



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**Μελέτη μορίων του πρωτόζωου *Leishmania* που εμπλέκονται στην
πρόοδο του κυτταρικού κύκλου**

ΑΛΕΞΑΝΔΡΑΤΟΣ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

2014

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Χημείας της Σχολής Θετικών
Επιστημών, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του
συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2»

Ημερομηνία **αίτησης** του κ. Αλεξανδράτου Αλέξανδρου: 11-02-2010

Ορισμός **Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής** από τη Γ.Σ.Ε.Σ.: 779^Α/ 19-02-2010

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων: Βασίλειος Τσίκαρης, Καθηγητής Τμήμ. Χημείας Παν/μίου Ιωαννίνων

Μέλη: Καίτη Σωτηριάδου-Νικολαΐδου, Ερευνήτρια Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ

Δημόκριτος Τσουκάτος, Καθηγητής Τμήμ. Χημείας Παν/μίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία **ορισμού θέματος: 19-02-2010**

Θέμα: «Μελέτη μορίων του πρωτόζωου *Leishmania* που εμπλέκονται στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ από τη Γ.Σ.Ε.Σ.:

873^Α/18-11-2013

1. Τσίκαρης Βασίλειος, Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
2. Τσουκάτος Δημόκριτος, Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
3. Σωτηριάδου Καίτη, Ερευνήτρια Α', Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ
4. Τσελέπης Αλέξανδρος, Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
5. Χατζηλουκάς Ευστάθιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
6. Παπαδοπούλου Χρυσάνθη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τμήματος Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
7. Προδρομίδης Μάμαντος, Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «**ΑΡΙΣΤΑ**» στις :**13-02-2014**

Ο Πρόεδρος του Τμήματος Χημείας
Τσίκαρης Βασίλειος, Καθηγητής

Η Γραμματέας του Τμήματος
Ελένη Αδαμαντίου

Στην οικογένειά μου
Λόγια πολλά δεν έχω παρά μόνο ευχαριστώ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η λεισμανίαση αποτελεί μια παρασιτική νόσο και είναι ενδημική στις τροπικές και υποτροπικές περιοχές 88 χωρών. Περίπου 350 εκατομμύρια άτομα θεωρείται ότι βρίσκονται σε πιθανό κίνδυνο από τη νόσο. Παράλληλα αποτελεί σημαντικό πρόβλημα Δημόσιας Υγείας και Κτηνιατρικής σημασίας στις χώρες της Μεσογειακής λεκάνης και ως εκ τούτου και στην Ελλάδα. Οι υπάρχουσες θεραπείες για τη νόσο χαρακτηρίζονται γενικά αναποτελεσματικές, εξαιτίας της εμφάνισης ανθεκτικότητας των παρασιτικών στελεχών έναντι των φαρμακευτικών ουσιών αλλά και των παρενεργειών που αυτές προκαλούν. Τοιουτοτρόπως, το ενδιαφέρον στρέφεται στην ανάπτυξη νέων ικανών και στοχευμένων θεραπευτικών ουσιών για την καταπολέμηση της νόσου.

Η ανάπτυξη όμως νέων φαρμάκων δεν είναι δυνατή αν δεν υπάρχει προηγουμένως ενδελεχής γνώση της βασικής βιολογίας που διέπει το παράσιτο. Μόνο τότε μπορούν να σχεδιαστούν φαρμακευτικές ουσίες που θα παρεμβαίνουν σε συγκεκριμένα κυτταρικά μονοπάτια και θα έχουν εξειδικευμένη δράση. Παράλληλα το ενδιαφέρον στρέφεται και σε μόρια του παρασίτου που αποτελούν παράγοντες μολυσματικότητας και εμπλέκονται άμεσα στην ικανότητα του παρασίτου να μολύνει τα κύτταρα του ξενιστή.

Η παρούσα διατριβή ασχολείται με τη διαλεύκανση του βιολογικού ρόλου της λεισμανιακής ιστόνης H1 και των γεγονότων που ακολουθούν μετά την υπερέκφραση της στο παράσιτο. Η επιλογή της πρωτεΐνης αυτής δεν ήταν τυχαία αλλά στηρίχθηκε σε προηγούμενα δεδομένα που δείχνουν ότι η υπερέκφραση της ιστόνης H1 παρεμβαίνει στη μολυσματικότητα και το φαινότυπο του παρασίτου. Η μελέτη αυτή εντάσσεται σε μια συλλογική προσπάθεια που πραγματοποιείται από πολλές ερευνητικές ομάδες με στόχο την κατανόηση της βασικής βιολογίας του παρασίτου και την ανάπτυξη νέων στοχευμένων φαρμάκων για την αντιμετώπιση της λεισμανίασης.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η πραγματοποίηση και συγγραφή μιας διδακτορικής διατριβής δεν αποτελεί μια εύκολη διαδικασία. Απαιτεί πολύ υπομονή και μεράκι και φυσικά βοήθεια και από άλλα άτομα. Η σελίδα αυτή είναι για όλους εκείνους που με στήριξαν και με βοήθησαν, ο καθένας με τον τρόπο του, στη διάρκεια εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής.

Πρώτα από όλα θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την πνευματική και υλική βοήθεια όλα αυτά τα χρόνια καθώς και για την αμέριστη συμπαράστασή τους. Η στήριξή τους κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής αποτελούσε πάντα σημαντικό παράγοντα εμψύχωσης.

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Παρασιτολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ κατά την περίοδο 2009-2013, υπό την επίβλεψη της Διευθύντριας Ερευνών του εργαστηρίου Δρ. Καίτης Σωτηριάδου και της Ερευνήτριας Δρ. Δέσποινας Σμυρλή. Η υποστήριξη και των δυο υπήρξε καταλύτης για την ολοκλήρωση της διατριβής. Οι πολύτιμες συμβουλές και υποδείξεις τους αλλά και οι πολύωρες συζητήσεις, υπήρξαν καθοριστικές για την πορεία της διατριβής.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον Καθηγητή του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Δρ. Τσίκαρη Βασίλειο που μου έδωσε τη δυνατότητα να εκπονήσω την παρούσα διατριβή και με υποστήριξε μέχρι την ολοκλήρωσή της.

Θερμά ευχαριστώ όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Μοριακής Παρασιτολογίας και ιδιαίτερα τη Γεωργία Κονεΐδου, την Έυη Γκουζέλου και την Αντωνία Ευσταθίου για την άριστη συνεργασία, τη συμπαράσταση και τις ατελείωτες ώρες που μοιραστήκαμε στο εργαστήριο.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω το Δρ. Γεώργιο Παναγιώτου, τη Δρ. Μαρίνα Σαμιωτάκη και το Δρ. Joachim Clos για τη σημαντική βοήθεια τους στον τομέα της Φασματομετρίας Μάζας.

Για τη σημαντική οικονομική στήριξη θα ήθελα να ευχαριστήσω το Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ για την υποτροφία που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης

της διδακτορικής διατριβής. Επίσης το πρόγραμμα ΚΡΗΠΙΣ αλλά και το Ευρωπαϊκό πρόγραμμα COST Action BM0802 “Life and Death of Protozoan Parasites”.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους φίλους μου που όλο αυτό το διάστημα στάθηκαν δίπλα μου και με στήριξαν στις δύσκολες στιγμές που αντιμετώπισα. Χωρίς την αμέριστη και ανιδιοτελή συμπαράστασή τους, η ολοκλήρωση της διατριβής αυτής θα ήταν πολύ πιο επίπονη και δύσκολη.

1	Εισαγωγή	13
1.1	Ταξινόμική κατάταξη του παρασίτου <i>Leishmania</i> spp.	14
1.2	Μορφολογικά στάδια	15
1.3	Κύκλος ζωής του παρασίτου	17
1.3.1	Στάδια στον ασπόνδυλο ξενιστή	17
1.3.2	Στάδια στο σπονδυλωτό ξενιστή	19
1.3.3	Ενδιάμεσος ξενιστής	20
1.4	Λεϊσμανίαση	21
1.4.1	Ιστορικά στοιχεία	22
1.4.2	Κλινικές μορφές της νόσου	23
1.4.2.1	Σπλαχνική λεϊσμανίαση (VL)	25
1.4.2.2	Δερματική λεϊσμανίαση (CL)	26
1.4.2.3	Βλεννογονοδερματική λεϊσμανίαση (MCL)	27
1.4.3	Ο ασυμπτωματικός παρασιτισμός	27
1.4.4	Συλλοίμωξη <i>Leishmania</i> / HIV	28
1.5	Γεωγραφική κατανομή	28
1.6	Επιδημιολογία της Λεϊσμανίασης	31
1.6.1	Λεϊσμανίαση στην Ελλάδα	32
1.7	Θεραπεία της νόσου	33
1.8	Προγράμματα ελέγχου της νόσου	35
1.9	Μοριακή Βιολογία του παρασίτου <i>Leishmania</i>	36
1.9.1	Το γονιδίωμα του παρασίτου	36
1.9.2	Γονιδιακή οργάνωση	36
1.9.3	Μάτισμα του mRNA	37
1.10	Οι Ιστόνες του παρασίτου <i>Leishmania</i>	40
1.10.1	Εισαγωγή	40

Περιεχόμενα

1.10.2	Πυρηνικές ιστόνες	41
1.10.3	Η συνδετική ιστόνη H1	42
1.11	Πρωτεΐνες θερμικού σοκ	48
1.11.1	Εισαγωγή	48
1.11.2	Πρωτεΐνη θερμικού σοκ 90 – HSP90	49
1.12	Απόπτωση	52
1.12.1	Εισαγωγή	52
1.12.2	Το βιοχημικό υπόβαθρο της απόπτωσης	53
1.12.3	Η απόπτωση στη <i>Leishmania</i>	54
1.13	Παράγοντες μολυσματικότητας στη <i>Leishmania</i>	56
2	Σκοπός	59
3	Υλικά – Μέθοδοι	62
3.1	Υλικά	63
3.1.1	Αντιδραστήρια	63
3.1.2	Αναλώσιμα υλικά	64
3.1.3	Εργαστηριακός εξοπλισμός	65
3.1.4	Αντισώματα	66
3.1.5	Διαλύματα	67
3.1.6	Φορείς κλωνοποίησης – βακτηριακά στελέχη	78
3.1.6.1	Πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση της <i>LeishH1</i>	78
3.1.6.2	Πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση τμημάτων των <i>LdHSP83</i> και <i>LdeEF-2</i>	80
3.1.6.3	Ο πλασμιδιακός φορέας <i>pSP72aNEOαHSP83</i>	81
3.1.7	Εναρκτήρια μόρια	81
3.1.8	Στελέχη παρασίτων	82
3.2	Μέθοδοι	83
3.2.1	Απομόνωση γενωμικού DNA από παράσιτα	83
3.2.2	Ενίσχυση PCR	83

Περιεχόμενα

3.2.3	Ανάλυση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης	86
3.2.4	Απομόνωση και καθαρισμός DNA από πήκτωμα αγαρόζης	87
3.2.5	Καθαρισμός προϊόντων PCR	87
3.2.6	Πέψη του DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες	88
3.2.7	Αντίδραση σύνδεσης του προϊόντος της αντίδρασης PCR σε πλασμιδιακό φορέα	88
3.2.8	Μετασχηματισμός βακτηρίων	89
3.2.8.1	Προετοιμασία επιδεκτικών κυττάρων <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS	90
3.2.8.2	Προετοιμασία επιδεκτικών κυττάρων <i>E. coli</i> DH5α	91
3.2.9	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργεια βακτηρίων σε μικρή κλίμακα	91
3.2.10	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργεια βακτηρίων σε μεγάλη κλίμακα	92
3.2.11	Υγρή και στερεή καλλιέργεια βακτηρίων – Φύλαξη βακτηρίων	93
3.3	Απομόνωση πρωτεϊνών από βακτήρια	94
3.3.1	Επαγωγή των βακτηρίων έκφρασης <i>E. coli</i> BL21	94
3.3.2	Απομόνωση των LdHSP83-(His) ₆ , LdeEF-2-(His) ₆ από βακτήρια	94
3.4	Ανοσοαποτύπωμα κατά Western	96
3.4.1	Ανάλυση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολύ-ακρυλαμίδιου (SDS-PAGE)	96
3.4.2	Χρώση πηκτωμάτων πολυακρυλαμίδιου με χρωστική coomassie	97
3.4.3	Μεταφορά πρωτεϊνών από το πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου σε μεμβράνη (Western blot)	97
3.4.4	Ανοσοενζυμική ανίχνευση πρωτεϊνών	98
3.4.5	Παραγωγή πολυκλωνικών αντισωμάτων έναντι των LdHSP83 και LdeEF-2	99
3.5	Κυτταροκαλλιέργειες	99
3.5.1	Παράσιτα	99
3.5.2	Μακροφάγα J774	100
3.5.3	Μετασχηματισμός παρασίτων <i>Leishmania</i> με	101

Περιεχόμενα

πλασμιδιακούς φορείς	
3.6 Έλεγχος της in vitro κυτταρικής επιβίωσης / πολλαπλασιασμού με τη μέθοδο του Alamar Blue	101
3.7 Επιμόλυνση μακροφάγων J774 με παράσιτα <i>L. donovani</i>	102
3.8 Υπολογισμός επιπέδων μεταγράφων γονιδίων κυτταρικής οικονομίας και γονιδίων που ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο	103
3.8.1 Εκχύλιση ολικού RNA από παράσιτα <i>L. donovani</i>	103
3.8.2 Σύνθεση του συμπληρωματικού κλώνου DNA (cDNA)	104
3.8.3 Υπολογισμός επιπέδων μεταγράφων γονιδίων κυτταρικής οικονομίας και γονιδίων που ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης πραγματικού χρόνου (real time RT-PCR)	105
3.9 Στύπωμα κατά Northern	106
3.9.1 Έλεγχος επιπέδων αγγελιαφόρου RNA (mRNA) με στύπωμα κατά Northern	106
3.9.2 Παρασκευή σημασμένων με ³² P-DNA ιχνηθετών (probes)	107
3.9.3 Καθαρισμός DNA ιχνηθετών	108
3.9.4 Υπολογισμός ειδικής ενεργότητας (specific activity) του σημασμένου ιχνηθέτη	108
3.9.5 Υβριδοποίηση στυπωμάτων Northern	109
3.9.6 Από-υβριδοποίηση στυπωμάτων Northern	110
3.10 Μεταβολική σήμανση των παρασίτων με ³⁵ S και ανοσοκατακρήμνιση των σημασμένων πρωτεϊνών	110
3.11 Πρωτεομική ανάλυση	112
3.11.1 Συγχρονισμός των παρασίτων και προετοιμασία πρωτεϊνικών δειγμάτων για πρωτεομική ανάλυση	112
3.11.2 Προετοιμασία πρωτεϊνικών δειγμάτων εμπλουτισμένων σε κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες για πρωτεομική ανάλυση	113
3.11.3 Ισο-ηλεκτρικός εστιασμός και ηλεκτροφόρηση δυο διαστάσεων	113
3.11.4 Χρώση πηκτωμάτων πολυακρυλαμίδιου μετά από ηλεκτροφόρηση δυο διαστάσεων με τη χρωστική Sypro Ruby Stain	114

Περιεχόμενα

3.11.5 Πέψη πρωτεϊνών από κομμάτια πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου με πρωτεάσες	114
3.11.6 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης μικρής κλίμακας (nanoHPLC) – Φασματομετρία μάζας σε σειρά (MS/MS analysis)	115
3.11.7 Ανάλυση πεπτιδίων με τη μέθοδο MALDI-TOF	116
3.11.8 Αναζήτηση σε βάσεις δεδομένων	117
3.12 Τεχνικές μελέτης κυτταρικού θανάτου	117
3.12.1 Υποβολή παρασίτων σε θερμικό σοκ (37°C)	117
3.12.2 Κυτταρομετρία ροής	118
3.12.3 Ανάλυση κυτταρικού κύκλου	118
3.12.4 Σήμανση <i>in vivo</i> με Ανεξίνη V και PI	119
3.12.5 <i>In situ</i> σήμανση κατακερματισμένων τμημάτων DNA με την τεχνική TUNEL	120
3.13 Ανοσοφθορισμός	120
3.14 Αναζήτηση πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την LeishH1	121
3.14.1 Προετοιμασία βακτηριακής καλλιέργειας και λύση βακτηρίων	122
3.14.2 Προετοιμασία σφαιριδίων γλουταθειόνης και πρόσδεση	122
3.14.3 Επώαση παρασιτικού λύματος με τα σφαιρίδια γλουταθειόνης και έκλυση	123
3.15 Πολυμερισμός της τουμπουλίνης και ιζηματοποίηση των μικροσωληνίσκων	123
4 Αποτελέσματα	125
4.1 Συγκριτική πρωτεομική ανάλυση μεταξύ των παρασίτων <i>L. donovani</i> pX63 και pX63-LeishH1	126
4.2 Ταυτοποίηση πρωτεϊνικών ζωνών	131
4.3 Επιβεβαίωση των παρατηρούμενων διαφορών στην κατανομή της τουμπουλίνης στην ηλεκτροφόρηση δυο διαστάσεων μεταξύ των παρασίτων ελέγχου και των παρασίτων που υπερεκφράζουν την LeishH1	134

4.4	Επιβεβαίωση της υποέκφρασης των eEF-2 και HSP83 στα παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1 σε σχέση με τα παράσιτα ελέγχου	135
4.4.1	Κλωνοποίηση τμημάτων των πρωτεϊνών eEF-2 και HSP83, ετερόλογη έκφραση των και παραγωγή πολυκλωνικών αντισωμάτων έναντι αυτών	135
4.4.2	Σύγκριση των πρωτεϊνικών επιπέδων των eEF-2 και HSP83 στα παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1 σε σχέση με τα παράσιτα ελέγχου	138
4.5	Έλεγχος των επιπέδων έκφρασης της HSP70 στα παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1 σε σχέση με τα παράσιτα ελέγχου	140
4.6	Μελέτη της επίδρασης της υπερέκφρασης της LeishH1 στη μεταγραφή γονιδίων κυτταρικής οικονομίας	141
4.7	Μελέτη μηχανισμού υποέκφρασης της HSP83 στα παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1	142
4.7.1	Έλεγχος των επιπέδων του <i>LdHSP83</i> mRNA στα παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1 σε σχέση με τα παράσιτα ελέγχου	142
4.7.2	Μελέτη των επιπέδων της <i>LdHSP83</i> μετά από αναστολή της δράσης του πρωτεοσώματος	143
4.7.3	Ανάλυση του ρυθμού έκφρασης της HSP83 στα παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1 σε σχέση με τα παράσιτα ελέγχου	144
4.8	Ανάλυση της αποπτωτικής διαδικασίας στα παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1 σε σχέση με τα παράσιτα ελέγχου	146
4.9	Αναπλήρωση των επιπέδων της HSP83 στα παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1	153
4.9.1	Αναπλήρωση των επιπέδων της HSP83 και έλεγχος των επιπέδων έκφρασης της LeishH1	153
4.9.2	Επίδραση της αναπλήρωσης των επιπέδων της HSP83 στη θερμοευαισθησία και την αντίσταση σε φάρμακα, των παρασίτων που υπερεκφράζουν την LeishH1	155
4.9.3	Επίδραση της αναπλήρωσης των επιπέδων της HSP83 στη μολυσματική ικανότητα των παρασίτων που υπερεκφράζουν την LeishH1	156
4.10	Μορφολογία των παρασίτων που υπερεκφράζουν την LeishH1 σε σχέση με τα παράσιτα ελέγχου	158

Περιεχόμενα

4.11 Έλεγχος της αλληλεπίδρασης της LeishH1 με πρωτεΐνες του παρασίτου	159
4.12 Πολυμερισμός της τουμπουλίνης και ιζηματοποίηση των μικροσωληνίσκων	160
5 Συζήτηση	164
5.1 Συγκριτική πρωτεομική ανάλυση του ολικού πρωτεόματος των παρασίτων <i>L. donovani</i> pX63 και pX63-LeishH1	165
5.2 Συγκριτική πρωτεομική ανάλυση του εμπλουτισμένου σε κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες κλάσματος των παρασίτων <i>L. donovani</i> pX63 και pX63-LeishH1	166
5.3 Η υπερέκφραση της LeishH1 προκαλεί μετα/μεταφραστικές αλλαγές ή αλλαγές έκφρασης στην τουμπουλίνη	169
5.4 Η LeishH1 αλληλεπιδρά απευθείας με την τουμπουλίνη και επηρεάζει τον πολυμερισμό των μικροσωληνίσκων	170
5.5 Η LdeEF-2 υποεκφράζεται στα παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1	172
5.6 Η υπερέκφραση της LeishH1 προκαλεί τη μείωση του ρυθμού και των επιπέδων έκφρασης της HSP83	172
6 Περίληψη	178
7 Summary	183
8 Βιβλιογραφία	187
9 Δημοσιεύσεις	201

Πίνακας Συντομογραφιών

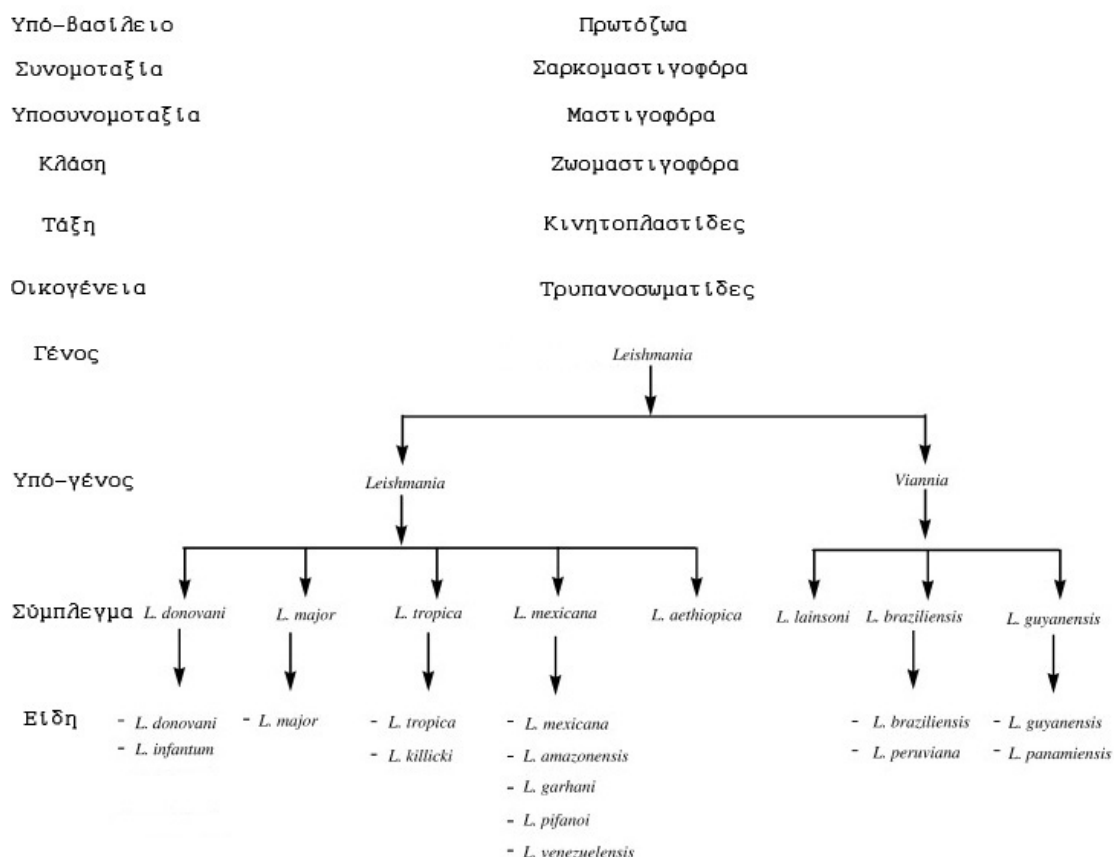
α-MPP	Alpha subunit of mitochondrial processing peptidase	LeishH1	Leishmanial Histone H1
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome	LPG	Lipophosphoglycan
BSA	Bovine Serum Albumine	MAP	Microtubule Associated Protein
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate	MCL	Mucocutaneous Leishmaniasis
CL	Cutaneous Leishmaniasis	MMTς	Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις
CYC 6	Cyclin 6	MOPS	3-(N-morpholino)propanesulfonic acid
CYC 5	Cyclin 5	mRNA	Messenger RNA
DMSO	Dimethyl Sulfoxide	MTOCs	Microtubule organizing centers
DRs	Death Receptors	NP-40	Nonidet P-40
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	PBS	Phosphate Buffered Saline
eEF-2	Eucaryotic Elongation Factor 2	PCD	Programmed Cell Death
Endo G	Endonuclease G	PCR	Polymerase Chain Reaction
EtBr	Ethidium Bromide	PI	Propidium Iodide
FBS	Fetal Bovine Serum	pI	Isoelectric point
FH	Fumarate Hydratase	PKDL	Post-kala-azar dermal leishmaniasis
FSC	Forward Scattering	PMI	Phospho Manose Isomerase
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	PMSF	phenylmethanesulfonylfluoride
GP 63	Glycoprotein 63	ROS	Reactive Oxygen Species
GSK-3	Glycogen synthase kinase 3	rRNA	Ribosomal RNA
GST	Glutathione	RT-PCR	Real time PCR
HIV	Human Immunodeficiency Virus	S29	Ribosomal protein S29
Hop	Hsp70-Hsp90 Organizing Protein	SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
HSP	Heat Shock Protein	SL RNA	Spliced leader RNA
IFN-γ	Interferon gamma	SSC	Side Scattering
IL-10	Interleukin 10	StI1	Stress Inducible Protein 1
INO 1	Myo-inositol-1-phosphate synthase	VL	Visceral Leishmaniasis

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1

1.1 Ταξινόμική κατάταξη του παρασίτου *Leishmania* spp.

Η κατάταξη του παρασίτου *Leishmania* είχε αρχικά βασιστεί σε οικο-βιολογικά κριτήρια όπως ο ξενιστής, η γεωγραφική κατανομή, ο τροπισμός, οι αντιγονικές ιδιότητες και η κλινική εικόνα. Παρ' όλα αυτά οι βιοχημικές και μοριακές αναλύσεις που ακολούθησαν τα επόμενα χρόνια, κατέδειξαν ότι τα προαναφερθέντα κλινικά και γεωγραφικά κριτήρια ήταν συχνά ανεπαρκή. Έτσι νέα κριτήρια όπως οι πολυμορφισμοί στο DNA του κινητοπλάστη (kDNA), πρωτεΐνες ή αντιγόνα ξεκίνησαν να χρησιμοποιούνται για την κατάταξη της *Leishmania* (Schonian *et al.*, 2011). Στην εικόνα που ακολουθεί απεικονίζεται η ταξινόμηση του παρασίτου με τα σημερινά δεδομένα (Almeida & Araujo, 2013, Choi & El-Sayed, 2012).



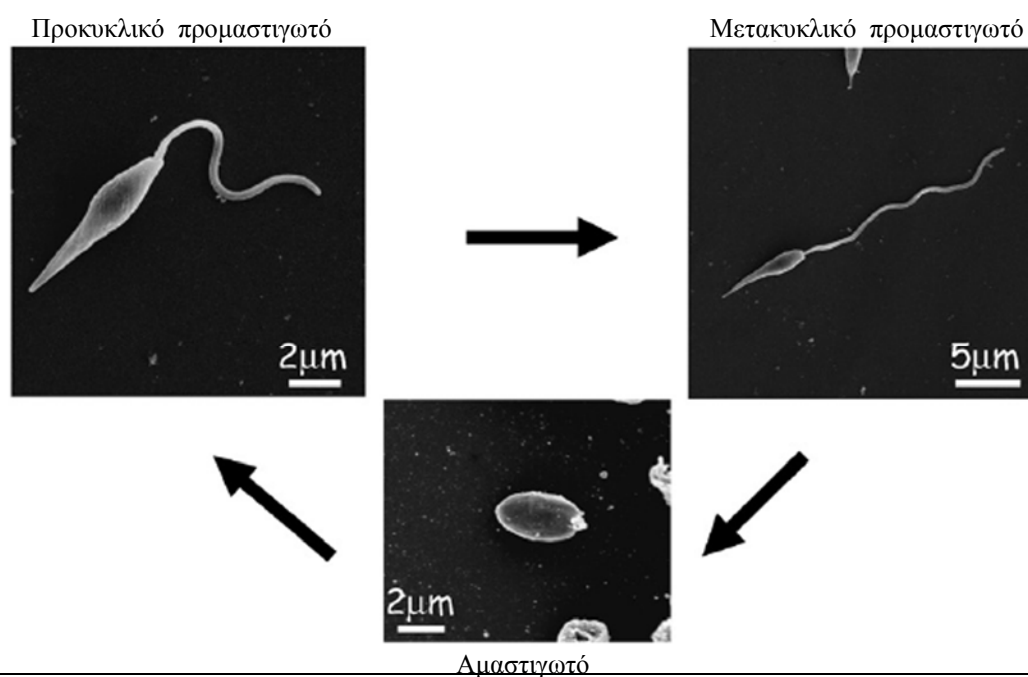
Εικόνα 1: Συστηματική κατάταξη του παρασίτου *Leishmania*

Το γένος *Leishmania* περιλαμβάνει 30 περίπου είδη, με τα περισσότερα από αυτά (~20) να είναι ικανά να μολύνουν τον άνθρωπο. Τα δυο υπό-γένη, *Leishmania*

και *Viannia*, κατηγοριοποιούνται με βάση την εύρεση του παρασίτου στο έντερο του ξενιστή (τα είδη του υπογένους *Viannia* αναπτύσσονται στο οπίσθιο τμήμα του εντέρου). Αξίζει να αναφερθεί πως με την εισαγωγή νέων μεθόδων μοριακής και γενετικής ανάλυσης, η κατάταξη κάποιων ειδών επανεξετάζεται (Lukes *et al.*, 2007).

1.2 Μορφολογικά στάδια

Τα παράσιτα του γένους *Leishmania* μπορούν να βρεθούν σε δυο κύριες μορφές: την προμαστιγωτή μορφή (που περιλαμβάνει την προκυκλική και μετακυκλική μορφή) που απαντάται στον ασπόνδυλο ενδιάμεσο ξενιστή (φλεβοτόμο) και την αμαστιγωτή μορφή που συναντάται αντίστοιχα στα μονοπύρηνα/μακροφάγα κύτταρα του τελικού ξενιστή (θηλαστικά, τρωκτικά) (Besteiro *et al.*, 2007).

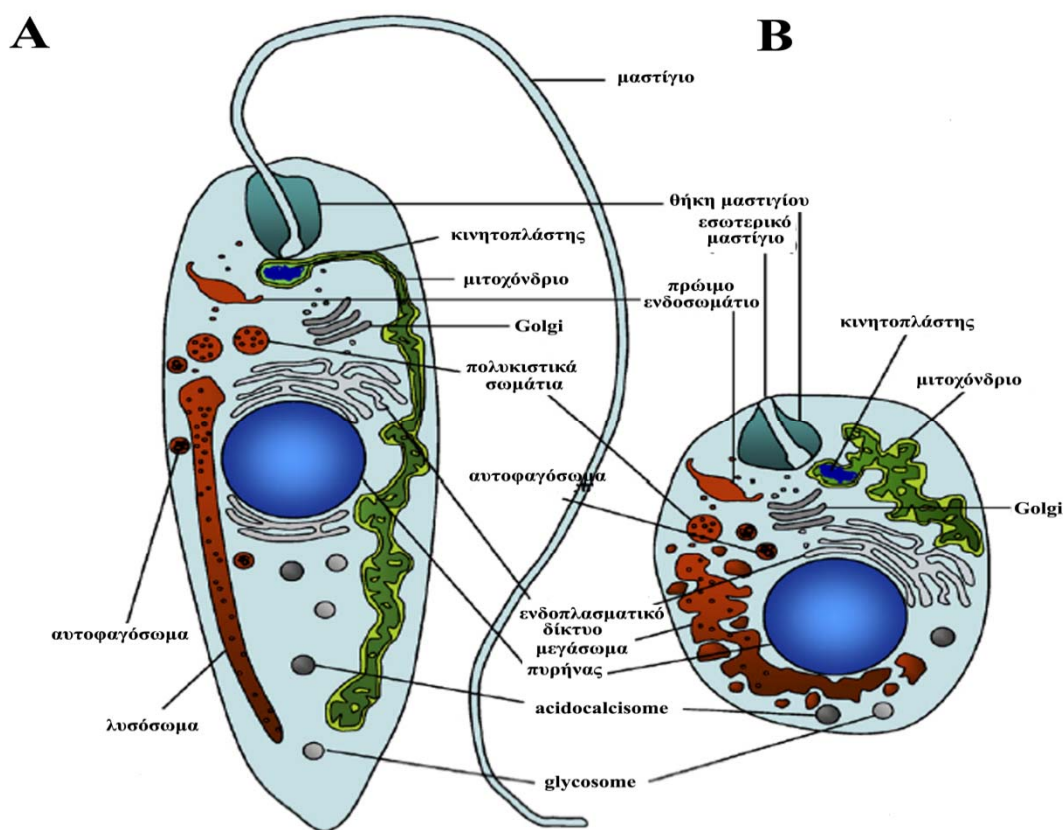


Εικόνα 2: Μορφολογικά στάδια του παρασίτου *Leishmania*. Φωτογραφίες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης [πηγή: (Besteiro *et al.*, 2007) τροποποιημένο].

Η προμαστιγωτή μορφή του παρασίτου είναι επιμήκης με μέγεθος 9-12μm x 2-3μm, φέρει μαστίγιο που εκφύεται από το πρόσθιο τμήμα του σώματος και έχει μήκος ίσο ή μεγαλύτερο από αυτό του σώματος του παρασίτου. Έκκεντρα απαντάται σφαιρικός πυρήνας με σαφή πυρηνίσκο. Στο κυτταρόπλασμα μπορούν

να παρατηρηθούν άφθονα ριβοσώματα, αδρό και λείο ενδοπλασματικό δίκτυο, σύμπλεγμα Golgi, κυστίδια λίπους και λυσοσώματα (Εικόνα 3Α). Κοντά στη βάση του μαστιγίου βρίσκεται ένας τροποποιημένος τύπος μιτοχονδρίου, ο οποίος εκτείνεται καθ' όλο το μήκος του σώματος του παρασίτου και περιέχει ένα δισκοειδή κινητοπλάστη. Ο τελευταίος αποτελεί μια χαρακτηριστική δομή των παρασίτων που ανήκουν στην τάξη των κινητοπλαστίδων. Ο κινητοπλάστης περιέχει δύο τύπους κυκλικών μορίων DNA γνωστά και ως kDNA, τους μικρόκυκλους (5×10^3 - 5×10^4 διαπλεγμένοι μικρόκυκλοι ανά παράσιτο) και τους μακρόκυκλους (Εικόνα 3Α).

Προμαστιγωτές μορφές του παρασίτου που βρίσκονται στο έντερο του ενδιάμεσου ξενιστή (σκνίπα), πολλαπλασιάζονται και μεταφέρονται στο πρόσθιο μέρος του εντέρου, όπου μετατρέπονται σε μετακυκλικά. Τα παράσιτα αυτά έχουν μικρότερο μέγεθος, χαμηλότερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και αυξημένη μολυσματική ικανότητα.



Εικόνα 3: Γραφική αναπαράσταση των κύριων οργανιδίων της προμαστιγωτής (Α) και αμαστιγωτής (Β) μορφής του παρασίτου *Leishmania* [πηγή: (Besteiro et al., 2007) τροποποιημένο].

Τα μετακυκλικά παράσιτα μετατρέπονται σε αμαστιγωτά μέσα στα φαγολυσσώματα των μονοπύρηνων/μακροφάγων του τελικού ξενιστή. Το αμαστιγωτό παράσιτο έχει σχήμα ωοειδές με διάμετρο 2-6μm x 1,5-2μm και φέρει έκκεντρο πυρήνα με πυρηνίσκο και ένα κινητοπλάστη που καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο μέρος του κυττάρου. Ο εναπομείνας χώρος του κυττάρου περιλαμβάνει τα ίδια οργανίδια με το προμαστιγωτό, που όμως είναι λιγότερο ανεπτυγμένα. Αξίζει να σημειωθεί πως το αμαστιγωτό παράσιτο φέρει ενδοκυτταρικό μαστίγιο (Εικόνα 3B).

1.3 Κύκλος ζωής του παρασίτου

Κατά τη διάρκεια του πολύπλοκου κύκλου ζωής τους, τα παράσιτα εκτίθενται σε διαφορετικά εξω- και ενδοκυτταρικά περιβάλλοντα. Οι οργανισμοί αυτοί είναι διγενετικοί με δυο βασικά στάδια του κύκλου ζωής: ένα εξωκυττάριο στάδιο σε ένα ασπόνδυλο ξενιστή (φλεβοτόμος σκνίπα) και ένα ενδοκυττάριο σε σπονδυλωτό ξενιστή. Έτσι, όπως αναφέρεται και παραπάνω, τα παράσιτα απαντώνται σε δυο κύριες μορφολογικές μορφές, την προμαστιγωτή και την αμαστιγωτή, που βρίσκονται σε σπονδυλωτούς και ασπόνδυλους ξενιστές, αντίστοιχα (Alexander *et al.*, 1999, Killick-Kendrick, 1990, Killick-Kendrick *et al.*, 1974).

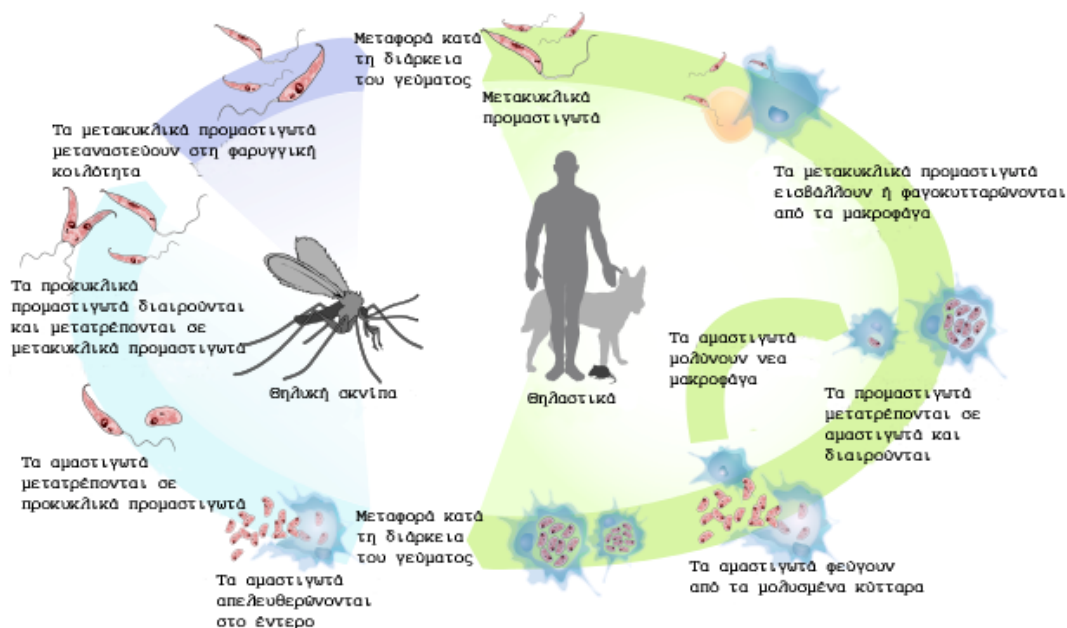
1.3.1 Στάδια στον ασπόνδυλο ξενιστή

Οι ασπόνδυλοι ξενιστές του παρασίτου είναι μικρά έντομα της τάξης Δίπτερα και ανήκουν στην υπο-οικογένεια *Phlebotominae*. Συνήθως αποκαλούνται απλά, φλεβοτόμοι. Από τα έξι γένη που υπάρχουν, μόνο δυο έχουν κλινική σημασία: το γένος *Plebotomus* του «Παλαιού Κόσμου», που χωρίζεται σε 12 υπογένη, και το γένος *Lutzomyia* του «Νέου Κόσμου», που χωρίζεται σε 25 υπογένη και ομάδες ειδών (Kamhawi, 2006, Sacks, 2001). Τα είδη των φλεβοτόμων που εμπλέκονται στη μετάδοση του παρασίτου διαφέρουν ανάλογα τη γεωγραφική περιοχή αλλά εξαρτώνται επίσης και από το είδος του παρασίτου. Όπως και στα

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

κουνούπια, η θηλυκή φλεβοτόμος απαιτεί ένα γεύμα αίματος για την ανάπτυξη των αυγών και μόνο το θηλυκό έντομο είναι αιματοφάγο (Killick-Kendrick, 1990, Killick-Kendrick, 1999).

Κατά την απομύζηση αίματος από το μολυσμένο τελικό ξενιστή, η μέχρι πρότινος μη-μολυσμένη φλεβοτόμος προσλαμβάνει μονοπύρρηνα/μακροφάγα κύτταρα που περιέχουν αμαστιγωτές μορφές του παρασίτου. Τα αμαστιγωτά αυτά παράσιτα μετατρέπονται στο οπίσθιο τμήμα του μεσέντερου του εντόμου σε προκυκλικά προμαστιγωτά και πολλαπλασιάζονται με συνεχείς διχοτομήσεις. Τα προμαστιγωτά προσκολλώνται στο τοίχωμα του εντέρου χρησιμοποιώντας το μαστίγιό τους (Killick-Kendrick et al., 1974). Μέσα στις επόμενες 4-5 ημέρες τα προμαστιγωτά μετακινούνται προς την οισοφαγική βαλβίδα του θωρακικού μεσέντερου. Κατά τη μετακίνηση αυτή ωριμάζουν σε μετακυκλικά (μετακυκλογένεση) που αποτελούν τη μολυσματική μορφή του παρασίτου. Όταν τα παράσιτα βρίσκονται πλέον στο πρόσθιο έντερο του εντόμου, καθίσταται δυνατή η μετάδοσή τους κατά την απομύζηση αίματος από τη φλεβοτόμο στο θηλαστικό πλέον ξενιστή.



Εικόνα 4: Αναπαράσταση του κύκλου ζωής του παρασίτου *Leishmania* (πηγή: Wikipedia τροποποιημένο)

1.3.2 Στάδια στο σπονδυλωτό ξενιστή

Ίσως ένα από τα πιο «επιτυχημένα» χαρακτηριστικά της *Leishmania* είναι ότι μπορεί να επιμολύνει και να αναπτυχθεί στα ίδια τα κύτταρα του οργανισμού, που είναι υπεύθυνα για να εξοντώνουν τους «εισβολείς»: τα μακροφάγα. Τα παράσιτα είναι ιδιαίτερα «επιτυχημένα» και φυσικές μολύνσεις απαντώνται σε διάφορα είδη θηλαστικών: τρωκτικά, κυνίδες, μαρσιποφόρα, πρωτόγονα οπλοφόρα και πρωτεύοντα. Όλα αυτά τα θηλαστικά θεωρούνται πιθανές δεξαμενές του παρασίτου με το σκύλο να παραμένει ο κύριος ξενιστής-δεξαμενή στη σπλαχνική λεϊσμανίαση ζωνοτικού τύπου, που προκαλείται από το παράσιτο *L. infantum*. Οι άνθρωποι αποτελούν τυχαίους ξενιστές για το παράσιτο, αν και έχει αναφερθεί ένας ανθρωπονοτικός κύκλος σε χρήστες ναρκωτικών ουσιών (Cruz *et al.*, 2002).

Στο σπονδυλωτό ξενιστή τα μετακυκλικά προμαστιγωτά που έχουν μεταδοθεί μετά το τσίμπημα από μολυσμένες θηλυκές φλεβοτόμους, έρχονται πρώτα σε επαφή με επιδερμικά μακροφάγα, κερατινοκύτταρα και κύτταρα Langerhans (Mougneau *et al.*, 2011). Πολύ γρήγορα φαγοκυτταρώνονται από τα μονοπύρρηνα/μακροφάγα κύτταρα των ιστών. Τα φαγοσώματα (κυστίδια που περιέχουν τις προμαστιγωτές μορφές των παρασίτων) συντήκονται με λυσοσώματα και δημιουργούν τα φαγολυσοσώματα. Μέσα στα τελευταία, πραγματοποιείται η διαφοροποίηση των προμαστιγωτών σε αμαστιγωτά, διαδικασία εξαιρετικά σημαντική για την πορεία και εξέλιξη της μόλυνσης. Μέσα στο όξινο και αφιλόξενο περιβάλλον των φαγολυσοσωμάτων τα αμαστιγωτά καταφέρνουν να επιζήσουν και να πολλαπλασιαστούν και όταν ο αριθμός τους φτάσει ένα ανώτατο όριο (>200 αμαστιγωτά), το κύτταρο ξενιστής (μακροφάγο) διαρρηγνύεται. Τα παράσιτα έτσι απελευθερώνονται στην κυκλοφορία του αίματος και φαγοκυτταρώνονται εκ νέου από άλλα μακροφάγα. Η διάρρηξη και επαναπροσβολή των νέων κυττάρων επαναλαμβάνεται συνήθως κάθε 12-24 ώρες (Chang & Fong, 1983).

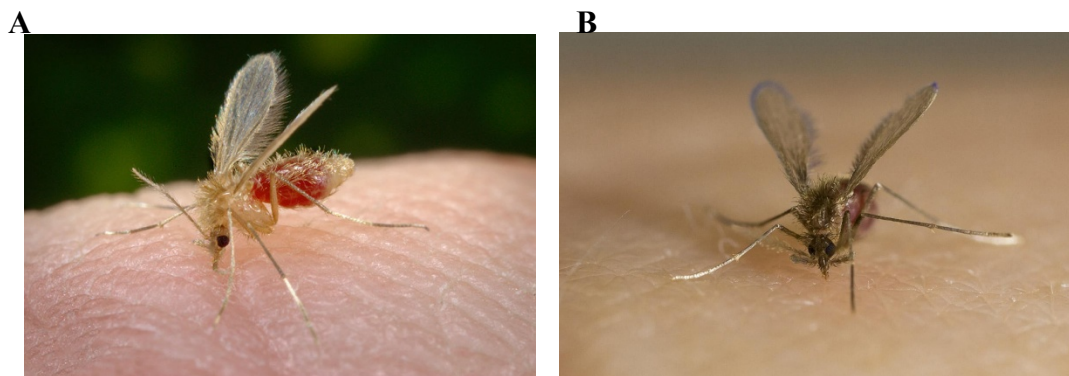
1.3.3 Ενδιάμεσος ξενιστής

Υπάρχουν περίπου 600 είδη φλεβοτόμων, που κατατάσσονται στην τάξη *Diptera*, οικογένεια *Psychodidae* και υπο-οικογένεια *Phlebotominae*, που περιλαμβάνει έξι γένη. Όσον αφορά τη λεισμανίαση, περίπου 80 είδη είναι δυνητικοί μεταδότες διαφόρων ειδών του παρασίτου *Leishmania*. Στην Ευρώπη, Ασία και Αφρική οι φλεβοτόμοι *Phlebotomus* spp. είναι μεταδότες του παρασίτου ενώ στην Αμερική οι φλεβοτόμοι *Lutzomyia* spp. (Kamhawi, 2000, Sacks, 2001) (Εικόνα 5).

Ο κύκλος ζωής της φλεβοτόμου περιλαμβάνει δύο διαφορετικά βιολογικά στάδια: το ενήλικο (ιπτάμενο έντομο) και το αναπτυσσόμενο (λάρβα) που χρειάζεται υγρό έδαφος πλούσιο σε οργανικά υλικά. Τα ενήλικα είναι μικρά ιπτάμενα έντομα με κίτρινο, τριχωτό σώμα μήκους 2-4 mm. Μόνο οι θηλυκές φλεβοτόμοι είναι αιματοφάγες και μπορούν κατά συνέπεια να μεταδώσουν το παράσιτο (Killick-Kendrick & Rioux, 2002).

Η είσοδος και η εγκαθίδρυση του παρασίτου στον τελικό ξενιστή διευκολύνεται σε μεγάλο βαθμό από το σίελο της φλεβοτόμου, ο οποίος έχει βρεθεί ότι αυξάνει τη μολυσματικότητα της *Leishmania*. Ο σίελος περιέχει φαρμακολογικά ενεργά υποστρώματα που γενικά αναστέλλουν τους αιμοστατικούς μηχανισμούς του ξενιστή και προκαλούν αγγειοδιαστολή και τοπική ανοσοκαταστολή (Tselentis *et al.*, 1994).

Στην Ελλάδα είναι γνωστά δώδεκα είδη φλεβοτόμων, εννέα από τα οποία ανήκουν στο γένος *Phlebotomus* και τρία στο γένος *Sergentomyia*. Ο δυνητικός φορέας του παρασίτου *L. infantum* στη Μεσόγειο είναι το είδος *Phlebotomus neglectus*, το οποίο είναι και από τα πιο συχνά απαντώμενα είδη στον Ελλαδικό χώρο (Christodoulou *et al.*, 2012).



Εικόνα 5: Φλεβοτόμοι των ειδών A. *Phlebotomus spp.* (πηγή: CDC) B. *Lutzomyia spp.* (πηγή: VectorBase).

1.4 Λεισμανίαση

Η λεισμανίαση αποτελεί μια παρασιτική νόσο που προκαλείται από πρωτόζωα του γένους *Leishmania*. Όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω, πρόκειται για ενδοκυττάρια πρωτόζωα που μπορούν να μολύνουν αρκετά είδη θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου, και μεταφέρονται κατά το δήγμα ενός μολυσμένου ενδιάμεσου ξενιστή (φλεβοτόμος). Η νόσος έχει εξαπλωθεί σε όλες τις ηπείρους (εκτός της Ανταρκτικής) και είναι ενδημική στις τροπικές και υποτροπικές περιοχές 88 χωρών. Περίπου 350 εκατομμύρια άτομα θεωρείται ότι βρίσκονται σε πιθανό κίνδυνο από τη νόσο. Υπολογίζεται πως 1.5-2 εκατομμύρια νέα περιστατικά αναφέρονται κάθε χρόνο και περίπου 14 εκατομμύρια άτομα είναι μολυσμένα (WHO, 2010).

Η κατάσταση των συστημάτων υγείας, η εξάπλωση της φτώχειας, η έλλειψη πολιτικής βούλησης και δέσμευσης καθώς και τα κενά που υπάρχουν στην κατανόηση της βιολογίας του παρασίτου, συμβάλλουν στην εξάπλωση της νόσου. Δεν πρέπει να παραβλέπεται πως η αδυναμία πρόσβασης σε φαρμακευτικές αγωγές για τη νόσο (κυρίως στις αναπτυσσόμενες χώρες), αποτελεί αυτή τη στιγμή σοβαρότατο φραγμό για τα προγράμματα περιορισμού και ελέγχου σε χώρες με σημαντικό πρόβλημα (Ινδία, Νεπάλ, Μπαγκλαντές και ενδημικές χώρες της Ανατολικής Αφρικής) (den Boer *et al.*, 2011).

1.4.1 Ιστορικά στοιχεία

Οι πρώτες περιγραφές διακριτών πληγών παρόμοιων με αυτών που παρατηρούνται στη δερματική λεϊσμανίαση, εμφανίζονται σε λίθινες πλάκες του Νέο-Ασσυριακού βασιλείου του Βασιλιά Ashurbanipal από τον 7^ο αιώνα π.Χ.. Υπάρχουν επίσης λεπτομερείς περιγραφές μιας εξωτικής νόσου σε κείμενα Αράβων ιατρών συμπεριλαμβανομένου και του Αβικέννα από τον 10^ο αιώνα, που συσχέτισαν τη νόσο με διάφορες περιοχές του Αφγανιστάν και της Μέσης Ανατολής, όπως η Βαγδάτη και η Ιερική. Η νόσος αργότερα εμφανίζεται με το όνομα Kala-azar το οποίο στα Ινδικά σημαίνει μαύρος πυρετός. Συγκεκριμένα το 1824 στην πόλη Jessore της Ινδίας, μια ομάδα ασθενών με έντονο πυρετό που πιστευόταν ότι πάσχει από ελονοσία, δεν ανταποκρίθηκε στη θεραπεία με κινίνη. Μέχρι το 1862 η νόσος είχε εξαπλωθεί στην περιοχή Burdwan, όπου και πήρε τις διαστάσεις επιδημίας (Cox, 2002). Στην Αμερική, στοιχεία για τη δερματική μορφή της νόσου εμφανίζονται σε αγγεία από περιοχές του Περού και του Ισημερινού, που αναπαριστούν δερματικές αλλοιώσεις και παραμορφωμένα πρόσωπα ανθρώπων και χρονολογούνται από τον 1^ο αιώνα μ.Χ.. Άλλα κείμενα του 15^{ου} και 16^{ου} αιώνα από την περίοδο των Ίνκας και των Ισπανών αποίκων, αναφέρονται σε «νόσο της κοιλάδας» ή «λευκή λέπρα», υποδηλώνοντας πιθανότατα τη δερματική μορφή λεϊσμανίασης.

Η ανακάλυψη του παρασίτου *L. donovani* ήρθε το 1903, σε δείγματα από σπλήνα μολυσμένων ατόμων, και οφείλεται στις ανεξάρτητες παρατηρήσεις του Σκωτσέζου στρατιωτικού ιατρού William Leishman και του Καθηγητή Φυσιολογίας στο Πανεπιστήμιο του Madras, Charles Donovan. Το 1904, οι Cathoire και Laveran βρήκαν το παράσιτο σε δείγματα παιδιών που νοσούσαν από παιδική σπληνική αναιμία (WHO, 2010). Ο Nicolle ονόμασε το παράσιτο *Leishmania infantum*, προσδιόρισε ως δεξαμενή του τους σκύλους στην Τυνησία το 1908 και καλλιέργησε το παράσιτο σε συνθήκες εργαστηρίου. Το 1914 οι Yakimoff και Schokhor διέκριναν δυο διαφορετικά «είδη» παρασίτων που θεωρήθηκαν υπεύθυνα για τη δερματική λεϊσμανίαση, αλλά προκαλούσαν διαφορετική κλινική εικόνα. Με βάση τις παρατηρήσεις αυτές, έγινε ο πρώτος διαχωρισμός σε δυο «ποικιλίες» παρασίτων: την ποικιλία *L. tropica major* και *L. tropica minor*. Στις αρχές της δεκαετίας του 1940,

οι Swaminath, Shortt και Anderson στην Ινδία και οι Adler και Ber στην Παλαιστίνη απέδειξαν τη μετάδοση των παρασίτων *L. donovani* και *L. tropica* μέσω των φλεβοτόμων σκνιπών. Το 1973, ο Bray και οι συνεργάτες του αντιμετώπισαν τις «ποικιλίες» που είχαν πρώτα διακρίνει οι Ρώσοι Yakimoff και Schokhor ως δυο διακριτές ταξινομικές μονάδες, γεγονός που οδήγησε στη μετονομασία τους και στα δυο είδη που γνωρίζουμε σήμερα (*Leishmania major* και *Leishmania tropica*) (Bray, 1974).

1.4.2 Κλινικές μορφές της νόσου

Η λεισμανίαση περιλαμβάνει μια ομάδα νοσημάτων με ευρύ φάσμα κλινικών συμπτωμάτων, που προκαλούνται από το πρωτόζωο *Leishmania*. Οι κλινικές μορφές της νόσου σχετίζονται άμεσα με το είδος του παράσιτου και την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή (Solbach & Laskay, 2000). Επίσης το είδος/υποείδος του παρασίτου σχετίζεται με συγκεκριμένες κλινικές μορφές, αν και πολλές φορές παρατηρείται πλειομορφισμός (Πίνακας 1).

Οι τρεις βασικές κλινικές μορφές λεισμανίασης είναι: η σπλαχνική λεισμανίαση (VL, visceral leishmaniasis), η δερματική λεισμανίαση (CL, cutaneous leishmaniasis) και η βλεννογονοδερματική λεισμανίαση (MCL, muco-cutaneous leishmaniasis) (WHO, 2010).

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

Είδος παρασίτου	Κλινικές μορφές λεισμανίασης*	Κύριος ενδιάμεσος ξενιστής	Ξενιστής δεξαμενή	Γεωγραφική κατανομή
Παλαιός Κόσμος				
<i>L. (L.) donovani infantum</i>	VL, CL	<i>P. perniciosus</i> , <i>P. ariasi</i> <i>P. langeroni</i> <i>P. chinesis</i> <i>P. major</i>	Σκύλοι, αλεπούδες, τσακάλια	Χώρες Μεσογείου, Μέση Ανατολή, Κίνα, κεντρική Ασία
<i>L. (L.) donovani chagasi</i> ^α	VL, CL	<i>Lu. Longipalpis</i>	Σκύλοι, αλεπούδες	Βραζιλία, Βενεζουέλα, Μεξικό
<i>L. (L.) donovani donovani</i> <i>L. (L.) donovani archibaldi</i> ^β	VL, PKDL	<i>P. argentipes</i> <i>P. orientalis</i> <i>P. martini</i> <i>P. alexandri</i>	Άνθρωποι, τρωκτικά, κυνοειδή	Βορειοανατολική Ινδία, Μπαγκλαντές, Νεπάλ, Κίνα, Σουδάν, Κένυα, Αιθιοπία
<i>L. (L.) major</i>	CL, DCL ^γ	<i>P. papatasi</i> <i>P. duboscqi</i>	Τρωκτικά (<i>Rhombomys opimus</i> , <i>Psammomys obesus</i> , και <i>Arvicanthis niloticus</i>)	Μέση Ανατολή, Βόρεια Ινδία, Πακιστάν, Βόρεια Αφρική, Κεντρική Ασία, Σουδάν
<i>L. (L.) tropica</i>	CL, VL	<i>P. sergenti</i> <i>P. saevus</i>	Άνθρωποι, σκύλοι, τρωκτικά	Μέση Ανατολή, Χώρες Μεσογείου, κεντρική Ασία, Κένυα
<i>L. (L.) aethiopica</i>	CL, DCL	<i>P. longipes</i> <i>P. pedifer</i>	Ύραξ (Hyraxes)	Κένυα, Αιθιοπία
Νέος Κόσμος				
<i>L. (L.) mexicana</i>	CL	<i>Lu. Olmeca</i>	Τρωκτικά <i>Ototylomys</i> sp.	Μεξικό, Μπελιζ, Γουατεμάλα
<i>L. (L.) amazonensis</i>	CL, DCL, VL	<i>Lu. Flaviscutellata</i>	Τρωκτικά <i>Ototylomys</i> sp.	Τροπικά δάση Νότιας Αμερικής
<i>L. (V.) peruviana</i>	CL	<i>Lutzomyia</i> spp.	Σκύλοι	Δυτικές Άνδεις του Περού, Αργεντινή
<i>L. (V.) guyanensis</i>	CL, DCL ^γ , MCL	<i>Lu. Umbratilis</i>	Βραδύποδες μυρμηγκοφάγοι, οπόσσουμ	Γουϊνέα, Σουρινάμ, Βραζιλία
<i>L. (V.) panamensis</i>	CL, MCL	<i>Lu. Trapidoi</i>	Βραδύποδες (<i>Choloepus hoffmani</i>)	Παναμάς, Κόστα Ρίκα, Κολομβία
<i>L. (V.) braziliensis</i>	CL, MCL, DCL	<i>Lutzomyia</i> spp., <i>Psychodopygus Wellcomei</i>	Τρωκτικά, περιοικιστικά ζώα, οπόσσουμ	Τροπικά δάση Νότιας και Κεντρικής Αμερικής

Πίνακας 1: Επιδημιολογικά στοιχεία κλινικά σημαντικών ειδών *Leishmania*. * Η πιο συνήθης μορφή κλινικής εκδήλωσης φαίνεται με έντονα γράμματα. VL (σπλαχνική λεισμανίαση), CL (δερματική λεισμανίαση), PKDL (post kala-azar δερματική λεισμανίαση), DCL (διάχυτη δερματική λεισμανίαση), MCL (βλεννογονοδερματική λεισμανίαση). ^α Το είδος αυτό θεωρείται από πολλούς ερευνητές συνώνυμο με το είδος *L. infantum* (Lukes et al., 2007). ^β Σύμφωνα με καινούργια μοριακά δεδομένα η ύπαρξη του είδους *L. archibaldi* αμφισβητείται, ενώ προτείνεται καινούργια ταξινόμηση των στελεχών *L. donovani*. ^γ Κατά τη διάρκεια ανοσοκαταστολής.

1.4.2.1 Σπλαχνική λεισμανίαση (VL, Kala-azar, Dum Dum fever)

Η σπλαχνική λεισμανίαση (visceral leishmaniasis, VL), γνωστή ευρέως και ως Kala-azar (μαύρος πυρετός), προκαλείται από παράσιτα του είδους *L. donovani* στην Ινδία και στην Ανατολική Αφρική, ενώ παράσιτα *L. infantum* προκαλούν τη νόσο σε περιοχές της Μεσογειακής λεκάνης, καθώς και στην Κεντρική και Νότια Αμερική (Chappuis *et al.*, 2007, Guerin *et al.*, 2002). Η σπλαχνική λεισμανίαση είναι η σοβαρότερη μορφή της νόσου και 500.000 νέα περιστατικά και πάνω από 50.000 θάνατοι καταγράφονται κάθε χρόνο (WHO, 2010). Η θνησιμότητα, αν δεν εφαρμοστεί έγκαιρα η κατάλληλη φαρμακευτική αγωγή, μπορεί να φτάσει το 75-95%.

Η νόσος ξεκινά να εμφανίζεται καθώς προοδεύει ο πολλαπλασιασμός των αμαστιγωτών μορφών του παρασίτου στα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα των οργάνων του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος όπως είναι ο σπλήνας, το ήπαρ, τα λεμφοειδή γάγγλια και ο μυελός των οστών. Η περίοδος επώασης κυμαίνεται από 2-6 μήνες. Τα κλινικά συμπτώματα της νόσου είναι διαλείπων πυρετός, ηπατο-σπληνομεγαλία, λεμφαδενοπάθεια, λευκοπενία, θρομβοκυτταροπενία, αναιμία και υπερ-γ-σφαιριναιμία. Επίσης παρατηρείται εφίδρωση, κόπωση, γαστρεντερικές διαταραχές και σταδιακή απώλεια βάρους. Στα προχωρημένα στάδια της νόσου μπορεί να εμφανιστούν οιδήματα, διάφορες αιμορραγικές εκδηλώσεις και άλλες θανατηφόρες επιπλοκές από λοιμώξεις (Marsden, 1979, van Griensven & Diro, 2012).

Μετά από την επιτυχή θεραπεία της σπλαχνικής λεισμανίασης, οι ασθενείς ενδέχεται να εμφανίσουν την post-Kala-azar δερματική λεισμανίαση (PKDL). Ο ινδικός τύπος της PKDL εμφανίζεται περίπου στο 10% των Ινδών ασθενών 2-3 χρόνια μετά από τη θεραπεία της σπλαχνικής λεισμανίασης. Σε αυτή την περίπτωση εμφανίζονται διάσπαρτες δερματικές αλλοιώσεις (υπόχρωμες κηλίδες, ερύθημα, οζίδια). Οι υπόχρωμες κηλίδες εμφανίζονται κυρίως στον κορμό, στους βραχίονες, στους μηρούς και στην κνήμη. Στην αρχή οι κηλίδες είναι μικρές, αλλά αυξανόμενες αθροίζονται και σχηματίζουν πλάκες. Συνήθως αργότερα στην πορεία της μόλυνσης εμφανίζονται τα οζίδια, κυρίως στην περιοχή του προσώπου. Τα οζίδια στο πρόσωπο μπορεί σε μεγάλο αριθμό ασθενών να προσομοιάζουν με αντίστοιχα έλκη

της λέπρας. Ο Αφρικανικός τύπος της PKDL εμφανίζεται πολύ νωρίτερα (0-6 μήνες) και μπορεί να παρουσιαστεί ακόμη και κατά την διάρκεια της θεραπείας, πριν υποχωρήσουν οι κλινικές εκδηλώσεις της σπλαχνικής νόσου. Περίπου 50-60% των ασθενών με VL εμφανίζουν PKDL. Το εξάνθημα σε αυτή την περίπτωση είναι συνήθως στικτό και μοιάζει με ιλαρά. Σε αντίθεση με τον ινδικό τύπο, ο αφρικανικός τύπος είναι αυτοθεραπευόμενος. Οι δερματικές αλλοιώσεις εμφανίζονται συνήθως γύρω από το στόμα και εξαπλώνονται σε όλο το πρόσωπο, ενώ μπορεί να εμφανιστούν και στον κορμό, στους βραχίονες, στους μηρούς και στην κνήμη (van Griensven & Diro, 2012, Zijlstra *et al.*, 2003).

1.4.2.2 Δερματική λεισμανίαση (CL, Baghdad/Jericho boil, Oriental sore)

Η δερματική λεισμανίαση (cutaneous leishmaniasis, CL) αποτελεί την πιο διαδεδομένη μορφή της νόσου με 1-1,5 εκατομμύριο περιστατικά στον κόσμο κάθε χρόνο (Desjeux, 2004). Η δερματική αλλοίωση (οζίδιο) εμφανίζεται στο σημείο του τσιμπήματος, που είναι συνήθως μέρος του σώματος εκτεθειμένο στη φλεβοτόμο, όπως το πρόσωπο και τα άκρα.

Τα παράσιτα *L. major* και *L. tropica* προκαλούν δερματική λεισμανίαση ξηρού τύπου. Η αρχική δερματική αλλοίωση μπορεί να είναι μονήρης ή πολλαπλή και εμφανίζεται ως ερυθηματώδης βλατίδα. Μέσα σε λίγες εβδομάδες η βλατίδα αυξάνει σε διάμετρο και όγκο, γίνεται οζώδης, εξελκώνεται και εμφανίζει κεντρική εφελκίδα. Βαθμιαία, το οζίδιο γίνεται στερεό. Η επούλωση μπορεί να διαρκέσει από 3 μήνες έως 2 χρόνια αλλά συνήθως επέρχεται σε 1 χρόνο. Ξηρά έλκη μπορούν να προκαλέσουν και παράσιτα του είδους *L. infantum* και *L. aethiopica*. Σε αυτή την περίπτωση η δερματική αλλοίωση συνήθως μένει στο στάδιο του οζιδίου (Nylen & Eidsmo, 2012).

Το παράσιτο *L. major* προκαλεί δερματική λεισμανίαση υγρού τύπου. Η αλλοίωση αναπτύσσεται με τον ίδιο τρόπο όπως η ξηρού τύπου, αλλά υπάρχει τάση νέκρωσης της κεντρικής περιοχής και δημιουργία αιμορραγικής εφελκίδας. Η αλλοίωση είναι μεγαλύτερης έκτασης από αυτήν του ξηρού τύπου, αλλά η επούλωση επέρχεται γρηγορότερα (2-8 εβδομάδες) (Bari, 2012). Παρόμοια

συμπτώματα αναφέρονται και στην περίπτωση μόλυνσης από είδη του Νέου Κόσμου (*L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. peruviana*, *L. guyanensis*, *L. panamensis* και *L. braziliensis*) (Almeida & Santos, 2011).

Η διάχυτη δερματική λεϊσμανίαση (Diffused cutaneous leishmaniasis, DCL) είναι μια σπάνια εκδήλωση της δερματικής λεϊσμανίασης, που οφείλεται κυρίως στο παράσιτο *L. aethiopica*, αλλά και σε παράσιτα του είδους *L. amazonensis*. Παρατηρούνται ευρείες οζώδεις δερματικές αλλοιώσεις, οι οποίες διατηρούνται για μεγάλο χρονικό διάστημα. Ο κύκλος της ασθένειας είναι παρατεταμένος αλλά δεν παρατηρείται προσβολή των σπλαχνικών οργάνων (Pearson *et al.*, 1983).

1.4.2.3 Βλεννογονοδερματική λεϊσμανίαση (MCL)

Η βλεννογονοδερματική λεϊσμανίαση (mucocutaneous leishmaniasis, MCL ή esrundia) προκαλείται από το παράσιτο *L. brasiliensis*. Αρχικά, εκδηλώνονται δερματικές αλλοιώσεις οι οποίες ενδέχεται να προκαλέσουν δευτεροπαθή εκδήλωση της νόσου, εξαιτίας διασποράς του παρασίτου μέσω του αίματος ή των λεμφαγγείων. Μετά την πάροδο μηνών ή ετών προκαλούνται παραμορφωτικές βλάβες στα όργανα του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος (λάρυγγας, φάρυγγας, οισοφάγος, ρινική και στοματική κοιλότητα). Η βλεννογονοδερματική λεϊσμανίαση δεν επουλώνεται από μόνη της και, αν μείνει χωρίς θεραπεία, προκαλεί προοδευτικά εκτεταμένες παραμορφωτικές αλλοιώσεις (Pearson *et al.*, 1983).

1.4.3 Ο ασυμπτωματικός παρασιτισμός

Έχει παρατηρηθεί πως σε ενδημικές για την *Leishmania* περιοχές, ένας σημαντικός αριθμός μολυσμένων ατόμων με το είδος *L. infantum* δεν αναπτύσσουν κλινικά συμπτώματα της νόσου. Γενικά υπολογίζεται, ότι μόνο ένα στα πέντε ή δέκα υγιή άτομα που μολύνονται με το παράσιτο αναπτύσσουν τελικά τη νόσο (Alvar *et al.*, 1997).

Η ύπαρξη ενός ασυμπτωματικού πληθυσμού μπορεί να αποκαλυφθεί σε παθολογικές καταστάσεις που επηρεάζουν το ανοσοποιητικό σύστημα, όπως για

παράδειγμα σε άτομα που έχουν μολυνθεί από τον ιό HIV που προκαλεί σύνδρομο επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας (Gillis *et al.*, 1995). Είναι επίσης πιθανό, ότι το δέρμα ασυμπτωματικών φορέων αποτελεί «δεξαμενή» του παρασίτου, από όπου οι φλεβοτόμοι μπορούν να μολυνθούν κατά τη διάρκεια της διατροφής τους.

1.4.4 Συλλοίμωξη *Leishmania* / HIV

Η πλειοψηφία των ενδημικών χωρών για τη *Leishmania*, έχουν αναφέρει περιστατικά λοίμωξης όπου συνυπάρχουν η *Leishmania* και ο ιός HIV. Τα περισσότερα από αυτά τα περιστατικά έχουν αναφερθεί στη νοτιοδυτική Ευρώπη, όπου το παράσιτο *L. infantum* είναι ενδημικό και κυρίως στην Ιταλία, Ισπανία, Γαλλία και Πορτογαλία (Alvar *et al.*, 2008, Jarvis & Lockwood, 2013). Σύμφωνα με μελέτες το 71% των ασθενών με συλλοίμωξη *Leishmania*/HIV είναι χρήστες ενδοφλέβιων ουσιών (WHO, 2010).

Οι ασθενείς με συλλοίμωξη HIV/*Leishmania* ενεργούν ως δυνητική δεξαμενή του παρασίτου. Έχει αναφερθεί η μετάδοση της νόσου μέσω μολυσμένων φλεβοτόμων ή συριγγών από άνθρωπο σε άνθρωπο (ανθρωπονοτικού τύπου) παρόλο που στην Ευρώπη η νόσος είναι καθαρά ζωνοτικού τύπου (Cruz *et al.*, 2002, Pratlong *et al.*, 1995). Οι ασθενείς με AIDS είναι ευαίσθητοι σε ευκαιριακές λοιμώξεις καθώς το ανοσοποιητικό τους σύστημα δεν μπορεί να τις αντιμετωπίσει εύκολα. Συνεπώς, έχουν αυξημένο κίνδυνο να μολυνθούν με το παράσιτο *Leishmania*, το οποίο καταστρέφει τα κύτταρα του ανοσοποιητικού που καταστρέφει και ο ιός HIV, επιδεινώνοντας έτσι την κατάσταση του ασθενή και κάνοντας τον ακόμη πιο επιρρεπή σε ευκαιριακές λοιμώξεις (Jarvis & Lockwood, 2013).

1.5 Γεωγραφική κατανομή

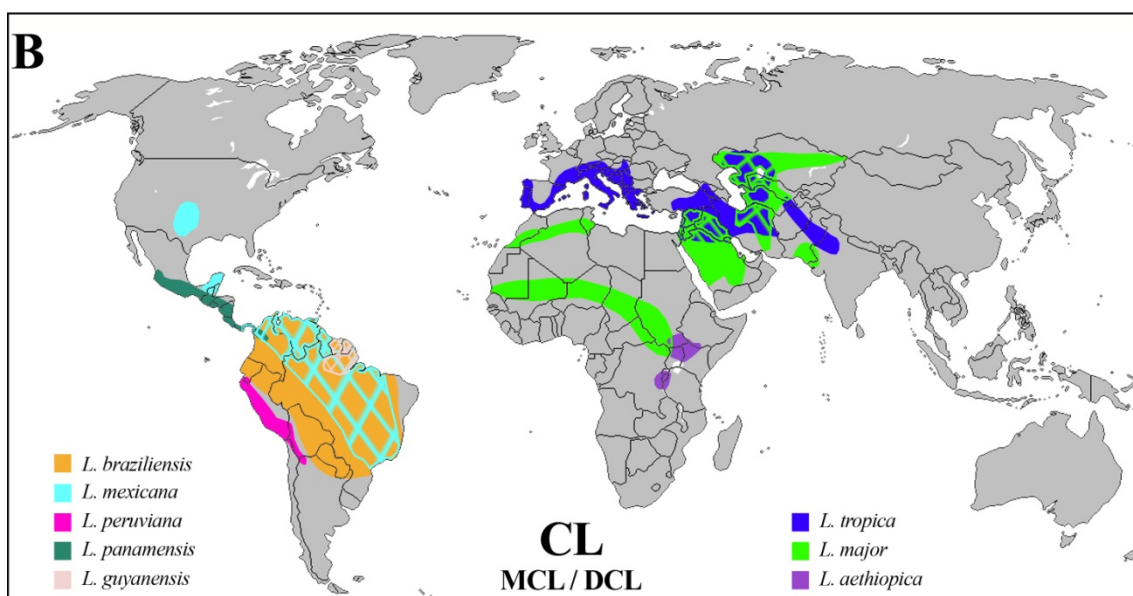
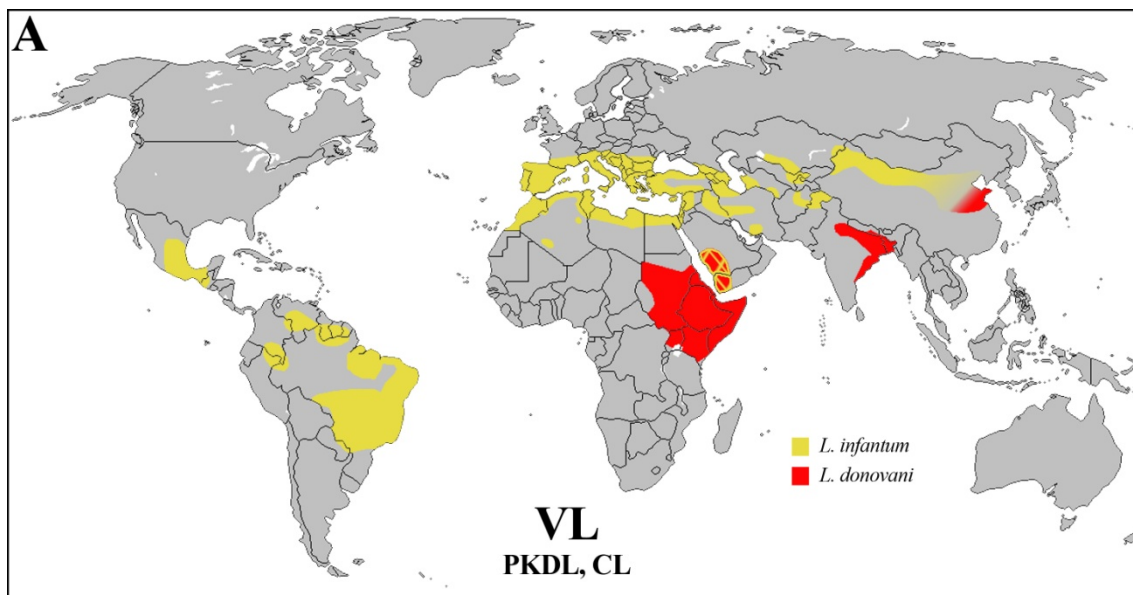
Η λεισμανίαση είναι διαδεδομένη σε όλες τις ηπείρους με εξαίρεση την Ανταρκτική, ενώ θεωρείται ενδημική στις τροπικές και υποτροπικές περιοχές 88 χωρών. Δεκαέξι από αυτές είναι αναπτυγμένες και οι υπόλοιπες 72 είναι

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

αναπτυσσόμενες εκ των οποίων μάλιστα οι 13 είναι από τις λιγότερο αναπτυγμένες στον κόσμο (Desjeux, 1996, WHO, 2010).

Πάνω από 90% των παγκόσμιων περιστατικών σπλαχνικής λεισμανίασης (VL) καταγράφονται σε τρεις ομάδες περιοχών: Σουδάν / Αιθιοπία / Κένυα, Ινδία / Μπαγκλαντές / Νεπάλ και Βραζιλία. Στις χώρες αυτές με εξαίρεση τη Βραζιλία, η σπλαχνική λεισμανίαση εμφανίζεται ως ανθρωπονόσος ή και ανθρωποζωνόσος (*L. donovani*), σε αντίθεση με τις χώρες της Μεσογείου, της Νότιας Αμερικής και τις υπόλοιπες χώρες της Ασίας όπου εμφανίζεται ως ζωνόσος (*L. infantum*). Η σπλαχνική λεισμανίαση μπορεί να εκδηλώσει εκτεταμένες επιδημίες με υψηλά ποσοστά θνησιμότητας. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η επιδημία στο Νότιο Σουδάν, την περίοδο 1984-1994 όπου αναφέρθηκαν 100.000 θάνατοι σε πληθυσμό 300.000 κατοίκων (Seaman *et al.*, 1996, WHO, 2010).

