

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ-ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ  
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΑΣΩΝ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΑΣ ΣΤΟΙΒΑΔΑΣ ΣΤΟ ΦΟΡΕΑ  
ΕΛΟΝΟΣΙΑΣ *Anopheles gambiae*  
ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΟΥΣ ΣΤΙΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ ΚΟΥΝΟΥΠΙΟΥ ΜΕ ΤΟ  
ΠΑΡΑΣΙΤΟ ΤΗΣ ΕΛΟΝΟΣΙΑΣ

ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ ΓΟΥΛΙΕΛΜΑΚΗ



ΗΡΑΚΛΕΙΟ  
ΙΟΥΛΙΟΣ 2011

**Επιστημονικός Υπεύθυνος:** Λουκέρης Αθανάσιος, Ερευνητής IMBB/ITE

**Υπεύθυνος Καθηγητής:** Λούης Χρήστος, Βιολογικό τμήμα Παν/μίου Κρήτης

#### **Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή παρακολούθησης**

Λούης Χρήστος, Καθηγητής Βιολογικού τμήματος Παν/μίου Κρήτης

Δελιδάκης Χρήστος, Καθηγητής Βιολογικού τμήματος Παν/μίου Κρήτης

Λουκέρης Αθανάσιος, Ερευνητής IMBB/ITE

#### **Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή**

Λούης Χρήστος, Καθηγητής Βιολογικού τμήματος Παν/μίου Κρήτης

Παπαματθαϊάκης Ιωσήφ, Καθηγητής Βιολογικού τμήματος Παν/μίου Κρήτης

Αλεξανδράκη Δέσποινα, Καθηγήτρια Βιολογικού τμήματος Παν/μίου Κρήτης

Αβέρωφ Μιχάλης, Ερευνητής IMBB/ITE

Χαλεπάκης Γεώργιος, Καθηγητής Βιολογικού τμήματος Παν/μίου Κρήτης

Δελιδάκης Χρήστος, Καθηγητής Βιολογικού τμήματος Παν/μίου Κρήτης

Λουκέρης Αθανάσιος, Ερευνητής IMBB/ITE

**Η παρούσα διδακτορική διατριβή χρηματοδοτήθηκε από το πρόγραμμα 03ΕΔ879**



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ



**Γενική Γραμματεία Ερευνας και Τεχνολογίας  
Γ' Κοινοτικό Πλαίσιο Στηριξης 2000-2006  
Ευρωπαϊκή Επιτροπή Συγχρηματοδότησης  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο (ΕΚΤ)**

## Summary

Midgut epithelial responses triggered by *Plasmodium* ookinete invasion in the vector *Anopheles gambiae* is a matter of intense research, due to their direct or indirect involvement in parasite survival. For this reason we undertook the effort to study mosquito metalloproteases of the extracellular matrix (ECM), which are the main enzymes involved in epithelial reorganization in several organisms.

Taking advantage of gene predictions of *Anopheles* database, as well as, of phylogenetic relationships, we identified representative members of all three major families of ECM metallo-proteinases, ADAMs, ADAMTSs and MMPs. Transcriptional profiling indicated putative implications of ADAMs and ADAMTSs in developmental processes, however, an additional involvement of those proteases in vector-parasite interactions cannot be excluded.

Our study was mainly focused on MMP-1, a representative member of MMP family of metalloproteases. Reverse genetics, cell biology and transcriptional profiling, as well as, the use of established *Anopheles gambiae* hemocyte-like celllines, revealed not only involvement of AgMMP1 in the processes of midgut epithelial reconstitution after parasite invasion, as expected, but in addition a protective role of the AgMMP1 protease in the survival of the parasite during the oocyst stage. Our data indicate that these two roles are probably conferred by different MMP1 isoforms; a transmembrane and a secreted form, expressed in the mosquito midgut epithelium and hemocytes respectively.

## Περίληψη

Το πέρασμα του ωοκινέτη από το μεσεντερικό επιθήλιο του κουνουπιού προκαλεί μια σειρά αποκρίσεων από το τελευταίο που επηρεάζουν την βιωσιμότητα του παρασιτικού πληθυσμού είτε άμεσα, είτε έμμεσα μέσω ανοσοποιητικών μηχανισμών. Για τους παραπάνω λόγους θελήσαμε να χαρακτηρίσουμε γονίδια του Ανωφελούς που κωδικοποιούν μεταλλοπρωτεάσες της εξωκυττάριας μήτρας, αφού αυτές θεωρούνται σε άλλους οργανισμούς ότι παίζουν βασικό ρόλο στην αναδιάταξη των επιθηλίων. Η αναζήτηση στη δημοσιευμένη αλληλουχία του γονιδιώματος του κουνουπιού, και η μελέτη των φυλογενετικών σχέσεων με ομόλογα γονίδια από άλλους οργανισμούς μας οδήγησαν στην ταυτοποίηση πρωτεασών της εξωκυττάριας μήτρας που ανήκουν σε τρεις διαφορετικές οικογένειες, τις ADAMs, ADAMTSs και τις MMPs. Το μεταγραφικό πρότυπο των ADAMs και ADAMTSs έδειξε ρύθμιση της έκφρασης τους σε στάδια διαφοροποίησης του εντόμου, γεγονός που συμφωνεί και με δεδομένα από άλλους οργανισμούς για πιθανή εμπλοκή τους σε αναπτυξιακές διεργασίες.

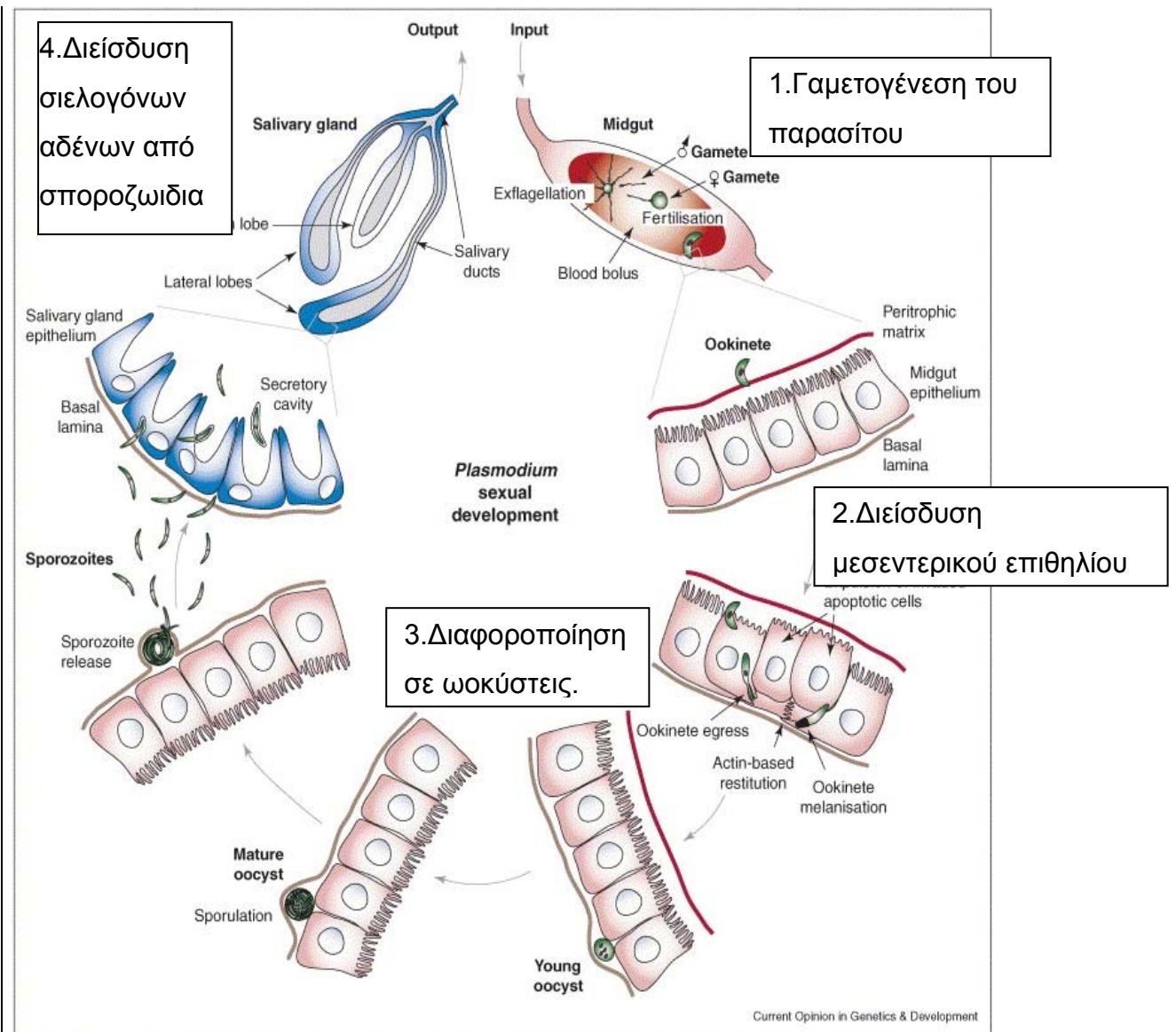
Η μελέτη μας επικεντρώθηκε κυρίως στον χαρακτηρισμό του γονιδίου MMP-1, που ανήκει στην οικογένεια των MMP μεταλλοπρωτεασών, από το οποίο βρήκαμε να εκφράζονται, μετά από εναλλακτικό μάτισμα, δυο ισομορφές της MMP1 πρωτεΐνης, μια επιθηλιακή διαμεμβρανική και μια εκκρινόμενη την οποία εντοπίσαμε στα περιφερειακά αιμοκύτταρα του ενήλικου ατόμου. Το μεταγραφικό πρότυπο του γονιδίου, σε συνδυασμό με πειράματα αντίστροφης γενετικής και κυτταρικής βιολογίας ανέδειξαν ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης σε πολλαπλά επίπεδα (μεταγραφικό, μετα-μεταγραφικό, μετα-μεταφραστικό) και πιθανή εμπλοκή της MMP1 πρωτεάσης στην διαδικασία επούλωσης του επιθηλίου μετά από το πέρασμα του ωοκινέτη μέσα από αυτό. Επιπλέον όμως υπέδειξαν ότι το(α) προϊόν(τα) του MMP1 γονιδίου λειτουργούν προστατευτικά για την επιβίωση του παρασίτου κατά την διάρκεια της πρώιμης ανάπτυξης της ωοκύστης. Μάλιστα τα ευρήματά μας οδηγούν στην υπόθεση ότι οι δυο διακριτοί βιολογικοί ρόλοι της πρωτεάσης, εμπλοκή στην αναδιάταξη του μεσεντέρου του κουνουπιού και προστασία της πρώιμης ωοκύστης του παρασίτου, μπορεί να εκτελούνται από την διαμεμβρανική και την εκκρινόμενη ισομορφή αντίστοιχα.

# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ελονοσία οφείλεται σε ένα από τα 5 διαφορετικά είδη *Plasmodium*: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, και του *P. knowlesi*. Τα παράσιτα αυτά μεταφέρονται στον άνθρωπο από περίπου 50 διαφορετικά είδη κουνουπιών, που ανήκουν κυρίως στο γένος του Ανωφελούς. Στο συγκεκριμένο γένος ωστόσο ανήκουν 350 περίπου επιπλέον διαφορετικά είδη στα οποία το παράσιτο δεν μπορεί να αναπτυχθεί.

Αξίζει επιπλέον να σημειωθεί ότι μεταξύ των φορέων κουνουπιών εμφανίζονται άτομα ανθεκτικά στο παράσιτο, ενώ υπό φυσιολογικές συνθήκες ο αριθμός των παρασίτων που τελικά επιβιώνουν μέσα στον φορέα είναι ελάχιστος σε σχέση με τον αριθμό τους στο αίμα (Sinden 2002). Οι λόγοι για τους οποίους τα κουνούπια εμφανίζουν αυτή τη 'φυσιολογική' ανθεκτικότητα στο παράσιτο είναι στο μεγαλύτερο βαθμό άγνωστοι, αλλά σαφώς καταδεικνύεται ότι η συμβίωση του παράσιτου με τον φορέα του αποτελεί μια πολύπλοκη και μερικώς μόνο προσδιορισμένη σχέση.

Η αποκάλυψη των βιολογικών διεργασιών που κρύβονται πίσω από αυτή τη σχέση δίνει νέα ώθηση στην αντιμετώπιση μιας ασθένειας που ακόμη και σήμερα ευθύνεται για τον θάνατο ενός εκατομμύριου ανθρώπων ετησίως μόνο στην Αφρική. Προς την κατεύθυνση αυτή έχουν συμβάλει σημαντικά η αλληλούχηση των γονιδιωμάτων τόσο του Ανωφελούς, όσο και του *P.falciparum*, καθώς και νέες τεχνικές αντίστροφης γενετικής (π.χ. RNAi) και σταθερού μετασχηματισμού, που έχουν εφαρμοστεί με επιτυχία στους δυο οργανισμούς. Μέσω αυτών των εργαλείων έχει αποκαλυφθεί ο ρόλος πολλών γονιδίων στην επιτυχή ολοκλήρωση της ζωής του παράσιτου μέσα στον ασπόνδυλο φορέα του ή στην παρεμπόδιση της επιτυχούς ολοκλήρωσης του παρασιτικού κύκλου μέσα στο κουνούπι.



**Εικόνα1:**Κύκλος ζωής του παράσιτου μέσα στον ασπόνδυλο φορέα του. Ο κύκλος ζωής του παρασίτου μέσα στο κουνούπι ξεκινά με τη διαφοροποίηση των γαμετών μέσα στο μεσεντερο. Συνεχίζει με σύντηξη των γαμετών, δημιουργία του ωοκινετη και τελικά διείσδυση του μεσεντερικού επιθηλίου από τον τελευταίο. Η προσέγγιση της βασικής λαμινας από τον ωοκινετη συμπίπτει με τη διαφοροποίηση του σε ωοκυστη. Μέσα στην ωοκυστη συνεχείς πυρηνικές διαιρέσεις και κυτοκίνηση οδηγούν στον σχηματισμό των σποροζωιδίων, τα οποία απελευθερώνονται στην αιμολεμφο του εντόμου 21 ημέρες μετά την αιματοφαγία και κατευθύνονται στους σιελογόνους αδένες για να μεταφερθούν στον επόμενο φορέα με το δάγκωμα του κουνουπιού.

## **1.1. Κύκλος ζωής του παρασίτου μέσα στον φορέα του**

### **1.1.1 Γαμετογένεση του παρασίτου**

Το ταξίδι του παρασίτου μέσα στο κουνούπι ξεκινά με την λήψη μολυσμένου αίματος από το τελευταίο. Μέσα στον μεσεντερικό αυλό αρσενικά και θηλυκά γαμετοκύτταρα του πλασμοδίου ωριμάζουν σε αρσενικούς και θηλυκούς γαμέτες. Στη διαδικασία αυτή καταλυτικό ρόλο φαίνεται να παίζει η πτώση της θερμοκρασίας μέσα στον μεσεντερικό αυλό, η αλλαγή του pH, καθώς και η παρουσία του ξανθουρενικού οξέος (Billker, Lindo et al. 1998). Συγκεκριμένα το τελευταίο φαίνεται να προκαλεί μια αύξηση των επιπέδων ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα των γαμετοκυττάρων επάγοντας έτσι την διαφοροποίηση τους σε γαμέτες. Επιπρόσθετα, η παρουσία ασβεστίου οδηγεί στην ενεργοποίηση μιας κινάσης (CDPK4) στους αρσενικούς γαμέτες με αποτέλεσμα τον σχηματισμό 8 ευκίνητων αρσενικών γαμετών (Billker, Dechamps et al. 2004), που φέρουν μαστίγιο και απελευθερώνονται από το ερυθροκύτταρο με τη βοήθεια μιας δεύτερης κινάσης Pbmpr2 προκειμένου να συντηχτούν με τους θηλυκούς γαμέτες και να σχηματιστεί έτσι το ζυγωτο (Khan, Franke-Fayard et al. 2005; Tewari, Dorin et al. 2005). Στην ανάπτυξη των γαμετοκυττάρων σημαντικό ρόλο παίζει και μια οικογένεια αντιοξειδωτικών ενζύμων (Peroxiredoxins) (Yano, Komaki-Yasuda et al. 2006). Μετά την δημιουργία του κάθε ζυγωτόδιαφοροποιείται σε έναν ευκίνητο ωοκινέτη μέσα σε μια χρονική περίοδο 5-18 ωρών.

### **1.1.2 Διαφοροποίηση του ζυγώτη σε ωοκινέτη και διείσδυση του μεσεντερικού επιθηλίου του κουνουπιού**

Στη διάρκεια της διαφοροποίησης του ζυγώτη σε ωοκινέτη λαμβάνουν χώρα δυο μειωτικές διαιρέσεις, οι οποίες όμως δεν συνοδεύονται από κυτταρική διαίρεση. Επιπλέον ο ζυγώτης διαφοροποιείται και μορφολογικά κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του. Συγκεκριμένα αλλάζει η σύσταση της επιφάνειας του και σχηματίζεται στο εμπρόσθιο τμήμα του ώριμου πλέον ωοκινέτη μια δομή, το κορυφαίο σύμπλοκο (apical complex), που αποτελείται κυρίως από ένα σύνολο εκκριτικών οργανιδίων που ονομάζονται μικρονημάτια (Sinden 2002). Η δομή αυτή φαίνεται να παίζει βασικό ρόλο στην αναγνώριση των κυττάρων του ξενιστή και στην ικανότητα κίνησης του ωοκινέτη που είναι



βασική προϋπόθεση προκειμένου να καταφέρει να διεισδύσει το μεσεντερικό επιθήλιο του κουνουπιού (Menard 2001). Να σημειωθεί ότι η κίνηση του ωοκινέτη κατά την διείσδυση του μεσεντερικού επιθηλίου έχει περιγραφεί (Vlachou, Zimmermann et al. 2004) και μοιάζει ως ένα βαθμό με την κίνηση των σποροζωιδίων κατά την διάρκεια εισβολής των ηπατικών κυττάρων.

Κατά τη διάρκεια της εισβολής του μεσεντέρου ο ωοκινέτης αντιμετωπίζει μια σειρά εμποδίων. Το πρώτο εμπόδιο είναι αυτό της περιτροφικής μεμβράνης. Όπως σε όλα τα αιματοφάγα έντομα έτσι και στα κουνούπια σχηματίζεται 6 περίπου ώρες μετά τη λήψη του αίματος ένα παχύ στρώμα εσωτερικά του μεσεντέρου που αποτελείται κυρίως από χιτίνη και εκκρίνεται από τα επιθηλιακά κύτταρα του μεσεντέρου. Η παρουσία αυτού του στρώματος προστατεύει το κουνούπι από την είσοδο μικροοργανισμών που πιθανά υπάρχουν μέσα στο αίμα, καθώς και από τα υψηλά επίπεδα αίμης που προκαλεί η πέψη του αίματος (Shao, Devenport et al. 2001). Προκειμένου να καταφέρει να περάσει ο ωοκινέτης τη περιτροφική μεμβράνη εκκρίνονται από τα μικρονημάτια του ένζυμα με δυνατότητα αποικοδόμησης της χιτίνης, οι χιτινάσες. Στο *P.falciparum* και στο *P.gallinaceum* η εμπλοκή των ενζύμων αυτών είναι απαραίτητη για την διείσδυση του μεσεντερικού επιθηλίου, ενώ στην περίπτωση του *P. berghei* φαίνεται να είναι λιγότερο σημαντική (Sinden RE 2004).

Το δεύτερο εμπόδιο στην πορεία του ωοκινέτη είναι το ίδιο το μεσεντερικό επιθήλιο. Η είσοδος στα επιθηλιακά κύτταρα του μεσεντέρου πιθανά να χρειάζεται την αλληλεπίδραση μεταξύ μορίων του παρασίτου και του φορέα. Από τη μεριά του φορέα τέτοια μόρια δεν έχουν ταυτοποιηθεί. Από τη μεριά του παρασίτου πιθανά μόρια είναι που εκκρίνονται από τα μικρονημάτια και σχετίζονται με την ικανότητα κίνησης και διείσδυσης.

Τέτοια μόρια είναι η πρωτεΐνη MAOP η οποία είναι σημαντική για την είσοδο του παρασίτου στα επιθηλιακά κύτταρα και μοιάζει δομικά με την πρωτεΐνη (SPECT) η οποία είναι σημαντική και για την διείσδυση των σποροζωιδίων στα ηπατοκύτταρα (Ishino, Yano et al. 2004; Kadota, Ishino et al. 2004). Σημαντικό ρόλο στη διείσδυση του μεσεντερικού επιθηλίου από τον ωοκινέτη έχουν και οι πρωτεΐνες CTRP και TRAP. Διαγονιδιακά παράσιτα που δεν εκφράζουν αυτές τις πρωτεΐνες παρουσιάζουν πρόβλημα στην ικανότητα κίνησης στο στάδιο του ωοκινέτη και δεν μπορούν να εισβάλλουν στο

μεσεντερικό επιθήλιο (Dessens, Beetsma et al. 1999; Yuda, Sakaida et al. 1999). Το γεγονός ότι η CTRP φαίνεται να αλληλεπιδρά με τη λαμινίνη του κουνουπιού υποδηλώνει ένα πιθανό ρόλο της CTRP (Limviroj, Yano et al. 2002; Mahairaki, Voyatzi et al. 2005), ενώ το γεγονός ότι το ίδιο μόριο αλληλεπιδρά με τη λαμινίνη και σε μετέπειτα αναπτυξιακά στάδια του παρασίτου κάνει τον ρόλο της για την επιβίωση του παρασίτου μέσα στον φορέα του πιο σημαντικό (Arrighi and Hurd 2002).

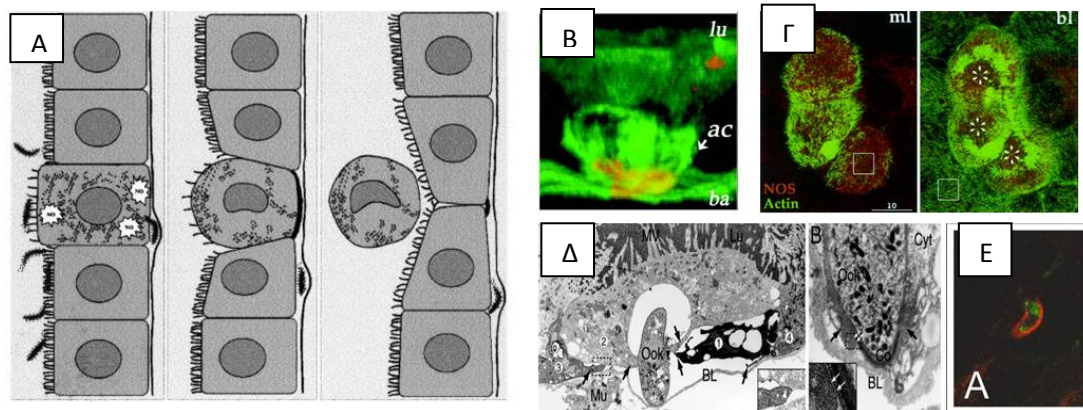
Προκειμένου να φτάσουν τα παράσιτα στο βασικό έλασμα του επιθηλίου πρέπει να περάσουν και από το κυτταρόπλασμα των μεσεντερικών κυττάρων. Συχνά μάλιστα φαίνεται ότι ένας μόνο ωοκινέτης περνά διαδοχικά από γειτονικά κύτταρα προκειμένου να καταφέρει να προσεγγίσει το βασικό έλασμα. Από την πλευρά του παρασίτου έχει ταυτοποιηθεί μια πρωτεΐνη (CeITOS) η οποία παίζει ρόλο σε αυτή τη διαδικασία (Kariu, Ishino et al. 2006). Στον φορέα το πέρασμα του ωοκινέτη προκαλεί αποπτωτικό θάνατο των επιθηλιακών κυττάρων που προσβάλλονται από τον ωοκινέτη, τα οποία αρχικά χάνουν τις μικρολάχνες τους και στη συνέχεια αποβάλλονται από το επιθήλιο μέσω ενός δακτυλίου ακτίνης στο είδος *An.gambiae* ή ενός σχηματισμού κώνου ακτίνης στο είδος *Aedes aegypti* (Han, Thompson et al. 2000; Gupta, Kumar et al. 2005). Και στις δύο περιπτώσεις οι μορφολογικές αυτές αλλαγές έχουν σαν αποτέλεσμα όχι μόνο την αποβολή των αποπτωτικών κυττάρων από το επιθήλιο του μεσεντέρου, αλλά και τη επούλωση του (healing) και τη διατήρηση της συνέχειας του. Μάλιστα η αναδιάταξη του κυτταροσκελετού της ακτίνης κατά τη διάρκεια επούλωσης του επιθηλίου φαίνεται ότι οδηγεί τα γειτονικά στο αποπτωτικό κύτταρα, να σχηματίζουν ψευδοπόδια προκειμένου να κλείσουν το κενό που αφήνει πίσω του το, ή τα αποπτωτικά κύτταρα (Vlachou, Zimmermann et al. 2004). Οι παραπάνω διαδικασίες μοιάζουν σε μεγάλο βαθμό με την διαδικασία επούλωσης που έχει περιγραφεί και σε άλλα επιθήλια (Brock, Midwinter et al. 1996).

Οι παραπάνω μορφολογικές αλλαγές στο επίπεδο του μεσεντέρου επηρεάζουν σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές και το παράσιτο. Ο αποπτωτικός θάνατος που προκαλεί η διείσδυση των παρασίτων στα επιθηλιακά κύτταρα έχει σαν αποτέλεσμα την απελευθέρωση ελεύθερων ριζών στο κυτταρόπλασμα του αποπτωτικού κυττάρου, που μπορούν να

επηρεάσουν την επιβίωση του παρασίτου (Han, Thompson et al. 2000). Επιπλέον η αναδιάταξη του κυτταροσκελετού ακτίνης φαίνεται με πειράματα σιώπησης των μορίων που είναι υπεύθυνα για τον πολυμερισμό/αποπολυμερισμό της ότι επηρεάζει την επιβίωση των ωοκινετών (Vlachou, Schlegelmilch et al. 2005). Ο μηχανισμός με τον οποίο γίνεται αυτό δεν είναι γνωστός, ωστόσο μορφολογικά δεδομένα υποστηρίζουν την επικάλυψη του ωοκινέτη από ένα ίσως προστατευτικό στρώμα ινιδίων ακτίνης (Vlachou, Zimmermann et al. 2004). Παρόμοια παρατήρηση έχει αναφερθεί και για την ιντεγκρίνη ένα μόριο που συμμετέχει στην αλληλεπίδραση μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων (Mahairaki, Lycett et al. 2005).

Η σημασία της ακεραιότητας του μεσεντερικού επιθηλίου για την επιβίωση του κουνουπιού φαίνεται από το γεγονός ότι ένα ζευγάρι μορίων, μια οξειδάση και μια περοξειδάση, οι οποίες συμβάλλουν στην διατήρηση της ακεραιότητας του εξωκυτταρίου στρώματος του μεσεντερικού επιθηλίου διασφαλίζουν την παρεμπόδιση της εισόδου του μικροβιακού πληθυσμού που υπάρχει στον μεσεντερικό αυλό στην αιμόλεμφο του, και την παρεμπόδιση της έκτοπης και έντονης ενεργοποίησης του αμυντικού του μηχανισμού. Τα δύο αυτά μόρια συμβάλλουν επίσης σημαντικά στην επιβίωση του παρασιτικού πληθυσμού (Kumar, Molina-Cruz et al.).

Η σημασία της μικροβιακής χλωρίδας στην επιβίωση του παρασίτου μέσα στον ασπόνδυλο φορέα του αποτελεί μια νέα περιοχή μελέτης και όπως δείχνουν πρόσφατες αναφορές συμπεριλαμβανομένης και της παραπάνω η μικροβιακή χλωρίδα μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την επιβίωση του παρασίτου.



**Εικόνα 2:** Μορφολογικές αποκρίσεις του μεσεντερικού επιθηλίου του κουνουπιού μετά από την διείσδυση του ωοκινέτη. Α) Το πέρασμα του ωοκινέτη μέσα από τα επιθηλιακά κύτταρα προκαλεί αποπτωτικό θάνατο στα τελευταία. Τα αποπτωτικά κύτταρα αποβάλλονται από το επιθήλιο μέσω ενός κώνου ακτίνης στο είδος *Aedes aegypti* (B) ή ενός δακτυλίου ακτίνης στο είδος *Anopheles gambiae* (Γ). Δ) **αριστερά:** Η αναδιάταξη του κυτταροσκελετού ακτίνης κατά την επούλωση του μεσεντερικού επιθηλίου οδηγεί στον σχηματισμό ψευδοποδίων από τα γειτονικά κύτταρα του αποπτωτικού, καθώς και στον σχηματισμό ενός στρώματος ινιδίων ακτίνης γύρω από τον ωοκινέτη (**δεξιά**). Ε) ο ωοκινέτης που διεισδύει το μεσεντερικό επιθήλιο περιβάλλεται επιπλέον από ιντεγκρίνη του κουνουπιού.

Η προσέγγιση του βασικού ελάσματος του μεσεντέρου από τον ωοκινέτη αποτελεί ίσως και το πιο ευάλωτο σημείο κατά την διείσδυση. Στο στάδιο αυτό το παράσιτο έρχεται σε επαφή με την αιμόλεμφο του φορέα και αυτό προκαλεί μια σειρά καλά καταγεγραμμένων αντιδράσεων του ανοσοποιητικού συστήματος. Δύο «ανοσολογικές» αντιδράσεις φαίνεται να ενεργοποιούνται: η μελανοποίηση και η λύση του ωοκινέτη.

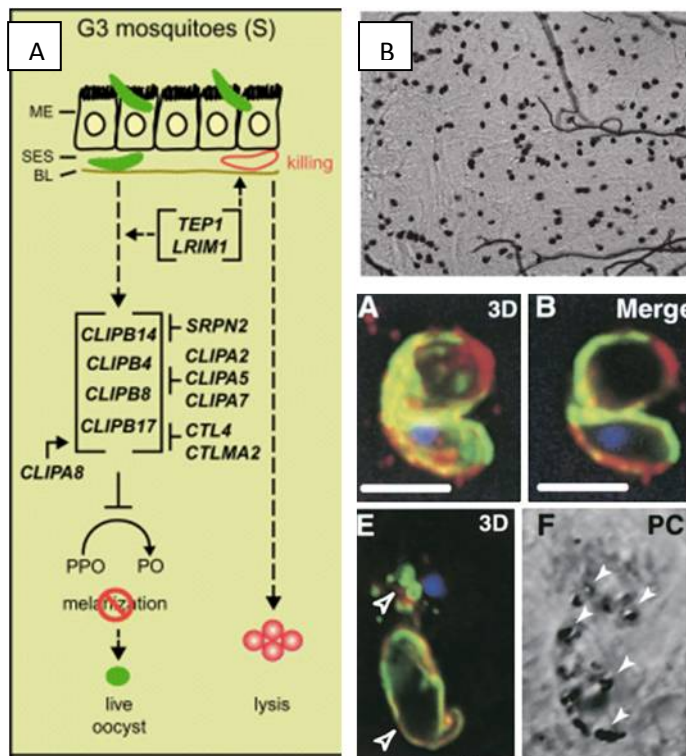
Στη λύση μετέχουν τρία βασικά μόρια, η TEP1 (thioester-containing complement like protein), η LRIM (leucine-rich repeat protein), και η APL1C (*Anopheles Plasmodium responsive leucine rich repeat 1*) (Blandin, Shiao et al. 2004; Osta, Christophides et al. 2004). Τα τρία αυτά μόρια φαίνεται ότι συμπλοκοποιούνται, όπως έδειξαν πειράματα σε κυτταρικές σειρές κουνουπιού και καλύπτουν την επιφάνεια του ωοκινέτη, μόλις αυτός φτάσει το βασικό έλασμα του μεσεντέρου, οδηγώντας τον σε λύση (Povelones,

Waterhouse et al. 2009). Ο μηχανισμός της λύσης φαίνεται να είναι όμοιος με τον μηχανισμό προσβολής μικροοργανισμών από πρωτεΐνες του συμπληρώματος σε ανωτέρα θηλαστικά.

Κατά τη μελανοποίηση τα μόρια που προάγουν την μετατροπή της προφαινολοξειδάσης σε ενεργή φαινολοξειδάση είναι πρωτεΐνες της οικογενείας των CLIPA και CLIPB (Volz, Muller et al. 2006). Ωστόσο η δράση τους περιορίζεται λόγω της αναστολής από πρωτεΐνες της οικογενείας των C-type λεκτινών (CTL4 και CTLMA2) καθώς και από τον αναστολέα πρωτεασών σερίνης SRPN2 (Michel, Budd et al. 2005).

Σημαντικό είναι ότι η έκφραση των μορίων και των δυο αυτών μονοπατιών ελέγχεται από τους μεταγραφικούς παράγοντες REL1 και REL2, οι οποίοι ενεργοποιούνται με τη σειρά τους μέσω των γνωστών μονοπατιών ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος των εντομών, τα μονοπάτια Toll και Imd (Meister, Kanzok et al. 2005).

Τα παραπάνω υποδεικνύουν ότι προκειμένου να μπορέσει να περάσει ο ωοκινέτης το φράγμα του μεσεντερικού επιθηλίου πρέπει να αντιμετωπίσει μια σειρά εμποδίων. Η επιτυχημένη έκβαση της διείσδυσης του απαιτεί από τη μεριά του κίνηση, αλλά και ικανότητα να αναγνωρίζει και να μπορεί να διεισδύσει τα επιθηλιακά κύτταρα, ενώ χρειάζεται παράλληλα να αποφύγει και τις επιθέσεις του ανοσοποιητικού συστήματος του κουνουπιού. Τα παραπάνω δικαιολογούν το λόγο για τον οποίο το στάδιο αυτό θεωρείται το πιο ευάλωτο στην διάρκεια της ανάπτυξης του παρασίτου μέσα στο κουνούπι και γιατί επομένως χρήζει και περαιτέρω μελέτης.



**Εικόνα 3** :Ανοσολογικές αποκρίσεις του κουνουπιού στη διείσδυση του μεσεντερικού επιθηλίου από τον ωοκινέτη. Α) Σχηματικά παρουσιάζονται οι δύο αντιδράσεις που ενεργοποιούνται με την προσέγγιση του βασικού ελάσματος από τον ωοκινέτη. Κατά την μελανοποίηση βασικό ρόλο παίζουν οι C-

typelectins και ο αναστολέας των πρωτεασών σερίνης SRPN2 που προφυλάσσουν τον ωοκινέτη από μελανοποίηση. Κατά την λύση βασικό ρόλο παίζουν οι πρωτεΐνες TEP-1, LRIM/APL1C, οι οποίες συμπλοκοποιούνται κι οδηγούν ένα μεγάλο μέρος του παρασιτικού πληθυσμού στη λύση. Β) παράσιτα που έχουν μελανοποιηθεί στην βασική πλευρά του μεσεντερικού επιθηλίου (**πάνω μέρος**) και ωοκινέτες που περιβάλλονται από TEP-1 και οδηγούνται στην λύση (**κάτω μέρος**).

### 1.1.3 Ανάπτυξη της ωοκύστης και των σποροζωιδίων στο βασικό έλασμα του μεσεντέρου.

Καθώς ο ωοκινέτης έρχεται σε επαφή με το βασικό έλασμα του μεσεντέρου ξεκινά η διαφοροποίηση του σε ωοκύστη. Η διαφοροποίηση του ωοκινέτη σε ωοκύστη έχει περιγραφεί σε κάποια έκταση (Al-Olayan, Beetsma et al. 2002). Στις αναπτυσσόμενες νεαρές ωοκύστες παρατηρούνται συνεχείς κυτταρικές διαιρέσεις, οι οποίες επειδή δεν συνοδεύονται από κυτοκίνηση οδηγούν σε ένα πολυπύρηνο παράσιτο το οποίο αυξάνει συνεχώς σε μέγεθος. Παράλληλα με τις κυτταρικές διαιρέσεις παρατηρούνται και πτυχώσεις της μεμβράνης της ωοκύστης οι οποίες χωρίζουν το κυτταρόπλασμα σε διαμερίσματα που έχουν ονομαστεί σποροβλάστες. Από τους σποροβλάστες

θα προεκβάλλουν τα σποροζωΐδια μέσω μιας διαδικασίας που απαιτεί κίνηση των πυρήνων και άλλων κυτταρικών οργανιδίων. Τελικά, κυτοκίνηση των σποροζωΐδιων οδηγεί στην ώριμη πλέον ωκύστη που περιέχει απλοειδή σποροζωΐδια. Βασικό ρόλο στις παραπάνω διαδικασίες φαίνεται να παίζουν οι πρωτεΐνες CSP (Menard, Sultan et al. 1997; Thathy, Fujioka et al. 2002) και LAP1 (Claudianos, Dessens et al. 2002), καθώς και η πρωτεΐνη κυστεΐνης falcipain στο *P. Falciparum* (Eksi, Czesny et al. 2004).

Παρόλο που έχει μελετηθεί σε μικρό βαθμό φαίνεται ότι και σε αυτό το στάδιο της ανάπτυξης του παρασίτου παίζει ρόλο η αλληλεπίδραση με το κουνούπι, τόσο θετικά ώστε να δοθούν τα κατάλληλα ερεθίσματα για να ξεκινήσει η διαφοροποίηση, στην φυσιολογία και το μεταβολισμό της αναπτυσσόμενης ωκύστης, αλλά και αρνητικά μέσω των ανοσοποιητικών μηχανισμών του κουνουπιού.

Ήδη αναφέρθηκε ότι τόσο η CTRP, όσο και η SOAP πρωτεΐνες του παρασίτου έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρούν με τη λαμινίνη ένα συστατικό του βασικού ελάσματος του μεσεντέρου (Arrighi and Hurd 2002). Παρ' όλο που σε *in vitro* συστήματα καλλιέργειας *P. berghei* βρέθηκε ότι μπορεί να γίνει ανάπτυξη του ωκινέτη σε ωκύστη χωρίς την παρουσία συστατικών του βασικού ελάσματος (Al-Olayan, Beetsma et al. 2002), και μάλιστα παρασίτων που στερούνταν τις πρωτεΐνες CTRP και SOAP (Nacer, Underhill et al. 2008), ωστόσο *in vivo* στο κουνούπι έχει βρεθεί ότι η επιφάνεια της ωκύστης αλληλεπιδρά με συστατικά του βασικού ελάσματος, και ότι μεταγραφική σιώπηση του γονιδίου της λαμινίνης επηρεάζει την επιβίωση του παρασίτου (Arrighi, Lycett et al. 2005). Επιπλέον πρέπει να αναφερθεί ότι έχει παρατηρηθεί έκτοπη ανάπτυξη ωκύστεων όταν ωκινέτες ενύονται στην αιμόλεμφο του κουνουπιού, αλλά και της *Drosophila melanogaster*. Οι έκτοπες όμως αυτές ωκύστες μεγαλώνουν μόνο σε επαφή με το βασικό έλασμα ιστών (Weathersby 1954; Schneider and Shahabuddin 2000).

Επιπρόσθετα η ανάπτυξη των ωκύστεων απαιτεί τη λήψη θρεπτικών συστατικών και ειδικά λιπιδίων. Προκειμένου να επιβιώσει το παράσιτο φαίνεται συμφώνα με πειραματικά δεδομένα ότι προσλαμβάνει λιποφορίνη του φορέα του (Atella, Bittencourt-Cunha et al. 2009). Με πειράματα γονιδιακής σιώπησης έχει βρεθεί ότι οι απολιποφορίνες I και II του κουνουπιού επηρεάζουν την επιβίωση του παρασίτου. Δεδομένου ότι η

σιώπηση των απολιποφορινών επηρεάζει όχι μόνο την βιωσιμότητα των ωοκύστεων, αλλά και το πέρασμα του ωοκινέτη από το μεσεντερικό επιθήλιο θεωρείται πιθανό ο ρόλος τους να αφορά όχι μόνο μεταβολικές ανάγκες του παρασίτου, αλλά και την εμπλοκή τους σε ανοσοποιητικές αντιδράσεις του κουνουπιού. Μια πιθανή εμπλοκή των απολιποφορινών στις ανοσολογικές αποκρίσεις του κουνουπιού ενισχύεται από το γεγονός ότι πειράματα μικροσυστοιχειών στην *Drosophila* υποδεικνύουν συμμετοχή των ομόλογων μορίων σε ανάλογα μονοπάτια. (Mendes, Schlegelmilch et al. 2008).

Αλλά και η αλληλεπίδραση της ωοκύστης με συστατικά του βασικού ελάσματος πιθανολογείται ότι πέρα από αναπτυξιακά ερεθίσματα μπορεί να προσφέρει στην ωοκύστη και προστασία από επιθέσεις του ανοσοποιητικού συστήματος του κουνουπιού. Όπως όμως φαίνεται από πρόσφατες αναφορές η κάλυψη της επιφάνειας της ωοκύστης από μόρια του φορέα δεν είναι αρκετή για να 'ξεγελάσει' το ανοσοποιητικό σύστημα. Επαγωγή της έκφρασης της συνθάσης του νιτρικού οξειδίου λόγω ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού μονοπατιού JAK/STAT οδηγεί σε συγκέντρωση ελεύθερων ριζών που μπορούν να οδηγήσουν σε απώλειες του παρασιτικού πληθυσμού (Gurta, Molina-Cruz et al. 2009). Μάλιστα το παράσιτο φαίνεται ότι στο στάδιο αυτό διατηρεί ενεργό ένα μεταβολικό μονοπάτι οξειδοαναγωγής για αποβολή αυτών των τοξικών ριζών. Απενεργοποίηση αυτού του μονοπατιού οδηγεί σε μη βιώσιμες ωοκύστες και μη παραγωγή σποροζωιδίων (Pastrana-Mena, Dinglasan et al.).

#### **1.1.4 Απελευθέρωση σποροζωιδίων από τις ώριμες ωοκύστες και διεξόδυση των σιελογόνων αδένων του κουνουπιού**

Η απελευθέρωση των σποροζωιδίων από την ώριμη ωοκύστη είναι μια ενεργή διαδικασία, στην οποία φαίνεται να συμμετέχουν δύο κυρίως παρασιτικές πρωτεΐνες η ECP (Egression Cysteine Protease), μια πιθανή πρωτεάση που ανήκει στην οικογένεια των SERA (Aly and Matuschewski 2005), αλλά και η κύρια adhesin των σποροζωιδίων, CSP (Wang, Fujioka et al. 2005), που αναφέρθηκε και προηγουμένως.

Ο τρόπος μετακίνησης των σποροζωιδίων στους σιελογόνους αδένες είναι ένα ζήτημα που δεν έχει διευκρινιστεί ακόμη. Υπάρχουν αναφορές που υποστηρίζουν ότι πρόκειται για ένα φαινόμενο χημειοτακτισμού, ενώ άλλες



υποστηρίζουν ότι πρόκειται για μια παθητική διαδικασία, μέσω της κυκλοφορίας της αιμολέμφου του κουνουπιού (Rodriguez and Hernandez-Hernandez Fde 2004; Akaki and Dvorak 2005).

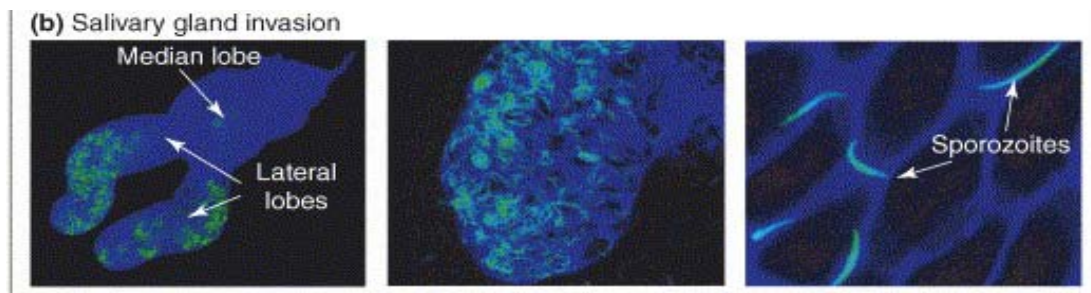
Πάντως η κίνηση ολίσθησης που παρουσιάζουν τα σποροζωΐδια είναι σημαντική για τον επιτυχημένο κύκλο της επιβίωσης του παρασίτου στον φορέα του. Σε αυτή παίζουν ρόλο η πρωτεΐνη TRAP, η οποία ανήκει στην ίδια οικογένεια με την πρωτεΐνη CTRP που εκφράζεται στο στάδιο το ωοκινέτη, καθώς και πρωτεΐνες του μηχανισμού ακτο-μυοσίνης. Ο μηχανισμός αυτός είναι σημαντικός όχι μόνο για την κίνηση, αλλά και για την εισβολή τελικά των σιελογόνων αδένων από τα σποροζωΐδια (Vlachou, Schlegelmilch et al. 2006).

Αντίθετα με την εισβολή του μεσεντερικού επιθηλίου η εισβολή των σιελογόνων αδένων γίνεται με αντίθετη φορά, δηλαδή από την βασική στην κορυφαία πλευρά του επιθηλίου. Παρόλα αυτά το συνθετικό πεππίδιο SM-1 (salivary gland and midgut peptide 1) εμποδίζει την εισβολή του παρασίτου και στα δύο επιθήλια (Ghosh, Ribolla et al. 2001). Πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν ότι η αλληλεπίδραση που παρεμποδίζει το παραπάνω πεππίδιο είναι αυτή της πρωτεΐνης TRAP με την πρωτεΐνη sagliπτων σιελογόνων αδένων του κουνουπιού (Ghosh, Devenport et al. 2009). Αντίστοιχη παρεμπόδιση αλληλεπίδρασης από το SM-1 μεταξύ παρασιτικής(ων) πρωτεϊνών και πρωτεϊνης(ων) του μεσεντερικού επιθηλίου του κουνουπιού δεν έχουν προσδιοριστεί.

Σε ότι αφορά παρασιτικές πρωτεΐνες σημαντικό ρόλο στην εισβολή των σιελογόνων αδένων φαίνεται ότι παίζουν και οι MAEBL και CSP (Kariu, Yuda et al. 2002).

Σημαντική μορφολογική διαφορά στις δυο διαδικασίες εισβολής, εκείνης του μεσεντέρου από τον ωοκινέτη και εκείνης των σιελογόνων αδένων από τα σποροζωΐδια, είναι ότι το πέρασμα των σποροζωΐδιων μέσα από το βασικό έλασμα του επιθηλίου των σιελογόνων αδένων οδηγεί στον σχηματισμό ενός παρασιτοφορου κυστιδίου γύρω από αυτά. Η απελευθέρωση των σποροζωΐδιων από αυτό το κυστίδιο γίνεται μέσα στο κυτταρόπλασμα των επιθηλιακών κυττάρων των σιελογόνων αδένων. Από εκεί τα σποροζωΐδια περνούν στους αγωγούς έκκρισης των αδένων, διαδικασία που οδηγεί στον σχηματισμό για μια ακόμη φορά ενός παρασιτοφόρου κυστιδίου. Η

απελευθέρωση τους από το κυστίδιο γίνεται μέσα στους αγωγούς και μόνο τα σποροζωΐδια που απελευθερώνονται στους αγωγούς έκκρισης μεταφέρονται με το τσίμπημα του κουνουπιού. Τα υπόλοιπα αποθηκεύονται για το επόμενο τσίμπημα ή χάνονται.



**Εικόνα 5:** Δείσδυση διαγονιδιακων σποροζωΐδιων που εκφράζουν GFP στους σιελογόνους αδένες του κουνουπιού

Παρασιτικά μόρια	εμπλοκή	Μόρια του κουνουπιού	εμπλοκή
CDPK4	Γαμετογένεση	WASP	Διείσδυση μεσεντερικού επιθηλίου
Pbmap2		Gelsolin	
Peroxiredoxins		Οξειδάση/υπεροξειδάση	
Chitinases	Διείσδυση μεσεντερικού επιθηλίου	TEP1	Μόρια ανοσοποιητικού συστήματος, που λειτουργούν ως αγωνιστές ή ανταγωνιστές στην επιβίωση του παρασίτου όταν αυτό φτάσει στην βασική πλευρά του επιθηλίου
MAOP		LRIM	
CTRP		APL1C	
Celto	Σχηματισμός σποροζωιδίων, απελευθέρωση αυτών από την ωκύστη, διείσδυση σιελογόνων αδένων	CLIPA/CLIPB/CTL4/CTLMA2/S RPN2	Επιβίωση παρασίτου στο στάδιο της ωκύστης
CSP/LAP1/Falcipain/ECP/MAEBL		Apoliporphorins/laminin/NO synthase	
		saglin	Διείσδυση σιελογόνων αδένων

## 2.1 Η οικογένεια μεταλλοπρωτεασών εξωκυττάριας στοιβάδας.

Το γεγονός ότι το πέρασμα του παρασίτου από το μεσεντερικό επιθήλιο του κουνουπιού αποτελεί το πιο αδύναμο σημείο στην διάρκεια της ανάπτυξης του, μας οδήγησε να επικεντρωθούμε σε αυτό το σημείο της βιολογικής αλληλεπίδρασης φορέα-παρασίτου. Πληροφορίες που παρατέθηκαν παραπάνω υποδεικνύουν την σημασία που μπορεί να έχει για την επιβίωση του πλασμοδίου η διαδικασία αναδιάταξης του επιθηλίου, τόσο για την επιβίωση του ωοκινέτη όσο και για το επόμενο αναπτυξιακό του στάδιο, αυτό της ωοκύστης.

Για τον λόγο αυτό οδηγηθήκαμε στην μελέτη των πρωτεασών εξωκυττάριας στοιβάδας που θεωρούνται τα μόρια που είναι κατ' εξοχήν υπεύθυνα για την αναδιοργάνωση των επιθηλίων. Άλλωστε μελέτες της έκφρασης γονιδίων του κουνουπιού με την χρήση μικροσυστοιχειών δείχνει επαγωγή του αναστολέα των μεταλλοπρωτεασών κατά την διάρκεια της εισβολής του μεσεντερικού επιθηλίου, γεγονός που μπορεί να υποδεικνύει αυξημένη πρωτεολυτική δράση από τις πρωτεάσες εξωκυττάριας στοιβάδας και ανάγκη ρύθμισης αυτής της ενεργότητας (Vlachou, Schlegelmilch et al. 2005).

Οι μεταλλοπρωτεάσες εξωκυττάριας στοιβάδας ανήκουν στις ψευδαργύρο-εξαρτώμενες πρωτεάσες οι οποίες χωρίζονται σύμφωνα με την πρωτοταγή δομή των καταλυτικών τους τμημάτων στις: gluzinkins, metzinkins, inuzinkins και carboxypeptidases. Η ομάδα των metzinkins υποκατηγοριοποιείται στις πρωτεάσες: serralyins, astacins, matrixins και adamalysins. Από τις τελευταίες, οι ομάδες των matrixins και των adamalysins είναι αυτές στις οποίες αποδίδεται η δυνατότητα να πρωτεολύσουν συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας. Στην κατηγορία των matrixins ανήκουν οι MMPs ενώ στην κατηγορία των adamalysins ανήκουν οι ADAMs και οι ADAMTSs (Seals and Courtneidge 2003).

Δομικά αυτές οι οικογένειες πρωτεασών παρουσιάζουν πολλές ομοιότητες ιδίως στον αμινοτελικό τους άκρο. Χαρακτηριστική είναι η παρουσία i) του σηματοδοτικού πεπτιδίου, ii) του προπεπτιδίου, η παρουσία του οποίου διατηρεί το ενζυμο ανενεργό, και iii) του μοτίβου πρόσδεσης του ψευδαργύρου στο καταλυτικό τους τμήμα. Ειδικά το τελευταίο μοτίβο διαφοροποιείται ανάμεσα στις MMPs και τις ADAMs/ADAMTSs. Στις MMPs η

χαρακτηριστική αλληλουχία είναι: HEXXHXXGXXH, ενώ στις ADAMs/ADAMTSs είναι HEXXHXXG/N/SXXHD. Το κατάλοιπο ασπαρτικού οξέος είναι χαρακτηριστικό για τις ADAMs/ADAMTSs και τις διαφοροποιεί από τις MMPs. Η πρόσδεση του ιόντος ψευδαργύρου ανάμεσα στα τρία κατάλοιπα ιστιδινών γίνεται με την βοήθεια του καταλοίπου γλουταμικού οξέος, ενώ η αλληλεπίδραση του με ένα διατηρημένο κατάλοιπο κυστεΐνης στο προπεπτιδίο των μεταλλοπρωτεασών είναι η αιτία που τις καθιστά ανενεργές. Σημαντική για την σωστή πρόσδεση του ψευδαργύρου είναι και η παρουσία του καταλοίπου μεθειονίνης που κωδικοποιείται μετά το μοτίβο πρόσδεσης και αλληλεπιδρά με αυτό δημιουργώντας τη χαρακτηριστική 'Met-turn' (Porter, Clark et al. 2005).

Καρβοξυτελικά, η δομή των πρωτεασών των τριών οικογενειών διαφέρει σημαντικά μεταξύ τους και αποτελεί ουσιαστικά την 'υπογραφή' της κάθε οικογένειας. Το καρβοξυτελικό μέρος των ADAMs χαρακτηρίζεται από την παρουσία ενός τμήματος disintegrin, ενός τμήματος που περιέχει πολλά κατάλοιπα κυστεΐνης (cysteine-rich), ενός τμήματος EGF-like, ενός διαμεμβρανικού τμήματος και μιας κυτταροπλασματικής ουράς (SealsandCourtneidge 2003).

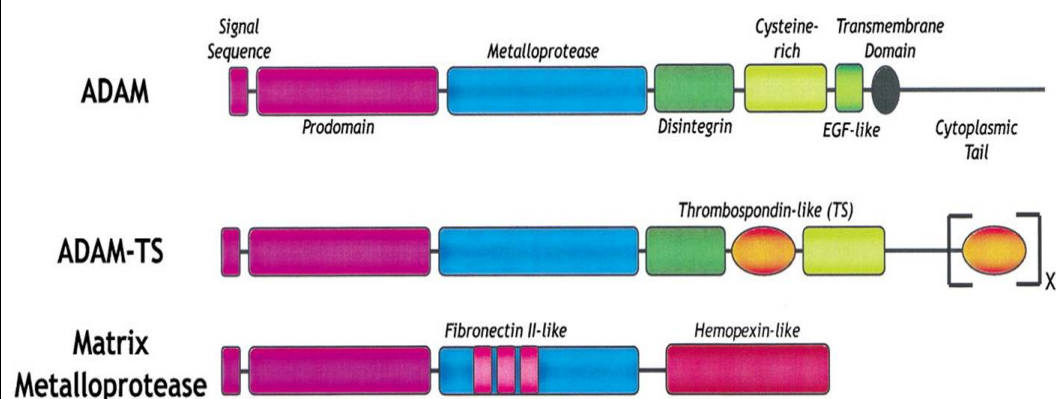
Το καρβοξυτελικό άκρο των ADAMTSs κωδικοποιεί ένα τμήμα disintegrin, όπως οι ADAMs, ένα κεντρικό TSPrepeat, το οποίο ακολουθείται από ένα τμήμα πλούσιο σε κυστεΐνες κι ένα spacerdomain. Το καρβοξυτελικό άκρο των ADAMTSs διαφοροποιείται από πρωτεάση σε πρωτεάση. Υπάρχουν κάποιες ADAMTSs που κωδικοποιούν επιπλέον TSPrepeats, ενώ κάποιες άλλες δεν κωδικοποιούν κανένα επιπλέον. Ο αριθμός των καρβοξυτελικών TSPrepeats μπορεί να φτάσει σε κάποιες από τις ADAMTSs και τα 14 (Porter, Clark et al. 2005).

Οι MMPs καρβοξυτελικά χαρακτηρίζονται από την παρουσία μιας περιοχής χαμηλής συντήρησης (hingeregion), η οποία κωδικοποιείται μετά το καταλυτικό τμήμα της πρωτεάσης και χωρίζει το τελευταίο, και από τα συντηρημένα hemopexindomains. Οι MMPs μπορούν να είναι είτε διαμεμβρανικές είτε εκκρινόμενες (RaandParks 2007).

Η δομή των μεταλλοπρωτεασών, όπως περιγράφηκε πιο πάνω καθορίζει και την τοπολογία τους στο κύτταρο. Η παρουσία του σηματοδοτικού πεπτιδίου σε όλες τις μεταλλοπρωτεάσες δικαιολογεί την παρουσία τους στο

ενδοπλασματικό δίκτυο και στην συνέχεια στο κυτταρικό διαμέρισμα του Golgi, όπου και φαίνεται ότι λαμβάνουν χώρα μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεασών,(Seals and Courtneidge 2003).

Η τελική θέση των μεταλλοπρωτεασών εξαρτάται αρχικά από την παρουσία ή όχι διαμεμβρανικού τμήματος. Έτσι θεωρείται ότι οι ADAMs είναι κατ' εξοχήν διαμεμβρανικές μεταλλοπρωτεάσες(Reiss and Saftig 2009), ενώ οι MMPs όπως αναφέρθηκε μπορεί να είναι είτε διαμεμβρανικές είτε εκκρινόμενες. Κάποια μέλη της οικογένειας αυτής στερούνται διαμεμβρανικού τμήματος, αλλά φαίνεται ότι αλληλεπιδρούν με την κυτταρική μεμβράνη λόγω παρουσίας GPIanchor. Τέλος οι πρωτεάσες της οικογένειας των ADAMTSs θεωρούνται κατ' εξοχήν εκκρινόμενες με δυνατότητα αλληλεπίδρασης με μόρια της εξωκυττάριας στοιβάδας λόγω παρουσίας των TSPrepeats(Porter, Clark et al. 2005).



**Εικόνα 6:** Διαγραμματική απεικόνιση της δομής των τριών οικογενειών μεταλλοπρωτεασών εξωκυττάριας στοιβάδας. Στο αμινοτελικό τους άκρο η δομή μεταξύ των τριών οικογενειών δεν διαφέρει και χαρακτηρίζεται από την παρουσία σηματοδοτικού πεπτιδίου, προπεπτιδίου και καταλυτικού κέντρου. Καρβοξυτελικά η παρουσία διαφορετικών τμημάτων διακρίνει δομικά τη μια οικογένεια από την άλλη. Οι MMPs κωδικοποιούν hemopexindomains, οι ADAMTSs τα TSPrepeats και οι ADAMs τα λεγόμενα EGFrepeats και το διαμεμβρανικό τμήμα.

## 2.2 Έκφραση των πρωτεασών εξωκυττάριας στοιβάδας.

Μελέτες πρωτεασών εξωκυττάριας στοιβάδας έχουν γίνει κυρίως σε ανώτερους φυλογενετικά οργανισμούς και ειδικά στον άνθρωπο, λόγω κυρίως της εμπλοκής τους σε μια σειρά από ασθένειες.

Σε ότι αφορά την οικογένεια των MMPs φαίνεται ότι στον ανθρώπινο οργανισμό κωδικοποιούνται 23 διαφορετικά γονίδια (Ra and Parks 2007). Στην *Drosophilamelanogaster* (Page-McCaw, Serano et al. 2003) αντίθετα και στο *Triboliumcastaneum* (Knorr, Schmidtberger et al. 2009) κωδικοποιούνται αντίστοιχα δύο και τρία μέλη αυτής της οικογένειας. Αναφορές για έκφραση MMP έχουν γίνει και για το έντομο *Galleriamelonella* (Altincicek and Vilcinskas 2008).

Η οικογένεια των ADAMTSs έχει 19 διαφορετικούς αντιπροσώπους στον άνθρωπο, ενώ έχει μελετηθεί κι ένα γονίδιο στον *C.elegans* (mig17), (Ihara and Nishiwaki 2007), κι ένα στο λεπιδόπτερο *Bombyxmori* (Bm-ADAMTS1) (Ote, Mita et al. 2005).

Σε ότι αφορά την οικογένεια των ADAMs υπάρχουν περισσότερες αναφορές για την έκφραση και το βιολογικό τους ρόλο σε μεγαλύτερη ποικιλία οργανισμών, όπως στον *Schizosacharomycespombe*, *C.elegans* και *D.melanogaster* (Reiss and Saftig 2009).

## 2.3 Ρύθμιση της δράσης των μεταλλοπρωτεασών εξωκυττάριας στοιβάδας.

Όπως η δράση των περισσότερων πρωτεασών, έτσι και η δράση των μεταλλοπρωτεασών ρυθμίζεται σε πολλά επίπεδα, τόσο μεταγραφικά όσο και μεταμεταγραφικά και μεταμεταφραστικά.

Τα μονοπάτια με τα οποία γίνεται επαγωγή της μεταγραφής των μεταλλοπρωτεασών έχουν χαρακτηριστεί μόνο ως ένα βαθμό και προφανώς διαφοροποιούνται μεταξύ των τριών οικογενειών, αφού και οι βιολογικοί τους ρόλοι δεν είναι οι ίδιοι και τα σήματα επαγωγής διαφορετικά (Vincenti and Brinckerhoff 2007).

Για τις οικογένειες μεταλλοπρωτεασών ADAMs και ADAMTSs έχει αναφερθεί σε πολλές περιπτώσεις εναλλακτικό μάτισμα. Συνήθως το εναλλακτικό

μάτισμα οδηγεί σε μετάγραφα που κωδικοποιούν πρωτεϊνικά προϊόντα τα οποία συνήθως έχουν ίδιο αμινοτελικό άκρο και διαφορετικό καρβοξυτελικό. Στην περίπτωση των ADAMs το εναλλακτικό μάτισμα απομακρύνει την περιοχή που κωδικοποιεί το διαμεμβρανικό τμήμα της πρωτεΐνης, οδηγώντας έτσι στην παραγωγή εναλλακτικών μορφών που διαφέρουν τοπολογικά (εκκρινόμενες ή διαμεμβρανικές)(Seals and Courtneidge 2003). Στην περίπτωση των ADAMTSs το εναλλακτικό μάτισμα διαφοροποιεί τον αριθμό των τελικών TSP repeats, γεγονός που οδηγεί σε πρωτεάσες με διαφορετική εξειδίκευση ως προς τα υποστρώματα(Porter, Clark et al. 2005).

Στην περίπτωση των MMPs εναλλακτικό μάτισμα έχει αναφερθεί σε μεμονωμένες μόνο περιπτώσεις και αντίθετα από την περίπτωση των ADAMs και ADAMTSs δεν φαίνεται να ακολουθεί ένα συγκεκριμένο πρότυπο. Σε κάποιες περιπτώσεις το εναλλακτικό μάτισμα επηρεάζει την περιοχή που κωδικοποιεί τα hemopexindomains(Illman, Keski-Oja et al. 2003), σε άλλες διαφοροποιεί το αμινοτελικό άκρο με αποτέλεσμα την κωδικοποίηση πρωτεάσης που δεν εκφράζει σηματοδοτικό πεπτιδίο (Hu, Klein et al. 1999), ή ακόμη δeneκφράζεισηματοδοτικό πεπτιδίο και προπεπτιδίο (Luo, Mari et al. 2002), γεγονός που τελικά καθιστά αυτές τις μορφές ενδοκυτταρικές τοπολογικά. Τέλος έχει αναφερθεί και περίπτωση όπου το εναλλακτικό μάτισμα, όπως και στην περίπτωση των ADAMs οδηγεί στην έκφραση δυο πανομοιότυπων πρωτεϊνικών προϊόντων, όπου το ένα είναι εκκρινόμενο και το άλλο διαμεμβρανικό (Matsumoto, Katoh et al. 1997).

Η μετα-μεταφραστική ρύθμιση της ενεργότητας των μεταλλοπρωτεασών γίνεται σε τρία κυρίως στάδια: θετικά με την απομάκρυνση προπεπτιδίου, και αρνητικά με το περιορισμό τους σε υπο-κυτταρικά διαμερίσματα και αναστολή τους από εξειδικευμένους αναστολείς(Ra and Parks 2007).

Η παρουσία του προπεπτιδίου είναι αυτή που καθιστά τις μεταλλοπρωτεάσες ανενεργές. Η απομάκρυνση του επομένως είναι ουσιαστική για την ρύθμιση της ενεργότητας. Κοινή αντίληψη είναι ότι η απομάκρυνση του προπεπτιδίου στις τρεις παραπάνω οικογένειες μεταλλοπρωτεασών γίνεται μέσω πρωτεόλυσης από πρωτεάσες της οικογένειας των pro-protein convertases και συγκεκριμένα από τη φουρίνη. Το παραπάνω συμπέρασμα προκύπτει από το γεγονός ότι τα περισσότερα χαρακτηρισμένα μέλη των τριών οικογενειών περιέχουν μεταξύ του προπεπτιδίου τους και της περιοχής της πρωτεάσης το



μοτίβο RXK/RR, που είναι η χαρακτηριστική θέση πρωτεόλυσης από φουρίνης. Ωστόσο υπάρχουν και αναφορές που υποδεικνύουν ότι η απομάκρυνση του προπεπτιδίου πιθανά να είναι πιο πολύπλοκη διαδικασία.

Για τα περισσότερα μέλη της οικογένειας των ADAMs η εμπλοκή της φουρίνης στην απομάκρυνση του προπεπτιδίου έχει δειχθεί τόσο με μεταλλαξογένεση του RXK/RR μοτίβου, όσο και με κυτταρολογικές μελέτες που υποδεικνύουν συνεντοπισμό της φουρίνης με τις μεταλλοπρωτεάσες στο Golgi (Nakayama 1997; Kang, Zhao et al. 2002). Σε κάποιες περιπτώσεις όμως έχει δειχθεί η απομάκρυνση του προπεπτιδίου να οφείλεται σε αυτοπρωτεόλυση (Schloman, Wildeboer et al. 2002).

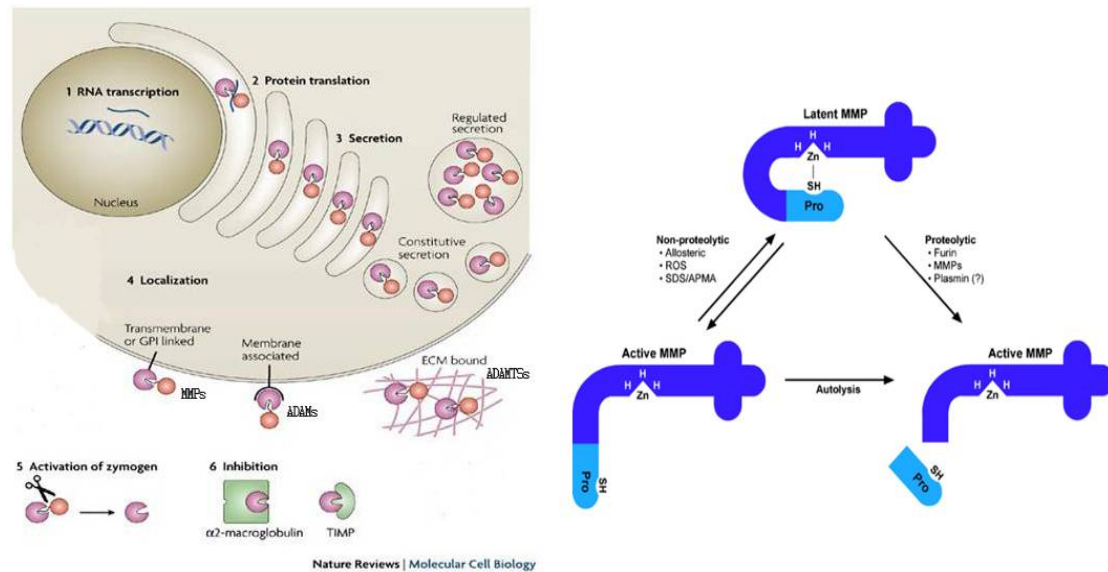
Στην οικογένεια των ADAMTSs έχουν αναφερθεί περιπτώσεις όπου το προπεπτίδιο δεν περιέχει το χαρακτηριστικό μοτίβο αναγνώρισης της φουρίνης. Για αυτές τις ADAMTSs έχει βρεθεί ότι η απομάκρυνση του προπεπτιδίου δεν είναι αναγκαία για την εκδήλωση της καταλυτικής ενεργότητας (Majerus, Zheng et al. 2003). Στις περισσότερες βέβαια αναφορές η απομάκρυνση του προπεπτιδίου γίνεται με την διαμεσολάβηση *pro-proteinconvertases* στο κυτταρικό διαμέρισμα του Golgi (Wang, Tortorella et al. 2004), ενώ δεν αποκλείεται και η διαμεσολάβηση άλλων μεταλλοπρωτεασών (Wang, Tortorella et al. 2004).

Σε κάποιες άλλες ADAMTS πρωτεάσες φαίνεται ότι το προπεπτίδιο περιέχει περισσότερα από ένα μοτίβα αναγνώρισης φουρίνης και θεωρείται ότι η τμηματική πρωτεόλυση του αμινοτελικού τους άκρου μπορεί να ελέγχει την έκκριση τους (Wang, Lee et al. 2003).

Για τα μέλη της οικογένειας των MMPs η απομάκρυνση του προπεπτιδίου μέσω της διαμεσολάβησης φουρίνης, ή μέσω δράσης άλλων μεταλλοπρωτεασών της ίδιας οικογένειας, ή τελικά μέσω αυτο-πρωτεόλυσης έχει αποδειχθεί σε ορισμένες περιπτώσεις και υπάρχουν ενδείξεις από *invitro* κυρίως δεδομένα και για πιο πολύπλοκους μηχανισμούς ενεργοποίησης των MMPs. Αυτοί μπορεί να είναι είτε αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις είτε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής που οδηγούν τελικά σε χαλάρωση του δεσμού μεταξύ του καταλοίπου κυστεΐνης του προπεπτιδίου και του ιόντος ψευδαργύρου στο καταλυτικό κέντρο (Ra and Parks 2007).

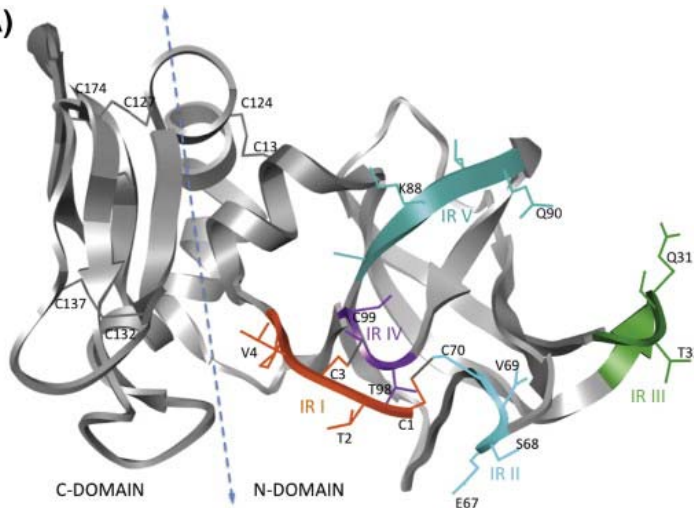
Μετά την ενεργοποίησή τους ο έλεγχος της ενεργότητας των μεταλλοπρωτεασών γίνεται από εξειδικευμένους αναστολείς στις περιοχές

δράσης τους. Οι εξειδικευμένοι πεπτιδικοί αναστολείς έναντι των μεταλλοπρωτεασών εξωκυτταρικής στοιβάδας είναι αυτοί της οικογένειας των TIMPs. Η δομή των αναστολέων αυτής της οικογένειας είναι αρκετά συντηρημένη μεταξύ διαφορετικών οργανισμών. Αποτελείται από ένα αμινοτελικό άκρο που είναι αυτό που έχει την ανασταλτική δράση κι ένα καρβοξυτελικό άκρο που δεν επηρεάζει την δομή και την δράση του πρώτου. Το ανασταλτικό τμήμα των TIMP χαρακτηρίζεται από την παρουσία δισουλφιδικών δεσμών. Λόγω αυτών τα μόρια παρουσιάζουν μια συμπαγή δομή η οποία εισχωρεί μέσα στο καταλυτικό κέντρο των μεταλλοπρωτεασών και αναστέλλει την ενεργότητα του. Ανάλογα με τον οργανισμό και τον αριθμό των μεταλλοπρωτεασών που εκφράζει φαίνεται να αυξάνει και ο αριθμός αναστολέων της συγκεκριμένης οικογένειας. Έτσι στον άνθρωπο έχει βρεθεί ότι εκφράζονται 4 αναστολείς TIMP, οι οποίοι μάλιστα παρουσιάζουν κι εξειδίκευση ως προς τις μεταλλοπρωτεάσες στόχους. Ο αναστολέας TIMP-3 φαίνεται να είναι πιο εξειδικευμένος έναντι μεταλλοπρωτεασών της οικογένειας των ADAMs και ADAMTSs, ενώ οι υπόλοιποι έχουν μεγαλύτερη ανασταλτική δράση έναντι των MMPs, η οποία όμως διαφέρει από αναστολέα σε αναστολέα, για παράδειγμα ο TIMP-1 δεν είναι ικανός αναστολέας για τις περισσότερες διαμεμβρανικές MMPs (Brew and Nagase). Στην περίπτωση της *Drosophila melanogaster* φαίνεται ότι κωδικοποιείται ένας μόνο αναστολέας, ο οποίος είναι εξίσου ικανός έναντι των MMPs της *Drosophila* όσο και έναντι της πρωτεάσης TACE του ίδιου οργανισμού που ανήκει στην οικογένεια των ADAMs (Wei, Xie et al. 2003). Τελευταίες αναφορές προτείνουν συμμετοχή των TIMPs σε διαδικασίες όπως η απόπτωση και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός. Σε αυτές τις περιπτώσεις όμως τα μόρια φαίνεται να εμπλέκονται όχι μέσω της ιδιότητάς τους ως αναστολείς μεταλλοπρωτεασών (Brew and Nagase).



**Εικόνα 7:** Τοπολογία των μεταλλοπρωτεασών εξωκυττάριας στοιβάδας και ρύθμιση της καταλυτικής τους ενεργότητας. Οι μεταλλοπρωτεάσες εξωκυττάριας στοιβάδας οδηγούνται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, λόγω της παρουσίας σηματοδοτικού πεπτιδίου κι από εκεί στο διαμέρισμα Golgi. Η τελική τοποθέτηση τους διαφέρει από οικογένεια σε οικογένεια. Οι ADAMTSs εντοπίζονται κυρίως στον εξωκυττάριο χώρο αλληλεπιδρώντας με μόρια της εξωκυττάριας μήτρας. Οι ADAMs είναι κατεξοχήν διαμεμβρανικές, ενώ οι MMPs μπορούν να είναι είτε μεμβρανικές, (μέσω GPIanchor ή μέσω διαμεμβρανικού τμήματος), είτε εκκρινόμενες. Β) Μεταμεταγραφικά το βασικότερο στάδιο ρύθμισης της ενεργότητας των μεταλλοπρωτεασών είναι η απομάκρυνση του προπεπτιδίου. Αυτή λαμβάνει χώρα κυρίως με πρωτεόλυση από πρωτεάσες της οικογενείας των *pro-proteinconvertases* ή από άλλες μεταλλοπρωτεάσες ή ακόμη και με αυτοπρωτεόλυση. Απομάκρυνση του προπεπτιδίου μπορεί να γίνει αλλοστερικά, καθώς και παρουσία ελεύθερων ριζών. Σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ενεργότητας των μεταλλοπρωτεασών παίζει και η παρουσία αναστολέων των μεταλλοπρωτεασών καθώς και η ρυθμιζόμενη έκκριση τους από το κύτταρο.

(A)



**Εικόνα 8** ::Δομή του αναστολέα των μεταλλοπρωτεασών TIMP. Φαίνονται η παρουσία καταλοίπων κυστεΐνης στο αμινοτελικό άκρο του αναστολέα (N-domain) και οι περιοχές που αλληλεπιδρούν με τις μεταλλοπρωτεάσες IRI-V.

## 2.4 Λειτουργικοί ρόλοι των μεταλλοπρωτεασών εξωκυττάριας στοιβάδας.

Όπως ειπώθηκε παραπάνω οι πρωτεάσες εξωκυττάριας στοιβάδας είναι τα κατεξοχήν μόρια που ευθύνονται για την αναδιοργάνωση της τελευταίας. Λόγω αυτής της ιδιότητας εμπλέκονται σε έναν πλήθος βιολογικών διεργασιών. Επιπλέον πολλές από τις πρωτεάσες αλληλεπιδρούν και πρωτεολύουν υποστρώματα που δεν σχετίζονται με τον περικυτταρικό χώρο γεγονός που διευρύνει ακόμη περισσότερο το λειτουργικό τους ρόλο.

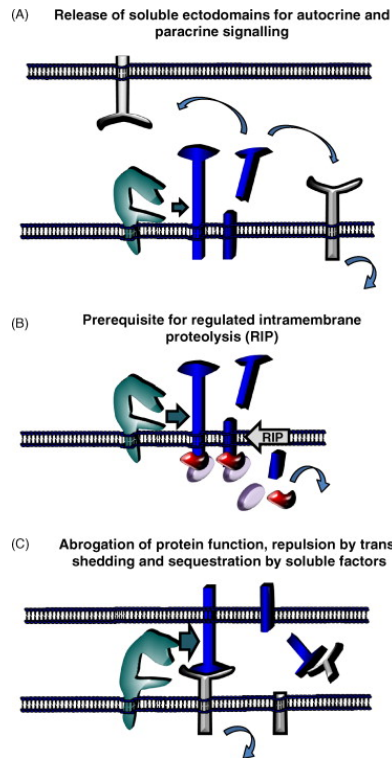
Τα μέλη της οικογένειας των ADAMTSs είναι τα κατεξοχήν μόρια αναδιοργάνωσης του εξωκυττάριας χώρου. Έχουν εμπλακεί σε ασθένειες που αφορούν διαταραχές του συνδετικού ιστού λόγω της καταλυτικής τους δράσης σε υποστρώματα, όπως το κολλαγόνο (απομάκρυνση του προπεπτιδίου των προκολλαγόνων I, II και III), ή συστατικών του χόνδρου (πρωτεογλυκάνες), όπως aggrecan, versican και brevican (Porter, Clark et al. 2005). Στο λεπιδόπτερο *Bombyx mori* η επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου Bm-ADAMTS1 κατά την έκδυση της νύμφης υποδηλώνει εμπλοκή του σε διαδικασίες ιστόλυσης και ιστονεογένεσης που γίνονται εκτεταμένα σ' αυτό το αναπτυξιακό στάδιο (Ote, Mita et al. 2005). Τα μέλη της οικογένειας των ADAMs είναι περισσότερο γνωστά για την εμπλοκή τους σε αναπτυξιακές διαδικασίες. Τα πιο γνωστά μέλη αυτής της οικογένειας είναι οι πρωτεάσες TACE και Kuzbanian.

Gene name	Protein name	Alternative names	Known substrates
<i>ADAMTS1</i>	ADAMTS-1	METH-1; aggrecanase-3	Aggrecan; versican V1
<i>ADAMTS2</i>	ADAMTS-2	PCINP	Procollagen I, II and III N-propeptides
<i>ADAMTS3</i>	ADAMTS-3	KIAA0366 <sup>+</sup>	Procollagen II N-propeptide
<i>ADAMTS4</i>	ADAMTS-4	aggrecanase-1; KIAA0688 <sup>+</sup>	Aggrecan; brevican; versican V1; fibromodulin; decorin;
<i>ADAMTS5</i>	ADAMTS-5	aggrecanase-2; ADAMTS11	Aggrecan
<i>ADAMTS9</i>	ADAMTS-9	KIAA1312	Aggrecan; versican
<i>ADAMTS13</i>	ADAMTS-13	vWFCP	von Willebrand factor
<i>ADAMTS14</i>	ADAMTS-14		Procollagen I N-propeptide
<i>ADAMTS15</i>	ADAMTS-15		Aggrecan

**Πίνακας 1** : Λειτουργικοί ρόλοι των μεταλλοπρωτεασών της οικογένειας των *ADAMTSs* του ανθρώπου. Στον πίνακα αναφέρονται τα ονόματα των πρωτεασών και τα υποστρώματα τους, όπου είναι γνωστά.

Οι πρωτεάσες αυτές δρουν στο επίπεδο της κυτταρικής μεμβράνης και η καταλυτική τους δράση θεωρείται απαραίτητη για να επακολουθήσει ενδομεμβρανική πρωτεόλυση οποία τελικά οδηγεί στην απελευθέρωση πρωτεολυτικών τμημάτων των μορίων που δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες. Στην περίπτωση των TACE και Kuzbanian στην *Drosophila* έχει βρεθεί ότι οι δυο πρωτεάσες μετέχουν στην πρωτεόλυση του Notch, παίζοντας έτσι βασικό ρόλο στα αναπτυξιακά μονοπάτια που αυτό επάγει (Reiss and Saftig 2009). Πέρα από τον ρόλο τους στην ενδομεμβρανική πρωτεόλυση οι πρωτεάσες της οικογένειας των ADAMs παίζουν βασικό ρόλο στην απελευθέρωση διαλυτών παραγόντων, όπως ορμονών, παραγόντων ανάπτυξης και χυμοκινών. Παραδείγματα τέτοιων παραγόντων είναι ο EGF και ο TGF- $\alpha$ . Τέλος κυρίως λόγω του disintegrin domain οι ADAMs έχουν την δυνατότητα να αλληλεπιδρούν και στη συνέχεια να πρωτεολύουν μόρια που παίζουν ρόλο στην επικοινωνία μεταξύ κυττάρων, όπως οι ιντεγκρίνες (integrins) και οι καντχερίνες (cadherins). Λόγω αυτής της εξειδίκευσής τους

έχουν εμπλακεί σε διαδικασίες αναδιάταξης επιθηλίων σε περιπτώσεις τραυματισμού του, ή σε περιπτώσεις μετακίνησης κυττάρων κατά τη διάρκεια ανοσολογικών αποκρίσεων (Reiss and Saftig 2009).



**Εικόνα 9:** Λειτουργικός ρόλος μεταλλοπρωτεασών της οικογένειας των ADAMs. A) Κατάλυση κι απελευθέρωση παραγόντων που δρουν ως σηματοδοτικά μόρια. B) Η πρωτεόλυση από τις ADAMs είναι απαραίτητη προϋπόθεση για να επακολουθήσει ενδομεμβρανική πρωτεόλυση. Γ) Πρωτεόλυση μορίων που παίζουν ρόλο στην επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων, όπως ιντεγκρίνες, καντχερίνες

Οι πρωτεάσες της οικογένειας των MMPs παρουσιάζουν το μεγαλύτερο εύρος υποστρωμάτων που μπορούν να πρωτεολύσουν κι επομένως και την μεγαλύτερη ποικιλία στις διεργασίες, (φυσιολογικές ή παθολογικές), στις οποίες τις βρίσκουμε να εμπλέκονται. Σε ότι αφορά τον ρόλο τους στην δομή κι οργάνωση των επιθηλίων οι πρωτεάσες της οικογένειας αυτής μπορούν να καταλύσουν τόσο πρωτεΐνες της εξωκυττάριας μήτρας, όπως η perlecan (Riggins, Mernaugh et al.), laminin και το κολλαγόνο (Sympson, Talhouk et al. 1994), όσο και πρωτεΐνες που καθορίζουν την επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων, όπως η ιντεγκρίνες (Gonzalo, Moreno et al.), η E-cadherin (McGuire, Li et al. 2003), και η ninjurin (Zhang, Dailey et al. 2006).

Η καταλυτική δράση των μεταλλοπρωτεασών πάνω σε αυτά τα μόρια επηρεάζει την αρχιτεκτονική των επιθηλίων διευκολύνοντας την μετακίνηση κυττάρων του επιθηλίου κατά την επούλωση τους ή την διάρρηξη επιθηλίων κατά την μετάσταση καρκινικών κυττάρων. Επιπλέον σε αυτή τη δράση των μεταλλοπρωτεασών πιστεύεται ότι οφείλεται ο ρόλος τους σε αναπτυξιακές διαδικασίες. Αυτές έχουν χαρακτηριστεί καλύτερα στην *Drosophila* με

φαινοτυπικό έλεγχο γενετικά μεταλλαγμένων στελεχών που δεν εκφράζουν είτε την Dm-MMP1(Llano, Pendas et al. 2000), είτε την Dm-MMP2(Llano, Adam et al. 2002). Στην πρώτη περίπτωση φαίνεται ότι η πρωτεάση επηρεάζει την μορφογένεση της τραχείας (Llano, Pendas et al. 2000), ενώ στην δεύτερη φάνηκε η απουσία της να δημιουργεί προβλήματα στην φυσιολογική λειτουργία της ιστόλυσης κατά την μεταμόρφωση του εντόμου(Llano, Adam et al. 2002). Να τονιστεί σε αυτό το σημείο ότι η καταλυτική δράση των μεταλλοπρωτεασών σε δομικές πρωτεΐνες του επιθηλίου μπορεί να λειτουργήσει και σηματοδοτικά. Για παράδειγμα η πρωτεόλυση του κολλαγόνου παράγει τμήματα που λειτουργούν ως σηματοδοτικά μόρια στην διαδικασία της αγγειογένεσης(Hamano, Zeisberg et al. 2003).

Παράλληλα με την αναμενόμενη δράση των MMPs έναντι μορίων της εξωκυττάριας μήτρας, *in vivo* μελέτες υποδεικνύουν βασικό ρόλο των MMPs στον μηχανισμό της έμφυτης ανοσίας (innate immunity). Ηδη ο ρόλος των MMPs στην διατήρηση της συνέχειας των επιθηλίων μετά από τραυματισμό είναι ουσιώδους σημασίας για την προστασία του οργανισμού από επιθέσεις μικροοργανισμών. Τα επιθήλια αποτελούν φράγμα για την είσοδο μικροοργανισμών κι επομένως η διατήρηση της συνέχειας τους λόγω της δράσης των μεταλλοπρωτεασών θεωρείται βασικός μηχανισμός του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος (William C. Parks 2004).

