



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Μελέτη μορίων που παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη
των πρωτόζωων *Leishmania* και *Trypanosoma***

**ΕΥΣΤΑΘΙΟΥ ΑΝΤΩΝΙΑ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ

ΙΟΥΛΙΟΣ 2014

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Μελέτη μορίων που παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των πρωτόζωων *Leishmania*
και *Trypanosoma*

ΕΥΣΤΑΘΙΟΥ ΑΝΤΩΝΙΑ

A.M.: 62721

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

ΔΗΜΟΠΟΥΛΟΣ ΚΩΝ/ΝΟΣ- ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ:

1. ΔΗΜΟΠΟΥΛΟΣ ΚΩΝ/ΝΟΣ- ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΧΗΜΕΙΑΣ
2. ΣΚΑΛΤΣΟΥΝΗΣ ΑΛΕΞΙΟΣ-ΛΕΑΝΔΡΟΣ- ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
3. ΒΑΣΙΛΑΚΟΠΟΥΛΟΥ ΔΙΔΩ- ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. ΔΗΜΟΠΟΥΛΟΣ ΚΩΝ/ΝΟΣ- ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΧΗΜΕΙΑΣ
2. ΣΚΑΛΤΣΟΥΝΗΣ ΑΛΕΞΙΟΣ-ΛΕΑΝΔΡΟΣ- ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
3. ΒΑΣΙΛΑΚΟΠΟΥΛΟΥ ΔΙΔΩ- ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
4. ΣΚΑΡΛΑΤΟΣ ΝΤΕΝΤΟΣ-ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
5. ΔΕΣΠΟΙΝΑ ΣΜΥΡΛΗ-ΕΡΕΥΝΗΤΡΙΑ Γ' ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΠΑΣΤΕΡ
6. ΛΙΑΝΙΔΟΥ ΕΥΗ- ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΧΗΜΕΙΑΣ
7. ΦΡΑΓΚΟΠΟΥΛΟΥ ΕΛΙΣΑΒΕΤ- ΕΠΙΚΟΥΡΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΣΤΟ ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ-ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

29/07/2014

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα πρωτόζωα *Leishmania spp.*, *Trypanosoma brucei* και *Trypanosoma cruzi* ανήκουν στις τρυπανοσωματίδες και είναι παράσιτα που προκαλούν τις ασθένειες λείσμανίαση, Ανθρώπινη Αφρικανική Τρυπανοσωμίαση (HAT) και Αμερικανική Τρυπανοσωμίαση (Νόσος του Chagas), αντίστοιχα. Αυτές οι παραμελημένες ασθένειες προκαλούν σημαντική νοσηρότητα και υψηλά ποσοστά θνησιμότητας παγκοσμίως. Μέχρι σήμερα, δεν έχουν ανακαλυφθεί αποτελεσματικά εμβόλια για τον άνθρωπο για την πρόληψη των ασθενειών αυτών, ενώ η χημειοθεραπεία είναι συχνά αναποτελεσματική ή/και τοξική και έχει υψηλό κόστος. Για το λόγο αυτό, είναι επιτακτική ανάγκη εύρεσης καινούριων και ιδανικότερα στοχευμένων χημειοθεραπειών. Παράλληλα, η αναζήτηση ιδανικών υποψήφιων παρασιτικών παραγόντων όπου η στόχευση τους να αναστέλλει επιλεκτικά τη διαφοροποίηση και ανάπτυξη των τρυπανοσωματίδων είναι μείζονος σημασίας. Τα παραπάνω αναμένεται να οδηγήσουν στον ορθολογικό σχεδιασμό καινούριων φαρμάκων. Η ολοκλήρωση της χαρτογράφησης του γονιδιώματος πολλών ειδών των τρυπανοσωματίδων μας παρέχει πλούτο γνώσης που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αναγνώριση των ιδανικών στόχων και των αντίστοιχων υποψήφιων φαρμάκων. Τα φάρμακα αυτά στη συνέχεια πρέπει να επιλεγθούν έτσι ώστε να εμφανίζουν επιλεκτικότητα έναντι των παρασιτικών πρωτεϊνών αντί των πρωτεϊνών του θηλαστικού ξενιστή. Στην παρούσα διατριβή, επικεντρωθήκαμε στη μελέτη σημαντικών πρωτεϊνών των παρασίτων, και μοριακών στόχων φαρμάκων για τη θεραπεία της λείσμανίασης και της HAT, που παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και στη βιωσιμότητα του παρασίτου. Πιο συγκεκριμένα, επικεντρωθήκαμε στην μελέτη της κινάσης της συνθετάσης του γλυκογόνου 3 (GSK-3) και της cdc2-σχετιζόμενης κινάσης 3 (CRK3). Μια βιβλιοθήκη χημικών αναστολέων που απαρτίζεται από ανάλογα ιντιρουμπίνης (μία δις-ινδόλη που απαντάται σε μαλάκια και φυτά), τα οποία στοχεύουν τις αντίστοιχες κινάσες των θηλαστικών δρώντας ως ATP-ανταγωνιστικοί αναστολείς, βρέθηκε να έχουν ισχυρή αντιπαρασιτική δράση. Ο τρόπος δράσης των αναλόγων αυτών υποδηλώνει σημαντικές διαφορές στο ενεργό κέντρο της κινάσης GSK-3 των παρασίτων *Leishmania* και *T. brucei*, αλλά και σε σχέση με την ομόλογη ανθρώπινη GSK-3. Ταυτόχρονα, οι αναστολείς αυτοί δοκιμάστηκαν για την δράση τους έναντι των παρασίτων *T. cruzi* τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Τέλος, ένας αναστολέας βρέθηκε να είναι πολλά υποσχόμενος έναντι της νόσου του Chagas σε ποντικούς Balb/c ενώ δύο αναστολείς της λείσμανιακής GSK-3 βρέθηκαν να έχουν υποσχόμενη δραστηριότητα στην οξεία και στη χρόνια φάση της σπλαχνικής λείσμανίασης σε πειραματικό μοντέλο ποντικού Balb/C. Η περαιτέρω μελέτη της *in vivo* δράσης των αναστολέων αυτών μπορεί να βοηθήσει στην διαλεύκανση του μηχανισμού δράσης των αναστολέων της GSK-3 ή/και να χρησιμεύσει στην ανάπτυξη μιας συνδυαστικής θεραπείας εναντίον της λείσμανίασης και της αμερικανικής τρυπανοσωμίας. Συνοπτικά, τα αποτελέσματα που περιγράφονται παραπάνω συμβάλλουν στην ανάπτυξη ανακάλυψης στοχευμένων φαρμάκων έναντι των παρασιτικών κινάσων για τη θεραπεία της λείσμανίασης, της HAT και της νόσου του Chagas.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Μοριακή Παρασιτολογία

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ *Leishmania donovani*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, ιντιρουμπίνες, GSK-3

ABSTRACT

Leishmania spp., *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi* are trypanosomatid protozoan parasites that cause leishmaniasis, Human African Trypanosomiasis (HAT) and American Trypanosomiasis (Chagas Disease) respectively. These neglected tropical diseases cause considerable morbidity and mortality worldwide. Currently there are no effective human vaccines for their prevention, whereas chemotherapy is often ineffective or toxic. For this reason, the discovery of new antiparasitic agents is of prime importance. It is imperative that the rational design of new medicines focuses on both the identification of candidate parasite targets that their inhibition affect parasite viability or virulence and the design of such inhibitors based on Structure-Activity Relationship (SAR) studies. Overall this strategy is anticipated to lead to an effective rational drug design. The search for drug targets requires a multidisciplinary approach. The completion of the genome project of many trypanosomatid species gives a vast amount of new information that can be exploited for the identification of putative drug candidates with a prediction of “druggability” based on their divergence from the mammalian host proteins. This thesis focuses on important parasite proteins that could constitute putative molecular drug targets for the treatment of leishmaniasis and HAT, because the inhibition of their activity is expected to modulate virulence and cell-cycle progression. Special emphasis is given on Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK-3) and the cdc2-related kinase 3 (CRK3). A number of indirubin analogues (a natural bis-indole present in mollusks and plants), that target these kinases by binding in the ATP-binding pocket, have potent anti-parasitic and parasite-specific activity. Their mode of action suggests important differences in the active sites between these *Leishmania* and *T. brucei* kinases, but also between the parasitic kinases and their human homologues. At the same time, these inhibitors were tested for their activity against *T. cruzi* parasites *in vitro* and *in vivo*. Finally, one inhibitor was found to be promising against Chagas disease in Balb/C mice while two GSK-3 inhibitors were found to have promising activity in both the acute and chronic phase of visceral leishmaniasis in the Balb/C experimental model. The above results could contribute to the search of potent drugs that could be exploited in a combined treatment schema for the above diseases or/and enhance the study of the *in vivo* mechanisms of action of the GSK-3 inhibitors. Overall, the results described above contribute to the concentrated international efforts towards the development of targeted drugs focusing on the kinome for the treatment of leishmaniasis, HAT and Chagas disease.

SUBJECT AREA: Molecular Parasitology

KEYWORDS: *Leishmania donovani*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, indirubins, GSK-3

***‘Αν, στην αρχή, μια ιδέα δεν φαίνεται τρελή,
τότε δεν υπάρχει καμιά ελπίδα γι’ αυτήν.’***

Albert Einstein

Στην οικογένεια μου.

**Στους γονείς μου -Μαρία, Στάθη- και στον αδερφό μου Γιώργο,
για την αγάπη και τη στήριξη τους .**

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	3
ABSTRACT	4
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	15
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	16
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ	20
ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	21
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.....	29
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	29
1.1 Τρυπανοσωματίδες	29
1.1.1 Ιστορικά στοιχεία.....	31
1.1.1.1 <i>Leishmania</i>	31
1.1.1.2 <i>Trypanosoma</i>	32
1.1.2 Μορφολογικά στάδια	34
1.1.2.1 <i>Leishmania</i>	34
1.1.2.2 <i>Trypanosoma brucei</i>	36
1.1.2.3 <i>Trypanosoma cruzi</i>	38
1.1.3 Κύκλος ζωής.....	40
1.1.3.1 <i>Leishmania</i>	40
1.1.3.2 <i>Trypanosoma brucei</i>	43
1.1.3.3 <i>Trypanosoma cruzi</i>	45
1.2 Παρασιτικές ασθένειες.....	47
1.2.1 Λεισμανίαση	47
1.2.1.1 Κλινικές μορφές της νόσου.....	48
1.2.1.1.1 Σπλαχνική λεισμανίαση (VL, Kala-azar, Dum Dum fever).....	49
1.2.1.1.2 Δερματική λεισμανίαση (CL, Baghdad/Jericho boil, Oriental sore)	51
1.2.1.1.3 Βλεννογονοδερματική λεισμανίαση (MCL)	52
1.2.1.1.4 Ο ασυμπτωματικός παρασιτισμός	53
1.2.1.1.5 Συλλοίμωση <i>Leishmania</i> / HIV	53
1.2.1.2 Γεωγραφική κατανομή	54
1.2.1.3 Επιδημιολογία της Λεισμανίασης.....	55
1.2.1.4 Λεισμανίαση στην Ελλάδα.....	57
1.2.2 Ανθρώπινη Αφρικανική Τρυπανοσωμίαση (HAT, ασθένεια του ύπνου).....	57

1.2.2.1 Κλινικές μορφές της νόσου HAT	59
1.2.2.2 Επιδημιολογία της HAT	59
1.2.3 Ανθρώπινη Αμερικάνικη Τρυπανοσωμίαση (Chagas Disease)	60
1.2.3.1 Κλινικές μορφές της Αμερικάνικης Τρυπανοσωμίας	61
1.2.3.2 Επιδημιολογία της Ανθρώπινης Αμερικάνικης Τρυπανοσωμίας	62
1.3 Διάγνωση	63
1.3.1 Διάγνωση της λεϊσμανίασης	63
1.3.2 Διάγνωση της Ανθρώπινης Αφρικανικής Τρυπανοσωμίας (HAT)	65
1.3.3 Διάγνωση της Ανθρώπινης Αμερικάνικης Τρυπανοσωμίας (Chagas Disease)	67
1.4 Θεραπεία και έλεγχος της νόσου	68
1.4.1 Θεραπεία και έλεγχος της λεϊσμανίασης.....	68
1.4.2 Θεραπεία και έλεγχος της Ανθρώπινης Αφρικανικής Τρυπανοσωμίας (HAT)	71
1.4.3 Θεραπεία και έλεγχος της Ανθρώπινης Αμερικανικής Τρυπανοσωμίας (Chagas Disease).....	73
1.5 Ιντιρουμπίνες	74
1.5.1 Μοριακοί στόχοι των ιντιρουμπινών.....	75
1.5.2 Δράση των ιντιρουμπινών σε κυτταρικό επίπεδο	79
1.6 Παρασιτικές Κινάσες.....	80
1.6.1 Κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες (CDKs).....	83
1.6.2 GSK-3	85
1.7 Μοριακή βιολογία και ειδικές λειτουργίες των παρασίτων.....	86
1.7.1 Ο κυτταρικός κύκλος στις τρυπανοσωματίδες.....	87
1.7.2 Απόπτωση.....	89
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.....	95
ΣΚΟΠΟΣ.....	95
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.....	101
ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ	101
3.1 Υλικά	101
3.1.1 Αντιδραστήρια	101
3.1.2 Αναλώσιμα υλικά.....	102
3.1.3 Εργαστηριακός εξοπλισμός	102
3.1.4 Αντισώματα	104
3.1.5 Διαλύματα	104

3.1.6 Φορείς κλωνοποίησης	108
3.1.7 Εναρκτήρια μόρια	109
3.1.8 Στελέχη παρασίτων – Κυτταρικές σειρές	110
3.1.9 Χημική βιβλιοθήκη.....	110
3.2 Μέθοδοι.....	111
3.2.1 Κλωνοποιήσεις	111
3.2.1.1 Απομόνωση γενωμικού DNA από παράσιτα	111
3.2.1.2 Ενίσχυση αλληλουχίας DNA με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	112
3.2.1.3 Ανάλυση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.....	115
3.2.1.4 Απομόνωση και καθαρισμός DNA από πήκτωμα αγαρόζης	115
3.2.1.5 Καθαρισμός προϊόντων PCR.....	116
3.2.1.6 Πέψη DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες.....	116
3.2.1.7 Κλωνοποίηση του προϊόντος της αντίδρασης PCR σε πλασμιδιακό φορέα	117
3.2.1.8 Μετασχηματισμός βακτηρίων	117
3.2.1.8.1 Προετοιμασία επιδεκτικών κυττάρων <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS	119
3.2.1.8.2 Προετοιμασία επιδεκτικών κυττάρων <i>E. coli</i> DH5a	119
3.2.1.9 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργεια βακτηρίων	120
3.2.1.10 Υγρή και στερεή καλλιέργεια βακτηρίων-Φύλαξη βακτηρίων.....	121
3.2.1.11 Παραγωγή, συμπύκνωση, τιτλοποίηση και συντήρηση ανασυνδυασμένων Βακιλοϊών.....	121
3.2.1.12 Απομόνωση ανασυνδυασμένου Βακιλοϊού με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων.....	123
3.2.1.13 Ενίσχυση κλώνων	124
3.2.1.14 Έλεγχος έκφρασης ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε κύτταρα SF-9	124
3.2.1.15 Τιτλοποίηση ιικών αποθεμάτων	125
3.2.1.16 Μόλυνση κυττάρων εντόμων SF-9 με ανασυνδυασμένο Βακιλοϊό	125
3.2.2 Απομόνωση πρωτεϊνών από βακτήρια και ευκαρυωτικά κύτταρα	126
3.2.2.1. Επαγωγή των βακτηρίων έκφρασης BL21.....	126
3.2.2.2 Απομόνωση της <i>TbGSK-3s</i> -(His) ₆ από βακτήρια	126
3.2.2.3 Απομόνωση <i>LdGSK-3s</i> και CRK3 από ανασυνδυασμένα παράσιτα	128
3.2.2.4 Απομόνωση <i>TbGSK-3s</i> -(His) ₆ από SF-9 κύτταρα εντόμων μολυσμένων με ανασυνδυασμένο βακιλοϊό.....	129
3.2.3. Ανοσοαποτύπωμα Western	130

3.2.3.1. Ανάλυση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)	130
3.2.3.2. Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Western blot) ...	131
3.2.3.3. Ανοσοενζυμική ανίχνευση των πρωτεϊνών	131
3.2.4 Ανοσοφθορισμός	132
3.2.5 Κυτταροκαλλιέργειες	133
3.2.5.1 Παράσιτα <i>Leishmania</i>	133
3.2.5.2 Παράσιτα <i>Trypanosoma</i>	134
3.2.5.3 Μακροφάγα J774.1	134
3.2.5.4 Κύτταρα σειράς SF-9 προερχόμενη από έντομα	135
3.2.6 Έλεγχος <i>in vitro</i> κυτταρικής επιβίωσης/πολλαπλασιασμού.	135
3.2.6.1 Εφαρμογή της μεθόδου Alamar blue σε προμαστιγωτά <i>L. donovani</i>	135
3.2.6.2 Εφαρμογή της μεθόδου Alamar blue σε ενδοκυτταρικά αμαστιγωτά <i>L. donovani</i>	136
3.2.6.3 Απομόνωση μακροφάγων περιτοναϊκής κοιλότητας για εφαρμογή της μεθόδου Alamar blue σε ενδοκυτταρικά αμαστιγωτά <i>L. donovani</i>	137
3.2.6.4 Εφαρμογή της μεθόδου Alamar blue σε μακροφάγα J774.1	138
3.2.6.5 Εφαρμογή της μεθόδου Alamar blue σε BSF <i>T. brucei</i>	139
3.2.6.6 Έλεγχος <i>in vitro</i> κυτταρικής επιβίωσης/πολλαπλασιασμού σε τρυπομαστιγωτά <i>T. cruzi</i>	139
3.2.6.7 Έλεγχος <i>in vitro</i> κυτταρικής επιβίωσης/πολλαπλασιασμού σε ενδοκυττάρια αμαστιγωτά <i>T. cruzi</i>	139
3.2.7 Ενζυμολογία	140
3.2.7.1. <i>In vitro</i> πείραματα αναστολής των <i>LdGSK-3s</i> , <i>CRK3</i> και <i>TbGSK-3s</i>	140
3.2.8 Κυτταρομετρία ροής (FACS-Fluorescence-activated cell sorting)	144
3.2.8.1 Ανάλυση κυτταρικού κύκλου των <i>L. donovani</i> προμαστιγωτών.	145
3.2.8.2 Ανάλυση κυτταρικού κύκλου των BSF <i>T. brucei</i>	145
3.2.9 Τεχνικές εντόπισης αποπτωτικών κυττάρων	145
3.2.9.1 Σήμανση <i>in vivo</i> με Ανεξίνη V και PI	146
3.2.9.2 <i>In situ</i> σήμανση κατακερματισμένων τμημάτων DNA με TUNEL	147
3.2.9.3 Κυτταρική και πυρηνική μορφολογία.	147
3.2.9.4 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία σε <i>T. cruzi</i> τρυπομαστιγωτά.	148
3.2.10 Πολλαπλή στοίχιση αλληλουχιών-Μοντέλο ομολογίας-Μοριακές προσομοιώσεις	148
3.2.11 <i>In vivo</i> μελέτη αντιπαρασιτικής δράσης ιντιρουμπινών	149
3.2.11.1 <i>In vivo</i> μελέτη τοξικότητας ιντιρουμπινών	149

3.2.11.2 <i>In vivo</i> μελέτη αντιπαρασιτικής δράσης ιντιρουμπινών σε πειραματικό μοντέλο σπλαχνικής λεισμανίασης	151
3.2.11.3 <i>In vivo</i> μελέτη αντιπαρασιτικής δράσης ιντιρουμπινών σε πειραματικό μοντέλο αμερικάνικης τρυπανοσωμίας (Chagas Disease)	153
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....	157
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	157
4.1 Λεισμάνια (<i>Leishmania donovani</i>).....	157
4.1.1 Καθορισμός της αντιλεισμανιακής δραστηριότητας (IC ₅₀) βιβλιοθήκης ιντιρουμπινών στα παράσιτα.....	157
4.1.2 Αντιδράσεις αναστολής των <i>LdGSK-3s</i> και <i>CRK3</i>	161
4.1.3 Επίδραση των ιντιρουμπινών 11 και 17 στον κυτταρικό κύκλο των <i>L. donovani</i> προμαστιγωτών παρασίτων.....	165
4.1.4 Επίδραση των ιντιρουμπινών 11 και 17 στον κυτταρικό θάνατο των <i>L. donovani</i> προμαστιγωτών παρασίτων.....	167
4.1.5 Μελέτη μοριακής προσομοίωσης των κινασών <i>LGSK-3s</i> και <i>CRK3</i> στη <i>Leishmania</i>	169
4.2 <i>In vivo</i> πειράματα σε πειραματικό μοντέλο σπλαχνικής λεισμανίασης	172
4.2.1 Έλεγχος τοξικότητας ιντιρουμπινών 11 και 5-Me-6BIO.....	172
4.2.2 Έλεγχος δράσης ιντιρουμπινών 11 και 5-Me-6BIO σε πειραματικό μοντέλο σπλαχνικής λεισμανίασης οξείας και χρόνιας φάσης.....	173
4.3 <i>Trypanosoma brucei</i>	179
4.3.1 Καθορισμός της αντιτρυπανοσωμικής δραστηριότητας (IC ₅₀) βιβλιοθήκης ιντιρουμπινών στα παράσιτα <i>T. brucei</i>	179
4.3.2 Μοριακός χαρακτηρισμός της <i>GSK-3s</i> του <i>T. brucei</i>	184
4.3.2.1 Μελέτη του ρόλου της <i>TbGSK-3s</i> στη βιωσιμότητα του παρασίτου μετά από επαγωγή επεμβατικού RNA (RNAi)	184
4.3.2.2 Ενδοκυτταρική εντόπιση της <i>TbGSK-3s</i> στα <i>T. brucei</i> προκυκλικά και τρυπομαστιγωτά παράσιτα.....	186
4.3.2.3 Επαγόμενες μορφολογικές και πυρηνικές αλλαγές μετά την επαγωγή του επεμβατικού RNAi ^{<i>TbGSK-3s</i>}	189
4.3.2.4 Επίδραση της επαγωγής του επεμβατικού RNAi ^{<i>TbGSK-3s</i>} στον κυτταρικό κύκλο τρυπομαστιγωτής μορφής <i>T. brucei</i> παρασίτων.....	191
4.3.2.5 Επίδραση της επαγωγής του επεμβατικού RNAi ^{<i>TbGSK-3s</i>} στον κυτταρικό θάνατο των BSF <i>T. brucei</i> παρασίτων	192
4.3.3 Κλωνοποίηση και έκφραση της <i>TbGSK-3s</i>	195
4.3.3.1 Κλωνοποίηση και έκφραση της <i>TbGSK-3s</i> σε βακτήρια.....	195
4.3.3.2 Κλωνοποίηση και έκφραση της <i>TbGSK-3s</i> σε παράσιτα <i>L. donovani</i>	196

4.3.3.3 Κλωνοποίηση και έκφραση της <i>TbGSK-3s</i> σε κύτταρα εντόμου SF-9 με χρήση βακιλοϊού.....	196
4.3.4 Απομόνωση <i>TbGSK-3s</i> -(His) ₆ από τα κύτταρα εντόμου SF-9 και καθορισμός της ενεργότητας τους	197
4.3.5 Μελέτη της κινητικής των ενζυμικών αντιδράσεων.....	198
4.3.6 Καθορισμός της ιδανικής ποσότητας ενζύμου για τις αντιδράσεις αναστολής.	199
4.3.7 Αντιδράσεις αναστολής της <i>TbGSK-3s</i>	199
4.3.8 Επίδραση των ιντιρουμπινών στον κυτταρικό κύκλο των BSF <i>T. brucei</i> παρασίτων	202
4.3.9 Επίδραση των ιντιρουμπινών στον κυτταρικό θάνατο των BSF <i>T. brucei</i> παρασίτων	205
4.4 <i>Trypanosoma cruzi</i>	209
4.4.1 Καθορισμός της αντιτρυπανοσωμικής δραστικότητας (IC ₅₀) βιβλιοθήκης ιντιρουμπινών στα παράσιτα <i>T. cruzi</i>	209
4.4.2 Επίδραση των ιντιρουμπινών στον κυτταρικό θάνατο των <i>T. cruzi</i> τρυπομαστιγωτών παρασίτων	211
4.4.3 Μελέτη της επίδρασης των ιντιρουμπινών στα <i>T. cruzi</i> τρυπομαστιγωτά παράσιτα μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης	213
4.4.4 Μελέτη της επίδρασης των ιντιρουμπινών στα <i>T. cruzi</i> τρυπομαστιγωτά παράσιτα μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας μετάδοσης	215
4.5 <i>In vivo</i> πειράματα σε πειραματικό μοντέλο αμερικάνικης τρυπανοσωμίας (Chagas Disease).....	217
4.5.1 Έλεγχος τοξικότητας της ιντιρουμπίνης 11	217
4.5.2 Έλεγχος δράσης ιντιρουμπινών 10, 11, 17 και 41 σε πειραματικό μοντέλο αμερικάνικης τρυπανοσωμίας (Chagas Disease).....	218
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5.....	223
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	223
5.1 <i>Leishmania</i>	223
5.2 <i>Trypanosoma brucei</i>	231
5.3 <i>Trypanosoma cruzi</i>	238
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ-ΑΡΤΙΚΟΛΕΞΑ-ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ.....	242
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6.....	245
ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....	245
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7.....	262
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ	262

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Επιδημιολογικά στοιχεία κλινικά σημαντικών ειδών <i>Leishmania</i>	48
Πίνακας 2: Κατηγορίες και οικογένειες ευκαρυωτικών κινασών στις τρυπανοσωματίδες ...	83
Πίνακας 3. Αντιλεϊσμανιακή δράση των 49 αναλόγων ιντιρουμπίνης που ελέγχθηκαν έναντι των <i>L. donovani</i> προμαστιγωτών και ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών.....	160
Πίνακας 4. Αναστολή της <i>LdGSK-3s</i> και CRK3 της <i>Leishmania</i> από τις ιντιρουμπίνες 11-17 που εμφάνισαν αντιλεϊσμανιακή δράση.	164
Πίνακας 5. Έλεγχος τοξικότητας ιντιρουμπινών 11 και 5-Me-6BIO	172
Πίνακας 6. Αντιτρυπανοσωμική δράση των 69 αναλόγων ιντιρουμπίνης που ελέγχθηκαν έναντι των <i>T. brucei</i> BSF	182
Πίνακας 7. Ποσοστά παρασίτων στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου πριν και μετά την επαγωγή του επεμβατικού RNAi ^{TbGSK-3s}	190
Πίνακας 8. Ποσοστά BSF <i>T. brucei</i> παρασίτων στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου πριν και μετά την επαγωγή του επεμβατικού RNAi ^{TbGSK-3s}	192
Πίνακας 9. Αναστολή της <i>TbGSK-3s</i> από τις ιντιρουμπίνες που εμφάνισαν αντιτρυπανοσωμική δράση έναντι των BSF <i>T. brucei</i>	201
Πίνακας 10. Αντιτρυπανοσωμική δράση των 7 αναλόγων ιντιρουμπίνης από τις 69 που ελέγχθηκαν έναντι των <i>T. cruzi</i> τρυπομαστιγωτά.. ..	210

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Συστηματική κατάταξη των γενών <i>Leishmania</i> και <i>Trypanosoma</i>	30
Εικόνα 2: Α) Αντιστράτηγος Sir William Boog Leishman (1865-1926), Β) Συνταγματάρχης Charles Donovan (1863-1951)	32
Εικόνα 3: Α) David Livingstone (1813-1873), Σκωτσέζος πρωτοπόρος ιατρικός ιεραπόστολος του Λονδίνου και εξερευνητής της Αφρικής, Β) Υποστράτηγος Sir David Bruce (1855-1931), μικροβιολόγος και παθολόγος, Γ) Joseph Everett Dutton (1874-1905), παθολόγος, Δ) Aldo Castellani (1877-1971), Ιταλός παθολόγος και βακτηριολόγος.	33
Εικόνα 4: Carlos Justiniano Ribeiro Chagas (1879–1934), Βραζιλιάνος βακτηριολόγος και ερευνητής.....	34
Εικόνα 5: Μορφολογικά στάδια του παρασίτου <i>Leishmania</i> όπως φαίνονται σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης.	34
Εικόνα 6: Κυτταρικά οργανίδια της προμαστιγωτής (Α) και αμαστιγωτής (Β) μορφής των παρασίτων <i>Leishmania</i>	35
Εικόνα 7: Μορφολογικά στάδια του παρασίτου <i>Trypanosoma brucei</i> : Α) προκυκλικά τρυπομαστιγωτά και Β) τρυπομαστιγωτά αίματος BSF όπως φαίνονται σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης.	37
Εικόνα 8: Σχηματική αναπαράσταση μορφολογικών σταδίων του παρασίτου <i>Trypanosoma brucei</i> στον ασπόνδυλο και στον θηλαστικό ξενιστή	37
Εικόνα 9: Κυτταρικά οργανίδια των BSF <i>T. brucei</i> παρασίτων	38
Εικόνα 10: Μορφολογικά στάδια του παρασίτου <i>Trypanosoma cruzi</i>	39
Εικόνα 11: Κυτταρικά οργανίδια των <i>T. cruzi</i> παρασίτων	40
Εικόνα 12: Κύκλος ζωής του παρασίτου <i>Leishmania</i>	43
Εικόνα 13: Φλεβοτόμοι των ειδών: Α) <i>Phlebotomus spp.</i> Β) <i>Lutzomyia spp.</i>	43
Εικόνα 14: Κύκλος ζωής του παρασίτου <i>T. brucei</i>	44
Εικόνα 15: Μύγα του είδους <i>Glossina (tsetse fly)</i>	45
Εικόνα 16: Κύκλος ζωής του παρασίτου <i>T. cruzi</i>	46
Εικόνα 17: Έντομο του γένους <i>Triatomine</i>	47
Εικόνα 18: Α) Ασθενής με σπλαχνική λεισμανίαση εμφανίζει ηπατοσπληνομεγαλία, Β) Δερματικές αλλοιώσεις που οφείλονται στην εμφάνιση της PKDL, Γ) Σκύλος που πάσχει από καλα-αζάρ.....	51
Εικόνα 19: Α, Β) Ασθενείς με δερματική λεισμανίαση, Γ) Δερματικές αλλοιώσεις που οφείλονται στην εμφάνιση της DCL.....	52
Εικόνα 20: Ασθενής με βλεννογονοδερματική λεισμανίαση	53

