέκυψαν δείγματα, τα οποία σε μικροσκοπική παρατήρηση εμφάνιζαν πολύ υψηλό background της πράσινης χρωστικής (που χρησιμοποιήθηκε για χρώση της λαμινίνης). Έτσι, η διάκριση των ωοκινετών έγινε πολύ δύσκολη και η εξαγωγή αποτελεσμάτων για την τοπολογία της λαμινίνης αδύνατη. Το γεγονός αυτό πιθανόν να οφείλεται στην παλαιότητα των δειγμάτων καθώς και στην παρατεταμένη παραμονή τους στους -80°C, παρουσία αφυδατικού/μονιμοποιητικού μέσου ή στην παρατεταμένη μονιμοποίηση τους κατά την παρασκευή και απομόνωση τους. Προσπάθειες επαναφοράς τους με σταδιακή ενυδάτωση οδήγησαν σε διάλυση των ιστών.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι πρωτεΐνες p25 και p28 εκφράζονται σε αφθονία στην επιφάνεια των παρασίτων του είδους Plasmodium και σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια όπως στους μακρογαμέτες, στο ζυγωτό, στους ωοκινέτες και στις ωοκύστεις, ενώ οι πρωτεΐνες SOAP και CTRP εκφράζονται μόνο στο στάδιο του ωοκινέτη. Σύμφωνα με τα υπάρχοντα πειραματικά δεδομένα αποτελούν τους κύριους υποψήφιους δεσμευτές για πιθανούς υποδοχείς στον φορέα, οι οποίοι επιτρέπουν την εισβολή στο μεσέντερο καθώς και σηματοδοτούν την διαφοροποίηση του ωοκινέτη σε ωοκύστη. Στα πλαίσια της προσπάθειας κατανόησης των μοριακών μηχανισμών της αναπτυξιακής πορείας του παρασίτου μέσα στο μεσέντερο του φορέα και των εμπλεκόμενων σε αυτή παραγόντων, η παρούσα εργασία διερευνά με εναλλακτικές πειραματικές διαδικασίες το ρόλο που διαδραματίζει η λαμινίνη του κουνουπιού στην παραπάνω διαδικασία ανάπτυξης. Στη βιβλιογραφία έχουν ήδη αναφερθεί αλληλεπιδράσεις της λαμινίνης με τις παραπάνω πρωτεΐνες (Arrighi & Hurd, 2002, Vlachou et al., 2001, Dessens et al., 2003;, Mahairaki, unpublished data). Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η περαιτέρω ανάλυση των αλληλεπιδράσεων των πρωτεϊνών CTRP και SOAP, του παρασίτου *P.berghei* με την υπομονάδα γ1 της λαμινίνης του κουνουπιού *An.gambiae*, *in vitro*, με τη μέθοδο της κατακρήμνισης συγγένειας GST. Επίσης, γίνεται μελέτη με πειράματα ανοσοεντοπισμού της λαμινίνης, *in vivo*, μεσεντέρων κουνουπιών μολυσμένα με παράσιτα, στα οποία έχει γίνει λειτουργική απενεργοποίηση των πρωτεϊνών p28, SOAP, p25, καθώς και σύγκριση με παράσιτα αγρίου τύπου.

Τα πρώτα αποτελέσματα της κατακρήμνισης συγγένειας GST, δείχνουν αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης CTRP του *P. berghei* με την υπομονάδα γ1 της λαμινίνης του κουνουπιού, γεγονός που υποδηλώνει ότι η πρωτεΐνη στην επιφάνεια του παρασίτου πιθανόν να αλληλεπιδρά με τη βασική λεπίδα του επιθηλίου του κουνουπιού. Είναι ήδη γνωστό ότι η πρωτεΐνη αυτή συμμετέχει στην εισβολή του επιθηλίου του μεσεντέρου (Yuda 1999 et al., Templeton et al., 2000). Η αλληλεπίδραση της με την λαμινίνη της βασικής λεπίδας, όπως αποδεικνύεται από την παρούσα και από άλλες μελέτες, ενδεχομένως να υποδεικνύει το ρόλο αυτής και στην διαδικασία της διαφοροποίησης του ωοκινέτη προς ωοκύστη. Πιθανόν, λοιπόν, ο λειτουργικός ρόλος της CTRP να είναι και σηματοδοτικός. Η υπόθεση συμφωνεί με τη χαρακτηριστική δομή της πρωτεΐνης CTRP, καθώς περιλαμβάνει περιοχές όπως αυτές τύπου-TSP που είναι γνωστό ότι παίζουν ρόλο σε μηχανισμούς σηματοδότησης (Yuda et al., 1999) καθώς και με το γεγονός ότι η CTRP είναι μια εκκρινόμενη