Παράλληλα όμως για κάποιες από τις MMPs έχουν περιγραφεί και πιο άμεσοι ρόλοι στην καταπολέμηση των μικροοργανισμών. Φαίνεται ότι κάποιες από τις MMPs επιδρούν στην δράση των χυμοκινών, που ευθύνονται για την επιστράτευση κυττάρων του ανοσοποιητικού στα σημεία της μόλυνσης. Η αλληλεπίδραση των μεταλλοπρωτεασών μπορεί να είναι άμεση με πρωτεόλυση των χυμοκινών, που οδηγεί σε μείωση (McQuibban, Gong et al. 2002), ή αύξηση (Van den Steen, Proost et al. 2000) της ικανότητας τους να προσελκύουν τα κύτταρα του ανοσοποιητικού. Οι μεταλλοπρωτεάσες μπορούν ακόμη να επιδρούν έμμεσα στην δράση των χυμοκινών αλλάζοντας κυρίως την τοπική συγκέντρωση των τελευταίων. Αυτό μπορεί να γίνει είτε με πρωτεόλυση των υποδοχέων των χυμοκινών είτε με πρωτεόλυση μορίων του εξωκυττάριαου στρώματος με τα οποία αλληλεπιδρούν οι χυμοκίνες προκειμένου να αγκιστρώνονται σε συγκεκριμένες θέσεις του περικυτταρικού

χώρου (Khandaker, Mitchell et al. 1999). Οι MMPs φαίνεται να πρωτεολύουν και κυτοκίνες (Yu and Stamenkovic 2000), σηματοδοτικά μόρια που ευθύνονται για τον έλεγχο της έκφρασης μορίων του ανοσοποιητικού. Αυτό γίνεται κυρίως με πρωτεολυτική ενεργοποίηση πρώιμων μορφών των κυτοκινών κι απελευθέρωση έτσι της ενεργής τους μορφής.

Τέλος, MMPs έχει αναφερθεί να εμπλέκονται στη πρωτεολυτική ωρίμανση πρώιμων μορφών αντιμικροβιακών πεπτιδίων, όπως οι pro-defensins (Wilson, Schmidt et al. 2009). Παράλληλα έχει σημειωθεί μια περίπτωση MMP, (MMP12), όπου τα ίδια τα hemopexin domains της πρωτεάσης μπορούν να δράσουν έναντι των μικροοργανισμών (Houghton, Hartzell et al. 2009).



Όνομα	Κοινή ονομασία	υπόστρωμα
1. MMP-1	Collagenase-1	Collagen
2. MMP-2	Gelatinase-A	chemokines
3. MMP-3	Stromelysin-1	Cadherin, laminin, IV collagen , cytokines
4. MMP-7	Matrilysin	Pro-defensins, FASL, cytokines, syndecan, E-cadherin, elastin
5. MMP-8	Collagenase-2	Chemokines
6. MMP-9	Gelatinase-B	Cytokines
7. MMP-12	Metalloelastase	Cytokines
8. MMP-13	Collagenase-3	Collagen
9. MMP-14	MT1-MMP	Pro-MMP2, collagen, fibrin, syndecan, laminin
10. MMP-15	MT2-MMP	Fibrin
11. MMP-16	MT3-MMP	Fibrin, syndecan
Dm1-MMP		Ninjurin

**Πίνακας 2:** Λειτουργικοί ρόλοι μεταλλοπρωτεασών οικογένειας MMPs. Στον πίνακα παρατίθενται γνωστά υποστρώματα μεταλλοπρωτεασών του ανθρώπου και της MMP1 της *D. melanogaster*. Με κόκκινο έχουν τονιστεί οι μεταλλοπρωτεάσες που έχουν πιθανό ρόλο σε μηχανισμούς του ανοσοποιητικού συστήματος.

## **Υλικά και μέθοδοι**

## **2.1 Βασικές τεχνικές που αφορούν τοκουνούπι**

### **2.1.1 Ανάπτυξη κουνουπιών**

Σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν κουνούπια του στελέχους G3 του *Anopheles gambiae*. Τα κουνούπια μεγάλωσαν με σταθερή θερμοκρασία 28°C, υγρασία 80% και με ελεγχόμενο κύκλο ημέρας-νυχτας (12-12). Οι προνύμφες των κουνουπιών μεγάλωσαν σε νερό με τροφή για γάτες. Τα ενήλικα άτομα τρέφονταν με διάλυμα σουκροζης 10%(w/v). Για την αναπαραγωγή τα θηλυκά ενήλικα άτομα τρέφονταν σε αναισθητοποιημένα ποντίκια BALB/c. Η εναπόθεση των αυγών γίνονταν 3 ημέρες μετά τη χορήγηση αίματος.

### **2.1.2 Μόλυνση κουνουπιών**

Η μόλυνση των κουνουπιών έγινε με δυο τρόπους, είτε από αναισθητοποιημένα μολυσμένα ποντίκια, είτε μέσω *membrane feeder*.

Στην πρώτη περίπτωση δίνονταν ιδιαίτερη προσοχή ώστε η παρασιταμία του ποντικού να μην ξεπερνά το 1-2%. Τα θηλυκά κουνούπια αφήνονταν να ταΐσουν από το ποντικό για 15 min.

Στην δεύτερη περίπτωση στα κουνούπια χορηγούνταν *in vitro* μεγαλωμένοι ωοκινέτες και μερικώς εμπλουτισμένοι μετά από κατακρήμνιση με *ammonium chloride*. Οι εμπλουτισμένοι ωοκινέτες αναμιγνύονταν με φρέσκο μη μολυσμένο αίμα σε συγκέντρωση 3000-5000 ωοκινέτες/μλ και χορηγούνταν στα κουνούπια μέσω *membrane feeder*. Καθ' όλη τη διάρκεια του ταΐσματος μέσω *feeder* η θερμοκρασία του μίγματος αίμα-ωοκινέτες διατηρούνταν σε σταθερή θερμοκρασία 37°C. Τα κουνούπια αφήνονταν να φάνε για τουλάχιστον 30 min, ενώ είχε προηγηθεί 12ωρη περίοδος, όπου τους παρέχονταν μόνο νερό. Και στις δυο περιπτώσεις τα κουνούπια διατηρούνταν κατευθείαν μετά την χορήγηση του αίματος σε θάλαμο θερμοκρασίας 19°C, με υγρασία 80%, ενώ 36-48 ώρες μετά την αιμοφαγία τα μη ταϊσμένα θηλυκά απομακρύνονταν.

### **2.1.3 Πειράματα μεταμεταγραφικής σιώπησης**

Για τα πειράματα αυτά χρησιμοποιούνταν πάντα έκτος από τις πειραματικές ομάδες των ενήλικων θηλυκών κουνουπιών στις οποίες γίνονταν σιωπήση του ή των γονιδίων στόχων και μια ομάδα κουνουπιών που ήταν το δείγμα

αναφοράς και ενύονταν με δίκλωνο RNA έναντι GFP. Όλα τα κουνούπιαπροέρχονταν από την ίδιαγενιά και είχαν την ίδιαηλικία (1-2ημερων). Τα κουνούπιααναισθητοποιούνταν με CO<sub>2</sub> και ενύονταν με τη βοήθειαειδικής συσκευής με δίκλωνοRNA. ΗποσότηταδίκλωνουRNA που ενύονταν σε κάθε κουνούπιήτανελεγχόμενη (3x69nl). Τρειςημέρεςμετά την χορήγηση του δίκλωνουRNA τα κουνούπια από την, ή τις πειραματικέςομάδες και το δείγμααναφοράςτρέφονταν από το ίδιομολυσμένοζώο, όπως περιγράφηκε στην προηγούμενηπαράγραφο. Ακολουθούσεανάλυση των ενεμένωννατόμωνανάλογα με τις ανάγκες του πειράματος.

#### **2.1.4 ΕξαγωγήRNA από κουνούπια**

Για την εξαγωγήRNA από ιστούσκουνουπιών η ανατομία του εντόμουγίνοντανπάνω σε πάγο. Η ποσότητα του ιστού που χρησιμοποιήθηκεδιαφοροποιούντανανάλογα με τον ιστό. Στην περίπτωση των μεσεντέρωνχρησιμοποιούνταν 50 μεσέντερα από κουνούπια που δεν είχανφάειαίμα και 30 μεσέντερα από κουνούπιαμετά την αιμοφαγία. Στην περίπτωση των περιφερικώναιμοκυττάρωνχρησιμοποιούντανπερίπου 300-500 κουνούπια. Για τη συλλογή της αιμολέμφουκόβονταν η προβοσκίδα του κουνουπιού και μετά από πίεση στον θώρακα του εντόμουσυλλέγονταν η σταγόνα που αποκαλύπτονταν από την προβοσκίδα. Στην περίπτωση των σωμάτων των κουνουπιώνχρησιμοποιούνταν 10-15 σώματακουνουπιών από τα οποίαείχαναπομακρυνθεί το κεφάλι, το μεσέντερο, οι ωθήκες και τα Malpighiantubules. Στην περίπτωσηεξαγωγήςRNA από προνύμφες και νύμφεςχρησιμοποιήθηκαν 8-10 άτομα.

Οιστός ή τα περιφερικάαιμοκύτταρατοποθετούντανάμεσα σε διάλυμαTRIZOL 1ml και διατηρούνταν στους -80<sup>0</sup>C ή συνεχίζονταν η επεξεργασία του δείγματος. Στην περίπτωση αυτή οι ιστοί διαλύονταν άμεσα στο TRIZOL και γίνονταν προσθήκη χλωροφορμίου(1/5 του όγκου). Ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 30min. Ηπάνωφάσηδιαχωρίζονταν και γίνοντανπροσθήκηισοπροπανόλης 1/1 του όγκου. Μετά την κατακρήμνιση του RNAεπ ακολούθουσε αν ήταναναγκαίοαπομάκρυνση του γενωμικούDNA με προσθήκηDNAσης, καθαρισμός με μίγμα φαινόλης-χλωροφορμίου και κατακρήμνιση του RNA με αιθανόλη. Στη συνέχειαγίνοντανποιοτικός και ποσοτικόςέλεγχος του RNA με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμααγαρόζης και

φωτομέτρηση. Υπόκανονικές συνθήκες η απόδοση σε RNA χρησιμοποιώντας τις παραπάνω ποσότητες ιστών κυμαίνονταν από 20-30 μgr RNA, εκτός από τα αιμοκύτταρα όπου η απόδοσή ήταν πολύ μικρότερη (500-1000 ngr).

### **2.1.5 Εξαγωγή πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από κουνούπια**

Για την εξαγωγή πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από ιστούς κουνουπιών η ανατομία του εντόμου έγινε πάλι πάνω σε πάγο, με τη διαφορά ότι στην περίπτωση αυτή η διατήρηση των ιστών γίνονταν σε διάλυμα 1xPBS στο οποίο είχαν προσθήκη μίγματος αναστολέων πρωτεασών. Οι πρωτεΐνες διαλυτοποιούνταν με προσθήκη Laemli buffer και βράσιμο στους 100°C για 5 min .

Η ποσότητα του ιστού που χρησιμοποιήθηκε στην περίπτωση αυτή διαφοροποιούνταν και πάλι από ιστό σε ιστό. Στην περίπτωση των μεσεντερικών επιθηλίων, 7-8 μεσέντερα από κουνούπια τα οποία δεν είχαν φάει αιμάδι ανικανοποίητη ποσότητα πρωτεϊνικού εκχυλίσματος για ένα δείγμα σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης. Αν τα μεσέντερα προέρχονταν από κουνούπια που είχαν φάει αιμάδι χρησιμοποιούσαμε 10 μεσέντερα από τα οποία όμως έπρεπε να έχουμε απομακρυνθεί προσεκτικά όλο το αίμα. Στην περίπτωση εκχυλισμάτων από σώματα κουνουπιών ένα κουνούπι ήταν αρκετό. Τα πρωτεϊνικά δείγματα από περιφερικά αιμοκύτταρα έπρεπε να περιέχουν ποσότητα αιμολέμφου από τουλάχιστον 20 κουνούπια/δείγμα. Τέλος για τα πρωτεϊνικά δείγματα των ωοθηκών η ποσότητα του ιστού διαφοροποιούνταν αν οι ωοθήκες προέρχονταν από κουνούπια που δεν είχαν φάει αιμάδι (7-10) ή από κουνούπια που είχαν φάει αιμάδι (3-4).

### **2.1.6 Ανοσοιστοχημεία σε μεσεντερικά επιθήλια, περιφερικά αιμοκύτταρα κουνουπιών και ωοθήκες.**

Για τα πειράματα ανοσοιστοχημείας σε μεσεντερικά επιθήλια κουνουπιών χρησιμοποιούνταν κουνούπια τα οποία είχαν φάει αιμάδι. Στην περίπτωση αυτή, όπως και στις προηγούμενες η απομάκρυνση του μεσεντέρου από το έντομο γίνονταν μέσα σε διάλυμα 1xPBS σε πάγο. Στη συνέχεια γίνονταν δυο κάθετες τομές στο άνω και κάτω μέρος του μεσεντέρου και μια επιμήκης, προκειμένου να ανοίξει το μεσέντερο και να αποκαλυφθεί το αίμα. Αυτό απομακρύνονταν προσεκτικά μαζί με την περιτροφική μεμβράνη.

Κατόπιν τα επιθήλια τοποθετούνταν σε διάλυμα 4% φορμαλδεΐδης για 15-20min. Αφού ξεπλένονταν 3x5min με 1xPBS επακολουθούσε η διάρρηση των κυτταρικών μεμβρανών με επώαση για 60-95min σε διάλυμα PBT (1xPBS, 1%BSA, 0,1% tritonx-100). Τα πρώτα αντισώματα αραιώνονταν στο ίδιο διάλυμα και επωάζονταν με τον ιστό για 12hrs. Ακολουθούσε πλύση με διάλυμα PBT 3x15min και επώαση με τα δεύτερα αντισώματα, που περιείχαν τα φθοροφόρα, για 1hr παρουσία PBT. Τα επιθήλια τοποθετούνταν σε slides σε διάλυμα κατάλληλο για τη διατήρηση του φθορισμού με τέτοιο τρόπο, ώστε να μη δημιουργούνται πτυχώσεις, αφού πρώτα ξεπλένονταν με διάλυμα PBT 3x15min. Οι χρώσεις του πυρήνα και του κυτταροσκελετού ακτινής με φαλλοιδίνη γίνονταν κατά τη διάρκεια του δεύτερου ξεπλύματος με PBT. Στην περίπτωση των ωθηκών το πρωτόκολλο για τα πειράματα ανοσοιστοχημείας διαφοροποιούνταν μόνο ως προς το διάλυμα PBT. Αντί αυτού χρησιμοποιήθηκε διάλυμα: 1x PBS pH7, 0.2% Saponin, 1% BSA.

Να σημειωθεί ότι τα μεσεντερικά επιθήλια που προορίζονταν για μέτρηση ωκύστεων στα λινοτυπικά πειράματα κυρίως της μεταμεταγραφικής αποσιώπησης απομακρύνονταν από το έντομο 7-10 ημέρες μετά την αιμοφαγία σε διάλυμα 1xPBS, τοποθετούνταν σε διάλυμα φορμαλδεΐδης 4% για 15-20min και αφού ξεπλένονταν 3x5min με 1xPBS ήταν έτοιμα για παρατήρηση.

Στην περίπτωση των αιμοκυττάρων χρησιμοποιήθηκαν slides, τα οποία είχαν πρώτα επωαστεί με διάλυμα poly-L-lysine, για να διασφαλιστεί η συνάφεια των αιμοκυττάρων με την επιφάνεια του slide. Ακολουθούσε fixation επώαση με διάλυμα PBT, όπως και στην περίπτωση των μεσεντερικών επιθηλίων. Η επώαση με τα πρώτα αντισώματα γίνονταν για 1hr σε RT και επακολουθούσε επώαση με τα δεύτερα αντισώματα, αφού πρώτα μεσολαβούσε ξεπλύμα με PBT. Στην περίπτωση αυτή οι χρώσεις του πυρήνα και του κυτταροσκελετού της ακτινής γίνονταν παράλληλα με την επώαση με το δεύτερο αντίσωμα.

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα αυτά και οι προτεινόμενες συγκεντρώσεις τους παρουσιάζονται στον πίνακα 2.

## **2.2 Τεχνικές που αφορούν το παράσιτο**

### **2.2.1 Διατήρηση του παρασιτικού στελέχους**

Τα παρασιτικά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν, δηλαδή το στέλεχος που εκφράζει GFP και το διαγονιδιακό που εκφράζει *timpr*, διατηρούνταν σε ποντίκια 6-10 εβδομάδων (BALB/C, ή Theiler's Original), τα οποία μολύνονταν μετά από ενδοπεριτοναϊκή ένεση με μολυσμένο αίμα. Για την μόλυνση ενός υγιούς ποντικίου χρησιμοποιούνταν 100-200 μl μολυσμένου αίματος. Η παρασιταίμια των μολυσμένων ποντικιών ελέγχονταν με χρώση Giemsa στρώματος αίματος και παρατήρηση σε μικροσκόπιο σε φακό 100x. Όταν τα ποντίκια χρησιμοποιούνταν για μόλυνση κουνουπιών η παρασιταίμια τους δεν έπρεπε να ξεπερνά το 3-5%, ενώ ελέγχονταν και το ποσοστό εξώθησης των φερόντων μαστίγια αρσενικών γαμετοκυττάρων σε μικροσκόπιο παρουσία θρεπτικού μέσου RPMI. Σε κάθε πεδίο ο αριθμός ζέτοιων συμβάντων δεν έπρεπε να ξεπερνά τα 4-5. Στην περίπτωση που το αίμα από τα μολυσμένα ποντίκια χρησιμοποιούνταν για *in vitro* παραγωγή ωοκινετών χορηγούνταν στα ποντίκια 24 ώρες πριν την μόλυνση *phenylhydrazine* (6 mg/ml, 200 μl ενδοπεριτοναϊκά. Η παρασιταίμια του μολυσμένου ποντικίου έπρεπε να ξεπερνά το 10-15% και η εμφάνιση αρσενικών γαμετοκυττάρων με μαστίγια έπρεπε να είναι πάνω από 5-6 σε κάθε πεδίο.

### **2.2.2 Μετασχηματισμός του παρασιτικού στελέχους και γενотύπηση**

Ο μετασχηματισμός του διαγονιδιακού παρασιτικού στελέχους που εκφράζει *timpr* έγινε στο στέλεχος 507cl1 που εκφράζει GFP συστατικά. Η διαδικασία του μετασχηματισμού έγινε, όπως έχει ήδη περιγραφεί. Συνοπτικά *in vitro* παρηγμένα ώριμα schizonts που περιέχουν και μεροζοΐτες απομονώνονταν με μέθοδο κλίσης Nycodenz. Περίπου  $0.5-1 \times 10^7$  απομονωμένα schizonts μετασχηματίζονταν με 5-10 μg DNA της πλασμιδιακής κατασκευής στην οποία είχε κλωνοποιηθεί το cDNA του *timpr* χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα U-33 της συσκευής Nucleofector (Amaxa GmbH).

Τα μετασχηματισμένα παράσιτα ενύονταν ενδοφλεβικά σε ποντίκια. Προκειμένου να επιλεγούν τα μετασχηματισμένα παράσιτα χορηγούνταν στο

πόσιμονερό των ποντικιώνrygrimethamine για ένα διάστημα 5-7 ημερών. Τα μετασχηματισμέναπαράσιταφέρουνγονίδιοανθεκτικότητας στο συγκεκριμένοφάρμακο. Η παρουσίαπαρασίτων στα οποία το πλασμίδιο που φέρει το timρείχειισαχθεί στο γενωμικόDNAελέγχονταν με PCP.

Για το λόγο αυτό απομονώνοντανγενωμικόDNA από το αίμαμολυσμένωνποντικιών, χρησιμοποιώντας το QIAmpDNAKit. Το γενωμικόDNAχρησιμοποιήθηκε ως μήτρα σε αλυσιδωτέςαντιδράσειςπολυμεράσης. Στις αντιδράσεις αυτές χρησιμοποιήθηκαν 3 διαφορετικάζεύγηεκκινητών. Το πρώτοζεύγος (L665-L740) αποκαλύπτει αν έχειγίνει ή όχι ενσωμάτωση του πλασμιδίου. Το δεύτερο και τρίτοζεύγοςαποκαλύπτει σε ποιο σημείο του χρωμοσώματοςέχειγίνει η ένθεση (στο cssu ή στο dssuγενετικότόπο). Το ζεύγος των εκκινητών για τον γενετικότόποcssu είναι L270-L740, ενώ το ζεύγοςεκκινητών για τον γενετικότόποdssu είναι L260-L740.

### 2.2.3 In vitroκαλλιέργειες ωοκινετων

Για τις in vitroκαλλιέργειες ωοκινετων και τον καθαρισμό τους ακολουθήθηκε ένα ήδηχαρακτηρισμένοπρωτόκολλο. Συνοπτικά 1mlαίματος από μολυσμένοποντικόσυλλέχτηκε σε σύριγγα που περιείχεηπαρίνημετά από διάρρηξη της καρδιάς. Το αίμα αναμιγνύονταν με θρεπτικό μέσο για καλλιέργεια ωοκινετών σε αναλογία 1:10 κι επωάζονταν στους 19°C για 18-24ωρες.

Για την απομόνωση των ωοκινετών η καλλιέργεια φυγοκεντρούνταν στις 2000rpm για 10min και η πελέττα επαναδιαλύονταν σε 0,5ml 1xPBS. Η επαναδιαλυμένη πελέττα προστίθενταν σε διάλυμα Am.chloride 0,9%(w/v). Για κάθε 1mlαίματοςχρειάζονταν 50mlδιαλύματοςAm.chloride. Ακλουθούσεεπώαση στον πάγο για 30-40min και φυγοκέντρηση στις 1500rpm για 5min. Κατόπιν η πελέττα των ωοκινετων πλένονταν με 1xPBS 3x5min και τέλοςεπαναδιαλύονταν σε κατάλληλοόγκο 1xPBSανάλογα με το μέγεθος της. Ο αριθμός των ωοκινετων που απομονώνοντανπροσδιορίζοντανμετάαπόμέτρηση σε αιματοκυτταρόμετρο.

*Θρεπτικό μέσο για την καλλιέργεια των ωοκινετων: Επαναδιάλυση 16,4grRPMI-1640 με HEPES (25mM) και γλουταμίνη (2mM, Sigma), 2grNaHCO<sub>3</sub>, 10mlπενικιλίνη (5000U/ml)/Στρεπτομυκίνη (5mg/ml),*



50mg hyroxanthine. Ρύθμιση pH στα 8.0 με NaOH. Ο τελικός όγκος του διαλύματος πρέπει να είναι 1lt. Ακολουθεί αποστείρωση με φίλτρο διαμέτρου 0,4μm και προσθήκη 10% FCS.

#### **2.2.4 Ανοσοιστοχημεία ωοκινετών και εκχύλιση πρωτεϊνών από ωοκινετές**

Στα πειράματα ανοσοιστοχημείας ωοκινετών οι απομονωμένοι και καθαρισμένοι σύμφωνα με την προηγούμενη παράγραφο ωοκινετές τοποθετούνταν πάνω σε microchamber slides. Κάθε δείγμα περιείχε 1000-5000 ωοκινετές. Τα δείγματα αφήνονταν να ξεραθούν και στη συνέχεια προστίθενταν διάλυμα 4% φορμαλδεΰδης για 15-20min. Ακολουθούσαν ξεπλύματα με 1xPBS, 3x5min κι επώαση σε διάλυμα PBT για 30-45min. Η επώαση των πρώτων αντισωμάτων έγινε σε θερμοκρασία δωματίου για 1hr και επακολούθησε επώαση με δεύτερο αντίσωμα για 1hr σε θερμοκρασία δωματίου και πάλι. Στο ενδιάμεσο των επωάσεων μεσολαβούσαν ξεπλύματα με PBT. Οι αραιώσεις των πρώτων και δεύτερων αντισωμάτων γίνονταν σε διάλυμα PBT. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα αυτά και οι προτεινόμενες συγκεντρώσεις τους παρουσιάζονται στον πίνακα 2.

Για την εκχύλιση πρωτεϊνών από ωοκινετές χρησιμοποιήθηκαν και πάλι απομονωμένοι και καθαρισμένοι ωοκινετές. Για κάθε πρωτεϊνικό δείγμα χρησιμοποιήθηκαν περίπου  $1 \times 10^6$  ωοκινετές επαναδιαλυμένοι σε RIPA buffer (1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0,1% SDS, 0,15M NaCl, 50mM Tris-HCl, pH 7.2, Roche complete protease inhibitor cocktail) στους οποίους είχε προστεθεί Laemmli buffer κι είχε επακολουθήσει βρασμός τους.

### **2.3 Τεχνικές που αφορούν τις κυτταρικές σειρές**

#### **2.3.1 Διατήρηση καλλιέργειών**

Οι κυτταρικές σειρές εντόμων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι sua5.β και η sua4.0. Τα κύτταρα καλλιεργούνταν σε 75 και 25cm<sup>2</sup> φλάσκες παρουσία θρεπτικού μέσου schneider's (GIBCO) που περιείχε 10% απενεργοποιημένο ορό και 1% Penicillin/streptomycin (D10 Complete) σε θερμοκρασία 28°C. Τα κύτταρα επωάζονταν 3-4 ημέρες μέχρι να καλυφθεί ολόκληρη η επιφάνεια της

φλάσκας. Στην συνέχεια τα κύτταρα αποκολλούνταν από την επιφάνεια της φλάσκας μηχανικά και τοποθετούνταν σε καινούργιες φλάσκες με αναλογία 1 μέρος κυτταρικού εναιωρήματος 4 μέρη καινούργιου θρεπτικού μέσου.

### **2.3.2 Μετασχηματισμός κυτταρικών σειρών.**

Για τον μετασχηματισμό των κυτταρικών σειρών τα κύτταρα από μια φλάσκα στην οποία είχε καλυφθεί κανονιστικά η επιφάνεια της τοποθετούνταν σε 6-well plates (η αναλογία σε αυτή την περίπτωση ήταν 1 μέρος κυτταρικού εναιωρήματος/3 μέρη καινούργιου θρεπτικού υλικού) και αφήνονταν στους 28°C για 12-24 ώρες. Για τον μετασχηματισμό των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το Effectene transfection reagent (Qiagen) με μερικές τροποποιήσεις. Συγκεκριμένα για κάθε φρεάτιο χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 4 μg πλασμιδιακού DNA. Στις περιπτώσεις όπου χρησιμοποιήθηκε το επαγόμενο σύστημα τετρακυκλίνης ο ενεργοποιητής αντιπροσώπευε το 1/4 της συνολικής ποσότητας του πλασμιδιακού DNA, το πλασμίδιο που έφερε το γονίδιο του ενδιαφέροντος μας το 1/2 και το πλασμίδιο που έφερε τον δείκτη για την αποδοτικότητα του πειράματος διαμόλυνσης (tetorRFP ή TETOPGFP) το 1/4.

Τα κύτταρα αφήνονταν για 24-36hrs, οπότε κι ελέγχονταν η αποδοτικότητα του πειράματος διαμόλυνσης παρατηρώντας το ποσοστό των κυττάρων που εξέφραζαν την φθορίζουσα χρωστική που είχε χρησιμοποιηθεί κάθε φορά (GFP/RFP). Αν αυτό το ποσοστό κρίνονταν ικανοποιητικό, τα κύτταρα ξεπλένονταν με διάλυμα 1xPBS και αφήνονταν άλλες 24-36 hrs παρουσία θρεπτικού μέσου, που δεν περιείχε FBS.

### **2.3.3 Εξαγωγή πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από κυτταρικές σειρές**

Για την εξαγωγή πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από κυτταρικές σειρές τα κύτταρα φυγοκεντρούνταν (1500rpm, 5min). Το θρεπτικό μέσο απομονώνονταν μετά την φυγοκέντρωση και οι πρωτεΐνες του κατακρημνίζονταν με ακετόνη. Η κυτταρική πέλεττα ξεπλένονταν 2 φορές με 1xPBS και επαναδιαλύονταν σε διάλυμα RIPA (1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0,1% SDS, 0,15M NaCl, 50mM Tris-HCl, pH 7.2, Roche complete protease inhibitors cocktail). Ακολουθούσε σπάσιμο των κυτταρικών μεμβρανών με 3 διαδοχικούς κύκλους ψύξης-αποψύξης και

ηχοβολισμό ( 1x 15sec). Το διαλυτόκλάσμα των κυττάρων διαχωρίζονταν από το μεμβρανικό με φυγοκέντρηση (13000rpm, 30min) και αναλύονταν σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης. Να σημειωθεί ότι τα κύτταρα από κάθε well ενός 6-well plate επαναδιαλύονταν σε 200-300μl RIPA buffer από το οποίο και χρησιμοποιούνταν το ¼ με 1/5 σε κάθε πείραμα ανοσοαποτύπωσης.

#### **2.3.4 Ανοσοιστοχημεία κυττάρων**

Τα πειράματα ανοσοιστοχημείας των κυττάρων έγιναν πάνω σε καλυπτρίδες διαμέτρου 13mm, οι οποίες είχαν πριν επωαστεί με διάλυμα *poly-L-lysine*. Τα κύτταρα (περίπου 50μl κυτταρικού εναιωρήματος από ένα well του 6-well plate) αφήνονταν να προσκολληθούν πάνω στις καλυπτρίδες περίπου 10-15min. Στη συνέχεια ακλουθούσε πλύσιμο με 1xPBS, επώαση με διάλυμα 4% φορμαλδεΐδης για 10min και πλύσιμο πάλι με 1xPBS. Η διάρρηξη των κυτταρικών μεμβρανών και το blocking γίνονταν με επώαση παρουσία διαλύματος PBT για 45min. Ακολουθούσε επώαση με τα πρώτα αντισώματα (αραιωμένα σε PBT) για 1hr σε θερμοκρασία δωματίου, πλυσίματα με διάλυμα PBT και επώαση με τα δεύτερα αντισώματα για 1hr σε θερμοκρασία δωματίου. Οι καλυπτρίδες στοποθετούνταν κατόπιν σε μικροσκοπικά slides πάνω σε διάλυμα διατήρησης του φθορισμού. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα αυτά και οι προτεινόμενες συγκεντρώσεις τους παρουσιάζονται στον πίνακα 2.

### **2.4 RNA Τεχνικές**

#### **2.4.1 Σύνθεση cDNA**

Η cDNA σύνθεση έγινε με το ενζυμο MMLV reverse transcriptase (Invitrogen) σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας. Σε όλες τις συνθέσεις χρησιμοποιήθηκε ποσότητα συνολικού RNA 5μgr, ενώ σαν εκκινητές της αντίδρασης της αντίστροφης μεταγραφής χρησιμοποιήθηκε *oligo dT<sub>18</sub>* στην προτεινόμενη συγκέντρωση.

#### **2.4.2 Παραγωγή δίκλωνου RNA**

Για την παραγωγή του δίκλωνου RNA κομμάτια των γονιδίων στόχων κλωνοποιήθηκαν στον φορέα p110, ο οποίος φέρει θέσεις πρόσδεσης της T7

RNAπολυμεράσης εκατέρωθεν του κλωνοποιημένου τμήματος του γονιδίου. Οι φορείς που περιείχαν τα υποκλωνοποιημέναμέρη των γονιδίωνστόχωνχρησιμοποιούνταν σε δυο διαφορετικέςαντιδράσειςπέψης ( με τα ενζυμα HINDIII και BamH1). Οι ευθυγραμμισμένοι με τα δυο διαφορετικά ενζυμα φορείςκαθαρίζονταν από την παρουσία των ενζύμων και φωτομετρούνταν. 1μgr από κάθε ευθυγραμμισμένοπλασμίδιοχρησιμοποιούνταν για την αντίδραση της σύνθεσης του δίκλωνουRNA με το MEGAscriptkit (Ambion). Οι αντιδράσειςγίνονταν σε τελικόόγκο 40μl και επωάζονταν στους 37°C για 12hrs. Ακλουθούσεκαθαρισμός της αντίδρασης με φαινόλη-χλωροφορμιο και κατακρήμνιση του δίκλωνουRNA. Το τελευταίοεπαναδιαλύονταν σε κατάλληλοόγκο, ώστε η συγκέντρωση του να είναι 3-5μgr/λ. Η ποιότητα του δίκλωνουRNAελέγχονταν και σε πήκτωμαγαρόζης.

### 2.4.3 Real-timePCR

Για τις αντιδράσεις του Real-timePCRσχεδιάστηκανκατάλληλαζεύγηεκκινητών για κάθε γονίδιοχρησιμοποιώντας το πρόγραμμαOligo. Κατά το σχεδιασμόιδιαιτερησημασίαδόθηκε στην κατά το δυνατόμικρότερηπιθανότητα των επιλεγμένωνεκκινητών να σχηματίζουνδιμερή. Επιπλέον οι εκκινητέςσχεδιάστηκαν στα όριαμεταξύ δυο εξονίων του κάθε μεταγράφουπροκειμένου να μην χρειάζεται τα RNA που απομονώθηκαν από τους ιστούς να υφίστανταιπέψη με Dnaση. Το συγκεκριμένοπρόγραμμαέδινε τη δυνατότηταυπολογισμού της θερμοκρασίας στην οποία το προϊόν που έδινε το κάθε ζευγάριεκκινητώνέλιωνε, γεγονός που διευκόλυνε το σχεδιασμό του προγράμματος της αντίδρασης.

Οι εκκινητές χρησιμοποιούνταν σε αντιδράσεις αντίστροφης πολυμεράσης με μήτρα cDNA από ιστούς του κουνουπιού (μεσέντερα ή σώματα) προκειμένου να κλωνοποιηθεί το κομμάτι εκείνο του μεταγράφου που βρίσκονταν μεταξύ των δυο εκκινητών σε πλασμιδιακό φορέα PCRItoro (Invitrogen).

Οι πλασμιδιακοίφορείς που περιείχαν το κομμάτι του μεταγράφου του ενδιαφέροντος μας αραιώνοντανδιαδοχικά (1ngr, 100pgr, 10pgr, 1pgr). Οι διαδοχικές αυτές αραιώσειςήταν η μήτρα σε δοκιμαστικέςαντιδράσειςReal-timePCR κατά τις οποίες οι εκκινητέςχρησιμοποιούνταν σε διαφορετικέςσυγκεντρώσεις. Τα ζευγάρια των διαφορετικώνσυγκεντρώσεων

που δοκιμάζονταν ήταν: 0,9F-0,9R, 0,9F-0,3R, 0,3F-0,9R, 0,3F-0,3R, όπου F είναι ο Forward εκκινητής και R είναι ο reverse εκκινητής για κάθε μετάγραφο. Το ζευγάρι εκείνο της συγκέντρωσης των εκκινητών με το οποίο η καμπύλη φθορισμού του προϊόντος μας ήταν ικανοποιητική στις μικρότερες συγκεντρώσεις επιλέγονταν ως η κατάλληλη συγκέντρωση για τις πειραματικές αντιδράσεις. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι προτεινόμενες συγκεντρώσεις, οι θερμοκρασίες υβριδοποίησης τους καθώς και οι θερμοκρασίες όπου εντοπίζονταν το παραγόμενο προϊόν.

Οι αντιδράσεις του Real-time PCR γίνονταν όπως οι κλασικές αντιδράσεις πολυμεράσης με τη διαφορά ότι γίνονταν προσθήκη χρωστικής SYBR-GREEN DYE σε συγκέντρωση 0,4x από συγκεντρωμένο διάλυμα 1000x.

Ονομασία εκκινητή	Θερμοκρασία υβριδοποίησης	Προτεινόμενη συγκέντρωση	Εύρος θερμοκρασίας εντοπισμού προϊόντος
qRTATS2 (up-Low)	67 <sup>0</sup> C	0,3-0,9	84,86,87,88,89,90 <sup>0</sup> C
qRTATS1 (Up-Low)	55 <sup>0</sup> C	0,9-0,3	84,86,87,88,89,90 <sup>0</sup> C
rtMMP2 (up-Low)	58 <sup>0</sup> C	0,9-0,3	82,84,86,88,90,92 <sup>0</sup> C
rtMMP1 (up-Low)	57 <sup>0</sup> C	0,9-0,3	82,84,86,88,90,92 <sup>0</sup> C
rtimp (Up-Low)	58 <sup>0</sup> C	0,9-0,3	82,84,86,88,90,92 <sup>0</sup> C
S7		0,3-0,9	

#### 2.4.4 Semi-quantitative PCR

Στις αντιδράσεις για το semi-quantitative PCR τα ζεύγη των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν δεν θεωρήθηκαν αναγκαίο να υβριδοποιούνται στο όριο μεταξύ δυο εξονίων, αρκεί το παραγόμενο προϊόν να μπορούσε να διαχωριστεί ικανοποιητικά από πιθανό παραγόμενο προϊόν από γενωμικό DNA.

Οι αντιδράσεις γίνονταν όπως οι κλασικές αντιδράσεις αλυσιδωτής πολυμεράσης με τη διαφορά ότι ο αριθμός των κύκλων ήταν τέτοιος ώστε η παραγωγή του προϊόντος να είναι σε εκθετική φάση και να μην έχει φτάσει στον κορεσμό. Για να γίνει αυτό δείγματα από την αντίδραση λαμβάνονταν σε διαφορετικούς κύκλους και αναλύονταν σε

πήκτωμα αγαρόζης. Ο καταλληλότερος αριθμός κύκλων επιλέγονταν και χρησιμοποιούνταν στα επόμενα πειράματα. οι θερμοκρασίες υβριδοποίησης των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα αυτά και οι κύκλοι που επιλέχθηκαν προκειμένου η παραγωγή του προϊόντος να είναι σε εκθετική φάση φαίνονται στον παρακάτω πίνακα .

Μετά το τέλος των αντιδράσεων τα δείγματα αναλύονταν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 5%, στα οποία γίνονταν προσθήκη χρωστικής SYBR GREEN DYE. Η ποσοτικοποίηση των παραγόμενων προϊόντων γίνονταν με το πρόγραμμα

Όνομασία εκκινήτων	Θερμοκρασία υβριδοποίησης	Αριθμός κύκλων ανάλυσης ιδωτής αντίδρασης
GTS1 (For-Rev)	58 <sup>0</sup> C	24
GTS2 (For-Rev)	60 <sup>0</sup> C	26
qRTATS2Up-isoTS2Low	58 <sup>0</sup> C	29
ADAMB (For-Rev)	60 <sup>0</sup> C	27
ADAMH (For-Rev)	60 <sup>0</sup> C	27
ADAMD (For-Rev)	58 <sup>0</sup> C	25
S7	58 <sup>0</sup> C	17

## **2.5 Πρωτεϊνικές τεχνικές**

### **2.5.1 Πειράματα ανοσοαποτύπωσης**

Για την ανάλυση των εκχυλισμάτων με την μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο της BIORAD. Η ανάλυση των εκχυλισμάτων έγινε με χρήση κατάλληλου πηκτώματος ακρυλαμίδης ανάλογα με το μέγεθος της πρωτεΐνης προς ανίχνευση.

Οι πρωτεΐνες μεταφέρονταν από το πήκτωμα σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και στην συνέχεια επώαζονταν σε 1xPBS στο οποίο είχε γίνει προσθήκη απορρυπαντικού Tween 20 (PBS-T) σε συγκέντρωση 0,1% το οποίο περιείχε 5% γάλα σε σκόνη. Μετά από ξεπλύματα σε PBS-T η μεμβράνη επώαστηκε με τα πρώτα αντισώματα σε διάλυμα PBS-T με 1% γάλα. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν και οι

προτεινόμενες συγκεντρώσεις φαίνονται στον πίνακα 1. Στην συνέχεια ακολουθούσαν ξεπλύματα με PBS-T και προσθήκη των δεύτερων αντισωμάτων α-mouse ή α-rabbit IgG ανάλογα με το είδος των πρώτων αντισωμάτων που είχαν χρησιμοποιηθεί. Το σήμα των πρωτεϊνικών ζωνών στο φιλμ παρήχθη από το ένζυμο HRP (horse raddish peroxidase) το οποίο είναι συζευγμένο με τα δεύτερα αντισώματα. Για την αντίδραση του HRP απαιτούνταν επώαση της μεμβράνης με το κατάλληλο υπόστρωμα (ECL: Pierce Biotechnology Inc). Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα αυτά και οι προτεινόμενες συγκεντρώσεις τους παρουσιάζονται στον πίνακα 2.

### **2.5.2 Απομόνωση και καθαρισμός βακτηριακά εκφρασμένων πρωτεϊνών**

Συνολικά έγιναν παραγωγή έξι διαφορετικών χιμαιρικών πρωτεϊνών της pQE30-ADAMTS1Ag, της pGAT2-ADAMTS2Ag1 και pETM80-ADAMTS2Ag2, της pET16b-MP1Ag, της pET16b-MP2Ag και της pET16b-timpAg. Όλες οι χιμαιρικές πρωτεΐνες χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή αντισωμάτων έναντι των αντίστοιχων πρωτεϊνών και η στρατηγική κλωνοποίησης τους στους αντίστοιχους φορείς παρουσιάζεται στην παράγραφο 2.3.1. τα βακτηριακά στέλεχη που χρησιμοποιήθηκαν για την έκφραση των παραπάνω πρωτεϊνών διέφεραν ανάλογα με τον φορέα που χρησιμοποιήθηκε. Οι κατασκευές που έγιναν στον φορέα pQE30 εκφραστήκαν στο βακτηριακό στέλεχος SG13009-pRep4, ενώ όλες οι υπόλοιπες στον στέλεχος BL21-pLys. Το pRep4 και pLys είναι επισώματα που διατηρούνται παρουσία καναμυκίνης και χλωραμφαινικόλης αντίστοιχα και εξασφαλίζουν την επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης του ενδιαφέροντος μόνο μετά την προσθήκη IPTG.

Αρχικά για κάθε πρωτεΐνη πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες σε καλλιέργειες μικρής κλίμακας προκειμένου να καθοριστεί σε ποιο κλάσμα των βακτηριακών κυττάρων εκφράζονται οι χιμαιρικές πρωτεΐνες και ποιες είναι οι βέλτιστες συνθήκες παραγωγής τους (θερμοκρασία, συγκέντρωση IPTG, χρόνος επώασης παρουσία IPTG). Από τις δοκιμασίες αυτές πρόέκυψε ότι όλες οι πρωτεΐνες εκφράζονται στο αδιάλυτο κλάσμα των βακτηριακών κυττάρων (inclusion bodies). Οι συνθήκες παραγωγής τους παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Χιμαιρική πρωτεΐνη	Συγκέντρωση IPTG	Θερμοκρασία επώασης παρουσία IPTG	Χρόνος επώασης παρουσία IPTG	Συγκέντρωση ημιδαζολίου στο διάλυμα έκλυσης
pQE30-ADAMTS 1Ag	0,5mM	30 <sup>0</sup> C	4hrs	
pETM80-ADAMTS 2Ag1	0,15mM	30 <sup>0</sup> C	4hrs	
pGAT2-ADAMTS 2Ag2	0,3mM	30 <sup>0</sup> C	4hrs	
pET16b-MP1Ag	0,3mM	30 <sup>0</sup> C	3hrs	
pET16b-MP2Ag	0,15mM	30 <sup>0</sup> C	3hrs	
pET16b-timpAg	0,15mM	30 <sup>0</sup> C	3hrs	

Μετά τον καθορισμό των συνθηκών παραγωγής έγινε παραγωγή των πρωτεϊνών σε μεγάλη κλίμακα. Για τον λόγο αυτό αρχικές καλλιέργειες των 200ml εμβολιάζονταν σε θρεπτικό μέσο LB που περιείχε την κατάλληλη ποσότητα αντιβιοτικού με το στέλεχος επιλογής. Η καλλιέργεια επωάζονταν O/N στους 37<sup>0</sup>C υπό ανάδευση. Την επόμενη μέρα εμβολιάζονταν 2-5 lt θρεπτικού μέσου LB/κατάλληλου αντιβιοτικού με 20 ml της αρχικής O/N καλλιέργειας (=1/50 αραίωση). Τα κύτταρα επωάζονταν στους 37<sup>0</sup>C υπό ανάδευση μέχρι να φτάσουν στην OD<sub>600</sub>=0.5-0.6. Από τα κύτταρα αυτά διατηρούνταν 1ml καλλιέργειας, το οποίο φυγοκεντρούνταν. Το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύονταν σε 50μl 3x Protein Loading Buffer. Το δείγμα αυτό αντιστοιχούσε στο προ επαγωγής δείγμα (-induction sample). Στις καλλιέργειες γίνονταν προσθήκη κατάλληλης συγκέντρωσης IPTG και ακλουθούσε επώαση στην κατάλληλη θερμοκρασία και για το απαραίτητο για κάθε πρωτεΐνη χρονικό διάστημα. Μετά την επώαση 1 ml καλλιέργειας



φυγοκεντρούνταν και η κυτταρική πελέττα επαναδιαλύονταν σε 3x Protein Loading Buffer, όπως και παραπάνω. Το δείγμα αυτό αντιστοιχούσε στο μετά επαγωγής δείγμα (+induction sample). Τα υπόλοιπα κύτταρα συλλέγονταν με φυγοκέντρηση στις 6000rpm στους 4°C για 15min.

Το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύονταν σε διάλυμα A: 20mM Tris pH=8, 50mM NaHPO<sub>4</sub>, 250mM NaCl, 0,05% Tween20, 1mM PMSF) σε αναλογία 10ml διαλύματος για κάθε 1g κυτταρικής πελέττας. Τα κύτταρα ηχοβολούνταν για 45 λεπτά με ενδιάμεσο πάγωμα του δοχείου τους σε διάλυμα EtOH-ξηρού πάγου. Στην συνέχεια φυγοκεντρούνταν στις 13.000 rpm στους 4°C για 45min.

Το αδιάλυτο κλάσμα των βακτηρίων επαναδιαλύονταν σε διάλυμα B: 20mM Tris pH=8,0, 50mM NaHPO<sub>4</sub>, 250mM NaCl, 0,05% Tween20, 8M UREA, 5% glycerol, 10mM β-mercaptaethanol κι επώαζονταν για 12hrs. Ακλουθούσε φυγοκέντρηση, προσθήκη 10mM ιμιδαζολίου κι επώαση του υπερκειμένου με σφαιρίδια Ni-NTA για 1-2hrs. Τα σφαιρίδια είχαν προηγουμένως ξεπλυθεί με H<sub>2</sub>O και με διάλυμα B (+10mM ιμιδαζόλιο) ποσότητας 5 όγκων του όγκου των σφαιριδίων Ni-NTA. Η ποσότητα των σφαιριδίων καθοριζόταν από την ποσότητα της χιμαιρικής πρωτεΐνης που περιείχε το αδιάλυτο κλάσμα των βακτηρίων το οποίο και υπολογιζόταν από μέτρηση με Bradford και από το πρότυπο με χρώση Coomassie που δίνει το αδιάλυτο κλάσμα σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Μετά την επώαση των σφαιριδίων ακλουθούσε πακετάρισμα της κολώνας και πλύσιμο αρχικά με 5 όγκους κολώνας διαλύματος B. Στη συνέχεια ακλουθούσε πλύση της κολώνας με 5 όγκους διαλύματος B': 20mM Tris pH=8,0, 50mM NaHPO<sub>4</sub>, 250mM NaCl, 0,05% Tween20, 6M UREA, 5% glycerol, 10mM ιμιδαζόλιο, 10mM β-mercaptaethanol. Κατόπιν γίνονταν πλύση με διάλυμα C: 20mM Tris pH=8,0, 50mM NaHPO<sub>4</sub>, 250mM NaCl, 0,05% Tween20, 6M UREA, 5% glycerol, 20mM ιμιδαζόλιο, 10mM β-mercaptaethanol και τέλος πλύση με διάλυμα D: 20mM Tris pH=8,0, 50mM NaHPO<sub>4</sub>, 250mM NaCl, 0,05% Tween20, 6M UREA, 5% glycerol, 40mM ιμιδαζόλιο, 10mM β-mercaptaethanol. Η έκλυση της κάθε χιμαιρικής πρωτεΐνης γίνονταν σε διάλυμα E: 20mM Tris pH=8,0, 50mM NaHPO<sub>4</sub>, 250mM NaCl, 0,05% Tween20, 6M UREA, 5% glycerol, 40mM ιμιδαζόλιο, 10mM β-mercaptaethanol. Η συγκέντρωση ιμιδαζολίου στο

διάλυμαέκλουσηςήτανδιαφορετική για κάθε πρωτεΐνη και παρουσιάζεται στον πίνακα 3. Η ποιότητα και η ποσότητα της καθαρισμένηςπρωτεΐνηςπροσδιορίζονταν με μέτρησηBradford και με ανάλυση των δειγμάτων σε αποδιατακτικόπήκτωμαπολυακρυλαμίδης και χρώση με Coomassie.

### **2.5.3 Παραγωγή αντισωμάτων**

Η παραγωγήόλων των αντισωμάτωνέγινε σε εταιρείαπαραγωγήςαντισωμάτων (CustomHybridoma). Η ανοσοποίηση σε όλες τις περιπτώσειςέγινε σε κουνέλια. Για την ανοσοποίηση ενός ζώουαπαιτήθηκαν 1-2mgκαθαρούαντιγόνου σε συγκέντρωση 1mgr/ml.

### **2.5.4 Καθαρισμόςαντισωμάτων**

Ο καθαρισμόςόλων των αντισωμάτωνέγινε με ακινητοποίηση των αντιγόνων από τα οποία αυτά προήρθαν σε μεμβράνηνιτροκυτταρίνης κι επώαση των ορών με αυτή. Πιο συγκεκριμένα 1mgαπομονωμένουαντιγόνουφορτώθηκε σε παρασκευαστικόπήκτωμαπολυακρυλαμίδης της κατάλληληςπυκνότητας, ανάλογα με το μέγεθος του, και ηλεκτροφορήθηκε σε αποδιατακτικέςσυνθήκες. Ακολούθησεμεταφορά της πρωτεΐνης σε μεμβράνηνιτροκυτταρίνης και χρώσηαυτής με PonceauS. Το κομμάτινιτροκυτταρίνης που είχεσυνδεμένο το αντιγόνοαπομονώθηκε κι επώαστηκε με 3%BSA σε διάλυμαTBST (20mMTris pH 7,4, 500mMNaCl, 0,05% Tween 20) για 1hr σε θερμοκρασίαδωματίου. Ο Όρος (περίπου 2ml) αραιώθηκε σε διάλυμα TBST 1:4 και επώαστηκε με την μεμβράνηνιτροκυτταρίνης για τουλάχιστον 12hrs στους 4<sup>0</sup>C. Μετά την επώαση η μεμβράνηξεπλύθηκε με διάλυμαTBST και τα ειδικά προς το αντιγόνοαντισώματαεκλούστηκαν από αυτό με διάλυμαέκλουσης (gentleAg/AbElutionbuffer ,PierceProteinResearchproducts). Η έκλουσηέγινε σε τελικόόγκοίδιο με αυτόν του ορού που χρησιμοποιήθηκεαρχικά και έλαβεχωρά με επώαση της νιτροκυτταρίνης με το διάλυμαέκλουσης 2x10min. Στα καθαρισμένααντισώματαπροστέθηκεNaN<sub>3</sub> και ακολούθησεφύλαξη τους στους -20<sup>0</sup>C.

### **.2.5.5 Ζυμογραφία καζείνης ζελατίνης**

Για τα πειράματα αυτά τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν απουσία αναγωγικού παράγοντα. Πιο συγκεκριμένα έγινε προσθήκη υποστρώματος καζεΐνης ή ζελατίνης στα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης (τελική συγκέντρωση 2mg/ml). Στη συνέχεια τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν, χωρίς να προηγηθεί βρασμός τους. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης τα πηκτώματα πλύθηκαν εκτενώς με διαλυμα 2% Triton. Ακολούθησε επώαση των πηκτωμάτων σε διαλυμα ενεργοποίησης (50mM Tris pH7.5, 150mM NaCl, 5mM CaCl<sub>2</sub>) στους 37<sup>0</sup>C για 24ώρες.

## **2.6 Πλασμιδιακές κατασκευές**

Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή των γονιδίων ή ολόκληρων των γονιδίων μέσω αλυσιδωτών αντιδράσεων πολυμεράσης παρατίθενται στον πίνακα 1.

### **2.6.1 Πλασμιδιακές κατασκευές για έκφραση σε βακτηριακά κύτταρα**

Για την πρωτεάση ADAMTS2 έγινε παραγωγή δυο τμημάτων της σε βακτηριακά κύτταρα, προκειμένου να αναπτυχθούν αντισώματα έναντι αυτών. Το ένα τμήμα αντιστοιχεί στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης και κλωνοποιήθηκε στον φορέα pGAT2 στις θέσεις περιοριστικών ενζύμων Nco-EcoR1. Το τμήμα αυτό του γονιδίου πολλαπλασιάστηκε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με τους εκκινητές TSP3AbFor-TSP3AbRev, οι οποίοι περιέχουν στις αλληλουχίες τους τις αντίστοιχες περιοριστικές θέσεις. Το δεύτερο τμήμα κλωνοποιήθηκε στον φορέα pETM80 στις θέσεις περιοριστικών ενζύμων Nco-Sac1. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην περίπτωση αυτή για την αναπαραγωγή του αντίστοιχου τμήματος του γονιδίου είναι οι ATS2-AbM80For-ATS2-AbM80Rev, που επίσης περιέχουν στις αλληλουχίες τους τις αντίστοιχες περιοριστικές θέσεις.

Για την παραγωγή του αντιγόνου έναντι ADAMTS1 έγινε κλωνοποίηση τμήματος του γονιδίου με τους εκκινητές ATSF-ATSR στον φορέα pQE30. Το τμήμα κλωνοποιήθηκε στις περιοριστικές θέσεις του φορέα BamH1-EcoR1, οι οποίες περιέχονται και στην αλληλουχία των εκκινητών.

Για τα αντιγόνα έναντι MMP1, MMP2 και timp η κλωνοποίηση των αντίστοιχων τμημάτων των γονιδίων έγινε στον φορέα pET16b. Και στις τρεις

περιπτώσεις τα τμήματα κλωνοποιήθηκαν στις περιοριστικές θέσεις Nde1-BamH1, οι οποίες περιέχονται και στις αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τον πολλαπλασιασμό των τμημάτων των γονιδίων. Στην περίπτωση της MMP1 οι εκκινητές αυτοί είναι οι AgMMP1Ab-For-AgMMP1AbRev, της MMP2 είναι οι MP2AgFor-MP2AgRev και στην περίπτωση του timp Οι εκκινητές είναι οι AgNtimpFor-AgNtimpRev. Πρέπει να σημειωθεί ότι για όλες τις κατασκευές ο σχεδιασμός των εκκινητών έγινε με τέτοιο τρόπο ώστε τα αντίστοιχα τμήματα των γονιδίων να εκφράζονται στα βακτηριακά κύτταρα με μια ουρά ιστιδίνης στο αμινοτελικό τους άκρο, χωρίς να χαλάσει το αναγνωστικό τους πλαίσιο.

### **2.6.2 Πλασμιδιακές κατασκευές για πειράματα σιωπής**

Όλες οι πλασμιδιακές κατασκευές για τα πειράματα σιωπής πραγματοποιήθηκαν στον φορέα p110. Για το γονίδιο ADAMTS2 πολλαπλασιάστηκε τμήμα του με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιώντας τους εκκινητές TS2F-TS2R. Αυτοί περιέχουν στο 5 άκρο της αλληλουχίας τους τις περιοριστικές θέσεις BamH1 και EcoR1 αντίστοιχα. Σε αυτές τις περιοριστικές θέσεις έγινε και η κλωνοποίηση του τμήματος του γονιδίου ADAMTS2. Στις υπόλοιπες περιπτώσεις τα τμήματα των γονιδίων που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή του δίκλωνου RNA κλωνοποιούνταν στον ενδιάμεσο φορέα PCR11τορο, μεταξύ δυο θέσεων EcoRI. Το τμήμα απομονώνονταν από τον ενδιάμεσο φορέα με πέψη με EcoRI και κλωνοποιούνταν στον p110 στην ίδια περιοριστική θέση. Στην περίπτωση αυτή η κλωνοποίηση δεν ήταν αναγκαίο να γίνει με συγκεκριμένο προσανατολισμό. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν παρατίθενται στον πίνακα 1.

### **2.6.3 Πλασμιδιακές κατασκευές για διαγονιδιακά παράσιτα**

Για την έκφραση του timp σε ωοκινετες, το κομμάτι του timp που εκφράζει τον ενεργό αναστολέα (AgNtimp) εκφράστηκε ως χιμαιρικό μόριο με το σηματοδοτικό πεπτιδίδιο της πλασμιδιακής πρωτεΐνης CTRP. Η έκφραση του χιμαιρικού αναστολέα ελέγχονταν από τον υποκινητή του ίδιου πλασμιδιακού γονιδίου CTRP, το οποίο εκφράζεται στο στάδιο του

ζυγώτη και του ωοκινετη. Το 3' UTR του χιμαιρικούγονιδίουαποτελούσε το 3'UTR του πλασμιδιακούγονιδίουPbs21.

Το σηματοδοτικό πεπτίδιο του CTRPσυντέθηκε ως 5-3 και 3-5 εκκινήτης (CTRPSPFor, CTRPSPRev). Οι εκκινήτέςείχανprotrudingάκρα των περιοριστικώνενζύμωνBamH1 και NdeI στο 5 και στο 3 άκρο τους αντίστοιχα. Το ενεργότμήμα του γονιδίουtimrκλωνοποιήθηκε στον φορέαPCRllτορο με τους εκκινήτες AgNtimpFor και BergheitimpRev, οι οποίοιπεριείχαν στην αλληλουχία τους τις περιοριστικέςθέσειςNdeI και NotI. Ο φορέαςPCRllτοροάνοιξε με BamH1 NdeIπροκειμένου να κλωνοποιηθεί στο 5 άκρο του AgNtimp το CTRP σηματοδοτικό πεπτίδιο. Στη συνέχεια το χιμαιρικόγονίδιοκλωνοποιήθηκε στον ενδιάμεσοφορέαCr~S σαν BamHI-NotIκομμάτιανάμεσα στον υποκινητήCTRP και στο 3'UTR του Pbs21. Ηκασέτα, εκκινήτήCTRP, cDNA AgNtimpρυπό σηματοδοτικό πεπτίδιοCTRP και 3'UTRPbs21, απομονώθηκε από τον ενδιάμεσοφορέα και κλωνοποιήθηκε στον φορέαμετασχηματισμού του πλασμιδίουDEF-TgDHFR/DSSU με το περιοριστικό ενζυμο EcoRV. Αυτό το τελικόπλασμίδιομετασχηματισμούDEF-TgDHFR/DSSUAgNtimpCTRPSPπεριέχει το dssu-rna με το οποίο και γίνεται ο ανασυνδιασμός κατά τον μετασχηματισμό του παρασίτου. Επιπλέον στον φορέα αυτό περιέχεται και το γονίδιο που προσδίδειανθεκτικότητα στην πυριμεθαμίνη (Τοχοplasmagondiidhfr/tsυπόυποκινητήrbef-1aa), προσφέρονταςέτσι τη δυνατότηταεπιλογήςμετασχηματισμένωνπαρασίτων. Να σημειωθεί ότι στο τελικόπλασμίδιομετασχηματισμούέγινε πέψη πριν τη χρήση του με μια περιοριστικήθέση που περιέχεταιμόνο μια φορά στην αλληλουχία του φορέα.

#### **2.6.4 Πλασμιδιακές κατασκευές για μετασχηματισμόκυτταρικώνσειρών**

Όλες οι πλασμιδιακές κατασκευές που θα περιγράψουν παρακάτω έγιναν στον φορέα TETOpLink, ο οποίος περιέχει ρυθμιστικά στοιχεία tetop ή tetopLink-a1AT, ο οποίος περιέχει το σηματοδοτικό πεπτίδιο της a1AT κλωνοποιημένο στις περιοριστικές θέσεις EcoRI -BglII του φορέα TETOpLink. Η κλωνοποίηση του σηματοδοτικούπεπτιδίουέγινε με πολλαπλασιασμό του με PCR, πέψη με MfeI, BglII και κλωνοποίηση στις αντίστοιχεςθέσεις του φορέα (Σταματακη Αγάπη).

Η πλασμιδιακή κατασκευή TETOrlink-MP1ORF έγινε με πολλαπλασιασμό του αναγνωστικού πλαισίου της MMP1 με PCR με τους εκκινητές MP1ORF-Up/MP1ORFLw, οι οποίοι περιέχουν στην αλληλουχία τους τις περιοριστικές θέσεις EcoRI- XhoI αντίστοιχα. Το προϊόν της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης κλωνοποιήθηκε στον TETOrlink με τα αντίστοιχα ενζυμα.

Η πλασμιδιακή κατασκευή TETOrlink-AgtimpORF έγινε με πολλαπλασιασμό και πάλι του αναγνωστικού πλαισίου του timp με τους εκκινητές AgtimpORFUp/AgtimpORFLw. Οι εκκινητές αυτοί περιέχουν στην αλληλουχία τους τα ίδια περιοριστικά ενζυμα με αυτά που χρησιμοποιήθηκαν στην περίπτωση της MMP1 και η στρατηγική κλωνοποίησης που ακολουθήθηκε ήταν ίδια.

Στην πλασμιδιακή κατασκευή TETOrlink-MP1-3xmyc-Ntag το προπεπτίδιο και το ενδογενές σηματοδοτικό πεπτίδιο της MMP1 αντικαταστάθηκαν από το σηματοδοτικό πεπτίδιο της α1AT και τον επίτοπο 3xmyc. Για αυτή την κατασκευή ο επίτοπος 3xmyc πολλαπλασιάστηκε με PCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές 3xmycFor-3xmycRev, οι οποίοι περιέχουν στην αλληλουχία τους τις περιοριστικές θέσεις EcoRI-NdeI αντίστοιχα. Το cDNA της ενεργοποιημένης MMP1 πολλαπλασιάστηκε με PCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές MP1w/orpropeptideFor-MP1w/orpropeptideRev, οι οποίοι περιέχουν στις αλληλουχίες τους τις περιοριστικές θέσεις NdeI-EcoRI αντίστοιχα. Η κλωνοποίηση των δυο αυτών τμημάτων, του επιτόπου και του cDNA της ενεργοποιημένης MMP1, έγινε ταυτόχρονα στην περιοριστική θέση του φορέα TETOrlink-α1AT MfeI. Επιλέχθηκαν οι κλώνοι αυτοί στους οποίους η κλωνοποίηση των δυο τμημάτωνείχε γίνει με τον σωστό προσανατολισμό.

Στην πλασμιδιακή κατασκευή TETOrlink-MP2-3xmyc-Ntag η στρατηγική της κλωνοποίησης ήταν ίδια με αυτή που χρησιμοποιήθηκε στην περίπτωση της MMP1. Για τον πολλαπλασιασμό του cDNA της ενεργοποιημένης μορφής της MMP2 χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές MP2w/orpropeptideFor-MP2w/orpropeptideRev.

Στην πλασμιδιακή κατασκευή TETOrlink-MP1-10xHisV5-Ntag το προπεπτίδιο και το ενδογενές σηματοδοτικό πεπτίδιο της MMP1 αντικαταστάθηκαν από το σηματοδοτικό πεπτίδιο της α1AT και τον επίτοπο 10xHisV5. Ο επίτοπος συντεθηκε ως 5-3 και 3-5 εκκινητής. Στην αλληλουχία αυτών των εκκινητών

περιέχονται τα protruding ακρα των περιοριστικών θέσεων BglII και NdeI (5' και 3' αντίστοιχα). Η τελική κατασκευή πρόεκυψε μετά από ταυτόχρονη κλωνοποίηση του δίκλωνου επιτόπου 10xHisV5 και του ενεργοποιημένου cDNA της MMP1 που είχε χρησιμοποιηθεί και στην περίπτωση της κατασκευής TETOplink-MP1-3xmyc-Ntag (NdeI-EcoRI κομμάτι) στις περιοριστικές θέσεις του φορέα TETOplink-a1AT BglII και MfeI.

Στην πλασμιδιακή κατασκευή TETOplink-AgNtimp-10xHisV5-Ntag το ενδογενές σηματοδοτικό πεπτίδιο του αναστολέα αντικαταστάθηκε από το σηματοδοτικό πεπτίδιο της α1AT και τον επίτοπο 10xHisV5. Το cDNA που αντιστοιχεί στο AgNtimp πολλαπλασιάστηκε με PCR. Η κλωνοποίηση στον φορέα TETOplink-a1AT έγινε όπως και στην προηγούμενη περίπτωση στις περιοριστικές θέσεις BglII-XhoI.

Για την πλασμιδιακή κατασκευή TETOplink-MMP1-10xHisV5Ntag-3xmycCtag το cDNA της ενεργοποιημένης μορφής της MMP1, που είχε χρησιμοποιηθεί και για τις προηγούμενες κατασκευές κλωνοποιήθηκε στον φορέα PCR II topo. Ακολούθησε πέψη του φορέα, με τα περιοριστικά ένζυμα Spe-HindIII, προκειμένου να απομακρυνθεί η περιοριστική θέση BamHI αυτού, και επανασύνδεση του, μετά από γέμισμα των άκρων του με Klenow. Στη συνέχεια κλωνοποιήθηκε στην περιοριστική θέση BamHI της MMP1 ο επίτοπος 3xmyc, ο οποίος είχε προκύψει μετά από PCR με τους εκκινητές 3xmycCtag For-3xmycCtag Rev. Στην αλληλουχία των εκκινητών αυτώνείχε προστεθεί η περιοριστική θέση BamHI, καθώς και τα απαραίτητα νουκλεοτίδια προκειμένου να μην χαλάσει το αναγνωστικό πλαίσιο της MMP1. Το χιμαιρικό cDNA MMP1-3xmycCtag κλωνοποιήθηκε στις περιοριστικές θέσεις BglII-MfeI του φορέα TETOplink-a1AT μαζί με τον επίτοπο 10xHisV5, που είχε χρησιμοποιηθεί και στις προηγούμενες κατασκευές.

Πίνακας 1 Εκκινήτες που χρησιμοποιήθηκαν



3xmycCtagRev	<u>GGATCC</u> CAAGATCTTCCTCTGAGATGAG	TETOPlink-MMP1N/Ctag	εκφραση ενεργοποιημενης μορφης MMP1 σε αιμοκυτταρικές σειρες με προσθηκη επιτοπου 10xHisV5 στο αμινοτελικο ακρο και 3xmyc στο καρβοξυτελικο ακρο	MMP1
10xHisV5Foroligo	<u>GATCTCAGCAGCATCACCACCATCATCACCATCACC ACCACCACGGTAAGCCTATCCCTAACCTCTCCTCG GTCTCGATTCTACGCA</u>	TETOPlink-MMP1N/Ctag	εκφραση ενεργοποιημενης μορφης MMP1 σε αιμοκυτταρικές σειρες με προσθηκη επιτοπου 10xHisV5 στο αμινοτελικο ακρο και 3xmyc στο καρβοξυτελικο ακρο	MMP1
10xHisV5Revoligo	<u>TATGCGTAGAATCGAGACCGAGGAGAGGGTTAGG GATAGGCTTACCGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT GGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT</u>	TETOPlink-MMP1N/Ctag	εκφραση ενεργοποιημενης μορφης MMP1 σε αιμοκυτταρικές σειρες με προσθηκη επιτοπου 10xHisV5 στο αμινοτελικο ακρο και 3xmyc στο καρβοξυτελικο ακρο	MMP1
MP1isoform Rev	<u>CTAG</u> GGAAAAAGGGAGCCAG		Αλληλουχια εναλλακτικής ισομορφης που εκφραζεται στα αιμοκυτταρα	MMP1
AgMMP2-Up	GAGTGGATGCGGGACAGGTC	pII10MMP2	κατασκευη δικλωνου RNA εναντι MMP2	MMP2
AgMMP2-Lw	TGCGCGTCCATAGATCGATT	pII10MMP2	κατασκευη δικλωνου RNA εναντι MMP2	MMP2
MP2AgFor	<u>AAACATATGACAACACGGCGACC</u>	pET16bMMP2Ag	παραγωγη αντιγονου εναντι MMP2	MMP2
MP2AgRev	<u>AAAGGATCTCA</u> CAGTGGTCTCGG	pET16bMMP2Ag	παραγωγη αντιγονου εναντι MMP2	MMP2
rtMMP2-Up	TGGTCGACTCTACTGGAATTC		Real-time PCR	MMP2
rtMMP2-Lw	GCCCTTGAAGAAGTACGTCT		Real-time PCR	MMP2
MP2 w/o propeptide For	<u>AAACATATGCGCCCTT</u> GTCTACACAGTTTG	TETOPlink-MP2	εκφραση ενεργοποιημενης μορφης MMP2 σε αιμοκυτταρικές σειρες με προσθηκη επιτοπου 3xmyc στο αμινοτελικο ακρο	MMP2
MP2 w/o propeptide Rev	<u>AAACTCGAGTTA</u> AGCGTAATGTTGGAAAAGTG	TETOPlink-MP2	εκφραση ενεργοποιημενης μορφης MMP2 σε αιμοκυτταρικές σειρες με προσθηκη επιτοπου 3xmyc στο αμινοτελικο ακρο	MMP2
Ag timp-up	GGATGCGTACAAGATTGCAATC	pII10-timp	κατασκευη δικλωνου RNA εναντι timp	TIMP
Ag timp-Lw	TCACGGTACTTGGGACTATT	pII10-timp	κατασκευη δικλωνου RNA εναντι timp	TIMP
rt timp-Up	GGATGGTGGTCTCCAC		Real-time PCR	TIMP
rt timp-Lw	CAACACTTGTGCAACGATTACG		Real-time PCR	TIMP
AgN timp-For	<u>AAAAACATATGTGCAGCTGCCTCCCGCAGCAT</u>	pET16b-timp	παραγωγη αντιγονου εναντι timp	TIMP
AgN timp-Rev	<u>AAAAAGGATCTCA</u> GCCCTTGCATAGACGCCG	pET16b-timp	παραγωγη αντιγονου εναντι timp	TIMP
Ag timpORF-For	GGATGAAGACGAACCGTCTGCTA	TETOPlink-timp	εκφραση αναγνωστικου πλαισιου timp σε αιμοκυτταρικές σειρες	TIMP
Ag timpORF-Rev (Ag timp-Lw)	TCACGGTACTTGGGACTATT	TETOPlink-timp	εκφραση αναγνωστικου πλαισιου timp σε αιμοκυτταρικές σειρες	TIMP
Bergheitimp-For (CTRP SP)	<u>GATCCATGAACAAAAATTTGTGTTAGCATTGTCTT ATTTAGTACTATGTGTGCATTTTATTATAGACA</u>		εκφραση AgN timp σε παρασιτα P.berghei με σηματοδοτικο πεπτιδιο CTRP	TIMP
Bergheitimp-Rev (CTRP SP)	<u>TATGTGCTATAATAAAATGCACACATAGTACTAAAT AAGACAATGCTAACACAAAATTTTTGTTTCATG</u>		εκφραση AgN timp σε παρασιτα P.berghei με σηματοδοτικο πεπτιδιο CTRP	TIMP
Bergheitimp-For (AgN timp-For)	<u>AAAAACATATGTGCAGCTGCCTCCCGCAGCAT</u>		εκφραση AgN timp σε παρασιτα P.berghei με σηματοδοτικο πεπτιδιο CTRP	TIMP
Bergheitimp-Rev	<u>AAACGGCCGCTCA</u> GCCCTTGCATAGACGCCG		εκφραση AgN timp σε παρασιτα P.berghei με σηματοδοτικο πεπτιδιο CTRP	TIMP
S7 (rt) F	GTGCGCGAGTTGGAGAAGA		Real-time PCR	
S8 (rt) R	ATCGGTTGGGCGAATGC		Real-time PCR	

Πίνακας 2 Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν και προτεινόμενες συγκεντρώσεις

Όνομα αντισώματος/χρωστικής	Προτεινομενη συγκεντρωση πειραματα ανοσοαποτυπωσης σε	Προτεινομενη συγκεντρωση πειραματα ανοσοιστοχημειας σε
<b>A-MMP1</b>	<b>1:500</b>	<b>1:200</b>
<b>a-tubulin</b>	<b>1:1000</b>	
<b>a-Pbs21</b>		<b>1:1000</b>
<b>a-PbCap380</b>		<b>1:1000</b>
<b>Falloidin</b>		<b>1:300</b>
<b>a-integrin</b>		<b>1:1000</b>
<b>a-timp</b>	<b>1:200</b>	<b>1:200</b>
<b>Topro</b>		<b>1:1000</b>
<b>a-myc</b>	<b>1:1000</b>	<b>1:1000</b>
<b>a-GFP</b>	<b>1:1000</b>	

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

**Ταυτοποίηση μεταλλοπρωτεασών  
εξωκυττάριας μήτρας στον  
οργανισμό *Anophelesgambiae***

### **1.1 Επιλογή μεταλλοπρωτεασών εξωκυττάριας στοιβάδας – Κριτήρια επιλογής για περαιτέρω μελέτη.**

Η εμπλοκή των μεταλλοπρωτεασών εξωκυττάριας στοιβάδας και των αναστολέων τους σε βιολογικές διαδικασίες (ανοσολογικές αποκρίσεις, αναδιάταξη επιθηλίων), ανάλογες με αυτές που λαμβάνουν χώρα κατά την διείσδυση του παρασίτου μέσα από το μεσεντερικό επιθήλιο, οδήγησε όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή στην επιλογή τους για περαιτέρω μελέτη.

Μετά από μια πρώτη αρχική ταυτοποίηση των γονιδίων θεωρήθηκε σημαντικό αυτά να τηρούν τις παρακάτω προϋποθέσεις ώστε να μελετηθούν λεπτομερώς:

A) Έκφραση τους στο μεσεντερικό επιθήλιο. Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή η διέλευση του παρασίτου μέσα από το μεσεντερικό επιθήλιο είναι μια σημαντική διεργασία στο κύκλο ζωής του παρασίτου μέσα στο κουνούπι, κατά την οποία το παράσιτο σημειώνει τις μεγαλύτερες του απώλειες. Γι'αυτον τον λόγο έκφραση των γονιδίων στο μεσεντερικό επιθήλιο του κουνουπιού αποτελεί βασικό κριτήριο επιλογής τους για περαιτέρω μελέτη.

B) Πιθανή μεταγραφική ρύθμιση μετά από ερεθίσματα αιματοφαγίας ή/και μόλυνσης με παράσιτο. Κάτι τέτοιο, χωρίς να είναι απόλυτο θα μπορούσε να υποδηλώνει πιθανή εμπλοκή των γονιδιακών προϊόντων στην διαδικασία διέλευσης του ωοκινέτη και επακόλουθης επούλωσης του επιθηλίου.

Γ) Φυλογενετικές τους σχέσεις με ομόλογα από συγγενείς οργανισμούς ήδη χαρακτηρισμένα γονίδια ή/και παράλογα γονίδια. Οι πληροφορίες από τις φυλογενετικές σχέσεις με ομόλογα γονίδια, εφόσον υποδεικνύουν λειτουργικούς ρόλους διαφορετικούς από αυτούς που ενδιαφέρουν την συγκεκριμένη μελέτη, θα μπορούσαν σε συνδυασμό με τα παραπάνω να αποκλείσουν γονίδια από περαιτέρω μελέτη.

### **1.2 Ταυτοποίηση γονιδίων της οικογένειας των μεταλλοπρωτεασων εξωκυττάριας στοιβάδας και των αναστολέων τους**

Προκειμένου να ταυτοποιηθούν πιθανά γονίδια μεταλλοπρωτεασων εξωκυττάριας μήτρας και αναστολέων τους έγινε αναζήτηση στο δημοσιευμένο γονιδιώμα του οργανισμού *An. Gambiae* ([www.anobase.org](http://www.anobase.org), [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)) υπό τους όρους IPR001818, IPR001590 και IPR001820.

Οι κωδικοί αυτοί αντιστοιχούν στα ενεργά τμήματα των πρωτεασών της οικογένειας MMPs (IPR001818), ADAMs και ADAMTSs (IPR001590) και του αναστολέα τους TIMP (IPR001820) και ουσιαστικά περιγράφουν τα βασικά χαρακτηριστικά των ενεργών τμημάτων των μορίων αυτών. Στην περίπτωση των μεταλλοπρωτεασών τα χαρακτηριστικά αυτά είναι: α) η παρουσία της αλληλουχίας **HEXXHXXGXXH** το σημείο δηλαδή πρόσδεσης ψευδαργύρου. β) η παρουσία του καταλοίπου μεθιονίνης στο 3 άκρο του ενεργού κέντρου. γ) η παρουσία της κυστεΐνης στο προπεπτιδίο των μορίων που διατηρεί τα ένζυμα ανενεργά. δ) Η παρουσία για κάθε μια από τις οικογένειες των μεταλλοπρωτεασών (MMPs, ADAMs και ADAMTSs) των επιπλέον καρβοξυτελικών τμημάτων υπευθύνων για την αλληλεπίδραση των ένζυμων με τα υποστρώματα τους (adhesivedomains). Στην περίπτωση του αναστολέα TIMP το βασικότερο χαρακτηριστικό του ενεργού τους τμήματος είναι η παρουσία 12 κυστεϊνών, που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς, όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή.

Η παραπάνω αναζήτηση οδήγησε στην ταυτοποίηση των αλληλουχιών με IDs **AGAP006904**, **AGAP011870**, **AGAP003929** ως πιθανά γονίδια που κωδικοποιούν MMPs, των **AGAP003496**, **AGAP003498**, **AGAP000974**, **AGAP002381**, **AGAP003070**, **AGAP008790** ως πιθανά γονίδια που κωδικοποιούν ADAMs, των **AGAP001113**, **AGAP004201**, **AGAP004961** ως πιθανά γονίδια που κωδικοποιούν ADAMTSs και του **AGAP003319** ως πιθανό γονίδιο που κωδικοποιεί TIMP.

Ανάλυση των πρωτεϊνικών αλληλουχιών που κωδικοποιούνται από τα παραπάνω πιθανά γονίδια με προγράμματα πρόβλεψης πρωτεϊνικών δομών ( <http://smart.embl-heidelberg.de/> ) επιβεβαίωσε ότι οι περισσότερες από αυτές φέρουν και τα επιπλέον τμήματα (adhesivedomains) υπεύθυνα για την αλληλεπίδραση με τα υποστρώματα τους κι επομένως αξίζει να μελετηθούν περαιτέρω. Από την περαιτέρω μελέτη αποκλείστηκε η αλληλουχία **AGAP004961** αφού δεν ικανοποιούσε την παραπάνω προϋπόθεση.

Η επιλογή των παραπάνω γονιδίων στηρίχτηκε και σε πληροφορίες, όπου υπήρχαν, από ομολογίες με άλλους ασπόνδυλους (*Drosophilamelanogaster*, *Aedesaegypti*, *Culexpiens*) και σπονδυλωτούς οργανισμούς σχ.1<sup>α</sup>, σχ.2<sup>α</sup>, σχ.3<sup>α</sup>, σχ.4<sup>α</sup>. Βάσει αυτών των πληροφοριών αποκλείστηκαν από την παραπέρα μελέτη τα γονίδια **AGAP002381**, **AGAP003070**, **AGAP008790**,

αφού αυτά φαίνεται από το φυλογενετικό δέντρο (σχ2α) να αποτελούν ομόλογα των ήδη χαρακτηρισμένων στην *Drosophila* γονιδίων TACE, Kuzbanian και kuzbanian-like. Τα γονίδια αυτά παίζουν βασικό ρόλο σε αναπτυξιακές διαδικασίες που δεν αφορούν όμως την συγκεκριμένη μελέτη (Nye 1997).

Συνοπτικά, συνδυάζοντας τις πληροφορίες που προκύπτουν από τις πρωτεϊνικές αλληλουχίες και τις ομολογίες των παραπάνω γονιδίων προκύπτει για τις μεν MMPs ότι και τα τρία ταυτοποιημένα γονίδια αυτής της οικογένειας, τα οποία στο εξής θα αναφέρονται ως MMP1 (AGAP006904) MMP2 (AGAP011870) και MMP3(AGAP003929) έχουν την χαρακτηριστική για την οικογένεια αυτή κεντρική πρωτεϊνική δομή όπως περιγράφηκε στη εισαγωγή (σηματοδοτικό πεπτιδίο, προπεπτιδίο, metalloproteasedomain και hemorexindomains) με εξαίρεση την MMP2 σχ.1β.

Συγκεκριμένα για το γονίδιο αυτό η βάση δεδομένων δεν προβλέπει την έκφραση σηματοδοτικού πεπτιδίου και προπεπτιδίου, γεγονός που οδηγεί στην πιθανότητα λάθους στην δημοσιευμένη αλληλουχία, αφού κάτι παρόμοιο είναι πολύ σπάνιο για την οικογένεια αυτή. Παρόμοια περίπτωση φαίνεται να είναι αυτή της μεταλλοπρωτεάσης stromelysin 3 στον άνθρωπο που περιγράφηκε και στην εισαγωγή, όπου μια εναλλακτική ισομορφή του γονιδίου φαίνεται ότι εκφράζει πρωτεϊνικό προϊόν που διατηρεί τα metalloprotease και hemorexindomains του, αλλά όχι το σηματοδοτικό πεπτιδίο και το προπεπτιδίο του, εκφράζεται δηλαδή ως ενεργή μεταλλοπρωτεάση και εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων(Luo, Mari et al. 2002). Επιπλέον η MMP23 στον άνθρωπο εκφράζεται χωρίς σηματοδοτικό πεπτιδίο, με ένα ασυνήθιστα μικρό σε σχέση με τις υπόλοιπες μεταλλοπρωτεάσες προπεπτιδίο στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων(Velasco, Pendas et al. 1999).

Παρά την έλλειψη σηματοδοτικού πεπτιδίου, προγράμματα πρόβλεψης πρωτεϊνικής δομής, αλλά και τοπολογίας πρωτεϊνών δείχνουν ότι το πρωτεϊνικό προϊόν του γονιδίου MMP2 περιέχει metalloproteasedomain, τέσσερα hemorexindomains κι ένα διαμεμβρανικό τμήμα στο καρβοξυτελικό του άκρο.

Το γονίδιο MMP1 προβλέπεται από τη βάση δεδομένων να έχει τρία εναλλακτικά μετάγραφα, τα οποία διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το

5'UTR(untranslatedregion) αλλά εκφράζουν το ίδιο πρωτεϊνικό προϊόν. Αυτό σύμφωνα με το πρόγραμμα πρόβλεψης πρωτεϊνικής δομής φαίνεται να είναι διαμεμβρανικό με το αμινοτελικό του άκρο να βρίσκεται στον εξωκυτταριο χώρο.

Το πρωτεϊνικό προϊόν του MMP3 γονιδίου δεν φαίνεται να είναι διαμεμβρανικό, ούτε προβλέπεται να είναι GPI-anchored. Η παρουσία ωστόσο σηματοδοτικού πεπτιδίου στο αμινοτελικό του άκρο φαίνεται να καθιστά πιθανότερη την έκκριση του από το κύτταρο.

Οι φυλογενετικές σχέσεις των γονιδίων της οικογένειας των MMPs φαίνονται στο φυλογενετικό δέντρο (σχ1α). Από αυτό προκύπτει ότι τα γονίδια MMP1 και MMP2 του κουνουπιού είναι ομόλογα με τα αντίστοιχα ήδη χαρακτηρισμένα γονίδια MMP1 και MMP2 της *Drosophila*. Όπως και στη *Drosophila* όμως τα δύο αυτά γονίδια φαίνεται να απέχουν φυλογενετικά μεταξύ τους. Αντίθετα στην ίδια φυλογενετική ομάδα με το MMP2 γονίδιο ανήκει το γονίδιο MMP3 του Ανωφελούς το οποίο όμως απουσιάζει από την *Drosophila*. Πρέπει να σημειωθεί εδώ παρόλο που δε φαίνεται στο φυλογενετικό δέντρο ότι για την *Drosophila* έχουν αναφερθεί δυο ισομορφές για το MMP1 γονίδιο (Page-McCaw, Serano et al. 2003). Οι δυο ισομορφές διαφοροποιούνται στα πρωτεϊνικά προϊόντα που εκφράζουν, αφού έχουν διαφορετικό καρβοξυτελικό άκρο(Zhang, Dailey et al. 2006).

Σύγκριση των πρωτεϊνικών αλληλουχιών των μεταλλοπρωτεασών του Ανωφελούς αυτής της οικογένειας με τις αντίστοιχες μεταλλοπρωτεάσες της *Drosophila* (σχήμα 1γ) επιβεβαιώνει τις φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των μορίων ενώ αποκαλύπτει και μεγάλη συντήρηση αμινοξικών κατολοίπων που παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοτητα των μορίων, όπως είναι γνωστό από άλλους οργανισμούς κι έχει ήδη συζητηθεί στην εισαγωγή. Τέτοια αμινοξικά κατάλοιπα είναι η συντηρημένη κυστεΐνη και μεθειονίνη του προπεπτιδίου και του ενεργού κέντρου αντίστοιχα, η furin cleavage site, θέση στην οποία κόβει η furin προκειμένου να απομακρυνθεί το προπεπτίδιο, το Zn binding domain, που είναι το κέντρο ενεργοτητας του μορίου, αλλά και τα hemorexin domains, τα οποία φαίνεται να παρουσιάζουν συντήρηση όχι μόνο ως προς την αμινοξική αλληλουχία τους, αλλά και ως προς τον αριθμό τους (4). Λιγότερο συντηρημένες περιοχές φαίνεται να είναι η περιοχή hinge και το καρβοξυτελικό άκρο των μορίων. Συγκεκριμένα η περιοχή hinge της MMP1

στον Ανωφελή και τη Δροσόφιλα φαίνεται να είναι σχετικά μικρή. Αντίθετα η περιοχή hinge της MMP2 και στους δυο οργανισμούς είναι ιδιαίτερα εκτεταμένη και χαρακτηρίζεται από την παρουσία πολλαπλών επαναλήψεων συγκεκριμένων αμινοξικών καταλοίπων. Στην περίπτωση της MMP2 του Ανωφελούς πρόκειται για επαναλήψεις θρεονίνης, ενώ στην περίπτωση της Δροσόφιλας είναι επαναλήψεις της αλληλουχίας: γλουταμίνη, γλουταμικό, αργινίνη. Σε ότι αφορά τα καρβοξυτελικά άκρα των μορίων η αμινοξική τους αλληλουχία καθορίζει και την προβλεπόμενη τοπολογία τους. Έτσι η MMP1 του Ανωφελούς περιέχει ένα πιθανά διαμεμβρανικό τμήμα, ενώ η αντίστοιχη της *Drosophila* προβλέπεται να αλληλεπιδρά με την μεμβράνη μέσω ενός GPI-anchor. Τόσο η MMP2 του Ανωφελούς, όσο και της *Drosophila* προβλέπονται να είναι τοποθετημένες στην μεμβράνη μέσω ενός GPI-anchor.

