

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

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Μελέτη της οικογένειας των αννεξινών του Ανωφελούς κώνωπα,
πρωτεϊνών που προσδέονται στο πρωτόζωο *Plasmodium berghei***



ΜΙΧΑΛΗΣ ΚΟΤΣΥΦΑΚΗΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ, ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2004

**Στους γονείς μου, Γεώργιο και Ειρήνη, στα
αδέλφια μου Στέλιο και Ανδρονίκη και σε
όλους όσους πίστεψαν σε μένα**

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε κατά το χρονικό διάστημα 2000-2004 στο εργαστήριο Μοριακής Γενετικής Εντόμων του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας στα πλαίσια του διατμηματικού προγράμματος Μοριακής Βιολογίας και Βιοϊατρικής. Ένα μέρος των πειραματικών εργασιών εκπονήθηκε στο Ινστιτούτο Μοριακής και Κυτταρικής Βιολογίας στο Στρασβούργο, με χρηματοδότηση από την Ευρωπαϊκή Οργάνωση Μοριακής Βιολογίας (EMBO).

Θέλω να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή Κίτσο Λούη για την ουσιαστική καθοδήγηση και επίβλεψη της διδακτορικής διατριβής και για τις δυνατότητες που μου έδωσε να προχωρήσω στο χώρο της έρευνας. Το αμείωτο ενδιαφέρον που έδειξε από την αρχή και καθ' όλη την διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής αυτής, καθόρισε την επιτυχή ολοκλήρωσή της.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής καθηγητές Μιχάλη Αβέρωφ και Τάσο Οικονόμου και της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, καθηγητές Γιώργο Γιαννόπουλο, Χρήστο Δελιδάκη, Φώτη Καφάτο και Ζαχαρία Σκούρα, τόσο για την αποδοχή της πρότασης συμμετοχής τους, όσο και για την εποικοδομητική τους κριτική και την πολύτιμη βοήθειά τους.

Ευχαριστώ ιδιαιτέρως την ερευνήτρια του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας Inga Siden-Kiamos για την επιστημονική συνεισφορά, τις κριτικές υποδείξεις και το συνεχές ενδιαφέρον της, που βοήθησαν ουσιαστικά τη μελέτη αυτή.

Αισθάνομαι βαθύτατα υπόχρεος στην Καθηγήτρια Laurence Ehret-Sabatier για τη γεμάτη από συναρπαστικές στιγμές φιλοξενία μου στο εργαστήριό της στο Στρασβούργο. Ένα μεγάλο ευχαριστώ ανήκει και στα υπόλοιπα μέλη της ομάδας της.

Επιθυμώ να ευχαριστήσω το Δρ. Γιάννη Βόντα, που με τη συναδελφικότητα και τον εύθυμο χαρακτήρα του συνέβαλε τα μέγιστα στην επιτυχή συνεργασία μας, καθώς και τον ερευνητή του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας Θανάση Λουκέρη για τις πολλές και γόνιμες συζητήσεις μας.

Η διατριβή αυτή δεν θα μπορούσε να ολοκληρωθεί χωρίς τη συνεπή και άρτια τεχνική συνδρομή του Γιώργη Βρέντζου, του Αλέκου Μπαμπαράτσα, του Λευτέρη Σπανού, του Μπάμπη Ποζίδη, του Γιώργου Παπαγιαννάκη και των αδελφών Μιχελιδάκη. Επίσης πολύτιμη ήταν η βοήθεια σε υπολογιστικά θέματα των Γιάννη Κουκλινού και Δημήτρη Αϊβαλιώτη.

Ευχαριστώ ακόμα τους συναδέλφους μου Χρυσούλα Πιτσούλη, Τάσο Παυλόπουλο, Παντελή Τοπάλη για την εποικοδομητική ανταλλαγή απόψεων και την πρόθυμη παροχή συμβουλών (τεχνικών και όχι μόνο) όποτε και αν τους ζητήθηκε. Επίσης τις Μαριάνθη Κηπαράκη και Κωνσταντίνα Ευσταθίου για την πολύτιμη βοήθεια τους κατά την διάρκεια παραμονής τους στο εργαστήριό μας. Θα ήταν παράλειψη αν δεν ευχαριστούσα και τα κατά καιρούς μέλη του Εργαστηρίου Μοριακής Γενετικής Εντόμων, καθώς και τα μέλη των άλλων εργαστηρίων του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας. Η καθημερινή αλληλεπίδραση μαζί τους ήταν κάτι παραπάνω από πολύτιμη για εμένα.

Από το στενό οικογενειακό μου περιβάλλον θα ήθελα να εκφράσω τη βαθιά μου ευγνωμοσύνη στους γονείς μου Γιώργο και Ειρήνη, στα αδέρφια μου Στέλιο και Ανδρονίκη και στο θείο μου Μανώλη Φραγκούλη για την πολύτιμη ηθική και όχι μόνο συμπαράσταση, που με αγάπη μου προσέφεραν μέχρι σήμερα.

Σε προσωπικό επίπεδο θα ήθελα να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους ξεχωριστούς φίλους μου, Αντώνη, Γιάννη, Γιώργο, Νίκο και Γιασεμή, καθώς και στη Χαρά Ζαφειροπούλου. Η φιλία τους ήταν πάντα πολύτιμη για μένα σε κάθε δύσκολη στιγμή. Επίσης ευχαριστώ από την καρδιά μου την Ευαγγελία, που με πίστη, υπομονή και κατανόηση με στήριξε όλο αυτό το διάστημα.

Μιχάλης Κοτσυφάκης
Ηράκλειο, Νοέμβριος 2004

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|---|--------------|
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ | 3 |
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΑΓΓΛΙΚΗ | 4 |
| ΕΙΣΑΓΩΓΗ | 5-19 |
| 1. ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΛΟΝΟΣΙΑ | 5-9 |
| 2. Ο ΚΥΚΛΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ | 9-12 |
| 3. Η ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΜΕΣΕΝΤΕΡΟΥ | 13-15 |
| 4. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΠΑΡΑΣΙΤΩΝ ΤΗΣ ΕΛΟΝΟΣΙΑΣ ΜΕ ΤΟ ΜΕΣΕΝΤΕΡΟ ΤΩΝ ΚΟΥΝΟΥΠΙΩΝ | 16-18 |
| 5. ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗ ΤΗΣ ΕΛΟΝΟΣΙΑΣ | 18-19 |
| 6. ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ | 19 |
| ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ | 20-37 |
| 1. ΠΗΓΕΣ ΠΡΩΤΗΣ ΥΛΗΣ | 20-24 |
| 2. ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ | 24-30 |
| 3. ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ | 30-34 |
| 4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΑΝΟΣΟΕΝΤΟΠΙΣΜΟΥ ΜΕ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ | 34-36 |
| 5. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΑΝΝΕΞΙΝΩΝ ΜΕ ΤΑ ΠΑΡΑΣΙΤΑ ΤΗΣ ΕΛΟΝΟΣΙΑΣ | 36-37 |
| ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ | 38-70 |
| 1. ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ-ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΟΛΥΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΣΔΕΝΟΥΝ ΩΟΚΙΝΕΤΕΣ | 38-46 |
| 2. ΓΟΝΙΔΙΑ ΑΝΝΕΞΙΝΩΝ ΣΤΟ ΚΟΥΝΟΥΠΙ ΑΝΟΡΗΕΛΕΣ GAMBIAE | 46-52 |
| 3. ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΩΝ ΑΝΝΕΞΙΝΩΝ ΣΤΟ ΚΟΥΝΟΥΠΙ ΑΝΟΡΗΕΛΕΣ GAMBIAE ΜΕ ΗΜΙ-ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ | 53 |
| 4. ΑΠΟΚΑΛΥΨΗ ΤΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΑΝΝΕΞΙΝΩΝ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΙΣΤΟΥΣ ΚΟΥΝΟΥΠΙΩΝ ΜΕ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟ | 54-62 |
| 5. ΑΝΑΔΕΙΞΗ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΑΝΝΕΞΙΝΩΝ ΜΕ ΠΑΡΑΣΙΤΑ ΤΗΣ ΕΛΟΝΟΣΙΑΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΜΕΣΕΝΤΕΡΑ ΚΟΥΝΟΥΠΙΟΥ | 62-68 |
| 6. ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΑΝΝΕΞΙΝΩΝ ΜΕ ΤΑ ΠΑΡΑΣΙΤΑ ΤΗΣ ΕΛΟΝΟΣΙΑΣ | 68-70 |
| ΣΥΖΗΤΗΣΗ | 71-79 |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | 80-87 |

Μελέτη της οικογένειας των αννεξινών του Ανωφελούς κώνωπα, πρωτεϊνών που προσδέονται στο πρωτόζωο *Plasmodium berghei*

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της συγκεκριμένης έρευνας ήταν η ταυτοποίηση πολυπεπτιδίων του Ανωφελούς κώνωπα (*Anopheles gambiae*) ικανών να αλληλεπιδρούν ισχυρά με το παράσιτο της ελονοσίας *Plasmodium berghei*, καθώς και η διερεύνηση του πιθανού λειτουργικού τους ρόλου κατά τη μόλυνση του μεσεντέρου του κουνουπιού με ελονοσία. Σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από *An. gambiae*, αλλά και από άλλα δίπτερα έντομα, όπως το κουνούπι *Aedes aegypti* και η μύγα *Drosophila melanogaster*, βρέθηκαν πρωτεΐνες με διαφορετικά μοριακά βάρη (από περίπου 34 kDa έως και 52 kDa), να έχουν την ικανότητα πρόσδεσης σε απομονωμένους ωοκινέτες, *in vitro*. Συνδυάζοντας ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων με φασματομετρία MALDI-TOF, τα πολυπεπίδια της μύγας των φρούτων ταυτοποιήθηκαν ως ισομορφές της αννεξίνης B11. Ακολούθησε η κλωνοποίηση των ορθόλογων γονιδίων του Ανωφελούς και η μελέτη της έκφρασής τους στους ιστούς του κουνουπιού. Ανοσοχρώση μεσεντέρων μετά τη λήψη μολυσμένου με παράσιτα γεύματος αίματος έδειξε ότι η πρόσδεση αννεξίνης συμβαίνει και *in vivo* εντός του κουνουπιού. Λειτουργική ανάλυση, με τεχνικές RNAi και με χορήγηση πολυκλωνικών αντισωμάτων έναντι των αννεξινών, ταυτόχρονα με τη λήψη μολυσμένου γεύματος αίματος από τα κουνούπια, δείχνει ότι η αλληλεπίδραση αννεξίνης με τα παράσιτα της ελονοσίας, είναι ευεργετική για τα τελευταία, υποβοηθώντας τη μόλυνση του μεσεντέρου του Ανωφελούς. Τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας θα μπορούσαν να συμβάλουν στην ανάπτυξη νέων στρατηγικών καταπολέμησης της νόσου που θα στοχεύουν τη μη ανάπτυξη του Πλασμοδίου στον ασπόνδυλο φορέα.

Λέξεις κλειδιά: *Anopheles gambiae* / *Drosophila melanogaster* / ελονοσία / μεσέντερο / *Plasmodium*.

A study of the *Anopheles* annexin family as proteins that bind *Plasmodium berghei* parasites

SUMMARY

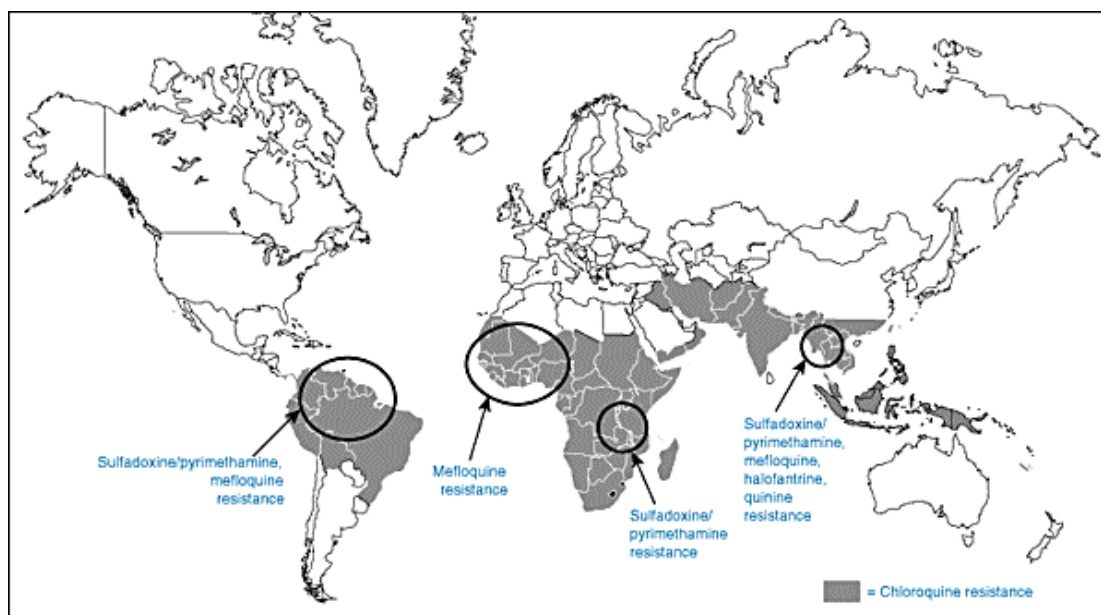
The aim of this study is to uncover polypeptides in the mosquito *Anopheles gambiae* that strongly interact with the malaria parasite *Plasmodium berghei* and study their putative functional role during the infection of the mosquito midgut. Distinct molecules (with an apparent molecular weight between 34 kDa and 52 kDa) were detected to selectively bind purified ookinetes *in vitro*, not only in *An. gambiae* protein extracts, but also in extracts from other dipteran insects, including the mosquito *Aedes aegypti* and the fruitfly *Drosophila melanogaster*. Combining two-dimensional electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry, the fruitfly polypeptides were identified as isomorphs of the annexin B11 protein. The *Anopheles* orthologues were subsequently cloned and their expression in the mosquito tissues was studied. Immunostaining of midguts after ingestion of a *Plasmodium*-infected blood meal, showed that annexin binding can be detected *in vivo* during the onset of malaria infection. Functional analysis using RNAi techniques and mosquito feeding with anti-annexin antibodies, indicates that annexin-*Plasmodium* interaction is advantageous for the developing malaria parasites, thus promoting the infection of the *Anopheles* midgut. The results of this work could contribute in the development of novel strategies to fight the disease, that target *Plasmodium* development in the invertebrate vector.

Keywords: *Anopheles gambiae* / *Drosophila melanogaster* / malaria / midgut / *Plasmodium*.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΛΟΝΟΣΙΑ

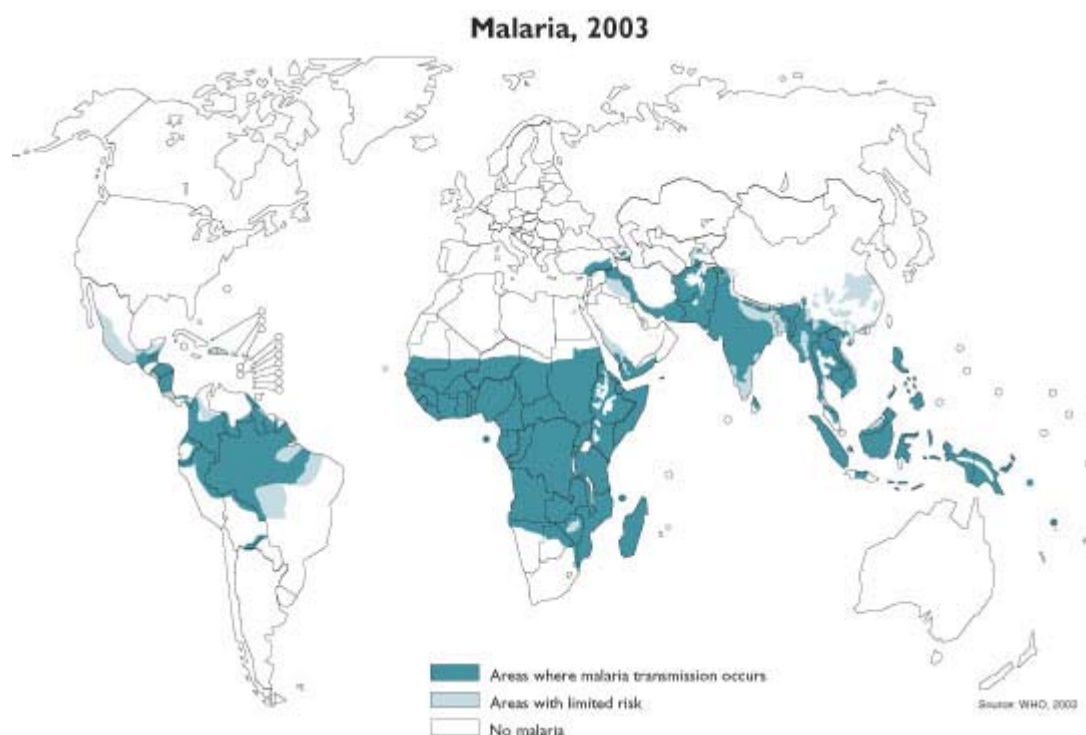
Η ελονοσία είναι μια ασθένεια που προκαλείται στους ανθρώπους από τέσσερα είδη του μονοκύτταρου παρασιτικού πρωτόζωου *Plasmodium*: τα *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, (Gilles, 1993) με το πρώτο να έχει τον κύριο λόγο σε λοιμώξεις και να είναι το πιο θανατηφόρο. Μετά την επιτυχή εξάλειψη της νόσου στις χώρες του Βορά, οι επί δεκαετίες προσπάθειες να ελεγχθεί η νόσος και στις χώρες του Νότου είναι απογοητευτικές (Snow *et al.*, 1999). Σήμερα είναι διαθέσιμος ένας σχετικά μικρός αριθμός φαρμάκων κατά της ελονοσίας, με ελάχιστα νέα φάρμακα να έχουν εμφανιστεί τα τελευταία 20 χρόνια, όπως τα halofantrine και mefloquine (White, 1996). Τα τελευταία χρόνια το παράσιτο έχει γίνει ανθεκτικό τόσο στα κλασσικά ανθελονοσιακά φάρμακα, όπως η χλωροκίνη, όσο και στα καλύτερα καινούργια (Βλ. Εικόνα 1). Είναι επιτακτική ανάγκη λοιπόν η ανάπτυξη νέων, ακόμα πιο δραστικών φαρμάκων μειωμένου κόστους (Ridley, 2002). Επιπλέον, κανένα αποτελεσματικό εμβόλιο δεν έχει παραχθεί ακόμα (Richie and Saul, 2002), πράγμα που είναι ίσως αναμενόμενο εάν κανείς σκεφτεί ότι το παράσιτο ζει σε συνεχή επαφή με το ανοσοποιητικό σύστημα (Roberts, 2002) και ως εκ τούτου έχει αναπτύξει μηχανισμούς ώστε να καταφέρνει να ξεφεύγει από αυτό.



Εικόνα 1 : γεωγραφική κατανομή της ανάπτυξης ανθεκτικότητας στα ανθελονοσιακά φάρμακα σε παγκόσμια κλίμακα

Οι αρνητικές επιπτώσεις της ελονοσίας στη δημόσια υγεία, σε παγκόσμια κλίμακα, αυξάνονται διαρκώς, ειδικά στην κάτω από την Σαχάρα Αφρική, κυρίως λόγω της ανθεκτικότητας των κουνουπιών-φορέων στα εντομοκτόνα, του παρασίτου στα φάρμακα, αλλά και λόγω κοινωνικών και περιβαλλοντικών συνθηκών. Αποτελεί κύριο δημόσιο πρόβλημα υγείας σε περισσότερες από 100

χώρες, συνολικού αριθμού κατοίκων 2.4 δις, δηλαδή σχεδόν στο μισό του παγκοσμίου πληθυσμού (Βλ. Εικόνα 2).



Εικόνα 2: γεωγραφική κατανομή της ελονοσίας κατά το 2003

Από τις Η.Π.Α. και σχεδόν όλη την Ευρώπη η νόσος εξαλείφθηκε κατά το πρώτο μισό του 20^{ου} αιώνα χάρις σε συντονισμένες αλλαγές στον τρόπο χρήσης γης, σε γεωργικές πρακτικές, στον τρόπο δόμησης των σπιτιών και σε προσπάθειες ελέγχου του φορέα της ελονοσίας, του Ανωφελούς κώνωπα. Η ανάπτυξη του αποτελεσματικότερου εντομοκτόνου DDT έδωσε το έναυσμα παγκοσμίως για μια προσπάθεια εξάλειψης του φορέα κατά τις δεκαετίες του '50 και του '60, που ήταν κατ' αρχάς εξαιρετικά επιτυχής σε πολλές χώρες, όπως η Ινδία, η Σρι Λάνκα και η πρώην Σοβιετική Ένωση. Όμως αυτά τα επιτυχή αρχικά αποτελέσματα δεν συνεχίστηκαν, κυρίως λόγω του κόστους του προγράμματος, της άρνησης πολλών κοινοτήτων για επανειλημμένους ψεκασμούς στα σπίτια τους, της ανάπτυξης ανθεκτικότητας στο DDT από την πλευρά του εντόμου, καθώς και εξαιτίας του γεγονότος ότι το DDT βιοσυσσώρευεται. Επιπλέον, με εξαίρεση κάποια μεμονωμένα πιλοτικά προγράμματα, καμία συντονισμένη προσπάθεια για έλεγχο της ελονοσίας δεν έγινε στην Υποσαχάρια Αφρική (Greenwood and Mutabingwa, 2002).

Όπως και να έχει, η εξάλειψη της νόσου από την Ευρώπη και την Βόρεια Αμερική οδήγησαν σε έλλειψη ενδιαφέροντος για την ελονοσία για τις επόμενες 2-3 δεκαετίες. Μονάχα 3 από τα 1223 νέα φάρμακα που αναπτύχθηκαν κατά την περίοδο από το 1975-1996 ήταν ανθελονοσιακά (Trouillier and Olliaro, 1998). Η βιομηχανία έχασε κάθε ενδιαφέρον για την ανάπτυξη νέων εντομοκτόνων, τα οποία θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για να προστατεύσουν τη δημόσια υγεία, ενώ και η χρηματοδότηση για έρευνα στον τομέα της ελονοσίας ελαττώθηκε. Σε πολλές ενδημικές της νόσου χώρες, τα εθνικά προγράμματα ελέγχου της ελονοσίας, τα οποία θεωρήθηκαν εφικτά κατά τους χρόνους της αποικιοκρατίας, τελικά εγκαταλείφθηκαν με την ανεξαρτητοποίησή τους. Έτσι για πολλά

χρόνια, ιδιαίτερα στην Αφρική, η θνησιμότητα λόγω ελονοσίας δεν μεταβλήθηκε σημαντικά και ειδικότερα στην Υποσαχάρια Αφρική παρουσιάζει αυξητικές τάσεις. Μερικοί από τους λόγους για αυτή την αύξηση φαίνονται στον πίνακα 1, αλλά ο σημαντικότερος είναι η προαναφερθείσα ανάπτυξη ανθεκτικότητας του κυριότερου παρασίτου που προκαλεί ανθρώπινη ελονοσία, του *P. falciparum*, σε φτηνά και αποτελεσματικά φάρμακα όπως η χλωροκίνη και η σουλφαδοξίνη/πυριμεθαμίνη.

Πίνακας 1

Παράγοντες που συνεισφέρουν στην αύξηση των επιπτώσεων της ελονοσίας παγκοσμίως.

ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΑ ΦΑΡΜΑΚΑ: σε τμήματα της Νοτιοανατολικής Ασίας το *Plasmodium falciparum* είναι πια ανθεκτικό σε σχεδόν το σύνολο των ανθελονοσιακών και εντοπίζονται στελέχη *Plasmodium vivax* ανθεκτικά στη χλωροκίνη. Στην Αφρική η ανθεκτικότητα στη χλωροκίνη διαρκώς εξαπλώνεται και η ανθεκτικότητα στη σουλφαδοξίνη/πυριμεθαμίνη εμφανίζει σαφείς αυξητικές τάσεις. Παγκόσμια εξάπλωση όλων αυτών των ανθεκτικών παρασίτων που προς το παρόν ανιχνεύονται μονάχα στην Νοτιοανατολική Ασία και την Αφρική θα έχει καταστροφικές συνέπειες.

ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΑ ENTOMOKTONA: κουνούπια ανθεκτικά στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα που αναπτύσσονται στη Δυτική και Νότια Αφρική τώρα απειλούν την αποτελεσματικότητα του προγράμματος χρήσης κουνουπιέρων εμποτισμένων σε εντομοκτόνα.

ΠΟΛΕΜΟΙ ΚΑΙ ΠΟΛΙΤΙΚΕΣ ΑΛΛΑΓΕΣ: πόλεμοι στην Αφρική και σε άλλα μέρη του πλανήτη έχουν οδηγήσει σε μεγάλα προβλήματα μετάδοσης ελονοσίας σε προσφυγικούς πληθυσμούς. Κατάρρευση των υπηρεσιών υγείας οδήγησε σε επανεμφάνιση της ελονοσίας σε τμήματα της πρώην Σοβιετικής Ένωσης.

ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΑΛΛΑΓΕΣ: στην Ταϊλάνδη, φορείς ελονοσίας κατάφεραν να πολλαπλασιάζονται σε αγροτικές καλλιέργειες, ενώ η κατασκευή μικρών φραγμάτων οδήγησε σε αύξηση της μετάδοσης της ελονοσίας στην Αιθιοπία.

ΚΛΙΜΑΤΙΚΕΣ ΑΛΛΑΓΕΣ: η αύξηση της θερμοκρασίας σε παγκόσμια κλίμακα ίσως συνεισφέρει στην εμφάνιση ελονοσίας σε ορεινές περιοχές της Ασίας, της Αφρικής και της Ν. Αμερικής. Πλημμύρες συνδεδεμένες με τις αυξημένες βροχοπτώσεις λόγω του μετεωρολογικού φαινομένου El Nino, επηρεάζουν την επιδημιολογία της νόσου στην Αφρική.

ΤΑΞΙΔΙΑ: περίπου 7000 εισαγόμενες περιπτώσεις ελονοσίας καταγράφονται στην Ευρώπη κάθε χρόνο. Σε χώρες ενδημικές της νόσου, το ταξίδι (κυρίως λόγω εργασίας) από περιοχές απαλλαγμένες από ελονοσία, σε περιοχές με υψηλή εμφάνιση της νόσου, είναι πιθανώς ένα σημαντικό αίτιο εξάπλωσης της ελονοσίας.

ΠΛΗΘΥΣΜΙΑΚΗ ΑΥΞΗΣΗ: στις δύο τελευταίες δεκαετίες, ο πληθυσμός πολλών ενδημικών στη νόσο χωρών διπλασιάστηκε και κατά συνέπεια αυξήθηκε ο απόλυτος αριθμός ατόμων που εμφανίζουν πιθανότητα μόλυνσης.

Αν και η ελονοσία εξακολουθεί να είναι σημαντικό πρόβλημα υγείας σε τμήματα της Ασίας και της Νοτίου Αμερικής, η μεγαλύτερη επίπτωση από τη νόσο παρατηρείται στην Υποσαχάρια Αφρική, όπου και συμβαίνουν πάνω από το 90% των θανάτων από ελονοσία. Ο σημαντικότερος λόγος για αυτό είναι η παρουσία του κυριότερου φορέα ελονοσίας, του κουνουπιού *Anopheles gambiae*, στην συγκεκριμένη περιοχή, σε συνδυασμό με μια σειρά από οικονομικό-κοινωνικούς παράγοντες. Το συγκεκριμένο κουνούπι παρουσιάζει ισχυρή προτίμηση στο ανθρώπινο αίμα, έχει μακρύ προσδόκιμο ζωής και συνεπώς είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικό στη μετάδοση ελονοσίας (Chandre *et al.* , 1999). Η συχνότητα με την οποία ένα τυχαίο άτομο δέχεται τσίμπημα από μολυσματικό κουνούπι, σπάνια υπερβαίνει τα 5 τσιμπήματα ανά χρόνο στην Ασία ή τη Νότια Αμερική, σε αντιπαράθεση με τα 1000 τσιμπήματα ανά χρόνο που έχουν καταγραφεί σε αρκετές περιοχές της Αφρικής. Σε περιοχές σαβάνας της Δυτικής Αφρικής δεν είναι ασυνήθιστο να συλλεχθούν από ένα δωμάτιο αρκετές εκατοντάδες κουνούπια *An. gambiae*, από τα οποία ποσοστό 1-5% είναι μολυσματικά. Βέβαια μπορούν να

παρατηρηθούν σημαντικές διαφορές στα κρούσματα ελονοσίας τόσο στις διάφορες Αφρικανικές χώρες, όσο και μεταξύ διαφορετικών περιοχών της ίδιας χώρας, όπως επίσης και μεταξύ χωριών που απέχουν μόλις 1-2 χιλιόμετρα μεταξύ τους. Η θεώρηση της Αφρικής ως μίας ενιαίας χώρας, υπερενδημικής της ελονοσίας, είναι μία απλουστευτική προσέγγιση σε μια αληθινά πολύπλοκη επιδημιολογική κατάσταση (Greenwood and Mutabingwa, 2002).

Εξίσου πολύπλοκος είναι ο ακριβής προσδιορισμός των επιπτώσεων της ελονοσίας, καθώς οι περισσότεροι θάνατοι συμβαίνουν στις κατοικίες των θυμάτων και όχι σε νοσοκομεία. Επίσης, τα κλινικά χαρακτηριστικά της είναι παρόμοια με αρκετές άλλες μεταδοτικές νόσους και κέντρα με σχετικώς καλή ποιότητα μικροσκοπίας σπανίζουν στην Αφρική. Οι θάνατοι από ελονοσία ξεπερνούν κατά πολύ το ένα εκατομμύριο κατ' έτος και εικάζεται ότι ο πραγματικός αριθμός τους ξεπερνάει και τα δύομισι εκατομμύρια, δηλαδή ένα άτομο χάνει τη ζωή του από ελονοσία κάθε 30 δευτερόλεπτα. Μικρά παιδιά κάτω των 5 ετών είναι κυρίως αυτά που βιώνουν τα κλινικά συμπτώματα της νόσου, με μονάχα ένα μικρό ποσοστό από αυτά (1-2%), ευτυχώς, να οδηγούνται σε σοβαρές επιπλοκές στην υγεία τους (Marsh *et al.* , 1995) . Οι θάνατοι από αναιμία λόγω ελονοσίας αυξάνονται κυρίως λόγω της ανθεκτικότητας του παρασίτου στα ανθελονοσιακά φάρμακα (Newton *et al.* , 1997), ενώ και η θνησιμότητα λόγω εγκεφαλικής ελονοσίας παραμένει γύρω στο 20%, ακόμα και σε νοσοκομεία με πολύ καλές υποδομές. Περίπου ένα 10% των παιδιών που τελικά επιβιώνουν από την εγκεφαλική ελονοσία, φέρουν μόνιμες νευρολογικές διαταραχές με συνέπειες τόσο στη δυνατότητα μόρφωσής τους, όσο και στις πιθανότητες για μια μελλοντική επαγγελματική καριέρα. Η νόσος είναι επίσης εξαιρετικά επικίνδυνη για το έμβρυο κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, δεδομένου ότι χάνεται ένα μέρος της ανοσίας που έχει αποκτηθεί από τη μητέρα εξαιτίας των επανειλημμένων εκθέσεων στο παράσιτο. Σε περιοχές όπου παρατηρείται χαμηλή μεταδοτικότητα της νόσου, η ελονοσία κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης μπορεί να οδηγήσει σε θάνατο της μητέρας, αποβολή του εμβρύου ή πρόωφο τοκετό. Σε περιοχές με υψηλή μεταδοτικότητα, συνήθως παρατηρείται αυξημένος αριθμός παρασίτων *P. falciparum* στον πλακούντα, οδηγώντας σε διαταραχή της λειτουργίας του και κατά συνέπεια στη γέννηση ενός ελλειποβαρούς νεογνού (Schultz *et al.* , 1994). Όμως είναι γνωστό ότι το προσδόκιμο επιβίωσης ενός νεογνού ελαττώνεται ακόμα και με μικρές απώλειες στο βάρος του.

Σε έναν υπολογισμό του οικονομικού κόστους της νόσου, επιπλέον του άμεσου κόστους, που προκύπτει από την αγορά των φαρμάκων και την αποχή από την εργασία ή το σχολείο, θα πρέπει να συνυπολογισθούν και μία σειρά από παράπλευρες επιπτώσεις, των οποίων η ζημία, αν και είναι δύσκολο να προσδιοριστεί με ακρίβεια, συμβάλλει σημαντικά στη συνολική οικονομική επίπτωση της νόσου. Επιπλέον η ελονοσία σήμερα είναι πραγματικά μία νόσος της φτώχειας και των υποανάπτυκτων χωρών και αποτελεί μία πραγματική τροχοπέδη σε όποιες προσπάθειες για καλύτερο μέλλον (Sachs and Malaney, 2000). Βέβαια παρά το γεγονός ότι η ελονοσία ουσιαστικώς σχετίζεται μονάχα με τον αναπτυσσόμενο κόσμο και τις τροπικές χώρες, η γεωγραφική της κατανομή εκτείνεται και πέρα από αυτές τις περιοχές και περιλαμβάνει, περιστασιακώς, μικρά τμήματα της Ευρώπης και της Βορείου Αμερικής (Persidis, 2000).

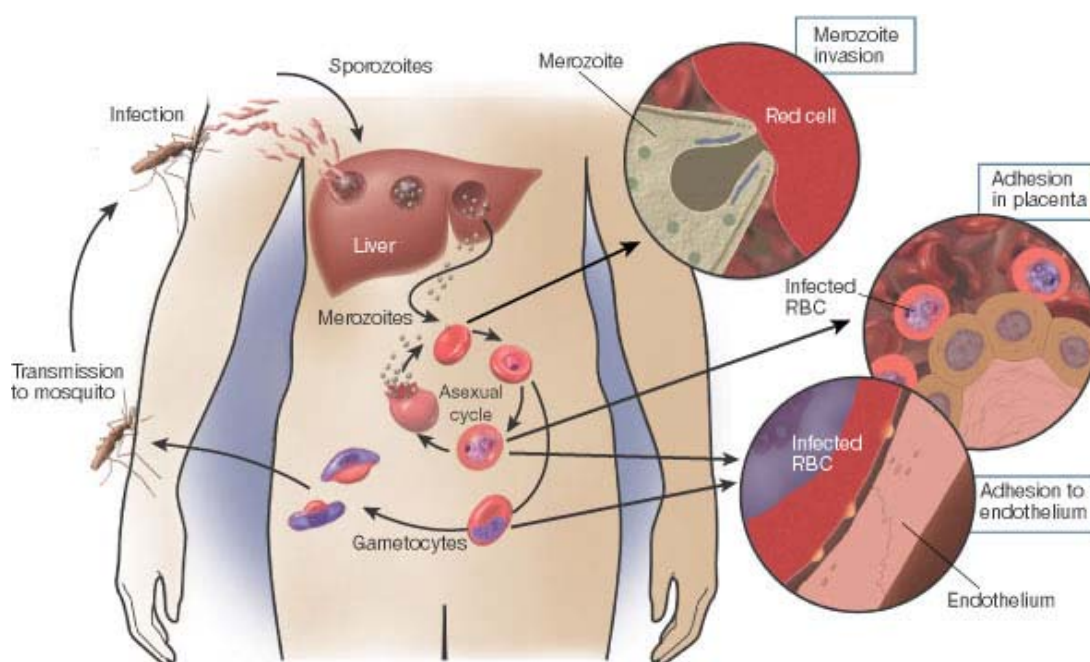
Πρέπει λοιπόν κάποιος να ακολουθήσει με ευλάβεια τα χνάρια του Pasteur, έχοντας τη βασική έρευνα για την κατανόηση του μηχανισμού μετάδοσης και παθογένειας της νόσου, ως μια

βασική προϋπόθεση για την ανάπτυξη νέων καλύτερων μεθόδων για τον έλεγχο και τη θεραπεία της ελονοσίας.

2. Ο ΚΥΚΛΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

2α. Ο κύκλος του παρασίτου στο σπονδυλωτό ξενιστή

Ο κύκλος του παρασίτου στο σπονδυλωτό ξενιστή καλείται και σχιζογονία και αποτελεί την κύρια πηγή συμπτωμάτων της νόσου. Το *P. falciparum* και σε πολύ μικρότερο βαθμό το *P. vivax* είναι οι κύριοι αιτιολογικοί παράγοντες της ελονοσίας. Όλα αρχίζουν μετά από κάποιο τσίμπημα από μολυσμένο κουνούπι, οπότε και ενίονται υποδερμικά στο σπονδυλωτό ξενιστή παράσιτα του αναπτυξιακού σταδίου των σποροζωιτών. Αυτά με τη σειρά τους ταξιδεύουν μέσω της κυκλοφορίας του αίματος έως το συκώτι, όπου αφού διεισδύσουν σε μία σειρά από ηπατοκύτταρα, διαφοροποιούνται μέσα σε αυτά, σε μερικές δεκάδες χιλιάδες μεροζωΐτες. Στη συνέχεια οι μεροζωΐτες εγκαταλείπουν το συκώτι και εισέρχονται σε ερυθρά αιμοσφαίρια, ξεκινώντας έναν κύκλο αφυλετικού πολλαπλασιασμού: χρειάζονται 48 ώρες εντός των ερυθρών αιμοσφαιρίων, ώστε να προκύψουν από κάθε μεροζωΐτη περίπου είκοσι νέοι, έτοιμοι να μολύνουν γειτονικά ερυθρά αιμοσφαίρια (Βλ. Εικόνα 3).



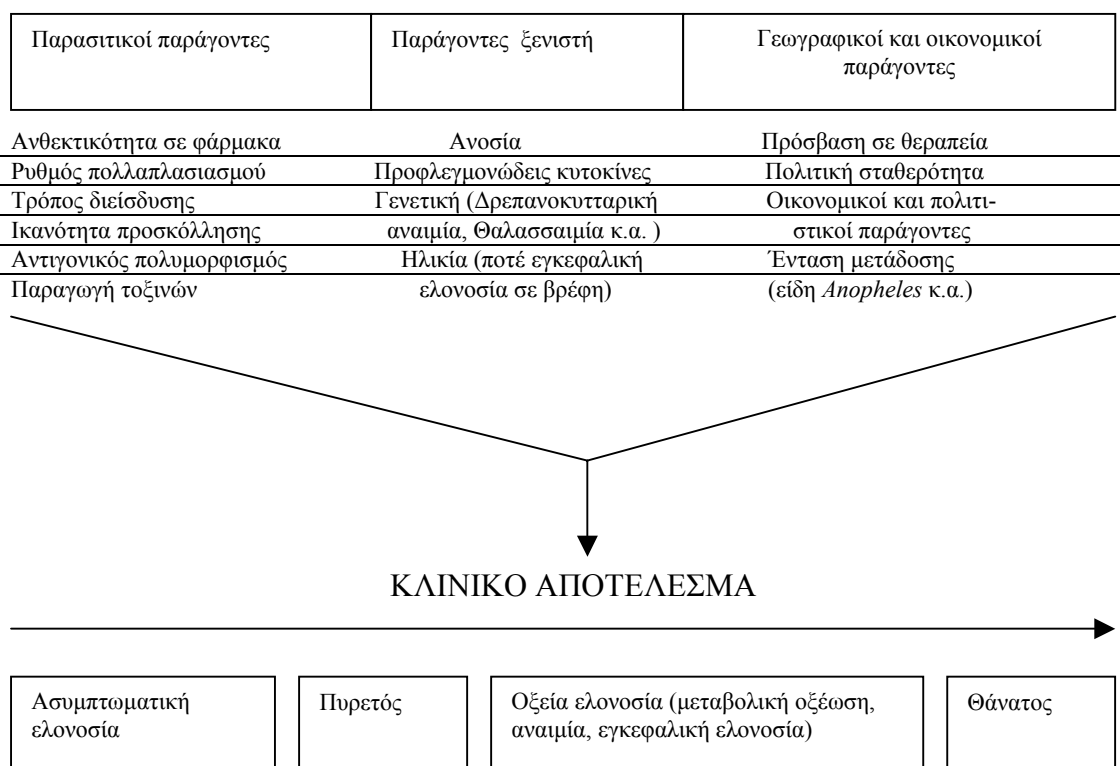
Εικόνα 3: η πορεία μόλυνσης του ανθρώπου (σπονδυλωτός ξενιστής) με ελονοσία (Miller *et al.*, 2002).

Κάπου εδώ αρχίζουν να γίνονται εμφανή και τα συμπτώματα της νόσου (Warrel, 1993). Οι εμφανιζόμενοι πυρετοί οφείλονται στη συγχρονισμένη λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Μιλώντας σε κλινικό επίπεδο για το τελικό αποτέλεσμα της μόλυνσης από ελονοσία, είναι φανερό ότι αυτό διαφέρει για κάθε μεμονωμένο περιστατικό και εξαρτάται από μια σειρά παραγόντων οι οποίοι συνοψίζονται

στον πίνακα 2. Ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά του *P. falciparum* είναι η ικανότητά του να κάνει τα μολυσμένα από αυτό ερυθρά αιμοσφαίρια να προσκολλώνται στο εσωτερικό επικάλυμμα μικρών αιμαγγείων. Το αποτέλεσμα είναι η διαταραχή στην αιμάτωση του υποκείμενου ιστού. Η καταστροφή των ερυθρών αιμοσφαιρίων είναι επίσης μία αναπόφευκτη συνέπεια της νόσου και η επακόλουθη αναιμία μειώνει ακόμα περισσότερο την προμήθεια οξυγόνου στους ιστούς (Miller *et al.* , 2002).

Πίνακας 2

Το κλινικό αποτέλεσμα της μόλυνσης ενός παιδιού στην Αφρική με ελονοσία εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, καθώς παράσιτο, ξενιστής, γεωγραφικοί και κοινωνικοί παράγοντες καθορίζουν εάν θα εκδηλωθεί η νόσος στην ασυμπτωματική της μορφή ή στην πιο οξεία και πολλές φορές θανατηφόρο μορφή



Ένας από τους βασικότερους κανόνες της συγκεκριμένης ασθένειας είναι ότι δεν υπάρχει μία απλή, ένα προς ένα, συσχέτιση μεταξύ των εμφανιζόμενων κλινικών συμπτωμάτων και της διαδικασίας παθογένεσης. Οξεία αναιμία μπορεί να εμφανισθεί τόσο μέσω ραγδαίας αιμόλυσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων και δυσερυθροποίησης, όσο και μέσω της συνεργειακής αλληλεπίδρασης της ελονοσίας με μία σειρά από άλλες παρασιτικές μολύνσεις ή με διατροφικές δυσλειτουργίες που λαμβάνουν χώρα ταυτόχρονα στο άτομο. Έτσι για πολλά άρρωστα παιδιά ένα απλό μοντέλο παθογένειας της μορφής 'ένα παθογόνο / μία νόσος' δεν είναι εφικτό. Ακόμα και το σύνδρομο της εγκεφαλικής ελονοσίας χρησιμοποιείται για να περιγράψει παιδιά που έχουν πέσει σε κόμα, ακολουθώντας το καθένα διαφορετικές εξατομικευμένες πορείες μέχρι αυτό το σημείο (Prada *et al.* , 1993). Στις περισσότερες

των περιπτώσεων είναι αποτέλεσμα μεταβολικού στρες, παρά κάποιο πρόβλημα στην εγκεφαλική τους λειτουργία.

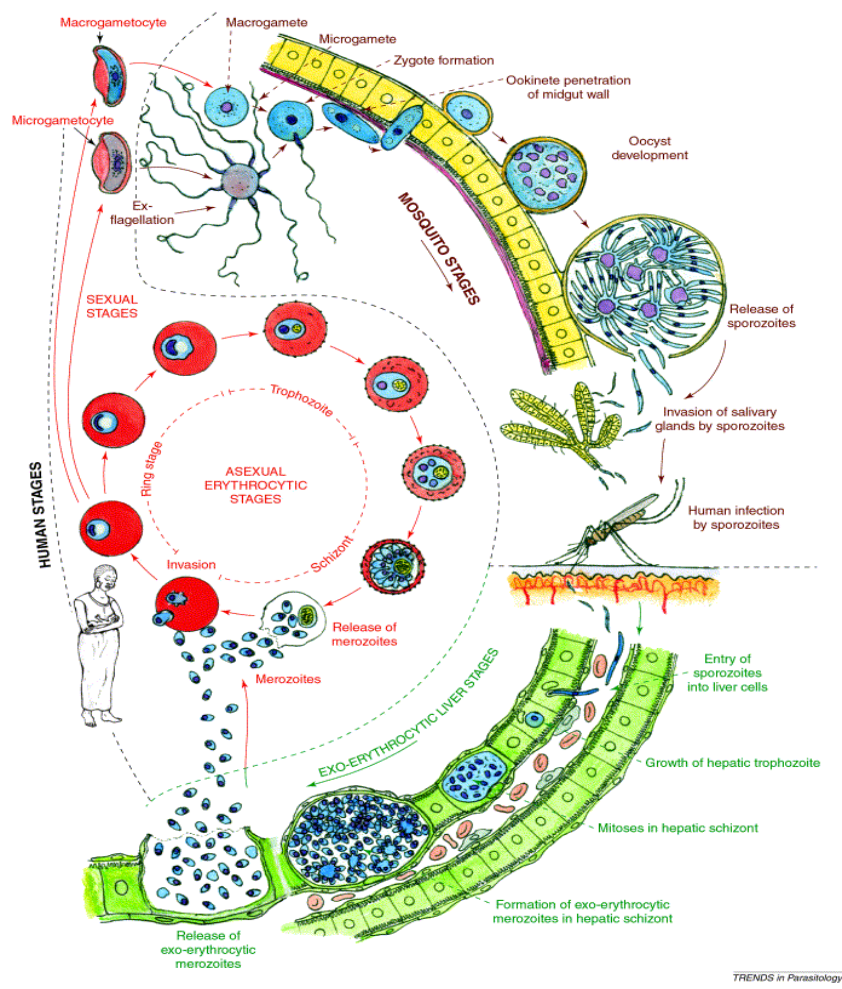
Η οξεία φάση της νόσου είναι ακόμα πιο περίπλοκη για να περιγραφεί με ένα απλό σχήμα. Όμως είναι γνωστές κάποιες βασικές διαδικασίες που οδηγούν σε αυτή, όπως η ταχεία αύξηση της συνολικής μάζας μολυσμένων από ελονοσία ερυθρών αιμοσφαιρίων, η καταστροφή μολυσμένων και μη μολυσμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων, η απόφραξη των αιμαγγείων και φλεγμονώδεις αντιδράσεις που συνολικά οδηγούν σε ελλειπή τροφοδοσία μίας πλειάδας σωματικών ιστών. Στη συνέχεια διεγείρονται μία σειρά από γεγονότα σε κυτταρικό επίπεδο, που στην πλειονότητα τους είναι ακόμα πιο επιβαρυντικά για τον ασθενή. Εάν τώρα αυτές οι γενικές διαδικασίες λαμβάνουν χώρα μεταξύ των άλλων και σε συγκεκριμένους ιστούς, τότε μιλάμε για εγκεφαλική ελονοσία, ή για ελονοσία του πλακούντα. Άνθρωπο-ειδικοί παράγοντες (για παράδειγμα η αυξημένη πιθανότητα έκφρασης κάποιων συγκεκριμένων υποδοχέων για το παράσιτο στο ενδοθήλιο του εγκεφάλου), καθώς και παράσιτο-ειδικοί (για παράδειγμα η έκφραση μορίων με υψηλή συγγένεια για τους ανωτέρω υποδοχείς στην επιφάνεια των μολυσμένων από ελονοσία αιμοσφαιρίων) είναι τελικά αυτοί που καθορίζουν τα όργανα στόχους κατά την πορεία εξάπλωσης του παρασίτου στον ανθρώπινο οργανισμό (Miller *et al.* , 2002).