Όσον αφορά τη δερματική λεισμανίαση σχεδόν το 90% των περιστατικών προέρχονται από 7 χώρες: το Αφγανιστάν, την Αλγερία, το Ιράν, τη Σαουδική Αραβία και τη Συρία στον Παλαιό Κόσμο και στο Νέο Κόσμο τη Βραζιλία και το Περού. Αντίστοιχα, το 90% των περιστατικών βλεννογονοδερματικής λεισμανίασης απαντώνται σε χώρες του Νέου Κόσμου (Βραζιλία, Βολιβία, Περού).



Εικόνα 6: Γεωγραφική κατανομή ειδών *Leishmania* ανά την υφήλιο. Τα είδη που είναι υπεύθυνα για την σπλαχνική λεισμανίαση απεικονίζονται στο χάρτη Α, ενώ τα είδη που προκαλούν δερματική και βλεννογονοδερματική λεισμανίαση απεικονίζονται στο χάρτη Β. **Α.** *L. infantum* (VL, κίτρινο χρώμα), *L. donovani* (VL, PKDL, κόκκινο χρώμα) **Β.** *L. braziliensis* (CL, MCL πορτοκαλί χρώμα), *L. mexicana* (CL, γαλάζιο χρώμα), *L. peruviana* (CL, Ματζέντα χρώμα), *L. panamensis* (CL, σκούρο πράσινο χρώμα), *L. guyanensis* (CL, ρόζ χρώμα), *L. tropica* (CL, μπλε χρώμα), *L. major* (CL, έντονο πράσινο χρώμα) και *L. aethiopica* (CL, μοβ χρώμα). (WHO, τροποποιημένο).

1.6 Επιδημιολογία της Λεϊσμανίασης

Η επιδημιολογία της λεϊσμανίασης εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά των ειδών του παρασίτου, τα τοπικά οικολογικά χαρακτηριστικά των περιοχών μετάδοσης, την τρέχουσα και προηγούμενη έκθεση του πληθυσμού στο παράσιτο και την ανθρώπινη συμπεριφορά (WHO, 2010).

Η νόσος μπορεί να μεταδοθεί μέσω της χρήσης κοινών συρίγγων μεταξύ των χρηστών ενδοφλέβιων ουσιών, μέσω μετάγγιση αίματος και από τη μητέρα στο έμβρυο. Παρ' όλα αυτά οι οδοί αυτοί μετάδοσης είναι πολύ πιο σπάνιοι από τη μετάδοση μέσω εντόμου (Cruz et al., 2002).

Το εύρος των ηλικιών που επηρεάζονται περισσότερο εξαρτάται από το είδος του παρασίτου και το ιστορικό έκθεσης του πληθυσμού. Για παράδειγμα σε ενδημικές για τη νόσο περιοχές, όπου το εμπλεκόμενο παράσιτο ανήκει στο είδος *L. infantum*, η μέση ηλικία των ασθενών που νοσούν από σπλαχνική λεϊσμανίαση τείνει να είναι μικρότερη (<5 ετών), σε αντίθεση με περιοχές ενδημικές στο είδος *L. donovani* (μέση ηλικία 13-23 έτη σε διάφορες περιοχές της Ασίας και Αφρικής). Επίσης, γενικά μιλώντας, σε περιοχές όπου το παράσιτο διαβιεί για αρκετά μεγάλη χρονική περίοδο, ένα μεγάλο μέρος του πληθυσμού είναι αναμενόμενο να έχει αποκτήσει ανοσία στο παράσιτο. Φυσικά αξίζει να αναφερθεί πως ανοσοκατεσταλμένοι ενήλικες που εισέρχονται σε ενδημική περιοχή, διατρέχουν κίνδυνο να νοσήσουν ακόμα και αν το παράσιτο που εμπλέκεται είναι του είδους *L. infantum* (Dujardin et al., 2008).

Οι συνθήκες κάτω από τις οποίες μολύνονται οι άνθρωποι, ποικίλουν αρκετά ανάλογα με την τοποθεσία και το χρόνο. Σε πολλές περιοχές-εστίες της νόσου, η λεϊσμανίαση είναι μόνο ζωννόσος, και η είσοδος των ανθρώπων σε αυτές τις άγριες περιοχές, έχει ως αποτέλεσμα μεγαλύτερη πιθανότητα μόλυνσης. Σε άλλες περιπτώσεις, η μετάδοση είναι ανθρωπονοτική, όπως στην περίπτωση της σπλαχνικής λεϊσμανίασης στην Ινδική χερσόνησο και κατά τη διάρκεια επιδημικών εξάρσεων στην Ανατολική Αφρική (WHO, 2010).

Οι ραγδαίες μεταβολές των περιβαλλοντικών και κλιματολογικών συνθηκών (εξωγενείς παράγοντες) τόσο σε παγκόσμιο όσο και σε περιφερειακό επίπεδο (αύξηση της θερμοκρασίας, συχνότητα βροχοπτώσεων) επηρεάζουν τους

ενδογενείς παράγοντες της νόσου (αλληλεπιδράσεις μεταξύ ξενιστή, παρασίτου και φορέα), γεγονός που σημειώνεται και σε άλλες μολυσματικές ασθένειες. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται –τουλάχιστον εν μέρει– στην πλαστικότητα των ειδών *Leishmania* και την ικανότητα των ενδιάμεσων ξενιστών (οι οποίοι είναι ευαίσθητοι στις κλιματολογικές αλλαγές) να αναπτύσσουν μηχανισμούς που τους επιτρέπουν να προσαρμόζονται και να εξελίσσονται (Croft, 2001, Croft *et al.*, 2006, Dujardin *et al.*, 2008).

Η λεισμανίαση έχει χαρακτηριστεί ως νόσος της φτώχειας (Alvar *et al.*, 2006). Η έλλειψη πόρων αυξάνει την πιθανότητα εμφάνισης της νόσου με πολλούς τρόπους. Κακές συνθήκες οίκησης και περιοικιστικές συνθήκες υγιεινής (π.χ. έλλειψη διαχείρισης αποβλήτων, ανοιχτό αποχετευτικό σύστημα) μπορούν να αυξήσουν την αναπαραγωγή των σκνιπών, καθώς και να διευκολύνουν την πρόσβασή τους στους ανθρώπους. Παρόμοιο αποτέλεσμα μπορεί να έχει ο συνωστισμός μεγάλου αριθμού ατόμων σε μικρούς χώρους. Η έξαρση του φαινομένου της οικονομικής μετανάστευσης, μπορεί να οδηγήσει στην είσοδο ατόμων σε ενδημικές για τη νόσο περιοχές και έτσι να αυξηθούν οι πιθανότητες μόλυνσης. Σημαντικό ρόλο παίζει επίσης και η διατροφή, καθώς φτωχή διατροφή μπορεί να αυξήσει αρκετά την πιθανότητα μια μόλυνση σπλαχνικής λεισμανίασης να εκδηλώσει κλινικά συμπτώματα (WHO, 2010).

1.6.1 Λεισμανίαση στην Ελλάδα

Το πρώτο περιστατικό λεισμανίασης στην Ελλάδα αναφέρεται το 1907 στην Κρήτη. Κατά τη δεκαετία του 1940, αναφέρονταν ετησίως 160 περιστατικά σπλαχνικής λεισμανίασης στον άνθρωπο. Τις δεκαετίες που ακολουθούν, τα κρούσματα δείχνουν μια ελαφριά αριθμητική κάμψη. Από το 1962 έως το 1992 αναφέρονται στο Υπουργείο Υγείας 1005 περιστατικά σπλαχνικής λεισμανίασης στην Αττική (Tselentis *et al.*, 1994). Παρ' όλα αυτά, τα τελευταία χρόνια η νόσος φαίνεται να ανακάμπτει (Christodoulou *et al.*, 2012). Αυξημένος επιπολασμός της ασθένειας έχει αναφερθεί σε μερικές περιοχές, όπως το Λασιθί στην Ανατολική Κρήτη και η Αττική. Στην Ελλάδα έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί τόσο στελέχη *L. infantum* από ανθρώπους και σκύλους με σπλαχνική λεισμανίαση, όσο και

στελέχη *L. tropica* από δερματικές αλλοιώσεις (Christodoulou et al., 2012, Garifallou et al., 1984, Tzamouranis et al., 1984).

Τα τελευταία χρόνια, τα πολιτικό-κοινωνικά γεγονότα στη λεκάνη της Μεσογείου καθώς και οι πολεμικές συρράξεις, προκάλεσαν εκτεταμένες εκτοπίσεις και μετακινήσεις πληθυσμιακών ομάδων από χώρες ενδημικές στη νόσο προς την περιοχή της Ευρώπης. Η Ελλάδα ευρισκόμενη στο σταυροδρόμι τριών ηπείρων, δέχτηκε ένα πολύ μεγάλος μέρος των προσφύγων αυτών. Παράλληλα, η αλλαγή των κλιματολογικών συνθηκών, έχει επιτρέψει την επέκταση των δυνητικών περιοχών εκκόλαψης και διαβίωσης των ξενιστών του παρασίτου, πιο κοντά στα μεγάλα αστικά κέντρα (Dujardin et al., 2008). Έτσι αρχίζει και παρατηρείται μια αύξηση στους ασθενείς με λεισμανίαση που καταγράφονται στα Ελληνικά νοσοκομεία. Τις περισσότερες φορές όμως, τα κρούσματα αυτά δεν είναι αυτόχθονα, αλλά μάλλον εισαγόμενα (Antonίου et al., 2008, Gouzelou & Soteriadiou, 2013).

1.7 Θεραπεία της νόσου

Μια ιδανική θεραπευτική ουσία έναντι της λεισμανίασης θα πρέπει να είναι αποτελεσματική, ασφαλής, εύκολα χορηγούμενη και προσιτή σε κόστος. Παρ' όλα αυτά μέχρι και σήμερα, μια τέτοια θεραπευτική ουσία που να συνδυάζει όλα τα παραπάνω στοιχεία δεν υπάρχει. Η επιλογή του θεραπευτικού σχήματος επηρεάζεται από την υπάρχουσα εμπειρία αλλά και τη διαθεσιμότητα του φαρμάκου σε μια χώρα.

Οι φαρμακευτικές ουσίες με βάση το τρισθενές αντιμόνιο, εισήχθησαν στη θεραπεία της δερματικής και βλεννογονοδερματικής λεισμανίασης από τον Vianna στη Βραζιλία το 1912 και για τη σπλαγχνική λεισμανίαση από τους Di Cristina και Caronia στην Ιταλία το 1915. Το 1922 ο Bramachari εισήγαγε τη χρήση της urea stibamine, την πρώτη από μια σειρά νέων ασφαλέστερων ουσιών με βάση το πεντασθενές αντιμόνιο, που έχουν παραμείνει μέχρι σήμερα στην πρώτη γραμμή για τη θεραπεία όλων των μορφών λεισμανίασης (WHO, 2010).

Οι φαρμακευτικές ουσίες που βασίζονται στο πεντασθενές αντιμόνιο, αποτελούν την πρώτη επιλογή για τη σπλαγχνική λεισμανίαση στις αναπτυσσόμενες, ενδημικές για τη νόσο, χώρες. Σε χώρες όμως όπως η Ινδία και η Κένυα, ήδη από το

1980 και 1970 αντίστοιχα, οι παραπάνω ουσίες έχουν εγκαταλειφθεί, λόγω της ευρείας ανθεκτικότητας των παρασίτων στις ουσίες με αντιμόνιο (Croft, 2001, Croft et al., 2006). Στις περιπτώσεις αυτές χρησιμοποιείται η Αμφοτερικίνη Β (Croft *et al.*, 1991). Η πολύχρονη εμπειρία που έχει σωρευθεί κατά τη χρήση των ουσιών με αντιμόνιο στις αναπτυσσόμενες χώρες, έχει αποκαλύψει πως οι ουσίες αυτές έχουν αποτελεσματικότητα ιδιαίτερα υψηλή (>90-95%), χαμηλά ποσοστά θνησιμότητας και επανεμφάνισης της νόσου. Επίσης το κόστος τους είναι ιδιαίτερο προσιτό. Παρ' όλα αυτά το κυριότερο μειονέκτημά τους είναι η ενδομυϊκή μέθοδος έγχυσης που απαιτεί μακρόχρονη νοσηλεία (που συνεπάγεται υψηλό κόστος νοσηλείας) και η εμφάνιση παρενεργειών όπως καρδιακή αρρυθμία, αυξημένα επίπεδα τρανσαμινασών, παγκρεατίτιδα και πνευμονίτιδα.

Η Αμφοτερικίνη Β έχει πολύ καλή αντι-λεϊσμανιακή δράση με ποσοστά ίασης της σπλαχνικής λεϊσμανίασης στην Ινδία μεγαλύτερα του 90%. Οι υποτροπές είναι σπάνιες, με μόνη εξαίρεση τους ασθενείς εκείνους στους οποίους υπάρχει συλλοίμωξη με τον ιό HIV. Εξαιτίας όμως των μειονεκτημάτων της εν λόγω ουσίας όπως για παράδειγμα μακρόχρονη νοσηλεία και χορήγηση αλλά και των συχνών παρενεργειών (νεφροτοξικότητα, υποκαλιαιμία, πυρετός, ρίγος), η χορήγηση της ουσίας δεν είναι συνήθης σε άλλες χώρες. Στον αντίποδα, η λιποσωμική αμφοτερικίνη Β αποτελεί τη φαρμακευτική ουσία πρώτης γραμμής έναντι της σπλαχνικής λεϊσμανίασης στην Ευρώπη και τις Η.Π.Α. εξαιτίας του πολύ καλού ποσοστού ίασης που παρουσιάζει, του μειωμένου χρόνου νοσηλείας, των λιγότερων παρενεργειών και του χαμηλότερου κόστους νοσηλείας.

Η Μιλτεφοσίνη αποτελεί το πρώτο αντι-λεϊσμανιακό φάρμακο με οδό χορήγησης από το στόμα. Σε κλινικές έρευνες που έχουν γίνει στην Ινδία σε ασθενείς με σπλαχνική λεϊσμανίαση, τα ποσοστά ίασης ήταν ιδιαίτερα υψηλά (95%), ενώ παρενέργειες όπως γαστρεντερική τοξικότητα και αυξημένα επίπεδα τρανσαμινασών και κρεατινίνης καταγράφηκαν μόνο στο 3% του δείγματος (Patra *et al.*, 2012, Sundar *et al.*, 2013). Μέχρι σήμερα η χορήγηση της ουσίας έχει αδειοδοτηθεί στην Ινδία, Γερμανία και Κολομβία. Αξίζει να αναφερθεί ότι η μιλτεφοσίνη πρέπει να αποφεύγεται να χορηγείται σε εγκύους, ένεκα φόβων για τερατογένεση (Dorlo *et al.*, 2012).

1.8 Προγράμματα ελέγχου της νόσου

Οι πρώτες καταγεγραμμένες απόπειρες ελέγχου και περιορισμού της νόσου αναφέρονται το 1920-1923 όταν ο McCombie Young, κατάφερε να ελέγξει μια υποτροπή της σπλαγχνικής λεισμανίασης μετά από μια επιδημία γρίπης στην περιοχή Assam (Ινδία), καταγράφοντας όλα τα κρούσματα και μεταφέροντας τους ασθενείς σε κέντρο περίθαλψης. Πάνω από 80.000 άτομα έλαβαν ενδοφλέβια θεραπεία με ουσίες βασισμένες στο τρισθενές αντιμόνιο για περίοδο 3 μηνών.

Ο ψεκασμός των υπόγειων στοών των γέρβιλων με εντομοκτόνες ουσίες κατάφερε να ελέγξει τη ζωνοτική δερματική λεισμανίαση σε μια ενδημική περιοχή του Τουρκμενιστάν τη δεκαετία του 1940, αλλά αντίστοιχα απέτυχε όταν εφαρμόστηκε στο Ιράν. Μεγάλης κλίμακας έλεγχος των φορέων της λεισμανίασης με τη χρήση εντομοκτόνων ουσιών, εισήχθη το 1950 και η χρήση τους σε συνδυασμό με την καταγραφή και θεραπεία των όποιων κρουσμάτων, οδήγησε στον έλεγχο της ανθρωπονοτικής δερματικής λεισμανίασης στη Σοβιετική Ένωση και την κεντρική Ασία. Παρ' όλα αυτά σε μερικές περιοχές της Κεντρικής Ασίας παρατηρήθηκε επανεμφάνιση της νόσου τα τελευταία χρόνια. Την ίδια περίοδο η λεισμανίαση σχεδόν εξαφανίστηκε σε περιοχές της Μέσης Ανατολής και της Ινδίας, ως επακόλουθο των ψεκασμών για την αντιμετώπιση της ελονοσίας.

Τη δεκαετία του 1970, σε μια προσπάθεια να ελεγχθεί η ζωνοτική δερματική λεισμανίαση στο Ουζμπεκιστάν, οι πληθυσμοί γέρβιλων εξολοθρεύτηκαν με χρήση δηλητηριασμένων δολωμάτων και τα ενδιαιτήματά τους καταστράφηκαν με επαναλαμβανόμενες φυσικές καταστροφές των υπόγειων στοών και των πληθυσμών φλεβοτόμων σκνιπών με τη χρήση βαριάς μορφής ερπυστριοφόρων εκσκαφών. Η πιο επιτυχημένη εκστρατεία ελέγχου της ζωνοτικής σπλαγχνικής λεισμανίασης μέσω του ελέγχου της δεξαμενής του παρασίτου, πραγματοποιήθηκε στην Κίνα από τη δεκαετία του 1950 μέχρι το 1980 και περιελάμβανε υποχρεωτική εξόντωση των σκύλων, με παράλληλους ψεκασμούς με εντομοκτόνα και φυσικά καταγραφή των όποιων κρουσμάτων και θεραπεία (WHO, 2010).

1.9 Μοριακή Βιολογία του παρασίτου *Leishmania*

1.9.1 Το γονιδίωμα του παρασίτου

Το γονιδίωμα του παρασίτου *Leishmania* αποτελείται κατά κύριο λόγο από δυο διακριτούς τύπους DNA, το πυρηνικό και το μιτοχονδριακό ή κινητοπλαστικό DNA. Τα χρωμοσώματα του παρασίτου δεν παρουσιάζουν εμφανή συμπύκνωση κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, όπως σε άλλα ευκαρυωτικά συστήματα. Οι νέες εξελιγμένες τεχνικές ηλεκτροφόρησης που αναπτύχθηκαν τα τελευταία χρόνια, αποκάλυψαν ότι ο καρυότυπος του παρασίτου αποτελείται από 36 χρωμοσώματα στα είδη *L. major*, *L. infantum*, *L. tropica* και *L. aethiopica* (Wincker *et al.*, 1996) και από 34-35 χρωμοσώματα στα είδη *L. braziliensis* και *L. mexicana* αντίστοιχα (Britto *et al.*, 1998). Αξίζει να αναφερθεί πως περίπου 25% του γενωμικού DNA αποτελείται από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες.

Μολονότι τα περισσότερα στελέχη *Leishmania* που καλλιεργούνται *in vitro* έχουν σταθερό καρυότυπο, έχουν παρατηρηθεί χρωμοσωμικές ανακατατάξεις είτε κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας, είτε κατά την εφαρμογή συνθηκών διατροφικού στρες (Rioux *et al.*, 1990). Η οργάνωση των χρωμοσωμάτων στο παράσιτο είναι παρόμοια με αυτή αρκετών πρωτόζωων και χαρακτηρίζεται από συντηρημένες περιοχές και πολυμορφικά άκρα. Η δομή και ο μηχανισμός διατήρησης των χρωμοσωμικών άκρων στη *Leishmania* δε διαφέρουν από εκείνα άλλων ευκαρυωτικών οργανισμών, καθώς έχει ανιχνευθεί η δράση της τελομεράσης με παρόμοιες ιδιότητες με αυτές άλλων ευκαρυωτικών τελομερασών (Cano *et al.*, 1999).

1.9.2 Γονιδιακή οργάνωση

Το γονιδίωμα της *Leishmania* οργανώνεται σε μεγάλα συμπλέγματα γονιδίων, που ουσιαστικά αποτελούνται από δεκάδες έως εκατοντάδες γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες, κατανεμημένων στο ίδιο τμήμα DNA. Αυτή η ασυνήθιστη γονιδιακή οργάνωση παρατηρήθηκε πρώτη φορά στο χρωμόσωμα 1 της *Leishmania major*, το οποίο περιέχει 85 γονίδια οργανωμένων σε δυο

διαφορετικά συμπλέγματα, με τα πρώτα 32 γονίδια να ομαδοποιούνται στο κατώτερο τμήμα ενώ τα υπόλοιπα 53 στο ανώτερο τμήμα (Mylers *et al.*, 1999). Μετά τη δημοσίευση του συνολικού γονιδιώματος του παρασίτου *L. major* (Ivens *et al.*, 2005), διαπιστώθηκε πως η πλειοψηφία των γονιδίων είναι οργανωμένη σε μεγάλα συμπλέγματα γονιδίων. Παράλληλες συστοιχίες rRNA γονιδίων βρίσκονται μεταξύ των συμπλεγμάτων. Τα περισσότερα tRNA γονίδια οργανώνονται σε ομάδες των 2-10 γονιδίων, στο άνω ή κάτω άκρο, και μπορεί να περιέχουν γονίδια που μεταγράφονται από τη DNA πολυμεράση III. Σε αντίθεση με άλλους οργανισμούς η διανομή των tRNA γονιδίων στο γονιδίωμα του παρασίτου *Leishmania*, δε φαίνεται να είναι τυχαία, καθώς τα γονίδια αυτά περιορίζονται σε μια μικρή ομάδα χρωμοσωμάτων.

Παρ' όλο που τα παράσιτα είναι εξελικτικά κατώτερα ευκαρυωτικά, παρατηρείται μεγάλη διατήρηση της γονιδιακής σειράς (συντενικότητα) για τα γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες (El-Sayed *et al.*, 2005). Επίσης, η συντριπτική πλειοψηφία των γονιδίων στερούνται ιντρονίων. Επίσης οι οργανισμοί αυτοί είναι διπλοειδείς παρ' όλο που μερικά χρωμοσώματα είναι ανευπλοειδή (Bastien *et al.*, 1992). Επί πρόσθετα, τα άκρα των χρωμοσωμάτων περιέχουν την τελομερική επαναλαμβανόμενη αλληλουχία GGGTTA, ενώ οι υπο-τελομερικές περιοχές αποτελούνται από ποικίλα επαναλαμβανόμενα στοιχεία, τα οποία ευθύνονται κατά κύριο λόγο για τον πολυμορφισμό στο μέγεθος που παρατηρείται μεταξύ ομόλογων χρωμοσωμάτων (Sunkin *et al.*, 2000).

1.9.3 Μάτισμα του mRNA (*trans splicing*)

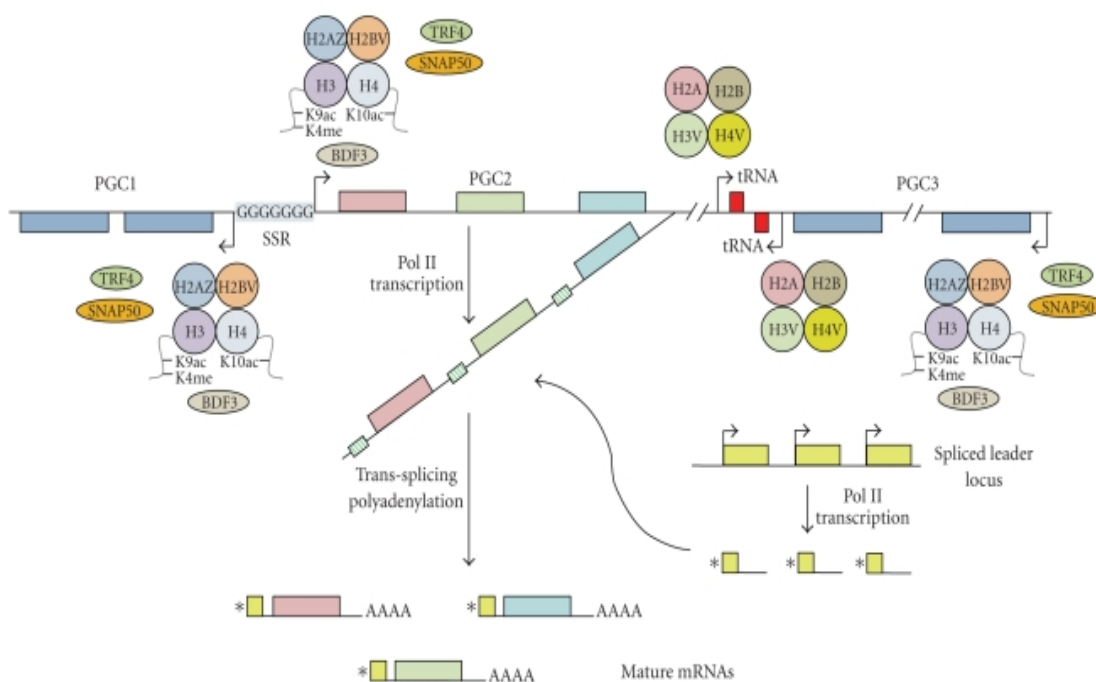
Σε αντίθεση με την πλειοψηφία των ευκαρυωτικών οργανισμών, η μεταγραφή στο παράσιτο *Leishmania* είναι πολυκιστρονική. Τα περισσότερα χρωμοσώματα περιέχουν τουλάχιστον δυο συμπλέγματα γονιδίων, τα οποία μπορούν να μεταγραφούν είτε αποκλινόμενα (με κατεύθυνση προς τα τελομερή) είτε συγκλινόμενα (με κατεύθυνση από τα τελομερή). Τα γονίδια που οργανώνονται σε ένα πολυκιστρονικό σύμπλεγμα συνήθως δεν κωδικοποιούν για λειτουργικά σχετιζόμενες πρωτεΐνες. Το τελευταίο, είναι τελείως αντίθετο από τον τρόπο που τα

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

οπερόνια λειτουργούν στα βακτήρια και τους νηματώδεις (Martinez-Calvillo *et al.*, 2010).

Τα ώριμα πυρηνικά mRNA προκύπτουν από τα πρώιμα μόρια, εφόσον πραγματοποιηθεί η διαδικασία του ματίσματος (trans-splicing) και της πολυαδενυλίωσης (Martinez-Calvillo *et al.*, 2010).

Το μάτισμα είναι μια διαδικασία κατά την οποία ένα μικρο-εξώνιο μήκους 39 νουκλεοτιδίων (mini-exon ή Spliced Leader), προστίθεται στο 5' άκρο του mRNA. Η προσθήκη του μορίου αυτού εξυπηρετεί δυο σκοπούς: μαζί με την πολυαδενυλίωση συμβάλλει στην εκτομή των πολυκιστρονικών μεταγράφων και παρέχει το κάλυμμα στα mRNA (Liang *et al.*, 2003). Όπως και η διαδικασία του cis-ματίσματος, το trans-μάτισμα πραγματοποιείται μέσω δυο αντιδράσεων trans-εστεροποίησης, αλλά περιλαμβάνει τη δημιουργία μιας δομής Υ αντί μιας δομής θηλειάς. Για τη διαδικασία αυτή απαιτείται η ύπαρξη ενός δινουκλεοτιδίου AG στο 3' σημείο εντομής και μια πλούσια σε πυριμιδίνες περιοχή. Το μάτισμα και η πολυαδενυλίωση παρακείμενων γονιδίων συνδέονται, καθώς η επιλογή του σημείου ματίσματος για ένα γονίδιο επηρεάζει την επιλογή για το σημείο πολυαδενυλίωσης για το γονίδιο που βρίσκεται σε προηγούμενη θέση.



Εικόνα 7: Μεταγραφή και επεξεργασία των mRNA. Στο ανώτερο τμήμα της εικόνας παρουσιάζεται ένα υποθετικό χρωμόσωμα με τρία πολυκιστρονικά συμπλέγματα γονιδίων (PGC1-3). Η εξαρτώμενη από την πολυμεράση II μεταγραφή (Pol II transcription) ξεκινάει αντίθετα από το πρώτο γονίδιο του συμπλέγματος. Τα νουκλεοσώματα που γειτνιάζουν στις περιοχές έναρξης της μεταγραφής, περιέχουν τις παραλλαγές ιστονών H2AZ και H2BV. Το αμινοτελικό άκρο της ιστόνης H3 σε αυτά τα νουκλεοσώματα είναι ακετυλιωμένο στις θέσεις K9/K14 (K9ac) και τριμεθυλιωμένο στη θέση K4 (K4me). Το αμινοτελικό άκρο της ιστόνης H4 είναι ακετυλιωμένο στη θέση K10 (K10ac). Ο παράγοντας BDF3 και οι μεταγραφικοί παράγοντες TRF4 και SNAP50 επίσης συνδέονται στις περιοχές έναρξης της μεταγραφής. Η μεταγραφή κάποιων συμπλεγμάτων γονιδίων τερματίζεται κοντά σε γονίδια tRNA, σε περιοχές του DNA που περιέχουν νουκλεοσώματα με παραλλαγές ιστονών H3V και H4V. Η μεταγραφή ενός συμπλέγματος γονιδίων δημιουργεί ένα πρώιμο μετάγραφο προϊόν (φαίνεται μόνο για το σύμπλεγμα PGC2) το οποίο επεξεργάζεται μέσω της trans-εντομής και πολυαδενυλίωσης για να δώσει τελικά το ώριμο mRNA. Μέσω του trans-ματίσματος, ένα καλυμμένο SL RNA (κίτρινο κουτάκι) προστίθεται στο 5' άκρο κάθε μορίου mRNA. Το κάλυμμα στα μόρια SL RNA σημειώνεται με * στο 5' άκρο του RNA. Το πολυκιστρονικό mRNA περιέχει πλούσιες σε πυριμιδίνες περιοχές (σκιαγραφημένα κουτάκια) οι οποίες απαιτούνται για το trans-μάτισμα και την πολυαδενυλίωση. Τα τέσσερα A στο 3' άκρο των ώριμων mRNA αντιπροσωπεύουν την πολύ-A-ουρά (Martinez-Calvillo et al., 2010).

Όλα τα γονίδια που αποτελούν μέρος ενός συμπλέγματος γονιδίων, μεταγράφονται στον ίδιο βαθμό σαν αποτέλεσμα της πολυκιστρονικής μεταγραφής. Παρ' όλα αυτά, τα ώριμα mRNA παρακείμενων γονιδίων εμφανίζουν πολύ διαφορετικές συγκεντρώσεις ή ποσοστό έκφρασης σε συγκεκριμένα στάδια του κυτταρικού κύκλου. Το γεγονός αυτό οφείλεται κυρίως στο ότι η γονιδιακή έκφραση στα παράσιτα ρυθμίζεται κυρίως μετα-μεταγραφικά, στο επίπεδο της επεξεργασίας και σταθερότητας του mRNA. Αλληλουχίες που βρίσκονται στην 3' αμετάφραστη περιοχή (3'-UTR) ενός mRNA, διαδραματίζουν επίσης μείζονα ρόλο στη γονιδιακή έκφραση. Τέλος, αξίζει να αναφερθεί πως μια σειρά μελετών υποστηρίζουν πως η

ποσότητα του mRNA και της πρωτεϊνικής αφθονίας, δε σχετίζονται πάντα καθώς ο μεταφραστικός και μετα-μεταφραστικός έλεγχος παίζουν σημαντικό ρόλο στις τρυπανοσωματίδες (Gale *et al.*, 1994, Mayho *et al.*, 2006, Nardelli *et al.*, 2007).

1.10 Οι Ιστόνες του παρασίτου *Leishmania*

1.10.1 Εισαγωγή

Στο ευκαρυωτικό κύτταρο το DNA απαντάται ως ένα νουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο γνωστό ως χρωματίνη. Οι ιστόνες αποτελούν το κύριο πρωτεϊνικό συστατικό αυτού του συμπλόκου και μπορούν να κατηγοριοποιηθούν δομικά σε: πυρηνικές και συνδετικές. Οι πυρηνικές ιστόνες (H2A, H2B, H3, H4) διαμορφώνουν μια σφαιρική δομή στην οποία ένα τετραμερές ιστονών H3-H4 λειτουργεί ως βάση για δυο διμερή ιστονών H2A-H2B. Ένα τμήμα DNA μήκους 146-180 βάσεων «τυλίγεται» γύρω από το πρωτεϊνικό αυτό σύμπλοκο συμπληρώνοντας σχεδόν 2 αριστερόστροφες υπερελικωμένες στροφές.

Κάθε μία από τις πυρηνικές ιστόνες παρουσιάζει μια δομή πτυχωτού τομέα (histone fold domain) η οποία επεκτείνεται σε λιγότερο οργανωμένους αμινο- και καρβόξυλο- τομείς, συχνά αποκαλούμενοι και «ουρές». Το αμινοτελικό τμήμα των πυρηνικών ιστονών παρουσιάζει πολύ πλούσια βασική αμινοξική σύσταση και μαζί με τις συνδετικές ιστόνες διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αναδίπλωση της χρωματίνης. Οι πυρηνικές ιστόνες αποτελούν ιδιαίτερα συντηρημένες εξελικτικά πρωτεΐνες και απαντώνται σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα.

Οι ιστόνες της οικογένειας H1 αντιδρούν εκτεταμένα με το συνδετικό τμήμα DNA και έτσι είναι γνωστές ως συνδετικές ιστόνες. Καθώς η ιστόνη H1 προσδένεται στο συνδετικό τμήμα DNA, η πολυνουκλεοσωμική ίνα αναδιπλώνεται σε ίνα χρωματίνης μήκους 30nm. Οι συνδετικές ιστόνες των πολυκύτταρων ευκαρυωτικών παρουσιάζουν μια τριμερή δομική οργάνωση στην οποία ένας σφαιρικός τομέας, πλαισιώνεται από δυο λιγότερο οργανωμένους βασικούς αμινο- και καρβόξυλο-τελικούς τομείς. Σε αντίθεση με τις πυρηνικές ιστόνες, οι συνδετικές είναι λιγότερο συντηρημένες εξελικτικά (Kasinsky *et al.*, 2001).

Στα κύτταρα των θηλαστικών, τα γονίδια που κωδικοποιούν για τις ιστόνες απαντώνται σε πολλά αντίτυπα, δεν περιέχουν εσώνια και συχνά είναι ομαδοποιημένα στο γονιδίωμα (Hentschel & Birnstiel, 1981). Η μεταγραφή τους και η σύνθεση των ιστονών πραγματοποιείται στη φάση S του κυτταρικού κύκλου, παράλληλα με την αντιγραφή του DNA (Meshi *et al.*, 2000). Κατά τη διάρκεια των φάσεων G1, G2, και M του κυτταρικού κύκλου, τα επίπεδα των μεταγράφων των ιστονών μειώνονται δραματικά. Επιπλέον, τα mRNAs των ιστονών των θηλαστικών δεν είναι πολυαδενυλιωμένα, αλλά παρουσιάζουν μία δομή θηλειάς στις 3' αμετάφραστες περιοχές (3'UTRs) (Mannironi *et al.*, 1989).

Η χρωματίνη της *Leishmania* μοιάζει δομικά με τη χρωματίνη των ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών. Δομείται από νουκλεοσώματα αλλά όχι τόσο «σφιχτά» όπως η χρωματίνη των ανώτερων θηλαστικών (Bellì, 2000). Αξίζει να σημειωθεί όμως πως, σε καμία φάση του κυτταρικού κύκλου των οργανισμών αυτών δεν παρατηρούνται συμπυκνωμένα χρωμοσώματα ή χρωματίνη εμφανίζεται με τη μορφή λεπτών ινιδίων και ο πυρηνικός φάκελος διατηρείται κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης (Galanti *et al.*, 1998).

1.10.2 Πυρηνικές ιστόνες

Στη *Leishmania* οι πυρηνικές ιστόνες H2A, H2B, H3, H4 έχουν μελετηθεί και εμφανίζουν σημαντικές διαφορές συγκρινόμενες με τις ιστόνες των ανώτερων οργανισμών (Bellì, 2000). Οι πυρηνικές ιστόνες κωδικοποιούνται από γονίδια σε πολλαπλά αντίγραφα, τα mRNAs τους είναι πολυαδενυλιωμένα και τα μεταγράφα τους περιέχουν ανεστραμμένες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες κοντά στις πολυαδενυλιωμένες «ουρές» που μπορούν να δημιουργήσουν δομές θηλειάς ανάλογης με αυτήν που έχει βρεθεί σε mRNAs ιστονών ανώτερων ευκαρυωτικών. Οι δομές αυτές φαίνεται να εμπλέκονται στη ρύθμιση του χρόνου ημίσειας ζωής του mRNA, στη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, και στην ωρίμανση του πρόδρομου mRNA (Soto *et al.*, 1991).

Όσον αφορά την ιστόνη H2A, η καρυοτυπική ανάλυση έδειξε ότι στο γονιδίωμα της *Leishmania* υπάρχουν τέσσερα γονίδια που κωδικοποιούν για την πρωτεΐνη, τα οποία εδράζονται στα χρωμοσώματα XIV και XIX. Η H2A αποτελείται

από 132 αμινοξικά κατάλοιπα, με μοριακό βάρος 14kDa και παρουσιάζει ομοιότητα 50% με την ομόλογη ανθρώπινη H2A ιστόνη και 75,6% με την αντίστοιχη ομόλογη του *T. cruzi*. Η ομοιότητα αυτή επικεντρώνεται στη σφαιρική υδρόφοβη περιοχή, ενώ τα αμινοτελικά και καρβοξυτελικά άκρα, είναι λιγότερο συντηρημένα (Soto *et al.*, 1992).

Τρία διαδοχικά επαναλαμβανόμενα γονίδια κωδικοποιούν για την ιστόνη H2B στη *L. enriettii*, η οποία αποτελείται από 111 αμινοξικά κατάλοιπα, με μοριακό βάρος 12kDa (Genske *et al.*, 1991). Το επίπεδο μεταγραφής της H2B είναι υψηλότερο στις προμαστιγωτές μορφές σε σχέση με τα ενδοκυτταρικές αμαστιγωτές μορφές του παρασίτου.

Στη *L. infantum*, δύο γονίδια κωδικοποιούν για την ιστόνη H3, τα οποία εδράζονται στα χρωμοσώματα XIV και XIX (Soto *et al.*, 2004, Soto *et al.*, 1996a). Η ιστόνη H3 αποτελείται από 131 αμινοξικά κατάλοιπα, με μοριακό βάρος 14,6kDa. Παρ' ότι η κωδική περιοχή των δύο γονιδίων είναι πανομοιότυπη, διαφέρουν σημαντικά στις 3' UTR περιοχές για το λόγο αυτό τα mRNA έχουν διαφορετικό μέγεθος. Η ιστόνη H3 της *L. infantum* είναι ομόλογη στη σφαιρική περιοχή και στο καρβοξυτελικό άκρο της, με ιστόνες H3 ανώτερων οργανισμών, αλλά το αμινοτελικό της άκρο εμφανίζει μεγάλη ετερογένεια (Soto *et al.*, 1996a).

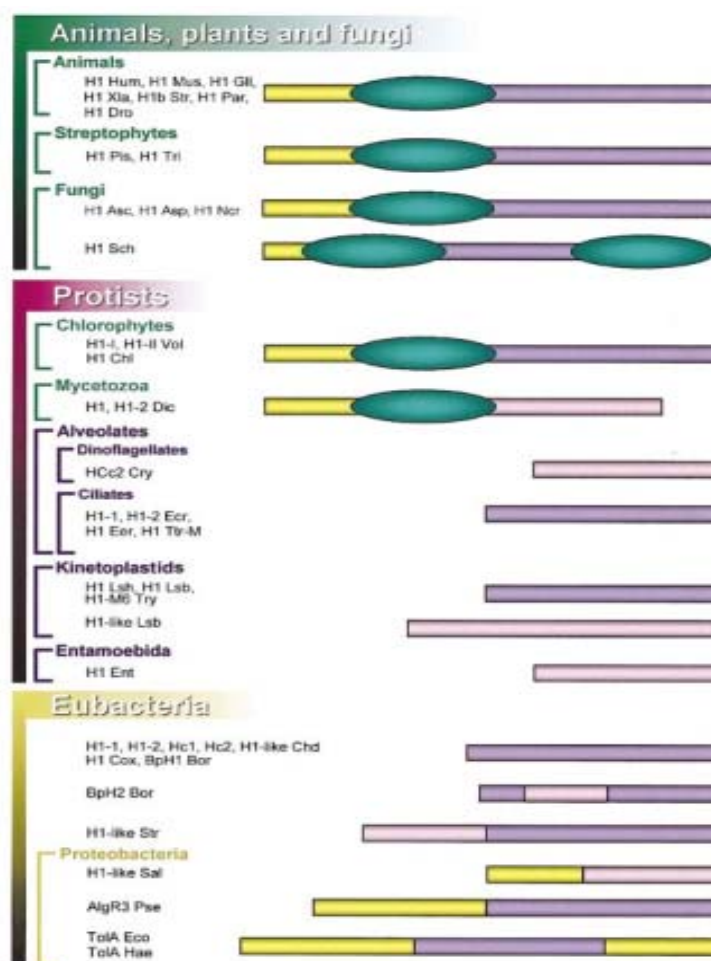
Τα γονίδια που κωδικοποιούν για την ιστόνη H4 στη *Leishmania infantum* βρίσκονται σε επτά αντίτυπα σε διαφορετικά χρωμοσώματα (Soto *et al.*, 1997). Η ιστόνη H4 στη *Leishmania* αποτελείται από 100 αμινοξικά κατάλοιπα και έχει μοριακό βάρος 11,5 kDa και εμφανίζει 56% ταυτότητα με την ανθρώπινη ομόλογη πρωτεΐνη (Soto *et al.*, 1997). Το επίπεδο έκφρασης του mRNA της ιστόνης H4 στην *L. infantum*, εμφανίζεται έντονα μειωμένο καθώς τα παράσιτα εισέρχονται στην στατική φάση ανάπτυξής τους (Soto *et al.*, 1997).

1.10.3 Η συνδετική ιστόνη H1

Οι πρώτες ευκαρυωτικές συνδετικές ιστόνες που απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν, παρουσίαζαν υψηλή συγκέντρωση στο αμινοξύ λυσίνη και για αυτό αρχικά αποκαλούνταν πλούσιες σε λυσίνη ιστόνες. Οι πρώιμες αναλύσεις αλληλουχίας απέδειξαν πως η πλούσια σε λυσίνη φύση των συνδετικών ιστονών

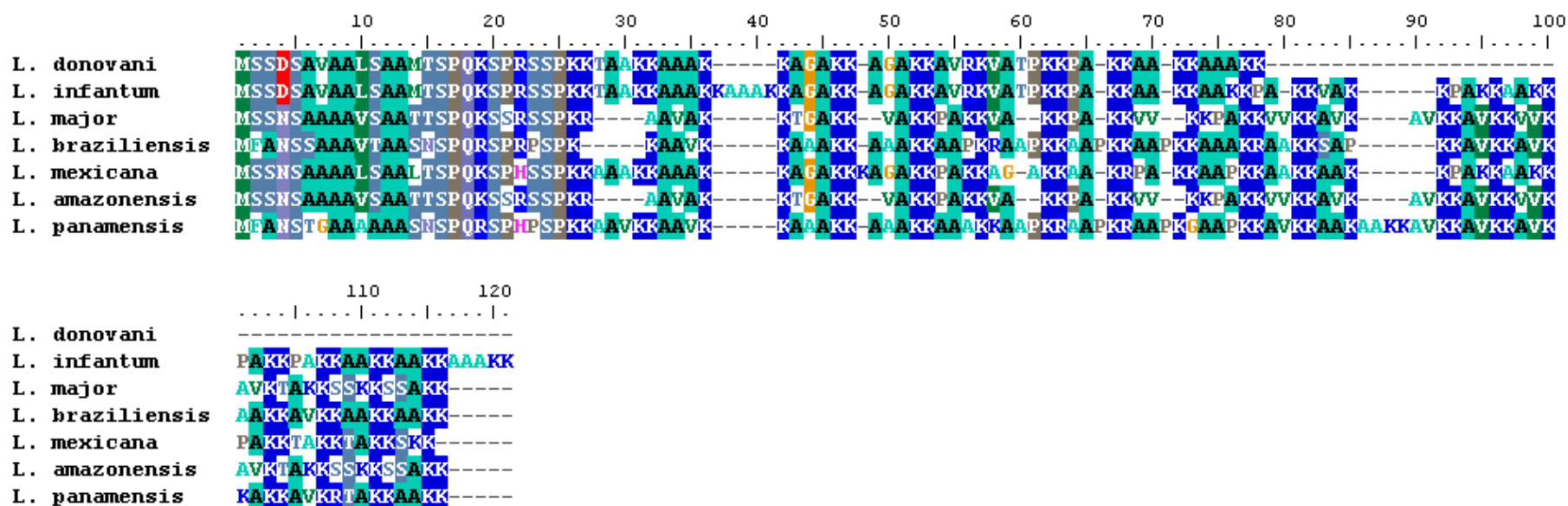
οφειλόταν κυρίως στη συχνή παρουσία του αμινοξέος αυτού στο καρβοξυτελικό τμήμα των πρωτεϊνών αυτών. Η παρουσία των αμινοξέων λυσίνη (K) και αλανίνη (A) (υψηλά ελικογενή αμινοξέα) που εναλλάσσονται στο τμήμα αυτό και η κατανομή φορτίου που προκύπτει, αξιώνουν ότι καταλήγουν σε μια οργάνωση α-έλικας ΑΚ διαστρεβλωμένη από προλίνη, η οποία και αποκαλείται ΑΚΡ έλικα. Σε πολλές περιπτώσεις αυτές οι εν δυνάμει α-έλικες παρουσιάζουν αμφιπαθή φύση, που μπορεί να διαδραματίζει σημαίνοντα ρόλο στην αλληλεπίδραση συνδετικής ιστόνης-ιστόνης στα ινίδια χρωματίνης. Και είναι ακριβώς αυτή η κατανομή των ΑΚΡ ελίκων στο καρβοξυτελικό τμήμα της ιστόνης που προσδίδει στην πρωτεΐνη τη δυνατότητα να προσδένεται στο συνδετικό τμήμα DNA. Ως εκ τούτου η παρουσία της H1 είναι ουσιώδης για την αναδίπλωση και συμπύκνωση της χρωματίνης.

Όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως, η κύρια λειτουργία της ιστόνης H1 είναι η συμπύκνωση του συνδετικού DNA που επάγει την αναδίπλωση της πολυνουκλεοσωμικής ίνας σε ίνα χρωματίνης διαμέτρου ~30nm. Παρ' όλο που μια πολυνουκλεοσωμική ίνα χωρίς H1, μπορεί να αναδιπλωθεί μέχρι ενός σημείου, η περαιτέρω αναδίπλωση στην ίνα διαμέτρου 30nm, κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, μπορεί να συμβεί μόνο μετά την πρόσδεση της ιστόνης H1 στο συνδετικό τμήμα DNA. Επίσης, μελέτες έχουν δείξει πως από τους τρεις δομικούς τομείς της πρωτεΐνης, ο καρβοξυτελικός τομέας είναι απαραίτητος για την αναδίπλωση της χρωματίνης.



Εικόνα 8: Σχηματικό διάγραμμα της εξέλιξης του σφαιρικού τομέα στην ιστόνη H1 των πρωτοζώων. Με σκούρο πράσινο χρώμα σημειώνεται ο κεντρικός σφαιρικός τομέας, με μωβ το καρβοξυτελικό άκρο, ενώ με κίτρινο το αμινοτελικό άκρο. [πηγή: (Kasinsky et al., 2001)]

Η ιστόνη H1 στη *Leishmania* (LeishH1) έχει αρκετά χαμηλότερο μοριακό βάρος συγκρινόμενη με τα αντίστοιχα μόρια των ανώτερων ευκαρυωτικών και επιπλέον δε φέρει την κεντρική σφαιρική υδρόφοβη περιοχή (Εικόνα 8). Το καρβοξυτελικό άκρο της H1 της *Leishmania* παρουσιάζει ομολογία, με το αντίστοιχο τμήμα της πρωτεΐνης άλλων κατώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών (Fasel *et al.*, 1993, Parageorgiou & Soteriadou, 2002).



Εικόνα 9: Πολλαπλή στοίχιση αλληλουχιών της ιστόνης H1 από διάφορα είδη *Leishmania*. Τα πανομοιότυπα αμινοξικά κατάλοιπα διακρίνονται από την όμοια χρώση. *L. infantum* (LinJ.27.1120), *L. donovani* (LdBPK_271070.1), *L. major* (Lmj.27.1240), *L. braziliensis* (LbrM.27.1340), *L. mexicana* (LmxM.27.1240), *L. amazonensis* (AAG60608.2), *L. panamensis* (AAQ62475.1).

Επίσης, αξίζει να αναφερθεί πως η αλληλουχία της ιστόνης H1 της *Leishmania* περιέχει δυο ή και τρία μοτίβα S/T-P-X-K/R (αναλόγως με το είδος ή το υποείδος του παρασίτου), τα οποία δυνητικά φωσφορυλιώνονται από σύμπλοκα κυκλινών/κινασών (Εικόνα 9). Η πρόσθεση των φωσφορικών ομάδων εισάγει ένα αρνητικό φορτίο που έχει σαν αποτέλεσμα τη μειωμένη αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης με το DNA (Marques Porto *et al.*, 2002).

Στη *Leishmania major* και σε άλλα είδη εκτός της *L. braziliensis*, το γονίδιο που κωδικοποιεί για την ιστόνη H1, βρίσκεται σε δύο αντίγραφα (*sw3.0*, *sw3.1*). Τα γονίδια απαντώνται στο χρωμόσωμα 27 και κωδικοποιούν για την LeishH1 1.1 και 1.2 αντίστοιχα (Fasel *et al.*, 1993). Τα δύο αντίγραφα της πρωτεΐνης έχουν ταυτόσημες 5' αμετάφραστες περιοχές (5' UTRs), αλλά διαφορετικές 3' αμετάφραστες περιοχές. Όσον αφορά στις πρωτεΐνες αυτές καθαυτές, η LeishH1 1.1 αποτελείται από 102 αμινοξέα, ενώ η LeishH1 1.2 από 111 αμινοξέα. Σε ανοσοαποτύπωμα κατά Western η LeishH1 ανιχνεύεται είτε σαν μια ζώνη, είτε σαν διπλή ζώνη με μοριακό βάρος 14-20kDa αναλόγως με το είδος ή το υποείδος του παρασίτου (Noll *et al.*, 1997, Papageorgiou & Soteriadou, 2002). Η ύπαρξη της δεύτερης ζώνης μπορεί να οφείλεται σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της πρωτεΐνης.

Τα επίπεδα έκφρασης της LeishH1 παρουσιάζουν διακυμάνσεις ανάλογα με το αναπτυξιακό στάδιο του παρασίτου. Συγκεκριμένα, καθώς τα παράσιτα μεταβαίνουν από τη λογαριθμική στη στατική φάση ανάπτυξης τα επίπεδα της LeishH1 αυξάνονται (Noll *et al.*, 1997, Papageorgiou & Soteriadou, 2002). Αυξημένα είναι επίσης τα επίπεδα έκφρασης της LeishH1 στις αμαστιγωτές μορφές του παρασίτου σε σχέση με τις προμαστιγωτές (Fasel *et al.*, 1993).

Προηγούμενη εργασία που έχει πραγματοποιηθεί στο Εργαστήριο Μοριακής Παρασιτολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ, κατέδειξε πως η επισωματική έκφραση της LeishH1 σε προμαστιγωτές μορφές *L. major* έχει ως αποτέλεσμα την υπερέκφραση της πρωτεΐνης *in vitro* (Papageorgiou & Soteriadou, 2002). Τα ανασυνδυασμένα αυτά παράσιτα που πλέον υπερεκφράζουν την LeishH1, παρουσιάζουν μειωμένη μολυσματικότητα τόσο *in vitro* (Papageorgiou & Soteriadou, 2002), όσο και *in vivo* (Smirlis *et al.*, 2006).

Η περαιτέρω μελέτη των παρασίτων που υπερεκφράζουν τη LeishH1 έδειξε πως η μειωμένη μολυσματικότητα που παρουσιάζουν, σχετίζεται με μια καθυστέρηση στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Συγκεκριμένα η υπερέκφραση της LeishH1 καθυστερεί τη μετάβαση των παρασίτων από τη φάση G1 στη φάση S του κυτταρικού κύκλου, αλλά και την πρόοδο της φάσης S. Παράλληλα είναι λογικό πως εξαιτίας αυτών των γεγονότων, καθυστερεί με τη σειρά της και η διαφοροποίηση των προμαστιγωτών μορφών σε αμαστιγωτές (Smirlis et al., 2006).

Για το ρόλο της ιστόνης H1 των πρωτόζωων, μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν πολλές πληροφορίες. Πρόσφατα, μελέτες στο πρωτόζωο *Trypanosoma brucei* έδειξαν πως η απαλοιφή του γονιδίου της H1, είχε ως αποτέλεσμα σημαντικές αλλαγές στη δομή της χρωματίνης που σχετίζονται με τη διάσπαση των σημείων έκφρασης της γλυκοπρωτεΐνης VSG και παράλληλα παύση της αποσιώπησης της μεταγραφής γονιδίων (Povelones et al., 2012).

Στα ανώτερα ευκαρυωτικά κύτταρα, τα γονίδια που κωδικοποιούν για την ιστόνη H1 αποτελούν παράδειγμα γενετικών αλληλουχιών όπου ο έλεγχος της έκφρασης τροποποιείται ανάλογα τα φυσιολογικά σήματα κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής. Συγκεκριμένα, η ρύθμιση της έκφρασης της ιστόνης H1 μπορεί να πραγματοποιηθεί σε μεταγραφικό, μεταφραστικό ή και μετα-μεταφραστικό επίπεδο (Stein et al., 1996). Εδώ όμως πρέπει να αναφερθεί πως η ιστόνη H1 εμπλέκεται στη γονιδιακή ρύθμιση δρώντας ως θετικός ή αρνητικός ρυθμιστής ανάλογα με το γονίδιο (Brown et al., 1996, Dworkin-Rastl et al., 1994, Gunjan et al., 1999). Μελέτες που έχουν γίνει στο βάτραχο *Xenopus* έχουν δείξει ότι η ιστόνη H1 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της μεταγραφής των γονιδίων της RNA πολυμεράσης III (Chipev & Wolffe, 1992, Schlissel & Brown, 1984). Άλλες *in vitro* μελέτες σε σύμπλοκα H1-DNA (Croston et al., 1991) και ανασυσταμένη χρωματίνη (Croston et al., 1992, Laybourn & Kadonaga, 1991), αναγνωρίζουν την ιστόνη H1 ως μεταγραφικό καταστολέα της μεταγραφής RNA πολυμεράσης III. Όσον αφορά την LeishH1, η επισωμική έκφρασή της στις κυτταρικές σειρές COS7 και NIH 3T3 είχε σαν αποτέλεσμα την καθυστέρηση της προόδου του κυτταρικού κύκλου (Smirlis et al., 2006). Διαπιστώνουμε έτσι πως σημαντικές ιδιότητες της ιστόνης H1 φαίνεται να είναι συντηρημένες και να διατηρούνται κατά την εξελικτική διαδικασία.

Παράλληλα, μια ακόμα σημαντική ιδιότητα της λεισμανιακής ιστόνης H1 είναι η χρήση της ως πιθανού εμβολίου. Παλαιότερες μελέτες έχουν δείξει ότι η μόλυνση από παράσιτα *Leishmania*, σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα αντισωμάτων έναντι των ιστονών (Carmelo *et al.*, 2002, Soto *et al.*, 1995, Soto *et al.*, 1996b, Soto *et al.*, 1999). Τα αντισώματα μάλιστα που προκύπτουν δεν έχουν ενεργότητα έναντι των θηλαστικών ιστονών (Carmelo *et al.*, 2002). Η χρήση δενδριτικών κυττάρων προερχόμενα από το μυελό των οστών ποντικού, τα οποία προηγουμένως είχαν επωαστεί-διεγερθεί παρουσία της LeishH1, σε ένα πειραματικό μοντέλο σπλαχνικής λεισμανίασης αποκάλυψε την ανοσοδιεγερτική ικανότητα της LeishH1. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε χαμηλό ποσοστό παρασιτικής μόλυνσης του σπλήνα και βελτιωμένες αναλογίες των μορίων IFN- γ /IL-10 καθώς και IgG2a/IgG1 (Agallou *et al.*, 2012).

1.11 Πρωτεΐνες θερμικού σοκ

1.11.1 Εισαγωγή

Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ (heat shocks proteins, HSPs) αποτελούν ένα αρχαίο, πρωτογενές σύστημα «ενδοκυττάριας αυτοάμυνας». Η πλειοψηφία των HSPs είναι συνοδές πρωτεΐνες. Οι συνοδές πρωτεΐνες αποτελούν μόρια ικανά να δεσμεύουν και να σταθεροποιούν ασταθή πρωτεϊνικά μόρια και μέσω ελεγχόμενης δέσμευσης και αποδέσμευσης να υποβοηθούν την περαιτέρω πορεία τους (αναδίπλωση, ολιγομερισμό, μεταφορά σε συγκεκριμένο οργανίδιο, αποικοδόμηση). Δεσμευόμενες στους στόχους τους, οι συνοδές πρωτεΐνες δρουν ως «συλλέκτες» κατεστραμμένων πρωτεϊνών. Δυο τάξεις συνοδών πρωτεϊνών που είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικές σε αυτόν τον τομέα, είναι οι μικρές HSPs και οι HSP90s. Συγκεκριμένα, αφού δεσμευτούν στους στόχους τους, τους διατηρούν σε μια εν δυνάμει κατάσταση αναδίπλωσης μέχρι το κύτταρο να έχει την απαραίτητη ενέργεια για την αναδίπλωσή τους. Τα μέλη της οικογένειας των HSP90 έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν και διάφορα πεπτίδια *in vitro* και *in vivo*. Τα πεπτίδια αυτά που μπορεί να έχουν προέλθει από εκτεταμένες προτεολυτικές διαδικασίες στο κυτταρόπλασμα, ενδέχεται να παρεμβάλλονται σε διαδικασίες μεταγωγής σήματος.

Άλλες οικογένειες HSPs (HSP60, HSP70) «βοηθούν» πρωτεΐνες που δεν έχουν αναδιπλωθεί ορθά, δίνοντάς τους έτσι μια ακόμα ευκαιρία να αναδιπλωθούν σωστά. Οι HSPs δεν καθορίζουν την τεταρτογενή δομή των πρωτεϊνών, αλλά τις «βοηθούν» να πάρουν την τελική τους μορφή πιο εύκολα. Ο μηχανισμός αυτός αυξάνει την απόδοση αλλά όχι το ρυθμό της αναδίπλωσης των πρωτεϊνών. Μόνο λίγες συνοδές πρωτεΐνες δρουν ως πραγματικοί καταλύτες, αυξάνοντας την ταχύτητα της αναδίπλωσης. Όλοι οι παραπάνω μηχανισμοί είναι θεμελιώδους σημασίας σε περιπτώσεις στρες, καθώς το κύτταρο καλείται να αναδιπλώσει διάφορες πρωτεΐνες που έχουν υποστεί βλάβη και να επανακτήσει την προηγούμενη δομή του.

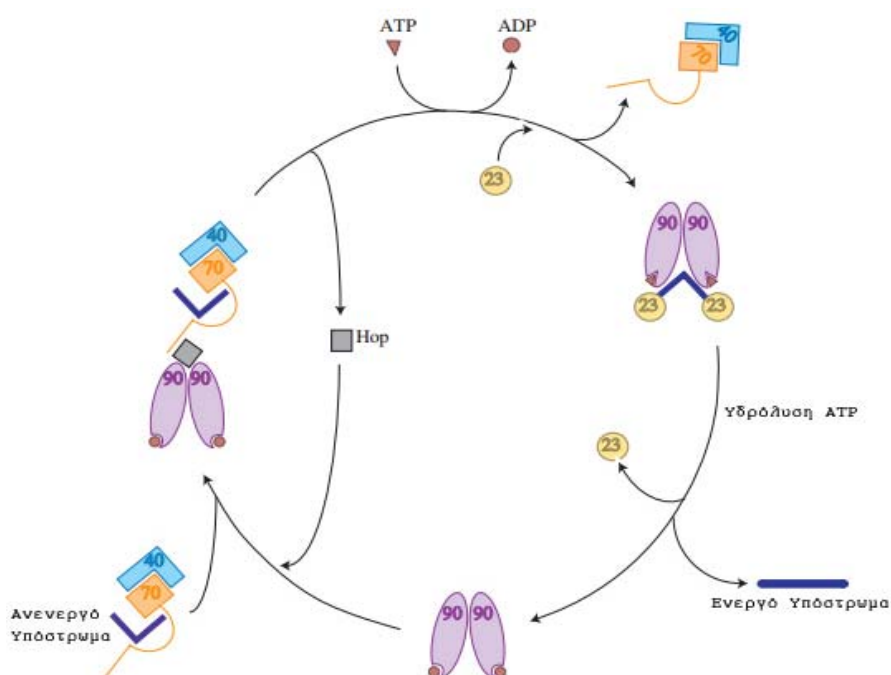
Η αναδίπλωση των πρωτεϊνών απαιτεί ενέργεια. Έτσι δεν προκαλεί έκπληξη ότι οι περισσότερες συνοδές πρωτεΐνες δεσμεύουν και υδρολύουν ATP. Η διαδικασία αυτή επάγει δομικές αλλαγές στη συνοδό πρωτεΐνη, το οποίο αποτελεί αναπόσπαστο τμήμα της διαδικασίας αναδίπλωσης. Παρ' όλα αυτά οι συνοδές πρωτεΐνες δεν είναι ιδιαίτερα ικανές ATP-άσες. Αυτή η αργή υδρόλυση του ATP δίνει τον απαραίτητο χρόνο στην πρωτεΐνη στόχο να αναδιπλωθεί.

1.11.2 Πρωτεΐνη θερμικού σοκ 90 – HSP90

Η πρωτεΐνη αυτή συναντάται με διάφορα ονόματα σε διαφορετικούς οργανισμούς όπως HSP90 στον άνθρωπο, HSP86 στους μύες, HSP83 στη μύγα *Drosophila* και στο παράσιτο *Leishmania*, HSP82 στη ζύμη. Φυλογενετικές αναλύσεις που έχουν πραγματοποιηθεί με βάση τις αλληλουχίες της HSP90, υποστηρίζουν πως η κυτταροπλασματική μορφή της πρωτεΐνης και η μορφή της που απαντάται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, αποτελούν παράλογα γονίδια που προέκυψαν μετά από διπλασιασμό ενός γονιδίου, γεγονός που φαίνεται να συνέβη αρκετά νωρίς στην εξέλιξη των ευκαρυωτικών κυττάρων (Gurta, 1995). Στους σπονδυλωτούς οργανισμούς υπάρχουν δυο μορφές της κυτταροπλασματικής HSP90 (α και β) που προέκυψαν από ένα επιπρόσθετο γεγονός διπλασιασμού, που συνέβη σε εξελικτικά μεταγενέστερο χρόνο. Πρόσφατα μια ενδελεχής ανάλυση των γονιδίων που κωδικοποιούν για την HSP90 στον άνθρωπο (Chen *et al.*, 2005), έδειξε πως η

οικογένεια αυτή αποτελείται από 17 διαφορετικά γονίδια, υποδηλώνοντας έτσι τη σημαντικότητα αυτής της οικογένειας συνοδών πρωτεϊνών.

Παρ' όλο που αρχικά η HSP90 ανακαλύφθηκε ως μια πρωτεΐνη που η αφθονία της αυξάνεται κατά τη διάρκεια του θερμικού στρες, στους περισσότερους οργανισμούς και κυτταρικούς τύπους, η πρωτεΐνη είναι ήδη σε πολύ υψηλά επίπεδα υπό φυσιολογικές συνθήκες (~1-2% των συνολικών πρωτεϊνών). Η HSP90 αποτελεί μια συνοδό πρωτεΐνη που εξαρτάται από το ATP και εμπλέκεται στην ενεργοποίηση, αναδίπλωση και μεταφορά πολλών πρωτεϊνών. Οι περισσότερες πρωτεΐνες που ελέγχονται από την HSP90, εμπλέκονται στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου και τη μετάδοση σήματος. Αξίζει να αναφερθεί πως η HSP90 δε δρα μόνη της, αλλά ένα σύμπλοκο άλλων συνοδών πρωτεϊνών σχηματίζεται γύρω από αυτήν. Το σύμπλοκο αποτελείται από τις HSP90, HSP70, HSP40, Hor και p23 (Εικόνα 10). Η HSP90 δρα ως διμερές και η δέσμευση της υποψήφιας προς τροποποίηση πρωτεΐνης στο ομοδιμερές της HSP90 απαιτεί την HSP70· η αντίδραση αυτή περιλαμβάνει την υδρόλυση του ATP από την HSP70 και προωθείται από την HSP40. Το σύμπλοκο σταθεροποιείται από μια πρωτεΐνη μεγέθους 60kDa που ονομάζεται Hor (HSP organizing protein) που δεσμεύεται και στην HSP90 και την HSP70. Η σύνδεση του ATP στην HSP90 επάγει μια δομική αλλαγή στο ομοδιμερές της, σταθεροποιώντας την αλληλεπίδραση μεταξύ της HSP90 και του υποστρώματος. Η αλλαγή αυτή επάγει επίσης την ανταλλαγή των HSP70 και Hor με την p23. Τέλος, η υδρόλυση του δεσμευμένου ATP επάγει μια ακόμα δομική αλλαγή στο σύμπλοκο, απελευθερώνοντας τα συστατικά του (υπόστρωμα, διμερές HSP90 και p23). Το υπόστρωμα που απελευθερώνεται μπορεί πλέον να ενεργοποιήσει συγκεκριμένα μονοπάτια σηματοδότησης.



Εικόνα 10: Κύκλος δέσμησης υποστρώματος της HSP90. Η πρωτεΐνη-υπόστρωμα που είναι συνδεδεμένη στο σύμπλοκο HSP70- HSP40 αλληλεπιδρά με την HSP90. Η δημιουργία του συμπλόκου αυτού επάγεται από την Hop. Η δέσμηση του ATP στην HSP90 επάγει μια δομική αλλαγή στο σύμπλοκο, η οποία οδηγεί στη μεταφορά του υποστρώματος από την HSP70 στην HSP90 και την απελευθέρωση του συμπλόκου HSP70- HSP40. Το σύμπλοκο HSP90-υπόστρωμα σταθεροποιείται από την p23. Τέλος, η υδρόλυση του ATP επάγει μια επιπρόσθετη δομική αλλαγή που απελευθερώνει το υπόστρωμα. [πηγή: (Folgueira & Requena, 2007) τροποποιημένο]

Γονίδια που κωδικοποιούν για την HSP90, που συχνά καλείται HSP83, έχουν βρεθεί στη *Leishmania* (Angel *et al.*, 1996, Shapira & Pedraza, 1990), το *Trypanosoma cruzi* (Dragon *et al.*, 1987) και το *Trypanosoma brucei* (Mottram *et al.*, 1989). Οι μελέτες αυτές κατέδειξαν την ύπαρξη ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων που οργανώνονται σε μια διαδοχική σειρά. Η ομοιότητα της HSP83 ελέγχει τη διαδικασία της διαφοροποίησης στη *L. donovani* (Wiesgigl & Clos, 2001a). Συγκεκριμένα, η απενεργοποίηση της HSP83 από τις φαρμακευτικές ουσίες γελνταμυκίνη και ραδισικόλη επάγει τη διαφοροποίηση του παρασίτου από την προμαστιγωτή στην αμαστιγωτή μορφή. Στο *T. cruzi* η αναστολή της HSP83 από την ουσία γελνταμυκίνη, προωθεί την αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης και ταυτόχρονα επάγει την απάντηση στο θερμικό σοκ (Graefe *et al.*, 2002).

Μια αναζήτηση στο γονιδίωμα της *L. major* αποκάλυψε την ύπαρξη 17 γονιδίων που κωδικοποιούν για την HSP83 ομαδοποιημένων διαδοχικά στο χρωμόσωμα 33. Οι πρωτεϊνικές αλληλουχίες που προκύπτουν είναι ουσιαστικά πανομοιότυπες, με εξαίρεση δυο πρωτεΐνες μικρότερες κατά ένα αμινοξύ.

Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στο παράσιτο *L. infantum* αποκάλυψαν ότι η γονιδιακή έκφραση της HSP83 ρυθμίζεται σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο μέσω μοριακών μηχανισμών που δρουν σε δυο στάδια: α) συσσώρευση μεταγράφων στους 37°C και β) ενισχυμένη μετάφραση της HSP83 κατά τη διάρκεια θερμικού σοκ. Η σταθεροποίηση των μεταγράφων της HSP83 στη *L. infantum* κατά τη διάρκεια του θερμικού σοκ εξαρτάται από τη σύνθεση της ενεργής πρωτεΐνης, υποδηλώνοντας την εμπλοκή ενός πρωτεϊνικού παράγοντα εξαρτώμενου από τη θερμοκρασία (Larreta *et al.*, 2004). Βέβαια, η παρατήρηση αυτή έρχεται σε αντίθεση με προηγούμενες μελέτες που έχουν γίνει στη *L. amazonensis* όπου βρέθηκε ότι παρ' όλο που τα μετάγραφα της HSP83 συσσωρεύονταν με την άνοδο της θερμοκρασίας, εντούτοις η σταθεροποίησή τους σε αυξημένες θερμοκρασίες οφειλόταν στη θερμο-εξαρτώμενη αναστολή ενός μηχανισμού αποικοδόμησης του mRNA, ο οποίος είναι ενεργός σε θερμοκρασία 26°C (Argaman *et al.*, 1994).

1.12 Απόπτωση

1.12.1 Εισαγωγή

Από τα μέσα του 19^{ου} αιώνα, μια σειρά παρατηρήσεων υπέδειξαν πως ο κυτταρικός θάνατος διαδραματίζει σημαντικό ρόλο κατά τη διάρκεια φυσιολογικών διαδικασιών των πολυκύτταρων οργανισμών και κυρίως κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης και της μεταμόρφωσης. Ο όρος προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος (programmed cell death, PCD), εισήχθη το 1964, προτείνοντας ότι ο κυτταρικός θάνατος κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης δε συμβαίνει τυχαία αλλά ακολουθεί μια σειρά ελεγχόμενων σταδίων που οδηγούν σε τοπικά και χρονικά ορισμένη αυτό-καταστροφή, σε αντίθεση με τη νέκρωση που αποτελεί μια μορφή κυτταρικού θανάτου που απορρέει από οξεία βλάβη του ιστού και προκαλεί

φλεγμονώδη αντίδραση. Είναι προφανές ότι ο κυτταρικός θάνατος μπορεί να συμβεί μέσω διαφορετικών μηχανισμών που οδηγούν σε διαφορετικές μορφολογίες (Smirlis *et al.*, 2010).

Κατά συνέπεια, διαφορετικοί τύποι PCD έχουν περιγραφεί, με τους πιο σημαντικούς να είναι η απόπτωση και η αυτοφαγία. Ο όρος απόπτωση περιγράφει βιοχημικές διεργασίες και μορφολογικά χαρακτηριστικά που οδηγούν σε ελεγχόμενη κυτταρική αυτοκαταστροφή όπως η στρογγυλοποίηση του κυττάρου, συμπύκνωση της χρωματίνης, κατάτμηση του πυρήνα, απώλεια του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης ($\Delta\Psi_m$) κ.α. Από την άλλη μεριά η αυτοφαγία αποτελεί το είδος εκείνο κυτταρικού θανάτου που συμβαίνει χωρίς να παρατηρείται συμπύκνωση της χρωματίνης, αλλά συχνά ακολουθείται από εκτεταμένο αυτοφαγικό εγκλεισμό του κυτταροπλάσματος σε κενοτόπια (Smirlis *et al.*, 2010).

Στα θηλαστικά κύτταρα τα δυο κύρια μονοπάτια της απόπτωσης είναι το «ενδογενές» (intrinsic) και το «εξωγενές» (extrinsic). Το ενδογενές μονοπάτι περιλαμβάνει τη μετάδοση σημάτων από τη διάτρηση της μιτοχονδριακής μεμβράνης, που ρυθμίζεται από την οικογένεια πρωτεϊνών Bcl2/Bax, ενώ το εξωγενές από την ενεργοποίηση των υποδοχέων θανάτου (death receptors, DRs), μέσω της TNF υπεροικογένειας των DRs. Παρ' όλο που τα μονοπάτια αυτά είναι σχετικά διακριτά, η συνύπαρξή τους είναι επίσης δυνατή.

1.12.2 Το βιοχημικό υπόβαθρο της απόπτωσης

Εάν κάποιος ήθελε να αναζητήσει τις πρωτεΐνες εκείνες που συνδέονται άρρηκτα με την απόπτωση, τότε αυτές θα ήταν οι κασπάσες. Οι κασπάσες αποτελούν μια ομάδα πρωτεασών κυστεΐνης που ενεργοποιούνται ειδικά στα αποπτωτικά κύτταρα. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι ομόλογες μεταξύ τους και παρουσιάζουν υψηλό βαθμό συντήρησης κατά τη διάρκεια της εξέλιξης (Hengartner, 2000).

Η ενεργοποίηση των κασπασών δεν έχει ως αποτέλεσμα την ολική αποικοδόμηση των κυτταρικών πρωτεϊνών. Για την ακρίβεια, οι κασπάσες επιλεκτικά «κόβουν» μια περιορισμένη ομάδα πρωτεϊνών, συνήθως σε ένα, ή και σε περισσότερα σημεία της αμινοξικής αλληλουχίας και πάντα ακριβώς μετά από ένα

κατάλοιπο ασπαρτικού οξέος, αν και κάποιες μελέτες αναφέρουν την ικανότητα ορισμένων κασπασών να πέπτουν μετά από κατάλοιπα γλουταμικού οξέος (Hawkins *et al.*, 2000, Srinivasula *et al.*, 2001). Στις περισσότερες περιπτώσεις, η παρέμβαση αυτή των κασπασών, έχει ως αποτέλεσμα την απενεργοποίηση της πρωτεΐνης-υποστρώματος. Οι κασπάσες επίσης μπορούν να ενεργοποιήσουν και πρωτεΐνες είτε άμεσα, αποκόπτοντας ένα αρνητικό τομέα ρύθμισης, είτε έμμεσα απενεργοποιώντας μια ρυθμιστική υπομονάδα.

Τα τελευταία χρόνια αρκετές βιβλιογραφικές αναφορές υποστηρίζουν την ύπαρξη μονοπατιών μιας ανεξάρτητης από κασπάσες απόπτωσης, με κεντρικά μόρια τις κατεψίνες, καλπαΐνες και της πρωτεάσες του πρωτεασώματος (Smirlis *et al.*, 2010).

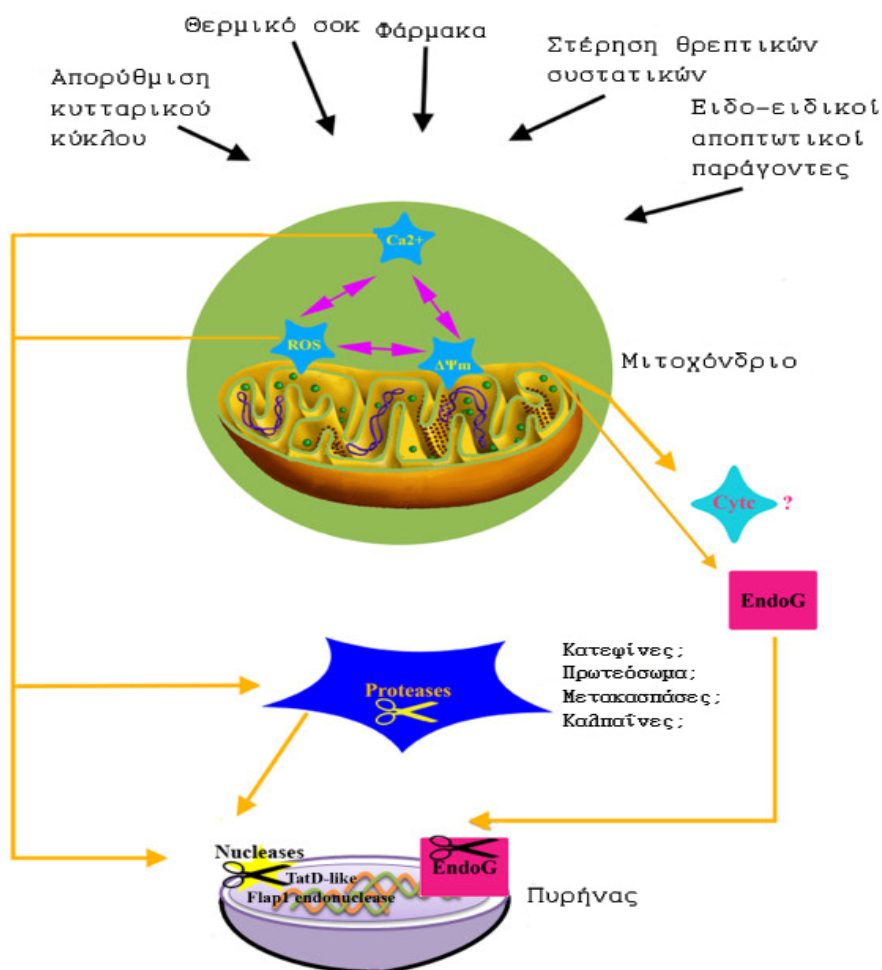
1.12.3 Η απόπτωση στη *Leishmania*

Παρ' όλο που αρχικά θεωρήθηκε ότι η απόπτωση προέκυψε με την εμφάνιση πολυκύτταρων οργανισμών, υπάρχουν πλέον ικανές πειραματικές αποδείξεις ότι παρόμοιοι μηχανισμοί υπάρχουν και στη *Leishmania*. Έχει βρεθεί ότι διάφοροι παράγοντες μπορούν να επάγουν την αποπτωτική διαδικασία στο παράσιτο όπως το θερμικό σοκ (Alzate *et al.*, 2006, Alzate *et al.*, 2007, Moreira *et al.*, 1996, Raina & Kaur, 2006), οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) (Das *et al.*, 2001, Holzmuller *et al.*, 2006), τα αντιπαρασιτικά φάρμακα (Alzate *et al.*, 2008, Das *et al.*, 2008, Dutta *et al.*, 2007a, Dutta *et al.*, 2007b, Kaur *et al.*, 2009, Li *et al.*, 2009), οι συνθήκες στέρησης τροφής (Zangger *et al.*, 2002), αντιμικροβιακά πεπτίδια (Kulkarni *et al.*, 2009, Luque-Ortega *et al.*, 2010) καθώς και μεταλλάξεις σε κυκλο-ρυθμιζόμενα γονίδια (Selvapandiyan *et al.*, 2004).

