

Πανεπιστήμιο Κρήτης
Έρευνας
Τμήμα Βιολογίας
και
Τμήμα Ιατρικής

Ίδρυμα Τεχνολογίας και
Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας
και Βιοτεχνολογίας

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ-ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Ανάπτυξη εργαλείων για την μελέτη της
υπεροικογένειας των Subtilisin στα *Apicomplexa*
(*Toxoplasma gondii* & *Plasmodium*)»**

ΤΑΜΠΑΚΗ ΖΩΗ

Υπεύθυνος Ερευνητής: Αθανάσιος Λουκέρης
Υπεύθυνος καθηγητής: Αναστάσιος Οικονόμου

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2004

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή

1.1 Παράσιτα του φύλου <i>Apicomplexa</i>σελ 1-3	σελ 1-3
1.2 Μηχανισμός εισβολής των παράσιτων <i>Apicomplexa</i> στα κύτταρα στόχους τους.....σελ 3-4	σελ 3-4
1.3 Ενδείξεις για τον κρίσιμο ρόλο πρωτεασών στον μηχανισμό εισβολής των παράσιτων.....σελ 4-8	σελ 4-8
1.4 Υποψήφιες πρωτεάσες που εμπλέκονται στον μηχανισμό εισόδου στα κύτταρα στόχους και στην επιβίωση του παράσιτου.....σελ 8	σελ 8
1.4α Πρωτεάσες κυστεϊνών.....σελ 8-9	σελ 8-9
1.4β Πρωτεάσες ασπαρτικού οξέος.....σελ 9-10	σελ 9-10
1.4γ Πρωτεάσες σερινών.....σελ 10	σελ 10
• <u>1.4γi Subtilisins</u>σελ 10-12	σελ 10-12
• <u>1.4γii Rhomboid-like πρωτεάσες σερίνης</u>σελ 12	σελ 12
1.5 Αναστολείς πρωτεασών σερίνης.....σελ 13	σελ 13
<u>1.5α Η υπεροικογένεια των σερπινών (Serine Protease Inhibitors)</u>σελ 13-16	σελ 13-16
ΣΚΟΠΟΣ.....σελ 16-17	σελ 16-17

2. Αποτελέσματα

2.1 Κατασκευή του SAD αναστολέα της PfSUB1 με μεταλλαξογένεση της CAM σερίνης.....σελ 18-19	σελ 18-19
2.2 Έκφραση και καθαρισμός του SAD αναστολέα.....σελ 19-21	σελ 19-21
2.3 Κατασκευή του LGI αναστολέα της PbSUB2 με μεταλλαξογένεση της CAM σερίνης.....σελ 21-24	σελ 21-24
2.4 Κατασκευή του EAP αναστολέα της TgSUB2 με μεταλλαξογένεση της CAM σερίνης.....σελ 24-26	σελ 24-26
2.5 Παροδικός μετασχηματισμός του <i>T. gondii</i> με την EAP.....σελ 26-29	σελ 26-29

3. Συζήτηση.....σελ 30-33

4. Υλικά και μέθοδοι

4.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....σελ 34-35	σελ 34-35
---------------------------------------------------------	-----------

4.2 Πέψη πλασμιδιακών φορέων και ενθεμάτων με περιοριστικά ένζυμα.....σελ 36-37	σελ 36-37
4.3 Αντίδραση συρραφής (ligation) πλασμιδιακών κατασκευών ή φορέων με το επιθυμητό τμήμα DNA και μετασχηματισμός βακτηριακών στελεχών.....σελ 37	σελ 37
4.4 Έκφραση και καθαρισμός της SAD με Ni ⁺² -NTA χρωματογραφία συγγένειας.....σελ 38-39	σελ 38-39
<u>5. Βιβλιογραφία</u>σελ 40-42	σελ 40-42

Περίληψη

Τα παράσιτα του φύλου των *Apicomplexa* έχουν αναπτύξει έναν ενδοκυτταρικό τρόπο ζωής, που τους εξασφαλίζει τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά και την κατάλληλη προστασία από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή. Ο μηχανισμός εισβολής στα κύτταρα στόχους είναι μία πολύ γρήγορη, αλλά και πολύπλοκη διαδικασία, η οποία περιλαμβάνει την διαδοχική έκκριση πρωτεϊνικών προϊόντων από τα εξειδικευμένα εκκριτικά οργανίδια των *Apicomplexa*. Εκτεταμένες μελέτες του μηχανισμού εισβολής υποδεικνύουν τις πρωτεολύτικες τροποποιήσεις πολλών από αυτά τα πρωτεϊνικά προϊόντα ως ιδιαίτερα σημαντικές για την επιτυχή είσοδο του παράσιτου στο κύτταρο στόχο. Επομένως, οι παρασιτικές πρωτεάσες και ιδιαίτερα οι πρωτεάσες με εξωκυτταρική λειτουργία αποτελούν σημαντικούς φαρμακευτικούς στόχους για το μπλοκάρισμα της εισόδου του παράσιτου στα κύτταρα αλλά και για την λεπτομερέστερη μελέτη του μηχανισμού εισβολής.

Οι subtilisins πρωτεάσες σερίνης των παράσιτων έχουν ενοχοποιηθεί ως σημαντικά μόρια τροποποίησης εμπλεκόμενα στον μηχανισμό εισβολής. Μία προσέγγιση που προσπαθούμε να αναπτύξουμε για την μελέτη των subtilisin πρωτεασών είναι η χρήση εξειδικευμένων αναστολέων πρωτεασών σερίνης, των σερπινών. Οι σερπίνες συνήθως ρυθμίζουν κρίσιμα πρωτεολυτικά φαινόμενα απενεργοποιώντας πρωτεάσες μιμούμενες το υποστρωμά τους. Για αυτό το λόγο προχωρήσαμε σε μεταλλαξογένεση της σερπίνης CAM του *A. gambiae* με τέτοιο τρόπο ώστε να μιμείται γνωστό υπόστρωμα της PfSUB1 καθώς και πιθανά υποστρώματα της PbSUB2 και TgSUB2.

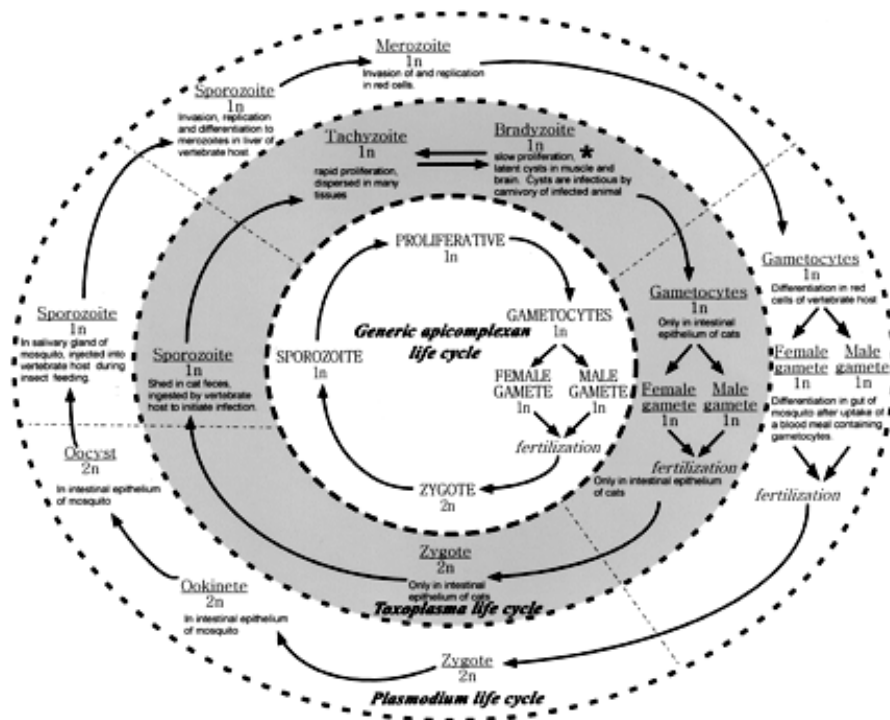
Εισαγωγή

1. Εισαγωγή.

1.1 Παράσιτα του φύλου *Apicomplexa*.

Το φύλο των *Apicomplexa* αποτελείται από διάφορα παρασιτικά γένη, εκ των οποίων πολλά από αυτά είναι παθογόνα για τον άνθρωπο. Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται τα παρασιτικά είδη του γένους *Plasmodium*, που προκαλούν ελονοσία, το *Toxoplasma gondii*, αίτιο της τοξοπλάσμωσης, τα είδη του γένους *Eimeria*, παθογόνα για το κοτόπουλο και τα βοοειδή, τα είδη του γένους *Theileria*, επίσης παθογόνα των βοοειδών και το *Cryptosporidium* παράσιτο των ζώων καθώς και παθογόνο στον άνθρωπο.

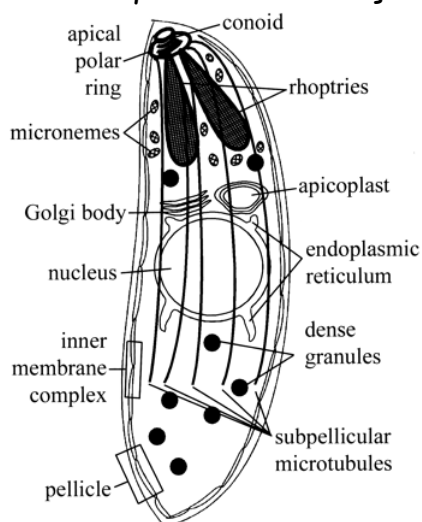
Τα *Apicomplexa* είναι απλοειδή για το μεγαλύτερο μέρος του κύκλου ζωής τους. Έχουν πολύπλοκο αναπτυξιακό κύκλο ζωής με διαφοροποιημένες παρασιτικές μορφές οι οποίες εισβάλλουν σε διακριτούς ιστούς και ξενιστές (εικόνα 1). Επιπροσθέτως, διαφοροποιούνται σε γαμετικά κύτταρα τα οποία συντήκονται και σχηματίζουν το ζυγωτό. Το ζυγωτό, υφίσταται διαφοροποίηση και έτσι πραγματοποιείται επαναφορά στην απλοειδή κατάσταση. Σε ορισμένες περιπτώσεις οι διαφοροποιημένες παρασιτικές μορφές έχουν την δυνατότητα να μολύνουν οργανισμούς (όπως κουνούπια ή τσιμπούρια), οι οποίοι χρησιμεύουν ως φορείς για την μετάδοση του παρασίτου από ξενιστή σε ξενιστή (Aikawa, 1988; Choboter et al, 1982; Sinden, 1978).



Εικόνα 1: Ο κύκλος ζωής των *Apicomplexa*. Εσωτερικά, απεικονίζεται η γενική μορφή του κύκλου ζωής των παράσιτων. Ενώ εξωτερικά απεικονίζονται συγκεκριμένα τα στάδια των κύκλων ζωής του *T. gondii* και *P. falciparum*.

Τα παράσιτα διαθέτουν ιδιαίτερα μορφολογικά χαρακτηριστικά (εικόνα 2). Έχουν επιμυκησμένο σχήμα και μία διακριτή περιοχή στο ένα άκρο τους (apical region) (Aikawa, 1988; Sinden, 1978). Στην περιοχή αυτή

εντοπίζονται εξειδικευμένα οργανίδια που συνιστούν το apical σύμπλοκο στο οποίο περιλαμβάνονται: Τα εκκριτικά οργανίδια rhoptries, micronemes και dense granules. Οι εκκριτικές αυτές μηχανές περιέχουν προϊόντα απαραίτητα για την κινητικότητα του παρασίτου, την προσκολλησή και την εισβολή του στα κύτταρα του ξενιστή, και τον σχηματισμό του παρασιτικού κυστιδίου (PMV) όπου αναπτύσσεται το παράσιτο όταν έχει εισβάλει στο κύτταρο (Carruthers et al. 1999, Carruthers et al. 1997). Σε ορισμένα είδη ανιχνεύεται μία μικρή δομή με σχήμα κώνου το conoid που αποτελείται από μαστίγια (Nichols et al. 1987) και παίζει μηχανικό κυρίως ρόλο κατά την εισβολή του παράσιτου στα κύτταρα στόχους του. Ιδιαίτερο χαρακτηριστικό αυτού του συμπλόκου αποτελεί η δομή του apical polar ring που χρησιμεύει ως οργανωτικό κέντρο των μικροσωληνίσκων (Nichols et al. 1987). Επιπλέον, τα *Apicomplexa* διαθέτουν και ένα ιδιαίτερο οργανίδιο τον apicoplast που μοιάζει με χλωροπλάστη και του οποίου ο ρόλος δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί (Foth et al. 2003), αλλά φαίνεται ότι η πρωταρχική του λειτουργία είναι η σύνθεση λιπαρών οξέων, ισοπρενοειδών και αίμης. Τέλος τα παράσιτα οριοθετούνται από την δομή pellicle η οποία αποτελείται από την πλασματική μεμβράνη και το σύμπλοκο της εωτερικής μεμβράνης (IMC) (Torrier et al. 1991). Η δομή αυτή συνδέεται με ένα μεγάλο αριθμό στοιχείων του κυτταροσκελετού όπως ακτίνη, μυοσίνη και μικροσωληνίσκους.



Εικόνα 2: Μορφή των *Apicomplexa* παράσιτων. Στην εικόνα απεικονίζονται όλα τα ιδιαίτερα μορφολογικά χαρακτηριστικά που θεωρούνται διαγνωστικά για αυτό το φύλο.

Όλα τα *Apicomplexa* είναι υποχρεωτικά ενδοκυτταρικά παράσιτα. Προσβάλλουν κύτταρα του ξενιστή προκειμένου να αναπτυχθούν και να πολλαπλασιαστούν μέσα σε αυτά. Από τα διαιρούμενα παράσιτα τα κύτταρα του ξενιστή υφίστανται λύση. Οι νέοι οργανισμοί που απελευθερώνονται εξωκυτταρικά δεν μπορούν να αναπτυχθούν και να πολλαπλασιαστούν και πρέπει πολύ γρήγορα να ξαναπροσβάλουν νέα κύτταρα του ξενιστή, προκειμένου να επιβιώσουν. Επαναλαμβανόμενοι κύκλοι εισβολής των κυττάρων, πολλαπλασιασμού των παράσιτων και επαναπροσβολής νέων

κυττάρων αποτελούν το αίτιο της ζημιάς που υφίστανται οι ιστοί ενός ξενιστή, ο οποίος έχει μολυνθεί με κάποιο παράσιτο.

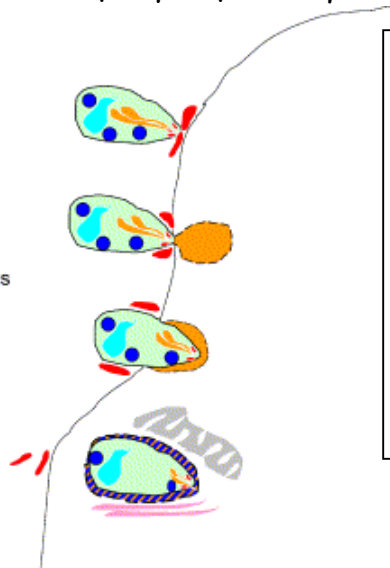
1.2 Μηχανισμός εισβολής των παράσιτων *Apicomplexa* στα κύτταρα στόχους τους.

Η εισβολή στα κύτταρα στόχους των παρασίτων εξασφαλίζει τις απαραίτητες πηγές θρεπτικών για την ανάπτυξή τους και επιπλέον έναν αποτελεσματικό τρόπο να αποφεύγουν το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή. Παρόλο που τα *Apicomplexa* έχουν παρόμοιο μηχανισμό κίνησης και πιθανά εισβολής στα κύτταρα, μολύνουν διαφορετικούς ξενιστές και παρασιτούν σε μία ποικιλία κυτταρικών τύπων, η οποία πιθανόν υποδεικνύεται από τις αλληλεπιδράσεις επιφανειακών πρωτεϊνών του παρασίτου με τους αντίστοιχους υποδοχείς των κυττάρων στόχων. Για παράδειγμα το *T. gondii* εισβάλλει επιτυχώς σε όλα τα εμπύρνηνα κύτταρα του ξενιστή του, ενώ τα είδη του *Plasmodium* πραγματοποιούν αλληλεπιδράσεις με συγκεκριμένα κύτταρα των ξενιστών τους (παρατηρείται προσβολή των ηπατοκυττάρων και των ερυθροκυττάρων του ξενιστή, των επιθηλιακών κυττάρων του μεσέντερου και των κυττάρων των σιελογόνων αδένων του κουνουπιού).

Ο μηχανισμός εισβολής του παρασίτου στα κύτταρα είναι μία ενεργή διαδικασία πολύ διαφορετική από την βακτηριακή ενδοκύττωση ή την εισβολή ιών στα κύτταρα. Το μοντέλο (εικόνα 3) που έχει μέχρι σήμερα διαμορφωθεί (Sidley, 2004) προτείνει ότι αρχικά το παράσιτο προσκολλάται στο κατάλληλο κύτταρο στόχο του. Στο σημείο αυτό αποκτά τον κατάλληλο προσανατολισμό έτσι ώστε η εξειδικευμένη apical περιοχή του να έρχεται σε επαφή με την μεμβράνη του προσβαλλόμενου κυττάρου και τελικά σχηματίζεται μία στενή σύνδεση μετά από έκκριση των προϊόντων των micronemes. Αυτή η σύνδεση μεταξύ του παρασίτου και της μεμβράνης του κυττάρου στόχου μετακινείται προς το οπίσθιο τμήμα του παρασίτου τραβώντας την μεμβράνη του κυττάρου στόχου μαζί της. Η κίνηση γίνεται λόγω μεταφοράς των πρωτεϊνών των micronemes από το σύστημα ακτομουσίνης του παρασίτου που είναι προσαρμοσμένο στην εσωτερική μεμβράνη του (Gaskins et al. 2004). Πρόσφατα στο *Plasmodium* και στο *Toxoplasma* ανιχνεύθηκαν οι μοριακοί συνδέτες του κυτταροσκελετικού συστήματος του παρασίτου και της κυτταροπλασματικής ουράς των διαμεμβρανικών προϊόντων των micronemes οι αλδολάσες. Στην συνέχεια πραγματοποιείται έκκριση των προϊόντων των rhoptries τα οποία συνεισφέρουν στην δημιουργία του παρασιτικού κυστιδίου. Τέλος αφού η είσοδος του παρασίτου στο κύτταρο ολοκληρωθεί γίνεται έκκριση των προϊόντων των dense granules. Ωστόσο, στα είδη του *Plasmodium* η έκκριση

των προϊόντων των dense granules γίνεται και σε ένα πιο πρώιμο στάδιο όπου δεν έχει ολοκληρωθεί η εισβολή του παράσιτου στο κύτταρο.