2β. Ο φυλετικός κύκλος στον ασπόνδυλο φορέα ή σπορογονία.

Ένα μικρό ποσοστό αφυλετικών παρασίτων διαφοροποιείται σε γαμετοκύτταρα, εξασφαλίζοντας την περαιτέρω εξάπλωση της νόσου μέσω του ασπόνδυλου φορέα. Με το επόμενο τσίμπημα κουνουπιού του γένους *Anopheles*, τα παράσιτα είναι σε θέση να εκτελέσουν το φυλετικό κύκλο της ζωής τους μέσα στο έντομο-φορέα. Πρόκειται για μια πολύπλοκη διαδικασία που περιλαμβάνει τη διαφοροποίηση σε έξι μορφολογικά διακριτά αναπτυξιακά στάδια: σε αρσενικούς και θηλυκούς γαμέτες, ζυγωτό, ωοκινέτες, ωοκύστες και σποροζωίτες, απ' όπου και ξεκίνησε ο κύκλος στο «αρχικό» τσίμπημα (Ghosh *et al.* , 2000). Πιο αναλυτικά, αμέσως μετά την αιματοφαγία, τα γαμετοκύτταρα διαφοροποιούνται σε αρσενικούς και θηλυκούς γαμέτες, από τους οποίους, μέσα σε μερικές ώρες, προκύπτει το ζυγωτό (Beier, 1998, Sinden, 1999). Το ζυγωτό με τη σειρά του, διαφοροποιείται σε ωοκινέτες, μέσα στο πηγμένο αίμα στο μεσέντερο του κουνουπιού. Οι ωοκινέτες είναι μορφολογικά και βιοχημικά διακριτοί από τα προηγούμενα φυλετικά στάδια, δηλαδή τα γαμετοκύτταρα και το ζυγωτό καθώς και από τα επόμενα στάδια, δηλαδή τις ωοκύστες και τους σποροζωίτες. Είναι αυτό το στάδιο που επιτρέπει στο παράσιτο να αποδράσει από το σφιχτά πακεταρισμένο βόλο αίματος και να διασχίσει την περιτροφική μεμβράνη. Η περιτροφική μεμβράνη είναι ένα παχύ, μη κυτταρικό κάλυμμα που εκκρίνεται από τα μεσεντέρια επιθηλιακά κύτταρα, ως απόκριση στην κυτταρική διάταση που προκαλείται μετά την πόση του αίματος και περιβάλλει τον βόλο του αίματος. Είναι φτιαγμένη από ένα δίκτυο χιτίνης, στο οποίο προστίθενται διάφορες πρωτεΐνες και γλυκοζαμινογλυκάνες (Moskalyk, 1996). Το πόσο πορώδες και παχύ είναι αυτό το δίκτυο φαίνεται να καθορίζεται από την ελεγχόμενη έκφραση και έκκριση χιτινασών από τα επιθηλιακά κύτταρα του μεσεντέρου (Shen *et al.* , 1999). Αφού οι ωοκινέτες καταφέρουν να προστατευθούν από το πεπτικό περιβάλλον του μεσεντέρου, διεισδύουν στο μεσεντήριο επιθήλιο και διασχίζοντάς το τελικά καταλήγουν στη βασική πλευρά του, ακριβώς κάτω από τη βασική λεπίδα. Εκεί διαφοροποιούνται σε ωοκύστες, οι οποίες περνούν από 13 γύρους πυρηνικών διαιρέσεων

παράγοντας τελικώς 3 με 4 χιλιάδες σποροζωίτες (Rosenberg and Rungsiwongse, 1991). Μετά τη ρήξη της ωοκύστης, οι σποροζωίτες απελευθερώνονται στο αιμόκοιλο και με την σειρά τους διεισδύουν στους σιελογόνους αδένες. Στο επόμενο τσίμπημα του κουνουπιού και δύο περίπου εβδομάδες μετά το τσίμπημα στον πρώτο μολυσμένο σπονδυλωτό ξενιστή, μεταφέρονται με το σάλιο μολύνοντας ένα νέο ξενιστή (Βλ. Εικόνα 4).

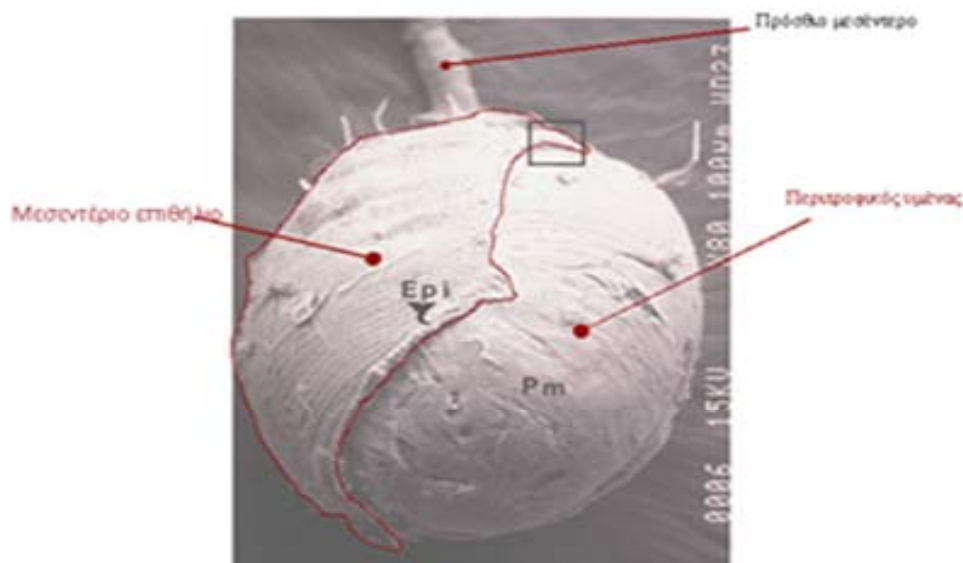
Κατά τη πορεία της διαφοροποίησης στο κουνούπι, το παράσιτο πρέπει να ξεπεράσει έναν αριθμό στενωπών (Vaughan et al. , 1994, Rosenberg and Rungsiwongse, 1991). Αυτοί οι σημαντικοί στενωποί που περνάει ο πληθυσμός του παρασίτου υποδεικνύουν ότι η διαφοροποίησή του περιορίζεται αυστηρά από το περιβάλλον του κουνουπιού και κατά συνέπεια από τις αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ φορέα και παρασίτου (Sinden, 1999). Επομένως ο βαθμός επιτυχίας της μόλυνσης εξαρτάται άμεσα από τα αποτελέσματα μίας αμφίδρομης σχέσης τροποποίησης μεταξύ του παρασίτου και του κουνουπιού φορέα (Alavi *et al.* , 2003).



Εικόνα 4: κύκλος μετάδοσης της ελονοσίας (Bannister and Mitchell, 2003).

3. Η ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΜΕΣΕΝΤΕΡΟΥ

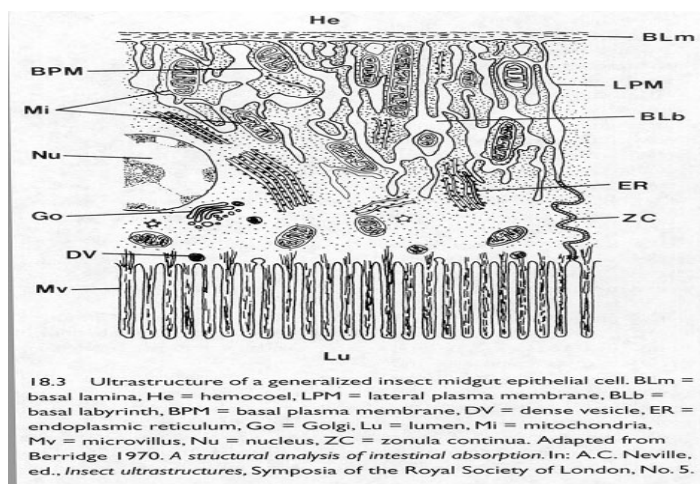
Το μεσέντερο του κουνουπιού, μετά το γεύμα αίματος, μοιάζει με έναν ελαστικό σωλήνα ο οποίος βρίσκεται σε έντονη διάταση. Τα στρώματα που περιβάλλουν το βόλο αίματος είναι αφ' ενός η περιτροφική μεμβράνη και αφ' ετέρου τα επιθηλιακά κύτταρα και οι μύες (Βλ. Εικόνα 5). Οι τελευταίοι διακρίνονται σε εγκάρσιους και επιμήκεις και σχηματίζουν ένα δικτυωτό πλέγμα το οποίο, όντας στο εξωτερικό μέρος του μεσεντέρου, καλείται να αντέξει τη μηχανική πίεση που ασκεί ο συγκριτικά τεράστιος όγκος γεύματος. Τα επιθηλιακά κύτταρα εκκρίνουν τα πεπτιδικά ένζυμα και απορροφούν τις θρεπτικές ουσίες της πέψης του γεύματος.



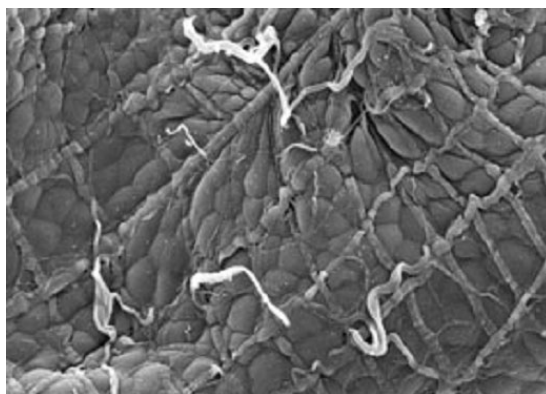
Εικόνα 5 : ηλεκτρονική μικρογραφία από ανατομή μεσεντέρου κουνουπιού (φωτογραφία: M. Jacobs-Lorena, προσωπ. επικοινωνία). Διακρίνεται η περιτροφική μεμβράνη που περιβάλλει το βόλο αίματος, το στρώμα επιθηλιακών κυττάρων και το πλέγμα μυών καθώς και κάποιες τραχειές εξωτερικά. Είναι φανερή και η συνολική διάταση του μεσεντέρου που μοιάζει με φουσκωμένο μπαλόνι.

Μία γενικευμένη σχηματική άποψη των επιθηλιακών κυττάρων πριν από το γεύμα αίματος φαίνεται στην εικόνα 6 Α. Πρόκειται για πολωμένα κύτταρα, στα οποία διακρίνεται η κορυφαία πλευρά τους - προς τη μεριά του αυλού και του γεύματος αίματος - και η βασική πλευρά τους, προς την μεριά του αιμόκοιλου. Χαρακτηριστικά της κορυφαίας πλευράς είναι οι μικρολάχνες -προεκβολές της μεμβράνης προς την μεριά του αυλού- , καθώς και η παρουσία εκκριτικών κυστιδίων με ένζυμα απαραίτητα για την πέψη. Στη βασική πλευρά βρίσκεται ένα χαρακτηριστικό πυκνό δίκτυο μεμβρανών, που καλείται βασικός λαβύρινθος, ενώ τα κύτταρα περιβάλλονται επιπλέον από τη βασική λεπίδα και από ένα πλέγμα μυών. Τέλος, στο εξωτερικό μέρος του μεσεντέρου παρατηρούνται διακλαδιζόμενες τραχειές (βλ. Εικόνα 6B).

A



B



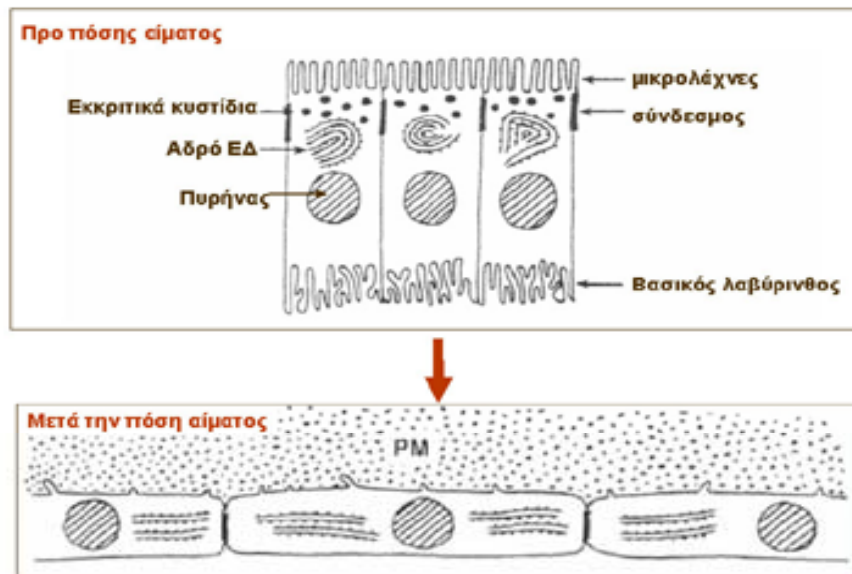
Εικόνα 6: δομές που εντοπίζονται στο μεσέντερο του κουνουπιού.

A: σχηματική αναπαράσταση επιθηλιακού κυττάρου του μεσεντέρου. Στην κορυφαία πλευρά του παρατηρούνται μικρολάχνες, ενώ στη βασική του πλευρά ο βασικός λαβύρινθος (Mv και BLb αντίστοιχα).

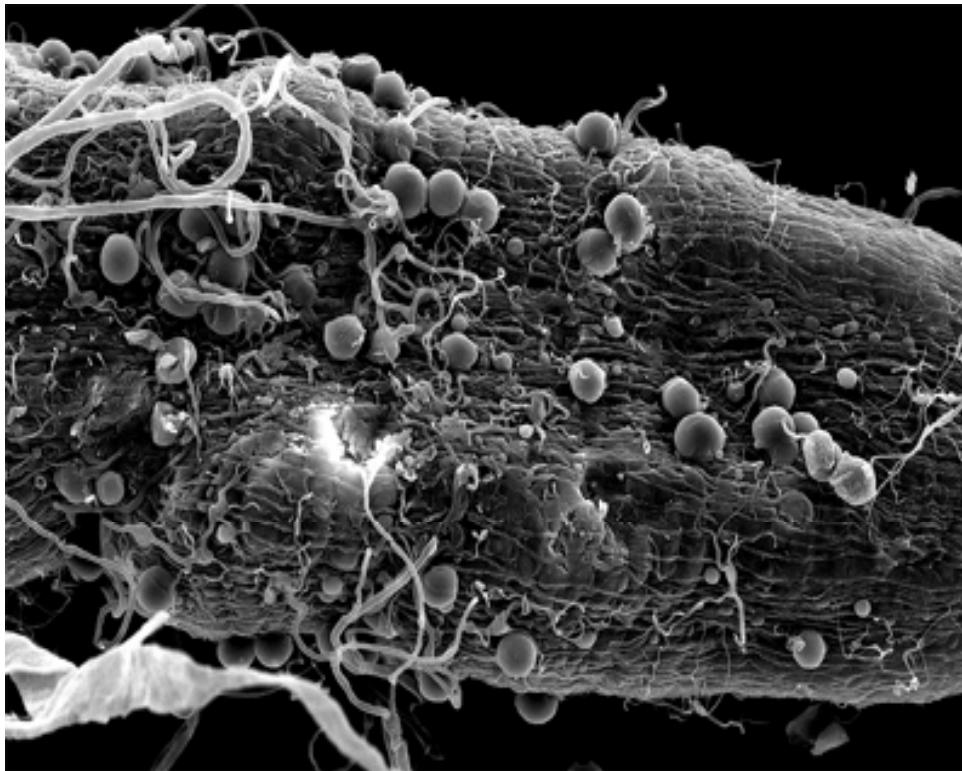
B: ηλεκτρονική μικρογραφία της βασικής πλευράς του μεσεντέρου (φωτογραφία του Δρ. Γ. Χριστοφίδη, προσωπ. επικοινωνία). Ένα δίκτυο εγκάρσιων και επιμηκών μυνών περιβάλλει τη βασική λεπίδα και τα επιθηλιακά κύτταρα, ενώ στο εξωτερικό μέρος του μεσεντέρου είναι ορατές και οι διακλαδιζόμενες τραχείες .

Τα επιθηλιακά κύτταρα αλλάζουν μορφολογία μετά το γεύμα αίματος, υφιστάμενα διάταση. Συνέπεια αυτής της διάτασης είναι η εξαφάνιση των μικρολαχνών και ο περιορισμός της έκτασης του βασικού λαβυρίνθου, για το λόγο ότι οι συγκεκριμένες «υπεράριθμες» μεμβρανικές επιφάνειες χρησιμοποιούνται για τη διάταση του κυττάρου (βλ. Εικόνα 7A). Το επιθήλιο αποτελεί έναν από τους κύριους μηχανικούς φραγμούς για τα παράσιτα της ελονοσίας. Εφ' όσον καταφέρουν να διεισδύσουν σε αυτό και να εξέλθουν στη βασική πλευρά του, διαφοροποιούνται σε ωοκύστες, οι οποίες καθώς μεγαλώνουν και ωριμάζουν, προεξέχουν αρκετά από το υπόλοιπο μεσέντερο (βλ. Εικόνα 7B).

A



B



Εικόνα 7: μεταβολές στη δομή του μεσεντέρου κατά τη λήψη φυσιολογικού ή μολυσμένου με ελονοσία (B) γεύματος αίματος.

A: σχηματική αναπαράσταση των μεταβολών που συμβαίνουν σε ένα επιθηλιακό κύτταρο μετά το γεύμα αίματος. Μικρολέχνες και βασικός λαβύρινθος μειώνονται συνεπεία της συνολικής διάτασης του κυττάρου.

B: ηλεκτρονική μικρογραφία μεσεντέρου μολυσμένου με ώριμες ωοκύστες (φωτογραφία του καθηγητή P. Pimenta, προσωπ. επικοινωνία). Οι ωοκύστες είναι τα σφαιρίδια που προεξέχουν στο εξωτερικό του μεσεντέρου.

4. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΠΑΡΑΣΙΤΩΝ ΤΗΣ ΕΛΟΝΟΣΙΑΣ ΜΕ ΤΟ ΜΕΣΕΝΤΕΡΟ ΤΩΝ ΚΟΥΝΟΥΠΙΩΝ

Η διείσδυση των παρασίτων της ελονοσίας στο μεσέντερο των κουνουπιών και η επακόλουθη διαφοροποίησή τους, είναι μία διαδικασία που προχωρά με αμοιβαίο κόστος και για τους δύο οργανισμούς. Αυτό είναι λιγότερο φανερό από τη μεριά του κουνουπιού, αφού καταφέρνει να αποκαταστήσει ταχύτατα τις όποιες ζημιές στο επιθήλιό του. Όμως και το παράσιτο έχει καταφέρει τελικά να ξεφεύγει από τους μηχανισμούς άμυνας του εντόμου και παρά τις τεράστιες αριθμητικές απώλειες, αρκετοί σποροζώιτες φτάνουν στους σιελογόνους αδένες, ώστε να μολύνουν τον επόμενο ξενιστή (Sinden, 2002). Το κουνούπι δεν είναι πάντοτε «εχθρικό» έναντι του Πλασμωδίου, αλλά αντιθέτως φαίνεται σε ορισμένες περιπτώσεις να διευκολύνει την ανάπτυξή του. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η απομαστίγωση του παρασίτου, το πρώτο από τα στάδια που λαμβάνουν χώρα στο μεσέντερο του κουνουπιού, αμέσως μετά το γεύμα μολυσμένου αίματος. Το έναυσμα για αυτή τη διαδικασία είναι η πτώση της θερμοκρασίας κατά 5°C περίπου στο σώμα του κουνουπιού. Επιπρόσθετα, με την παραγωγή ξανθουρενικού οξέος, το κουνούπι επάγει την απομαστίγωση σε διάφορα είδη Πλασμωδίου (Billker *et al.*, 1998).

Με το σχηματισμό των ωοκινετών στο βόλο του αίματος, αυτοί αντιμετωπίζουν ένα εξαιρετικά εχθρικό περιβάλλον και την απειλή της καταστροφής, λόγω της παρουσίας πρωτεϊνών του συμπληρώματος και πεπτικών ενζύμων. Η περιτροφική μεμβράνη δρα ως ένα αποτελεσματικό εμπόδιο σε κάθε προσπάθειά τους να αποδράσουν από το βόλο του αίματος, οπότε και ακολουθείται μια διαδικασία τροποποίησης του φορέα από το ίδιο το παράσιτο. Οι ωοκινέτες εκκρίνουν χιτινάσες, ώστε να καταφέρουν να υπερσκελήσουν κάθε χιτινώδες φράγμα του κουνουπιού και να διεισδύσουν στη συνέχεια στα επιθηλιακά κύτταρα. Έχουν κλωνοποιηθεί γονίδια του παρασίτου που κωδικοποιούν χιτινάσες και αν αυτά απενεργοποιηθούν είτε βιοχημικά (χρήση αναστολέων χιτινασών), είτε γενετικά (γενετικά τροποποιημένα παράσιτα), τότε παρατηρείται παρεμπόδιση στην ανάπτυξη του παρασίτου (Shahabuddin *et al.*, 1993, Dessens *et al.*, 2001). Το κουνούπι φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση των χιτινασών του παρασίτου, καθώς αυτές εκκρίνονται ως προένζυμα από το παράσιτο και για την ενεργοποίησή τους είναι απαραίτητη η δράση θρυψινών που εκκρίνονται από το κουνούπι (Shahabuddin and Kaslow, 1994, Billingsley and Hecker, 1991).

Επόμενο βήμα είναι η διείσδυση των ωοκινετών στο μονόστιβο μεσεντέριο επιθήλιο το οποίο αποτελείται από τρεις διαφορετικούς τύπους κυττάρων. Η συντριπτική πλειοψηφία των επιθηλιακών κυττάρων ανήκει στα κιονοειδή κύτταρα (columnar cells), ενώ απαντάται και ένας μικρός αριθμός ενδοκρινών και αναγεννητικών κυττάρων. Από τη μεριά του αυλού, οι κυτταρικές μεμβράνες σχηματίζουν μια σειρά από πτυχές που καλούνται μικρολάχνες και καλύπτονται από γλυκοκάλυκα. Πιστεύεται ότι υδατάνθρακες παίζουν βασικό ρόλο στην πρόσδεση των ωοκινετών στο μεσεντέριο επιθήλιο, αφού *in vitro* επίδραση σε μεσέντερα με περιοδικό οξύ (Zieler *et al.*, 1999) ή με λεκτίνες (Zieler *et al.*, 2000), εμποδίζει την πρόσδεση των ωοκινετών σε αυτά. Από την άλλη πλευρά, *in vitro* επίδραση σε μεσέντερα με φωσφολιπάση έχει ακριβώς το ίδιο αποτέλεσμα, τονίζοντας το ρόλο των φωσφολιπιδίων στην πρόσδεση (Zieler *et al.*, 2001). Το τελευταίο πείραμα (σε αντίθεση με τα πειράματα των υδατανθράκων) επαναλήφθηκε και *in vivo*, αφού, είτε εάν στα κουνούπια χορηγηθεί

μολυσμένο με ελονοσία αίμα που περιέχει απενεργοποιημένη φωσφολιπάση, είτε εάν χορηγηθεί μολυσμένο με ελονοσία γεύμα σε μετασχηματισμένα κουνούπια που εκφράζουν φωσφολιπάση στο μεσέντερό τους, τότε και στις δύο περιπτώσεις παρατηρείται υψηλή αναστολή στο σχηματισμό ωοκυστών (Moreira *et al.*, 2002). Αναστολή κατά 80% στο σχηματισμό ωοκυστών παρατηρείται και όταν κουνούπια τροποποιηθούν γενετικά, ώστε να εκφράζουν στο μεσέντερό τους από τη μεριά του αυλού ένα συνθετικό δωδεκαμερές πεπτίδιο, το SM1 (Ito *et al.*, 2002). Συμπερασματικά λοιπόν φαίνεται ότι ο ωοκινέτης αλληλεπιδρά τόσο με φωσφολιπίδια και υδατάνθρακες, όσο και με κάποιον υποθετικό υποδοχέα SM1, ώστε να καταφέρει να διεισδύσει στα μεσεντέρια επιθηλιακά κύτταρα.

Έχει βρεθεί ότι κατά τη διαδικασία της διείσδυσης, οι ωοκινέτες ακολουθούν μία πορεία είτε ανάμεσα στα επιθηλιακά κύτταρα, είτε διεισδύουν σε μια σειρά από αυτά. Αρχικά φαίνεται να μετακινούνται με αργό ρυθμό ανάμεσα στις εντερικές μικρολάγχες και στην επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων, μέχρι να αρχίσει η ταχύτερη διείσδυση (διαρκεί κάποια λίγα λεπτά) εντός των κυττάρων από την πλευρική μεμβρανική επιφάνειά τους (Vlachou *et al.*, 2004). Πολλά κύτταρα αλλάζουν μορφολογία μετά την είσοδο ωοκινετών σε αυτά και σε μερικές περιπτώσεις “εκρήγνυνται”. Η αλλαγή μορφολογίας έχει συσχετισθεί με την επαγωγή απόπτωσης σε αυτά, ενώ κάποια νεκρά κύτταρα εξωθούνται προς τη μεριά του αιμόκουλου, εγκαταλείποντας το επιθήλιο (Han *et al.*, 2000). Ταυτόχρονα, γειτονικά τους κύτταρα αρχίζουν μία διαδικασία μετανάστευσης, ώστε να καλύψουν το κενό που δημιουργείται και να διατηρηθεί η ακεραιότητα του επιθηλίου. Άλλες αντιδράσεις του φορέα στη διείσδυση του παρασίτου περιλαμβάνουν τη μεταβολή στην έκφραση γονιδίων που παίζουν ρόλο στην ανοσολογική απόκριση έναντι του παρασίτου (Christophides *et al.*, 2004) και την ανακατανομή της ακτίνης και της β-ιντεγκρίνης στα επιθηλιακά κύτταρα (V. Mahairaki, προσ. επικοινωνία).

Η επιτυχία λοιπόν καθεμιάς από τις ανωτέρω δραστηριότητες του παρασίτου φαίνεται να εξαρτάται από βιοχημικούς και φυσικούς φραγμούς που προβάλλει το κουνούπι, όπως η πυκνότητα του βόλου αίματος, το πάχος και η σύσταση της περιτροφικής μεμβράνης, η ενεργότητα πρωτεόλυσης στο μεσέντερο και άλλα. Όμως σημασία έχει και η ικανότητα του ωοκινέτη να ξεπερνά αυτούς τους φραγμούς. Η κινητικότητα του ωοκινέτη, η έκκριση χιτινινασών, η ανθεκτικότητα έναντι πεπτικών ενζύμων καθώς και η αναγνώριση και επακόλουθη διείσδυση στο μεσεντέριο επιθήλιο, φαίνεται να παίζουν θεμελιώδη ρόλο στην επίτευξη της τελικής μεταμόρφωσής του σε ωοκύστη (Shahabuddin, 1998). Η κινητικότητα του ωοκινέτη, φαίνεται να εξαρτάται και από μόρια της επιφάνειάς του, τα οποία αφ’ ενός αναπτύσσουν αλληλεπιδράσεις τύπου υποδοχέα-προσδέτη μεταξύ μορίων της επιφάνειάς του παρασίτου και του εντόμου και αφ’ ετέρου έχουν την ικανότητα να συνδέονται και να αλληλεπιδρούν, μέσω της κυτταρικής μεμβράνης του παρασίτου, με το παρασιτικό δίκτυο ακτίνης-μυοσίνης και μικροσωληνίσκων (Sinden, 1985). Δεν είναι όμως γνωστός ο τρόπος με τον οποίο οι ωοκινέτες βρίσκουν το δρόμο από το εσωτερικό της μάζας του αίματος προς το επιθήλιο. Είναι τυχαία ή κατευθυνόμενη η μετακίνησή τους;

Αν και κάποιες πρωτεΐνες της επιφάνειάς του ωοκινέτη έχουν ήδη ταυτοποιηθεί, η μελέτη της πορείας διείσδυσης του παρασίτου στο μεσεντέριο τοίχωμα των Ανωφελών έχει αρχίσει πολύ πρόσφατα (Cociancich *et al.*, 1999, Vlachou *et al.*, 2004). Αιτία αυτής της καθυστέρησης είναι η δυσκολία να μελετηθούν με λεπτομέρεια τα γεγονότα που λαμβάνουν χώρα στο μεσέντερο του κουνουπιού. Από την άλλη μεριά έχει αναφερθεί η ικανότητα των ωοκινετών να διεισδύουν *in vitro* σε

ένα μεγάλο εύρος κυττάρων, όπως ερυθροκύτταρα και κυτταρικές σειρές εντόμων-φορέων ή μη της ελονοσίας (Sinden, 1978). *In vitro* ανάπτυξη ωοκυστών έχει παρατηρηθεί επίσης σε ανάλογο εύρος κυτταρικών σειρών και έχει περιγραφεί από πολλά εργαστήρια (Warburg and Miller, 1992, Warburg and Schneider, 1993), ενώ έχει αναπτυχθεί και *in vitro* συστήματα καλλιέργειας των σπορογονικών σταδίων του *P. berghei* (Siden-Kiamos *et al.*, 2000, Al-Olayan *et al.*, 2002a).

Το ταξίδι του ωοκινέτη στο επιθήλιο σταματά μεταξύ μυών και βασικής λεπίδας, με την τελευταία πιθανότατα να κατέχει σπουδαίο ρόλο στη μεταμόρφωση του ωοκινέτη σε ωοκύστη. Συστατικά της βασικής λεπίδας, όπως η λαμινίνη και το κολλαγόνο, έχουν την ικανότητα πρόσδεσης ωοκινετών, ενώ έχει δειχθεί ότι τέσσερις διαφορετικές παρασιτικές πρωτεΐνες έχουν την ικανότητα αλληλεπίδρασης με λαμινίνη: οι SOAP, CTRP, P25 και P28. Οι δύο πρώτες εκφράζονται μόνο στο στάδιο των ωοκινετών, ενώ οι δύο τελευταίες εκφράζονται τόσο σε ωοκινέτες όσο και σε ωοκύστες (Tomas *et al.*, 2001, Arrighi and Hurd, 2002, Vlachou *et al.*, 2001, Dessens *et al.*, 2003). Επιπλέον έχει δειχθεί σε *in vitro* καλλιέργειες παρασίτων, ότι η προσθήκη συστατικών της βασικής λεπίδας είναι απαραίτητη για τη μεταμόρφωση του ωοκινέτη σε ωοκύστες (Al-Olayan *et al.*, 2002a).

5. ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗ ΤΗΣ ΕΛΟΝΟΣΙΑΣ

Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα φάρμακα από την πλευρά του παρασίτου και στα εντομοκτόνα από την πλευρά του κουνουπιού κάνουν επιτακτική την ανάγκη εύρεσης νέων συμπληρωματικών μεθόδων για την καταπολέμηση της νόσου. Βασικό ρόλο στη μετάδοση κατέχει ο ασπόνδυλος φορέας. Εφ' όσον παρεμποδισθεί η μόλυνσή του από το Πλασμώδιο, τότε παύει και ο κίνδυνος εξάπλωσης της νόσου. Η γενετική τροποποίηση του κουνουπιού είναι πια τεχνικώς δυνατή (Alrhey *et al.*, 2002, Moreira *et al.*, 2002), καθιστώντας εν δυνάμει εφικτή μία ιδέα που πρωτοεμφανίστηκε πριν από αρκετές δεκαετίες: την αντικατάσταση των πληθυσμών-φορέων αγρίου τύπου με γενετικώς τροποποιημένους πληθυσμούς, οι οποίοι θα αδυνατούν να μεταδώσουν το παράσιτο (Curtis, 1968, James, 2002). Η πλήρης αλληλούχιση των γονιδιωμάτων του *An. gambiae* και του *P. falciparum*, ανοίγει τεράστιους ορίζοντες στην ανάπτυξη νέων εργαλείων απαραίτητων για την ελεγχόμενη έκφραση διαγονιδίων σε συγκεκριμένους ιστούς κουνουπιών που θα εμποδίζουν τη μεταφορά των Πλασμοδίων. Επιπλέον, η εξεύρεση τρόπων εξάπλωσης διαγονιδιακών κατασκευών στη φύση, πιθανώς να μπορέσουν να μας οδηγήσουν στην επιθυμητή αντικατάσταση των αγρίων πληθυσμών. Όμως πριν την απελευθέρωση των γενετικώς τροποποιημένων κουνουπιών στη φύση, θα πρέπει να ληφθούν υπ' όψη ζητήματα που έχουν να κάνουν με τη γενετική πληθυσμών, με την ανταγωνιστικότητα των τροποποιημένων κουνουπιών έναντι των αγρίου τύπου και με περιβαλλοντικούς, αλλά το κυριότερο ηθικό-πολιτικούς παράγοντες.

Το ολοκληρωμένο γονιδίωμα, σε συνδυασμό με την ανάπτυξη της τεχνολογίας RNAi στο κουνούπι (Blandin *et al.*, 2002) επιτρέπουν και την απενεργοποίηση γονιδίων, ώστε να αποκαλυφθούν όχι μονάχα εκείνα τα οποία καταπολεμούν, αλλά και εκείνα που υποστηρίζουν και προστατεύουν το παράσιτο στην πορεία μόλυνσης του κουνουπιού. Μετά από μία μαζική προσέγγιση απενεργοποίησης

100 περίπου γονιδίων κουνουπιού, αποκαλύφθηκαν τόσο το γονίδιο *LRIMI* το οποίο βοηθάει τα κουνούπια να σκοτώνουν τα παράσιτα, όσο και τα γονίδια *CTL4* και *CTLMA2* τα οποία παίζουν προστατευτικό για το παράσιτο ρόλο (Osta *et al.* , 2004). Τέτοιες προσεγγίσεις, ανεξάρτητες ή σε συνδυασμό με τεχνολογίες μικροσυστοιχιών και πρωτεομικής, μπορούν πέρα από το να ρίξουν άπλετο φως στη βιολογία της ελονοσίας, να συμβάλλουν αποφασιστικά τόσο στην παρασκευή εμβολίων, όσο και στην ανάπτυξη νέων μεθόδων χημικής καταπολέμησης της νόσου στο απώτερο, ή γιατί όχι και στο εγγύτερο μέλλον.

6. ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Κατά τη διάρκεια της ερευνητικής μου δραστηριότητας στο Εργαστήριο Μοριακής Γενετικής Εντόμων για την απόκτηση μεταπτυχιακού τίτλου ειδίκευσης, αναπτύχθηκε μία τεχνική *in vitro* πρόσδεσης ωοκινετών σε φίλτρα πρωτεϊνών, με την οποία βρέθηκαν πολυπεπτιδία μοριακού βάρους από περίπου 34 έως και 52 kDa, στις κυτταρικές σειρές S2 από *D. melanogaster*, Mos 20 από *Ae. aegypti* και 4a-3A από *An. gambiae*, να προσδένουν ισχυρά τους ωοκινέτες σε φίλτρα.

Κατά την έναρξη της παρούσας διατριβής (2000), το μόνο ολοκληρωμένο γονιδίωμα εντόμου ήταν αυτό της Δροσόφιλας, επιτρέποντας έτσι την εφαρμογή ευαίσθητων προσεγγίσεων πρωτεομικής για την ταυτοποίηση πρωτεϊνών μονάχα στο συγκεκριμένο οργανισμό. Συνεπώς, πρώτο στόχο της παρούσας εργασίας αποτέλεσε ο βιοχημικός χαρακτηρισμός και ταυτοποίηση τριών πολυπεπτιδίων μοριακού βάρους περίπου 36 kDa, τα οποία εκφράζονται στην κυτταρική σειρά S2 της *D. melanogaster* και προσδένουν το παράσιτο *Plasmodium berghei*. Η αποκάλυψη της ταυτότητας των πεπτιδίων της δροσόφιλας, πραγματοποιήθηκε με διαχωρισμό τους σε ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων και ανάγνωση της αλληλουχίας τους με ευαίσθητες τεχνικές φασματομετρίας μάζας. Επόμενος στόχος ήταν η κλωνοποίηση των ορθόλογων γονιδίων του Ανωφελούς, ώστε αφ' ενός να αποκαλυφθεί το πρότυπο έκφρασής τους στους ιστούς του κουνουπιού και αφ' ετέρου να αναδειχθεί η ικανότητα αλληλεπίδρασης των γονιδιακών προϊόντων με τα παράσιτα της ελονοσίας, κατά τη διαδικασία μόλυνσης του μεσεντέρου του κουνουπιού. Το τελευταίο μέρος της εργασίας αφιερώθηκε στη μελέτη του λειτουργικού ρόλου της συγκεκριμένης αλληλεπίδρασης, με τελικό σκοπό την ανάδειξη της συμβολής της, θετικής ή αρνητικής, στην ικανότητα των παρασίτων να μολύνουν το κουνούπι.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Για όσες από τις τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν δεν γίνεται εκτενής αναφορά, η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται αναλυτικώς από τους Sambrook *et al.*, 1989.

1. ΠΗΓΕΣ ΠΡΩΤΗΣ ΥΛΗΣ

Κυτταροκαλλιέργειες

Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι ακόλουθες: η S2 από *D. melanogaster* (Schneider, 1972), η Mos 20 από *Ae. aegypti* (Singh, 1971), και η 4a-3A από *An. gambiae* (Muller *et al.*, 1999), που ευγενικά παραχωρήθηκε από τον Δρ. Hans-Michael Muller (EMBL, Χαϊδελβέργη). Τα κύτταρα S2 καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό Shields and Sang M3, και τα κύτταρα 4a-3A σε θρεπτικό υλικό Schneider's (και τα δύο από τη Sigma), ενώ το θρεπτικό υλικό 199 για τα κύτταρα Mos 20 είναι της Gibco BRL. Όλες οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε θερμοκρασία 25°C.

Καλλιέργεια κουνουπιών

Κουνούπια του είδους *An. gambiae* του στελέχους G3 αναπτύχθηκαν σε θερμοκρασία 27°C και σχετική υγρασία $\geq 75\%$. Τα στάδια των προνυμφών και των νυμφών αναπτύχθηκαν σε διάλυμα 0.1% NaCl με χορήγηση ελάχιστης γατοτροφής σε μορφή σκόνης. Τα ενήλικα τρέφονται με διάλυμα 10% σακχαρόζης εμποτισμένης σε βαμβάκι.

Καλλιέργειες παρασίτων

Χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος του παρασίτου *P. berghei* με ονομασία «κλώνος 2.34» σύμφωνα με το πρωτόκολλο που δημοσιεύτηκε από το Sinden, 1997. Πρόκειται για στέλεχος αγρίου τύπου που προκαλεί ελονοσία σε τρωκτικά και χρησιμοποιείται ευρέως για την πειραματική μελέτη της ελονοσίας, γιατί είναι εντελώς ακίνδυνο για τον άνθρωπο.

Ως πειραματόζωα χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια του στελέχους TO (Theiler's Original) ηλικίας περίπου 6-8 εβδομάδων και αυτό γιατί ποντίκια μεγαλύτερης ηλικίας δεν επιτρέπουν την επίτευξη υψηλών ποσοστών παρασιταϊμίας και την αυξημένη ανάπτυξη γαμετοκυττάρων (Dyer and Day, 2000). Δύο με τρεις μέρες πριν τη μόλυνση τους ενίονται ενδοπεριτοναϊκώς με 200 μ l φαινυλδραζίνης σε συγκέντρωση 6mg/ml. Αυτό γίνεται γιατί το *P. berghei* προτιμά να προσβάλλει τα δικτυοερυθροκύτταρα του ποντικού. Με τη χορήγηση φαινυλδραζίνης τα ερυθροκύτταρα του ποντικού λύνονται επάγοντας ερυθροποίηση. Αν και ο συγκεκριμένος χειρισμός μπορεί να γίνει 1-5 μέρες πριν τη

μόλυνση, η επιλογή της δεύτερης-τρίτης μέρας δίνει τα καλύτερα αποτελέσματα. Η φαινυλδραζίνη (Sigma) διαλύθηκε σε PBS και φυλάσσεται στους -20°C για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος PBS είναι η ακόλουθη:

137 mM NaCl

2.7 mM KCl

4.3 mM Na_2HPO_4

1.4 mM KH_2PO_4

ρύθμιση pH στο 7.2 .

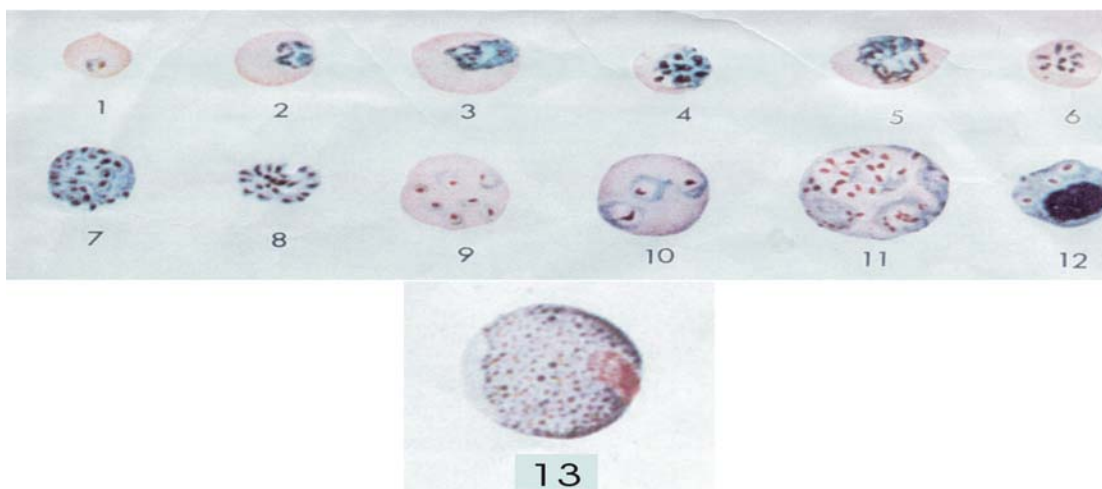
Το ποντίκι μολύνεται με ενδοπεριτοναϊκή ένεση 100-200 μl μολυσμένου αίματος. Για να είναι επιτυχής η μόλυνση, θα πρέπει να παρατηρούνται διαφοροποιούμενα παράσιτα της ελονοσίας τουλάχιστον στο 5-10% των ερυθροκυττάρων. Αμέσως μετά, το ποντίκι επανέρχεται στο κλουβί και καλύπτεται με ειδικό δίχτυ, έτσι ώστε να αποφευχθεί η τυχαία μετάδοση ελονοσίας στο φυσικό πληθυσμό των ποντικών από κάποιο ενδεχόμενο τσίμπημα κουνουπιού. Αφού περάσουν 70-100 ώρες από την στιγμή της μόλυνσης, γίνεται εκτίμηση του βαθμού ανάπτυξης του παρασίτου στο ποντίκι. Για τον σκοπό αυτό, κόβεται η άκρη της ουράς του ποντικού και μια σταγόνα αίματος τοποθετείται σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Χρησιμοποιώντας άλλη αντικειμενοφόρο, το στρώμα του αίματος γίνεται όσο το δυνατόν πιο λεπτό. Ακολουθεί μονιμοποίηση με μεθανόλη για 30 sec και έπειτα χρώση με Giemsa για 10 λεπτά. Για να γίνει η χρώση Giemsa, χρησιμοποιείται Giemsa stain αραιωμένη 10 φορές σε ρυθμιστικό διάλυμα με σύσταση:

0.1% Na_2HPO_4

0.07% KH_2PO_4

pH 7.2

Τέλος, η αντικειμενοφόρος ξεπλένεται με άφθονο νερό βρύσης και αφήνεται να στεγνώσει, ώστε με την προσθήκη κεδρέλαιου να παρατηρηθεί στο μικροσκόπιο σε 1000 φορές τελική μεγέθυνση. Σκοπός της συγκεκριμένης παρατήρησης είναι να εκτιμηθεί το ποσοστό των ερυθροκυττάρων στα οποία εντοπίζονται διαφοροποιούμενα παράσιτα της ελονοσίας, καθώς και να διαπιστωθεί το αναπτυξιακό στάδιο των παρασίτων μέσα στον σπονδυλωτό ξενιστή τους (ποντικό) (βλ. Εικόνα 8).



Εικόνα 8 : Αφυλετικά στάδια του *P. berghei* σε ώριμα ερυθροκύτταρα (1-8) και σε δικτυοερυθροκύτταρα (9-12) από τους Corradetti – Verolini, 1951. Γαμετοκύτταρο του *P.berghei* (13). Εικόνα από την Mme I. Landau (προσωπ. επικοινωνία).