Όταν η αποπτωτική διαδικασία ενεργοποιηθεί, μια σειρά από γεγονότα παρόμοια με αυτά της απόπτωσης των θηλαστικών διαδραματίζεται όπως η παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), υπεροξείδωση λιπιδίων, αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων Ca^{2+} , αλλαγές στο δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης ($\Delta\Psi m$), έκθεση της φωσφατυδυλοσερίνης στο εξωτερικό της πλασματικής μεμβράνης, διατήρηση της συνέχειας της πλασματικής μεμβράνης μέχρι τα τελευταία στάδια της διαδικασίας, απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

επαγωγή των πρωτεασών και της πέψης του DNA, μετατόπιση της μιτοχονδριακής ενδονουκλεάσης G (EndoG) από το μιτοχόνδριο στον πυρήνα (Deponte, 2008, Duszenko *et al.*, 2006, Smirlis *et al.*, 2010, Smirlis & Soteriadou, 2011).



Εικόνα 11: Αναπαράσταση των κύριων μονοπατιών που οδηγούν σε απόπτωση στις τρυπανοσωματίδες. Τα γεγονότα που οδηγούν στην απόπτωση έχουν ως αποτέλεσμα την απώλεια δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης ($\Delta\Psi_m$), τη δημιουργία δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) και την αύξηση των κυτταροπλασματικών επιπέδων Ca^{2+} . Οι αλλαγές αυτές ενισχύουν την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και της EndoG στο κυτταρόπλασμα και την ενεργοποίηση των πρωτεασών και νουκλεασών. Η EndoG καθώς απελευθερώνεται από το κυτταρόπλασμα, μεταφέρεται στον πυρήνα όπου και αποικοδομεί το DNA. Τα ερωτηματικά βρίσκονται σε διεργασίες που είτε δεν έχουν ακόμα εξακριβωθεί στις τρυπανοσωματίδες ή έχουν προταθεί μόνο σε ορισμένα είδη των τρυπανοσωματιδίων. [πηγή (Smirlis *et al.*, 2010) τροποποιημένο]

Παρ' όλο που τα παράσιτα αυτά παρουσιάζουν κοινά γεγονότα στην αποπτωτική διαδικασία σε σχέση με την αντίστοιχη διαδικασία στα θηλαστικά, η απουσία ομόλογων μορίων που ρυθμίζουν ή επιδρούν στην απόπτωση (όπως οι υποδοχείς TNF, τα μέλη της οικογένειας Bcl και οι κασπάσες) υποδεικνύουν πως τα μονοπάτια της απόπτωσης σε αυτούς τους πρώιμους εξελικτικά ευκαρυωτικούς οργανισμούς είναι εν μέρει διαφορετικά. Εντούτοις, η απουσία των μορίων αυτών δεν μπορεί να αποκλείσει την παραδοχή ότι τα παράσιτα αυτά φαίνεται να διαθέτουν τους βασικούς μηχανισμούς «αυτοκαταστροφής».

1.13 Παράγοντες μολυσματικότητας στη *Leishmania*

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η *Leishmania* έχει προσαρμοστεί εξελικτικά ώστε να επιζεί και να πολλαπλασιάζεται εντός των μακροφάγων μέσω της αλλοίωσης πολυάριθμων βιολογικών λειτουργιών του ξενιστή. Την τελευταία δεκαετία, η αποκωδικοποίηση του γονιδιώματος της *Leishmania*, προσέφερε ένα ευρύ πλαίσιο για πειραματικές προσεγγίσεις με σκοπό την ανεύρεση γονιδίων που εμπλέκονται στη μόλυνση του ξενιστή (Olivier *et al.*, 2012).

Μια από τις πρώτες πρωτεΐνες για τις οποίες υπήρξαν αναφορές ότι εμπλέκεται στη μολυσματικότητα του παρασίτου είναι η λιποφωσφογλυκάνη (LPG). Η LPG αποτελεί μια από τις βασικές γλυκοπρωτεΐνες του παρασίτου. Ο λιπιδικός σκελετός του μορίου, συμπληρώνεται από επαναλαμβανόμενες μονάδες δισακχαριτών και είναι ενωμένος με ένα πυρήνα γλυκάνης που εισέρχεται στην πλασματική μεμβράνη μέσω ενός μορίου-άγκυρα ινοσιτόλης. Τα τελευταία χρόνια, μια σειρά μελετών έχουν πραγματοποιηθεί που αποκαλύπτουν το ρόλο του μορίου αυτού στη μόλυνση από παράσιτα *Leishmania*. Μια από τις πρώτες αναφορές εμπλέκει την LPG στην αναστολή (τουλάχιστον εν μέρει) της ενεργοποίησης της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) (Descoteaux & Turco, 1999). Στον αντίποδα, μια πρόσφατη μελέτη κατέδειξε ότι η LPG που προέρχεται από παράσιτα *Leishmania mexicana* ρυθμίζει διαφορετικά την πρωτεΐνη PKCα που προέρχεται από ποντίκια BALB/C ή C57BL/6 αναστέλλοντας ή διεγείροντας τις ιδιότητές τους αντίστοιχα (Delgado-Dominguez *et al.*, 2010). Οι αναφορές αυτές υπογραμμίζουν το γεγονός ότι πιθανόν υπάρχουν σημαντικές διαφορές ανάμεσα σε διαφορετικά είδη *Leishmania*

και τον τρόπο που ο ξενιστής αντιδρά όταν ο ρόλος των παραγόντων μολυσματικότητας μελετάται. Ο τύπος των κυττάρων του ξενιστή καθώς και η δομή των μορίων του παρασίτου πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν. Για την ακρίβεια ενδο- και διαειδικοί πολυμορφισμοί των LPGs έχουν αναφερθεί και ίσως να ευθύνονται εν μέρει για αυτές τις παρατηρούμενες διαφορές (Coelho-Finamore *et al.*, 2011).

Πειραματικές μελέτες στις οποίες το γονίδιο *lpg1* απαλείφθηκε στο παράσιτο *L. major* έδειξαν ότι τα παράσιτα που προέκυπταν είχαν μειωμένη μολυσματική ικανότητα *in vitro* και *in vivo*. Η μολυσματικότητα όμως των παρασίτων επανερχόταν σε φυσιολογικά επίπεδα μετά την επανα-εισαγωγή του γονιδίου (Spath *et al.*, 2000).

Ένα σημαντικό βήμα στις μελέτες για τη λεισμανιακή LPG ήταν η ανακάλυψη ότι δίνει τη δυνατότητα στα προμαστιγωτά παράσιτα να αναστέλλουν την ωρίμανση του φαγοσώματος στα πρώιμα στάδια της μόλυνσης. Η στρατηγική αυτή επιτρέπει στα προμαστιγωτά να επιβιώνουν μέσα στο φαγόσωμα μέχρι να διαφοροποιηθούν σε αμαστιγωτά, τα οποία μπορούν και πολλαπλασιάζονται σε όξινο περιβάλλον (Desjardins & Descoteaux, 1997). Επίσης πολύ ενδιαφέρουσα είναι η ανακάλυψη ότι οι LPGs εμπλέκονται στην επιβίωση των προμαστιγωτών μορφών του παρασίτου στη σκνίπα, προσδένοντας τα παράσιτα στο μεσέντερο του εντόμου. Οι μετακυκλικές LPGs βρέθηκαν να υπόκεινται σε αλλαγές στη διαμόρφωσή τους που έχουν ως αποτέλεσμα τη μη ικανή πρόσδεση στο μεσέντερο της σκνίπας. Το γεγονός αυτό αποτελεί βήμα-κλειδί στην απελευθέρωση των μολυσματικών μορφών του παρασίτου κατά τη διάρκεια του γεύματος του εντόμου (Sacks *et al.*, 1995, Saraiva *et al.*, 1995).

Μια άλλη κατηγορία πρωτεϊνών για τις οποίες έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες είναι οι πρωτεάσες κυστεΐνης (CP). Έρευνες που έχουν γίνει σε παράσιτα *L. mexicana* που δε φέρουν πλέον τα γονίδια *cra* και *crb* αποκάλυψαν ότι τα μόρια αυτά αποτελούν παράγοντες μολυσματικότητας ικανούς να τροποποιήσουν την απόκριση του ξενιστή προς όφελος του παρασίτου (Motttram *et al.*, 2004). Παράλληλα, παράσιτα με μεταλλαγμένη την πρωτεΐνη CPB δεν είναι ικανά να δημιουργήσουν έλκη σε ποντίκια ούτε να επάγουν την αλλαγή από μια ανοσολογική απόκριση Th2 σε Th1 (Alexander *et al.*, 1998).

Μια ακόμα πρωτεΐνη για την οποία υπάρχουν πολλά στοιχεία είναι μια πρωτεάση ψευδαργύρου, η γλυκοπρωτεΐνη 63 (GP63) (Matlashewski, 2001, Yao *et al.*, 2003). Η πρωτεΐνη αυτή βρίσκεται στην επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης του παρασίτου, αποτελεί κύριο αντιγόνο επιφανείας και έχει ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων όπως η κασεΐνη, η ζελατίνη, η αλβουμίνη, η αιμογλοβίνη και το ινωδογόνο (Bordier, 1987, Bouvier *et al.*, 1987, Brittingham *et al.*, 1999). Η GP63 βρίσκεται σε αφθονία στις προμαστιγωτές μορφές του παρασίτου αλλά υποεκφράζεται στις αμαστιγωτές (Schneider *et al.*, 1992). Η GP63 πιστεύεται ότι διαδραματίζει σημαίνοντα ρόλο στην προστασία των προμαστιγωτών από τη δράση των υδρολυτικών ενζύμων στο μεσέντερο του εντόμου (Mottram *et al.*, 1992, Reiner *et al.*, 1990) και το φαγολυσόσωμα στο μακροφάγο (Peters *et al.*, 1995). Η πρωτεΐνη έχει ανιχνευθεί σε αμαστιγωτές μορφές όλων των ειδών *Leishmania* που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα (Yao *et al.*, 2010). Παρ' όλα αυτά η ακριβής λειτουργία της και ο ρόλος της στην ενδοκυττάρια επιβίωση του αμαστιγωτού δεν έχει εξακριβωθεί πλήρως. Μελέτες έχουν δείξει ότι η υποέκφραση της GP63 σε παράσιτα *L. amazonensis*, είχε ως αποτέλεσμα τη μειωμένη πρόσδεση των παρασίτων σε μακροφάγα, μειωμένη επιβίωση στο εσωτερικό των μακροφάγων καθώς και μειωμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού (Reiner *et al.*, 1987, Thiakaki *et al.*, 2006).

ΣΚΟΠΟΣ

2

2. Σκοπός

Στο εισαγωγικό μέρος αναφέρθηκε η λεισμανίαση ως νόσος αλλά και ο αντίκτυπος που έχει στο γενικό πληθυσμό και ειδικότερα στις τροπικές και υποτροπικές περιοχές όπου και αποτελεί σημαντικό πρόβλημα Δημόσιας Υγείας. Τα τελευταία χρόνια οι χώρες της Μεσογειακής λεκάνης έχουν έρθει αντιμέτωπες με αυξανόμενα ποσοστά εμφάνισης της νόσου, όχι μόνο στα ζώα αλλά και στον άνθρωπο. Μάλιστα, η νόσος εμφανίζεται πλέον και σε περιοχές προηγουμένως μη-ενδημικές. Η φαρμακευτική αντιμετώπιση που χρησιμοποιείται αυτή τη στιγμή είναι γενικά αναποτελεσματική, κυρίως εξαιτίας των παρενεργειών που παρουσιάζει, της οδού χορήγησης που απαιτεί νοσηλεία, αλλά και την εμφάνιση ανθεκτικότητας στη φαρμακευτική αγωγή. Παράλληλα η έλλειψη κάποιου αποτελεσματικού εμβολίου για τη νόσο στον άνθρωπο κάνει ακόμα πιο δύσκολη την πρόληψη εμφάνισης της νόσου. Με βάση τα παραπάνω στοιχεία, καθίσταται επιτακτική η ανάγκη ανάπτυξης νέων στοχευμένων ουσιών για τη θεραπεία της λεισμανίασης.

Τα παράσιτα χαρακτηρίζονται από διγενετικό κύκλο ζωής και στη διάρκεια της εξελικτικής τους πορείας έχουν αναπτύξει ένα εύρος χαρακτηριστικών που τους επιτρέπει να προσαρμόζονται και να επιβιώνουν στα διαφορετικά ενδιαίτηματα – μικροπεριβάλλοντα (ενδιάμεσος και τελικός ξενιστής). Τα χαρακτηριστικά αυτά αντικατοπτρίζονται στην πολυπλοκότητα της ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου του παρασίτου (Naula *et al.*, 2005). Ως εκ τούτου η κατανόηση των βασικών βιολογικών μηχανισμών του παρασίτου και ειδικότερα εκείνων που σχετίζονται με τη διαφοροποίηση και την επιβίωση, κρίνεται απαραίτητη καθώς μπορεί να οδηγήσει στην αναγνώριση μορίων – στόχων για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων.

Στο εργαστήριο Μοριακής Παρασιτολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ έχει προσδιοριστεί και μελετηθεί η ιστόνη H1 (LeishH1) του παρασίτου *Leishmania*. Συγκεκριμένα έχει βρεθεί ότι τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης δεν είναι σταθερά αλλά διαφέρουν ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης του παρασίτου, καθώς παρουσιάζονται αυξημένα σε μετακυκλικά προμαστιγωτά στατικής φάσης σε σχέση με τα προκυκλικά προμαστιγωτά (Parageorgiou & Soteriadou, 2002). Επιπρόσθετα η υπερέκφραση της ιστόνης H1 στο παράσιτο μειώνει τη

Κεφάλαιο 2: Σκοπός

μολυσματικότητα του παρασίτου τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* (Smirlis et al., 2006). Η περαιτέρω μελέτη των παρασίτων που υπερεκφράζουν την LeishH1 αποκάλυψε πως η μειωμένη μολυσματικότητα που παρουσιάζουν σχετίζεται με μια καθυστέρηση στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Συγκεκριμένα καθυστερεί η μετάβαση των παρασίτων από τη φάση G1 στη φάση S του κυτταρικού κύκλου αλλά και η πρόοδος της φάσης S.

Στόχοι της παρούσας διατριβής είναι:

- η περαιτέρω μελέτη του βιολογικού ρόλου της ιστόνης μέσω του προσδιορισμού των πρωτεϊνών των οποίων η έκφραση επηρεάζεται από την υπερέκφραση της LeishH1
- η συσχέτιση τους με τη μειωμένη μολυσματικότητα που παρουσιάζουν τα παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1.

Τα όποια αποτελέσματα προκύψουν, θα συμβάλουν στη διαλεύκανση του βιολογικού ρόλου της ιστόνης H1 στο παράσιτο αλλά και τον τρόπο με τον οποίο η υπερέκφρασή της οδηγεί στη δημιουργία ενός μη μολυσματικού φαινοτύπου.

ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ 3

3. Υλικά και μέθοδοι

3.1 Υλικά

3.1.1 Αντιδραστήρια

Χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια:

- Κοινά χημικά αναλυτικού τύπου καθώς και χημικά υψηλού βαθμού καθαρότητας (>99%) για τις τεχνικές Μοριακής Βιολογίας (Sigma, Fluka, Merck, BDH, Applichem).
- Περιοριστικές ενδονουκλεάσες (NEB, Roche), DNA πολυμεράση (Phusion high-fidelity, Finnzymes), T4 λιγάση (Roche), αλκαλική φωσφατάση (NEB).
- Πρωτεΐνάση K (Macherey-Nagel, Applichem), Λυσοζύμη (Sigma), Rnase A (Sigma), Απροτινίνη (Applichem), Πεπστατίνη (Sigma).
- DNA δείκτες μοριακών μεγεθών, 1kb DNA ladder (NEB).
- Πρωτεΐνες αναφοράς χαμηλού μοριακού βάρους (Low Molecular Weight Calibration kit for SDS electrophoresis, GE Healthcare).
- Μόρια εκκινητές για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Thermo).
- Σύστημα απομόνωσης πλασμιδιακού DNA από βακτήρια (Macherey-Nagel).
- Σύστημα για τον καθαρισμό DNA από πήκτωμα αγαρόζης NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel).
- Θρεπτικά υλικά για τις βακτηριακές καλλιέργειες: Τρυπτόνη, εκχύλισμα ζύμης, άγαρ (Applichem).
- Θρεπτικά υλικά για τις κυτταροκαλλιέργειες: RPMI-1640 (Life Technologies), RPMI-1640 χωρίς μεθειονίνη (Life Technologies), ορός από έμβρυο μόσχου (FBS, Gibco), απενεργοποιημένος στους 56°C για 30 λεπτά.
- Διάλυμα Hepes (Gibco).
- Αντιβιοτικά για τις κυτταροκαλλιέργειες: πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη (Gibco), υγρομυκίνη B (Invitrogen), G418 (Applichem).
- Alamar Blue αντιδραστήριο για τα πειράματα κυτταρικής επιβίωσης (Biosource AG).

- Για την ανίχνευση της απόπτωσης: Apoptosis detection kit (R&D systems), TUNEL fluorescein apoptosis detection kit (Roche).
- Στήλη νικελίου (Ni-NTA Superflow resin, Quiagen, Macherey-Nagel).
- Στήλη γλουταθειόνης (Glutathione Sepharose 4B, GE Healthcare)
- Μαγνητικά σφαιρίδια αγαρόζης A (Dynabeads protein A-agarose, Invitrogen)
- Ραδιενεργός φώσφορος α $^{32}\text{PdCT}$ (Perkin-Elmer).
- Μεθειονίνη σημασμένη με ραδιενεργό θείο EasyTag L- ^{35}S -methionine (Perkin-Elmer).

3.1.2 Αναλώσιμα υλικά

- Δοκιμαστικοί σωλήνες 15 και 50ml (Sarstedt, Greiner).
- Πλαστικά ακρορύγχια (tips) (Greiner).
- Αποστειρωμένες πλαστικές ορολογικές πιπέτες (Sarstedt).
- Πλαστικοί σωλήνες “eppendorf” 1,5ml (Greiner).
- Πλαστικοί σωλήνες για PCR 0,2ml (Kisker).
- Κυψελίδες 0,1cm για ηλεκτροδιάταξη (Gene Pulser Cuvette Biorad) για βακτήρια.
- Κυψελίδες 2mm για ηλεκτροδιάταξη (Gene Pulser Cuvette Biorad , Eurogentec) για ευκαρυωτικά κύτταρα/ παράσιτα.
- Πλαστικές κυψελίδες μιας χρήσης (Sarstedt).
- Φίλτρα με διάμετρο πόρου 0,2 και 0,45 μm (Sartorius).
- Μembrάνη νιτροκυτταρίνης για μεταφορά πρωτεϊνών Hybond C (GE Healthcare).
- Φλάσκες καλλιέργειας παρασίτων 25 και 50cm² (Nunc).
- Τρυβλία κυτταροκαλλιέργειών και πλάκες 24 και 96 φρεατίων για κυτταροκαλλιέργειες (Sarstedt).
- Αποστειρωμένοι πλαστικοί ξύστες (Sarstedt).
- Κρυοπροστατευτικοί σωλήνες 1,5ml (Nunc).

- Αιμοκυτταρόμετρα (Malassez, για τη μέτρηση παρασίτων/ Neubauer για τη μέτρηση κυττάρων θηλαστικών).
- Πλαστικοί σωλήνες κυτταρομετρίας των 5ml (BD Biosciences).
- Χαρτί διήθησης 3MM (Whatmann).
- Τρυβλία για στερεές καλλιέργειες βακτηρίων (Sarstedt, Greiner).
- Μεμβράνη διαπίδυσης (Spectrum)

3.1.3 Εργαστηριακός εξοπλισμός

- Συσκευές κάθετης ηλεκτροφόρησης (Mini-Protean II, Maxi-Protean Biorad) για την ανάλυση πρωτεϊνών και συσκευή μεταφοράς πρωτεϊνών σε νιτροκυτταρίνη (Mini Trans-Blot, Biorad).
- Συσκευές οριζόντιας ηλεκτροφόρησης για την ανάλυση DNA (Owl Buffer Puffer™, Model A5 της ThermoFischer Scientific).
- Ζυγοί: μικροζυγός ακριβείας και αναλυτικός ζυγός (430-33, Kern και AE50, Mettler αντίστοιχα).
- Υδατόλουτρο (ED13, Julabo).
- Πεχάμετρο (Orion 2-Star pH Benchtop Meter, Thermo Scientific).
- Vortex, θερμαινόμενη πλάκα, μαγνητικοί αναδευτήρες (MS2 minishaker της IKA, Bioblock Scientific της Sybron/Thermolyne και SB162 της Stuart αντίστοιχα).
- Πιπέτες μεταβλητού όγκου 1000μl/200μl/20μl και 2μl (Pipetman P1000, P200, P20 και U2 της Gilson αντίστοιχα).
- Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής (Eurocyt 120, FluFrance).
- Επωαστήρας για την καλλιέργεια ευκαρυωτικών κυττάρων (Heraeus Hera cell 150).
- Επωαστήρας 25 °C για την καλλιέργεια παρασίτων (Shel-lab).
- Επωαστήρας για την καλλιέργεια βακτηρίων υπό ανάδευση (Lab Tech).
- Κυτταρομετρητής ροής (FACS CALIBUR, Becton-Dickinson).
- Φασματοφωτόμετρο (Perkin Elmer, Lambda Bio10).

- Συσκευή PCR (MJ Research, PTC-200).
- Μικροφυγόκεντρος και επιτραπέζια φυγόκεντρος (Eppendorf 5410 και Thermo, αντίστοιχα).
- Φυγόκεντρος εξάτμισης υπό κενό Centrifugal Evaporator (Labconco CentriVap Concentrator).
- Σύστημα 3 συσκευών για μετασχηματισμό βακτηρίων και παρασίτων με ηλεκτροδιάταξη (Gene Pulser, Pulse Controller, Gene Transformer, Biorad).
- Ξηραντήρας πηκτών υπό κενό (Model 583 Gel Dryer/ HydroTech Vacuum Pump, Bio-Rad).
- Σύστημα σάρωσης οθονών αποτύπωσης ραδιενέργειας (PhosphorImager, Molecular Dynamics Storm).
- Συσκευή υπερήχων (Virsonic 475 Ultrasonic Cell Disrupter, Virtis).
- Σύστημα φωτογράφισης πηκτών αгарόζης σε UV (AlphaImager, AlphaInnotech Corp.).
- Μικροσκόπια: Ανάστροφο μικροσκόπιο (Axiovert 40C, Zeiss), TCSSP Leica συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού, μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss.
- Συσκευή υβριδισμού στυπωμάτων Northern (UVP, HB-1000 Hybridizer).

3.1.4 Αντισώματα

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα ακόλουθα:

- Συζευγμένα με υπεροξειδάση αντι-ισοτυπικά αντισώματα, έναντι των ανοσοσφαιρινών του κουνελιού και του ποντικού (Pierce).
- Πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης LeishH1, που παρασκευάσθηκε στο εργαστήριο (Smirlis et al., 2006).
- Πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι τμήματος της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης LdHSP83, που παρασκευάσθηκε στα πλαίσια της παρούσας διατριβής.

- Πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι τμήματος της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης *LdeEF-2*, που παρασκευάσθηκε στα πλαίσια της παρούσας διατριβής.
- Πολυκλωνικό αντίσωμα ποντικού IgG His-probe (Acris antibodies).
- Πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης *LinINO1*, που παρασκευάσθηκε στο εργαστήριο (Smirlis et al., 2006).
- Πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού (anti-rabbit IgG), συζευγμένο με την πράσινη φθορίζουσα χρωστική Alexa Fluor 488 (Mol. probes). Χρησιμοποιήθηκε σαν δεύτερο αντίσωμα σε ανοσοφθορισμούς.
- Πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού (anti-rabbit IgG), συζευγμένο με την κόκκινη φθορίζουσα χρωστική Alexa Fluor 546 (Mol. probes). Χρησιμοποιήθηκε σαν δεύτερο αντίσωμα σε ανοσοφθορισμούς.
- Πολυκλωνικό αντίσωμα όρνιθας (anti-chicken IgG), έναντι της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης *LdHSP70*, που παραχωρήθηκε από τον Δρ. Joachim Clos.

3.1.5 Διαλύματα

Για την παρασκευή όλων των διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε δις-απεσταγμένο απιονισμένο νερό (ddH₂O). Τα θρεπτικά υλικά για τις καλλιέργειες των βακτηρίων, καθώς και τα ρυθμιστικά διαλύματα για τις διάφορες τεχνικές DNA και τις καλλιέργειες των ευκαρυωτικών κυττάρων, αποστειρώθηκαν σε υγρό κλίβανο για 20 λεπτά σε συνθήκες 15lb/in² και θερμοκρασία 120°C, ή φιλτραρίστηκαν σε φίλτρα με διάμετρο πόρων 0.2μm.

PBS pH 7.4 (1lt), 10X	
NaCl	80g
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	12g
KCl	2g
KH ₂ PO ₄	2g

Διαλύματα ηλεκτροφόρησης DNA

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης TBE (1lt), 10X	
Tris-base	108g
H ₃ BO ₃	55g
0.5M EDTA pH 8.0	40ml

Ρυθμιστικό διάλυμα “φόρτωσης” δείγματος DNA (loading buffer), 6X	
Χρωστική μπλέ της βρωμοφαινόλης	0.25% (w/v)
Σουκρόζη	40% (w/v)

Διαλύματα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών (SDS-PAGE)

Διάλυμα ακρυλαμίδιου 30% (w/v) (100ml)	
Ακρυλαμίδιο (C ₃ H ₅ NO)	29.2g
N,N-μεθυλεν- δισακρυλαμίδιο (C ₇ H ₁₀ N ₂ O ₂)	0.8g

Πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel) 12% (5ml)	
1.5M Tris-HCl pH 8.8	1.3ml
SDS 10% (w/v)	0.05ml
Διάλυμα ακρυλαμίδιου 30% (w/v)	2ml
Υπερθειϊκό αμμώνιο 10% (w/v) (APS)	50μl
TEMED	2μl
ddH ₂ O	1.7ml

Πήκτωμα συσσώρευσης (stacking gel) 4% (w/v) (5ml)	
1M Tris-HCl pH6.8	0.63ml
SDS 10% (w/v)	0.05ml
Διάλυμα ακρυλαμιδίου 30% (w/v)	0.83ml
Υπερθειικό αμμώνιο 10% (w/v) (APS)	50μl
TEMED	5μl
ddH ₂ O	3.4ml

Διάλυμα «φόρτωσης» δείγματος πρωτεϊνών (5X Laemli sample buffer, 20ml)	
SDS 2% (w/v)	2g
60mM Tris-HCl pH6.8	4ml
β-μερκαπτοαιθανόλη 5% (v/v)	5ml
Γλυκερόλη 10% (v/v)	10ml
Μπλε της βρωμοφαινόλης 0.01% (w/v)	1ml 1% (w/v) μπλε της βρωμοφαινόλης

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (500ml)	
Tris-base	1.5g
Γλυκίνη	7g
SDS 20% (w/v)	5ml

Διάλυμα χρώσης (Coomasie stain)	
Χρωστική Coomassie R-250	0.25% (w/v)
Μεθανόλη	40% (v/v)
Οξικό οξύ	10% (v/v)

Διάλυμα χρώσης (Colloidal Coomassie stain)	
Χρωστική Coomassie G-250	0.25% (w/v)
Μεθανόλη	25% (v/v)
Θειικό αμμώνιο	8% (w/v)
Ορθο-φωσφορικό οξύ	1.6% (v/v)

Διάλυμα αποχρωματισμού (destain buffer)	
Μεθανόλη	25% (v/v)
Οξικό οξύ	10% (v/v)

Διάλυμα αποχρωματισμού (destain buffer για colloidal coomassie stain)	
Μεθανόλη	25% (v/v)

Διαλύματα ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών (Western blot)

Διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς πρωτεϊνών (transfer buffer), 1lt	
Tris-base	3g
Γλυκίνη	14g
Μεθανόλη	20% (v/v)

Διάλυμα χρώσης νιτροκυτταρίνης Ponceau S	
Ponceau S	1mg/ml
Οξικό οξύ	7% (v/v)

TBS pH7.4 (1lt) 10X	
Tris-base	60.57g
NaCl	87.66g

Διάλυμα 3',3' διαμινοβενζιδίνης (DAB) για εμφάνιση Western blot	
TBS 1X	10ml
DAB	100μl
H ₂ O ₂ 30% (v/v)	6μl

Διαλύματα για πρωτεομική ανάλυση

HBSS (100ml, 10X)	
NaCl	8g
KCl	0.4g
KH ₂ PO ₄	60mg
Na ₂ HPO ₄	90mg
Γλυκόζη	1g

Διάλυμα λύσης παρασίτων	
Tris pH 9.5	40mM
EDTA	1mM
E-64	0.01mM

Διάλυμα ενυδάτωσης δείγματος (rehydration buffer) (10ml)	
8M urea	4.8g
2M thiurea	1.52g
4% (w/v) CHAPS	0.4g
2% (w/v) DTT	0.1g
2.4% (w/v) ASB14	0.24g
μπλε της βρωμοφαινόλης	5μl 0.1% (w/v) μπλε της βρωμοφαινόλης

Διάλυμα εμπλουτισμού δείγματος σε κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες (PEM Buffer)	
PIPES	0.1M
EGTA	5mM
MgCl ₂	2mM
NP40	1% (v/v)

Διάλυμα Εξισορρόπησης 1 μετά το πέρας της δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης	
Ουρία	6M
Tris-HCl pH 8.8	0.375M
SDS	2% (w/v)
Γλυκερόλη	20% (v/v)
DTT	2% (w/v)

Διάλυμα Εξισορρόπησης 2 μετά το πέρας της δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης	
Ουρία	6M
Tris-HCl pH 8.8	0.375M
SDS	2% (w/v)
Γλυκερόλη	20% (v/v)
Ιοδοακεταμίδιο	2.5% (w/v)

Θρεπτικό υλικό βακτηρίων

LB (Luria-Bertani, 1lt)*	
NaCl	10g
Τρυπτόνη	10g

Yeast extract	5g
---------------	----

*για την παρασκευή στερεού θρεπτικού υλικού προστίθεται άγαρ 1.5% (w/v).

Διαλύματα λύσης κυττάρων

Διάλυμα λύσης παρασίτων <i>Leishmania</i> για απομόνωση γενωμικού DNA	
NaCl	50mM
Tris-HCl, pH 7.4	50mM
EDTA	10mM

Διαλύματα για μεταβολική σήμανση και ανοσοκαθίζηση

Διάλυμα λύσης παρασίτων μετά τη μεταβολική σήμανση	
Tris-HCl pH 8.0	50mM
EDTA	10mM
SDS	1% (w/v)
PMSF	1mM
Πεπστατίνη	4μg/ml
Απροτινίνη	4μg/ml

Διάλυμα ανοσοκαθίζησης	
Tris-HCl pH 8.1	16.7mM
NaCl	167mM
EDTA	1.2mM
Triton X-100	1.1% (v/v)
SDS	0.01% (w/v)
PMSF	1mM
Πεπστατίνη	4μg/ml
Απροτινίνη	4μg/ml

Διαλύματα για χρήση με σφαιρίδια γλουταθειόνης

Διάλυμα λύσης βακτηρίων	
Λυσοζύμη	Μερικοί κόκκοι
Triton X-100	0.1% (v/v)
PMSF	1mM
Πεπστατίνη	4μg/ml
Απροτινίνη	4μg/ml

Διάλυμα πρόσδεσης (pH7.3)	
NaCl	140mM
KCl	2.7mM
Na ₂ HPO ₄	10mM
KH ₂ PO ₄	1.8mM

Διάλυμα έκλουσης (pH8.0)	
Tris-HCl	50mM
Ανηγμένη γλουταθειόνη	10mM

Διάλυμα λύσης παρασίτων	
Triton X-100	1% (v/v)
PMSF	1mM
Πεπστατίνη	2.5μg/ml
Απροτινίνη	1μg/ml

Διαλύματα απομόνωσης πλασμιδιακού DNA

Διάλυμα P1	
Tris-HCl, pH 8.0	50mM
EDTA	10mM
RNase A	100μg/ml

Διάλυμα P2	
NaOH	200mM
SDS	1% (w/v)

Διάλυμα P3	
Οξικό κάλιο (pH 5.0)	3M

Διαλύματα για την απομόνωση πρωτεϊνών με τη χρήση στήλης νικελίου

Διάλυμα λύσης βακτηρίων	
NaH ₂ PO ₄	50mM
NaCl	300mM
Λυσοζύμη	Μερικοί κόκκοι
Triton X-100	0.1% (v/v)
PMSF	1mM
Πεπστατίνη	4μg/ml
Απροτινίνη	4μg/ml
Ιμιδαζόλιο	20mM

Διάλυμα NP1 (pH 8.0 με NaOH)	
NaH ₂ PO ₄	50mM

Κεφάλαιο 3: Υλικά – Μέθοδοι

NaCl	300mM
Ιμιδαζόλιο	10mM

Διάλυμα DNPI1 (pH 8.0 με NaOH)	
NaH ₂ PO ₄	50mM
NaCl	300mM
Ιμιδαζόλιο	10mM
Ουρία	8M

Διάλυμα DNPI20 (pH 8.0 με NaOH)	
NaH ₂ PO ₄	50mM
NaCl	300mM
Ιμιδαζόλιο	20mM
Ουρία	8M

Διάλυμα DNPI250 (pH 8.0 με NaOH)	
NaH ₂ PO ₄	50mM
NaCl	300mM
Ιμιδαζόλιο	250mM
Ουρία	8M

Διαλύματα για απομόνωση RNA

Διάλυμα NETS 2X	
Tris-HCl, pH 8.0	10mM
EDTA	10mM
NaCl	100mM

Κεφάλαιο 3: Υλικά – Μέθοδοι

SDS	0.2% (w/v)
-----	------------

Διαλύματα για στύπωμα κατά Northern

Διάλυμα MOPS/EDTA 10X (pH 7.0)	
MOPS	0.2M
EDTA	0.01M
NaOAc	0.05M

Διάλυμα SSC 20X (pH 7.0)	
NaCl	3M
Trisodium citrate	300mM

Διάλυμα SSPE 5X (pH 7.4)	
NaCl	0.75M
NaH ₂ PO ₄	0.05M
EDTA	0.005M

Ρυθμιστικό διάλυμα “φόρτωσης” δείγματος RNA (loading buffer), 6X	
Deionised formamide	55% (v/v)
MOPS/EDTA 10X	11% (w/v)
Formaldehyde 37%	17.9% (v/v)
Glycerol	7.5% (v/v)
Μπλε της βρωμοφαινόλης	0.25% (w/v)
EtBr	0.033mg/ml

Διάλυμα Denhardt's 5X	
Ficoll type 400	0.1% (w/v)
Polyvinylpyrrolidone	0.1%
BSA	0.1% (w/v)

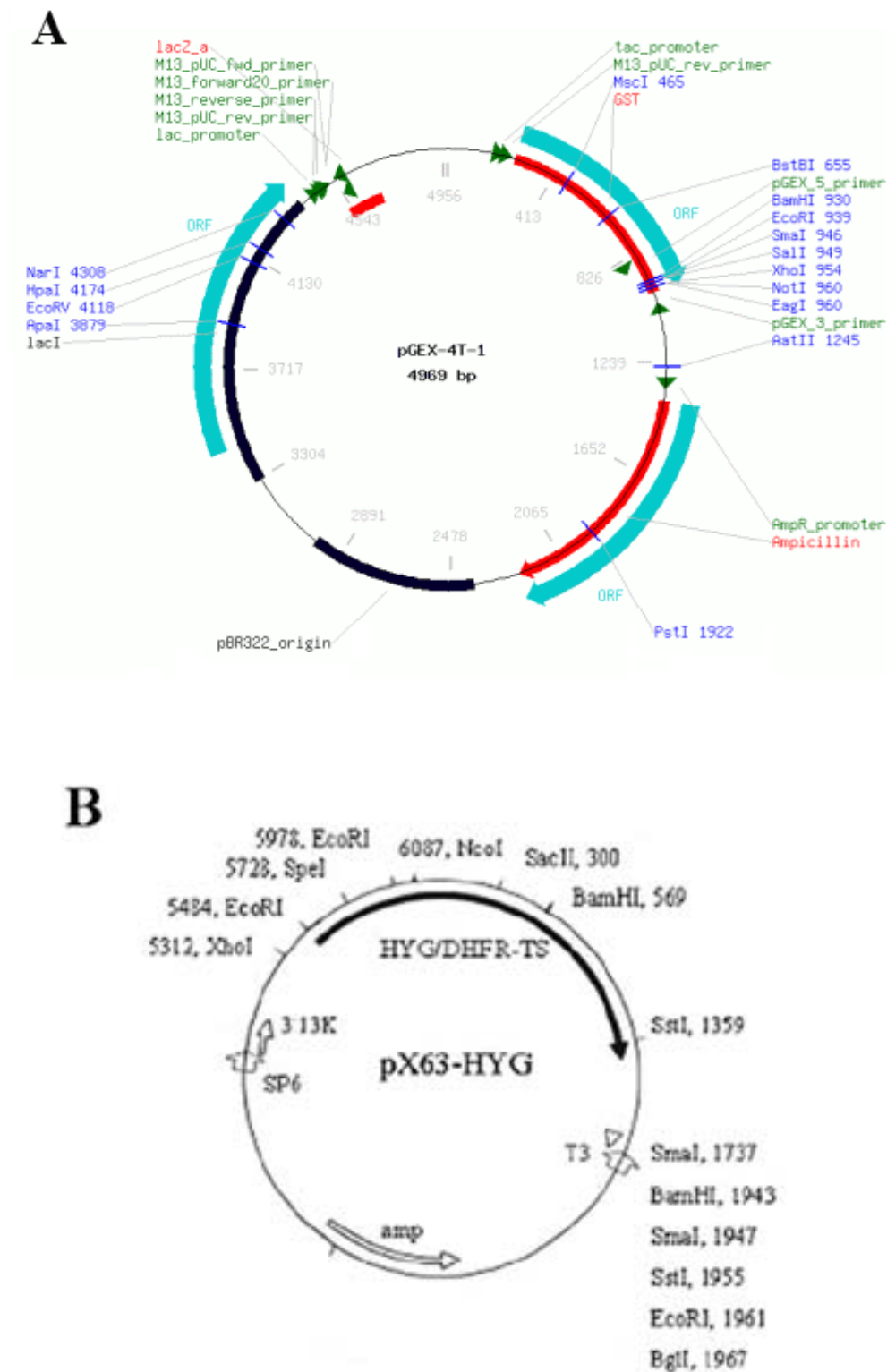
Διάλυμα TE	
Tris-HCl, pH 8.0	10mM
EDTA	1mM

3.1.6 Φορείς κλωνοποίησης – βακτηριακά στελέχη

3.1.6.1 Πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση της *LeishH1*.

Για την υπερέκφραση της *LeishH1* σε παράσιτα *L. donovani*, το γονίδιο που κωδικοποιεί την *LeishH1* ενισχύθηκε με PCR και κλωνοποιήθηκε στη θέση *Bgl* II του πλασμιδίου *pX63-HYG* (*pX63*) όπως αναφέρεται σε προηγούμενη δημοσίευση του εργαστηρίου (Smirlis et al., 2006). Ο πλασμιδιακός φορέας *pX63-HYG* φέρει το γονίδιο *hph* (*hygromycin phosphotransferase*), που προσδίδει ανθεκτικότητα έναντι της υδρομυκίνης B, ώστε να πραγματοποιηθεί η επιλογή των ανασυνδυασμένων παρασίτων.

Η *LeishH1* εκφράστηκε επίσης και σε βακτήρια *E. coli* (BL21) ως συζευγμένη πρωτεΐνη με την τρανσφεράση της γλουταθειόνης (*glutathione-S-transferase*, GST). Για το σκοπό αυτό το cDNA ενισχύθηκε μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και κλωνοποιήθηκε στις θέσεις *EcoRI/XhoI* του πλασμιδιακού φορέα *pGEX-4T1*, όπως αναφέρεται σε προηγούμενη δημοσίευση του εργαστηρίου (Smirlis et al., 2006).



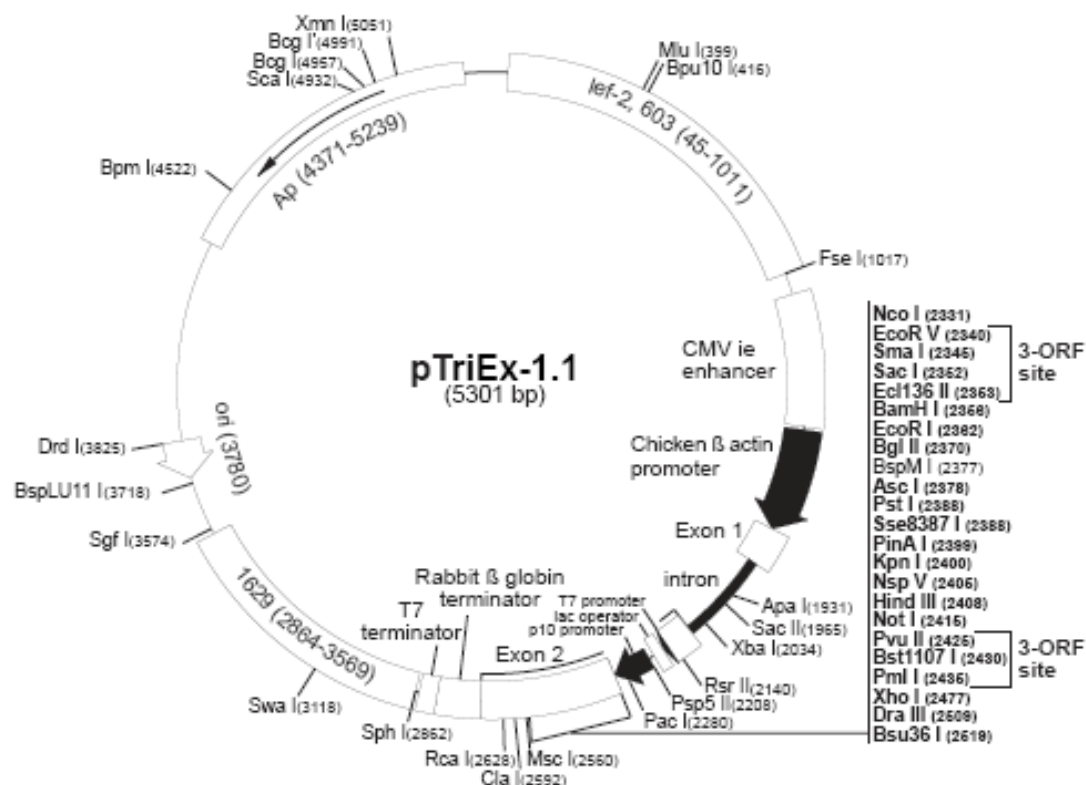
Εικόνα 12: Α. Ο πλασμιδιακός φορέας pGEX-4T1, Β. Ο πλασμιδιακός φορέας pX63-HYG.

3.1.6.2 Πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση τμημάτων των *LdHSP83* και *LdeEF-2*

Για την ετερόλογη έκφραση του καρβοξυτελικού τμήματος της *LdHSP83* (αμινοξέα 431-686, LinJ33_V3.0350) σε βακτήρια χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pTriex 1.1 (Novagen). Το τμήμα του γονιδίου ενισχύθηκε από γενωμικό DNA *L. donovani* με τη διαδικασία της PCR και κλωνοποιήθηκε στη θέση NcoI/NotI του πολυσυνδέτη, η οποία επιτρέπει την προσθήκη μιας αλληλουχίας έξι συνεχών καταλοίπων ιστιδίνης (6xHis tag) στο καρβοξυτελικό τμήμα της *LdHSP83*.

Για την ετερόλογη έκφραση του καρβοξυτελικού τμήματος της *LdeEF-2* (αμινοξέα 1-357, LinJ36_V3.0190) σε βακτήρια χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pTriex 1.1 όπως και παραπάνω. Το τμήμα του γονιδίου ενισχύθηκε από γενωμικό DNA *L. donovani* με τη διαδικασία της PCR και κλωνοποιήθηκε στη θέση NcoI/XhoI του πολυσυνδέτη, η οποία επιτρέπει την προσθήκη μιας αλληλουχίας έξι συνεχών καταλοίπων ιστιδίνης (6xHis tag) στο καρβοξυτελικό τμήμα της *LdeEF-2*.

Ο πλασμιδιακός φορέας pTriex 1.1 φέρει γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμικικιλίνη. Επίσης, περιέχει τον υποκινητή T7 της λακτόζης, ο οποίος επάγεται από το μόριο επαγωγέα β-ισοπρόπυλο-D-θειογαλακτοζίδιο (IPTG), με αποτέλεσμα την έκφραση των *LdHSP83* και *LdeEF-2* συντηγμένων με την αλληλουχία 6xHis tag. Τα βακτήρια έκφρασης *E. coli* BL21(DE3)pLysS χρησιμοποιήθηκαν για την έκφραση των ανασυνδυασμένων *LdHSP83*, *LdeEF-2*.



Εικόνα 13: Ο πλασμιδιακός φορέας pTriEx-1.1

3.1.6.3 Ο πλασμιδιακός φορέας pSP72aNEOαHSP83

Οι πλασμιδιακοί φορείς pSP72aNEOa και pSP72aNEOaHSP83 παραχωρήθηκαν από τους Καθηγητές B. Papadopoulos και M. Ouellette (Centre de recherche du CHUL and Division de Microbiologie, Faculte de Medecine, Universite Laval, Canada). Οι παραπάνω φορείς φέρουν γονίδιο που επιφέρει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό G418 (geneticin).

3.1.7 Εναρκτήρια μόρια

Οι αλληλουχίες των εναρκτήριων μορίων που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου *LdHSP83* από γενωμικό DNA *L. donovani* είναι οι εξής:

LdHSP83 πρόσθιος εκκινητής: 5'- CACACCATGGCGACGCTGAAGGACTACGTG-3'

LdHSP83 οπίσθιος εκκινητής: 5'- TATAGCGGCCGCGTCCACCTGCTCCATGCTG-3'

Το προϊόν της αντίδρασης PCR που ενισχύεται, έχει μήκος 255 ζεύγη βάσεων (bp). Τα εναρκτήρια μόρια σχεδιάστηκαν με βάση την αλληλουχία της *L. infantum* HSP83 (LinJ33_V3.0350, TriTryp).

Οι αλληλουχίες των εναρκτηρίων μορίων που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου *LdeEF-2* από γενωμικό DNA *L. donovani* είναι οι εξής:

LdeEF-2 πρόσθιος εκκινητής: 5'- GAGACCATGGTGAACCTTTACCGTCGATCAG-3'

LdeEF-2 οπίσθιος εκκινητής: 5'- TATACTCGAGGCCAGAGTACAGCATCTCCG-3'

Το προϊόν της αντίδρασης PCR που ενισχύεται, έχει μήκος 356 ζεύγη βάσεων (bp). Τα εναρκτήρια μόρια σχεδιάστηκαν με βάση την αλληλουχία του *L. infantum* eEF-2 (LinJ36_V3.0190, TriTryp).

3.1.8 Στελέχη παρασίτων

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη παρασίτων *L. donovani*, LG13, MON-31, MHOM/ET/0000/HUSSEN που ανήκουν στην τράπεζα παρασιτικών στελεών του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ.

Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω ανασυνδυασμένα παράσιτα που ονομάζονται σύμφωνα με το μετασχηματισμένο πλασμίδιο/φορέα έκφρασης:

- *L. donovani*, LG13 pX63
- *L. donovani*, LG13 pX63-LeishH1
- *L. donovani*, LG13 pX63pSP72aNEOa
- *L. donovani*, LG13 pX63pSP72aNEOaHSP83
- *L. donovani*, LG13 pX63-LeishH1pSP72aNEOa
- *L. donovani*, LG13 pX63-LeishH1pSP72aNEOaHSP83

3.2 Μέθοδοι

3.2.1 Απομόνωση γενωμικού DNA από παράσιτα

Για την απομόνωση γενωμικού DNA από παράσιτα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της φαινόλης. Τα παράσιτα φυγοκεντρούνται στις 1600rpm για 10 λεπτά. Αποχύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα πλένεται με προσθήκη 20ml PBS. Τα παράσιτα επαναφυγοκεντρούνται στις 1600rpm για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο αποχύνεται και προστίθεται διάλυμα λύσης σε αναλογία (ίζημα/διαλυμα λύσης) 1:10. Στη συνέχεια, προστίθεται SDS 0.5% (w/v), πρωτεΐνάση K 100μg/ml, RNase A 100μg/ml και το δείγμα επωάζεται για 5 ώρες στους 55°C. Μετά το πέρας της επώασης, προστίθεται ίσος όγκος φαινόλης και το δείγμα φυγοκεντρείται στις 3500rpm για 10 λεπτά. Συλλέγεται η ανώτερη υδατική φάση (που περιέχει το DNA) και σε αυτή προστίθεται ίσος όγκος φαινόλης/χλωροφορμίου 1:1 (v/v). Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 3500rpm για 10 λεπτά, προστίθεται ίσος όγκος χλωροφορμίου και επαναφυγοκεντρείται στις 3500rpm για 10 λεπτά. Η ανώτερη υδατική φάση συλλέγεται και το DNA κατακρημνίζεται με προσθήκη 1/10 του όγκου 3M οξικού νατρίου pH 5.2 και 2.5 όγκους αιθανόλης 100% (v/v). Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 3500rpm για 15 λεπτά, αποχύνεται το υπερκείμενο, προστίθεται ίσος όγκος αιθανόλης 70% (v/v) και επαναφυγοκεντρείται στις 3500rpm για 15 λεπτά. Ακολουθεί εξάτμιση του διαλύτη και αναδιάλυση του DNA σε ddH₂O. Η συγκέντρωση του DNA στο παρασκεύασμα προσδιορίζεται με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 260nm, με βάση τη σχέση $1 \text{ OD}_{260\text{nm}} = 50\mu\text{g DNA/ml διαλύματος}$.

Η καθαρότητα του DNA στο παρασκεύασμα προσδιορίζεται από το λόγο $\text{OD}_{260\text{nm}} / \text{OD}_{280\text{nm}}$ (φυσιολογικές τιμές $1,8 < x < 2,0$). Τέλος, η ποιότητα του DNA ελέγχεται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης.

3.2.2 Ενίσχυση PCR

Η PCR είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον πολλαπλασιασμό μιας αλληλουχίας DNA. Η ενζυμική αναπαραγωγή της αλληλουχίας αυτής καταλύεται από μια DNA πολυμεράση η οποία είναι ανθεκτική σε υψηλές θερμοκρασίες. Η DNA

πολυμεράση χρησιμοποιεί μονόκλωνο DNA ως εκμαγείο για τη σύνθεση μιας νέας συμπληρωματικής αλυσίδας, αλλά χρειάζεται ένα μικρό προϋπάρχον τμήμα δίκλωνου DNA για να ξεκινήσει τη σύνθεση. Γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιούνται δυο ολιγονουκλεοτίδια (εκκινητές, primers) ως εναρκτήρια μόρια για τον πολυμερισμό των συμπληρωματικών αλυσίδων DNA. Τα ολιγονουκλεοτίδια που θα χρησιμοποιηθούν ως εκκινητές πρέπει να δεσμεύονται σε θέσεις αντίθετες από την αλληλουχία που πρόκειται να ενισχυθεί, δηλαδή καθορίζουν τα άκρα του θραύσματος DNA που πρόκειται να ενισχυθεί. Τα βασικά κριτήρια που πρέπει να πληρούν οι εκκινητές έτσι ώστε να εξασφαλίζεται η πιστότητα της όλης διαδικασίας είναι: α) το μήκος τους να είναι μεγαλύτερο από 17 βάσεις, β) η θερμοκρασία «τήξης» του δίκλωνου DNA, όπου λαμβάνει χώρα ο αποχωρισμός των αλυσίδων (T_m) να είναι στο εύρος 50-65°C, γ) η περιεκτικότητα στις βάσεις GC να είναι 50-60%, δ) να μην είναι συμπληρωματικοί μεταξύ τους, έτσι ώστε να προλαμβάνεται ο πολυμερισμός τους.

Ένας κύκλος μιας αντίδρασης PCR περιλαμβάνει τρία στάδια. Στο πρώτο στάδιο πραγματοποιείται η αποδιάταξη (denaturation) του DNA εκμαγείου με θέρμανση. Στο δεύτερο στάδιο, η θερμοκρασία ελαττώνεται έτσι ώστε να μπορέσει να πραγματοποιηθεί η προσαρμογή και υβριδοποίηση (annealing) των εκκινητών με τις συμπληρωματικές αλυσίδες του εκμαγείου DNA. Τέλος, οι νέες αλυσίδες DNA πολυμερίζονται (extension) από τη DNA πολυμεράση. Ο κύκλος αυτός των τριών σταδίων επαναλαμβάνεται πολλές φορές και τα προϊόντα κάθε κύκλου χρησιμοποιούνται ως μήτρα DNA στους επόμενους κύκλους. Στην παρούσα εργασία, η PCR χρησιμοποιήθηκε για:

- Την ενίσχυση της αλληλουχίας *LdHSP83* από γενωμικό DNA
- Την ενίσχυση της αλληλουχίας *LdeEF-2* από γενωμικό DNA

A. Ενίσχυση της αλληλουχίας *LdHSP83* από γενωμικό DNA

Το εκμαγείο DNA που χρησιμοποιήθηκε ήταν γενωμικό DNA από παράσιτα *L. donovani*, LG13. Το μίγμα της αντίδρασης PCR ακολουθεί:

Κεφάλαιο 3: Υλικά – Μέθοδοι

Ρυθμιστικό διάλυμα Phusion DNA πολυμεράσης	20μl
dNTPs (10mM)	2μl
HSP83 πρόσθιος εκκινητής (50pmol/μl)	1μl
HSP83 οπίσθιος εκκινητής (50pmol/μl)	1μl
ddH ₂ O	74μl
DNA (100ng/μl)	1μl
<u>Phusion DNA πολυμεράση (2U/μl)</u>	<u>1μl</u>
Τελικός όγκος αντίδρασης	100μl

Το πρόγραμμα της αντίδρασης PCR που χρησιμοποιήθηκε ήταν το εξής:

➤ Αρχική αποδιάταξη	98°C	1 λεπτό
---------------------	------	---------

Επτά κύκλοι με τις παρακάτω συνθήκες

• Αποδιάταξη	98 °C	10 δευτερόλεπτα
• Υβριδοποίηση	50 °C	20 δευτερόλεπτα
• Πολυμερισμός	72 °C	45 δευτερόλεπτα

Είκοσι οχτώ κύκλοι με τις παρακάτω συνθήκες

• Αποδιάταξη	98 °C	10 δευτερόλεπτα
• Υβριδοποίηση	56 °C	20 δευτερόλεπτα
• Πολυμερισμός	72 °C	45 δευτερόλεπτα
➤ Τελικός πολυμερισμός	72 °C	10 λεπτά

Η αντίδραση τερματίζεται στους 4 °C.

Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης PCR τα προϊόντα αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης 1% (w/v).

B. Ενίσχυση της αλληλουχίας *LdeEF-2* από γενωμικό DNA

Το εκμαγείο DNA που χρησιμοποιήθηκε ήταν γενωμικό DNA από παράσιτα *L. donovani*, LG13. Το μίγμα της αντίδρασης PCR ακολουθεί:

Ρυθμιστικό διάλυμα Phusion DNA πολυμεράσης	20μl
dNTPs (10mM)	2μl
eEF-2 πρόσθιος εκκινητής (50pmol/μl)	1μl
eEF-2 οπίσθιος εκκινητής (50pmol/μl)	1μl
ddH ₂ O	74μl

DNA (100ng/μl)	1μl
<u>Phusion DNA πολυμεράση (2U/μl)</u>	<u>1μl</u>
Τελικός όγκος αντίδρασης	100μl

Το πρόγραμμα της αντίδρασης PCR που χρησιμοποιήθηκε ήταν το εξής:

- | | | |
|---------------------|------|---------|
| ➤ Αρχική αποδιάταξη | 98°C | 1 λεπτό |
|---------------------|------|---------|

Επτά κύκλοι με τις παρακάτω συνθήκες

- | | | |
|----------------|-------|-----------------|
| • Αποδιάταξη | 98 °C | 10 δευτερόλεπτα |
| • Υβριδοποίηση | 50 °C | 20 δευτερόλεπτα |
| • Πολυμερισμός | 72 °C | 45 δευτερόλεπτα |

Είκοσι οχτώ κύκλοι με τις παρακάτω συνθήκες

- | | | |
|------------------------|-------|-----------------|
| • Αποδιάταξη | 98 °C | 10 δευτερόλεπτα |
| • Υβριδοποίηση | 55 °C | 20 δευτερόλεπτα |
| • Πολυμερισμός | 72 °C | 45 δευτερόλεπτα |
| ➤ Τελικός πολυμερισμός | 72 °C | 10 λεπτά |

Η αντίδραση τερματίζεται στους 4 °C.

Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης PCR τα προϊόντα αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% (w/v).

3.2.3 Ανάλυση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ανάλυση των μορίων DNA πραγματοποιήθηκε με βάση το μέγεθός τους με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου σε οριζόντιο σύστημα πηκτώματος αγαρόζης. Κατά την ηλεκτροφόρηση, τα αρνητικά φορτισμένα μόρια DNA, μετακινούνται προς το θετικό πόλο με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη προς το μέγεθός τους. Ανάλογα με το μέγεθος των προς ανάλυση μορίων, χρησιμοποιήθηκαν οριζόντια πηκτώματα αγαρόζης 1-2% (w/v) σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης TBE 1x παρουσία 0,5μg/ml βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr). Τα δείγματα DNA μετά την προσθήκη διαλύματος «φόρτωσης» δείγματος, ηλεκτροφορήθηκαν σε διάλυμα TBE 1x σε θερμοκρασία δωματίου με σταθερό ρεύμα τάσης 90volts. Παράλληλα με τα δείγματα αναλύθηκαν τμήματα DNA γνωστών μοριακών μεγεθών. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα εξετέθη σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV) μήκους

κύματος 302nm, οπότε και έγιναν ορατές οι θέσεις που είχαν μεταναστεύσει τα τμήματα DNA με βάση το μέγεθός τους. Τέλος, το πήκτωμα αгарόζης φωτογραφήθηκε με τη χρήση συστήματος φωτογράφισης.

3.2.4 Απομόνωση και καθαρισμός DNA από πήκτωμα αгарόζης

Για την απομόνωση και τον καθαρισμό DNA από πήκτωμα αгарόζης, χρησιμοποιήθηκαν παρασκευαστικά πηκτώματα αгарόζης. Συγκεκριμένα, το τμήμα της αгарόζης που περιέχει το επιθυμητό τμήμα DNA αποκόπτεται από το πήκτωμα με χρήση αποστειρωμένης λεπίδας μιας χρήσης και εν συνεχεία το DNA απομονώνεται και καθαρίζεται με τη χρήση του Nucleospin Extract II (Macherey-Nagel), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η διαδικασία ακολουθεί συνοπτικά

Το κομμάτι που περιέχει τη ζώνη DNA ενδιαφέροντος, αποκόπηκε από το πήκτωμα και ζυγίστηκε. Σε αυτό προστέθηκε ποσότητα διαλύματος NTI ανάλογη του βάρους του κομματιού πηκτώματος (200μl NTI/100mg πηκτώματος). Το δείγμα θερμαίνεται σε θερμοκρασία 50°C για 5-10 λεπτά μέχρι να λιώσει το πήκτωμα. Ακολούθως το δείγμα τοποθετείται στην ειδική στήλη και φυγοκεντρείται για 30 δευτερόλεπτα στα 11 000g. Η στήλη πλένεται μια φορά με 700μl διαλύματος NT3 και ακολούθως αφήνεται να στεγνώσει. Τέλος το DNA που έχει προσδεθεί στη στήλη εκλούεται με προσθήκη 25μl ddH₂O.

Η συγκέντρωση και η ποιότητα του απομονωμένου DNA ελέγχονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης.

3.2.5 Καθαρισμός προϊόντων PCR

Για τον καθαρισμό των προϊόντων που προέκυψαν από την αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκε το Nucleospin Extract II (Macherey-Nagel), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ο καθαρισμός έχει στόχο την απομάκρυνση αλάτων, ολιγονουκελοτιδίων και άλλων πιθανών προσμίξεων από το δείγμα. Η διαδικασία ακολουθεί συνοπτικά.

Στο δείγμα της PCR προστέθηκε διπλάσιος όγκος διαλύματος NTI και ακολούθως το δείγμα τοποθετήθηκε στην ειδική στήλη. Ακολούθησε φυγοκέντρηση 30 δευτερόλεπτα στα 11 000g. Η στήλη πλύθηκε μια φορά με 700μl διαλύματος NT3 και αφέθηκε να στεγνώσει. Τέλος το DNA που έχει προσδεθεί στη στήλη εκλούστηκε με προσθήκη 25μl ddH₂O.

3.2.6 Πέψη του DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένα είδος ενζύμων που αναγνωρίζουν μικρές αλληλουχίες DNA και κόβουν το δίκλωνο DNA σε συγκεκριμένες θέσεις στο εσωτερικό ή σε γειτονικό σημείο της αλληλουχίας αναγνώρισης. Μια μονάδα (1U) περιοριστικής ενδονουκλεάσης είναι η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για την πλήρη πέψη 1μg καθαρού DNA σε χρόνο 60 λεπτών. Σε ορισμένες περιπτώσεις επειδή το DNA που χρησιμοποιείται είναι μερικώς καθαρισμένο, απαιτείται μεγαλύτερος χρόνος ή/και μεγαλύτερη ποσότητα ενζύμου για να ολοκληρωθεί η πέψη. Επίσης, το κάθε περιοριστικό ένζυμο απαιτεί ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα για να μπορέσει να λειτουργήσει.

Για όλες τις πέψεις με περιοριστικές ενδονουκλεάσες που πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιήθηκε η ακόλουθη αναλογία:

2-3U περιοριστικής ενδονουκλεάσης/1μg DNA/20μl (τελικός όγκος αντίδρασης).

Αξίζει να αναφερθεί ότι ο όγκος της περιοριστικής ενδονουκλεάσης που χρησιμοποιήθηκε δεν ξεπέρασε σε καμία περίπτωση το 1/10 του τελικού όγκου της αντίδρασης, καθώς η γλυκερόλη που περιέχεται στο διάλυμα φύλαξης του ενζύμου ενδέχεται να επηρεάσει την αντίδραση.

3.2.7 Αντίδραση σύνδεσης του προϊόντος της αντίδρασης PCR σε πλασμιδιακό φορέα

Για να μπορέσει να ενσωματωθεί το προϊόν της PCR στον πλασμιδιακό φορέα επιλογής, πρέπει ο τελευταίος να υποστεί πέψη με τις ίδιες περιοριστικές ενδονουκλεάσες που χρησιμοποιήθηκαν και για την πέψη του προϊόντος της PCR.

Επίσης, μετά το πέρας της πέψης ο πλασμιδιακός φορέας πρέπει να αποφωσφορυλιωθεί, έτσι ώστε να αποκλειστεί η πιθανότητα επανασύνδεσης των άκρων του που έχουν προκύψει από τη δράση των περιοριστικών ενδονουκλεασών. Για την αποφωσφορυλίωση χρησιμοποιήθηκε η αλκαλική φωσφατάση από έντερο μοσχαριού (calf intestinal alkaline phosphatase, CIP), η οποία αποφωσφορυλώνει τα 5' άκρα του γραμμικού πλασμιδιακού DNA. Η αποφωσφορυλίωση πραγματοποιήθηκε με ανάμιξη 10μg γραμμικού πλασμιδιακού DNA και 10U CIP σε ρυθμιστικό διάλυμα αποφωσφορύλιωσης και επώαση στους 37 °C για 20 λεπτά.

Στη συνέχεια ακολουθεί η αντίδραση σύνδεσης του γραμμικού πλασμιδιακού DNA με το προϊόν της PCR με τη χρήση της T4 DNA λιγάσης. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 10μl με την προσθήκη του γραμμικού πλασμιδιακού DNA, την αντίστοιχη ποσότητα του προς κλωνοποίηση μορίου DNA, την προσθήκη 1U T4 DNA λιγάσης (1U/μl) και 1μl ρυθμιστικού διαλύματος λιγάσης (10x). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στους 16 °C για 16 ώρες και η επιτυχία της αντίδρασης ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

3.2.8 Μετασχηματισμός βακτηρίων

Ανάλογα με τα επιδεκτικά βακτήρια που χρησιμοποιούνται ο μετασχηματισμός τους μπορεί να είναι είτε χημικός είτε με ηλεκτροδιάτρηση. Ο χημικός μετασχηματισμός χρησιμοποιήθηκε για τα βακτήρια *E. coli* TOP10F και τα βακτήρια έκφρασης *E. coli* BL21(DE3)pLysS, ενώ ο μετασχηματισμός με ηλεκτροδιάτρηση για τα βακτήρια *E. coli* DH5a.

Η διαδικασία του χημικού μετασχηματισμού περιγράφεται στη συνέχεια. Αναμίχθηκαν 50μl επιδεκτικών κυττάρων (που διατηρούνται στους -80°C) με 1μl (~50ng) DNA από την αντίδραση σύνδεσης. Το μίγμα διατηρήθηκε στον πάγο για 15 λεπτά. Τα κύτταρα ακολούθως τοποθετήθηκαν στους 42 °C για 90 δευτερόλεπτα και αμέσως μετά στον πάγο όπου και διατηρήθηκαν για διάστημα 5 λεπτών. Εν συνεχεία, στα κύτταρα προστέθηκε 1ml θρεπτικού υλικού LB και επώαστηκαν στους 37°C για διάστημα 1 ώρας σε επωαστικό θάλαμο υπό ανάδευση (170 στροφές/λεπτό). Μετά το πέρας της επώασης τα μετασχηματισμένα βακτήρια επιστρώθηκαν σε στερεό θρεπτικό υλικό LB που περιέχει το αντιβιοτικό επιλογής

(στη συγκεκριμένη περίπτωση αμπικιλίνη, 100μg/ml). Το τρυβλίο επώαστηκε στους 37°C για 16 ώρες. Από τις αποικίες που προέκυψαν, συλλέχθηκαν ορισμένες (~15) προκειμένου να ελεγχθεί η αντίδραση ανασυνδυασμού.

Ο μετασχηματισμός των βακτηρίων *E. coli* DH5a πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροδιάταση (electroporation) ως εξής: Αναμίχθηκαν 50μl επιδεκτικών βακτηρίων και 1-2μl (~50ng DNA) από την αντίδραση σύνδεσης, μεταφέρθηκαν σε κυψελίδα 0,1cm, και επώαστηκαν στον πάγο για 1 λεπτό. Η συσκευή Gene Pulser ρυθμίστηκε στα 25μF και 1,8KV και η συσκευή Pulse Controller στα 200Ωhm. Εφαρμόστηκε τάση στα άκρα της κυψελίδας με την ενεργοποίηση της συσκευής που παράγει τον ηλεκτρικό παλμό. Για να είναι επιτυχής ο μετασχηματισμός των βακτηρίων ο ηλεκτρικός παλμός πρέπει να παρουσιάζει χρόνο εκπόλωσης (time constant) 4,5-5msec. Αμέσως μετά τον παλμό, προστέθηκε 1ml θρεπτικού υλικού LB χωρίς αντιβιοτικό στην κυψελίδα και τα μετασχηματισμένα βακτήρια επώαστηκαν στους 37°C για 1 ώρα. Μετά την επώαση, τα βακτήρια επιστρώθηκαν σε στερεό θρεπτικό LB σε τρυβλίο παρουσία αντιβιοτικού επιλογής (στη συγκεκριμένη περίπτωση αμπικιλίνη, 100μg/ml). Το τρυβλίο επώαστηκε στους 37°C για 16 ώρες. Από τις αποικίες που προέκυψαν, συλλέχθηκαν ορισμένες (~15) προκειμένου να ελεγχθεί η αντίδραση ανασυνδυασμού.

3.2.8.1 Προετοιμασία επιδεκτικών κυττάρων *E. coli* BL21(DE3)pLysS

Βακτήρια προερχόμενα από αποθηκευμένο κλώνο στους -80oC, επιστρώθηκαν σε στερεό θρεπτικό LB σε τρυβλίο παρουσία αντιβιοτικού επιλογής (στη συγκεκριμένη περίπτωση αμπικιλίνη, 100μg/ml). Την επόμενη ημέρα μια αποικία επιλέχθηκε και επώαστηκε σε 10ml υγρού θρεπτικού υλικού LB παρουσία αντιβιοτικού επιλογής (στη συγκεκριμένη περίπτωση αμπικιλίνη, 100μg/ml) σε θερμοκρασία 37°C. Τα βακτήρια αναπτύχθηκαν μέχρι την μέση-λογαριθμική φάση ανάπτυξης έτσι ώστε η συγκέντρωσή τους να μην υπερβαίνει τα 10⁸ κύτταρα/ml. Στη συνέχεια τα βακτήρια επώαστηκαν στον πάγο για 10 λεπτά και φυγοκεντρήθηκαν στα 2500g για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το βακτηριακό ίζημα

επαναιωρήθηκε σε 10ml στείρου παγωμένου διαλύματος 0.1M CaCl_2 . Τα επαναιωρημένα βακτήρια επώστηκαν στον πάγο για ακόμα 10 λεπτά. Επαναλήφθηκε η φυγοκέντρηση όπως και προηγουμένως. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το βακτηριακό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 2ml 0.1M CaCl_2 . Τα επαναιωρημένα βακτήρια μοιράζονται σε ποσότητες 100-200μl και φυλάσσονται στους -80°C .

3.2.8.2 Προετοιμασία επιδεκτικών κυττάρων *E. coli* DH5α

Βακτήρια προερχόμενα από αποθηκευμένο κλώνο στους -80°C , επιστρώθηκαν σε στερεό θρεπτικό LB σε τρυβλίο παρουσία αντιβιοτικού επιλογής. Την επόμενη ημέρα μια αποικία επιλέχθηκε και επώστηκε σε 10ml υγρού θρεπτικού υλικού LB παρουσία αντιβιοτικού επιλογής (στη συγκεκριμένη περίπτωση αμπικιλίνη, 100μg/ml). Την επόμενη ημέρα η καλλιέργεια των 10ml ενσωματώθηκε σε 1l θρεπτικού υλικού LB και επώστηκε μέχρι η τιμή της οπτικής πυκνότητας να φτάσει την τιμή 0.6 ($\text{OD}_{600}=0.6$). Ακολούθως η βακτηριακή καλλιέργεια επώστηκε στον πάγο για 15 λεπτά και φυγοκεντρήθηκε στα 1500g για 15 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C . Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το βακτηριακό ίζημα πλύθηκε δυο φορές με 250ml παγωμένου ddH₂O. Το βακτηριακό ίζημα που προέκυψε επαναιωρείται με την προσθήκη 10ml παγωμένου διαλύματος 10% (v/v) γλυκερόλης. Τα βακτήρια φυγοκεντρήθηκαν και το υπερκείμενο απορρίφθηκε. Τέλος, το βακτηριακό ίζημα επαναιωρήθηκε σε ίσο όγκο παγωμένου διαλύματος 10% (v/v) γλυκερόλης. Τα επαναιωρημένα βακτήρια μοιράζονται σε ποσότητες 100-200μl και φυλάσσονται στους -80°C .

3.2.9 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργεια βακτηρίων σε μικρή κλίμακα

Για να μπορέσουμε να ελέγξουμε την ορθότητα των θετικά μετασχηματισμένων αποικιών χρησιμοποιήθηκε η απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini prep). Με τη μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται η απομόνωση

μικρής ποσότητας πλασμιδιακού DNA από υγρές καλλιέργειες μικρού όγκου (~2ml) εμβολιασμένες με αποικίες μετασχηματισμένων βακτηρίων. Η διαδικασία της μεθόδου ακολουθεί.

Μία αποικία μετασχηματισμένων βακτηρίων εμβολιάστηκε σε 2ml θρεπτικού υλικού LB παρουσία αντιβιοτικού (στη συγκεκριμένη περίπτωση αμπικιλίνη, 100μg/ml) και επώαστηκε με ανάδευση στους 37°C για περίπου 16 ώρες. Το ίζημα των βακτηριακών κυττάρων, μετά από φυγοκέντρηση, επαναδιαλύθηκε με έντονη ανάδευση σε 100μl διαλύματος P1. Προστέθηκαν 200μl διαλύματος P2 (διάλυμα λύσης) και ακολούθησε επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστέθηκαν 150μl διαλύματος P3 και το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 10.000rpm για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο περιέχει πλασμιδιακό DNA και RNA, ενώ το χρωμοσωμικό DNA συμπαρασύρεται από τα βακτηριακά υπολείμματα στο ίζημα. Στο υπερκείμενο προστέθηκε 1ml αιθανόλης 100% (v/v), η οποία κατακρημνίζει το πλασμιδιακό DNA και το RNA. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 10.000rpm για 10 λεπτά και απομάκρυνση του υπερκειμένου. Το ίζημα πλύθηκε με αιθανόλη 70% (v/v) και, μετά την εξάτμιση του διαλύτη, αναδιαλύθηκε σε 40μl ddH₂O. Το πλασμιδιακό DNA ελέγχθηκε με πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες, οπότε και εντοπίστηκαν οι κλώνοι που φέρουν το επιθυμητό ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.

3.2.10 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργεια βακτηρίων σε μεγάλη κλίμακα

Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα (maxi prep) χρησιμοποιείται για την απομόνωση μεγάλης ποσότητας πλασμιδιακού DNA υψηλής καθαρότητας, που απαιτείται σε περιπτώσεις κλωνοποίησης τμημάτων DNA, βακτηριακού μετασχηματισμού και έκφρασης ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε πλασμιδιακό φορέα. Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα χρησιμοποιήθηκε το σύστημα Nucleobond Xtra Midi/Maxi (Macherey-Nagel), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η μέθοδος ακολουθεί συνοπτικά:

Η βακτηριακή καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε για 30 λεπτά στα 1500g σε θερμοκρασία 4°C. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το βακτηριακό ίζημα

επαναιωρήθηκε με την προσθήκη 8ml διαλύματος RES και 8ml διαλύματος LYS. Ακολούθησε ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Εν τω μεταξύ η ειδική στήλη εξισσοροπείται με την προσθήκη 12ml διαλύματος EQU. Στο βακτηριακό εναιώρημα προστέθηκαν 8ml διαλύματος NEU και ακολούθησε ήπια ανάδευση για 5 λεπτά. Στη συνέχεια το βακτηριακό λύμα τοποθετήθηκε στην ειδική στήλη και εφόσον σταμάτησε η εκροή, ακολούθησε πλύση της στήλης με 5ml διαλύματος EQU και στη συνέχεια με 8ml διαλύματος WASH. Τέλος το πλασμιδιακό DNA που είχε δεσμευθεί στη στήλη εκλούστηκε με την προσθήκη 5ml διαλύματος ELU. Στην έκλουση προστέθηκαν 3.5ml διαλύματος ισοπροπανόλης και το μείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 15000g για 30 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα πλύθηκε με 2ml διαλύματος 70% (v/v) αιθανόλης. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το πλασμιδιακό DNA επαναιωρήθηκε με την προσθήκη 100μl ddH₂O.

Η συγκέντρωση και η ποιότητα του απομονωμένου DNA ελέγχονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης.

3.2.11 Υγρή και στερεή καλλιέργεια βακτηρίων-Φύλαξη βακτηρίων

Η καλλιέργεια των διαφόρων βακτηριακών στελεχών *E. coli* πραγματοποιήθηκε στο θρεπτικό μέσο LB, παρουσία του απαιτούμενου αντιβιοτικού. Οι υγρές καλλιέργειες των βακτηρίων πραγματοποιήθηκαν σε άσηπτους σωλήνες των 15 και 50ml και σε κωνικές φλάσκες των 500, 1000 και 2000ml, με συνεχή ανάδευση σε επωαστικούς θαλάμους, στους 37°C υπό ανάδευση και για τον απαιτούμενο χρόνο επώασης. Οι στερεές καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε τρυβλία Petri, με θρεπτικό υλικό LB που περιέχει άγαρ 1,5% (w/v), παρουσία του απαιτούμενου αντιβιοτικού. Η επώαση πραγματοποιήθηκε για 16-24 ώρες στους 37°C.

