

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ Ζ. ΤΣΑΚΡΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΦΥΣΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΙΔΙΚΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ ΣΤΟ
ΕΠΙΠΕΔΟ ΤΩΝ TOLL-LIKE ΚΑΙ TCR ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ, ΣΕ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ
ΑΠΟ ΠΑΡΑΣΙΤΑ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ *LEISHMANIA*.**

ΟΛΓΑ Σ. ΚΟΥΤΣΩΝΗ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2015

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ Ζ. ΤΣΑΚΡΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΦΥΣΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΙΔΙΚΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ ΣΤΟ
ΕΠΙΠΕΔΟ ΤΩΝ TOLL-LIKE ΚΑΙ TCR ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ, ΣΕ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΑΠΟ
ΠΑΡΑΣΙΤΑ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ *LEISHMANIA*.**

ΟΛΓΑ Σ. ΚΟΥΤΣΩΝΗ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2015

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Ονοματεπώνυμο Υποψηφίου: Όλγα Σ. Κουτσώνη

Ημερομηνία Αίτησης Υποψηφίου: 09/10/2007

Ημερομηνία Ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 14/11/2007

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

1. Αθανάσιος Τσακρής (Επιβλέπων), Καθηγητής Μικροβιολογίας, Διευθυντής Εργ. Μικροβιολογίας, Ιατρικής Σχολής, Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών
2. Αθανάσιος Παπαβασιλείου, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας, Ιατρικής Σχολής, Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών
3. Ιωάννης Ρούτσιας, Επίκουρος Καθηγητής Ανοσολογίας - Μικροβιολογίας, Ιατρικής Σχολής, Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

Τίτλος: «Αλληλεπίδραση μεταξύ φυσικής και ειδικής ανοσίας στο επίπεδο των Toll-like και TCR υποδοχέων σε λοιμώξεις από παράσιτα του γένους *Leishmania*.»

Ημερομηνία Κατάθεσης Πρωτοκόλλου: 14/02/2008

Κατάθεση 1^{ης} έκθεσης προόδου: 08/07/2009

Κατάθεση 2^{ης} έκθεσης προόδου: 27/09/2010

Κατάθεση 3^{ης} έκθεσης προόδου: 06/06/2012

Ημερομηνία Υποβολής Πρότασης Ορισμού Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής:
15/10/2015

Ημερομηνία Ορισμού Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής: 05/11/2015

Μέλη Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής:

1. Αθανάσιος Τσακρής, Καθηγητής Μικροβιολογίας, Διευθυντής Εργ. Μικροβιολογίας, Ιατρικής Σχολής, Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών
2. Αθανάσιος Παπαβασιλείου, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας, Ιατρικής Σχολής, Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών
3. Ιωάννης Ρούτσιας, Επίκουρος Καθηγητής Ανοσολογίας - Μικροβιολογίας, Ιατρικής Σχολής, Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών
4. Βιολέττα Καψιμάλη - Βαϊοπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Μικροβιολογίας - Ανοσολογίας Λοιμώξεων, Ιατρικής Σχολής, Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών
5. Ουρανία Τσιτσιλώνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ανοσολογίας, Τμήματος Βιολογίας, Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών
6. Νικήτας Καποτάς, Επίκουρος Καθηγητής Μικροβιολογίας, Ιατρικής Σχολής, Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών
7. Ευαγγελία - Θεοφανώ Πιπεράκη, Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, Ιατρικής Σχολής, Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟΣ ΟΡΚΟΣ



Ορκίζομαι στον Απόλλωνα τον Ιατρό και στον Ασκληπιό και στην Υγεία και στην Πανάκεια και σε όλους τους Θεούς και τις Θεές, επικαλούμενος την μαρτυρία τους, να τηρήσω πιστά κατά τη δύναμη και την κρίση μου αυτόν τον όρκο και το συμβόλαιό μου αυτό.

Να θεωρώ αυτόν που μου δίδαξε αυτή την τέχνη ίσο με τους γονείς μου και να μοιραστώ μαζί του τα υπάρχοντά μου και τα χρήματά μου αν έχει ανάγκη φροντίδας. Να θεωρώ τους απογόνους του ίσους με τα αδέρφια μου και να τους διδάξω την τέχνη αυτή αν θέλουν να τη μάθουν, χωρίς αμοιβή και συμβόλαιο και να μεταδώσω με παραγγελίες, οδηγίες και συμβουλές όλη την υπόλοιπη γνώση μου και στα παιδιά μου και στα παιδιά εκείνου που με δίδαξε και στους άλλους μαθητές που έχουν κάνει γραπτή συμφωνία μαζί μου και σε αυτούς που έχουν ορκισθεί στον ιατρικό νόμο και σε κανέναν άλλο.

Να θεραπεύω τους πάσχοντες κατά τη δύναμή μου και την κρίση μου χωρίς ποτέ, εκουσίως, να τους βλάψω ή να τους αδικήσω. Και να μη δώσω ποτέ σε κανένα, έστω κι αν μου το ζητήσει, θανατηφόρο φάρμακο, ούτε να δώσω ποτέ τέτοια συμβουλή. Ομοίως να μη δώσω ποτέ σε γυναίκα φάρμακο για να αποβάλει.

Να διατηρήσω δε τη ζωή μου και την τέχνη μου καθαρή και αγνή. Και να μη χειρουργήσω πάσχοντες από λίθους αλλά να αφήσω την πράξη αυτή για τους ειδικούς. Και σε όποια σπίτια κι αν μπω, να μπω για την ωφέλεια των πασχόντων αποφεύγοντας κάθε εκούσια αδικία και βλάβη και κάθε γενετήσια πράξη και με γυναίκες και με άνδρες, ελεύθερους και δούλους.

Και ό,τι δω ή ακούσω κατά την άσκηση του επαγγέλματός μου, ή κι εκτός, για τη ζωή των ανθρώπων, που δεν πρέπει ποτέ να κοινοποιηθεί, να σιωπήσω και να το τηρήσω μυστικό.

Αν τον όρκο μου αυτό τηρήσω πιστά και δεν τον αθετήσω, είθε να απολαύσω για πάντα την εκτίμηση όλων των ανθρώπων για τη ζωή μου και για την τέχνη μου, αν όμως παραβώ και αθετήσω τον όρκο μου να υποστώ τα αντίθετα από αυτά.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ: Κουτσώνη Όλγα, Βιολόγος

➤ ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όνομα πατρός: Σωκράτης

Όνομα μητρός: Βασιλική

Οικογενειακή κατάσταση: Έγγαμη

Ημερομηνία γέννησης: 23 Ιουνίου 1982

Τόπος γέννησης: Πειραιάς

Υπηκοότητα: Ελληνική

Τηλέφωνο: 6974408625

e-mail: olkoutsoni@yahoo.gr okoutsoni@pasteur.gr

Εκπαίδευση- Ακαδημαϊκές Σπουδές	2000-2005 Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (Γενικός Βαθμός «Λίαν Καλώς»)
Εργαστηριακή και Ερευνητική Εμπειρία	2004-2005 Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Βιολογίας <u>Διπλωματική εργασία με τίτλο:</u> «Μελέτη παραγόντων οξειδωτικής καταπόνησης (stress) σε πειραματικώς επαγόμενο διαβήτη». (Τομέας Γενετικής και Βιοτεχνολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τομέας Πειραματικής Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή Αθηνών). Επιβλέπουσα εργασίας: Κουγιανού-Κουτσούκου Σοφία, Βιολόγος, PhD, Επίκουρη Καθηγήτρια του Τομέα Γενετικής και Βιοτεχνολογίας του Τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

Υποτροφίες	2006-2007 Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Τμήμα Μικροβιολογίας, Εργαστήριο Κυτταρικής Ανοσολογίας <u>Ερευνητική εργασία με θέμα:</u> «<i>In vitro</i> και <i>in vivo</i> μελέτες για την ανοσοθεραπεία της λείσμανιάσης». Επιβλέπουσα εργασίας: Ντότσικα Ελένη, DVM, PhD 2007-2015 Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Τμήμα Μικροβιολογίας, Εργαστήριο Κυτταρικής Ανοσολογίας α. Ερευνητική εργασία με θέμα : «Αλληλεπίδραση μεταξύ φυσικής και ειδικής ανοσίας στο επίπεδο των Toll-like και TCR υποδοχέων σε λοιμώξεις από παράσιτα του γένους <i>Leishmania</i>». (Στα πλαίσια εκπόνησης διδακτορικής διατριβής, στον Τομέα Μικροβιολογίας της Ιατρικής Σχολής Αθηνών, με επίσημη ημερομηνία ορισμού τριμελούς επιτροπής την 14η Νοεμβρίου 2007) Επιβλέπουσα εργασίας: Ντότσικα Ελένη, DVM, PhD β. Συμμετοχή σε ερευνητικά προγράμματα μελέτης ανοσοτροποποιητικών ιδιοτήτων πρωτεϊνών του παρασίτου του γένους <i>Leishmania</i>, για την ανάπτυξη προστατευτικών εμβολίων έναντι της λείσμανιάσης σε πειραματικά μοντέλα ποντικού. γ. Συμμετοχή σε πρόγραμμα μελέτης ανοσολογικών παραμέτρων σε εθελοντές και πειραματόζωα που ακολουθούν πειραματικά πρωτόκολλα διατροφής. δ. Διατήρηση καλλιεργειών ποικίλων στελεχών του παρασίτου του γένους <i>Leishmania</i> (π.χ. <i>Leishmania donovani</i>, <i>Leishmania major</i>) και παρασκευή διαλυτών αντιγόνων του παρασίτου για την κάλυψη των αναγκών του Εθνικού Κέντρου Αναφοράς Λείσμανιάσεων. 2015 Παροχή υποτροφίας από την οργανωτική επιτροπή του συνεδρίου “Annual Scientific Meeting of the Institute Pasteur International Network”, για την συμμετοχή και παρακολούθηση του συνεδρίου που διεξήχθη το 2015 (Paris, 14-16 Οκτωβρίου). 2010 Παροχή υποτροφίας από την οργανωτική επιτροπή του συνεδρίου “Annual Scientific Meeting
--------------------------	--

Συμμετοχές σε Συνέδρια	of the Institute Pasteur International Network”, για την συμμετοχή και παρακολούθηση του συνεδρίου που διεξήχθει το 2010 (Hong Kong, 22-25 Νοεμβρίου). 2006-2008 Σύμβαση υποτρόφου στο εργαστήριο Κυτταρικής Ανοσολογίας, του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ. 15 συμμετοχές σε Παγκόσμια και Πανελλήνια Συνέδρια, με προφορικές ομιλίες ή με παρουσίαση poster. 2015. Scientific Meeting of the Institut Pasteur International Network. Paris, France, 14-16 Οκτωβρίου 2015 <u>Παρουσίαση poster:</u> Koutsoni, S.O., Kyriazis, J.D., Barhoumi, M., Abdelkrim, Y.Z., Karagouni, E., Guizani, I., Dotsika, E. “Evaluation of the therapeutic activity of LieIF in experimentally induced visceral leishmaniasis”. 2014. Scientific Meeting of the Institut Pasteur International Network. Paris, France, 10-13 Σεπτεμβρίου 2014. <u>Παρουσίαση poster:</u> Kyriazis I.D., Smyrlis D., Koutsoni O., Papadaki A., Boleti H., Karagouni E., Skaltsounis L.A., Dotsika, E. “Oleuropein possesses immune-modulatory nature along with leishmanicidal activity”. 2014. Scientific Meeting of the Institut Pasteur International Network. Paris, France, 10-13 Σεπτεμβρίου 2014. <u>Παρουσίαση poster:</u> Agallou, M., Athanasiou, E., Koutsoni, O., Samiotaki, M., Panayotou, G., Dotsika, E., Karagouni, E. “Antigen identification through bioinformatics and proteomics approaches for vaccine development against leishmaniasis”. 2014. Aquaculture Europe 2014, Donostia–San Sebastián, Spain, 14-17 Οκτώβρη. <u>Παρουσίαση poster:</u> M. Smyrli, E. Dotsika, O. Koutsoni, P.G. Kalatzis, C. Kokkari and P. Katharios
--------------------------------------	--

	“Specific antibody response of seabass (<i>Dicentrarchus labrax</i>) to <i>Aeromonas Veronii</i> autogenous vaccine.” 2013. Regional European Biomedical Laboratory Science Congress, and the 4th Greek Medical Laboratory Technologists Conference, Αθήνα, 5-7 Δεκεμβρίου, 2013. <u>Προφορική παρουσίαση:</u> O. Koutsoni “Vaccine adjuvants as tools for designing innovative vaccines.” 2013.”26th Annual Congress of the European Society of Veterinary Dermatology and the European College of Veterinary Dermatology - ESVD-ECVD”, Valencia, Spain, 19-21 Σεπτεμβρίου 2013 <u>Ελεύθερη ανακοίνωση και παρουσίαση poster:</u> M.K. Chatzis, L.V. Athanasiou, E. Papadopoulos, D. Kasabalis, K. Apostolides, T. Petanides, M. Mylonakis, T. Rallis, L. Leontides, E. Dotsika, O. Koutsoni, A.F. Koutinas, and M.N. Saridomichelakis “A cross-sectional survey of leishmaniosis in clinically normal and sick cats in Greece with indirect immunofluorescence antibody test and enzyme-linked immunosorbent assay” 2013. “10th International Veterinary Immunology Symposium – IVIS”, Milan, Italy, 28 Αυγούστου – 01 Σεπτεμβρίου 2013 <u>Παρουσίαση poster:</u> E. Athanasiou, M. Agallou, O. Koutsoni, E. Dotsika, and E. Karagouni “<i>In silico</i> analysis of five known <i>Leishmania infantum</i> antigenic proteins and in vitro assessment of the derived peptides immunogenicity in sera from asymptomatic or symptomatic naturally infected dogs” 2013.“15th International Congress of Immunology – ICI”, Milan, Italy, 22-27 Αυγούστου 2013 <u>Παρουσίαση poster:</u> Agallou M., Koutsoni O., Dotsika E., Karagouni E. “<i>In silico</i> prediction of promiscuous <i>Leishmania infantum</i> KMP-11, H1, LeIF, CPA, CPB peptides and experimental validation of eliciting CD4⁺ and CD8⁺ T-cell specific responses” 2011. “Annual Scientific Meeting of the Institute Pasteur International Network-Scientific Meeting of the Young Researchers ”, Paris, 10 Νοεμβρίου 2011
--	---

	<u>Παρουσίαση poster στο συνέδριο:</u> Koutsoni O., Barhoumi M., Guizani I., Dotsika E. “Pre-treatment of J774A.1 macrophages with LeIF and IFN-γ induces resistance to <i>Leishmania donovani</i> at the late phase of infection” 2010. “Annual Scientific Meeting of the Institute Pasteur International Network”, Hong Kong, 22-25 Νοεμβρίου 2010 <u>Συμπράττων συγγραφέας της προφορικής παρουσίασης στο συνέδριο:</u> Barhoumi M., Koutsoni O., Guizani I., Dotsika E. “Characterization of immunomodulatory activity of eIF4A protein” 2010. “Annual Scientific Meeting of the Institute Pasteur International Network”, Hong Kong, 22-25 Νοεμβρίου 2010 <u>Παρουσίαση poster στο συνέδριο:</u> Koutsoni O., Barhoumi M., Guizani I., Dotsika E. “LieIF and its recombinant polypeptides enhance the maturation of mouse dendritic cells and the production of the protective IL-12 cytokine”. 2010. 32^ο Επιστημονικό Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών», Καρπενήσι, 20-22 Μαΐου 2010. <u>Παρουσίαση poster στο συνέδριο:</u> Κουτσώνη Ο., Barhoumi M., Guizani I., Καραγκούνη Ε., Ρούτσιας Ι., Ντότσικα Ε. «LieIF: Μια ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη του παρασίτου <i>Leishmania spp.</i> ως υποψήφιο αντιγόνο για την ανάπτυξη εμβολίου» 2008. 30^ο Επιστημονικό Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών», Θεσσαλονίκη, 22-24 Μαΐου 2008. <u>Παρουσίαση poster στο συνέδριο:</u> Κουτσώνη Ο., Καραγκούνη Ε., Ντότσικα Ε «<i>Leishmania major</i> και δενδριτικά κύτταρα: ρόλος των TLR3 και TLR9 στην αναγνώριση του παρασίτου» 2007. 29^ο Επιστημονικό Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών», Καβάλα, 17-19 Μαΐου 2007. <u>Παρουσίαση poster στο συνέδριο:</u> Κουτσώνη Ο., Τσαγκόζης Π., Καραγκούνη Ε., Ντότσικα Ε. «Πλασματοκυτταροειδή δενδριτικά ως οχήματα μεταφοράς αντιγόνων για την επαγωγή προστατευτικής ανοσίας σε πειραματικά μοντέλα δερματικής
--	---

Δημοσιεύσεις σε Διεθνή Περιοδικά	λεισμανίασης». 2006. “COST ACTION B22 – Drug development for parasitic diseases – Joint meeting” Basel (CH), 20-21 Νοεμβρίου 2006 <u>Συμπράττων συγγραφέας της παρουσίασης poster στο συνέδριο:</u> I. Kyriazis, O. Koutsoni, E. Karagouni, K. Soteriadou, L. Skaltsounis and E. Dotsika. <i>“Immunological parameters for validating natural products as antiprotozoan drugs: Oleuropein as potent antiparasitic compound”.</i> ➤ 2015. <u>Experimental Neurology</u> Tseveleki V, Tselios T, Kanistras I, Koutsoni O, Karamita M, Vamvakas SS, Apostolopoulos V, Dotsika E, Matsoukas J, Lassmann H, Probert L. Mannan-conjugated myelin peptides prime non-pathogenic Th1 and Th17 cells and ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis. <i>Exp. Neurol.</i> Vol. 267, pg. 254-267 ➤ 2014. <u>Plos One</u> Koutsoni O, Barhoumi M, Guizani I, Dotsika E. Leishmania eukaryotic initiation factor (LeIF) inhibits parasite growth in murine macrophages. <i>Plos One</i>, Vol, 9, Issue 5, e97319 ➤ 2014. <u>Frontiers in Immunology</u> Agallou M., Athanasiou E., Koutsoni O, Dotsika E., and Karagouni E., Experimental Validation of Multi-Epitope Peptides Including Promising MHC Class I- and II-Restricted Epitopes of Four Known <i>Leishmania infantum</i> Proteins. <i>Front. Immunol.</i> Vol. 5, art. 268 ➤ 2013. <u>Forschende Komplementärmedizin</u> Papagiannopoulos IA, Sideris VI, Boschmann M, Koutsoni OS, Dotsika EN. Anthropometric, hemodynamic, metabolic, and renal responses during 5 days of food and water deprivation. <i>Forschende Komplementärmedizin.</i> Vol. 20(6), pg. 427-33 ➤ 2007. <u>International Immunology</u> Tseveleki V., Tsagozis P., Koutsoni O., Dotsika
---	--

Παρακολούθηση Ημερίδων/ Σεμιναρίων/ Συνεδρίων	Ευδοκία Καραγκούνη. ➤ PTR No 426, 2012-2014 Τίτλος έργου: <i>Structural and experimental approaches to validate Leishmania LeIF antigen as drug target and immunotherapeutic molecule.</i> Scientific network: Institute Pasteur Tunis (Coordinator Prof I. Guizani), Institute Pasteur Paris (Coordinator Dr M. Nilges), Hellenic Pasteur Institute (Coordinator Dr. E.Dotsika). ➤ 2015. Παρακολούθηση συνεδρίου Scientific Meeting of the Institut Pasteur International Network. Paris, France, 14-16 Οκτωβρίου 2015. ➤ 2015. Συμμετοχή στο σεμινάριο «Εισαγωγή στο στατιστικό πακέτο IBM SPSS STATISTICS: βασικά θέματα επεξεργασίας και ανάλυσης δεδομένων» Τμήμα Πληροφορικής, Πανεπιστημιούπολη, 8-9 Ιουνίου 2015. ➤ 2014. Παρακολούθηση ημερίδας «Ζώα Εργαστηρίου: αλλαγή παραδείγματος» Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, 30 Μαΐου 2014. ➤ 2014. Παρακολούθηση ημερίδας «ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗ – ένα αναδύομενο νόσημα: Έρευνα και καινοτομία στην ανάπτυξη εμβολίων κατά των ενδοκυτταρικών παθογόνων». Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, 21 Δεκεμβρίου 2014. ➤ 2011. Παρακολούθηση συνεδρίου Annual Scientific Meeting of the Institute Pasteur International Network-Scientific Meeting of the Young Researchers, 10 Νοεμβρίου 2011, Paris. ➤ 2010. Παρακολούθηση συνεδρίου Annual Scientific Meeting of the Institute Pasteur International Network, 22-25 Νοεμβρίου, Hong Kong. ➤ 2010. Παρακολούθηση συνεδρίου 32^ο Επιστημονικό Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών», 20-22 Μαΐου 2010,
---	---

Καρπενήσι.

- **2008.** Παρακολούθηση συνεδρίου 30^ο Επιστημονικό Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών, 22-24 Μαΐου, Θεσσαλονίκη.
- **2007.** Παρακολούθηση συνεδρίου 29^ο Επιστημονικό Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών, 17-19 Μαΐου, Καβάλα.
- **2006.** Παρακολούθηση συνεδρίου “16th European Congress of Immunology”, 6-9 Σεπτεμβρίου, Παρίσι.
- **2006.** Συμμετοχή στο σεμινάριο “**Imaging the Immunological Synapse**”. **Pre-Congress Educational Session**, 16th European Congress of Immunology, 5-6 Σεπτεμβρίου 2006, Παρίσι.
- **2006.** Συμμετοχή στο σεμινάριο με θέμα: “**FEBS Practical/Lecture Course: Human and Microbial Genomics, DNA Arrays applied to Human Pathogens and Diseases**”. 30 Μαρτίου-7 Απριλίου 2006, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ.
- **2005.** Παρακολούθηση ημερίδας «Δημόσια Υγεία και Ζωοανθρωπονόσοι (Λείσμανίαση - Τοξοπλάσμωση): Σύγχρονη προσέγγιση και διαχείριση». Εθνική Σχολή Δημόσιας Υγείας. 13 Νοεμβρίου 2005.
- **2003-2004.** Παρακολούθηση επιμορφωτικών σεμιναρίων στο Εθνικό Ιδρυμα Ερευνών κατά τους κύκλους ομιλιών «Κοινωνία και Υγεία III» (11 Νοεμβρίου έως 16 Δεκεμβρίου 2003) και «Κοινωνία και Υγεία IV» (09 Νοεμβρίου έως 14 Δεκεμβρίου 2004).
- **2001.** Παρουσίαση Σεμιναρίου με τίτλο: «*Ρόλος των πλασμιδίων στους προκαρυωτικούς οργανισμούς*», στον Τομέα Μικροβιολογίας του τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, Μάιος 2001.

Διδακτική εμπειρία	➤ 2008. Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ Παράδοση διαλέξεων σε μαθητές δευτεροβάθμιας εκπαίδευσης στα πλαίσια επιμορφωτικών-εκπαιδευτικών επισκέψεων στο Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ. ➤ 2007. Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, 2-4 Ιουλίου 2007. Παράδοση πρακτικών ασκήσεων στα πλαίσια επιμορφωτικού σεμιναρίου για καθηγητές δευτεροβάθμιας εκπαίδευσης με τίτλο «Τεχνολογίες Αιχμής και η Συμβολή τους στο Μέλλον των Βιοεπιστημών». ➤ 2006. Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, 18-20 Δεκεμβρίου. Παράδοση πρακτικών ασκήσεων στα πλαίσια επιμορφωτικού σεμιναρίου για καθηγητές δευτεροβάθμιας εκπαίδευσης με τίτλο «Τεχνολογίες Αιχμής και η Συμβολή τους στο Μέλλον των Βιοεπιστημών».
Ξένες Γλώσσες	➤ Αγγλικά (Certificate of Proficiency in English, Cambridge University) ➤ Γαλλικά (Diplome d'études en langue française, DEL F I).
Γνώσεις H/Y	Άριστη κατανόηση και χρησιμοποίηση υπολογιστικών συστημάτων και προγραμμάτων: - Microsoft Office Word 2003-2007 - Microsoft Office Excel 2003-2007 - Microsoft Office Powerpoint - Adobe Photoshop CS2 - Adobe ImageReady CS2 - Image Analysis - Adobe Reader/Acrobat - EndNote - SPSS (πρόγραμμα στατιστικής επεξεργασίας μη κανονικών και κανονικών κατανομών) - Internet Explorer - Mozilla Firefox

Στους γονείς μου,

στον σύντροφό μου,

στην κόρη μας

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η λεισμανίαση αποτελεί μία σοβαρή πρωτοζωική νόσο, που παρά τον υψηλό επιπολασμό της στις τροπικές περιοχές, συναντάται με διαρκώς αυξανόμενη επίπτωση και στις αναπτυγμένες χώρες του δυτικού κόσμου. Η αναζήτηση νέων αντιγόνων του παρασίτου *Leishmania spp.* που εμφανίζουν ανοσοτροποποιητικές ιδιότητες ικανές να ενεργοποιήσουν τόσο την έμφυτη, όσο και την ειδική κυτταρική απόκριση, κρίνεται επιτακτική για την αποτελεσματική πρόληψη της νόσου, μέσω θεραπευτικών ή εμβολιαστικών προσεγγίσεων.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε υπό την εποπτεία του Καθηγητή Μικροβιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, κ. Α. Ζ. Τσακρή. Πραγματοποιήθηκε κατά την περίοδο 2008-2015, στο Εργαστήριο Κυτταρικής Ανοσολογίας, του Τμήματος Μικροβιολογίας, του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ, υπό την επίβλεψη της Δρ. Ελένης Ντότσικα. Η υλοποίηση αυτής της διατριβής δεν θα ήταν δυνατή χωρίς την υποστήριξη των ακόλουθων πηγών χρηματοδότησης: α) υποτροφία εκπόνησης διδακτορικής διατριβής του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ, 2006-2008, β) του προγράμματος με τίτλο “Structural and experimental approaches to validate *Leishmania* LeIF antigen as drug target and immunotherapeutic molecule”, με κωδικό PTR No 426, που χρηματοδοτήθηκε από το Διεθνές Δίκτυο των Ινστιτούτων Παστέρ (Institut Pasteur International Network – RIIP), 2012-2014 και γ) του προγράμματος με τίτλο: «Λοιμώδη και νευροεκφυλιστικά νοσήματα στον 21ο αιώνα: από τη μελέτη των βασικών μηχανισμών στην ανάπτυξη μεταφραστικής έρευνας και τεχνολογιών αιχμής με στόχο τη διάγνωση, την πρόληψη και τη θεραπεία», με κωδικό MIS450598, της Δράσης Εθνικής Εμβέλειας «Αναπτυξιακές προτάσεις ερευνητικών φορέων - ΚΡΗΠΙΣ», που χρηματοδοτήθηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΤΠΑ) και εθνικούς πόρους, ΕΣΠΑ 2013-2015.

Ολοκληρώνοντας την διδακτορική διατριβή, αισθάνομαι την ανάγκη να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όσους ήταν δίπλα μου και με ενθάρρυναν στην προσπάθειά μου αυτή. Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή κ. Α. Τσακρή για την ανάθεση του θέματος της διατριβής και την συστηματική παρακολούθηση της πορείας της εκπόνησής της, καθώς και τα μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Α. Παπαβασιλείου και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Ι. Ρούτσια, για τον χρόνο που διέθεσαν για την παρακολούθηση της μελέτης, και τις εύστοχες υποδείξεις τους.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, την κα. Β. Καψιμάλη - Βαϊοπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Μικροβιολογίας – Ανοσολογίας Λοιμώξεων, την κα. Ο. Τσιτσιλώνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ανοσολογίας, τον κ. Ν. Καποτά, Επίκουρο Καθηγητή Μικροβιολογίας και την κα. Ε.-Θ. Πιπεράκη, Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, για την τιμή που μου έκαναν να αξιολογήσουν τη διατριβή αυτή.

Επιπλέον, θα επιθυμούσα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου και τις ευχαριστίες μου προς την υπεύθυνη του Εργαστηρίου Κυτταρικής Ανοσολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ, Δρ. Ελένη Ντότσικα για την καθοδήγηση και επίβλεψη της διατριβής αυτής. Επίσης, ευχαριστώ θερμά την Δρ. Ευδοκία Καραγκούνη, για την πολύτιμη καθοδήγησή της και τον κ. Χρήστο Κόμη για τις μοναδικές συμβουλές του. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους υπόλοιπους συναδέλφους στο εργαστήριο και έναν έναν ξεχωριστά, την κα. Εβίτα Αθανασίου, την κα. Μαρίτσα Μαργαρώνη, την κα. Μαρία Αγάλλου, την κα. Δήμητρα Τουμπανάκη και τον κ. Γιάννη Κυριαζή, διότι εκτός από την αρμονική και ευχάριστη συνεργασία, μου προσέφεραν πολύπλευρη συμπαράσταση, αποδεικνύοντας πως τα όρια μεταξύ της επαγγελματικής συναδελφικότητας και της φιλίας, μπορούν να αλληλοεπικαλύπτονται.

Επίσης, θα ήθελα να αναφερθώ και στους σημαντικότερους ανθρώπους της ζωής μου. Θα ήθελα να εκφράσω ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου, που σμίλεψαν με πολλή αγάπη την ψυχή μου, όντας πάντα δίπλα μου με ουσιαστικό τρόπο. Δε θα ήθελα με τίποτα να παραλείψω την αδερφή μου, που σε όλη την πορεία των σπουδών μου ήταν δίπλα μου, προσφέροντας απλόχερα την βοήθειά της. Και φυσικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον σύντροφό μου, για την πολύτιμη κατανόηση, και την πολύπλευρη και αποτελεσματική συμπαράστασή του σε όλη την περίοδο της εκπόνησης της διατριβής και ιδιαίτερα στην απαιτητική περίοδο της συγγραφής της. Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την λατρεία μου στην κόρη μου, που ένα της χαμόγελο μπορεί να διώξει όλα τα σύννεφα μακριά.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

1. Εισαγωγή	25
1.1 Παράσιτο του γένους <i>Leishmania</i>	26
1.1.1 Ιστορικά στοιχεία και συστηματική κατάταξη του παρασίτου.....	26
1.1.2 Μετάδοση του παρασίτου.	27
1.1.3 Αναπτυξιακές μορφές του παρασίτου.	29
1.1.4 Κύκλος ζωής του παρασίτου.....	30
1.1.4.1 Είσοδος του παρασίτου στον ενδιάμεσο ξενιστή.	30
1.1.4.2 Είσοδος του παρασίτου στον τελικό ξενιστή.	32
1.2 Η νόσος λεισμανίαση.	33
1.2.1 Κλινικές μορφές της λεισμανίασης.	33
1.2.2 Επίπτωση της νόσου.	36
1.2.3 Γεωγραφική κατανομή της λεισμανίασης.	37
1.2.4 Διάγνωση της λεισμανίασης.....	40
1.3 Θεραπευτικές προσεγγίσεις της λεισμανίασης.....	41
1.3.1 Χημειοθεραπεία της λεισμανίασης.....	41
1.3.2 Ανοσοθεραπεία έναντι της λεισμανίασης.....	44
1.4 Ανάπτυξη εμβολίων έναντι της λεισμανίασης.	45
1.4.1 Υποψήφια εμβόλια έναντι της λεισμανίασης.....	45
1.4.2 Χρήση πρωτεϊνών του παρασίτου <i>Leishmania spp.</i> στην κατασκευή εμβολίων.....	50
1.4.2.1 Ευκαρυωτικός παράγοντας έναρξης του παρασίτου <i>Leishmania</i> (LeIF).	52
1.5 Ανοσοενισχυτικά.	54

1.6 Ανοσολογική απόκριση έναντι του παρασίτου <i>Leishmania spp.</i>	56
1.6.1 Τύποι ανοσίας.....	56
1.6.2 Τύποι ανοσολογικής απόκρισης.....	57
1.6.2.1 Χυμική ανοσολογική απόκριση.	57
1.6.2.2 Κυτταρική ανοσολογική απόκριση.....	57
1.7 Ο ρόλος των CD4 ⁺ T κυττάρων.....	58
1.7.1 Th1-Th2 πόλωση.....	58
1.7.2 Παράγοντες που συμμετέχουν στην Th1/Th2 πόλωση.	60
1.8 Ο ρόλος των CD8 ⁺ T κυττάρων.....	66
1.9 Μακροφάγα, δενδριτικά και πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα.....	67
1.9.1 Μακροφάγα	67
1.9.2 Δενδριτικά κύτταρα.....	69
1.9.2.1 Υποδοχείς τύπου Toll.....	73
1.9.3 Πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα.	76
2. Σκοπός.....	77
2. Σκοπός της μελέτης.....	78
3. Υλικά και Μέθοδοι	80
3.1 Υλικά.....	81
3.1.1 Εργαστηριακός εξοπλισμός.....	81
3.1.2 Αναλώσιμα.....	82
3.1.3 Εμπορικά διαθέσιμα αντιδραστήρια.....	83
3.1.3.1 Θρεπτικά υλικά και υλικά κυτταροκαλλιιεργειών.	83
3.1.3.2 Ειδικά αντιδραστήρια.....	84
3.1.4 Αντισώματα	87
3.1.5 Παρασκευή διαλυμάτων.....	90
3.1.6 Βιολογικό Υλικό.....	91

3.1.6.1 Παράσιτα του γένους <i>Leishmania</i> spp.	91
3.1.6.2 Κύτταρα θηλαστικών.	92
3.1.7 Πειραματόζωα.....	92
3.1.8 Εναρκτήρια μόρια.....	92
3.1.9 Χρήση λογισμικών προγραμμάτων.	93
 3.2 Μέθοδοι.....	 93
3.2.1 Κυτταροκαλλιέργειες.....	93
3.2.1.1 <i>In vitro</i> καλλιέργεια του παρασίτου <i>Leishmania</i> spp.	93
3.2.1.2 <i>In vitro</i> καλλιέργεια κυττάρων θηλαστικών.	93
3.2.2 Διατήρηση και επανάκτηση των ευκαρυωτικών οργανισμών και των κυττάρων θηλαστικών.....	94
3.2.2.1 Διατήρηση στελεχών του παρασίτου <i>Leishmania</i> spp. σε πειραματόζωα ή υγρό άζωτο και επανάκτηση μολυσματικών μορφών.....	94
3.2.2.2 Διατήρηση και επανάκτηση των κυττάρων θηλαστικών.	95
3.2.3 Παρασκευή διαλυτού αντιγόνου του παρασίτου <i>Leishmania</i> spp.....	96
3.2.4 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών.	96
3.2.5 Ποσοτικός προσδιορισμός του παρασιτικού φορτίου στους ιστούς των πειραματοζώων.	97
3.2.6 Μέτρηση των επιπέδων ειδικών έναντι του παρασίτου, αντισωμάτων IgG1 και IgG2a ισοτύπων.	98
3.2.7 <i>In vitro</i> παραγωγή και διαφοροποίηση μυελοειδών δενδριτικών κυττάρων.	98
3.2.8 Ταυτοποίηση των μυελοειδών ΔΚ.....	99
3.2.9 Εκτίμηση του βαθμού ωρίμανσης των ΔΚ.	100
3.2.10 Κυτταροπλασματική εντόπιση κυτταροκινών και iNOS στα ΔΚ.	100
3.2.11 Σήμανση επιφανειακών αντιγόνων για τον φαινοτυπικό προσδιορισμό κυτταρικών υποπληθυσμών.	101
3.2.12 Απομόνωση RNA.	101
3.2.13 Ανάλυση της έκφρασης γονιδίων με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real-time PCR).	102
3.2.14 <i>In silico</i> ανάλυση του ευκαρυωτικού παράγοντα έναρξης του στελέχους <i>L. infantum</i> (LieIF).....	104
3.2.15 Εκτίμηση της λεμφοβλαστικής ικανότητας των λεμφοκυττάρων.	105

3.2.16 <i>In vitro</i> επίδραση της ανασυνδυασμένης LieIF και των πρωτεϊνικών της τμημάτων στην ενδοκυττάρια ανάπτυξη του στελέχους <i>L. donovani</i> , στο κυτταρόπλασμα των J774A.1 κυττάρων.....	106
3.2.16.α Επίδραση της ανασυνδυασμένης LieIF και των πρωτεϊνικών της τμημάτων με τα J774A.1 κύτταρα, πριν την έναρξη της μόλυνσης με <i>L. donovani</i> προμαστιγωτές μορφές (pre-treatment).....	106
3.2.16.β Επίδραση της ανασυνδυασμένης LieIF και των πρωτεϊνικών της τμημάτων με τα J774A.1 κύτταρα, μετά την έναρξη της μόλυνσης με <i>L. donovani</i> προμαστιγωτές μορφές (post-treatment).....	107
3.2.17 Ποσοτικός προσδιορισμός του παραγόμενου μονοξειδίου του αζώτου (NO), σε υπερκείμενα καλλιιεργειών J774A.1 κυττάρων.....	108
3.2.18 Ποσοτικός προσδιορισμός παραγόμενων ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS), σε υπερκείμενα καλλιιεργειών J774A.1 κυττάρων.....	108
3.2.19 Προσδιορισμός των επιπέδων κυτταροκινών στα υπερκείμενα καλλιιεργειών J774A.1 μακροφάγων, με ανοσοενζυμική δοκιμασία ELISA.	109
3.2.20 Επίδραση του επαγόμενου TNF-α στην παραγωγή ROS, στο σύστημα των J774A.1 μακροφάγων.....	110
3.2.21 Διερεύνηση της πιθανής συνεργιστικής δράσης της ανασυνδυασμένης LieIF με τους υποδοχείς τύπου Toll.	110
3.2.22 Αξιολόγηση της δράσης της ανασυνδυασμένης LieIF ως ανοσοενισχυτικό, σε <i>in vivo</i> πειραματικό μοντέλο ποντικού.	111
3.2.23 Εφαρμογή της ανασυνδυασμένης LieIF σε πειραματικά πρωτόκολλα ανοσοθεραπείας έναντι της σπλαγχνικής λεϊσμανίασης.	112
3.2.24 Εφαρμογή της ανασυνδυασμένης LieIF σε πειραματικά πρωτόκολλα προφυλακτικού εμβολιασμού έναντι της δερματικής λεϊσμανίασης.....	114
3.2.25 Στατιστική επεξεργασία.....	115
 4. Αποτελέσματα	116
 4.1 Κλωνοποίηση, έκφραση και ταυτοποίηση της <i>L. infantum</i> eIF (LieIF). ..	117
 4.2 Επίδραση της ανασυνδυασμένης LieIF στην κυτταρική βιωσιμότητα. .	117
 4.3 <i>In vitro</i> αξιολόγηση της αντιλεϊσμανιακής δράσης της LieIF.	118

4.3.1 Επίδραση της ανασυνδυασμένης LieIF στην ενδοκυτταρική ανάπτυξη του στελέχους <i>L. donovani</i> , σε πειραματικό μοντέλο J774A.1 μολυσμένων μακροφάγων.	118
4.3.1.1 Επίδραση της ανασυνδυασμένης LieIF, πριν την έναρξη της μόλυνσης με <i>L. donovani</i> προμαστιγωτές μορφές στατικής φάσης ανάπτυξης (pre-treatment).	118
4.3.1.2 Επίδραση της ανασυνδυασμένης LieIF, μετά την έναρξη της μόλυνσης με <i>L. donovani</i> προμαστιγωτές μορφές στατικής φάσης ανάπτυξης (post-treatment).	121
4.3.2 Διερεύνηση του επαγόμενου προστατευτικού μηχανισμού των J774A.1 μακροφάγων από τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες LieIF/IFN-γ.	123
4.3.2.1 Επίδραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών LieIF/IFN-γ στην παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (NO) από <i>L. donovani</i> - μολυσμένα J774A.1 μακροφάγα.	123
4.3.2.2 Επίδραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών LieIF/IFN-γ στην παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS) από <i>L. donovani</i> - μολυσμένα J774A.1 μακροφάγα.	125
4.3.2.3 Επίδραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών LieIF/IFN-γ στην παραγωγή κυτταροκινών και χημειοκινών από <i>L. donovani</i> - μολυσμένα J774A.1 μακροφάγα.	127
4.3.2.4 Συσχέτιση του παραγόμενου TNF-α και των ROS, στα μολυσμένα J774A.1 μακροφάγα.	131
4.4 Μελέτη ανοσογονικών ιδιοτήτων της ανασυνδυασμένης LieIF.	132
4.4.1 Επίδραση της ανασυνδυασμένης LieIF στην λειτουργική διαφοροποίηση των μυελοειδών δένδριτικών κυττάρων.	132
4.4.1.1 Επίδραση της ανασυνδυασμένης LieIF στην ωρίμανση των ΔΚ.	133
4.4.1.2 Επίδραση της ανασυνδυασμένης LieIF στην παραγωγή κυτταροκινών από ΔΚ.	135
4.4.2 Εκτίμηση της πιθανής συνεργιστικής δράσης της ανασυνδυασμένης LieIF με τους υποδοχείς τύπου Toll.	137
4.5 Αξιολόγηση της δράσης της ανασυνδυασμένης LieIF ως ανοσοενισχυτικό, σε <i>in vivo</i> πειραματικό μοντέλο ποντικού.	140
4.6 Αντιγονική χαρτογράφηση της LieIF και προσδιορισμός των ενεργών ανοσογονικών περιοχών της.	144

4.6.1 Προσδιορισμός T αντιγονικών επιτόπων στην ανασυνδυασμένη LieIF.	144
4.6.2 <i>In silico</i> ανάλυση του ευκαρυωτικού παράγοντα έναρξης (LieIF) του παρασίτου <i>Leishmania spp.</i>	145
4.6.3 Μελέτη ανοσογονικών ιδιοτήτων των συνθετικών πεπτιδίων της LieIF.	152
4.6.4 Μελέτη ανοσοτροποποιητικών ιδιοτήτων των πρωτεϊνικών τμημάτων της LieIF.	156
4.6.4.1 Αξιολόγηση της επίδρασης των πρωτεϊνικών τμημάτων στην λειτουργική διαφοροποίηση των μυελοειδών ΔΚ.	156
4.6.4.2 Αξιολόγηση της <i>in vitro</i> αντιλειτουργικής δράσης των ανασυνδυασμένων πολυεπιτοπικών πρωτεϊνικών τμημάτων της LieIF.	161
4.7. Εφαρμογή της ανασυνδυασμένης LieIF σε πειραματικά πρωτόκολλα εμβολιασμών.	165
4.7.1 Εφαρμογή της LieIF σε πειραματικά πρωτόκολλα ανοσοθεραπείας έναντι της λεισμανίασης.	165
4.7.2 Ανοσιακή μεταφορά ΔΚ ευαισθητοποιημένων με την LieIF σε <i>in vivo</i> πειραματικό μοντέλο δερματικής λεισμανίασης.	173
5. Συζήτηση	177
5.1 <i>In vitro</i> αντιλειτουργική δράση του ευκαρυωτικού παράγοντα έναρξης eIF του παρασίτου <i>L. infantum</i> (LieIF).	178
5.1.1 Προστατευτικός και ανοσοθεραπευτικός ρόλος της LieIF, <i>in vitro</i> .	178
5.1.2 Μηχανισμός προστασίας των LieIF - ευαισθητοποιημένων μακροφάγων.	180
5.2 Μελέτη ανοσογονικών ιδιοτήτων της LieIF.	185
5.2.1 Λειτουργική διαφοροποίηση των δένδριτικών κυττάρων.	185
5.2.2 Υποδοχείς τύπου Toll.	187
5.2.3 Αξιολόγηση της δράσης της ανασυνδυασμένης LieIF ως ανοσοενισχυτικό, σε <i>in vivo</i> πειραματικό μοντέλο ποντικού.	189

5.3 Αντιγονική χαρτογράφηση της LieIF και προσδιορισμός των ενεργών ανοσογονικών περιοχών της.....	191
5.3.1 Προσδιορισμός T αντιγονικών επιτόπων στην ανασυνδυασμένη LieIF.....	191
5.3.2 <i>In silico</i> ανάλυση της LieIF.....	192
5.3.3 Εκτίμηση ανοσογονικών ιδιοτήτων των τμημάτων της LieIF.....	193
5.4 Εφαρμογή της LieIF σε πειραματικά πρωτόκολλα ανοσοθεραπείας και εμβολιασμού.	196
5.4.1 Εφαρμογή της LieIF σε πειραματικό πρωτόκολλο ανοσοθεραπείας έναντι της σπλαγχνικής λείσμανιάσης.	196
5.4.2 Ανοσιακή μεταφορά LieIF – ευαισθητοποιημένων ΔΚ σε πειραματικό μοντέλο δερματικής λείσμανιάσης.	199
5.5 Επίλογος.....	200
6. Περίληψη	201
6. Περίληψη	202
6. Summary.....	204
7. Βιβλιογραφία	206
7.1 Βιβλιογραφικές αναφορές	207
7.2 Βιβλιογραφικές αναφορές εικόνων και πινάκων.....	218
Παράρτημα I	220
Συντμήσεις.....	220

1. Εισαγωγή

1.1 Παράσιτο του γένους *Leishmania*.

1.1.1 Ιστορικά στοιχεία και συστηματική κατάταξη του παρασίτου.

Τα πρωτόζωα του γένους *Leishmania* αποτελούν υποχρεωτικά ενδοκυτταρικά παράσιτα που προκαλούν την νόσο λείσμανίαση και περιγράφηκαν για πρώτη φορά το 1903, όταν οι Leishman και Donovan παρατήρησαν ανεξάρτητα την ύπαρξή τους στο σπλήνα ασθενών από την Ινδία που υπέφεραν από kala azar (μαύρος πυρετός), τη σπλαγχνική μορφή της νόσου [1]. Συγχρόνως, ο Ross δημιούργησε το γένος *Leishmania* για το συγκεκριμένο παράσιτο. Λίγο αργότερα, το 1908, οι Nicolle και Comte, ανέφεραν την πρώτη μόλυνση σκύλου, στην Τυνησία [2].

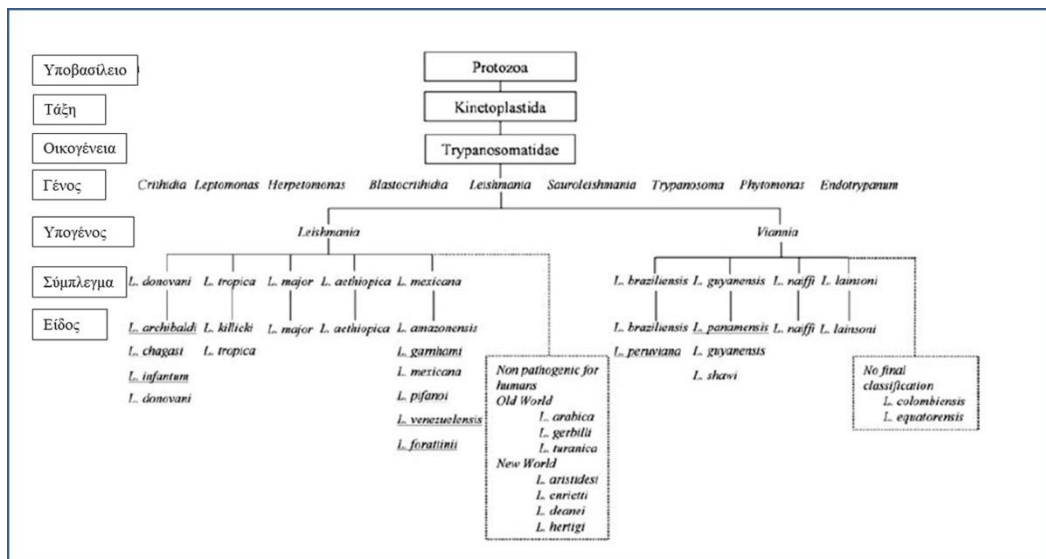
Τα παράσιτα του γένους *Leishmania* ανήκουν στην τάξη των κινητοπλαστοειδών (Kinetoplastida) και στην οικογένεια των τρυπανοσωματιδών (Trypanosomatidae) (Εικ. 1.1).

Βασίλειο: Πρώτιστα (Protista)
Υποβασίλειο: Πρωτόζωα (Protozoa)
Συνομοταξία: Σαρκομαστιγοφόρα (Sarcomastigophora)
Υποσυνομοταξία: Μαστιγοφόρα (Mastigophora)
Κλάση: Ζωομαστιγοφόρα (Zooastigophorea)
Τάξη: Κινητοπλαστοειδή (Kinetoplastida)
Υπότάξη: Τρυπανοσωματινές (Trypanosomatina)
Οικογένεια: Τρυπανοσωματιδες (Trypanosomatidae)
Γένος: Λείσμανια (<i>Leishmania</i>)

Εικόνα 1.1. Συστηματική ταξινόμηση του παρασίτου *Leishmania spp.* Προσαρμοσμένη σχηματική απεικόνιση από Garcia-Almagro, D., 2005.

Η *Leishmania* και άλλα πρωτόζωα της τάξης αυτής, κατατάσσονται μεταξύ των πιο πρωτόγονων ευκαρυωτικών οργανισμών [3]. Η συστηματική ταξινόμηση του παρασίτου έχει υποστεί συχνές μεταβολές και αναπροσαρμογές [4]. Τα διάφορα είδη του παρασίτου, δεν μπορούν να διαφοροποιηθούν με μορφολογικά κριτήρια και ως εκ τούτου, χρησιμοποιήθηκαν άλλα κριτήρια. Παλαιότερα, η διάκριση των ειδών, στηριζόταν σε βιολογικά και οικολογικά κριτήρια, όπως οι ενδιάμεσοι ξενιστές και η θέση ανάπτυξης του παρασίτου στο έντερο του ενδιάμεσου ξενιστή, η γεωγραφική κατανομή, ο τροπισμός και οι κλινικές εκδηλώσεις της νόσου. Με την πορεία των χρόνων τα κριτήρια αυτά αποδείχθηκαν ανεπαρκή και έδωσαν τη θέση τους σε άλλα, όπως οι πολυμορφισμοί του

κινητοπλαστικού DNA, οι πρωτεΐνες και τα αντιγόνα του παρασίτου [5]. Η τεχνική αναφοράς για τη διάκριση μεταξύ των διαφόρων ειδών *Leishmania* πραγματοποιείται με κριτήριο την ύπαρξη χαρακτηριστικών ισοενζυμικών μορφών μεταξύ 12 ενζύμων (MLEE). Μέσα στο ίδιο είδος μπορούν να διακριθούν διαφορετικές ισοενζυμικές μορφές, ζυμοδέματα (zymodemes), το κάθε ένα από τα οποία χαρακτηρίζεται από ένα συγκεκριμένο πρότυπο ισοενζύμων [6]. Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί περίπου 30 είδη του γένους *Leishmania*, η πλειοψηφία των οποίων (περίπου 20 είδη) μολύνει τον άνθρωπο και προκαλεί τις διάφορες κλινικές μορφές λεισμανιάσης (Εικ. 1.2) [7].



Εικόνα 1.2. Συστηματική ταξινόμηση των ειδών του παρασίτου *Leishmania* spp. Προσαρμοσμένη σχηματική απεικόνιση από Banuls, A.L. et al., 2007.

1.1.2 Μετάδοση του παρασίτου.

Τα παράσιτα του γένους *Leishmania* μεταδίδονται στους σπονδυλωτούς ξενιστές (τελικούς ξενιστές) μέσω του δήγματος των ενδιάμεσων ξενιστών (φορείς μετάδοσης), των θηλυκών εντόμων της οικογένειας των ψυχροειδών (γένη *Lutzomyia* και *Phlebotomus*) [8]. Από τα 1000 σχεδόν συνολικά είδη σκνίπας, λιγότερα από 50 είδη είναι φορείς του παρασίτου παγκοσμίως, εξαιτίας της αδυναμίας ορισμένων ειδών σκνίπας να υποστηρίξουν την ανάπτυξη των μολυσματικών μορφών στο μικροπεριβάλλον τους [9]. Επίσης, παρατηρείται ποικιλία των φορέων μετάδοσης του παρασίτου ανάλογα με την γεωγραφική κατανομή. Η σκνίπα του γένους *Lutzomyia* συναντάται στις χώρες του Νέου Κόσμου, αντίθετα με το γένος *Phlebotomus* που εντοπίζεται κυρίως στις χώρες του Παλαιού Κόσμου (Νότια Ευρώπη, Ασία, Αφρική). Στην Ελλάδα υπάρχουν 13 είδη

σκνίπας, 10 από τα οποία ανήκουν στο γένος *Phlebotomus* και 3 στο γένος *Sergentomyia* [10].

Το επιδημιολογικό πρότυπο μετάδοσης της νόσου, εξαρτάται από παραμέτρους που σχετίζονται τόσο με τον ενδιάμεσο όσο και με τον τελικό ξενιστή του παρασίτου. Πιο συγκεκριμένα, εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις ανθρωπόφιλες ή ζωόφιλες διατροφικές συνήθειες του ενδιάμεσου ξενιστή και τον οικολογικό θώκο που αυτός καταλαμβάνει, π.χ. αν βρίσκεται κοντά σε οικισμούς ή στην ύπαιθρο. Ανάλογα με το είδος του τελικού ξενιστή, υπάρχουν δύο βασικοί τύποι επιδημιολογικών κύκλων: η ζωννόσος (ζώο-σκνίπα-ζώο) και η ανθρωπονόσος (άνθρωπος-σκνίπα-άνθρωπος) [11].

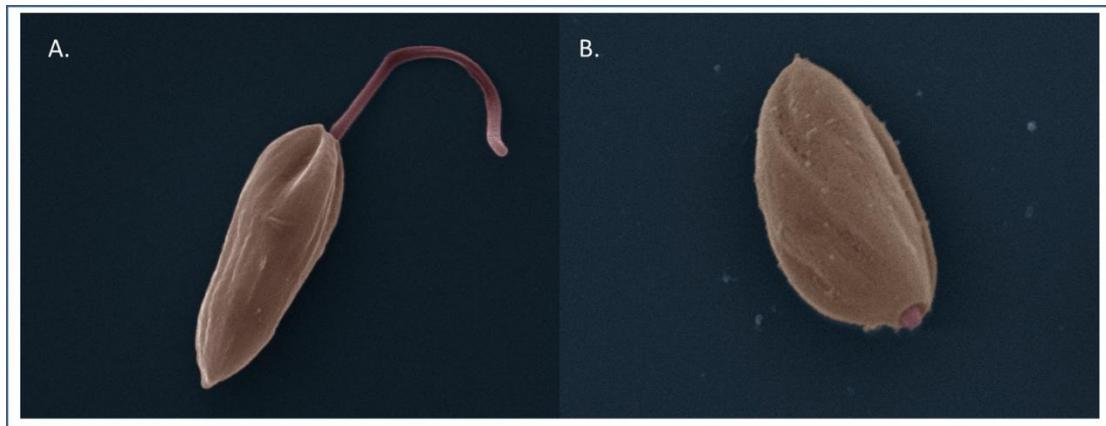
Η λεϊσμανίαση είναι κυρίως ζωννόσος που προκαλείται συνήθως από την *L. infantum* και ο οικόσιτος σκύλος αποτελεί την κύρια δεξαμενή του παρασίτου [11]. Οι κυριότερες φυλές σκύλων που εμφανίζουν την νόσο με μεγαλύτερη συχνότητα είναι ο γερμανικός ποιμενικός, τα μπόξερ και τα ντόμπερμαν [12, 13]. Επίσης, μεταξύ άλλων ξενιστών, συναντώνται τα τρωκτικά, τα μαρσιποφόρα, οι πίθηκοι, οι κυνίδες, τα άγρια σαρκοφάγα, η κόκκινη αλεπού, η αιγυπτιακή μαγκούστα, το κουνάβι των πεύκων, ενώ προσφάτως, καταγράφηκαν και μολυσμένοι ιβηρικοί λαγοί [9, 14]. Η ζωννοτική λεϊσμανίαση αποτελεί μία αναδυόμενη νόσο και σε μη ενδημικές περιοχές, όπου απουσιάζουν οι σκνίπες φορείς. Η εμφάνιση αυτή οφείλεται κυρίως στη μεταφορά των σκύλων από ενδημικές περιοχές [9, 15]. Η κλασσική οδός μετάδοσης του παρασίτου είναι μέσω των μολυσμένων σκνιπών. Παρόλα αυτά, υπάρχουν αναφορές κάθετης μετάδοσης, μετάδοσης μέσω σεξουαλικής επαφής των σκύλων καθώς και μέσω μετάγγισης αίματος [15].

Παρόλα αυτά, η λεϊσμανίαση μπορεί να είναι και ανθρωπονόσος, με τις σκνίπες να μεταδίδουν το παράσιτο ανάμεσα στους ανθρώπους (τελικούς ξενιστές). Η ανθρωπονοτική μετάδοση είναι χαρακτηριστική για τα είδη του συμπλέγματος *L. tropica* (δερματική λεϊσμανίαση) και *L. donovani* (σπλαγχνική λεϊσμανίαση) [16]. Ο άνθρωπος έχει καταγραφεί ως ο μόνος ξενιστής για το στέλεχος *L. donovani*. Παρατηρείται αύξηση του αριθμού των κρουσμάτων της ανθρωπονοτικής λεϊσμανίασης σε μη ενδημικές περιοχές όπως η Γαλλία, η Γερμανία, η Ιταλία και το Ηνωμένο Βασίλειο. Αξιοσημείωτο είναι επίσης το γεγονός πως η *L. donovani*, εισήχθηκε πρόσφατα στην Κύπρο [9]. Ο αυξανόμενος ρυθμός ταξιδίων και η μετάδοση της νόσου μέσω άλλων οδών (συγγενώς ή μέσω της παρεντερικής οδού μετά από μετάγγιση αίματος ή μετά από τρύπημα με μολυσμένη βελόνα), χωρίς τη μεσολάβηση του ενδιάμεσου ξενιστή, μπορεί να εξηγήσει

αυτές τις καταγραφές [1, 9]. Τέλος, η κάθετη οδός μετάδοσης από την μητέρα στο παιδί, αναφέρεται σπάνια [16].

1.1.3 Αναπτυξιακές μορφές του παρασίτου.

Τα παράσιτα του γένους *Leishmania* έχουν διμορφικό κύκλο ζωής, με δύο κύριες μορφές, την προμαστιγωτή και την αμαστιγωτή μορφή (Εικ. 1.3) [17]. Οι προμαστιγωτές μορφές είναι αυτές που εντοπίζονται εξωκυττάρια, στον πεπτικό σωλήνα του ενδιάμεσου ξενιστή. Είναι επιμήκεις, με μέγεθος $15 - 20 \mu\text{m} \times 1,5 - 3,5 \mu\text{m}$ και φέρουν μαστίγιο μεγέθους $15 - 28 \mu\text{m}$, το οποίο χρησιμεύει τόσο σαν όργανο κίνησης όσο και σαν όργανο προσκόλλησης, ενώ η περί τη βάση του περιοχή εμπλέκεται σε διαδικασίες ενδοκυττάρωσης και εξωκυττάρωσης διαφόρων ουσιών [4, 18].



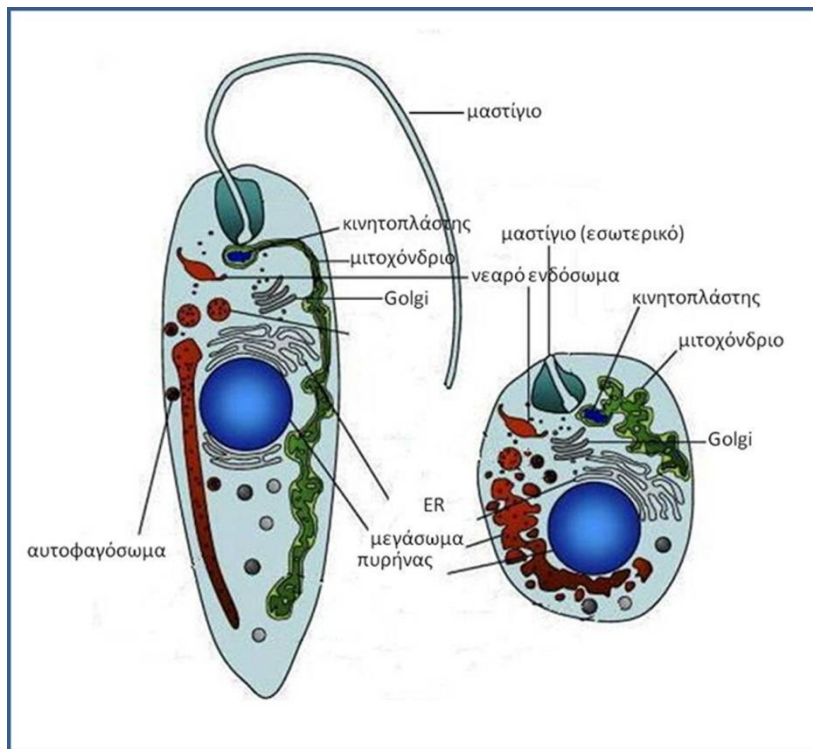
Εικόνα 1.3. Προμαστιγωτή (A) και αμαστιγωτή (B) μορφή του παρασίτου *L. mexicana*.

(http://en.wikipedia.org/wiki/Leishmania_mexicana)

Οι αμαστιγωτές μορφές είναι υποχρεωτικά ενδοκυττάρια παράσιτα που εντοπίζονται στα φαγολυσosomalικά χυμοτόπια των φαγοκυττάρων του τελικού ξενιστή. Είναι ωοειδείς σχηματισμοί με μέγεθος $2-5 \mu\text{m}$ σε διάμετρο και στερούνται ορατού με το κοινό μικροσκόπιο μαστιγίου, καθώς αυτό δεν εξέρχεται του κυτταρικού σώματος (Εικ. 1.3, 1.4) [5].

Ωστόσο, η γενική δομή και σύσταση και των δύο σταδίων είναι όμοια, κύρια στοιχεία της οποίας είναι η παρουσία ενός δικτύου μικροσωληνίσκων που διατηρεί τη μορφολογία του κυττάρου, και η ύπαρξη του κινητοπλάστη (Εικ. 1.4). Ο κινητοπλάστης αποτελεί ένα οργανίδιο με λειτουργίες ανάλογες του μιτοχονδρίου και περιέχει το κινητοπλαστικό DNA [19]. Το γενετικό υλικό του κινητοπλάστη (kDNA), απαρτίζεται από ένα γιγαντιαίο

δίκτυο εκατοντάδων κυκλικών μορίων DNA που ονομάζονται μινι-κύκλοι (minicircles) και μαξι-κύκλοι (maxi-circles) [20].



Εικόνα 1.4. Σχηματική αναπαράσταση των κύριων ενδοκυτταρικών οργανιδίων της προμαστιγωτής μορφής (αριστερά) και της αμαστιγωτής μορφής (δεξιά), του παρασίτου *Leishmania spp.* Προσαρμοσμένη σχηματική αναπαράσταση από Besteiro, S., *et al.*, 2007.

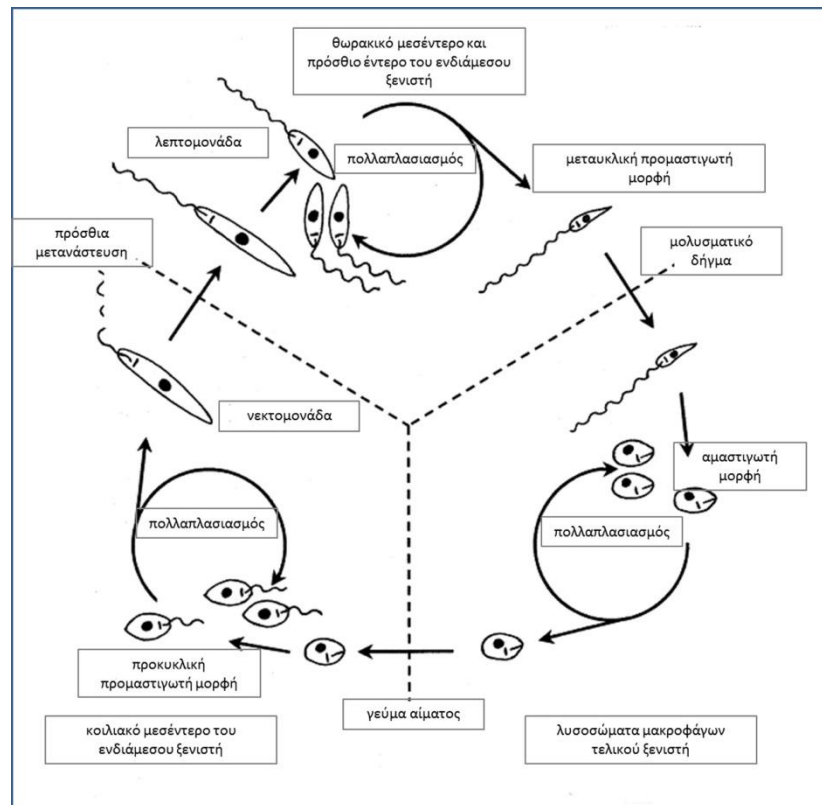
1.1.4 Κύκλος ζωής του παρασίτου.

1.1.4.1 Είσοδος του παρασίτου στον ενδιάμεσο ξενιστή.

Έξω από τον τελικό ξενιστή, ο κύκλος ζωής του παρασίτου περιορίζεται στην πεπτική οδό του ενδιάμεσου ξενιστή (της σκνίπας) [21]. Κατά το δήγμα αίματος της σκνίπας, αναρροφάται η αμαστιγωτή μορφή, που θεωρείται η λοιμογόνος μορφή για τον ενδιάμεσο ξενιστή [16]. Το δήγμα αίματος, περνά στο οπίσθιο μεσέντερο της σκνίπας και στη συνέχεια τα παράσιτα, καθώς μεταναστεύουν στο πρόσθιο μεσέντερο, υπόκεινται σε πληθώρα μετασχηματισμών κατά τη διαδικασία της μετακυκλογένεσης (Εικ. 1.5) [21, 22].

Ο όρος μετακυκλογένεση χαρακτηρίζεται από ένα συνδυασμό μορφολογικών, μεταβολικών, δομικών και λειτουργικών αλλαγών προκειμένου να εξασφαλιστεί η

επιβίωση του παρασίτου στον ενδιάμεσο ξενιστή. Πιο συγκεκριμένα, οι αμαστιγωτές μορφές διαφοροποιούνται αρχικά σε μικρές και νωθρές προμαστιγωτές μορφές (προκυκλικές) με κύριο χαρακτηριστικό το μικρό μαστίγιο και τον έντονο ρυθμό πολλαπλασιασμού. Στη συνέχεια, μετατρέπονται σε μεγαλύτερες δομές που μεταναστεύουν προς το πρόσθιο μεσέντερο, τις νεκτομονάδες, οι οποίες διαφοροποιούνται περαιτέρω στις λεπτομονάδες [21, 22].



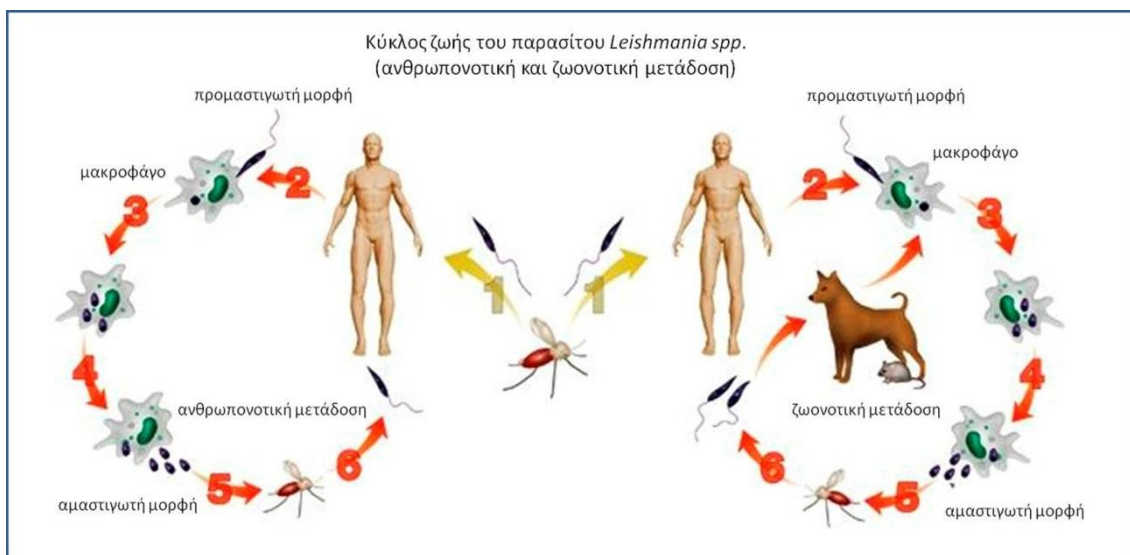
Εικόνα 1.5. Σχηματική αναπαράσταση του κύκλου ζωής του παρασίτου *Leishmania* spp. Διακρίνονται τρεις κύριες αναπτυξιακές φάσεις κατά τον πολλαπλασιασμό του παρασίτου: η αμαστιγωτή μορφή στο φαγολυσοσώμα των μακροφάγων, η προκυκλική προμαστιγωτή μορφή στο κοιλιακό μεσέντερο του ενδιάμεσου ξενιστή και η λεπτομονάδα στο θωρακικό μεσέντερο. Τροποποιημένη σχηματική απεικόνιση από Gossage, S.M. et al, 2003.

Τέλος, στο φάρυγγα της σκνίπας, συναντώνται δύο αναπτυξιακά στάδια, οι απομονάδες και οι μετακυκλικές μορφές. Χαρακτηριστικά των απομονάδων είναι το μικρό μαστίγιο και η έλλειψη κινητικότητας. Αντίστοιχα, οι μετακυκλικές μορφές αποτελούν τις μολυσματικές μορφές του παρασίτου με κύρια χαρακτηριστικά τους το μικρό κυτταρικό σώμα, το επίμηκες μαστίγιο και την έντονη κινητικότητα. Ο εκτιμώμενος χρόνος που απαιτείται για την ολοκλήρωση των αναπτυξιακών σταδίων του παρασίτου στο εσωτερικό της σκνίπας, κυμαίνεται από 6 έως 9 ημέρες ανάλογα το είδος του παρασίτου [21].

1.1.4.2 Είσοδος του παρασίτου στον τελικό ξενιστή.

Οι μολυσματικές προμαστιγωτές μορφές (μετακυκλικές) που επώαστηκαν από τον ενδιάμεσο ξενιστή, στη συνέχεια ενοφθαλμίζονται, κατά τη διάρκεια ενός νέου γεύματος αίματος, στο δέρμα των τελικών ξενιστών. Οι μετακυκλικές προμαστιγωτές μορφές του παρασίτου, είναι προσαρμοσμένες για την επιβίωσή τους στον τελικό ξενιστή [21]. Χαρακτηρίζονται από την ικανότητά τους να αναπαράγονται, να ανθίστανται στους δραστικούς λυτικούς μηχανισμούς του ξενιστή, να εισβάλλουν στα κύτταρά του και να δημιουργούν μέσα σε αυτά ένα μικροπεριβάλλον, ευνοϊκό για την επιβίωση και για τον πολλαπλασιασμό τους.

Τα μολυσματικά παράσιτα διαπερνούν τον επιδερμικό φραγμό και εισέρχονται στους ιστούς του, όπου προσλαμβάνονται από τα μακροφάγα (Εικ. 1.6) [9, 23]. Η πρόσδεση των μορίων του συμπληρώματος C3b, στην επιφάνεια των προμαστιγωτών μορφών, επιτρέπει την προσκόλληση αυτών στα μακροφάγα του ξενιστή, μέσω του υποδοχέα CR1. Ένα μόριο του παρασίτου που εμπλέκεται στην προσκόλληση αυτή είναι η γλυκοπρωτεΐνη gp63 [24].



Εικόνα 1.6. Βιολογικός κύκλος και μετάδοση του παρασίτου. Κατά το γεύμα αίματος της σκνίπας, οι προμαστιγωτές μορφές εισέρχονται στα μακροφάγα του τελικού ξενιστή, όπου μετασχηματίζονται σε αμαστιγωτές μορφές και πολλαπλασιάζονται με δυαδική σχάση. Ακολουθεί λύση των κυττάρων και απελευθέρωση των αμαστιγωτών μορφών, οι οποίες προσλαμβάνονται κατά το επόμενο δήγμα του εντόμου και μετασχηματίζονται σε προμαστιγωτές μορφές στο μεσέντερο αυτού. Προσαρμοσμένη σχηματική απεικόνιση από Kumar, R. and Engwerda, C., 2014.

Στο εσωτερικό των στρατολογημένων μακροφάγων, εντοπίζονται στο φαγολυσόσωμα, όπου μετατρέπονται στην αμαστιγωτή μορφή και πολλαπλασιάζονται, με τελικό αποτέλεσμα τη ρήξη του κυττάρου-στόχου. Οι αμαστιγωτές μορφές που απελευθερώνονται, μολύνουν νέα κύτταρα αποικίζοντας διάφορους ιστούς του ξενιστή, όπως το δέρμα, οι βλεννογόνοι υμένες, το ήπαρ και ο σπλήνας [25]. Έχουν παρατηρηθεί μολύνσεις πολλαπλών κυτταρικών τύπων με αμαστιγωτές μορφές του παρασίτου, όπως των μονοκυττάρων, των πολυμορφοπύρηνων ουδετρόφιλων και των ινοβλαστών [26, 27]. Ο ιστικός τροπισμός εξαρτάται από το γενετικό υπόβαθρο τόσο του ξενιστή όσο και του παρασίτου και προσδιορίζει την χαρακτηριστική ανοσοπαθολογία των διαφόρων ειδών *Leishmania*.

Ο βιολογικός κύκλος του παρασίτου ολοκληρώνεται όταν ο μη μολυσμένος ενδιάμεσος ξενιστής γίνει φορέας του παρασίτου λαμβάνοντας μολυσμένα κύτταρα, κατά τη διάρκεια ενός νέου γεύματος αίματος.

1.2 Η νόσος λεϊσμανίαση.

1.2.1 Κλινικές μορφές της λεϊσμανίασης.

Η λεϊσμανίαση χαρακτηρίζεται από πολυπλοκότητα και ποικιλία κλινικών εκδηλώσεων, οι οποίες κυμαίνονται από αυτοϊάσιμες δερματικές αλλοιώσεις έως θανατηφόρα αποίκιση των σπλαγχνικών οργάνων [16, 28]. Η βαρύτητα των κλινικών εκδηλώσεων εξαρτάται τόσο από το είδος του παρασίτου όσο και από παράγοντες που επηρεάζουν την επάρκεια του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή, όπως είναι ο υποσιτισμός και η συλλοίμωξη με τον ιό HIV [16].

Οι βασικές κλινικές μορφές της νόσου είναι δύο, η δερματική και η σπλαγχνική μορφή. Η δερματική λεϊσμανίαση (cutaneous leishmaniasis – CL) προκαλείται κυρίως από δύο υπογένη *Leishmania*, την *L. (Leishmania)* στις παλαιοτροπικές περιοχές (Ευρασία και Αφρική) και την *L. (Viannia)* στις νεοτροπικές περιοχές (Αμερική). Πιο συγκεκριμένα, προκαλείται κυρίως από τα είδη *L. major*, *L. tropica* και *L. aethiopica* στις παλαιοτροπικές περιοχές και *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis* και *L. panamensis* στις νεοτροπικές περιοχές (Εικ. 1.7) [28].

Είδος του παρασίτου <i>Leishmania</i>	Κλινική μορφή	Τελικός ξενιστής	Ενδιάμεσος ξενιστής
<i>Leishmania infantum chagasi</i>	VL	Dogs Humans	<i>Lutzomyia longipalpis</i> , <i>Lutzomyia evansi</i>
<i>Leishmania infantum</i>	VL, CL	Dogs	<i>Papatasi perniciosus</i> , <i>Papatasi ariasi</i> , <i>Papatasi tobbi</i> , <i>Papatasi neglectus</i>
<i>Leishmania donovani</i>	VL	Humans	<i>Papatasi argentipes</i> , <i>Papatasi orientalis</i> , <i>Papatasi martini</i>
<i>Leishmania tropica</i>	CL	Humans	<i>Papatasi sergenti</i>
<i>Leishmania major</i>	CL	Rodents	<i>Papatasi papatasi</i> , <i>Papatasi duboscqi</i> , <i>Papatasi salehi</i> , <i>Papatasi bergeroti</i>
<i>Leishmania braziliensis</i>	CL, ML	Dogs Humans Rodents	<i>Lutzomyia intermedia</i> , <i>Lutzomyia whitmani</i> , <i>Lutzomyia migonei</i> , <i>Lutzomyia wellcomei</i> , <i>Lutzomyia ovallesi</i>
<i>Leishmania amazonensis</i>	CL, DCL	Rodents	<i>Lutzomyia flaviscutellata</i>
<i>Leishmania guyanensis</i>	CL, ML	Marsupials Rodents	<i>Lutzomyia umbratilis</i> , <i>Lutzomyia anduzei</i> , <i>Lutzomyia whitmani</i>
<i>Leishmania mexicana</i>	CL, DCL	Rodents Marsupials	<i>Lutzomyia olmeca olmeca</i> , <i>Lutzomyia shannoni</i> , <i>Lutzomyia diabolica</i>
VL, Σπλαγγη	CL, Δερματική	ML, Στεννογονοδερματική	DCL, Διάχυτη δερματική

Εικόνα 1.7. Συσχέτιση των διαφορετικών ειδών του παρασίτου του γένους *Leishmania spp.* με τις κλινικές μορφές της νόσου καθώς και με τον τελικό και ενδιάμεσο ξενιστή. Προσαρμοσμένη σχηματική απεικόνιση από Oliveira, F. *et al.*, 2013.

Η δερματική λείσμανίαση χαρακτηρίζεται από δερματικές βλάβες στο σημείο του δήγματος της σκνίπας (Εικ. 1.8) [14, 29]. Οι πληγές ποικίλλουν από μικρές αυτοϊάσιμες ελκώσεις έως κοκκιοματώδη οζίδια και μεγάλες ερυθματώδεις πληγές [25]. Οι περισσότεροι ασθενείς, εμφανίζουν μία ή δύο πληγές, συνήθως στα εκτιθιμένα σημεία, που κυμαίνονται σε διάμετρο από 0,5 έως 3 εκατοστά [27, 30]. Η νόσος μπορεί να παραμείνει υποκλινική ή να εξελιχθεί μετά από μια περίοδο επώασης που μπορεί να διαρκέσει από 1 έως 12 εβδομάδες [27].



Εικόνα 1.8. Κύριες κλινικές μορφές λείσμανίασης. Δερματική (αριστερά) και σπλαγγική (δεξιά) λείσμανίαση. (www.who.int)

Οι χρόνιες μολύνσεις και η φλεγμονή μπορούν να διαρκέσουν για πολλούς μήνες ή χρόνια και συχνά οδηγούν σε σημαντική ιστική καταστροφή και μόνιμες ουλές [28]. Οι βλάβες που οφείλονται στην *L. major* εμφανίζουν ταχεία εξέλκωση ενώ οι βλάβες από τις *L. tropica* και *L. aethiopica* εξελκώνονται μετά από πολλούς μήνες. Και στις δύο περιπτώσεις, τα έλκη μπορεί να είναι πολλαπλά και κατά κανόνα αυτοϊώνονται αφήνοντας ουλή. Παρόλα αυτά έχουν αναφερθεί ορισμένα είδη του παρασίτου που προκαλούν μη ιάσιμη δερματική λεισμανίαση [16].

Η σπλαγχνική μορφή της νόσου (visceral leishmaniasis – VL) (Εικ. 1.8) προκαλείται από τα είδη του συμπλέγματος *L. donovani* (*L. donovani*, *L. infantum*, *L. chagasi*) (Εικ. 1.7) [31]. Περιστασιακά, η *L. tropica* στην Μέση Ανατολή και η *L. amazonensis* στην Νότια Αμερική μπορούν επίσης να προκαλέσουν σπλαγχνική λεισμανίαση. Αποτελεί την πιο σοβαρή κλινική μορφή της νόσου, καθώς το παράσιτο, αποικίζει τα εσωτερικά όργανα του ξενιστή (ήπαρ, σπλήνας και μυελός των οστών). Στην πλειονότητα των περιπτώσεων η μόλυνση παραμένει ασυμπτωματική ή υποκλινική. Ο χρόνος επώασης του παρασίτου κυμαίνεται από 2 εβδομάδες έως 18 μήνες, με τις πιο έντονες φλεγμονώδεις αντιδράσεις στα όργανα να εμφανίζονται 2 έως 8 μήνες μετά την μόλυνση [23, 32]. Η εκδήλωση της σπλαγχνικής λεισμανίασης χαρακτηρίζεται κλινικά από πυρετό (εισβάλλει βαθμιδόν, χαρακτηρίζεται από δύο ημερήσιες αιχμές, διαρκεί 1-6 εβδομάδες και κατόπιν εξαφανίζεται, για να επανεμφανισθεί σε ακανόνιστα χρονικά διαστήματα), αδυναμία, ανορεξία, απώλεια βάρους, ταχυκαρδία, γαστρεντερικές διαταραχές, μυϊκή ατροφία, ηπατοσπληνομεγαλία, υπαλβουμιναιμία και πανκυτταροπενία. Η ασθένεια, χωρίς θεραπεία μπορεί να οδηγήσει στον θάνατο, με ποσοστό θνησιμότητας 75 - 95%. Το ποσοστό θνησιμότητας μπορεί να φτάσει και το 10 - 20% ακόμα και μετά από επιτυχή θεραπεία. Ο θάνατος επέρχεται συνήθως μέσα σε δύο χρόνια και οφείλεται σε επιπλοκές λόγω μόλυνσης με άλλα παράσιτα, βακτήρια ή ιούς, σε εγκεφαλική αιμοραγία, σε σηψαιμία και σε μυοκαρδιακή έκπτωση [23].

Εκτός από τις δύο κύριες κλινικές μορφές της νόσου, εμφανίζονται και αρκετές παραλλαγές. Τέτοιες είναι η διάχυτη δερματική (diffuse cutaneous leishmaniasis - DCL), η βλεννογονοδερματική (mucocutaneous leishmaniasis – MCL), η δερματική λεισμανίαση μετά από σπλαγχνική λεισμανίαση (post kala-azar dermal leishmaniasis – PKDL) και η σπλαγχοτροπική (viscerotropic) λεισμανίαση. Η διάχυτη δερματική λεισμανίαση αποτελεί μια χρόνια πολυπαρασιτική μορφή που εκδηλώνεται με τη μορφή διάχυτων δερματικών βλαβών (βλατίδων, πλακών και όζων) (Εικ. 1.9) [33].



Εικόνα 1.9. Κλινικές μορφές λείσμανιάσης. Διάχυτη δερματική (αριστερά) και βλεννογονοδερματική (δεξιά) λείσμανιάση. (www.who.int)

Η βλεννογονοδερματική λείσμανιάση, χαρακτηρίζεται από την καθυστερημένη ανάπτυξη μεταστατικών πληγών και την καταστροφή του βλεννογόνου του στόματος, της ρινικής κοιλότητας, του φάρυγγα και του λάρυγγα (Εικ. 1.9) [27]. Η δερματική λείσμανιάση μετά από σπλαγχνική λείσμανιάση, εμφανίζεται με ποσοστό 20 - 60%, ανάλογα με την γεωγραφική κατανομή, σε ασθενείς με σπλαγχνική λείσμανιάση. Εκδηλώνεται με διάφορες δερματικές βλάβες και μπορεί να εμφανιστεί μέχρι και 20 χρόνια μετά την αρχική μόλυνση. Τέλος, η σπλαγχοτροπική λείσμανιάση χαρακτηρίζεται από περιορισμένου βαθμού παρασιτισμό των οργάνων του ξενιστή [28].

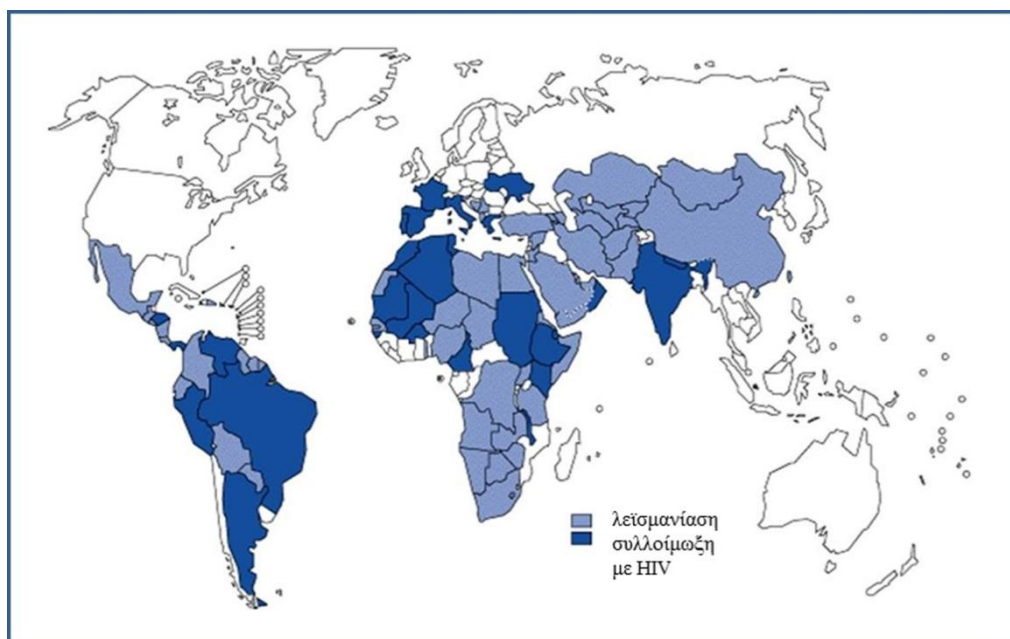
1.2.2 Επίπτωση της νόσου.

Η λείσμανιάση είναι μια παραμελημένη τροπική ασθένεια που έχει συνδεθεί με συνθήκες φτώχειας και υποσιτισμού [23]. Κατατάσσεται δεύτερη σε θνησιμότητα, καθώς είναι η πιο σημαντική πρωτοζωϊκή παρασιτική νόσος μετά την ελονοσία, και ένατη στην παγκόσμια ανάλυση των μολυσματικών ασθενειών [34, 35].

Σύμφωνα με τον παγκόσμιο οργανισμό υγείας (WHO), ο επιπολασμός της νόσου έχει υποτιμηθεί καθώς τις προηγούμενες δεκαετίες, η καταγραφή των περιστατικών ήταν υποχρεωτική μόνο σε 32 από το σύνολο των 98 ενδημικών χωρών [9, 28]. Μέχρι σήμερα,

έχουν καταγραφεί παγκοσμίως 14 εκατομμύρια κλινικά περιστατικά, ενώ 2 εκατομμύρια νέες μολύνσεις σημειώνονται ετησίως (400000 και 1300000 για τη σπλαγχνική και τη δερματική μορφή, αντίστοιχα) [15, 36]. Οι θάνατοι που καταγράφονται λόγω σπλαγχνικής λείσμανιάσης, ανέρχονται στις 40000, ετησίως [23]. Στην περιοχή της Μεσογείου, τα κρούσματα της σπλαγχνικής λείσμανιάσης στον άνθρωπο, καλύπτουν το 5 - 6% της παγκόσμιας έκτασης της νόσου, με μία εκτιμώμενη ετήσια συχνότητα 1200 - 2000 περιστατικά [14]. Στην Ελλάδα, αναφέρονται κατά μέσο όρο 25 περίπου κρούσματα ετησίως, κυρίως σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς, ενώ το νόσημα είναι πολύ συχνό στο σκύλο (0,7-48,7%) [10].

Επιπρόσθετα, στις αναπτυγμένες χώρες, η διαρκής αύξηση των επιβεβαιωμένων περιστατικών συλλοίμωξης με τον ιό HIV, τροποποιεί τον επιπολασμό της νόσου [9]. Παλαιότερα, τα δύο τρίτα των ασθενών της λείσμανιάσης ήταν παιδιά, όμως μετά το 1985 όπου ξεκίνησε η πανδημία του ιού HIV, το 70% των ασθενών είναι ενήλικες [37]. Τέτοια περιστατικά συλλοίμωξης έχουν καταγραφεί σε 35 χώρες παγκοσμίως και η πλειοψηφία αυτών καταγράφεται στη Γαλλία, την Ιταλία, την Πορτογαλία και την Ισπανία (Εικ. 1.10) [9, 14]. Στη Δυτική Ευρώπη, έχουν αναφερθεί 2000 περιστατικά συλλοίμωξης σπλαγχνικής λείσμανιάσης - HIV. Η εισαγωγή της αντιρετροϊκής θεραπείας υψηλής δραστηριότητας (highly active antiretroviral therapy, HAART), έχει βελτιώσει αρκετά την επιδημιολογία της ταυτόχρονης λοίμωξης. Στην περιοχή της Μεσογείου, η HAART μείωσε την επίπτωση της σπλαγχνικής λείσμανιάσης κατά 50 - 60% [14].



Εικόνα 1.10. Γεωγραφική κατανομή περιστατικών συλλοίμωξης *Leishmania*-HIV.

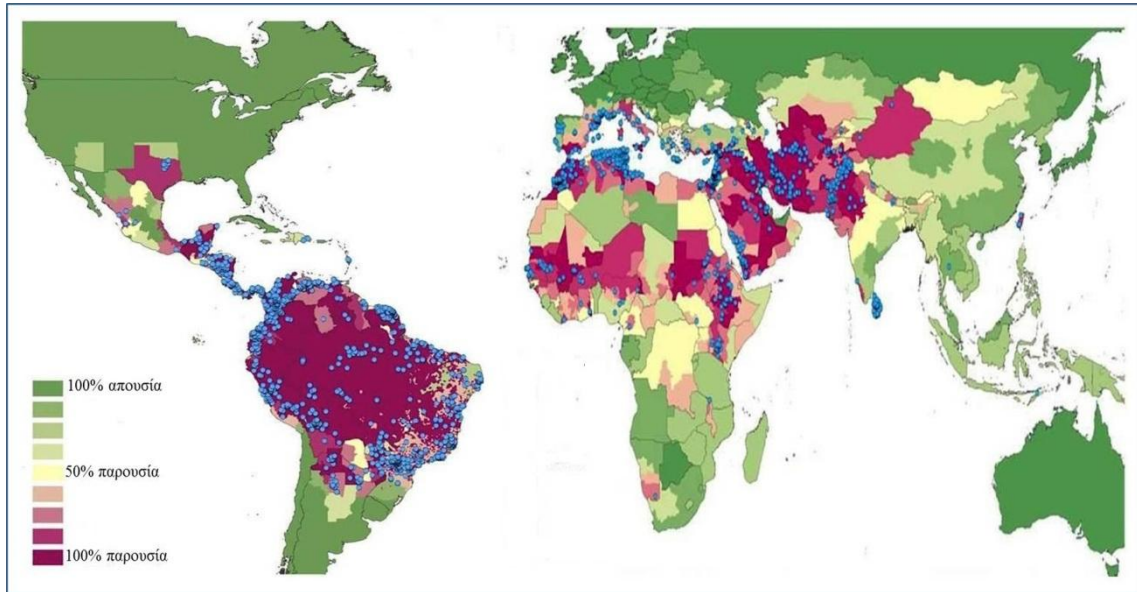
(http://www.who.int/leishmaniasis/burden/hiv_coinfection/burden_hiv_coinfection/en/)

1.2.3 Γεωγραφική κατανομή της λεισμανίασης.

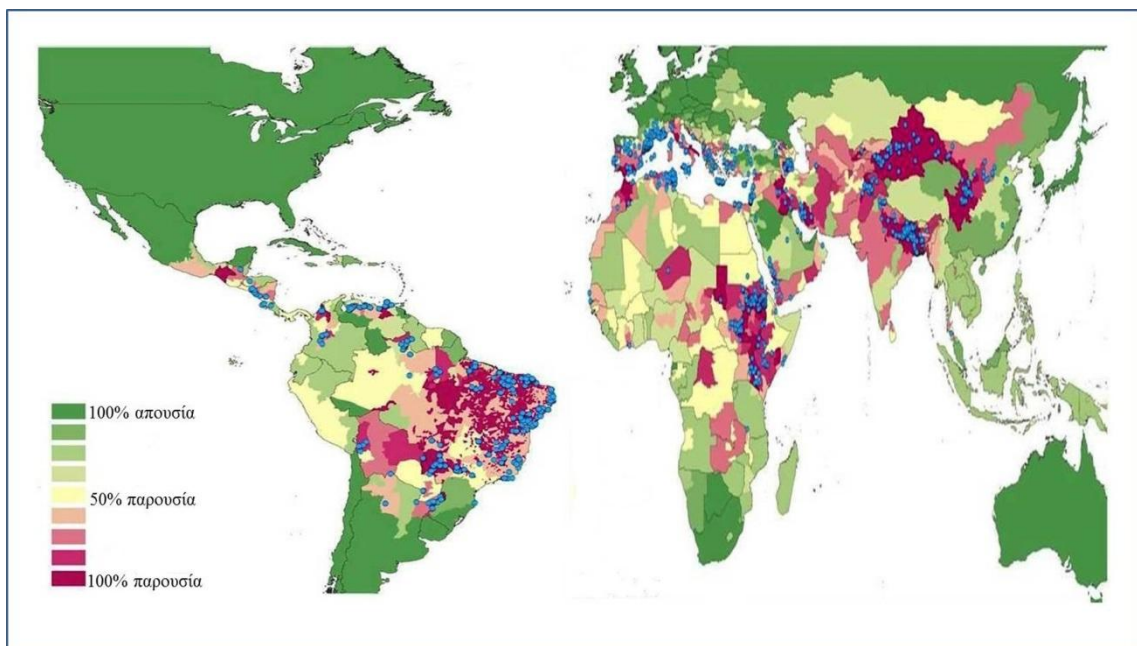
Η γεωγραφική κατανομή και εξάπλωση της νόσου, κατηγοριοποιείται αδρά σε δύο μεγάλες περιοχές, τον «Παλαιό Κόσμο» (Αφρική, Ασία, Ευρώπη) και τον «Νέο Κόσμο» (Αμερική). Παρά την πραγματική εξάπλωση της νόσου σε όλες τις ηπείρους, πλην της Ανταρκτικής, οι περισσότερες ενδημικές περιοχές είναι τροπικές και υποτροπικές. Το σύνολο των χωρών αυτών εκτείνεται από τα τροπικά δάση της Νοτίου Αμερικής, στη Νότια Ευρώπη, στη Μέση Ανατολή, στη Νότια και Ανατολική Αφρική και στην Ινδία [9, 16, 33].

Επιπλέον, η λεισμανίαση καταγράφεται με διαρκώς αυξημένη συχνότητα, σε γεωγραφικά πλάτη όπου οι ενδιάμεσοι ξενιστές απουσιάζουν ή υπάρχουν σε περιορισμένο αριθμό. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν οι Ανατολικές Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής, ο Καναδάς και η Γερμανία. Αξιοσημείωτο είναι επίσης πως η νόσος έχει προσδιοριστεί στην Ταϋλάνδη και στην Αυστραλία [9, 29].

Η πλειοψηφία των περιστατικών δερματικής λεισμανίασης (90%) καταγράφεται στο Αφγανιστάν, στη Μέση Ανατολή και στη Νότια Αμερική (Εικ. 1.11). Η σπλαγχνική λεισμανίαση συναντάται κυρίως στην Ινδία (Εικ. 1.12) [11, 15]. Η συχνότητα της νόσου στην νότια Ευρώπη είναι χαμηλή και η περιοχή της Μεσογείου χαρακτηρίζεται υποενδημική, καλύπτοντας το 5-6% των παγκόσμιων περιστατικών [14]. Αναλυτικότερα, καταγράφεται κυρίως στην Ιταλία, στη Γαλλία, στην Ελλάδα, στην Κροατία και στην Τουρκία. Επιπλέον, υπάρχουν αναφορές για εξάπλωση των επιβεβαιωμένων κρουσμάτων και στη Βόρεια Ευρώπη (Βόρεια Ιταλία και Γερμανία) [14]. Τέλος, η πλειοψηφία των περιστατικών βλεννογονοδερματικής και διάχυτης δερματικής λεισμανίασης, καταγράφεται στη Νότια Αμερική [9].



Εικόνα 1.11. Καταγεγραμμένα περιστατικά δερματικής λεϊσμανίασης (CL) στον Νεό (αριστερά) και Παλαιό Κόσμο (δεξιά). Η εξάπλωση της νόσου κυμαίνεται από 100% απουσία (πράσινο) έως 100% παρουσία (μωβ). Οι μπλε κηλίδες καταδεικνύουν γεωγραφικά κέντρα βάρους των περιστατικών. Προσαρμοσμένη σχηματική απεικόνιση από Pigott, D.M. *et al.*, 2014.



Εικόνα 1.12. Καταγεγραμμένα περιστατικά σπλαγγχνικής λεϊσμανίασης (VL) στον Νεό (αριστερά) και Παλαιό Κόσμο (δεξιά). Η εξάπλωση της νόσου κυμαίνεται από 100% απουσία (πράσινο) έως 100% παρουσία (μωβ). Οι μπλε κηλίδες καταδεικνύουν γεωγραφικά κέντρα βάρους των περιστατικών. Προσαρμοσμένη σχηματική απεικόνιση από Pigott, D.M. *et al.*, 2014.

1.2.4 Διάγνωση της λεισμανίασης.

Οι κύριες διαγνωστικές μέθοδοι της νόσου είναι δύο, η ορολογική και η μικροσκοπική ανίχνευση του παρασίτου σε επιχρίσματα ιστών [9]. Η μικροσκοπική ανίχνευση μπορεί να εφαρμοστεί σε διάφορους τύπους κυττάρων με αντίστοιχα μειονεκτήματα και πλεονεκτήματα. Η χρήση των κυττάρων αίματος, παρά την ευκολία χειρισμού που παρουσιάζει, μειονεκτεί στο χαμηλό παρασιτικό φορτίο. Τα επιχρίσματα σπληνός παρόλο που πλεονεκτούν έναντι των κυττάρων αίματος, καθώς αποτελούν πλούσια πηγή παρασίτων, απαιτούν καλά εκπαιδευμένο προσωπικό κατά τη βιοψία του δείγματος λόγω κινδύνου ρήξης ή αιμορραγίας. Η αντίστοιχη βιοψία ήπατος είναι πιο ασφαλής, αλλά η εύρεση των παρασίτων είναι βέβαιη μόνο σε προχωρημένες μολύνσεις [23].

Οι ορολογικοί έλεγχοι αποτελούν τις περισσότερο χρησιμοποιούμενες μεθόδους έμμεσης διάγνωσης. Σε αυτούς τους ελέγχους, περιλαμβάνονται η δοκιμασία έμμεσου ανοσοφθορισμού, η ανοσοενζυμική δοκιμασία ELISA και η μέθοδος Western blot [1]. Στα μειονεκτήματα της εφαρμογής των μεθόδων αυτών, περιλαμβάνονται η ανάγκη ειδικού εξοπλισμού που αποτρέπει την εφαρμογή τους σε συνθήκες πεδίου.