Το αίμα είναι έτοιμο για καλλιέργεια μόνον όταν περισσότερα από το 20% των ερυθροκυττάρων έχουν μολυνθεί από το παράσιτο και επιπλέον παρατηρείται και ικανοποιητικός αριθμός γαμετοκυττάρων. Εφ' όσον τηρούνται οι ανωτέρω προϋποθέσεις, ακολουθεί αιμοληψία από το ποντίκι και επακόλουθη καλλιέργεια του αίματος ώστε τελικά να παραχθούν από αυτό ωοκινέτες. Η διαδικασία έχει ως εξής: το ποντίκι αναισθητοποιείται με ενδομυϊκή ένεση στο μηρό 100 μl, αναισθητικού μείγματος Rompun και Vetalar. Όταν το ποντίκι κοιμηθεί, αφαιρείται από αυτό περίπου 1ml αίματος απευθείας από την καρδιά με χρήση σύριγγας 1 ml, η οποία περιέχει 100 μl ηπαρίνης για να αποφευχθεί η πήξη του αίματος. Το αναισθητικό μείγμα προκύπτει προσθέτοντας σε 1.3 ml αποστειρωμένο νερό 0.5 ml Rompun 2% και 1.2 ml Vetalar συγκεντρώσεως 100 mg/ml, και διατηρείται στους 4⁰C για τουλάχιστον 2 εβδομάδες. Η ηπαρίνη (Sigma) διαλύθηκε σε 0.9 % NaCl και διατηρήθηκε στους -20⁰C.

Ακολούθως, το αίμα περνάει από στήλη κυτταρίνης CF11 όγκου 2 ml για να απομακρυνθούν τα λευκά αιμοσφαίρια που παρεμποδίζουν την περαιτέρω διαφοροποίηση του παρασίτου σε ωοκινέτες. Κατόπιν διαλύεται σε 10 ml μέσου καλλιέργειας ωοκινετών RPMI-1640 (Gibco BRL) και καλλιεργείται σε θερμοκρασία 19⁰C. Στα πρώτα 20 λεπτά της καλλιέργειας γίνεται δειγματοληψία και επακόλουθη παρατήρηση στο μικροσκόπιο σε 400 φορές τελική μεγέθυνση, για να ελεγχθεί εάν έχει συμβεί απομαστίγωση, ένα από τα πιο κρίσιμα βήματα για την τελική παραγωγή ωοκινετών. Κατά την απομαστίγωση κυρίως παρατηρούνται κέντρα βίαιης κίνησης και ακολουθεί η απελευθέρωση ανεξάρτητων κινούμενων μαστιγίων, σημάδια της παρουσίας βιώσιμων αρσενικών γαμετών.

Με τη συμπλήρωση 18-24 ωρών καλλιέργειας γίνεται δεύτερη δειγματοληψία και παρατήρηση στο μικροσκόπιο σε 400 φορές τελική μεγέθυνση, ώστε να διερευνηθεί εάν υπάρχουν καλά σχηματισμένοι και ώριμοι ωοκινέτες. Είναι η απαραίτητη προϋπόθεση για να ξεκινήσει η διαδικασία απομόνωσής τους. Για την απομόνωση χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά πρωτόκολλα εργασίας. Σύμφωνα με το πρώτο, το σύνολο των χειρισμών πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου. Το πρώτο βήμα είναι η φυγοκέντρηση του υλικού της καλλιέργειας στις 2.000 στροφές/λεπτό, για 10 λεπτά, σε επιτραπέζια φυγόκεντρο. Αφού απομακρυνθεί το υπερκείμενο, το ίζημα επαναδιαλύεται σε 0.5 ml PBS και μεταφέρεται σε αποστειρωμένο σωληνάκι τύπου Eppendorf. Στη συνέχεια προστίθενται 2.5 μl μονοκλωνικού αντισώματος ενάντια στην επιφανειακή πρωτεΐνη του ωοκινήτη P28, το οποίο φέρει και μαγνητικά σφαιρίδια (DynabeadΣ). Ακολουθεί επώαση για 5 λεπτά υπό ήπια ανάδευση και επακολούθως ο σωληνίσκος τοποθετείται σε μαγνητική θήκη Dynal MPC (Magnetic Particle Concentrator), όπου παραμένει για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο απομακρύνεται, το ίζημα επαναδιαλύεται σε 0.5 ml PBS και επανατοποθετείται στη μαγνητική θήκη για άλλα 5 λεπτά. Αφού αφαιρεθεί προσεκτικά το υπερκείμενο, το παρασιτικό ίζημα επαναδιαλύεται σε 0.25-0.5 ml PBS.

Σύμφωνα με το δεύτερο πρωτόκολλο απομόνωσης ωοκινετών, το υλικό της καλλιέργειας φυγοκεντρείται στις 2000 στροφές/λεπτό για 8 λεπτά, στους 4⁰C. Το σύνολο των φυγοκεντρήσεων πραγματοποιείται σε επιτραπέζια φυγόκεντρο. Αφού αφαιρεθεί το υπερκείμενο, προστίθενται στο ίζημα 10 ml παγωμένου 0.17M NH₄Cl και διατηρείται στον πάγο για 10-15 λεπτά. Το NH₄Cl συμβάλλει στο να λυθούν τα ερυθροκύτταρα. Στη συνέχεια προστίθενται 10 ml PBS, ώστε να σταματήσει η λύση των ερυθροκυττάρων και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 2000 στροφές για 8 λεπτά στους 4⁰C. Αφού αφαιρεθεί το υπερκείμενο, γίνεται επαναδιάλυση του ιζήματος σε 10 ml PBS και

επαναφυγοκέντρωση στις 2000 στροφές για 8 λεπτά στους 4°C. Το ίζημα που προκύπτει επαναδιαλύεται σε 2.5 ml PBS και τοποθετείται σε σωλήνα χωρητικότητας 15 ml μαζί με 5 ml Nycodenz. Η τοποθέτηση πρέπει να γίνει αρκετά προσεκτικά ώστε το επαναδιαλυθέν ίζημα να σχηματίσει στοιβάδα στα όρια της επιφάνειας επαφής του με το διάλυμα Nycodenz. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 2000 στροφές, για μισή ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης οι ωοκινέτες έχουν μαζευτεί και έχουν σχηματίσει μια σκούρα καφέ μεσόφαση, η οποία πρέπει με μεγάλη προσοχή να αφαιρεθεί με την βοήθεια πιπέτας Pasteur και να μεταφερθεί σε καθαρό σωλήνα.

Η διαδικασία που ακολουθείται για την παρασκευή του διαλύματος Nycodenz έχει ως εξής : 17 gr σκόνης Nycodenz (Sigma) διαλύονται σε 100 ml Nycodenz buffer, αναδεύοντας σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου μία ώρα. Το Nycodenz buffer έχει την εξής σύσταση :

0.06 % Tris-HCl

0.0122 % CaNaHEDTA

0.022 % KCl

και το pH του ρυθμίζεται στο 7.5.

Ανεξάρτητα της μεθόδου απομόνωσης ωοκινετών, απαιτείται ο προσδιορισμός της τελικής συγκέντρωσής τους. Αυτό γίνεται με την βοήθεια αιμοκυτταρόμετρου Neubauer και παρατήρηση στο μικροσκόπιο σε 400 φορές τελική μεγέθυνση, οπότε και καταγράφεται ο συνολικός αριθμός ωοκινετών που μπορεί να παρατηρηθεί σε 25 διαγραμμισμένα τετράγωνα του αιμοκυτταρόμετρου. Ο συγκεκριμένος αριθμός αντιστοιχεί σε όγκο 0.1 μl διαλύματος και πρέπει να πολλαπλασιαστεί με το 10⁴, ώστε να εκφρασθεί η τελική συγκέντρωση ωοκινετών ανά ml διαλύματος.

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

Παρασκευή αντισωμάτων που φέρουν μαγνητικά σφαιρίδια

Κατά τη διαδικασία απομόνωσης των ωοκινετών χρησιμοποιούνται τα μονοκλωνικά αντισώματα 12.1 και 13.1 έναντι της επιφανειακής πρωτεΐνης P28 των ωοκινετών, συνδεδεμένα με μαγνητικά σφαιρίδια. Για τη σύνδεση με τα μονοκλωνικά αντισώματα, τα μαγνητικά σφαιρίδια Dynabeads M-450 (DYNAL) φέρουν στην επιφάνειά τους συνδεδεμένα αντισώματα “goat anti-Mouse IgG” και έτσι έχουν την ικανότητα να αντιδρούν με τις βαριές αλυσίδες των 12.1 και 13.1.

Το σύνολο των χειρισμών πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου. Αρχικά τα μαγνητικά σφαιρίδια πλένονται σε μαγνητική θήκη Dynal MPC (DYNAL). Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής: τα μαγνητικά σφαιρίδια βρίσκονται διαλυμένα σε PBS με 0.1%BSA (Bovine Serum Albumin) και 0.02% NaN₃. Γίνεται ισχυρή ανάδυσή τους σε συσκευή Vortex, ώστε το διάλυμα να γίνει ομογενές και μία ποσότητα σφαιριδίων μεταφέρεται σε σωλήνα πλύσης τύπου Eppendorf χωρητικότητας 1.5 ml. Στη συνέχεια τοποθετείται σε μαγνητική θήκη Dynal MPC για 2

λεπτά και απομακρύνεται το υπερκείμενο. Έπειτα βγαίνει ο σωληνίσκος από την θήκη και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 1 ml PBS με 0.1%BSA, το οποίο είναι το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται σε όλα τα παρακάτω βήματα. Ο σωληνίσκος επανέρχεται ξανά στην μαγνητική θήκη για 2 λεπτά, απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναδιαλύεται σε όγκο ίσο με αυτόν που είχαν τα σφαιρίδια πριν αρχίσει η διαδικασία του πλυσίματος. Με αυτό τον τρόπο εξασφαλίζεται μία τελική συγκέντρωση σφαιριδίων περίπου 4×10^8 ανά ml ρυθμιστικού διαλύματος.

Το επόμενο βήμα είναι η μεταφορά 10^7 πλυμένων μαγνητικών σφαιριδίων σε σωληνίσκο χωρητικότητας 1.5 ml και η προσθήκη 1.5 μ g αντισώματος 12.1 ή 13.1. Ακολουθεί επώαση για μισή ώρα με ταυτόχρονη ανάδευση και ο σωληνίσκος τοποθετείται στη μαγνητική θήκη για 2 λεπτά. Ακολούθως και ενώ ο σωληνίσκος βρίσκεται ακόμα στη θήκης, αφαιρείται το υπερκείμενο. Στη συνέχεια ο σωληνίσκος βγαίνει από τη μαγνητική θήκη και τα μαγνητικά σφαιρίδια επαναδιαλύονται σε ίσο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος με ανάδευση για μερικά δευτερόλεπτα. Ο σωληνίσκος επανατοποθετείται στην μαγνητική θήκη για δύο λεπτά και ο κύκλος πλυσίματος επαναλαμβάνεται για 4 ακόμα φορές. Με το τέλος των πλυσίματων, τα μαγνητικά σφαιρίδια προσδεδεμένα με το αντίσωμα και διαλυμένα σε PBS με 0.1% BSA μπορούν να διατηρηθούν στους 4°C για περισσότερες από 15 ημέρες.

2. ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Κλασμάτωση των κυτταρικών πρωτεϊνών με διαφορική φυγοκέντρηση

Ο προσδιορισμός του αριθμού των κυττάρων γίνεται με χρήση αιμοκυτταρόμετρου Neubauer και μικροσκοπίου. Τα κύτταρα μαζεύονται με μία δεκάλεπτη φυγοκέντρηση στα 1000xg και πλένονται μία φορά με PBS. Επακολούθως ρυθμίζεται η συγκέντρωσή τους σε 60.000 κύτταρα/ μ l PBS παρουσία αναστολέων πρωτεασών (1mM PMSF, 2 μ g/ml pepstatin, 10 μ g/ml aprotinin, 5 μ g/ml leupeptin) και ηχοβολούνται σε πάγο με υπερήχους ισχύος 200W. Γίνονται έξι διαδοχικές εκθέσεις των κυττάρων για 15 δευτερόλεπτα και διαλείμματα ψύξης διάρκειας ενός λεπτού, ώστε να αποφευχθεί η υπερθέρμανση. Άθικτα κύτταρα, πυρήνες και μη διαλυτό υλικό απομακρύνονται ως ίζημα μετά από δεκάλεπτη φυγοκέντρηση στα 1000xg σε φυγόκεντρο τύπου Eppendorf. Στο υπερκείμενο, ακολουθεί ημίωρη φυγοκέντρηση στα 10000xg, οπότε κατακρημνίζονται οργανίδια και μεγάλα κομμάτια κυτταρικών μεμβρανών και το νέο υπερκείμενο που προκύπτει, υπερφυγοκεντρείται στα 100000xg για μία ώρα, ώστε να διαχωριστούν οι μικροσωμικές πρωτεΐνες, που κατακρημνίζονται σαν ίζημα, από αυτές του κυτταροδιαλύματος, που παραμένουν στο υπερκείμενο. Τελευταίο βήμα είναι η πλύση του μικροσωμικού ιζήματος με PBS το οποίο περιέχει αναστολείς πρωτεασών.

Ενίοτε το μικροσωμικό ίζημα εκχυλίζεται για μία ακόμα ώρα, ή με 0.6 M KCl, ή με ισχυρούς αποδιατακτικούς παράγοντες (2M Ουρία, 3M υδροχλωρική γουανιδίνη), με χειλικούς παράγοντες όπως το EGTA, ή, τέλος, με ακραίο αλκαλικό pH (100mM Na_2CO_3 , pH:11). Οι μικροσωμικές πρωτεΐνες που δεν εκχυλίζονται με τα ανωτέρω διαλύματα, απομακρύνονται ως ίζημα, με υπερφυ-

γοκέντρωση στα 100000xg για μία ώρα, ενώ το υπερκείμενο υφίσταται εκτεταμένη διάλυση σε ρυθμιστικό διάλυμα συστάσεως 20 mM Tris-HCl pH:7.5, 0.1M NaCl, 10% γλυκερόλη, 1mM DTT, 0.1% IGEPAL CA-630 (Sigma). Στο τέλος προστίθενται αναστολείς πρωτεασών.

Διαδικασία παρασκευής φίλτρων, που φέρουν πρωτεΐνες από κυτταρικές σειρές εντόμων

Στα πρωτεϊνικά δείγματα προστίθεται ίσος όγκος 2x sample buffer στο οποίο δεν έχει προστεθεί β-μερκαπτοαιθανόλη, έτσι ώστε να εξασφαλισθούν όσο το δυνατόν λιγότερο αποδιατακτικές συνθήκες για τις πρωτεΐνες.

Η σύσταση του 2x sample buffer είναι: 0.0625 M Tris-HCl pH 6.8

20% glycerol

2% SDS

μερικοί κόκκοι bromophenol blue.

Στη συνέχεια τα δείγματα βράζονται για 5 λεπτά στους 100⁰C και απομακρύνονται οι μη διαλυτές πρωτεΐνες με μια φυγοκέντρωση 10 λεπτών σε φυγόκεντρο τύπου Eppendorf στις 15.000 στροφές. Τα δείγματα μπορούν να διατηρηθούν στους -20⁰C για όσο χρόνο είναι αυτό απαραίτητο, αρκεί κάθε φορά προ του φορτώματος σε πήκτωμα ακρυλαμίδης, να προηγείται ένα σύντομο βράσιμο διάρκειας 5 λεπτών.

Το πήκτωμα ακρυλαμίδης παρασκευάζεται κατά Laemmli, δηλαδή αποτελείται από δύο διαφορετικές περιοχές. Η πρώτη περιοχή που καλείται πήκτωμα συγκέντρωσης των δειγμάτων έχει σύσταση:

4% acrylamide/bis acrylamide 30:0.8

0.125 M Tris-HCl, pH 6.8

0.1% ammonium persulfate

0.2% TEMED.

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

10% acrylamide/bis acrylamide 30:0.8

0.375 M Tris-HCl, pH 8.8

0.1% ammonium persulfate

0.05% TEMED.

Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε διάλυμα σύστασης :

0.3% Tris base

1.44% glycine

0.1% SDS

και χρησιμοποιείται η συσκευή Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell της BIORAD. Μέχρι τα δείγματα να ξεπεράσουν το πήκτωμα συγκέντρωσης, η συσκευή διαρρέεται από ρεύμα έντασης 15-20mA, ενώ στη συνέχεια η ένταση του ρεύματος αυξάνεται στα 25-30 mA.

Ακολουθεί μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF, η οποία έχει προηγουμένως εμποτιστεί για 30 δευτερόλεπτα έως 1 λεπτό σε μεθανόλη. Εναλλακτικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί

μεμβράνη νιτροκυτταρίνης εμποτισμένη σε νερό. Για τη μεταφορά των πρωτεϊνών χρησιμοποιείται η συσκευή LKB-NovaBlot της Pharmacia και η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής: δύο χαρτιά Whatmann πάχους 3 χιλιοστών και επιφανείας 6x9 εκατοστών εμποτίζονται σε διάλυμα με σύσταση

3.625 % Tris base

20% μεθανόλη

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

0.3 % Tris base

20% methanol.

Στη συνέχεια τοποθετείται το πήκτωμα που φέρει τις προς μεταφορά πρωτεΐνες, καθώς και τέσσερα ίδιου μεγέθους χαρτιά Whatmann εμποτισμένα σε διάλυμα συστάσεως :

0.52% ε-αμινοκαπροϊκό οξύ

20% μεθανόλη.

Η διάρκεια της μεταφοράς των πρωτεϊνών είναι μία ώρα, κατά την οποία η συσκευή διαρρέεται από ρεύμα έντασης 43mA. Η συγκεκριμένη τιμή έντασης προκύπτει σύμφωνα με τον κανόνα ότι κάθε τετραγωνικό εκατοστό της επιφάνειας του φίλτρου πρέπει να πολλαπλασιαστεί με την τιμή 0.8 ώστε να προκύψει η τελική ένταση του ρεύματος που θα διαρρέει την συσκευή. Όταν πλέον η μεταφορά έχει ολοκληρωθεί, η μεμβράνη που φέρει τις πρωτεΐνες φυλάσσεται στους 4°C.

Ανοσοανίχνευση πρωτεϊνών σε φίλτρα (western blotting)

Μετά το τέλος της μεταφοράς των πρωτεϊνών, οι μεμβράνες επωάζονται με τα κατάλληλα αντισώματα που αναγνωρίζουν τις υπό μελέτη πρωτεΐνες και ακολουθεί η ανίχνευσή τους με τη χρήση σημασμένων δευτερευόντων αντισωμάτων. Για τη σήμανση χρησιμοποιούνται συνήθως ένζυμα τα οποία, μετά τη χορήγηση κατάλληλου υποστρώματος, καταλύουν αντιδράσεις που οδηγούν στην παραγωγή χημειοφωταύγειας.

Το σύνολο της διαδικασίας πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου με ήπια ανάδευση. Πρώτο βήμα είναι η επώαση των μεμβρανών για μία ώρα σε PBS εμπλουτισμένο με 5% άπαχο γάλα. Η μεμβράνη ακολούθως πλένεται για 5 λεπτά με TTBS (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20) το οποίο είναι και το διάλυμα που χρησιμοποιείται σε όλα τα παρακάτω βήματα, εάν δεν αναφέρεται κάτι διαφορετικό. Μετά προστίθεται το πρωτεΐν αντίσωμα σε κατάλληλη αραιώση και η διάρκεια της επώασης κυμαίνεται μεταξύ μίας και τριών ωρών, ανάλογα με το πρωτεΐν αντίσωμα που χρησιμοποιείται. Ακολουθούν τρία πλυσίματα κυμαινόμενης διάρκειας από 5 έως 15 λεπτά και η προσθήκη του κατάλληλου δευτερευόντος αντισώματος, το οποίο είναι σημασμένο με υπεροξειδάση ραπανιού (HRP: Horse Radish Peroxidase). Ενίοτε προστίθεται και 1-2% άπαχο γάλα στο διάλυμα επώασης, ώστε να περιοριστούν φαινόμενα μη ειδικής πρόσδεσης των αντισωμάτων στα φίλτρα. Η επώαση διαρκεί μία ώρα και μετά από τρία ή τέσσερα πλυσίματα διάρκειας 10-15 λεπτών, αρχίζει η διαδικασία εμφάνισης των θέσεων πρόσδεσης των αντισωμάτων στις μεμβράνες. Βασίζεται στη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (Enhanced Chemiluminescence ECL-PIERCE), η οποία

χρησιμοποιεί για την ανίχνευση με αυτοραδιογραφία, το φως που παράγεται από την αντίδραση οξειδωσης της λουμινόλης από την υπεροξειδάση, παρουσία φαινολών. Σε κάποιες περιπτώσεις, με το τέλος της διαδικασίας ήταν απαραίτητος ο καθαρισμός των μεμβρανών από τα προσδεδεμένα αντισώματα /αντιδραστήρια και αυτό γίνεται σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσης του Re-Blot Plus-Mild διαλύματος της εταιρείας CHEMICON.

Ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων

Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα αραιώνονται σε διάλυμα σύστασης:

8M Ουρία

4% CHAPS

0.5% Triton X-100

0.5% αμφολύτες εύρους pI 3-10,

ενώ λίγο πριν τη χρήση του διαλύματος, προστίθεται σε αυτό σκόνη DTT, ώστε η τελική του συγκέντρωση να είναι 20 mM. Τα δείγματα φορτώνονται σε ταινίες, οι οποίες παρουσιάζουν ένα σταθερό κλινές pH κατά μήκος τους (linear immobilized pH Gradient strips) και η ποσότητα του ανωτέρου διαλύματος που προστίθεται στα δείγματα είναι τέτοια, ώστε ο τελικός όγκος μετά την αραιώση να μην ξεπερνά τα 150 μl όταν χρησιμοποιούνται ταινίες μήκους 7 εκατοστών και τα 350 μl όταν χρησιμοποιούνται ταινίες μήκους 17 εκατοστών. Η τελική πρωτεϊνική συγκέντρωση προσδιορίζεται με χρήση του RC/DC™ assay (BIORAD) και BSA (Sigma) ως πρωτεΐνη αναφοράς, ενώ η συνολική ποσότητα πρωτεΐνης που φορτώνεται ανά ταινία, δεν ξεπερνά τα 20 μg για τις μικρές και τα 150 μg για τις μεγάλες ταινίες. Το εύρος pH στις ταινίες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 3-10 και 5-8 (Ready Strips IPG Strips, BIORAD).

Ενεργητική ενυδάτωση των ταινιών και ισοηλεκτρική εστίαση πραγματοποιήθηκαν στους 20°C με χρήση της μηχανής Protean IEF Cell της BIORAD. Μετά την ενεργητική ενυδάτωση των ταινιών στα 50V για τουλάχιστον 10 ώρες, ακολουθεί η διαδικασία ισοηλεκτρικής εστίασης στην οποία διακρίνονται τρία βήματα:

- 1) Προετοιμασία για την ισοηλεκτρική εστίαση (15 λεπτά στα 250 V).
- 2) Βαθμιδωτή άνοδος της τάσης που εφαρμόζεται στα άκρα των ταινιών (από τα 250 στα 4000V σε δύο ώρες για τις ταινίες των 7 εκατοστών και από τα 250 στα 10000V σε πέντε ώρες για τις ταινίες των 17 εκατοστών).
- 3) Ισοηλεκτρική εστίαση (5 ώρες στα 4000V για τις μικρές ταινίες και 8 ώρες στα 10000V για τις μεγάλες ταινίες).

Σε καθένα από τα βήματα η ένταση του ρεύματος που διαρρέει την κάθε ταινία, περιορίζεται στα 50 μΑ.

Πριν τη δεύτερη διάσταση της ηλεκτροφόρησης, τα δείγματα υφίστανται οξειδωση / αλκυλίωση. Οι ταινίες επωάζονται για 15 λεπτά σε διάλυμα εξισορρόπησης σύστασης:

6M Ουρία

2% SDS

375 mM Tris pH 8.8

20% γλυκερόλη

2% DTT

και για 20 λεπτά στο ίδιο διάλυμα, με τη διαφορά ότι το DTT αντικαθίσταται από τον αλκυλιωτικό παράγοντα ιωδοακεταμίδιο σε τελική συγκέντρωση 2.5%, ενώ προστίθενται και μερικοί κόκκοι μπλε της βρωμοφαινόλης, ώστε να είναι δυνατή η παρατήρηση του μετώπου της ηλεκτροφόρησης κατά τη δεύτερη διάσταση. Η δεύτερη διάσταση πραγματοποιείται σε 10% πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (τυπικό SDS-PAGE χρησιμοποιώντας piperazine diacrylamide ως crosslinker), ενώ χρησιμοποιείται και δείκτης μοριακού βάρους (Precision Prestained marker, BIORAD). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 20V για τα πρώτα 30 λεπτά και στα 150V για μία ώρα, σε συσκευή Mini-PROTEAN II της BIORAD στην περίπτωση των μικρών ταινιών. Για τις μεγάλες ταινίες η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 32 mA για τα πρώτα 30 λεπτά και στα 48 mA για 5 ώρες σε συσκευή PROTEAN II XL της BIORAD. Με το πέρας και της δεύτερης διάστασης ηλεκτροφόρησης γίνεται η ανίχνευση των πρωτεϊνών, είτε με χρώση αργύρου (Shevchenko *et al.*, 1996), είτε με χρώση Coomassie Brilliant Blue G-250 (Neuhoff *et al.*, 1988), ακολουθώντας τις τροποποιήσεις που αναφέρουν οι Matsui *et al.*, (1999).

Πέψη πρωτεϊνών εντός του πηκτώματος πολυακρυλαμίδιου - εκχύλιση των πεπτιδίων –
φασματομετρία μάζας – ταυτοποίηση των πρωτεϊνών

Οι κηλίδες πρωτεϊνών που μας ενδιαφέρουν, αποκόπτονται από το πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου εντός εξάωρου από τη χρώση του και πέπτονται χρησιμοποιώντας θρυψίνη, σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται από τους Jensen *et al.*, (1999). Όταν γίνεται χρώση αργύρου αντί για Coomassie, τότε προηγείται μία διαδικασία αποχρωματισμού, όπως αυτή περιγράφεται από τους Gharahdaghi *et al.*, (1999). Τα πεπτίδια που προκύπτουν από την πέψη των πρωτεϊνών με θρυψίνη, εκχυλίζονται από το πήκτωμα με 70% ακετονιτρίλιο και 3% μυρμηκικό οξύ. Για τα επόμενα 10 λεπτά κατεργάζονται με υπερήχους, απαλλάσσονται από την παρουσία αλάτων, χρησιμοποιώντας microtips ZipTip C₁₈ (Millipore) και εκκλύονται σε 4 ul 50% ακετονιτρίλιου.

Στη συνέχεια τα δείγματα αναλύονται σε BiflexTM MALDI-TOF φασματογράφο μάζας. Η μέθοδος που ακολουθήθηκε είναι η αποκαλούμενη ως μέθοδος ‘σάντουιτς’ (Kusmann *et al.*, 1997), χρησιμοποιώντας για την επικάλυψη των δειγμάτων α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (Sigma). Για επιπλέον ακρίβεια στον προσδιορισμό του μοριακού βάρους των πεπτιδίων, στην ανάλυση του κάθε δείγματος, περικλείονται και τα προϊόντα αυτόλυσης της θρυψίνης, των οποίων το ακριβές μοριακό βάρος είναι εκ των προτέρων γνωστό. Η ταυτοποίηση της πρωτεΐνης βασίζεται στη σύγκριση της πραγματικής μέτρησης του μοριακού βάρους των πεπτιδίων που προκύπτουν από την πέψη της με θρυψίνη, με τα υποθετικά μοριακά βάρη που προκύπτουν εάν όλα τα ανοικτά πλαίσια διαβάσματος που εντοπίζονται σε ένα γονιδίωμα υποστούν πέψη με θρυψίνη. Τα θεωρητικά μοριακά βάρη υπάρχουν σε ειδικές βάσεις δεδομένων (Genpept, MSDB, NCBI) και οι συγκρίσεις γίνονται χρησιμοποιώντας τα προγράμματα MS-Fit (<http://prospector.ucsf.edu>) ή Mascot (<http://www.matrixscience.com>), ενώ επιτρέπεται και ένα περιθώριο σφάλματος στον προσδιορισμό του μοριακού

βάρους των πεπτιδίων της τάξης των 0.15 Da. Το σύνολο των πειραμάτων ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων και ταυτοποίησης πρωτεϊνών με φασματομετρία μάζας πραγματοποιήθηκαν στο Ινστιτούτο Μοριακής και Κυτταρικής Βιολογίας στο Στρασβούργο, Γαλλία.

Πρόσδεση ωοκινετών σε φίλτρα πρωτεϊνών

Το σύνολο των χειρισμών γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου. Τα φίλτρα βάζονται με χρωστική Ponceau S (Sigma), ώστε να ελεγχθεί η επάρκεια της διαδικασίας μεταφοράς πρωτεϊνών από το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου και επακολούθως αποχρωματίζονται και «μπλοκάρονται» για μία ώρα με 5 % άπαχο γάλα σκόνη διαλυμένο σε PBS, στο οποίο έχει προστεθεί είτε 1mM MgCl₂ και 0.5 mM CaCl₂, είτε 1mM EDTA. Αφού γίνει ένα σύντομο ξέπλυμα των φίλτρων με PBS, τοποθετούνται σε σωλήνα Falcon χωρητικότητας 50 ml. Στον ίδιο σωλήνα τοποθετούνται και οι ωοκινέτες. Ο όγκος της επώασης των ωοκινετών με τα φίλτρα κυμάνθηκε από 1.5 ml έως 2 ml, η συγκέντρωση των ωοκινετών κυμάνθηκε από 10⁶ έως 10⁷ ωοκινέτες ανά ml, ενώ το διάλυμα επώασης ήταν είτε το PBS με 1mM MgCl₂ και 0.5 mM CaCl₂, είτε το PBS με 1mM EDTA. Οι σωλήνες Falcon έχοντας πλέον τα φίλτρα και το διάλυμα των ωοκινετών, τοποθετούνται σε φούρνο επώασης που έχει τη δυνατότητα περιστροφής τους. Η διάρκεια της επώασης κυμαίνεται μεταξύ δύο και τριών ωρών και μετά το τέλος της τα φίλτρα παρατηρούνται. Ανάλογα με την εμφάνισή τους, ένα σύντομο πλύσιμο μπορεί να προηγηθεί της διαδικασίας μονιμοποίησης των ωοκινετών στα φίλτρα με 4 % φορμαλδεΰδη διαλυμένη σε PBS. Το συγκεκριμένο βήμα εγκαταλείφθηκε στην πορεία των πειραμάτων, μια και δεν επηρεάζει το τελικό αποτέλεσμα.

Ακολουθεί η διαδικασία πρόσδεσης του πρώτου και δεύτερου αντισώματος στους ωοκινέτες που εκφράζουν στην επιφάνειά τους, μεταξύ των άλλων και την P28, μία πρωτεΐνη μοριακού βάρους 21 kDa. Με το δεδομένο αυτό, δύο διαθέσιμα μονοκλωνικά αντισώματα έναντι της P28 -τα 12.1 και 13.1- χρησιμοποιήθηκαν ως πρώτα αντισώματα στην διαδικασία ανάδειξης των σημείων πρόσδεσης των ωοκινετών στα φίλτρα. Τα φίλτρα επώάζονται με το 12.1 ή το 13.1 πρώτο αντίσωμα αραιωμένο στο 1:40.000 σε TTBS. Η επώαση γίνεται με την βοήθεια αναδευόμενου επωαστήρα, για μία ώρα και ακολουθούν τρία 15-λεπτα πλυσίματα με TTBS στις ίδιες συνθήκες. Στη συνέχεια προστίθεται ως δεύτερο αντίσωμα “goat anti-Mouse IgG” συζευγμένο με HRP (BIORAD), σε τελική αραιώση 1:100.000 σε TTBS. Η επώαση διαρκεί 45 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και ακολουθούν τέσσερα δεκαπεντάλεπτα πλυσίματα με TTBS και η διαδικασία εντοπισμού των θέσεων πρόσδεσης των αντισωμάτων στη μεμβράνη, σύμφωνα με τη διαδικασία που αναφέρεται παραπάνω (βλ. ανοσοανίχνευση πρωτεϊνών).

Πρόσδεση πρωτεϊνών εντόμων σε ωοκινέτες υπό συνθήκες διαλύματος

Κύτταρα S2 κατεργάζονται με υπερήχους (βλ. παραπάνω) και το πρωτεϊνικό τους εκχύλισμα φυγοκεντρείται στα 10000xg. Το υπερκείμενο που προκύπτει από τη φυγοκέντρωση, τοποθετείται σε

δοκιμαστικό σωλήνα και προστίθενται απομονωμένοι ωοκινέτες. Ακολουθεί επώαση για δύο ώρες, υπό ανάδευση, παρουσία 5% φυσιολογικού ορού και αναστολέων πρωτεασών. Το σύνολο των χειρισμών πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου. Με το τέλος της επώασης, οι ωοκινέτες συνδεδεμένοι με όποιες από τις πρωτεΐνες έχουν την ικανότητα να προσδένονται σε αυτούς, απομονώνονται με μία δεκάλεπτη φυγοκέντρηση στα 1000xg και πλένονται τρεις φορές, για είκοσι λεπτά, με PBT (1x PBS, 0.2% σαπονίνη, 5% φυσιολογικός ορός). Μετά το τέλος των πλυσιμάτων οι ωοκινέτες ξανααπομονώνονται και το πρωτεϊνικό τους περιεχόμενο εξετάζεται με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και μεταφορά σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης. Παράλληλα γίνεται και μία σειρά πειραμάτων ελέγχου. Πιο συγκεκριμένα, στο ίδιο πήκτωμα φορτώνονται:

- 1) το αρχικό εκχύλισμα πρωτεϊνών των S2 κυττάρων, που χρησιμοποιήθηκε για την επώαση με τους ωοκινέτες (θετικός έλεγχος),
- 2) πρωτεϊνικό διάλυμα απομονωμένων ωοκινετών, που δεν έχουν υποστεί επώαση με πρωτεΐνες εντόμων (αρνητικός έλεγχος),
- 3) το ίζημα πρωτεϊνών που προκύπτει εάν το αρχικό εκχύλισμα των S2 κυττάρων δεν επωασθεί με ωοκινέτες, αλλά υποβληθεί στο σύνολο της πειραματικής διαδικασίας συμπεριλαμβανομένης και της τελικής φυγοκέντρησης στα 1000xg (αρνητικός έλεγχος).

Ακολουθεί ανοσοανίχνευση χρησιμοποιώντας πολυκλωνικά αντισώματα έναντι της αννεξίνης B11 της *D. melanogaster*, ώστε να ελεγχθεί η ικανότητα της συγκεκριμένης πρωτεΐνης να προσδένεται σε ωοκινέτες, σε συνθήκες διαλύματος.

3. ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ

Απομόνωση DNA – Προσδιορισμός της πρωτοταγούς νουκλεοτιδικής αλληλουχίας DNA

Για μεγάλες ποσότητες και υψηλή καθαρότητα πλασμιδιακού DNA από βακτήρια χρησιμοποιήθηκαν στήλες διαχωρισμού της QIAGEN, σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσης της εταιρείας. Για τον καθαρισμό προϊόντων PCR από πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε το Qiaex II gel extraction kit της QIAGEN, ενώ ο προσδιορισμός της πρωτοταγούς νουκλεοτιδικής αλληλουχίας DNA έγινε αυτόματα σύμφωνα με τη μέθοδο των Rosenblum *et al.*, (1997).

Απομόνωση RNA - σύνθεση cDNA

Η συνολική ποσότητα RNA απομονώνεται χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο TRI (Sigma) σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσης της εταιρείας. Το RNA επιάζεται με DNase RQ1(Promega) για να απομακρυνθεί από το διάλυμα τυχόν γονιδιωματικό DNA και 5μg mRNA από κάθε δείγμα υφίστανται αντίστροφη μεταγραφή σε cDNA σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσης της αντίστροφης μεταγραφάσης SuperScript II (Invitrogen), χρησιμοποιώντας ως εκκινητές ολιγονουκλεοτίδια θυμίνης.

Εργαλεία Βιοπληροφορικής

Πολύτιμη ήταν η βάση δεδομένων της ομάδας ENSEMBL που έχει αναλάβει τη βιοπληροφορική διαχείριση της αλληλουχίας του γονιδιώματος του Ανωφελούς (http://www.ensembl.org / Anopheles_gambiae), καθώς και η αντίστοιχη βάση δεδομένων για τη Δροσόφιλα Flybase (<http://flybase.bio.indiana.edu>). Για το σχεδιασμό εκκινητών χρησιμοποιήθηκε το GCG Wisconsin Package Tools (<http://oscinfo.osc.edu/software/sunfire/gcg.shtml>), καθώς και για τη σύγκριση αλληλουχιών, σε συνδυασμό με τα υπολογιστικά προγράμματα BLAST του NCBI (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST>) και ClustalX (<ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX>) (Thompson *et al.*, 1997). Η τυχόν ύπαρξη αλληλουχιών σινιάλων για την έκκριση των αννεξινών έγινε με το υπολογιστικό πρόγραμμα SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) (Bendtsen *et al.*, 2004) και η τυχόν παρουσία υδρόφοβων περιοχών, οι οποίες θα μπορούσαν να ενσωματωθούν στην πλασματική μεμβράνη έγινε με το υπολογιστικό πρόγραμμα PredictProtein (<http://cubic.bioc.columbia.edu/predictprotein>). Πιθανά υπολείμματα στόχοι μετά-μεταφραστικών τροποποιήσεων εντοπίστηκαν με τα υπολογιστικά προγράμματα NetNGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc>), NetOGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc>), YinOYang (<http://www.cbs.dtu.dk/services/YinOYang>) και Net Phos (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos>) (Blom *et al.*, 2004).

Ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης με RT-PCR

Ο τελικός σκοπός στο συγκεκριμένο πείραμα είναι η ανάλυση του προτύπου έκφρασης των αννεξινών στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια και στους διάφορους ιστούς των κουνουπιών. Το μονόκλωνο cDNA που συντέθηκε από την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής (βλ. παραπάνω), πολλαπλασιάζεται με PCR, χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές για τα γονίδια που θέλουμε να αντλήσουμε πληροφορία. Προκειμένου η ποσοτικοποίηση των προϊόντων να είναι αξιόπιστη, στην ίδια αντίδραση προστίθενται εκκινητές για ένα γονίδιο αναφοράς, του οποίου η έκφραση είναι σταθερή. Στην περίπτωση μας χρησιμοποιείται το ριβοσωμικό γονίδιο S7 του *An. gambiae* (Mahairaki *et al.*, 2001). Η εφαρμογή ίδιων συνθηκών πολλαπλασιασμού τόσο για το γονίδιο στόχο, όσο και για το γονίδιο αναφοράς, επιτρέπει τη σύγκριση των προϊόντων της αντίδρασης και κατά συνέπεια την εκτίμηση της μεταβολής στη συγκέντρωση μεταγράφων του υπό μελέτη γονιδίου.

0.5 μl cDNA (περίπου το 2% από κάθε δείγμα) χρησιμοποιείται ως μήτρα σε αντίδραση PCR με ζεύγη εκκινητών ειδικά για κάθε γονίδιο αννεξίνης του κουνουπιού. Πιο συγκεκριμένα για το μετάγραφο ENSANGT00000015145 χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές 145F-145R, για το μετάγραφο ENSANGT00000015300 οι εκκινητές 300F-300R, για το μετάγραφο ENSANGT00000015318 οι εκκινητές 318F-318D και για το γονίδιο ENSANGT00000028228, οι εκκινητές 228F-228R (Βλ. Πίνακα 3). Για το ριβοσωμικό γονίδιο S7 χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές που δημοσιεύτηκαν από τους Mahairaki *et al.*, (2001). Ο αριθμός των κύκλων που απαιτούνται για γραμμική ενίσχυση των μεταγράφων κάθε γονιδίου, καθορίστηκε με διαδοχική αύξηση του αριθμού κύκλων της αντίδρασης PCR. Είκοσι έξι κύκλοι PCR αντίδρασης είχαν σαν αποτέλεσμα γραμμική ενίσχυση των μεταγράφων ENSANGT00000015145 και ENSANGT00000015300, είκοσι τέσσερις κύκλοι για το μετάγραφο

ENSANGT00000015318 και είκοσι κύκλοι για το ριβοσωμικό γονίδιο S7.

Κάθε αντίδραση PCR περιλαμβάνει εκτός του μονόκλωνου cDNA, 0.5 μΜol του κάθε εκκινητή, 3mM MgCl₂ και 2.5 μονάδες Taq πολυμεράσης (Platinum) σε ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο παρέχεται μαζί με την πολυμεράση. Κάθε κύκλος ενίσχυσης πραγματοποιείται στις εξής συνθήκες: 94°C για 30 δευτερόλεπτα, 58 °C για 30 δευτερόλεπτα και 72 °C για ένα λεπτό. Τα προϊόντα διαχωρίζονται σε πήκτωμα αγαρόζης και βάφονται με βρωμιούχο αιθίδιο. Χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα ImageJ, συγκρίνεται η μεταβολή στην έκφραση των διαφόρων αννεξινών, έχοντας τα μετάγραφα για το γονίδιο S7 ως σημείο αναφοράς. Κάθε αντίδραση PCR επαναλαμβάνεται τουλάχιστον τρεις φορές για κάθε γονίδιο αννεξίνης.

Πίνακας 3

Γονίδια και εντός παρενθέσεως τα αντίστοιχα μετάγραφα τους, των οποίων η έκφραση ελέγχθηκε με PCR χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές. Επίσης παρουσιάζονται η ονομασία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν και η αλληλουχία τους, καθώς και το μέγεθος των προϊόντων που προκύπτουν από την αντίδραση PCR. Ονομασίες γονιδίων και αρίθμηση βάσεων υιοθετούνται ως έχουν από τις γονιδιωματικές βάσεις δεδομένων ENSEMBL για τον *An.gambiae* και Flybase για τη *D. melanogaster*

| ΓΟΝΙΔΙΟ | ΟΝΟΜΑ ΕΚΚΙΝΗΤΗ | ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΕΚΚΙΝΗΤΗ | ΜΗΚΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ PCR |
|--|-------------------|-----------------------------|---------------------------|
| | | (5'-3') | (bp) |
| Drosophila B11 (CG9968-PA) | B11F | ATCCCTTCGGAACCTCCAC | |
| | B11R | ATCGCCCTTGATCCAGCTC | 904 bp |
| ENSANGG 00000012656 (ENSANGT 00000015145) | 145F | GTATTATACGCCTGTTCCGACG | |
| | 145D | TTCACCTCCTCGTTCGT | 365 bp |
| | 145R | AGCACGCTTGATAGTCGCC | 930 bp |
| ENSANGG 00000012811 (ENSANGT 00000015300) | 300F | ATTCCAATGCACACCGAC | |
| | 300R | AGCCTTCCTCGATAGCAC | 703 bp |
| ENSANGG 00000024040 (ENSANGT 00000028228) | 228F | AGGATGCTGCCGCCCTTCGCAA A | |
| | 228R | CGTGCTCTAACGGGCGTGC | 320 bp |
| ENSANGG 00000012829 (ENSANGT 00000015318) | 318F | TACTATACGCCCCACCCGAC | |

| | | | |
|--|------|----------------------|--------|
| | 318D | TCGCCCGTATCTGATCGTTC | 369 bp |
| | 145R | AGCACGCTTGTAGTCGCC | 929 bp |

Παρασκευή ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης και παραγωγή πολυκλωνικών αντισωμάτων

Πρώτο βήμα για την παραγωγή πολυκλωνικών αντισωμάτων έναντι της αννεξίνης B11 της *D. melanogaster* και τριών αννεξινών του κουνουπιού *An. gambiae*, είναι η υπερέκφραση των πρωτεϊνών σε βακτήρια, ώστε αυτές να χρησιμοποιηθούν για την ανοσοποίηση ποντικών. Για το σκοπό αυτό πολλαπλασιάζονται με PCR τμήματα DNA μήκους 900 και 700 περίπου ζευγών βάσεων, που περιέχουν την πληροφορία για την παραγωγή τμήματος της αμινοτελικής περιοχής καθώς και των επαναλήψεων αννεξίνης των ανωτέρω πρωτεϊνών (Βλ. Πίνακα 4). Ως μήτρα στην αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκε cDNA μεσεντέρου κουνουπιού ή cDNA S2 κυττάρων της *D. melanogaster*.

Πίνακας 4: τα γονίδια-μετάγραφα αννεξίνης τα οποία ενισχύθηκαν με PCR, το μήκος του τμήματος που προκύπτει από την αντίδραση πολυμεράσης, καθώς και τα σημεία των γονιδίων στα οποία προσδένονται οι εκκινητές. Ονομασίες γονιδίων και αρίθμηση βάσεων υιοθετούνται ως έχουν στις γονιδιωματικές βάσεις δεδομένων ENSEMBL για τον *An.gambiae* και Flybase για τη *D. melanogaster*

| ΓΟΝΙΔΙΟ-MΕΤΑΓΡΑΦΟ | ΜΗΚΟΣ (bp) | 5' Εκκινητής | 3' Εκκινητής |
|------------------------|------------|--------------|--------------|
| ENSANGT000000 15145 | 931 | 217-238 | 1147-1130 |
| ENSANGT000000 15300 | 704 | 119-136 | 822-805 |
| ENSANGT000000 15318 | 930 | 348-367 | 1277-1260 |
| CG9968-PA | 904 | 112-130 | 1016-998 |

Οι πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν για την επαγωγή της έκφρασης των πρωτεϊνών σε βακτήρια, είναι οι PRSET A, B και C της Invitrogen. Τα συγκεκριμένα πλασμίδια φέρουν αλληλουχία που κωδικοποιεί για την προσθήκη μιας σειράς έξι ιστιδινών στο αμινοτελικό άκρο της παραγόμενης πρωτεΐνης. Έτσι επιτρέπουν τον εύκολο και γρήγορο καθαρισμό της μέσω στηλών νικελίου, καθώς και την ανοσοανίχνευσή της με σφαιρίδια νικελίου, στα οποία είναι προσδεσμένη υπεροξειδάση (HRP). Επίσης κάθε φορέας (A, B ή C) έχει διαφορετικά κωδικόνια έναρξης της μετάφρασης και πολυάριθμες θέσεις αναγνώρισης περιοριστικών ενδονουκλεασών/κλωνοποίησης, έτσι ώστε να είναι δυνατή η μετάφραση του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης οποιουδήποτε ενθέματος cDNA. Ένα επιπλέον χαρακτηριστικό τους, είναι ο σχεδιασμός τους για να παρέχουν υψηλά επίπεδα έκφρασης σε προκαρυωτικά κύτταρα, υπό τον έλεγχο του ισχυρού υποκινητή του βακτηριοφάγου T7.