Η πρωτεϊνική αλληλουχία των γονιδίων AGAP001113 και AGAP004201 (θα αναφέρονται ως ADAMTS1 και ADAMTS2 αντίστοιχα) είναι η χαρακτηριστική για αυτή την οικογένεια (σχ.2β), περιέχουν δηλαδή τα χαρακτηριστικά για την οικογένεια των ADAMTS metalloprotease domain, spacer domain και thrombospondin repeats (TSPs). Η πρωτεΐνη ADAMTS2 περιέχει στο καρβοξυτελικό της άκρο ένα επιπλέον domain, το gondomain, το οποίο την κατηγοριοποιεί στην ομάδα των gonADAMTSs, όπως φαίνεται και στο φυλογενετικό δέντρο. Από την ομάδα αυτή των γονιδίων έχει χαρακτηριστεί το γονίδιο gon-1 του οργανισμού *C.elegans*, το οποίο λειτουργικά φαίνεται να μετέχει στην μορφογένεση των γονάδων του οργανισμού (Meighan, Cram et al. 2004).

Όπως φαίνεται και από το φυλογενετικό δέντρο (σχ2β) τα δυο γονίδια των ADAMTSs του Ανωφελούς απέχουν μεταξύ τους και σχηματίζουν, μαζί με τα ομόλογα τους στα άλλα είδη κουνουπιών και στη Δροσόφιλα, διαφορετικές ομάδες. Συγκρινόμενες οι πρωτεϊνικές αλληλουχίες των ADAMTS1 του κουνουπιού και του ομόλογου του στην Δροσόφιλα (DmADAMTS1) εμφανίζουν μεγάλη συντήρηση τόσο στις περιοχές που αντιστοιχούν στα χαρακτηριστικά για αυτές τις πρωτεΐνες domains, όσο και έξω από αυτά (σχ2γ,β). Το ίδιο συμβαίνει και με τις ADAMTS2 του Ανωφελούς και του ομόλογου του στην Δροσόφιλα (DmADAMTS2) (σχ2γ,α). Για την σύγκριση αυτή χρησιμοποιήθηκε η πρωτεϊνική αλληλουχία μόνο της μιας από τις δυο ισομορφές του γονιδίου DmADAMTS2 που εκφράζονται στην Δροσόφιλα. Ο





πρωτεϊνικό προϊόν της μιας από αυτές φαίνεται να έχει μικρότερη κυτταροπλασματική ουρά από το άλλο. Στη σύγκριση των πρωτεϊνικών αλληλουχιών των τριών γονιδίων, όπου χρησιμοποιήθηκε η μια από τις δυο ισομορφές του γονιδίου Neu-3 φαίνεται ότι η πρωτεΐνη ADAMD βρίσκεται πιο κοντά στη Neu-3 της Δροσόφιλας. Πάντως και τα τρία πρωτεϊνικά προϊόντα παρουσιάζουν συντήρηση των αλληλουχιών τους στα βασικά δομικά στοιχεία τους (furincleavagesite, metalloproteasedomain, disintegrindomain, ACRdomain και EGFrepeat).

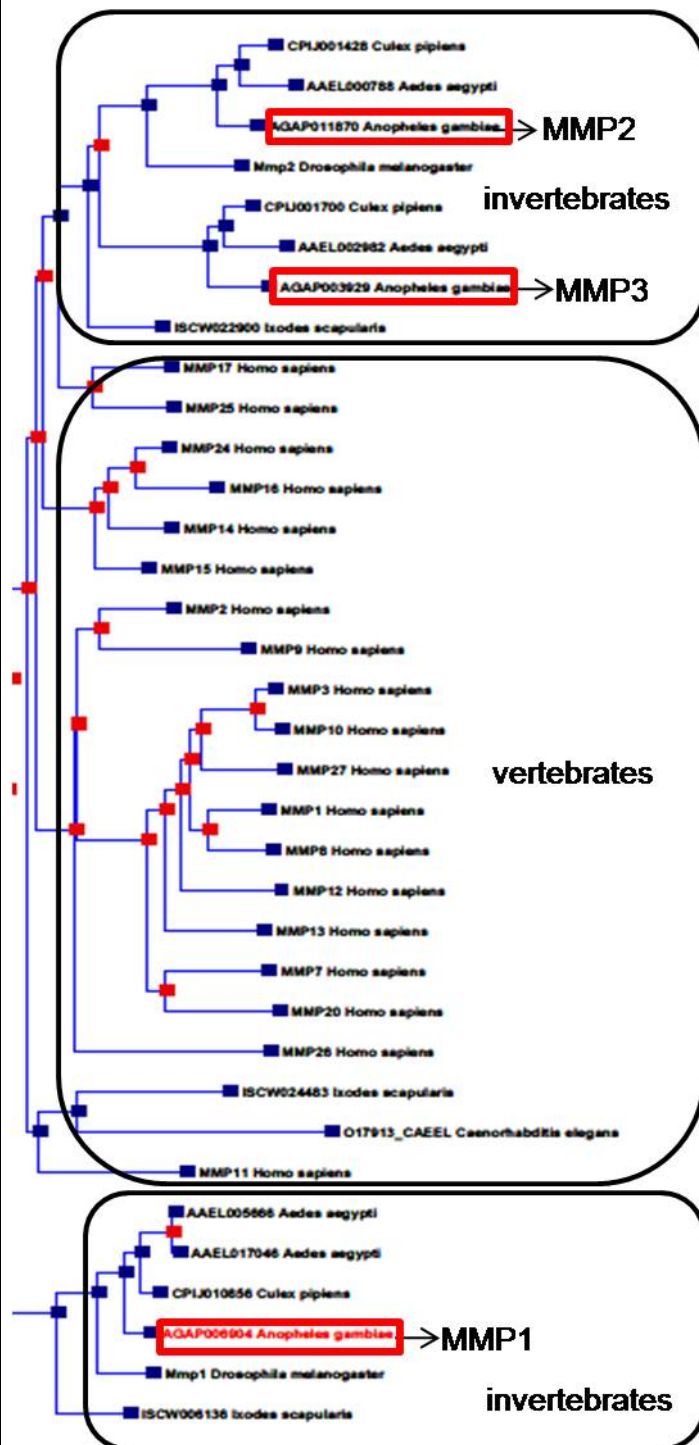
Το γονίδιο ADAMH έχει ομολογία με το γονίδιο mind-meld της *Drosophila*, όπως φαίνεται στο φυλογενετικό δέντρο σχ3α. Το τελευταίο φαίνεται να σχετίζεται με την ανάπτυξη του κεντρικού νευρικού συστήματος του οργανισμού (Flybase) και φαίνεται να έχει τρεις εναλλακτικές ισομορφές, τα πρωτεϊνικά προϊόντα των οποίων διαφέρουν, όπως και στη περίπτωση του γονιδίου Neu-3 στην κυτταροπλασματική τους ουρά. Σύγκριση των πρωτεϊνικών αλληλουχιών των δυο γονιδίων ADAMH και mind- meld (sx3γ) οδήγησε στη διαπίστωση ότι παρόλο που παρουσιάζουν συντήρηση όλων των γνωστών πρωτεϊνικών δομών των ADAMs, φέρουν και τα δυο την ίδια σημειακή μετάλλαξη στο κατάλοιπο γλουταμίνη (E-M) του καταλυτικού τους κέντρου, η οποία εφόσον είναι αληθής τα καθιστά ανενεργά. Αναζήτηση ομόλογων γονιδίων σε άλλους οργανισμούς έδειξε ότι παρόμοιες περιπτώσεις έχουν βρεθεί τόσο στον άνθρωπο, όσο και στον οργανισμό *C.elegans*. Στον τελευταίο το ομόλογο γονίδιο του ADAMH, που ονομάζεται unc-71, φέρει επίσης σημειακή μετάλλαξη στο καταλυτικό του κέντρο που το καθιστά ανενεργό. Λειτουργικάτο γονίδιο unc-71 σχετίζεται με τη ρύθμιση της μετανάστευσης των νευρικών αξόνων μέσω αλληλεπίδρασης με ιντεγκρίνες. Αν και έχει προταθεί για άλλους οργανισμούς ότι παρόμοιες περιπτώσεις ανενεργών ADAMs μπορεί να ασκούν ανασταλτική δράση σε ενεργές ADAMs κάτι τέτοιο δεν αποδείχθηκε για την περίπτωση του γονιδίου unc-71 (Huang, Huang et al. 2003).

Τέλος το μοναδικό γονίδιο που ανήκει στην οικογένεια των αναστολέων TIMPs έχει το χαρακτηριστικό για την οικογένεια αυτή NTRdomain σχ.4β1 και στο εξής θα αναφέρεται ως timp. Πέρα από τη φυλογενετική σχέση μεταξύ του αναστολέα timp του κουνουπιού και των ομόλογων αναστολέων άλλων οργανισμών, έχει δειχθεί και συντήρηση στην θέση των γονιδίων αυτών μέσα

στο γονιδίωμα του κάθε οργανισμού (σπονδυλωτά και ασπόνδυλα). Όλα, λοιπόν τα γονίδια που κωδικοποιούν αναστολείς αυτής της οικογένειας εντοπίζονται σε ιντρόνια του γονιδίου της synapsin (Pohar, Godenschwege et al. 1999). Αυτό φαίνεται να ισχύει και στην περίπτωση του γονιδίου timp του Ανωφελούς σχ4β2.

Σύγκριση των πρωτεϊνικών αλληλουχιών των αναστολέων του Ανωφελούς και της Δροσόφιλα έδειξε συντήρηση κυρίως των καταλοίπων κυστεΐνης των ενεργών περιοχών τους που αποτελεί άλλωστε και το βασικότερο χαρακτηριστικό τους

## Σχ.1<sup>α</sup> Φυλογενετικό δέντρο MMPs



## MMPs

### MMP1



### MMP2



### MMP3



**Σχημα1β:** Σχηματική απεικόνιση των ταυτοποιημένων από την βάση δεδομένων γονιδίων των μεταλλοπρωτεασών της εξωκυττάριας μήτρας και των προβλεπόμενων πρωτεϊνικών τους προϊόντων. Τα διαφορετικά χρώματα αντιπροσωπεύουν διαφορετικές πρωτεϊνικές δομές και τα αντίστοιχα εξώνια από τα οποία αυτές κωδικοποιούνται. Τα βέλη υποδεικνύουν τις θέσεις πάνω στο γονίδιο όπου σχεδιάστηκαν εκκινήτες για την κλωνοποίηση μέρους των γονιδίων και την περιγραφή του μεταγραφικού τους προτύπου. Η παρουσία \* στα σχήματα δηλώνει ότι η αλληλουχία των γονιδίων, όπως αυτή δίνεται από την βάση δεδομένων δεν είναι πλήρης. Για το γονίδιο AGAP006904(MMP1) η βάση δεδομένων προβλέπει την ύπαρξη τριών μεταγράφων, τα οποία διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το 5'UTR.

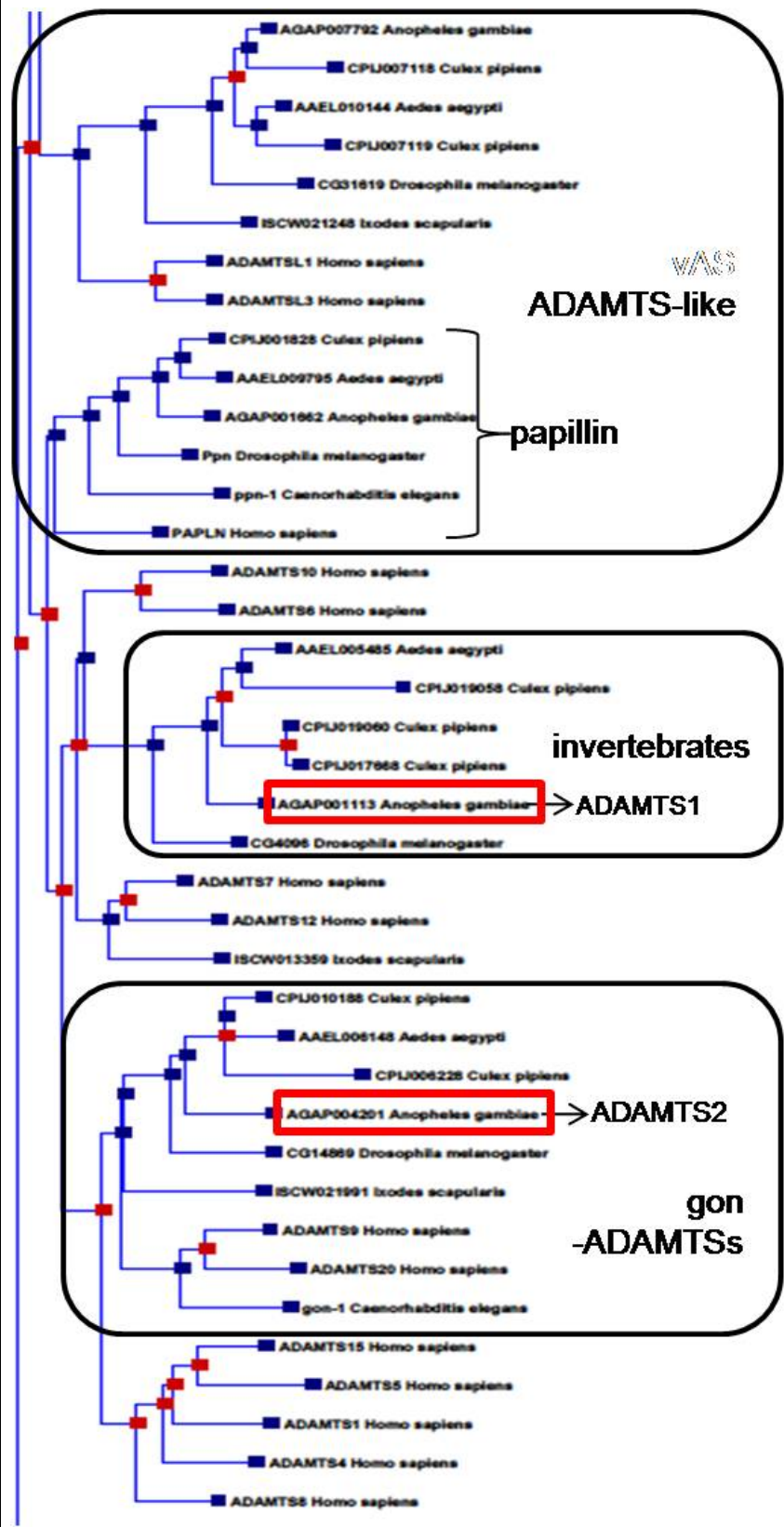
**Σχήμα 1γ.** Σύγκριση πρωτεϊνικών αλληλουχιών των γονιδίων της οικογένειας του Ανωφελούς με τα γονίδια της ίδιας οικογένειας της *Drosophila*. Έχουν τοποθετηθεί σε πλαίσιο οι αλληλουχίες στις οποίες παρατηρείται μεγαλύτερη συντήρηση ( *cysteineswitch*, *furincleavagesite* και *Znbindingdomain*). Συντήρηση παρατηρείται επίσης στις περιοχές που αντιστοιχούν στα 4 *hemopexindomains* (μαύρο, κόκκινο, πράσινο και πορτοκαλί περίγραμμα)των μορίων.

		Section 6					
	(261)	251	270	280	290	300	312
AGMMP1	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DmMMP1-iso2	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DMMMP1-iso1	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DmMMP2-iso1	(261)	HIYIAMRIYKCV	ALIDMKESR	KKKMGNAKR	KEQDHRVQPA	EKDVRL	LMSARQ
DMMMP2-ISO2	(153)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AGMMP2	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AGMMP3	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Consensus	(261)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
		Section 7					
	(313)	313	320	330	340	350	364
AGMMP1	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DmMMP1-iso2	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DMMMP1-iso1	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DmMMP2-iso1	(313)	SGAFLMGMYLL	MGAHRVGKR	QRSKKGAIF	RCRGRALI	FPFGSGKV	RGERGAS
DMMMP2-ISO2	(153)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AGMMP2	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AGMMP3	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Consensus	(313)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
		Section 8					
	(365)	365	370	380	390	400	416
AGMMP1	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DmMMP1-iso2	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DMMMP1-iso1	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DmMMP2-iso1	(365)	QHAVVMAKATV	FRCSSLAPF	RLHLVFS	PCSHSTRCN	FLAIFVLS	SAVPDPR
DMMMP2-ISO2	(153)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AGMMP2	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AGMMP3	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Consensus	(365)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
		Section 9					
	(417)	417	430	440	450	468	
AGMMP1	(24)	TAIVVSTPQAE	LISQFGYLS	PKYRNPTGN	LD--ODTWEK	AMEFOSFA	
DmMMP1-iso2	(23)	QSAIVVSTTQ	AEIISQFGY	LSPASARNP	ASGHD--	ORTWVSA	
DMMMP1-iso1	(23)	QSAIVVSTTQ	AEIISQFGY	LSPASARNP	ASGHD--	ORTWVSA	
DmMMP2-iso1	(417)	RISIAFRHGC	CCYVTLAVT	GAKICYGHN	SECKRNGG	EDASGKI	
DMMMP2-ISO2	(153)	-----	-----	-----	-----	-----	
AGMMP2	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	
AGMMP3	(23)	HGIAVPEKEM	IDRRRFGYL	E---KGFCE	ALYSGEA	IIDAIAKHV	
Consensus	(417)	AP T YL FGYL S AL AI Q FA					
		Section 10					
	(469)	469	480	490	500	510	520
AGMMP1	(74)	GINVTGELD	GTQMLSL	RCGVDRVGT	DSRKR	ALQGR	RRVVDLTY
DmMMP1-iso2	(73)	GINVTGELD	ASTKMLSL	RCGVDRVGT	DSRKR	ALQGR	RRVVDLTY
DMMMP1-iso1	(73)	GINVTGELD	ASTKMLSL	RCGVDRVGT	DSRKR	ALQGR	RRVVDLTY
DmMMP2-iso1	(469)	CIYELRELGN	INDIYVT	LQHRFRNGR	LTA	NRCV	INQI
DMMMP2-ISO2	(157)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AGMMP2	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AGMMP3	(71)	GIPTGVLR	RRLEMLA	RCGVDRVGT	QVQHDQS	HRH	IVGSES
Consensus	(469)	GL TGELED ETM LMS RCGVDRVGT G R KR LQ S WRVK LTY					
				<b>Cysteineswitch</b>		<b>Furin cleavage site</b>	
		Section 11					
	(521)	521	530	540	550	560	572
AGMMP1	(126)	RIRKPRRERT	-----	-AVDPR	AKARAVY	EDDRE	TPKKGAVH
DmMMP1-iso2	(124)	KIKPKIKRV	-----	-DVARE	AGAAV	EDDRE	TRKTRGPV
DMMMP1-iso1	(124)	KIKPKIKRV	-----	-DVARE	AGAAV	EDDRE	TRKTRGPV
DmMMP2-iso1	(521)	SILQOLHNCH	MVNRSPDASK	VLMVOTALD	VWANSK	LREVV	DDADIQ
DMMMP2-ISO2	(163)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AGMMP2	(7)	G-----	-----	-----	-----	-----	-----
AGMMP3	(123)	FANSSGEGE	-----	-QVRI	THEAL	QALAN	REVVTDAD
Consensus	(521)	IS Y RL VDR IAKAFGVS HS LTF VYS ADI					
		Section 12					
	(573)	573	580	590	600	610	624
AGMMP1	(170)	IREENEHGD	DPFDG	GGTLAGA	YVY	---GDAR	FDAEOWT
DmMMP1-iso2	(168)	IKVSEHGD	DAFDG	GGTLAGA	YVY	---GDAR	FDAELWT
DMMMP1-iso1	(168)	IKVSEHGD	DAFDG	GGTLAGA	YVY	---GDAR	FDAELWT
DmMMP2-iso1	(573)	ILFARRAHG	DYKFDG	GGTLAGA	YVY	---GDAR	FDAETN
DMMMP2-ISO2	(195)	ILFARRAHG	DYKFDG	GGTLAGA	YVY	---GDAR	FDAETN
AGMMP2	(40)	MPARKFHGD	YDFDGT	GGTLAGA	YVY	---GDAR	FDAETN
AGMMP3	(167)	ICFISGH	HGDNP	GGTLAGA	YVY	---GDAR	FDAETN
Consensus	(573)	I FA HGDGY FDGPG VLAHAFYP G GGDARFDDE W I					
		Section 13					
	(625)	625	630	640	650	660	676
AGMMP1	(214)	KPRGTNL	QVAARE	GHSLGL	RSRDSAL	MAVYSG	---PVFRL
DmMMP1-iso2	(212)	SFRGTNL	QVAARE	GHSLGL	RSRDSAL	MAVYSG	---PVFRL
DMMMP1-iso1	(212)	SFRGTNL	QVAARE	GHSLGL	RSRDSAL	MAVYSG	---PVFRL
DmMMP2-iso1	(623)	DHGTN	FLVAARE	GHSLGL	RSRDSAL	MAVYSG	---PVFRL
DMMMP2-ISO2	(245)	DHGTN	FLVAARE	GHSLGL	RSRDSAL	MAVYSG	---PVFRL
AGMMP2	(89)	DAEGR	FLVAARE	GHSLGL	RSRDSAL	MAVYSG	---PVFRL
AGMMP3	(218)	IEGVD	FLVAARE	GHSLGL	RSRDSAL	MAVYSG	---PVFRL
Consensus	(625)	S GTNLFQVALHEFGHSLGLAHS I SALMFFPYRG FE LDDDR G					
		Section 14					
	(677)	677	690	700	710	728	
AGMMP1	(265)	ICLYR	RTT	-----	-----	-----	
DmMMP1-iso2	(263)	ICLYR	RTT	-----	-----	-----	
DMMMP1-iso1	(263)	ICLYR	RTT	-----	-----	-----	
DmMMP2-iso1	(674)	ICLYR	RTT	TWGPYK	PQTTT	TTTTRAMI	
DMMMP2-ISO2	(296)	ICLYR	RTT	TWGPYK	PQTTT	TTTTRAMI	
AGMMP2	(141)	ICLYR	RTT	IKIYK	NPERHT	TPSTTT	
AGMMP3	(268)	YCYL	IQNP	HIITDE	PDWMT	TEATV	
Consensus	(677)	IQSLYG K K T TTT					
		Section 15					
	(729)	729	740	750	760	770	780
AGMMP1	(275)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DmMMP1-iso2	(272)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DMMMP1-iso1	(272)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DmMMP2-iso1	(726)	NDRNRARE	RQEEERR	RQEKERR	RQEEERR	HQEEERR	RQVEER
DMMMP2-ISO2	(348)	NDRNRARE	RQEEERR	RQEKERR	RQEEERR	HQEEERR	RQVEER
AGMMP2	(192)	HPWEGLY	PHGRPYT	TRRTTT	TTTTT	-----	-----
AGMMP3	(320)	APLPTST	PALSST	TEVDI	PITFV	-----	-----
Consensus	(729)	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Zn binding domain

	(781)	781	790	800	810	820	Section 16
AGMMP1	(275)	-----	-----	-----	-----	-----	832
DmMMP1-iso2	(272)	-----	-----	-----	-----	-----	
DMMMP1-iso1	(272)	-----	-----	-----	-----	-----	
DmMMP2-iso1	(778)	EQERQEEENRRRRIE	HKSQWERNNPSKERN	RRPREQEMERRRQEQ	ERQEQEQEQEQEQ		
DMMMP2-ISO2	(400)	EQERQEEENRRRRIE	HKSQWERNNPSKERN	RRPREQEMERRRQEQ	ERQEQEQEQEQEQ		
AGMMP2	(217)	SHHREDEETRYR	-----	-----	-----	-----	TOLPATTETTITV
AGMMP3	(345)	-----	-----	-----	-----	-----	
Consensus	(781)	-----	-----	-----	-----	-----	
	(833)	833	840	850	860	870	Section 17
AGMMP1	(275)	-----	-----	-----	-----	NPGGGAGATETPT	PKT
DmMMP1-iso2	(272)	-----	-----	-----	-----	NQLRPTNVYPATT	QEP
DMMMP1-iso1	(272)	-----	-----	-----	-----	NQLRPTNVYPATT	QEP
DmMMP2-iso1	(830)	EQEDRRRERERDRQ	LEWERRNRNGAREP	VTPTANTTPRPTN	KPYFTVHRCQH		
DMMMP2-ISO2	(952)	EQEDRRRERERDRQ	LEWERRNRNGAREP	VTPTANTTPRPTN	KPYFTVHRCQH		
AGMMP2	(241)	R-----	-----	-----	-----	HRPHHRPHHRTT	TAMTTT
AGMMP3	(345)	-----	-----	-----	-----	DYETVDDHISRHH	AQSPPT
Consensus	(833)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	(885)	885	890	900	910	920	Section 18
AGMMP1	(293)	---TEMDS	ELCTSPKIA	ENTAD	STAKKDKY	LENA	AEQYKK
DmMMP1-iso2	(290)	PKVFL	LDDSI	CKDSK	VTLENSA	QGSTAF	KDKYK
DMMMP1-iso1	(290)	PKVFL	LDDSI	CKDSK	VTLENSA	QGSTAF	KDKYK
DmMMP2-iso1	(882)	HHNKPR	KPKIDS	CMTYDAIS	TRGHTFR	PLWRR	IGTSG
DMMMP2-ISO2	(904)	HHNKPR	KPKIDS	CMTYDAIS	TRGHTFR	PLWRR	IGTSG
AGMMP2	(269)	YRHRTT	IHNPC	NTSDAIT	IN	SPIDR	LWRNEND
AGMMP3	(376)	LAIPSY	VVPV	DI	CGSSDAIG	IRGSL	IKKAL
Consensus	(885)	P	P	P	C	DAI	IIRGELFIFKG
	(937)	937	950	960	970	980	Section 19
AGMMP1	(342)	SGGPP	PP	-----	-----	-----	-----
DmMMP1-iso2	(341)	SGGPP	PP	-----	-----	-----	-----
DMMMP1-iso1	(341)	SGGPP	PP	-----	-----	-----	-----
DmMMP2-iso1	(933)	RHHNS	ALPEL	LT	KTVDAV	YENK	ORC
DMMMP2-ISO2	(555)	RHHNS	ALPEL	LT	KTVDAV	YENK	ORC
AGMMP2	(320)	EMT	FT	FER	D	TYNKHQ	-----
AGMMP3	(428)	WV	GR	FK	VSH	DAV	YERLDD
Consensus	(937)	R	W	GL	PP	-----	-----
	(989)	989	1000	1010	1020	1030	Section 20
AGMMP1	(389)	CF	FT	GV	FP	-----	-----
DmMMP1-iso2	(388)	CF	FT	GV	FP	-----	-----
DMMMP1-iso1	(388)	CF	FT	GV	FP	-----	-----
DmMMP2-iso1	(984)	GL	LP	P	T	DA	AV
DMMMP2-ISO2	(606)	GL	LP	P	T	DA	AV
AGMMP2	(371)	GL	LP	D	S	R	DA
AGMMP3	(480)	GL	EE	EL	R	DA	AV
Consensus	(989)	GL	P	L	H	DA	AM
	(1041)	1041	1050	1060	1070	1080	Section 21
AGMMP1	(441)	GV	PN	VD	AA	LV	TNG
DmMMP1-iso2	(440)	GV	PN	VD	AA	LV	TNG
DMMMP1-iso1	(440)	GV	PN	VD	AA	LV	TNG
DmMMP2-iso1	(1035)	CG	GY	DA	AF	LD	GT
DMMMP2-ISO2	(657)	CG	GY	DA	AF	LD	GT
AGMMP2	(422)	CG	GY	DA	AF	LD	GT
AGMMP3	(531)	CG	GY	DA	AF	LD	GT
Consensus	(1041)	GV	PN	VD	AA	LV	TNG
	(1093)	1093	1100	1110	1120	1130	Section 22
AGMMP1	(493)	GCK	NT	P	S	T	F
DmMMP1-iso2	(492)	GCK	NT	P	S	T	F
DMMMP1-iso1	(492)	GCK	NT	P	S	T	F
DmMMP2-iso1	(1087)	RS	A	E	V	D	D
DMMMP2-ISO2	(709)	RS	A	E	V	D	D
AGMMP2	(474)	ER	L	L	N	D	L
AGMMP3	(583)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Consensus	(1093)	N	I	E	E	-----	-----
	(1145)	1145	1150	1160	1170	1180	Section 23
AGMMP1	(545)	T	T	G	T	S	S
DmMMP1-iso2	(535)	H	O	S	N	D	E
DMMMP1-iso1	(535)	H	O	S	N	D	E
DmMMP2-iso1	(1118)	R	N	H	F	I	S
DMMMP2-ISO2	(740)	R	N	H	F	I	S
AGMMP2	(507)	S	D	G	Y	A	P
AGMMP3	(583)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Consensus	(1145)	R	I	L	I	L	-----

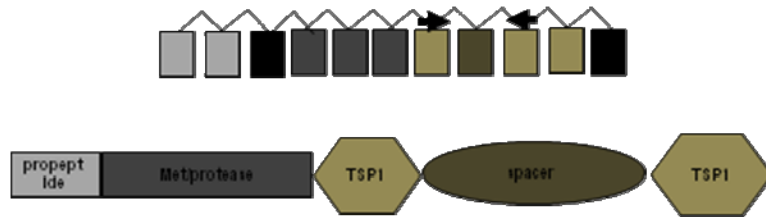
## Σχ2β Φυλογενετικό δέντρο ADAMTSs



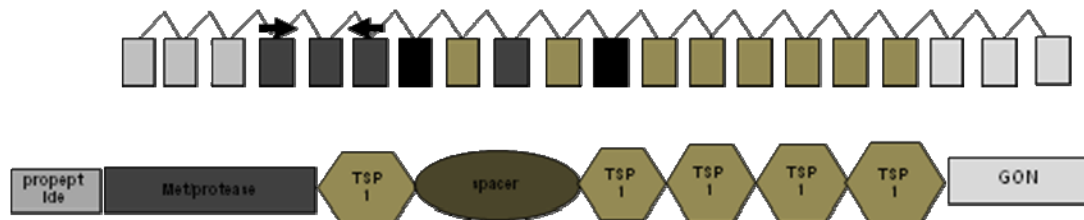


# ADAMTSs

## AGAP001113 (ADAMTS1)



## AGAP004201 (ADAMTS2)



**Σχημα2β:** Σχηματική απεικόνιση των ταυτοποιημένων από την βάση δεδομένων γονιδίων των μεταλλοπρωτεασών της εξωκυττάριας μήτρας και των προβλεπόμενων πρωτεϊνικών τους προϊόντων. Τα διαφορετικά χρώματα αντιπροσωπεύουν διαφορετικές πρωτεϊνικές δομές και τα αντίστοιχα εξώνια από τα οποία αυτές κωδικοποιούνται. Τα βέλη υποδεικνύουν τις θέσεις πάνω στο γονίδιο όπου σχεδιάστηκαν εκκινητές για την κλωνοποίηση μέρους των γονιδίων και την περιγραφή του μεταγραφικού τους προτύπου

a)

	(1)	10	20	30	40	50	Section 1
AgADAMTS2	(1)						
DmADAMTS2-iso1	(1)	MSTHWRQNA	CLYACC	IAFLGLML	IMPHLGL	LRSAHKQ	EEELPQSTHPLANS
Consensus	(1)						
	(51)	60	70	80	90	100	Section 2
AgADAMTS2	(1)						
DmADAMTS2-iso1	(51)	PFATPATL	HPRLDND	STDHEPP	DGLDDL	DEEEHSA	FAFVMPKVVNYLSLS
Consensus	(51)						
	(101)	110	120	130	140	150	Section 3
AgADAMTS2	(1)						
DmADAMTS2-iso1	(101)	EADLIYES	KRNSDIN	SFLKES	ASAFAM	TGTRNMS	NEIWDPHPEYELNVF
Consensus	(101)					TGFRS	IWDPHPEYELNVF
	(151)	160	170	180	190	200	Section 4
AgADAMTS2	(24)	GIRH	KISH	DEE	HKDM	KVTHFF	PNP
DmADAMTS2-iso1	(151)	GRLH	VIHQ	DSV	HNHSM	THIRIL	RK
Consensus	(151)	G	LHI	L	DA	FIH	E
	(201)	210	220	230	240	250	Section 5
AgADAMTS2	(71)	KGSV	VVGDA	SNVR	VSLCE	GMQ	GHIKTS
DmADAMTS2-iso1	(201)	SGYV	EDDP	PHSM	VSLCG	GMT	CVIKTS
Consensus	(201)	G	V	D	S	V	VSLC
	(251)	260	270	280	290	300	Section 6
AgADAMTS2	(121)	QLM	TDKTS	SGND	GRTL	VGG	PTPAQDCS
DmADAMTS2-iso1	(250)	RIS	QRNAR	HVSK	FELG	LD	DFSKLEQVQ
Consensus	(251)	K		A		LD	IS
	(301)	310	320	330	340	350	Section 7
AgADAMTS2	(171)	ANN	DYTV	EVLL	VVDN	QMQ	R
DmADAMTS2-iso1	(300)	DNQ	VYI	EVLL	AVDN	SKQ	EGED
Consensus	(301)	NN	YTLE	VLI	VDN	M	PH
	(351)	360	370	380	390	400	Section 8
AgADAMTS2	(221)	IAT	HTSY	HHDD	DACT	AANK	KGLED
DmADAMTS2-iso1	(350)	LL	VR	IS	IPN	IND	OTH
Consensus	(351)	I	L	I	I	QT	AA
	(401)	410	420	430	440	450	Section 9
AgADAMTS2	(271)	RNPA	ENNC	DTL	LGLA	ELGT	CRD
DmADAMTS2-iso1	(399)	GSPV	PGKI	CHML	LGLA	ELGT	CCSS
Consensus	(401)				C	LGLA	ELGT

Furin cleavage site

Metalloprotease domain

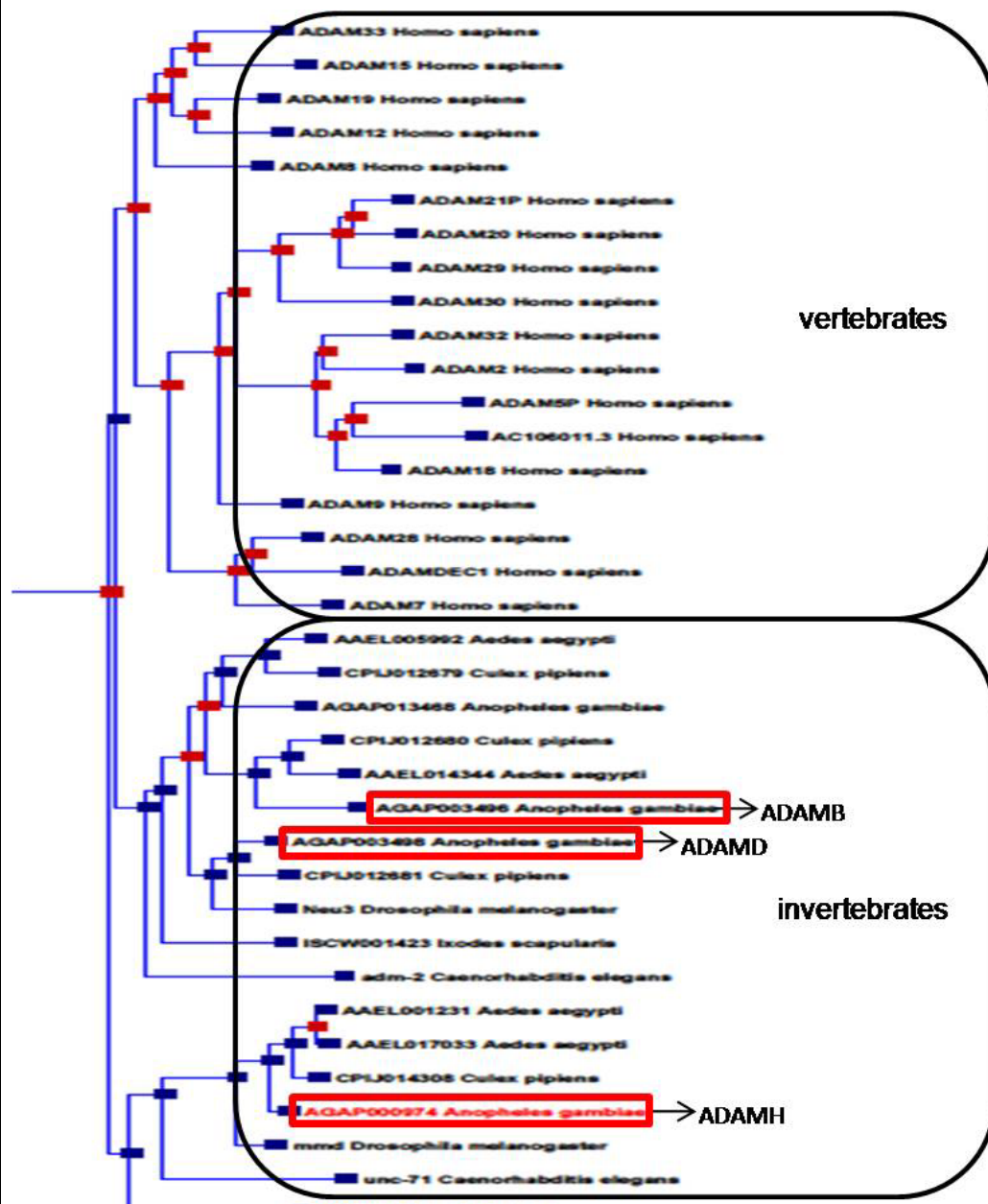


β)

		1	10	20	30	40	53	Section 1
AgADAMTS1	(1)	-----						
DmADAMTS1	(1)	MTCSRMRWIRSRWLGLLLHYLVVVVTQGGGVRPLYGLHSDDELVAGEGQLVPPRR						
Consensus	(1)	-----						
		54	60	70	80	90	106	Section 2
AgADAMTS1	(54)	-----						
DmADAMTS1	(54)	VHPDGAFMTHQLEYAHELDRRRHRQRRLNSEHDTQAADLHLLPLANETLHL						
Consensus	(54)	-----						
		107	120	130	140		159	Section 3
AgADAMTS1	(107)	-----						
DmADAMTS1	(107)	ELMAHSYFLAPNLYVERRRDRTR-VRPMMNINCHVQGVRRGHQDQRYVAISA						
Consensus	(107)	LVIERHRRDLRTR R INCHF G VRG S VAIS						
		160	170	180	190	200	212	Section 4
AgADAMTS1	(41)	CNGSLA-----GVRTNRTVEYIEFVXHPQGENGEHPHVVE						
DmADAMTS1	(160)	CAGLVSCPNFCVLPELITLCQVGHRTAGNEYIEFVNEHEPHVNGHPHVVE						
Consensus	(160)	C GL G IRT EYFIEPAK H P HPHVVE						
		213	220	230	240	250	265	Section 5
AgADAMTS1	(77)	KRADVKEPTPKNSRSALIKKKKRRKRHSNCGTREPRLLETRELEWQHGGK						
DmADAMTS1	(213)	QRSVVKPKHLLKRNKRKGGSGSGAESNCGTREPRLLETRELEWARGK						
Consensus	(213)	RA VK A K R KK K LSNCGTREPRL ETRELEWQ GK						
		266	280	290	300		318	Section 6
AgADAMTS1	(130)	VLVQGGKRTKRNQHPDLTASFATGVEEGEKMAKTKKGG-----						
DmADAMTS1	(265)	MKVQGGKQIRRHSHHHHHHHHKRHHHQQLSRVPHKFFYETQFQTEPDHA						
Consensus	(266)	V VQGGK R H HHR K SK K						
		319	330	340	350	360	371	Section 7
AgADAMTS1	(171)	--RTRRISKPRHVEALVYADHNVQFHDQVLDLQYLLIMNMVSLYKDFE						
DmADAMTS1	(318)	EIEARRRISPRHVEALVADALNSAFHR--DLGGLLITIMNMVSLYKDFE						
Consensus	(319)	R RR IS PRHVE LIVAD SM FH DLN YLL IMNMVSLYKDFE						Furin cleavage site
		372	380	390	400	410	424	Section 8
AgADAMTS1	(222)	IGNSIQVTVVYIILSEESHADFNTHTMASNTLNFCRWQRNLNPKPEDPH						
DmADAMTS1	(369)	IGNSIEVVVYIILQLEESQLQLNLTQNAOKNLFCRSWQHKLNKGSKDPH						
Consensus	(372)	IGNSI I VVKII LDEEDS NLT A LD FC WQ LN D DPH						
		425	430	440	450	460	477	Section 9
AgADAMTS1	(275)	HHDVAILITRKNICSNYGCATLGVANVGGMCKPDKSCSVNEDNGITLAHTISH						
DmADAMTS1	(422)	HHDVAILITRKNICAN-CMTLGVANVGGMCKPKQSCSVNEDNGIMLSHTISH						
Consensus	(425)	HHDVAILITRKNICAN C TLGLANVGGMCKP SCVSNEDNGI LAHTISH						
		478	490	500	510	520	530	Section 10
AgADAMTS1	(478)	ELGHNFGMFDHTAKTCCDHRGQYIIMITRFEADTQVSWNCSRRDITHEL						
DmADAMTS1	(474)	ELGHNFGMFDHTAKIGHPRGELIIMITRFEADTQVSWNCSRRDITHEL						
Consensus	(478)	ELGHNFGMFDHTAK GC RIGPILHIMTPSF ADTLOV WSNCSRK ITHFL						Metalloprotease domain
		531	540	550	560	570	583	Section 11
AgADAMTS1	(381)	DQGLGKCLLDAPS-QEYEPFLPFGAMYNAQLQCRLOFN-ITDEMTVCSKL						
DmADAMTS1	(527)	DQGLGKCLLDPPFLPEYNYTGELEPGMRYNARGQCRLOFNLTDSVAGCSAP						
Consensus	(531)	DQGLG CLDD PS DEY Y PG YNA QCRLOFN STD DM CS						
		584	590	600	610	620	636	Section 12
AgADAMTS1	(432)	DEICQLWCLVGEVCTMIRPAAPGTNCGRRMWCQNKCVVDVEELPAPVDSGW						
DmADAMTS1	(580)	HEFETLCKVNGECVHRETAAGTLCGRNKCQNGKCVRRRELAAYNGGW						
Consensus	(584)	E CS LWC V C T LRP APGT CGR WCQN KCV EEL A V GGW						
		637	650	660	670	680	694	Section 13
AgADAMTS1	(485)	DWSPWSECSRSCGGVGGKQTRGCHHSFAHGGFCIGERARYKTCVQAF						
DmADAMTS1	(632)	DWSPWSECSRSCGGGGTQQRGCDNVEPANGGFCIGERKRYIKCRKRPCFA						
Consensus	(637)	DWS WSECSRSCG GIA Q RECD P PA GGMFCIGER RYK C CF						TSP-1
		690	700	710	720	730	742	Section 14
AgADAMTS1	(538)	GTPSFRAEQCAHDNDIKGEKYTNLFPDKNEPCELCNSNTDTHIVPQDT						
DmADAMTS1	(685)	EETPSFRAQCCRFQDNVYQGGATYKPLFPDKNNPKKLCSDVDTLANKGAT						
Consensus	(690)	PSFRA QCA DN S G Y WLPFFDKN FC LFCS DDTII FG T						
		743	750	760	770	780	795	Section 15
AgADAMTS1	(591)	AADGTFCNLGTNDMCIIGTICKVGGCDWVDSNTTDRCGVCGGSDTCFVKVGG						
DmADAMTS1	(738)	VLDTGTPCTLGTNMCIDGICKVGGCDWVDSVQVDRCGVCGGSDTCQVPEE						
Consensus	(743)	DGT C LGTN MCI GICKKVGCDWIVDS DDCRGVCGGSGD C K						
		796	810	820	830		848	Section 16
AgADAMTS1	(644)	IINKRINTTDS-VHVMIPAGARNVLEELPFSKNTGVYRSTG-NECFLNCK						
DmADAMTS1	(791)	IYTDPPFAAKDQAYVNTIPARARHLIREANSPLHATGDDGDRFVYLVNG						
Consensus	(796)	DG DIL IPA AR ILI EI S FIAIA G YLN						spacer
		849	860	870	880	890	904	Section 17
AgADAMTS1	(695)	IHFICLPGEVYASLCLYRENEQERKIFGIMEDNYIYKKNNAAGI						
DmADAMTS1	(844)	DSLISEPGEVYASLESYRVDRQETITIQIQHSASAVYGNESAGI						
Consensus	(849)	I LPGEFEIA A LYDR EQE I IP PI I LF IIK NAGI						
		902	910	920	930	940	954	Section 18
AgADAMTS1	(748)	YEFYFLP HN GKNQSAAY LLDNVCVSA CGGGKQFRESICYHRGKGVKRE						
DmADAMTS1	(897)	YEFYFLP LNVTAGROEY LLDNVCVSA CGGGVQHREPIQENKGGKNEP						
Consensus	(902)	YEFYFLP N F KLS WS CSASC GGG Q RE IC KGK A E						TSP-2
		955	960	970	980	990	1007	Section 19
AgADAMTS1	(800)	-----EQCLRHPGKRHEPIKRDNDPCPFWNWWVGPWQL						
DmADAMTS1	(950)	FQRIVSIKRNLLIALGDTLPCWTRAKNKRPARCRGCGDQPCPAHWWVGPWQF						
Consensus	(955)	C HA KR AR C D PCP WW GPWQ						
		1008	1020	1030	1040	1050	1060	Section 20
AgADAMTS1	(835)	CPMTCKRKPVKVPIRRR-SILCVDSNSNARPTRCNNKPSPHKPECGEELP						
DmADAMTS1	(1003)	CPVTCRPVGFVAIPQRRRSYCLDEHDVVVAEACGHLQKPAEMEPCESSLF						
Consensus	(1008)	CPMTCR P RR SILCLD D C KP D EPC LPI						
		1061	1070	1080	1090	1103	Section 21	
AgADAMTS1	(887)	CQENQRSGQETERPDTIPFEFPGSDLPSPSTPADDYEVNINI						
DmADAMTS1	(1056)	CRTK-----						
Consensus	(1061)	C						

**Σχημα2γ** Σύγκριση πρωτεϊνικών αλληλουχιών των α) ADAMTS2 του Ανωφελούς και της Δροσόφιλας β) ADAMTS1 του Ανωφελούς και της Δροσόφιλας. Έχουν υπογραμμιστεί οι περιοχές πιθανής πρωτεόλυσης από την πρωτεάση furin, ενεργότητας μεταλλοπρωτεάσης και το spacerdomain των μορίων, καθώς και τα δυο TSP repeats με διαφορετικό χρώμα.

**Σχ.3<sup>α</sup> Φυλογενετικό δέντρο ADAMs**

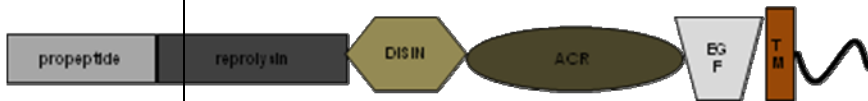
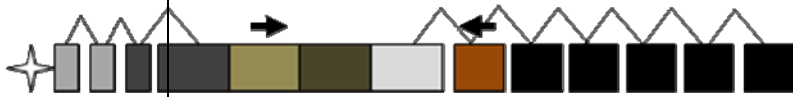


## ADAMs

### AGAP003496 (ADAMB)



### AGAP003498 (ADAMD)



### AGAP00974 (ADAMH)



**Σχημα3β:** Σχηματική απεικόνιση των ταυτοποιημένων από την βάση δεδομένων γονιδίων των μεταλλοπρωτεασών της εξωκυττάριας μήτρας και των προβλεπόμενων πρωτεϊνικών τους προϊόντων. Τα διαφορετικά χρώματα αντιπροσωπεύουν διαφορετικές πρωτεϊνικές δομές και τα αντίστοιχα εξώνια από τα οποία αυτές κωδικοποιούνται. Τα βέλη υποδεικνύουν τις θέσεις πάνω στο γονίδιο όπου σχεδιάστηκαν εκκινήτες για την κλωνοποίηση μέρους των γονιδίων και την περιγραφή του μεταγραφικού τους προτύπου. Η παρουσία \* στα σχήματα δηλώνει ότι η αλληλουχία των γονιδίων, όπως αυτή δίνεται από την βάση δεδομένων δεν είναι πλήρης.

a)

	(1)	10	20	30	40	50	
AgADAMH	(1)	KMSPLRAL	LAALVMTLAE	SAGEADYTLDDSPWNEES	SPVGEVERLLKE		
Dmindmeld-isoD	(1)	WNIANLIL	LAALVMTLAE	SAGEADYTLDDSPWNEES	SPVGEVERLLKE		
Consensus	(1)	M I	LIIA L	SAGEADYTLDDSPWNEES	SPVGEVERLLKEH		
Section 2							
AgADAMH	(51)	51	60	70	80	90	100
Dmindmeld-isoD	(51)	QNQELVDRKIGSSYYQIIYPVQLRRHHEKMGISTREV	NQPKTG	-----			
Consensus	(51)	QNQELVDRKIGSSYYQIIYPVQLRRHHEKMGISTREV	PKG				
Section 3							
AgADAMH	(101)	101	110	120	130	140	150
Dmindmeld-isoD	(93)	-----	KHFHRTSLLIKAFNHKFRLLDLELN	QLLAPNI	VQKHYLPSG		
Consensus	(101)	SGFNRRGRTK	KHFHRTSLLIKAFNHKFRLLDLELN	QLLAPNI	VQKHYHVG		
Section 4							
AgADAMH	(151)	151	160	170	180	190	200
Dmindmeld-isoD	(134)	FAQDSHR	SLIEHCYYHGTVKDYPGASAAAFHTCNGVSGVIH	GNETFVIHP			
Consensus	(151)	FLVDGNRH	SLIEHCYYHGTVKDYPGASAAAFHTCNGVSGVIH	GNETFVIHP			
Section 5							
AgADAMH	(201)	201	210	220	230	240	250
Dmindmeld-isoD	(183)	FYGGDLSKHPHVIPEARTK	NKGCANSGL	W--R	RSIRGSSHHAGLV		
Consensus	(201)	FYGGDLSKHPHVIPEARTK	NKGCANSGL	SWRLSRRT	HLSSAGVAGVV		
Section 6							
AgADAMH	(251)	251	260	270	280	290	300
Dmindmeld-isoD	(231)	ELDRNGAGYR	RDVRETKYIETAL	IVDKAMF	QRNNGSTRTEV	VHDAIQ	
Consensus	(251)	EELQAGVGNR	RDVRETKYIETAL	IVDKAMF	DRNNGSTRTEV	VHDAIQ	
Section 7							
AgADAMH	(301)	301	310	320	330	340	350
Dmindmeld-isoD	(281)	VANIADLYFRTLNTRVSVVYIETW	OGONQA	QIDG	KDISKAI	SNFNNDYTS	
Consensus	(301)	VANIADLYFRTLNTRVSVVYIETW	GKNOA	VIDG	KDISKAI	SNFNNDYTS	
Section 8							
AgADAMH	(351)	351	360	370	380	390	400
Dmindmeld-isoD	(331)	RNLKIDKDTTQLLTGETFAGGE	VGMVVPETVCTF	RAVGISVDMN	YEPH		
Consensus	(351)	RNLKIDKDTTQLLTGETFAGGE	GMAVVPETVCTF	RAVGISVDMN	YEPH		
Section 9							
AgADAMH	(401)	401	410	420	430	440	450
Dmindmeld-isoD	(381)	LLAGTMAH	MIIGHNIGMGHDD	RDEC	CRDWHG	CIMQ	OSIVGLENVQPYKE
Consensus	(401)	LLAGTMAH	MIIGHNIGMGHDD	RDEC	CRDWHG	CIMQ	OSIVGLENVQPYKE
Section 10							
AgADAMH	(451)	451	460	470	480	490	500
Dmindmeld-isoD	(431)	SECSKDYIDALR	GHGLCLLNKPNELR	NCGN	KIVE	DEECDG	CGSAL
Consensus	(451)	SECSKDYIDALR	GHGLCLLNKPNELR	NCGN	KIVE	DEECDG	CGSAL
Section 11							
AgADAMH	(501)	501	510	520	530	540	550
Dmindmeld-isoD	(481)	DCDKTDP	CCDGITCKL	KEQCA	FGCCDK	CILP	PGVICRDAHNECDLP
Consensus	(501)	DCDKTDP	CCDGITCKL	KEQCA	FGCCDK	CILP	PGVICRDAHNECDLP
Section 12							
AgADAMH	(551)	551	560	570	580	590	600
Dmindmeld-isoD	(531)	EYCNESG	QCQPPDV	HKKN	GNPCG	NSITGF	STGYCF
Consensus	(551)	EYCNESG	QCQPPDV	HKKN	GNPCG	NSITGF	STGYCF
Section 13							
AgADAMH	(601)	601	610	620	630	640	650
Dmindmeld-isoD	(581)	GYSGTADR	CYEQFNSKGS	INGHCG	DAN	GN	YIKCEPENIQCGSLQCKD
Consensus	(601)	GYSGTADR	CYEQFNSKGS	INGHCG	DAN	GN	YIKCEPENIQCGSLQCKD
Section 14							
AgADAMH	(651)	651	660	670	680	690	700
Dmindmeld-isoD	(631)	GDRTPV	EDCC	HLYSRA	IISIK	GT	EYECKE
Consensus	(651)	GDRTPV	EDCC	HLYSRA	IISIK	GT	EYECKE
Section 15							
AgADAMH	(701)	701	710	720	730	740	750
Dmindmeld-isoD	(681)	PCGDNLIC	NQTCVSI	FFVLD	QTKCP	NHNS	LECS
Consensus	(701)	PCGDNLIC	NQTCVSI	FFVLD	QTKCP	NHNS	LECS
Section 16							
AgADAMH	(751)	751	760	770	780	790	800
Dmindmeld-isoD	(731)	GWGPD	DCS	IQAH	TTT	YPSL	ITST
Consensus	(751)	GWGPD	DCS	IQAH	TTT	YPSL	ITST
Section 17							
AgADAMH	(801)	801	810	820	830	840	850
Dmindmeld-isoD	(781)	VGVLMSVVG	VFITF	LMALCYR	SKTT	RLKYD	PPYV
Consensus	(801)	VGVLMSVVG	VFITF	LMALCYR	SKTT	RLKYD	PPYV
Section 18							
AgADAMH	(851)	851	860	870	880	890	900
Dmindmeld-isoD	(830)	ANHHSQ	DDVSLDGS	NKMM	FGNQT	TQFRD	HKAIR
Consensus	(851)	ANHHSQ	DDVSLDGS	NKMM	FGNQT	TQFRD	HKAIR

Furin cleavage site

Metalloprotease domain

Disintegrin domain

ACR

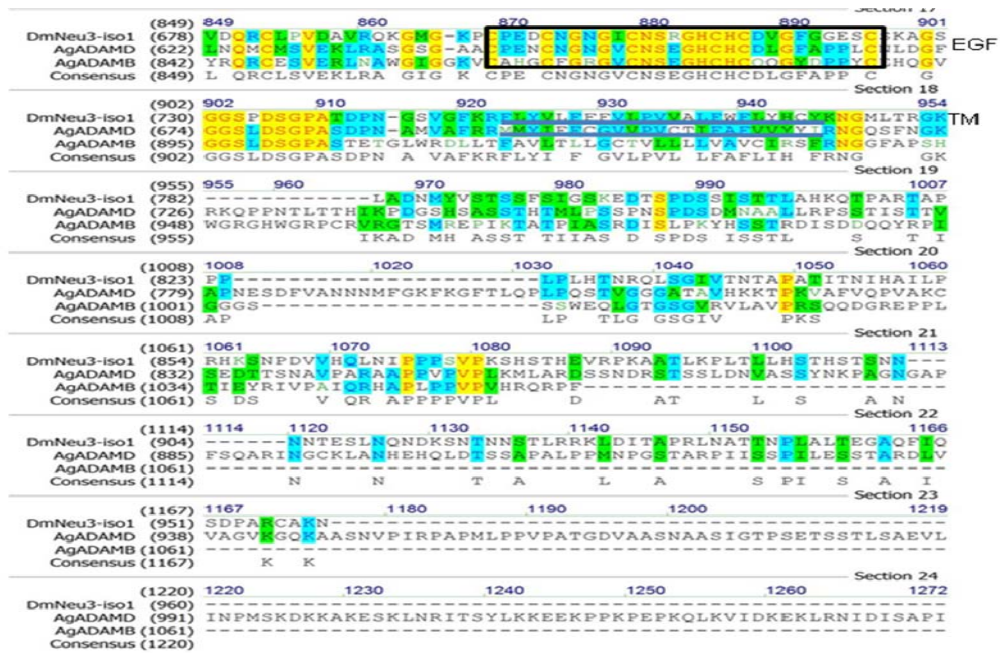
EGF

TM

										Section 19	
	(901)	901		910		920		930		940	950
	AgADAMH (880)	ETV	S	FIDLPPNSLLNKQMP		EKGILKKKHGLGLV	LD	GD	KDRW	HAAN	DDAQS
	Dmindmeld-isoD (890)	---	S	HA-----		EKGILKKKHGYGLV	HGE	QL	KDKW	---	DDNQS
	Consensus (901)		S			EKGILKKKHG	GLV	GD	KDKW		DD QS
											Section 20
	(951)	951		960		970		980		990	1000
	AgADAMH (930)	DNLELI	A	QESTIP	SSGG	QVVVGGGGGGV	GVGGG	VGGG	VGGV	GGLGG	PGVIGGV
	Dmindmeld-isoD (921)	DNLELI	T	QDGTILAS	ISGG	-----					
	Consensus (951)	DNLELI	Q	S	SSGG						
											Section 21
	(1001)	1001		1010		1020		1030		1040	1050
	AgADAMH (980)	LG	GVGGGGGI	IISGG	GLG	GVGGV	LGT	V	SDVERT	MKSLNGYHEDILEALR	
	Dmindmeld-isoD (939)	---	AA			A			SEVERT	LKSLNGYHEDILEALR	
	Consensus (1001)	AA				A			SDVERT	LKSLNGYHEDILEALR	
											Section 22
	(1051)	1051		1060		1070		1080		1090	1100
	AgADAMH (1030)	SAA	QAQR	SANTP	---	SGSISEE	LLR	KTL	A	CVTGS	QISAA
	Dmindmeld-isoD (964)	NAA	THRG	GTG	TPVG	SGSISEE	MLR	KTL	Q	CNNS	QLGYSAEQY
	Consensus (1051)	AA	S			SGSISEE	LLR	KTL	DC		AA H
											Section 23
	(1101)	1101		1110		1120		1130		1140	1150
	AgADAMH (1077)	KRS	VSSRT	GSREN	V	-----			CEP	QPHV	LSD
	Dmindmeld-isoD (1014)	KSS	SREN	ICD	NAAV	HAI	ILD	GS	GG	LG	MGLGSS
	Consensus (1101)	K S			V						LS A
											Section 24
	(1151)	1151		1160		1170		1180		1190	1200
	AgADAMH (1105)	ATLLH	H	RQQ	QQ	QQ	Q	QHQV	Q	QLL	G
	Dmindmeld-isoD (1064)	HGG	TML	HHR	S	QH	QLH	Q	PST	VAL	Q
	Consensus (1151)		H	Q	Q	Q	Q			DDDD	PS
											Section 25
	(1201)	1201		1210		1220		1230		1240	1250
	AgADAMH (1155)	LEHHS	SRHMS	PSG	SED	IRM	SET	EADR	HRY	R	DSSAAC
	Dmindmeld-isoD (1114)	LEHHS	SRHMS	PSG	SED	IRM	SET	EADR	HRY	R	DSSAAC
	Consensus (1201)	LEHHS	SRHMS	PSG	SED	IRM	SET	EADR	HRY	R	DSSAAC
											Section 26
	(1251)	1251		1260		1270		1280		1290	1300
	AgADAMH (1205)	QKTAT	IL	FPY	SS	R	CRP	PR	S	D	E
	Dmindmeld-isoD (1156)	---				R	SCR	PR	S	D	E
	Consensus (1251)					R	PR	S	D	E	R
											Section 27
	(1301)	1301		1310		1320		1330		1340	1350
	AgADAMH (1255)	TVSG	T	GRY	R	H	PAS	IR	H	Q	H
	Dmindmeld-isoD (1173)	---				R	H	R	Q	P	A
	Consensus (1301)				RH		H	H	H	S	P
											Section 28
	(1351)	1351		1360		1370		1380		1390	1400
	AgADAMH (1305)	HHSS	H	THL	H	Q	D	E	G	I	Y
	Dmindmeld-isoD (1215)	HHSS	H	THL	Q	D	E	G	I	Y	E
	Consensus (1351)	HHSS	H	THL	Q	D	E	G	I	Y	E
											Section 29
	(1401)	1401		1410		1420		1430		1440	1450
	AgADAMH (1355)	HPPN	PH	R	S	R	S	H	R	H	S
	Dmindmeld-isoD (1262)	QQ	L	A	R	W	A	E	D	V	S
	Consensus (1401)					I	L	P	S		
											Section 30
	(1451)	1451		1460		1470		1480		1490	1500
	AgADAMH (1405)	FSDE	L	F	Q	A	Q	L	A	R	W
	Dmindmeld-isoD (1312)	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	H	P	H
	Consensus (1451)		Q	Q		A	S				
											Section 31
	(1501)	1501		1510		1520		1530		1540	1550
	AgADAMH (1455)	HPS	Q	Q	P	P	S	Q	Q	P	L
	Dmindmeld-isoD (1362)	NG	I	S	V	S	Q	R	D	Y	P
	Consensus (1501)		H	H	P	P		I	LN	AA	AA
											Section 32
	(1551)	1551		1560		1570		1580		1590	1600
	AgADAMH (1505)	NH	Q	L	V	N	R	D	Y	F	S
	Dmindmeld-isoD (1412)	CH	Q	Q	L	L	L	L	E	I	Y
	Consensus (1551)	NH	Q	N		P				T	
											Section 33
	(1601)	1601		1607							
	AgADAMH (1555)	R	Y	P	E	Y	K	H			
	Dmindmeld-isoD (1457)	C	Y	P	E	Y	K	H			
	Consensus (1601)	Y	P	E	Y	K	H				

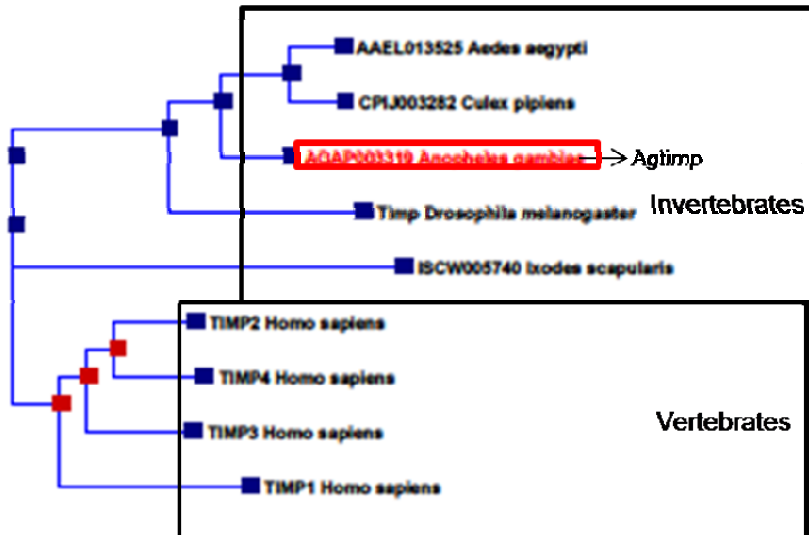




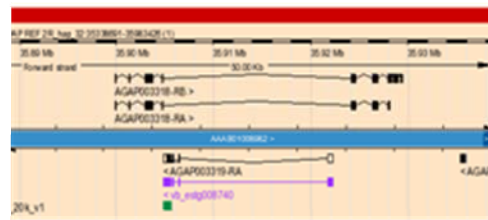
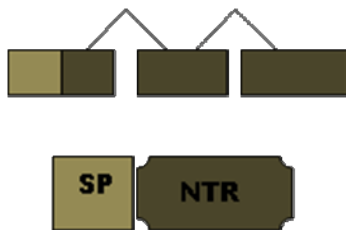


**Σχήμα 3γ** Σύγκριση των πρωτεϊνικών προϊόντων του γονιδίου ADAMH και μιας από τις τρεις ισομορφές του γονιδίου *mind-meld* της Δροσόφιλας(α), καθώς και των προϊόντων των γονιδίων ADAMB, ADAMD και μιας από τις δυο ισομορφές του γονιδίου Neu-3(β). Έχουν υπογραμμιστεί τα βασικά δομικά στοιχεία των πρωτεϊνών: *furin* cleavagesite, *metalloproteasedomain*, *disintegrindomain*, ACR, EGF repeat και διαμεμβρανικό domain. Στην περίπτωση των ADAMH και *mind-meld* έχει υπογραμμιστεί η σημειακή μετάλλαξη του καταλυτικού τους κέντρου που καθιστά τα μόρια ανενεργά.

**Σχ.4<sup>α</sup>** Φυλογενετικό δέντρο timp



1) 2)



**Σχήμα 4β:** 1) Σχηματική απεικόνιση του μοναδικού στο γονιδίωμα του Ανωφελούς γονιδίου που κωδικοποιεί αναστολέα μεταλλοπρωτεασών. Τα διαφορετικά χρώματα αντιπροσωπεύουν διαφορετικές πρωτεϊνικές δομές και τα αντίστοιχα εξώνια από τα οποία αυτές κωδικοποιούνται. Τα βέλη υποδεικνύουν τις θέσεις πάνω στο γονίδιο όπου σχεδιάστηκαν εκκινήτες για την κλωνοποίηση μέρους των γονιδίων και την περιγραφή του μεταγραφικού τους προτύπου.

2) οργάνωση του γονιδίου  *timp*  στο γονιδίωμα του Ανωφελούς. Ο κωδικός AGAP003318 αντιστοιχεί στο γονίδιο  *synapsin*  του κουνουπιού, στο τέταρτο ιντρόνιο του οποίου εντοπίζεται το  *timp*  (AGAP003319)

	Signal peptide										Section 1																																												
	(1)	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160	170	180																																			
Dmtimp-iso1	(1)	M	D	L	R	K	H	G	L	T	L	L	V	A	V	F	A	F	Y	G	R	P	A	A	E	S	C	M	P	S	H	P	Q	T	H	F	A	Q	N	D	Y	V	V	Q	L	R	V	L	R	K	S				
Agtimp	(1)	-	M	K	T	N	R	L	L	P	V	L	T	I	I	G	L	A	M	V	M	L	P	T	A	E	T	E	S	C	L	P	Q	H	P	Q	T	A	E	C	D	S	Q	Y	V	V	I	V	A	Q	V	L	R	K	T
Consensus	(1)							L	L	L	I	I	A	L										A	D		E	S	C	L	P	H	P	Q	T	F	A	Y	V	I					V	L	R	K	S						
		(55)	55	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500							
Dmtimp-iso1	(55)	D	T	I	E	P	G	R	T	T	Y	K	V	H	I	K	R	T	Y	K	A	T	S	E	A	R	R	L	R	D	G	R	L	S	T	P	Q	D	D	A	M	C	G	I	N	L	D	L	G	K	V	Y	I	V	
Agtimp	(54)	A	S	K	N	E	R	M	D	A	Y	K	I	A	I	K	K	E	Y	K	M	S	D	E	A	R	Q	L	L	N	H	G	K	L	Y	T	S	T	M	D	S	A	C	G	I	K	L	K	P	S	T	L	Y	A	I
Consensus	(55)	S				A				Y	K	I			I	K			Y	K		S		E	A	R	L		G	K	L	T		D	A	C	G	I	L					L								L	Y	I	
		(109)	109	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500													
Dmtimp-iso1	(109)	A	G	R	M	P	T	N	T	C	S	Y	K	E	Y	T	R	M	T	I	T	E	R	H	G	F	S	G	G	Y	A	K	A	T	N	C	T	V	T	P	C	H	G	E	R	C	F	K	G	R	N	Y	A		
Agtimp	(108)	A	A	N	S	E	Q	V	G	L	C	D	E	I	R	P	Y	D	E	L	S	I	V	E	K	R	G	L	A	G	V	Y	R	K	G	C	K	I	N	H	C	W	D	D	K	C	H	Q	R	L	G	S	C		
Consensus	(109)	A				L	I	C	F	K	Y		L	S	I	E	K	G	A	G	Y	K	A		C	I		C	F	D	K																								
		(163)	163	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500																		
Dmtimp-iso1	(163)	D	T	C	K	W	S	P	F	G	K	C	E	T	N	Y	S	A	C	M	P	H	K	V	Q	T	V	N	G	V	I	S	R	C	W	R	R	T	Q	L	Y	R	K	C	M	S	N	P	---	---					
Agtimp	(162)	N	W	T	P	F	A	P	K	G	I	C	E	T	S	Y	G	S	C	V	P	A	G	V	T	K	K	N	G	A	P	I	K	C	H	W	R	R	S	P	R	E	G	Q	C	V	A	E	N	S	P	K	Y	P	
Consensus	(163)					F	A	P		G	C	E	T	Y		A	C	M	P		V		N	G		K	C	W	R	R	S		F		C	M	A																		

NTR

**Σχήμα 4v:** Σύγκριση των πρωτεϊνικών αλληλουχιών των αναστολέων της οικογένειας  *timp* του Ανωφελούς και της Δροσόφιλα. Με κόκκινο πλαίσιο έχει σημειωθεί το σηματοδοτικό πεπτιδίο των δυο μορίων, ενώ έχει υπογραμμιστεί το ενεργό τους κέντρο. Το αμινοτελικό άκρο του ενεργού κέντρου, που αλληλεπιδρά με τις μεταλλοπρωτεασες είναι διπλά υπογραμμισμένο.

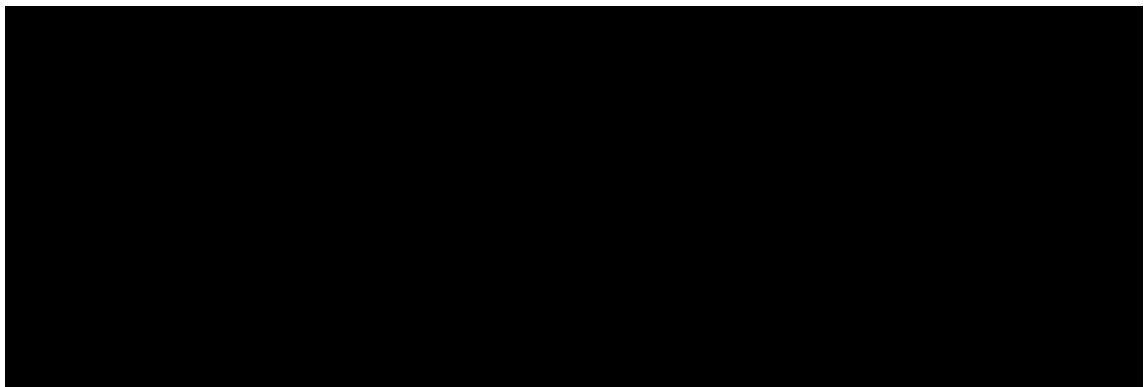
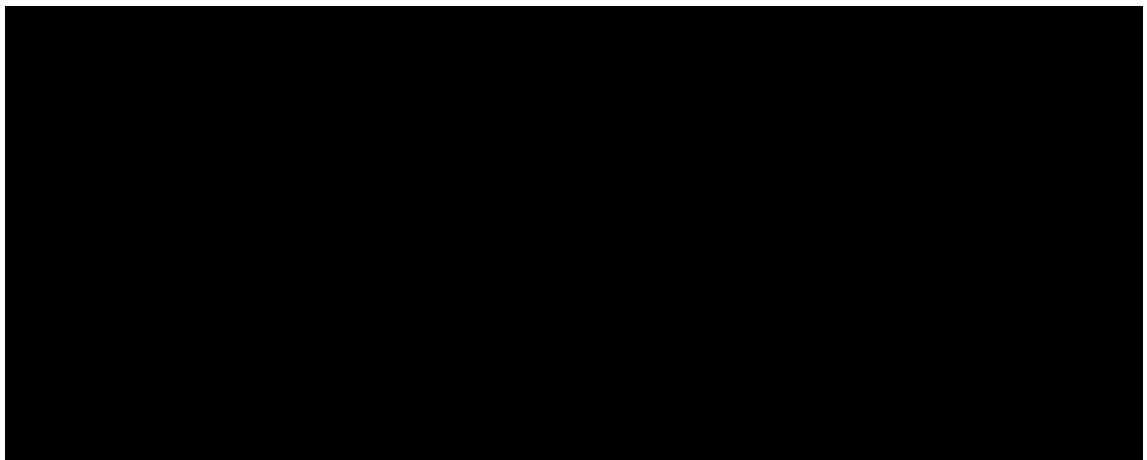
**1<sup>α</sup>.4 Έκφραση των μεταλλοπρωτεασών εξωκυττάριας στοιβάδας στο μεσέντερο του κουνουπιού και μεταγραφική ρύθμιση τους μετά από ερεθίσματα αιματοφαγίας ή επιμόλυνσης με παράσιτο.**

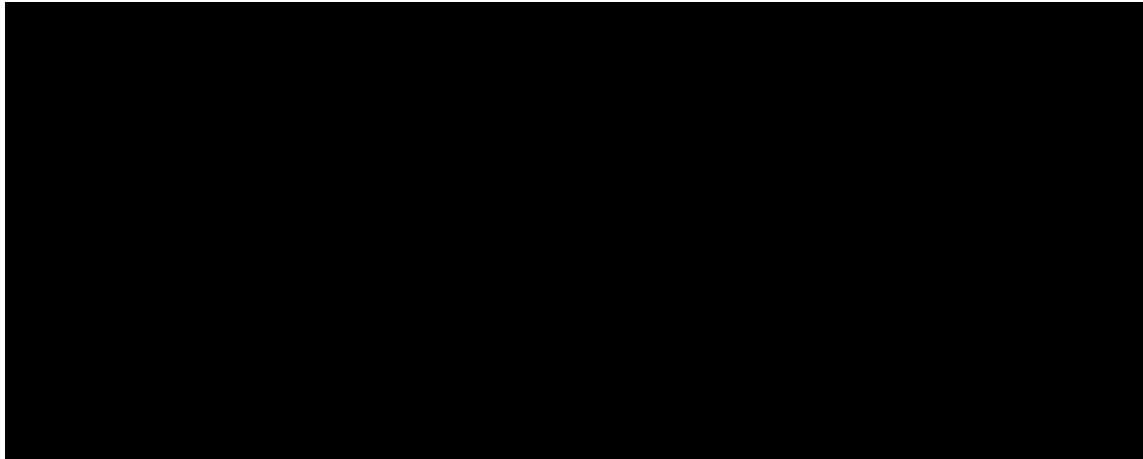
Προκειμένου να πιστοποιηθεί ότι τα γονίδια που επιλέχτηκαν καταρχήν εκφράζονται, σχεδιάστηκαν εκκινητές (σχ.1β,2β,3β). Αυτοί χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα semi-quantitativePCR, για να διερευνηθεί η παρουσία και τα επίπεδα των αντίστοιχων μεταγράφων στοmRNAπροερχόμενοαπό μεσέντερα ενήλικων θηλυκών κουνουπιών σε διαφορετικά χρονικά σημεία (0,24,48,96 ώρες) μετά από λήψη είτε φυσιολογικού και είτε μολυσμένου αίματος . Επιπρόσθεταγια να μελετηθεί και το ιστοειδικό πρότυπο έκφρασης των γονιδίων (μεσέντερο σε σχέση με σώμα κουνουπιού), καθώς και το αναπτυξιακό πρότυπο έκφρασης, χρησιμοποιήθηκε και cDNAπροερχόμενο από RNA μεσεντέρων, υπόλοιπου σώματος (μετά την αφαίρεση του μεσεντέρου), καθώς και από RNAαπό 2 και 4 σταδίου προνύμφης , και σταδίου νύμφης. Τα πειράματα επαναλήφθηκαν τουλάχιστον τρεις φορές για

κάθε πειραματικό δείγμα, χρησιμοποιώντας mRNAs από διαφορετικές ομάδες κουνουπιών. Για να γίνει η κανονικοποίηση των mRNAs στα παραπάνω πειράματα χρησιμοποιήθηκαν εκκινήτες για τη ριβοσωμική πρωτεΐνη S7, τα επίπεδα έκφρασης της οποίας δεν διαφοροποιούνται σημαντικά ανάλογα με τον ιστό ή με την αναπτυξιακό στάδιο (constitutively expressed).

#### Μεταγραφικό πρότυπο ADAMs

Ο μέσος όρος των πειραμάτων (σχ.5) για τα γονίδια της οικογένειας των ADAMs έδειξε ότι και τα τρία γονίδια εκφράζονται στο μεσεντερικό επιθήλιο του Ανωφελούς. Ωστόσο η έκφραση των γονιδίων ADAMB και ADAMH είναι πολύ χαμηλότερη στο μεσέντερο σε σχέση με το υπόλοιπο σώμα του κουνουπιού. Επιπλέον, η έκφραση και των τριών γονιδίων φαίνεται να βρίσκεται σε ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα στα στάδια ανάπτυξης του κουνουπιού που εξετάστηκαν (προνύμφες 2<sup>ου</sup> και 4<sup>ου</sup> σταδίου και νύμφες)





**Σχ.5** Μεταγραφικό πρότυπο έκφρασης της οικογένειας γονιδίων ADAMs στο μεσεντερικό επιθήλιο σε διαφορετικά χρονικά σημεία μετά τη λήψη αίματος με ή χωρίς παράσιτο, στα διαφορετικά στάδια ανάπτυξης του εντόμου και σε διαφορετικούς ιστούς (μεσέντερα, σώμα κουνουπιού) σε αρσενικά και θηλυκά ενήλικα άτομα.

#### Μεταγραφικό πρότυπο ADAMTSs

##### A) Μεταγραφικό πρότυπο ADAMTS2

Οι αρχικοί εκκινητές που σχεδιάστηκαν για το γονίδιο ADAMTS2 (σχ6α) και χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα αλυσιδωτής αντίδρασης με υπόστρωμα cDNA από μεσέντερα κουνουπιών έδωσαν αντίθετα με τις προβλέψεις της δημοσιευμένης αλληλουχίας δυο διαφορετικού μεγέθους προϊόντα διακριτά το ένα από το άλλο. Αλληλούχηση αυτών των προϊόντων έδειξε ότι και τα δυο προέρχονται από το γονίδιο ADAMTS2 πιθανά μετά από εναλλακτικό μάτισμα. Για να διαπιστωθεί η ύπαρξη και το ακριδρβές πρότυπο εναλλακτικού ματίσματος και η τυχόν παρουσία επιπλέον εναλλακτικών μεταγράφων προχωρήσαμε σε πειράματα 3' και 5' RACEPCR (σε συνεργασία με τον Δρα G.J. Lycett). Για τον λόγο αυτό σχεδιάστηκαν εκκινητές στο κομμάτι του μεταγράφου που κωδικοποιεί το ενζυμικό μέρος του μορίου (σχ6α) και χρησιμοποιήθηκαν στις αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης με μήτρα cDNA από σώματα κουνουπιών. Από την αντίδραση 5' RACEPCR πρόεκυψε ένα μονό προϊόν, που αντιστοιχεί στο προβλεπόμενο από τη βάση

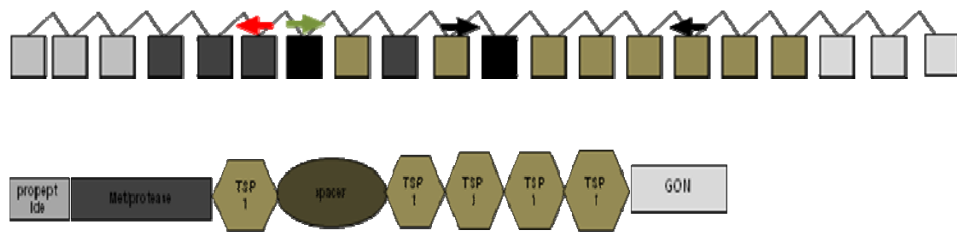
δεδομένων, ενώ από την αντίδραση 3' RACEPCR προέκυψαν τέσσερα διαφορετικά προϊόντα, η αλληλούχηση των οποίων έδειξε ότι όλα προέρχονται από το γονίδιο ADAMTS2. Συγκεκριμένα οι αλληλουχίες των προϊόντων αυτών φαίνεται να είναι ταυτόσημες και σύμφωνες με την προβλεπόμενη μέχρι το σημείο που κωδικοποιεί και το δεύτερο TSPrepeat. Στη συνέχεια όμως η αλληλουχία τους διαφοροποιείται λόγω εναλλακτικού ματίσματος και αποκλεισμού διαφορετικών εξωνίων. Με βάση τα παραπάνω πιστοποιήθηκε η ύπαρξη εναλλακτικών για το γονίδιο ADAMTS2 ισομορφών, οι οποίες και ονομάστηκαν A, B, C και D (σχ6β). Μάλιστα ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι το εναλλακτικό μάτισμα διαφοροποιεί και τα προβλεπόμενα πρωτεϊνικά προϊόντα που εκφράζουν οι τέσσερις ισομορφές, αφού επηρεάζει τον αριθμό και την αμινοξική αλληλουχία των TSPrepeats. Πάντως το πρότυπο ματίσματος είναι κοινό και για τα τέσσερα μετάγραφα ως προς το σημείο εκείνο που κωδικοποιεί το gondomain του μορίου.

Για να διαπιστωθεί αν τα εναλλακτικά μετάγραφα παρουσιάζουν ιστοειδικό πρότυπο έκφρασης, καθώς και αν η παρουσία αίματος ή παρασίτου στο μεσεντερικό επιθήλιο αλλάζει το πρότυπο έκφρασης τους προχωρήσαμε σε πειράματα RT-PCR χρησιμοποιώντας τα cDNAs που χρησιμοποιήθηκαν και για την περιγραφή του μεταγραφικού προτύπου των άλλων μορίων και ζευγάρι εκκινητών που αντιστοιχεί σε κοινές μεταξύ των μεταγράφων αλληλουχίες, αλλά που το προϊόν τους έχει διαφορετικό μέγεθος για την κάθε ισομορφή (σχ6β). Η αλυσιδωτή αυτή αντίδραση πολυμεράσης έδειξε ότι οι ισομορφές A και B εντοπίζονται στα στάδια νύμφης, προνύμφης και στα σώματα των ενήλικων κουνουπιών, ενώ οι ισομορφές C και D εντοπίζονται στα σώματα και στα μεσέντερα των ενήλικων κουνουπιών, ανεξάρτητα από την παρουσία αίματος με ή χωρίς παράσιτο (σχ6γ).

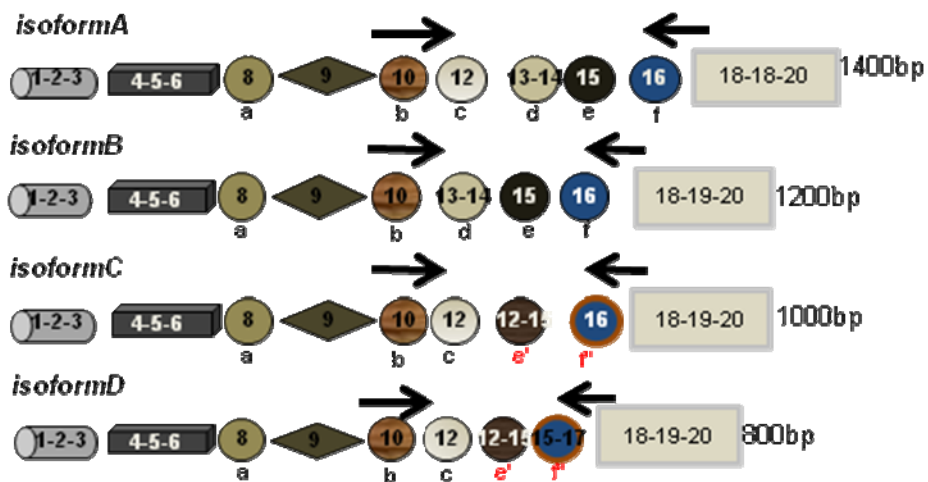
Για να εξεταστεί αν τα μεταγραφικά επίπεδα του γονιδίου ADAMTS2 αλλάζουν μεταξύ των παραπάνω καταστάσεων προχωρήσαμε σε πειράματα semi-quantitativePCR, όπως και στην περίπτωση των ADAMs, χρησιμοποιώντας όμως ζεύγος εκκινητών στο 5' άκρο του γονιδίου (σχ.1β), που είναι κοινό και για τα τέσσερα μετάγραφα. Ο μέσος όρος τριών ανεξαρτήτων μεταξύ τους πειραμάτων έδειξε ότι τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου ADAMTS2 στο μεσέντερο και στο σώμα του ενήλικου κουνουπιού είναι τα ίδια και δεν επηρεάζονται από την παρουσία αίματος ή παρασίτου. Στα αναπτυξιακά από

την άλλη σταδία του εντόμου η έκφραση του γονιδίου φαίνεται να βρίσκεται σε ίδια επίπεδα στα σταδία προνύμφης τετάρτου σταδίου και νύμφης με αυτά του ενήλικου εντόμου. Αντίθετα τα επίπεδα έκφρασης διατηρούνται χαμηλά σε προνύμφες δευτέρου σταδίου (σχ7).