Εικόνα 21: Γεωγραφική κατανομή ειδών <i>Leishmania</i> στον κόσμο:	55
Εικόνα 22: Γεωγραφική κατανομή ειδών <i>Trypanosoma brucei</i> (<i>T. b. gambiense</i> και <i>T. b. rhodesiense</i>) στην Αφρική.....	58
Εικόνα 23: Περιστατικό Ανθρώπινης Αφρικανικής τρυπανοσωμίας. Ασθενής στο τελευταίο στάδιο της νόσου.....	59
Εικόνα 24: Γεωγραφική κατανομή του είδους <i>Trypanosoma cruzi</i> στον κόσμο.....	63
Εικόνα 25: Δομή των οξειδωμένων παραγώγων του δακτυλίου της ινδόλης, το ινδοξύλιο και η ισατίνη, τα δύο πρόδρομα μόρια των ιντιγκοειδών ιντιρουμπίνης, ιντιγκο, ισοίντιγκο	75
Εικόνα 26. Κρυσταλλική δομή των: Α) 3' οξίμης της ιντιρουμπίνης σε σύμπλοκο με την CDK5/p25 και Β) 3' οξίμης της 6-βρώμο-ιντιρουμπίνης με την GSK-3β.	77
Εικόνα 27. Οι ενδοκυτταρικοί μηχανισμοί δράσης των ιντιρουμπινών, που σχετίζονται με τις αντικαρκινικές τους ιδιότητες.	78
Εικόνα 28. Α) Ο πλασμιδιακός φορέας pTriEx-1.1, Β) Ο πλασμιδιακός φορέας pLexsy-sat	109
Εικόνα 29: Περιγραφή του AcNPV BaculoGold DNA.	123
Εικόνα 30: Συνολική σχηματική απεικόνιση της πειραματικής μεθοδολογίας για την κατασκευή ανασυνδιασμένων βακιλοϊών..	123
Εικόνα 31. Αντιδράσεις στις οποίες βασίζεται η μέθοδος Kinase-Glo®.	141
Εικόνα 32: Σχηματική αναπαράσταση διαδικασίας για <i>in vivo</i> μελέτη τοξικότητας ιντιρουμπινών.....	150
Εικόνα 33: Σχηματική αναπαράσταση διαδικασίας για <i>in vivo</i> μελέτη αντιπαρασιτικής δράσης ιντιρουμπινών σε πειραματικό μοντέλο οξείας φάσης σπλαχνικής λείσμανιάσης.	152
Εικόνα 34: Σχηματική αναπαράσταση διαδικασίας για <i>in vivo</i> μελέτη αντιπαρασιτικής δράσης ιντιρουμπινών σε πειραματικό μοντέλο χρόνιας φάσης σπλαχνικής λείσμανιάσης.	152
Εικόνα 35: Ιστογράμματα ανάλυσης με κυτταρομετρία ροής του κυτταρικού κύκλου των <i>L. donovani</i> προμαστιγωτών	166
Εικόνα 36. Η έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης και η κυτταρική διαπερατότητα των <i>L. donovani</i> προμαστιγωτών	168
Εικόνα 37. Πολλαπλή ευθυγράμμιση αλληλουχίας της GSK-3 και CRK3 τριών ειδών <i>Leishmania</i>	170
Εικόνα 38. Σύγκριση των σημείων ενυδάτωσης των ενεργών κέντρων των LGSK-3 και CRK3 με τη βοήθεια του αλγόριθμου Szmap..	171
Εικόνα 39. Ανίχνευση της TbGSK-3s στο αναμενόμενο μοριακό βάρος 41KDa με χρήση πολυκλωνικού αντισώματος κουνελιού έναντι της λείσμανιακής GSK-3s.	185

Εικόνα 40. Επίπεδα έκφρασης της <i>TbGSK-3s</i> μετά από 0, 24, 48 και 72h επαγωγής του RNAi ^{<i>TbGSK-3s</i>}	186
Εικόνα 41. Εντόπιση της <i>TbGSK-3s</i> σε προκυκλικά παράσιτα <i>T. brucei</i> 90-13 μετά από μονιμοποίηση με PF.....	187
Εικόνα 42. Συνεντοπισμός της <i>TbGSK-3s</i> με την Mab22 (basal body marker) σε προκυκλικά παράσιτα <i>T. brucei</i> 90-13 μετά από μονιμοποίηση με μεθανόλη.....	187
Εικόνα 43. Συνεντοπισμός της <i>TbGSK-3s</i> με την Mab25 (axoneme marker) σε προκυκλικά παράσιτα <i>T. brucei</i> 90-13 μετά από μονιμοποίηση με μεθανόλη.....	188
Εικόνα 44. Μη-συνεντοπισμός της <i>TbGSK-3s</i> με την IFT172 (IFT marker) σε προκυκλικά παράσιτα <i>T. brucei</i> 90-13 μετά από μονιμοποίηση με μεθανόλη.....	188
Εικόνα 45. Α) Εντόπιση της <i>TbGSK-3s</i> σε BSF παράσιτα <i>T. brucei</i> 90-13 μετά από μονιμοποίηση με PF, Β) Εντόπιση της <i>TbGSK-3s</i> στον κυτταροσκελετό των παρασίτων BSF παράσιτα <i>T. brucei</i> 90-13 μετά από απομάκρυνση των διαλυτών κλασμάτων των παρασίτων με SSB/PEM-Nonidet 1%.	189
Εικόνα 46. Μορφολογικές και πυρηνικές αλλαγές παρασίτων BSF <i>T. brucei</i> μετά την επαγωγή του επεμβατικού RNAi ^{<i>TbGSK-3s</i>}	190
Εικόνα 47. Κυτταρικός κύκλος BSF <i>T. brucei</i> παρασίτων πριν και μετά την επαγωγή του επεμβατικού RNAi ^{<i>TbGSK-3s</i>}	192
Εικόνα 48. Ποσοστά θετικών παρασίτων BSF <i>T. brucei</i> με τεμαχισμένο γενωμικό DNA πριν και μετά την επαγωγή του επεμβατικού RNAi ^{<i>TbGSK-3s</i>} χρησιμοποιώντας την τεχνική TUNEL (terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nick end labeling).....	194
Εικόνα 49. Η έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης και η κυτταρική διαπερατότητα των BSF <i>T. brucei</i> έτσι όπως φαίνεται με κυτταρομετρία ροής μετά απο διπλή σήμανση με Ανεξίνη V-FITC και PI, πριν και μετά την επαγωγή του επεμβατικού RNAi ^{<i>TbGSK-3s</i>}	194
Εικόνα 50. Ανίχνευση έκφρασης <i>TbGSK-3s</i> σε βακτήρια <i>E. coli</i> BL21.....	195
Εικόνα 51. Ηλεκτροφόρηση των εκλούσεων της ανασυνδυασμένης κινάσης <i>TbGSK-3s</i> -(His) ₆ που απομονώθηκε από από τα κύτταρα εντόμου SF-9.....	197
Εικόνα 52. Κυτταρικός κύκλος BSF <i>T. brucei</i> παρασίτων μετά από επώαση με ανάλογα ιντιρουμπίνης για 72 και 96h.	204
Εικόνα 53. Η έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης και η κυτταρική διαπερατότητα των BSF <i>T. brucei</i> μετά από επώαση με ανάλογα ιντιρουμπίνης για 48 και 72h, έτσι όπως φαίνεται με κυτταρομετρία ροής, μετά απο διπλή σήμανση με Ανεξίνη V-FITC και PI.	208
Εικόνα 54. Μορφολογία παρασίτων BSF <i>T. brucei</i> μετά από επώαση 72h με την 6-βρώμο-3'διεθυλοφωσφατοξίμη, έτσι όπως παρατηρήθηκε μέσω της τεχνικής TUNEL.....	208

Εικόνα 55. Η έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης και η κυτταρική διαπερατότητα των <i>T. cruzi</i> τρυπομαστιγωτών παρασίτων μετά από επώαση με ανάλογα ιντιρουμπίνης για 6 και 24h, έτσι όπως φαίνεται με κυτταρομετρία ροής μετά απο διπλή σήμανση με Ανεξίνη V-FITC και PI. Άξονας FL1-H: AnnexinV, Άξονας FL2-H:PI.	212
Εικόνα 56. Εικόνες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης τρυπομαστιγωτών παρασίτων <i>T. cruzi</i> : Α) παράσιτα αναφοράς (control), Β) παράσιτα μετά από επώαση 24h με συγκέντρωση IC ₅₀ του αναλόγου 11, Γ) παράσιτα μετά από επώαση 24h με συγκέντρωση 2XIC ₅₀ του αναλόγου 11 και Δ) παράσιτα μετά από επώαση 24h με συγκέντρωση IC ₅₀ του αναλόγου 12.	214
Εικόνα 57. Εικόνες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου μετάδοσης τρυπομαστιγωτών παρασίτων <i>T. cruzi</i> : Α) παράσιτα αναφοράς (control), Β) παράσιτα μετά από επώαση 24h με συγκέντρωση IC ₅₀ του αναλόγου 10, Γ) παράσιτα μετά από επώαση 24h με συγκέντρωση IC ₅₀ του αναλόγου 11 και Δ) παράσιτα μετά από επώαση 24h με συγκέντρωση IC ₅₀ του αναλόγου 17.	216
Εικόνα 58. Εικόνες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου μετάδοσης τρυπομαστιγωτών παρασίτων <i>T. cruzi</i> μετά από επώαση 24h με συγκέντρωση IC ₅₀ του 7-υποκατεστημένου αναλόγου 41.	217

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

Γράφημα 1. Παρασιτικό φορτίο στο ήπαρ (A) και στο σπλήνα (B) μετά από 3 και 7 δόσεις του αναλόγου 5-Me-6BIO με συγκέντρωση 20mg/Kg σε πειραματικό μοντέλο σπλαχνικής λεισμανίασης οξείας φάσης.....	174
Γράφημα 2. Παρασιτικό φορτίο στο ήπαρ (A) και στο σπλήνα (B) μετά από 7 δόσεις του αναλόγου 5-Me-6BIO με συγκέντρωση 20mg/Kg σε πειραματικό μοντέλο σπλαχνικής λεισμανίασης χρόνιας φάσης.....	175
Γράφημα 3. Παρασιτικό φορτίο στο ήπαρ (A) και στο σπλήνα (B) μετά από 3 και 7 δόσεις του αναλόγου 11 με συγκέντρωση 10mg/Kg σε πειραματικό μοντέλο σπλαχνικής λεισμανίασης οξείας φάσης.....	176
Γράφημα 4 Παρασιτικό φορτίο στο ήπαρ (A) και στο σπλήνα (B) μετά από 7 δόσεις του αναλόγου 11 με συγκέντρωση 10mg/Kg σε πειραματικό μοντέλο σπλαχνικής λεισμανίασης χρόνιας φάσης..	177
Γράφημα 5. Παρασιτικό φορτίο στο ήπαρ (A) και στο σπλήνα (B) μετά από 7 δόσεις του αναλόγου 11 με συγκέντρωση 20mg/Kg σε πειραματικό μοντέλο σπλαχνικής λεισμανίασης χρόνιας φάσης..	177
Γράφημα 6. Σύγκριση παρασιτικού φορτίου στο ήπαρ (A) και στο σπλήνα (B) μετά από 7 δόσεις των αναλόγων 11 και 5-Me-6BIO με συγκέντρωση 20mg/Kg και μετά από χορήγηση δοσολογικού σχήματος συνολικά 10 δόσεων (40mg/Kg) του φαρμάκου ελέγχου Glycantime, σε πειραματικό μοντέλο σπλαχνικής λεισμανίασης οξείας φάσης.	178
Γράφημα 7. Ανάπτυξη παρασίτων BSF <i>T. brucei</i> συναρτήση του χρόνου.....	186
Γράφημα 8. Έλεγχος της ενεργότητας της TbGSK-3s στα εκλούσματα διαφορετικών συγκεντρώσεων ιμιδαζολίου.....	198
Γράφημα 9. Καμπύλη τιτλοδότησης της TbGSK-3s..	199
Γράφημα 10. % επιβίωση των ποντικών Balb/C μετά από χορήγηση δόσης αναλόγου ιντιρουμπίνης 11 σε συγκέντρωση 20mg/Kg, 60mg/Kg και 120mg/Kg.....	218
Γράφημα 11. Α) Παρασιταίμια στο αίμα ποντικών Balb/C μολυσμένων με 10^4 <i>T. cruzi</i> τρυπομαστιγωτά (Y strain) μετά από θεραπεία με τις ιντιρουμπίνες 10, 11 και 17 και με βενζιμιδαζόλιο (BDZ) και PBS-10 % DMSO ως θετικές και αρνητικές ομάδες αναφοράς. Β) % επιβίωση των ποντικών Balb/C σε κάθε ομάδα μετά τη μόλυνση και για 30 μέρες.	219
Γράφημα 12. Α) Παρασιταίμια στο αίμα ποντικών Balb/C μολυσμένων με 10^4 <i>T. cruzi</i> τρυπομαστιγωτά (Y strain) μετά από θεραπεία με την 7-υποκατεστημένης ιντιρουμπίνης 41 και με βενζιμιδαζόλιο και PBS-10 % DMSO ως θετικές και αρνητικές ομάδες αναφοράς. Β) % επιβίωση των ποντικών Balb/C σε κάθε ομάδα μετά τη μόλυνση και για 30 μέρες.	220

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Οι παρασιτικές ασθένειες Λεισμανίαση, Ανθρώπινη Αφρικανική Τρυπανοσωμίαση και Αμερικάνικη Τρυπανοσωμίαση αποτελούν τις λεγόμενες παραμελημένες ασθένειες καθώς απειλούν κυρίως τους φτωχότερους των φτωχών στις αναπτυσσόμενες χώρες και έτσι υπάρχει μικρό ενδιαφέρον ανάπτυξης αποτελεσματικών, μη τοξικών φαρμάκων για την αντιμετώπιση τους. Οι ασθένειες αυτές μολύνουν εκατομμύρια ανθρώπους κάθε χρόνο και απειλούν μεγάλο ποσοστό του ανθρώπινου πληθυσμού καθώς είναι αιτία θνησιμότητας κυρίως στις αναπτυσσόμενες χώρες. Παράλληλα, οι αναπτυσσόμενες χώρες απειλούνται ολοένα και περισσότερο από τις ασθένειες αυτές καθώς εξωγενείς παράγοντες όπως οι ραγδαίες μεταβολές των περιβαλλοντικών και κλιματολογικών συνθηκών (αύξηση της θερμοκρασίας, συχνότητα βροχοπτώσεων) και οι κοινωνικοπολιτικές αλλαγές (μετανάστευση πληθυσμών, αύξηση της φτώχειας σε αναπτυσσόμενες χώρες) βοηθούν στην εξάπλωση των ασθενειών σε χώρες μη ενδημικές μέχρι στιγμής. Μάλιστα, η λεισμανίαση αποτελεί σημαντικό πρόβλημα Δημόσιας Υγείας και Κτηνιατρικής σημασίας στις Μεσογειακές χώρες. Εφόσον η ανάπτυξη εμβολίων είναι αρκετά δύσκολο να πραγματοποιηθεί και η χημειοθεραπεία που χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση των ασθενειών αυτών είναι γενικά αναποτελεσματική, κυρίως εξαιτίας της εμφάνισης ανθεκτικότητας στη φαρμακευτική αγωγή και των ισχυρών παρενεργειών, είναι επιτακτική ανάγκη να αναπτυχθούν νέα, αποτελεσματικά φάρμακα για τη στοχευμένη θεραπεία των νόσων αυτών.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή ασχολείται με τη διαλεύκανση του βιολογικού ρόλου της κινάσης της συνθετάσης του γλυκογόνου-3 (GSK-3) των παρασίτων *Leishmania*, *Trypanosoma brucei* και *Trypanosoma cruzi*, τα οποία προκαλούν τις ασθένειες Λεισμανίαση, Ανθρώπινη Αφρικανική Τρυπανοσωμίαση και Αμερικάνικη Τρυπανοσωμίαση, αντίστοιχα. Πιο συγκεκριμένα, στη διατριβή αυτή γίνεται έλεγχος συγκεκριμένης ομάδας ουσιών (ιντιρουμπίνες), οι οποίες στοχεύουν την GSK-3 των παρασίτων με σκοπό την πιθανή ανάπτυξη μιας καινούριας θεραπευτικής προσέγγισης για την αντιμετώπιση των παρασιτικών αυτών ασθενειών. Διερευνάται δηλαδή η πιθανότητα ανάπτυξης νέων στοχευμένων φαρμάκων που να αναστέλλουν τη

λειτουργία της παρασιτικής GSK-3, η οποία είναι απαραίτητη για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των παρασίτων. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν αναμένεται να συμβάλουν στην διαλεύκανση του βιολογικού ρόλου της GSK-3 στα παράσιτα, καθώς και στη διερεύνηση/ταυτοποίηση της GSK-3 σαν μόριο-στόχο θεραπευτικών προσεγγίσεων που να βασίζονται στην αναστολή του κυτταρικού κύκλου και στο σχεδιασμό καινούριων πιο αποτελεσματικών φαρμάκων για αυτές τις παραμελημένες παρασιτικές ασθένειες.

Η διατριβή αυτή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Παρασιτολογίας του Τμήματος Μικροβιολογίας, στο Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, κατά την περίοδο 2010-2014, υπό την επίβλεψη της Διευθύντριας Ερευνών του εργαστηρίου Δρ. Καίτης Σωτηριάδου και υπό την εποπτεία του Δρ. Κωνσταντίνου Δημόπουλου, Καθηγητή Βιοχημείας στο Τμήμα Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Για την πραγματοποίηση της διατριβής αυτής συνεργάστηκα με πολλά άτομα, χωρίς τα οποία δε θα είχε πραγματοποιηθεί η παρούσα διατριβή. Επομένως, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τη Δρ. Καίτη Σωτηριάδου για όλες τις ευκαιρίες και τη βοήθεια που μου έδωσε και τον Δρ. Κωνσταντίνο Δημόπουλο για την καθοδήγηση και τη στήριξη που μου πρόσφερε, από τις προπτυχιακές σπουδές μου μέχρι και σήμερα, διευκολύνοντας έτσι την αγάπη μου για τη βιοχημεία και την έρευνα.

Ένα τεράστιο ευχαριστώ στη Δρ. Δέσποινα Σμυρλή, η οποία με εκπαίδευσε, με καθοδήγησε και με στήριξε καθ'όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής μου αλλά και μετέπειτα. Ευχαριστώ για την άριστη συνεργασία τον Δρ. Αλέξιο Λέανδρο Σκαλτσούνη, Καθηγητή του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων στο τμήμα Φαρμακευτικής του ΕΚΠΑ, που χωρίς τη βοήθεια του και τη συνεργασία του, η παρούσα διατριβή δε θα μπορούσε να έχει πραγματοποιηθεί. Επίσης, ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλη την ομάδα του Δρ. Α.-Λ. Σκαλτσούνη με την οποία συνεργάστηκα και κυρίως τον Δρ. Nicolas Gaboriaud-Kolar αλλά και τους Δρ. Κωνσταντίνα Βουγογιαννοπούλου, Δρ. Μαρία Χαλαμπαλάκη και Job Tchoumtchoua. Ευχαριστώ πολύ τον Δρ. Εμμανουήλ Μικρό, Καθηγητή του τομέα Φαρμακευτικής Χημείας στο τμήμα Φαρμακευτικής του ΕΚΠΑ, και τον Δρ.

Βασίλη Μυριανθόπουλο για την πραγματοποίηση των μοντέλων ομολογίας και τις μοριακές προσομοιώσεις.

Ευχαριστώ για τη συνεργασία τη Dr. Milena Botelho Pereira Soares, η οποία με δέχτηκε στο εργαστήριο της στο ινστιτούτο Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz -Fiocruz στο Σαλβαδόρ Βραζιλίας στα πλαίσια του προγράμματος FP7-Chembiofight, όπου εκπαιδεύτηκα και πραγματοποίησα τα πειράματα που αφορούν τα παράσιτα του γένους *Trypanosoma cruzi*. Μεγάλη βοήθεια στα πειράματα αυτά μου πρόσφερε κυρίως ο Cassio Santana Meira αλλά και η Tanira Matutino Bastos και τους ευχαριστώ πολύ.

Θερμά ευχαριστώ για τη συνεργασία, τη καθοδήγηση και τις εποικοδομητικές συζητήσεις τη Δρ. Ευδοκία Καραγκούνη, Ερευνήτρια Α' στο Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ καθώς και τις Δρ. Μαρία Αγάλλου και Μαρίτσα Μαργαρώνη για την άριστη συνεργασία και κυρίως για την πολύτιμη βοήθεια τους. Ευχαριστώ επίσης για τη βοήθεια και τη συνεργασία την Aicher Stephanie, διδακτορική φοιτήτρια στο εργαστήριο μοριακής ιολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω για τη συνεργασία και τη βοήθεια, τους Dr. Philippe Bastin και Dr. Ines Subota (Institute Pasteur, Paris), τον Dr. Wesley Van Voorhis (Department of Medicine, University of Washington, Seattle, Washington) και τους Δρ. Γεώργιο Παναγιώτου και τη Δρ. Μαρτίνα Σαμιωτάκη (BSRC Alexander Fleming).

Ευχαριστώ πολύ τη Δρ. Διδώ Βασιλακοπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τμήματος Βιολογίας του ΕΚΠΑ και μέλος της Τριμελούς Επιτροπής Παρακολούθησης της παρούσας διατριβής για τη καθοδήγηση, την επίβλεψη και τα εποικοδομητικά σχόλια που μου προσέφερε. Ευχαριστώ επίσης τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς επιτροπής της διδακτορικής μου διατριβής, τη Δρ. Λιανίδου Εύη (Καθηγήτρια τμήματος Χημείας, ΕΚΠΑ), τον Δρ. Σκαρλάτο Ντέντο (Επίκουρος Καθηγητής τμήματος Βιολογίας, ΕΚΠΑ) και τη Δρ. Φραγκοπούλου Ελισάβετ (Επίκουρη Καθηγήτρια στο Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο) για τα εποικοδομητικά σχόλια, τις ιδέες και τη συνεισφορά τους για την ολοκλήρωση της διατριβής.

Επίσης ευχαριστώ θερμά όλους τους συναδέλφους στο εργαστήριο Μοριακής Παρασιτολογίας, την Εύη Γκουζέλου, την Γεωργία Κονεΐδου, τον Αλέξανδρο Αλεξανδράτο και τον Δρ. Χρίστο Χαραλάμπους για τις ατελείωτες ώρες που περάσαμε στο εργαστήριο και για τη στήριξη και τη φιλία τους. Παράλληλα ευχαριστώ τις ερευνήτριες Δρ. Χαραλαμπία Μπολέτη και Δρ. Ελένη Ντότσικα για τις εποικοδομητικές συζητήσεις όλα αυτά τα χρόνια. Ευχαριστώ επίσης τους μεταπτυχιακούς φοιτητές ή υποψήφιους διδάκτορες ή διδάκτορες του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ με τους οποίους συζητήσαμε πολλές φορές και μοιραστήκαμε ανησυχίες αλλά και ωραίες στιγμές. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αμαλία Παπαδάκη, τον Ανάργυρο Δούκα, την Εβίτα Αθανασίου, την Δήμητρα Τουμπαμάκη, την Όλγα Κουτσώνη, τον Ιωάννη Κυριαζή, τον Ιωάννη Κάνιστρα και την Αγγελική Σαλή.

Βοήθεια δέχτηκα από όλο το προσωπικό (επιστημονικό, τεχνικό και Διοικητικό) του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ και θα ήθελα να τους ευχαριστήσω όλους για τη συνεισφορά τους στην προσπάθεια μου. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Ειρήνη Φραγκιαδάκη, την Αριάδνη Κάρλες, τη Δρ. Σύλβα Χαραλάμπους, τη Δρ. Μαρία Γαϊτάνου, τον Βαγιώνα Άγγελο, τον Νίκο Βλαχογιάννη, τον Ιωάννη Ευαγγέλου, τον Ιωάννη Κούσκο, τον Ιωάννη Πουλάκη, τον Τάσο Μαΐδη, τον Νίκο Κοντουδάκη, τη Φένια Καλογεροπούλου, την Πέγκυ Ξυνογαλά, τη Δήμητρα Καζανά, την Ευγενία Κωνσταντάκη, τη Βασιλική Σταΐκου, την Χριστίνα Οικονομοπούλου και την Ελένη Παπαδιά.

Πάνω από όλα θέλω να ευχαριστώ με όλη τη ψυχή μου τους ανθρώπους από το οικογενειακό και το φιλικό περιβάλλον που στέκονται στο πλάι μου πάντα με κάθε κόστος και με απεριόριστη αγάπη και κατανόηση. Ευχαριστώ ολόψυχα τον Αλέξανδρο Μίνη για όλες τις στιγμές που με στηρίζει και με βοηθάει να βάζω στην άκρη και να ξεπερνάω τα προβλήματα και τις δυσκολίες. Ευχαριστώ όλους τους ιδιαίτερους για τη ζωή μου φίλους που πάντα είναι εκεί όταν τους χρειάζομαι παρόλο που τους παραμελώ λόγω περιορισμένου ελεύθερου χρόνου. Ευχαριστώ λοιπόν με τυχαία σειρά τους: Μαρίζα Κατσιώτη, Ελίζα Δαλακίδη, Κατερίνα Πουρνάρα, Κωνσταντίνο Τσερώνη, Ελευθερία Ζαχαριάδου, Αντιγόνη Ελεφάντη, Σωκράτη Ράμμο, Δημήτρη Αναγνωστόπουλο, Βασίλη Σιουχλέρη και Βασίλη Ελευθερόπουλο.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω και να αφιερώσω στην οικογένεια μου τη προσπάθεια αυτή. Ευχαριστώ ιδιαίτερα τη θεία μου Φωτεινή και τους θείους μου Μιχάλη, Βασίλη και Χρήστο για τη συνεχή τους συμπαράσταση σε όλους τους τομείς. Ευχαριστώ τη γιαγιά μου Αντωνία και τον παππού μου Γιώργο για όλες τις συμβουλές και την αγάπη τους. Ευχαριστώ την εκλιπούσα γιαγιά μου Βασιλική για όλα τα εφόδια, τα οποία μου έχει προσφέρει. Το μεγαλύτερο ευχαριστώ όμως είναι για τους γονείς μου Μαρία και Στάθη και τον αδερφό μου Γιώργο για την αμέριστη αγάπη τους, τη συμπαράσταση και τη στήριξη που μου προσφέρουν. Χωρίς αυτούς δεν θα μπορούσα να καταφέρω πολλά. Δεν έχω πολλά να πω, παρά μόνο ευχαριστώ.