Μία άλλη μέθοδος διάγνωσης της νόσου, είναι η βιοχημική, η οποία πραγματοποιείται με ισοενζυμική ανάλυση [5]. Κατά την ανάλυση αυτή επιτυγχάνεται προσδιορισμός τόσο των φυλογενετικών ειδών όσο και των στελεχών ή ζυμοδεμάτων του παρασίτου. Η μέθοδος αυτή προϋποθέτει την ανάπτυξη πολλών παρασίτων γεγονός που αυξάνει τον κίνδυνο επιμόλυνσης με βακτήρια ή μύκητες. Η πολυεστιακή ενζυμική ηλεκτροφόρηση (MLEE) προϋποθέτει την καλλιέργεια αξενικών παρασίτων.

Μεταξύ των μεθόδων διάγνωσης, συναντάται και το τεστ Montenegro (τεστ λεισμανίνης), το οποίο δεν είναι αρκετά ειδικό για τα είδη *Leishmania* [6, 9]. Αποδίδει ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα σε ενεργή νόσο και ψευδώς θετικά αποτελέσματα ακόμα και μετά από πετυχημένη θεραπεία διάρκειας δύο μηνών. Επιπλέον, χρησιμοποιούνται οι ανοσοχρωματογραφικές δοκιμασίες που χρησιμοποιούν το ανασυνδυασμένο αντιγόνο K39 και οι δοκιμασίες άμεσης συγκόλλησης, οι οποίες εμφανίζουν υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα [9].

Τέλος, η διάγνωση του παρασίτου επιτυγχάνεται και με μοριακές μεθόδους. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) εμφανίζει υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα και χρησιμοποιείται συχνά ως ο πρωταρχικός έλεγχος σε νοσοκομεία και ερευνητικά κέντρα [23].

1.3 Θεραπευτικές προσεγγίσεις της λεισμανίασης.

1.3.1 Χημειοθεραπεία της λεισμανίασης.

Η θεραπεία της νόσου με φυσικές μεθόδους, όπως η εφαρμογή ακτινοβολίας, ο καυτηριασμός και η τοπική κρυοθεραπεία, αποδείχθηκε ανεπαρκής για την θεραπεία της δερματικής λεισμανίασης [38]. Η κύρια θεραπεία όλων των κλινικών μορφών της νόσου είναι η χημειοθεραπεία.

Για τη θεραπεία της λεισμανίασης, τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται περιορίζονται στον αριθμό 6 [39]. Τα φάρμακα πρώτης γραμμής βασίζονται στο πεντασθενές αντιμόνιο (στιβογλυκονικό νάτριο με την εμπορική ονομασία Pentostam και αντιμονιακή μεγλουμίνη με την εμπορική ονομασία Glucantime) (Πίν. 1.1). Ο μηχανισμός δράσης των φαρμάκων αυτών, στηρίζεται στη μετατροπή του πεντασθενούς αντιμονίου σε τρισθενές, το οποίο προκαλεί κερματισμό του DNA των αμαστιγωτών μορφών του παρασίτου [40, 41]. Τα φάρμακα αυτά αναπτύχθηκαν τη δεκαετία του 1940 και παραμένουν στυλοβάτες της συστηματικής θεραπείας έναντι της λεισμανίασης [30]. Οι ενώσεις του αντιμονίου αποτελούν φάρμακα επιλογής έναντι όλων των τύπων της νόσου, όμως παρουσιάζουν σημαντικά μειονεκτήματα, μεταξύ των οποίων η αναγκαιότητα παρεντερικής χορήγησης, η καρδιοτοξικότητα, η νεφροτοξικότητα και η πρόκληση παγκρεατίτιδας [11, 42]. Επιπρόσθετα, παρατηρείται ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών του παρασίτου έναντι αυτών των ενώσεων με αποτέλεσμα την έλλειψη αποτελεσματικότητας της θεραπείας, ιδιαίτερα στις ενδημικές περιοχές. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η Ινδία, όπου το 40 - 60% των ασθενών με σπλαγχνική λεισμανίαση, δεν ανταποκρίνεται πλέον σε αυτή τη θεραπεία [42]. Επιπλέον, αναφέρονται διακυμάνσεις αποτελεσματικότητας των φαρμάκων αυτών, ανάλογα με το είδος του παρασίτου [43, 44]. Επίσης, η χρήση των ενώσεων του αντιμονίου, δεν οδηγεί σε κλινική και παρασιτολογική θεραπεία του σκύλου, που αποτελεί τον κύριο ξενιστή του παρασίτου στην περιοχή της Μεσογείου.

Η αναποτελεσματικότητα των ενώσεων του αντιμονίου οδήγησε σε εναλλακτικές θεραπείες με τα φάρμακα δεύτερης γραμμής. Σε αυτά περιλαμβάνονται η πενταμιδίνη (αρωματικές διαμιδίνες, εμπορική ονομασία Pentacarinat) και η αμφοτερικίνη B (εμπορική ονομασία Fungizone), τα οποία είναι επίσης γνωστά από το 1940 και 1959, αντίστοιχα. Η ακριβής δράση της πενταμιδίνης δεν είναι γνωστή αλλά υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν ότι δρα στα μιτοχόνδρια του παρασίτου [45]. Τα φάρμακα αυτά εμφανίζουν υψηλή τοξικότητα και σχετίζονται με σοβαρές παρενέργειες (Πίν. 1.1) [42]. Η πενταμιδίνη προκαλεί υπόταση, ταχυκαρδία και έμετο και η χρήση της

αμφοτερικίνη Β είναι δαπανηρή και προϋποθέτει ενδοφλέβια χορήγηση και μακροχρόνια νοσηλεία [15]. Αντίστοιχα, η θεραπεία των σκύλων με αμφοτερικίνη Β, οδηγεί σε παροδική μείωση του παρασιτικού φορτίου και σε καταστροφή της ρινικής κοιλότητας του ζώου.

Φάρμακα όπως, η μιλτεφοσίνη, η παρομομυκίνη και η λιποσωμική αμφοτερικίνη Β, αντικαθιστούν σταδιακά τις ενώσεις του πεντασθενούς αντιμονίου και της συμβατικής αμφοτερικίνη Β [9].

Πίνακας 1.1. Διαθέσιμα φάρμακα και θεραπευτικά σχήματα που χρησιμοποιούνται για την θεραπεία της λεϊσμανίασης. IM: ενδομυϊκή οδός χορήγησης, IV: ενδοφλέβια οδός χορήγησης. Πίνακας προσαρμοσμένος από de Menezes, J.P. *et al.*, 2015.

Φάρμακο	Οδός χορήγησης	Δοσολογία	Αποτελεσματικότητα	Τοξικότητα
Ενώσεις του πεντασθενούς αντιμονίου	IM, IV	20 mg/kg/ημέρα (28-30 ημέρες)	35%-95%	Σοβαρή καρδιοτοξικότητα, παγκρεατίτιδα, νεφροτοξικότητα, ηπατοτοξικότητα
Αμφοτερικίνη Β	IV	0,75-1 mg/kg/ημέρα (15-20 ημέρες)	> 90%	Σοβαρή νεφροτοξικότητα, υποκαλιαιμία, υψηλός πυρετός
Λιποσωματική αμφοτερικίνη Β	IV	10-30 mg/kg (συνολική δόση)	> 97%	Ήπια νεφροτοξικότητα
Μιλτεφοσίνη	Δια στόματος	100-150 mg/ημέρα (28 ημέρες)	Ασία: 94% Αφρική: 60% - 93%	Έμετος, διάρροια, νεφροτοξικότητα, ηπατοτοξικότητα, τερατογένεση
Παραμομυκίνη	IM για την σπλαγχνική τοπικά για την δερματική	15 mg/ημέρα (21 ημέρες) ή 20 mg/kg (17 ημέρες)	Ινδία: 94% Αφρική: 46%-85%	Σοβαρή νεφροτοξικότητα, ηπατοτοξικότητα
Πενταμιδίνη	IM	3 mg/kg/ημέρα (4 ενέσεις)	35%-96% (ανάλογα με το είδος του παρασίτου)	Υπόταση, ταχυκαρδία, παγκρεατική βλάβη, ηλεκτροκαρδιογραφικές μεταβολές

Η μιλτεφοσίνη, η οποία είχε αρχικά χρησιμοποιηθεί ως αντικαρκινικό φάρμακο, αποτελεί ένα νέο φάρμακο πρώτης γραμμής που χρησιμοποιείται ευρέως από το 2002, τόσο για την ανθρωπονοτική όσο και για την ζωνοτική λεϊσμανίαση. Ο μηχανισμός δράσης του κατά του παρασίτου *Leishmania* στηρίζεται στην παρεμπόδιση της σύνθεσης των φωσφολιπιδίων και των στερολών [46, 47]. Αποτελεί το πρώτο αποτελεσματικό φάρμακο που χορηγείται διά στόματος (Πίν. 1.1) [48]. Έχει χρησιμοποιηθεί στο Πρόγραμμα Περιορισμού της Σπλαγχνικής Λεϊσμανίασης στην Ινδία και απέδωσε ενθαρρυντικά αποτελέσματα έναντι της σπλαγχνικής και της δερματικής λεϊσμανίασης, τόσο του Παλαιού όσο και του Νέου Κόσμου [42]. Οι παρενέργειες της χρήσης της, είναι κυρίως γαστρεντερικές διαταραχές [11]. Παρόλα αυτά είναι υποθετικά τερατογόνος,

απαιτεί μια μακρά περίοδο θεραπείας (28 ημέρες) που μπορεί να οδηγήσει σε μικρή συμμόρφωση και σε υποτροπή, ενώ ταυτόχρονα υπάρχει ανησυχία για ανάπτυξη αντοχής [23]. Η μιλτεφοσίνη έχει αναδειχθεί ως πιθανό εργαλείο και για την θεραπεία της σπλαγγχνικής λεισμανίασης του σκύλου. Δεν υπάρχουν αναφορές για νεφροτοξική δράση και ο έμετος αποτελεί την πιο συνηθισμένη παρενέργεια [49].

Η χρήση της παρομομυκίνης παρουσιάζει πλεονεκτήματα, όπως το χαμηλό κόστος και η σχετικά μικρή διάρκεια χορήγησης. Η παρομομυκίνη παρουσιάζει διακυμάνσεις αποτελεσματικότητας και η κύρια παρενέργειά της είναι η διαταραχή της ηπατικής λειτουργίας. Η χρήση της στην θεραπεία του σκύλου, οδηγεί αρχικά σε βελτίωση της κλινικής εικόνας του ζώου, αλλά συχνά παρατηρούνται υποτροπές [11].

Η λιποσωμική αμφοτερικίνη B (εμπορική ονομασία Ambisome), αποτελεί τροποποιημένη μορφή της αμφοτερικίνης B, που παρουσιάζει βελτιωμένη ασφάλεια χρήσης και αυξημένη αντιλεισμανιακή δράση (Πίν. 1.1). Αποτελεί την πρώτη επιλογή θεραπείας της σπλαγγχνικής λεισμανίασης σε πολλές ενδημικές χώρες της Ευρώπης και στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής, καθώς και τη σύγχρονη θεραπεία ρουτίνας για τη σπλαγγχνική λεισμανίαση έναντι της *L. donovani* στην Ινδία [11, 23]. Παρόλα αυτά, εμφανίζει διακυμάνσεις αποτελεσματικότητας καθώς κλινικές μελέτες αναδεικνύουν πως είναι λιγότερο αποτελεσματική έναντι της *L. donovani* στην Ανατολική Αφρική και έναντι της *L. infantum* στη Λατινική Αμερική [23]. Η χρήση της λιποσωμικής αμφοτερικίνης B στην θεραπεία του σκύλου, οδήγησε σε ίαση των ζώων, αλλά παρά την αρχική αποτελεσματικότητα, παρατηρήθηκαν υποτροπές [50, 51].

Συνοψίζοντας, τα διαθέσιμα φάρμακα εμφανίζουν τοξικές παρενέργειες και απαιτούν μακροχρόνια παραμονή στο νοσοκομείο [29]. Επίσης έχουν υψηλό κόστος, γεγονός που αποτελεί σημαντικό μειονέκτημα καθώς τα εκατομμύρια των ασθενών και των ανθρώπων που βρίσκονται σε κίνδυνο να νοσήσουν, κατοικούν σε υπανάπτυκτες ή αναπτυσσόμενες χώρες και είναι πράγματι «οι φτωχότεροι των φτωχών της γης». Επιπλέον, η δραστηριότητα των φαρμάκων επηρεάζεται από ποικιλία παραγόντων, όπως το είδος του παρασίτου, το γένος, η ηλικία και το ανοσολογικό προφίλ του ξενιστή [42]. Ως εκ τούτου, τα τελευταία χρόνια, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) προτείνει τη χρήση συνδυασμένης χημειοθεραπείας.

Ο συνδυασμός φαρμάκων αποσκοπεί στη μείωση της διάρκειας της θεραπείας και των απαιτούμενων περεντερικών χορηγήσεων, καθώς και στην επιβράδυνση της ανάπτυξης ανθεκτικότητας [11]. Η στρατηγική της συνδυαστικής χημειοθεραπείας

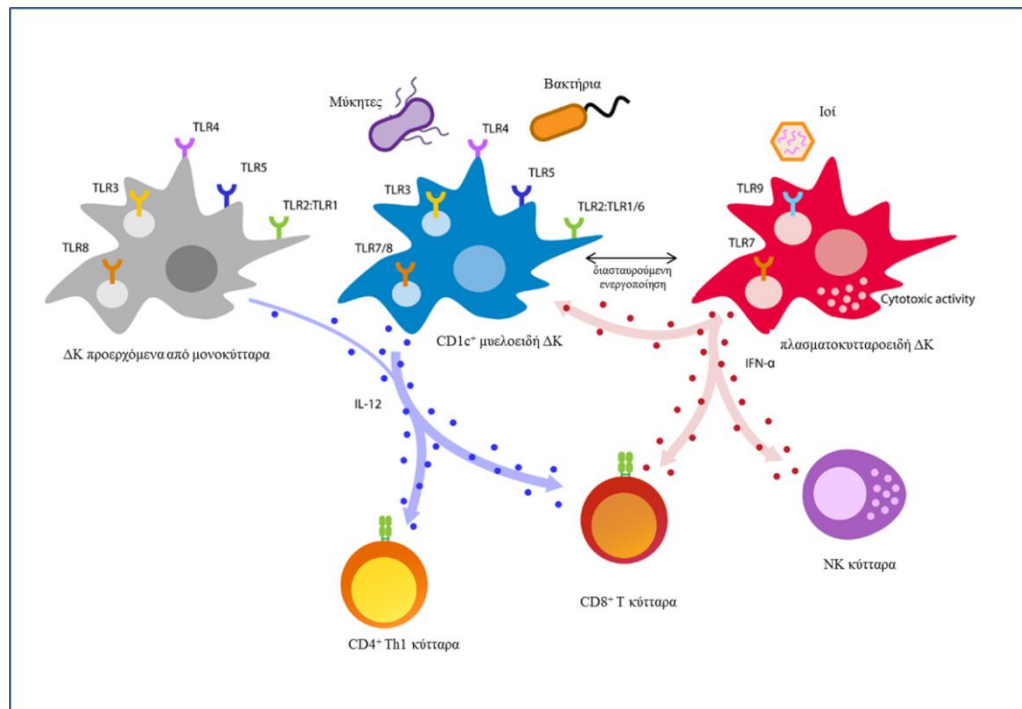
ενθαρρύνει την επίτευξη θεραπείας σε περιπτώσεις υποτροπών, σε περιπτώσεις ασθενών που δεν ανταποκρίθηκαν στην αρχικά διαθέσιμη μονοθεραπεία και σε περίπλοκες παθολογικές καταστάσεις, όπως η συλλοίμωξη με τον ιό HIV, όπου η τεχνική της μονοθεραπείας αποδείχθηκε ανεπαρκής [11, 42]. Η συνδυαστική χημειοθεραπεία της λιποσωμικής αμφοτερικίνης Β σε συνδυασμό με την μιλτεφοσίνη και την παραμομυκίνη, χρησιμοποιείται σε κλινικές μελέτες φάσης III, στην Ινδία, με ενθαρρυντικά αποτελέσματα [23].

1.3.2 Ανοσοθεραπεία έναντι της λείσμανιάσης.

Η ανοσοθεραπεία, αφορά στην χρήση βιολογικών ουσιών ή μορίων, ικανών να ρυθμίζουν τις ανοσολογικές αποκρίσεις και αποτελεί μία υποσχόμενη στρατηγική που εφαρμόζεται στην θεραπεία πολλών ασθενειών (π.χ. καρκίνος, ιογενείς παθήσεις) [11]. Επιπλέον, ο συνδυασμός ανοσοθεραπείας με χημειοθεραπευτικά φάρμακα (ανοσοχημειοθεραπεία) μπορεί να οδηγήσει σε βελτίωση της μειωμένης αποτελεσματικότητας και σε μείωση της υψηλής τοξικότητας που προκαλείται από την συμβατική χημειοθεραπεία [11].

Οι αυξανόμενες αναφορές για αποτυχία της συμβατικής θεραπείας έναντι της λείσμανιάσης καθώς και οι πολύπλοκες κλινικές περιπτώσεις, ιδιαίτερα οι περιπτώσεις με συνυπάρχουσα ανοσοκαταστολή όπως για παράδειγμα η ταυτόχρονη λοίμωξη *Leishmania* – HIV και οι μεταμοσχευόμενοι ασθενείς, επιτάσσουν τη χρήση συνδυασμού θεραπειών και την ανάπτυξη νέων στρατηγικών θεραπείας. Η ανοσοθεραπεία, μόνη της ή σε συνδυασμό με την χημειοθεραπεία, έχει εφαρμοστεί στην θεραπεία της σπλαγχνικής λείσμανιάσης, για την καλύτερη ανταπόκριση των ασθενών και την παρεμπόδιση της ανάπτυξης αντοχής [52, 53]. Πιο συγκεκριμένα, η ανοσοθεραπεία και η ανοσοχημειοθεραπεία χρησιμοποιούνται για την επιλεκτική επαγωγή της προστατευτικής Th1 απόκρισης που είναι απαραίτητη για την αποτελεσματική προστασία του ξενιστή έναντι του παρασίτου [11, 42]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα ανοσορυθμιστικού παράγοντα αποτελεί η IFN- γ , η οποία αποτελεί μια καλά χαρακτηρισμένη κυτταροκίνη που ενεργοποιεί την ενδοκυττάρια εξάλειψη του παρασίτου από τα μακροφάγα [54]. Επαναλαμβανόμενη συνδυαστική θεραπεία με IFN- γ και ενώσεις του αντιμονίου, φαίνεται να είναι αποτελεσματική σε υποτροπιάζοντες ασθενείς με σπλαγχνική λείσμανιάση, επιταχύνοντας τον έλεγχο του παρασίτου και ενισχύοντας την κλινική αποτελεσματικότητα της συμβατικής θεραπείας [11, 55].

Μία άλλη καινοτόμος προσέγγιση ανοσοθεραπείας, αφορά στη χρήση των δενδριτικών κυττάρων (ΔΚ) για την επαγωγή ειδικής T κυτταρικής ανοσίας (Εικ. 1.13) [56]. Τα ΔΚ αποτελούν τα πιο ισχυρά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση των T, B και NK κυττάρων. Τα ΔΚ προσλαμβάνουν το αντιγόνο και στη συνέχεια μεταναστεύουν στους επιχώριους λεμφαδένες όπου παρουσιάζουν τον αντιγονικό επίτοπο στα παρθένα T κύτταρα, ενεργοποιώντας τις ειδικές ανοσολογικές αποκρίσεις [57]. Στο πειραματικό μοντέλο ποντικού, η συνδυασμένη ανοσοθεραπεία που στηρίζεται στην χρήση των ΔΚ και του αντιμονίου είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική έναντι της σπλαγχνικής λεισμανίασης. Επίσης, στο ίδιο πειραματικό μοντέλο, η θεραπεία με στιβογλουκονικό νάτριο σε συνδυασμό με ΔΚ ευαισθητοποιημένα με διαλυτά αντιγόνα της *L. donovani*, οδήγησε σε πλήρη εκκαθάριση των παρασίτων [42].



Εικόνα 1.13. Βιολογία της ανοσοθεραπείας με την χρήση ανθρώπινων υποπληθυσμών ΔΚ. Σχηματική απεικόνιση προσαρμοσμένη από Wimmers, F. *et al.* 2014.

1.4 Ανάπτυξη εμβολίων έναντι της λεισμανίασης.

1.4.1 Υποψήφια εμβόλια έναντι της λεισμανίασης.

Ο εμβολιασμός αποτελεί τον ιδανικότερο τρόπο ελέγχου μιας νόσου [23]. Συνεπώς, η ανάπτυξη ενός προστατευτικού εμβολίου έναντι της λεισμανίασης αποτελεί αντικείμενο

έντατικής έρευνας. Παρόλα αυτά, η ανεπαρκής γνώση των μηχανισμών παθογένεσης των διαφορετικών ειδών του παρασίτου, ο πολύπλοκος κύκλος ζωής του και η δυναμική των ανοσοπαθολογικών αποκρίσεων του ξενιστή που προσδιορίζονται τόσο από την γενετική του προδιάθεση όσο και από την ανοσοικανότητά του, καθιστούν την ανάπτυξη ενός εμβολίου, έναν δύσκολο και προκλητικό στόχο που παραμένει ανέφικτος μέχρι σήμερα [29, 58].

Ένα αποτελεσματικό εμβόλιο πρέπει να διαθέτει ορισμένα χαρακτηριστικά όπως ασφάλεια, σταθερότητα σύνθεσης, ευκολία χορήγησης και υψηλή αποτελεσματικότητα ως προς την επαγωγή ισχυρής ανοσολογικής απόκρισης, ικανής να παρέχει μακροχρόνια προστασία [58, 59].

Η δια βίου προστασία που επάγεται, στη δερματική μορφή της νόσου, μετά από φυσική μόλυνση, καταδεικνύει την ανάπτυξη ενός εμβολίου ως ρεαλιστικό στόχο [58]. Προς το παρόν δεν υπάρχει εμπορικά διαθέσιμο εμβόλιο έναντι της λεισμανίασης και όσα εμβόλια έχουν μελετηθεί, εμφανίζουν ποικίλα πλεονεκτήματα αλλά και σημαντικά μειονεκτήματα.

Οι πρώτες προσπάθειες για την ανάπτυξη προστατευτικού εμβολίου αφορούν στον ενδοδερμικό εμβολιασμό προμαστιγωτών μορφών του παρασίτου *L. major*, συνήθως στο άνω τμήμα του βραχίονα, ο οποίος οδηγεί στην ανάπτυξη δερματικών φυμάτων (leishmanization) [58]. Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην παρατήρηση πως μετά από ίαση των δερματικών βλαβών (φυμάτων), ο ασθενής αποκτά προστασία σε μελλοντική επαναμόλυνση.

Η παραπάνω μέθοδος αντικαταστάθηκε από τα εμβόλια πρώτης γενιάς, τα οποία αποτελούνται από νεκρά ή αδρανοποιημένα παράσιτα. Τα εμβόλια αυτά περιέχουν ολόκληρο τον μικροοργανισμό που έχει υποστεί διάφορες επεξεργασίες, όπως η *in vitro* μακροχρόνια καλλιέργεια, η θερμική επεξεργασία, η αδρανοποίηση μέσω γ-ακτινοβολίας, η χημική μεταλλαξογένεση που απενεργοποιεί στοιχεία μολυσματικότητας ή η καλλιέργειά του υπό την παρουσία φαρμάκων [58, 60]. Στα πλεονεκτήματα των εμβολίων πρώτης γενιάς, συγκαταλέγεται το γεγονός πως ο μικροοργανισμός δεν έχει τη δυνατότητα να πολλαπλασιάζεται στο εσωτερικό του ξενιστή και κατ'επέκταση δε μπορεί να εγκαταστήσει ενεργή μόλυνση, διατηρώντας έτσι ένα καλό πρότυπο ασφάλειας [29, 60]. Παρόλα αυτά, καταγράφονται και σημαντικά μειονεκτήματα, όπως η πρόκληση μέτριας έντασης και μικρής διάρκειας ανοσολογικής απόκρισης, που απαιτεί πολλαπλές ανοσοποιήσεις καθώς και η μειωμένη αποτελεσματικότητα στις κλινικές δοκιμές [59].

Η κατάκτηση επιστημονικής γνώσης σχετικά με πιθανούς μολυσματικούς παράγοντες του παρασίτου και με αντιγόνα αυτού που είναι υπεύθυνα για την επίτευξη ανοσίας του ξενιστή, οδήγησε στα εμβόλια δεύτερης γενιάς [58]. Τα εμβόλια δεύτερης γενιάς περιλαμβάνουν ζωντανά εξασθενημένα ή γενετικά τροποποιημένα παράσιτα, προσδιορισμένες υπομονάδες, ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες, πολυπρωτεΐνες, ή ανασυνδυασμένους φορείς (βακτήρια ή ιούς) που εκφράζουν λείσμανιακά αντιγόνα [58, 59].

Ως ζωντανά εξασθενημένα παράσιτα χρησιμοποιούνται μη παθογόνα είδη όπως η *L. tarentolae*. Η *L. tarentolae* έχει την ικανότητα να μολύνει τα κύτταρα των θηλαστικών και να μετατρέπεται στην ενδοκυττάρια αμαστιγωτή μορφή χωρίς να προκαλεί νόσο ή κλινικό σύμπτωμα, σε πειραματικά μοντέλα ποντικού και χάμστερ [58]. Γενωμική ανάλυση αλληλούχισης του στελέχους αυτού, έδειξε ότι η πλειοψηφία των γονιδίων του (περισσότερο από 90%) συναντάται σε όλα τα είδη του παρασίτου *Leishmania*. Ωστόσο, μερικά από τα απαραίτητα γονίδια που σχετίζονται με την παθογένεια του παρασίτου ή εκφράζονται στην αμαστιγωτή μορφή που αποικίζει τα κύτταρα του ξενιστή, δεν υπάρχουν στο γονιδίωμα της *L. tarentolae* [58]. Η χρήση της *L. tarentolae* ως μη παθογόνου φορέα αποτελεί ένα υποσχόμενο μέσο για την ανάπτυξη ενός αποτελεσματικού εμβολίου έναντι της λείσμανιάσης. Σε πειραματικές δοκιμές εμβολιασμών ευαίσθητων BALB/c ποντικών, η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση της *L. tarentolae*, οδήγησε σε προστατευτική ανοσολογική απόκριση [61]. Επιπλέον, λόγω έλλειψης της δυνατότητας ανάκτησης παθογόνου μορφής, η *L. tarentolae* παρέχει μεγαλύτερη ασφάλεια μειώνοντας την πιθανότητα ανάπτυξης της νόσου στον άνθρωπο. Το βασικό μειονέκτημα της χρήσης της, είναι η αδυναμία επιβίωσης για μεγάλο χρονικό διάστημα στα κύτταρα των θηλαστικών [58].

Η δημιουργία γενετικά τροποποιημένων παρασίτων εισάγοντας ή αποσιωπώντας συγκεκριμένα γονίδια, αποτέλεσε επανάσταση στη δημιουργία γενετικά προσδιορισμένων εμβολίων [62]. Η χρήση των γενετικά τροποποιημένων παρασίτων σε πρωτόκολλα εμβολιασμού, παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα. Στα εμβόλια αυτά, ο ζωντανός μικροοργανισμός διατηρεί τη δυνατότητα να πολλαπλασιάζεται στο εσωτερικό του ξενιστή και να προκαλεί μια ήπια και μικρής έντασης μόλυνση που ενεργοποιεί το ανοποιητικό σύστημα του ξενιστή παρόμοια με τη φυσική πορεία της μόλυνσης [63]. Επιπλέον, με τη χρήση αυτών των παρασίτων, επιτυγχάνεται μεταφορά μεγάλου φάσματος αντιγόνων στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και ενεργοποίηση και των δύο

μορίων του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC τάξης I και II). Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η επαγωγή ισχυρής και μακροχρόνιας ανοσολογικής απόκρισης, μέσω της ενεργοποίησης τόσο των $CD4^+$ όσο και των $CD8^+$ T κυττάρων. Η επίτευξη μιας ισχυρής απόκρισης, μετά την πρώτη ανοσοποίηση, μειώνει τον αριθμό των απαιτούμενων αναμνηστικών ανοσοποιήσεων. Επιπλέον, τα εμβόλια που φέρουν γενετικά τροποποιημένα παράσιτα είναι σχετικά απλά ως προς την παρασκευή τους και με χαμηλό κόστος παραγωγής [63]. Παρά τον σημαντικό αριθμό των πλεονεκτημάτων τους, τα εμβόλια αυτά εμφανίζουν και μειονεκτήματα. Το μεγαλύτερο μειονέκτημά τους αφορά στην εν δυνάμει ικανότητά τους να προκαλέσουν μόλυνση, ιδιαίτερα σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα [59]. Μέσω οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων και φυσικής τυχαίας μεταλλαξογένεσης, οι μικροοργανισμοί μπορούν να επανεκφράσουν μολυσματικά γονίδια και να μετασχηματιστούν σε αγρίου τύπου μικροοργανισμούς με μολυσματική ικανότητα. Σε πειραματικά μοντέλα ποντικού έχει επιτευχθεί ουσιαστική προστασία έναντι της λείσμανιάσης αλλά η υπαρκτή πιθανότητα «αναστροφής της νόσου», τα καθιστά ακατάλληλα για τη χρήση τους στον άνθρωπο [58]. Επιπρόσθετα, η αποτελεσματικότητά τους στις κλινικές δοκιμές δεν έχει προσδιοριστεί πλήρως.

Τα εμβόλια υπομονάδων περιέχουν καλά προσδιορισμένα και μεμονωμένα αντιγόνα του παρασίτου που είναι ικανά να επάγουν την επιθυμητή προστατευτική ανοσολογική απόκριση. Παρόλα αυτά, ο περιορισμένος αριθμός αντιγονικών επιτόπων καθιστά τα εμβόλια αυτά λιγότερο ανοσογονικά, συγκριτικά με τα εμβόλια που περιέχουν ολόκληρο τον μικροοργανισμό [59]. Τα εμβόλια υπομονάδων που έχουν ελεγχθεί μέχρι σήμερα, δεν επάγουν την ανάπτυξη μακροχρόνιας ανοσίας, γεγονός που οδηγεί στην ανάγκη πολλαπλών ανοσοποιήσεων [29]. Ως εκ τούτου, έχουν χρησιμοποιηθεί πολυπρωτεϊνικά εμβόλια προκειμένου να ενισχυθεί η ανοσογονικότητά τους [64].

Η άλλη σύγχρονη κατηγορία εμβολίων (εμβόλια τρίτης γενιάς), χρησιμοποιεί το γενετικό υλικό του παθογόνου, και όχι πρωτεϊνικά ή άλλα δομικά συστατικά του [65]. Χρησιμοποιώντας την αλληλουχία DNA που κωδικοποιεί έναν συγκεκριμένο προστατευτικό επίτοπο, επάγεται ειδική ανοσία έναντι του επίτοπου-στόχου (Πίν. 1.2). Η κωδική περιοχή του αντιγονικού επίτοπου μπορεί να ενσωματωθεί σε πλασμίδια και να μεταφερθεί μέσω κάποιου ιϊκού φορέα ή να ενσωματωθεί σε σωματίδια και να μεταφερθεί μέσω των δενδριτικών κυττάρων [59].

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, δεν υπάρχει εμπορικά διαθέσιμο εμβόλιο έναντι της λείσμανιάσης. Μέχρι σήμερα, τρία εμβόλια έχουν αδειοδοτηθεί για προφυλακτική χρήση

στο σκύλο (εμπορική ονομασία Leishmune, Leish-tec και CaniLeish) ενώ τα υποψήφια εμβόλια για χρήση στον άνθρωπο βρίσκονται υπό κλινικές δοκιμές [66].

Πίνακας 1.2. Αντιγόνα του παρασίτου *Leishmania spp.* που έχουν χρησιμοποιηθεί ως υποψήφια DNA εμβόλια.

Πίνακας προσαρμοσμένος από Kumar, R. and Engwerda, C., 2014.

Υποψήφιο αντιγόνο	Πειραματικό μοντέλο	Κλινική μορφή	Είδος
LACK	σκύλος, ποντίκι	VL, CL	<i>L. donovani</i> , <i>L. chagasi</i> , <i>L. major</i> , <i>L. infantum</i>
gp63	σκύλος, ποντίκι	CL, VL	<i>L. major</i> , <i>L. infantum</i>
KMP11	ποντίκι	CL, VL	<i>L. major</i> , <i>L. donovani</i>
CPB	σκύλος, ποντίκι	VL, CL	<i>L. infantum</i> , <i>L. major</i>
ORFF	ποντίκι	VL	<i>L. donovani</i>
NH 36	ποντίκι	VL, CL	<i>L. chagasi</i> , <i>L. mexicana</i>
TRYP	σκύλος	VL	<i>L. infantum</i>
PSA-2	ποντίκι	CL	<i>L. major</i>

Το εμβόλιο με την εμπορική ονομασία Leishmune, χρησιμοποιείται στη Βραζιλία από το 2004 και παρέχει αποτελεσματικότητα 76 – 80% [9, 15, 65]. Επιπλέον, το εμβόλιο με την εμπορική ονομασία Leish-Tec (ανασυνδυασμένο αντιγόνο A2 των αμαστιγωτών και σαπωνίνη) είναι εμπορικά διαθέσιμο στην Βραζιλία, αλλά έχει εφαρμοστεί σε μικρό αριθμό δειγμάτων [15, 65]. Τέλος, το εμβόλιο CaniLeish, κυκλοφόρησε στην Ευρώπη πρόσφατα (2011) και τα μέχρι στιγμής δεδομένα δεν αναφέρουν πλήρη προστασία [67].

Μερικά από τα εμπόδια που πρέπει να ξεπεραστούν για την ανάπτυξη ενός αποτελεσματικού εμβολίου είναι η επίτευξη μονής δόσης εμβολιασμού και η άρση της μειωμένης ανοσογονικότητας των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών και αντιγονικών υπομονάδων. Η ανάπτυξη νέων ανοσοενισχυτικών που ενισχύουν την αποτελεσματικότητα των εμβολίων αποτελεί ένα πολλά υποσχόμενο μέσο για την κατάκτηση των παραπάνω στόχων.

1.4.2 Χρήση πρωτεϊνών του παρασίτου *Leishmania spp.* στην κατασκευή εμβολίων.

Διάφορες πρωτεΐνες του παρασίτου *Leishmania spp.* έχουν χαρακτηριστεί ως ανοσογονικές και πιθανά προστατευτικές [60].

Πίνακας 1.3. Συνοπτική παρουσίαση των κυριότερων πειραματικών προσεγγίσεων εμβολιασμού έναντι της λείσμανιάσης. Πίνακας προσαρμοσμένος από Kedzierski, L. 2011.

Αντιγόνο	Σύνθεση εμβολίου	Πειραματικό μοντέλο	Αξιολόγηση προστατευτικής δράσης	Κλινική μορφή λείσμανιάσης
KSAC	πολυπρωτεΐνη (KMP11/SMT/A2/CP B) + MPLA	ποντίκι	προστατευτική δράση	VL/CL
gp63	ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη	ποντίκι	μη προστατευτική δράση	CL
	ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη	πρωτεύοντα	μερική προστασία	CL
	πρωτεΐνη εκφρασμένη σε BCG	ποντίκι	προστατευτική δράση	CL
	DNA εμβόλιο	ποντίκι	μερική προστασία	CL
	ΔΚ ευαισθητοποιημένα με την πρωτεΐνη	ποντίκι	προστατευτική δράση	CL
gp46/PSA-2	ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη	ποντίκι	μη προστατευτική δράση	CL
	DNA εμβόλιο	ποντίκι	μερική προστασία	CL
	ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη + IL-12	ποντίκι	προστατευτική δράση	CL
p36/LACK	DNA εμβόλιο + πρωτεΐνη εκφρασμένη σε ιικό σωματίο	ποντίκι	προστατευτική δράση	CL
	DNA εμβόλιο + πρωτεΐνη εκφρασμένη σε ιικό σωματίο	σκύλος	προστατευτική δράση	CVL
	ΔΚ ευαισθητοποιημένα με την πρωτεΐνη	ποντίκι	προστατευτική δράση	CL
KMP-11	DNA εμβόλιο	χάμστερ	προστατευτική δράση	VL
	ΔΚ ευαισθητοποιημένα με την πρωτεΐνη	ποντίκι	προστατευτική δράση	CL

P0	DNA εμβόλιο	ποντίκι	προστατευτική δράση	CL
PFR-2	DNA εμβόλιο	ποντίκι	προστατευτική δράση	CL
NH36	DNA εμβόλιο	ποντίκι	μερική προστασία	VL/CL
Leish-111f	ανασυνδυασμένη πολυπρωτεΐνη	ποντίκι	προστατευτική δράση	CL
	ανασυνδυασμένη πολυπρωτεΐνη	ποντίκι	προστατευτική δράση	VL
	ανασυνδυασμένη πολυπρωτεΐνη	σκύλος	μη προστατευτική δράση	CVL
	ανασυνδυασμένη πολυπρωτεΐνη + Glucantime	σκύλος	προστατευτική δράση	CVL
Leish-110f	ανασυνδυασμένη πολυπρωτεΐνη	ποντίκι	προστατευτική δράση	VL/CL
Leish-F1	ανασυνδυασμένη πολυπρωτεΐνη	άνθρωπος κλινική φάση I	ασφαλές και ανοσογονικό	CL
	ανασυνδυασμένη πολυπρωτεΐνη + στιβογλυκονικό νάτριο	άνθρωπος κλινική φάση I	ασφαλές και ανοσογονικό	ML
	ανασυνδυασμένη πολυπρωτεΐνη + Glucantime	άνθρωπος κλινική φάση I	ασφαλές και ανοσογονικό	CL
	ανασυνδυασμένη πολυπρωτεΐνη	άνθρωπος κλινική φάση I	ασφαλές και ανοσογονικό	VL
cpa-/-	ζωντανά εξασθενημένα παράσιτα	ποντίκι	προστατευτική δράση	CL
		χάμστερ	προστατευτική δράση	CL
lpg2-/-	ζωντανά εξασθενημένα παράσιτα	ποντίκι	προστατευτική δράση	CL

Ανάμεσά τους βρίσκονται η γλυκοπρωτεΐνη 63 (gp63), η μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη 46 (gp46 ή M-2), η ιστόνη H1, καθώς και οι LACK, PSA-2, KMP-11 και LeIF [60].

Εξαιτίας των γενετικών πολυμορφισμών που συναντώνται στο ανοσοποιητικό σύστημα των θηλαστικών, τα τελευταία χρόνια έχει προωθηθεί η ιδέα σχηματισμού πολυαντιγονικών εμβολίων, προκειμένου να επιτευχθεί καλύτερη και καθολικότερη ανοσολογική απόκριση (Πίν. 1.3) [63, 68].

Ένα τέτοιο εμβόλιο ανασυνδυασμένης πολυπρωτεΐνης αποτελεί το Leish-111f που αποτελείται από τρεις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες του παρασίτου. Ειδικότερα, αποτελείται από το αμινοτελικό τμήμα (1-226) της LeIF του στελέχους *L. braziliensis*,

μαζί με τις πρωτεΐνες TSA (thiol-specific antioxidant) και STI1 (stress-inducible protein 1) του στελέχους *L. major*, σε συνδυασμό με το μονοφωσφορυλικό λιπίδιο A (MPL, προερχόμενο από τον λιποπολυσακχαρίτη της *Salmonella minnesota*) και το σκουαλένιο (MPL-SE) [58, 63, 69].

1.4.2.1 Ευκαρυωτικός παράγοντας έναρξης του παρασίτου *Leishmania* (LeIF).

Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, η σύνθεση των πρωτεϊνών ή η μετάφραση όπως αποκαλείται, είναι θεμελιώδης για την έκφραση των γονιδίων [70]. Ο έλεγχος της μετάφρασης μπορεί να πραγματοποιηθεί σε κάθε ένα από τα τρία στάδια: έναρξη, επιμήκυνση και λήξη [71]. Παρόλα αυτά, η ρύθμιση συμβαίνει κυρίως στο στάδιο της έναρξης [70].

Η σύνθεση των πρωτεϊνών ξεκινάει με την πρόσδεση της 5'-αμετάφραστης περιοχής (UTR) του mRNA στη μικρή υπομονάδα του ριβοσώματος και καταλύεται από τους ευκαρυωτικούς παράγοντες έναρξης (eukaryotic translation initiation factors – eIFs), όπως προσδιορίστηκε το 1983 [70, 71]. Οι παράγοντες έναρξης eIF4 (eIF4F, eIF4A και eIF4B) είναι υπεύθυνοι για την προσέλκυση του mRNA στο ριβόσωμα [71]. Πιο συγκεκριμένα, ο eIF4A ξεδιπλώνει το mRNA σε έκταση που καλύπτει τις 15 πρώτες βάσεις του. Ο eIF4A των θηλαστικών ανήκει στην οικογένεια των DEAD-box πρωτεϊνών και είναι ένα πολυπεπίδιο 46 kDa που επειδικνύει δραστηριότητες RNA-εξαρτώμενης ATPάσης και RNA ελικάσης. Στα θηλαστικά, διακρίνονται τρεις ισομορφές: οι eIF4AI, eIF4AII και eIF4AIII [71]. Επιπλέον, μέλη της οικογένειας eIF4A παίζουν ρόλο σε πολλά διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια. Ενδεικτικό παράδειγμα των λειτουργικών ρόλων των eIF4A πρωτεϊνών, αποτελεί το παράδειγμα των μεταλλάξεων στο eIF4A γονίδιο της *Drosophila*, που επέφεραν δυσλειτουργία στην ανάπτυξη της λάρβας, στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στην αντιγραφή του DNA [70].

Ο ευκαρυωτικός παράγοντας έναρξης του παρασίτου *Leishmania spp.* (*Leishmania* eukaryotic initiation factor, LeIF), είναι ομόλογος με τον ευκαρυωτικό παράγοντα έναρξης eIF4A [72]. Ο παράγοντας LeIF είναι υψηλά συντηρημένος ανάμεσα στα είδη του παρασίτου *Leishmania* και συναντάται και στα δύο αναπτυξιακά του στάδια (προμαστιγωτή και αμαστιγωτή μορφή) [73]. Είναι άφθονος στο σύνολο των εκκρινόμενων μορίων και κυστιδίων (exosomes) των προμαστιγωτών μορφών στατικής φάσης ανάπτυξης της *L. donovani* [74, 75]. Ο *in vitro* χαρακτηρισμός του παράγοντα

eIF4A της *L. infantum*, έδειξε πως είναι μία RNA-εξαρτώμενη ATPάση και μία ATP-εξαρτώμενη RNA ελικάση [76].

Ο παράγοντας LeIF, είχε αρχικά περιγραφεί ως φυσικό ανοσοενισχυτικό και ως αντιγόνο που επάγει την Th1 ανοσολογική απόκριση [77]. Η LeIF επάγει την παραγωγή των προστατευτικών κυτταροκινών IL-12 και IFN- γ , σε ανθρώπινα μονοκύτταρα περιφερικού αίματος (PBMC) τόσο από ασθενείς που πάσχουν από λείσμανίαση όσο και από υγιείς εθελοντές [73]. Επιπλέον, η LeIF ρυθμίζει την παραγωγή IL-12p70, TNF- α και IL-10 από μακροφάγα προερχόμενα από μονοκύτταρα υγιών εθελοντών [72, 78].

Επιπρόσθετα, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το αμινοτελικό τμήμα της πρωτεΐνης (1-226), έχει χρησιμοποιηθεί ως μέρος ενός πολυπρωτεϊνικού εμβολίου, του Leish-111f, το οποίο αποδείχτηκε προστατευτικό σε πειραματικά μοντέλα ποντικού και χάμστερ. Ειδικότερα, η χορήγηση Leish-111f μαζί με το ανοσοενισχυτικό MPL-SE σε πειραματικό μοντέλο ποντικών, οδήγησε σε σημαντική προστασία των πειραματοζώων έναντι της *L. infantum*, καθώς παρατηρήθηκε μείωση του παρασιτικού φορτίου έως και 99,6%, ποσοστό προστασίας μεγαλύτερο από οποιοδήποτε άλλο υποψήφιο εμβόλιο σε πειραματικό μοντέλο σπλαγγικής λείσμανιάσης (Πίν. 1.3) [16, 69]. Επιπλέον, έχει δειχθεί πως η χορήγηση του πολυπρωτεϊνικού εμβολίου Leish-111f μέσω της ρινικής οδού, μπορεί να επάγει ανοσία προστατευτικού τύπου Th1, σε πειραματικό μοντέλο ευαίσθητου BALB/c ποντικού έναντι της *L. major* [79]. Το επίπεδο ασφαλείας και η κλιμάκωση της δόσης ελέγχθηκαν σε εθελοντές στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής, με ικανοποιητικά αποτελέσματα, ενώ κλινικές δοκιμές I και II έχουν ολοκληρωθεί στη Βραζιλία, το Περού και την Κολομβία σε ασθενείς με δερματική και βλεννογονοδερματική λείσμανίαση [29, 63].

Παρόλο που το σκεύασμα αυτό απέτυχε να επάγει προστασία στο μοντέλο του σκύλου, η συνδυασμένη με χημειοθεραπεία (Glucantime) χρήση του, οδήγησε σε βελτιωμένες κλινικές παραμέτρους (αιματολογικές, βιοχημικές και ανοσολογικές) των συμπτωματικών σκύλων και σε μειωμένο αριθμό θανάτων, συγκριτικά με τις ομάδες ελέγχου (ανοσοενισχυτικό μόνο του ή placebo) [11, 29].

Τέλος, οι ίδιες ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες, όταν χορηγήθηκαν συνδυαστικά με τον παράγοντα GM-CSF, σε περιστατικό αναφοράς (case report) ασθενούς με βλεννογονοδερματική λείσμανίαση που παρουσίασε ανθεκτικότητα στη συμβατική χημειοθεραπεία, ήταν επίσης αποτελεσματικές [80].

1.5 Ανοσοενισχυτικά.

Ο όρος ανοσοενισχυτικό (adjuvant) χρησιμοποιείται για οποιοδήποτε μόριο μπορεί να ενισχύσει τη χυμική ή κυτταρομεσολαβητική απόκριση έναντι ενός αντιγόνου. Τα ανοσοενισχυτικά επιδρούν στο ανοσοποιητικό σύστημα ενδυναμώνοντας την ανοσολογική απόκριση (χυμική και κυτταρική) έναντι των αντιγόνων ενός εμβολίου, χωρίς τα ίδια να παρουσιάζουν καμία ειδική αντιγονική δραστηριότητα [36, 59, 81]. Η χρήση των ανοσοενισχυτικών στα συμβατικά εμβόλια, επάγει ταχύτερες και μεγαλύτερης διάρκειας ανοσολογικές αποκρίσεις, ενισχύοντας την ανοσογονικότητα των συστατικών των εμβολίων και προάγοντας την πιθανότητα ανάπτυξης εμβολίων μονήρους ανοσοποίησης [36, 59, 81].

Τα αντιγόνα των παθογόνων που περιέχονται στα εμβόλια και τα ανοσοενισχυτικά που επιλέγονται σε κάθε περίπτωση, αλληλεπιδρούν ποικιλοτρόπως με το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή. Η επαγωγή της ανοσολογικής απόκρισης εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως η οδός χορήγησης του αντιγόνου (π.χ. ενδομυϊκή, υποδόρια κ.ά.), η δόση του αντιγόνου, η διάρκεια της παρουσίας του, καθώς και ο αριθμός και η συχνότητα των ανοσοποιήσεων. Τα ανοσοενισχυτικά μπορούν να επηρεάσουν όλους αυτούς τους παράγοντες με πολλούς και διαφορετικούς τρόπους.

Δεν υπάρχουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά που να περιγράφουν το ιδανικό ανοσοενισχυτικό για όλες τις καταστάσεις και κανένα ανοσοενισχυτικό δεν μπορεί να είναι αποτελεσματικό σε όλες τις εφαρμογές των εμβολίων [81]. Επιπρόσθετα, βιολογικά χαρακτηριστικά του ασθενή όπως η ηλικία, το ιατρικό του ιστορικό και το γενετικό του προφίλ, είναι σημαντικά και μπορούν να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα του ανοσοενισχυτικού.

Παρόλα αυτά υπάρχουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά που πρέπει να πληρούνται από ένα καλό ανοσοενισχυτικό, τα οποία μπορούν αδρά να κατηγοριοποιηθούν σε δύο κατηγορίες: βιολογικά και πρακτικά/οικονομικά χαρακτηριστικά. Ένα καλό ανοσοδιεγερτικό-ενισχυτικό εμβολίων πρέπει να ευαισθητοποιεί την επιθυμητή ανοσολογική απόκριση, χωρίς τοξικότητα και χωρίς την επαγωγή υπερβολικής φλεγμονής. Επιπλέον, στην επιλογή του ιδανικού ανοσοενισχυτικού πρέπει να ληφθούν υπόψη οικονομικές και πρακτικές παράμετροι, όπως είναι η σταθερότητά του, η ευκολία στον χειρισμό του, και το χαμηλό κόστος [60, 81].

Οι μηχανισμοί δράσης των ανοσοενισχυτικών, έχουν κατηγοριοποιηθεί με διαφορετικούς τρόπους στη διεθνή βιβλιογραφία [82]. Τα ανοσοενισχυτικά δρουν μέσω

τριών κυρίως μηχανισμών: δημιουργούν μία αντιγονική δεξαμενή αργής και παρατεταμένης αποδέσμευσης του αντιγόνου στο σημείο του εμβολιασμού, διευκολύνουν τη στόχευση του αντιγόνου στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα μέσω της ενίσχυσης της φαγοκυττάρωσης ή/και της ενεργοποίησης των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων, και τέλος, προκαλούν την παραγωγή πολλών και διαφορετικών κυτταροκινών, διαμορφώνοντας και ενισχύοντας τον τύπο της ανοσολογικής απόκρισης [36, 59, 81]. Ο σχηματισμός αντιγονικής δεξαμενής στο σημείο του εμβολιασμού είναι ο παλαιότερος και ο πιο καλά μελετημένος μηχανισμός δράσης των ανοσοενισχυτικών. Η παγίδευση του αντιγόνου και η αργή αποδέσμευσή του στο σημείο της έγχυσης εξασφαλίζει τη διαρκή ευαισθητοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος και την παραγωγή υψηλών τίτλων αντισωμάτων. Πρόσφατες μελέτες των μηχανισμών δράσης των ανοσοενισχυτικών έχουν επικεντρωθεί στην προσέλκυση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος στο σημείο της έγχυσης του ανοσοενισχυτικού. Τα ανοσοενισχυτικά δημιουργούν ένα τοπικό προφλεγμονώδες περιβάλλον για την αποτελεσματική προσέλκυση αυτών των κυττάρων. Μια ομάδα γονιδίων που κωδικοποιούν κυτταροκίνες, χημειοκίνες, υποδοχείς της έμφυτης ανοσίας και μόρια προσκόλλησης, χαρακτηρίζονται ως «γονίδια πυρήνας της απόκρισης των ανοσοενισχυτικών» (adjuvant core response genes) [82].

Τα ανοσοενισχυτικά, κατηγοριοποιούνται επίσης και ανάλογα με την σύστασή τους και τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες. Οι δύο κύριες κατηγορίες ανοσοενισχυτικών είναι οι ανοσορυθμιστές και οι φορείς - οχήματα, αν και ορισμένα ανήκουν ταυτόχρονα και στις δύο κατηγορίες [59]. Στους ανοσορυθμιστές περιλαμβάνονται οι υποδοχείς τύπου Toll (Toll-like υποδοχείς), οι σαπωνίνες και οι βακτηριακές τοξίνες. Δρούν άμεσα στην έμφυτη ανοσία και επηρεάζουν την παραγωγή κυτταροκινών μέσω της ενεργοποίησης των μορίων του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC). Στα οχήματα και στα συστήματα μεταφοράς περιλαμβάνονται μεταξύ άλλων τα μεταλλικά άλατα, τα γαλακτώματα, τα λιποσώματα και τα ιικά σωματίδια. Τα ανοσοενισχυτικά αυτά, παρουσιάζουν το αντιγόνο με το βέλτιστο δυνατό τρόπο, μέσω της ελεγχόμενης αποδέσμευσής του [59].

Υποψήφια ανοσοενισχυτικά που βρίσκονται υπό διερεύνηση αποτελούν οι ανασυνδυασμένες κυτταροκίνες και τα συστήματα μεταφοράς που αποτελούνται από βιοδιασπώμενα πολυμερή και στηρίζονται σε κατασκευασμένες δομές μικρο- και νάνο-κλίμακας [59, 81]. Τα εγκεκριμένα ανοσοενισχυτικά για χρήση σε εμβόλια που αφορούν στον άνθρωπο είναι το MPL (μη τοξικό ανάλογο του λιποπολυσακχαρίτη που

προσδένεται στον Toll-like υποδοχέα 4) από την κατηγορία των ανοσορυθμιστών και τα μεταλλικά άλατα, τα γαλακτώματα (π.χ. MF59) και τα λιποσώματα από την κατηγορία των συστημάτων μεταφοράς [59].

Τα ανοσοενισχυτικά που έχουν ελεγχθεί σε πειραματικά εμβόλια έναντι του παρασίτου *Leishmania* είναι τα ακόλουθα: η κυτταροκίνη IL-12, ο παράγοντας διέγερσης σχηματισμού αποικιών κοκκιοκυττάρων/μακροφάγων (Granulocyte macrophage-colony stimulating factor- GM-CSF), ο βάκιλος Calmette Guerin (BCG), τα άλατα του αλουμινίου (αλουμίνη, Alum), το μονοφωσφορικό λιπίδιο A, τα CpG ολιγοδεοξυνουκλεοτίδια, τα λιποσώματα, η γλυκάνη, η σαπωνίνη και τα ανοσοενισχυτικά Freund's [83]. Τα άλατα του αλουμινίου (alum) έχουν τη μεγαλύτερη κλινική χρήση ανάμεσα στα ανοσοενισχυτικά που έχουν εγκριθεί για χρήση στον άνθρωπο. Χρησιμοποιούνται για περισσότερο από εβδομήντα χρόνια και οι παρενέργειες που έχουν αναφερθεί είναι τοπικές αντιδράσεις όπως ερύθημα, υποδόρια οζίδια και κοκκιοματώδης φλεγμονή [36].

1.6 Ανοσολογική απόκριση έναντι του παρασίτου *Leishmania spp.*

1.6.1 Τύποι ανοσίας.

Οι διακριτές κατηγορίες ανοσίας είναι η έμφυτη - μη ειδική (innate) και η επίκτητη - ειδική (adaptive) ανοσία. Η έμφυτη ανοσία περιλαμβάνει το σύνολο των ανατομικών (επιδερμίδα, βλεννογόνοι) και φυσιολογικών (pH και μόρια όπως η λυσοζύμη, οι ιντερφερόνες α και β , και το συμπλήρωμα) φραγμών, καθώς και κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος όπως τα πολυμορφοπύρηνα ουδετερόφιλα (PMN) και τα μακροφάγα (ΜΦ). Αντίστοιχα, τα κύτταρα που συμμετέχουν στην επίκτητη ανοσία είναι τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APCs) (κύτταρα Langerhans του δέρματος και άλλα δενδριτικά κύτταρα, μονοκύτταρα και μακροφάγα των ιστών) καθώς και τα Τ και Β λεμφοκύτταρα [84]. Η επίκτητη ανοσία αναγνωρίζει ειδικούς ως προς το αντιγόνο επίτοπους μέσω ειδικευμένων υποδοχέων επιφανείας (αντίσωμα ή Τ κυτταρικός επίτοπος), καταλήγοντας σε αντιγονοειδική ανοσολογική απόκριση [81]. Η ανοσολογική απόκριση έναντι του παρασίτου του γένους *Leishmania* διαμεσολαβείται τόσο από την έμφυτη όσο και από την επίκτητη ανοσία [29].

1.6.2 Τύποι ανοσολογικής απόκρισης.

1.6.2.1 Χυμική ανοσολογική απόκριση.

Τα κύρια μόρια της χυμικής ανοσίας είναι τα εκκρινόμενα αντισώματα. Τα αντισώματα είναι γλυκοπρωτεΐνες που αποτελούνται από δύο πανομοιότυπες ελαφρές και δύο πανομοιότυπες βαριές αλυσίδες, στο αμινοτελικό άκρο των οποίων προσδένεται το αντιγόνο [85]. Τα εκκρινόμενα αντισώματα διακρίνονται σε διάφορες τάξεις (IgG, IgM, IgA, IgE) ανάλογα με τη μοριακή τους δομή. Επιπρόσθετα, σε κάθε τάξη αντισωμάτων διακρίνονται διαφορετικοί ισότυποι, που χαρακτηρίζουν τον τύπο της ανοσολογικής απόκρισης. Για παράδειγμα, η παραγόμενη από τα Th1 κύτταρα, IFN- γ προάγει την έκκριση ανοσοσφαιρινών του ισότυπου IgG2, ενώ οι κυτταροκίνες IL-4, IL-5 και IL-10 που παράγονται από τα Th2 κύτταρα, προάγουν την έκκριση ανοσοσφαιρινών του ισότυπου IgG1 [86, 87]. Τα σχετικά επίπεδα ειδικών ως προς το παράσιτο *Leishmania spp.*, IgG1 και IgG2a αντισωμάτων έχουν αναφερθεί ως προγνωστικοί δείκτες ίασης ή νόσου, συνδέοντας τον ισότυπο IgG1 με την ανάπτυξη της νόσου και τον ισότυπο IgG2a με ασυμπτωματική μόλυνση [88, 89].

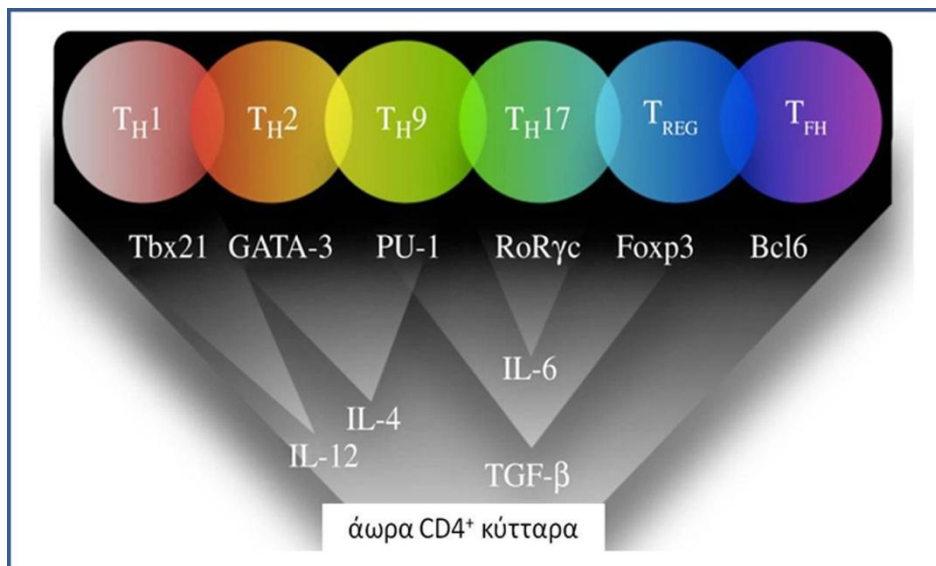
1.6.2.2 Κυτταρική ανοσολογική απόκριση.

Τα T κύτταρα παίζουν σημαντικό ρόλο στην παραγωγή αποτελεσματικών και μνημονικών αποκρίσεων έναντι των παθογόνων. Η ανάπτυξη προστατευτικής ανοσίας συνδέεται αδρά με την κυτταρομεσολαβούμενη απόκριση, ενώ η ανάπτυξη της μη προστατευτικής ανοσίας συνδέεται με ισχυρή χυμική απόκριση. Υπάρχουν δύο κύριοι πληθυσμοί T κυττάρων, τα βοηθητικά (Th) και τα κυτταροτοξικά (Tc) κύτταρα, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη των μορίων CD4 και CD8 στην επιφάνειά τους, αντίστοιχα. Τα Th κύτταρα αναγνωρίζουν πεπτίδια σε σύμπλεγμα με τα μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης II (MHC-II) και τα Tc κύτταρα με τα μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης I (MHC-I), αντίστοιχα [90]. Επιπλέον, οι δύο αυτοί πληθυσμοί αποτελούνται από επιμέρους υποπληθυσμούς (π.χ. Th1, Th2, T_{DTH}, Tregs) που χαρακτηρίζονται από τη διακριτή λειτουργία τους [91].

1.7 Ο ρόλος των CD4⁺ T κυττάρων.

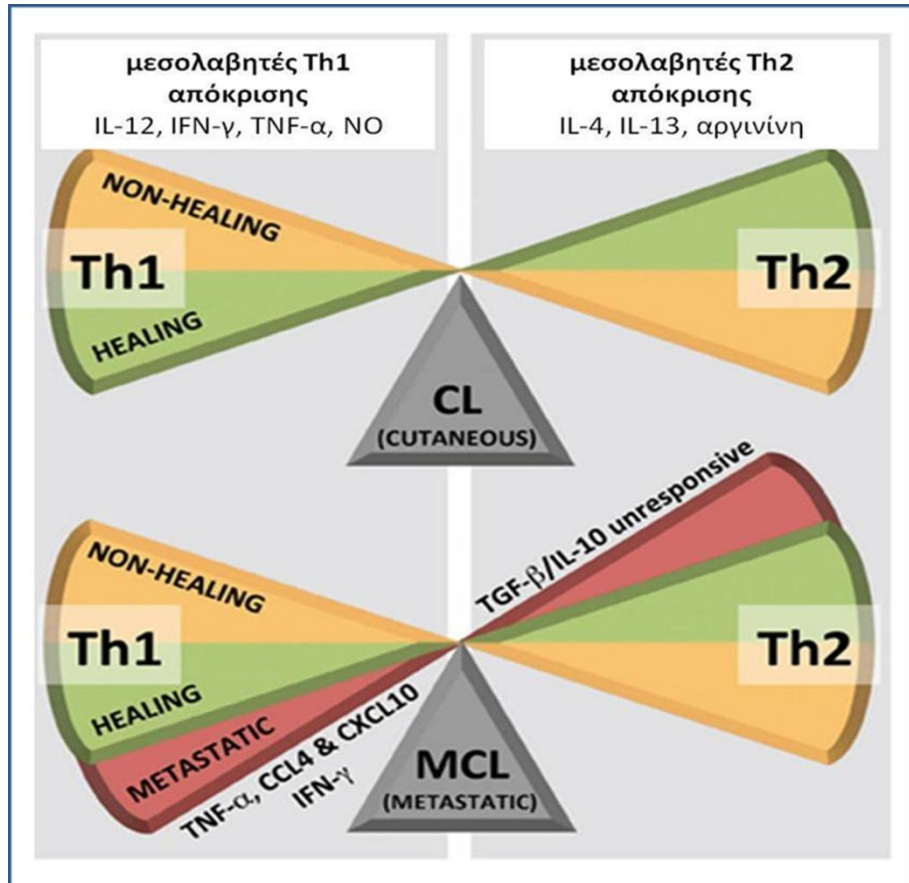
1.7.1 Th1-Th2 πόλωση.

Τα CD4⁺ T κύτταρα, μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε περαιτέρω υποπληθυσμούς (π.χ. Th1, Th2, Th17, Treg) (Εικ. 1.14) που εμφανίζουν ετερογένεια ως προς την ικανότητα έκκρισης κυτταροκινών [92, 93].



Εικόνα 1.14. Διαφοροποίηση υποπληθυσμών T κυττάρων. Τα διαφορετικά περιβάλλοντα κυτταροκινών, κατόπιν ενεργοποίησης του υποδοχέα των T κυττάρων σε συνδυασμό με κατάλληλη συνδιέγερση, ενεργοποιούν συγκεκριμένους και διαφορετικούς μεταγραφικούς παράγοντες, με αποτέλεσμα την τελική διαφοροποίηση των T κυττάρων. Τροποποιημένη σχηματική απεικόνιση από Coomes, S.M. *et al*, 2013.

Η κυτταρική απόκριση τύπου Th1 που θεωρείται υπεύθυνη για την ανοσία έναντι των ενδοκυττάρων παθογόνων, χαρακτηρίζεται από την παραγωγή των κυτταροκινών IL-12, IL-2, TNF-α και IFN-γ που ευνοούν την κυτταρική ανοσία και τη φαγοκυττάρωση των παθογόνων [58, 94, 95]. Επιπλέον, η Th1 τύπου απόκριση, ευνοεί τις αντιδράσεις καθυστερημένης υπερευαισθησίας στις οποίες συμμετέχουν ειδικά T κύτταρα (T_{DTH}) [95]. Αντίστοιχα, μία κυτταρική απόκριση τύπου Th2, ευνοεί την ανάπτυξη χυμικής ανοσίας και εκκρίνει τις κυτταροκίνες IL-4, IL-5, IL-13 και IL-10 [94]. Αυτοί οι δύο υποπληθυσμοί των Th κυττάρων, αποτελούν τους δύο ακραίους πόλους του μεγάλου λειτουργικού ρεπερτορίου των T κυττάρων [92].



Εικόνα 1.15. Το ανοσολογικό Th1/Th2 δόγμα στην λείσμανίαση. Η δερματική λείσμανίαση (CL) παρουσιάζει ένα σχετικά απλό διπολικό φάσμα, ενώ αντίστοιχα, η μεταστατική/βλενογοννοδερματική λείσμανίαση (MCL) παρουσιάζει πιο σύνθετο φάσμα. Τροποποιημένη σχηματική απεικόνιση από Hartley, M.A. *et al.*, 2012.

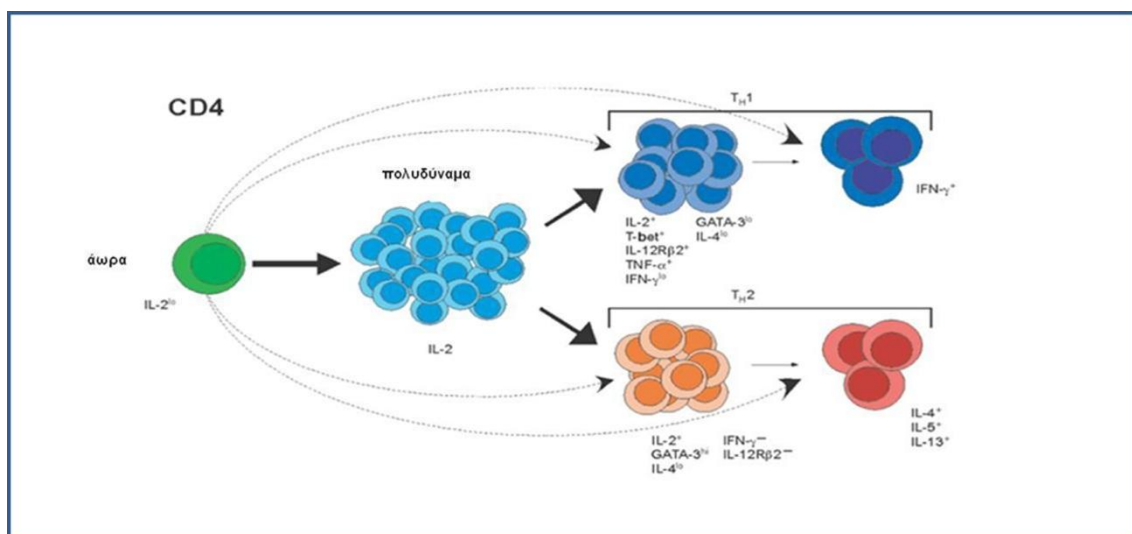
Η ανοσολογική απόκριση έναντι του παρασίτου είναι γνωστή από την μελέτη της νόσου σε πειραματικά μοντέλα [29]. Μελέτες της λείσμανίασης σε πειραματικά μοντέλα ποντικού κατέδειξαν την Th1/Th2 πόλωση ως χαρακτηριστική για την αντοχή ή την ευαισθησία αντίστοιχα έναντι της νόσου (Εικ. 1.15). Η πόλωση αυτή είναι ξεκάθαρη στη δερματική μορφή της νόσου όπου παρατηρούνται γενετικά ανθεκτικές φυλές ποντικών, όπως τα CBA και τα C57BL/6 που αναπτύσσουν Th1 ανοσολογική απόκριση με έκκριση άφθονης IFN-γ, IL-12 και IL-2, και ευαίσθητες φυλές, όπως τα BALB/c όπου αναπτύσσουν Th2 ανοσολογική απόκριση που χαρακτηρίζεται από την παραγωγή IL-4, IL-5 και IL-10 (Εικ. 1.15) [24, 34]. Παρόλα αυτά, η πόλωση αυτή δεν είναι καλά προσδιορισμένη στη σπλαγχνική λείσμανίαση [34].

Τα παραπάνω μοντέλα προσομοιάζουν σε μεγάλο βαθμό την κλινική εικόνα της λείσμανίασης στον άνθρωπο, αν και η ξεκάθαρη πόλωση των T κυττάρων στην δερματική λείσμανίαση του ανθρώπου δεν υφίσταται [96]. Οι ασθενείς αυτοί εμφανίζουν

μικτή Th1/Th2 κυτταρική απόκριση. Επιπλέον, οι ασθενείς που υποφέρουν από σπλαγγική λείσμανίαση, εκκρίνουν κυτταροκίνες λιγότερο πολωμένες από αυτές που παρατηρούνται στο μοντέλο του ποντικού και αναπτύσσουν πολυπλοκότερες T κυτταρικές αποκρίσεις [96, 97].

1.7.2 Παράγοντες που συμμετέχουν στην Th1/Th2 πόλωση.

Τα καθοριστικά γεγονότα που επηρεάζουν τη λειτουργική διαφοροποίηση των T κυττάρων προς τον Th1 ή Th2 ανοσοφαινότυπο, θεωρούνται ότι συμβαίνουν στους λεμφαδένες νωρίς κατά την μόλυνση. Το επικρατές μοντέλο για τη διαφοροποίηση των Th κυττάρων υποστηρίζει ότι κατά τις αρχικές κυτταρικές διαιρέσεις παρατηρείται σταδιακή αναδόμηση της χρωματίνης με στόχο την ενεργοποίηση γονιδίων, που οδηγούν μετά από 3-5 διαιρέσεις στην απόκτηση πολωμένου φαινοτύπου. Στην πορεία αυτή, τα κύτταρα αρχικά εκφράζουν τόσο τον μεταγραφικό παράγοντα GATA-3, που είναι χαρακτηριστικός για τον Th2 υποπληθυσμό, όσο και τον T-bet, που είναι χαρακτηριστικός για τον Th1 υποπληθυσμό. Η πρόσδεση αυτών των μεταγραφικών παραγόντων σε κατάλληλους ενισχυτές, προάγει τη μεταγραφή των κυτταροκινών IL-4 και IFN- γ αντίστοιχα (Εικ. 1.16) [98]. Αυτό προφανώς οφείλεται στο ότι κατά την παραμονή τους στον λεμφαδένα, όπου στις περισσότερες περιπτώσεις τα αντιγόνα μεταφέρονται από αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και βρίσκονται σε μικρές ποσότητες, τα άωρα λεμφοκύτταρα υφίστανται κλωνικό πολλαπλασιασμό υπό μη πολωμένες συνθήκες.



Εικόνα 1.16. Διαφοροποίηση CD4⁺ T κυττάρων. Άωρα CD4⁺ T κύτταρα ευαισθητοποιούνται σε συνθήκες που ευνοούν την Th1 ή Th2 πόλωση, και διαφοροποιούνται περαιτέρω σε κύτταρα που εκκρίνουν τις κυτταροκίνες IFN- γ ή IL-4, αντίστοιχα. Μετά την ενεργοποίησή τους, παρατηρείται σημαντική ετερογένεια σε επίπεδο κάθε κυττάρου ξεχωριστά όσον αφορά στην έκκριση των κυτταροκινών IFN- γ ή IL-4. Μέσα σ' έναν πληθυσμό ενεργοποιημένων κυττάρων, ένα ποσοστό τους εκκρίνει IL-2 και έχει την ικανότητα να διαφοροποιηθεί σε κύτταρα που παράγουν είτε IFN- γ , είτε IL-4 (πολυδύναμα). Ένας άλλος πληθυσμός περισσότερο διαφοροποιημένων κυττάρων φέρουν mRNA για παράγοντες που χαρακτηρίζουν Th1 ή Th2 κύτταρα, αλλά έχουν χαμηλή έκφραση και μετάφραση των mRNA για τις χαρακτηριστικές κυτταροκίνες IFN- γ και IL-4. Αυτά τα κύτταρα διατηρούν ωστόσο την ικανότητά τους να διαφοροποιηθούν σε Th1 και Th2 κύτταρα αντίστοιχα, μετά από περαιτέρω διέγερση. Τα περισσότερα διαφοροποιημένα κύτταρα έχουν την ικανότητα να εκκρίνουν IFN- γ ή IL-4 αμέσως μετά από διέγερση. Τροποποιημένη σχηματική απεικόνιση από Seder, R.A. *et al.*, 2003.

Η μη αναστρέψιμη πόλωση των Th κυττάρων συνοδεύεται από σίγαση των GATA-3 ή T-bet, γεγονός που ρυθμίζεται από ποικίλες κυτταροκίνες, κυρίως τις IL-2 και IL-4, αλλά και τις IL-18, IL-23 και IFN- γ , με σταδιακό τρόπο (Εικ. 1.16) [99]. Τα γεγονότα αυτά συμβαίνουν στην περιοχή της φλεγμονής όπου πιθανότατα λαμβάνει χώρα ένα νέο κύμα πολλαπλασιασμού υπό την επίδραση των κυτταροκινών.

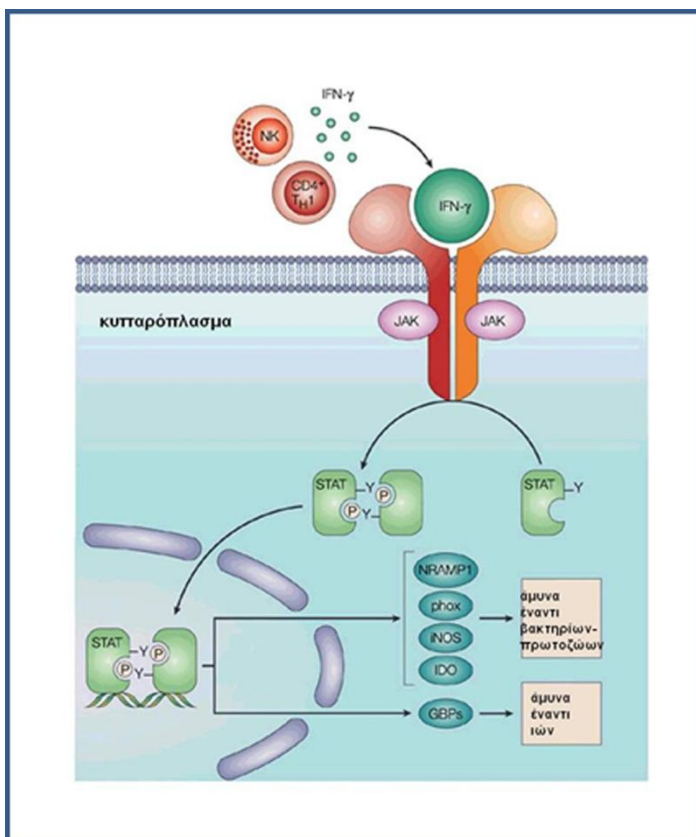
Η τάση της ανοσολογικής απόκρισης να πολωθεί προς Th1 ή Th2 ανοσοφαινότυπο, εξαρτάται από έναν συνδυασμό παραγόντων, όπως γενετικοί παράγοντες του ξενιστή καθώς και ο τύπος και η ποσότητα του αντιγόνου [94]. Η πόλωση των Th κυττάρων καθοδηγείται τόσο από κατάλληλα πολωμένους πληθυσμούς δενδριτικών κυττάρων, όσο και από το περιβάλλον της ιστικής φλεγμονής στο οποίο εκτίθενται, όπου η ισορροπία μεταξύ IL-4 και IL-12 είναι καθοριστική.

Η παραγωγή της κυτταροκίνης IL-4 λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής της παραγωγής χημειοκινών που συμμετέχουν στην προστατευτική Th1 απόκριση και παρεμποδίζει την ενεργοποίηση των μακροφάγων. Παρόλα αυτά, κατά τα πρώτα στάδια της μόλυνσης, η IL-4 είναι ικανή να επάγει την παραγωγή της κυτταροκίνης IL-12 από τα ΔΚ [100]. Ως εκ τούτου, μία πρόωρη και παροδική παραγωγή της IL-4 είναι απαραίτητη για την επαγωγή της Th1 απόκρισης, δρώντας παρακρινώς στα ΔΚ, τα οποία στην συνέχεια παράγουν IL-12 μετά από τη μετανάστευσή τους στους επιχώριους λεμφαδένες.

Η κυτταροκίνη IL-12 συμμετέχει στην επαγωγή της κυτταρομεσολαβούμενης ανοσίας και στον κλωνικό πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων [83]. Παράγεται από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα όπως τα μακροφάγα, τα ουδετερόφιλα και τα ΔΚ. Η IL-12 ενεργοποιεί τα μακροφάγα και ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό και την παραγωγή IFN- γ από τα T και NK κύτταρα [36]. Προωθεί την ανάπτυξη CD4⁺ Th1 κυττάρων, που είναι

απαραίτητα για την προστατευτική ανοσία έναντι της νόσου [42]. Ταυτόχρονα περιορίζει την παραγωγή της IL-4 από τα Th2 τύπου λεμφοκύτταρα που αναπτύσσονται στα αρχικά στάδια της μόλυνσης, τόσο στα ανθεκτικά όσο και στα ευαίσθητα ποντίκια [101]. Σε πειραματικά συστήματα, όπου η παραγωγή της IL-12 παρεμποδίστηκε, είτε συστηματικά με την χορήγηση εξουδετερωτικών μονοκλωνικών αντισωμάτων, είτε με την κατασκευή γενετικά ελλειμματικών ως προς την παραγωγή IL-12 πειραματόζων, παρατηρήθηκε ότι ο ξενιστής απέτυχε να αναπτύξει Th1 απόκριση ικανή να ελέγξει την εξάπλωση του παρασίτου [102, 103]. Στα γενετικά ευαίσθητα πειραματόζωα παρατηρείται ελάττωση της σηματοδότησης του υποδοχέα της IL-12, που πιθανότατα οφείλεται στα χαμηλά επίπεδα έκφρασης της $\beta 2$ αλυσίδας του. Κατά συνέπεια, δεν παρεμποδίζεται η παραγωγή IL-4 νωρίς στην πορεία της μόλυνσης, και ως εκ τούτου εγκαθίσταται η Th2 απόκριση.

Η IFN- γ είναι επίσης απαραίτητη για τον έλεγχο της εξάπλωσης του παρασίτου στους ιστούς του ξενιστή. Αποτελεί το μοναδικό μέλος της ομάδας των ιντερφερονών τύπου II. Αντίθετα με τις ιντερφερόνες α και β (ιντερφερόνες τύπου I) που έχουν κυρίως αντιϊκή δράση, η IFN- γ ρυθμίζει την δράση των κυτταρικών υποπληθυσμών του ανοσοποιητικού συστήματος, ενώ οι αντιϊκές τις δράσεις είναι σαφώς ασθενέστερες [104].



Εικόνα 1.17. Ενδοκυττάριοι αντιμικροβιακοί διαμεσολαβητές που επάγονται από την IFN- γ . Η πρόσδεση της IFN- γ στον υποδοχέα της στην επιφάνεια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, οδηγεί στην ενεργοποίηση διαφόρων οδών σηματοδότησης, συμπεριλαμβανομένων των JAK κινασών και των πρωτεϊνών STAT. Τροποποιημένη σχηματική απεικόνιση από Taylor, G.A. *et al.*, 2004.

Παράγεται τόσο από τα φυσικά κύτταρα φονείς (NK) νωρίς κατά την έναρξη της νόσου όσο και από τα $CD4^+$ Th1 κύτταρα μέσω της IL-12 (Εικ. 1.17). Για την παραγωγή της απαιτούνται τρία σήματα: ένα συνδετικό μόριο για τον υποδοχέα, η παρουσία κατάλληλων κυτταροκινών στο μικροπεριβάλλον του κυττάρου και η επαφή με βοηθητικά κύτταρα μέσω μορίων κυτταρικής πρόσφυσης. Οι υποδοχείς της συναντώνται σχεδόν σε όλους τους κυτταρικούς τύπους [105]. Η εκκρινόμενη IFN- γ ενεργοποιεί το παρασιτιζόμενο μακροφάγο ώστε να συνθέσει το ένζυμο επαγόμενη συνθετάση του NO (iNOS), που με τη σειρά της καταλύει την παραγωγή ενεργών ριζών αζώτου που είναι τοξικές για την ενδοκυττάρια αμαστιγωτή μορφή της *Leishmania* [106]. Τόσο η IFN- γ όσο και η iNOS είναι μόρια απαραίτητα για την άμυνα έναντι του παρασίτου. Η IFN- γ μπορεί να ενεργοποιήσει τα μακροφάγα είτε μόνη της είτε δρώντας συνεργιστικά με τον παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNF) και δευτερευόντως με τις κυτταροκίνες IL-2, IL-6 και IL-7 [107]. Οι υπόλοιπες βιολογικές δράσεις της IFN- γ , εστιάζονται κυρίως στη ρύθμιση της έκφρασης των αντιγόνων του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) από τα κύτταρα του οργανισμού. Συγκεκριμένα, η IFN- γ φαίνεται να ενισχύει την έκφραση των μορίων MHC τάξης I και να επάγει την έκφραση των μορίων MHC τάξης II από κυτταρικούς τύπους που δεν τα εκφράζουν συνεχώς.

Η υπερικογένεια των TNF πρωτεϊνών αριθμεί 19 μέλη, τα οποία μετάγουν το σήμα τους μέσω 29 υποδοχέων [108]. Έχουν αναγνωρισθεί δύο υποδοχείς του TNF με ανεξάρτητη λειτουργία, ο p60-p55 ή TNFR1 (κύριος υποδοχέας του διαλυτού TNF), που εκφράζεται σταθερά σε όλους σχεδόν τους κυτταρικούς τύπους και ο p80-p75 ή TNFR2 (κύριος υποδοχέας του μεμβρανικού TNF), που εμφανίζει επαγόμενη έκφραση στα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος [109]. Η IFN- γ αποτελεί ισχυρό επαγωγέα των υποδοχέων αυτών. Οι υποδοχείς αυτοί πυροδοτούν διάφορους μηχανισμούς σηματοδότησης, που περιλαμβάνουν την κινάση I- κ B (IKK), την αμινοτερματική κινάση c-Jun (JNK), τις p38 και p42/44 πρωτεϊνικές κινάσες που ενεργοποιούνται από μιτογόνα (MAPK), και με τη σειρά τους ελέγχουν την έκφραση γονιδίων μέσω μεταγραφικών παραγόντων όπως ο NF- κ B και ο AP-1 [110, 111]. Οι κύριοι κυτταρικοί τύποι που παράγουν τον TNF- α είναι τα μονοκύτταρα/μακροφάγα, τα T κύτταρα, οι ινοβλάστες, τα λεία μυϊκά κύτταρα και τα ιστιοκύτταρα, ενώ ο TNF- β παράγεται κυρίως από τα T κύτταρα. Ο ρόλος του TNF στην άμυνα του οργανισμού έναντι των παθογόνων, ιδιαίτερα των ενδοκυττάρων, είναι καίριος. Ενδεικτικά αναφέρεται η συμβολή του στην ενεργοποίηση και διαφοροποίηση των

μονοκυττάρων/μακροφάγων, συχνά σε συνέργεια με την IFN- γ , οπότε και ενισχύεται τόσο η οδός παραγωγής ενεργών ενδιάμεσων μεταβολιτών του οξυγόνου όσο και της παραγωγής μονοξειδίου του αζώτου (NO). Επίσης, συμμετέχει στον πολλαπλασιασμό των T και B κυττάρων και στην έκφραση του υποδοχέα IL-2R. Η δράση του επεκτείνεται στην ενεργοποίηση των πολυμορφοπύρηνων, την παραγωγή GM-CSF, G-CSF, PDGF και IL-1 και στην έκφραση των αντιγόνων MHC-I και ELAM-1 [112].

Οι χημειοκίνες αποτελούν μικρές κυτταροκίνες, μεγέθους 8-10 kDa, και διαχωρίζονται ανάλογα με τα κατάλοιπα κυστεΐνης στο αμινοτελικό τους άκρο, στις CXC, CC, CX3C και C χημειοκίνες [113, 114]. Ορισμένες χημειοκίνες εκφράζονται συνεχώς και συμμετέχουν στην οργάνωση της δομής του λεμφικού ιστού (ομοιοστατικές χημειοκίνες), ενώ άλλες επάγονται κατά τη μόλυνση με παθογόνα με σκοπό την προσέλκυση κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος στον τόπο της φλεγμονής (φλεγμονώδεις χημειοκίνες), χωρίς όμως αυτή η διάκριση να είναι απόλυτη [114]. Οι φλεγμονώδεις χημειοκίνες εκκρίνονται ως απόκριση σε βακτηριακά, ιικά, παρασιτικά, μυκητιακά και μυκοβακτηριακά παθογόνα [113]. Ο κύριος ρόλος των χημειοκινών είναι η προσέλκυση κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος όπως τα μονοκύτταρα και τα ανώριμα ΔΚ στο σημείο της φλεγμονής [94, 113]. Από τις οικογένειες των χημειοκινών, οι CXC κυρίως, προσελκύουν πολυμορφοπύρηνια ουδετερόφιλα, ενώ οι CC χημειοκίνες προσελκύουν λεμφοκύτταρα και μονοκύτταρα. Οι χημειοκίνες, εκτός από την προσέλκυση των κυττάρων της έμφυτης ανοσίας, παρουσιάζουν ευρύτερη κλίμακα βιολογικών δραστηριοτήτων, όπως η συμμετοχή τους στην κυτταρομεσολαβούμενη ανοσία και η εμπλοκή τους στη διαφοροποίηση της Th1-Th2 απόκρισης [113]. Μελέτες σε πειραματικό μοντέλο ποντικού που έφερε τεχνητή εξάλειψη των γονιδίων των κυτταροκινών IL-12 και IL-4, ανέδειξαν την ύπαρξη ενός εναλλακτικού μονοπατιού πόλωσης των λεμφοκυττάρων προς Th1/Th2 ανοσοφαινότυπο, του μονοπατιού των χημειοκινών [94, 115]. Τα αποτελέσματα πολλών ανεξάρτητων μελετών αναδεικνύουν μια απρόσμενη ομοιότητα μεταξύ του μονοπατιού της IL-12 και της αλληλεπίδρασης των χημειοκινών CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β) και CCL5 (RANTES) με τον υποδοχέα CCR5. Ειδικότερα, όταν οι χημειοκίνες CCL3, CCL4, CCL5 υπάρχουν σε επαρκή ποσότητα, κατά την ενεργοποίηση του T κυττάρου, ευοδώνεται σε σημαντικό βαθμό η Th1απόκριση. Παράλληλα, ανάλογη σχέση υφίσταται μεταξύ της IL-4, της CCL2, και των υποδοχέων CCR4 και CCR8 [94, 115]. Επιπλέον, οι χημειοκίνες προσελκύουν τα ώριμα ΔΚ στα λεμφικά αγγεία, φέρνοντας έτσι σε επαφή τα T κύτταρα και τα

αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα στο εσωτερικό του παρακείμενου λεμφικού οργάνου [94]. Επίσης, χημειοκίνες όπως η CCL3 (MIP-1α) και η CCL2 (MCP-1) επάγουν την οξειδωτική έκρηξη σε παρασιτιζόμενα μακροφάγα [113]. Επιπλέον, η MIP-1α εμπλέκεται στην παραγωγή της IFN-γ και διευκολύνει τις κυτταρομεσολαβούμενες αποκρίσεις μέσω επιλεκτικής προσέλκυσης των Th1 κυττάρων [94, 113].

Άλλες κυτταροκίνες που συμμετέχουν στην πόλωση των Th1 κυττάρων, είναι οι IL-27 και η IL-23 [116]. Η IL-27 είναι μία κυτταροκίνη που παράγεται μετά από έκθεση σε διεγέρτες φλεγμονής και σχετίζεται λειτουργικά και δομικά με την IL-12. Συμμετέχει στη ρύθμιση των λειτουργιών των T κυττάρων και στην παραγωγή της IFN-γ. Η IL-23 είναι μια προφλεγμονώδης κυτταροκίνη που επίσης συμμετέχει στη ρύθμιση της παραγωγής της IFN-γ.

Ωστόσο, οι απαντήσεις τύπου Th1 είναι λειτουργικά ετερογενείς. Έχει δειχθεί ότι ένας υψηλής συχνότητας πληθυσμός $CD4^+$ T κυττάρων που παράγει μόνο IFN-γ, δεν επαρκεί για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στη μόλυνση από το παράσιτο του γένους *Leishmania*. Οι Th1 αποκρίσεις που κατευθύνονται από $CD4^+$ T κύτταρα που παράγουν μόνο IFN-γ ή TNF, έχουν περιορισμένη ικανότητα να εξελιχθούν σε κύτταρα μνήμης σε σχέση με τα T κύτταρα που παράγουν IL-2 [117]. Ως εκ τούτου, η ικανότητά τους να παρέχουν μακροχρόνια προστασία είναι περιορισμένη. Από την άλλη μεριά, η IFN-γ και ο TNF συνεργάζονται προκειμένου να σκοτώσουν πιο αποτελεσματικά το παράσιτο, επομένως, τα πολυλειτουργικά $CD4^+$ T κύτταρα που παράγουν ταυτόχρονα διάφορες κυτταροκίνες είναι περισσότερο πιθανό να εμπλέκονται στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας στην μόλυνση.

Αντίστοιχα, οι κυτταροκίνες που συμμετέχουν στην πόλωση των Th2 κυττάρων είναι οι IL-13, IL-10, TGF-β και IL-17. Η IL-13 μοιράζεται κοινό μονοπάτι μεταγωγής σήματος μέσω του υποδοχέα άλφα της IL-4. Σχετίζεται με την ευαισθησία έναντι της νόσου παρεμποδίζοντας την παραγωγή της IL-12 από τα μακροφάγα. Δρα ανεξάρτητα από την IL-4, καταδεικνύοντας πως οι δράσεις των δύο κυτταροκινών είναι πιθανώς αθροιστικές [118, 119]. Η IL-10 είναι ανοσοκατασταλτική και απαραίτητη για την παραμονή του παρασίτου και την επιδείνωση της μόλυνσης. Καταστέλει την ενεργοποίηση των μακροφάγων και εμποδίζει την ωρίμανση των ΔΚ [120]. Ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού β (TGF-β) είναι μία ρυθμιστική κυτταροκίνη που ελέγχει την έναρξη και την εξέλιξη των φλεγμονωδών αποκρίσεων. Διαφορετικά είδη του παρασίτου επάγουν την παραγωγή TGF-β από τα μακροφάγα. Σε πειραματικά μοντέλα

ποντικών, ο TGF- β παρεμποδίζει τις Th1 αποκρίσεις και οδηγεί σε αυξημένη ευαισθησία έναντι του παρασίτου. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω καταστολής της παραγωγής του μονοξειδίου του αζώτου και παρεμπόδισης των TNF και IFN- γ [121]. Ο πιο πολλά υποσχόμενος ρόλος της IL-17 είναι η επαγωγή προφλεγμονωδών αποκρίσεων μέσω της παραγωγής κυτταροκινών, όπως οι IL-6, TGF- β ή TNF [122]. Υπάρχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα σχετικά με τη βιολογική δράση της κυτταροκίνης IL-17. Πειραματικά μοντέλα δερματικής λεϊσμανίασης που αναπτύχθηκαν στο ποντίκι, αναδεικνύουν πως η κυτταροκίνη εμπλέκεται στην επιδείνωση της νόσου ενώ παρατηρείται η ανάπτυξη προστατευτικής δράσης στην παθογένεια της σπλαγχνικής λεϊσμανίασης του ανθρώπου [123, 124].

Επιπλέον, απαραίτητο για την επαγωγή και διατήρηση μιας αποτελεσματικής ανοσολογικής απόκρισης είναι και το συνδιεγερτικό μόριο CD40 καθώς και ο συνδέτης του, CD40L. Ανθεκτικά C57BL/6 ποντίκια, ελλειματικά στον CD40L (CD40L^{-/-}), αναπτύσσουν σοβαρές δερματικές βλάβες μετά από μόλυνση με την *L. major*, οι οποίες συνδέονται με ανεπαρκή παραγωγή της κυτταροκίνης IL-12 [125]. Παράλληλα, η πρόσδεση του μορίου CD40 στην επιφάνεια των μακροφάγων παρουσία της IFN- γ , προκαλεί την ενεργοποίηση των κυττάρων και κατ'επέκταση την καταστροφή των ενδοκυττάρων αμαστιγωτών μορφών [126]. Επίσης, η χορήγηση μονοκλωνικού αντισώματος έναντι του CD40, σε ευαίσθητα BALB/c ποντίκια που έχουν μολυνθεί με την *L. major*, οδηγεί στην εγκατάσταση προστατευτικής Th1 απόκρισης [127]. Ωστόσο, η αλληλεπίδραση CD40-CD40L δεν επαρκεί για την εγκατάσταση Th1 απόκρισης, όταν απουσιάζει η συνδιέγερση μέσω του μορίου CD28 [128].

1.8 Ο ρόλος των CD8⁺ T κυττάρων.

Οι δύο κύριες λειτουργίες των CD8⁺ T κυττάρων, που συνεισφέρουν στην εξέλιξη της λεϊσμανίασης, είναι η κυτταροτοξική δραστηριότητα και η παραγωγή κυτταροκινών. Μέχρι πρότινος, θεωρούνταν πως τα CD8⁺ T κύτταρα παίζουν ρόλο μόνο σε δευτερογενείς αποκρίσεις σε περιπτώσεις επαναμόλυνσης. Παρόλα αυτά, έχουν αποδειχθεί απαραίτητα και για τον έλεγχο της πρωτογενούς μόλυνσης, στρέφοντας την απόκριση προς τον Th1 ανοσοφαινότυπο [29, 129]. Τα CD8⁺ T κύτταρα που παράγουν IFN- γ , είναι θεμελιώδη για την ανάπτυξη της Th1 απόκρισης και συνεισφέρουν στην επούλωση των πληγών σε πειραματικό μοντέλο C57BL/6 ποντικών.

Εκτός από την παραγωγή κυτταροκινών, τα $CD8^+$ T κύτταρα συμμετέχουν στον έλεγχο της μόλυνσης μέσω κυτταροτοξικών μηχανισμών, όπως η παραγωγή περφορίνης και η ενεργοποίηση του μονοπατιού Fas/FasL [130]. Ωστόσο, ο ακριβής τρόπος με τον οποίο πραγματοποιείται η ενεργοποίηση των $CD8^+$ T κυττάρων στην λείσμανίαση, δεν είναι γνωστός, καθώς το παράσιτο βρίσκεται στο παρασιτοφόρο χυμοτόπιο των μακροφάγων και δεν είναι ξεκάθαρο πως αυτά τα κύτταρα παρουσιάζουν τα αντιγόνα μέσω των μορίων MHC τάξης I [29]. Ο πιο πιθανός μηχανισμός ενεργοποίησης είναι η διασταυρούμενη παρουσίαση.

1.9 Μακροφάγα, δενδριτικά και πολυμορφοπύρηνα κύτταρα.

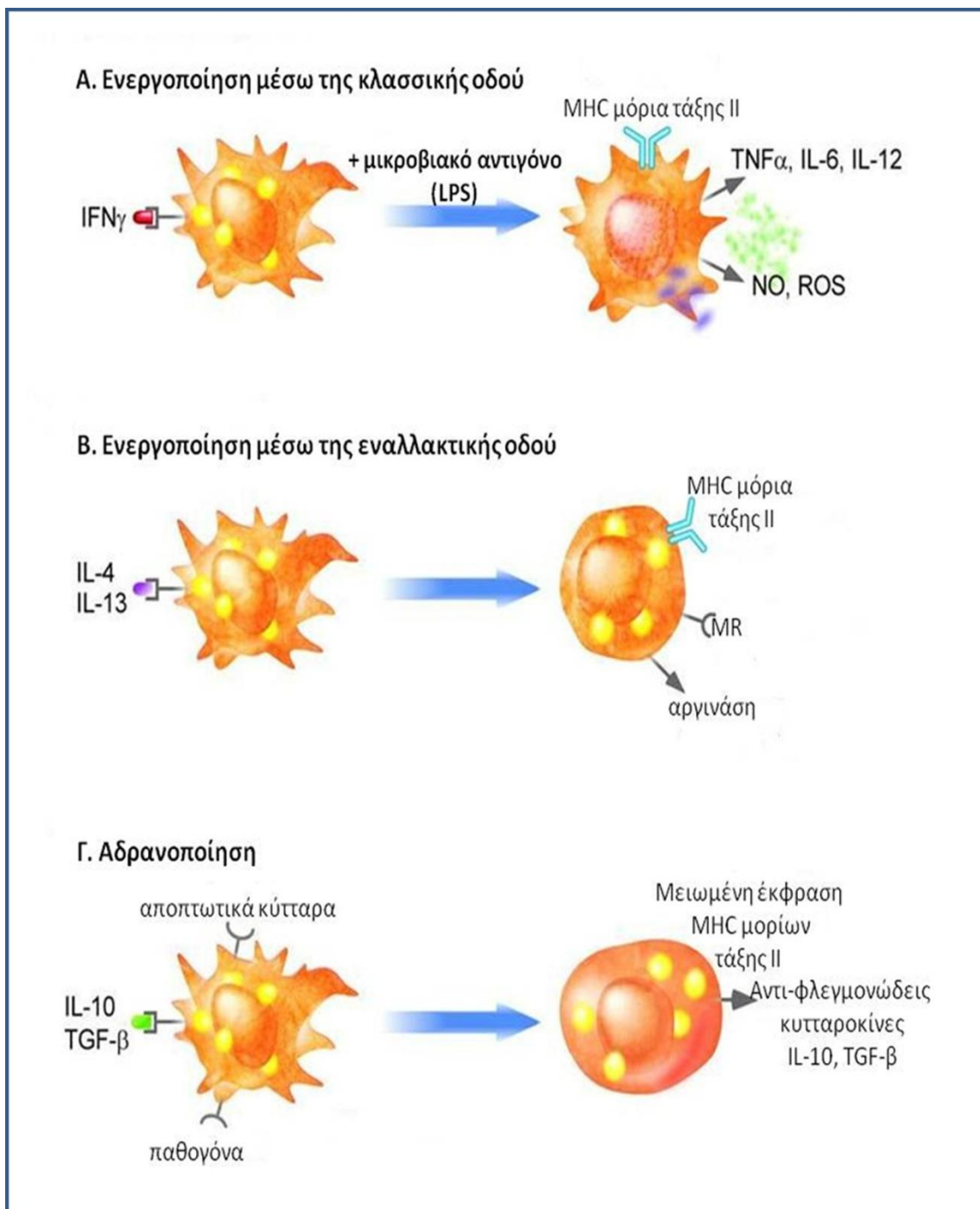
1.9.1 Μακροφάγα

Τα μακροφάγα αποτελούν τα κύρια φαγοκύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της λείσμανίασης. Δρουν έχοντας διπλό ρόλο, τόσο ως κύτταρα ξενιστές για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό του παρασίτου στο εσωτερικό του φαγολυσωσώματος, όσο και ως αποτελεσματικά κύτταρα για την εξάλειψη του παρασίτου [131].