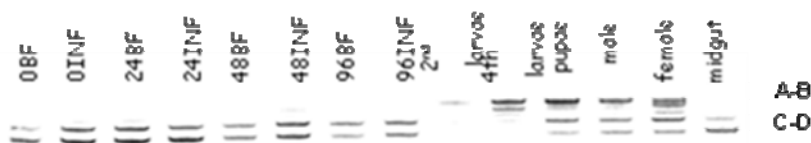
A)



B)



Γ)



**Σχήμα 6:** Εναλλακτικό μάτισμα γονιδίου ADAMTS2. A) Δομή γονιδίου όπως περιγράφεται στη βάση δεδομένων και προβλεπόμενο πρωτεϊνικό προϊόν. Τα βέλη με μαύρο χρώμα αντιπροσωπεύουν το ζευγάρι των εκκινήτων που αρχικά αποκάλυψαν το εναλλακτικό μάτισμα. Τα βέλη με κόκκινο και πράσινο χρώμα αντιπροσωπεύουν τους εκκινήτες που χρησιμοποιήθηκαν για το 5'RACE και το 3'RACEPCR αντίστοιχα. B) Δομή των πρωτεϊνικών προϊόντων που εκφράζονται από τα εναλλακτικά μετάγραφα A, B, C και D. Οι αριθμοί στο κάθε domain των πρωτεϊνών αντιπροσωπεύουν τον αριθμό των εξωνίων από τα οποία αυτά κωδικοποιούνται. Το εναλλακτικό μάτισμα αλλάζει όχι μόνο τον αριθμό των TSPrepeats, αλλά και την αμινοξική τους αλληλουχία, όπως φαίνεται στα μετάγραφα C και D στα TSPrepeats συμβολισμένα ως e' και f'. Γ) Ιστοειδικό πρότυπο έκφρασης των εναλλακτικών μεταγράφων. Οι ισομορφές A και B εμφανίζονται μόνο στα σώματα των ενήλικων κουνουπιών και στα σταδία της προνύμφης και νύμφης.

. **Σχήμα 7:** Μεταγραφικό πρότυπο έκφρασης του γονιδίου ADAMTS2 στο μεσεντερικό επιθήλιο σε διαφορετικά χρονικά σημεία μετά τη λήψη αίματος με και χωρίς παράσιτο, σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης του εντόμου και σε διαφορετικούς ιστούς σε αρσενικά και θηλυκά άτομα.

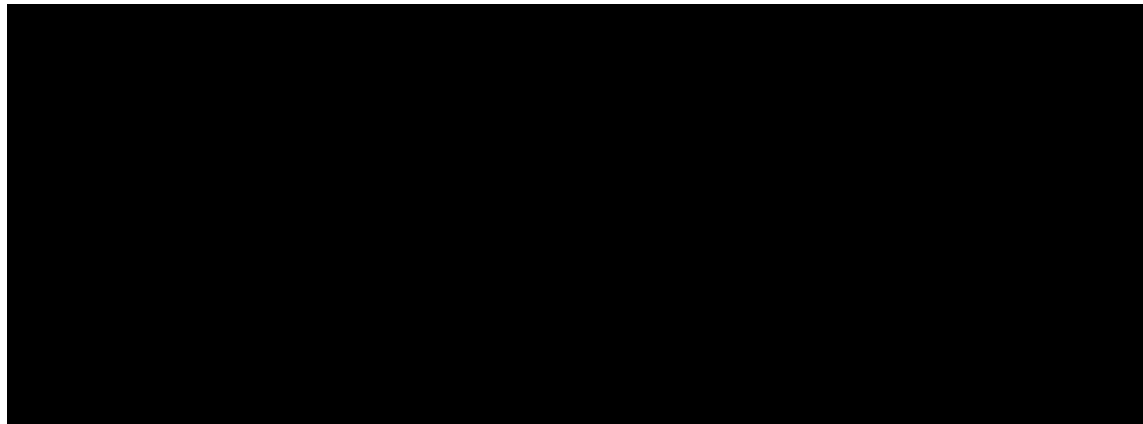
#### B) Μεταγραφικό πρότυπο έκφρασης ADAMTS1

Όπως και στην περίπτωση του γονιδίου ADAMTS2 τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου ADAMTS1 στο μεσέντερο και στο σώμα του ενήλικου κουνουπιού



είναι ίδια. Τα μεταγραφικά επίπεδα όμως του γονιδίου φαίνεται να ρυθμίζονται από την παρουσία του παρασίτου στο μεσέντερο του κουνουπιού. Συγκεκριμένα 24 ώρες μετά την λήψη μολυσμένου αίματος, το χρονικό δηλαδή παράθυρο κατά το οποίο οι ωοκινέτες διαπερνούν μαζικά το μεσεντερικό επιθήλιο τα επίπεδα μεταγραφής του γονιδίου μειώνονται περίπου 80% σε σχέση με τα μεταγραφικά επίπεδα του γονιδίου στο ίδιο χρονικό παράθυρο μετά την λήψη αίματος χωρίς όμως παράσιτο.

Σε ότι αφορά την έκφραση των γονιδίων στα αναπτυξιακά στάδια αυτή φαίνεται να αυξάνεται στα τελευταία στάδια ανάπτυξης του εντόμου (4<sup>ου</sup> σταδίου προνύμφες και νύμφες).



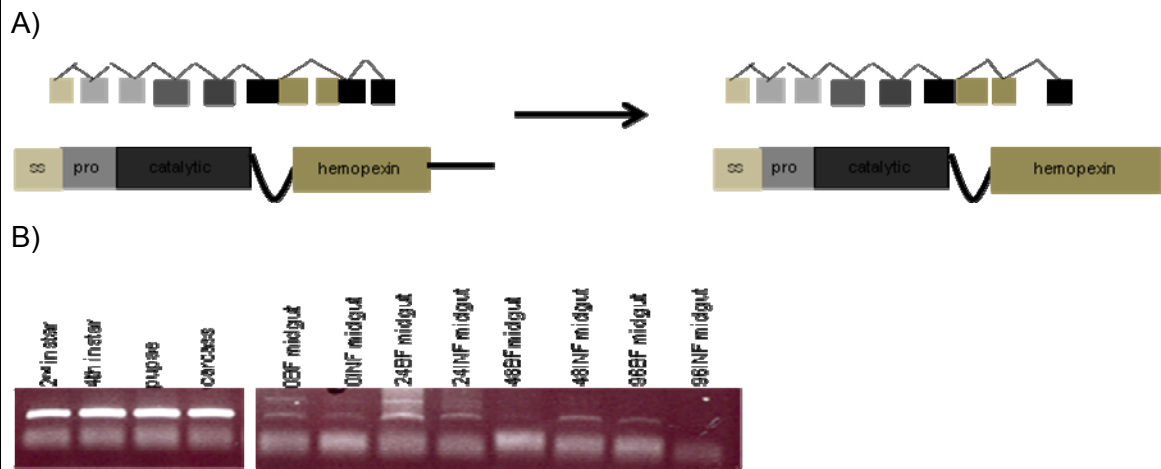
**Σχήμα 8** Μεταγραφικό πρότυπο έκφρασης του γονιδίου *ADAMTS1* στο μεσεντερικό επιθήλιο σε διαφορετικά χρονικά σημεία μετά τη λήψη αίματος με ή χωρίς παράσιτο, στα διαφορετικά στάδια ανάπτυξης του εντόμου και σε διαφορετικούς ιστούς (μεσέντερα, σώμα κουνουπιού) σε αρσενικά και θηλυκά ενήλικα άτομα. 24 ώρες μετά τη λήψη μολυσμένου αίματος η έκφραση του γονιδίου μειώνεται σημαντικά στο μεσεντερικό επιθήλιο

#### Μεταγραφικό πρότυπο MMPs

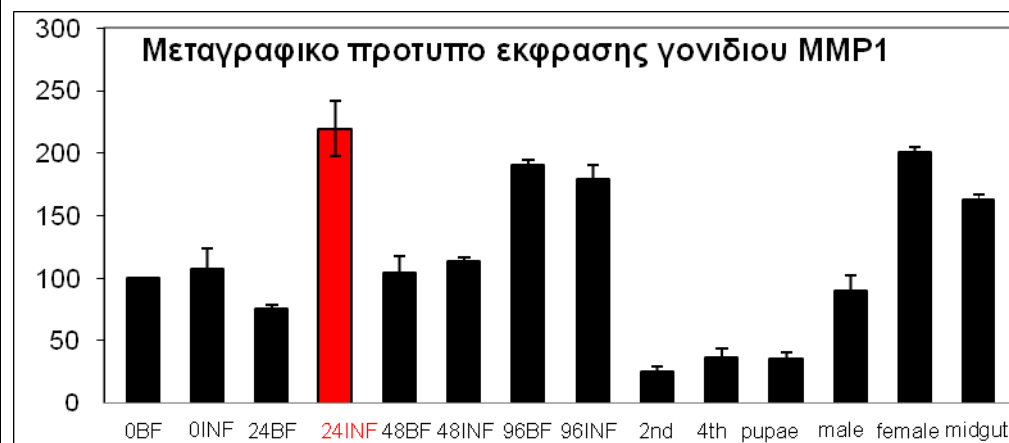
Σε ότι αφορά το μεταγραφικό πρότυπο των γονιδίων της οικογένειας των MMPs και την παραπέρα μελέτη τους πρέπει να σημειωθεί ότι η προσθήκη

της πρόβλεψης του γονιδίου MMP3 στην βάση δεδομένων έγινε αφού είχε ολοκληρωθεί μεγάλο μέρος της συγκεκριμένης μελέτης. Γι' αυτό τον λόγο στην εργασία αυτή περιλαμβάνονται μονό οι πληροφορίες που αφορούν τον αρχικό χαρακτηρισμό του. Συγκεκριμένα τα αρχικά πειράματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης προκειμένου να διαπιστωθεί το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου σε διαφορετικούς ιστούς και στα αναπτυξιακά στάδια έδειξε ότι αυτό εκφράζεται στο στάδιο της προνύμφης και νύμφης καθώς και στα ενήλικα άτομα. Σε αυτά όμως φαίνεται να εκφράζεται κυρίως στο σώμα των ενήλικων κουνουπιών και πολύ λιγότερο στο μεσεντερικό τους ιστό. Επιπλέον κλωνοποίηση του γονιδίου από διαφορετικές πηγές (mRNA από προνύμφες και από σώματα ενήλικων ατόμων) αποκάλυψε ότι η αλληλουχία του μεταγράφου που προβλέπεται από τη βάση δεδομένων δεν είναι ακριβής. Συγκεκριμένα η αλληλούχηση των κλώνων που απομονώθηκαν έδειξε ότι το μάτισμα των δυο τελευταίων εξωνίων γίνεται διαφορετικά από το προβλεπόμενο με αποτέλεσμα να αλλάζει το αναγνωστικό πλαίσιο του μεταγράφου κι επομένως και το παραγόμενο πρωτεϊνικό προϊόν στο καρβοξυτελικό του άκρο. Σε αυτό φαίνεται να μην εκφράζεται η προβλεπόμενη καρβοξυτελική ουρά. Αντί αυτής το καινούργιο πρωτεϊνικό προϊόν εκφράζει ένα επιπλέον hemorexindomain. Η δομή του μεταγράφου και της πρωτεΐνης MMP3 σύμφωνα με την αλληλούχηση φαίνεται στο σχ.9.1. Τα γονίδια MMP1 και MMP2 διαφέρουν σημαντικά ως προς το μεταγραφικό τους πρότυπο. Συγκεκριμένα η παρουσία του μεταγράφου του γονιδίου MMP1 είναι πολύ πιο έντονη στο μεσεντερικό επιθήλιο του Ανωφελούς σε σχέση με την παρουσία του μεταγράφου του γονιδίου MMP2. Επιπλέον, η παρουσία παρασίτου στο μεσέντερο του κουνουπιού συμπίπτει με αύξηση των μεταγραφικών επιπέδων του MMP1 γονιδίου. Αντίθετα η έκφραση του γονιδίου MMP2 στο μεσεντερικό ιστό δεν φαίνεται να επηρεάζεται ούτε από την παρουσία αίματος, ούτε από την παρουσία παρασίτου. Σημαντική όμως αύξηση των μεταγραφικών επιπέδων του MMP2 σημειώνεται στα αναπτυξιακά στάδια του κουνουπιού και ειδικότερα στο στάδιο του 4<sup>ου</sup> σταδίου προνύμφης και στο στάδιο της νύμφης. Τέλος η αναλογία της έκφρασης των δυο γονιδίων στο μεσέντερο σε σχέση με το υπόλοιπο σώμα του κουνουπιού είναι διαφορετική, ενώ δηλαδή η έκφραση του MMP1 βρίσκεται στα ίδια

επίπεδα στους δυο ιστούς, η έκφραση του γονιδίου MMP2 εντοπίζεται σε υψηλότερα επίπεδα στο σώμα του κουνουπιού (σχ.9.2).



**Σχημα9.1A)** Το προβλεπόμενο από τη βάση δεδομένων μεταγραφικό και πρωτεϊνικό προϊόν του γονιδίου MMP3 φαίνεται αριστερά. Η αλληλούχηση διαφορετικών κλώνων αποκάλυψε διαφορετικό πρότυπο ματίσματος από το προβλεπόμενο, το οποίο επηρεάζει και την αλληλουχία και δομή του πρωτεϊνικού προϊόντος στο καρβοξυτελικό του άκρο. B) Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιώντας τους εκκινήτες που φαίνονται στο σχ.Α (μαύρα βέλη) και cDNA από προνύμφες, νύμφες, σώματα και μεσέντερα ενήλικων κουνουπιών.

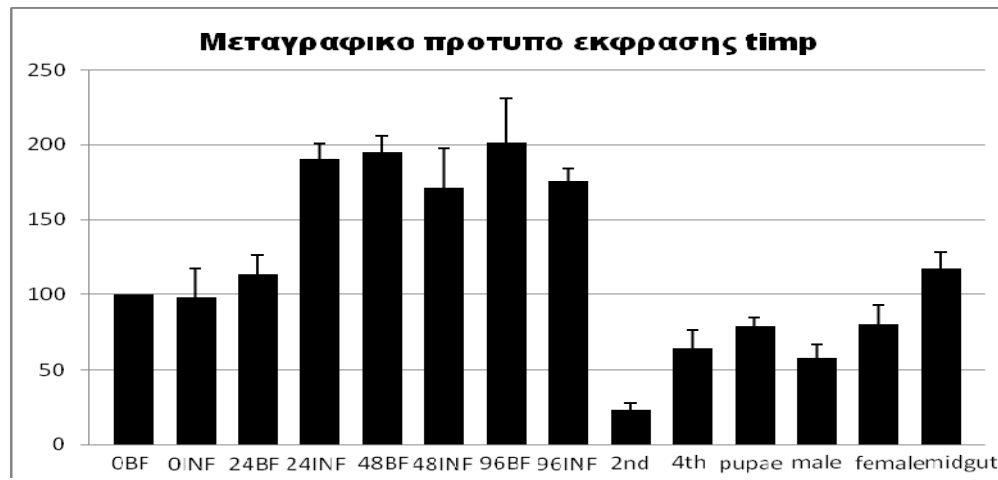




**Σχήμα 9.2** Μεταγραφικό πρότυπο έκφρασης της οικογένειας γονιδίων MMPs στο μεσεντερικό επιθήλιο σε διαφορετικά χρονικά σημεία μετά τη λήψη αίματος με ή χωρίς παράσιτο, στα διαφορετικά στάδια ανάπτυξης του εντόμου και σε διαφορετικούς ιστούς (μεσέντερα, σώμα κουνουπιού) σε αρσενικά και θηλυκά ενήλικα άτομα.

#### Μεταγραφικό πρότυπο έκφρασης timp

Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου timp φαίνεται να αυξάνονται στο τέταρτο στάδιο προνύμφης και να διατηρούνται σταθερά τόσο στο στάδιο της νύμφης όσο και στο ενήλικο άτομο. Μάλιστα, στο ενήλικο άτομο τα επίπεδα έκφρασης δεν διαφέρουν ανάμεσα στο μεσέντερο και το υπόλοιπο σώμα κουνουπιού). Ωστόσο η παρουσία αίματος στο μεσέντερο προκαλεί αύξηση της μεταγραφής του γονιδίου, η οποία εντοπίζεται χρονικά 24 ώρες μετά την παρουσία αίματος και συνεχίζεται μέχρι και 96 ώρες μετά την αιμοφαγία. Η παρουσία του παρασίτου στο μεσεντερικό επιθήλιο δεν φαίνεται να επηρεάζει επιπλέον την έκφραση του γονιδίου.



**Σχήμα 10** Μεταγραφικό πρότυπο έκφρασης του γονιδίου *timp* στο μεσεντερικό επιθήλιο σε διαφορετικά χρονικά σημεία μετά τη λήψη αίματος με ή χωρίς παράσιτο, στα διαφορετικά στάδια ανάπτυξης του εντόμου και σε διαφορετικούς ιστούς (μεσέντερα, σώμα κουνουπιού) σε αρσενικά και θηλυκά ενήλικα άτομα.

#### **1.4 Συμπεράσματα**

Οι πληροφορίες που προέκυψαν από τη δομή των γονιδίων των πρωτεασών εξωκυττάριας στοιβάδας και των αντίστοιχων πρωτεϊνικών προϊόντων τους, αλλά και από το μεταγραφικό πρότυπο έκφρασης τους και την φυλογενετική σχέση μεταξύ τους και με ομόλογα γονίδια οδήγησε στα παρακάτω συμπεράσματα.

Τα γονίδια της οικογένειας των ADAMs που εξετάσαμε φαίνεται να έχουν πολύ χαμηλά επίπεδα έκφρασης στο μεσεντερικό επιθήλιο του κουνουπιού. Μάλιστα η έκφραση τους δεν επηρεάζεται από την παρουσία αίματος, με ή χωρίς παράσιτο. Σύμφωνα λοιπόν με τα κριτήρια που θέσαμε στην παράγραφο 1.2 αποφασίστηκε ότι η οικογένεια αυτών των πρωτεασών δεν θα μελετηθεί περαιτέρω. Στην απόφαση αυτή συνετέλεσε και το γεγονός ότι τα ομόλογα αυτών των γονιδίων στην *Drosophila* έχουν λειτουργικούς ρόλους που δεν αφορούν την συγκεκριμένη μελέτη (π.χ. διαφοροποίηση νευρικών κυττάρων). Τα υψηλά επίπεδα έκφρασης και των τριών γονιδίων της οικογένειας αυτής στο στάδιο της προνύμφης και νύμφης του κουνουπιού θα μπορούσαν να υποδεικνύουν συμμετοχή των μορίων σε αναπτυξιακά μονοπάτια.

Η οικογένεια πρωτεϊνών ADAMTSs φαίνεται να περιλαμβάνει δυο γονίδια με χαρακτηριστική για τις πρωτεάσες αυτές δομή. Και τα δυο γονίδια της οικογένειας που ταυτοποιήθηκαν φάνηκε αρχικά να εκφράζονται στο μεσεντερικό επιθήλιο και μάλιστα τα επίπεδα του ADAMTS1 μεταγράφου μειώνονται σημαντικά κατά την φάση διείσδυσης των ωοκινετών.

Το γονίδιο ADAMTS2 προβλέπεται να κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη με το χαρακτηριστικό GONdomain στο καρβοξυτελικό της άκρο. Το πιο καλά χαρακτηρισμένο ομόλογο γονίδιο αυτής της οικογένειας στο *C.elegans* είναι το gon-1. Το προϊόν του gon-1 γονιδίου βρέθηκε ότι παίζει καθοριστικό ρόλο στην μετανάστευση των κυττάρων tip κατά την μορφογένεση των γονάδων. Θεωρείται ότι ασκεί αυτόν τον ρόλο μέσω πρωτεόλυσης συστατικών της εξωκυττάριας μήτρας, πιθανά της fibulin (Meighan, Crametal. 2004)

Βρήκαμε ότι το γονίδιο ADAMTS2 μεταγράφεται σε τέσσερις διαφορετικές ισομορφές, οι οποίες διατηρούν τα γενικά δομικά χαρακτηριστικά των ADAMTSs, αλλά διαφέρουν ως προς την αλληλουχία των TSPdomains λόγω

εναλλακτικού ματίσματος. Οι ισομορφές A και B εντοπίζονται μόνο στο σώμα του κουνουπιού και στα στάδια της προνύμφης και νύμφης, ενώ οι ισομορφές C και D εντοπίζονται τόσο στο μεσέντερο του ενήλικου ατόμου όσο και στο σώμα του. Με δεδομένο ότι έχει προταθεί ότι τα TSPdomainstτων ADAMTSs είναι υπεύθυνα για την αλληλεπίδραση των ενζύμων με τα υποστρώματα τους, μπορεί να κανείς να υποθέσει ότι τα πρωτεϊνικά προϊόντα των ισομορφών έχουν διαφορετικά υποστρώματα.

Οι ADAMTSs είναι τα κατεξοχήν μόρια με δυνατότητα πρωτεόλυσης συστατικών εξωκυτταρίας μήτρας όπως έχει δειχθεί με τη λειτουργική μελέτη ADAMTSs του ανθρώπου. Πιο συγκεκριμένα μόρια του συνδετικού ιστού που έχει βρεθεί να πρωτεολύει η οικογένεια αυτή πρωτεασών είναι οι πρωτείνες του χόνδρου aggrecan και versican, αλλά και το κολλαγόνο και μια γλυκοπρωτεΐνη του αίματος η οποία χαρακτηρίζεται από την δημιουργία μεγάλων συμπλόκων, που ονομάζεται vonWillebrandfactor. Η δράση των ADAMTSs εναντι των παραπάνω υποστρωμάτων τις εμπλέκει σε παθολογικές καταστάσεις, όπως η αρθρίτιδα, η μετανάστευση καρκινικών κυττάρων (Porter, Clark et al. 2005), και η δημιουργία θρομβώσεων στο αίμα, λόγω αδυναμίας του ενζύμου ADAMTS13 να πρωτεολύσει τον vonWillebrandfactor (Sadler 2008).

Η οικογένεια των MMPs περιλαμβάνει τρία γονίδια στον Ανωφελή. Στην *Drosophila* αντίθετα έχουν χαρακτηριστεί δυο MMPs. Από τις φυλογενετικές σχέσεις των γονιδίων μεταξύ τους προκύπτει ότι τα γονίδια MMP1 και MMP2 του Ανωφελούς είναι ομόλογα με τα αντίστοιχα χαρακτηρισμένα στη *Drosophila* MMP1 και MMP2 γονίδια. Επιπλέον τα δυο αυτά γονίδια φαίνεται ότι τόσο στο κουνούπι όσο και στην *Drosophila* ανήκουν σε δυο διαφορετικές φυλογενετικές ομάδες. Το τρίτο γονίδιο του Ανωφελούς, MMP3, ανήκει στην ίδια φυλογενετική ομάδα με το MMP2 και ομόλογα του ταυτοποιήθηκαν όχι μόνο στον Ανωφελή, αλλά και στα *AedesAegypti* και *Culexripriens*. Τρία μέλη της οικογένειας των MMPs έχουν ταυτοποιηθεί και στο *Tribolium*.

Το MMP3 γονίδιο δεν μελετήθηκε διεξοδικά, ωστόσο φαίνεται από αρχικά πειράματα να εκφράζεται περισσότερο στα αναπτυξιακά στάδια και στα σώματα των ενήλικων ατόμων κι όχι στον μεσέντερο. Πρέπει επίσης να τονιστεί σε ότι αφορά το γονίδιο MMP3 ότι αλληλούχηση κλώνων του από διαφορετικά cDNA αποκάλυψε διαφορετικό από το προβλεπόμενο από την

DATABASE πρότυπο ματίσματος, το οποίο διαφοροποιεί και το προβλεπόμενο πρωτεϊνικό προϊόν σε ότι αφορά το καρβοξυτελικό του άκρο.

Τα γονίδια MMP1 και MMP2 παρουσιάζουν διαφορετικό πρότυπο έκφρασης, γεγονός που θα μπορούσε να υποδηλώνει, λαμβάνοντας υπόψη και την φυλογενετική τους απόκλιση, και διαφορετικό λειτουργικό ρόλο. Πάντως και τα δυο γονίδια εκφράζονται στο μεσεντερικό επιθήλιο και μάλιστα το γονίδιο MMP1 επηρεάζεται μεταγραφικά από την παρουσία του παρασίτου.

Σε ότι αφορά την οικογένεια των αναστολέων των μεταλλοπρωτεασών timp στον Ανωφελή αντιπροσωπεύεται με ένα και μόνο γονίδιο, που διατηρεί τα γνωστά για τους TIMP αναστολείς χαρακτηριστικά της πρωτεϊνικής αλληλουχίας και δομής, αλλά και της γενωμικής θέσης και οργάνωσης. Ο timp αναστολέας της *Drosophila* (Wei, Xie et al. 2003), αλλά και ο timp-3 αναστολέας του ανθρώπου (Anand-Apte, Bao et al. 1996) εμφανίζουν ένα ευρύ φάσμα αναστολής έναντι όλων των οικογενειών των μεταλλοπρωτεασών εξωκυττάριας στοιβάδας.

Πρέπει στο σημείο αυτό να τονιστεί ότι ανασταλτική δράση έναντι πρωτεασών εξωκυττάριας στοιβάδας έχει αναφερθεί και για άλλα μόρια. Ένα από αυτά είναι η πρωτεΐνη του πλάσματος, που ονομάζεται alpha2macroglobulin και ανήκει στην ίδια οικογένεια με αυτή των πρωτεϊνών του συμπληρώματος του αίματος, μια ομάδα πρωτεϊνών που συμμετέχει στην έμφυτη ανοσία, προκαλώντας λύση των μικροοργανισμών που εισβάλλουν στον οργανισμό. Η alpha2macroglobulin διαφέρει από τις άλλες πρωτεΐνες του συμπληρώματος, αφού πρόκειται για αναστολέα, με πολύ ευρύ μάλιστα φάσμα δράσης (Armstrong 2006). Συγκεκριμένα ανασταλτική δράση αυτού του μορίου έχει αναφερθεί όχι μόνο για μεταλλοπρωτεάσες, αλλά και για πρωτεάσες κυστεΐνης, σερίνης και ασπαρτικού οξέος. Ομόλογα αυτής της οικογένειας, έχουν χαρακτηριστεί και μελετηθεί στην *Drosophila* και στο κουνούπι και ονομάζονται TEPs (thioestercontainingproteins). Στο κουνούπι η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει 14 γονίδια, ένα από τα οποία (TEP1) έχει μελετηθεί εκτεταμένα, (Levashina, Moita et al. 2001; Blandin, Shiao et al. 2004). Αν και η tep1 δεν έχει ρόλο αναστολέα, θα μπορούσε κανείς να περιμένει από άλλα γονίδια της οικογένειας αυτής να δρουν ως τέτοιοι.

Ο δεύτερος χαρακτηρισμένος αναστολέας μεταλλοπρωτεασών ονομάζεται RECK. Πρόκειται για μια γλυκοπρωτεΐνη με μοτίβα αναστολέα πρωτεασών



σερίνης. Σε αντίθεση με το timp που είναι εκκρινόμενο από το κύτταρο, εκτός από τις περιπτώσεις όπου αλληλεπιδρά με άλλα μόρια, ο αναστολέας RECK φαίνεται να διατηρείται στην μεμβράνη του κύτταρου μέσω ενός GPIanchor. Το γεγονός τον κάνει πιθανό αναστολέα διαμεμβρανικώνμεταλλοπρωτεασών. Δράση του RECK έχει αναφερθεί και απέναντι στις ADAMTSs (κατεξοχήν εκκρινόμενες), όπως βέβαια και απέναντι στις πρωτεασες της οικογένειας των ADAMs και των MMPs(RheeandCoussens 2002). Στον άνθρωπο η δράση του συγκεκριμένου αναστολέα απέναντι στις μεταλλοπρωτεασες έχει μελετηθεί κυρίως σε περιπτώσεις καρκινικών κύτταρων, ενώ στη *Drosophila* το μόριο αυτό φαίνεται να συμμετέχει στην αποδόμηση της βασικής μεμβράνης(Srivastava, Pastor-Pareja et al. 2007). Εκφραση του αναστολέα αυτού έχει αναφερθεί και στο *Tribolium*(Knorr, Schmidtbergetal. 2009).

Το προβλεπόμενο ομόλογο γονίδιο στο κουνούπι (AGAP010646) κωδικοποιεί αναστολέα με χαρακτηριστικά μοτίβα αναστολέων πρωτεασών σερίνης. Πειράματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με εκκινητές που σχεδιάσαμε για το γονίδιο, χρησιμοποιώντας ως μήτρα mRNAs από μεσεντερικό ιστό κουνουπιών δείχνουν έκφραση του γονιδίου στο μεσέντερο.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2**

**Ανάπτυξη εργαλείων-τεχνικών για την  
λειτουργική μελέτη των γονιδίων ADAMTSs,  
MMPs και timp**

## 2.1. Αντίστροφη γενετική στον οργανισμό *Anophelesgambiae*

Η αλληλούχηση του γονιδιώματος του Ανωφελούς αποτελεί αναμφίβολα μια σημαντική πηγή πληροφοριών για την μελέτη γονιδίων του οργανισμού αυτού. Προκειμένου όμως να διερευνηθεί ο λειτουργικός ρόλος τους απαιτείται η χρήση αντίστροφης γενετικής (ReverseGenetics). Ο γενετικός μετασχηματισμός είναι ένα από τα εργαλεία αντίστροφης γενετικής. Ένα άλλο είναι η μεταγραφική σιώπηση γονιδίων μέσω της χορήγησης δίκλωνου RNA ομόλογου με το γονίδιο στόχο, μια τεχνική η οποία έχει αποδειχθεί αρκετά αποδοτική στην περίπτωση του Ανωφελούς.

Όπως είναι γνωστό από την μελέτη του μηχανισμού RNAinterference σε άλλους οργανισμούς, το δίκλωνο RNA κόβεται σε siRNAs από την ενδοριβονουκλεάση Dicer. Το σύμπλοκο Dicer/siRNA μεταφέρεται στο σύμπλοκο RISC (RnaInducedSilencingComplex), το οποίο ενεργοποιείται με τη διαμεσολάβηση μιας ελικάσης. Η ελικάση οδηγεί στην απομάκρυνση του senseRNA από το σύμπλοκο RISC και την αλληλεπίδραση του τελευταίου με το mRNA του γονιδίου στόχου λόγω συμπληρωματικότητας. Στο τελευταίο βήμα του μηχανισμού του RNAinterference βασικό ρόλο παίζει μια νουκλεάση η οποία κόβει το mRNA του γονιδίου στόχου και οδηγεί σε μεταμεταγραφική σιώπηση του τελευταίου.

Η χρήση της RNAinterferenceteχνολογίας έχει οδηγήσει σε σημαντικές ανακαλύψεις που αφορούν κυρίως τον ρόλο γονιδίων του ανοσοποιητικού συστήματος του κουνουπιού σε σχέση με το παράσιτο. Μέσω αυτής της τεχνικής αποκαλύφθηκε ο ρόλος όλων των γονιδίων που συμμετέχουν στο μονοπάτι της μελανοποίησης του παρασίτου, αλλά και ο ρόλος των λεγόμενων μορίων ανταγωνιστών του παρασίτου, δηλαδή των γονιδίων του Ανωφελούς LRIM, APL1 και TEP1.

Όταν γίνεται χρήση της τεχνολογίας μεταμεταγραφικής σιώπησης για την διερεύνηση του λειτουργικού ρόλου των γονιδίων στόχων πρέπει να ακολουθούνται ορισμένα βασικά βήματα ελέγχου. Πρώτα από όλα είναι σημαντικό να προσδιορίζεται, σε μεταγραφικό καταρχήν επίπεδο η αποτελεσματικότητα του RNAinterferenceέναντι του γονιδίου στόχου. Στα γονίδια που μέχρι τώρα έχουν μελετηθεί μέσω αυτής της τεχνολογίας η μείωση των μεταγραφικών επιπέδων μετά από την χορήγηση του ομόλογου

σε αυτά δίκλωνου RNA ήταν της τάξης του 70-80% σε σχέση με τα μεταγραφικά επίπεδα των αντίστοιχων γονιδίων σε κουνούπια όπου δεν είχε γίνει χορήγηση ομόλογου δίκλωνου RNA. Επιπλέον, σημαντικό είναι να καθοριστεί και το χρονικό παράθυρο στο οποίο η σιωπή του γονιδίου λαμβάνει χώρα. Στα περισσότερα γονίδια που έχουν σιωπηθεί μέχρι τώρα το φαινόμενο της σιωπής φαίνεται να ξεκινά 1 ημέρα μετά την χορήγηση του δίκλωνου RNA και να συνεχίζει μέχρι και 6-12 ημέρες μετά (Blandin, Moita et al. 2002; Volz, Muller et al. 2006). Τέλος πρέπει να σημειωθεί ότι η επιτυχία καταστολής της έκφρασης ενός γονιδίου εξαρτάται και από τον χρόνο ημιζωής της πρωτεΐνης που αυτό εκφράζει. Γι αυτό τον λόγο θεωρείται σημαντικός ο έλεγχος μετά από χορήγηση δίκλωνου RNA όχι μόνο των μεταγραφικών επιπέδων του γονιδίου, αλλά και των επιπέδων του αντίστοιχου πρωτεϊνικού προϊόντος. Προκειμένου βέβαια να γίνει αυτό απαιτείται η ύπαρξη λειτουργικού αντισώματος έναντι της συγκεκριμένης πρωτεΐνης.

Επιπρόσθετα όμως ένα αντίσωμα μπορεί να δώσει σημαντικές πληροφορίες για την πρωτεΐνη που αφορούν μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, υποκυτταρική θέση μέσα στο κύτταρο, αλλά και πιθανές αλληλεπιδράσεις με άλλα μόρια.

Κρίθηκε λοιπόν σημαντικό να εξεταστεί αν τα μόρια του ενδιαφέροντος μας μπορούν να σιωπηθούν με την χορήγηση δίκλωνου RNA. Επίσης θεωρήθηκε απαραίτητη η ανάπτυξη αντισωμάτων για τα επιλεγμένα μόρια, που θα διευκόλυνε τόσο για τον έλεγχο της αποσιώπησης, όσο και για την πιο ολοκληρωμένη περιγραφή τους. Στο κεφάλαιο αυτό επομένως θα αναφερθούν οι προσπάθειες για μεταμεταγραφική σιωπή των μεταλλοπρωτεασών της οικογένειας των ADAMTSs, των MMPs και του χαρακτηρισμένου από άλλους οργανισμούς ομόλογου αναστολέα τους timp, καθώς και η ανάπτυξη και πιστοποίηση των αντισωμάτων που αναπτύχθηκαν για τα παραπάνω μόρια.

### **2α.1 Η έκφραση των γονιδίων της οικογένειας των ADAMTSs δεν καταστέλλεται μετά από χορήγηση ομόλογου δίκλωνου RNA**

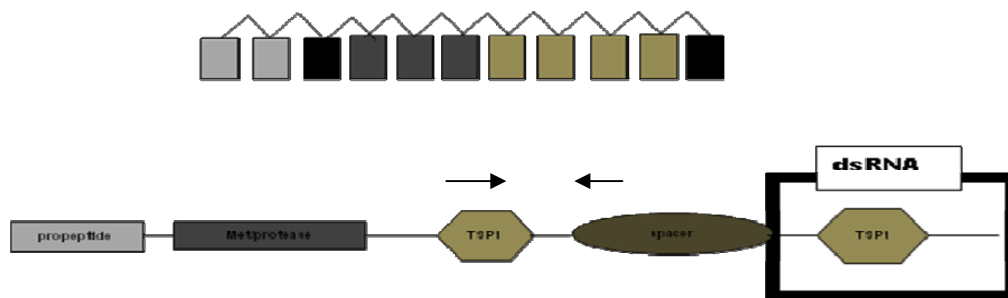
Για την μεταμεταγραφική σιωπή των γονιδίων ADAMTS1 και ADAMTS2 μέρος των γονιδίων κλωνοποιήθηκε και χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή

δίκλωνου RNA. Όπως φαίνεται στο σχήμα 1 στην περίπτωση της ADAMTS1 χρησιμοποιήθηκε μέρος της 3' αλληλουχίας του γονιδίου που φαίνεται να κωδικοποιεί το τελευταίο TSPrepeat του γονιδιακού προϊόντος. Στην περίπτωση του ADAMTS2 επιλέχτηκε και πάλι αλληλουχία στο 3' ακρο του γονιδίου, που φαίνεται να κωδικοποιεί το gondomain της πρωτεΐνης (σχ.2). Η αλληλουχία αυτή είναι κοινή και για τις τέσσερις ADAMTS2 ισομορφές.

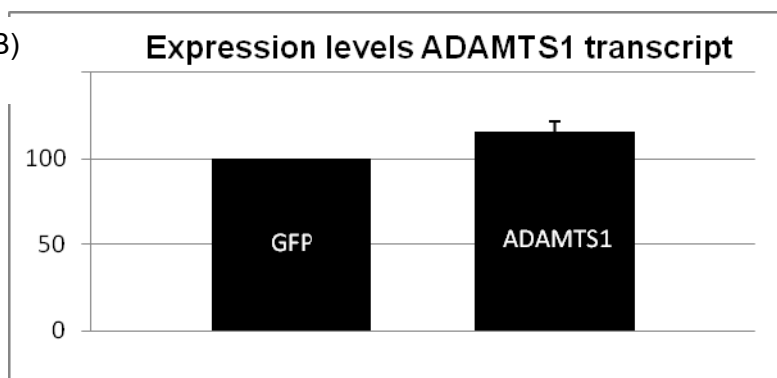
Το δίκλωνο RNA που παράχθηκε από τα παραπάνω τμήματα ενέθηκε στον θώρακα ενήλικων κουνουπιών. Σαν πείραμα αναφοράς ενέθηκε δίκλωνο RNA έναντι GFP με τον ίδιο τρόπο και στην ίδια ποσότητα.

Για να ελέγξουμε την σιώπηση των αντίστοιχων γονιδίων σε επίπεδο RNA σχεδιάστηκαν εκκινήτες σε διαφορετική περιοχή από αυτή που χρησιμοποιήθηκε για την σιώπηση τους (σχ.1,2). Αυτοί χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα Real-time PCR, όπου ποσοτικοποιήθηκαν τα μεταγράφα των δύο γονιδίων σε mRNA από τα μεσέντερα των ενεμένων με δίκλωνο RNA έναντι ADAMTS1 και ADAMTS2 κουνουπιών, καθώς και στο mRNA από τα μεσέντερα των ενεμένων με δίκλωνο GFP κουνουπιών. Η σύγκριση των τιμών σε τρεις διαφορετικές πειραματικές διατάξεις έδειξε ότι η μεταγραφή των δύο ADAMTS γονιδίων δεν καταστέλλεται στο μεσέντερο των ενήλικων κουνουπιών μετά από τη χορήγηση του δίκλωνου RNA. Ο μέσος όρος των πειραμάτων real-timePCR φαίνεται διαγραμματικά στο σχήμα1 για το γονίδιο ADAMTS1 και στο σχήμα2 για το γονίδιο ADAMTS2.

A)

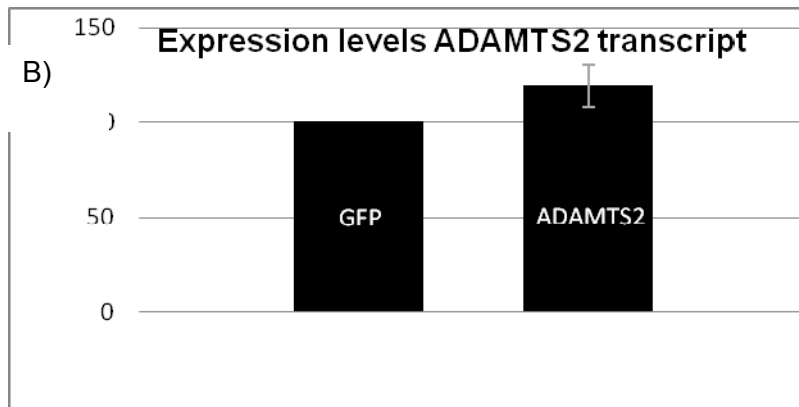
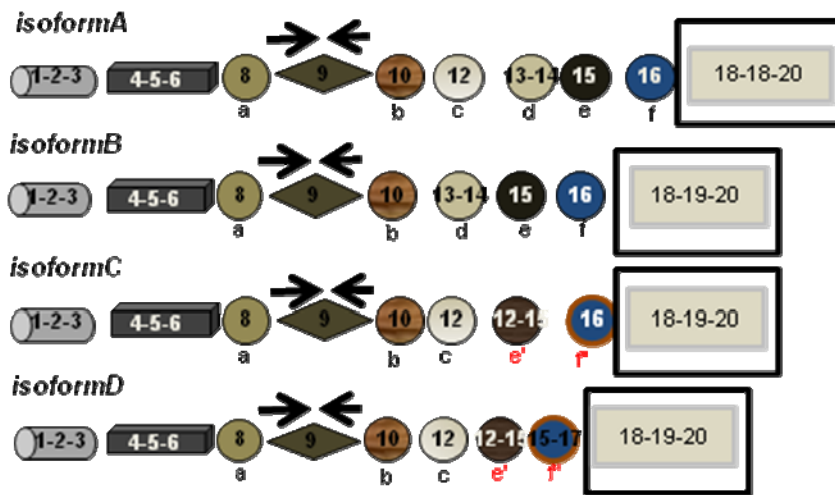


B)



**Σχήμα 1.A)** Σχηματική απεικόνιση του γονιδίου *ADAMTS1* και του πρωτεϊνικού του προϊόντος. Τα μπλε βέλη αντιπροσωπεύουν τους εκκινητές που σχεδιάστηκαν για την κλωνοποίηση του τμήματος του γονιδίου που χρησιμοποιήθηκε για παράγωγή δίκλωνου RNA. Η αντίστοιχη περιοχή έχει σημειωθεί και στη σχηματική απεικόνιση της πρωτεΐνης *ADAMTS1*. Τα κόκκινα βέλη αντιπροσωπεύουν τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα *Real-timePCR*, προκειμένου να πιστοποιηθεί η μεταμεταγραφική αποσιώπηση του γονιδίου. **B)** Διαγραμματική απεικόνιση αποτελεσμάτων τριών ανεξαρτήτων αποτελεσμάτων *real-timePCR* σε μεσέντερα ενεμένων με δίκλωνο *GFP* και *ADAMTS1* κουνουπιών. Τα επίπεδα μεταγραφής του γονιδίου *ADAMTS1* δεν φαίνεται να μεταβάλλονται μετά τη χορήγηση ομόλογου δίκλωνου RNA σε σχέση με το πείραμα αναφοράς

A)



**Σχήμα 2A)** Σχηματική απεικόνιση των εναλλακτικών μεταγράφων του γονιδίου *ADAMTS2* και των πρωτεϊνικών τους προϊόντων. Η περιοχή του *gondomain* που έχει τονιστεί είναι η περιοχή που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή δίκλωνου *RNA* και είναι κοινή για τα τέσσερα μεταγράφα. Τα βέλη αντιπροσωπεύουν τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα *real-timePCR* για να πιστοποιηθεί η σιγή του γονιδίου. **B)** τρία ανεξάρτητα πειράματα *real-timePCR* έδειξαν ότι η ποσότητα του *ADAMTS2* μεταγράφου παραμένει σταθερή μετά από την χορήγηση δίκλωνου για το αντίστοιχο γονίδιο *RNA* σε σχέση με το πείραμα αναφοράς. Τα πειράματα έγιναν από *cDNA* προερχόμενο από μεσέντερα κουνουπιών. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα αυτά είναι κοινοί και για τα τέσσερα μεταγράφα.

## 2<sup>α</sup>.2 Παραγωγή αντισωμάτων έναντι γονιδίων της οικογένειας ADAMTSs

Για την ανάπτυξη αντισωμάτων έγινε παραγωγή σε βακτήρια αντιγόνων που αντιστοιχούσαν σε ανασυνδισμένα τμήματα των πρωτεϊνών ADAMTS1, ADAMTS2 και καθαρισμός τους μέσω χρωματογραφίας συγγένειας. Η επιλογή των πρωτεϊνικών τμημάτων που χρησιμοποιήθηκαν ως αντιγόνα έγινε βάσει των παρακάτω κριτηρίων:

A) Αντιγονικότητα των ανασυνδισμένων πρωτεϊνών, αποκλείοντας όπου ήταν δυνατό υδροφοβικές περιοχές των μορίων.

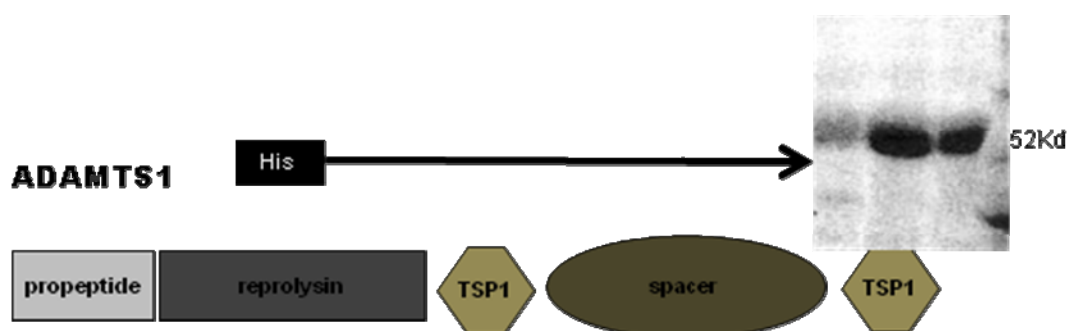
B) Ομολογία με άλλες πρωτεΐνες του κουνουπιού. Τα πρωτεϊνικά τμήματα που τελικά επιλέχθηκαν ως αντιγόνα δεν παρουσίαζαν εκτενείς ομολογίες, πάνω δηλαδή από έξι αμινοξέα (θεωρητικά μικρότερος δυνατός επίτοπος) στη σειρά, με καμιά άλλη πρωτεΐνη του Ανωφελούς. Έτσι αποφεύγεται η ανάπτυξη αντισωμάτων, που θα μπορούσαν να αναγνωρίσουν και άλλες πρωτεΐνες του κουνουπιού πέρα από αυτές που μας ενδιαφέρουν.

Γ) Πληροφορίες για την βιολογία των μεταλλοπρωτεασών από άλλα συστήματα. Το σημείο αυτό αφορά κυρίως τις πρωτεάσες της οικογένειας των ADAMTSs. Η εκτεταμένη πρωτεόλυση στο καρβοξυτελικό άκρο των ADAMTSs, μας προέτρεψε να επιλέξουμε περιοχές στο καρβοξυτελικό άκρο. Ανάκτηση πιθανών αντισωμάτων έναντι του καρβοξυτελικού άκρου πιθανά θα διευκόλυνε την σύνδεση τροποποίησης/λειτουργικότητας.

Στον άνθρωπο έχει βρεθεί ότι η ADAMTS4 και 5 πρωτεολύονται στο καρβοξυτελικό τους άκρο. Τα προϊόντα που προκύπτουν φαίνεται να έχουν διαφορετική συγγένεια με τα υποστρώματα της πρωτεάσης σε σχέση με το μη πρωτεολυμένο μόριο (Kashiwagi, Enghild et al. 2004; Zeng, Corcoran et al. 2006). Ενδείξεις για μεταμεταφραστικές πρωτεολύσεις υπάρχουν επίσης για τις ADAMTS9,-16 και 18 (Porter, Clark et al. 2005). Κοινό χαρακτηριστικό αυτών των τροποποιήσεων είναι ότι λαμβάνουν χώρα στο καρβοξυτελικό άκρο των μορίων, όπου και εκφράζονται οι περιοχές της πρωτεΐνης που είναι υπεύθυνες για την αλληλεπίδραση τους με άλλα μόρια. Μάλιστα ειδικά για την ADAMTS4 δείχθηκε ότι το πρωτεολυτικό βήμα που απαιτείται προκειμένου να διατηρηθεί η συγγένεια του μορίου με το βασικό του υπόστρωμα aggrecan λαμβάνει χώρα μέσα στο spacerdomain (Kashiwagi, Enghild et al. 2004).



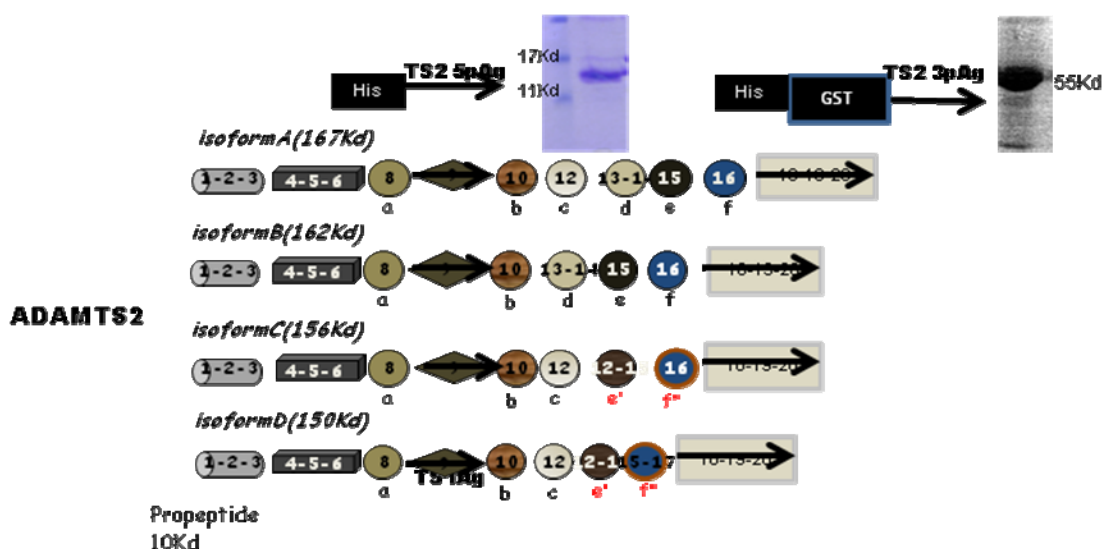
Έτσι, για την παράγωγή ορού έναντι της πρωτεΐνης ADAMTS1 επιλέχθηκε η περιοχή που φαίνεται στο σχήμα 3 και αντιστοιχεί στο μεγαλύτερο μέρος του καρβοξυτελικού άκρου της, ενώ περιλαμβάνει και μέρος της αλληλουχίας που κωδικοποιεί το ενεργό κέντρο της. Το τμήμα αυτό του γονιδίου υποκλωνοποιήθηκε σε φορέα έκφρασης με τέτοιο τρόπο ώστε κατά τη μετάφραση του να υπάρχουν στο πρωτεϊνικό προϊόν 6 ιστιδίνες στο 5' άκρο του, χωρίς όμως να αλλάζει το αναγνωστικό πλαίσιο του γονιδίου ADAMTS1 . Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων με τον συγκεκριμένο πλασμιδιακό φορέα έκφρασης οδήγησε σε παραγωγή του ανασυνδιασμένου τμήματος της πρωτεΐνης ADAMTS1, μεγέθους 55Kd. Το απομονωμένο από τα βακτηριακά εκχυλίσματα ανασυνδιασμένο τμήμα της πρωτεΐνης ADAMTS1 χρησιμοποιήθηκε για την επαγωγή ανοσολογικής αντίδρασης σε κουνέλια, από τα οποία και προέκυψε τελικά ο ορός.



**Σχήμα 3** . Η περιοχή που αντιστοιχεί στο βέλος απεικονίζει την ανασυνδιασμένη πρωτεΐνη που χρησιμοποιήθηκε ως αντιγόνο για την παραγωγή του ορού έναντι ADAMTS1. Η ζώνη της φωτογραφίας αντιστοιχεί στο καθαρισμένο κι απομονωμένο πρωτεϊνικό προϊόν που παρήχθη στα βακτηριακά κύτταρα και χρησιμοποιήθηκε για ανοσοποίηση.

Για την παραγωγή αντισωμάτων έναντι της ADAMTS2 πρωτεάσης εκφράστηκαν σε βακτηρια δυο διαφορετικά ανασυνδιασμένα τμήματα αυτής. Το πρώτο (TS25pAg) αντιστοιχεί στην περιοχή της πρωτεΐνης που ονομάζεται spacerdomain και το δεύτερο (TS23pAg) στην περιοχή της πρωτεΐνης που ονομάζεται gondomain. Οι περιοχές αυτές της πρωτεάσης κωδικοποιούνται και από τα τέσσερα εναλλακτικά μετάγραφα του γονιδίου, επομένως τα πιθανά παραγόμενα αντισώματα θα έπρεπε να αναγνωρίζουν τα πρωτεϊνικά

προϊόντα και των τεσσάρων μεταγράφων(σχημα.4). Και στις δυο περιπτώσεις τα αντιγόνα εκφράστηκαν ως χιμαιρικές πρωτεΐνες, στην πρώτη περίπτωση (TS25pAg) με μια ουρά έξι αμινοξέων ιστιδίνης και στην δεύτερη (TS23pAg) με μια ουρά έξι αμινοξέων ιστιδίνης και με την πρωτεΐνη GST (σχημα 4).



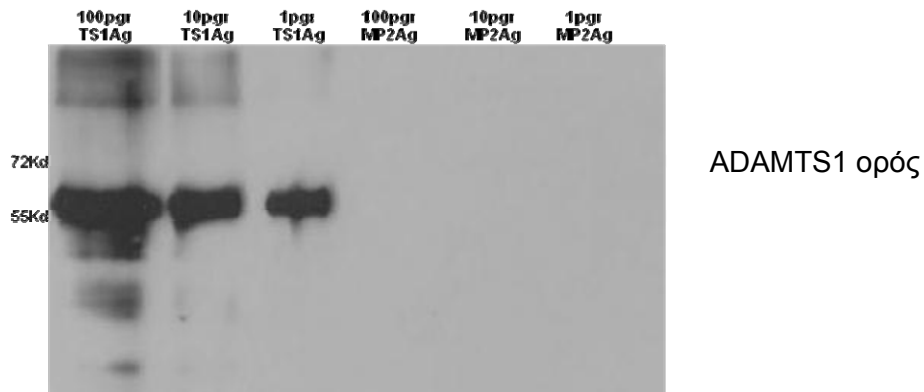
**Σχήμα 4** Σχηματική απεικόνιση των πρωτεϊνικών προϊόντων των τεσσάρων ισομορφών του γονιδίου ADAMTS2 και του μοριακού μεγέθους αυτών. Με το κόκκινο βέλος φαίνεται η περιοχή που κλωνοποιήθηκε κι εκφράστηκε για την παραγωγή του TS25p ορού, ενώ με το κίτρινο βέλος φαίνεται η αντίστοιχη περιοχή που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή του TS23p ορού. Η ποσότητα και ποιότητα των απομονωμένων ανασυνδισμένων πρωτεϊνών ελέγχθηκε σε αποδιατακτικό πήκτωμα με κατάλληλη χρωστική.

Η ειδικότητα των ορρών ελέγχθηκε αρχικά έναντι των ανασυνδισμένων αντιγόνων που χρησιμοποιήθηκαν για την ανοσοποίηση. Τα πειράματα αυτά έδειξαν ότι ο ορός ADAMTS1 περιέχει αντισώματα έναντι του αντιγόνου που χρησιμοποιήθηκε (σχήμα 5<sup>A</sup>). Το ίδιο συνέβει και με τον ορό που προέκυψε μετά από ανοσοποίηση με το TS23pAg το οποίο αναγνώριζε το αντίστοιχο αντιγόνο σε συγκεντρώσεις πολύ μικρές, ακόμη και της τάξης του 1pgr, όπως φαίνεται και στο σχ5β. Αντίθετα ο ορός που προέκυψε από το TS25pAg φαίνεται να αναγνωρίζει το τελευταίο μόνο σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις, της τάξης των 10ngr (σχ.5B). Το γεγονός μάλιστα ότι αναγνωρίζει με την ίδια ένταση άσχετη με την ADAMTS2 ανασυνδισμένη πρωτεΐνη εκφρασμένη σε

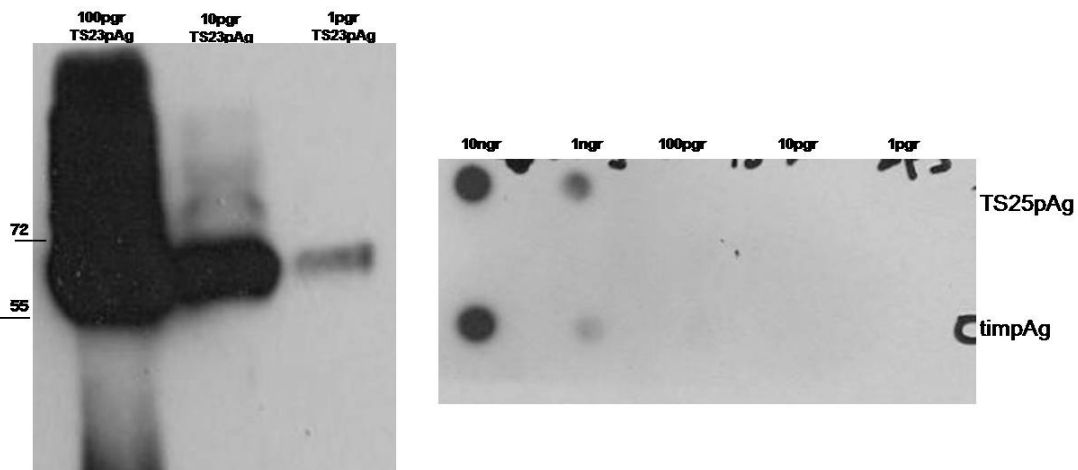
βακτηριακά κύτταρα και απομονωμένη με τον ίδιο τρόπο δημιουργεί εξ αρχής αμφιβολίες ως προς την ειδικότητα του.

Για να προσδιορίσουμε την ειδικότητα του ορρών έναντι των ενδογενών ADAMTS1 και ADAMTS2 χρησιμοποιήσαμε κατ' αρχήν ανοσοαποτύπωση εκχυλισμάτων που προέρχονταν τόσο από παϊνεκουνούπια όσο και από κουνούπια τα οποία είχαν ταϊστεί με αίμα ή είχαν μολυνθεί από παράσιτο. Επιπρόσθετα, χρησιμοποιήθηκαν και εκχυλίσματα από κουνούπια που είχαν χωριστεί σε μεσέντερο και υπόλοιπο σώμα. Με αυτό τον τρόπο όχι μόνο τα αναμενόμενα μοριακά μεγέθη των πρωτεϊνικών προϊόντων, αλλά και η προηγούμενη πληροφορία όσον αφορά την ιστοειδικότητα της έκφρασης των ADAMTSγονιδίων, αλλά και μεταβολές της έκφρασης μετά από ερέθισμα (αιματοφαγία ή επιμόλυνση με παράσιτο), μπορούσαν βοηθητικά να χρησιμοποιηθούν για να πιστοποιηθεί η ειδικότητα των ορρών. Τέλος, χρησιμοποιήθηκε και ανοσο-ιστοχημία μια και η υποκυτταρική τοπολογία του ανοσο-αντιδρόντος υλικού θα μπορούσε να προσφέρει ένα επιπρόσθετο στοιχείο σε σχέση με την ειδικότητα των ορρών. Παρόλες αυτές τις προσπάθειες (που παρατίθενται στο τέλος του κεφαλαίου, Annex), δεν κατορθώσαμε να αποκομίσουμε ασφαλή πληροφορία για την ειδικότητα των ορρών.

A)



B)



**Σχήμα 5** A)Ειδικότητα ορού ADAMTS1 έναντι του ίδιου του αντιγόνου (TS1Ag 100, 10 και 1 pgr) και μη σχετικού αντιγόνου (MP2Ag 100, 10 και 1pgr). B)Πιστοποίηση της ειδικότητας των δυο ADAMTS2 ορών έναντι των αντιγόνων που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή τους. A) ο TS23p ορός αναγνωρίζει το αντιγόνο TS23p σε συγκεντρώσεις της τάξης 1pgr-100pgr. B) Ο TS25p ορός αναγνωρίζει την ανασυνδιασμένη πρωτεΐνη TS25p σε συγκεντρώσεις της τάξης του 1ngr-10ngr. Αναγνωρίζει εξίσου έντονα όμως και ανασυνδιασμένη πρωτεΐνη εκφρασμένη και απομονωμένη με τον ίδιο τρόπο στις ίδιες συγκεντρώσεις

## Συμπεράσματα

Προκειμένου να μελετήσουμε λειτουργικά τα γονίδια ADAMTS1 και ADAMTS2 θελήσαμε να αναπτύξουμε αντισώματα έναντι των αντίστοιχων πρωτεϊνών. Επιπλέον εξετάσαμε αν για τα γονίδια αυτά μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε ως εργαλείο τη μεταμεταγραφική σιώπηση.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων μας έδειξαν ότι τόσο το γονίδιο ADAMTS1, όσο και το γονίδιο ADAMTS2 δεν είναι δεκτικά σε μεταμεταγραφική σιωπή. Το γεγονός ότι δεν καταφέραμε να εντοπίσουμε σιωπή των γονιδίων στο μεσέντερο μπορεί να οφείλεται σε πολλούς παράγοντες. Αρχικά πρέπει να τονιστεί ότι στις περισσότερες δημοσιευμένες περιπτώσεις η τεχνική του RNAi έχει εφαρμοστεί κυρίως για γονίδια του κουνουπιού που εκφράζονται στα αιμοκύτταρα ή στο λιπώδες σώμα (fatbody). Τόσο τα αιμοκύτταρα όσο και τα κύτταρα του λιπώδους σώματος είναι περισσότερο προσβάσιμα στο δίκλωνο RNA, που ενύεται στον θώρακα του ενήλικου ατόμου. Παρόλαυτα και στην περίπτωση γονιδίων που εκφράζονται στα αιμοκύτταρα έχουν περιγραφεί περιπτώσεις, όπως αυτή ορισμένων γονιδίων της οικογένειας των C-typelectins, όπου η μεταμεταγραφική τους σιωπή δεν ήταν εφικτή ή δεν ήταν ικανοποιητική (Volz, Muller et al. 2006). Μάλιστα, ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι σε παράλογα αυτών των γονιδίων επιτεύχθηκε ικανοποιητική μείωση των μεταγραφικών επιπέδων της τάξης του 60-85%, σε σχέση πάντα με τα μεταγραφικά τους επίπεδα στο δείγμα αναφοράς.

Η μη δεκτικότητα στη μεταμεταγραφική σιωπή μπορεί να οφείλεται είτε σε λανθασμένη επιλογή της περιοχής που χρησιμοποιείται ως μήτρα για το δίκλωνο RNA είτε στη δομή του γονιδίου που είναι υποψήφιο για μεταμεταγραφική σιωπή. Όπως έχει αναφερθεί το δίκλωνο RNA πρέπει να πληροί συγκεκριμένες θερμοδυναμικές ιδιότητες που εξαρτώνται από την αλληλουχία του και καθορίζουν την ενσωμάτωση του siRNA στο συμπλοκο RISC. Στην δεύτερη περίπτωση θεωρείται ότι η δομή RNA του γονιδίου μπορεί να περιορίζει την προσβασιμότητα του συμπλόκου RISC κι επομένως και την σιωπή του (Kurreck 2006). Θα είχε ίσως νόημα συνεπώς η επιλογή διαφορετικής περιοχής και η επανάληψη των πειραμάτων.

Σε ότι αφορά τα αντισώματα που αναπτύχθηκαν έναντι των πρωτεϊνών ADAMTS1 και ADAMTS2 τα αποτελέσματα που προέκυψαν δεν έδωσαν σαφή απάντηση ως προς την ειδικότητα τους. Δημιουργεί πρόβλημα το

γεγονός ότι η σιώπηση των δυο γονιδίων δεν είναι δυνατή τουλάχιστον στον μεσεντερικό ιστό, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να γίνει επιβεβαίωση της ειδικότητας των ορών που αναπτύχθηκαν. Ο μόνος εναλλακτικός τρόπος που προτείνουμε έτσι ώστε να διαπιστωθεί αν τελικά οι ορροί είναι λειτουργικοί είναι η έκφραση ανασυνδιασμένου cDNA των γονιδίων σε κυτταρικές σειρές εντόμων.

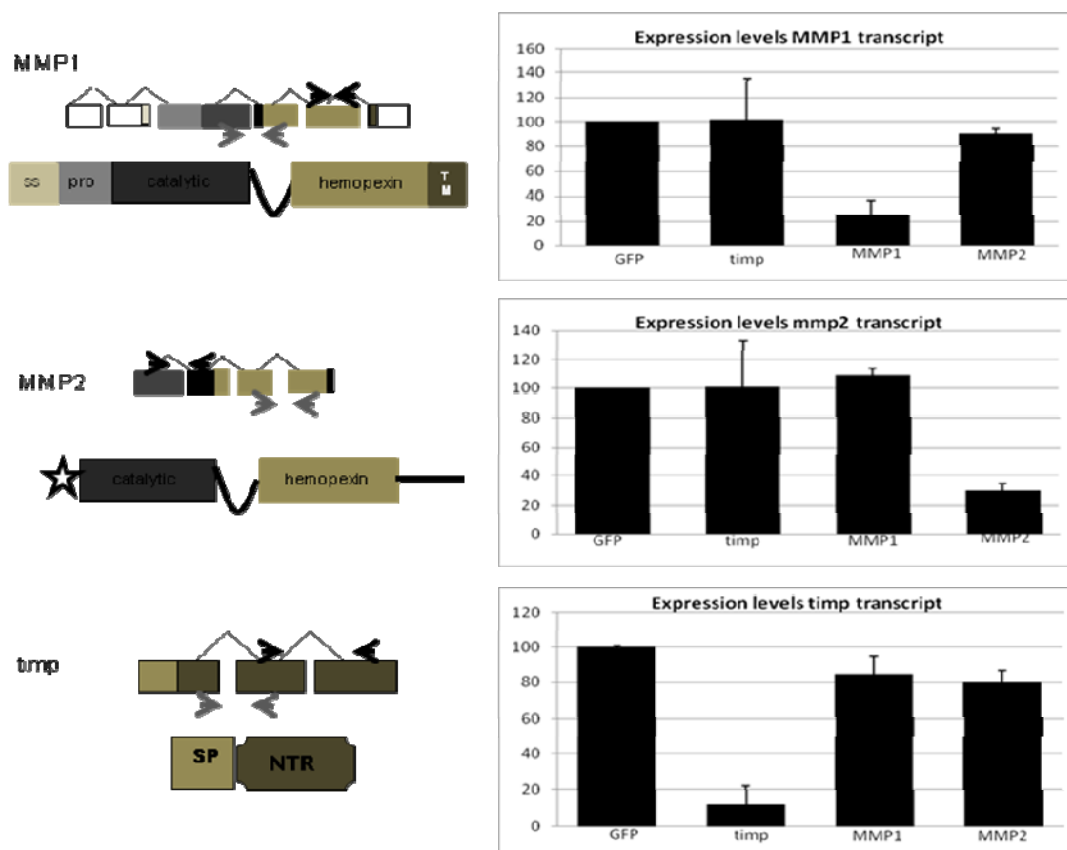
### **2β.1 Η μεταγραφή των γονιδίων MMP1, MMP2 και timp καταστέλλεται μετά από τη χορήγηση ομόλογου δίκλωνου RNA**

Όπως και στην περίπτωση των γονιδίων ADAMTS1, ADAMTS2 μέρος των μεταγράφων των γονιδίων MMP1, MMP2 και timp κλωνοποιήθηκε και χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή δίκλωνου RNA. Αυτό ενέθηκε στο θώρακα ενήλικων κουνουπιών. Παράλληλα ως πείραμα αναφοράς ενέθηκε με τον ίδιο τρόπο και δίκλωνο RNA έναντι GFP. Τα μεσέντερα των ενεμένων κουνουπιών απομονώθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση mRNA. Το cDNA που προέκυψε από αυτό αποτέλεσε τη μήτρα σε πειράματα real-timePCR, στα οποία ποσοτικοποιήθηκαν τα μετάγραφα των τριών γονιδίων σε σχέση πάντα με τα πειράματα αναφοράς.

Για τις αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκαν και σε αυτή την περίπτωση ζεύγη εκκινητών που αντιστοιχούν σε περιοχές διαφορετικές από αυτές που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή του δίκλωνου RNA. Η ανάλυση τριών τουλάχιστον πειραμάτων real-timePCR έδειξε ότι τα επίπεδα μεταγραφής και των τριών γονιδίων στα μεσέντερα κουνουπιών ενεμένων με το αντίστοιχο δίκλωνο RNA μειώνονται 80-90% σε σχέση με τα επίπεδα μεταγραφής των γονιδίων σε μεσέντερα κουνουπιών ενεμένων με δίκλωνο GFP. Συγκεκριμένα στην περίπτωση των γονιδίων MMP1, MMP2 τα επίπεδα μεταγραφής τους στο μεσέντερο μετά από τη χορήγηση ομόλογου δίκλωνου RNA μειώνονται κατά 70% σε σχέση με τα επίπεδα μεταγραφής τους στο μεσέντερο κουνουπιών ενεμένων με δίκλωνο GFP.

Στην περίπτωση του timp αναστολέα η μεταμεταγραφική σιώπηση είναι ακόμη πιο ισχυρή (πτώση των μεταγραφικών επιπέδων κατά 90% σε σχέση πάντα με το πείραμα αναφοράς). Σε αυτή την περίπτωση, λήφθηκε υπόψη και η πιθανότητα αλληλεπίδρασης των γονιδίων σε μεταγραφικό επίπεδο. Για αυτό

τον λόγο ελέγχθηκαν τα μεταγραφικά επίπεδα και των τριών γονιδίων μετά από τη σιωπήση καθενός από αυτά. Ο σχεδιασμός και η ανάλυση των πειραμάτων RNAi και για τα τρία γονίδια φαίνεται στο σχήμα6.



**Σχήμα 6.** Τα μαύρα βέλη υποδεικνύουν την περιοχή που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή δίκλωνου RNA για τα γονίδια MMP1, MMP2 και timp αντίστοιχα. Τα γκρι βέλη αντιπροσωπεύουν τους εκκινήτες που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε γονίδιο στα πειράματα *real-timePCR*. Διαγραμματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων των *real-timePCR* τριών ανεξάρτητων μεταξύ τους πειραμάτων μεταμεταγραφικής σιωπήσης για κάθε γονίδιο. Σε κάθε πειραματικό σύνολο ελέγχθηκαν μεταγραφικά τα αποτελέσματα της σιωπήσης καθενός από τα τρία γονίδια στα επίπεδα μεταγραφής των υπολοίπων.

**2β.2 Ανάπτυξη αντισωμάτων έναντι των μεταλλοπρωτεασών MMP1 και MMP2 κι έναντι του πιθανού αναστολέα τους timp.**

Όπως και στην περίπτωση των γονιδίων ADAMTSs κρίθηκε αναγκαία η ανάπτυξη αντισωμάτων έναντι των MMPs και του του αναστολέα τους. Λαμβάνοντας υπόψη τα κριτήρια που αναφέρθηκαν στο κεφαλαίο 2<sup>α</sup>.2 έγινε παραγωγή ανασυνδιασμένων τμημάτων των τριών πρωτεϊνών σε βακτηριακά κύτταρα. Η προσθήκη επιτόπου 6 αμινοξέων ιστιδίνης στο αμινοτελικό άκρο των ανασυνδιασμένων πρωτεϊνών συνέβαλλε στην εύκολη απομόνωση τους από τα βακτηριακά εκχυλίσματα, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν τελικά για την ανοσοποίηση ζώων. Τα αντισώματα που πρόεκυψαν δοκιμάστηκαν για την ειδικότητα τους έναντι εκχυλισμάτων από ιστούς κουνουπιών, όπως περιγράφεται παρακάτω. Σε αντίθεση με την περίπτωση των ADAMTSs, για τα γονίδια MMPs και timptα δεδομένα μας αποδεικνύουν την ικανοποιητική σιώπηση τους στον μεσεντερικό ιστό μετά από χορήγηση δίκλωνου RNA. Επομένως κι εφόσον ο χρόνος ημιζωής των τριών πρωτεϊνών δεν είναι μεγάλος, περιμένει κανείς να δει σημαντική μείωση των πρωτεϊνικών προϊόντων που θα αναγνωρίζουν τα αντισώματα, εάν είναι ειδικά, σε μεσεντερικά τουλάχιστον εκχυλίσματα σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης.

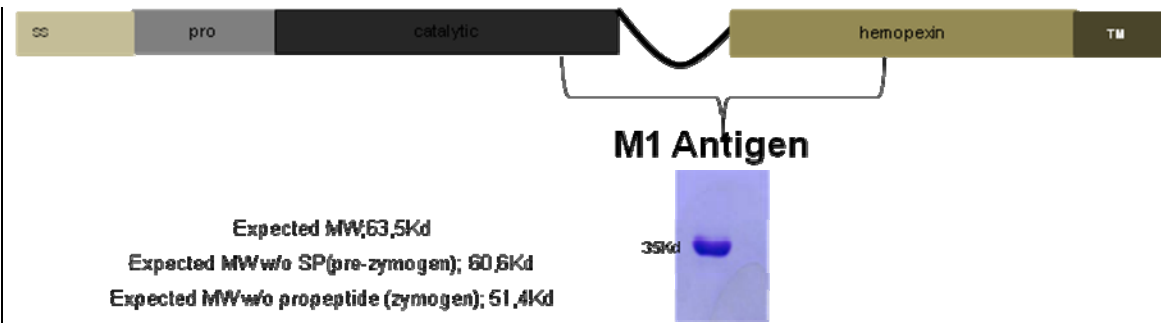
### **2β.3 Το αντίσωμα έναντι MMP1 είναι ειδικό.**

Η περιοχή που επιλέχτηκε για την παραγωγή του αντιγόνου της πρωτεΐνης MMP1 φαίνεται στο σχήμα 22 και περιλαμβάνει ένα μικρό μέρος του ενεργού τμήματος της μεταλλοπρωτεάσης καθώς και τα δυο πρώτα hemorexindomains αυτής μαζί με το hingeregion. Ο ορρός που πρόεκυψε από ανοσοποίηση με την παραπάνω ανασυνδιασμένη πρωτεΐνη καθαρίστηκε έναντι αυτής. Το καθαρισμένο πλέον πολυκλωνικό αντίσωμα αναγνωρίζει σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης, όπως φαίνεται στο σχήμα 8, σε ικανοποιητικό βαθμό το ίδιο το αντιγόνο, αλλά και δυο πρωτεϊνικά προϊόντα μεγέθους περίπου 60 και 50Kd σε μεσεντερικά εκχυλίσματα. Το αναμενόμενο μέγεθος της MMP1 του Ανωφελούς είναι 63,5Kd. Μετά την απομάκρυνση του σηματοδοτικού πεπτιδίου η πρωτεΐνη (προζυμογόνο) έχει αναμενόμενο μέγεθος 60,6Kd, ενώ μετά την απομάκρυνση του προπεπτιδίου η ενεργή πλέον πρωτεάση έχει μέγεθος 51,4Kd (σχήμα 7). Τα δυο πρωτεϊνικά προϊόντα που αναγνωρίζονται επομένως στα μεσεντερικά εκχυλίσματα θα μπορούσαν με βάση το μέγεθος τους να αντιστοιχούν στο προζυμογόνο και

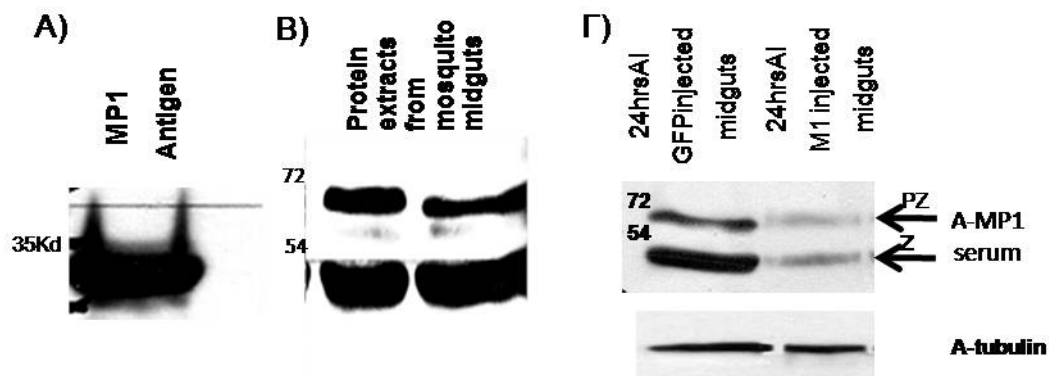


ζυμογόνο της MMP1. Για να διαπιστωθεί αυτό έγιναν πειράματα RNAi σε κουνούπια, από τα οποία απομονώθηκαν τα μεσέντερα και αναλύθηκαν σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης. Η ένταση των πρωτεϊνικών προϊόντων που αναγνωρίζονται από το αντίσωμα σε μεσέντερα από κουνούπια που είχαν ενεθεί με δίκλωνο RNA έναντι MMP1 ήταν εμφανώς μειωμένη σε σχέση με αυτή των προϊόντων που αναγνωρίζονται στα εκχυλίσματα από μεσέντερα κουνουπιών ενεμένων με δίκλωνο GFP, παρόλο που τα δυο πρωτεϊνικά δείγματα φαίνεται να φέρουν το ίδιο συνολικό ποσό πρωτεΐνης, όπως δείχνει επώαση τους με αντίσωμα τουμπουλίνης.

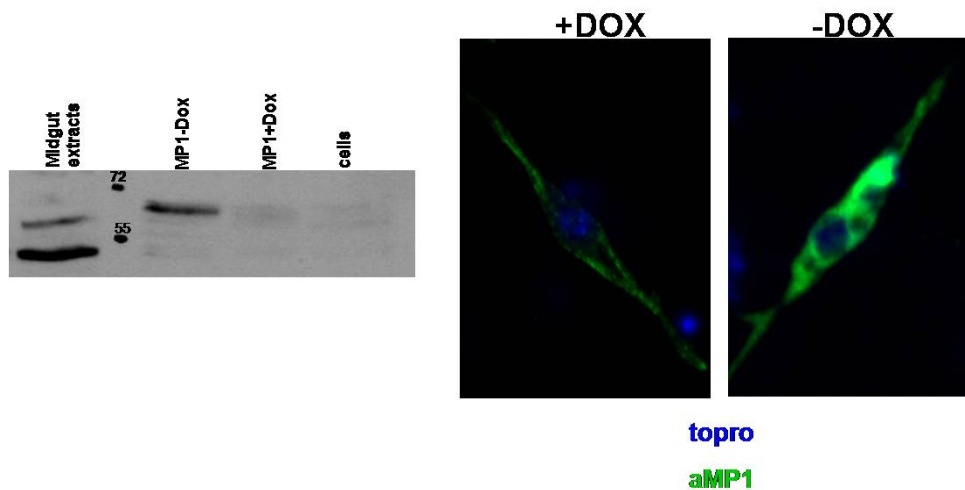
Για την περαιτέρω απόδειξη της ειδικότητας του ορού το cDNA που αντιστοιχεί στο αναγνωστικό πλαίσιο του γονιδίου MMP1 κλωνοποιήθηκε σε φορέα επαγόμενης έκφρασης μέσω του συστήματος τετρακυκλίνης. Ακολούθησε συνδιαμόλυνση αιμοκυτταρικής σειράς κουνουπιού (sua5.1) με τον παραπάνω φορέα καθώς και με φορέα έκφρασης του συνεργοποιητή tTA2. Ο συνεργοποιητής βρίσκεται υπό τον μεταγραφικό έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου SRPN10 σερπίνης ή ακτινης και καταστέλλεται παρουσία δοξυκυκλίνης. Ενεργοποίηση του συστήματος (απουσία δοξυκυκλίνης) και ανάλυση των κυτταρικών εκχυλισμάτων με πειράματα ανοσοαποτύπωσης έδειξε ότι ο καθαρισμένος MMP1 ορός αναγνωρίζει πρωτεϊνικό προϊόν αναμενόμενου μοριακού μεγέθους (63,5Kd σχ.7) μόνο στα διαμολυσμένα με MMP1-ORFcDNA κυτταρικά εκχυλίσματα και μόνο απουσία δοξυκυκλίνης (σχ.9). Παράλληλα πειράματα ανοσοφθορισμού χρησιμοποιώντας τον ορό έναντι MMP1 επιβεβαίωσαν τα αποτελέσματα των πειραμάτων ανοσοαποτύπωσης. Πρέπει ωστόσο να σημειωθεί ότι το πρότυπο που δίνουν τα εκχυλίσματα των μετασχηματισμένων κυττάρων υποδεικνύουν ότι σε αυτά δεν λαμβάνει χώρα απομάκρυνση του προπεπτιδίου, αλλά ούτε και του σηματοδοτικού πεπτιδίου, όπως υποδηλώνει η μικρή διαφορά μεγέθους με το προζυμογόνο της MMP1 που εντοπίζει το αντίσωμα στα μεσεντερικά εκχυλίσματα.



**Σχημα7..** Σχηματική απεικόνιση της MMP1 και του αναμενόμενου μοριακού μεγέθους αυτής μετά τις αναμενόμενες μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις. Η περιοχή που περιλαμβάνεται στην αγκύλη αντιπροσωπεύει την περιοχή που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή του αντιγόνου. Η απομονωμένη από βακτηριακά εκχυλίσματα ανασυνδιασμένη πρωτεΐνη φαίνεται στο αποδιατακτικό πήκτωμα με χρωστική Coomassie.



**Σχημα8** A) Ο ορός έναντι MMP1 αναγνωρίζει το αντιγόνο του. B) σε μεσεντερικά εκχυλίσματα ο ορός αναγνωρίζει δυο πρωτεϊνικά προϊόντα μεγέθους μεταξύ 60 και 50Kd. Γ) η ένταση των πρωτεϊνικών προϊόντων που αναγνωρίζονται από τον MMP1 ορό μειώνεται σε μεσεντερικά εκχυλίσματα από κουνούπια που έχουν ενεθεί με δίκλωνο RNA έναντι MMP1 σε σχέση με την ένταση των προϊόντων στα μεσεντερικά εκχυλίσματα κουνουπιών ενεμένων με δίκλωνο GFP. Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα έχουν ποσοτικοποιηθεί με αντίσωμα έναντι τουμπουλίνης.



**Σχήμα 9.** Εκχυλίσματα από, κύτταρα διαμολυσμένα με φορέα έκφρασης που φέρει το cDNA του αναγνωστικού πλαισίου της MMP1 απουσία δοξυκυκλίνης και κύτταρα διαμολυσμένα με τον ίδιο φορέα παρουσία δοξυκυκλίνης αναλύθηκαν σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης παράλληλα με μεσεντερικά εκχυλίσματα κι επωάστηκαν με ορρό έναντι MMP1. Β) ανοσοφθορισμός κυττάρων διαμολυσμένων με τον ίδιο φορέα απουσία και παρουσία δοξυκυκλίνης. Η MMP1 φαίνεται με πράσινο χρώμα, ενώ το μπλε χρώμα αντιστοιχεί σε χρώση του πυρήνα με topro.

#### 2β.4 Το αντίσωμα έναντι MMP2 είναι μη ειδικό.

Η παρουσία πολλαπλών επαναλήψεων αμινοξέων θρεονίνης στο hingeregion της MMP2 σε συνδυασμό με την εκτενή ομολογία της με τις υπόλοιπες μεταλλοπρωτεάσες του Ανωφελούς περιόρισε τις επιλογές ως προς την περιοχή που θα μπορούσε να εκφραστεί για την παραγωγή αντιγόνου. Τελικά καταλήξαμε στην επιλογή μικρού μέρους του hingeregion και του πρώτου hemorexindomain, όπως φαίνεται στο σχήμα 10. Τομήμα αυτό της πρωτεΐνης εκφράστηκε σε βακτηριακά κύτταρα και απομονώθηκε μέσω του επιτόπου ιστιδινών που προστέθηκε, όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις, στο αμινοτελικό της άκρο. Ο ορρός που προέκυψε από ανοσοποίηση με την ανασυνδιασμένη αυτή πρωτεΐνη καθαρίστηκε έναντι του αντιγόνου του, όπως και στην περίπτωση του MMP1 ορρού. Ο καθαρισμένος ορρός αναγνωρίζει το αντιγόνο του, αλλά όχι ολόκληρη την ανασυνδιασμένη πρωτεΐνη παρηγμένη και απομονωμένη με τον ίδιο τρόπο (σχ.10).

Σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης ο καθαρισμένος ορός αναγνωρίζει σε εκχυλίσματα από μεσέντερα κουνουπιών απομονωμένα σε διαφορετικά χρονικά σημεία (0,24,48,96 ώρες) μετά τη λήψη αίματος παρουσία ή απουσία παρασίτου πρωτεϊνικό προϊόν μεγέθους περίπου 60 Kd (σχ.11β). Το αναμενόμενο μέγεθος της ενεργής πρωτεάσης είναι 62,7Kd. Επομένως το προϊόν που αναγνωρίζει ο ορός θα μπορούσε βάσει μεγέθους να αντιστοιχεί στην MMP2. Ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι στα παραπάνω πειράματα ανοσοαποτύπωσης η έκφραση του προϊόντος που αναγνωρίζεται φαίνεται να ρυθμίζεται από την παρουσία αίματος, αφού η ένταση της αυξάνεται σημαντικά 24 ώρες μετά τη λήψη αίματος και αρχίζει να επανέρχεται σε φυσιολογικά επίπεδα 48ωρες μετά, μόνο απουσία παρασίτου. Διαφορετικά παραμένει σε υψηλά επίπεδα μέχρι και 96 ώρες μετά την λήψη μολυσμένου αίματος. Τα πειράματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, που παρουσιάστηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο δεν έδειξαν κάτι ανάλογο σε μεταγραφικό επίπεδο για το mRNA του MMP2 γονιδίου. Επιπλέον πειράματα real-timePCR όμως που έγιναν προκειμένου να προσδιοριστεί με μεγαλύτερη ακρίβεια το μεταγραφικό πρότυπο του MMP2 γονιδίου μετά από αιματοφαγία παρουσία ή απουσία παρασίτου (σχ.11<sup>α</sup>) δείχνουν μικρή αύξηση (της τάξης 1,5X) των μεταγραφικών επιπέδων του γονιδίου 48 ώρες μετά τη λήψη αίματος στον μεσεντερικό ιστό. Παρουσία παρασίτου αντίθετα η αύξηση των μεταγραφικών επιπέδων στο μεσέντερο φαίνεται να ξεκινά 24 ώρες μετά τη λήψη αίματος και να διατηρείται σε υψηλά επίπεδα μέχρι και 4 ημέρες μετά την αιματοφαγία, αποτέλεσμα που συμβαδίζει με την έκφραση του πρωτεϊνικού προϊόντος που αναγνωρίζεται από τον MMP2 ορό. Πρέπει να σημειωθεί εδώ ότι τα αποτελέσματα αυτά προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα μεταξύ τους πειράματα.

Για να διαπιστωθεί αν η ταυτότητα του παραπάνω προϊόντος αντιστοιχεί στην MMP2 συνδιάσαμε τη μεταμεταγραφική σιώπηση με την ανοσοαποτύπωση των εκχυλισμάτων που προέκυψαν. Τα μεσέντερα από τα ενεμένα με δίκλωνο RNA έναντι MMP2 κουνούπια απομονώθηκαν σε διαφορετικά χρονικά σημεία μετά τη χορήγηση του δίκλωνου RNA (0ωρες, 2 και 4 ημέρες) και αναλύθηκαν. Η ποσότητα του ανοσο-αντιδρόντος προϊόντος που αναγνωρίζεται σε αυτά τα δείγματα δεν φαίνεται να διαφέρει σε σχέση με την ποσότητα του σταεκχυλίσματα από μεσέντερα κουνουπιών ενεμένων με

δίκλωνο GFP και απομονωμένων στα ίδια χρονικά σημεία (σχ.12). Η συνολική ποσότητα πρωτεΐνης που φέρουν τα παραπάνω πρωτεϊνικά εκχυλίσματα, όπως δείχνει η τουμπουλίνη δεν διαφοροποιείται σημαντικά. Τα παραπάνω δεν συμφωνούν με τα αποτελέσματα που δείχνουν ότι η χορήγηση του δίκλωνου RNA έναντι MMP2 επιφέρει μεταμεταγραφική σιώπηση του γονιδίου στον μεσεντερικό ιστό. Η παραπάνω αντίθεση σε σχέση με τα αποτελέσματα του real-timePCR μπορεί να σημαίνει, είτε ότι το πρωτεϊνικό προϊόν που αναγνωρίζει το αντίσωμα δεν έχει σχέση με την MMP2, είτε το προϊόν του MMP2 γονιδίου είναι εξαιρετικά σταθερό και τα επίπεδα του δεν μεταβάλλονται μετά από μεταμεταγραφική σιώπηση του γονιδίου.

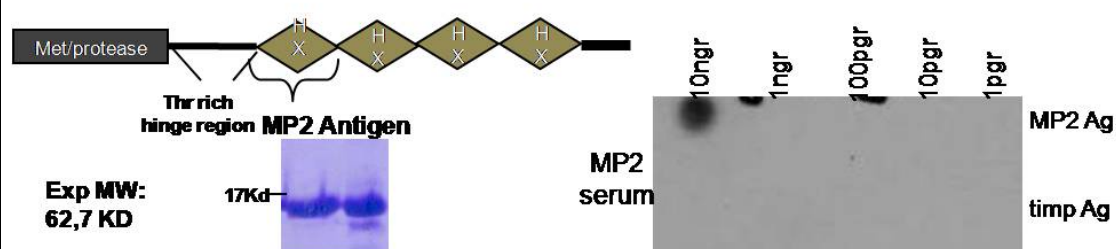
Εφόσον λοιπόν τα πειράματα RNAi δεν μπορούν να δώσουν απάντηση προχωρήσαμε σε πειράματα έκτοπης έκφρασης ανασυνδιασμένου τμήματος του γονιδίου MMP2 σε αιμοκυτταρικές σειρές εντόμων, κουνουπιού και Δροσόφιλας (sua5.1 και S2 αντίστοιχα). Συγκεκριμένα δημιουργήθηκε ένα τεχνητό μινι-γονίδιο στο οποίο το proteasedomain και το 3' άκρο του MMP2 γονιδίου συνδέθηκε αμινοτελικά με το σηματοδοτικό πεπτιδίο της A1 αντιθρυψίνης και με αλληλουχία που κωδικοποιεί για τρεις επαναλήψεις του επιτόπου που αναγνωρίζεται από mycαντίσωμα (σχ213α). Το τεχνητό αυτό μινι-γονίδιο (pTETOM2ATNtag) τέθηκε υπό το μεταγραφικό έλεγχο του tetORυποκινητή ο οποίος ενεργοποιείται από τον rtTA συνεργοποιητή. Ο rtTA συνεργοποιητής ρυθμίζεται από δοξυκυκλίνη. Δηλαδή παρουσία δοξυκυκλίνης προσδένεται στον tetORυποκινητή και ενεργοποιεί το υποκείμενο γονίδιο.

Η διαμόλυνση των κυτταρικών σειρών έγινε με μίγματος πλασμιδίου(pTETOM2ATNtag) και ένα πλασμίδιο που εκφράζει τον ενεργοποιητή rtTA υπό υποκινητή ακτίνης. Η έκφραση του ανασυνδιασμένου μινι-γονιδίου της MMP2 επάχθηκε με την προσθήκη δοξυκυκλίνης. Πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των διαμολυσμένων κυττάρων παρουσία και απουσία δοξυκυκλίνης αναλύθηκαν σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης, όπου χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι του επιτόπου myc και ο καθαρισμένος ορός έναντι MMP2.

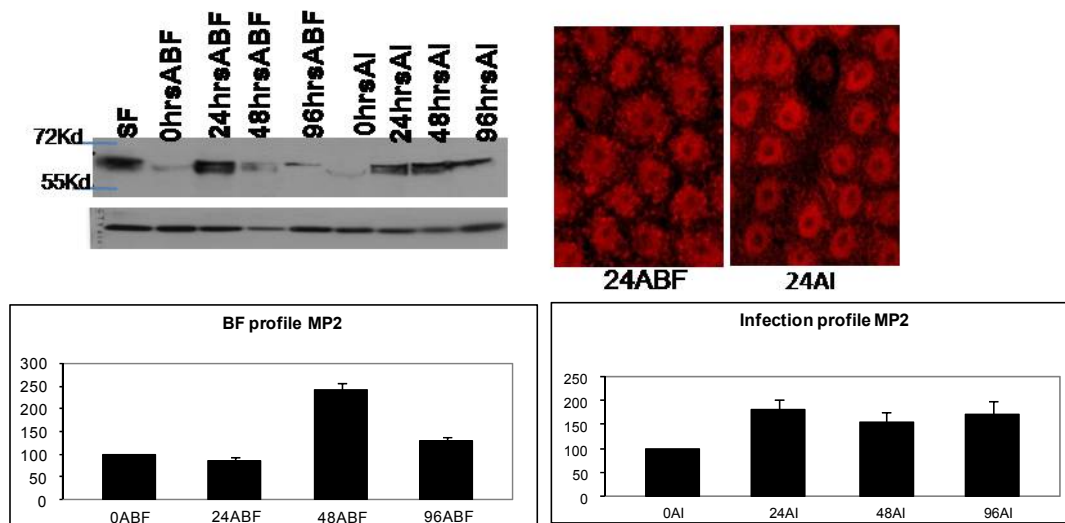
Η χρήση του mycαντισώματος επιβεβαίωσε την έκφραση πρωτεϊνικού προϊόντος του αναμενόμενου μοριακού μεγέθους (72Kd) (σχ.13β). Αντίθετα με τον MMP2 ορρό δεν ανιχνεύτηκε το αντίστοιχο προϊόν (σχ13γ) επιβεβαιώνοντας έτσι την μη ειδικότητά του.

Στα ίδια πειράματα διαμόλυνσης έγινε ανοσοχρώση των κυττάρων με αντίσωμα έναντι mpc και καθαρισμένο MMP2 όρο. Παρατήρηση των δειγμάτων επιβεβαίωσε ότι ο ορός δεν αναγνωρίζει το προϊόν του ανασυνδιασμένου MMP2 γονιδίου που εκφράζεται στα κύτταρα, αφού το πρότυπο που δίνουν τα κύτταρα παρουσία και απουσία δοξυκυκλίνης δεν διαφοροποιείται.

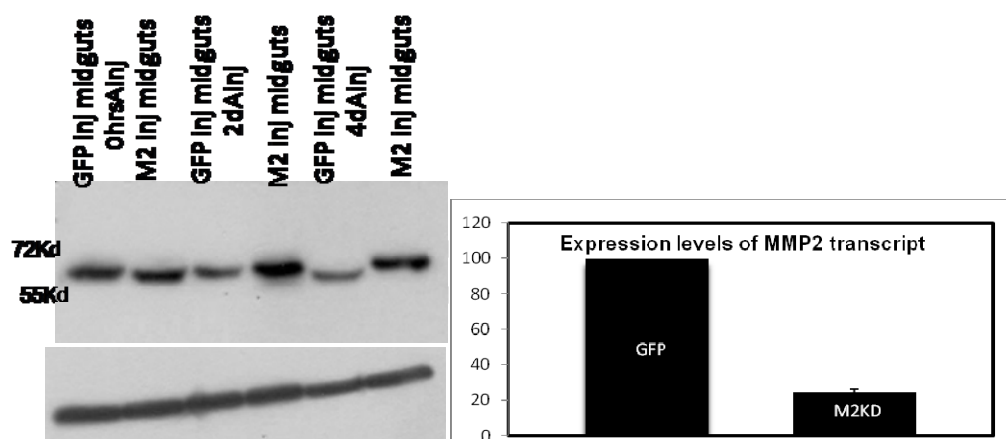
Αντίθετα το mpc αντίσωμα εντοπίζει το προϊόν μόνο όμως στα διαμολυσμένα κύτταρα όπου έχει προστεθεί δοξυκυκλίνη. Μάλιστα η έκφραση αυτού φαίνεται να εντοπίζεται κυρίως στην περιοχή γύρω από τον πυρήνα (σχ.13γ).



**Σχήμα 10.** Διαγραμματική απεικόνιση της πρωτεϊνικής δομής της MMP2. Αναγράφεται η περιοχή που επιλέχτηκε για την παραγωγή του αντιγόνου, το οποίο και φαίνεται μετά τον καθαρισμό του σε αποδιατακτικό πήκτωμα με χρώση Coomassie.



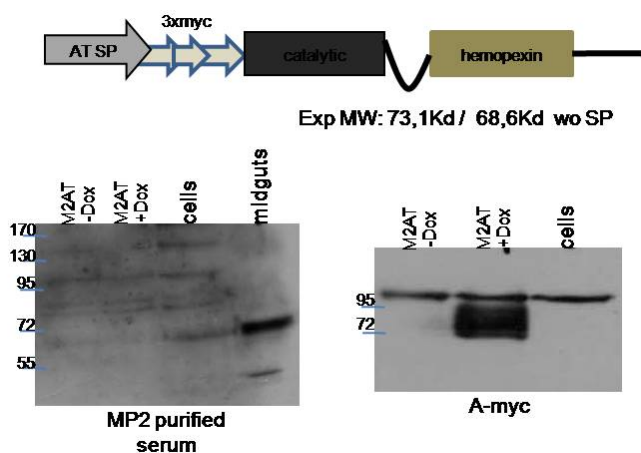
**Σχήμα 11** Α) Πρότυπο έκφρασης του πρωτεϊνικού προϊόντος (μεγέθους 60kd) που αναγνωρίζεται από τον MMP2 ορό με πειράματα ανοσοαποτύπωσης στον μεσεντερικό ιστό σε διαφορετικές χρονικές στιγμές (0,24,48 και 96 ώρες) μετά την λήψη αίματος απουσία και παρουσία παρασίτου. Β) Πρότυπο έκφρασης του μεταγράφου της MMP2, όπως προέκυψε μετά από 3 ανεξάρτητα μεταξύ τους πειράματα Real-timePCR στις ίδιες χρονικές στιγμές μετά τη λήψη αίματος απουσία και παρουσία παρασίτου.



**Σχήμα 12A)** Μεσεντερικοί ιστοί από κουνούπια ενεμένα με δίκλωνο RNA έναντι GFP και MMP2 απομονώθηκαν σε διαφορετικά χρονικά σημεία μετά την χορήγηση του δίκλωνου RNA (0 ώρες, 2 και 4 ημέρες) και αναλύθηκαν σε πείραμα ανοσοαποτύπωσης με τον MMP2 ορό Β) Έλεγχος των μεταγραφικών

επιπέδων του MMP2 γονιδίου στον μεσεντερικό ιστό 4 ημέρες μετά την χορήγηση δίκλωνου RNA έναντι MMP2. Στο διάγραμμα απεικονίζονται τα αποτελέσματα τριών ανεξαρτήτων μεταξύ τους πειραμάτων Real-timePCR.

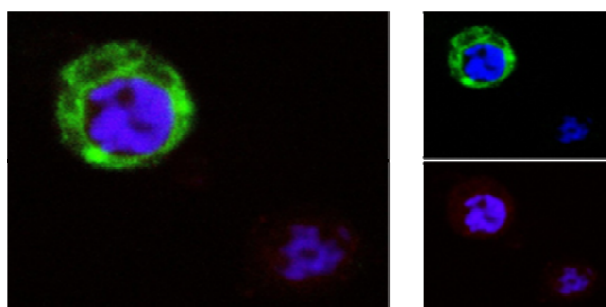
β)



**Σχήμα 13A)** Διαγραμματική

απεικόνιση της κατασκευής που χρησιμοποιήθηκε για επιμόλυνση των κυττάρων. Το ανασυνδισμένο γονίδιο που απεικονίζεται κλωνοποιήθηκε σε φορέα που φέρει ρυθμιστικά στοιχεία tetop

προκειμένου να εξασφαλιστεί η επαγόμενη έκφραση του με το σύστημα τετρακυκλίνης. Β) Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των διαμολυσμένων κυττάρων παρουσία και απουσία της δοξουκυκλίνης αναλύθηκαν σε



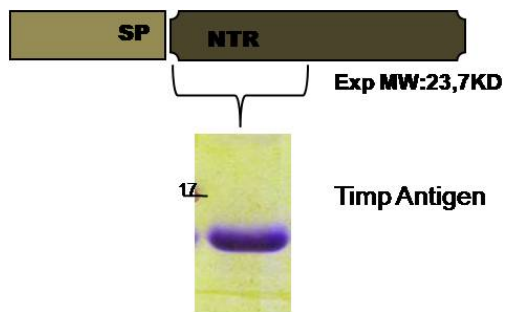
πειράματα ανοσοαποτύπωσης με αντίσωμα έναντι του επιτόπου myc και με τον καθαρισμένο ορό έναντι MMP2. Γ) το πείραμα της διαμόλυνσης αναλύθηκε και με ανοσοχρώση. Το myc αντίσωμα εντοπίζει το παραγόμενο προϊόν (πράσινο) σε διαμολυσμένα κύτταρα παρουσία της δοξουκυκλίνης. Το πρότυπο του ορού έναντι MMP2 δεν αλλάζει με την παρουσία της δοξουκυκλίνης. Το μπλε χρώμα αντιστοιχεί στην χρώση του πυρήνα (torpo).

## 2β.5 Ο ορός έναντι timp είναι ειδικός

Η περιοχή που επιλέχτηκε για την παράγωγη timp αντιγόνου αντιστοιχεί σε μέρος του inhibitory domain της πρωτεΐνης (σχ.14). Συγκεκριμένα με βάση βιβλιογραφικά δεδομένα από ομόλογους αναστολείς άλλων οργανισμών (*Drosophila*, άνθρωπο) η περιοχή αυτή θεωρείται αρκετή και απαραίτητη για να εξασφαλιστεί η ανασταλτική δράση του μορίου (Wei, Xie et al. 2003). Σε

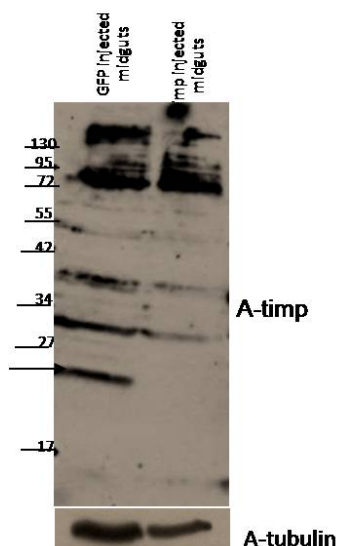


συμφωνία με τις παραπάνω αναφορές η περιοχή αυτή ονομάστηκε AgNtimp και διατηρεί όπως και στους άλλους οργανισμούς την χαρακτηριστική παρουσία πολλών αμινοξέων κυστεΐνης (CxCxCxx....Cxx....Cxx....CxCxCxCxCx...CxxCxxx). Όπως και με τα παραπάνω αντιγόνα το AgNtimpπαρήχθη σε βακτηριακά κύτταρα και απομονώθηκε μέσω της ουράς των έξι ιστιδινών που φέρει στο αμινοτελικό της άκρο. Ο ορός που προέκυψε μετά από ανοσοποίηση ζώων με το συγκεκριμένο αντιγόνο καθαρίστηκε έναντι του αντιγόνου του και δοκιμάστηκε σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης με μεσεντερικά εκχυλίσματα από κουνούπια ενεμένα με δίκλωνο RNA έναντι GFP και κουνούπια ενεμένα με δίκλωνο RNA έναντι timp. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν στο κεφάλαιο 2β.1 η μεταμεταγραφική σιώπηση του γονιδίου timp είναι επιτυχής κι επομένως περιμένει κανείς να είναι ανιχνεύσιμη και σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Όπως φαίνεται στο σχ.15ο καθαρισμένος ορός ανιχνεύει στα μεσεντερικά εκχυλίσματα των GFPενεμένων κουνουπιών ένα πρωτεϊνικό προϊόν μεγέθους περίπου 25Kd. Η ένταση αυτού του προϊόντος μειώνεται σημαντικά στα εκχυλίσματα των ds-timp ενεμένων κουνουπιών, παρόλο που τα δυο δείγματα φέρουν συνολικά το ίδιο πρωτεϊνικό φορτίο, όπως δείχνει επώαση τους με αντίσωμα τουμπουλίνης. Το μέγεθος του συγκεκριμένου προϊόντος συμφωνεί με το αναμενόμενο μέγεθος του αναστολέα (23,5Kd) και το γεγονός ότι μειώνεται σημαντικά μετά από την χορήγηση του δίκλωνου RNA συνηγορεί υπέρ της ειδικότητας του ορού. Ωστόσο ο καθαρισμένος ορός αναγνωρίζει στα μεσεντερικά εκχυλίσματα και άλλα πρωτεϊνικά προϊόντα η ένταση των οποίων δεν διαφοροποιείται μετά από τη μεταμεταγραφική αποσιώπηση.



**Σχήμα14** Διαγραμματική απεικόνιση της πρωτεϊνικής δομής του αναστολέα. Η περιοχή που επιλέχθηκε ως αντιγόνο αντιστοιχεί σε μέρος του NTRdomain του αναστολέα και φαίνεται στο

αποδιατακτικό πήκτωμα με χρώση Coomassie μετά τον καθαρισμό της από τα βακτηριακά εκχυλίσματα.



**Σχήμα 15** Μεσεντερικά εκχυλίσματα από κουνούπια ενεμένα με δίκλωνο GFP και timp σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης με τον καθαρισμένο ορό έναντι timp. Το πρωτεϊνικό προϊόν που αντιστοιχεί, βάσει μεγέθους, στον αναστολέα υποδεικνύεται με το βέλος. Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα ποσοτικοποιήθηκαν με αντίσωμα τουμπουλίνης.

## 2β.6 Συζήτηση

Όπως και με τις ADAMTSs έτσι και με τις MMPs και τον αναστολέα τους timp θεωρήθηκε απαραίτητη η ανάπτυξη αντισωμάτων και η εδραίωση της τεχνικής της μεταμεταγραφικής σιώπησης, προκειμένου να είναι δυνατό να προχωρήσει κανείς στον χαρακτηρισμό τους και τη διερεύνηση του λειτουργικού τους ρόλου.

Ξεκινώντας με την τεχνική του RNAi, επιλέχθηκε για κάθε μια από τις MMPs και για τον timp αναστολέα περιοχή αντίστοιχου μεγέθους με αυτή που χρησιμοποιήθηκε και για τις ADAMTSs προκειμένου να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή δίκλωνου RNA. Σε αντίθεση όμως με την περίπτωση των

ADAMTSs αποδείχτηκε ότι χορήγηση του δίκλωνου RNA έναντι των MMPs και του *timp* οδήγησε σε σημαντική πτώση των μεταγραφικών επιπέδων των γονιδίων στα μεσέντερα των κουνουπιών, όταν αυτά συγκρίθηκαν με τα μεταγραφικά επίπεδα των γονιδίων σε μεσέντερα κουνουπιών ενεμένων με δίκλωνο GFP. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι τουλάχιστον η τεχνική είναι εφικτή για την λειτουργική ανάλυση κάποιων από τις μεταλλοπρωτεάσες. Το γεγονός ότι δεν επιτύχαμε σιώπηση για τα ADAMTSγονίδια μπορεί τελικά πράγματι να οφείλεται στην δομή RNA των των γονιδίων ή στην συγκεκριμένη περιοχή που επιλέχτηκε για παραγωγή του δίκλωνου RNA.

Η παρουσία δίκλωνου RNA φαίνεται να έχει κάποιες φορές μη επιθυμητά αποτελέσματα στη μεταγραφική ρύθμιση άλλων γονιδίων πέραν του γονιδίου στόχου, θετικά ή αρνητικά. Μερική ομολογία του δίκλωνου RNAγια το γονίδιο στόχο με τα γονίδια αυτά θα μπορούσε να επηρεάσει αρνητικά τα επίπεδα των αντίστοιχων RNA(Naito, Yoshimura et al. 2009).Εκτοπη ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων, λόγω της σιώπησης του γονιδίου στόχου, μπορεί να οδηγήσει στην αύξηση της μεταγραφικής δραστηριότητας των γονιδίων που αυτοί ελέγχουν(Svoboda 2007). Σε άλλες περιπτώσεις έχει βρεθεί ότι σιώπηση ενός γονιδίου μπορεί να επηρεάσει τα μεταγραφικά επίπεδα ενός ή περισσότερων γονιδίων με τα οποία συμμετέχουν στα ίδια ρυθμιστικά μονοπάτια. Για παράδειγμα σιώπηση του αναστολέα μεταλλοπρωτεασών *timp-1* σε ηπατικές κυτταρικές σειρές οδήγησε στην αύξηση των μεταγραφικών επιπέδων της μεταλλοπρωτεάσης 13(Cong, Liu et al. 2009).

Προκειμένου να αποκλειστεί λοιπόν το ενδεχόμενο όπου αποσιώπηση της μιας MMP επηρεάζει τα μεταγραφικά επίπεδα της άλλης, ή του *timp* αναστολέα στον μεσεντερικό ιστό, ελέγχθηκαν τα μεταγραφικά επίπεδα και των τριών γονιδίων μετά από τη χορήγηση δίκλωνου RNA έναντι καθενός από αυτά. Τα αποτελέσματα αυτά όμως δεν έδειξαν σε μεταγραφικό τουλάχιστον επίπεδο να υπάρχει συν-ρύθμιση μεταξύ των τριών γονιδίων. Πρέπει βέβαια να τονιστεί ότι δεν είναι γνωστό κατά πόσο επηρεάζεται η MMP3 από τη σιώπηση των άλλων δύο MMPs και του *timp* αναστολέα, αφού η μελέτη του συγκεκριμένου γονιδίου δεν περιλήφθηκε από την αρχή στην συγκεκριμένη εργασία.

Σε ότι αφορά την ανάπτυξη και την πιστοποίηση της ειδικότητας των αντισωμάτων βοήθησε σημαντικά το γεγονός ότι η έκφραση και των τριών

γονιδίων μειώνονταν σημαντικά μετά την χορήγηση δίκλωνου RNA. Ανάλογη μείωση επομένως περιμένει κανείς να δει και σε πρωτεϊνικό επίπεδο, εκτός και αν ο χρόνος ημιζωής τους είναι μεγάλος. Στην περίπτωση πάντως και της MMP1 και του *timp* εντοπίστηκαν σε μεσεντερικά εκχυλίσματα πρωτεϊνικά προϊόντα του αναμενόμενου μοριακού μεγέθους που μειωνόταν αισθητά μετά από χορήγηση δίκλωνου RNA έναντι των δύο γονιδίων. Πρέπει να σημειωθεί ότι ο ορός έναντι του αναστολέα αναγνωρίζει στα μεσεντερικά εκχυλίσματα κι άλλα πρωτεϊνικά προϊόντα μεγαλύτερου μοριακού μεγέθους από το αναμενόμενο, η έκφραση όμως των οποίων δεν φαίνεται να διαφοροποιείται μετά από την χορήγηση δίκλωνου RNA έναντι *timp*.

Στην περίπτωση της MMP1 ο ορός αναγνωρίζει στα μεσεντερικά εκχυλίσματα δυο πρωτεϊνικά προϊόντα που βάσει μεγέθους αντιστοιχούν στο προζυμογόνο και στο ζυμογόνο της μεταλλοπρωτεάσης, δείχνοντας ότι μεταμεταγραφικά η πρωτεΐνη αυτή παρουσιάζει το γνωστό πρότυπο ενεργοποίησης που έχει ήδη περιγραφεί για τις MMPs.

Σε ότι αφορά τον MMP2 ορό αντίθετα ο συνδιασμός γονιδιακής σιώπησης και ανοσοαποτύπωσης, υπέδειξε ότι ήταν μάλλον μη ειδικός, μια και η γονιδιακή σιώπηση δεν οδήγησε σε αναμενόμενη μείωση της πρωτεΐνης, πράγμα που επιβεβαιώθηκε και με την έκτοπη έκφραση του MMP2 γονιδίου σε αιμοκυτταρικές σειρές κουνουπιών. Σε αυτή τη περίπτωση ο ορός δεν αναγνώρισε ούτε σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης ούτε σε πειράματα ανοσοιστοχημείας το έκτοπα εκφρασμένο προϊόν, παρόλο που αντίσωμα έναντι του επιτόπου *myc* με το οποίο έκτοπα εκφρασμένη MMP2 ήταν σημασμένη, αναγνώρισε προϊόν αναμενόμενου μοριακού μεγέθους στο κυτταρόπλασμα των διαμολυσμένων κυττάρων, συγκεντρωμένο κυρίως στην περιοχή γύρω από τον πυρήνα. Το γεγονός αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο συγκεκριμένος ορός δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί περαιτέρω στην λειτουργική ανάλυση και χαρακτηρισμό του μορίου.

Σε αντίστοιχα πειράματα έκτοπης έκφρασης της MMP1 στις κυτταρικές σειρές φάνηκε ότι το έκτοπα εκφρασμένο πρωτεϊνικό προϊόν, είναι μόνο το προζυμογόνο, δηλαδή δεν παράγεται ζυμογόνο μέσω απομάκρυνσης του σηματοδοτικού πεπτιδίου και του προπεπτιδίου όπως συμβαίνει στο μεσέντερο. Μάλιστα τα πειράματα της ανοσοιστοχημείας δείχνουν ότι το έκτοπα εκφρασμένο προζυμογόνο συγκεντρώνεται στο κυτταρόπλασμα των

διαμολυσμένων κυττάρων, πιθανά στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Τα παραπάνω υποδεικνύουν ότι η έκφραση ολόκληρου του αναγνωστικού πλαισίου του γονιδίου της MMP1 στη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά δεν οδηγεί στην επιθυμητή μεταμεταφραστική τροποποίηση της πρωτεΐνης. Εφόσον είμαστε σίγουροι για την αλληλουχία του εκφρασμένου cDNA, μπορεί κανείς να υποθέσει ότι η μη απομάκρυνση του προπεπτιδίου και η συσσώρευση κατά συνέπεια της πρωτεΐνης στα διαμολυσμένα κύτταρα μπορεί να οφείλεται στην απουσία από τα κύτταρα της πρωτεάσης που είναι υπεύθυνη για την απομάκρυνση του προπεπτιδίου στο μεσέ. Τέτοιες πρωτεάσες ανήκουν στην οικογένεια των pro-proteinconvertases κι ένας χαρακτηριστικός αντιπρόσωπος τους είναι η furin. Όπως έχει ήδη δειχθεί (Wu, Munshi et al. 2007) μη απομάκρυνση του προπεπτιδίου της διαμεμβρανικής MT-MMP1 του ανθρώπου λόγω αναστολής της δράσης της υπεύθυνης για την ενεργοποίηση της πρωτεάσης οδήγησε σε συσσώρευση του ανενεργού προζυμογόνου της μεταλλοπρωτεάσης σε ενδοσώματα του κυττάρου και εκτενή γλυκοζυλίωση της. Κατά αντιστοιχία είναι πιθανό οι αιμοκυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν για την διαμόλυνση να μην εκφράζουν την κατάλληλη pro-proteinconvertase που ενεργοποιεί την MMP1 στα μεσεντερικά επιθηλιακά κύτταρα, με αποτέλεσμα την έκφραση τελικά ενός ανενεργού μορίου που δεν μπορεί να οδηγηθεί στην κυτταρική μεμβράνη.

## Παράρτημα

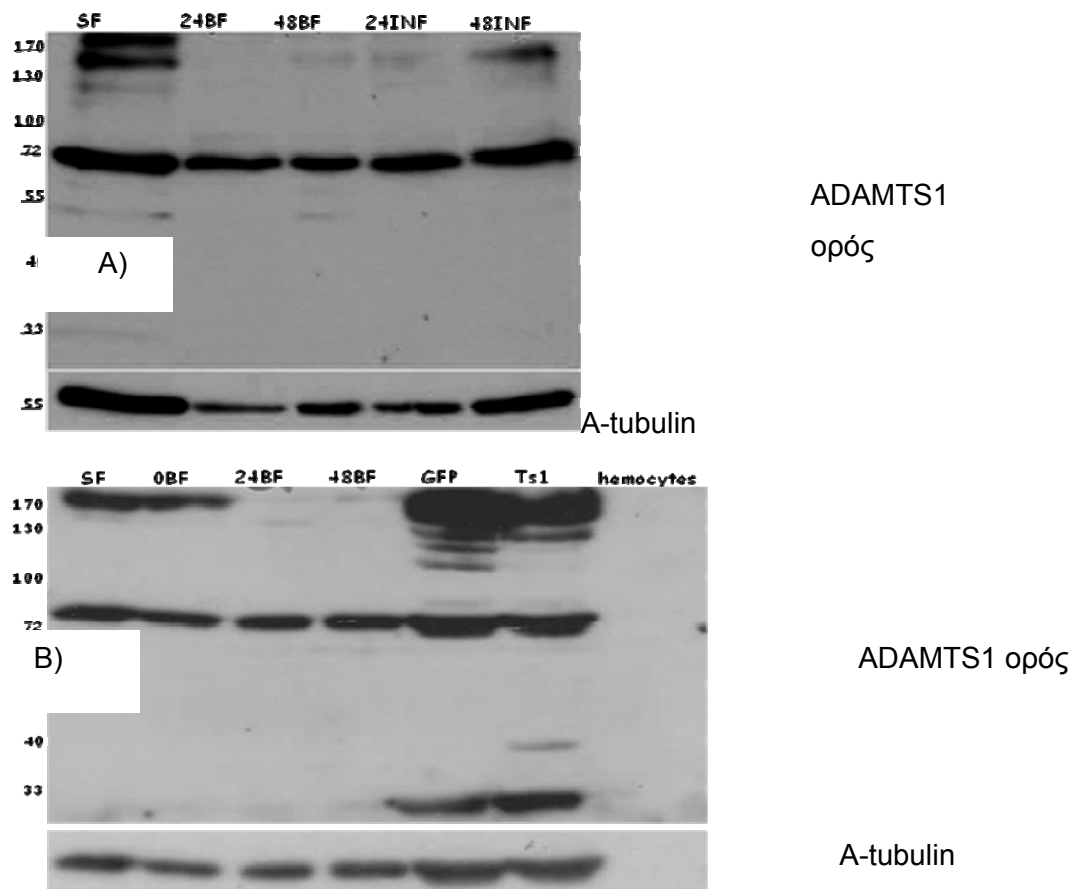
### ADAMTS1 ορρός

Η ADAMTS1 του Ανωφελούς προβλέπεται να έχει μοριακό μέγεθος της τάξης των 100Kd, ενώ μετά την απομάκρυνση του προπεπτιδίου το παραγόμενο πρωτεϊνικό προϊόν έχει μοριακό μέγεθος 90Kd. Συνδυάζοντας τις πληροφορίες που υπάρχουν για αυτό το μόριο από το μεταγραφικό πρότυπο έκφρασης του, θα περίμενε κανείς τα επίπεδα της πρωτεΐνης που εκφράζονται από το συγκεκριμένο γονίδιο να μειώνονται σημαντικά 24ωρες μετά από την χορήγηση μολυσμένου αίματος, στο μεσέντερο του κουνουπιού. Πειράματα ανοσοαποτύπωσης σε εκχυλίσματα από μεσέντερα κουνουπιών 24 και 48 ώρες μετά τη χορήγηση αίματος παρουσία και απουσία παρασίτου, καθώς και σε μεσέντερα κουνουπιών που δεν είχαν τραφεί με αίμα ωστόσο έδειξαν ότι ο ορρός δεν αναγνωρίζει κανένα πρωτεϊνικό προϊόν μεγέθους 90-100Kd. Αντίθετα αναγνωρίζει έντονα ένα πρωτεϊνικό προϊόν μεγέθους περίπου 72Kd, η ποσότητα του οποίου όμως παραμένει αμετάβλητη σε όλα τα παραπάνω πρωτεϊνικά δείγματα (σχ.1A). Να αναφερθεί ότι τα δείγματα αυτά έφεραν ίδια ποσότητα συνολικής πρωτεΐνης, όπως έδειξε στο ίδιο πείραμα ανοσοαποτύπωσης επώαση με αντίσωμα έναντι τουμπουλίνης, μιας πρωτεΐνης του κυτταρικού σκελετού η έκφραση της οποίας δεν μεταβάλλεται σημαντικά μεταξύ διαφορετικών συνθηκών.

Επιπρόσθετα κουνούπια ενέθηκαν, με δίκλωνο RNA έναντι GFP κι έναντι ADAMTS1 και τα εκχυλίσματα τους χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης. Ανάλυση εκχυλισμάτων από σώματα των παραπάνω κουνουπιών με τον συγκεκριμένο ορρό έδειξε ότι αυτός αναγνωρίζει και στα εκχυλίσματα από σώματα κουνουπιών πρωτεϊνικό προϊόν μεγέθους 72Kd, όπως και στην περίπτωση των μεσεντέρων. Η ποσότητα όμως του πρωτεϊνικού αυτού προϊόντος δεν φαίνεται να διαφοροποιείται μετά από σιώπηση του ADAMTS1 γονιδίου. Αντίθετα η χορήγηση δίκλωνου RNA έναντι ADAMTS1 φαίνεται να μειώνει την έκφραση δυο πρωτεϊνικών προϊόντων, το μέγεθος των οποίων σύμφωνα με τον πρωτεϊνικό μάρτυρα είναι μικρότερο από 130 και μεγαλύτερο από 100Kd, διαφορετικό δηλαδή και πάλι από το αναμενόμενο για την ADAMTS1 (σχ.1B). Να σημειωθεί ότι τα δυο αυτά πρωτεϊνικά προϊόντα δεν αναγνωρίζονται από τον ορρό σε μεσεντερικά εκχυλίσματα, αλλά ούτε και σε εκχυλίσματα από σώματα κουνουπιών 24 και

48 ώρες μετά από αιματοφαγία στο ίδιο πείραμα ανοσοαποτύπωσης. Η βασική διαφορά των εκχυλισμάτων από τα σώματα των ενεμένων κουνουπιών και των υπολοίπων δειγμάτων είναι ότι τα πρώτα περιέχουν πολύ περισσότερη πρωτεΐνη, όπως αποκαλύπτεται μετά από επώαση με αντίσωμα τουμπουλίνης. Επιπλέον, ο ορός δεν αναγνωρίζει κανένα πρωτεϊνικό προϊόν σε εκχυλίσματα από αιμόλεμφο κουνουπιών.

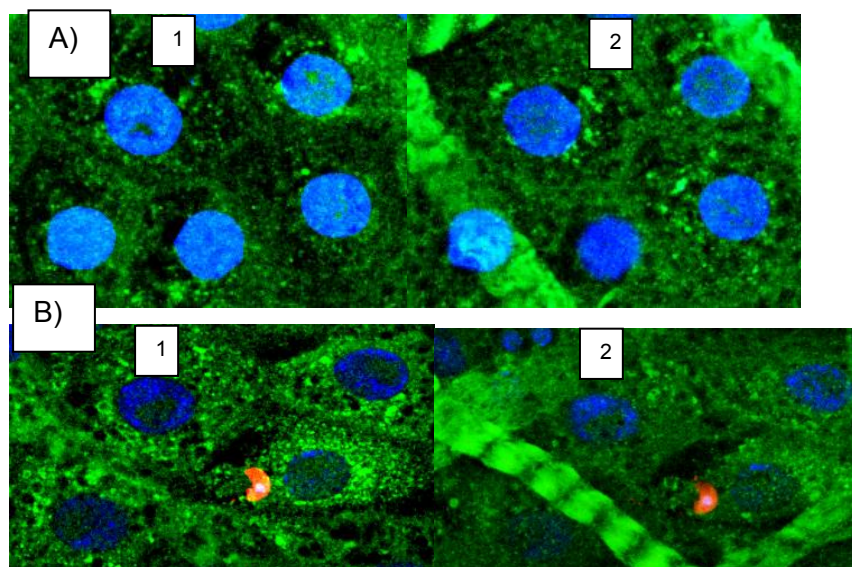
Τέλος, ο ορός ADAMTS1 ελέγχθηκε και σε πειράματα ανοσοφθορισμού έναντι μεσεντερικού ιστού. Μεσεντερικά επιθήλια 24 ώρες μετά τη λήψη αίματος παρουσία ή μη παρασίτου επώαστηκαν με ADAMTS1 ορό και παρατήρηση τους σε μικροσκόπιο φθορισμού έδειξε ότι το ανοσοαντιδρόν υλικό που αναγνωρίζει ο ορός εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα των επιθηλιακών κυττάρων του μεσεντέρου και στους μύες που περιβάλλουν τη βασική πλευρά του( σχημα2). Η ένταση του σήματος, αλλά και η θέση του ανοσο-αντιδρόντος υλικού δεν διαφοροποιείται μεταξύ των διαφορετικών καταστάσεων (παρουσία-απουσία παρασίτου).



### Σχήμα1.ΕιδικότηταορούADAMTS1

A) έναντι εκχυλισμάτων από μεσέντερα κουνουπιών που δεν έχουν φάει αίμα και από μεσέντερα κουνουπιών 24 και 48 ώρες μετά από αιματοφαγία παρουσία ή απουσία παρασίτου. Το πρωτεϊνικό περιεχόμενο των δειγμάτων φαίνεται από την επώαση με αντίσωμα τουμπουλίνης

B)έναντι εκχυλισμάτων από σώματα και αιμόλεμφο κουνουπιών που δεν έχουν φάει αίμα και από σώματα κουνουπιών 24 και 48 ώρες μετά από αιματοφαγία. Στο ίδιο πείραμα επωάστηκαν με τον ίδιο ορρό και εκχυλίσματα από σώματα κουνουπιών ενεμένα με δίκλωνο RNA έναντι GFP και ADAMTS1. Όπως αποκαλύπτει και το αντίσωμα τουμπουλίνης τα δυο τελευταία δείγματα περιέχουν πολύ περισσότερη πρωτεΐνη από τα προηγούμενα. Να σημειωθεί ότι το αντίσωμα τουμπουλίνης δεν δίνει σήμα στο δείγμα της αιμολέμφου.



Σχημα2εντοπισμός του ανοσο-αντιδρόντος υλικού με αντι-ADAMTS1 ορρό (πράσινο) με ανοσοχρώση και χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας. Στο πείραμα αυτό έγινε ταυτόχρονη χρώση με torpo (μπλε) και a-Pbs21 (κόκκινο) A) Εντοπισμός σε επιθηλιακά κύτταρα του μεσεντερικού ιστού στην κορυφαία(1) και την βασική πλευρά τους (2) 24 ώρες μετά την λήψη αίματος. B)Εντοπισμός σε επιθηλιακά κύτταρα του μεσεντέρου στην κορυφαία (1) και την βασική(2) πλευρά τους 24 ώρες μετά την λήψη μολυσμένου αίματοςμεσεντερου στην



κορυφαία (1) και την βασική(2) πλευρά τους 24 ώρες μετά την λήψη μολυσμένου αίματος

### ADAMTS2 ορός

Οι ADAMTS2 ορροί που παρήχθησαν θα έπρεπε να αναγνωρίζουν σε εκχυλίσματα από ιστούς κουνουπιών πρωτεϊνικά προϊόντα που να αντιστοιχούν στα τέσσερα εναλλακτικά μετάγραφα του ADAMTS2 γονιδίου. Τα τέσσερα εναλλακτικά μετάγραφα του γονιδίου ADAMTS2 δίνουν τέσσερα πρωτεϊνικά προϊόντα μοριακού μεγέθους 167, 162, 156 και 150kd αντίστοιχα για τις ισομορφές A, B, Γ και Δ. Το μοριακό μέγεθος των προϊόντων αυτών μετά από την απομάκρυνση του προπεπτιδίου μειώνεται κατά 10Kd. Σύμφωνα με το μεταγραφικό πρότυπο του γονιδίου που περιγράφηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο οι ισομορφές Γ και Δ κι επομένως και τα πρωτεϊνικά τους προϊόντα (156, 150kd) θα πρέπει να εντοπίζονται στον μεσεντερικό ιστό και στα σώματα των κουνουπιών, ενώ οι ισομορφές A και B και τα προϊόντα τους (167, 162kd) θα πρέπει να εντοπίζονται μόνο στο σώμα του κουνουπιού. Για να διαπιστωθεί αν ισχύουν τα παραπάνω οι δυο ορροί δοκιμάστηκαν σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης με πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από μεσέντερα και σώματα κουνουπιών.

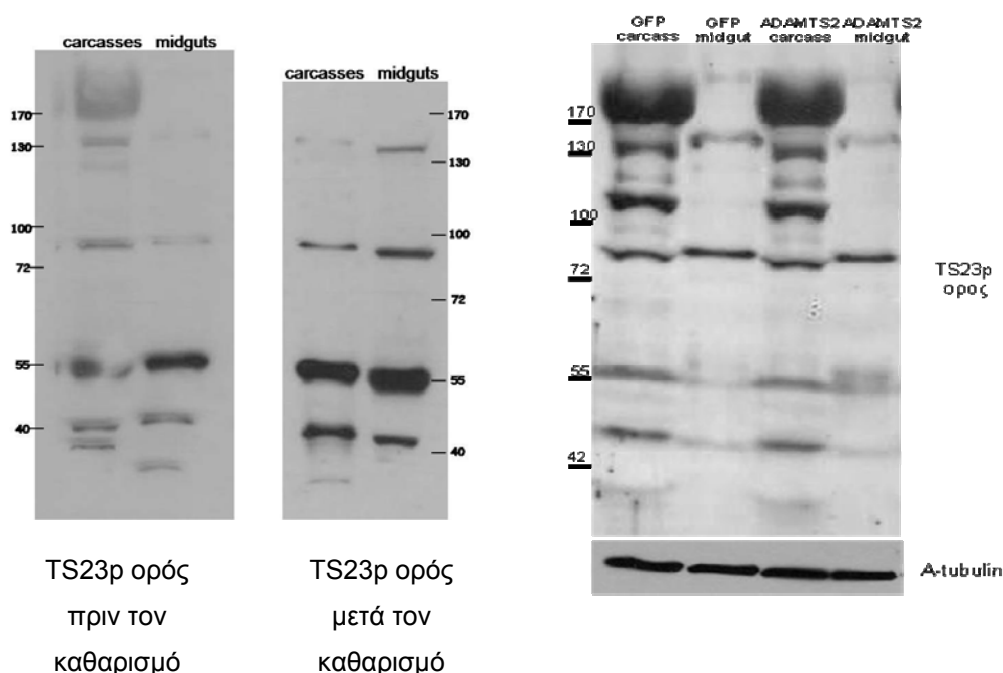
Στην περίπτωση του ορρού που προέκυψε από το TS23pAg αναγνωρίζονται πρωτεϊνικά προϊόντα στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από σώματα κουνουπιών, και προϊόντα μικρότερα από τα παραπάνω τόσο στα μεσεντερικά εκχυλίσματα, όσο και στα εκχυλίσματα από τα σώματα (σχ3). Σύμφωνα με τα παραπάνω θα μπορούσαν τα πρωτεϊνικά προϊόντα που αναγνωρίζονται μόνο στα σώματα των κουνουπιών να αντιστοιχούν στις ισομορφές A και B, ενώ το μικρότερο πρωτεϊνικό προϊόν που εντοπίζεται και στα δυο πρωτεϊνικά εκχυλίσματα να αντιστοιχεί στις ισομορφές Γ και Δ.

Μετά από καθαρισμό του ορρού έναντι του αντιγόνου και χρησιμοποίηση του σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης έναντι των ίδιων πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων (σχ3) το πρωτεϊνικό πρότυπο των εκχυλισμάτων δεν φαίνεται να διαφέρει σημαντικά. Συγκεκριμένα, αναγνωρίζεται και στα δυο πρωτεϊνικά εκχυλίσματα μόνο το μικρότερο πρωτεϊνικό προϊόν, αυτό δηλαδή που θα μπορούσε βάσει μεγέθους να αντιστοιχεί στις ισομορφές Γ και Δ (η διαφορά

μεγέθους μεταξύ των δυο προϊόντων είναι πολύ μικρή για να γίνει διακριτή σε αποδιατακτικό πήκτωμα). Επιπλέον αναγνωρίζονται τόσο πριν, όσο και μετά από τον καθαρισμό έναντι αντιγόνου πρωτεϊνικά προϊόντα μικρότερου μοριακού μεγέθους(100-72kd, 55Kd και 42Kd). Αυτά θα μπορούσαν να αντιστοιχούν σε προϊόντα πρωτεόλυσης.

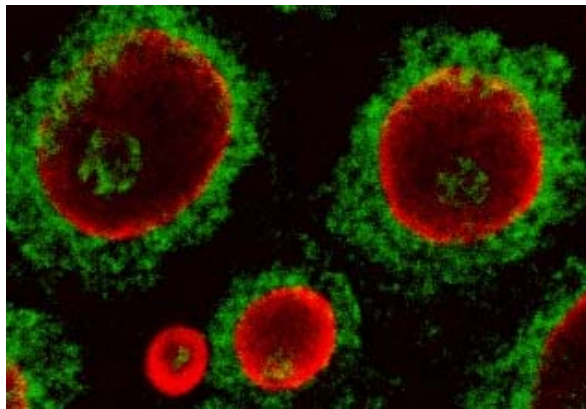
Εγιναν επίσης πειράματα ανοσοαποτύπωσης με εκχυλίσματα από σώματα και μεσέντερα κουνουπιών ενεμένων με δίκλωνων RNA έναντι ADAMTS2. Το πρότυπο που έδωσε ο ορός σε αυτά τα εκχυλίσματα συγκρίθηκε με το πρότυπο που έδωσε σε εκχυλίσματα των ίδιων ιστών από κουνούπια ενεμένα με δίκλωνο GFP. Στο πείραμα αυτό δεν χρησιμοποιήθηκε ο καθαρισμένος ορός. Όπως φαίνεται στο σχήμα 3 η ένταση των πρωτεϊνικών προϊόντων, τόσο των μεγαλομοριακών, όσο και των μικρότερων, που αναγνωρίζει ο ορός δεν φαίνεται να διαφέρει μεταξύ των κουνουπιών των ενεμένων με δίκλωνο RNA έναντι GFP ή ADAMTS2.

Τέλος ο TS23p ορός ελέγχθηκε και σε πειράματα ανοσοφθορισμού με μεσεντερικούς ιστούς 24 ώρες μετά την λήψη αίματος. Όπως φαίνεται και από το σχήμα4, το ανοσοαντιδρών υλικό που αναγνωρίζει ο ορός φαίνεται να εντοπίζονται στο ενδοπλασματικό κυρίως δίκτυο των επιθηλιακών κυττάρων του μεσεντερου.



**Σχήμα3** Πρωτεϊνικό πρότυπο ορού TS23p σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης με εκχυλίσματα από μεσέντερα και σώματα κουνουπιών πριν και μετά τον καθαρισμό έναντι του αντιγόνου. Ο καθαρισμός του ορού δεν διαφοροποιεί σημαντικά τα πρωτεϊνικά προϊόντα που αυτός αναγνωρίζει.

Γ) Πειράματα ανοσοαποτύπωσης με εκχυλίσματα από σώματα και μεσέντερα κουνουπιών μετά από σιωπή του γονιδίου ADAMTS2 με δίκλωνο RNA. Σύγκριση του πρωτεϊνικού προτύπου που αναγνωρίζεται σε αυτά τα εκχυλίσματα από τον TS23p ορό σε σχέση με πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από κουνούπια ενεμένα με δίκλωνο GFP. Η ένταση των πρωτεϊνικών προϊόντων μεταξύ των δυο διαφορετικών ομάδων (ενωμένων με δίκλωνο GFP και δίκλωνο ADAMTS2) παραμένει ίδια.



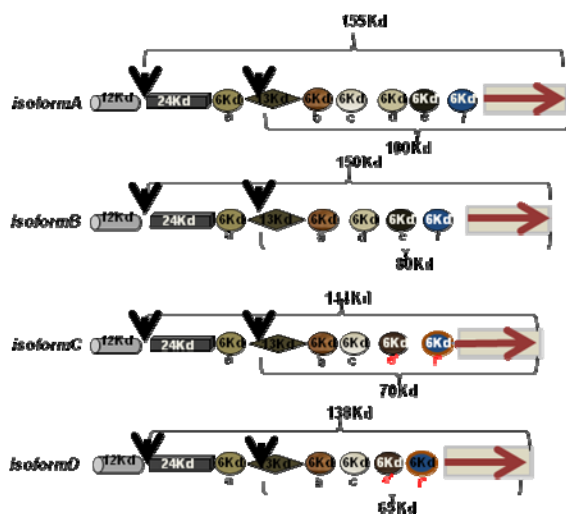
**Σχήμα4** Εντοπισμός του TS25p ορού ειδικού υλικού (πράσινο) σε επιθηλιακά κύτταρα μεσεντερικού ιστού 24ωρες μετά την λήψη αίματος με χρήση ανοσοιστοχημείας και συνεστιακής μικροσκοπίας. Συγχρώση με  $\alpha$ -Histone αντίσωμα

(κόκκινο).

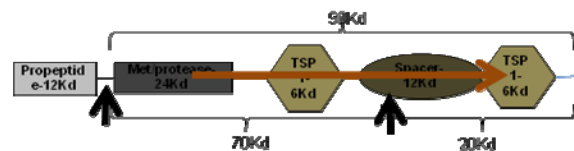
Στην οικογένεια πρωτεϊνών των ADAMTSs έχουν αναφερθεί πολλές περιπτώσεις μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων, όπως γλυκοζυλιώσεις, αλλά και πρωτεολύσεις. Είναι πιθανό και οι ADAMTSs του Ανωφελούς να υφίστανται παρόμοιες τροποποιήσεις, που θα μετέβαλλαν τα αναμενόμενα μεγέθη των ADAMTSπροϊόντων. Αν λάβει κανείς υπόψη τα βιβλιογραφικά δεδομένα, που αναφέρθηκαν για την ADAMTS4 του ανθρώπου, πιθανή θέση πρωτεόλυσης για τις ADAMTSs είναι η περιοχή πριν ή μέσα στο spacerdomain. Βάσει αυτού μπορεί κανείς να υπολογίσει τα προβλεπόμενα μοριακά μεγέθη των αμονοτελικών και καρβοξυτελικών πιθανών προϊόντων πρωτεόλυσης των ADAMTS1 και 2, όπως φαίνεται στο σχήμα 5 και να τα συγκρίνει με τα μοριακά μεγέθη των προϊόντων που οι οροί αναγνωρίζουν. Στην περίπτωση του ADAMTS1 ορού το κυριότερο πρωτεϊνικό προϊόν που

αναγνωρίζεται είναι περίπου 75 Kd. Σε ορισμένα μάλιστα πρωτεϊνικά δείγματα με πλούσιο πρωτεϊνικό περιεχόμενο ο ADAMTS1 ορός αναγνωρίζει επιπλέον πρωτεϊνικά προϊόντα μεγέθους 50 και 30Kd. Επομένως σύμφωνα με το σχήμα 20 και δεδομένου ότι ο συγκεκριμένος ορός μπορεί θεωρητικά να αναγνωρίζει και τα δυο μέρη της πρωτεΐνης που προκύπτουν από πιθανή πρωτεόλυση, θα μπορούσε κανείς να ισχυριστεί ότι τα δυο πρωτεϊνικά προϊόντα που αναγνωρίζονται στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα (70 και 30Kd) θα μπορούσαν βάσει μεγέθους να προέρχονται από την ADAMTS1.

Αντίστοιχα ο TS23p ορός αναγνωρίζει τόσο πριν όσο και μετά τον καθαρισμό του έναντι αντιγόνου ένα πρωτεϊνικό προϊόν μεγέθους περίπου 100Kd, αλλά και μικρότερα μεγέθους 50 και 40Kd. Τα προϊόντα αυτά μάλιστα φαίνεται να αναγνωρίζονται στα εκχυλίσματα από σώματα, αλλά και από μεσέντερα κουνουπιών. Σύμφωνα ωστόσο με τα μεγέθη που φαίνονται στο σχήμα 20 και δεδομένου ότι ο TS23p ορός μπορεί θεωρητικά να αναγνωρίσει μονό τα καρβοξυτελικό άκρο του μορίου, κανένα από τα προϊόντα που αναγνωρίζονται στα πειράματα ανοσοαποτύπωσης δεν θα μπορούσε να αντιστοιχεί βάσει μεγέθους στα υποτιθέμενα πρωτεολυτικά προϊόντα των τεσσάρων ισομορφών. Επομένως είτε ο ορός δεν είναι ειδικός, είτε λαμβάνει χώρα στο μόριο αυτό πρωτεόλυση σε κάποιο άλλο σημείο του. .



Πιθανά σημεία πρωτεόλυσης ADAMTS2



Πιθανά σημεία πρωτεόλυσης ADAMTS1

**Σχημα5** Σχηματική απεικόνιση της δομής των πρωτεϊνών ADAMTS1 και ADAMTS2, όπως έχει ήδη περιγράψει σε προηγούμενο κεφαλαίο. Τα μαύρα βέλη δείχνουν πιθανά σημεία πρωτεόλυσης των μορίων, σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα. Στις αγκύλες αναφέρονται τα μοριακά μεγέθη των παραγομένων προϊόντων που θα πρέπει να αναγνωρίζονται από τους ορούς (τα αντιγόνα από τα οποία αυτοί προέκυψαν υποδεικνύονται με το πορτοκαλί βέλος)

### **Κεφάλαιο 3**

## **Λειτουργική ανάλυση του γονιδίου MMP1 του οργανισμού *Anopheles gambiae***

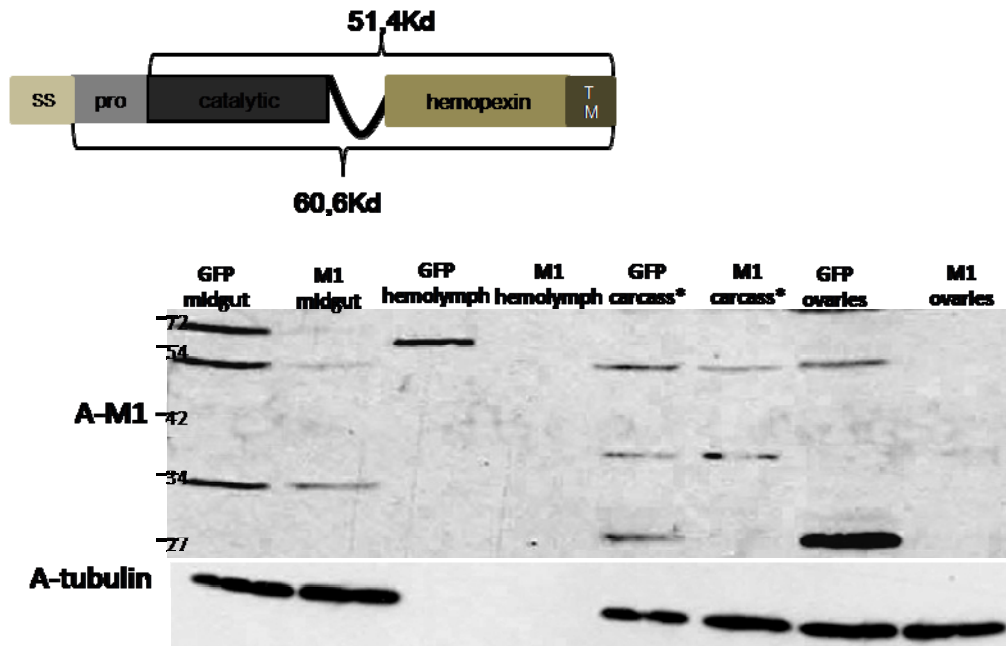
### **3.1.1 Το πρωτεϊνικό προϊόν του γονιδίου MMP1 παρουσιάζει διαφορετικό πρότυπο έκφρασης σε διαφορετικούς ιστούς του οργανισμού *Anopheles gambiae*.**

Προκειμένου να γίνει πλήρης λειτουργικός χαρακτηρισμός της MMP1 εξετάστηκε το πρότυπο έκφρασης της σε ένα εύρος ιστών του κουνουπιού. Τα κουνούπια χωρίστηκαν σε αιμόλεμφο/περιφερειακά αιμοκύτταρα, μεσέντερο, ωθήκες και υπόλοιπο σώμα (carcass).

Οι παραπάνω ιστοί απομονώθηκαν από κουνούπια ενεμένα με δίκλωνο RNA έναντι MMP1, είτε με δίκλωνο RNA έναντι GFP (δείγματα αναφοράς) και αναλύθηκαν σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης με το  $\alpha$ -MMP1 αντίσωμα. Τα αποτελέσματα των παραπάνω πειραμάτων επιβεβαίωσαν την έκφραση της πρωτεΐνης MMP1 στον μεσεντερικό ιστό με τη μορφή δύο πρωτεϊνών που με βάση τα μοριακά τους μεγέθη αντιστοιχούν στο προζυμογόνο και στο ζυμογόνο αντίστοιχα.

Τόσο στα εκχυλίσματα από ωθήκες όσο και από σώματα των κουνουπιών η MMP1 ανιχνεύεται στη μορφή του ζυμογόνου. Επιπρόσθετα όμως στα εκχυλίσματα που προέρχονται από μεσέντερα ή από τις ωθήκες και τα σώματα των κουνουπιών ανιχνεύονται με το αντι-MMP1 αντίσωμα πρωτεϊνικά προϊόντα μικρότερου μοριακού μεγέθους, 34Kd (μεσέντερα) και 27Kd (ωθήκες/carcasses). Τα προϊόντα αυτά σχετίζονται με την MMP1, καθώς τα επίπεδα τους μειώνονται μετά από χορήγηση δίκλωνου RNA ειδικού για MMP1 σε σχέση πάντα με τα επίπεδα τους στο δείγμα αναφοράς. Πρέπει όμως να σημειωθεί ότι η παρουσία τους όπως φαίνεται από επαναλήψεις των πειραμάτων ανοσοαποτύπωσης είναι τυχαία.

Στην αιμόλεμφο των κουνουπιών το  $\alpha$ -MMP1 αντίσωμα εντοπίζει μια μόνο πρωτεΐνη, το μοριακό μέγεθος της οποίας είναι μεταξύ εκείνων του προζυμογόνου και του ζυμογόνου. Η απόκλιση μεγέθους της MMP1 πρωτεΐνης της αιμόλεμφο από εκείνο του MMP1 προζυμογόνου και ζυμογόνου που ανιχνεύονται στο μεσέντερο δείχνει είτε την παρουσία μιας εναλλακτικής ισομορφής MMP1 στην αιμόλεμφο και τα περιφερειακά αιμοκύτταρα, είτε εναλλακτική πρωτεολυτική ωρίμανση.



**Σχημα1** Πείραμα ανοσοαποτύπωσης που επιβεβαιώνει το διαφορετικό πρότυπο έκφρασης της MMP1 στο μεσέντερο (midguts), στην αιμολεμφο (haemolymph) και στο σώμα του κουνουπιού (carcass), που δεν περιλαμβάνει τον μεσεντερικό ιστό και τις ωοθήκες. Συγκρίνεται το πρότυπο έκφρασης της πρωτεΐνης στους παραπάνω ιστούς από κουνούπια εννεμένα με δίκλωνο RNA έναντι MMP1 σε σχέση με κουνούπια εννεμένα με δίκλωνο GFP (δείγμα αναφοράς). Η ίση ποσότητα πρωτεϊνικού φορτίου μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων επιβεβαιώνεται με επώαση με αντίσωμα έναντι του μπουλίνης. Για το δείγμα της αιμολέμφου, όπου δεν εκφράζεται ο μπουλίνης η κανονικοποίηση των δειγμάτων έγινε με μέτρηση αυτών με Bradford

Τα ομόλογα γονίδια στην Δροσόφιλα και το *Tribolium castaneum* προβλέπεται να κωδικοποιούν δυο εναλλακτικά μετάγραφα εκ των οποίων το ένα αντιστοιχεί σε διαμεμβρανική πρωτεΐνη, όπως η μεσεντερική μορφή της MMP1 του Ανωφελούς, και το άλλο σε εκκρινόμενη. Τα παραπάνω ενίσχυσαν την υπόθεση της πιθανής ύπαρξης εναλλακτικού MMP1 μεταγράφου στον Ανωφελή.

Για τον λόγο αυτό διερευνήθηκε η EST database του Ανωφελούς για MMP1 σχετιζόμενα ESTs (<http://web.bioinformatics.ic.ac.uk/vectorbase/AnoEST.v8>).

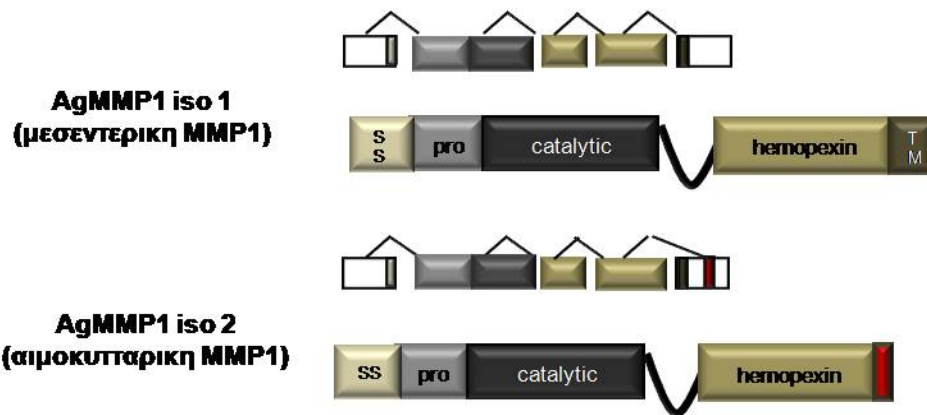


Φάνηκε ότι κάποιες αλληλουχίες ESTs που προέρχονταν από ενήλικα κουνούπια υποδείκνυαν την ύπαρξη ενός μεταγράφου που κωδικοποιούσε πρωτεϊνικό προϊόν με διαφορετικό καρβοξυτελικό άκρο από το ήδη προβλεπόμενο.

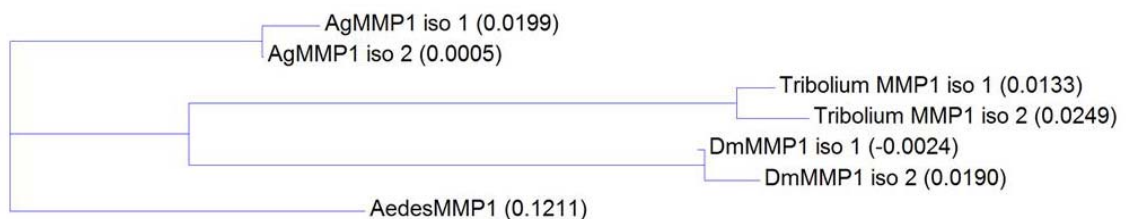
Σχεδιάστηκαν εκκινητές με βάση την παραπάνω αλληλουχία οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν σε αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης με μήτρα cDNA από αιμοκύτταρα και σώματα ενθλίκων θηλυκών κουνουπιών. Το προϊόν που προέκυψε από αυτές τις αντιδράσεις αλληλουχήθηκε και η αλληλουχία του έδειξε ότι πράγματι στα αιμοκύτταρα εκφράζεται ένα εναλλακτικό μετάγραφο της MMP1 στο οποίο το μάτισμα του τέταρτου εξονίου γίνεται με αλληλουχία του μη μεταγραφόμενου 3' άκρου του γονιδίου της MMP1. Το πρωτεϊνικό προϊόν που εκφράζεται από το συγκεκριμένο μετάγραφο έχει προβλεπόμενο μοριακό μέγεθος ίδιο με αυτό που εντοπίζεται στα αιμοκύτταρα, ενώ το καρβοξυτελικό του άκρο δεν κωδικοποιεί διαμεμβρανική περιοχή. Σχηματικά το εναλλακτικό μετάγραφο της MMP1 και του πρωτεϊνικού του προϊόντος που εκφράζεται στα αιμοκύτταρα παρουσιάζεται στο σχήμα 2A.

Η φυλογενετική σχέση των ομόλογων γονιδίων της MMP1 του Ανωφελούς στους οργανισμούς *Tribolium* και *Drosophila* παρουσιάζεται στο σχήμα 2B με τη μορφή δένδρογράμματος. Από αυτό γίνεται αντιληπτό ότι σε όλα τα έντομα στα οποία έχει μελετηθεί η MMP1, αυτή βρίσκεται με δύο μορφές, μια διαμεμβρανική και μια εκκρινόμενη, ενώ φαίνεται ότι η DmMMP1 είναι πιο κοντά φυλογενετικά στην MMP1 του *Tribolium castaneum*.

A.



B.



**Σχήμα 2A)** Διαγραμματική απεικόνιση της δομής των δυο εναλλακτικών μεταγράφων της MMP1 του Ανωφελούς και των πρωτεϊνικών προϊόντων που αυτά εκφράζουν. Να υπενθυμιστεί ότι η ισομορφή 1 (iso1) είναι το μετάγραφο που εντοπίζεται στο μεσεντερικό επιθήλιο του Ανωφελούς και κωδικοποιεί μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη μεγέθους 63,5kd, ενώ η ισομορφή 2(iso 2) είναι η ισομορφή που εκφράζεται στα αιμοκύτταρα και κωδικοποιεί μια εκκρινόμενη πρωτεΐνη μεγέθους 57,5Kd .

**B)** Φυλογενετικό δέντρο των ομόλογων γονιδίων της πρωτεάσης MMP1 του ανωφελούς στους οργανισμούς *Triboliumcastaneum*, *Drosophila melanogaster* και *Aedesegypti*. Το φυλογενετικό δέντρο έγινε με σύγκριση των πρωτεϊνικών αλληλουχιών των μεταγράφων κάθε οργανισμού και περιλαμβάνει και τα προϊόντα των εναλλακτικών ισομορφών, όπου αυτά

προβλέπονται. Η ισομορφή 1 (iso 1) αντιστοιχεί στην κάθε περίπτωση στο διαμεμβρανικό πρωτεϊνικό προϊόν, ενώ η ισομορφή 2 στο εκκρινόμενο πρωτεϊνικό προϊόν.

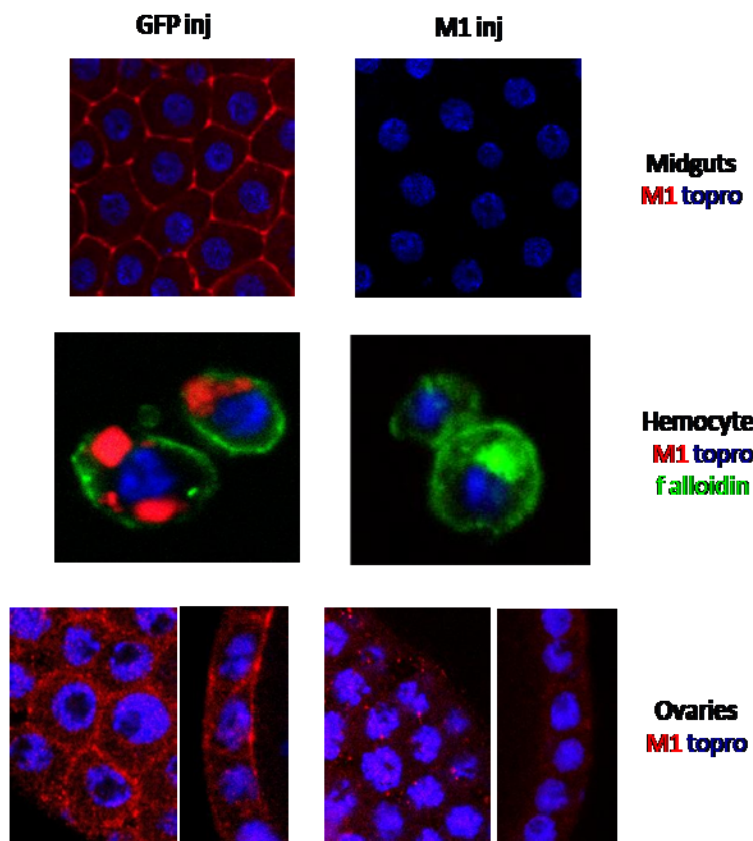
Τα πειράματα ανοσοαποτύπωσης συνοδεύτηκαν και με πειράματα ανοσοεντοπισμού, προκειμένου να αποκαλυφθεί η υποκυτταρική τοπολογία της MMP1 στους διαφορετικούς ιστούς και κυτταρικούς τύπους. Η απομόνωση των ιστών για τα πειράματα αυτά έγινε παράλληλα με την απομόνωση τους για τα πειράματα ανοσοαποτύπωσης.

Η ανάλυση των δειγμάτων έγινε με συνεστιακή μικροσκοπία και παρουσιάζεται στο σχήμα 3. Στον μεσεντερικό ιστό ο ανοσοεντοπισμός έδειξε ότι η πρωτεΐνη εκφράζεται μόνο στο δείγμα αναφοράς (μεσέντερα από κουνούπια ενεμένα με δίκλωνο GFP) κι εντοπίζεται κυρίως στις επιφάνειες επαφής/διασύνδεσης των επιθηλιακών κυττάρων (attachmentsites), καθώς και στο κυτταρόπλασμα αυτών. Παρόμοιο εντοπισμό εμφανίζει η MMP1 πρωτεάση και στις ωοθήκες των κουνουπιών στις επιφάνειες επαφής/διασύνδεσης των θυλακοκυττάρων (folliclecells) που περιβάλλουν τα τροφοκύτταρα (nursecells) και το αναπτυσσόμενο ωοκύτταρο.

Στα περιφερειακά αιμοκύτταρα της ίδιας ομάδας κουνουπιών η πρωτεάση MMP1 εμφανίζει διαφορετικό εντοπισμό. Εντοπίζεται συγκεντρωμένη μέσα στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων σε μεγάλα συσσωματώματα, τα οποία πιθανόν αντιστοιχούν σε υποκυτταρικά κυστίδια.

\

**Σχήμα 3** Μεσεντερικοί ιστοί (*midguts*), αιμοκύτταρα (*hemocytes*) και ωθήκες (*ovaries*) κουνουπιών ενεμεμένων με δίκλωνο RNA έναντι GFP (*GFP inj*) κι έναντι *MMP1* (*M1 inj*) αναλύθηκαν σε πειράματα ανοσοιστοχημείας με



συνεστιακή μικροσκοπία. Με κόκκινο εντοπίζεται η *MMP1* και με μπλε ο πυρήνας των κυττάρων και στους τρεις ιστούς. Το πράσινο αντιστοιχεί στην φοριζουσα χρωστική ή *Phalloidin* που διαγράφει τα ινίδια ακτινης. Η χρωστική αυτή χρησιμοποιήθηκε μόνο στο αιμοκυτταρικό δείγμα

, προκειμένου να αποκαλυφθούν τα όρια των κυττάρων.

Συμπερασματικά, η πρωτεάση *MMP1*, εκφράζεται σαν διαμεμβρανική πρωτεάση στα επιθηλιακά κύτταρα του μεσεντέρου και τα θυλακοκύτταρα και εντοπίζεται κυρίως στις επιφάνειες επαφής των κυττάρων, ενώ τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης και του ανοσοεντοπισμού συνηγορούν ότι η εναλλακτική ισομορφή της *MMP1* η οποία στερείται διαμεμβρανικού τμήματος, εκφράζεται αποκλειστικά στα αιμοκύτταρα και εντοπίζεται σε υποκυτταρικά συσσωματώματα.

### 3.1.2 Και οι δύο ισομορφές της *MMP1* του Ανωφελούς αντιστοιχούν σε ενεργή πρωτεάση

Προκειμένου να πιστοποιηθεί ότι οι δύο εναλλακτικές MMP1 ισομορφές που εκφράζονται στο μεσεντερικό επιθήλιο και στα περιφερικά αιμοκύτταρα αντίστοιχα έχουν ενεργότητα πρωτεάσης, εκχυλίσματα των ανωτέρω αναλύθηκαν με ζυμογραφία καζεΐνης απουσία αναγωγικού παράγοντα.

Στην ζυμογραφία τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτώματα πολυακρυλαμίδης που έχουν συμπολυμεριστεί με υποστρώματα όπως η καζεΐνη ή η ζελατίνη. Απομάκρυνση του αποδιατακτικού παράγοντα οδηγεί σε επαναδιάταξη των πρωτεασών και κατάλυση του υποστρώματος. Η πρωτεολυτική ενεργότητα ανιχνεύεται μετά από βάψιμο του πηκτώματος. Στις συνθήκες στις οποίες λαμβάνει χώρα η συγκεκριμένη διαδικασία ενεργοποιείται όχι μόνο το ζυμογόνο, αλλά και το πρόζυμογόνο της μεταλλοπρωτεάσης.

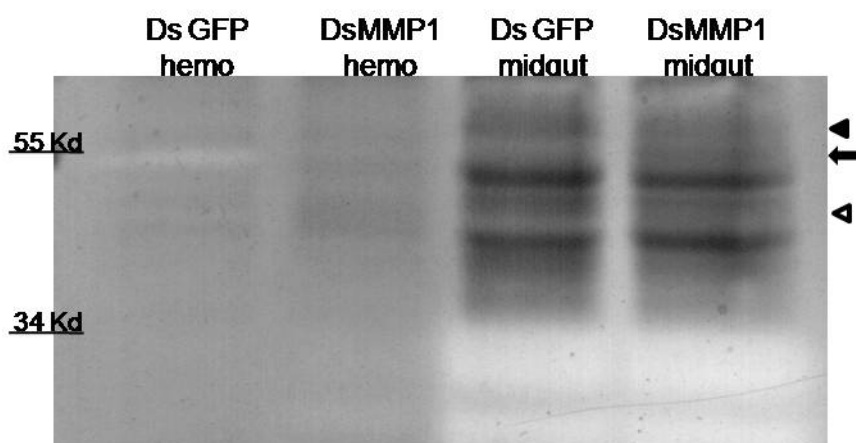
Δεδομένου ότι η καζεΐνη είναι ένα γενικό υπόστρωμα πρωτεασών, για να πιστοποιηθεί ποιές ζώνες καζεϊνολυτικής ενεργότητας αντιστοιχούν στις ισομορφές της MMP1 αναλύθηκαν συγκριτικά εκχυλίσματα περιφερικών αιμοκυττάρων και μεσεντέρων από κουνούπια στα οποία η έκφραση της MMP1 είχε σιωπηθεί με χορήγηση δίκλωνου RNA έναντι MMP1, και αντίστοιχα εκχυλίσματα από κουνούπια τα οποία είχαν ενεθεί με δίκλωνο RNA έναντι GFP(δείγματα αναφοράς) .

Χρώση του πηκτώματος με Coomassie αποκάλυψε καζεϊνολυτική ενεργότητα σε ζώνες με μοριακά μεγέθη αναμενόμενα για το προζυμογόνο και την μεσεντερική μορφή του ζυμογόνου της MMP1, στα εκχυλίσματα από μεσέντερο, καθώς επίσης και για την αιμοκυτταρική MMP1 ισομορφή στα εκχυλίσματα από αιμόλεμφο. Στα αντίστοιχα εκχυλίσματα από κουνούπια στα οποία η έκφραση της MMP1 είχε αποσιωπηθεί οι αντίστοιχες ζώνες καζεϊνολυτικής ενεργότητας δεν εμφανίζονταν υποδεικνύοντας ότι όντως οι ζώνες αντιστοιχούσαν στις ισομορφές της MMP1 (σχ.4).

Πρέπει να σημειωθεί ότι σε παρόμοια πειράματα ζυμογραφίας στα οποία χρησιμοποιήθηκε σαν υπόστρωμα ζελατίνη δεν αποκαλύφθηκαν ζώνες ζελατινολυτικής ενεργότητας που να αντιστοιχούν στα αναμενόμενα μεγέθη για τις MMP1 ισομορφές, γεγονός που υποδηλώνει ότι η ζελατίνη δεν είναι προτιμώμενο υπόστρωμα από την MMP1. Κάτι αντίστοιχο είχε προηγουμένα παρατηρηθεί και στην περίπτωση της MMP1 της *Drosophila* η οποία φαίνεται

επίσης να προτιμά την καζεΐνη κι όχι τη ζελατίνη σαν υπόστρωμα(Llano, Pendas et al. 2000).

Όπως φαίνεται στο σχήμα 4 έντονη καζεΐνολυτική ενεργότητα εμφανίζεται στα εκχυλίσματα που προέρχονται από μεσέντερο και σε ζώνη που αντιστοιχεί σε πρωτεΐνη μεγέθους περίπου 34Kd. Παρόμοιο μέγεθος έχει και το προϊόν που ευκαιριακά εντοπίζεται με  $\alpha$ -MMP1 αντίσωμα και εικάζεται ότι είναι προϊόν πρωτεόλυσης της MMP1. Το γεγονός όμως ότι η ζώνη καζεΐνολυτικής ενεργότητας στην ζυμογραφία δεν φαίνεται να διαφοροποιείται μεταξύ εκχυλισμάτων που προέρχονται από κουνούπια στα οποία έχει χορηγηθεί δίκλωνο RNAέναντι GFPή δίκλωνο RNAέναντι MMP1 υποδεικνύει ότι η συγκεκριμένη καζεΐνολυτική ενεργότητα δεν ταυτίζεται με MMP1 πρωτεολυτικό προϊόν.



**Σχήμα4** Ζυμογραφική ανάλυση σε υπόστρωμα καζεΐνης εκχυλισμάτων από μεσεντερικό ιστό (*midguts*) και περιφερικά αιμοκύτταρα (*hemo*) κουνουπιών στα οποία είχε χορηγηθεί δίκλωνο RNAέναντι GFP (*dsGFP*) κι έναντι MMP1 (*dsMMP1*). Το μαύρο και άσπρο τόξο υποδεικνύουν το προζυμογόνο και ζυμογόνο της μεσεντερικής MMP1, ενώ το βέλος υποδεικνύει την αιμοκυτταρική MMP1

## **3.2 Περιγραφή του προτύπου έκφρασης της μεσεντερικής και αιμοκυτταρικής MMP1**

### **3.2.1 Η αιματοφαγία επάγει άμεσα την έκφραση της MMP1 στο μεσεντερικό επιθήλιο.**

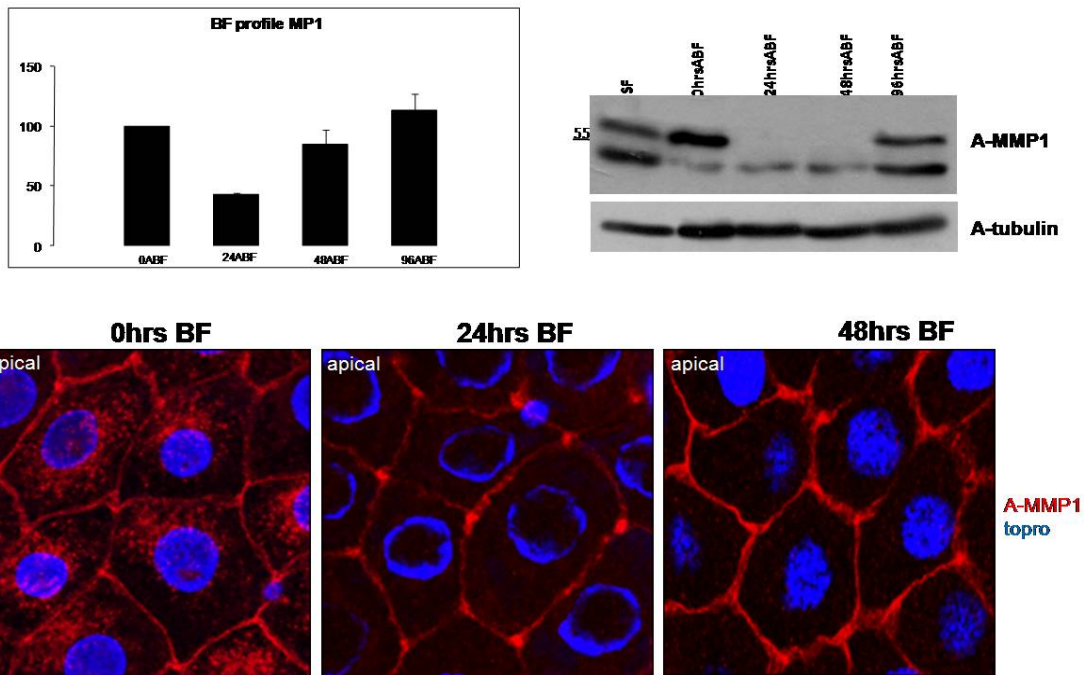
Η πρόσληψη αίματος από τα θηλυκά κουνούπια, έχει σαν αποτέλεσμα την άμεση διάταση του μεσεντέρου για να μπορέσει να χωρέσει τον όγκο του αίματος που είναι σχεδόν πενταπλάσιος του συνολικού όγκου του εντόμου. Για να επιτευχθεί η διάταση αυτή μπορεί κανείς να πιθανολογήσει ότι τα κύτταρα του μονόστοιβου μεσεντερικού επιθηλίου χρειάζεται να χαλαρώσουν τις μεταξύ τους συνδέσεις ή ακόμη και να κινηθούν πάνω στην εξωκυττάρια μήτρα (extracellularmatrix). Σ αυτή την διεργασία σημαντικό ρόλο μπορεί να παίζει και η MMP1 πρωτεάση.

Θελήσαμε συνεπώς αρχικά να διερευνήσουμε τις μεταβολές του προτύπου έκφρασης της MMP1 στο μεσέντερο σε σχέση με την πρόσληψη αίματος.

Για τον λόγο αυτό απομονώθηκαν μεσέντερα θηλυκών κουνουπιών σε διαφορετικές χρονικές στιγμές, 0, 24, 48 και 96 ώρες, μετά την αιματοφαγία.

Η έκφραση της MMP1 σε αυτά τα επιθήλια αναλύθηκε αρχικά σε μεταγραφικό επίπεδο με πειράματα Real-timePCR. Η κανονικοποίηση των δειγμάτων mRNA έγινε μέσω της μέτρησης των μεταγράφων του γονιδίου της ριβοσωμικής πρωτεΐνης S7, τα οποία όπως έχει ήδη αναφερθεί παραμένουν σταθερά ανεξαρτήτως συνθηκών μόλυνσης ή αιματοφαγίας.

Τα αποτελέσματα τριών ανεξαρτήτων πειραμάτων Real-timePCR έδειξαν ότι 24ωρες μετά τη λήψη του αίματος παρουσιάζεται μια μικρή πτώση της μεταγραφής του γονιδίου περίπου 50% σε σχέση με τα επίπεδα μεταγραφής του 0 ώρες μετά την αιμοφαγία. Στις 48 και 96 ώρες όμως μετά την αιματοφαγία τα επίπεδα έκφρασης του μορίου είναι ελαφρώς αποκλείοντα (48ωρες) ή σχεδόν ταυτόσημα (96ωρες) με αυτά των 0 ωρών (σχ.5).