Εισαγωγή

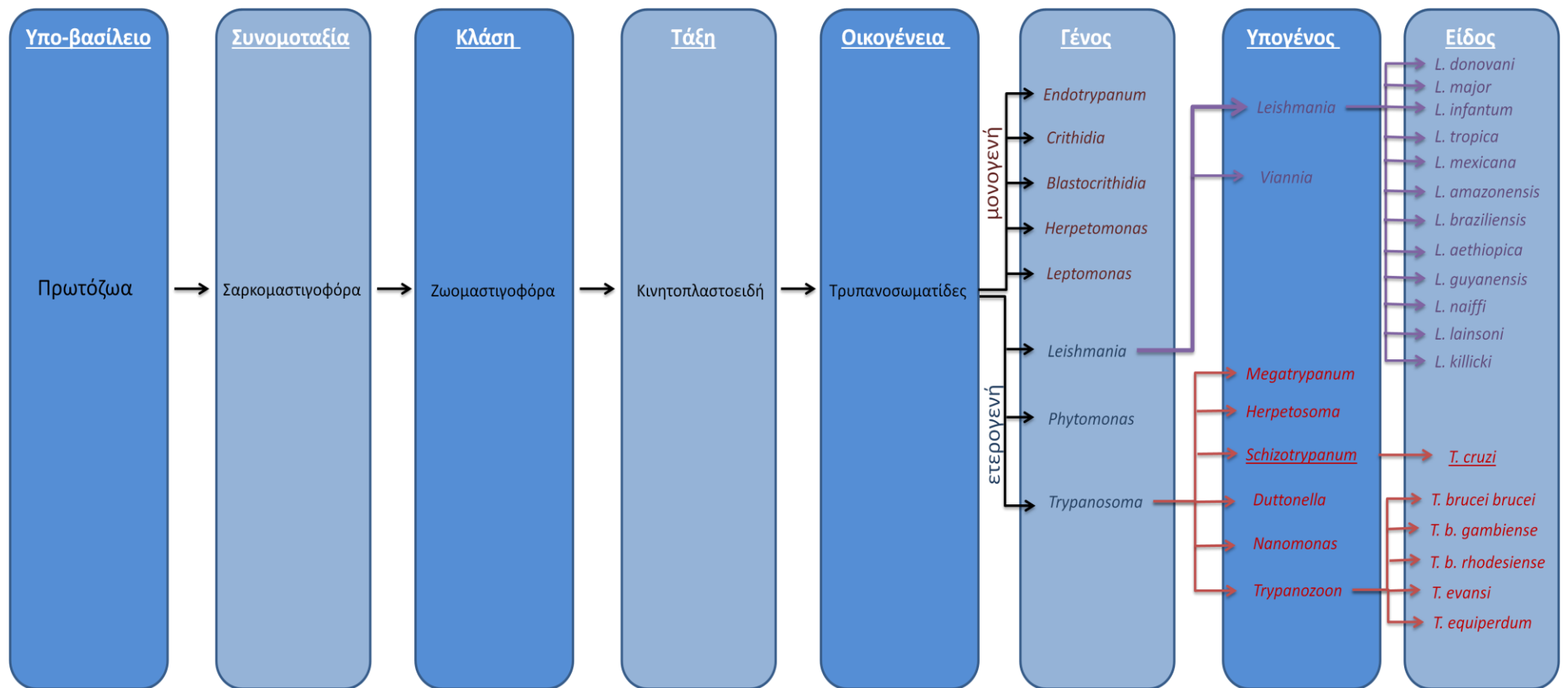
Κεφάλαιο **1**

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Τρυπανοσωματίδες

Για πάνω από εκατό εκατομμύρια χρόνια, οι τρυπανοσωματίδες έχουν επιβιώσει και συνεχίζουν να εξελίσσονται πάνω στη γη [1]. Τα έντομα ήταν οι αρχικοί ξενιστές των τρυπανοσωματίδων [1, 2], σήμερα όμως οι τρυπανοσωματίδες έχουν εξελιχθεί και απαντώνται σε σχεδόν όλες τις ηπείρους (εκτός της Ανταρκτικής) ενώ μολύνουν όλες τις ομάδες των σπονδυλωτών, κάποιες ομάδες ασπόνδυλων (έντομα) και μερικά φυτά [3, 4]. Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωριστεί 9 γένη παρασίτων τα οποία ανήκουν στην οικογένεια των τρυπανοσωματίδων: τα μονογενή *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Herpetomonas*, *Wallaceina* και *Leptomonas*, και τα ετερογενή *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Endotrypanum* και *Phytomonas* (Εικόνα 1). Τα γένη αυτά διαχωρίζονται μεταξύ τους από τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους (μέγεθος, σχήμα, τοποθεσία κινητοπλάστη και βάσης μαστιγίου σε σχέση με τον πυρήνα του κυττάρου) καθώς και από την αλληλεπίδραση που έχει καθένα από αυτά με τον ξενιστή [5-7]. Η παρούσα εργασία έχει ως αντικείμενο την μελέτη των παρασίτων που ανήκουν στις τρυπανοσωματίδες και πιο συγκεκριμένα των γενών *Leishmania* και *Trypanosoma*.



Εικόνα 1. Συστηματική κατάταξη των γενών *Leishmania* και *Trypanosoma*

1.1.1 Ιστορικά στοιχεία

1.1.1.1 *Leishmania*

Το γένος *Leishmania* χωρίζεται σε 2 υπό-γένη: *Leishmania* και *Viannia*. Τα 2 αυτά υπό-γένη διαχωρίζονται μεταξύ τους λόγω της ανάπτυξης του παρασίτου σε διαφορετικό σημείο στο έντερο του ασπόνδυλου ξενιστή. Ειδικότερα, τα είδη του υπογένους *Viannia* αναπτύσσονται στο οπίσθιο τμήμα του εντέρου ενώ τα είδη του υπογένους *Leishmania* αναπτύσσονται στο εμπρόσθιο τμήμα του εντέρου. 30 περίπου είδη περιλαμβάνονται στο γένος *Leishmania* από τα οποία περίπου τα 20 έχουν βρεθεί ότι μολύνουν τον άνθρωπο. Παρόλα αυτά, η κατάταξη των ειδών συνεχώς ανανεώνεται ή αναδιαμορφώνεται καθώς συνεχώς εφαρμόζονται πιο σύγχρονες μέθοδοι μοριακής τεχνικής και γενετικής ανάλυσης [8, 9].

Τα παράσιτα του γένους *Leishmania* αναφέρονται για πρώτη φορά ότι μολύνουν τον άνθρωπο το 1903 σε ασθενείς του μαύρου πυρετού (*Kala-azar*), μια σοβαρή σπλαχνική νόσο. Σχεδόν την ίδια περίοδο, ο Leishman και ο Donovan πραγματοποιούν μικροσκοπικές αναλύσεις και ανακαλύπτουν τον μικροοργανισμό σε επίχρισμα σπλήνας. Με την κατάταξη και ταξινόμηση του παρασίτου ασχολήθηκε ο Ross όπου ονόμασε το γένος του παρασίτου *Leishmania* και το είδος *Leishmania donovani* προς τιμήν των Leishman και Donovan.

Εκτός από τη σπλαχνική μορφή της νόσου, ο Wright πρώτος παρατήρησε την ύπαρξη μιας δερματικής ασθένειας που προκαλεί πληγές με τη χαρακτηριστική μορφή και ονομασία ‘φύμα της ανατολής’ ενώ ο Mesnil ήταν αυτός που παρατήρησε την ομοιότητα των 2 μικροοργανισμών που προκαλούν αυτές τις διαφορετικές μορφές ασθένειας το 1904. Μετά από 2 χρόνια τελικά ο Luhe κατέταξε το παθογόνο που προκαλεί τη δερματική νόσο στο γένος *Leishmania* ενώ το είδος του συγκεκριμένου στελέχους ονομάστηκε *Leishmania tropica* (*L. tropica*). Το 1914 οι Yakimoff και Schokhor σημείωσαν ότι υπάρχουν δύο είδη που προκαλούν τη δερματική λείσμανίαση: *L. tropica major* και *L. tropica minor* τα οποία προκαλούσαν διαφορετική κλινική εικόνα λόγω της διαφορετικής ταχύτητας εμφάνισης πληγής. Μετά από αρκετά χρόνια (1973-74), ο Bray [10, 11] μετονόμασε τις 2 πλέον ξεχωριστές ταξινομικές μονάδες σε *L. major* και *L. tropica*.



A)



B)

Εικόνα 2: A) Αντιστράτηγος Sir William Boog Leishman (1865-1926), B) Συνταγματάρχης Charles Donovan (1863-1951)

1.1.1.2 *Trypanosoma*

Η ύπαρξη της ασθένειας της τρυπανοσωμίας στην Αφρικανική ήπειρο φαίνεται να αναφέρεται ήδη σε πηγές από την αρχαιότητα. Στην αρχαία Αίγυπτο τη 2^η χιλιετία προ Χριστού παρατηρείται μια ασθένεια στα βοοειδή, η επονομαζόμενη ‘nagana’, ενώ παράλληλα οι αρχαίοι Αιγύπτιοι φαίνεται να χρησιμοποιούν το λίπος από ορισμένα πουλιά για να κατασκευάσουν μια αλοιφή, η οποία χρησιμοποιούνταν για θεραπεία κατά το τσίμπημα των μυγών. Στο Μεσαίωνα, υπάρχουν κάποιες γραπτές αναφορές που αναφέρουν περιπτώσεις της ανθρώπινης μορφής της νόσου, ενώ στη νεότερη ιστορία η νόσος σχετιζόταν τις περισσότερες φορές με το δουλεμπόριο. Τον 19^ο αιώνα αυξήθηκαν τα κρούσματα της νόσου στους ανθρώπους και τα συμπτώματα καταγράφηκαν χωρίς όμως να υπάρχει κάποια γνώση για τη φύση και τα ειδικά χαρακτηριστικά της νόσου. Ο βρετανός David Livingstone το 1852 ήταν ο πρώτος που υπέδειξε τη σχέση της νόσου ‘nagana’ με το τσίμπημα της μύγας tsetse [12]. Μετά από περίπου 50 χρόνια, ο David Bruce ανακάλυψε ότι το παράσιτο *Trypanosoma brucei* ήταν το στέλεχος που προκαλεί την ασθένεια [13]. Το 1901, ο χειρουργός Robert Michael Forde ανακάλυψε παράσιτα σε αίμα ασθενών και ο Joseph Everett Dutton τα κατονόμασε τρυπανοσώματα και συγκεκριμένα *T. gambiense* (*T. b. gambiense*) [14]. Παράλληλα, ο παθολόγος Aldo Castellani ανακάλυψε την ύπαρξη των παρασίτων στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) και εισηγήθηκε ότι τα παράσιτα προκαλούν την ασθένεια του ύπνου. Τέλος, ο γερμανός Friedrich Karl Kleine έδειξε το 1909 το κύκλο ζωής του παρασίτου από την μύγα tsetse στον άνθρωπο. Τα είδη που προκαλούν τη νόσο στα ζώα δεν άργησαν να ανακαλυφθούν αφού το 1905 τα είδη *T. congolense* και *T. vivax* ανακαλύφθηκαν από τους Alphonse Broden και Hans Ziemann

αντίστοιχα. Το δεύτερο παθογόνο που προσβάλει τους ανθρώπους, το είδος *T. rhodesiense* (*T. b. rhodesiense*), ανακαλύφθηκε λίγο αργότερα (1910) από τους John William Watson Stephens και Harold Benjamin Fantham [15].



Εικόνα 3: Α) David Livingstone (1813-1873), Σκωτσέζος πρωτοπόρος ιατρικός ιεραπόστολος του Λονδίνου και εξερευνητής της Αφρικής, Β) Υποστράτηγος Sir David Bruce (1855-1931), μικροβιολόγος και παθολόγος, Γ) Joseph Everett Dutton (1874-1905), παθολόγος, Δ) Aldo Castellani (1877-1971), Ιταλός παθολόγος και βακτηριολόγος.

Όσον αφορά την αμερικάνικη τρυπανοσωμίαση ο Carlos Chagas το 1900 ήταν αυτός ο οποίος συνέδεσε την αυξημένη ενδημική ανεπάρκεια του μυοκαρδίου με το έντομο *Triatomine*. Για να αποδείξει ότι επρόκειτο για μια νέα μολυσματική ασθένεια που μεταδίδεται μέσω φορέων, ο Chagas μελέτησε το έντερο των εντόμων με τη βοήθεια ενός απλού οπτικού μικροσκοπίου όπου τελικά ανακάλυψε τα ευκαρυωτικά μαστιγοφόρα πρωτόζωα τα οποία θύμιζαν τα στελέχη που ευθύνονται για την ανθρώπινη αφρικάνικη τρυπανοσωμίαση (*T. brucei*) τα οποία είχαν ανακαλυφθεί μόλις 6 χρόνια νωρίτερα. Το πρωτόζωο που ανακάλυψε το ονόμασε *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) προς τιμήν του μέντορά του Oswaldo Cruz ενώ στη συνέχεια ανακάλυψε τον κύκλο ζωής του παρασίτου ανάμεσα στους ξενιστές [16, 17].

Τα *T. cruzi* παράσιτα διακρίνονται σε 2 γένη, Υ και CL ανάλογα με τη μορφή που παρατηρούνται στο αίμα (λεπτή ή ευρεία μορφή, αντίστοιχα). Επίσης, το γένος Υ φαίνεται να προκαλεί τροπισμό σε μακροφάγα και άλλα μονοπύρηνα του ανοσοποιητικού συστήματος ενώ το CL προκαλεί αμελητέο τροπισμό στα κύτταρα αυτά [18].

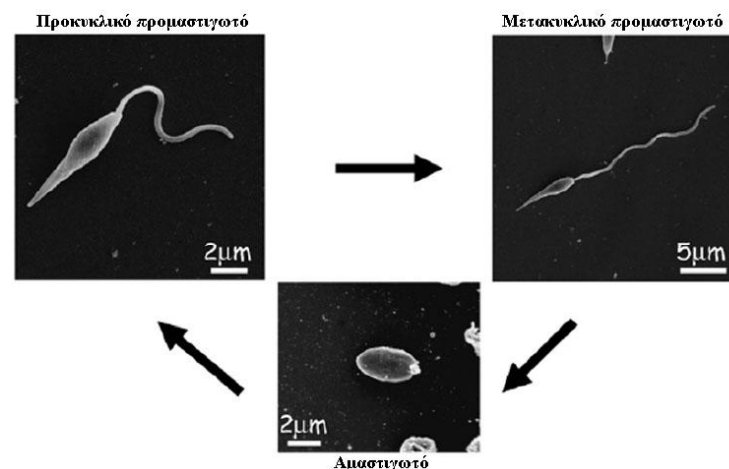


Εικόνα 4: Carlos Justiniano Ribeiro Chagas (1879–1934), Βραζιλιάνος βακτηριολόγος και ερευνητής.

1.1.2 Μορφολογικά στάδια

1.1.2.1 *Leishmania*

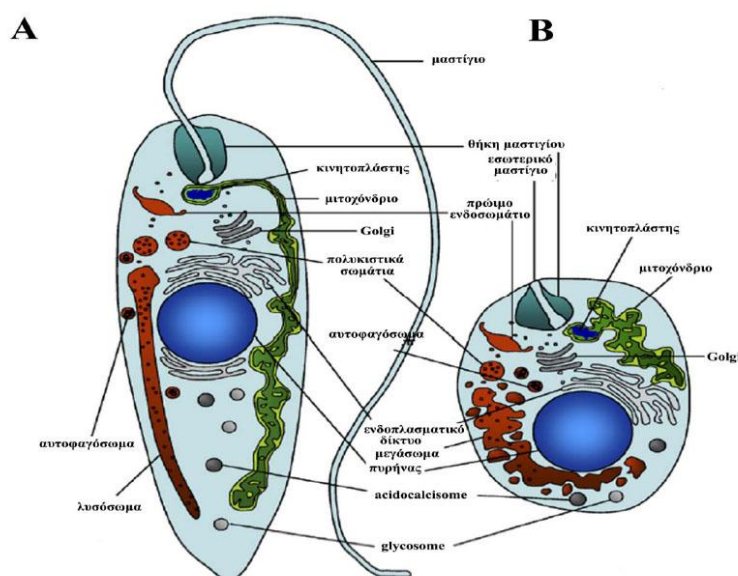
Ανάλογα με τον ξενιστή στον οποίο βρίσκεται για την ολοκλήρωση του κύκλου ζωής του, το παράσιτο του γένους *Leishmania* παίρνει 2 κύριες μορφές: την προμαστιγωτή μορφή (προκυκλική και μετακυκλική) όταν βρίσκεται στον ασπόνδυλο ενδιάμεσο ξενιστή (φλεβοτόμο/σκνίπα) και την αμαστιγωτή μορφή μέσα στα μακροφάγα ή τα μονοπύρηνα του τελικού ξενιστή (θηλαστικά) (Εικόνα 5) [19].



Εικόνα 5: Μορφολογικά στάδια του παρασίτου *Leishmania* όπως φαίνονται σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης [πηγή: (Besteiro et al., 2007) τροποποιημένο].

Οι 2 αυτές βασικές μορφές διαφέρουν και στο σχήμα και στο μέγεθος. Αρχικά, όσον αφορά την προμαστιγωτή μορφή του παρασίτου, έχει μέγεθος 9-12μm x 2-3μm, είναι επιμήκης και φέρει μαστίγιο που εκφύεται από το πρόσθιο τμήμα του σώματος. Το μέγεθος του μαστιγίου είναι ίσο με το μήκος του σώματος του παρασίτου. Στο κέντρο του παρασίτου βρίσκεται ο πυρήνας ο οποίος έχει σφαιρικό σχήμα και διαθέτει πυρηνίσκο. Στο κυτταρόπλασμα της προμαστιγωτής μορφής του παρασίτου παρατηρούνται αδρό και λείο

ενδοπλασματικό δίκτυο, ριβοσώματα, σύμπλεγμα Golgi, κυστίδια λίπους, λυσοσώματα ενώ δίπλα στη βάση του μαστιγίου βρίσκεται το μιτοχόνδριο (Εικόνα 6). Το μιτοχόνδριο όπως φαίνεται και στην εικόνα 6 εκτείνεται κατά μήκος του σώματος του παρασίτου και καλύπτει μεγάλη επιφάνεια, όμως στο μέρος του μιτοχονδρίου που βρίσκεται κοντά στη βάση του μαστιγίου περιέχεται ο δισκοειδής κινητοπλάστης του παρασίτου. Ο κινητοπλάστης είναι χαρακτηριστική δομή των παρασίτων της τάξης των κινητοπλαστίδων και περιέχει δύο τύπους κυκλικών μορίων DNA γνωστά και ως kDNA, τους μικρόκυκλους (5×10^3 - 5×10^4 διαπλεγμένοι μικρόκυκλοι ανά παράσιτο) και τους μακρόκυκλους.



Εικόνα 6: Κυτταρικά οργάνδια της προμαστιγωτής (A) και αμαστιγωτής (B) μορφής των παρασίτων *Leishmania* [πηγή: (Besteiro et al., 2007) τροποποιημένο].

Οι προμαστιγωτές μορφές του παρασίτου απαντώνται στο έντερο του ενδιάμεσου ξενιστή (φλεβοτόμος/σκνίπα) όπου πολλαπλασιάζονται. Όταν μεταφερθούν στο πρόσθιο μέρος του εντέρου του εντόμου διαφοροποιούνται σε μετακυκλικά προμαστιγωτά παράσιτα τα οποία είναι μικρότερα σε μέγεθος και έχουν χαμηλότερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες αλλά έχουν αυξημένη μολυσματική ικανότητα. Τα μετακυκλικά παράσιτα είναι αυτά τα οποία μολύνουν τον τελικό ξενιστή (θηλαστικά) και φαγοκυτταρώνονται από τα μακροφάγα του. Όταν τα παράσιτα αυτά εισέλθουν στο φαγολυσόσωμα των μακροφάγων διαφοροποιούνται προς την αμαστιγωτή τους μορφή, δηλαδή αποκτούν ωοειδή σχήμα και το μέγεθος τους μειώνεται αισθητά ($2-6 \mu\text{m} \times 1,5-2 \mu\text{m}$). Ο πυρήνας παραμένει άθικτος όπως επίσης και ο κινητοπλάστης.

Τα υπόλοιπα οργανίδια είναι λιγότερο ανεπτυγμένα σε σχέση με αυτά της προμαστιγωτής μορφής και καταλαμβάνουν πολύ μικρό χώρο στο παράσιτο. Τέλος, η αμαστιγωτή μορφή του παρασίτου φέρει ενδοκυτταρικό μαστίγιο (Εικόνα 6).

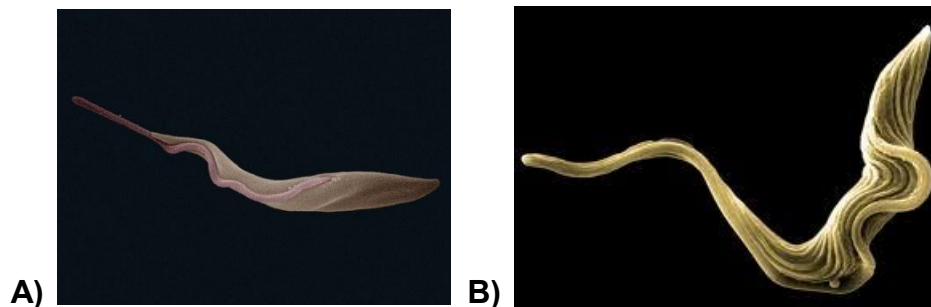
1.1.2.2 *Trypanosoma brucei*

Όπως αναφέρθηκε και για το παράσιτο του γένους *Leishmania* έτσι και το γένος *T. brucei* απαντάται σε 2 κύριες μορφές: την τρυπρομαστιγωτή μορφή όταν βρίσκεται στον σπονδυλωτό τελικό ξενιστή (θηλαστικά) και την επιμαστιγωτή μορφή όταν βρίσκεται στον ασπόνδυλο ενδιάμεσο ξενιστή (μύγα *tsetse*) [7]. Σε αντίθεση με τη *Leishmania*, όλες οι μορφές του παρασίτου *T. brucei* είναι εξωκυττάρειες ακόμα και στον τελικό ξενιστή (θηλαστικά) όπου πολλαπλασιάζεται στο αίμα και στα υγρά του λεμφικού συστήματος. Με αυτό τον τρόπο τα παράσιτα αυτά καταφέρνουν να περάσουν στο κεντρικό νευρικό σύστημα και να προκαλέσουν την τελική φάση της ασθένειας του ύπνου.

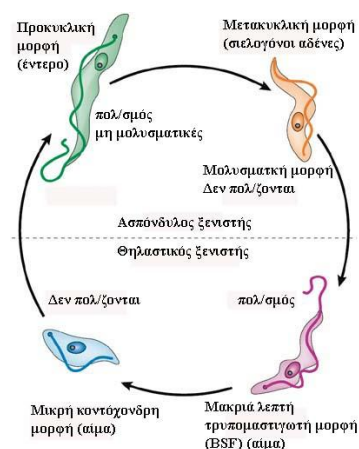
Ο σπονδυλωτός ξενιστής προσλαμβάνει μέσω τσιμπήματος από τη μύγα *tsetse* μετακυκλικά τρυπομαστιγωτά του γένους *T. brucei*, τα οποία στο περιβάλλον του θηλαστικού ξενιστή μετατρέπονται σε τρυπομαστιγωτά αίματος (bloodstream form-BSF) και πολλαπλασιάζονται. Τα τρυπομαστιγωτά χαρακτηρίζονται ως πλειόμορφα με μέγεθος 16-42 μm x 1-3 μm . Διαθέτουν όπως και τα παράσιτα *Leishmania*, πυρήνα ο οποίος έχει σφαιρικό σχήμα και διαθέτει πυρηνίσκο ενώ στο κυτταρόπλασμα παρατηρούνται αδρό και λείο ενδοπλασματικό δίκτυο, ριβοσώματα, σύμπλεγμα Golgi, κυστίδια λίπους και λυσοσώματα. Ο κινητοπλάστης έχει τα ίδια χαρακτηριστικά με αυτό του παρασίτου *Leishmania* και βρίσκεται στο οπίσθιο μέρος του σώματος. Το παράσιτο διαθέτει μακριά κυματιστή μεμβράνη. Είναι επιμήκη σε μέγεθος και λεπτά και η βάση του μαστιγίου βρίσκεται στο οπίσθιο τμήμα του κυττάρου. Το μαστίγιο εξέρχεται από τη βάση του μαστιγίου και είναι προσκολλημένο κατά μήκος του σώματος του παρασίτου μέσω της ζώνης επισύναψης μαστιγίου (FAZ) η οποία ξεκινά πλησίον της βάσης του μαστιγίου και του κινητοπλάστη [20-22]. Το μαστίγιο παρουσιάζει μια κανονική κυλινδρική διαμόρφωση '9+2' αξονημίου μικροσωληνίσκων ενώ τα παράσιτα διαθέτουν διαμόρφωση δικτύου που είναι γνωστή ως PFR (paraflagellar rod) [23-25].

Όταν τα παράσιτα περάσουν από το σπονδυλωτό ξενιστή στο έντερο του ασπόνδυλου διαφοροποιούνται προς προκυκλικά τρυπομαστιγωτά τα οποία είναι μη- μολυσματικά, λιγότερο λεπτά και επιμήκη και πολλαπλασιάζονται. Όταν τα προκυκλικά τρυπομαστιγωτά εγκαταλείψουν το έντερο της μύγας διαφοροποιούνται περαιτέρω σε επιμαστιγωτά τα οποία έχουν μέγεθος 10-35μm x από 1-3μm και κοντή κυματιστή μεμβράνη ενώ ο κινητοπλάστης και το μαστίγιο πλέον βρίσκονται στο εμπρόσθιο μέρος του σώματος [7, 20]. Εκεί πολλαπλασιάζονται εκ νέου και μεταφέρονται στους σιελογόνους αδένες της μύγας όπου διαφοροποιούνται σε μετακυκλικά τρυπομαστιγωτά έτοιμα να μολύνουν τον θηλαστικό ξενιστή.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, όλες οι μορφές του παρασίτου είναι εξωκυττάρειες. Για το λόγο αυτό, τα *T. brucei* παράσιτα έχουν εξελιχθεί και διαθέτουν στην επιφάνειά τους ποικιλόμορφες γλυκοπρωτεΐνες επιφάνειας (variable surface glycoprotein -VSG) για να αποφύγουν την ανοσοποιητική απάντηση στο πλάσμα του ξενιστή [26, 27].



Εικόνα 7: Μορφολογικά στάδια του παρασίτου *Trypanosoma brucei*: A) προκυκλικά τρυπομαστιγωτά (πηγή: Wikipedia [28]) και B) τρυπομαστιγωτά αίματος BSF (πηγή: University of York [29]) όπως φαίνονται σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης.



Nature Reviews | Microbiology

Εικόνα 8: Σχηματική αναπαράσταση μορφολογικών σταδίων του παρασίτου *Trypanosoma brucei* στον ασπόνδυλο και στον θηλαστικό ξενιστή (πηγή: Lee et al. 2007 [30], τροποποιημένο)



Εικόνα 9: Κυτταρικά οργάνδια των BSF *T. brucei* παρασίτων [πηγή: [31] τροποποιημένο].

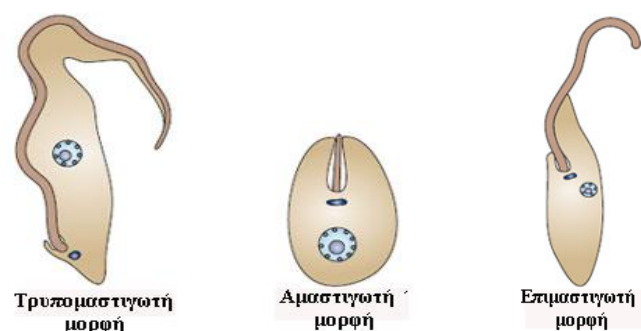
1.1.2.3 *Trypanosoma cruzi*

Σε αντίθεση με το τρυπανόσωμα του γένους *brucei*, οι μορφές του γένους *cruzi* δεν είναι όλες εξωκυττάρειες παρόλο που τα παράσιτα βρίσκονται και στο αίμα των σπονδυλωτών ξενιστών. Το παράσιτο *T. cruzi* απαντάται σε 3 μορφές: την τρυπομαστιγωτή, την επιμαστιγωτή και την ενδοκυττάρια αμαστιγωτή μορφή. Η κύρια διαφορά των μορφών αυτών είναι η θέση του κινητοπλάστη ο οποίος περιέχει το 20-25% του παρασιτικού DNA, και επομένως και της θέσης της βάσης του μαστιγίου σε σχέση με τον πυρήνα ο οποίος βρίσκεται στο κέντρο του σώματος του παρασίτου. Στα μετακυκλικά τρυπομαστιγωτά, τα οποία μεταφέρονται με το τσίμπημα του ασπόνδυλου στον τελικό ξενιστή, ο κινητοπλάστης που έχει σχήμα καλαθιού λόγω των ιδιόμορφων πολλών στρώσεων των DNA βρόχων, βρίσκεται στο οπίσθιο μέρος του παρασίτου και πίσω από τον πυρήνα. Όπως στην *Leishmania* και το *T. brucei*, το DNA του κινητοπλάστη (k-DNA) είναι οργανωμένο σε μικρόκυκλους (20.000-25.000) και μακρόκυκλους. Παρόλο που ο ακριβής ρόλος του k-DNA δεν έχει εξακριβωθεί, είναι απαραίτητο για την επιβίωση του κυττάρου καθώς οι μικρόκυκλοι φαίνεται να κωδικοποιούν μικρές πρωτεΐνες ενώ οι μακρόκυκλοι ένζυμα απαραίτητα για τον παρασιτικό μεταβολισμό. Το μαστίγιο εκφύεται από τη βάση μαστιγίου που βρίσκεται δίπλα στον κινητοπλάστη και εκτείνεται κατά μήκος όλου του υπόλοιπου σώματος του παρασίτου. Ο κινητοπλάστης βρίσκεται μέσα σε μια ενιαία δομή μιτοχονδρίων που επίσης εκτείνεται σε όλο το σώμα του παρασίτου και κινούν το μαστίγιο. Το σχήμα τους είναι επίμηκες με μήκος 20μm και λεπτό. Η μεμβράνη τους είναι λεπτή και ακαθορίστου σχήματος. Το παράσιτο περιέχει ενδοπλασματικό

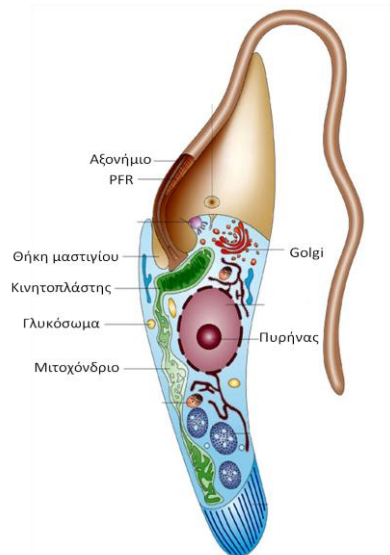
δίκτυο, ριβοσώματα, σύμπλεγμα Golgi και υπεροξυσώματα τα οποία είναι προσκολλημένα στη μεμβράνη και περιέχουν καταλάσες και οξειδάσες ενώ ο κυτταροσκελετός τους από μικροσωληνίσκους αποτελείται από νημάτια α-ακτίνης και α- και β- τουμπουλίνης [32].