Τα βακτήρια φυλάσσονται για μεγάλα χρονικά διαστήματα στους -20°C και -80°C σε θρεπτικό υλικό παρουσία γλυκερόλης 50% (v/v). Οι υγρές καλλιέργειες μπορούν να διατηρηθούν στους 4°C για διάστημα 3-4 ημερών. Οι στερεές

καλλιέργειες διατηρούνται επίσης στους 4°C για διάστημα που κυμαίνεται από αρκετές ημέρες έως και μερικές εβδομάδες

3.3 Απομόνωση πρωτεϊνών από βακτήρια

3.3.1 Επαγωγή των βακτηρίων έκφρασης *E. coli* BL21

Η επαγωγή των βακτηρίων αυτών, πραγματοποιήθηκε με προσθήκη IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) στο υλικό της καλλιέργειας ως εξής:

Μία αποικία μετασχηματισμένων βακτηρίων εμβολιάστηκε σε υγρή καλλιέργεια θρεπτικού υλικού LB (2ml) παρουσία του απαιτούμενου αντιβιοτικού και επώαστηκε στους 37 °C για 16 ώρες. Από την παραπάνω υγρή καλλιέργεια 1ml εμβολιάστηκε σε νέα υγρή καλλιέργεια 10ml και επώαστηκε στους 37 °C για 16 ώρες. Στη συνέχεια, εμβολιάστηκαν 10ml από την καλλιέργεια του προηγούμενου σταδίου σε 500ml θρεπτικού υλικού LB, που περιέχει 100μg/ml αμπικιλίνη και ακολούθησε επώαση με ανάδευση (170 στροφές/λεπτό) στους 37°C, μέχρι η οπτική πυκνότητα (O.D._{600nm}) της καλλιέργειας να είναι ίση με 0.6. Στο σημείο αυτό έγινε προσθήκη IPTG σε τελική συγκέντρωση 1mM και ακολούθησε περαιτέρω επώαση της καλλιέργειας στους 37°C για 3 ώρες. Μετά το πέρας των 3 ωρών, η καλλιέργεια συλλέχθηκε και φυγοκεντρήθηκε στις 4.000rpm για 30 λεπτά στους 4°C και απομακρύνθηκε το υπερκείμενο. Το βακτηριακό ίζημα μπορεί να διατηρηθεί στους -80°C μέχρι τη λύση του.

Ακολούθησε λύση του βακτηριακού ιζήματος με 25ml διαλύματος λύσης. Το βακτηριακό λύμα διαλυτοποιήθηκε επιπλέον με τη χρήση υπερήχων (5-6 κύκλοι των 30 δευτερολέπτων με αντίστοιχο χρονικό διάλειμμα, μέχρις ότου μειωθεί το ιώδες του λύματος) και φυγοκεντρήθηκε στις 14.000rpm για 15 λεπτά στους 4°C. Συλλέχθηκε το υπερκείμενο, που περιέχει το σύνολο των βακτηριακών πρωτεϊνών σε αποδιαταγμένη μορφή.

3.3.2 Απομόνωση των *LdHSP83-(His)₆*, *LdeEF-2-(His)₆* από βακτήρια

Η αλληλουχία των έξι συνεχόμενων καταλοίπων ιστιδίνης στο τέλος των πρωτεϊνικών τμημάτων των *LdHSP83*, *LdeEF-2* επιτρέπει τον καθαρισμό τους με

χρωματογραφία συγγένειας σε στήλη νικελίου (Ni^{2+} -NTA-ρητίνη). Οι πρωτεΐνες προσδένονται με υψηλή συγγένεια στη στήλη νικελίου σε pH 8.0, καθώς σε αυτή την τιμή pH τα κατάλοιπα ιστιδίνης φορτίζονται αρνητικά και ενώνονται με το κατιόν νικελίου. Το NTA (nitrilotriacetic acid) αποτελεί ένα τετραδοντικό χηλικό συνδέτη που καταλαμβάνει τις τέσσερις από τις έξι διαθέσιμες θέσεις δέσμησης του Ni^{2+} . Οι υπόλοιπες δυο θέσεις δέσμησης καταλαμβάνονται συνήθως από μόρια H_2O τα οποία μπορούν να αντικατασταθούν από τα κατάλοιπα ιστιδίνης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Εφόσον οι πρωτεΐνες που μας ενδιαφέρουν συνδεθούν στη ρητίνη, η έκλουση τους πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας ιμιδαζόλιο (δομικό ανάλογο της ιστιδίνης) σε υψηλή συγκέντρωση που δρα ανταγωνιστικά ως προς τις πρωτεΐνες.

Για την απομόνωση των *LdHSP83*, *LdeEF-2* χρησιμοποιήθηκε το Protino Ni-NTA agarose kit (Macherey-Nagel) ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η μέθοδος ακολουθεί συνοπτικά:

Το βακτηριακό ίζημα που έχει προκύψει από την καλλιέργεια λύθηκε με την προσθήκη 10ml διαλύματος λύσης. Το εναιώρημα υποβλήθηκε σε δέκα συνεχόμενους κύκλους υπερήχησης του ενός λεπτού με διάλειμμα 30 δευτερολέπτων, σε θερμοκρασία 4°C. Το βακτηριακό λύμα φυγοκεντρήθηκε στα 10000g για 30 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C και το υπερκείμενο απορρίφθηκε. Στη συνέχεια το ίζημα πλύθηκε μια φορά με 10ml διαλύματος NP10 και φυγοκεντρήθηκε στα 10000g για 30 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε εκ νέου και το ίζημα διαλυτοποιήθηκε με την προσθήκη 2ml διαλύματος DNPI10. Το δείγμα ανακινήθηκε για μια ώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και ακολούθως φυγοκεντρήθηκε στα 10000g για 30 λεπτά. Το υπερκείμενο κρατήθηκε και προστέθηκε σε 200μl σφαιριδίων Ni-NTA. Ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 2 ώρες υπό ανάδευση.

Μετά το πέρας της ανάδευσης, το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στα 500g για 5 λεπτά και τα σφαιρίδια που προέκυψαν υποβλήθηκαν σε δυο διαδοχικές πλύσεις με 5ml διαλύματος DNPI20. Τέλος πραγματοποιήθηκαν τρεις διαδοχικές εκλούσεις με 200μl διαλύματος DNPI250.

3.4 Ανοσοαποτύπωμα κατά Western

3.4.1 Ανάλυση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Ο διαχωρισμός και η αναγνώριση των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με βάση το μοριακό τους βάρος, με ηλεκτροφόρηση σε κάθετο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου παρουσία θειϊκού δωδεκακυλικού νατρίου (SDS), ακολουθώντας τη μέθοδο του Laemmli (Laemmli, 1970). Το SDS διασπά τους υπάρχοντες δισουλφιδικούς δεσμούς απελευθερώνοντας έτσι τις πολυπεπτιδικές αλυσίδες και συνδέεται με αυτές ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Το προηγούμενο φορτίο των πρωτεϊνών εξουδετερώνεται και πλέον οι πρωτεΐνες καθίστανται αρνητικά φορτισμένες. Έτσι κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης οι πρωτεΐνες μετακινούνται προς το θετικό πόλο με βάση το μοριακό τους βάρος και με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη προς αυτό.

Κατά την ηλεκτροφόρηση οι πρωτεΐνες τοποθετήθηκαν αρχικά στο πήκτωμα συσσώρευσης που είναι χαμηλής περιεκτικότητας σε ακρυλαμίδιο (12% w/v), και στη συνέχεια μετακινήθηκαν και διαχωρίστηκαν στο υψηλής περιεκτικότητας σε ακρυλαμίδιο πήκτωμα διαχωρισμού. Τα δείγματα αραιώθηκαν σε διάλυμα φόρτωσης δείγματος και θερμάνθηκαν στους 95-100°C για 5 λεπτά. Οι συνθήκες αυτές είναι αποδιατακτικές για τις πρωτεΐνες καθώς η υψηλή θερμοκρασία και η παρουσία του SDS καταστρέφουν τους ασθενείς δεσμούς (υδρογόνου, ιοντικούς, υδρόφοβους, van der Waals), ενώ η παρουσία της β-μερκαπτοαιθανόλης έχει ως αποτέλεσμα την αναγωγή των ισχυρών ομοιοπολικών δισουλφιδικών δεσμών. Παράλληλα με τα δείγματα πραγματοποιήθηκε ανάλυση μίγματος πρωτεϊνών αναφοράς γνωστού μοριακού βάρους. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών υπό σταθερή τάση 200V σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα υπόκειται εναλλακτικά σε: α) χρώση με διάλυμα χρωστικής ουσίας (π.χ. coomassie), β) μεταφορά των διαχωρισμένων πρωτεϊνών σε νιτροκυτταρίνη. Στην πρώτη περίπτωση οι πρωτεϊνικές ζώνες γίνονται εμφανείς μετά από χρώση του πηκτώματος για 16 ώρες

σε θερμοκρασία δωματίου ακολουθούμενη από αποχρωματισμό του πηκτώματος με συνεχόμενες πλύσεις με διάλυμα αποχρωματισμού.

3.4.2 Χρώση πηκτωμάτων πολυακρυλαμιδίου με χρωστική coomassie

Τα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης πλύθηκαν 1 φορά με ddH₂O και ακολούθως επώαστηκαν με ικανή ποσότητα χρώσης coomassie για 12 ώρες υπό ήπια ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Μετά το τέλος της επώασης το πήκτωμα πλύθηκε μια φορά με ddH₂O και ακολούθως υποβλήθηκε σε διαδοχικές πλύσεις (~4-5) με διάλυμα αποχρωματισμού μέχρις ότου το πήκτωμα αποχρωματιστεί και παραμείνουν μόνο οι πρωτεϊνικές ζώνες χρωματισμένες.

3.4.3 Μεταφορά πρωτεϊνών από το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη (Western blot)

Για τη μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα στη μεμβράνη, χρησιμοποιήθηκε διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς πρωτεϊνών (Transfer buffer). Για τη μεταφορά των πρωτεϊνών προετοιμάστηκε ένα σύστημα «sandwich» με την εξής σειρά: α) ένα λεπτό φύλλο σφουγγαριού, β) δύο φύλλα διηθητικού χαρτιού Whatmann 3MM, γ) το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, δ) ένα κομμάτι νιτροκυτταρίνης, το οποίο έχει τις διαστάσεις του πηκτώματος, ε) δυο φύλλα διηθητικού χαρτιού Whatmann 3MM, στ) ένα λεπτό φύλλο σφουγγαριού. Το σύστημα «sandwich» τοποθετήθηκε στην ειδική συσκευή μεταφοράς έτσι ώστε η νιτροκυτταρίνη να βρίσκεται στην άνοδο. Η μεταφορά των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με ρεύμα σταθερής έντασης 300mA για 2 ώρες στους 4°C. Μετά τη μεταφορά, η νιτροκυτταρίνη χρωματίστηκε για περίπου 1 λεπτό με διάλυμα χρωστικής Ponceau S (βάφει μη ειδικά όλες τις πρωτεΐνες) και κατόπιν πλύθηκε με ddH₂O για να απομακρυνθεί η περίσσεια της χρωστικής. Οι ζώνες των πρωτεϊνών κατέστησαν ορατές και ελέγχθηκε έτσι η επιτυχία της μεταφοράς. Παράλληλα, αριθμήθηκαν επάνω στην νιτροκυτταρίνη οι διαδρομές των δειγμάτων και απομακρύνθηκε με νυστέρι η διαδρομή που περιέχει τις πρωτεΐνες αναφοράς. Ο

αποχρωματισμός της νιτροκυτταρίνης από την χρωστική Ponceau S έγινε με επανειλημμένες πλύσεις σε διάλυμα TBS.

3.4.4 Ανοσοενζυμική ανίχνευση πρωτεϊνών

Μετά τον αποχρωματισμό της μεμβράνης από τη χρωστική Ponceau S, η νιτροκυτταρίνη επώαστηκε, σε διάλυμα 5% (w/v) λυοφιλιωμένου άπαχου γάλακτος σε TBS, για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να εμποδιστεί η μη ειδική πρόσδεση των αντισωμάτων. Ακολούθησε επώαση της νιτροκυτταρίνης με το ειδικό αντίσωμα, αραιωμένο σε διάλυμα 2% (w/v) λυοφιλιωμένου άπαχου γάλακτος σε TBS, για περίπου 16 ώρες στους 4°C υπό συνεχή ανακίνηση. Πραγματοποιήθηκαν τρεις διαδοχικές πλύσεις με διάλυμα TBS που περιέχει Tween-20 1‰ (v/v) (10 λεπτά /πλύση) και μια πλύση με διάλυμα TBS. Στη συνέχεια η μεμβράνη επώαστηκε με αντί-ισοτυπικό αντίσωμα, σε διάλυμα 2% (w/v) λυοφιλιωμένου γάλακτος σε TBS, για 1-2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανακίνηση. Το αντίσωμα αυτό φέρει ομοιοπολικά συνδεδεμένο το ένζυμο της υπεροξειδάσης. Πραγματοποιήθηκαν τρεις διαδοχικές πλύσεις με διάλυμα TBS που περιέχει Tween-20 1‰ (v/v) (10 λεπτά /πλύση) και μια πλύση με διάλυμα TBS. Ακολούθησε επώαση της νιτροκυτταρίνης σε ρυθμιστικό διάλυμα εμφάνισης υποστρώματος. Το διάλυμα περιέχει ως υπόστρωμα για το ένζυμο της υπεροξειδάσης την 3,3' DAB. Η 3,3' DAB οξειδώνεται, παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2), από το ένζυμο της υπεροξειδάσης και παράγει ένα έντονο σκούρο καφέ χρώμα. Με τον τρόπο αυτό οι ζώνες των πρωτεϊνών, που έχουν προσδέσει ειδικά το αντίσωμα, και κατ' επέκταση και το αντι-ισοτυπικό αντίσωμα, εμφανίζονται μετά από 2-3 λεπτά επώασης. Η νιτροκυτταρίνη στη συνέχεια πλύθηκε με ddH₂O, για να σταματήσει η αντίδραση και τοποθετήθηκε πάνω σε χαρτί Whatmann 3MM για να στεγνώσει. Εναλλακτικά, όταν απαιτήθηκε μεγαλύτερη ευαισθησία ή ποσοτικοποίηση των ζωνών των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε το ECL Advance Western Blotting Detection kit (GE Healthcare) ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Επειδή, το ανωτέρω σύστημα στηρίζεται στη χημειοφωταύγεια η νιτροκυτταρίνη εμφανίζεται και φωτογραφίζεται στο Storm 860 Phosphorimager (Molecular Dynamics).

3.4.5 Παραγωγή πολυκλωνικών αντισωμάτων έναντι των *LdHSP83*, *LdeEF-2*

Για την παραγωγή πολυκλωνικών αντισωμάτων έναντι των *LdHSP83* και *LdeEF-2*, 200μg καθαρισμένης πρωτεΐνης/δόση χρησιμοποιήθηκαν για την ανοσοποίηση δυο λευκών κουνελιών Νέας Ζηλανδίας σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται σε προηγούμενη δημοσίευση του εργαστηρίου (Smirlis et al., 2006). Όλες οι διαδικασίες που περιλαμβάνουν χρήση πειραματοζώων πραγματοποιήθηκαν με βάση τις Ευρωπαϊκές προδιαγραφές εγκεκριμένων από την επιτροπή βιοηθικής του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ. Με τον τρόπο αυτό παρασκευάστηκαν πολυκλωνικά αντισώματα έναντι της *LdHSP83* και πολυκλωνικά αντισώματα έναντι της *LdeEF-2*. Ακολούθησε καθαρισμός των αντισωμάτων με εκλούσεις σε χαμηλό pH (1mM γλυκίνη pH2.6) από προσδεσμένη σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης *LdHSP83* και *LdeEF-2* αντίστοιχα.

3.5 Κυτταροκαλλιέργειες

3.5.1 Παράσιτα

Οι προμαστιγωτές μορφές των παρασίτων *L. donovani* LG13 καλλιεργήθηκαν στους 25°C απουσία CO₂, σε θρεπτικό υλικό RPMI-1640 (Life Technologies) εμπλουτισμένο με 10% (v/v) FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco), 10mM Hepes (Gibco) και αντιβιοτικά (πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη σε τελική συγκέντρωση 100U/ml, Gibco). Κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας πραγματοποιούνταν καθημερινά καταμέτρηση των παρασίτων, ώστε να παρακολουθείται ο ρυθμός ανάπτυξής τους. Για τον εμβολιασμό μιας καλλιέργειας παρασίτων χρησιμοποιήθηκε ενδεικτικά αριθμός παρασίτων ίσος με 10⁶ παράσιτα. Στην στατική φάση ανάπτυξης, τα παράσιτα φτάνουν σε αριθμό ίσο με 1,8-2x10⁷ παράσιτα/ml.

Τα ανασυνδυασμένα παράσιτα LG13 που φέρουν πλασμίδια που εκφράζουν το γονίδιο αντίστασης στην υδρομυκίνη καλλιεργήθηκαν στο ίδιο θρεπτικό υλικό που αναφέρεται παραπάνω εμπλουτισμένο περαιτέρω με Hygromycin B (Invitrogen) σε τελική συγκέντρωση 0,1mg/ml. Τα ανασυνδυασμένα παράσιτα LG13 που φέρουν το γονίδιο αντίστασης έναντι της υδρομυκίνης αλλά και του G418, καλλιεργήθηκαν

στο ίδιο θρεπτικό υλικό που αναφέρεται και παραπάνω εμπλουτισμένο περαιτέρω με Hygromycin B (Invitrogen) σε τελική συγκέντρωση 0,1mg/ml και G418 (Applichem) σε τελική συγκέντρωση 25μg/ml.

Για τη διατήρηση των προαναφερθέντων στελεχών *Leishmania* για μικρό χρονικό διάστημα, $\sim 10^7$ παράσιτα σε θρεπτικό υλικό RPMI-1640 εμπλουτισμένο με 25% (v/v) FBS και 10% (v/v) DMSO, φυλάσσονται στους -80°C ή σε ειδικό δοχείο που περιέχει υγρό άζωτο σε ειδικούς προστατευτικούς σωλήνες των 1.8ml (Nunc).

3.5.2 Μακροφάγα J774

Τα μακροφάγα της σειράς J774 προερχόμενα από μύες (American Type Culture Collection, Manassas, VA) καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό RPMI-1640 εμπλουτισμένο με 10% FBS, 10mM Hepes και αντιβιοτικά (στρεπτομυκίνη/πενικιλίνη σε τελική συγκέντρωση 100U/ml). Επώαστηκαν σε επωαστικό κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 37°C , σε ατμόσφαιρα 5% CO_2 για 7 περίπου ημέρες, μέχρι η επιφάνεια καλλιέργειας να καλυφθεί από μακροφάγα κατά 80% περίπου (τα ζωντανά μακροφάγα είναι προσκολλημένα, ενώ τα νεκρά μακροφάγα αιωρούνται στο υλικό κυτταροκαλλιέργειας). Για τον εμβολιασμό της καλλιέργειας μακροφάγων χρησιμοποιήθηκαν 10^5 μακροφάγα/ml. Ο αριθμός των μακροφάγων στη στατική φάση ανάπτυξης είναι περίπου 2×10^6 μακροφάγα/ml. Η ανακαλλιέργεια πραγματοποιήθηκε ως εξής: απομακρύνθηκε το υπερκείμενο υλικό (που περιέχει και νεκρά μακροφάγα), αναπληρώθηκε φρέσκο υλικό και με πλαστική άσηπτη ξύστρα ανασηκώθηκαν τα ζωντανά μακροφάγα, που χρησιμοποιήθηκαν για εμβολιασμό. Ο χρόνος διπλασιασμού των μακροφάγων J774 είναι 24 ώρες.

Η περισυλλογή των μακροφάγων J774 έγινε με φυγοκέντρηση (1000rpm) για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η κυτταρική σειρά J774 διατηρείται σε RPMI-1640 εμπλουτισμένο με 25% FBS και 10% DMSO για μικρό χρονικό διάστημα στους -80°C ή εναλλακτικά για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε υγρό άζωτο.

3.5.3 Μετασχηματισμός παρασίτων *Leishmania* με πλασμιδιακούς φορείς

Ο μετασχηματισμός των προμαστιγωτών μορφών των παρασίτων *L. donovani* LG13 πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροδιάτρηση. Αρχικά, συλλέχθηκαν παράσιτα που βρίσκονται στο τέλος της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης ($\sim 1,5 \times 10^7$ παράσιτα/ml). Τα παράσιτα φυγοκεντρήθηκαν στις 1700rpm για 12 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και το ίζημα πλύθηκε μια φορά με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροδιάτρησης (21mM HEPES, pH7.5, 0.7mM Na_2HPO_4 , 137mM NaCl, 6mM glucose, 5mM KCl). Ακολούθως, στα παράσιτα προστέθηκε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο επιλογής ($\sim 20\mu\text{g}$), το μίγμα τοποθετήθηκε σε κυψελίδα ηλεκτροδιάτασης 0.2cm (Biorad) και επωάστηκε για 10 λεπτά στον πάγο. Η συσκευή Gene Pulser (Biorad) ρυθμίστηκε στα 50μF και 0.45KV και η συσκευή Pulse Controller στα 0Ωhm. Η κυψελίδα τοποθετήθηκε στην ειδική θέση και η συσκευή ετέθη σε λειτουργία. Για να είναι επιτυχής ο μετασχηματισμός των παρασίτων ο ηλεκτρικός παλμός πρέπει να παρουσιάζει χρόνο εκπόλωσης 4msec. Στα παραπάνω παράσιτα προστέθηκαν 10ml θρεπτικού υλικού RPMI-1640 εμπλουτισμένου με 20% FBS και επωάστηκαν στους 25°C. Αφού τα παράσιτα ξεκίνησαν να αναπτύσσονται κανονικά ($\sim$ μετά από 1-2 ημέρες) προστέθηκε σε αυτά το κατάλληλο αντιβιοτικό επιλογής.

3.6 Έλεγχος της *in vitro* κυτταρικής επιβίωσης/πολλαπλασιασμού χρησιμοποιώντας τη μέθοδο του Alamar blue

Το Alamar blue (Invitrogen) αποτελεί ένα δείκτη οξειδωσης-αναγωγής, μη τοξικό για τα κύτταρα και χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση της ανάπτυξης και βιωσιμότητας κυττάρων επωασμένων με ουσίες (Mikus & Steverding, 2000). Το Alamar blue ανάγεται από μεταβολικά ενδιάμεσα των ζωντανών κυττάρων, όπως το NADH, FADH, NADPH και αυτή η αναγωγή του συνοδεύεται από μία μετρήσιμη μετατροπή στο χρώμα, δηλαδή μετατροπή από την οξειδωμένη μορφή (μη φθορίζουσα-μπλε) στην ανηγμένη μορφή (φθορίζουσα-κόκκινη).

Η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε είναι η ακόλουθη :

Χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες παρασίτων *L. donovani* LG13 που βρίσκονται στη στατική φάση (περίπου 2.5×10^7 παράσιτα/ml). Επιστρώθηκαν 5×10^5

παράσιτα σε 200μl υλικού κυτταροκαλλιέργειας/φρεάτιο (2.5×10^6 παράσιτα/ml). Σε κάθε φρεάτιο προστέθηκε η χημική ουσία επιλογής (π.χ. τρισθενές αντιμόνιο Sb(III)) σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις ή ο ίδιος όγκος του διαλύτη DMSO (φρεάτια-control), με τέτοιο τρόπο, ώστε πάντα η τελική συγκέντρωση του DMSO στα φρεάτια να είναι $<1\%$ (v/v) (συγκέντρωση του DMSO μεγαλύτερη από 2% (v/v) μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη των παρασίτων). Κάθε συγκέντρωση χημικής ουσίας ή DMSO ελέγχθηκε σε τριπλά φρεάτια. Στο πείραμα περιλήφθηκαν και φρεάτια με υλικό κυτταροκαλλιέργειας, όπου η ανάπτυξη είναι 0%. Τα παράσιτα επώαστηκαν για 72 ώρες στους 25°C , οπότε προστέθηκαν 20μl Alamar blue/φρεάτιο και ακολούθησε περαιτέρω επώαση για 12 ώρες. Ακολούθησε φωτομέτρηση σε συσκευή μέτρησης πλακών Elisa στα 550nm με αναφορικό μήκος κύματος στα 620nm. Οι τιμές οπτικής πυκνότητας (OD) που λαμβάνονται στα φρεάτια που έχει προστεθεί DMSO είναι περίπου 1.9-2.0 και αντιστοιχούν σε 100% ανάπτυξη των παρασίτων. Σύγκριση των τιμών OD στα φρεάτια με τη χημική ουσία, σε σχέση με τα φρεάτια-ελέγχου, επιτρέπει τον υπολογισμό της κατάλληλης συγκέντρωσης χημικής ουσίας, για να μειωθεί ο αριθμός των προμαστιγωτών κατά 50% (IC_{50}).

3.7 Επιμόλυνση μακροφάγων J774 με παράσιτα *L. donovani*

Για την επιμόλυνση χρησιμοποιήθηκαν μακροφάγα J774 τα οποία καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό RPMI-1640 εμπλουτισμένο με 10% FBS, 10mM HEPES και αντιβιοτικά (στρεπτομυκίνη/πενικιλίνη σε τελική συγκέντρωση 100U/ml). Τα μακροφάγα επώαστηκαν σε επωαστικό κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 37°C , σε ατμόσφαιρα 5% CO_2 .

Αρχικά, 2×10^5 μακροφάγα επιστρώθηκαν σε λαμέλλες μεγέθους 13mm, που προηγουμένως είχαν επικαλυφθεί με poly-L-lysine, σε πλάκες κυτταροκαλλιέργειας 48 φρεατίων. Στη συνέχεια προμαστιγωτές μορφές των παρασίτων προστέθηκαν στα μακροφάγα σε αναλογία 10 παράσιτα/μακροφάγο και επώαστηκαν για 6 ώρες. Τα επιμολυσμένα μακροφάγα πλύθηκαν 3 φορές με διάλυμα PBS για να απομακρυνθεί η περίσσεια προμαστιγωτών. Μετά τις πλύσεις προστέθηκε στα μακροφάγα θρεπτικό υλικό RPMI-1640 όπως αναφέρεται παραπάνω. Πριν την

μικροσκοπική ανάλυση τα κύτταρα πλύθηκαν με διάλυμα PBS και μονιμοποιήθηκαν με την προσθήκη παγωμένης μεθανόλης για 5 λεπτά. Τέλος, τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε χρώση Giemsa. Τα ενδοκυτταρικά παράσιτα παρατηρήθηκαν και καταμετρήθηκαν χρησιμοποιώντας μικροσκόπιο Zeiss Axioaphot (63x lens). Τα επιμολυσμένα μακροφάγα υπολογίστηκαν μετρώντας τον αριθμό τους σε σύνολο 100 κυττάρων (τρεις φορές τουλάχιστον).

3.8 Υπολογισμός επιπέδων μεταγράφων γονιδίων κυτταρικής οικονομίας και γονιδίων που ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο

3.8.1 Εκχύλιση ολικού RNA από παράσιτα *L. donovani*

Για την εκχύλιση ολικού RNA από προμαστιγωτές μορφές *Leishmania*, εφαρμόστηκε η μέθοδος της θερμής όξινης φαινόλης. Η μέθοδος ακολουθεί.

Αρχικά παρασκευάστηκε μίγμα από 1 όγκο φαινόλης (water stabilized), μισό όγκο NETS 2X και μισό όγκο οξικού νατρίου 50mM pH 4.0. Το μίγμα αυτό θερμάνθηκε μέχρι ώστε οι δυο φάσεις του να αναμειχθούν και να γίνει διαυγές. Σε ίζημα από 10^9 προμαστιγωτά παράσιτα προστέθηκαν 250μl από το παραπάνω διάλυμα και ακολούθησε έντονη ανάδευση. Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 14.000rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε σε νέο erpendorf και στην εναπομένουσα κάτω φάση προστέθηκαν 70μl NETS 2X. Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 14.000rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και τοποθετήθηκε μαζί με το υπερκείμενο του προηγούμενου βήματος. Σε αυτό το νέο υπερκείμενο προστέθηκαν 250μl θερμής όξινης φαινόλης (1 όγκος φαινόλης, 1 όγκος οξικό νάτριο 50mM pH 4.0) και ακολούθησε έντονη ανάδευση. Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 14.000rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε σε νέο erpendorf και επανεκχυλίστηκε με 250μl θερμής όξινης φαινόλης (1 όγκος φαινόλης, 1 όγκος οξικό νάτριο 50mM pH 4.0) και ακολούθησε έντονη ανάδευση. Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 14.000rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε σε νέο erpendorf και προστέθηκε σε αυτό ίσος όγκος χλωροφορμίου. Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 14.000rpm για 5 λεπτά σε

θερμοκρασία δωματίου. Η ανώτερη υδατική φάση συλλέχθηκε και το RNA κατακρημνίστηκε με προσθήκη 1/10 του όγκου 3M οξικό νάτριο pH 5.2 και διπλάσιο όγκο αιθανόλης 100%. Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 14.000rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το RNA (με τη μορφή ιζήματος) πλύθηκε με προσθήκη 1ml αιθανόλης 70% (v/v). Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 14.000rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την εξάτμιση του διαλύτη το RNA αναδιαλύθηκε σε αποστειρωμένο ddH₂O.

Η συγκέντρωση του RNA προσδιορίστηκε με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 260nm, με βάση τη σχέση: $1 \text{ OD}_{260\text{nm}} = 40\mu\text{g RNA/ml διαλύματος}$. Η καθαρότητα του RNA στο παρασκεύασμα ελέγχθηκε από το λόγο $\text{OD}_{260\text{nm}} / \text{OD}_{280\text{nm}}$. Καθαρά παρασκευάσματα έχουν τιμή σε αυτό το λόγο ίση με 2. Τέλος το παρασκεύασμα του RNA φυλάχθηκε στους -80°C.

3.8.2 Σύνθεση του συμπληρωματικού κλώνου DNA (cDNA)

Αρχικά απομονώθηκε RNA από προμαστιγωτές μορφές παρασίτων *L. donovani*, συγχρονισμένων με υδροξουρία, ακολουθώντας τη μέθοδο της θερμής όξινης φαινόλης (Papageorgiou & Soteriadou, 2002). Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση του συμπληρωματικού κλώνου DNA (cDNA) χρησιμοποιώντας κιτ σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Protoscript M-MuLV Taq RT-PCR kit, New England Biolabs).

Για την πρώτη αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω

Ολικό RNA	2μl (250ng)
Εκκινητής dT ₂₃ VN	2μl
Μίγμα dNTPs	4μl
<u>H₂O απαλλαγμένο από νουκλεάσες</u>	<u>8μl</u>
Συνολικός όγκος	16μl

Το παραπάνω μίγμα θερμάνθηκε στους 70°C για 5 λεπτά. Ακολούθως τοποθετήθηκε στον πάγο. Στο παραπάνω μίγμα προστέθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια.

Ρυθμιστικό διάλυμα 10X RT Buffer	2μl
Αναστολέας RNase	1μl
M-MuLV ανάστροφη μεταγραφάση	1μl
<u>H₂O απαλλαγμένο από νουκλεάσες</u>	<u>0.5μl</u>
Συνολικός όγκος	20μl

Το νέο μίγμα επώαστηκε στους 42°C για μια ώρα και στη συνέχεια το ένζυμο απενεργοποιήθηκε στους 80°C για 5 λεπτά. Ο συνολικός όγκος συμπληρώθηκε μέχρι τα 50μl με την προσθήκη ddH₂O.

3.8.3 Υπολογισμός επιπέδων μεταγράφων γονιδίων κυτταρικής οικονομίας και γονιδίων που ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης πραγματικού χρόνου (real time RT-PCR)

Για να εξακριβωθεί το αν η υπερέκφραση της LeishH1 μπορεί να καταστείλει καθολικά τη μεταγραφική διαδικασία, υπολογίσαμε τα σχετικά επίπεδα των μεταγράφων γονιδίων κυτταρικής οικονομίας (house-keeping genes) και γονιδίων που ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο με την τεχνική αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης πραγματικού χρόνου (real time RT-PCR). Η συγκεκριμένη τεχνική αποτελεί ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο για την ποσοτικοποίηση των επιπέδων του mRNA σε βιολογικά δείγματα. Τα πλεονεκτήματά της έναντι των συμβατικών μεθόδων μέτρησης RNA είναι η ευαισθησία της, το μεγάλος εύρος εφαρμογών και η δυνατότητα για ταχεία, μεγάλης κλίμακας και ακριβή ποσοτικοποίηση (Huggett *et al.*, 2005).

Τα γονίδια που επιλέχθηκαν είναι τα ακόλουθα: cycline 5 (CYC5, LinJ.33.0830), cycline 6 (CYC6, LinJ.32.3520), ribosomal protein S29 (S29, LinJ.28.2360), phosphomannose isomerase (PMI, LinJ.32.1660), fumarate hydratase (FH, LinJ.34.0310). Ως γονίδιο αναφοράς επιλέχθηκε το glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GADPH, LinJ.36.2480).

Το cDNA που παρήχθη χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για τις αντιδράσεις RT-PCR στη συσκευή Exicycler 96 (BioNEER). Τα μόρια εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις είναι τα εξής: CYC5 [(LinJ.33.0830), (F: 5'AGTTTCTGAGCGTCACACG^{3'} R: 5'GTCATCTCGCTCAGTGGAA^{3'})], CYC6 [(LinJ.32.3520), (F: 5'TTTCTGGCGTTGCTGATGC^{3'}, R: 5'AATCTAGGATGGCCTCCGC^{3'})], GADPH [(LinJ.36.2480), (F: 5'GGGGCACTTGTGTGAATG^{3'} R: 5'TGCTCCTGCTTCAA-TGTGC^{3'})], ribosomal protein S29 [(LinJ.28.2360), (F: 5'ATCTCGACCAGTGGCGTTCT^{3'} R: 5'ATGTGCTCGGCGTTTTCAC^{3'})], PMI [(LinJ.32.1660 F: 5'AGCTGCTCGAGGAGTTCCTGAA^{3'}, R: 5'CTTCTCGGCAAGCTTCTTGCA^{3'}], FH (LinJ.34.0310), (F: 5'GTGTCGCACAAGGAAACCAAG^{3'}, R: 5'TGCGAAGAGCGTAGCAGATGCT^{3'}). Το κάθε δείγμα επαναλήφθηκε τουλάχιστον 3 φορές.

Πιθανές διαφορές στα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη συγκριτική μέθοδο C_t (Livak & Schmittgen, 2001, Pfaffl, 2001). Η τιμή C_t αντιπροσωπεύει τον αριθμό κύκλων PCR που απαιτούνται ώστε ο φθορισμός του προϊόντος να ξεπεράσει την τιμή «κατώφλι» που έχει οριστεί («θόρυβος» μηχανήματος). Στη συνέχεια η γονιδιακή έκφραση για τα 2 δείγματα υπολογίζεται με βάση την παρακάτω εξίσωση:

$$2^{-\Delta\Delta C_t} = [(C_t \text{ γονίδιο ενδιαφέροντος} - C_t \text{ γονίδιο ελέγχου}) \text{ pX63} - (C_t \text{ γονίδιο ενδιαφέροντος} - C_t \text{ γονίδιο ελέγχου}) \text{ pX63-LeishH1}].$$

3.9 Στύπωμα κατά Northern

3.9.1. Έλεγχος επιπέδων αγγελιαφόρου RNA (mRNA) με στύπωμα κατά Northern

Για το στύπωμα κατά Northern χρησιμοποιήθηκε RNA που απομονώθηκε από προμαστιγωτές μορφές παρασίτων *L. donovani* συγχρονισμένων με υδροξυουρία, ακολουθώντας τη μέθοδο της θερμής όξινης φαινόλης (Papageorgiou & Soteriadou, 2002). Η μεθοδολογία του στυπώματος κατά Northern ακολουθεί.

Αρχικά παρασκευάστηκε πήκτωμα αγαρόζης 1% (w/v) σε διάλυμα MOPS/EDTA 1X. Μόλις το πήκτωμα έφτασε σε θερμοκρασία 50°C, προστέθηκαν 5ml 37% (w/v) φορμαλδεΐδης ανά 100ml πηκτώματος. Τα δείγματα RNA μετά την προσθήκη

ειδικού διαλύματος φόρτωσης (διάλυμα φόρτωσης RNA) και πριν την ηλεκτροφόρησή τους θερμάνθηκαν για 10 λεπτά στους 65°C, ώστε να καταστραφούν τυχούσες δευτεροταγείς δομές. Η ηλεκτροφόρηση τέλος πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα MOPS/EDTA 1X.

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα πλύθηκε 2 φορές με διάλυμα SSC 10X για 20 λεπτά. Κατασκευάστηκε η «γέφυρα» μεταφοράς, πάνω από το δοχείο που είχε πληρωθεί με διάλυμα μεταφοράς SSC 20X. Προετοιμάστηκαν στις διαστάσεις του πηκτώματος, ένα κομμάτι νάιλον μεμβράνης (Zeta probe, BioRad), τέσσερα φύλλα διηθητικού χαρτιού Whatman 3MM και χαρτοπετσέτες (συνολικού πάχους 5cm). Το πήκτωμα τοποθετήθηκε ανεστραμμένο στη γέφυρα μεταφοράς. Η περιοχή γύρω από το πήκτωμα στεγανοποιήθηκε με parafilm έτσι ώστε το διάλυμα να μεταφερθεί μόνο μέσω του πηκτώματος. Η μεμβράνη νάιλον αφού διεβράχει σε διάλυμα SSC 10X τοποθετήθηκε επάνω στο πήκτωμα. Ακολουθώντας τοποθετήθηκαν πάνω στο πήκτωμα τα φύλλα Whatman, αφού προηγουμένως είχαν διαβραχεί σε διάλυμα SSC 10X και οι χαρτοπετσέτες. Στο επάνω μέρος αυτής της κατασκευής τοποθετήθηκε βάρος (~1.5kg) και αφέθηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για διάστημα ~16 ωρών.

Μετά το πέρας της μεταφοράς η μεμβράνη τοποθετήθηκε ανάμεσα σε δυο φύλλα Whatman και θερμάνθηκε για 30 λεπτά στους 80°C έτσι ώστε το RNA να σταθεροποιηθεί πάνω στη μεμβράνη. Η μεμβράνη είναι πλέον έτοιμη να επωαστεί με τον ανιχνευτή, αλλά μπορεί επίσης να διατηρηθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα σε θερμοκρασία δωματίου.

3.9.2 Παρασκευή σημασμένων με ^{32}P -DNA ιχνηθετών (*probes*)

Για τη σήμανση DNA ιχνηθετών με ^{32}P χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της τυχαίας έναρξης (random prime DNA labeling) με το σύστημα Prime-a-Gene labeling kit της Promega.

Η αντίδραση σήμανσης περιείχε 10μl διάλυμα σήμανσης 5X (5X labeling buffer), BSA (2μg), μίγμα dNTPs (1:1:1 dATP, dGTP, dTTP, 20μM από το καθένα), 100-300ng του cDNA ιχνηθέτη (τα μόρια ανιχνευτές που χρησιμοποιήθηκαν, προήλθαν μετά από πέψη του πλασμιδίου pSP72aNEOaHSP83 με τα περιοριστικά

ένζυμα XbaI και HindIII). Πριν προστεθεί θερμάνθηκε για 4-5 λεπτά σε νερό (θερμοκρασίας 100°C), συμπληρώθηκε απεσταγμένο νερό μέχρι όγκου 45μl, 5μl του [α 32 P] dCTP (3000Ci/mmol, 10μCi/μl) και 3 μονάδες DNA πολυμεράσης I (Klenow). Το μίγμα της αντίδρασης αυτής επωάστηκε στους 37°C για 2 ώρες.

3.9.3 Καθαρισμός DNA ιχνηθετών

Η μέθοδος χρωματογραφίας σε στήλη Sephadex G50 χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό υψηλού μοριακού βάρους DNA από μικρότερα μόρια. Με τον τρόπο αυτό διαχωρίστηκαν οι ραδιοσημασμένοι DNA ιχνηθέτες από την περίσσεια των μη ενσωματωμένων ραδιενεργών νουκλεοτιδίων μετά το πέρας της αντίδρασης σήμανσης. Η παρασκευή των σφαιριδίων πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη διαλύματος TE, pH 8.0 σε Sephadex G-50, σε αναλογία 10:1.

Ακολούθως το διάλυμα αποστειρώθηκε επί 15 λεπτά σε υγρό κλίβανο και φυλάχθηκε στους 4 °C. Ο καθαρισμός του σημασμένου ιχνηθέτη πραγματοποιήθηκε ως εξής:

Τα ανωτέρω παρασκευασμένα σφαιρίδια Sephadex G-50 πακετάρονται σε σύριγγα ινσουλίνης που περιείχε μικρή ποσότητα υαλοβάμβακα. Η στήλη φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά στα 5000g, ώστε να απομακρυνθεί το διάλυμα TE και να αποφευχθεί η αραιώση του ιχνηθέτη. Το μίγμα από την αντίδραση σύνθεσης του ιχνηθέτη προστέθηκε στη στήλη και φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά στα 5000g. Από το έκλουσμα, 1μl χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση των κρούσεων σε μετρητή β-ακτινοβολίας, έτσι ώστε να υπολογιστεί η ειδική ενεργότητα του ιχνηθέτη.

3.9.4 Υπολογισμός ειδικής ενεργότητας (*specific activity*) του σημασμένου ιχνηθέτη

Η ειδική ενεργότητα (b) του σημασμένου ιχνηθέτη, υπολογίστηκε ως εξής:

$$b = a \times 3\text{cpm} = 3a \text{ cpm}/\lambda = 3a \text{ cpm} \times 50\lambda = 150a \text{ cpm}/25\text{ng} = 6a \text{ cpm}/\text{ng} = 6a \times 10^3 \text{ cpm}/\mu\text{g},$$

όπου a είναι ο αριθμός των κρούσεων από 1μl ιχνηθέτη/λεπτό (cpm), τιμή που δίδεται από τον μετρητή β-ακτινοβολίας, ενώ τα 25ng και τα 50μl στην παραπάνω

εξίσωση, αντιστοιχούν στην ποσότητα του DNA που ραδιοσημάνθηκε και τον όγκο του εκλούσματος από τη στήλη Sephadex G-50 αντίστοιχα. Η ειδική ενεργότητα ενός ιχνηθέτη κρίνεται ικανοποιητική όταν είναι μεγαλύτερη από 10^8 cpm/μg DNA. Η ποσότητα του ιχνηθέτη που χρησιμοποιείται σε διαδικασίες υβριδοποίησης, αντιστοιχεί περίπου σε 10^6 cpm/ml διαλύματος υβριδοποίησης.

3.9.5 Υβριδοποίηση στυπωμάτων Northern

Η υβριδοποίηση των στυπωμάτων με ^{32}P σημασμένο ιχνηθέτη πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο που ακολουθεί.

Το στύψωμα τοποθετήθηκε στον ειδικό κύλινδρο της συσκευής υβριδοποίησης και επώαστηκε στους 45°C για μια ώρα με το διάλυμα προ-υβριδοποίησης (50% deionised formamide, 5X SSPE, 5X Denhardt's, 0.1% (w/v) SDS, 100μg/ml αποδιαταγμένο DNA από σπέρμα σολωμού). Ο ραδιενεργά σημασμένος ιχνηθέτης θερμάνθηκε σε θερμοκρασία 100°C για 3 λεπτά, ώστε να αποδιαταχθούν οι δυο αλυσίδες του DNA. Μετά την παρέλευση μιας ώρας, το διάλυμα προ-υβριδοποίησης απομακρύνθηκε από τον ειδικό κύλινδρο, και ακολούθως προστέθηκε σε αυτόν το διάλυμα υβριδοποίησης (ίδιο με το διάλυμα προ-υβριδοποίησης αλλά περιέχει επιπλέον 10% (w/v) dextran sulfate) μαζί με τον αποδιαταγμένο DNA ιχνηθέτη. Η υβριδοποίηση πραγματοποιήθηκε στους 45°C για διάστημα 12-16 ωρών.

Ακολούθησαν διαδοχικές πλύσεις της μεμβράνης με διάλυμα SSC 2X/0.1% (w/v) SDS, SSC 1X/0.1% (w/v) SDS και τέλος με SSC 0.1X/0.1% (w/v) SDS θερμασμένου στους 65°C . Κάθε πλύση διαρκεί 20 λεπτά. Μετά το πέρας των πλύσεων, η μεμβράνη στεγανοποιήθηκε σε σακούλα και τοποθετήθηκε στην ειδική κασέτα αυτοραδιογραφίας (Phosphor Screen, Molecular Dynamics) για μια ώρα. Η εμφάνιση της αυτοραδιογραφίας πραγματοποιήθηκε σε ειδική συσκευή (PhosphorImager, Molecular Dynamics).

3.9.6 Από-υβριδοποίηση των στυπωμάτων Northern

Για την από-υβριδοποίηση των στυπωμάτων πραγματοποιήθηκε βράσιμο της μεμβράνης στους 95 °C για 30 λεπτά, σε διάλυμα από-υβριδοποίησης.

3.10 Μεταβολική σήμανση των παρασίτων με ³⁵S και ανοσοκατακρήμνιση των σημασμένων πρωτεϊνών

Η μεταβολική σήμανση χρησιμοποιείται για να μελετηθεί η βιοσύνθεση, κατεργασία, ενδοκυτταρική μεταφορά, έκκριση, αποικοδόμηση και οι φυσικο-χημικές ιδιότητες των πρωτεϊνών. Η σήμανση επιτυγχάνεται επωάζοντας τα κύτταρα σε θρεπτικό υλικό που περιέχει όλα εκείνα τα απαραίτητα για την ανάπτυξη συστατικά, εκτός από ένα αμινοξύ το οποίο έχει αντικατασταθεί από τη ραδιενεργή μορφή του. Τα ραδιοσημασμένα αμινοξέα μεταφέρονται διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης, και όταν βρεθούν στο κυτταρόπλασμα, προσδένονται σε μόρια tRNA προτού ενσωματωθούν σε νέο-συντιθόμενες πρωτεΐνες.

Για τη μεταβολική σήμανση προμαστιγωτών μορφών παρασίτων *L. donovani* χρησιμοποιήθηκαν 3×10^7 παράσιτα και αφού πλύθηκαν μια φορά με 1ml PBS 1X, επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε 100μl θρεπτικού υλικού RPMI-1640 χωρίς μεθειονίνη (Life Technologies), εμπλουτισμένου με 10% FBS και αντιβιοτικά (στρεπτομυκίνη/πενικιλίνη σε τελική συγκέντρωση 100U/ml). Τα παράσιτα επώαστηκαν για 30 λεπτά σε θερμοκρασία 25°C και ακολούθως προστέθηκαν σε αυτά 100μCi σημασμένης με ³⁵S μεθειονίνης (EasyTag L-[³⁵S]-methionine, PerkinElmer) και επώαστηκαν στις ίδιες συνθήκες για χρονικό διάστημα 2 ωρών.

Μετά το πέρας της επώασης τα παράσιτα φυγοκεντρήθηκαν στις 1700rpm και πλύθηκαν δυο φορές (με συνακόλουθη φυγοκέντρηση και επαναδιάλυση) με 1ml διαλύματος PBS 1X. Ακολούθως λύθηκαν με την προσθήκη 200μl διαλύματος λύσης (50mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM EDTA, 1% (w/v) SDS, 1mM PMSF, 4μg/ml απροτινίνη, 4μg/ml πεπστατίνη). Τα κυτταρικά λύματα που περιέχουν περίπου 150μg ολικών πρωτεϊνών επώαστηκαν στους 4°C για 30 λεπτά υπό ανάδευση και εν συνεχεία τοποθετήθηκαν σε συσκευή υπερήχων όπου υποβλήθηκαν σε συνεχόμενους κύκλους υπερήχησης 1 λεπτού με αντίστοιχο διάλειμμα, για

συνολικό χρονικό διάστημα 30 λεπτών. Τέλος τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 15 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C. Τα ιζήματα απορρίπτονται και φυλάσσονται οι διαλυτές πρωτεΐνες που βρίσκονται στο υπερκείμενο.

150μl διαλυτών πρωτεϊνών προστέθηκαν σε 1350μl διαλύματος ανοσοκατακρήμνισης (167mM NaCl, 16.7mM Tris-HCl pH 8.1, 1.2mM EDTA, 1.1% (v/v) Triton X-100, 0.01% (w/v) SDS, 1mM PMSF, 4μg/ml aprotinin, 4μg/ml pepstatin) μαζί με 30μl ορού από κουνέλι έναντι της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει να ανοσοκατακρημνίσουμε. Τα δείγματα επώαστηκαν στους 4°C για 12 ώρες υπό ήπια ανάδευση. Μετά το τέλος της επώασης τα δείγματα προστέθηκαν σε 50μl μεταλλικών σφαιριδίων (protein A-agarose, Dynabeads, Invitrogen) τα οποία προηγουμένως είχαν πλυθεί με 1ml PBS και επωαστεί για 10 λεπτά με 100μl διαλύματος λύσης. Τα δείγματα επώαστηκαν για 1 ώρα σε θερμοκρασία 4°C υπό ήπια ανάδευση. Μετά την επώαση, τα δείγματα τοποθετήθηκαν στο ειδικό μαγνητικό στατώ, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο διάλυμα, πλύθηκαν 2 φορές με 200μl PBS και τέλος εκλούονται με προσθήκη 20μl 50mM γλυκίνης pH 2.8. Στα εκλούσματα προστέθηκε ίσος όγκος 1 M Tris-HCl.

Όλες οι εκλούσεις διαχωρίζονται σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 12%. Το πήκτωμα μονιμοποιήθηκε με προσθήκη διαλύματος 40% (v/v) μεθανόλης – 10% (v/v) οξικού οξέος και ξηράθηκε σε αυτόματο σύστημα ξήρανσης πηκτωμάτων (Gel Dryer model 583, BioRad). Το πήκτωμα τοποθετήθηκε στην ειδική κασέτα αυτοραδιογραφίας (Phosphor Screen, Molecular Dynamics) για 16 ώρες. Η εμφάνιση της αυτοραδιογραφίας πραγματοποιήθηκε σε ειδική συσκευή (PhosphorImager, Molecular Dynamics).

Η ένταση των πρωτεϊνικών ζωνών υπολογίστηκε με τη χρήση ειδικού λογισμικού (AlphaImager software, Alpha Innotech). Οι διαφορές στην ένταση μεταξύ των διαφορετικών ζωνών υπολογίστηκαν μετά από τρία ανεξάρτητα πειράματα.

3.11 Πρωτεομική ανάλυση

3.11.1 Συγχρονισμός των παρασίτων και προετοιμασία πρωτεϊνικών δειγμάτων για πρωτεομική ανάλυση.

Παράσιτα *L. donovani* στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης ($\sim 5 \times 10^6$ κύτταρα/ml), συγχρονίστηκαν στην G1/S φάση του κυτταρικού κύκλου με προσθήκη 5mM υδροξουρίας για 12 ώρες στους 25°C (Smirlis et al., 2006). Η υδροξουρία είναι μια χημική ουσία, η οποία δρα ως αναστολέας του ενζύμου αναγωγή των ριβονουκλεοτιδίων. Η αναστολή του ενζύμου έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή αντιγραφής του DNA διατηρώντας ανέπαφη όμως την έναρξη της φάσης S του κυτταρικού κύκλου. Έτσι τα παράσιτα συγχρονίζονται στο τέλος της φάσης G1 προς αρχές της φάσης S του κυτταρικού κύκλου (Galanti et al., 1994). Ο συγχρονισμός αυτός των παρασίτων είναι απαραίτητος ώστε να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα οι παρατηρούμενες διαφορές στα επίπεδα των πρωτεϊνών να οφείλονται σε διαφορές οφειλόμενες στον κυτταρικό κύκλο.

Ίδιος αριθμός παρασίτων (5×10^8 - 10^9) για κάθε δείγμα συλλέχθηκε με φυγοκέντρηση (500xg, 15min, RT) και πλύθηκε δυο φορές με PBS εμπλουτισμένο με 1% (w/v) γλυκόζη. Τα παράσιτα ακολούθως λύθηκαν με προσθήκη 50μl διαλύματος λύσης (40mM Tris pH 9.5, 1mM EDTA, 0.01mM E-64), υποβλήθηκαν σε πέντε διαδοχικούς κύκλους ψύξης-θέρμανσης (υγρό άζωτο-37°C) και τέλος φυγοκεντρήθηκαν (20.000xg, 30 λεπτά, 4°C). Στο υπερκείμενο προστέθηκε 400μl διαλύματος ενυδάτωσης (7M ουρία, 2M θειοουρία, 4% (w/v) CHAPS, 2.4% (w/v) ASB-14, 0.2% (v/v) Biolytes [BioRad]), τα δείγματα επώαστηκαν για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου υπό ήπια ανάδευση και τέλος φυγοκεντρήθηκαν (17.000xg, 40 λεπτά, θερμοκρασία περιβάλλοντος) (Bente et al., 2003). Το υπερκείμενο πλέον είναι έτοιμο ώστε να τοποθετηθεί στην ειδική εσοχή της συσκευής ισοηλεκτρικού εστιασμού (BioRad).

3.11.2 Προετοιμασία πρωτεϊνικών δειγμάτων εμπλουτισμένων σε κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες για πρωτεομική ανάλυση

Για τον εμπλουτισμό των πρωτεϊνικών δειγμάτων σε κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες, ίδιος αριθμός παρασίτων συγχρονισμένων με υδροξυουρία όπως παραπάνω, επώαστηκαν με 50μl διαλύματος PEM (0.1M PIPES, 5mM EGTA, 2mM MgCl₂) εμπλουτισμένου με 1% (v/v) NP40. Τα δείγματα επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά υπό ήπια ανάδευση. Μετά την επώαση, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν (1000xg, 15 λεπτά, RT), πλύθηκαν μια φορά με 500μl διαλύματος PEM και επαναφυγοκεντρήθηκαν. Στα ιζήματα προστέθηκαν 20μl διαλύματος λύσης και ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία όπως και παραπάνω.

3.11.3 Ισο-ηλεκτρικός εστιασμός και ηλεκτροφόρηση δυο διαστάσεων

Η πρώτη διάσταση του ισο-ηλεκτρικού εστιασμού πραγματοποιήθηκε στην ειδική συσκευή (BioRad) ως εξής. Στην ειδική εσοχή της συσκευής τοποθετήθηκε το δείγμα. Ακριβώς πάνω στο δείγμα τοποθετήθηκε το ειδικό φιλμ (iso-electric focusing strips 17cm, BioRad) και ακριβώς από πάνω 3ml μεταλλικού ελαίου (mineral oil, BioRad) τα οποία εμποδίζουν την εξάτμιση του δείγματος. Τα δείγματα αφέθηκαν να ενυδατώσουν τα ειδικά φιλμ για 16-22 ώρες υπό ένταση ρεύματος 50μΑ/φιλμ.

Μετά το τέλος την ενυδάτωσης τοποθετήθηκαν στα δυο άκρα του φιλμ, ανάμεσα από τα φιλμ και τα ηλεκτρόδια, δυο μικρά κομμάτια χαρτιού εμποτισμένα με 10μl δις-απεσταγμένου νερού. Η συσκευή ρυθμίστηκε στις ακόλουθες συνθήκες: 500volts για 1 ώρα, 1.000volts για 1 ώρα, 3.000volts για 1 ώρα και 10.000volts για 96.000Vhs. Αφού ολοκληρώθηκε το πρόγραμμα της συσκευής, τα φιλμ επώαστηκαν σε δυο διαφορετικά διαλύματα εξισορρόπησης για 15 λεπτά το καθένα. Τα φιλμ μετά και τις δυο επώσεις τοποθετήθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 12%, σφραγίστηκαν από πάνω με προσθήκη μικρής ποσότητας 1% (w/v) αγαρόζης και ηλεκτροφορήθηκαν.

Αφού ολοκληρώθηκε η ηλεκτροφόρηση, τα πήκτωμα επώαστηκαν με χρώση colloidal coomasie για 12 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου υπό ήπια

ανακίνηση. Ο αποχρωματισμός πραγματοποιήθηκε με διαδοχικές πλύσεις με διάλυμα 25% (v/v) μεθανόλης.

Τα πηκτώματα μπορούν να αποθηκευτούν και διατηρηθούν για μεγάλο χρονικό διάστημα σε διάλυμα 25% (w/v) θειικού αμμωνίου σε θερμοκρασία 4°C.

3.11.4 Χρώση πηκτωμάτων πολυακρυλαμιδίου μετά από ηλεκτροφόρηση δυο διαστάσεων με τη χρωστική Sypro Ruby Stain

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα επώαστηκε σε διάλυμα 40% (v/v) μεθανόλης – 10% (w/v) τριχλωροξικού οξέος για 3 ώρες υπό ήπια ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ακολούθησαν τρεις πλύσεις με ddH₂O για χρόνο δέκα λεπτών η κάθε μία.

Μετά τις πλύσεις το πήκτωμα επώαστηκε με τη χρωστική Sypro Ruby Stain για 12 ώρες υπό ήπια ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος υπό συνθήκες σκοταδιού.

Τέλος το πήκτωμα πλύθηκε μια φορά με διάλυμα 10% (v/v) μεθανόλης – 7% (v/v) οξικού οξέος για 30 λεπτά υπό ήπια ανάδευση, δυο φορές με ddH₂O και τοποθετήθηκε σε σύστημα φωτογράφισης με ενσωματωμένη λυχνία UV (300nm).

3.11.5 Πέψη πρωτεϊνών από κομμάτια πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου με πρωτεάσες

Για την πέψη των πρωτεϊνών ακολουθήθηκε η διαδικασία όπως αναφέρεται και αλλού (Shevchenko *et al.*, 2006). Αρχικά, τα πηκτώματα πλύθηκαν σχολαστικά με απεσταγμένο νερό και αποφεύχθηκε όσο το δυνατόν η επιμόλυνσή τους με κερατίνη. Τα σημεία εκείνα στο πήκτωμα που έφεραν τις πρωτεΐνες που μας ενδιαφέρουν αποκόπηκαν και μεταφέρθηκαν σε ειδικούς πλαστικούς σωλήνες (low protein-binding tubes).

Σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 100μl 100mM διτανθρακικού αμμωνίου/ακετονιτρίλιο (1:1 v/v) και επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου μέχρις ωσότου αποχρωματιστεί. Επιπλέον 500μl ακετονιτρίλιου προστέθηκαν σε κάθε δείγμα και επώαστηκαν μέχρι τα κομμάτια πολυακρυλαμιδίου να γίνουν

λευκά και συρρικνωθούν. Μετά από αυτό το στάδιο η περίσσεια ακετονιτρίλιου απορρίφθηκε. Στα συρρικνωμένα κομμάτια πολυακρυλαμιδίου προστέθηκε ικανή ποσότητα διαλύματος τρυψίνης (20μg τρυψίνης διαλύονται σε 1.5ml 10mM διττανθρακικού αμμωνίου που περιέχει 10% (v/v) ακετονιτρίλιο) ώστε να καλυφθούν τα κομμάτια πολυακρυλαμιδίου. Τα δείγματα αφέθηκαν στον πάγο για 90 λεπτά. Ακολούθως τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε θερμαινόμενη συσκευή εξάτμισης ρυθμισμένη στους 37°C για χρονικό διάστημα 12-16 ωρών. Μετά το τέλος της επώασης, 100μl διαλύματος εκχύλισης (1:2 (v/v) 5% φορμικό οξύ/ακετονιτρίλιο) προστέθηκαν σε κάθε δείγμα και επωάστηκαν για 15 λεπτά στους 37°C.

3.11.6 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης μικρής κλίμακας (nanoHPLC) - Φασματομετρία μάζας σε σειρά (MS/MS analysis)

Τα πεπτίδια που προέκυψαν από την παραπάνω διαδικασία, αναλύθηκαν με τη μέθοδο της νάνο-υγρής χρωματογραφίας σε συσκευή υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (Dionex) χρησιμοποιώντας στήλη μήκους 10cm (EASY column, 75μm, 3μm, C18, Thermo Scientific). Οι διαλύτες της κινητής φάσης αποτελούνται από A: 2% (v/v) ακετονιτρίλιο/0.1% (v/v) φορμικό οξύ και B: 80% (v/v) ακετονιτρίλιο/0.1% (v/v) φορμικό οξύ. Τα πεπτίδια εκλούστηκαν χρησιμοποιώντας μια γραμμική διαβάθμιση του διαλύματος B που κυμάνθηκε από 2%-50% στη διάρκεια 30 λεπτών και ακολούθησε πλύση με 100% διάλυμα B για 5 λεπτά με ρυθμό ροής ~200nL/min.

Οι αναλύσεις φασματομετρίας μάζας των πεπτιδίων πραγματοποιήθηκαν σε φασματόμετρο μάζας hybrid LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific). Χρησιμοποιήθηκε η εξαρτώμενη από τα 6 πρώτα αποτελέσματα μέθοδος απόκτησης (top6 data dependent acquisition method). Πραγματοποιήθηκε λήψη ενός φάσματος με εύρος 300-2000m/z, ανάλυση 60K και με στοχευόμενη τιμή συσσώρευσης 500,000 ιόντων. Έως και έξι από τα πιο συχνά απαντούμενα ιόντα με επίπεδα φόρτισης $\geq +2$ απομονώθηκαν διαδοχικά και κατακερματίστηκαν εντός της γραμμικής ιοντικής παγίδας χρησιμοποιώντας διάσπαση υποκινούμενη από πρόσκρουση (CID, collision-induced dissociation) με 35% ομαλοποιημένη ενέργεια πρόσκρουσης. Επί πρόσθετα, οι αναλογίες μάζας/φορτίου που επιλέχθηκαν για τη

φασματομετρία μάζας σε σειρά αποκλείστηκαν για 20 δευτερόλεπτα χρησιμοποιώντας ένα διάστημα απομόνωσης 10ppm.

3.11.7 Ανάλυση πεπτιδίων με τη μέθοδο MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation – Time Of Flight*)

Αρχικά, τα πηκτώματα πλύθηκαν σχολαστικά με απεσταγμένο νερό και αποφεύχθηκε όσο το δυνατόν η επιμόλυνσή τους με κερατίνη. Τα σημεία εκείνα στο πήκτωμα που φέρουν τις πρωτεΐνες που μας ενδιαφέρουν αποκόπηκαν και μεταφέρθηκαν σε ειδική κασέτα ZipPlate (Montage In-Gel-DigestZP Kit, Millipore). Ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή, τα κομμάτια πηκτώματος αποχρωματίστηκαν, υποβλήθηκαν σε πέψη με θρυψίνη, εκχυλίστηκαν, καθαρίστηκαν σε μια στήλη ανάστροφης φάσης C18 και εκλούστηκαν σε 8μl 60% ακετονιτρίλιο, 0.1% τριφθοροξικό οξύ (TFA).

Τα πεπτίδια που εκλούσθηκαν τοποθετήθηκαν σε ειδική πλάκα 378 θέσεων (378-well, 400lm Anchor Plate). Η ανάλυση των πεπτιδίων με τη μέθοδο MALDI-TOF πραγματοποιήθηκε σε φασματόμετρο μάζας Bruker Auto-Flex Mass Spectrometer (Bruker Daltonics). Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν ακολουθούν: Τάση ιοντικής πηγής 1: 19kV, τάση ιοντικής πηγής 2: 16.5kV, τάση ανάκλασης 20kV, τάση φακών 8kV, χρόνος παλμού 40ns, χρόνος εξαγωγής παλμού 120ns. Τα φάσματα αναλύθηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος Xtof (Bruker Daltonics).

Οι μονο-ισοτοπικές μάζες που προέκυψαν από την ανάλυση ελέγχθηκαν έναντι των πεπτιδικών μαζών σε βάση δεδομένων χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα MASCOT. Η καρβαμιδομεθυλίωση των καταλοίπων κυστεΐνης ορίστηκε ως σταθερή τροποποίηση. Το πρόγραμμα MASCOT δίνει μια τιμή για κάθε έλεγχο που βασίζεται στο σκορ MOWSE (Molecular Weight Search Score). Η τιμή αυτή διαμορφώνεται από ένα αριθμό παραγόντων όπως το ποσοστό των πεπτιδίων που διασταυρώνονται και το πραγματικό σφάλμα μεταξύ των πεπτιδικών μαζών για την πρωτεΐνη που έχει αναγνωρισθεί και τις παρατηρούμενες πεπτιδικές μάζες. Συγκεκριμένα, MASCOT σκορ μεγαλύτερα από την τιμή 61 θεωρήθηκαν σημαντικά ($P < 0.05$).

3.11.8 Αναζήτηση σε βάσεις δεδομένων

Τα φάσματα που προέκυψαν ελέγχθηκαν έναντι της βάσης δεδομένων LinfantumAnnotatedProteins_TriTrypDB-2.5.fasta (<http://tritrypdb.org>) χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο αναζήτησης SEQUEST (Proteome Discoverer version 1.2). Χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες παράμετροι: ειδικότητα θρυψίνης με ένα επιτρεπόμενο λάθος, ιοντική ανεκτικότητα προϊόντος στα 0.8Da, διαφορικές τροποποιήσεις της οξείδωσης της μεθειονίνης και καρβαμιδομεθυλίωση της κυστεΐνης.

Στην περίπτωση πρωτεϊνών που εμφάνιζαν διευρυμένο ισοηλεκτρικό σημείο, τα φάσματά τους ελέγχθηκαν για πιθανές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, έναντι της βάσης δεδομένων με διαφορικές τροποποιήσεις για τη φωσφορυλίωση της σερίνης και θρεονίνης (+79.97), οξείδωση της μεθειονίνης (+15.99) και καρβαμιδομεθυλίωση της κυστεΐνης (+57.02).

3.12 Τεχνικές μελέτης κυτταρικού θανάτου

Οι τεχνικές εντοπισμού και μελέτης αποπτωτικών κυττάρων βασίζονται σε μορφολογικές παρατηρήσεις, βιοχημικές και ανοσοϊστοχημικές μεθόδους και στην ανίχνευση του κατακερματισμένου DNA *in situ*. Η ανάλυση και μελέτη του κυτταρικού κύκλου δίνει πληροφορίες για την απόπτωση καθώς εντοπίζονται τα κύτταρα εκείνα που έχουν διασπασμένο γενετικό υλικό. Η έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης στην εξωτερική μεμβράνη των παρασίτων προηγείται του κερματισμού του DNA και έτσι επιτρέπει την ανίχνευση της αποπτωτικής διαδικασίας στα αρχικά της στάδια.

3.12.1 Υποβολή παρασίτων σε θερμικό σοκ (37°C)

Προμαστιγωτές μορφές παρασίτων *L. donovani* υποβλήθηκαν σε στρεσογόνες συνθήκες που προσομοιάζουν τις συνθήκες διαφοροποίησης του παρασίτου από την προμαστιγωτή στην αμαστιγωτή μορφή. Συγκεκριμένα, παράσιτα στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης υποβλήθηκαν σε θερμικό σοκ (37°C)

για χρονική περίοδο 12, 24 και 48 ωρών. Μετά από κάθε χρονική περίοδο τα παράσιτα συλλέγονται και χρησιμοποιούνται αναλόγως.

3.12.2 Κυτταρομετρία ροής (Fluorescence-activated cell sorting, FACS)

Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί μια τεχνική που επιτρέπει τον ταυτόχρονο έλεγχο φυσικοχημικών χαρακτηριστικών, κατάλληλα επεξεργασμένων κυττάρων. Τα προς ανάλυση κύτταρα μπορεί προηγουμένως να έχουν σημανθεί με φθορίζουσες χρωστικές ή με αντισώματα που φέρουν πάνω τους συζευγμένα φθοριοχρώματα. Η τεχνική μπορεί επίσης να προσδιορίσει σκεδαστικά χαρακτηριστικά με βάση την ένταση του φθορισμού και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των προς ανάλυση κυττάρων (πρόσθιος σκεδασμός FSC-μέγεθος κυττάρων και πλάγιος σκεδασμός SSC-εσωτερική πολυπλοκότητα του κυττάρου). Στην παρούσα μελέτη η κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη του κυτταρικού κύκλου των παρασίτων, τη μελέτη της απόπτωσης και της γενικής μορφολογίας των παρασίτων.

3.12.3 Ανάλυση κυτταρικού κύκλου

Προμαστιγωτές μορφές παρασίτων *L. donovani* στατικής φάσης (2×10^7 κύτταρα/ml) ανακαλλιεργήθηκαν σε συγκέντρωση 10^6 κύτταρα/ml και επωάστηκαν στους 25°C για 24 ώρες. Για να μπορέσει να αναλυθεί ο κυτταρικός κύκλος των παρασίτων, απαιτείται πρώτα η προετοιμασία των δειγμάτων των παρασίτων, που περιλαμβάνει σήμανση των παρασίτων με τη χρωστική Propidium Iodide (PI), η οποία προσδένεται στο DNA και RNA των κυττάρων. Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε είναι η παρακάτω:

Τα παράσιτα φυγοκεντρήθηκαν στις 1700rpm για 10 λεπτά και πλύθηκαν μια φορά με 8ml PBS. Το παρασιτικό ίζημα επαναιωρήθηκε με τη βοήθεια 1ml παγωμένης μεθανόλης. Τα μονιμοποιημένα πλέον παράσιτα φυγοκεντρήθηκαν και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε διάλυμα 50μg/ml χρωστικής PI και RNase A (1mg/ml σε PBS).

Η ανάλυση του κυτταρικού κύκλου των παρασίτων (10000 παράσιτα/δείγμα) πραγματοποιήθηκε σε κυτταρομετρητή ροής. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με τη χρήση του προγράμματος CellQuest (BD Biosciences).

3.12.4 Σήμανση *in vivo* με Ανεξίνη V και PI

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, αποτελεί μια μέθοδο ανίχνευσης αποπτωτικών κυττάρων. Υπό φυσιολογικές συνθήκες η φωσφατιδυλοσερίνη συγκεντρώνεται στην κυτταροπλασματική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης. Στα πρώιμα στάδια της απόπτωσης, η φωσφατιδυλοσερίνη μεταναστεύει στην εξωτερική μεριά της κυτταρικής μεμβράνης. Μάλιστα το φαινόμενο αυτό συμβαίνει πριν εμφανιστούν οι χαρακτηριστικές αλλοιώσεις στον πυρήνα του κυττάρου. Η τεχνική σήμανσης χρησιμοποιεί μια πρωτεΐνη με μεγάλη συνάφεια σύνδεσης με τη φωσφατιδυλοσερίνη, την Ανεξίνη V, η οποία φέρει συζευγμένη πάνω της τη φθορίζουσα χρωστική φλουοροσκεΐνη. Η συνδυασμένη σήμανση με Ανεξίνη V και PI, επιτρέπει την κατηγοριοποίηση των κυττάρων σε πρώιμα αποπτωτικά (ανεξίνη V-θετικά), αποπτωτικά (ανεξίνη V-θετικά και PI-θετικά), νεκρωτικά (ανεξίνη V-αρνητική και PI-θετικά) και υγιή (ανεξίνη V και PI αρνητικά).

Για τη σήμανση χρησιμοποιήθηκαν προμαστιγωτές μορφές *L. donovani* λογαριθμικής φάσης. Ως θετικοί μάρτυρες για την απόπτωση χρησιμοποιήθηκαν παράσιτα που εκτέθηκαν σε 4mM υπεροξείδιο του υδρογόνου για 20 λεπτά. Ως θετικοί μάρτυρες για τη νέκρωση χρησιμοποιήθηκαν παράσιτα που εκτέθηκαν σε 0.1% Triton X-100 για 5 λεπτά. Τα δείγματα προετοιμάστηκαν για την ανάλυση με κυτταρομετρία ροής ως εξής:

Τα παράσιτα φυγοκεντρήθηκαν και το ίζημα πλύθηκε (με συνακόλουθη φυγοκέντρωση) μια φορά με παγωμένο PBS. Πληθυσμός 10^6 παρασίτων αραιώθηκε σε διάλυμα επώασης ανεξίνης [10μl διαλύματος πρόσδεσης, 10μl PI (τελική συγκέντρωση 5μg/ml), 1μl συμπλόκου ανεξίνης V-FITC, 79μl απεσταγμένου νερού] και ακολούθησε επώαση για 15 λεπτά στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου. 10.000 παράσιτα ανά δείγμα μελετήθηκαν και τα δεδομένα που προέκυψαν αναλύθηκαν με το πρόγραμμα Cell Quest. Τα αποτελέσματα προέκυψαν μετά από 3

τουλάχιστον ανεξάρτητα πειράματα για να εξασφαλιστεί η επαναληψιμότητα και κατ' επέκταση η φερεγγυότητα των αποτελεσμάτων.

3.12.5 *In situ* σήμανση κατακερματισμένων τμημάτων DNA με την τεχνική TUNEL

Η τεχνική TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase TdT-mediated dUTP Nick end labeling) χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό κατακερματισμένου DNA που προκύπτει από την αποπτωτική διαδικασία. Οι θέσεις εντομής στο DNA αναγνωρίζονται από το ένζυμο TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase), το οποίο και καταλύει την προσθήκη μορίων dUTP σε αυτές.

Για την τεχνική TUNEL χρησιμοποιήθηκε το Cell Death Fluorescein Detection kit (Roche), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Χρησιμοποιήθηκαν προμαστιγωτές μορφές *L. donovani* λογαριθμικής φάσης. Ως θετικός μάρτυρας για την απόπτωση χρησιμοποιήθηκαν προμαστιγωτά που εκτέθηκαν σε 4mM υπεροξείδιο του υδρογόνου για 6 ώρες (οι συνθήκες αυτές είναι γνωστό ότι επάγουν την απόπτωση στο παράσιτο). Τα παράσιτα μονιμοποιήθηκαν με 4% παραφορμαλδεΰδη για μια ώρα και στη συνέχεια επώαστηκαν με 0.1% Triton X-100 σε διάλυμα 0.1% κιτρικού νατρίου για 2 λεπτά, έτσι ώστε να αυξηθεί η διαπερατότητα των μεμβρανών. Στη συνέχεια τα κύτταρα πλύθηκαν με PBS, επικαλύφθηκαν με το μίγμα της αντίδρασης TUNEL (TUNEL reaction mixture) και επώαστηκαν για μια ώρα στους 37°C.

Μετά το τέλος της επώασης τα κύτταρα πλύθηκαν με PBS και παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού Leica. Ως TUNEL-θετικά (αποπτωτικά κύτταρα), χαρακτηρίζονται τα κύτταρα εκείνα στα οποία ο πυρήνας έχει επισημανθεί. Το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων υπολογίστηκε μετά τη μέτρηση τουλάχιστον 400 κυττάρων ανά κατηγορία, από 3 ανεξάρτητα πειράματα.

3.13 Ανοσοφθορισμός

Ο ανοσοφθορισμός αποτελεί μια τεχνική αιχμής η οποία επιτρέπει τον εντοπισμό αντιγόνων των κυττάρων ή ιστών, μέσω της χρήσης αντισωμάτων σημασμένων με φθορίζουσες ουσίες. Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής

χρησιμοποιήθηκε ο έμμεσος ανσοφθορισμός με χρήση αντισώματος ειδικού για την υπό μελέτη πρωτεΐνη και ενός δεύτερου αντισώματος αντι-ισοτυπικού (σημασμένο με φθορίζουσα ουσία). Η μέθοδος που ακολουθήθηκε είναι η παρακάτω:

Τα παράσιτα προς μελέτη, φυγοκεντρήθηκαν στις 1400rpm για 10 λεπτά και πλύθηκαν μια φορά με παγωμένο διάλυμα PBS. Στη συνέχεια μονιμοποιήθηκαν με την προσθήκη 1ml PBS που περιέχει 2% (w/v) φορμαλδεΰδη και 0.05% (w/v) γλουταραλδεΰδη για 30 λεπτά. Τα μονιμοποιημένα κύτταρα πλύθηκαν μια φορά με PBS και επαναιωρήθηκαν σε 1ml PBS.

Σε γυάλινες καλυπτρίδες (επεξεργασμένες με 1mg poly-L-lysine) επιστρώθηκαν 50μl παρασιτικού εναιωρήματος. Μετά την πάροδο μιας ώρας οι καλυπτρίδες πλύθηκαν με PBS για να απομακρυνθούν τα κύτταρα που δεν προσκολλήθηκαν. Τα προσκολλημένα κύτταρα επώαστηκαν με διάλυμα 1% (w/v) σε PBS για 1 ώρα. Ακολούθως οι πυρήνες επεξεργάστηκαν με 10μg/ml PI και 50μg/ml RNase A. Το πρώτο αντίσωμα διαλύθηκε σε PBS που περιέχει 0.1% Triton X-100 και 3% BSA και προστέθηκε στα κύτταρα (επώαση 1 ώρα). Το αντίσωμα που δε δεσμεύτηκε στα κύτταρα απομακρύνθηκε με διαδοχικές εμβαπτίσεις (τουλάχιστον 3) σε διάλυμα PBS.

Τα κύτταρα επώαστηκαν περαιτέρω (1 ώρα) με το δεύτερο αντίσωμα που είναι σημασμένο με φθορίζουσα ουσία. Το αντίσωμα που δε δεσμεύτηκε στα κύτταρα απομακρύνθηκε με διαδοχικές εμβαπτίσεις (τουλάχιστον 3) σε διάλυμα PBS. Εντέλει οι καλυπτρίδες μονταρίστηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες και παρατηρήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού TCSSP Leica.