Οι μετακυκλικές προμαστιγωτές μορφές, κατά την είσοδό τους στην κυκλοφορία του αίματος του ξενιστή, αλληλεπιδρούν αρχικά με τα μακροφάγα, μέσω του μαστιγίου τους. Στη συνέχεια, προσλαμβάνονται από τα μακροφάγα, με φαγοκυττάρωση, κυρίως μέσω της συμμετοχής των παραγόντων του συμπληρώματος και των υποδοχέων CR1 και CR3, οι οποίοι εντοπίζονται στην επιφάνεια των κυττάρων [132]. Παρόλα αυτά, έχουν αναφερθεί και άλλοι υποδοχείς των μακροφάγων που εμπλέκονται σε αυτή την διαδικασία, όπως οι υποδοχείς μαννόζης, οι υποδοχείς φμπρονεκτίνης και οι Fcγ υποδοχείς [133, 134]. Στη συνέχεια, τα παράσιτα περιβάλλονται από το φαγόσωμα, το οποίο κατόπιν σύντηξης με τα ενδοσώματα, μετατρέπεται σε φαγολυσόσωμα [135].

Η είσοδος του παρασίτου στα μακροφάγα, οδηγεί στην παραγωγή των μεσολαβητών της οξειδωτικής έκρηξης (ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS) και του μονοξειδίου του αζώτου (NO)), που αποτελούν απαραίτητα μόρια για την εξάλειψη του παρασίτου [136]. Ανθεκτικοί ποντικοί που παρουσιάζουν σαφή ενεργοποίηση της Th1 απόκρισης, παράγοντας υψηλές ποσότητες IFN- γ , ενεργοποιούν τα μακροφάγα και περιορίζουν το ενδοκυττάριο παράσιτο, μέσω της παραγωγής του NO (κλασική οδός ενεργοποίησης των μακροφάγων) [137, 138]. Επιπλέον, η εμπλεκόμενη στην Th1 απόκριση, IL-12

κυτταροκίνη, είναι επίσης απαραίτητη για την λείσμανιοκτόνο δράση των μακροφάγων, καθώς οδηγεί σε αύξηση της σύνθεσης της επαγόμενης συνθετάσης του μονοξειδίου του αζώτου (iNOS), του NO και της παραγωγής IFN- γ από τα T και NK κύτταρα (Εικ. 1.18) [138]. Επίσης, τα μακροφάγα που ενεργοποιούνται μέσω της κλασσικής οδού, παρουσιάζουν μειωμένα αποθέματα αργινίνης, καθώς τη χρησιμοποιούν για την παραγωγή του NO, και άλλων αμινοξέων που είναι απαραίτητα για την ενδοκυττάρια επιβίωση του παρασίτου [134].



Εικόνα 1.18. Η οδός ενεργοποίησης των μακροφάγων συμβάλλει στη λειτουργική διαφοροποίησή τους. Κατόπιν σηματοδότησης από διαφορετικά περιβάλλοντα κυτταροκινών, τα μακροφάγα υποβάλλονται σε διακριτά προγράμματα ενεργοποίησης. Α) Ευαισθητοποίηση των κυττάρων με την κυτταροκίνη IFN- γ (προστατευτικού Th1 τύπου) και μικροβιακούς διεγέρτες (όπως ο πολυσακχαρίτης LPS), προωθεί την ενεργοποίηση της κλασσικής οδού ωρίμανσης των μακροφάγων. Β) Ευαισθητοποίηση των κυττάρων με κυτταροκίνες μη-προστατευτικού Th2 τύπου (IL-4, IL-13) προωθεί αντίστοιχα την ενεργοποίηση των κυττάρων μέσω της εναλλακτικής οδού. Γ) Αντιθέτως, η απενεργοποίηση των μακροφάγων είτε από την κατάποση των αποπτωτικών κυττάρων είτε από την ευαισθητοποίησή τους από την κυτταροκίνη IL-10 ή τα γλυκοκορτικοειδή, οδηγεί στην καταστολή της ικανότητας αντιγονοπαρουσίασης. Τροποποιημένη σχηματική απεικόνιση από Chawla, A. *et al.*, 2010.

Παρόλα αυτά, τα παράσιτα του γένους *Leishmania*, έχουν αναπτύξει ευφυείς μηχανισμούς για την αποφυγή της λείσμανιοκτόνου δράσης των μακροφάγων, είτε καταστέλλοντας την παραγωγή αυτών των μικροβιοκτόνων μορίων, είτε παρεμποδίζοντας την παραγωγή κυτταροκινών, στρέφοντας το προφίλ της ανοσολογικής απόκρισης προς τον Th2 ανοσοφαινότυπο. Η ενεργοποίηση αυτού του υποπληθυσμού των T κυττάρων, οδηγεί σε παρεμπόδιση της παραγωγής του NO και σε ενίσχυση της δράσης της αργινάσης, η οποία καταλύει την παραγωγή ορνιθίνης και την επακόλουθη σύνθεση πολυαμινών, που είναι απαραίτητες για την επιβίωση του παρασίτου (εναλλακτική οδός ενεργοποίησης των μακροφάγων) (Εικ. 1.18) [137]. Η ανατρεπτική δράση του παρασίτου προκειμένου να εξασφαλίσει την επιβίωσή του στο εσωτερικό των μακροφάγων, αφορά μεταξύ άλλων, στην παρεμπόδιση της παραγωγής της IL-12, μέσω της επαγωγής της παραγωγής των αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών TGF- β και IL-10 [139]. Η παρεμπόδιση της παραγωγής της IL-12, συνεπάγεται την παρεμπόδιση της ενεργοποίησης των T κυττάρων με αποτέλεσμα την καταστολή της ανοσολογικής απόκρισης.

1.9.2 Δενδριτικά κύτταρα.

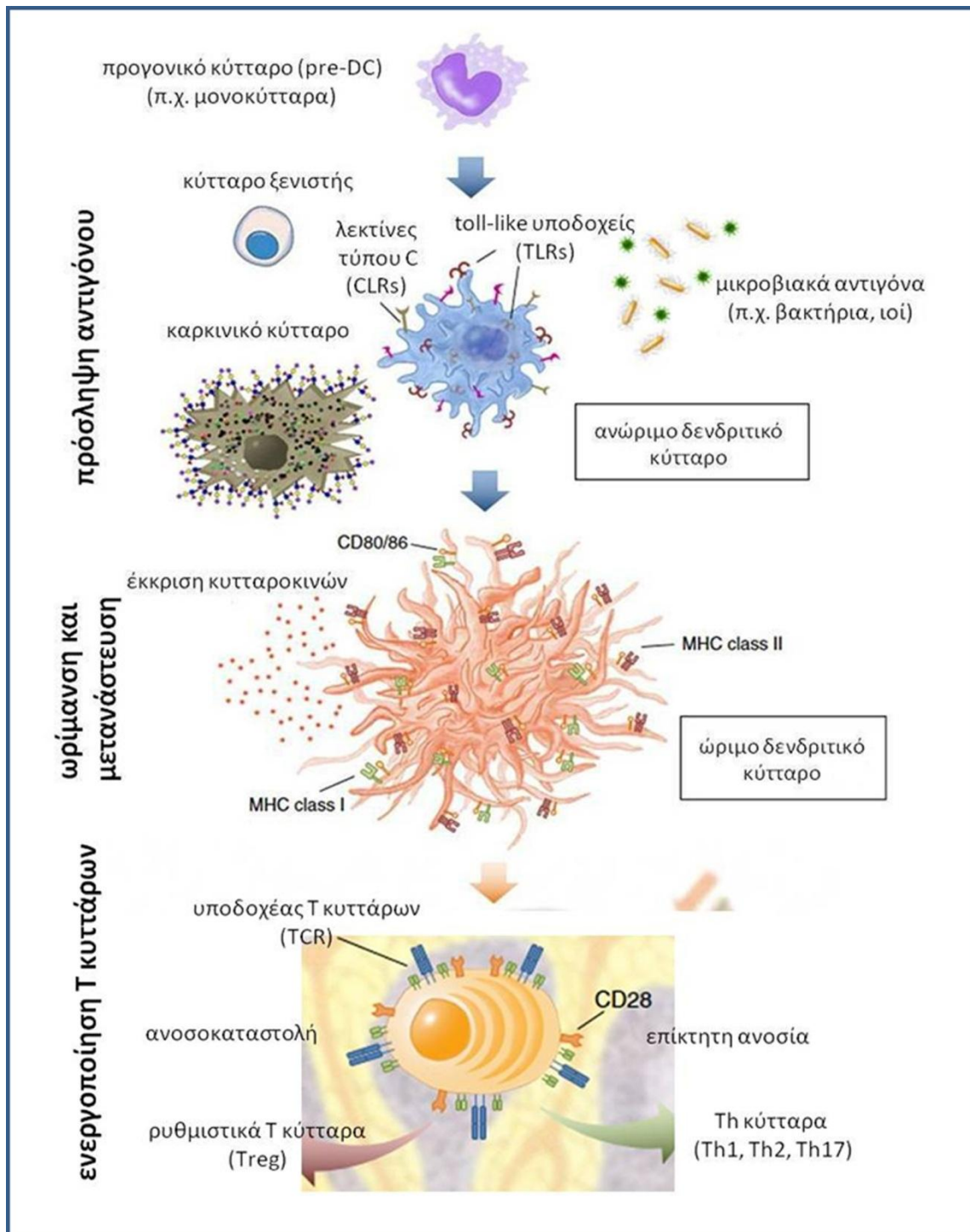
Τα δενδριτικά κύτταρα (ΔΚ) περιγράφηκαν για πρώτη φορά το 1973, από τον Steinman R. και τους συνεργάτες του και αποτελούν ένα ετερογενές σύστημα κυττάρων [140, 141]. Προέρχονται από αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα του μυελού των οστών, τόσο μυελοειδούς όσο και λεμφοειδούς προέλευσης.

Τα ΔΚ αποτελούν μία σημαντική ομάδα κυττάρων της έμφυτης ανοσίας και εμπλέκονται στην επαγωγή ανοσολογικών αποκρίσεων, αποτελώντας μια φυσική γέφυρα

ανάμεσα στην έμφυτη και στην επίκτητη ανοσία. Η ανακάλυψη των ΔΚ και ο σημαντικός ρόλος τους στην κατανόηση της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος, τιμήθηκε με την απονομή του βραβείου Νόμπελ Φυσιολογίας, το 2011. Αποτελούν τα κύρια αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος. Εδράζονται στους περιφερικούς ιστούς όπου προσλαμβάνουν αντιγόνα με σκοπό την επεξεργασία και την παρουσίασή τους στα $CD4^+$ και $CD8^+$ T κύτταρα, καθορίζοντας τις Th1 και Th2 ανοσολογικές αποκρίσεις [142].

Η πρόσληψη του αντιγόνου από τα ΔΚ πραγματοποιείται με τρεις κύριους μηχανισμούς, τη φαγοκυττάρωση, τη μακροπινοκύτωση για την πρόσληψη διαλυτών αντιγόνων και τη διαμεσολαβούμενη από υποδοχείς (υποδοχείς συμπληρώματος, Fc υποδοχείς, υποδοχείς αναγνώρισης προτύπου). Ειδικότερα, τα ΔΚ, αρχικά ανιχνεύουν τα μικροβιακά σήματα κινδύνου, αναγνωρίζοντας δομικά πρότυπα ευρείας κλίμακας, που είναι υψηλά συντηρημένα μεταξύ των μικροβιακών ειδών, αλλά λείπουν από τον ξενιστή (Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs). Στα πρότυπα αυτά, μεταξύ άλλων, ανήκουν μερικά πρότυπα νουκλεϊνικών οξέων, όπως το RNA διπλής έλικας και η μη μεθυλιωμένη κυτοσίνη συνδεδεμένη με γουανίνη (CpG αλληλουχίες) καθώς και οι συνδυασμοί σακχάρων [143]. Η ειδική αναγνώριση των διακριτών και συντηρημένων μικροβιακών και ιικών δομών επιτυγχάνεται μέσω ειδικών υποδοχέων αναγνώρισης, στην επιφάνειά τους, οι οποίοι ονομάζονται υποδοχείς αναγνώρισης προτύπου (pattern recognition receptors, PRR). Τέτοιοι υποδοχείς είναι οι υποδοχείς μαννόζης, οι λεκτίνες τύπου C και οι υποδοχείς τύπου Toll [144, 145].

Τα ΔΚ του αίματος και των ιστών χαρακτηρίζονται ως ανώριμα κύτταρα, με κύρια χαρακτηριστικά τους την ικανότητα φαγοκυττάρωσης των εξωγενών αντιγόνων, την αποικοδόμησή τους σε πεπτίδια και την μειωμένη έκφραση συνδιεγερτικών μορίων και μορίων που σχετίζονται με την κυτταρική μετανάστευση (CCR7, DC-SIGN, DEC-205). Η ωρίμανση των ΔΚ επάγεται μετά από κατάλληλη ευαισθητοποίηση, όπως η επαφή τους με το αντιγόνο, η έκθεσή τους σε προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες ή η πρόσδεση του μορίου CD40 στον αντίστοιχο υποδοχέα επιφανείας [142]. Η διαδικασία ωρίμανσης των ΔΚ συνοδεύεται από μειωμένη φαγοκυτταρική ικανότητα, διαφοροποίηση των προτύπων των υποδοχέων μετανάστευσης, αύξηση της έκφρασης των επιφανειακών συνδιεγερτικών μορίων CD80, CD86 και CD40, και των μορίων MHC τάξης I και II και μετανάστευση των κυττάρων στους επιχώριους λεμφαδένες (Εικ. 1.19) [146].



Εικόνα 1.19. Ανοσολογική δράση των δενδριτικών κυττάρων (ΔΚ). Τα ΔΚ λειτουργούν κυρίως μέσω τριών δράσεων: αναγνώριση και πρόσληψη του αντιγόνου μέσω διαφόρων υποδοχέων, ωρίμανση και μετανάστευση στα δευτερογενή λεμφικά όργανα και παρουσίαση των επεξεργασμένων αντιγόνων στα Τ λεμφοκύτταρα. Τροποποιημένη σχηματική απεικόνιση από Crespo, H. *et al.*, 2013.

Η προσέλκυση των ΔΚ στους λεμφαδένες, συνεπάγεται την τοποθέτησή τους στην παραφλοιώδη ζώνη, ζώνη κυκλοφορίας των πρώιμων Τ κυττάρων, όπου αγκυροβολούν και προβάλλουν τους δενδρίτες, ως διαπλεκόμενα πλέον ΔΚ [147-149]. Δρουν ως ισχυρά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα στα μη ευαισθητοποιημένα $CD4^+$ και $CD8^+$ Τ κύτταρα, διαμορφώνοντας την παραγωγή κυτταροκινών και την επίκτητη ανοσολογική απόκριση [150]. Τα ενεργοποιημένα ΔΚ παράγουν τον TNF- α και μια ποικιλία κυτταροκινών όπως οι IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 και IL-10. Η έκκριση της IL-1 β από τα ΔΚ επάγει την έκκριση της IL-2, η οποία διευκολύνει την ωρίμανση και τον πολλαπλασιασμό των μη-ευαισθητοποιημένων αντιγονοειδικών Τ κυττάρων. Αντιθέτως, η αντιγονοπαρουσίαση χωρίς την παρουσία συνδιεγερτικών μορίων ή κυτταροκινών, επάγει την μη αποτελεσματική ενεργοποίηση των Τ κυττάρων που οδηγεί είτε σε ανοσολογική ανοχή είτε σε ανέργια [151].

Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παρασίτων του γένους *Leishmania* και των ΔΚ, είναι ιδιαίτερα πολύπλοκες και μπορούν να οδηγήσουν είτε σε ενεργοποίηση είτε σε παρεμπόδιση των Τ κυτταρικών αποκρίσεων, προκαλώντας τον έλεγχο ή την εξέλιξη της νόσου, αντίστοιχα [152]. Η πρόσληψη των αμαστιγωτών από τα ΔΚ που βρίσκονται στο σημείο της μόλυνσης, οδηγεί σε αύξηση της παραγωγής της IL-12 και της έκφρασης των συνδιεγερτικών μορίων και των μορίων MHC τάξης I και II [29]. Επιπλέον, μελέτες σε πειραματικό μοντέλο ποντικού, έδειξαν πως μερικές εβδομάδες μετά την μόλυνση, ο αριθμός των $CD11c^+$ ΔΚ στο σημείο της έγχυσης, αυξάνεται και τα μολυσμένα ΔΚ είναι ικανά να παρουσιάσουν τα αντιγόνα του παρασίτου μέσω των MHC II και I μονοπατιών και να ενεργοποιήσουν τα $CD4^+$ και $CD8^+$ Τ κύτταρα. Παρόλα αυτά, τα παράσιτα έχουν αναπτύξει πολύπλοκους μηχανισμούς αποφυγής των λειτουργιών των ΔΚ, οδηγώντας στην παρεμπόδιση της ενεργοποίησης των κυττάρων αυτών. Η μόλυνση των ΔΚ με αμαστιγωτές μορφές του παρασίτου, καταλήγει σε μειωμένη φωσφορυλίωση, σε υποβάθμιση σημαντικών μορίων κινασών, σε μειωμένη έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα NF- κ B και κατ'επέκταση σε ανεπαρκή ενεργοποίηση των ΔΚ και NK κυττάρων καθώς και στην καταστολή της παραγωγής IL-12 και IFN- γ [153].

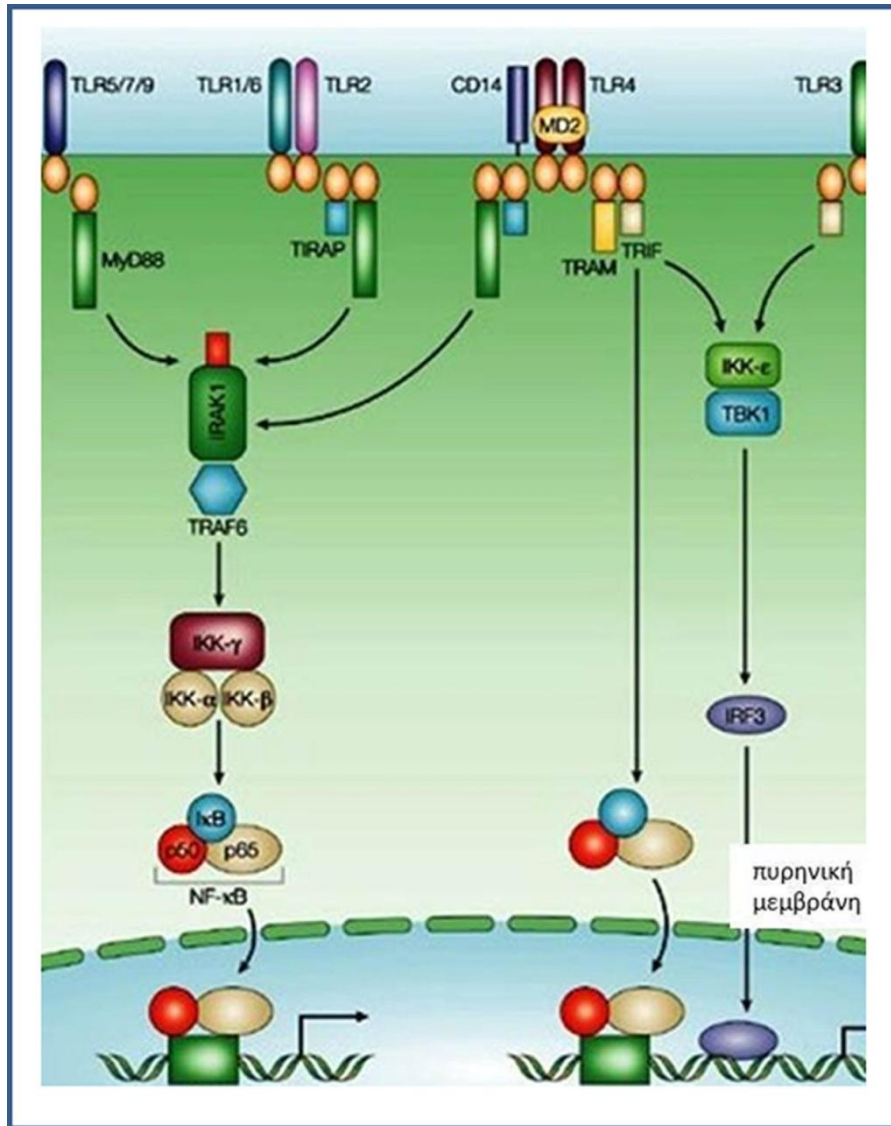
1.9.2.1 Υποδοχείς τύπου Toll.

Τα ΔΚ είναι εξοπλισμένα με μια μεγάλη ποικιλία υποδοχέων τύπου Toll (TLRs), οι οποίοι αναγνωρίζουν δομικά πρότυπα ευρείας κλίμακας μικροοργανισμών (PRRs), όπως οι CpG αλληλουχίες, ο λιποπολυσακχαρίτης (LPS), το μονόκλωνο και δίκλωνο RNA, τα λιποπεπτίδια, τα γλυκολιπίδια, η ζυμοζάνη και η φλαγγελίνη. Στον άνθρωπο, έχουν προσδιοριστεί 11 διαφορετικοί TLRs, όπου ο καθένας αναγνωρίζει διαφορετικές μικροβιακές δομές [154]. Επιπλέον, οι διαφορετικοί υποπληθυσμοί ΔΚ, εκφράζουν διαφορετικούς συνδυασμούς των TLRs. Τα CD8⁺ ΔΚ που εντοπίζονται στον σπλήνα ποντικού, εκφράζουν τους TLR 2, 3, 4 και 9 ενώ τα CD8⁻ ΔΚ εκφράζουν τους TLR2, 3, 4, 5, 7 και 9 [155].

Οι TLRs είναι μόρια που προσδίδουν στην έμφυτη ανοσία ένα βαθμό ειδικότητας, ενώ παράλληλα καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό τη λειτουργική πόλωση των T κυττάρων. Η πρόσδεση των κατάλληλων προσδεμάτων στους TLRs, οδηγεί στην ενεργοποίηση συγκεκριμένων ενδοκυτταρικών μονοπατιών σηματοδότησης (π.χ. My-D88 εξαρτώμενου ή ανεξάρτητου μονοπατιού), οδηγώντας στην ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων (NF-κB, AP-1) απαραίτητων για τη μετανάστευση των ΔΚ, την ωρίμανσή τους, την αποτελεσματική παρουσίαση του αντιγόνου καθώς και τη σύνθεση και έκκριση φλεγμονωδών κυτταροκινών και χημειοκινών (π.χ. IL-6, IL-12, CCL5) (Εικ. 1.20) [81].

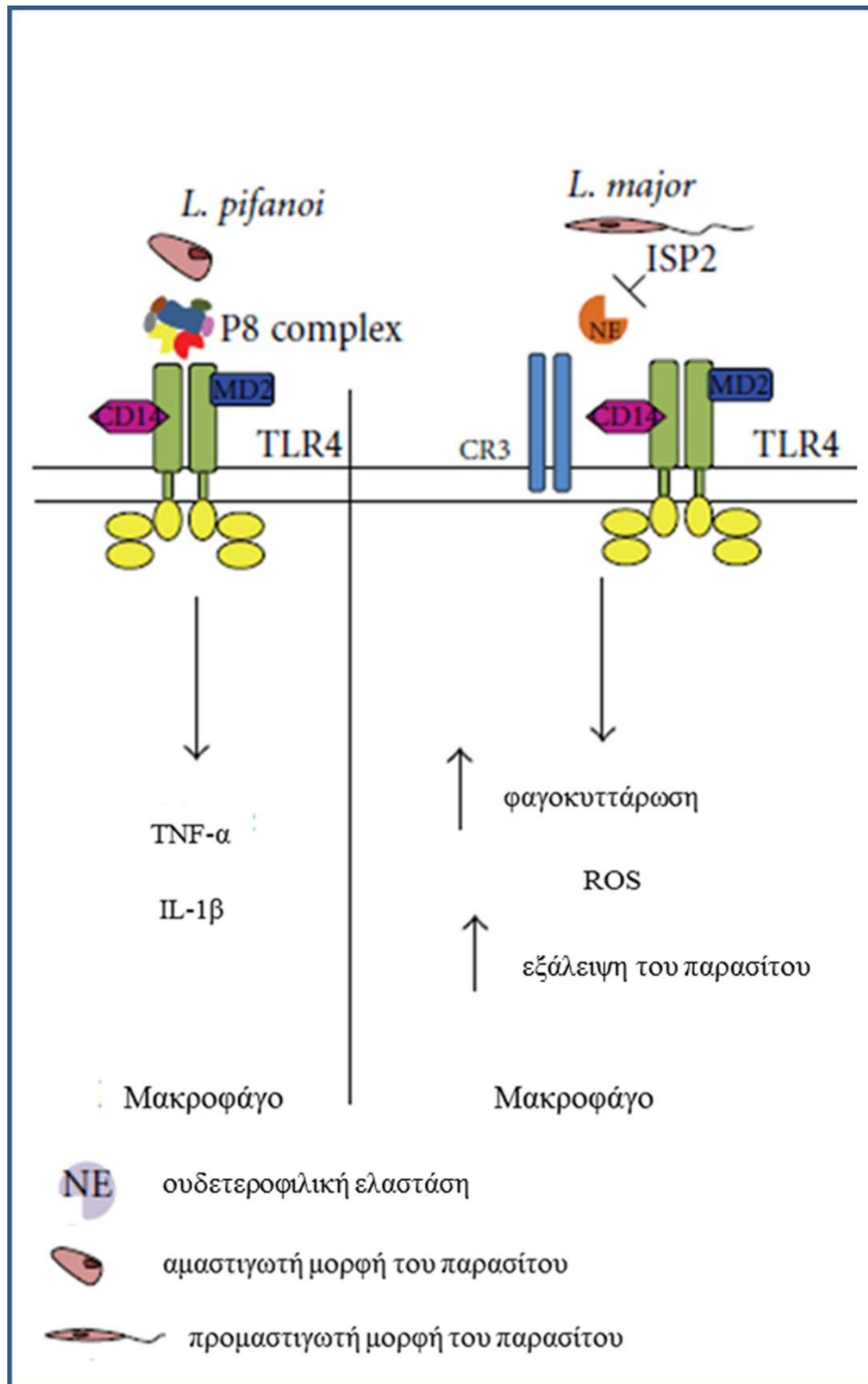
Επιπλέον, οι TLRs δρουν συνεργιστικά, ενισχύοντας την ωρίμανση των ΔΚ. Ο πιο συνηθισμένος και μελετημένος συνδυασμός είναι ο συνδυασμός των TLR2 και TLR4. Η ενεργοποίηση διαφορετικών TLRs στα ΔΚ μπορεί να προκαλέσει την παραγωγή διαφορετικών ομάδων κυτταροκινών, μέσω της ενεργοποίησης διαφορετικών μονοπατιών σηματοδότησης [143].

Συνεπώς, οι TLRs ενισχύουν την ικανότητα των ΔΚ να επάγουν T κυτταρικές αποκρίσεις. Για αυτόν τον λόγο, πολλές φαρμακευτικές εταιρείες έχουν στρέψει το ενδιαφέρον τους στην εφαρμογή των TLR προσδεμάτων ως συστατικά προφυλακτικών ή ανοσοθεραπευτικών εμβολίων για την ενεργοποίηση ανοσολογικών αποκρίσεων έναντι χρόνιων ιικών μολύνσεων ή του καρκίνου [156].



Εικόνα 1.20. MyD88 - εξαρτώμενο και ανεξάρτητο μονοπάτι μεταγωγής σήματος από τους TLRs. Τροποποιημένη σχηματική απεικόνιση από Akira, S. *et al.*, 2004).

Κύριοι TLRs που συνδέονται με την προστασία έναντι της λείσμανιάσης είναι οι TLR2 και TLR4 (Εικ. 1.21). Επιπλέον, προστατευτικοί ρόλοι έχουν αποδοθεί και σε κυτταροπλασματικούς υποδοχείς που ανιχνεύουν νουκλεϊκά οξέα, όπως ο TLR3 και TLR9 [157]. Ο TLR3 έχει αποδειχθεί απαραίτητος για την λείσμανιοκτόνο δράση των ενεργοποιούμενων με IFN- γ μακροφάγων, καθώς η αποσιώπηση του υποδοχέα σε μακροφαγική κυτταρική σειρά ποντικού, οδήγησε σε αυξημένο παρασιτικό φορτίο συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου [158]. Η προστασία μέσω της ενεργοποίησης των TLRs συνδέεται κυρίως με την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως οι TNF- α , IL-6 και χημειοκινών τύπου CXC.



Εικόνα 1.21. Ενεργοποίηση του TLR4 κατά την μόλυνση με στελέχη του παρασίτου *Leishmania spp.* Το σύμπλοκο γλυκολιπιδίων P8 που προέρχεται από την *L. pifanoi*, ενεργοποιεί τον TLR4 των μακροφάγων, με την διαμεσολάβηση των μορίων MD2, CD14 και την ενεργοποίηση ενός MyD88-εξαρτώμενου μονοπατιού σηματοδότησης (αριστερά). Η ενεργοποίηση του TLR4, κατά την μόλυνση με *L. major*, με τη διαμεσολάβηση της ουδετεροφιλικής ελαστάσης, επάγει την παραγωγή ROS και τη μερική εξάλειψη του παρασίτου (δεξιά). Τροποποιημένη σχηματική απεικόνιση από Faria, M.*et al.*, 2012.

1.9.3 Πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα.

Υπάρχουν αντικρουόμενα αποτελεσμάτα σχετικά με το ρόλο των ουδετερόφιλων στην εξέλιξη της λεισμανίασης. Τα ουδετερόφιλα δρουν κυρίως ως δούρειοι ίπποι, υποβοηθώντας την ενδοκυττάρια εγκατάσταση των μετακυκλικών προμαστιγωτών μορφών χωρίς την παράλληλη ενεργοποίηση της έμφυτης αντιμικροβιακής άμυνας. Ειδικότερα, τα ουδετερόφιλα φαγοκυτταρώνουν τις προμαστιγώτες μορφές του παρασίτου, οι οποίες επιβιώνουν στο φαγόσωμα αυτών [159]. Ακολούθως, τα μολυσμένα ουδετερόφιλα επάγονται σε διαδικασία απόπτωσης και φαγοκυτταρώνονται από τα μακροφάγα μέσω μονοπατιών διαμεσολαβούμενων από υποδοχείς που αποτυγχάνουν να εκκινήσουν τις αμυντικές αποκρίσεις αυτών, με αποτέλεσμα το φορτίο των προμαστιγωτών να μεταφέρεται αποτελεσματικά και με ασφάλεια στο φαγόσωμα των μακροφάγων [159].

Παρόλα αυτά, τα ουδετερόφιλα συνεισφέρουν και στον περιορισμό του παρασίτου μέσω της εξώθησης εξωκυττάρια παγίδων (NETs) που αποτελούνται από νηματοειδές DNA που φέρει αντιμικροβιακά πεπτίδια [159].

2. Σκοπός

2. Σκοπός της μελέτης.

Η λεισμανίαση είναι μια τροπική νόσος, που παρά τον υψηλό επιπολασμό που παρουσιάζει, καθώς τοποθετείται ένατη μεταξύ των λοιμωδών νοσημάτων, παραμένει παραμελημένη. Τα τελευταία χρόνια, εμφανίζεται με σταδιακά αυξανόμενη συχνότητα σε μη ενδημικές αναπτυσσόμενες χώρες και σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (Π.Ο.Υ), το άθροισμα των χρόνων ζωής και των παραγωγικών χρόνων που έχουν χαθεί λόγω της ασθένειας (DALYs = Disability Adjusted Life Years), αγγίζει τα 2,4 εκατομμύρια.

Παρά την συνεισφορά της ανάλυσης του γονιδιώματος του παρασίτου στην ανάδειξη νέων αντιγόνων, και την κατάκτηση επιστημονικής γνώσης σχετικά με την ανοσοβιολογία των ειδών του παρασίτου και τον μηχανισμό δράσης των ανοσοενισχυτικών, η κατασκευή ενός αποτελεσματικού εμβολίου παραμένει ως ένας ιδιαίτερης σημασίας, επιδιωκόμενος στόχος. Επιπλέον, παρά την πρόοδο που έχει επιτευχθεί στην θεραπευτική προσέγγιση της νόσου, τα ευρέως χρησιμοποιούμενα φάρμακα, είτε σε συνδυασμό με ανοσοθεραπεία, είτε μόνα τους, κρίνονται ανεπαρκή.

Συνεπώς, ο έλεγχος της νόσου μέσω της αποτελεσματικής θεραπείας και της ανάπτυξης ενός προστατευτικού εμβολίου ικανού να επάγει μακροχρόνιες προστατευτικές κυτταρομεσολαβητικές ανοσολογικές αποκρίσεις, κρίνεται ως επιτακτική ανάγκη.

Στόχος της παρούσας διατριβής, είναι η διερεύνηση της προστατευτικής ή/και ανοσοθεραπευτικής δράσης του ευκαρυωτικού παράγοντα έναρξης του στελέχους *L. infantum* (*Leishmania* eukaryotic initiation factor - LieIF), σε *in vitro* και *in vivo* συστήματα. Η προσέγγιση αυτού του στόχου, θα πραγματοποιηθεί με τον σχεδιασμό πρωτοκόλλων, με τα οποία θα διερευνηθεί η δυνατότητα της LieIF να επάγει την ειδική ενεργοποίηση των T κυττάρων και την πόλωσή τους προς τον απαραίτητο για την προστασία του ξενιστή και την εξάλειψη του παρασίτου, Th1 υποπληθυσμό.

Με την προσέγγιση της αντίστροφης ανάπτυξης εμβολίου (reverse vaccinology), θα επιδιώξουμε την ταυτοποίηση αντιγονικών πεπτιδίων της LieIF, προκειμένου να σχεδιαστούν εμβόλια με ικανότητα επιλεκτικής επαγωγής της Th1 απόκρισης. Επίσης, θα διερευνηθούν οι ανοσοτροποποιητικές ιδιότητες ολοκλήρου του μορίου της ανασυνδυασμένης LieIF και των πρωτεϊνικών τμημάτων της, σε *in vitro* συστήματα μακροφάγων και δενδριτικών κυττάρων, τόσο σε επίπεδο ωρίμανσης και λειτουργικής διαφοροποίησης των κυττάρων, όσο και σε επίπεδο συνέργειας με τους υποδοχείς τύπου

Toll (Toll-like receptors). Επιπλέον, θα μελετηθεί η προστατευτική ή/και ανοσοθεραπευτική δράση της LieIF και των πρωτεϊνικών της τμημάτων, σε *in vitro* σύστημα *L. donovani* - μολυσμένων μακροφάγων.

Τα αποτελέσματα που θα προκύψουν θα συμβάλλουν στην κατανόηση του τρόπου δράσης αυτής της κυτταροπλασματικής πρωτεΐνης του παρασίτου, προκειμένου σε δεύτερο χρόνο, να σχεδιαστούν και να εφαρμοστούν *in vivo* συστήματα ανοσοθεραπείας ή προφυλακτικού εμβολιασμού, σε πειραματικά μοντέλα ποντικών. Η αξιολόγηση της δράσης της LieIF *in vivo*, θα πραγματοποιηθεί τόσο με την διερεύνηση της δράσης της πρωτεΐνης ως ανοσοενισχυτικό, όσο και με την ανάπτυξη πρότυπων πρωτοκόλλων ανοσοθεραπείας με την διαλυτή πρωτεΐνη καθώς και προστατευτικού εμβολιασμού με τη χρήση των δενδριτικών κυττάρων ως οχήματα μεταφοράς της πρωτεΐνης.

3. Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Υλικά

3.1.1 Εργαστηριακός εξοπλισμός.

Ο εργαστηριακός εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε για την κάλυψη των αναγκών της παρούσας διδακτορικής διατριβής, καθώς και οι εταιρείες προέλευσης, καταγράφονται στον Πίν. 3.1.

Πίνακας 3.1. Εργαστηριακός εξοπλισμός
Αναλυτής Cobas Mira: βιοχημικός αναλυτής που εκτελεί φωτομετρικές αναλύσεις (σάκχαρο, ουρία κτλ), μετρήσεις φαρμάκων καθώς και ποτενσιομετρικές αναλύσεις (ηλεκτρολύτες κάλιο, νάτριο) (Roche)
Αναλυτικός ζυγός (Kern, Balingen, Germany)
Διοφθάλμιο οπτικό μικροσκόπιο (Laborlux D, Leitz, Germany)
Διοφθάλμιο ανάστροφο μικροσκόπιο (Olympus, Tokyo, Japan)
Δοχείο αποθήκευσης αζώτου (Statebourne bio36, Statebourne, US)
Επιτραπέζια φυγόκεντρος (GPR Centrifuge, BECKMAN, Nyon, Switzerland)
Επωαστικός κλίβανος σταθερής θερμοκρασίας 26 °C (Sanyo mir-253 Electronic Biomedical, Osaka, Japan)
Επωαστικός κλίβανος σταθερής θερμοκρασίας 37 °C (Galaxy 170S, Eppendorf, UK)
Επωαστικός κλίβανος σταθερής θερμοκρασίας 60 °C (Binder, US)
Ζυγός (Mettler PM4600, Mettler Toledo, US)
Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής βιοασφάλειας τύπου II (Telstar, Bio-IIA, Madrid, Spain)
Θερμαινόμενη μαγνητική πλάκα (Velp Scientifica)
Θερμικός κυκλοποιητής (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems, IL, USA)
Θερμικός κυκλοποιητής – σύστημα ποσοτικής PCR (Exicycler 96, Bioneer, Korea)
Κυτταρομετρητής ροής (FACS Calibur, Becton-Dickinson, San Jose, CA)
Κυτταροσυλλέκτης (Cell Harvester, Skatron, Norway)
Κυτταροφυγόκεντρος (Shandon Cytospin 2, England)
Λαμπτήρας φωτισμού ισχύος 100 Watt
Μετρητής β ακτινοβολίας (Wallac, Turcu, Finland)

Μηχάνημα υπερήχων (UP100H, Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, Germany)
Μικροφυγόκεντρος (Biofuge 13, Heraeus, Germany)
Παχύμετρο dial gauge (Kori Seiki, Japan)
Πεχάμετρο (Orion 2-Star pH Benchtop Meter, Thermo Scientific)
Συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης για την ανάλυση DNA (Mini-sub DNA Electrophoresis Cell, Bio-Rad)
Τροφοδοτικό ρεύματος (BioRad Powerpac 1000)
Υδατόλουτρο (LabTech, Daihan LabTech, Korea)
Υπερκαταψύκτης (M, Electrolux, Stockholm, Sweden)
Φασματοφωτόμετρο (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, IL, USA)
Φασματοφωτόμετρο (Dynatech Laboratories MRX, Germany)

3.1.2 Αναλώσιμα

Το σύνολο των αναλωσίμων που χρησιμοποιήθηκε, αναγράφεται στον παρακάτω πίνακα (Πίν. 3.2).

Πίνακας 3.2. Αναλώσιμα
Αιματοκυτταρόμετρο τύπου Malassez
Ακρορύγχια για μηχανικές πιπέττες (Greiner, Germany)
Αποστειρωμένες ορολογικές πιπέττες, όγκου 5 και 10 ml (Greiner, Germany)
Αποστειρωμένα ακρορύγχια με φίλτρο (Brand, UK)
Βακτηριολογικά τρυβλία καλλιέργειας διαμέτρου 100 mm (Greiner, Germany)
Γυάλινοι τριχοειδείς σωλήνες (BDH, US)
Διηθητικό χαρτί επικαλυμμένο με πλέγμα από μικροσκοπικές ίνες υάλου (PerkinElmer, Massachusetts, USA)
Δοκιμαστικοί σωλήνες erpendorf, όγκου 0,2 ml
Δοκιμαστικοί σωλήνες erpendorf όγκου, 1,5 ml
Εργαλείο αποκόλλησης κυττάρων (cell scraper) (Nunc, Roskilde, Denmark)
Κρυογονικό φιαλίδιο όγκου 1,5 ml (Nunc, Roskilde, Denmark)
Πλάκες καλλιέργειας 24 και 96 θέσεων με επίπεδα φρεάτια (Sarstedt, Germany)
Πλάκες καλλιέργειας 96 θέσεων με κοίλα φρεάτια (Greiner, Germany)

Πλάκες μικροτιτλοποίησης 96 φρεατίων με πυθμένα σχήματος V (Greiner, Germany)
Πλάκες μικροτιτλοποίησης ELISA 96 θέσεων υψηλής προσροφητικότητας (MaxiSorp Surface, Nunc, Denmark)
Πλαστικοί σωλήνες φυγοκέντρωσης, όγκου 15 και 50 ml (Greiner, Germany)
Πλαστικοί σωλήνες κυτταρομετρίας, όγκου 5 ml (Falcon, Germany)
Σακούλες τοποθέτησης διηθητικού χαρτιού, 90 x 120 mm (PerkinElmer, Massachusetts, USA)
Σύριγγες ινσουλίνες εφοδιασμένες με βελόνες διαμέτρου 26GA3/8 και 30GA1/2 (BD)
Σωληνάκια όγκου 0.2 ml και αντίστοιχα καπάκια, σε σειρές των οκτώ, για Real Time PCR (Nippon Genetics, , Germany)
Φίλτρα με διάμετρο πόρων 0,22 μm (Sarstedt, Germany)
Φίλτρα με διάμετρο πόρων 70 μm (BD Biosciences, Belgium)
Φιάλες κυτταροκαλλιέργειας (Tissue Culture Quality) με βιδωτό πώμα και έκταση επιφάνειας 25 cm^2 (Sarstedt, Germany)
Φιάλες κυτταροκαλλιέργειας (Tissue Culture Quality) με βιδωτό πώμα και έκταση επιφάνειας 75 cm^2 (Sarstedt, Germany)
Φιάλες κυτταροκαλλιέργειας με βιδωτό πώμα που έφερε φίλτρο και έκταση επιφάνειας 25 cm^2 (Nunc, Roskilde, Denmark)

3.1.3 Εμπορικά διαθέσιμα αντιδραστήρια.

3.1.3.1 Θρεπτικά υλικά και υλικά κυτταροκαλλιέργειών.

Θρεπτικό υλικό RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute Medium, Biochrom, Germany). Ένας όγκος πυκνού (10x) διαλύματος RPMI-1640 (Biochrom, Germany) αραιώνεται με προσθήκη εννέα όγκων δις-απεσταγμένου νερού. Το διάλυμα συμπληρώνεται ώστε τελικά να περιέχει 24 mM NaHCO_3 , 2 mM L-γλουταμίνης, 0,05 mM β -μερκαπτοαιθανόλης, 10 mM διαλύματος HEPES (ονομασία κατά IUPAC: 2-[4-(2-υδροξυαιθυλο)-1-πιπεραζινο]αιθυλοσουλφονικό οξύ), πενικιλίνη σε συγκέντρωση 100 U/ml και στρεπτομυκίνη σε συγκέντρωση 100 $\mu\text{g/ml}$.

Θρεπτικό υλικό Schneider's Insect (Sigma-Aldrich). Το θρεπτικό υλικό συμπληρώνεται με την προσθήκη πενικιλλίνης (συγκέντρωση 100 U/ml) και στρεπτομυκίνης (συγκέντρωση 100 µg/ml).

Ρυθμιστικό διάλυμα HEPES (Biochrom, Germany)

Διάλυμα L-γλουταμίνης 200 mM (L-glutamine, Biochrom, Germany)

Διάλυμα πενικιλλίνης – στρεπτομυκίνης (PEST, Biochrom, Germany)

β-μερκαπτοαιθανόλη (Sigma-Aldrich)

Διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου 7,5% (NaHCO₃, Gibco)

Ορός εμβρύου μόσχου (Fetal Bovine Serum, FBS, Biochrom, Germany). Ο ορός αδρανοποιείται στους 56 °C για 30 λεπτά προκειμένου να αδρανοποιηθούν οι πρωτεΐνες του συμπληρώματος. Ο απενεργοποιημένος ορός αποθηκεύεται στους -20 °C.

3.1.3.2 Ειδικά αντιδραστήρια.

Τα ειδικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν, παρατίθενται με αλφαβητική σειρά.

Αλβουμίνη αυγού (OVA, Sigma-Aldrich)

Ανασυνδυασμένος παράγοντας διέγερσης σχηματισμού αποικιών κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων ποντικού (Recombinant granulocyte-macrophage colony stimulating factor, rmGM-CSF, Peprotech, UK): ο αιμοποιητικός παράγοντας GM-CSF αποτελείται από 125 αμινοξέα και το μοριακό βάρος του υπολογίζεται στα 14,2 kDa. Ενεργοποιεί την ανάπτυξη των ουδετερόφιλων και των μακροφάγων, ενώ επάγει τον πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη των προγονικών μεγακαρυοκυττάρων και ηωσινόφιλων. Η ανασύσταση γίνεται σε συγκέντρωση 0,1 mg/ml, σε ddH₂O.

Ανασυνδυασμένη ιντερφερόνη-γ ποντικού (rmIFN-γ, BD Pharmingen, San Diego, USA)

Ανοσοενισχυτικό Imject Alum (Pierce, IL): το εμπορικά διαθέσιμο σκεύασμα περιέχει υδατικό διάλυμα υδροξειδίου του αργιλίου (40 mg/ml) και υδροξειδίου του μαγνησίου (40 mg/ml).

Αντιδραστήριο Alamar Blue (Invitrogen Life Technologies, USA): το Alamar Blue ανάγεται από μεταβολικά ενδιάμεσα των ζωντανών κυττάρων. Κατά την αναγωγική διαδικασία παρατηρείται μετατροπή του χρώματος του αντιδραστηρίου (reazurin) από την οξειδωμένη μη φθορίζουσα-μπλε μορφή στην αναγμένη φθορίζουσα-κόκκινη μορφή [160].

Αντιδραστήριο Griess (Sigma-Aldrich, USA): αποτελείται από 1% w/v σουλφανιλαμίδιο, 0,1% w/v διϋδροχλωρική ναφθυλ-εθυλ-διαμίνη και 1,25% v/v φωσφορικό οξύ (H_3PO_4).

Αντίστροφη μεταγραφάση M-MLV (Promega, USA)

Δωδέκυλο θειικό νάτριο (SDS, Sigma-Aldrich)

Εκκινητές oligo-(dT)15 (Promega, USA)

Εμπορικά διαθέσιμη συσκευασία για τον ποσοτικό προσδιορισμό πρωτεϊνών (Micro BCA Protein Assay Reagent Kit, Pierce, IL): η αρχή της μεθόδου αφορά στην αναλογική σχέση της ποσότητας της ελεγχόμενης πρωτεΐνης και της ποσότητας των αναγμένων ιόντων Cu^{+2} .

Εμπορικά διαθέσιμη συσκευασία για την απομόνωση ολικού RNA (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Germany)

Επιφανειοδραστική ουσία Tween-20 (Merck Millipore)

Θειϊκό οξύ 96% (H_2SO_4 , Analyticals Carbo Erba)

Kapa SYBR FAST Universal 2x qPCR Master Mix (KapaBiosystems, USA). Εμπορικά διαθέσιμη συσκευασία που περιέχει την DNA πολυμεράση, το ρυθμιστικό διάλυμα για την πραγματοποίηση της αντίδρασης ποσοτικής PCR και την παρεμβαλλόμενη χημική ουσία SYBR Green.

Κονκαβαλίνη A (Concavalin A, ConA, Sigma-Aldrich): η κονκαβαλίνη A αποτελεί μιτογόνο φυτικής προέλευσης. Παρασκευάζεται διάλυμα κονκαβαλίνης A σε ddH₂O συγκέντρωσης 1 mg/ml, το οποίο αποθηκεύεται στους -20°C μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

Λιποπολυσακχαρίτης LPS (Sigma-Aldrich). Η ανασύσταση γίνεται σε συγκέντρωση 1 mg/ml σε ddH₂O και το διάλυμα φυλάσσεται στους -20 °C.

Μπλε του τρυπανίου (TrypanBlue, BDH): η χρωστική διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη των νεκρών κυττάρων.

Μπρεφελδίνη Α (Brefeldin A, Sigma-Aldrich): η μπρεφελδίνη Α παρεμποδίζει την μεταφορά των πρωτεϊνών από το ενδοπλασματικό δίκτυο στο σύμπλεγμα Golgi. Η ανασύσταση γίνεται σε συγκέντρωση 5 mg/ml σε μεθανόλη (Merck Millipore) και το διάλυμα διατηρείται στους -20 °C.

Ολιγονουκλεοτίδια CpG (ODN 1826, InvivoGen, US)

Παραφορμαλδεΰδη (PFA, Sigma-Aldrich)

Πλακίδια ελέγχου βακτηριακών ενδοτοξινών (LAL test limulus amebocyte lysate test, Metrolab): τα πλακίδια περιέχουν έτοιμα και σταθεροποιημένα αντιδραστήρια LAL για τον χρωματομετρικό έλεγχο των βακτηριακών ενδοτοξινών.

Πολυινοσινικό-πολυκυτιδυλικό οξύ (Poly (I: C), InvivoGen, US): αποτελεί συνθετικό ανάλογο δίκλωνου RNA (dsRNA) και αναγνωρίζεται από τον υποδοχέα τύπου Toll 3 (TLR3).

Σαπωνίνη (Sigma-Aldrich)

Στρεπταβιδίνη συζευγμένη με υπεροξειδάση HR (AbD Serotec, UK)

Συνθετικά πεπτίδια (bioSYNTHESIS, Texas, US): τα πεπτίδια συντέθηκαν με καθαρότητα μεγαλύτερη από 95%, όπως προσδιορίστηκε με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC). Η διάλυσή τους πραγματοποιήθηκε σε συγκεκριμένους διαλύτες ανάλογα με το φορτίο και τον αριθμό των υδροφοβικών καταλοίπων τους.

Τριτιωμένη θυμιδίνη (methyl-³H-Thymidine, PerkinElmer, Massachusetts, USA): το ραδιενεργό υλικό παρέχεται ως στείο υδατικό διάλυμα. Το διάλυμα τριτιωμένης θυμιδίνης που χρησιμοποιείται στις πειραματικές διαδικασίες, παρασκευάζεται με αραίωση κατάλληλης ποσότητας της εμπορικά διαθέσιμης συσκευασίας σε θρεπτικό υλικό, λίγο πριν την χρήση.

Υγρό σπινθηρισμού (scintillation fluid, Wallac, Turku, Finland)

Φθορίζοντες ανιχνευτές (carboxy-H₂DCFDA, C400, Life Technologies, USA): Αποτελούν ακετυλιωμένη μορφή της φλουορεσκεΐνης και χρησιμοποιούνται ως δείκτες της παραγωγής ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS) από τα κύτταρα.

Χρωμογόνο διάλυμα υποστρώματος TMB (Pierce, IL): η ενεργότητα της υπεροξειδάσης HRP ελέγχεται με τη χρήση του υποστρώματος TMB. Η εμπορικά διαθέσιμη συσκευασία αποτελείται από διάλυμα 3,3', 5,5'-τετραμέθυλοβενζιδίνης (TMB) συγκέντρωσης 0,4 g/L και διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) συγκέντρωσης 0,02% v/v σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέος. Τα παραπάνω διαλύματα αναμιγνύονται σε αναλογία ίσων όγκων λίγο πριν την χρήση τους.

3.1.4 Αντισώματα

Αντι-TNF- α μονοκλωνικό αντίσωμα, χαμηλής περιεκτικότητας σε ενδοτοξίνη (AbD Serotec, UK): το αντίσωμα (κλώνος MP6-XT3) παρασκευάζεται σε αρουραίο και αναγνωρίζει τον TNF- α ποντικού. Ο TNF- α παράγεται από μονοκύτταρα, μακροφάγα, ουδετερόφιλα, NK κύτταρα και $CD4^+$ T κύτταρα.

Αντισώματα συζευγμένα με φθορίζουσες ουσίες

Αντι- $CD4$ -FITC (BD Biosciences): το αντίσωμα (κλώνος L3T4) είναι συζευγμένο με φλουορεσκεΐνη (FITC) και αλληλεπιδρά με το επιφανειακό αντιγόνο $CD4$ (L3T4), το οποίο εκφράζεται στα περισσότερα θυμοκύτταρα, στους υποπληθυσμούς των ώριμων T κυττάρων και σε έναν υποπληθυσμό NK κυττάρων.

Αντι- $CD8a$ -PE (BD Biosciences): το αντίσωμα (κλώνος 53-6.7) είναι συζευγμένο με φυκοερυθρίνη (PE) και αλληλεπιδρά με τις αλυσίδες α και α' , μοριακού βάρους 38 και 34 kDa αντίστοιχα, του αντιγόνου διαφοροποίησης $CD8$.

Αντι- $CD11b$ -FITC (AbD Serotec, UK): το αντίσωμα (κλώνος M1/70.15) είναι συζευγμένο με FITC και αναγνωρίζει το επιφανειακό αντιγόνο ποντικού $CD11b$ (ή MAC-1) που εκφράζεται από τα κοκκιοκύτταρα, τα μονοκύτταρα, τα NK κύτταρα και τα ιστικά μακροφάγα.

Αντι- $CD11c$ -PE (BD Bioscience): το αντίσωμα (κλώνος HL3) είναι συζευγμένο με PE και αλληλεπιδρά με την α αλυσίδα της ιντεγκρίνης $gp150$, η οποία εκφράζεται στην επιφάνεια των δενδριτικών κυττάρων, των $CD4^- CD8^+$ εντερικών ενδοεπιθηλιακών λεμφοκυττάρων και των NK κυττάρων.

Αντι-F4/80-RPE (AbD Serotec, UK): το αντίσωμα (κλώνος CI:A3-1) είναι συζευγμένο με R-φυκοερυθρίνη (RPE) και αναγνωρίζει την επιφανειακή γλυκοπρωτεΐνη μεγέθους 160 kD F4/80, ποντικού.

Αντι-Ly6C-PE (AbD Serotec, UK): το αντίσωμα (κλώνος AL-21) είναι συζευγμένο με PE και αναγνωρίζει την GPI-αγκυροβολημένη πρωτεΐνη ποντικού, μεγέθους 14-17 kDa που εκφράζεται σε πληθυσμούς μονοκυττάρων/μακροφάγων, T κυττάρων, καθώς και σε κοκκιοκύτταρα, ενδοθηλιακά και NK κύτταρα.

Αντι-Ly6G-PE (AbD Serotec, UK): το αντίσωμα (κλώνος 1A8) είναι συζευγμένο με PE και αναγνωρίζει την GPI-αγκυροβολημένη πρωτεΐνη μεγέθους 21-25 kDa, Ly-6G.

Αντι-CD40-PE (BD Biosciences): το αντίσωμα (κλώνος 3/23) είναι συζευγμένο με PE και αλληλεπιδρά με το μόριο CD40, μία γλυκοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 40-50 kDa η οποία εκφράζεται στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (B-λεμφοκύτταρα, μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα).

Αντι-CD80-FITC (B7-1, BD Biosciences): το αντίσωμα (κλώνος 16-10A1) είναι συζευγμένο με FITC και αναγνωρίζει το συνδιεγερτικό μόριο B7-1. Αυτό το μέλος της υπερικογένειας των ανοσοσφαιρινών, μαζί με το μόριο CD86 συμμετέχει στην συνδιέγερση των T κυττάρων μέσω των αλληλεπιδράσεων με τα μόρια CD28 και CD152 (CTLA-4). Το CD80 εκφράζεται συνεχώς στην επιφάνεια των δενδριτικών κυττάρων, των μονοκυττάρων και των μακροφάγων της περιτοναϊκής κοιλότητας, ενώ η έκφρασή του στην επιφάνεια των B λεμφοκυττάρων είναι επαγόμενη από διάφορους παράγοντες, όπως ο βακτηριακός λιποπολυσακχαρίτης και η κυτταροκίνη IL-4.

Αντι-CD86-FITC (B7-2, BD Biosciences): το αντίσωμα (κλώνος GL1) είναι συζευγμένο με FITC και αναγνωρίζει το συνδιεγερτικό μόριο B7-2 το οποίο εκφράζεται στην επιφάνεια της πλειοψηφίας των λευκοκυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των B και T κυττάρων, των επαγόμενων από το θειογλυκολικό ζωμό μακροφάγων περιτοναϊκής κοιλότητας και των δενδριτικών κυττάρων. Το CD86 αποτελεί πρόσδεμα των μορίων CD28 και CD152 (CTLA-4), και είναι ένα από τα μόρια που συμβάλλουν στις αλληλεπιδράσεις των T και B κυττάρων με άλλα κύτταρα. Επίσης, εμπλέκεται στην αλλαγή τάξης των ανοσοσφαιρινών.

Αντι-I-A/I-E-PE (BD Biosciences): το αντίσωμα (κλώνος M5/114.15.2) είναι συζευγμένο με PE και αναγνωρίζει έναν πολυμορφικό επίτοπο που υπάρχει στα I-A^b, I-A^d, I-A^q, I-E^d και I-E^k αλλοαντιγόνα του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) τάξης II.

Αντι-IFN-γ-FITC (BD Biosciences): το αντίσωμα (κλώνος XMG1.2) είναι συζευγμένο με FITC και αναγνωρίζει ειδικά την ιντερφερόνη-γ (IFN-γ) του ποντικού.

Αντι-IL-12p40/p70-PE (BD Biosciences): το αντίσωμα (κλώνος C15.6) είναι συζευγμένο με PE και αναγνωρίζει την υπομονάδα p40 του υποδοχέα της IL-12 ποντικού.

Αντι-IL-4-PE (BD Biosciences): το αντίσωμα (κλώνος BVD4-1D11) είναι συζευγμένο με PE και αναγνωρίζει την IL-4 ποντικού.

Αντι-IL-10-PE (BD Biosciences): το αντίσωμα (κλώνος JES5-16E3) είναι συζευγμένο με PE και αναγνωρίζει την IL-10 ποντικού.

Αντι-IL-17A-PE (BD Biosciences): το αντίσωμα (κλώνος TC11-18H10) είναι συζευγμένο με PE και αλληλεπιδρά με την ανασυνδυασμένη και την φυσική κυτταροκίνη IL-17A, του ποντικού.

Αντι-iNOS/NOS τύπου II-FITC (BD Biosciences): το αντίσωμα (κλώνος 6/iNOS/NOS Type II) είναι συζευγμένο με FITC και αναγνωρίζει την επαγόμενη συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου, ποντικού.

Αντισώματα ELISA

Εμπορικά διαθέσιμη τυποποιημένη συσκευασία για ανίχνευση MIP-1α (murine MIP-1α standard ELISA development kit, Peprotech, NJ): Το όριο ανίχνευσης της χημειοκίνης MIP-1α, ορίζεται στα 8 pg/ml.

Εμπορικά διαθέσιμη τυποποιημένη συσκευασία για ανίχνευση TNF-α (murine TNF-α standard ELISA development kit, Peprotech, NJ): Το όριο ανίχνευσης του TNF-α, ορίζεται στα 16 pg/ml.

Αντίσωμα ανίχνευσης IgG1 (AbD Serotec, UK): το αντίσωμα αναγνωρίζει τις βαριές αλυσίδες των ανοσοσφαιρινών τάξης G1 ποντικού και είναι συζευγμένο με βιοτίνη.

Αντίσωμα ανίχνευσης IgG2a (AbD Serotec, UK): το αντίσωμα αναγνωρίζει τις βαριές αλυσίδες των ανοσοσφαιρινών τάξης G2a ποντικού και είναι συζευγμένο με βιοτίνη.

3.1.5 Παρασκευή διαλυμάτων.

Ρυθμιστικό διάλυμα PBS: 1 lt ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών παρασκευάζεται με την προσθήκη 8 gr. NaCl, 0,2 gr. KCl, 0,2 gr. KH_2PO_4 και 1,15 gr. Na_2HPO_4 σε 1 lt δις-απεσταγμένου νερού. Το pH ρυθμίζεται στο 7,2 – 7,4 και το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4 °C.

Διάλυμα λύσης χλωριούχου αμμωνίου (ACK buffer): 1 lt διαλύματος παρασκευάζεται με την προσθήκη 0,15M NH_4Cl , 1mM KHCO_3 και 0,1mM Na_2EDTA , σε δις-απεσταγμένο νερό. Το pH ρυθμίζεται στο 7,2 - 7,4 και το διάλυμα διηθείται με φίλτρο με μέγεθος πόρων 0,22 μm και διατηρείται στους 4 °C μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

Διάλυμα κατάψυξης: Το μέσο κατάψυξης είναι ειδικά σχεδιασμένο ώστε να επιτρέπει την κατάψυξη κυττάρων για μακροπρόθεσμη φύλαξη χωρίς επιπτώσεις. Το διάλυμα κατάψυξης αποτελείται από 7 μέρη θρεπτικού διαλύματος RPMI-1640, 2 μέρη ορού FBS και 1 μέρος DMSO.

Διάλυμα κατάψυξης σημειωμένων κυττάρων (FBS-10% DMSO): παρασκευάζεται με την προσθήκη 10% DMSO σε FBS, λίγο πριν την χρήση του.

Διάλυμα PBS/BSA: Παρασκευάζεται με την προσθήκη 1 gr. BSA σε 100 ml διαλύματος PBS. Το διάλυμα διηθείται με φίλτρο με μέγεθος πόρων 0,22 μm και διατηρείται στους 4 °C μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

Ρυθμιστικό διάλυμα κυτταρομετρίας ροής (PBS/FBS, facs buffer): παρασκευάζεται με την προσθήκη 3 ml FBS σε 100 ml PBS λίγο πριν την χρήση του.

Διάλυμα διάτρησης (permeabilization buffer): παρασκευάζεται με την προσθήκη 0,1 gr. σαπωνίνης και 3 ml FBS σε 100 ml PBS, λίγο πριν την χρήση του.

Διττανθρακικό διάλυμα κάλυψης μη ειδικών θέσεων (carbonate buffer): παρασκευάζεται με την προσθήκη Na_2CO_3 (15 mM) και NaHCO_3 (35 mM) σε δις-απεσταγμένο νερό και το pH ρυθμίζεται στο 9,6.

Διάλυμα πλύσης PBS-Tween 0,05%: παρασκευάζεται με την προσθήκη 0,05 ml Tween-20 σε 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος PBS.

Διάλυμα μονιμοποίησης 2% w/v PFA: παρασκευάζεται με την προσθήκη 2 gr. παραφορμαλδεϋδης σε 100 ml PBS. Η ανάδευση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 65 °C. Στη συνέχεια, το διάλυμα διηθείται με διηθητικό χαρτί και διατηρείται στους – 20 °C.

Διάλυμα θειϊκού οξέος (2M H₂SO₄): παρασκευάζεται με την προσθήκη 111,2 ml H₂SO₄ 96% σε δις-απεσταγμένο νερό.

Διάλυμα αραίωσης (diluent buffer): παρασκευάζεται με την προσθήκη 0,05 ml Tween-20 και 0,1gr. BSA σε 100 ml PBS. Το διάλυμα διηθείται με φίλτρο με μέγεθος πόρων 0,22 μm και διατηρείται στους 4 °C.

Διάλυμα χρωστικής TrypanBlue, 4% w/v: παρασκευάζεται με την διάλυση 4 gr. χρωστικής TrypanBlue σε 100 ml PBS.

Διάλυμα SDS: παρασκευάζεται με την προσθήκη 0,01 gr. SDS σε 100 ml αποστειρωμένου νερού.

3.1.6 Βιολογικό Υλικό.

3.1.6.1 Παράσιτα του γένους *Leishmania* spp.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα στελέχη του παρασίτου *Leishmania* spp.:

Στέλεχος MCAN/PT/98/IMT 244, *Leishmania infantum* zymodeme MON-1, το οποίο παραχωρήθηκε ευγενικά από την Δρ. M. Santos-Gomes (Κέντρο ελονοσίας και άλλων Νεοεισερχόμενων Τροπικών Νόσων, Πορτογαλία).

Στέλεχος MHOM/IN/1996/THAK35, *Leishmania donovani* zymodeme MON-2, το οποίο παραχωρήθηκε ευγενικά από την Δρ. Κ. Σωτηριάδου (Εργ. Μοριακής Παρασιτολογίας, Τμήμα Μικροβιολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ).

Στέλεχος MRHO/SU/59/P, *Leishmania major* zymodeme LV39.

3.1.6.2 Κύτταρα θηλαστικών.

Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε η αθανатоποιημένη κυτταρική σειρά J774A.1, προερχόμενη από ενήλικα ποντίκια της αιμομικτικής φυλής BALB/cN (ATCC No: TIB-67, Rockville, Maryland, USA).

3.1.7 Πειραματόζωα

Χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια (*Mus musculus*) της αιμομικτικής φυλής BALB/c (H-2^d) και C57BL/6 (H-2^b), τα οποία παραλαμβάνονταν από την Μονάδα Πειραματοζώων του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ. Όλα τα πειραματόζωα διατηρούνται σε συνθήκες ελεύθερες παθογόνων (specific pathogen-free conditions), λαμβάνοντας ισορροπημένη δίαιτα και απεριόριστη παροχή πόσιμου νερού και τροφής (*ad libitum*), σε θερμοκρασία 22-25 °C και φωτοπερίοδο 12 ωρών. Τα πειράματα έλαβαν χώρα σε θηλυκά ενήλικα ζώα, ηλικίας 6-8 εβδομάδων.

3.1.8 Εναρκτήρια μόρια.

Τα εναρκτήρια μόρια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή, αποτελούν ειδικά σχεδιασμένους εκκινητές “QuantiTect Primer Assays” (Qiagen, Germany). Τα μεταγραφικά στοιχεία (mRNA) που ελέγχθηκαν είναι τα ακόλουθα: της ιντερλευκίνης 10 (IL-10), του μονομερούς p40 της ιντερλευκίνης 12 (IL-12), της ιντερλευκίνης 1β (IL-1β), του μεταγραφικού παράγοντα Tbox-21 (Tbx21), του μεταγραφικού παράγοντα GATA-3, του p52 πυρηνικού μεταγραφικού παράγοντα (NF-κB2) και της δεϋδρογονάσης της γλυκεραλδεϋδης της 3-φωσφατάσης (GAPDH). Το GAPDH χρησιμοποιείται για εξομάλυνση των αποτελεσμάτων. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν και συμβατικοί εκκινητές που στοχεύουν το γονίδιο MIP-1α και TNF-α (Invitrogen, Life Technologies, USA). Τα ζεύγη των εκκινητών ενισχύουν μέγεθος DNA 321 bp και 406 bp, αντίστοιχα και έχουν τις ακόλουθες αλληλουχίες: MIP-1α (ανοδικός: TGG GTC CAA GAA TAC ATC ACT G, καθοδικός: GAG GGA GAT GGG GGT TGA) και TNF-α ανοδικός: AGC CCA CGT CGT AGC AAA CCA CCA A, καθοδικός: ACACCC ATT CCC TTC ACA GAG CAA T). Παράλληλα, χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές που ενισχύουν την IL-12p40, την IFN-γ, την IL-4 και τον TNF-α κατά την ανάπτυξη συμβατικής PCR, όπου ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε αυτό της β-ακτίνης.

3.1.9 Χρήση λογισμικών προγραμμάτων.

Χρησιμοποιήθηκαν τα λογισμικά προγράμματα: RT2 Profiler PCR Array Data Analysis v.3.5 (SABiosciences - Qiagen Hilden, Germany), Image Quant IQ 5.2, CellQuest Pro V. 5.2.1 (BD, CA), FlowJo V.10.0.8, η βάση δεδομένων NCBI/protein (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>) και οι αλγόριθμοι πρόβλεψης αντιγονικότητας NetMHC 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC-3.0/>), NetMHCII 2.2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCII>) και SYFPEITHI (<http://www.syfpeithi.de>).

3.2 Μέθοδοι

3.2.1 Κυτταροκαλλιέργειες

3.2.1.1 *In vitro* καλλιέργεια του παρασίτου *Leishmania spp.*

Η *in vitro* καλλιέργεια του παρασίτου *Leishmania spp.* πραγματοποιείται σε θρεπτικό υλικό RPMI-1640 εμπλουτισμένο με 10% FBS (πλήρες θρεπτικό υλικό), σε ειδικές αποστειρωμένες φιάλες κυτταροκαλλιέργειας. Οι φιάλες τοποθετούνται σε επωαστικό κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 26 °C, απουσία CO₂ και ελέγχονται καθημερινά σε ανάστροφο μικροσκόπιο. Ο έλεγχος της ανάπτυξης των παρασίτων πραγματοποιείται με την καταμέτρησή τους σε πλήρες θρεπτικό υλικό RPMI-1640, σε πλάκα καταμέτρησης κυττάρων τύπου Malassez.

Στην αρχή της στατικής φάσης ανάπτυξης των παρασίτων (4^η έως 6^η ημέρα καλλιέργειας, ανάλογα με το στέλεχος του παρασίτου), πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια, ώστε να αποφεύγεται η μετάπτωση των παρασίτων στη φάση κυτταρικού θανάτου. Η ανακαλλιέργεια πραγματοποιείται με τον ενοφθαλμισμό 2 – 2,5 x 10⁷ παρασίτων στατικής φάσης ανάπτυξης σε τελικό όγκο 10 ml πλήρους θρεπτικού υλικού RPMI-1640. Για τη διατήρηση της μολυσματικότητας των στελεχών, η *in vitro* καλλιέργεια των προμαστιγωτών μορφών τους, περιορίζεται στον ελάχιστο απαραίτητο αριθμό ανακαλλιεργειών, ο οποίος δεν ξεπερνά τις έξι.

3.2.1.2 *In vitro* καλλιέργεια κυττάρων θηλαστικών.

Η κυτταρική σειρά J774A.1 μακροφάγων καλλιεργείται σε πλήρες θρεπτικό υλικό RPMI-1640, σε επωαστικό κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 37°C, σε περιβάλλον 5%

CO₂. Το θρεπτικό μέσο ανανεώνεται 1 - 2 φορές εβδομαδιαίως. Όταν η συρροή των κυττάρων φτάνει το 85 - 90 % κατά προσέγγιση, πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια, προκειμένου να εξασφαλίζεται η βιωσιμότητα και η ανάπτυξη των κυττάρων. Τα κύτταρα αποκόλλονται μηχανικά με ειδικό εργαλείο αποκόλλησης (scraper) και κατόπιν, το κυτταρικό εναιώρημα μοιράζεται ισόποσα σε τρεις νέες φιάλες κυτταροκαλλιέργειας για την εκκίνηση νέων καλλιεργειών τελικού όγκου 10 ml πλήρους θρεπτικού υλικού RPMI-1640.

3.2.2 Διατήρηση και επανάκτηση των ευκαρυωτικών οργανισμών και των κυττάρων θηλαστικών.

3.2.2.1 Διατήρηση στελεχών του παρασίτου *Leishmania spp.* σε πειραματόζωα ή υγρό άζωτο και επανάκτηση μολυσματικών μορφών.

Ποντίκια της αιμομικτικής φυλής BALB/c μολύνονται περιοδικά με τα στελέχη του παρασίτου. Η μόλυνση πραγματοποιείται είτε υποδόρια στο πέλμα των πειραματόζωων, με 10⁶ προμαστιγωτές μορφές *L. major* σε 0,025 ml αποστειρωμένου διαλύματος PBS, είτε ενδοφλέβια (αριστερή ουραία φλέβα) με 10⁷ προμαστιγωτές μορφές *L. donovani*, σε 0,1 ml διαλύματος PBS. Μετά την πάροδο 2 - 3 μηνών τα ζώα θανατώνονται σε ατμούς CO₂ και πραγματοποιείται ασηπτική απομόνωση και ομογενοποίηση, είτε του ιγνυακού λεμφαδένου (μόλυνση με *L. major* – δερματική λείσμανίαση), είτε του σπλήνα (μόλυνση με *L. donovani* – σπλαγχνική λείσμανίαση). Στη συνέχεια, μέρος του ομογενοποιημένου (0,2 ml) ενοφθαλμίζεται σε 10 ml πλήρους θρεπτικού υλικού RPMI-1640, σε αποστειρωμένες φιάλες κυτταροκαλλιέργειας και τοποθετείται σε επωαστικό κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 26 °C, απουσία CO₂. Ακολουθεί καθημερινή παρακολούθηση των καλλιεργειών σε ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο. Η ανάπτυξη προμαστιγωτών μορφών επιβεβαιώνεται συνήθως μετά την παρέλευση τριών περίπου ημερών. Η ανακαλλιέργεια πραγματοποιείται στο χρονικό σημείο όπου στο αρχικό δείγμα παρατηρείται πυκνότητα αντίστοιχη της στατικής φάσης ανάπτυξης.

Η μακροχρόνια διατήρηση των παρασίτων επιτυγχάνεται με κρυογονική αποθήκευσή τους σε υγρό άζωτο. Ειδικότερα, καλλιεργητικό υλικό που περιέχει τον επιθυμητό αριθμό των προμαστιγωτών μορφών στατικής φάσης ανάπτυξης (2 x 10⁷ παράσιτα/ml), φυγοκεντρείται στις 1.600 rpm για 10 λεπτά, στους 26 °C. Ακολουθούν τρεις διαδοχικές

εκπλύσεις με διάλυμα PBS, στις ίδιες συνθήκες. Στη συνέχεια, το ίζημα των παρασίτων επαναιωρείται ήπια σε διάλυμα κατάψυξης και κατανέμεται σε κρυογονικά φιαλίδια όπου καταψύχονται σταδιακά (στους 4 °C για 1 ώρα, στους -20 °C για 1 ώρα, στους -80 °C για 18 ώρες και τέλος στο υγρό άζωτο).

Η διαδικασία εκκίνησης των παρασίτων από το κατεψυγμένο απόθεμα πραγματοποιείται ως εξής: τα κύτταρα αποψύχονται ταχέως σε προθερμασμένο υδατόλουτρο θερμοκαρσίας 37 °C. Στη συνέχεια, τοποθετούνται σε 10 ml εμπλουτισμένου θρεπτικού μέσου, μεταφέρονται σε φιάλη κυτταροκαλλιέργειας και επωάζονται σε κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 26 °C. Μετά από 1 ώρα, το καλλιεργητικό υλικό φυγοκεντρείται εκ νέου και το ίζημα επαναιωρείται σε 10 ml φρέσκου εμπλουτισμένου θρεπτικού υλικού.

3.2.2.2 Διατήρηση και επανάκτηση των κυττάρων θηλαστικών.

Η μακροχρόνια διατήρηση των κυττάρων θηλαστικών επιτυγχάνεται με κρυογονική αποθήκευσή τους σε υγρό άζωτο. Κατάλληλος όγκος καλλιεργητικού υλικού που περιέχει τον επιθυμητό αριθμό των κυττάρων (1×10^7 κύτταρα / ml), φυγοκεντρείται στις 1.300 rpm για 10 λεπτά, στους 26 °C. Ακολουθούν τρεις διαδοχικές εκπλύσεις με πλήρες θρεπτικό υλικό RPMI-1640, στις ίδιες συνθήκες. Στη συνέχεια, το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται ήπια σε διάλυμα κατάψυξης και κατανέμεται σε κρυογονικά φιαλίδια, τα οποία καταψύχονται σταδιακά (στους 4 °C για 1 ώρα, στους -20 °C για 1 ώρα, στους -80 °C για 18 ώρες και τέλος στο υγρό άζωτο).

Η διαδικασία εκκίνησης των μακροφάγων από το κατεψυγμένο απόθεμα πραγματοποιείται ως εξής: τα κύτταρα αποψύχονται ταχέως σε προθερμασμένο υδατόλουτρο θερμοκαρσίας 37 °C, τοποθετούνται σε 10 ml εμπλουτισμένου θρεπτικού μέσου, μεταφέρονται σε φιάλη κυτταροκαλλιέργειας και επωάζονται σε κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 37 °C, σε περιβάλλον 5% CO₂. Μετά από 18 ώρες, το καλλιεργητικό υλικό φυγοκεντρείται εκ νέου σε ήπιες συνθήκες (1.300 rpm για 10 λεπτά της ώρας) και το ίζημα επαναιωρείται σε 10 ml φρέσκου εμπλουτισμένου θρεπτικού υλικού.

3.2.3 Παρασκευή διαλυτού αντιγόνου του παρασίτου *Leishmania spp.*

Η παρασκευή διαλυτού αντιγόνου του παρασίτου (Soluble Leishmania Antigen, SLA) πραγματοποιείται με την εφαρμογή δύο διαφορετικών τεχνικών, των διαδοχικών κύκλων ψύξης – θέρμανσης (μη μηχανική τεχνική) και της εφαρμογής υπερήχων (μηχανική τεχνική). Ειδικότερα, το καλλιεργητικό υλικό που περιέχει προμαστιγωτές μορφές του παρασίτου στατικής φάσης ανάπτυξης, φυγοκεντρείται στις 1600 rpm για 10 λεπτά, σε ψυχόμενη φυγόκεντρο. Ακολουθούν τρεις διαδοχικές εκπλύσεις με ρυθμιστικό διάλυμα PBS, στις ίδιες συνθήκες. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται καταμέτρηση των προμαστιγωτών μορφών με την χρήση πλάκας Malassez, σε οπτικό μικροσκόπιο. Η συγκέντρωση των προμαστιγωτών ρυθμίζεται στα 10^9 παράσιτα/ml και ακολουθεί λύση τους με τρεις διαδοχικούς κύκλους ψύξης-θέρμανσης (διαδοχική μεταφορά σε υπερκαταψύκτη θερμοκρασίας $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 30 λεπτά και κατόπιν σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ για λίγα δευτερόλεπτα). Στη συνέχεια, ακολουθεί μηχανική λύση των παρασίτων με εφαρμογή υπερήχων. Εφαρμόζονται τρία στάδια υπερήχων διάρκειας 1 λεπτού, όπου ο δείκτης “amplitude” ρυθμίζεται στην τιμή 100 και ο δείκτης “cycle” ρυθμίζεται στην τιμή 1. Η εφαρμογή των υπερήχων γίνεται κατά διαστήματα με τη χρήση παγόλουτρου, προκειμένου να αντιμετωπίζεται η αύξηση της θερμοκρασίας του μεταδότη και του κυτταρικού διαλύματος. Κατόπιν, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση του κυτταρικού εναιωρήματος στις 13000 rpm, για 60 λεπτά, σε θερμοκρασία $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, προκειμένου να κατακρημνιστούν τα κυτταρικά θραύσματα. Τέλος, συλλέγεται το υπερκείμενο, το οποίο αποτελεί το διαλυτό αντιγόνο του παρασίτου (soluble *Leishmania* antigen – SLA). Η ολική συγκέντρωση των πρωτεϊνών προσδιορίζεται με την τυποποιημένη μέθοδο Micro BCA Protein Assay Kit, με την μέτρηση της οπτικής πυκνότητας των δειγμάτων στα 570 nm.

3.2.4 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών πραγματοποιείται φασματοφωτομετρικά, με την χρήση εμπορικά διαθέσιμης τυποποιημένης συσκευασίας (Micro BCA Protein Assay Reagent Kit). Η τυποποιημένη συσκευασία περιέχει πρότυπο διάλυμα αλβουμίνης μόσχου (BSA) συγκέντρωσης 2 mg/ml και το BCA αντιδραστήριο. Συνοπτικά, για τον σχηματισμό της πρότυπης καμπύλης, το πρότυπο διάλυμα BSA αραιώνεται διαδοχικά

προκειμένου να επιτευχθούν αραιώσεις από 50 $\mu\text{g/ml}$ έως 1,5 $\mu\text{g/ml}$. Το BCA αντιδραστήριο παρασκευάζεται από την ανάμιξη των τριών συστατικών του (50 μέρη MA : 48 μέρη MB : 2 μέρη MC). Ακολουθεί ανάμιξη 1 μέρους των δειγμάτων με 1 μέρος αντιδραστήριου. Κατόπιν, τα δείγματα επωάζονται για 1 ώρα σε κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 60 °C και στη συνέχεια πραγματοποιείται μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 562 nm.

3.2.5 Ποσοτικός προσδιορισμός του παρασιτικού φορτίου στους ιστούς των πειραματόζων.

Ο προσδιορισμός του παρασιτικού φορτίου πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων [161, 162]. Αρχικά πραγματοποιείται ασηπτική λήψη των εσωτερικών οργάνων (ήπατος και σπλήνα) κατόπιν θανάτωσης των ζώων με αυχενική παρεκτόπιση. Στη συνέχεια, τα όργανα τοποθετούνται σε προζυγισμένους πλαστικούς σωλήνες όγκου 15 ml που περιέχουν ψυχρό θρεπτικό διάλυμα RPMI-1640 και ζυγίζονται, προκειμένου να υπολογιστεί το βάρος τους. Ακολουθεί απομόνωση μικρού ιστοτεμαχίου και εκτίμηση του βάρους του (10 - 20 mg) σε αναλυτικό ζυγό. Τα ιστοτεμάχια ομογενοποιούνται με διαδοχικά περάσματα από σύριγγες που φέρουν βελόνες διαμέτρου 26GA3/8 και 30GA1/2. Το ιστικό ομογενοποίημα επαναωρεείται σε θρεπτικό υλικό Schneider's εμπλουτισμένο με 20% FBS, σε τελική αραιώση 1 mg/ml. Σε πλάκα μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων με επίπεδα φρεάτια, τοποθετούνται 100 μl πλήρους θρεπτικού υλικού (Schneider's + 20% FBS) και 100 μl του ομογενοποιηματος, σε τετραπλή επανάληψη. Ακολουθεί διαδοχική αραιώση του ομογενοποιηματος για 11 διαδοχικές φορές και επώαση της πλάκας μικροτιτλοποίησης σε κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 26 °C. Η τιτλοποίηση του παρασίτου στους ιστούς πραγματοποιείται 7 - 10 ημέρες αργότερα, με την παρακολούθηση της ανάπτυξης των προμαστιγωτών μορφών σε ανάστροφο μικροσκόπιο, όπου σημειώνεται η μέγιστη αραιώση στην οποία παρατηρείται έστω και μία προμαστιγωτή μορφή του παρασίτου. Ο τελικός υπολογισμός του παρασιτικού φορτίου γίνεται σύμφωνα με τον τύπο: **παρασιτικό φορτίο οργάνου = (1/αραιώση) x βάρος οργάνου (mg).**

3.2.6 Μέτρηση των επιπέδων ειδικών έναντι του παρασίτου, αντισωμάτων IgG1 και IgG2a ισοτύπων.

Πλάκα μικροτιτλοποίησης ELISA επιστρώνεται με 5 µg/ml διαλυτού αντιγόνου του παρασίτου *Leishmania spp.*, σε 100 µl διττανθρακικού ρυθμιστικού διαλύματος κάλυψης (carbonate buffer) και επωάζεται σε θερμοκρασία 4 °C, για 18 ώρες. Στη συνέχεια το περιεχόμενο της πλάκας απορρίπτεται και ακολουθεί έκπλυση εις τριπλούν, με PBS/Tween υπό πίεση. Ακολούθως σε κάθε φρεάτιο προστίθενται 200 µl PBS/BSA και η πλάκα επωάζεται στους 37 °C για 1,5 ώρα με σκοπό την κάλυψη των μη-ειδικών θέσεων. Το περιεχόμενο απορρίπτεται και ακολουθεί έκπλυση εις τριπλούν με PBS/Tween υπό πίεση. Στη συνέχεια, σε κάθε φρεάτιο προστίθενται 100 µl διαδοχικών αραιώσεων των ορών και ακολουθεί επώαση διάρκειας 1 ώρας, στους 37 °C. Οι διαδοχικές αραιώσεις των ορών πραγματοποιούνται σε διάλυμα PBS/BSA. Στη συνέχεια το περιεχόμενο της πλάκας απορρίπτεται και μετά από τρεις διαδοχικές εκπλύσεις, προστίθενται 100 µl αντισώματος αντίχνευσης IgG1 (500 ng/ml) ή IgG2a (250 ng/ml). Ακολουθεί επώαση διάρκειας 1 ώρας, στους 37 °C. Ακολούθως, το περιεχόμενο της πλάκας απορρίπτεται και μετά από τέσσερις διαδοχικές εκπλύσεις, σε κάθε φρεάτιο τοποθετούνται 100 µl στρεπταβιδίνης (1:5000) συνδεδεμένης με HRP (horseradish peroxidase). Μετά από επώαση 1 ώρας, στους 37 °C, προστίθενται 100 µl TMB χρωμογόνου και η αντίδραση πραγματοποιείται στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία δωματίου (διάρκειας 15 - 30 λεπτά). Ο τερματισμός της αντίδρασης πραγματοποιείται με την προσθήκη 100 µl διαλύματος H₂SO₄ (2M) και προσδιορίζεται η οπτική πυκνότητα στα 450 nm.

3.2.7 *In vitro* παραγωγή και διαφοροποίηση μυελοειδών δένδριτικών κυττάρων.

Η απομόνωση των δένδριτικών κυττάρων (ΔΚ) από *in vivo* συστήματα δεν ενδείκνυται, λόγω του μικρού αριθμού των κυττάρων αυτών στα διάφορα όργανα. Ως εκ τούτου, έχουν αναπτυχθεί τεχνικές για την διαφοροποίηση μεγάλου αριθμού ΔΚ από αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα [163]. Ειδικότερα, η αποτελεσματική παραγωγή ικανοποιητικού αριθμού ΔΚ με μικρό ποσοστό προσμίξεων Β κυττάρων και κοκκιοκυττάρων, πραγματοποιείται με την διαφοροποίηση κυττάρων μυελού των οστών ποντικού υπό την επίδραση του παράγοντα διέγερσης σχηματισμού αποικιών κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων (GM-CSF, Granulocyte-macrophage colony stimulating

factor). Πιο συγκεκριμένα, μηριαία και κνημιαία οστά απομονώνονται από θηλυκά BALB/c ποντίκια, ηλικίας 6 - 8 εβδομάδων. Απομακρύνονται οι επιφύσεις με την χρήση αποστειρωμένου ψαλιδιού και ο μυελός των οστών εκλούεται μετά από έγχυση θρεπτικού υλικού RPMI-1640 στο εσωτερικό των οστών. Τα συσσωματώματα των κυττάρων που προκύπτουν, διαλύονται με ήπιες αναρροφήσεις του θρεπτικού υλικού με την χρήση ορολογικής πιπέττας. Στη συνέχεια το κυτταρικό εναίωρημα διηθείται σε φίλτρο με διάμετρο πόρων 70 μm . Κατόπιν, τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται στις 1300 rpm για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία 4 °C. Ακολουθούν δύο εκπλύσεις με φρέσκο θρεπτικό υλικό RPMI-1640 και λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων με διάλυμα ACK. Τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα καλλιεργούνται σε συγκέντρωση $3,5 \times 10^5$ κύτταρα/ml σε βακτηριολογικά τρυβλία διαμέτρου 100 mm, σε τελικό όγκο 10 ml πλήρους θρεπτικού υλικού RPMI-1640. Τα κύτταρα ευαισθητοποιούνται με την προσθήκη 20 ng/ml ανασυνδυασμένου παράγοντα GM-CSF, προκειμένου να επιτευχθεί η διαφοροποίηση των μυελοειδών ΔΚ. Ο συνολικός χρόνος επώασης των κυττάρων σε κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 37 °C και ατμόσφαιρας 5% CO₂, είναι 9 ημέρες. Την τρίτη ημέρα καλλιέργειας, σε κάθε τρυβλίο προστίθεται όγκος 10 ml φρέσκου θρεπτικού υλικού RPMI-1640 που περιέχει 10% FBS και 20 ng/ml ανασυνδυασμένου παράγοντα GM-CSF. Την έκτη ημέρα καλλιέργειας, 10 ml κυτταρικού εναιωρήματος αφαιρούνται από την καλλιέργεια, φυγοκεντρώνονται στις 1300 rpm για 10 λεπτά και το κυτταρικό ίζημα που προκύπτει επαναιωρείται σε φρέσκο θρεπτικό υλικό RPMI-1640 που περιέχει 10% FBS και 20 ng/ml ανασυνδυασμένου παράγοντα GM-CSF. Την ένατη ημέρα καλλιέργειας, τα μη-προσκολλητικά κύτταρα συλλέγονται σε πλαστικό σωλήνα φυγοκέντρωσης όγκου 50 ml, με προσεκτική αποκόλληση με την χρήση ορολογικής πιπέττας.

3.2.8 Ταυτοποίηση των μυελοειδών ΔΚ.

Η ταυτοποίηση των ΔΚ μυελογενούς ή λεμφογενούς σειράς πραγματοποιήθηκε με κυτταρομετρία ροής. Τα κύτταρα που προκύπτουν από την *in vitro* διέγερση των κυττάρων του μυελού των οστών με τον ανασυνδυασμένο παράγοντα GM-CSF, επωάζονται με ειδικό σημασμένο μονοκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει την αλυσίδα α_χ της ιντεγκρίνης gp150 (αντι-CD11c-PE), η οποία εκφράζεται στην επιφάνεια των δενδριτικών κυττάρων και των NK κυττάρων, καθώς και με σημασμένο μονοκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει την άλφα αλυσίδα του CD8 μορίου (αντι-CD8a-PE). Η

εκτίμηση του ποσοστού των μυελοειδών ΔΚ (mDCs, CD11c⁺CD8a⁻) πραγματοποιείται με την αυτοματοποιημένη μέθοδος ανάλυσης των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών μεμονωμένων σωματιδίων, της κυτταρομετρίας ροής (FACS).

3.2.9 Εκτίμηση του βαθμού ωρίμανσης των ΔΚ.

Η εκτίμηση του βαθμού ωρίμανσης των ΔΚ πραγματοποιείται με κυτταρομετρία ροής (FACS). Πιο συγκεκριμένα, τα ΔΚ επωάζονται *in vitro* με τους υπό διερεύνηση παράγοντες που ελέγχονται για την ικανότητα επαγωγής διέγερσης/ωρίμανσης. Για τους πειραματισμούς που σχεδιάστηκαν για αυτή την εργασία, δοκιμάστηκαν ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες ή πεπτίδια σε συγκέντρωση 10 μg/ml (βέλτιστη συγκέντρωση λεμφοβλαστικής ικανότητας), για 24 ώρες, σε κλίβανο θερμοκρασίας 37 °C και συγκέντρωσης 5% CO₂. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιούνται ΔΚ που επωάζονται με τον λιποπολυσακχαρίτη των Gram αρνητικών βακτηρίων (LPS) (1 μg/ml). Ακολουθεί συλλογή των κυττάρων και διπλή χρώση με κατάλληλα σημασμένα μονοκλωνικά αντισώματα έναντι των συνδιεγερτικών μορίων CD40, CD80, CD86 και των μορίων του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης II (MHCII).

Ειδικότερα, τα ΔΚ (5×10^5 κύτταρα/δείγμα) επαναιωρούνται σε 0,1 ml διαλύματος PBS. Ακολουθεί έκπλυση των κυττάρων και επαναιώρησή τους σε 0,1 ml διαλύματος PBS - 3% FBS (facs buffer) που περιέχει τα συζευγμένα με φθοριοχρώματα αντισώματα (αραίωση 1:100). Στη συνέχεια, τα κύτταρα επωάζονται στους 4 °C και σε συνθήκες σκότους, για 30 λεπτά. Ακολουθεί έκπλυση των κυττάρων εις διπλούν σε facs buffer. Κατόπιν, το κυτταρικό ίζημα, είτε επαναιωρείται σε 500 μl PBS και το εναίωρημα αναλύεται άμεσα, είτε μονιμοποιείται σε 100 μl διαλύματος PBS - 2% (w/v) παραφολμαδεΰδης, για 20 λεπτά στους 4 °C και σε συνθήκες σκότους. Τα μονιμοποιημένα κύτταρα διατηρούνται σε διάλυμα FBS - 10% DMSO. Στον κυτταρομετρική ροής αναλύονται 10.000-20.000 γεγονότα/δείγμα.

3.2.10 Κυτταροπλασματική εντόπιση κυτταροκινών και iNOS στα ΔΚ.

Η ενδοκυτταρική ανίχνευση κυτταροκινών πραγματοποιείται επίσης με FACS, μετά από επώαση των κυττάρων με μπρεφελδίνη A, συγκέντρωσης 2,5 μg/ml, για τουλάχιστον 4 ώρες, σε κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 37 °C. Στη συνέχεια, το κυτταρικό ίζημα που

προκύπτει μετά την απομάκρυνση της μπρεφελδίνης (5×10^5 κύτταρα/δείγμα), επαναιωρείται σε 100 μ l διαλύματος PBS – 2% (w/v) παραφολμαδεΰδης για 20 λεπτά, στους 4 °C και σε συνθήκες σκότους, προκειμένου να επιτευχθεί η μονιμοποίηση των κυττάρων. Ακολουθούν δύο εκπλύσεις σε διάλυμα PBS - 3% FBS και επαναιώρηση των κυττάρων σε 50 μ l διαλύματος διάτρησης έτσι ώστε να επιτευχθεί η αντιστρεπτή διάτρηση των μεμβρανών. Ακολουθώντας, τα κύτταρα επωάζονται για 30 λεπτά, στους 4 °C σε συνθήκες σκότους με τα κατάλληλα σημασμένα αντισώματα, αραιωμένα σε διάλυμα διάτρησης. Ακολουθούν δύο εκπλύσεις, η πρώτη με διάλυμα διάτρησης και η δεύτερη με διάλυμα PBS - 3% FBS. Κατόπιν, το κυτταρικό ίζημα είτε επαναιωρείται σε 500 μ l PBS και το εναιώρημα αναλύεται άμεσα, είτε διατηρείται σε διάλυμα FBS - 10% DMSO, για μελλοντική ανάλυση. Στον κυτταρομετρητή ροής αναλύονται 10.000-20.000 γεγονότα / δείγμα.

3.2.11 Σήμανση επιφανειακών αντιγόνων για τον φαινοτυπικό προσδιορισμό κυτταρικών υποπληθυσμών.

Στην παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκε φαινοτυπικός προσδιορισμός των ουδετερόφιλων ($\text{Ly6G}^+\text{-CD11b}^+$), των μακροφάγων ($\text{F4/80}^+\text{-CD11b}^+$) και των μονοκυττάρων ($\text{Ly6C}^+\text{-CD11b}^+$), περιτοναϊκής κοιλότητας ποντικού. Ειδικότερα, τα κύτταρα της περιτοναϊκής κοιλότητας συλλέγονται μετά από έκπλυση αυτής με 5 ml ψυχρού διαλύματος PBS. Το κυτταρικό εναιώρημα φυγοκεντρείται στις 1300 rpm για 10 λεπτά, στους 4 °C και ακολουθεί διπλή χρώση των κυττάρων με κατάλληλα σημασμένα μονοκλωνικά αντισώματα, όπως περιγράφεται στην § 3.2.9.

3.2.12 Απομόνωση RNA.

Για την απομόνωση του RNA χρησιμοποιήθηκε η εμπορικά διαθέσιμη τυποποιημένη συσκευασία απομόνωσης RNeasy Mini Kit. Ειδικότερα, 5×10^6 κύτταρα/δείγμα, φυγοκεντρούνται σε επιτραπέζια μικροφυγόκεντρο, στις 3500 rpm για 10 λεπτά. Κατόπιν, απομακρύνεται το υπερκείμενο και το κυτταρικό ίζημα υποβάλλεται σε διαδικασία απομόνωσης ολικού RNA μέσω κολώνας, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Στη συνέχεια, προσδιορίζεται η συγκέντρωση του απομονωμένου RNA

μέσω της μέτρησης της οπτικής πυκνότητας στα 260 nm, σε φασματοφωτόμετρο (Nanodrop). Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του RNA, εφαρμόζεται η σχέση: 1 μονάδα $OD_{260nm} = 40 \mu g/ml$ RNA. Η καθαρότητα των δειγμάτων ελέγχεται σύμφωνα με τον λόγο OD_{260nm}/OD_{280nm} , όπου αποδεκτά θεωρούνται τα δείγματα που παρουσιάζουν λόγο $OD_{260nm}/OD_{280nm} > 1,6$. Τέλος, τα δείγματα RNA διατηρούνται στους $-80^{\circ}C$.

3.2.13 Ανάλυση της έκφρασης γονιδίων με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real-time PCR).

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με την χρήση της αντίστροφης μεταγραφάσης (real-time RT-PCR) αποτελείται από δύο στάδια. Αρχικά, πραγματοποιείται η αντίστροφη μεταγραφή του RNA των μεταγραφικών στοιχείων των κυττάρων, σε cDNA βιβλιοθήκη, με τη χρήση της αντίστροφης μεταγραφάσης M-MLV και των 15μερών ολιγοδεοξυνουκλεοτίδιων (Promega, USA) (εκκινητών oligo-dT), οι οποίοι υβριδοποιούνται με τις poly(A) ουρές στο 3'-άκρο των mRNA μορίων, επιτυγχάνοντας με αυτόν τον τρόπο την αντιγραφή μόνο των mRNA μεταγραφικών στοιχείων. Ειδικότερα, σε καθένα δοκιμαστικό σωλήνα τύπου eppendorff των 0,2 ml, αντιστοιχεί ένα ξεχωριστό δείγμα και τοποθετείται μίγμα που περιέχει 1 μg από το υπόστρωμα RNA, 0,5 $\mu g/ml$ oligodT και δις-απεσταγμένο νερό, έτσι ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι 14 μl . Στη συνέχεια τα δείγματα επωάζονται στους $80^{\circ}C$ για 10 λεπτά, προκειμένου να αποδιαταχθούν οι δευτεροταγείς δομές του RNA. Η αντίστροφη μεταγραφή πραγματοποιείται στους $40^{\circ}C$ για 1 ώρα και στους $90^{\circ}C$ για 5 λεπτά της ώρας. Έπειτα, τα δείγματα ψύχονται στον πάγο για 2 έως 3 λεπτά και ακολούθως προστίθενται 6 μl μίγματος που περιέχει 5x ρυθμιστικό διάλυμα, 10 mM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) και 200U της αντίστροφης μεταγραφάσης.