Όταν τα παράσιτα φαγοκυτταρωθούν από τα μακροφάγα ή τα μονοκύτταρα του θηλαστικού ξενιστή μετατρέπονται σε αμαστιγωτά τα οποία έχουν σφαιρικό και μικρότερο σχήμα και πολλαπλασιάζονται μέσα στα κύτταρα του ξενιστή. Ο πυρήνας παραμένει άθικτος, ο κινητοπλάστης όμως είναι πλέον στο εμπρόσθιο τμήμα του κυτάρου και έχει σχήμα ράβδου. Τα υπόλοιπα οργάνδια είναι λιγότερο ανεπτυγμένα σε σχέση με αυτά της τρυπομαστιγωτής μορφής και καταλαμβάνουν πολύ μικρό χώρο στο παράσιτο. Η αμαστιγωτή μορφή του παρασίτου φέρει ενδοκυτταρικό μαστίγιο. Η επιμαστιγωτή μορφή που απαντάται στον ασπόνδυλο ξενιστή έχει τα ίδια χαρακτηριστικά με την τρυπομαστιγωτή μορφή με τη διαφορά ότι ο κινητοπλάστης έχει σχήμα ράβδου και παράλληλα αυτός και η βάση μαστιγίου βρίσκονται εμπρόσθια του πυρήνα και στο σώμα του παρασίτου.

Τέλος, τα παράσιτα διαθέτουν στην επιφάνεια τους μακρομοριακά συμπλέγματα, γλυκοπρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες και λιπίδια που βοηθούν την αναγνώριση και την ενσωμάτωση του παρασίτου στα κύτταρα του ανοσοποιητικού του σπονδυλωτού ξενιστή.



Εικόνα 10: Μορφολογικά στάδια του παρασίτου *Trypanosoma cruzi* (πηγή: Docampo *et al.*, 2005 [33]).



Εικόνα 11: Κυτταρικά οργάνδια των *T. cruzi* παρασίτων [πηγή: Docampo *et al.*, 2005 [33], τροποποιημένο].

1.1.3 Κύκλος ζωής

1.1.3.1 *Leishmania*

Όπως έχει ήδη αναφερθεί ο κύκλος ζωής του παρασίτου *Leishmania* λαμβάνει χώρα σε 2 διαφορετικούς ξενιστές: στον ενδιάμεσο ασπόνδυλο (φλεβοτόμος/σκνίπα) και στον τελικό ξενιστή (θηλαστικό) (εικόνα 12). Λόγω της πολυπλοκότητας του κύκλου ζωής του παρασίτου, τα παράσιτα εκτίθενται σε διαφορετικά εξω- και ενδο-κυτταρικά περιβάλλοντα καθώς από το εξωκυττάριο περιβάλλον στον ασπόνδυλο ξενιστή (σκνίπα) αντιμετωπίζει στη συνέχεια το ενδοκυττάριο περιβάλλον στον σπονδυλωτό ξενιστή.

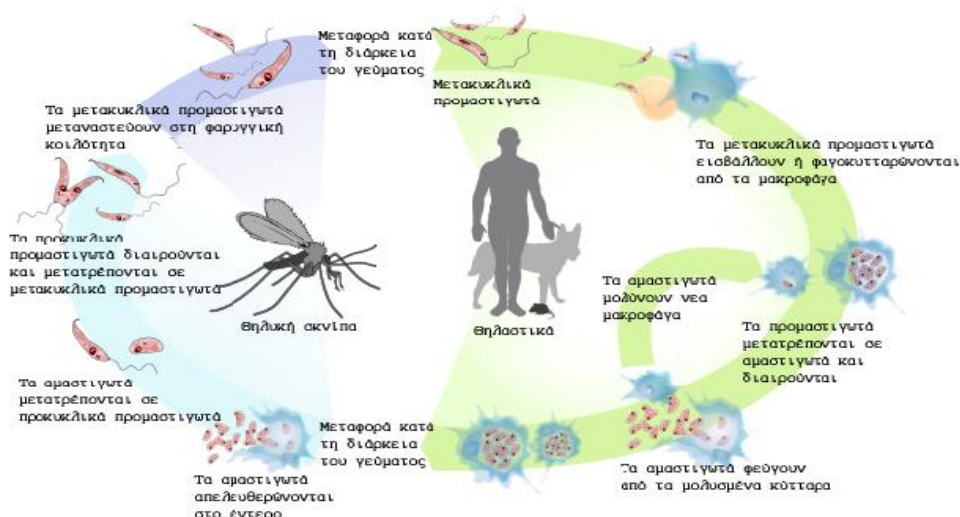
Συγκεκριμένα, τα παράσιτα απαντώνται στην προμαστιγωτή μορφή όταν βρίσκονται στους ασπόνδυλους ξενιστές [34-38], οι οποίοι είναι μικρά έντομα της τάξης Δίπτερα και ανήκουν στην υπο-οικογένεια *Phlebotominae*. Δύο γένη από την υπο-οικογένεια *Phlebotominae* είναι οι κύριοι ασπόνδυλοι φορείς του παρασίτου *Leishmania*: το γένος *Phlebotomus* του «Παλαιού Κόσμου», που χωρίζεται σε 12 υπογένη, και το γένος *Lutzomyia* του «Νέου Κόσμου», που χωρίζεται σε 25 υπογένη [39, 40]. Τα είδη αυτά διαφέρουν ως προς τη γεωγραφική περιοχή που απαντώνται και από το είδος του παρασίτου που τα προσβάλλουν. Στην Ευρώπη, Ασία και Αφρική οι φλεβοτόμοι *Phlebotomus* spp. είναι μεταδότες του παρασίτου ενώ στην Αμερική οι φλεβοτόμοι *Lutzomyia* spp. [40, 41] (Εικόνα 13). Στην Ελλάδα είναι γνωστά δώδεκα είδη φλεβοτόμων, από τα οποία εννέα ανήκουν στο γένος

Phlebotomus και τρία στο γένος *Sergentomyia*. Το είδος *Phlebotomus neglectus*, ένα από τα πιο συχνά απαντώμενα είδη στον Ελλαδικό χώρο αποτελεί τον φορέα του παρασίτου *L. infantum* στη Μεσόγειο [42].

Τα παράσιτα μεταφέρονται στη θηλυκή φλεβοτόμο μετά από ένα γεύμα αίματος [36, 43, 44]. Το έντομο προσλαμβάνει μέσω του γεύματος μακροφάγα μολυσμένα με τις αμαστιγωτές μορφές του παρασίτου, διαδικασία που διευκολύνεται από την αύξηση της μολυσματικότητας του παρασίτου λόγω των συστατικών στο σίελο της φλεβοτόμου όπου περιέχονται φαρμακολογικά ενεργά υποστρώματα που γενικά αναστέλλουν τους αιμοστατικούς μηχανισμούς του ξενιστή και προκαλούν αγγειοδιαστολή και τοπική ανοσοκαταστολή [45]. Τα παράσιτα στο οπίσθιο μέρος του μεσεντέρου του εντόμου και σε περιβάλλον με pH 7 και θερμοκρασία 25°C διαφοροποιούνται σε προκυκλικά προμαστιγωτά παράσιτα, προσκολλώνται με το μαστίγιο τους στο τοίχωμα του εντέρου και πολλαπλασιάζονται με διχοτόμηση [38]. Μετά από 4-5 μέρες τα προμαστιγωτής μορφής μετακινούνται προς την οισοφαγική βαλβίδα του θωρακικού μεσεντέρου και ωριμάζουν σε μετακυκλικά (μετακυκλογένεση) που αποτελούν τη μολυσματική μορφή του παρασίτου. Στο επόμενο γεύμα της φλεβοτόμου, όταν τα παράσιτα βρίσκονται πλέον στο πρόσθιο έντερο του εντόμου, 100-200 μετακυκλικά παράσιτα μεταφέρονται στον τελικό ξενιστή.

Στον τελικό ξενιστή, τα μετακυκλικά προμαστιγωτά παράσιτα *Leishmania* εκμεταλλεύονται τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος του οργανισμού, τα μακροφάγα και τα μονοκύτταρα για να επιβιώσουν και να πολλαπλασιαστούν. Τα παράσιτα απαντώνται σε διάφορα είδη θηλαστικών όπως τρωκτικά, κυνίδες, μαρσιποφόρα, πρωτόγονα οπλοφόρα και πρωτεύοντα τα οποία θεωρούνται πιθανές δεξαμενές του παρασίτου με το σκύλο να παραμένει ο κύριος ξενιστής- δεξαμενή στη σπλαχνική λεισμανίαση ζωονοτικού τύπου, που προκαλείται από το παράσιτο *L. infantum*. Οι άνθρωποι αποτελούν τυχαίους ξενιστές για το παράσιτο *L. infantum*, αν και έχει αναφερθεί ένας ανθρωπονοτικός κύκλος σε χρήστες ναρκωτικών ουσιών [46]. Με το τσίμπημα της σκνίπας, τα παράσιτα αρχικά έρχονται σε επαφή με επιδερμικά μακροφάγα, κερατινοκύτταρα και κύτταρα Langerhans [47] όπου φαγοκυτταρώνονται από τα μονοκύτταρα ή μακροφάγα κύτταρα των ιστών.

Στη συνέχεια, τα φαγοσώματα που περιέχουν τις προμαστιγωτές μορφές των παρασίτων συντήκονται με λυσοσώματα και δημιουργούν τα φαγολυσοσώματα όπου το pH είναι όξινο (5,5) και η θερμοκρασία του ξενιστή είναι 37°C. Εκεί τα παράσιτα διαφοροποιούνται από προμαστιγωτά σε αμαστιγωτά τα οποία μπορούν να επιβιώσουν και να πολλαπλασιαστούν στο περιβάλλον αυτό. Όταν τα παράσιτα φτάσουν στο ανώτατο όριο στο κύτταρο (>200 αμαστιγωτά), το κύτταρο διαρρηγνύεται και τα παράσιτα απελευθερώνονται στην κυκλοφορία του αίματος και φαγοκυτταρώνονται εκ νέου από άλλα μακροφάγα. Η διαδικασία από την πρόσληψη των παρασίτων από το μακροφάγο μέχρι την διάρρηξη και επαναπροσβολή των νέων κυττάρων λαμβάνει χώρα σε 12-24 ώρες [48]. Όταν η μόλυνση των μακροφάγων από τα παράσιτα παραμένει στο σημείο του τσιμπήματος από τη σκνίπα η απελευθέρωση κυτταροκινών καθώς και η ανάπτυξη διάφορων κυτταρικών αντιδράσεων οδηγούν στην εμφάνιση εντοπισμένης δερματικής αλλοίωσης (δερματική λείσμανίαση-CL). Σε διαφορετική περίπτωση όταν τα μολυσμένα μακροφάγα μεταναστεύουν από το αίμα σε άλλους ιστούς, μολύνοντας έτσι το σπλήνα, το ήπαρ και το μυελό των οστών οδηγούν στην εμφάνιση σπλαχνικής λείσμανίασης (VL). Πρέπει να τονιστεί ότι τα παραπάνω είναι στενά συνυφασμένα με το είδος του παρασίτου. Ο τροπισμός αυτός εξαρτάται από παράγοντες, όπως ο γονότυπος/φαινότυπος του παρασίτου και η ανοσολογική κατάσταση [37, 38]. Ο κύκλος ζωής του παρασίτου ολοκληρώνεται όταν μια θηλυκή μη μολυσμένη σκνίπα κατά τη διάρκεια του γεύματος της προσλαμβάνει μακροφάγα κύτταρα του δέρματος που περιέχουν τις αμαστιγωτές μορφές του παρασίτου από το μολυσμένο τελικό ξενιστή μαζί με το υγρό των ιστών (εικόνα 12).



Εικόνα 12: Κύκλος ζωής του παρασίτου *Leishmania* [πηγή: Wikipedia [49], τροποποιημένο].



A)



B)

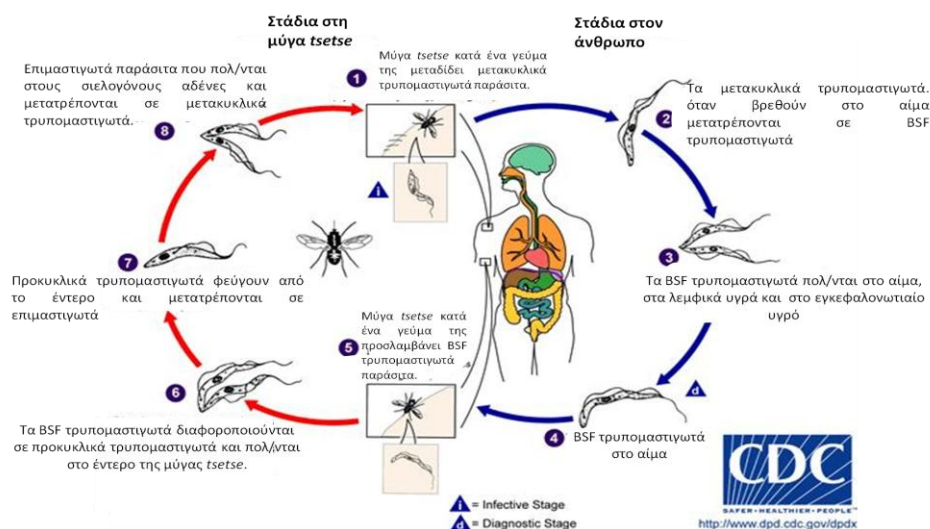
Εικόνα 13: Φλεβοτόμοι των ειδών: A) *Phlebotomus* spp. (πηγή: CDC [50]) B) *Lutzomyia* spp. (πηγή: VectorBase [51]).

1.1.3.2 *Trypanosoma brucei*

Ο κύκλος ζωής του παρασίτου *T. brucei* λαμβάνει μέρος στον ενδιάμεσο ασπόνδυλο και στον τελικό σπονδυλωτό ξενιστή (εικόνα 14). Τα παράσιτα απαντώνται στην προκυκλική τρυπομαστιγωτή μορφή όταν βρίσκονται στους ασπόνδυλους ξενιστές [7], οι οποίοι είναι οι μύγες *tsetse* του γένους *Glossina* (εικόνα 15). Αρχικά, η μύγα *tsetse* προσλαμβάνει τα τρυπομαστιγωτής μορφής παράσιτα *T. brucei* κατά τη διάρκεια ενός γεύματος από το αίμα ή το εγκεφαλονωτιαίο υγρό του σπονδυλωτού ξενιστή, τα οποία στο μεσέντερο του εντόμου διαφοροποιούνται σε προκυκλικά τρυπομαστιγώτα. Αφού πολλαπλασιαστούν, τα προκυκλικά προμαστιγώτα μεταναστεύουν μέσω των μεμβρανών του εντέρου στους σιελογόνους αδένες του εντόμου και διαφοροποιούνται σε επιμαστιγώτα και στη συνέχεια πολλαπλασιάζονται με διχοτόμηση. Όταν τα επιμαστιγώτα αποκολληθούν από τους σιελογόνους αδένες διαφοροποιούνται σε μολυσματικής μορφής μετακυκλικά τρυπομαστιγώτα. Ο πλήρης κύκλος των παρασίτων από το

έντερο στους σιελογόνους αδένες της μύγας λαμβάνει χώρα σε περίπου 3 εβδομάδες [52].

Με το επόμενο γεύμα της μύγας τα μετακυκλικά προμαστιγωτά περνάνε στο δέρμα του σπονδυλωτού ξενιστή δημιουργώντας μια πληγή γνωστή ως 'φύμα της Ανατολής' σε 5-15 μέρες. Στη συνέχεια, τα παράσιτα προσαρμόζονται στο περιβάλλον του θηλαστικού ξενιστή και διαφοροποιούνται σε τρυπομαστιγωτά αίματος (bloodstream) και μεταφέρονται στα υγρά του σώματος (αίμα, λέμφο και εγκεφαλονωτιαίο υγρό) όπου και πολλαπλασιάζονται με διχοτόμηση. Αυτά τα παράσιτα μπορούν να διαπεράσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και να εισέλθουν στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) σε λίγες μόνο εβδομάδες και να προκαλέσουν το τελικό στάδιο της αφρικάνικης τρυπανοσωμίας. Τα πολλαπλασιαζόμενα λεπτά τρυπομαστιγωτά παράσιτα *T. brucei* έχουν εξελιχθεί έτσι ώστε να αποφεύγουν την ανοσολογική επίθεση από τον ξενιστή καθώς διαθέτουν στην επιφάνειά τους την γλυκοπρωτεΐνη VSG (Variable Surface Glycoprotein). Μερικά από τα τρυπομαστιγωτά του αίματος υφίστανται διαφοροποιήσεις αποκτώντας έτσι κοντόχοντρη μορφή και χάνοντας την ικανότητα αποφυγής του ανοσοποιητικού συστήματος. Με αυτό τον τρόπο, ο πληθυσμός αυτός των παρασίτων εισέρχεται στα κύτταρα του ανοσοποιητικού και έτσι καθίσταται πιο ικανός να μολύνει τον ασπόνδυλο φορέα κατά ένα γεύμα αίματος. Με αυτό τον τρόπο ολοκληρώνεται ο κύκλος ζωής του παρασίτου *T. brucei* [7]. Τέλος, τα παράσιτα σε σπάνιες περιπτώσεις μπορούν να μεταδοθούν μέσω μετάγγισης αίματος.



Εικόνα 14: Κύκλος ζωής του παρασίτου *T. brucei* [πηγή: CDC [53], τροποποιημένο].



Εικόνα 15: Μύγα του είδους *Glossina* (tsetse fly) [πηγή: Encyclopaedia Britannica [54]].

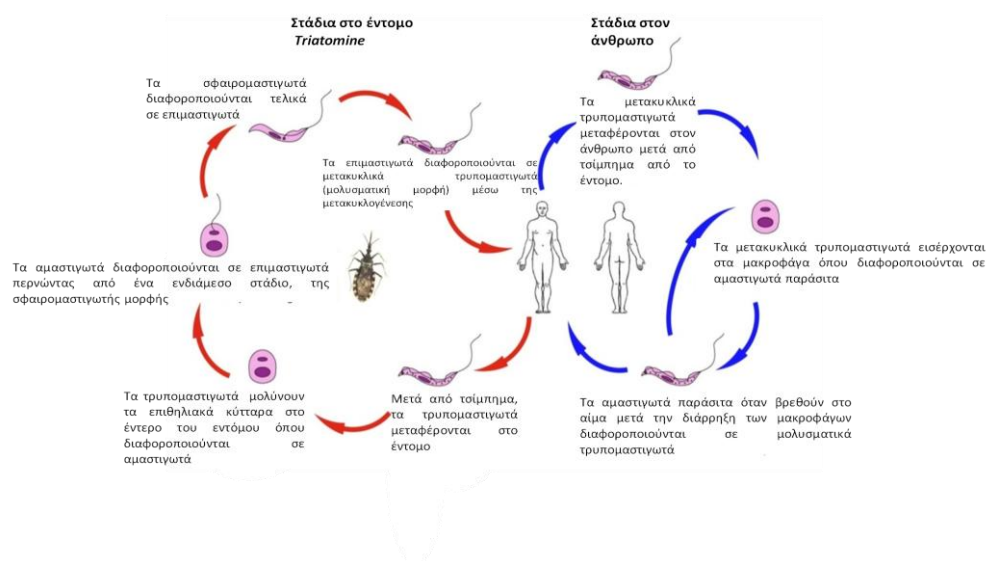
1.1.3.3 *Trypanosoma cruzi*

Ο κύκλος ζωής του παρασίτου *T. cruzi* ακριβώς όπως τα προαναφερθέντα 2 παράσιτα λαμβάνει μέρος στον ενδιάμεσο ασπόνδυλο και στον τελικό σπονδυλωτό ξενιστή (εικόνα 16) [55-57]. Τα παράσιτα απαντώνται στην επιμαστιγωτή μορφή όταν βρίσκονται στους ασπόνδυλους ξενιστές [7], οι οποίοι είναι τα έντομα του γένους *Triatomine* (εικόνα 17) και ειδικότερα τα *Triatoma*, *Rhodnius*, και *Panstrongylus*. Αρχικά, το έντομο (αρσενικό ή θηλυκό) προσλαμβάνει τα τρυπομαστιγωτής μορφής παράσιτα από το αίμα μετά από τσίμπημα ενός μολυσμένου σπονδυλωτού ξενιστή. Στο μεσέντερο του εντόμου τα τρυπομαστιγωτά διαφοροποιούνται σε επιμαστιγωτά όπου και πολλαπλασιάζονται με διχοτόμηση. Τα επιμαστιγωτά μεταναστεύουν στο οπίσθιο μέρος του εντέρου και διαφοροποιούνται σε μετακυκλικά τρυπομαστιγωτά τα οποία είναι και η μολυσματική μορφή τους.

Κατά τη διάρκεια ενός γεύματος του εντόμου, μετά το τσίμπημα στον θηλαστικό ξενιστή απελευθερώνονται στη πληγή κόπρανα τα οποία περιέχουν τα μολυσματικά μετακυκλικά τρυπομαστιγωτά. Τα παράσιτα εισέρχονται στον τελικό ξενιστή μέσω της πληγής ή μέσω βλεννογόνων μεμβρανών. Όπως και τα παράσιτα *T. brucei*, τα παράσιτα *T. cruzi* έχουν εξελιχθεί έτσι ώστε να αποφεύγουν τον ανοσοποιητικό αμυντικό μηχανισμό των θηλαστικών όχι όμως μέσω της VSG αλλά με το να κρύβονται μέσα στα κύτταρα του ανοσοποιητικού. Μετά από 7-14 μέρες τα παράσιτα μεταφέρονται στους λεμφαδένες όπου και πολλαπλασιάζονται και σχηματίζουν συσσωματώματα τις λεγόμενες ψευδοκύστες. Όταν ο αριθμός των παρασίτων φτάσει στο ανώτατο όριο μέσα στις ψευδοκύστες αυτές, γίνεται ρήξη και ελευθερώνονται τα παράσιτα τα οποία προσβάλλουν καινούρια κύτταρα σε διάφορα μέρη του σώματος συμπεριλαμβανομένων των λεμφικών ιστών, των μυών και του ιστού γύρω από τα νευρικά γάγγλια. Τελικό στάδιο είναι η εισβολή των παρασίτων στα καρδιακά γάγγλια και αυτό κατ' επέκταση αυξάνει τον κίνδυνο

παρουσίασης καρδιαγγειακής νόσου σε περιοχές όπου ενδημεί το παράσιτο *T. cruzi*.

Συγκεκριμένα, τα μετακυκλικά τρυπομαστιγωτά προσλαμβάνονται με φαγοκύτταρωση από τα μακροφάγα. Όταν το κύτταρο έρχεται σε επαφή με το παράσιτο δίνεται σήμα μέσω αύξησης των ενδοκυττάριων επιπέδων ασβεστίου (Ca^{2+}) και λυσοσώματα μεταναστεύουν στην επιφάνεια του κυττάρου. Έτσι το παράσιτο εισέρχεται σε ένα κενोटύπιο που σχηματίζεται από ένα λυσόσωμα, όπου το περιβάλλον είναι όξινο pH 5.5 και η θερμοκρασία 37°C. Τα παράσιτα σε αυτό το περιβάλλον εκκρίνουν μια τοξική πρωτεΐνη που διασπά τη μεμβράνη του λυσοσώματος καταφέροντας έτσι να ξεφύγουν την αποικοδόμηση από το λυσόσωμα και μετά από περίπου μία ώρα απελευθερώνονται στο κυτταρόπλασμα. Έχειδειχθεί ότι αν παρεμποδιστεί η δημιουργία λυσοσωμάτων ή το pH μέσα σε αυτά αυξηθεί με τη βοήθεια φαρμάκων, σταματά και η μόλυνση καθώς τα παράσιτα δε μπορούν να διαφύγουν προς το κυτταρόπλασμα. Όταν τα παράσιτα τελικά βρεθούν στο κυτταρόπλασμα, διαφοροποιούνται σε αμαστιγωτές μορφές και πολλαπλασιάζονται. Τα αμαστιγωτά δεσμεύονται στην κυτταρική επιφάνεια του μακροφάγου με τη βοήθεια ποικιλίας πρωτεϊνών υποδοχέων συμπεριλαμβανομένης της ινονηκτίνης. Μετά τη ρήξη των μακροφάγων, τα αμαστιγωτά διαφοροποιούνται σε τρυπομαστιγωτά αίματος (bloodstream) τα οποία δε μπορούν να πολλαπλασιαστούν αλλά μπορούν να μολύνουν μεγάλη ποικιλία ιστών.



Εικόνα 16: Κύκλος ζωής του παρασίτου *T. cruzi* [πηγή: González *et al.*, 2013, [58] τροποποιημένο].



Εικόνα 17: Έντομο του γένους *Triatomine* [πηγή: world news [59]].

Ο κύκλος ολοκληρώνεται με την πρόσληψη των τρυπομαστιγωτών που βρίσκονται στο αίμα από ένα μη μολυσμένο έντομο κατά τη διάρκεια ενός γεύματος. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός πως η ανεπάρκεια σιαλικού οξέος έχει ως αποτέλεσμα τη μη δυνατή πρόσληψη των παρασίτων. Σε αυτή τη περίπτωση, τα παράσιτα *T. cruzi* παράγουν ένα ένζυμο που ονομάζεται trans-σιαλιδάση το οποίο διευκολύνει τα παράσιτα να μολύνουν τον ξενιστή. Τέλος, έχουν αναφερθεί περιπτώσεις που τα παράσιτα *T. cruzi* μεταδίδονται με μεταγγίσεις αίματος, μεταμόσχευση οργάνων, μέσω του πλακούντα και από εργαστηριακά ατυχήματα [7, 60-63].

1.2 Παρασιτικές ασθένειες

1.2.1 Λεϊσμανίαση

Οι παρασιτικές ασθένειες Λεϊσμανίαση, Ανθρώπινη Αφρικανική Τρυπανοσωμίαση (HAT) και Αμερικάνικη Τρυπανοσωμίαση (Chagas Disease) χαρακτηρίζονται ως παραμελημένες ασθένειες καθώς η πλειοψηφία των ανθρώπων που νοσούν απαντάται στις αναπτυσσόμενες χώρες και αφορούν στους φτωχότερους των φτωχών. Ως εκ τούτου το ενδιαφέρον των φαρμακοβιομηχανιών για την ανάπτυξη νέων αποτελεσματικών φαρμάκων για τον έλεγχο τους είναι πολύ περιορισμένο ως και ανύπαρκτο.

Η λεϊσμανίαση αποτελεί μια παρασιτική νόσο που προκαλείται από πρωτόζωα του γένους *Leishmania* τα οποία όπως προαναφέρθηκε, μολύνουν τα περισσότερα είδη θηλαστικών συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου ενώ μεταδίδεται μέσω του ενδιάμεσου ξενιστή (φλεβοτόμος/σκνίπα). Η νόσος όπως έχει ήδη αναφερθεί, έχει εξαπλωθεί σε σχεδόν όλες τις ηπείρους (εκτός της Ανταρκτικής) και είναι ενδημική στις τροπικές και υποτροπικές περιοχές 88 χωρών. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) περίπου 14 εκατομμύρια άτομα είναι μολυσμένα από τα παράσιτα του γένους *Leishmania*, ενώ κάθε χρόνο 1.5-2 εκατομμύρια νέα περιστατικά αναφέρονται. Εκτιμάται ότι συνολικά, περίπου 350 εκατομμύρια άτομα βρίσκονται σε πιθανό κίνδυνο

να μολυνθούν από το παθογόνο [64]. Η εξάπλωση της νόσου έχει και κοινωνικοπολιτικές αιτίες καθώς η εξάπλωση της φτώχειας, η μετανάστευση, η κακή κατάσταση των συστημάτων υγείας, η έλλειψη πολιτικής βούλησης και δέσμευσης για την αντιμετώπιση αυτού του τόσο σημαντικού προβλήματος Δημόσιας Υγείας, η ανεπαρκής χρηματοδότηση έρευνας για την κατανόηση της βιολογίας του παρασίτου και της νόσου καθώς και η δύσκολη πρόσβαση σε φαρμακευτικές αγωγές κατά της νόσου στις αναπτυσσόμενες χώρες, συμβάλλουν στην εξάπλωση της νόσου [65]. Ταυτόχρονα, η αλλαγή του κοινωνικοπολιτικού σκηνικού, οι περιβαλλοντικές αλλαγές, οι μεταναστεύσεις πληθυσμών και η εξαθλίωση των συνθηκών διαβίωσης των ανθρώπων λόγω της οικονομικής κρίσης έχουν ως αποτέλεσμα τη διάδοση και την αύξηση των κρουσμάτων της ασθένειας στις αναπτυσσόμενες χώρες (χώρες της Ευρώπης όπως η Κύπρος, η Ελλάδα, η Ισπανία κ.α.).