3.14 Αναζήτηση πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την LeishH1

Η αναζήτηση αυτή πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας πειράματα *in vitro* πρόσδεσης με τη χρήση χειμαιρικής GST-LeishH1. Η λογική της τεχνικής, είναι να προσδεθεί αρχικά η συζευγμένη με την GST πρωτεΐνη LeishH1, στα σφαιρίδια γλουταθειόνης. Ακολούθως, τα συζευγμένα πλέον σφαιρίδια επώάζονται με πρωτεϊνικό λύμα που προέρχεται από παράσιτα *L. donovani*. Μετά το τέλος της επώασης, εκλούνται οι όποιες πρωτεΐνες έχουν προσδεθεί στο σύμπλοκο GST-

LeishH1, και ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Η όλη διαδικασία ακολουθεί.

3.14.1 Προετοιμασία βακτηριακής καλλιέργειας και λύση βακτηρίων

Προετοιμάστηκε καλλιέργεια βακτηρίων *E. coli* BL21 pGEX-LeishH1 και όταν η οπτική πυκνότητα (O.D._{600nm}) της καλλιέργειας έγινε ίση με 0,6 προστέθηκε IPTG σε τελική συγκέντρωση 0.1mM και ακολούθησε περαιτέρω επώαση της καλλιέργειας στους 37°C για 3 ώρες.

Μετά το πέρας των 3 ωρών, τα βακτήρια φυγοκεντρήθηκαν στις 4000rpm για 30 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C και λύθηκαν με την προσθήκη κατάλληλου όγκου διαλύματος λύσης. Ακολούθως υποβλήθηκαν σε 5 κύκλους υπερήχησης των 45 δευτερολέπτων με ισόχρονο διάλειμμα μετά από κάθε κύκλο, σε θερμοκρασία 4°C. Το βακτηριακό λύμα φυγοκεντρήθηκε στις 14000rpm για 20 λεπτά στους 4°C. Μετά τη φυγοκέντρωση το υπερκείμενο φυλάσσεται για περαιτέρω χρήση.

3.14.2 Προετοιμασία σφαιριδίων γλουταθειόνης και πρόσδεση

Ποσότητα 500μl από τα σφαιρίδια γλουταθειόνης (Glutathione Sepharose 4B, GE Healthcare) φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά στα 500g σε θερμοκρασία δωματίου και το υπερκείμενο απορρίφθηκε. Τα σφαιρίδια εξισορροπήθηκαν με την προσθήκη 3ml διαλύματος πρόσδεσης και αναδεύτηκαν ήπια σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 5 λεπτά. Ακολούθως φυγοκεντρήθηκαν στα 500g για 5 λεπτά και το υπερκείμενο απορρίφθηκε. Η παραπάνω διαδικασία επαναλήφθη δυο φορές ακόμα.

Μετά την εξισορρόπηση, τα σφαιρίδια επώαστηκαν με το βακτηριακό λύμα για 1 ώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος υπό ήπια ανάδευση. Μετά το τέλος της επώασης, τα σφαιρίδια φυγοκεντρήθηκαν στις ίδιες συνθήκες όπως παραπάνω, φυλάχθηκε το υπερκείμενο και υποβλήθηκαν σε τρεις διαδοχικές πλύσεις με 5ml διαλύματος πρόσδεσης κάθε φορά. Εφόσον οι πλύσεις ολοκληρώθηκαν τα σφαιρίδια με τη συζευγμένη σε αυτά πλέον GST-LeishH1 διατηρήθηκαν στους -20°C.

3.14.3 Επώαση παρασιτικού λύματος με τα σφαιρίδια γλουταθειόνης και έκλουση

Το παρασιτικό λύμα επώαστηκε με τα σφαιρίδια γλουταθειόνης που έφεραν πλέον συζευγμένη την GST-LeishH1, για 12 ώρες σε θερμοκρασία 4°C υπό ήπια ανάδευση. Μετά το τέλος της επώασης, το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στα 500g για 5 λεπτά και το υπερκείμενο απομακρύνθηκε. Ακολούθησαν τρεις διαδοχικές πλύσεις με 5ml διαλύματος πρόσδεσης κάθε φορά. Τέλος, στα σφαιρίδια προστέθηκαν 500μl διαλύματος έκλουσης και επώαστηκαν για 10 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος υπό ήπια ανάδευση. Τα σφαιρίδια φυγοκεντρήθηκαν στα 500g για 5 λεπτά και το υπερκείμενο φυλάχθηκε.

Συνολικά πραγματοποιήθηκαν τρεις εκλούσεις σε θερμοκρασία περιβάλλοντος χρησιμοποιώντας το κατάλληλο διάλυμα έκλουσης. Οι εκλούσεις ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 12% το οποίο ακολούθως επώαστηκε με διάλυμα χρωστικής colloidal Coomassie για 12 ώρες υπό ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Κατόπιν το πήκτωμα αποχρωματίστηκε και ελέγχθηκαν οι ζώνες που εμφανίζονται. Οι ζώνες που παρουσίασαν διαφορετική έκφραση αποκόπηκαν και προετοιμάστηκαν για ταυτοποίηση μέσω της τεχνικής της φασματομετρίας μάζας όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως.

3.15 Πολυμερισμός της τουμπουλίνης και ιζηματοποίηση των μικροσωληνίσκων

Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για την ιζηματοποίηση των μικροσωληνίσκων βασίστηκε σε ήδη δημοσιευμένη εργασία (Wittmann *et al.*, 1998) και ακολουθεί η συνοπτική περιγραφή της. Βακτηριακή καλλιέργεια 1L βακτηρίων BL21*pLysS* που εκφράζει ίσες ποσότητες των μορίων GST και GST-LeishH1 (Smirlis *et al.*, 2006) ή πληθυσμός 5×10^9 προμαστιγωτών μορφών *L. donovani* λύθηκαν με υπερήχηση και ομογενοποιήθηκαν σε ομογενοποιητή dounce σε διάλυμα σταθεροποίησης μικροσωληνίσκων (100mM PIPES pH7.0, 0.5mM EGTA, 2.5mM MgCl₂, 2mM DTT, 10μg/ml pepstatin, 10μg/ml leupeptin, 10μg/ml aprotinin, 1mM PMSF). Τα κυτταρικά λύματα φυγοκεντρήθηκαν στα 20000g για 20 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C.

Τα υπερκείμενα επαναφυγοκεντρήθηκαν για 90 λεπτά στα 180000g σε θερμοκρασία 4°C. Στα νέα υπερκείμενα που προέκυψαν προστέθηκαν 20μM ταξόλη, 600μg/ml τουμπουλίνης προερχόμενη από χοίρο και 1mM GTP. Η τουμπουλίνη αφέθηκε να πολυμεριστεί για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Οι μικροσωληνίσκοι φυγοκεντρήθηκαν σε διαβάθμιση σουκρόζης 15% και ακολούθως επαναφυγοκεντρήθηκαν στα 30000g για 20 λεπτά σε θερμοκρασία 22°C. Το βήμα αυτό επαναλήφθηκε 2 φορές και οι μικροσωληνίσκοι μαζί με τις σχετιζόμενες πρωτεΐνες αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου και στη συνέχεια στύπωμα κατά Western.

Ο πολυμερισμός της τουμπουλίνης υπολογίστηκε μετρώντας τη θολότητα των λυμάτων που περιέχουν τουμπουλίνη μετά το τέλος της αντίδρασης σε μήκος κύματος 300nm (Mithieux *et al.*, 1984).

Αποτελέσματα

4

4.1 Συγκριτική πρωτεομική ανάλυση μεταξύ των παρασίτων *Leishmania donovani* pX63 και pX63LeishH1

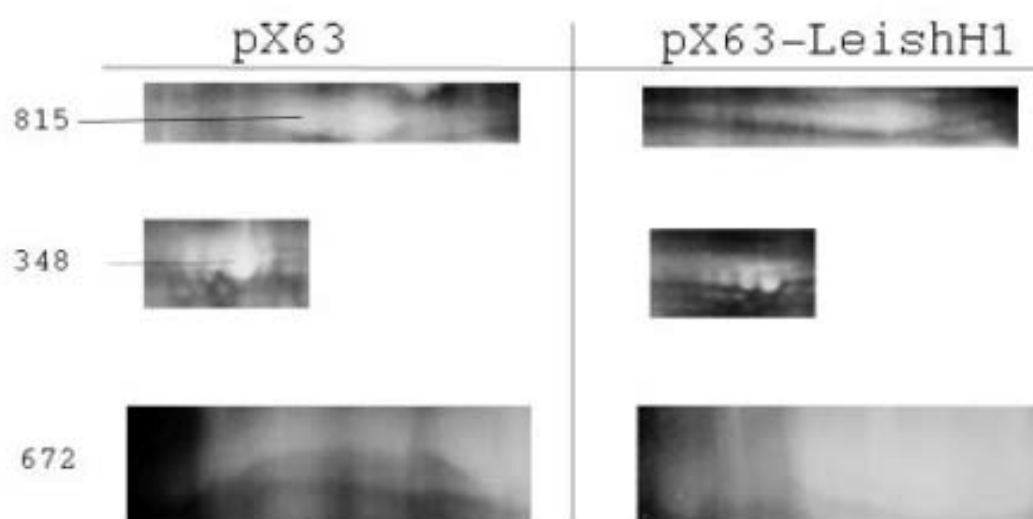
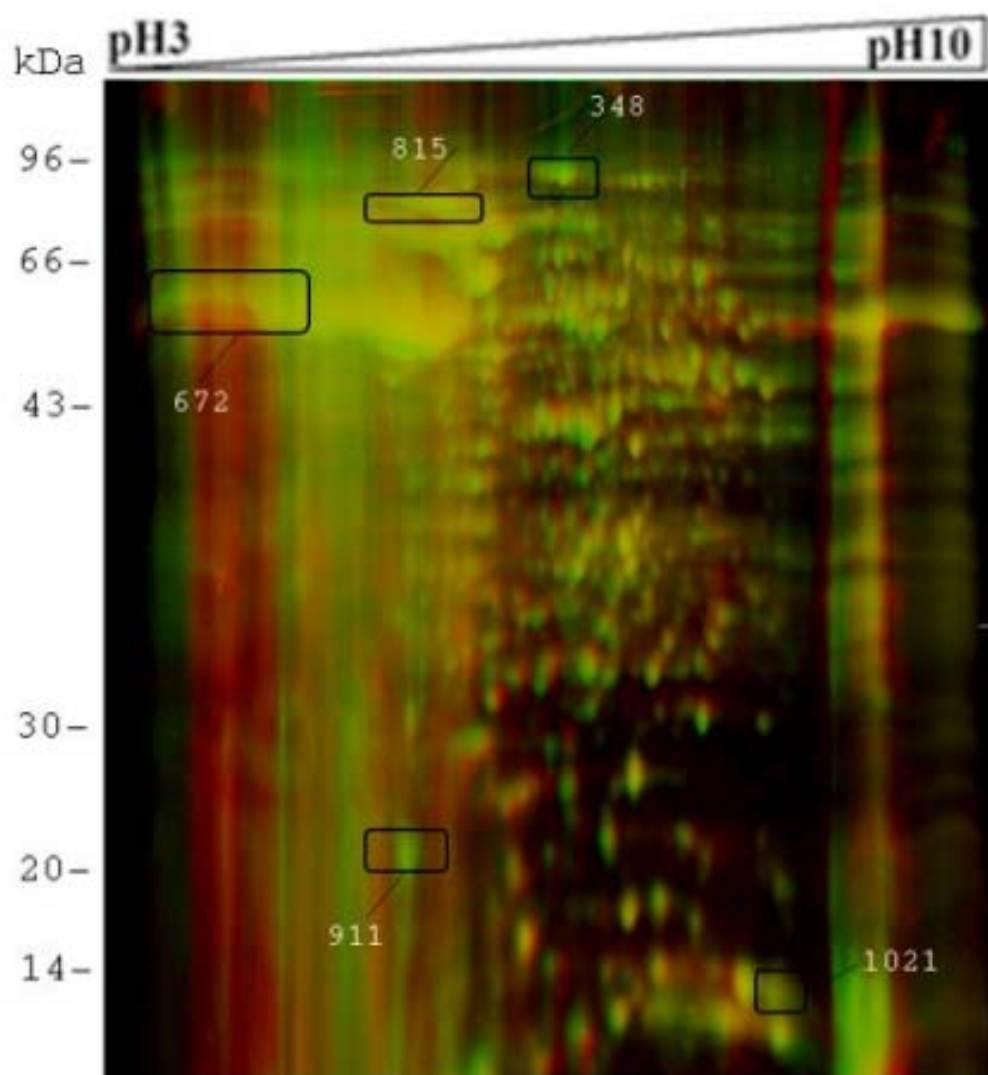
Όπως έχει προαναφερθεί, τα παράσιτα που υπερεκφράζουν τη LeishH1, παρουσιάζουν μειωμένη μολυσματικότητα τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* (Smirlis et al., 2006). Για να μπορέσουμε να ταυτοποιήσουμε πρωτεΐνες που σχετίζονται με αυτή την απώλεια μολυσματικότητας στα παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1, πραγματοποιήσαμε συγκριτική πρωτεομική ανάλυση χρησιμοποιώντας την τεχνική της δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης. Για τη διαδικασία αυτή συγκρίναμε το ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα από παράσιτα *L. donovani* που υπερεκφράζουν την LeishH1 (pX63-LeishH1) και παράσιτα ελέγχου που φέρουν μόνο το πλασμίδιο (pX63). Για να εξασφαλίσουμε ότι οι διαφορές που παρατηρούνται στο πρωτέωμα δεν οφείλονται στον κυτταρικό κύκλο, συγχρονίσαμε λογαριθμικά παράσιτα pX63 και pX63-LeishH1 στη φάση G1/S του κυτταρικού κύκλου με προσθήκη υδροξουρίας και αναλύσαμε το περιεχόμενο DNA των παρασίτων με κυτταρομετρία ροής. Η ανάλυση αυτή (Πίνακας 2) έδειξε πως οι δυο αυτές κυτταρικές σειρές έχουν παρόμοιο κυτταρικό κύκλο πριν την πρωτεομική ανάλυση.

		Λογαριθμική Φάση	Μετά από συγχρονισμό με HU
pX63	G0/G1	54%	72%
	S	14%	9%
	G2/M	31%	18%
pX63-LeishH1	G0/G1	55%	75%
	S	15%	7%
	G2/M	28%	18%

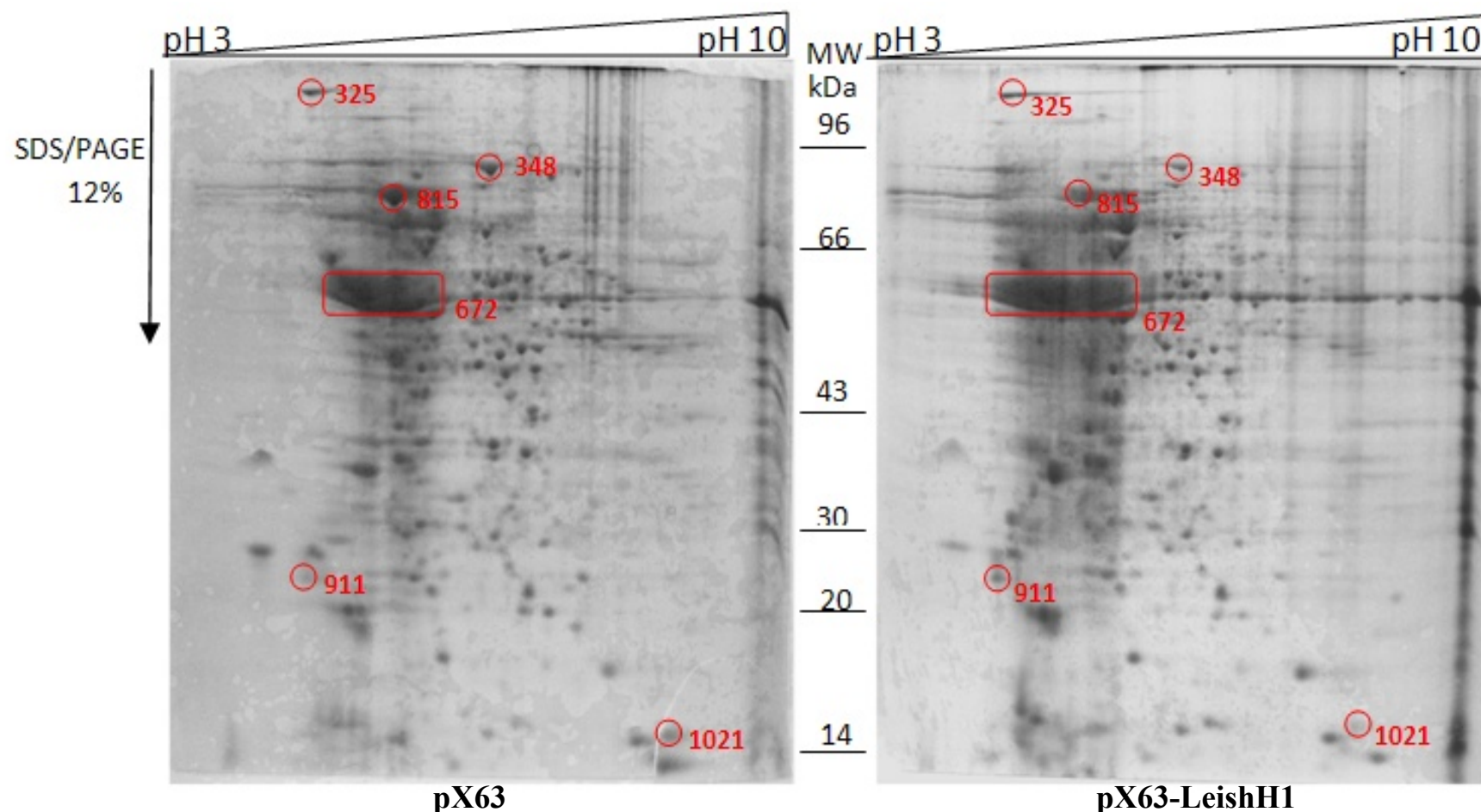
Πίνακας 2: Περιεχόμενο DNA, παρασίτων *L. donovani* pX63 & pX63-LeishH1 στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης και μετά από συγχρονισμό με HU. Ο υπολογισμός πραγματοποιήθηκε αφού τα παράσιτα υποβλήθηκαν σε χρώση με PI και ο κυτταρικός κύκλος αναλύθηκε με κυτταρομετρία ροής.

Κεφάλαιο 4: Αποτελέσματα

Για την πρωτεομική ανάλυση πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον τρεις επαναλήψεις από τρεις διαφορετικές καλλιέργειες παρασίτων για να εξασφαλιστεί η φερεγγυότητα των αποτελεσμάτων. Τα πηκτώματα που προέκυψαν από την πρωτεομική ανάλυση υποβλήθηκαν σε χρώση με τη χρωστική Colloidal Comassie και Sypro Ruby Stain. Συνολικά, περισσότερες από 1500 πρωτεϊνικές ζώνες εντοπίστηκαν, αριθμός που είναι παρόμοιος με άλλες μελέτες. Συγκεκριμένα, για τα παράσιτα ελέγχου εντοπίστηκαν 1530, ενώ για τα παράσιτα που υπερεκφράζουν τη LeishH1, 1544 (Εικόνα 14). Το ποσοστό αντιστοίχησης για τις πρωτεϊνικές ζώνες μεταξύ των δυο σετ πηκτωμάτων ανήλθε στο 94%. Για την αντιστοίχηση και σύγκριση των πηκτωμάτων χρησιμοποιήθηκε το εξειδικευμένο λογισμικό PDQuest v8.0 και ImageQuant v5.0 (Biorad).



Εικόνα 14: Αντιπροσωπευτικά πηκτώματα 2 διαστάσεων ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από παράσιτα *L. donovani* rX63 & rX63-LeishH1 συγχρονισμένα στο στάδιο G1/S του κυτταρικού κύκλου. Τα πηκτώματα υποβλήθηκαν σε χρώση με τη χρωστική Sypro Ruby. Οι αριθμοί υποδεικνύουν πρωτεΐνες που επαναλαμβανόμενα παρουσιάζουν διαφορεική έκφραση στα παράσιτα rX63-LeishH1 σε σύγκριση με τα παράσιτα ελέγχου rX63. Η εικόνα αποτελεί συγχώνευση δυο εικόνων από τα παράσιτα rX63 (πράσινο ψευδοχρώμα) και rX63-LeishH1 (κόκκινο ψευδοχρώμα). Οι ενθέσεις που ακολουθούν αντιστοιχούν σε μεγεθυμένες περιοχές (3X) των πρωτεϊνικών ζωνών 348, 815 και 672 όπου και φαίνεται πιο καθαρά η διαφορά στην έκφραση.



Εικόνα 15: Πρωτεομική ανάλυση ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων παρασίτων *L. donovani* rX63 & rX63-LeishH1 συγχρονισμένων στη G1/S φάση με υδροξυουρία. Αντιπροσωπευτικά πηκτώματα δυο διαστάσεων. Τα ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα (1.5mg ολικής πρωτεΐνης), κατανεμήθηκαν κατά μήκος των γραμμικών φιλμ ισοηλεκτρικού εντοπισμού και ακολούθως ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 12% (w/v). Τα πηκτώματα υποβλήθηκαν σε χρώση με colloidal Coomassie blue. Τα νούμερα υποδεικνύουν πρωτεΐνες των οποίων τα επίπεδα έκφρασης διαφέρουν ανάμεσα στα δείγματα μετά από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα.

Για περαιτέρω ανάλυση επιλέχθηκαν πρωτεϊνικές ζώνες που διέφεραν επαναλαμβανόμενα σε όλες τις επαναλήψεις και μάλιστα η διαφορά αυτή ήταν στατιστικά σημαντική ανάμεσα στις δυο ομάδες πηκτωμάτων. Όπως φαίνεται και στις ανωτέρω εικόνες (Εικόνα 14 & 15), έξι πρωτεϊνικές ζώνες ήταν επαναλαμβανόμενα διαφορετικές ανάμεσα στα παράσιτα ελέγχου και τα παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1. Από αυτές, μια υπερεκφράζεται στα παράσιτα pX63-LeishH1, τρεις εκφράζονται σε χαμηλότερα επίπεδα και δυο παρουσιάζουν διαφορετική κατανομή του ισοηλεκτρικού τους σημείου.

4.2 Ταυτοποίηση πρωτεϊνικών ζωνών

Οι πρωτεϊνικές ζώνες που επιλέχθηκαν για αναγνώριση, υποβλήθηκαν σε ενζυμική πέψη και ακολούθως σε φασματομετρία μάζας. Από τις έξι πρωτεΐνες που επιλέχθηκαν, τέσσερις τελικά αναγνωρίστηκαν. Τα στοιχεία για τις τέσσερις αυτές πρωτεΐνες παρατίθενται στον πίνακα που ακολουθεί.

Οι δυο πρωτεϊνικές ζώνες (348 & 815) που επαναλαμβανόμενα παρουσίαζαν χαμηλότερη έκφραση στα παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1 ταυτοποιήθηκαν ως παράγοντας επιμήκυνσης 2 (eEF-2) και πρωτεΐνη θερμικού σοκ 83 (HSP83) και παρουσίασαν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης κατά 2.0 και 2.4 φορές αντίστοιχα. Οι ζώνες με ευρύτερη κατανομή του ισοηλεκτρικού σημείου (325 & 672) αναγνωρίστηκαν ως πρωτεΐνη σχετιζόμενη με μικροσωληνίσκους (microtubule associated protein, MAP) και ένα μίγμα α- και β-τουμπουλίνης αντίστοιχα.

Η ευρύτερη κατανομή του ισοηλεκτρικού σημείου των πρωτεϊνικών ζωνών συνήθως σχετίζεται με μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών που περιέχονται σε αυτές. Για το λόγο αυτό τα πεπτίδια τουμπουλίνης που ανακτήθηκαν, ελέγχθηκαν για την πιθανή παρουσία μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων. Οι τουμπουλίνες παρουσιάζουν μια ποικιλία ΜΜΤς όπως γλουταμυλίωση (α- και β- τουμπουλίνη), ακετυλίωση και τυροσινίωση (α- τουμπουλίνη) (Chavan *et al.*, 2007, Kohl & Gull, 1998), φωσφορυλίωση (Prasad & Dey, 2000, Rosenzweig *et al.*, 2008) και γλυκοσυλίωση (Rosenzweig *et al.*, 2008). Παρ' όλο που στη συγκεκριμένη ανάλυση, οι ανωτέρω τροποποιήσεις αναζητήθηκαν στα πεπτίδια τουμπουλίνης, εντέλει δεν κατέστη δυνατό να

Κεφάλαιο 4: Αποτελέσματα

εντοπίσουμε κάποια. Αυτό θα μπορούσε να οφείλεται σε διάφορους λόγους όπως για παράδειγμα στην πολύ χαμηλή αναλογία του τροποποιημένου πεπτιδίου στη συγκεκριμένη ομάδα πεπτιδίων (Wastling *et al.*, 2012).

Κεφάλαιο 4: Αποτελέσματα

Κωδικός πρωτεΐνης	Πρωτεΐνη που ταυτοποιήθηκε	Κωδικός βάσης δεδομένων	Μέγεθος kDa (θεωρητικό /πειραματικό)	Θεωρητικό Ip / Πειραματικό Ip	Αριθμός πεπτιδίων που ταυτοποιήθηκαν	Ποσοστό κάλυψης της πρωτεΐνης	Σκορ	Παρατηρούμενη αλλαγή στα παράσιτα rX63-LeishH1	Διαφορά στην έκφραση / τιμή <i>p</i>
325	Microtubule associated protein, putative	LinJ.05.0380	165.1/160.5	4.82/4.83	12	74.56%	145.18**	Ευρύτερη κατανομή Ip	-
348	Elongation factor 2	LinJ.36.0190	94.9/95.0	5.7/6.4	13	31.24%	134*	Υποεκφράζεται	2.0/0.0019
815	Heat shock protein 83-1	LinJ.33.0350	80.8/82.1	5.1/5.53	9	32.94%	129*	Υποεκφράζεται	2.4/0.0014
672	α -tubulin β -tubulin	LinJ.13.0330 LinJ.08.1280	49.7/51.0 49.7/51.0	4.45/5.25 4.65/5.25	11 12	43.68% 41.98%	157*	Ευρύτερη κατανομή Ip	-
911	Δεν αναγνωρίστηκε	-	-/23.0	-/4.85	-	-	-	Υπερεκφράζεται	0.43/0.0024
1021	Δεν αναγνωρίστηκε	-	-/13.0	-/8.41	-	-	-	Υποεκφράζεται	1.8/0.0020
122	Mitochondrial processing peptidase alpha subunit, putative, metallo-peptidase, Clan ME, Family M16	LinJ.21.0400	51.2/45.0	7.47/7.4	18	50.96%	285.79**	Υποεκφράζεται	2.1/0.0019
158	β -tubulin	LinJ.08.1290	49.7/48.5	4.65/5.25	17	28.89%	113.26**	Υπερεκφράζεται	0.16/0.0020

Πίνακας 3: Πρωτεΐνες με διαφορετική έκφραση στα rX63-LeishH1 παράσιτα σε σχέση με τα rX63 παράσιτα ελέγχου. *: MASCOT σκορ, **: SERQUEST σκορ, τιμή *p*, two-tail, paired, Student's *t*-test. Ip: isoelectric point.

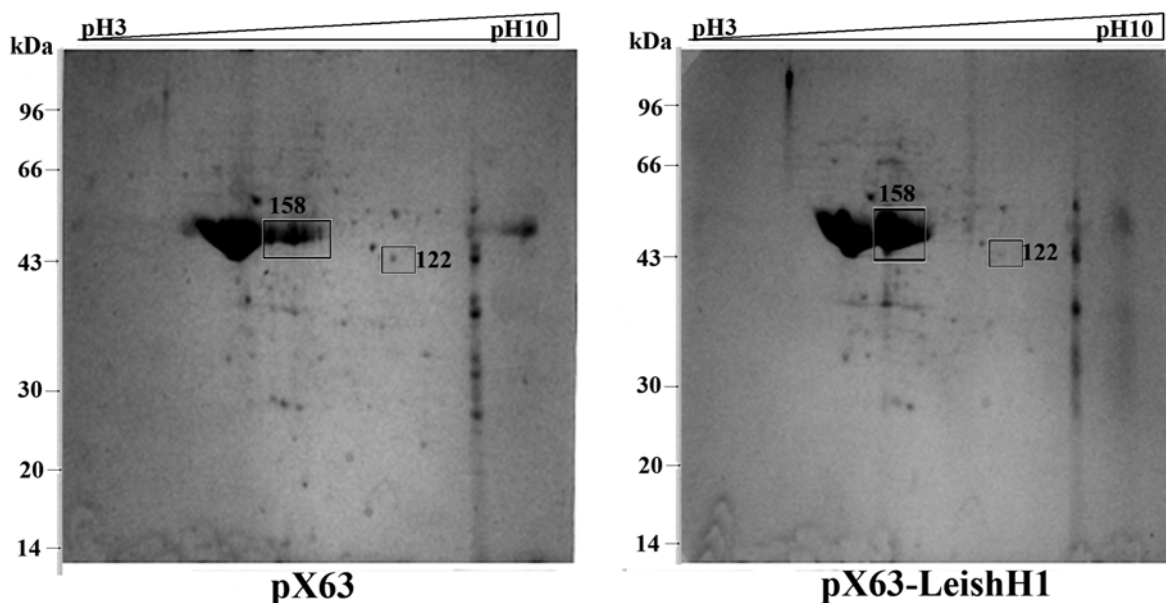
Επί πρόσθετα, αναζητήσαμε πιθανά μοτίβα φωσφορυλίωσης στη MAP πρωτεΐνη, καθώς είναι γνωστό ότι οι πρωτεΐνες αυτές ρυθμίζονται με φωσφορυλίωση. Εντοπίσαμε ένα φωσφορυλιωμένο πεπτίδιο (hnnvSadgtadaaps) με σκορ υψηλής εμπιστοσύνης, το οποίο ανιχνεύθηκε μόνο στα παράσιτα που υπερεκφράζουν τη LeishH1. Το μοτίβο αυτό φωσφορυλίωσης ανήκει στην κινάση της κασεΐνης 1α και προβλέφθηκε με το σύστημα GPS2.1 ρυθμισμένο σε υψηλό κατώφλι ουδούς (Xue Y. *et al.*, 2011).

4.3 Επιβεβαίωση των παρατηρούμενων διαφορών στην κατανομή της τουμπουλίνης στην ηλεκτροφόρηση δυο διαστάσεων μεταξύ των παρασίτων ελέγχου και των παρασίτων που υπερεκφράζουν την LeishH1

Η τουμπουλίνη είναι μια από τις πιο άφθονες πρωτεΐνες της *Leishmania* και αποτελεί κύριο συστατικό του κυτταροσκελετού. Με γνώμονα τα στοιχεία αυτά, μια διαφορική έκφρασή της θα είχε ως αποτέλεσμα την απορύθμιση της δυναμικής των μικροσωληνίσκων καθώς και ευρείες κυτταροσκελετικές αλλοιώσεις. Τοιουτοτρόπως, εξετάσαμε με ηλεκτροφόρηση δυο διαστάσεων αν οι διαφορές που παρατηρήσαμε στην έκφραση της τουμπουλίνης στα παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1, εξακολουθούν να υπάρχουν και σε ένα πρωτεϊνικό κλάσμα εμπλουτισμένο σε κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες (αδιάλυτες στο NP40 πρωτεΐνες). Εάν οι διαφορές που παρατηρούνται εξακολουθούν να υπάρχουν και σε αυτό το κλάσμα τότε θα επιβεβαιωνόταν το αποτέλεσμα και επίσης θα αποτελούσε ένδειξη για κυτταροσκελετικές διαφορές ανάμεσα στα δυο στελέχη παρασίτων.

Τουλάχιστον τρεις επαναλήψεις από τρεις διαφορετικές καλλιέργειες παρασίτων πραγματοποιήθηκαν για να εξασφαλιστεί η επαναληψιμότητα και εγκυρότητα των αποτελεσμάτων. Συνολικά 104 και 92 πρωτεϊνικές ζώνες εντοπίστηκαν στα παράσιτα ελέγχου και παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1 αντίστοιχα (Εικόνα 16). Μόνο οι πρωτεϊνικές ζώνες που επαναλαμβάνονταν σε όλες τις επαναλήψεις χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν ότι η διαφορά στην έκφραση της τουμπουλίνης εξακολουθεί να υπάρχει και στο εμπλουτισμένο σε κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες κλάσμα. Παράλληλα, καθώς ο εμπλουτισμός αυτός βοήθησε στο να επιτευχθεί μικρότερη

πολυπλοκότητα στην εικόνα των πηκτωμάτων, ταυτοποιήσαμε μια ακόμα πρωτεΐνη (ζώνη 122) η οποία παρουσιάζει σταθερά χαμηλότερη έκφραση (κατά 2.1 φορές) στα παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1 σε σχέση με τα παράσιτα ελέγχου (Πίνακας 3). Η ζώνη αυτή ταυτοποιήθηκε ως υποθετική α -υπομονάδα της μιτοχονδριακής πεπτιδάσης (mitochondrial processing peptidase alpha subunit, α -MPP).



Εικόνα 16: Αντιπροσωπευτικά πηκτώματα ηλεκτροφόρησης δυο διαστάσεων, πρωτεϊνικών κλασμάτων εμπλουτισμένων σε κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες, προερχόμενων από παράσιτα ελέγχου (pX63) και παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1 (pX63-LeishH1) συγχρονισμένων με υδροξυουρία.

4.4 Επιβεβαίωση της υποέκφρασης των eEF-2 και HSP83 στα παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1 σε σχέση με τα παράσιτα ελέγχου

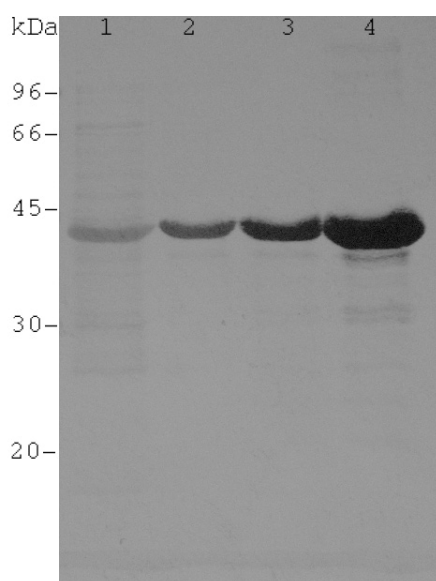
4.4.1 Κλωνοποίηση τμημάτων των πρωτεϊνών eEF-2 και HSP83, ετερόλογη έκφρασή των και παραγωγή πολυκλωνικών αντισωμάτων έναντι αυτών

Για να επιβεβαιώσουμε την υποέκφραση των δυο αυτών πρωτεϊνών στα παράσιτα pX63-LeishH1 αποφασίσαμε να κλωνοποιήσουμε τμήματα των πρωτεϊνών αυτών με απώτερο στόχο την παραγωγή πολυκλωνικών αντισωμάτων έναντι αυτών.

Κεφάλαιο 4: Αποτελέσματα

Για την *LdeEF-2* επιλέξαμε να κλωνοποιήσουμε ένα τμήμα από το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης (αμινοξέα 1-357, LinJ36_V3.0190). Το τμήμα αυτό έχει μήκος 1071 βάσεις. Το τμήμα του γονιδίου κλωνοποιήθηκε στη θέση *NcoI/XhoI* του πλασμιδιακού φορέα *pTriex 1.1*. Μετά την κλωνοποίηση του προϊόντος αντίδρασης PCR στον πλασμιδιακό φορέα, πραγματοποιήθηκε ο μετασχηματισμός βακτηρίων και ο έλεγχος των αποικιών που αναπτύχθηκαν.

Το επόμενο βήμα ήταν η εισαγωγή του πλασμιδίου με το ένθεμα σε βακτήρια *E. coli* BL21 για να πραγματοποιηθεί η ετερόλογη έκφραση του πρωτεϊνικού τμήματος. Στην εικόνα που ακολουθεί (Εικόνα 17) φαίνονται οι εκλούσεις του πρωτεϊνικού τμήματος μετά την απομόνωσή του από το βακτηριακό λύμα με τη χρήση χρωματογραφίας συγγένειας. Το μοριακό βάρος του τμήματος που κλωνοποιήθηκε είναι 40.97kDa.



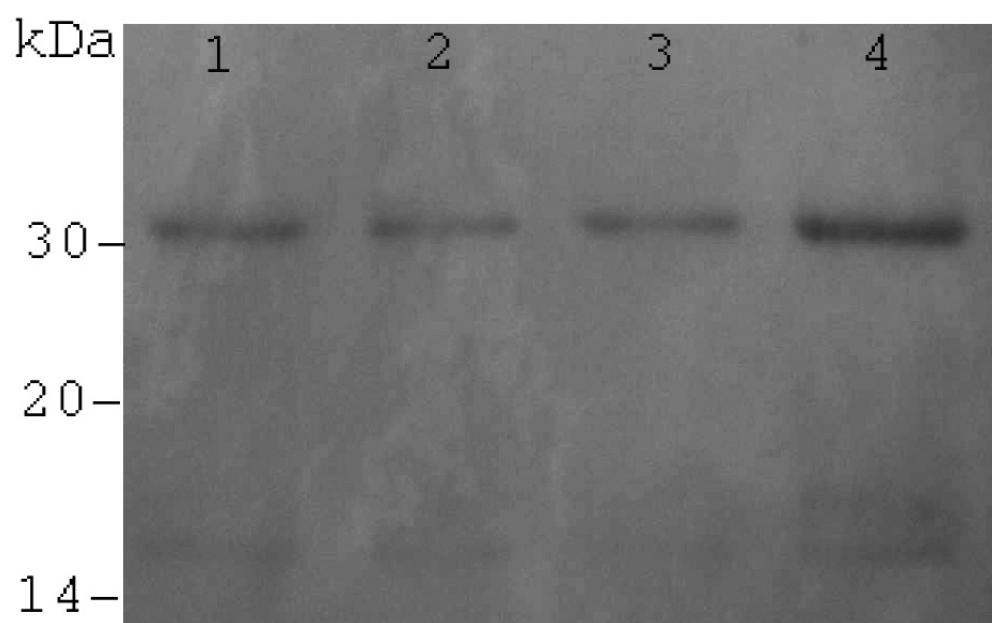
Εικόνα 17: Ηλεκτροφόρηση των εκλούσεων του πρωτεϊνικού τμήματος της *LdeEF-2* μετά τη χρωματογραφία συγγένειας. Διαδρομές 1. Βακτηριακό λύμα πριν την πρόσδεση στα σφαιρίδια, 2. Έκλουση με 10mM ιμιδαζόλιο, 3. Έκλουση με 20mM ιμιδαζόλιο, 4. Έκλουση με 200mM ιμιδαζόλιο.

Τέλος για την παραγωγή του πολυκλωνικού αντισώματος έναντι της *LdeEF-2* χρησιμοποιήθηκε καθαρισμένη πρωτεΐνη από τις παραπάνω εκλούσεις.

Κεφάλαιο 4: Αποτελέσματα

Για την *LdHSP83* επιλέξαμε να κλωνοποιήσουμε ένα τμήμα από το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης (αμινοξέα 431-686, LinJ33_V3.0350). Το τμήμα αυτό έχει μήκος 768 βάσεις. Το τμήμα του γονιδίου κλωνοποιήθηκε στη θέση *NcoI/NotI* του πλασμιδιακού φορέα *pTriex 1.1*. Μετά την κλωνοποίηση του προϊόντος αντίδρασης PCR στον πλασμιδιακό φορέα, πραγματοποιήθηκε ο μετασχηματισμός βακτηρίων και ο έλεγχος των αποικιών που αναπτύχθηκαν.

Το επόμενο βήμα ήταν η εισαγωγή του πλασμιδίου με το ένθεμα σε βακτήρια για να πραγματοποιηθεί η ετερόλογη έκφραση του πρωτεϊνικού τμήματος. Στην εικόνα που ακολουθεί (Εικόνα 18) φαίνονται οι εκλούσεις του πρωτεϊνικού τμήματος μετά την απομόνωσή του από το βακτηριακό λύμα με τη χρήση χρωματογραφίας συγγένειας. Το μοριακό βάρος του τμήματος που κλωνοποιήθηκε είναι 29.96kDa.

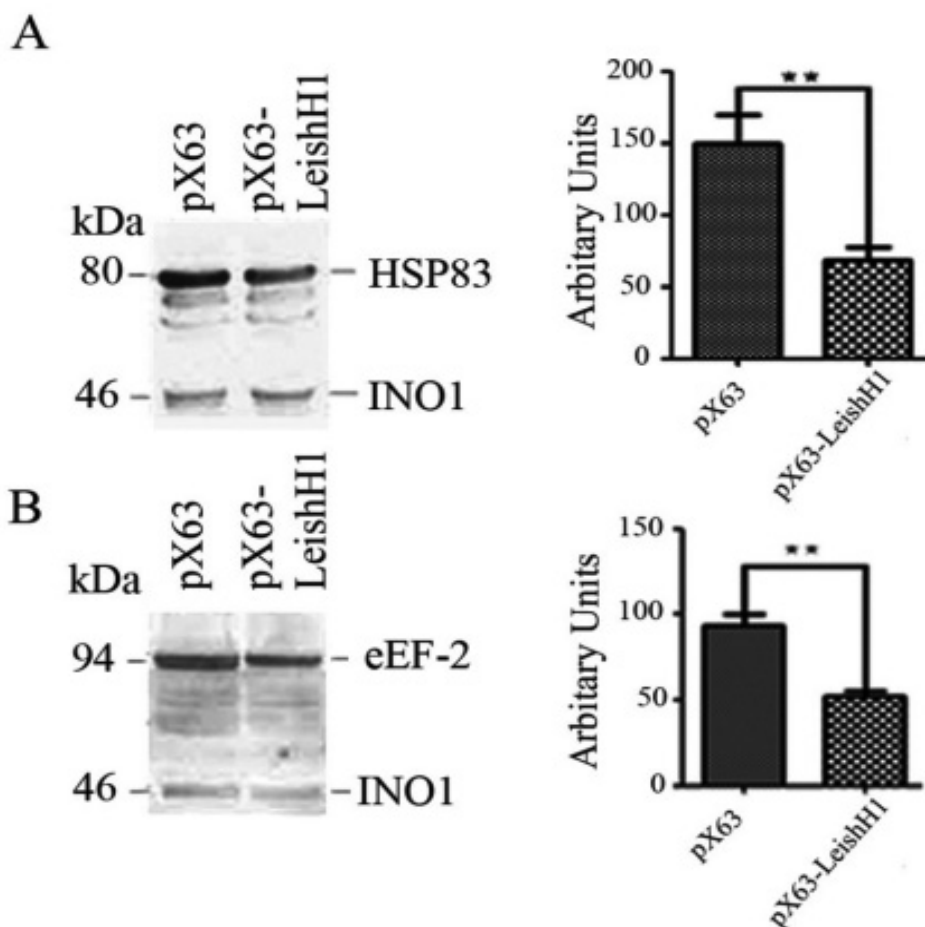


Εικόνα 18: Ηλεκτροφόρηση των εκλούσεων του πρωτεϊνικού τμήματος της *LdHSP83* μετά τη χρωματογραφία συγγένειας. Διαδρομές 1. Βακτηριακό λύμα πριν την πρόσδεση στα σφαιρίδια, 2. Έκλουση με 10mM ιμιδαζόλιο, 3. Έκλουση με 20mM ιμιδαζόλιο, 4. Έκλουση με 200mM ιμιδαζόλιο. Τα μοριακά μεγέθη επισημαίνονται σε kDa.

Τέλος για την παραγωγή του πολυκλωνικού αντισώματος έναντι της *LdHSP83* χρησιμοποιήθηκε καθαρισμένη πρωτεΐνη από τις παραπάνω εκλούσεις.

4.4.2 Σύγκριση των πρωτεϊνικών επιπέδων των *eEF-2* και *HSP83* στα παράσιτα που υπερεκφράζουν την *LeishH1* σε σχέση με τα παράσιτα ελέγχου

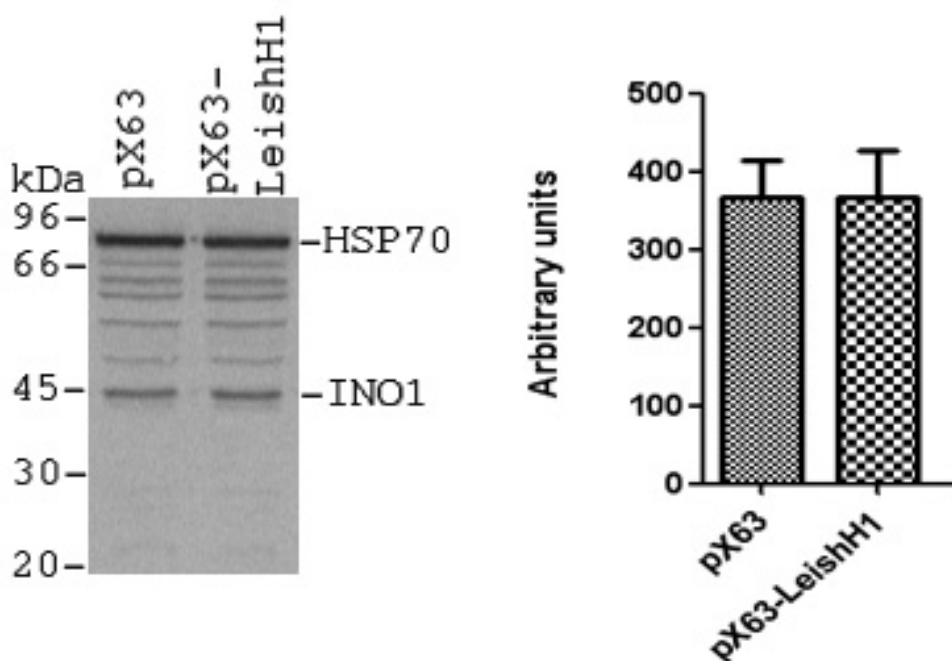
Για να επιβεβαιωθεί η υποέκφραση των *LdeEF-2* και *LdHSP83* στα παράσιτα που υπερεκφράζουν την *LeishH1* σε σχέση με τα παράσιτα ελέγχου, πραγματοποιήσαμε μια ανάλυση με στύπωμα κατά Western χρησιμοποιώντας τα πολυκλωνικά αντισώματα anti-*LdeEF-2* και anti-*LdHSP83* που αναφέρονται παραπάνω. Για να εξασφαλίσουμε ότι οι πρωτεΐνες που αναγνωρίστηκαν από την πρωτεομική διαδικασία δεν ήταν κάτι μη ειδικό, χρησιμοποιήσαμε διαφορετικές καλλιέργειες κλώνων *pX63* και *pX63-LeishH1* για να ελέγξουμε την έκφραση των *LdeEF-2* και *LdHSP83*. Επίσης για να εξασφαλιστεί η ίση ποσότητα παρασίτων που θα τοποθετηθούν σε κάθε διαδρομή του πηκτώματος, το στύπωμα επωάστηκε με αντίσωμα έναντι της *LdINO1* (myo-inositol-1-phosphate synthase) μια πρωτεΐνη που εκφράζεται το ίδιο σε παράσιτα λογαριθμικής και στατικής φάσης ανάπτυξης (Ilg, 2002). Τα μέσα επίπεδα έκφρασης των *LdHSP83* και *LdeEF-2* στα παράσιτα *pX63-LeishH1*, ήταν 2.2 και 1.8 φορές χαμηλότερα από ότι στα παράσιτα ελέγχου, τιμές που είναι πολύ κοντά στις τιμές που προέκυψαν από την πρωτεομική ανάλυση (2.4 και 2.0 αντίστοιχα).



Εικόνα 19: Έκφραση των *LdeEF-2* και *LdHSP83* σε προμαστιγωτές μορφές *pX63* και *pX63-LeishH1*. Πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από προμαστιγωτά *pX63* και *pX63-LeishH1* στο τέλος της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης αναλύθηκαν με SDS/PAGE και στύπωμα κατά Western (ανά διαδρομή πρωτεΐνη από 10^7 παράσιτα). Τα μοριακά μεγέθη επισημαίνονται σε kDa. Α. Στύπωμα κατά Western που δείχνει την έκφραση της *LdHSP83*. Η μέση υπερέκφραση (2.2 φορές) φαίνεται στο ραβδόγραμμα και υπολογίστηκε από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Στο ραβδόγραμμα επισημαίνονται επίσης και οι τυπικές αποκλίσεις (** Σημαντικά διαφορετική από την αντίστοιχη τιμή ελέγχου. $P < 0.05$, two-tail, paired, Student's *t*-test). Β. Στύπωμα κατά Western που δείχνει την έκφραση της *LdeEF-2*. Η μέση υπερέκφραση (1.8 φορές) φαίνεται στο ραβδόγραμμα και υπολογίστηκε από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Στο ραβδόγραμμα επισημαίνονται επίσης και οι τυπικές αποκλίσεις (** Σημαντικά διαφορετική από την αντίστοιχη τιμή ελέγχου. $P < 0.05$, two-tail, paired, Student's *t*-test).

4.5 Έλεγχος των επιπέδων έκφρασης της HSP70 στα παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1 σε σχέση με τα παράσιτα ελέγχου

Η υποέκφραση της HSP83 στα παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1 φαίνεται να είναι ειδική και να μην σχετίζεται με άλλες HSPs, καθώς η πρωτεομική ανάλυση δεν απέφερε στοιχεία για άλλες πρωτεΐνες θερμικού σοκ. Σε αυτό το πλαίσιο και για να επιβεβαιώσουμε την υπόθεσή μας, σκεφτήκαμε να ελέγξουμε και τα επίπεδα έκφρασης της HSP70. Η τελευταία αποτελεί μια από τις πιο άφθονες σε ποσότητα πρωτεΐνες του παρασίτου και επιπλέον είναι γνωστή η συνεργασία της με την HSP83. Όπως φαίνεται και στην εικόνα που ακολουθεί (Εικόνα 20), δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην έκφραση της πρωτεΐνης ανάμεσα στα παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1 και τα παράσιτα ελέγχου, υποδηλώνοντας ότι η παρατηρούμενη υποέκφραση της HSP83 είναι συγκεκριμένο και ανεξάρτητο γεγονός στα pX63-LeishH1 παράσιτα. Επίσης για να εξασφαλιστεί η ίση ποσότητα παρασίτων που θα τοποθετηθούν σε κάθε διαδρομή του πηκτώματος, το στύπωμα επωάστηκε παράλληλα εκτός του αντισώματος έναντι της *LdHSP70* και με αντίσωμα έναντι της *LdINO1* (myo-inositol-1-phosphate synthase) μια πρωτεΐνη που εκφράζεται το ίδιο σε παράσιτα λογαριθμικής και στατικής φάσης ανάπτυξης (Ilg, 2002).



Εικόνα 20: Έκφραση της *LdHSP70* σε προμαστιγωτές μορφές pX63 και pX63-LeishH1. Πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από προμαστιγωτά pX63 και pX63-LeishH1 στο τέλος της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης αναλύθηκαν με SDS/PAGE και στύπωμα κατά Western (ανά διαδρομή πρωτεΐνη από 10^7 παράσιτα). Τα μοριακά μεγέθη επισημαίνονται σε kDa. Τα επίπεδα έκφρασης φαίνονται στο ραβδόγραμμα και υπολογίστηκαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Στο ραβδόγραμμα επισημαίνονται επίσης και οι τυπικές αποκλίσεις.

4.6 Μελέτη της επίδρασης της υπερέκφρασης της LeishH1 στη μεταγραφή γονιδίων κυτταρικής οικονομίας

Η υπερέκφραση της θηλαστικής $H1^0$ καθυστερεί με παρόμοιο τρόπο όπως και στη *Leishmania* την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Για την ακρίβεια έχει συσχετιστεί με μια γενική καταστολή της μεταγραφικής διαδικασίας όπως παρατηρήθηκε μετά την ανάλυση αρκετών κυκλο-εξαρτώμενων και γονιδίων κυτταρικής οικονομίας (Brown et al., 1996). Για να διαπιστώσουμε εάν η LeishH1 σχετίζεται με μια γενική καταστολή της μεταγραφής, ελέγξαμε τη σχετική ποσότητα των μεταγράφων κυκλο-εξαρτώμενων γονιδίων και γονιδίων κυτταρικής οικονομίας, στα παράσιτα pX63 και pX63-LeishH1, με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης πραγματικού χρόνου (real time RT-PCR). Συγκεκριμένα ελέγχθηκε η έκφραση των γονιδίων: ribosomal protein S29 (S29), fumarate hydratase (FH), phosphomannose isomerase (PMI), cyclin 5 (CYC5), cyclin 6 (CYC6) χρησιμοποιώντας ως γονίδιο ελέγχου το glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH).

	pX63	pX63-LeishH1
CYC5	1.51	1
CYC6	1.62	1
S29	1.20	1
FH	0.61	1
PMI	0.81	1

Πίνακας 4: Διαφορές στα επίπεδα μεταγραφών γονιδίων κυκλο-εξαρτώμενων και οικιακής οικονομίας μεταξύ των παρασίτων pX63 και pX63-LeishH1. Οι τιμές προέκυψαν έπειτα από τρία ανεξάρτητα πειράματα και δείχνουν πόσες φορές μεγαλύτερα ή μικρότερα είναι τα επίπεδα μεταγραφών ενός γονιδίου των παρασίτων ελέγχου, σε σχέση με τα παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1. Σε όλες τις περιπτώσεις οι διαφορές ήταν στο εύρος $0.5 < x < 2.0$.

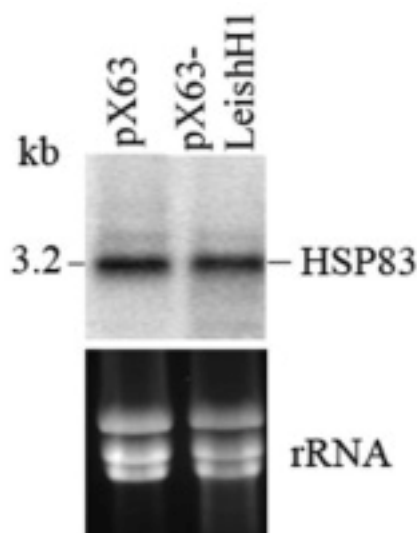
Από τα παραπάνω αποτελέσματα (Πίνακας 4) διαπιστώνουμε πως δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των τιμών που παρουσιάζουν τα παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1 σε σχέση με τα παράσιτα ελέγχου. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει την απουσία κάποιου γενικού μηχανισμού μεταβολής της μεταγραφικής διαδικασίας ή της αφθονίας του RNA που να οφείλεται στην υπερέκφραση της LeishH1.

4.7 Μελέτη μηχανισμού υποέκφρασης της HSP83 στα παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1

4.7.1 Έλεγχος των επιπέδων του *LdHSP83 mRNA* στα παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1 σε σχέση με τα παράσιτα ελέγχου

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η υπερέκφραση της LeishH1 δεν προκαλεί μια γενική καταστολή της μεταγραφικής διαδικασίας. Με βάση το αποτέλεσμα αυτό αποφασίσαμε να ελέγξουμε τα επίπεδα του mRNA της *LdHSP83*, στις δυο κυτταρικές σειρές. Ο υπολογισμός των επιπέδων του mRNA πραγματοποιήθηκε με στύπωμα κατά Northern. Όπως φαίνεται και στην εικόνα που ακολουθεί (Εικόνα

21), δεν παρατηρούνται διαφορές στα επίπεδα του *LdHSP83* mRNA μεταξύ των παρασίτων που υπερεκφράζουν την *LeishH1* και των παρασίτων ελέγχου, υποδηλώνοντας ότι η υποέκφραση της *LdHSP83* μπορεί να οφείλεται σε κάποιο μετα-μεταγραφικό γεγονός.

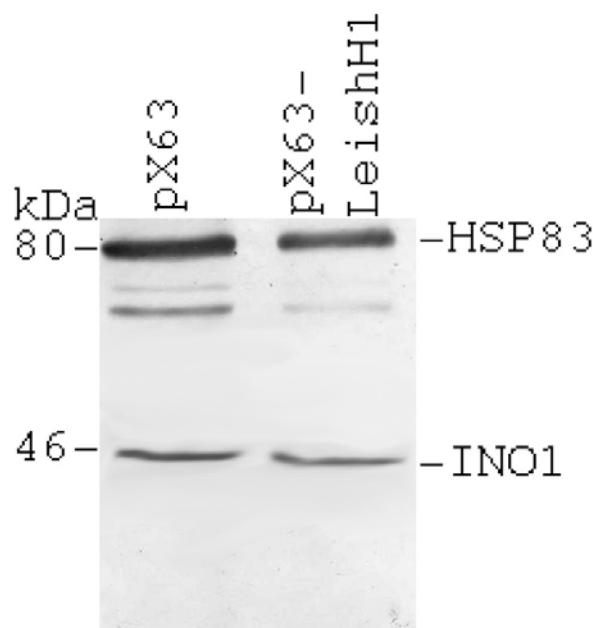


Εικόνα 21: Στύπωμα κατά Northern ολικού RNA απομονωμένου από προμαστιγωτές μορφές παρασίτων pX63 και pX63-LeishH1 στο τέλος της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης, ιχνηθετημένων με [³²P] σημασμένο HSP83 ιχνηθέτη. Σε κάθε διαδρομή τοποθετήθηκαν 7.5μg ολικού RNA. Το rRNA προφίλ των δυο δειγμάτων πριν το στύπωμα κατά Northern φαίνεται στο κάτω μέρος της εικόνας και χρησιμοποιήθηκε για να εξασφαλιστεί η ισόποση παρουσία δείγματος. Οι σχετικές εντάσεις των ζωνών υπολογίστηκαν έπειτα από τρία ανεξάρτητα πειράματα που δείχνουν ίσα επίπεδα έκφρασης και προέκυψαν από τη μέση τιμή της έντασης των HSP83 μεταγράφων διαιρούμενη με την ένταση του αντίστοιχου 18S rRNA.

4.7.2 Μελέτη των επιπέδων της *LdHSP83* μετά από αναστολή της δράσης του πρωτεοσώματος

Εφόσον τα προηγούμενα πειράματα έδειξαν ότι το mRNA της HSP83 παραμένει σταθερό, η μικρότερη έκφρασή της στα παράσιτα που υπερεκφράζουν την *LeishH1* θα μπορούσε δυνητικά να απεικονίζει αυξημένη πρωτεόλυση από το πρωτεόσωμα. Τοιουτοτρόπως, επώασαμε παράσιτα ελέγχου και παράσιτα που υπερεκφράζουν την *LeishH1* με την ουσία MG132 (Carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-L-

leucinal) η οποία αποτελεί αναστολέα του πρωτεοσώματος. Στόχος ήταν να εξακριβώσουμε εάν τα επίπεδα της *LdHSP83* μπορούν να επανέλθουν. Όπως φαίνεται και στην εικόνα που ακολουθεί (Εικόνα 22), τα επίπεδα της *LdHSP83* στα παράσιτα που υπερεκφράζουν την *LeishH1* συνεχίζουν να είναι μειωμένα σε σύγκριση με τα παράσιτα ελέγχου και έτσι μπορούμε να ισχυριστούμε πως τα μειωμένα επίπεδα δε σχετίζονται με μια αυξημένη λειτουργία του πρωτεοσώματος.

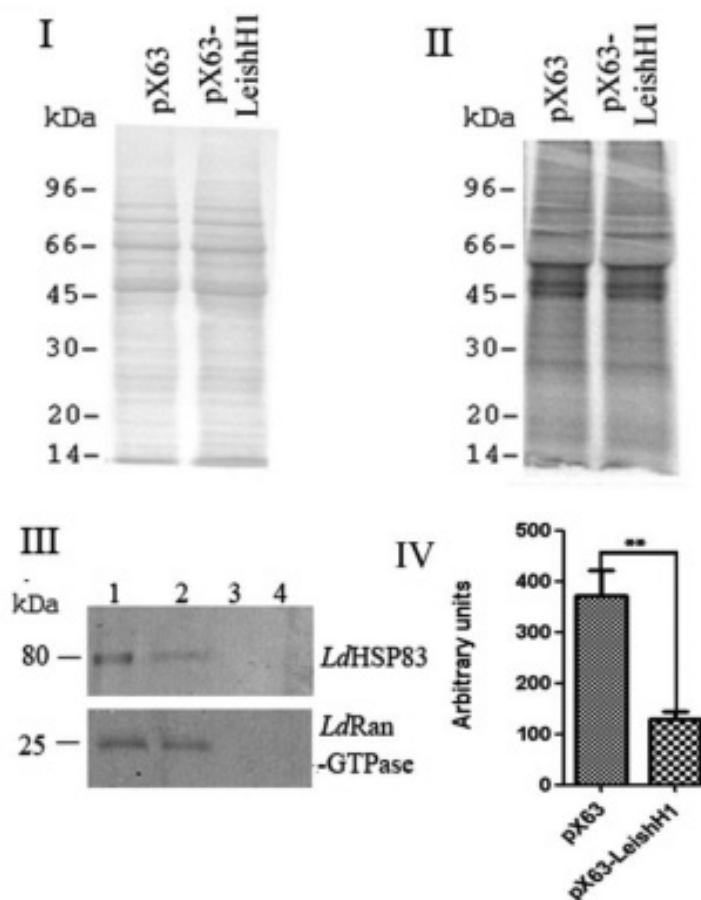


Εικόνα 22: Επίδραση του MG132 στα επίπεδα της *LdHSP83*. Προμαστιγωτές μορφές παρασίτων *rX63* και *rX63-LeishH1* στο τέλος της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης επωάστηκαν για 24 ώρες με MG132 σε τελική συγκέντρωση 5μg/ml. Ακολούθως απομονώθηκαν τα ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα και αναλύθηκαν με στύπωμα κατά Western χρησιμοποιώντας το αντίσωμα anti-*LdHSP83* και το αντίσωμα anti-*LdINO1* για να επιβεβαιωθεί η ίση ποσότητα δείγματος σε κάθε διαδρομή.

4.7.3 Ανάλυση του ρυθμού μετάφρασης της *HSP83* στα παράσιτα που υπερεκφράζουν την *LeishH1* σε σχέση με τα παράσιτα ελέγχου

Το επόμενο βήμα ήταν να ερευνήσουμε το ρυθμό μετάφρασης της *LdHSP83* στα παράσιτα ελέγχου και τα παράσιτα που υπερεκφράζουν την *LeishH1*. Για το σκοπό αυτό προμαστιγωτές μορφές των παρασίτων επωάστηκαν για 2 ώρες με σημασμένη [³⁵S]-μεθειονίνη και στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε ανοσοκαθίζηση

χρησιμοποιώντας ορό anti-*LdHSP83*. Ίσες ποσότητες ολικών και σημασμένων πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν για τα pX63 και pX63-LeishH1 δείγματα, όπως φαίνεται και στην εικόνα που ακολουθεί (Εικόνα 23). Ως στοιχείο ελέγχου επιλέξαμε την Ran-GTPase την οποία απομονώσαμε με ανοσοκαθίζηση χρησιμοποιώντας ορό anti-*LdRan* και όντως διαπιστώσαμε μη σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα δείγματα που ελέγχθηκαν. Η ανάλυση κατέστησε σαφές ότι ο ρυθμός μετάφρασης της *LdHSP83* στα παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1 μειώνεται κατά 2.85 φορές σε σχέση με τα παράσιτα ελέγχου.



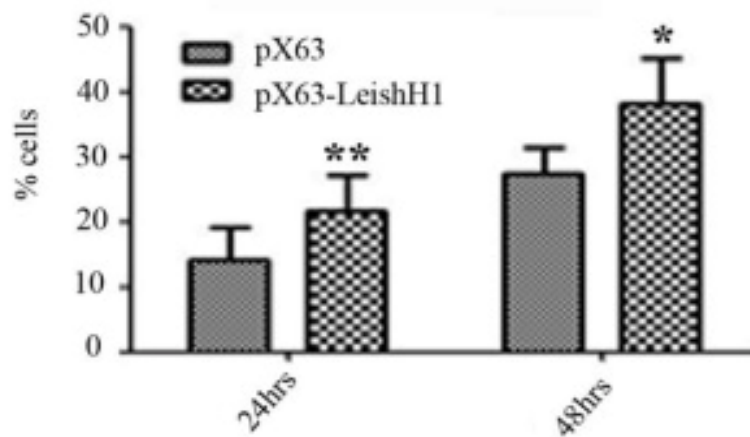
Εικόνα 23: Η μετάφραση της *LdHSP83* είναι μειωμένη στα pX63-LeishH1 παράσιτα.

I. 33% της ολικής πρωτεΐνης (50µg) διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 12% (w/v) και επωάστηκαν με χρώση Coomassie Blue. **II.** Σημασμένα με [³⁵S] πρωτεϊνικά λύματα που αντιπροσωπεύουν 10% της ολικής ποσότητας πρωτεΐνης (καθένα 15µg) εμφανίστηκαν με αυτοραδιογραφία. **III.** Δείγματα που προέκυψαν από την ανοσοκαθίζηση και χωρίστηκαν στα δυο αφού είχαν επωαστεί με ορούς anti-*LdHSP83* & anti-*LdRan-GTPase*, αναλύθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου και ακολούθως εμφανίστηκε η αυτοραδιογραφία του αφυδατωμένου πηκτώματος.

1: λύμα από ρΧ63 παράσιτα επωασμένο με anti-HSP83 ορό (άνω πλαίσιο)/ anti-*LdRan*-GTPase ορό (κάτω πλαίσιο), 2: λύμα από ρΧ63-LeishH1 παράσιτα επωασμένο με anti-HSP83 ορό (άνω πλαίσιο)/ anti-*LdRan*-GTPase ορό (κάτω πλαίσιο), 3: λύμα από ρΧ63 παράσιτα επωασμένο με ορό πριν την ανοσοποίηση, 4: λύμα από ρΧ63-LeishH1 παράσιτα επωασμένο με ορό πριν την ανοσοποίηση. **IV.** Η μέση υπολογισμένη υπερέκφραση (2.85 φορές) υποδεικνύεται στο ραβδόγραμμα και προέκυψε μετά από τρία ανεξάρτητα πειράματα διαιρώντας την ένταση της ζώνης από την ανοσοκαθίζηση της *LdHSP83* με την ένταση της ζώνης της *LdRan*-GTPase, και συγκρίνοντας τους λόγους αυτούς για τα ρΧ63 & ρΧ63-LeishH1 παράσιτα. Οι τυπικές αποκλίσεις σημειώνονται πάνω στα ραβδόγραμμα. **Σημαντικά διαφορετική τιμή από την τιμή ελέγχου, $P < 0.05$, two tail, paired, Student's *t*-test.

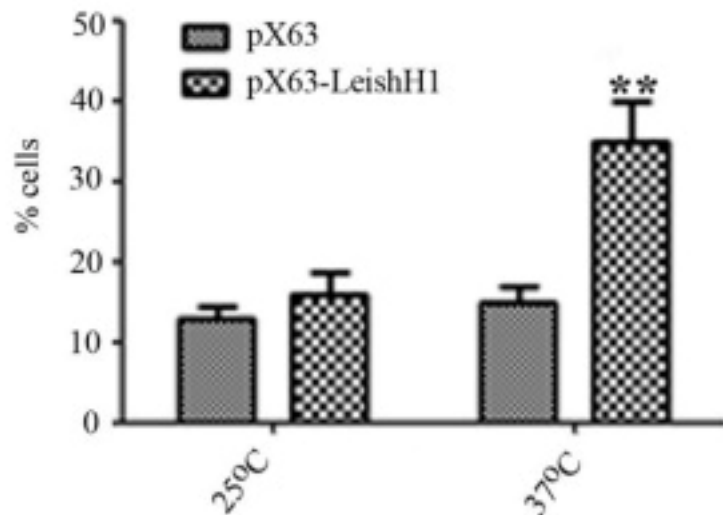
4.8 Ανάλυση της αποπτωτικής διαδικασίας στα παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1 σε σχέση με τα παράσιτα ελέγχου

Η HSP83 γνωρίζουμε ότι εμπλέκεται στη διαδικασία της διαφοροποίησης (Wiesiggl & Clos, 2001a) και η αναστολή της από την ουσία γελνταναμυκίνη επάγει την αποπτωτική διαδικασία κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης (Li et al., 2009). Εφόσον η διαφοροποίηση που ωθείται από τη θερμοκρασία, επάγει την αποπτωτική διαδικασία στη *Leishmania* (Alzate et al., 2007, Raina & Kaur, 2006), υποθέσαμε ότι το μειονέκτημα που παρουσιάζουν τα παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1 κατά τη διαφοροποίηση από την προμαστιγωτή στην αμαστιγωτή μορφή, σχετίζεται με τη χαμηλότερη έκφραση της HSP83 και παράλληλα με αυξημένο ποσοστό απόπτωσης. Για να ελέγξουμε την υπόθεση αυτή υποβάλαμε παράσιτα ρΧ63 και ρΧ63-LeishH1 σε θερμικό σοκ στους 37°C για περίοδο 24 και 48 ωρών. Με την τεχνική της κυτταρομετρίας ροής υπολογίσαμε την αύξηση των υποδιπλοειδίων 24 και 48 ώρες μετά την έναρξη του θερμικού σοκ. Και στις δυο περιπτώσεις όπως φαίνεται και στην εικόνα που ακολουθεί (Εικόνα 24), το ποσοστό των υποδιπλοειδίων ήταν μεγαλύτερο στα παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1.

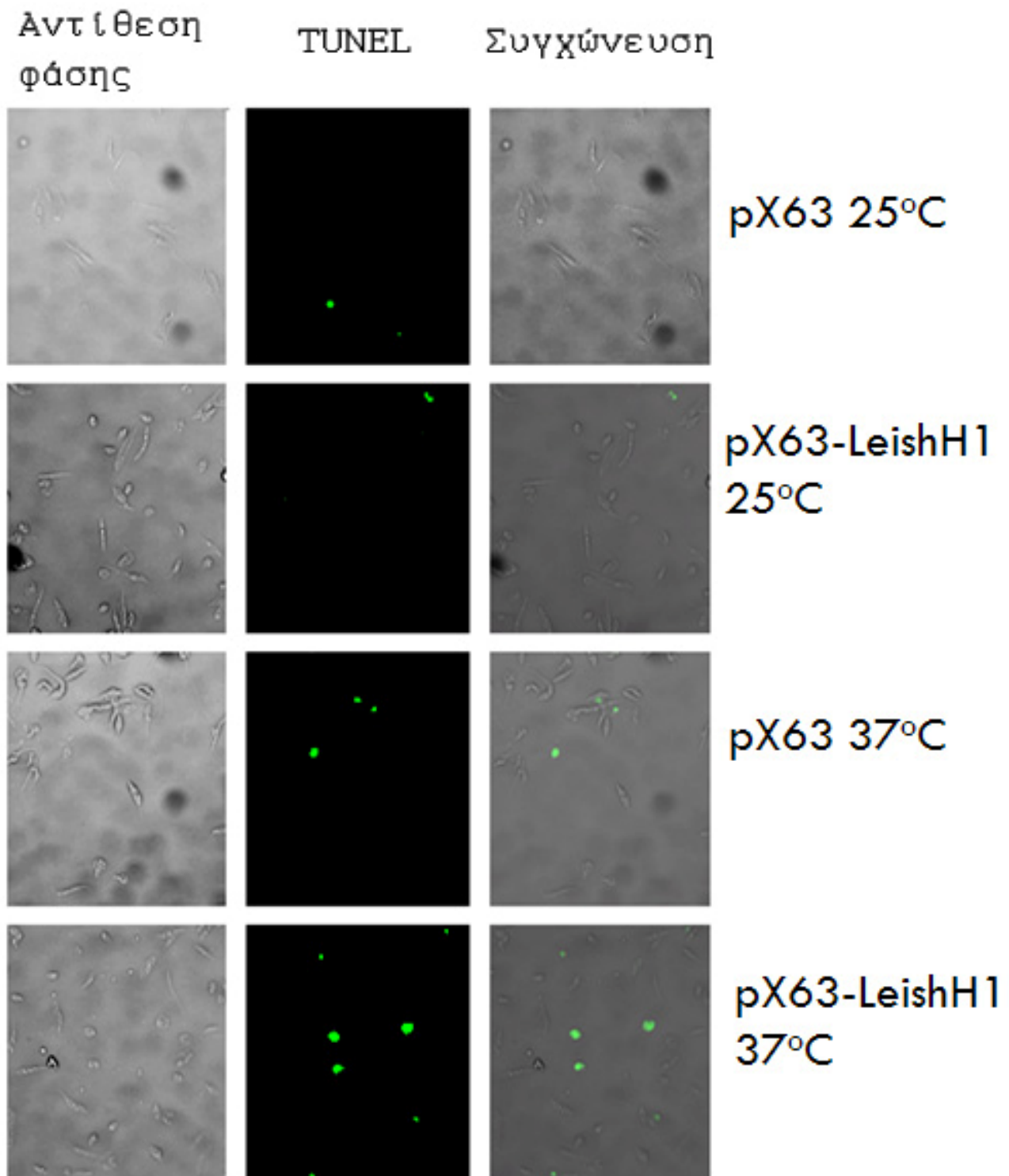


Εικόνα 24: Κατακερματισμός του DNA προμαστιγωτών μορφών pX63 και pX63-LeishH1 παρασίτων μετά από θερμικό σοκ. Μέση τιμή της αύξησης των υποδιπλοειδίων (% κύτταρα) μεταξύ pX63 και pX63-LeishH1 παρασίτων στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης μετά από 24 και 48 ώρες θερμικού σοκ, σε σχέση με την τις υποδιπλοειδίες των ίδιων παρασίτων στους 25°C. Το περιεχόμενο DNA υπολογίστηκε με κυτταρομετρία ροής. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n=9$, two-tailed, paired, Student's *t*-test.

Η θερμο-ευαισθησία των παρασίτων που υπερεκφράζουν την LeishH1 επιβεβαιώθηκε περαιτέρω μέσω της τεχνικής TUNEL η οποία μπορεί και εντοπίζει τα 3'-υδροξυλο άκρα των θραύσεων του DNA που προκύπτουν μετά την αποπτωτική διαδικασία (Εικόνα 25 & 26).



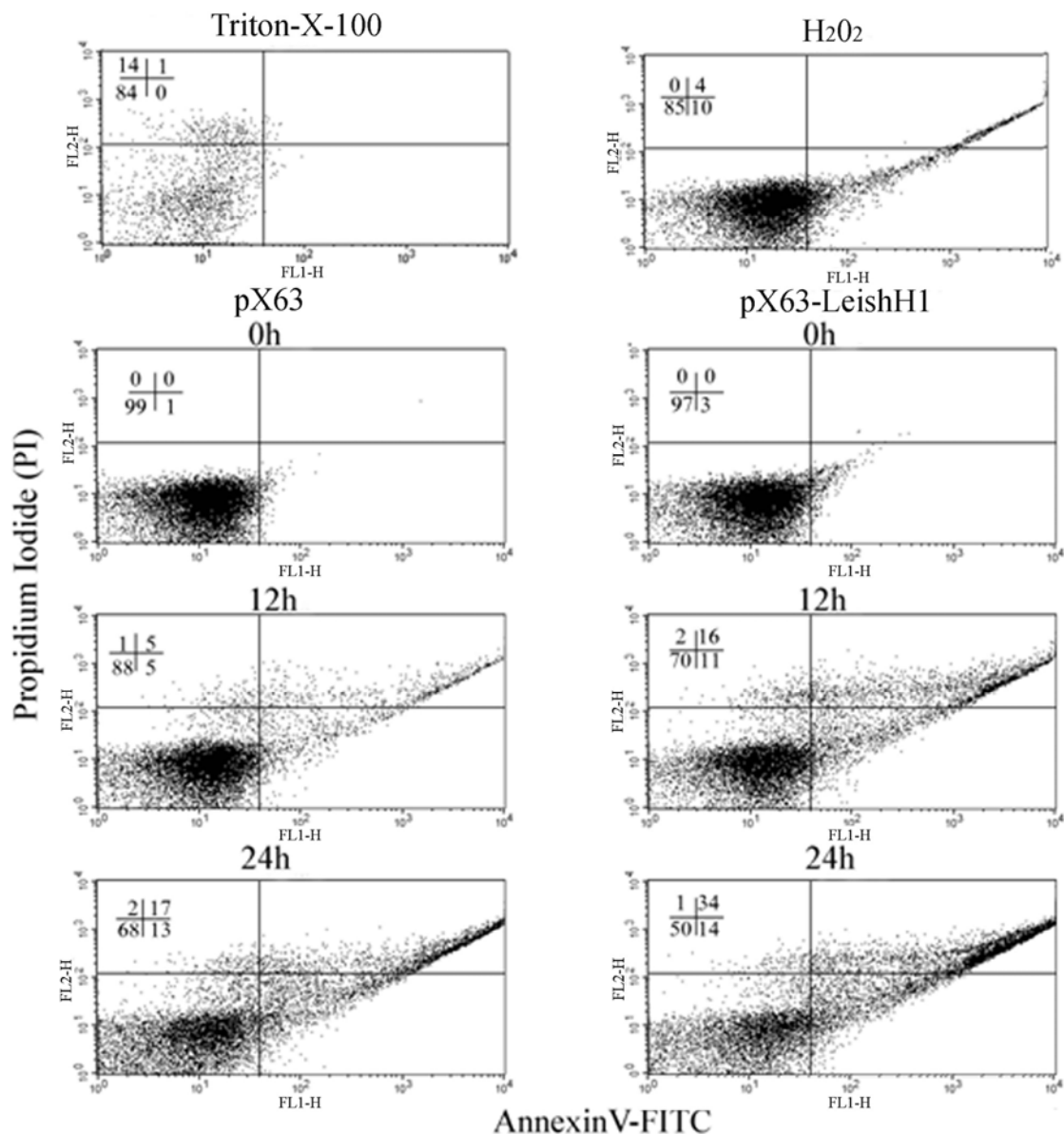
Εικόνα 25: Ποσοστά TUNEL θετικών (+) κυττάρων για τα παράσιτα pX63 και pX63-LeishH1 στους 25°C και μετά το θερμικό σοκ στους 37°C για 24 ώρες. Οι μπάρες σφάλματος αντιπροσωπεύουν τις τυπικές αποκλίσεις. ** $P < 0.01$, $n = 9$, two-tailed, paired, Student's t -test.