Στο δεύτερο στάδιο λαμβάνει χώρα η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου. Στην παρούσα μελέτη, η real-time PCR πραγματοποιήθηκε σε θερμικό κυκλοποιητή (Exicycler 96, Bioneer, Korea) με την εμπορικά διαθέσιμη συσκευασία SYBR Green PCR Master Mix (Kapa Biosystems, USA). Σε αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα eppendorf των 0,2 ml, τοποθετούνται τα αντιδραστήρια που θα αποτελέσουν το κύριο μίγμα της κάθε αντίδρασης. Το μίγμα της PCR, τελικού όγκου 20 μl , περιέχει τον εκάστοτε εκκινητή (5 pmol/ μl), απεσταγμένο νερό (3 μl), υπόστρωμα

cDNA (5 μ l) και το μίγμα που περιέχει DNA πολυμεράση, $MgCl_2$, SYBR Green και ρυθμιστικό διάλυμα (SYBR Green master mixture) (10 μ l). Σε κάθε θέση ελέγχεται η έκφραση ενός μεταγραφικού στοιχείου και ο έλεγχος του κάθε μεταγραφικού στοιχείου, για κάθε δείγμα, γίνεται εις διπλούν. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι ειδικά σχεδιασμένοι εκκινητές “QuantiTect Primer Assays” (Qiagen). Τα μεταγραφικά στοιχεία (mRNA) που ελέγχθηκαν είναι τα ακόλουθα: της ιντερλευκίνης 10 (IL-10), του μονομερούς p40 της ιντερλευκίνης 12 (IL-12p40), της ιντερλευκίνης 1 β (IL-1 β), του μεταγραφικού παράγοντα Tbx-21 (Tbx21), του μεταγραφικού παράγοντα GATA-3, του p52 πυρηνικού μεταγραφικού παράγοντα (NF- κ B2) και της δεϋδρογονάσης της γλυκεραλδεϋδης της 3-φωσφατάσης (GAPDH). Το GAPDH χρησιμοποιείται για εξομάλυνση των αποτελεσμάτων. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν και συμβατικοί εκκινητές που στοχεύουν το γονίδιο MIP-1 α και TNF- α . Τα ζεύγη των εκκινητών ενισχύουν μέγεθος DNA 321 bp και 406 bp, αντίστοιχα. Παράλληλα, χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές που ενισχύουν την IL-12p40, την IFN- γ , την IL-4 και τον TNF- α κατά την ανάπτυξη συμβατικής PCR, όπου ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε αυτό της β -ακτίνης.

Οι συνθήκες αντίδρασης στον θερμικό κυκλοποιητή για τους ειδικά σχεδιασμένους εκκινητές ήταν οι ακόλουθες: 1) αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων στους 94 °C για 10 λεπτά, 2) 40 κύκλοι ενίσχυσης που αποτελούνται από το στάδιο της αποδιάταξης των δίκλωνων μορίων στους 94 °C για 10 δευτερόλεπτα και το στάδιο της υβριδοποίησης των εκκινητών και του πολυμερισμού των νεοσυντιθέμενων νουκλεϊκών αλυσίδων στους 60 °C. Οι συνθήκες αντίδρασης για τους συμβατικά σχεδιασμένους εκκινητές είναι: 1) αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων στους 95 °C για 10 λεπτά, 2) 45 κύκλοι ενίσχυσης που αποτελούνται από το στάδιο της αποδιάταξης των δίκλωνων μορίων στους 95 °C για 30 δευτερόλεπτα και το στάδιο της υβριδοποίησης των εκκινητών στους 60 °C για 30 δευτερόλεπτα και της επέκτασης στους 72 °C για 45 δευτερόλεπτα. Όλα τα πειράματα PCR πραγματικού χρόνου ακολουθήθηκαν από ανάλυση καμπύλης τήξης από τους 60 °C έως τους 94 °C. Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων ενίσχυσης γονιδίων με τους ειδικά σχεδιασμένους εκκινητές χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό RT2 Profiler PCR Array Data Analysis v.3.5 (SAbiosciences, Qiagen), ενώ όλα τα αποτελέσματα ενίσχυσης με τους συμβατικούς εκκινητές, υπολογίστηκαν με βάση τη μέθοδο $\Delta\Delta Ct$. Επιπλέον, η σχετική ποσοτικοποίηση των μεταγράφων που προσδιορίστηκαν με συμβατική PCR, πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό Image QuantI:5.2.

3.2.14 *In silico* ανάλυση του ευκαρυωτικού παράγοντα έναρξης του στελέχους *L. infantum* (LieIF).

Αρχικά πραγματοποιήθηκε λήψη της πλήρους αλληλουχίας του ευκαρυωτικού παράγοντα έναρξης των στελεχών *L. infantum*, *L. major* και *L. braziliensis*, από την βάση δεδομένων NCBI/protein (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>). Προκειμένου να επιτευχθεί ο σχεδιασμός αντιγονικών επιτόπων που πιθανά αναγνωρίζονται από μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης I και II (MHCI και MHCII), πραγματοποιήθηκε χαρτογράφηση της πρωτεϊνικής αλληλουχίας με αλγόριθμους πρόβλεψης αντιγονικότητας.

Στην παρούσα ερευνητική μελέτη, το ενδιαφέρον επικεντρώθηκε σε τρεις φυλές ποντικών, στα BALB/c (γενετικά ευαίσθητη φυλή έναντι της λείσμανιάσης) και στα C57BL/6 και CBA ποντίκια (γενετικά ανθεκτικές φυλές έναντι της λείσμανιάσης). Για τον προσδιορισμό των T κυτταρικών επιτόπων, οι οποίοι αναγνωρίζονται από τα MHC μόρια τάξης II του ποντικού επιλέχθηκαν οι αλγόριθμοι NetMHCII 2.2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCII>) και SYFPEITHI (<http://www.syfpeithi.de>), οι οποίοι λειτουργούν με κριτήριο την αναγνώριση της συμπληρωματικότητας μεταξύ των μορίων ιστοσυμβατότητας και των T κυτταρικών επιτόπων. Η συμπληρωματικότητα των T κυτταρικών επιτόπων ελέγχθηκε έναντι 4 αλληλομόρφων των MHC μορίων τάξης II (H2-IA^d, H2-IA^b, H2-A^k, H2-E^k).

Αντίστοιχα, για τον προσδιορισμό T κυτταρικών επιτόπων που αναγνωρίζονται από τα MHC μόρια τάξης I του ποντικού επιλέχθηκαν οι αλγόριθμοι NetMHC 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC-3.0/>) και SYFPEITHI (<http://www.syfpeithi.de>). Η συμπληρωματικότητα των T κυτταρικών επιτόπων ελέγχθηκε έναντι 6 υπερτύπων των MHC μορίων τάξης I του ποντικού (H2-K^d, H2-K^b, H2-L^d, H2-D^b, H2-D^d, H2-K^k).

Το όριο αποδοχής της συμπληρωματικότητας κάθε μορίου ιστοσυμβατότητας με κάθε T κυτταρικό επίτοπο (threshold), για τον αλγόριθμο SYFPEITHI, ορίζεται σύμφωνα με τις υποδείξεις των κατασκευαστών στο 20. Σχετικά με τους αλγόριθμους NetMHCII και NetMHC, επιλέχθηκαν οι επίτοποι, των οποίων η δύναμη σύνδεσης με τα μόρια ιστοσυμβατότητας ήταν < 50 nM και χαρακτηρίζονταν ως ισχυροί προσδέτες (SB, Strong Binder) ή < 500 nM και χαρακτηρίζονταν ως ασθενείς προσδέτες (WB, Weak Binder), αντίστοιχα.

3.2.15 Εκτίμηση της λεμφοβλαστικής ικανότητας των λεμφοκυττάρων.

Η μέθοδος βασίζεται στη μέτρηση και τον υπολογισμό της ικανότητας πολλαπλασιασμού των ειδικών T λεμφοκυττάρων του ποντικού μετά από διέγερσή τους με αντιγόνο. Στην παρούσα μελέτη, ελέγχθηκε η ανάπτυξη ειδικών λεμφοκυττάρων προερχόμενων από σπλήνες μολυσμένων με *L. major* - ποντικών τόσο έναντι του διαλυτού αντιγόνου του παρασίτου όσο και έναντι της ανασυνδυασμένης LieIF.

Πιο συγκεκριμένα, σπλήνες από BALB/c και C57BL/6 ποντίκια μολυσμένα με *L. major* (1 μήνα μετά τη μόλυνση), απομονώνονται με άσηπτη τεχνική και τα κύτταρα που προκύπτουν αραιώνονται σε πλήρες θρεπτικό υλικό (RPMI-1640 + 10% FBS). Το εναιώρημα φυγοκεντρείται στις 1300 rpm για 10 λεπτά στους 4 °C, σε φυγόκεντρο Beckmann. Ακολουθούν άλλες δύο εκπλύσεις στις ίδιες συνθήκες. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται λύση των ερυθροκυττάρων με διάλυμα ACK. Κατόπιν, η συγκέντρωση του κυτταρικού εναιωρήματος ρυθμίζεται στα 1×10^6 λευκά αιμοσφαίρια/ml και τοποθετείται (200 μl εναιωρήματος) σε πιάτα κυτταροκαλλιέργειας 96 θέσεων με κοίλα φρεάτια. Αμέσως μετά τοποθετείται το μιτογόνο κονκαβαλίνη A (ConA, 3 μg/ml), διαλυτό αντιγόνο του παρασίτου (SLA, 10 μg/ml) και της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης (10μg/ml). Η ConA επάγει τον μη ειδικό κλωνικό πολλαπλασιασμό τόσο των CD4 όσο και των CD8 κυττάρων. Κάθε δείγμα τοποθετείται σε τριπλή επανάληψη και η επώαση διαρκεί 78 ώρες και πραγματοποιείται σε κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 37 °C και συγκέντρωσης CO2 5%. Στη συνέχεια, σε κάθε φρεάτιο προστίθενται 20 μl τριτιωμένης θυμιδίνης (2 μCi/ml) και η επώαση συνεχίζεται για 18 ώρες, ακόμη. Η ενσωμάτωση της τριτιωμένης θυμιδίνης στο DNA προσδιορίζεται μετά από συλλογή σε διηθητικό φίλτρο επικαλυμμένο με πλέγμα από μικροσκοπικές ίνες υάλου, με τη χρήση κυτταροσυλλέκτη. Τα φίλτρα στεγνώνουν στους 60 °C για 1 ώρα και στη συνέχεια τοποθετούνται σε ειδικές μεμβράνες όπου διαποτίζονται με υγρό σπινθηρισμού. Η εκπεμπόμενη β-ακτινοβολία μετρείται σε ειδικό μετρητή και οι τιμές εκφράζονται ως κρούσεις ανά λεπτό (counts per minute ή cpm) ή ως δείκτης διέγερσης (stimulation index, SI) που υπολογίζεται σύμφωνα με τον εξής τύπο: $SI = M.O.cpm_{\text{δείγματος}} / cpm_{\text{αυθόρμητου πολλαπλασιασμού}}$.

3.2.16 *In vitro* επίδραση της ανασυνδυασμένης LieIF και των πρωτεϊνικών της τμημάτων στην ενδοκυττάρια ανάπτυξη του στελέχους *L. donovani*, στο κυτταρόπλασμα των J774A.1 κυττάρων.

Η επίδραση της LieIF και των κλωνοποιημένων της τμημάτων 1-226 και 196-403, στην ενδοκυττάρια ανάπτυξη του παρασίτου MON-2 στα J774A.1 κύτταρα, προσδιορίστηκε με την φασματομετρική μέθοδο του Alamar Blue όπου η αναγωγή του θρεπτικού υλικού και η ανάπτυξη χρώματος του συστατικού είναι ανάλογη με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, μέσω προσδιορισμού της φωταύγειας στα 570 nm χρησιμοποιώντας ως φίλτρο αναφοράς τα 630 nm [164].

Τα μακροφάγα αποκολλώνται μηχανικά από την φιάλη κυτταροκαλλιέργειας και εκπλένονται διαδοχικά τρεις φορές (1300 rpm, για 10 λεπτά) σε πλήρες θρεπτικό υλικό RPMI-1640. Ο συνολικός αριθμός των κυττάρων προσδιορίζεται με καταμέτρηση αυτών σε μικροσκόπιο με την βοήθεια πλάκας τύπου Malassez και η βιωσιμότητά τους προσδιορίζεται κατόπιν χρώσης αυτών με την χρωστική Trypan Blue. Η αποδεκτή βιωσιμότητα προσδιορίζεται στο 97%. Στη συνέχεια, το κυτταρικό εναίωρημα των μακροφάγων (2×10^5 κύτταρα/ml), μεταφέρεται σε πλάκες καλλιέργειας 24 φρεατίων και τοποθετείται για 2 ώρες σε επωαστικό κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 37 °C, ατμόσφαιρας 5% CO₂, προκειμένου να διατηρηθούν τα κύτταρα σε κατάσταση ηρεμίας και να προσκολληθούν στο επίστρωμα των πλακών καλλιέργειας.

3.2.16.α Επίδραση της ανασυνδυασμένης LieIF και των πρωτεϊνικών της τμημάτων με τα J774A.1 κύτταρα, πριν την έναρξη της μόλυνσης με *L. donovani* προμαστιγωτές μορφές (pre-treatment).

Τα προσκολλημένα μακροφάγα επιδρούν *in vitro* με καθεμία από τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες (συγκέντρωσης 10μg/ml) σε συνδυασμό με την εμπορικά διαθέσιμη ανασυνδυασμένη IFN-γ (συγκέντρωσης 1 ng/ml). Η διάρκεια της επώασης είναι 15 ώρες, σε κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 37 °C, ατμόσφαιρας 5% CO₂. Η ομάδα αρνητικού ελέγχου επωάζεται με θρεπτικό υλικό απαλλαγμένο από τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες. Στη συνέχεια, οι πρωτεΐνες απομακρύνονται και τα μακροφάγα εκτίθενται σε προμαστιγωτές μορφές *L. donovani* στατικής φάσης ανάπτυξης, με αναλογία μακροφάγων:παρασίτων 1:15. 4 ώρες μετά την μόλυνση,

απομακρύνονται οι προμαστιγωτές μορφές που δεν εισέρχονται στα μακροφάγα, με διαδοχικές πλύσεις των κυττάρων με ζεστό θρεπτικό υλικό RPMI-1640. Η επίδραση της προεπώασης των μακροφάγων με τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες στην εξέλιξη της μόλυνσης, προσδιορίζεται τόσο σε αρχικό στάδιο (4 ώρες μετά την μόλυνση) όσο και σε προχωρημένο στάδιο (72 ώρες μετά την μόλυνση), με την φασματοφωτομετρική μέθοδο Alamar Blue. Το θρεπτικό υλικό απομακρύνεται στα αντίστοιχα χρονικά σημεία και στην καλλιέργεια των κυττάρων προστίθενται 50 μ l PBS ενισχυμένου με 0,01% w/v SDS. Ακολουθεί επώαση διάρκειας 30 λεπτών στις ίδιες συνθήκες, κατά την οποία πραγματοποιείται λύση των μακροφάγων και απελευθέρωση των παρασίτων σε πλήρες θρεπτικό υλικό Schneider's Insect, για 24 ώρες. Στη συνέχεια, στην καλλιέργεια προστίθεται Alamar Blue (αραίωση 10% με πλήρες θρεπτικό υλικό Schneider's) και η καλλιέργεια επωάζεται για 18 ώρες ακόμη, στις ίδιες συνθήκες. Η παρασιτοκτόνος δράση της ανασυνδυασμένης LieIF και των πρωτεϊνικών της τμημάτων, αξιολογείται με τον συσχετισμό του αριθμού των μεταβολικά ενεργών παρασίτων. Η οπτική πυκνότητα των J774A.1 μακροφάγων, χρησιμοποιείται ως αρνητική ομάδα ελέγχου ενώ η αντίστοιχη οπτική πυκνότητα των μολυσμένων και λυμένων μακροφάγων χρησιμοποιείται ως θετική ομάδα ελέγχου.

3.2.16.β Επίδραση της ανασυνδυασμένης LieIF και των πρωτεϊνικών της τμημάτων με τα J774A.1 κύτταρα, μετά την έναρξη της μόλυνσης με *L. donovani* προμαστιγωτές μορφές (post-treatment).

Κατά αντιστοιχία με την § 3.2.16.α, τα προσκολλημένα μακροφάγα μολύνονται *in vitro* με προμαστιγωτές μορφές *L. donovani* στατικής φάσης ανάπτυξης, σε αναλογία μακροφάγων:παρασίτων, 1:15. 4 ώρες μετά την έκθεση των μακροφάγων στο παράσιτο, οι προμαστιγωτές μορφές του παρασίτου, που δεν εισέρχονται στα μακροφάγα, απομακρύνονται με διαδοχικές πλύσεις των κυττάρων με ζεστό θρεπτικό υλικό RPMI-1640. Στη συνέχεια, τα μακροφάγα επιδρούν *in vitro* με την ανασυνδυασμένη LieIF και τα πρωτεϊνικά της τμήματα (10 μ g/ml) σε συνδυασμό με την ανασυνδυασμένη IFN- γ (1 ng/ml). Η διάρκεια της επώασης είναι 15 ώρες, σε κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 37 °C, ατμόσφαιρας 5% CO₂. Η ομάδα αρνητικού ελέγχου επωάζεται με θρεπτικό υλικό απαλλαγμένο από τις LieIF/IFN- γ . Η επίδραση της επώασης των μακροφάγων με τις

LieIF/IFN- γ στην εξέλιξη της μόλυνσης, προσδιορίζεται τόσο σε αρχικό στάδιο (19 ώρες μετά την μόλυνση) όσο και σε προχωρημένο στάδιο (72 ώρες μετά την μόλυνση), με την φασματοφωτομετρική μέθοδο Alamar Blue όπως περιγράφεται στην § 3.1.3.2.

3.2.17 Ποσοτικός προσδιορισμός του παραγόμενου μονοξειδίου του αζώτου (NO), σε υπερκείμενα καλλιέργειών J774A.1 κυττάρων.

Η επαγόμενη από την επίδραση των LieIF/IFN- γ , σύνθεση του NO προσδιορίστηκε ως η συσσώρευση των νιτρωδών στα υπερκείμενα των καλλιέργειών των J774A.1 μακροφάγων, για τα αντίστοιχα επιθυμητά χρονικά σημεία, χρησιμοποιώντας την αντίδραση Griess, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή [165]. Συνοπτικά, τα J774A.1 κύτταρα, επωάζονται με τις LieIF/IFN- γ (10 μ g/ml και 1 ng/ml, αντίστοιχα), είτε πριν είτε μετά την έκθεσή τους στις προμαστιγωτές μορφές *L. donovani*. Τα J774A.1 κύτταρα της θετικής ομάδας ελέγχου, επωάζονται με LPS (1 μ g/ml) και IFN- γ (1 ng/ml). Στα καθορισμένα χρονικά σημεία μετά την μόλυνση (αρχική και προχωρημένη φάση), μέρος του υπερκείμενου (50 μ l) αναμιγνύεται με 100 μ l αντιδραστήριου Griess, και τοποθετείται σε φρεάτια πλάκας 96 θέσεων. Η οπτική πυκνότητα προσδιορίζεται στα 570 nm και οι σχετικές συγκεντρώσεις νιτρωδών προσδιορίζονται μέσω πρότυπης καμπύλης γνωστών συγκεντρώσεων NaNO₂.

3.2.18 Ποσοτικός προσδιορισμός παραγόμενων ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS), σε υπερκείμενα καλλιέργειών J774A.1 κυττάρων.

Η επαγόμενη από την επίδραση των LieIF/IFN- γ , κυτταροπλασματική παραγωγή των ROS, προσδιορίστηκε με την βοήθεια φθορίζοντων ανιχνευτών (carboxy-H₂DCFDA), μέσω FACS [166]. Συνοπτικά, τα J774A.1 κύτταρα επιδρούν με την ανασυνδυασμένη LieIF, ή τα ανασυνδυασμένα τμηματά της, σε συνδυασμό με την IFN- γ , τόσο πριν, όσο και μετά την μόλυνση των κυττάρων με προμαστιγωτές μορφές *L. donovani*. Για κάθε χρονικό σημείο (αρχική και προχωρημένη φάση της μόλυνσης), τα κύτταρα επωάζονται με H₂DCFDA (5 μ M) για 30 λεπτά της ώρας, σε επωαστικό κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 37 °C, ατμόσφαιρας 5% CO₂. Μακροφάγα που έχουν επωαστεί για 15 λεπτά της ώρας στις ίδιες συνθήκες θερμοκρασίας, με 1 mM υπεροξειδίου του υδρογόνου

(H₂O₂) χρησιμοποιούνται ως θετική ομάδα ελέγχου. Εναλλακτικά, μακροφάγα που αλληλεπιδράσαν με 1 μg/ml LPS, χρησιμοποιούνται επίσης ως θετική ομάδα ελέγχου ενώ τα κύτταρα που δεν επωάζονται με τον H₂DCFDA ανιχνευτή, χρησιμοποιούνται ως αρνητικοί μάρτυρες φθορισμού. Τα κύτταρα αναλύθηκαν με FACS Calibur χρησιμοποιώντας το λογισμικό CellQuest (BD, CA) και τα αποτελέσματα εκφράζονται ως γεωμετρικός μέσος έντασης φθορισμού (Geometrical Mean Fluorescent Index).

3.2.19 Προσδιορισμός των επιπέδων κυτταροκινών στα υπερκείμενα καλλιέργειών J774A.1 μακροφάγων, με ανοσοενζυμική δοκιμασία ELISA.

Ο προσδιορισμός των επιπέδων των παραγόμενων κυτταροκινών στα υπερκείμενα καλλιέργειών J774A.1 μακροφάγων, πραγματοποιήθηκε με την ανοσοενζυμική δοκιμασία ELISA (sandwich ELISA). Χρησιμοποιήθηκαν εμπορικά διαθέσιμες τυποποιημένες συσκευασίες και ακολουθήθηκαν οι οδηγίες του κατασκευαστή. Ακολουθεί περιγραφή της πειραματικής διαδικασίας, εν συντομία.

Τα φρεάτια της πλάκας μικροτιτλοποίησης, επιστρώνονται με το πρώτο επισημασμένο αντίσωμα (capture antibody), κατάλληλης συγκέντρωσης (0,25 μg/ml για το αντι-MIP-1α αντίσωμα και 1 μg/ml για το αντι-TNF-α αντίσωμα), σε 100 μl ρυθμιστικού διαλύματος PBS και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 18 ώρες. Στη συνέχεια το περιεχόμενο της πλάκας απορρίπτεται και ακολουθούν τέσσερις εκπλύσεις με PBS/Tween υπό πίεση. Ακολουθώς, σε κάθε φρεάτιο προστίθενται 300 μl PBS/BSA και ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου, διάρκειας 1 ώρας, με σκοπό την κάλυψη των μη ειδικών θέσεων. Στη συνέχεια, το περιεχόμενο απορρίπτεται και η πλάκα πλένεται τέσσερις φορές με PBS/Tween υπό πίεση. Προστίθενται 100 μl διαδοχικών αραιώσεων του πρότυπου διαλύματος και των υπό εξέταση δειγμάτων (σε αραιώση 1:2). Η πρότυπη καμπύλη της MIP-1α πρωτεΐνης, ξεκινά από συγκέντρωση 0,5 ng/ml και καταλήγει σε συγκέντρωση 0 ng/ml, ενώ η αντίστοιχη πρότυπη καμπύλη του TNF-α βρίσκεται μεταξύ των συγκεντρώσεων 2 ng/ml και 0 ng/ml. Η πλάκα επωάζεται για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια, το περιεχόμενό της απορρίπτεται και η πλάκα εκπλένεται τέσσερις φορές με PBS/Tween υπό πίεση. Ακολουθεί προσθήκη του δεύτερου επισημασμένου αντισώματος (detection antibody) σε 100 μl διαλύματος αραιώσης (αντι-MIP-1α συγκέντρωσης 0,5 μg/ml και αντι-TNF-α συγκέντρωσης 0,25

μg/ml) και η πλάκα επωάζεται για 2 ώρες, σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί απόρριψη του περιεχομένου και τετραπλή έκπλυση με PBS/Tween. Σε κάθε φρεάτιο τοποθετούνται 100 μl αβιδίνης συζευγμένης με HRP υπεροξειδάση (1:2000), σε διάλυμα αραίωσης. Η πλάκα επωάζεται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα πλένεται τέσσερις φορές με PBS/Tween. Σε κάθε φρεάτιο, προστίθενται 100 μl διαλύματος υποστρώματος και ακολουθεί επώαση, σε θερμοκρασία δωματίου, μέχρι την εμφάνιση χρώματος. Η τιμή της οπτικής πυκνότητας προσδιορίζεται στα 405 nm.

3.2.20 Επίδραση του επαγόμενου TNF-α στην παραγωγή ROS, στο σύστημα των J774A.1 μακροφάγων.

Η συσχέτιση της παραγωγής TNF-α με την δημιουργία ενεργών ριζών οξυγόνου στα *L. donovani* - μολυσμένα J774A.1 κύτταρα, πραγματοποιήθηκε με FACS. Πιο συγκεκριμένα, τα μακροφάγα επωάζονται με τις LieIF/IFN-γ (§ 3.2.16) καθώς και με τον συνδυασμό των παραπάνω ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με το ειδικό μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του TNF-α ποντικού, συγκέντρωσης 4 mg/ml. Στα χρονικά διαστήματα που περιγράφονται στις παραγράφους 3.2.16.α και 3.2.16.β τα κύτταρα συλλέγονται και ακολουθεί προσδιορισμός των ROS (§ 3.2.18).

3.2.21 Διερεύνηση της πιθανής συνεργιστικής δράσης της ανασυνδυασμένης LieIF με τους υποδοχείς τύπου Toll.

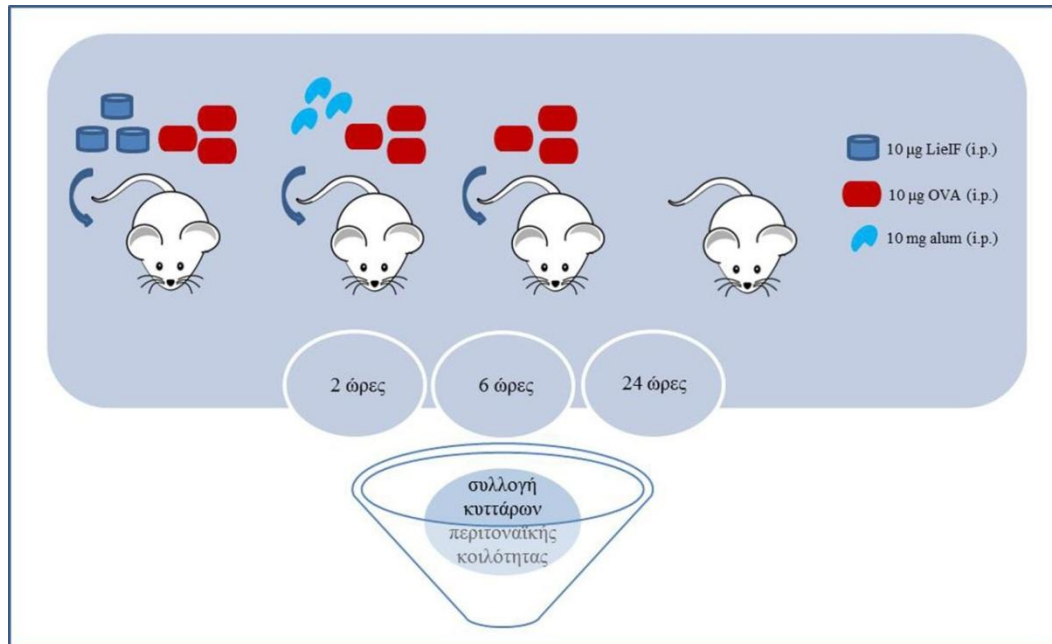
Μυελοειδή δενδρικά κύτταρα που προκύπτουν σύμφωνα με την μέθοδο που περιγράφεται στην § 3.2.7, επωάζονται ταυτόχρονα με την ανασυνδυασμένη LieIF (10μg/ml) και τους προσδέτες των TLR3 (poly(I:C, 10μg/ml), TLR4 (LPS, 1μg/ml) και TLR9 (CpG, 10μg/ml). Η επώαση διαρκεί 24 ώρες και πραγματοποιείται σε κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 37 °C και ατμόσφαιρας CO₂ 5%. Κατόπιν, τα κύτταρα συλλέγονται και σημαίνονται με ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα για τον έλεγχο της έκφρασης των συνδιεγερτικών μορίων CD80 και CD86, όπως περιγράφεται στην § 3.2.9.

3.2.22 Αξιολόγηση της δράσης της ανασυνδυασμένης LieIF ως ανοσοενισχυτικό, σε *in vivo* πειραματικό μοντέλο ποντικού.

Τα ανοσοενισχυτικά ενισχύουν την επαγόμενη του εμβολιασμού ανοσολογική απόκριση. Η χρήση τους ως συστατικά εμβολίων, συναντάται εδώ και σχεδόν ογδόντα χρόνια. Στην παρούσα ερευνητική εργασία, διερευνήθηκε η πιθανή δράση της ανασυνδυασμένης LieIF ως ανοσοενισχυτικό, σε πειραματικό μοντέλο ποντικού. Μελετήθηκε η επαγωγή φλεγμονώδους απόκρισης από την ανασυνδυασμένη LieIF στο σημείο χορήγησής της καθώς και ο πιθανός μηχανισμός δράσης της.

Σε θηλυκά ποντίκια της αιμομικτικής φυλής BALB/c ($n=5$), ηλικίας 6 - 8 εβδομάδων, χορηγούνται ενδοπεριτοναϊκά 500 μ l της ανασυνδυασμένης LieIF (10 μ g/ποντίκι) σε συνδυασμό με το αντιγόνο OVA (10 μ g/ποντίκι) σε αποστειρωμένο διάλυμα PBS. Η θετική ομάδα ελέγχου αποτελείται από πειραματόζωα στα οποία χορηγούνται 500 μ l διαλύματος PBS που περιέχει OVA (10 μ g/ποντίκι) και το ανοσοενισχυτικό alum (10 mg/ποντίκι) [167]. Η αρνητική ομάδα ελέγχου αποτελείται από ποντίκια στα οποία χορηγείται OVA. Επιπλέον, υπάρχει η αρνητική ομάδα ελέγχου στην οποία ενίεται ίσος όγκος διαλύματος PBS (Εικ. 3.1). Στις 2, 6 και 24 ώρες μετά την έγχυση, πραγματοποιείται θανάτωση των ζώων με αυχενική παρεκτόπιση και έκπλυση της περιτοναϊκής κοιλότητας με 5 ml ψυχρού διαλύματος PBS. Το κυτταρικό εναιώρημα φυγοκεντρείται στις 1300 rpm για 10 λεπτά, στους 4 °C. Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται στον ίδιο αρχικό όγκο σε διάλυμα ACK και η διαδικασία επαναλαμβάνεται.

Ακολούθως, γίνεται καταμέτρηση των κυττάρων με χρώση διαλύματος Trypan Blue σε οπτικό μικροσκόπιο Olympus. Μέρος των κυττάρων χρησιμοποιείται για ταυτοποίηση και προσδιορισμό του ποσοστού των ουδετερόφιλων ($Ly6G^+-CD11b^+$), μακροφάγων ($F4/80^+-CD11b^+$) και μονοκυττάρων ($Ly6C^+-CD11b^+$) στην περιτοναϊκή κοιλότητα, μέσω κυτταρομετρίας ροής (§ 3.2.11). Επιπλέον, στα χρονικά σημεία των 6 και 24 ωρών, προσδιορίζεται η συγκέντρωση ουρικού οξέως στον ορό του αίματος πειραματόζώων με βιοχημικό αναλυτή Cobas Mira. Τέλος, πραγματοποιείται προσδιορισμός της σχετικής έκφρασης των μεταγραφικών στοιχείων της ιντερλευκίνης 1 β (IL-1 β) και του p52 πυρηνικού μεταγραφικού παράγοντα (NF-k β 2), όπως αναλύεται στην § 3.2.13.



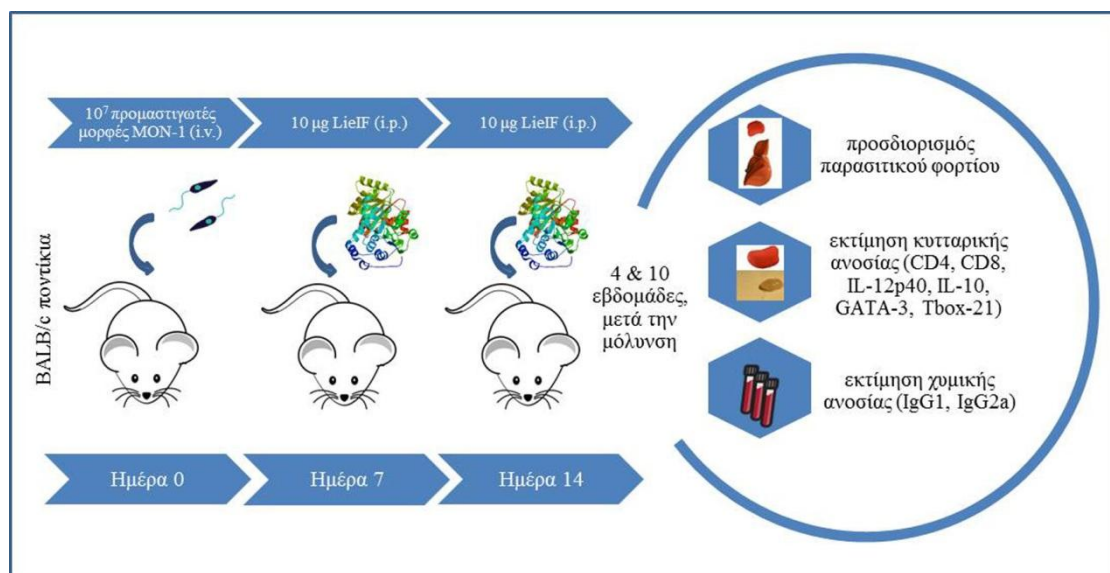
Εικόνα 3.1. Σχηματική αναπαράσταση πειραματικού πρωτοκόλλου για την αξιολόγηση της δράσης της ανασυνδυασμένης LieIF ως ανοσοενισχυτικό, σε *in vivo* πειραματικό μοντέλο ποντικού.

3.2.23 Εφαρμογή της ανασυνδυασμένης LieIF σε πειραματικά πρωτόκολλα ανοσοθεραπείας έναντι της σπλαγχνικής λεισμανίασης.

Η ανοσοθεραπεία της λεισμανίασης εφαρμόζεται για περισσότερο από εκατό χρόνια. Παρόλα αυτά, δεν υπάρχει εγκεκριμένο θεραπευτικό εμβόλιο έναντι της νόσου. Τα τελευταία χρόνια, η χρήση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών του παρασίτου ικανών να ρυθμίζουν την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή, εφαρμόζεται ιδιαίτερα σε πειραματικά πρωτόκολλα ανοσοθεραπείας.

Το πειραματικό πρωτόκολλο που αφορά στην εφαρμογή της LieIF σε πρωτόκολλο ανοσοθεραπείας έναντι της λεισμανίασης, περιγράφεται παρακάτω. Θηλυκά ποντίκια της αιμομικτικής φυλής BALB/c, ηλικίας 6 - 8 εβδομάδων, μολύνονται με ενδοφλέβια χορήγηση (i.v., intravenously) 10^7 προμαστιγωτών μορφών *L. infantum* (MON-1) στατικής φάσης ανάπτυξης. Για τον σκοπό αυτό, οι ουραίες φλέβες των πειραματοζώων, θερμαίνονται υπό λαμπτήρα φωτισμού ισχύος 100 W και οι μολύνσεις πραγματοποιούνται με σύριγγες ινσουλίνες εφοδιασμένες με βελόνες διαμέτρου 30GA1/2. Μία εβδομάδα μετά την μόλυνση, ξεκινά η εφαρμογή του εμβολιαστικού σχήματος το οποίο περιλαμβάνει χορήγηση της ανασυνδυασμένης LieIF (10

μg/πειραματόζωο). Το χρονοδιάγραμμα των ανοσοποιήσεων περιλαμβάνει συνολικά δύο ανοσοποιήσεις μέσω της περιτοναϊκής οδού (i.p., intraperitoneal) ανά 7 ημέρες (Εικ. 3.2). Η θετική ομάδα ελέγχου αποτελείται από μολυσμένα με *L. infantum* πειραματόζωα ενώ η αρνητική ομάδα ελέγχου, αποτελείται από υγιή ζώα.



Εικόνα 3.2. Σχηματική αναπαράσταση πειραματικού πρωτοκόλλου για την εφαρμογή της ανασυνδυασμένης Lief σε πειραματικά πρωτόκολλα ανοσοθεραπείας έναντι της σπλαγχνικής λείσμανιάσης.

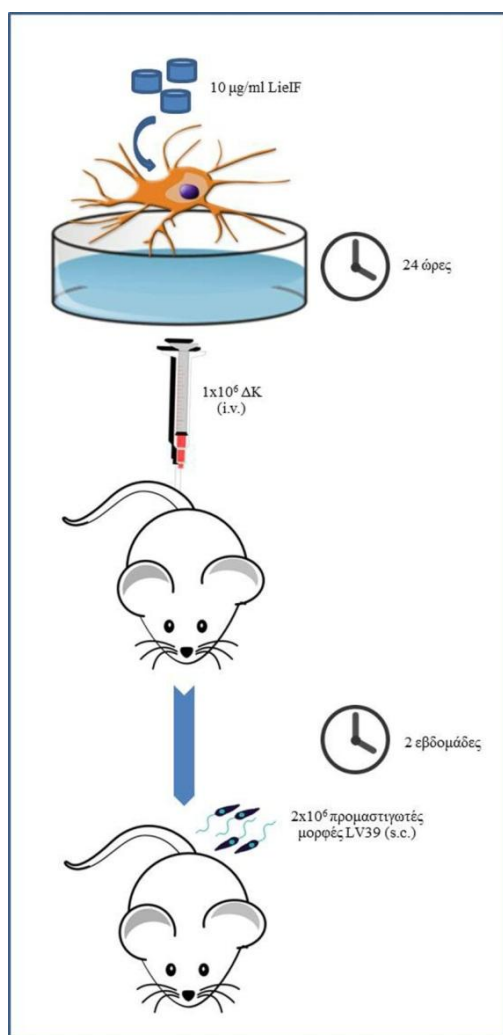
Μετά την πάροδο τεσσάρων και δέκα εβδομάδων μετά την μόλυνση των πειραματόζωων, πραγματοποιείται αιμοληψία και λήψη οργάνων προκειμένου να εκτιμηθεί το παρασιτικό φορτίο και η κυτταρική και χυμική ανοσία. Η αιμοληψία πραγματοποιείται με τρώση του οπισθοβολβικού φλεβικού πλέγματος με γυάλινο τριχοειδές. Κατόπιν, το αίμα αφήνεται να πήξει σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα και το πύγμα φυγοκεντρείται στις 3500 rpm για 5 λεπτά, προκειμένου να ληφθεί ο ορός. Ακολουθεί μέτρηση των ειδικών για το παράσιτο αντισωμάτων IgG1 και IgG2a ισοτύπων, όπως περιγράφεται αναλυτικά στην § 3.2.6. Ο προσδιορισμός του παρασιτικού φορτίου στο ήπαρ και στον σπλήνα, πραγματοποιείται με την μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων (§ 3.2.5). Η εκτίμηση της ανάπτυξης αντιδράσεων κυτταρικής ανοσίας, επιτυγχάνεται με τον προσδιορισμό του ποσοστού των CD4⁺ και CD8⁺ κυττάρων στον σπλήνα και στο ήπαρ των ζώων, και για τα δύο χρονικά διαστήματα. Η μέτρηση του ποσοστού των CD4⁺ και CD8⁺ κυττάρων πραγματοποιείται με κυτταρομετρία ροής. Επιπλέον, ανιχνεύεται η ενδοκυττάρια IL-12p40/p70 κυτταροκίνη σπληνοκυττάρων και κυττάρων λεμφαδένων, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Το πρωτόκολλο της ενδοκυττάριας

ανίχνευσης κυτταροκινών μέσω FACS αναλύεται στην § 3.2.10. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της έκφρασης γονιδίων ανοσολογικών παραγόντων στον σπλήνα και στους λεμφαδένες, με σχετική ποσοτικοποίηση με PCR πραγματικού χρόνου (§ 3.2.13). Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται είναι ειδικά σχεδιασμένοι εκκινητές «QuantiTect Primer Assays» και τα μεταγραφικά στοιχεία που ελέγχονται είναι τα ακόλουθα: της ιντερλευκίνης 10 (IL-10), του μονομερούς p40 της ιντερλευκίνης 12 (IL-12b), του μεταγραφικού παράγοντα Tbox-21, του μεταγραφικού παράγοντα GATA-3, και της δεϋδρογονάσης της γλυκεραλδεϋδης της 3-φωσφατάσης (GAPDH). Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό RT2 Profiler PCR Array Data Analysis v. 3.5. (SAbiosciences - Qiagen Hilden, Germany).

3.2.24 Εφαρμογή της ανασυνδυασμένης LieIF σε πειραματικά πρωτόκολλα προφυλακτικού εμβολιασμού έναντι της δερματικής λεϊσμανίασης.

Τα ευαισθητοποιημένα, με καθορισμένα αντιγόνα του παρασίτου, δενδριτικά κύτταρα μπορούν να αποτελέσουν πολύτιμο εργαλείο ανοσολογικής παρέμβασης για την επαγωγή προστασίας έναντι της λεϊσμανίασης [168]. Στην παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκε ανοσιακή μεταφορά ΔΚ προεπωασμένων με την ανασυνδυασμένη LieIF. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται στη συνέχεια.

Διαφοροποιημένα μυελοειδή δενδριτικά κύτταρα (συγκέντρωσης 1×10^6 κύτταρα/ml) τοποθετούνται σε πλάκες κυτταροκαλλιέργειας 24 θέσεων, και επωάζονται με την ανασυνδυασμένη LieIF (συγκέντρωσης 10 $\mu\text{g/ml}$). Η επώαση διαρκεί 24 ώρες, σε συνθήκες θερμοκρασίας 37 °C και ατμόσφαιρας 5% CO₂ (Εικ. 3.3). Στη συνέχεια, τα κύτταρα συλλέγονται και φυγοκεντρώνονται στις 1300 rpm για 10 λεπτά. Ακολουθεί έκπλυση των κυττάρων σε πλήρες θρεπτικό υλικό RPMI-1640 και επαναιώρηση σε αποστειρωμένο διάλυμα PBS (1×10^6 κύτταρα σε 100 μl PBS). Θηλυκά ποντίκια της αιμομικτικής φυλής BALB/c, ηλικίας 6-8 εβδομάδων, εμβολιάζονται ενδοφλέβια με 1×10^6 δενδριτικά κύτταρα που έχουν προεπωαστεί με την ανασυνδυασμένη LieIF. Η αρνητική ομάδα ελέγχου αποτελείται από ποντίκια που ανοσοποιήθηκαν με ΔΚ που καλλιεργήθηκαν μόνο με την επίδραση του θρεπτικού υλικού.



Εικόνα 3.3. Σχηματική αναπαράσταση πειραματικού πρωτοκόλλου για την εφαρμογή της ανασυνδυασμένης LieIF σε πειραματικά πρωτόκολλα προφυλακτικού εμβολιασμού έναντι της δερματικής λείσμανιάσης.

Με την πάροδο 2 εβδομάδων από τον εμβολιασμό, τα πειραματόζωα μολύνονται με 2×10^6 προμαστιγωτές μορφές *L. major* στατικής φάσης ανάπτυξης. Τα παράσιτα χορηγούνται υποδόρια (s.c., subcutaneous) στο πέλμα των πειραματοζώων σε PBS σε τελικό όγκο 25 µl. Η πορεία της μόλυνσης ελέγχεται ανά εβδομάδα με μέτρηση του πάχους του άκρου ποδός με dial gauge παχύμετρο. Επιπλέον, 5 εβδομάδες μετά την μόλυνση, πραγματοποιείται αιμοληψία και προσδιορισμός των ειδικών για το παράσιτο αντισωμάτων IgG1 και IgG2a (§ 3.2.6).

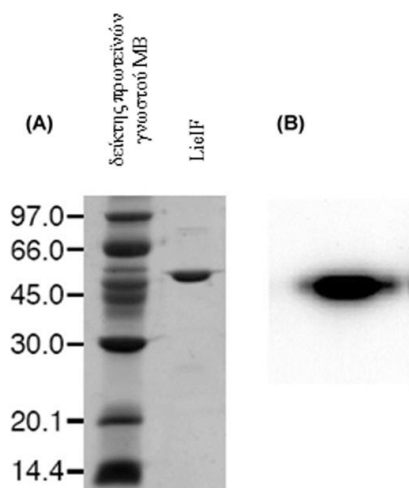
3.2.25 Στατιστική επεξεργασία.

Οι *in vitro* πειραματικές διαδικασίες επαναλαμβάνονται τουλάχιστον τρεις φορές, και κάθε δείγμα τοποθετείται εις τριπλούν σε κάθε πειραματική διαδικασία. Στις *in vivo* πειραματικές διαδικασίες, χρησιμοποιούνται ομάδες των 5 πειραματοζώων και τα πειράματα επαναλαμβάνονται τρεις φορές. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσες τιμές $\pm$ τυπική απόκλιση (standard deviation). Η στατιστική σημαντικότητα των διαφορών μεταξύ των μέσων τιμών εκτιμήθηκε με τη δοκιμασία Mann-Whitney (U-test) και η πιθανότητα $p < 0,05$, θεωρήθηκε ως ενδεικτική στατιστικής σημαντικότητας.

4. Αποτελέσματα

4.1 Κλωνοποίηση, έκφραση και ταυτοποίηση της *L. infantum* eIF (LieIF).

Η ανασυνδυασμένη LieIF παράχθηκε σε σύστημα έκφρασης *E.coli* (στέλεχος Origami). Ο καθαρισμός της πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου Ni και η ταυτοποίησή της έγινε με ενζυμική δοκιμή (Western blot) με την χρήση ειδικών έναντι της LieIF πολυκλωνικών αντισωμάτων που δημιουργήθηκαν σε κουνέλι (Εικ. 4.1) [169].



Εικόνα 4.1. Έκφραση και καθαρισμός της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης LieIF. (Α) Αντιπροσωπευτική εικόνα του προϊόντος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για την LieIF. Ο δείκτης πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (kDa) αναγράφεται στα αριστερά. (Β) Η ταυτοποίηση της πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε με την χρήση ειδικών πολυκλωνικών αντισωμάτων έναντι της LieIF, που δημιουργήθηκαν σε κουνέλι (αραίωση 1/1000).

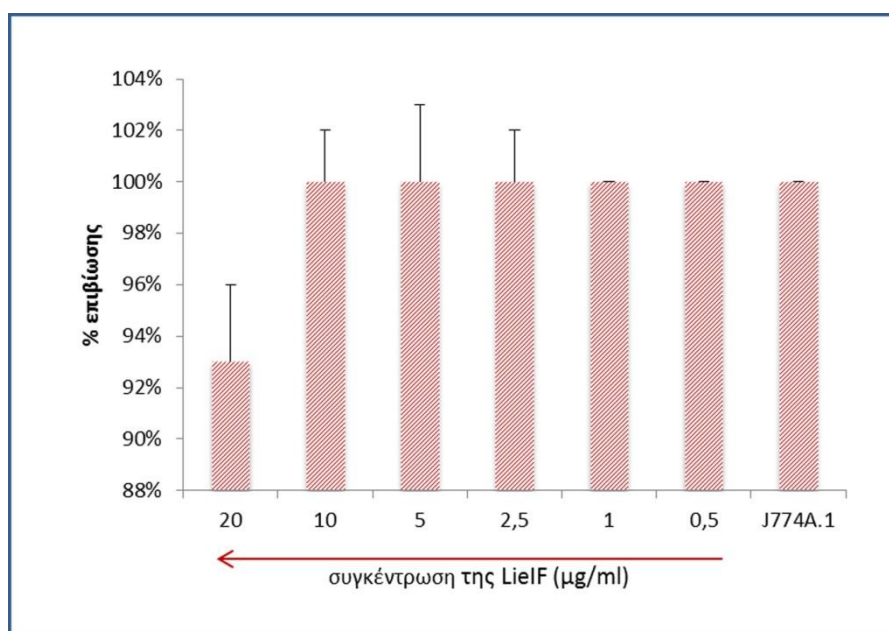
Η ανασυνδυασμένη LieIF χαρακτηρίστηκε ως ελεύθερη δράσης υπολειπόμενης ενδοτοξίνης, καθώς η συγκέντρωση του LPS βρέθηκε μικρότερη των 5 EU/mg, όπως προσδιορίστηκε από την δοκιμασία LAL (LAL test limulus amebocyte lysate test).

4.2 Επίδραση της ανασυνδυασμένης LieIF στην κυτταρική βιωσιμότητα.

Ο έλεγχος της επίδρασης της ανασυνδυασμένης LieIF, στην κυτταρική βιωσιμότητα, πραγματοποιήθηκε στην μακροφαγική κυτταρική σειρά J774A.1 (αθανατοποιημένη κυτταρική σειρά, προερχόμενη από ενήλικα ποντίκια της αιμομικτικής φυλής BALB/cN), με την χρήση του οξειδοαναγωγικού δείκτη Alamar Blue, ο οποίος αποδίδει χρωματομετρική αλλαγή και σήμα φθορισμού ως απόκριση σε μεταβολική δραστηριότητα. Με την δοκιμή αυτή, πραγματοποιείται ευρέως η ποσοτική εκτίμηση της βιωσιμότητας ή/και του πολλαπλασιασμού κυττάρων θηλαστικών και μικροοργανισμών.

Η επίδραση της πρωτεΐνης ελέγχθηκε μετά από *in vitro* επώαση των μακροφάγων με διαφορετικές συγκεντρώσεις της LieIF (20, 10, 5, 2,5, 1 και 0,5 µg/ml) και παρατηρήθηκε πως η επίδραση της πρωτεΐνης, στο παραπάνω εύρος συγκεντρώσεων, δεν

επέφερε αλλαγή στην επιβίωση και στον ρυθμό ανάπτυξης των μακροφάγων συγκριτικά με την καλλιέργεια αναφοράς των J774A.1 κυττάρων (Εικ. 4.2).



Εικόνα 4.2. Επίδραση της ανασυνδυασμένης LielF στην κυτταρική βιωσιμότητα των J774A.1 κυττάρων. J774A.1 μακροφάγα επωάστηκαν *in vitro* με διαφορετικές συγκεντρώσεις της ανασυνδυασμένης LielF (20, 10, 5, 2,5, 1 και 0,5 µg/ml, για 24 ώρες, σε κλίβανο θερμοκρασίας 37 °C, ατμόσφαιρας 5% CO₂). Ο προσδιορισμός της κυτταρικής επιβίωσης πραγματοποιήθηκε με την φασματοφωτομετρική μέθοδο Alamar Blue.

4.3 *In vitro* αξιολόγηση της αντιλειτουργικής δράσης της LielF.

4.3.1 Επίδραση της ανασυνδυασμένης LielF στην ενδοκυτταρική ανάπτυξη του στελέχους *L. donovani*, σε πειραματικό μοντέλο J774A.1 μολυσμένων μακροφάγων.

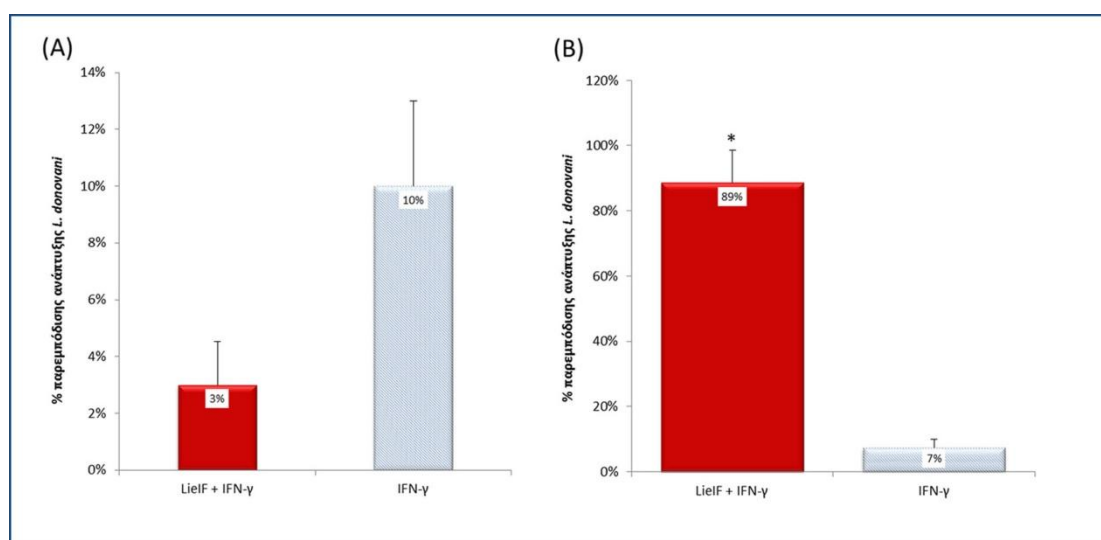
4.3.1.1 Επίδραση της ανασυνδυασμένης LielF, πριν την έναρξη της μόλυνσης με *L. donovani* προμαστιγωτές μορφές στατικής φάσης ανάπτυξης (*pre-treatment*).

Μελέτες έχουν δείξει ότι η *in vitro* επίδραση της LielF σε ενεργοποιημένα με IFN-γ μακροφάγα και μονοκύτταρα περιφερικού αίματος, επάγει την παραγωγή της IL-12 κυτταροκίνης, απαραίτητης για την ανάπτυξη προστατευτικής Th1 απόκρισης [77].

Στην παρούσα μελέτη, διερευνήθηκε η επίδραση της ανασυνδυασμένης LielF στην ανάπτυξη προστασίας των J774A.1 μακροφάγων έναντι του παρασίτου *L. donovani* (ζυμόδεμα MON-2, στέλεχος MHOM/IN/1996/THAK35). Τα J774A.1 μακροφάγα

επώαστηκαν ταυτόχρονα με τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες LieIF (10 µg/ml) και IFN-γ (1 ng/ml) (LieIF/IFN-γ). Η διάρκεια της επώασης ήταν 15 ώρες. Στη συνέχεια, τα κύτταρα μολύνθηκαν με προμαστιγωτές μορφές *L. donovani* στατικής φάσης ανάπτυξης, σε αναλογία 1:15, για 4 ώρες. Ο προσδιορισμός της χρονικής διάρκειας της μόλυνσης (4 ώρες), προέκυψε μετά από μελέτη κινητικής της χρονικής διάρκειας της έκθεσης των J774A.1 μακροφάγων σε *L. donovani* προμαστιγωτές μορφές (τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται). Η επίδραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών LieIF/IFN-γ στην ενδοκυτταρική ανάπτυξη του παρασίτου, προσδιορίστηκε σε δύο χρονικά σημεία, στην αρχική φάση που αντιστοιχεί στις 4 ώρες μετά την έναρξη της μόλυνσης, και στην προχωρημένη φάση που αντιστοιχεί στις 72 ώρες μετά την μόλυνση.

Η επίδραση των LieIF/IFN-γ στα J774A.1 μακροφάγα προσδιορίστηκε με την φασματοφωτομετρική μέθοδο Alamar Blue, όπου ο αριθμός των μεταβολικά ενεργών ενδοκυττάρων παρασίτων σχετίζεται με την απορρόφηση του αντιδραστηρίου.

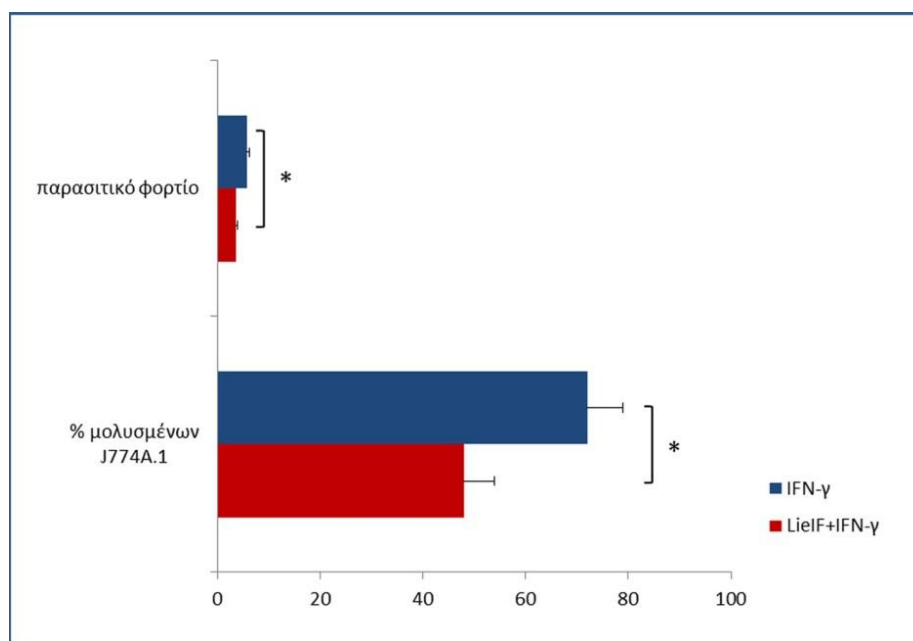


Εικόνα 4.3. Επίδραση της LieIF πριν την έναρξη της μόλυνσης με προμαστιγωτές μορφές *L. donovani* (pre-treatment), στην ενδοκυτταρική ανάπτυξη του παρασίτου. J774A.1 μακροφάγα επώαστηκαν ταυτόχρονα με τις ανασυνδυασμένες LieIF (10 µg/ml) και IFN-γ (1 ng/ml), πριν την έκθεση σε προμαστιγωτές μορφές *L. donovani*. Ο προσδιορισμός της παρεμπόδισης της ενδοκυτταρικής ανάπτυξης του παρασίτου πραγματοποιήθηκε στην αρχική φάση της μόλυνσης (A) και στην προχωρημένη φάση (B), με την χρωματομετρική μέθοδο Alamar Blue. Η οπτική πυκνότητα μετρήθηκε στα 570/630nm.

Στην αρχική φάση της μόλυνσης (4 ώρες έκθεσης στο παράσιτο), τα μακροφάγα που διεγέρθηκαν ταυτόχρονα με τις LieIF/IFN-γ, παρουσίασαν χαμηλό ποσοστό παρεμπόδισης της ενδοκυτταρικής ανάπτυξης του παρασίτου (3%) (Εικ. 4.3A).

Αντιθέτως, στην προχωρημένη φάση της μόλυνσης, η επίδραση των LieIF/IFN- γ οδήγησε σε σημαντική παρεμπόδιση της ανάπτυξης του παρασίτου (89%) συγκριτικά με την αντίστοιχη παρεμπόδιση που προκάλεσε η μονήρης διέγερση με την IFN- γ (7%) (Εικ. 4.3B). Αξίζει να σημειωθεί ότι J774A.1 κύτταρα που αλληλεπίδρασαν μόνο με την ανασυνδυασμένη LieIF, δεν παρουσίασαν παρεμπόδιση της ανάπτυξης του παρασίτου, σε κανένα χρονικό σημείο (τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται).

Ταυτόχρονα, σε παράλληλα πειράματα, η ικανότητα των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών LieIF/IFN- γ , να παρεμποδίζουν την επιβίωση ή/και τον πολλαπλασιασμό των ενδοκυττάρων παρασίτων, ελέγχθηκε σε οπτικό μικροσκόπιο όπου προσδιορίστηκε το ποσοστό των μολυσμένων μακροφάγων καθώς και το παρασιτικό φορτίο (αριθμός ενδοκυττάρων παρασίτων / κύτταρο), στην προχωρημένη φάση της μόλυνσης. Τα J774A.1 μακροφάγα που επώαστηκαν με τις LieIF/IFN- γ παρουσίασαν σημαντικά χαμηλότερο ποσοστό μολυσμένων κυττάρων ($p < 0,05$) (Εικ. 4.4) καθώς και παρασιτικό φορτίο συγκριτικά με τα κύτταρα που επώαστηκαν μόνο με την IFN- γ , 48% έναντι 72% και 3,48 έναντι 5,62, αντίστοιχα (Εικ. 4.4).



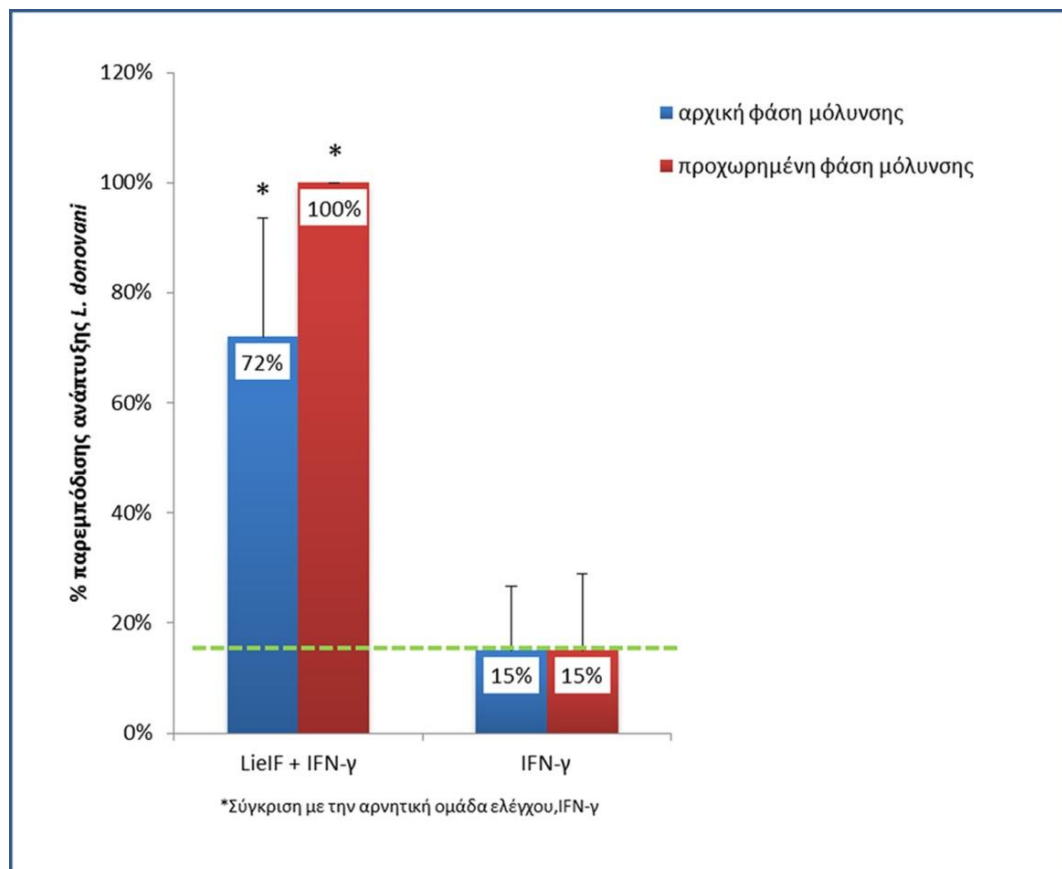
Εικόνα 4.4. Επίδραση της LieIF πριν την έναρξη της μόλυνσης με προμαστιγωτές μορφές *L. donovani* (pre-treatment), στην ενδοκυτταρική ανάπτυξη του παρασίτου. J774A.1 μακροφάγα επώαστηκαν ταυτόχρονα με τις ανασυνδυασμένες LieIF (10 $\mu\text{g/ml}$) και IFN- γ (1 ng/ml), πριν την έκθεση σε προμαστιγωτές μορφές *L. donovani*. Ο προσδιορισμός του ποσοστού των μολυσμένων κυττάρων και του παρασιτικού φορτίου πραγματοποιήθηκε στην προχωρημένη φάση, που αντιστοιχεί στις 72 ώρες μετά την μόλυνση. Για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων, πραγματοποιήθηκε χρώση των κυττάρων με χρωστική Giemsa και παρατήρηση 200 κυττάρων στο οπτικό μικροσκόπιο.

Τα παραπάνω αποτελέσματα καταδεικνύουν πως η ταυτόχρονη διέγερση των J774A.1 μακροφάγων με την LieIF σε συνδυασμό με την IFN- γ , προάγει την ανάπτυξη αμυντικών μηχανισμών προστασίας των κυττάρων έναντι της εξελισσόμενης μόλυνσης με *L. donovani* παράσιτα. Η παρεμπόδιση της ενδοκυτταρικής ανάπτυξης του παρασίτου με την συνδυαστική δράση των LieIF/IFN- γ είναι εμφανώς έκδηλη στην προχωρημένη φάση της μόλυνσης και αποδεικνύει ότι η ικανότητα αυτή της LieIF εξαρτάται από την συνέργεια της IFN- γ .

4.3.1.2 Επίδραση της ανασυνδυασμένης LieIF, μετά την έναρξη της μόλυνσης με *L. donovani* προμαστιγωτές μορφές στατικής φάσης ανάπτυξης (post-treatment).

Η ανάπτυξη προστασίας των J774A.1 μακροφάγων έναντι της μόλυνσης με παράσιτα *L. donovani*, που οφείλεται στην ταυτόχρονη επίδραση των LieIF/IFN- γ πριν την έναρξη της μόλυνσης, οδήγησε το ερευνητικό ενδιαφέρον στην διερεύνηση της αποτελεσματικότητας της χορήγησης των πρωτεϊνών στο *in vitro* σύστημα της καλλιέργειας των μακροφάγων, μετά την μόλυνση. Αυτή η προσέγγιση θα μπορούσε να ληφθεί ως ένα πρότυπο *in vitro* σύστημα ανοσοθεραπείας, πριν σχεδιαστούν και εφαρμοστούν *in vivo* συστήματα.

J774A.1 μακροφάγα μολύνθηκαν με προμαστιγωτές μορφές *L. donovani* στατικής φάσης ανάπτυξης, σε αναλογία 1:15, για 4 ώρες. Στη συνέχεια, τα παράσιτα που δεν εισήλθαν στο κυτταρόπλασμα των μακροφάγων, απομακρύνθηκαν και τα κύτταρα επώαστηκαν με τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες LieIF/IFN- γ , για το χρονικό διάστημα των 15 ωρών. Ακολούθησε απομάκρυνση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών και προσθήκη φρέσκου θρεπτικού υλικού στα φρεάτια καλλιέργειας των κυττάρων. Η επίδραση των LieIF/IFN- γ στην ενδοκυτταρική ανάπτυξη του παρασίτου, προσδιορίστηκε σε δύο χρονικά σημεία, στην αρχική φάση που αντιστοιχεί στις 19 ώρες μετά την έναρξη της μόλυνσης, και στην προχωρημένη φάση που αντιστοιχεί στις 72 ώρες μετά την μόλυνση, με την φασματοφωτομετρική μέθοδο Alamar Blue. Η ταυτόχρονη επίδραση των πρωτεϊνών LieIF/IFN- γ , μετά την μόλυνση, παρουσίασε σημαντική και κλιμακωμένη παρεμπόδιση της ενδοκυτταρικής ανάπτυξης του παρασίτου. Πιο συγκεκριμένα, το ποσοστό παρεμπόδισης που σημειώθηκε στην αρχική φάση ανέρχεται στο 72% και μεγιστοποιείται (100% παρεμπόδιση) στην προχωρημένη φάση της μόλυνσης (Εικ. 4.5).



Εικόνα 4.5. Επίδραση της LieIF μετά την έναρξη της μόλυνσης με προμαστιγωτές μορφές *L. donovani* (post-treatment), στην ενδοκυτταρική ανάπτυξη του παρασίτου. J774A.1 μακροφάγα επωάστηκαν ταυτόχρονα με τις ανασυνδυασμένες LieIF (10 μg/ml) και IFN-γ (1 ng/ml), μετά την μόλυνση με προμαστιγωτές μορφές *L. donovani*. Ο προσδιορισμός της παρεμπόδισης της ενδοκυτταρικής ανάπτυξης του παρασίτου πραγματοποιήθηκε στην αρχική φάση της μόλυνσης (19 ώρες) και στην προχωρημένη φάση (72 ώρες), με την χρωματομετρική μέθοδο Alamar Blue. Η οπτική πυκνότητα μετρήθηκε στα 570/630nm.

Τα παραπάνω αποτελέσματα δεικνύουν ότι η LieIF είναι ένα σημαντικό μόριο του παρασίτου, ικανό να ενισχύσει την αντιλειτουργική δράση της IFN-γ. Η αποτελεσματικότητα αυτής της συνδυαστικής αντιλειτουργικής επίδρασης μετά την μόλυνση, ενθαρρύνει την άποψη ότι πρόκειται για ένα ανοσοτροποποιητικό μόριο με βάσιμες ενδείξεις θετικής ανοσοθεραπευτικής δράσης.

4.3.2 Διερεύνηση του επαγόμενου προστατευτικού μηχανισμού των J774A.1 μακροφάγων από τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες LieIF/IFN- γ .

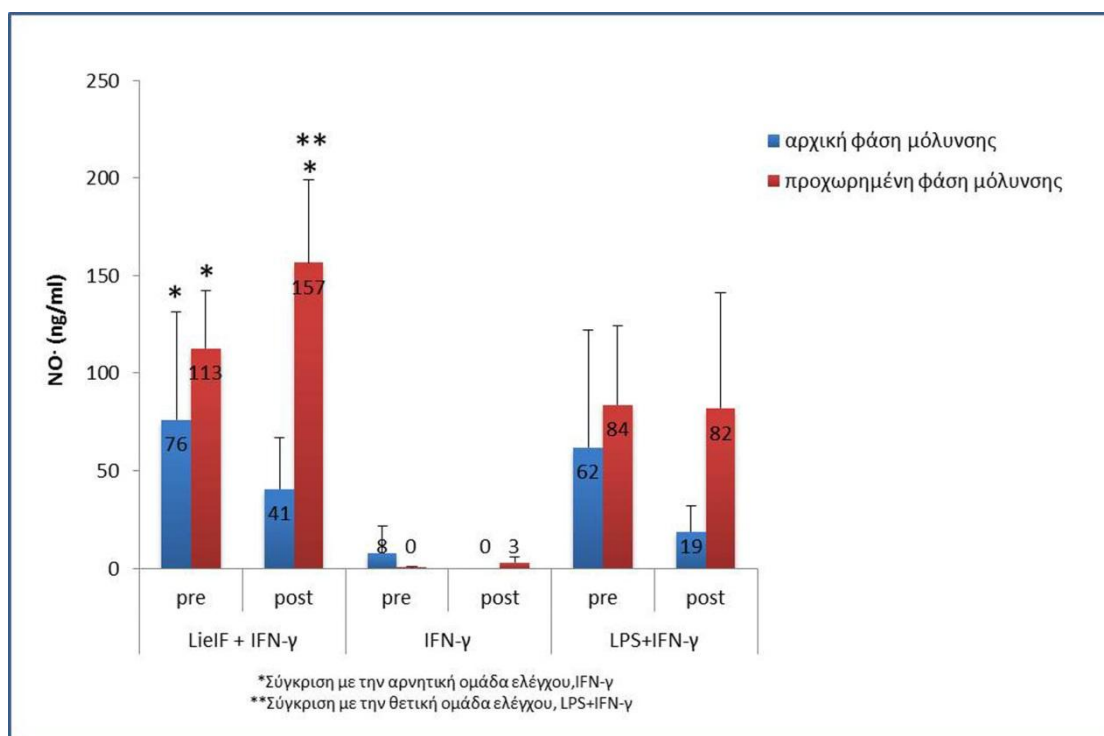
4.3.2.1 Επίδραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών LieIF/IFN- γ στην παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (NO) από *L. donovani* - μολυσμένα J774A.1 μακροφάγα.

Η ταυτόχρονη επίδραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών LieIF/IFN- γ , στα J774A.1 μακροφάγα, τόσο πριν την έναρξη της μόλυνσης με *L. donovani* προμαστιγωτές μορφές στατικής φάσης ανάπτυξης (pre-treatment), όσο και μετά την έναρξη αυτής (post-treatment), οδηγεί στον περιορισμό της ενδοκυττάριας ανάπτυξης του παρασίτου, καταδεικνύοντας έμμεσα την ενεργοποίηση αποτελεσματικών αντι-μικροβιακών μηχανισμών και την παραγωγή μορίων με λειψμανιοκτόνο δράση.

Η εξάλειψη των ενδοκυττάρων παθογόνων από τα μακροφάγα, σε *in vivo* συστήματα, διαμεσολαβείται από την παραγωγή του μονοξειδίου του αζώτου (NO). Το NO αποτελεί ρυθμιστικό μεσολαβητή της έμφυτης ανοσίας, αλλά παρόλα αυτά, τα παράσιτα του γένους *Leishmania*, έχουν αναπτύξει ευφυείς μηχανισμούς παρεμπόδισης της παραγωγής του [170].

Στην παρούσα μελέτη, προσδιορίστηκε το παραγόμενο NO στα υπερκείμενα καλλιιεργειών μολυσμένων J774A.1 μακροφάγων με *L. donovani*, που είχαν επωαστεί με τις ανασυνδυασμένες LieIF/IFN- γ είτε πριν την έναρξη της μόλυνσης, είτε κατόπιν αυτής. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των παραγόμενων επιπέδων NO πραγματοποιήθηκε σε δύο χρονικά σημεία (στην αρχική και στην προχωρημένη φάση της μόλυνσης) με την φασματοφωτομετρική αντίδραση Griess. Η θετική ομάδα ελέγχου αποτελούνταν από J774A.1 κύτταρα τα οποία εκτέθηκαν στην ταυτόχρονη επίδραση του LPS (1 μ g/ml) και της IFN- γ (1 ng/ml), ενώ η αρνητική ομάδα ελέγχου, αποτελούνταν από κύτταρα που δεν επώαστηκαν υπό την επίδραση κάποιου παράγοντα. Τα *L. donovani* παράσιτα είναι ικανά να επάγουν μια μικρή αύξηση της συγκέντρωσης NO στα υπερκείμενα καλλιιεργειών. Ως εκ τούτου, όλες οι τιμές που παρουσιάζονται έχουν προκύψει μετά από αφαίρεση της παραγωγής NO που οφείλεται στην επίδραση του παρασίτου στα J774A.1 μακροφάγα.

Τα αποτελέσματα αποδεικνύουν πως η επίδραση των LieIF/IFN- γ , τόσο πριν την έναρξης της μόλυνσης όσο και κατόπιν αυτής, οδηγεί σε σημαντική παραγωγή NO από τα μακροφάγα.



Εικόνα 4.6. Παραγωγή NO· (ng/ml) από J774A.1 μακροφάγα, που αλληλεπιδράσαν με τον συνδυασμό των LieIF/IFN-γ. Τα J774A.1 κύτταρα επωάστηκαν με τις ανασυνδυασμένες LieIF (10 µg/ml) και IFN-γ (1 ng/ml), είτε πριν την έναρξη της μόλυνσης με *L. donovani* προμαστιγωτές μορφές, είτε μετά. Η συγκέντρωση των νιτρωδών στα υπερκείμενα καλλιιεργειών, προσδιορίστηκε μέσω της αντίδρασης Griess και η απορρόφηση των προϊόντων, μετρήθηκε στα 570nm.

Αναλυτικότερα, τα επίπεδα του παραγόμενου NO· αυξάνουν με την πάροδο του χρόνου αλληλεπίδρασης των κυττάρων με το ενδοκυττάριο παράσιτο. Τα υψηλότερα επίπεδα ανιχνεύτηκαν στα υπερκείμενα καλλιιεργειών στο χρονικό σημείο των 72 ωρών μετά την μόλυνση. Οι τιμές αυτές είναι τα 113 ng/ml για την ομάδα των προεπωασμένων μακροφάγων και 157 ng/ml για την ομάδα των μολυσμένων μακροφάγων που επωάστηκαν με τις πρωτεΐνες, μετά την μόλυνση (Εικ. 4.6).

Χαμηλότερα, αλλά εξίσου σημαντικά, είναι τα επίπεδα NO· που ανιχνεύτηκαν στην αρχική φάση της μόλυνσης. Οι τιμές αυτές είναι 76 και 41 ng/ml, αντίστοιχα. Τα επίπεδα NO· που ανιχνεύτηκαν στην ομάδα των μακροφάγων που επέδρασε αποκλειστικά η IFN-γ, κυμαίνονται από 0-8 ng/ml, στα επιλεγμένα χρονικά σημεία ελέγχου.

Είναι επίσης αξιοσημείωτο, πως η επίδραση των LieIF/IFN- γ επάγει την παραγωγή NO $\cdot$ σε ανάλογο ή και μεγαλύτερο βαθμό με τον συνδυασμό των διεγερτικών μορίων LPS/IFN- γ . Πρέπει να σημειωθεί πως η υψηλότερη τιμή NO $\cdot$ (157 ng/ml) σημειώθηκε 72 ώρες μετά την μόλυνση στα κύτταρα που αλληλεπίδρασαν με τις LieIF/IFN- γ κατόπιν της μόλυνσης. Η παραγωγή αυτή είναι σημαντικά μεγαλύτερη ($p = 0,023$) από την αντίστοιχη παραγωγή της θετικής ομάδας ελέγχου (82 ng/ml) (Εικ. 4.6). Επιπλέον, σε αυτό το σημείο ελέγχου, η παρεμπόδιση της ενδοκυτταρικής ανάπτυξης του παρασίτου βρέθηκε να αγγίζει την τιμή 100% (Εικ. 4.5).

Συμπερασματικά, ο συνδυασμός των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών LieIF/IFN- γ , αποδεικνύεται ισχυρός επαγωγέας παραγωγής μονοξειδίου του αζώτου στα μολυσμένα με *L. donovani*, J774A.1 μακροφάγα, σε σύγκριση με τη μονήρη δράση της IFN- γ που αποδεικνύεται ως πιο μετριοπαθής επαγωγέας. Επιπλέον, επιβεβαιώνεται πως ο περιορισμός της ενδοκυτταρικής ανάπτυξης του παρασίτου σχετίζεται αναλογικά με την παραγωγή NO.

4.3.2.2 Επίδραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών LieIF/IFN- γ στην παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS) από *L. donovani* - μολυσμένα J774A.1 μακροφάγα.

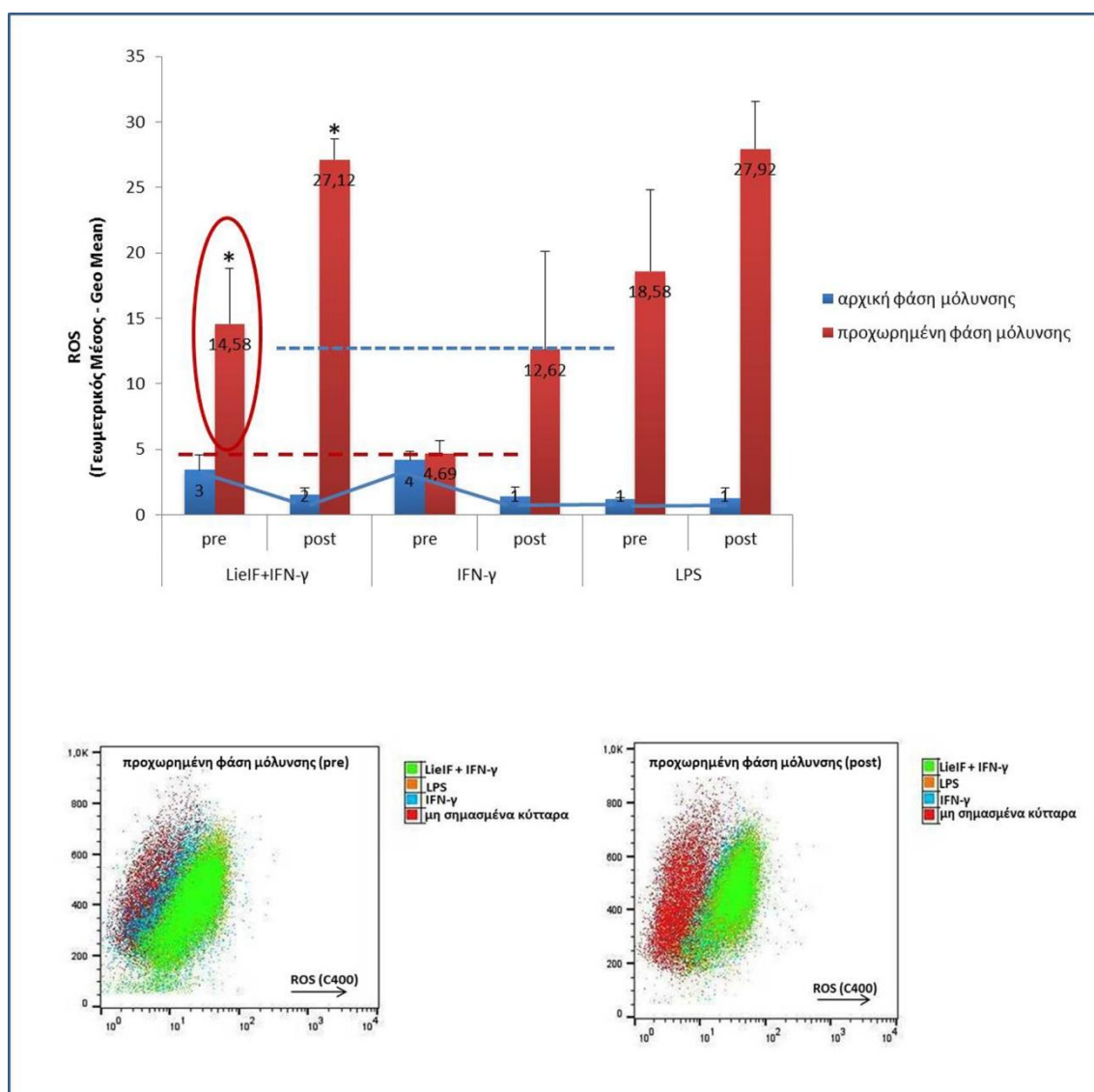
Η είσοδος των μικροβιακών εισβολέων στα μακροφάγα, επάγει την παραγωγή ROS, οι οποίες αποτελούν σημαντικό τμήμα του αμυντικού μηχανισμού του ξενιστή. Η είσοδος των παρασίτων του γένους *Leishmania* στο κυτταρόπλασμα των μακροφάγων, συνοδεύεται από την ανάπτυξη μηχανισμών άμυνας έναντι της οξειδωτικής έκρηξης του κυττάρου-ξενιστή, όπως η έκφραση αντι-οξειδωτικών ενζύμων και η παρεμπόδιση της παραγωγής ROS και NO.

Στόχος της μελέτης ήταν η διερεύνηση της επίδρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών LieIF/IFN- γ στην παραγωγή ROS από τα παρασιτιζόμενα J774A.1 μακροφάγα. Η διερεύνηση αυτή επιτεύχθηκε με την χρήση του φθορίζοντα ανιχνευτή H2DCFDA, με κυτταρομετρία ροής.

Η θετική ομάδα ελέγχου αποτελούνταν από J774A.1 κύτταρα τα οποία εκτέθηκαν στον βακτηριακό λιποπολυσακχαρίτη (1 μ g/ml LPS) ή σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (1mM H₂O₂). Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην Εικ. 4.7, έχουν προκύψει από την αφαίρεση του αυθόρμητου φθορισμού των μη σημασμένων κυττάρων. Η αυθόρμητη παραγωγή ROS από τα J774A.1 μακροφάγα, ήταν χαμηλή (Geo Mean = 1,80). Επιπλέον,

η μονήρης επίδραση της IFN- γ σε μη μολυσμένα μακροφάγα επέφερε αμελητέα παραγωγή ROS καθώς ο γεωμετρικός μέσος κυμάνθηκε από 0,4 έως 5,12, σε όλους τους ελέγχους (τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται).

Η επίδραση των LieIF/IFN- γ , οδήγησε στην παραγωγή ROS, 72 ώρες μετά την μόλυνση, ενώ δεν ανιχνεύτηκε παραγωγή ROS στην αρχική φάση της μόλυνσης. Πιο συγκεκριμένα, τα κύτταρα που αλληλεπίδρασαν με τις πρωτεΐνες πριν την έναρξη της μόλυνσης παρουσίασαν τριπλάσια παραγωγή ROS (14,58) σε σχέση με την αντίστοιχη παραγωγή που προκάλεσε η μονήρης επίδραση της IFN- γ (4,69) ($p = 0,021$) (Εικ. 4.7)



Εικόνα 4.7. Παραγωγή ROS από J774A.1 μακροφάγα, που αλληλεπίδρασαν με τον συνδυασμό LieIF/IFN- γ . Τα J774A.1 κύτταρα επώαστηκαν με τις ανασυνδυασμένες LieIF (10 μ g/ml) και IFN- γ (1 ng/ml), είτε πριν την έναρξη της μόλυνσης με *L. donovani* προμαστιγωτές μορφές, είτε μετά. Η σήμανση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με 5 μ M του φθορίζοντα ανιχνευτή H2DCFDA και ο φθορισμός των κυττάρων ανιχνεύτηκε με FACS.

Αντίστοιχα, τα κύτταρα που αλληλεπιδράσαν με τον συνδυασμό LieIF/IFN- γ μετά την μόλυνση παρουσίασαν διπλάσια παραγωγή ROS (27,12) σε σχέση με την αντίστοιχη παραγωγή που προκάλεσε η μονήρης IFN- γ (12,62) ($p = 0,050$) (Εικ. 4.7).

Επιπρόσθετα, είναι αξιοσημείωτο πως στο χρονικό σημείο των 72 ωρών, η παραγωγή ROS που οφείλεται στην επίδραση των LieIF/IFN- γ , πριν ή μετά την έναρξη της μόλυνσης, είναι όμοια ($p > 0,05$) με την παραγωγή που παρατηρήθηκε λόγω της επίδρασης του ισχυρού διεγέρτη LPS (14,58 έναντι 18,58 και 27,12 έναντι 27,92, αντίστοιχα).

Συνοψίζοντας τα παραπάνω, συμπεραίνεται πως η LieIF ενισχύει ισχυρά την αντιλειτουργική δράση της ανασυνδυασμένης IFN- γ . Η δράση αυτή είναι ανάλογη του χρόνου αλληλεπίδρασης των μακροφάγων με το ενδοκυττάριο παράσιτο και μεγιστοποιείται στις 72 ώρες μετά την μόλυνση. Επιπλέον, η αντιλειτουργική δράση των LieIF/IFN- γ , διαμεσολαβείται από την παραγωγή των ισχυρών αντιμικροβιακών μορίων NO και ROS, η παραγωγή των οποίων είναι επίσης μεγαλύτερη στο χρονικό σημείο των 72 ωρών μετά την μόλυνση, όπου παρατηρείται και μεγαλύτερη παρεμπόδιση της ενδοκυττάριας ανάπτυξης του παρασίτου.

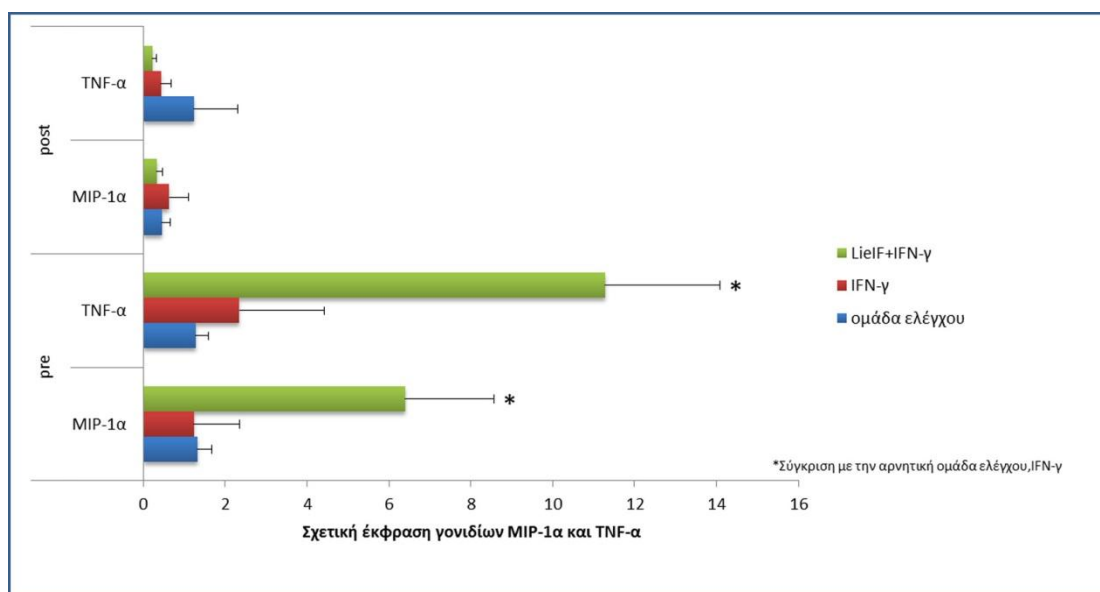
4.3.2.3 Επίδραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών LieIF/IFN- γ στην παραγωγή κυτταροκινών και χημειοκινών από *L. donovani* - μολυσμένα J774A.1 μακροφάγα.

Οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες και οι χημειοκίνες συμμετέχουν τόσο στην έμφυτη όσο και στην επίκτητη ανοσία, συμμετέχοντας στην έναρξη και στην διατήρηση των ανοσολογικών μηχανισμών που ενεργοποιούνται από τα ενδοκυττάρια παράσιτα [171]. Επιπλέον, βιβλιογραφικά δεδομένα καταδεικνύουν πως η χημειοκίνη MIP-1 α διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανοσία έναντι της πειραματικής σπλαγχνικής λεισμανίασης [172].

Στην παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός mRNA μεταγράφων για την MIP-1 α και τον TNF- α , με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real-time PCR). Ο προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε σε J774A.1 μακροφάγα που επώαστηκαν με τις ανασυνδυασμένες LieIF/IFN- γ πριν ή μετά την μόλυνση με *L. donovani* προμαστιγωτές μορφές στατικής φάσης ανάπτυξης. Για τον έλεγχο της έκφρασης των παραπάνω γονιδίων, επιλέχτηκε το χρονικό σημείο των 72 ωρών μετά την μόλυνση, όπου παρατηρήθηκε και η εντονότερη αντιπαρασιτική δράση με

την μεσολάβηση των NO και ROS. Η έκφραση του γονιδίου GAPDH χρησιμοποιήθηκε για την εξομάλυνση των αποτελεσμάτων. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται υπολογίστηκαν με την μέθοδο του ΔΔCt, συγκρίνοντας την σχετική έκφραση κάθε δείγματος με την σχετική έκφραση του αντίστοιχου γονιδίου της αρνητικής ομάδας ελέγχου (J774A.1 μακροφάγα σε καλλιεργητικό υλικό).

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι στα παρασιτιζόμενα μακροφάγα που είχαν προεπωαστεί ταυτόχρονα με τις ανασυνδυασμένες LieIF/IFN-γ (pre-treatment), παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης του mRNA της MIP-1α κατά 5 φορές και αύξηση της έκφρασης του TNF-α κατά 8,6 φορές, συγκριτικά με τα κύτταρα που επώαστηκαν μόνο με την επίδραση της IFN-γ ($p = 0,009$ και $0,034$, αντίστοιχα) (Εικ. 4.8). Αντιθέτως, η επίδραση των LieIF/IFN-γ στα ήδη μολυσμένα μακροφάγα (post-treatment), δεν οδήγησε σε σημαντική αύξηση της έκφρασης των MIP-1α και TNF-α γονιδίων (Εικ. 4.8). Επιπλέον, ελέγχθηκε η μονήρης επίδραση της LieIF στην έκφραση των παραπάνω γονιδίων, όπου τα επίπεδα έκφρασής τους ήταν χαμηλά (τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται).



Εικόνα 4.8. Σχετική έκφραση των mRNA μεταγράφων των MIP-1α και TNF-α, σε μολυσμένα J774A.1 μακροφάγα. Τα J774A.1 κύτταρα επώαστηκαν με τις ανασυνδυασμένες LieIF (10 μg/ml) και IFN-γ (1 ng/ml), είτε πριν την έναρξη της μόλυνσης με *L. donovani* προμαστιγωτές, μορφές, είτε μετά. Η ανάλυση της σχετικής έκφρασης των γονιδίων MIP-1α και TNF-α, πραγματοποιήθηκε στην προχωρημένη φάση της μόλυνσης (72 ώρες), με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου.

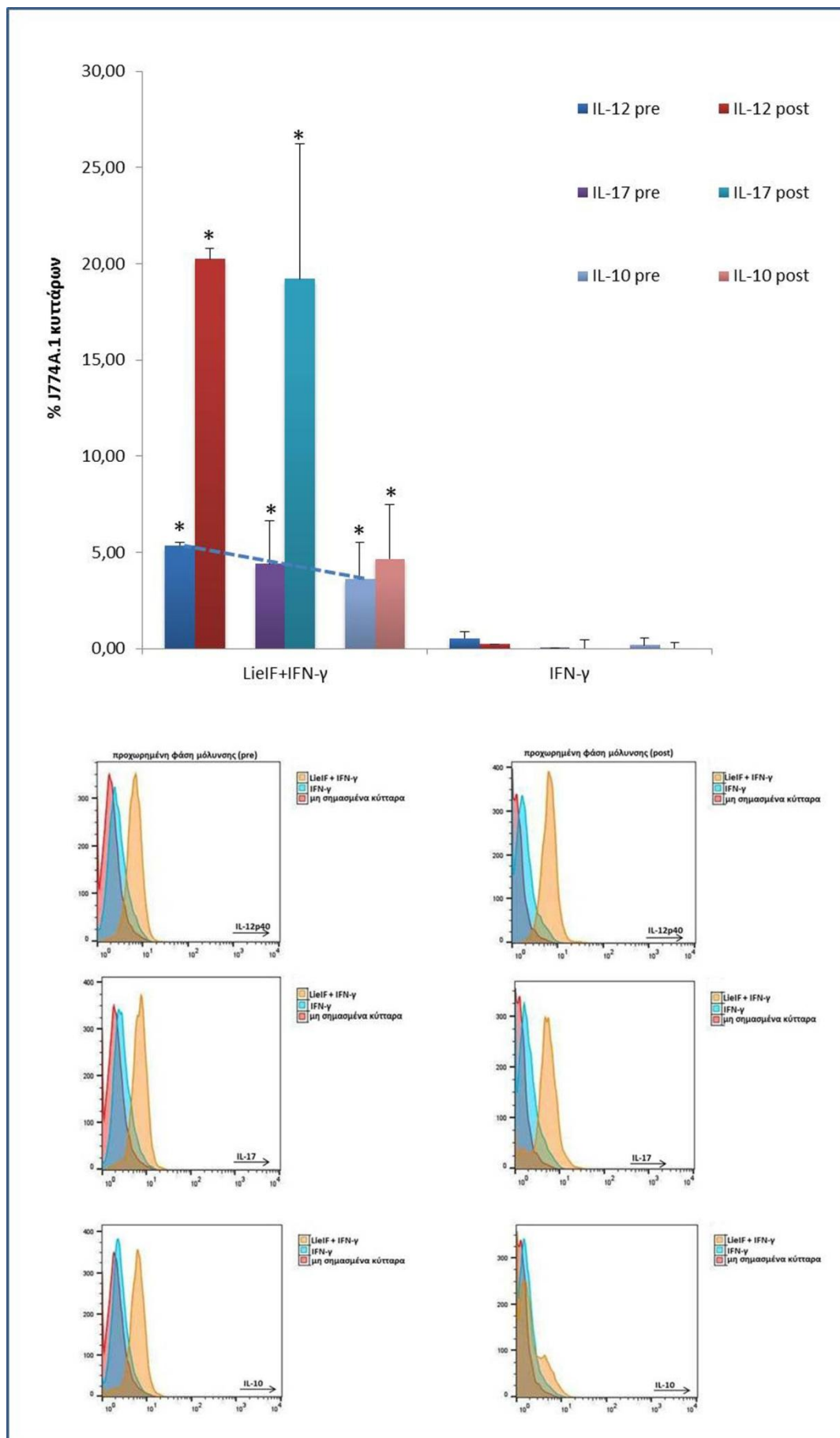
Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός των παραγόμενων MIP-1α και TNF-α στα υπερκείμενα των καλλιεργείων των J774A.1 μολυσμένων μακροφάγων,

72 ώρες μετά την μόλυνση. Να σημειωθεί ότι αυτά τα δύο δραστικά μόρια παράγονται και αθροίζονται στο υπερκείμενο καλλιεργητικό υλικό χωρίς να αλλοιώνονται ή να καταναλώνονται από το κυτταρικό σύστημα των μακροφάγων. Προσδιορίστηκε η συγκέντρωση των εκκρινόμενων MIP-1α και TNF-α στα υπερκείμενα καλλιεργείων σε όλες τις ομάδες ελέγχου και βρέθηκε ότι δεν υπάρχουν διαφορές μεταξύ των πειραματικών ομάδων συγκρινόμενα με την αρνητική ομάδα ελέγχου (τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται).

Συμπερασματικά, η συνδυαστική αντιλειτουργική δράση των LieIF/IFN-γ, που παρατηρείται σε προεπωασμένα μακροφάγα μετά την μόλυνση, διαμεσολαβείται, εκτός από τα αντιμικροβιακά μόρια NO και ROS, και από τα μόρια MIP-1α και TNF-α. Αντιθέτως, η αντιλειτουργική δράση των LieIF/IFN-γ, στα ήδη μολυσμένα μακροφάγα, διαμεσολαβείται από τα αντιμικροβιακά μόρια NO και ROS χωρίς να διαφαίνεται η συμμετοχή των μορίων MIP-1α και TNF-α.

Επιπλέον, προκειμένου να διερευνηθεί το προφίλ των ενεργοποιούμενων κυτταροκινών που εμπλέκονται στην πόλωση της ανοσολογικής απόκρισης των T κυττάρων, πραγματοποιήθηκε κυτταροπλασματική εντόπιση των κυτταροκινών IL-12, IL-17 και IL-10, με κυτταρομετρία ροής. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται προέκυψαν κατόπιν αφαίρεσης της αντίστοιχης παραγωγής κυτταροκινών που οφείλεται στην αλληλεπίδραση του κυττάρου με το παράσιτο, και ως εκ τούτου αντιστοιχούν στην καθαρή επίδραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στην ποσοτικοποίηση των παραπάνω κυτταροκινών. Το χρονικό σημείο ελέγχου ήταν οι 72 ώρες μετά την μόλυνση.