Η επαγωγή της έκφρασης γίνεται σε στελέχη *Escherichia coli* BL21 με την προσθήκη IPTG στο υλικό καλλιέργειας των βακτηρίων και την επακόλουθη παραγωγή T7 RNA πολυμεράσης από αυτά.

Οι εκκινητές φέρουν στα άκρα τους αλληλουχίες αναγνώρισης από περιοριστικά ένζυμα και έτσι τα προϊόντα της PCR καθώς και οι κατάλληλοι κάθε φορά πλασμιδιακοί φορείς, πέπτονται με περιοριστικές ενδονουκλεάσες και ακολουθεί αντίδραση σύνδεσης μορίων DNA με χρήση της λιγάσης του βακτηριοφάγου T4. Τα πλασμίδια που προκύπτουν, χρησιμοποιούνται για το μετασχηματισμό βακτηρίων *E. coli* του στελέχους BL21(D3)*pLysS* και οι κλώνοι που φέρουν ένθεμα, επιλέγονται με PCR. Παράλληλα γίνεται αλληλούχιση του πλασμιδίου για να ελεγχθεί η ακεραιότητα του ανοικτού πλαισίου διαβάσματος. Η επαγωγή της πρωτεϊνικής έκφρασης γίνεται με προσθήκη IPTG στις βακτηριακές καλλιέργειες, σε τελική συγκέντρωση 1mM, σύμφωνα με το πρωτόκολλο το οποίο συνοδεύει τους πλασμιδιακούς φορείς (Invitrogen). Η απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών γίνεται με χρωματογραφία συγγένειας σε αποδιατακτικές συνθήκες, χρησιμοποιώντας σφαιρίδια Ni-NTA (Qiagen) σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσης της εταιρείας.

Θηλυκά ποντίκια στελέχους BALB/C ενίονται υποδερμικώς με 50 μg καθαρής πρωτεΐνης, αναμεμιγμένης σε ίσο όγκο complete Freund's adjuvant (Sigma) κατά την πρώτη ανοσοποίηση και incomplete Freund's adjuvant (Sigma) κατά τις 4 επακόλουθες ενέσεις υπενθύμισης. Προ της ανοσοποίησης απομονώνεται ορός από την ουρά των ποντικών, ο οποίος και θα χρησιμοποιηθεί σε πειράματα ελέγχου. Μεταξύ της κάθε ένεσης μεσολαβεί ένας μήνας, ενώ 12 με 14 ημέρες μετά την κάθε ένεση λαμβάνεται ορός από την ουρά των ποντικών και ελέγχεται ως προς την ικανότητά του αναγνώρισης του ανοσογόνου. Τέλος ο ορός φυλάσσεται στους -80°C.

4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΑΝΟΣΟΕΝΤΟΠΙΣΜΟΥ ΜΕ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ

Πειράματα ανοσοφθορισμού σε κυτταρικές σειρές εντόμων

Όλη η διαδικασία πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου. Κύτταρα MOS 20 και 4a3A τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρους πλάκες, στεγνώνονται, ξεπλένονται σύντομα με PBS και μονιμοποιούνται για δέκα λεπτά με 2% φορμαλδεΰδη διαλυμένη σε PBS. Αφού απομακρυνθεί η φορμαλδεΰδη ξεπλένοντας πάλι με PBS, τα κύτταρα επωάζονται για μισή ώρα με πολυκλωνικό ορό έναντι των αννεξινών του κουνουπιού, αραιωμένο 1000 φορές με PBS το οποίο περιέχει και 3% BSA καθώς και 0,1% Tween-20. Πρόκειται για το διάλυμα που χρησιμοποιείται σε όλα τα παρακάτω βήματα, εάν δεν αναφέρεται κάτι διαφορετικό. Ακολουθούν τρία δεκάλεπτα πλυσίματα και ημίωρη επώαση με κατάλληλο δευτερεύον αντίσωμα, αραιωμένο 2000 φορές. Μετά από επανάληψη των πλυσιμάτων, τα κύτταρα στεγνώνονται, ακολουθεί η προσθήκη διαλύματος γλυκερόλης Vectashield (Vector Laboratories) και το σφράγισμα με καλυπτρίδες. Τελευταίο βήμα είναι η παρατήρηση των δειγμάτων με μικροσκόπιο φθορισμού και η ηλεκτρονική, ψηφιακή φωτογράφιση. Χρώση πραγματοποιείται παράλληλα, παραλείποντας την επώαση με πρώτο αντίσωμα ή χρησιμοποιώντας ως πρώτο αντίσωμα ορό ποντικού προ της ανοσοποίησης με αννεξίνη, τα οποία και αποτελούν πειράματα ελέγχου.

Πειράματα ανοσοφθορισμού σε ιστούς ενήλικων κουνουπιών

Όλη η διαδικασία πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου υπό ήπια ανάδευση και όπου δεν αναφέρεται διαφορετικά, το διάλυμα που χρησιμοποιείται είναι το PBT (Βλ. παραπάνω). Μεσέντερα ή ωσθήκες από ενήλικα κουνούπια απομονώνονται με ανατομή σε στερεοσκόπιο, τοποθετούνται σε PBS και επακολουθώς για μια ώρα σε διάλυμα μονιμοποίησης αποτελούμενο από 4% φορμαλδεΰδη διαλυμένη σε PBS. Η φορμαλδεΰδη απομακρύνεται με διαδοχικές πλύσεις με PBS και οι μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης αντισώματος στον ιστό απενεργοποιούνται με επώαση για μια ώρα σε PBT. Επόμενο βήμα είναι η προσθήκη πρώτου αντισώματος για τουλάχιστον τρεις ώρες και μετά από τρία εικοσάλεπτα πλυσίματα, τοποθετείται το δευτερεύον αντίσωμα. Η επώαση του δευτερεύοντος αντισώματος διαρκεί μιάμιση ώρα και όπως και όλα τα παρακάτω βήματα γίνεται απουσία φωτός. Τα διάφορα πρωτεύοντα και δευτερεύοντα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς και η τελική τους αραίωση φαίνονται στον πίνακα που ακολουθεί:

Πίνακας 5

Πρωτεύοντα και δευτερεύοντα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα ανοσοφθορισμού

| ΠΡΩΤΕΥΟΝΤΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ | |
|------------------------|----------------|
| Αντίσωμα | Αραίωση |
| Rabbit anti-Laminin | 1:200 |
| Mouse anti-annexin: | |
| ENSANGT00000015145 | 1:500 |
| ENSANGT00000015300 | 1:500 |
| ENSANGT00000015318 | 1:500 |
| Rabbit anti-GFP | 1:1000 |
| Mouse anti-P28 | 1:1000 |

| ΔΕΥΤΕΡΕΥΟΝΤΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ | |
|--------------------------------------|----------------|
| Αντίσωμα | Αραίωση |
| Goat anti-mouse IgG-FITC | 1:250 |
| Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG | 1:1000 |
| Alexa Fluor 568 goat anti-mouse IgG | 1:1000 |
| Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG | 1:1000 |

Ακολουθούν τρία εικοσάλεπτα πλυσίματα στο τελευταίο των οποίων έχει προστεθεί RNase A (Invitrogen) σε τελική συγκέντρωση 100 µg/ml. Στη συνέχεια γίνεται μία πεντάλεπτη επώαση με τη χρωστική TO-PRO (Molecular Probes) αραιωμένη 5000 φορές σε PBS και δύο πεντάλεπτα πλυσίματα με το ίδιο διάλυμα. Τελευταία βήματα είναι η συλλογή των ιστών, η τοποθέτησή τους σε αντικειμενοφόρους, η απαλλαγή τους από κάθε υπόλειμμα διαλύματος, η προσθήκη διαλύματος γλυκερόλης Vectashield (Vector Laboratories) και το σφράγισμα με καλυπτρίδες, οπότε και τα δείγματα μπορούν να διατηρηθούν για όσο καιρό χρειαστεί στους -20°C. Χρώση πραγματοποιείται παράλληλα, παραλείποντας την επώαση με πρώτο αντίσωμα ή χρησιμοποιώντας ως πρώτο αντίσωμα ορό ποντικού προ της ανοσοποίησης με αννεξίνη, τα οποία και αποτελούν πειράματα ελέγχου.

Στην περίπτωση που τα μεσέντερα αφαιρέθηκαν από τα κουνούπια 24 ώρες μετά το γεύμα μολυσμένου αίματος, ακολουθείται η ίδια διαδικασία με τις εξής τροποποιήσεις:

- 1) Η ανατομή των κουνουπιών γίνεται σε 2% φορμαλδεΰδη και ακολούθως τα μεσέντερα μεταφέρονται σε PBS, όπου και αφαιρείται το αίμα που αυτά περιέχουν με κατάλληλη τομή. Στη συνέχεια γίνεται μονιμοποίηση με 2% φορμαλδεΰδη για άλλα 30 λεπτά.
- 2) Τα εικοσάλεπτα πλυσίματα γίνονται δεκάλεπτα, πλην αυτού της προσθήκης RNase.
- 3) Προ της επώασης με TO-PRO, γίνεται χρώση των ωοκινετών με μονοκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει την επιφανειακή πρωτεΐνη P28 και το οποίο είναι ήδη συνδεδεμένο με τη φθορίζουσα χρωστική FITC. Το αντίσωμα χρησιμοποιείται αραιωμένο κατά 1000 φορές και ο χρόνος επώασης μία ώρα, ενώ ακολουθούν και τρία δεκάλεπτα πλυσίματα.

Σε όλες τις ανωτέρω πειραματικές διαδικασίες, ο ανοσοεντοπισμός των πρωτεϊνών γίνεται με τη χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου Radiance 2100 της BIORAD για τη λήψη οπτικών τομών.

5. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΑΝΝΕΞΙΝΩΝ ΜΕ ΤΑ ΠΑΡΑΣΙΤΑ ΤΗΣ ΕΛΟΝΟΣΙΑΣ

Χορήγηση πολυκλωνικών αντισωμάτων σε κουνούπια, ταυτόχρονα με το γεύμα μολυσμένου με ελονοσία αίματος

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε έχει περιγραφεί από τους Dinglasan *et al.*, (2003). Συνοπτικά, 1ml μολυσμένου με ελονοσία αίματος αναμιγνύεται με 50 μl πολυκλωνικού ορού έναντι των αννεξινών του κουνουπιού και τοποθετείται σε ειδικές συσκευές, οι οποίες φέρουν ηπαρίνη ώστε να αποτραπεί η πήξη του αίματος, καθώς και μεμβράνη στο κάτω μέρος τους, η οποία επιτρέπει τη λήψη του αίματος από κουνούπια *An. stephensi* ηλικίας 6 ημερών. Τα κουνούπια στερούνται τροφής για τουλάχιστον 12 ώρες, ώστε να είναι πεινασμένα όταν τους προσφερθεί το μολυσμένο γεύμα, ενώ η θερμοκρασία του αίματος στη συσκευή διατηρείται στους 37°C, ώστε να αποφευχθεί το φαινόμενο της απομαστίγωσης στη μία ώρα που συνολικά διαρκεί η λήψη του αίματος από τα κουνούπια. Τα κουνούπια που δεν προτίμησαν το αίμα απομακρύνονται και ο αριθμός των ωοκυστών που αναπτύσσονται στο μεσέντερο του κάθε κουνουπιού μετράται μετά από 10 ημέρες. Ως πείραμα ελέγχου, το μολυσμένο αίμα αναμιγνύεται με φυσιολογικό ορό ποντικού.

Απενεργοποίηση των γονιδίων των αννεξινών με τη μέθοδο RNAi

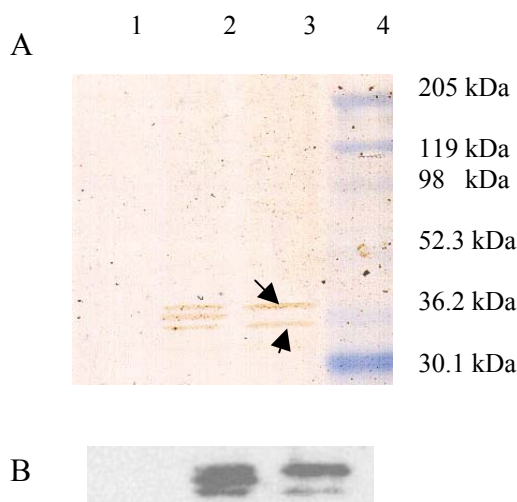
DNA μήκους 900 και 700 περίπου ζευγών βάσεων, που παράγονται από την αντίστροφη μεταγραφή και την ενίσχυση με PCR τμήματος των μεταγράφων αννεξινών του κουνουπιού ENSANGT00000015300 και ENSANGT00000015318 (βλ. παραπάνω), κλωνοποιούνται σε πλασμίδιο το οποίο φέρει υποκινητές T7 εκατέρωθεν του ενθέματος (Blandin *et al.*, 2002). Δίκλωνο RNA παράγεται χρησιμοποιώντας το T7 Ambion kit (Invitrogen), σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσης της εταιρείας και φυλάσσεται διαλυμένο σε νερό στους -80°C. Κουνούπια *An. gambiae* αναισθητοποιούνται με CO₂ και 69 nl δίκλωνου RNA συγκεντρώσεως 1mg/ml ενίονται ενδοθωρακικά

με κατάλληλη συσκευή (Nanoinjector-Nanoject, Drummond). Τα κουνούπια αναρρώνουν από την ένεση για 4 ημέρες και ελέγχεται η αναστολή της έκφρασης των αννεξινών στους ιστούς τους με Western. Την τέταρτη ημέρα τους χορηγείται μολυσμένο με ελονοσία γεύμα και ο αριθμός των ωοκυστών στο μεσέντερό τους προσδιορίζεται 10 ημέρες αργότερα. Ως πείραμα ελέγχου, γίνονται ενέσεις με δίκλωνο RNA για το γονίδιο *LacZ*.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Βιοχημικός χαρακτηρισμός, απομόνωση και ταυτοποίηση πολυπεπτιδίων που προσδέουν ωοκινέτες

Κατά τη διάρκεια της έρευνας για την απόκτηση του μεταπτυχιακού τίτλου ειδίκευσης βρέθηκαν τρία πολυπεπίδια στην κυτταρική σειρά S2 της *D. melanogaster* που έχουν την ικανότητα πρόσδεσης σε ωοκινέτες. Για να βρεθεί ο πιθανός υποκυτταρικός εντοπισμός τους, εφαρμόστηκε ένα πρωτόκολλο διαφορικής φυγοκέντρησης πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων κυττάρων. Σύμφωνα με αυτό, τα κύτταρα σπάνε με χρήση υπερήχων και αφού απομακρυνθούν μεγάλα τμήματα κυττάρων και πυρήνες με φυγοκέντρηση στα 1000xg, το υπερκείμενο φυγοκεντρείται στα 10000xg, οπότε καθιζάνουν οργανίδια και μεγάλα κομμάτια μεμβρανών. Το υπόλοιπο υλικό επαναφυγοκεντρείται στα 100000xg, οπότε προκύπτει το ίζημα των μικροσωμικών πρωτεϊνών, που σχετίζονται με κάποια μεμβράνη του κυττάρου, ενώ αυτές που ακόμα είναι διαλυτές, αποτελούν συστατικά του κυτταροδιαλύματος (cytosol). Από τα τρία υπό μελέτη πολυπεπίδια, δύο εγκαταλείπουν το διάλυμα μετά από φυγοκέντρηση στα 10000xg (βλ. βέλη, Εικόνα 9A), ενώ και τα τρία μετά από φυγοκέντρηση στα 100000xg, υποδεικνύοντας τον πιθανό μεμβρανικό εντοπισμό τους (βλ. Εικόνα 9A). Η πρόσδεση των ωοκινετών στα συγκεκριμένα πολυπεπίδια μοριακού βάρους περίπου 35.5, 36.5 και 38 kDa μπορεί να παρατηρηθεί ακόμα και με γυμνό μάτι, μια και οι ωοκινέτες σχηματίζουν ένα σκούρο καφέ ίζημα στο λευκό πρωτεϊνικό φίλτρο, πιθανότατα λόγω της αιμοζωίνης που αυτοί περιέχουν (βλ. Εικόνα 9A). Η παρασιτική προέλευση του συγκεκριμένου ιζήματος περαιτέρω αποδεικνύεται, εάν τα φίλτρα επωασθούν με το μονοκλωνικό αντίσωμα 12.1, το οποίο αναγνωρίζει το επιφανειακό πεπτιδίο P28 των παρασίτων. Το σήμα στο τύπου Western πείραμα αντιστοιχεί στην περιοχή του φίλτρου που παρατηρείται και το καφέ ίζημα (βλ. Εικόνα 9B).

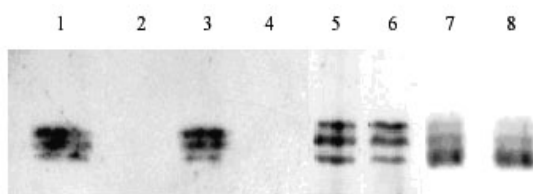


Εικόνα 9: τρεις μεμβρανικές πρωτεΐνες της κυτταρικής σειράς S2 της *D. melanogaster* προσδέουν τους ωοκινέτες.

A. Η πρόσδεση των ωοκινετών στα φίλτρα πρωτεϊνών μπορεί να παρατηρηθεί ακόμα και με γυμνό μάτι σαν καφέ σκούρο ίζημα. Τα υπό μελέτη πολυπεπίδια κατακρημνίζονται τόσο μετά τη φυγοκέντρηση στα 10000xg (στήλη 3) όσο και στα 100000xg (στήλη 2), ενώ καμία ενεργότητα πρόσδεσης δεν παρατηρείται στο κυτταροδιάλυμα (στήλη 1), υποδεικνύοντας τη συσχέτισή τους με τη μεμβράνη του κυττάρου. Στη στήλη 4 φαίνεται έγχρωμος μάρτυρας μοριακού βάρους πρωτεϊνών της εταιρείας BIORAD.

B. Επώαση των φίλτρων με το 12.1 μονοκλωνικό αντίσωμα, έναντι του επιφανειακού πεπτιδίου P28 των παρασίτων, αποδεικνύει την παρασιτική προέλευση του ιζήματος.

Λόγω του πιθανού μεμβρανικού εντοπισμού των πολυπεπτιδίων, το ερώτημα που προκύπτει είναι εάν αυτά είναι ενσωματωμένα στην κυτταρική μεμβράνη ή απλά σχετίζονται με αυτή. Για να απαντηθεί το ερώτημα, μικροσωμικά ιζήματα επωάζονται με αυξανόμενη ιονική ισχύ, ή σε ακραίο βασικό pH ή με χηλικούς παράγοντες όπως το EGTA ή με αποδιατακτικούς παράγοντες όπως η ουρία και η υδροχλωρική γουανιδίνη. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, μόνο οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες παραμένουν συνδεδεμένες στα μικροσώματα, μια και για την εκχύλιση τους από τη λιπιδική διπλοστοιβάδα είναι απολύτως απαραίτητη η παρουσία απορρυπαντικού. Μερική εκχύλιση των υπό μελέτη πεπτιδίων επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας 0.6 M KCl ή 100mM Na₂CO₃ pH 11 ή EGTA, ενώ ολική εκχύλιση επιτυγχάνεται με 2M Ουρία ή 3M Υδροχλωρική Γουανιδίνη (βλ. Εικόνα 10), οπότε συνάγεται το συμπέρασμα ότι αυτά σχετίζονται ναί μεν με την κυτταρική μεμβράνη, αλλά δεν πρόκειται για διαμεμβρανικές πρωτεΐνες.



Εικόνα 10: Τα υπό μελέτη πολυπεπτιδία εκχυλίζονται πλήρως από τα μικροσώματα με ουρία ή υδροχλωρική γουανιδίνη, ενώ μερική εκχύλιση επιτυγχάνεται με KCl ή ακραία βασικό pH.

- 1: διαλυτοποιημένες μικροσωμικές πρωτεΐνες μετά την εκχύλιση με 2M ουρία
- 2: μη διαλυτές μικροσωμικές πρωτεΐνες μετά την εκχύλιση με 2M ουρία
- 3: διαλυτοποιημένες μικροσωμικές πρωτεΐνες μετά την εκχύλιση με 3M υδροχλωρική γουανιδίνη
- 4: μη διαλυτές μικροσωμικές πρωτεΐνες μετά την εκχύλιση με 3M υδροχλωρική γουανιδίνη
- 5: διαλυτοποιημένες μικροσωμικές πρωτεΐνες μετά την εκχύλιση με 0.6M KCl
- 6: μη διαλυτές μικροσωμικές πρωτεΐνες μετά την εκχύλιση με 0.6M KCl
- 7: διαλυτοποιημένες μικροσωμικές πρωτεΐνες μετά την εκχύλιση με 100mM Na₂CO₃ pH 11
- 8: μη διαλυτές μικροσωμικές πρωτεΐνες μετά την εκχύλιση με 100mM Na₂CO₃ pH 11.

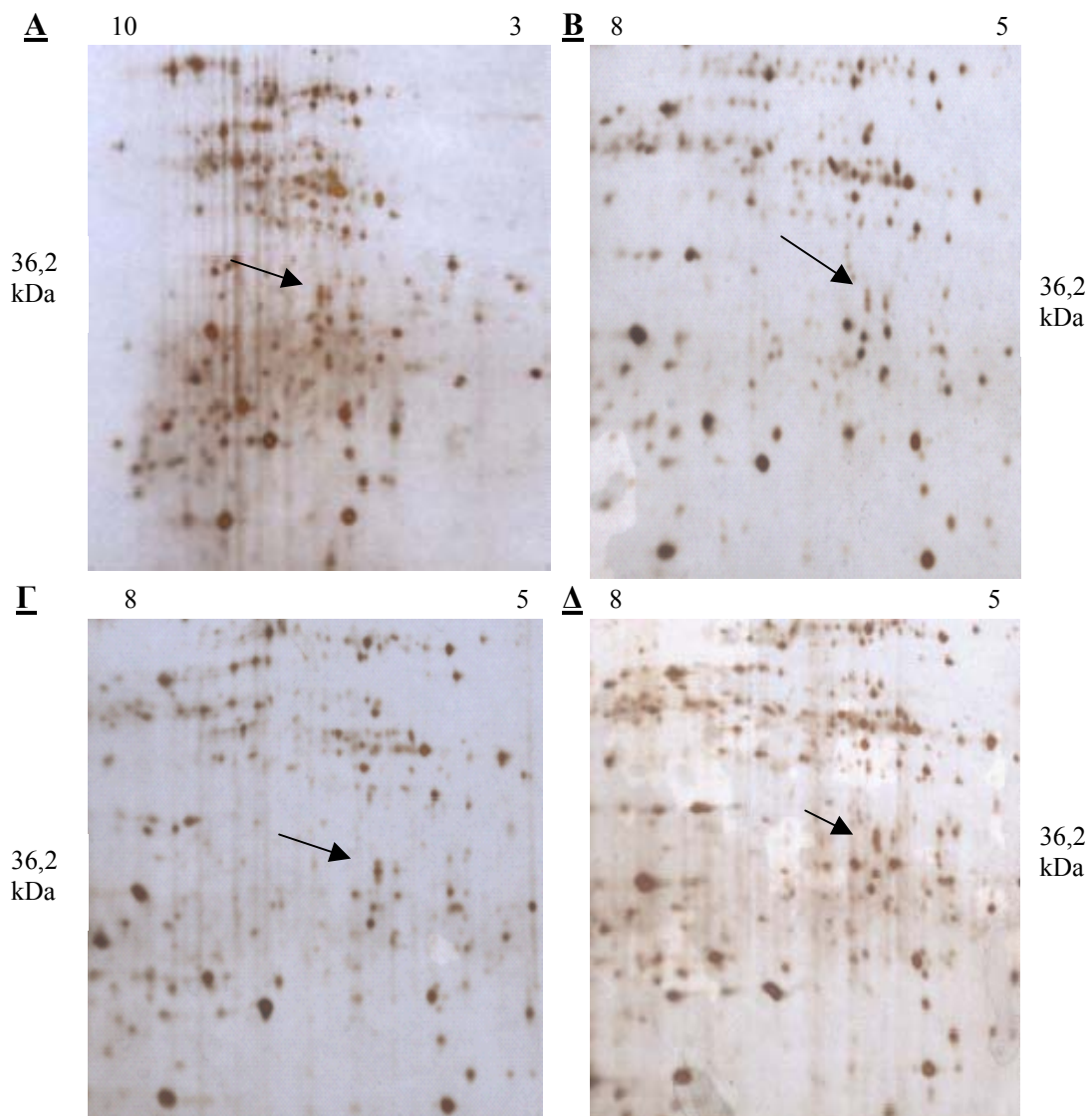
Απομόνωση και ταυτοποίηση

Για την απομόνωση και ταυτοποίηση των πρωτεϊνών που προσδένουν τους ωοκινέτες επιλέχθηκε η στρατηγική της ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων, με επακόλουθη χρήση τεχνικών φασματομετρίας μάζας. Ενισχυτικό ρόλο στην απόφαση αυτή έπαιξε και το γεγονός της διαλυτότητας των υπό μελέτη πρωτεϊνών στην ουρία (βλ. προηγούμενη παράγραφο), ενός από τα κύρια συστατικά των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται κατά το διαχωρισμό των πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων. Επιπλέον, στη δεδομένη χρονική στιγμή, η Δροσόφιλα ήταν το μοναδικό έντομο του οποίου το γονιδίωμα ήταν γνωστό, επιτρέποντας την εφαρμογή τεχνικών φασματομετρίας μάζας για την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών του.

Το σύνολο των μικροσωμικών πρωτεϊνών κυττάρων S2 της *D. melanogaster*, καθώς και εκχυλίσματά τους με αυξανόμενη συγκέντρωση KCl, ουρίας και υδροχλωρικής γουανιδίνης, διαχωρίστηκαν πρώτα σε πηκτώματα μίας διάστασης, ώστε να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη των υπό μελέτη πρωτεϊνών σε αυτά. Στην συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν μικρού μεγέθους πηκτώματα δύο διαστάσεων, ώστε να δοκιμαστεί η δυνατότητα της συγκεκριμένης τεχνικής για υψηλής ποιότητας διαχωρισμό των πρωτεϊνών των δειγμάτων. Με το τέλος του διαχωρισμού, η χρώση αργύρου του πηκτώματος ακρυλαμίδιου αποκάλυψε χαμηλή διακριτική ικανότητα και μεγάλου μεγέθους συσσωματώματα

πρωτεϊνών γύρω από την περιοχή φόρτωσης στην πλειονότητα των δειγμάτων. Μονάχα εκχυλίσματα μικροσωμικών πρωτεϊνών με ουρία έδιναν διαχωρισμό καλής διακριτικής ικανότητας, αλλά όμως η συνολική ποσότητα πρωτεΐνης που μπορεί να φορτωθεί σε μικρού μεγέθους πηκτώματα, δεν επέτρεψε την ταυτοποίηση ακόμα και με τις πιο ευαίσθητες μεθόδους φασματομετρίας μάζας.

Με τη χρήση μεγάλων πηκτωμάτων ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων, επιτεύχθηκε τόσο η αύξηση της συνολικής ποσότητας πρωτεϊνών που διαχωρίζονται, όσο και η επιπλέον βελτίωση της διακριτικής ικανότητας κατά το διαχωρισμό τους. Αρχικά, κατά την πρώτη διάσταση, χρησιμοποιήθηκαν λωρίδες ευρέως φάσματος, οι οποίες διαχωρίζουν το σύνολο των πρωτεϊνών με ισοηλεκτρικό σημείο από 3 έως 10. Μετά τη χρώση των πηκτωμάτων φανερώθηκε η παρουσία τριών κηλίδων στο ίδιο ισοηλεκτρικό σημείο (περίπου 6) και στο μοριακό βάρος, που σύμφωνα με τα προηγούμενα πειράματα, εντοπίζεται η ενεργότητα πρόσδεσης ωοκινετών (βλ. Εικόνα 11Α). Επόμενο βήμα ήταν η εστίαση ακόμα περισσότερο στη συγκεκριμένη περιοχή, χρησιμοποιώντας λωρίδες στενότερου φάσματος ισοηλεκτρικού σημείου, δηλαδή από 5 έως 8. Πράγματι σε τρία διαφορετικά εκχυλίσματα μικροσωμάτων με αυξανόμενη συγκέντρωση ουρίας (Εικόνες 11Β, Γ, Δ) παρατηρήθηκαν τα ίδια πολυπεπίδια (πιθανώς το αυτό, αλλά με τις τρεις ισομορφές του), στο αναμενόμενο μοριακό βάρος, καθιστώντας τα ως υπονήφιους για τις τριπλές ζώνες πρόσδεσης των ωοκινετών στα φίλτρα (βλ. Εικόνες 9 και 10).



Εικόνα 11: χρώση αργύρου σε πηκτώματα διαχωρισμού δύο διαστάσεων. Και τα 4 δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν εκχύλισμα μικροσωμάτων με ουρία.
Α: εκχύλισμα με 4M ουρία, διαχωρίστηκε στην πρώτη διάσταση με ταινία ευρέως φάσματος 3-10.
Β: εκχύλισμα με 2M ουρία, διαχωρίστηκε στην πρώτη διάσταση με ταινία στενού φάσματος 5-8.
Γ: εκχύλισμα με 4M ουρία, διαχωρίστηκε στην πρώτη διάσταση με ταινία στενού φάσματος 5-8.
Δ: εκχύλισμα με 6M ουρία διαχωρίστηκε στην πρώτη διάσταση με ταινία στενού φάσματος 5-8.
Ένα πιθανό πολυπεπτίδιο με τρεις ισομορφές ανιχνεύθηκε σε όλα τα δείγματα και δείχνεται με βέλη.

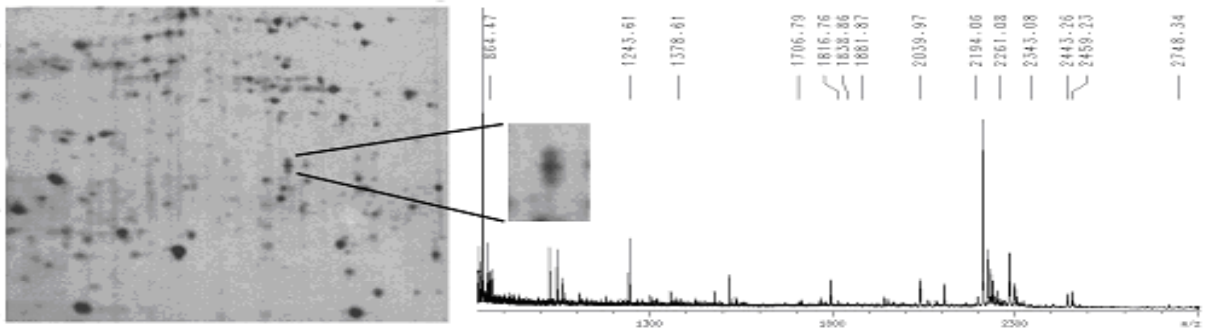
Κάθε μία από τις τρεις κηλίδες αποκόπηκε και μετά τον αποχρωματισμό ακολούθησε η πέψη της, εντός του πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου, με θρυψίνη. Τα προϊόντα καθαρίστηκαν από το πηκτώμα και αναλύθηκαν με φασματομετρία μάζας MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time Of Flight) (Corthals *et al.*, 2000). Σύμφωνα με τις αρχές της τεχνικής, τα πεπτίδια πρώτα αναμειγνύονται με μία μικρή αρωματική χημική ένωση, όπως το σιναπινικό οξύ ή το α -cyano-4-hydroxycinnamic acid, η οποία διαλυμένη σε οργανικό διαλύτη, παίζει το ρόλο υποστρώματος για τη στερέωση των δειγμάτων σε ένα μεταλλικό στόχο. Με την αποξήρανση του μείγματος, ο στόχος τοποθετείται στο φασματογράφο, φέροντας και τα υπό ανάλυση δείγματα. Αφού δημιουργηθεί υψηλό κενό (της τάξης του 10^{-5} έως 10^{-7} Torr), στο στόχο εφαρμόζεται ισχυρότατο ηλεκτρικό πεδίο (της τάξης των 20kV) και κατευθύνεται ακτίνα λέιζερ κατάλληλου μήκους κύματος, ώστε οι κρύσταλλοι του υποστρώματος να απορροφήσουν την φωτονική ενέργεια και να αρχίσει η έκλυση θερμότητας από αυτούς. Η απότομη αύξηση της θερμοκρασίας έχει ως συνέπεια τη μετάβαση υποστρώματος και των πεπτιδίων στην αέρια φάση. Αυτή η διαδικασία παράλληλα ιονίζει τα δείγματα μέσω πρωτονιώσεων/αποπρωτονιώσεων, πρόσδεσης/αποκοπής κατιόντων, ή οξειδώσεων/αναγωγών στην αέρια φάση. Τα ιονισμένα μόρια απωθούνται από το μεταλλικό στόχο, λόγω του ισχυρότατου πεδίου και συσσωρεύονται προς μία σειρά φακών που τα κατευθύνουν σε περιοχή απαλλαγμένη από πεδίο. Όλα τα ιόντα έχουν την ίδια τελική κινητική ενέργεια καθώς φτάνουν στην ελεύθερη του πεδίου περιοχή, επομένως ο χρόνος που μεσολαβεί για την άφιξή τους εξαρτάται απόλυτα από τη μάζα τους. Ένας ανιχνευτής ενεργοποιείται από τους παλμούς του λέιζερ και καταγράφει το χρόνο πτήσης των ιόντων, από τον αρχικό ιονισμό έως την άφιξή τους στην περιοχή που το ηλεκτρικό πεδίο παύει. Μικρότερα ιόντα ταξιδεύουν ταχύτερα σε σύγκριση με μεγαλύτερα και έτσι πρακτικά η μάζα τους μπορεί να υπολογισθεί, εάν ο χρόνος πτήσης τους συγκριθεί με τον αντίστοιχο μορίων των οποίων το ακριβές μοριακό βάρος είναι ήδη γνωστό. Στο συγκεκριμένο πείραμα, χρησιμοποιήθηκαν τα πεπτίδια αυτόλυσης της θρυψίνης.

Από τις τρεις κηλίδες που αναλύθηκαν, η μεσαία έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα ταυτοποίησης (βλ. Εικόνα 12). Δεκατέσσερα συνολικά πεπτίδια τα οποία ανιχνεύθηκαν στο φάσμα, μπορούν να αποδοθούν στην πρωτεΐνη αννεξίνη B11 (CG9968) της *D. melanogaster*. Το φάσμα καθώς και τα μοριακά βάρη των πεπτιδίων φαίνονται στην εικόνα 12 A, ενώ στην εικόνα 12B εμφανίζεται η αλληλουχία των πεπτιδίων και παράλληλα απεικονίζεται με κόκκινο χρώμα, σε σχέση με την υπόλοιπη αλληλουχία της πρωτεΐνης που απεικονίζεται με μαύρο χρώμα. Στην ίδια εικόνα, παρουσιάζονται επίσης οι τροποποιήσεις των πεπτιδίων που ελήφθησαν υπ' όψη κατά τη διαδικασία της ταυτοποίησης, καθώς και το ποσοστό της συνολικής αλληλουχίας που αναγνωρίστηκε και ανέρχεται στο 50%. Άλλα έξι πεπτίδια τα οποία ανιχνεύθηκαν στο φάσμα μπορούν να αποδοθούν στη συγκεκριμένη πρωτεΐνη με την παραδοχή φωσφορυλιώσεων, γλυκοσυλιώσεων και άλλων

ομοιοπολικών τροποποιήσεων. Το κατ' εκτίμηση ισοηλεκτρικό σημείο της αννεξίνης B11 είναι 6.04, ενώ το μοριακό της βάρος 36.289, σε απόλυτη συμφωνία με την εκτίμηση από τα πηκτώματα δύο διαστάσεων. Δέκα από τα δεκατέσσερα πεπτίδια που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση της πρωτεΐνης της μεσαίας κηλίδας, μπορούσαν να εντοπισθούν και στο φάσμα της άνω κηλίδας. Δυστυχώς η ποσότητα της πρωτεΐνης στην κατώτερη από τις τρεις κηλίδες ήταν ανεπαρκής για την ανάλυσή της με τη συγκεκριμένη τεχνική. Όπως και να έχει το πράγμα, το σχεδόν απόλυτα ταυτόσημο ισοηλεκτρικό τους σημείο, σε συνδυασμό με τα δεδομένα της φασματομετρίας μάζας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι τουλάχιστον δύο κηλίδες αντιστοιχούν σε ισομορφές της αννεξίνης B11 (CG9968) της *D. melanogaster*.

Επόμενο βήμα ήταν η παραγωγή φίλτρων από πηκτώματα δύο διαστάσεων για να διαπιστωθεί η ενεργότητα πρόσδεσης των ωοκινετών στην συγκεκριμένη τριπλέτα κηλίδων. Τέτοια ενεργότητα όμως δεν βρέθηκε, επειδή ο συνδυασμός της παρουσίας λιπόφιλων απορρυπαντικών κατά την ηλεκτροφόρηση, με το υψηλό πεδίο που εφαρμόζεται για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών, καθώς και η ταυτόχρονη παρουσία πλειάδας αποδιατακτικών παραγόντων (αλκυλιωτικοί, οξειδωτικοί παράγοντες), οδήγησαν σε απώλεια της ικανότητας πρόσδεσης των ωοκινετών στα φίλτρα.

A



B

CG9968 protein (Annexin B11) (GH16395P) (GM13766p) - Drosophila melanogaster (Fruit fly).

Nominal mass (M_r): **36609**; Calculated pI value: **6.04**

NCBI BLAST search of [Q9VXC4](#) against nr

Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Drosophila melanogaster](#)

Links to retrieve other entries containing this sequence from NCBI Entrez:

[AAF48610](#) from [Drosophila melanogaster](#)

[CAB86189](#) from [Drosophila melanogaster](#)

[AAL13626](#) from [Drosophila melanogaster](#)

[AAM52650](#) from [Drosophila melanogaster](#)

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)

Variable modifications: Oxidation (M)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Number of mass values searched: **90**

Number of mass values matched: **14**

Sequence Coverage: **50%**

Matched peptides shown in **Bold Red**

1 MYPF~~G~~TP~~T~~TVV PAANF~~D~~AVK~~D~~ AHD~~L~~R~~K~~AM~~K~~G F~~G~~TDE~~D~~ALIN IICRRSNEQR
51 QEIQ~~R~~Q~~F~~K~~T~~H F~~G~~KDLIEDIK SETSGNFEKL LVGLLRPIVD YYCAELNDAM
101 AGLGTDEEVL IELLCTLSNM EINTIKNQYL RLYGAHLESE LKSETSGNFK
151 RLLTSLCTAA RDESGR~~V~~DPV AAKNDARELL KAGELRV~~G~~TD ESMF~~N~~MILCQ
201 RNYQLK~~L~~IF QEYEGMTGHS LEKAIKKEFS GDVMEGLIAI YRCVTNKAEY
251 FASRLHKAMA GIGTND~~T~~QLI RVII~~T~~RSEID MTDIKVAFER LYGKSLKSWI
301 K~~G~~DTSGHYKH ALYALVGEQR SS

Show predicted peptides also

Sort Peptides By

Residue Number Increasing Mass Decreasing Mass

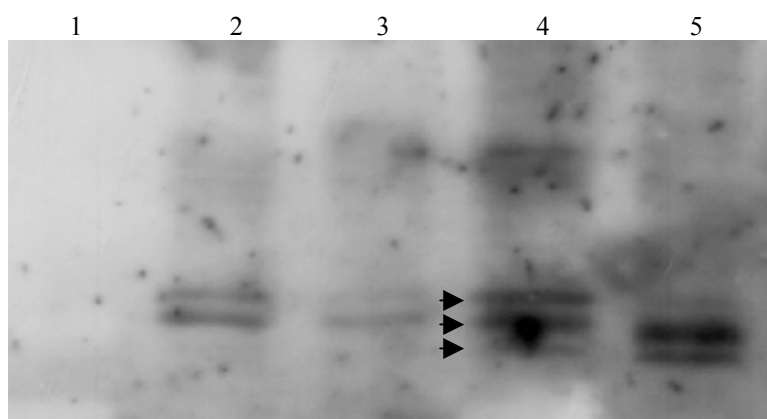
| Start - End | Observed | Mr(expt) | Mr(calc) | Delta | Miss Sequence |
|------------------|----------------|----------------|----------------|--------------|--|
| 1 - 25 | 2748.34 | 2747.33 | 2747.34 | -0.01 | 1 MYPF G TP T TVVPAANF D AVK D AHD L R Oxidation (M) |
| 27 - 44 | 2039.97 | 2038.96 | 2038.98 | -0.02 | 1 AMKGF G TDE D ALINII C R Oxidation (M) |
| 46 - 63 | 2261.08 | 2260.08 | 2260.15 | -0.07 | 3 SNEQRQEIQ R Q F K T HFGK |
| 162 - 173 | 1243.61 | 1242.60 | 1242.62 | -0.02 | 1 DESGRVDPVAAK |
| 182 - 201 | 2343.08 | 2342.07 | 2342.08 | -0.01 | 1 AGELRV G TDESMF N MILC Q R Oxidation (M) |
| 187 - 201 | 1816.76 | 1815.75 | 1815.80 | -0.05 | 0 VGTDESMF N MILC Q R Oxidation (M) |
| 208 - 223 | 1881.87 | 1880.86 | 1880.90 | -0.04 | 0 LIFQEYEGMTGHSLEK |
| 208 - 226 | 2194.06 | 2193.06 | 2193.11 | -0.06 | 1 LIFQEYEGMTGHSLEKAIK |
| 255 - 271 | 1838.86 | 1837.86 | 1837.98 | -0.13 | 1 LHKAMAGIGTND T QLIR |
| 277 - 297 | 2443.26 | 2442.25 | 2442.28 | -0.03 | 3 SEIDMTDIKVAFERLYGKSLK |
| 277 - 297 | 2459.23 | 2458.22 | 2458.28 | -0.06 | 3 SEIDMTDIKVAFERLYGKSLK Oxidation (M) |
| 295 - 309 | 1706.79 | 1705.78 | 1705.88 | -0.10 | 2 SLKSWIK G DTSGHYK |
| 298 - 309 | 1378.61 | 1377.60 | 1377.67 | -0.06 | 1 SWIK G DTSGHYK |
| 302 - 309 | 864.47 | 863.47 | 863.38 | 0.09 | 0 GDTSGHYK |

Εικόνα 12: η διαδικασία ταυτοποίησης της πρωτεΐνης.

A: το φάσμα που προέκυψε από την ανάλυση MALDI-TOF της μεσαίας κηλίδας. Σημειώνονται τα μοριακά βάρη των πεπτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν για την τελική ταυτοποίηση της πρωτεΐνης.

B: η αλληλουχία των πεπτιδίων, πιθανές τροποποιήσεις τους, η διαφορά μεταξύ του προσδοκώμενου και του παρατηρούμενου μοριακού βάρους τους, η θέση τους σε σχέση με τη συνολική πρωτεϊνική αλληλουχία, καθώς και το ποσοστό της αλληλουχίας που αναγνωρίστηκε, παρουσιάζονται μέσω του υπολογιστικού προγράμματος Mascot. Το πρόγραμμα τρέχει με την υπόθεση ότι το σφάλμα στον υπολογισμό της μάζας των πεπτιδίων δεν υπερβαίνει τα 0.15 Da, ενώ και η πέψη με την θρυψίνη μπορεί να μην είναι επιτυχής σε τρεις συνεχόμενες θέσεις αναγνώρισης του ενζύμου.

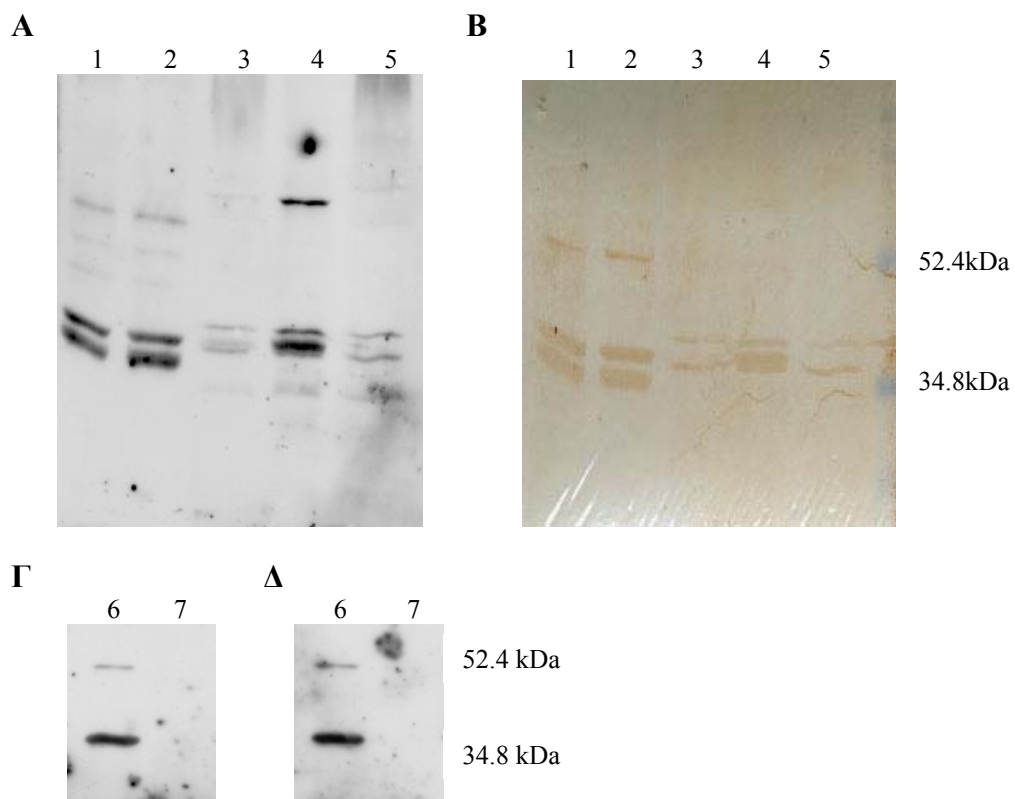
Δεδομένης της αδυναμίας πρόσδεσης των ωοκινετών στις τρεις κηλίδες από τις οποίες έγινε η ταυτοποίηση, η προσπάθεια εστιάστηκε στην παραγωγή αντισωμάτων έναντι της αννεξίνης B11, ώστε να ελεγχθεί η ικανότητα πρόσδεσής της στους ωοκινέτες. Ειδικοί εκκινητές σχεδιάστηκαν και με αντίδραση PCR, χρησιμοποιώντας ως μήτρα cDNA από κύτταρα S2 της *D. melanogaster* (η κυτταρική σειρά από την οποία προέρχονται τα δείγματα που οδήγησαν στην ταυτοποίηση), επιβεβαιώθηκε η έκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου σε αυτά. Το προϊόν της αντίδρασης PCR, που κωδικοποιεί τμήμα του αμινοτελικού άκρου και των επαναλήψεων αννεξίνης, κλωνοποιήθηκε σε κατάλληλο φορέα υπερέκφρασης σε βακτήρια και μετά την επαγωγή της έκφρασης, η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη απομονώθηκε μέσω χρωματογραφίας συγγένειας χρησιμοποιώντας στήλη νικελίου. Μετά από πέντε ενέσεις ανοσοποίησης ποντικών BALB/C, ο ορός τους αναγνώριζε την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη σε πειράματα Western blot σε αραιώση 1: 5000. Ακολούθως εκτελέστηκε ένα πείραμα το οποίο απέδειξε την ικανότητα της αννεξίνης να προσδένεται σε ωοκινέτες, ακόμα και σε συνθήκες διαλύματος: κύτταρα S2 σπάζονται με υπερήχους και μετά από φυγοκέντρηση στα 10000xg, το υπερκείμενο ελέγχεται για την παρουσία αννεξίνης (βλ. Εικόνα 13, στήλες 2 και 3). Ακολούθως προστίθενται καθαροί ωοκινέτες και επωάζονται με το πρωτεϊνικό διάλυμα για δύο ώρες. Με το τέλος της επώασης οι ωοκινέτες απομονώνονται με φυγοκέντρηση στα 1000xg, πλένονται και το σύνολο των πρωτεϊνών τόσο αυτών των παρασίτων, όσο και αυτών των εντόμων που προσδένονται στα παράσιτα, διαχωρίζεται με ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικές συνθήκες και μεταφέρεται σε φίλτρα. Η επώαση των φίλτρων με πολυκλωνικό ορό έναντι της αννεξίνης B11 έδωσε ένα ισχυρό σήμα αναγνώρισης των τριών πρωτεϊνών (βλέπε βέλη Εικόνας 13), αποδεικνύοντας ότι οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες έχουν την ικανότητα να προσδένονται στους ωοκινέτες σε συνθήκες διαλύματος και επομένως συμπαρασύρονται μαζί τους σε φυγοκέντρηση 1000xg (βλ. Εικόνα 13, στήλες 4 και 5). Εάν στο φίλτρο περιέχονται μονάχα πρωτεΐνες των ωοκινετών, τότε αυτές δεν αναγνωρίζονται από τον πολυκλωνικό ορό (βλ. Εικόνα 13, στήλη 1) και επιπλέον, εάν το εκχύλισμα των S2 κυττάρων δεν επωαστεί με ωοκινέτες, τότε επίσης δεν ανιχνεύεται κάποιο σήμα αναγνώρισης μετά από φυγοκέντρηση του στα 1000xg (δεδομένα που δεν παρουσιάζονται).