1.2.1.1 Κλινικές μορφές της νόσου

Έχει ήδη αναφερθεί ότι το πρωτόζωο *Leishmania* προκαλεί ένα ευρύ φάσμα κλινικών συμπτωμάτων τα οποία ομαδοποιούνται σε τρεις διαφορετικές μορφές της νόσου. Η εκδήλωση των διαφορετικών μορφών σχετίζεται άμεσα τόσο με το είδος του παράσιτου όσο με την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή [66]. Υπάρχουν περιπτώσεις που συγκεκριμένο είδος του παράσιτου μπορεί να προκαλεί διαφορετικές κλινικές μορφές της νόσου (πλειομορφισμός). Οι τρεις βασικές κλινικές μορφές λείσμανιάσης είναι: η σπλαχνική λείσμανιάση (VL, visceral leishmaniasis), η δερματική λείσμανιάση (CL, cutaneous leishmaniasis) και η βλεννογονοδερματική λείσμανιάση (MCL, muco-cutaneous leishmaniasis) [64]. Στον πίνακα 1 παρατίθενται τα είδη του παράσιτου και οι κλινικές μορφές της νόσου που προκαλούν.

Πίνακας 1: Επιδημιολογικά στοιχεία κλινικά σημαντικών ειδών *Leishmania*. VL (σπλαχνική λείσμανιάση), CL (δερματική λείσμανιάση), PKDL (post kala-azar δερματική λείσμανιάση), DCL (διάχυτη δερματική λείσμανιάση), MCL (βλεννογονοδερματική λείσμανιάση).

Είδος παράσιτου	Κλινικές μορφές λείσμανιάσης*	Κύριος ενδιάμεσος ξενιστής	Ξενιστής δεξαμενή	Γεωγραφική κατανομή
Παλαιός Κόσμος				
<i>L. donovani</i> <i>infantum</i>	VL, CL	<i>P. perniciosus</i> , <i>P. ariasi</i> <i>P. langeroni</i> <i>P. chinensis</i>	Σκύλοι, αλεπούδες, τσακάλια	Χώρες Μεσογείου, Μέση Ανατολή, Κίνα, κεντρική Ασία

<i>P. major</i>				
<i>L. donovani chagasi</i>	VL, CL	<i>Lu. Longipalpis</i>	Σκύλοι, αλεπούδες	Βραζιλία, Βενεζουέλα, Μεξικό
<i>L. donovani donovani</i> <i>L. donovani archibaldi</i>	VL, PKDL	<i>P. argentipes</i> <i>P. orientalis</i> <i>P. martini</i> <i>P. alexandri</i>	Άνθρωποι, τρωκτικά, κυνοειδή	Βορειοανατολική Ινδία, Μπαγκλαντές, Νεπάλ, Κίνα, Σουδάν, Κένυα, Αιθιοπία
<i>L. major</i>	CL, DCL γ	<i>P. papatasi</i> <i>P. duboscqi</i>	Τρωκτικά (<i>Rhombomys opimus</i> , <i>Psammomys obesus</i> , και <i>Arvicanthis niloticus</i>)	Μέση Ανατολή, Βόρεια Ινδία, Πακιστάν, Βόρεια Αφρική, Κεντρική Ασία, Σουδάν
<i>L. tropica</i>	CL, VL	<i>P. sergenti</i> <i>P. saevus</i>	Άνθρωποι, σκύλοι, τρωκτικά	Μέση Ανατολή, Χώρες Μεσογείου, κεντρική Ασία, Κένυα
<i>L. aethiopica</i>	CL, DCL	<i>P. longipes</i> <i>P. pedifer</i>	Ύραξ (Hyraxes)	Κένυα, Αιθιοπία
Νέος Κόσμος				
<i>L. donovani infantum</i>	VL, CL	<i>P. perniciosus</i> , <i>P. ariasi</i> <i>P. langeroni</i> <i>P. chinesis</i> <i>P. major</i>	Σκύλοι, αλεπούδες, τσακάλια	Χώρες Μεσογείου, Μέση Ανατολή, Κίνα, κεντρική Ασία
<i>L. donovani chagasi</i>	VL, CL	<i>Lu. Longipalpis</i>	Σκύλοι, αλεπούδες	Βραζιλία, Βενεζουέλα, Μεξικό
<i>L. donovani donovani</i> <i>L. donovani archibaldi</i>	VL, PKDL	<i>P. argentipes</i> <i>P. orientalis</i> <i>P. martini</i> <i>P. alexandri</i>	Άνθρωποι, τρωκτικά, κυνοειδή	Βορειοανατολική Ινδία, Μπαγκλαντές, Νεπάλ, Κίνα, Σουδάν, Κένυα, Αιθιοπία
<i>L. major</i>	CL, DCL γ	<i>P. papatasi</i> <i>P. duboscqi</i>	Τρωκτικά (<i>Rhombomys opimus</i> , <i>Psammomys obesus</i> , και <i>Arvicanthis niloticus</i>)	Μέση Ανατολή, Βόρεια Ινδία, Πακιστάν, Βόρεια Αφρική, Κεντρική Ασία, Σουδάν
<i>L. tropica</i>	CL, VL	<i>P. sergenti</i> <i>P. saevus</i>	Άνθρωποι, σκύλοι, τρωκτικά	Μέση Ανατολή, Χώρες Μεσογείου, κεντρική Ασία, Κένυα
<i>L. aethiopica</i>	CL, DCL	<i>P. longipes</i> <i>P. pedifer</i>	Ύραξ (Hyraxes)	Κένυα, Αιθιοπία

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

Η σπλαχνική λεισμανίαση (visceral leishmaniasis, VL), γνωστή ευρέως και ως Kala-azar (μαύρος πυρετός) είναι η σοβαρότερη μορφή της νόσου καθώς σε περίπτωση μη έγκαιρης κατάλληλης θεραπευτικής αγωγής, η θνησιμότητα κυμαίνεται στο 75-95%. Κάθε χρόνο 500.000 νέα περιστατικά σπλαχνικής λεισμανίασης καταγράφονται ενώ οι θάνατοι που προκαλούνται

κάθε χρόνο από τη νόσο ανέρχονται στους 50.000 [64]. Το είδος του παρασίτου που είναι υπεύθυνο για αυτή τη κλινική μορφή της νόσου στην Ινδία και στην Ανατολική Αφρική είναι το *L. donovani*, ενώ στις περιοχές της Μεσογειακής λεκάνης, καθώς και στην Κεντρική και Νότια Αμερική υπεύθυνο είναι το παράσιτο του είδους *L. infantum* [67, 68].

Με την μόλυνση και τον πολλαπλασιασμό των αμαστιγωτών παρασίτων στα μακροφάγα και τα μονοκύτταρα των οργάνων του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος όπως είναι ο σπλήνας, το ήπαρ, τα λεμφοειδή γάγγλια και ο μυελός των οστών ξεκινά η εμφάνιση της νόσου. Η περίοδος από την αρχική μόλυνση μέχρι τη μετανάστευση των παρασίτων στα όργανα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος κυμαίνεται από 2-6 μήνες. Ο διαλείπων πυρετός, η ηπατο-σπληνομεγαλία, η λεμφαδενοπάθεια, η λευκοπενία, η θρομβοκυτταροπενία, η αναιμία και η υπερ-γ-σφαιριναιμία αποτελούν μερικά από τα κλινικά συμπτώματα της σπλαχνικής λεισμανίασης. Ο κατάλογος των κλινικών συμπτωμάτων συμπληρώνεται με την εφίδρωση, την κόπωση, την εμφάνιση γαστρεντερικών διαταραχών και με τη σταδιακή απώλεια βάρους, ενώ η εμφάνιση οιδημάτων και αιμορραγιών είναι επίσης πιθανή κατά τα προχωρημένα στάδια της νόσου [69, 70]. Ακόμα και μετά από επιτυχημένη θεραπεία της σπλαχνικής λεισμανίασης, υπάρχει πιθανότητα οι ασθενείς να εμφανίσουν την post-Kala-azar δερματική λεισμανίαση (PKDL). Το 10% των Ινδών ασθενών υποτροπιάζουν προς τον ινδικό τύπο της PKDL σε περίοδο 2-3 χρόνων μετά από την επιτυχημένη θεραπεία της σπλαχνικής λεισμανίασης. Τα κλινικά συμπτώματα της PKDL συμπεριλαμβάνουν διάσπαρτες δερματικές αλλοιώσεις (υπόχρωμες κηλίδες, ερύθημα, οζίδια) στον κορμό, στους βραχίονες, στους μηρούς και στην κνήμη και ενώ αρχικά είναι μικρές και διάσπαρτες στη συνέχεια αυξάνονται, ενώνονται και σχηματίζουν πλάκες. Σε αργότερο στάδιο της νόσου γίνεται και η εμφάνιση των οζιδίων κυρίως στην περιοχή του προσώπου του ασθενή τα οποία προσομοιάζουν σε μεγάλο βαθμό με τα έλκη της λέπρας. Ο Αφρικανικός τύπος της PKDL είναι πιο επιθετικός, μολύνει 50-60% των ασθενών και εμφανίζεται από 0-6 μήνες μετά τη θεραπεία της σπλαχνικής λεισμανίασης ή και ακόμα και κατά τη διάρκεια της θεραπείας, πριν καν υποχωρήσουν οι κλινικές εκδηλώσεις της σπλαχνικής νόσου. Στην αφρικάνικου τύπου PKDL οι

δερματικές αλλοιώσεις εμφανίζονται συνήθως γύρω από το στόμα και εξαπλώνονται σε όλο το πρόσωπο, αλλά εμφανίζονται και στον κορμό, στους βραχίονες, στους μηρούς και στην κνήμη και προσομοιάζουν με ιλαρά. Σε αντίθεση με τον ινδικό τύπο, ο αφρικανικός τύπος της PKDL είναι αυτοθεραπευόμενος [70, 71].



Εικόνα 18: Α) Ασθενής με σπλαχνική λείσμανίαση εμφανίζει ηπατοσπληνομεγαλία, Β) Δερματικές αλλοιώσεις που οφείλονται στην εμφάνιση της PKDL, Γ) Σκύλος που πάσχει από καλα-αζάρ [πηγή:[72]].

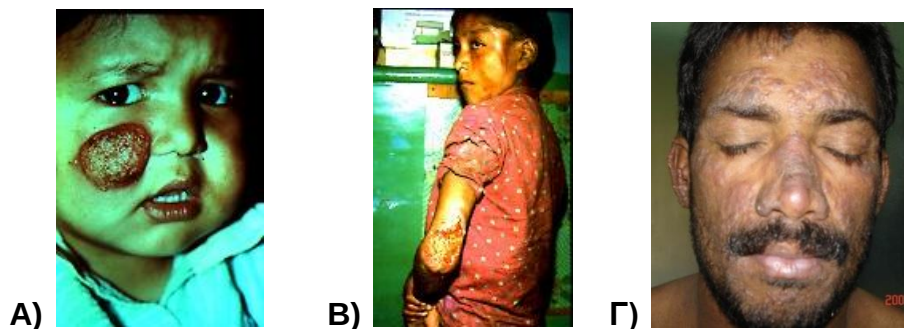
1.2.1.1.2 Δερματική λείσμανίαση (CL, Baghdad/Jericho boil, Oriental sore)

Η δερματική λείσμανίαση (cutaneous leishmaniasis, CL) με 1-1,5 εκατομμύριο περιστατικά στον κόσμο κάθε χρόνο, αποτελεί την πιο διαδεδομένη μορφή της λείσμανίασης [73]. Η δερματική λείσμανίαση προκαλείται από διαφορετικά είδη παρασίτου *Leishmania* τα οποία προκαλούν διαφορετικές μορφές της δερματικής νόσου. Σε πολλές περιπτώσεις η δερματική λείσμανίαση αυτοθεραπεύεται.

Γενικά, η δερματική αλλοίωση εμφανίζεται σε μορφή οζιδίου στο σημείο του τσιμπήματος. Συνήθως το μέρος του σώματος που είναι εκτεθειμένο στη φλεβοτόμο, είναι το πρόσωπο και τα άκρα. Μια μορφή της δερματικής λείσμανίασης είναι η ξηρού τύπου, η οποία προκαλείται από τα παράσιτα *L. major* και *L. tropica*. Επίσης, ξηρού τύπου δερματικής λείσμανίασης μπορεί να προκληθεί και από τα παράσιτα του είδους *L. infantum* και *L. aethiopica* όπου όμως η δερματική αλλοίωση συνήθως μένει στο στάδιο του οζιδίου [74]. Σε διαφορετική περίπτωση, τα υπόλοιπα παράσιτα αρχικά προκαλούν δερματική αλλοίωση με τη μορφή της ερυθρηματώδους βλατίδας η οποία σε διάστημα κάποιων εβδομάδων αυξάνει σε διάμετρο και όγκο, γίνεται οζώδης, εξελκώνεται, εμφανίζει κεντρική εφελκίδα και βαθμιαία το οζίδιο μετατρέπεται σε στερεό. Οι δερματικές αλλοιώσεις μπορεί να επουλωθούν σε 3 μήνες έως 2 χρόνια, με πιο συνήθη τον 1 χρόνο.

Η δερματική λείσμανίαση υγρού τύπου προκαλείται από το παράσιτο του είδους *L. major* και μοιάζει με του ξηρού τύπου με τη διαφορά ότι στου υγρού τύπου υπάρχει επιπλέον νέκρωση της κεντρικής περιοχής και δημιουργία αιμορραγικής εφελκίδας, ενώ η αλλοίωση είναι μεγαλύτερης έκτασης από αυτήν του ξηρού τύπου. Οι αλλοιώσεις του υγρού τύπου επουλώνονται σε 2-8 εβδομάδες [75]. Παρόμοια συμπτώματα με την υγρού τύπου δερματικής λείσμανιάσης που προκαλείται από το παράσιτο του είδους *L. major* φαίνεται να προκαλούνται και μετά από μόλυνση από τα είδη του Νέου Κόσμου *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. peruviana*, *L. guyanensis*, *L. panamensis* και *L. braziliensis* [76].

Τέλος, μια σπάνια μορφή της δερματικής λείσμανιάσης είναι η επανομαζόμενη διάχυτη δερματική λείσμανίαση (Diffused cutaneous leishmaniases, DCL) και προκαλείται από το είδος *L. aethiopica*, και σε κάποιες περιπτώσεις από το είδος *L. amazonensis*. Σε αυτό το τύπο εμφανίζονται ευρείες οζώδεις δερματικές αλλοιώσεις, οι οποίες διατηρούνται για μεγάλο χρονικό διάστημα [77].



Εικόνα 19: Α, Β) Ασθενείς με δερματική λείσμανίαση [πηγή:[72]]., Γ) Δερματικές αλλοιώσεις που οφείλονται στην εμφάνιση της DCL [πηγή: [78]].

1.2.1.1.3 Βλεννογονοδερματική λείσμανίαση (MCL)

Το παράσιτο του είδους *L. braziliensis* είναι υπεύθυνο για την τρίτη κύρια κλινική μορφή της λείσμανιάσης τη βλεννογονοδερματική λείσμανίαση (mucocutaneous leishmaniasis, MCL ή espundia). Αυτή η μορφή της λείσμανιάσης εμφανίζεται ως δερματική λείσμανίαση. Στη συνέχεια, τα παράσιτα που βρίσκονται στις δερματικές αλλοιώσεις μεταναστεύουν μέσω του αίματος και των λεμφαγγείων στα όργανα του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος (λάρυγγα, φάρυγγα, οισοφάγο, ρινική και στοματική κοιλότητα) και προκαλούν εκεί τη δευτεροπαθή εκδήλωση της νόσου. Έτσι, μετά από την

πάροδο μηνών ή ετών προκαλούνται παραμορφωτικές βλάβες στα όργανα αυτά. Σε αντίθεση με τις αλλοιώσεις της δερματικής λείσμανιάσης, οι αλλοιώσεις της βλεννογονοδερματικής λείσμανιάσης δεν αυτό-επουλώνονται και πρέπει να χορηγηθεί άμεσα φαρμακευτική αγωγή για να μην προκληθούν προοδευτικά εκτεταμένες παραμορφωτικές αλλοιώσεις [77].



Εικόνα 20: Ασθενής με βλεννογονοδερματική λείσμανιάση [πηγή:[79]].

1.2.1.1.4 Ο ασυμπτωματικός παρασιτισμός

Υπάρχουν περιπτώσεις μολυσμένων ατόμων με το είδος *L. infantum* σε ενδημικές για την *Leishmania* περιοχές, οι οποίοι όμως δεν εκδηλώνουν κλινικά συμπτώματα της νόσου. Πιο συγκεκριμένα, μόνο 10-20% των μολυσμένων ατόμων τελικά εκδηλώνουν τα κλινικά συμπτώματα [80]. Τα μολυσμένα αυτά άτομα μπορεί να εκδηλώσουν τελικά τα κλινικά συμπτώματα όταν το ανοσοποιητικό τους σύστημα είναι ευάλωτο, για παράδειγμα σε παθολογικές καταστάσεις όπως μετά από μόλυνση από τον ιό HIV που προκαλεί σύνδρομο επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας [81]. Τα άτομα τα οποία είναι ασυμπτωματικά, είναι παρόλα αυτά «δεξαμενή» εξάπλωσης του παρασίτου και της νόσου, καθώς μπορούν να μολύνουν τις φλεβοτόμους κατά τη διάρκεια της διατροφής τους.

1.2.1.1.5 Συλλοίμωξη *Leishmania* / HIV

Οι ασθενείς με AIDS είναι γνωστό πως είναι ευαίσθητοι σε ευκαιριακές λοιμώξεις καθώς το ανοσοποιητικό τους σύστημα δεν μπορεί να τις αντιμετωπίσει εύκολα. Η μόλυνση με το παράσιτο *Leishmania* είναι επομένως αυξημένη καθώς το παράσιτο επιβιώνει μέσα στα κύτταρα του ανοσοποιητικού, τα οποία έχει ήδη εξασθενίσει ο ιός HIV, επιδεινώνοντας έτσι την κατάσταση του ασθενή και κάνοντας τον ακόμη πιο επιρρεπή σε ευκαιριακές λοιμώξεις [82].

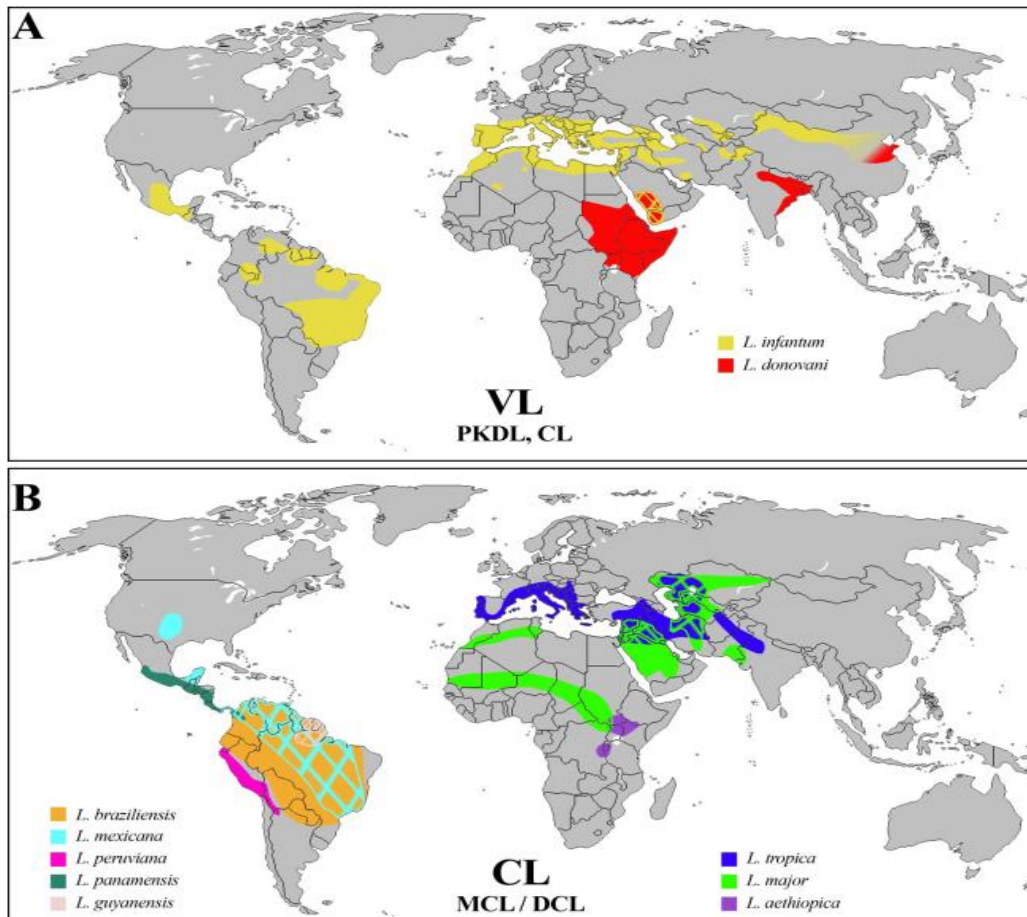
Αυτή η συλλοίμωξη *Leishmania*/HIV φαίνεται να απαντάται στην πλειοψηφία των ενδημικών χωρών για τη *Leishmania*, με μεγαλύτερα

ποσοστά να αναφέρονται στη νοτιοδυτική Ευρώπη (Ιταλία, Ισπανία, Γαλλία και Πορτογαλία), όπου ενδημεί το παράσιτο *L. infantum* [80, 82]. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, το 71% των ασθενών με συλλοίμωση *Leishmania*/HIV είναι χρήστες ενδοφλέβιων ουσιών [64] αυξάνοντας έτσι τη μετάδοση της νόσου σε αυτές τις περιοχές από άνθρωπο σε άνθρωπο αλλά και από φλεβοτόμο σε άνθρωπο καθώς τα άτομα αυτά λειτουργούν ως δυνητική δεξαμενή του παρασίτου, παρόλο που στην Ευρώπη η νόσος είναι κυρίως ζωνοτικού τύπου [83-85]. Ταυτόχρονα, τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μεγάλη αύξηση της συλλοίμωσης τόσο στις χώρες της Αφρικής όσο και στην Βραζιλία με αποτέλεσμα την αύξηση των θανάτων που οφείλονται στη σπλαχνική λείσμανίαση [86]

1.2.1.2 Γεωγραφική κατανομή

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η λείσμανίαση είναι διαδεδομένη σε όλες σχεδόν τις ηπείρους με εξαίρεση την Ανταρκτική, ενώ εμφανίζεται στις τροπικές και υποτροπικές περιοχές 88 χωρών. Από αυτές οι 72 είναι αναπτυσσόμενες και μάλιστα οι 13 είναι από τις λιγότερο αναπτυγμένες χώρες στον κόσμο [64, 87]. Παρόλα αυτά, οι υπόλοιπες 16 χώρες ανήκουν στις αναπτυγμένες χώρες.

Όσον αφορά τη σπλαχνική λείσμανίαση (VL), το 90% των περιστατικών καταγράφεται στις χώρες Σουδάν, Αιθιοπία, Κένυα, Ινδία, Μπαγκλαντές, Νεπάλ και Βραζιλία και μάλιστα η πλειοψηφία των περιστατικών είναι ανθρωπονοτικού τύπου και προκαλούνται από το παράσιτο του είδους *L. donovani* σε αντίθεση με τη Μεσόγειο, τη Νότια Αμερική και τις υπόλοιπες χώρες της Ασίας που η πλειοψηφία των περιστατικών σπλαχνικής λείσμανίασης που καταγράφονται είναι ζωνοτικού τύπου και προκαλούνται από το παράσιτο *L. infantum*. Τα ποσοστά θνησιμότητας της σπλαχνικής λείσμανίασης στις χώρες που δεν έχουν εύκολη πρόσβαση σε φαρμακευτική αγωγή είναι ιδιαίτερα υψηλά με χαρακτηριστικό παράδειγμα την επιδημία στο Νότιο Σουδάν κατά την περίοδο 1984-1994 όπου σημειώθηκαν 100.000 θάνατοι σε πληθυσμό μόλις 300.000 κατοίκων [64, 88].



Εικόνα 21: Γεωγραφική κατανομή ειδών *Leishmania* στον κόσμο: Α) Χάρτης σπλαχνικής λείσμανιάσης. *L. infantum* (VL, κίτρινο χρώμα), *L. donovani* (VL, PKDL, κόκκινο χρώμα), Β) Χάρτης δερματικής και βλεννογονοδερματικής λείσμανιάσης. *L. braziliensis* (CL, MCL πορτοκαλί χρώμα), *L. mexicana* (CL, γαλάζιο χρώμα), *L. peruviana* (CL, Ματζέντα χρώμα), *L. panamensis* (CL, σκούρο πράσινο χρώμα), *L. guyanensis* (CL, ρόζ χρώμα), *L. tropica* (CL, μπλε χρώμα), *L. major* (CL, έντονο πράσινο χρώμα) και *L. aethiopica* (CL, μοβ χρώμα). [πηγή: WHO [64]].

Όσον αφορά τη δερματική λείσμανιάση σχεδόν το 90% των περιστατικών παρουσιάζονται σε 7 χώρες: 5 στον Παλαιό Κόσμο (Αφγανιστάν, Αλγερία, Ιράν, Σαουδική Αραβία και Συρία) και 2 στο Νέο Κόσμο (Βραζιλία και Περού). Τέλος, το 90% των καταγεγραμμένων περιστατικών βλεννογονοδερματικής λείσμανιάσης απαντώνται σε χώρες του Νέου Κόσμου (Βραζιλία, Βολιβία, Περού).

1.2.1.3 Επιδημιολογία της Λείσμανιάσης

Τόσο τα είδη του παρασίτου όσο και τα τοπικά χαρακτηριστικά των περιοχών μετάδοσης που περιλαμβάνουν τα οικολογικά χαρακτηριστικά, τον πληθυσμό που κατοικεί σε αυτές τις περιοχές και τη προηγούμενη έκθεση του πληθυσμού αυτού στο παράσιτο, διαμορφώνουν την επιδημιολογία της λείσμανιάσης [64].

Η νόσος μεταδίδεται μέσω του ασπόνδυλου ξενιστή αλλά σε πολύ σπάνιες περιπτώσεις μπορεί να μεταδοθεί και μέσω της χρήσης κοινών συρίγγων μεταξύ των χρηστών ενδοφλέβιων ουσιών, μέσω μετάγγισης αίματος και από τη μητέρα στο έμβρυο [46]. Συνήθως, τα άτομα που προσβάλλονται σε ενδημικές περιοχές από το είδος *L. infantum* με σπλαχνική λεισμανίαση είναι τα παιδιά κάτω των 5 ετών, ενώ σε περιοχές ενδημικές στο είδος *L. donovani* (Ασία, Αφρική) προσβάλλονται συνήθως άτομα ηλικίας 13-23 χρονών. Σε γενικές γραμμές, πληθυσμοί που έχουν επαφή με το παράσιτο για μεγάλη χρονική περίοδο, αποκτούν ανοσία, παρόλα αυτά οι ανοσοκατεσταλμένοι/ανοσοανεπαρκείς άνθρωποι πάντα διατρέχουν κίνδυνο να νοσήσουν αν μολυνθούν με το παράσιτο [89].

Υπάρχουν περιοχές όπου η νόσος απαντάται κυρίως στη ζωνοτική της μορφή και σε άλλες όπου απαντάται κυρίως στην ανθρωπονοτική της μορφή όπως στην περίπτωση της σπλαχνικής λεισμανίασης στην Ινδική χερσόνησο και κατά τη διάρκεια επιδημικών εξάρσεων στην Ανατολική Αφρική [64]. Παρόλα αυτά, εξωγενείς παράγοντες όπως οι ραγδαίες μεταβολές των περιβαλλοντικών και κλιματολογικών συνθηκών (αύξηση της θερμοκρασίας, συχνότητα βροχοπτώσεων) και οι κοινωνικοπολιτικές αλλαγές (μετανάστευση πληθυσμών, αύξηση της φτώχειας σε αναπτυσσόμενες χώρες) επηρεάζουν τους ενδογενείς παράγοντες της νόσου (αλληλεπιδράσεις μεταξύ ξενιστή, παρασίτου και φορέα). Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στην ικανότητα τόσο των ειδών *Leishmania* όσο και των ενδιάμεσων ξενιστών να αναπτύσσουν μηχανισμούς που τους επιτρέπουν να προσαρμόζονται και να εξελίσσονται [89-91].