Η συνδυαστική επίδραση των LieIF/IFN-γ πριν την μόλυνση των μακροφάγων καθώς και μετά από αυτήν, οδήγησε σε σημαντική παραγωγή των παραπάνω κυτταροκινών, συγκριτικά με την μονήρη επίδραση της IFN-γ. Αναλυτικότερα, στα μολυσμένα μακροφάγα που επώαστηαν με τις LieIF/IFN-γ πριν την μόλυνση, σημειώθηκε σημαντική παραγωγή και για τις τρεις κυτταροκίνες. Τα ποσοστά των μακροφάγων που παράγουν τις αντίστοιχες κυτταροκίνες, ανέρχονται σε 5,37% για την IL-12p40, 4,40% για την IL-17 και 3,60% για την IL-10 (Εικ. 4.9). Η επίδραση των LieIF/IFN-γ μετά την μόλυνση, οδήγησε επίσης σε σημαντική παραγωγή των κυτταροκινών. Τα ποσοστά των μακροφάγων που παράγουν τις IL-12p40, IL-17 και IL-10, είναι 20,25%, 19,12% και 4,68%, αντίστοιχα (Εικ. 4.9). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός, πως η παραγωγή της προστατευτικής IL-12p40 και της IL-17, είναι σημαντικά υψηλότερη ($p = 0,046$) συγκριτικά με την παραγωγή της κατασταλτικής IL-10.



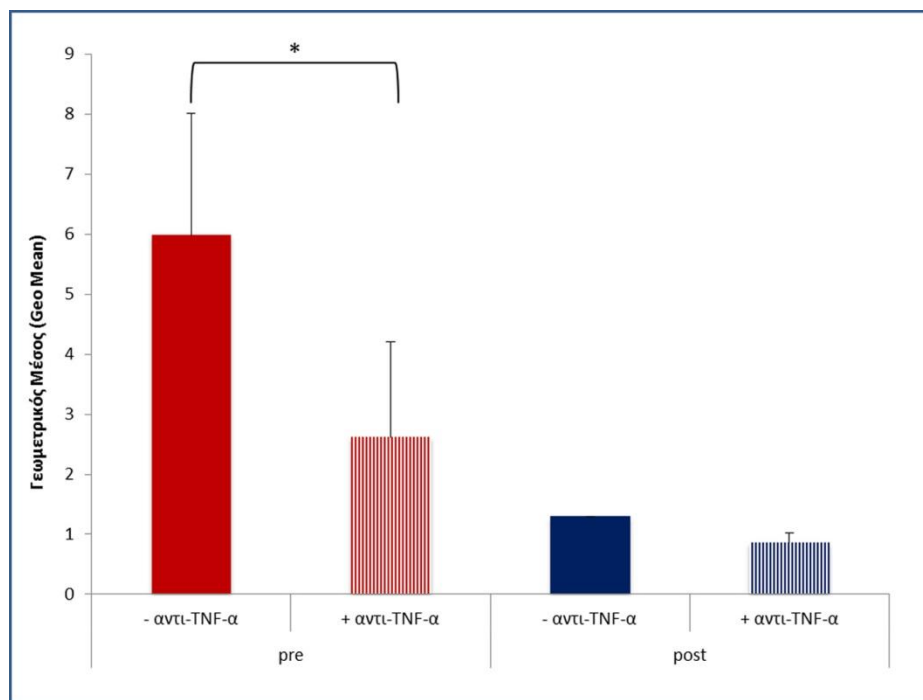
Εικόνα 4.9. Ενδοκυτταρική ανίχνευση IL-12, IL-17 και IL-10 σε μολυσμένα J774A.1 μακροφάγα. Η προσθήκη των πρωτεϊνών LieF (10 $\mu\text{g/ml}$) και IFN- γ (1 ng/ml) στην καλλιέργεια των J774A.1 μακροφάγων, πραγματοποιήθηκε είτε πριν την έναρξη της μόλυνσης με προμαστιγωτές μορφές *L. donovani* (pre-treatment), είτε μετά (post-treatment). Η ενδοκυτταρική ανίχνευση των κυτταροκινών πραγματοποιήθηκε με την χρήση κατάλληλων μονοκλωνικών αντισωμάτων που έφεραν φθορίζουσες ουσίες, με κυτταρομετρία ροής.

4.3.2.4 Συσχέτιση του παραγόμενου TNF- α και των ROS, στα μολυσμένα J774A.1 μακροφάγα.

Μελέτες αποδεικνύουν την συνεργιστική δράση του TNF- α και της IFN- γ , ως προς την ενεργοποίηση των μακροφάγων και τον επακόλουθο περιορισμό των ενδοκυττάρων παρασίτων (*Leishmania*, *Trypanosoma*), μέσω μηχανισμών εξαρτώμενων από μόρια της οξειδωτικής έκρηξης των κυττάρων [173].

Προκειμένου να αποσαφηνιστεί η πιθανή αλληλεπίδραση μεταξύ των παραγόμενων NO/ROS και του TNF- α , ελέγχθηκε η επίδραση της εξουδετέρωσης του TNF- α , με τη βοήθεια ειδικού μονοκλωνικού αντισώματος, στην οξειδωτική έκρηξη των παρασιτιζόμενων μακροφάγων, στην προχωρημένη φάση της μόλυνσης. Τα J774A.1 μακροφάγα επώαστηκαν με τις ανασυνδυασμένες LieIF/IFN- γ πρωτεΐνες, σε συνδυασμό με το εξουδετερωτικό μονοκλωνικό αντίσωμα (anti-TNF- α , 4 $\mu\text{g/ml}$), είτε πριν τη μόλυνση με *L. donovani* προμαστιγωτές μορφές, είτε μετά. Ο προσδιορισμός των ROS έγινε με κυτταρομετρία ροής και τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται έχουν προκύψει τόσο από την αφαίρεση του αυθόρμητου φθορισμού των μη σημασμένων κυττάρων, όσο και της μονήρους επίδρασης της IFN- γ .

Η εξουδετέρωση του TNF- α , οδήγησε στην σημαντική μείωση των παραγόμενων ROS ($p = 0,003$), στην περίπτωση των προεπωασμένων μακροφάγων (Εικ. 4.10). Παρόλα αυτά, η εξουδετέρωση του TNF- α , δεν είχε σημαντική επίδραση στην παραγωγή ROS στα μακροφάγα που επώαστηκαν με τις LieIF/IFN- γ , μετά την μόλυνση ($p = 0,121$) (Εικ. 4.10).



Εικόνα 4.10. Επίδραση της εξουδετέρωσης του TNF-α στην παραγωγή ROS από παρασιτιζόμενα J774A.1 μακροφάγα. J774A.1 μακροφάγα επωάστηκαν με τις ανασυνδυασμένες LieIF (10 μg/ml) και IFN-γ (1 ng/ml), παρουσία ή απουσία του ειδικού αντι-TNF-α μονοκλωνικού αντισώματος (4 μg/ml), είτε πριν, είτε μετά την έναρξη της μόλυνσης με *L. donovani* προμαστιγωτές μορφές. Η ενδοκυτταρική ανίχνευση των ROS πραγματοποιήθηκε με τον φθορίζοντα ανιχνευτή H2DCFDA, στο χρονικό σημείο των 72 ωρών μετά την μόλυνση, με κυτταρομετρία ροής. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται προέκυψαν από την σχέση: Γεωμετρικός Μέσος = Γεωμετρικός Μέσος (J774A.1+LieIF+IFN-γ) – Γεωμετρικός Μέσος (J774A.1+IFN-γ).

Συνοψίζοντας, επιβεβαιώνεται πως η προστετευτική δράση της LieIF στο *in vitro* σύστημα των προεπωαζόμενων μακροφάγων (pre-treatment) διαμεσολαβείται από την παραγωγή των NO και ROS μέσω ενός μηχανισμού εξαρτώμενου από τον TNF-α. Αντιθέτως, η αντιλεισμμανιακή της δράση στα ήδη μολυσμένα μακροφάγα (post-treatment), διαμεσολαβείται από τα αντιμικροβιακά μόρια NO και ROS χωρίς να διαφαίνεται η συμμετοχή των μορίων MIP-1α και TNF-α.

4.4 Μελέτη ανοσογονικών ιδιοτήτων της ανασυνδυασμένης LieIF.

4.4.1 Επίδραση της ανασυνδυασμένης LieIF στην λειτουργική διαφοροποίηση των μυελοειδών δενδριτικών κυττάρων.

Τα δενδριτικά κύτταρα (ΔΚ) αποτελούν μια ετερογενή ομάδα κυττάρων, οι υποπληθυσμοί των οποίων επιδεικνύουν τόσο φαινοτυπικές όσο και λειτουργικές

διαφορές [174]. Τα ΔΚ ποντικού αποτελούνται κυρίως από δύο διακριτούς υποπληθυσμούς, τα συμβατικά (ή κλασσικά) μυελοειδή ΔΚ (mDCs) και τα πλασματοκυτταροειδή ΔΚ (pDCs) [175].

Στην παρούσα μελέτη, εφαρμόστηκε η μεθοδολογία της *in vitro* παραγωγής μυελοειδών ΔΚ από πρόδρομα κύτταρα του μυελού των οστών [163], όπως περιγράφεται αναλυτικά στην § 3.2.7. Για τα πειράματα που περιγράφονται παρακάτω, επιλέχθηκαν τα μυελοειδή ΔΚ, τα οποία θα αναφέρονται εφεξής ως ΔΚ.

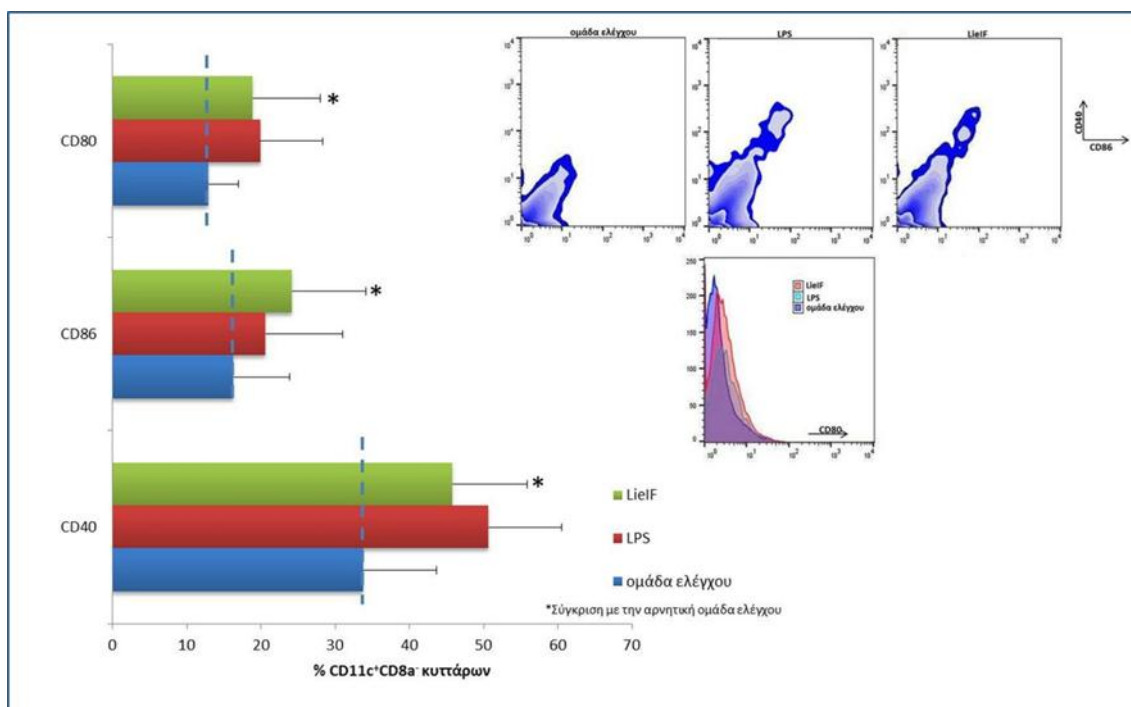
4.4.1.1 Επίδραση της ανασυνδυασμένης *LieIF* στην ωρίμανση των ΔΚ.

Τα ΔΚ, ανάλογα με τον βαθμό ωρίμανσής τους, ρυθμίζουν ποικιλοτρόπως τις αντιγονο-ειδικές Τ κυτταρικές αποκρίσεις. Πιο συγκεκριμένα, τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης των συνδιεγερτικών επιφανειακών μορίων, ιδιαιτέρως των CD80 και CD86, που χαρακτηρίζουν τα ανώριμα ΔΚ, κατευθύνουν την δράση τους προς την ανάπτυξη ανοσολογικής ανοχής [176]. Αντιθέτως, τα ώριμα ΔΚ χαρακτηρίζονται από υψηλά επίπεδα έκφρασης των συνδιεγερτικών μορίων και κατευθύνουν με την δράση τους την ρύθμιση της κυτταρομεσολαβητικής απόκρισης από τα Τ κύτταρα [177].

Στην παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκε εκτίμηση του επιπέδου ωρίμανσης των ΔΚ μετά από *ex vivo* ευαισθητοποίησή τους με την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη *LieIF*. Προς αυτή την κατεύθυνση εφαρμόστηκαν τεχνικές χρώσης με φθορίζοντα μονοκλωνικά αντισώματα για τον εντοπισμό των δεικτών ενεργοποίησης CD40, CD86 και CD80 καθώς και για τον εντοπισμό των μορίων MHC τάξης II.

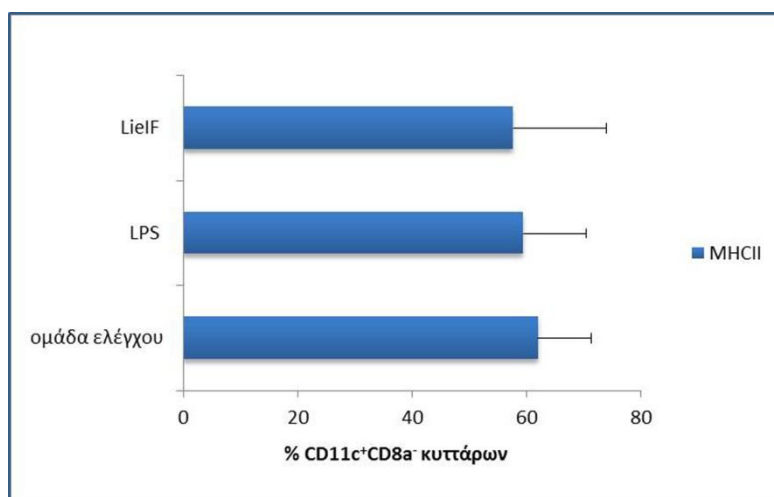
Η διέγερση των ΔΚ με την *LieIF* (10μg/ml), οδήγησε σε σημαντική αύξηση της έκφρασης των συνδιεγερτικών μορίων CD40, CD86 και CD80.

Αναλυτικότερα, η αύξηση του ποσοστού των ΔΚ που εκφράζουν τον δείκτη CD40 είναι της τάξης του 35,7% σε σχέση με την αρνητική ομάδα ελέγχου των ΔΚ που καλλιεργήθηκαν μόνο με την επίδραση καλλιεργητικού υλικού. Οι αντίστοιχες αυξήσεις για τους δείκτες CD86 και CD80 είναι 48,6% και 46,2% (Εικ. 4.11).



Εικόνα 4.11. *In vitro* επίδραση της LieIF στην ωρίμανση των ΔΚ. Τα ΔΚ επωάστηκαν με την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη LieIF (10 µg/ml) για 24 ώρες. Η έκφραση των συνδιεγερτικών μορίων CD40, CD86 και CD80, ελέγχθηκε με κυτταρομετρία ροής, κατόπιν χρήσης ειδικών μονοκλωνικών αντισωμάτων που έφεραν φθορίζουσες ουσίες.

Αξίζει να αναφερθεί πως η διέγερση με την LieIF, οδήγησε σε παρόμοια αύξηση των ποσοστών έκφρασης των συνδιεγερτικών μορίων, με αυτή που παρατηρήθηκε λόγω της επίδρασης του ισχυρού διεγέρτη LPS (1 µg/ml) ($p > 0,05$). Τέλος, τα μόρια MHC τάξης II δεν παρουσίασαν σημαντική μεταβολή ανάμεσα στις πειραματικές ομάδες (Εικ. 4.12).



Εικόνα 4.12. *In vitro* επίδραση της LieIF στην έκφραση των μορίων MHC τάξης II, από ΔΚ. Τα ΔΚ επωάστηκαν με την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη LieIF (10 µg/ml) για 24 ώρες. Τα ΔΚ της θετικής ομάδας ελέγχου, επωάστηκαν με το LPS (1 µg/ml), ενώ τα ΔΚ της αρνητικής ομάδας ελέγχου, καλλιεργήθηκαν μόνο με την επίδραση του καλλιεργητικού υλικού. Η έκφραση των MHC μορίων, ελέγχθηκε με κυτταρομετρία ροής, κατόπιν χρήσης ειδικού μονοκλωνικού αντισώματος που έφερε PE.

Συμπερασματικά, τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώνουν πως η ανασυνδυασμένη ενδοκυτταρική πρωτεΐνη LieIF, επάγει *in vitro* την ωρίμανση των μυελοειδών ΔΚ που αποδεδειγμένα συμβάλλουν στην ρύθμιση των ανοσολογικών αποκρίσεων [178, 179].

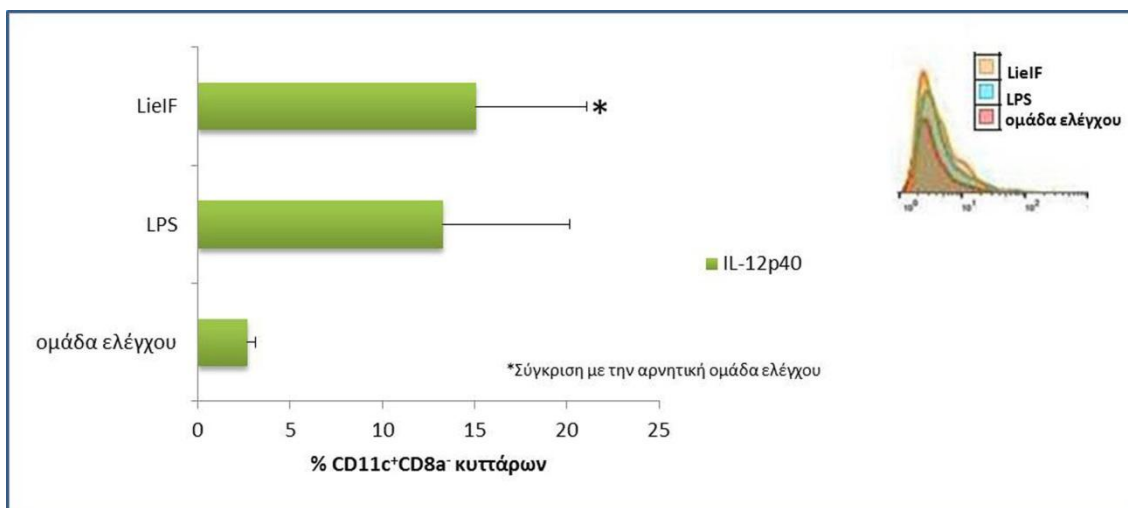
4.4.1.2 Επίδραση της ανασυνδυασμένης LieIF στην παραγωγή κυτταροκινών από ΔΚ.

Τα ευαισθητοποιημένα ΔΚ εκκρίνουν ένα ευρύ φάσμα κυτταροκινών όπως ανοσορυθμιστικές ή κυτταροκίνες φλεγμονώδους απόκρισης (π.χ. IL-12, IL-6, IL-1β, IL-8) καθώς και ανοσοκατασταλτικές (π.χ. IL-10, TGF-β) κυτταροκίνες. Η ισορροπία μεταξύ των υποπληθυσμών των ΔΚ που παράγουν διαφορετικές ομάδες κυτταροκινών φαίνεται να ρυθμίζεται από ποικίλους περιβαλλοντικούς παράγοντες [179].

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε το προφίλ των εκκρινόμενων κυτταροκινών από μυελοειδή ΔΚ, κατόπιν διέγερσης των κυττάρων αυτών με την ανασυνδυασμένη LieIF (10 μg/ml). Τα διεγερμένα ΔΚ επωάστηκαν με κατάλληλα μονοκλωνικά αντισώματα για την ενδοκυτταρική ανίχνευση των κυτταροκινών IL-12p40, IFN-γ, IL-10, IL-4 καθώς και της iNOS, αφού προηγουμένως επωάστηκαν με την μπρεφελδίνη-A για την παρακράτηση των πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο, αναστέλλοντας την μεταφορά τους στο σύμπλεγμα Golgi.

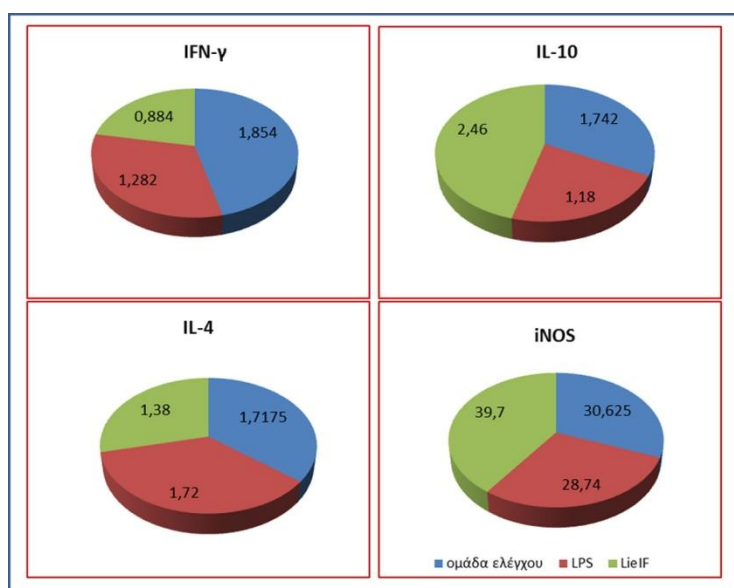
Η διέγερση των ΔΚ με την LieIF, οδήγησε σε εξαπλάσια αύξηση του ποσοστού των κυττάρων που παράγουν IL-12p40 (15,08%) συγκριτικά με το ποσοστό της αυθόρμητης παραγωγής (2,67%) ($p = 0,018$) (Εικ. 4.13).

Τα αποτελέσματα επιπλέον δείχνουν, ότι η αποτελεσματικότητα της διέγερσης των ΔΚ με την LieIF στην παραγωγή της IL-12 (IL-12p40), που εμπλέκεται στην επαγωγή των προστατευτικών μηχανισμών για την λεισμανίαση, είναι ανάλογη της επίδρασης του LPS (13,29%) (Εικ. 4.13).



Εικόνα 4.13. *In vitro* επίδραση της LieIF στην παραγωγή IL-12p40, από ΔΚ. Τα ΔΚ επωάστηκαν με την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη LieIF (10 μg/ml) για 24 ώρες. Τα ΔΚ της θετικής ομάδας ελέγχου, επωάστηκαν με το LPS (1 μg/ml), ενώ τα ΔΚ της αρνητικής ομάδας ελέγχου, καλλιεργήθηκαν μόνο με την επίδραση του καλλιεργητικού υλικού. Η παραγωγή IL-12p40, ελέγχθηκε με κυτταρομετρία ροής, κατόπιν χρήσης ειδικού μονοκλωνικού αντισώματος που έφερε PE.

Επιπλέον, προσδιορίστηκαν οι κυτταροκίνες IFN-γ, IL-10 και IL-4. Βρέθηκε μια ήπια αύξηση του ποσοστού των ΔΚ που παράγουν IL-10 (2,46% έναντι 1,74%) και ενεργοποιούν την επαγωγίμη συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου (iNOS) (39,7% έναντι 30,6%), σε σύγκριση με την αρνητική ομάδα ελέγχου (Εικ. 4.14). Δεν παρατηρήθηκε αύξηση του ποσοστού των κυττάρων που παράγουν τις IFN-γ και IL-4 (Εικ. 4.14).



Εικόνα 4.14. *In vitro* επίδραση της LieIF στην παραγωγή IFN-γ, IL-10, IL-4 και iNOS, από ΔΚ.

Τα ΔΚ επωάστηκαν με την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη LieIF (10 μg/ml) για 24 ώρες. Τα ΔΚ της θετικής ομάδας ελέγχου, επωάστηκαν με το LPS (1 μg/ml), ενώ τα ΔΚ της αρνητικής ομάδας ελέγχου, καλλιεργήθηκαν μόνο με την επίδραση του καλλιεργητικού υλικού. Η παραγωγή των κυτταροκινών ελέγχθηκε με κυτταρομετρία ροής, κατόπιν χρήσης ειδικών μονοκλωνικών αντισώματος που έφεραν φθορίζουσες ουσίες.

Συμπερασματικά, τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώνουν πως η πρωτεΐνη LieIF προκαλεί τόσο φαινοτυπικές όσο και λειτουργικές μεταβολές στα ΔΚ.

4.4.2 Εκτίμηση της πιθανής συνεργιστικής δράσης της ανασυνδυασμένης LieIF με τους υποδοχείς τύπου Toll.

Η ενεργοποίηση υποδοχέων τύπου Toll (TLRs), επάγει την ωρίμανση των ΔΚ που χαρακτηρίζεται από την παραγωγή κυτταροκινών (π.χ. IL-12, IL-6) και την αύξηση της έκφρασης των συνδιεγερτικών μορίων [180].

Όπως έχει δειχθεί, οι TLRs δρουν συνεργιστικά προκαλώντας την ενεργοποίηση διαφορετικών μονοπατιών σηματοδότησης που οδηγούν στην παραγωγή διαφορετικών ομάδων κυτταροκινών [143].

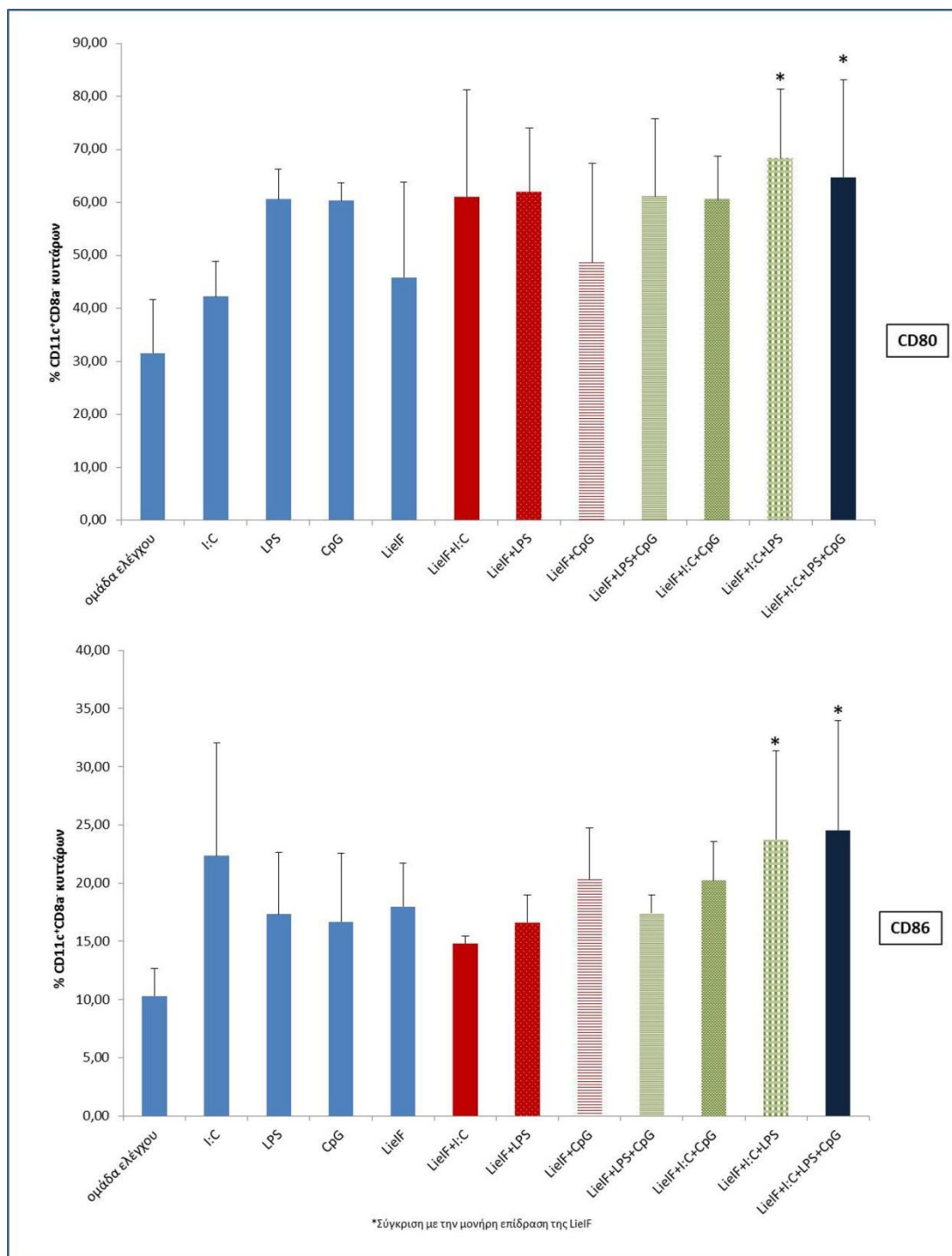
Στην παρούσα μελέτη, επιδιώχθηκε να διερευνηθεί η επίδραση της συνδυαστικής ενεργοποίησης των υποδοχέων τύπου Toll και της ανασυνδυασμένης LieIF, στην φαινοτυπική διαφοροποίηση των ΔΚ. Η επιλογή των TLRs, βασίστηκε σε βιβλιογραφικά δεδομένα που αποδεικνύουν την συμμετοχή των TLR3, TLR4 και TLR9, στην επιτυχή ενεργοποίηση της επίκτητης ανοσολογικής απόκρισης έναντι του παρασίτου *Leishmania* [158, 181, 182].

Τα ΔΚ επωάστηκαν με την ανασυνδυασμένη LieIF (10 µg/ml) και τους προσδέτες των TLR3 (polyI:C, 10 µg/ml), TLR4 (LPS, 1 µg/ml) και TLR9 (CpG, 10 µg/ml) σε διάφορους συνδυασμούς, για 24 ώρες. Ακολούθησε, αξιολόγηση της έκφρασης των συνδιεγερτικών μορίων CD80 και CD86, μετά από σήμανση των κυττάρων με κατάλληλα μονοκλωνικά αντισώματα που έφεραν φθορίζουσες ουσίες.

Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη LieIF παρουσίασε όμοια επίδραση με τους TLR3, 4 και 9 διεγέρτες, poly(I:C), LPS και CpG, αντίστοιχα ως προς την έκφραση των CD80 και CD86 ($p > 0,05$) (Εικ. 4.15). Τα ευρήματα αυτά καταδεικνύουν τις ισχυρές ανοσοτροποποιητικές ιδιότητες της πρωτεΐνης. Η ταυτόχρονη επίδραση της LieIF με την ενεργοποίηση καθενός από τους Toll-like υποδοχείς, TLR3 ή TLR4 ή TLR9, οδήγησε σε μέτρια αύξηση της έκφρασης των δεικτών CD80 και CD86, συγκριτικά με την μονήρη επίδραση της LieIF ($p > 0,05$) (Εικ. 4.15). Στη συνέχεια, αξιολογήθηκε η ταυτόχρονη διέγερση των ΔΚ με την LieIF και την ταυτόχρονη ενεργοποίηση των TLRs, με συνδυασμούς ανά δύο ή και των τριών προσδετών. Η περισσότερα υποσχόμενη συνεργιστική δράση, παρατηρήθηκε για τον συνδυασμό των TLR3 και TLR4 με την

ταυτόχρονη επίδραση της LieIF, καθώς οδήγησε σε ενισχυμένη έκφραση τόσο του δείκτη CD80 (68,27 έναντι 45,81) όσο και του CD86 (23,73 έναντι 17,97), συγκριτικά με την μονήρη επίδραση της LieIF ($p = 0,013$ και $0,037$, αντίστοιχα) (Εικ. 4.15). Η ενεργοποίηση των ΔΚ και με τους τρεις προσδέτες των TLRs σε συνδυασμό με την επίδραση της LieIF, οδήγησε επίσης σε αύξηση της έκφρασης των συνδιεγερτικών μορίων CD80 και CD86 ($p = 0,013$ και $0,037$, αντίστοιχα), συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου της μονήρους επίδρασης της LieIF. Παρόλα αυτά, η έκφραση των μορίων κυμάνθηκε σε παρόμοια επίπεδα με την αντίστοιχη έκφραση που προκλήθηκε από την συνέργεια των TLR3, TLR4 και LieIF (Εικ. 4.15).

Η συνδυαστική ενεργοποίηση των TLRs εκκινεί ταυτόχρονα διακριτά μονοπάτια μεταγωγής σήματος (π.χ. MyD88-εξαρτώμενου και μη-εξαρτώμενου μονοπατιού) με αποτέλεσμα την ενισχυμένη ενεργοποίηση των ΔΚ [143]. Συμπερασματικά, από τα παραπάνω αποτελέσματα διαφαίνεται μια πιθανή συνεργιστική δράση των TLR3, TLR4 και της LieIF. Παρόλα αυτά, απαιτείται περαιτέρω αξιολόγηση αυτής της δράσης τόσο σε επίπεδο ελέγχου της παραγωγής φλεγμονωδών κυτταροκινών και της έκφρασης RANTES χημειοκινών, καθώς και σε επίπεδο προσδιορισμού της ικανότητας αυτών των «υπερ-ενισχυμένων» ΔΚ, να επάγουν την ενεργοποίηση των $CD4^+$ και $CD8^+$ T κυττάρων.



Εικόνα 4.15. Επίδραση της συνδυαστικής ενεργοποίησης των TLRs και της ανασυνδυασμένης LieIF, στην φαινοτυπική διαφοροποίηση των ΔΚ. Τα ΔΚ επώαστηκαν με την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη LieIF (10 μg/ml) και τους προσδέτες των TLR3 (polyI:C, 10 μg/ml), TLR4 (LPS, 1 μg/ml) και TLR9 (CpG, 10 μg/ml), για 24 ώρες. Η έκφραση των συνδιεγερτικών μορίων CD80 και CD86, ελέγχθηκε με κυτταρομετρία ροής, κατόπιν χρήσης ειδικών μονοκλωνικών αντισωμάτων που έφεραν φθορίζουσες ουσίες.

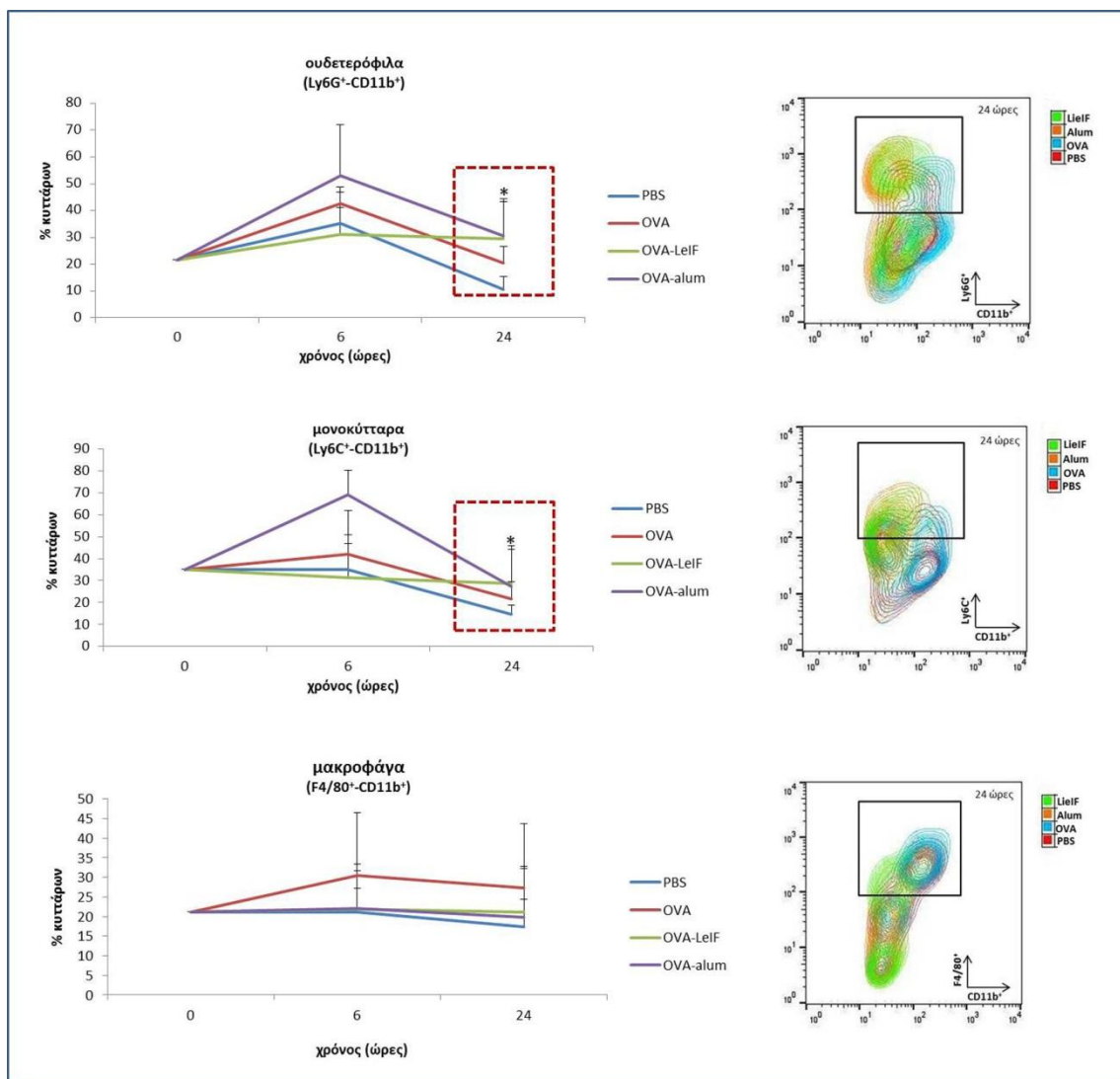
4.5 Αξιολόγηση της δράσης της ανασυνδυασμένης LieIF ως ανοσοενισχυτικό, σε *in vivo* πειραματικό μοντέλο ποντικού.

Όπως δείχνουν προηγούμενα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, η ανασυνδυασμένη LieIF έχει άμεση επίδραση στην ρύθμιση της παραγωγής κυτταροκινών και στην έκφραση των συνδιδεργετικών μορίων, από τα μυελοειδή δένδριτικά κύτταρα ποντικού. Αυτή η ικανότητα της ανασυνδυασμένης LieIF να επάγει *in vitro* κυτταροκίνες και συνδιδεργετικά μόρια στα κύρια αντιπαρουσιαστικά κύτταρα (ΔΚ), είναι αναντίρρητα η χαρακτηριστική δράση των ανοσοενισχυτικών.

Για την περαιτέρω διερεύνηση της ανοσοενισχυτικής δράσης της ανασυνδυασμένης LieIF ως ανοσοενισχυτικό, σχεδιάστηκε ένα *in vivo* σύστημα για τη διαλεύκανση του μηχανισμού δράσης της, αναπαράγοντας ένα πειραματικό πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία για το ευρέως χρησιμοποιούμενο ανοσοενισχυτικό στον άνθρωπο, που συνίσταται από άλατα του αλουμινίου (alum) [167]. Πιο συγκεκριμένα, η αξιολόγηση της ανοσοενισχυτικής δράσης της LieIF, βασίστηκε στην ανάλυση των κυτταρικών πληθυσμών που προσελκύονται στην περιοχή έγχυσης της LieIF σε συνδυασμό με ένα κλασσικό αντιγόνο, την αλβουμίνη του αυγού.

Συνοπτικά, σε ποντίκια της αιμομικτικής φυλής BALB/c, πραγματοποιήθηκε ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση 10 μ g της ανασυνδυασμένης LieIF σε συνδυασμό με ίση ποσότητα OVA, γαλακτοποιημένων σε αποστειρωμένο ρυθμιστικό διάλυμα PBS. Η θετική ομάδα ελέγχου αποτελούνταν από ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε το γνωστό ανοσοενισχυτικό alum (10 mg) σε συνδυασμό με την OVA. Η αρνητική ομάδα ελέγχου αποτελούνταν από ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε OVA (10 μ g/ποντίκι) χωρίς ανοσοενισχυτικό ενώ παράλληλα ο αρνητικός μάρτυρας αποτελούνταν από ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε μόνο αποστειρωμένο ρυθμιστικό διάλυμα PBS. Στα χρονικά σημεία των 2, 6 και 24 ωρών μετά την έγχυση, συλλέχθηκαν τα κύτταρα της περιτοναϊκής κοιλότητας και προσδιορίστηκαν οι ακόλουθες παράμετροι: η προσέλκυση των κυττάρων της έμφυτης ανοσίας που στρατολογήθηκαν στην περιτοναϊκή κοιλότητα της μετά την έγχυση, η παραγωγή ουρικού οξέος στο περιτοναϊκό έκπλυμα και η έκφραση των IL-1 β και NF- κ B2.

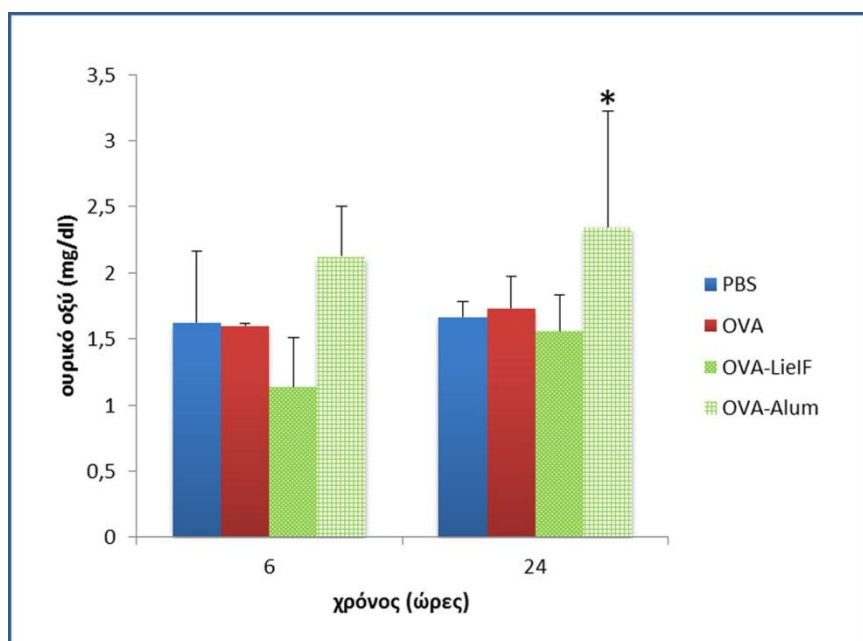
Η ενδοπεριτοναϊκή έγχυση των OVA-LieIF, οδήγησε σε σημαντική προσέλκυση των ουδετερόφιλων (Ly6G⁺CD11b⁺) ($p = 0,028$) και των μονοκυττάρων (Ly6C⁺CD11b⁺) ($p = 0,012$) στην περιτοναϊκή κοιλότητα, συγκριτικά με την αρνητική ομάδα ελέγχου (Εικ. 4.16).



Εικόνα 4.16. Επαγόμενη από την ανασυνδυασμένη LieIF, εισροή κυττάρων της έμφυτης ανοσίας στην περιτοναϊκή κοιλότητα. Σε ποντίκια της φυλής BALB/c πραγματοποιήθηκε ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση LieIF (10 μg) σε συνδυασμό με ίση ποσότητα OVA. Η θετική ομάδα ελέγχου αποτελούνταν από ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε alum (10 mg) σε συνδυασμό με OVA. Η αρνητική ομάδα ελέγχου αποτελούνταν από ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε OVA, χωρίς ανοσοενισχυτικό. Ο απόλυτα αρνητικός μάρτυρας αποτελούνταν από ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε PBS. Στα χρονικά σημεία των 6 και 24 ωρών, συλλέχθηκαν τα κύτταρα της περιτοναϊκής κοιλότητας και προσδιορίστηκε το ποσοστό των κυττάρων που επιστρατεύθηκαν, με FACS.

Από τα παραπάνω δεδομένα, αποδεικνύεται πως η LieIF οδηγεί σε προσέλκυση των χαρακτηριστικών κυττάρων της φλεγμονώδους αντίδρασης όπως τα ουδετερόφιλα, τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα. Όπως φαίνεται στην Εικ. 4.16, η δράση της είναι ηπιότερη από την αντίστοιχη δράση του alum, καθώς δεν παρατηρήθηκε προσέλκυση των κυττάρων της έμφυτης ανοσίας στο χρονικό σημείο των 6 ωρών.

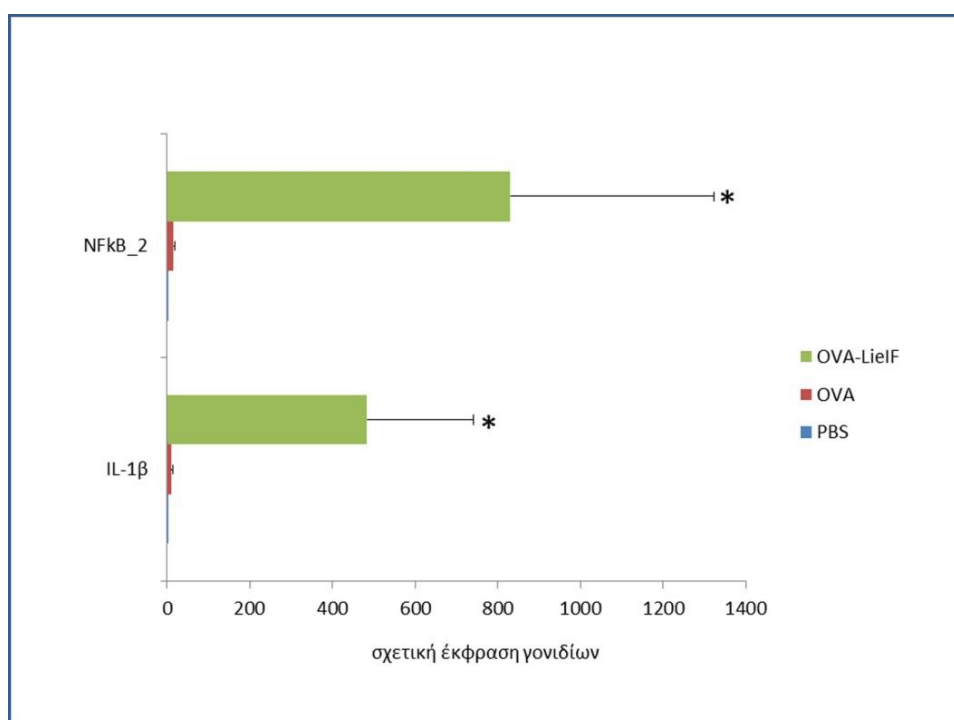
Έχει αποδειχθεί πως η δράση των αλάτων του αλουμινίου εξαρτάται από την παραγωγή του ουρικού οξέος, καθώς εξουδετέρωση αυτού δεν οδηγεί στην επιστράτευση των μονοκυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, το alum προκαλεί ισχυρή εισροή ουδετρόφιλων στο σημείο της έγχυσης που συνοδεύεται από την παραγωγή χημειοκινών και κυτταροκινών όπως η IL-1β και IL-18, μηχανισμός παρόμοιος με αυτόν του ουρικού οξέος [167]. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των επιπέδων του ουρικού οξέος στην περιτοναϊκή κοιλότητα, στα χρονικά σημεία των 6 και 24 ωρών μετά την έγχυση. Ένας πιθανός μηχανισμός προσέλκυσης φλεγμονωδών κυττάρων είναι η τοπική ιστική παραγωγή ουρικού οξέος που διαμεσολαβεί ως «σήμα κινδύνου» για την ενεργοποίηση της μεταναστευτικής ροής των κυττάρων της έμφυτης ανοσίας, που στην συνέχεια θα διαμορφώσει και το προφίλ της ειδικής ανοσίας. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η χορήγηση της LieIF δεν οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων του ουρικού οξέος, υποδηλώνοντας την επαγωγή ενός διαφορετικού μηχανισμού προσέλκυσης κυττάρων στην περιτοναϊκή κοιλότητα, συγκριτικά με το alum (Εικ. 4.17).



Εικόνα 4.17. Προσδιορισμός ουρικού οξέος στην περιτοναϊκή κοιλότητα. Σε ποντίκια της φυλής BALB/c πραγματοποιήθηκε ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση LieIF (10 μg) σε συνδυασμό με ίση ποσότητα OVA. Η θετική ομάδα ελέγχου αποτελούνταν από ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε alum (10 mg) σε συνδυασμό με OVA. Η αρνητική ομάδα ελέγχου αποτελούνταν από ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε OVA χωρίς ανοσοενισχυτικό. Ο απόλυτα αρνητικός μάρτυρας αποτελούνταν από ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε PBS. Στα χρονικά σημεία των 6 και 24 ωρών, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός του ουρικού οξέος της περιτοναϊκής κοιλότητας.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε έλεγχος των μεταγραφικών στοιχείων IL-1 β και NF- κ B2, με PCR πραγματικού χρόνου, στο χρονικό σημείο των 2 ωρών μετά την έγχυση. Η παραγωγή IL-1 β καταδεικνύει την πιθανή ενεργοποίηση του συμπλόκου υψηλού μοριακού βάρους (inflammasome) που ενεργοποιεί φλεγμονώδεις κασπάσες και κυτταροκίνες της IL-1 οικογένειας, το οποίο συναντάται στον μηχανισμό δράσης του alum [183]. Επιπλέον, η ενεργοποίηση του p52 πυρηνικού μεταγραφικού παράγοντα (NF- κ B2) σχετίζεται με την αντίσταση έναντι της λείσμανιάσης, καθώς διαγονιαδικά ποντίκια με ελλειμματικό το γονίδιο του p52 (p52 $^{-/-}$) εμφανίζουν δυσλειτουργία στην CD40 - διαμεσολαβούμενη παραγωγή της προστατευτικής IL-12 από μακροφάγα [184]. Η εξομάλυνση των αποτελεσμάτων έγινε με την αρνητική ομάδα ελέγχου.

Προσδιορίστηκε αύξηση της έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν τα μόρια IL-1 β και NF- κ B2 κατά 50 φορές στην ομάδα που χορηγήθηκε η OVA σε συνδυασμό με την Lief, συγκριτικά με την ομάδα στην οποία χορηγήθηκε η OVA μόνη της (Εικ. 4.18).



Εικόνα 4.18. Σχετική έκφραση γονιδίων IL-1 β και NF- κ B2 σε κύτταρα της περιτοναϊκής κοιλότητας. Σε ποντίκια της φυλής BALB/c πραγματοποιήθηκε ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση Lief (10 μ g) σε συνδυασμό με ίση ποσότητα OVA. Η θετική ομάδα ελέγχου αποτελούνταν από ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε alum (10 mg) σε συνδυασμό με OVA. Η αρνητική ομάδα ελέγχου αποτελούνταν από ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε OVA χωρίς ανοσοενισχυτικό. Ο απόλυτος αρνητικός μάρτυρας αποτελούνταν από ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε PBS. Στο χρονικό σημείο των 2 ωρών μετά την έγχυση, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της σχετικής έκφρασης των γονιδίων IL-1 β και NF- κ B2, με PCR πραγματικού χρόνου.

Αυτή η δυναμική ενίσχυση της ειδικής ανοσολογικής απόκρισης στο αντιγόνο OVA από την LieIF εδραιώνει την βιολογική δράση της ως ανοσοενισχυτικό σε ένα πρώτο *in vivo* σύστημα.

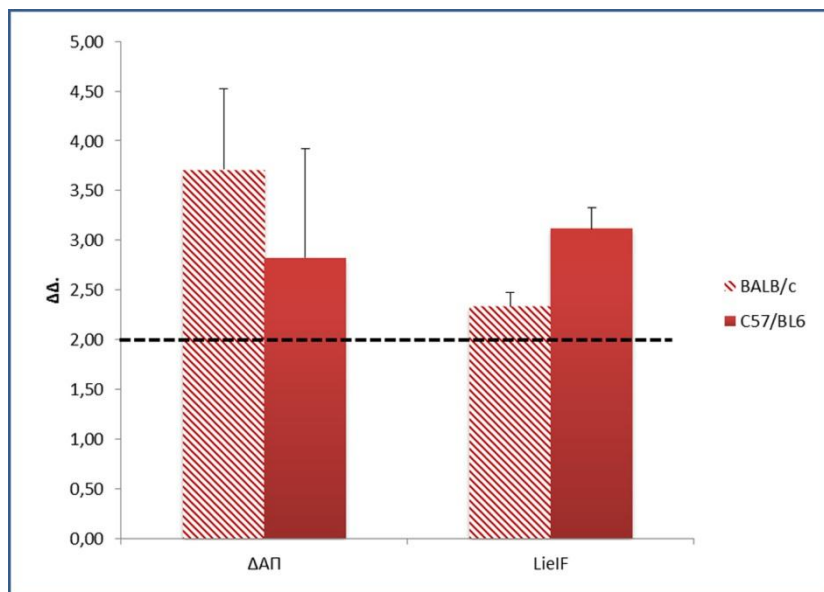
4.6 Αντιγονική χαρτογράφηση της LieIF και προσδιορισμός των ενεργών ανοσογονικών περιοχών της.

4.6.1 Προσδιορισμός T αντιγονικών επιτόπων στην ανασυνδυασμένη LieIF.

Η δοκιμασία του *in vitro* πολλαπλασιασμού των λεμφοκυττάρων, χρησιμοποιείται ως ένα υποκατάστατο της *in vivo* αντίδρασης καθυστερημένης υπερευαισθησίας, προκειμένου να αξιολογηθεί ο χαρακτήρας της κυτταρομεσολαβούμενης απόκρισης. Τα λεμφοκύτταρα υπόκεινται σε κλωνικό πολλαπλασιασμό κατόπιν *in vitro* ευαισθητοποίησής τους από κάποιο αντιγόνο. Στην παρούσα μελέτη, η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να αξιολογηθεί η ύπαρξη πιθανών T αντιγονικών επιτόπων στην ανασυνδυασμένη LieIF.

Πιο συγκεκριμένα, ελέγχθηκε η *in vitro* πολλαπλασιαστική ικανότητα ειδικών T λεμφοκυττάρων στους σπλήνες μολυσμένων με *L. major* – BALB/c και C57BL/6 ποντικών, τόσο έναντι του διαλυτού αντιγόνου του παρασίτου (ΔΑΠ) όσο και έναντι της ανασυνδυασμένης LieIF, στο χρονικό σημείο του ενός μήνα μετά την μόλυνση. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως δείκτης διέγερσης (ΔΔ). ΔΔ μεγαλύτερος του 2, υποδηλώνει θετική λεμφοβλαστική απόκριση.

Παρατηρήθηκε θετική απόκριση έναντι της ανασυνδυασμένης LieIF, τόσο στα ευαίσθητα BALB/c ποντίκια (SI = 2,34) που υποκύπτουν στην νόσο γιατί είναι ανάκανα να παράγουν μηχανισμούς περιορισμού της εξάπλωσης του παρασίτου, όσο και στα ανθεκτικά C57BL/6 (SI = 3,12) που είναι ικανά να επάγουν κυτταρικούς μηχανισμούς αναχαίτισης του πολλαπλασιασμού των ενδοκυττάρων αμαστιγωτών μορφών του παρασίτου και επούλωσης των ιστικών βλαβών (Εικ. 4.19).



Εικόνα 4.19. Λεμφοβλαστική ικανότητα σπληνοκυττάρων κατόπιν *in vitro* διέγερσης με την ανασυνδυασμένη LieIF. Σπληνοκύτταρα από *L. major*-μολυσμένα BALB/c και C57BL/6 ποντίκια, διεγέρθηκαν *in vitro* με την ανασυνδυασμένη LieIF (10 μg/ml), για 96 ώρες. Τις τελευταίες 18 ώρες, πραγματοποιήθηκε προσθήκη τριτιωμένης θυμιδίνης (2 μCi/ml) και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $\Delta\Delta = \text{M.O.cpm}_{\text{δείγματος}} / \text{M.O.cpm}_{\text{αυθόρμητου πολλαπλασιασμού}}$.

Τα παραπάνω αποτελέσματα δεικνύουν την ύπαρξη T αντιγονονικών επιτόπων στο μόριο της LieIF που αναγνωρίζονται τόσο από τα βοηθητικά CD4⁺ όσο και από τα κυτταροτοξικά CD8⁺ κύτταρα των BALB/c ή/και των C57BL/6 ποντικών.

4.6.2 *In silico* ανάλυση του ευκαρυωτικού παράγοντα έναρξης (LieIF) του παρασίτου *Leishmania spp.*

Η LieIF αποτελεί μια πρωτεΐνη μεγέθους 403 αμινοξέων, η οποία σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα και την διεθνή βιβλιογραφία, παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως πιθανό εργαλείο εμβολιασμού ή/και ανοσοθεραπείας στην προσπάθεια ανάπτυξης προστατευτικών ή θεραπευτικών παρεμβάσεων έναντι της λεισμανίασης, καθώς ρυθμίζει την παραγωγή της προστατευτικής IL-12 από μακροφάγα και μονοκύτταρα περιφερικού αίματος τόσο ασθενών όσο και υγιών εθελοντών. Επίσης, προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η ικανότητά της αυτή φαίνεται να εντοπίζεται στην αμινοτελική της περιοχή (1-226 αα) [77, 185].

Στόχος της μελέτης είναι η *in silico* ανάλυση της πρωτεΐνης προκειμένου να προσδιοριστούν τα ελάχιστα αντιγονικά τμήματά της που είναι ικανά να επάγουν την διαφοροποίηση και πόλωση ειδικών T κυτταρικών αποκρίσεων ικανών να εγκαταστήσουν κυτταρικούς μνημονικούς προστατευτικούς μηχανισμούς σε πρωτόκολλα εμβολιασμών ή να ενεργοποιήσουν μηχανισμούς εκκαθάρισης του παρασίτου σε πρωτόκολλα ανοσοθεραπείας.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε λήψη της πλήρους αλληλουχίας του ευκαρυωτικού παράγοντα έναρξης των στελεχών *L. infantum* (Lief), *L. major* (LmeIF) και *L. braziliensis* (LbeIF), από την βάση δεδομένων NCBI/protein (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>) (Πίν. 4.1).

Πίνακας 4.1. Ευκαρυωτικός παράγοντας έναρξης 4a (eIF 4a) του παρασίτου *Leishmania spp.*

Σύντμηση	Ονομασία	Αρ. Πρόσβασης
Lief	<i>Leishmania infantum</i> eukaryotic Initiation Factor 4a	CAM65230.1
LmeIF	<i>Leishmania major</i> eukaryotic Initiation Factor 4a	CBZ11883.1
LbeIF	<i>Leishmania braziliensis</i> eukaryotic Initiation Factor 4a	XP_001561513.1

Οι πρωτεΐνες Lief και LmeIF εμφανίζουν 100% ομολογία μεταξύ τους και 98% ομολογία με την LbeIF [185]. Η Lief εμφανίζει αντικαταστάσεις αμινοξέων στις θέσεις 2, 4, 6, 7, 125, 149 και 384, συγκριτικά με την LbeIF (Εικ. 4.20).

L. infantum 1 maqndkiapq dqdsflddqp gvrpipsfdd mplhqnlrg iysygfekps siqqraiaipf
L. braziliensis 1 msqqdrvapq dqdsflddqp gvrpipsfdd mplhqnlrg iysygfekps siqqraiaipf
L. major 1 maqndkiapq dqdsflddqp gvrpipsfdd mplhqnlrg iysygfekps siqqraiaipf

61 trggdiiqa qsgtgktgaf sigllqrlldf rhnliqglvl sptrelalqt aevsirigef
 61 trggdiiqa qsgtgktgaf sigllqrlldf rhnliqglvl sptrelalqt aevsirigef
 61 trggdiiqa qsgtgktgaf sigllqrlldf rhnliqglvl sptrelalqt aevsirigef

121 lsns~~sk~~fcet fvggtrvqdd lrklqagv~~iv~~ avgtprgrvsd vikrgalrte slrvlvidea
 121 lsnsakfcet fvggtrvqdd lrklqagvvv avgtprgrvsd vikrgalrte slrvlvidea
 121 lsnskfcet fvggtrvqdd lrklqagviv avgtprgrvsd vikrgalrte slrvlvidea

181 demlsqgfad qiyeif-196 rflp kdiqvalfsa tmpeevlelt kkfmrd-226 pvri lvkresltle
 181 demlsqgfad qiyeif-196 rflp kdiqvalfsa tmpeevlelt kkfmrd-226 pvri lvkresltle
 181 demlsqgfad qiyeif-196 rflp kdiqvalfsa tmpeevlelt kkfmrd-226 pvri lvkresltle

241 gikqffiave eehkldtlmd lyetvsiaqs vifantrkv dwiaeklnqs nhtvssmhae
 241 gikqffiave eehkldtlmd lyetvsiaqs vifantrkv dwiaeklnqs nhtvssmhae
 241 gikqffiave eehkldtlmd lyetvsiaqs vifantrkv dwiaeklnqs nhtvssmhae

301 mpksdrervm ntfrsgssrv lvttdlvarg idvhhvnivi nfdlptnken ylhrigrggr
 301 mpksdrervm ntfrsgssrv lvttdlvarg idvhhvnivi nfdlptnken ylhrigrggr
 301 mpksdrervm ntfrsgssrv lvttdlvarg idvhhvnivi nfdlptnken ylhrigrggr

361 ygrkgvainf vtekdvellh eiea~~hy~~htqi delpvdfaay lge
 361 ygrkgvainf vtekdvellh eieghyhtqi delpvdfaay lge
 361 ygrkgvainf vtekdvellh eieahyhtqi delpvdfaay lge

Εικόνα 4.20. Σύγκριση των αμινοξικών αλληλουχιών των πρωτεϊνών LieIF, LbeIF και LmeIF. Τα αμινοξέα που αναγράφονται με μπλε, αποτελούν τις θέσεις αντικατάστασης μεταξύ LieIF και LbeIF.

Στη συνέχεια, η αλληλουχία αναλύθηκε με το πρόγραμμα Signal IP, ώστε να διερευνηθεί η υποκυτταρική τοποθέτηση του πρωτεϊνικού μορίου και διαπιστώθηκε πως η LieIF δεν διαθέτει πεπτίδιο οδηγό και επομένως δεν χαρακτηρίζεται ως εκκρινόμενη.

Προκειμένου να επιτευχθεί ο σχεδιασμός των επιτόπων που πιθανά αναγνωρίζονται από μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης I και II (MHC I και MHC II), πραγματοποιήθηκε χαρτογράφηση της LieIF με αλγόριθμους πρόβλεψης αντιγονικότητας. Το ερευνητικό ενδιαφέρον επικεντρώθηκε σε τρεις φυλές ποντικών, στα BALB/c (γενετικά ευαίσθητη φυλή ως πειραματικό μοντέλο λεισμανίασης τρωκτικών) και στα C57BL/6 και CBA ποντίκια (γενετικά ανθεκτικές φυλές ως πειραματικό μοντέλο λεισμανίασης), τα MHC αλληλόμορφα των οποίων παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίν.4.2).

Πίνακας 4.2. MHC αλληλομόρφα που εκφράζονται σε αιμομικτικές φυλές ποντικών.

H-2 ΤΑΞΗΣ I				H-2 ΤΑΞΗΣ II			
Φυλή	Φαινότυπος	Απλότυπος	K	D	L	IA	IE
BALB/c	λευκό (albino)	d	Kd	Dd	Ld	IAd	IEd
C3H/He	agouti	k	Kk	Dk	-	IAk	IEk
C57BL/6	μαύρο (black)	b	Kb	Db	-	IAb	-
CBA	agouti	k	Kk	Dk	-	IAk	IEk

https://www.proimmune.com/ecommerce/page.php?page=MHC_alleles

Για τον προσδιορισμό T-κυτταρικών επιτόπων, οι οποίοι αναγνωρίζονται από τα MHC μόρια τάξης II του ποντικού επιλέχθηκαν οι αλγόριθμοι NetMHCII 2.2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCII>) και SYFPEITHI (<http://www.syfpeithi.de>). Η συμπληρωματικότητα των T-κυτταρικών επιτόπων ελέγχθηκε έναντι 4 αλληλομόρφων των MHC μορίων τάξης II (H2-IA^d, H2-IA^b, H2-A^k, H2-IE^k). Από τον έλεγχο προέκυψαν 61 15-μερή πεπτίδια. Από αυτά, το 44,26% (27 πεπτίδια) υπεδείχθη από τον αλγόριθμο NetMHCII και το 63,93% (39 πεπτίδια) από τον αλγόριθμο SYFPEITHI (Πίν. 4.3). Το όριο του βαθμού αντιγονικότητας (cut-off score) ορίστηκε ≥ 20 για τον αλγόριθμο SYFPEITHI και < 500 για τον αλγόριθμο NetMHCII.

Πίνακας 4.3. *In silico* προβλεπόμενοι επίτοποι της LeIF, που δύνανται να συνδεθούν με μόρια MHC τάξης II.

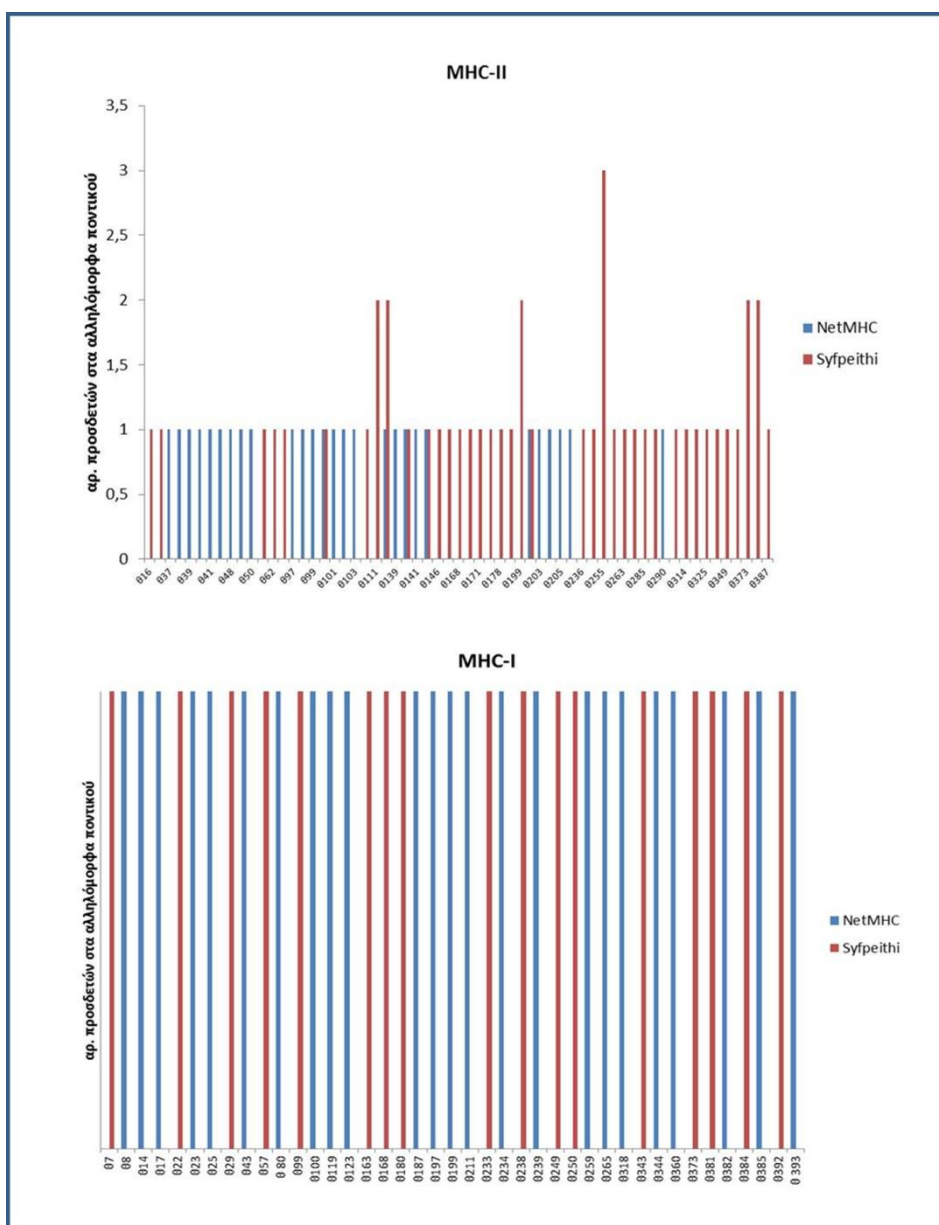
15-μερή			SYFPEITHI H2-IA ^d	SYFPEITHI H2-IA ^k	SYFPEITHI H2-IE ^k	NetMHCII H2-IA ^d	NetMHCII H2-IA ^b
α/α	πρωτεΐνη	Πεπτιδιο/θέση	Τιμές πρόβλεψης (score)				
1	LeIF	178		32			
2	LeIF	100	28			264,2 (WB)	
3	LeIF	320	28				
4	LeIF	199	27	24			
5	LeIF	387	27				
6	LeIF	138	26		20	205,3 (WB)	
7	LeIF	166	26				
8	LeIF	169	26				
9	LeIF	62	25				
10	LeIF	140	24			256,8 (WB)	
11	LeIF	142	24			296,7 (WB)	
12	LeIF	259	24				
13	LeIF	27		24			
14	LeIF	146			24		
15	LeIF	243			24		
16	LeIF	349			24		
17	LeIF	325	23				
18	LeIF	168	22				
19	LeIF	263	22				
20	LeIF	293	22				
21	LeIF	314	22				
22	LeIF	61		22			
23	LeIF	285		22			
24	LeIF	111		22	20		
25	LeIF	255	20	22	20		
26	LeIF	373		22	20		
27	LeIF	16	20				
28	LeIF	71	20				
29	LeIF	107	20				
30	LeIF	174	20				
31	LeIF	171			20		
32	LeIF	190			20		
33	LeIF	202			20		240,4 (WB)
34	LeIF	236			20		
35	LeIF	277			20		
36	LeIF	333			20		
37	LeIF	365			20		
38	LeIF	376	20		20		
39	LeIF	288		20			
40	LeIF	37					417,9 (WB)
41	LeIF	38					209,8 (WB)
42	LeIF	39					170,5 (WB)
43	LeIF	40					149,2 (WB)
44	LeIF	41					139,3 (WB)
45	LeIF	42					208,8 (WB)
46	LeIF	203					176,9 (WB)
47	LeIF	204					158,6 (WB)
48	LeIF	205					152,8 (WB)
49	LeIF	206					265,2 (WB)
50	LeIF	48				378,0 (WB)	
51	LeIF	49				320,9 (WB)	
52	LeIF	50				434,6 (WB)	
53	LeIF	97				452,0 (WB)	
54	LeIF	98				287,6 (WB)	
55	LeIF	99				263,1 (WB)	
56	LeIF	101				163,8 (WB)	
57	LeIF	102				95,3 (WB)	
58	LeIF	103				95,4 (WB)	
59	LeIF	139				249,0 (WB)	
60	LeIF	141				256,8 (WB)	
61	LeIF	290				489,1 (WB)	

Αντίστοιχα, για τον προσδιορισμό T-κυτταρικών επιτόπων που αναγνωρίζονται από τα MHC μόρια τάξης I του ποντικού επιλέχθηκαν οι αλγόριθμοι NetMHC 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC-3.0/>) και SYFPEITHI (<http://www.syfpeithi.de>). Η συμπληρωματικότητα των T-κυτταρικών επιτόπων ελέγχθηκε έναντι 6 υπερτύπων των MHC μορίων τάξης I του ποντικού (H2-K^d, H2-K^b, H2-L^d, H2-D^b, H2-D^d, H2-K^k). Από τον έλεγχο προέκυψαν 41 9-μερή πεπτίδια. Από αυτά, το 58,54% (24 πεπτίδια) υπεδείχθη από τον αλγόριθμο NetMHC και το 41,46% (17 πεπτίδια) από τον αλγόριθμο SYFPEITHI (Πίν. 4.4). Το όριο του βαθμού αντιγονικότητας (cut-off score) ορίστηκε ≥ 20 για τον αλγόριθμο SYFPEITHI και < 500 για τον αλγόριθμο NetMHC.

Πίνακας 4.4. *In silico* προβλεπόμενοι επίτοποι της Lief, που δύνανται να συνδεθούν με μόρια MHC τάξης I.

			SYFPEITHI	SYFPEITHI	SYFPEITHI	SYFPEITHI	NetMHC	NetMHC	NetMHC	NetMHC	NetMHC	NetMHC
			H2-Ld	H2-Kd	H2-Db	H2-Kk	H2-Kd	H2-Dd	H2-Ld	H2-Kb	H2-Db	H2-Kk
9-μερή			Τιμές πρόβλεψης (score)									
α.α	πρωτεΐνη	Πεπτίδιο/ θέση										
1	Lief	43		26								
2	Lief	385		24								
3	Lief	360		23								
4	Lief	17				23						
5	Lief	239				22						
6	Lief	8	22									
7	Lief	25	22									
8	Lief	199	22									
9	Lief	344	22									
10	Lief	393	22									
11	Lief	100	21									
12	Lief	14		21								
13	Lief	197		21								
14	Lief	234				21						
15	Lief	382				21						
16	Lief	23	20									
17	Lief	123	20									
18	Lief	265	20									
19	Lief	187		20								
20	Lief	318		20								
21	Lief	259				20						
22	Lief	80			20							
23	Lief	119			20							
24	Lief	211			20							
25	Lief	384					132,0 (WB)					
26	Lief	7							125,0 (WB)			
27	Lief	22							51,0 (WB)			
28	Lief	57							164,0 (WB)			
29	Lief	343							160,0 (WB)			
30	Lief	392							227,0 (WB)			
31	Lief	163								241,0 (WB)		
32	Lief	29								318,0 (WB)		
33	Lief	99								423,0 (WB)		
34	Lief	381										6,0 (SB)
35	Lief	238										11,0 (SB)
36	Lief	233										21,0 (SB)
37	Lief	373										88,0 (WB)
38	Lief	250										104,0 (WB)
39	Lief	168										189,0 (WB)
40	Lief	249										300,0 (WB)
41	Lief	180										333,0 (WB)

Τα προβλεπόμενα 9-μερή πεπτίδια επέδειξαν δυνατότητα σύνδεσης με τα μόρια H2-L^d, H2-K^d, H2-K^k, H2-D^b και H2-K^b, ενώ τα 15-μερή πεπτίδια επέδειξαν δυνατότητα σύνδεσης με τα μόρια H2-IA^d, H2-IA^k, H2-IE^k και H2-IA^b. Από το σύνολο των προβλεπόμενων επιτόπων, ελάχιστοι από αυτούς προβλέφθηκαν από το σύνολο των χρησιμοποιούμενων αλγορίθμων, με δυνατότητα πρόσδεσης σε περισσότερα του ενός αλληλόμορφα (Εικ. 4.21).



Εικόνα 4.21. Σχηματική απεικόνιση των 15-μερών και 9-μερών πεπτιδίων της LieIF.

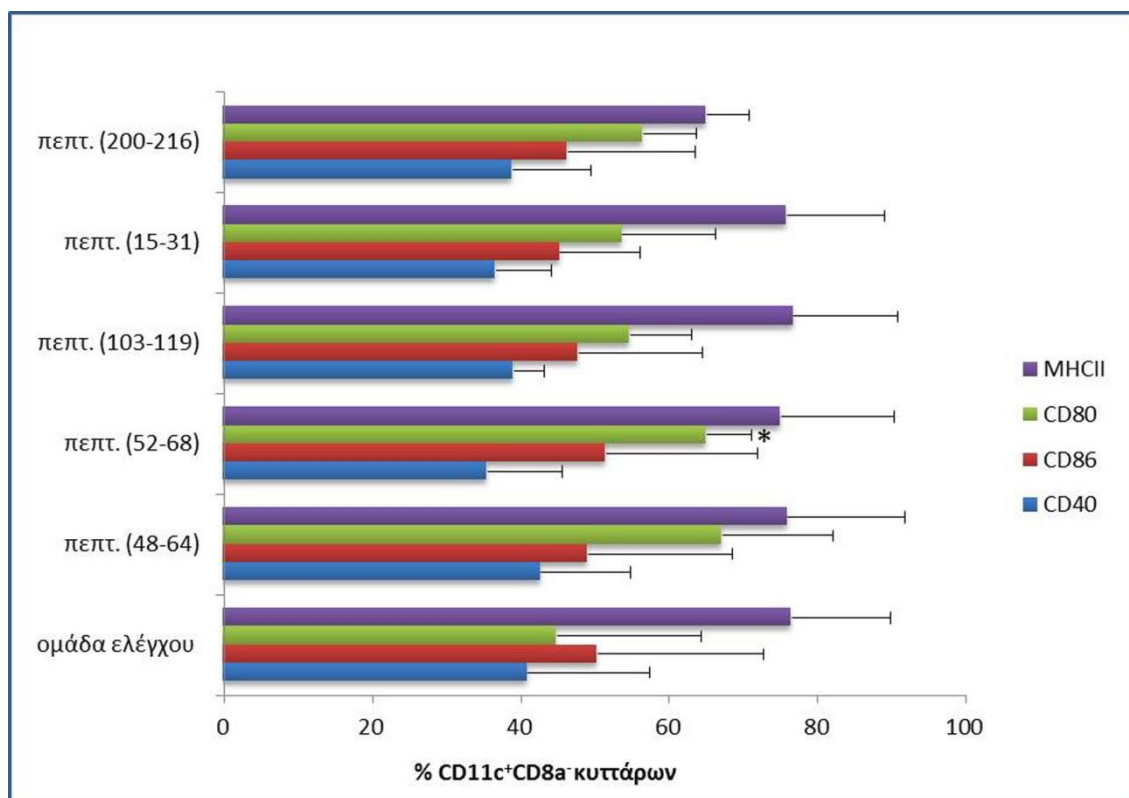
Από το σύνολο των 15-μερών και 9-μερών πεπτιδίων της LieIF που υπεδείχθησαν από τους αλγόριθμους, επιλέχθηκαν, τελικά, πέντε πολυπεπίδια μεγέθους 16 - 18 αμινοξέων που ικανοποιούσαν τα παρακάτω κριτήρια: ανήκαν στην αμινοτελική περιοχή της πρωτεΐνης (1-226 αα), καθώς βιβλιογραφικά δεδομένα [185] υποστηρίζουν πως το τμήμα της πρωτεΐνης στο οποίο εντοπίζονται οι περιοχές που επάγουν την παραγωγή IL12/IFN- γ βρίσκονται στο τμήμα αυτό, παρουσίαζαν υψηλά σκορ πρόσδεσης στους αλγόριθμους πρόσδεσης και περιείχαν τόσο 9-μερείς όσο και 15-μερείς επιτόπους (Πίν. 4.5).

Πίνακας 4.5. Συνθετικά πεπτίδια της LieIF.			
πρωτεΐνη	πεπτίδιο	9-μερή	15-μερή
LieIF	LieIF_1 48-KPSSIQQRAIAPFTRGG-64	57-IAPFTRGGD-65	48-KPSSIQQRAIAPFTR-62 49-PSSIQQRAIAPFTRG-63 50-SSIQQRAIAPFTRGG-64
	LieIF_2 52-IQQRRAIAPFTRGGDI-68	57-IAPFTRGGD-65	
	LieIF_3 103-TRELALQTAEVISRI-119	100-LSPTRELAL-108	103-TRELALQTAEVISRI-117
	LieIF_4 15-FLDDQPGVRPIPSFDDM-31	17-DDQPGVRPI-25 22-VRPIPSFDD-30 23-RPIPSFDDM-31	16-LDDQPGVRPIPSFDD-30
	LieIF_5 200-PKDIQVALFSATMP-216	199-LPKDIQVAL-207	202-DIQVALFSATMP-216 199-LPKDIQVALFSATMP-213

4.6.3 Μελέτη ανοσογονικών ιδιοτήτων των συνθετικών πεπτιδίων της LieIF.

Πραγματοποιήθηκε εκτίμηση της ικανότητας των συνθετικών πεπτιδίων της LieIF, μεγέθους 16 - 18 αα, να επάγουν την φαινοτυπική και λειτουργική διαφοροποίηση των ΔΚ. Για την επίτευξη αυτού του σκοπού, ελέγχθηκε η ωρίμανση των κυττάρων και η παραγωγή κυτταροκινών ικανών να επάγουν την πόλωση της προστατευτικής Th1 απόκρισης, μέσω κυτταρομετρίας ροής.

Τα πεπτίδια που προέκυψαν από την *in silico* ανάλυση της LieIF, επώαστηκαν με τα ΔΚ, σε συγκέντρωση 10 $\mu\text{g/ml}$. Κατόπιν 24ώρης επώασης, τα ΔΚ σημάνθηκαν με ειδικά φθορίζοντα μονοκλωνικά αντισώματα έναντι των συνδιεγερτικών μορίων και των μορίων MHC τάξης II.

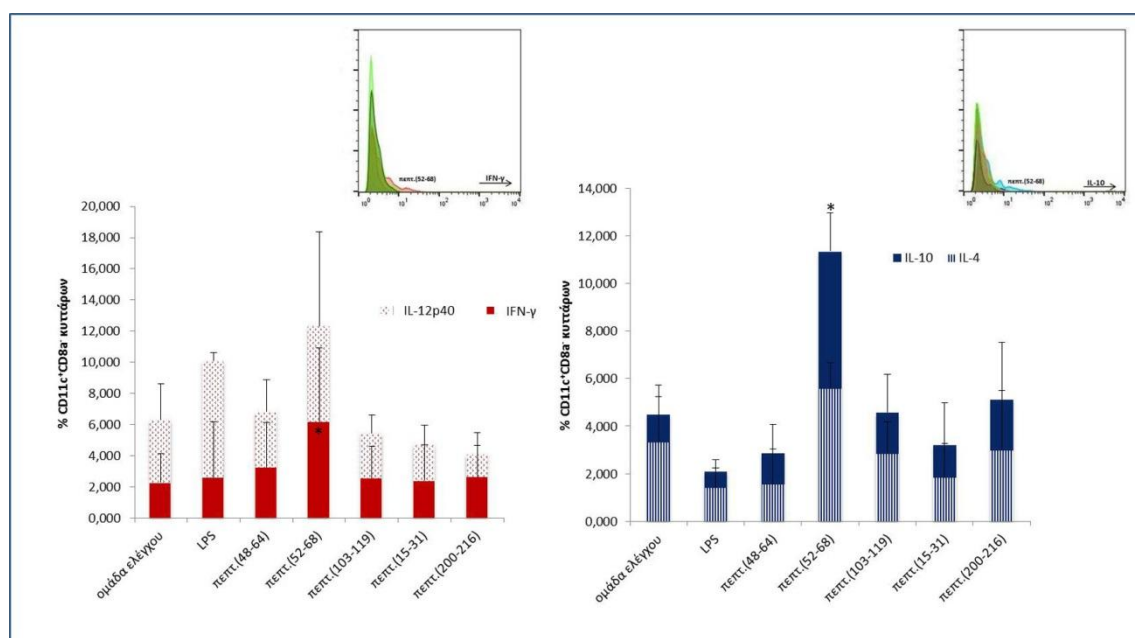


Εικόνα 4.22. *In vitro* επίδραση των συνθετικών πεπτιδίων της LielF στην ωρίμανση των ΔΚ. Τα ΔΚ επωάστηκαν με τα συνθετικά πεπτίδια της πρωτεΐνης LielF (10 μg/ml) για 24 ώρες. Η έκφραση των συνδιεγερτικών μορίων CD40, CD86 και CD80, καθώς και των μορίων MHC τάξης II, ελέγχθηκε με κυτταρομετρία ροής, κατόπιν χρήσης ειδικών μονοκλωνικών αντισωμάτων που έφεραν φθορίζουσες ουσίες. Τα ΔΚ της ομάδας ελέγχου επωάστηκαν μόνο με την επίδραση του καλλιεργητικού υλικού.

Τα συνθετικά πεπτίδια, στην πλειοψηφία τους, επάγουν μια μέτρια αύξηση της έκφρασης του δείκτη CD80. Αξιοσημείωτη εξαίρεση αποτελεί το πεπτίδιο 52-68, η επίδραση του οποίου οδήγησε σε σημαντική αύξηση του αριθμού των μυελοειδών ΔΚ που εκφράζουν τον επιφανειακό CD80 (Εικ. 4.22). Μελέτες σε πειραματικό μοντέλο αλλεργικής εγκεφαλομυελίτιδας, αναφέρουν πως η εξουδετέρωση του CD80, με το κατάλληλο αντίσωμα, επάγει την ανάπτυξη Th2 ανοσοαπόκρισης ενώ η αντίστοιχη εξουδετέρωση του CD86, επάγει Th1 ανοσοαπόκριση [186].

Στη συνέχεια, προσδιορίστηκε η επίδραση των συνθετικών πεπτιδίων στην παραγωγή κυτταροκινών. Πραγματοποιήθηκε η κυτταροπλασματική εντόπιση κυτταροκινών, το προφίλ των οποίων είναι «η υπογραφή» της λειτουργικής πόλωσης των ειδικών T-κυττάρων που ενορχηστρώνουν είτε την προστατευτική απόκριση τύπου Th1 (IL-12, IFN-γ), είτε την απόκριση τύπου Th2 (IL-4, IL-10) που ευθύνεται για την επιδείνωση της νόσου.

Παρατηρήθηκε πως η πλειοψηφία των συνθετικών πεπτιδίων (4 από το σύνολο των 5 πεπτιδίων), δεν επάγουν σημαντική παραγωγή της βιοενεργής IL-12, γεγονός αναμενόμενο δεδομένου πως η επίδραση των πεπτιδίων αυτών δεν οδήγησε σε ωρίμανση των κυττάρων. Όμως, η επίδραση του πεπτιδίου 52-68, είχε ως αποτέλεσμα, την σημαντική αύξηση της παραγωγής IFN- γ από τα ΔΚ ($p = 0,037$) (Εικ. 4.23). Επιπλέον, παρατηρήθηκε πως τα ανώριμα ΔΚ παράγααν χαμηλά αλλά ανιχνεύσιμα επίπεδα της κατασταλτικής IL-10, δεδομένα που συμφωνούν με την διεθνή βιβλιογραφία [187]. Το ενδιαφέρον επικεντρώθηκε στο πεπτίδιο 52-68, η επίδραση του οποίου οδήγησε και σε σημαντική παραγωγή της IL-10. Η αύξηση αυτή, μπορεί εν μέρει να αποδοθεί στην αυτοκρινή δράση της αυθόρμητης παραγωγής της κυτταροκίνης (Εικ. 4.23).



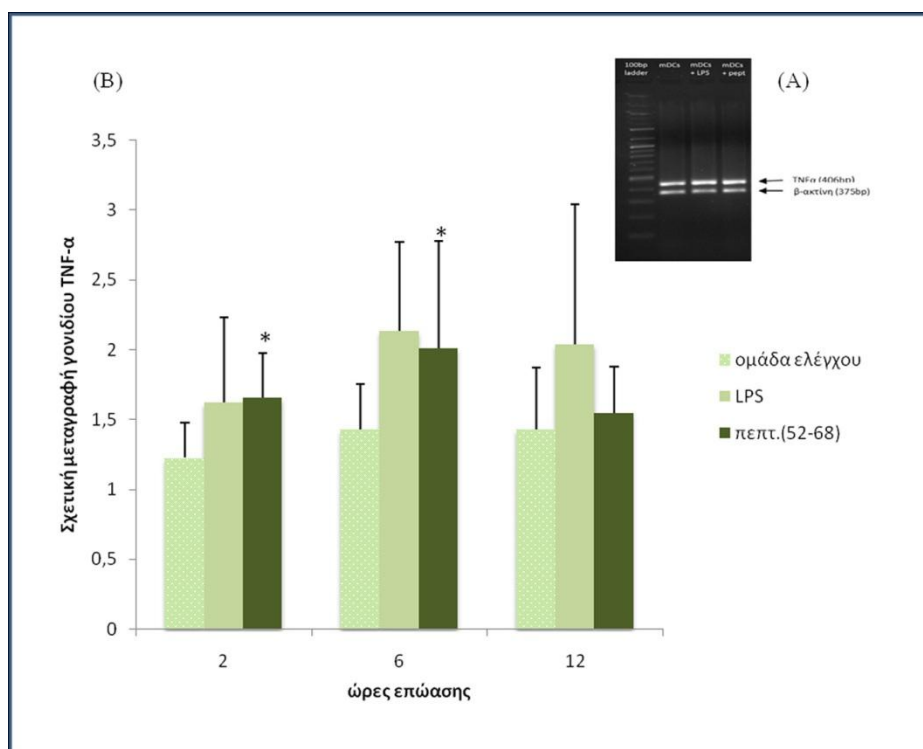
Εικόνα 4.23. *In vitro* επίδραση των συνθετικών πεπτιδίων της LieIF στην παραγωγή κυτταροκινών από ΔΚ.

Τα ΔΚ επώαστηκαν με τα συνθετικά πεπτιδία της πρωτεΐνης LieIF (10 $\mu\text{g/ml}$) για 24 ώρες. Η παραγωγή κυτταροκινών, ελέγχθηκε με κυτταρομετρία ροής, κατόπιν χρήσης ειδικών μονοκλωνικών αντισωμάτων που έφεραν φθορίζουσες ουσίες. Τα ΔΚ της θετικής ομάδας ελέγχου επώαστηκαν με LPS (1 $\mu\text{g/ml}$), ενώ τα ΔΚ της αρνητικής ομάδας ελέγχου καλλιεργήθηκαν μόνο με την επίδραση του καλλιεργητικού υλικού.

Το πεπτίδιο 52-68, για το οποίο υπήρξαν ενδείξεις λειτουργικής διαφοροποίησης των ΔΚ, ελέγχθηκε περαιτέρω. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των mRNA μεταγράφων για τις κυτταροκίνες IL-12p40, IFN- γ , IL-4 και TNF- α , στα χρονικά σημεία των 2, 6 και 12 ωρών επώασης. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο

της β-ακτίνης και η εξαγωγή ποσοτικών συμπερασμάτων έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος Image Quant IQ 5.2.

Παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης του TNF- α , στα χρονικά σημεία των 2 και 6 ωρών ($p = 0,011$ και $0,035$, αντίστοιχα) (Εικ. 4.24). Αντιθέτως, προσδιορίστηκε έκφραση του γονιδίου της IL-12p40, χωρίς ωστόσο να παρατηρηθεί σημαντική αύξηση σε σύγκριση με την αρνητική ομάδα ελέγχου. Στα παραπάνω χρονικά διαστήματα, δεν προσδιορίστηκαν mRNA μεταγράφα για τις IL-4 και IFN- γ (τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται).



Εικόνα 4.24. *In vitro* επίδραση του συνθετικού πεπτιδίου 52-68 στην παραγωγή TNF- α από ΔΚ. Τα ΔΚ επώαστηκαν με το συνθετικό πεπτίδιο 52-68 (10 μ g/ml) για 2, 6 και 12 ώρες. Ο προσδιορισμός mRNA μεταγράφων για τον TNF- α , πραγματοποιήθηκε με συμβατική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της β-ακτίνης. (Α) Αντιπροσωπευτική εικόνα της PCR για τον TNF- α . Ο δείκτης πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους αναγράφεται στα αριστερά. (Β) Σχετική μεταγραφή γονιδίου TNF- α . Η εξαγωγή ποσοτικών συμπερασμάτων έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος Image Quant IQ 5.2.

Συνοψίζοντας, τα συνθετικά πεπτίδια που ανήκουν στην αμινοτελική περιοχή (1-226) της LieIF, μεγέθους 16-18 αα, δεν αποτελούν ισχυρούς διεγέρτες των μυελοειδών ΔΚ. Ωστόσο, το πεπτίδιο 52-68, επάγει μια μέτρια ωρίμανση των ΔΚ, χωρίς ωστόσο την επακόλουθη ισχυρή παραγωγή της προστατευτικής IL-12 κυτταροκίνης. Η επίδραση

αυτή, έχει επίσης ως αποτέλεσμα την παραγωγή TNF- α και IFN- γ αλλά και της κατασταλτικής IL-10 (Εικ. 4.23, 4.24).

Σε παράλληλα πειράματα, εξετάστηκε η ανάπτυξη ειδικού λεμφοκυτταρικού πολλαπλασιασμού στους σπλήνες *L. major* - μολυσμένων ποντικών, έναντι των συνθετικών πεπτιδίων, σε εύρος συγκεντρώσεων 1-20 $\mu\text{g/ml}$. Δεν βρέθηκε θετική λεμφοβλαστική απόκριση για κανένα πεπτίδιο και για καμία από τις συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν (τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται).

4.6.4 Μελέτη ανοσοτροποποιητικών ιδιοτήτων των πρωτεϊνικών τμημάτων της LieIF.

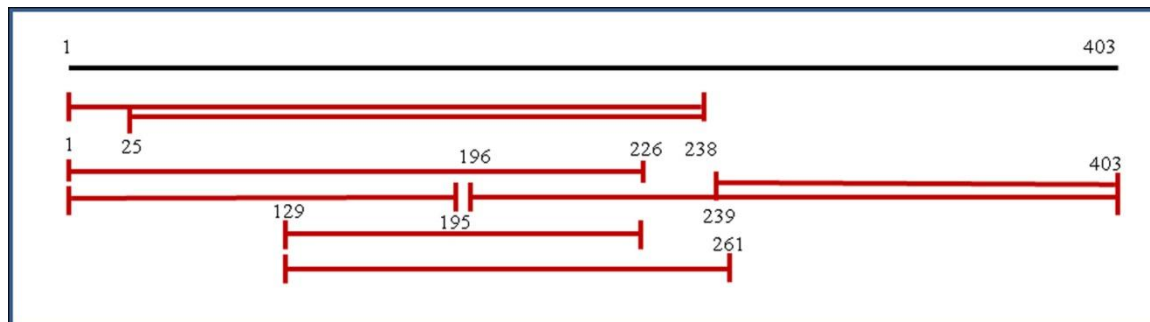
4.6.4.1 Αξιολόγηση της επίδρασης των πρωτεϊνικών τμημάτων στην λειτουργική διαφοροποίηση των μυελοειδών ΔΚ.

Η σύνθεση πεπτιδίων μεγέθους 16-18 αα, της αμινοτελικής περιοχής της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης LieIF, που προέκυψαν από την *in silico* ανάλυση, δεν οδήγησε στην πρόκριση ενός ισχυρού ανοσορυθμιστικού πεπτιδίου, ικανού να επάγει ισχυρή λειτουργική διαφοροποίηση των ΔΚ που προήλθαν από αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα του μυελού των οστών ποντικού.

Η LeIF αρχικά είχε χαρακτηριστεί ως κυτταροπλασματική πρωτεΐνη του παρασίτου, ικανή να επάγει την παραγωγή των προστατευτικών κυτταροκινών IL-12 και IFN- γ , σε ανθρώπινα μονοκύτταρα περιφερικού αίματος υγιών εθελοντών [73]. Επιπλέον, στην παρούσα μελέτη αποδείχθηκε πως η ανασυνδυασμένη LeIF του στελέχους *L. infantum*, επάγει την λειτουργική διαφοροποίηση των κύριων αντιγονοπροσραστικών κυττάρων (ΔΚ) και παρουσιάζει αντιλειτουργική δράση σε *in vitro* μοντέλο μολυσμένων μακροφάγων [169]. Συνεπώς, προκειμένου να προσδιοριστούν πιθανές ανοσογονικές περιοχές που θα μπορούσαν περαιτέρω να χρησιμοποιηθούν σε πρωτόκολλα προφυλακτικού εμβολιασμού ή ανοσοθεραπείας έναντι της νόσου, πραγματοποιήθηκε χαρτογράφηση της LieIF και κατασκευή αλληλοεπικαλυπτόμενων πρωτεϊνικών τμημάτων.

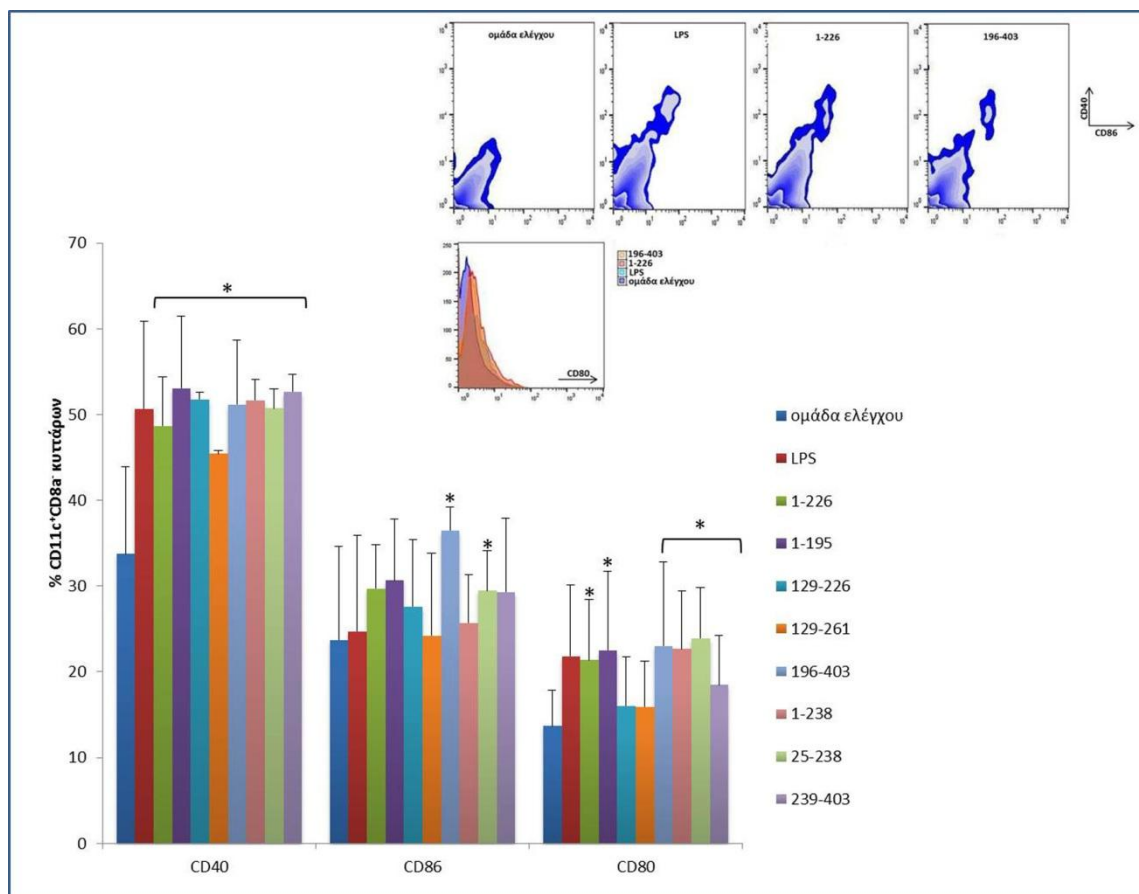
Οι ανασυνδυασμένοι κλώνοι σχεδιάστηκαν για να κωδικοποιούν τα τμήματα 1-226 (αμινοτελική περιοχή), 196-403 (καρβοξυτελική περιοχή), 1-195, 129-226, 129-261, 1-

238 (D1(+25)), 25-238 (D1) και 239-403 (D2) (Εικ. 4.25). Η πιθανή ποσότητα υπολειπόμενης ενδοτοξίνης ελέγχθηκε με δοκιμασία LAL.