Εικόνα 13: Western blot με πολυκλωνικό ορό έναντι της αννεξίνης B11. Στη στήλη 1 έχει διαχωριστεί το σύνολο των πρωτεϊνών καθαρών ωοκινετών, που όπως είναι φυσικό δεν αναγνωρίζονται από τον ορό. Στις στήλες 2 και 3 έχουν διαχωριστεί δύο πρωτεϊνικά διαλύματα κυττάρων S2, ύστερα από φυγοκέντρησή τους στα 10000xg, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για επώαση με ωοκινέτες. Μετά την επώασή τους με τα διαλύματα 2 ή 3, οι ωοκινέτες απομονώνονται με φυγοκέντρηση στα 1000xg, πλένονται και το σύνολο των πρωτεϊνών διαχωρίζονται, οπότε προκύπτουν αντίστοιχα οι στήλες 4 ή 5. Φαίνεται καθαρά το σήμα προσδεδεμένης στους ωοκινέτες αννεξίνης όταν αυτοί επωασθούν με τα διαλύματα 2 και 3.

Οι πρωτεΐνες που προσδένουν τους ωοκινέτες στα φίλτρα αντιστοιχούν σε αννεξίνες:

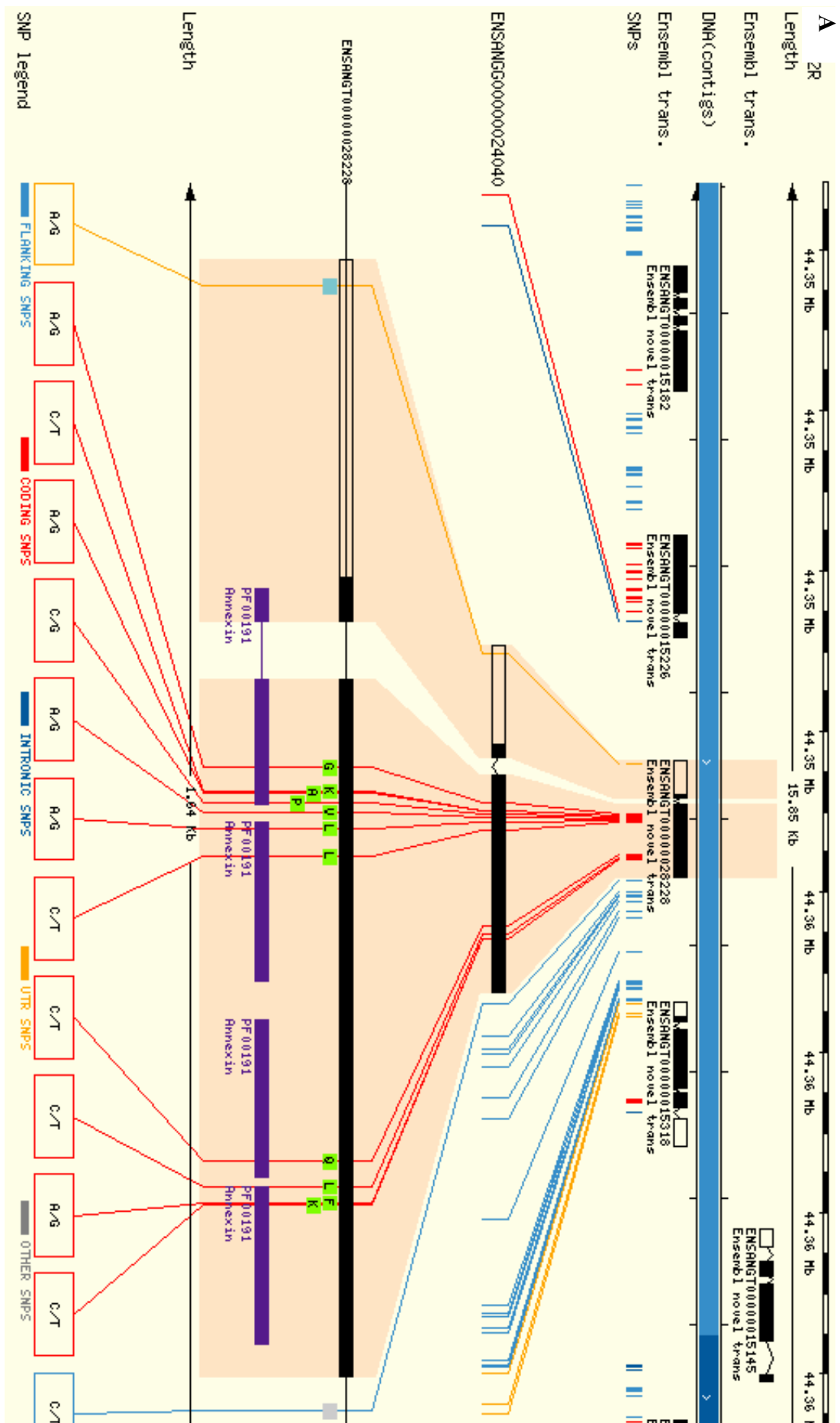
Η ερευνητική εργασία που έγινε για την απόκτηση του μεταπτυχιακού τίτλου ειδίκευσης, απέδειξε την ύπαρξη των πολυπεπτιδίων που προσδένουν ωοκινέτες τόσο στη Δροσόφιλα όσο και σε μεσέντερα και κυτταρικές σειρές κουνουπιών. Το ερώτημα που άμεσα προκύπτει, είναι εάν τα πολυπεπτιδία αυτά αντιστοιχούν σε αννεξίνες. Επιπλέον, δεδομένου ότι μας ενδιαφέρει η μελέτη των συγκεκριμένων πρωτεϊνών κατά τη διαδικασία διείσδυσης των παρασίτων στο μεσέντερο του κουνουπιού, η προσπάθεια εστιάστηκε στην κλωνοποίηση και παραγωγή πολυκλωνικών αντισωμάτων έναντι των ομόλογων γονιδίων του Ανωφελούς. Εξαιρετικό πλεονέκτημα στην προσπάθεια αυτή αποτέλεσε η, πλέον, ολοκληρωμένη αλληλούχιση του γονιδιώματος του *An. gambiae*. Ειδικοί εκκινητές σχεδιάστηκαν με βάση την αλληλουχία των τεσσάρων γονιδίων αννεξινών που βρέθηκαν με μεθόδους βιοπληροφορικής στο γονιδίωμα. Αντιδράσεις PCR με μήτρα cDNA από μεσέντερα κουνουπιών, έδειξαν ότι τρία από τα τέσσερα υποθετικά γονίδια εκφράζονται στο μεσέντερο των κουνουπιών. Τα υποθετικά μετάγραφα των γονιδίων αυτών ονομάζονται ENSANGT00000015145, ENSANGT00000015300 και ENSANGT00000015318, ενώ το δυνητικό μετάγραφο του τέταρτου γονιδίου ENSANGT00000028228 δεν βρέθηκε σε cDNA μεσεντέρων κουνουπιού (βλέπε σελίδα 46). Τα προϊόντα της αντίδρασης PCR, που κωδικοποιούν τμήμα του αμινοτελικού άκρου και των επαναλήψεων αννεξίνης των τριών πολυπεπτιδικών προϊόντων των υποθετικών γονιδίων, κλωνοποιήθηκαν σε κατάλληλο φορέα υπερέκφρασης σε βακτήρια και, όπως και στην περίπτωση της δροσόφιλας, παρήχθησαν πολυκλωνικά αντισώματα. Τα αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα ανοσοεντοπισμού των αννεξινών σε φίλτρα, τα οποία φέρουν το σύνολο των πρωτεϊνών κυττάρων S2 από *D. melanogaster* και 4a-3A από *An. gambiae* (βλ. Εικόνα 14A). Να σημειωθεί ότι το αποτέλεσμα είναι το ίδιο, οποιοσδήποτε από τους τρεις πολυκλωνικούς ορούς που αναγνωρίζουν τις αννεξίνες του κουνουπιού και εάν χρησιμοποιηθεί, μια και κάθε ένας τους αναγνωρίζει και τις τρεις αννεξίνες του κουνουπιού. Ακολούθως τα αντισώματα απομακρύνονται και τα φίλτρα επωάζονται με ωοκινέτες. Οι ωοκινέτες προσδένονται στα φίλτρα (βλ. Εικόνα 14B) στα ίδια ακριβώς σημεία όπου είχαν προηγουμένως εντοπισθεί οι αννεξίνες με ανάλυση Western. Εάν τα φίλτρα περιέχουν πρωτεΐνες της κυτταρικής σειράς MOS 20 του *Ae. aegypti*, επίσης παρατηρείται ταύτιση μεταξύ σήματος αννεξινών και θέσης πρόσδεσης των ωοκινετών στα φίλτρα (βλ. Εικόνα 14Γ, Δ), ενώ ούτε αναγνώριση από τα αντισώματα, ούτε πρόσδεση ωοκινετών επιτυγχάνεται, όταν τα φίλτρα περιέχουν καθαρή αννεξίνη θηλαστικών (αννεξίνη V ή καλπακτίνη).



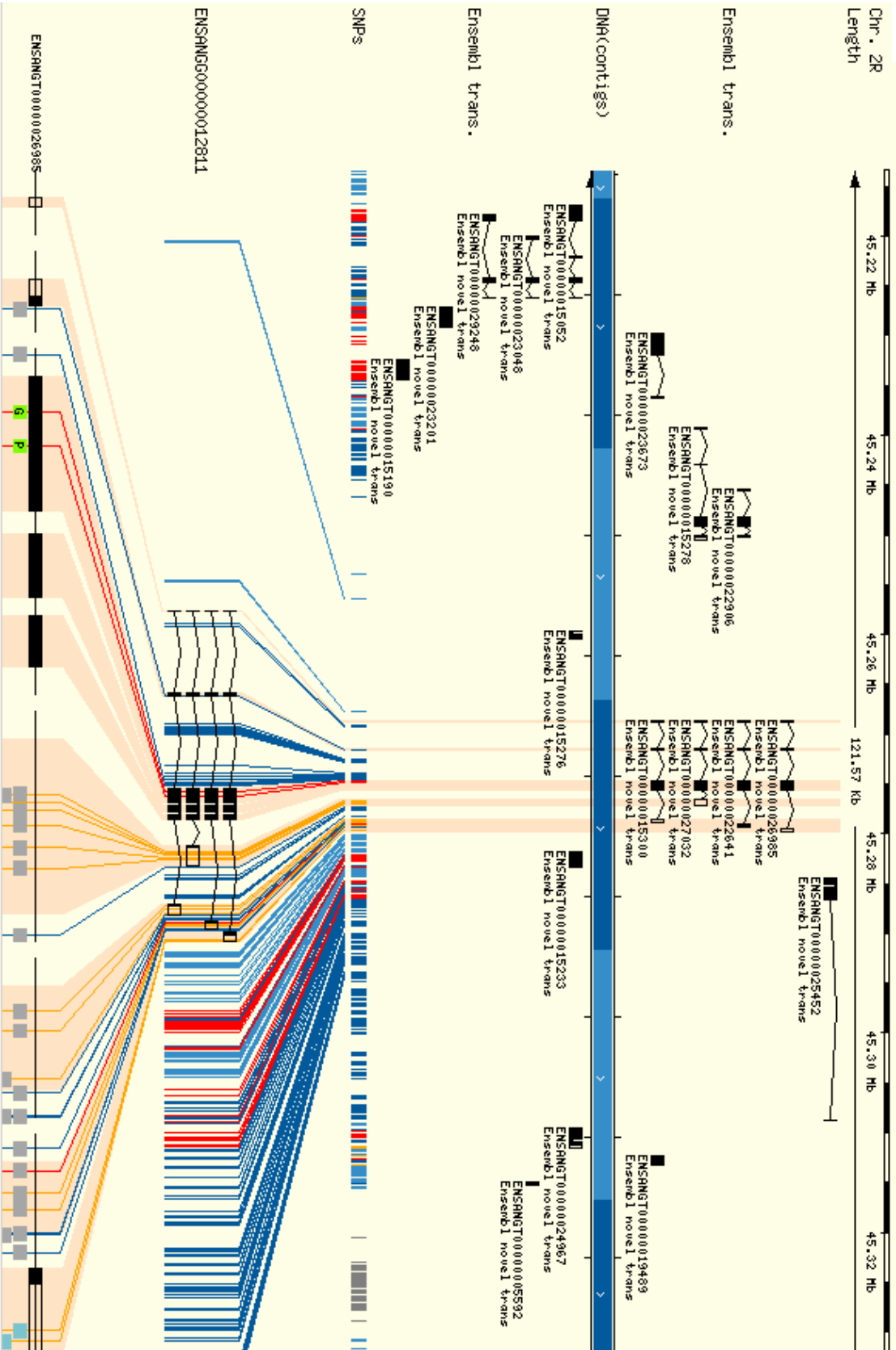
Εικόνα 14: οι θέσεις πρόσδεσης των ωοκινετών στα φίλτρα αντιστοιχούν σε αννεξίνες. Α, Γ : Ανάλυση Western με πολυκλωνικό ορό έναντι των αννεξινών του *An. gambiae*. Πρόσδεση των ωοκινετών στα ίδια φίλτρα Β και Δ αντίστοιχα. Η αντίγνωση των θέσεων πρόσδεσης των ωοκινετών γίνεται είτε με γυμνό μάτι (Β) ως ένα σκούρο καφέ ίζημα, είτε με χρήση του μονοκλωνικού αντισώματος 12.1 που αναγνωρίζει το παράσιτο (Δ).
 1-2: πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυττάρων 4a-3A του *An. gambiae*
 3-5: πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυττάρων S2 της *D. melanogaster*
 6: πρωτεϊνικό εκχύλισμα κυττάρων MOS20 του *Ae. aegypti*
 7: καθαρή ανθρώπινη αννεξίνη V (Sigma)

2. Γονίδια αννεξινών στο κουνούπι *An. gambiae*

Επόμενο βήμα μετά την ταυτοποίηση των αννεξινών, ήταν ο εντοπισμός των γονιδίων τους στο ολοκληρωμένο γονιδίωμα του Ανωφελή. Χρήσιμο εργαλείο στη φάση αυτή της εργασίας αποτέλεσε η σχετική βάση δεδομένων της ομάδας ENSEMBL που έχει αναλάβει τη βιοπληροφορική διαχείριση της αλληλουχίας του γονιδιώματος του Ανωφελούς (http://www.ensembl.org/_/Anopheles_gambiae). Σύμφωνα με τη βάση δεδομένων, 4 συνολικά γονίδια αννεξινών υπάρχουν στο γονιδίωμα του κουνουπιού, όλα στο χρωμόσωμα 2R. Τα γονίδια (αναφερόμενα με τη σειρά που βρίσκονται κατανεμημένα στο γονιδίωμα) ENSANGG00000024040, ENSANGG00000012829 και ENSANGG00000012656 συναθροίζονται σε αλληλουχία μήκους 8Kb, περίπου στη συντεταγμένη 44.4 Mb του ικριώματος του γονιδιώματος του χρωμοσώματος 2R, με τα δύο πρώτα να έχουν την ίδια κατεύθυνση μεταγραφής, ενώ το τρίτο έχει αντίθετη κατεύθυνση μεταγραφής από τα άλλα δύο. Αντίθετη κατεύθυνση μεταγραφής έχει και το τέταρτο γονίδιο ENSANGG00000012811, του οποίου τα εξόνια απλώνονται σε αλληλουχία μήκους 11Kb, σε απόσταση 1Mb περίπου από τα υπόλοιπα τρία γονίδια, στη συντεταγμένη 45.3 Mb. Τα τρία γονίδια περιέχουν τρία εξόνια, ενώ το πρώτο (ENSANGG00000024040) έχει μόνο δύο. Πρέπει να επισημανθεί ότι μετάγραφο του πρώτου γονιδίου δεν ήταν δυνατόν να ανιχνευθεί με PCR σε ιστούς ενήλικων κουνουπιών. Τα μετάγραφα των τριών πρώτων γονιδίων (ENSANGT00000028228, ENSANGT00000015318 και ENSANGT00000015145 αντίστοιχα), σύμφωνα με την ENSEMBL, παρουσιάζονται στην εικόνα 15 A, ενώ στην εικόνα 15B παρουσιάζεται το μετάγραφο του τέταρτου γονιδίου (ENSANGT00000015300). Στα δύο σχήματα φαίνονται παράλληλα και οι πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου (SNPs), που ενδεχομένως συμβαίνουν στην περιοχή των γονιδίων.



B



Εικόνα 15 : τα γονίδια των αννεξινών στο κουνούπι *An. gambiae*, όπως αυτά παρουσιάζονται από την ENSEMBL (A), (B). Τρία γονίδια εντοπίζονται σε μία περιοχή μήκους 8Kb (τα μετάγραφα τους ENSANGT00000028228, ENSANGT00000015318 και ENSANGT00000015145 φαίνονται στην εικόνα A) και ένα τέταρτο (ENSANGT00000015300, εικόνα B) βρίσκεται 0,9 Mb πιο πέρα. Η μπλε μπάρα αντιπροσωπεύει την αλυσίδα του DNA, με τα μετάγραφα που απεικονίζονται άνωθεν της, να προκύπτουν με μεταγραφή από αριστερά προς τα δεξιά, ενώ αυτά που απεικονίζονται κάτωθεν της, προκύπτουν με από δεξιά προς τα αριστερά μεταγραφή. Τα μαύρα κουτιά αντιπροσωπεύουν τα εξόνια του κάθε γονιδίου, ενώ με διαφορετικά χρώματα παρουσιάζονται οι πιθανοί πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου στην περιοχή (SNPs). Με κόκκινο χρώμα φαίνονται πιθανές σιωπηλές μεταλλαγές σε κωδικές περιοχές των γονιδίων.

Σε επίπεδο πρωτεϊνικής αλληλουχίας, τα προϊόντα των τριών πρώτων γονιδίων (ENSANGP00000029637, ENSANGP00000015318 και ENSANGP00000015145 αντίστοιχα) παρουσιάζουν υψηλή ομοιότητα μεταξύ τους και η ταύτισή τους κυμαίνεται γύρω στο 86% (βλ. Εικόνα 16A). Αντίθετα η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το τέταρτο γονίδιο (ENSANGP00000015300), παρουσιάζει χαμηλότερη ταυτότητα με τις υπόλοιπες τρεις, που κυμαίνεται στο 50% περίπου. Το θεωρητικό μοριακό τους βάρος κυμαίνεται γύρω στα 35.5 kDa και στην αμινοξική τους αλληλουχία δεν παρατηρείται ούτε σήμα έκκρισης (signal peptide), ούτε κάποια υδροφοβική περιοχή που θα μπορούσε να είναι διαμεμβρανική. Φέρουν υπολείμματα στόχους για γλυκοσυλιώσεις τύπου μουκίνης (mucin type) και N ακέτυλο-γλυκοζαμίνης, τόσο στο αμινοτελικό όσο και στο καρβοξυτελικό τους άκρο, ενώ στο αμινοτελικό τους άκρο υπάρχουν και στόχοι φωσφορυλιώσεων. Είναι γνωστό για τις αννεξίνες των θηλαστικών, ότι το αμινοτελικό τους άκρο καθορίζει τη λειτουργική τους ειδικότητα και τον υποκυτταρικό τους εντοπισμό και ακολουθείται από 4 ή 8 επαναλήψεις μίας συντηρημένης περιοχής 70 αμινοξέων που καλούνται επαναλήψεις αννεξίνης. Με το δεδομένο αυτό, οι περιοχές των επαναλήψεων αννεξίνης των τριών κουνουπίσιων πρωτεϊνών, συγκρίνονται με το υπολογιστικό πρόγραμμα CLUSTALX, ως προς την ομοιότητά τους με τις αντίστοιχες του ανθρώπου, του μεταξοσκώληκα, της δροσόφιλας, του σκουληκιού, της αρτέμιας, της ταινίας, της ύδρας, της νευρόσπορας και της *Giardia*. Τα αποτελέσματα της σύγκρισης παρουσιάζονται στην εικόνα 16B. Αυτό που διαπιστώνει κανείς είναι ότι οι αννεξίνες των εντόμων όπως και το σύνολο σχεδόν των αννεξινών των ασπόνδυλων, ομαδοποιούνται και είναι συγκριτικά διαφοροποιημένες από τις αντίστοιχες του ανθρώπου.

A

```

1      10     20     30     40     50     60     70     80     90    100    110    120    130
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
15318 HSHYITPHRTVYPRPEEDFDRSRIORNLKRNKGGF6TDEQNIIDILCRNSNAGORQREIREFKRELGRQLIDQLKSELGAKTEEDVTLGLMLRPERYLCKQLHKRNDG6TDEKSLIEICPQIMNOQIRRIYDC
15145 HSHYITPPTVYPRPEEDFDRSRIORNLKRNKGGF6TDEQNIIDILCRNSNAGORQREIREFKRELGRQLIDQLKSELGAKTEEDVTLGLMLRPERYLCKQLHKRNDG6TDEKSLIEICPQIMNOQIRRIYDC
ENSNNGP00000029637 LDPKPTVYPRPEENFPESEIORNLKRNKGGF6TDEQNIIDILCRNSNYORQQLIEHFKNELGRQLYKQLKSELGAKTEEDVTLGLMLRPERYLCKQLYKRNDD6TDEKRLIEILCSQNDQNHIEIRI
Consensus nswyqP.PTYVPE#FtaSaDrhNLKRNKGGF6TDEQNIIDILCRNSN.GRQL.ea3k.ELGRQLIDQLKSELgAKTEEDVTLGLMLPe.YLCKQL.KRNDD6TDEK.LIEILcpqLH##...IvdC

```

```

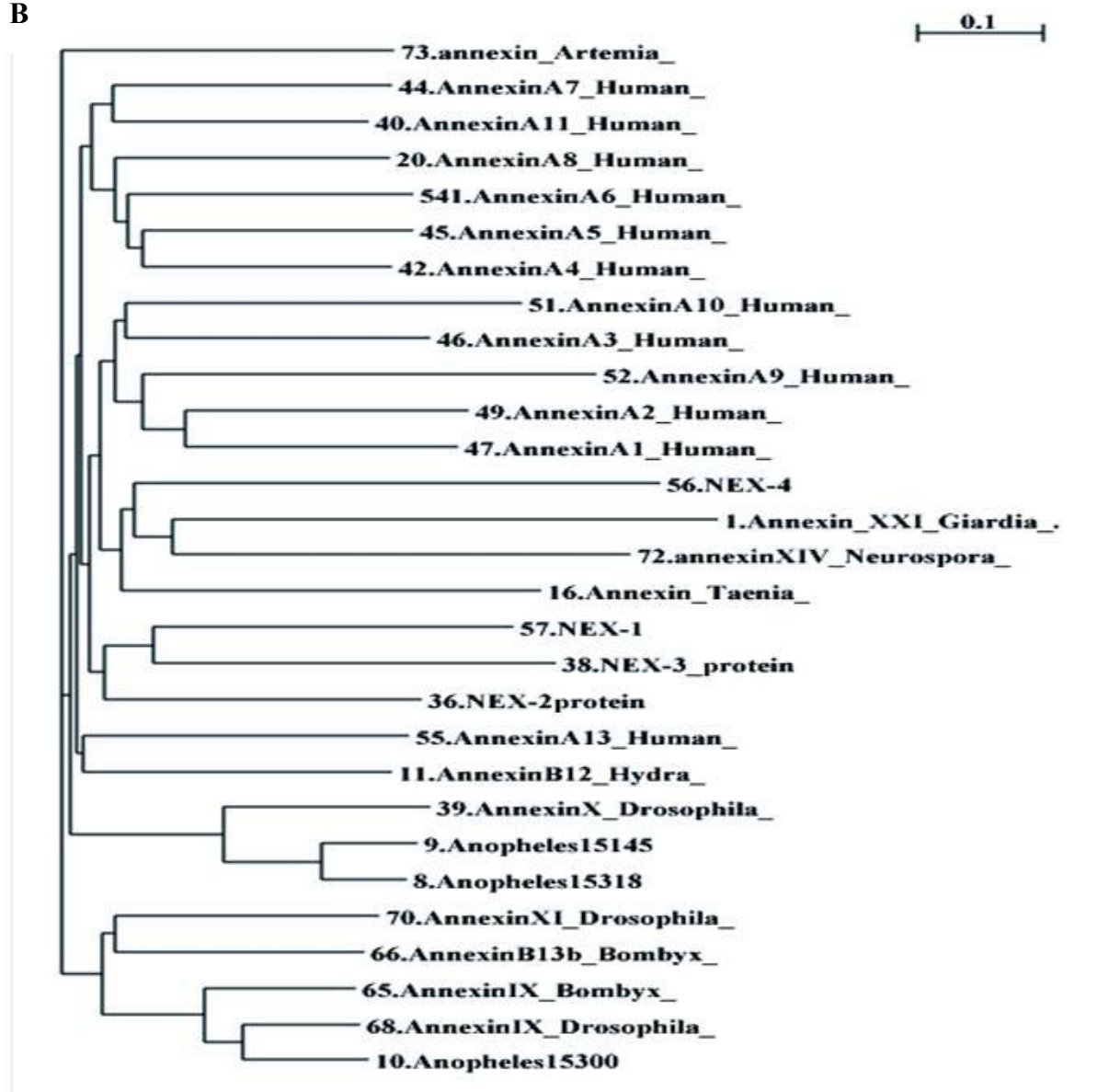
131   140   150   160   170   180   190   200   210   220   230   240   250   260
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
15318 YEEMSRQLREHLCSSETSFFRQLIMLTYVSR-DPQGTYPPELRHEQRKQLYORRGFKLGTDEEYTKLRRHSFDQLEIYFEEYKLSGRITIEORLKNELSGELYORL SNIYECYORRRPHFFRKRLHK
15145 YEEMSRQLREHLCSSETSFFRQLIMLTYVSR-DPQGTYPPELRHEQRKQLYORRGFKLGTDEEYTKLRRHSFDQLEIYFEEYKLSGQITIEORNSLSEL YORL SNIYECYORRRPHFFRKRLHK
ENSNNGP00000029637 YETIMYDRPLREHWCTETSSSFFRQLILITIGTQQPSEPRLPDLRHEQRKQLYORRGFKLGTDESFTYKTLRRHSFQLEIYFEEYKLTGRITIEORLKNELTSQDFYORL SNIYECYORRRPHFFRKRLFK
Consensus YEeHy.RRLREHLCSETSsSFFRQLI4IIG.G.R.DpqgtvDpELRHEQRKQLYORRGFKLGTDEeIFTKTLRRHSFDQLEIYFEEYKLSGrTIEORNKDELISG4LYORL SNIYECYORRRPHFFRKRLHK

```

```

261   270   280   290   300   310   32822
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
15318 RMQGVETIDORILIRLITVSESELQNIKQEEEQNTKTLVSRFKEISDQYKRALCRLIGNR
15145 RMQGRITIDEEKLIRLITVSESELQNIKQEEEQNTKTLVSRFKECSQDQYKRALCRLIGGA
ENSNNGP00000029637 RMQGLGITIDKTLIRLITVSESELQNIKQEEEQNTKTLVSRFKEISDQYKRALCRLIGGA
Consensus RMQGV.GITID.LLIRLITVSRSESELQNIKQEEEQNTKTLVSRFSELSDQYKRALCRLIGGA

```

B

Εικόνα 16 A: σύγκριση της πρωτεϊνικής αλληλουχίας τριών αννεξινών (ENSANGP00000029637, ENSANGP00000015318 και ENSANGP00000015145) του κουνουπιού *An. gambiae*.

B: το αποτέλεσμα της σύγκρισης των πρωτεϊνών του κουνουπιού, ως προς την ομοιότητα των επαναλήψεων αννεξίνης, με τις αντίστοιχες του ανθρώπου, του μεταξοσκώληκα, της δροσόφιλας, του σκουληκιού, της αρτέμιας, της ταινίας, της ύδρας, της νευρόσπορας και της *Giardia*.

3. Ανάλυση της μεταγραφής των γονιδίων των αννεξινών στο κουνουπί

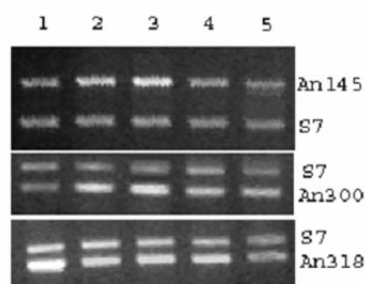
An. gambiae με ημί-ποσοτική αντίδραση πολυμεράσης

Η συνολική ποσότητα RNA από διάφορα αναπτυξιακά στάδια και ιστούς του κουνουπιού *An. gambiae* απομονώθηκε και χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για την παραγωγή cDNA. Στη συνέχεια μελετήθηκε το πρότυπο έκφρασης τριών μεταγράφων - γονιδίων αννεξινών (ENSANGT00000015145, ENSANGT00000015300, ENSANGT00000015318) με τη μέθοδο της ημί-ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Τα αναπτυξιακά στάδια που ελέγχθηκαν για την έκφραση αννεξινών ήταν προνύμφες πρώτου/δευτέρου σταδίου, τρίτου/τετάρτου σταδίου, νύμφες, ενώ σε ενήλικα κουνουπια έγινε σύγκριση της έκφρασης μεταξύ αρσενικών και θηλυκών κουνουπιών, καθώς και σύγκριση του επίπεδου έκφρασης αννεξινών στο μεσέντερο του κουνουπιού σε σχέση με το υπόλοιπο σώμα του κουνουπιού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 17A και συμπερασματικά μπορούμε να πούμε, ότι το σύνολο των γονιδίων εκφράζεται στο σύνολο των αναπτυξιακών σταδίων του κουνουπιού, χωρίς να παρουσιάζει καμία ισχυρή ειδικότητα στο φύλο, ενώ φαίνεται να εκφράζεται και στο σύνολο του σώματος του ενήλικου θηλυκού. Ακολούθως έγινε σύγκριση του επιπέδου των μεταγράφων, σε μεσέντερα κουνουπιών που τρέφονται με σάκχαρα, με αίμα ή με αίμα μολυσμένο με *Plasmodium*. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 17B. Τα μετάγραφα δύο γονιδίων (ENSANGT00000015145, ENSANGT00000015300) παρουσιάζουν αύξηση περίπου 2,5 με 3 φορές, 24 ώρες μετά τη λήψη αίματος και μία περαιτέρω αύξηση κατά τη λήψη μολυσμένου με *Plasmodium* αίματος. Τα αυξημένα επίπεδα μεταγράφων, διατηρούνται ακόμα και 48 ώρες μετά το γεύμα αίματος, αν και σε μικρότερο βαθμό συγκριτικά με τις 24 ώρες. Αντιθέτως, το μετάγραφο του τρίτου γονιδίου (ENSANGT00000015318), παρουσιάζει 2 με 3 φορές μείωση των μεταγράφων του 24 και 48 ώρες μετά το γεύμα αίματος, είτε αυτό είναι μολυσμένο είτε όχι.

A



B



Εικόνα 17: ανάλυση της έκφρασης των αννεξινών στο επίπεδο της μεταγραφής.

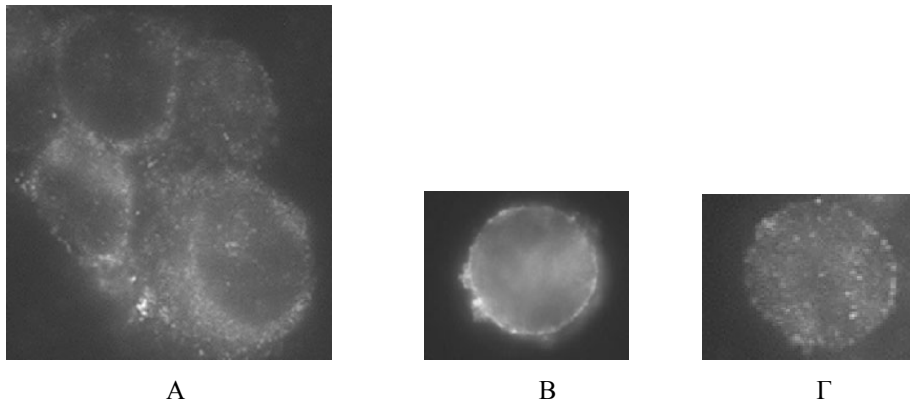
A: σύγκριση της συσσώρευσης μεταγράφων αννεξινών σε προνύμφες πρώτου-δευτέρου σταδίου (L₁₋₂), τρίτου-τετάρτου σταδίου (L₃₋₄), νύμφες (P), ενώ σε ενήλικα κουνουπια έγινε σύγκριση μεταξύ αρσενικών (Mal) και θηλυκών κουνουπιών (Fem), καθώς και του μεσεντέρου του θηλυκού κουνουπιού (Gut) με το υπόλοιπο σώμα του (Car).

B: σύγκριση της συσσώρευσης μεταγράφων, σε μεσέντερα θηλυκών κουνουπιών που τρέφονται με σάκχαρα (1), 24 ώρες μετά το γεύμα αίματος (2), 24 ώρες μετά το γεύμα αίματος μολυσμένου με *Plasmodium* (3), 48 ώρες μετά το γεύμα αίματος (4) και 48 ώρες μετά το γεύμα αίματος μολυσμένου με *Plasmodium* (5).

4. Αποκάλυψη του προτύπου έκφρασης των αννεξινών σε κύτταρα και ιστούς κουνουπιών με ανοσοφθορισμό

Εντοπισμός των αννεξινών σε κυτταρικές σειρές κουνουπιών

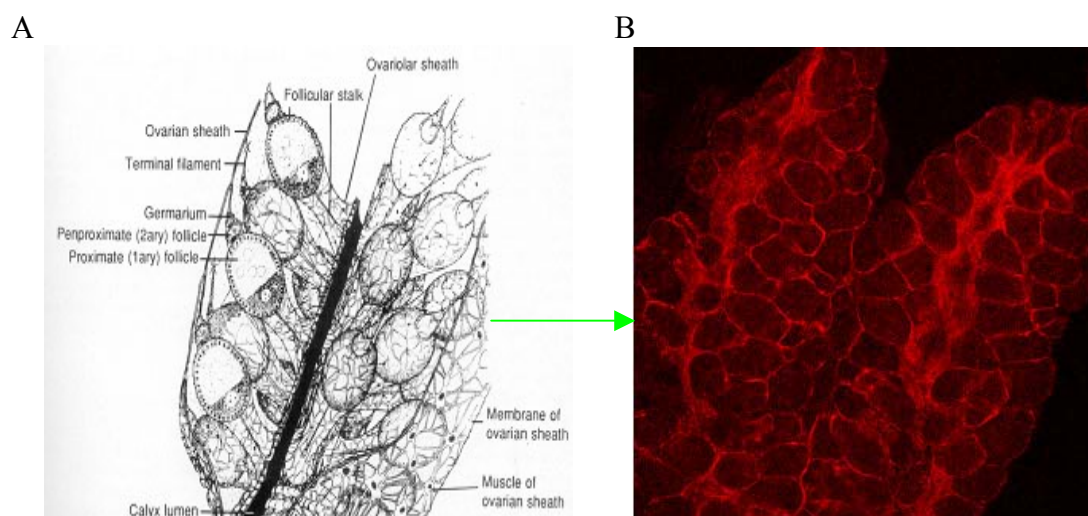
Τα βιοχημικά δεδομένα έδειξαν ότι οι αννεξίνες σχετίζονται με τα μικροσώματα και εκφράζονται σε κυτταρικές σειρές κουνουπιών, όπως η Mos20 του *Ae. aegypti* και η 4a-3A του *An. gambiae*. Επίσης τα πειράματα Western έδειξαν ότι τα πολυκλωνικά αντισώματα αναγνωρίζουν τις αννεξίνες στις συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές. Επομένως θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε πειράματα ανοσοφθορισμού, ώστε να αποκαλυφθεί ο υποκυτταρικός εντοπισμός της πρωτεΐνης. Για τον σκοπό αυτό κύτταρα μονιμοποιούνται σε αντικειμενοφόρους με 2% φορμαλδεΐδη και επώάζονται με τα αντισώματα, απουσία απορρυπαντικού. Υπό αυτές τις συνθήκες, τα αντισώματα δεν μπορούν να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη και επομένως αναγνωρίζουν μονάχα εξωκυττάριους επίτοπους. Ενίοτε, παραλείπεται ακόμα και η μονιμοποίηση, ώστε να είναι βέβαιο το αδιατάρακτο της πλασματικής μεμβράνης. Μετά την επώαση με κατάλληλο δευτερεύον αντίσωμα, η παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού αποκαλύπτει ότι οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη (βλ. Εικόνα 18). Στα πειράματα ελέγχου, η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται παραλείποντας την προσθήκη πρωτεύοντος αντισώματος ή χρησιμοποιώντας ως πρωτεύον αντίσωμα προ της ανοσοποίησης ορό ποντικού, οπότε και δεν ανιχνεύεται κανένα σήμα.



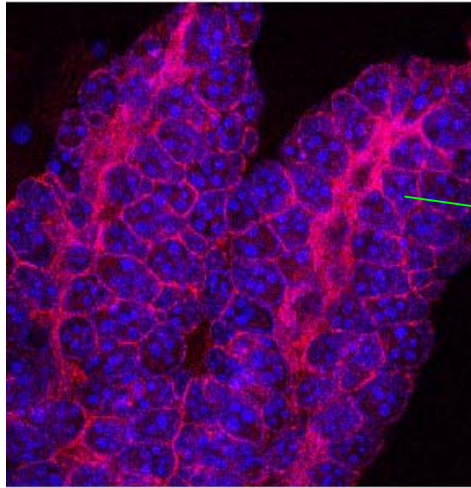
Εικόνα 18: πειράματα ανοσοφθορισμού εντοπίζουν τις αννεξίνες στην πλασματική μεμβράνη κυττάρων Mos20 του κουνουπιού *Ae. aegypti* (Α) και 4a-3A του κουνουπιού *An. gambiae* (Β και Γ). Στα (Α) και (Γ) έχει γίνει μονιμοποίηση των κυττάρων με φορμαλδεΐδη, ενώ στο (Β) η μονιμοποίηση έχει παραλειφθεί.

Εντοπισμός των αννεξινών σε ωοθήκες ενήλικων κουνουπιών

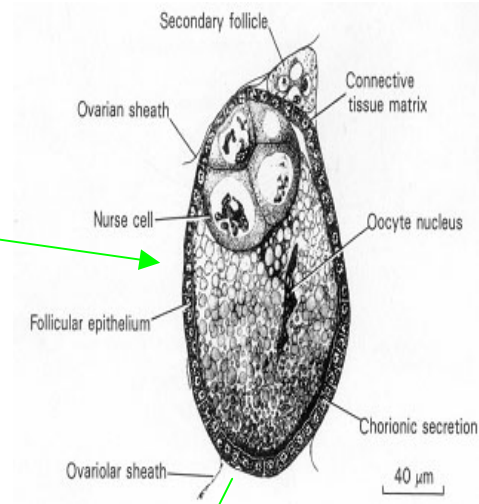
Δεδομένου ότι μετάγραφα αννεξινών ανιχνεύθηκαν εκτός από το μεσέντερο και στο υπόλοιπο τμήμα του σώματος του θηλυκού κουνουπιού, έγινε προσπάθεια εντοπισμού της πρωτεΐνης σε ωοθήκες ενήλικων κουνουπιών *An. gambiae*, οι οποίες εκτός των άλλων περιέχουν και επιθηλιακά κύτταρα. Κάθε ωοθήκη αποτελείται από ένα συνάθροισμα ωοθυλακίων και χωρίζεται σε δύο μέρη από ένα αυλό που καλείται κάλυκας και την διατρέχει σε όλο το μήκος της (βλ. Εικόνα 19Α). Ο αυλός αυτός αποτελείται από μονόστιβο επιθήλιο, όπως και το περίβλημα του κάθε ωοθυλακίου. Εκτός των επιθηλιακών κυττάρων, σε κάθε ωοθυλάκιο μπορούν να διακριθούν τα τροφοκύτταρα και μικρότεροι πυρήνες ωοκυττάρων (βλ. Εικόνα 19Δ). Το σύνολο του ωοθυλακίου περιβάλλεται, εξωτερικά του προαναφερθέντος μονόστιβου επιθηλίου, από εξωκυττάριο υπόστρωμα-συνδετικό υλικό και έναν προστατευτικό υμένα. Μετά από ανοσοχρώση των ωοθηκών με πολυκλωνικά αντισώματα έναντι της αννεξίνης και παρατήρηση σε συνεστιακό μικροσκόπιο, η πρωτεΐνη εντοπίζεται στον εξωκυττάριο συνδετικό χώρο μεταξύ των γειτονικών ωοθυλακίων. Σχηματίζει επίσης ένα καλυπτήριο στρώμα στον κάλυκα (βλ. Εικόνα 19Β). Εάν περαιτέρω βαφούν οι πυρήνες των διαφόρων κυττάρων με τη χρωστική TOPRO, τότε διακρίνεται το κάθε ωοθυλάκιο με περισσότερη σιγουριά, λόγω των βαμμένων μεγάλων πυρήνων των τροφοκυττάρων (βλ. Εικόνα 19Γ). Φαίνεται επίσης ότι οι αννεξίνες βρίσκονται στο χώρο μεταξύ των ωοθυλακίων. Αυτό γίνεται ακόμα πιο εμφανές αν αυξηθεί η μεγέθυνση του φακού και γίνει εστίαση σε ένα τυχαίο ωοθυλάκιο (βλ. Εικόνες 19Ε, Ζ), οπότε φαίνονται καθαρά εκτός των τροφοκυττάρων, οι πυρήνες των επιθηλιακών κυττάρων και κάποιων ωοκυττάρων, οι πυρήνες δευτερευόντων ωοθυλακίων, καθώς και οι πυρήνες των επιθηλιακών κυττάρων που περιβάλλουν τον κάλυκα. Ανοσοχρώση για αννεξίνη μπορεί να εντοπισθεί μονάχα στον εξωκυττάριο χώρο των επιθηλιακών κυττάρων και σε κανένα άλλο τύπο κυττάρων της ωοθήκης. Στα πειράματα ελέγχου, επαναλήφθηκε όλη η διαδικασία απουσία πρωτεύοντος αντισώματος ή χρησιμοποιώντας ως πρωτεύον αντίσωμα ορό ποντικού προ της ανοσοποίησης, οπότε και δεν ανιχνεύτηκε κανένα σήμα.



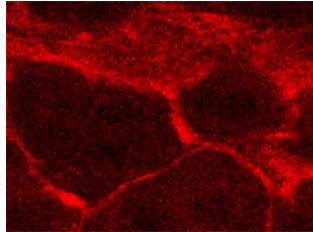
Γ



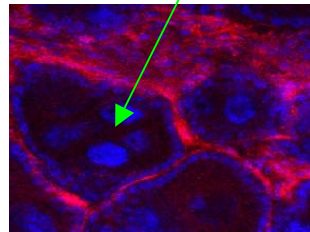
Δ



Ε



Ζ



Εικόνα 19: εντοπισμός των αννεξινών σε ωοθήκες ενήλικων κουνουπιών, με ανοσοχρώση και χρήση τεχνικών συνεστιακής μικροσκοπίας.

A: σχηματική αναπαράσταση ωοθήκης.

B: ανοσοχρώση για αννεξίνη σε ζεύγος ωοθηκών.

Γ: διπλή χρώση ζεύγους ωοθηκών για αννεξίνη (κόκκινο) και DNA (μπλε).

Δ: σχηματική αναπαράσταση της δομής ενός ωοθυλακίου.

Ε: εστίαση σε ένα τυχαίο ωοθυλάκιο βαμμένο για αννεξίνη.