πρωτεΐνη. Ωστόσο, τα παραπάνω αποτελέσματα αυτά, καθώς και αποτελέσματα από παρατήρηση τοπολογικής κατανομής σε μικροσκοπία φθορισμού, όπου η λαμινίνη φαίνεται να καλύπτει την ωοκύστη (Μαχαιράκη Β., διδακτορική διατριβή), πιθανόν να υποδεικνύουν ότι λειτουργικός ρόλος της λαμινίνης κατά την ανάπτυξη του παρασίτου να είναι προστατευτικός. Δηλαδή, είναι δυνατόν η κάλυψη των ωοκυστών με συστατικά του εξωκυττάριου υποστρώματος να εμποδίζει την αναγνώρισή τους από το ανοσοποιητικό σύστημα του κουνουπιού επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο την ανάπτυξή τους για εκτεταμένες χρονικές περιόδους μέσα στην μεσεντερική κοιλότητα χωρίς τον κίνδυνο της επίθεσης και απόρριψής τους από το αμυντικό σύστημα του ξενιστή.

Η πρωτεΐνη SOAP, σύμφωνα με προηγούμενα βιβλιογραφικά δεδομένα, αλληλεπιδρά με λαμινίνη του κουνουπιού, όπως φάνηκε από πειράματα δυο υβριδίων (Dessens et al., 2003). Η παρούσα μελέτη αποδεικνύει την ισχυρή αλληλεπίδραση της SOAP με την λαμινίνη της βασικής λεπίδας και με την μέθοδο της κατακρήμνισης συγγένειας GST. Έχει δειχθεί ότι ωοκινέτες knock out για την SOAP έχουν αισθητά μειωμένο ποσοστό διαφοροποίησης σε ωοκύστεις (Dessens et al., 2003). Φαίνεται, λοιπόν, ότι και η SOAP, που είναι εξωκυτταρική, παίζει σηματοδοτικό ρόλο κατά τη διαφοροποίηση. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι ωοκινέτες knock out για την SOAP σε μεσέντερα με χρώση για την λαμινίνη εμφανίζουν κατανομή αυτής ίδια με ωοκινέτες αγρίου τύπου, σε μικροσκοπική παρατήρηση. Τα γεγονός αυτό σημαίνει ότι το πρότυπο που παρατηρείται οφείλεται στη δράση πολλών γονιδίων, οπότε έλλειψη ενός δεν προκαλεί διαφορές στην κατανομή της λαμινίνης. Και στην περίπτωση αυτή, δεν αποκλείεται ο πιθανός προστατευτικός ρόλος της λαμινίνης.

Η προσπάθεια καταπολέμησης της ελονοσίας οδηγεί στην διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων των πρωτεϊνών του παρασίτου και του φορέα αυτής. Κατανόησης τους μπορεί να οδηγήσει στην πιθανή εύρεση στόχων για την διακοπή της διέλευσης του παρασίτου μέσα στο μεσέντερο του κουνουπιού ή την δημιουργία εμβολίων. Τέτοιους στόχους μπορεί να αποτελέσουν και οι πρωτεΐνες CTRP και SOAP, εξαιτίας του ρόλου που παίζουν στην εισβολή στο μεσέντερο και στην διαφοροποίηση του ωοκινέτη προς ωοκύστεις, όπως φαίνεται από αυτή και από άλλες εργασίες.

Βιβλιογραφία

[1-34]

1. Adini, A. and A. Warburg, *Interaction of Plasmodium gallinaceum ookinetes and oocysts with extracellular matrix proteins.* Parasitology, 1999. **119 (Pt 4)**: p. 331-6.
2. Alphey, L., et al., *Malaria control with genetically manipulated insect vectors.* Science, 2002. **298**(5591): p. 119-21.
3. Arrighi, R.B. and H. Hurd, *The role of Plasmodium berghei ookinete proteins in binding to basal lamina components and transformation into oocysts.* Int J Parasitol, 2002. **32**(1): p. 91-8.
4. Beck, K., I. Hunter, and J. Engel, *Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain glycoprotein.* Faseb J, 1990. **4**(2): p. 148-60.
5. Billingsley, P.F. and H. Hecker, *Blood digestion in the mosquito, Anopheles stephensi Liston (Diptera: Culicidae): activity and distribution of trypsin, aminopeptidase, and alpha-glucosidase in the midgut.* J Med Entomol, 1991. **28**(6): p. 865-71.
6. Billker, O., et al., *Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito.* Nature, 1998. **392**(6673): p. 289-92.
7. Colognato, H. and P.D. Yurchenco, *Form and function: the laminin family of heterotrimers.* Dev Dyn, 2000. **218**(2): p. 213-34.
8. Dessens, J.T., et al., *SOAP, a novel malaria ookinete protein involved in mosquito midgut invasion and oocyst development.* Mol Microbiol, 2003. **49**(2): p. 319-29.
9. Ghosh, A.K., P.E. Ribolla, and M. Jacobs-Lorena, *Targeting Plasmodium ligands on mosquito salivary glands and midgut with a phage display peptide library.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(23): p. 13278-81.
10. Grossman, G.L., et al., *Germline transformation of the malaria vector, Anopheles gambiae, with the piggyBac transposable element.* Insect Mol Biol, 2001. **10**(6): p. 597-604.
11. Han, Y.S., et al., *Molecular interactions between Anopheles stephensi midgut cells and Plasmodium berghei: the time bomb theory of ookinete invasion of mosquitoes.* Embo J, 2000. **19**(22): p. 6030-40.
12. Hemingway, J., L. Field, and J. Vontas, *An overview of insecticide resistance.* Science, 2002. **298**(5591): p. 96-7.
13. Hohenester, E. and J. Engel, *Domain structure and organisation in extracellular matrix proteins.* Matrix Biol, 2002. **21**(2): p. 115-28.
14. Huber, M., E. Cabib, and L.H. Miller, *Malaria parasite chitinase and penetration of the mosquito peritrophic membrane.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(7): p. 2807-10.
15. Limviroj, W., et al., *Immuno-electron microscopic observation of Plasmodium berghei CTRP localization in the midgut of the vector mosquito Anopheles stephensi.* J Parasitol, 2002. **88**(4): p. 664-72.
16. Mota, M.M. and A. Rodriguez, *Invasion of mammalian host cells by Plasmodium sporozoites.* Bioessays, 2002. **24**(2): p. 149-56.
17. Mu, J., et al., *Multiple transporters associated with malaria parasite responses to chloroquine and quinine.* Mol Microbiol, 2003. **49**(4): p. 977-89.