**Σχήμα 5** Διαγραμματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων Real-time PCR που αφορούν το μεταγραφικό πρότυπο του μορίου 0, 24, 48 και 96 ώρες μετά την αιμοφαγία (0, 24, 48, 96 ABF). Στο ίδιο σχήμα φαίνονται τα πειράματα ανοσοαποτύπωσης επιθηλίων απομονωμένων από κουνούπια στα ίδια χρονικά σημεία, καθώς και από κουνούπια που δεν έχουν ταϊστεί με αίμα (SF). Τα πειράματα ανοσοιστοχημείας αναλύθηκαν με συνεστιακή μικροσκοπία και δείχνουν την τοποθέτηση της MMP1 στην κορυφαία πλευρά (apical) του μεσεντέρου. Με κόκκινο απεικονίζεται η MMP1, ενώ με μπλε ο πυρήνας των κυττάρων (topro).

Παράλληλα εκχυλίσματα μεσεντέρων αναλύθηκαν σε πρωτεϊνικό επίπεδο με πειράματα ανοσοαποτύπωσης. Στα εκχυλίσματα μεσεντέρων που προέρχονται από κουνούπια που δεν έχουν προσλάβει αίμα οι δύο μορφές της MMP1, ζυμογόνο και προζυμογόνο, βρίσκονται σχεδόν σε ισομοριακές αναλογίες. Ο λόγος όμως μεταξύ των δύο μορφών της MMP1 αλλάζει δραματικά αμέσως μετά την πρόσληψη αίματος προς όφελος του προζυμογόνου γεγονός που υποδηλώνει νεοσύνθεση (σχ.5).

Στις 24 και 48 ώρες όμως μετά τη λήψη αίματος τα επίπεδα της MMP1 μειώνονται δραματικά σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης της στο χρόνο 0, και η πρωτεάση ανιχνεύεται κυρίως στη μορφή του ζυμογόνου.



Η παραπάνω εικόνα διασταυρώθηκε και με πειράματα ανοσο-ιστοχημείας μεσεντερικών επιθηλίων στα αντίστοιχα χρονικά σημεία μετά την πρόσληψη αίματος. Αμέσως μετά την αιματοφαγία, οπότε ανιχνεύονται αυξημένα επίπεδα MMP1 προζυμογόνου στα εκχυλίσματα με Western, το ανοσο-αντιδρόν MMP1 υλικό εντοπίζεται ενδοκυτταρικά σε κοκκιώδη μορφή, πιθανά στο ενδοπλασματικό δίκτυο, ενισχύοντας έτσι την υπόθεση της νεοσύνθεσης MMP1 αμέσως μετά τη πρόσληψη του αίματος (σχ.5).

Στις 24 και 48 ώρες όμως μετά τη αιματοφαγία, όταν στα εκχυλίσματα ανιχνεύεται μόνο MMP1 ζυμογόνο, ανοσο-αντιδρόν MMP1 υλικό συγκεντρώνεται κυρίως στις θέσεις επαφής/διασύνδεσης μεταξύ των κυττάρων, που είναι και η αναμενόμενη θέση του ζυμογόνου.

Συνεκτιμώντας τα αποτελέσματα από τις τρεις μεθοδολογίες που χρησιμοποιήσαμε για να αποτυπώσουμε το πρότυπο έκφρασης της MMP1 κατά την αιματοφαγία, καταλήγουμε στα ακόλουθα συμπεράσματα.

Στο μεσέντερο των θηλυκών κουνουπιών που δεν έχουν προσλάβει αίμα ο λόγος προζυμογόνου/ζυμογόνο MMP1 είναι σχεδόν ισομοριακός. Αμέσως όμως μετά την πρόσληψη αίματος και πολύ γρήγορα τα επίπεδα του MMP1 προζυμογόνου αυξάνουν σημαντικά λόγω αυξημένης μεταγραφής ή μετάφρασης (νεοσύνθεση). Η απότομη αύξηση των επιπέδων του προζυμογόνου έχει σαν αντισταθμιστικό αποτέλεσμα μια πτώση του μεταγραφικού ρυθμού που είναι εμφανής 24 ώρες μετά την αιματοφαγία, ο οποίος αρχίζει να ανακάμπτει στις 48 ώρες.

Παράλληλα όμως στο ίδιο διάστημα η πρωτεολυτική ωρίμανση του ζυμογόνου επιταχύνεται. Πιθανολογούμε ότι αυτή η σύνθετη ρύθμιση αφενός μεν αντανakλά αυξημένη ανάγκη για ενεργή MMP1πρωτεάση, λόγω της διάτασης του μεσεντέρου και της αναδιάταξης του επιθηλίου, αλλά ταυτόχρονα και μια προσπάθεια ρύθμισης των συνολικών επιπέδων της MMP1 έτσι ώστε τελικά τα επίπεδα ενεργού ενζύμου να μη γίνουν επικίνδυνα για την ακεραιότητα του επιθηλίου.

Μόνο στις 96 ώρες μετά την αιματοφαγία, και όταν το μεσέντερο έχει σχεδόν επανέλθει στις κανονικές τους διαστάσεις, ο λόγος προζυμογόνου προς ζυμογόνο επανέρχεται στα κανονικά επίπεδα.

### **3.2.2 Αυξημένη δίοδος ωοκινετών μέσω του μεσεντερικού επιθηλίου αυξάνει δραστικά τα επίπεδα MMP1**

Στην συνέχεια θελήσαμε να διερευνήσουμε το πρότυπο έκφρασης της MMP1 στο μεσεντερικό επιθήλιο σε συνθήκες μόλυνσης με παράσιτο. Για το σκοπό αυτό απομονώθηκαν μεσέντερα θηλυκών κουνουπιών στις χρονικές στιγμές 0, 24, 48 και 96 ώρες μετά τη λήψη μολυσμένου αίματος.

Χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές συνθήκες ταΐσματος των θηλυκών κουνουπιών. Στην μία περίπτωση τα κουνούπια ταΐστηκαν με μολυσμένα ποντίκια στα οποία καταγράφηκε υψηλή παρασιταιμία (>5%), ενώ στην δεύτερη περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια με μικρότερη παρασιταιμία (<1%).

Η λήψη μολυσμένου αίματος διαφορετικής παρασιταιμίας, οδηγεί θεωρητικά σε διαφορετικό φορτίο ωοκινετών και επομένως σε διαφορετικού βαθμού προσβολή του μεσεντέρου. Σε αντιπροσωπευτικό δείγμα από τις δύο ομάδες κουνουπιών, σπισμένων με αίμα υψηλής (High-H) ή χαμηλής (Low-L) παρασιταιμίας έγινε καταμέτρηση του αριθμού των ωοκυστεων 7 ημέρες μετά τη λήψη του αίματος, προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι όντως ο μέσος αριθμός των ωοκινετων που πέρασε από τα μεσέντερα και αναπτύχθηκε σε ωοκύστεις ήταν αντίστοιχος του βαθμού της αρχικής παρασιταιμίας (υψηλός ή χαμηλός). Στο 80% των μεσεντέρων που αναλύθηκαν από την ομάδα L το εύρος του αριθμού των ωοκύστεων ανά μεσέντερο ήταν 0-60. Στην περίπτωση που τα κουνούπια προσέλαβαν αίμα υψηλής παρασιταιμίας (ομάδα H), στο 70% των μεσεντέρων το εύρος του αριθμού των ωοκύστεων ήταν 60-300 (σχ.6).

Από τα υπόλοιπα κουνούπια των ομάδων H και L, απομονώθηκαν τα μεσέντερα και προσδιορίστηκαν με real-time PCR τα επίπεδα μεταγράφων MMP1, και τα επίπεδα MMP1 και ο λόγος προζυμογόνο/ζυμογόνο με πειράματα ανοσοαποτύπωσης.

Τρία διαφορετικά κι ανεξάρτητα μεταξύ τους πειράματα real-time PCR, στα οποία η κανονικοποίηση των δειγμάτων έγινε, όπως και παραπάνω, με το μεταγράφο της ριβοσωμικής πρωτεΐνης S7, επιβεβαίωσαν την παρατήρηση που είχε αρχικά καταγραφεί και με τα semi-quantitative PCR.

Δηλαδή την αύξηση των επιπέδων μεταγράφων MMP1 τη χρονική στιγμή της διέλευσης του παρασίτου μέσα από τα επιθηλιακά κύτταρα του μεσεντερου

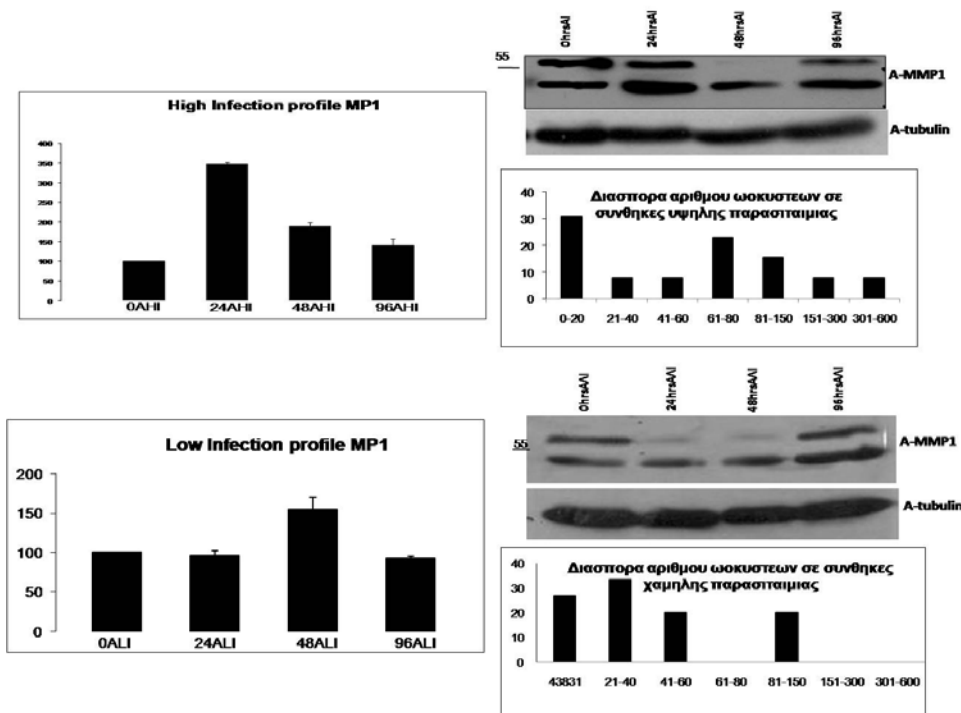
(24 ώρες μετά τη λήψη του μολυσμένου αίματος) σε σχέση με τα επίπεδα μεταγραφής του μορίου τη χρονική στιγμή 0 (σχ.6).

Φάνηκε όμως ότι αυτό ίσχυε μόνο για τα μεσέντερα κουνουπιών από τα οποία είχε περάσει μεγάλος αριθμός ωοκινετων, δηλαδή εκείνων της ομάδας Η. Στην αντίστοιχη χρονική περίοδο στα μεσέντερα των κουνουπιών που προέρχονται από την ομάδα L, που έχουν δηλαδή προσλάβει αίμα χαμηλής παρασιταιμίας και στα οποία τελικά καταγράφεται χαμηλός αριθμός ωοκύστεων, τα επίπεδα MMP1 μεταγράφων φαίνεται ελαφρώς να μειώνονται, όπως και στην περίπτωση της απλής αιματοφαγίας (σχ.6).

Σε πρωτεϊνικό επίπεδο η ανάλυση εκχυλισμάτων των μεσεντέρων σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης με το MMP1 αντίσωμα όχι μόνο επιβεβαίωσε τα αποτελέσματα των real-timePCR, αλλά επιπλέον αποκάλυψε και σημαντική διαφορά στο λόγο MMP1 προζυμογόνο/ζυμογόνο μεταξύ των ομάδων Η και L. Στην περίπτωση των μεσεντέρων που προέρχονταν από τα κουνούπια της ομάδας L (πρόσληψη αίματος χαμηλής παρασιταιμίας), 24 ώρες μετά την πρόσληψη αίματος, το πρωτεϊνικό πρότυπο έκφρασης της MMP1 ήταν παρόμοιο με αυτό που περιγράφηκε στην περίπτωση της απλής αιματοφαγίας (σχ.6).

Στα εκχυλίσματα μεσεντέρων που προέρχονταν από τα κουνούπια της ομάδας Η, 24 ώρες μετά την πρόσληψη μολυσμένου αίματος τα επίπεδα του ζυμογόνου αυξάνονταν δραματικά, υποδηλώνοντας όχι μόνο νεοσύνθεση του μορίου (όπως επαληθεύουν και τα αποτελέσματα των real-timePCRs), αλλά και αυξημένη ωρίμανση και παραγωγή της ενεργής μορφής του (σχ.6).

Στις υπόλοιπες χρονικές στιγμές (48 και 96 ώρες μετά την πρόσληψη μολυσμένου αίματος) δεν καταγράφηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων L και Η, δηλαδή παρουσία μικρού ή μεγάλου αριθμού παρασίτων. Μεταγραφικά φαίνεται να επιστρέφουν σταδιακά τα επίπεδα έκφρασης σε αυτά των 0 ωρών, ενώ πρωτεϊνικά εντοπίζεται κυρίως η μορφή του ζυμογόνου στα εκχυλίσματα μεσεντέρων. Τέλος, 96 ώρες μετά τη λήψη αίματος η έκφραση της MMP1 μεταγραφικά και πρωτεϊνικά δεν παρουσιάζει διαφορές σε σχέση με το αντίστοιχο πρότυπο έκφρασης τη χρονική στιγμή 0.



**Σχήματα** αποτελέσματα των *real-timePCRs* που αφορούν το μεταγραφικό πρότυπο έκφρασης του γονιδίου *MMP1* σε συνθήκες μόλυνσης με υψηλούς (*HighInfection*) ή χαμηλούς αριθμούς (*LowInfection*) παρασίτων παρουσιάζονται διαγραμματικά.

Παράλληλα γίνεται παράθεση των πειραμάτων ανοσοαποτύπωσης με το αντίσωμα *MMP1* (*A-MMP1*), που αφορούν το πρωτεϊνικό πρότυπο έκφρασης του μορίου *MMP1* 0, 24, 48 και 96 ώρες μετά τη λήψη αίματος υψηλής (0, 24, 48, 96 hrs *AHI*) και χαμηλής παρασιταίμιας (0, 24, 48, 96 hrs *ALI*). Να σημειωθεί ότι η κοινωνικοποίηση των πρωτεϊνικών δειγμάτων έγινε με επώαση τους με αντίσωμα του μπουλίνης (*α-tubulin*). Η διασπορά του αριθμού των ωκυστεων που μετρήθηκαν 7 ημέρες μετά τη λήψη αίματος στα μεσέντερα κάθε ομάδας κουνουπιών (χαμηλή, υψηλή παρασιταίμια) παρατίθεται διαγραμματικά. Η μέτρηση των ωκυστεων έγινε χρησιμοποιώντας το *GFP* που ενδογενώς εκφράζουν τα παράσιτα.

Η αλλαγή του προτύπου έκφρασης της *MMP1* 24 ώρες μετά τη λήψη μολυσμένου αίματος αναλύθηκε και με πειράματα ανοσοιστοχημείας (σχ.7). Με ανάλυση των δειγμάτων με συνεστιακή μικροσκοπία, φάνηκε ότι στην κορυφαία πλευρά του μεσεντερικού επιθηλίου, προς τον μεσεντερικό αυλό, η

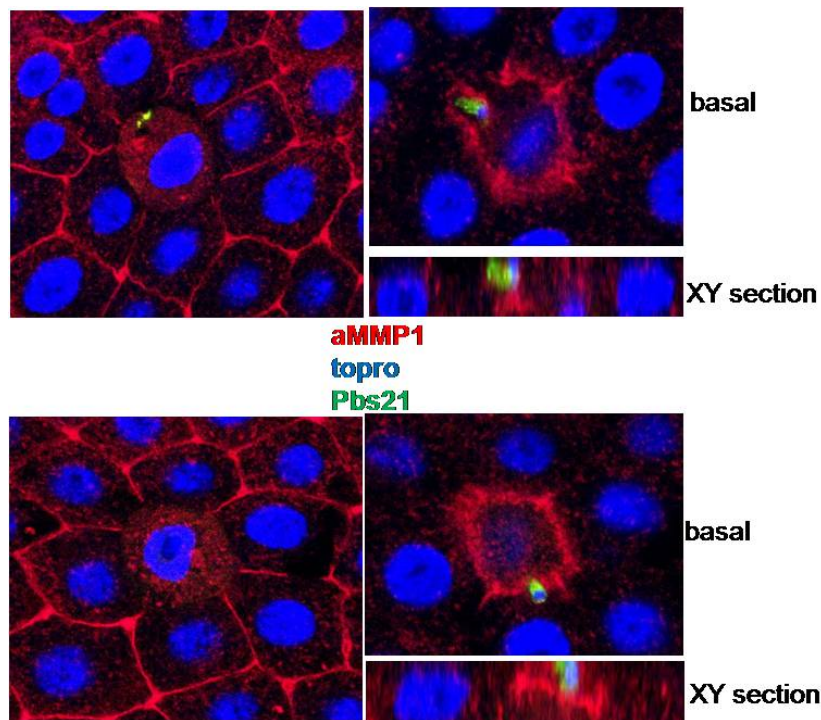
MMP1 εντοπίζεται στα σημεία πρόσδεσης/επαφής των επιθηλιακών κυττάρων. Στα σημεία στα οποία ο ωοκινετης εισβάλλει στο μεσεντερικό επιθήλιο MMP1 ανοσοαντιδρόν υλικό διαγράφει την ήδη χαρακτηρισμένη «ροζέτα», τον σχηματισμό δηλαδή των υγιών επιθηλιακών κυττάρων που περιβάλλει συνήθως το κύτταρο ή τα κύτταρα τα οποία καταστρέφει ο ωοκινετης κατά την εισβολή του στο επιθήλιο(Mahairaki, Lycett et al. 2005).

Τα κύτταρα τα οποία έχουν υποστεί την εισβολή του ωοκινέτη τελικά αποπίπτουν και απομακρύνονται από το επιθήλιο. Τα γειτονικά υγιή επιθηλιακά κύτταρα, όπως έχει προταθεί, διατείνονται για να κλείσουν το κενό που δημιουργείται από την απομάκρυνση των προσβεβλημένων κυττάρων και έτσι σχηματίζεται η χαρακτηριστική «ροζέτα».Στη βασική πλευρά του μεσεντερου και μόνο στα σημεία εισβολής του παρασίτου παρατηρήθηκε ότι η MMP1 σχηματίζει ένα δακτύλιο που περιβάλλει το διερχόμενο παράσιτο. Στα σημεία εισβολής του παρασίτου, όπου τα αποπτωτικά κύτταρα δεν έχουν ακόμη αποβληθεί από το επιθήλιο, ο σχηματισμός του MMP1-δακτυλίου φαίνεται να βρίσκεται στο κέντρο της ροζέτας κάτω από το κύτταρο ή κύτταρα στα οποία έχει προκαλέσει απόπτωση το πέρασμα του ωοκινετη

Τομές των επιθηλίων στον άξονα ΧΥ έδειξαν ότι ο δακτύλιος ουσιαστικά αντιπροσωπεύει υπερσυγκέντρωση του μορίου MMP1 στις προεκτεινόμενες άκρες των υγιών επιθηλιακών κυττάρων (σχ.7).

Δεδομένου ότι ο κυτταρικός εντοπισμός της MMP1 στο υπόλοιπο μεσέντερο, πέρα δηλαδή από τις θέσεις εισβολής του παρασίτου, δεν διαφοροποιείται από τον αντίστοιχο εντοπισμό σε κατάσταση αιματοφαγίας (εκτός ίσως από το πιο έντονο κυτταροπλασματικό εντοπισμό), θα μπορούσε κανείς να υποθέσει ότι η υπερσυγκέντρωση MMP1 που παρατηρείται στη βασική πλευρά του μεσεντερου αντιπροσωπεύει την αυξημένη σύνθεση ζυμογόνου που παρατηρήθηκε στα πειράματα ανοσοαποτύπωσης. Θεωρητικά επομένως ο δακτύλιος MMP1 που περιβάλλει το παράσιτο θα μπορούσε να είναι ενεργή μεταλλοπρωτεάση.

Να σημειωθεί ότι 48ωρες μετά τη λήψη του μολυσμένου αίματος, όπου στις περισσότερες θέσεις εισβολής τα παράσιτο έχει πλέον φτάσει στη βασική πλευρά του μεσεντερου, και το ή τα αποπτωτικά κύτταρα έχουν αποβληθεί από το επιθήλιο, η παρουσία του MMP1-δακτυλίου παραμένει, αλλά η διάμετρος του μειώνεται.



**Σχήμα7** Συνεστιακή μικροσκοπία σε πειράματα ανοσοιστοχημείας μεσεντερικών επιθηλίων 24ωρες μετά τη λήψη μολυσμένου αίματος δείχνουν διαφορετικό πρότυπο εντοπισμού της MMP1 στην κορυφαία (apical) και τη βασική (basal) πλευρά του μεσεντερου. Οι τομές των επιθηλίων στη βασική πλευρά του μεσεντερου έγιναν και στον ΧΥάξονα (XY sections). Με κόκκινο αντιπροσωπεύεται η MMP1 ενώ με πράσινο μια πρωτεΐνη επιφανείας του παρασίτου το Pbs21. Το μπλε αντιστοιχεί στον πυρήνα των κυττάρων (topro)

### 3.2.3 Πρώιμες ωκύστες στην βασική πλευρά του μεσεντερου περιβάλλονται από MMP1.

Όπως αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο 48ωρες μετά τη λήψη μολυσμένου αίματος το πρότυπο εντοπισμού της MMP1 στα μεσεντερικά επιθήλια τείνει να ομοιάσει αυτό της φυσιολογικής κατάστασης (απουσία παρασίτου).

Ωστόσο παρατήρηση μεσεντερικών επιθηλίων 3 και 4 ημέρες μετά την αιματοφαγία έδειξε ότι ένας σημαντικός αριθμός παρασίτων, τα οποία έχουν

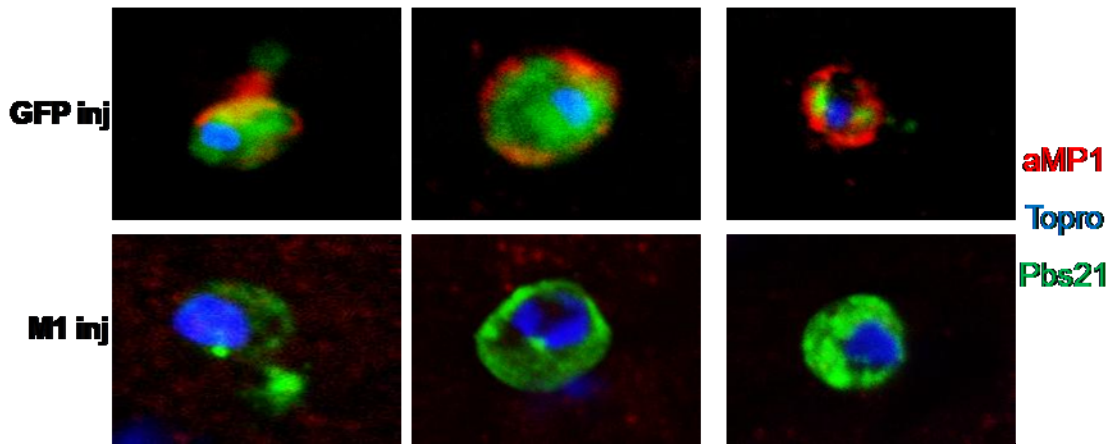
πλέον προσεγγίσει το βασικό έλασμα (basallamina) του επιθηλίου κι έχουν αρχίσει την διαφοροποίηση σε ωοκύστες, περιβάλλονται από MMP1 ανοσο-αντιδρόν υλικό.

Για να διευκρινιστεί εάν πράγματι MMP1 πρωτεΐνη περιβάλλει το παράσιτο πραγματοποιήθηκαν πειράματα αποσιώπησης στα οποία κουνούπια ενεμένα με δίκλωνο RNAέναντι MMP1 ή έναντι GFPταΐστηκαν με μολυσμένο αίμα. Τα μεσεντερικά επιθήλια αυτών των κουνουπιών απομονώθηκαν 3 ημέρες μετά τη λήψη αίματος και αναλύθηκαν με πειράματα ανοσοιστοχημείας και συνεστιακής μικροσκοπίας. Η παρατήρηση έδειξε ότι σε μεσέντερα κουνουπιών στα οποία είχε σιωπηθεί η MMP1 οι πρώιμες ωοκύστες δεν ήταν θετικές στο MMP1 αντίσωμα, επιβεβαιώνοντας έτσι ότι η αναγνώριση των παρασίτων από το MMP1 αντίσωμα, είναι αληθής και οφείλεται στην παρουσία πρωτεΐνης MMP1 στην επιφάνεια αυτών (σχήμα 8).

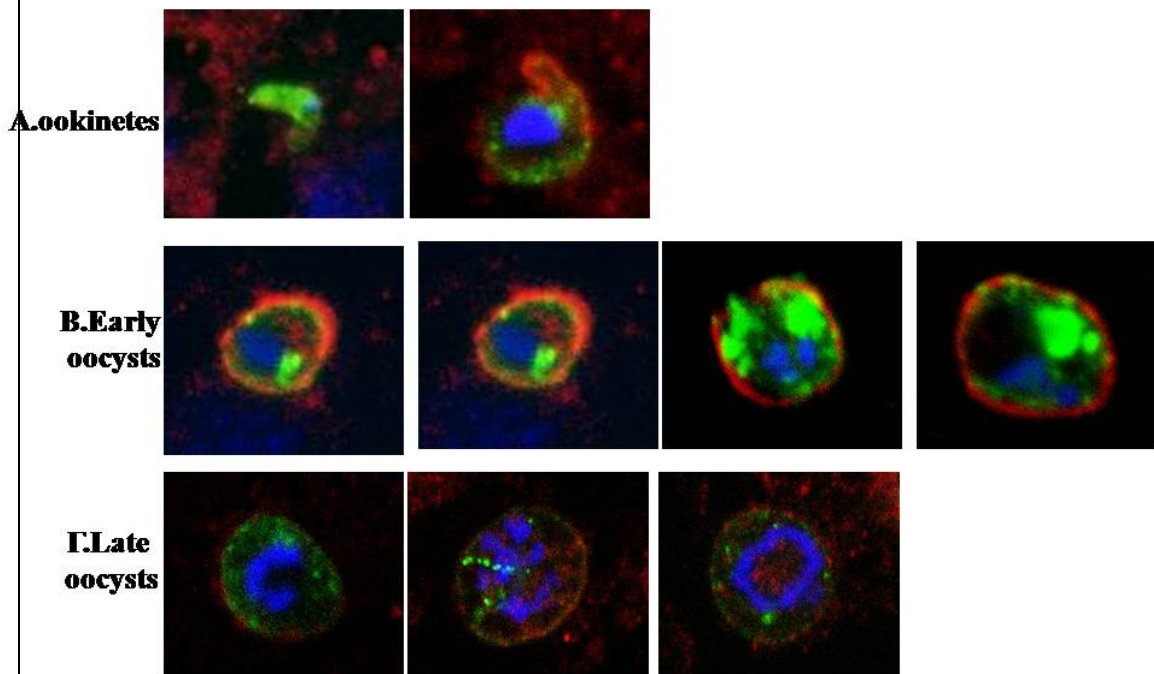
Για να διαπιστωθεί αν η παρουσία MMP1 ανοσο-αντιδρόντος υλικού είναι συνεχής καθόλη τη διάρκεια ανάπτυξης της ωοκύστης συγκρίναμε ωοκύστες 3 και 7 ημέρες μετά τη λήψη μολυσμένου αίματος.

Σαν διαγνωστικοί δείκτες των διαφορετικών σταδίων ανάπτυξης των ωοκύστεων χρησιμοποιήθηκαν η μορφολογία και το μέγεθος των ωοκύστεων, και η χρώση του πυρήνα, που αντανakλά τις πυρηνικές διαιρέσεις που λαμβάνουν χώρα μέσα στην ωοκύστη και οδηγούν τελικά στο σχηματισμό των σποροζωιδίων.

Παρατήρηση των επιθηλίων στο συνεστιακό μικροσκόπιο βάσει των παραπάνω κριτηρίων επιβεβαίωσε την παρουσία MMP1 ανοσο-αντιδρόντος υλικού σε πρώιμες ωοκύστες (3ημερες μετά την αιματοφαγία, σχημα9B), αλλά όχι και σε ώριμες ωοκύστες (7 ημέρες μετά την αιματοφαγία, σχημα9Γ). Πρέπει να σημειωθεί ότι στα μεσέντερα που αναλύθηκαν 3 ημέρες μετά τη λήψη μολυσμένου αίματος εντοπίστηκαν και ωοκινετες που ξεκινούσαν (βάσει μορφολογίας) την διαφοροποίησή τους σε ωοκύστες. Ορισμένοι από αυτούς ήταν θετικοί για MMP1 η οποία εντοπιζονταν κυρίως στο μέρος του ωοκινετη που ήταν σε επαφή με το βασικό έλασμα του μεσεντερικού επιθηλίου (σχημα9Α).



**Σχήμα8** Μεσεντερικά επιθήλια 3 ημέρες μετά τη λήψη μολυσμένου αίματος αναλύθηκαν σε πειράματα ανοσοιστοχημείας. Τα παράσιτα που εντοπίστηκαν στην βασική πλευρά του μεσεντερου βρίσκονται στο στάδιο ανάπτυξης της ωοκυστες, όπως δηλώνει ο πυρήνας τους (μπλε) και η μορφολογία τους και είναι θετικά, τόσο για το Pbs21 (πράσινο), όσο και για την MMP1 (κόκκινο). Σε μεσέντερα κουνουπιών στα οποία έχει σιωπηθεί η MMP1 (M1inj) οι αναπτυσσόμενες ωοκυστες δεν περιβάλλονται από MMP1.



**Σχήμα9** A,B) παράσιτα που αναπτύσσονται σε μεσεντερικά επιθήλια κουνουπιών 3 ημέρες μετά την αιμοφαγία. Στα πειράματα ανοσοιστοχημείας χρησιμοποιήθηκε αντισώμα έναντι MMP1 (κόκκινο)



και *Pbs21* (πράσινο) για τον εντοπισμό των παρασίτων, καθώς και *topro* (μπλε). Η *MMP1* φαίνεται να αλληλεπιδρά με *ωοκινετες* (*A. ookinetes*), αλλά κυρίως με πρώιμες *ωοκυστεις* (*B. earlyoocysts*).

Γ) Ωριμες *ωοκυστεις* σε μεσέντερα κουνουπιών 7 ημέρες μετά την αιμοφαγία. Για τον εντοπισμό τους χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα *MMP1* (κόκκινο) *topro* (μπλε) και το ενδογενές *GFP* (πράσινο) που εκφράζουν τα παράσιτα.

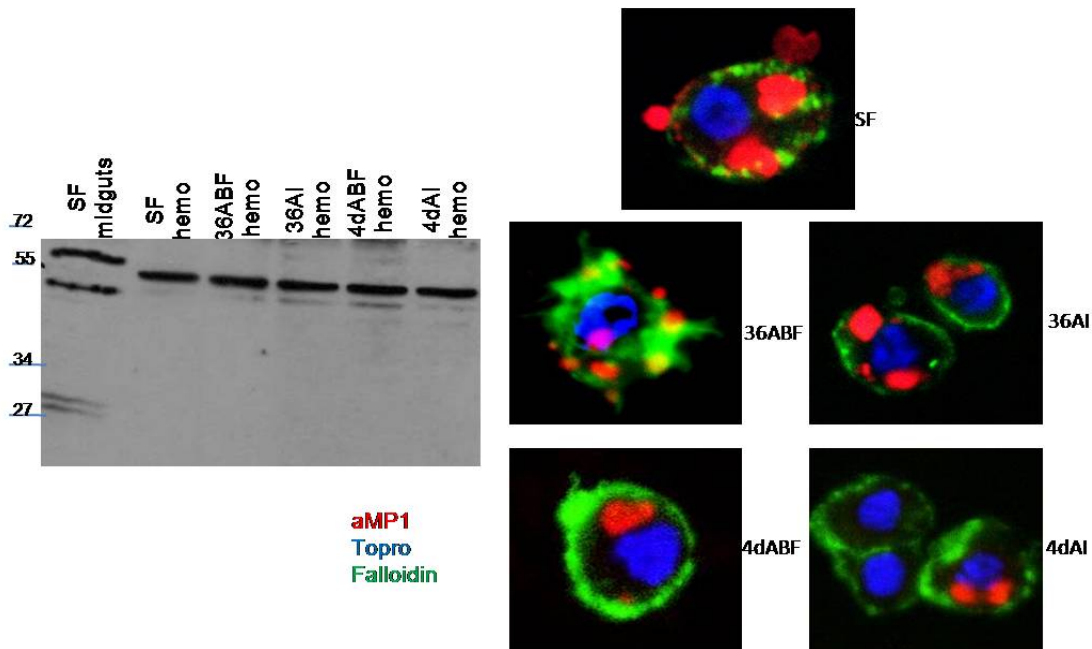
### **3.2.4 Τα επίπεδα της αιμοκυτταρικής ισομορφής της *MMP1* δεν επηρεάζονται από την παρουσία αίματος ή/και παρασίτου.**

Δεδομένου ότι η μεσεντερική μορφή της *MMP1* φάνηκε τόσο μεταγραφικά, όσο και πρωτεϊνικά να επηρεάζεται από την λήψη αίματος και ιδιαίτερα από τη λήψη μολυσμένου αίματος, θεωρήθηκε σημαντικό να δειχθεί αν ισχύει το ίδιο και για την αιμοκυτταρική *MMP1*. Το ερώτημα ήταν δύσκολο να απαντηθεί, λόγω του πολύ μικρού δείγματος αιμολέμφου που μπορεί κανείς να συλλέξει από κάθε κουνούπι. Γι αυτό το λόγο το πρότυπο έκφρασης της *MMP1* προσεγγίστηκε σε αυτή την περίπτωση μόνο σε πρωτεϊνικό επίπεδο με πειράματα ανοσοαποτύπωσης και ανοσοϊστοχημείας.

Αιμόλεμφος συλλέχθηκε από κουνούπια που δεν είχαν φάει αίμα και από κουνούπια που είχαν φάει αίμα με ή χωρίς παράσιτο 36 ώρες και 4 ημέρες μετά την πρόσληψη αίματος.

Τα πειράματα ανοσοαποτύπωσης με το *MMP1* αντίσωμα έναντι των παραπάνω δειγμάτων έδειξαν ότι η έκφραση της *MMP1* παραμένει σταθερή ανεξάρτητα από την παρουσία αίματος ή παρασίτου. Επιπλέον η μελέτη περιφερικών αιμοκυττάρων με ανοσοϊστοχημεία έδειξε ότι στις παραπάνω συνθήκες αιματοφαγίας δεν επηρεάζεται ούτε ο κυτταρικός εντοπισμός της *MMP1* στα αιμοκύτταρα.

Σε όλες τις περιπτώσεις η *MMP1* που ανιχνεύεται στα κύτταρα περιορίζεται σε κυστίδια εντός των κύτταρων ή σε επαφή με αυτά (σχημα10).



**Σχήμα 10** Πείραμα ανοσοαποτύπωσης σε δείγματα αιμολέμφου από κουνούπια που δεν είχαν φάει αίμα (SF hemo) και από κουνούπια που είχαν φάει αίμα με (AI) ή χωρίς παράσιτο (ABF) 36 ώρες και 4 ημέρες μετά. Παράλληλα φαίνεται στο πείραμα αυτό και το πρότυπο έκφρασης της MMP1 σε μεσέντερα κουνουπιών που δεν έχουν φάει αίμα (SF midguts). Τα αιμολεμφικά δείγματα ποσοτικοποιήθηκαν με Bradford, προκειμένου να αναλυθούν συνολικά ίσες ποσότητες πρωτεΐνης. Τα ίδια δείγματα αναλύθηκαν και σε πειράματα ανοσοιστοχημείας. Σε αυτά η MMP1 εντοπίζεται με κόκκινο, ενώ το πράσινο αντιστοιχεί στα ινίδια ακτινής των κύτταρων (phalloidin) και το μπλε στον πυρήνα τους (topro).

### 3.3 Λειτουργική μελέτη του γονιδίου MMP1

#### 3.3.1 Η παρουσία της MMP1 δρα προστατευτικά για την επιβίωση του παρασίτου και την ανάπτυξη των ωοκύστεων.

Το επόμενο ερώτημα που θελήσαμε να προσεγγίσουμε μετά την ολοκλήρωση της περιγραφής της έκφρασης του μορίου της MMP1 ήταν αν υπάρχει πιθανός λειτουργικός ρόλος της σε ότι αφορά την επιβίωση του παρασίτου μέσα στο κουνούπι. Για το λόγο αυτό προχωρήσαμε σε πειράματα μεταμεταγραφικής αποσιώπησης του γονιδίου MMP1 κι έλεγχο της

βιωσιμότητας του παρασίτου μέσα σε κουνούπια με τέτοιο γενετικό υπόβαθρο.

Όπως περιγράφηκε ήδη στο προηγούμενο κεφάλαιο η χορήγηση δίκλωνου RNAέναντι MMP1 έχει ως αποτέλεσμα ικανοποιητική μείωση της έκφρασης του μορίου τόσο σε μεταγραφικό όσο και σε πρωτεϊνικό επίπεδο στον μεσεντερικό ιστό, χωρίς να επηρεάζεται μεταγραφικά τουλάχιστον στον ίδιο ιστό το πρότυπο έκφρασης άλλων μορίων που πιθανά σχετίζονται λειτουργικά με την MMP1, δηλαδή η MMP2 και ο αναστολέας TIMP.

Επιπλέον πειράματα ανοσοαποτύπωσης με το αντίσωμα MMP1 στα οποία αναλύθηκαν εκχυλίσματα διαφορετικών ιστών από κουνούπια ενεμένα με δίκλωνοRNAέδειξαν όπως φαίνεται στο σχήμα 1 ικανοποιητική μείωση της έκφρασης του μορίου όχι μόνο στο μεσέντερο, αλλά και στην αιμολεμφο, στις ωοθήκες και στο υπόλοιπο σώμα του κουνουπιού.

Σύμφωνα επομένως με τα παραπάνω φαίνεται ότι τεχνικά τουλάχιστον η σιωπή της MMP1 στο κουνούπι είναι δυνατή με την χορήγηση δίκλωνου RNA. Προχωρήσαμε έτσι σε επαναλήψεις τέτοιων πειραμάτων, στα οποία τα ενεμένα με MMP1 δίκλωνο RNA κουνούπια τρέφονταν με μολυσμένο αίμα και μετρούνταν ο αριθμός των ωοκυστεων που αναπτύσσονταν μέσα σε αυτά 7-10 ημέρες μετά την πρόσληψη μολυσμένου αίματος (M1-πειραματική ομάδα). Ο αριθμός αυτός συγκρινόταν κάθε φορά με τον αριθμό των ωοκύστεων που αναπτύσσονταν σε κουνούπια τα οποία είχαν προσλάβει το ίδιο μολυσμένο αίμα αλλά είχαν προηγούμενα ενεθεί με δίκλωνο RNAέναντι GFP (GFP-ομάδα αναφοράς).

Για κάθε setπειραμάτων αρχικά εξεταζόταν με πειράματα ανοσοαποτύπωσης (χρησιμοποιώντας MMP1 αντίσωμα) αν η σιώπη του γονιδίου MMP1 είναι επιτυχής συγκρίνονταν δηλαδή τα επίπεδα έκφρασης της MMP1 σε εκχυλίσματα μεσεντέρων τυχαία επιλεγμένων κουνουπιών των ομάδων M1 και GFP. Επιτυχής σιώπη της έκφρασης του MMP1 γονιδίου στα μεσέντερα σήμαινει και ικανοποιητική σιώπη του στον υπόλοιπο οργανισμό.

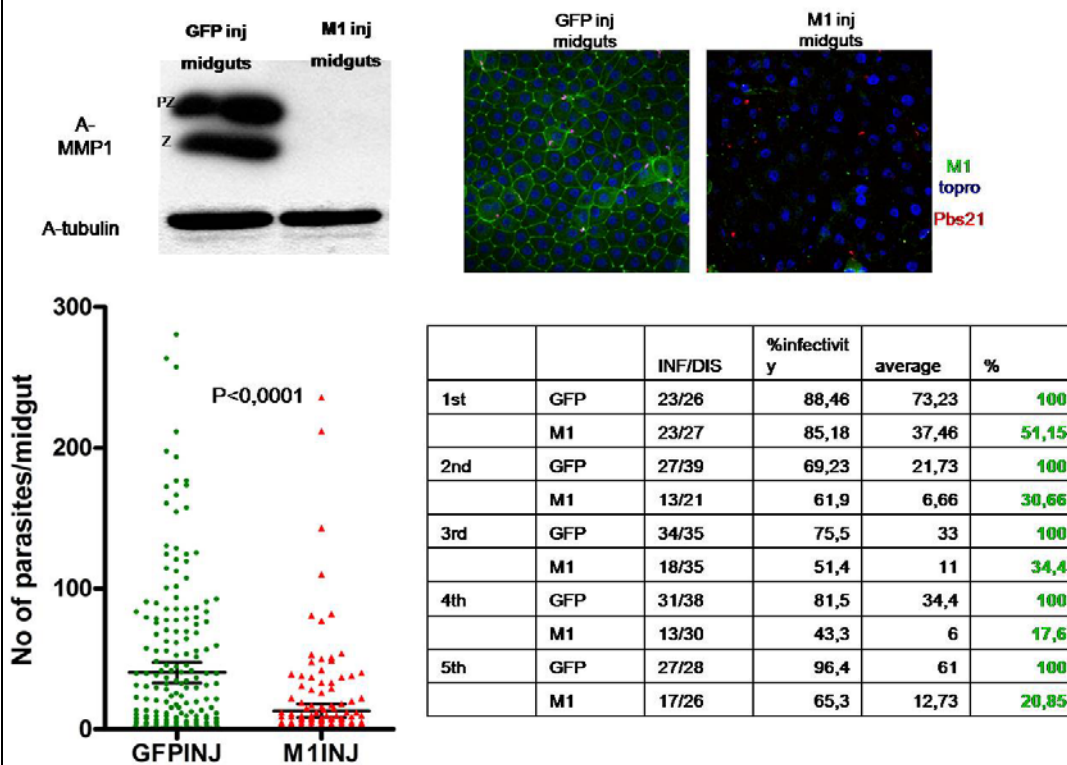
Στο σχήμα 11 παρουσιάζεται ενδεικτικά ένα πείραμα ανοσοαποτύπωσης στο οποίο τα επίπεδα έκφρασης της MMP1 στα κουνούπια που έχουν ενεθεί με δίκλωνο RNAέναντι MMP1 (M1-πειραματική ομάδα) είναι σημαντικά μειωμένα σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης σε κουνούπια στα οποία έχει χορηγηθεί δίκλωνο RNAέναντι GFP (GFP-ομάδα αναφοράς). Παράλληλα

παρουσιάζεται κι ένα ενδεικτικό πείραμα ανοσοιστοχημείας το οποίο αποδεικνύει παραπέρα την επιτυχή σιώπηση του γονιδίου σε κουνούπια M1-ομάδας. Μόνο πειραματικά setsτα οποία καταγράφηκε ικανοποιητική σιώπηση του MMP1 γονιδίου συμπεριλήφθησαν στις στατιστικές αναλύσεις.

Σημαντικό θεωρήθηκε επίσης για αυτά τα πειράματα ο αριθμός των κουνουπιών που τελικά επιβίωναν της όλης διαδικασίας, για κάθε μια από τις ομάδες (M1 ή GFP) κάθε πειραματικού set, να ήταν μεγαλύτερος από 25. Αυτό βοηθά ώστε οι στατιστικές μετρήσεις να είναι αξιόπιστες. Επιπλέον σημαντικό για την αξιοπιστία των μετρήσεων είναι οι αριθμοί των ωοκυστεων που καταμετρούνται σε κάθε μεσέντερο να μην είναι ιδιαίτερα μικροί (0-10), ή να μην εμφανίζονται μεγάλες διαφορές από μεσέντερο σε μεσέντερο (πχ 50% των μεσεντέρων να φέρουν 0 παράσιτα και το υπόλοιπο 50% >200).

Τέλος και αυτό αφορά ιδιαίτερα την αποκάλυψη φαινοτύπων που δεν είναι ιδιαίτερα ισχυροί είναι απαραίτητο ο αριθμός των ανεξαρτήτων επαναλήψεων των πειραμάτων (διαφορετικός πληθυσμός κουνουπιών, διαφορετικό δείγμα δίκλωνου RNA, διαφορετικό δείγμα μολυσμένου αίματος) να είναι μεγαλύτερος από τρία.

Βάσει αυτών των προϋποθέσεων επιλέχθηκαν 5 ανεξάρτητες επαναλήψεις πειραμάτων, 5 πειραματικά set. Οι αριθμοί των παρασίτων που καταμετρήθηκαν σε κάθε πειραματικό set από τις δυο διαφορετικές ομάδες κουνουπιών (M1 ή GFP) υποβλήθηκαν σε στατιστική ανάλυση (Mann-Whitneytest), τα αποτελέσματα της οποίας φαίνονται στο σχήμα 11. Οι μέσοι όροι των ωοκυστεων από τις δυο πειραματικές ομάδες σε κάθε πειραματικό set καταγράφονται στον πίνακα του σχήματος 11 και υποδεικνύουν ότι σιώπηση της MMP1 έχει ως αποτέλεσμα μείωση του αριθμού των ωοκυστεων κατά 50-80%. Η τιμή  $p$  που προέκυψε από τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων ( $p < 0,0001$ ) δείχνει ότι η διαφορά αυτή είναι σημαντική και αποτελεί ισχυρή ένδειξη ότι η MMP1 δρα προστατευτικά για το παράσιτο.



**Σχήμα 11** Στο επάνωμέρος του σχήματος παρουσιάζονται ενδεικτικά πειράματα ανοσοαποτύπωσης και ανοσοιστοχημείας σε μεσεντερικά επιθήλια κουνουπιών ενεμένων με δίκλωνο GFP και δίκλωνο MMP1, στα οποία χρησιμοποιήθηκε το MMP1 αντίσωμα. Στην περίπτωση των πειραμάτων ανοσοαποτύπωσης η κανονικοποίηση των δειγμάτων έγινε με αντίσωμα του μπουλίνης, ενώ στην περίπτωση των πειραμάτων ανοσοιστοχημείας χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι του παρασίτου (*Pbs21*), το οποίο φαίνεται με κόκκινο και topro, το οποίο φαίνεται με μπλε. Το διάγραμμα του σχήματος δείχνει την διασπορά των παρασίτων στα μεσέντερα των κουνουπιών στα οποία έχει σιωπηθεί η MMP1 (*M1inj*) σε σχέση με τη διασπορά των παρασίτων στα μεσέντερα του δείγματος αναφοράς (*GFPinj*). Οι οριζόντιες μπάρες αντιστοιχούν στο μέσο όρο του αριθμού των ωκυστεων και οι κάθετες στο 95% διάστημα εμπιστοσύνης. Αναλυτικά οι αριθμοί των μεσεντέρων που αναλύθηκαν στα πέντε ανεξάρτητα πειράματα, το ποσοστό αυτών που είχαν παράσιτα (%infectivity) και ο μέσος όρος των παρασίτων που μετρήθηκαν στην κάθε πειραματική ομάδα καταγράφονται στον πίνακα που παρατίθεται.

Υπάρχουν δυο σημεία κατά την εισβολή του παρασίτου από το μεσέντερο του κουνουπιού , όπου το παράσιτο έρχεται σε επαφή με την MMP1.

Το πρώτο είναι όταν ο ωοκινέτης διαπερνά το επιθήλιο, όπου ενεργή πιθανά πρωτεάση σχηματίζει δακτύλιο στη βάση του προσβεβλημένου κυττάρου με τον οποίο ο ωοκινέτης έρχεται σε γεινίαση. Παρόλαυτα πρέπει να σημειωθεί ότι δεν παρατηρήθηκε MMP1-ανοσοαντιδρόν υλικό στην επιφάνεια του Λαμβάνοντας υπόψη τις βιβλιογραφικές αναφορές που αφορούν την συμμετοχή MMP πρωτεασών στη διαδικασία επούλωσης των επιθηλίων ωοκινέτη κατά την δίοδο του από το επιθήλιο.(Chen and Parks 2009)η σιώπηση της MMP1 θα μπορούσε να έχει αρνητική επίπτωση στην γρήγορη επούλωση του μεσεντερου του κουνουπιού. Κάτι τέτοιο είναι δυνατό να έχει σαν αποτέλεσμα την εισόδο μεγάλου αριθμού βακτηρίων από τον αυλό του στην αιμολεμφο του κουνουπιούκαι ενεργοποίηση ανοσοποιητικών μηχανισμών του κουνουπιού. Παρόμοια κατάσταση έχει περιγραφεί με δυο γονίδια του Ανωφελούς, μια περοξειδάση και μια οξειδάση, που παίζουν όπως φαίνεται σημαντικό ρόλο στον σχηματισμό ενός γλυκοπρωτεϊνικού στρώματος στο μεσεντερικο επιθήλιο εμποδίζοντας έτσι την είσοδο βακτηρίων πληθυσμών στην αιμολεμφο του εντόμου, με αποτέλεσμα την διατήρηση των ανοσολογικών αποκρίσεων σε φυσιολογικά επίπεδα και την επιβίωση τελικά του παρασίτου στον μεσεντερικο ιστό(Kumar, Molina-Cruz et al.).Σ' αυτή την τελευταία περίπτωση η παρουσία της MMP1 θα είχε ένα έμεσα προστατευτικό ρόλο, καθώς θα επιτάχυνε την διαδικασία επούλωσης και άρα την παρεμπόδιση της διέλευσης βακτηρίων.

Το δεύτερο στάδιο είναι όταν ο ωοκινέτης φτάνει στο βασικό έλασμα και έρχεται σε επαφή με την αιμόλεμφο. Και όπως παρατηρήθηκε μέρος των πρώιμων ωοκύστεων που αναπτύσσονται στην βασική πλευρά του μεσεντερου περιβάλλονται από MMP1 ανοσοαντιδρόν υλικό (σχήμα 5,6). Η παρουσία MMP1 στην επιφάνεια της αναπτυσσόμενης ωοκύστης θα μπορούσε να υποδεικνύει ένα πιθανά άμεσα προστατευτικό ρόλο της πρωτεάσης στο στάδιο αυτό.

### **3.3.2 Η επούλωση του μεσεντερικού επιθηλίου δεν παρουσιάζει σημαντικές φαινομενολογικές διαφορές σε κουνούπια όπου έχει σιωπηθεί η MMP1.**

Για να ελεγχθεί αν η MMP1 έχει ουσιαστικό και αναντικατάστατο ρόλο στη διαδικασία επούλωσης του επιθηλίου, χρησιμοποιήθηκαν δυο κυτταρικοί δείκτες που φαίνεται να αποκαλύπτουν τη διαδικασία. Ο πρώτος είναι η φαλλοιδίνη, μια φθορίζουσα χρωστική που δένει στα ινίδια της F-ακτινής επιτρέποντας έτσι την παρατήρηση του κυτταροσκελετού και ο δεύτερος είναι το αντίσωμα έναντι β-ιντεγκρίνης ενός υποδοχέα που επιτρέπει την επικοινωνία μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων και του εξωκυτταρίου στρώματος.

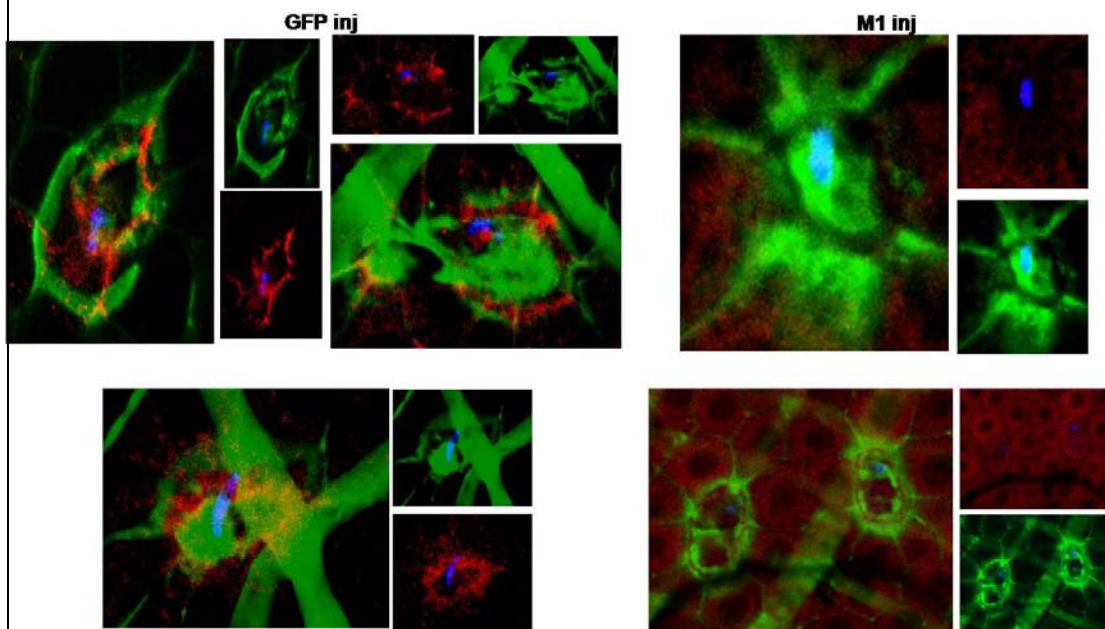
Σύμφωνα με τις βιβλιογραφικές αναφορές η επούλωση των επιθηλίων γίνεται με δυο τρόπους ανάλογα με την έκταση του τραύματος, είτε με την προέκταση λαμελλοποδίων από τα γειτονικά κύτταρα, είτε με έναν ενεργό μηχανισμό του κυτταροσκελετού και πάλι των γειτονικών κυττάρων που οδηγεί στη σύσφιξη μεταξύ αυτών (purse-stringmechanism), προκειμένου και στις δυο περιπτώσεις να αποκατασταθεί τελικά η συνέχεια του επιθηλίου (Brock, Midwinter et al. 1996). Παρόμοια κατάσταση όπως ειπώθηκε και στην εισαγωγή έχει περιγραφεί και στο προσβεβλημένο από ωοκινετες μεσεντερο του κουνουπιού κυρίως με τη χρήση της φαλλοιδίνης (Han, Thompson et al. 2000; Gupta, Kumar et al. 2005), αλλά και του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (Vlachou, Zimmermann et al. 2004).

Για τον λόγο αυτό επαναλήφθηκαν τα πειράματα σιωπησης της MMP1, όπως περιγράφηκαν στην προηγούμενη παράγραφο, 24ωρες όμως μετά την λήψη μολυσμένου αίματος τα μεσεντερικά επιθήλια απομονώθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα ανοσοιστοχημείας με αντίσωμα έναντι MMP1 και φαλλοιδίνη.

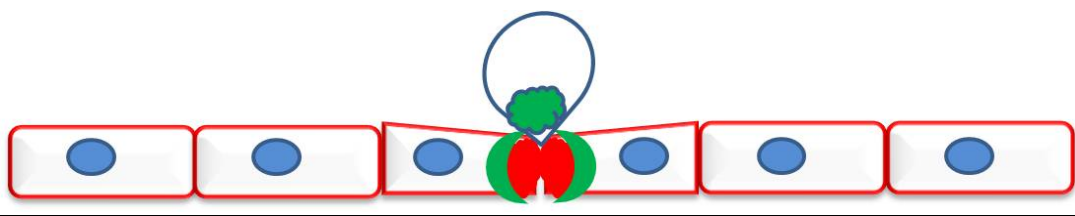
Ανάλυση των επιθηλίων με συνεστιακή μικροσκοπία έδειξε ότι στα δείγματα αναφοράς η φαλλοιδίνη δίνει το πρότυπο των δακτυλίων που έχει ήδη περιγραφεί γύρω από το αποπτωτικό κύτταρο, έναν εξωτερικό που φαίνεται να προέρχεται από τα ινίδια ακτινής των γειτονικών κυττάρων κι έναν

εσωτερικό που φαίνεται να προέρχεται από τον κυτταροσκελετό του αποπτωτικού κυττάρου που αποβάλλεται. Ο δακτύλιος της MMP1 στις περισσότερες περιπτώσεις βρίσκεται μεταξύ των δυο δακτυλίων ακτινης γύρω από τον διερχόμενο ωοκινετή (σχ.12A). Στην περίπτωση των επιθηλίων που προέρχονται από κουνούπια στα οποία έχει σιωπηθεί η MMP1 οι δυο δακτύλιοι ακτινης που προβάλλονται με τη φαλλοιδίνη φαίνεται να σχηματίζονται κανονικά, ενώ η χρώση με MMP1 αντίσωμα επιβεβαιώνει την έλλειψη MMP1 σε αυτά. Να σημειωθεί ότι η συγκριτική παρατήρηση επιθηλίων όπου η MMP1 εκφράζεται ή έχει σιωπηθεί έδειξε παρόμοιους αριθμούς ωοκινετων να διέρχονται μέσα από αυτά.

A.



B.



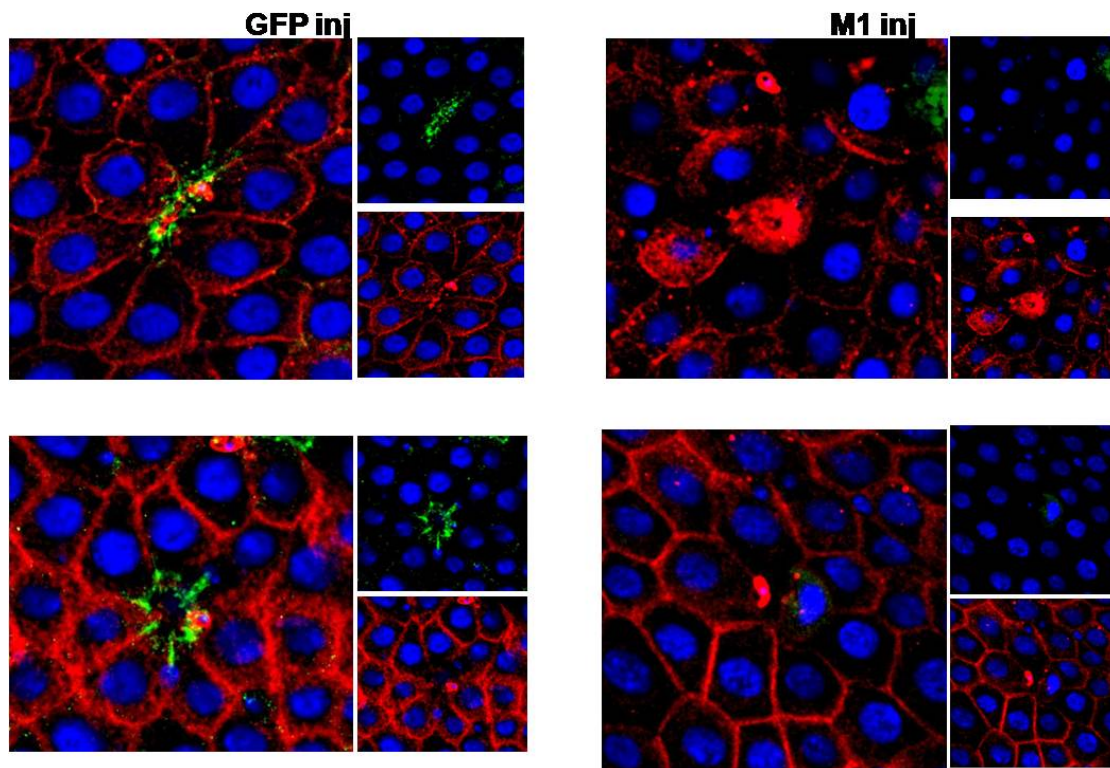
**Σχήμα 12 A)** Μεσεντερικά επιθήλια από κουνούπια ενεμεμένα με δίκλωνο GFP (*GFP inj*) και δίκλωνο RNA έναντι MMP1 (*M1 inj*) αναλυθήκαν σε πειράματα ανοσοιστοχημείας 24 ώρες μετά τη λήψη μολυσμένου αίματος με αντισώματα έναντι MMP1 (κόκκινο) κι έναντι Pbs21 (μπλε) καθώς και με



φαλλοιδίνη (πράσινο).B) Διαγραμματική απεικόνιση της τοπολογίας των δυο δακτυλίων ακτινης και MMP1 που αχρηματίζονται γύρω από το αποπτωτικό, λόγω του περασμά του ωοκινετη, μεσεντερικό επιθηλιακό κύτταρο. Το κοκκίνο, πράσινο και μπλε αντιπροσωπεύει αντιστοιχά την MMP1, ακτινή και τον πυρήνα

Ο δεύτερος κυτταρολογικός δείκτης που χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να διαπιστώσουμε αν η διαδικασία της εισβολής του ωοκινετη μέσα από το μεσεντερικό επιθήλιο παρουσιάζει διαφορές σε κουνούπια που δεν εκφράζουν MMP1 ήταν η ιντεγκρίνη. Σύμφωνα με τις βιβλιογραφικές αναφορές το αντίσωμα έναντι β-ιντεγκρίνης δεν αποκαλύπτει μόνο τη διαδικασία επούλωσης του επιθηλίου, αφού διαγράφει τη ροζέτα γύρω από το αποπτωτικό κύτταρο και υπερσυγκεντρώνεται στην βασική πλευρά της θέσης διείσδυσης του ωοκινετη κάτω από το αποβαλλόμενο αποπτωτικό κύτταρο, αλλά υποδεικνύει κι έναν πιθανό σημαντικό ρολό της ιντεγκρίνης για το ίδιο το παράσιτο, αφού περιβάλλει τον διερχόμενο ωοκινετη, προστατεύοντας τον, όπως εικάζεται(Mahairaki, Lycett et al. 2005).Δεδομένου ότι σε αλλά συστήματα οι MMPs έχει βρεθεί να αλληλεπιδρούν άμεσα ή έμμεσα με τις ιντεγκρίνες συμμετέχοντας έτσι στη μεταφορά ερεθισμάτων στο κύτταρο από τον εξωκυτταρικό χώρο(Crosby and Waters)θελήσαμε να δούμε αν υπάρχει πιθανή επίπτωση του κυτταρολογικού προτύπου έκφρασης της ιντεγκρίνης στα μολυσμένα μεσεντερικά επιθήλια του κουνουπιού σε συνθήκες σιωπής της MMP1.

Η πειραματική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή την περίπτωση είναι ίδια με αυτή που περιγράφηκε παραπάνω μόνο που αντί για φαλλοιδίνη τα πειράματα ανοσοιστοχημείας πραγματοποιήθηκαν με αντίσωμα ιντεγκρίνης. Ανάλυση των επιθηλίων στο συνεχιστικό μικροσκόπιο επιβεβαίωσε την έντονη παρουσία ανοσο-αντιδρόντος υλικού με το αντίσωμα της ιντεγκρίνης στην επιφάνεια του διερχόμενου ωοκινετη καθώς και την συγκέντρωση αυτής στη βασική πλευρά του μεσεντερου κάτω από το αποβαλλόμενο αποπτωτικό κύτταρο. Οι παρατηρήσεις αυτές ισχύουν όχι μόνο για τα μεσέντερα κουνουπιών που έχουν ενεθεί με δίκλωνο RNA έναντι GFP, αλλά και αυτών που έχουν ενεθεί με δίκλωνο RNA έναντι MMP1 (σχ.13).



**Σχήμα 13** Τομές από συνεστιακό μικροσκόπιο μεσεντερικών επιθηλίων κουνουπιών στα οποία έχει χορηγηθεί δίκλωνο RNA έναντι GFP (*GFP inj*) και έναντι MMP1 (*M1 inj*) και έχουν επωαστεί με αντίσωμα MMP1 (πράσινο), β-ιντεγκρίνης (κόκκινο) και *topro* (μπλε).

### 3.3.3 Οι απώλειες των παρασίτων που αναπτύσσονται σε μεσεντερικά επιθήλια στα οποία έχει σιωπηθεί η MMP1 σημειώνονται στο αναπτυξιακό στάδιο της ωκύστης.

Προκειμένου να διαπιστωθεί αν η εναπόθεση MMP1 ανοσο-αντιδρόντος υλικού στη επιφάνεια των πρώιμων ωκύστεων ευθύνεται για τον προστατευτικό ρόλο της MMP1 έναντι του παρασίτου πραγματοποιήθηκε συγκριτική φαινοτυπική ανάλυση σε κουνούπια που είχαν ενεθεί με δίκλωνο RNA έναντι MMP1 ή έναντι GFP (δείγμα αναφοράς). Σε αυτή την περίπτωση η καταμέτρηση των ωκύστεων έγινε σε δυο χρονικά σημεία, στις 2 και στις 7

ημέρες μετά τη χορήγηση του μολυσμένου αίματος. Οι ωοκύστες που καταμετρούνταν συγκρίνονταν με αυτούς του δείγματος αναφοράς, ενώ το μολυσμένο αίμα που χορηγήθηκε και στις δυο ομάδες (πειραματική και αναφοράς) ήταν το ίδιο.

Το χρονικό σημείο των 7 ημερών ήταν αυτό που είχε επιλεγεί και στα προηγούμενα φαινοτυπικά πειράματα και αποκάλυψε τον πιθανό λειτουργικό ρολό της πρωτεάσης στην επιβίωση του παρασίτου. Το χρονικό σημείο των δυο ημερών επιλέχθηκε προκειμένου να διαπιστωθεί αν οι αριθμοί των ωοκινετών που φτάνουν στο βασικό έλασμα του μεσεντερικού επιθηλίου των δυο πειραματικών ομάδων και αρχίζουν την διαφοροποίηση σε ωοκυστες είναι ίδιοι.

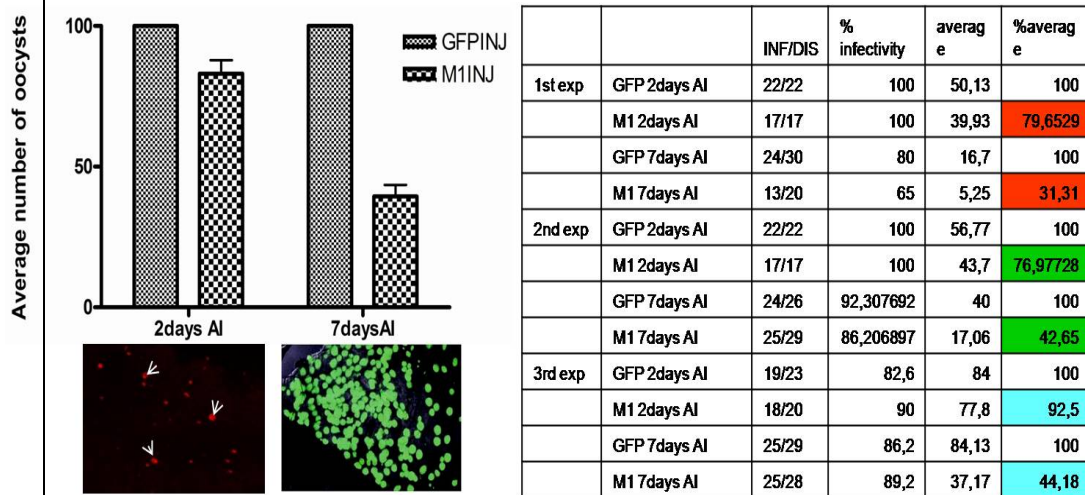
Δεδομένου ότι η διείσδυση του μεσεντερου από τους ωοκινετες δεν είναι συγχρονισμένη, αλλά πραγματοποιείται σε ένα χρονικό παράθυρο 18-36 ωρών μετά την αιματοφαγία θεωρήθηκε ότι είναι προτιμότερο η καταμέτρηση να γίνει στις 48ωρες κι όχι νωρίτερα.

Η αποκάλυψη των ωοκύστεων στα δυο επιλεγμένα χρονικά σημεία έγινε με διαφορετικό τρόπο. Στις 7 ημέρες μετά την αιμοφαγία οι ωοκύστες έχουν πλέον αυξηθεί σημαντικά σε διάμετρο, αφού έχουν ξεκινήσει οι πυρηνικές και κυτταρικές διαιρέσεις. Για αυτό το λόγο ο φθορισμός του ενδογενούς GFP που εκφράζουν είναι ικανοποιητικός και διακριτός (σχήμα 14). Στο στάδιο ωστόσο των δυο ημερών η καταμέτρηση μέσω GFP είναι δύσκολο να γίνει. Για αυτό το λόγο χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι PbCap380 (σχήμα 14). Το τελευταίο αναγνωρίζει μια πρωτεΐνη που εντοπίζεται στην κάψα της ωοκύστης. Η έκφραση της ξεκινά όταν το παράσιτο αρχίζει να διαφοροποιείται σε ωοκυστη (~36ωρες μετά την αιμοφαγία) και συνεχίζεται μέχρι και 15 ημέρες μετά τη λήψη αίματος (Srinivasan, Fujioka et al. 2008). Η χρήση του συγκεκριμένου αντισώματος όχι μόνο έκανε πιο διακριτή την παρουσία των παρασίτων, αλλά επέτρεψε και την καταμέτρηση μόνο εκείνων των παρασίτων που είχαν εισέλθει στο στάδιο διαφοροποίησης σε ωοκυστες που ήταν και το επιθυμητό. Όπως και στην προηγούμενη περίπτωση τα πειράματα επαναλήφθηκαν τρεις ανεξάρτητες φορές. Οι μέσοι όροι των παρασίτων που καταμετρήθηκαν σε κάθε πείραμα στα μεσέντερα των δυο ομάδων (πειραματικής και αναφοράς) στις δυο χρονικές στιγμές ανάχθηκαν σε ποσοστό επί τοις εκατό για να μπορεί να γίνει σύγκριση μεταξύ τους, δεδομένου ότι τα ποσοστά παρουσίας των

παρασίτων στον ξενιστή διαφοροποιούνται από πείραμα σε πείραμα.

Όπως φαίνεται και στον πίνακα του σχήματος 14, όπου αναγράφονται οι μέσοι όροι των παρασίτων που μετρούνταν σε κάθε πείραμα, αλλά και στο διάγραμμα του ίδιου σχήματος, όπου παρουσιάζονται συνολικά τα αποτελέσματα και των τριών πειραμάτων, στη χρονική περίοδο των δυο ημερών οι αριθμοί των ωοκύστεων που αναπτύσσονται στα επιθήλια των κουνουπιών στα οποία έχει σιωπηθεί η MMP1 είναι παρόμοιοι με αυτούς του δείγματος αναφοράς. Αντίθετα στις 7 ημέρες παρατηρείται μείωση του αριθμού των ωοκύστεων που συνεχίζουν να αναπτύσσονται στα κουνούπια που δεν εκφράζουν MMP1 της τάξης του 60% σε σχέση πάντα με τους αριθμούς των ωοκύστεων που καταμετρούνται στα ενεμένα με δίκλωνο RNAέναντι GFPκουνούπια.

Ανάλυση των μέσων όρων (two-wayANOVA) των τριών πειραμάτων έδειξε ότι η διαφορά στον αριθμό των παρασίτων στις δυο χρονικές στιγμές ήταν στατιστικά σημαντική ( $P < 0,0001$ ).



**Σχήμα 14** Στον πίνακα του σχήματος καταγράφονται οι αριθμοί των μεσεντέρων που αναλυθήκαν (DIS) και πόσα εξ'αυτων είχαν παράσιτα (INF) σε κάθε ένα από τα τρία πειράματα (1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>, 3<sup>rd</sup> exp) στη χρονική στιγμή των 2 και των 7 ημερών μετά την αιμοφαγία (2days, 7 days AI αντίστοιχα) στην πειραματική ομάδα των ενεμένων με δίκλωνο RNAέναντι GFPκι έναντι MMP1

κουνουπιών (GFP, M1 inj). Η πληροφορία αυτή παρουσιάζεται και με ποσοστό επί τοις εκατό (% infectivity). Στον πίνακα αναγράφεται ακόμη ο μέσος όρος των παρασίτων που καταμετρήθηκαν σε κάθε ομάδα (average), καθώς και ο αντίστοιχος επί τοις εκατό μέσος όρος (% average). Συνολικά τα αποτελέσματα των τριών ανεξαρτήτων αποτελεσμάτων παρουσιάζονται και διαγραμματικά.

Οι εικόνες που παρατίθενται μαζί με το διάγραμμα είναι ενδεικτικές λήψεις από μικροσκόπιο φθορισμού, όπου φαίνεται το πρότυπο των νεαρών ωοκυστεων που ήταν θετικές για την έκφραση PbCap380 στις δυο ημέρες μετά την αιμοφαγία και καταμετρήθηκαν (κόκκινο, υποδεικνύονται από τα βέλη). Αντίστοιχα στις 7 ημέρες μετά την αιμοφαγία φαίνεται το πρότυπο έκφρασης του ενδογενούς GFP που εκφράζουν οι ώριμες πλέον ωοκύστες (πράσινο).

Τα παραπάνω αποτελέσματα ουσιαστικά υποδεικνύουν ότι η MMP1 ασκεί τον προστατευτικό ρόλο έναντι του παρασίτου όταν αυτό έχει φτάσει πλέον στην βασική λαμίνα του μεσεντερου κι έχει αρχίσει την διαφοροποίηση του σε ωοκύστη. Στο στάδιο αυτό, όπως έχει ήδη περιγραφεί, η MMP1 περιβάλλει την αναπτυσσομένη ωοκύστη (σχήμα 8,9) γεγονός που ενισχύει τα ευρήματα των παραπάνω φαινοτυπικών πειραμάτων κι οδηγεί σε περαιτέρω διερεύνηση του πιθανού ρόλου που έχει η παρουσία της MMP1 σε αυτό το στάδιο του παρασίτου.

Προκειμένου όμως να προσεγγιστεί το παραπάνω ερώτημα θα πρέπει να εξακριβωθεί ποια μορφή της MMP1 περιβάλλει την αναπτυσσομένη ωοκύστη και αν η μορφή αυτή έχει ενεργότητα πρωτεάσης.

Το αντίσωμα έναντι MMP1 αποκάλυψε τρεις διαφορετικές εκφραζόμενες μορφές της πρωτεΐνης που θα τις διαχωρίσουμε σύμφωνα με το μοριακό τους μέγεθος. Τις 60 και 51Kd μορφές της MMP1 που αντιστοιχούν στο προζυμογόνο και ζυμογόνο της πρωτεάσης, εκφράζονται στον μεσεντερικό κυρίως ιστό και σύμφωνα με τη νουκλεοτιδική αλληλουχία τους και το κυτταρολογικό πρότυπο έκφρασης τους εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα και την μεμβράνη αντίστοιχα της κορυφαίας πλευράς των επιθηλιακών κυτταρών. Την 55Kd MMP1 που εκφράζεται στα περιφερικά αιμοκύτταρα και τα 34 και 27kD πρωτεϊνικά προϊόντα που εικάζεται ότι είναι προϊόντα πρωτεόλυσης του μορίου κι εντοπίζονται στον μεσεντερικό ιστό και στο σώμα του κουνουπιού

αντίστοιχα.

Η διαμεμβρανική τοπολογία των μεσεντερικών μορφών της MMP1 στην κορυφαία πλευρά της μεμβράνης των μεσεντερικών επιθηλιακών κυττάρων μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι δεν θα μπορούσε να περιβάλλει την αναπτυσσομένη ωοκυστη.

Θεωρούμε επομένως πιο πιθανό η προέλευση της MMP1 που αλληλεπιδρά με την ωοκυστη να είναι είτε το 55Kd αιμολεμφικό προϊόν είτε τα 34/27Kd προϊόντα που εντοπίζονται στα μεσεντερικά εκχυλίσματα και στα εκχυλίσματα από το σώμα του κουνουπιού. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η υπόθεση αυτή χρειάζεται να αποδειχθεί ότι τα δυο αυτά πρωτεϊνικά προϊόντα μπορεί να είναι εκκρινόμενα. Επιπλέον σημαντικό είναι να δειχθεί αν διατηρούν την πρωτεολυτική τους ενεργότητα ή όχι, ειδικά σε ότι αφορά το πρωτεολυτικό προϊόν, αφού η αιμοκυτταρική MMP1 βάσει μεγέθους φαίνεται να περιέχει το πρωτεολυτικό τμήμα. Ενεργή παρουσία της MMP1 στην επιφάνεια του παρασίτου διαφοροποιεί πιθανό τρόπο με τον οποίο αυτή ασκεί τον πιθανό προστατευτικό της ρόλο.

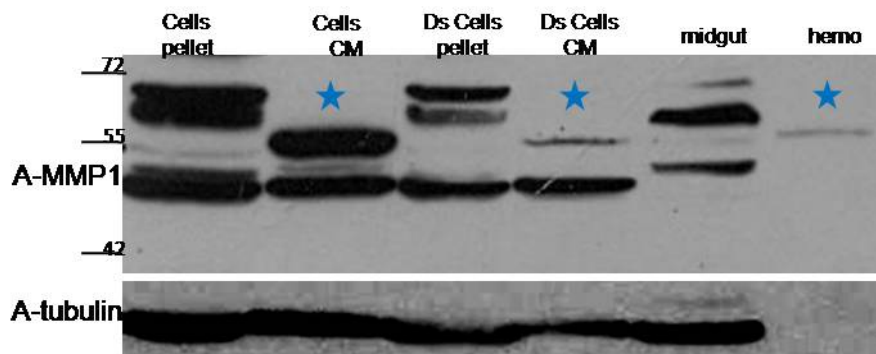
Για να απαντηθούν τα παραπάνω ερωτήματα ακολουθήσαμε δυο διαφορετικές προσεγγίσεις. Στην μια χρησιμοποιήσαμε τις κυτταρικές σειρές προκειμένου να χαρακτηρίσουμε τα δυο πρωτεϊνικά προϊόντα της MMP1 και να απαντήσουμε στα ερωτήματα που μας αφορούν.

Στη δεύτερη προσέγγιση μελετήθηκε το πρότυπο έκφρασης και πιθανός λειτουργικός ρόλος του αναστολέα των μεταλλοπρωτεασών *timpr*. Θεωρήσαμε ότι εφόσον το *timpr* του κουνουπιού είναι ενεργός αναστολέας μεταλλοπρωτεασών είναι πιθανό το πρότυπο έκφρασης του και ο ρόλος του στην επιβίωση του παρασίτου να αποκαλύψει έμμεσα αν η MMP1 που καλύπτει την επιφάνεια του παρασίτου έχει ή όχι πρωτεολυτική δράση.

#### **3.4.1 Η αιμοκυτταρική ισομορφή της MMP1 εκφράζεται στην αιμοκυτταρική σειρά sua4.0 του *A.gambiae*, εκκρίνεται στο θρεπτικό μέσο κι έχει πρωτεολυτική ενεργότητα.**

Αρχική ανάλυση εκχυλισμάτων **sua4.0** κυττάρων και του θρεπτικού τους μέσου σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης με το MMP1 αντίσωμα έδειξε ότι το τελευταίο αναγνωρίζει πολλαπλά πρωτεϊνικά προϊόντα. Προκειμένου να

ταυτοποιηθούν τα πρωτεϊνικά προϊόντα που αντιστοιχούν στην MMP1 τα κύτταρα επώαστηκαν με δίκλωνο RNAέναντι της πρωτεάσης. Στη συνέχεια τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των κυττάρων και του υπερκειμένου θρεπτικού μέσου αναλυθήκαν και πάλι σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης με το MMP1 αντίσωμα. Η σύγκριση του προτύπου των πρωτεϊνικών προϊόντων που αναγνωρίζονται από το αντίσωμα στα εκχυλίσματα από τα κύτταρα που είχε γίνει προσθήκη δίκλωνου RNAμε αυτό των εκχυλισμάτων από κύτταρα στα οποία δεν είχε γίνει προσθήκη αποκάλυψε ότι στο θρεπτικό μέσο της κυτταρικής σειράς sua 4.0 εκκρίνεται μια πρωτεΐνη που έχει το ίδιο μοριακό μέγεθος με αυτό της αιμοκυτταρικής ισομορφής της MMP1 (σχ.15). Μπορούμε επομένως να συμπεράνουμε ότι η αιμοκυτταρική MMP1 μπορεί να είναι εκκρινόμενη.



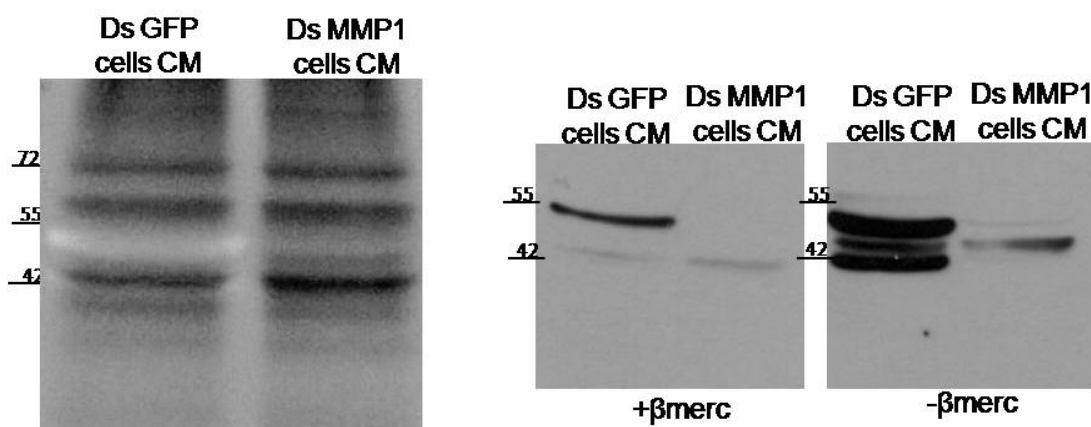
**Σχήμα 15** πειράματα ανοσοαποτύπωσης με πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από την κυτταρική πέλεττα (*cell pellet*) και το θρεπτικό μέσο (*cells CM*) κυττάρων *sua 4.0* χωρίς προσθήκη και με προσθήκη δίκλωνου RNAέναντι MMP1 (*dscell pellet*, *dscell CM*). Ο αστερίσκος υποδεικνύει την αιμοκυτταρική MMP1 που εντοπίζεται στο θρεπτικό μέσο των *sua 4.0* και σε εκχυλίσματα από περιφερικά αιμοκύτταρα ανωφελούς (*hemo*). Στο ίδιο πείραμα αναλυθήκαν και μεσεντερικά εκχυλίσματα, ενώ η κανονικοποίηση των δειγμάτων έγινε με αντίσωμα έναντι του μπουλίνης.

Επιπλέον θελήσαμε να διαπιστώσουμε αν η MMP1 που εκκρίνεται στο θρεπτικό μέσο των κυττάρων διατηρεί την πρωτεολυτική της ενεργότητα, όπως και η αιμοκυτταρική MMP1. Για αυτό τον λόγο υπερκείμενα κύτταρα στα οποία είχε χορηγηθεί δίκλωνο RNAέναντι GFPή δίκλωνο RNAέναντι

MMP1 αναλύθηκαν με ζυμογραφία καζεΐνης.

Όπως φαίνεται στο σχήμα 16 καζεΐνολυτική ενεργότητα εντοπίστηκε μόνο στο θρεπτικό μέσο των κυττάρων στα οποία είχε χορηγηθεί δίκλωνο RNAέναντι GFPκαι στο αναμενόμενο για την αιμοκυτταρική ισομορφή MMP1 μοριακό μέγεθος. Επιπλέον, καζεΐνολυτική ενεργότητα εντοπίζεται και σε ζώνη μικρότερου μοριακού μεγέθους (~42kDa). Μάλιστα και αυτή η ενεργότητα φαίνεται να σχετίζεται με την MMP1, αφού δεν εντοπίζεται στο θρεπτικό μέσο κυττάρων στα οποία η MMP1 έχει σιωπηθεί.

Η ίδια πρωτεΐνη ~42kDaανιχνεύεται και σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης στα οποία δεν έχει προστεθεί μερκαπταιθανόλη στο θρεπτικό μέσο, όπως φαίνεται στο σχήμα 16β, (στις ίδιες δηλαδή συνθήκες με αυτές που γίνεται η ζυμογραφία). Εικάζουμε ότι το προϊόν αυτό αντιστοιχεί στην αιμοκυτταρική MMP1 ισομορφή μετά την αφαίρεση του προπεπτιδίου (prodomain), δηλαδή στο ζυμογόνο MMP1 στα αιμοκύτταρα. Πιθανά απουσία αναγωγικού παράγοντα καταλύεται η απομάκρυνση του προπεπτιδίου μέσα στον δοκιμαστικό σωλήνα.



**Σχήμα 16** A) Ζυμογραφία καζεΐνης θρεπτικού μέσου (CM) κυττάρων στα οποία έχει χορηγηθεί δίκλωνο RNAέναντι GFP (dsGFP Cells) και δίκλωνο RNAέναντι MMP1 (dsMMP1 cells). B) Πείραμα ανοσοαποτύπωσης θρεπτικού μέσου κυττάρων παρουσία (+) και απουσία (-) β-μερκαπταιθανόλης.