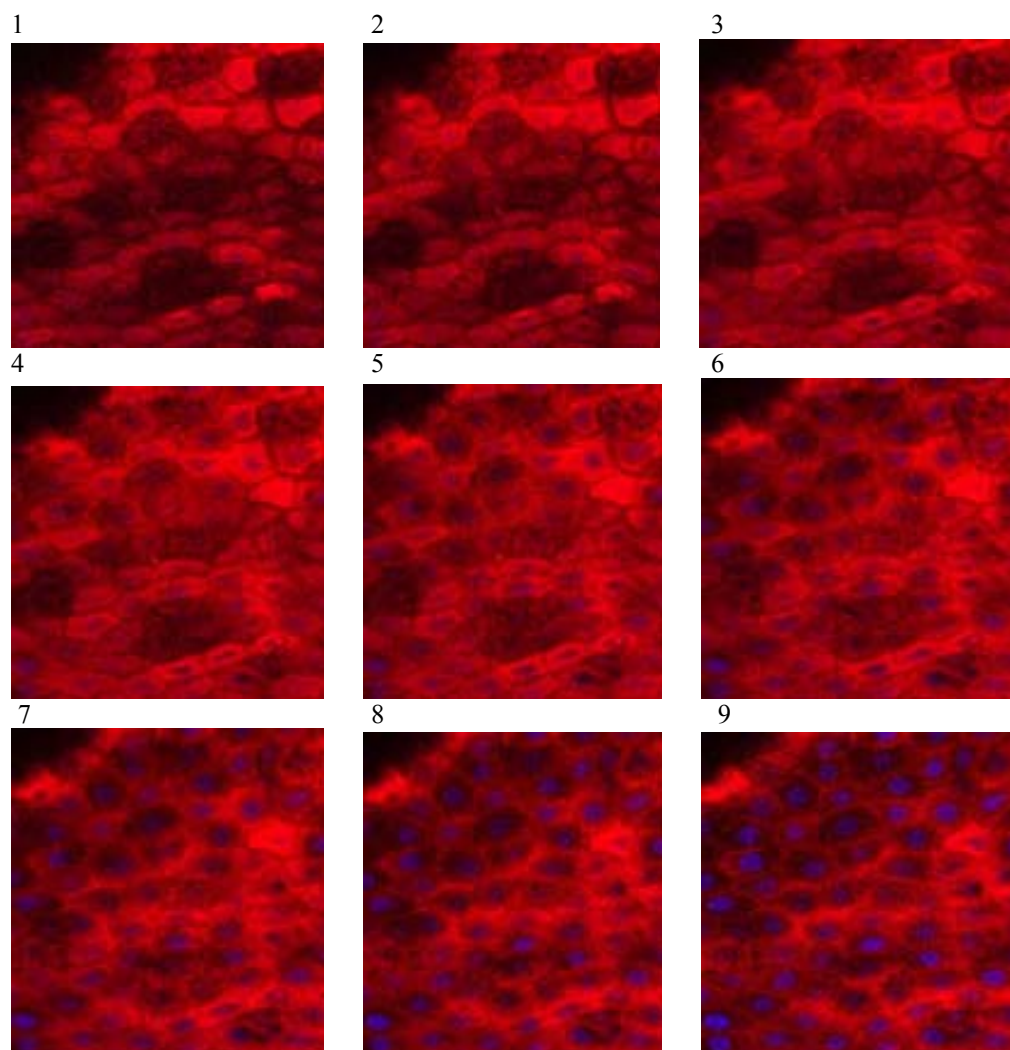
Ζ: εστίαση σε ένα τυχαίο ωοθυλάκιο βαμμένο για αννεξίνη (κόκκινο) και DNA (μπλε).

Εντοπισμός των αννεξινών σε μεσέντερα ενήλικων κουνουπιών

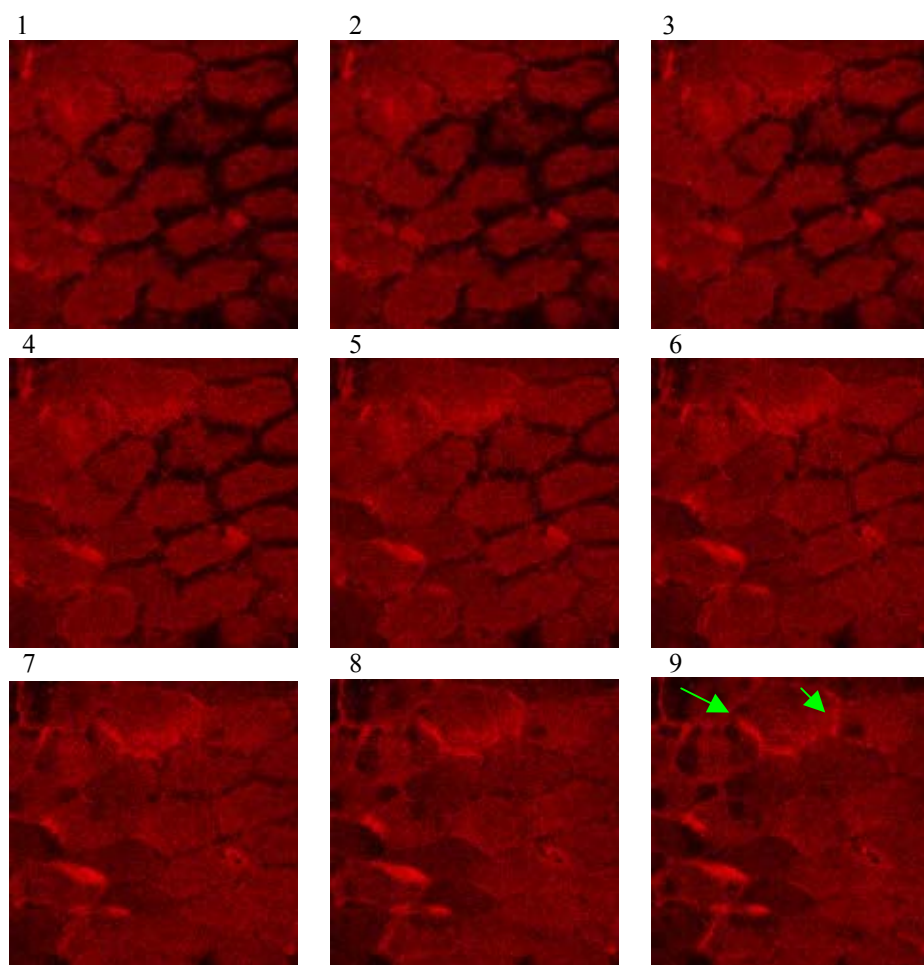
Μεσέντερα κουνουπιών *An. gambiae* απομονώθηκαν μετά τη λήψη αίματος. Ο βόλος αίματος απομακρύνεται μετά από ήπια μονιμοποίηση με φορμαλδεΰδη με κατάλληλες λαβίδες ανατομής. Στη συντριπτική πλειοψηφία των μεσεντέρων, η απομάκρυνση του αίματος συνεπάγεται και την απομάκρυνση της περιτροφικής μεμβράνης, η οποία περιβάλλει το στενά πακεταρισμένο γεύμα αίματος, με συνέπεια το μεσέντερο πλέον να μοιάζει με ένα λεπτό διάφανο υμένα, αποτελούμενο από τη μονοστοιβάδα των επιθηλιακών κυττάρων και το δίκτυο μυών που την περιβάλλει και την συγκρατεί. Στη συνέχεια τα μεσέντερα υφίστανται ανοσοχρώση με πολυκλωνικά αντισώματα έναντι των αννεξινών του κουνουπιού, ενώ σε πολλές περιπτώσεις βάφονται και οι πυρήνες των κυττάρων με τη χρωστική TOPRO. Η παρατήρηση γίνεται με συνεστιακό μικροσκόπιο. Ξεκινώντας τη λήψη οπτικών τομών από το κορυφαίο τμήμα των επιθηλιακών κυττάρων, παρατηρείται ανοσοχρώση της κορυφιαίας πλευράς της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων (βλ. Εικόνα 20A / φωτογραφίες 1-9). Μία άμεση παρατήρηση είναι ότι τα κύτταρα δεν βρίσκονται όλα σε ένα επίπεδο, αλλά το επιθήλιο, στην κορυφαία πλευρά του, σχηματίζει βαθουλώματα και προεξοχές. Η πλασματική μεμβράνη δεν

σχηματίζει πλέον λάχνες, αλλά μοιάζει με ένα θόλο, ο οποίος καταλήγει σε κάθε κύτταρο στα σημεία με τα οποία αυτό συνδέεται με τα γειτονικά του. Αννεξίνη παρατηρείται και στους συνδέσμους των κυττάρων, ενώ το συνολικό μήκος της διαδρομής από τον εντοπισμό του πρώτου ανιχνεύσιμου σήματος αννεξίνης, μέχρι την αχνή εμφάνιση των πυρήνων των επιθηλιακών κυττάρων κυμαίνεται στα 2 με 3 μικρόμετρα. Εάν η παρατήρηση γίνει σε μεγαλύτερη μεγέθυνση, τότε το σχήμα του θόλου της κορυφαίας πλευράς της πλασματικής μεμβράνης και η παρουσία αννεξινών στα σημεία σύνδεσης των κυττάρων γίνεται ακόμα πιο εμφανής (βλ. Εικόνα 20B/ φωτογραφίες 1-9).

A



B



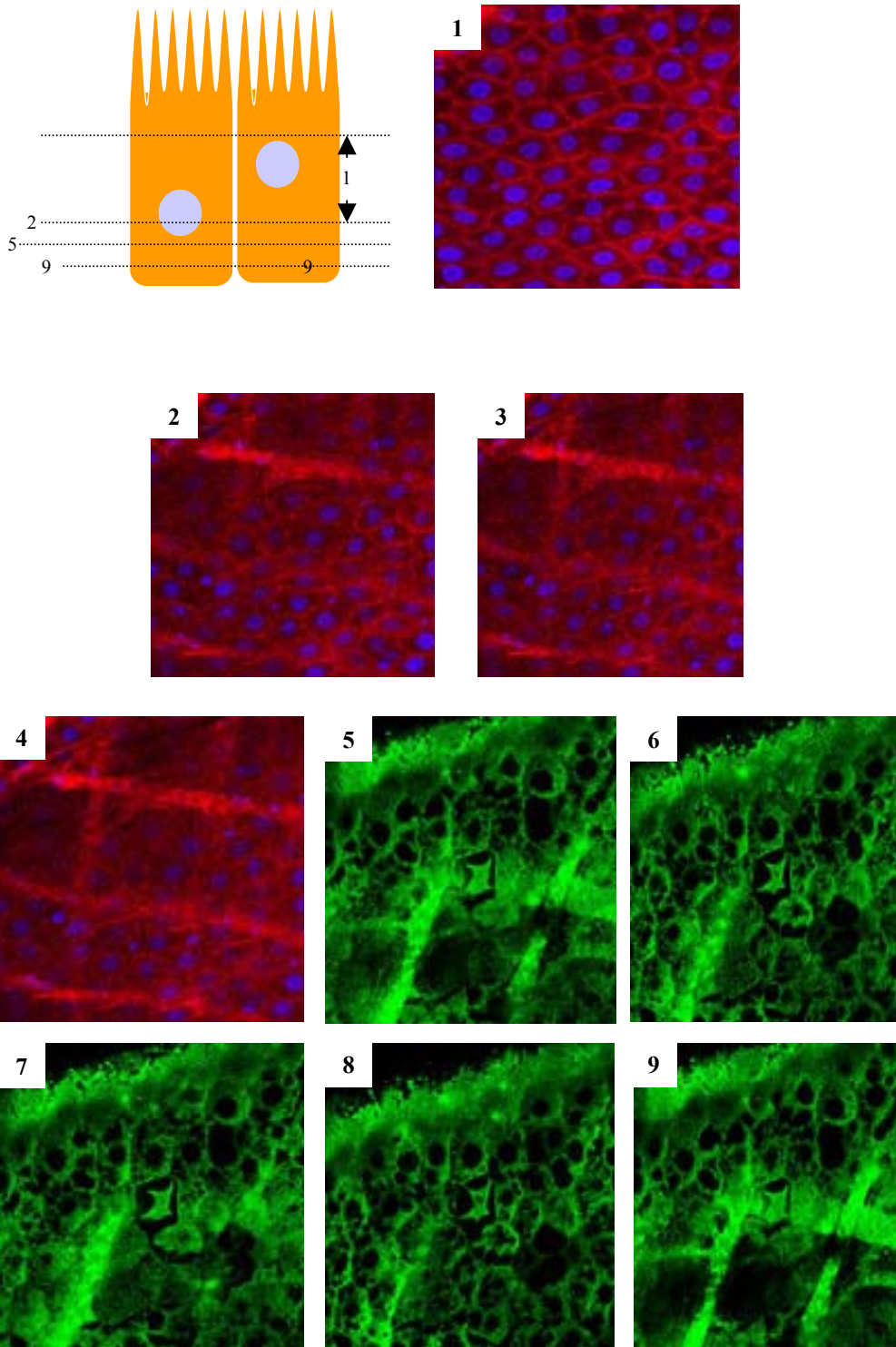
Εικόνα 20: ανοσοεντοπισμός, με χρήση τεχνικών συνεστιακής μικροσκοπίας, των αννεξινών σε μεσέντερα ενήλικων κουνουπιών μετά από γεύμα αίματος. Το κόκκινο χρώμα αντιστοιχεί σε αννεξίνη και το μπλε χρώμα αντιστοιχεί σε DNA.

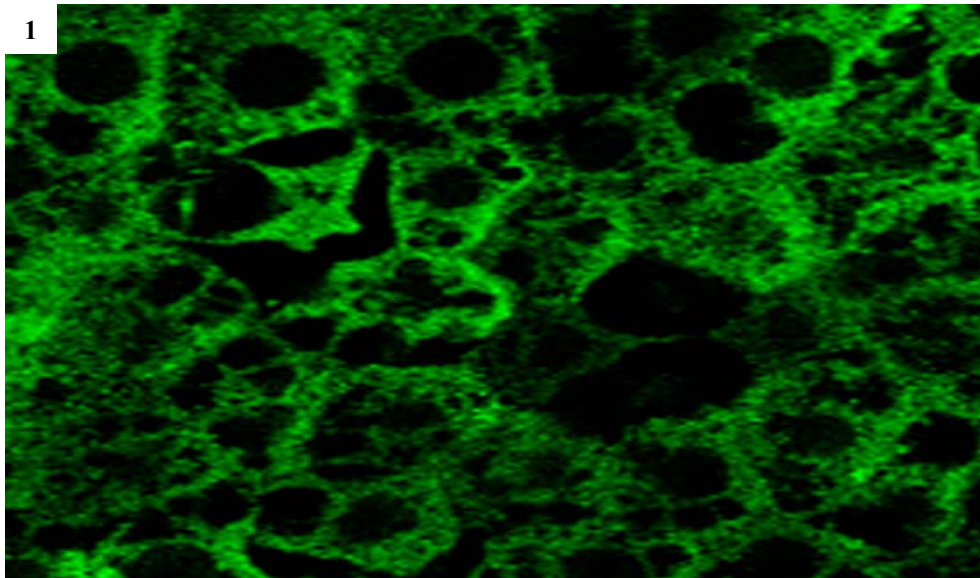
A. Σειρά τομών στην κορυφαία πλευρά των επιθηλιακών κυττάρων με βήμα 0.5 μικρόμετρα.

B. Σειρά τομών στην κορυφαία πλευρά των επιθηλιακών κυττάρων με βήμα 0.3 μικρόμετρα. Με βέλος δείχνονται οι περιοχές συνδέσμων μεταξύ των κυττάρων.

Προχωρώντας σε μία διαδρομή μήκους περίπου 8-10 μικρομέτρων προς τη βασική πλευρά του επιθηλίου, η αννεξίνη εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη, ανάμεσα στα γειτονικά επιθηλιακά κύτταρα (βλ. Εικόνα 21/ φωτογραφία 1), ενώ αρχίζουν να ανιχνεύονται και οι πρώτοι μεγάλοι εγκάρσιοι και επιμήκεις μύες (βλ. Εικόνα 21/ φωτογραφίες 2-4). Στο ίδιο περίπου σημείο εμφανίζονται οι μεμβρανώδεις σχηματισμοί του βασικού λαβυρίνθου, όταν το κουνούπι τρέφεται με σάκχαρα (βλ. Εικόνα 21/ φωτογραφίες 5-9). Ως μεμβρανώδεις σχηματισμοί, φέρουν και αυτοί αννεξίνη, ενώ αξιοπερίεργος είναι και ένας σχηματισμός με μορφή άστρου (βλ. βέλη Εικόνας 21), ο οποίος φαίνεται να βάφεται εντονότερα με αννεξίνη και βρίσκεται στο σημείο σύνδεσης ενός εγκάρσιου μυ με τα επιθηλιακά κύτταρα. Πιθανότατα αντιπροσωπεύει ένα σύνδεσμο του επιθηλίου με τον υπερκείμενο μυ, στον οποίο έχει συσσωρευτεί αννεξίνη. Αν η μεγέθυνση αυξηθεί ακόμα περισσότερο (βλ. Εικόνα 21/ φωτογραφία 10), τότε διακρίνεται ο δαιδαλώδης χαρακτήρας του δικτύου και οι μικροί κυκλικοί

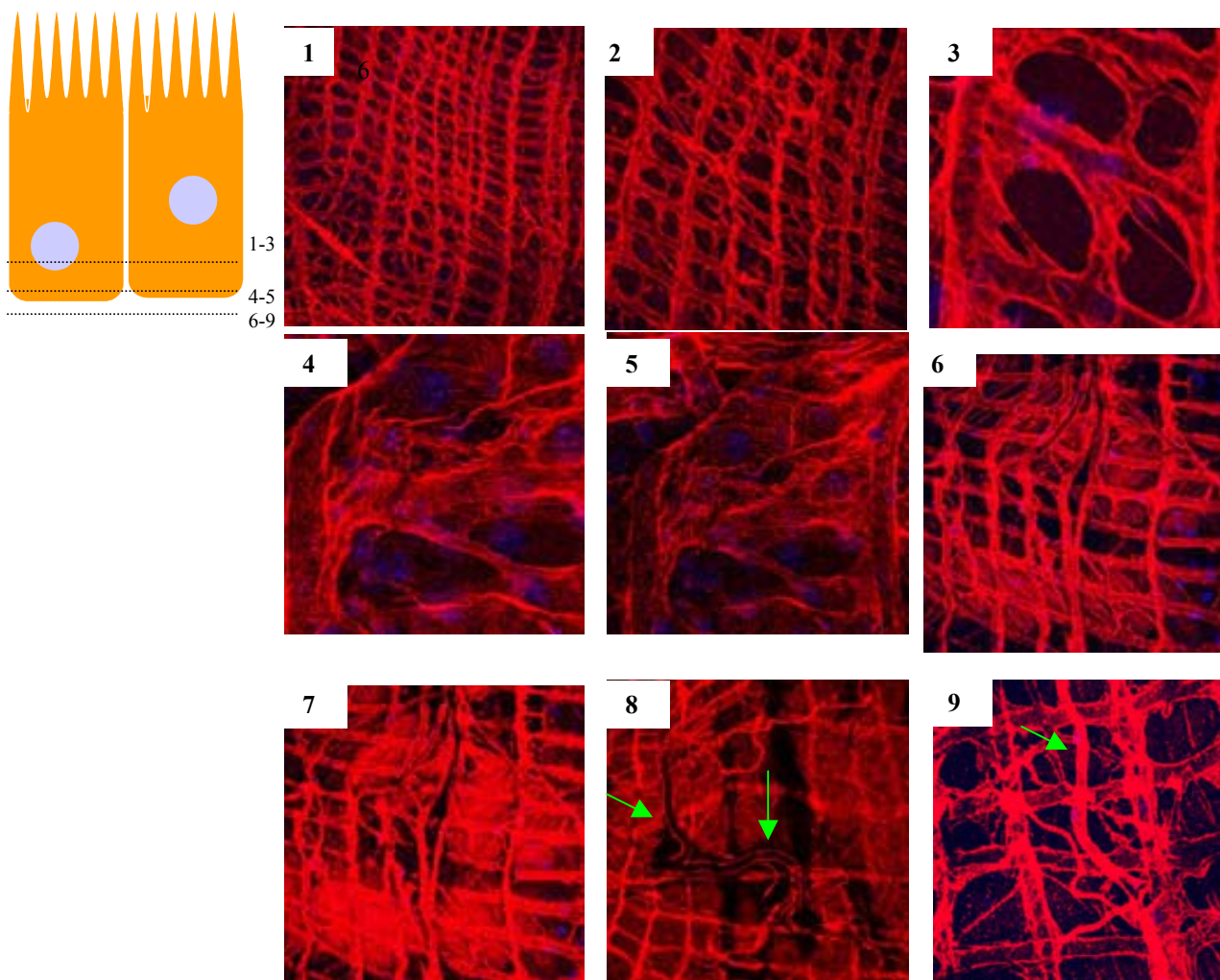
σχηματισμοί που προκύπτουν από την εγκάρσια τομή των μεμβρανικών αναδιπλώσεων, σε απόλυτη συμφωνία με πρόσφατες παρατηρήσεις των Vlachou *et al.* , (2004), που έβαψαν *in vivo* το συγκεκριμένο σχηματισμό χρησιμοποιώντας μία λιπόφιλη χρωστική που αναγνωρίζει τα φωσφολιπίδια της λιπιδικής διπλοστοιβάδας.





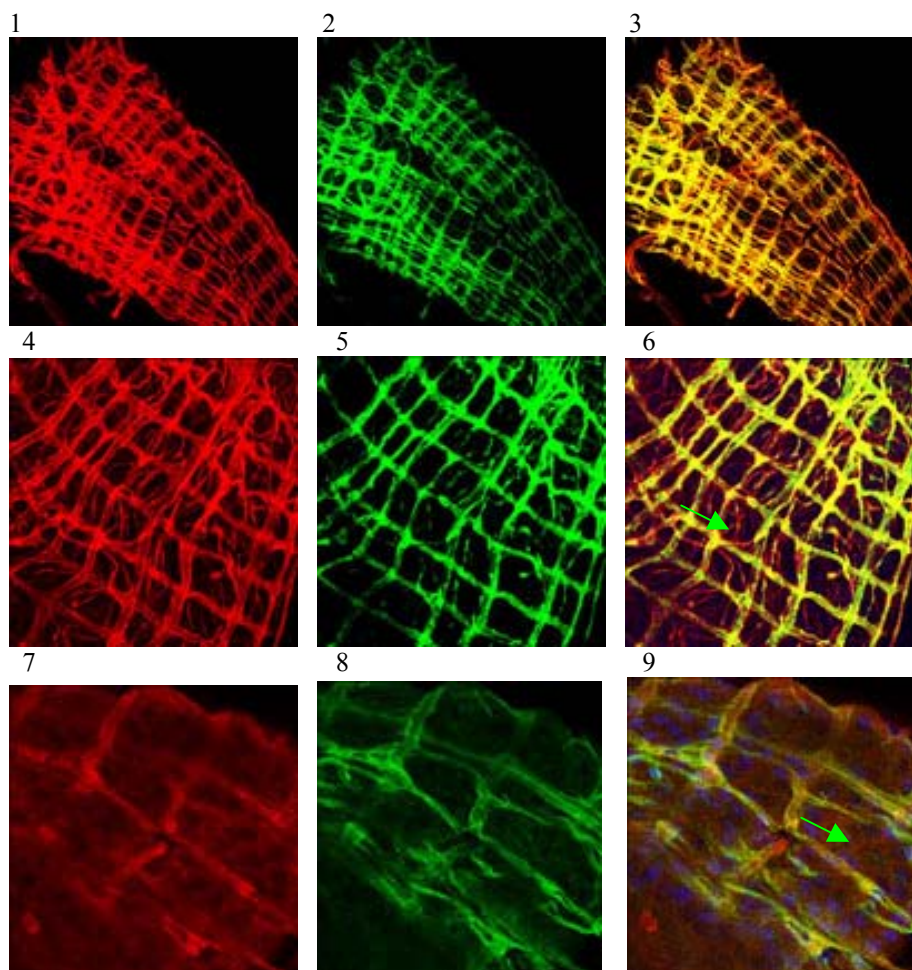
Εικόνα 21: ανοσοεντοπισμός, με χρήση τεχνικών συνεστιακής μικροσκοπίας, των αννεξινών σε μεσέντερα ενήλικων κουνουπιών. Μια σχηματική απεικόνιση του επιθηλιακού κυττάρου χρησιμοποιείται για να δείξει το βάθος στο οποίο έχουν ληφθεί οι τομές. Τα μεσέντερα των φωτογραφιών 1-5 αφαιρέθηκαν μετά από γεύμα αίματος, ενώ αυτά των φωτογραφιών 5-10 μετά από γεύμα σακχάρων. Η λήψη τομών ξεκίνησε από το μέσο και με κατεύθυνση προς τη βασική πλευρά των επιθηλιακών κυττάρων. Το κόκκινο χρώμα αντιστοιχεί σε αννεξίνη με εξαίρεση τις φωτογραφίες 5-10, όπου το πράσινο χρώμα αντιστοιχεί σε αννεξίνη. Το μπλε χρώμα αντιστοιχεί σε DNA.

Συνεχίζοντας τις οπτικές τομές βασοπλευρικά των επιθηλιακών κυττάρων, παρατηρείται ότι το δίκτυο των μυών πυκνώνει αισθητά (βλ. Εικόνα 22/ φωτογραφίες 1-2) και κάθε κύτταρο πλέον συνδέεται-συγκρατείται πλευρικά από το πλέγμα μυών (βλ. Εικόνα 22/ φωτογραφία 3). Στη βασική πλευρά των επιθηλιακών κυττάρων, οι μύες εμφανίζουν μικρότερες διακλαδώσεις που σχηματίζουν ένα ακανόνιστο δίκτυο συγκράτησης των επιθηλιακών κυττάρων (βλ. Εικόνα 22/ φωτογραφίες 4-5). Αυτό αποτελεί το σκελετό ο οποίος σε συνδυασμό με τη βασική λεπίδα και με τους συνδέσμους των επιθηλιακών κυττάρων σε αυτόν, καλείται να φερθεί ελαστικά, στη διάθεση των θηλυκών κουνουπιών για όσο το δυνατόν περισσότερο αίμα. Το τελικό αποτέλεσμα είναι να σχηματιστεί ένα στρώμα συγκράτησης των επιθηλιακών κυττάρων στην βασική τους πλευρά (βλ. Εικόνα 22/ φωτογραφίες 6-7), στην ελαστικότητα του οποίου, ρόλο ίσως παίζουν οι μεγάλοι επιμήκεις και εγκάρσιοι μύες, καθώς και οι μικρότεροι διακλαδιζόμενοι. Στην ανθεκτικότητα και στην ικανότητα συγκράτησης των κυττάρων, εκτός από το πλέγμα των μυών, σημαντικό ρόλο παίζει και η ενίσχυση με συστατικά της βασικής λεπίδας, καθώς και η σύνδεση των κυττάρων τόσο μεταξύ τους όσο και με το μυϊκό πλέγμα. Η αννεξίνη θα μπορούσε να κατέχει θεμελιώδη ρόλο σε αυτή τη οργάνωση, όντας τόσο στα σημεία σύνδεσης των επιθηλιακών κυττάρων, όσο και στα σημεία σύνδεσής τους με τους υποκείμενους μύες. Ως συστατικό της βασικής λεπίδας, η αννεξίνη περιβάλλει όχι μονάχα τους μύες, αλλά και ένα εκτεταμένο δίκτυο τραχειών που διατρέχει το μεσέντερο (βλ. Εικόνα 22/ φωτογραφίες 7-9).



Εικόνα 22: ανοσοεντοπισμός, με χρήση τεχνικών συνεστιακής μικροσκοπίας, των αννεξινών σε μεσέντερα ενήλικων κουνουπιών μετά από γεύμα αίματος. Μια σχηματική απεικόνιση του επιθηλιακού κυττάρου χρησιμοποιείται για να δείξει το βάθος στο οποίο έχουν ληφθεί οι τομές. Το κόκκινο χρώμα αντιστοιχεί σε αννεξίνη και το μπλε χρώμα αντιστοιχεί σε DNA. Οι τομές γίνονται ακόμα πιο βασικά των επιθηλιακών κυττάρων, στην περιοχή πλευρικής σύνδεσής τους με τους μύες και την βασική λεπίδα. Χρώση για αννεξίνη εντοπίζεται στους μύες και τις τραχείες (δείχνονται με βέλος στις εικόνες 8 και 9) που περιβάλλουν εξωτερικά το μεσέντερο. Οι τομές 1, 2, 3 έχουν ληφθεί από την ίδια περιοχή του μεσεντέρου, ενώ η μεγέθυνση αυξάνεται κατά 4 και 20 φορές αντίστοιχα.

Ταυτόχρονη ανοσοχρώση για αννεξίνη και για λαμινίνη, ένα ήδη γνωστό μόριο της βασικής λεπίδας του κουνουπιού, δείχνει συνεντοπισμό των δύο πρωτεϊνών (βλ. Εικόνα 23/ φωτογραφίες 3, 6, 9). Μια βασική διαφορά που παρατηρείται, είναι ότι η αννεξίνη εντοπίζεται και στις περιοχές συνδέσμων των επιθηλιακών κυττάρων με τους μύες και τη βασική λεπίδα (βλ. βέλος Εικόνα 23/ φωτογραφίες 4-6), καθώς και πολύ πιο κορυφαία σε σχέση με τη λαμινίνη (βλ. βέλος Εικόνα 23/ φωτογραφίες 7-9), εντός του στρώματος των επιθηλιακών κυττάρων.



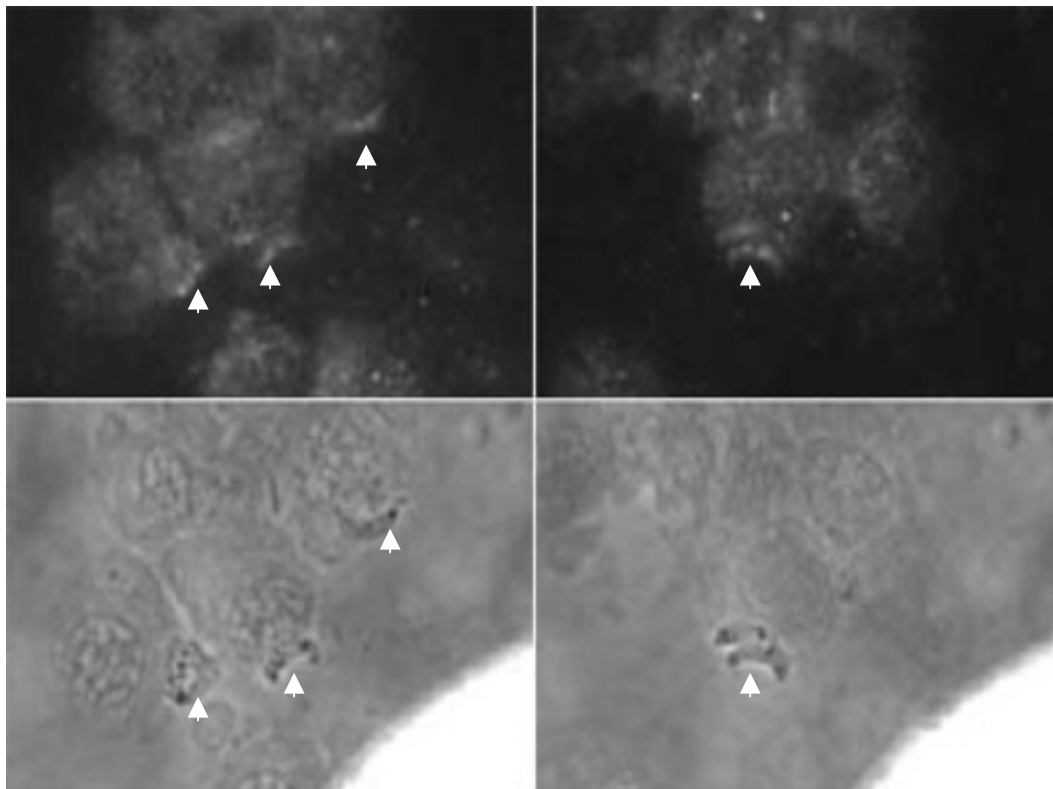
Εικόνα 23: ταυτόχρονη ανοσοχρώση μεσεντέρων ενήλικων κουνουπιών για αννεξίνη (κόκκινο) και λαμινίνη (πράσινο) μετά από γέυμα αίματος. Το μπλε χρώμα αντιστοιχεί σε DNA. Ο συνεντοπισμός των δύο πρωτεϊνών αποκαλύπτεται όταν γίνει επικάλυψη των διαφορετικών χρώσεων στις εικόνες 3, 6 και 9, ενώ με βέλη δείχνονται περιοχές του μεσεντέρου, όπου παρατηρούνται διαφορές στον εντοπισμό των δύο πρωτεϊνών. Οι τομές 1-3 και 4-6 έχουν ληφθεί από την ίδια περιοχή του μεσεντέρου, ενώ η μεγέθυνση αυξάνεται κατά 4 φορές.

5. Ανάδειξη της ικανότητας αλληλεπίδρασης αννεξινών με παράσιτα της ελονοσίας σε κύτταρα και μεσέντερα κουνουπιού

Ανοσοεντοπισμός των αννεξινών σε ταυτόχρονη καλλιέργεια ωοκινετών και κυττάρων κουνουπιού

Στο εργαστήριό μας έχει αναπτυχθεί ένα *in vitro* σύστημα καλλιέργειας των πρώιμων σπορογονικών σταδίων του *P. berghei* (Siden-Kiamos *et al.*, 2000). Κύτταρα από κυτταρικές σειρές εντόμων, φορέων ή μη της ελονοσίας, επωάζονται με απομονωμένους ωοκινέτες, σε συγκεκριμένες συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας όπου παρατηρείται τόσο η είσοδος των ωοκινετών στο κύτταρο, όσο και η περαιτέρω διαφοροποίησή τους σε ωοκύστες. Δηλαδή το συγκεκριμένο σύστημα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη αναπτυξιακών γεγονότων του παρασίτου, που κανονικά λαμβάνουν χώρα στο μεσέντερο του κουνουπιού. Κύτταρα της κυτταρικής σειράς Mos 20 επωάζονται με ωοκινέτες και γίνεται ανοσοχρώση των καλλιιεργειών με πολυκλωνικά αντισώματα έναντι των

αννεξινών. Πρόσδεση της αννεξίνης των κυττάρων, σε ωοκινέτες που διεισδύουν σε αυτά, αποκαλύπτεται με μικροσκοπία φθορισμού (βλ. Εικόνα 24). Αντίθετα κανένα σήμα δεν ανιχνεύεται εάν το πείραμα επαναληφθεί με φυσιολογικό ορό ποντικού ως πρωτεύον αντίσωμα ή εάν τα πολυκλωνικά αντισώματα έναντι της αννεξίνης χρησιμοποιηθούν για ανοσοχρώση απομονωμένων ωοκινετών.



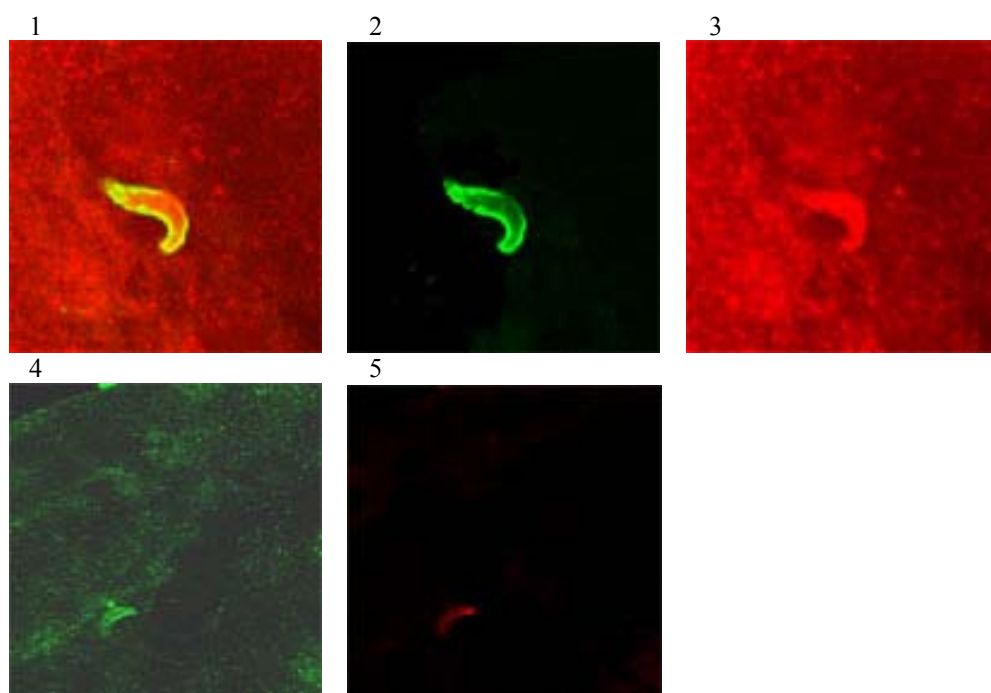
Εικόνα 24: ανοσοεντοπισμός των αννεξινών σε ταυτόχρονη καλλιέργεια ωοκινετών και κυττάρων κουνουπιού. Στο κάτω μέρος φαίνεται η εικόνα της καλλιέργειας με διερχόμενο φωτισμό, ενώ στο πάνω μέρος ο ανοσοφθορισμός για αννεξίνη. Είναι φανερή η πρόσδεση αννεξίνης με ωοκινέτες που διεισδύουν στα κύτταρα (βλ. βέλη).

Ανοσοχρώση αννεξινών σε μεσέντερα ενήλικων κουνουπιών μολυσμένων με ελονοσία

Ένα από τα βασικότερα ερωτήματα της παρούσας εργασίας είναι εάν η αλληλεπίδραση μεταξύ αννεξίνης και ωοκινετών, που φανερώθηκε σε *in vitro* δοκιμές και σε ταυτόχρονες καλλιέργειες παρασίτων με κύτταρα κουνουπιών, μπορεί να παρατηρηθεί και *in vivo*. Για το σκοπό αυτό μεσέντερα κουνουπιών *An. gambiae* απομονώνονται 18-24 ώρες μετά τη λήψη μολυσμένου με ελονοσία αίματος. Σε αυτό το χρονικό σημείο αναμένεται να υπάρχουν εντός του μεσεντέριου επιθηλίου καλά σχηματισμένοι ωοκινέτες, οι οποίοι διασχίζοντας το επιθήλιο με κατεύθυνση προς τη βασική του πλευρά, καταλήγουν μεταξύ επιθηλίου, βασικής λεπίδας και μυών, όπου και μεταμορφώνονται σε ωοκύστες. Στα μεσέντερα γίνεται ήπια μονιμοποίηση με φορμαλδεϋδη και ο βώλος αίματος που δεν έχει ακόμα απορροφηθεί πλήρως από το κουνούπι, απομακρύνεται με κατάλληλες λαβίδες ανατομής, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Στη συνέχεια γίνεται ανοσοχρώση

για αννεξίνη με χρήση πολυκλωνικών αντισωμάτων, ενώ τα παράσιτα βάφονται με μονοκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει τον εξωκυττάριο επίτοπό τους P28. Όπου κρίνεται απαραίτητο, γίνεται χρώση για DNA με TOPRO και το σύνολο των δειγμάτων παρατηρείται σε συνεστιακό μικροσκόπιο. Θα πρέπει να τονιστεί ότι κάποια από τα μεσέντερα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα αυτά έπρεπε να μας αποσταλούν από συνεργαζόμενα εργαστήρια (EMBL, καθηγητής Φ. Καφάτος, Imperial College καθηγητής R. Siden), μονιμοποιημένα και παγωμένα, γεγονός που φαίνεται να επηρέασε την ποιότητα χρώσης τους για αννεξίνη.

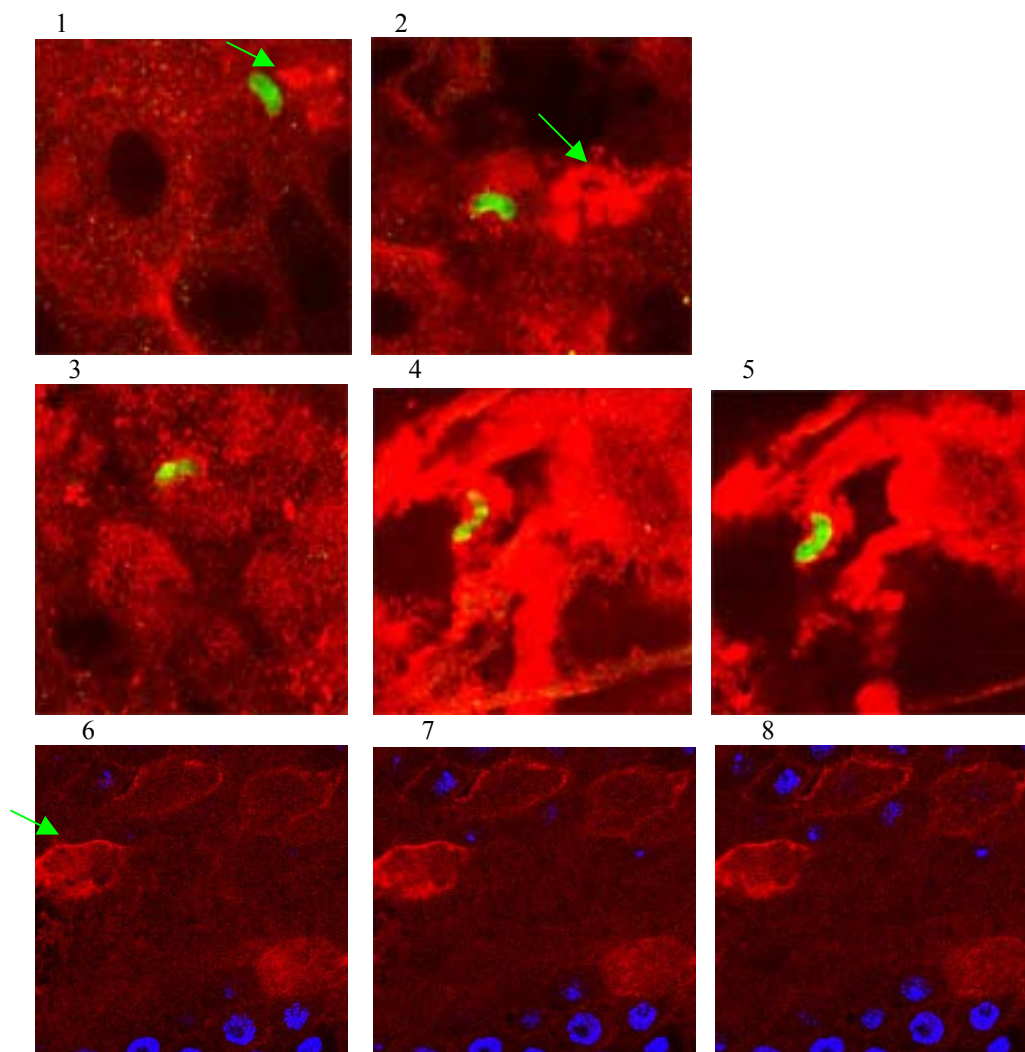
Ωοκινέτες εντοπίστηκαν κατά την έναρξη της διείσδυσής τους στο επιθήλιο, στην κορυφαία πλευρά της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων, ενώ το σύνολο της επιφάνειάς τους είναι πλήρως καλυμμένο με αννεξίνη (βλ. Εικόνα 25 /φωτογραφίες 1, 3, 4). Το ότι οι συγκεκριμένες δομές που παρατηρούνται είναι ωοκινέτες, πέρα από τη μορφολογία τους, επιβεβαιώθηκε και με χρώση με αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης P28 (βλ. Εικόνα 25 /φωτογραφίες 2, 5). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τόσο ο φυσιολογικός ορός ποντικού, όσο και τα δευτερεύοντα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη χρώση, δεν αναγνωρίζουν κάποιο επίτοπο του επιθηλίου ή του παρασίτου, ενώ και τα πολυκλωνικά αντισώματα έναντι της αννεξίνης, δεν εμφανίζουν καμία αντίδραση αναγνώρισης με απομονωμένους ωοκινέτες ή ωοκύστες.



Εικόνα 25: ανοσοεντοπισμός των αννεξινών σε μεσέντερα ενήλικων κουνουπιών με χρήση τεχνικών συνεστιακής μικροσκοπίας, 18-24 ώρες μετά τη λήψη μολυσμένου με ελονοσία αίματος από τα κουνούπια. Εντοπίζονται ωοκινέτες σχετιζόμενοι με την κορυφαία πλευρά των επιθηλιακών κυττάρων του μεσεντέρου. Στις φωτογραφίες 2 και 5 παρουσιάζεται χρώση για την πρωτεΐνη P28 του παρασίτου, στις φωτογραφίες 3 και 4 ανοσοχρώση για αννεξίνη, ενώ η φωτογραφία 1 προκύπτει από επικάλυψη των 2 και 3.

Μετά την προσκόλλησή τους στην κορυφαία πλευρά των επιθηλιακών κυττάρων, τα παράσιτα διεισδύουν στα κύτταρα πλησίον των συνδέσμων τους (Vlachou *et al.* , 2004), με μία χρονικώς σύντομη διαδικασία και εξέρχονται βασοπλευρικά, για να διεισδύσουν σε ένα νέο, γειτονικό επιθηλιακό κύτταρο. Ακολούθως, τα παράσιτα συνεχίζουν την πορεία τους προς, ή παράλληλα με τη βασική λεπίδα, όπου μπορεί να παρατηρηθεί πέρα από τη συγκέντρωση αννεξίνης γύρω από αυτά (βλ.