18. Ranson, H., et al., *Evolution of supergene families associated with insecticide resistance.* Science, 2002. **298**(5591): p. 179-81.
19. Ringwald, P., et al., *Monitoring of drug-resistant malaria in Africa.* Lancet, 2002. **360**(9336): p. 875-6.
20. Rosenberg, R., *Ejection of malaria sporozoites by feeding mosquitoes.* Trans R Soc Trop Med Hyg, 1992. **86**(1): p. 109.
21. Schlagenhauf, P., R. Steffen, and L. Loutan, *Migrants as a major risk group for imported malaria in European countries.* J Travel Med, 2003. **10**(2): p. 106-7.
22. Shahabuddin, M., et al., *Transmission-blocking activity of a chitinase inhibitor and activation of malarial parasite chitinase by mosquito protease.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(9): p. 4266-70.
23. Shao, L., M. Devenport, and M. Jacobs-Lorena, *The peritrophic matrix of hematophagous insects.* Arch Insect Biochem Physiol, 2001. **47**(2): p. 119-25.
24. Sinden, R.E. and P.F. Billingsley, *Plasmodium invasion of mosquito cells: hawk or dove?* Trends Parasitol, 2001. **17**(5): p. 209-12.
25. Templeton, T.J., D.C. Kaslow, and D.A. Fidock, *Developmental arrest of the human malaria parasite Plasmodium falciparum within the mosquito midgut via CTRP gene disruption.* Mol Microbiol, 2000. **36**(1): p. 1-9.
26. Tomas, A.M., et al., *P25 and P28 proteins of the malaria ookinete surface have multiple and partially redundant functions.* Embo J, 2001. **20**(15): p. 3975-83.
27. Vlachou, D., et al., *Anopheles gambiae laminin interacts with the P25 surface protein of Plasmodium berghei ookinetes.* Mol Biochem Parasitol, 2001. **112**(2): p. 229-37.
28. Vlachou, D., et al., *Real-time, in vivo analysis of malaria ookinete locomotion and mosquito midgut invasion.* Cell Microbiol, 2004. **6**(7): p. 671-85.
29. Warburg, A. and L.H. Miller, *Sporogonic development of a malaria parasite in vitro.* Science, 1992. **255**(5043): p. 448-50.
30. Wilkins, S. and P.F. Billingsley, *Partial characterization of oligosaccharides expressed on midgut microvillar glycoproteins of the mosquito, Anopheles stephensi Liston.* Insect Biochem Mol Biol, 2001. **31**(10): p. 937-48.
31. Yuda, M., H. Sakaida, and Y. Chinzei, *Targeted disruption of the plasmodium berghei CTRP gene reveals its essential role in malaria infection of the vector mosquito.* J Exp Med, 1999. **190**(11): p. 1711-6.
32. Zieler, H., J.P. Nawrocki, and M. Shahabuddin, *Plasmodium gallinaceum ookinetes adhere specifically to the midgut epithelium of Aedes aegypti by interaction with a carbohydrate ligand.* J Exp Biol, 1999. **202 (Pt 5)**: p. 485-95.
33. Zieler, H. and J.A. Dvorak, *Invasion in vitro of mosquito midgut cells by the malaria parasite proceeds by a conserved mechanism and results in death of the invaded midgut cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(21): p. 11516-21.
34. Zieler, H., et al., *A snake venom phospholipase A(2) blocks malaria parasite development in the mosquito midgut by inhibiting ookinete association with the midgut surface.* J Exp Biol, 2001. **204**(Pt 23): p. 4157-67.