Εικόνα 26: Η διάσπαση του DNA, όπως ανιχνεύεται με σήμανση με TUNEL σε παράσιτα pX63 και pX63-LeishH1 στους 25°C και μετά το θερμικό σοκ στους 37°C για 24 ώρες. Τα κύτταρα παρατηρήθηκαν με μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss σε μεγέθυνση 120x. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

Όπως διαπιστώνεται και από τα παραπάνω γραφήματα (Εικόνα 25), τα παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1 εμφανίζουν πολύ μεγαλύτερα ποσοστά (35%) κατακερματισμένου DNA σε σχέση με τα παράσιτα ελέγχου (16%), μετά την υποβολή τους σε θερμικό σοκ για 24 ώρες.

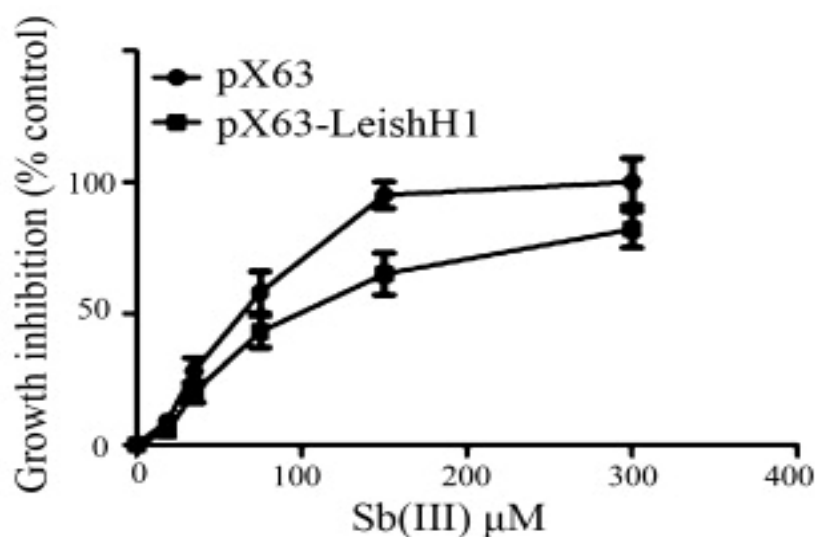
Η έκθεση της φωσφατιδυλο-σερίνης στην εξωτερική μεριά της πλασματικής μεμβράνης αποτελεί ένα από τα χαρακτηριστικά της αποπτωτικής διαδικασίας στα παράσιτα (Jimenez-Ruiz *et al.*, 2010, Smirlis & Soteriadou, 2011). Για να εκτιμήσουμε την έκθεση της φωσφατιδυλο-σερίνης στην εξωτερική μεριά της πλασματικής μεμβράνης και την μη-περατότητα της πλασματικής μεμβράνης, χρησιμοποιήσαμε την τεχνική διπλής χρώσης με Ανεξίνη V / propidium iodide. Ως στοιχεία ελέγχου χρησιμοποιήσαμε παράσιτα μεταχειρισμένα με υπεροξείδιο του υδρογόνου (θετικό στοιχείο ελέγχου απόπτωσης) και με Triton X-100 (θετικό στοιχείο ελέγχου νέκρωσης). Παρατηρούμε πως στην αρχή του πειράματος (0 ώρες) τα παράσιτα δεν εμφανίζουν διαφορές μεταξύ τους. Μετά από 12 ώρες θερμικού σοκ στους 37°C, τα παράσιτα ελέγχου εμφάνισαν 5% πρώιμα αποπτωτικά κύτταρα (Annexin V + / PI -) και 5% τέλο-αποπτωτικά / νεκρωτικά κύτταρα (Annexin V + / PI +), ενώ τα παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1 παρουσίασαν ποσοστά 11% και 16% αντίστοιχα. Μετά από 24 ώρες θερμικού σοκ, παρατηρείται μια αύξηση στα ποσοστά των τέλο-αποπτωτικών / νεκρωτικών κυττάρων με τα παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1 να εμφανίζουν περισσότερο από διπλάσιο ποσοστό (34%) τέλο-αποπτωτικών κυττάρων σε σχέση με τα παράσιτα ελέγχου (14%) (Εικόνα 27).



Εικόνα 27: Επίδραση του θερμικού σοκ στην έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης στην εξωτερική μεριά της πλασματικής μεμβράνης και τη διαπερατότητα της, σε παράσιτα pX63 & pX63-LeishH1. Παράσιτα στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης υποβλήθηκαν σε θερμικό σοκ για 12 και 24 ώρες και ακολούθως μεταχειρίστηκαν με χρώση Annexin V/PI. Τα παράσιτα αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής και τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν με το λογισμικό Cell Quest. Τα ποσοστά των κυττάρων σε κάθε τεταρτημόριο αντιστοιχούν στα κάτωθι: κάτω αριστερά, διπλά αρνητικά άνω αριστερά, PI θετικά κάτω δεξιά, Annexin-V θετικά άνω δεξιά, PI & Annexin-V διπλά θετικά. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

Η προστατευτική δράση της *LdHSP83* δεν περιορίζεται μόνο στο θερμικό σοκ. Ο κυτταρικός θάνατος που επάγεται από τη δράση φαρμακευτικών ουσιών ρυθμίζεται επίσης από την *HSP83* και έχει διαπιστωθεί πως κλινικά απομονωμένα στελέχη παρασίτων με αυξημένα επίπεδα έκφρασης της *HSP83* είναι περισσότερο ανθεκτικά στην απόπτωση που προκαλείται από ουσίες με βάση το αντιμόνιο (Vergnes *et al.*, 2007). Ακολουθώντας τα στοιχεία αυτά, μια ένδειξη ότι τα παράσιτα που υπερεκφράζουν την *LeishH1* είναι πιο ευαίσθητα σε αυτές τις ουσίες θα παρείχε περαιτέρω στήριξη στην εμπλοκή της *HSP83* στο φαινότυπο αυτών των παρασίτων.

Για να διαπιστώσουμε εάν τα παράσιτα που υπερεκφράζουν την *LeishH1* είναι πιο ευαίσθητα στο $[Sb(III)]$ υπολογίσαμε τη συγκέντρωση εκείνη στην οποία αναστέλλεται η ανάπτυξη του 50% του συνολικού πληθυσμού των παρασίτων (IC_{50}). Ο υπολογισμός αυτός πραγματοποιήθηκε για τα παράσιτα ελέγχου (pX63) και τα παράσιτα που υπερεκφράζουν την *LeishH1* (pX63-*LeishH1*). Τα παράσιτα ελέγχου παρουσιάζουν τιμή IC_{50} ίση με $98\mu M$ ενώ τα παράσιτα που υπερεκφράζουν την *LeishH1* μια αρκετά χαμηλότερη τιμή ίση με $59\mu M$ και έτσι είναι πιο ευαίσθητα στο $Sb(III)$ (Εικόνα 28).

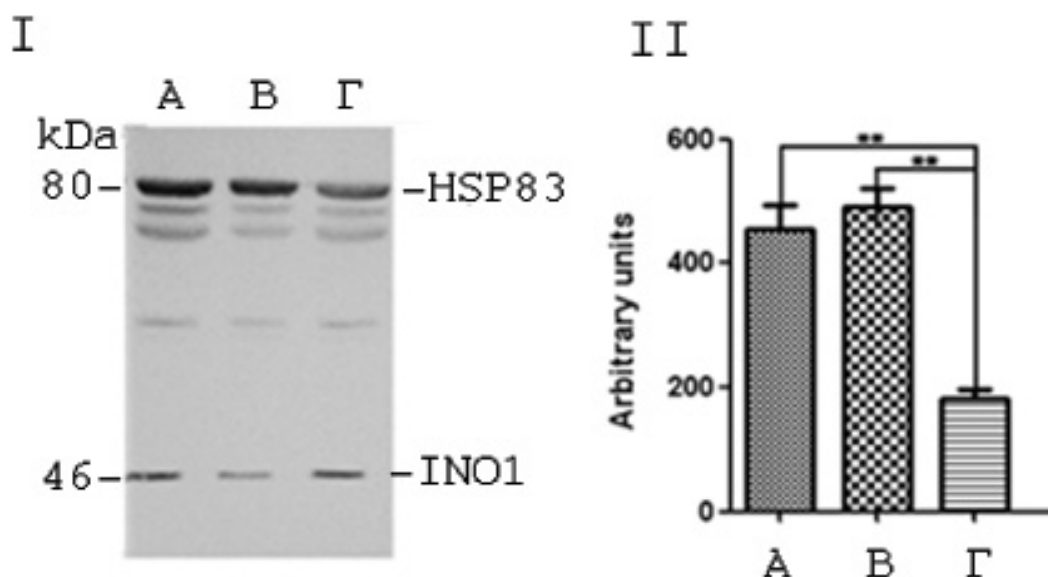


Εικόνα 28: Επίδραση του $[Sb(III)]$ στην επιβίωση προμαστιγωτών μορφών παρασίτων pX63 & pX63-*LeishH1*. Τα παράσιτα επωάστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις $[Sb(III)]$ και η επιβίωσή τους υπολογίστηκε μετά από 72 ώρες με τη μέθοδο του Alamar blue. Οι μπάρες σφάλματος αναπαριστούν τις τυπικές αποκλίσεις, $n=5$.

4.9 Αναπλήρωση των επιπέδων της HSP83 στα παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1

4.9.1 Αναπλήρωση των επιπέδων της HSP83 και έλεγχος των επιπέδων έκφρασης της LeishH1.

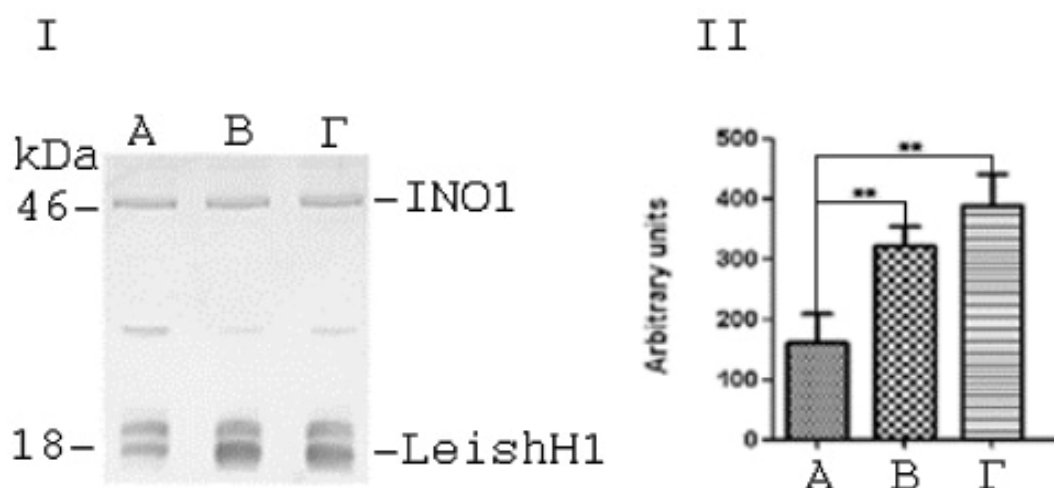
Για να ελέγξουμε εάν τα χαμηλότερα επίπεδα της HSP83 ευθύνονται τουλάχιστον εν μέρει για την ευαισθησία των παρασίτων αυτών σε στρεσογόνους παράγοντες (θερμικό σοκ, φαρμακευτικές ουσίες) αποφασίσαμε να αναπληρώσουμε την έκφραση της HSP83 μέσω ενός πλασμιδίου έκφρασης (pSP72aNEOaHSP83) στα παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1 (Vergnes et al., 2007). Στην εικόνα που ακολουθεί (Εικόνα 29) φαίνεται πως τα επίπεδα της HSP83 επανέρχονται στα ίδια επίπεδα που εμφανίζουν και τα παράσιτα ελέγχου.



Εικόνα 29: Αναπλήρωση των επιπέδων της HSP83 μέσω της εισαγωγής επισωμικού φορέα έκφρασης. I. Στύπωμα κατά Western για τις προμαστιγωτές μορφές των παρασίτων pX63pSP72aNEOa & pX63-LeishH1pSP72aNEOaHSP83 (10^7 παράσιτα/διαδρομή) επωασμένο με τα αντισώματα anti-LdHSP83 & anti-LdINO1. Το αντίσωμα anti-LdINO1 χρησιμοποιήθηκε για να διαπιστωθεί η ίση ποσότητα πρωτεΐνης σε κάθε διαδρομή. Διαδρομές A: pX63pSP72aNEOa, B: pX63-LeishH1pSP72aNEOaHSP83, Γ: pX63-LeishH1pSP72aNEOa. II. Ραβδόγραμμα που δείχνει τα επίπεδα της HSP83 όπως υπολογίστηκαν για κάθε δείγμα, μετά τη

μέτρηση της έντασης των αντίστοιχων ζωνών στο στύπωμα κατά Western. Οι μπάρες σφάλματος αναπαριστούν τις τυπικές αποκλίσεις. $**P<0.05$, $n=3$, two-tailed, paired, Student's *t*-test.

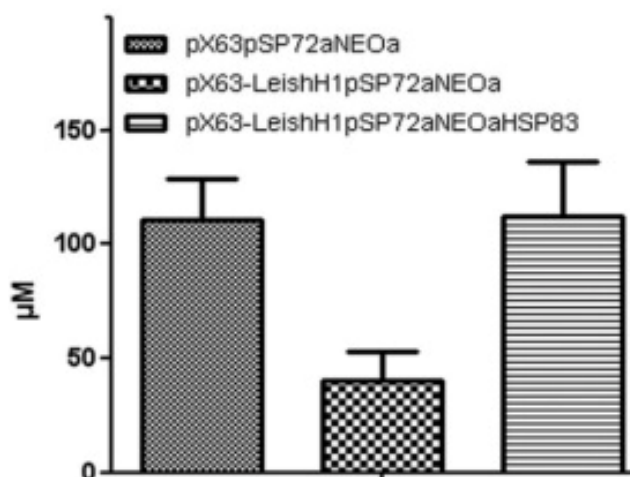
Το επόμενο βήμα ήταν να ελέγξουμε εάν η αναπλήρωση των επιπέδων της HSP83 επηρεάζει την υπερέκφραση της LeishH1. Έτσι πραγματοποιήσαμε στύπωμα κατά Western για να ελέγξουμε τα επίπεδα της LeishH1 στα παράσιτα μετά την εισαγωγή του πλασμιδίου pSP72aNEOaHSP83. Όπως διαπιστώνουμε από την παρακάτω εικόνα (Εικόνα 30), η υπερέκφραση της LeishH1 διατηρείται μετά την εισαγωγή των πλασμιδίων pSP72aNEOa και pSP72aNEOaHSP83.



Εικόνα 30: Η υπερέκφραση της LeishH1 διατηρείται μετά την εισαγωγή των πλασμιδίων pSP72aNEOa και pSP72aNEOaHSP83. I. Στύπωμα κατά Western πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων (ανά διαδρομή εκχύλισμα από 10^7 παράσιτα) από προμαστιγωτές μορφές παρασίτων pX63pSP72aNEOa, pX63-LeishH1pSP72aNEOa, pX63-LeishH1pSP72aNEOaHSP83 στο τέλος της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης επωασμένων με αντισώματα anti-LeishH1 & anti-INO1. Διαδρομές A: pX63pSP72aNEOa, B: pX63-LeishH1pSP72aNEOa, Γ: pX63-LeishH1pSP72aNEOaHSP83. II. Στο ραβδόγραμμα σημειώνεται η μέση υπερέκφραση της LeishH1, η οποία προκύπτει από τρία ανεξάρτητα πειράματα και υπολογίζεται διαιρώντας την ένταση και των δυο ζωνών της LeishH1 με την ένταση της INO-1 και ακολούθως συγκρίνοντας το λόγο για τα διαφορετικά παράσιτα. $**$ Σημαντικά διαφορετική τιμή από την τιμή ελέγχου. Οι μπάρες σφάλματος αναπαριστούν τις τυπικές αποκλίσεις. $P<0.05$, $n=3$, two-tailed, paired, Student's *t*-test.

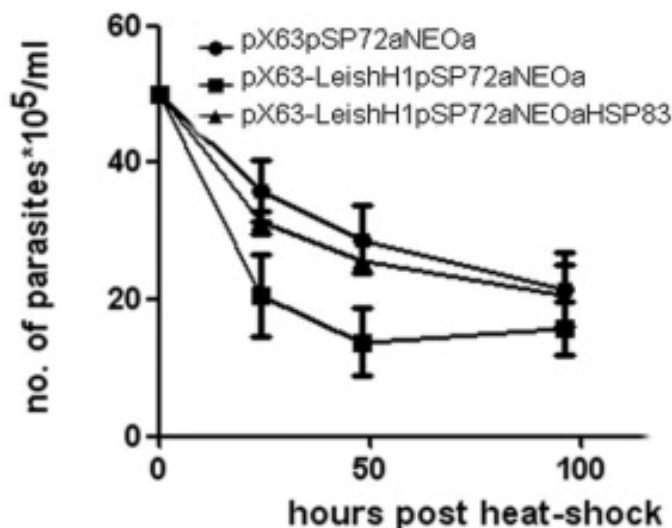
4.9.2 Επίδραση της αναπλήρωσης των επιπέδων της HSP83 στη θερμοευαισθησία και την αντίσταση σε φάρμακα, των παρασίτων που υπερεκφράζουν την LeishH1

Με γνώμονα τα στοιχεία ότι η HSP83 εμπλέκεται στην αντίσταση των παρασίτων σε φαρμακευτικές ουσίες, εξετάσαμε την αντίσταση των παρασίτων που υπερεκφράζουν την LeishH1 μετά την αναπλήρωση των επιπέδων της HSP83 σε αυτά. Όπως φαίνεται από το γράφημα που ακολουθεί (Εικόνα 31), η αναπλήρωση των επιπέδων της HSP83 έχει σαφέστατη επίδραση στην ανθεκτικότητα των παρασίτων που υπερεκφράζουν την Leish1, έναντι του [Sb(III)] καθώς η νέα τιμή IC_{50} είναι σε παρόμοια επίπεδα με αυτή των παρασίτων ελέγχου.



Εικόνα 31: Επίδραση του Sb(III) στην επιβίωση των παρασίτων pX63pSP72aNEOa, pX63-LeishH1pSP72aNEOa, pX63-LeishH1pSP72aNEOaHSP83. Τα παράσιτα επωάστηκαν με Sb(III) για 24 ώρες και ακολούθως υπολογίστηκε η βιωσιμότητα των παρασίτων. Οι μπάρες σφάλματος αντιπροσωπεύουν τις τυπικές αποκλίσεις από τρία ανεξάρτητα πειράματα.

Παρομοίως εξετάσαμε εάν η αντοχή των παρασίτων, που υπερεκφράζουν την LeishH1, σε συνθήκες θερμικού σοκ επανέρχεται μετά την αναπλήρωση των επιπέδων της HSP83. Όπως φαίνεται στην ακόλουθη εικόνα (Εικόνα 32), η αναπλήρωση των επιπέδων της HSP83 επαναφέρει την αντοχή των παρασίτων που υπερεκφράζουν την LeishH1 στα επίπεδα που παρουσιάζουν και τα παράσιτα ελέγχου.



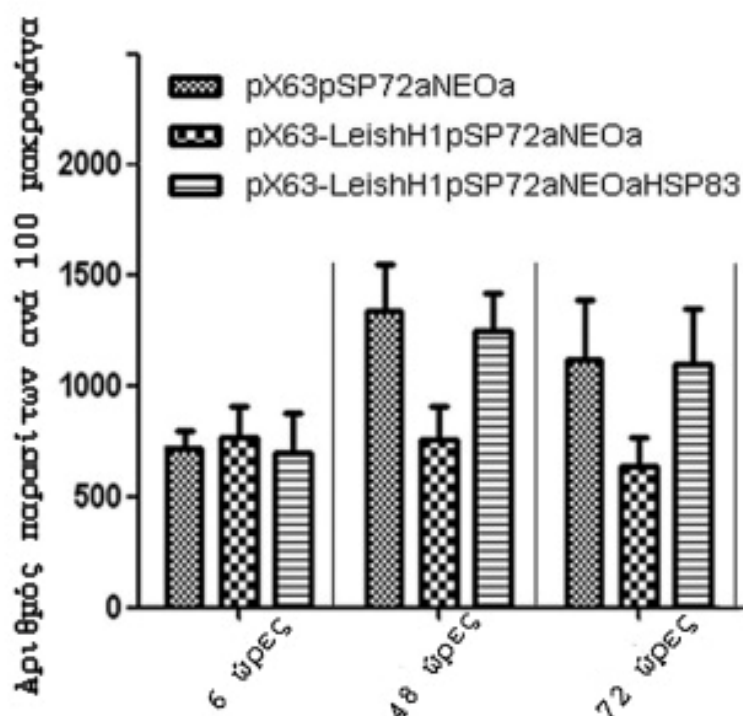
Εικόνα 32: Επίδραση του θερμικού σοκ στην επιβίωση των παρασίτων pX63pSP72aNEOa, pX63-LeishH1pSP72aNEOa, pX63-LeishH1pSP72aNEOaHSP83. Τα παράσιτα υποβλήθηκαν σε θερμικό σοκ και η επιβίωσή τους υπολογίστηκε μετά από 24, 48 και 96 ώρες. Οι μπάρες σφάλματος αντιπροσωπεύουν τις τυπικές αποκλίσεις μετά από τρία ανεξάρτητα πειράματα.

4.9.3 Επίδραση της αναπλήρωσης των επιπέδων της HSP83 στη μολυσματική ικανότητα των παρασίτων που υπερεκφράζουν την LeishH1

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1 παρουσιάζουν μειωμένη μολυσματική ικανότητα τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Μετά την αναπλήρωση των επιπέδων της HSP83 σε αυτά τα παράσιτα διαπιστώσαμε πως η θερμο-ανθεκτικότητά τους και η αντοχή τους σε φαρμακευτικές ουσίες επανήλθε. Το επόμενο βήμα ήταν να ελέγξουμε την πιθανότητα η αναπλήρωση των επιπέδων της HSP83 να επηρεάζει με κάποιο τρόπο την μολυσματικότητα των παρασίτων.

Για το σκοπό αυτό, επιμολύναμε μακροφάγα κύτταρα J774 προερχόμενα από ποντικό, με παράσιτα ελέγχου (pX63pSP72aNEOa), παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1 και έχουν αναπληρωμένα επίπεδα της HSP83 (pX63-LeishH1pSP72aNEOaHSP83) και παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1 και φέρουν τον πλασμιδιακό φορέα pSP72aNEOa αλλά χωρίς να εκφράζουν την HSP83 (pX63-LeishH1pSP72aNEOa). Ποσοστό μεγαλύτερο του 75% των μακροφάγων επιμολύνθηκε με παράσιτα.

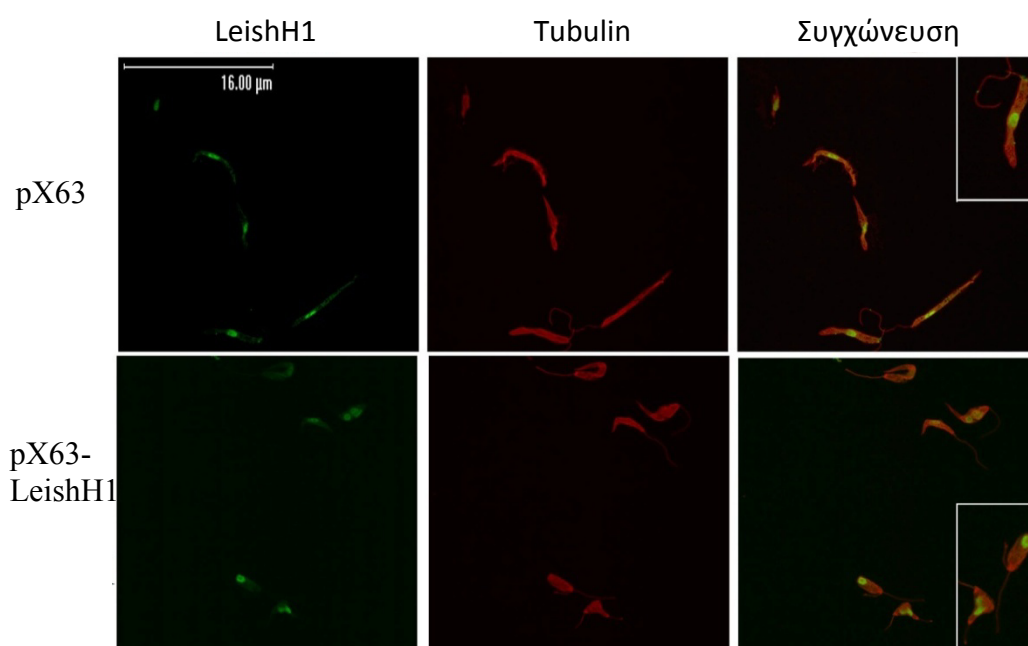
Όλοι οι ανωτέρω κλώνοι επιμόλυναν τα μακροφάγα εξίσου καλά, μη παρουσιάζοντας κάποια διαφορά στο ρυθμό επιμόλυνσης (Εικόνα 33, 6 ώρες) γεγονός που είχε παρατηρηθεί και προηγουμένως (Parageorgiou & Soteriadou, 2002, Smirlis et al., 2006). Στα επόμενα στάδια όμως (48 και 72 ώρες), παρατηρούμε λιγότερα ενδοκυτταρικά παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1 (pX63-LeishH1pSP72aNEOa) σε σχέση με τα παράσιτα ελέγχου (pX63pSP72aNEOa). Παράλληλα, στα παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1 και έχουν αναπληρωμένα επίπεδα της HSP83 (pX63-LeishH1pSP72aNEOaHSP83) η μολυσματική τους ικανότητα επανέρχεται σε επίπεδα συγκρίσιμα με αυτά των παρασίτων ελέγχου (pX63pSP72aNEOa).



Εικόνα 33: Επιμόλυνση μακροφάγων με παράσιτα *Leishmania* που υποδεικνύει την επάνοδο της μολυσματικής ικανότητας των παρασίτων που υπερεκφράζουν την LeishH1 μετά την επαναφορά των επιπέδων της HSP83. Τα μακροφάγα επιμολύνθηκαν με παράσιτα *L. donovani* pX63pSP72aNEOa, pX63-LeishH1pSP72aNEOa και pX63-LeishH1pSP72aNEOaHSP83 και παρατηρήθηκαν 6, 48 και 72 ώρες μετά την επιμόλυνση. Τα ενδοκυτταρικά παράσιτα μετρήθηκαν μετά από χρώση Giemsa. Στο γράφημα φαίνονται οι μέσες τιμές μετά από τρία ανεξάρτητα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν δύο φορές και οι μπάρες σφάλματος υποδεικνύουν τις τυπικές αποκλίσεις.

4.10 Μορφολογία των παρασίτων που υπερεκφράζουν την LeishH1 σε σχέση με τα παράσιτα ελέγχου

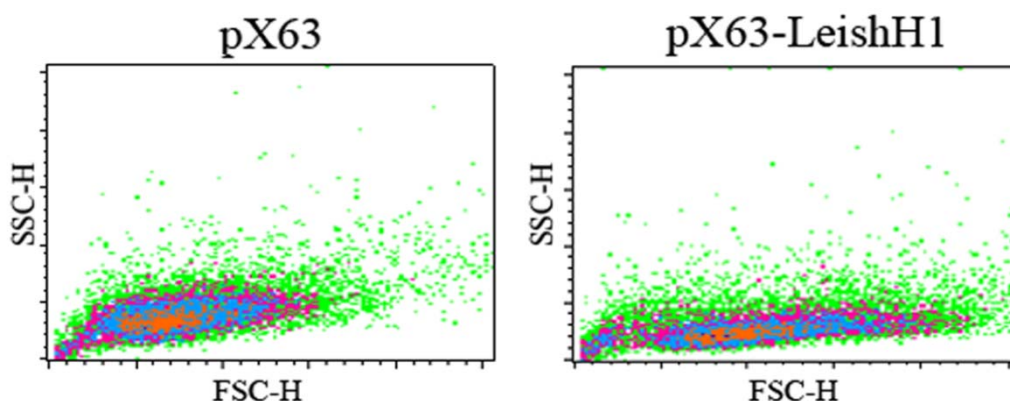
Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η έκφραση της τουμπουλίνης είναι διαφορετική στα παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1 (Εικόνα 15). Για την ακρίβεια η διαφορά αυτή εξακολουθεί να υφίσταται και στο πρωτεϊνικό κλάσμα εμπλουτισμένο σε κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες (Εικόνα 16). Τα στοιχεία αυτά οδήγησαν στο ερώτημα, εάν οι παρατηρούμενες διαφορές αυτές στην έκφραση της τουμπουλίνης αντανακλώνται και στον κυτταροσκελετό του παρασίτου. Για να μπορέσουμε να απαντήσουμε σε αυτό το ερώτημα, πραγματοποιήσαμε μια μικροσκοπική ανάλυση των παρασίτων που υπερεκφράζουν την LeishH1 σε σχέση με τα παράσιτα ελέγχου. Όπως φαίνεται και στην εικόνα που ακολουθεί (Εικόνα 34), ένα αρκετά μεγάλο ποσοστό (45%) των παρασίτων που υπερεκφράζουν την LeishH1 είναι μικρότερα και πιο στρογγυλά, παρουσιάζοντας ένα μήκος σώματος της τάξεως των 5μm σε σύγκριση με αυτό των παρασίτων ελέγχου (8μm).



Εικόνα 34: Κυτταρική μορφολογία παρασίτων pX63 και pX63-LeishH1 στο τέλος της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης. Τα παράσιτα υποβλήθηκαν σε χρώση με αρχικά αντισώματα anti-LeishH1 & anti- α -tubulin και δευτερογενή αντισώματα Alexa Fluor® 488- (πράσινο στην εικόνα) και - Alexa Fluor® 546- (κόκκινο στην εικόνα). Οι εικόνες που προκύπτουν από τη συγχώνευση, φαίνονται αριστερά. Μια περιοχή έχει

μεγεθυνθεί (1.5 φορές) και περιστραφεί, ώστε να διακρίνονται καλύτερα οι μορφολογικές διαφορές.

Παράλληλα, μετά από ανάλυση με κυτταρομετρία ροής των παρασίτων που υπερεκφράζουν την LeishH1 σε σύγκριση με τα παράσιτα ελέγχου, διαπιστώθηκε πως τα πρώτα παρουσιάζουν μεγαλύτερη ετερογένεια όσον αφορά τη μορφολογία και το μέγεθός τους (Εικόνα 35).



Εικόνα 35: Μελέτη πυκνότητας με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής με βάση τις τιμές FSC (πρόσθια σκέδαση) & SSC (πλάγια σκέδαση) για τα παράσιτα pX63 & pX63-LeishH1. Η ανάλυση καταδεικνύει ότι τα παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1 (pX63-LeishH1) τείνουν να εμφανίζουν υψηλότερες και πιο ετερογενείς τιμές πρόσθιας σκέδασης από ότι τα παράσιτα ελέγχου.

4.11 Έλεγχος της αλληλεπίδρασης της LeishH1 με πρωτεΐνες του παρασίτου

Όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω η υπερέκφραση της LeishH1 δημιουργεί μια σειρά από κυτταρικές ανωμαλίες. Ο ακριβής τρόπος όμως με τον οποίο πραγματοποιείται αυτό δεν έχει εξακριβωθεί. Στο πλαίσιο αυτό θελήσαμε να διερευνήσουμε με ποιες πρωτεΐνες αλληλεπιδρά η LeishH1, με στόχο τη συλλογή περισσότερων πληροφοριών για τον τρόπο δράσης της.

Για να το επιτύχουμε αυτό επώασαμε ένα σύμπλοκο GST-LeishH1 με ολικές πρωτεΐνες του παρασίτου και ακολούθως αναλύσαμε τις εκλούσεις που περιέχουν τις πρωτεΐνες που έχουν συνδεθεί με την LeishH1. Η ανάλυση αυτή περιλαμβάνει

Κεφάλαιο 4: Αποτελέσματα

σύγκριση των εκλούσεων με τις αντίστοιχες που προέκυψαν από την επώαση της GST με το ολικό πρωτεϊνικό λύμα.

Τουλάχιστον μια πρωτεϊνική ζώνη αναγνωρίστηκε στην έκλουση της GST-LeishH1 η οποία δεν υπάρχει στα δείγματα ελέγχου.

Στη συνέχεια αναλύσαμε τη συγκεκριμένη πρωτεϊνική ζώνη με φασματομετρία μάζας και διαπιστώσαμε ότι αποτελείται από ένα μίγμα α- και β-τουμπουλίνης. Τα πλήρη στοιχεία της ανάλυσης φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 5).

Πρωτεΐνη που ταυτοποιήθηκε	Κωδικός βάσης δεδομένων	Μοριακό βάρος (θεωρητικό/πειραματικό)	Αριθμός πεπτιδίων	Ποσοστό κάλυψης	Σκορ
β-tubulin	LinJ21_V3.2240	49.7	8	31.83%	25.19
α-tubulin	LinJ13_V3.0330	49.7	4	29.49%	18.04

Πίνακας 5: Πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν στην πρωτεϊνική ζώνη της έκλουσης της GST-LeishH1.

4.12 Πολυμερισμός της τουμπουλίνης και ιζηματοποίηση των μικροσωληνίσκων

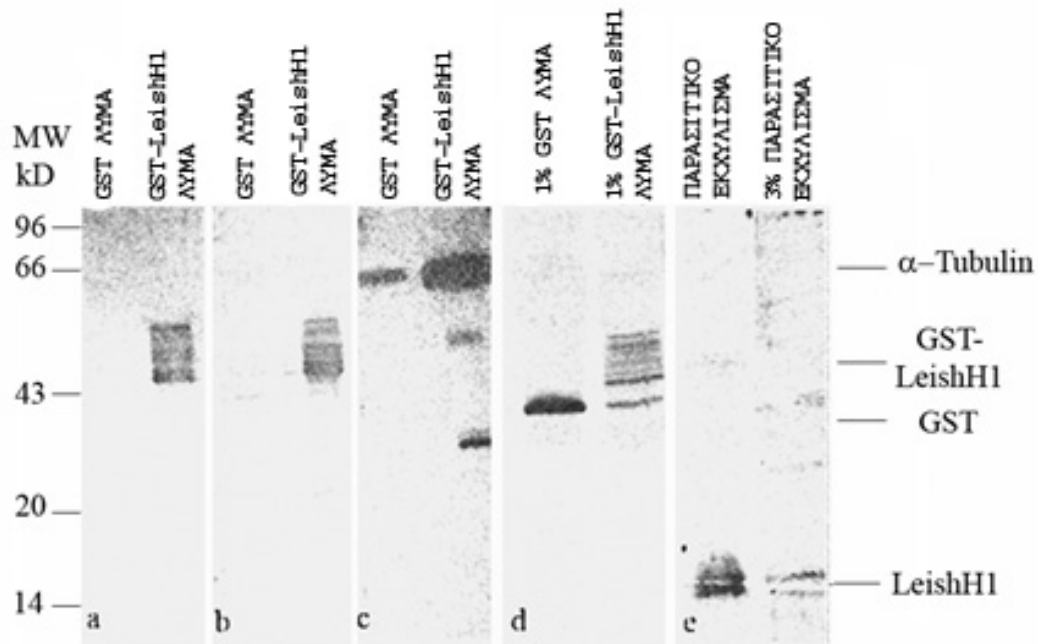
Καθώς τα προηγούμενα αποτελέσματα δείχνουν μια πιθανή αλληλεπίδραση της LeishH1 με την τουμπουλίνη, αποφασίσαμε να ερευνήσουμε περαιτέρω την πιθανότητα η LeishH1 να επηρεάζει το σχηματισμό των μικροσωληνίσκων. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε μια τεχνική ιζηματοποίησης των μικροσωληνίσκων χρησιμοποιώντας α- και β- τουμπουλίνη προερχόμενη από χοίρο που παρουσιάζει μεγάλη ομολογία με την παρασιτική α- και β- τουμπουλίνη .

Για την τεχνική αυτή, μικροσωληνίσκοι πολυμερίστηκαν παρουσία ίσου όγκου εκχυλισμάτων από βακτήρια BL21, που περιείχαν ίσες ποσότητες GST και GST-LeishH1 καθώς και εκχυλίσματος από παράσιτα *L. donovani*. Όπως φαίνεται στην εικόνα που ακολουθεί (Εικόνα 36), η GST-LeishH1 βοηθά στον πολυμερισμό-σχηματισμό/ σταθεροποίηση των μικροσωληνίσκων και η αλληλεπίδραση αυτή

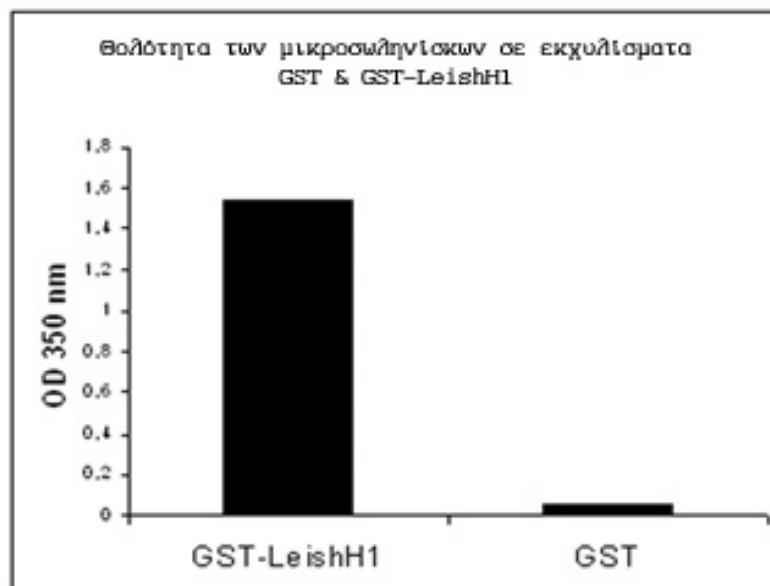
Κεφάλαιο 4: Αποτελέσματα

φαίνεται να είναι ειδική, καθώς το μόριο GST από μόνο του δε φαίνεται να αλληλεπιδρά με τους μικροσωληνίσκους. Το ίδιο στύπωμα επωάστηκε και με αντίσωμα έναντι της LeishH1 για να επιβεβαιωθεί ότι η πρωτεΐνη που παρατηρείται με το anti-GST αντίσωμα είναι όντως η GST-LeishH1. Η LeishH1 ανιχνεύθηκε επίσης και όταν η τεχνική πραγματοποιήθηκε με το παρασιτικό λύμα, δείχνοντας ότι η αλληλεπίδραση της LeishH1 με τους μικροσωληνίσκους δεν οφείλεται σε υπερβολική ποσότητα που χρησιμοποιήθηκε για την τεχνική. Επίσης, μεγαλύτερη ποσότητα α-τουμπουλίνης ιζηματοποιήθηκε, στο κλάσμα GST-LeishH1 σε σχέση με το κλάσμα GST.

A



B



Εικόνα 36: Επίδραση της ιστόνης στον πολυμερισμό/σταθεροποίηση των μικροσωληνίσκων. **A.** Ανοσοενζυμική ανάλυση των διαλυτών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων πριν τη δόμηση των μικροσωληνίσκων και ίζημα μετά τη φυγοκέντρηση στα 30000g του μίγματος τουμπουλίνης-εκχυλίσματος. (a) Αδιάλυτο υλικό μετά τον πολυμερισμό της τουμπουλίνης με το GST και το GST-LeishH1 λύμα,

επωασμένο με τα παρακάτω αντισώματα i) anti-LeishH1 αντίσωμα, (b) anti-GST αντίσωμα, (c) anti-α τουμπουλίνη αντίσωμα, (d) Ανοσοενζυμική ανάλυση του 1% των BL21 GST & GST-LeishH1 διαλυτών εκχυλισμάτων επωασμένων με μικροσωληνίσκους. (e) Αδιάλυτο υλικό τουμπουλίνης παρασκευασμένο με πρωτεϊνικό εκχύλισμα από παράσιτα *L. donovani* και 3% του παρασιτικού διαλυτού εκχυλίσματος, επωασμένων με anti-LeishH1 αντίσωμα. Το πείραμα επαναλήφθηκε δυο φορές. **B.** Το ραβδόγραμμα αναπαριστά την απορρόφηση στα 350nm της τουμπουλίνης (0.6mg/ml) μετά τον πολυμερισμό σε μίγμα GST & GST-LeishH1 αφαιρώντας προηγουμένως την απορρόφηση στα 350nm των διαλυτών εκχυλισμάτων GST & GST-LeishH1 αντίστοιχα. 1% του διαλυτού εκχυλίσματος που χρησιμοποιήθηκε φαίνεται παραπάνω (A(d)).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5

5.1 Συγκριτική πρωτεομική ανάλυση του ολικού πρωτεόματος των παρασίτων *L. donovani* pX63 και pX63-LeishH1

Προηγούμενες έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί στο Εργαστήριο Μοριακής Παρασιτολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ, έχουν δείξει ότι η υπερέκφραση της λεισμανιακής ιστόνης H1 (LeishH1) ελαττώνει τη μολυσματικότητα των παρασίτων τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* (Parageorgiou & Soteriadou, 2002, Smirlis et al., 2006). Τα παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1 ήταν μη-μολυσματικά σε ένα μοντέλο δερματικής λεισμανίασης βασισμένο στον ποντικό και αυτή η απώλεια της μολυσματικής ικανότητας σχετίζεται με μια απορύθμιση του κυτταρικού κύκλου και ένα μειονέκτημα στη διαδικασία διαφοροποίησης από την προμαστιγωτή στην αμαστιγωτή μορφή (Smirlis et al., 2006). Παρόλο που γνωρίζαμε τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά αυτών των παρασίτων, δεν υπήρχαν εντούτοις στοιχεία για τους μοριακούς μηχανισμούς και τις πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη μεταβολή της παθογένειας αυτών των μη-μολυσματικών παρασίτων. Η γνώση αυτή δεν είναι χρήσιμη μόνο για την αναγνώριση πιθανών μολυσματικών παραγόντων στη *Leishmania*, αλλά επίσης και για την κατανόηση των λειτουργιών της συνδετικής ιστόνης LeishH1 στον κύκλο ζωής του και τη βιολογία του παρασίτου. Παράλληλα, η γνώση των αλλαγών στο μοριακό επίπεδο μεταξύ των παρασίτων που υπερεκφράζουν την LeishH1 και των παρασίτων ελέγχου, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την καθιέρωση βιοδεικτών της υπομολυσματικότητας καθώς και για την ανάπτυξη ενός «ζωντανού» εμβολίου.

Μια εξαιρετικά χρήσιμη τεχνική που έχει βοηθήσει ιδιαίτερα στην έρευνα για την αναγνώριση μολυσματικών παραγόντων και μονοπατιών στη *Leishmania* είναι η πρωτεομική ανάλυση (Daneshvar et al., 2011, Paape & Aebischer, 2011, Yao et al., 2010). Η χρήση της τεχνικής αυτής αποκτά ιδιαίτερο νόημα στη *Leishmania*, καθώς στα παράσιτα ο γονιδιακός έλεγχος ρυθμίζεται κυρίως στο μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Με γνώμονα τη γνώση αυτή χρησιμοποιήσαμε τη συγκριτική πρωτεομική ανάλυση μέσω ηλεκτροφόρησης δυο διαστάσεων, με σκοπό να αναγνωρίσουμε πρωτεΐνες με διαφορετική έκφραση στα παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1 σε σχέση με τα παράσιτα ελέγχου. Αρχικά αναγνωρίστηκε παρόμοιος αριθμός πρωτεϊνών για τα παράσιτα που

υπερεκφράζουν την LeishH1 (1544) και τα παράσιτα ελέγχου (1530). Η παρατήρηση αυτή μας δίνει την πληροφορία ότι ο πρωτεϊνικός πληθυσμός των παρασίτων που συγκρίνονται, δε διαφέρει ιδιαίτερα. Ο πληθυσμός αυτός είναι αριθμητικά σύμφωνος με άλλες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί για τη *Leishmania* (Bente et al., 2003, Drummelsmith et al., 2004, McNicoll et al., 2006). Συγκεκριμένα τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μόνο μια μικρή ομάδα πρωτεϊνών (HSP83, eEF-2, MAP, α/β tubulin) παρουσιάζει σταθερά διαφορική έκφραση στα παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1. Από αυτές τις πρωτεΐνες, οι HSP83 και eEF-2 υποεκφράζονται στα παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1 κατά 2.4 και 2.0 φορές αντίστοιχα. Οι υπόλοιπες δυο πρωτεΐνες παρουσιάζουν ευρύτερη κατανομή στο ισοηλεκτρικό τους σημείο, υποδηλώνοντας την παρουσία μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων.

Η διαφορική έκφραση του μικρού υποσυνόλου των προαναφερθέντων πρωτεϊνών καταδεικνύει ότι η υπερέκφραση της LeishH1 δεν αποτελεί ένα γενικό καταστολέα της μεταγραφικής διαδικασίας. Επιπρόσθετα οι πρωτεΐνες αυτές πιθανόν να σχετίζονται με την απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και τη μείωση της μολυσματικότητας των παρασίτων που υπερεκφράζουν την LeishH1. Ένα πρώτο συμπέρασμα είναι ότι η έκφραση της LeishH1 μπορεί να προκαλεί διαφορετικούς φαινοτύπους σε διάφορους οργανισμούς, δείχνοντας με αυτόν τον τρόπο ότι τα μονοπάτια που ελέγχει μπορεί να είναι ειδικά για το παράσιτο *Leishmania*.

5.2 Συγκριτική πρωτεομική ανάλυση του εμπλουτισμένου σε κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες κλάσματος των παρασίτων *L. donovani* pX63 και pX63-LeishH1

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω δύο από τις πρωτεΐνες που παρουσιάζουν διαφορική έκφραση, στα παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1, είναι η α/β-τουμπουλίνη και η MAP. Οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες δεν παρουσιάζουν κάποια διαφορά στα επίπεδα έκφρασής τους, αλλά στο εύρος κατανομής του ισοηλεκτρικού τους σημείου. Η ευρύτερη αυτή κατανομή συνήθως σχετίζεται με μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών αυτών.

Οι πρωτεΐνες μπορούν να υφίστανται ένα μεγάλο εύρος χημικών τροποποιήσεων μετά τη μετάφραση. Αυτές οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (MMTs) μπορούν να καθορίσουν τον εντοπισμό της πρωτεΐνης, τη δομή της αλλά και τις αλληλεπιδράσεις της με άλλες πρωτεΐνες ή κύτταρα. Οι MMTs όμως δεν είναι ιδιαίτερα καλά χαρακτηρισμένες στα παράσιτα.

Με βάση τα δεδομένα αυτά, υποβάλαμε το πρωτεϊνικό φορτίο του παρασίτου σε επεξεργασία με διάλυμα PEM εμπλουτισμένο με το απορρυπαντικό NP-40. Η διαδικασία αυτή είχε στόχο να ανακτήσουμε ένα πρωτεϊνικό κλάσμα εμπλουτισμένο σε κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες (Robinson *et al.*, 1991). Ακολούθως το κλάσμα αυτό υποβλήθηκε σε πρωτεομική ανάλυση. Αρχικά, η κλασματοποίηση του πρωτεϊνικού φορτίου είχε ως αποτέλεσμα λιγότερες πρωτεΐνες να εμφανιστούν στα πηκτώματα. Η μικρότερη πολυπλοκότητα και βελτιωμένη ευκρίνεια των πηκτωμάτων επέτρεψε την καλύτερη μελέτη τους, η οποία επιβεβαίωσε τη σαφή διαφορά στην κατανομή του ισοηλεκτρικού σημείου της τουμπουλίνης. Παράλληλα, στα παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1 οι πρωτεϊνικές ζώνες της α- και β- τουμπουλίνης είναι σαφώς διαχωρισμένες (Εικόνα 16), μια εικόνα που έχει αναφερθεί και για την τουμπουλίνη άλλων μελών της οικογένειας των τρυπανοσωματίδων (Russell *et al.*, 1984). Το επόμενο βήμα ήταν η αναζήτηση πιθανών MMT στις ζώνες αυτές. Οι τουμπουλίνες παρουσιάζουν μια ποικιλία μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων όπως γλουταμυλίωση (α- και β- τουμπουλίνη), ακετυλίωση και τυροσινίωση (α-τουμπουλίνη) (Chavan *et al.*, 2007, Kohl & Gull, 1998), φωσφορυλίωση (Prasad & Dey, 2000, Rosenzweig *et al.*, 2008) και γλυκοσυλίωση (Rosenzweig *et al.*, 2008). Οι MMTs οδηγούν σε ποικιλομορφία στους σχηματιζόμενους μικροσωληνίσκους και πιθανόν επηρεάζουν τις λειτουργίες τους. Για παράδειγμα σε προμαστιγωτές μορφές *L. donovani* η τουμπουλίνη συναντάται ευρέως πολυγλουταμυλιωμένη, υποδηλώνοντας ότι η εν λόγω τροποποίηση συμβάλλει στη σταθεροποίηση των μικροσωληνίσκων (Moulay *et al.*, 1996). Παρ' όλο που στη συγκεκριμένη ανάλυση, οι ανωτέρω τροποποιήσεις αναζητήθηκαν στα πεπτίδια τουμπουλίνης, εντέλει δεν καταφέραμε να εντοπίσουμε κάποια. Αυτό θα μπορούσε να οφείλεται σε διάφορους λόγους όπως για παράδειγμα στην πολύ χαμηλή αναλογία του τροποποιημένου πεπτιδίου στη συγκεκριμένη ομάδα πεπτιδίων.

Η τουμπουλίνη μπορεί να θεωρηθεί ως μια από τις πιο συντηρημένες πρωτεΐνες στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Αποτελεί μια πρωτεΐνη που αποτελείται από ένα α- και ένα β-μονομερές και έχει αναγνωριστεί ως το κύριο συστατικό των μικροσωληνίσκων. Μετά τη σύνθεσή τους, οι α- και β-τουμπουλίνη υποβάλλονται σε μια πολύπλοκη διαδικασία αναδίπλωσης, η οποία υποβοηθείται από άλλες πρωτεΐνες του κυττάρου, και τελικά αποδίδει το ετεροδιμερές τουμπουλίνης. Εφόσον έχουν συντεθεί, οι α- και β-τουμπουλίνη ενδέχεται να υποβληθούν σε αρκετές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, ο λειτουργικός ρόλος των οποίων παραμένει σε μεγάλο βαθμό ασαφής. Η έλλειψη συγκεκριμένων λειτουργικών ενδείξεων οδήγησε στη διατύπωση της άποψης ότι αυτές οι τροποποιήσεις, όχι μόνο αποδίδουν σαφείς βιοχημικές ιδιότητες αλλά μπορεί να καλύπτουν διαφορές ανάλογα τον ισότυπο του μορίου, μειώνοντας κατά αυτό τον τρόπο την ετερογένεια της τουμπουλίνης.

Όσον αφορά την υποθετική MAP πρωτεΐνη η έρευνα για MMTs οδήγησε στην ανεύρεση ενός φωσφορυλιωμένου πεπτιδίου στη θέση Ser1168, το οποίο όμως παρατηρείται μόνο στα παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1. Χρησιμοποιώντας έναν αλγόριθμο εύρεσης πιθανού μορίου φωσφορυλίωσης, βρέθηκε ότι το εν λόγω φωσφορυλιωμένο πεπτίδιο αποτελεί ειδική θέση για την κίνηση της κασεΐνης 1^α. Η φωσφορυλίωση των MAP πρωτεϊνών αποτελεί σημαντικό γεγονός καθώς εμπλέκεται στη δυναμική της τουμπουλίνης και σε επόμενο στάδιο των μικροσωληνίσκων. Συγκεκριμένα η φωσφορυλίωση επηρεάζει την ικανότητά τους να σταθεροποιούν τους μικροσωληνίσκους. Μια πληθώρα μελετών έχει δείξει ότι σχεδόν όλες οι MAP αποτελούν *in vitro* υποστρώματα για αρκετές πρωτεϊνικές κινήσεις (Drewes *et al.*, 1998, Lane & Stebbings, 1998). Ως εκ τούτου, οι MAP μπορούν να λειτουργήσουν ως πρωταρχικοί στόχοι για τη ρύθμιση των μικροσωληνίσκων μέσω μονοπατιών σηματοδότησης. Στη *Leishmania* παρ' όλα αυτά δεν υπάρχουν ακόμα αρκετά στοιχεία για τις MAP γενικότερα και πόσο μάλλον για τα γεγονότα φωσφορυλίωσης αυτών. Αξίζει να αναφερθεί πως για την MAP πρωτεΐνη που ταυτοποιήσαμε έχει αναφερθεί πως φέρει τουλάχιστον ένα ακόμα σημείο φωσφορυλίωσης στη θέση Ser1316 (Rosenzweig *et al.*, 2008). Ο έλεγχος που έγινε όμως για υποψήφιο μόριο υπεύθυνο για τη φωσφορυλίωση στη θέση αυτή, δεν απέφερε αποτέλεσμα.

Καθώς η κλασματοποίηση του ολικού πρωτεϊνικού φορτίου απέδωσε πηκτώματα με μικρότερη πολυπλοκότητα, αναγνωρίσαμε μια ακόμα πρωτεΐνη η έκφραση της οποίας είναι χαμηλότερη στα παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1. Η πρωτεΐνη αυτή αναγνωρίστηκε ως η α - υπομονάδα της μιτοχονδριακής πεπτιδάσης (α -subunit of the Mitochondrial processing peptidase, α -MPP). Η μιτοχονδριακή πεπτιδάση αποτελεί ένα ενζυμικό σύμπλοκο που αποτελείται από την α - και β -υπομονάδα. Η α -υπομονάδα είναι μεγαλύτερη με μοριακό βάρος που κυμαίνεται από 53-57 kDa ενώ το μέγεθος της β -υπομονάδας κυμαίνεται από 48-52 kDa. Η μιτοχονδριακή πεπτιδάση ανήκει στην ευρύτερη οικογένεια των μεταλλοενδοπεπτιδασών (Gakh *et al.*, 2002). Το ένζυμο καταλύει την αποκοπή αλληλουχιών που υπάρχουν σε διάφορες πρωτεΐνες και αποτελούν ενδογενή σινιάλα για τη μεταφορά τους στο μιτοχόνδριο. Οι αλληλουχίες αυτές χαρακτηρίζονται στην πλειοψηφία τους από θετικό φορτίο, την ικανότητα να σχηματίζουν αμφιφιλικές α -έλικες και την παρουσία ενός καταλοίπου αργινίνης στην -2 θέση από το σημείο αποκοπής (Braun & Schmitz, 1997, Gakh *et al.*, 2002). Μέχρι και σήμερα δεν υπάρχουν δεδομένα για την πρωτεΐνη αυτή στη *Leishmania*. Τα χαμηλότερα επίπεδα της α -MPP θα μπορούσαν πιθανόν να προκαλέσουν τη συσσώρευση πρώιμων μορφών πρωτεϊνικών μορίων στο μιτοχόνδριο (Luciano & Geli, 1996), οδηγώντας έτσι σε ένα δυσλειτουργικό οργανίδιο. Για να εξακριβωθεί ο ακριβής ρόλος της πρωτεΐνης αυτής στο παράσιτο αλλά και στη μολυσματικότητά του χρειάζεται περαιτέρω έρευνα.

5.3 Η υπερέκφραση της LeishH1 προκαλεί μετα/μεταφραστικές αλλαγές ή αλλαγές έκφρασης στην τουμπουλίνη

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω η τουμπουλίνη παρουσιάζει διαφορετική έκφραση στα παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1. Για την ακρίβεια οι ζώνες της τουμπουλίνης εμφανίζονται πεπλατυσμένες προς την περιοχή με όξινο pH (Εικόνα 15). Η εικόνα αυτή της πρωτεϊνικής ζώνης θα μπορούσε να σημαίνει τα παρακάτω: α) η συνολική α/β τουμπουλίνη υπερεκφράζεται, β) μόνο μια από τις δυο υπομονάδες (α/β) εκφράζεται διαφορετικά, και γ) υπάρχουν MMTς. Η αναζήτηση

για MMTs, που θα μπορούσαν να δικαιολογήσουν τη διαφορά στην έκφραση, δεν απέφερε κάποια αποτελέσματα όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως.

Παρ' όλα αυτά, οι διαφορές αυτές στην έκφραση της τουμπουλίνης αντικατοπτρίζονται στην ίδια τη μορφολογία του παρασίτου. Για την ακρίβεια τα παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1 παρουσιάζουν πιο στρογγυλό σχήμα, είναι μικρότερα και παράλληλα παρουσιάζουν υψηλότερη ετερογένεια στο σχήμα τους (Εικόνα 34 & 35). Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν ότι η υπερέκφραση της LeishH1 επιφέρει άμεσα ή έμμεσα λειτουργικές διαφορές στο σχηματισμό των μικροσωληνίσκων και άρα του κυτταροσκελετού των παρασίτων.

5.4 Η LeishH1 αλληλεπιδρά απευθείας με την τουμπουλίνη και επηρεάζει τον πολυμερισμό των μικροσωληνίσκων

Παλαιότερες μελέτες δείχνουν την αλληλεπίδραση της τουμπουλίνης (προερχόμενη από αρουραίο) με την ιστόνη H1 (Mithieux et al., 1984). Για να μελετηθεί πως θα μπορούσε η LeishH1 να επηρεάζει τον κυτταροσκελετό, πραγματοποιήθηκαν πειράματα αλληλεπίδρασης της LeishH1 με πρωτεΐνες του παρασίτου. Τα πειράματα αυτά κατέδειξαν ότι οι κυριότερες πρωτεΐνες που αλληλεπιδρά η LeishH1 ήταν α- και β- τουμπουλίνη. Ενώ αργότερα θεωρήθηκε ότι η πιθανή αλληλεπίδραση των ιστονών με την τουμπουλίνη είναι μη ειδική, οφειλόμενη στην ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση των θετικών λυσινών της ιστόνης με τα αρνητικά γλουταμικά οξέα της τουμπουλίνης, σύγχρονες μελέτες δείχνουν ότι μπορεί να είναι και ειδική.

Πιο συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ότι σε κύτταρα φυτών (BY-2 κύτταρα προερχόμενα από καπνό) η συνδετική ιστόνη H1 μπορεί και οργανώνει τους ακτινωτούς μικροσωληνίσκους, από άτυπα κέντρα οργάνωσης μικροσωληνίσκων (microtubule organizing centers, MTOCs), που βρίσκονται στον πυρηνικό φάκελο (Nakayama et al., 2008). Επιπλέον, είναι γνωστό ότι οι μικροσωληνίσκοι στη *Leishmania* είναι και ενδοπυρηνικοί και εμπλέκονται άμεσα στη διαίρεση του πυρήνα (κλειστή διαδικασία μίτωσης). Για τη διαδικασία αυτή χρειάζεται ο ενδοπυρηνικός σχηματισμός MTOCs, δημιουργία πυρηνικής ατράκτου και ενδοπυρηνικός σχηματισμός μικροσωληνίσκων. Στα ανώτερα θηλαστικά, οι

διαδικασίες αυτές ελέγχονται από τη RanGTPase, μια μικρή GTP-πρωτεΐνη της υπεροικογένειας Ras . Η ίδια αυτή πρωτεΐνη έχει δειχθεί ότι αλληλεπιδρά με τη LeishH1 στη περιφέρεια του πυρήνα, μακριά από το DNA, της *Leishmania* (Smirlis *et al.*, 2009). Η αλληλεπίδραση αυτή είναι ενδεικτική μιας πιθανής συσχέτισης της ιστόνης με τη δημιουργία MTOCs, ενδοπυρηνικής ατράκτου και μικροσωληνίσκων.

Για τους παραπάνω λόγους υποθέσαμε ότι η LeishH1 μπορεί να εμπλέκεται στην οργάνωση των μικροσωληνίσκων ή στη δυναμική τους. Για να ελεγχθεί αυτό, πραγματοποιήθηκε μια ανάλυση ιζηματοποίησης, χρησιμοποιώντας α- και β-τουμπουλίνη προερχόμενη από χοίρο που παρουσιάζει μεγάλη ομολογία με τις παρασιτικές τουμπουλίνες (Bordier *et al.*, 1982, Wilson & Borisy, 1997). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όντως η LeishH1 είναι ικανή να επηρεάζει το σχηματισμό ή τον πολυμερισμό των μικροσωληνίσκων.

Οι αλλαγές που παρατηρούνται στην τουμπουλίνη μπορεί να σχετίζονται άμεσα με τη δυναμική των μικροσωληνίσκων. Μάλιστα οι αλλαγές αυτές θα μπορούσαν να έχουν άμεση συσχέτιση με τον κυτταρικό κύκλο καθώς ο πολυμερισμός της τουμπουλίνης είναι άμεσα συνυφασμένος με το φαινόμενο αυτό αλλά και με τη διαφοροποίηση του παρασίτου από την προμαστιγωτή στην αμαστιγωτή μορφή (Mojtahedi *et al.*, 2008). Επί πρόσθετα, γνωρίζοντας ότι οι μικροσωληνίσκοι στη *Leishmania* απαντώνται και ακριβώς κάτω από την κυτταρική μεμβράνη (subpellicular microtubules), ενισχύεται η υπόθεση ότι η αλληλεπίδραση της LeishH1 με την τουμπουλίνη ίσως να επιφέρει δραστικές αλλαγές στη μορφολογία της κυτταρικής μεμβράνης και σε επόμενο επίπεδο του ίδιου του παρασίτου. Οι αλλαγές αυτές στη μεμβράνη του παρασίτου μπορεί να είναι σημαίνουσας σημασίας καθώς οι αλληλεπιδράσεις της μεμβράνης εμπλέκονται ιδιαίτερα στις σχέσεις παρασίτου-ξενιστή και επομένως μπορούν να επηρεάζουν πιθανώς τη μολυσματική ικανότητα του παρασίτου (Dwyer, 1980, Dwyer, 1981).

5.5 Η LdeEF-2 υποεκφράζεται στα παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1

Ανάμεσα στις πρωτεΐνες με διαφορετική έκφραση που ταυτοποιήθηκαν είναι και ο eEF-2. Η πρωτεΐνη αυτή παίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της μετάφρασης (Kaul *et al.*, 2011). Συγκεκριμένα είναι υπεύθυνος για τη μετατόπιση των κωδικωνίων από τη θέση A στη θέση P του ριβοσώματος. Καθώς ο eEF-2 φωσφορυλιώνεται, απενεργοποιείται και κατ' επέκταση η πρωτεϊνική σύνθεση αναστέλλεται επίσης μέχρι ο eEF-2 να «απελευθερωθεί» από τους παράγοντες αναστολής. Η απενεργοποίηση του eEF-2 επιτυγχάνεται μέσω της φωσφορυλίωσης του καταλοίπου Thr56 από την κινάση του EF-2. Η φωσφορυλίωση αποκλείει τη δομική πρόσδεση στο ριβόσωμα, ως εκ τούτου η επιμήκυνση των εν τη γενέσει πρωτεϊνών αναστέλλεται (Proud, 2007). Ο μηχανισμός της επιμήκυνσης των πρωτεϊνών είναι άρρηκτα δεμένος με την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και έτσι οποιαδήποτε απορύθμιση της λειτουργίας του eEF-2 μπορεί να επηρεάσει τον κυτταρικό κύκλο (White-Gilbertson *et al.*, 2009).

Στα παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1, ο eEF-2 παρουσιάζει μειωμένη έκφραση. Η υποέκφραση αυτή μπορεί να σχετίζεται με την απορύθμιση του κυτταρικού κύκλου που παρατηρούμε σε αυτά τα παράσιτα αλλά ακόμα πιθανόν και με αυξημένη ευαισθησία των παρασίτων αυτών σε στρεσογόνες συνθήκες. Παρ' όλα αυτά χρειάζεται περισσότερη έρευνα πάνω στην πρωτεΐνη αυτή για να αποσαφηνίσει την πιθανή συνεισφορά της στο φαινότυπο των παρασίτων που υπερεκφράζουν την LeishH1.

5.6 Η υπερέκφραση της LeishH1 προκαλεί τη μείωση του ρυθμού και των επιπέδων έκφρασης της HSP83

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η LdHSP83 είναι μία από τις πρωτεΐνες με διαφορετική έκφραση στα παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1 και μάλιστα παρουσιάζει χαμηλότερη έκφραση σε σχέση με τα παράσιτα ελέγχου (Εικόνα 19). Η HSP83 αποτελεί μια από τις κύριες πρωτεΐνες του παρασίτου και έχει βρεθεί ότι εμπλέκεται στη διαφοροποίηση από την προμαστιγωτή στην αμαστιγωτή μορφή του παρασίτου, την ανάπτυξη και την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου (Wiesigil &

Clos, 2001b, Wiesgigl & Clos, 2001a). Πρόσφατα βρέθηκε πως η αλληλεπίδραση της HSP83 με την πρωτεΐνη StI1 (Stress Inducible Protein 1) είναι ιδιαίτερα σημαντική για την ανάπτυξη του παρασίτου (Hombach *et al.*, 2012). Επί πρόσθετα η φωσφορυλίωση της HSP83 συμβαίνει κατά τη διαδικασία διαφοροποίησης και το γεγονός αυτό συνδέεται με το σχηματισμό σταδιο-ειδικών πολύ-πρωτεϊνικών συμπλόκων μέσω της συσχέτισης με την πρωτεΐνη STI1 (Morales *et al.*, 2010).

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει πως η αναστολή της HSP83 με τη χρήση εξειδικευμένων φαρμακευτικών ουσιών σε παράσιτα *L. donovani* που καλλιεργούνται στους 25°C, είχε ως αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή της πρωτεΐνης A2 (ειδική για την αμαστιγωτή μορφή του παρασίτου) και παράλληλα το μορφολογικό μετασχηματισμό των παρασίτων προς ένα σχήμα πιο στρογγυλό που προσομοιάζει την αμαστιγωτή μορφή (Wiesgigl & Clos, 2001a). Αυτή η παρατήρηση αρχικά φαίνεται να έρχεται σε αντίθεση με προηγούμενα δημοσιευμένα δεδομένα του εργαστηρίου που περιγράφουν το μειονέκτημα στη διαδικασία διαφοροποίησης των παρασίτων που υπερεκφράζουν την LeishH1 (Smirlis *et al.*, 2006). Ωστόσο, παρόλο που τα παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1 αργούν να πάρουν το χαρακτηριστικό σχήμα της αμαστιγωτής μορφής, τα επίπεδα του mRNA της πρωτεΐνης A2 ήταν ίσα ή και μεγαλύτερα από τα αντίστοιχα των παρασίτων ελέγχου (Smirlis *et al.*, 2006), υποδηλώνοντας ότι η επιτυχής διαδικασία διαφοροποίησης μπορεί να περιλαμβάνει περισσότερες από μια ανεξάρτητες διαδικασίες (μορφολογικές, βιοχημικές κ.λ.π.). Παράλληλα με τη διαδικασία διαφοροποίησης, η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου είναι απορυθμισμένη στα παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1 και τοιουτοτρόπως μπορούμε να υποθέσουμε πως η μείωση των επιπέδων της HSP83, προκαλεί την απώλεια της ικανότητας των παρασίτων που υπερεκφράζουν την LeishH1 να ρυθμίζουν κατάλληλα τη λειτουργία των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου.

Εξάλλου, σε παράσιτα *L. donovani* η απενεργοποίηση της HSP83 κατά τη διάρκεια θερμικού σοκ σε αξενικές συνθήκες, επάγει την αποπτωτική διαδικασία (Li *et al.*, 2009). Σε αυτό το πλαίσιο ήταν λογικό να υποθέσουμε πως τα παράσιτα που παρουσιάζουν χαμηλότερα επίπεδα της HSP83 θα ήταν πιο ευαίσθητα σε συνθήκες θερμικού σοκ (25°C → 37°C), ένα στρεσογόνο παράγοντα απαραίτητο για τη

διαδικασία διαφοροποίησης, που παράλληλα γνωρίζουμε ότι προωθεί την αποπτωτική διαδικασία (Alzate et al., 2007). Ως εκ τούτου ερευνήσαμε το αποπτωτικό περιεχόμενο (Jimenez-Ruiz et al., 2010, Smirlis et al., 2010) των παρασίτων που υπερεκφράζουν την LeishH1 κατά τη διάρκεια του θερμικού σοκ σε μια προσπάθεια να εξηγήσουμε περαιτέρω το μειονέκτημα στη διαδικασία διαφοροποίησης από την προμαστιγωτή στην αμαστιγωτή μορφή καθώς και τη μειωμένη μολυσματικότητα που παρουσιάζουν αυτά τα παράσιτα. Όπως παρατηρήσαμε από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, τα παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1 είναι πιο ευαίσθητα σε συνθήκες θερμικού σοκ και παρουσιάζουν υψηλότερο αποπτωτικό περιεχόμενο, υπονοώντας πως η μειωμένη έκφραση της HSP83 μπορεί να επηρεάζει την ικανότητα των παρασίτων αυτών να ανταπεξέρχονται σε συνθήκες θερμικού στρες (Εικόνα 25 & 26 & 27). Ως εκ τούτου, καθώς στρεσογόνα σήματα όπως χαμηλές τιμές pH, υψηλή θερμοκρασία και συνθήκες αστίας μπορεί να επάγουν τη διαδικασία διαφοροποίησης ή/και απόπτωσης, η ισορροπία μεταξύ της διαφοροποίησης και της απόπτωσης φαίνεται να αποτελεί κρίσιμο παράγοντα για την επιτυχή εγκαθίδρυση και πρόοδο της νόσου.

Παράλληλα τα αποτελέσματά μας έρχονται να συμφωνήσουν με αποτελέσματα άλλων μελετών που υποστηρίζουν πως η HSP83 εμπλέκεται στην αντίσταση *L. donovani* παρασίτων απομονωμένων από κλινικά δείγματα, έναντι φαρμακευτικών ουσιών βασισμένων στο αντιμόνιο (Kumar et al., 2010, Vergnes et al., 2007). Τοιουτοτρόπως ήταν λογικό να υποθέσουμε πως τα παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1 και χαρακτηρίζονται από χαμηλότερα επίπεδα της HSP83, θα είναι και πιο ευαίσθητα στο Sb(III). Όντως η τιμή IC₅₀ για τα παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1 (59μM) ήταν πολύ χαμηλότερη από αυτή που επιδείκνυαν τα παράσιτα ελέγχου (98μM) (Εικόνα 28).

Επί πρόσθετα, η ευαισθησία των παρασίτων αυτών έναντι των φαρμακευτικών ουσιών σχετίζεται άμεσα με την υποέκφραση της HSP83, καθώς τα παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1 και έχουν αναπληρωμένα τα επίπεδα της HSP83 παρουσιάζουν την ίδια αντοχή έναντι του Sb(III) όπως και τα παράσιτα ελέγχου. Επιπλέον, η αναπλήρωση των επιπέδων της HSP83 επανέφερε τη θερμοανθεκτικότητα των παρασίτων σε συνθήκες θερμοκρασίας 37 °C, σε επίπεδα

συγκρίσιμα με αυτά των παρασίτων ελέγχου. Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει πως η χαμηλότερη έκφραση της HSP83 είναι υπεύθυνη για την αυξημένη ευαισθησία των παρασίτων που υπερεκφράζουν την LeishH1 όταν συναντούν συνθήκες θερμοκρασίας που προσομοιάζουν αυτές που θα συναντούσαν στο θηλαστικό ξενιστή και επάγουν τη διαδικασία διαφοροποίησης.

Για να διαπιστωθεί εάν η απώλεια της μολυσματικής ικανότητας των παρασίτων που υπερεκφράζουν την LeishH1, οφείλεται στα χαμηλότερα επίπεδα της HSP83 πραγματοποιήσαμε μια δοκιμασία μολυσματικότητας *in vitro* αφού πρώτα αναπληρώθηκαν τα επίπεδα της HSP83 στα παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1. Τα αποτελέσματα δείχνουν ευκρινώς πως μετά την αναπλήρωση των επιπέδων της HSP83, η μολυσματική ικανότητα των παρασίτων αυτών επίσης επανήλθε καθώς μπορούσαν πλέον να μολύνουν μακροφάγα και να επιβιώσουν μέσα σε αυτά εξίσου καλά όπως και τα παράσιτα ελέγχου (Εικόνα 33).

Τα τελευταία χρόνια, έρευνες έχουν αποκαλύψει στοιχεία που εμπλέκουν την HSP90, ομόλογη της HSP83, ως παράγοντα μολυσματικότητας σε διάφορα ευκαρυωτικά παθογόνα. Η υπερέκφραση της HSP90 σε ένα εργαστηριακό στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae* και η μετέπειτα χρήση του σε ένα μοντέλο επιμόλυνσης σε ποντίκια, έδειξε πως η μολυσματικότητα του στελέχους αυξήθηκε σημαντικά και σε επίπεδο μόλυνσης αλλά και σε επίπεδο θνητότητας και έδωσε τη δυνατότητα στο μικροβιακό στέλεχος να πολλαπλασιάζεται και να εγκαθιδρύεται στα εσωτερικά όργανα των ποντικών με ένα τρόπο παρόμοιο των κλινικών στελεχών (Hodgetts *et al.*, 1996). Μελέτες σχετικά με την HSP90 έχουν πραγματοποιηθεί και για το παθογόνο ενδοκυτταρικό παράσιτο *Plasmodium falciparum* που προκαλεί την ελονοσία, μια νόσο που ευθύνεται για το θάνατο σχεδόν 2 εκατομμυρίων ατόμων κάθε χρόνο στην υποσαχάρια Αφρική. Η αναστολή της HSP90 από την ουσία γελνταναμυκίνη επιφέρει στο παράσιτο, παύση της διαδικασίας διαφοροποίησης και έτσι γίνεται σαφές πως η εξέλιξη της νόσου επηρεάζεται δραστικά (Acharya *et al.*, 2007). Σε ένα άλλο παθογόνο μικροοργανισμό, την *Candida albicans*, η αναστολή έκφρασης της HSP90 είχε ως αποτέλεσμα μια σημαντική μείωση στη μολυσματικότητα του μύκητα σε ένα μοντέλο συστηματικής νόσου βασισμένο στον ποντικό (Shapiro *et al.*, 2009). Τα παραπάνω δεδομένα μαζί με αρκετά άλλα, υποδηλώνουν πως η HSP90 φαίνεται να εξελίχθηκε στα πρώιμα ευκαρυωτικά

συστήματα με ένα τρόπο έτσι ώστε να προστατεύει αυτούς τους οργανισμούς από το αφιλόξενο περιβάλλον που συναντούν στο θηλαστικό ξενιστή.

Κατά συνέπεια, η αυξημένη ευαισθησία σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα των παρασίτων που υπερεκφράζουν την LeishH1, μπορεί πιθανότατα να αποτελεί σημαντικό παράγοντα που ευθύνεται για την απώλεια μολυσματικότητας που παρουσιάζουν σε *in vivo* συστήματα. Αυξημένη θερμο-ευαισθησία που σχετίζεται με ένα μη μολυσματικό φαινότυπο έχει παρατηρηθεί και σε ένα στέλεχος *L. major* με ατελή έκφραση της πρωτεΐνης calcineurin (Naderer *et al.*, 2011). Παρομοίως, η απώλεια μολυσματικότητας σε κλώνους *L. major* με μη έκφραση της πρωτεΐνης HSP100, σχετίζεται άμεσα με μειωμένη επιβίωση των παρασίτων αυτών σε συνθήκες καλλιέργειας στους 35°C (Hubel *et al.*, 1997).

Εν κατακλείδι, μπορούμε να συμπεράνουμε πως υπάρχει μια σαφής συσχέτιση μεταξύ μονοπατιών που εμπλέκονται στην αντοχή σε φαρμακευτικές ουσίες, στην απόπτωση και τη μολυσματικότητα. Τοιουτοτρόπως, τα σήματα και οι μηχανισμοί που ρυθμίζουν τη διαφοροποίηση των παρασίτων και τη μολυσματικότητα καθώς και την απόπτωση και την απάντηση σε στρεσογόνους παράγοντες χρήζουν περισσότερης και αναλυτικότερης μελέτης καθώς φαίνεται να αποτελούν τις δυο όψεις του ίδιου νομίσματος.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

6

6. Περίληψη

Τα είδη του γένους *Leishmania* αποτελούν υποχρεωτικά ενδοκυττάρια πρωτοζωικά παράσιτα που προκαλούν ένα ευρύ φάσμα ασθενειών, τις λεισμανιάσεις, με σοβαρό αντίκτυπο στη Δημόσια Υγεία. Η λεισμανίαση (δερματική, σπλαχνική κ.λ.π.) θεωρείται νόσος εξέχουσας σπουδαιότητας, με 2 εκατομμύρια νέα κρούσματα το χρόνο, χρήζουσας μεγάλης κοινωνικής και οικονομικής σημασίας. Το παράσιτο μεταδίδεται στο θηλαστικό ξενιστή μέσω δήγματος σκνίπας του γένους *Phlebotomus* ή *Lutzomyia*. Τα παράσιτα *Leishmania* διακρίνονται από δυο μορφολογικά στάδια, την αμαστιγωτή μορφή που επιβιώνει και πολλαπλασιάζεται στα μακροφάγα του θηλαστικού ξενιστή και την προμαστιγωτή μορφή που επιβιώνει και πολλαπλασιάζεται στο έντομο-ξενιστή. Για τον έλεγχο των συνεχώς αυξανόμενων κρουσμάτων, είναι επιτακτική ανάγκη η ανάπτυξη νέων μη τοξικών φαρμάκων που θα στοχεύουν σε μόρια-στόχους σημαντικά για την ολοκλήρωση του κύκλου ζωής του παρασίτου. Κατ' αυτόν τον τρόπο κρίνεται απαραίτητη η μελέτη μηχανισμών και παραγόντων μολυσματικότητας του παρασίτου, που ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο και τη διαφοροποίηση του παρασίτου από την προμαστιγωτή στην αμαστιγωτή μορφή.