- Attachment via Microneme contents
- Rhoptry protein secretion
- Entry of parasite using actin-myosin motor
- Treadmilling of microneme proteins
- Formation of parasitophorous vacuole (PV)
- Microneme proteins in moving junction but not PV
- Parasite in PV with mitochondria and ER surrounding
- Secretion of dense granules
- Microneme proteins shed into media



Εικόνα 3: Μηχανισμός της εισβολής του *T. gondii* στο κύτταρο όπου πραγματοποιείται διαδοχική έκκριση των προϊόντων των **micronemes** (κόκκινο), των **rhoptries** (πορτοκαλί) και των **dense granules** (μπλε). Οι σημαντικότερες διαδικασίες του μηχανισμού περιγράφονται περιληπτικά δίπλα από το κάθε στάδιο.

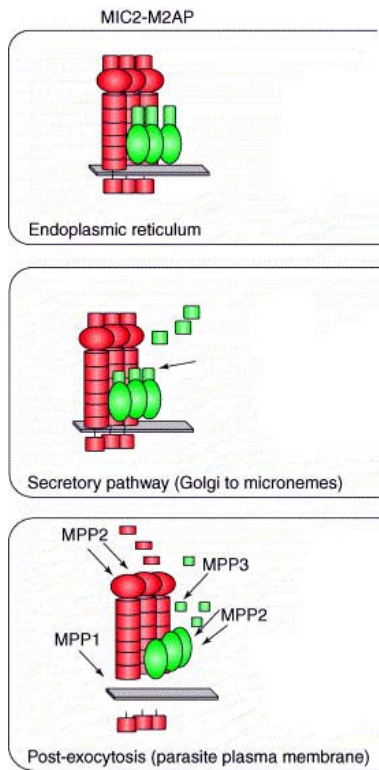
1.3 Ενδείξεις για τον κρίσιμο ρόλο πρωτεασών στον μηχανισμό εισβολής των παράσιτων.

Από μελέτες για την ανίχνευση της λειτουργικότητας των προϊόντων των εκκριτικών οργανιδίων των παρασίτων έχουν προκύψει σημαντικά δεδομένα που υποδεικνύουν την πρωτεολυτική τροποποίηση πολλών από τα μόρια αυτά. Συγκεκριμένα φαίνεται ότι πολλά πρωτεϊνικά μόρια υφίστανται πρωτεολυτικές τροποποιήσεις και κατά την μεταφορά τους διαμέσου του εκκριτικού μονοπατιού αλλά και κατά την έκκρισή τους από το παράσιτο. Ιδιαίτερα σημαντικό, είναι ότι πολλές από τις πρωτεολυτικές τροποποιήσεις είναι απαραίτητες προκειμένου το παράσιτο να εισβάλει στα κύτταρα στόχους του. Στα *Apicomplexa* που έχουν μελετηθεί το φαινόμενο των τροποποιήσεων αυτών μοιάζει πολύ με το φαινόμενο της πρωτεόλυσης η οποία γίνεται με σχηματισμό εξειδικευμένων εκκριτικών κυστιδίων στα κύτταρα των θηλαστικών. Για παράδειγμα η τροποποίηση της ινσουλίνης έχει ως αποτέλεσμα την έκκρισή της από το μη συστατικό εκκριτικό μονοπάτι των κυττάρων (Zhang et al. 2001) και πραγματοποιείται από μέλη της ομάδας Kex-2 της υπερικογένειας των πρωτεασών σερίνης Subtilisin. Τα rhoptries θεωρούνται ανάλογα των πολυκυστιδικών εκκριτικών οργανιδίων που εντοπίζονται στα κύτταρα των θηλαστικών (Shaw et al. 1998).

Μέχρι σήμερα, έχουν μελετηθεί καλύτερα οι τροποποιήσεις που υφίστανται οι πρωτεΐνες των micronemes. Τα μόρια αυτά μεταφέρονται ως σύμπλοκα στα micronemes μέσω του ενδοπλασματικού δικτύου (ER) και του συστήματος Golgi. Σε κάθε σύμπλοκο εντοπίζεται μία πρωτεΐνη, η οποία έχει μία διαμεμβρανική και μία κυτταροπλασματική περιοχή. Η πληροφορία για την

μεταφορά στα micropores βρίσκεται στην C-τελική περιοχή της (Di Cristina et al. 2000) και για αυτόν τον λόγο αποκαλείται «συνόδος» (Meissner et al. 2002). Με πειράματα γενετικής φαίνεται ότι η παρουσία των συνοδών μορίων είναι απαραίτητη για την σωστή μεταφορά των συμπλόκων στα micropores (Reiss et al. 2001) και επομένως για την επαρκή είσοδο του παρασίτου στα κύτταρα στόχους του. Επιπροσθέτως, τα σύμπλοκα αυτά περιέχουν συνήθως μία πρωτεΐνη η οποία υφίσταται πρωτεολυτικές τροποποιήσεις κατά την μεταφορά τους διαμέσου του εκκριτικού μονοπατιού (Garcia-Reguet et al. 2001, Rabenau et al. 2001).

Μετά την τοποθέτηση των πρωτεϊνών των micropores στην πλασματική μεμβράνη του παράσιτου και την αλληλεπίδραση τους με μόρια υποδοχείς των κυττάρων στόχων, τα μόρια αυτά υφίστανται επιπλέον τροποποιήσεις. Η καλύτερα μελετημένη περίπτωση είναι αυτή του TgMIC2-TgM2AP συμπλόκου (εικόνα 4), το οποίο πρωτεολύεται από τρεις υποθετικές πρωτεάσες τις MMP1, MMP2 και MMP3 (micropore protease 1, 2 & 3) στο *Toxoplasma* (Carruthers et al. 2000). Η δράση της MMP1 έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση της διαλυτής εξωκυτταροπλασματικής περιοχής της TgMIC2 καθώς της TgM2AP που σχηματίζει σύμπλοκο μαζί της στο εξωκυττάριο μέσο. Γεγονός που είναι πολύ κρίσιμο για την εισβολή του παράσιτου στο κύτταρο (Brossier et al. 2003). Μεταλλάγματα της TgMIC2 στα οποία δεν γίνεται η παραπάνω τροποποίηση μεταφέρονται κατά την είσοδο του παράσιτου προς το οπίσθιο τμήμα του άλλα παραμένουν ενωμένα στην επιφάνεια του σε σύμπλοκο, με την M2AP. Παράσιτα που φέρουν αυτά τα μεταλλάγματα φαίνεται ότι προσκολούνται καλύτερα στην μεμβράνη των κυττάρων στόχων. Ωστόσο, είναι λιγότερο ικανά στο να εισβάλουν στα κύτταρα. Επομένως για να πραγματοποιηθεί αποτελεσματική είσοδος του παράσιτου στο κύτταρο τα σύμπλοκα που εξυπηρετούν την πρόσδεση του παράσιτου στην κυτταρική μεμβράνη του ξενιστή πρέπει σε δεύτερη φάση να απελευθερώνονται. Η θέση πρωτεόλυσης της TgMIC2 από την MMP1 έχει εντοπισθεί μέσα στην διαμεμβρανική της περιοχή (Ortiz et al. 2002). Και στα είδη του *Plasmodium* καθώς και σε άλλα *Apicomplexa* οι ομόλογες πρωτεΐνες της TgMIC2 έχουν συντηρημένη την θέση αυτή της πρωτεόλυσης στο διαμεμβρανικό τους τμήμα (Soldati et al. 2001). Η PbTRAP (thrombospondin-related anonymous protein) ομόλογη της TgMIC2 (Bhanot et al. 2003) στο *Plasmodium berghei* πρωτεολύεται φυσιολογικά όταν εκφράζεται στο *T.gondii*. Επομένως, η TRAP είναι ένα πιθανό υπόστρωμα της MMP1 αν και αυτή η διαμεμβρανική τροποποίηση δεν έχει αποδειχθεί στο σύστημα του *Plasmodium berghei*.



Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση των ενδοπρωτεολυτικών τροποποιήσεων του TgMIC2-TgM2AP συμπλόκου. Οι τροποποιήσεις γίνονται κατά την μεταφορά του συμπλόκου στο εκκριτικό μονοπάτι και στην μεμβράνη του παράσιτου όταν πια το σύμπλοκο έχει αλληλεπιδράσει με μόρια υποδοχείς του κυττάρου στόχου. Η TgMIC2 απεικονίζεται με κόκκινο και η TgM2AP με πράσινο.

Η TgAMA1 πρωτεΐνη των micronemes υφίσταται τροποποιήσεις στο N-άκρο της κατά την έκκριση της και αποβάλλεται από την επιφάνεια του παράσιτου λόγω πρωτεόλυσης πιθανά μέσα στην διαμεμβρανική της περιοχή (Hehl et al. 2000). Η ομόλογη της AMA1 έχει μελετηθεί καλύτερα στο *P. Falciparum* (PfAMA1). Έχει αποδειχθεί ότι η πρωτεολυτική επεξεργασία του μορίου αυτού είναι κρίσιμη για την εισβολή του παράσιτου στα αιματοκύτταρα (Dutta et al. 2003). Μετά από αφαίρεση του προπεπτιδίου η PfAMA1 τροποποιείται σε δύο θέσεις στην επιφάνεια του παράσιτου. Τα δύο προϊόντα των 44 kDa και των 48 kDa παραμένουν ενωμένα ως σύμπλοκο μέσω δισουλφιδικών δεσμών. Απομάκρυνση του εξωκυτταρικού τμήματος της PfAMA1 από την επιφάνεια του παράσιτου (Howell et al. 2003) γίνεται με απελευθέρωση της μορφής των 48 kDa, ή των 44 kDa. Η πρωτεάση που ευθύνεται για αυτήν την τροποποίηση, αναστέλεται από PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) και κόβει στην θέση AEVT*SNNE (με * αντιπροσωπεύεται η θέση πρωτεόλυσης) ανοδικά της διαμεμβρανικής περιοχής του μορίου.

Με μελέτες αναστολής, έχουν προκύψει δεδομένα τα οποία υποδεικνύουν ότι πρόκειται για την ίδια πρωτεάση που ευθύνεται για την δεύτερη τροποποίηση της επιφανειακής πρωτεΐνης PfMSP1 (merozoite surface protein 1) του μεροζωΐτη. Η επιφανειακή πρωτεΐνη του παράσιτου MSP1 πρωτεολύεται σε δύο διακριτά στάδια (Blackman et al. 1994, Fleck et al. 2003). Το προϊόν των τροποποιήσεων αυτών η MSP1-19 μορφή παραμένει στην επιφάνεια του παράσιτου και αποτελείται από δύο EGF-like δομικά

στοιχεία (Citara et al. 1999) τα οποία εμπλέκονται σε ισχυρές αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνικών μορίων του παράσιτου και του κυττάρου στόχου. Αναστολή της ωρίμανσης του MSP1 συνεπάγεται το μπλοκάρισμα της εισόδου του μεροζωΐτη στα ερυθροκύτταρα.

Τέλος, έχει βρεθεί ότι και στα σποροζωΐδια η PfAMA1 πρωτεολύεται με παρόμοιο τρόπο αλλά από μία διαφορετική πρωτεάση, η οποία αναστέλεται από TLCK (*N*-tosyl-L-lysylchloromethane) (Silvie et al. 2004). Επομένως, φαίνεται ότι οι τροποποιήσεις της AMA1 αν και γίνονται από διαφορετικά μόρια είναι πολύ σημαντικές για τον μηχανισμό εισβολής του παράσιτου. Ιδιαίτερα εντυπωσιακό είναι ότι το φαινόμενο αυτό εμφανίζεται σε δύο πολύ διαφορετικά στάδια του κύκλου ζωής του παρασίτου στα οποία στοχεύονται διαφορετικά κύτταρα (αιματοκύτταρα και ηπατοκύτταρα αντίστοιχα).

Πολύ λιγότερα είναι γνωστά για την τροποποίηση των rhoptry πρωτεϊνών. Τα μόρια αυτά είναι τα λιγότερο συντηρημένα στο φύλο των *Apicomplexa*. Πρωτεόλυση των πρωτεϊνών που προορίζονται να εγκατασταθούν στα rhoptries παρατηρείται κατά την βιογένεση των οργανιδίων αυτών (Sam-Yellowe, 1996). Για παράδειγμα στην ROP1 του *T. gondii* παρατηρείται αφαίρεση ενός N-τελικού θραύσματος μέσα ή πολύ κοντά στα rhoptries (Soldati et al. 1998). Άλλες rhoptry πρωτεΐνες όπως οι ROP2, ROP3 και ROP4 επίσης φέρουν ένα προπεπτίδιο του ίδιου μεγέθους με της ROP1 το οποίο αφαιρείται ενδοκυτταρικά. Η σημασία των τροποποιήσεων αυτών δεν έχει διευκρινιστεί. Παρόλα αυτά για την ROP1 φαίνεται ότι ούτε το προπεπτίδιο, ούτε η πρωτεόλυση του απαιτούνται για την στόχευση της στα rhoptries (Bradley et al. 2002).

Επιπλέον μελέτες στο *T. gondii* με τον πρωτεϊνικό αναστολέα III subtilisin (*Z*-Gly-Phe-NHO-BZ-p-OMe) και τον αναστολέα III cathepsin B ([L-3-*trans*-(propylcarbamoyl)orirane-2-carbonyl]-L-isoleucyl-L-proline) έχουν ως αποτέλεσμα την εμφάνιση μη φυσιολογικών rhoptries και την αναστολή του πολλαπλασιασμού των παράσιτων (Shaw et al. 2002). Δεδομένο, που υποδεικνύει την κρίσιμότητα του ρόλου των πρωτεολυτικών τροποποιήσεων για την επιτυχή εισβολή του παράσιτου στο κύτταρο στόχο.

1.4 Υποψήφιες πρωτεάσες που εμπλέκονται στον μηχανισμό εισόδου στα κύτταρα στόχους και στην επιβίωση του παράσιτου.

Καμία από τις πρωτεάσες που εμπλέκονται στην διαδικασία εισβολής του παράσιτου στα κύτταρα δεν έχουν πλήρως ταυτοποιηθεί. Παρόλα αυτά μελέτες στις οποίες έχει χρησιμοποιηθεί μεγάλη γκάμα χημικών αναστολέων πρωτεασών προτείνουν ότι πολλές διακριτές ομάδες πρωτεασών συμμετέχουν στην διαδικασία αυτή (Blackman, 2000). Με συγκρίσεις γενωμικών αλληλουχιών παρασίτων και πειραματικά δεδομένα από μελέτες

στο *Plasmodium* και στο *T.gondii* έχουν ανιχνευθεί πολλά υποψήφια πρωτεολυτικά μόρια. Πρόσφατα, μία μελέτη επισκόπησης της γενωμικής αλληλουχίας του *P. falciparum* παρείχε ένα πολύ ευρύ φάσμα του ρεπερτορίου των πρωτεασών του (Wu et al. 2003). Αναφέρθηκε η ανίχνευση περισσότερων από 92 μόρια με πιθανή λειτουργικότητα πρωτεασών από όλες τις γνωστές τάξεις πρωτεασών (ασπαρτικού, κυστεΐνης, σερίνης και θρεονίνης) όπου για πολλές από αυτές πιθανολογείται ότι έχουν πολύ σημαντικό ρόλο στην διαδικασία εισβολής του παράσιτου στα κύτταρα.

1.4α Πρωτεάσες κυστεΐνών.

Στο *P. falciparum* έχει εντοπιστεί ένα μεγάλο ρεπερτόριο πρωτεασών κυστεΐνης στο οποίο περιλαμβάνονται οι SERAs (Serine Repeat Antigen), rarpain, calrpain και falcipains. Η οικογένεια των SERAs αποτελείται από 9 μέλη και εμφανίζει πολύ μεγάλη ομολογία με τις rarpain πρωτεάσες, εκτός από ορισμένα μέλη στα οποία το καταλυτικό κατάλοιπο κυστεΐνης έχει αντικατασταθεί από μία σερίνη. Σε μία από αυτές τις περιπτώσεις ανήκει η SERA5, η οποία εκφράζεται και πιθανά εμπλέκεται στην έξοδο των μεροζωϊτών από τα αιματοκύτταρα είτε στην είσοδο τους σε αυτά είτε και στις δύο διαδικασίες (Hodder et al. 2003).

Οι falcipain-2 και 3 εμπλέκονται στην αποικοδόμηση της αιμοσφαιρίνης (Sijwali et al. 2004, Sijwali et al. 2001). Επιπλέον, η falcipain-2 φέρεται να εμπλέκεται και στην απελευθέρωση του μεροζωϊτη πρωτεολύοντας συστατικά του μεμβρανικού σκελετού του ερυθροκύτταρου (Dhawan et al. 2003). Η falcipain-1 εντοπίζεται στο apical άκρο του παράσιτου και είναι ενεργή κατά το στάδιο εισβολής του μεροζωϊτη στα κύτταρα στόχους του. Με μελέτη όπου πραγματοποιήθηκε μεγάλης κλίμακας σάρωση εξειδικευμένων χημικών συστατικών που αναστέλουν την falcipain-1, αποδείχθηκε ότι η πρωτεάση αυτή εμπλέκεται στην παραπάνω διαδικασία (Greenbaum et al. 2002).

Στο *T. gondii*, η toxopain-1, παράγεται σε μία πρόδρομη μορφή (proproteain) η οποία με αυτοκατάλυση μετατρέπεται σε ενεργό ένζυμο. Με αναστολές πρωτεασών κυστεΐνης που χρησιμοποιήθηκαν έτσι ώστε να μπλοκαριστεί η toxopain-1, προκλήθηκαν βλάβες στον μηχανισμό εισόδου του παράσιτου στα κύτταρα καθώς και στην πρωτεολυτική επεξεργασία των πρωτεϊνών των rhoptries (ROP2, ROP3 & ROP4) (Que et al. 2002). Ένα δεύτερο γονίδιο που κωδικοποιεί την toxopain-2 έχει εντοπισθεί στο *T. gondii* και αποτελεί ένα πιθανό ομόλογο της falcipain-1 μέχρι στιγμής όμως δεν έχει πραγματοποιηθεί ο λειτουργικός χαρακτηρισμός του.

1.4β Πρωτεάσες ασπαρτικού οξέος.