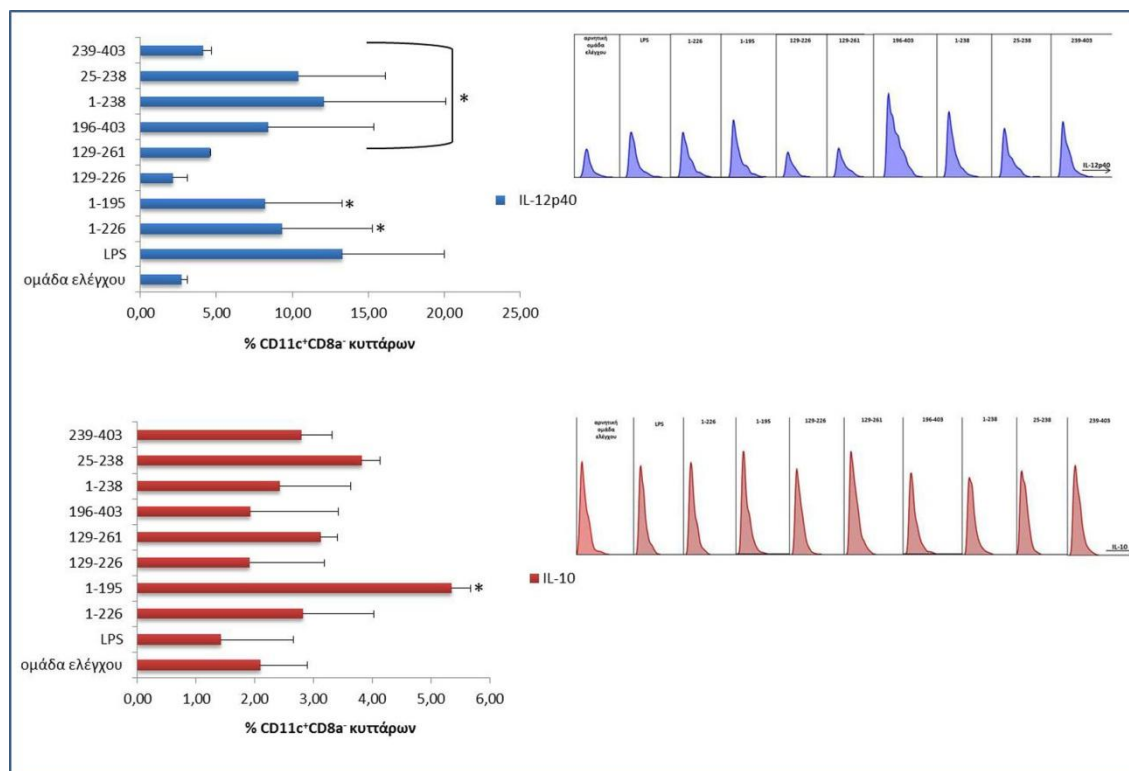
Εικόνα 4.25. Ανασυνδυασμένα αλληλοεπικαλυπτόμενα πολυπεπτίδια της LielF. Οι ανασυνδυασμένοι κλώνοι που κωδικοποιούν τα τμήματα 1-226 (αμινοτελική περιοχή), 196-403 (καρβοξυτελική περιοχή), 1-195, 129-226, και 129-261, σχεδιάστηκαν με βάση την πρωτοταγή δομή της πρωτεΐνης LielF. Οι ανασυνδυασμένοι κλώνοι 1-238 (D1(+25)), 25-238 (D1) και 239-403 (D2), σχεδιάστηκαν με βάση γνωστά τρισδιάστατα μοντέλα κρυσταλλικών δομών άλλων DEAD box πρωτεϊνών. Η πιθανή ποσότητα υπολειπόμενης ενδοτοξίνης, ελέγχθηκε με δοκιμασία LAL.

Τα πρωτεϊνικά τμήματα (10 μg/ml) επώαστηκαν με τα μυελοειδή ΔΚ για 24 ώρες και στην συνέχεια αξιολογήθηκαν για την ικανότητά τους να επάγουν την λειτουργική διαφοροποίηση των κυττάρων. Από τον έλεγχο αυτό, αρχικά, προέκυψε πως τα τμήματα αυτά επάγουν την ωρίμανση των ΔΚ. Πιο συγκεκριμένα, τα τμήματα 196-403 και 25-238, επάγουν την αύξηση της έκφρασης και των τριών συνδιεγερτικών μορίων CD40, CD86 και CD80, συγκριτικά με την αρνητική ομάδα ελέγχου (Εικ. 4.26). Τα τμήματα 1-226, 1-195 1-238 και 239-403, προκαλούν την έκφραση δύο συνδιεγερτικών μορίων, των CD40 και CD80, και τέλος, τα τμήματα της κεντρικής περιοχής, 129-226 και 129-261, προκαλούν την αύξηση της έκφρασης του δείκτη CD40. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της έκφρασης των μορίων MHC τάξης II, όπου σημειώθηκαν υψηλά ποσοστά έκφρασης (60 - 70%), χωρίς ωστόσο να υπάρχουν διαφορές μεταξύ των πρωτεϊνικών τμημάτων που δοκιμάστηκαν (τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται).



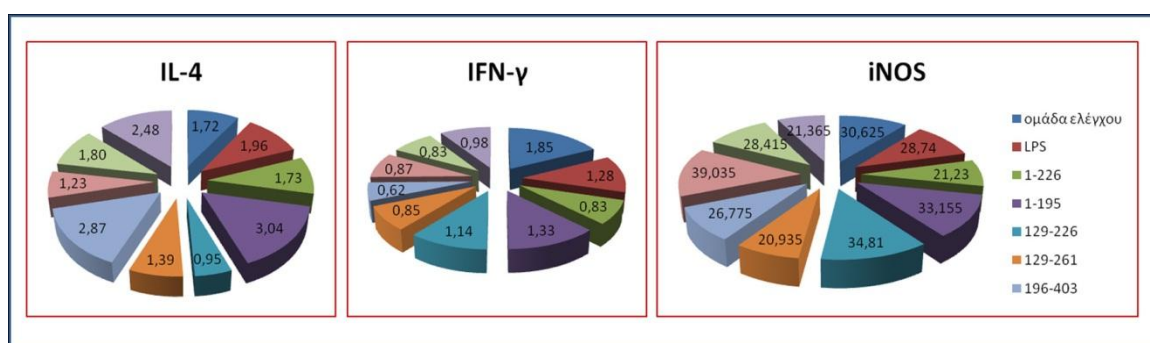
Εικόνα 4.26. *In vitro* επίδραση των πρωτεϊνικών τμημάτων της LielF στην ωρίμανση των ΔΚ. Τα ΔΚ επωάστηκαν με τα αλληλοεπικαλυπτόμενα τμήματα της πρωτεΐνης LielF (10 μg/ml) για 24 ώρες. Η έκφραση των συνδεδεγμένων μορίων CD40, CD86 και CD80, ελέγχθηκε με κυτταρομετρία ροής, κατόπιν χρήσης ειδικών μονοκλωνικών αντισωμάτων που έφεραν φοριζουσες ουσίες. Τα ΔΚ της αρνητικής ομάδας ελέγχου επωάστηκαν μόνο με την επίδραση του καλλιεργητικού υλικού, ενώ τα ΔΚ της θετικής ομάδας ελέγχου επωάστηκαν με το LPS (1 μg/ml).

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε η αξιολόγηση των παραγόμενων κυτταροκινών μέσω της ενδοκυττάριας ανίχνευσής τους, με την χρήση ειδικών μονοκλωνικών αντισωμάτων. Σημειώθηκε σημαντική παραγωγή της προστατευτικής IL-12 κυτταροκίνης, γεγονός που συνάδει με την επίτευξη της ωρίμανσης των ΔΚ. Πιο συγκεκριμένα, η επίδραση των τμημάτων 196-403 και 25-238 που είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση και των τριών επιφανειακών δεικτών, οδήγησε σε σημαντική αύξηση της παραγωγής IL-12p40 (8,42% και 10,37% αντίστοιχα, έναντι 2,67% της αρνητικής ομάδας ελέγχου). Τα υπόλοιπα τμήματα, που προκάλεσαν την αύξηση δύο ή λιγότερων επιφανειακών μορίων, οδήγησαν επίσης σε σημαντική παραγωγή της IL-12, με μοναδική εξαίρεση το τμήμα 129-226 (Εικ. 4.27).



Εικόνα 4.27. *In vitro* επίδραση της πρωτεϊνικών τμημάτων της LieIF στην παραγωγή IL-12p40 και IL-10 από ΔΚ. Τα ΔΚ επωάστηκαν με τα αλληλοεπικαλυπτόμενα τμήματα της πρωτεΐνης LieIF (10 μg/ml) για 24 ώρες. Τα ΔΚ της θετικής ομάδας ελέγχου, επωάστηκαν με το LPS (1 μg/ml), ενώ τα ΔΚ της αρνητικής ομάδας ελέγχου, καλλιεργήθηκαν μόνο με την επίδραση του καλλιεργητικού υλικού. Η παραγωγή των κυτταροκινών ελέγχθηκε με κυτταρομετρία ροής, κατόπιν χρήσης ειδικών μονοκλωνικών αντισώματων που έφεραν φθορίζουσες ουσίες.

Παράλληλα, ανιχνεύτηκε σε μικρότερα ποσοστά η κατασταλτική IL-10 κυτταροκίνη, σε όλες τις ομάδες, που φαίνεται όμως πως δεν ήταν αρκετή για να παρεμποδίσει την παραγωγή της IL-12. Εξαιρεση αποτελεί το τμήμα 1-195, η επίδραση του οποίου οδήγησε σε σημαντική αύξηση της παραγωγής της IL-10 (5,35% έναντι 2% της αρνητικής ομάδας ελέγχου) (Εικ. 4.27). Επιπλέον, ελέγχθηκαν τα ποσοστά έκφρασης των IL-4, IFN-γ και iNOS, για τα οποία δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές σε σχέση με τα μη ευαισθητοποιημένα ΔΚ (Εικ. 4.28).



Εικόνα 4.28. *In vitro* επίδραση των πρωτεϊνικών τμημάτων της LieIF στην παραγωγή IL-4, IFN- γ και iNOS, από ΔΚ. Τα ΔΚ επωάστηκαν με τα αλληλοεπικαλυπτόμενα τμήματα της πρωτεΐνης LieIF (10 $\mu\text{g/ml}$) για 24 ώρες. Τα ΔΚ της θετικής ομάδας ελέγχου, επωάστηκαν με το LPS (1 $\mu\text{g/ml}$), ενώ τα ΔΚ της αρνητικής ομάδας ελέγχου, καλλιεργήθηκαν μόνο με την επίδραση του καλλιεργητικού υλικού. Η παραγωγή των κυτταροκινών ελέγχθηκε με κυτταρομετρία ροής, κατόπιν χρήσης ειδικών μονοκλωνικών αντισώματων που έφεραν φθορίζουσες ουσίες.

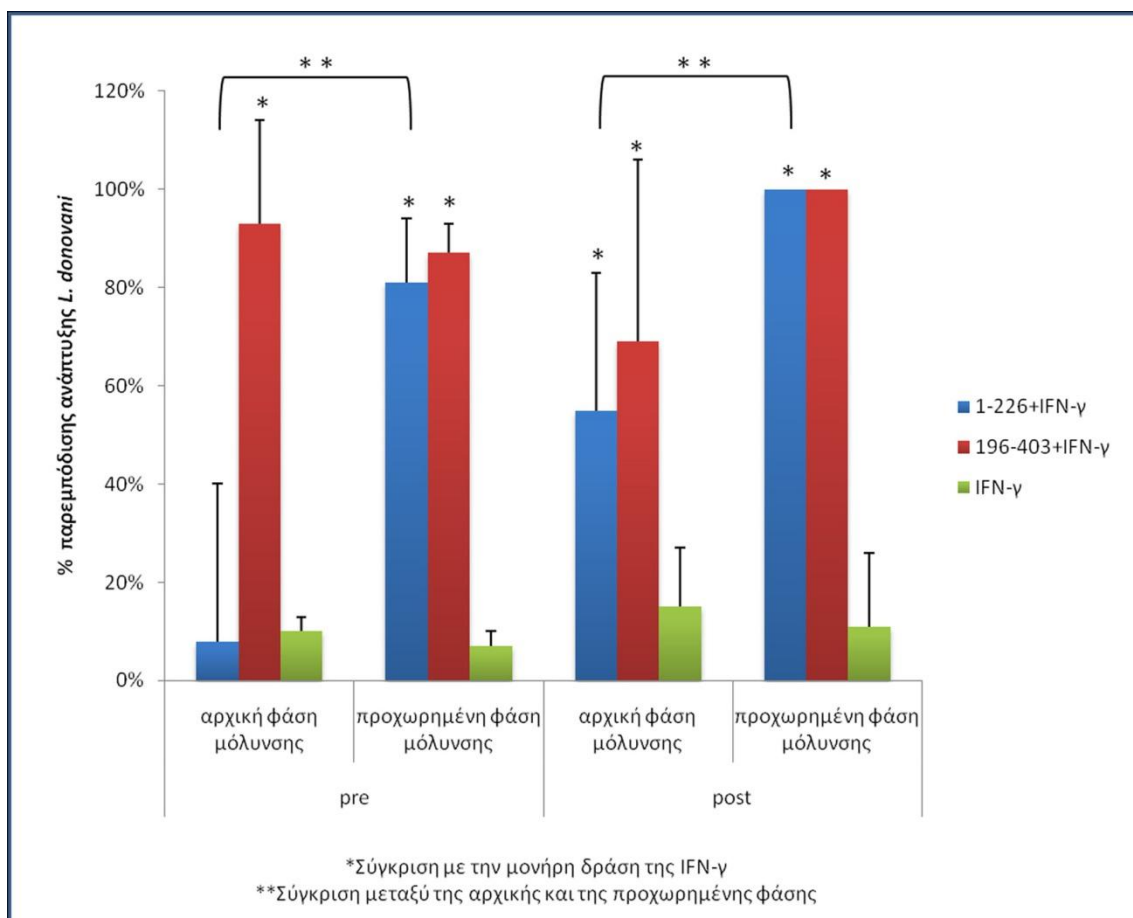
Συμπερασματικά, τα ανασυνδυασμένα αλληλοεπικαλυπτόμενα πολυεπιτοπικά τμήματα που καλύπτουν στο σύνολό τους ολόκληρη την αλληλουχία της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης LieIF, επάγουν την ωρίμανση των μυελοειδών ΔΚ και την παραγωγή της βιοενεργής IL-12. Η αμινοτελική περιοχή 1-226 της LieIF, επιβεβαιώνεται ως ανοσορρυθμιστική, και τα τμήματα της κεντρικής περιοχής 129-226 και 129-261, επιβεβαιώνονται ως ανάξια ερευνητικού ενδιαφέροντος. Τα δεδομένα αυτά, έρχονται σε συνέργεια με ερευνητική μελέτη της επίδρασης πολυεπιτοπικών τμημάτων της LieIF στην παραγωγή IL-12p70 από μονοκύτταρα υγιών εθελοντών [72]. Σύμφωνα με την μελέτη αυτή, τα τμήματα 1-226, 1-195 και 196-403, αντίθετα με τα τμήματα 129-226 και 129-261, προκαλούν την παραγωγή IL-12p70 σε ενεργοποιημένα με IFN- γ ανθρώπινα μονοκύτταρα. Για πρώτη φορά όμως καταδεικνύεται από την παρούσα μελέτη ότι και η καρβοξυτελική περιοχή 196-403 της LieIF, επάγει φαινοτυπικές και λειτουργικές μεταβολές σε μυελοειδή ΔΚ. Αντίθετα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα που έχουν προκύψει από την μελέτη των LbeIF και LmeIF, η LieIF δεν διαθέτει πόλωση, διότι τόσο η αμινοτελική όσο και η καρβοξυτελική περιοχή επάγουν την σημαντική παραγωγή IL-12 από ΔΚ προερχόμενα από ποντίκι και την ωρίμανσή τους [77, 185]. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνονται και από την περιοχή 239-403 (D2) που ανήκει στην καρβοξυτελική περιοχή της LieIF. Αυτά τα αντικρουόμενα αποτελέσματα μπορούν να αποδοθούν σε διαφορές αμινοξέων στην καρβοξυτελική περιοχή των πρωτεϊνών LieIF και LbeIF στη θέση 384 (αλανίνη έναντι γλυκίνης). Τα αποτελέσματα αυτά προτείνουν την αξιοποίηση της καρβοξυτελικής περιοχής της πρωτεΐνης, σαν ένα υποσχόμενο μόριο για περαιτέρω μελέτες ανάπτυξης είτε προστατευτικού εμβολίου είτε ανοσοθεραπείας.

4.6.4.2 Αξιολόγηση της *in vitro* αντιλειτουργικής δράσης των ανασυνδυασμένων πολυεπιτοπικών πρωτεϊνικών τμημάτων της *LieIF*.

Το ερευνητικό ενδιαφέρον, επικεντρώθηκε στην διερεύνηση της πιθανής αντιλειτουργικής δράσης των τμημάτων 1-226 (αμινοτελική περιοχή) και 196-403 (καρβοξυτελική περιοχή). Αρχικά, πραγματοποιήθηκε εκτίμηση της κυτταρικής βιωσιμότητας J774A.1 κυττάρων που διεγέρθηκαν με τα ανασυνδυασμένα πολυεπιτοπικά τμήματα. Στη συνέχεια, μελετήθηκε η επίδραση αυτών των ανασυνδυασμένων τμημάτων στην ενδοκυτταρική ανάπτυξη του στελέχους *L. donovani* σε J774A.1 μακροφάγα. Τα κύτταρα διεγέρθηκαν ταυτόχρονα με τα τμήματα 1-226 ή 196-403, παρουσία της ανασυνδυασμένης IFN- γ , για 15 ώρες. Ακολούθησε απομάκρυνση των υπερκειμένων που περιείχαν τα πρωτεϊνικά τμήματα και την IFN- γ και ακολούθησε μόλυνση με προμαστιγωτές μορφές *L. donovani* στατικής φάσης ανάπτυξης, όπως περιγράφεται λεπτομερέστερα στην § 3.2.16. Η επίδραση των πρωτεϊνικών τμημάτων στην ενδοκυτταρική ανάπτυξη του παρασίτου, προσδιορίστηκε σε δύο χρονικά σημεία, στην αρχική και στην προχωρημένη φάση της μόλυνσης.

Η επίδραση του τμήματος 1-226, είτε πριν την μόλυνση είτε μετά, οδήγησε στην παρεμπόδιση της ανάπτυξης του παρασίτου, συγκριτικά με την μονήρη επίδραση της IFN- γ . Η παρεμπόδιση αυτή, στα προεπωασμένα μακροφάγα, αυξήθηκε σημαντικά με την πάροδο του χρόνου καθώς το ποσοστό παρεμπόδισης που σημειώθηκε στην αρχική φάση ανέρχεται μόλις στο 8% και το αντίστοιχο ποσοστό της προχωρημένης φάσης στο 81% ($p = 0,050$). Αντίστοιχη αύξηση σημειώθηκε και στην περίπτωση των ήδη μολυσμένων μακροφάγων (55% παρεμπόδιση στην αρχική φάση έναντι 100% στην προχωρημένη) ($p = 0,037$) (Εικ. 4.29).

Επίσης, η επίδραση του τμήματος 196-403, οδήγησε σε έντονη παρεμπόδιση της ενδοκυτταρικής ανάπτυξης του παρασίτου, από την αρχική κιόλας φάση της μόλυνσης. Η παρεμπόδιση αυτή, στα προεπωασμένα μακροφάγα, στην αρχική φάση ανέρχεται στο 93% και το αντίστοιχο ποσοστό της προχωρημένης φάσης στο 87%. Αντίστοιχη παρεμπόδιση σημειώθηκε και στην περίπτωση των ήδη μολυσμένων μακροφάγων (69% παρεμπόδιση στην αρχική φάση έναντι 100% στην προχωρημένη) (Εικ. 4.29).



Εικόνα 4.29. Επίδραση των ανασυνδυασμένων πολυεπιτοπικών τμημάτων 1-226 και 196-403, στην ενδοκυτταρική ανάπτυξη του παρασίτου. J774A.1 μακροφάγα επωάστηκαν ταυτόχρονα με τα ανασυνδυασμένα τμήματα 1-226 και 196-403 (10 µg/ml) παρουσία της IFN-γ (1 ng/ml), τόσο πριν όσο και μετά την μόλυνση με προμαστιγωτές μορφές *L. donovani*. Ο προσδιορισμός της παρεμπόδισης της ενδοκυτταρικής ανάπτυξης του παρασίτου πραγματοποιήθηκε στην αρχική και στην προχωρημένη φάση της μόλυνσης, με την χρωματομετρική μέθοδο Alamar Blue. Η οπτική πυκνότητα προσδιορίστηκε στα 570/630 nm.

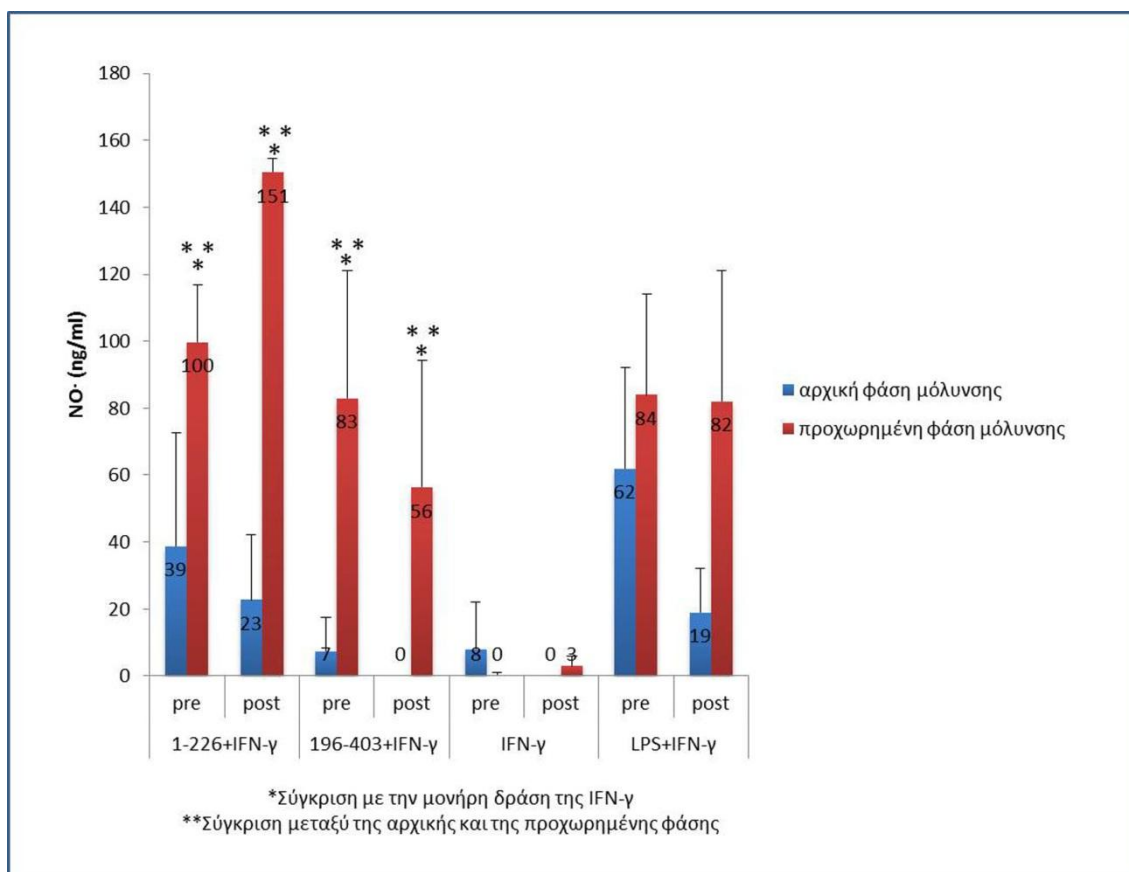
Συνεπώς, το αμινοτελικό και το καρβοξυτελικό άκρο της LieIF, παρουσιάζουν έντονη ανοσοτροποποιητική δράση, που αποδεικνύεται από την αντιλειτουργική δράση των J774A.1 μακροφάγων στις 72 ώρες μετά την μόλυνση. Η δράση αυτή παρατηρείται τόσο στην περίπτωση της επίδρασης των πρωτεϊνικών τμημάτων πριν την μόλυνση, υποδηλώνοντας προφυλακτική δράση, όσο και στην περίπτωση της επίδρασής τους μετά την μόλυνση, υποδηλώνοντας ανοσοθεραπευτική δράση.

Περαιτέρω, διερευνήθηκε η πιθανή ενεργοποίηση των πλέον αποτελεσματικών μορίων με παρασιτοκτόνο δράση, των μορίων του μονοξειδίου του αζώτου (NO). Η θετική ομάδα ελέγχου αποτελούνταν από J774A.1 κύτταρα τα οποία διεγέρθηκαν

ταυτόχρονα με LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) και IFN- γ (1 ng/ml), ενώ η αρνητική ομάδα ελέγχου, αποτελούνταν από κύτταρα που δεν επώαστηκαν υπό την επίδραση κάποιου παράγοντα. Οι τιμές που παρουσιάζονται, προέκυψαν από την αφαίρεση των παραγόμενων NO που οφείλεται στην επίδραση του παρασίτου στα J774A.1 μακροφάγα.

Η επίδραση των πολυεπιτοπικών πρωτεϊνικών τμημάτων 1-226 και 196-403, οδήγησε σε σημαντική παραγωγή NO $\cdot$ από τα μακροφάγα. Εκτενέστερα, παρατηρήθηκε πως τα επίπεδα του παραγόμενου NO $\cdot$ είναι υψηλότερα στην προχωρημένη φάση της *in vitro* μόλυνσης, επιβεβαιώνοντας τα ανάλογα αποτελέσματα της επίδρασης ολόκληρης της ανασυνδυασμένης LieIF (Εικ. 4.6). Επομένως, 72 ώρες μετά την μόλυνση, σημειώθηκαν οι υψηλότερες τιμές των ανιχνεύσιμων NO $\cdot$. Οι τιμές αυτές είναι 100 ng/ml και 83 ng/ml λόγω της επίδρασης των τμημάτων 1-226 και 196-403, πριν την έναρξη της μόλυνσης (Εικ. 4.30). Οι αντίστοιχες τιμές NO $\cdot$ που οφείλονται στην επίδραση των τμημάτων μετά την μόλυνση, είναι 151 ng/ml και 56 ng/ml (Εικ. 4.30). Τα αντίστοιχα ποσοστά που ανιχνεύτηκαν στην αρχική φάση της μόλυνσης, είναι σαφώς χαμηλότερα, με εύρος ανιχνεύσιμων τιμών από 0-39 ng/ml (Εικ. 4.30). Αναλυτικότερα, η επίδραση του τμήματος 1-226, είτε πριν, είτε μετά την μόλυνση, επέφερε την σημαντική παραγωγή NO $\cdot$ (39 ng/ml και 23 ng/ml , αντίστοιχα), συγκριτικά με την μονήρη επίδραση της IFN- γ (Εικ. 4.30). Αντιθέτως, το τμήμα 196-403, οδήγησε σε αμελητέα παραγωγή NO $\cdot$ στην αρχική φάση της μόλυνσης (0-7 ng/ml) (Εικ. 4.30). Η μονήρης επίδραση της IFN- γ , στα διάφορα σημεία ελέγχου, οδήγησε επίσης σε αμελητέα παραγωγή NO $\cdot$ (0-8 ng/ml).

Είναι επίσης αξιοσημείωτο, πως η επίδραση των τμημάτων 1-226 και 196-403 επάγει την παραγωγή NO $\cdot$ σε ανάλογο ή και μεγαλύτερο βαθμό με τον συνδυασμό των διεγερτικών μορίων LPS/IFN- γ . Πρέπει να σημειωθεί πως η υψηλότερη τιμή NO $\cdot$ (151 ng/ml) σημειώθηκε 72 ώρες μετά την μόλυνση στα κύτταρα που αλληλεπίδρασαν με το τμήμα 1-226, μετά την μόλυνση. Η παραγωγή αυτή είναι σημαντικά μεγαλύτερη ($p = 0,083$) από την αντίστοιχη παραγωγή της θετικής ομάδας ελέγχου (82 ng/ml) (Εικ. 4.30). Επιπλέον, σε αυτό το σημείο ελέγχου, η παρεμπόδιση της ενδοκυττάριας ανάπτυξης του παρασίτου άγγιξε το 100% (Εικ. 4.29).



Εικόνα 4.30. Παραγωγή NO[•] (ng/ml) από J774A.1 μολυσμένα μακροφάγα, κατόπιν επίδρασης των ανασυνδυασμένων πολυεπιτοπικών τμημάτων της LieIF. Τα J774A.1 κύτταρα επώαστηκαν με τα ανασυνδυασμένα τμήματα 1-226 και 196-403 (10 μg/ml), παρουσία IFN-γ (1 ng/ml), είτε πριν την έναρξη της μόλυνσης με *L. donovani* προμαστιγωτές μορφές, είτε μετά. Τα J774A.1 κύτταρα της θετικής ομάδας ελέγχου, διεγέρθηκαν με LPS (1 μg/ml) και IFN-γ (1 ng/ml). Η συγκέντρωση των νιτρωδών στα υπερκείμενα καλλιιεργειών, προσδιορίστηκε μέσω της αντίδρασης Griess και η απορρόφηση των προϊόντων, μετρήθηκε στα 570nm.

Τα παραπάνω αποτελέσματα καταδεικνύουν πως τόσο η επίδραση του τμήματος 1-226 της LieIF, όσο και του τμήματος 196-403, οδηγούν σε σημαντική παραγωγή NO από τα J774A.1 μακροφάγα.

4.7. Εφαρμογή της ανασυνδυασμένης LieIF σε πειραματικά πρωτόκολλα εμβολιασμών.

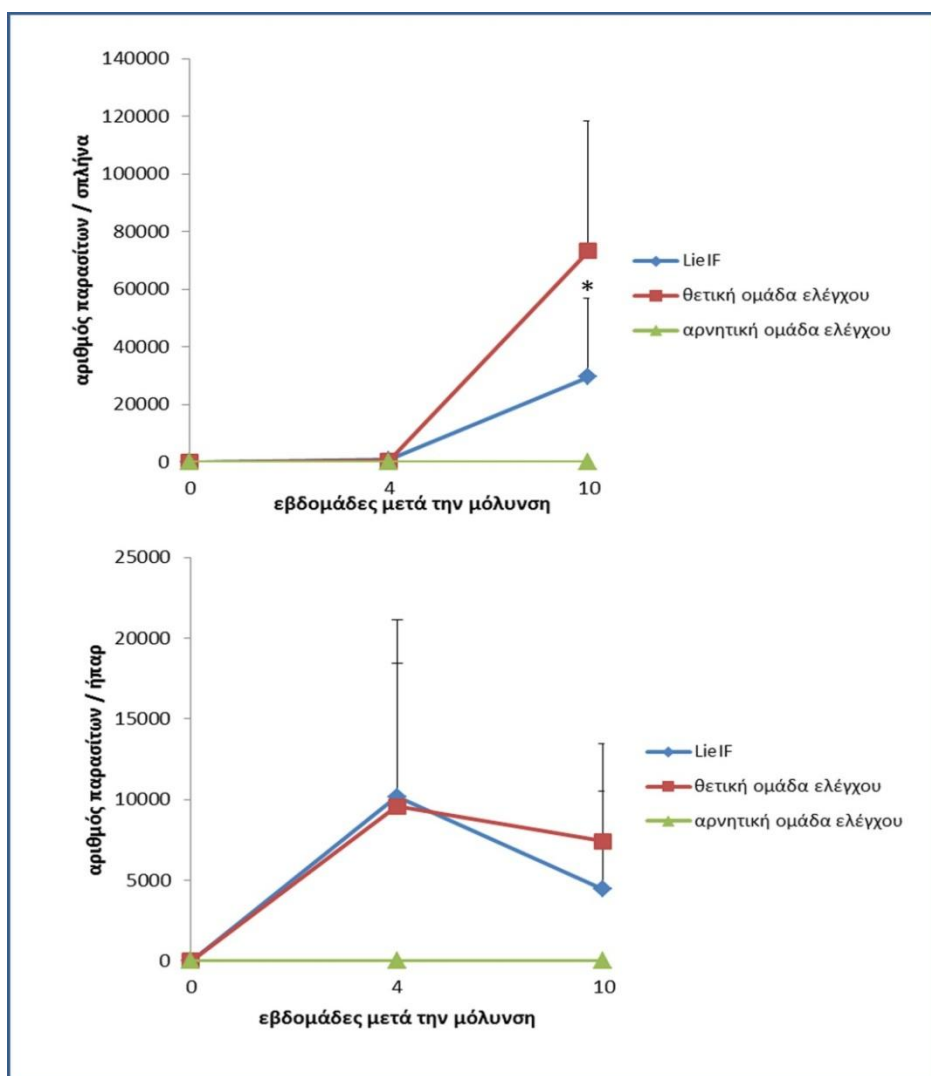
4.7.1 Εφαρμογή της LieIF σε πειραματικά πρωτόκολλα ανοσοθεραπείας έναντι της λείσμανιάσης.

Η ανοσοθεραπεία αφορά στην χρήση βιολογικών συστατικών ή μορίων ικανών να ρυθμίζουν τις ανοσολογικές αποκρίσεις, προκειμένου να επιταχυνθεί η ενεργοποίηση της ειδικής ανοσίας. Οι Th1 ανοσοαποκρίσεις παίζουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της λείσμανιάσης και ως εκ τούτου, η εφαρμογή της ανοσοθεραπείας άπτεται της κεντρικής ιδέας της επιλεκτικής επαγωγής της θεμελιώδους Th1 προστατευτικής απόκρισης [11]. Συνεπώς, πρωτεΐνες του παρασίτου *Leishmania spp.* που διεγείρουν Th1 κυτταρικές αποκρίσεις στον ξενιστή, αποτελούν υποψήφια μόρια. Κατά την αναζήτηση τέτοιων αντιγόνων, η LeIF αναδείχθηκε ως ένα πολλά υποσχόμενο μόριο. Το αμινοτελικό τμήμα (1-226) της πρωτεΐνης LeIF της *L. braziliensis*, αποτελεί μέρος του πολυπρωτεϊνικού εμβολίου Leish-111f (LEISH-F1), το οποίο σε συνδυασμό με το ανοσοενισχυτικό MPL-SE, έχει χρησιμοποιηθεί σε κλινικές μελέτες ανοσοχημειοθεραπείας [188].

Στόχος της παρούσας μελέτης, ήταν η διερεύνηση της ικανότητας ολόκληρου του μορίου της ανασυνδυασμένης LeIF του στελέχους *L. infantum* (LieIF), χωρίς την παρουσία ανοσοενισχυτικού ή χημειοθεραπευτικού, να προκαλέσει θεραπευτικό αποτέλεσμα σε πειραματικό μοντέλο σπλαγχνικής λείσμανιάσης. Προς την επίτευξη αυτού του σκοπού, χρησιμοποιήθηκε το πειραματικό μοντέλο των γενετικά ευαίσθητων BALB/c ποντικών, όπου η εξέλιξη της νόσου, προσομοιάζει σε μεγάλο βαθμό την εκδήλωση της ασθένειας στον άνθρωπο, με έντονη σπληνομεγαλία και ηπατομεγαλία [1].

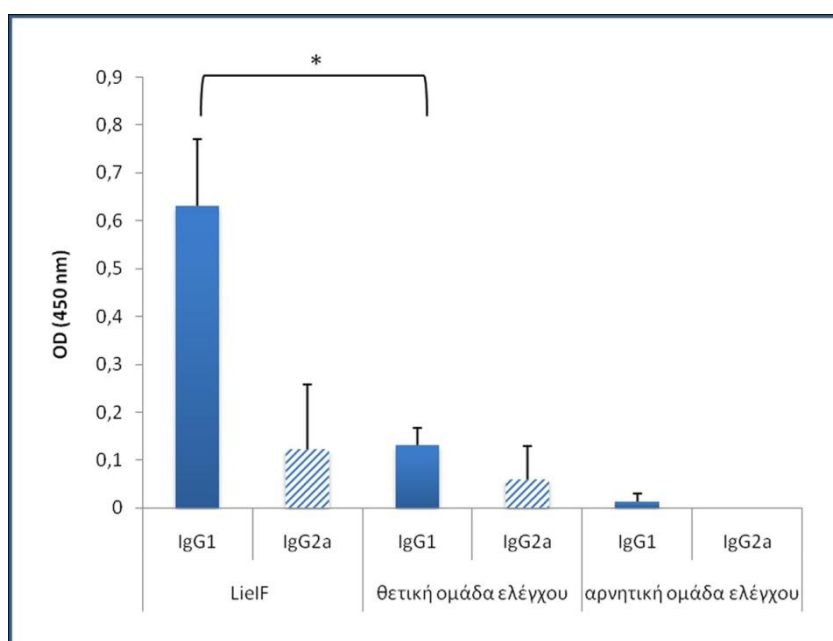
Συνοπτικά, η πειραματική μόλυνση πραγματοποιήθηκε με την ενδοφλέβια χορήγηση 10^7 προμαστιγωτών μορφών του είδους *L. donovani* (MON-1) στατικής φάσης ανάπτυξης, σε ποντίκια της αιμομικτικής φυλής BALB/c. Μία εβδομάδα μετά την μόλυνση (πρώτη φάση εγκατάστασης σπλαγχνικής λείσμανιάσης), ξεκίνησε η εφαρμογή του πρωτοκόλλου ανοσοθεραπείας που περιελάμβανε δύο ενδοπεριτοναϊκές χορηγήσεις της ανασυνδυασμένης LieIF (10 μ g), με χρονική απόσταση 7 ημερών. Η θετική ομάδα ελέγχου αποτελούνταν από μολυσμένα με *L. donovani* πειραματόζωα που δεν ανοσοποιήθηκαν με την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη, ενώ η αρνητική ομάδα ελέγχου, αποτελούνταν από φυσιολογικά ζώα.

Αρχικά προσδιορίστηκε το παρασιτικό φορτίο του ήπατος και του σπλήνα στις 4 και 10 εβδομάδες μετά την μόλυνση. Τα μολυσμένα ποντίκια της θετικής ομάδας ελέγχου, ανέπτυξαν όπως ήταν αναμενόμενο, έκδηλο παρασιτισμό τόσο στον σπλήνα όσο και στο ήπαρ (Εικ. 4.31). Αναλυτικότερα, ο παρασιτισμός του σπλήνα, όπου σύμφωνα με την βιβλιογραφία παραμένει χρονικά παρατεταμένος, κορυφώθηκε στις 10 εβδομάδες μετά την μόλυνση (73239 αμαστιγώτες/σπλήνα) (Εικ. 4.31). Το παρασιτικό φορτίο του ήπατος έφτασε στη μέγιστη τιμή του στις 4 εβδομάδες μετά την μόλυνση (9580 αμαστιγώτες/ήπαρ) και ακολούθως μειώθηκε μέχρι τις 10 εβδομάδες μετά την μόλυνση όπου παρακολούθησαμε τα πειραματόζωα (7410 αμαστιγώτες/ήπαρ) (Εικ. 4.31). Τα ζώα στα οποία χορηγήθηκε LieIF, παρατηρήθηκε ότι αν και ανέπτυξαν επίσης παρασιτισμό των οργάνων στα αντίστοιχα χρονικά διαστήματα, σημείωσαν σημαντικά ελαττωμένο φορτίο στον σπλήνα, 29510 αμαστιγώτες/σπλήνα έναντι 73239 αμαστιγώτες/σπλήνα της θετικής ομάδας ελέγχου, στις 10 εβδομάδες μετά την μόλυνση (χρόνια φάση μόλυνσης) (Εικ. 4.31).



Εικόνα 4.31. Ιστικός παρασιτισμός στον σπλήνα και στο ήπαρ. BALB/c ποντίκια μολύνθηκαν με 10^7 προμαστιγωτές μορφές του στελέχους *L. donovani* (MON-1) και μία εβδομάδα μετά την μόλυνση, τα ποντίκια της ομάδας ενδιαφέροντος ανοσοποιήθηκαν εις διπλούν με την ανασυνδυασμένη LieIF (10 μg/πειραματόζωο), με χρονική απόσταση 7 ημερών. Τα παρασιτικά φορτία προσδιορίστηκαν με την τεχνική των διαδοχικών αραιώσεων, 4 και 10 εβδομάδες μετά την μόλυνση.

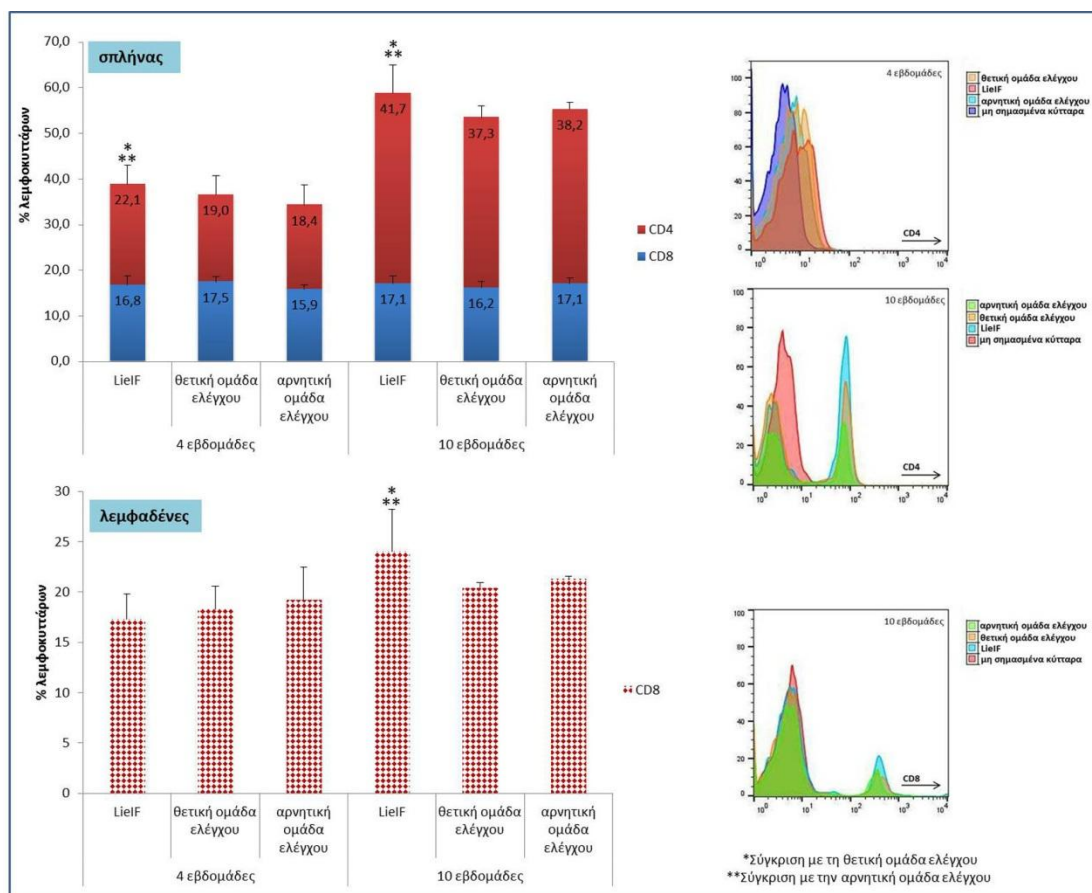
Προκειμένου να εξακριβωθεί εάν το μειωμένο παρασιτικό φορτίο των ζώων που έλαβαν ανοσοθεραπεία, οφείλεται σε μετατόπιση της ισορροπίας μεταξύ των ειδικών για το παράσιτο Th1 και Th2 υποπληθυσμών λεμφοκυττάρων, έγινε προσδιορισμός του τίτλου των IgG1 και IgG2a αντισωμάτων. Στο χρονικό σημείο των 4 εβδομάδων μετά την μόλυνση, δεν πραγματοποιήθηκε ανίχνευση ειδικών IgG1 ή IgG2a αντισωμάτων. Στο χρονικό σημείο των 10 εβδομάδων μετά την μόλυνση, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των IgG1 και μικρή αύξηση των IgG2a ειδικών ανοσοσφαιρινών στα πειραματόζωα που έλαβαν δύο συνεχόμενες φορές LieIF σε διάστημα μιας εβδομάδας, γεγονός που υποδηλώνει την επαγωγή μιας μικτής Th1/Th2 ανοσοαπόκρισης (Εικ. 4.32).



Εικόνα 4.32. Χυμική απόκριση επαγόμενη από την ανασυνδυασμένη LieIF. BALB/c ποντίκια μολύνθηκαν με 10^7 προμαστιγωτές μορφές του στελέχους *L. donovani* (MON-1) και μία εβδομάδα μετά την μόλυνση, τα ποντίκια της ομάδας ενδιαφέροντος ανοσοποιήθηκαν εις διπλούν με την ανασυνδυασμένη LieIF (10 μg/πειραματόζωο), με χρονική απόσταση 7 ημερών. Τα ειδικά για το παράσιτο αντισώματα IgG1 και IgG2a ισοτύπων, προσδιορίστηκαν στον ορό των πειραματόζωων, 10 εβδομάδες μετά την μόλυνση, με ELISA. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως οπτική πυκνότητα στα 450 nm.

Η περαιτέρω εκτίμηση της ανάπτυξης αντιδράσεων κυτταρικής ανοσίας, πραγματοποιήθηκε με τον προσδιορισμό του ποσοστού των $CD4^+$ και $CD8^+$ κυττάρων στον σπλήνα και στους επιχώριους λεμφαδένες των ζώων, στα παραπάνω χρονικά διαστήματα, με κυτταρομετρία ροής.

Αναλυτικότερα, στις 4 εβδομάδες (οξεία φάση της μόλυνσης) παρατηρήθηκε 16% ποσοστιαία αύξηση ($p = 0,035$) των Th ($CD4^+$) λεμφοκυττάρων στον σπλήνα των πειραματόζων που έλαβαν θεραπεία συγκριτικά με την ομάδα θετικού ελέγχου των μολυσμένων και χωρίς θεραπεία πειραματόζων (22,1% έναντι 19,0%) (Εικ. 4.33). Επιπλέον, στις 10 εβδομάδες (χρόνια φάση της μόλυνσης), σημειώθηκε σημαντική αύξηση τόσο των Th ($CD4^+$) του σπλήνα όσο και των Tc ($CD8^+$) λεμφοκυττάρων των επιχώριων λεμφαδένων, στα πειραματόζωα που χορηγήθηκε θεραπεία (Εικ. 4.33). Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε 12% ποσοστιαία αύξηση των Th λεμφοκυττάρων στον σπλήνα και 17,58% αύξηση των Tc λεμφοκυττάρων στους επιχώριους λεμφαδένες, στα πειραματόζωα που έλαβαν θεραπεία συγκριτικά με την ομάδα θετικού ελέγχου των μολυσμένων και χωρίς θεραπεία πειραματόζων ($p = 0,013$ και $0,046$, αντίστοιχα).

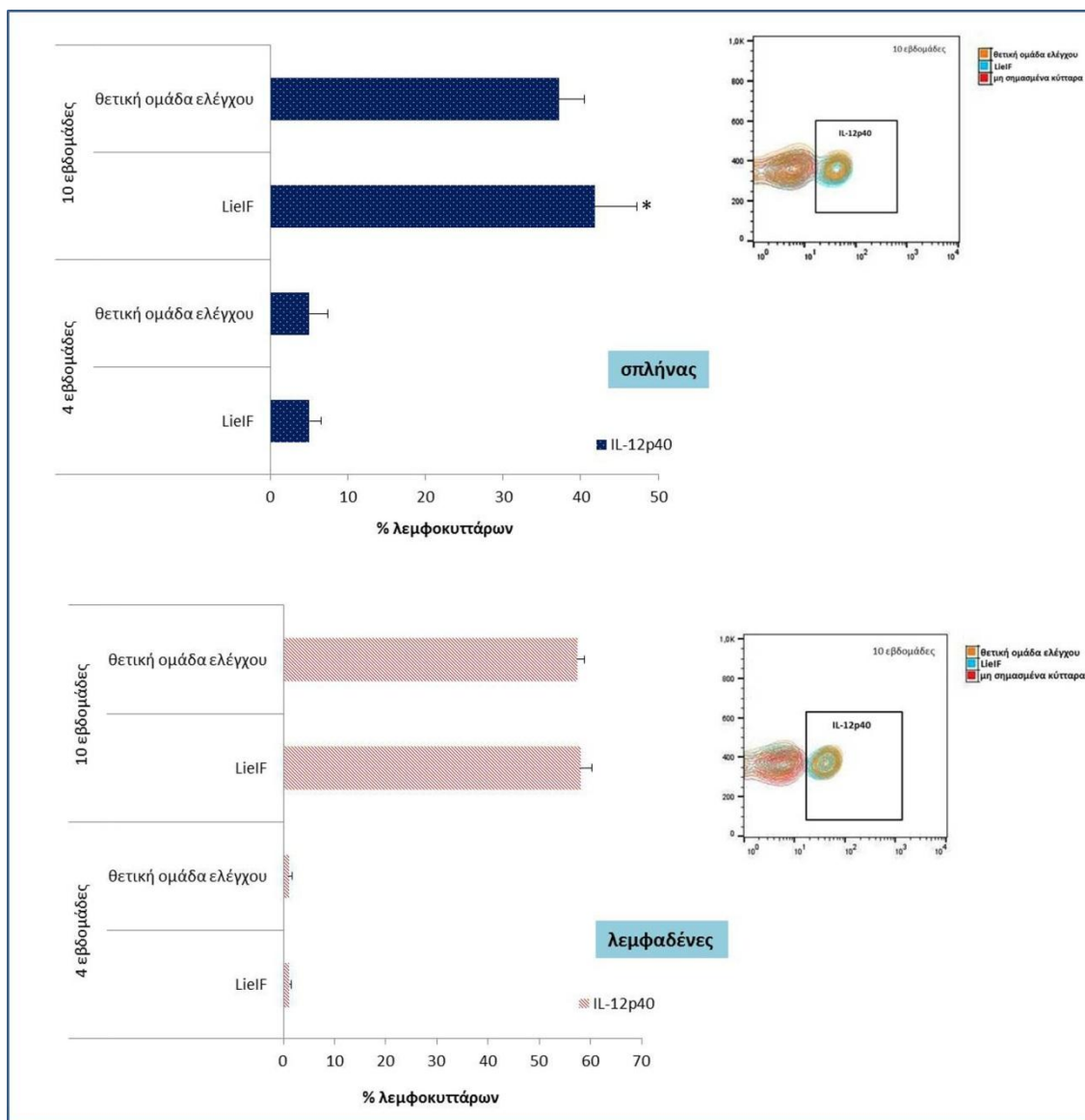


Εικόνα 4.33. Ανίχνευση $CD4^+$ και $CD8^+$ T λεμφοκυττάρων. BALB/c ποντίκια μολύνθηκαν με 10^7 προμαστιγωτές μορφές του στελέχους *L. donovani* (MON-1) και μία εβδομάδα μετά την μόλυνση, τα ποντίκια της ομάδας ενδιαφέροντος ανοσοποιήθηκαν εις διπλούν με την ανασυνδυασμένη LieIF (10 μg/πειραματόζωο), με χρονική απόσταση 7 ημερών. Ο αριθμός των $CD4^+$ και $CD8^+$ λεμφοκυττάρων, προσδιορίστηκε στον σπλήνα και στους επιχώριους λεμφαδένες, στις 4 και 10 εβδομάδες μετά την μόλυνση. Ο προσδιορισμός των πληθυσμών των λεμφοκυττάρων, πραγματοποιήθηκε με κυτταρομετρία ροής, κατόπιν χρήσης ειδικών μονοκλωνικών αντισωμάτων που έφεραν φθορίζουσες ουσίες.

Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν μια σχετική επάρκεια του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή στον περιορισμό της ιστικής εξάπλωσης του παρασίτου, που επιβεβαιώθηκε από το σημαντικά ελαττωμένο παρασιτικό φορτίο. Παράλληλα, το γεγονός ότι παρατηρείται αύξηση του αριθμού των $CD8^+$ T λεμφοκυττάρων στους επιχώριους λεμφαδένες (Εικ. 4.33), αποτελεί ένδειξη για τη συμμετοχή των κυτταροτοξικών κυττάρων στον έλεγχο του πολλαπλασιασμού του παρασίτου, όπως έχει δειχθεί σε προηγούμενη μελέτη [189].

Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της κυτταροπλασματικής εντόπισης της προστατευτικής IL-12 κυτταροκίνης. Στον σπλήνα, σημειώθηκε σημαντική αύξηση του ποσοστού των λεμφοκυττάρων που παράγουν την IL-12 ($p = 0,050$), 10 εβδομάδες μετά την μόλυνση, συνηγορώντας στην συμμετοχή της κυτταροκίνης στην πόλωση του Th1 υποπληθυσμού και στην παρατηρούμενη μείωση του παρασιτικού φορτίου (Εικ. 4.34). Στους επιχώριους λεμφαδένες, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές της παραγόμενης IL-12 ανάμεσα στις ομάδες, στα χρονικά σημεία που ελέγχθηκαν (Εικ. 4.34).

Επιπλέον, για να επιβεβαιωθεί η διαμόρφωση υποπληθυσμών T βοηθητικών κυττάρων με κατεύθυνση πόλωσης προς τον Th1 ανοσοφαινότυπο, πραγματοποιήθηκε έλεγχος με PCR πραγματικού χρόνου, των επιπέδων των mRNA των μεταγραφικών παραγόντων Tbx21 (T-bet) και GATA-3 καθώς και των κυτταροκινών IL-12b και IL-10, σε απομονωμένα λεμφοκύτταρα από τον σπλήνα των πειραματόζωων που έλαβαν θεραπεία καθώς και των μολυσμένων ζώων της θετικής ομάδας ελέγχου.

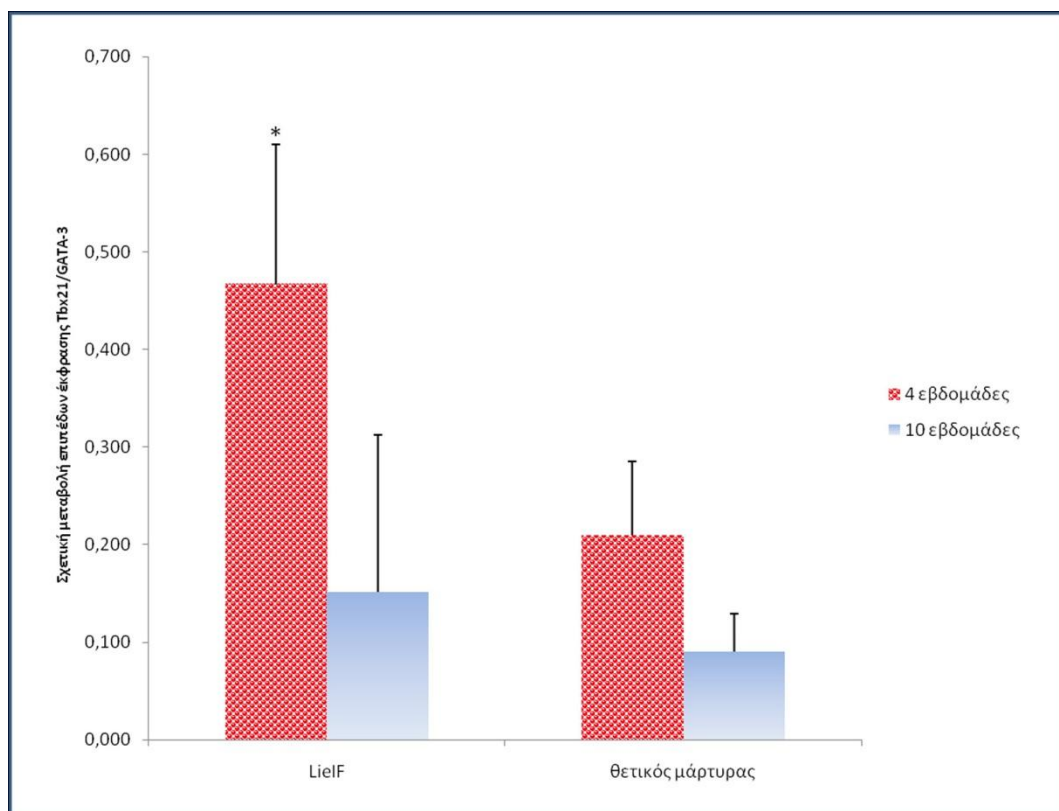


Εικόνα 4.34. Ενδοκυτταρική εντόπιση IL-12p40. BALB/c ποντίκια μολύνθηκαν με 10^7 προμαστιγωτές μορφές του στελέχους *L. donovani* (MON-1) και μία εβδομάδα μετά την μόλυνση, τα ποντίκια της ομάδας ενδιαφέροντος ανοσοποιήθηκαν εις διπλούν με την ανασυνδυασμένη LieIF (10 μg/πειραματόζωο), με χρονική απόσταση 7 ημερών. Η εντόπιση της IL-12, πραγματοποιήθηκε στα κύτταρα του σπλήνα και στους επιχώριους λεμφαδένες, στις 4 και 10 εβδομάδες μετά την μόλυνση, με κυτταρομετρία ροής.

Οι μεταγραφικοί παράγοντες T-bet και GATA-3 παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία καθορισμού της διαφοροποίησης των υποπληθυσμών των Th λεμφοκυττάρων. Η υπερέκφραση του T-bet κατευθύνει τα κύτταρα να διαφοροποιηθούν σε Th1 ανοσοφαινότυπο, ενώ παράλληλα καταστέλλει τη διαφοροποίησή τους προς Th2. Η αντίστοιχη υπερέκφραση του GATA-3 ασκεί αντίθετη δράση, προάγοντας τη διαφοροποίηση των παρθένων T κυττάρων σε κύτταρα Th2, καταστέλλοντας ταυτόχρονα

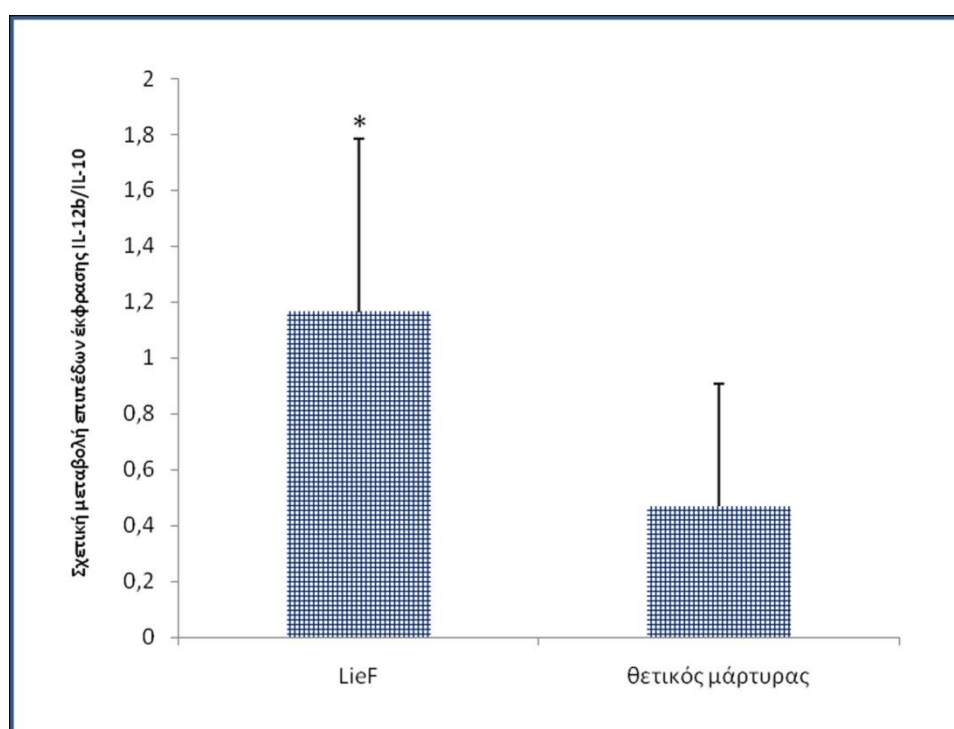
τη διαφοροποίηση προς Th1 [190]. Ο λόγος αυτών των δύο μεταγραφικών παραγόντων απεικονίζει το προφίλ της διαφοροποίησης των Th λεμφοκυττάρων που διαδραματίζεται στο μικροπεριβάλλον του σπλήνα στο πειραματικό μοντέλο της σπλαγχνικής λεισμανίασης που μελετήθηκε.

Στα ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε η ανασυνδυασμένη LieIF για ανοσοθεραπεία αρχικής φάσης σπλαγχνικής λεισμανίασης, ο λόγος Tbx21/GATA-3 προσδιορίστηκε σημαντικά υψηλότερος ($p = 0,050$) έναντι του λόγου που σημειώθηκε στην ομάδα των μολυσμένων πειραματοζώων (θετικός μάρτυρας), 4 εβδομάδες μετά την μόλυνση (Εικ. 4.35). Στις 10 εβδομάδες, όπου και σημειώθηκε μείωση του παρασιτικού φορτίου στον σπλήνα, ο λόγος παρέμεινε υψηλότερος από τον αντίστοιχο λόγο της θετικής ομάδας ελέγχου, χωρίς ωστόσο η διαφορά να αξιολογείται σημαντική (Εικ. 4.35).



Εικόνα 4.35. Λόγος σχετικής μεταβολής του επιπέδου έκφρασης των γονιδίων Tbx21 και GATA-3. BALB/c ποντίκια μολύνθηκαν με 10^7 προμαστιγωτές μορφές του στελέχους *L. donovani* (MON-1) και μία εβδομάδα μετά την μόλυνση, τα ποντίκια της ομάδας ενδιαφέροντος ανοσοποιήθηκαν εις διπλούν με την ανασυνδυασμένη LieIF (10 μ g/πειραματοζώο), με χρονική απόσταση 7 ημερών. Η σχετική έκφραση των γονιδίων Tbx21 και GATA-3, προσδιορίστηκε σε κύτταρα του σπλήνα, 4 και 10 εβδομάδες μετά την μόλυνση, με PCR πραγματικού χρόνου.

Επιπλέον, προσδιορίστηκε η έκφραση των κυτταροκινών IL-12b και IL-10. Ο λόγος IL-12b/IL-10 αντικατοπτρίζει επίσης το προφίλ της πόλωσης των Th1/ Th2 κυττάρων, καθώς η IL-12 διαμεσολαβεί στην ανάπτυξη προστατευτικής Th1 απόκρισης της ενώ η IL-10 υποστηρίζει την Th2 απόκριση. 4 εβδομάδες μετά την μόλυνση, ο παραπάνω λόγος δεν παρουσίασε σημαντική διαφορά ανάμεσα στα LieIF - θεραπευμένα ποντίκια και στην θετική ομάδα ελέγχου (τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται). Στο χρονικό σημείο των 10 εβδομάδων, προσδιορίστηκε σημαντική αύξηση του λόγου IL-12b/IL-10 ($p = 0,035$) σε σύγκριση με την θετική ομάδα ελέγχου, γεγονός που τεκμηριώνει την επαγωγή και την αποτελεσματικότητα της Th1 απόκρισης (Εικ. 4.36).



Εικόνα 4.36. Λόγος σχετικής μεταβολής του επιπέδου έκφρασης των γονιδίων IL-12b και IL-10. BALB/c ποντίκια μολύνθηκαν με 10^7 προμαστιγωτές μορφές του στελέχους *L. donovani* (MON-1) και μία εβδομάδα μετά την μόλυνση, τα ποντίκια της ομάδας ενδιαφέροντος ανοσοποιήθηκαν εις διπλούν με την ανασυνδυασμένη LieIF (10 μ g/πειραματόζωο), με χρονική απόσταση 7 ημερών. Η σχετική έκφραση των γονιδίων IL-12b και IL-10, προσδιορίστηκε σε κύτταρα του σπλήνα, 10 εβδομάδες μετά την μόλυνση, με PCR πραγματικού χρόνου.

Συμπερασματικά, τα παραπάνω αποτελέσματα καταδεικνύουν πως η χορήγηση της ανασυνδυασμένης LieIF σε μολυσμένα BALB/c ποντίκια, οδηγεί σε μείωση του παρασιτικού φορτίου του σπλήνα, στην χρόνια φάση της μόλυνσης.

Η αξιολόγηση του προφίλ των παραγόμενων ανοσοσφαιρινών, υποδηλώνει την ανάπτυξη μικτής Th1/Th2 ανοσολογικής απόκρισης. Ο φαινοτυπικός προσδιορισμός των βοηθητικών $CD4^+$ και των κυτταροτοξικών $CD8^+$ λεμφοκυττάρων, έδειξε μια μικρή αύξηση του αριθμού και των δύο χαρακτηριστικών $CD4^+$ και $CD8^+$ πληθυσμών, αποδεικνύοντας την επαγωγή και την συμμετοχή των κυττάρων αυτών στους μηχανισμούς εξάλειψης του παρασίτου. Η εξάλειψη αυτή, βρέθηκε πως διαμεσολαβείται από την παραγωγή της IL-12, υποδεικνύοντας τελικά την ανάπτυξη μιας Th1 ανοσολογικής απόκρισης. Η πίεση που ασκεί η εγκατάσταση της μόλυνσης στον ανοσολογικό προσανατολισμό του ξενιστή, εμφανίζεται στο αποτέλεσμα του λόγου έκφρασης Tbx21/GATA-3. Ο αυξημένος λόγος Tbx21/GATA-3 που σημειώθηκε στα κύτταρα του σπλήνα στην αρχική φάση της μόλυνσης, έναντι των μολυσμένων πειραματοζώων, υποδηλώνει την διαφοροποίηση των Th λεμφοκυττάρων προς την Th1 πόλωση. Η κυριαρχία αυτού του υποπληθυσμού πιστοποιείται περαιτέρω και από τον αυξημένο λόγο IL-12/IL-10.

4.7.2 Ανοσιακή μεταφορά ΔΚ ευαισθητοποιημένων με την LieIF σε *in vivo* πειραματικό μοντέλο δερματικής λεισμανίασης.

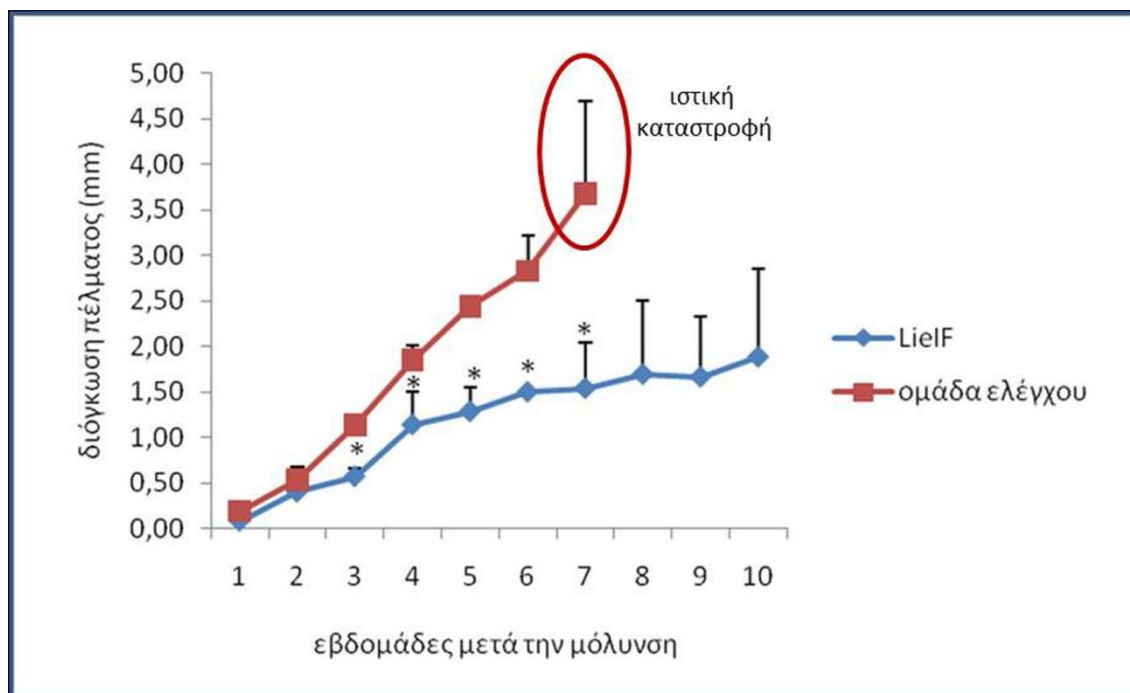
Δεν υπάρχει αμφιβολία πως ο αποτελεσματικός εμβολιασμός παραμένει το καταλληλότερο μέσο για την παρεμπόδιση και την ασφαλή θεραπεία όλων των μορφών της νόσου. Βασικός στόχος πολυάριθμων μελετών της αλληλεπίδρασης του παρασίτου με το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή σε *in vivo* πειραματικά μοντέλα λεισμανιάσεων, είναι η ανάπτυξη ενός ασφαλούς και αποτελεσματικού εμβολίου, ικανού να εγκαταστήσει ισχυρή και μεγάλης διάρκειας προστατευτική ανοσιακή απόκριση [191].

Ο εμβολιασμός με την χρήση ΔΚ αποτελεί στρατηγική που έχει πρόσφατα αποκτήσει εξαιρετικό ενδιαφέρον και στην περίπτωση της λεισμανίασης, καθώς μια σειρά μελετών έχει αναδείξει την αποτελεσματικότητά τους στην πρόληψη της πειραματικής νόσου.

Στην παρούσα μελέτη, αναπτύχθηκε σύστημα εμβολιασμού με την χρήση ΔΚ που προήλθαν από πρόδρομες μορφές του μυελού των οστών και επωάστηκαν με την ανασυνδυασμένη LieIF. Μελετήθηκε η ικανότητα των ΔΚ να επάγουν προστασία σε

γενετικά ευαίσθητα BALB/c ποντίκια μετά από πειραματική μόλυνση με *L. major*. Επίσης, διερευνήθηκε η ανάπτυξη ανοσολογικής απόκρισης τύπου Th1 ικανής να προστετέψει τα πειραματόζωα από την ανάπτυξη δερματικών βλαβών μετά την υποδόρια χορήγηση μολυσματικών παρασίτων. Για τον σκοπό αυτό, 10^6 ΔΚ, που είχαν προεπωαστεί με την ανασυνδυασμένη LiIF, (συγκέντρωσης 10 $\mu\text{g/ml}$) για 24 ώρες, χορηγήθηκαν ενδοφλέβια σε BALB/c ποντίκια. Τα πειραματόζωα μάρτυρες ανοσοποιήθηκαν με ΔΚ που είχαν καλλιεργηθεί σε θρεπτικό υλικό χωρίς την επίδραση της πρωτεΐνης. Με την πάροδο 2 εβδομάδων από τον εμβολιασμό με ανοσιακή μεταφορά ευαισθητοποιημένων ΔΚ, τα πειραματόζωα μολύνθηκαν υποδόρια στο πέλμα, με 2×10^6 προμαστιγωτές μορφές *L. major* στατικής φάσης ανάπτυξης. Η αξιολόγηση του πιθανού προστατευτικού αποτελέσματος, πραγματοποιήθηκε με μέτρηση του πάχους του άκρου ποδός σε διαστήματα μιας εβδομάδας για συνολική διάρκεια 10 εβδομάδων. Το πάχος του άκρου ποδός αναδεικνύει το μέτρο της αναπτυσσόμενης τοπικής φλεγμονής που τελικά, εφ'όσον δεν υφίστανται προστατευτικοί μηχανισμοί, οδηγεί στην ανεξέλεγκτη ιστική καταστροφή του άκρου ποδός.

Το μέγεθος των βλαβών στα εμβολιασμένα πειραματόζωα ήταν σημαντικά ελαττωμένο σε σχέση με τα ποντίκια της θετικής ομάδας ελέγχου, τα οποία και εμφάνισαν ταχέως αυξανόμενες βλάβες (Εικ. 4.37).

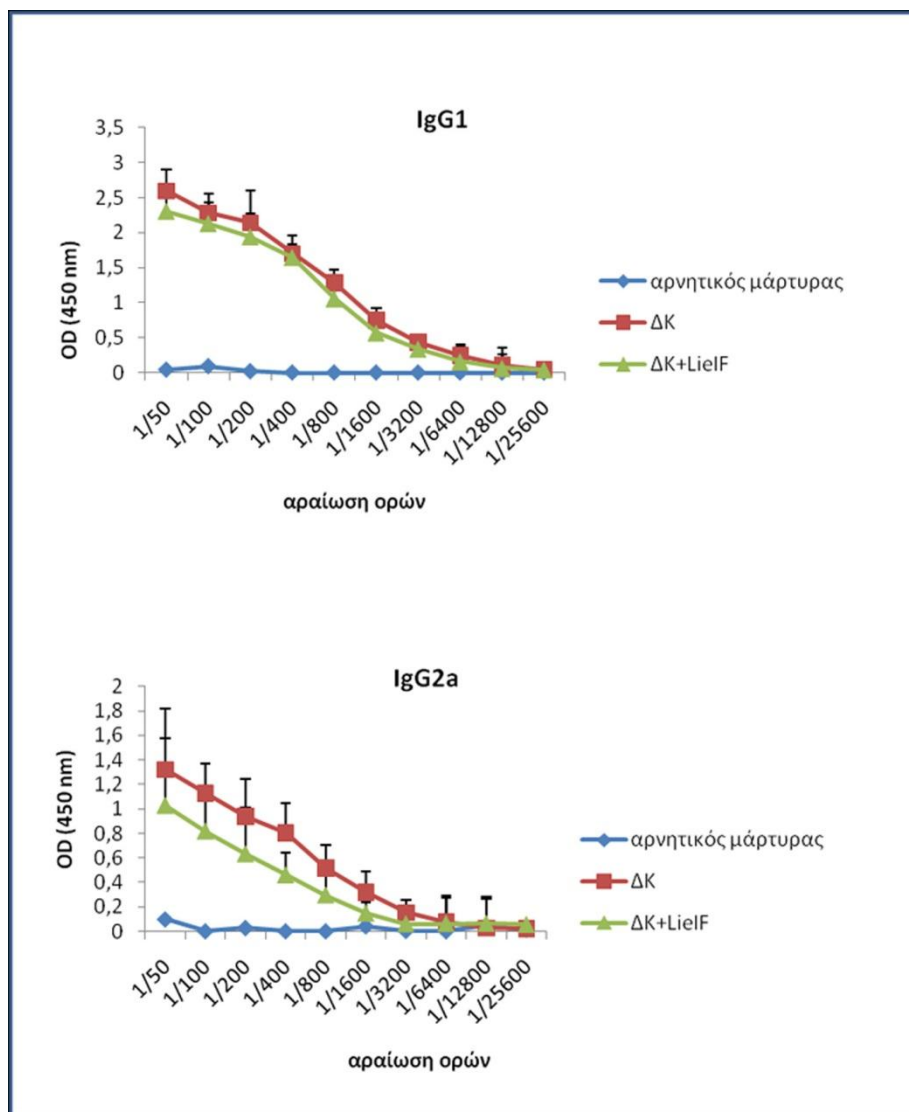


Εικόνα 4.37. Εξέλιξη των δερματικών βλαβών γενετικά ευαίσθητων BALB/c ποντικών, που είχαν εμβολιαστεί με προεπωασμένα με την LieIF, ΔΚ. BALB/c ποντίκια εμβολιάστηκαν με 10^6 ΔΚ που είχαν προεπωαστεί με την ανασυνδυασμένη LieIF. Τα ποντίκια της ομάδας ελέγχου εμβολιάστηκαν με 10^6 ΔΚ που είχαν καλλιεργηθεί μόνο με την επίδραση του καλλιεργητικού υλικού. Τα πειραματόζωα μολύνθηκαν με 2×10^6 προμαστιγωτές μορφές *L. major*, δύο εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό. Η διόγκωση του άκρου ποδός μετρήθηκε ως δείκτης της ιστικής βλάβης από το παράσιτο.

Επιπλέον, αντίθετα με τα εμβολιασμένα ποντίκια, η αρνητική ομάδα ελέγχου εμφάνισε έντονη ιστική καταστροφή την 7^η εβδομάδα μετά την μόλυνση. Παρόλα αυτά και στα εμβολιασμένα πειραματόζωα η προστασία δεν ήταν πλήρης, καθώς οι δερματικές βλάβες αυξήθηκαν μέχρι και τη θανάτωση των πειραματόζωων (10^η εβδομάδα μετά την μόλυνση), χωρίς να παρατηρηθεί τάση για ίαση από την ασθένεια με τη χαρακτηριστική υποστροφή των δερματικών βλαβών (Εικ. 4.37).

Για να εξακριβωθεί κατά πόσο το προστατευτικό αποτέλεσμα των εμβολιασμών οφείλεται σε μετατόπιση της ισορροπίας μεταξύ των ειδικών για το παράσιτο Th1 και Th2 υποπληθυσμών λεμφοκυττάρων, έγινε προσδιορισμός του τίτλου των IgG1 και IgG2a ισοτύπων των ειδικών ανοσοσφαιρινών μετά την μόλυνση. Είναι γνωστό ότι ειδικά IgG1 αντισώματα παράγονται κυρίως στις Th2 αποκρίσεις ενώ ο ισότυπος IgG2a επικρατεί στις ειδικές ανοσοσφαιρίνες όταν η απόκριση είναι Th1 τύπου [192]. Επομένως, 5 εβδομάδες μετά την μόλυνση, πραγματοποιήθηκε αιμοληψία και προσδιορισμός των ειδικών για το παράσιτο αντισωμάτων IgG1 και IgG2a (§ 3.2.6.). Ο προφυλακτικός εμβολιασμός BALB/c ποντικών με ΔΚ που είχαν προεπωαστεί με την ανασυνδυασμένη LieIF, είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή ειδικών αντισωμάτων έναντι του παρασίτου, τόσο IgG1 όσο και IgG2a ισότυπου. Πιο συγκεκριμένα, ο τίτλος IgG1 δε μεταβλήθηκε ενώ η παραγωγή ανοσοσφαιρινών IgG2a τύπου στην ομάδα των εμβολιασμένων ζώων, ήταν χαμηλότερη συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (Εικ. 4.38).

Συνολικά τα παραπάνω δεδομένα, αποδεικνύουν ότι ο εμβολιασμός με ΔΚ που είχαν προεπωαστεί με την LieIF, δύναται να επιφέρει σημαντικού βαθμού προστασία στον ξενιστή, με έκδηλη την επιβραδυνόμενη εξέλιξη των δερματικών βλαβών. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν την επαγωγή μη αμιγών προστατευτικών μηχανισμών με κυρίαρχη την Th1 πόλωση.



Εικόνα 4.38. Χυμική απόκριση γενετικά ευαίσθητων BALB/c ποντικών, που είχαν εμβολιαστεί με προεπωασμένα με την Lief, ΔK. BALB/c ποντίκια εμβολιάστηκαν με 10^6 ΔK που είχαν προεπωαστεί με την ανασυνδυασμένη Lief. Τα ποντίκια της ομάδας ελέγχου εμβολιάστηκαν με 10^6 ΔK που είχαν καλλιεργηθεί μόνο με την επίδραση του καλλιεργητικού υλικού. Τα πειραματόζωα μολύνθηκαν με 2×10^6 προμαστιγωτές μορφές *L. major*, δύο εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό. Ο προσδιορισμός των ειδικών IgG1 και IgG2a ισotύπων, πραγματοποιήθηκε με ELISA. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως η οπτική πυκνότητα στα 450 nm.

5. Συζήτηση

5.1 *In vitro* αντιλεϊσμανιακή δράση του ευκαρυωτικού παράγοντα έναρξης eIF του παρασίτου *L. infantum* (LieIF).

5.1.1 Προστατευτικός και ανοσοθεραπευτικός ρόλος της LieIF, *in vitro*.

Ο ευκαρυωτικός παράγοντας έναρξης eIF του παρασίτου *L. infantum* (LieIF), εμφανίζει υψηλή ομολογία αμινοξικής αλληλουχίας με τον παράγοντα έναρξης της μετάφρασης eIF4A των θηλαστικών και άλλων ομολόγων στους κατώτερους και ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Η LieIF αποτελεί μία εξαιρετικά συντηρημένη πρωτεΐνη ανάμεσα στα είδη του παρασίτου *Leishmania* και εκφράζεται και στα δύο αναπτυξιακά του στάδια (προμαστιγωτές και αμαστιγωτές μορφές) [77].

Οι eIF4A πρωτεΐνες ανήκουν στην οικογένεια των DEAD box πρωτεϊνών. Τα μέλη της οικογένειας αυτής, περιέχουν εννέα συντηρημένα μοτίβα αμινοξέων, που περιλαμβάνουν την αλληλουχία ασπαραγινικό οξύ - γλουταμινικό οξύ – αλανίνη - ασπαραγινικό οξύ (Asp-Glu-Ala-Asp / D-E-A-D), από την οποία προέρχεται και το όνομά τους [193]. Μέλη της οικογένειας των DEAD box πρωτεϊνών συναντώνται σε μεγάλο εύρος οργανισμών όπως τα βακτήρια και οι ευκαρυώτες και συμμετέχουν σχεδόν σε κάθε κυτταρική διαδικασία που περιλαμβάνει RNA, όπως η μεταγραφή, η βιογένεση του ριβοσώματος και η υποβάθμιση του RNA [194, 195]. Ο ευκαρυωτικός παράγοντας έναρξης eIF4A, σε συνδυασμό με τους παράγοντες eIF4E και eIF4G, αποτελούν το σύμπλοκο eIF4F, που καταλύει την πρόσδεση της 40S ριβοσωμικής υπομονάδας στο mRNA και τον επακόλουθο έλεγχο για το κωδικόνιο έναρξης AUG [71, 196]. Η *in vitro* ανάλυση των eIF4A πρωτεϊνών, αναδύει τη δραστηριότητα RNA-εξαρτώμενης ATPάσης και σε ορισμένες περιπτώσεις ATP-εξαρτώμενης ελικάσης [197, 198].

Η έναρξη της μετάφρασης στα πρωτόζωα της οικογένειας των τρυπανοσοματιδίων, δεν είναι σαφώς χαρακτηρισμένη και οι παράγοντες της μετάφρασης έχουν προσδιοριστεί σύμφωνα με τις ομοιότητες της αμινοξικής τους αλληλουχίας με γνωστούς αντίστοιχους παράγοντες άλλων οργανισμών. Επομένως, ο ρόλος της LieIF στην βιολογία του παρασίτου, παραμένει αδιευκρίνιστος. Οι *in silico* προβλέψεις υποδηλώνουν την πιθανή συμμετοχή της στην διαδικασία της μετάφρασης, παρόλο που πρόσφατες μελέτες ανάλυσης αλληλουχίας της LieIF των στελεχών *L. braziliensis* και *L. major* με την eIF4A άλλων ευκαρυωτικών οργανισμών φανερώνουν μερική απόκλιση [199, 200]. Ερευνητικές μελέτες αποκαλύπτουν πως η LieIF της *L. infantum* (LieIF) παρουσιάζει ενεργότητα RNA-εξαρτώμενης ATPάσης καθώς και ATP-εξαρτώμενης RNA ελικάσης

[76]. Επιπλέον, έχειδειχθεί πως η LieIF δεν δύναται να υποκαταστήσει τον παράγοντα eIF4A των ζυμομυκήτων, παρά την υψηλή ομοιότητα αμινοξικής αλληλουχίας ανάμεσα στις δύο πρωτεΐνες. Επίσης, ερευνητικά δεδομένα αναφέρουν την ύπαρξη ενδείξεων παρεμποδιστικής δράσης του μορίου της LieIF, στην μεταφραστική διαδικασία των κυττάρων του θηλαστικού ξενιστή [76].

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, προκειμένου να προσδιοριστεί εν μέρει, ο πολύπλοκος βιολογικός ρόλος της LeIF, διερευνήθηκε αρχικά η πιθανή αντιλειτουργική δράση της LieIF, σε ένα *in vitro* πειραματικό μοντέλο μολυσμένων μακροφάγων. Τα μακροφάγα αποτελούν φαγοκύτταρα που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις ανοσολογικές αποκρίσεις του ξενιστή έναντι μικροβιακών παθογόνων, τόσο ως δυναμικά κύτταρα της φυσικής ανοσίας, όσο και ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα της ειδικής επίκτητης ανοσολογικής απόκρισης. Ως εκ τούτου, η δράση αυτών των κυττάρων είναι καθοριστική στην έναρξη και εγκατάσταση κυτταρικών μηχανισμών για την ενεργοποίηση προστατευτικής ανοσολογικής απόκρισης έναντι του παρασίτου *Leishmania* [134]. Παρόλα αυτά, τα μακροφάγα εμφανίζουν διπλό ρόλο στην άμυνα του ξενιστή έναντι του παρασίτου, δρώντας και ως «κύτταρα ξενιστές» επιτρέποντας παράλληλα την επιβίωση και την ανάπτυξη αυτού του ενδοκυττάριου παθογόνου [201].

Στη μελέτη αυτή, αρχικά διερευνήθηκε η πιθανή συνεργιστική δράση της ανασυνδυασμένης κυτταροπλασματικής πρωτεΐνης του παρασίτου *L. infantum* (LieIF), και της προφλεγμονώδους πλειοτροπικής κυτταροκίνης IFN- γ , στον ενδοκυτταρικό περιορισμό του στελέχους *L. donovani*, σε *in vitro* πειραματικό μοντέλο J774A.1 μακροφάγων. Η επιλογή της IFN- γ , στηρίχτηκε σε πληθώρα βιβλιογραφικών αναφορών που υποστηρίζουν πως η ιντερφερόνη τύπου II (IFN- γ) που παράγεται από ενεργοποιημένα CD4⁺ και CD8⁺ κύτταρα, παίζει καθοριστικό ρόλο στην επαγωγή λείσμανιοκτόνου δράσης έναντι του παρασίτου. Τα μακροφάγα, μετά την ενεργοποίησή τους με IFN- γ , παράγουν ανοσορυθμιστικά μηνύματα μέσω κυτταροκινών και χημειοκινών. Σε ευαισθητοποιημένα με IFN- γ μακροφάγα, οι προμαστιγωτές μορφές *L. donovani* επάγουν την έκκριση του μονοξειδίου του αζώτου (NO), το οποίο αποτελεί έναν βασικό αμυντικό μηχανισμό άμυνας έναντι σχεδόν όλων των ειδών του γένους *Leishmania* [183, 202]. Παρά την σημαντικότητα της IFN- γ στην ανάπτυξη αμυντικών μηχανισμών έναντι του παρασίτου, έχει αναφερθεί πως η εξωγενής χορήγηση IFN- γ , δεν επαρκεί για την ανάπτυξη προστασίας των γενετικά ευαίσθητων BALB/c ποντικών σε πειραματικά μοντέλα δερματικής λείσμανίασης [203]. Επιπλέον, mRNA μετάγραφα της

IFN- γ , ανιχνεύονται σε δερματικές βλάβες τόσο των ανθεκτικών C57BL/6 όσο και των ευαίσθητων BALB/c ποντικών [204]. Τα παραπάνω βιβλιογραφικά δεδομένα, καταδεικνύουν πως η IFN- γ δεν είναι αρκετή για τον έλεγχο της *L. major* και επομένως απαιτούνται πρόσθετοι παράγοντες για την ανάπτυξης ειδικής προστατευτικής ανοσίας.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, υποστηρίζουν πως η συνδυαστική χορήγηση των LieIF και IFN- γ στα μακροφάγα κυτταρικής σειράς J774A.1, πριν την μόλυνση των κυττάρων με τα παράσιτα του στελέχους *L. donovani*, οδηγεί σε σημαντική μείωση της ενδοκυτταρικής ανάπτυξης του παρασίτου στην προχωρημένη φάση της μόλυνσης (72 ώρες μετά την μόλυνση). Η μείωση αυτή επιβεβαιώνεται τόσο από το σημαντικά ελαττωμένο ποσοστό μολυσμένων κυττάρων όσο και από το μειωμένο παρασιτικό φορτίο ανά κύτταρο [169]. Τα παραπάνω αποτελέσματα, καταδεικνύουν έναν δυνητικά προστατευτικό ρόλο της LieIF, κατά τα πρώιμα στάδια της μόλυνσης, ενισχύοντας την ανοσορυθμιστική δράση της IFN- γ .

Η παρατήρηση πως στα μακροφάγα, στα οποία χορηγήθηκαν ταυτόχρονα οι πρωτεΐνες LieIF και IFN- γ πριν την έναρξη της μόλυνσης, αναπτύχθηκαν αμυντικοί μηχανισμοί έναντι του παρασίτου, οδήγησε στη μελέτη της αντιπαρασιτικής δράσης της LieIF μετά την εγκατάσταση της μόλυνσης, με γνώμονα την μεταβολική δραστηριότητα των ενδοκυττάρων παρασίτων. Η ταυτόχρονη χορήγηση LieIF/IFN- γ , μετά την μόλυνση των μακροφάγων, οδηγεί επίσης σε παρεμπόδιση της ενδοκυττάριας ανάπτυξης του παρασίτου, τόσο στην αρχική φάση της μόλυνσης (19 ώρες) όσο και στην προχωρημένη φάση αυτής (72 ώρες), υποδηλώνοντας ανοσοθεραπευτική δράση της LieIF.

5.1.2 Μηχανισμός προστασίας των LieIF-ευαισθητοποιημένων μακροφάγων.

Η επιβίωση και ο πολλαπλασιασμός του παρασίτου του γένους *Leishmania* στα μακροφάγα, διασφαλίζεται μεταξύ άλλων, με την καταστολή της παραγωγής των μικροβιοκτόνων μορίων NO και ROS [139]. Το NO και οι μεσολαβητές της οξειδωτικής καταπόνησης, εξαλείφουν αποτελεσματικά το παράσιτο, ως αποτέλεσμα της συνεργιστικής δράσης κυτταροκινών απόκρισης τύπου Th1 (π.χ. IFN- γ , TNF- α). Στην παρούσα μελέτη, η αποδεδειγμένη δυνατότητα της LieIF να αναστέλει την ανάπτυξη των ενδοκυττάρων αμαστιγωτών *L. donovani*, οδήγησε το ερευνητικό ενδιαφέρον, στον έλεγχο της μακροφαγικής παραγωγής και έκκρισης του NO στο υπερκείμενο των

καλλιεργειών των εν λόγω κυττάρων καθώς και της ενδομακροφαγικής συγκέντρωσης των ROS.

Στην παρούσα μελέτη, η συνδυαστική χορήγηση LieIF/IFN- γ πριν την μόλυνση με το στέλεχος *L. donovani*, οδήγησε σε σημαντική παραγωγή NO, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου των μακροφάγων στα οποία χορηγήθηκε η μονήρης IFN- γ . Τα επίπεδα του παραγόμενου αντιμικροβιακού μορίου NO, ήταν σημαντικά τόσο στην αρχική όσο και στην προχωρημένη φάση της μόλυνσης. Επιπλέον, παρατηρήθηκε παραγωγή NO και στην περίπτωση της συνδυαστικής χορήγησης LieIF/IFN- γ μετά την εγκατάσταση της μόλυνσης. Συνεπώς, η ευαισθητοποίηση αυτή οδήγησε σε περιορισμό του πολλαπλασιασμού του παρασίτου μέσω ενός NO - εξαρτώμενου μηχανισμού. Ο ρόλος του NO στον έλεγχο της μόλυνσης των μακροφάγων από το παράσιτο, είναι καλά μελετημένος τόσο στο ανοσοποιητικό σύστημα του ανθρώπου όσο και στο ανοσοποιητικό σύστημα άλλων θηλαστικών [107, 205, 206]. Σε μολυσμένα, με το στέλεχος *L. infantum*, μακροφάγα, προερχόμενα από περιφερικά μονοκύτταρα αίματος υγιών εθελοντών, παρατηρείται σημαντική απελευθέρωση του NO. Η παραγωγή αυτή σχετίζεται με την λείσμανιοκτόνο δράση των κυττάρων και αυξάνεται μετά την εξωγενή προσθήκη της κυτταροκίνης IFN- γ και του βακτηριακού λιποπολυσακχαρίτη (LPS) [207].

Επιπλέον, στην προχωρημένη φάση της μόλυνσης, όπου η παρεμπόδιση της ανάπτυξης του παρασίτου ήταν σημαντική, προσδιορίστηκε η παραγωγή ROS. Παρατηρήθηκε, πως τα μακροφάγα στα οποία χορηγήθηκαν οι LieIF/IFN- γ , είτε πριν την εγκατάσταση της μόλυνσης είτε μετά, παράγουν σημαντικά επίπεδα ROS, επιβεβαιώνοντας την λείσμανιοκτόνο δράση αυτών των μεσολαβητών της οξειδωτικής καταπόνησης. Η παρασιτοκτόνος δράση των ROS επιβεβαιώνεται από πλήθος επιστημονικών αναφορών. Μελέτες αναφέρουν πως σε *in vivo* συστήματα, το παράσιτο παρεμποδίζει την παραγωγή ριζών οξυγόνου (O_2^-) και τα επίπεδα των O_2^- και του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) που σημειώνονται σε μονοκύτταρα ασθενών με ενεργή σπλαγγχνική λείσμανίαση, είναι σημαντικά ελαττωμένα συγκριτικά με τα αντίστοιχα επίπεδα των υγιών εθελοντών [208, 209].

Συνεπώς, η συνδυαστική χορήγηση των LieIF/IFN- γ , τόσο πριν όσο και μετά την εγκατάσταση της μόλυνσης, αποτελεί ένα υποσχόμενο προφυλακτικό ή ανοσοθεραπευτικό σχήμα που επηρεάζει αρνητικά την εξέλιξη της μόλυνσης μέσω ενός μηχανισμού που ενεργοποιεί την παραγωγή των NO και ROS.

Επιπλέον, στην παρούσα μελέτη, βρέθηκε πως η διέγερση των J774A.1 μακροφάγων με τις LieIF/IFN- γ , πριν την εγκατάσταση της μόλυνσης, οδηγεί σε πενταπλάσια αύξηση της έκφρασης των μεταγράφων mRNA της MIP-1 α , στην προχωρημένη φάση της μόλυνσης. Τα παραπάνω αποτελέσματα, επιβεβαιώνουν πως οι CC χημειοκίνες, στις οποίες ανήκει η MIP-1 α , παίζουν σημαντικό ρόλο στον περιορισμό της εξάπλωσης της λεισμανίασης [210-213]. Μελέτες υποστηρίζουν πως η χορήγηση MIP-1 α σε *L. donovani* - μολυσμένα μακροφάγα, οδηγεί σε περιορισμό του παρασιτικού φορτίου μέσω της επαγωγής του ανιόντος του υπεροξειδίου του υδρογόνου και της παραγωγής νιτρωδών [214]. Επιπλέον, η εξωγενής χορήγηση MIP-1 α σε *L. donovani* - μολυσμένα μακροφάγα, επάγει την παραγωγή της προστατευτικής κυτταροκίνης IL-12 και παρεμποδίζει την παραγωγή των κατασταλτικών IL-10 και TGF- β κυτταροκινών [215]. Καθώς η MIP-1 α θεωρείται υπεύθυνη για την ρύθμιση της έκκρισης TNF- α από τα μακροφάγα, ακολούθησε έλεγχος της έκφρασης των mRNA μεταγράφων του TNF- α [202, 216].

Η επίδραση των LieIF/IFN- γ πριν την εγκατάσταση της μόλυνσης, οδήγησε σε εννεαπλάσια αύξηση της έκφρασης του mRNA που κωδικοποιεί τον TNF- α , στην προχωρημένη φάση της μόλυνσης. Τα αποτελέσματα αυτά συνηγορούν προς την παραδοχή πως ο TNF- α προάγει ένα δεύτερο μήνυμα για την επαγωγή αντιμικροβιακής δραστηριότητας σε ενεργοποιημένα με IFN- γ μακροφάγα, ρυθμίζοντας την παραγωγή NO [217]. Αντιθέτως τα μακροφάγα τα οποία διεγέρθηκαν με τις LieIF/IFN- γ μετά την εγκατάσταση της μόλυνσης, δεν παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης των MIP-1 α και TNF- α γονιδίων.

Οι CC χημειοκίνες παίζουν σημαντικό ρόλο στον περιορισμό της ενδοκυτταρικής επιβίωσης της *L. donovani* μέσω NO - εξαρτώμενων μηχανισμών. Μακροφάγα που διεγέρθηκαν με την MIP-1 α χημειοκίνη παρουσίασαν ενισχυμένη παραγωγή NO και ικανότητα εξάλειψης των ενδοκυττάρων πρωτοζώων *Trypanosoma* και *Leishmania* [213, 218]. Στο *in vitro* σύστημα μακροφάγων που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, παρατηρήθηκε, όπως αναφέρεται παραπάνω, αυξημένη παραγωγή MIP-1 α και TNF- α κατόπιν της συνδυαστικής επίδρασης των πρωτεϊνών LieIF/IFN- γ . Καθώς η MIP-1 α ρυθμίζει την έκφραση του TNF- α , προκειμένου να επιβεβαιωθεί η συμμετοχή τους στον περιορισμό της ενδοκυττάριας ανάπτυξης του παρασίτου, εκτελέστηκαν δοκιμασίες παρεμπόδισης χρησιμοποιώντας εξουδετερωτικά αντισώματα έναντι του TNF- α και περαιτέρω έλεγχος της επίδρασης αυτής της εξουδετέρωσης, στην οξειδωτική έκκριση των παρασιτιζόμενων μακροφάγων, και συγκεκριμένα στην παραγωγή ROS. Η

εξουδετέρωση του παραγόμενου TNF- α , οδήγησε σε μειωμένη παραγωγή ROS, στην περίπτωση της επίδρασης της LieIF στα J774A.1 μακροφάγα, πριν την έναρξη της μόλυνσης. Τα αποτελέσματα αυτά αναδεικνύουν πως ο έλεγχος του παρασίτου διαμεσολαβείται από την παραγωγή των αντιμικροβιακών μορίων μέσω του TNF- α -εξαρτώμενου μονοπατιού, επιβεβαιώνοντας άλλες πειραματικές μελέτες που αναφέρουν πως η επίδραση του TNF- α ενισχύει την οξειδωτική έκρηξη των μακροφάγων [219, 220]. Αντιθέτως, η επίδραση της διέγερσης με LieIF, μετά την εγκατάσταση της μόλυνσης, οδήγησε στον έλεγχο της ενδοκυτταρικής ανάπτυξης του παρασίτου μέσω ενός μηχανισμού παραγωγής ROS που διαμεσολαβείται από TNF- α -ανεξάρτητα μονοπάτια μεταγωγής μηνυμάτων. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν την απουσία της μεταβολής στην ένταση της μεταγραφής TNF- α όπως προσδιορίστηκε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου και έρχονται σε συμφωνία με άλλες μελέτες που ανέδειξαν την παραγωγή ROS μέσω TNF- α -ανεξάρτητων μονοπατιών. Αντιπροσωπευτική έρευνα αναφέρει πως η εξουδετέρωση του παραγόμενου TNF- α σε ουδετερόφιλα ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα, δεν μεταβάλλει τα επίπεδα των παραγόμενων ROS [221].