Στα πλαίσια αυτά, έχει δειχθεί ότι η επισωματική υπερέκφραση της συνδετικής ιστόνης H1 του παρασίτου *Leishmania* (LeishH1) οδηγεί στην καθυστέρηση της ολοκλήρωσης του κυτταρικού κύκλου, αλλά παράλληλα και στη μείωση του ρυθμού διαφοροποίησης των παρασίτων από προμαστιγωτές σε αμαστιγωτές μορφές, έχοντας σαν αποτέλεσμα τη μείωση της μολυσματικότητας του παρασίτου τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*.

Στόχος αυτής της διατριβής ήταν η ανάδειξη μορίων που επηρεάζουν τη μολυσματικότητα του παρασίτου, μελετώντας το προτέωμα των μη μολυσματικών παρασίτων που υπερεκφράζουν την LeishH1. Η συγκριτική μελέτη των παρασίτων που υπερεκφράζουν τη LeishH1 σε σχέση με τα παράσιτα ελέγχου, είχε επίσης ως σκοπό την περαιτέρω μελέτη του βιολογικού ρόλου της ιστόνης H1 στα παράσιτα και τη διερεύνηση του ρόλου της στη γονιδιακή ρύθμιση του παρασίτου.

Η συγκριτική πρωτεομική ανάλυση με ηλεκτροφόρηση δυο διαστάσεων, των παρασίτων που υπερεκφράζουν την LeishH1 σε σχέση με τα παράσιτα ελέγχου,

κατέδειξε πως μόνο μια μικρή ομάδα πρωτεϊνών παρουσιάζει διαφορική έκφραση. Συγκεκριμένα, τρεις πρωτεΐνες [heat shock protein 83 (HSP83), eukaryotic elongation factor 2(eEF-2), alpha subunit of the mitochondrial processing peptidase (α -MPP)] παρουσιάζουν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης ενώ άλλες δυο (α/β τουμπουλίνη, MAP) παρουσιάζουν μεγαλύτερη κατανομή έκφρασης. Πειράματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης πραγματικού χρόνου, επιβεβαίωσαν το αποτέλεσμα αυτό, υποδηλώνοντας ότι η συνδετική ιστόνη του παρασίτου δεν είναι γενικός καταστολέας της μεταγραφής αλλά επηρεάζει ένα ειδικό υποσύνολο πρωτεϊνών, σε προ- ή μετα-μεταγραφικό επίπεδο.

Ο eEF-2 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της μετάφρασης, καθώς είναι υπεύθυνος για τη μετατόπιση των κωδικονίων. Η ρύθμιση της διαδικασίας της μετάφρασης, είναι άρρηκτα δεμένη με την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και έτσι οποιαδήποτε απορρύθμιση της λειτουργίας του eEF-2 μπορεί να επηρεάσει τον κυτταρικό κύκλο. Όσον αφορά τη MAP πρωτεΐνη, γνωρίζουμε ότι εμπλέκεται στη δυναμική της τουμπουλίνης στο κύτταρο και σε επόμενο στάδιο των μικροσωληνίσκων. Η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης αυτής επηρεάζει την ικανότητα της να σταθεροποιεί τους μικροσωληνίσκους και άρα η διευρυμένη κατανομή που παρατηρούμε στην πρωτεΐνη ενδέχεται να επηρεάζει τη σταθεροποίηση αυτή. Τέλος, η α -MPP, αποτελεί μια πεπτιδάση της οποίας ο ρόλος είναι η αποκοπή αλληλουχιών που υπάρχουν σε διάφορες πρωτεΐνες και αποτελούν ενδογενή σινιάλα για τη μεταφορά τους στο μιτοχόνδριο. Χαμηλότερα επίπεδα της α -MPP θα μπορούσαν πιθανόν να προκαλέσουν τη συσσώρευση πρώιμων μορφών πρωτεϊνικών μορίων στο μιτοχόνδριο, οδηγώντας έτσι σε ένα δυσλειτουργικό οργανίδιο. Με βάση τα παραπάνω στοιχεία, διαπιστώνουμε ότι η διαφορική έκφραση των πρωτεϊνών ενδέχεται να συνδέεται άρρηκτα με μια αλλοίωση και απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου του παρασίτου και εν μέρει να εξηγούν το φαινότυπο των παρασίτων που υπερεκφράζουν την LeishH1.

Ανάμεσα στις υπόλοιπες πρωτεΐνες με διαφορική έκφραση ήταν και η τουμπουλίνη. Η πρωτεομική ανάλυση υπέδειξε την ύπαρξη μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων οι οποίες θα μπορούσαν να δικαιολογήσουν τη διαφορική έκφραση, αλλά εντέλει δεν μπόρεσαν να ανιχνευθούν. Η διαφορική έκφραση της πρωτεΐνης αντικατοπτρίζεται άμεσα στη μορφολογία των παρασίτων που

υπερεκφράζουν την LeishH1, καθώς τα παράσιτα αυτά παρουσιάζουν μικρότερο και πιο στρογγυλό σχήμα και παράλληλα μεγαλύτερη μορφολογική ετερογένεια. Για να εξακριβωθεί πως η LeishH1 επηρεάζει τον κυτταροσκελετό του παρασίτου, μελετήθηκε η ικανότητα της LeishH1 να προσδένεται με πρωτεΐνες του παρασίτου. Από την ανάλυση αυτή βρέθηκε ότι οι κυριότερες πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρά η LeishH1 είναι η α - και β - τουμπουλίνη. Η παρατήρηση αυτή έχει αναφερθεί και σε παλαιότερες μελέτες αλλά δε διερευνήθηκε περαιτέρω καθώς θεωρήθηκε ότι η αλληλεπίδραση αυτή είναι κυρίως ηλεκτροστατικής φύσης και άρα μη ειδική. Παρ' όλα αυτά νέες μελέτες υποδεικνύουν ότι η αλληλεπίδραση της ιστόνης H1 με την τουμπουλίνη είναι ειδική. Πιο συγκεκριμένα η ιστόνη H1 μπορεί και οργανώνει τους ακτινωτούς μικροσωληνίσκους από άτυπα κέντρα οργάνωσης μικροσωληνίσκων σε φυτικά κύτταρα. Στα θηλαστικά σε αυτή τη διαδικασία εμπλέκεται η πρωτεΐνη RAN-GTPase, η οποία στη *Leishmania* έχει δείχθει ότι αλληλεπιδρά με την LeishH1 στην περιφέρεια του πυρήνα. Η πληροφορία αυτή οδήγησε στην υπόθεση εάν η LeishH1 εμπλέκεται στο σχηματισμό ή τη δυναμική των μικροσωληνίσκων και όντως με πειράματα ιζηματοποίησης μικροσωληνίσκων αποκαλύφθηκε ότι η LeishH1 μπορεί να επηρεάζει το σχηματισμό ή τον πολυμερισμό των μικροσωληνίσκων. Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν την εμπλοκή της LeishH1 στη δυναμική της τουμπουλίνης και σε επόμενο επίπεδο των μικροσωληνίσκων και δείχνουν ότι η υπερέκφραση της ιστόνης μπορεί να επηρεάζει με έμμεσο τρόπο τον κυτταροσκελετό και τη μορφολογία του παρασίτου. Επιπρόσθετα η αλληλεπίδραση αυτή μπορεί να επηρεάζει τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις κρατώντας την τουμπουλίνη «μακριά» από μεθυλάσεις, ακετυλάσεις και άλλα ένζυμα.

Μια άλλη πρωτεΐνη της οποίας η έκφραση επηρεάζεται από την υπερέκφραση της LeishH1, ήταν και η πρωτεΐνη θερμικού σοκ 83 (HSP83), γνωστή για τον προστατευτικό ρόλο της στην επαγόμενη από φαρμακευτικές ουσίες απόπτωση. Η HSP83 παρουσίασε χαμηλότερα επίπεδα στα παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1. Θέλοντας να εξακριβώσουμε σε ποιο επίπεδο παρεμβαίνει η LeishH1 στο μηχανισμό έκφρασης της HSP83, συγκρίναμε τα επίπεδα του mRNA μέσω στυπώματος κατά Northern. Η ανάλυση κατέδειξε ότι δεν υπάρχουν διαφορές στα επίπεδα του mRNA και έτσι η παρεμβολή της LeishH1 δε

συμβαίνει στο μεταγραφικό επίπεδο. Ακολούθως ερευνήσαμε κατά πόσον τα χαμηλότερα ποσοστά έκφρασης της HSP83 θα μπορούσαν να σχετίζονται με μια αυξημένη λειτουργία της αποικοδόμησης μέσω του πρωτεοσώματος, αλλά και πάλι τα αποτελέσματα δεν έδειξαν κάποια διαφορά. Τέλος, μελετήθηκε ο ρυθμός έκφρασης της πρωτεΐνης μέσω της μεταβολικής σήμανσης των πρωτεϊνών και αποκαλύφθηκε πως σε αυτό το στάδιο εντοπίζεται η παρεμβολή της LeishH1, καθώς τα παράσιτα που την υπερεκφράζουν παρουσιάζουν χαμηλότερο ρυθμό έκφρασης της HSP83. Για να ερευνηθεί αν τα χαμηλότερα επίπεδα της HSP83 σχετίζονται με την καθυστέρηση στη διαδικασία της διαφοροποίησης που παρουσιάζουν τα παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1, μελετήθηκε η συμπεριφορά των παρασίτων αυτών σε συνθήκες θερμικού σοκ ($25^{\circ}\text{C} \rightarrow 37^{\circ}\text{C}$). Ένα φυσιολογικό παράγοντα στρες που υποβάλλονται τα παράσιτα κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης σε αμαστιγωτές μορφές. Το θερμικό σοκ προήγαγε την απόπτωση σε μεγαλύτερο ποσοστό στα παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1. Τα αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι τα παράσιτα που υπερεκφράζουν την LeishH1 πεθαίνουν πιο εύκολα όταν εκτεθούν σε συνθήκες θερμικού σοκ. Επιπρόσθετα, τα παράσιτα αυτά ήταν και πιο ευαίσθητα στον κυτταρικό θάνατο που επάγεται από το τρισθενές αντιμόνιο [Sb(III)], ένα φάρμακο «πρώτης γραμμής» για την αντιμετώπιση της λεισμανίασης. Παράλληλα, όταν τα επίπεδα της HSP83 αναπληρώθηκαν μέσω επισωματικής υπερέκφρασης της HSP83, η αντοχή στις φαρμακευτικές ουσίες αποκαταστάθηκε στα πρωτότερα επίπεδα. Επίσης το ίδιο συνέβη και για τη μολυσματικότητα των παρασίτων αυτών σε ένα μοντέλο επιμόλυνσης *in vitro*, βασισμένο σε μακροφάγα κύτταρα ποντικού J774.

Συμπερασματικά διαφαίνεται πως υπάρχει μια συσχέτιση μεταξύ μονοπατιών που εμπλέκονται στην αντίσταση έναντι φαρμακευτικών ουσιών, στην απόπτωση και τη μολυσματικότητα. Κατ' αυτόν τον τρόπο, τα ειδικά σήματα και οι μηχανισμοί που ρυθμίζουν τη διαφοροποίηση/μολυσματικότητα του παρασίτου και την απόπτωση/απόκριση στο στρες, χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης καθώς φαίνεται να αποτελούν τις δυο όψεις του ίδιου νομίσματος.

SUMMARY

7

7. Summary

Leishmania spp. are obligatory intracellular parasites that cause a wide spectrum of human diseases of major health importance. Leishmaniasis (cutaneous, visceral etc) is considered to be of high significance, responsible for 2 million new cases annually. The parasite is transmitted to the mammalian host by the bite of female sand-flies of the genus *Phlebotomus* or *Lutzomyia*. *Leishmania* parasites are characterized by the existence of two morphologically distinct stages, the amastigote that resides in the macrophages of the mammalian host and the promastigote that resides and multiplies in the insect host.

To control the increasing outbreaks of the disease, new, effective and non-toxic drugs must be discovered. To this end, the analysis of the mechanisms and virulence factors of the parasite that control the cell-cycle and the differentiation process, is of prime importance.

Previous studies showed that the episomic overexpression of *Leishmania* linker histone H1 (LeishH1) leads to a deregulation of the cell-cycle and furthermore to a promastigote – to – amastigote differentiation handicap. These incidents result in a reduction of the parasite's infectivity *in vitro* and *in vivo*.

The aim of this study was the identification of molecules that affect the virulence of the parasite, by analyzing the proteome of the parasites overexpressing LeishH1. The comparative proteomic analysis was aimed at the analysis of the LeishH1 biological role and its implication in the *Leishmania* gene regulation.

To identify proteins associated with the avirulent phenotype of the LeishH1 overexpressing parasites, we applied a comparative proteomic approach using 2D electrophoresis. Our results showed that only a small subset of proteins presented differential expression. Among these proteins, three were underexpressed [heat shock protein 83 (HSP83), eukaryotic elongation factor 2(eEF-2), alpha subunit of the mitochondrial processing peptidase (α -MPP)] and two presented a wider isoelectric point (Ip) distribution [α/β tubulin, microtubule associated protein (MAP)]. This wider Ip distribution could imply that post-translational modifications exist but the analysis performed did not reveal any. Real-time RT-PCR analysis, confirmed the above result showing that the overexpression of LeishH1 does not result in a general

suppression of transcription but affects a specific group of proteins, at a pre- or post – transcriptional stage.

eEF-2 plays a significant role in the translation process of the cell. The regulation of translation is inversely associated with the progression of the cell-cycle and therefore any deregulation in the expression of eEF-2 could affect the cell-cycle. As far as MAP is concerned, its role resides in regulating tubulin dynamics inside the cell. More precisely phosphorylation of MAP results in increasing the stability of microtubules. Besides eEF-2 and MAP, a protein homologous to the α subunit of the MPP was expressed in lower amounts. The MPP protein complex is implicated in the removal of mitochondrial targeting signals from precursor proteins. The lower levels could possibly lead to an accumulation of pre-proteins in the mitochondrion leading to a dysfunctional organelle. Considering the data above, we ascertain that the differential expression of these proteins can be associated with a deregulation of the parasitic cell-cycle.

Tubulin, is also among the proteins presenting a differential expression pattern. The proteomic analysis implied the existence of post-translational modifications that could justify the pattern observed, but further analysis did not reveal any. The differential expression of the protein correlates with a more heterogeneous morphology of the LeishH1 overexpressing promastigotes compared to control parasites. To assess how LeishH1 affects the cytoskeleton of the parasite, we analysed the ability of the histone to bind to specific parasitic proteins, and the results showed that α/β tubulin is the major protein associated with LeishH1. This finding has been reported by previous studies but was not further evaluated since this association was attributed to the electrostatic nature and thus considered non-specific. However, current studies depict that the tubulin-histone association could be specific. In particular, histone H1 can organize radial microtubules from atypical microtubule organizing centers in plant cells. In this procedure, RAN-GTAase plays a significant role in higher eukaryotes. In Leishmania, RAN-GTPase has been shown to interact with LeishH1 at the nuclear rim. This information led to the hypothesis, that LeishH1 could be involved in the assembly or the dynamics of the microtubules. The microtubule sedimentation experiments performed, revealed that LeishH1 can indeed affect the assembly or the nucleation/polymerization of the microtubules.

The latter implies the direct effect LeishH1 could have on the cell-cycle, since polymerization of tubulin is directly associated with the cell-cycle progression and the differentiation process. Furthermore, this interaction may affect post-translational modifications by quenching tubulin from methylases / acetylases and other modifying enzymes.

Another protein, whose expression is affected from the LeishH1 overexpression, was HSP83 that is known for its protective role in drug-induced apoptosis. More specifically, HSP83 was found to be underexpressed in the LeishH1 overexpressing parasites. In the light of the evidence that there is no general modification of transcription in LeishH1 overexpressing promastigotes, we wanted to determine if there is any change in the levels of HSP83 mRNA. We thus evaluated the levels of HSP83 mRNA from control and LeishH1 overexpressing parasites. From our results, it is evident that no significant differences exist. Next we checked if the lower levels of HSP83 correlated with an enhanced proteasomal degradation, but again our results showed that this was not the case. We then sought to evaluate the translational rates of HSP83 using the metabolic labeling technique. Based on our observation, translation was reduced in the LeishH1 overexpressing parasites. To further investigate whether the lower levels of HSP83 were associated with the differentiation handicap observed in the LeishH1 overexpressing parasites, we subjected the parasites to heat-shock treatment (37°C) and calculated the apoptotic index. Our results showed that parasites that overexpressed LeishH1, when exposed to heat shock, died faster than control cells. Furthermore, these parasites were more sensitive towards trivalent antimony Sb(III), a drug used for the treatment of leishmaniasis. When we restored the levels of HSP83 through episomal overexpression, we observed that the LeishH1 overexpressing parasites' resistance to antimony was restored. Similarly the restoration of HSP83 levels in LeishH1 overexpressing parasites was sufficient to complement the loss of infectivity observed before in these parasites.

Overall, we may conclude that there is a cross-talk between pathways involved in drug resistance, apoptosis and virulence. Thus, the signals and mechanisms regulating differentiation/virulence and apoptosis/stress response merit in depth investigation as they seem to be the two sides of the same coin.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

8

- Acharya, P., R. Kumar & U. Tatu, (2007) Chaperoning a cellular upheaval in malaria: Heat shock proteins in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasit* **153**: 85-94.
- Agallou, M., D. Smirlis, K. P. Soteriadou & E. Karagouni, (2012) Vaccination with *Leishmania* histone H1-pulsed dendritic cells confers protection in murine visceral leishmaniasis. *Vaccine* **30**: 5086-5093.
- Alexander, J., G. H. Coombs & J. C. Mottram, (1998) *Leishmania mexicana* cysteine proteinase-deficient mutants have attenuated virulence for mice and potentiate a Th1 response. *J Immunol* **161**: 6794-6801.
- Alexander, J., A. R. Satoskar & D. G. Russell, (1999) *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *J Cell Sci* **112 Pt 18**: 2993-3002.
- Almeida, L. A. & R. Araujo, (2013) Highlights on molecular identification of closely related species. *Infect Genet Evol* **13**: 67-75.
- Almeida, O. L. & J. B. Santos, (2011) Advances in the treatment of cutaneous leishmaniasis in the new world in the last ten years: a systematic literature review. *An Bras Dermatol* **86**: 497-506.
- Alvar, J., P. Aparicio, A. Aseffa, M. Den Boer, C. Canavate, J. P. Dedet, L. Gradoni, R. Ter Horst, R. Lopez-Velez & J. Moreno, (2008) The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev* **21**: 334-359, table of contents.
- Alvar, J., C. Canavate, B. Gutierrez-Solar, M. Jimenez, F. Laguna, R. Lopez-Velez, R. Molina & J. Moreno, (1997) *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin Microbiol Rev* **10**: 298-319.
- Alvar, J., S. Yactayo & C. Bern, (2006) Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol* **22**: 552-557.
- Alzate, J. F., A. Alvarez-Barrientos, V. M. Gonzalez & A. Jimenez-Ruiz, (2006) Heat-induced programmed cell death in *Leishmania infantum* is reverted by Bcl-X(L) expression. *Apoptosis* **11**: 161-171.
- Alzate, J. F., A. Arias, F. Mollinedo, E. Rico, J. de la Iglesia-Vicente & A. Jimenez-Ruiz, (2008) Edelfosine induces an apoptotic process in *Leishmania infantum* that is regulated by the ectopic expression of Bcl-XL and Hrk. *Antimicrob Agents Chemother* **52**: 3779-3782.
- Alzate, J. F., A. A. Arias, D. Moreno-Mateos, A. Alvarez-Barrientos & A. Jimenez-Ruiz, (2007) Mitochondrial superoxide mediates heat-induced apoptotic-like death in *Leishmania infantum*. *Mol Biochem Parasitol* **152**: 192-202.
- Angel, S. O., J. M. Requena, M. Soto, D. Criado & C. Alonso, (1996) During canine leishmaniasis a protein belonging to the 83-kDa heat-shock protein family elicits a strong humoral response. *Acta Trop* **62**: 45-56.
- Antoniou, M., C. Haralambous, A. Mazeris, F. Pratlong, J. P. Dedet & K. Soteriadou, (2008) *Leishmania donovani* leishmaniasis in Cyprus. *Lancet Infect Dis* **8**: 6-7.
- Argaman, M., R. Aly & M. Shapira, (1994) Expression of heat shock protein 83 in *Leishmania* is regulated post-transcriptionally. *Mol Biochem Parasitol* **64**: 95-110.
- Bari, A. U., (2012) Clinical spectrum of cutaneous leishmaniasis: an overview from Pakistan. *Dermatol Online J* **18**: 4.
- Bastien, P., C. Blaineau & M. Pages, (1992) *Leishmania*: sex, lies and karyotype. *Parasitol Today* **8**: 174-177.
- Belli, S. I., (2000) Chromatin remodelling during the life cycle of trypanosomatids. *Int J Parasitol* **30**: 679-687.

- Bente, M., S. Harder, M. Wiesgigl, J. Heukeshoven, C. Gelhaus, E. Krause, J. Clos & I. Bruchhaus, (2003) Developmentally induced changes of the proteome in the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Proteomics* **3**: 1811-1829.
- Besteiro, S., R. A. Williams, G. H. Coombs & J. C. Mottram, (2007) Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *Int J Parasitol* **37**: 1063-1075.
- Bordier, C., (1987) The promastigote surface protease of *Leishmania*. *Parasitol Today* **3**: 151-153.
- Bordier, C., R. M. Garavito & B. Armbruster, (1982) Biochemical and structural analyses of microtubules in the pellicular membrane of *Leishmania tropica*. *J Protozool* **29**: 560-565.
- Bouvier, J., R. Etges & C. Bordier, (1987) Identification of the promastigote surface protease in seven species of *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* **24**: 73-79.
- Braun, H. P. & U. K. Schmitz, (1997) The mitochondrial processing peptidase. *Int J Biochem Cell B* **29**: 1043-1045.
- Bray, R. S., (1974) *Leishmania*. *Annu Rev Microbiol* **28**: 189-217.
- Brittingham, A., G. Chen, B. S. McGwire, K. P. Chang & D. M. Mosser, (1999) Interaction of *Leishmania* gp63 with cellular receptors for fibronectin. *Infect Immun* **67**: 4477-4484.
- Britto, C., C. Ravel, P. Bastien, C. Blaineau, M. Pages, J. P. Dedet & P. Wincker, (1998) Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal rearrangements between Old World and New World *Leishmania* genomes. *Gene* **222**: 107-117.
- Brown, D. T., B. T. Alexander & D. B. Sittman, (1996) Differential effect of H1 variant overexpression on cell cycle progression and gene expression. *Nucleic Acids Res* **24**: 486-493.
- Cano, M. I., J. M. Dungan, N. Agabian & E. H. Blackburn, (1999) Telomerase in kinetoplastid parasitic protozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 3616-3621.
- Carmelo, E., E. Martinez, A. C. Gonzalez, J. E. Pinero, M. E. Patarroyo, A. Del Castillo & B. Valladares, (2002) Antigenicity of *Leishmania braziliensis* histone H1 during cutaneous leishmaniasis: localization of antigenic determinants. *Clin Diagn Lab Immunol* **9**: 808-811.
- Chang, K. P. & D. Fong, (1983) Cell biology of host-parasite membrane interactions in leishmaniasis. *Ciba Found Symp* **99**: 113-137.
- Chappuis, F., S. Sundar, A. Hailu, H. Ghalib, S. Rijal, R. W. Peeling, J. Alvar & M. Boelaert, (2007) Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol* **5**: 873-882.
- Chavan, H. D., G. Singh & C. S. Dey, (2007) Confocal microscopic investigation of tubulin distribution and effect of paclitaxel on posttranslationally modified tubulins in sodium arsenite resistant *Leishmania donovani*. *Exp Parasitol* **116**: 320-326.
- Chen, B., W. H. Piel, L. Gui, E. Bruford & A. Monteiro, (2005) The HSP90 family of genes in the human genome: insights into their divergence and evolution. *Genomics* **86**: 627-637.
- Chipev, C. C. & A. P. Wolffe, (1992) Chromosomal organization of *Xenopus laevis* oocyte and somatic 5S rRNA genes in vivo. *Mol Cell Biol* **12**: 45-55.
- Choi, J. & N. M. El-Sayed, (2012) Functional genomics of trypanosomatids. *Parasite Immunol* **34**: 72-79.
- Christodoulou, V., M. Antoniou, P. Ntais, I. Messaritakis, V. Iovovic, J. P. Dedet, F. Pratlong, V. Dvorak & Y. Tselentis, (2012) Re-emergence of visceral and

- cutaneous leishmaniasis in the Greek Island of Crete. *Vector Borne Zoonotic Dis* **12**: 214-222.
- Coelho-Finamore, J. M., V. C. Freitas, R. R. Assis, M. N. Melo, N. Novozhilova, N. F. Secundino, P. F. Pimenta, S. J. Turco & R. P. Soares, (2011) *Leishmania infantum*: Lipophosphoglycan intraspecific variation and interaction with vertebrate and invertebrate hosts. *Int J Parasitol* **41**: 333-342.
- Cox, F. E., (2002) History of human parasitology. *Clin Microbiol Rev* **15**: 595-612.
- Croft, S. L., (2001) Monitoring drug resistance in leishmaniasis. *Trop Med Int Health* **6**: 899-905.
- Croft, S. L., R. N. Davidson & E. A. Thornton, (1991) Liposomal amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis. *J Antimicrob Chemother* **28 Suppl B**: 111-118.
- Croft, S. L., S. Sundar & A. H. Fairlamb, (2006) Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev* **19**: 111-126.
- Croston, G. E., L. A. Kerrigan, L. M. Lira, D. R. Marshak & J. T. Kadonaga, (1991) Sequence-specific antirepression of histone H1-mediated inhibition of basal RNA polymerase II transcription. *Science* **251**: 643-649.
- Croston, G. E., P. J. Laybourn, S. M. Paranjape & J. T. Kadonaga, (1992) Mechanism of transcriptional antirepression by GAL4-VP16. *Genes Dev* **6**: 2270-2281.
- Cruz, I., M. A. Morales, I. Noguer, A. Rodriguez & J. Alvar, (2002) *Leishmania* in discarded syringes from intravenous drug users. *Lancet* **359**: 1124-1125.
- Daneshvar, H., S. Wyllie, S. Phillips, P. Hagan & R. Burchmore, (2011) Comparative proteomics profiling of a gentamicin-attenuated *Leishmania infantum* cell line identifies key changes in parasite thiol-redox metabolism. *J Proteomics*.
- Das, M., S. B. Mukherjee & C. Shaha, (2001) Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *J Cell Sci* **114**: 2461-2469.
- Das, R., A. Roy, N. Dutta & H. K. Majumder, (2008) Reactive oxygen species and imbalance of calcium homeostasis contributes to curcumin induced programmed cell death in *Leishmania donovani*. *Apoptosis* **13**: 867-882.
- Delgado-Dominguez, J., H. Gonzalez-Aguilar, M. Aguirre-Garcia, L. Gutierrez-Kobeh, M. Berzunza-Cruz, A. Ruiz-Remigio, M. Robles-Flores & I. Becker, (2010) *Leishmania mexicana* lipophosphoglycan differentially regulates PKC α -induced oxidative burst in macrophages of BALB/c and C57BL/6 mice. *Parasite Immunol* **32**: 440-449.
- den Boer, M., D. Argaw, J. Jannin & J. Alvar, (2011) Leishmaniasis impact and treatment access. *Clin Microbiol Infect* **17**: 1471-1477.
- Deponte, M., (2008) Programmed cell death in protists. *Biochim Biophys Acta* **1783**: 1396-1405.
- Descoteaux, A. & S. J. Turco, (1999) Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochim Biophys Acta* **1455**: 341-352.
- Desjardins, M. & A. Descoteaux, (1997) Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. *J Exp Med* **185**: 2061-2068.
- Desjeux, P., (1996) Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clin Dermatol* **14**: 417-423.
- Desjeux, P., (2004) Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **27**: 305-318.
- Dorlo, T. P., M. Balasegaram, J. H. Beijnen & P. J. de Vries, (2012) Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *J Antimicrob Chemother* **67**: 2576-2597.

- Dragon, E. A., S. R. Sias, E. A. Kato & J. D. Gabe, (1987) The genome of *Trypanosoma cruzi* contains a constitutively expressed, tandemly arranged multicopy gene homologous to a major heat shock protein. *Mol Cell Biol* **7**: 1271-1275.
- Drewes, G., A. Ebner & E. M. Mandelkow, (1998) MAPs, MARKs and microtubule dynamics. *Trends Biochem Sci* **23**: 307-311.
- Drummlersmith, J., I. Girard, N. Trudel & M. Ouellette, (2004) Differential protein expression analysis of *Leishmania major* reveals novel roles for methionine adenosyltransferase and S-adenosylmethionine in methotrexate resistance. *J Biol Chem* **279**: 33273-33280.
- Dujardin, J. C., L. Campino, C. Canavate, J. P. Dedet, L. Gradoni, K. Soteriadou, A. Mazeris, Y. Ozbek & M. Boelaert, (2008) Spread of vector-borne diseases and neglect of Leishmaniasis, Europe. *Emerg Infect Dis* **14**: 1013-1018.
- Duszenko, M., K. Figarella, E. T. Macleod & S. C. Welburn, (2006) Death of a trypanosome: a selfish altruism. *Trends Parasitol* **22**: 536-542.
- Dutta, A., S. Bandyopadhyay, C. Mandal & M. Chatterjee, (2007a) Aloe vera leaf exudate induces a caspase-independent cell death in *Leishmania donovani* promastigotes. *J Med Microbiol* **56**: 629-636.
- Dutta, A., A. Ghoshal, D. Mandal, N. B. Mondal, S. Banerjee, N. P. Sahu & C. Mandal, (2007b) Racemoside A, an anti-leishmanial, water-soluble, natural steroidal saponin, induces programmed cell death in *Leishmania donovani*. *J Med Microbiol* **56**: 1196-1204.
- Dworkin-Rastl, E., H. Kandolf & R. C. Smith, (1994) The maternal histone H1 variant, H1M (B4 protein), is the predominant H1 histone in *Xenopus* pregastrula embryos. *Dev Biol* **161**: 425-439.
- Dwyer, D. M., (1980) Isolation and partial characterization of surface membranes from *Leishmania donovani* promastigotes. *J Protozool* **27**: 176-182.
- Dwyer, D. M., (1981) Structural, chemical and antigenic properties of surface membranes isolated from *Leishmania donovani*. In: The biochemistry of parasites. G. M. Slutzky (ed). Exeter: Pergamon Press, pp. 9-28.
- El-Sayed, N. M., P. J. Myler, G. Blandin, M. Berriman, J. Crabtree, G. Aggarwal, E. Caler, H. Renault, E. A. Worthey, C. Hertz-Fowler, E. Ghedin, C. Peacock, D. C. Bartholomeu, B. J. Haas, A. N. Tran, J. R. Wortman, U. C. Alsmark, S. Angiuoli, A. Anupama, J. Badger, F. Bringaud, E. Cadag, J. M. Carlton, G. C. Cerqueira, T. Creasy, A. L. Delcher, A. Djikeng, T. M. Embley, C. Hauser, A. C. Ivens, S. K. Kummerfeld, J. B. Pereira-Leal, D. Nilsson, J. Peterson, S. L. Salzberg, J. Shallom, J. C. Silva, J. Sundaram, S. Westenberger, O. White, S. E. Melville, J. E. Donelson, B. Andersson, K. D. Stuart & N. Hall, (2005) Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science* **309**: 404-409.
- Fasel, N. J., D. C. Robyr, J. Mauel & T. A. Glaser, (1993) Identification of a histone H1-like gene expressed in *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol* **62**: 321-323.
- Folgueira, C. & J. M. Requena, (2007) A postgenomic view of the heat shock proteins in kinetoplastids. *FEMS Microbiol Rev* **31**: 359-377.
- Gakh, O., P. Cavadini & G. Isaya, (2002) Mitochondrial processing peptidases. *Biochim Biophys Acta* **1592**: 63-77.
- Galanti, N., J. A. Dvorak, J. Grenet & J. P. McDaniel, (1994) Hydroxyurea-induced synchrony of DNA replication in the Kinetoplastida. *Exp Cell Res* **214**: 225-230.

- Galanti, N., M. Galindo, V. Sabaj, I. Espinoza & G. C. Toro, (1998) Histone genes in trypanosomatids. *Parasitol Today* **14**: 64-70.
- Gale, M., Jr., V. Carter & M. Parsons, (1994) Translational control mediates the developmental regulation of the Trypanosoma brucei Nrk protein kinase. *J Biol Chem* **269**: 31659-31665.
- Garifallou, A., L. F. Schnur, J. D. Stratigos, M. Hadziandoniou, M. Savigos, N. Stavrianeas & C. Serie, (1984) Leishmaniasis in Greece II. Isolation and identification of the parasite causing cutaneous leishmaniasis in man. *Ann Trop Med Parasitol* **78**: 369-375.
- Genske, J. E., B. R. Cairns, S. P. Stack & S. M. Landfear, (1991) Structure and regulation of histone H2B mRNAs from Leishmania enriettii. *Mol Cell Biol* **11**: 240-249.
- Gillis, D., S. Klaus, L. F. Schnur, P. Piscopos, S. Maayan, E. Okon & D. Engelhard, (1995) Diffusely disseminated cutaneous Leishmania major infection in a child with acquired immunodeficiency syndrome. *Pediatr Infect Dis J* **14**: 247-249.
- Gouzelou, E. & K. Soteriadou, (2013) Unpublished results.
- Graefe, S. E., M. Wiesgigl, I. Gaworski, A. Macdonald & J. Clos, (2002) Inhibition of HSP90 in Trypanosoma cruzi induces a stress response but no stage differentiation. *Eukaryot Cell* **1**: 936-943.
- Guerin, P. J., P. Olliaro, S. Sundar, M. Boelaert, S. L. Croft, P. Desjeux, M. K. Wasunna & A. D. Bryceson, (2002) Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect Dis* **2**: 494-501.
- Gunjan, A., B. T. Alexander, D. B. Sittman & D. T. Brown, (1999) Effects of H1 histone variant overexpression on chromatin structure. *J Biol Chem* **274**: 37950-37956.
- Gupta, R. S., (1995) Phylogenetic analysis of the 90 kD heat shock family of protein sequences and an examination of the relationship among animals, plants, and fungi species. *Mol Biol Evol* **12**: 1063-1073.
- Hawkins, C. J., S. J. Yoo, E. P. Peterson, S. L. Wang, S. Y. Vernoooy & B. A. Hay, (2000) The Drosophila caspase DRONC cleaves following glutamate or aspartate and is regulated by DIAP1, HID, and GRIM. *J Biol Chem* **275**: 27084-27093.
- Hengartner, M. O., (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**: 770-776.
- Hentschel, C. C. & M. L. Birnstiel, (1981) The organization and expression of histone gene families. *Cell* **25**: 301-313.
- Hodgetts, S., R. Matthews, G. Morrissey, K. Mitsutake, P. Piper & J. Burnie, (1996) Over-expression of Saccharomyces cerevisiae hsp90 enhances the virulence of this yeast in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* **16**: 229-234.
- Holzmuller, P., M. Hide, D. Sereno & J. L. Lemesre, (2006) Leishmania infantum amastigotes resistant to nitric oxide cytotoxicity: Impact on in vitro parasite developmental cycle and metabolic enzyme activities. *Infect Genet Evol* **6**: 187-197.
- Hombach, A., G. Ommen, M. Chrobak & J. Clos, (2012) The Hsp90-Sti1 interaction is critical for Leishmania donovani proliferation in both life cycle stages. *Cell Microbiol*.
- Hubel, A., S. Krobitsch, A. Horauf & J. Clos, (1997) Leishmania major Hsp100 is required chiefly in the mammalian stage of the parasite. *Molecular and Cellular Biology* **17**: 5987-5995.

- Huggett, J., K. Dheda, S. Bustin & A. Zumla, (2005) Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun* **6**: 279-284.
- Ilg, T., (2002) Generation of myo-inositol-auxotrophic *Leishmania mexicana* mutants by targeted replacement of the myo-inositol-1-phosphate synthase gene. *Mol Biochem Parasitol* **120**: 151-156.
- Ivens, A. C., C. S. Peacock, E. A. Worthey, L. Murphy, G. Aggarwal, M. Berriman, E. Sisk, M. A. Rajandream, E. Adlem, R. Aert, A. Anupama, Z. Apostolou, P. Attipoe, N. Bason, C. Bauser, A. Beck, S. M. Beverley, G. Bianchetti, K. Borzym, G. Bothe, C. V. Bruschi, M. Collins, E. Cadag, L. Ciarloni, C. Clayton, R. M. Coulson, A. Cronin, A. K. Cruz, R. M. Davies, J. De Gaudenzi, D. E. Dobson, A. Duesterhoeft, G. Fazelina, N. Fosker, A. C. Frasch, A. Fraser, M. Fuchs, C. Gabel, A. Goble, A. Goffeau, D. Harris, C. Hertz-Fowler, H. Hilbert, D. Horn, Y. Huang, S. Klages, A. Knights, M. Kube, N. Larke, L. Litvin, A. Lord, T. Louie, M. Marra, D. Masuy, K. Matthews, S. Michaeli, J. C. Mottram, S. Muller-Auer, H. Munden, S. Nelson, H. Norbertczak, K. Oliver, S. O'Neil, M. Pentony, T. M. Pohl, C. Price, B. Purnelle, M. A. Quail, E. Rabinowitsch, R. Reinhardt, M. Rieger, J. Rinta, J. Robben, L. Robertson, J. C. Ruiz, S. Rutter, D. Saunders, M. Schafer, J. Schein, D. C. Schwartz, K. Seeger, A. Seyler, S. Sharp, H. Shin, D. Sivam, R. Squares, S. Squares, V. Tosato, C. Vogt, G. Volckaert, R. Wambutt, T. Warren, H. Wedler, J. Woodward, S. Zhou, W. Zimmermann, D. F. Smith, J. M. Blackwell, K. D. Stuart, B. Barrell, et al., (2005) The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* **309**: 436-442.
- Jarvis, J. N. & D. N. Lockwood, (2013) Clinical aspects of visceral leishmaniasis in HIV infection. *Curr Opin Infect Dis* **26**: 1-9.
- Jimenez-Ruiz, A., J. F. Alzate, E. T. Macleod, C. G. Luder, N. Fasel & H. Hurd, (2010) Apoptotic markers in protozoan parasites. *Parasit Vectors* **3**: 104.
- Kamhawi, S., (2000) The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections. *Microbes Infect* **2**: 1765-1773.
- Kamhawi, S., (2006) Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol* **22**: 439-445.
- Kasinsky, H. E., J. D. Lewis, J. B. Dacks & J. Ausio, (2001) Origin of H1 linker histones. *FASEB J* **15**: 34-42.
- Kaul, G., G. Pattan & T. Rafeequi, (2011) Eukaryotic elongation factor-2 (eEF2): its regulation and peptide chain elongation. *Cell Biochemistry and Function* **29**: 227-234.
- Kaur, J., B. K. Singh, R. P. Tripathi, P. Singh & N. Singh, (2009) *Leishmania donovani*: a glycosyl dihydropyridine analogue induces apoptosis like cell death via targeting pteridine reductase 1 in promastigotes. *Exp Parasitol* **123**: 258-264.
- Killick-Kendrick, R., (1990) The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. *Ann Parasitol Hum Comp* **65 Suppl 1**: 37-42.
- Killick-Kendrick, R., (1999) The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin Dermatol* **17**: 279-289.
- Killick-Kendrick, R., D. H. Molyneux & R. W. Ashford, (1974) *Leishmania* in phlebotomid sandflies. I. Modifications of the flagellum associated with attachment to the mid-gut and oesophageal valve of the sandfly. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **187**: 409-419.

- Killick-Kendrick, R. & J. A. Rioux, (2002) Mark-release-recapture of sand flies fed on leishmanial dogs: the natural life-cycle of *Leishmania infantum* in *Phlebotomus ariasi*. *Parassitologia* **44**: 67-71.
- Kohl, L. & K. Gull, (1998) Molecular architecture of the trypanosome cytoskeleton. *Mol Biochem Parasitol* **93**: 1-9.
- Kulkarni, M. M., W. R. McMaster, W. Kamysz & B. S. McGwire, (2009) Antimicrobial peptide-induced apoptotic death of leishmania results from calcium-dependent, caspase-independent mitochondrial toxicity. *J Biol Chem* **284**: 15496-15504.
- Kumar, A., B. Sisodia, P. Misra, S. Sundar, A. K. Shasany & A. Dube, (2010) Proteome mapping of overexpressed membrane-enriched and cytosolic proteins in sodium antimony gluconate (SAG) resistant clinical isolate of *Leishmania donovani*. *Br J Clin Pharmacol* **70**: 609-617.
- Laemmli, U. K., (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lane, J. D. & H. Stebbings, (1998) Phosphorylation of microtubule-associated proteins from the ovaries of hemipteran insects by MPF and MAP kinase: possible roles in the regulation of microtubules during oogenesis. *Arch Insect Biochem Physiol* **39**: 81-90.
- Larreta, R., M. Soto, L. Quijada, C. Folgueira, D. R. Abanades, C. Alonso & J. M. Requena, (2004) The expression of HSP83 genes in *Leishmania infantum* is affected by temperature and by stage-differentiation and is regulated at the levels of mRNA stability and translation. *BMC Mol Biol* **5**: 3.
- Laybourn, P. J. & J. T. Kadonaga, (1991) Role of nucleosomal cores and histone H1 in regulation of transcription by RNA polymerase II. *Science* **254**: 238-245.
- Li, Q., Y. Zhou, C. Yao, X. Ma, L. Wang, W. Xu, Z. Wang & Z. Qiao, (2009) Apoptosis caused by Hsp90 inhibitor geldanamycin in *Leishmania donovani* during promastigote-to-amastigote transformation stage. *Parasitol Res* **105**: 1539-1548.
- Liang, X. H., A. Haritan, S. Uliel & S. Michaeli, (2003) trans and cis splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation. *Eukaryot Cell* **2**: 830-840.
- Livak, K. J. & T. D. Schmittgen, (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* **25**: 402-408.
- Luciano, P. & V. Geli, (1996) The mitochondrial processing peptidase: function and specificity. *Experientia* **52**: 1077-1082.
- Lukes, J., I. L. Mauricio, G. Schonian, J. C. Dujardin, K. Soteriadou, J. P. Dedet, K. Kuhls, K. W. Tintaya, M. Jirku, E. Chocholova, C. Haralambous, F. Pratlong, M. Obornik, A. Horak, F. J. Ayala & M. A. Miles, (2007) Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 9375-9380.
- Luque-Ortega, J. R., L. J. Cruz, F. Albericio & L. Rivas, (2010) The antitumoral depsipeptide IB-01212 kills *Leishmania* through an apoptosis-like process involving intracellular targets. *Mol Pharm* **7**: 1608-1617.
- Mannironi, C., W. M. Bonner & C. L. Hatch, (1989) H2A.X, a histone isoprotein with a conserved C-terminal sequence, is encoded by a novel mRNA with both DNA replication type and polyA 3' processing signals. *Nucleic Acids Res* **17**: 9113-9126.

- Marques Porto, R., R. Amino, M. C. Elias, M. Faria & S. Schenkman, (2002) Histone H1 is phosphorylated in non-replicating and infective forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* **119**: 265-271.
- Marsden, P. D., (1979) Current concepts in parasitology. Leishmaniasis. *N Engl J Med* **300**: 350-352.
- Martinez-Calvillo, S., J. C. Vizuet-de-Rueda, L. E. Florencio-Martinez, R. G. Manning-Cela & E. E. Figueroa-Angulo, (2010) Gene expression in trypanosomatid parasites. *J Biomed Biotechnol* **2010**: 525241.
- Matlashewski, G., (2001) Leishmania infection and virulence. *Med Microbiol Immunol* **190**: 37-42.
- Mayho, M., K. Fenn, P. Craddy, S. Crosthwaite & K. Matthews, (2006) Post-transcriptional control of nuclear-encoded cytochrome oxidase subunits in *Trypanosoma brucei*: evidence for genome-wide conservation of life-cycle stage-specific regulatory elements. *Nucleic Acids Res* **34**: 5312-5324.
- McNicoll, F., J. Drummelsmith, M. Muller, E. Madore, N. Boilard, M. Ouellette & B. Papadopoulou, (2006) A combined proteomic and transcriptomic approach to the study of stage differentiation in *Leishmania infantum*. *Proteomics* **6**: 3567-3581.
- Meshi, T., K. I. Taoka & M. Iwabuchi, (2000) Regulation of histone gene expression during the cell cycle. *Plant Mol Biol* **43**: 643-657.
- Mikus, J. & D. Steverding, (2000) A simple colorimetric method to screen drug cytotoxicity against *Leishmania* using the dye Alamar Blue. *Parasitol Int* **48**: 265-269.
- Mithieux, G., C. Alquier, B. Roux & B. Rousset, (1984) Interaction of tubulin with chromatin proteins. H1 and core histones. *J Biol Chem* **259**: 15523-15531.
- Mojtahedi, Z., J. Clos & E. Kamali-Sarvestani, (2008) *Leishmania major*: identification of developmentally regulated proteins in procyclic and metacyclic promastigotes. *Exp Parasitol* **119**: 422-429.
- Morales, M. A., R. Watanabe, M. Dacher, P. Chafey, J. O. Y. Fortea, D. A. Scott, S. M. Beverley, G. Ommen, J. Clos, S. Hem, P. Lenormand, J. C. Rousselle, A. Namane & G. F. Spath, (2010) Phosphoproteome dynamics reveal heat-shock protein complexes specific to the *Leishmania donovani* infectious stage. *P Natl Acad Sci USA* **107**: 8381-8386.
- Moreira, M. E., H. A. Del Portillo, R. V. Milder, J. M. Balanco & M. A. Barcinski, (1996) Heat shock induction of apoptosis in promastigotes of the unicellular organism *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *J Cell Physiol* **167**: 305-313.
- Mottram, J. C., G. H. Coombs & J. Alexander, (2004) Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*. *Curr Opin Microbiol* **7**: 375-381.
- Mottram, J. C., W. J. Murphy & N. Agabian, (1989) A transcriptional analysis of the *Trypanosoma brucei* hsp83 gene cluster. *Mol Biochem Parasitol* **37**: 115-127.
- Mottram, J. C., C. D. Robertson, G. H. Coombs & J. D. Barry, (1992) A developmentally regulated cysteine proteinase gene of *Leishmania mexicana*. *Mol Microbiol* **6**: 1925-1932.
- Mougneau, E., F. Bihl & N. Glaichenhaus, (2011) Cell biology and immunology of *Leishmania*. *Immunol Rev* **240**: 286-296.
- Moulay, L., M. Robert-Gero, S. Brown, M. C. Gendron & F. Tournier, (1996) Sinefungin and taxol effects on cell cycle and cytoskeleton of *Leishmania donovani* promastigotes. *Exp Cell Res* **226**: 283-291.
- Myler, P. J., L. Audleman, T. deVos, G. Hixson, P. Kiser, C. Lemley, C. Magness, E. Rickel, E. Sisk, S. Sunkin, S. Swartzell, T. Westlake, P. Bastien, G. Fu, A.

- Ivens & K. Stuart, (1999) *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 has an unusual distribution of protein-coding genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 2902-2906.
- Naderer, T., O. Dandash & M. J. McConville, (2011) Calcineurin is required for *Leishmania major* stress response pathways and for virulence in the mammalian host. *Molecular Microbiology* **80**: 471-480.
- Nakayama, T., T. Ishii, T. Hotta & K. Mizuno, (2008) Radial microtubule organization by histone H1 on nuclei of cultured tobacco BY-2 cells. *J Biol Chem* **283**: 16632-16640.
- Nardelli, S. C., A. R. Avila, A. Freund, M. C. Motta, L. Manhaes, T. C. de Jesus, S. Schenkman, S. P. Fragoso, M. A. Krieger, S. Goldenberg & B. Dallagiovanna, (2007) Small-subunit rRNA processome proteins are translationally regulated during differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Eukaryot Cell* **6**: 337-345.
- Naula, C., M. Parsons & J. C. Mottram, (2005) Protein kinases as drug targets in trypanosomes and *Leishmania*. *Biochim Biophys Acta* **1754**: 151-159.
- Noll, T. M., C. Desponds, S. I. Belli, T. A. Glaser & N. J. Fasel, (1997) Histone H1 expression varies during the *Leishmania major* life cycle. *Mol Biochem Parasitol* **84**: 215-227.
- Nylen, S. & L. Eidsmo, (2012) Tissue damage and immunity in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* **34**: 551-561.
- Olivier, M., V. D. Atayde, A. Isnard, K. Hassani & M. T. Shio, (2012) *Leishmania* virulence factors: focus on the metalloprotease GP63. *Microbes Infect* **14**: 1377-1389.
- Paape, D. & T. Aebischer, (2011) Contribution of proteomics of *Leishmania* spp. to the understanding of differentiation, drug resistance mechanisms, vaccine and drug development. *J Proteomics* **74**: 1614-1624.
- Papageorgiou, F. T. & K. P. Soteriadou, (2002) Expression of a novel *Leishmania* gene encoding a histone H1-like protein in *Leishmania major* modulates parasite infectivity in vitro. *Infect Immun* **70**: 6976-6986.
- Patra, P., S. K. Guha, A. K. Maji, P. Saha, S. Ganguly, A. Chakraborty, P. K. Kundu, S. Sarker & K. Ray, (2012) Efficacy of oral miltefosine in visceral leishmaniasis in rural West Bengal, India. *Indian J Pharmacol* **44**: 500-503.
- Pearson, R. D., D. A. Wheeler, L. H. Harrison & H. D. Kay, (1983) The immunobiology of leishmaniasis. *Rev Infect Dis* **5**: 907-927.
- Peters, C., T. Aebischer, Y. D. Stierhof, M. Fuchs & P. Overath, (1995) The role of macrophage receptors in adhesion and uptake of *Leishmania mexicana* amastigotes. *J Cell Sci* **108** (Pt 12): 3715-3724.
- Pfaffl, M. W., (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**: e45.
- Povelones, M. L., E. Gluenz, M. Dembek, K. Gull & G. Rudenko, (2012) Histone H1 Plays a Role in Heterochromatin Formation and VSG Expression Site Silencing in *Trypanosoma brucei*. *PLoS Pathog* **8**: e1003010.
- Prasad, V. & C. S. Dey, (2000) Tubulin is hyperphosphorylated on serine and tyrosine residues in arsenite-resistant *Leishmania donovani* promastigotes. *Parasitol Res* **86**: 876-880.
- Pratlong, F., J. P. Dedet, P. Marty, M. Portus, M. Deniau, J. Dereure, P. Abranches, J. Reynes, A. Martini, M. Lefebvre & et al., (1995) *Leishmania*-human immunodeficiency virus coinfection in the Mediterranean basin: isoenzymatic characterization of 100 isolates of the *Leishmania infantum* complex. *J Infect Dis* **172**: 323-326.

- Proud, C. G., (2007) Signalling to translation: how signal transduction pathways control the protein synthetic machinery. *Biochem J* **403**: 217-234.
- Raina, P. & S. Kaur, (2006) Chronic heat-shock treatment driven differentiation induces apoptosis in *Leishmania donovani*. *Mol Cell Biochem* **289**: 83-90.
- Reiner, N. E., W. Ng & W. R. McMaster, (1987) Parasite-accessory cell interactions in murine leishmaniasis. II. *Leishmania donovani* suppresses macrophage expression of class I and class II major histocompatibility complex gene products. *J Immunol* **138**: 1926-1932.
- Reiner, N. E., W. Ng, C. B. Wilson, W. R. McMaster & S. K. Burchett, (1990) Modulation of in vitro monocyte cytokine responses to *Leishmania donovani*. Interferon-gamma prevents parasite-induced inhibition of interleukin 1 production and primes monocytes to respond to *Leishmania* by producing both tumor necrosis factor-alpha and interleukin 1. *J Clin Invest* **85**: 1914-1924.
- Rioux, J. A., G. Lanotte, E. Serres, F. Pratlong, P. Bastien & J. Perieres, (1990) Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann Parasitol Hum Comp* **65**: 111-125.
- Robinson, D., P. Beattie, T. Sherwin & K. Gull, (1991) Microtubules, tubulin, and microtubule-associated proteins of trypanosomes. *Methods Enzymol* **196**: 285-299.
- Rosenzweig, D., D. Smith, P. J. Myler, R. W. Olafson & D. Zilberstein, (2008) Post-translational modification of cellular proteins during *Leishmania donovani* differentiation. *Proteomics* **8**: 1843-1850.
- Russell, D. G., D. Miller & K. Gull, (1984) Tubulin heterogeneity in the trypanosome *Crithidia fasciculata*. *Mol Cell Biol* **4**: 779-790.
- Sacks, D. L., (2001) *Leishmania*-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. *Cell Microbiol* **3**: 189-196.
- Sacks, D. L., P. F. Pimenta, M. J. McConville, P. Schneider & S. J. Turco, (1995) Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan. *J Exp Med* **181**: 685-697.
- Saraiva, E. M., P. F. Pimenta, T. N. Brodin, E. Rowton, G. B. Modi & D. L. Sacks, (1995) Changes in lipophosphoglycan and gene expression associated with the development of *Leishmania major* in *Phlebotomus papatasi*. *Parasitology* **111** (Pt 3): 275-287.
- Schlissel, M. S. & D. D. Brown, (1984) The transcriptional regulation of *Xenopus* 5S RNA genes in chromatin: the roles of active stable transcription complexes and histone H1. *Cell* **37**: 903-913.
- Schneider, P., J. P. Rosat, J. Bouvier, J. Louis & C. Bordier, (1992) *Leishmania major*: differential regulation of the surface metalloprotease in amastigote and promastigote stages. *Exp Parasitol* **75**: 196-206.
- Schonian, G., K. Kuhls & I. L. Mauricio, (2011) Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. *Parasitology* **138**: 405-425.
- Seaman, J., A. J. Mercer & E. Sondorp, (1996) The epidemic of visceral leishmaniasis in western Upper Nile, southern Sudan: course and impact from 1984 to 1994. *Int J Epidemiol* **25**: 862-871.
- Selvapandiyan, A., A. Debrabant, R. Duncan, J. Muller, P. Salotra, G. Sreenivas, J. L. Salisbury & H. L. Nakhasi, (2004) Centrin gene disruption impairs stage-specific basal body duplication and cell cycle progression in *Leishmania*. *J Biol Chem* **279**: 25703-25710.

- Shapira, M. & G. Pedraza, (1990) Sequence analysis and transcriptional activation of heat shock protein 83 of *Leishmania mexicana amazonensis*. *Mol Biochem Parasitol* **42**: 247-255.
- Shapiro, R. S., P. Uppuluri, A. K. Zaas, C. Collins, H. Senn, J. R. Perfect, J. Heitman & L. E. Cowen, (2009) Hsp90 Orchestrates Temperature-Dependent *Candida albicans* Morphogenesis via Ras1-PKA Signaling. *Current Biology* **19**: 621-629.
- Shevchenko, A., H. Tomas, J. Havlis, J. V. Olsen & M. Mann, (2006) In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc* **1**: 2856-2860.
- Smirlis, D., S. N. Bisti, E. Xingi, G. Konidou, M. Thiakaki & K. P. Soteriadou, (2006) *Leishmania* histone H1 overexpression delays parasite cell-cycle progression, parasite differentiation and reduces *Leishmania* infectivity in vivo. *Mol Microbiol* **60**: 1457-1473.
- Smirlis, D., H. Boleti, M. Gaitanou, M. Soto & K. Soteriadou, (2009) *Leishmania donovani* Ran-GTPase interacts at the nuclear rim with linker histone H1. *Biochem J* **424**: 367-374.
- Smirlis, D., M. Duszenko, A. J. Ruiz, E. Scoulica, P. Bastien, N. Fasel & K. Soteriadou, (2010) Targeting essential pathways in trypanosomatids gives insights into protozoan mechanisms of cell death. *Parasit Vectors* **3**: 107.
- Smirlis, D. & K. Soteriadou, (2011) Trypanosomatid apoptosis: 'Apoptosis' without the canonical regulators. *Virulence* **2**.
- Solbach, W. & T. Laskay, (2000) The host response to *Leishmania* infection. *Adv Immunol* **74**: 275-317.
- Soto, M., S. Iborra, L. Quijada, C. Folgueira, C. Alonso & J. M. Requena, (2004) Cell-cycle-dependent translation of histone mRNAs is the key control point for regulation of histone biosynthesis in *Leishmania infantum*. *Biochem J* **379**: 617-625.
- Soto, M., L. Quijada, C. Alonso & J. M. Requena, (1997) Molecular cloning and analysis of expression of the *Leishmania infantum* histone H4 genes. *Mol Biochem Parasitol* **90**: 439-447.
- Soto, M., J. M. Requena, L. C. Gomez, I. Navarrete & C. Alonso, (1992) Molecular characterization of a *Leishmania donovani* infantum antigen identified as histone H2A. *Eur J Biochem* **205**: 211-216.
- Soto, M., J. M. Requena, A. Jimenez-Ruiz & C. Alonso, (1991) The mRNA coding for the nucleosomal protein H2A of *Leishmania* is polyadenylated and has stem-loops at the 3' end. *Nucleic Acids Res* **19**: 4554.
- Soto, M., J. M. Requena, L. Quijada & C. Alonso, (1996a) Organization, transcription and regulation of the *Leishmania infantum* histone H3 genes. *Biochem J* **318** (Pt 3): 813-819.
- Soto, M., J. M. Requena, L. Quijada, M. Garcia, F. Guzman, M. E. Patarroyo & C. Alonso, (1995) Mapping of the linear antigenic determinants from the *Leishmania infantum* histone H2A recognized by sera from dogs with leishmaniasis. *Immunol Lett* **48**: 209-214.
- Soto, M., J. M. Requena, L. Quijada, L. C. Gomez, F. Guzman, M. E. Patarroyo & C. Alonso, (1996b) Characterization of the antigenic determinants of the *Leishmania infantum* histone H3 recognized by antibodies elicited during canine visceral leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* **106**: 454-461.
- Soto, M., J. M. Requena, L. Quijada, M. J. Perez, C. G. Nieto, F. Guzman, M. E. Patarroyo & C. Alonso, (1999) Antigenicity of the *Leishmania infantum*

- histones H2B and H4 during canine viscerocutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* **115**: 342-349.
- Spath, G. F., L. Epstein, B. Leader, S. M. Singer, H. A. Avila, S. J. Turco & S. M. Beverley, (2000) Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite *Leishmania major*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 9258-9263.
- Srinivasula, S. M., R. Hegde, A. Saleh, P. Datta, E. Shiozaki, J. Chai, R. A. Lee, P. D. Robbins, T. Fernandes-Alnemri, Y. Shi & E. S. Alnemri, (2001) A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature* **410**: 112-116.
- Stein, G. S., J. L. Stein, A. J. Van Wijnen & J. B. Lian, (1996) Transcriptional control of cell cycle progression: the histone gene is a paradigm for the G1/S phase and proliferation/differentiation transitions. *Cell Biol Int* **20**: 41-49.
- Sundar, S., P. Sinha, T. K. Jha, J. Chakravarty, M. Rai, N. Kumar, K. Pandey, M. K. Narain, N. Verma, V. N. Das, P. Das, J. Berman & B. Arana, (2013) Oral miltefosine for Indian post-kala-azar dermal leishmaniasis: a randomised trial. *Trop Med Int Health* **18**: 96-100.
- Sunkin, S. M., P. Kiser, P. J. Myler & K. Stuart, (2000) The size difference between *leishmania major* friedlin chromosome one homologues is localized to sub-telomeric repeats at one chromosomal end. *Mol Biochem Parasitol* **109**: 1-15.
- Thiakaki, M., B. Kolli, K. P. Chang & K. Soteriadou, (2006) Down-regulation of gp63 level in *Leishmania amazonensis* promastigotes reduces their infectivity in BALB/c mice. *Microbes Infect* **8**: 1455-1463.
- Tselentis, Y., A. Gikas & B. Chaniotis, (1994) Kala-azar in Athens basin. *Lancet* **343**: 1635.
- Tzamouranis, N., L. F. Schnur, A. Garifallou, E. Pateraki & C. Serie, (1984) Leishmaniasis in Greece I. Isolation and identification of the parasite causing human and canine visceral leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol* **78**: 363-368.
- van Griensven, J. & E. Diro, (2012) Visceral leishmaniasis. *Infect Dis Clin North Am* **26**: 309-322.
- Vergnes, B., B. Gourbal, I. Girard, S. Sundar, J. Drummelsmith & M. Ouellette, (2007) A proteomics screen implicates HSP83 and a small kinetoplastid calpain-related protein in drug resistance in *Leishmania donovani* clinical field isolates by modulating drug-induced programmed cell death. *Mol Cell Proteomics* **6**: 88-101.
- Wastling, J. M., S. D. Armstrong, R. Krishna & D. Xia, (2012) Parasites, proteomes and systems: has Descartes' clock run out of time? *Parasitology* **139**: 1103-1118.
- White-Gilbertson, S., D. T. Kurtz & C. Voelkel-Johnson, (2009) The role of protein synthesis in cell cycling and cancer. *Mol Oncol* **3**: 402-408.
- WHO, (2010) Control of the leishmaniases. Report of a WHO expert committee. *WHO Technical Report Series* **949**: 1-186.
- Wiesiggl, M. & J. Clos, (2001a) Heat shock protein 90 homeostasis controls stage differentiation in *Leishmania donovani*. *Mol Biol Cell* **12**: 3307-3316.
- Wiesiggl, M. & J. Clos, (2001b) The heat shock protein 90 of *Leishmania donovani*. *Med Microbiol Immunol* **190**: 27-31.
- Wilson, P. G. & G. G. Borisy, (1997) Evolution of the multi-tubulin hypothesis. *Bioessays* **19**: 451-454.

Κεφάλαιο 8: Βιβλιογραφία

- Wincker, P., C. Ravel, C. Blaineau, M. Pages, Y. Jauffret, J. P. Dedet & P. Bastien, (1996) The Leishmania genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. *Nucleic Acids Res* **24**: 1688-1694.
- Wittmann, T., H. Boleti, C. Antony, E. Karsenti & I. Vernos, (1998) Localization of the kinesin-like protein Xklp2 to spindle poles requires a leucine zipper, a microtubule-associated protein, and dynein. *J Cell Biol* **143**: 673-685.
- Xue Y. , Liu Z. , Cao J. & R. J., (2011) *Computational Prediction of Post-Translational Modification Sites in Proteins*, p. 105-124. Ning-Sun Yang
- Yao, C., J. E. Donelson & M. E. Wilson, (2003) The major surface protease (MSP or GP63) of Leishmania sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. *Mol Biochem Parasitol* **132**: 1-16.
- Yao, C., Y. Li, J. E. Donelson & M. E. Wilson, (2010) Proteomic examination of Leishmania chagasi plasma membrane proteins: Contrast between avirulent and virulent (metacyclic) parasite forms. *Proteomics Clin Appl* **4**: 4-16.
- Zangger, H., J. C. Mottram & N. Fasel, (2002) Cell death in Leishmania induced by stress and differentiation: programmed cell death or necrosis? *Cell Death Differ* **9**: 1126-1139.
- Zijlstra, E. E., A. M. Musa, E. A. Khalil, I. M. el-Hassan & A. M. el-Hassan, (2003) Post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* **3**: 87-98.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

9

The loss of virulence of histone H1 overexpressing *Leishmania donovani* parasites is directly associated with a reduction of HSP83 rate of translation

Alexandros Alexandratos,^{1,2} Joachim Clos,³ Martina Samiotaki,⁴ Antonia Efstathiou,¹ George Panayotou,⁴ Ketty Soteriadou¹ and Despina Smirlis^{1*}

¹Laboratory of Molecular Parasitology, Department of Microbiology, Hellenic Pasteur Institute, 127 Vas Sofias Ave., Athens, Greece.

²Chemistry Department, University of Ioannina, Ioannina, Greece.

³Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine, Hamburg, Germany.

⁴Biomedical Sciences Research Center, 'Alexander Fleming', Vari, Greece.

Summary

Overexpression of *Leishmania* histone H1 (LeishH1) was previously found to cause a promastigote-to-amastigote differentiation handicap, deregulation of cell-cycle progression, and loss of parasite infectivity. The aim of this study was to identify changes in the proteome of LeishH1 overexpressing parasites associated with the avirulent phenotype observed. 2D-gel electrophoresis analysis revealed only a small protein subset of differentially expressed proteins in the LeishH1 overexpressing promastigotes. Among these was the chaperone HSP83, known for its protective role in *Leishmania* drug-induced apoptosis, which displayed lower translational rates. To investigate if the lower expression levels of HSP83 are associated with the differentiation handicap, we assayed the thermostability of parasites by subjecting them to heat-shock (25°C→37°C), a natural stress-factor occurring during stage differentiation. Heat-shock promoted apoptosis to a greater extent in the LeishH1 overexpressing parasites. Interestingly, these parasites were not only more sensitive to heat-shock but also to drug-induced [Sb(III)] cell-death. In addition, the restoration of HSP83 levels re-established drug resistance, and restored infectivity to LeishH1 overexpressing para-

sites in the murine J774 macrophage model. Overall, this study suggests that LeishH1 levels are critical for the parasite's stress-induced adaptation within the mammalian host, and highlights the cross-talk between pathways involved in drug resistance, apoptosis and virulence.

Introduction

Leishmania protozoa are obligate intracellular parasites that reside in the phagolysosome of host macrophages and cause a large spectrum of pathologies in humans that are known as leishmaniasis. Clinical manifestations range from self-healing skin lesions to life-threatening visceral leishmaniasis (infection of the internal organs). They are transmitted by the bite of female phlebotomine sand-flies, during which the infective metacyclic promastigote stages are injected into the mammalian host. In the mammalian host, *Leishmania* spp. are phagocytosed by macrophages. They encounter a temperature upshift (25°C→37°C/39°C) and a drop of the pH inside the macrophage endolysosomal compartment. In this harsh environment they differentiate and multiply as amastigotes (Chang and Fong, 1983; Bard, 1989; Kamhawi, 2000; Sacks, 2001).

It is estimated that over 12 million people worldwide are currently infected with *Leishmania*. 350 million more people in 88 countries are at risk. Two million of them can be expected to be freshly infected annually and 60 000 deaths occur each year (WHO, 2010). Key control measures for the treatment of leishmaniasis mainly rely on early case detection and chemotherapy which is hampered by the toxicity and side-effects of drugs, and the emergence of drug resistance (Croft and Olliaro, 2011). The final outcome of the disease is multi-factorial and relies not only on the parasite species and the immune status of the host, but also on ascribed parasitic virulence factors. In this respect, the determination of virulence factors that affect the disease outcome is of prime importance.

Previous studies showed that the overexpression of the leishmanial histone H1 (LeishH1) reduces *Leishmania* infectivity *in vitro* and *in vivo* (Papageorgiou and Soteriadou, 2002; Smirlis *et al.*, 2006; Masina *et al.*, 2007). Parasites that overexpress LeishH1, although growing

Accepted 15 April, 2013. *For correspondence. E-mail penny@pasteur.gr; Tel. (+30) 2106478879; Fax (+30) 2106423498.

nearly as well as control cells, displayed a promastigote-to-amastigote differentiation handicap (Smirlis *et al.*, 2006). This handicap was associated with a deregulation of cell-cycle progression and a limited survival in host macrophages. In addition, this parasitic line was completely attenuated in a murine model of cutaneous leishmaniasis (Smirlis *et al.*, 2006). Therefore, the limited survival of these parasites in their mammalian host suggests that virulence factors within this parasite line are affected.

Despite gaps in our understanding, some progress has been made in delineating LeishH1 functions/properties in the parasitic life cycle. For example, it has been shown that LeishH1, while a monomer in solution, oligomerizes upon binding to DNA (Carmelo *et al.*, 2011). In addition LeishH1 can directly decrease Micrococcal Nuclease digestion sensitivity and compact chromatin (Masina *et al.*, 2007). Interestingly, the parasitic linker histone colocalizes at the nuclear rim with Ran-GTPase, a protein playing a critical role in nucleo-cytoplasmic transport and in the maintenance of nuclear structure (Smirlis *et al.*, 2009), suggesting a possible role in nuclear remodelling processes.

One of the critical functions of metazoan histone H1 is the regulation of gene expression serving both as a negative and positive regulator of gene expression, depending on the gene (Dworkin-Rastl *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 1996; Gunjan *et al.*, 1999). However, less is known about the function of protozoan linker histone. Recently, a function of the related to *Leishmania* trypanosomatid, *T. brucei* histone H1 has come to light. *T. brucei* histone H1 knock-down, resulted in significant changes in chromatin structure correlated to the disruption of variable surface glycoprotein (VSG) expression sites (ES) and cessation of gene transcription silencing. These changes were only evident in the bloodstream form, and not in the procyclic stage (Povelones *et al.*, 2012). Nevertheless, the function of LeishH1 in *Leishmania* spp. and how the overexpression of LeishH1 in promastigotes reduces infectivity *in vivo* and *in vitro*, is less known. To address this question, we have applied a comparative proteomic approach between control and LeishH1 overexpressing *L. donovani* promastigotes.

The present study shows that LeishH1 overexpression in *L. donovani* promastigotes results in a few changes in the 2-DE protein pattern compared with that of control parasites. These data reveal a role for this ancestral linker histone in modifying specific gene expression in a direct or indirect way. Among the proteins affected is the molecular chaperone Heat Shock Protein-83 (HSP83), the homologue of mammalian HSP90, which has been previously reported to be implicated in the induction of resistance to drug-induced apoptosis (Vergnes *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2010). In this study we demonstrated that the loss of infectivity in LeishH1 overexpressing para-

sites was directly associated with a reduced rate of translation of HSP83. This resulted in an impaired stress response observed during different stresses, e.g. temperature up-shift (25°C→37°C), mimicking the stage differentiation temperature shift and drug treatment. Lastly, our data suggest that the linker histone H1 levels are important for modulation of a stress-induced adaptation required for parasitic survival within the mammalian host.

Results

Comparative proteome analysis between *L. donovani* control pX63 and pX63-LeishH1 attenuated parasites

To identify proteins associated with the loss of virulence in the LeishH1 overexpressing parasites, we performed a comparative proteomic approach by applying 2D electrophoresis. To this end, we compared total protein cell-extracts from LeishH1 overexpressing parasites and from control parasites bearing plasmid alone (pX63). To ensure that the differences detected in the proteome of the two cell lines were not attributed to cell-cycle differences, we synchronized logarithmic pX63 and pX63-LeishH1 promastigotes in the G1/S phase of the cell-cycle with hydroxyurea (HU) and analysed the DNA content of these cell-lines by flow cytometry. The latter certified that these cell lines had a similar cell-cycle distribution prior to proteomic analysis (data not shown). The analysis was also performed in independent transfectants and gels were stained with colloidal Coomassie (Fig. 1) and Sypro Ruby stain (Life Technologies) (Fig. S1). At least 3 consecutive runs from two or three separate cell-cultures were performed which displayed reproducible protein patterns. In total more than 1500 spots were identified from a batch of pX63 and pX63-LeishH1 parasites (1530 and 1544) having a match rate of 94% (1454 matched). We selected only spots for MS analysis that had statistically significant differences between the two groups of gels (pX63, pX63-LeishH1). Our results show that 6 spots were consistently different between control and LeishH1 overexpressing parasites (Table 1, Fig. 1). From these, one protein was upregulated in LeishH1 overexpressing parasites, three proteins were expressed at lower amounts and two had a different pI distribution (Table 1, Fig. 1). From these spots only four were identified by mass spectrometry (spots 911 and 1021 were not identified). The two spots that were routinely less abundant – spots 348 and 815 – in LeishH1 overexpressing promastigotes were identified as eukaryotic Elongation Factor 2 (eEF-2) and HSP83 and displayed 2 and 2.4-fold lower levels respectively (Table 1, Fig. 1). Spots that showed a wider pI distribution – spots 325 and 672 – were identified as a hypothetical Microtubule Associated Protein (MAP) and a mixture of α - and β -tubulin respectively.

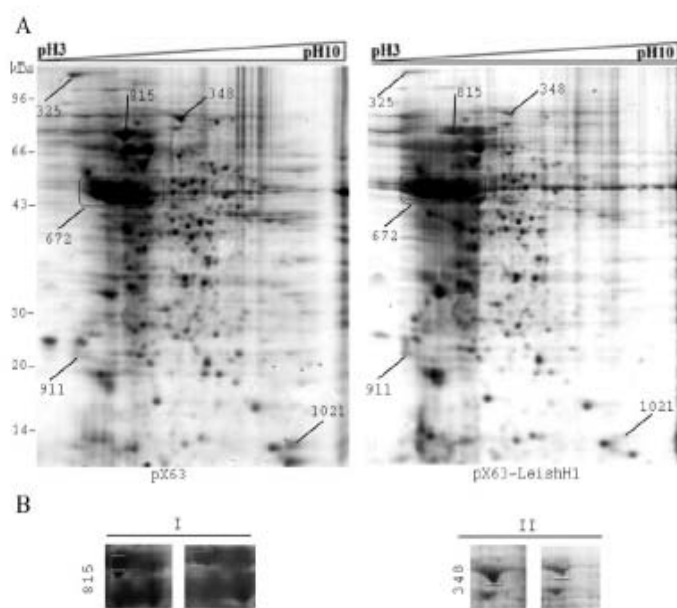


Fig. 1. Proteomic analyses of total cell extracts from pX63-LeishH1 and control pX63 *L. donovani* parasites synchronized in the G1/S border with HU.

A. Representative 2D gels comparing the proteome of LeishH1 overexpressing promastigotes (pX63-LeishH1) and control cells bearing vector alone (pX63) synchronized in the G1/S border with HU. The total protein extracts (1.5 mg of total protein) were separated on linear ReadyStrip™ IPG strips (pH 3–10) followed by 12% polyacrylamide gel electrophoresis. The gels were stained with colloidal Coomassie blue. Numbers indicate proteins which are differentially expressed in pX63-LeishH1 parasites in contrast to control pX63 parasites after three independent experiments. B. Insets I and II correspond to zoomed areas with spots 815 and 348 respectively, that show differences in protein expression.

Wider pI distribution is often associated with post-translational modifications. For this reason tubulin peptides identified were examined for the presence of post-translational modifications. Tubulins display a variety of post-translational modifications such as glutamylation (α and β tubulin subunits), acetylation and tyrosination (α tubulin subunit) (Kohl and Gull, 1998; Chavan *et al.*, 2007), phosphorylation (Prasad and Dey, 2000; Rosenzweig *et al.*, 2008) and glycosylation (Rosenzweig *et al.*, 2008). Although in our analysis we searched for the pre-mentioned modifications, we were not able to identify any. This could be due to several reasons such as the absence or the low molar ratio of the modified peptide in the data set.

In addition, we searched for phosphorylation modifications in the putative MAP (LinJ05_0380), as MAPs are known to be regulated by phosphorylation. In this search we detected a phosphorylated peptide (hvvvSadgtadaaps) with high confidence score, present only in the LeishH1 overexpressing parasites. The phosphorylation motif identified, belonged to Casein kinase 1a and was predicted by the Group-based prediction system GPS2.1 set at high threshold (Xue *et al.*, 2011).

Validation of differences identified by 2DE in the proteome of control and LeishH1 overexpressing parasites

Tubulin is one of the most abundant proteins in *Leishmania* and the major component of the cytoskeleton. In this respect, modified tubulin expression is often associated with deregulation of microtubule dynamics and cytoskeletal alterations. Thus we investigated by 2D electrophore-

sis if the differences in tubulin expression observed in LeishH1 overexpressing parasites also persisted in the cytoskeleton-enriched fraction (NP-40 insoluble). Proof of a persistence of tubulin differences in the cytoskeleton enriched fraction would provide validation of our results, but also indication of cytoskeletal differences between the two parasitic lines. At least 3 consecutive runs were performed to ensure the reproducibility of the protein patterns and a total of 106 and 92 protein spots were identified from pX63 and pX63-LeishH1 parasites respectively (Fig. S2). Only the spots that were reproducible in all replica experiments were further evaluated. Our results showed that the difference in tubulin expression/modification (spot 158) identified from total cell extracts was sustained in the cytoskeleton-enriched fraction (Fig. S2). Moreover, and as the NP-40 insoluble fractions resulted in lower complexity of the gel patterns, we identified an additional spot (spot 122) that is routinely expressed at a lower abundance (2.1-fold) in pX63-LeishH1 parasites compared with control cells. This spot was identified as a hypothetical mitochondrial processing peptidase subunit (MPP) (Table 1).