Στο γονιδίωμα του *P. falciparum* έχουν εντοπισθεί δέκα πρωτεάσες ασπαρτικού οξέος οι επονομαζόμενες Plasmeprin I, II, IV-X και μία HAP (histo-aspartyl protease) ή Plasmeprin III. Οι Plasmeprins εμφανίζουν ομολογία με τις cathepsins D και F και την pepsinogen A των θηλαστικών (Coombs et al. 2001). Οι Plasmeprins I, II, IV και η HAP εμπλέκονται στην αποικοδόμηση της αιμοσφαιρίνης (Coombs et al. 2001, Banerjee et al. 2002). Στις Plasmeprins V-X όμως, η λειτουργικότητά τους δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί. Σε μία πρόσφατη ανάλυση της χρονικής μεταβολής του μεταγραφικού προτύπου έκφρασης γονιδίων σε αιματοκυτταρικά αναπτυξιακά στάδια, οι Plasmeprins IX και X χαρακτηρίστηκαν σημαντικές για την εισβολή του παρασίτου στα κύτταρα (Bozdech et al. 2003). Η πολύ αυστηρή ρύθμιση της μεταγραφικής ακολουθίας κατά την ανάπτυξη του παράσιτου, επέτρεψε την ενοχοποίηση γονιδίων που πιθανά εμπλέκονται στην διαδικασία εισόδου του *P. falciparum* στα ερυθροκύτταρα. Στην συγκεκριμένη μελέτη οι Plasmeprins IX και X ενοχοποιήθηκαν λόγω του ότι το χρονικό πρότυπο έκφρασής τους ακολουθούσε το πρότυπο έκφρασης άλλων πρωτεϊνών οι οποίες είναι γνωστό ήδη ότι συμμετέχουν στην παραπάνω διαδικασία.

Στο παράσιτο *Eimeria tenella* έχει ανιχνευθεί μία αντίστοιχη πρωτεάση των Plasmeprins IV και X. Η Eimeprin, εντοπίζεται στην apical άκρη του πρωτόζωου λίγο πριν αυτό εισβάλει στα κύτταρα στόχους του (Jean et al. 2000), ενδεχομένως λοιπόν να συμμετέχει στο φαινόμενο αυτό πραγματοποιώντας κρίσιμες πρωτεολυτικές τροποποιήσεις. Παρόλα αυτά ο ρόλος της δεν έχει ακόμη αποσαφηνιστεί.

Στο γένωμα του *T. gondii* έχουν βρεθεί 4 γονίδια πρωτεασών ασπαρτικού οξέος. Από αυτά η Toxomeprin-1 μία τύπου II διαμεμβρανική πρωτεάση εμφανίζει σε μεγάλο βαθμό ομοιότητα με την Eimeprin. Ωστόσο, μέχρι στιγμής δεν έχει μελετηθεί θεωρείται όμως σημαντικό μόριο λόγω της πολύ μεγάλης πιθανότητας να εμπλέκεται στον μηχανισμό εισόδου του *T. gondii* στα κύτταρα του ξενιστή.

1.4γ Πρωτεάσες σερινών.

Σε μελέτες που έγιναν με χρήση αναστολέων πρωτεασών σερίνης προτάθηκε ότι η ενεργότητα πρωτεασών σερίνης είναι απαραίτητη για την επιτυχή είσοδο του παράσιτου στα κύτταρα (Blackman, 2000). Γονίδια της οικογένειας θρυψίνης-χυμοθρυψίνης πρωτεασών σερίνης δεν εντοπίζονται στα *Apicomplexa*. Αντίθετα εντοπίζονται γονίδια με ομολογία στις subtilisin πρωτεάσες σερινών. Οι subtilases είναι εκκρινώμενες πρωτεάσες σερινών που εμφανίζονται τόσο σε προκαρυωτικούς όσο και σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς.

1.4γι Subtilisins

Η λειτουργία δύο πρωτεασών της υπεροικογένειας των subtilases, PfSUB-1 και PfSUB-2 έχει διερευνηθεί εκτεταμένα στο σύστημα του *P. falciparum* λόγω της μεγάλης πιθανότητας εμπλοκής τους στην διαδικασία εισβολής του παράσιτου στα κύτταρα στόχους του (Blackman, 2000). Για την PfSUB-1 αναφέρθηκε η συσώρευση της στα dense granules οργανίδια και η απελευθέρωση της στην μεμβράνη του παράσιτου την ίδια χρονική στιγμή που γίνεται και η εισβολή του μεροζωΐτη στα ερυθροκύτταρα. Για αυτόν τον λόγο, αρχικά θεωρήθηκε ότι ευθύνεται για την δεύτερη τροποποίηση της MSP-1 (Blackman et al. 1998). Η PfSUB-1 τροποποιείται με αυτοκατάλυση (Blackman et al. 1998, Sajid et al. 2000) και τα δύο θραύσματα που προκύπτουν μπορούν και αλληλεπιδρούν με το προ-πεπτίδιο της, το οποίο έχει ανασταλτική δράση στην ώριμη πρωτεάση (Sajid et al. 2000, Jean et al. 2003). Όμως, η αλληλουχία των αμινοξέων που η PfSUB-1 προτιμά να πρωτεολύει, μετά από ένα κατάλοιπο ασπαρτικού (Sajid et al. 2000, Withers-Martinez et al. 2002) είναι μη συμβατή με την αμινοξική αλληλουχία της δεύτερης πρωτεολυτικής τροποποίησης της MSP-1 η οποία γίνεται μετά από ένα κατάλοιπο λευκίνης (Blackman et al. 1991). Επιπλέον, πεπτίδια τα οποία αναστέλουν την PfSUB-1 δεν φάνηκε να μπλοκάρουν την είσοδο του μεροζωΐτη στα ερυθροκύτταρα (Jean et al. 2003). Επομένως, η υπόθεση που είχε διαμορφωθεί για την PfSUB-1 απορίφθηκε και οι πρωτεΐνες στόχοι της δεν έχουν ανιχνευθεί.

Η PfSUB-2 είναι μία τύπου I μεμβρανική πρωτεΐνη που εκφράζεται στο στάδιο των ώριμων schizonts (στάδιο στο οποίο πολλοί μεροζωΐτες έχουν πολλαπλασιαστεί μέσα στα ερυθροκύτταρα) και ενδοκυτταρικά εντοπίζεται στα dense granules (Barale et al. 1999, Hackett et al. 1999). Το ένζυμο τροποποιείται μετα-μεταφραστικά σε δύο διακριτά στάδια όπου παράγεται αρχικά ένα θραύσμα των 74 kDa και στην συνέχεια ένα μικρότερο των 72 kDa (Hackett et al. 1999). Στο σύστημα του *P. berghei* η PbSUB-2 είναι απαραίτητη για την εισβολή του παράσιτου στα ερυθροκύτταρα (Uzureau et al. 2004). Έμμεσες ενδείξεις (Barale et al. 1999, Hackett et al. 1999) και μεγάλη αμινοξική ομοιότητα στην θέση που γίνεται η δεύτερη τροποποίηση της MSP-1 (Barale et al. 1999, Blackman et al. 1992) με την θέση αυτοκατάλυσης της SUB2 ενοχοποιούν την πρωτεάση αυτή για την παραπάνω λειτουργία. Σημαντικά στοιχεία, υποδεικνύουν ότι η ίδια πρωτεάση που ευθύνεται για την δεύτερη τροποποίηση του MSP-1 ευθύνεται και για την απομάκρυνση του εξωκυτταρικού τμήματος της PfAMA1 από την επιφάνεια του παράσιτου (Howell et al. 2003). Τέλος, κατά την προσβολή των επιθηλιακών κυττάρων του μεσεντέρου του κουνουπιού παρατηρήθηκε

έκφραση της PbSUB2 στο στάδιο του ωοκινέτη (παρασιτικό στάδιο που εισβάλλει στα επιθηλιακά κύτταρα του μεσεντέρου του φορέα) και έκκριση της στο κυτταρόπλασμα των προσβαλλόμενων κυττάρων (Han et al. 2000). Επιπροσθέτως, με πρωτεομική ανάλυση ανιχνεύθηκε και σε γαμετοκύτταρα (Florens et al. 2000). Όλα αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ένα πιθανώς ευρύ φάσμα λειτουργικότητας της SUB-2, πιθανή ποικιλότητα των υποστρωμάτων της και συμμετοχή της σε σημαντικές βιολογικές αλληλεπιδράσεις του παράσιτου τόσο με τον ξενιστή όσο και με τον φορέα.

Στο *T. gondii* έχουν επίσης ανιχνευθεί δύο subtilases. Η TgSUB-1 αναγνωρίζεται από ένα anti-PfSUB-1 αντίσωμα, γεγονός που αποδεικνύει ότι τα δύο μόρια έχουν συντηρημένη διαμόρφωση (Miller et al. 2001). Η TgSUB-1 εντοπίζεται στα micronemes και η πρόδρομη μορφή της των 120 kDa πρωτεολύεται σε διάφορα προϊόντα πιθανά με αυτοκατάλυση (Miller et al. 2001). Ωστόσο, υποστρώματα για το ένζυμο αυτό δεν έχουν ανιχνευθεί μέχρι στιγμής.

Η TgSUB-2 είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη η οποία εντοπίζεται στα rhoptries. Με αυτοκατάλυση στο N-άκρο της από το αρχικό μόριο των 140 kDa προκύπτει αρχικά ένα θραύσμα των 90 kDa και τέλος ένα θραύσμα των 85 kDa (Miller et al. 2003). Λόγω του υποκυτταρικού της εντοπισμού, την δημιουργία συμπλόκου με την ROP1 και την ομοιότητα της αλληλουχίας εξειδίκευσης του υποστρώματος της με την θέση τροποποίησης της ROP1 πιθανολογείται ότι η TgSUB-2 είναι μία πρωτεάση υπεύθυνη για την τροποποίηση των πρωτεϊνών των rhoptries (Miller et al. 2003).

Με ανάλυση της γενωμικής βάσης δεδομένων που μέχρι στιγμής έχει διαμορφωθεί για το *T. gondii* προβλέπεται η ύπαρξη επιπλέον 8 πιθανών πρωτεασών με δραστικότητα subtilisins οι οποίες δεν έχουν χαρακτηριστεί. Και στο γένωμα του *P. falciparum* έχει ανιχνευθεί μία τρίτη subtilisin η PfSUB-3 η οποία δεν έχει ακόμα χαρακτηριστεί. Οι πρωτεΐνες των rhoptries στα είδη του *Plasmodium* τροποποιούνται και πιθανολογείται ότι η υπεύθυνη πρωτεάση για αυτές τις τροποποιήσεις είναι η PfSUB-3, γιατί οι άλλες δύο subtilisins που έχουν βρεθεί εντοπίζονται στα dense granules.

1.4γii Rhomboid-like πρωτεάσες σερίνης.

Μία οικογένεια πολυτοπικών μεμβρανικών rhomboid-like πρωτεασών σερίνης έχει εντοπισθεί και είναι αρκετά συντηρημένη στο φύλο των *Apicomplexa*. Στο *T. gondii* έχουν ανιχνευθεί μέχρι σήμερα πέντε γονίδια αυτού του τύπου πρωτεασών. Οι TgROM1-5 εμφανίζουν διαφορετικό πρότυπο έκφρασης κατά τον κύκλο ζωής του παράσιτου και εντοπίζονται σε διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα του εκκριτικού μονοπατιού. Σε πειράματα όπου χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα διαμεμβρανικές

πρωτεΐνες των micronemes (TgMIC2, TgMIC6 και TgMIC12) και Rhomboid-1 της *Drosophila melanogaster* ή της ανθρώπινη RHDLB-2, αποδείχθηκε ότι οι πρωτεάσες αναγνώριζαν ως υποστρώματα τους τις πρωτεΐνες των micronemes (Urban et al. 2003). Αυτά τα αποτελέσματα καθιστούν πιθανούς υποψήφιους με δραστικότητα MMP1 τα μέλη της οικογένειας των rhomboid-like πρωτεασών. Οι TgROM1, TgROM2 και TgROM4 εντοπίζονται στα micronemes, στο Golgi και στην πλασματική μεμβράνη αντίστοιχα. Σε προηγούμενη μελέτη η MMP1 ενεργότητα είχε εντοπιστεί μόνιμα στην πλασματική μεμβράνη (Optiz et al. 2002). Φαίνεται λοιπόν ότι στην περίπτωση αυτή η TgROM4 αποτελεί έναν ιδανικό υποψήφιο πρωτεάσης με δραστικότητα MMP1. Ωστόσο, περισσότερα πειραματικά δεδομένα απαιτούνται προκειμένου να αποσαφηνιστεί ο ρόλος αυτής της νέας οικογένειας πρωτεασών στα *Apicomplexa*.

1.5 Αναστολείς πρωτεασών σερίνης.

Πολλοί τύποι αναστολέων πρωτεασών σερίνης έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί σε μοριακό και βιοχημικό επίπεδο. Στα ασπόνδυλα οι καλύτερα μελετημένοι αναστολείς είναι αυτοί της αιμολέμφου των αρθρόποδων (Kanost, et al 1999) και ορισμένων καρκινοειδών. Οι αναστολείς αυτοί έχουν κατηγοριοποιηθεί σε διάφορες οικογένειες ανάλογα με την αμινοξική τους αλληλουχία και τον τρόπο που αναστέλουν. Οι οικογένειες που έχουν διαμορφωθεί είναι η Kazal, η Kunitz, η $\alpha 2$ -macroglobulin και τέλος η υπεροικογένεια των σερπινών στην οποία θα γίνει εκτεταμένη αναφορά λόγω της χρήσης στην μελέτη του ρόλου των πρωτεασών TgSUB-2, PbSUB2 και PfSUB-1.

1.5α Η υπεροικογένεια των σερπινών (Serine Protease Inhibitors).

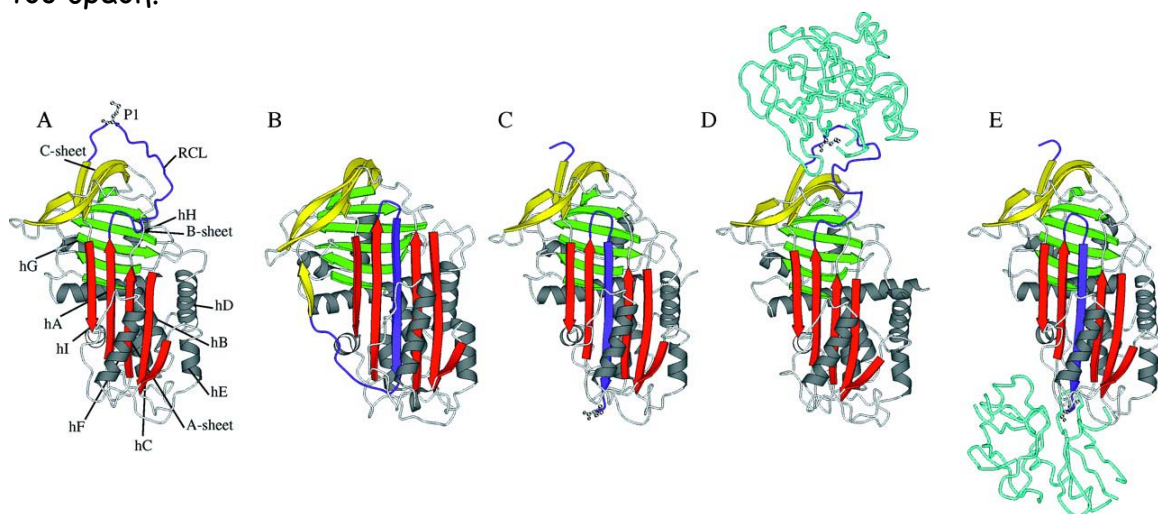
Η υπεροικογένεια των σερπινών συνιστά μία πολύ μεγάλη ομάδα αναστολέων πρωτεασών σερίνης. Οι πρωτεΐνες αυτές έχουν την ίδια συντηρημένη δομή και ίδιο μηχανισμό δράσης, όπου ενεργούν ως αυτοκτονικά υποστρώματα πρωτεασών σερίνης (Potempa et al. 1994).

Η ανασταλτική τους δράση ενεργοποιείται μετά από ένα πρωτεολυτικό κόψιμο ενός δεσμού προκαλώντας σημαντικές αλλαγές στην διαμόρφωσή τους (εικόνα 5). Η ενεργή διαμόρφωση των σερπινών χαρακτηρίζεται από μία συντηρημένη δευτεροταγή δομή τριών β -φύλλων και τυπικά εννέα α -ελικών (Stein et al. 1995). Το εκτεθειμένο καρβοξυτελικό τους άκρο (reactive site loop ή RSL), προσαρμοσμένο μεταξύ των β -φύλλων A και C είναι ένα εκτεθειμένο εύκαμπτο τμήμα αμινοξικών καταλοίπων. Η περιοχή αυτή δρα ως δόλωμα μιμούμενη την θέση πρωτεόλυσης του δεσμού P1-P1' που αναγνωρίζουν οι πρωτεάσες στόχοι της σερπίνης.

Στην κυρίως δομική διαμόρφωση των σερπινών (native state) η RSL είναι εκτεθειμένη και εύκολα προσιτή από τις πρωτεάσες (εικόνα 5A). Με κόψιμο του προσβάσιμου δεσμού της RSL, όταν η σερπίνη αλληλεπιδρά με την πρωτεάση στόχο της, η δομή του RSL εισέρχεται μέσα στο A β -φύλλο. Το κόψιμο του δεσμού αυτού σχετίζεται με μία αύξηση στην σταθερότητα, λόγω αλλαγής στην διαμόρφωση του μορίου σε μία πιο χαλαρή κατάσταση (R) (εικόνα 5E). Η αλλαγή αυτή απαιτείται για να δράσει η σερπίνη ανασταλτικά. Μία εναλλακτική χαλαρή διαμόρφωση που έχει παρατηρηθεί είναι η λανθάνουσα διαμόρφωση (εικόνα 5B) όπου η RSL εισάγεται μέσα στο A β -φύλλο με αποτέλεσμα τμήμα του C β -φύλλου να εξάγεται προς τα έξω. Σε αυτήν την λανθάνουσα μορφή οι σερπίνες δεν έχουν ανασταλτική δράση μπορούν όμως να επανέλθουν στην κύρια διαμόρφωση μετά από διαδικασίες αποδιάταξης και επαναδίπλωσης τους. Αντίθετα, οι σερπίνες στις οποίες έχει

κοπεί ο δεσμός της RSL περιοχής δεν μπορούν να ξαναενεργοποιηθούν (εικόνα 5C).