Η λεισμανίαση εκτός από μία από τις πιο παραμελημένες ασθένειες, έχει χαρακτηριστεί και ως νόσος της φτώχειας καθώς η έλλειψη πόρων αυξάνει την πιθανότητα εμφάνισης της νόσου [92]. Εκτός από την δύσκολη πρόσβαση στη φαρμακευτική αγωγή, οι συνθήκες οίκησης και συνθήκες υγιεινής παίζουν σημαντικό ρόλο στην αύξηση της αναπαραγωγής των σκνιπών και επομένως στην εξάπλωση της νόσου. Σημαντικό ρόλο παίζει επίσης και η διατροφή, καθώς φτωχή διατροφή μπορεί να αυξήσει την πιθανότητα εμφάνισης σπλαχνικής λεισμανίασης. Τέλος, η έξαρση του φαινομένου της οικονομικής ή για πολιτικούς λόγους μετανάστευσης, μπορεί

να οδηγήσει στην είσοδο ατόμων σε ενδημικές για τη νόσο περιοχές, ή στην είσοδο μολυσμένων ατόμων σε μη ενδημικές περιοχές ή ακόμη να οδηγήσει στη μεταφορά καινούριων στελεχών παρασίτου σε περιοχές που δεν προϋπήρχε η νόσος ή το είδος αυτό του παρασίτου [64].

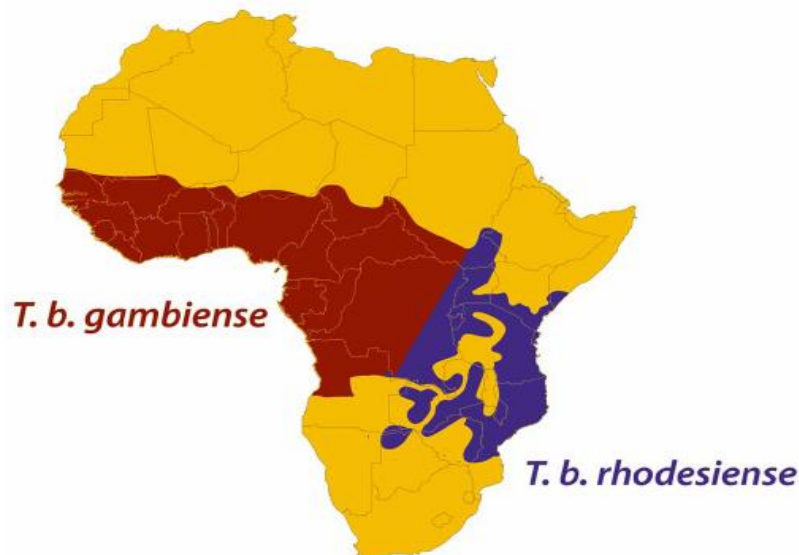
1.2.1.4 Λεισμανίαση στην Ελλάδα

Όπως σε όλες τις μεσογειακές χώρες έτσι και στη Ελλάδα αναφέρεται η νόσος με το πρώτο περιστατικό να καταγράφηκε το 1907 στην Κρήτη. Τα περιστατικά φαίνεται να αυξάνονται κατά τη δεκαετία του 1940, όπου 160 περιστατικά σπλαχνικής λεισμανίασης στον άνθρωπο αναφέρονται ετησίως. Στη συνέχεια, τα κρούσματα φαίνονται να μειώνονται. Το υπουργείο Υγείας έχει καταγράψει 1005 περιστατικά σπλαχνικής λεισμανίασης στην Αττική μόνο, στο διάστημα 1962 έως το 1992 [93]. Μετά το 1992, φαίνεται να αυξάνεται ο αριθμός των κρουσμάτων ιδιαίτερα σε συγκεκριμένες περιοχές όπως στο Λασιθί στην Ανατολική Κρήτη και στην Αττική [42]. Στην Ελλάδα έχουν απομονωθεί τόσο το στέλεχος *L. infantum* από ανθρώπους και σκύλους με σπλαχνική λεισμανίαση, όσο και το στέλεχος *L. tropica* από δερματικές αλλοιώσεις [42, 94, 95]. Τα τελευταία χρόνια, τα κοινωνικοπολιτικά γεγονότα στη λεκάνη της Μεσογείου καθώς και οι πολεμικές συρράξεις και η οικονομική κρίση, προκάλεσαν εκτεταμένες εκτοπίσεις και μετακινήσεις πληθυσμιακών ομάδων από χώρες ενδημικές στη νόσο προς την περιοχή της Ευρώπης και ειδικότερα στο ανατολικό της άκρο στην Ελλάδα, καθώς και αύξηση της φτώχειας στον ελλαδικό χώρο. Τα παραπάνω σε συνδυασμό με τις κλιματολογικές αλλαγές έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση της διάδοσης της νόσου βορειότερα, ακόμη και σε μέχρι πρότινος μη ενδημικές Ευρωπαϊκές Χώρες, την εν γένει αύξηση των περιστατικών και την επέκταση των δυνητικών περιοχών εκκόλαψης και διαβίωσης των ξενιστών του παρασίτου, πιο κοντά στα μεγάλα αστικά κέντρα [89]. Επομένως, τα καταγεγραμμένα πλέον περιστατικά αυξάνονται με την πλειονότητα όμως αυτών να μην είναι αυτόχθονα, αλλά εισαγόμενα [96, 97].

1.2.2 Ανθρώπινη Αφρικανική Τρυπανοσωμίαση (HAT, ασθένεια του ύπνου)

Η Αφρικανική Τρυπανοσωμίαση είναι μια παραμελημένη τροπική ασθένεια η οποία προκαλείται από το παράσιτο του γένους *Trypanosoma* και

μεταδίδεται στα θηλαστικά από τον ασπόνδυλο ξενιστή του γένους *Glossina*. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας χαρακτηρίζει τη νόσο ως μία από τις πιο θανατηφόρες ασθένειες καθώς αν δε χορηγηθεί φαρμακευτική αγωγή σχεδόν πάντα οδηγεί σε θάνατο [98, 99]. Η Αφρικανική Τρυπανοσωμίαση ζωνοτικού τύπου (AAT) μολύνει σχεδόν 50 εκατομμύρια βοοειδή το χρόνο από τα οποία τα 3 εκατομμύρια περιστατικά καταλήγουν στο θάνατο. Το γεγονός αυτό έχει σοβαρό αντίκτυπο στην οικονομία η οποία στηρίζεται στην εκτροφή βοοειδών στην Υποσαχάρια Αφρική [100]. Η Αφρικανική Τρυπανοσωμίαση ζωνοτικού τύπου προκαλείται από τα παράσιτα *T. congolense*, *T. vivax*, *T. evansi*, *T. brucei brucei* στα βοοειδή και εμφανίζεται με τη μορφή της νόσου 'nagana', ενώ στα άλογα εμφανίζεται με τη μορφή της νόσου 'dura' για την οποία ευθύνονται τα παράσιτα του γένους *T. equiperdum*.



Εικόνα 22: Γεωγραφική κατανομή ειδών *Trypanosoma brucei* (*T. b. gambiense* και *T. b. rhodesiense*) στην Αφρική [πηγή: Lopes et al. [7]].

Η Ανθρώπινη Αφρικάνικη Τρυπανοσωμίαση (HAT) παρατηρείται σε 36 χώρες της Υποσαχάριας Αφρικής δηλαδή στο 1/3 της Αφρικανικής ηπείρου. Περίπου 70 εκατομμύρια άνθρωποι διατρέχουν κίνδυνο να μολυνθούν από τη νόσο. 500.000 άτομα είναι ήδη μολυσμένα από το παράσιτο και κάθε χρόνο περίπου 70.000 νέα περιστατικά καταγράφονται [101]. Η HAT μπορεί να προκληθεί από τα παράσιτα του υποείδους *T. brucei rhodesiense* στις περιοχές της ανατολικής και νότιας Αφρικής και του υποείδους *T. brucei gambiense* στις περιοχές της κεντρικής και δυτικής Αφρικής (εικόνα 22). Τα 2

αυτά υποείδη δεν είναι δυνατόν να διαχωριστούν μορφολογικά αλλά μόνο γονιδιακά.

1.2.2.1 Κλινικές μορφές της νόσου HAT

Αμέσως μετά το τσίμπημα από τη μολυσμένη μύγα *tsetse*, στα αρχικά στάδια της νόσου, τα παράσιτα *T. brucei* εισέρχονται στο αίμα και στα λεμφικά υγρά του ξενιστή και αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται. Τα συμπτώματα κατά τη διάρκεια αυτού του σταδίου συμπεριλαμβάνουν ρίγη, πυρετό, πονοκέφαλο, πόνο στις αρθρώσεις, αδυναμία και λεμφαδενοπάθεια. Τα άτομα που μολύνονται μπορεί να μην εκδηλώσουν τα συμπτώματα των αρχικών σταδίων κατευθείαν. Επίσης, η εμφάνιση διογκωμένων λεμφαδένων, ήπατος και σπλήνας είναι χαρακτηριστική εικόνα ανταπόκρισης του ανοσοποιητικού στη νόσο.

Στη συνέχεια, τα παράσιτα διαπερνούν το αιματοεγκεφαλικό φράγμα και εισέρχονται στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ). Στο στάδιο αυτό της νόσου ο ασθενής υποφέρει από νευρολογικές διαταραχές καθώς εμφανίζονται δριμύτατοι πονοκέφαλοι, αϋπνίες, σπασμοί και ψυχιατρικές διαταραχές. Αν δεν χορηγηθεί φαρμακευτική αγωγή, η νόσος εξελίσσεται και ο ασθενής εκδηλώνει δριμύτατους σπασμούς, υπνηλία και τελικά πέφτει σε κώμα και επέρχεται ο θάνατος [52].



Εικόνα 23: Περιστατικό Ανθρώπινης Αφρικανικής τρυπανοσωμίας. Ασθενής στο τελευταίο στάδιο της νόσου.

1.2.2.2 Επιδημιολογία της HAT

Όντας μια από τις παραμελημένες ασθένειες, η HAT μολύνει κυρίως φτωχούς πληθυσμούς που κατοικούν σε απομακρυσμένες αγροτικές περιοχές. Σπάνια περιστατικά έχουν καταγραφεί στις αστικές περιοχές αλλά σε κάποιες ενδημικές χώρες έχουν διαπιστωθεί κρούσματα στα προάστια μεγάλων πόλεων. Παρόλα αυτά, οι ταξιδιώτες από άλλες μη ενδημικές χώρες διατρέχουν κίνδυνο να προσβληθούν από τη νόσο όταν περάσουν από αυτές τις ενδημικές περιοχές που το έντομο μύγα *tsetse* ενδημεί. Αυτοί μάλιστα είναι

πιο ευάλωτοι στη μόλυνση καθώς δεν έχουν έρθει ποτέ πριν σε επαφή με το παράσιτο και τον ασπώνδυλο φορέα.

Πάνω από 90% των συνολικών κρουσμάτων της HAT προκαλούνται από το παράσιτο του υποείδους *T. brucei gambiense* το οποίο ενδημεί στις περιοχές της κεντρικής και δυτικής Αφρικής. Το υποείδος αυτό έχει το χαρακτηριστικό ότι για να επέλθει το τελικό στάδιο της νόσου όπου τα παράσιτα εισβάλουν στο ΚΝΣ περνάνε αρκετοί μήνες, ενώ το τελικό στάδιο της ασθένειας μπορεί να διαρκέσει αρκετά χρόνια [102, 103]. Αντίθετα, το υποείδος *T. brucei rhodesiense* το οποίο ενδημεί στις περιοχές της ανατολικής και νότιας Αφρικής και το οποίο είναι υπεύθυνο για λιγότερο από το 10% των συνολικών κρουσμάτων της HAT, προκαλεί την πιο επιθετική μορφή της νόσου όπου σε μόλις μερικές εβδομάδες το παράσιτο περνά στο ΚΝΣ και το τελικό στάδιο της ασθένειας προκαλεί θάνατο μέσα σε 3 μήνες από την αρχική μόλυνση [98, 99, 104, 105].

Το 1995 ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας εκτίμησε πως οι άνθρωποι που διατρέχουν κίνδυνο μόλυνσης από τη νόσο ανέρχονταν σε 60 εκατομμύρια, με 300.000 εκτιμώμενα νέα κρούσματα κάθε χρόνο. Από αυτά, λιγότερο από 30.000 κρούσματα καταγράφονταν και προχωρούσαν σε φαρμακευτική αγωγή. Το 2004, τα νέα κρούσματα καταγράφουν πτώση στα περίπου 17.616 ετησίως. Ο εκτιμώμενος αριθμός των πραγματικών κρουσμάτων επίσης σημείωσε πτώση στα 50.000 μέχρι 70.000 ετησίως. Το 2009, τα καταγραφέντα κρούσματα σημείωσαν επιπλέον πτώση και για πρώτη φορά μετά από 50 χρόνια ήταν κάτω από 10.000, ενώ τα πραγματικά κρούσματα ανέρχονταν πλέον στα 30.000. Η θετική αυτή εξέλιξη οφείλεται στην προσπάθεια που κάνει ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας να θέσει σε έλεγχο την ασθένεια και να ενημερώσει τους κατοίκους των ενδημικών περιοχών [101].

1.2.3 Ανθρώπινη Αμερικάνικη Τρυπανοσωμίαση (Chagas Disease)

Η Ανθρώπινη Αμερικάνικη Τρυπανοσωμίαση (Chagas Disease), η οποία πήρε το όνομά της από τον Carlos Chagas που ανακάλυψε τον μηχανισμό μετάδοσής της και τη συνέδεσε με τα καρδιολογικά προβλήματα, είναι μια παρασιτική ασθένεια η οποία προκαλείται από τα παράσιτα του γένους *T. cruzi* και μεταδίδεται μέσω των περιττωμάτων του εντόμου

Triatomine. Η ασθένεια αυτή είναι ενδημική στην κεντρική και νότια Αμερική και συγκεκριμένα σε 21 χώρες της λατινικής Αμερικής. Εκτιμάται πως 7-8 εκατομμύρια άνθρωποι έχουν μολυνθεί παγκοσμίως με το μεγαλύτερο μέρος των κρουσμάτων να απαντάται στη Λατινική Αμερική. Η Ανθρωπίνη Αμερικάνικη Τρυπανοσωμίαση είναι υπεύθυνη για τους περισσότερους θανάτους από παρασιτική ασθένεια στη Λατινική Αμερική [106]. Τις τελευταίες δεκαετίες, υπάρχουν αυξανόμενα κρούσματα και στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, στον Καναδά αλλά και στην Ευρώπη. Το φαινόμενο αυτό φαίνεται να συνδέεται με τις μετακινήσεις πληθυσμών ανάμεσα στη Λατινική Αμερική και τις άλλες χώρες [7].

Η ασθένεια αυτή είναι θεραπεύσιμη αν χορηγηθεί φαρμακευτική αγωγή αμέσως μετά τη μόλυνση από το παράσιτο. Σε διαφορετική περίπτωση, η ασθένεια επέρχεται στη χρόνια φάση της, όπου το περίπου 30% των κρουσμάτων θα αναπτύξουν καρδιολογικά προβλήματα ενώ περίπου 10% των κρουσμάτων θα αναπτύξουν γαστρεντερικά ή/και νευρολογικά προβλήματα [101].

Το κόστος θεραπείας της ασθένειας παραμένει υψηλό και για το λόγο αυτό ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας προσπαθεί να ελέγξει τη μετάδοση της ασθένειας με τον έλεγχο των εντόμων φορέων.

1.2.3.1 Κλινικές μορφές της Αμερικάνικης Τρυπανοσωμίας

Η Αμερικάνικη Τρυπανοσωμίαση, όπως και η ΗΑΤ, έχει 2 φάσεις εκδήλωσης της ασθένειας. Αρχικά, η οξεία φάση ξεκινά με τη μόλυνση του τελικού ξενιστή από το παράσιτο μέσω του μολυσμένου εντόμου και διαρκεί για περίπου 2 μήνες. Στη διάρκεια αυτή των 2 μηνών τα παράσιτα κυκλοφορούν στο αίμα και πολλαπλασιάζονται στα μακροφάγα του ξενιστή. Τα πρώτα συμπτώματα που εκδηλώνονται είναι ήπια ή περνάνε και απαρατήρητα κάποιες φορές. Σε αυτά τα συμπτώματα συμπεριλαμβάνονται πυρετός, πονοκέφαλος, πόνοι μυών, διογκωμένοι λεμφαδένες, ωχρότητα, δυσκολία στην αναπνοή και στην κατάποση και κοιλιακό ή θωρακικό πόνο. Μερικές φορές, σε λιγότερο από το 50% των κρουσμάτων μετά το τσίμπημα εμφανίζεται μια χαρακτηριστική δερματική πληγή ή οίδημα στο μέρος του τσίμπηματος [101, 107].

Σε περίπτωση που δε χορηγηθεί φαρμακευτική αγωγή στην οξεία φάση της ασθένειας, τότε τα παράσιτα κρύβονται στους ιστούς (κυρίως στη καρδιά ή το πεπτικό σύστημα) και η ασθένεια περνά στην χρόνια μορφή της [108]. Σε αυτή τη φάση, το περίπου 30% των κρουσμάτων αναπτύσσουν καρδιομυοπάθειες [109, 110] ενώ περίπου 10% των κρουσμάτων αναπτύσσουν γαστρεντερικά (μεγέθυνση του εντέρου ή του οισοφάγου) ή/και νευρολογικά προβλήματα [55, 109, 111, 112]. Στα επόμενα χρόνια, η ασθένεια μπορεί να οδηγήσει σε ξαφνικό θάνατο από καρδιακή προσβολή ή από προοδευτική καταστροφή του καρδιακού μυ.

Τέλος, η εγκεφαλική μορφή της νόσου είναι μια σπάνια επιπλοκή της οξείας φάσης της ασθένειας [56, 111, 113]. Η μορφή αυτή της ασθένειας φαίνεται επίσης να εμφανίζεται όταν το ανοσοποιητικό σύστημα μολυσμένων ασθενών στη χρόνια φάση της νόσου καταστεί ανεπαρκές λόγω μόλυνσης με τον ιό του HIV ή μετά από συγκεκριμένη θεραπευτική αγωγή. Στην περίπτωση αυτή, η ασθένεια φαίνεται να επανενεργοποιείται στο ΚΝΣ [111, 114].

1.2.3.2 Επιδημιολογία της Ανθρώπινης Αμερικάνικης Τρυπανοσωμίας

Η Ανθρώπινη Αμερικάνικη Τρυπανοσωμίαση όπως ήδη αναφέρθηκε αρχικά περιοριζόταν σε 21 χώρες της κεντρικής και νότιας Αμερικανικής ηπείρου (Μεξικό, και χώρες της κεντρικής και νότιας Αμερικής). Στις περιοχές αυτές 8 εκατομμύρια άνθρωποι έχουν μολυνθεί από το παράσιτο *T. cruzi* μέσω των περιπτώσεων του εντόμου *Triatoma*. Άτομα που κατοικούν σε αγροτικές περιοχές και οι συνθήκες διαβίωσης είναι δύσκολες είναι οι πιο επιρρεπείς να μολυνθούν από το παράσιτο. Επίσης, σε σπάνιες περιπτώσεις έχει διαπιστωθεί και μόλυνση μετά από μετάγγιση αίματος, μεταμόσχευση οργάνων ή και από τη μητέρα σε έμβryo μέσω του πλακούντα [60-62].

Το πρόβλημα εξάπλωσης της Ανθρώπινης Αμερικάνικης Τρυπανοσωμίας καθίσταται πλέον παγκόσμιο φαινόμενο λόγω της μετανάστευσης των πληθυσμών από τη Λατινική Αμερική σε άλλες μη ενδημικές περιοχές [115]. Το 2007, το κέντρο ελέγχου ασθενειών των Η.Π.Α. (CDC) εκτίμησε ότι περίπου 340.000 μετανάστες μολυσμένοι με το παράσιτο *T. cruzi* κατοικούν στις Η.Π.Α. από τα οποία τα 65.000 είχαν εκδηλώσει συμπτώματα της ασθένειας [115, 116]. Τέτοια περιστατικά έχουν καταγραφεί

και στο Καναδά, σε Ευρωπαϊκές χώρες, στην Αυστραλία και την Ιαπωνία. Τα άτομα αυτά έχουν μολυνθεί πριν την μετανάστευση τους από τη Λατινική Αμερική αλλά υπάρχει πάντα ο κίνδυνος της επιπλέον εξάπλωσης της νόσου καθώς για παράδειγμα στις Η.Π.Α. ενδημεί έντομο του γένους *Triatomine*. Γενικά λοιπόν, ο έλεγχος για περιορισμό της νόσου και της εξάπλωσης αυτής τόσο σε παγκόσμιο αλλά και σε τοπικό επίπεδο, είναι επιτακτική ανάγκη.



Εικόνα 24: Γεωγραφική κατανομή του είδους *Trypanosoma cruzi* στον κόσμο [πηγή: Lopes *et al.* [7]].

1.3 Διάγνωση

1.3.1 Διάγνωση της λεισμανίασης

Η διάγνωση της λεισμανίασης γίνεται αρχικά με τη κλινική παρατήρηση και στη συνέχεια επιβεβαιώνεται με παρασιτολογική διάγνωση ή με ορολογικές και μοριακές μεθόδους.

Εφόσον, η κλινική παρατήρηση του ασθενούς υποδεικνύει ότι έχει μολυνθεί από το παράσιτο *Leishmania*, τότε λαμβάνεται δείγμα από τη δερματική πληγή (σε περίπτωση δερματικής λεισμανίασης), ή από τους ιστούς (μυελός των οστών, σπλήνα, ήπαρ, λεμφογάγγλια σε περίπτωση σπλαχνικής λεισμανίασης) και ελέγχονται τα επιχρίσματα αυτών μετά από χρώση Giemsa για πιθανή ύπαρξη αμαστιγωτών μορφών του παρασίτου. Επίσης, σε κάποιες περιπτώσεις γίνεται προσπάθεια απομόνωσης του παρασίτου από τους ιστούς αυτούς. Η χαμηλή ευαισθησία είναι ένα κύριο μειονέκτημα της μεθόδου αυτής ιδιαίτερα σε ασυμπτωματικούς ασθενείς.

Μια πιο ευαίσθητη και αποτελεσματική μέθοδος είναι η μοριακή διάγνωση με την τεχνική της PCR για την ανίχνευση DNA του παρασίτου από δείγματα που λαμβάνονται από τους ιστούς ή το αίμα των ασθενών. Για την

ανίχνευση του παρασιτικού DNA έχουν επιλεγεί διάφορες αλληλουχίες του γενωμικού DNA αλλά και του kDNA οι οποίες επαναλαμβάνονται στο γονιδίωμα του παρασίτου. Τα γονίδια *SSU rRNA* [117], *ITS1 rRNA* [118], του κινητοπλαστικού DNA [119], τα γονίδια *mini exon* [120] και οι επαναλαμβανόμενες μη-κωδικές περιοχές [121] είναι χαρακτηριστικές αλληλουχίες οι οποίες ενισχύονται για την ανίχνευση του παρασίτου. Η μοριακή μέθοδος με την τεχνική της PCR είναι αξιόπιστη και με πολύ υψηλά όρια ανίχνευσης (10^{-3} παράσιτα/ml αίματος για την ανίχνευση κινητοπλαστικού DNA και 5πάρσιτα/ml αίματος για την ενίσχυση γονιδίων *SSU rRNA*) [122] και χρησιμοποιείται μόνο σε εξειδικευμένα εργαστήρια και νοσοκομεία. Εφαρμόζεται όμως με επιτυχία για όλες τις μορφές της νόσου (δερματική, σπλαχνική, HIV-λείσμανίαση) ακόμα και στις ασυμπτωματικές μολύνσεις.

Η ομάδα του εργαστηρίου Μοριακής Παρασιτολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ έχει αναπτύξει μια επίσης αξιόπιστη μοριακή τεχνική ανίχνευσης και ταυτόχρονα τυποποίησης των στελεχών *L. donovani* [123], η οποία βασίζεται στην ενίσχυση του γονιδίου *K26* από παράσιτα ή από δείγματα ασθενών. Η ταυτοποίηση και τυποποίηση του είδους των στελεχών που ανήκουν στο σύμπλεγμα *L. donovani* βασίζεται στο πολυμορφισμό που υπάρχει στο γονίδιο αυτό ανάμεσα στα είδη του παρασίτου, γεγονός που οδηγεί σε διαφορετικό μέγεθος προϊόντος με τη μέθοδο της *K26-PCR*.

Τέλος, μια απλούστερη μέθοδος για τη διάγνωση της ασθένειας είναι η ανοσολογική ορολογική διάγνωση μέσω της ανίχνευσης των ειδικών για τη *Leishmania* αντισωμάτων που παράγονται κατά τη μόλυνση του ασθενή με σπλαχνική και διάχυτη δερματική λείσμανίαση. Στη δερματική λείσμανίαση, ο τίτλος των αντισωμάτων είναι πολύ χαμηλός και επομένως σε αυτές τις περιπτώσεις δε μπορεί να χρησιμοποιηθεί αυτή η μέθοδος. Έως σήμερα έχουν αναπτυχθεί διάφοροι τύποι ανοσολογικής ορολογικής διάγνωσης. Μερικοί από αυτούς είναι ο έμμεσος ανοσοφθορισμός (IFA) με ειδικότητα 70-89% και ευαισθησία 55-70%, η ανοσοενζυμική δοκιμασία (ELISA) με ειδικότητα 84-100% και ευαισθησία 63-100% και η άμεση συγκόλληση (DAT) με ειδικότητα 72-95% και ευαισθησία 91-100% [124]. Επίσης, έχουν αναπτυχθεί και ορολογικά τεστ τα οποία βασίζονται στην αναγνώριση του αντιγόνου rk39 από τα αντισώματα του ορού (Corixa Corp®, InBiosInc®,

DiaMed IT®) με ειδικότητα 88-100% [124]. Οι προαναφερθέντες ορολογικές μέθοδοι δεν μπορούν να εφαρμοστούν σε άτομα με χαμηλούς ή ανύπαρκτους τίτλους αντισωμάτων όπως είναι οι ασθενείς με HIV, τα ασυμπτωματικά μολυσμένα άτομα καθώς και στα άτομα που πιθανόν να έχουν δερματική λεϊσμανίαση. Ένα άλλο μειονέκτημα τους είναι ότι δεν μπορούν να διακρίνουν αν τα αντισώματα που ανιχνεύουν είναι από παλιά ή νέα μόλυνση. Τα μειονεκτήματα αυτά δεν υπάρχουν στη μέθοδο KATEx, η οποία βασίζεται στην ανίχνευση ενός σταθερού μη πρωτεϊνικού αντιγόνου στα ούρα των ασθενών με ενεργή νόσο (ευαισθησία 68-100%) [124].

1.3.2 Διάγνωση της Ανθρώπινης Αφρικανικής Τρυπανοσωμίας (HAT)

Η διάγνωση της HAT γίνεται όταν δεν υπάρχουν άλλες πιο ειδικές μέθοδοι, με κλινική παρατήρηση. Η κλινική παρατήρηση έχει ως άμεσο σκοπό να εντοπιστεί μικροσκοπικά το παράσιτο σε αίμα, στο λεμφικό υγρό ή άλλα υγρά του ασθενή. Υπάρχει μια ποικιλία μικροσκοπικών μεθόδων, η ειδικότητα των οποίων είναι 100% αλλά η ευαισθησία ποικίλει και είναι πολύ χαμηλή σε κάποιες περιπτώσεις. Η πιο απλή ανίχνευση γίνεται μέσω χρήσης υγρού φιλμ του παρασίτου σε αίμα ή λεμφικό υγρό με ευαισθησία 3-54% [125-127]. Επίσης, υπάρχουν και η TBF (Thick blood films) με ευαισθησία 25-100% [125-127], η LNA (Lymph node aspirate) η οποία χρησιμοποιείται περισσότερο από κάθε άλλη μικροσκοπική μέθοδο με ευαισθησία 18-63% [128], η mHCT (mini haematocrit centrifugation technique) με ευαισθησία 44-93% [129-132], η QBC (Quantitative buffy Coat) με ευαισθησία 100% [131, 132] και η mAECT (mini Anion Exchange centrifugation technique) με ευαισθησία 75-90% [133-135]. Με τις μικροσκοπικές μεθόδους μπορούν να αναγνωριστούν τα άτομα που έχουν μολυνθεί και από τα 2 είδη παρασίτων *T. b. rhodesiense* και *T. b. gambiense* αλλά συνήθως εντοπίζονται όταν η ασθένεια έχει περάσει στη δεύτερη φάση και τα παράσιτα έχουν περάσει στο ΚΝΣ.

Όσον αφορά το παράσιτο *T. b. gambiense* το οποίο ευθύνεται για το πάνω από 90% των περιπτώσεων HAT, έχουν αναπτυχθεί διάφορες ορολογικές μέθοδοι που ανιχνεύουν τα αντισώματα που παράγει ο οργανισμός όταν έρχεται σε επαφή με το παράσιτο. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιούνται οι 3 τύποι της CATT (Card Agglutination Trypanosomiasis Test) οι οποίοι χρησιμοποιούν το αντιγόνο LiTat 1.3 και εφαρμόζονται στο

αίμα, στο πλάσμα ή στο λεμφικό υγρό του ασθενή [136, 137] με ευαισθησία 68-100% και ειδικότητα 58-100% [135] και οι μέθοδοι LATEX/*T. b. gambiense* [138] και ELISA [137] οι οποίες ανιχνεύουν τα ίδια αντισώματα (LiTat 1.3, 1.5 και 1.6) με ευαισθησία 67-100% και 82-100% αντίστοιχα και ειδικότητα 96-99% και 94-100% αντίστοιχα. Επίσης, χρησιμοποιούνται και οι μέθοδοι IFAT (indirect fluorescent antibody test) με ειδικότητα 99-100% και ευαισθησία 75-99% [101] και ITT (immune trypanolysis test) με ειδικότητα 100% και ευαισθησία 97-100% [139, 140].