### 3.4.2 Υπερέκφραση μεσεντερικού MMP1 ζυμογόνου σε sua4.0 κύτταρα



## οδηγεί σε MMP1 πρωτεολυτικά προϊόντα.

Βιβλιογραφικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι η υπερέκφραση ή/και ο ολιγομερισμός ενεργών MMP ζυμογόνων σε άλλα συστήματα οδηγεί σε φαινόμενα αυτο-πρωτεόλυσης τους

(Hernandez-Barrantes, Toth et al. 2000; Lehti, Lohi et al. 2002; Rozanov and Strongin 2003). Θα μπορούσε επομένως κανείς να υποστηρίξει ότι η υπερ-συγκέντρωση MMP1 ζυμογόνου στα μεσέντερα στα σημεία εισβολής του ωοκινέτη μπορεί να έχει σαν συνέπεια την αυτοπρωτεόλυση του μορίου και να εξηγεί την παρουσία μικρότερων πρωτεϊνικών MMP1 προϊόντων που ενίοτε εντοπίζονται στα εκχυλίσματα μεσεντέρων. Προκειμένου να πετύχουμε συνθήκες υπερέκφρασης μεσεντερικού MMP1 ζυμογόνου χρησιμοποιήσαμε την κυτταρική σειρά sua4.0. Όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο 2 μετασχηματισμός της κυτταρικής σειράς sua5.1 με το cDNA που κωδικοποιεί ολόκληρο το αναγνωστικό πλαίσιο της MMP1 οδήγησε σε έκφραση του μορίου, χωρίς όμως απομάκρυνση του προπεπτιδίου του και του σηματοδοτικού του πεπτιδίου. Αυτό μπορεί να οφείλεται, όπως έχει ήδη αναφερθεί, είτε σε μη αναγνώριση του σηματοδοτικού πεπτιδίου από τη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά, είτε στο γεγονός ότι στη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά δεν εκφράζονται *proproteinconvertases* που να αναγνωρίζουν το MMP1 προζυμογόνο σαν υπόστρωμα και να απομακρύνουν το προπεπτίδιο της καθιστώντας την ενεργό ζυμογόνο.

Έκφραση της ίδιας κατασκευής στην κυτταρική σειρά sua 4.0 οδήγησε και πάλι στην έκφραση ενός μορίου μεγέθους 63kd, το οποίο αντιστοιχεί στο προ-ζυμογόνο, όπως φαίνεται από πειράματα ανοσοαποτύπωσης και εντοπισμό του μέσα στα κύτταρα, πιθανά στο ενδοπλασματικό δίκτυο (σχ.17A).

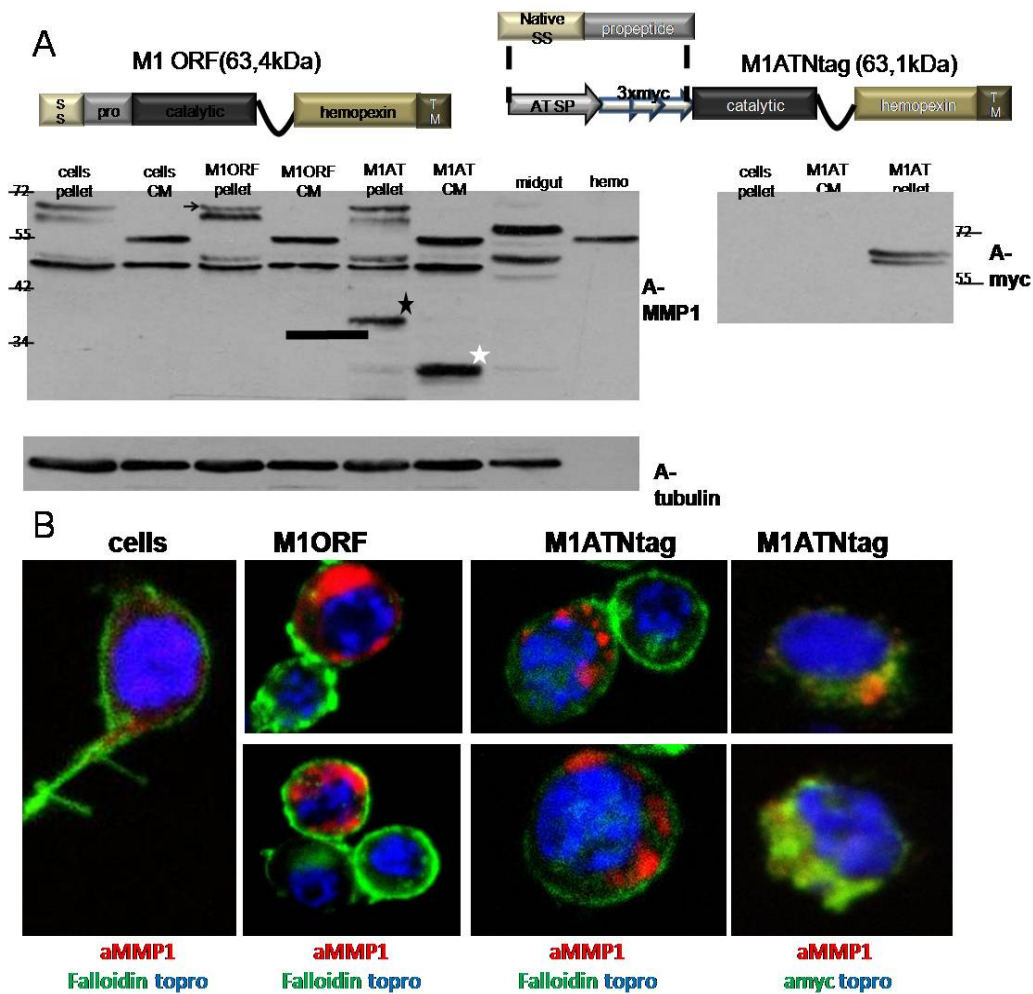
Προκειμένου να πετύχουμε λοιπόν έκφραση ενεργοποιημένου MMP1 ζυμογόνου η κυτταρική σειρά sua4.0 μετασχηματίστηκε παροδικά με ένα ανασυνδισμένο cDNA της μεσεντερικής MMP1 ισομορφής όπου η περιοχή που κωδικοποιεί το σηματοδοτικό της πεπτίδιο και το προπεπτίδιο αντικαταστάθηκε με μια περιοχή που κωδικοποιεί για το σηματοδοτικό πεπτίδιο της α1-αντιπρυψίνης και τον επίτοπο 3xmyc. Η υπόλοιπη περιοχή της MMP1 που κωδικοποιεί την ενεργότητα πρωτεάσης, τα

hemopexindomains και το διαμεμβρανικό τμήμα παρέμειναν ανέπαφα. Το ανασυνδιασμένο αυτό cDNA (παρουσιάζεται σχηματικά στο σχήμα 17A) κλωνοποιήθηκε σε φορέα που φέρει τον υποκινητή tet-O-P και μετασχηματίστηκε μαζί με φορέα που εκφράζει τον μεταγραφικό ενεργοποιητή tTA2s, που αναγνωρίζει τον tet-O-P υποκινητή.

Ανάλυση εκχυλισμάτων της πελέτας και του θρεπτικού μέσου των μετασχηματισμένων κυττάρων σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης με αντίσωμα έναντι του επιτόπου 3myc (α-myc αντίσωμα) ανίχνευσε στην πελέτα των μετασχηματισμένων κυττάρων μια διπλή ζώνη στο μέγεθος που αντιστοιχεί στο αναμενόμενο για το ενεργοποιημένο προζυμογόνο (~65kDa) (σχ17A). Η παρουσία της διπλής ζώνης μπορεί να ερμηνευτεί σαν μη ικανοποιητική απομάκρυνση του σηματοδοτικού πεπτιδίου.

Χρησιμοποιώντας όμως το α-MMP1 αντίσωμα σε ανοσοαποτύπωση των ίδιων εκχυλισμάτων δεν ανιχνεύθηκε η ~65kDa ζώνη αλλά αντίθετα ανιχνεύθηκαν δύο διαφορετικού μεγέθους πρωτεϊνικά προϊόντα. Στο μεν εκχύλισμα της κυτταρικής πελέτας το αντίσωμα ανιχνεύει κυρίως ένα πρωτεϊνικό προϊόν 40kDa και με λιγότερη ένταση ένα πρωτεϊνικό προϊόν 34kDa. Το ίδιο 34kDa πρωτεϊνικό προϊόν ανιχνεύεται πιο έντονα στο θρεπτικό μέσο των μετασχηματισμένων κυττάρων. Το πρωτεϊνικό αυτό προϊόν έχει παραπλήσιο μοριακό μέγεθος με αυτό που εντοπίζεται ενίοτε σε εκχυλίσματα μεσεντέρων εκχυλίσματα (σχ17A).

Ανοσοιστοχημεία των μετασχηματισμένων κυττάρων με το α-MMP1 αντίσωμα ανίχνευσε ανοσο-αντιδρόν υλικό στα κύτταρα όπως και το α-myc αντίσωμα ενώ ταυτόχρονη χρώση με τα δύο αντισώματα οδηγεί σε μερικό συνεντοπισμό των δυο σημάτων (σχ17B).



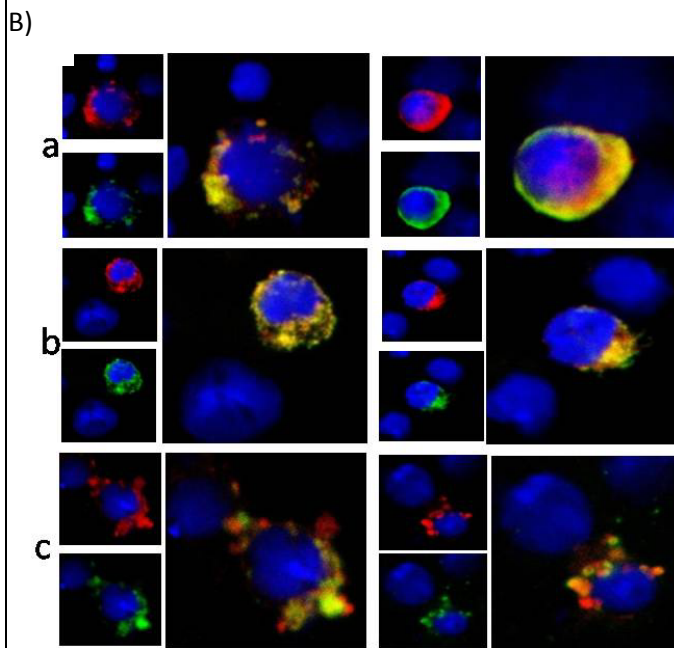
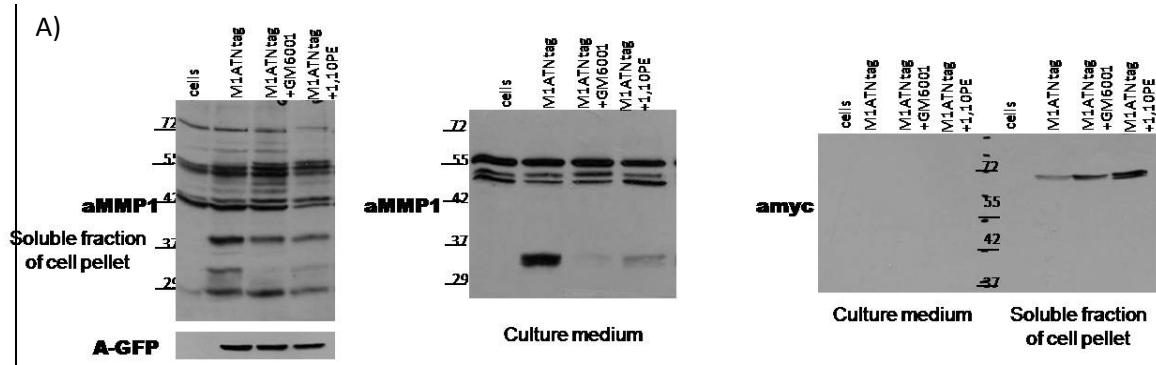
**Σχήμα 17** Σχηματική απεικόνιση του ανασυνδιασμένου cDNA της MMP1 που αντιστοιχεί σε ολοκληρωμένο το αναγνωστικό πλαίσιο του μορίου (M1ORF) και της χιμαιρικής MMP1 που χρησιμοποιήθηκε για τον μετασχηματισμό των *sua4.0* κυττάρων (M1ATNtag). Το αναμενόμενο μοριακό μέγεθος του πρωτεϊνικού προϊόντος του M1ORF cDNA είναι 63,4 kDa, ενώ του M1ATNtag cDNA είναι 63,1 kDa. Τα μετασχηματισμένα με M1ATNtag κύτταρα, οι κυτταρικές τους πελέττες (pellet) και το θρεπτικό μέσο (CM), αναλύθηκαν σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης με αντίσωμα έναντι του myc επιτόπου. Τα ίδια εκχυλίσματα δοκιμάστηκαν σε πείραμα ανοσοαποτύπωσης με αντίσωμα έναντι MMP1 μαζί με εκχυλίσματα από κύτταρα μετασχηματισμένα με το M1ORF cDNA, καθώς και με εκχυλίσματα από μεσέντερα (midguts), περιφερικά αιμοκύτταρα (hemo) και σώματα (carcasses) κουνουπιών. Τα πρωτεϊνικά προϊόντα των 42 και 34 kDa σημειώνονται με μαυρο και ασπρο αστερίσκο αντίστοιχα ενώ η ολομορφή της MMP1 με βέλος.

*B) Τοκυτταρικό πρότυπο της M1ATNtag και της M1ORF αποκαλύφθηκε σε πειράματα ανοσοιστοχημείας με αντίσωμα έναντι MMP1 και myc(κόκκινο). Στα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκε φαλλοιδίνη (πράσινο) και torpo (μπλε). Παράλληλα παρατίθενται και πειράματα ανοσοιστοχημείας στα οποία έγινε συγχρώση με αντίσωμα έναντι myc (πράσινο) και MMP1 (κόκκινο).*

Επιχειρώντας μια πρώτη ερμηνεία των αποτελεσμάτων θα μπορούσε κανείς να υποθέσει ότι η υπερέκφραση ενεργοποιημένου ζυμογόνου MMP1 οδηγεί μέσα στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) σε αυξημένη αυτο-πρωτεόλυση του, είτε διαμοριακή (inter-molecular) είτε ενδομοριακή (intra-molecular). Από τα δύο προϊόντα αυτο-πρωτεόλυσης το ένα (34kDa) εξάγεται τελικά στο υπερκείμενο θρεπτικό μέσο. Τα επίπεδα όμως της ενδογενούς αιμοκυτταρικής MMP1 ισομορφής παραμένουν ανέπαφα. Προκειμένου να δειχθεί ότι υπεύθυνο για την παρουσία των παραπάνω προϊόντων είναι το ενεργοποιημένο προζυμογόνο και ότι τα προϊόντα που ανιχνεύονται είναι προϊόντα αυτο-πρωτεόλυσης έγινε προσθήκη δυο διαφορετικών χημικών αναστολέων μεταλλοπρωτεασών στα μετασχηματισμένα κύτταρα και επώαση με αυτούς 24-36 ώρες. Οι πελέττες και το θρεπτικό μέσο των κυττάρων αναλύθηκαν στη συνέχεια σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης με α-MMP1 και α-mycαντισώματα.

Όπως φαίνεται στο σχήμα 18 επώαση των μετασχηματισμένων κυττάρων οδηγεί σαφώς σε μειωμένο εντοπισμό του πρωτεϊνικού προϊόντος των 34kD στο θρεπτικό μέσο των κυττάρων, επιβεβαιώνοντας έτσι ότι το τελευταίο προέρχεται από πρωτεόλυση της ενεργοποιημένης MMP1 και μάλιστα ότι αυτή η πρωτεόλυση είναι αποτέλεσμα της δράσης κάποιας μεταλλοπρωτεάσης. Αντίθετα η παρουσία του προϊόντος των 42kD φαίνεται να επηρεάζεται εξίσου δραστικά, υποδηλώνοντας ότι το προϊόν αυτό είναι πιθανά αποτέλεσμα δράσης κάποιας άλλης πρωτεάσης, ίσως όχι μεταλλοπρωτεάσης.

Το γεγονός ότι τα 34 και 42kD προϊόντα προέρχονται από το ενεργοποιημένο MMP1 επιβεβαιώνεται περαιτέρω από το γεγονός ότι η ποσότητα της πρωτεΐνης αυτής αυξάνεται στα εκχυλίσματα της κυτταρικής πελέτας μετά την προσθήκη των χημικών αναστολέων.



**.Σχήμα 18A)**

πειράματα ανοσοαποτύπωσης με εκχυλίσματα από την κυτταρική πελέττα (soluble fraction of cell pellet) και το θρεπτικό μέσο (culture medium) κυττάρων (cells) κυττάρων μετασχηματισμένων με την ενεργοποιημένη μορφή της MMP1 (M1ATNtag) και

κυττάρων μετασχηματισμένων με την ίδια κατασκευή μετά την προσθήκη των χημικών αναστολέων GM6001 και 1,10PE (M1ATNtag+GM, M1ATNtag+1,10PE αντίστοιχα). Στα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι MMP1 και myc επιτόπου, ενώ το ίδιο ποσοστό μετασχηματισμένων κυττάρων στα δείγματα που αναλύθηκαν επιβεβαιώθηκε με τον μάρτυρα GFP. B) πειράματα ανοσοιστοχημείας στα οποία έγινε συγχρώση με αντίσωμα έναντι MMP1 (κόκκινο) και myc (πράσινο) a) κύτταρα μετασχηματισμένα με την ενεργοποιημένη MMP1, b) κύτταρα μετασχηματισμένα με την ενεργοποιημένη MMP1 μετά από προσθήκη αναστολέα GM, c) κύτταρα μετασχηματισμένα με την ενεργοποιημένη MMP1 μετά την προσθήκη αναστολέα 1,10PE.

Τα παραπάνω αποτελέσματα υποστηρίζουν ότι το ενεργοποιημένο MMP1 ζυμογόνο μπορεί να υποστεί πρωτεόλυση σε συνθήκες υπερέκφρασης, η οποία είναι μάλιστα αποτέλεσμα δράσης της ίδιας της MMP1 (ή κάποιας μεταλλοπρωτεάσης του ER). Το γεγονός ότι το αντίσωμα έναντι του myc επιτόπου δεν αναγνωρίζει τα παραγόμενα πρωτεολυτικά προϊόντα της έκτοπα εκφρασμένης MMP1 δεν βοηθά στο να προσδιορίσουμε τη θέση πρωτεόλυσης, ωστόσο προτείνει ότι στα πρωτεολυτικά αυτά προϊόντα δεν περιέχεται το αμινοτελικό άκρο της πρωτεάσης.

### **3.4.3 Προσπάθειες προσδιορισμού της αλληλεπίδρασης της MMP1 με την αναπτυσσόμενη ωοκύστη**

Σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές συν-καλλιέργεια κυτταρικών σειρών εντόμων με *invitro* αναπτυγμένους ωοκινετες οδηγεί στην διαφοροποίηση των τελευταίων προς ωοκύστες η οποία συνήθως είναι ατελής, αλλά σε μερικές περιπτώσεις φτάνει μέχρι και του σχηματισμού σποροζωιδίων (Carter, Nacer et al. 2007).

Όπως προαναφέρθηκε τα sua4.0 κύτταρα φαίνεται να μοιάζουν με περιφερικά αιμοκυτταρα, σε ότι τουλάχιστον αφορά την MMP1 αφού εκφράζουν σχεδόν αποκλειστικά την αιμοκυτταρική ισομορφή της. Επιπρόσθετα, παραπάνω δείξαμε ότι μετά από διαμόλυνση μπορεί να εκφραστεί εξωγενώς στα sua4.0 ενεργό MMP1 ζυμογόνο (που αντιστοιχεί στην ζυμογόνο ισομορφή του μεσεντέρου), το οποίο μάλιστα με αυτο-πρωτεόλυση φαίνεται να παράγει πρωτεολυτικά προϊόντα των οποίων το μέγεθος συμπίπτει με εκείνο MMP1 προϊόντων που ανιχνεύσαμε *invivo*.

Θεωρήσαμε συνεπώς ότι τα υπερκείμενα sua4.0 κυττάρων, όπως έχουν ή μετά από διαμόλυνση τους με το πλασμίδιο (pTetopM1ATNtag) μπορούν να αποτελέσουν μια πηγή MMP1-σχετιζόμενων πεπτιδίων και να μας διευκολύνουν να προσεγγίσουμε την προέλευση του MMP1 ανοσο-αντιδρόντος υλικού που παρατηρήσαμε να καλύπτει ένα μεγάλο αριθμό αναπτυσσόμενων ωοκύστεων *invivo*.

Για το σκοπό αυτό προχωρήσαμε σε συν-καλλιέργειες *invitro* αναπτυγμένων ωοκινετών και sua4.0 κυττάρων (ως έχουν, ή μετά από επίδραση με δίκλωνο RNA έναντι MMP1 ώστε να αποσιωπηθεί ή έκφραση της αιμοκυτταρικής

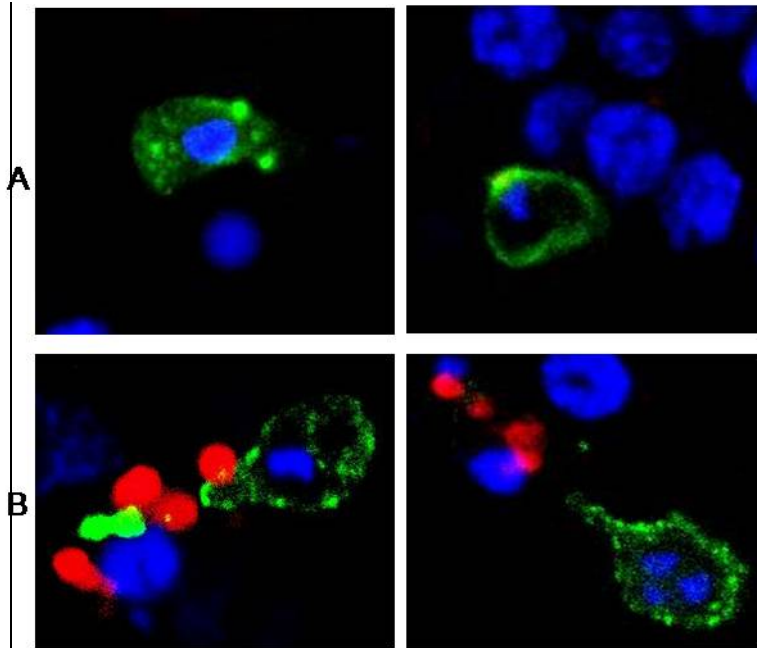
MMP1, ή μετά από διαμόλυνσή τους με το πλασμίδιο (pTetopM1ATNtag) ώστε να εκφράσουν ενεργοποιημένο MMP1 ζυμογόνο και τα πρωτολυτικά του προϊόντα).

Οι ωοκινέτες αφαίθηκαν σε καλλιέργεια με τα sua4.0 κύτταρα για περίπου 2 ημέρες οπότε στην μεγάλη τους πλειοψηφία είχαν διαφοροποιηθεί σε νεαρές ωοκυστες.

Στην συνέχεια από όλες τις συν-καλλιέργειες απομονώθηκαν κύτταρα και ωοκινέτες/ωοκύστες και έγινε ανοσοιστοχημική χρώση χρησιμοποιώντας τον ορό έναντι MMP1 και αντίσωμα έναντι Pbs21 το οποίο ανιχνεύεται στην επιφάνεια ωοκινετών και νεαρών ωοκύστεων. Όπως φαίνεται στο σχήμα 19 παρά το γεγονός ότι τα παράσιτα είχαν αρχίσει μέσα στις συγκαλλιέργειες να διαφοροποιούνται σε ωοκυστες, γεγονός που αναδεικνύεται από τη μορφολογία τους και από το μέγεθος και την μορφολογία του πυρήνα τους, σε καμία περίπτωση δεν παρατηρήθηκε παρουσία MMP1 στην επιφάνεια αυτών.

Πέραν των ερμηνειών για τεχνικές αδυναμίες τις προσέγγισης (π.χ. αραιή συγκέντρωση της MMP1 και πρωτεολυτικών προϊόντων στο υπερκείμενο των κυττάρων σε σχέση με την πιθανά υψηλή τοπική συγκέντρωση τους γύρω από την αναπτυσσόμενη ωοκύστη *in vivo*) οι παρατηρήσεις σ' αυτό το τεχνητό σύστημα μπορεί να υποδηλώνουν ότι η αλληλεπίδραση των νεαρών ωοκύστεων με MMP1 *in vivo* μπορεί να μην είναι άμεση αλλά να διαμεσολαβείται από άλλα συστατικά της εξωκυττάριας στοιβάδας (όπως κολλαγόνο και λαμινίνη) με τα οποία η MMP1 μπορεί να αλληλεπιδράσει και τα οποία έχει δειχθεί να καλύπτουν επίσης την επιφάνεια του ωοκινέτη. Απουσία αυτών των μορίων από τα υπερκείμενα των sua 4.0 κυττάρων μπορεί να οδηγεί και στην απουσία αλληλεπίδρασης MMP1 πεπτιδίου(ων) με τις νεαρές ωοκυστες όπως παρατηρείται *in vivo*.

Επιπλέον δεν πρέπει να ξεχνάμε ότι η ανάπτυξη των ωοκύστεων στα τεχνητά συστήματα συν-καλλιέργειας με κύτταρα στο μεγαλύτερο αριθμό δεν είναι παραγωγική (δεν οδηγεί δηλαδή σε πλήρως ανεπτυγμένες ωοκύστες με φυσιολογική σπορογονία), που μπορεί να σημαίνει μεγάλες διαφορές στην φυσιολογία τους και στην δομή της κάψας τους.



**Σχήμα 19** Πειράματα συγκαλλιέργειών κύτταρων *sua 4.0* με *invitro*μεγαλωμένους ωοκινετες 3 ημέρες μετά την προσθήκη των τελευταίων. A) Νεαρές ωοκύστες (πράσινο) που αναπτύσσονται παρουσία κύτταρων *sua4.0* στα οποία η ενδογενής MMP1 έχει

σιωπηθεί. Με μπλε φαίνεται η χρωστική του πυρήνα (*topro*). B) Νεαρές ωοκύστες παρουσία κύτταρων *sua4.0* διαμολυσμένων με την κατασκευή M1Ntag. Το πρωτεϊνικό προϊόν της εξωγενούς πρωτεάσης φαίνεται με κόκκινο, ενώ το πράσινο και μπλε αντιστοιχεί στα παράσιτα και στην χρωστική του πυρήνα (*topro*).

Εναλλακτικά με την παραπάνω προσέγγιση χρησιμοποιήσαμε υπερκείμενα *sua4.0* κυτάρων, (είτε από κύτταρα στα οποία δεν είχαμε καθόλου επιδράσει, είτε από κύτταρα στα οποία είχαμε σιωπήσει την MMP1, είτε από κύτταρα στα οποία είχαμε έκτοπα εκφράσει ενεργοποιημένο MMP1 ζυμογόνο), τα οποία ενέσαμε στην αιμόλεμφο. Η χορήγηση των υπερκειμένων στην αιμόλεμφο έγινε 48 ώρες μετά την πρόσληψη μολυσμένου αίματος, όταν η πλειονότητα των ωοκινετων είχαν φτάσει πλέον στο βασικό έλασμα του μεσεντέρου και είχαν αρχίσει την διαφοροποίηση σε ωοκύστες.

Δεδομένου ότι ένα μέρος μόνο των νεαρών ωοκύστεων που αναπτύσσονται *invitro*, φαίνεται να καλύπτονται με MMP1 ανοσο-αντιδρόν υλικό, θεωρήσαμε ότι με αυτό τον τρόπο, χορηγώντας επιπλέον MMP1 θα μπορούσαμε να αυξήσουμε τον αριθμό των MMP1-καλυμμένων ωοκύστεων.

Το μεγάλο πρόβλημα που αντιμετωπίσαμε όμως με αυτή την προσέγγιση, η οποία τελικά εγκαταλήφθηκε, ήταν τα υψηλά ποσοστά μελανοποίησης των ωοκύστεων που αναπτύσσονται στα μεσεντερικά επιθήλια κουνουπιών ενεμένων με θρεπτικό μέσο της αιμοκυτταρικής σειράς, το οποίο μπορεί να



εξηγηθεί από το γεγονός ότι στην κυτταρική σειρά sua4.0 είναι ενεργοποιημένο το μονοπάτι της φαινολοξειδάσης και άρα τα τελικά προϊόντα που συντελούν στην μελανοποίηση.

### **3.5 Μοριακός/λειτουργικός χαρακτηρισμός του ιστικού αναστολέα μεταλλοπρωτεασών (tissue inhibitor of metalloproteases), TIMP, του Ανωφελούς**

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν στο κεφάλαιο 1 και 2 φαίνεται ότι τουλάχιστον στον μεσεντερικό ιστό του κουνουπιού παράλληλα με την MMP1 εκφράζεται και το γονίδιο TIMP.

Θεωρήσαμε σημαντικό να περιγράψουμε το πρότυπο έκφρασης (χρονο- ιστο- ειδική έκφραση, υποκυττάριος εντοπισμός) του αναστολέα TIMP προκειμένου να διαπιστωθεί αν τα δυο γονίδια (MMP1 και TIMP) συν-ρυθμίζονται μεταγραφικά και μετα-μεταγραφικά.

#### **3.5.1 Ο αναστολέας AgTIMP έχει ενεργότητα έναντι MMP1.**

Κατ' αρχήν θελήσαμε να προσδιορίσουμε αν το γονίδιο το οποίο ταυτοποιείται ως TIMP αναστολέας στο γονιδίωμα του Ανωφελούς, είναι πράγματι αναστολέας μεταλλοπρωτεασών και ιδιαίτερα της MMP1. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε την κυτταρική σειρά sua4.0. Όπως παρουσιάστηκε στο κεφάλαιο 3, έκτοπη έκφραση ανασυνδισμένου cDNA που κωδικοποιεί για ενεργοποιημένη πρωτεάση MMP1 σε sua4.0 κύτταρα, οδηγεί σε πρωτεολυτικά προϊόντα διακριτού μεγέθους. Η πρωτεόλυση αυτή οφείλεται σε δράση κάποιας μεταλλοπρωτεάσης, αφού αναστέλλεται από την παρουσία του χημικού αναστολέα έναντι μεταλλοπρωτεασών GM6001, και όλες οι ενδείξεις συνηγορούν ότι οφείλεται σε αυτοπρωτεόλυση (είτε ενδο-, είτε δια-μοριακή).

Το πλασμίδιο (pTETO<sub>2</sub>timp) από το οποίο ο TIMP αναστολέας εκφράζεται με επαγόμενο τρόπο χρησιμοποιήθηκε σε μίγμα με το πλασμίδιο (pTETOM1ATNtag) που εκφράζει ενεργοποιημένο MMP1 ζυμογόνο (M1Ntag). Στα παραπάνω πλασμίδια, τόσο ο TIMP όσο και το

ενεργοποιημένο MMP1 ζυμογόνο έχουν τεθεί υπό τον μεταγραφικό έλεγχο του tetORυποκινητή, ο οποίος ενεργοποιείται μόνο παρουσία ttA2s ενεργοποιητή. Για να επιτευχθεί επομένως έκφραση των των TIMP και MMP1 ζυμογόνου στις διαμολύνσεις των sua4.0 κυττάρων συμπεριλαμβάνεται και το πλασμίδιο που εκφράζει τον ενεργοποιητή ttA2sυπό υποκινητή σερπίνης. Σε διαμολύνσεις αναφοράς τα πλασμίδια (pTETOtimpκαι pTETOM1ATNtag) εκφράστηκαν μόνο τους με πλασμίδιο ενεργοποιητή.

Σε καθένα ένα από τα παραπάνω πειράματα συμπεριλήφθηκε και πλασμίδιο το οποίο εκφράζει GFP υπό τον μεταγραφικό έλεγχο του tetORυποκινητή, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης του ποσοστού της διαμόλυνσης των κυττάρων.

Πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των διαμολυσμένων κύτταρων και των υπερκείμενων θρεπτικών μέσων τους απομονώθηκαν και αναλυθήκαν σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης με αντισώματα έναντι TIMP, MMP1, myc (επίτοπος που έχει χρησιμοποιηθεί για την σήμανση (tagging) του MMP1 ζυμογόνου) και GFP.

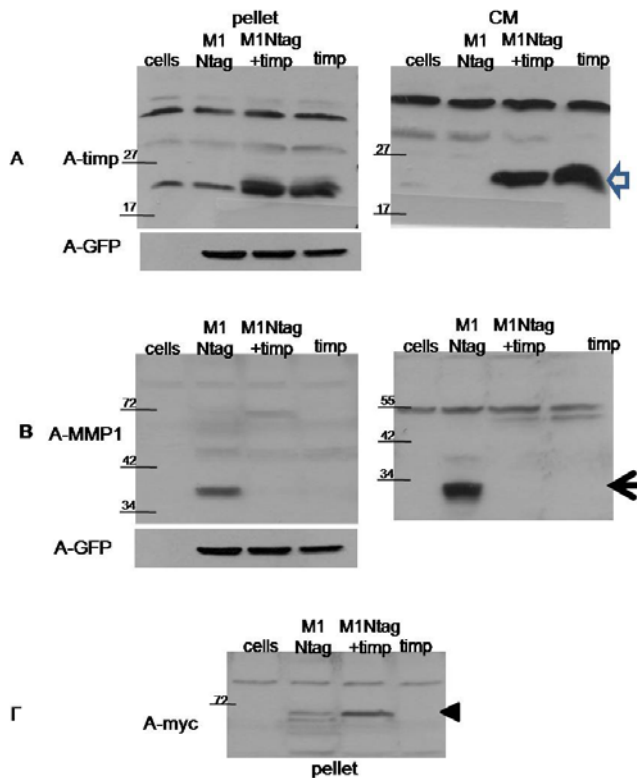
Ο ορρός έναντι TIMPανιχνεύει στην κυτταρική πελέτα των sua4.0 κυττάρων ή στην πελέτα των κυττάρων που έχουν διαμολυνθεί μόνο με το πλασμίδο (pTETOtimp) μια ζώνη ~.23.kDa, ή οποία αντιστοιχεί στο αναμενόμενο μέγεθος του TIMP. Η ένταση της ζώνης αυξάνει στην πελέτα των κυττάρων που έχουν διαμολυνθεί μόνο με το pTETOtimpπλασμίδιο, όσο και σε αυτά τα οποία διαμολύνθηκαν με pTETOtimp και pTETOM1ATNtag μίγμα πλασμιδίων. TIMP αναστολέας δεν ανιχνεύεται στο υπερκείμενο των sua4.0 κυττάρων, ενώ αντίθετα ανιχνεύεται έντονα στα υπερκείμενα κυττάρων που έχουν διαμολυνθεί με pTETOtimpκαιpTETOtimp+pTETOM1ATNtagμίγμα πλασμιδίων (σχ.20<sup>A</sup>).

Η ανάλυση των εκχυλισμάτων που προέρχονταν από κύτταρα διαμολυσμένα με τα δύο πλασμίδια (pTETOtimpκαι pTETOM1ATNtag) φαίνεται να οδηγεί στην εξαφάνιση από την κυτταρική πελέτα του (~.42kDa) προϊόντος και από το υπερκείμενο του (~34KDa) προϊόντος τα οποία ανιχνεύονται με το αντίσωμα έναντι MMP1. Αντίθετα και τα δύο χαρακτηριστικά πρωτεολυτικά προϊόντα, τα οποία εικάζουμε ότι είναι προϊόν αυτο-πρωτεόλυσης της ενεργοποιημένης MMP1, ανιχνεύονται σε κύτταρα που διαμολύνθηκαν μόνο με (pTETOM1ATNtag) πλασμίδιο (σχ.20B).

Επιπρόσθετα, η ανάλυση των εκχυλισμάτων με αντι-μγς αντίσωμα, το οποίο ανιχνεύει το έκτοπα εκφρασμένο μη πρωτεολυμένο MMP1, έδειξε ότι σε συνθήκες συνέκφρασης ενεργοποιημένου MMP1 ζυμογόνου και TIMP, και επομένως καταστολή της αυτο-πρωτεόλυσης, το μη πρωτεολυμένο MMP1 ζυμογόνο αυξάνεται σημαντικά σε σχέση με την παρουσία του στις πελέτες των κυττάρων που έχουν διαμολυνθεί μόνο με το pTetoM1ATNtag πλασμίδιο (σχ.20Γ).

Συμπερασματικά, τα sua4.0 κύτταρα εκφράζουν ενδογενώς TIMP αναστολέα, ο οποίος όμως σε αντίθεση με το αιμοκυττάρικο ζυμογόνο της MMP1 δεν εκκρίνεται στο υπερκείμενο των κυττάρων. Αυτό συνηγορεί με πειράματα που παρουσιάζονται παρακάτω και δείχνουν ασθενή παρουσία του TIMP στην αιμόλεμφο. Εκκρίση του TIMP στο υπερκείμενο των sua4.0 κυττάρων παρατηρείται μόνο στην περίπτωση έκτοπης υπερ-έκφρασης του αναστολέα μετά από διαμόλυνση.

Ταυτόχρονη έκτοπη υπερ-έκφραση του TIMP και ενεργοποιημένου MMP1 ζυμογόνου έχει σαν αποτέλεσμα την αναστολή της αυτο-πρωτεόλυσης του ενεργοποιημένου MMP1 ζυμογόνου, που διαγνωστικά ανιχνεύεται με την παρουσία χαρακτηριστικών ζωνών στα εκχυλίσματα κυτταρικής πελέτας και υπερκειμένου, πράγμα που δείχνει ότι το προβλεπόμενο TIMP γονίδιο κωδικοποιεί για αναστολέα MMPs.



A) Πειράματα ανοσοαποτύπωσης με ορόενα αντι *timp* σε κυτταρικές πελέττες (*pellet*) και θρεπτικό μέσο (*CM*) κύτταρων (*cells*), και κύτταρων διαμολυσμένων με ενεργοποιημένη *MMP1* (*M1Ntag*), με ενεργοποιημένη *MMP1* και αναστολέα (*M1Ntag+ timp*) και με αναστολέα (*timp*). Το πρωτεϊνικό προϊόν που αντιστοιχεί στον αναστολέα φαίνεται με το ανοιχτό τόξο, ενώ τα ίσα ποσοστά διαμόλυνση μεταξύ των διαφορετικών κυτταρικών πληθυσμών φαίνονται με πειράματα ανοσοαποτύπωσης εκχυλισμάτων της πελεττας αυτών με αντίσωμα έναντι *GFP*. B) πειράματα ανοσοαποτύπωσης των ίδιων πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων με ορόενα αντι *MMP1*. Το κλειστό τόξο υποδεικνύει τα πρωτεολυτικά προϊόντα που εντοπίζονται στην πελέττα και το θρεπτικό μέσο των διαμολυσμένων με ενεργοποιημένη *MMP1* κύτταρων. Γ) πείραμα ανοσοαποτύπωσης των ίδιων εκχυλισμάτων της κυτταρικής πελεττας με αντίσωμα έναντι του επιτόπου *myc*. Η κέρανη ενεργοποιημένη *MMP1* υποδεικνύεται με το βέλος.

### **3.5.2 Περιγραφή του προτύπου έκφρασης του αναστολέα μεταλλοπρωτεασών, TIMP, στον μεσεντερικό ιστό και στα περιφερικά αιμοκύτταρα του οργανισμού *A. Gambiae***

*3.5.2α Η έκφραση του αναστολέα TIMP διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα κατά την διάρκεια επούλωσης του μεσεντερικού επιθηλίου μετά την εισβολή των παρασίτων.*

Το πρότυπο έκφρασης του TIMP στο μεσέντερο μελετήθηκε με παρόμοιο τρόπο με αυτόν της MMP1, δηλαδή στα χρονικά σημεία 0, 24, 48 και 96 ώρες μετά από απλή αιματοφαγία και μετά την λήψη μολυσμένου αίματος, τόσο σε επίπεδο μεταγράφων με Real-timePCR, όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης με πειράματα ανοσοαποτύπωσης, καθώς και σε κυτταρολογικό επίπεδο στα ίδια χρονικά σημεία.

Μεταγραφικά, τρία διαφορετικά κι ανεξάρτητα πειράματα δείχνουν ότι τα επίπεδα έκφρασης του TIMP στο μεσέντερο παραμένουν σταθερά και στα τρία χρονικά σημεία, τόσο μετά από τη λήψη απλού αίματος όσο και μετά από τη λήψη μολυσμένου αίματος (σχήμα 21). Μόνο 24 ώρες μετά τη πρόσληψη μολυσμένου αίματος με υψηλό βαθμό παρασιταϊμίας φαίνεται να υπάρχει μικρή αύξηση των επιπέδων TIMP μεταγράφων (1,5x) σε σχέση με τα επίπεδα κατά την πρόσληψη μολυσμένου αίματος.

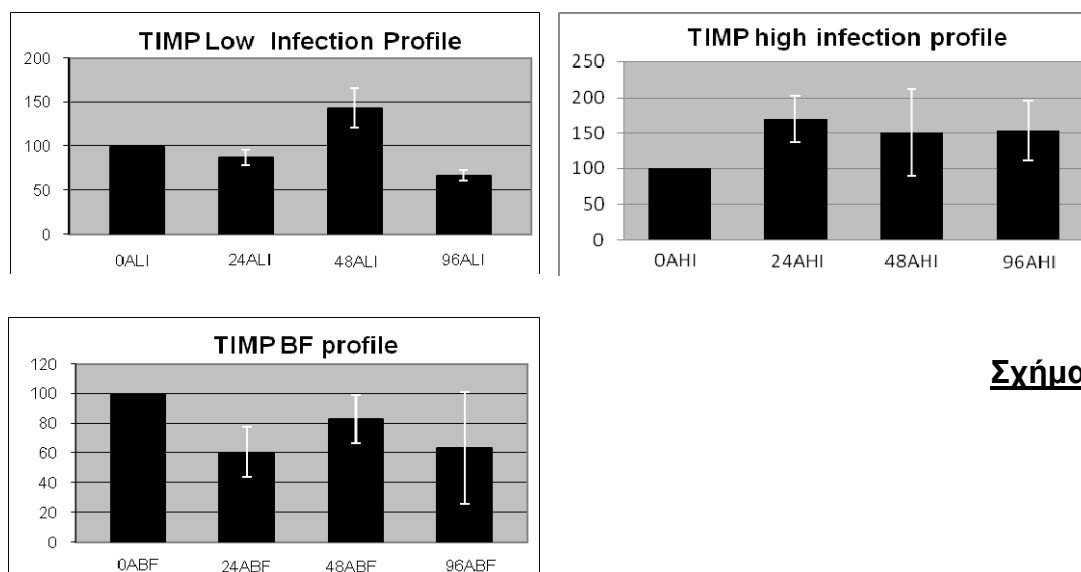
Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα αυτά με το αντίστοιχο πρότυπο έκφρασης του MMP1 γονιδίου διαπιστώνεται ότι μεταγραφικά, η έντονη παρουσία MMP1 μεταγράφων 24 ώρες μετά τη λήψη μολυσμένου αίματος (αύξηση των επιπέδων έκφρασης 3x), σε συνθήκες υψηλής μόλυνσης, δεν συνοδεύεται με αντίστοιχα έντονη παρουσία TIMP μεταγράφων.

Σε ότι αφορά τα επίπεδα TIMP πρωτεΐνης, όπως φαίνεται στο σχήμα 22Α είναι υψηλά πριν την όποια πρόσληψη αίματος (μολυσμένου ή μη). Αμέσως μετά την πρόσληψη αίματος (φυσιολογικού ή μολυσμένου) τα επίπεδα του TIMP πεπτιδίου μειώνονται δραματικά και παραμένουν μειωμένα μέχρι και 48 ώρες μετά την πρόσληψη αίματος. Μόνο στις 96 ώρες αρχίζει να καταγράφεται μια τάση επαναφοράς του TIMP στα αρχικά επίπεδα.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί ο ορρός έναντι TIMP, παρόλες τις προσπάθειες για καθαρισμό του αναγνωρίζει και άλλα πρωτεϊνικά προϊόντα μεγαλύτερου

μοριακού μεγέθους. Μάλιστα όπως διαπιστώνεται στο σχήμα 22<sup>A</sup> η έκφραση κάποιων προϊόντων φαίνεται να μεταβάλλεται στα διάφορα χρονικά σημεία μετά την αιματοφαγία.

Προκειμένου να διερευνηθεί η παρουσία ή απουσία TIMP από τις ζώνες μεγαλύτερου μοριακού μεγέθους (με πιθανή αιτιολογία συμπλοκοποίηση με κάποια άλλη πρωτεΐνη ή με τον εαυτό του), έγιναν πειράματα σιώπησης του TIMP. Σε διαφορετικά χρονικά σημεία απομονώθηκαν μεσέντερα από κουνούπια στα οποία είχε χορηγηθεί δίκλωνο RNA έναντι GFP ή έναντι TIMP. Πειράματα ανοσοαποτύπωσης των εκχυλισμάτων έδειξαν ότι οι ζώνες αυτές των οποίων η έκφραση διαφοροποιείται στα διαφορετικά χρονικά σημεία μετά την αιματοφαγία δεν φαίνεται να σχετίζονται με τον αναστολέα, αφού η έκφραση τους δεν επηρεάζεται από τη σιώπηση του γονιδίου. Αντίθετα, τα επίπεδα του TIMP μειώνονται δραματικά στα κουνούπια στα οποία χορηγείται δίκλωνο RNA έναντι TIMP (σύγκριση των GFP με timplanes, στα ίδια χρονικά σημεία),

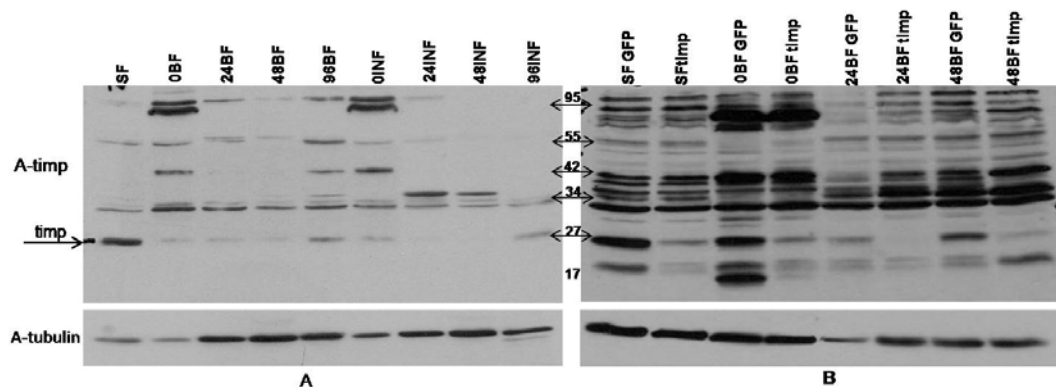


**Σχήμα**

**21** Μεταγραφικό πρότυπο έκφρασης αναστολέα μεταλλοπρωτεασών στον μεσεντερικό ιστό κουνουπιών.

Διαγραμματική απεικόνιση τριών ανεξαρτήτων πειραμάτων Real-time PCR σε συνθήκες αιματοφαγίας (BF profile) και αιματοφαγίας παρουσίας μικρού αριθμού παρασίτων (Low infection) και μεγάλου αριθμού παρασίτων (High Infection). Η κανονικοποίηση των δειγμάτων έγινε με το μετάγραφο της ριβοσωμικής πρωτεΐνης S7. Να σημειωθεί

ότι τα cDNA που χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρες σε αυτά τα πειράματα είναι τα ίδια με τα cDNA που χρησιμοποιήθηκαν για την περιγραφή του προτύπου έκφρασης της μεταλλοπρωτεάσης MMP1, επομένως και οι διασπορές των ωκυστεων βάσει των οποίων καθορίστηκε η υψηλή και η χαμηλή παρασιταίμια ισχύουν και σε αυτή την περίπτωση.



**Σχήμα 22** Πρωτεϊνικό πρότυπο έκφρασης αναστολέα *timp* στον μεσεντερικό ιστό ιστού του κουνουπιού. Α) Πειράματα ανοσοαποτύπωσης με μεσεντερικά εκχυλίσματα απομονωμένα σε διαφορετικά χρονικά σημεία (0, 24, 48, 96) μετά από τη λήψη αίματος (BF) και αίματος παρουσία παρασίτου (INF). Β) πειράματα ανοσοαποτύπωσης με μεσεντερικά εκχυλίσματα απομονωμένα στις ίδιες χρονικές στιγμές μετά την αιμοφαγία από κουνούπια στα οποία είχε χορηγηθεί δίκλωνο RNA έναντι GFP (*dsGFP*) κι έναντι *timp* (*dstimp*). Το πρωτεϊνικό προϊόν που αντιστοιχεί στον αναστολέα, όπως αποκαλύπτεται από τα πειράματα σιωπής υποδεικνύεται με το βέλος. Και στις δυο περιπτώσεις τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα έχουν κανονικοποιηθεί με αντίσωμα έναντι του μπουλίνης.

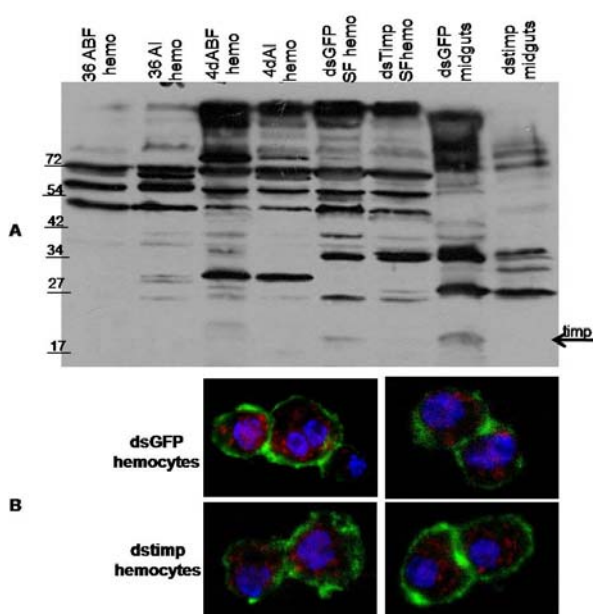
### 3.5.2β Εκφραση του TIMP στην αιμόλεμφο και τα περιφερικά αιμοκύτταρα

Η διερεύνηση του προτύπου έκφρασης του αναστολέα στα περιφερικά αιμοκύτταρα έγινε μόνο σε πρωτεϊνικό επίπεδο, όπως και στην περίπτωση της MMP1. Αιμόλεμφος απομονώθηκε από κουνούπια 36 ώρες και 4 ημέρες μετά τη λήψη φυσιολογικού αίματος, ή μετά τη λήψη μολυσμένου αίματος. Και

σε αυτή την περίπτωση αναλύθηκαν παράλληλα και εκχυλίσματα αιμόλεμφο από κουνούπια ενεμένα με δίκλωνο RNAέναντι GFPή έναντιTIMP, (σχήμα 4A).

Όπως διαπιστώθηκε τα επίπεδα έκφρασης του αναστολέα στην αιμόλεμφο είναι ιδιαίτερα χαμηλά και δεν παρουσιάζουν καμιά μεταβολή κατά την μόλυνση με το παράσιτο. Στα δε εκχυλίσματα που προέρχονται από κουνούπια στα οποία χορηγείται δίκλωνο RNAέναντι TIMP, ακόμη και η μικρή ποσότητα TIMP εξαφανίζεται από τα εκχυλίσματα της αιμόλεμφο (σχ.23<sup>A</sup>).

Ανοσοιστοχημία (σχημα23B) περιφερικών αιμοκυττάρων εντόπισε με τον όρο έναντι TIMP ασθενική χρώση στο κυτταρόπλασμα. Η διαφοροποίηση όμως στην ένταση της χρώσης στα αιμοκύτταρα που προέρχονταν από κουνούπια στα οποία η έκφραση του TIMP είχε σιωπηθεί ήταν πολύ μικρή, γεγονός που συμφωνεί με τα πειράματα ανοσοαποτύπωσης



**Σχήμα 23** A) πειράματα ανοσοαποτύπωσης σε εκχυλίσματα από περιφερικά αιμοκύτταρα (hemo) με τον όρο έναντι *timp*. Τα αιμοκύτταρα απομονώθηκαν 36 ώρες και 4 ημέρες μετά τη λήψη αίματος με (AI) και χωρίς παράσιτο (ABF). Στο ίδιο πείραμα αναλυθήκαν και εκχυλίσματα από περιφερικά αιμοκύτταρα και μεσεντερικά

επιθήλια (midgut) κουνουπιών στα οποία είχε σιωπηθεί ο αναστολέας (*dstimp*) και των αντίστοιχων δειγμάτων αναφοράς (*dsGFP*). Το πρωτεϊνικό προϊόν που αντιστοιχεί στο *timp*υποδεικνύεται με βέλος. B) πειράματα ανοσοιστοχημείας σε περιφερικά αιμοκύτταρα κουνουπιών ενεμένων με δίκλωνοRNAέναντι GFPκι έναντι *timp*. Όπως και στο παραπάνω πείραμα τα κουνούπια αυτά δεν είχαν φάει αίμα. Με κόκκινο παρουσιάζεται ο αναστολέας και με πράσινο η χρώση φαλλοιδίνης. Οι πυρήνες των αιμοκυττάρων απεικονίζονται με μπλε.



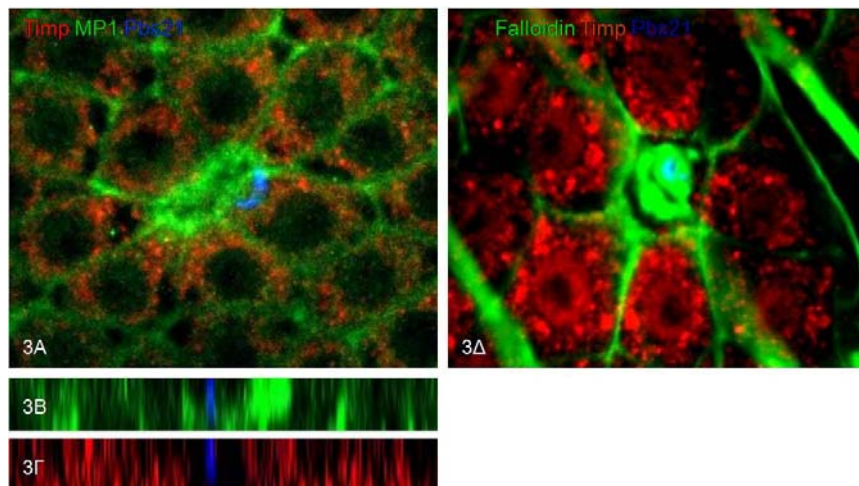
### **3.5.3 Απουσία TIMP από τα σημεία επούλωσης του μεσεντερικού επιθηλίου μετά το πέρασμα του ωοκινέτη**

Για να διαπιστώσουμε αν υπάρχει υπερ-συγκέντρωση του αναστολέα στα σημεία επούλωσης του μεσεντερικού επιθηλίου μετά το πέρασμα του ωοκινέτη (δομές ροζέτας), πραγματοποιήθηκαν πειράματα ταυτόχρονης χρώσης των μεσεντερικών επιθηλίων 24 ώρες μετά τη λήψη μολυσμένου αίματος με αντισώματα έναντι TIMP και MMP1. Επειδή και οι δύο ορροί (anti-Timp, antiMMP1) έχουν αναπτυχθεί σε κουνέλια για να πετύχουμε ταυτόχρονη χρώση έγινε δέσμευση του anti-timpορού με κομμάτι αντισώματος που αναγνωρίζει IgG κουνελίων και φέρει φθοροφόρο.

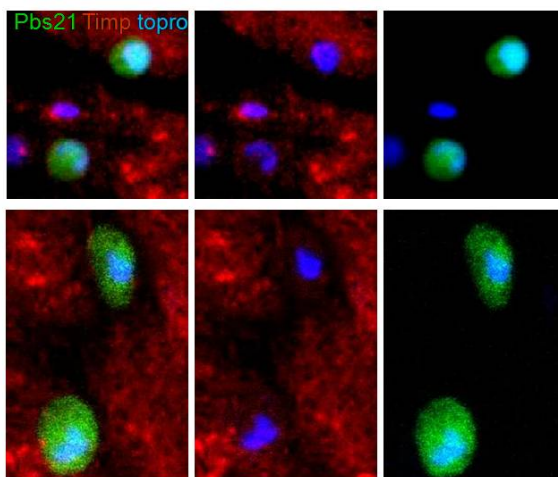
Όπως φαίνεται στο σχήμα 24 (3<sup>A</sup>, 3B, 3Γ) η αυξημένη συγκέντρωση MMP1 στη βασική πλευρά του επιθηλίου γύρω από την περιοχή όπου διέρχεται ο ωοκινέτης δεν συνοδεύεται από αυξημένη παρουσία TIMP αναστολέα. Απουσία TIMP από τον σχηματισμό “ροζέτας” καταγράφηκε και σε μεσεντερικά επιθήλια 24 ώρες μετά την λήψη μολυσμένου αίματος τα οποία «βάφτηκαν» με καθαρισμένο ορρό έναντι TIMP και χρώση έναντι ακτίνης (φαλλοιδίνη) (σχήμα 24, 3Δ).

Παρ' όλο που ο ορρός έναντι του αναστολέα δεν είναι ικανοποιητικά καθαρός, το πιθανότερο είναι ότι ο TIMP αναστολέας απουσιάζει από την περιοχή επούλωσης του μεσεντερικού επιθηλίου μετά από τη διέλευση του παρασίτου. Επιπρόσθετα, μια και καταγράψαμε παρουσία MMP1-ανοσοαντιδρόντος υλικού στην επιφάνεια της αναπτυσσόμενης ωοκύστης 3-4 ημέρες μετά τη λήψη του μολυσμένου αίματος θελήσαμε να διαπιστώσουμε αν συνεντοπίζεται και ο αναστολέας TIMP στην επιφάνεια νεαρών ωοκύστεων. Πειράματα ανοσοιστοχημείας σε μεσεντερικά επιθήλια μολυσμένων κουνουπιών με τον ορρό έναντι TIMP, 3 ημέρες μετά την πρόσληψη μολυσμένου αίματος έδειξαν ότι οι επιφάνειες των νεαρών ωοκύστεων είναι αρνητικές για την παρουσία TIMP (σχ. 25).

Συμπερασματικά, και στις δύο θέσεις που καταγράψαμε έκτοπη αυξημένη παρουσία MMP1-ανοσοαντιδρόντος υλικού, δηλαδή στα σημεία επούλωσης του μεσεντερικού επιθηλίου και στην επιφάνεια των νεαρών ωοκύστεων, ο TIMP αναστολέας απουσιάζει



**Σχήμα 24** Πειράματα ανοσοαποτύπωσης μεσεντερικών επιθηλίων 24 ώρες μετά τη λήψη μολυσμένου αίματος. Α) τομές στη βασική πλευρά του μεσεντερικού επιθηλίου στην περιοχή διείσδυσης του ωοκινετη. Με πράσινο απεικονίζεται η MMP1, με κόκκινο το *timp* και με μπλε το *Pbs21*. Β και Γ) Πλάγιες τομές της ίδιας με αυτή στο Α περιοχή στον άξονα ΧΖ. Δ) τομές και πάλι στη βασική πλευρά του επιθηλίου. Το πράσινο αντιστοιχεί στη χρώση της φαλλοιδίνης και το κόκκινο στο *timp*, ενώ με μπλε απεικονίζεται ο ωοκινετης (*Pbs21*).



**Σχημα25** Απουσία αναστολέα από την αναπτυσσόμενη ωοκυστη. Πειράματα ανοσοιστοχημείας 3 ημέρες μετά τη λήψη μολυσμένου αίματος. Στη βασική πλευρά του επιθηλίου οι νεαρές ωοκυστες εντοπίζονται με το αντίσωμα *Pbs21* (πράσινο), ενώ ο αναστολέας με τον ορό εναντι αυτού (κόκκινο). Για τον

εντοπισμό των πυρήνων χρησιμοποιήθηκε η χρώση *topro* (μπλε).

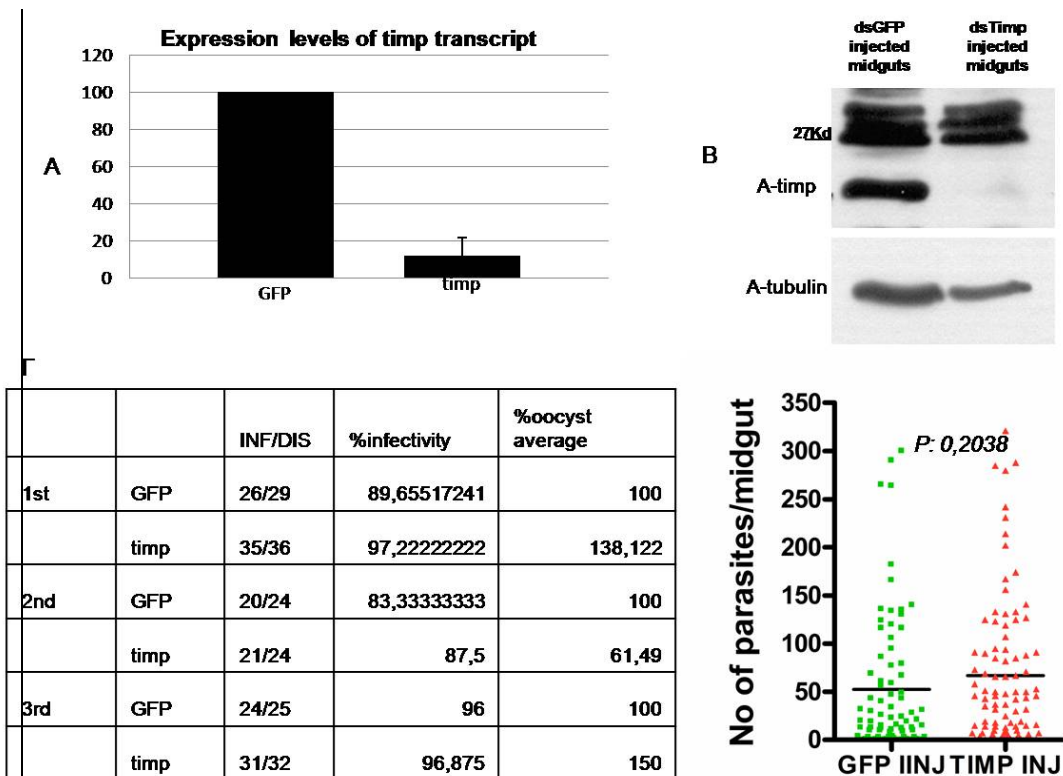
**3.6.4 Η σιώπηση του αναστολέα TIMP δεν έχει καμία επίδραση στην διέλευση και παραπέρα ανάπτυξη του παρασίτου.**

Επιχειρήσαμε να διερευνήσουμε πιθανή λειτουργική εμπλοκή του αναστολέα TIMP στην διαδικασία διείσδυσης του μεσεντερικού επιθηλίου από τον ωοκινέτη και την διαδικασία επούλωσης του πρώτου. Για τον σκοπό αυτό προχωρήσαμε σε πειράματα αποσιώπησης της έκφρασης του TIMP. Η επιτυχής σιώπηση του TIMP ελέγχθηκε σε μεταγραφικό επίπεδο με πειράματα real-time PCR, καθώς και σε πρωτεϊνικό επίπεδο με πειράματα ανοσοαποτύπωσης σε εκχυλίσματα μεσεντερικών επιθηλίων (σχήμα 26Α,Β). Και στις δύο περιπτώσεις ως δείγμα αναφοράς χρησιμοποιήθηκε συνολικό cDNA ή πρωτεϊνικό εκχύλισμα από μεσέντερα κουνουπιών ενεμένων με δίκλωνο RNA έναντι GFP.

Στα κουνούπια στα οποία η έκφραση του TIMP είχε σιωπηθεί και στα αντίστοιχα δείγματα αναφοράς (κουνούπια ενεμένα με δίκλωνο RNA έναντι GFP) χορηγήθηκε μολυσμένο αίμα. Τα μεσέντερα των ενεμένων κουνουπιών που είχαν φάει αίμα απομονώθηκαν 7 ημέρες μετά την αιματοφαγία, προκειμένου να μετρηθεί ο αριθμός των ωοκυστεών που αναπτύσσονταν σε αυτά.

Τα αποτελέσματα τριών ανεξαρτήτων πειραμάτων για κάθε πειραματική ομάδα αναλύθηκαν στατιστικά (Student's t test), και οι αριθμοί των ωοκυστεών που μετρήθηκαν στην κάθε ομάδα συγκρίθηκαν. Πρέπει να σημειωθεί ότι και στην περίπτωση αυτή τελικά επιλέχθηκαν κι αναλυθήκαν πειράματα που τηρούσαν τις προϋποθέσεις που αναφέρθηκαν στην παράγραφο 3.3.1.

Οι μετρήσεις από τα παραπάνω πειράματα και η διαγραμματική απεικόνιση της διασποράς των ωοκυστεών φαίνεται στο σχήμα 26Γ. Η συγκριτική ανάλυση των αριθμών των ωοκυστεών μεταξύ των δύο πειραματικών ομάδων (κουνουπιών τα οποία είχαν ενεθεί με δίκλωνο RNA έναντι GFP ή TIMP) έδειξε τελικά ότι η σιώπηση της έκφρασης του TIMP γονιδίου δεν έχει καμιά επίδραση στην επιβίωση του παρασίτου μέσα στον φορέα.



**Σχήμα 26** A) Διαγραμματική απεικόνιση τριών ανεξαρτήτων πειραμάτων Real-time PCR με *timp* ρεκκινητές σε μήτρας DNA απομονωμένο από μεσεντερικά επιθηλιακούς κουνουπιών ενεμένων με δίκλωνο RNA έναντι GFP και κουνουπιών ενεμένων με δίκλωνο RNA έναντι *timp*. B) Πειράματα ανοσοαποτύπωσης σε εκχυλίσματα μεσεντερικών επιθηλίων κουνουπιών στα οποία είχε χορηγηθεί δίκλωνο RNA έναντι GFP (*dsGFP injected midguts*) κι έναντι *timp* (*dsTimp injected midguts*). Η κανονικοποίηση των πρωτεϊνικών δειγμάτων έγινε με αντίσωμα έναντι τουμπουλίνης. Γ) Στον πίνακα αναγράφονται αναλυτικά και για τα τρία πειράματα ο αριθμός των μεσεντέρων που είχαν ωοκυστίες στο συνολικό αριθμό των μεσεντέρων που αναλυθήκαν (INF/DIS) και το ποσοστό επί τοις εκατό (%infectivity) που προκύπτει από αυτή την αναλογία για κάθε πειραματικό σύνολο (GFP vs *timp*), καθώς και ο μέσος όρος των ωοκυστέων σε ποσοστό %. Διαγραμματικά απεικονίζεται η διασπορά των ωοκυστέων στα μεσέντερα και των τριών πειραμάτων.

Εφόσον τα πειράματα σιώπησης του αναστολέα δεν αποκάλυψαν κάποια αλληλεπίδραση του με την MMP1, προσπαθήσαμε να προσεγγίσουμε το ερώτημα με αντίθετο τρόπο. Συγκεκριμένα, εξετάστηκε η δυνατότητα να αυξηθούν αντί να μειωθούν τα επίπεδα του αναστολέα στο μεσεντερικό επιθήλιο και πιο συγκεκριμένα στη διάρκεια κατά την οποία αναπτύσσονται σε αυτό οι νεαρές ωκύστες, δεδομένου ότι χρονικά εκεί τοποθετείται ο προστατευτικός ρόλος που ασκεί η πρωτεάση στο παράσιτο. Σύμφωνα με τα όσα αναφέρθηκαν παραπάνω η ελλειψη φαινοτύπου μετά από σιώπηση του αναστολέα μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι τα δυο μόρια δεν συνεντοπίζονται στην επιφάνεια της νεαρής ωκύστης, επομένως αύξηση των επιπέδων έκφρασης του αναστολέα σε αυτή την περιοχή θα μπορούσε να οδηγήσει σε αλληλεπίδραση του με την MMP1 και αναστολή της. Κάτι τέτοιο όχι μόνο θα αποδείκνυε την ανασταλτική δράση του *timpr* στην πρωτεάση αλλά και θα έδειχνε ότι ο προστατευτικός προς το παράσιτο ρόλος της MMP1 οφείλεται στη πρωτεολυτική της δράση.

Προκειμένου να πετύχουμε το παραπάνω χρησιμοποιήθηκε το παράσιτο ως φορέας έκφρασης *timpr*.

### 3.7 Συζήτηση

Το γονίδιο με κωδικό (AGAP006904) προβλέπεται από την βάση δεδομένων του Anopheles (Anobase) να κωδικοποιεί μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη με τα χαρακτηριστικά μεταλλοπρωτεάσης εξωκυττάριας στοιβάδας, την οποία ονομάσαμε TM-MMP1 (TransMembrane-MMP1). Και αυτό γιατί στην παρούσα εργασία ανακαλύψαμε μια δεύτερη MMP1 ισομορφή η οποία προκύπτει από εναλλακτικό μετάγραφο του ίδιου γονιδίου. Το μετάγραφο παράγεται με εναλλακτικό μάτισμα και κωδικοποιεί πρωτεΐνη, η οποία στερείται διαμεμβρανικού τμήματος και γι' αυτό προβλέπεται να είναι εκκρινόμενη, (Secreted-MMP1, S-MMP1).

Δείξαμε επίσης ότι η ενώ η έκφραση της διαμεμβρανικής TM-MMP1 ισομορφής περιορίζεται σε επιθηλιακούς ιστούς (μεσέντερο, ωσθήκες), η εναλλακτική εκκρινόμενη S-MMP1 ισομορφή εκφράζεται αποκλειστικά στα αιμοκύτταρα.

Τόσο η διαμεμβρανική TM-MMP1 όσο και η αιμοκυτταρική/εκκρινόμενη S-MMP1 ισομορφή, δείξαμε ότι έχουν καζεϊνολυτική ενεργότητα με πειράματα ζυμογραφίας. Το γεγονός ότι σε αντίστοιχα πειράματα ζυμογραφίας ζελατίνης και κολλαγόνου (μη παρατιθέμενα), παρότι πιο εξειδικευμένα υποστρώματα των μεταλλοπρωτεασών εξωκυττάριας στοιβάδας, δεν αποκαλύφθηκε η MMP1 ενεργότητα συμφωνεί με αντίστοιχα ευρήματα για την ομόλογη MMP1 της Δροσόφιλα (Llano, Pendasetal. 2000).

Εναλλακτικό μάτισμα προβλέπεται και για τα ομόλογα MMP1 γονίδια της *Drosophila* και του *Tribolium castaneum*, όπου και σ' αυτές τις περιπτώσεις φαίνεται να οδηγεί σε μια διαμεμβρανική και μια εκκρινόμενη ισομορφή. Είναι όμως πρώτη φορά που καταδεικνύεται ότι οι δύο εναλλακτικές μορφές υπάρχουν *in vivo*, δεν συνεντοπίζονται αλλά έχουν ιστο-/κυτταρο-ειδική έκφραση.

Έχει συνεπώς ιδιαίτερο ενδιαφέρον να μελετηθεί αν η κατάσταση αυτή είναι γενικευμένη για τις MMP1 των αρθροπόδων καθώς επίσης και ο ρόλος της S-MMP στην κυτταρική ανοσία. Αυξημένα επίπεδα MMP1 mRNA έχουν καταγραφεί σε ανοσο-διεγερμένα (stimulated) αιμοκύτταρα του *T. Castaneum*, χωρίς να έχει προσδιοριστεί αν κωδικοποιεί για S-MMP1, ενώ η σιώπηση του

MMP1 γονιδίου αυξάνει την επιδεκτικότητα *Tribolium* στον εντομοπαθογόνο μύκητα *Beauveria bassiana*. (Knorr, Schmidtberg et al. 2009)

Υποκυτταρικά στα αιμοκύτταρα του Ανωφελούς η S-MMP1 εντοπίζεται συσσωρευμένη σε μεγάλα κυστίδια υποδηλώνοντας πιθανή ελεγχόμενη έκκριση της. Είναι ξεκάθαρο από το μέγεθος της S-MMP1 που προσδιορίζεται τόσο με ανοσο-αποτύπωση όσο και με ζυμογραφία ότι μέσα στα κυστίδια των αιμοκυττάρων η S-MMP1 βρίσκεται με την μορφή του προ-ζυμογόνου.

Βιβλιογραφικές αναφορές σε MMPs του ανθρώπου υποδεικνύουν ότι σε ότι αφορά τις εκκρινόμενες MMPs η ελεγχόμενη έκκριση τους είναι σημαντική για τη ρύθμιση της ενεργότητας τους. Συγκεκριμένα η MMP7 (Ryu, Lee et al. 2009) και η MMP9 (Rao and Parks 2007) φαίνεται να αλληλεπιδρούν με πρωτεογλυκάνες κυτταρικών μεμβρανών. Μέσω αυτής της αλληλεπίδρασης οι πρωτεάσες συγκεντρώνονται σε περιοχές του περικυτταρικού χώρου μέσα στα οποία φαίνεται να λαμβάνει χώρα μέσω αυτο-πρωτεόλυσης απομάκρυνση των προ-πεπτιδίων τους κι ενεργοποίησή τους.

Εγείρονται συνεπώς ερωτήματα σε ότι αφορά τα ερεθίσματα που μπορούν να προκαλέσουν την έκκριση της S-MMP1 και την επακόλουθη ωρίμανση της σε ζυμογόνο. Από τα αποτελέσματα που παραθέτουμε ούτε η αιματοφαγία ούτε η παρουσία του παρασίτου οδήγησαν σε αυξημένη έκκριση της S-MMP1 από τα κυστίδια (degranulation) των αιμοκυττάρων, ή ωρίμανση της σε ζυμογόνο, χωρίς να αποκλείουν τοπική απελευθέρωση και ωρίμανση.

Σημειώνουμε ότι στην αιμοκυτταρική σειρά sua 4.0, η S-MMP1 εκφράζεται σε σημαντικά επίπεδα και όπως δείχνει ο συνδιασμός ανοσο-ιστοχημίας και ανοσο-αποτύπωσης εκκρίνεται συνεχώς (constitutively) στο υπερκείμενο των κυττάρων.

Και σ' αυτήν την περίπτωση όμως συνδιασμός ανοσο-αποτύπωσης και ζυμογραφίας έδειξε ότι η S-MMP1 εκκρίνεται στο υπερκείμενο των κυττάρων με την μορφή του προ-ζυμογόνου. Ζυμογόνο ανιχνεύθηκε στο θρεπτικό μέσο των sua 4.0 κύτταρων μόνο σε συνθήκες δοκιμαστικού σωλήνα παρουσία αποδιατακτικών παραγόντων (απορρυπαντικό), γεγονός που υποδεικνύει ότι η ωρίμανση της S-MMP1 λαμβάνει χώρα εξωκυττάρια. Όπως έχει αναφερθεί για άλλες MMPs, εξωκυττάρια η ωρίμανση τους σε ζυμογόνο γίνεται με την

διαμεσολάβηση είτε μη πεπτιδικών ενεργοποιητών (π.χ. NO), είτε άλλων εκκρινόμενων πρωτεασών ή μέσω αυτο-πρωτεόλυσης ((Ra and Parks 2007)). Σε αντίθεση με την S-MMP1, τόσο προ-ζυμογόνο όσο και ζυμογόνο της TM-MMP1 ανιχνεύεται στο μεσέντερο, ενώ στις ωοθήκες η TM-MMP1 ανιχνεύεται κυρίως με την μορφή του ζυμογόνου. Προφανώς και λόγω της τοπολογίας της TM-MMP1 στα σημεία επαφής των επιθηλιακών κυττάρων, η ενεργοποίησή της γίνεται ενδοκυττάρια, πιθανά μέσα στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Endoplasmic Reticulum, ER). Η παρουσία στο προπεπτιδίο (prodomain) της MMP1 του χαρακτηριστικού μοτίβου RKKR, που εξειδικευμένα αναγνωρίζεται από πρωτεάσες της οικογένειας των ProproteinConvertases (PCs), οι οποίες εντοπίζονται κυρίως στο ER, υποδεικνύουν την TM-MMP1 ως πιθανό υπόστρωμα των PCs.

Αμέσως μετά την λήψη αίματος η στοιχειομετρία TM-MMP1 προζυμογόνου/ζυμογόνου αλλάζει προς όφελος του προζυμογόνου. Αυτό πιθανά αντανακλά νεοσύνθεση της TM-MMP1 πράγμα που υποδεικνύεται και από την αυξημένη συγκέντρωση της TM-MMP1 στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Στις 24 ώρες μετά την πρόσληψη αίματος τα επίπεδα του ζυμογόνου αυξάνονται σημαντικά σε βάρος του προ-ζυμογόνου, ενώ μειώνεται η παρουσία TM-MMP1 στο ER και αυξάνεται η παρουσία της στις κυτταρικές μεμβράνες των επιθηλιακών κύτταρων.

Τα παραπάνω προτείνουν ότι ακόμη και κατά την απλή αιματοφαγία, η MMP1 στο μεσέντερο ρυθμίζεται τόσο σε μεταγραφικό, όσο και σε μεταμεταγραφικό επίπεδο, και υποδηλώνουν πιθανή λειτουργική εμπλοκή της TM-MMP1 στις διεργασίες διάτασης και επαναφοράς του μεσεντερικού επιθηλίου που συμβαίνουν κατά την πρόσληψη και την πέψη του αίματος.

Αντίστοιχα στις 24 ώρες μετά την πρόσληψη αίματος υψηλής παρασιταιμίας τα μεταγραφικά επίπεδα του MMP1 γονιδίου αυξάνονται σημαντικά, ενώ σε πρωτεϊνικό επίπεδο παρότι καταγράφονται αυξημένα επίπεδα TM-MMP1 προ-ζυμογόνου σε σχέση με τα επίπεδα του κατά την πρόσληψη (0 ώρες), ο λόγος προζυμογόνου/ζυμογόνου είναι προς όφελος του τελευταίου, πράγμα που υποδηλώνει επιτάχυνση της ωρίμανσης της TM-MMP1.

Παράλληλα πειράματα ανοσο-ιστοχημίας έδειξαν ότι 24 ώρες μετά την πρόσληψη μολυσμένου αίματος, στη βασική πλευρά του μεσεντερικού επιθηλίου στις θέσεις διείσδυσης των ωοκινετών και στα κύτταρα που



γειτονεύουν με εκείνα που έχουν υποστεί την προσβολή παρατηρείται υπερσυγκέντρωση TM-MMP1 σε μορφή δακτυλίου, σε γειτνίαση με τον δακτύλιο ακτινης που έχει ήδη περιγραφεί (Han, Thompson et al. 2000) και σχηματίζεται γύρω από το σημείο εισβολής του ωοκινετη στο επιθήλιο.

Με δεδομένο ότι το χρονικό σημείο των 24 ωρών μετά την πρόσληψη μολυσμένου αίματος είναι το σημείο που αρχίζει μαζικά η διείσδυση των ωοκινετών στο μεσέντερο, προκαλώντας καταστροφή επιθηλιακών κυττάρων και ρήξη στην συνέχεια του επιθηλίου, τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με μια αυξημένη ανάγκη για ενεργό ένζυμο.

Τα κυτταρολογικά ευρήματα συμφωνούν επίσης με βιβλιογραφικές αναφορές όπου έχει παρατηρηθεί ότι ο μηχανικός τραυματισμός ψευδο-επιθηλίων, (δηλαδή κυτταρικών σειρών που δημιουργούν σε καλλιέργεια συνεχές μονόστοιβο επιθήλιο), συνοδεύεται από αναδιάταξη του κυτταροσκελετού ακτινης των κύτταρων που γειτονεύουν με το μηχανικά προκαλούμενο τραύμα, προκειμένου να κλείσουν τα κενά στη συνέχεια του ψευδο-επιθηλίου. Προκειμένου ωστόσο τα γειτονικά κύτταρα να κινηθούν προς το τραύμα και να το «επούλωσουν» χρειάζεται να χαλαρώσουν την επαφή μεταξύ τους και να κινηθούν πάνω στην εξωκυττάρια μήτρα. Σε αυτή την κατεύθυνση φαίνεται να παίζουν βασικό ρόλο οι MMPs, η έκφραση πολλών από τις οποίες αυξάνεται στα κύτταρα γύρω από το τραύμα, έτσι ώστε να είναι δυνατή η κατάλυση συστατικών της εξωκυτταρίας μήτρας, π.χ. κολλαγόνο, ιντεγκρίνες, syndecan, που συμβάλλουν στις αλληλεπιδράσεις των κυττάρων μεταξύ τους και με τον εξωκυτταριο χώρο (Chen and Parks 2009). Στις κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν ως μοντέλα ψευδο-επιθηλίων για τη μελέτη της διαδικασίας της επούλωσης αυτό που παρατηρήθηκε ήταν καθυστέρηση της επούλωσης, όταν αναστέλλονταν η δράση των MMPs.

Πιθανή χρονική υστέρηση στην επούλωση του μεσεντερικού επιθηλίου μετά την προσβολή του από ωοκινέτες, λόγω απουσίας MMP1 είναι δύσκολο να καταγραφεί με την μεθοδολογία που ακολουθήσαμε δεδομένου ότι η εισβολή των ωοκινετών δεν είναι συγχρονισμένη κι επομένως κάθε θέση εισβολής χρονικά βρίσκεται σε διαφορετική φάση της διαδικασίας επούλωσης. Για κάτι τέτοιο χρειάζεται μια πειραματική μεθοδολογία για την παρακολούθηση της διαδικασίας επούλωσης σε πραγματικό χρόνο.

Επιπρόσθετα δεν πρέπει να αγνοείται ότι απουσία MMP1, η δράση της μπορεί να αναπληρώνεται από την δράση κάποιου άλλου παράλογου γονιδίου (MMP2, MMP3), ή ακόμη και από ADAMs ή ADAMTSs. Η μορφολογία πάντως των δακτυλίων ακτίνης ή ιντεγκρίνης στις θέσεις διείσδυσης των ωοκινετών δεν φαίνεται να διαφοροποιείται σε κουνούπια στα οποία έχει σιωπηθεί η έκφραση του MMP1 γονιδίου, πράγμα που σημαίνει ότι ο μηχανισμός επούλωσης διατηρεί τα βασικά του χαρακτηριστικά.

Μια από τις αρχικές υποθέσεις εργασίας που είχαμε κάνει είναι ότι πιθανή ενεργοποίηση μεταλλοπρωτεασών εξωκυττάριας στοιβάδας, να διευκολύνει την διέλευση των ωοκινετών, «χαλαρώνοντας» το μεσεντερικό επιθήλιο. Λειτουργική εμπλοκή μεταλλοπρωτεασών έχει δειχθεί να διευκολύνει την διέλευση παρασιτών και ιών. Σε κάποιες περιπτώσεις οι μεταλλοπρωτεάσες παράγονται από τον παθογόνο μικροοργανισμό(Heck, Morihara et al. 1986; Brindley, Gam et al. 1995), σε άλλες περιπτώσεις εμπλέκονται μεταλλοπρωτεάσες του ξενιστή και ο παθογόνος μικροοργανισμός επηρεάζει είτε τα επίπεδα τους, είτε την ενεργοποίησή τους. Μια τέτοια περίπτωση είναι αυτή του ιού HIV, που χρησιμοποιεί μια MMP του ξενιστή του προκειμένου να μπορέσει να εισβάλλει στους επιθηλιακούς ιστούς(Weeks, Klotman et al. 1993). Παρόμοια κατάσταση έχει περιγραφεί και στην περίπτωση της εγκεφαλικής ελονοσίας, όπου πιθανά λόγω αιμοζοίνης(Prato, D'Alessandro et al.) παρατηρείται αύξηση της δράσης μεταλλοπρωτεασών, η οποία και σχετίζεται με την ικανότητα του παρασίτου να μπορεί να περάσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό(Van den Steen, Van Aelst et al. 2006). Εξ' άλλου μια αρχική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων έδειχναν μια σχέση παρασιτικού φορτίου και επιπέδων ζυμογόνου στο μεσέντερο.

Επιχειρήθηκε λοιπόν αποσιώπηση της έκφρασης του MMP1 γονιδίου μέσω dsRNA και σύνδεση της με την ανάπτυξη των ωοκύστεων. Μετά την καταμέτρηση των ωοκύστεων που αναπτύσσονται στο μεσεντερικό επιθήλιο 7 ημέρες μετά τη χορήγηση του μολυσμένου αίματος διαπιστώθηκε μια στατιστικά σημαντική μείωση του αριθμού τους, της τάξης του 70%, στα κουνούπια στα οποία το MMP1 γονίδιο είχε επιτυχώς σιωπηθεί (dsMMP1inj) σε σχέση με την ομάδα αναφοράς (dsGFPinj). Η μείωση αυτή όμως δεν μπορούσε να συνδεθεί άμεσα με μια υστέρηση στην διαδικασία εισβολής γιατί στις 24 ώρες, μετά την πρόσληψη μολυσμένου αίματος, με τους κατάλληλους

μοριακούς δείκτες, η πυκνότητα των θέσεων εισβολής ωοκινετών δεν φαινόταν να διαφοροποιείται σημαντικά στα μεσέντερα της πειραματικής dsMMP1inj ομάδας και σε εκείνα της ομάδας αναφοράς (dsGFPinj).

Σε επόμενο κύκλο πειραμάτων καταγράψαμε τον αριθμό των ωοκινετών/ωοκύστεων στα μεσέντερα dsMMP1inj και dsGFPinj κουνουπιών (όλα προερχόμενα από την ίδια γενιά) σε δύο χρονικά σημεία. Στο χρονικό σημείο των 48 ωρών μετά την πρόσληψη μολυσμένου αίματος, όταν οι ωοκινετες έχουν φτάσει πλέον στο βασικό έλασμα του μεσεντερου και έχουν ξεκινήσει να διαφοροποιούνται σε ωοκύστες (πρώιμες ωοκύστες), και στο χρονικό σημείο των 7 ημερών (όψιμες οοκύστες). Στις 48 ώρες μετά την λήψη μολυσμένου αίματος οι αριθμοί των πρώιμων ωοκύστεων και στις δύο ομάδες (dsMMP1inj και dsGFPinj) ήταν περίπου ίδιοι, ενώ στις 7 ημέρες καταγράψαμε και πάλι μια στατιστικά σημαντική μείωση όψιμων οοκύστεων στα κουνούπια της dsMMP1inj ομάδας.