Ο ανασταλτικός μηχανισμός συνεπάγεται την δημιουργία ενός πολύ σταθερού (SDS-σταθερού) και μη αναστρέψιμου συμπλόκου σερπίνης-πρωτεάσης. Η πρωτεάση αρχικά σχηματίζει ένα μη-ομοιοπολικά συνδεδεμένο σύμπλοκο με την σερπίνη (Michaelis-like complex), αλληλεπιδρώντας με τα κατάλοιπα της RSL που περιβάλλουν την θέση πρωτεόλυσης του δεσμού P1-P1'. Με προσέγγιση του P1-P1' δεσμού από την πρωτεάση, σχηματίζεται ένα ακυλιωμένο ενδιάμεσο μεταξύ του P1 καταλοίπου της σερπίνης και της ενεργής σερπίνης της πρωτεάσης και τελικά επακολουθεί κόψιμο του δεσμού αυτού (Gettins et al. 1996). Στο σημείο αυτό η RSL περιοχή εισέρχεται μέσα στο A β-φύλλο συμπαρασύροντας μαζί της και την πρωτεάση. Έτσι, η πρωτεάση μετακινείται κατά 70 Å και το ενεργό της κέντρο παραμορφώνεται λόγω συμπίεσης της προς την βάση της σερπίνης (εικόνα 5E). Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η κινητική παγίδευση του ακυλιωμένου ενδιάμεσου. Εάν, η μετακίνηση της RSL παρεμποδιστεί, η πρωτεάση μπορεί επιτυχώς να ολοκληρώσει την πρωτεόλυση του P1-P1' πραγματοποιώντας και το στάδιο της απακετυλίωσης. Σε μία τέτοια περίπτωση η πρωτεάση απελευθερώνεται και η σερπίνη έχει μετατραπεί σε ένα μόριο που έχει χάσει την ανασταλτική του δράση.



Εικόνα 5: Η RSL υποδεικνύεται με μπλε. Οι 9 α-έλικες (hA-hI) με γκρι. Τα 3 β-φύλλα με κόκκινο (A), με πράσινο (B) και κίτρινο (C) αντίστοιχα. Στις εικόνες 5D&E η πρωτεάση που αλληλεπιδρά με την σερπίνη υποδεικνύεται με γαλάζιο. A. Σερπίνη σε native μορφή με την RSL εκτεθειμένη. B. Σερπίνη σε λανθάνουσα μορφή όπου η RSL έχει εισέρθει μέσα στο A β-φύλλο. C. Κομμένη και ανενεργή σερπίνη. D. Σύμπλοκο Michaelis που σχηματίζεται πριν το πρωτεολυτικό κόψιμο στον P1-P1' δεσμό. E. Παγιδευμένη πρωτεάση σε σταθερό σύμπλοκο με την σερπίνη.

Πολλές περιοχές των σερπινών που έχουν περιγραφεί εμπλέκονται στην ρύθμιση της εισαγωγής του RSL μέσα στο A β-φύλλο και στις αλλαγές της διαμόρφωσης του μορίου (Irving et al. 2000). Η περιοχή των P15-P9 κατάλοιπων της RSL, παρέχει στην σερπίνη την απαραίτητη κινητικότητα για την αλλαγή της διαμόρφωσης της στην R κατάσταση (Hopkins et al. 1993).

Ένα μοτίβο (breach point) που εντοπίζεται στο πάνω όριο του Α β-φύλλου, αποτελεί το σημείο εισόδου της RSL περιοχής. Τέλος, μία περιοχή κοντά στο κέντρο του Α β-φύλλου (shutter) συμβάλλει μαζί με την breach περιοχή στο άνοιγμα του Α β-φύλλου και περιβάλλει την εισερχόμενη RSL. Αντικαταστάσεις αμινοξέων στις παραπάνω περιοχές ή μεταλλαγές ελλείψεων επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα των αλλαγών διαμόρφωσης του μορίου (Silverman et al. 2001). Αντίθετα, με μεταλλαγές στην θέση P1 ενδέχεται να αλλάξει η πρωτεάση στόχος της σερπίνης (Silverman et al. 2001).

Μέχρι σήμερα, μέλη της οικογένειας των σερπινών έχουν βρεθεί σε ίους και σε πολλούς ευκαρυωτικούς οργανισμούς, (φυτά, νηματώδεις, αρθρόποδα και σπονδυλωτά), αλλά δεν έχουν ανιχνευθεί στα πρόκαρυωτικά και στον σακχαρομύκητα (Irving et al. 2000). Τα μέλη της οικογένειας αυτής ανάλογα με την αμινοξική τους αλληλουχία, τα κοινά βιολογικά χαρακτηριστικά που παρουσιάζουν και δεδομένα φυλογενετικών μελετών έχουν κατηγοριοποιηθεί σε πολλές υποομάδες (Silverman et al. 2001). Πρόσφατα, στο κουνούπι *Anopheles gambiae* ανιχνεύθηκε ο γενωμικός τόπος SRPN10 ο οποίος κωδικοποιεί τέσσερις ισομορφές σερπινών τις CAM, FCM, KRAL και RCM (Danielli et al. 2003). Οι σερπίνες αυτές δημιουργούνται με εναλλακτικό μάτισμα και διαφέρουν στο C-άκρο τους, δηλαδή στην περιοχή όπου εντοπίζεται η RSL. Όλες οι ισομορφές εκφράζονται στα περικαρδικά κύτταρα και στα αιμοκύτταρα όπου υποκυτταρικά εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα αυτών των κυττάρων. Επιπλέον, εκφράζονται και στο μεσέντερο του κουνουπιού όπου στην περίπτωση αυτή εντοπίζονται στον πυρήνα των κυττάρων του.

Η μεγάλη ομοιότητα των τεσσάρων αυτών σερπινών με τις ον-σερπίνες (onalbumin serpins) σε συνδυασμό με το ότι πολλές από τις ον-σερπίνες εμπλέκονται στην άμυνα των οργανισμών αναστέλοντας μικροβιακές ή ιϊκές πρωτεάσες, οδήγησε στην υπόθεση ότι τα μόρια αυτά δρουν πιθανά ως αντιμικροβιακοί παράγοντες στο κουνούπι. Αποδείχθηκε, ότι τα μεταγραφικά επίπεδα των σερπινών του *Anopheles gambiae* επηρεάζονταν οριακά μετά από μόλυνση του με βακτήρια. Ωστόσο, τα επίπεδα παραγωγής σε δύο ισομορφές, της KRAL και της RCM υπερευθιμίζονταν μετά από διαμόλυνση του κουνουπιού με το παράσιτο *P. berghei*.

Σε πρόσφατη μελέτη κατασκευάστηκε μία τροποποιημένη σερπίνη η α1-PDX με τροποποιημένη την RSL περιοχή της έτσι ώστε να αναστέλει την furin πρωτεάση που ανήκει στην οικογένεια των subtilisins (Jean et al. 1998). Η furin μεταφέρεται μέσα από το δίκτυο του trans-Golgi όπου πρωτεολύει ένα ευρύ φάσμα μορίων στα κύτταρα των θηλαστικών (Nakayama, 1997). Επιπροσθέτως, η πρωτεολυτική δράση της απαιτείται για την ενεργοποίηση πολλών παθογόνων μορίων. Για παράδειγμα πολλές ιϊκές

γλυκοπρωτεΐνες όπως η HIV-1 gp160 και η HCMV χρειάζεται να τροποποιηθούν από την ενδογενή furin προκειμένου να εγκαθιδρυθεί η μόλυνση από τους ιούς (Nakayama, 1997). Δοκιμές της ανασταλτικής δράσης της α1-PDX (Jean et al. 2000a) έδειξαν ότι πρόκειται για έναν πολύ εξειδικευμένο αναστολέα έναντι της furin, που δεν προκαλεί τοξικότητα στα κύτταρα και μειώνει σημαντικά την μόλυνση που προκαλείται από τον HCMV ιό. Η μοριακή τροποποίηση σερπινών είναι πιθανό να οδηγήσει σε μόρια με ιατροφαρμακευτικές ιδιότητες μιας και οι πρωτεολυτικοί μηχανισμοί είναι εξαιρετικά σημαντικοί σε ένα ευρύ φάσμα βιολογικών διεργασιών.

ΣΚΟΠΟΣ

Στην εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε μεταλλαξογένεση της CAM σερπίνης του φορέα της ελονοσίας *Anopheles gambiae*. Η RSL της σερπίνης μεταλλάχθηκε με τέτοιο τρόπο ώστε να αποτελεί δόλωμα για τις πρωτεάσες TgSUB-2, PbSUB2 και PfSUB-1. Ο ρόλος των πρωτεασών αυτών δεν έχει αποσαφηνιστεί ακόμη, αν και υπάρχουν πολύ σημαντικές ενδείξεις ότι τα μόρια αυτά ευθύνονται για κρίσιμα πρωτεολυτικά φαινόμενα κατά την διαδικασία της εισβολής του παράσιτου στα κύτταρα.

Η στρατηγική σημασία της μεταλλαξογένεσης είναι η δημιουργία πιθανών εξειδικευμένων αναστολέων για τις πρωτεάσες αυτές. Η κατασκευή ενός αναστολέα μπορεί να αποτελέσει πολύ χρήσιμο εργαλείο για την μελέτη τους. Επιπλέον, ενδεχόμενη ανασταλτική δράση των πρωτεασών αυτών μπορεί να μπλοκάρει ή τουλάχιστον να καθυστερεί την διαδικασία εισόδου του παράσιτου στα κύτταρα στόχους του παρέχοντας στο ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή το απαραίτητο χρονικό διάστημα να αποκριθεί εμποδίζοντας την μετάδοση της ασθένειας.

Σε προηγούμενη μελέτη πραγματοποιήθηκαν πειράματα *in vitro* αναστολής πρωτεασών που στοχεύονταν από την σερπίνη CAM (Danielli et al. 2003). Ανάμεσα στις διάφορες πρωτεάσες που δοκιμάστηκαν βρέθηκε ότι η CAM ήταν πολύ ισχυρός αναστολέας βακτηριακών subtilisins. Λόγο του ότι οι TgSUB-2, PbSUB2 και PfSUB-1 ανήκουν και αυτές στην οικογένεια των subtilisins, η CAM θεωρήθηκε ένας πολύ καλός υποψήφιος για την κατασκευή εξειδικευμένων αναστολέων με μοριακή τροποποίηση της RSL περιοχής της. Η προσέγγιση αυτή ενισχύεται και από το γεγονός του ότι στο παρελθόν υπήρξαν βιβλιογραφικές αναφορές εξειδικευμένου αναστολέα της furin, μίας πρωτεάσης που ανήκει στην υπέρ-οικογένεια των subtilisins (Dahlen et al. 1998, Jean et al. 1998, Jean et al. 2000a), από σερπίνη μοριακά τροποποιημένη στην RSL περιοχή.

Αποτελέσματα

2. Αποτελέσματα.

2.1 Κατασκευή του SAD αναστολέα της PfsSUB1 με μεταλλαξογένεση της CAM σερίνης.

Με μελέτες που έχουν γίνει για την PfsSUB1 έχουν υπάρξει πολλά δεδομένα για την δομή της, τον τρόπο που τροποποιείται μετα-μεταφραστικά και την εξειδίκευση του υποστρωματός της. Η έκφραση της PfsSUB1 παρατηρείται μόνο στα παρασιτικά στάδια του αίματος του ξενιστή, ενώ υποκυτταρικά εντοπίζεται στα *dense granules*. Μέχρι σήμερα ο λειτουργικός της ρόλος και τα φυσιολογικά της υποστρώματα δεν έχουν βρεθεί. Φαίνεται ότι το μόριο αυτό πιθανά δεν έχει εξωκυτταρική λειτουργία γιατί απελευθερώνεται κατά την εισβολή του παράσιτου σε μία διαλυτή κομμένη μορφή (Blackman et al. 1998). Η μόνη υπόθεση που υφίσταται μέχρι στιγμής είναι ότι πιθανά εμπλέκεται στην τροποποίηση πρωτεϊνών που εκκρίνονται και παίζουν ρόλο στην είσοδο του παράσιτου στο κύτταρο.

Η PfsSUB1 έχει παραχθεί και απομονωθεί σε καθαρή ενεργή μορφή χρησιμοποιώντας για την έκφραση της το σύστημα του ραβδοϊού (*baculovirus*) και τροποποιώντας κατάλληλα πρωτόκολλα έτσι ώστε να αποφευχθεί η γλυκοζυλίωση της που καθιστούσε το μόριο ανενεργό. Η απομόνωση της σε καθαρή ενεργή μορφή επέτρεψε τον προσδιορισμό πιθανών πεπτιδικών υποστρωμάτων καθώς και την ανάπτυξη δοκιμασιών ενεργότητας. Χρησιμοποιώντας αυτήν την πληροφορία προχωρήσαμε στην κατασκευή του αναστολέα SAD. Η περιοχή γύρω από τα P1-P1' κατάλοιπα της RSL της CAM τροποποιήθηκε με βάση την αλληλουχία του πεπτιδίου Val-Ser-Ala-Asp*Asn (εικόνα 2.1i) το οποίο αναγνωρίζεται και κόβεται από την καθαρισμένη PfsSUB1.

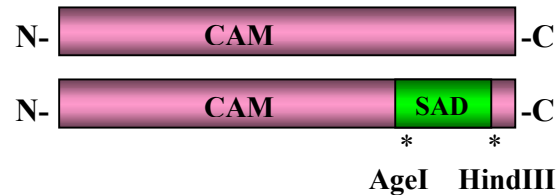
Για την κατασκευή του SAD αναστολέα χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί εκκινήτες. Ο ένας εκ των δύο έφερε την μετάλλαξη για την αλλαγή των αμινοξέων 341-354 μεταξύ των οποίων βρίσκεται ο δεσμός P1-P1' που πρωτεολύεται στην RSL της CAM. Με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) όπου χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα η αλληλουχία της CAM απομονώθηκε το τμήμα του DNA, μεγέθους ~100bp που έφερε την μεταλλαγή. Μετά από διαδοχική πέψη με χρήση των περιοριστικών ενζύμων AgeI και HindIII ο πλασμιδιακός φορέας στον οποίο είχε κλωνοποιηθεί η CAM και το απομονωμένο τμήμα DNA με την SAD μεταλλαγή διασυνδέθηκαν (*ligation*). Οι αποικίες που επιλέχθηκαν λόγω ανθεκτικότητας τους στο αντιβιοτικό της αμπικιλίνης (*Amp*) ελέγχθηκαν για τον αν φέρουν την μεταλλαγή μέσω πέσεων με περιοριστικά ένζυμα (εικόνα 2.1ii) και τελικά με αλληλούχιση (*sequencing*).

εικόνα 2.1i

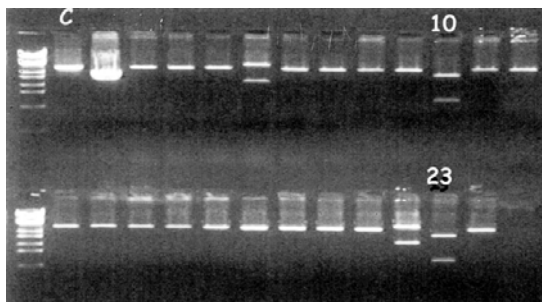
Τροποποίηση του RSL της CAM σε SAD.

V M M T C A M I M Y P M F T
GTG ATG ATG ACG TGC GCA ATG ATT ATG TAC CCT ATG TTT ACG

L V S A D N I D I S G
CTG GTG TCG GCG GAC AAC ATA GAT ATC TCC GGT



Εικόνα 2.1ii



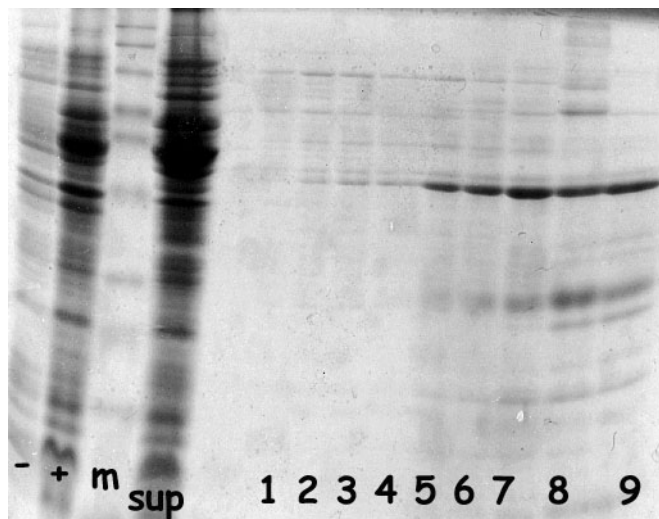
Πέψη απομονωμένου πλασμιδιακού DNA για την ανίχνευση του θετικού κλώνου rQE30/SAD. Το DNA επωάστηκε με τα ένζυμα BamHI & BglII τα οποία κόβουν τα ένθεμα SAD (~1100bp) στα δύο άκρα, ενώ παράλληλα έγινε και μία πέψη ελέγχου (C) με τα ίδια ένζυμα για την κατασκευή rQE30/CAM (C) η οποία δεν κόβεται από την BglII. Οι θετικοί κλώνοι SAD 10 & 23 που απομονώθηκαν ελέγχθηκαν με sequencing.

2.2 Έκφραση και καθαρισμός του SAD αναστολέα.

Προκειμένου να πραγματοποιηθούν *in vitro* πειράματα αναστολής ακολούθησε προσπάθεια απομόνωσης της SAD πρωτεΐνης σε διαλυτή ενεργή μορφή. Η μεταλλαγμένη σερπίνη SAD κλωνοποιήθηκε σε κατάλληλο φορέα (rQE30) ο οποίος φέρει στο 5' άκρο της περιοχής του πολυσυνδετή (polylinker) την αλληλουχία του επίτοπου έξι καταλοίπων ιστιδίνης (6His tag). Με αυτό τον τρόπο τοποθετείται ο επίτοπος στο N-άκρο της πρωτεΐνης, έτσι ώστε να αποφευχθεί οποιαδήποτε δομική επίδραση στην RSL. Το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε για την έκφραση της SAD ήταν το M15(pRep4), το οποίο παρουσία καναμυκίνης διατηρεί ως επίσωμα το pRep4 πλασμίδιο με αποτέλεσμα να καταστέλεται η μεταγραφή του γονιδίου προς έκφραση μέχρι την στιγμή που προστίθεται στα κύτταρα IPTG. Τέλος, με ανοσοαποτύπωση όπου χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα anti-σερπίνης

αποδείχθηκε ότι η παραγόμενη SAD δεν υφίσταται κανένα είδος πρωτεολυτικής τροποποίησης στα βακτηριακά εκχυλίσματα (εικόνα 2.2ii).