Στη συνέχεια προκειμένου να διερευνηθεί σε βάθος η λειτουργική διαφοροποίηση των μακροφάγων, προσδιορίστηκε η κυτταροπλασματική εντόπιση των κυτταροκινών IL-12, IL-17 και IL-10, στο χρονικό σημείο των 72 ωρών, όπου παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη παρεμπόδιση της ενδοκυτταρικής ανάπτυξης του παρασίτου καθώς και μεγαλύτερη παραγωγή των μεσολαβητών της οξειδωτικής καταπόνησης και των MIP-1 α και TNF- α μορίων. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η ανασυνδυασμένη LieIF, τόσο όταν επιδρά στο σύστημα των μακροφάγων πριν την εγκατάσταση της μόλυνσης, όσο και μετά, επάγει την παραγωγή IL-12 από τα J774A.1 μακροφάγα. Τα δεδομένα αυτά συνηγορούν με τα ευρήματα της επιστημονικής κοινότητας σύμφωνα με τα οποία η ανασυνδυασμένη LeIF, τόσο του στελέχους *L. braziliensis* (LbeIF) όσο και του στελέχους *L. infantum* (LieIF), επάγει την παραγωγή της βιοενεργής IL-12p70 από ανθρώπινα μακροφάγα, μονοκύτταρα και ΔΚ που έχουν προηγουμένως εκτεθεί στην IFN- γ [72, 77]. Η επακόλουθη παραγωγή της IL-12 από την επίδραση της κυτταροπλασματικής πρωτεΐνης LieIF, είναι απαραίτητη για την διαφοροποίηση και την πόλωση των CD4⁺ κυττάρων προς τον Th1 ανοσοφαινότυπο [92].

Επιπλέον, βρέθηκε πως η ανασυνδυασμένη LieIF επάγει και την παραγωγή IL-10 από τα J774A.1 μακροφάγα, τόσο όταν επιδρά στο σύστημα των μακροφάγων πριν την

μόλυνση όσο και μετά, συμφωνώντας με άλλα βιβλιογραφικά δεδομένα [72, 77]. Η LeIF (LbeIF ή LmeIF), επάγει την παραγωγή IL-10 από ανθρώπινα μακροφάγα, μονοκύτταρα και ΔΚ που έχουν προηγουμένως εκτεθεί στην IFN-γ [72, 77]. Η IL-10 δρα κατασταλτικά στην λειτουργία των μακροφάγων και των ΔΚ, παρεμποδίζοντας την έκφραση των συνδιεγερτικών μορίων [222]. Επιπλέον, παρεμποδίζει την οξειδωτική έκρηξη και την παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών, ιδιαιτέρως του TNF-α, περιορίζοντας την λεισμανιοκτόνο δράση των μακροφάγων και ευνοώντας την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό του παρασίτου στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων-ξενιστών [131]. Παρόλα αυτά, η παραγωγή της IL-10 από την LieIF, δεν αποκλείει το γεγονός ότι αυτή η πρωτεΐνη μπορεί να αποτελέσει ισχυρό ανοσοτροποποιητικό μόριο και πιθανό υποψήφιο ανοσοενισχυτικό. Μελέτες αναφέρουν πως η παραγωγή της κατασταλτικής IL-10 μπορεί να είναι συμβατή και με την επαγωγή Th1 φαινοτύπου, καθώς έχουν προσδιοριστεί IL-12-επαγόμενα Th1 κύτταρα, που παράγουν IL-10 [222]. Επιπλέον, CD4⁺ T κύτταρα που εκφράζουν τον χαρακτηριστικό μεταγραφικό παράγοντα των Th1 κυττάρων, T-bet, και εκκρίνουν μεγάλη ποσότητα IFN-γ, αποτελούν πηγές IL-10 [223].

Επίσης, αποδείχθηκε για πρώτη φορά πως η κυτταροπλασματική πρωτεΐνη LieIF επάγει την παραγωγή της IL-17 κυτταροκίνης από J774A.1 μακροφάγα. Παρότι, τα Th17 κύτταρα αναφέρονται ως ο κύριος κυτταρικός πληθυσμός που παράγει την IL-17, έχουν αναφερθεί και άλλοι κυτταρικοί πληθυσμοί, όπως τα μακροφάγα, τα NK κύτταρα και τα γδ T κύτταρα [224, 225]. Υπάρχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα σχετικά με τον ρόλο της IL-17 στην παθολογία της λεισμανίασης. Πειραματικά μοντέλα δερματικής λεισμανίασης που αναπτύχθηκαν στο ποντίκι, καταδεικνύουν πως η κυτταροκίνη αυτή συμμετέχει στην επιδείνωση της νόσου ενώ παρατηρείται προστατευτική δράση στην παθογένεια της σπλαγχνικής λεισμανίασης του ανθρώπου [123, 124]. Επιπλέον, πρόσφατη μελέτη συνηγορεί στον προστατευτικό ρόλο της IL-17 έναντι της σπλαγχνικής λεισμανίασης, καθώς αποδεικνύει ότι η IL-17 δρα συνεργιστικά με την IFN-γ, βελτιώνοντας την λεισμανιοκτόνο δράση των μακροφάγων [226].

Συνοψίζοντας, στην παρούσα μελέτη αποδείχθηκε για πρώτη φορά η προστατευτική ή/και ανοσοθεραπευτική δράση της κυτταροπλασματικής πρωτεΐνης LeIF του στελέχους *L. infantum*, σε *in vitro* σύστημα *L. donovani* - μολυσμένων μακροφάγων. Επιπλέον, επιβεβαιώθηκε πως η λεισμανιοκτόνος δράση της LieIF, διαμεσολαβείται από την παραγωγή λεισμανιοκτόνων παραγόντων όπως τα NO και ROS. Επίσης, αποδείχθηκε πως η προστατευτική δράση της LieIF και ο επιτυχημένος έλεγχος του παρασίτου,

διαμεσολαβείται από την παραγωγή των αντιμικροβιακών μορίων μέσω ενός TNF- α εξαρτώμενου μονοπατιού και από την παραγωγή της IL-12, υποδηλώνοντας την ενεργοποίηση των μακροφάγων μέσω της κλασσικής οδού [227]. Αντιθέτως, η ανοσοθεραπευτική δράση των LieIF/IFN- γ , στα ήδη μολυσμένα μακροφάγα, διαμεσολαβείται από τα αντιμικροβιακά μόρια NO και ROS μέσω ενεργοποίησης μηχανισμών που δεν περιλαμβάνουν τη συμμετοχή των μορίων MIP-1 α και TNF- α . Παρόλα αυτά, στον μηχανισμό της θεραπευτικής δράσης της πρωτεΐνης, φαίνεται να εμπλέκονται οι κυτταροκίνες IL-12 και IL-17.

5.2 Μελέτη ανοσογονικών ιδιοτήτων της LieIF.

5.2.1 Λειτουργική διαφοροποίηση των δενδριτικών κυττάρων.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, αξιολογήθηκε η ικανότητα της ανασυνδυασμένης LieIF, να επάγει την ωρίμανση και την ενεργοποίηση των μυελοειδών δενδριτικών κυττάρων (ΔΚ) που προήλθαν από τον μυελό των οστών ποντικού. Η *ex vivo* επίδραση της LieIF, οδήγησε σε υψηλά ποσοστά έκφρασης των μορίων MHC τάξης II, καταδεικνύοντας την δυνατότητα των LieIF - ευαισθητοποιημένων ΔΚ, να επάγουν το αρχικό σήμα, Σήμα 1, που δημιουργείται από την αλληλεπίδραση του αντιγονικού πεπτιδίου με το σύμπλεγμα του υποδοχέα του T κυττάρου (TCR)/CD3.

Επιπλέον, η *ex vivo* επίδραση της LieIF, οδήγησε σε σημαντική αύξηση της έκφρασης των συνδιεγερτικών μορίων CD40, CD80 και CD86. Η αύξηση αυτή ήταν ανάλογη με την αντίστοιχη αύξηση που προκλήθηκε από την επίδραση του βακτηριακού LPS, που αποτελεί ισχυρό διεγέρτη των ΔΚ. Τα δεδομένα αυτά έρχονται σε συμφωνία με βιβλιογραφικές αναφορές καθώς έχει αποδειχθεί πως και η LbeIF αυξάνει την έκφραση του CD80 σε ανθρώπινα μακροφάγα και ΔΚ [77]. Η πρωτοτυπία της παρούσας μελέτης, έγκειται στην ανάδειξη της θετικής επίδρασης της ανασυνδυασμένης LieIF στην έκφραση των μορίων CD40 και CD86, από μυελοειδή ΔΚ προερχόμενα από μυελό των οστών ποντικού. Ανάλογη μελέτη έδειξε πως η επίδραση της ανασυνδυασμένης LbeIF σε ΔΚ προερχόμενα από ανθρώπινα μονοκύτταρα, επάγει αμελητέα αύξηση της έκφρασης του επιφανειακού μορίου CD40 και μηδενική αύξηση του συνδιεγερτικού μορίου CD86 [77]. Αυτές οι δύο πρωτεΐνες (LieIF, LbeIF) παρουσιάζουν υψηλή ομολογία (98%) αλλά όχι πανομοιότυπη αμινοξική αλληλουχία, εμφανίζοντας τις περισσότερες διαφορές στο αμινοτελικό τμήμα (1-226 αα). Επομένως, τα αντιφατικά αποτελέσματα που

παρουσιάζονται παραπάνω, είναι πιθανόν να αποδίδονται σε αυτές τις αντικαταστάσεις των αμινοξικών καταλοίπων.

Η ικανότητα της LieIF να επάγει την αύξηση της έκφρασης των επιφανειακών μορίων CD80 και CD86, αποτελεί μία ιδιαιτέρως σημαντική ανοσοτροποποιητική ιδιότητα της πρωτεΐνης. Τα μέλη της οικογένειας των B7 γλυκοπρωτεϊνών (B7-1/CD80 και B7-2/CD86) είναι απαραίτητα για την ενεργοποίηση των T κυττάρων καθώς η διαφοροποίηση των παρθένων T κυττάρων προς ανοσοδραστικά κύτταρα, απαιτεί περισσότερα του ενός σήματα. Πιο συγκεκριμένα, οι γλυκοπρωτεΐνες CD80 και CD86 εμπλέκονται στο δεύτερο και μη αντιγονοειδικό, συνδεδεγμένο σήμα, το Σήμα 2 [228]. Η παρουσία ή η απουσία του συνδεδεγμένου σήματος 2, καθορίζει την επαγωγή κλωνικής εξάπλωσης ή κλωνικής ανέργειας.

Επιπλέον, η αυξημένη έκφραση του επιφανειακού δείκτη CD40, κατόπιν της επίδρασης της LieIF, είναι ιδιαίτερα σημαντική για την ενίσχυση των ανοσοτροποποιητικών ιδιοτήτων της πρωτεΐνης. Ο επιφανειακός δείκτης CD40 των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων αλληλεπιδρά με το μόριο gp39 (CD40L) των ενεργοποιημένων CD4⁺ T κυττάρων. Η αλληλεπίδραση CD40 - CD40L έχει μελετηθεί στα πλαίσια της διερεύνησης των επίκτητων ανοσολογικών αποκρίσεων έναντι του παρασίτου του γένους *Leishmania*. Η αλληλεπίδραση CD40 - CD40L έχει αποδειχθεί απαραίτητη για την παραγωγή IL-12 και IFN-γ και τον επακόλουθο έλεγχο της μόλυνσης από το στέλεχος *L. major* [128]. Η παραπάνω παραδοχή επιβεβαιώνεται και από συναφή μελέτη, όπου η εξωγενής χορήγηση ανασυνδυασμένης IL-12 σε πειραματικό μοντέλο δερματικής λεισμανίασης ποντικών που έφεραν τεχνητή εξάλειψη του γονιδίου CD40L (CD40L^{-/-}), οδήγησε σε μείωση του μεγέθους των δερματικών βλαβών [125]. Επιπλέον, η αλληλεπίδραση CD40/CD40L επάγει την ενεργοποίηση της επαγωγίσιμης συνθετάσης του μονοξειδίου του αζώτου (iNOS), ενός ενζύμου που καταλύει την παραγωγή του λεισμανιοκτόνου μορίου NO [229].

Συνοψίζοντας, η αύξηση της έκφρασης των συνδεδεγμένων μορίων κατόπιν της επίδρασης της LieIF, υποδηλώνει την ωρίμανση των ΔΚ συμβάλλοντας στην επίτευξη των απαραίτητων αλληλεπιδράσεων συνδεδεγμένου σήματος για την αποτελεσματική ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων και την ενίσχυση των ανοσολογικών αποκρίσεων [90].

Τα ΔΚ μπορούν επιπλέον, να ρυθμίζουν τις ανοσολογικές αποκρίσεις παράγοντας κυτταροκίνες [174]. Αμετάβλητες μοριακές δομές μικροβίων, όπως ο LPS, εκτός από την

επαγωγή της έκφρασης των συνδιεγερτικών μορίων, ρυθμίζουν και την παραγωγή κυτταροκινών από ΔΚ. Αναλόγως, στην παρούσα μελέτη ελέγχθηκε η δυνατότητα της ανασυνδυασμένης LieIF, να επάγει, πέραν της έκφρασης των συνδιεγερτικών μορίων, και την παραγωγή κυτταροκινών.

Ως εκ τούτου, ελέγχθηκε η παραγωγή των κυτταροκινών IL-12, IFN- γ , IL-10 και IL-4 καθώς και η ενεργοποίηση της iNOS. Η *in vitro* επίδραση της LieIF στα ΔΚ, προκάλεσε εξαπλάσια αύξηση του ποσοστού των κυττάρων που παράγουν IL-12, δράση ανάλογη με την επίδραση του LPS. Όπως είναι γνωστό, η IL-12 πρωταρχικά εκκρίνεται από τα ΔΚ και δρα παρακρινώς στα NK κύτταρα επάγοντας την παραγωγή IFN- γ καθώς και στα παρθένα T λεμφοκύτταρα κατευθύνοντας την πόλωσή τους προς τον Th1 υποπληθυσμό [230]. Η επίδραση της LieIF στην παραγωγή της IL-12 από ΔΚ προερχόμενα από μυελό των οστών ποντικού, ελέγχεται για πρώτη φορά. Ανάλογες μελέτες επιβεβαιώνουν την παραγωγή IL-12 από μονοκύτταρα και ΔΚ υγιών εθελοντών, που οφείλεται στην επίδραση της ομόλογης (98% ομολογία) LbeIF [77]. Η LieIF οδήγησε επιπλέον, σε μέτρια αύξηση του ποσοστού των ΔΚ που παράγουν IL-10 και ενεργοποιούν την iNOS, ενώ δεν προκάλεσε αύξηση της παραγωγής της IFN- γ και της απαραίτητης για την ανάπτυξη Th2 απόκρισης, της IL-4. Ανάλογες μελέτες, επιβεβαιώνουν την παραγωγή IL-10 από ανθρώπινα μονοκύτταρα και μακροφάγα, κατόπιν επίδρασης της LieIF και LbeIF, αντίστοιχα [72, 77].

Συνολικά, τα παραπάνω αποτελέσματα αναδεικνύουν την δράση της LieIF ως ισχυρό επαγωγέα της IL-12, η οποία είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη ανοσολογικής απόκρισης τύπου Th1 και για τον αποτελεσματικό έλεγχο της λοίμωξης από τα παράσιτα του γένους *Leishmania spp.*

5.2.2 Υποδοχείς τύπου Toll.

Οι υποδοχείς τύπου Toll (TLRs) ενισχύουν την ικανότητα των ΔΚ να επάγουν T κυτταρικές αποκρίσεις [231]. Επιπλέον, οι TLRs δρουν συνεργιστικά, ενισχύοντας την ωρίμανση των ΔΚ και προκαλώντας την παραγωγή διαφορετικών ομάδων κυτταροκινών, μέσω της σηματοδότησης διαφορετικών μονοπατιών [143].

Σκοπός της παρούσας μελέτης, ήταν η αξιολόγηση της πιθανής συνεργιστικής δράσης των TLRs και της LieIF. Η συνδυαστική ενεργοποίηση των TLRs αντικατοπτρίζει με μεγαλύτερη πιστότητα την φυσική πορεία των μολύνσεων, καθώς τα παθογόνα περιέχουν

διάφορους αγωνιστές των TLRs, που μπορούν να ενεργοποιήσουν συνδυαστικά διαφορετικούς υποδοχείς, που βρίσκονται σε διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα [231]. Για την αξιολόγηση της πιθανής συνεργιστικής δράσης, διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας εφαρμόστηκαν στα ΔΚ και αξιολογήθηκαν οι διαφορές στην ωρίμανσή τους.

Τα αποτελέσματα της *in vitro* δοκιμασίας, επιβεβαίωσαν τις ανοσοτροποποιητικές ιδιότητες της LieIF, καθώς η ανασυνδυασμένη LieIF παρουσίασε όμοια επίδραση στην ωρίμανση των ΔΚ, με αυτή που παρατηρήθηκε λόγω της δράσης των καλά μελετημένων προσδεμάτων των υποδοχέων TLR3, 4 και 9 (polyI:C, LPS και CpG αλληλουχίες, αντίστοιχα). Η επιλογή των συγκεκριμένων TLRs βασίστηκε σε πληθώρα βιβλιογραφικών δεδομένων που αναλύουν την συμμετοχή αυτών των TLRs, στην παθολογία της λεισμανίασης. Ερευνητικές μελέτες αναδεικνύουν την συμμετοχή του TLR3 στην φαγοκυττάρωση της *L. donovani* και στην ενίσχυση της λεισμανιοκτόνου δράσης των μακροφάγων [158]. Ο TLR4 είναι απαραίτητος για την ενεργοποίηση προστατευτικής επίκτητης ανοσολογικής απόκρισης στην δερματική λεισμανίαση. Πειραματικό μοντέλο δερματικής λεισμανίασης που εγκαταστάθηκε σε ανθεκτικά C57BL/6 ποντίκια που έφεραν εξάλειψη του γονιδίου του TLR4 (TLR4^{0/0}), παρουσίασε αυξημένο παρασιτικό φορτίο και μειωμένη ικανότητα επούλωσης των δερματικών βλαβών, συγκριτικά με τον φυσικό τύπο των C57/BL6 ποντικών [181]. Επιπλέον, μελέτες σε πειραματικό μοντέλο σπλαγχνικής λεισμανίασης αναδεικνύουν την θετική συσχέτιση της ενεργοποίησης του TLR4 και της αντιλεισμανιακής δραστηριότητας των μακροφάγων [232]. Ο TLR9 αποτελεί έναν καλά μελετημένο υποδοχέα των ΔΚ και το πρόσδεμά του (CpG αλληλουχίες) χρησιμοποιείται ως ανοσοενισχυτικό σε πειραματικά εμβόλια έναντι της νόσου [83]. Επιπλέον, σύγχρονη βιβλιογραφική αναφορά, υποστηρίζει τη συμμετοχή του TLR9 στην ανάπτυξη προστασίας έναντι της *L. guyanensis*, σε πειραματικό μοντέλο ποντίκου [182].

Επιπρόσθετα, στην παρούσα μελέτη, δεν διαφάνηκε η συνεργιστική δράση της LieIF με κάποιον από τους παραπάνω TLRs, καθώς η ταυτόχρονη επίδραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης και καθενός από τους TLR αγωνιστές, δεν οδήγησε σε ενίσχυση της έκφρασης των συνδιεγερτικών μορίων της B7 οικογένειας. Αντιθέτως, τα πειραματικά δεδομένα αναδεικνύουν για πρώτη φορά, την ενίσχυση της ανοσορυθμιστικής δράσης της LieIF από την συνεργιστική δράση δύο MyD88-ανεξάρτητων TLRs, των TLR3 και TLR4. Η ταυτόχρονη διέγερση των ΔΚ με τους

αγωνιστές των TLR3 και TLR4, (polyI:C και LPS, αντίστοιχα) σε συνδυασμό με την ανασυνδυασμένη LieIF, οδήγησε στην αύξηση της έκφρασης των συνδιεγερτικών μορίων CD80 και CD86. Η συνεργιστική δράση των TLR3/TLR4 έχει επίσης αποδειχθεί στην παραγωγή της IL-12p70 από ΔΚ προερχόμενα από μυελό των οστών ποντικού [231]. Επιπλέον, η ενίσχυση της ανοσοτροποποιητικής δράσης της LieIF από την συνεργιστική δράση των TLR3 και TLR4, φάνηκε να είναι εξίσου αποτελεσματική ως προς την ωρίμανση των ΔΚ, με την συνεργιστική δράση δύο MyD88-ανεξάρτητων (TLR3, TLR4) και ενός MyD88-εξαρτημένου (TLR9) υποδοχέα.

Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνουν μια πιθανή συνεργιστική δράση των TLR3, TLR4 και της LieIF. Παρόλα αυτά, απαιτείται περαιτέρω αξιολόγηση αυτής της δράσης σε επίπεδο ελέγχου της παραγωγής φλεγμονωδών κυτταροκινών και της έκφρασης χημειοκινών. Επιπλέον, απαιτείται η διερεύνηση της ρύθμισης των TLRs, λαμβάνοντας υπόψη όχι μόνο την επίπτωση της ευαισθητοποίησής τους αλλά και την χρονολογική σειρά με την οποία ρυθμίζονται [28].

Η επιβεβαίωση της ενίσχυσης των ανοσοτροποποιητικών ιδιοτήτων της ανασυνδυασμένης LieIF από την συνεργιστική δράση των TLRs, θα ανοίξει δρόμο για την χρήση της πρωτεΐνης σε πειραματικά πρωτόκολλα ανοσοθεραπείας με ενισχυμένο θεραπευτικό αποτέλεσμα. Βιβλιογραφικές αναφορές, καταδεικνύουν την αποτελεσματική εφαρμογή της συνέργειας των TLRs, σε πρωτόκολλα ανοσοθεραπείας έναντι της δερματικής λεισμανίασης σε πειραματικό μοντέλο ποντικού. Αναλυτικότερα, η συνδυασμένη χορήγηση της πολυπρωτεΐνης L110f (που περιέχει την αμινοτελική περιοχή της eIF πρωτεΐνης του στελέχους *L. braziliensis*) με το πρόσδεμα του TLR4 (MPL) και το πρόσδεμα του TLR9 (CpG), σε μολυσμένα με *L. major*, BALB/c ποντίκια, οδήγησε σε μείωση του παρασιτικού φορτίου, αύξηση του αριθμού των δραστικών CD4⁺ κυττάρων και της παραγωγής IL-12, IFN-γ και CCL5 [233].

5.2.3 Αξιολόγηση της δράσης της ανασυνδυασμένης LieIF ως ανοσοενισχυτικό, σε *in vivo* πειραματικό μοντέλο ποντικού.

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, αποδείχθηκε πως η ανασυνδυασμένη LieIF έχει άμεση επίδραση στην ρύθμιση της παραγωγής κυτταροκινών και στην έκφραση των συνδιεγερτικών μορίων, από τα μυελοειδή ΔΚ ποντικού, ενισχύοντας την πιθανότητα δράσης της ίδιας της πρωτεΐνης ως ανοσοενισχυτικό. Η υπόθεση αυτή, ισχυροποιείται και

από την μελέτη της δράσης της LieIF του στελέχους *L. major* (LmeIF), η οποία παρουσιάζει 100% ομολογία με την LieIF. Η LmeIF μπορεί να ρυθμίσει την κυρίαρχη Th1 απόκριση, σε υγιή ή μολυσμένα με *L. major*, BALB/c ποντίκια, αναπτύσσοντας κλώνους T λεμφοκυττάρων ικανούς να παράγουν IFN- γ , χωρίς την χρήση επιπρόσθετου ανοσοενισχυτικού, υποδηλώνοντας την πιθανή δράση της ίδιας της πρωτεΐνης ως ανοσοενισχυτικό [185].

Η διερεύνηση της δράσης της LieIF ως αποτελεσματικό ανοσοενισχυτικό, ελέγχθηκε σε *in vivo* πειραματικό μοντέλο ποντικού, καθώς η χρήση των αιμομικτικών φυλών ποντικών αποτελεί ένα ευρέως αποδεκτό μοντέλο προκλινικών μελετών για τη διαλεύκανση του μηχανισμού δράσης ανοσοτροποποιητικών και θεραπευτικών ουσιών [234].

Επιλέχθηκε το πειραματικό πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του μηχανισμού δράσης του πλέον ευρύτατα χρησιμοποιούμενου ανοσοενισχυτικού στον άνθρωπο, των αλάτων του αλουμινίου (alum) [167]. Συνεπώς, η LieIF αξιολογήθηκε ως ανοσοενισχυτικό, μέσω της μελέτης της επαγωγής φλεγμονής στο σημείο της έγχυσης της μαζί με ένα κλασικό αντιγόνο, την αλβουμίνη του αυγού (OVA). Η έγχυση των OVA-LieIF, οδήγησε σε σημαντική προσέλκυση του κύριου λευκοκυτταρικού πληθυσμού που διηθεί τους ιστούς στα αρχικά στάδια της φλεγμονώδους απόκρισης, των ουδετερόφιλων (Ly6G⁺-CD11b⁺). Τα ουδετερόφιλα φαγοκυτταρώνουν τα παθογόνα και απελευθερώνουν μεσολαβητές (π.χ. MIP-1 α) που συνεισφέρουν στη φλεγμονώδη απόκριση, προσελκύοντας μακροφάγα στο σημείο της φλεγμονής [235]. Η επιστράτευση και ενός άλλου κυτταρικού πληθυσμού, των μονοκυττάρων (Ly6C⁺-CD11b⁺), στην περιτοναϊκή κοιλότητα, στο χρονικό σημείο των 24 ωρών, ανέδειξε, όπως και στην περίπτωση του alum, πως η LieIF οδηγεί επιτυχώς την προσέλκυση των κυττάρων της φλεγμονώδους αντίδρασης.

Η διερεύνηση του μηχανισμού δράσης της LieIF μέσω ενδογενούς ιστικού σήματος κινδύνου κατά αντιστοιχία με το alum [167], απέδειξε πως η δράση της LieIF δεν διαμεσολαβείται από την παραγωγή του ουρικού οξέος. Λαμβάνοντας υπόψη την φαινοτυπική ωρίμανση και τη λειτουργική διαφοροποίηση που επάγει η LieIF στα ΔΚ, είναι πιθανόν αυτή η άμεση ενεργοποίηση των ΔΚ να αναπληρώνει την απουσία του ουρικού οξέος ως ενδογενές σήμα κινδύνου.

Επιπλέον, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της έκφρασης της IL-1 β , η οποία συνδέεται με την αυξημένη εισροή των ουδετερόφιλων στο σημείο της έγχυσης [183],

και του μεταγραφικού παράγοντα NF- κ B2, ο οποίος συνδέεται με την αντοχή έναντι του παρασίτου *Leishmania spp* [184]. Η παραγωγή IL-1 β καταδεικνύει την πιθανή ενεργοποίηση του συμπλόκου υψηλού μοριακού βάρους (inflammasome) που ενεργοποιεί φλεγμονώδεις κασπάσες και κυτταροκίνες της IL-1 οικογένειας, και συναντάται στον μηχανισμό δράσης του alum [183].

Ως απόρροια των παραπάνω, η LieIF επιδεικνύει ιδιότητες και δραστηριότητα ανοσοενισχυτικού ικανού να προάγει την προσαρμοστική ανοσία.

5.3 Αντιγονική χαρτογράφηση της LieIF και προσδιορισμός των ενεργών ανοσογονικών περιοχών της.

5.3.1 Προσδιορισμός T αντιγονικών επιτόπων στην ανασυνδυασμένη LieIF.

Κατά την εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής, προσδιορίστηκε η ύπαρξη T αντιγονικών επιτόπων στο μόριο της LieIF, που μπορούν εν δυνάμει να συνδεθούν στερεοχημικά με τον ομόλογο μεμβρανικό υποδοχέα των T κυττάρων (TCR). Αρχικά, ο προσδιορισμός αυτός πραγματοποιήθηκε έμμεσα μέσω της εκτίμησης του ρυθμού ανάπτυξης των λεμφοκυττάρων. Αναλυτικότερα, τα λεμφοκύτταρα που προήλθαν από τον σπλήνα *L. major* - μολυσμένων BALB/c (ευαίσθητη φυλή) και C57BL/6 (ανθεκτική φυλή) ποντικών, επώαστηκαν *in vitro* υπό την επίδραση της ανασυνδυασμένης LieIF και του διαλυτού αντιγόνου του παρασίτου.

Παρατηρήθηκε λεμφοβλαστική ικανότητα έναντι της ανασυνδυασμένης LieIF, τόσο στα ευαίσθητα BALB/c, όσο και στα ανθεκτικά C57BL/6 ποντίκια, υποδηλώνοντας την ύπαρξη T αντιγονικών επιτόπων που αναγνωρίζονται από τους TCR των CD4⁺ ή CD8⁺ λεμφοκυττάρων, στο μόριο της LieIF. Το αποτέλεσμα αυτό, έρχεται σε συνέπεια με τα δεδομένα άλλων μελετών όπου κύτταρα των επιχώριων λεμφαδένων *L. major*-μολυσμένων ή LmeIF - ανοσοποιημένων BALB/c ποντικών, αποκρίθηκαν θετικά στην *in vitro* επίδραση της LmeIF, με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο [185].

5.3.2 *In silico* ανάλυση της LieIF.

Η έμμεση κατάδειξη της ύπαρξης T αντιγονικών επιτόπων στο μόριο της LieIF, προσανατόλισε το ερευνητικό ενδιαφέρον, στην χαρτογράφηση του μορίου της, προκειμένου να προσδιοριστεί το μικρότερο δυνατό τμήμα της πρωτεΐνης που αποτελεί πρόσδεμα του ομόλογου TCR και φέρει ανοσογονικές ιδιότητες [77]. Ο προσδιορισμός του μικρότερου δυνατού τμήματος μιας πρωτεΐνης που φέρει ανοσογονικές ιδιότητες, είναι ιδιαίτερα σημαντικός διότι προσομοιάζει την φυσική πορεία της αποικοδόμησης της πρωτεΐνης μέσω της ενδοκυτταρικής οδού, αποκλείοντας τις αλληλουχίες τις πρωτεΐνης που μπορούν να προκαλέσουν επιδείνωση της παθολογίας της νόσου.

Επίσης, η χαρτογράφηση αντιγονικών επιτόπων είναι καθοριστική για τον σχεδιασμό ενός αποτελεσματικού εμβολίου [236, 237]. Ένα εμβόλιο θεωρείται αποτελεσματικό όταν προκαλεί ισχυρή ανοσολογική απόκριση από τα T κύτταρα, κατόπιν της αναγνώρισης των αντιγονικών πεπτιδίων και του σχηματισμού τριμοριακού συμπλέγματος (TCR , ένα μόριο MHC και αντιγονικό πεπτίδιο). Τα ενδογενή αντιγόνα (αυτά που παράγονται μέσα στο κύτταρο) υφίστανται επεξεργασία διαμέσου της κυτταροπλασματικής οδού και παρουσιάζονται στη μεμβράνη των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων με μόρια MHC τάξης I [238]. Τα μόρια MHC τάξης I, προσδένονται σε πεπτίδια μεγέθους 8 - 15 καταλοίπων [239]. Αντίστοιχα, τα εξωγενή αντιγόνα (αυτά που προσλαμβάνονται με ενδοκυττάρωση) υφίστανται επεξεργασία διαμέσου της ενδοκυτταρικής οδού και παρουσιάζονται με μόρια MHC τάξης II [240]. Τα μόρια MHC τάξης II, προσδένονται σε πεπτίδια μεγέθους που ποικίλλουν σε μήκος από 12 - 25 αμινοξικά κατάλοιπα .

Συνεπώς, η *in silico* ανάλυση των πρωτεϊνών με την χρήση αλγόριθμων πρόβλεψης αντιγονικότητας, επιταχύνει την διαδικασία εύρεσης αντιγονικών επιτόπων που αναγνωρίζονται από τους ομόλογους TCR, ενισχύοντας την έρευνα που σχετίζεται με την εφαρμογή πεπτιδίων σε πρωτόκολλα εμβολιασμού. Αυτή η μεθοδολογία προσδιορισμού αντιγονικών επιτόπων συνιστά μια καινοτόμο προσέγγιση έρευνας εμβολίων και ονομάζεται αντίστροφη ανάπτυξη εμβολίων (reverse vaccinology) [241]. Τα τελευταία χρόνια έχει αναπτυχθεί μια σειρά αλγορίθμων πρόβλεψης αντιγονικότητας, που διακρίνουν συνδετικά από μη συνδετικά πεπτίδια, με κριτήριο την αμινοξική τους αλληλουχία [242]. Προς αυτή την κατεύθυνση, πραγματοποιήθηκε λήψη της πλήρους αλληλουχίας του ευκαρυωτικού παράγοντα έναρξης eIF της *L. infantum* από την βάση δεδομένων NCBI/protein. Στη συνέχεια αποκλείστηκε ο ρόλος της LieIF ως

εκκρινόμενης πρωτεΐνης και ακολούθησε χαρτογράφηση της LieIF με αλγόριθμους πρόβλεψης αντιγονικότητας. Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν τρεις αλγόριθμοι για την πρόβλεψη αλληλουχιών της LieIF που μπορούν να προσδένονται στα μόρια MHC τάξης I και II. Αναλυτικότερα, για τον προσδιορισμό T - κυτταρικών επιτόπων, οι οποίοι αναγνωρίζονται από τα μόρια MHC τάξης II του ποντικού (φυλές BALB/c, C57BL/6 και CBA) επιλέχθηκαν οι αλγόριθμοι NetMHCII 2.2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCII>) και SYFPEITHI (<http://www.syfpeithi.de>). Αντίστοιχα, για τον προσδιορισμό T - κυτταρικών επιτόπων που αναγνωρίζονται από τα μόρια MHC τάξης I του ποντικού επιλέχθηκαν οι αλγόριθμοι NetMHC 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC-3.0/>) και SYFPEITHI (<http://www.syfpeithi.de>). Η ανάλυση της αλληλουχίας αποκάλυψε έναν σημαντικό αριθμό πιθανών επιτόπων, 61 15-μερή πεπτίδια και 41 9-μερή πεπτίδια, αλλά ελάχιστοι από αυτούς προβλέφθηκαν από το σύνολο των χρησιμοποιούμενων αλγορίθμων, με δυνατότητα πρόσδεσης σε περισσότερα του ενός αλληλόμορφα. Τα προβλεπόμενα 9-μερή πεπτίδια επέδειξαν δυνατότητα σύνδεσης με τα μόρια H2-L^d, H2-K^d, H2-K^k, H2-D^b και H2-K^b, ενώ τα 15-μερή πεπτίδια επέδειξαν δυνατότητα σύνδεσης με τα μόρια H2-IA^d, H2-IA^k, H2-IE^k και H2-IA^b. Από το σύνολο των 15-μερών και 9-μερών πεπτιδίων της LieIF που υπεδείχθησαν από τους αλγορίθμους, προκρίθηκαν, τελικά, πέντε πολυπεπτίδια μεγέθους 16-18 αμινοξέων που ικανοποιούσαν τα παρακάτω κριτήρια: άνηκαν στην αμινοτελική περιοχή της πρωτεΐνης (1-226 αα), καθώς βιβλιογραφικές αναφορές υποστηρίζουν πως η ανοσοτροποποιητική ικανότητά της LieIF εντοπίζεται στην αμινοτελική της περιοχή (1-226 αα) [185], παρουσίαζαν υψηλά σκορ πρόσδεσης στους αλγόριθμους πρόσδεσης και περιείχαν τόσο 9-μερείς όσο και 15-μερείς επίτοπους.

5.3.3 Εκτίμηση ανοσογονικών ιδιοτήτων των τμημάτων της LieIF.

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι τα συνθετικά πεπτίδια της αμινοτελικής περιοχής της LieIF, μεγέθους 16 - 18 αα, δεν επάγουν την ωρίμανση των ΔΚ. Εξαίρεση αποτελεί το πεπτίδιο 52-68, η επίδραση του οποίου οδήγησε σε αύξηση της έκφρασης του συνδιεγερτικού μορίου CD80. Το αποτέλεσμα αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό, καθώς υπάρχουν ενδείξεις πως η έκφραση των μορίων CD80 και CD86, έχει διαφορετικές επιδράσεις στην ανάπτυξη των Th1 και Th2 κυττάρων. Σε πειραματικό μοντέλο αλλεργικής εγκεφαλομυελίτιδας, η εξουδετέρωση του CD80, με το κατάλληλο αντίσωμα,

επάγει την ανάπτυξη Th2 ανοσοαπόκρισης ενώ η αντίστοιχη εξουδετέρωση του CD86, επάγει Th1 ανοσοαπόκριση [186]. Επιπλέον, σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές, η ρύθμιση της έκφρασης των συνδιεγερτικών μορίων CD80 και CD86 επηρεάζεται από πληθώρα κυτταροκινών, όπως η IL-4, η IFN- γ και η IL-10. Η IL-4, που αποτελεί χαρακτηριστική κυτταροκίνη της Th2 απόκρισης, δρα ως ισχυρός επαγωγέας της γλυκοπρωτεΐνης CD86 και λιγότερο της CD80, στα B λεμφοκύτταρα [243]. Αντίστοιχα, η IFN- γ που συνδέεται με την ανάπτυξη Th1 απόκρισης, παρουσιάζει αντιφατική δράση ως προς την επαγωγή της έκφρασης του CD80, καθώς η επίδρασή της προκαλεί αύξηση της έκφρασής του στα περιφερικά μονοκύτταρα αίματος υγιών εθελοντών [244] και μείωσή του σε περιτοναϊκά μακροφάγα ποντικού [245]. Επιπλέον, η επίδραση της IL-10, που δρα κατασταλτικά στην ανάπτυξη Th1 απόκρισης, προκαλεί μείωση της έκφρασης του CD86 ενώ δεν προκαλεί μεταβολή στην έκφραση του CD80, σε ΔΚ υγιών εθελοντών [246].

Η ανεπάρκεια των συνθετικών πεπτιδίων να επάγουν την λειτουργική διαφοροποίηση των ΔΚ, επιβεβαιώθηκε από το προφίλ των παραγόμενων κυτταροκινών. Τα πεπτίδια που δεν επέφεραν αύξηση της έκφρασης των συνδιεγερτικών μορίων (πεπτ. 48-64, 103-119, 15-31 και 200-216), δεν οδήγησαν επίσης σε σημαντική αύξηση της έκφρασης των κυτταροκινών IL-12, IFN- γ , IL-10 και IL-4. Το πεπτίδιο 52-68, η επίδραση του οποίου είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης του CD80, οδήγησε σε αύξηση της παραγωγής των κυτταροκινών IFN- γ και IL-10, οι οποίες φαίνεται να ρυθμίζουν με την σειρά τους την έκφραση των συνδιεγερτικών μορίων, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Επιπλέον, η παρατηρούμενη αύξηση της IL-10, μπορεί να αποδοθεί στην αυτοκρινή δράση της αυθόρμητα παραγόμενης IL-10 από τα ανώριμα ΔΚ [187]. Η αδυναμία του πεπτιδίου 15-31 να επάγει την παραγωγή κυτταροκινών, επιβεβαιώνεται από πρόσφατη μελέτη κατά την οποία η επίδραση του πρωτεϊνικού τμήματος LieIFΔ25 (που δεν περιέχει τα πρώτα 25 αμινοξικά κατάλοιπα της πρωτεΐνης) σε ανθρώπινα μονοκύτταρα, οδήγησε σε παρόμοια παραγωγή IL-12p70, IL-10 και TNF- α με την αντίστοιχη επίδραση ολόκληρης της LieIF, καταδεικνύοντας πως το τμήμα 1-25, δεν είναι απαραίτητο για την παραγωγή κυτταροκινών [72].

Η αδυναμία πρόκρισης ενός ισχυρού ανοσορυθμιστικού πεπτιδίου, οδήγησε την μελέτη στον προσδιορισμό πολυπεπτιδίων. Για να προσδιοριστεί το πολυεπιτοπικό τμήμα που φέρει ανοσογονικές ιδιότητες, σχεδιάστηκαν και εκφράστηκαν συνολικά 8 ανασυνδυασμένα αλληλοεπικαλυπτόμενα πολυπεπτίδια που κάλυπταν το σύνολο της

πρωτεΐνης. Τα πρωτεϊνικά αυτά τμήματα, ελέγχθηκαν ως προς την ικανότητά τους να επάγουν την λειτουργική διαφοροποίηση των ΔΚ.

Τα τμήματα 196-403 και 25-238 (D1), επάγουν την αύξηση της έκφρασης των CD40, CD86 και CD80 καθώς και της παραγωγής της IL-12. Ακολουθούν τα τμήματα 1-226, 1-195 1-238 και 239-403, που εκτός από την παραγωγή της IL-12, προκαλούν την έκφραση δύο συνδιεγερτικών μορίων (CD40 και CD80). Τέλος ακολουθούν τα τμήματα της κεντρικής περιοχής, 129-226 και 129-261, που αυξάνουν την έκφραση ενός μόνο δείκτη (CD40). Από τα τμήματα αυτά, μόνο το τμήμα 129-261 και όχι το τμήμα 129-226, προκάλεσε σημαντική παραγωγή της IL-12. Τα δεδομένα αυτά, συμφωνούν με ερευνητική μελέτη ανάλογης επίδρασης των πολυεπιτοπικών τμημάτων της Lief στην παραγωγή IL-12p70 από μονοκύτταρα υγιών εθελοντών [72]. Σύμφωνα με την μελέτη αυτή, τα τμήματα 1-226, 1-195 και 196-403, αντίθετα με τα τμήματα 129-226 και 129-261, προκαλούν την παραγωγή IL-12p70 σε ενεργοποιημένα με IFN- γ μονοκύτταρα υγιών εθελοντών. Συνεπώς, τα παραπάνω αποτελέσματα, αποδεικνύουν ότι η περιοχή που παρουσιάζει την ικανότητα διέγερσης των ΔΚ, βρίσκεται στην περιοχή 1-129 (για την αμινοτελική περιοχή) και 261-403 για την καρβοξυτελική περιοχή.

Η καινοτομία της παρούσας μελέτης, έγκειται στο γεγονός, πως αντίθετα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα που έχουν προκύψει από την μελέτη της LbeIF, η Lief δεν διαθέτει πόλωση, διότι τόσο η αμινοτελική (1-226) όσο και η καρβοξυτελική της περιοχή (196-403), επάγουν την ωρίμανσή των ΔΚ και την σημαντική παραγωγή IL-12p40. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνονται και από την επίδραση των περιοχών που προσδιορίστηκαν με τρισδιάστατα μοντέλα κρυσταλλικών δομών, 25-238 (D1) και 239-403 (D2) που αντιπροσωπεύουν την αμινοτελική και την καρβοξυτελική περιοχή, αντίστοιχα. Η αντιφατική επίδραση της καρβοξυτελικής περιοχής της Lief και της LbeIF, μπορεί να αποδοθεί στην αντικατάσταση αμινοξέος στην θέση 384 (αλανίνη έναντι γλυκίνης).

Τα παραπάνω αποτελέσματα, προσανατόλισαν το ερευνητικό ενδιαφέρον σε αυτές τις δύο περιοχές της πρωτεΐνης και στην διερεύνηση της αντιλειτουργικής τους ικανότητας, σε πειραματικό μοντέλο μακροφάγων. Η επίδραση της αμινοτελικής και της καρβοξυτελικής περιοχής της Lief, είτε πριν είτε μετά την εγκατάσταση της μόλυνσης με *L. donovani* προμαστιγωτές μορφές, οδήγησε σε παρεμπόδιση της ενδοκυτταρικής ανάπτυξης του παρασίτου, υποδηλώνοντας τον σημαντικό τους ρόλο σε πρωτόκολλα εμβολιασμού και ανοσοθεραπείας. Η επίδραση της αμινοτελικής περιοχής (1-226), πριν ή

μετά την μόλυνση, οδήγησε σε σχεδόν όμοια επίπεδα παρεμπόδισης σε όλα τα χρονικά σημεία ελέγχου με την αντίστοιχη παρεμπόδιση που προκάλεσε ολόκληρο το μόριο της LieIF, δηλώνοντας έμμεσα πως το τμήμα 1-226 είναι υπεύθυνο για την παρατηρούμενη αντιλειτουργική δράση της LieIF. Παρόλα αυτά, η αντίστοιχη επίδραση της καρβοξυτελικής περιοχής (196-403), τόσο πριν όσο και μετά την έκθεση στο παράσιτο, οδήγησε σε ταχύτερη παρεμπόδιση της ανάπτυξης του παρασίτου, συγκριτικά με την LieIF, καθώς σημειώθηκε υψηλό ποσοστό παρεμπόδισης από τις πρώτες ώρες τις μόλυνσης.

Επιπλέον, η αντιλειτουργική δράση των τμημάτων 1-226 και 196-403, φάνηκε να διαμεσολαβείται από την παραγωγή του πλέον αποτελεσματικού μορίου με παρασιτοκτόνο δράση, του NO. Όμοια ή και υψηλότερα επίπεδα NO· προκλήθηκαν από την επίδραση των τμημάτων 1-226 και 196-403, από την αντίστοιχη παραγωγή που προκάλεσε η συνδυαστική επίδραση των ισχυρών διεγερτών LPS και IFN-γ. Τα επίπεδα του παραγόμενου NO· εμφάνισαν αναλογική συσχέτιση με την παρεμπόδιση της ανάπτυξης του παρασίτου, φτάνοντας στις μεγαλύτερες τιμές όταν η παρεμπόδιση άγγιζε το 100%. Η ευαισθητοποίηση των μακροφάγων με το τμήμα 1-226, πριν ή μετά την έκθεση στο παράσιτο, οδήγησε σε σχεδόν όμοια παραγωγή NO με την αντίστοιχη παραγωγή που προκάλεσε ολόκληρο το μόριο της LieIF, στα διάφορα χρονικά σημεία ελέγχου, επιβεβαιώνοντας την παρόμοια αντιλειτουργική δράση που παρατηρήθηκε ανάμεσα στο τμήμα 1-226 και σε ολόκληρη την LieIF. Η αντίστοιχη παραγωγή NO που προκλήθηκε από την επίδραση του τμήματος 196-403, οδήγησε σε χαμηλότερη παραγωγή NO από την αντίστοιχη παραγωγή της LieIF, υποδηλώνοντας την πιθανή συμμετοχή και άλλων αντιμικροβιακών μορίων.

5.4 Εφαρμογή της LieIF σε πειραματικά πρωτόκολλα ανοσοθεραπείας και εμβολιασμού.

5.4.1 Εφαρμογή της LieIF σε πειραματικό πρωτόκολλο ανοσοθεραπείας έναντι της σπλαγχνικής λεισμανίασης.

Οι Th1 ανοσοαποκρίσεις παίζουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της σπλαγχνικής λεισμανίασης και ως εκ τούτου, πρωτεΐνες του παρασίτου *Leishmania spp.* που διεγείρουν T κυτταρικές αποκρίσεις στον ξενιστή, αποτελούν υποψήφια μόρια για την

ανάπτυξη εμβολίου. Κατά την αναζήτηση τέτοιων αντιγόνων, η LeIF αναδείχθηκε ως ένα υποσχόμενο μόριο.

Η LeIF, είτε προερχόμενη από το στέλεχος *L. braziliensis* (LbeIF), είτε από το στέλεχος *L. major* (LmeIF), ρυθμίζει την παραγωγή της προστατευτικής IL-12 από μακροφάγα και μονοκύτταρα περιφερικού αίματος τόσο ασθενών όσο και υγιών εθελοντών, παρουσιάζοντας ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως πιθανό εργαλείο ανοσοθεραπείας στην προσπάθεια ανάπτυξης προστατευτικής ανοσίας έναντι της λείσμανιάσης [72, 73, 77]. Επιπλέον, το αμινοτελικό τμήμα (1-226) της LbeIF, μαζί με τις πρωτεΐνες TSA (thiol-specific antioxidant) και STI1 (stress-inducible protein 1) του στελέχους *L. major*, αποτελεί μέρος της ανασυνδυασμένης πολυπρωτεΐνης Leish-111f (LEISH-F1) [69], η οποία σε συνδυασμό με το ανοσοενισχυτικό MPL-SE έχει χρησιμοποιηθεί σε κλινικές μελέτες ανοσοθεραπείας (ανοσοχημειοθεραπείας) της δερματικής και της βλεννογονοδερματικής λείσμανιάσης, με ενθαρρυντικά αποτελέσματα [188, 247]. Επίσης, η πολυπρωτεΐνη Leish-110f (LEISH-F2), που αποτελεί τροποποιημένο μόριο της Leish-111f, κατόπιν αφαίρεσης των 6 καταλοίπων ιστιδίνης του αμινοτελικού άκρου και αντικατάστασης του αμινοξέος στην θέση 274, έχει δοκιμαστεί σε κλινικές μελέτες ανοσοχημειοθεραπείας έναντι της δερματικής λείσμανιάσης [248].

Στην συνέχεια των ερευνητικών αποτελεσμάτων που αναφέραμε και των δεδομένων της υπάρχουσας βιβλιογραφίας, σχεδιάστηκε η διερεύνηση της ικανότητας ολόκληρου του μορίου της ανασυνδυασμένης LeIF του στελέχους *L. infantum* (LieIF), χωρίς την παρουσία ανοσοενισχυτικού ή χημειοθεραπευτικού, να προκαλέσει ανοσοθεραπευτικό αποτέλεσμα σε πειραματικό μοντέλο σπλαγχνικής λείσμανιάσης.

Τα LieIF - ανοσοποιημένα πειραματόζωα, αν και ανέπτυξαν παρασιτισμό του ήπατος και του σπλήνα, σημείωσαν σημαντικά ελαττωμένο παρασιτικό φορτίο στον σπλήνα, 10 εβδομάδες μετά την μόλυνση. Το αποτέλεσμα αυτό, υποδηλώνει πως τα LieIF - ανοσοποιημένα ποντίκια μπόρεσαν να αναχαιτίσουν την εξάπλωση της μόλυνσης, συγκριτικά με τα μη - ανοσοποιημένα πειραματόζωα. Επιπλέον, όσον αφορά στην παραγωγή ειδικών αντιλειτουργικών αντισωμάτων, τα LieIF - ανοσοποιημένα ποντίκια παρουσίασαν αύξηση τόσο των IgG1 όσο και των IgG2a ανοσοσφαιρινών.

Ανάλυση με κυτταρομετρία ροής, του φαινοτύπου των λεμφοκυττάρων του σπλήνα, ανέδειξε αύξηση του ποσοστού των CD4⁺ και CD8⁺ κυττάρων στα ανοσοποιημένα ποντίκια, υποδηλώνοντας την ανάπτυξη αντιδράσεων κυτταρικής ανοσίας και την

σχετική επάρκεια του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή στον περιορισμό της ιστικής εξάπλωσης του παρασίτου.

Για την αξιολόγηση της Th1/Th2 ισορροπίας, προσδιορίστηκε η έκφραση της Th1-διαμεσολαβούμενης κυτταροκίνης IL-12 έναντι της IL-10, καθώς και των μεταγραφικών παραγόντων T-bet (Tbx21) και GATA-3. Τα LieIF - ανοσοποιημένα ποντίκια, παρουσίασαν αύξηση της παραγωγής της IL-12 στα λεμφοκύτταρα του σπλήνα, 10 εβδομάδες μετά την μόλυνση, όπου παρατηρήθηκε και η μείωση του παρασιτικού φορτίου του λεμφικού οργάνου. Επιπλέον, σημειώθηκαν υψηλότεροι λόγοι IL-12b/IL-10 και Tbx21/GATA-3, στα κύτταρα του σπλήνα των LieIF - ανοσοποιημένων ποντικών, υποδηλώνοντας τον ανοσολογικό προσανατολισμό των Th1 κυττάρων, προς την Th1 πόλωση. Η έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων T-bet και GATA-3, αποτελεί σήμα ρύθμισης της διαφοροποίησης των Th κυττάρων προς Th1 και Th2, αντίστοιχα, καθώς αυτοί οι δύο κύριοι μεταγραφικοί παράγοντες των T κυττάρων, ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων του Th1 και Th2 ανοσοφαινότυπου [249]. Η έκφραση του GATA-3 επηρεάζει άμεσα την έκφραση των γονιδίων των IL-5, IL-4 και IL-13 και αναστέλλει την παραγωγή των Th1 κυτταροκινών. Επίσης, πειραματικές μελέτες υποδεικνύουν πως η σχετική έκφραση αυτών των μεταγραφικών παραγόντων και όχι η έκφραση του καθενός από αυτούς χωριστά, αντικατοπτρίζει καλύτερα την Th1/Th2 πόλωση [250].

Συνολικά, τα παραπάνω αποτελέσματα αντικατοπτρίζουν την δυνητική χρήση της LieIF ως ένα υποσχόμενο εργαλείο για την ανοσοθεραπεία της λεισμανίασης. Αυτή η δυνατότητα της πρωτεΐνης, ενισχύεται και από τα αποτελέσματα της μελέτης της LieIF σε *in vitro* συστήματα, τα οποία προήλθαν από την έρευνα που πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της εκπόνησης της παρούσας διδακτορικής διατριβής και αναφέρθηκαν στις προηγούμενες ενότητες. Στην μελέτη αυτή, αναδείχθηκε η ενεργότητα της LieIF να παράγει κυτταροκίνες της προστατευτικής Th1 απόκρισης, σε *in vitro* συστήματα μακροφάγων και ΔΚ.

Η πρωτοτυπία της μελέτης αυτής, αφορά σε δύο παραμέτρους. Αρχικά, στο γεγονός της χρήσης της *L. infantum* eIF (LieIF) σε πρωτόκολλο ανοσοθεραπείας έναντι της λεισμανίασης και όχι της *L. braziliensis* eIF (LbeIF), η οποία αποτελεί μέρος του πολυπρωτεϊνικού εμβολίου Leish-111f. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η LieIF παρουσιάζει 98% ομολογία με την LbeIF. Επιπλέον, στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ολόκληρο το μόριο της LieIF σε αντιδιαστολή με το αμινοτελικό τμήμα (1-226) της LbeIF που αποτελεί συστατικό του εμβολίου Leish-111f και έχει εφαρμοστεί

σε κλινικές μελέτες ανοσοθεραπείας. Η αμινοτελική περιοχή 1-226 της LieIF, παρουσιάζει διαφορές στις θέσεις 2, 4, 6, 7, 125 και 149 από την αντίστοιχη περιοχή της LbeIF. Επιπλέον, στο συνολικό μόριο της LieIF, περιλαμβάνεται, πέραν της αλληλουχίας 1-226, και το καρβοξυτελικό τμήμα 196-403, για το οποίο προσδιορίστηκαν για πρώτη φορά ανοσοτροποποιητικές και αντιλειτουργικές ιδιότητες σε συστήματα ΔΚ και μακροφάγων, κατά την εκπόνηση της παρούσας διατριβής.

5.4.2 Ανοσιακή μεταφορά LieIF - ευαισθητοποιημένων ΔΚ σε πειραματικό μοντέλο δερματικής λεϊσμανίασης.

Ο σημαντικός ρόλος των ΔΚ στον συντονισμό της ανοσολογικής απόκρισης, οδήγησε την επιστημονική κοινότητα, στην χρήση των κυττάρων αυτών σε πειραματικές προσεγγίσεις ανοσολογικής παρέμβασης. Αυτή η στρατηγική εμβολιασμού με την χρήση των ΔΚ, στηρίζεται στην τεχνική της *ex vivo* ευαισθητοποίησης των κυττάρων με κάποιο αντιγόνο επιλογής. Η χρήση των ΔΚ έχει εφαρμοστεί σε πειραματικά πρωτόκολλα εμβολιασμών έναντι ιών, βακτηρίων και του καρκίνου [151, 251-254]. Αναλυτικότερα, μελέτες που αφορούν στην ανάπτυξη προστατευτικών εμβολίων έναντι της λεϊσμανίασης, αποδεικνύουν πως τα ΔΚ μπορούν να αποτελέσουν πλεονεκτικό σύστημα για την ανάπτυξη εμβολίων ικανών να αναχαιτίσουν την εξέλιξη της πειραματικής μόλυνσης. Κύτταρα Langerhans που ευαισθητοποιήθηκαν με διαλυτό αντιγόνο του παρασίτου, οδήγησαν στην ανάπτυξη προστασίας σε πειραματικό μοντέλο δερματικής λεϊσμανίασης [251]. Επιπλέον, ΔΚ που ευαισθητοποιήθηκαν *ex vivo* με το πεπτίδιο 12-31 αα της πρωτεΐνης KMP-11 του παρασίτου σε συνδυασμό με CpG ολιγονουκλεοτίδια και ΔΚ που αλληλεπιδράσαν με ιστόνες του παρασίτου (H2A, H2B, H3 και H4), επήγαγαν προστασία σε πειραματικά μοντέλα σπλαγγικής λεϊσμανίασης [255, 256]. Επίσης, η χρήση της LmeIF, η οποία παρουσιάζει 100% ομολογία με την LieIF, σε πρωτόκολλο προστατευτικής ανοσοποίησης ευαίσθητων BALB/c ποντικών που μολύνθηκαν με το στέλεχος *L. major*, επέφερε μερική προστασία και ελαττωμένο μέγεθος βλαβών [185].

Στην παρούσα μελέτη, αναπτύχθηκε σύστημα εμβολιασμού με την χρήση μυελοειδών ΔΚ που επωάστηκαν με την ανασυνδυασμένη LieIF. Διερευνήθηκε η ικανότητα των LieIF - ευαισθητοποιημένων ΔΚ, να προστατεύσουν τα γενετικά ευαίσθητα BALB/c ποντίκια έναντι της μόλυνσης με το στέλεχος *L. major*. Τα ποντίκια που εμβολιάστηκαν με τα LieIF - ευαισθητοποιημένα ΔΚ, παρουσίασαν σημαντικά ελαττωμένο μέγεθος

βλαβών μέχρι και την 10^η εβδομάδα μετά την μόλυνση, όπου τερματίστηκε ο πειραματισμός. Επιπλέον, παρουσίασαν όμοια επίπεδα IgG1 και χαμηλότερα επίπεδα IgG2a ανοσοσφαιρινών, συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (πειραματόζωα που εμβολιάστηκαν με μη διεγερμένα ΔΚ).

Τα παραπάνω αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι ο εμβολιασμός με LieIF - ευαισθητοποιημένα ΔΚ, δύναται να επιφέρει μέτρια προστασία στον ξενιστή, χωρίς να είναι εφικτή η ολοκληρωτική στροφή της ανοσολογικής απόκρισης προς την κυρίαρχη Th1 πόλωση. Ενδεχόμενες τροποποιήσεις στον αριθμό των ανοσοποιήσεων ή στους διεγέρτες των ΔΚ (π.χ. ταυτόχρονη διέγερση των υποδοχέων τύπου Toll), αξίζει να διερευνηθούν.

5.5 Επίλογος

Ο ευκαρυωτικός παράγοντας έναρξης του παρασίτου *Leishmania spp.* (*Leishmania* eukaryotic initiation factor, LeIF), αποτελεί μια υψηλά συντηρημένη πρωτεΐνη ανάμεσα στα είδη του παρασίτου, που είχε αρχικά περιγραφεί ως αντιγόνο ικανό να επάγει την Th1 προστατευτική ανοσολογική απόκριση.

Στα πλαίσια της εκπόνησης της παρούσας διδακτορικής διατριβής, μελετήθηκε η δράση της LeIF του παρασίτου *L. infantum* (LieIF) ως πιθανός αντι-λεϊσμανιακός παράγοντας. Από τα αποτελέσματα μιας σειράς *in vitro* δοκιμασιών, προέκυψαν ισχυρές αποδείξεις χαρακτηρισμού της LieIF ως δραστικού αντι-λεϊσμανιακού βιομορίου. Η μελέτη της *in vitro* προστατευτικής και ανοσοθεραπευτικής δράσης σε πειραματικό μοντέλο μολυσμένων μακροφάγων, η ικανότητά της να επάγει τη λειτουργική διαφοροποίηση των κύριων αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (δενδριτικών κυττάρων), η συνέργειά της με τους Toll-like υποδοχείς, καθώς και η ταυτοποίηση αντιγονικών περιοχών της, ικανών να πυροδοτήσουν την αναγνώριση του υποδοχέα των T κυττάρων (TCR), επιβεβαιώνουν τον σημαντικό λειτουργικό ρόλο της LieIF στην ανοσοπαθολογία της λεϊσμανίασης.

Επιπλέον, η μελέτη της πρωτεΐνης σε μια σειρά *in vivo* δοκιμασιών, όπως η διερεύνηση της δραστικότητάς της ως ανοσοενισχυτικού ικανού να επάγει την προσαρμοστική ανοσία και η μελέτη της σε πειραματικά πρωτόκολλα προστατευτικού εμβολιασμού και ανοσοθεραπείας για τον περιορισμό των βλαβών και της ιστικής εξάπλωσης της νόσου, ανέδειξαν την LieIF ως ένα ισχυρό υποψήφιο μόριο ικανό να προάγει μελλοντικές κλινικές εφαρμογές.

6. Περίληψη

6. Περίληψη

Οι Th1 ανοσολογικές αποκρίσεις συμβάλλουν ουσιαστικά στην ανάπτυξη προστατευτικής ανοσίας έναντι της λείσμανιάσης. Τα τελευταία χρόνια, έχουν προσδιοριστεί διάφορα ανασυνδυασμένα αντιγόνα του παρασίτου *Leishmania spp.*, τα οποία επέδειξαν ικανότητα επαγωγής Th1 ανοσολογικής απόκρισης και συνεπώς, υποσχόμενη δυναμική για την κατασκευή αποτελεσματικού εμβολίου έναντι της λείσμανιάσης.

Οι ευκαρυωτικοί παράγοντες έναρξης eIF του παρασίτου *Leishmania spp.* (LeIF), αποτελούν υψηλά συντηρημένες πρωτεΐνες και μελέτες αναφέρουν πως οι ευκαρυωτικοί παράγοντες έναρξης των στελεχών *L. braziliensis* και *L. major*, επάγουν αποτελεσματική προστασία έναντι της λείσμανιάσης, σε πειραματικά μοντέλα ποντικών.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, διερευνήθηκε η αντιλειτουργική δράση του ευκαρυωτικού παράγοντα έναρξης του στελέχους *L. infantum* (LieIF) και αποδείχθηκε για πρώτη φορά η προστατευτική ή/και ανοσοθεραπευτική δράση της πρωτεΐνης, σε *in vitro* σύστημα *L. donovani* - μολυσμένων μακροφάγων. Επίσης, προσδιορίστηκαν οι δραστικοί μηχανισμοί που επιστρατεύουν τα μακροφάγα ώστε να καταστείλουν τον πολλαπλασιασμό του παρασίτου και επιβεβαιώθηκε πως η λείσμανιοκτόνος δράση της LieIF, διαμεσολαβείται από την παραγωγή των παραγόντων NO και ROS. Αυτή η προστατευτική δράση της LieIF συσχετίστηκε με την ενεργοποίηση ενός TNF- α εξαρτώμενου μονοπατιού καθώς και με την παραγωγή της κυτταροκίνης IL-12. Αντιθέτως, η αντίστοιχη παραγωγή των αντιμικροβιακών μορίων, που προκλήθηκε από την ανοσοθεραπευτική δράση της LieIF, αποδείχθηκε πως δεν ρυθμίζεται από μηχανισμούς που περιλαμβάνουν τη συμμετοχή του TNF- α .

Στη συνέχεια, μελετήθηκαν οι ανοσοτροποποιητικές ιδιότητες της πρωτεΐνης LieIF, σε *in vitro* σύστημα μυελοειδών δένδριτικών κυττάρων (ΔΚ), τόσο σε επίπεδο ωρίμανσης και λειτουργικής διαφοροποίησης των κυττάρων, όσο και σε επίπεδο συνέργειας με τους υποδοχείς τύπου Toll (TLRs). Η επιβεβαίωση της ενίσχυσης των ανοσοτροποποιητικών ιδιοτήτων της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης LieIF από τη συνεργιστική δράση των TLRs, ενισχύει τη μελλοντική χρήση της πρωτεΐνης σε πειραματικά πρωτόκολλα ανοσοθεραπείας με ενισχυμένο θεραπευτικό αποτέλεσμα.

Επιπλέον, ακολουθώντας τη μεθοδολογία της αντίστροφης πορείας σχεδιασμού εμβολίων (reverse vaccinology) πραγματοποιήθηκε *in silico* ανάλυση της πρωτεΐνης

LieIF, προκειμένου να προσδιοριστούν τα ελάχιστα δυνατά τμήματά της, που αναγνωρίζονται εν δυνάμει από τους ομόλογους υποδοχείς των T κυττάρων (TCR) και φέρουν ανοσογονικές ιδιότητες. Η *in silico* ανάλυση των πρωτεϊνών με την χρήση αλγορίθμων πρόβλεψης αντιγονικότητας, επιταχύνει τη διαδικασία εύρεσης αντιγονικών επιτόπων, ενισχύοντας την έρευνα που σχετίζεται με τον προσδιορισμό κατάλληλων πεπτιδίων για πρότυπα πρωτόκολλα συνθετικών εμβολίων. Τα συνθετικά πεπτίδια που προέκυψαν από την παραπάνω διαδικασία, καθώς και μεγαλύτερα αλληλοεπικαλυπτόμενα ανασυνδυασμένα πρωτεϊνικά τμήματα της LieIF, ελέγχθηκαν περαιτέρω, ως προς τις ανοσοτροποποιητικές τους ιδιότητες, σε *in vitro* συστήματα μακροφάγων και ΔΚ. Τα αποτελέσματα έδειξαν για πρώτη φορά, την ύπαρξη πολυεπιτοπικών τμημάτων της πρωτεΐνης με ισχυρές ανοσοτροποποιητικές ιδιότητες.

Τα *in vitro* αποτελέσματα αυτής της διατριβής οδήγησαν στην αξιολόγηση της *in vivo* δράσης της LieIF σε πειραματικά μοντέλα ευαίσθητων έναντι της λείσμανιασης, ποντικών. Ειδικότερα, μελετήθηκε η δράση της LieIF ως ανοσοενισχυτικό και αναπτύχθηκαν πειραματικά πρωτόκολλα ανοσοθεραπείας με διαλυτή πρωτεΐνη και πρωτόκολλα προστατευτικού εμβολιασμού με ανοσιακή μεταφορά δενδριτικών κυττάρων ως «οχήματα μεταφοράς» της LieIF.

Συνοψίζοντας, η LieIF επέδειξε ιδιότητες και δραστικότητα ανοσοενισχυτικού, ικανού να προάγει προσαρμοστική ανοσία, καθώς και ισχυρές ανοσοτροποποιητικές ιδιότητες σε *in vitro* και *in vivo* συστήματα, που αποδείχθηκαν ικανές να προσανατολίσουν την πόλωση μιας Th1 - διαμεσολαβούμενης ανοσολογικής απόκρισης. Τα ευρήματα της μελέτης αυτής προσφέρουν πληρέστερη κατανόηση του ρόλου αυτής της κυτταροπλασματικής πρωτεΐνης του παρασίτου, αναδεικνύοντας τη μελλοντική της εκμετάλλευση στην στρατηγική ενός αποτελεσματικού ελέγχου της νόσου.

6. Summary

Th1 immune responses contribute to the development of a protective immunity against *Leishmania* species. Over the past years, several *Leishmania* recombinant antigens have been identified and demonstrated to be potential candidates for use in experimental vaccines against leishmaniasis, since they induce the desired Th1 immune response.

Eukaryotic initiation factors of *Leishmania* spp. (LeIF), are highly conserved proteins among *Leishmania* species and studies with eIF proteins from *L. braziliensis* and *L. major*, revealed the capacity of these proteins to induce effective protection in murine models of disease.

In the present study, it was demonstrated for the first time the protective and/or immunotherapeutic activity of the eukaryotic initiation factor from *L. infantum* (LieIF), in an *in vitro* system of *L. donovani* - infected macrophages. It was also determined the mechanisms activated by macrophages in order to suppress the intracellular multiplication of the parasite, thus was confirmed that the leishmanicidal effect of LieIF was mediated by the production of antimicrobial agents such as NO and ROS. This protective effect of LieIF was associated with the activation of a TNF- α - dependent pathway and the production of the protective IL-12 cytokine. In contrary, the corresponding output of antimicrobial molecules induced by the immunotherapeutic activity of LieIF, proved not to be regulated by mechanisms that involve TNF- α production.

Then, the immunomodulatory properties of LieIF were studied in an *in vitro* system of myeloid dendritic cells (DCs), by determining both maturation and functional differentiation of these cells, as well as its synergy with the Toll-like receptors (TLRs). Confirmation of amplification of the immunomodulatory properties of the recombinant protein LieIF, in synergy with the TLRs, enhances the future perspectives of exploiting this protein in various experimental protocols of immunotherapy with enhanced therapeutic effect.

Following the methodology of reverse vaccinology, an *in silico* analysis of LieIF protein was performed in order to identify short peptides that are recognized by T cell receptors (TCR) and have immunogenic properties. The *in silico* analysis of proteins with the use of epitope prediction algorithms, accelerates the process of finding antigenic epitopes and amplifies the use of these peptides as promising synthetic vaccine

candidates. Synthetic peptides derived from such process and larger overlapping recombinant protein fragments of LieIF, were further tested for their immunomodulatory properties in *in vitro* systems, including macrophages and dendritic cells. The results showed for the first time, the existence of polyepitopic fragments of the protein with potent immunomodulatory properties.

The data obtained by the *in vitro* studies, led to the evaluation of the *in vivo* activity of LieIF in experimental models of susceptible mice. Specifically, it was studied the effect of LieIF as adjuvant, as well as the use of the recombinant protein in experimental protocols of immunotherapy and of protective vaccination against the disease.

In brief, the obtained data showed that LieIF acts as adjuvant that is capable to induce adaptive immunity, as well as a strong immunomodulator in *in vitro* and *in vivo* experimental systems. This effect has proved capable to direct the polarization towards a Th1 - mediated immune response in experimental animal models. These findings provide a better understanding of the role of this cytoplasmic protein of the parasite, showing its potential for exploitation in effective strategies for disease control.

7. Βιβλιογραφία

7.1 Βιβλιογραφικές αναφορές

1. Herwaldt, B.L., *Leishmaniasis*. Lancet, 1999. **354**(9185): p. 1191-9.
2. Chargui, N., et al., *Increase of canine leishmaniasis in a previously low-endemicity area in Tunisia*. Parasite, 2007. **14**(3): p. 247-51.
3. Sogin, M.L., H.J. Elwood, and J.H. Gunderson, *Evolutionary diversity of eukaryotic small-subunit rRNA genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(5): p. 1383-7.
4. Hommel, M., *Visceral leishmaniasis: biology of the parasite*. J Infect, 1999. **39**(2): p. 101-11.
5. Banuls, A.L., M. Hide, and F. Prugnolle, *Leishmania and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans*. Adv Parasitol, 2007. **64**: p. 1-109.
6. Rioux, J.A., et al., *Taxonomy of Leishmania. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification*. Ann Parasitol Hum Comp, 1990. **65**(3): p. 111-25.
7. Boite, M.C., et al., *New insights on taxonomy, phylogeny and population genetics of Leishmania (Viannia) parasites based on multilocus sequence analysis*. PLoS Negl Trop Dis, 2012. **6**(11): p. e1888.
8. Bates, P.A., *Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies*. Int J Parasitol, 2007. **37**(10): p. 1097-106.
9. Ready, P.D., *Leishmaniasis emergence in Europe*. Euro Surveill, 2010. **15**(10): p. 19505.
10. Ntais, P., et al., *Leishmaniasis in Greece*. Am J Trop Med Hyg, 2013. **89**(5): p. 906-15.
11. Roatt, B.M., et al., *Immunotherapy and Immunochemotherapy in Visceral Leishmaniasis: Promising Treatments for this Neglected Disease*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 272.
12. Sideris, V., et al., *Canine visceral leishmaniasis in the great Athens area, Greece*. Parasite, 1996. **3**(2): p. 125-30.
13. Abranches, P., et al., *Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection*. J Parasitol, 1991. **77**(4): p. 557-61.
14. Monge-Maillo, B., et al., *Visceral leishmaniasis and HIV coinfection in the Mediterranean region*. PLoS Negl Trop Dis, 2014. **8**(8): p. e3021.
15. Palatnik-de-Sousa, C.B. and M.J. Day, *One Health: the global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis*. Parasit Vectors, 2011. **4**: p. 197.
16. Kedzierski, L., *Leishmaniasis*. Hum Vaccin, 2011. **7**(11): p. 1204-14.
17. Mougneau, E., F. Bihl, and N. Glaichenhaus, *Cell biology and immunology of Leishmania*. Immunol Rev, 2011. **240**(1): p. 286-96.
18. Dostalova, A. and P. Volf, *Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview*. Parasit Vectors, 2012. **5**: p. 276.
19. McConville, M.J., et al., *Living in a phagolysosome; metabolism of Leishmania amastigotes*. Trends Parasitol, 2007. **23**(8): p. 368-75.
20. Chen, J., et al., *The topology of the kinetoplast DNA network*. Cell, 1995. **80**(1): p. 61-9.
21. Kamhawi, S., *Phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes?* Trends Parasitol, 2006. **22**(9): p. 439-45.
22. Gossage, S.M., M.E. Rogers, and P.A. Bates, *Two separate growth phases during the development of Leishmania in sand flies: implications for understanding the life cycle*. Int J Parasitol, 2003. **33**(10): p. 1027-34.
23. Ready, P.D., *Epidemiology of visceral leishmaniasis*. Clin Epidemiol, 2014. **6**: p. 147-54.
24. Reiner, S.L. and R.M. Locksley, *The regulation of immunity to Leishmania major*. Annu Rev Immunol, 1995. **13**: p. 151-77.
25. Leclercq, V., et al., *The outcome of the parasitic process initiated by Leishmania infantum in laboratory mice: a tissue-dependent pattern controlled by the Lsh and MHC loci*. J Immunol, 1996. **157**(10): p. 4537-45.

26. Solbach, W. and T. Laskay, *The host response to Leishmania infection*. Adv Immunol, 2000. **74**: p. 275-317.
27. David, C.V. and N. Craft, *Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis*. Dermatol Ther, 2009. **22**(6): p. 491-502.
28. Hartley, M.A., et al., *The immunological, environmental, and phylogenetic perpetrators of metastatic leishmaniasis*. Trends Parasitol, 2014. **30**(8): p. 412-22.
29. Kedzierski, L., *Leishmaniasis Vaccine: Where are We Today?* J Glob Infect Dis, 2010. **2**(2): p. 177-85.
30. Hepburn, N.C., *Cutaneous leishmaniasis*. Clin Exp Dermatol, 2000. **25**(5): p. 363-70.
31. Boelaert, M., et al., *Visceral leishmaniasis control: a public health perspective*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2000. **94**(5): p. 465-71.
32. Barrett, M.P. and S.L. Croft, *Management of trypanosomiasis and leishmaniasis*. Br Med Bull, 2012. **104**: p. 175-96.
33. Reithinger, R., et al., *Cutaneous leishmaniasis*. Lancet Infect Dis, 2007. **7**(9): p. 581-96.
34. Loria-Cervera, E.N. and F.J. Andrade-Narvaez, *Animal models for the study of leishmaniasis immunology*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 2014. **56**(1): p. 1-11.
35. Hartley, M.A., et al., *The therapeutic potential of immune cross-talk in leishmaniasis*. Clin Microbiol Infect, 2013. **19**(2): p. 119-30.
36. Mutiso, J.M., J.C. Macharia, and M.M. Gicheru, *A review of adjuvants for Leishmania vaccine candidates*. J Biomed Res, 2010. **24**(1): p. 16-25.
37. Alvar, J., *Leishmaniasis and AIDS co-infection: the Spanish example*. Parasitol Today, 1994. **10**(4): p. 160-3.
38. McGwire, B.S. and A.R. Satoskar, *Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment*. QJM, 2014. **107**(1): p. 7-14.
39. de Menezes, J.P., et al., *Advances in Development of New Treatment for Leishmaniasis*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 815023.
40. Sereno, D., et al., *Antimonial-mediated DNA fragmentation in Leishmania infantum amastigotes*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(7): p. 2064-9.
41. Sudhandiran, G. and C. Shaha, *Antimonial-induced increase in intracellular Ca²⁺ through non-selective cation channels in the host and the parasite is responsible for apoptosis of intracellular Leishmania donovani amastigotes*. J Biol Chem, 2003. **278**(27): p. 25120-32.
42. El-On, J., *Current status and perspectives of the immunotherapy of leishmaniasis*. Isr Med Assoc J, 2009. **11**(10): p. 623-8.
43. Neal, R.A., et al., *The sensitivity of Leishmania species to aminosidine*. J Antimicrob Chemother, 1995. **35**(5): p. 577-84.
44. Navin, T.R., et al., *Placebo-controlled clinical trial of sodium stibogluconate (Pentostam) versus ketoconazole for treating cutaneous leishmaniasis in Guatemala*. J Infect Dis, 1992. **165**(3): p. 528-34.
45. Mukherjee, A., et al., *Roles for mitochondria in pentamidine susceptibility and resistance in Leishmania donovani*. Mol Biochem Parasitol, 2006. **145**(1): p. 1-10.
46. Rakotomanga, M., M. Saint-Pierre-Chazalet, and P.M. Loiseau, *Alteration of fatty acid and sterol metabolism in miltefosine-resistant Leishmania donovani promastigotes and consequences for drug-membrane interactions*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(7): p. 2677-86.
47. Verma, N.K. and C.S. Dey, *Possible mechanism of miltefosine-mediated death of Leishmania donovani*. Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(8): p. 3010-5.
48. Sundar, S. and P.L. Olliaro, *Miltefosine in the treatment of leishmaniasis: Clinical evidence for informed clinical risk management*. Ther Clin Risk Manag, 2007. **3**(5): p. 733-40.
49. Woerly, V., et al., *Clinical efficacy and tolerance of miltefosine in the treatment of canine leishmaniosis*. Parasitol Res, 2009. **105**(2): p. 463-9.

50. Oliva, G., et al., *Activity of liposomal amphotericin B (AmBisome) in dogs naturally infected with Leishmania infantum*. J Antimicrob Chemother, 1995. **36**(6): p. 1013-9.
51. Cortadellas, O., *Initial and long-term efficacy of a lipid emulsion of amphotericin B desoxycholate in the management of canine leishmaniasis*. J Vet Intern Med, 2003. **17**(6): p. 808-12.
52. Singh, O.P. and S. Sundar, *Immunotherapy and targeted therapies in treatment of visceral leishmaniasis: current status and future prospects*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 296.
53. Sundar, S., A. Singh, and O.P. Singh, *Strategies to overcome antileishmanial drugs unresponsiveness*. J Trop Med, 2014. **2014**: p. 646932.
54. Murray, H.W., B.Y. Rubin, and C.D. Rothermel, *Killing of intracellular Leishmania donovani by lymphokine-stimulated human mononuclear phagocytes. Evidence that interferon-gamma is the activating lymphokine*. J Clin Invest, 1983. **72**(4): p. 1506-10.
55. Sundar, S. and H.W. Murray, *Effect of treatment with interferon-gamma alone in visceral leishmaniasis*. J Infect Dis, 1995. **172**(6): p. 1627-9.
56. Van Brussel, I., Z.N. Berneman, and N. Cools, *Optimizing dendritic cell-based immunotherapy: tackling the complexity of different arms of the immune system*. Mediators Inflamm, 2012. **2012**: p. 690643.
57. Moll, H., *Dendritic cells and host resistance to infection*. Cell Microbiol, 2003. **5**(8): p. 493-500.
58. Saljoughian, N., T. Taheri, and S. Rafati, *Live vaccination tactics: possible approaches for controlling visceral leishmaniasis*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 134.
59. Riese, P., et al., *Vaccine adjuvants: key tools for innovative vaccine design*. Curr Top Med Chem, 2013. **13**(20): p. 2562-80.
60. Nagill, R. and S. Kaur, *Vaccine candidates for leishmaniasis: a review*. Int Immunopharmacol, 2011. **11**(10): p. 1464-88.
61. Breton, M., et al., *Live nonpathogenic parasitic vector as a candidate vaccine against visceral leishmaniasis*. Infect Immun, 2005. **73**(10): p. 6372-82.
62. Kumar, R. and C. Engwerda, *Vaccines to prevent leishmaniasis*. Clin Transl Immunology, 2014. **3**(3): p. e13.
63. Khamesipour, A., et al., *Leishmaniasis vaccine candidates for development: a global overview*. Indian J Med Res, 2006. **123**(3): p. 423-38.
64. Palatnik-de-Sousa, C.B., *Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years*. Vaccine, 2008. **26**(14): p. 1709-24.
65. Foroughi-Parvar, F. and G. Hatam, *Vaccines for canine leishmaniasis*. Adv Prev Med, 2014. **2014**: p. 569193.
66. Jain, K. and N.K. Jain, *Vaccines for visceral leishmaniasis: A review*. J Immunol Methods, 2015. **422**: p. 1-12.
67. Martin, V., et al., *The protective immune response produced in dogs after primary vaccination with the LiESP/QA-21 vaccine (CaniLeish(R)) remains effective against an experimental challenge one year later*. Vet Res, 2014. **45**: p. 69.
68. Joshi, S., et al., *Visceral Leishmaniasis: Advancements in Vaccine Development via Classical and Molecular Approaches*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 380.
69. Coler, R.N., et al., *Leish-111f, a recombinant polyprotein vaccine that protects against visceral Leishmaniasis by elicitation of CD4+ T cells*. Infect Immun, 2007. **75**(9): p. 4648-54.
70. Hernandez, G. and P. Vazquez-Pianzola, *Functional diversity of the eukaryotic translation initiation factors belonging to eIF4 families*. Mech Dev, 2005. **122**(7-8): p. 865-76.
71. Gingras, A.C., B. Raught, and N. Sonenberg, *eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation*. Annu Rev Biochem, 1999. **68**: p. 913-63.

72. Barhoumi, M., et al., *Leishmania infantum* LeIF and its recombinant polypeptides modulate interleukin IL-12p70, IL-10 and tumour necrosis factor-alpha production by human monocytes. *Parasite Immunol*, 2011. **33**(10): p. 583-8.
73. Skeiky, Y.A., et al., A recombinant *Leishmania* antigen that stimulates human peripheral blood mononuclear cells to express a Th1-type cytokine profile and to produce interleukin 12. *J Exp Med*, 1995. **181**(4): p. 1527-37.
74. Silverman, J.M., et al., Proteomic analysis of the secretome of *Leishmania donovani*. *Genome Biol*, 2008. **9**(2): p. R35.
75. Silverman, J.M., et al., An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from *Leishmania* and communication with macrophages. *J Cell Sci*, 2010. **123**(Pt 6): p. 842-52.
76. Barhoumi, M., et al., *Leishmania infantum* LeIF protein is an ATP-dependent RNA helicase and an eIF4A-like factor that inhibits translation in yeast. *FEBS J*, 2006. **273**(22): p. 5086-100.
77. Probst, P., et al., A *Leishmania* protein that modulates interleukin (IL)-12, IL-10 and tumor necrosis factor-alpha production and expression of B7-1 in human monocyte-derived antigen-presenting cells. *Eur J Immunol*, 1997. **27**(10): p. 2634-42.
78. Barhoumi, M., et al., DEAD-box proteins, like *Leishmania* eIF4A, modulate interleukin (IL)-12, IL-10 and tumour necrosis factor-alpha production by human monocytes. *Parasite Immunol*, 2013. **35**(5-6): p. 194-9.
79. Sakai, S., et al., Intranasal immunization with Leish-111f induces IFN-gamma production and protects mice from *Leishmania major* infection. *Vaccine*, 2010. **28**(10): p. 2207-13.
80. Badaro, R., et al., Successful use of a defined antigen/GM-CSF adjuvant vaccine to treat mucosal *Leishmaniasis* refractory to antimony: A case report. *Braz J Infect Dis*, 2001. **5**(4): p. 223-32.
81. Wilson-Welder, J.H., et al., Vaccine adjuvants: current challenges and future approaches. *J Pharm Sci*, 2009. **98**(4): p. 1278-316.
82. Awate, S., L.A. Babiuk, and G. Mutwiri, Mechanisms of action of adjuvants. *Front Immunol*, 2013. **4**: p. 114.
83. Raman, V.S., et al., Adjuvants for *Leishmania* vaccines: from models to clinical application. *Front Immunol*, 2012. **3**: p. 144.
84. Hoebe, K., E. Janssen, and B. Beutler, The interface between innate and adaptive immunity. *Nature Immunology*, 2004. **5**(10): p. 971-974.
85. Walther, S., et al., Equine immunoglobulins and organization of immunoglobulin genes. *Dev Comp Immunol*, 2015. **53**(2): p. 303-319.
86. Davies, D.R. and H. Metzger, Structural basis of antibody function. *Annu Rev Immunol*, 1983. **1**: p. 87-117.
87. Burton, D.R., Antibody: the flexible adaptor molecule. *Trends Biochem Sci*, 1990. **15**(2): p. 64-9.
88. Bourdoiseau, G., et al., Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmania infantum*-infected treated and untreated dogs. *Vet Immunol Immunopathol*, 1997. **59**(1-2): p. 21-30.
89. Deplazes, P., et al., Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. *Parasite Immunol*, 1995. **17**(9): p. 451-8.
90. Dustin, M.L., The immunological synapse. *Cancer Immunol Res*, 2014. **2**(11): p. 1023-33.
91. Luckheeram, R.V., et al., CD4(+)T cells: differentiation and functions. *Clin Dev Immunol*, 2012. **2012**: p. 925135.
92. Mosmann, T.R. and R.L. Coffman, TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*, 1989. **7**: p. 145-73.
93. Pulendran, B. and R. Ahmed, Immunological mechanisms of vaccination. *Nat Immunol*, 2011. **12**(6): p. 509-17.

94. Luther, S.A. and J.G. Cyster, *Chemokines as regulators of T cell differentiation*. Nat Immunol, 2001. **2**(2): p. 102-7.
95. Romagnani, S., *Lymphokine production by human T cells in disease states*. Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 227-57.
96. Ribeiro-de-Jesus, A., et al., *Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis*. Braz J Med Biol Res, 1998. **31**(1): p. 143-8.
97. Nylen, S. and D. Sacks, *Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis*. Trends Immunol, 2007. **28**(9): p. 378-84.
98. Grogan, J.L. and R.M. Locksley, *T helper cell differentiation: on again, off again*. Curr Opin Immunol, 2002. **14**(3): p. 366-72.
99. Robinson, D.S. and A. O'Garra, *Further checkpoints in Th1 development*. Immunity, 2002. **16**(6): p. 755-8.
100. Biedermann, T., et al., *IL-4 instructs TH1 responses and resistance to Leishmania major in susceptible BALB/c mice*. Nat Immunol, 2001. **2**(11): p. 1054-60.
101. Sacks, D. and N. Noben-Trauth, *The immunology of susceptibility and resistance to Leishmania major in mice*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(11): p. 845-58.
102. Macatonia, S.E., et al., *Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells*. J Immunol, 1995. **154**(10): p. 5071-9.
103. Engwerda, C.R., et al., *Neutralization of IL-12 demonstrates the existence of discrete organ-specific phases in the control of Leishmania donovani*. Eur J Immunol, 1998. **28**(2): p. 669-80.
104. Farrar, M.A. and R.D. Schreiber, *The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor*. Annu Rev Immunol, 1993. **11**: p. 571-611.
105. Ehrt, S., et al., *Reprogramming of the macrophage transcriptome in response to interferon-gamma and Mycobacterium tuberculosis: signaling roles of nitric oxide synthase-2 and phagocyte oxidase*. J Exp Med, 2001. **194**(8): p. 1123-40.
106. Green, S.J., C.A. Nacy, and M.S. Meltzer, *Cytokine-induced synthesis of nitrogen oxides in macrophages: a protective host response to Leishmania and other intracellular pathogens*. J Leukoc Biol, 1991. **50**(1): p. 93-103.
107. Liew, F.Y., Y. Li, and S. Millott, *Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of Leishmania major through the induction of nitric oxide*. J Immunol, 1990. **145**(12): p. 4306-10.
108. Locksley, R.M., N. Killeen, and M.J. Lenardo, *The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology*. Cell, 2001. **104**(4): p. 487-501.
109. Naude, P.J., et al., *Tumor necrosis factor receptor cross-talk*. FEBS J, 2011. **278**(6): p. 888-98.
110. Ghosh, S., et al., *Leishmania donovani suppresses activated protein 1 and NF-kappaB activation in host macrophages via ceramide generation: involvement of extracellular signal-regulated kinase*. Infect Immun, 2002. **70**(12): p. 6828-38.
111. Varfolomeev, E.E. and A. Ashkenazi, *Tumor necrosis factor: an apoptosis JuNKie?* Cell, 2004. **116**(4): p. 491-7.
112. Tracey, K.J. and A. Cerami, *Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target*. Annu Rev Med, 1994. **45**: p. 491-503.
113. Brenier-Pinchart, M.P., et al., *Chemokines in host-protozoan-parasite interactions*. Trends Parasitol, 2001. **17**(6): p. 292-6.
114. Rot, A. and U.H. von Andrian, *Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokinese grammar for immune cells*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 891-928.
115. Dorner, B.G., et al., *MIP-1alpha, MIP-1beta, RANTES, and ATAC/lymphotactin function together with IFN-gamma as type 1 cytokines*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(9): p. 6181-6.

116. Hunter, C.A., *New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(7): p. 521-31.
117. Zhu, J., H. Yamane, and W.E. Paul, *Differentiation of effector CD4 T cell populations (*)*. Annu Rev Immunol, 2010. **28**: p. 445-89.
118. Hurdal, R. and F. Brombacher, *The role of IL-4 and IL-13 in cutaneous Leishmaniasis*. Immunol Lett, 2014. **161**(2): p. 179-83.
119. Matthews, D.J., et al., *IL-13 is a susceptibility factor for Leishmania major infection*. J Immunol, 2000. **164**(3): p. 1458-62.
120. Ng, T.H., et al., *Regulation of adaptive immunity; the role of interleukin-10*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 129.
121. Gant, K.R., et al., *Activation of TGF-beta by Leishmania chagasi: importance for parasite survival in macrophages*. J Immunol, 2003. **170**(5): p. 2613-20.
122. Novoa, R., et al., *IL-17 and Regulatory Cytokines (IL-10 and IL-27) in L. braziliensis Infection*. Parasite Immunol, 2011. **33**(2): p. 132-6.
123. Lopez Kostka, S., et al., *IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice*. J Immunol, 2009. **182**(5): p. 3039-46.
124. Pitta, M.G., et al., *IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by Leishmania donovani*. J Clin Invest, 2009. **119**(8): p. 2379-87.
125. Campbell, K.A., et al., *CD40 ligand is required for protective cell-mediated immunity to Leishmania major*. Immunity, 1996. **4**(3): p. 283-9.
126. Kamanaka, M., et al., *Protective role of CD40 in Leishmania major infection at two distinct phases of cell-mediated immunity*. Immunity, 1996. **4**(3): p. 275-81.
127. Ferlin, W.G., et al., *The induction of a protective response in Leishmania major-infected BALB/c mice with anti-CD40 mAb*. Eur J Immunol, 1998. **28**(2): p. 525-31.
128. Padigel, U.M., P.J. Perrin, and J.P. Farrell, *The development of a Th1-type response and resistance to Leishmania major infection in the absence of CD40-CD40L costimulation*. J Immunol, 2001. **167**(10): p. 5874-9.
129. Belkaid, Y., et al., *CD8+ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with Leishmania major*. J Immunol, 2002. **168**(8): p. 3992-4000.
130. Scaffidi, C., et al., *Apoptosis signaling in lymphocytes*. Curr Opin Immunol, 1999. **11**(3): p. 277-85.
131. Gordon, S., *Alternative activation of macrophages*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(1): p. 23-35.
132. Rosenthal, L.A., et al., *Leishmania major-human macrophage interactions: cooperation between Mac-1 (CD11b/CD18) and complement receptor type 1 (CD35) in promastigote adhesion*. Infect Immun, 1996. **64**(6): p. 2206-15.
133. Ueno, N. and M.E. Wilson, *Receptor-mediated phagocytosis of Leishmania: implications for intracellular survival*. Trends Parasitol, 2012. **28**(8): p. 335-44.
134. Podinovskaia, M. and A. Descoteaux, *Leishmania and the macrophage: a multifaceted interaction*. Future Microbiol, 2015. **10**(1): p. 111-29.
135. Roberts, S.C., M.E. Wilson, and J.E. Donelson, *Developmentally regulated expression of a novel 59-kDa product of the major surface protease (Msp or gp63) gene family of Leishmania chagasi*. J Biol Chem, 1995. **270**(15): p. 8884-92.
136. Bhattacharya, P., et al., *Genetically Modified Live Attenuated Leishmania donovani Parasites Induce Innate Immunity through Classical Activation of Macrophages That Direct the Th1 Response in Mice*. Infect Immun, 2015. **83**(10): p. 3800-15.
137. Liu, D. and J.E. Uzonna, *The early interaction of Leishmania with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response*. Front Cell Infect Microbiol, 2012. **2**: p. 83.

138. Martinez, F.O., et al., *Macrophage activation and polarization*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 453-61.
139. Cunningham, A.C., *Parasitic adaptive mechanisms in infection by leishmania*. Exp Mol Pathol, 2002. **72**(2): p. 132-41.
140. Crowley, M., et al., *The cell surface of mouse dendritic cells: FACS analyses of dendritic cells from different tissues including thymus*. Cell Immunol, 1989. **118**(1): p. 108-25.
141. Steinman, R.M. and Z.A. Cohn, *Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution*. J Exp Med, 1973. **137**(5): p. 1142-62.
142. Munz, C., R.M. Steinman, and S. Fujii, *Dendritic cell maturation by innate lymphocytes: coordinated stimulation of innate and adaptive immunity*. J Exp Med, 2005. **202**(2): p. 203-7.
143. Medzhitov, R., *Toll-like receptors and innate immunity*. Nat Rev Immunol, 2001. **1**(2): p. 135-45.
144. Gijzen, K., et al., *C-type lectins on dendritic cells and their interaction with pathogen-derived and endogenous glycoconjugates*. Curr Protein Pept Sci, 2006. **7**(4): p. 283-94.
145. Pasare, C. and R. Medzhitov, *Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity*. Microbes Infect, 2004. **6**(15): p. 1382-7.
146. Steinman, R.M. and J. Banchereau, *Taking dendritic cells into medicine*. Nature, 2007. **449**(7161): p. 419-26.
147. Austyn, J.M., et al., *Migration patterns of dendritic cells in the mouse. Homing to T cell-dependent areas of spleen, and binding within marginal zone*. J Exp Med, 1988. **167**(2): p. 646-51.
148. Steinman, R., L. Hoffman, and M. Pope, *Maturation and migration of cutaneous dendritic cells*. J Invest Dermatol, 1995. **105**(1 Suppl): p. 2S-7S.
149. Stingl, G. and P.R. Bergstresser, *Dendritic cells: a major story unfolds*. Immunol Today, 1995. **16**(7): p. 330-3.
150. Sprent, J., *Antigen-presenting cells. Professionals and amateurs*. Curr Biol, 1995. **5**(10): p. 1095-7.
151. Tseveleki, V., et al., *Mannan-conjugated myelin peptides prime non-pathogenic Th1 and Th17 cells and ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis*. Exp Neurol, 2015. **267**: p. 254-67.
152. Soong, L., *Modulation of dendritic cell function by Leishmania parasites*. J Immunol, 2008. **180**(7): p. 4355-60.
153. Kima, P.E., *The amastigote forms of Leishmania are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist*. Int J Parasitol, 2007. **37**(10): p. 1087-96.
154. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, *Toll-like receptor control of the adaptive immune responses*. Nat Immunol, 2004. **5**(10): p. 987-95.
155. Naik, S.H., et al., *Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes*. Nat Immunol, 2006. **7**(6): p. 663-71.
156. Klinman, D.M., *Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(4): p. 249-58.
157. Faria, M.S., F.C. Reis, and A.P. Lima, *Toll-like receptors in leishmania infections: guardians or promoters?* J Parasitol Res, 2012. **2012**: p. 930257.
158. Flandin, J.F., F. Chano, and A. Descoteaux, *RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of Leishmania donovani promastigotes by interferon-gamma-primed macrophages*. Eur J Immunol, 2006. **36**(2): p. 411-20.
159. Kaye, P. and P. Scott, *Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface*. Nat Rev Microbiol, 2011. **9**(8): p. 604-15.
160. O'Brien, J., et al., *Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity*. Eur J Biochem, 2000. **267**(17): p. 5421-6.