Overall, the fact that the differences in tubulin expression are sustained in the cytoskeleton-enriched fraction suggests that these modifications in the tubulin of LeishH1 overexpressing parasites might mirror differences in the parasitic cytoskeleton. To assay if the overexpression of LeishH1 affects the morphology of these parasites we performed a microscopic and FACS analysis of pX63 and pX63-LeishH1 cells (Figs S3 and S4). The evaluation of morphology by microscopy showed that a greater percentage (45%) of *L. donovani* promastigotes that overex-

Table 1. A list of proteins with different expression motif in pX63-LeishH1 parasites compared with pX63 control parasites, as inferred from the 2D proteomics procedure.

Spot number	Protein identified	Accession number	Molecular mass (kDa) predicted/observed	Theoretical Ip/actual Ip	Number of peptides matched	Protein coverage	Score	Effect observed in pX63-LeishH1 parasites	Fold change pX63/pX63-LeishH1, P-value
325	Microtubule associated protein, putative	LinJ.05.03.80	165.1/160.5	4.82/4.83	12	74.56%	145.18**	Wider Ip distribution	–
348	Elongation factor 2	LinJ.36.01.90	94.9/95.0	5.76/4	13	31.24%	134*	Underexpressed	2.0, 0.0019
815	Heat shock protein 83-1	LinJ.33.03.50	80.8/82.1	5.15/5.3	9	32.94%	129*	Underexpressed	2.4, 0.0014
672	α -Tubulin	LinJ.13.03.30	49.7/51.0	4.45/5.25	11	43.68%	157*	Wider Ip distribution	–
	β -Tubulin	LinJ.08.12.80	49.7/51.0	4.65/5.25	12	41.98%	–	Overexpressed	0.43, 0.0024
911	Not identified	–	–/23.0	–/4.85	–	–	–	Underexpressed	1.8, 0.0020
1021	Not identified	–	–/13.0	–/8.41	–	–	–	Underexpressed	2.1, 0.0019
122	Mitochondrial processing peptidase alpha subunit, putative, metallo-peptidase, Clan ME, Family M16	LinJ.21.04.00	51.2/45.0	7.47/7.4	18	50.96%	285.79**	Overexpressed	0.16, 0.0020
158	β -Tubulin	LinJ.08.12.90	49.7/48.5	4.65/5.25	17	28.89%	113.26**	Overexpressed	–

*MASCOT score, **SEQUEST score, P-value, two-tail, paired, Student's t-test. Ip, isoelectric point

pressed LeishH1 were rounder and 'shorter', displaying overall a small mean body length (~ 5 μ m) than control parasites (~ 8 μ m). In addition, these parasites displayed a greater morphological and size heterogeneity than control parasites (Fig. S2). FACS analysis also confirmed this result (Fig. S3). Therefore, the difference in morphology between pX63 and pX63-LeishH1 validates the results obtained from the proteomic analysis with respect to the differences in tubulin expression/modifications.

To confirm the lower levels of LdHSP83 and LdeEF-2 in the LeishH1 overexpressing parasites compared with the control ones, we performed a Western blot analysis using anti-LdHSP83 and anti-LdeEF-2 specific antibodies. To ensure that the proteins identified from the proteomics screen were not an artefact of the transfected clones we used different pX63 and pX63-LeishH1 *Leishmania* clones to check the expression of LdHSP83 and LdeEF-2. As a control for loading equal number of cells, the blot was probed with LinINO1 (myo-inositol-1-phosphate synthase) specific antibody, a protein known to be equally expressed in logarithmic and stationary parasites (Ilg, 2002). The mean normalized levels of expression of LdHSP83 and eEF-2 in pX63-LeishH1 parasites, were 2.2 and 1.8 times lower than the control cells (Fig. 2), a ratio that is closely related to the fold difference observed from the proteomic analysis (2.4 and 2.0 respectively). In addition, we also investigated the possibility that LeishH1 overexpression modulates the levels of the other abundant chaperone, HSP70. No differences were observed in the protein levels of control pX63 and pX63-LeishH1 parasites (data not shown), suggesting that the downregulation of HSP83 is a specific event in LeishH1 overexpressing promastigotes.

Investigation of LeishH1 overexpression in the modulation of gene expression; overexpression of LeishH1 results in the reduction of LdHSP83 translational rate

Overexpression of the mammalian variant histone H1^o delays in a similar way to the protozoan homologue, cell-cycle progression, whereas this has been shown to be associated with a general repression of transcription as judged by the analysis of several cell-cycle regulated and housekeeping genes (Brown *et al.*, 1996). For investigating if LeishH1 is associated with a general repression of transcription, we evaluated the relative amount of housekeeping and cell-cycle regulated transcripts in pX63 and pX63-LeishH1 parasites, by real-time RT-PCR. To this end, we tested the expression of ribosomal protein S29 (S29), LinJ.28.2360, fumarate hydratase (FH), LinJ.34.0310, phosphomannose isomerase (PMI), LinJ.32.1660, Cyclin 5 (CYC5), LinJ.33.0830, Cyclin 6 (CYC6), LinJ.32.3520 using as a control glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), LinJ.36.2480. These experiments show

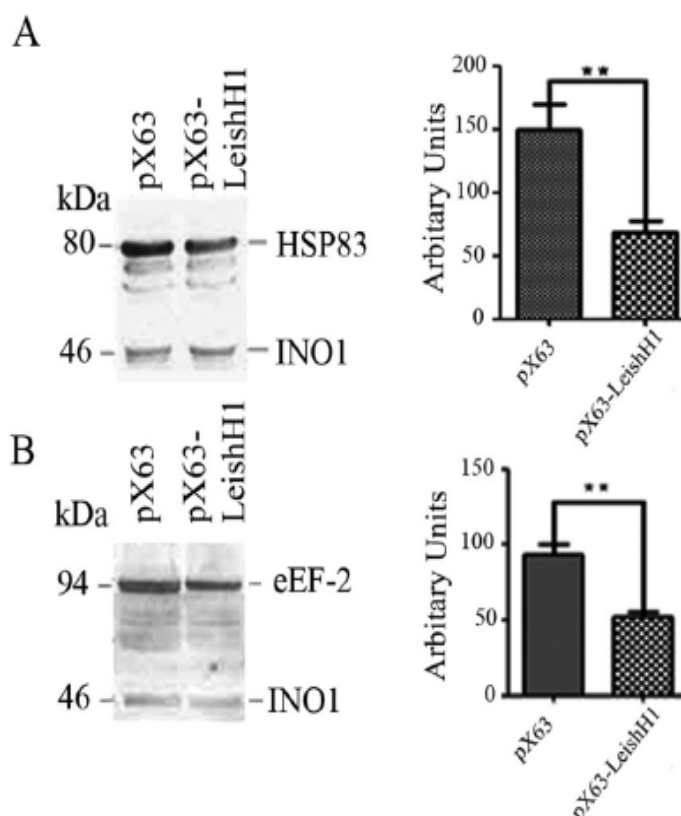


Fig. 2. Expression of LdHSP83 and LdeEF-2 in pX63 and pX63-LeishH1 promastigotes. Protein extracts from late logarithmic pX63 and pX63-LeishH1 promastigotes were analysed by SDS/PAGE and Western blotting (per lane protein from 10^7 promastigotes). Molecular masses are indicated in kDa. A. Western blot analysis showing the expression of LdHSP83. The anti-LdINO1 Ab (INO1) was used to confirm equal amounts of loading. The mean normalized fold overexpression (2.2-fold) is indicated in column chart and was calculated from 3 independent experiments by dividing the band intensity of LdHSP83 with the band intensity of INO1 and comparing this ratio in pX63-LeishH1-transfected parasites over the same ratio in control pX63 parasites. Standard deviation error bars are shown. **Significantly different from the corresponding control value, $P < 0.05$, two-tail, paired, Student's *t*-test. B. Western blot analysis showing the expression of LdeEF-2. Expression of LdeEF-2 in pX63 and pX63-LeishH1 promastigotes. The mean normalized fold overexpression is indicated in column chart and was calculated from 3 independent experiments by dividing the band intensity of LdeEF-2 with the band intensity of INO1 and comparing this ratio in pX63-LeishH1-transfected parasites over the same ratio in control pX63 parasites. Standard deviation error bars are shown. **Significantly different from the corresponding control value, $P < 0.05$, two-tail, paired, Student's *t*-test.

that no significant differences ($0.5 < x < 2.0$ -fold, where x normalized fold difference) were observed between pX63 and pX63-LeishH1 (data not shown).

In the light of the evidence that there is no general modification of transcription/ RNA abundance in LeishH1 overexpressing promastigotes we wanted to determine if there is any change in the levels of LdHSP83 mRNA. We thus evaluated the levels of LdHSP83 in pX63 and pX63-LeishH1 promastigotes by Northern blotting, and from our experiments, it is evident that no significant differences exist (Fig. 3A), suggesting that this could be due to a post-transcriptional event. Next, we treated pX63-LeishH1 parasites with the proteasome inhibitor MG132, for evaluating if the amounts of LdHSP83 could be recovered. We observed that there were no significant differences between untreated and pX63-LeishH1 parasites, suggesting that the lower levels of LdHSP83 protein, were not due to enhanced proteasomal degradation (data not shown). We then sought to evaluate the translational rates of HSP83 by incubating pX63 and pX63-LeishH1 promastigotes for 2 h with [35 S]-methionine, followed by immunoprecipitation with anti-LdHSP83 serum (Fig. 3B). Similar amounts of total and [35 S]-methionine labelled proteins were used for both pX63 and pX63-LeishH1, as shown in Fig. 3B and II. As a control, we immunoprecipitated

Ran-GTPase using an anti-LdRan specific serum (Smirlis *et al.*, 2009), where no significant differences were observed between the two cell-lines compared (Fig. 3CIII). Thus this experiment showed that the rate of translation was reduced by 2.85-fold in the pX63-LeishH1 parasites.

L. donovani parasites overexpressing LeishH1 are more susceptible to heat-shock and drug-induced apoptosis

HSP83 is involved in stage differentiation (Wiesigl and Clos, 2001a), and its inhibition by geldanamycin induces apoptosis during differentiation (Li *et al.*, 2009). Since temperature-driven differentiation also induced apoptosis in *Leishmania* (Raina and Kaur, 2006; Alzate *et al.*, 2007), we hypothesized that the promastigote to amastigote differentiation handicap in LeishH1 overexpressing parasites was related to the lower expression level of HSP83, and consequently to an increased apoptotic rate. To test this hypothesis, we subjected pX63 and pX63-LeishH1 parasites to heat-shock at 37°C for a period of 24 and 48 h. Using flow cytometry we calculated the rise of the hypodiploids at 24 and 48 h post heat-shock induction. In both cases the hypodiploid percentage was higher in the parasites that overexpress LeishH1 (Fig. 4A). The thermosensitivity of pX63-LeishH1 parasites was further confirmed by

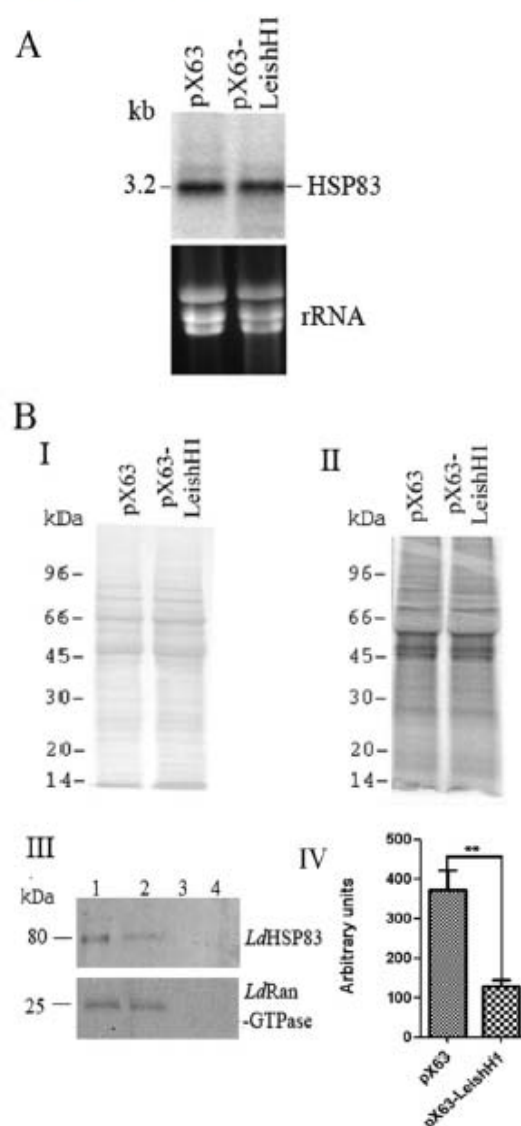


Fig. 3. LeishH1 overexpression does not affect *LdHSP83* mRNA amounts but results in the reduction of the rate of translation.

A. Northern blot hybridization analysis of total RNA from late logarithmic pX63 and pX63-LeishH1 promastigotes probed with [32 P] labelled HSP83 probe. 7.5 μ g of total RNA was loaded per lane. The rRNA profiles of the two samples prior to Northern blotting are also shown as loading controls. Relative intensities were calculated from 3 independent experiments showing equal levels of expression, as the mean ratio of intensity of the HSP83 transcript divided by the intensity of the corresponding 18S rRNA. **B.** The translation of HSP83 is impaired in pX63-LeishH1 promastigotes. The experiment was performed by growing *L. donovani* pX63 and pX63-LeishH1 promastigotes for 2 h in the presence of [35 S]-methionine. **I.** 33% of total protein input (50 μ g of protein) were separated over 12% (w/v) SDS-PAGE and stained with Coomassie blue. **II.** [35 S]-methionine labelled protein lysates representing 10% of total input protein (15 μ g each) were revealed by autoradiography. **III.** Immunoprecipitates from the same lysate per sample, split into two, after incubation with anti-Ran-GTPase and anti-LdHSP83 serum were subjected to SDS-PAGE and the autoradiography of the dried gel was obtained. 1: pX63 lysate incubated with anti-HSP83 (upper panel)/Ran-GTPase serum (lower panel), 2: pX63-LeishH1 lysate incubated with anti-HSP83 (upper panel)/Ran-GTPase serum (lower panel), 3: pX63 lysate incubated with pre-immune serum, 4: pX63-LeishH1 lysate incubated with pre-immune serum. **IV.** The mean normalized fold overexpression (2.85-fold) is indicated in column chart and was calculated from 3 independent experiments by dividing the band intensity of *LdHSP83* immunoprecipitate with the band intensity of Ran-GTPase and comparing this ratio in pX63-LeishH1-transfected parasites over the same ratio in control pX63 parasites. Standard deviation error bars are shown. **Significantly different from the corresponding control value, $P < 0.05$, two-tail, paired, Student's *t*-test.

TUNEL assay, used to detect the 3'-hydroxyl ends of DNA breaks that result from apoptotic signalling cascades. After 24 h at 37°C, 16% of the control parasites and 35% of the LeishH1 overexpressing parasites were TUNEL-positive (Fig. 4B). Phosphatidyl-serine exposure to the outer leaflet of the plasma membrane and membrane impermeability until late stages of apoptosis as in metazoan cells is one of the expected outcomes of trypanosomatid apoptosis (Jimenez-Ruiz *et al.*, 2010; Smirlis and Soteriadou, 2011). For assessing phosphatidyl-serine exposure to the outer leaflet of the plasma membrane and membrane impermeability, we used the Annexin V-FITC/PI double staining. To ensure that the populations selected represent Annexin positive and PI negative we used H_2O_2 treated parasites

(apoptosis positive control) and Triton X-100 treated respectively (necrosis positive control), (data not shown). After 12 h of heat shock treatment at 37°C, control parasites exhibited 5% early apoptotic cells (Annexin V positive/PI negative) and 5% late apoptotic/necrotic cells (Annexin V positive/PI positive) whereas in the LeishH1 overexpressing parasites these populations increased to 11% and 16% respectively (Fig. 4C). After 24 h there was a rise in late apoptotic/necrotic (Annexin V positive/PI positive) with LeishH1 overexpressing having more than double percentage (34%) late apoptotic than control parasites (14%, data not shown).

LdHSP83 has not only a protective role against heat-shock. Drug induced cell-death is also modulated by HSP83 and clinical isolates with upregulated amounts of HSP83 are more resistant to antimony-induced apoptosis (Vergnes *et al.*, 2007). Thus, proof of an increased sensitivity of LeishH1 towards antimonials would provide additional 'evidence' for the involvement of HSP83 in the phenotype of LeishH1 overexpressing parasites.

To test if LeishH1 overexpressing parasites were more sensitive to trivalent antimony [Sb(III)] we calculated the half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of the drug in control (pX63) and LeishH1 overexpressing parasites (pX63-LeishH1). The control parasites exhibited an IC_{50} value of 98 μ M whereas the parasites overexpressing

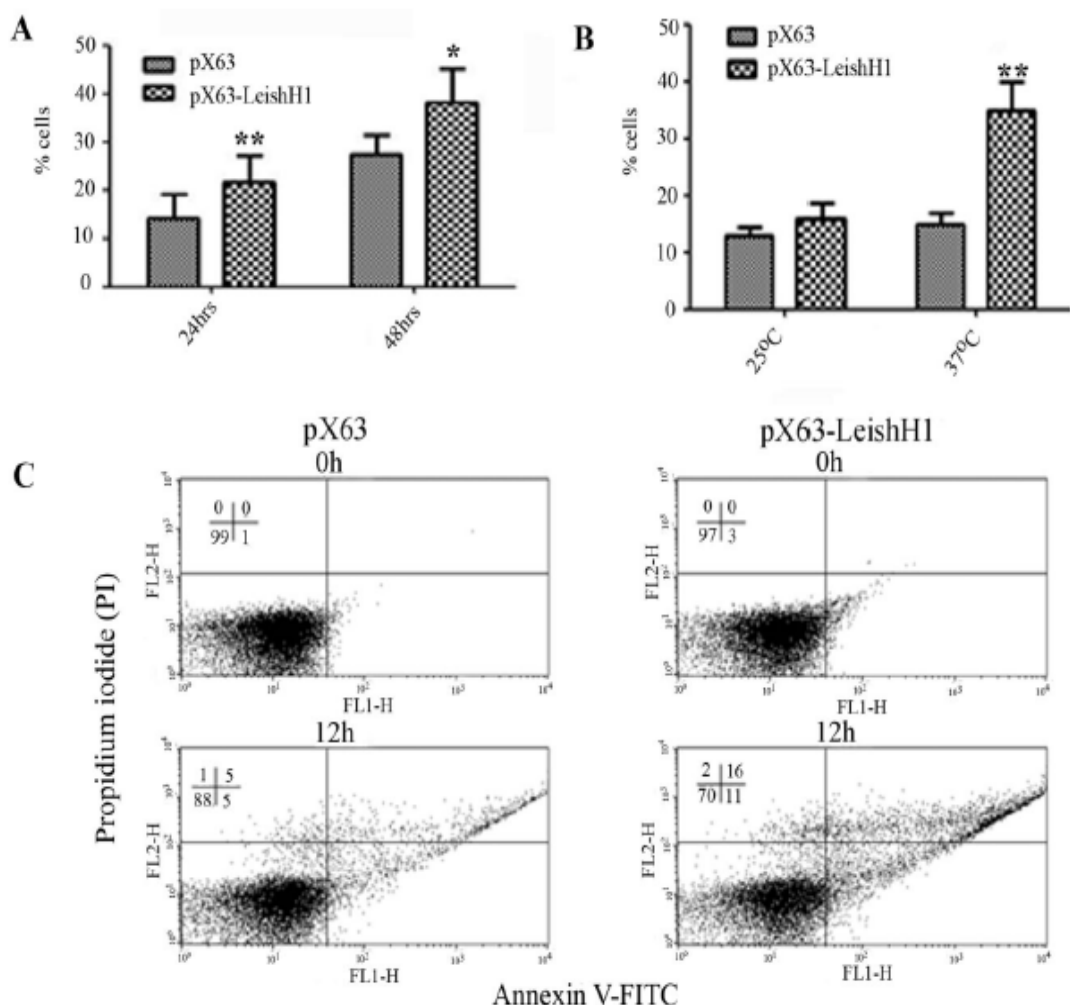


Fig. 4. *L. donovani* promastigotes overexpressing LeishH1 are more sensitive to heat-shock induced apoptosis-like death. **A.** DNA fragmentation in *L. donovani* pX63 and pX63-LeishH1 promastigotes after heat-shock treatment. Mean percentage of hypodiploid DNA content rise between logarithmic pX63-LeishH1 and pX63 parasites after 24 and 48 h of heat-shock treatment at 37°C over the hypodiploid content of the same cells grown at 25°C. DNA content was determined by FACS analysis in logarithmic promastigotes. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; $n = 9$ compared with the corresponding control values (two-tailed paired Student's *t*-test). **B.** Percentage of TUNEL positive (+) cells for pX63 and pX63-LeishH1 parasites at 25°C and after heat shock treatment at 37°C for 24 h. Error bars represent standard deviation, $n = 3$. **C.** Effects of heat shock treatment on the externalization of phosphatidylserine and the permeability of the plasma membrane in pX63 and pX63-LeishH1 parasites. Logarithmic *L. donovani* pX63 and pX63-LeishH1 parasites were subjected to heat shock (37°C) treatment for 12 h and then stained with Annexin-V FITC and propidium iodide (PI). Flow cytometry was performed in a FACSCalibur flow cytometer and data were analysed using the Cell Quest software. The percentage of cells in each quadrant represent the following: lower left, double negative; upper left, PI single positive; lower right, Annexin-V single positive and upper right, PI and Annexin-V double positive. Results are representative of 3 independent experiments.

LeishH1 exhibited a much lower value of 59 μM , and thus were more sensitive to Sb(III) (Fig. 5).

Recovery of infectivity and drug-induced tolerance in LeishH1 overexpressing parasites upon restoration of HSP83 levels

To check if the lower levels of HSP83 in these parasites was at least in part responsible for sensitivity to stresses

(heat-shock, drugs) we restored the expression levels of HSP83 by transfecting them with an HSP83 expression plasmid (pSP72aNEOaHSP83) (Vergnes *et al.*, 2007) (Fig. S5) and then measured the sensitivity of these parasites both to Sb(III) and to heat-shock (37°C). Fig. S5A and C show that HSP83 protein levels are restored to control levels, upon transfection with the HSP83 expression plasmid. Next, we performed Western blot analysis to confirm that the overexpression of LeishH1 was

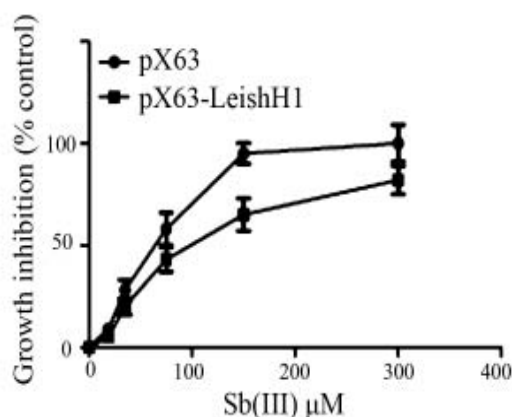


Fig. 5. Effects of Sb(III) on the survival of pX63 and pX63-LeishH1 promastigotes. pX63 and pX63-LeishH1 parasites were incubated with increasing concentrations of Sb(III). Alamar blue was added 72 h later and the viability of these parasites was estimated after an additional, 12 h incubation. Error bars represent standard deviation, $n = 5$.

retained after transfection with the pSP72aNEOaHSP83 plasmid (Fig. S5B). The analysis revealed that the fold LeishH1 overexpression in pSP72aNEOa and pSP72aNEOaHSP83 transfected cells was comparable (Fig. S5D). We then assayed the sensitivity of these parasites to Sb(III) by measuring their growth inhibition. The cells were cultured in the presence of increasing Sb(III) concentrations and the IC_{50} of each transfected cell-line was determined. Our results show that the normalization of HSP83 levels in LeishH1 overexpressing parasites restored their resistance to antimony (Fig. 6A). Similarly, the normalization of HSP83 levels in the LeishH1 overexpressing parasites restored the temperature tolerance to control strain levels (Fig. 6B). This suggests that the increased sensitivity to stresses of LeishH1 overexpressing parasites is at least in part due to the reduced levels of HSP83. Also, our data suggest that the loss of thermotolerance due to the lower levels of LdHSP83 in parasites overexpressing LeishH1 could be a major factor underlying the loss of virulence in the mammalian host. To investigate this, we infected murine J774 macrophages with control cells (pX63pSP72aNEO), LeishH1 overexpressing promastigotes bearing the pSP72aNEOa vector alone (pX63-LeishH1pSP72aNEOa) and LeishH1 overexpressing promastigotes with 'restored' levels of HSP83 (pX63-LeishH1pSP72aNEOaHSP83). Over 75% of macrophages were infected with *Leishmania*. All transfectants infected macrophages equally well, having no difference in the rate of infection (Fig. 7, 6 h), in agreement with previous work (Papageorgiou and Soteriadou, 2002; Smirlis et al., 2006). However, at later infection stages (Fig. 6, 48 h, 72 h) we observed less intracellular LeishH1 overexpressing (pX63-LeishH1pSP72aNEOa)

than control parasites (pX63pSP72aNEOa). Confirming our hypothesis, the restoration of HSP83 levels in LeishH1 overexpressing parasites was sufficient to complement the loss of infectivity we observe in these parasites (Fig. 7).

Discussion

We have previously reported that LeishH1 overexpression reduces *Leishmania* infectivity *in vivo* and *in vitro*

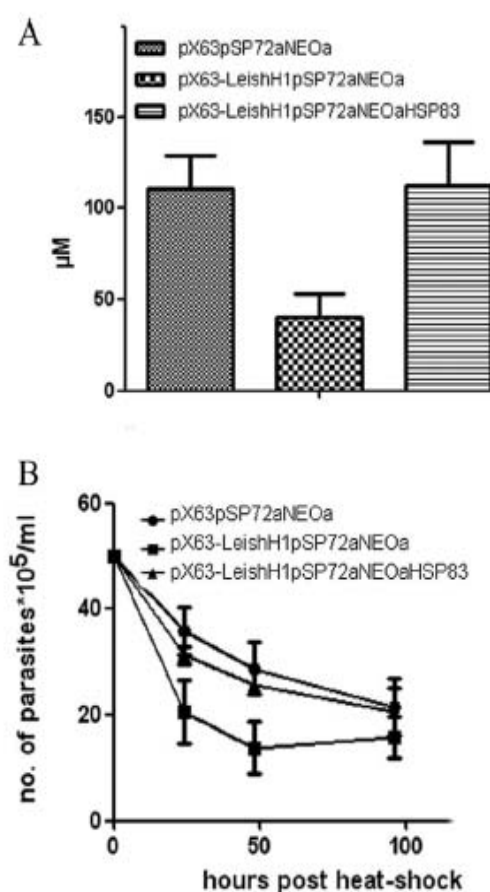


Fig. 6. Recovery of thermo- and drug-induced tolerance upon restoration of HSP83 levels.

A. Effects of Sb(III) on the survival of pX63pSP72aNEOa, pX63-LeishH1pSP72aNEOa and pX63-LeishH1pSP72aNEOaHSP83 parasites after incubation with Sb(III). Parasites were incubated with Sb(III) for 24 h and the viability of these parasites was determined 12 h later as described previously. Error bars representing standard deviation from three independent experiments ($n = 3$).

B. Effects of heat-shock on the survival of pX63pSP72aNEOa, pX63-LeishH1pSP72aNEOa and pX63-LeishH1pSP72aNEOaHSP83 parasites. Parasites were subjected to heat-shock ($25^{\circ}\text{C} \rightarrow 37^{\circ}\text{C}$) and the viability of these parasites was determined at the time points indicated (24, 48, 96 h) by counting live parasites (Trypan blue exclusion assay). Error bars representing standard deviation, from three independent experiments ($n = 3$).

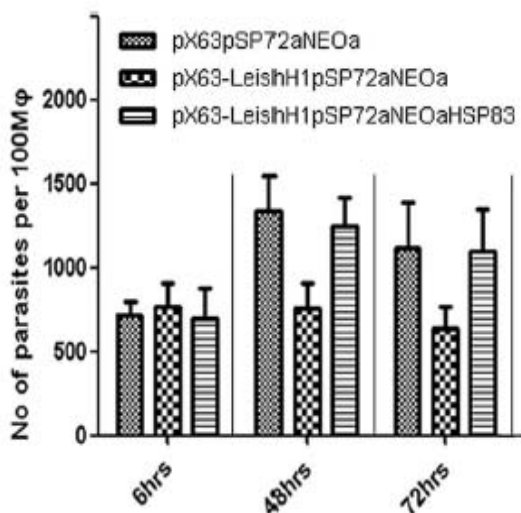


Fig. 7. *In vitro* infection assay showing the recovery of virulence in LeishH1 overexpressing parasites with normalized levels of HSP83. Macrophages were infected with *L. donovani* pX63pSP72aNEOa control, pX63LeishH1pSP72aNEOa, and pX63LeishH1pSP72aNEOaHSP83 parasites. Macrophages were inoculated with stationary phase promastigotes for 6 h at a ratio of 10 parasites per macrophage and were extensively washed. Macrophages were examined at 6, 48 and 72 h after infection. Intracellular parasites were counted by Giemsa staining. Graph represents the mean values from three independent experiments performed in duplicate and the error bars represent the standard deviations.

(Papageorgiou and Soteriadou, 2002; Smirlis *et al.*, 2006). *Leishmania* parasites overexpressing histone H1 were completely attenuated in a murine model of cutaneous leishmaniasis and the loss of virulence was associated with cell-cycle deregulation and a handicap during the promastigote to amastigote differentiation (Smirlis *et al.*, 2006). Despite the knowledge of the phenotypic characteristics of these parasites, we lacked knowledge of the molecular mechanisms and proteins involved in modulating the pathogenicity of this attenuated cell line. This knowledge is not only useful for identifying potential virulence factors of *Leishmania*, but also for the understanding of functions of the protozoan linker histone in the parasitic life cycle. In addition, the knowledge of changes at the molecular level between control and LeishH1 overexpressing attenuated parasites may be used to establish biomarkers for attenuation and for the development of a live vaccine.

A useful tool that has aided the search for virulence factors and pathways of *Leishmania* has been proteomics analysis (Yao *et al.*, 2010; Daneshvar *et al.*, 2011). To this end we used a proteomics screen aiming to identify differentially expressed proteins in LeishH1 overexpressing parasites. Our results showed that only a small subset of proteins (i.e. HSP83, eEF-2, MPP, α/β tubulin) is differentially expressed in LeishH1 overexpressing parasites.

Previous work showed that the mammalian variant histone H1* when overproduced caused cell-cycle deregulation (Brown *et al.*, 1996), a similar phenotype observed during the overexpression of LeishH1 in promastigotes (Smirlis *et al.*, 2006). As this was also linked to a reduced transcription of housekeeping and cell-cycle regulated genes (Brown *et al.*, 1996) due to an increase in chromatin condensation (Gunjan *et al.*, 1999) we investigated if a similar mechanism occurs in *Leishmania*. We observed that LeishH1 overexpression at least in the promastigote stage, did not cause a similar downregulation of transcripts (ribosomal protein S29, FH, PMI, CYC5, CYC6 relative to GADPH).

Similarly, there were no significant changes in the *LdHSP83* mRNA between control promastigotes and cells overexpressing LeishH1. Downregulation of *LdHSP83* was due to reduced translational rates of this protein in cells overexpressing LeishH1. The reduced translation of *LdHSP83* and the differential expression of other proteins i.e. eEF-2 may be related to stress, due to LeishH1 overexpression. Recently in *S. pombe* it was shown that oxidative stress, temperature and DNA damage caused a global regulation of gene expression that mostly acts in the same direction as transcription and translation (Lackner *et al.*, 2012). However in our case from the limited number of housekeeping and cell-cycle regulated transcripts we checked, we did not observe any modification in mRNA abundance. Moreover in *Leishmania* gene expression is regulated mainly at a post-translational level, thus it remains unclear if *Leishmania* spp. have the same mechanism of regulation as *S. pombe*. Another possible explanation of how LeishH1 modulates the translation of HSP83, may be given by a recent report of mammalian linker histone interactions with the ribosomal 40S and 60S proteins (Kalashnikova *et al.*, 2013) pointing out to a novel role for linker histones connecting their function with the modulation of translation.

Apart from the proteins that are differentially expressed in LeishH1 overexpressing parasites, proteomics analysis showed that a subset of proteins such as α/β tubulin and a hypothetical MAP appear with a different pI distribution, a change that is often associated with differences in post-translational modifications. For the hypothetical MAP we searched for potential differences in phosphorylated peptides between control and LeishH1 overexpression, as phosphorylation is a major modification in mammalian MAPs and regulates tubulin dynamics (Drewes *et al.*, 1998). In our search we identified a phosphorylated peptide at position Ser1168 of the hypothetical MAP with a predicted Casein Kinase 1a-specific phosphorylation site. Specific post-translational modifications (tyrosination, acetylation, phosphorylation, glutamylation) that could explain the differential pI distribution in α/β tubulin were not identified. This could be due to the low mass

ratio of the modified peptide or to the absence of the modified peptides from the detectable set. Although the precise change(s) in tubulin expression and/or post-translational modification were not identified, the differential expression correlates with a more heterogeneous morphology of the LeishH1 overexpressing promastigotes compared with control parasites. In addition, the phosphorylation of the hypothetical MAP in LeishH1 overexpressing parasites could also be related to the heterogeneous morphology of these parasites.

Besides MAP and tubulin, a protein homologous to the α subunit of the mitochondrial processing peptidase (α -MPP) in the cytoskeleton-enriched fraction (NP-40 insoluble) was expressed in lower amounts. The MPP protein complex is implicated in the removal of mitochondrial targeting signals from the precursor proteins in metazoan cells (Gakh *et al.*, 2002). To date there are no available data about MPP in *Leishmania*. The lower levels of α -MPP could possibly lead to an accumulation of pre-proteins in the mitochondrion (Luciano and Geli, 1996) leading to a dysfunctional organelle. Further research is required to assess the precise role of this protein in *Leishmania* and to analyse the effect of its reduced abundance on parasitic virulence.

In addition to MPP, *LdeEF-2* was expressed in lower amounts in LeishH1 overexpressing parasites. This protein is critical for eukaryotic translation and in metazoan cells there is a link between eEF-2 activity, cell-cycling and apoptosis (White-Gilbertson *et al.*, 2009; Cheng *et al.*, 2011). Therefore, reduced expression of *LdeEF-2* could be associated with the cell-cycle deregulation that is observed in LeishH1 overexpressing parasites and could potentially be related to the increased sensitivity of these parasites to stresses. However, further research is required to delineate the potential contribution of eEF-2 to these events.

Besides *LdeEF-2*, as mentioned above, *LdHSP83* displayed lower levels in histone H1 overexpressing parasites. HSP83 is a very abundant protein in *Leishmania* and has been shown to be implicated in promastigote to amastigote stage differentiation, growth and cell-cycle progression (Wiesgigl and Clos, 2001a,b). Recently, it was shown that the interaction of HSP83 with Stress Inducible Phosphoprotein 1 (STI1) is critical for *Leishmania* proliferation (Hombach *et al.*, 2012). Moreover, phosphorylation of HSP83 occurs during stage differentiation and this is linked to the formation of stage specific multi-protein complexes via the association with STI1 (Morales *et al.*, 2010).

The reduction of translation of *LdHSP83* in LeishH1 overexpressing parasites was mirrored by Western blot analysis in 2D gels (data not shown). This analysis showed that all three adjacent HSP83 spots were less abundant in LeishH1 overexpressing cells. This suggests

the lower translation of HSP83 results in the concomitant downregulation of phosphorylated HSP83 isoforms, and may explain the inability of LeishH1 overexpressing parasites to complete stage differentiation. Wiesgigl and Clos showed that drug induced inactivation of HSP83 in *L. donovani* parasites cultivated at 25°C, resulted in increased expression of the amastigote specific A2 proteins and a morphological transformation towards a round amastigote-like shape (Wiesgigl and Clos, 2001b). This initially, due to the lower expression of HSP83 in pX63-LeishH1 parasites seems to contradict our previous findings describing their differentiation handicap (Smirlis *et al.*, 2006). However, although these parasites delayed to round up, the levels of A2 mRNA were equal or even higher than the levels of control parasites (Smirlis *et al.*, 2006), suggesting that successful stage differentiation may involve more than one independent processes (morphological, biochemical etc). In addition to stage differentiation, cell-cycle progression, is deregulated in LeishH1 overexpressing parasites, and thus it is tempting to hypothesize that the reduction of HSP83 levels, bring about the loss of the ability of pX63-LeishH1 parasites to appropriately chaperone proteins involved in cell-cycle progression.

Moreover, in *L. donovani* parasites inactivation of *LdHSP83* during heat shock in axenic conditions induces apoptosis (Li *et al.*, 2009). In this context it was logical to assume that parasites that under-expressed *LdHSP83* would be more sensitive to heat-shock (25°C→37°C), a stress factor required for stage differentiation, that is also known to promote apoptosis (Alzate *et al.*, 2007). We have therefore checked for the apoptotic index (Jimenez-Ruiz *et al.*, 2010; Smirlis *et al.*, 2010) of LeishH1 overexpressing parasites during heat-shock in an attempt to further explain the promastigote to amastigote handicap and the reduced virulence these parasites have. Interestingly, our results show that these parasites were more sensitive to heat-shock and displayed a higher apoptotic index implying that the reduced expression of *LdHSP83* might impair the ability of these parasites to tolerate heat-stress. Therefore, since stress signals such as low pH, high temperature and nutritional starvation may both induce stage differentiation (Sacks and Perkins, 1984; Zilberstein and Shapira, 1994), and/or apoptosis (Smirlis *et al.*, 2010; Smirlis and Soteriadou, 2011), the balance between differentiation and apoptosis seems to be a critical factor for the successful establishment and progression of the infection.

Interestingly, our results are in line with previous data showing that *LdHSP83* is implicated in antimonial drug resistance in *L. donovani* clinical isolates (Vergnes *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2010). It was thus tempting to speculate that these parasites would be more sensitive to Sb(III). Indeed the IC_{50} of pX63-LeishH1 cells to Sb(III) was lower (59 μ M) than that of control parasites (98 μ M).

Moreover, this sensitivity was directly associated with HSP83 under-expression, as pX63-LeishH1 parasites with normalized levels of HSP83 were as resistant to Sb(III) as control parasites. Furthermore, normalization of HSP83 levels also restored the thermotolerance at 37°C of these parasites to the same levels as control parasites. This result suggests that the lower expression of LdHSP83 is responsible for increasing the sensitivity of parasites when they encounter a similar temperature rise (37°C), as the one initiating differentiation in the mammalian host.

To find out if the loss of virulence of LeishH1 overexpressing parasites, was due to the lower levels of HSP83 we performed an *in vitro* infectivity assay after the normalization of HSP83 levels in these parasites. Our results showed that upon restoration of HSP83 levels, the virulence of these parasites was also recovered as they could infect macrophages and survive therein at equal rates as control parasites.

Moreover, in the past few years accumulating evidence in the literature implicates HSP90 – the homologue of HSP83 – as a virulence factor in other eukaryotic pathogens such as *Plasmodium falciparum* and *Candida albicans*, suggesting that this protein may have evolved in early branching eukaryotes to protect from proteotoxic damage that is encountered from the 'harsh environments' of the mammalian host (Hodgetts *et al.*, 1996; Acharya *et al.*, 2007; Shapiro *et al.*, 2009; Shapiro and Cowen, 2010).

Consequently, the increased sensitivity to environmental cues (i.e. thermosensitivity) of these parasites that overexpress LeishH1 is likely to be a major factor underlying the loss of virulence *in vivo*. Increased thermosensitivity that mediates an avirulent phenotype has been previously reported for a calcineurin-deficient *L. major* strain (Naderer *et al.*, 2011), showing that this could be a major mechanism leading to attenuation. Likewise, the loss of virulence in *L. major* HSP100 null mutants correlates with a decreased survival at 35°C in culture (Hubel *et al.*, 1997).

Overall, we may conclude that there is a cross-talk between pathways involved in drug resistance, apoptosis and virulence. Thus the signals and mechanisms regulating parasite differentiation/virulence and apoptosis/stress response merit in depth investigation as they seem to be the two sides of the same coin.

Experimental procedures

Plasmids, recombinant protein and antibody production

For the production of anti-LdHSP83 and anti-LdeEF-2 antibodies we generated recombinant fragments as C-terminal His₆-tagged proteins in the *Escherichia coli* strain BL21 pLysS, as described before (Smirlis *et al.*, 2006) correspond-

ing to the 431–686 and 1–357 aminoacids of LdHSP83 and LdeEF-2 respectively. These protein fragments were expressed and subsequently purified on a Ni-NTA (Ni²⁺-nitrilotriacetate) matrix under denaturing conditions according to the manufacturer's instructions (Qiagen). To generate these proteins, genomic *L. donovani* DNA (MHOM/ET/0000/HUSSEN) encoding these fragments was amplified by PCR and cloned into the pTriex1.1 vector (Invitrogen) in frame with the C-terminal His₆ tag. For the amplification of the DNA from LdHSP83 we used primers 5'-CACACCATGGCGACGCTGAAGGACTACGTG-3' and 5'-TATAGCGGCCGCGTCCACCTGCTCCATGCTG-3' based on the sequence of the *L. infantum* HSP83 gene (LinJ33_V3.0350). For the amplification of LdeEF-2 we used primers 5'-GAGACCATGTGAACCTTACCGTCGATCAG-3' and 5'-TATACTCGAGGCCAGAGTACAGCATCTCCG-3' designed on the *L. infantum* eEF-2 gene (LinJ36_V3.0190). The LdHSP83 and LdeEF-2 PCR products were cloned in the NcoI/NotI sites and NcoI/XhoI sites of the pTriex1.1 vector respectively. Finally the cloned products were sequenced and found to encode identical products to the corresponding homologous *L. infantum* genes.

For antibody production, loads of 200 µg of the recombinant proteins were used per injection for the immunization of two New Zealand white rabbits respectively, as described before (Smirlis *et al.*, 2006). All procedures involving animals were conducted in accordance with the European Guidelines, approved by the ethical committee of the Hellenic Pasteur Institute. Affinity-purified antibodies (anti-LdHSP83, anti-LdeEF-2) were isolated by low-pH elution from nitrocellulose strips loaded with purified LdHSP83 and LdeEF-2 proteins respectively as described before (Smirlis *et al.*, 2006).

The LeishH1 gene was cloned in the forward orientation in the BglII site of the pX63-HYG (pX63) plasmid as described previously (Smirlis *et al.*, 2006). The *INO1* (myo-inositol-1-phosphate synthase) gene was cloned in the pTriex1.1 plasmid as described previously (Xingi *et al.*, 2009).

The pSP72aNEOa and pSP72aNEOaHSP83 expression vectors were kindly provided by Prof. Barbara Papadopoulos and Prof. Marc Ouellette (Vergnes *et al.*, 2007).

Cell culture and transfection

Leishmania donovani (MHOM/ET/0000/HUSSEN) promastigotes were cultured in fully supplemented culture-medium [RPMI 1640 medium containing 10% (v/v) HIFBS (heat-inactivated fetal bovine serum), 10 mM HEPES and penicillin-streptomycin (final concentration 100 U ml⁻¹)] at 25°C as described previously (Xingi *et al.*, 2009). Transfection of *L. donovani* parasites with plasmids pX63, pX63LeishH1, pSP72aNEOa and pSP72aNEOaHSP83 was performed by electroporation as described previously (Beverley and Clayton, 1993). pX63 and pX63-LeishH1 transfected promastigotes were cultured in fully supplemented culture-medium (see above) and transfectants were selected with addition of hygromycin B (Invitrogen) at a final concentration of 0.1 mg ml⁻¹. pX63pSP72aNEOa and pX63-LeishH1pSP72aNEOaHSP83 double-transfected promastigotes were cultured in fully supplemented culture-medium and selection was performed by the addition of hygromycin B and G418 at a final concentration of 0.1 mg ml⁻¹ (Sigma) and

25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ respectively. For counting live *L. donovani* promastigotes we used a Malassez haemocytometer and the Trypan blue exclusion assay (0.4% w/v Trypan Blue) as previously described (Xingi *et al.*, 2009).

In situ labelling of DNA fragmentation by TUNEL assay after heat shock treatment (37°C, 24 h) of pX63 and pX63-LeishH1 promastigotes

Cell Death Fluorescein Detection kit (Roche Applied Science) was used to detect *in situ* the DNA strand breaks, according to the manufacturer. Samples were analysed under a TCSSP Leica confocal microscope. The apoptotic ratio (apoptotic to total cells) was determined by counting at least 400 cells (in triplicate).

Cellular morphology and immunofluorescence

Late logarithmic promastigotes ($3-5 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$) were washed once with phosphate-buffered saline (PBS) and then fixed for 20 min at room temperature (RT) (25°C) with PBS containing 2% (w/v) paraformaldehyde. The parasite cells were then permeabilized and blocked by incubation for 1 h at RT with blocking buffer [0.3% (w/v) BSA and 0.1% (v/v) Triton X-100 in PBS] and were stained with affinity purified 2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ rabbit anti-LeishH1 (Smirlis *et al.*, 2006) and mouse anti- α tubulin antibody (Molecular Probes). Incubation with the primary antibodies, was performed overnight in a humid chamber at 4°C. After extensive washing, the appropriate secondary antibodies were added, Alexa Fluor® 546- and Alexa Fluor® 488-conjugated anti-rabbit and anti-mouse (Molecular Probes), at a final concentration of 2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ in blocking buffer, for 2 h at RT. Coverslips were mounted with Mowiol. Microscopic analysis of the samples was performed by a Leica TCSSP confocal microscope using the 63 $\times$ apochromat lens.

DNA content and apoptosis analysis of pX63 and pX63-LeishH1 promastigotes after heat shock treatment (37°C, 24 and 48 h) by flow cytometry

pX63 and pX63-LeishH1 promastigotes were subjected to heat shock treatment at 37°C for a period of 24 and 48 h. Upon completion of treatment, the parasites were centrifuged at 1000 g for 15 min and washed once with PBS. For DNA content analysis, parasites were prepared as previously described (Smirlis *et al.*, 2006). Briefly, parasites were fixed with the addition of 1 ml ice-cold methanol for 5 min. Parasites were then centrifuged and the pellet was resuspended in PBS containing propidium iodide (Sigma) at a final concentration of 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and RNAase A (Applchem) at a concentration of 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Samples were analysed in a Becton Dickinson FACS Calibur flow cytometer counting 10 000 parasites per sample. Exposed phosphatidylserine on the outer membrane of cells and plasma membrane integrity of cells were assessed using Annexin V-FITC and propidium iodide (PI) staining (Apoptosis detection kit, R&D Systems). The preparation of samples for FACS analysis was performed following the manufacturer's instructions. In all cases, 10 000 cells per sample were analysed, in a Becton Dickinson

FACS Calibur flow cytometer and data acquired were analysed using the Cell Quest software. All experiments were performed at least three times.

Northern blot hybridization analysis

Total RNA was extracted from *L. donovani* promastigotes synchronized by hydroxyurea and transfer to nylon membrane (Zeta probe, Bio-Rad) was performed as previously described (Papageorgiou and Soteriadou, 2002). Equal amounts of total RNA (7.5 μg) were loaded per sample.

The probes used for Northern blot hybridization were the entire coding region of the *HSP83* and *LeishH1* gene which were obtained by digesting the pSP72aNEOaHSP83 plasmid with XbaI and HindIII (Vergnes *et al.*, 2007) and the pGEX-4T1-LeishH1 plasmid with EcoRI and XhoI respectively (Smirlis *et al.*, 2006). The hybridization and washing were performed as previously described (Papageorgiou and Soteriadou, 2002).

SDS/PAGE and immunoblotting

SDS/PAGE was performed according to the method of Laemmli (1970). For immunoblotting, proteins were first transferred on to a nitrocellulose filter (Hybond C, GE Healthcare). Then immunoblotting was performed as described previously (Papageorgiou and Soteriadou, 2002) and detected by ECL Plus (enhanced chemiluminescence) (GE Healthcare) according to the manufacturer's instructions and developed in a Storm 860 Phosphorimager (Molecular Dynamics). AlphaImager software (Alpha Innotech) was used to quantify the immunoblot bands.

cDNA synthesis

First strand cDNA was synthesized from 500 ng total RNA of pX63 and pX63-LeishH1 *L. donovani* promastigotes, synchronized with HU, following the manufacturer's instructions (Protoscript M-MuLV Taq RT-PCR kit, New England Biolabs). The resulting cDNA was diluted up to a volume of 50 μl with nuclease-free water (NEB).

Real-time quantitative RT-PCR and data analysis

From the cDNA diluted samples, a volume of 5 μl was used as template in a final volume of 20 μl SYBR Green (Kappa Biosystems) based quantitative PCR reactions on the Exicycler 96 (BioNEER). The protocol used for the qPCR was: 10 s at 94°C, 40 cycles comprising of 30 s at 94°C, 20 s at 52°C, 30 s at 72°C, and a final step of 10 min at 4°C. We analysed the expression of the following genes using forward (F) and reverse (R) primers as indicated: CYC5 (LinJ.33.0830, F: 5'-AGTTTCTGAGCGTCACACG-3', R: 5'-GTACATCTCGCTCAGTGGAA-3'), CYC6 (LinJ.32.3520, F: 5'-TTTCTGGCGTTGCTGATGC-3', R: 5'-AATCTAGGATGGCCTCCGC-3'), GADPH (LinJ.36.2480, F: 5'-GGGGCACCTTGTGTGAATG-3', R: 5'-TGCTCCTGCTTCAA-TGTGC-3'), ribosomal protein S29 (LinJ.28.2360, F: 5'-ATCTCGACAGTGGCGTTCT-3', R: 5'-ATGTGCTCGGCGTTTTCAC-3'), PMI (LinJ.32.1660, F:

5'-AGCTGCTCGAGGAGTTCCTGAA-3', R: 5'-CTTCTCGGC AAGCTTCTTGCA-3'), and FH (LinJ.34.0310, F: 5'-GTGT CGCACAAGGAAACCAAG-3', R: 5'-TGCGAAGAGCGTAG CAGATGCT-3').

Possible differences in gene expression levels were calculated using the comparative C_i method. The cycle threshold value (C_i) represents the number of PCR cycles required so that the fluorescence signal exceeds the detection threshold value (background noise). The comparative C_i method uses the following equation to compare the gene expression in two different samples; in our case the gene expression in pX63 and pX63-LeishH1 promastigotes.

$$2^{-\Delta\Delta C_i} = [(C_i \text{ gene of interest} - C_i \text{ internal control}) \text{ pX63} - (C_i \text{ gene of interest} - C_i \text{ internal control}) \text{ pX63} - \text{LeishH1}]$$

The analysis was performed on two biological samples per experiment, which were further assayed in triplicate. The cycle threshold value (C_i) for each sample, resulted from the average values of the duplicated samples.

Metabolic labelling and immunoprecipitation

For the metabolic labelling of pX63 and pX63-LeishH1 promastigotes, 3×10^7 parasites were collected, washed once with PBS and then resuspended in 100 μ l of RPMI-1640 without methionine (Life Technologies) supplemented with penicillin-streptomycin (final concentration 100 U ml^{-1}) and 10% (v/v) HIFBS (heat-inactivated fetal bovine serum). Samples were incubated at 25°C for 30 min, followed by addition of 100 μ l of [35 S]-methionine (EasyTag L-[35 S]-methionine, Perkin Elmer) and further incubated for 2 h in the same conditions.

The immunoprecipitation of LdHSP83 and the protein used as control, Ran-GTPase was performed as previously described (Larreta *et al.*, 2004). Briefly after the end of the labelling, parasites were harvested, washed twice with PBS and lysed with 200 μ l of lysis buffer [50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 1% (w/v) SDS, 1 mM PMSF, 4 μ g ml^{-1} pepstatin, 4 μ g ml^{-1} aprotinin]. Lysates (containing 150 μ g of total protein) were incubated at 4°C for 30 min under gentle shaking and then sonicated for a total period of 10 min. The samples were centrifuged for 15 min at 4°C. 150 μ l of soluble proteins for each sample were incubated with 1350 μ l CHIP buffer [167 mM NaCl, 16.7 mM Tris-HCl pH 8.1, 1.2 mM EDTA, 1.1% (v/v) Triton X-100, 0.01% (w/v) SDS, 1 mM PMSF, 4 μ g ml^{-1} Pepstatin, 4 μ g ml^{-1} aprotinin] and 30 μ l of rabbit anti-HSP83 serum or 30 μ l of rabbit anti-Ran-GTPase serum (Smirlis *et al.*, 2009) at 4°C for 12 h under gentle shaking. Fifty microlitres of protein A-agarose slurry (Dynabeads, Invitrogen) was washed twice with PBS, equilibrated in 100 μ l of lysis buffer and added to the lysate-anti-HSP83 serum mixture. Samples were incubated at 4°C for 1 h under gentle shaking. After incubation the samples were placed on the special magnetic rack and the lysate-antiserum mixture was removed. The beads were washed twice with 200 μ l of PBS and eluted with 20 μ l 50 mM glycine pH 2.8. In each elution same volume of 1 M Tris-HCl was added. All elutions were separated over 12% SDS-polyacrylamide gel. The gel was fixed with 40% (v/v) methanol-10% (v/v) acetic acid and dried using a gel dryer system (Gel Dryer model 583, Bio-Rad). Alphamager soft-

ware (Alpha Innotech) was used to quantify the protein bands on the autoradiographs. The mean fold difference was calculated from three independent experiments.

In vitro testing of the antileishmanial activity of Sb(III)

To determine the antileishmanial activity of Sb(III) against *L. donovani* pX63 and pX63-LeishH1 parasites we used the Alamar Blue assay, as described previously (Xing *et al.*, 2009). Briefly, logarithmic phase parasites were seeded into 96-well flat bottom plates at a density of 2.5×10^6 cells ml^{-1} in 200 μ l RPMI, containing increasing concentrations of Sb(III), each in triplicate. After an incubation period of 72 h, Alamar blue was added (20 μ l per well) and samples were incubated further at 25°C for 12 h. Colorimetric readings were performed at a test wavelength of 550 nm and a reference wavelength of 620 nm. Comparison of mock treated controls with samples allowed the calculation of the concentration of Sb(III) necessary to reduce the growth of the parasites by 50% (IC_{50}). The data were analysed by a sigmoid dose-response curve, using the mean of three experiments in duplicate.

Macrophage infection

Murine macrophages of the J774 cell line (American Type Culture Collection, Manassas, VA) were used for the infection and were maintained in RPMI-1640 medium supplemented with 10% (v/v) HIFBS and penicillin-streptomycin (final concentration 100 U ml^{-1}) grown in an atmosphere of 5% CO_2 , at 37°C. Macrophage infection was performed as previously described (Papageorgiou and Soteriadou, 2002; Smirlis *et al.*, 2006). Briefly, 2×10^5 macrophages were plated on 13 mm coverslips coated with poly-L-lysine (Sigma) in 48-well plates. Stationary phase (pX63pSP72aNEOa, pX63LeishH1pSP72aNEOa, pX63LeishH1pSP72aNEOaHSP83) promastigotes were added to macrophage cultures at a ratio of 10 parasites per macrophage and were incubated for 6 h. Infected macrophages were washed 3 times with PBS to remove non-adherent promastigotes. Following the removal of free promastigotes, fully supplemented RPMI-1640 (see above) was added to macrophages. Prior to microscopic examination cells were washed in PBS and fixed with ice-cold methanol for 5 min. At the end of the assay, macrophages were stained with Giemsa. Intracellular parasites were counted on a Zeiss Axiophot microscope using a $\times 63$ zoom lens. Parasite burden was verified by counting the number of infected macrophages in 100 cells (in triplicate).

Cell synchronization and protein sample preparation for proteomic analysis

Leishmania donovani pX63 and pX63-LeishH1 parasites in the logarithmic phase ($\sim 5 \times 10^6$ parasites ml^{-1}) were synchronized with 5 mM HU (hydroxyurea) in the G1/S phase border of the cell cycle, as previously described (Smirlis *et al.*, 2006). This synchronization was necessary so as to eliminate the possibility that the resulting differences were due to cell-cycle differences.

Equal number of parasites (5×10^8 – 10^9) were harvested by centrifugation (500 g, 15 min) and washed twice in PBS supplemented with 0.1% w/v glucose. Following resuspension in 50 µl lysis buffer (40 mM Tris pH 9.5, 1 mM EDTA, 0.01 mM E-64), cells were subjected to five freeze-thaw cycles in solid CO₂/ethanol, and subjected to centrifugation (20 000g, 30 min at 4°C). After addition of 400 µl of rehydration buffer [7 M urea, 2 M thiourea, 4% (w/v) CHAPS, 2.4% (w/v) aminosulphobetaine-14 (w/v) (ASB-14), 0.2% (v/v) Biolytes (Bio-Rad)] was added per protein extract and the samples were incubated for 30 min at RT, followed by centrifugation (17 000 g, 40 min) at RT (Bente *et al.*, 2003). Each time equal amounts of protein were analysed (1–2 mg for 17 cm IEF strips).

To enrich our protein samples for cytoskeletal proteins, equal number of parasites (10^9) were treated with 50 µl of PEM buffer (0.1 M PIPES, 5 mM EGTA, 2 mM MgCl₂) supplemented with 1% (v/v) NP40. The protein samples were incubated at RT for 15 min. After incubation, samples were centrifuged (1000 g, 15 min) washed once with PEM buffer and re-centrifuged. The pellet (NP40 insoluble fraction) was treated with 20 µl of lysis buffer and the rest of the procedure is the same as described earlier for the whole protein samples.

Two-dimensional gel electrophoresis (2-DE), staining and image analysis

The first dimension of the iso-electric focusing (IEF) was performed at 20°C using dry 17 cm strips, pl 3–10 or 7 cm strips, pl 3–10 (Bio-Rad). The protein samples were loaded on the strips separately and allowed to rehydrate for 18–22 h under a maximum current of 50 µA per strip using the PROTEAN IEF Cell (Bio-Rad). After rehydration the IEF run was carried out using conditions previously described (Bente *et al.*, 2003) slightly modified: 500 V for 1 h, 1000 V for 1 h, 3000 V for 1 h, 10 000 V for 96 000 Vhs. For the 7 cm strips the conditions used are: 250 V for 1 h, 4000 V for 20 000 Vhs. After the end of the IEF, strips were equilibrated in two different solutions for 15 min each [6 M urea, 0.375 M Tris-HCl pH 8.8, 2% SDS (w/v), 20% (v/v) glycerol] supplemented with 2% (w/v) DTT and 2.5% (w/v) iodoacetamide respectively. The equilibrated strips were then inserted into 12% SDS/PAGE gels and sealed with 1% agarose.

After the end of the electrophoresis, the gels were incubated in 1.4% phosphoric acid, 8% ammonium sulphate, 20% methanol, 0.12% Coomassie Brilliant Blue G-250 for 12 h at RT. Destaining was performed with subsequent washes using 25% methanol for 6 h. The gels were stored in 25% (w/v) ammonium-sulphate at 4°C. Images were acquired using a GS-800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad) and analysed using the PDQuest v8.0 and ImageQuant v5.0 software (Bio-Rad).

Alternatively, the gels were stained using the SYPRO Ruby protein gel stain (Life Technologies) following the manufacturer's instructions. Stained proteins can be visualized using a 300 nm UV transilluminator and the density of the bands was analysed using the Alpha Imager software (Alpha Innotech).

In-gel digestion of proteins

For the in-gel digestion of proteins we followed the procedure as described elsewhere (Shevchenko *et al.*, 2006). Briefly,

the gels were rinsed thoroughly with water prior to protein band excision. Special care was taken to prevent keratin contamination of the samples. The protein bands were excised and transferred into microcentrifuge low protein-binding tubes (Eppendorf). To each band 100 µl of 100 mM ammonium bicarbonate/acetonitrile (1:1 v/v) were added and left for 30 min for the bands to be de-stained. 500 µl of acetonitrile was added as well and the bands were incubated at RT until the gel bands became white and shrank. After this step the excess acetonitrile was removed. To the dehydrated gel bands enough trypsin buffer (20 µg trypsin diluted in 1.5 ml of 10 mM ammonium bicarbonate containing 10% (v/v) acetonitrile) was added until the bands were covered. The bands were left on ice for 90 min. The tubes containing the gel bands were placed into an air circulation thermostat and incubated at 37°C over night. After the incubation, 100 µl of extraction buffer [1:2 (v/v) 5% formic acid/acetonitrile] was added to each tube and incubated for 15 min at 37°C.

nanoHPLC-MS/MS analysis

Peptides were separated by nano-LC using an Ultimate HPLC and autosampler system (Dionex, Amsterdam, Netherlands) on an 10-cm-long EASY-Column (75 µm, 3 µm, C18, Thermo Scientific). LC mobile phase buffers were comprised of A: 2% (v/v) acetonitrile/0.1% (v/v) formic acid and B: 80% (v/v) acetonitrile 0.1% (v/v) formic acid. Peptides were eluted using a linear gradient of 2% B to 50% B over a period of 30 min and then 100% B wash over 5 min at a flow rate of ~200 nl min⁻¹.

The MS analyses of the digests were performed using a hybrid LTQ Orbitrap XL mass-spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Germany). A top6 data dependent acquisition method was used. One MS survey scan, with m/z range of 300–2000, was acquired with a resolution of 60K and with an accumulation target value of 500 000 ions, in the Orbitrap. Up to six of the most abundant ions with charge states $\geq +2$ were sequentially isolated and fragmented within the linear ion trap using CID with 35% normalized collision energy. Additionally, mass-to-charge ratios selected for MS/MS were dynamically excluded for 20 s using an isolation window of 10 ppm.

MALDI-TOF peptide analysis

Tryptic in-gel digests and sample preparation were performed as described in (Mojtahedi *et al.*, 2008). Briefly, protein spots stained with colloidal Coomassie brilliant blue were punched from the gel using a wide-bore pipet tip. The gel plugs were placed into individual wells of a ZipPlate (Montage In-Gel-DigestZP Kit, Millipore). Using the kit's components in accordance to the manufacturer's specifications, the proteins in the gel plugs were destained, digested with trypsin (Promega), extracted, purified on a C18 reverse phase matrix, and eluted in 8 µl of 60% acetonitrile, 0.1% trifluoroacetic acid (TFA).

Eluted peptides (2.5 µl) were spotted onto a 378-well, 400 fm Anchor Plate (Bruker Daltonics). When the solvent was almost evaporated, 1 µl of matrix solution (saturated α-cyano-4-hydroxy-cinnamic acid (Sigma) solution in 50% acetonitrile, 0.1% trifluoroacetic acid) was added. The plate was air dried.

Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) was performed on a Bruker Auto-flex Mass Spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen). Measurements were performed in the reflection mode using the following set-tings: Ion source 1 voltage: 19 kV; ion source 2 voltage: 16.5 kV; reflector voltage 20 kV; lens voltage 8 kV; 40 ns pulse time, 120 ns pulse extraction time, matrix suppression < 500 Da. Spectra were analysed using the Xtof analysis software package, version 5.1.5 (Bruker Daltonics). The mass spectra were calibrated internally, using a mix of peptides (Sigma-Aldrich).

Monoisotopic masses generated by MALDI-TOF MS were searched against peptide masses of eukaryotes in the Matrix Science Data Base (MSDB) 20060831 using the MASCOT program (<http://www.matrixscience.com>). One missed cleavage per peptide and a mass tolerance of 60 ppm were allowed. Carbamidomethylation of cysteine residues was set as a fixed modification. The MASCOT program gives a score for each entry that is based on the molecular weight search (MOWSE) score (Pappin *et al.*, 1993). This score takes into account a number of factors, including the fraction of predicted peptides that are matched and the actual error between the peptide masses predicted for the identified protein and the observed peptide masses. In the present study, MASCOT scores greater than 61 were considered to be significant ($P < 0.05$).

Database searching

Spectra generated from the experiments were searched against the *Leishmania infantum* Annotated Proteins_TriTrypDB-2.5.fasta (<http://tritrypdb.org>) using the SEQUEST Search Algorithm (Proteome Discoverer version 1.2). The following search parameters were used: trypsin specificity with one allowed missed cleavage, precursor and product ion tolerances set to 10 ppm and 0.8 Da respectively, differential modifications of methionine oxidation and cysteine carbamidomethylation. False positive rate was determined using the forward-reverse database method.

In the case of protein spots that presented wider *Ip* distribution, their MS/MS spectra were searched for possible post-translational modifications. These spectra were searched against the reversed and concatenated database *L. infantum* Annotated Proteins_TriTrypDB-2.5.fasta (<http://tritrypdb.org>) using the SEQUEST algorithm with differential modifications for serine and threonine phosphorylation (+ 79.97), methionine oxidation (+ 15.99) and cysteine carbamidomethylation (+ 57.02).

Acknowledgements

The authors would like to thank Professor B. Papadopoulos and Professor M. Ouellette (Centre de recherche du CHUL and Division de Microbiologie, Faculté de Médecine, Université Laval, Canada) for the pSP72aNEOa and pSP72aNEOaHSP83 vectors. Authors are also grateful to G. Konidou (Hellenic Pasteur Institute) for her help in the production of the LdHSP83 and LdeEF-2 antibodies. Part of this work was funded from the General Secretariat of Research and Technology action 'Proposals for the development of

Research Institutes, Krepis'. A.A. is a recipient of a scholarship from the Hellenic Pasteur Institute. The authors would like to thank COST action BM0802, 'Life and Death of Protozoan Parasites'.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Acharya, P., Kumar, R., and Tatu, U. (2007) Chaperoning a cellular upheaval in malaria: heat shock proteins in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **153**: 85–94.
- Alzate, J.F., Arias, A.A., Moreno-Mateos, D., Alvarez-Barrientos, A., and Jimenez-Ruiz, A. (2007) Mitochondrial superoxide mediates heat-induced apoptotic-like death in *Leishmania infantum*. *Mol Biochem Parasitol* **152**: 192–202.
- Bard, E. (1989) Molecular biology of *Leishmania*. *Biochem Cell Biol* **67**: 516–524.
- Bente, M., Harder, S., Wiesgigl, M., Heukeshoven, J., Gelhaus, C., Krause, E., *et al.* (2003) Developmentally induced changes of the proteome in the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Proteomics* **3**: 1811–1829.
- Beverley, S.M., and Clayton, C.E. (1993) Transfection of *Leishmania* and *Trypanosoma brucei* by electroporation. *Methods Mol Biol* **21**: 333–348.
- Brown, D.T., Alexander, B.T., and Sittman, D.B. (1996) Differential effect of H1 variant overexpression on cell cycle progression and gene expression. *Nucleic Acids Res* **24**: 486–493.
- Carmelo, E., Gonzalez, G., Cruz, T., Osuna, A., Hernandez, M., and Valladares, B. (2011) Characterization of monomeric DNA-binding protein Histone H1 in *Leishmania braziliensis*. *Parasitology* **138**: 1093–1101.
- Chang, K.P., and Fong, D. (1983) Cell biology of host-parasite membrane interactions in leishmaniasis. *Ciba Found Symp* **99**: 113–137.
- Chavan, H.D., Singh, G., and Dey, C.S. (2007) Confocal microscopic investigation of tubulin distribution and effect of paclitaxel on posttranslationally modified tubulins in sodium arsenite resistant *Leishmania donovani*. *Exp Parasitol* **116**: 320–326.
- Cheng, Y., Ren, X., Zhang, Y., Patel, R., Sharma, A., Wu, H., *et al.* (2011) eEF-2 kinase dictates cross-talk between autophagy and apoptosis induced by Akt inhibition, thereby modulating cytotoxicity of novel Akt inhibitor MK-2206. *Cancer Res* **71**: 2654–2663.
- Croft, S.L., and Olliaro, P. (2011) Leishmaniasis chemotherapy—challenges and opportunities. *Clin Microbiol Infect* **17**: 1478–1483.
- Daneshvar, H., Wyllie, S., Phillips, S., Hagan, P., and Burchmore, R. (2011) Comparative proteomics profiling of a gentamicin-attenuated *Leishmania infantum* cell line identifies key changes in parasite thiol-redox metabolism. *J Proteomics* **75**: 1463–1471.
- Drewes, G., Ebner, A., and Mandelkow, E.M. (1998) MAPs, MARKs and microtubule dynamics. *Trends Biochem Sci* **23**: 307–311.

- Dworkin-Rastl, E., Kandolf, H., and Smith, R.C. (1994) The maternal histone H1 variant, H1M (B4 protein), is the pre-dominant H1 histone in *Xenopus* pregastrula embryos. *Dev Biol* **161**: 425–439.
- Gakh, O., Cavadini, P., and Isaya, G. (2002) Mitochondrial processing peptidases. *Biochim Biophys Acta* **1592**: 63–77.
- Gunjan, A., Alexander, B.T., Sittman, D.B., and Brown, D.T. (1999) Effects of H1 histone variant overexpression on chromatin structure. *J Biol Chem* **274**: 37950–37956.
- Hodgetts, S., Matthews, R., Morrissey, G., Mitsutake, K., Piper, P., and Burnie, J. (1996) Over-expression of *Saccharomyces cerevisiae* hsp90 enhances the virulence of this yeast in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* **16**: 229–234.
- Hombach, A., Ommen, G., Chrobak, M., and Clos, J. (2012) The Hsp90-Sti1 interaction is critical for *Leishmania donovani* proliferation in both life cycle stages. *Cell Microbiol* **15**: 585–600.
- Hubel, A., Krobisch, S., Harauf, A., and Clos, J. (1997) *Leishmania major* Hsp100 is required chiefly in the mammalian stage of the parasite. *Mol Cell Biol* **17**: 5987–5995.
- Ilg, T. (2002) Generation of myo-inositol-auxotrophic *Leishmania mexicana* mutants by targeted replacement of the myo-inositol-1-phosphate synthase gene. *Mol Biochem Parasitol* **120**: 151–156.
- Jimenez-Ruiz, A., Alzate, J.F., Macleod, E.T., Luder, C.G., Fasel, N., and Hurd, H. (2010) Apoptotic markers in protozoan parasites. *Parasit Vectors* **3**: 104.
- Kalashnikova, A.A., Winkler, D.D., McBryant, S.J., Henderson, R.K., Herman, J.A., Deluca, J.G., et al. (2013) Linker histone H1.0 interacts with an extensive network of proteins found in the nucleolus. *Nucleic Acids Res* **41**: 4026–4035.
- Kamhawi, S. (2000) The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections. *Microbes Infect* **2**: 1765–1773.
- Kohl, L., and Gull, K. (1998) Molecular architecture of the trypanosome cytoskeleton. *Mol Biochem Parasitol* **93**: 1–9.
- Kumar, A., Sisodia, B., Misra, P., Sundar, S., Shasany, A.K., and Dube, A. (2010) Proteome mapping of overexpressed membrane-enriched and cytosolic proteins in sodium antimony gluconate (SAG) resistant clinical isolate of *Leishmania donovani*. *Br J Clin Pharmacol* **70**: 609–617.
- Lackner, D.H., Schmidt, M.W., Wu, S., Wolf, D.A., and Bahler, J. (2012) Regulation of transcriptome, translation, and proteome in response to environmental stress in fission yeast. *Genome Biol* **13**: R25.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.
- Larreta, R., Soto, M., Quijada, L., Folgueira, C., Abanades, D.R., Alonso, C., and Requena, J.M. (2004) The expression of HSP83 genes in *Leishmania infantum* is affected by temperature and by stage-differentiation and is regulated at the levels of mRNA stability and translation. *BMC Mol Biol* **5**: 3.
- Li, Q., Zhou, Y., Yao, C., Ma, X., Wang, L., Xu, W., et al. (2009) Apoptosis caused by Hsp90 inhibitor geldanamycin in *Leishmania donovani* during promastigote-to-amastigote transformation stage. *Parasitol Res* **105**: 1539–1548.
- Luciano, P., and Geli, V. (1996) The mitochondrial processing peptidase: function and specificity. *Experientia* **52**: 1077–1082.
- Masina, S., Zangger, H., Rivier, D., and Fasel, N. (2007) Histone H1 regulates chromatin condensation in *Leishmania* parasites. *Exp Parasitol* **116**: 83–87.
- Mojtahedi, Z., Clos, J., and Kamali-Sarvestani, E. (2008) *Leishmania major*: identification of developmentally regulated proteins in procyclic and metacyclic promastigotes. *Exp Parasitol* **119**: 422–429.
- Morales, M.A., Watanabe, R., Dacher, M., Chafey, P., Fortea, J.O.Y., Scott, D.A., et al. (2010) Phosphoproteome dynamics reveal heat-shock protein complexes specific to the *Leishmania donovani* infectious stage. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 8381–8386.
- Naderer, T., Dandash, O., and McConville, M.J. (2011) Calcineurin is required for *Leishmania major* stress response pathways and for virulence in the mammalian host. *Mol Microbiol* **80**: 471–480.
- Papageorgiou, F.T., and Soteriadou, K. (2002) Expression of a novel *Leishmania* gene encoding a histone H1-like protein in *Leishmania major* modulates parasite infectivity in vitro. *Infect Immun* **70**: 6976–6986.
- Pappin, D.J.C., Hojrup, P., and Bleasby, A.J. (1993) Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Curr Biol* **3**: 327–332.
- Povelones, M.L., Gluenz, E., Dembek, M., Gull, K., and Rudenko, G. (2012) Histone H1 plays a role in heterochromatin formation and VSG expression site silencing in *Trypanosoma brucei*. *PLoS Pathog* **8**: e1003010.
- Prasad, V., and Dey, C.S. (2000) Tubulin is hyperphosphorylated on serine and tyrosine residues in arsenite-resistant *Leishmania donovani* promastigotes. *Parasitol Res* **86**: 876–880.
- Raina, P., and Kaur, S. (2006) Chronic heat-shock treatment driven differentiation induces apoptosis in *Leishmania donovani*. *Mol Cell Biochem* **289**: 83–90.
- Rosenzweig, D., Smith, D., Myler, P.J., Olafson, R.W., and Zilberstein, D. (2008) Post-translational modification of cellular proteins during *Leishmania donovani* differentiation. *Proteomics* **8**: 1843–1850.
- Sacks, D.L. (2001) *Leishmania*-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. *Cell Microbiol* **3**: 189–196.
- Sacks, D.L., and Perkins, P.V. (1984) Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science* **223**: 1417–1419.
- Shapiro, R., and Cowen, L. (2010) Coupling temperature sensing and development. Hsp90 regulates morphogenetic signaling in *Candida albicans*. *Virulence* **1**: 45–48.
- Shapiro, R.S., Uppuluri, P., Zaas, A.K., Collins, C., Senn, H., Perfect, J.R., et al. (2009) Hsp90 orchestrates temperature-dependent *Candida albicans* morphogenesis via Ras1-PKA signaling. *Curr Biol* **19**: 621–629.
- Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J.V., and Mann, M. (2006) In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc* **1**: 2856–2860.
- Smirlis, D., and Soteriadou, K. (2011) Trypanosomatid apoptosis: 'apoptosis' without the canonical regulators. *Virulence* **2**: 253–256.

- Smirlis, D., Bisti, S.N., Xingi, E., Konidou, G., Thiakaki, M., and Soteriadou, K.P. (2006) *Leishmania* histone H1 overexpression delays parasite cell-cycle progression, parasite differentiation and reduces *Leishmania* infectivity *in vivo*. *Mol Microbiol* **60**: 1457–1473.
- Smirlis, D., Boleti, H., Gaitanou, M., Soto, M., and Soteriadou, K. (2009) *Leishmania donovani* Ran-GTPase interacts at the nuclear rim with linker histone H1. *Biochem J* **424**: 367–374.
- Smirlis, D., Duszenko, M., Ruiz, A.J., Scoulica, E., Bastien, P., Fasel, N., and Soteriadou, K. (2010) Targeting essential pathways in trypanosomatids gives insights into protozoan mechanisms of cell death. *Parasit Vectors* **3**: 107.
- Vergnes, B., Gourbal, B., Girard, I., Sundar, S., Drummelsmith, J., and Ouellette, M. (2007) A proteomics screen implicates HSP83 and a small kinetoplastid calpain-related protein in drug resistance in *Leishmania donovani* clinical field isolates by modulating drug-induced programmed cell death. *Mol Cell Proteomics* **6**: 88–101.
- White-Gilbertson, S., Kurtz, D.T., and Voelkel-Johnson, C. (2009) The role of protein synthesis in cell cycling and cancer. *Mol Oncol* **3**: 402–408.
- WHO (2010) Control of the leishmaniases. *WHO Technical Report Series*.
- Wiesgigl, M., and Clos, J. (2001a) The heat shock protein 90 of *Leishmania donovani*. *Med Microbiol Immunol* **190**: 27–31.
- Wiesgigl, M., and Clos, J. (2001b) Heat shock protein 90 homeostasis controls stage differentiation in *Leishmania donovani*. *Mol Biol Cell* **12**: 3307–3316.
- Xingi, E., Smirlis, D., Myrianthopoulos, V., Magiatis, P., Grant, K.M., Meijer, L., *et al.* (2009) 6-Br-5methylindirubin-3'-oxime (5-Me-6-BIO) targeting the leishmanial glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) short form affects cell-cycle progression and induces apoptosis-like death: exploitation of GSK-3 for treating leishmaniasis. *Int J Parasitol* **39**: 1289–1303.
- Xue, Y., Liu, Z., Cao, J., and Ren, J. (2011) *Computational Prediction of Post-Translational Modification Sites in Proteins*, p. 105–124. Ning-Sun Yang.
- Yao, C., Li, Y., Donelson, J.E., and Wilson, M.E. (2010) Proteomic examination of *Leishmania chagasi* plasma membrane proteins: contrast between avirulent and virulent (metacyclic) parasite forms. *Proteomics Clin Appl* **4**: 4–16.
- Zilberstein, D., and Shapira, M. (1994) The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol* **48**: 449–470.

Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site.