Η απομόνωση της πρωτεΐνης έγινε με Ni^{2+} -NTA χρωματογραφία συγγένειας. Τα αποτελέσματα καθαρισμού της πρωτεΐνης δεν ήταν πολύ ικανοποιητικά και παρά τις πολλαπλές προσπάθειες δεν καταφέραμε να έχουμε εντελώς καθαρή SAD πρωτεΐνη (εικόνα 2.2i).

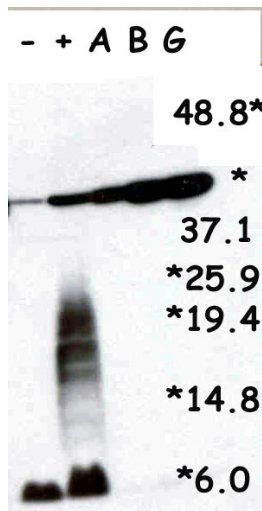


Εικόνα 2.2i : Προσπάθεια καθαρισμού της SAD με Ni^{2+} -NTA σφαιρίδια.

-/+: δείγματα προ και μετά επαγωγής με IPTG. m: marker. sup: το υπερκείμενο του κυτταρικού εκχυλίσματος που φορτώνεται στην κολώνα. 1-9: κλάσματα έκλουσης της SAD με 5, 10, 15, 20, 25, 40, 60, 80 και 100mM συγκέντρωση ιμιδαζολίου αντίστοιχα.

15μl από κάθε δείγμα ηλεκτροφορήθηκαν σε 15% πήκτωμα SDS-ακρυλαμίδης και αναλύθηκαν μετά από βαφή του πηκτώματος με gimsa.

Τα προβλήματα που αντιμετωπίσαμε ήταν η χαμηλή συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο διαλυτό κλάσμα και η συγκέντρωση κυρίως σε σωματίδια έγκλεισης (inclusion bodies). Λόγω του ότι η απομόνωση της πρωτεΐνης από το διαλυτό κλάσμα θα εξασφάλιζε την δομική της ακεραιότητα και κατ'επέκταση την λειτουργικότητα της μειώσαμε την θερμοκρασία στην οποία γίνεται η επαγωγή στους $22-30^{\circ}\text{C}$ και την ποσότητα του IPTG στα $0,1\text{mM}$, έτσι ώστε να αυξήσουμε την συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο διαλυτό κλάσμα. Επιπλέον, για να αυξήσουμε το ποσό της απομονωμένης σερπίνης αυξήσαμε τον όγκο της καλλιέργειας στα 6lt και χρησιμοποιήσαμε όσο το δυνατόν λιγότερη ποσότητα σφαιριδίων Ni^{2+} -NTA στην κολώνα απομόνωσης. Ένα επιπρόσθετο πρόβλημα που εντοπίστηκε ήταν η μη αποτελεσματική πρόσδεση της πρωτεΐνης στα Ni^{2+} -NTA σφαιρίδια. Πιθανά η δομή του N-άκρου στην οποία έχει προστεθεί ο 6xHis επίτοπος εμποδίζει την αποτελεσματική πρόσδεση της πρωτεΐνης στην κολώνα ενώ παράλληλα, εντοπίζεται και μη εξειδικευμένη πρόσδεση πρωτεϊνών. Προκειμένου να αντιμετωπιστούν τα προβλήματα αυτά το κυτταρικό εκχύλισμα επώαστηκε με Triton και πριν την φόρτωση του στην κολώνα προστάθηκε β -Mercaptoethanol, ενώ στα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν προστέθηκε γλυκερόλη.



Εικόνα 2.2ii: ανοσοαποτύπωση της απομόνωσης της SAD πρωτεΐνης. -/+ : δείγματα προ και μετά επαγωγής με IPTG. A, B, G: κλάσματα έκλουσης της SAD με 10, 20 και 250mM συγκέντρωσης ιμιδαζολίου αντίστοιχα. Για την ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιήθηκε αντι-σερπίνης αντίσωμα προκειμένου να ανιχνευθεί η απομονωμένη σερπίνη. Στα κλάσματα έκλουσης A, B, G ανιχνεύεται μόνο η SAD γεγονός που υποδεικνύει ότι η πρωτεΐνη δεν υφίσταται κανένα είδος πρωτεολυτικής τροποποίησης στα δείγματα αυτά. Ωστόσο στα βακτηριακά εκχυλίσματα - & + πιθανά να έχουμε μερική πρωτεόλυση της SAD.

Η σερπίνη SAD έχει σταλεί στα εργαστήριο του M. J. Blackman έτσι ώστε να ελεγχθεί για την ανασταλτική της δράση έναντι της PfsUB1 με τις κατάλληλες δοκιμασίες και με χρήση φθορίζοντων υποστρωμάτων που έχουν αναπτυχθεί στο εργαστήριο αυτό.

2.3 Κατασκευή του LGI αναστολέα της PbSUB2 με μεταλλαξογένεση της CAM σερπίνης.

Η SUB-2 πρωτεάση ανακαλύφθηκε αρχικά στο *Plasmodium falciparum* και στην συνέχεια σε επόμενες μελέτες στο *Plasmodium berghei* αλλά και σε πολλά άλλα είδη του γένους αυτού. Πρόκειται για μία διαμεμβρανική τύπου I πρωτεάση που τροποποιείται μετα-μεταφραστικά σε δύο βήματα, πιθανά με αυτοκατάλυση. Υποκυτταρικά εντοπίζεται και αυτή στα dense granules. Αν και έχει ενοχοποιηθεί ως ένα πολύ σημαντικό μόριο για την διαδικασία της εισβολής του παράσιτου στα κύτταρα στόχους του η λειτουργία της παραμένει άγνωστη μέχρι στιγμής.

Η SUB-2 πρωτεάση δεν έχει παραχθεί σε καθαρή ενεργή μορφή, γεγονός που δεν επιτρέπει την *in vitro* μελέτη της ενζυμικής της ενεργότητας καθώς και τον προσδιορισμό κάποιων πιθανών υποστρωμάτων όπως έγινε στην περίπτωση της PfsUB1. Λόγω του μεγάλου περιεχομένου του γονιδιώματος του *Plasmodium* σε TAs (~82%) τα παρασιτικά γονίδια δεν εκφράζονται ικανοποιητικά σε ετερόλογα συστήματα έκφρασης. Το πρόβλημα αυτό στην περίπτωση της PfsUB1 επιλύθηκε με την αλλαγή του νουκλεοτιδικού περιεχομένου του αντίστοιχου γονιδίου και τον εμπλουτισμό του σε GCs μέσω μίας διαδικασίας αναδόμησης (gene restructuring technique) που βασίστηκε σε ολιγονουκλεοτίδια. Από αυτό το αναδομημένο γονίδιο έγινε τελικά δυνατό να παραχθεί ικανοποιητικά PfsUB1 πρωτεΐνη (Withers-Martinez et al.1999). Αντίστοιχες προσπάθειες αναδόμησης έχουν γίνει και για την PfsUB2. Παρόλα αυτά όμως προσπάθειες να παραχθεί

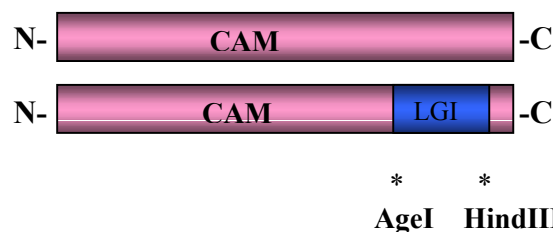
PfSUB2 από αυτό το αναδομημένο γονίδιο σε μία σειρά συστημάτων έκφρασης (βακτηριακό, COS και HepG2 κύτταρα, σύστημα ραβδοϊού και ζυμομύκητα) κατέληξαν όλες σε παραγωγή αδιάλυτης, ανενεργής πρωτεάσης. Επίσης, προσπάθειες δικές μας να παράγουμε PfSUB2 πεπτίδια από κομμάτια DNA που προέρχονταν από τον αναδομημένο cDNA κλώνο της PfSUB2 σε κύτταρα κουνουπιού χρησιμοποιώντας επαγώγιμα συστήματα έκφρασης κατέληξαν σε αποτυχία.

Η έλλειψη καθαρής πρωτεάσης, δοκιμασίας ενεργότητας και η μη γνώση ενός πιθανού υποστρώματος για την SUB-2 κάνει εξαιρετικά δύσκολη την προσέγγιση που επιλέχθηκε στην περίπτωση της PfSUB1. Για τούτο στην περίπτωση αυτή επιλέξαμε να τροποποιήσουμε την περιοχή της RSL της CAM με βάση την παραδοχή ότι η θέση της δεύτερης πρωτεόλυσης της MSP-1 είναι μία πιθανή θέση υποστρώματος της SUB-2. Η θέση αυτή προσδιορίζεται στην εικόνα 2.3i για την περίπτωση της δεύτερης τροποποίησης της MSP-1 του *P. berghei* με τα κατάλοιπα L-G στις θέσεις P1-P1'. Τα κατάλοιπα αυτά είναι επίσης συμβατά με το ότι οι subtilisins της οικογένειας των πυρολυσίνων, όπου οι πλασμοδιακές subtilisins ανήκουν προτιμούν γενικώς υδρόφοβα αμινοξέα (όπως η λευκίνη) στην θέση P1. Η τροποποίηση συνεπώς της CAM με την εισαγωγή της πεπτιδικής αλληλουχίας της δεύτερης τροποποίησης της MSP-1 του *P. berghei* μπορεί να οδηγήσει στην κατασκευή μίας άντι-PbSUB2 σερπίνης.

Εικόνα 2.3i

Τροποποίηση του RSL της CAM σε LGI.

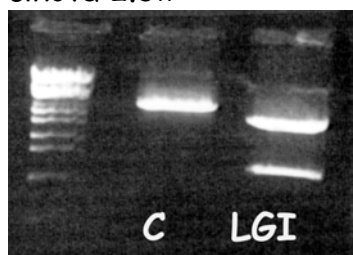
V M M T C A M I M Y P M F T
GTG ATG ATG ACG TGC GCA ATG ATT ATG TAC CCT ATG TTT ACG
 S M D L L G I D P K H
TCG ATG GAT CTG CTC GGA ATT GAT CCG AAA CAT



Για την κατασκευή της LGI πραγματοποιήθηκε PCR με Ταq πολυμεράση και εκκινητές που σχεδιάστηκαν κατάλληλα προκειμένου να απομονωθεί το επιθυμητό τμήμα του DNA από την RSL της CAM με την μεταλλαγή. Το τμήμα αυτό ενσωματώθηκε στον γραμμικό πλασμιδιακό φορέα Τορο-TA, ο οποίος φέρει poly-T 3' άκρα. Με επιλογή άσπρων, ανθεκτικών στην Amp

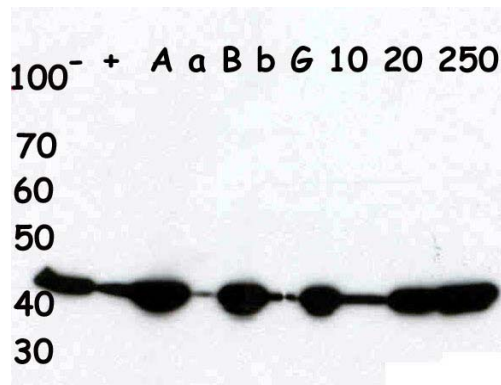
αποικιών επιλέχθηκαν οι πιθανά θετικοί κλώνοι. Με περαιτέρω ανάλυση τους με πέψεις περιοριστικών ενζύμων και αλληλούχιση επιλέχθηκε ο κλώνος Torο-TA/LGI. Ακολούθησε διαδοχική πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα AgeI και HindIII, του πλασμιδιακού φορέα στον οποίο είχε κλωνοποιηθεί η CAM και του Torο-TA/LGI. Το LGI ένθεμα και ο φορέας της CAM διασυνδέθηκαν. Στην συνέχεια οι αποικίες που επιλέχθηκαν λόγω ανθεκτικότητας τους στην Amp ελέγχθηκαν για τον αν φέρουν την μεταλλαγή μέσω πέψεων με περιοριστικά ένζυμα (εικόνα 2.3ii) και αλληλούχιση (sequencing).

εικόνα 2.3ii



Πέψη πλασμιδιακού DNA με τα περιοριστικά ένζυμα BamHI & BglII τα οποία κόβουν στα άκρα του ενθέματος (~1100bp) της pQE30/LGI κατασκευής.
C: πέψη ελέγχου όπου το DNA της κατασκευής pQE30/CAM επώαστηκε με τα ίδια ένζυμα. Η κατασκευή αυτή δεν κόβεται από το BglII ένζυμο.
LGI: Ο θετικός κλώνος LGI αναλύθηκε περαιτέρω με sequencing.

Προκειμένου να προχωρήσουμε σε περαιτέρω πειράματα κρίνεται απαραίτητη η έκφραση και η απομόνωση του αναστολέα LGI. Το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε για την έκφραση της LGI ήταν το M15(pRep4), το οποίο παρουσία καναμυκίνης διατηρεί ως επίσωμα το pRep4 πλασμιδίο με αποτέλεσμα να καταστέλεται η μεταγραφή του γονιδίου προς έκφραση μέχρι την στιγμή που προστίθεται στα κύτταρα IPTG. Αρχικά, έγινε μικρής κλίμακας απομόνωση της LGI με Ni⁺²-NTA σφαιρίδια, όπου φάνηκε πιθανή πρωτεόλυση της LGI στο βακτηριακό εκχύλισμα. Για αυτόν τον λόγο προχωρήσαμε σε ανοσοαποτύπωση της μικρής κλίμακας απομόνωσης της σερπίνης, όπου χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα anti-σερπίνης προκειμένου να διευκρινιστεί εάν η παραγόμενη LGI υφίσταται κάποιο είδος πρωτεολυτικής τροποποίησης στα βακτηριακά εκχυλίσματα (εικόνα 2.3iii). Με την ανάλυση αυτή αποδείχθηκε ότι η παραγόμενη LGI δεν υφίσταται κανένα είδος πρωτεολυτικής τροποποίησης γεγονός που μας επιτρέπει να προχωρήσουμε σε έκφραση και απομόνωση της LGI σε μεγάλη κλίμακα.



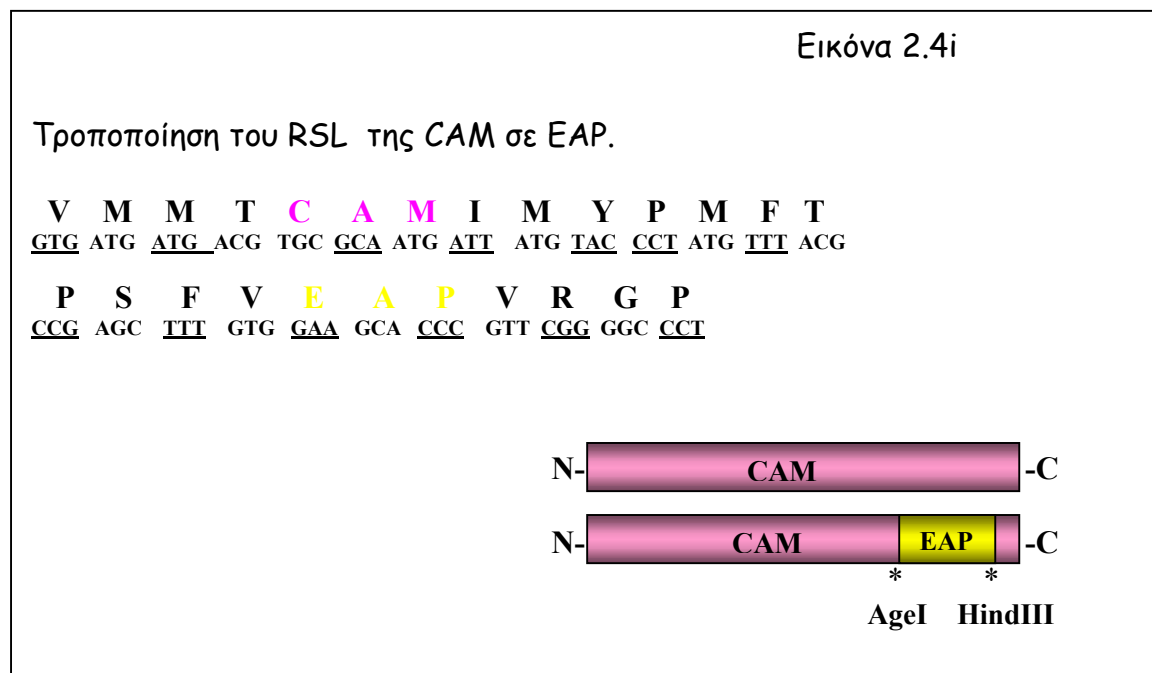
Εικόνα 2.3iii: Ανοσοαποτύπωση της μικρής κλίμακας απομόνωσης της LGI. -/+ : προ και μετά επαγωγής δείγματα. **A&a:** υπερκείμενο και Ni²⁺-NTA σφαιρίδια μετά από 2 hrs επώασης της LGI με τα σφαιρίδια αντίστοιχα. **B&b:** υπερκείμενο και Ni²⁺-NTA σφαιρίδια μετά το πρώτο πλύσιμο (50mM NaH₂PO₄ & 150mM NaCl pH:8) αντίστοιχα. **G&10&20&250:** Ni²⁺-NTA σφαιρίδια και κλάσματα έκλουσης με 10, 20, 250mM συγκέντρωσης ιμιδαζολίου αντίστοιχα. Για την ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιήθηκε αντι-σερπίνης αντίσωμα προκειμένου να ανιχνευθεί η απομονωμένη σερίνη. Στα δείγματα ανιχνεύεται μόνο η LGI γεγονός που υποδεικνύει ότι η πρωτεΐνη δεν υφίσταται κανένα είδος πρωτεολυτικής τροποποίησης στα βακτηριακά εκχυλίσματα.

2.4 Κατασκευή του EAP αναστολέα της TgSUB2 με μεταλλαξογένεση της CAM σερίνης.