Έχει βρεθεί ότι οι απώλειες του παρασιτικού πληθυσμού δεν λαμβάνουν χώρα μόνο κατά τη διείσδυση του επιθηλίου, αλλά και κατά την ωρίμανση των ωοκυστεων. Συγκεκριμένα ο αριθμός των παρασίτων που καταγράφονται 24 ώρες μετά τη λήψη μολυσμένου αίματος μειώνεται κατά 2,8 φορές στις 48 ώρες, ενώ στις 72 ώρες παρατηρείται μια επιπλέον μείωση της τάξης του 35% (Abraham, Pinto et al. 2005). Οι λόγοι για τους οποίους παρατηρείται αυτή η μείωση του παρασιτικού πληθυσμού δεν έχουν διερευνηθεί πλήρως. Πρόσφατη μελέτη υποστηρίζει ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού μονοπατιού STAT, που έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη έκφραση του ενζύμου NOS και τη λύση τελικά των ωοκύστεων μέσω παραγωγής του NO (Gupta, Molina-Cruz et al. 2009).

Τα δεδομένα μας υπέδειξαν ότι η MMP1 ασκεί ένα προστατευτικό ρόλο για το παράσιτο όταν αυτό έχει πλέον περάσει το μεσεντερικό επιθήλιο, έχει φτάσει στο βασικό έλασμα και έχει αρχίσει να διαφοροποιείται σε ωοκύστη. Σε συμφωνία με αυτή την υπόθεση η ανοσο-ιστοχημία αποκάλυψε την παρουσία MMP1 ανοσο-αντιδρόντος υλικού στην επιφάνεια ενός σημαντικού αριθμού πρώιμων ωοκυστεων, αλλά όχι στην επιφάνεια όψιμων οοκύστεων, ή ωοκινετών κατά την φάση διείσδυσης του επιθηλίου.

Η αλληλεπίδραση του MMP1-ανοσοαντιδρόντος υλικού με την επιφάνεια της πρώιμης ωοκύστης μπορεί να είναι είτε άμμεση, είτε έμμεση μέσω

αλληλεπίδρασης των MMP1 hemorexin domains με μόρια της εξωκυτταριας μήτρας του μεσεντέρου (κολλαγόνο, λαμινίνη), τα οποία σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές ο ωοκινέτης συσσωρεύει στην επιφάνεια του κατά το πέρασμα του από το μεσεντερικό επιθήλιο.

Ποιά όμως είναι η προέλευση του MMP1 ανοσο-αντιδρόντος υλικού στη επιφάνεια των πρώιμων ωοκύστεων?

Μια προφανής πηγή είναι τα αιμοκύτταρα και επομένως το MMP1 ανοσο-αντιδρόν υλικό η S-MMP1. Εναλλακτικά όμως θα μπορούσε να σχετίζεται με πρωτεολυτικά παράγωγα της TM-MMP1. Παράλληλα με τα TM-MMP1 προζυμογόνο και ζυμογόνο στα εκχυλίσματα μεσεντέρων εντοπίστηκε και ένα μικρότερο πρωτεϊνικό προϊόν (34Kd), του οποίου η έκφραση μειωνόταν μετά από σιώπηση του γονιδίου.

Πρωτεολυτικά παράγωγα έχουν παρατηρηθεί για πολλές MMPs, είτε *in vivo*, είτε σε *in vitro* πειραματικές διατάξεις. (Kremer, Chen et al. 1998; Ray, Lukyanov et al. 2003; Osenkowski, Toth et al. 2004).

Στις πιο πολλές περιπτώσεις τα πρωτεολυτικά παράγωγα προέρχονται από αυτοπρωτεόλυση των MMPs που οδηγεί στην απενεργοποίησή τους. Η αυτοπρωτεόλυση αποτελεί ένα τρόπο ελέγχου της ενζυμικής ενεργότητας και συνδέεται με την υπερέκφραση των MMPs (Roderfeld, Buttner et al. 2000), ή την μη φυσιολογική ενδοκύττωση τους (Gingras, Page et al. 2000). Σε άλλες πάλι περιπτώσεις η αυτοπρωτεόλυση φαίνεται να ελέγχεται από την γλυκοζυλίωση που λαμβάνει χώρα στο καρβοξυτελικό άκρο των MMPs (Remacle, Chekanov et al. 2006).

Για να διερευνήσουμε αν η υπερέκφραση TM-MMP1 ζυμογόνου μπορεί να σχετιστεί με πρωτεολυτικά παράγωγα, εκφράσαμε έκτοπα σε sua 4.0 κύτταρα TM-MMP1 από την οποία είχαμε αφαιρέσει το προπεπτιδίο (ενεργοποιημένη TM-MMP1), (Cao, Hymowitz et al. 2000). Η έκτοπη έκφραση ενεργοποιημένης TM-MMP1 στα sua 4.0 κύτταρα είχε σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση στα κυτταρικά εκχυλίσματα και στο θρεπτικό μέσο των διαμολυσμένων κυττάρων πρωτεολυτικών παραγώγων 42 και 34 Kd αντίστοιχα. Επώση διαμολυσμένων sua 4.0 κυττάρων με δυο διαφορετικούς χημικούς αναστολείς μεταλλοπρωτεασών, ή ταυτόχρονη έκφραση ενεργοποιημένου TM-MMP1 ζυμογόνου και ιστικού αναστολέα timp, είχε σαν αποτέλεσμα την μείωση των

TM-MMP1 πρωτεολυτικών παραγώγων και αντίστοιχα την αύξηση της ποσότητας του ακέραιου ενεργοποιημένου TM-MMP1 ζυμογόνου. Τα παραπάνω επιβεβαίωσαν ότι υπερέκφραση ζυμογόνου TM-MMP1 έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή πρωτεολυτικών παραγώγων, πιθανά μέσω αυτοπρωτεόλυσης, εκ των οποίων τουλάχιστον ένα 34 kDa παράγωγο εκκρίνεται. Το παράγωγο αυτό θεωρούμε ότι προέρχεται από το καρβοξυτελικό άκρο της TM-MMP1 στο οποίο εδράζονται τα hemopexindomain και hingeregion, αλλά προφανώς χρειάζεται ακριβής προσδιορισμός του μέσω πρωτεομικής ανάλυσης.

Πάντως το 34 kDa πρωτεολυτικό παράγωγο που ανιχνεύθηκε στο θρεπτικό μέσο των διαμολυσμένων κυττάρων έχει ίδιο μοριακό μέγεθος με αυτό που εντοπίζεται στα εκχυλίσματα των μεσεντέρων. Επομένως δεν μπορεί να αποκλειστεί ότι στα σημεία εισβολής του ωοκινέτη στο μεσέντερο, όπου παρατηρήσαμε υπερ-συγκέντρωση TM-MMP1 ζυμογόνου παράγεται και εκκρίνεται τοπικά 34 kDa πρωτεολυτικό παράγωγο της TM-MMP1, και να είναι αυτό τελικά το MMP1-ανοσοαντιδρόν υλικό που καλύπτει τις πρώιμες ωοκύστες.

Είναι προφανές ότι η ταυτότητα του MMP1-ανοσοαντιδρόντος υλικού στην επιφάνεια των νεαρών ωοκύστεων, (S-MMP1 ή 34 kDa πρωτεολυτικό παράγωγο), οδηγεί σε παραπέρα υποθέσεις σε ότι αφορά τον τρόπο που πιθανά ασκεί την θετική του δράση στην ανάπτυξη των ωοκύστεων. Η βασική διαφορά είναι ότι η μεν αιμοκυτταρική S-MMP1 περιέχει και την ενεργότητα πρωτεάσης, ενώ το 34 kDa πρωτεολυτικό προϊόν παράγωγο υποθέτουμε ότι προέρχεται από το καρβοξυτελικό άκρο της TM-MMP1 στο οποίο εδράζονται η πλούσια σε κυστεΐνες hinge region και τα hemopexin domains.

Ο ρόλος των hemopexindomains στη λειτουργία των μεταλλοπρωτεασών φαίνεται να είναι πολλαπλός. Σε όλες τις περιπτώσεις η περιοχή αυτή των πρωτεασών θεωρείται σημαντική γιατί επάγει την επαφή των πρωτεασών με άλλα μόρια (Piccard, Van den Steen et al. 2007). Τέτοια μόρια μπορεί να είναι οι αναστολείς τους ή άλλες μεταλλοπρωτεάσες επηρεάζοντας έτσι την αναστολή ή την ενεργοποίησή τους. Ακόμη μπορεί να είναι τα υποστρώματα των MMPs, όπως το κολλαγόνο, οι ιντεγκρίνες ή οι χυμοκίνες και οι υποδοχείς τους. Πρόσφατες δημοσιεύσεις αναφέρουν ότι η MMP12 περιέχει ένα

τετραπεπτιδίο στο hemorexindomainτης (KDDK) το οποίο φαίνεται να έχει αντιμικροβιακή δράση (Houghton, Hartzell et al. 2009).

Αν μπορεί να υποτεθεί ένας ρόλος του 34 kDa MMP1 προϊόντος αυτός είναι ανάλογος αυτού που έχει προταθεί για άλλα συστατικά του βασικού ελάσματος του μεσεντερου δηλαδή ένα μασκάρισμα (masking) και προστασία από αντιδράσεις του ανοσοποιητικού συστήματος του εντόμου(Arrighi, Lycett et al. 2005).

Στην πρώτη όμως περίπτωση, (όπου το MMP1-ανοσοαντιδρόν υλικό ανιστοιχεί σε S-MMP1), η προστασία των οοκύστεων ή η θετική επίδραση στην ανάπτυξη τους μπορεί να είναι ενεργή, εμπλέκοντας την ενζυμική ενεργότητα. Σύμφωνα με αναφορές ιικές μεταλλοπρωτεάσες μπορούν να πρωτεολύσουν αντιμικροβιακά πεπτιδία(Belas, Manosetal. 2004). Βέβαια πρέπει να τονιστεί ότι η δομή αυτών των μεταλλοπρωτεασών είναι διαφορετική από αυτή των MMPs και επιπλέον ότι οι MMPs του ανθρώπου που έχουν μεγαλύτερη συγγένεια με την MMP1 του κουνουπιού φαίνεται ότι έχουν αντίθετη από την παραπάνω δράση. Συγκεκριμένα απομακρύνουν το προπεπτιδίο αντιμικροβιακών πεπτιδίων, α και β defensins, καθιστώντας τα έτσι ενεργά(Wilson, Schmidt et al. 2009).

Από την άλλη μεριά η συμμετοχή της MMP1 στην βιωσιμότητα του παρασιτικού πληθυσμού μπορεί να μην αφορά ανοσολογικές αντιδράσεις, αλλά αναπτυξιακά ερεθίσματα. Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή ο μηχανισμός με τον οποίο το παράσιτο περνά από το στάδιο του ωοκινέτη στο στάδιο της ωοκύστης αποτελεί θέμα αντιθέσεων, αφού υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν ότι η αναπτυξιακή αυτή διαφοροποίηση δεν απαιτεί συμμετοχή του κουνουπιού(Carter, Nacer et al. 2007), και άλλα δεδομένα που υποστηρίζουν ότι συστατικά της βασικής λαμινας είναι αυτά που αποτελούν το αναπτυξιακό ερέθισμα για την συνέχεια του κύκλου ζωής του μέσα στον φορέα(Adini and Warburg 1999; Arrighi and Hurd 2002; Arrighi, Lycett et al. 2005). Προσπαθήσαμε να διερευνήσουμε αν άλλα μόρια του κουνουπιού τα οποία επίσης συγκεντρώνονται στην επιφάνεια ωοκινετών και ωοκύστεων και έχουν συνδεθεί με απώλειες του παρασίτου μέσα στο κουνούπι όπως η TEP-1(Blandin, Shiao et al. 2004)ή μόρια με τα οποία η TEP-1 αλληλεπιδρά για να προκαλέσει λύση των παρασίτων, LRIM/APL1Ccomplex(Povelones, Waterhouse et al. 2009), εμφανίζουν αλλαγές στο πρότυπο έκφρασης τους (ή

στην πρωτεολυτική τους ωρίμανση) απουσία MMP1, στα υπερκείμενα sua 4.0 κύτταρα, ή στην αιμόλεμφο αλλά δεν καταγράψαμε καμιά σημαντική διαφοροποίηση.

Εφόσον το *timr* θα μπορούσε να δρα ως αναστολέας της MMP1 θα περίμενε κανείς σιώπηση του να έχει τον αντίθετο φαινότυπο από αυτόν της σιωπησης της μεταλλοπρωτεάσης, πράγμα το οποίο δεν παρατηρήσαμε.

Ο *Anopheles* TIMP αναστολέας απουσιάζει τόσο από τον δακτύλιο MMP1 στις θέσεις εισβολής, που θεωρούμε θέσεις τοπικής υπερ-συγκέντρωσης ενεργού TM-MMP1 ζυμογόνου, (και πιθανά θέσεις παραγωγής του 34 kDa προϊόντος), ή από την επιφάνεια των πρώιμων ωοκύστεων. Η εικόνα που έχουμε τόσο από τα sua 4.0 κύτταρα, όσο και από τα *in vivo* πειράματα ανοσο-ιστοχημίας είναι ότι ο TIMP αναστολέας δεν εκκρίνεται. Μόνο σε συνθήκες έκτοπης υπερ-έκφρασης στα sua 4.0 κύτταρα παρατηρήσαμε έκκριση του στο υπερκείμενο των κυττάρων.

Πιθανά η μόνη προσέγγιση για να δοθεί οριστική απάντηση σε ότι αφορά την φύση της προστασίας που η MMP1 παρέχει στην αναπτυσσόμενη ωοκύστη, και αν αυτή εμπλέκει την ενεργότητα μεταλλοπρωτεάσης, είναι ή έκτοπη υπερ-έκφραση του ιστικού αναστολέα MMP (tissue inhibitor of metalloproteases), TIMP, σε διαγονιδιακά κουνούπια, είτε εκκρινόμενου στην αιμόλεμφο, είτε αυξάνοντας τα επίπεδα του στο μεσέντερο.

Παρακάμπτοντας την δημιουργία διαγονιδιακών κουνουπιών που να υπερ-εκφράζουν TIMP, προσπαθήσαμε να αυξήσουμε τα επίπεδα του TIMP στην γειτνίαση του ωοκινέτη, δημιουργώντας διαγονιδιακά παράσιτα που να εκφράζουν ενεργό TIMP αναστολέα σε εκκρινόμενη μορφή στο στάδιο του ωοκινέτη και της ωοκύστης. Η προσπάθεια αυτή ατύχησε μια και η ανάλυση των διαγονιδιακών παρασίτων έδειξε ότι ο TIMP αναστολέας δεν εκκρίνεται από τα διαγονιδιακά παράσιτα. Τα αποτελέσματα αυτής της προσπάθειας παραθέτονται στο επόμενο κεφάλαιο.

Συνοπτικά τα αποτελέσματα μας δείχνουν ότι το γονίδιο MMP1 του *Anopheles* έχει δυο ισομορφές που κωδικοποιούν δυο πρωτεϊνικά προϊόντα, τα οποία παρουσιάζουν ιστοειδικό πρότυπο έκφρασης και διαφοροποιούνται ως προς την τοπολογία τους. Η μεσεντερική MMP1 είναι διαμεμβρανική

πρωτεΐνη, ενώ η αιμοκυτταρική MMP1 είναι εκκρινόμενη. Λειτουργικά τα αποτελέσματα αυτού του κεφαλαίου υποδεικνύουν διαφορετικό ρόλο για αυτές τις δυο ισομορφές. Η μεν μεσεντερική MMP1 φαίνεται να συμμετέχει σε διαδικασίες επούλωσης του μεσεντερικού επιθηλίου μετά από την διείσδυση του ωοκινέτη. Η δε αιμοκυτταρική MMP1 είναι πιθανό να αλληλεπιδρά με τη νεαρή ωοκύστη παίζοντας έτσι ένα προστατευτικό ρόλο για την επιβίωση του παρασίτου.

Η αξιολόγηση των πειραμάτων που έχουν παρατεθεί παραπάνω, προτείνουν ότι MMP1 κατά την αλληλεπίδραση του ωοκινέτη με το επιθήλιο συγκεντρώνεται στα σημεία διείσδυσης στα γειτονικά κύτταρα του(των) προσβαλλόμενου(ων) κυττάρου(ων), γεγονός που προτείνει μια πιθανή εμπλοκή στην επιδιόρθωση του μεσεντερικού επιθηλίου μετά την εισβολή, και στην επιφάνεια των ωοκινετών αμέσως μόλις φτάνουν στο βασικό έλασμα, καθώς και στην επιφάνεια των νεαρών ωοκύστεων. Το γεγονός ότι η αποσιώπηση της έκφρασης της MMP1 δεν επηρεάζει σημαντικά τον αριθμό των ωοκινετών που περνούν το μεσεντερικό επιθήλιο και φτάνουν στο βασικό έλασμα υποδεικνύει ότι πιθανότατα η MMP1 δεν εμπλέκεται στην διαδικασία διείσδυσης του επιθηλίου από τον ωοκινέτη.



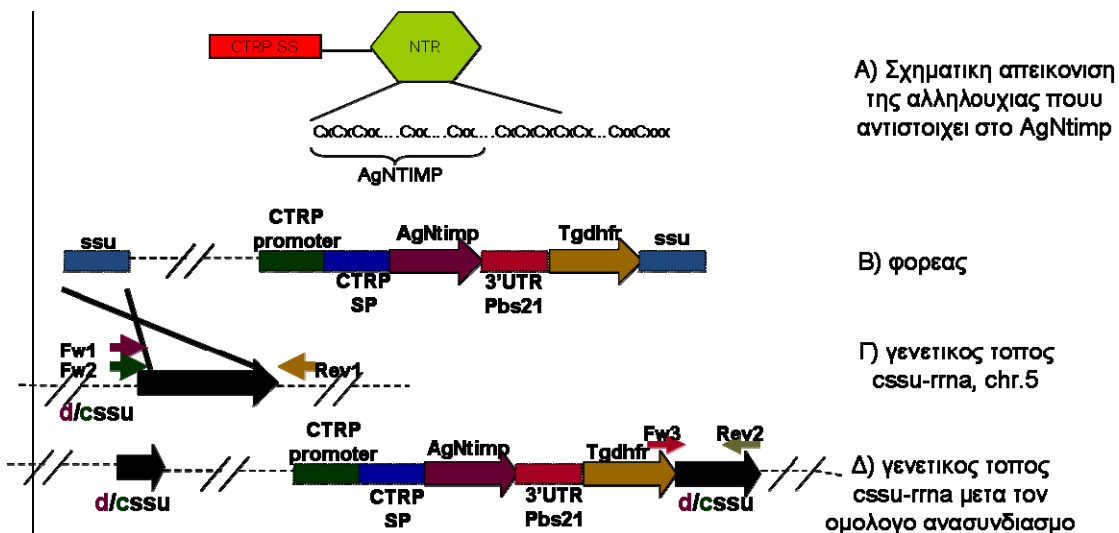
**Εκτοπη έκφραση του TIMP αναστολέα του  
Ανωφελούς σε διαγονιδιακό παράσιτο**

### **Κατασκευή του φορέα CTRP-timp**

Προκειμένου να αποφευχθούν προβλήματα με την έκφραση του αναστολέα στο παράσιτο επιλέχθηκε να εκφραστεί μια μικρότερη περιοχή κι όχι ολόκληρο το αναγνωστικό πλαίσιο του γονιδίου. Η περιοχή που επιλέξαμε ήταν αυτή που κωδικοποιεί το λεγόμενο AgNtimp, το οποίο είχε χρησιμοποιηθεί και ως αντιγόνο για την παραγωγή αντισώματος έναντι του αναστολέα (κεφ.2).

Για να αυξήσουμε την έκκριση του γονιδιακού προϊόντος επιλέχθηκε ως σηματοδοτικό πεπτίδιο αυτό του CTRP, δεδομένου ότι η παραπάνω πρωτεΐνη γνωρίζουμε ότι οδηγείται στο εκκριτικό μονοπάτι του παρασίτου μέσω των μικρονηματίων (Limviroj, Yanoetal. 2002; Li, Templetonetal. 2004).

Για την παραγωγή των διαγονιδιακών παρασίτων χρησιμοποιήθηκε ο φορέας pDEFSSUToxo (RV). Ο φορέας αυτός περιέχει το γονίδιο dhfr-tst του *T.gondii*, υπό τον έλεγχο του eef1a υποκινητή του *P.berghei*, το οποίο επιτρέπει την επιβίωση του παρασίτου παρουσία πυριμεθαμίνης. Επιπλέον ο φορέας περιέχει την αλληλουχία του γενετικού τόπου d-ssu-rna, μέσω του οποίου επιτυγχάνεται ο ομόλογος ανασυνδιασμός με τον αντίστοιχο γενετικό τόπο στο γένωμα του παρασίτου. Να τονιστεί ότι ο γενετικός τόπος dssuέχει μεγάλη ομολογία με τον γενετικό τόπο cssu και η αλληλουχία που περιέχεται στον φορέα είναι πανομοιότυπη και στα δυο γονίδια. Γι'αυτό το λόγο και η ενσωμάτωση στο γένωμα μπορεί να γίνει σε οποιοδήποτε από τα δύο γονίδια. Το cDNA που αντιστοιχεί στην ενεργή περιοχή του timpτοποθετήθηκε κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή CTRP, ο οποίος εξασφαλίζει έκφραση του γονιδίου στο στάδιο του ζυγώτη, του ωοκινέτη, αλλά και της ωοκύστης, που μας ενδιαφέρει (Vlachou, Zimmermann et al. 2004). Το 3'UTR του γονιδίου επιλέχθηκε να είναι το 3'UTR του γονιδίου Pbs28. Στο 3'ακρο αυτού βρίσκεται το γονίδιο dhfr-ts. Η παραπάνω κασέτα τοποθετήθηκε μεταξύ της αλληλουχίας d-ssu-rna. Ομόλογος ανασχεδιασμός οδηγεί σε ενσωμάτωση αυτής στο γένωμα του παρασίτου. Σχηματικά ο φορέας που χρησιμοποιήθηκε και η περιοχή στην οποία γίνεται ο ομόλογος ανασυνδιασμός φαίνεται στο σχήμα 27.

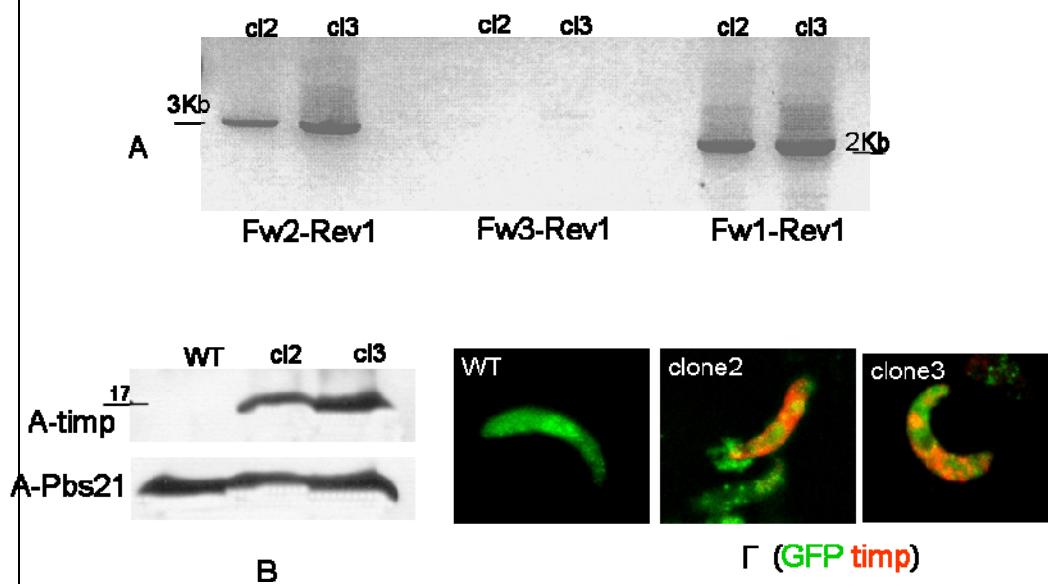


**Σχήμα 27** Α) Σχηματική απεικόνιση της αλληλουχίας που αντιστοιχεί στην περιοχή AgNtimp που επιλέχθηκε για έκφραση στο πλασμώδιο. Όπως φαίνεται η αλληλουχία αντιστοιχεί στο αμινοτελικό άκρο του NTRdomain του αναστολέα και χαρακτηρίζεται από την παρουσία καταλοίπων κυστεϊνης. Στο 5' άκρο της αλληλουχίας που αντιστοιχεί στο AgNtimp κλωνοποιήθηκε η αλληλουχία του CTRPγονιδίου που κωδικοποιεί το σηματοδοτικό πεπτίδιο της πρωτεΐνης. Β) Απεικόνιση του φορέα που χρησιμοποιήθηκε για τον μετασχηματισμό των παρασίτων. Γ) Σχηματική απεικόνιση του γενετικού τόπου *dssu-rna* στον οποίο λαμβάνει χώρα ο ομόλογος ανασχεδιασμός. Δ) ο γενετικός τόπος *dssu-rna*, όπως προκύπτει μετά τον ομόλογο ανασυνδιασμό με τον φορέα μετασχηματισμού.

### 3.8.2 Γενοτύπηση και χαρακτηρισμός του διαγονιδιακού παρασίτου Pbtimp.

Η παραγωγή των διαγονιδιακών παρασίτων (Ρουμπάκη Χαρά) οδήγησε σε απομόνωση δυο παρασιτικών πληθυσμών, που ονομάστηκαν κλώνος 2 και 3 κι έγινε, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο υλικά και μέθοδοι σε δυο βήματα. Αρχικά με electroporation της πλασμωδιακής κατασκευής που περιγράφηκε παραπάνω και στη συνέχεια με διαδοχική αραίωση (serial dilution), προκειμένου να καταλήξουμε σε καθαρούς πληθυσμούς διαγονιδιακών παρασίτων (κλώνους), που να προκύπτουν από ένα αρχικό παράσιτο, και επομένως να είναι γονιδιακά πανομοιότυπα. Η σωστή ενσωμάτωση του πλασμιδιακού φορέα επιβεβαιώθηκε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιώντας ως μήτρα γενωμικό DNA από τους δυο κλώνους και τρεις

διαφορετικούς εκκινητές, που υποδεικνύονται στο σχήμα 27, τους Fw1 (L665), Fw2 (L260) και Fw3 (L270). Οι παραπάνω εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν σε συνδυασμό με τον εκκινητή Rev1 (L740), που υβριδοποιείται σε αλληλουχία κοινή για τα *cssu* και *dssu* γονίδια. Ο παραπάνω εκκινητής σε συνδυασμό με τον εκκινητή Fw1 δίνει ένα προϊόν μεγέθους 2,1Kb στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, που αντιστοιχεί σε αλληλουχία του γονιδίου *Tgdhfr*, εφόσον έχει ενσωματωθεί η κασέτα του φορέα μετασχηματισμού στο γένωμα του παρασίτου. Όπως φαίνεται στο σχήμα 28, η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με το παραπάνω ζεύγος εκκινητών δίνει τόσο για τον κλώνο 2, όσο και για τον 3 το επιθυμητού μεγέθους προϊόν, που σημαίνει ότι η κασέτα του φορέα μετασχηματισμού ενσωματώθηκε σταθερά στο γονιδίωμα και των δυο παρασιτικών πληθυσμών (κλώνων) που απομονώθηκαν. Τα ζεύγη των εκκινητών Fw2-Rev1 και Fw3-Rev1 υβριδοποιούνται στα *d* και *cssu* γονίδια αντίστοιχα και δίνουν ένα προϊόν μεγέθους 3kb στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, εφόσον ο αντίστοιχος γενετικός τόπος είναι άθικτος. Τα ζεύγη των εκκινητών αυτών χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να πιστοποιήσουν περαιτέρω την ενσωμάτωση της πλασμιδιακής κατασκευής στο παρασιτικό γένωμα, αλλά και να υποδείξουν το αλληλόμορφο στο οποίο έλαβε χώρα η ενσωμάτωση αυτή. Όπως φαίνεται λοιπόν στο σχήμα 28A και οι δυο κλώνοι που επιλέχθηκαν δίνουν το παραπάνω προϊόν μόνο με το ζεύγος Fw2-Rev1, που σημαίνει ότι ο ομόλογος ανασχεδιασμός δεν έγινε στο *dssu* γονίδιο, αλλά στο *cssu*, οι εκκινητές του οποίου δεν δίνουν κανένα προϊόν κατά την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.



**Σχήμα 28** Γονοτύπηση και χαρακτηρισμός των διαγονιδιακών παρασίτων που εκφράζουν *timp*. A) Η ενσωμάτωση του φορέα στο παρασιτικό γένωμα υποδεικνύεται από την παραγωγή του προϊόντος μεγέθους 2Kb σε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με τους εκκινητές Fw1-Rev1. Η σωστή ενσωμάτωση του στον γενετικό τόπο *cssuki* όχι στο αλληλόμορφο του *dssu* υποδεικνύεται από την παραγωγή προϊόντος μεγέθους 3Kb με το ειδικό για το *dssu* γενετικό τόπο ζεύγος εκκινητών (Fw2-Rev1) κι όχι με το *cssu* ειδικό ζεύγος εκκινητών (Fw3-Rev1). Τα παραπάνω ισχύουν και για τους δυο παρασιτικούς πληθυσμούς (cl2, cl3). B) πείραμα ανοσοαποτύπωσης με ορό έναντι *timp* σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα ωοκινετών αγρίου τύπου (*wt*) και ωοκινετών από τους δυο διαγονιδιακούς παρασιτικούς πληθυσμούς (cl2, cl3). Η κανονικοποίηση των πρωτεϊνικών δειγμάτων έγινε με αντίσωμα έναντι *Pbs21*. Γ) πείραμα ανοσοιστοχημείας σε ωοκινετές των ίδιων παρασιτικών πληθυσμών (*wt*, cl2, cl3). Με πράσινο απεικονίζεται το ενδογενές GFP που εκφράζουν τα παράσιτα και με κόκκινο το *timp*.

Τα παραπάνω πειράματα επιβεβαίωσαν την ενσωμάτωση του φορέα μετασχηματισμού στο γονιδίωμα των παρασίτων. Προκειμένου όμως να διαπιστωθεί αν τα παράσιτα με τέτοιο γενετικό υπόβαθρο μπορούν να εκφράσουν το πρωτεϊνικό προϊόν που αντιστοιχεί στο AgNt*timp* χρειάστηκε να αναλυθούν και τα πρωτεϊνικά τους εκχυλίσματα. Γι' αυτό το λόγο ωοκινέτες από τους δυο θετικούς παρασιτικούς πληθυσμούς απομονώθηκαν από

*invitro*καλλιέργειες και τα πρωτεϊνικά τους εκχυλίσματα αναλύθηκαν σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης με ορό έναντι timp, όπως φαίνεται στο σχήμα 28B. Ο ορός αναγνωρίζει στα εκχυλίσματα των ωοκινετών και των δυο παρασιτικών κλώνων πρωτεϊνικό προϊόν του επιθημιτού μοριακού μεγέθους (17Kd). Το προϊόν αυτό αναγνωρίζεται μόνο στα εκχυλίσματα των διαγονιδιακών παρασίτων κι όχι σε αυτά του αγρίου τύπου, επιβεβαιώνοντας ότι το προϊόν αυτό προέρχεται από το γονίδιο που εισήχθη στο γένωμα των παρασίτων.

Πειράματα ανοσοιστοχημείας με ορό έναντι timp σε ωοκινέτες απομονωμένους με τον ίδιο τρόπο, όπως παραπάνω από τα μετασχηματισμένα και μη παράσιτα έδειξαν ότι μόνο στους ωοκινέτες των μετασχηματισμένων παρασίτων ο ορός αναγνωρίζει πρωτεϊνικό προϊόν. Παρατήρηση των δειγμάτων σε συνεστιακή μικροσκοπία αποκάλυψε επιπλέον και την κυτταρική τοπολογία του έκτοπα εκφρασμένου προϊόντος. Στο σχήμα 28Γ φαίνεται ότι ο αναστολέας εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα του ωοκινέτη ιδιαίτερα στην περιοχή γύρω από τον πυρήνα (πιθανά ενδοπλασματικό δίκτυο). Το ενδογενές CTRP με το υποκινητή και το σηματοδοτικό πεπτιδίο του οποίου εκφράζεται ο αναστολέας εντοπίζεται κυρίως στην κορυφαία περιοχή του ωοκινέτη στα οργανίδια των μικρονηματίων (Li, Templeton et al. 2004). Το γεγονός ότι η τοπολογία του αναστολέα δεν είναι η ίδια με αυτή του CTRP μπορεί να υποδεικνύει πρόβλημα στην τοποθέτηση του στο σωστό εκκριτικό μονοπάτι, λόγω λανθασμένης δομής της πρωτεΐνης ή λόγω υπερέκφρασης αυτής.

### **3.8.3 Το έκτοπα AgNtimp δεν εκκρίνεται γύρω από την περιοχή του παρασίτου στη διάρκεια της εισβολής του μεσεντερικού επιθηλίου και στα επόμενα στάδια ανάπτυξης του σε αυτό.**

Η παραγωγή των διαγονιδιακών παρασίτων έγινε προκειμένου να αυξηθούν τα επίπεδα του αναστολέα στην περιοχή γύρω από το παράσιτο σε δυο κυρίως χρονικές περιόδους ανάπτυξης του τελευταίου. Κατά την διάρκεια της εισβολής του μεσεντερικού επιθηλίου, οπότε και παρατηρείται η υπερσυγκέντρωση της MMP1, πιθανά λόγω συμμετοχής της στην επούλωση του επιθηλίου και κατά το στάδιο της νεαρής ωοκύστης, οπότε και παρατηρείται παρουσία της πρωτεάσης στην επιφάνεια αυτής με

προστατευτικό ρόλο για το παράσιτο, όπως στηρίζουν τα φαινοτυπικά πειράματα σιώπησης της MMP1.

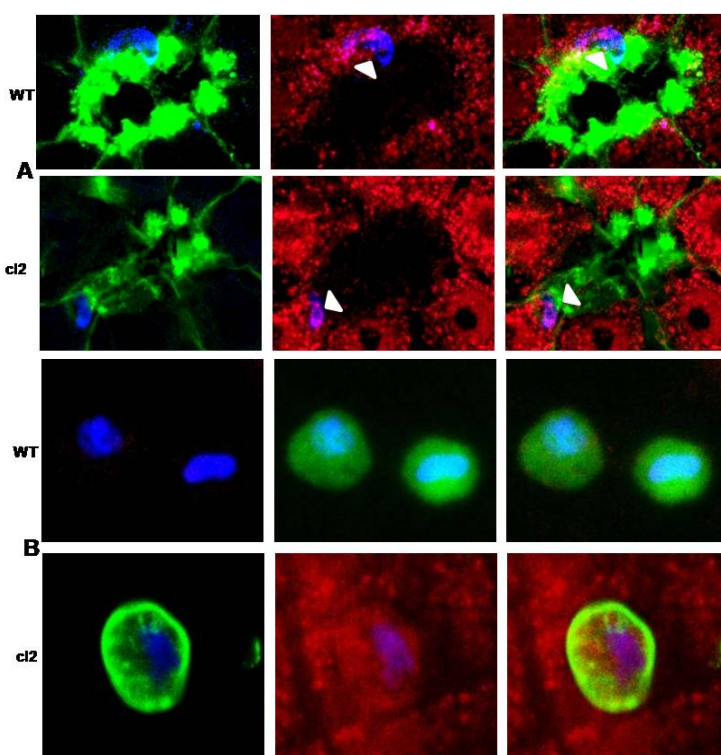
Βάσει των παραπάνω εξετάσαμε αν και ο έκτοπα εκφρασμένος αναστολέας συνεντοπίζεται με την MMP1 στις παραπάνω χρονικές στιγμές. Για αυτό το λόγο μεσεντερικά επιθήλια από κουνούπια που είχαν λάβει διαγονιδιακά παράσιτα απομονώθηκαν 24ωρες και 3ημερες μετά τη λήψη μολυσμένου αίματος και αναλύθηκαν σε πειράματα ανοσοιστοχημείας με ορό έναντι timp.

Στο χρονικό σημείο των 24ωρων μετά τη λήψη του μολυσμένου αίματος παρατήρηση των επιθηλίων αποκάλυψε ότι το διαγονιδιακό παράσιτο ήταν θετικό για την παρουσία timp. Φάνηκε όμως ότι η παρουσία του αναστολέα περιοριζόταν μέσα στο παράσιτο κι όχι στην περιοχή όπου αυτός διεισδύει το μεσεντερικό επιθήλιο. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν και με τα πειράματα ανοσοιστοχημείας των *invitrowοκινετών* που δείχνουν ότι το έκτοπα εκφρασμένο πρωτεϊνικό προϊόν εντοπίζεται κυρίως στην περιοχή που πιθανά αποτελεί το ενδοπλασματικό δίκτυο του παρασίτου. Μη τοποθέτηση του timp στα μικρονηματια μπορεί να δικαιολογήσει το γεγονός της απουσίας του από το μεσεντερικό επιθήλιο. Να τονιστεί εδώ ότι η ενδογενής πρωτεΐνη CTRP εντοπίζεται στο επιθήλιο κατά τη διάρκεια της εισβολής του παρασίτου μέσα από αυτό.

Τα απομονωμένα 3 ημέρες μετά τη λήψη μολυσμένου αίματος μεσεντερικά επιθήλια εξετάστηκαν για την παρουσία του έκτοπα εκφρασμένου αναστολέα στην επιφάνεια των νεαρών ωοκυστεων. Όπως και στην προηγούμενη περίπτωση η απουσία του ενδογενούς αναστολέα τόσο από την περιοχή εισβολής του παρασίτου, όσο και από την επιφάνεια του στο στάδιο της νεαρής ωοκυστες διευκόλυνε την παρατήρηση των δειγμάτων και την εξαγωγή συμπερασμάτων σε όρα την απουσία ή την παρουσία του έκτοπα εκφρασμένου αναστολέα από τις ζητούμενες περιοχές. Η παρατήρηση των δειγμάτων έδειξε πολύ χαμηλά επίπεδα έκφρασης του αναστολέα στις νεαρές ωοκυστες. Μάλιστα το πρωτεϊνικό προϊόν δεν εντοπιζόταν στην επιφάνεια των νεαρών ωοκυστεων, αλλά στο κυτταρόπλασμα αυτών. Παρόμοια παρατήρηση ισχύει και για τα διαγονιδιακά παράσιτα που εκφράζουν την πρωτεΐνη GFP κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή του ενδογενούς CTRP γονιδίου. Σε αυτή την περίπτωση όμως δεν είχε

χρησιμοποιηθεί και το σηματοδοτικό πεπτιδίο του ctrγονιδίου(Vlachou, Zimmermann et al. 2004).

Όπως φαίνεται όμως από τα παραπάνω αποτελέσματα η παρουσία αυτού του σηματοδοτικού πεπτιδίου δεν εξασφάλισε το ζητούμενο πρότυπο έκφρασης του έκτοπα εκφρασμένου αναστολέα, πράγμα που σημαίνει ότι δεν ήταν δυνατό να χρησιμοποιηθεί για να απαντηθούν τα ερωτήματα που αφορούν την MMP1, εάν δηλαδή η παρουσία της κατά την εισβολή και ανάπτυξη του παρασίτου στο μεσέντερο είναι ενεργή και αν μπορεί να αναστέλλει από το *Ag timp*.



**Σχήμα 29** παρουσία του έκτοπα εκφρασμένου αναστολέα στο μεσεντερικό επιθήλιο. A) Μεσεντερικά επιθήλια απομονωμένα 24ωρες μετά την λήψη μολυσμένου αίματος με παράσιτα αγρίου τύπου (WT) και Διαγονιδιακά παράσιτα που

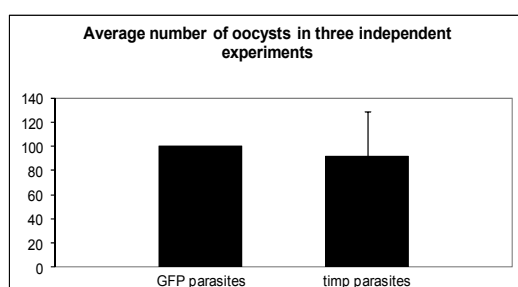
εκφράζουν *timp(cl2)*. Το πράσινο αντιπροσωπεύει την χρώση ακτινης(φαλλοιδίνη) στην περιοχή εισβολής του ωοκινετη. Ο ωοκινετης υποδεικνύεται με το άσπρο βέλος και στις δυο περιπτώσεις και απεικονίζεται με μπλε (*Pbs21*). Το κόκκινο αντιπροσωπεύει τον αναστολέα *timp*, που φαίνεται να εντοπίζεται στο εσωτερικό των διαγονιδιακών παρασίτων. B) νεαρές ωοκυστεις σε μεσεντερικά επιθήλια απομονωμένα 3 ημέρες μετά την λήψη αίματος με παράσιτα αγρίου τύπου(WT) και Διαγονιδιακά παράσιτα (*cl2*). Με μπλε απεικονίζεται ο πυρήνας των νεαρών ωοκυστεων, με πράσινο η παρασιτική πρωτεΐνη *Pbs21* και με κόκκινο ο αναστολέας *timp*.



### 3.8.4 Έκτοπη έκφραση του αναστολέα *timpr* στο *Plasmodiumberghei* δεν επηρεάζει την επιβίωση του στον ασπόνδυλο φορέα του.

Παρά το γεγονός ότι η διαγονιδιακή σειρά που παρήχθη δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να απαντηθούν ερωτήματα που αφορούν την MMP1, θελήσαμε να διαπιστώσουμε αν το διαγονιδιακό παράσιτο που εκφράζει τον αναστολέα έχει κάποιο πρόβλημα στην επιβίωση του μέσα στο κουνούπι.

Για τους παραπάνω λόγους κουνούπια ταΐστηκαν με σύστημα τεχνητής μεμβράνης με μολυσμένο αίμα που περιείχε *in vitro* μεγαλωμένους ωοκινέτες αγρίου τύπου και ωοκινέτες από το διαγονιδιακό παράσιτο που εκφράζει *timpr*. Και σε αυτή την περίπτωση τα πειράματα έγιναν με διαγονιδιακά παράσιτα του κλώνου 2, ο οποίος φαίνεται να έχει πανομοιότυπο πρότυπο έκφρασης του αναστολέα με τον κλώνο 3 (σχημα28). Το τσίγμα των κουνουπιών έγινε με τεχνητό σύστημα, προκειμένου να διασφαλιστεί ότι δίνεται ο ίδιος αριθμός ωοκινετών στα κουνούπια. Επτά ημέρες μετά την λήψη του μολυσμένου αίματος τα μεσεντερικά επιθήλια των κουνουπιών απομονώθηκαν και οι ωοκύστες μετρήθηκαν σε κάθε δείγμα και συγκρίθηκαν, για να διαπιστωθεί αν η διαγονιδιακή σειρά συμπεριφέρεται διαφορετικά. Τρία ανεξάρτητα πειράματα ωστόσο έδειξαν ότι τα διαγονιδιακά παράσιτα δεν παρουσιάζουν κανένα πρόβλημα στην ανάπτυξη τους μέσα στον ασπόνδυλο φορέα (σχημα30)



		INF/DIS	infectivity	average	%average
1st	GFP parasite	22/27	81.48148	63.9259	100
	timpr parasite	30/31	96.77419	39.1290	61.20996
2nd	GFP parasite	19/26	73.07692	13.5769	100
	Timpr parasite	12/20	60	18.1111	133.3963
3rd	GFP parasite	27/32	84.375	27.6129	100
	Timpr parasite	31/37	83.78378	22.0270	79.77078

**Σχήμα 30** Φαινοτυπική ανάλυση διαγονιδιακής σειράς που εκφράζει *timpr*. Στο σχήμα παρουσιάζονται διαγραμματικά οι μέσοι όροι ωοκυστεων που μετρήθηκαν σε μεσεντερικά επιθήλια κουνουπιών ταϊσμένων με παράσιτα αγρίου τύπου που εκφράζουν GFP (*GFPparasites*) και κουνουπιών ταϊσμένων με παράσιτα που εκφράζουν *timpr* (*timprparasites*). Αναλυτικά ο αριθμός των μεσεντέρων που είχαν παράσιτα (*INF*) και ο αριθμός των μεσεντέρων που

αναλυθήκαν (DIS) φαίνεται στον πίνακα που παρατίθεται. Από αυτά τα νούμερα υπολογίζεται το επί τοις εκατό ποσοστό των μεσεντέρων που είχαν παράσιτα (infectivity). Ο μέσος όρος των ωοκυστεων (average) σε κάθε δείγμα στα τρία ανεξάρτητα πειράματα και ο μέσος όρος επί τοις εκατό (%average) παρατίθεται στον ίδιο πίνακα.

**Συμπερασματικά**, η προσπάθεια να αυξηθούν τα επίπεδα του αναστολέα των μεταλλοπρωτεασών στο ίδιο χρονικό σημείο και στην ίδια περιοχή πιθανής πρωτεολυτικής δραστηριότητας της MMP1, δηλαδή στην επιφάνεια των νεαρών ωοκύστεων δεν λειτούργησε. Γι' αυτό τον λόγο και το γεγονός ότι τα διαγονιδιακά παράσιτα δεν παρουσιάζουν φαινοτυπικά πρόβλημα στην ανάπτυξη τους μέσα στον ασπόνδυλο φορέα τους δεν μπορεί να αξιολογηθεί, αφού μπορεί να οφείλεται είτε στο γεγονός ότι ο προστατευτικός ρόλος της MMP1 δεν έχει σχέση με την πρωτεολυτική της δράση είτε στο ότι τα επίπεδα έκφρασης του αναστολέα δεν είναι ικανοποιητικά προκειμένου να αναστείλουν την δράση της MMP1 πάνω στην επιφάνεια της νεαρής ωοκύστεως.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### Γενικά συμπεράσματα/ Συζήτηση

Στον φορέα ελονοσίας *Anophelesgambiae* εκφράζονται αντιπροσωπευτικά γονίδια μέλη που κωδικοποιούν για πρωτεάσες της εξωκυττάριας μήτρας και από τις τρεις γνωστές οικογένειες [A Disintegrin And Metalloprotease, (ADAMs), A Disintegrin and Metalloprotease with Thrombospondin repeats, ADAMTSs, και Matrix Metalloproteases, (MMPs)], καθώς και τουλάχιστον ένας καλά χαρακτηρισμένος αναστολέας τους, ο ιστικός αναστολέας μεταλλοπρωτεασών (tissue inhibitor of metalloproteases, timp).

Συγκεκριμένα βρεθήκαν τρία μέλη της οικογένειας των ADAMs, που ονομάστηκαν ADAMB, ADAMC και ADAMD. Η έκφραση τους φαίνεται να επάγεται στη διάρκεια των αναπτυξιακών σταδίων του εντόμου (στάδιο προνύμφης και νύμφης), γεγονός που οδηγεί στην υπόθεση για πιθανή εμπλοκή τους σε αναπτυξιακά μονοπάτια, όπως είναι ήδη γνωστό για γονίδια της οικογένειας αυτής ειδικά στη *Drosophila melanogaster*.

Η οικογένεια ADAMTSs αντιπροσωπεύεται στον Ανωφελή με δύο γονίδια, τα ADAMTS1 και ADAMTS2. Και τα δύο γονίδια φαίνεται ότι εκφράζονται σε ικανοποιητικά επίπεδα στο ενήλικο έντομο και ειδικότερα στο μεσεντερικό επιθήλιο. Ειδικά σε ότι αφορά το ADAMTS1 το πρότυπο έκφρασης έδειξε σημαντική μείωση της μεταγραφής του γονιδίου κατά την διάρκεια της μαζικής εισβολής ωοκινετών από το μεσέντερο (24 ώρες μετά την πρόσληψη μολυσμένου αίματος).

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεάση ADAMTS2 από την άλλη βρέθηκε ότι εκφράζει τέσσερις μορφές οι οποίες κωδικοποιούν τέσσερα διαφορετικά πρωτεϊνικά προϊόντα. Τα προϊόντα αυτά διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τον αριθμό και την αμινοξική αλληλουχία των TSP repeats του καρβοξυτελικού τους άκρου. Δεδομένου ότι τα συγκεκριμένα τμήματα της πρωτεάσης καθορίζουν την συγγένεια της με τα υποστρώματα και το γεγονός ότι οι εναλλακτικές μορφές παρουσιάζουν διαφορετικό πρότυπο έκφρασης (δύο από αυτές εκφράζονται μόνο στα αναπτυξιακά στάδια του κουνουπιού και στο σώμα του ενήλικου ατόμου) μπορεί να υποδηλώνει διαφορετικούς λειτουργικούς τους ρόλους. Οι προσπάθειες να προσεγγίσουμε τον λειτουργικό ρόλο τόσο της ADAMTS1 όσο και της ADAMTS2 με τη βοήθεια αντισωμάτων και την χρήση RNA τεχνικής δεν ήταν αποτελεσματικές με αποτέλεσμα να εξακολουθούν να υπάρχουν σημαντικά ερωτήματα για τα συγκεκριμένα γονίδια.

Σε ότι αφορά την οικογένεια των MMPs στα αρχικά μας ευρήματα έδειξαν την παρουσία στο γονιδίωμα του Ανωφελούς τριών γονιδίων που κωδικοποιούν για μεταλλοπρωτεάσες της εξωκυττάριας μήτρας (Matrix Metalloproteases, MMPs) που ονομάστηκαν MMP1, MMP-2 και MMP-3. Σε αντίθεση με την *Drosophila* που εκφράζει δυο MMPs, ο *Anopheles gambiae* όπως και το σκαθάρι *Tribolium castaneum* εκφράζει τρεις MMPs. Η MMP2 και η MMP3 του Ανωφελούς φαίνεται ότι εκφράζονται πιο έντονα στη διάρκεια των αναπτυξιακών σταδίων του εντόμου, ενώ αντίθετα τα επίπεδα έκφρασης της MMP1 στη διάρκεια των αναπτυξιακών σταδίων είναι πολύ πιο χαμηλά.

Στο ενήλικο έντομο η έκφραση της MMP2 και MMP3 περιορίζεται μόνο στο σώμα του κουνουπιού (εκτός του μεσεντέρου). Αντίθετα η MMP1 εκφράζεται όχι μόνο στο σώμα αλλά σε υψηλά επίπεδα και στο μεσέντερο.

Βρέθηκε ότι το γονίδιο έχει δυο εναλλακτικές μορφές, που κωδικοποιούν αντίστοιχα μια διαμεμβρανική και μια εκκρινόμενη μορφή της MMP1 πρωτεάσης. Η έκφραση της διαμεμβρανικής μορφής περιορίζεται στα επιθήλια, ενώ η έκφραση της εκκρινόμενης περιορίζεται στα αιμοκύτταρα του ενήλικου εντόμου.

Η χρήση αντισώματος που παρήχθη εναντί της MMP1 και ο λεπτομερής χαρακτηρισμός του μεταγραφικού προτύπου έκφρασης του γονιδίου έδειξε ρύθμιση τόσο σε μεταγραφικό όσο και σε μεταμεταγραφικό επίπεδο της διαμεμβρανικής MMP1. Συγκεκριμένα φάνηκε ότι στη διάρκεια διείσδυσης του ωοκινέτη από το μεσεντερικό επιθήλιο του κουνουπιού επάγεται η μεταγραφή του γονιδίου και η απομάκρυνση από τη νεοσυντιθέμενη πρωτεΐνη του προπεπτιδίου της, γεγονός που οδηγεί σε υψηλά επίπεδα έκφρασης ενεργής πιθανά μεταλλοπρωτεάσης (ζυμογόνο) στον μεσεντερικό ιστό. Τοπολογικά, η διαμεμβρανική MMP1 βρέθηκε να συγκεντρώνεται στη βασική πλευρά του επιθηλίου σχηματίζοντας μια δομή δακτυλίου που περιβάλλει τον ωοκινέτη.

Η ρύθμιση της έκφρασης του MMP1 γονιδίου κατά την φάση διείσδυσης του ωοκινέτη, και ο συνεντοπισμός του γονιδιακού προϊόντος με άλλους δείκτες της αναδιοργάνωσης του επιθηλίου, όπως η ακτίνη και η ιντεγκρίνη κατά την διάρκεια αυτής της διαδικασίας υποδεικνύει συμμετοχή της MMP1 στην επούλωση του μεσεντέρου μετά από το πέρασμα του παρασίτου μέσα από αυτό. Παρόλο που περαιτέρω πειράματα έδειξαν ότι η πιθανολογούμενη

συμμετοχής MMP1 στην επούλωση δεν επηρεάζει την διείσδυση του παρασίτου από το μεσεντερικό επιθήλιο, η διερεύνηση του μηχανισμού με τον οποίο η MMP1 συμμετέχει στην διαδικασία αυτή μπορεί να συνεισφέρει γενικότερα στις μελέτες για τον ρόλο των MMPs στους μηχανισμούς επούλωσης επιθηλίων. Το μονόστοιβο μεσεντερικό επιθήλιο του κουνουπιού θα μπορούσε να αποτελέσει ένα λειτουργικό σύστημα μοντέλο για τέτοιες μελέτες δεδομένου ότι μπορεί κανείς, χρησιμοποιώντας το παράσιτο, να προκαλέσει ελεγχόμενα μικρότερο ή μεγαλύτερο τραυματισμό στο επιθήλιο, ελέγχοντας το παρασιτικό φορτίο.

Η εκκρινόμενη (αιμοκυτταρική) μορφή της MMP1 εκφράζεται κι εκκρίνεται ως προζυμογόνο, όπως έδειξαν μελέτες στις οποίες χρησιμοποιήσαμε μια αιμοκυτταρική σειρά του Ανωφελούς. Εξακολουθεί να αποτελεί ερώτημα ποιός είναι ο μηχανισμός που μπορεί να οδηγήσει σε απομάκρυνση του προπεπτιδίου από την εκκρινόμενη MMP1, και συνακόλουθη ενεργοποίησή της, μετά την έκκριση από το κύτταρο. Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήσαμε μπορεί ίσως να αποτελέσει ένα σύστημα που θα μας επέτρεπε την διερεύνηση της εμπλοκής διαφορετικών παραγόντων (π.χ. ελεύθερες ρίζες, NO, μικροβιακή επιμόλυνση), στην εξωκυττάρια ωρίμανση της εκκρινόμενης MMP1. Πάντως, τα επίπεδα έκφρασης της και ο υποκυττάρικος εντοπισμός της εκκρινόμενης MMP1 δεν φάνηκε να διαφοροποιούνται σημαντικά σε συνθήκες λήψης αίματος, με ή χωρίς παράσιτο. Ο φαινοτυπικός χαρακτηρισμός ατόμων στα οποία επιτυχώς σιωπήθηκε το γονίδιο της MMP1 ανέδειξε τον προστατευτικό του ρόλο για την επιβίωση του παρασίτου μέσα στο κουνούπι. Η προσπάθεια να προσδιορίσουμε χρονικά το στάδιο στο οποίο το προϊόν(τα) του MMP1 γονιδίου επηρεάζει την επιβίωση του παρασίτου μας οδήγησε στο συμπέρασμα ότι ο προστατευτικός αυτός ρόλος εκδηλώνεται κατά τα πρώτα στάδια διαφοροποίησης της νεαρής ωκύστης. Αυτό υποστηρίζεται και από το γεγονός ότι οι αναπτυξιακά πρώιμες ωκύστεις αλλά όχι οι ώριμες καλύπτονται με MMP1 ανοσοαντιδρών υλικό.

Θεωρούμε ότι η ωκύστη κατά την πρώιμη φάση ανάπτυξης της αλληλεπιδρά με κάποια από τις μορφές της MMP1, είτε την εκκρινόμενη είτε το πρωτεολυτικό προϊόν της διαμεμβρανικής MMP1 το οποίο ανιχνεύσαμε σε εκχυλίσματα μεσεντέρου. Το τελευταίο πιθανολογούμε με βάση και τα

δεδομένα από την έκτοπη έκφραση ενεργοποιημένης διαμεμβρανικής MMP1 σε κύτταρα, ότι μπορεί να απελευθερώνεται μέσω αυτο-πρωτεόλυσης στα σημεία υπερ-συγκέντρωσης ενεργοποιημένης MMP1. Τέτοια σημεία είναι οι περιοχές διείσδυσης του ωοκινέτη στην γειτνίαση των οποίων αναπτύσσονται οι ωοκύστες.

Υποστηρίζουμε ότι είναι πιο πιθανό πρώιμη ωοκύστη να καλύπτεται από εκκρινόμενη MMP1, δεδομένου ότι η ανίχνευση του πρωτεολυτικού προϊόντος της διαμεμβρανικής MMP1 στα εκχυλίσματα του μεσεντέρου ήταν στοχαστική. Αν η προστασία που ασκεί η MMP1 στη νεαρή ωοκύστη εμπλέκει την ενεργότητα πρωτεάσης ή τα hemopexin domains, μέσω των οποίων μπορεί να αλληλεπιδρά με άλλα μόρια, (παρασιτικά ή μόρια του φορέα), εξακολουθεί να αποτελεί ένα σημαντικό έρωτημα το οποίο προσπαθήσαμε να προσεγγίσουμε με διάφορους τρόπους (π.χ. με πειράματα συγκαλλιέργειας παρασίτων με την αιμοκυτταρική σειρά ή με έκθεση *in vitro* καλλιιεργημένων ωοκινετών στο υπερκείμενο αιμοκυττάρων). Δυστυχώς οι προσεγγίσεις που ακλουθήσαμε παρουσίαζαν τεχνικές αδυναμίες με αποτέλεσμα να μην μπορούμε να βγάλουμε ασφαλή συμπεράσματα.

Θεωρούμε όμως ότι η απάντηση των παραπάνω ερωτημάτων έχει ιδιαίτερη σημασία προκειμένου να κατανοηθεί με λεπτομέρεια ο μηχανισμός μέσω του οποίου η MMP1 προστατεύει την νεαρή ωοκύστη. Προς το παρόν μπορούμε μόνο να κάνουμε υποθέσεις σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα που υπάρχουν, και οι υποθέσεις αυτές μας κατευθύνουν είτε σε συμμετοχή της MMP1 στους μηχανισμούς έμφυτης ανοσίας (innate immunity) του κουνουπιού, είτε εμπλοκή της σε κάποιο μονοπάτι που επάγει την διαφοροποίηση του ωοκινέτη σε ωοκύστη. Εφόσον αποδειχθεί η δεύτερη υπόθεση μας θα είναι η πρώτη φορά που θα δειχθεί ένα μόριο του κουνουπιού να επηρεάζει τις αναπτυξιακές διαδικασίες του παρασίτου.

Είναι γεγονός ότι στην εργασία αυτή περιοριστήκαμε στην πιθανή εμπλοκή των μεταλλοπρωτεασών εξωκυττάριας στοιβαδας στην αλληλεπίδραση του παρασίτου με το μεσεντερικό επιθήλιο. Ωστόσο ανοικτά ερωτήματα υπάρχουν και για τον τρόπο με τον οποίο τα σποροζωΐδια του παρασίτου εισβάλλουν στο επιθήλιο των σιελογόνων αδένων του κουνουπιού. Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή το πέρασμα των σποροζωΐδιων μέσα από αυτό το επιθήλιο

γίνεται με την αντίθετη φορά από αυτή που ακολουθεί ο ωοκινέτης κατά την δεισδυση του μεσεντέρου, δηλαδή από την βασική στην κορυφαία πλευρά του επιθηλίου. Το γεγονός ότι τα ευρηματα μας δείχνουν ότι η διαμεμβρανική μορφή της MMP1 εντοπίζεται και σε άλλα επιθήλια, όπως το επιθήλιο των θυλακοκυττάρων στις ωθήκες των θηλυκών κάνει εξαιρετικά ενδιαφέρουσα τη διερεύνηση της παρουσίας και των λειτουργικών ρόλων των MMPs στην μορφολογία και οργάνωση του επιθηλίου των σιελογόνων αδένων του κουνουπιού, καθώς και τη πιθανή εμπλοκή τους στην δεισδυση τους από τα σποροζωΐδια.



# Βιβλιογραφία

- Abraham, E. G., S. B. Pinto, et al. (2005). "An immune-responsive serpin, SRPN6, mediates mosquito defense against malaria parasites." Proc Natl Acad Sci U S A**102**(45): 16327-32.
- Adini, A. and A. Warburg (1999). "Interaction of Plasmodium gallinaceum ookinetes and oocysts with extracellular matrix proteins." Parasitology**119** ( Pt 4): 331-6.
- Akaki, M. and J. A. Dvorak (2005). "A chemotactic response facilitates mosquito salivary gland infection by malaria sporozoites." J Exp Biol**208**(Pt 16): 3211-8.
- Al-Olayan, E. M., A. L. Beetsma, et al. (2002). "Complete development of mosquito phases of the malaria parasite in vitro." Science**295**(5555): 677-9.
- Altincicek, B. and A. Vilcinskas (2008). "Identification of a lepidopteran matrix metalloproteinase with dual roles in metamorphosis and innate immunity." Dev Comp Immunol**32**(4): 400-9.
- Aly, A. S. and K. Matuschewski (2005). "A malarial cysteine protease is necessary for Plasmodium sporozoite egress from oocysts." J Exp Med**202**(2): 225-30.
- Anand-Apte, B., L. Bao, et al. (1996). "A review of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) and experimental analysis of its effect on primary tumor growth." Biochem Cell Biol**74**(6): 853-62.
- Armstrong, P. B. (2006). "Proteases and protease inhibitors: a balance of activities in host-pathogen interaction." Immunobiology**211**(4): 263-81.
- Arrighi, R. B. and H. Hurd (2002). "The role of Plasmodium berghei ookinete proteins in binding to basal lamina components and transformation into oocysts." Int J Parasitol**32**(1): 91-8.
- Arrighi, R. B., G. Lycett, et al. (2005). "Laminin and the malaria parasite's journey through the mosquito midgut." J Exp Biol**208**(Pt 13): 2497-502.
- Atella, G. C., P. R. Bittencourt-Cunha, et al. (2009). "The major insect lipoprotein is a lipid source to mosquito stages of malaria parasite." Acta Trop**109**(2): 159-62.
- Belas, R., J. Manos, et al. (2004). "Proteus mirabilis ZapA metalloprotease degrades a broad spectrum of substrates, including antimicrobial peptides." Infect Immun**72**(9): 5159-67.
- Billker, O., S. Dechamps, et al. (2004). "Calcium and a calcium-dependent protein kinase regulate gamete formation and mosquito transmission in a malaria parasite." Cell**117**(4): 503-14.
- Billker, O., V. Lindo, et al. (1998). "Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito." Nature**392**(6673): 289-92.
- Blandin, S., L. F. Moita, et al. (2002). "Reverse genetics in the mosquito Anopheles gambiae: targeted disruption of the Defensin gene." EMBO Rep**3**(9): 852-6.
- Blandin, S., S. H. Shiao, et al. (2004). "Complement-like protein TEP1 is a determinant of vectorial capacity in the malaria vector Anopheles gambiae." Cell**116**(5): 661-70.
- Brew, K. and H. Nagase "The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity." Biochim Biophys Acta**1803**(1): 55-71.
- Brindley, P. J., A. A. Gam, et al. (1995). "Ss40: the zinc endopeptidase secreted by infective larvae of Strongyloides stercoralis." Exp Parasitol**80**(1): 1-7.
- Brock, J., K. Midwinter, et al. (1996). "Healing of incisional wounds in the embryonic chick wing bud: characterization of the actin purse-string and demonstration of a requirement for Rho activation." J Cell Biol**135**(4): 1097-107.
- Carter, V., A. M. Nacer, et al. (2007). "Minimum requirements for ookinete to oocyst transformation in Plasmodium." Int J Parasitol**37**(11): 1221-32.
- Chen, P. and W. C. Parks (2009). "Role of matrix metalloproteinases in epithelial migration." J Cell Biochem**108**(6): 1233-43.
- Claudianos, C., J. T. Dessens, et al. (2002). "A malaria scavenger receptor-like protein essential for parasite development." Mol Microbiol**45**(6): 1473-84.

- Cong, M., T. Liu, et al. (2009). "Suppression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by recombinant adeno-associated viruses carrying siRNAs in hepatic stellate cells." Int J Mol Med**24**(5): 685-92.
- Crosby, L. M. and C. M. Waters "Epithelial repair mechanisms in the lung." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**298**(6): L715-31.
- Dessens, J. T., A. L. Beetsma, et al. (1999). "CTRP is essential for mosquito infection by malaria ookinetes." EMBO J**18**(22): 6221-7.
- Dong, Y., F. Manfredini, et al. (2009). "Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites." PLoS Pathog**5**(5): e1000423.
- Edwards, D. R., M. M. Handsley, et al. (2008). "The ADAM metalloproteinases." Mol Aspects Med**29**(5): 258-89.
- Eksi, S., B. Czesny, et al. (2004). "Targeted disruption of Plasmodium falciparum cysteine protease, falcipain 1, reduces oocyst production, not erythrocytic stage growth." Mol Microbiol**53**(1): 243-50.
- Fessler, J. H., I. Kramerova, et al. (2004). "Papilin, a novel component of basement membranes, in relation to ADAMTS metalloproteases and ECM development." Int J Biochem Cell Biol**36**(6): 1079-84.
- Ghosh, A. K., M. Devenport, et al. (2009). "Malaria parasite invasion of the mosquito salivary gland requires interaction between the Plasmodium TRAP and the Anopheles saglin proteins." PLoS Pathog**5**(1): e1000265.
- Ghosh, A. K., P. E. Ribolla, et al. (2001). "Targeting Plasmodium ligands on mosquito salivary glands and midgut with a phage display peptide library." Proc Natl Acad Sci U S A**98**(23): 13278-81.
- Gingras, D., M. Page, et al. (2000). "Rapid activation of matrix metalloproteinase-2 by glioma cells occurs through a posttranslational MT1-MMP-dependent mechanism." Biochim Biophys Acta**1497**(3): 341-50.
- Gonzalo, P., V. Moreno, et al. "MT1-MMP and integrins: Hand-to-hand in cell communication." Biofactors**36**(4): 248-54.
- Gupta, L., S. Kumar, et al. (2005). "Midgut epithelial responses of different mosquito-Plasmodium combinations: the actin cone zipper repair mechanism in Aedes aegypti." Proc Natl Acad Sci U S A**102**(11): 4010-5.
- Gupta, L., A. Molina-Cruz, et al. (2009). "The STAT pathway mediates late-phase immunity against Plasmodium in the mosquito Anopheles gambiae." Cell Host Microbe**5**(5): 498-507.
- Hamano, Y., M. Zeisberg, et al. (2003). "Physiological levels of tumstatin, a fragment of collagen IV alpha3 chain, are generated by MMP-9 proteolysis and suppress angiogenesis via alphaV beta3 integrin." Cancer Cell**3**(6): 589-601.
- Han, Y. S., J. Thompson, et al. (2000). "Molecular interactions between Anopheles stephensi midgut cells and Plasmodium berghei: the time bomb theory of ookinete invasion of mosquitoes." EMBO J**19**(22): 6030-40.
- Heck, L. W., K. Morihara, et al. (1986). "Degradation of soluble laminin and depletion of tissue-associated basement membrane laminin by Pseudomonas aeruginosa elastase and alkaline protease." Infect Immun**54**(1): 149-53.
- Hernandez-Barrantes, S., M. Toth, et al. (2000). "Binding of active (57 kDa) membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) to tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 regulates MT1-MMP processing and pro-MMP-2 activation." J Biol Chem**275**(16): 12080-9.
- Houghton, A. M., W. O. Hartzell, et al. (2009). "Macrophage elastase kills bacteria within murine macrophages." Nature**460**(7255): 637-41.
- Hu, S. I., M. Klein, et al. (1999). "Identification of a splice variant of neutrophil collagenase (MMP-8)." FEBS Lett**443**(1): 8-10.

- Huang, X., P. Huang, et al. (2003). "UNC-71, a disintegrin and metalloprotease (ADAM) protein, regulates motor axon guidance and sex myoblast migration in *C. elegans*." Development**130**(14): 3147-61.
- Ihara, S. and K. Nishiwaki (2007). "Prodomain-dependent tissue targeting of an ADAMTS protease controls cell migration in *Caenorhabditis elegans*." EMBO J**26**(11): 2607-20.
- Illman, S. A., J. Keski-Oja, et al. (2003). "The mouse matrix metalloproteinase, epilysin (MMP-28), is alternatively spliced and processed by a furin-like proprotein convertase." Biochem J**375**(Pt 1): 191-7.
- Ishino, T., K. Yano, et al. (2004). "Cell-passage activity is required for the malarial parasite to cross the liver sinusoidal cell layer." PLoS Biol**2**(1): E4.
- Kadota, K., T. Ishino, et al. (2004). "Essential role of membrane-attack protein in malarial transmission to mosquito host." Proc Natl Acad Sci U S A**101**(46): 16310-5.
- Kang, T., Y. G. Zhao, et al. (2002). "Intracellular activation of human adamalysin 19/disintegrin and metalloproteinase 19 by furin occurs via one of the two consecutive recognition sites." J Biol Chem**277**(28): 25583-91.
- Kariu, T., T. Ishino, et al. (2006). "CelTOS, a novel malarial protein that mediates transmission to mosquito and vertebrate hosts." Mol Microbiol**59**(5): 1369-79.
- Kariu, T., M. Yuda, et al. (2002). "MAEBL is essential for malarial sporozoite infection of the mosquito salivary gland." J Exp Med**195**(10): 1317-23.
- Kashiwagi, M., J. J. Enghild, et al. (2004). "Altered proteolytic activities of ADAMTS-4 expressed by C-terminal processing." J Biol Chem**279**(11): 10109-19.
- Khan, S. M., B. Franke-Fayard, et al. (2005). "Proteome analysis of separated male and female gametocytes reveals novel sex-specific *Plasmodium* biology." Cell**121**(5): 675-87.
- Khandaker, M. H., G. Mitchell, et al. (1999). "Metalloproteinases are involved in lipopolysaccharide- and tumor necrosis factor-alpha-mediated regulation of CXCR1 and CXCR2 chemokine receptor expression." Blood**93**(7): 2173-85.
- Knorr, E., H. Schmidtberg, et al. (2009). "MMPs regulate both development and immunity in the tribolium model insect." PLoS One**4**(3): e4751.
- Kremer, E. A., Y. Chen, et al. (1998). "Hydroxyapatite induces autolytic degradation and inactivation of matrix metalloproteinase-1 and -3." J Bone Miner Res**13**(12): 1890-902.
- Kumar, S., A. Molina-Cruz, et al. "A peroxidase/dual oxidase system modulates midgut epithelial immunity in *Anopheles gambiae*." Science**327**(5973): 1644-8.
- Kurreck, J. (2006). "siRNA efficiency: structure or sequence-that is the question." J Biomed Biotechnol**2006**(4): 83757.
- Lehti, K., J. Lohi, et al. (2002). "Oligomerization through hemopexin and cytoplasmic domains regulates the activity and turnover of membrane-type 1 matrix metalloproteinase." J Biol Chem**277**(10): 8440-8.
- Levashina, E. A., L. F. Moita, et al. (2001). "Conserved role of a complement-like protein in phagocytosis revealed by dsRNA knockout in cultured cells of the mosquito, *Anopheles gambiae*." Cell**104**(5): 709-18.
- Li, F., T. J. Templeton, et al. (2004). "Plasmodium ookinete-secreted proteins secreted through a common micronemal pathway are targets of blocking malaria transmission." J Biol Chem**279**(25): 26635-44.
- Limviroj, W., K. Yano, et al. (2002). "Immuno-electron microscopic observation of *Plasmodium berghei* CTRP localization in the midgut of the vector mosquito *Anopheles stephensi*." J Parasitol**88**(4): 664-72.
- Llano, E., G. Adam, et al. (2002). "Structural and enzymatic characterization of *Drosophila* Dm2-MMP, a membrane-bound matrix metalloproteinase with tissue-specific expression." J Biol Chem**277**(26): 23321-9.

- Llano, E., A. M. Pendas, et al. (2000). "Dm1-MMP, a matrix metalloproteinase from *Drosophila* with a potential role in extracellular matrix remodeling during neural development." *J Biol Chem***275**(46): 35978-85.
- Luo, D., B. Mari, et al. (2002). "Alternative splicing and promoter usage generates an intracellular stromelysin 3 isoform directly translated as an active matrix metalloproteinase." *J Biol Chem***277**(28): 25527-36.
- Mahairaki, V., G. Lycett, et al. (2005). "Close association of invading *Plasmodium berghei* and beta integrin in the *Anopheles gambiae* midgut." *Arch Insect Biochem Physiol***60**(1): 13-9.
- Mahairaki, V., T. Voyatzi, et al. (2005). "The *Anopheles gambiae* gamma1 laminin directly binds the *Plasmodium berghei* circumsporozoite- and TRAP-related protein (CTRP)." *Mol Biochem Parasitol***140**(1): 119-21.
- Majerus, E. M., X. Zheng, et al. (2003). "Cleavage of the ADAMTS13 propeptide is not required for protease activity." *J Biol Chem***278**(47): 46643-8.
- Matsumoto, S., M. Katoh, et al. (1997). "Identification of soluble type of membrane-type matrix metalloproteinase-3 formed by alternatively spliced mRNA." *Biochim Biophys Acta***1354**(2): 159-70.
- McGuire, J. K., Q. Li, et al. (2003). "Matrilysin (matrix metalloproteinase-7) mediates E-cadherin ectodomain shedding in injured lung epithelium." *Am J Pathol***162**(6): 1831-43.
- McQuibban, G. A., J. H. Gong, et al. (2002). "Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo." *Blood***100**(4): 1160-7.
- Meighan, C. M., E. J. Cram, et al. (2004). "Organogenesis: cutting to the chase." *Curr Biol***14**(22): R948-50.
- Meister, S., B. Agianian, et al. (2009). "*Anopheles gambiae* PGRPLC-mediated defense against bacteria modulates infections with malaria parasites." *PLoS Pathog***5**(8): e1000542.
- Meister, S., S. M. Kanzok, et al. (2005). "Immune signaling pathways regulating bacterial and malaria parasite infection of the mosquito *Anopheles gambiae*." *Proc Natl Acad Sci U S A***102**(32): 11420-5.
- Menard, R. (2001). "Gliding motility and cell invasion by Apicomplexa: insights from the *Plasmodium* sporozoite." *Cell Microbiol***3**(2): 63-73.
- Menard, R., A. A. Sultan, et al. (1997). "Circumsporozoite protein is required for development of malaria sporozoites in mosquitoes." *Nature***385**(6614): 336-40.
- Mendes, A. M., T. Schlegelmilch, et al. (2008). "Conserved mosquito/parasite interactions affect development of *Plasmodium falciparum* in Africa." *PLoS Pathog***4**(5): e1000069.
- Michel, K., A. Budd, et al. (2005). "*Anopheles gambiae* SRPN2 facilitates midgut invasion by the malaria parasite *Plasmodium berghei*." *EMBO Rep***6**(9): 891-7.
- Nacer, A., A. Underhill, et al. (2008). "The microneme proteins CTRP and SOAP are not essential for *Plasmodium berghei* ookinete to oocyst transformation in vitro in a cell free system." *Malar J*: 82.
- Naito, Y., J. Yoshimura, et al. (2009). "siDirect 2.0: updated software for designing functional siRNA with reduced seed-dependent off-target effect." *BMC Bioinformatics***10**: 392.
- Nakayama, K. (1997). "Furin: a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins." *Biochem J***327** ( Pt 3): 625-35.
- Nye, J. S. (1997). "Developmental signaling: notch signals Kuz it's cleaved." *Curr Biol***7**(11): R716-20.
- Osenkowski, P., M. Toth, et al. (2004). "Processing, shedding, and endocytosis of membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP)." *J Cell Physiol***200**(1): 2-10.

- Osta, M. A., G. K. Christophides, et al. (2004). "Effects of mosquito genes on Plasmodium development." *Science***303**(5666): 2030-2.
- Ote, M., K. Mita, et al. (2005). "Characteristics of two genes encoding proteins with an ADAM-type metalloprotease domain, which are induced during the molting periods in *Bombyx mori*." *Arch Insect Biochem Physiol***59**(2): 91-8.
- Page-McCaw, A., J. Serano, et al. (2003). "Drosophila matrix metalloproteinases are required for tissue remodeling, but not embryonic development." *Dev Cell***4**(1): 95-106.
- Pastrana-Mena, R., R. R. Dinglasan, et al. "Glutathione reductase-null malaria parasites have normal blood stage growth but arrest during development in the mosquito." *J Biol Chem***285**(35): 27045-56.
- Piccard, H., P. E. Van den Steen, et al. (2007). "Hemopexin domains as multifunctional liganding modules in matrix metalloproteinases and other proteins." *J Leukoc Biol***81**(4): 870-92.
- Pohar, N., T. A. Godenschwege, et al. (1999). "Invertebrate tissue inhibitor of metalloproteinase: structure and nested gene organization within the synapsin locus is conserved from *Drosophila* to human." *Genomics***57**(2): 293-6.
- Porter, S., I. M. Clark, et al. (2005). "The ADAMTS metalloproteinases." *Biochem J***386**(Pt 1): 15-27.
- Povelones, M., R. M. Waterhouse, et al. (2009). "Leucine-rich repeat protein complex activates mosquito complement in defense against Plasmodium parasites." *Science***324**(5924): 258-61.
- Prato, M., S. D'Alessandro, et al. "Natural haemozoin modulates matrix metalloproteinases and induces morphological changes in human microvascular endothelium." *Cell Microbiol*.
- Ra, H. J. and W. C. Parks (2007). "Control of matrix metalloproteinase catalytic activity." *Matrix Biol***26**(8): 587-96.
- Ray, S., P. Lukyanov, et al. (2003). "Members of the cystatin superfamily interact with MMP-9 and protect it from autolytic degradation without affecting its gelatinolytic activities." *Biochim Biophys Acta***1652**(2): 91-102.
- Reiss, K. and P. Saftig (2009). "The "a disintegrin and metalloprotease" (ADAM) family of sheddases: physiological and cellular functions." *Semin Cell Dev Biol***20**(2): 126-37.
- Remacle, A. G., A. V. Chekanov, et al. (2006). "O-glycosylation regulates autolysis of cellular membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP)." *J Biol Chem***281**(25): 16897-905.
- Rhee, J. S. and L. M. Coussens (2002). "RECKing MMP function: implications for cancer development." *Trends Cell Biol***12**(5): 209-11.
- Riggins, K. S., G. Mernaugh, et al. "MT1-MMP-mediated basement membrane remodeling modulates renal development." *Exp Cell Res***316**(17): 2993-3005.
- Rodriguez, M. H. and L. Hernandez-Hernandez Fde (2004). "Insect-malaria parasites interactions: the salivary gland." *Insect Biochem Mol Biol***34**(7): 615-24.
- Rozanov, D. V. and A. Y. Strongin (2003). "Membrane type-1 matrix metalloproteinase functions as a proprotein self-convertase. Expression of the latent zymogen in *Pichia pastoris*, autolytic activation, and the peptide sequence of the cleavage forms." *J Biol Chem***278**(10): 8257-60.
- Ryu, H. Y., J. Lee, et al. (2009). "Syndecan-2 functions as a docking receptor for pro-matrix metalloproteinase-7 in human colon cancer cells." *J Biol Chem***284**(51): 35692-701.
- Sadler, J. E. (2008). "Von Willebrand factor, ADAMTS13, and thrombotic thrombocytopenic purpura." *Blood***112**(1): 11-8.
- Schlomann, U., D. Wildeboer, et al. (2002). "The metalloprotease disintegrin ADAM8. Processing by autocatalysis is required for proteolytic activity and cell adhesion." *J Biol Chem***277**(50): 48210-9.

- Schneider, D. and M. Shahabuddin (2000). "Malaria parasite development in a Drosophila model." *Science***288**(5475): 2376-9.
- Seals, D. F. and S. A. Courtneidge (2003). "The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions." *Genes Dev***17**(1): 7-30.
- Shao, L., M. Devenport, et al. (2001). "The peritrophic matrix of hematophagous insects." *Arch Insect Biochem Physiol***47**(2): 119-25.
- Sinden, R. E. (2002). "Molecular interactions between Plasmodium and its insect vectors." *Cell Microbiol***4**(11): 713-24.
- Sinden RE, A. Y., Butcher G, Dessens JT, Raine JD, Trueman HE (2004). *Ookinete cell biology*, Caister Academic Press.
- Srinivasan, P., H. Fujioka, et al. (2008). "PbCap380, a novel oocyst capsule protein, is essential for malaria parasite survival in the mosquito." *Cell Microbiol***10**(6): 1304-12.
- Srivastava, A., J. C. Pastor-Pareja, et al. (2007). "Basement membrane remodeling is essential for Drosophila disc eversion and tumor invasion." *Proc Natl Acad Sci U S A***104**(8): 2721-6.
- Svoboda, P. (2007). "Off-targeting and other non-specific effects of RNAi experiments in mammalian cells." *Curr Opin Mol Ther***9**(3): 248-57.
- Sympson, C. J., R. S. Talhouk, et al. (1994). "Targeted expression of stromelysin-1 in mammary gland provides evidence for a role of proteinases in branching morphogenesis and the requirement for an intact basement membrane for tissue-specific gene expression." *J Cell Biol***125**(3): 681-93.
- Tewari, R., D. Dorin, et al. (2005). "An atypical mitogen-activated protein kinase controls cytokinesis and flagellar motility during male gamete formation in a malaria parasite." *Mol Microbiol***58**(5): 1253-63.
- Thathy, V., H. Fujioka, et al. (2002). "Levels of circumsporozoite protein in the Plasmodium oocyst determine sporozoite morphology." *EMBO J***21**(7): 1586-96.
- Traub, L. M. (2009). "Tickets to ride: selecting cargo for clathrin-regulated internalization." *Nat Rev Mol Cell Biol***10**(9): 583-96.
- Van den Steen, P. E., P. Proost, et al. (2000). "Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO-alpha and leaves RANTES and MCP-2 intact." *Blood***96**(8): 2673-81.
- Van den Steen, P. E., I. Van Aelst, et al. (2006). "Matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of MMPs and TACE in experimental cerebral malaria." *Lab Invest***86**(9): 873-88.
- Velasco, G., A. M. Pendas, et al. (1999). "Cloning and characterization of human MMP-23, a new matrix metalloproteinase predominantly expressed in reproductive tissues and lacking conserved domains in other family members." *J Biol Chem***274**(8): 4570-6.
- Vincenti, M. P. and C. E. Brinckerhoff (2007). "Signal transduction and cell-type specific regulation of matrix metalloproteinase gene expression: can MMPs be good for you?" *J Cell Physiol***213**(2): 355-64.
- Vlachou, D., T. Schlegelmilch, et al. (2005). "Functional genomic analysis of midgut epithelial responses in Anopheles during Plasmodium invasion." *Curr Biol***15**(13): 1185-95.
- Vlachou, D., T. Schlegelmilch, et al. (2006). "The developmental migration of Plasmodium in mosquitoes." *Curr Opin Genet Dev***16**(4): 384-91.
- Vlachou, D., T. Zimmermann, et al. (2004). "Real-time, in vivo analysis of malaria ookinete locomotion and mosquito midgut invasion." *Cell Microbiol***6**(7): 671-85.
- Volz, J., H. M. Muller, et al. (2006). "A genetic module regulates the melanization response of Anopheles to Plasmodium." *Cell Microbiol***8**(9): 1392-405.
- Wang, P., M. Tortorella, et al. (2004). "Proprotein convertase furin interacts with and cleaves pro-ADAMTS4 (Aggrecanase-1) in the trans-Golgi network." *J Biol Chem***279**(15): 15434-40.

- Wang, Q., H. Fujioka, et al. (2005). "Exit of Plasmodium sporozoites from oocysts is an active process that involves the circumsporozoite protein." *PLoS Pathog***1**(1): e9.
- Wang, W. M., S. Lee, et al. (2003). "Transforming growth factor-beta induces secretion of activated ADAMTS-2. A procollagen III N-proteinase." *J Biol Chem***278**(21): 19549-57.
- Weathersby, A. B. (1954). "The ectopic development of malarial oocysts." *Exp Parasitol***3**(6): 538-43.
- Weeks, B. S., M. E. Klotman, et al. (1993). "HIV-1 infection stimulates T cell invasiveness and synthesis of the 92-kDa type IV collagenase." *AIDS Res Hum Retroviruses***9**(6): 513-8.
- Wei, S., Z. Xie, et al. (2003). "Drosophila TIMP is a potent inhibitor of MMPs and TACE: similarities in structure and function to TIMP-3." *Biochemistry***42**(42): 12200-7.
- William C. Parks, C. L. W., Yolanda S. Lopez-Boado (2004). "Matrix Metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity." *Nature Reviews Immunology***4**: 617-629.
- Wilson, C. L., A. P. Schmidt, et al. (2009). "Differential Processing of {alpha}- and {beta}-Defensin Precursors by Matrix Metalloproteinase-7 (MMP-7)." *J Biol Chem***284**(13): 8301-11.
- Wu, Y. I., H. G. Munshi, et al. (2007). "Activation-coupled membrane-type 1 matrix metalloproteinase membrane trafficking." *Biochem J***407**(2): 171-7.
- Yano, K., K. Komaki-Yasuda, et al. (2006). "2-Cys Peroxiredoxin TPx-1 is involved in gametocyte development in Plasmodium berghei." *Mol Biochem Parasitol***148**(1): 44-51.
- Yu, Q. and I. Stamenkovic (2000). "Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis." *Genes Dev***14**(2): 163-76.
- Yuda, M., H. Sakaida, et al. (1999). "Targeted disruption of the plasmodium berghei CTRP gene reveals its essential role in malaria infection of the vector mosquito." *J Exp Med***190**(11): 1711-6.
- Zeng, W., C. Corcoran, et al. (2006). "Glycosaminoglycan-binding properties and aggrecanase activities of truncated ADAMTSs: comparative analyses with ADAMTS-5, -9, -16 and -18." *Biochim Biophys Acta***1760**(3): 517-24.
- Zhang, S., G. M. Dailey, et al. (2006). "An MMP liberates the Ninjurin A ectodomain to signal a loss of cell adhesion." *Genes Dev***20**(14): 1899-910.