161. Carrion, J., et al., *Immunohistological features of visceral leishmaniasis in BALB/c mice*. Parasite Immunol, 2006. **28**(5): p. 173-83.
162. Buffet, P.A., et al., *Culture microtitration: a sensitive method for quantifying Leishmania infantum in tissues of infected mice*. Antimicrob Agents Chemother, 1995. **39**(9): p. 2167-8.
163. Lutz, M.B., et al., *An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow*. Journal of Immunological Methods, 1999. **223**(1): p. 77-92.
164. Mikus, J. and D. Steverding, *A simple colorimetric method to screen drug cytotoxicity against Leishmania using the dye Alamar Blue*. Parasitol Int, 2000. **48**(3): p. 265-9.
165. Tsikas, D., *Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2007. **851**(1-2): p. 51-70.
166. Eruslanov, E. and S. Kusmartsev, *Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry*. Methods Mol Biol, 2010. **594**: p. 57-72.
167. Kool, M., et al., *Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells*. J Exp Med, 2008. **205**(4): p. 869-82.
168. Majumder, S., et al., *CXCL10 is critical for the generation of protective CD8 T cell response induced by antigen pulsed CpG-ODN activated dendritic cells*. PLoS One, 2012. **7**(11): p. e48727.
169. Koutsoni, O., et al., *Leishmania eukaryotic initiation factor (LeIF) inhibits parasite growth in murine macrophages*. PLoS One, 2014. **9**(5): p. e97319.
170. Olivier, M., D.J. Gregory, and G. Forget, *Subversion mechanisms by which Leishmania parasites can escape the host immune response: a signaling point of view*. Clin Microbiol Rev, 2005. **18**(2): p. 293-305.
171. Luster, A.D., *Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation*. N Engl J Med, 1998. **338**(7): p. 436-45.
172. Sato, N., et al., *Defects in the generation of IFN-gamma are overcome to control infection with Leishmania donovani in CC chemokine receptor (CCR) 5-, macrophage inflammatory protein-1 alpha-, or CCR2-deficient mice*. J Immunol, 1999. **163**(10): p. 5519-25.
173. Munoz-Fernandez, M.A., M.A. Fernandez, and M. Fresno, *Synergism between tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on macrophage activation for the killing of intracellular Trypanosoma cruzi through a nitric oxide-dependent mechanism*. Eur J Immunol, 1992. **22**(2): p. 301-7.
174. Said, A. and G. Weindl, *Regulation of Dendritic Cell Function in Inflammation*. J Immunol Res, 2015. **2015**: p. 743169.
175. Chen, P., et al., *Role of dendritic cell subsets in immunity and their contribution to noninfectious uveitis*. Surv Ophthalmol, 2015. **60**(3): p. 242-9.
176. Gilboa, E., *Opinion - The promise of cancer vaccines*. Nature Reviews Cancer, 2004. **4**(5): p. 401-411.
177. Edelson, R.L., *Mechanistic insights into extracorporeal photochemotherapy: Efficient induction of monocyte-to-dendritic cell maturation*. Transfusion and Apheresis Science, 2014. **50**(3): p. 322-329.
178. Steinman, R.M. and K. Inaba, *Myeloid dendritic cells*. Journal of Leukocyte Biology, 1999. **66**(2): p. 205-208.
179. Steinman, R.M. and J. Idoyaga, *Features of the dendritic cell lineage*. Immunological Reviews, 2010. **234**: p. 5-17.
180. Warger, T., et al., *Synergistic activation of dendritic cells by combined Toll-like receptor ligation induces superior CTL responses in vivo*. Blood, 2006. **108**(2): p. 544-50.
181. Kropf, P., et al., *Toll-like receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite Leishmania major*. Infect Immun, 2004. **72**(4): p. 1920-8.

182. Ives, A., et al., *MyD88 and TLR9 dependent immune responses mediate resistance to Leishmania guyanensis infections, irrespective of Leishmania RNA virus burden*. PLoS One, 2014. **9**(5): p. e96766.
183. Lima-Junior, D.S., et al., *Inflammasome-derived IL-1 β production induces nitric oxide-mediated resistance to Leishmania*. Nat Med, 2013. **19**(7): p. 909-15.
184. Speirs, K., et al., *NF-kappa B2 is required for optimal CD40-induced IL-12 production but dispensable for Th1 cell Differentiation*. J Immunol, 2002. **168**(9): p. 4406-13.
185. Skeiky, Y.A., et al., *LeIF: a recombinant Leishmania protein that induces an IL-12-mediated Th1 cytokine profile*. J Immunol, 1998. **161**(11): p. 6171-9.
186. Kuchroo, V.K., et al., *B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy*. Cell, 1995. **80**(5): p. 707-18.
187. Corinti, S., et al., *Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions*. J Immunol, 2001. **166**(7): p. 4312-8.
188. Nascimento, E., et al., *A clinical trial to evaluate the safety and immunogenicity of the LEISH-F1+MPL-SE vaccine when used in combination with meglumine antimoniate for the treatment of cutaneous leishmaniasis*. Vaccine, 2010. **28**(40): p. 6581-7.
189. Tsagozis, P., E. Karagouni, and E. Dotsika, *Function of CD8+ T lymphocytes in a self-curing mouse model of visceral leishmaniasis*. Parasitol Int, 2005. **54**(2): p. 139-46.
190. Kanhere, A., et al., *T-bet and GATA3 orchestrate Th1 and Th2 differentiation through lineage-specific targeting of distal regulatory elements*. Nat Commun, 2012. **3**: p. 1268.
191. Rezvan, H. and M. Moafi, *An overview on Leishmania vaccines: A narrative review article*. Vet Res Forum, 2015. **6**(1): p. 1-7.
192. Romagnani, S., *The Th1/Th2 paradigm*. Immunol Today, 1997. **18**(6): p. 263-6.
193. Cordin, O., et al., *The DEAD-box protein family of RNA helicases*. Gene, 2006. **367**: p. 17-37.
194. de la Cruz, J., D. Kressler, and P. Linder, *Unwinding RNA in Saccharomyces cerevisiae: DEAD-box proteins and related families*. Trends Biochem Sci, 1999. **24**(5): p. 192-8.
195. Schmid, S.R. and P. Linder, *D-E-A-D protein family of putative RNA helicases*. Mol Microbiol, 1992. **6**(3): p. 283-91.
196. Pain, V.M., *Initiation of protein synthesis in eukaryotic cells*. Eur J Biochem, 1996. **236**(3): p. 747-71.
197. Iost, I., M. Dreyfus, and P. Linder, *Ded1p, a DEAD-box protein required for translation initiation in Saccharomyces cerevisiae, is an RNA helicase*. J Biol Chem, 1999. **274**(25): p. 17677-83.
198. Okanami, M., T. Meshi, and M. Iwabuchi, *Characterization of a DEAD box ATPase/RNA helicase protein of Arabidopsis thaliana*. Nucleic Acids Res, 1998. **26**(11): p. 2638-43.
199. Dhalia, R., et al., *Translation initiation in Leishmania major: characterisation of multiple eIF4F subunit homologues*. Mol Biochem Parasitol, 2005. **140**(1): p. 23-41.
200. Linder, P., *Yeast RNA helicases of the DEAD-box family involved in translation initiation*. Biol Cell, 2003. **95**(3-4): p. 157-67.
201. Naderer, T. and M.J. McConville, *The Leishmania-macrophage interaction: a metabolic perspective*. Cell Microbiol, 2008. **10**(2): p. 301-8.
202. Green, S.J., et al., *Leishmania major amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha*. J Immunol, 1990. **145**(12): p. 4290-7.
203. Sadick, M.D., et al., *Cure of murine leishmaniasis with anti-interleukin 4 monoclonal antibody. Evidence for a T cell-dependent, interferon gamma-independent mechanism*. J Exp Med, 1990. **171**(1): p. 115-27.
204. Stenger, S., et al., *Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to Leishmania major*. J Exp Med, 1994. **180**(3): p. 783-93.

205. Liew, F.Y., et al., *Resistance to Leishmania major infection correlates with the induction of nitric oxide synthase in murine macrophages*. Eur J Immunol, 1991. **21**(12): p. 3009-14.
206. Cunha, F.Q., et al., *Repeated induction of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity in murine macrophages*. Eur J Immunol, 1993. **23**(6): p. 1385-8.
207. Panaro, M.A., et al., *Inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production in Leishmania infantum-infected human macrophages stimulated with interferon-gamma and bacterial lipopolysaccharide*. Int J Clin Lab Res, 1999. **29**(3): p. 122-7.
208. Kumar, R., K. Pai, and S. Sundar, *Reactive oxygen intermediates, nitrite and IFN-gamma in Indian visceral leishmaniasis*. Clin Exp Immunol, 2001. **124**(2): p. 262-5.
209. Kumar, P., et al., *NADH-oxidase, NADPH-oxidase and myeloperoxidase activity of visceral leishmaniasis patients*. J Med Microbiol, 2002. **51**(10): p. 832-6.
210. O'Garra, A., L.M. McEvoy, and A. Zlotnik, *T-cell subsets: chemokine receptors guide the way*. Curr Biol, 1998. **8**(18): p. R646-9.
211. Sallusto, F., C.R. Mackay, and A. Lanzavecchia, *The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 593-620.
212. Maurer, M. and E. von Stebut, *Macrophage inflammatory protein-1*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(10): p. 1882-6.
213. Bhattacharyya, S., et al., *Chemokine-induced leishmanicidal activity in murine macrophages via the generation of nitric oxide*. J Infect Dis, 2002. **185**(12): p. 1704-8.
214. Dey, R., et al., *Regulation of impaired protein kinase C signaling by chemokines in murine macrophages during visceral leishmaniasis*. Infect Immun, 2005. **73**(12): p. 8334-44.
215. Dey, R., et al., *Induction of host protective Th1 immune response by chemokines in Leishmania donovani-infected BALB/c mice*. Scand J Immunol, 2007. **66**(6): p. 671-83.
216. Fahey, T.J., 3rd, et al., *Macrophage inflammatory protein 1 modulates macrophage function*. J Immunol, 1992. **148**(9): p. 2764-9.
217. Liew, F.Y., D. Xu, and W.L. Chan, *Immune effector mechanism in parasitic infections*. Immunol Lett, 1999. **65**(1-2): p. 101-4.
218. Villalta, F., et al., *The cysteine-cysteine family of chemokines RANTES, MIP-1alpha, and MIP-1beta induce trypanocidal activity in human macrophages via nitric oxide*. Infect Immun, 1998. **66**(10): p. 4690-5.
219. Green, S.P. and W.A. Phillips, *Activation of the macrophage respiratory burst by phorbol myristate acetate: evidence for both tyrosine-kinase-dependent and -independent pathways*. Biochim Biophys Acta, 1994. **1222**(2): p. 241-8.
220. Phillips, W.A., M. Croatto, and J.A. Hamilton, *Priming the macrophage respiratory burst with IL-4: enhancement with TNF-alpha but inhibition by IFN-gamma*. Immunology, 1990. **70**(4): p. 498-503.
221. Hartmann, P., et al., *Blockade of TNF does not alter oxygen burst and phagocytosis of human neutrophils in patients with rheumatoid arthritis*. Immunobiology, 2005. **209**(9): p. 669-79.
222. O'Garra, A. and P. Vieira, *T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(6): p. 425-8.
223. Jankovic, D., et al., *Conventional T-bet(+)Foxp3(-) Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection*. J Exp Med, 2007. **204**(2): p. 273-83.
224. Song, C., et al., *IL-17-producing alveolar macrophages mediate allergic lung inflammation related to asthma*. J Immunol, 2008. **181**(9): p. 6117-24.
225. Korn, T., et al., *IL-17 and Th17 Cells*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 485-517.
226. Nascimento, M.S., et al., *Interleukin 17A acts synergistically with interferon gamma to promote protection against Leishmania infantum infection*. J Infect Dis, 2015. **211**(6): p. 1015-26.

227. Sica, A. and A. Mantovani, *Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas*. J Clin Invest, 2012. **122**(3): p. 787-95.
228. Savelkoul, H.F., et al., *Choice and Design of Adjuvants for Parenteral and Mucosal Vaccines*. Vaccines (Basel), 2015. **3**(1): p. 148-71.
229. Martin, S., et al., *CD40 expression levels modulate regulatory T cells in Leishmania donovani infection*. J Immunol, 2010. **185**(1): p. 551-9.
230. Espinosa, V. and A. Rivera, *Cytokines and the regulation of fungus-specific CD4 T cell differentiation*. Cytokine, 2012. **58**(1): p. 100-6.
231. Napolitani, G., et al., *Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells*. Nat Immunol, 2005. **6**(8): p. 769-76.
232. Murray, H.W., et al., *Regulatory actions of Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 in Leishmania donovani infection in the liver*. Infect Immun, 2013. **81**(7): p. 2318-26.
233. Raman, V.S., et al., *Applying TLR synergy in immunotherapy: implications in cutaneous leishmaniasis*. J Immunol, 2010. **185**(3): p. 1701-10.
234. Nishisaka, N., et al., *Murine animal model*. Methods Mol Med, 2001. **53**: p. 255-64.
235. Carlsen, E.D., et al., *Leishmania amazonensis amastigotes trigger neutrophil activation but resist neutrophil microbicidal mechanisms*. Infect Immun, 2013. **81**(11): p. 3966-74.
236. De Groot, A.S., *Immunomics: discovering new targets for vaccines and therapeutics*. Drug Discov Today, 2006. **11**(5-6): p. 203-9.
237. De Groot, A.S. and J.A. Berzofsky, *From genome to vaccine--new immunoinformatics tools for vaccine design*. Methods, 2004. **34**(4): p. 425-8.
238. Loureiro, J. and H.L. Ploegh, *Antigen presentation and the ubiquitin-proteasome system in host-pathogen interactions*. Adv Immunol, 2006. **92**: p. 225-305.
239. Jardetzky, T.S., et al., *Crystallographic analysis of endogenous peptides associated with HLA-DR1 suggests a common, polyproline II-like conformation for bound peptides*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(2): p. 734-8.
240. Castellino, F., G. Zhong, and R.N. Germain, *Antigen presentation by MHC class II molecules: invariant chain function, protein trafficking, and the molecular basis of diverse determinant capture*. Hum Immunol, 1997. **54**(2): p. 159-69.
241. Davies, M.N. and D.R. Flower, *Harnessing bioinformatics to discover new vaccines*. Drug Discov Today, 2007. **12**(9-10): p. 389-95.
242. Lundegaard, C., et al., *Modeling the adaptive immune system: predictions and simulations*. Bioinformatics, 2007. **23**(24): p. 3265-75.
243. Stack, R.M., et al., *IL-4 treatment of small splenic B cells induces costimulatory molecules B7-1 and B7-2*. J Immunol, 1994. **152**(12): p. 5723-33.
244. Barcy, S., et al., *FcR cross-linking on monocytes results in impaired T cell stimulatory capacity*. Int Immunol, 1995. **7**(2): p. 179-89.
245. Hathcock, K.S., et al., *Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function*. J Exp Med, 1994. **180**(2): p. 631-40.
246. Buelens, C., et al., *Interleukin-10 differentially regulates B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) expression on human peripheral blood dendritic cells*. Eur J Immunol, 1995. **25**(9): p. 2668-72.
247. Llanos-Cuentas, A., et al., *A clinical trial to evaluate the safety and immunogenicity of the LEISH-F1+MPL-SE vaccine when used in combination with sodium stibogluconate for the treatment of mucosal leishmaniasis*. Vaccine, 2010. **28**(46): p. 7427-35.
248. Beaumier, C.M., et al., *New vaccines for neglected parasitic diseases and dengue*. Transl Res, 2013. **162**(3): p. 144-55.
249. Glimcher, L.H. and K.M. Murphy, *Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up*. Genes Dev, 2000. **14**(14): p. 1693-711.

250. Chakir, H., et al., *T-bet/GATA-3 ratio as a measure of the Th1/Th2 cytokine profile in mixed cell populations: predominant role of GATA-3*. J Immunol Methods, 2003. **278**(1-2): p. 157-69.
251. Flohe, S.B., et al., *Antigen-pulsed epidermal Langerhans cells protect susceptible mice from infection with the intracellular parasite Leishmania major*. Eur J Immunol, 1998. **28**(11): p. 3800-11.
252. Ludewig, B., et al., *Dendritic cells efficiently induce protective antiviral immunity*. J Virol, 1998. **72**(5): p. 3812-8.
253. Moll, H., *Antigen delivery by dendritic cells*. Int J Med Microbiol, 2004. **294**(5): p. 337-44.
254. Su, H., et al., *Vaccination against chlamydial genital tract infection after immunization with dendritic cells pulsed ex vivo with nonviable Chlamydiae*. J Exp Med, 1998. **188**(5): p. 809-18.
255. Agallou, M., M. Margaroni, and E. Karagouni, *Cellular vaccination with bone marrow-derived dendritic cells pulsed with a peptide of Leishmania infantum KMP-11 and CpG oligonucleotides induces protection in a murine model of visceral leishmaniasis*. Vaccine, 2011. **29**(31): p. 5053-64.
256. Carrion, J., C. Folgueira, and C. Alonso, *Immunization strategies against visceral leishmaniasis with the nucleosomal histones of Leishmania infantum encoded in DNA vaccine or pulsed in dendritic cells*. Vaccine, 2008. **26**(20): p. 2537-44.

7.2 Βιβλιογραφικές αναφορές εικόνων και πινάκων

- Εικ. 1.1 Garcia-Almagro, D., *Cutaneous leishmaniasis*. Actas Dermosifiliogr, 2005. 96(1): p. 1-24.
- Εικ. 1.2 Banuls, A.L., M. Hide, and F. Prugnolle, *Leishmania and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans*. Adv Parasitol, 2007. 64: p. 1-109.
- Εικ. 1.4 Besteiro, S., et al., *Protein turnover and differentiation in Leishmania*. Int J Parasitol, 2007. 37(10): p. 1063-75.
- Εικ. 1.5 Gossage, S.M., M.E. Rogers, and P.A. Bates, *Two separate growth phases during the development of Leishmania in sand flies: implications for understanding the life cycle*. Int J Parasitol, 2003. 33(10): p. 1027-34.
- Εικ. 1.6 Kumar, R. and C. Engwerda, *Vaccines to prevent leishmaniasis*. Clin Transl Immunology, 2014. 3(3): p. e13.
- Εικ. 1.7 Oliveira, F., A.M. de Carvalho, and C.I. de Oliveira, *Sand-fly saliva-leishmania-man: the trigger trio*. Front Immunol, 2013. 4: p. 375.
- Εικ. 1.11 Pigott, D.M., et al., *Global distribution maps of the leishmaniasis*. Elife, 2014. 3.
- Εικ. 1.12 Pigott, D.M., et al., *Global distribution maps of the leishmaniasis*. Elife, 2014. 3.

Εικ. 1.13 Wimmers, F., et al., *Paradigm Shift in Dendritic Cell-Based Immunotherapy: From in vitro Generated Monocyte-Derived DCs to Naturally Circulating DC Subsets*. Front Immunol, 2014. 5: p. 165.

Εικ. 1.14 Coomes, S.M., V.S. Pelly, and M.S. Wilson, *Plasticity within the alphabeta(+)CD4(+) T-cell lineage: when, how and what for?* Open Biol, 2013. 3(1): p. 120157.

Εικ. 1.15 Hartley, M.A., et al., *Leishmania RNA virus: when the host pays the toll*. Front Cell Infect Microbiol, 2012. 2: p. 99.

Εικ. 1.16 Seder, R.A. and R. Ahmed, *Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation*. Nat Immunol, 2003. 4(9): p. 835-42.

Εικ. 1.17 Taylor, G.A., C.G. Feng, and A. Sher, *p47 GTPases: regulators of immunity to intracellular pathogens*. Nat Rev Immunol, 2004. 4(2): p. 100-9.

Εικ. 1.18 Chawla, A., *Control of macrophage activation and function by PPARs*. Circ Res, 2010. 106(10): p. 1559-69.

Εικ. 1.19 Crespo, H.J., J.T. Lau, and P.A. Videira, *Dendritic cells: a spot on sialic Acid*. Front Immunol, 2013. 4: p. 491.

Εικ. 1.20 Akira, S. and K. Takeda, *Toll-like receptor signalling*. Nat Rev Immunol, 2004. 4(7): p. 499-511.

Εικ. 1.21 Faria, M.S., F.C. Reis, and A.P. Lima, *Toll-like receptors in leishmania infections: guardians or promoters?* J Parasitol Res, 2012. 2012: p. 930257.

Πίν. 1.1 de Menezes, J.P., et al., *Advances in Development of New Treatment for Leishmaniasis*. Biomed Res Int, 2015. 2015: p. 815023.

Πίν. 1.2 Kumar, R. and C. Engwerda, *Vaccines to prevent leishmaniasis*. Clin Transl Immunology, 2014. 3(3): p. e13.

Πίν. 1.3 Kedzierski, L., *Leishmaniasis*. Hum Vaccin, 2011. 7(11): p. 1204-14.

Παράρτημα Ι**Συντμήσεις**

ΔΑΠ	Διαλυτό Αντιγόνο Παρασίτου (Soluble Leishmania Antigen - SLA)
ΔΔ	Δείκτης Διέγερσης
ΔΚ	Δενδριτικά κύτταρα
AIDS	Σύνδρομο επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας (Acquired immunodeficiency syndrome)
AP-1	Μεταγραφικός παράγοντας AP-1
APCs	Αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (Antigen Presenting Cells)
C3b	Προϊόν του συμπληρώματος C3b
CD11c	Σύμπλεγμα Διαφοροποίησης 11c (Cluster of differentiation 11c)
CD28	Σύμπλεγμα Διαφοροποίησης 28 (Cluster of differentiation 28)
CD40	Σύμπλεγμα Διαφοροποίησης 40 (Cluster of differentiation 40)
CD80	Σύμπλεγμα Διαφοροποίησης 80 (Cluster of differentiation 80)
CD86	Σύμπλεγμα Διαφοροποίησης 86 (Cluster of differentiation 86)
CL	Δερματική λεισμανίαση (Cutaneous leishmaniasis)
CPB	Πρωτεάση κυστεΐνης Β (Cysteine protease B)
CpG	Μη μεθυλιωμένη κυτοσίνη συνδεδεμένη με γουανίνη
cpm	Κρούσεις ανά λεπτό
CR1	Υποδοχέας Συμπληρώματος τύπου 1 (Complement receptor 1)
CR3	Υποδοχέας Συμπληρώματος τύπου 3 (Complement receptor 3)
CVL	Σπλαγχνική λεισμανίαση σκύλου (Canine visceral leishmaniasis)
DCL	Διάχυτη δερματική λεισμανίαση (Diffuse cutaneous leishmaniasis)
DMSO	Διμεθυλοσουλφοξείδιο
DNA	Δεσοξυριβοζονουκλεϊνικό οξύ
DTH	Αντίδραση καθυστερημένης υπερευαισθησίας

dNTP	Τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια
eIF	Ευκαρυωτικός παράγοντας έναρξης 4A
eIF4A	Ευκαρυωτικός παράγοντας έναρξης 4B
eIF4B	Ευκαρυωτικός παράγοντας έναρξης 4F
eIF4F	Ευκαρυωτικός παράγοντας έναρξης
ELAM-1	Μόριο προσκόλλησης λευκοκυττάρων ενδοθηλίου (Endothelium leukocyte adhesion molecule 1)
ELISA	Ενζυμική δοκιμή ανοσοπροσρόφησης (Enzyme-linked immunosorbent assay)
FACS	Κυτταρομετρία ροής
FcγR	Υποδοχέας των ανοσοσφαιρινών τάξης G
FITC	Φλουορεσκεΐνη
GAPDH	Δεϋδρογονάση της γλυκεραλδεϋδης της 3-φωσφατάσης
GATA-3	Μεταγραφικός παράγοντας GATA-3
G-CSF	Παράγοντας διέγερσης σχηματισμού αποικιών κοκκιοκυττάρων
GM-CSF	Παράγοντας διέγερσης σχηματισμού αποικιών κοκκιοκυττάρων/μακροφάγων
gp46	Γλυκοπρωτεΐνη 46
gp63	Γλυκοπρωτεΐνη 63
HAART	Αντιρετροϊκή θεραπεία υψηλής δραστηριότητας (Highly Active Antiretroviral Therapy)
HIV	Ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (Human Immunodeficiency Virus)
HLA	Ανθρώπινα λευκοκυτταρικά αντιγόνα
HRP	Υπεροξειδάση ραπανιού (horseradish peroxidase)
H1	Ιστόνη H1 (histone H1)
IFN-γ	Ιντερφερόνη-γ
IgA	Ανοσοσφαιρίνη τάξης A (Immunoglobulin A)
IgE	Ανοσοσφαιρίνη τάξης E (Immunoglobulin E)

IgG	Ανοσοσφαιρίνη τάξης G (Immunoglobulin G)
IgM	Ανοσοσφαιρίνη τάξης M (Immunoglobulin M)
IL-1β	Ιντερλευκίνη-1β
IL-2	Ιντερλευκίνη-2
IL-4	Ιντερλευκίνη-4
IL-5	Ιντερλευκίνη-5
IL-6	Ιντερλευκίνη-6
IL-7	Ιντερλευκίνη-7
IL-10	Ιντερλευκίνη-10
IL-12	Ιντερλευκίνη-12
IL-12p40	Υπομονάδα p40 της ιντερλευκίνης 12
IL-12p70	Υπομονάδα p70 της ιντερλευκίνης 12
IL-13	Ιντερλευκίνη-13
IL-17	Ιντερλευκίνη-17
IL-18	Ιντερλευκίνη-18
IL-23	Ιντερλευκίνη-23
IL-27	Ιντερλευκίνη-27
iNOS	Επαγόμενη συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου (Inducible nitric oxide synthase)
i.p.	Ενδοπεριτοναϊκά (intraperitoneal)
i.v.	Ενδοφλέβια (intravenous)
kDNA	Κινητοπλαστικό δεσοξυριβοζονουκλεϊνικό οξύ
KMP-11	Κινητοπλαστική μεμβρανική πρωτεΐνη 11 (Kinetoplastid membrane protein 11)
LACK	Πρωτεΐνη του παρασίτου <i>Leishmania spp.</i> ομόλογη των υποδοχέων των ενεργοποιημένων C κινασών (<i>Leishmania</i> homolog of receptors for activated C-kinase)
LieIF	Ευκαρυωτικός παράγοντας έναρξης του παρασίτου <i>Leishmania</i>

infantum (*Leishmania infantum* eukaryotic initiation factor)

LbeIF	Ευκαρυωτικός παράγοντας έναρξης του παρασίτου <i>Leishmania braziliensis</i> (<i>Leishmania braziliensis</i> eukaryotic initiation factor)
LmeIF	Ευκαρυωτικός παράγοντας έναρξης του παρασίτου <i>Leishmania major</i> (<i>Leishmania major</i> eukaryotic initiation factor)
LPS	Λιποπολυσακχαρίτης (lipopolysaccharide)
MCL	Βλεννογονοδερματική λείσμανίαση (Mucocutaneous leishmaniasis)
MCP	Χημειοτακτική πρωτεΐνη των μονοκυττάρων (Monocyte chemotactic protein)
mDCs	Μυελοειδή δένδριτικά κύτταρα (myeloid dendritic cells)
MHC-I	Μόριο μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης I
MHC-II	Μόριο μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης II
MIP	Φλεγμονώδης πρωτεΐνη των μακροφάγων (Macrophage inflammatory protein)
MLEE	Πολυτοπική ενζυμική ηλεκτροφόρηση (Multilocus enzyme electrophoresis)
MPL	Μονοφωσφορικό λιπίδιο A (Monophosphoryl lipid A)
MyD88	Γονίδιο πρωτεύουσας απάντησης μυελοειδούς διαφοροποίησης 88 (Myeloid differentiation primary response gene 88)
mRNA	Αγγελιοφόρο RNA
NF-κB	Πυρηνικός μεταγραφικός παράγοντας – κB (Nuclear factor – κB)
NK	Φυσικά φονικά κύτταρα (Natural Killer cells)
NO	Μονοξείδιο του αζώτου
ORFF	Ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης F (Open reading frame F)
OVA	Αλβουμίνη αυγού
PAMPs	Δομικά πρότυπα μικροβιακών δομών, ευρείας κλίμακας (Pathogen-associated molecular patterns)
PBMC	Μονοκύτταρα περιφερικού αίματος (Peripheral blood mononuclear cells)

PCR	Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction)
pDCs	Πλασματοκυτταροειδή δένδριτικά κύτταρα (plasmacytoid dendritic cells)
PDGF	Αυξητικός παράγοντας προερχόμενος από τα αιμοπετάλια (Platelet-derived growth factor)
PE	Φυκοερυθρίνη
PKDL	Δερματική λεισμανίαση μετά από σπλαγχνική λεισμανίαση (Post kala-azar dermal leishmaniasis)
PMN	Πολυμορφοπύρηνα ουδετερόφιλα (Polymorphonuclear leukocytes)
PolyI:C	Πολυινοσινικό-πολυκυτιδυλικό οξύ (Polyinosinic-polycytidylic acid)
PRR	Υποδοχέας αναγνώρισης προτύπου (Pathogen recognition receptor)
PSA-2	Επιφανειακό αντιγόνο 2 των προμαστιγωτών μορφών του παρασίτου <i>Leishmania spp.</i> (<i>Leishmania</i> promastigote surface antigen-2)
RANTES	Παράγοντας ρυθμιζόμενος από τη διέγερση, εκφραζόμενος και εκκρινόμενος από τα φυσιολογικά T κύτταρα (Regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted)
RNA	Ριβοζονουκλεϊκό οξύ
ROS	Ενεργές ρίζες οξυγόνου (reactive oxygen species)
RPE	R-φυκοερυθρίνη
RT-PCR	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με τη χρήση αντίστροφης μεταγραφάσης
s.c.	Υποδόρια (subcutaneous)
SDS	Δωδεκανικό θειικό νάτριο (Sodium dodecyl sulfate)
STI1	Επαγόμενη πρωτεΐνη σε συνθήκες στρες (Stress-inducible protein 1)
T-bet	Μεταγραφικός παράγοντας T-bet
Tc	T κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα
TCR	Υποδοχέας των T κυττάρων (T cell receptor)
T _{DTH}	T λεμφοκύτταρα που διαμεσολαβούν τις αντιδράσεις καθυστερημένης υπερευαισθησίας

TGF-β	Αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού β
Th1	T βοηθητικά λεμφοκύτταρα τύπου 1
Th2	T βοηθητικά λεμφοκύτταρα τύπου 2
Th17	T βοηθητικά λεμφοκύτταρα τύπου 17
TLRs	Υποδοχείς τύπου Toll (Toll-like receptors)
TNF-α	Παράγοντας νέκρωσης όγκων α (Tumor Necrosis Factor – α)
TNFR	Προσδέτης του TNF (TNF receptor)
Treg	T ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα
TRIF	TIR περιοχές που περιέχουν πρωτεΐνες-προσαρμογείς, που επάγουν την ιντερφερόνη β (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β)
TSA	Ειδικό αντιοξειδωτικό θειόλης (Thiol specific antioxidant)
VL	Σπλαγχνική λείσμανίαση (Visceral leishmaniasis)
ΜΦ	Μακροφάγα
ΠΟΥ (WHO)	Παγκόσμιος οργανισμός υγείας (World Health Organization)



Leishmania Eukaryotic Initiation Factor (Lief) Inhibits Parasite Growth in Murine Macrophages

Olga Koutsoni^{1,3*}, Mourad Barhoumi^{2*}, Ikram Guizani^{2*†}, Eleni Dotsika^{1*†}

1 Laboratory of Cellular Immunology, Department of Microbiology, Hellenic Pasteur Institute, Athens, Greece, **2** Laboratoire d'Epidémiologie Moléculaire et de Pathologie Expérimentale Appliquée aux Maladies Infectieuses/LR11IPT04, Institut Pasteur de Tunis- Université Tunis El Manar, Tunis-Belvédère, Tunisia, **3** Department of Microbiology, Medical School of Athens, National and Kapodistrian University, Athens, Greece

Abstract

The leishmaniasis constitute neglected global public health problems that require adequate control measures, prophylactic clinical vaccines and effective and non-toxic drug treatments. In this study, we explored the potential of *Leishmania infantum* eukaryotic initiation factor (Lief), an exosomal protein, as a novel anti-infective therapeutic molecule. More specifically, we assessed the efficacy of recombinant Lief, in combination with recombinant IFN- γ , in eliminating intracellular *L. donovani* parasites in an *in vitro* macrophage model. J774A.1 macrophages were initially treated with Lief/IFN- γ prior to *in vitro* infection with *L. donovani* stationary phase promastigotes (pre-infection treatment), and resistance to infection was observed 72 h after infection. J774A.1 macrophages were also treated with Lief/IFN- γ after *L. donovani* infection (post-infection treatment), and resistance to infection was also observed at both time points tested (19 h and 72 h) after infection. To elucidate the Lief/IFN- γ -induced mechanism(s) that mediate the reduction of intracellular parasite growth, we examined the generation of potent microbicidal molecules, such as nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS), within infected macrophages. Furthermore, macrophages pre-treated with Lief/IFN- γ showed a clear up-regulation in macrophage inflammatory protein 1 α (MIP-1 α) as well as tumor necrosis factor alpha (TNF- α) expression. However, significant different protein levels were not detected. In addition, macrophages pre-treated with Lief/IFN- γ combined with anti-TNF- α monoclonal antibody produced significantly lower amounts of ROS. These data suggest that during the pre-treatment state, Lief induces intramacrophage parasite growth inhibition through the production of TNF- α , which induces microbicidal activity by stimulating NO and ROS production. The mechanisms of NO and ROS production when macrophages are treated with Lief after infection are probably different. Overall, these results indicate that Lief is a good candidate for use as an anti-leishmanial molecule.

Citation: Koutsoni O, Barhoumi M, Guizani I, Dotsika E (2014) *Leishmania* Eukaryotic Initiation Factor (Lief) Inhibits Parasite Growth in Murine Macrophages. PLoS ONE 9(5): e97319. doi:10.1371/journal.pone.0097319

Editor: Dipshikha Chakravorty, Indian Institute of Science, India

Received: November 26, 2013; **Accepted:** April 16, 2014; **Published:** May 15, 2014

Copyright: © 2014 Koutsoni et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was conducted in the frame of an Institut Pasteur fellowship (programme Calmette et Yersin) granted to M.B. as post-doctoral fellow. O.K. received a PhD fellowship from the Greek Ministry of Education, Religious Affairs, Culture and Sport. Work in the HPI was funded by an internal grant. Work in IPT received support from the special program of the UNICEF/UNDP/World Bank/WHO for research and training on tropical diseases, TDR (A30134) and the Tunisian ministry of higher education and scientific research (LR00SP04 and LR11IPT04). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: ikram.guizani@pasteur.rns.tn (IG); e.dotsika@pasteur.gr (ED)

† These authors contributed equally to this work.

‡ These authors also contributed equally to this work.

Introduction

Protozoa belonging to the order Kinetoplastida and the genus *Leishmania* constitute an important group of more than 20 species and subspecies of parasites that are transmitted to human or animals by sandfly vectors [1]. These protozoa cause leishmaniasis, a group of diseases characterised by a wide spectrum of clinical manifestations, ranging from self-healing skin ulcers (e.g. *Leishmania major*) to disfiguring mucosal lesions (e.g. *Leishmania braziliensis*), or fatal visceral infections (e.g. *Leishmania donovani*) [2].

Leishmania spp. have a digenetic life cycle, existing in two distinct forms, the flagellated promastigotes in the gut of their sand-fly vectors and the aflagellated amastigotes in the mammalian host. Within the mammalian host, *Leishmania* parasites reside in phagocytic cells, primarily macrophages (MΦs), the key cellular mediators of inflammatory responses, which are important for host

immune protection against microbial infections [3]. Flagellated promastigotes are targeted to acidic vacuolar compartments in MΦs that have the characteristics of mature phagolysosomes, where they differentiate into the smaller aflagellated amastigote stage [4]. Aflagellated amastigotes replicate by binary fission, rupturing infected macrophages and spreading to uninfected cells, thereby initiating the onset of disease symptoms in the host [5].

Although a major function of MΦs is to protect the host from microbes, *Leishmania* parasites are able to survive and persist inside the MΦs, indicating that these parasites deploy sophisticated mechanisms to evade and modulate the host immune system for their own benefit. The fate of intracellular *Leishmania* parasites is determined by the activation status of MΦs. On one hand, "classically" activated MΦs by interferon-gamma (IFN- γ), are capable of killing parasites effectively [6]. The immunological pathway that induces parasite destruction involves the production

of nitric oxide (NO) upon activation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and other leishmanicidal molecules, such as reactive oxygen species (ROS) [7–9]. NO and ROS are key players in the macrophage defence system against intracellular parasites. Moreover, chemokines, the critical mediators of leukocyte trafficking and cellular recruitment during inflammatory responses, have been reported to restrict the intracellular survival of *Leishmania* via the activation of NO mechanisms. More specifically, cysteine-cysteine (CC) chemokines, such as MIP-1 α and MCP-1, have a potent antileishmanial role via the generation of NO [10]. It has been shown that in human macrophages infected with *L. infantum*, treatment with MIP-1 α triggers NO release and increases leishmanicidal ability [11]. Additionally, MIP-1 α is responsible for stimulating TNF- α secretion by macrophages, a cytokine well recognised as an activator of the anti-leishmanial activity of macrophages [12]. On the other hand, “alternatively” activated macrophages (by non-protective Th2 cytokines, IL-4 and IL-10) preferentially activate the arginase pathway to produce polyamines and enhance parasite persistence [4,13,14]. Consequently, parasite persistence within macrophages is determined by a balance between the ability of the immune response to sufficiently activate *Leishmania*-infected macrophages versus the ability of the parasite to resist the cytotoxic mechanisms of macrophage activation [9].

Therefore, the parasite molecules that influence early cytokine production may be key determinants of resistance or susceptibility to *Leishmania* infection. *Leishmania* eukaryotic initiation factor (LeIF), which is homologous to eukaryotic initiation factor eIF4A, is highly conserved among *Leishmania* spp. and is present in both the amastigote and promastigote forms [15]. It is abundant in the secretome [16] and in the exosomes [17] of stationary phase *L. donovani* promastigotes. LeIF was first described as an antigen that induces the production of the protective Th-1 type cytokines, IL-12 and IFN- γ , in human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from either leishmaniasis patients or normal individuals [15]. LeIF also modulates IL-12p70, TNF- α and IL-10 production by human monocyte-derived macrophages from healthy individuals [18,19]. LeIF also was used as part of a trifuoson recombinant protein vaccine, Leish 111f, which was shown to be protective in mice and hamster experimental models [20–22]. These recombinant proteins, when administered as a cocktail, were efficient for immunotherapy [23]. As LeIF induces secretion of IL-12, a cytokine necessary for the development of specific immunity towards a Th1 phenotype [24,25], in presence of IFN- γ in macrophages or monocytes [18,19,26], we assessed in the present study the effect of *L. infantum* eukaryotic initiation factor (LeIF) and IFN- γ on *L. donovani* infection in J774A.1 macrophages by evaluating the intracellular parasite growth, and investigating possible mechanism(s) that induce resistance to *L. donovani* infection in these macrophages.

Materials and Methods

Cell and parasite culture

The immortalised macrophage cell line J774A.1, derived from adult BALB/cN mice (ATCC No: TIB-67), was purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Maryland, USA). The J774A.1 cells were maintained in tissue flasks in complete medium RPMI-1640 (Biochrom AG, Berlin, Germany) with low content in phenol red supplemented with 2 mM L-glutamine, 10 mM Hepes, 24 mM NaHCO₃, 50 μ M of 2-mercaptoethanol, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin and 10% v/v heat-inactivated foetal Bovine serum (FBS; Gibco, Paisley, UK). The J774A.1 cells were sub-cultured in 25-

cm² cell culture flasks (CellStar, Greiner Bio-one, Germany) at 37°C with 5% CO₂ in air. After incubation for 2 h, the flasks were washed three times with medium at 37°C to remove the unattached cells, and the remaining attached cells were used as the macrophage monolayer.

The *Leishmania donovani* parasite (strain MHOM/IN/1996/THAK35, zymodeme MON-2) was kindly provided by Dr. Ketty Soteriadou (Laboratory of Molecular Parasitology, Hellenic Pasteur Institute, Athens, Greece). Promastigotes were grown at 26°C in complete RPMI-1640 medium (Biochrom AG, Berlin, Germany) in a cell culture flask (CellStar, Greiner Bio-one, Germany). Promastigote multiplication from the exponential to stationary phase was achieved at 26°C in a refrigerated incubator (Sanyo incubator mir-253 Electronic Biomedical, Japan) within 3 to 4 days (starting density of promastigotes 2 $\times$ 10⁶/ml and reaching the late stationary phase at 2 $\times$ 10⁷/ml). Late stationary phase parasites were centrifuged at 450 g (Beckman GPR Centrifuge) for 10 min and resuspended in RPMI-1640 culture medium supplemented with 10% FBS prior to their addition to the adhering macrophage monolayer.

Cloning, protein expression and purification

The *LeIF* gene was amplified from *L. infantum* (MHOM/TN/88/Aymen) genomic DNA by PCR using 5' oligonucleotide containing *SpeI* and *NdeI* sites and a 3' oligonucleotide containing an *XhoI* site. The sequences of the oligonucleotides used for PCR were as follows:

LeIF 5': 5' GCGCG**ACTAGTCATATGGCGCAGAATGA-TAAGATCG** 3'

LeIF 3': 5' GCGCG**CTCGAGCTCACCAAGGTAGG-CAGCGAAG** 3'

The underlined regions hybridized to the LeIF sequence and the regions shown in bold are the inserted restriction sites. The 5' extensions (GCGCG) facilitated cleavage by the restriction enzymes.

The PCR product was purified from a 0.9% agarose gel and cloned into a Bluescript plasmid (Stratagene, La Jolla, CA, USA) cut with *SpeI* and *XhoI*. The sequence of the insert was confirmed by DNA sequencing. *LeIF* was then subcloned into a pET-22b expression vector (Novagen, San Diego, CA, USA) cut with *NdeI* and *XhoI*, and the protein was expressed from the Origami (DE3) *E. coli* strain (Novagen) and purified as previously reported mainly upon lysozyme treatment of the bacterial pellets and Ni affinity chromatography of the soluble bacterial extracts [27]. Protein concentration was determined using the Bio-Rad (Hercules, CA, USA) protein assay with bovine serum albumin (BSA) as a standard. Purity and concentration were verified using a 12% Coomassie-stained SDS PAGE gel. The identity of the protein LeIF was verified by western blot using rabbit anti-LeIF primary polyclonal antibodies (1/1000 dilution). The recombinant LeIF was tested for the absence of contaminating lipopolysaccharide (LPS) as previously described [18].

Macrophage infection assay

J774A.1 macrophages were detached from culture flasks monolayer by scraping, washed and pelleted twice at 500 g (Beckman GPR Centrifuge, Germany) for 10 min, resuspended in complete RPMI-1640 culture medium and counted in Malassez chambers. Cell viability (97%) was determined by Trypan blue exclusion dye. Cell suspensions at an appropriate concentration (2 $\times$ 10⁵ cells/ml) were added to 24-well culture plates (Sarstedt, Numbrecht, Germany), and they were allowed to adhere for 2 h at 37°C under 5% CO₂ atmosphere. Adherent J774A.1 cells were infected *in vitro* with the *L. donovani* stationary phase promastigotes

at a ratio of 1:15 as previously described [28]. At 4 h post-infection, non-internalised promastigotes were removed by washing 3 times with RPMI-1640 at 37°C. J774A.1 cells were treated for 15 h with recombinant LieIF (10 µg/ml) in combination with mouse recombinant IFN-γ (1 ng/ml) (BD Pharmingen, San Diego, USA) prior to or after infection with *L. donovani* promastigotes. Control cells were cultured and infected with promastigotes in a LieIF/IFN-γ-deficient medium for all of the procedures. We determined the effect of LieIF/IFN-γ treatment on *L. donovani* infection in J774A.1 macrophages at early (4 h and 19 h, respectively) and late (72 h) time points after infection. The effect of each treatment was determined using the alamarBlue (Invitrogen Life Technologies, NY, USA) colorimetric method as described previously [28]. The culture medium was removed at designated time points, and 50 µl of PBS (phosphate buffered saline) supplemented with 0.01% w/v sodium dodecyl sulphate (SDS) was added. After a 30 min incubation at 37°C in 5% CO₂ atmosphere, J774A.1 cells were lysed, and the parasites were released into complete Schneider's Insect medium (Sigma, St. Louis, MO) for 24 h. AlamarBlue was then diluted to 10% with complete Schneider's medium and incubated for 18 h. The leishmanicidal activity was evaluated by correlation of the number of surviving *Leishmania* organisms with the absorbance of alamarBlue. The O.D. of lysed J774A.1 macrophages was used as negative control while the O.D. of lysed infected J774A.1 macrophages was used as positive control. In this method, the reduction of the culture medium and colour development of the reagent are proportional to cell proliferation by determining fluorescence at 570 nm using as a reference filter at 630 nm [29]. Additionally, in similar experimental conditions of infection, the pre-infection and post-infection treated J774A.1 macrophages were collected by using a cell scraper (Sarstedt, Inc. Newton, USA) and were washed twice with PBS. Finally, they were suspended in 200 µl PBS and cytocentrifuged (Cytospin 2, Shandon, UK) on a slide and stained with Giemsa's Azure Eosin Methylene Blue Solution (Merck, Germany). Intracellular amastigotes were counted in 200 macrophages in a microscope at 100× magnification (Olympus, BH, Japan). The infection rate (percentage of infected macrophages containing amastigotes/200 macrophages) and the parasite load (total number of intracellular parasites in 200 infected macrophages/200) were determined and compared in LieIF/IFN-γ and IFN-γ treated cells.

NO synthesis assay

The LieIF/IFN-γ-induced NO synthesis by J774A.1 cells was measured as the accumulation of nitrites in cell culture supernatants for designated incubation periods using the Griess reaction (Sigma-Aldrich, USA) according to manufacturer's protocol [30]. Briefly, the J774A.1 cells were stimulated with LieIF/IFN-γ (10 µg/ml and 1 ng/ml, respectively), either pre- or post-infection, upon exposure to *L. donovani* promastigotes in a cell:parasite ratio 1:15. As a positive control, J774A.1 cells were co-cultured with 1 µg/ml LPS and 1 ng/ml IFN-γ. At designated time points post-infection, 50 µl of supernatants were mixed with 100 µl of Griess reagent (1% sulphanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride, 3% phosphoric acid dissolved in distilled water) [31]. Absorbance was measured at 570 nm with a Dynatech Laboratories MRX spectrophotometer (Germany). The relative NO concentrations were calculated from a standard curve generated with known amounts of NaNO₂ and the data are expressed as the mean concentration units (ng/ml) ± SD.

Generation of reactive oxygen species (ROS) in J774A.1 macrophages

LieIF/IFN-γ-mediated generation of ROS in J774A.1 cells. To measure the LieIF/IFN-γ-mediated generation of ROS in J774A.1 cells, we used flow cytometry with fluorescent probes (carboxy-H₂DCFDA (Life Technologies, NY, USA) that permit the determination of intracellular fluorescence [32]. Briefly, J774A.1 cells were stimulated with LieIF/IFN-γ (10 µg/ml and 1 ng/ml), pre- or post-infection with *L. donovani* stationary phase promastigotes (as described in § 3). For each time point, the cells were probed with H₂DCFDA (5 M) for 30 min at 37°C and 5% CO₂. Hydrogen peroxide (H₂O₂; 1 mM) was added as the positive control group, and the cells were incubated for 15 min at 37°C and 5% CO₂. The cells were analysed for intracellular ROS with FACS Calibur using CellQuest software (Becton-Dickinson, San Jose, CA). The data are expressed as the intensity of fluorescence (Geo Mean).

Effect of TNF-α on ROS production in J774A.1 cells. To determine the correlation of TNF-α production with generation of ROS in parasitized J774A.1 cells, we used flow cytometry with carboxy-H₂DCFDA probe. J774A.1 cells were stimulated with LieIF/IFN-γ, as described above, with or without anti- mouse TNF-α monoclonal antibody (4 µg/ml) (clone: MP6-XT3, AbD Serotec, Oxford, UK). Cells were analyzed for intracellular ROS with FACS Calibur. Data are expressed by the following formula: $\text{Geo Mean} = \text{Geo Mean}_{\text{J774+LieIF+MON2+IFN-}\gamma} - \text{Geo Mean}_{\text{J774+MON2+IFN-}\gamma}$.

Isolation of RNA and RT - PCR

The total RNA of non-infected and infected (either pre-infection or post-infection treated) J774A.1 cells (3×10^6) was extracted using an RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germany) following the manufacturer's instructions [33]. A 1 µg aliquot of total RNA was then reverse-transcribed using M-MLV Reverse Transcriptase and the oligo(dT) 15 primer, according to the manufacturer's instructions (Promega, USA). The reverse transcription step was performed at 40°C for 60 min and 90°C for 5 min.

MIP-1α and TNF-α analysis by real-time quantitative PCR

Real-time PCR was performed using an Exicycler 96 (Bioneer, Daejeon, Korea) with a SYBR Green PCR Master Mix (Kapa Biosystems, Boston, USA). The PCR mixture (20 µl) contained 5 pmoles of each primer, 3 µl of distilled water, 10 µl of commercial SYBR Green master mixture and 5 µl of cDNA. Primer pairs for MIP-1α (forward: TGG GTC CAA GAA TAC ATC ACT G, reverse: GAG GGA GAT GGG GGT TGA), TNF-α (forward: AGC CCA CGT CGT AGC AAA CCA CCA A, reverse: ACA CCC ATT CCC TTC ACA GAG CAA T) and GAPDH (forward: AGG TGG TGA AGC AGG CAT C, reverse: AGG CCC CTC CTG TTA TTA TGG) were derived from published work [34]; the primer pairs amplified 321 bp, 406 bp and 357 bp DNA fragments, respectively. GAPDH was used for normalisation. The samples were placed in low-profile 0.2 ml 8-tube strips (Bio-Rad, Hercules, USA) that were sealed with flat optical 8-cap strips (Bio-Rad, Hercules, USA). The thermal cycling conditions were as follows: an initial activation step for 10 min at 95°C followed by 45 cycles of denaturation for 30 sec at 95°C, annealing for 30 sec at 60°C and extension for 45 sec at 72°C. All PCR experiments were followed by a melting curve analysis to verify amplicon specificity. All expression ratios were computed via the $\Delta\Delta C_t$ method. More specifically, cytokine cycle threshold (C_t) values were normalised to GAPDH expression, as determined by $\Delta C_t = C_{t(\text{cytokine})} - C_{t(\text{GAPDH})}$. Fold change in gene expression

was determined by $2^{-\Delta\Delta C_t}$, where $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t (\text{experimental}) - \Delta C_t (\text{control})$ [35]. All real-time PCR experiments were performed as 3 replicates from one experiment.

MIP-1 α and TNF- α detection by ELISA

MIP-1 α and TNF- α were detected at the late time points either at pre-infected or post-infected J774A.1 macrophages. Culture supernatants were collected at the end of each incubation period and were stored at -80°C until analyzed. MIP-1 α and TNF- α were determined by sandwich ELISA kits (900-K125, 900-K54; PeproTech, Rocky Hill, NJ) according to manufacturer's instructions. The concentrations of cytokines were calculated by using standard curves. Detection threshold for MIP-1 α and TNF- α was 8 pg/ml and 16 pg/ml, respectively.

Statistical analysis

The significance of the results was calculated using a nonparametric statistical test: the two-sided Mann-Whitney for comparison between two groups. The data shown are representative of at least three independent experiments and are presented as the mean $\pm$ SD. The level of statistical significance was set at $p \leq 0.05$.

Results

Effect of LieIF/IFN- γ pre-infection treatment on *L. donovani* growth in J774A.1 macrophages

Since previous reports showed that LieIF in IFN- γ activated macrophages and monocytes induces secretion of IL-12 [18,19,26] a cytokine necessary for the development of specific immunity towards a Th1 phenotype [24,25], we investigated the effect of LieIF on the susceptibility of M Φ s to *L. donovani* infection. To this end, the LieIF gene was sub-cloned into pET22b plasmid containing a carboxyl terminal His 6 tag to permit the recombinant protein purification on nickel affinity column upon expression in *Escherichia coli* (Fig. 1A). The identity of the protein was verified by using rabbit anti-LieIF polyclonal antibodies (Fig. 1B). Subsequently, J774A.1 macrophages were pre-treated with LieIF/IFN- γ and were then infected with *L. donovani* parasites. The effect of these proteins was determined using the alamarBlue colorimetric method, where the number of intracellular parasites is correlated with the absorbance of the reagent. At 4 h time point after infection, the percentage of intracellular parasite growth inhibition in LieIF/IFN- γ -treated cells was low (3%), similar to the percentage obtained by IFN- γ alone (Fig. 2A). At the late time point (72 h) after infection, the LieIF/IFN- γ -treated cells showed a significantly higher inhibition of parasite growth in comparison to cells treated solely with IFN- γ (89% vs 7%) (Fig. 2B). Additionally, as shown in Fig. 2C and Fig. 2D, LieIF/IFN- γ -pre-treated macrophages exhibited significantly ($p < 0.05$) lower *L. donovani* infection rates and parasite load than the IFN- γ -treated cells, 48% vs 72% and 3.48 vs 5.62, respectively whereas J774A.1 cells treated solely with LieIF did not exhibit parasite growth inhibition (data not shown). These results suggest that at 72 h post infection, LieIF/IFN- γ induced resistance of co-cultured J774A.1 cells to *L. donovani* infection.

Effect of LieIF/IFN- γ post-infection treatment on *L. donovani* growth in J774A.1 macrophages

The observation that LieIF/IFN- γ -pre-treated J774A.1 macrophages showed resistance to *L. donovani* infection prompted us to examine the efficacy of treatment with LieIF/IFN- γ post- *L. donovani* infection on intracellular parasite growth. Thus, treatment

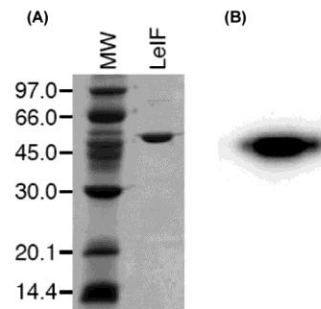


Figure 1. Expression and purification of the recombinant LieIF protein. (A) An aliquot of the purified LieIF was resolved by SDS polyacrylamide gel and stained with Coomassie brilliant blue. The positions of the Bio-Rad prestained marker (in kDa) are indicated at the left. (B) The identity of the protein LieIF was verified by using rabbit anti-LieIF primary polyclonal antibodies (1/1000 dilution). doi:10.1371/journal.pone.0097319.g001

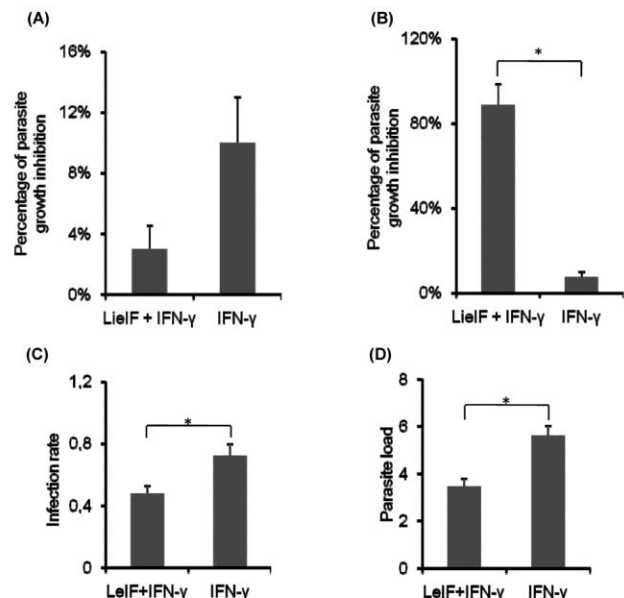


Figure 2. Effect of pre-infection treatment of J774A.1 macrophages with LieIF/IFN- γ on intracellular *L. donovani* growth inhibition. (A) at early (4 h) and (B) late (72 h) time points after infection. J774A.1 cells were stimulated with recombinant LieIF (10 $\mu\text{g/ml}$) and recombinant IFN- γ (1 ng/ml). *L. donovani* growth inhibition at the late time point (72 h) is associated with reduction of the infection rate (C) and the parasite load (D). The parasite growth inhibition was determined by the colorimetric method alamarBlue and OD was measured at 570/630 nm. Infection rate and parasite load were determined by microscopic observation upon Giemsa's staining of slides to count the mean number of infected macrophages considering 200 macrophages and the mean number of intracellular amastigotes in 200 infected macrophages, respectively. Data are presented as the mean $\pm$ S.D. of at least three independent experiments. Asterisks indicate statistically significant differences ($p \leq 0.05$). doi:10.1371/journal.pone.0097319.g002

of J774A.1 cells with LieIF/IFN- γ post-infection showed a statistically significant inhibition of intracellular parasite growth ($p \leq 0.05$) (Fig. 3). The inhibition of parasite growth was apparent at early (19 h) (Fig. 3A) and at late (72 h) time points after infection

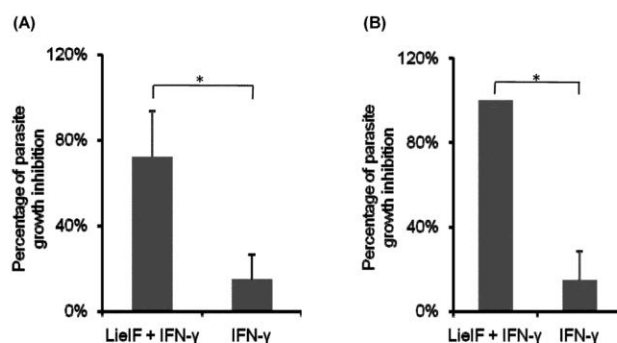


Figure 3. Effect of post-infection treatment of J774A.1 macrophages with LieIF/IFN-γ in intracellular *L. donovani* growth inhibition. (A) at early (19 h) and (B) late (72 h) time points after infection. J774A.1 cells were stimulated with 10 μg/ml recombinant LieIF and 1 ng/ml recombinant IFN-γ. *L. donovani* growth inhibition was determined by the colorimetric method alamarBlue and OD was measured at 570/630 nm. Data are presented as the mean ± S.D. of at least three independent experiments. Asterisks indicate statistically significant inhibition of parasite growth ($p \leq 0.05$). doi:10.1371/journal.pone.0097319.g003

(Fig. 3B), with 72% and 100% parasite growth inhibition, respectively. These results suggest that J774A.1 cells post-treated with LieIF/IFN-γ also gained resistance to *L. donovani* infection, similar to their effect when administered prior to the infection.

LieIF/IFN-γ-induced NO generation in infected J774A.1 macrophages

The ability of J774A.1 macrophages to reduce intracellular parasite growth after treatment with LieIF/IFN-γ before or after the infection indicates that effective anti-microbial mechanisms are activated and leishmanicidal molecules are produced due to this dual treatment. Even though *Leishmania* has evolved sophisticated mechanisms leading to the repression and inhibition of NO production [36], macrophage killing of the *Leishmania* parasite *in vivo* is mediated by NO, a key mediator of nonspecific immunity. We found that infected J774A.1 cells, pre- or post-infection treated with LieIF/IFN-γ, had a marked increase in generation of NO synthesis as measured by nitrite accumulation in the culture medium determined by the Griess reaction (Fig. 4). For comparison, NO production of cells stimulated with LPS plus IFN-γ and non-stimulated cells served as positive and negative controls respectively. All presented values have been calculated after subtraction of the NO production values of the control group of infected macrophages as *L. donovani* alone is able to induce negligible amounts of NO in culture supernatants. The highest values of NO levels (113 ng/ml and 157 ng/ml) were observed, at the late time point (72 h) after infection in culture supernatants of J774A.1 cells when pre- or post-infection treated with LieIF/IFN-γ (Fig. 4A, 4B), respectively. The lowest values of NO production were detected at early time points (4 h and 19 h) after infection of J774A.1 cells that were pre- or post-infection treated with LieIF/IFN-γ, 76 ng/ml and 41 ng/ml, respectively (Fig. 4C and Fig. 4D). Collectively, LieIF together with IFN-γ induced the production of NO in infected J774A.1 cells.

LieIF/IFN-γ triggered ROS generation in *L. donovani* infected J774A.1 macrophages

Ingestion of microbial invaders by MΦs induces the generation of reactive oxygen intermediates, which constitute an essential part of the defence mechanism adopted by the host. Because *Leishmania*

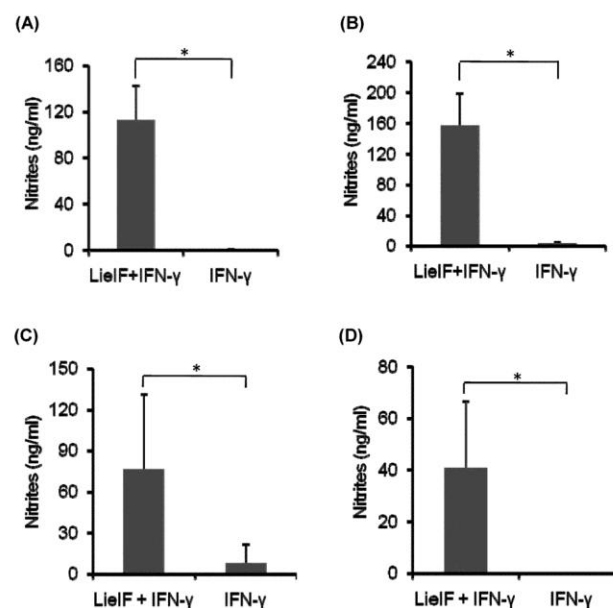


Figure 4. Nitric oxide production (ng/ml) by J774A.1 macrophages upon treatment with LieIF/IFN-γ at late (A, B) and early (C, D) time points after *L. donovani* infection. J774A.1 cells were treated pre-infection (A, C) and post-infection (B, D) with recombinant LieIF (10 μg/ml) and recombinant IFN-γ (1 ng/ml). Nitrite accumulation in the medium was measured by addition of Griess reagent, absorbance reading of the reaction product at 570 nm. All data are presented as the mean ± S.D. of at least three independent experiments. Asterisks indicate statistically significant production of NO ($p \leq 0.05$). doi:10.1371/journal.pone.0097319.g004

parasites enter MΦs, they protect themselves against host oxidative burst through the expression of antioxidant enzymes and by the inhibition of ROS and NO production in the MΦs [37]. To investigate whether LieIF/IFN-γ caused ROS generation in J774A.1 cells, the fluorescent probe H₂DCFDA was used. For comparison, ROS generation in LPS- and in H₂O₂- stimulated cells served as positive controls. The detectable inherent basal level of ROS generation in J774A.1 cells was low (Geo Mean = 1.80); thus, all the results are presented with the subtraction of the background fluorescence of non-labelled (NL) cells and are presented in Fig. 5. LieIF/IFN-γ triggered ROS generation in infected J774A.1 cells at the late time point after infection, either when added to cells pre- or post-infection, Geo Mean = 14.58 and 27.12, respectively (Fig. 5A and Fig. 5B). The ROS generation caused by addition of LieIF/IFN-γ was 3-fold higher and 2-fold higher, pre- and post-infection, respectively, than the corresponding generation caused by IFN-γ alone (Fig. 5A, 5B). Additionally, it is noteworthy that pre- and post-infection treatment with LieIF/IFN-γ produced similar amounts of ROS as those observed in the positive control (LPS-treated macrophages), 18.58 and 27.92, respectively. Interestingly, no ROS generation was evident at the early time (4 h and 19 h) points of infection (data not shown).

LieIF/IFN-γ induced MIP-1α and TNF-α production in *L. donovani* infected J774A.1 macrophages

Chemokines and proinflammatory cytokines are involved in both innate and adaptive immunity, facilitating the initiation and maintenance of the immune response mechanisms that are elicited by intracellular parasites [38–41]. The chemokine MIP-1α has a key role in immunity against experimental visceral leishmaniasis

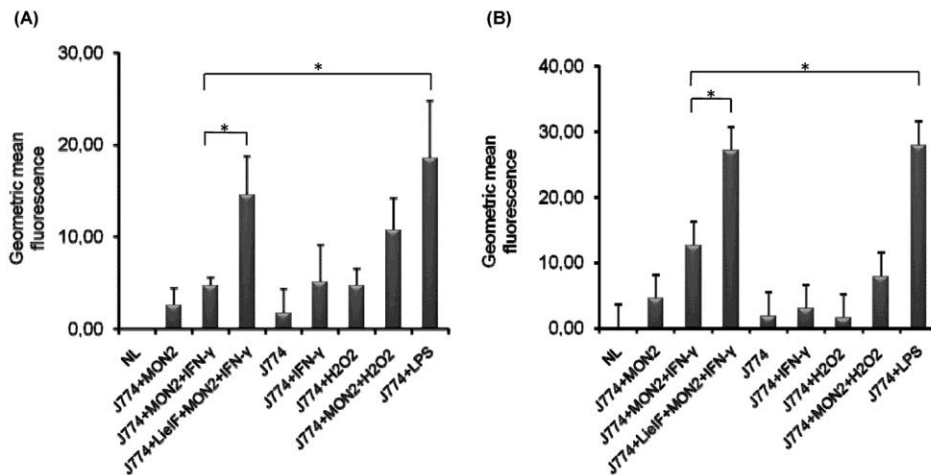


Figure 5. ROS generation by J774A.1 macrophages pre- and post-infection treated (A and B, respectively) with recombinant LieIF (10 μ g/ml) and recombinant IFN- γ (1 ng/ml). ROS generation was determined at the late time point (72 h) after *L. donovani* infection. Cells were labelled with 5 μ M H₂DCFDA fluorescent probe and fluorescence of cells reacting with the probe was estimated by FACS analysis. All data are presented as the mean $\pm$ S.D of at least three independent experiments. Asterisks indicate statistically significant production of ROS ($p \leq 0.05$) compared to the control group of infected J774A.1 cells stimulated with IFN- γ (J774 + MON2 + IFN- γ). NL: for medium only; MON2: for the MHOM/IN/1996/THAK35 *L. donovani* strain used. doi:10.1371/journal.pone.0097319.g005

[42–44]. Moreover, the proinflammatory cytokine TNF- α potentially plays a role as a triggering signal for NO generation [45]. The MIP-1 α and TNF- α gene expressions in J774A.1 cells treated with LieIF/IFN- γ pre- or post-infection were determined by quantitative real-time PCR. The expression of GAPDH was used to normalise the data, and these results are presented in Figure 6. Infected cells pre-treated with LieIF/IFN- γ showed a clear 5-fold up-regulation in MIP-1 α mRNA expression compared to infected macrophages treated only with IFN- γ ($p < 0.05$) (Fig. 6A). A low level of MIP-1 α expression was detected in macrophages that were incubated with medium only and cells pre-treated with LieIF alone exhibited low MIP-1 α mRNA expression as well. In contrast, when J774A.1 cells were post-infection treated with LieIF/IFN- γ , no increased expression in MIP-1 α was observed compared to infected macrophages treated only with IFN- γ . MIP-1 α was also detected in culture supernatants at the late time point (72 h) after *L. donovani* infection. Pre-treatment of infected cells with LieIF/IFN- γ induced the release of MIP-1 α . Nevertheless, control J774A.1 cells not exposed to LieIF/IFN- γ , as well as infected J774A.1 cells exposed to IFN- γ only, elicited a MIP-1 α response of similar magnitude at 72 h after infection (Fig. 6C). In addition, infected J774A.1 cells that were pre-treated with LieIF/IFN- γ showed an 8.6-fold TNF- α up-regulation of gene expression, compared to infected cells treated only with IFN- γ (Fig. 6B). However, TNF- α release in supernatants of infected J774A.1 cells pre-treated with LieIF/IFN- γ was not significant when compared to control groups (Fig. 6D). Conversely, post-infection treatment of the cells with LieIF/IFN- γ did not induce any up-regulation in MIP-1 α or TNF- α mRNA expression. Similarly, infected macrophages post-treated with LieIF/IFN- γ released similar levels of MIP-1 α and TNF- α to the control groups.

Correlation of TNF- α production with generation of ROS in parasitized J774A.1 cells

Nitrogen and reactive oxygen (ROS) intermediates are important in activation of transcription factor NF- κ B, which controls the activity of numerous immunity and inflammation genes, including TNF- α [46]. In order to clarify the interplay between NO and

ROS generation and TNF- α production, we tested the effect of anti-TNF- α monoclonal antibody on oxidative burst in parasitized macrophages, at the late time point (72 h) after *L. donovani* infection. J774A.1 cells, pre-infection treated with LieIF/IFN- γ combined with anti-TNF- α monoclonal antibody produced significantly lower amounts of ROS compared to J774A.1 cells pre-infection treated with LieIF/IFN- γ only ($p = 0.003$) (Fig. 7A). Nevertheless, TNF- α neutralization had no effect on ROS production in J774A.1 cells that were post-infection treated with LieIF/IFN- γ ($p = 0.121$) (Fig. 7B).

Discussion

Macrophages are phagocytic cells that play a critical role in host immune responses to microbial infection. They play a pivotal role in initiating protective immune response to *Leishmania* infection whereas they allow the growth of this intracellular pathogen. During the past decades, a large body of evidence has supported the notion that the IFN- γ cytokine plays a decisive role in anti-leishmanial defence [47,48]. Upon IFN- γ activation, macrophages provide the necessary regulatory signals in the form of cytokines to induce T cell activation and elicit several effector mechanisms involved in the control of infection. In IFN- γ -primed bone marrow-derived macrophages, *L. donovani* promastigotes induce the secretion of NO, which plays an essential role in the control of *Leishmania* infection by these macrophages [49,50]. However, despite the importance of IFN- γ in the development of resistance to *Leishmania* infection, it was reported that the administration of exogenous IFN- γ does not protect susceptible BALB/c mice from *L. major* infection [51]. In addition, IFN- γ mRNA was detected in the infected skin lesions of not only resistant C57BL/6 mice but also susceptible BALB/c mice [52]. These reports suggest that IFN- γ alone is not sufficient to control *L. major* and that additional factor(s) would be required for the development of protective immunity to *Leishmania* infection. Exosomes of *Leishmania* are considered to play a role during the early stage of infection by delivering pre-emptive strikes that create permissive environment for infection with particularly a role for gp63, the major

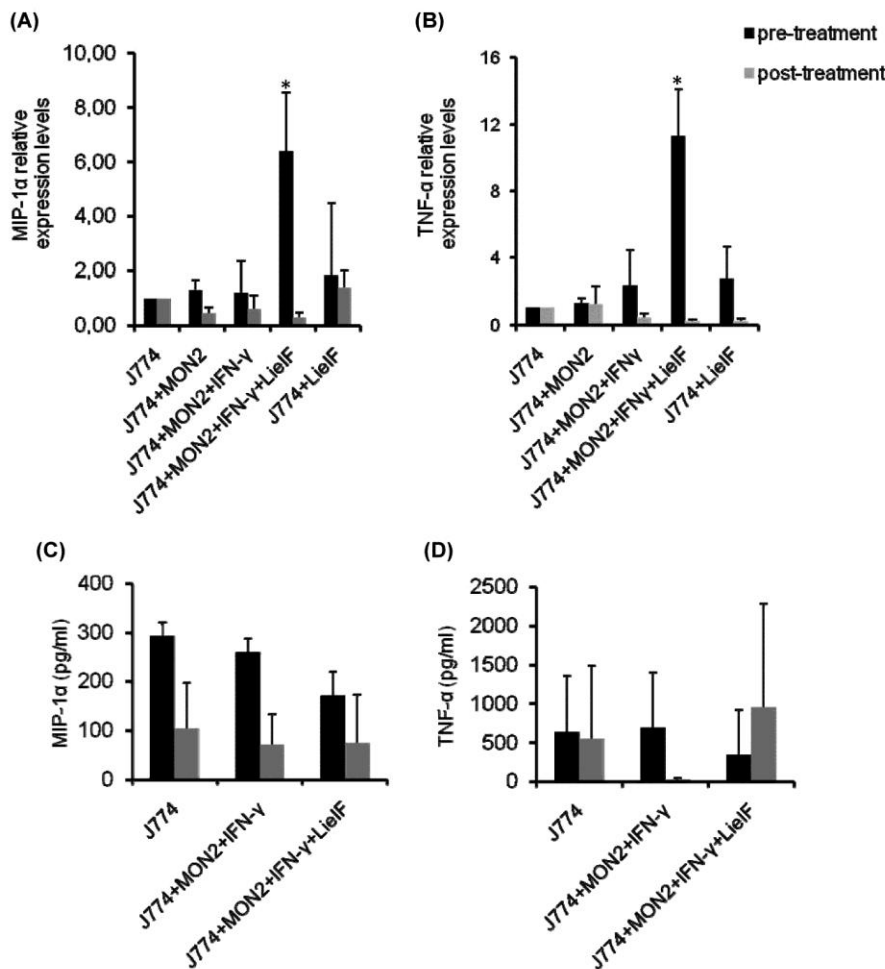


Figure 6. Relative expression of transcripts encoding MIP-1α (A) and TNF-α (B) in J774A.1 cells pre- (black bars) and post- infection treated (grey bars) with recombinant LieIF/IFN-γ (10 μg/ml and 1 ng/ml respectively). (C) and (D) detection of protein levels of MIP-1α and TNF-α, respectively in supernatants of J774A.1 cell cultures. Gene expression and protein levels were determined at the late time point (72 h) after *L. donovani* infection. The relative expression of transcripts are expressed as the mean ± S.D. of the three replicates from one biological experiment. Asterisks indicate statistically significant up-regulation in gene expression ($p \leq 0.05$) by infected J774A.1 cells stimulated with LieIF/IFN-γ as compared to cells treated with IFN-γ only. The protein levels in supernatants are expressed as the mean ± S.D of three separate experiments run independently in triplicates.

doi:10.1371/journal.pone.0097319.g006

promastigote surface glycoprotein, and EF-1α, elongation factor 1α, which are delivered into the cytosol of the infected macrophage where they activate multiple host protein-tyrosine phosphatases. This way, these proteins negatively regulate IFN-γ signalling pathways and thus prevent the effective expression of microbicidal functions of the macrophage [53]. LieIF, antigen well known for its immune-modulating activities and ability to induce secretion of IL-12 cytokine from macrophages or monocytes of healthy donors [18,19] or from PBMC from either leishmaniasis patients or normal individuals [16], constitutes an abundant protein in the exosomes of *L. donovani* stationary phase promastigotes [18] that is supposedly also delivered to infected cells.

In this study, we demonstrated the synergistic effect of the recombinant proteins LieIF and IFN-γ in eliminating intracellular *L. donovani* parasites in an *in vitro* macrophage infection model thus inferring a potential role for this exosomal protein during the early stages of infection. Our findings suggest that treatment of J774A.1 macrophages with LieIF/IFN-γ, prior to *Leishmania* infection, led to a statistically significant reduction in intracellular parasite

growth at the late time point of infection (72 h). This result was confirmed by the significant reduction in both infection rate and parasite load. The observed immunomodulatory activities of IFN-γ are consistent with previous studies, and our results demonstrate clearly that LieIF reinforces the activities of IFN-γ [54]. The finding that LieIF/IFN-γ- pre-treated J774A.1 cells showed resistance to *L. donovani* infection prompted us to examine the efficacy of LieIF on intracellular growth of *L. donovani* following infection, and we showed that J774A.1 cells treatment with LieIF/IFN-γ after *Leishmania* infection also led to a significant prevention of parasite growth at early (19 h) and late time (72 h) points of infection.

Here, reduction of intracellular parasite growth upon LieIF/IFN-γ treatment was shown to be mediated by the production of anti-microbial effector molecules. Nitric oxide and oxidative mediators are proven leishmanicidal molecules capable of killing parasites effectively upon exposure to Th1 cytokines, including IFN-γ and TNF-α. The role of NO in controlling *Leishmania* MΦ infection is well established in humans and other mammals

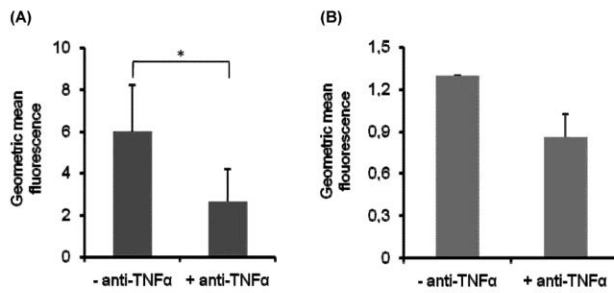


Figure 7. Correlation of TNF- α production with generation of ROS in parasitized J774A.1 cells. The effect of TNF- α on ROS production in J774A.1 cells pre- and post- infection treated (A and B, respectively) with recombinant LiIF/IFN- γ (10 μ g/ml and 1 ng/ml respectively), with or without anti-mouse TNF- α monoclonal antibody (4 μ g/ml), was determined at the late time point (72 h) after *L. donovani* infection. Cells were analyzed for intracellular ROS with FACS Calibur. All data are presented as the mean $\pm$ S.D. of three independent experiments. Data are expressed by the formula: Geo Mean = Geo Mean^(J774+LiIF+MON2+IFN- γ) - Geo Mean^(J774+MON2+IFN- γ). doi:10.1371/journal.pone.0097319.g007

[48,55–61]. In particular, NO release has been documented in human PBMC-derived M Φ s infected with *L. infantum* *in vitro*. This production was increased after activation with IFN- γ and bacterial LPS and was correlated with leishmanicidal ability [62]. In our study, treatment of J774A.1 cells with LiIF/IFN- γ prior to *L. donovani* infection led to significant production of NO as compared to J774A.1 cells treated with IFN- γ alone, at both early (4 h) and late time points (72 h) after infection, suggesting this pre-infection treatment induced resistance to *L. donovani* infection in an NO-dependent manner. Interestingly, J774A.1 cells treated with LiIF/IFN- γ after their infection produced greater levels of NO both at early (19 h) and late time points (72 h) of infection. Collectively, these results suggest that treatment with LiIF/IFN- γ , either pre- or post-infection, impairs *L. donovani* macrophage infection in an NO-dependent manner.

In addition to NO production, activation of macrophages leads to ROS production through an oxidative burst that is ultimately responsible for the leishmanicidal activity [61,63–65]. Although ROS derivatives normally lead to the destruction of the phagocytosed microorganism, *Leishmania* spp. have been adapted to survive and replicate in this hostile environment by deploying antioxidant systems or by suppressing macrophage ROS production [63]. *Leishmania* inhibits the production of O $_2^-$ *in vivo*, and it has been reported that O $_2^-$ and H $_2$ O $_2$ levels are significantly lower in monocytes from patients with active visceral leishmaniasis as compared to healthy controls [66,67]. To assess whether the intracellular parasite growth inhibition is also mediated by ROS derivatives, we determined ROS production at the late time point (72 h) after infection, when the inhibition of intracellular parasite growth was most prominent. Our results support the notion that ROS production is responsible for leishmanicidal activity. Indeed, we observed that J774A.1 cells treated with LiIF/IFN- γ , pre- or post-infection, led to a significant increase of ROS generation which suggests that LiIF, in synergy with IFN- γ , is able to confer protection to *L. donovani* infection by driving the innate immune response towards the up-regulation of NO and ROS, the potent macrophage-derived microbicidal molecules that are critical in controlling *Leishmania* infection [68,69].

Chemokines are structurally defined small proteins that are the key molecules in recruiting immune cells by chemotaxis; they also act in leukocyte activation, inflammatory diseases and anti-microbial mechanisms [39,70]. Furthermore, they have a much

wider range of biological activity, such as participation in cell-mediated immunity and involvement in Th1-Th2 differentiation, which is of the greatest importance in the control of infection by intracellular protozoa [71–73]. The CC chemokines (MIP-1 α , MCP-1) play an important role in restricting disease progression in leishmaniasis [12]. In this study, we focused on MIP-1 α because it has been shown to have an important role in limiting macrophage parasitic burden [11]. MIP-1 α treatment in *L. donovani*-infected macrophages induces the production of the protective Th1-type cytokine IL-12 and inhibits the production of the non-protective Th2-type cytokines, IL-10 and TGF- β [12]. Our study confirms previous findings that MIP-1 α treatment restricts the parasite burden via the induction of the superoxide anion and nitrite generation in *L. donovani*-infected macrophages [74]. Thus, our findings clearly showed that *L. donovani*-infected J774A.1 cells pre-treated with LiIF/IFN- γ exhibited a 5-fold up-regulation in MIP-1 α mRNA expression at the late time point (72 h) of infection. It is noteworthy that at the same time point, these cells presented significant intracellular parasite growth inhibition in a NO- and ROS- dependent manner. The levels of MIP-1 α were also detected in culture supernatants of J774A.1 cells. Despite the observed up-regulation of MIP-1 α mRNA expression in J774A.1 cells pre-treated with LiIF/IFN- γ , we did not detect significant different protein levels among the tested groups. This is in accordance with reports regarding poor correlation between the level of mRNA and level of protein [75].

MIP-1 α is the protein primarily responsible for stimulating TNF- α secretion by macrophages [76]. TNF- α provides a second signal to induce microbicidal activity in IFN- γ -activated macrophages by stimulating NO production [48]. Our results showed that *L. donovani*-infected J774A.1 cells pre-infection treated with LiIF/IFN- γ had a 9-fold up-regulation in TNF- α mRNA expression at the late time point (72 h) of infection. It is worth noting that J774A.1 cells post-infection treated with LiIF/IFN- γ did not have elevated expression levels of MIP-1 α and TNF- α mRNA. Similarly, no significant levels of TNF- α were detected.

In summary, we have demonstrated that J774A.1 macrophages treated with LiIF/IFN- γ prior or post their infection, inhibit the intracellular growth of *L. donovani*. In the case of pre-infection treatment with LiIF/IFN- γ and at 72 h post infection, J774A.1 cells eliminate the intracellular parasites by engaging a NO- and ROS-mediated leishmanicidal mechanism. We also showed, in accordance with other reports [10], that there is interplay between oxidative burst (ROS production) and TNF- α . Conversely, in the case of post-infection treatment with LiIF/IFN- γ , J774A.1 cells also inhibit the intracellular parasite growth in a NO- and ROS-dependent manner, but we found no correlation with the production of MIP-1 α and TNF- α . These results indicate that post-infection treated J774A.1 cells engage NO- and ROS-mediated leishmanicidal activity probably by employing a mechanism independent of MIP-1 α and TNF- α . Overall, the effective intra-macrophage parasite growth inhibition and the apparent immune-modulatory effect of LiIF pave the way for its evaluation as a candidate anti-leishmanial molecule.

Acknowledgments

The authors acknowledge Dr. Geneviève Milon (Institut Pasteur, Paris) for critical reading of the manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: ED IG OK MB. Performed the experiments: OK MB. Analyzed the data: OK MB ED IG. Wrote the paper: OK MB ED IG.

References

- Halstead SB, Mahalingam S, Marovich MA, Ubol S, Mosser DM (2010) Intrinsic antibody-dependent enhancement of microbial infection in macrophages: disease regulation by immune complexes. *Lancet Infect Dis* 10: 712–722.
- von Stebut E, Udey MC (2004) Requirements for Th1-dependent immunity against infection with *Leishmania major*. *Microbes Infect* 6: 1102–1109.
- Gossage SM, Rogers ME, Bates PA (2003) Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. *Int J Parasitol* 33: 1027–1034.
- Naderer T, McConville MJ (2008) The *Leishmania*-macrophage interaction: a metabolic perspective. *Cell Microbiol* 10: 301–308.
- Awasthi A, Mathur RK, Saha B (2004) Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J Med Res* 119: 238–258.
- Gordon S (2003) Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3: 23–35.
- Reiner SL, Locksley RM (1995) The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu Rev Immunol* 13: 151–177.
- Bogdan C (2001) Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2: 907–916.
- Mukbel RM, Patten C Jr, Gibson K, Ghosh M, Petersen C, et al. (2007) Macrophage killing of *Leishmania amazonensis* amastigotes requires both nitric oxide and superoxide. *Am J Trop Med Hyg* 76: 669–675.
- Bhattacharyya S, Ghosh S, Dasgupta B, Mazumdar D, Roy S, et al. (2002) Chemokine-induced leishmanicidal activity in murine macrophages via the generation of nitric oxide. *J Infect Dis* 185: 1704–1708.
- Brandonisio O, Panaro MA, Fumarola I, Sisto M, Leogrande D, et al. (2002) Macrophage chemotactic protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 alpha induce nitric oxide release and enhance parasite killing in *Leishmania infantum*-infected human macrophages. *Clin Exp Med* 2: 125–129.
- Dey R, Majumdar N, Bhattacharjee S, Majumdar SB, Banerjee S, et al. (2007) Induction of host protective Th1 immune response by chemokines in *Leishmania donovani*-infected BALB/c mice. *Scand J Immunol* 66: 671–683.
- Das P, Lahiri A, Lahiri A, Chakravorty D (2010) Modulation of the arginase pathway in the context of microbial pathogenesis: a metabolic enzyme moonlighting as an immune modulator. *PLoS Pathog* 6: e1000899.
- McConville MJ, Naderer T (2011) Metabolic pathways required for the intracellular survival of *Leishmania*. *Annu Rev Microbiol* 65: 543–561.
- Skeiky YA, Guderian JA, Benson DR, Bacelar O, Carvalho EM, et al. (1995) A recombinant *Leishmania* antigen that stimulates human peripheral blood mononuclear cells to express a Th1-type cytokine profile and to produce interleukin 12. *J Exp Med* 181: 1527–1537.
- Silverman JM, Chan SK, Robinson DP, Dwyer DM, Nandan D, et al. (2008) Proteomic analysis of the secretome of *Leishmania donovani*. *Genome Biol* 9: 35.
- Silverman JM, Clos J, deOliveira CC, Shirvani O, Fang Y, et al. (2010) An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from *Leishmania* and communication with macrophages. *J Cell Sci* 123: 842–852.
- Barhoumi M, Garnaoui A, Kaabi B, Tanner NK, Guizani I (2011) *Leishmania infantum* LeIF and its recombinant polypeptides modulate interleukin IL-12p70, IL-10 and tumour necrosis factor-alpha production by human monocytes. *Parasite Immunol* 33: 583–588.
- Barhoumi M, Meddeb-Garnaoui A, Tanner NK, Banroques J, Kaabi B, et al. (2013) DEAD-box proteins, like *Leishmania* eIF4A, modulate interleukin (IL)-12, IL-10 and tumor necrosis factor-alpha production by human monocytes. *Parasite Immunol* 35: 194–199.
- Skeiky YA, Coler RN, Brannon M, Stromberg E, Greeson K, et al. (2002) Protective efficacy of a tandemly linked, multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (Leish-111f) formulated in MPL adjuvant. *Vaccine* 20: 3292–3303.
- Coler RN, Goto Y, Bogatzki L, Raman V, Reed SG (2007) Leish-111f, a recombinant polypeptide vaccine that protects against visceral leishmaniasis by elicitation of CD4+ T cells. *Infect Immun* 75: 4648–4654.
- Sakai S, Takashima Y, Matsumoto Y, Reed SG, Hayashi Y, et al. (2010) Intranasal immunization with Leish-111f induces IFN-gamma production and protects mice from *Leishmania major* infection. *Vaccine* 28: 2207–2213.
- Badaro R, Lobo I, Nakatani M, Muiños A, Netto EM, et al. (2001) Successful use of a defined antigen/GM-CSF adjuvant vaccine to treat mucosal leishmaniasis refractory to antimony: A case report. *Braz J Infect Dis* 5: 223–232.
- Scott P (2003) Development and regulation of cell-mediated immunity in experimental leishmaniasis. *Immunol Res* 27: 489–498.
- Mougneau E, Bihl F, Glaichenhaus N (2011) Cell biology and immunology of *Leishmania*. *Immunol Rev* 240: 286–96.
- Probst P, Skeiky YA, Steeves M, Gervasi A, Grabstein KH, et al. (1997) A *Leishmania* protein that modulates interleukin (IL)-12, IL-10 and tumor necrosis factor-alpha production and expression of B7-1 in human monocyte-derived antigen-presenting cells. *Eur J Immunol* 27: 2634–2642.
- Barhoumi M, Tanner NK, Banroques J, Linder P, Guizani I (2006) *Leishmania infantum* LeIF protein is an ATP-dependent RNA helicase and an eIF4A-like factor that inhibits translation in yeast. *FEBS J* 273: 5086–5100.
- Kyriazis JD, Aliannis N, Polychronopoulos P, Skaltsounis AL, Dotsika E (2013) Leishmanicidal activity assessment of olive tree extracts. *Phytomedicine* 20: 275–281.
- Mikus J, Steverding D (2000) A simple colorimetric method to screen drug cytotoxicity against *Leishmania* using the dye Alamar Blue. *Parasitol Int* 48: 265–269.
- Tsikis D (2007) Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 851: 51–70.
- Ding AH, Nathan GF, Stuehr DJ (1988) Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol* 141: 2407–2412.
- Eruslanov E, Kusmartsev S (2010) Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. *Methods Mol Biol* 594: 57–72.
- Kar S, Ukil A, Sharma G, Das PK (2010) MAPK-directed phosphatases preferentially regulate pro- and anti-inflammatory cytokines in experimental visceral leishmaniasis: involvement of distinct protein kinase C isoforms. *J Leukoc Biol* 88: 9–20.
- Tsagozis P, Karagouni E, Dotsika E (2003) CD8(+) T cells with parasite-specific cytotoxic activity and a Tc1 profile of cytokine and chemokine secretion develop in experimental visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol* 25: 569–579.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402–408.
- Olivier M, Gregory DJ, Forget G (2005) Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin Microbiol Rev* 18: 293–305.
- Van Assche T, Deschacht M, da Luz RA, Maes L, Gos P (2011) *Leishmania*-macrophage interactions: insights into the redox biology. *Free Radic Biol Med* 51: 337–351.
- Strieter RM, Standiford TJ, Huffnagle GB, Colletti LM, Lukacs NW, et al. (1996) "The good, the bad, and the ugly." The role of chemokines in models of human disease. *J Immunol* 156: 3583–3586.
- Baggiolini M, Dewald B, Moser B (1997) Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol* 15: 675–705.
- Baggiolini M (1998) Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 392: 565–568.
- Locati M, Murphy PM (1999) Chemokines and chemokine receptors: biology and clinical relevance in inflammation and AIDS. *Annu Rev Med* 50: 425–440.
- Sato N, Kuziel WA, Melby PC, Reddick RL, Kosteki V, et al. (1999) Defects in the generation of IFN-gamma are overcome to control infection with *Leishmania donovani* in CC chemokine receptor (CCR) 5-, macrophage inflammatory protein-1 alpha-, or CCR2-deficient mice. *J Immunol* 163: 5519–5525.
- Gu L, Tseng S, Horner RM, Tam C, Loda M, et al. (2000) Control of Th2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1. *Nature* 404: 407–411.
- Sato N, Ahuja SK, Quinones M, Kosteki V, Reddick RL, et al. (2000) CC chemokine receptor (CCR)2 is required for langerhans cell migration and localization of T helper cell type 1 (Th1)-inducing dendritic cells. Absence of CCR2 shifts the *Leishmania major*-resistant phenotype to a susceptible state dominated by Th2 cytokines, b cell outgrowth, and sustained neutrophilic inflammation. *J Exp Med* 192: 205–218.
- Green SJ, Meltzer MS, Hibbs JB Jr, Nacy CA (1990) Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *J Immunol* 144: 278–283.
- Li Q, Verma IM (2002) NF-kappa B regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2: 725–734.
- Murray HW, Masur H, Keithly JS (1982) Cell-mediated immune response in experimental visceral leishmaniasis. I. Correlation between resistance to *Leishmania donovani* and lymphokine-generating capacity. *J Immunol* 129: 344–350.
- Liew FY, Xu D, Chan WL (1999) Immune effector mechanism in parasitic infections. *Immunol Lett* 65: 101–104.
- Green SJ, Crawford RM, Hockmeyer JT, Meltzer MS, Nacy CA (1990) *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* 145: 4290–4297.
- Liew FY, Millott S, Parkinson C, Palmer RM, Moncada S (1990) Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J Immunol* 144: 4794–4797.
- Sadick MD, Heinzel FP, Holaday BJ, Pu RT, Dawkins RS, et al. (1990) Cure of murine leishmaniasis with anti-interleukin 4 monoclonal antibody. Evidence for a T cell dependent, interferon gamma-independent mechanism. *J Exp Med* 171: 115–127.
- Stenger S, Thürling H, Röllinghoff M, Bogdan C (1994) Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*. *J Exp Med* 180: 783–793.
- Silverman JM, Reiner NE (2011) *Leishmania* exosomes deliver preemptive strikes to create an environment permissive for early infection. *Front Cell Infect Microbiol* 1: 26.
- Zhang S, Kim CC, Batra S, McKerrow JH, Loke P (2010) Delineation of diverse macrophage activation programs in response to intracellular parasites and cytokines. *PLoS Negl Trop Dis* 4: e648.

55. Liew FY, Li Y, Millot S (1990) Tumor necrosis factor- α synergizes with IFN- γ in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. *J Immunol* 145: 4306–4310.
56. Liew FY, Li Y, Moss D, Parkinson C, Rogers MV, et al. (1991) Resistance to *Leishmania major* infection correlates with the induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. *Eur J Immunol* 21: 3009–3014.
57. Nacy CA, Mcierovics AI, Belosevic M, Green SJ (1991) Tumor necrosis factor- α : central regulatory cytokine in the induction of macrophage antimicrobial activities. *Pathobiology* 59: 182–184.
58. Cunha FQ, Assreuy J, Xu D, Charles I, Liew FY, et al. (1993) Repeated induction of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity in murine macrophages. *Eur J Immunol* 23: 1385–1388.
59. Evans TG, Thai L, Granger DL, Hibbs JB Jr (1993) Effect of in vivo inhibition of nitric oxide production in murine leishmaniasis. *J Immunol* 151: 907–915.
60. Assreuy J, Cunha FQ, Epperlein M, Noronha-Dutra A, O'Donnell GA, et al. (1994) Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of *Leishmania major*. *Eur J Immunol* 24: 672–676.
61. Gantt KR, Goldman TL, McCormick ML, Miller MA, Jeronimo SM, et al. (2001) Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. *J Immunol* 167: 893–901.
62. Panaro MA, Acquafredda A, Lisi S, Lofrumento DD, Trotta T, et al. (1999) Inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production in *Leishmania infantum*-infected human macrophages stimulated with interferon- γ and bacterial lipopolysaccharide. *Int J Clin Lab Res* 29:122–127.
63. Murray HW (1981) Susceptibility of *Leishmania* to oxygen intermediates and killing by normal macrophages. *J Exp Med* 153: 1302–1315.
64. Stafford JL, Neumann NF, Belosevic M (2002) Macrophage-mediated innate host defense against protozoan parasites. *Crit Rev Microbiol* 28: 187–248.
65. Bisti S, Konidou G, Boelaert J, Lebastard M, Soteriadou K (2006) The prevention of the growth of *Leishmania major* progeny in BALB/c iron-loaded mice: a process coupled to increased oxidative burst, the amplitude and duration of which depend on initial parasite developmental stage and dose. *Microbes Infect* 8: 1464–1472.
66. Kumar R, Pai K, Sundar S (2001). Reactive oxygen intermediates, nitrite and IFN- γ in Indian visceral leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* 124: 262–265.
67. Kumar P, Pai K, Pandey HP, Sundar S (2002) NADH-oxidase, NADPH-oxidase and myeloperoxidase activity of visceral leishmaniasis patients. *J Med Microbiol* 51: 832–836.
68. Basu R, Bhaumik S, Basu JM, Naskar K, De T, et al. (2005) Kinetoplastid membrane protein-11 DNA vaccination induces complete protection against both pentavalent antimonial-sensitive and -resistant strains of *Leishmania donovani* that correlates with inducible nitric oxide synthase activity and IL-4 generation: evidence for mixed Th1- and Th2-like responses in visceral leishmaniasis. *J Immunol* 174: 7160–7171.
69. Sharma A, Madhubala R (2009) Ubiquitin conjugation of open reading frame F DNA vaccine leads to enhanced cell-mediated immune response and induces protection against both antimony-susceptible and -resistant strains of *Leishmania donovani*. *J Immunol* 183: 7719–7731.
70. Matsukawa A, Hogaboam CM, Lukacs NW, Lincoln PM, Evanoff HL, et al. (2000) Pivotal role of the CC chemokine, macrophage-derived chemokine, in the innate immune response. *J Immunol* 164: 5362–5368.
71. O'Garra A, McEvoy LM, Zlotnik A (1998) T-cell subsets: chemokine receptors guide the way. *Curr Biol* 8: 646–649.
72. Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A (2000) The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu Rev Immunol* 18: 593–620.
73. Maurer M, von Stebut E (2004) Macrophage inflammatory protein-1. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 1882–1886.
74. Dey R, Sarkar A, Majumder N, Bhattacharyya Majumdar S, Roychoudhury K, et al. (2005) Regulation of impaired protein kinase C signaling by chemokines in murine macrophages during visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 73: 8334–8344.
75. Greenbaum D, Colangelo C, Williams K, Gerstein M (2003) Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. *Genome Biol* 4: 117.
76. Fahey TJ 3rd, Tracey KJ, Tekamp-Olson P, Cousens LS, Jones WG, et al. (1992) Macrophage inflammatory protein 1 modulates macrophage function. *J Immunol* 148: 2764–2769.

LECTURE PRESENTATION

Open Access

LiEIF and its recombinant polypeptides enhance the maturation of mouse dendritic cells and the production of the protective IL-12 cytokine

O Koutsoni^{1*}, M Barhoumi², I Guizani², E Dotsika¹

From Institut Pasteur International Network Annual Scientific Meeting
Hong Kong. 22-23 November 2010

Dendritic cells (DCs) maturation is associated with upregulation of costimulatory molecules (CD80, CD86, CD40) and secretion of cytokines including IL-12 which is important for generation of effective T cells. Proteins of *Leishmania* parasite that stimulate the production of IL-12 could be of significant interest either as immunotherapeutic components for leishmaniasis or as adjuvants. LiEIF (*Leishmania* eukaryotic initiation factor) belongs to this group of proteins since it induces the production of IL-12, IL-10 and TNF- α by human monocytes of healthy volunteers. In particular, the induction of cytokines appears to be located in the N-terminal part (1-226) of the protein. In the present study we evaluated the ability of the recombinant protein *L. infantum* eIF (LiEIF) and its constructs to induce *in vitro* the maturation of myeloid DCs (mDCs) and the production of cytokines supporting the polarization of Th1 type immune response. For this purpose, we used five synthetic peptides (16-18 aa) belonging in the N-terminal region, eight overlapped recombinant polypeptides covering the full protein sequence and the full-length protein. Enriched mDCs were obtained by *ex vivo* expansion of bone marrow cells, from BALB/c mice, cultured with the hematopoietic factor GM-CSF. The incubation of mDCs with the recombinant polypeptides, led to their maturation since it was observed a significant augmentation of the percentage of mDCs that express the molecules CD40, CD80 and CD86. On the contrary, the synthetic peptides did not enhance CD40 and CD86 expression and drove only to significant augmentation of CD80. In addition, we

evaluated the ability of LiEIF and its polypeptides to induce the production of IL-12, IL-10 and the expression of iNOS by mouse mDCs. We determined an augmentation of the percentage of mDCs that produce IL-12 upon their incubation with LiEIF as well as with all the recombinant polypeptides and with three synthetic peptides whereas negligible amount of IL-10 was obtained. Augmentation of iNOS was found after incubation with the entire molecule of LiEIF and with the recombinant polypeptides. In conclusion, LiEIF and some of its recombinant polypeptides seem to have immunomodulatory properties demonstrating their potential use as therapeutic and prophylactic vaccine antigens.

Author details

¹Laboratory of Cellular Immunology, Department of Microbiology, Hellenic Pasteur Institute, Athens 11521, Greece. ²Laboratoire d'Epidémiologie et d'Ecologie Parasitaire, Institut Pasteur de Tunis, 1002 Tunis-Belvédère, Tunisia.

Published: 10 January 2011

doi:10.1186/1753-6561-5-S1-P41

Cite this article as: Koutsoni et al.: LiEIF and its recombinant polypeptides enhance the maturation of mouse dendritic cells and the production of the protective IL-12 cytokine. *BMC Proceedings* 2011 **5** (Suppl 1):P41.

¹Laboratory of Cellular Immunology, Department of Microbiology, Hellenic Pasteur Institute, Athens 11521, Greece
Full list of author information is available at the end of the article