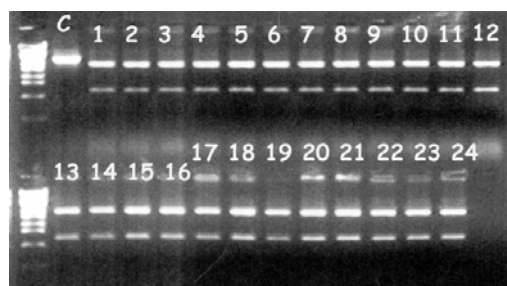
Το γονίδιο που κωδικοποιεί για την TgSUB2 ανιχνεύθηκε λόγω ομολογίας του με το ενεργό κέντρο των subtilisin μέσω PCR (Miller et al. 2003). Η αμινοξική αλληλουχία του εμφανίζει πολύ μεγάλη ομολογία με την PfsUB2. Η TgSUB2 είναι και αυτή μία τύπου I διαμεμβρανική πρωτεΐνη. Πρόσφατα δεδομένα υποδεικνύουν ότι πρόκειται για μία πρωτεάση που παίζει ρόλο στην τροποποίηση των πρωτεϊνών των rhotries. Αν και η θέση των τροποποιήσεων δεν έχει ανιχνευθεί για τις ROP2, ROP4, και ROP8, η ROP1 πρωτεολύεται μετά την θέση SFVE (Bradley et al. 1999). Στην TgSUB2, που προβλέπεται η ιδιότητα αυτοκατάλυσης καθώς επίσης και στις άλλες rhotries πρωτεΐνες που προαναφέρθηκαν εμφανίζεται η αλληλουχία SFXE στις περιοχές που προβλέπεται η πρωτεόλυση (Miller et al. 2003). Μεταλλάγματα της TgSUB2 σε αυτήν την περιοχή δεν πρωτεολύονται in trans από την ενδογενή TgSUB2 όταν εισάγονται στο *T. gondii* με μετασχηματισμό (Miller et al. 2003). Επιπλέον, μελέτες ανοσοκατακρήμνισης δείχνουν ότι η TgSUB2 συγκατακρημνίζεται με την ROP1, γεγονός που υποδηλώνει ότι πιθανά η TgSUB2 είναι το τροποποιητικό ένζυμο της ROP1 (Miller et al 2003). Ωστόσο, περισσότερα πειραματικά δεδομένα απαιτούνται για την διευκρίνηση του ρόλου της TgSUB2.

Ο αναστολέας της EAP σχεδιάστηκε έτσι ώστε να φέρει στην RSL περιοχή την αλληλουχία τροποποίησης της ROP1 (εικόνα 2.4i). Στο μετάλλαγμένο τμήμα του RSL της CAM που απομονώθηκε μέσω PCR με Pfu πολυμεράση προστέθηκαν A άκρα και ακολούθησε κλωνοποίηση στον pGEM-T φορέα. Τελικά, το EAP ένθεμα κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα της CAM όπως και στις δύο προηγούμενες περιπτώσεις. Οι πιθανοί θετικοί

κλώνοι ελέγχθηκαν και πάλι μέσω πέψεων με περιοριστικά ένζυμα (εικόνα 2.4ii) και αλληλούχιση.



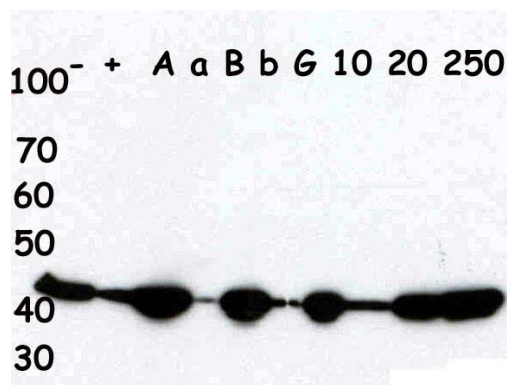
εικόνα 2.4ii



Πέψη πλασμιδιακού DNA για την ανίχνευση του θετικού κλώνου rQE30/EAP. Το DNA επωάστηκε με τα ένζυμα BamHI & BglII τα οποία κόβουν τα ένθεμα EAP (~1100bp) στα δύο άκρα, ενώ παράλληλα έγινε και μία πέψη ελέγχου (C) με τα ίδια ένζυμα για την κατασκευή rQE30/CAM (C) η οποία δεν κόβεται από την BglII. Ο θετικός κλώνος 12 που απομονώθηκε ελέγχθηκε με sequencing.

Για να προχωρήσουμε σε περαιτέρω πειράματα προσπαθήσαμε να εκφράσουμε και να απομόνωσουμε του αναστολέα EAP. Το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε για την έκφραση της EAP ήταν και σε αυτήν την περίπτωση το M15(pRep4). Αρχικά, έγινε μία δοκιμαστική μικρής κλίμακας απομόνωση της EAP με Ni²⁺-NTA σφαιρίδια, όπου φάνηκε πιθανή πρωτεόλυση της EAP στο βακτηριακό εκχύλισμα. Για αυτόν τον λόγο προχωρήσαμε σε ανοσοαποτύπωση της μικρής κλίμακας απομόνωσης της σερπίνης, όπου χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα anti-σερπίνης προκειμένου να διευκρινιστεί εάν η παραγόμενη EAP υφίσταται κάποιο είδος πρωτεολυτικής τροποποίησης στα βακτηριακά εκχυλίσματα (εικόνα 2.4iii). Με την ευαίσθητη ανάλυση της ανοσοαποτύπωσης αποδείχθηκε ότι η παραγόμενη EAP δεν υφίσταται

πρωτεολυτική τροποποίηση γεγονός που μας επιτρέπει να προχωρήσουμε σε έκφραση και απομόνωση της σε μεγάλη κλίμακα.

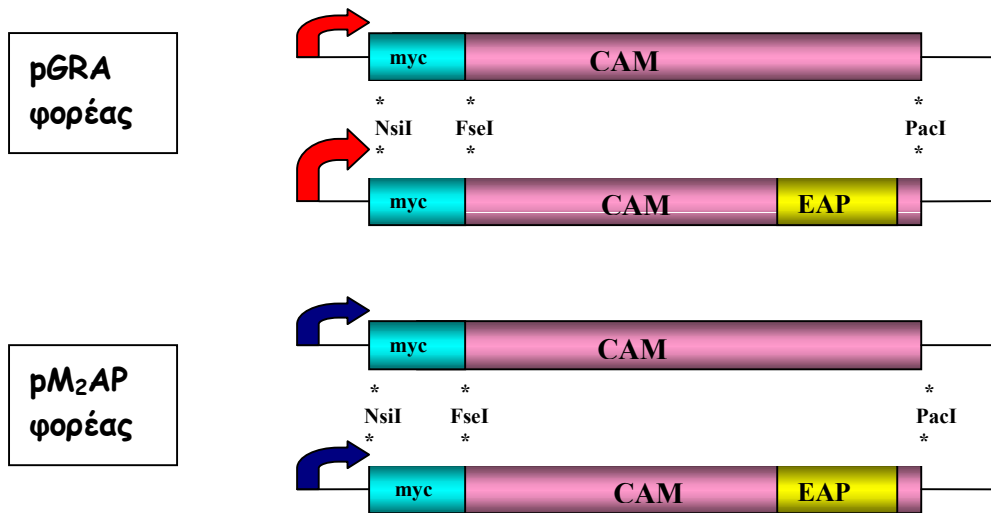


Εικόνα 2.4iii: Ανοσοαποτύπωση της μικρής κλίμακας απομόνωσης της ΕΑΡ. -/+ : προ και μετά επαγωγής δείγματα. **A&a:** υπερκείμενο και Ni²⁺-NTA σφαιρίδια μετά από 2 hrs επώασης της ΕΑΡ με τα σφαιρίδια αντίστοιχα. **B&b:** υπερκείμενο και Ni²⁺-NTA σφαιρίδια μετά το πρώτο πλύσιμο (50mM NaH₂PO₄ & 150mM NaCl pH:8) αντίστοιχα. **G&10&20&250:** Ni²⁺-NTA σφαιρίδια και κλάσματα έκλουσης με 10, 20, 250mM συγκέντρωσης ιμιδαζολίου αντίστοιχα. Για την ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιήθηκε αντι-σερπίνης αντίσωμα προκειμένου να ανιχνευθεί η απομονωμένη σερπίνη. Στα δείγματα ανιχνεύεται μόνο η ΕΑΡ γεγονός που υποδεικνύει ότι η πρωτεΐνη δεν υφίσταται κανένα είδος πρωτεολυτικής τροποποίησης στα βακτηριακά εκχυλίσματα.

2.5 Παροδικός μετασχηματισμός του *T. gondii* με την ΕΑΡ.

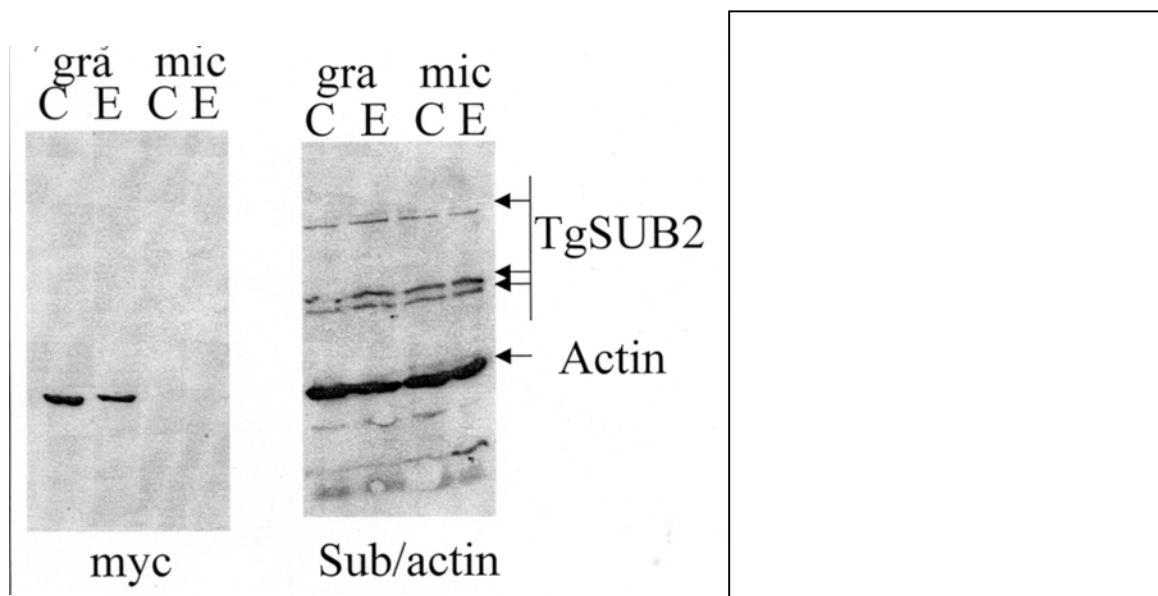
Ο σχεδιάσμος του ΕΑΡ αναστολέα πραγματοποιήθηκε για την χρήση του σε μελέτες διεκρίνησης του λειτουργικού ρόλου της TgSUB2 λόγω των πλεονεκτημάτων που προσφέρει το σύστημα του *T. gondii*. Στο *T. gondii* μπορούν να γίνουν γενετικοί χειρισμοί εύκολα με παροδικό ή σταθερό μετασχηματισμό. Τέλος, πλεονεκτεί λόγω της διαθεσιμότητας πολλών κυτταρικών δεικτών και την ευκολία με την οποία μπορεί να παρατηρηθεί το παράσιτο σε μελέτες μικροσκοπίας. Επομένως, η αποτελεσματικότητα της στρατηγικής των μεταλλαγμένων σερπινών μπορεί να αξιολογηθεί ευκολότερα και γρηγορότερα με *in vivo* μελέτες σε αυτό το παρασιτικό σύστημα.

Για να δοκιμαστεί εάν η ΕΑΡ έχει ανασταλτική δράση στην TgSUB2 πραγματοποιήθηκε παροδικός μετασχηματισμός του παράσιτου σε συνεργασία με την Dr Kami Kim που ειδικεύεται στην μελέτη της TgSUB2. Στην περίπτωση αυτή προστέθηκε στο Ν-άκρο της ΕΑΡ ο επίτοπος myc. Το τμήμα αυτό ενθέθηκε σε κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς pGRA και pM₂AP, οι οποίοι φέρουν υποκινητές που ελέγχουν γονίδια τα οποία εκφράζονται στα dense granules ή στα micronemes αντίστοιχα. Η ίδια κατασκευή έγινε και για την CAM προκειμένου να χρησιμοποιηθεί σε αντίστοιχα πειράματα ελέγχου αποδεικνύοντας την ενδεχόμενη εξειδικευμένη δράση της ΕΑΡ (εικόνα 2.5i).



Εικόνα 2.5i

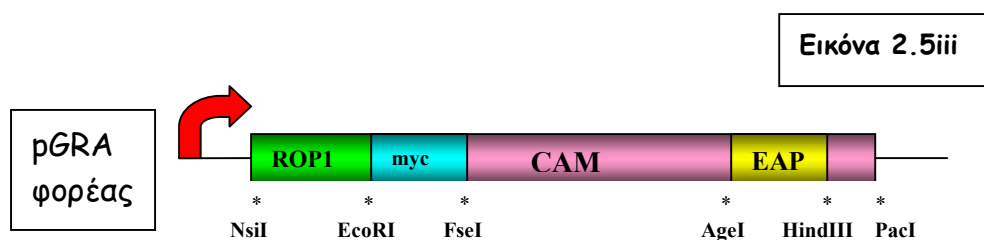
Ο επίτοπος myc και οι δύο σερπίνες απομονώθηκαν με PCR όπου χρησιμοποιήθηκε Pfu πολυμεράση και κατάλληλα σχεδιασμένοι εκκινήτες. Τα τμήματα αυτά πέπτηκαν με FseI και διασυνδέθηκαν. Στα συνδεδεμένα myc-CAM και myc-EAP προστέθηκαν A άκρα και ακολούθησε κλωνοποίησή τους στον pGEM-T φορέα. Οι θετικοί κλώνοι ταυτοποιήθηκαν με πέψεις περιοριστικών ενζύμων και αλληλούχιση. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε διαδοχική πέψη των φορέων pGRA, pM₂AP και των κατασκευών pGEM-T/mycCAM και pGEM-T/mycEAP με τα ένζυμα PacI και NsiI. Οι θετικοί κλώνοι pGRA/mycCAM, pGRAmycEAP, pM₂AP/mycCAM και pM₂APmycEAP επιλέχθηκαν και πάλι με πέψεις και αλληλούχιση.



Παράσιτα *T. gondii* μετασχηματίστηκαν παροδικά με αυτές τις κατασκευές και ανάλυση του κυτταρικού εκχυλίσματος έγινε με ανοσοαποτύπωση. Στην εικόνα 2.5ii φαίνεται ότι οι σερπίνες εκφράζονται ικανοποιητικά στο *T. gondii*. Στην περίπτωση αυτή αναμέναμε την δημιουργία

SDS σταθερού συμπλόκου εαν η EAP σερπίνη ανάστειλε έστω και εν μέρει την λειτουργία της TgSUB2. το σύμπλοκο αυτό θα ήταν ανιχνεύσιμο είτε με anti-myc αντίσωμα που αναγνωρίζει την EAP σερπίνη είτε με αντίσωμα έναντι της TgSUB2. Τέτοιο σύμπλοκο δεν ανιχνεύθηκε σε καμμία περίπτωση. Παρόλα ενδέχεται η EAP μέσα στο κύτταρο να μην καταλήγει στο ίδιο υποκυτταρικό διαμέρισμα με την πρωτεάση. Για αυτό κρίθηκε απαραίτητη η δημιουργία μίας επιπλέον κατασκευής που θα εξασφαλίσει την μεταφορά της EAP στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στα rhortries όπου έχει εντοπιστεί η TgSUB2. Στην περίπτωση αυτή το σηματοδοτικό πεπτίδιο (signal peptide) της ROP1 πρωτεΐνης ενσωματώθηκε στο N-άκρο της mycEAP κατασκευής του φορέα pGRA (εικόνα 2.5iii). Για την κατασκευή επιλέχθηκε ο pGRA γιατί όπως φαίνεται και στην εικόνα 2.5ii οι σερπίνες εκφράζονταν ικανοποιητικότερα όταν χρησιμοποιήθηκε αυτός ο φορέας.

Συγκεκριμένα, το ROP1 τμήμα και ο myc επότοπος απομονώθηκαν με PCR όπου χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλα σχεδιασμένοι εκκινητές και Pfu πολυμεράση. Τα κομμάτια αυτά πέπηκαν με EcoRI και διασυνδέθηκαν. Στη συνέχεια έγινε προσθήκη A άκρων και κλωνοποίηση του ROP1myc στον pGEM-T φορέα. Ο θετικός κλώνος pGEM-T/ROP1myc ταυτοποιήθηκε με αλληλούχηση και πέψεις με περιοριστικά ένζυμα. Για την ενσωμάτωση του ROP1myc στο pGRAMycEAP πραγματοποιήθηκαν δύο διαδοχικές πέψεις με FseI και NsiI των pGEM-T/ ROP1myc και pGRAMycEAP πλασμιδίων και ακολούθησε αντίδραση διασύνδεσης. Ο θετικός κλώνος pGRA/ ROP1mycEAP ανιχνευθηκε με πέψεις περιοριστικών ενζύμων και αλληλούχηση (εικόνα 2.5iv) και ελέγχεται αυτήν την στιγμή στο εργαστήριο της Dr Kami Kim για την παραγωγή της EAP σερπίνης και τον υποκυτταρικό εντοπισμό της.



εικόνα 2.5iv



Πέψη πλασμιδιακού DNA για την ανίχνευση του θετικού κλώνου rGRA/Ror1mycEAP. Το DNA επωάστηκε με τα ένζυμα NsiI & NcoI τα οποία κόβουν το ένθεμα στην άκρη και σε μία εσωτερική θέση αμέσως μετά τον myc επίτοπο δίνοντας ένα τμήμα (~100bp), ενώ παράλληλα έγινε και μία πέψη ελέγχου (QP) με τα ίδια ένζυμα για την κατασκευή rGRA/mycEAP (QP) η οποία δεν φέρει το Ror1. Επιπλέον η κατασκευή rGEM-T/Ror1myc (T15) επωάστηκε με NotI έτσι ώστε να αφαιρεθεί το ένθεμα της για να μπορεί να συγκριθεί με το τμήμα που αφαιρείται από τους πιθανούς θετικούς κλώνους. Ο θετικός κλώνος 4 που απομονώθηκε ελέγχθηκε με sequencing.