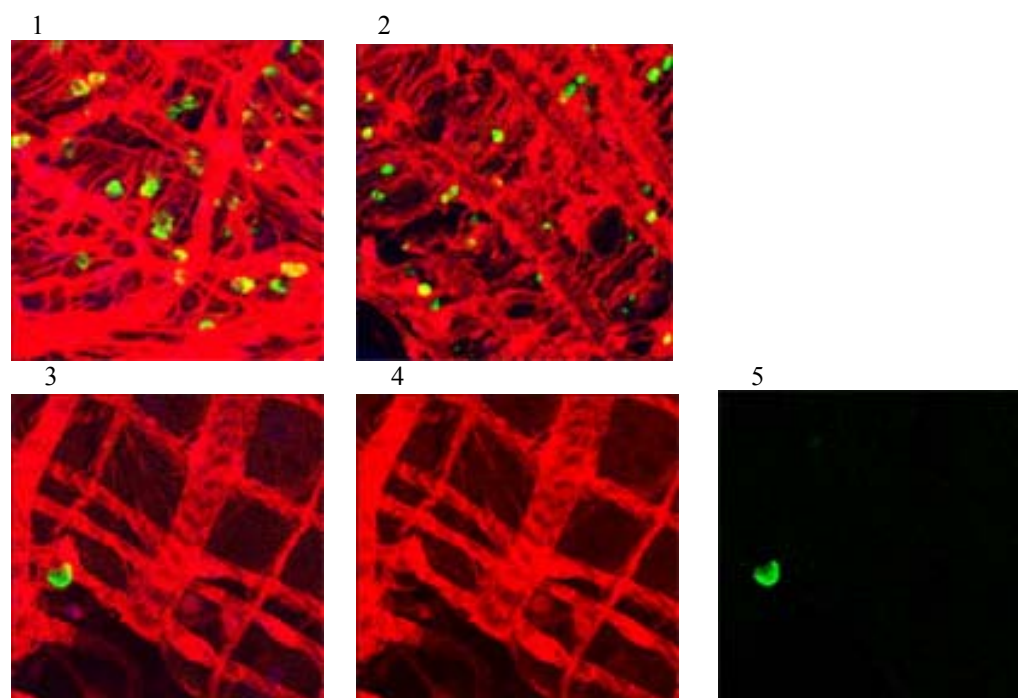
Εικόνα 26 /φωτογραφίες 2, 3) και ένα αποτύπωμα συσσωρευμένης αννεξίνης πλησίον του ωοκινέτη (βλ. Εικόνα 26 / φωτογραφίες 1, 2), απόρροια πιθανότατα της αλληλεπίδρασης με τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη, κατά τη σπειροειδή/ελικοειδή κίνηση του παρασίτου εντός του μεσεντέρου (Vlachou *et al.* , 2004). Εναλλακτικά, θα μπορούσε αυτή η συσσώρευση αννεξίνης να αποτελεί απομεινάρια κάποιου νεκρού επιθηλιακού κυττάρου. Το ταξίδι του ωοκινέτη φαίνεται να καταλήγει μεταξύ βασικής λεπίδας και μυών, με τη συνολική του επιφάνεια να εξακολουθεί να περιβάλλεται από συσσωρευμένη αννεξίνη (βλ. Εικόνα 26 /φωτογραφίες 4, 5). Να σημειωθεί ότι τα παράσιτα τα οποία παρουσιάζονται στις φωτογραφίες 1-5 της εικόνας 26, εκφράζουν GFP στο κυτταρόπλασμά τους (Vlachou *et al.* , 2004), ενώ και η επιφάνεια τους βάφεται με αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης P28. Η διείσδυση των παρασίτων στα επιθηλιακά κύτταρα, ενεργοποιεί πρόγραμμα απόπτωσης σε αυτά, με συνέπεια την προεκβολή τους προς την μεριά του αυλού και την τελική αποβολή τους από το επιθήλιο (Han *et al.* , 2000). Πράγματι κύτταρα με τροποποιημένη μορφολογία (βλ. Εικόνα 26 /φωτογραφίες 6-8), τα οποία προεξέχουν αισθητά από τα υπόλοιπα επιθηλιακά κύτταρα και δεν εμφανίζουν χρώση για DNA, μπορούν να παρατηρηθούν στην κορυφαία πλευρά του μολυσμένου από παράσιτα επιθηλίου, ευρισκόμενα πιθανότατα σε προχωρημένη απόπτωση.



Εικόνα 26: ανοσοεντοπισμός των αννεξινών σε μεσέντερα ενήλικων κουνουπιών με χρήση τεχνικών συνεστιακής μικροσκοπίας, 18-24 ώρες μετά τη λήψη μολυσμένου με ελονοσία αίματος από τα κουνούπια. Το κόκκινο αντιστοιχεί σε αννεξίνη, ενώ το μπλε σε χρώση για DNA με TOPRO. Οι ωοκινέτες βρίσκονται εντός του μεσεντέριου επιθηλίου. Στο σύνολο των παρασίτων έχει γίνει ανοσοχρώση για την πρωτεΐνη P28 (πράσινο), ενώ

αυτά εκφράζουν και GFP στο κυτταρόπλασμά τους. Στις φωτογραφίες 1 και 2 δείχνεται με βέλος η συσσώρευση αννεξίνης πλησίον του παρασίτου, πιθανότατα λόγω της συσχέτισης του παρασίτου με την πρωτεΐνη, κατά την σπειροειδή/ελικοειδή κίνηση του παρασίτου στο επιθήλιο. Στις φωτογραφίες 6-8 φαίνονται κύτταρα με τροποποιημένη μορφολογία (βλ. βέλος), τα οποία πιθανώς βρίσκονται σε προχωρημένη απόπτωση και αποβάλλονται από το επιθήλιο προς τη μεριά του αυλού. Οι τομές έχουν ληφθεί από την κορυφαία πλευρά των επιθηλιακών κυττάρων με βήμα 0,5 μm.

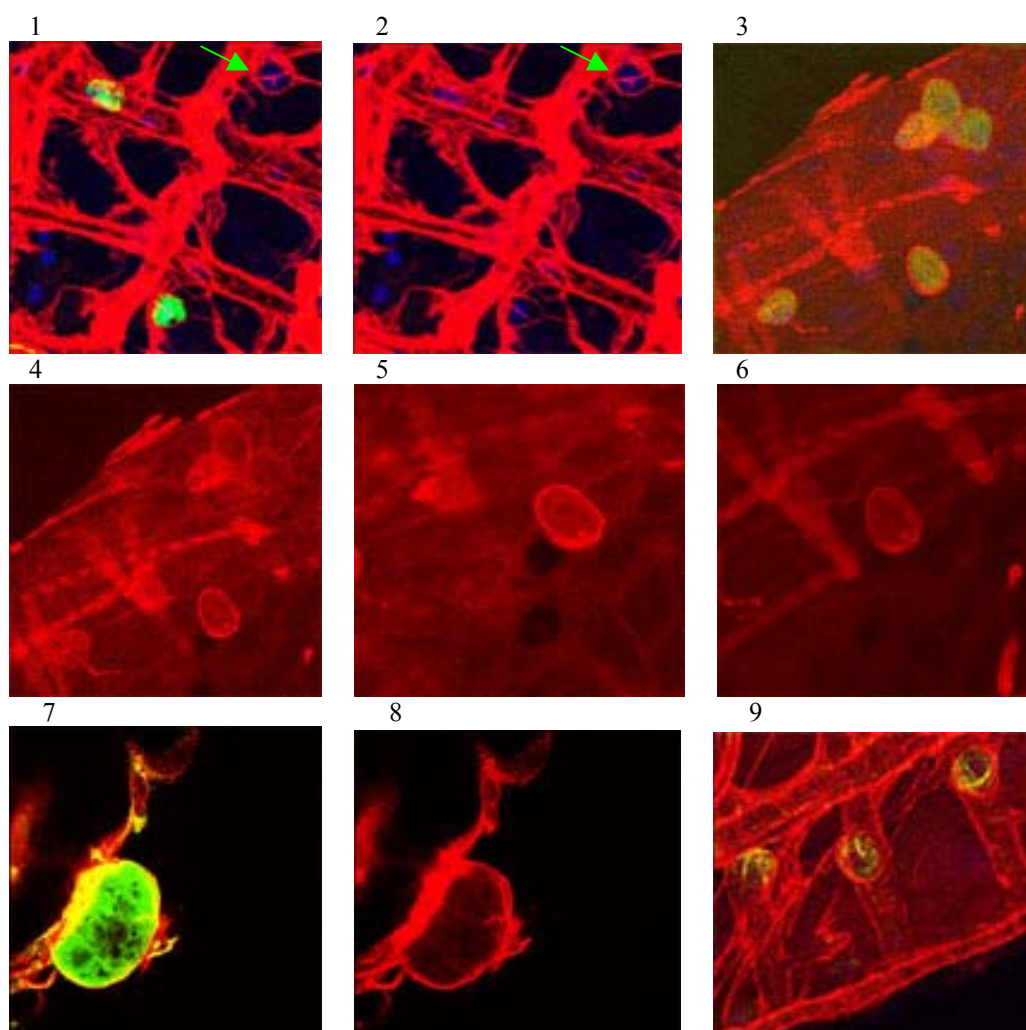
48 ώρες μετά το γεύμα μολυσμένου αίματος, αναπτύσσονται νεαρές ωοκύστες στο μεσέντερο. Η ταυτοποίησή τους γίνεται μέσω της φθορίζουσας πρωτεΐνης GFP που αυτές εκφράζουν στο κυτταρόπλασμά τους, λόγω ανάλογου διαγονιδιακού μετασχηματισμού (Vlachou *et al.*, 2004) (βλ. Εικόνα 27 /φωτογραφίες 1, 2, 3, 5). Η θέση τους είναι μεταξύ της βασικής λεπίδας και πλησίον ή και εντός του πλέγματος που σχηματίζουν οι μύες (βλ. Εικόνα 27 /φωτογραφίες 1-2). Στη φωτογραφία 3 της εικόνας 27 φαίνεται μια νεαρή ωοκύστη η οποία περιβάλλεται - βρίσκεται σχεδόν περικυκλωμένη- από αννεξίνη, κάτω ακριβώς από έναν μυ. Αξιοπεριεργό είναι ότι ο μυς φαίνεται να είναι παραμορφωμένος (βλ. Εικόνα 27 /φωτογραφία 4), σχηματίζοντας έναν θόλο προς τη βασική πλευρά, μονάχα στην περιοχή που αναπτύσσεται η νεαρή ωοκύστη. Ίσως να είναι το αποτέλεσμα της συνεχώς αυξανόμενης μηχανικής πίεσης που ασκεί η αναπτυσσόμενη ωοκύστη στον υπερκείμενο μυ.



Εικόνα 27: ανοσοεντοπισμός των αννεξινών σε μεσέντερα ενήλικων κουνουπιών με χρήση τεχνικών συνεστιακής μικροσκοπίας 48 ώρες μετά το γεύμα μολυσμένου αίματος από τα κουνούπια. Το κόκκινο αντιστοιχεί σε αννεξίνη, ενώ οι νεαρές ωοκύστες εκφράζουν GFP.

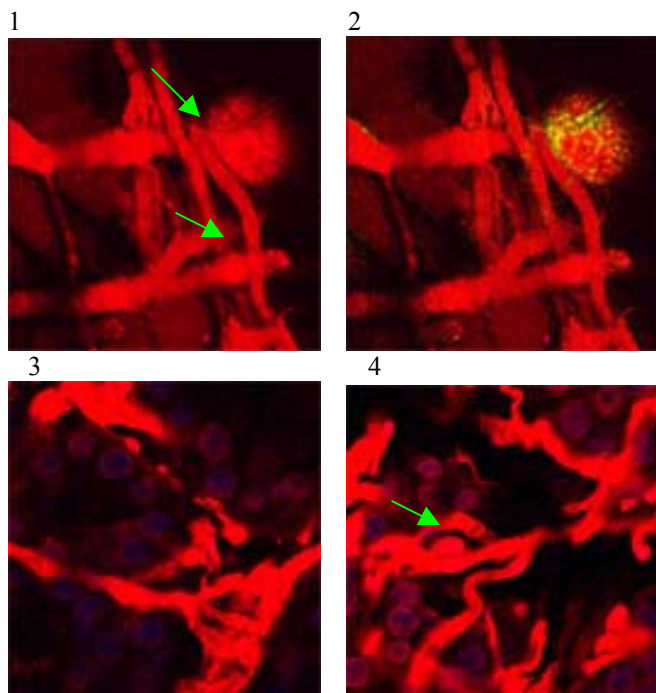
Τρεις ημέρες μετά το γεύμα μολυσμένου αίματος, σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία (Vlachou *et al.*, 2004), το GFP αρχίζει να χάνει την έντασή του (βλ. Εικόνα 28 /φωτογραφίες 3, 9), μια και ο υποκινητής που ελέγχει την έκφρασή του παύει να είναι ενεργός. Ακόμα και εάν χρησιμοποιηθεί κατάλληλο πολυκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει το GFP, είναι φανερό ότι κάποιες ωοκύστες, ενώ αποκαλύπτονται με χρώση για DNA, δεν εκφράζουν πλέον GFP (βλ. βέλη στις φωτογραφίες 1, 2 της εικόνας 28). Ωοκύστες αναπτύσσονται είτε υπό /εντός των μυών (βλ. Εικόνα 28 /φωτογραφίες 1, 9), είτε πλησίον των μυών περιβαλλόμενες από αννεξίνη (βλ. Εικόνα 28 /φωτογραφία 1), είτε πιο

κορυφαία, εντός της βασικής λεπίδας, προεκβάλλοντας προς την αιμολέμφο, ενώ περιγράφονται από αννεξίνη (βλ. Εικόνα 28 /φωτογραφίες 3-8).



Εικόνα 28: ανοσοεντοπισμός των αννεξινών σε μεσέντερα ενήλικων κουνουπιών με χρήση τεχνικών συνεστιακής μικροσκοπίας 3 ημέρες μετά το γεύμα μολυσμένου αίματος από τα κουνούπια. Το κόκκινο αντιστοιχεί σε αννεξίνη, ενώ το GFP δεν μπορεί να ανιχνευθεί σε κάποιες από αυτές, ακόμα και ύστερα από ανοσοχρώση με κατάλληλο πολυκλωνικό αντί-GFP αντίσωμα (βλ. βέλη στις φωτογραφίες 1, 2). Κάποιες άλλες εκφράζουν χαμηλά επίπεδα ενδογενούς GFP (φωτογραφίες 3, 9), ενώ στη φωτογραφία 7 έχει γίνει επιπλέον ανοσοχρώση (πράσινο) για την πρωτεΐνη P28 του παρασίτου.

Επτά ημέρες μετά από γεύμα μολυσμένου αίματος, οι ωκύστες εντοπίζονται μέσω της έκφρασης της πρωτεΐνης P28 ή με χρώση για DNA. Έχουν τροποποιήσει το πλέγμα μυών στη γύρω περιοχή τους (βλ. βέλη εικόνας 29), ώστε να καταφέρουν να προεξέχουν προς την αιμολέμφο και περιβάλλονται από στρώμα αννεξίνης (βλ. Εικόνα 29 /φωτογραφίες 1-4).



Εικόνα 29: ανοσοεντοπισμός των αννεξινών σε μεσέντερα ενήλικων κουνουπιών με χρήση τεχνικών συνεστιακής μικροσκοπίας 7 ημέρες μετά το γεύμα μολυσμένου αίματος από τα κουνούπια. Το κόκκινο αντιστοιχεί σε αννεξίνη και το μπλε σε DNA. Στη φωτογραφία 2 έχει γίνει ανοσοχρώση (πράσινο) για την πρωτεΐνη P28 του παρασίτου. Με βέλη δείχνονται σημεία πλησίον των ωοκυστών, όπου παρατηρούνται μεταβολές στο πλέγμα των μυών.

6. Λειτουργική σημασία της αλληλεπίδρασης της αννεξινών με τα παράσιτα της ελονοσίας

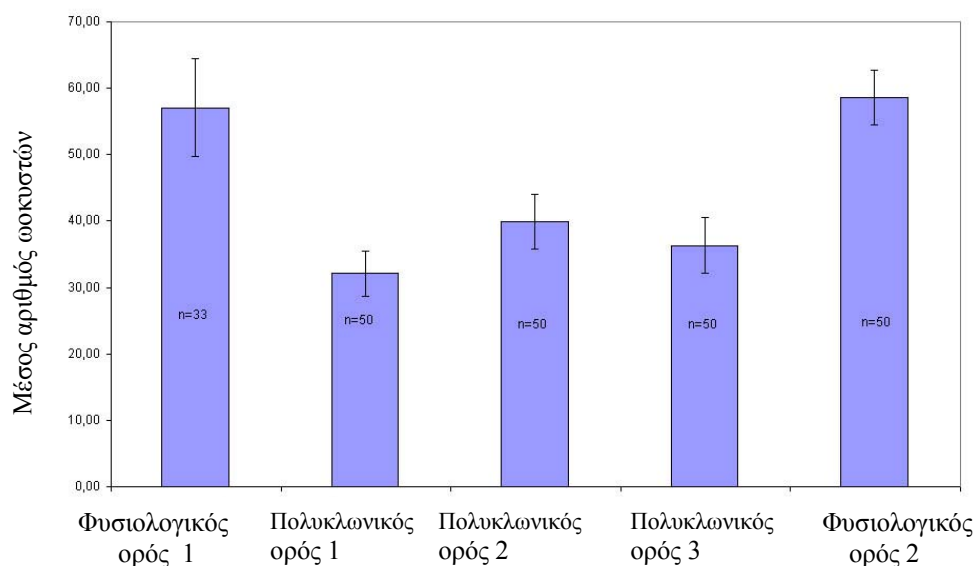
Δεδομένου ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ των αννεξινών και των παρασίτων της ελονοσίας αναπτύσσεται κατά την διείσδυση και διαφοροποίηση των τελευταίων στο μεσέντερο του κουνουπιού (βλ. προηγούμενη παράγραφο), το ερώτημα είναι ποιος είναι ο πιθανός λειτουργικός ρόλος της συγκεκριμένης αλληλεπίδρασης στην πορεία μόλυνσης του κουνουπιού. Είναι ήδη γνωστό ότι το κουνούπι εκφράζει γονίδια που είτε καταπολεμούν, είτε υποστηρίζουν και προστατεύουν το παράσιτο στην πορεία μόλυνσης του κουνουπιού (Osta *et al.*, 2004). Προκειμένου να αποκαλυφθεί ο θετικός, αρνητικός ή ουδέτερος ρόλος των αννεξινών ακολουθήθηκαν δύο στρατηγικές.

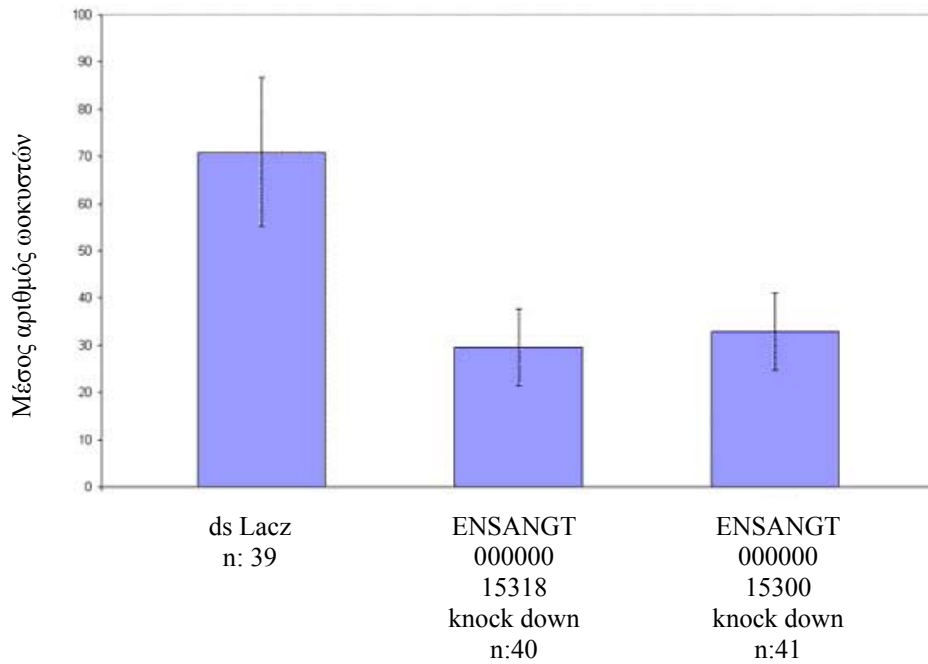
Κατά την πρώτη, κουνούπια *An. stephensi*, παράλληλα με το γεύμα μολυσμένου αίματος, λαμβάνουν και πολυκλωνικά αντισώματα έναντι των αννεξινών. Η ιδέα είναι ότι τα αντισώματα θα παρουσιάζουν ισχυρή αναγνώριση έναντι των αννεξινών, με συνέπεια να οδηγούν σε ανταγωνιστική αναστολή της πρόσδεσης των παρασίτων σε αυτές (Dinglasan *et al.*, 2003). Επομένως, εάν συγκριθεί ο αριθμός των ωοκυστών που αναπτύσσονται σε κουνούπια που πήραν γεύμα μολυσμένου αίματος συνοδευόμενο με αντισώματα έναντι των αννεξινών, με τον αριθμό αυτών που είχαν το ίδιο γεύμα συνοδευόμενο με φυσιολογικό ορό ποντικού, τότε ό,τι διαφορά παρατηρηθεί, θα οφείλεται στην

ανταγωνιστική αναστολή των αννεξινών από τα αντισώματα. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν, ταυτόχρονα με το γεύμα μολυσμένου αίματος, δύο διαφορετικοί φυσιολογικοί οροί ποντικού καθώς και τρία διαφορετικά πολυκλωνικά αντισώματα έναντι των αννεξινών ENSANGP00000015145, ENSANGP00000015300, ENSANGP00000015318. Οι τρεις πολυκλωνικοί οροί που χρησιμοποιήθηκαν αναγνωρίζουν και τις τρεις αννεξίνες του κουνουπιού. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στην εικόνα 30A. Εάν χρησιμοποιηθούν δύο διαφορετικοί φυσιολογικοί οροί ποντικού παράλληλα με το γεύμα, παρατηρούνται 57 και 59 ωοκύστες κατά μέσο όρο, ανά κουνούπι. Οι αντίστοιχοι αριθμοί όταν χρησιμοποιηθούν και τα τρία πολυκλωνικά αντισώματα είναι 32, 40 και 36 ωοκύστες κατά μέσο όρο ανά κουνούπι, δηλαδή παρατηρείται μία μείωση του αριθμού των ωοκυστών που κυμαίνεται από 30 έως περίπου 50%.

Κατά τη δεύτερη στρατηγική, απενεργοποιήθηκαν τα γονίδια των αννεξινών με τη μέθοδο RNAi (Blandin *et al.*, 2002). Δίκλωνο RNA με στόχο τα μετάγραφα ENSANGT00000015318, ENSANGT00000015300 παράγεται και ενίεται ενδοθωρακικά σε ενήλικα θηλυκά άτομα *An.gambiae*. Ακόμα και κατά την τέταρτη μέρα, οπότε και σύμφωνα με την τεχνική παρατηρείται το μέγιστο σίγησης, παρατηρείται με τεχνική Western ότι ο βαθμός αναστολής της έκφρασης των αννεξινών σε επίπεδο πρωτεΐνης φαίνεται να μην ξεπερνά το 50 με 70%, στην καλύτερη των περιπτώσεων. Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα τριών διαφορετικών πειραμάτων παρουσιάζονται στην εικόνα 30B. Ενώ στα κουνούπια ελέγχου παρατηρούνται κατά μέσο όρο 71 ωοκύστες ανά κουνούπι, στα κουνούπια που έχει στοχευθεί η έκφραση των αννεξινών, ο μέσος όρος είναι 30 και 33 ωοκύστες αντίστοιχα. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι στη μία από τις τρεις επαναλήψεις του πειράματος, η μείωση στον αριθμό ωοκυστών άγγιξε το 70%. Επίσης το ποσοστό των κουνουπιών που δεν μολύνονται καθόλου με ελονοσία, από 2.6% στα κουνούπια ελέγχου, αυξάνει σε 25 και 19.5% αντίστοιχα.

A



B

Εικόνα 30: λειτουργική σημασία της αλληλεπίδρασης των αννεξινών με τα παράσιτα της ελονοσίας. Στον κάθετο άξονα παρουσιάζεται ο μέσος όρος ωοκυστών ανά κουνούπι.

A: παρουσίαση των αποτελεσμάτων της λήψης πολυκλωνικών αντισωμάτων από κουνούπια *An. stephensi* ταυτόχρονα με το μολυσμένο γεύμα. Ο πολυκλωνικός ορός 1 είναι έναντι της πρωτεΐνης ENSANGP00000015145, ο πολυκλωνικός ορός 2 είναι έναντι της πρωτεΐνης ENSANGP00000015300 και ο πολυκλωνικός ορός 3 έναντι της πρωτεΐνης ENSANGP00000015318.

B: παρουσίαση των αποτελεσμάτων της αναστολής έκφρασης των αννεξινών στο κουνούπι *An. gambiae*, με την τεχνολογία RNAi. Σαν πείραμα ελέγχου γίνεται ένεση δίκλωνου RNA για το γονίδιο *LacZ* (*dsLacZ*), παράλληλα με τις ενέσεις δίκλωνου RNA που έχουν στόχο τα μετάγραφα ENSANGT00000015318, ENSANGT00000015300 (δεύτερη και τρίτη στήλη αντίστοιχα).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Προηγούμενες μελέτες, στα πλαίσια της έρευνας για την απόκτηση του μεταπτυχιακού τίτλου ειδίκευσης, αποκάλυψαν την παρουσία πολυπεπτιδίων σε κυτταρικές σειρές και μεσέντερα κουνουπιών, αλλά και σε κυτταρικές σειρές Δροσόφιλας, που έχουν την ικανότητα πρόσδεσης ωοκινετών. Η ήδη ολοκληρωμένη αλληλούχιση του γονιδιώματος, αλλά και η ούτως ή άλλως προχωρημένη γενετική της *D. melanogaster* έδωσαν σε πρώτη φάση προτεραιότητα στο βιοχημικό χαρακτηρισμό και την προσπάθεια απομόνωσης-ταυτοποίησης των τριών πολυπεπτιδίων μοριακού βάρους περίπου 36 kDa, που εκφράζονται στην κυτταρική σειρά S2 της μύγας, ενώ στη συνέχεια θα ακολουθούσε η μετάβαση στα ομόλογα του *An. gambiae* μέσω των αποτελεσμάτων που θα είχαν αποκτηθεί. Τα πρώτα πειράματα έδειξαν ότι πρόκειται για πεπτίδια σχετιζόμενα με την κυτταρική μεμβράνη, αλλά μάλλον όχι συστατικά αυτής. Κεντρικό ρόλο στον καθορισμό του σχήματος απομόνωσης των πεπτιδίων, έπαιξε η δυσκολία με την οποία μπορεί να αναλυθεί ένας μεγάλος αριθμός πρωτεϊνικών κλασμάτων ως προς την ικανότητα πρόσδεσης των ωοκινετών. Για κάθε φίλτρο πρωτεϊνών, δηλαδή για την ανάλυση 8 δειγμάτων, κάτω από ιδανικές συνθήκες, απαιτείται η προετοιμασία τουλάχιστον δύο ποντικών για μία εβδομάδα, ενώ και η δοκιμασία πρόσδεσης των ωοκινετών στα φίλτρα δεν είναι πάντοτε απόλυτα επιτυχής. Για τους λόγους αυτούς επιλέχθηκε η ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων για την απομόνωση των πρωτεϊνών.

Αν και είναι γνωστή η δυσκολία διαχωρισμού μεμβρανικών πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων (Santoni *et al.*, 2000), σημασία στην τελική απόφαση είχε και το γεγονός ότι οι υπό μελέτη πρωτεΐνες δεν είναι ενσωματωμένες στην πλασματική μεμβράνη και επομένως δεν αναμένονταν να είναι εξαιρετικά υδρόφοβες. Επιπλέον δείχθηκε ότι είναι διαλυτές στην ουρία, ένα από τα κύρια συστατικά που χρησιμοποιούνται κατά το διαχωρισμό των πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων. Πράγματι, από τα διαφορετικά εκχυλίσματα που δοκιμάστηκαν, υψηλή διακριτική ικανότητα επιτεύχθηκε μονάχα στα εκχυλίσματα ουρίας, τα οποία έδωσαν αξιόπιστους και επαναλαμβανόμενους χάρτες πρωτεϊνικών κηλίδων μετά από χρώση αργύρου των πηκτωμάτων δύο διαστάσεων. Κατά τις δοκιμασίες πρόσδεσης των ωοκινετών σε φίλτρα πρωτεϊνών που έχουν διαχωριστεί με SDS-PAGE, αναδεικνύεται μία τριπλέτα ζωνών, με μικρή διαφορά στο μοριακό τους βάρος, που έχει την ικανότητα πρόσδεσης των παρασίτων. Μετά το διαχωρισμό των πρωτεϊνών σε πηκτώματα δύο διαστάσεων και τη χρώση αργύρου, στο σύνολο των δειγμάτων που αναλύθηκαν, αποκαλύπτονται, στο αντίστοιχο μοριακό βάρος, τρεις κηλίδες πρωτεϊνών, με σχεδόν το ίδιο και για τις τρεις ισοηλεκτρικό σημείο. Η προσπάθεια ταυτοποίησης εστιάστηκε στις συγκεκριμένες κηλίδες, οι οποίες θα μπορούσαν να αποτελούν τις τρεις ισομορφές της πρωτεΐνης που προσδένει τα παράσιτα. Χρησιμοποιήθηκαν ευαίσθητες τεχνικές φασματομετρίας μάζας (MALDI-TOF) και βρέθηκε ότι οι δύο τουλάχιστον κηλίδες αντιστοιχούν σε ισομορφές της αννεξίνης B11 της *D. melanogaster*.

Ακολούθησαν δοκιμές πρόσδεσης ωοκινετών σε φίλτρα πρωτεϊνών που έχουν διαχωριστεί με ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων, χωρίς όμως αποτέλεσμα, πιθανότατα λόγω των πολύ πιο ισχυρών αποδιατακτικών συνθηκών που εφαρμόζονται στη συγκεκριμένη τεχνική. Όμως χρησιμοποιώντας πολυκλωνικά αντισώματα έναντι των αννεξινών, φανερώθηκε η ενεργότητα πρόσδεσής τους σε ωοκινέτες, ακόμα και σε συνθήκες διαλύματος. Πρόκειται για μία αλληλεπίδραση που αναπτύσσεται

όχι μονάχα λόγω των ιδιαίτερων *in vitro* συνθηκών μεταξύ πρωτεϊνικών φίλτρων και παρασίτων, αλλά όπως φαίνεται, και για την ικανότητα των αννεξινών να αναγνωρίζουν και να προσδένονται στους ωοκινέτες κατά την διείσδυση των τελευταίων στο μεσέντερο του κουνουπιού.

Η οικογένεια των αννεξινών

Η ονομασία των πρωτεϊνών αυτών προέρχεται από τα λατινικά (*ad nectere*: προσδένω) και επιλέχθηκε για να περιγράψει τη βασική ιδιότητα σχεδόν όλων των αννεξινών, να προσδένονται και να συγκρατούν συγκεκριμένες βιολογικές δομές και ειδικότερα μεμβράνες. Έχει και μία ιστορική κατά κάποιον τρόπο έννοια, γιατί ομαδοποιεί μια σειρά ανεξάρτητων ερευνητικών προσπαθειών που, ψάχνοντας για πρωτεΐνες που δρουν ως σκαλωσιές ή γέφυρες, αποκάλυψαν τις αννεξίνες. Πρόκειται για πρωτεΐνες που ανάλογα με τη συγκέντρωση ιόντων Ca^{++} , προσδένονται σε φωσφολιπίδια και αποτελούν μία εξελικτικώς συντηρημένη πολυγονιδιακή οικογένεια με μέλη της να έχουν βρεθεί τόσο στο ζωικό όσο και στο φυτικό βασίλειο (Morgan and Fernandez, 1997). Περισσότερες από 160 διαφορετικές αννεξίνες έχουν χαρακτηριστεί σε περισσότερους από 65 οργανισμούς, από κατώτερους, όπως μύκητες και πρώτιστα, ως ανώτερους όπως φυτά και σπονδυλωτά. Εντατική βιοχημική έρευνα που περιελάμβανε και την αλληλούχιση γονιδίων και cDNA, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι το σύνολο των αννεξινών παρουσιάζουν κοινές κύριες βιοχημικές ιδιότητες, καθώς και ομοιότητες σε επίπεδο αλληλουχίας και δομής γονιδίων.

Κάθε αννεξίνη αποτελείται από δύο βασικές δομικές περιοχές (Moss and Morgan, 2004):

- 1) τη μη συντηρημένη αμινοτελική περιοχή που είναι διαφορετική σε κάθε μέλος της οικογένειας και στις περισσότερες περιπτώσεις καθορίζει τις *in vivo* ιδιότητες της κάθε αννεξίνης, όπως τον υποκυτταρικό εντοπισμό της ή την λειτουργική της ειδικότητα και
- 2) τη συντηρημένη, σφιχτά πακεταρισμένη κεντρική περιοχή, πλούσια σε α-έλικες, που θεωρείται ότι αποτελεί τη ρυθμιζόμενη από το ασβέστιο ενεργότητα πρόσδεσης της στη μεμβράνη.

Η κεντρική περιοχή περιλαμβάνει 4 ή 8 επαναλήψεις ενός δομικού στοιχείου 70 αμινοξέων, που καλείται επανάληψη αννεξίνης (*annexin repeat*). Έχει παρατηρηθεί ποικιλομορφία τόσο στην ευαισθησία με την οποία το ασβέστιο επηρεάζει την πρόσδεση της κεντρικής περιοχής σε φωσφολιπίδια, όσο και στην προτίμησή της για πρόσδεση σε συγκεκριμένες ομάδες φωσφολιπιδίων (Sohma *et al.*, 2001). Γενικά μοιάζει με ένα βαθουλωμένο δίσκο, του οποίου η κυρτή πλευρά συνδέεται περιφερικά με τα φωσφολιπίδια της μεμβράνης (βλ. Εικόνα 31). Στην κοίλη πλευρά του δίσκου βρίσκεται το αμινοτελικό άκρο κάθε αννεξίνης, το οποίο εκτεθειμένο με κατεύθυνση μακριά από τη μεμβράνη, είναι προσβάσιμο για αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες, όπως μέλη της οικογένειας S100 ή με μία δεύτερη μεμβρανική επιφάνεια. Παράλληλα το αμινοτελικό άκρο παίζει και βασικό ρυθμιστικό ρόλο, αφ' ενός λόγω της παρουσίας υπολειμμάτων στόχων μετά-μεταφραστατικών τροποποιήσεων σε αυτό και αφ' ετέρου επειδή επηρεάζει την ασβέστιο-εξαρτώμενη ικανότητα σύνδεσης με φωσφολιπίδια, σταθεροποιώντας ή αποσταθεροποιώντας διαφορετικές συνολικές διαμορφώσεις του μορίου (Rosengarth and Luecke, 2003). Είναι πιθανότατα το αμινοτελικό άκρο που ευθύνεται για μία σειρά λειτουργιών των αννεξινών οι οποίες δεν απαιτούν την παρουσία ασβεστίου για να εκτελεστούν (Gerke and Moss, 2002).

Οι αννεξίνες των εντόμων είναι διαφοροποιημένες από τις αντίστοιχες σπονδυλωτών και κατώτερων οργανισμών

Οι αννεξίνες των σπονδυλωτών (A1-13) δεν αντιπροσωπεύονται με ορθόλογα γονίδια στα έντομα (Gerke and Moss, 2002), γεγονός που αναδεικνύεται και με τη σύγκριση των αλληλουχιών της συντηρημένης κεντρικής περιοχής των αννεξινών κουνουπιών, με τις αντίστοιχες άλλων εντόμων, σπονδυλωτών, κατώτερων πολυκύτταρων οργανισμών και πρωτίστων. Μονάχα οι προγονικές αννεξίνες των σπονδυλωτών, όπως η A13, φαίνεται να αντιπροσωπεύονται σε κατώτερους πολυκύτταρους οργανισμούς, όπως η ύδρα. Μία πρόσθετη θεμελιώδης διαφορά μεταξύ των αννεξινών του Ανωφελούς και των αντίστοιχων των σπονδυλωτών είναι και ο συνολικός αριθμός εξονίων από τα οποία αποτελείται το κάθε γονίδιο. Οι αννεξίνες των σπονδυλωτών κωδικοποιούνται από 12 έως 15 εξόνια (Gerke and Moss, 2002), ενώ οι αντίστοιχες του Ανωφελούς από 2 έως 4 εξόνια. Σε αντίθεση με τα σπονδυλωτά, όπου η πληροφορία για την κεντρική περιοχή των αννεξινών περικλείεται σε μία πλειάδα εξονίων που απέχουν ελάχιστα μεταξύ τους (μέγεθος εσονίων μικρότερο του 1 Kb), στον Ανωφελή οι αντίστοιχες πληροφορίες περιέχονται σε ένα ή δύο εξόνια.

Έχει προταθεί ότι νωρίς στη φυλογένεση των χορδωτών, πριν από 500-600 εκατομμύρια έτη, το «πρώτο» γονιδίωμα των σπονδυλωτών περιείχε την πληροφορία για μονάχα τρεις αννεξίνες, τις A7, A11 και A13 (Morgan and Fernandez, 1995, Morgan and Fernandez, 1997, Bances *et al.*, 2000, Iglesias *et al.*, 2002). Στο κουνούπι υπάρχουν 4 γονίδια αννεξινών, από τα οποία τα τρία εμφανίζουν υψηλή ομολογία μεταξύ τους, βρίσκονται συναθροισμένα σε αλληλουχία μήκους 8 Kb και είναι πιθανόν να προέκυψαν από διπλασιασμό ενός γονιδίου. Η συσσώρευση μεταλλαγών στην κωδική περιοχή του ενός από αυτά και η απουσία έκφρασης στους ιστούς ενήλικων κουνουπιών, θα μπορούσε να αποτελεί ένδειξη ότι πρόκειται για ψευδογονίδιο. Στη Δροσόφιλα υπάρχουν μόνο τρία γονίδια αννεξινών (Ann IX, AnnX, anxb11), αλλά και ένα πιθανό παραπροϊόν διπλασιασμού (CG33487) που περιέχει την πληροφορία για τη σύνθεση 122 αμινοξέων του καρβοξυτελικού άκρου της αννεξίνης AnnX. Σε αντίθεση με το κουνούπι που το σύνολο των γονιδίων είναι στενά συνδεδεμένα στο δεξιό βραχίονα του 2 χρωμοσώματος, τα δύο από τα τρία δροσοφιλικά (AnnX, anxb11) εντοπίζονται στο X χρωμόσωμα ενώ το τρίτο στο δεξιό βραχίονα του χρωμοσώματος 3.

Η ύπαρξη πολλαπλών ισομορφών αληθεύει για μέλη της οικογένειας των αννεξινών

Στην παρούσα εργασία, βρέθηκαν με ανάλυση Western πολλαπλές ισομορφές αννεξινών, τόσο στον Ανωφελή όσο και στην Δροσόφιλα, με μοριακό βάρος γύρω στα 35kDa, αλλά και στα 50 kDa. Δεν είναι η πρώτη φορά που κάτι τέτοιο αναφέρεται για τις αννεξίνες και έχουν δοθεί διαφορετικές εξηγήσεις για το φαινόμενο αυτό. Εναλλακτικό μάτισμα της αννεξίνης A6 των σπονδυλωτών οδηγεί στην απομάκρυνση ενός εξονίου μήκους 18 νουκλεοτιδίων και έτσι προκύπτουν δύο ισομορφές της πρωτεΐνης με χαρακτηριστική εμφάνιση ηλεκτροφορητικής διπλέτας (Moss and Crompton, 1990). Παράληψη της μεταγραφής του εξονίου 2 της αννεξίνης A5, οδηγεί στην παραγωγή μίας ισομορφής της πρωτεΐνης με βραχύτερο αμινοτελικό άκρο και μοριακό βάρος μικρότερο κατά 3

kDa (Berendes *et al.* , 1993). Για τις αννεξίνες A1 και A2 έχει αναφερθεί ότι φωσφορυλίωσή τους οδηγεί τόσο σε πρωτεόλυση του αμινοτελικού τους άκρου, όσο και σε τροποποίηση του υποκυτταρικού εντοπισμού τους (Seemann *et al.* , 1996), ενώ η ενδοκυτταρική πρωτεόλυση της A1 μπορεί να προηγηθεί της φωσφορυλίωσής της, αντιπροσωπεύοντας έναν καθαρό μετά τη μετάφραση ρυθμιστικό μηχανισμό (Movitz and Dahlgren, 2000). Το αμινοτελικό άκρο των αννεξινών του Ανωφελούς φέρει στόχους πλειάδας πιθανών μετά-μεταφραστικών τροποποιήσεων, όπως γλυκοσυλιώσεων και φωσφορυλιώσεων, οι οποίες θα μπορούσαν να ευθύνονται και για τη μικρή διαφορά που παρατηρείται στην κινητικότητα των ισομορφών κατά την ηλεκτροφόρηση. Ειδικότερα για τις ισομορφές μοριακού βάρους γύρω στα 50 kDa, θα μπορούσαν να αντιπροσωπεύουν προϊόντα γονιδίων με 8 συνολικά επαναλήψεις αννεξίνης, που έχουν ήδη εντοπισθεί στο γονιδίωμα της Δροσόφιλας, ή σύμπλοκα των αννεξινών με EF-hand πρωτεΐνες και ειδικότερα της υποοικογένειας S100 (Schafer and Heizmann, 1996). Οι S100 πρωτεΐνες έχουν μοριακό βάρος που κυμαίνεται γύρω στα 10 kDa, και έχει δειχθεί ότι τρεις τουλάχιστον αννεξίνες σπονδυλωτών αλληλεπιδρούν με τρία διαφορετικά μέλη της συγκεκριμένης υποοικογένειας (Donato and Russo-Marie, 1999, Donato, 1999). Ισομορφές της αννεξίνης A7, μοριακού βάρους 47 και 51 kDa οι οποίες διαφέρουν κατά 22 αμινοξέα στο αμινοτελικό τους άκρο, βρέθηκε να εκφράζονται σε μυοκύτταρα (Selbert *et al.* , 1995). Συνοψίζοντας λοιπόν, γίνεται φανερό, ότι η ύπαρξη πλειάδας ισομορφών αννεξινών είναι ένα σύνηθες φαινόμενο για τη συγκεκριμένη οικογένεια, όμως επιπλέον έρευνα είναι απαραίτητη για να ξεκαθαρίσει εάν κάτι από τα παραπάνω συμβαίνει και στα έντομα.

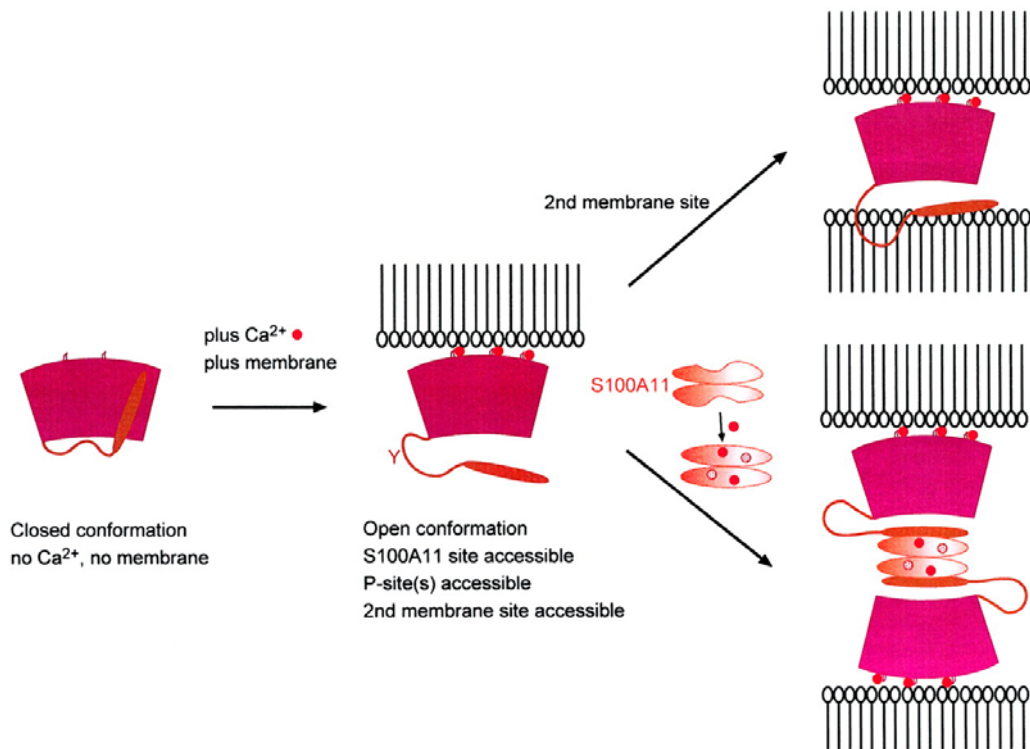
Οι αννεξίνες του κουνουπιού βρίσκονται στον εξωκυττάριο χώρο

Ανοσοχρώση σε ιστούς κουνουπιών δείχνει ότι οι αννεξίνες εντοπίζονται στον εξωκυττάριο χώρο των επιθηλιακών κυττάρων του μεσεντέρου και των ωοθηκών. Παρόλο που δεν φέρουν αλληλουχίες-σήματα για την έκκρισή τους, μέλη της οικογένειας έχει δειχθεί πως μπορούν να δρουν ως υποδοχείς του ενδοθηλίου για πρωτεάσες του ορού, καθώς και ως αναστολείς για τη μετανάστευση των ουδετερόφιλων και την πήξη του αίματος (Raynal and Pollard, 1994). Εξωκυττάρια αννεξίνη A1 συνεντοπίζεται με, και προσδέεται σε $\alpha_4\beta_1$ ιντεγκρίνες (Euzger *et al.* , 1999, Solito *et al.* , 2000), η αννεξίνη A5 προσδέεται σε κολλαγόνο τύπου II και X (von der Mark and Mollenhauer, 1997), ενώ η εξωκυττάρια αννεξίνη A2 έχει την ικανότητα πρόσδεσης σε δομικές περιοχές φιμπρονεκτίνης τύπου III (Chung and Erickson, 1994). Στην παρούσα εργασία η αννεξίνη συνεντοπίζεται με λαμίνη, μία γνωστή πρωτεΐνη του εξωκυττάριου υποστρώματος. Τουλάχιστον 20 διαφορετικά πολυπεπίδια θηλαστικών, κυρίως αυξητικοί παράγοντες και λεκτίνες βρίσκονται στον εξωκυττάριο χώρο, χωρίς να ακολουθούν το κλασικό μονοπάτι έκκρισης (Rubartelli and Sitia, 1997). Μία πρόσφατη μελέτη ρίχνει φως σε έναν πιθανό νέο τρόπο μεταφοράς των αννεξινών έξω από το κύτταρο (Deora *et al.* , 2004). Σύμφωνα με αυτή, η μεταφορά της αννεξίνης A2 στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων ανθρώπου συμβαίνει ανεξάρτητα από το κλασικό μονοπάτι του ενδοπλασματικού δικτύου - Golgi και χρειάζεται τη φωσφορυλίωση του αμινοτελικού της άκρου και την πρόσδεση της πρωτεΐνης p11. Εναλλακτικές θεωρίες θέλουν τις εξωκυττάρια αννεξίνες να προέρχονται από τη λύση γειτονικών

κυττάρων ή να ακολουθούν κάποιους υποδοχείς του κυττάρου στην διαδικασία της εξωκύττωσής τους (Raynal and Pollard, 1994).