Οι ορολογικές μέθοδοι σε συνδυασμό με τις μικροσκοπικές μεθόδους μπορούν να διαγνώσουν την ασθένεια και σε ποια φάση βρίσκεται. Παρόλα αυτά, υπάρχουν περιπτώσεις που δεν μπορούν να βγουν συμπεράσματα καθώς δεν συμπίπτουν τα αποτελέσματα των μικροσκοπικών με αυτά των ορολογικών. Σε αυτές τις περιπτώσεις, πρέπει να επαναληφθεί ο έλεγχος ή να γίνει προσδιορισμός μέσω των μοριακών μεθόδων. Οι μοριακές μέθοδοι είναι πιο αξιόπιστες και αποτελεσματικές και βασίζονται στην τεχνική της PCR για την ανίχνευση DNA του παρασίτου από δείγματα που λαμβάνονται από το αίμα ή λεμφικό υγρό των ασθενών. Για την ανίχνευση του παρασιτικού DNA έχουν επιλεγεί διάφορες αλληλουχίες του γενωμικού DNA αλλά και του kDNA οι οποίες επαναλαμβάνονται στο γονιδίωμα του παρασίτου και με τον τρόπο αυτό μπορούν να διακριθούν και τα υποείδη του παρασίτου [141]. Για να γίνει διάκριση ανάμεσα στα 2 παθογόνα για τον άνθρωπο παράσιτα *T. b. rhodesiense* και *T. b. gambiense*, ενισχύονται τα γονίδια SRA (serum-resistance-associated protein) και TgsGP (*T. b. gambiense*-specific glycoprotein) αντίστοιχα [142]. Στην κατηγορία των μοριακών τεχνικών διάγνωσης συμπεριλαμβάνονται επίσης και οι τεχνικές: α) LAMP (loop-mediated isothermal amplification) η οποία μπορεί να εφαρμοστεί και σε εργαστήρια με λιγότερο εξοπλισμό και έχει ευαισθησία 75% και ειδικότητα 100% [143], β) NASBA (nucleic acid sequence based amplification) με ευαισθησία 69% και ειδικότητα 100% [144] και γ) OC (oligochromatography) η οποία πραγματοποιείται σε DNA ή RNA που έχει ενισχυθεί με τη μέθοδο της PCR ή τη NASBA και έχει ευαισθησία 73-97% και ειδικότητα 99-100% [145-147].

1.3.3 Διάγνωση της Ανθρώπινης Αμερικάνικης Τρυπανοσωμίας (Chagas Disease)

Η διάγνωση της Αμερικάνικης Τρυπανοσωμίας είναι πιο περίπλοκη από τη διάγνωση των προηγούμενων 2 παρασιτικών ασθενειών καθώς το παράσιτο *T. cruzi* στην οξεία φάση της ασθένειας είναι μεν σε μεγάλο αριθμό στο αίμα και στους ιστούς του ασθενή ώστε να μπορεί να εντοπιστεί, στη χρόνια όμως φάση τα παράσιτα είναι κρυμμένα στους ιστούς (καρδιακού ή πεπτικού συστήματος) γεγονός που καθιστά δύσκολη τη διάγνωση της νόσου.

Για την οξεία φάση της ασθένειας όπως επίσης και στην επανεμφάνιση της νόσου λόγω ανοσοανεπάρκειας του ασθενή, όπου ο αριθμός των παρασίτων είναι ιδιαίτερα υψηλός στο αίμα, η διάγνωση είναι πολύ εύκολη με τη μικροσκοπική ανάλυση και τη χρώση των παρασίτων. Επίσης χρησιμοποιούνται και μέθοδοι συμπύκνωσης αίματος όπως η τροποποιημένη μέθοδος Strout για τη εξάπλωση της ασθένειας μέσω πλακούντα [148].

Ο αριθμός των παρασίτων μειώνεται δραματικά μετά από λίγους μήνες και η ασθένεια περνά στη δεύτερη φάση όπου είναι αδύνατον να εντοπιστούν παράσιτα στο αίμα. Για το λόγο αυτό έχουν αναπτυχθεί ορολογικές μέθοδοι για να ανιχνεύουν τα αντισώματα που έχουν αναπτύξει οι ασθενείς για την αντιμετώπιση του παρασίτου. Εδώ πρέπει να σημειωθεί ότι μια και μόνο ορολογική μέθοδος δεν είναι αρκετά αξιόπιστη ή ευαίσθητη για να τεκμηριώσει την ύπαρξη της ασθένειας. Επομένως, 2 ή περισσότερες ορολογικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται κάθε φορά ή χρησιμοποιείται η ίδια μέθοδος αλλά με αναγνώριση αντισωμάτων μέσω 2 ή περισσότερων αντιγόνων για να καταλήξουμε σε αξιόπιστο αποτέλεσμα. Στις ορολογικές μεθόδους συμπεριλαμβάνονται η ELISA, η ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (western blot) και η IFA (immunofluorescent antibody test) [149].

Οι μοριακές τεχνικές με τη τεχνική της PCR για εντοπισμό DNA του παρασίτου χρησιμοποιούνται μόνο για ερευνητικούς σκοπούς μέχρι στιγμής [150]. Τέλος, για αποφυγή της εξάπλωσης της νόσου μέσω της μεταμόσχευσης οργάνων και δώρησης αίματος, το 2006 εγκρίθηκε ένα τεστ για τον έλεγχο των αιμοδοτών ενώ το 2010, ένα ακόμα τέτοιο τεστ βγήκε στην αγορά. Όποιος βρεθεί θετικός στα τεστ αυτά δε μπορεί πλέον να γίνει δωρητής αίματος ή οργάνων. Παρόλα αυτά δεν μπορούν αυτά τα τεστ να

χρησιμοποιηθούν για διαγνωστικούς λόγους καθώς παραπάνω έλεγχος πρέπει να γίνει για την αξιόπιστη εξακρίβωση της ασθένειας [150].

1.4 Θεραπεία και έλεγχος της νόσου

1.4.1 Θεραπεία και έλεγχος της λείσμανιάσης

Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει ανθρώπινο εμβόλιο για τη λείσμανιάση και όλη η προσπάθεια για περιορισμό της ασθένειας γίνεται μέσω της προσπάθειας ελέγχου της μετάδοσης της νόσου και μέσω της θεραπείας των ήδη υπαρχόντων και νέων περιστατικών. Γενικά, η ιδανική θεραπεία εκτός από αποτελεσματική και ασφαλής θα πρέπει επίσης να είναι εύκολα χορηγούμενη και προσιτή σε κόστος καθώς τα περισσότερα κρούσματα είναι σε φτωχούς πληθυσμούς που δεν έχουν πρόσβαση σε νέας τεχνολογίας ιατρικούς και φαρμακευτικούς εξοπλισμούς. Δυστυχώς, θεραπεία που να συνδυάζει όλα τα παραπάνω δεν έχει βρεθεί ακόμα και οι ήδη υπάρχουσες θεραπείες έχουν αρκετά μειονεκτήματα.

Το τρισθενές αντιμόνιο (Sb^{3+}) και οι φαρμακευτικές ουσίες που δημιουργούνται βάσει αυτού αρχικά εισήχθησαν το 1912 από τον Vianna για τη θεραπεία της δερματικής και βλεννογονοδερματικής λείσμανιάσης στη Βραζιλία, ενώ το 1915 οι Di Cristina και Caronia το χρησιμοποίησαν για τη θεραπεία της σπλαχνικής λείσμανιάσης στην Ιταλία. Τα φάρμακα αυτά χαρακτηρίζονται από τοξικότητα, επομένως το 1922 ο Bramachari προς ανεύρεση νέων ασφαλέστερων ουσιών εισάγει την 'urea stibamine', η οποία έχει βάση το πεντασθενές αντιμόνιο (Sb^{5+}). Οι ουσίες με βάση το πεντασθενές αντιμόνιο (Sb^{5+}) παραμένουν μέχρι και σήμερα τα φάρμακα πρώτης γραμμής για τη θεραπεία όλων των μορφών λείσμανιάσης [64]. Δυστυχώς, το 1980 και 1970 σε χώρες όμως όπως η Ινδία και η Κένυα αντίστοιχα, τα παράσιτα άρχισαν να αποκτούν ευρεία ανθεκτικότητα στις ουσίες με βάση το αντιμόνιο και επομένως δεν χρησιμοποιούνται πλέον στις περιοχές αυτές παρά μόνο στις άλλες αναπτυσσόμενες ενδημικές περιοχές [90, 91]. Οι ουσίες αυτές στις αναπτυσσόμενες περιοχές έχουν υψηλή αποτελεσματικότητα (>90-95%) με ταυτόχρονα χαμηλά ποσοστά θνησιμότητας και επανεμφάνισης της νόσου, ενώ είναι σχετικά προσιτά όσο αφορά το κόστος. Δυστυχώς όμως, η θεραπεία αυτή γίνεται μέσω ενδομυϊκής έγχυσης και είναι μακροχρόνια, γεγονός που αυξάνει πολύ το κόστος νοσηλείας, ενώ οι ασθενείς παρουσιάζουν σε μεγάλο

βαθμό παρενέργειες (καρδιακή αρρυθμία, αυξημένα επίπεδα τρανσαμινασών, παγκρεατίτιδα και πνευμονίτιδα).

Για την αντιμετώπιση της νόσου στις περιοχές με ανθεκτικότητα στο αντιμόνιο χρησιμοποιείται η Αμφοτερικίνη Β (Amphotericin B) [151], η οποία έχει υψηλή αποτελεσματικότητα (στην Ινδία ίαση που φτάνει το 90% των περιπτώσεων σπλαχνικής λεισμανίασης), με πολύ χαμηλό ποσοστό υποτροπών με μόνη εξαίρεση τους ασθενείς εκείνους στους οποίους υπάρχει συλλοίμωση με τον ιό HIV. Παρόλα αυτά, η επίσης μακρόχρονη νοσηλεία που απαιτείται καθώς και η εμφάνιση των παρενεργειών (νεφροτοξικότητα, υποκαλιαιμία, πυρετός, ρίγος), την έχουν αποκλείσει από τα φάρμακα τα οποία χορηγούνται στις υπόλοιπες χώρες. Τελευταία, έχει γίνει προσπάθεια με τη λιποσωμική αμφοτερικίνη Β η οποία συνδυάζει τα πλεονεκτήματα και την έλλειψη των μειονεκτημάτων της αμφοτερικίνης Β καθώς δεν παρατηρούνται οι παρενέργειες ενώ το κόστος και ο χρόνος της νοσηλείας είναι κατά πολύ μικρότερος. Παρόλο που η λιποσωμική αμφοτερικίνη Β είναι πολλά υποσχόμενο φάρμακο και χρησιμοποιείται ως πρώτη γραμμής θεραπεία έναντι της σπλαχνικής λεισμανίασης στην Ευρώπη και τις Η.Π.Α., δυστυχώς, έχει παρατηρηθεί νεοεμφανιζόμενη *in vitro* αντίσταση των παρασίτων στην ουσία αυτή [89, 152].

Τέλος, έχει εισαχθεί στην αγορά η Μιλτεφοσίνη (Miltefosine) η οποία αποτελεί το πρώτο αντι-λεισμανιακό φάρμακο με οδό χορήγησης από το στόμα. Η μιλτεφοσίνη ανήκει στα αλκυλολυσω-φωσφολιποειδή (alkyl-lysophospholipids, ALP), που αρχικά αναπτύχθηκαν ως αντικαρκινικά φάρμακα. Τα ALP είναι δομικά ανάλογα του Παράγοντα Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων (PAF) χωρίς ωστόσο να έχουν συσχετισθεί ως σήμερα με αυτόν. Ο PAF αποτελεί έναν ισχυρό φλεγμονώδη μεσολαβητή [153] ο οποίος έχει βρεθεί ότι έχει διττή δράση στη λοίμωξη που προκαλεί η *Leishmania*. Μελέτες δείχνουν ότι είναι απαραίτητος για τη διατήρηση και την ενίσχυση της λοιμογονικότητας τους [154], χωρίς ωστόσο να έχει πιστοποιηθεί ότι τα παράσιτα *Leishmania* παράγουν PAF από μόνα τους. Από έρευνα που πραγματοποιήθηκε στο Πανεπιστήμιο Αθηνών, σε συνεργασία με το Εργαστήριο Κυτταρικής Ανοσολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ, βρέθηκαν για πρώτη φορά, λιποειδικά μόρια με PAF-like δράση στα παράσιτα *Leishmania* [155]. Ωστόσο, από την πλευρά των ξενιστών, το ανοσοποιητικό

σύστημα των οποίων αντιδρά μέσω των μακροφάγων, φαίνεται ότι ο ενδογενώς από τα μακροφάγα παραγόμενος PAF, ρυθμίζει την ικανότητα τους να ελέγξουν την επίδραση των παρασίτων επάνω τους και τους προσδίδει αντιλειτουργική δράση [156, 157]. Η μιτεφοσίνη μελετήθηκε σε έρευνες στην Ινδία όπου παρατηρήθηκαν ποσοστά ίασης κοντά στο 95%, ενώ μόλις το 3% των ασθενών παρουσίασαν παρενέργειες (γαστρεντερική τοξικότητα και αυξημένα επίπεδα τρανσαμινασών και κρεατινίνης) [158, 159]. Η χορήγηση της ουσίας έχει ήδη εγκριθεί για τη θεραπεία της σπλαχνικής λείσμανιάσης στην Ινδία, στη Γερμανία και στη Κολομβία και παρόλο την πρόσφατη έγκριση της από την αμερικανική FDA (Food and Drug Administration), αποφεύγεται να χορηγείται σε εγκύους, καθώς υπάρχει σύνδεση του φαρμάκου με τερατογένεση [160].

Στον αντίποδα για τον έλεγχο της λείσμανιάσης είναι οι απόπειρες περιορισμού της νόσου. Τέτοιες προσπάθειες ξεκίνησαν αρκετά νωρίς, από το 1920-1923 όταν ο McCombie Young κατάφερε να περιορίσει μια υποτροπή της σπλαχνικής λείσμανιάσης στην περιοχή Assam (Ινδία), αναγνωρίζοντας και μεταφέροντας τους ασθενείς μιας επιδημίας γρίπης (80.000 άτομα) σε κέντρο περίθαλψης όπου τους χορηγήθηκε ενδοφλέβια θεραπεία με ουσίες βασισμένες στο τρισθενές αντιμόνιο για περίοδο 3 μηνών. Το 1940, πραγματοποιήθηκε ψεκασμός των υπόγειων στοών των γέρβιλων με εντομοκτόνες ουσίες με αποτέλεσμα να περιοριστεί η ζωνοτική δερματική λείσμανιάση σε μια ενδημική περιοχή του Τουρκμενιστάν. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και στο Ιράν αλλά δε κατάφερε να περιορίσει τη εξάπλωση της νόσου. Το 1950 άρχισε ο έλεγχος μεγάλης κλίμακας των φορέων της νόσου με τη χρήση εντομοκτόνων ουσιών και σε συνδυασμό με την καταγραφή και θεραπεία των κρουσμάτων, έφερε ως αποτέλεσμα τον έλεγχο της ανθρωπονοτικής δερματικής λείσμανιάσης στη Σοβιετική Ένωση και την κεντρική Ασία. Το γεγονός αυτό όμως δεν απέτρεψε την επανεμφάνιση της νόσου μετά από πολλά χρόνια. Την ίδια περίοδο η λείσμανιάση σχεδόν εξαφανίστηκε σε περιοχές της Μέσης Ανατολής και της Ινδίας, ως επακόλουθο των ψεκασμών για την αντιμετώπιση της ελονοσίας. Έχουν γίνει πολλές άλλες προσπάθειες εξολόθρευσης των πληθυσμών των γέρβιλων (τρωκτικά της Μογγολίας) και φλεβοτόμων με χρήση δηλητηριασμένων δολωμάτων και με τη χρήση βαριάς μορφής ερπυστριοφόρων εκσκαφέων

αντίστοιχα. Τέλος, στην Κίνα (1950-1980) για να ελεγχθεί η εξάπλωση της ασθένειας, θανατώθηκαν οι σκύλοι παράλληλα με τον ψεκασμό με εντομοκτόνα και την καταγραφή και τη θεραπεία των κρουσμάτων, το οποίο είχε ως αποτέλεσμα τον επιτυχημένο περιορισμό της ζωνοτικής σπλαχνικής λεισμανίασης [64].

1.4.2 Θεραπεία και έλεγχος της Ανθρώπινης Αφρικανικής Τρυπανοσωμίας (HAT)

Όπως και για την λεισμανίαση, έτσι και για τη HAT δεν έχει ανακαλυφθεί ακόμα εμβόλιο, και σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η έλλειψη φαρμακευτικής αγωγή επιφέρει θάνατο στους ασθενείς, θέτει τη θεραπεία και τον έλεγχο ως πρωτεύουσας σημασίας για τον περιορισμό της εξάπλωσης της νόσου.

Για τη θεραπεία της HAT στα πρώτα στάδια εμφάνισης χρησιμοποιούνται 2 φάρμακα, η πενταμιδίνη (Pentamidine) και η σουραμίνη (Suramin) τα οποία είναι αποτελεσματικά τόσο ενάντια στα παράσιτα *T. b. rhodesiense* όσο και στα παράσιτα *T. b. gambiense*. Η πενταμιδίνη εισήχθη για την θεραπεία της HAT το 1937 και λίγο αργότερα χρησιμοποιήθηκε και για τη θεραπεία της λεισμανίασης αλλά αναγνωρίστηκε μόλις το 1950 ως φάρμακο. Πλέον αποτελεί ένα αντιπρωτοζωικό φάρμακο, το οποίο είναι μια αρωματική διαμίνη που επιφέρει αλλαγές στην τοπολογία του DNA και αναστέλλει τις τοποϊσομεράσες, διαταράσσοντας έτσι την αντιγραφή του DNA στα παράσιτα. Στις παρενέργειες του φαρμάκου παρόλα αυτά συγκαταλέγονται η εμφάνιση σακχαρώδη διαβήτη και η νεφρική ανεπάρκεια [101, 161]. Η σουραμίνη, μια πολυσουλφονιωμένη ναφθαλίνη χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά έναντι της τρυπανοσωμίας το 1922 και φαίνεται να δρα με τη παρεμπόδιση της πρόσληψης χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (LDL) εμποδίζοντας έτσι το παράσιτο να εφοδιαστεί με χοληστερόλη και φωσφολιπίδια. Έχει επίσης αντιπρωτοζωική δράση ενώ έχει χρησιμοποιηθεί και για θεραπεία καρκίνου αλλά έχει παρενέργειες στο ρινικό σύστημα των ασθενών και εμφάνιση αλλεργιών [162].

Οι 2 προαναφερθέντες ουσίες δεν μπορούν να διαπεράσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό επομένως δε μπορούν να χρησιμοποιηθούν στα τελευταία στάδια της ασθένειας. Για τα στάδια αυτά χρησιμοποιούνται η μελαρσοπρόλη (Melarsoprol) και η εφλορνιθίνη (Efloornithine). Η

μελαρσόπρρολη άρχισε να χρησιμοποιείται το 1949 και μέχρι και σήμερα αποτελεί το κύριο φάρμακο για την καταπολέμηση της αφρικάνικης τρυπανοσωμίας. Χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση της νόσου που προκαλείται και από τα 2 παράσιτα *T. b. rhodesiense* και *T. b. gambiense*, αλλά μέχρι και σήμερα δεν γνωρίζουμε ποιος είναι ο μηχανισμός δράσης της [163, 164]. Όντας παράγωγο αρσενικού, η μελαρσόπρρολη έχει πολλές και σοβαρές παρενέργειες όπως σπασμοί και άλλες νευρολογικές επιπτώσεις που εμφανίζονται στο 5-10% των ασθενών που τους χορηγείται η φαρμακευτική αυτή αγωγή [165]. Οι παρενέργειες αυτές μπορεί να εξελιχθούν σε εγκεφαλοπάθεια όπου ο ασθενής πέφτει σε κώμα και επέρχεται ο θάνατος. Τα ποσοστά θνησιμότητας στους ασθενείς που εμφανίζουν εγκεφαλοπάθεια ποικίλει από 10 έως 70% [166]. Από την άλλη μεριά, η εφλορνιθίνη η οποία είναι ένα ανάλογο του αμινοξέος ορνιθίνης, δρα παρεμποδίζοντας τη δράση του ενζύμου δεκαρβοξυλάση της ορνιθίνης. Χρησιμοποιείται μόνο εναντίον των παρασίτων του γένους *T. b. gambiense* και είναι σχετικά ασφαλές φάρμακο καθώς παρόλο που στοχεύει το ίδιο ένζυμο και στα παράσιτα και στα κύτταρα θηλαστικών του ξενιστή, μεταβολίζεται αρκετά πιο αργά στα τρυπανοσώματα [163]. Εδώ και περίπου 25 χρόνια, σαν θεραπεία για την αφρικάνικη τρυπανοσωμίαση από το παράσιτο *T. b. gambiense* χρησιμοποιείται συνδυαστική φαρμακευτική αγωγή της εφλορνιθίνης με νιφουρτιμόξη (Nifurtimox) η οποία δρα ως αναστολέας της αναγωγής της τρυπανιοθιόνης και χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της αμερικανικής τρυπανοσωμίας [163, 166]. Η συνδυαστική αυτή αγωγή δεν έχει ακόμα εγκριθεί από κάποια χώρα και είναι ιδιαίτερα ακριβή αλλά την προτείνει και την προμηθεύει μέχρι στιγμής ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας [101].

Η ανάπτυξη εμβολίου θεωρείται πολύ δύσκολη έως απίθανη καθώς υπάρχει συνεχής διαφορετική έκφραση και ανασυνδυασμοί των 1000 γονιδίων του παρασίτου που είναι υπεύθυνα για την έκφραση των γλυκοπρωτεϊνών VSG του κυττάρου [52, 167].

Προγράμματα ελέγχου της νόσου έχουν εφαρμοστεί με επιτυχία από τις αρχές της δεκαετίας του 1960 με αποτέλεσμα να μειωθεί σημαντικά ο επιπολασμός της νόσου. Στα τέλη της δεκαετίας του 1980, υπήρξε παρόλα αυτά αύξηση των κρουσμάτων σε πολλές χώρες και έτσι ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας οργάνωσε μια εκστρατεία ευαισθητοποίησης και

προώθησης η οποία κατάφερε το 2001 να δημιουργήσει ένα πρόγραμμα δημόσιου-ιδιωτικού τομέα για την ενίσχυση του ελέγχου της HAT. Ο έλεγχος της ασθένειας περιλαμβάνει συνεχή παρακολούθηση του πληθυσμού σε κίνδυνο, εντοπισμό των κρουσμάτων και άμεση θεραπεία, τη μείωση των δεξαμενών των ζώων μέσω επιλεκτικής ή μαζικής θεραπευτικής αγωγής των ζώων και έντονη δραστηριότητα ελέγχου του φορέα σε ενδημικές και επιδημικές περιοχές [101].

1.4.3 Θεραπεία και έλεγχος της Ανθρώπινης Αμερικανικής Τρυπανοσωμίας (Chagas Disease)

Τα αντιγόνα έναντι των παρασίτων *T. cruzi* ήταν τα πρώτα αντιγόνα από ασθένεια που ανακαλύφθηκαν. Βάσει αυτών των αντιγόνων έχουν γίνει αρκετές προσπάθειες ανακάλυψης εμβολίου κατά της Αμερικανικής Τρυπανοσωμίας. Δυστυχώς, η ποικιλομορφία της ανοσολογικής απόκρισης στα διαφορετικά στελέχη κάνει τη διαδικασία παραγωγής ενός εμβολίου πολύ δύσκολη.

Για τα αρχικά στάδια της μόλυνσης από το παράσιτο *T. cruzi* χρησιμοποιούνται τα φάρμακα νιφουρτιμόξη (Nifurtimox) και βενζιμιδαζόλιο (Benznidazole) με το τελευταίο να είναι παράγωγο της νιτροιμιδαζόλης [168, 169]. Και οι 2 αυτές ουσίες καταπολεμούν την ασθένεια με το σχηματισμό ελεύθερων ριζών και ηλεκτροφιλικών μεταβολιτών που οδηγεί όμως παράλληλα και σε τοξικότητα στον ξενιστή. Οι έρευνες για ανακάλυψη καινούριας θεραπείας συνεχίζονται και μάλιστα προς την κατεύθυνση της στοχευμένης θεραπείας. Πολλές εργασίες έχουν δημοσιευτεί για τη μελέτη ενζύμων του παρασίτου που θα μπορούσαν να αποτελέσουν στόχο για φάρμακα χωρίς όμως να έχουν καταλήξει μέχρι σήμερα στην ανακάλυψη κάποιου τέτοιου στόχου. Παράλληλα, πολλές δραστηριότητες γίνονται προς την κατεύθυνση των φυσικών προϊόντων ενάντια στην καταπολέμηση της νόσου αλλά πρέπει να γίνει περαιτέρω έλεγχος για την κατανόηση και τη δράση των προϊόντων αυτών [170].

Στη χρόνια φάση της ασθένειας όπως έχουμε ήδη αναφέρει, τα παράσιτα βρίσκονται κρυμμένα στους ιστούς και δεν ανιχνεύονται και επομένως δεν υπάρχουν φάρμακα που να μπορούν να τα καταπολεμήσουν. Η αντιμετώπιση λοιπόν στη φάση αυτή της ασθένειας, εστιάζεται στην αντιμετώπιση των προβλημάτων που προκαλεί η Αμερικανική

Τρυπανοσωμίαση. Για παράδειγμα, η εισαγωγή κυττάρων μυελού των οστών σε ποντίκια που είχαν μολυνθεί με τα παράσιτα, έδειξε 60% μείωση στην ίνωση 2 μήνες μετά τη θεραπεία. Η τεχνική αυτή βρίσκεται ακόμα σε κλινικές μελέτες για την εφαρμογή της σε ανθρώπους [171, 172].

Πρόσφατα, επετεύχθη εξάλειψη της εξάπλωσης της νόσου από τα έντομα *Triatoma* σε περιοχές της Αργεντινής, στη Βραζιλία στη Χιλή και σε άλλες χώρες. Παρόλα αυτά, υπάρχει συνεχής κίνδυνος εξάπλωσης και μετάδοσης της ασθένειας από άλλες γειτονικές χώρες καθώς δεν υπάρχει συγχρονισμένη προσπάθεια από όλες τις ενδημικές χώρες για έλεγχο και εξάλειψη της νόσου αλλά και επειδή έχει παρατηρηθεί σε αρκετές περιοχές αντίσταση των εντόμων στα εντομοκτόνα [173-175].

Λόγω της ιδιομορφίας της ασθένειας της Αμερικάνικης Τρυπανοσωμίασης πρέπει να γίνει συνδυαστική προσπάθεια θεραπείας και ελέγχου της νόσου σε όλες τις χώρες που διατρέχουν τον κίνδυνο, πράγμα που φαίνεται ιδιαίτερα δύσκολο αυτή τη στιγμή [7].

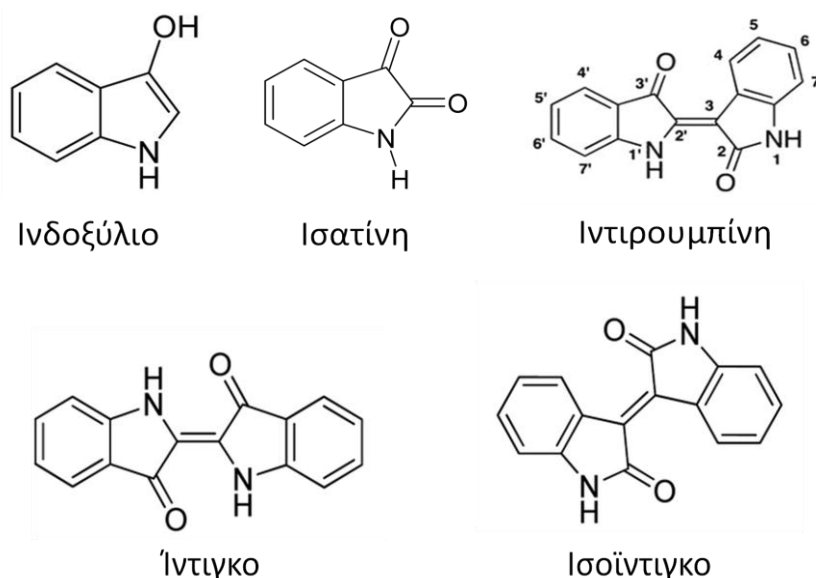
1.5 Ιντιρουμπίνες

Σύμφωνα με τα δεδομένα των προηγούμενων παραγράφων, παρατηρούμε ότι είναι επιτακτική ανάγκη να βρεθεί νέα πιο αποτελεσματική, προσιτή και χωρίς σημαντικές παρενέργειες θεραπεία στις παρασιτικές αυτές ασθένειες. Μάλιστα, παρόλο που η έρευνα και εφαρμογή της στοχευμένης θεραπείας για την αντιμετώπιση πολλών ασθενειών συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου, του Αλσχάιμερ και άλλων έχει βρεθεί ότι είναι πολλά υποσχόμενη προσέγγιση, μόνο μόλις πρόσφατα έχει αρχίσει να ερευνάται για τη θεραπεία των παρασιτικών ασθενειών.