Συζήτηση

3. Συζήτηση

Ο ενδοκυτταρικός τρόπος ζωής που έχει υιοθετηθεί από πολλά παθογόνα αποτελεί έναν πολύ αποτελεσματικό μηχανισμό αποφυγής του ανοσοποιητικού συστήματος των προσβαλλόμενων οργανισμών. Για την διείσδυση και την εγκαθίδρυση τους μέσα στα κυττάρα των ξενιστών τα *Apicomplexa* βασίζονται σε έναν ενεργητικό μηχανισμό εισόδου. Πρόκειται για μία πολύπλοκη διαδικασία στην οποία περιλαμβάνεται η συντονισμένη έκκριση πρωτεϊνικών προϊόντων από τα εξειδικευμένα κυτταρικά οργανίδια των παράσιτων. Πολλές πειραματικές ενδείξεις υποδεικνύουν την πρωτεολυτική τροποποίηση των προϊόντων αυτών και σε κάποιες περιπτώσεις τονίζουν ιδιαίτερα την κρίσιμη σημασία τους για την διείσδυση του παράσιτου στα κύτταρα. Σήμερα, πολλές πρωτεάσες έχουν εντοπισθεί στο γένωμα των παράσιτων *P. falciparum* και στο *T. gondii*. Ωστόσο, η ταυτοποίηση της βιολογικής τους λειτουργίας και η ανίχνευση των υποστρωμάτων τους δεν έχει ακόμη επιτευχθεί.

Ιδιαίτερα, οι subtilisins έχουν ενοχοποιηθεί ως σημαντικά μόρια για τον μηχανισμό εισβολής. Όμως η μελέτη αυτών των μορίων περιορίζεται σημαντικά. Συγκεκριμένα, για την SUB-1 από εκτεταμένες βιοχημικές μελέτες υπάρχουν πολλά δεδομένα για την δομή και την εξειδίκευση του υποστρώματος της αλλά η λειτουργία της παραμένει άγνωστη. Για την SUB-2 αντίθετα οι πειραματικές ενδείξεις είναι πολύ λιγότερες. Το γεγονός ότι το γένωμα του παρασίτου παραμένει απλοειδές για το μεγαλύτερο μέρος του κύκλου ζωής του καθώς και ο κρίσιμος ρόλος της SUB2 έχουν ως αποτέλεσμα μη βιώσιμα παράσιτα σε πειράματα γενετικής καταστροφής (knock-out) του γονιδίου (Uzureau et al. 2004). Επιπλέον, ακόμη δεν έχει παραχθεί ενεργή πρωτεάση από κάποιο σύστημα έκφρασης προκειμένου να γίνει δομική και λειτουργική της *in vitro* ανάλυση.

Μία εναλλακτική προσέγγιση που προσπαθούμε να αναπτύξουμε είναι η χρήση εξειδικευμένων αναστολέων πρωτεασών σερίνης, των σερπινών. Οι πρωτεΐνες αυτές συνήθως ρυθμίζουν κρίσιμα πρωτεολυτικά φαινόμενα απενεργοποιώντας πρωτεάσες μιμούμενες το υποστρωμά τους. Αλληλεπιδρούν με το ενεργό κέντρο των πρωτεασών μέσω του εκτεθειμένου καρβυλυτελικού άκρου τους (RSL) το οποίο αναγνωρίζεται από τις πρωτεάσες. Γεγονός, που ενισχύει την χρήση των μορίων αυτών ως εργαλεία στην μελέτη μας είναι το ότι έχουν υπάρξει βιβλιογραφικές αναφορές εξειδικευμένης αναστολής της furin, πρωτεάσης (Dahlen et al. 1998, Jean et al. 1998, Jean et al. 2000a), από φυσικά απομονωμένες (PI8) ή μεταλλαγμένες σερπίνες (α1PDX). Διαθέτωντας την σερπίνη CAM του *A. gambiae* για την οποία έχει δειχθεί *in vitro* η ανασταλτική της δράση σε βακτηριακές subtilisins (Danielli 2003) προχωρήσαμε σε μία σειρά

μεταλλαξογενέσεων της RSL περιοχής της. Ο σχεδιασμός των μεταλλάξεων της RSL έγινε έτσι ώστε να είναι πιθανόν τα μεταλλαγμένα μόρια να αναγνωρίζονται από τις πρωτεάσες PfsUB1, PbsUB2 και TgsUB2 και να προκαλούν την αναστολή της πρωτεολυτικής τους δράσης.

Συγκεκριμένα για την PfsUB1 κατασκευάστηκε η σερπίνη SAD. Η SAD φέρει στην RSL της την αλληλουχία των αμινοξέων Val-Ser-Ala-Asp*Asn (εικόνα 2.1i) για την οποία έχει δείχθει ότι η πρωτεάση αυτή πρωτεολύει. Ενδεχόμενος σχηματισμός συμπλόκου PfsUB1-SAD θα αποδεικνύει την ανασταλτική δράση της SAD. Με αυτόν τον τρόπο, εκμεταλευόμενοι την πληροφορία της εξειδίκευσης του υποστρώματος της SUB1 έχουμε την δυνατότητα να ελέγξουμε αν η προσέγγιση που προσπαθούμε να αναπτύξουμε μπορεί να έχει αποτέλεσμα. Επιπλέον, το γεγονός ότι η PfsUB1 έχει παραχθεί *in vitro* σε ενεργή μορφή επιτρέπει τον σχεδιασμό πειραμάτων *in vitro* αναστολής. Για αυτό τον λόγο προχωρήσαμε στην έκφραση και απομόνωση της SAD. Μόλις πραγματοποιηθούν οι *in vitro* δοκιμασίες αναστολής θα έχουμε σαφές ενδείξεις για την χρησιμότητα αυτής της στρατηγικής.

Αντίστοιχα για την TgsUB2 ο ΕΑΡ αναστολέας σχεδιάστηκε έτσι ώστε να φέρει στην RSL περιοχή την αλληλουχία Ser-Phe-Val-Glu*Ala (εικόνα 2.4i) η οποία είναι η αλληλουχία τροποποίησης της ROP1. Αν και δεν έχει αποδειχθεί άμεσα ότι η TgsUB2 ευθύνεται για την τροποποίηση της ROP1, υπάρχουν έμμεσα δεδομένα που το υποδεικνύουν. Παρόλο που το σύστημα που εξειδικεύεται το εργαστηρίου δεν είναι το *T. gondii* ο σχεδιασμός του ΕΑΡ αναστολέα πραγματοποιήθηκε για την χρήση του σε περαιτέρω μελέτες διευκρίνησης του λειτουργικού ρόλου της TgsUB2 αλλά επιπλέον και λόγω των πλεονεκτημάτων που προσφέρει το σύστημα του *T. gondii*. Μελέτες κυτταρικής βιολογίας μπορούν να πραγματοποιηθούν ευκολότερα στο *T. gondii* εξαιτίας της μεγάλης απόδοσης παροδικού ή σταθερού μετασχηματισμού του. Επομένως, παρέχεται η δυνατότητα έκφρασης της ΕΑΡ στο παράσιτο με πολύ ευκολότερη και γρηγορότερη διαδικασία, γεγονός που θα επιτρέψει την αξιολόγηση της στρατηγικής των μεταλλαγμένων σερπινών. Για αυτόν τον λόγο στην συνέχεια πραγματοποιήθηκαν πειράματα παροδικού μετασχηματισμού του *T. gondii* με τις ΕΑΡ και CAM στο εργαστήριο της Dr. Kami Kim που εξειδικεύεται πάνω στο σύστημα του *T. gondii*. Κυτταρικά εκχυλίσματα των μετασχηματισμένων παράσιτων αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση (western blot) και τα κατάλληλα αντισώματα για την τυχόν ανίχνευση του συμπλόκου ΕΑΡ-TgsUB2, γεγονός που θα αποδείκνυε την εξειδικευμένη ανασταλτική δράση της ΕΑΡ. Τα αποτελέσματα σε αυτήν την περίπτωση δεν ήταν θετικά αν και η σερπίνη εκφράζονταν ικανοποιητικά στο παράσιτο. Ωστόσο, πριν απορριφθεί η χρησιμότητα αυτού του αναστολέα θα πρέπει να εξασφαλιστεί ότι καταλήγει στο ίδιο υποκυτταρικό διαμέρισμα με

την πρωτεάση. Γι'αυτό δημιουργήθηκε η pGRA/ROP1mycEAP κατασκευή στην οποία προστέθηκε στο N-άκρο του αναστολέα το σηματοδοτικό πεπτίδιο της ROP1 η οποία φέρει την απαραίτητη πληροφορία για την μεταφορά της EAP στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στα rhoptries όπου έχει εντοπιστεί η TgSUB2. Σε επόμενα πειράματα θα γίνει παροδικός μετασχηματισμός του *T. gondii* με αυτήν την κατασκευή και θα εξεταστεί εάν η EAP έχει ανασταλτική δράση έναντι της TgSUB2 και επιπλέον με μικροσκοπία φθορισμού θα γίνει εντοπισμός του αναστολέα υποκυτταρικά. Στην περίπτωση που δεν ανιχνευθεί ανασταλτική δράση της EAP παρά το ότι θα εντοπίζεται στα rhoptries θα υποδεικνύεται ότι η EAP δεν αναγνωρίζεται από την TgSUB2. Αντίθετα, αν παρατηρηθεί ανασταλτική δράση της EAP, τότε μπορεί να αξιολογηθεί ο ρόλος της TgSUB2 στην διαδικασία εισβολής του παράσιτου γιατί θα έχει κατασκευασθεί για την πρωτεάση αυτή ένας εξειδικευμένος αναστολέας που μπορεί να εκφραστεί μέσα στο παράσιτο. Επιπλέον, μπορούν να πραγματοποιηθούν μελέτες με στόχο την ανίχνευση των μορίων που πρωτεολύει η TgSUB2.

Τέλος για την PbSUB2 ο LGI αναστολέας σχεδιάστηκε έτσι ώστε να φέρει στην RSL την αλληλουχία της δεύτερης τροποποίησης της MSP-1 (εικόνα 2.3i) η οποία πιθανολογείται ότι γίνεται από την SUB-2. Αν και ο αναστολέας αυτός δεν έχει δοκιμαστεί σε περίπτωση που δειχθεί η ανασταλτική του δράση θα αποδειχθεί πολύ χρήσιμο εργαλείο για την μελέτη της SUB-2. Το μόριο αυτό λόγω της εξωκυτταρικής του λειτουργίας καθώς και της έκφρασης του σε διαφορετικά στάδια του παρασίτου αποτελεί ένα μόριο κλειδί για την προσβολή των κυττάρων στόχων και επιπλέον έναν ιδανικό φαρμακευτικό στόχο (Blackman et al. 2000), γιατί στα στάδια που εντοπίζεται η δράση του το παράσιτο εκτίθεται για μικρό χρονικό διάστημα στο πλάσμα του αίματος ή στο περιβάλλον του μεσέντερου.

Διαθέτωντας έναν εξειδικευμένο αναστολέα για την SUB-2 θα μπορούσαμε να επικεντρώσουμε την μελέτη μας στο στάδιο του ωοκινέτη και στην ανίχνευση του ρόλου της πρωτεάσης κατά την προσβολή του μεσεντερικού επιθηλίου που αποτελεί το κύριο πεδίο έρευνας του εργαστηρίου. Σ'αυτή την περίπτωση μπορούν να σχεδιαστούν πειράματα μελέτης της προσβολής του εντερικού επιθηλίου παρουσία ή απουσία του αναστολέα της SUB-2 έτσι ώστε να εκτιμηθεί ο ρόλος της πρωτεάσης στην προσβολή των επιθηλιακών κυττάρων. Επιπλέον, η κατασκευή διαγονιδιακού παράσιτου *P. berghei* που θα εκφράζει τον αναστολέα στο στάδιο του ωοκινέτη θα οδηγήσει στην ανίχνευση του ρόλου της πρωτεάσης στον αναπτυξιακό κύκλο του παράσιτου και στον προσδιορισμό των πιθανών στόχων της, πληροφορίες ιδιαίτερα σημαντικές για την ανίχνευση της βιολογικής λειτουργίας της πρωτεάσης. Τέλος, διαθέτωντας έναν εξειδικευμένο αναστολέα έναντι της SUB2 η δημιουργία τροποποιημένων

κουνουπιών τα οποία θα εκκρίνουν την μεταλλαγμένη σερπίνη από τα επιθηλιακά κύτταρα του μεσέντερου, μπορεί να οδηγήσει σε αρκετά ικανοποιητικό έλεγχο της μετάδοσης της ελονοσίας και σε λεπτομερέστερη ανάλυση του μηχανισμού εισόδου του παράσιτου στο μεσέντερο.

Η μεταλλαξογένεση της σερπίνης CAM επιλέχθηκε σαν πιλοτική αφενός μεν λόγω της ανασταλτικής δράσης της CAM έναντι βακτηριακών subtilisins αφετέρου γιατί ήταν τεχνικά εύκολο να επιτευχθεί. Η παρουσία μίας AgeI περιοριστικής θέσης στην αρχή της RSL επέτρεψε την γρήγορη και εύκολη αλλαγή της RSL με RCR. Η CAM όμως δεν είναι η μόνη σερπίνη που θα δοκιμαστεί σε αυτές τις προσεγγίσεις. Ήδη ετοιμαζόμαστε να δοκιμάσουμε έναν πεπτιδικό αναστολέα πρωτεασών που ανήκει στην οικογένεια των Kazal. Ο αναστολέας αυτός έχει απομονωθεί από την *Neospora caninum* και είναι αποτελεσματικός έναντι βακτηριακών subtilisins (Morris et al. 2004). Επίσης σχεδιάζεται και η μοριακή τοποποίηση της α-1PDX η οποία έχει δώσει έναν ικανοποιητικό αναστολέα έναντι της furin (Jean et al. 1998, Jean et al. 2000a).

Ωστόσο, λόγω των δυσκολιών που μέχρι σήμερα αντιμετωπίζουμε στο πεδίο έρευνας των παρασιτικών πρωτεασών και ιδιαίτερα της SUB-2 οφείλουμε να συνυπολογίσουμε την πιθανότητα διερεύνησης του ρόλου της πρωτεάσης με εναλλακτικούς τρόπους, εαν δεν αποδώσει η προσέγγιση των μεταλλαγμένων σερπινών. Στην περίπτωση αυτή ο σχεδιασμός διαγονιδιακού παράσιτου που θα εκφράζει μόνο στα αναπτυξιακά παρασιτικά στάδια του αίματος την SUB-2 και όχι στο στάδιο του ωοκινέτη πιθανά να αποδώσει χρήσιμες πληροφορίες για τον ρόλο της πρωτεάσης κατά την προσβολή του μεσεντερικού επιθηλίου.

Εκείνο που πρέπει να τονιστεί είναι ότι ο ρόλος των πρωτεασών κατά την εισβολή του εντερικού επιθηλίου αποδεικνύεται όλο και σημαντικότερος. Σε μία πρόσφατη μελέτη δείχθηκε ότι η καταστολή της έκφρασης της falcipain I (μίας πρωτεάσης κυστεΐνης που μέχρι σήμερα υποστηρίζονταν ότι σχετίζεται είτε με τον μεταβολισμό της αιμοσφαιρίνης είτε με την προσβολή των ερυθροκυττάρων) είχε ως συνέπεια την μείωση του αριθμού των ωοκύστων στο κουνούπι κατά 70-90% (Eksin et al. 2004). Επομένως, οι πρωτεάσες μπορεί να αποδειχθούν τα ιδανικά μόρια στόχοι για την ανάπτυξη στρατηγικών που θα στοχεύουν το παράσιτο μέσα στο κουνούπι.

Υλικά και μέθοδοι

4. Υλικά και μέθοδοι.

4.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση και μετάλλαξη της RSL της CAM σερπίνης, για την απομόνωση του επίτοπου *myc* και της σηματοδοτικής αλληλουχίας της ROP1. Και τέλος, για την απομόνωση της CAM ή EAP σερπίνης προκειμένου να έντεθουν σε πλασμιδιακό φορέα που εκφράζεται στο *T. gondii*. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν σχεδιάστηκαν κατάλληλα για την κάθε περίπτωση. Στα άκρα των εκκινητών προστέθηκε η αλληλουχία αναγνώρισης περιοριστικών ενζύμων τα οποία δεν κόβουν τα απομονωμένα τμήματα του DNA σε κάποια εσωτερική θέση. Η προσθήκη αυτή πραγματοποιήθηκε προκειμένου να διευκολυνθεί η σύνδεση των τμημάτων αυτών στις κατάλληλες θέσεις τμημάτων DNA ή στους κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς.

Το πρόγραμμα που επιλέχθηκε για την PCR αντίδραση ήταν συγκεκριμένο για την κάθε περίπτωση. Οι συνθήκες του προγράμματος διαμορφώθηκαν ανάλογα με την θερμοκρασία τήξης (T_m) του κάθε εκκινητή σε συνδυασμό με το μέγεθος του προϊόντος της αντίδρασης. Συγκεκριμένα:

1) Οι συνθήκες της αντίδρασης για την κατασκευή των SAD, LGI, EAP, την απομόνωση του *myc* επίτοπου για τις κατασκευές *pGRA/mycCAM*, *pGRAmycEAP*, *pM₂AP/mycCAM* και *pM₂APmycEAP* και την απομόνωση της σηματοδοτικής αλληλουχίας ROP1 για την κατασκευή *pGRA/ROP1mycEAP* ήταν οι εξής:

Αρχή	95°C, 5 min		
30 κύκλοι	{ 95°C, 1 min (αποδιάταξη) 50°C, 1 min (υβριδοποίηση των εκκινητών) 72°C, 30 sec (επιμήκυνση της αλυσίδας)		
		τέλος	72°C, 5 min (τέλος της επιμήκυνσης)

2) Οι συνθήκες της αντίδρασης για την απομόνωση των CAM και EAP προκειμένου να ενθεθούν στους φορείς *pGRA* και *pM₂AP* ήταν οι εξής:

Αρχή	95°C, 5 min		
30 κύκλοι	{ 95°C, 1 min (αποδιάταξη) 50°C, 1 min (υβριδοποίηση των εκκινητών) 72°C, 1 min (επιμήκυνση της αλυσίδας)		
		τέλος	72°C, 5 min (τέλος της επιμήκυνσης)

Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

1. Για την SAD:

SAD5':

5'-GACCGGTATGCTGGTGTCTGGCGGACAACATAGATATCTCCGGTATGTTTA-3'

AgeI

CAMB-H3':

5'-GAAGCTT AGATCT TTAAACTTTAAGTATTTTA-3'

HindIII BglII

2. Για την LGI:

LGI5':

5'-GACCGGTATGTCGATGGATCTGCTCGGAATTGATCCGAAACATATGTTTA-3'

AgeI

και ο εκκινητής CAMB-H3' που περιγράφεται παραπάνω.