Πιθανές λειτουργίες των αννεξινών στο κουνούπι

Ο μεγαλύτερος όγκος πληροφοριών για πιθανές λειτουργίες των αννεξινών, αφορά τα σπονδυλόζωα. Φαίνεται ότι συμμετέχουν στη ρύθμιση της οργάνωσης της κυτταρικής μεμβράνης και της μεμβρανικής κυκλοφορίας, καθώς και στη ρύθμιση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσής και του δυναμικού των ιόντων ασβεστίου κατά μήκος της μεμβράνης, (Donato and Russo-Marie, 1999). Στον Ανωφελή, η επαγωγή της μεταγραφής δύο γονιδίων αννεξινών 24 και 48 ώρες μετά το γέυμα γεύματος αίματος αποκαλύπτει την πιθανή σημασία τους κατά την αιματοφαγία. Μέσα σε λίγα λεπτά, το κουνούπι καταπίνει έναν σχετικά τεράστιο όγκο αίματος και αρχίζει μία σειρά δομικών μεταβολών με κατάληξη την ολική διάταση του μεσεντέρου. Δεδομένου του προτύπου έκφρασης των αννεξινών, στο μεσοκυττάριο χώρο και στη βασική πλευρά του μεσεντέρου, μεταξύ των συνδέσμων κυττάρων και μυών, καθώς και στην βασική λεπίδα, είναι πολύ πιθανόν να απαιτείται η *de novo* παραγωγή αννεξινών, ώστε να ενισχυθεί η συνάφεια μεταξύ των κυττάρων που αποτελούν το τοίχωμα του μεσεντέρου και κατά συνέπεια η ανθεκτικότητά του στην πίεση που ασκεί ο μεγάλος όγκος του γεύματος. Πράγματι, με κρυοηλεκτρονική μικροσκοπία έχει παρατηρηθεί ότι αννεξίνες συμμετέχουν στο σχηματισμό συνδέσμων μεταξύ απέναντι μεμβρανών (Lambert *et al.* , 1997). Καθώς η μοριακή δομή των αννεξινών αποκαλύπτει μία θέση πρόσδεσης με φωσφολιπίδια, η ικανότητά τους να συνδέουν απέναντι μεμβράνες θα μπορούσε να εξηγηθεί είτε μέσω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ δύο μορίων αννεξινών που βρίσκονται προσδεμένα σε αυτές (Oling *et al.* , 2000), είτε με τον εντοπισμό στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης μίας δεύτερης δομικής περιοχής πρόσδεσης σε μεμβράνη (βλ. Εικόνα 31), κάτι που αληθεύει για την αννεξίνη A1 (Bitto and Cho, 1999). Τέλος, μία τρίτη εναλλακτική ερμηνεία είναι μέσω της αλληλεπίδρασης του αμινοτελικού άκρου, με διμερικές πρωτεΐνες της οικογένειας S100, όπως είναι γνωστό για την αννεξίνη A2 (Lewit-Bentley *et al.* , 2000).



Εικόνα 31: μοντέλο για το συνδετικό μεταξύ δύο μεμβρανών ρόλο των αννεξινών από τους Gerke and Moss, (2002).

Η ύπαρξη δύο διαφορετικών θέσεων πρόσδεσης σε βιολογικές δομές, βρέθηκε στις αννεξίνες των εντόμων: η απομάκρυνση των δισθενών ιόντων από το διάλυμα με EGTA είναι ικανή να οδηγήσει την εκχύλιση των αννεξινών από τα μικροσώματα, αποδεικνύοντας την ασβέστιο-εξαρτώμενη σύνδεσή τους με την κυτταρική μεμβράνη. Η πρόσδεσή τους όμως στα παράσιτα δεν διαταράσσεται από την απουσία δισθενών ιόντων στο διάλυμα επώασης των ωοκινετών με τα φίλτρα. Ενεργότητα πρόσδεσης των αννεξινών σε μεμβράνες, απουσία δισθενών ιόντων, έχει παρατηρηθεί τόσο κατά την πρόσδεση της αννεξίνης A2 στις μεμβράνες κυττάρων A549 (Liu *et al.*, 1997), όσο και κατά την αλληλεπίδραση της αννεξίνης A5 με την πλασματική μεμβράνη των αιμοπεταλίων (Tzima and Walker, 2000). Ίσως στις συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις αννεξινών να μεσολαβεί κάποια πρωτεΐνη τύπου υποδοχέα, η οποία αφ' ενός να αλληλεπιδρά με αυτές και αφ' ετέρου να βρίσκεται συνδεδεμένη με την πλασματική μεμβράνη.

Μέλη της οικογένειας των αννεξινών και ειδικότερα η αννεξίνη A5, έχουν την ικανότητα ασβέστιο-εξαρτώμενης σύνδεσης σε φωσφατιδυλοσερίνη. Φυσιολογικά, τα συγκεκριμένα φωσφολιπίδια βρίσκονται στο εσωτερικό της πλασματικής μεμβράνης, αλλά κατά τη διάρκεια της απόπτωσης του κυττάρου εξωτερικεύονται, με αποτέλεσμα να είναι διαθέσιμα για πρόσδεση σε εξωγενώς προστιθέμενη αννεξίνη A5. Το γεγονός αυτό είναι εκμεταλλεύσιμο τεχνικά για τον εντοπισμό αποπτωτικών κυττάρων μέσω της δοκιμής πρόσδεσης αννεξίνης A5 σε αυτά (van Engeland *et al.*, 1998). Κατά τη διείδυση του μεσεντέρου από τα παράσιτα της ελονοσίας, ένα μέρος των επιθηλιακών κυττάρων, αλλά και μεγάλο ποσοστό των παρασίτων, εισέρχονται σε πρόγραμμα απόπτωσης (Han *et al.*, 2000, Al-Olayan *et al.*, 2002b). Η πρόσδεση όμως των παρασίτων σε φίλτρα που φέρουν τις αννεξίνες του κουνουπιού δεν φαίνεται να σχετίζεται με την απόπτωση του παρασίτου:

οι αννεξίνες των εντόμων προσδένονται στα παράσιτα απουσία ασβεστίου, και επίσης, φίλτρα που φέρουν καθαρή ανθρώπινη αννεξίνη A5 ή A2 των βοοειδών δεν προσδένουν ωοκινέτες, ενώ δεν ανιχνεύθηκε και σήμα πρόσδεσης της φθορίζουσας αννεξίνης A5 σε ωοκινέτες υπό συνθήκες καλλιέργειας. Ορθόλογο της αννεξίνης A5 δεν βρίσκεται ούτε στη Δροσόφιλα, ούτε στον Ανωφελή, ενώ είναι γνωστό ότι τα κουνούπια δεν παράγουν φωσφατιδυλοσερίνη, αλλά μονάχα φωσφατιδυλοχολίνη και φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (van Heusden, 1996). Όλα τα παραπάνω δείχνουν ότι συμμετοχή, άμεση ή έμμεση, των αννεξινών στην απόπτωση όπως έχει περιγραφεί στα θηλαστικά δεν συμβαίνει στα έντομα.

Με συνεστιακή μικροσκοπία αποκαλύφθηκε ότι ο συνεντοπισμός των αννεξινών με τους ωοκινέτες είναι ένα φαινόμενο το οποίο συμβαίνει και *in vivo*, κατά την επαφή και επακόλουθη διείσδυση των παρασίτων στο μεσέντερο του κουνουπιού. Καθώς οι αννεξίνες βρίσκονται στην κορυφαία πλευρά του μεσεντέριου επιθηλίου, τα παράσιτα έρχονται σε επαφή και περιβάλλονται από αυτές, αμέσως μόλις διασχίσουν την περιτροφική μεμβράνη. Σε ένα πρόσφατο άρθρο αναφέρεται ότι *in vitro* επίδραση με φωσφολιπάση A₂ σε μεσέντερα, εμποδίζει τη διαφοροποίηση του παρασίτου σε αυτά (Zieler *et al.*, 2001). Για το συγκεκριμένο αποτέλεσμα δεν απαιτείται η υδρολυτική δράση της φωσφολιπάσης αλλά, μονάχα η ικανότητα πρόσδεσης σε φωσφολιπίδια, ενώ η επίδρασή της γίνεται στην πλευρά του μεσεντέρου και όχι του παρασίτου. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η αδυναμία των ωοκινετών να προσδένονται και να διαπερνούν το μεσέντερο του κουνουπιού. Οι παρατηρήσεις αυτές επιβεβαιώθηκαν και *in vivo*, αφού γενετικά τροποποιημένα κουνούπια τα οποία εκφράζουν φωσφολιπάση στο μεσέντερό τους, έχουν μειωμένη ικανότητα μετάδοσης της ελονοσίας (Moreira *et al.*, 2002). Θα πρέπει εδώ να σημειωθεί η ανασταλτική αλληλεπίδραση των αννεξινών με τη φωσφολιπάση A₂ (Kim *et al.*, 2001, Buckland *et al.*, 1998, Parente and Solito, 2004) καθώς και ότι οι αννεξίνες A1 και A5 είναι γνωστές και ως αντί-φωσφολιπάσες. Όμως επιπλέον πειράματα είναι απαραίτητα για να διαπιστωθεί εάν η ανασταλτική δράση της φωσφολιπάσης οφείλεται στην πιθανή παρεμπόδιση της αλληλεπίδρασης του παρασίτου με τις αννεξίνες του κουνουπιού.

Μία άλλη πρόσφατη εργασία (Kenis *et al.*, 2004) προτείνει ότι η πρόσδεση αννεξίνης A5 με την κυρτή πλευρά του μορίου σε φωσφολιπίδια, δημιουργεί μία κάμψη στην πλασματική μεμβράνη. Σε συνδυασμό με τον πολυμερισμό της πρωτεΐνης λόγω αλληλεπιδράσεων, σχηματίζεται τοπική εγκόλπωση και ενδοκυτταρικό κυστίδιο, με ένα καινούριο μηχανισμό μακροπινοκύτωσης, που δεν απαιτεί την παρουσία κλαθρίνης ή καβεολίνης, ούτε την καθοδήγηση του κυστιδίου από το δίκτυο ακτίνης του κυττάρου. Στην παρούσα εργασία δεν ήταν δυνατός ο εντοπισμός ωοκινετών σε ενδοκυτταρικά κυστίδια και ούτε κάτι τέτοιο είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία. Όμως η συσσώρευση αννεξίνης γύρω από τον ωοκινέτη, ίσως οδηγεί εκτός από την προσκόλληση στην κυτταρική μεμβράνη και σε μία τοπική εγκόλπωση, ένα από τα πιθανά πρώτα βήματα για να διαπεραστεί η πλασματική μεμβράνη κατά τη διαδικασία εισόδου των παρασίτων εντός των επιθηλιακών κυττάρων. Μία ανάλογη δράση υποδοχέα της αννεξίνης A2 έχει ήδη περιγραφεί για τον ανθρώπινο κυτταρομεγαλοϊό (HCMV) (Wright *et al.*, 1995).

Η αλληλεπίδραση ωοκινέτη-αννεξίνης, πέρα από την αύξηση της συγγένειας του μεσεντέριου επιθηλίου για τους ωοκινέτες, η οποία είναι θεμελιώδης για την προσκόλληση των παρασίτων και την έναρξη της διείσδυσης του επιθηλίου, θα μπορούσε να συμβάλλει και στο χαλάρωμα της σύνδεσης των

επιθηλιακών κυττάρων - διευκολύνοντας το πέρασμα των παρασίτων μεταξύ των κυττάρων - , ή στην εξασθένιση της σύνδεσης των κυττάρων με το εξωκυττάριο υπόστρωμα. Μια τέτοια δράση των αννεξινών στην πλαστικότητα των κυτταρικών μεμβρανών και στην προσκόλληση των κυττάρων στο εξωκυττάριο υπόστρωμα, είναι ήδη γνωστή όχι μόνο στα θηλαστικά (Siever and Erickson, 1997), αλλά και σε κατώτερους πολυκύτταρους οργανισμούς όπως η Ύδρα (Schlaepfer *et al.* , 1992). Το πρότυπο έκφρασης των αννεξινών δείχνει ότι θα μπορούσαν να δρουν και ως υπόστρωμα για την κινητικότητα και την καθοδήγηση του ωοκινέτη στο σύνολο της πορείας του εντός του επιθηλίου, ή να επιβραδύνουν και να σταματούν την κίνησή του προς την αιμολέμφο, καθώς αυτός φτάνει στη βασική λεπίδα. Εναλλακτικά, η αλληλεπίδραση ωοκινέτη-αννεξινών θα μπορούσε να συμβάλλει στην αναδιαμόρφωση του μεσεντέριου επιθηλίου, συνεπεία της μόλυνσης ή να οδηγεί στην παρουσίαση ή στην απόκρυψή των παρασίτων από το ανοσοποιητικό σύστημα του κουνουπιού. Πρόσδεση αννεξίνης στην επιφάνεια των T λεμφοκυττάρων καθυστερεί τον προγραμματισμένο κυτταρικό τους θάνατο με ένα άγνωστο μέχρι τώρα μηχανισμό (Gidon-Jeangirard *et al.* , 1999). Κάτι ανάλογο ίσως να συμβαίνει και με τους ωοκινέτες. Είναι επίσης πιθανόν η αλληλεπίδραση στη βασική λεπίδα να επάγει έναν άγνωστο μέχρι στιγμής σηματοδοτικό μηχανισμό που ελέγχει τη μεταμόρφωση του ωοκινέτη σε ωοκύστη και την επακόλουθη ανάπτυξή της στη βασική πλευρά του επιθηλίου, αφού η αννεξίνη φανερώνεται να περιβάλλει και να προστατεύει τις αναπτυσσόμενες ωοκύστες. Η επιπρόσθετη συσσώρευση μεταγράφων αννεξινών του κουνουπιού κατά τη λήψη μολυσμένου αίματος, ενισχύει ακόμα περισσότερο την υπόθεση της εμπλοκής της συγκεκριμένης οικογένειας πρωτεϊνών σε διαδικασίες που συνοδεύουν τη μόλυνση του μεσεντέριου με ελονοσία.

Πρόσδεση αννεξίνης έχει παρατηρηθεί σε μία σειρά από διαφορετικά κύτταρα, με διαφορετικό κάθε φορά λειτουργικό ρόλο. Εκτός από το θετικό ρόλο που έχει ήδη αναφερθεί στη διείσδυση ιών στα κύτταρα στόχους και στην αναστολή της απόπτωσης των T-λεμφοκυττάρων, η εξωτερίκευση αννεξίνης A1 από τα ενδοθηλιακά κύτταρα οδηγεί σε αναστολή της σύνδεσης και διαπίδυσης των ουδετερόφιλων στο ενδοθήλιο (Perretti *et al.* , 1996), ενώ το ίδιο φαινόμενο επαναλαμβάνεται και κατά την πρόσδεση των μονοκύτταρων στο ενδοθήλιο (Solito *et al.* , 2000). Τα πρώτα πειράματα για τον πιθανό λειτουργικό ρόλο της πρόσδεσης αννεξίνης, συγκλίνουν προς μία ευεργετική για το παράσιτο αλληλεπίδραση. Όταν χρησιμοποιηθούν πολυκλωνικά αντισώματα παράλληλα με το γεύμα μολυσμένου αίματος, η μείωση στον αριθμό των ωοκυστών κυμαίνεται από 30 έως 50%. Θα πρέπει ωστόσο να συνεκτιμηθεί και το γεγονός ότι ενώ τα πολυκλωνικά αντισώματα προέρχονται από ανοσοποίηση έναντι των αννεξινών του *An.gambiae*, τα συγκεκριμένα πειράματα έγιναν σε κουνούπια *An.stephensi*. Επιπλέον, κατά την ανοσοποίηση χρησιμοποιήθηκε ως ανοσογόνο ένα τμήμα της πρωτεΐνης που είχε υπερεκφρασθεί σε βακτήρια, με πιθανό επακόλουθο την αδυναμία αναγνώρισης του συνόλου των περιοχών των αννεξινών που πιθανώς να ευθύνονται για την πρόσδεση στους ωοκινέτες. Επίσης είναι αμφίβολο το κατά πόσο η λήψη των αντισωμάτων με το μολυσμένο γεύμα μπορεί να οδηγήσει σε εξ' ίσου αποτελεσματική ανταγωνιστική καταστολή της αλληλεπίδρασης με τα παράσιτα, στο σύνολο του μεσεντέριου από την κορυφαία έως και τη βασική του πλευρά, ενώ κανείς δεν μπορεί να αποκλείσει και την πιθανότητα ότι περισσότερες της μίας, διαφορετικές πρωτεΐνες του κουνουπιού υποστηρίζουν με συμπληρωματικό τρόπο, τη μόλυνση του μεσεντέριου από τα παράσιτα.

Στα πειράματα λειτουργικής απενεργοποίησης των αννεξινών με τη μέθοδο RNAi, ένα μεγάλο εμπόδιο φαίνεται να αποτελεί ο μεγάλος χρόνος ζωής της πρωτεΐνης. Ακόμα και 4 ημέρες μετά την ένεση του δίκλωνου RNA, οπότε και γίνεται η λήψη μολυσμένου γεύματος από το κουνούπι, το επίπεδο έκφρασης αννεξινών μειώνεται περίπου στο μισό. Εντούτοις, αυτή η μείωση της συνολικής ποσότητας αννεξινών είναι ικανή να προκαλέσει μία σχεδόν αντίστοιχη μείωση στον αριθμό των ωοκυστών που ανιχνεύονται μετά από μολυσμένο γεύμα. Είναι πιθανόν, εάν παρακολουθηθεί το επίπεδο αναστολής της έκφρασης της πρωτεΐνης σε ένα ευρύτερο χρονικό διάστημα μετά την ένεση δίκλωνου RNA, να επιτευχθεί μία μεγαλύτερη μείωση των επιπέδων των αννεξινών κατά τη χρονική στιγμή της λήψης μολυσμένου γεύματος, κάτι που ίσως θα είχε θεαματικότερες επιδράσεις στην αναστολή της διαφοροποίησης του παρασίτου εντός του μεσεντέρου.

Ένα ερώτημα που άμεσα προκύπτει από την παρούσα διατριβή είναι γιατί η ενεργότητα πρόσδεσης ωοκινετών εντοπίζεται σε ένα έντομο - τη Δροσόφιλα - που ποτέ δεν έρχεται σε επαφή με Πλασμώδια. Πρέπει να σημειωθεί ότι τα κύτταρα S2 υποστηρίζουν την πλήρη *in vitro* διαφοροποίηση του *P. gallinaceum* (Al-Olayan *et al.*, 2002a), καθώς και ότι ωοκινέτες του ίδιου είδους διαφοροποιούνται πλήρως σε μολυσματικούς σποροζωίτες όταν ενεθούν σε ενήλικες Δροσόφιλες (Schneider and Shahabuddin, 2000). Επομένως φαίνεται ότι τα παράσιτα της ελονοσίας επωφελούνται προϋπαρχόντων μηχανισμών για να διεισδύσουν στους ιστούς των εντόμων και να προστατευθούν από τις επιθέσεις του ανοσοποιητικού τους συστήματος.

Συνοψίζοντας θα λέγαμε ότι χρησιμοποιώντας μία πρωτότυπη *in vitro* τεχνική πρόσδεσης ωοκινετών σε φίλτρα, ταυτοποιήθηκε στα δίπτερα μία οικογένεια πρωτεϊνών - των αννεξινών - που έχει την ικανότητα αλληλεπίδρασης *in vivo* με τα παράσιτα της ελονοσίας, επηρεάζοντας την πορεία μόλυνσης του μεσεντέρου του κουνουπιού από αυτά. Για να επιτευχθεί αυτό το απροσδόκητο αποτέλεσμα, έγινε χρήση μεθοδολογιών γονιδιοματικής και πρωτεομικής που οδήγησαν στην ταυτοποίηση των πρωτεϊνών σε ένα οργανισμό - τη Δροσόφιλα - και στην κλωνοποίηση των ορθόλογων γονιδίων στον οργανισμό που μας ενδιαφέρει - τον Ανωφελή -, ανάλογα με τη διαθεσιμότητα της ολοκληρωμένης γονιδιοματικής αλληλουχίας. Δεδομένου ότι ο εξελικτικός διαχωρισμός των δύο ειδών έγινε πριν 250 εκατομμύρια χρόνια (Yeates and Wiegmann, 1999), η επιτυχία της συγκεκριμένης στρατηγικής δείχνει την αξία των δύο συγκεκριμένων ολοκληρωμένων γονιδιωμάτων για την εντομολογία. Το πρότυπο έκφρασης των αννεξινών, καθιστά τα αντισώματα που παρήχθησαν στη συγκεκριμένη εργασία, πολύτιμα εργαλεία για τη μελέτη της διείσδυσης του μεσεντέρου των δίπτερων εντόμων από σειρά επικίνδυνων για τη δημόσια υγεία παθογόνων. Πολύ λίγα είναι γνωστά για τις αννεξίνες των εντόμων ως τώρα και δεδομένης της διαφοροποίησης τους σε επίπεδο αλληλουχίας από τις αντίστοιχες των θηλαστικών, η μοριακή ανάλυση της αλληλεπίδρασής τους με το παράσιτο, ίσως ανοίξει νέους ορίζοντες, τόσο για την παρασκευή εμβολίων κατά της ελονοσίας, όσο και για την ανάπτυξη νέων μεθόδων καταπολέμησης της νόσου που θα στοχεύουν τον κύκλο του παρασίτου στο κουνούπι.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alavi, Y., Arai, M., Mendoza, J., Tufet-Bayona, M., Sinha, R., Fowler, K., Billker, O., Franke-Fayard, B., Janse, C.J., Waters, A. and Sinden, R.E. (2003) The dynamics of interactions between *Plasmodium* and the mosquito: a study of the infectivity of *Plasmodium berghei* and *Plasmodium gallinaceum*, and their transmission by *Anopheles stephensi*, *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. *Int J Parasitol*, **33**, 933-943.
- Al-Olayan, E.M., Beetsma, A.L., Butcher, G.A., Sinden, R.E. and Hurd, H. (2002a) Complete development of mosquito phases of the malaria parasite in vitro. *Science*, **295**, 677-679.
- Al-Olayan, E.M., Williams, G.T. and Hurd, H. (2002b) Apoptosis in the malaria protozoan, *Plasmodium berghei*: a possible mechanism for limiting intensity of infection in the mosquito. *Int J Parasitol*, **32**, 1133-1143.
- Alphey, L., Beard, C.B., Billingsley, P., Coetzee, M., Crisanti, A., Curtis, C., Eggleston, P., Godfray, C., Hemingway, J., Jacobs-Lorena, M., James, A.A., Kafatos, F.C., Mukwaya, L.G., Paton, M., Powell, J.R., Schneider, W., Scott, T.W., Sina, B., Sinden, R., Sinkins, S., Spielman, A., Toure, Y. and Collins, F.H. (2002) Malaria control with genetically manipulated insect vectors. *Science*, **298**, 119-121.
- Arrighi, R.B. and Hurd, H. (2002) The role of *Plasmodium berghei* ookinete proteins in binding to basal lamina components and transformation into oocysts. *Int J Parasitol*, **32**, 91-98.
- Bances, P., Fernandez, M.R., Rodriguez-Garcia, M.I., Morgan, R.O. and Fernandez, M.P. (2000) Annexin A11 (ANXA11) gene structure as the progenitor of paralogous annexins and source of orthologous cDNA isoforms. *Genomics*, **69**, 95-103.
- Bannister, L. and Mitchell, G. (2003) The ins, outs and roundabouts of malaria. *Trends Parasitol*, **19**, 209-213.
- Beier, J.C. (1998) Malaria parasite development in mosquitoes. *Annu Rev Entomol*, **43**, 519-543.
- Bendtsen, J.D., Nielsen, H., von Heijne, G. and Brunak, S. (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol*, **340**, 783-795.
- Berendes, R., Burger, A., Voges, D., Demange, P. and Huber, R. (1993) Calcium influx through annexin V ion channels into large unilamellar vesicles measured with fura-2. *FEBS Lett*, **317**, 131-134.
- Billingsley, P.F. and Hecker, H. (1991) Blood digestion in the mosquito, *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae): activity and distribution of trypsin, aminopeptidase, and alpha-glucosidase in the midgut. *J Med Entomol*, **28**, 865-871.
- Billker, O., Lindo, V., Panico, M., Etienne, A.E., Paxton, T., Dell, A., Rogers, M., Sinden, R.E. and Morris, H.R. (1998) Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito. *Nature*, **392**, 289-292.
- Bitto, E. and Cho, W. (1999) Structural determinant of the vesicle aggregation activity of annexin I. *Biochemistry*, **38**, 14094-14100.

- Blandin, S., Moita, L.F., Kocher, T., Wilm, M., Kafatos, F.C. and Levashina, E.A. (2002) Reverse genetics in the mosquito *Anopheles gambiae*: targeted disruption of the Defensin gene. *EMBO Rep*, **3**, 852-856.
- Blom, N., Sicheritz-Ponten, T., Gupta, R., Gammeltoft, S. and Brunak, S. (2004) Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics*, **4**, 1633-1649.
- Buckland, A.G. and Wilton, D.C. (1998) Inhibition of human cytosolic phospholipase A2 by human annexin V. *Biochem J*, **329 (Pt 2)**, 369-372.
- Chandre, F., Darrier, F., Manga, L., Akogbeto, M., Faye, O., Mouchet, J. and Guillet, P. (1999) Status of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* sensu lato. *Bull World Health Organ*, **77**, 230-234.
- Christophides, G.K., Vlachou, D. and Kafatos, F.C. (2004) Comparative and functional genomics of the innate immune system in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Immunol Rev*, **198**, 127-148.
- Chung, C.Y. and Erickson, H.P. (1994) Cell surface annexin II is a high affinity receptor for the alternatively spliced segment of tenascin-C. *J Cell Biol*, **126**, 539-548.
- Cociancich, S.O., Park, S.S., Fidock, D.A. and Shahabuddin, M. (1999) Vesicular ATPase-overexpressing cells determine the distribution of malaria parasite oocysts on the midguts of mosquitoes. *J Biol Chem*, **274**, 12650-12655.
- Corradetti, A. and Verolini, F. (1951) [Relation between *Plasmodium berghei* and erythrocytes during the primary attack in the white rat.]. *Ann Ist Super Sanita*, **14**, 584-605.
- Corthals G.L., Gygi S.P., Aebersold R. and Patterson S.D. (2000) Identification of proteins by Mass Spectrometry in *Proteome Research: Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Identification Methods* Rabilloud T. (Ed.) pp 197-231 New York: Springer.
- Curtis, C.F. (1968) A possible genetic method for the control of insect pests, with special reference to tsetse flies (*Glossina* spp.). *Bull Entomol Res*, **57**, 509-523.
- Deora, A.B., Kreitzer, G., Jacovina, A.T. and Hajjar, K.A. (2004) An annexin 2 phosphorylation switch mediates its p11-dependent translocation to the cell surface. *J Biol Chem*.
- Dessens, J.T., Mendoza, J., Claudianos, C., Vinetz, J.M., Khater, E., Hassard, S., Ranawaka, G.R. and Sinden, R.E. (2001) Knockout of the rodent malaria parasite chitinase pbCMT1 reduces infectivity to mosquitoes. *Infect Immun*, **69**, 4041-4047.
- Dessens, J.T., Siden-Kiamos, I., Mendoza, J., Mahairaki, V., Khater, E., Vlachou, D., Xu, X.J., Kafatos, F.C., Louis, C., Dimopoulos, G. and Sinden, R.E. (2003) SOAP, a novel malaria ookinete protein involved in mosquito midgut invasion and oocyst development. *Mol Microbiol*, **49**, 319-329.
- Dinglasan, R.R., Fields, I., Shahabuddin, M., Azad, A.F. and Sacci, J.B., Jr. (2003) Monoclonal antibody MG96 completely blocks *Plasmodium yoelii* development in *Anopheles stephensi*. *Infect Immun*, **71**, 6995-7001.
- Donato, R. (1999) Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. *Biochim Biophys Acta*, **1450**, 191-231.

- Donato, R. and Russo-Marie, F. (1999) The annexins: structure and functions. *Cell Calcium*, **26**, 85-89.
- Dyer, M. and Day, K.P. (2000) Commitment to gametocytogenesis in *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Today*, **16**, 102-107.
- Euzger, H.S., Flower, R.J., Goulding, N.J. and Perretti, M. (1999) Differential modulation of annexin I binding sites on monocytes and neutrophils. *Mediators Inflamm*, **8**, 53-62.
- Gerke, V. and Moss, S.E. (1997) Annexins and membrane dynamics. *Biochim Biophys Acta*, **1357**, 129-154.
- Gerke, V. and Moss, S.E. (2002) Annexins: from structure to function. *Physiol Rev*, **82**, 331-371.
- Gharahdaghi, F., Weinberg, C.R., Meagher, D.A., Imai, B.S. and Mische, S.M. (1999) Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. *Electrophoresis*, **20**, 601-605.
- Ghosh, A., Edwards, M.J. and Jacobs-Lorena, M. (2000) The journey of the malaria parasite in the mosquito: hopes for the new century. *Parasitol Today*, **16**, 196-201.
- Gidon-Jeangirard, C., Solito, E., Hofmann, A., Russo-Marie, F., Freyssinet, J.M. and Martinez, M.C. (1999) Annexin V counteracts apoptosis while inducing Ca(2+) influx in human lymphocytic T cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **265**, 709-715.
- Gilles, H.M. (1993) The malaria parasites in *Essential Malariology* Gilles, H.M. and Warrell, D.A. (eds) pp 12-34 London: Arnold
- Greenwood, B. and Mutabingwa, T. (2002) Malaria in 2002. *Nature*, **415**, 670-672.
- Han, Y.S., Thompson, J., Kafatos, F.C. and Barillas-Mury, C. (2000) Molecular interactions between *Anopheles stephensi* midgut cells and *Plasmodium berghei*: the time bomb theory of ookinete invasion of mosquitoes. *Embo J*, **19**, 6030-6040.
- Iglesias, J.M., Morgan, R.O., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Gilbert, D.J. and Fernandez, M.P. (2002) Comparative genetics and evolution of annexin A13 as the founder gene of vertebrate annexins. *Mol Biol Evol*, **19**, 608-618.
- Ito, J., Ghosh, A., Moreira, L.A., Wimmer, E.A. and Jacobs-Lorena, M. (2002) Transgenic anopheline mosquitoes impaired in transmission of a malaria parasite. *Nature*, **417**, 452-455.
- James, A.A. (2002) Engineering mosquito resistance to malaria parasites: the avian malaria model. *Insect Biochem Mol Biol*, **32**, 1317-1323.
- Jensen, O.N., Wilm, M., Shevchenko, A. and Mann M. (1999) in *Methods in Molecular Biology*, Vol 112: 2D Proteome Analysis Protocols (A.J. Link, Ed.), pp 513-518, Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- Kenis, H., Van Genderen, H., Bennaghmouch, A., Rinia, H.A., Frederik, P., Narula, J., Hofstra, L. and Reutelingsperger, C.P. (2004) Cell surface expressed phosphatidylserine and Annexin A5 open a novel portal of cell entry. *J Biol Chem*.
- Kim, S.W., Rhee, H.J., Ko, J., Kim, Y.J., Kim, H.G., Yang, J.M., Choi, E.C. and Na, D.S. (2001) Inhibition of cytosolic phospholipase A2 by annexin I. Specific interaction model and mapping of the interaction site. *J Biol Chem*, **276**, 15712-15719.
- Kusmann, M., Lassing, U., Sturmer, C.A., Przybylski, M. and Roepstorff, P. (1997) Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric peptide mapping of the neural cell adhesion

- protein neurolin purified by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis or acidic precipitation. *J Mass Spectrom*, **32**, 483-493.
- Lambert, O., Gerke, V., Bader, M.F., Porte, F. and Brisson, A. (1997) Structural analysis of junctions formed between lipid membranes and several annexins by cryo-electron microscopy. *J Mol Biol*, **272**, 42-55.
- Lewit-Bentley, A., Rety, S., Sopkova-de Oliveira Santos, J. and Gerke, V. (2000) S100-annexin complexes: some insights from structural studies. *Cell Biol Int*, **24**, 799-802.
- Liu, L., Tao, J.Q. and Zimmerman, U.J. (1997) Annexin II binds to the membrane of A549 cells in a calcium-dependent and calcium-independent manner. *Cell Signal*, **9**, 299-304.
- Mahairaki, V., Lycett, G., Blass, C. and Louis, C. (2001) Beta-integrin of *Anopheles gambiae*: mRNA cloning and analysis of structure and expression. *Insect Mol Biol*, **10**, 217-223.
- Marsh, K., Forster, D., Waruiru, C., Mwangi, I., Winstanley, M., Marsh, V., Newton, C., Winstanley, P., Warn, P. and Peshu, N. (1995) Indicators of life-threatening malaria in African children. *N Engl J Med*, **332**, 1399-1404.
- Matsui, N.M., Smith-Beckerman, D.M. and Epstein, L.B. (1999) in *Methods in Molecular Biology*, Vol 112: 2D Proteome Analysis Protocols (A.J. Link, Ed.), pp 513-518, Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- Miller, L.H., Baruch, D.I., Marsh, K. and Doumbo, O.K. (2002) The pathogenic basis of malaria. *Nature*, **415**, 673-679.
- Moreira, L.A., Ito, J., Ghosh, A., Devenport, M., Zieler, H., Abraham, E.G., Crisanti, A., Nolan, T., Catteruccia, F. and Jacobs-Lorena, M. (2002) Bee venom phospholipase inhibits malaria parasite development in transgenic mosquitoes. *J Biol Chem*, **277**, 40839-40843.
- Morgan, R.O. and Fernandez, M.P. (1995) Molecular phylogeny of annexins and identification of a primitive homologue in *Giardia lamblia*. *Mol Biol Evol*, **12**, 967-979.
- Morgan, R.O. and Pilar Fernandez, M. (1997) Distinct annexin subfamilies in plants and protists diverged prior to animal annexins and from a common ancestor. *J Mol Evol*, **44**, 178-188.
- Moskalyk, L.A., Oo, M.M. and Jacobs-Lorena, M. (1996) Peritrophic matrix proteins of *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol*, **5**, 261-268.
- Moss, S.E. and Crumpton, M.J. (1990) Alternative splicing gives rise to two forms of the p68 Ca²⁺(+)-binding protein. *FEBS Lett*, **261**, 299-302.
- Moss, S.E. and Morgan, R.O. (2004) The annexins. *Genome Biol*, **5**, 219.
- Movitz, C. and Dahlgren, C. (2000) Endogenous cleavage of annexin I generates a truncated protein with a reduced calcium requirement for binding to neutrophil secretory vesicles and plasma membrane. *Biochim Biophys Acta*, **1468**, 231-238.
- Muller, H.M., Dimopoulos, G., Blass, C. and Kafatos, F.C. (1999) A hemocyte-like cell line established from the malaria vector *Anopheles gambiae* expresses six prophenoloxidase genes. *J Biol Chem*, **274**, 11727-11735.
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D. and Ehrhardt, W. (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*, **9**, 255-262.

- Newton, C.R., Warn, P.A., Winstanley, P.A., Peshu, N., Snow, R.W., Pasvol, G. and Marsh, K. (1997) Severe anaemia in children living in a malaria endemic area of Kenya. *Trop Med Int Health*, **2**, 165-178.
- Oling, F., Santos, J.S., Govorukhina, N., Mazeret-Dubut, C., Bergsma-Schutter, W., Oostergetel, G., Keegstra, W., Lambert, O., Lewit-Bentley, A. and Brisson, A. (2000) Structure of membrane-bound annexin A5 trimers: a hybrid cryo-EM - X-ray crystallography study. *J Mol Biol*, **304**, 561-573.
- Osta, M.A., Christophides, G.K. and Kafatos, F.C. (2004) Effects of mosquito genes on Plasmodium development. *Science*, **303**, 2030-2032.
- Parente, L. and Solito, E. (2004) Annexin 1: more than an anti-phospholipase protein. *Inflamm Res*, **53**, 125-132.
- Perretti, M., Croxtall, J.D., Wheller, S.K., Goulding, N.J., Hannon, R. and Flower, R.J. (1996) Mobilizing lipocortin 1 in adherent human leukocytes downregulates their transmigration. *Nat Med*, **2**, 1259-1262.
- Persidis, A. (2000) Malaria. *Nat Biotechnol*, **18**, 111-112.
- Prada, J., Alabi, S.A. and Bienzle, U. (1993) Bacterial strains isolated from blood cultures of Nigerian children with cerebral malaria. *Lancet*, **342**, 1114.
- Raynal, P. and Pollard, H.B. (1994) Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta*, **1197**, 63-93.
- Richie, T.L. and Saul, A. (2002) Progress and challenges for malaria vaccines. *Nature*, **415**, 694-701.
- Ridley, R.G. (2002) Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs. *Nature*, **415**, 686-693.
- Roberts, L. (2002) Mosquitoes and disease. *Science*, **298**, 82-83.
- Rosenberg, R. and Rungsiwongse, J. (1991) The number of sporozoites produced by individual malaria oocysts. *Am J Trop Med Hyg*, **45**, 574-577.
- Rosenblum, B.B., Lee, L.G., Spurgeon, S.L., Khan, S.H., Menchen, S.M., Heiner, C.R. and Chen, S.M. (1997) New dye-labeled terminators for improved DNA sequencing patterns. *Nucleic Acids Res*, **25**, 4500-4504.
- Rosengarth, A. and Luecke, H. (2003) A calcium-driven conformational switch of the N-terminal and core domains of annexin A1. *J Mol Biol*, **326**, 1317-1325.
- Rubartelli, A. and Sitia, R. (1997) Secretion of mammalian proteins that lack a signal sequence in *Unusual secretory Pathways: From Bacteria to Man* Kuchler, K., Rubartelli, A., and Holland, B., (eds) R.G. Landes Co., Austin, TX.
- Sachs, J. and Malaney, P. (2002) The economic and social burden of malaria. *Nature*, **415**, 680-685.
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Press, Cold Spring Harbour, New York, USA
- Santoni, V., Molloy, M. and Rabilloud, T. (2000) Membrane proteins and proteomics: un amour impossible? *Electrophoresis*, **21**, 1054-1070.

- Schafer, B.W. and Heizmann, C.W. (1996) The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends Biochem Sci*, **21**, 134-140.
- Schlaepfer, D.D., Fisher, D.A., Brandt, M.E., Bode, H.R., Jones, J.M. and Haigler, H.T. (1992) Identification of a novel annexin in *Hydra vulgaris*. Characterization, cDNA cloning, and protein kinase C phosphorylation of annexin XII. *J Biol Chem*, **267**, 9529-9539.
- Schneider, I. (1972) Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *J Embryol Exp Morphol*, **27**, 353-365.
- Schneider, D. and Shahabuddin, M. (2000) Malaria parasite development in a *Drosophila* model. *Science*, **288**, 2376-2379.
- Schultz, L.J., Steketee, R.W., Macheso, A., Kazembe, P., Chitsulo, L. and Wirima, J.J. (1994) The efficacy of antimalarial regimens containing sulfadoxine-pyrimethamine and/or chloroquine in preventing peripheral and placental *Plasmodium falciparum* infection among pregnant women in Malawi. *Am J Trop Med Hyg*, **51**, 515-522.
- Seemann, J., Weber, K., Osborn, M., Parton, R.G. and Gerke, V. (1996) The association of annexin I with early endosomes is regulated by Ca²⁺ and requires an intact N-terminal domain. *Mol Biol Cell*, **7**, 1359-1374.
- Selbert, S., Fischer, P., Pongratz, D., Stewart, M. and Noegel, A.A. (1995) Expression and localization of annexin VII (synexin) in muscle cells. *J Cell Sci*, **108 (Pt 1)**, 85-95.
- Shahabuddin, M., Toyoshima, T., Aikawa, M. and Kaslow, D.C. (1993) Transmission-blocking activity of a chitinase inhibitor and activation of malarial parasite chitinase by mosquito protease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 4266-4270.
- Shahabuddin, M. and Kaslow, D.C. (1994) Plasmodium: parasite chitinase and its role in malaria transmission. *Exp Parasitol*, **79**, 85-88.
- Shahabuddin, M. (1998) Plasmodium ookinete development in the mosquito midgut: a case of reciprocal manipulation. *Parasitology*, **116 Suppl**, S83-93.
- Shen, Z., Dimopoulos, G., Kafatos, F.C. and Jacobs-Lorena, M. (1999) A cell surface mucin specifically expressed in the midgut of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 5610-5615.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. and Mann, M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem*, **68**, 850-858.
- Siden-Kiamos, I., Vlachou, D., Margos, G., Beetsma, A., Waters, A.P., Sinden, R.E. and Louis, C. (2000) Distinct roles for pbs21 and pbs25 in the in vitro ookinete to oocyst transformation of *Plasmodium berghei*. *J Cell Sci*, **113 Pt 19**, 3419-3426.
- Siever, D.A. and Erickson, H.P. (1997) Extracellular annexin II. *Int J Biochem Cell Biol*, **29**, 1219-1223.
- Sinden, R.E. (1978) Rodent malaria, Killick-Kendrick R, Peters WA (eds) pp 85-186 New York: Academic Press.
- Sinden, R.E. (1985) A cell biologist's view of host cell recognition and invasion by malarial parasites. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **79**, 598-605.
- Sinden R.E. (1997) Infection of mosquitoes with rodent malaria. In *The molecular biology of insect*

disease vectors: a methods manual, Crampton JM, Beard CB, Louis C (eds) pp 67-91 London : Chapman & Hall.

- Sinden, R.E. (1999) Plasmodium differentiation in the mosquito. *Parassitologia*, **41**, 139-148.
- Sinden, R.E. (2002) Molecular interactions between Plasmodium and its insect vectors. *Cell Microbiol*, **4**, 713-724.
- Singh, K.R. (1971) Propagation of arboviruses in Singh's Aedes cell lines. I. Growth of arboviruses in Aedes albopictus and A. aegypti cell lines. *Curr Top Microbiol Immunol*, **55**, 127-133.
- Snow, R.W., Craig, M., Deichmann, U. and Marsh, K. (1999) Estimating mortality, morbidity and disability due to malaria among Africa's non-pregnant population. *Bull World Health Organ*, **77**, 624-640.
- Sohma, H., Creutz, C.E., Gasa, S., Ohkawa, H., Akino, T. and Kuroki, Y. (2001) Differential lipid specificities of the repeated domains of annexin IV. *Biochim Biophys Acta*, **1546**, 205-215.
- Solito, E., Romero, I.A., Marullo, S., Russo-Marie, F. and Weksler, B.B. (2000) Annexin 1 binds to U937 monocytic cells and inhibits their adhesion to microvascular endothelium: involvement of the alpha 4 beta 1 integrin. *J Immunol*, **165**, 1573-1581.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D.G. (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, **25**, 4876-4882.
- Tomas, A.M., Margos, G., Dimopoulos, G., van Lin, L.H., de Koning-Ward, T.F., Sinha, R., Lupetti, P., Beetsma, A.L., Rodriguez, M.C., Karras, M., Hager, A., Mendoza, J., Butcher, G.A., Kafatos, F., Janse, C.J., Waters, A.P. and Sinden, R.E. (2001) P25 and P28 proteins of the malaria ookinete surface have multiple and partially redundant functions. *Embo J*, **20**, 3975-3983.
- Trouiller, P. and Olliaro, P.L. (1998) Drug development output from 1975 to 1996: what proportion for tropical diseases? *Int J Infect Dis*, **3**, 61-63.
- Tzima, E. and Walker, J.H. (2000) Platelet annexin V: the ins and outs. *Platelets*, **11**, 245-251.
- van Engeland, M., Nieland, L.J., Ramaekers, F.C., Schutte, B. and Reutelingsperger, C.P. (1998) Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*, **31**, 1-9.
- van Heusden (1996) Fat body and hemolymph in *The Biology of Disease Vectors*, Beaty BJ and Marquardt WS (eds) pp: 349-55 Colorado: University Press of Colorado
- Vaughan, J.A., Hensley, L. and Beier, J.C. (1994) Sporogonic development of Plasmodium yoelii in five anopheline species. *J Parasitol*, **80**, 674-681.
- Vlachou, D., Lycett, G., Siden-Kiamos, I., Blass, C., Sinden, R.E. and Louis, C. (2001) Anopheles gambiae laminin interacts with the P25 surface protein of Plasmodium berghei ookinetes. *Mol Biochem Parasitol*, **112**, 229-237.
- 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.

- von der Mark, K. and Mollenhauer, J. (1997) Annexin V interactions with collagen. *Cell Mol Life Sci*, **53**, 539-545.
- Warburg, A. and Miller, L.H. (1992) Sporogonic development of a malaria parasite in vitro. *Science*, **255**, 448-450.
- Warburg, A. and Schneider, I. (1993) In vitro culture of the mosquito stages of *Plasmodium falciparum*. *Exp Parasitol*, **76**, 121-126.
- Warrel (1993) Clinical features of malaria in *Essential Malariology* Gilles, H.M. and Warrell, D.A. (eds) pp 35-49 London: Arnold
- White, N.J. (1996) The treatment of malaria. *N Engl J Med*, **335**, 800-806
- Wright, J.F., Kurosky, A., Prydzial, E.L. and Wasi, S. (1995) Host cellular annexin II is associated with cytomegalovirus particles isolated from cultured human fibroblasts. *J Virol*, **69**, 4784-4791.
- Yeates, D.K. and Wiegmann, B.M. (1999) Congruence and controversy: toward a higher-level phylogeny of Diptera. *Annu Rev Entomol*, **44**, 397-428.
- Zieler, H., Nawrocki, J.P. and Shahabuddin, M. (1999) *Plasmodium gallinaceum* ookinetes adhere specifically to the midgut epithelium of *Aedes aegypti* by interaction with a carbohydrate ligand. *J Exp Biol*, **202 (Pt 5)**, 485-495.
- Zieler, H., Garon, C.F., Fischer, E.R. and Shahabuddin, M. (2000) A tubular network associated with the brush-border surface of the *Aedes aegypti* midgut: implications for pathogen transmission by mosquitoes. *J Exp Biol*, **203 Pt 10**, 1599-1611.
- Zieler, H., Keister, D.B., Dvorak, J.A. and Ribeiro, J.M. (2001) 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*, **204**, 4157-4167.