3. Για την EAP:

EAP5':

5'-GACCGGTATGCCGAGCTTTGTGGAAGCACCGGTTCCGGGGCCCTATGTTTA-3'

AgeI

και ο εκκινητής CAMB-H3'.

4. Για την απομόνωση της CAM και της EAP στις κατασκευές pGRA/mycCAM, pGRAMycEAP, pM₂AP/mycCAM και pM₂APmycEAP.

CAMtoxο5':

5'-CTGGGCCGGCCCATGGCCGACAATAGC-3'

FseI

CAMtoxο3':

5'-CCTTAATTAAACTTTAAGTATTTTAC-3'

PacI

5. Για την απομόνωση του myc επίτοπου στις κατασκευές pGRA/mycCAM, pGRAMycEAP, pM₂AP/mycCAM και pM₂APmycEAP

toxοmyc5':

5'-CCAATGCATGAACAAAAACTC-3'

NsiI

myctoxο3':

5'-CTGGGCCGGCCAGATCCTCTTTC-3'

FseI

6. Για την απομόνωση της σηματοδοτικής αλληλουχίας της ROP1 στην κατασκευή

pGRA/ROP1mycEAP.

spROP1 5':

5'-GATGCATGAGCAAAGGCTGC-3'

NsiI

spROP1 3':

5'-GGAATTCGGCGCTTGGGGTTG-3'

EcoRI

7. Για την απομόνωση του myc επίτοπου στην κατασκευή pGRA/ROP1mycEAP.

myc(RI) 5':

5'-GGAATTCGAACAAAACTCATCTC-3'

EcoRI

Και ο εκκινητής myctoχο3'.

Μία ελάχιστη ποσότητα των προϊόντων της αντίδρασης της πολυμεράσης ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αгарόζης 2% ή 1% προκειμένου να ταυτοποιηθεί ο πολυμερισμός των τμημάτων DNA.

Τέλος σε περιπτώσεις που ήταν απαραίτητο πραγματοποιήθηκε PCR για προσθήκη poly-A άκρων στα τμήματα του DNA που προορίζονταν να ενθεθούν στον pGEM-T φορέα, ο οποίος είναι γραμμικός και φέρει στα δύο άκρα του μία ουρά με θυμίνες. Στην περίπτωση αυτή το DNA επώαστηκε στους 72°C για 30 λεπτά με Taq πολυμεράση η οποία έχει την ιδιότητα να προσθέτει μία ουρά με αδενίνες δεξιά και αριστερά του ενθέματος.

4.2 Πέψη πλασμιδιακών φορέων και ενθεμάτων με περιοριστικά ένζυμα.

Οι πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν, ορισμένες κατασκευές και τα τμήματα του DNA που απομονώθηκαν με την μέθοδο του PCR, πέπτονται με τις ίδιες περιοριστικές ενδονουκλεάσες προκειμένου να δημιουργηθούν συμβατά άκρα μεταξύ τους.

Τα περιοριστικά ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν προήλθαν από τις εταιρείες MINOTECH και NEW ENGLAND BIOLABS. Οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιούνται οι αντιδράσεις είναι οι προτεινόμενες από τους κατασκευαστές. Η κάθε αντίδραση αφήνεται για περίπου 2-3 ώρες στην κατάλληλη θερμοκρασία. Στις αντιδράσεις που δεν ήταν συμβατά τα ρυθμιστικά διαλύματα των ενζύμων και επομένως έπρεπε να πραγματοποιηθούν διαδοχικά, το DNA καθαρίστηκε με ειδικά πρωτόκολλα καθαρισμού. Είτε της Qiagen είτε παρουσία 1/10 του όγκου του διαλύματος 3M οξικού νατρίου pH=5.2 με δύο εκχυλίσεις με *Ph/CHCl₃/iia* και μία με μίγμα *CHCl₃/iia*, και κατακρήμνιση με 2.5 όγκους 100% αιθανόλης. Το DNA επαναδιαλύθηκε στην κάθε περίπτωση σε νερό και ακολούθησε η επόμενη αντίδραση. Τα επιθυμητά τμήματα του DNA διαχωρίστηκαν μετά από ηλεκτροφόρηση τους σε πήκτωμα αгарόζης και ακολούθησε απομόνωση τους. Συγκεκριμένα, η δημιουργία της κάθε κατασκευής πραγματοποιήθηκε όπως έχει περιγραφεί στα αποτελέσματα.

4.3 Αντίδραση συρραφής (ligation) πλασμιδιακών κατασκευών ή φορέων με το επιθυμητό τμήμα DNA και μετασχηματισμός βακτηριακών στελεχών από τις σχηματισμένες πλασμιδιακές κατασκευές.

Η αντίδραση συρραφής πραγματοποιείται αναμειγνύοντας τις κατάλληλες ποσότητες πλασμιδίου και ενθέματος έτσι ώστε η μοριακή τους αναλογία να είναι 1/5-1/10. Στο μίγμα προστίθονται 10x ρυθμιστικού διαλύματος συρραφής και T4 λιγάση και ακολουθεί επώαση στους 16°C για περίπου 16 ώρες.

Ο μετασχηματισμός έγινε με χρήση χημικά επιδεκτικών κυττάρων. Σε 200ml κυττάρων προστίθονται 20-30ng DNA από την αντίδραση συρραφής και το μίγμα επωάζεται για 30 λεπτά στον πάγο. Ακολουθεί, θερμικό σοκ των κυττάρων με επώαση τους στους 42°C για 1 λεπτό και επώαση τους για 2 λεπτά στον πάγο. Στο μίγμα προστίθεται 1ml θρεπτικού μέσου LB και πραγματοποιείται επώαση για 1 ώρα στους 37°C υπό ανάδευση. Το δείγμα επιστρώνεται σε πιάτο με στερεό θρεπτικό μέσο LB, το οποίο περιέχει την κατάλληλη ποσότητα αντιβιοτικού. Στις περιπτώσεις που χρησιμοποιήθηκαν οι φορείς pGEM-T και TOPO-TA τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε πιάτα που περιείχαν και ένα ανάλογο της λακτόζης X-Gal προκειμένου να γίνει επιλογή των άσπρων αποικιών που θα φέρουν το ένθεμα. Τα πιάτα τοποθετούνται στους 37°C για 16 ώρες περίπου ώσπου να αναπτυχθούν οι αποικίες των βακτηρίων.

Η ανίχνευση των βακτηριακών αποικιών που φέρουν την επιθυμητή κατασκευή γίνεται ως εξής:

- 1) Λαμβάνονται οι αποικίες και γίνεται απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας (mini scale preparation DNA) με την μέθοδο της αλκαλικής λύσης (Sambrook et al., 1989).
- 2) Πραγματοποιούνται πέψεις με τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα.
- 3) Ηλεκτροφορούνται τα δείγματα και ελέγχεται αν κάποιο από τα δείγματα DNA των αποικιών δίνει τα αναμενόμενα τμήματα DNA.
- 4) Επιλέγονται οι αποικίες που φέρουν την επιθυμητή πλασμιδιακή κατασκευή και γίνεται απομόνωση DNA μεγάλης κλίμακας (large scale DNA preparation) με την μέθοδο της αλκαλικής λύσης με περαιτέρω καθαρισμό μέσω κατακρήμισης με πολυαιθυλενογλυκερόλη (PEG) 8000 (Sambrook et al., 1989) και το πλασμίδιο αυτό δίνεται για ταυτοποίηση της αλληλουχίας του (sequencing).

4.4 Έκφραση και καθαρισμός της SAD με Ni²⁺-NTA χρωματογραφία συγγένειας.

- 1) Εμβολιασμός 200ml αρχικής καλλιέργειας σε θρεπτικό μέσο LB που περιέχει την κατάλληλη ποσότητα αντιβιοτικού με το στέλεχος επιλογής. Η καλλιέργεια επωάζεται ο/η στους 37°C υπό ανάδευση.

- 2) Την επόμενη μέρα εμβολιάζονται 6 lt θρεπτικού μέσου LB/κατάλληλου αντιβιοτικού με 25ml της αρχικής ο/η καλλιέργειας (=1/40 αραιώση της αρχικής καλλιέργειας. Τα κύτταρα επωάζονται στους 30°C υπό ανάδευση μέχρι να φτάσουν στην $OD_{600}=0.5-0.6$.
- 3) Από τα κύτταρα αυτά σώζεται 1ml καλλιέργειας, το οποίο φυγοκεντρείται. Η πελλέτα επαναδιαλύεται σε 50μl 5x Protein Loading Buffer και 10μl από το διάλυμα αυτό ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα ακρυλαμίδης-SDS 15%. Το δείγμα αυτό αντιστοιχεί στο προ επαγωγής δείγμα (-induction sample).
- 4) Στις καλλιέργειες προστίθενται 0.1mM IPTG και αφήνονται στους 30°C υπό ανάδευση για τις επόμενες 4 ώρες. Μετά το διάστημα των τεσσάρων ωρών, 1 ml καλλιέργειας κρατείται, πελετάρεται και επαναδιαλύεται σε 5x Protein Loading Buffer. Το δείγμα αυτό αντιστοιχεί στο μετά επαγωγής δείγμα (+induction sample).
- 5) Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 6000rpm στους 4°C για 15min. Οι πελλέτες επαναδιαλύονται σε διάλυμα lysis (50mM Tris, 0.5M NaCl, 10% glycerol, pH=8). Επαναδιαλύουμε, 1ml lysis buffer/1gr κυτταρικής μάζας.
- 6) Προσθέτουμε 100μg/ml λυσοζύμη και 1mM PMSF και επωάζουμε για 40min στον πάγο.
- 7) Τα κύτταρα ηχοβολούνται για 30min με ενδιάμεσο πάγωμα του δοχείου τους σε διάλυμα EtOH-ξηρού πάγου.
- 8) Στην συνέχεια φυγοκεντρούμε στις 13000rpm στους 4°C για 45min. Στο υπερκείμενο προστίθεται 0.1% Triton και ακολουθεί επώαση τους για 30min στους 4°C με ελαφρά ανάδευση.
- 9) Για κολώνες Ni^{+2} -NTA λαμβάνεται η κατάλληλη ποσότητα σφαιριδίων Ni^{+2} -NTA η οποία καθορίζεται από το ποσό της πρωτεΐνης στο υπερκείμενο.
- 10) Ακολουθεί εξισορόπηση των σφαιριδίων που έχουν φορτωθεί στην κολώνα με 10 όγκους κολώνας lysis buffer. Στο υπερκείμενο που φορτώνεται στην κολώνα προστίθενται 10mM β-Mercaptoethanol). Το διάλυμα που εκλούεται από την κολώνα (flow-through) ξαναφορτώνεται στην κολώνα.
- 11) Στην συνέχεια γίνεται πλύσιμο της κολώνας με 10 όγκους κολώνας lysis buffer.
- 12) Πραγματοποιούνται άλλα δύο πλυσίματα με 10 και 3 όγκους κολώνας wash buffer 1 (50mM Tris, 10% glycerol, pH=8) αντίστοιχα.
- 13) Στη συνέχεια γίνεται ένα τελευταίο ξέπλυμα με 3 όγκους κολώνας wash buffer 2 (50mM Tris, 10% glycerol, 10mM imidazol pH=8).

- 14) Τέλος ακολουθεί έκλυση της πρωτεΐνης με 6 όγκους κολώνας elution buffer (50mM Tris, 10% glycerol, 25mM imidazol, pH=8) και συλλέγονται κλάσματα του 1ml.
- 15) Τα αποτελέσματα του καθαρισμού ελέγχονται με ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων: -/+ induction samples, του υπερκείμενου και όλων των σταδίων της κολώνας σε πήκτωμα SDS-ακρυλαμίδης 15%.

Βιβλιογραφία

5. Βιβλιογραφία.

- Aikawa, M. (1988) *In* W. H. Wernsdorf and I. McGregor (ed.), *Malaria: principles and practice of malariology*. p. 97-129.
- Banerjee, R., et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa*. **99**: 990-995.
- Barale, J. C. et al., (1999) *PNAS*. **96**, 6445-6450.
- Bhanot, P., et al. (2003) *Mol. Biochem. Parasitol.* **126**: 263-273.
- Blackman, M. J., et al. (1991) *Mol. Biochem. Parasitol.* **49**: 29-33.
- Blackman, M. J. et al., (1992) *Mol Biochem parasitol.* **50**: 307-316.
- Blackman, M. J., et al. (1994) *J. Exp. Med.* **180**: 389-393.
- Blackman, M. J., et al. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**:23398-23409.
- Blackman, M. J., (2000) *Curr Drug Targets.* **11**, 59-83.
- Bozdech, Z., et al. (2003) *PloS. Biol.* **1**: E5.
- Bradley, P. J., et al. (1999) *Mol Biochem parasitol.* **100**: 103-109.
- Bradley, P. J., et al. (2002) *Mol. Biochem. Parasitol.* **125**: 189-193.
- Brossier, F., et al. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**: 6229-6234.
- Carruthers, V. B., et al. (1997) *Eur. J. Cell Biol.* **73**: 114-123.
- Carruthers, V. B., et al. (1999) *Cell. Microbiol.* **1**: 225-235.
- Carruthers, V. B., et al. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**: 14346-14353.
- Choboter, W., et al. (1982) *In* P. L. Long (ed.), *The biology of coccidian*. p. 101-165.
- Citarra, V. et al., (1999) *Mol Cell Biol.* **3**, 457-464.
- Coombs, G. H., et al. (2001) *Trends Parasitol.* **17**: 532-537.
- Dahlen, J. R. et al., (1998) *J Biol Chem.* **273(4)**, 1851-1854.
- Danielli, A. et al., (2003) *J Biol Chem.* **278**, 4184-4193.
- Dhawan, S., et al. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**: 30180-30186.
- Di Cristina, M., et al. (2000) *Mol. Cell. Biol.* **20**: 7332-7341.
- Dutta, S., et al. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa*. **100**: 12295-12300.
- Eksin, S., et al. (2004) *Mol. Microbiol.* **52(1)**: 243-250.
- Fleck, S. L., et al. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**: 47670-47677.
- Florens, L. et al., (2000) *Nature*. **419**, 520-526.
- Foth, B. J., et al. (2003) *Science* **299**: 705-708.
- Garcia-Reguet, N., et al. (2001) *Cell. Microbiol.* **2**: 353-364.
- Gaskins, E., et al. (2004) *J. Cell Biol.* **165**: 383-393.
- Gettins, P. G., et al. (1996) *Molecular Biology Intelligence Unit, R. G. Landes Co., and Chapman & Hall, Austin, TX.*
- Greenbaum, D. C., et al. (2002) *Science*. **298**: 2002-2006.
- Hackett, F. et al., (1999) *Mol Biochem parasitol.* **103**, 183-195.
- Han, Y. S. et al., (2000) *Embo J.* **19(22)**, 6030-6040.

- Hehl, A. B., et al. (2000) *Infect. Immun.* **68**: 7078-7086.
- Hodder, A. N., et al. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**: 48169-48177.
- Hopkins, P. C., et al. (1993) *Biochemistry.* **32(30)**: 7650-7657.
- Howell, S. A., et al. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**:23890-23898.
- Irving, J. A., et al. (2000) *Genome Res.* **10(12)**: 1845-1864.
- Jean, F. et al., (1998) *PNAS.* **95**, 7293-7298.
- Jean, F. et al., (2000a) *PNAS.* **97**, 2864-2869.
- Jean, L., et al. (2000) *Int. J. Parasitol.* **30**: 1099-1107.
- Jean, L., et al. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**: 28572-28579.
- Kanost, M. R., et al (1999) *Dev. Comp. Immunol.* **23(4-5)**: 291-301.
- Le Roch, K. G. et al. (2003) *Science* **301**: 1503-1508.
- Meissner, M., et al. (2002) *J. Cell Sci.* **115**: 563-574.
- Miller, S. A., et al. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**: 45341-45348.
- Miller, S. A., et al. (2003) *Mol. Microbiol.* **49**: 883-894.
- Morris, M. T., et al. (2004) *Int. J. Parasitol.* **34**: 693-701.
- Nakayama, K., (1997) *Biochem. J.* **327**: 625-635.
- Nichols, B. A., et al. (1987) *J. Protozool.* **34**: 217-226.
- Optiz, C., et al. (2002) *EMBO J.* **21**: 1577-1585.
- Potempa, J. E., et al. (1994) *J. Biol. Chem.* **269(23)**: 15957-15960.
- Que, X., et al. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**: 25791-25797.
- Reiss, M., et al. (2001) *J. Cell Biol.* **152**: 563-578.
- Urban, S., et al. (2003) *Moll. Cell.* **11**: 1425-1434.
- Uzureau, P., et al. (2004) *Cell. Microbiol.* **6**: 65-78.
- Sajid, M., et al. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**: 631-641.
- Sambrook, J., et al., (1989) *New york, C. S. H. Press.*
- Sam-Yellowe, T. Y. (1996) *Parasitol. Today.* **12**: 308-316.
- Shaw, M. K., et al. (1998) *Parasitology.* **117**: 435-443.
- Shaw, M. K., et al. (2002) *Microbes Infect.* **4**: 119-132.
- Sidley, L. D., (2004) *Science.* **304**: 248-253.
- Sijwali, P. S., et al. (2001) *Biochem. J.* **360**: 481-489.
- Sijwali, P. S., et al. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa.* In press.
- Silverman, G. A., et al. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**: 33293-33296.
- Silvie, O., et al. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**: 9490-9496.
- Sinden, R. E. (1978) *In* R. Killick-Kendrick and W. Jones (ed.), *Rodent malaria* p. 85-168.
- Soldati, D., et al. (1998) *Mol. Biochem. Parasitol.* **96**: 37-48.
- Soldati, D., et al. (2001) *Int. J. Parasitol.* **31**: 1293-1302.
- Stein, P. E., et al. (1995) *Nat. Struct. Biol.* **2(2)**: 96-113.
- Torpier, G., et al. (1991) *Exp. Parasitol.* **72**: 99-102.
- Withers-Martinez, C. et al., (1999) *Protein Eng.* **12**, 1113-1120.

- Withers-Martinez, C., et al. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**: 29698-29709.
- Wu, Y., et al. (2003) *Genome Res.* **13**: 601-616
- Zhang, B., et al. (2001) *J. Cell Biol.* **153**: 1187-1198.