Ιδανικές υποψήφιες ουσίες για στοχευμένη θεραπεία είναι οι ιντιρουμπίνες. Ιντιρουμπίνες ονομάζονται τα ανάλογα της ιντιρουμπίνης και ανήκουν στην οικογένεια των δις-ινδολών. Οι ιντιρουμπίνες έχουν μωβ/κόκκινο χρώμα και χρησιμοποιούνται από τα αρχαία χρόνια είτε ως βαφές είτε ως φαρμακευτικές ουσίες. Μάλιστα, η ιντιρουμπίνη αποτελεί το κύριο δραστικό συστατικό της δρόγης Danggui Longhui Wan, παρόλο που βρίσκεται σε μικρή αναλογία από τα άλλα συστατικά του μείγματος, που χρησιμοποιείται από την παραδοσιακή κινέζικη θεραπευτική για την αντιμετώπιση της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας (CML). Ο μοριακός

μηχανισμός δράσης της ιντιρουμπίνης πρόσφατα ανακαλύφθηκε ότι εμπεριέχει αναστολή των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (CDKs), αναστολή του κυτταρικού κύκλου, περιορισμό ιδιαίτερα του σηματοδοτικού μονοπατιού STAT3 και επαγωγή του μη-αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου [176, 177].

Τα ανάλογα ιντιρουμπίνης παρασκευάζονται από τον μη ενζυμικό διμερισμό της ισατίνης και το ινδοξύλιο (εικόνα 25). Οι ουσίες αυτές βρίσκονται σε φυτά που παράγουν τη χρωστική ίντιγκο (*Indigofera sp.*), σε θαλάσσια γαστερόποδα (οικογένειες *Muricidae* και *Thaididae*), σε βακτήρια των γενών *Pseudomonas*, *Rhodococcus* και έχουν βρεθεί και σε βιολογικά υγρά (ούρα ασθενών και υγριών ανθρώπων, ως προϊόντα μεταβολισμού της τρυπτοφάνης) [178].



Εικόνα 25: Δομή των οξειδωμένων παραγώγων του δακτυλίου της ινδόλης, το ινδοξύλιο και η ισατίνη, τα δύο πρόδρομα μόρια των ιντιγκοειδών ιντιρουμπίνη, ίντιγκο, ισοΐντιγκο [πηγή: [178].

1.5.1 Μοριακοί στόχοι των ιντιρουμπινών

Ανάλογα με τους υποκαταστάτες που διαθέτουν τα ανάλογα ιντιρουμπίνης, μπορεί να στοχεύουν διαφορετικούς μοριακούς στόχους. Αρχικά, οι ιντιρουμπίνες βρέθηκαν ότι δρουν ως ATP-ανταγωνιστικοί αναστολείς των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών CDKs (CDK1, CDK2 και CDK5) [179, 180]. Στη συνέχεια, διαπιστώθηκε ότι είναι επίσης ισχυροί αναστολείς της κινάσης της συνθετάσης του γλυκογόνου GSK-3 [181, 182]. Εκτός αυτών των κύριων μοριακών στόχων, οι ιντιρουμπίνες έχουν βρεθεί ότι

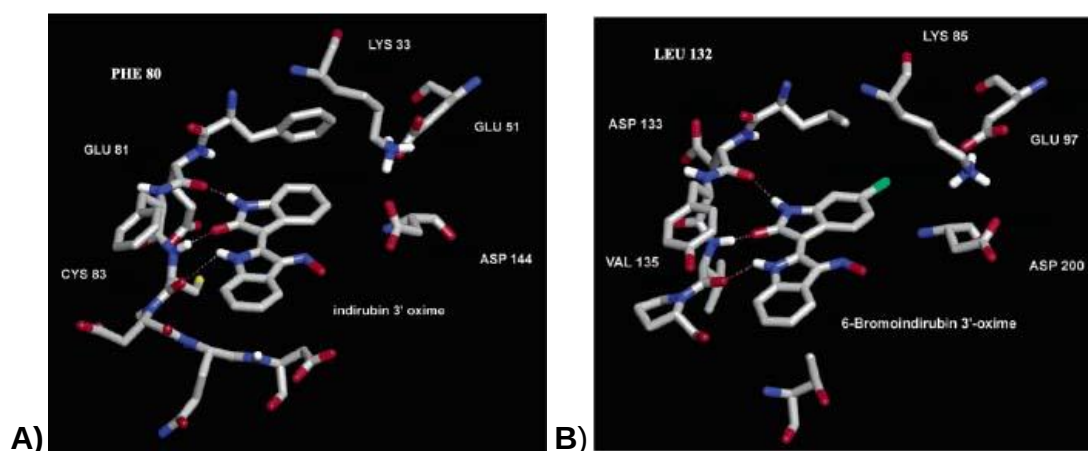
στοχεύουν και τον υποδοχέα της διοξίνης (AhR) [183], τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου [184], τη Jun NH2-terminal κινάση [185], τη c-Src κινάση τυροσίνης, τον Stat3 μεταγραφικό παράγοντα [186], τις κινάσες Aurora B και C [187] και τις διπλής ειδικότητας κινάσες φωσφορυλίωσης της τυροσίνης (DYRKs) [188].

Βασική θέση υποκατάστασης που επηρεάζει την συγγένεια πρόσδεσης της ιντιρουμπίνης στο μόριο στόχο είναι η 3' θέση του σκελετού της, ενώ παράλληλα η υποκατάσταση στη θέση αυτή με πολική ομάδα οξίμης ενισχύει τη διαλυτότητα και την κυτταρική διαπερατότητα της ουσίας καθώς και τη δράση αναστολής της [182]. Η υποκατάσταση στη θέση 6 καθορίζει την επιλεκτικότητα του αναλόγου ιντιρουμπίνης προς ένα μόριο στόχο [182]. Για παράδειγμα, η 3' οξίμη της 6-βρώμο ιντιρουμπίνης (6BIO) στοχεύει GSK-3 κινάσης των θηλαστικών με τιμή IC_{50} 5nM δηλαδή πολύ πιο ειδικά από ότι την CDK1 των θηλαστικών με IC_{50} 320nM [182]. Κάποιες υποκαταστάσεις στη θέση 7 αυξάνουν την εκλεκτικότητα της ουσίας προς τις διπλής ειδικότητας κινάσες φωσφορυλίωσης της τυροσίνης [188]. Τέλος, με υποκατάσταση της N1 θέσης του σκελετού της ιντιρουμπίνης με μεθύλιο, αυτόματα αυτή χάνει τη δράση της έναντι των κινασών [182].

Πρόσφατα, οι ανθρώπινες κινάσες CDK2, CDK5 και GSK-3 β έχουν κρυσταλλωθεί παρουσία ιντιρουμπινών. Η κρυσταλλική δομή αυτών δίνει πολύτιμες πληροφορίες τόσο για τις διαφορές στα ενεργά κέντρα των κινασών όσο για τον τρόπο πρόσδεσης των ιντιρουμπινών στα κέντρα αυτά δίνοντας έτσι την ευκαιρία σχεδιασμού πιο ειδικών προς ένα στόχο φαρμάκων [182]. Όπως φαίνεται στην εικόνα 26, η κρυστάλλωση της CDK5 με την 3'οξίμη της ιντιρουμπίνης στην περιοχή πρόσδεσης του ATP της κινάσης γίνεται μέσω δυνάμεων van der Waals και τριών δεσμών υδρογόνου με τα αμινοξέα Cys83 και Glu81 (εικόνα 26A), ενώ η 6-βρώμο-3'οξίμη της ιντιρουμπίνης (6-BIO) ενώνεται στην περιοχή πρόσδεσης του ATP της GSK-3 β μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων και τριών δεσμών υδρογόνου με τα αμινοξέα Val135 και Asp133 [182] (εικόνα 26B). Η υδρόφοβη περιοχή του καταλυτικού κέντρου ATP της κινάσης όπου προσδένεται η ιντιρουμπίνη, έχει τα αμινοξέα Ile62, Val70, Ala83, Leu132 και Tyr134 από τη μία πλευρά και τα αμινοξέα Thr138, Arg141, Leu188 και Cys199 από την άλλη [182], ενώ τα καταλυτικά αμινοξέα της κοιλότητας πρόσδεσης είναι τα Lys33CDK5/Lys85GSK-3,

Asp144CDK5/Asp200GSK-3 και Glu51CDK5/Glu97GSK-3. Τα 3 αυτά καταλυτικά αμινοξέα αλληλεπιδρούν τόσο μεταξύ τους όσο με τις υποκαταστάσεις της θέσης 5 της ιντιρουμπίνης και καθορίζουν τη πρόσδεση της ουσίας στην κοιλότητα πρόσδεσης.

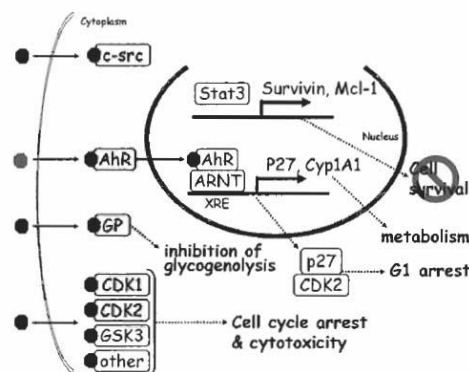
Η επιλεκτικότητα της 6BIO προς την GSK-3β σε σύγκριση με αυτή των CDKs μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι στις 2 CDKs που κρυσταλλώθηκαν (CDK5 και CDK2), η κοιλότητα πρόσδεσης οριοθετείται από τον φαινολικό δακτύλιο της Phe80 (εικόνα 26A), ενώ στην GSK-3β από την ισοβουτυλική πλευρική αλυσίδα της Leu132 (εικόνα 26B), γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την μεγαλύτερη σε μέγεθος κοιλότητα πρόσδεσης στο μόριο της GSK-3β. Παράλληλα, ενώ η Phe80 στις CDKs όντας ογκώδης δεν αλληλεπιδρά με το βρώμιο της 6-BIO, η Leu132 στην GSK-3β μπορεί και δημιουργεί δεσμούς Van der Waals με αυτό [189]. Έτσι, η 6BIO μπορεί να εισέλθει και να προσδεθεί ευκολότερα στο ενεργό κέντρο της GSK-3β σε σχέση με το ενεργό κέντρο των CDK5 και CDK2. Ο ρόλος των CDKs και της GSK-3β θα αναφέρονται αναλυτικά στην επόμενη παράγραφο.



Εικόνα 26. Κρυσταλλική δομή των: A) 3' οξίμης της ιντιρουμπίνης σε σύμπλοκο με την CDK5/p25 και B) 3' οξίμης της 6-βρώμο-ιντιρουμπίνης με την GSK-3β. [πηγή: [189]]

Οι ιντιρουμπίνες έχουν βρεθεί ότι αλληλεπιδρούν και με τον αρυλικό υδρογονανθρακικό υποδοχέα ή αλλιώς υποδοχέα της διοξίνης [aryl hydrocarbon receptor (AhR)] ο οποίο είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας, που ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων, που σχετίζονται με την κυτταρική διαίρεση και διαφοροποίηση, με συνέπεια τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη G1 φάσης λόγω της αύξησης της έκφρασης γονιδίων όπως το p27, το οποίο αναστέλλει το σύμπλοκο CDK2/cyclin E-A (εικόνα 27) [190]. Η

πρόσδεση των ιντιρουμπινών στον AhR δεν αλληλεπιδρά ή επηρεάζεται από την πρόσδεσή τους στις κινάσες [190]. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η ενεργοποίηση του AhR ευθύνεται για τις κυτταροστατικές επιδράσεις των ιντιρουμπινών, ενώ η αναστολή των κινασών ευθύνεται για τις κυτταροτοξικές ιδιότητες των ιντιρουμπινών [190]. Η c-Src είναι ένας επίσης σημαντικός στόχος των ιντιρουμπινών ο οποίος φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα Stat3 που εμπλέκεται στην κυτταρική ανάπτυξη, στην απόπτωση και στην μετάσταση καρκινικών κυττάρων. Έτσι, με την πρόσδεση τους στην c-Src, οι ιντιρουμπίνες αναστέλλουν το μονοπάτι αυτό και μειώνουν την έκφραση των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών Mcl-1 και Survivin με αποτέλεσμα να επάγουν την απόπτωση [186] (εικόνα 27).



Εικόνα 27. Οι ενδοκυτταρικοί μηχανισμοί δράσης των ιντιρουμπινών, που σχετίζονται με τις αντικαρκινικές τους ιδιότητες. [πηγή: [190]].

Έχοντας την κρυσταλλική δομή του συμπλόκου φωσφορυλάση του γλυκογόνου GP με την 5-σουλφονική-ιντιρουμπίνη, έχει διαπιστωθεί ότι με την πρόσδεση αυτή η ιντιρουμπίνη αναστέλλει το ένζυμο καθώς ανταγωνίζεται τη γλυκόζη, τις πουρίνες και τα νουκλεοτίδια [184], τα οποία με την πρόσδεσή τους στο ένζυμο GP ρυθμίζουν την αποικοδόμηση του γλυκογόνου και της κυτταρικής διαίρεσης. Με την αναστολή αυτή λοιπόν, η ιντιρουμπίνη παίζει σημαντικό ρόλο στη θεραπεία του διαβήτη τύπου II.

Η 3'οξίμη της ιντιρουμπίνης έχειδειχθεί ότι προσδένεται στην c-Jun NH2-terminal κινάση (JNK) η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στην απόπτωση των νευρικών κυττάρων. Με την πρόσδεση της ιντιρουμπίνης αναστέλλεται η δράση της κινάσης με αποτέλεσμα την προστασία των νευρικών κυττάρων από την απόπτωση [185].

Οι 7-υποκατεστημένες ιντιρουμπίνες εμφανίζουν ισχυρή και επιλεκτική αναστολή των κινασών Aurora B και C [187] αλλά και των κινασών DYRKs [188]. Οι κινάσες Aurora B και C αποτελούν μόρια-ρυθμιστές της μίτωσης και εμπλέκονται στη συσπείρωση των χρωμοσωμάτων και στο σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου [187], ενώ οι κινάσες DYRK εμπλέκονται στο εναλλακτικό μάτισμα του πρόδρομου mRNA, καθώς και σε νευροπαθολογικές καταστάσεις, όπως η νόσος του Αλσχάιμερ και το σύνδρομο Down [188].

Όσον αφορά την παρασιτική δράση των ιντιρουμπινών, προκαταρκτικές έρευνες έχουν δείξει πως αναστέλλουν την *in vitro* ανάπτυξη των παρασίτων του γένους *Leishmania*, ενώ δεν έχει έως τώρα ερευνηθεί ούτε η δράση τους έναντι της ανάπτυξης του παρασίτου *Leishmania in vivo*, ούτε έναντι της *in vitro* ή *in vivo* ανάπτυξης των παρασίτων του γένους *Trypanosoma* (*T. brucei* και *T. cruzi*). Προηγούμενη μελέτη στο εργαστήριο μοριακής παρασιτολογίας στο Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, έδειξε ότι τόσο η 6-BIO όσο και η 5-μέθυλο-6BIO (5-Me-6BIO), διαθέτουν αντιλειτουργική δράση *in vitro*. Η ίδια έρευνα έδειξε ότι η 6BIO στοχεύει 7 φορές πιο επιλεκτικά την CRK3 (το λεισμανιακό ομόλογο της CDK2) σε σχέση με την GSK-3short (GSK-3s, το λεισμανιακό ομόλογο της GSK-3β). Η επιλεκτικότητα αυτή της 6-BIO και των περισσότερων 6-υποκατεστημένων ιντιρουμπινών προς την CRK3 σε σχέση με την GSK-3s μπορεί να εξηγηθεί από την ύπαρξη ενός δεσμού υδρογόνου μεταξύ της Tyr101 και Glu103 στην CRK3, ο οποίος δεν υπάρχει στην ανθρώπινη CDK2 και αλλάζει το μέγεθος της περιοχής πρόσδεσης της ουσίας [191]. Τέλος, παρατηρήθηκε ότι αυτή η αλλαγή στην εκλεκτικότητα των 6-υποκατεστημένων ιντιρουμπινών, δεν ισχύει για το δις-υποκατεστημένο ανάλογο 5-Me-6BIO και την ακετοξίμη της ιντιρουμπίνης (6-BIA), τα οποία λόγω της παρουσίας του ογκώδη υποκαταστάτη μετατοπίζουν τη σύνδεση των αμινοξέων Tyr101-Glu103, με αποτέλεσμα να μην έχουν ευνοϊκές αλληλεπιδράσεις με την κοιλότητα της CRK3 αλλά αντιθέτως να συνδέονται με μεγαλύτερη συγγένεια (7 φορές πιο ειδικά) με τη κοιλότητα της παρασιτικής GSK-3s [191].

1.5.2 Δράση των ιντιρουμπινών σε κυτταρικό επίπεδο

Οι ιντιρουμπίνες σε πολλές έρευνες σε κύτταρα θηλαστικών έχουν βρεθεί να σχετίζονται με την αναστολή του κυτταρικού κύκλου ιδιαίτερα στις

φάσεις G1 ή G2/M [192] που στη συνέχεια έχουν ως αποτέλεσμα τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο. Έτσι, οι ιντιρουμπίνες φαίνεται να εμφανίζουν ισχυρή αντιμιτωτική δράση σε πολλές κυτταρικές σειρές (HBL-100, A549, MCF-7, CCL-39, HT-29, Jurkat). Σε κύτταρα συγχρονισμένα στη M φάση, οι ιντιρουμπίνες προκαλούν ενδοδιπλασιασμό του DNA, που όμως έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό πολυπλοειδών κυττάρων αφού τα κύτταρα δεν μπορούν να διαιρεθούν [180, 192].

Η δράση των ιντιρουμπινών σε κυτταρικό επίπεδο επίσης φαίνεται να επηρεάζεται από τη φύση και τη θέση των υποκαταστατών. Για παράδειγμα, η 6-BIO και η 3'οξίμη της 5-βρώμο-ιντιρουμπίνης (5-BIO) επάγουν αποπτωτικό θάνατο με εμφάνιση της φωσφατιδυλοσερίνης στην επιφάνεια των κυττάρων και αυτοφαγικό θάνατο σε κύτταρα του νευροβλαστώματος SH-SY5Y [193, 194], με ενεργοποίηση των δραστικών κασπασών 3 και 7. Αντίθετα, η 3'οξίμη της 7-βρώμο-ιντιρουμπίνης (7-BIO) επάγει μη-αποπτωτικό νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές (SH-SY5Y, MDA-MB-231, Jurkat), ο οποίος πραγματοποιείται από πρωτεάσες σερίνης [177].

1.6 Παρασιτικές Κινάσες

Για να χαρακτηριστεί ένα μόριο ως φαρμακευτικός στόχος πρέπει να τηρεί κάποια κριτήρια, μερικά από αυτά είναι αναγκαία και κάποια επιθυμητά. Όσον αφορά τις παρασιτικές ασθένειες, ο φαρμακευτικός στόχος πρέπει να είναι απαραίτητος για την επιβίωση του παρασίτου ή έστω με την παρεμπόδιση του να αφαιρείται η ικανότητα μόλυνσης του παρασίτου όπως για παράδειγμα αν παρεμποδίζει τη διαφοροποίηση του στη μολυσματική μορφή. Επιπλέον, είναι απαραίτητο αυτός ο στόχος να βρίσκεται στη μορφή του παρασίτου που βρίσκεται στο θηλαστικό τελικό ξενιστή και να μην υπάρχει ομόλογος στόχος στα θηλαστικά ή έστω να μην υπάρχει μεγάλη ομοιότητα και ταυτότητα με αυτόν, έτσι ώστε να μην υπάρχει τοξικότητα στα κύτταρα του ξενιστή. Το τελευταίο κριτήριο κάποιες φορές μπορεί να ξεπεραστεί αν το ίδιο μόριο στόχος υπάρχει και στο παράσιτο και στα κύτταρα του ξενιστή αλλά στη πρώτη περίπτωση είναι απαραίτητος για την επιβίωση του παρασίτου αλλά στη δεύτερη περίπτωση η παρεμπόδιση του υπερκαλύπτεται από την ενεργοποίηση κάποιου άλλου μορίου στο κύτταρο [195]. Οι πρωτεϊνικές κινάσες των παρασίτων είναι ιδανικά υποψήφια μόρια-

στόχοι φαρμάκων. Οι ευκαρυωτικές πρωτεϊνικές κινάσες ήδη έχουν χαρακτηριστεί ως φαρμακευτικοί στόχοι για κάποιες ασθένειες κυρίως για τον καρκίνο. Οι παρασιτικές πρωτεϊνικές κινάσες έχουν καθοριστικό ρόλο στην επιβίωση, στη μολυσματικότητα, στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και στη διαφοροποίηση των παρασίτων, γεγονός που τις κάνει ιδανικό φαρμακευτικό στόχο [196]. Παρόλα αυτά, δεν υπάρχουν πολλές έρευνες μέχρι σήμερα που να μελετούν τις παρασιτικές κινάσες ως φαρμακευτικούς στόχους. Έχειδειχθεί ότι οι πρωτεϊνικές κινάσες αποτελούν το 2% του γονιδιώματος στις τρυπανοσωματίδες, γεγονός που αποκαλύπτει πόσο σημαντικές είναι για το παράσιτο καθώς είναι 33% περισσότερες από αυτές του *Saccharomyces cerevisiae*, διπλάσιες από τις αντίστοιχες του παρασίτου *Plasmodium falciparum* και ίσες με το 1/3 των ανθρώπινων πρωτεϊνικών κινασών. Πρόσφατα, η αποκωδικοποίηση των γονιδιωμάτων των *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* και *Trypanosoma cruzi*, έδειξε ότι κωδικοποιούν 179, 156 και 171 ευκαρυωτικές κινάσες (ePKs), οι οποίες είναι πιθανότατα καταλυτικά ενεργές, καθώς και 17, 20 και 19 άτυπες πρωτεϊνικές κινάσες αντίστοιχα [196] οι οποίες χωρίζονται σε κινάσες τυροσίνης και κινάσες σερίνης/θρεονίνης και ταξινομούνται σε 7 κατηγορίες με βάση την ομοιότητα των καταλυτικών τους περιοχών (πίνακας 2) [196, 197]. Αρκετές από αυτές τις κινάσες, οι οποίες ανήκουν στην CMGC ομάδα κινασών και είναι κινάσες σερίνης/θρεονίνης, έχουν χαρακτηριστεί ως φαρμακευτικοί στόχοι. Ανάμεσα σε αυτές είναι οι κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες (CDKs), η κινάση της συνθετάσης του γλυκογόνου 3 (GSK-3) και οι κινάσες που ενεργοποιούνται από μιτογόνο (MAPKs) [191, 198-205].

Ο αριθμός των MAPKs κινασών είναι αρκετά μεγάλος καθώς έχουν ταυτοποιηθεί 15 ομόλογες MAPKs στη *Leishmania* και 13 *T. brucei*, μερικές από τις οποίες έχουν αντίγραφο σε 2 διαφορετικά γονίδια [203]. Οι περισσότερες από αυτές έχουν χαρακτηριστεί αλλά μέχρι σήμερα δεν έχει αποδειχθεί ότι κάποια από αυτές μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως φαρμακευτικός στόχος για την καταπολέμηση των παρασιτικών ασθενειών [195].

Σε αντίθεση με τις κινάσες της CMGC ομάδας και της STE ομάδας κινασών, έχουν παρατηρηθεί και κάποιες ευκαρυωτικές κινάσες όπως αυτές των κατηγοριών TK (κινάσες τυροσίνης) και TKL (tyrosine kinase-like) οι

οποίες δεν υπάρχουν στο παράσιτο ενώ από τις ομάδες CAMK και AGC κινασών οι περισσότερες δεν αντιπροσωπεύονται σε μεγάλο βαθμό στις παρασιτικές πρωτεΐνες. Από την άλλη μεριά, υπάρχουν και παρασιτικές πρωτεΐνες οι οποίες δεν εμφανίζουν ομοιότητα με τις γνωστές οικογένειες ευκαρυωτικών κινασών, κάτι που δείχνει ότι τα ένζυμα αυτά διαφέρουν στη δομή και στη λειτουργία και μπορούν να αποτελέσουν πιθανούς στόχους φαρμάκων.

Στις κινάσες τυροσίνης συγκαταλλέγονται οι διπλής-ειδικότητας κινάσες (DYRKs, CLKs, και STE7), που μπορούν να φωσφορυλιώνουν αμινοξέα σερίνης, θρεονίνης και τυροσίνης. Από αυτές, οι DYRKs είναι μόρια τα οποία μελετώνται για τη πιθανότητα να αποτελούν φαρμακευτικούς στόχους. Επιπλέον, η CRK3, το CDK1 ομόλογο στη *Leishmania* περιέχει ένα συντηρημένο αμινοξύ τυροσίνης στην περιοχή πρόσδεσης του ATP, όπως και η CDK1 [197].

Υπάρχουν επίσης κινάσες σερίνης/θρεονίνης που δε μπορούν να ταξινομηθούν σε κάποια από τις κατηγορίες του πίνακα. Σε αυτές συγκαταλέγονται κινάσες που έχειδειχτεί ότι εμπλέκονται στην κυτταρική διαίρεση στα ανώτερα ευκαρυωτικά κύτταρα όπως η Aurora και οι PLK (Polo-like kinases). Επίσης, στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι κινάσες καζεΐνης (Casein kinase-CK) από τις οποίες η CK1 έχει ταυτοποιηθεί στη *L. mexicana* και στο *T. cruzi* σαν ενδοκυτταρικός στόχος του CDK αναστολέα purvalanol B. Επώαση των παρασίτων με την ουσία αυτή αναστέλλει την ανάπτυξη τους [206], ενώ πρόσφατα η CK1 έχει χαρακτηριστεί και ως φαρμακευτικός στόχος γιατί βρέθηκε να είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη του παρασίτου *L. donovani* [207].

Παράλληλα, μεγάλο ποσοστό των κινασών στη *Leishmania* και στο *Trypanosoma* είναι απαραίτητες για την επιβίωση των παρασίτων και σε συνδυασμό με τη σχετικά μικρή ομολογία που παρουσιάζουν στην αλληλουχία τους (<60%) με τις ομόλογες κινάσες των ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών, τις καθιστά μόρια-στόχους για ανάπτυξη εξειδικευμένων στοχευμένων χημικών αναστολέων με δράση κατά του παρασίτου [208-211].

Πίνακας 2: Κατηγορίες και οικογένειες ευκαρυωτικών κινασών στις τρυπανοσωματίδες

Κατηγορίες	AGC	CAMK	CMGC	STE	Άλλες
Οικογένειες	-NDR	-CAMKL	-CDK	-STE7	-AURORA
	-PKA		-CLK	-STE11	-CAMKK
	-RSK		-DYRK	-STE20	-CK
			-GSK		-NAK
			-CDKL (MAPK-like)		-NEK
			-MAPK		-PEK
			-RCK (MAPK-like)		-PLK
			-SRPK		-TKL
					-ULK
					-WEE

1.6.1 Κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες (CDKs)

Στην CMGC κατηγορία κινασών σερίνης/θρεονίνης, η οποία είναι η περισσότερο μελετημένη στις τρυπανοσωματίδες ανήκουν οι κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες (CDKs), οι κινάσες που ενεργοποιούνται από μιτογόνο (MAPKs), οι κινάσες της συνθετάσης του γλυκογόνου (GSK3) και οι διπλής-ειδικότητας CLK και DYRK κινάσες [197, 212]. Στην *L. major* έχουν ταυτοποιηθεί 45 μέλη της οικογένειας έναντι των 61 μελών που υπάρχουν στον άνθρωπο γεγονός που αποκαλύπτει την ανάγκη που έχουν οι τρυπανοσωματίδες να ρυθμίζουν τον πολύπλοκο κύκλο ζωής και το κυτταρικό κύκλο των παρασίτων καθώς και τον ακριβή διπλασιασμό και διαχωρισμό των οργανιδίων, όπως του μοναδικού μιτοχονδρίου, του πυρήνα και του μαστιγίου. Επίσης, έχει βρεθεί ότι κατέχουν μικρή σχετικά ομολογία (<60%) με τις ομόλογες κινάσες του ανθρώπου. Επομένως, οι CMGC κινάσες του παρασίτου καθίστανται ιδανικά υποψήφια μόρια για να αποτελέσουν φαρμακευτικούς στόχους για την ανάπτυξη επιλεκτικών χημικών αναστολέων με αντιπαρασιτική δράση.

Στα κύτταρα των θηλαστικών οι CDKs αποτελούν τους κύριους ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου καθώς ρυθμίζουν τη μετάβαση του κυτταρικού κύκλου από τη μία φάση στην επόμενη (checkpoints). Στα κύτταρα των θηλαστικών, οι CDK4 και CDK6 είναι ενεργές στην G1 φάση του κυτταρικού κύκλου, η CDK2 ρυθμίζει τη μετάβαση από την G1 στην S φάση και η CDK1 παίζει σημαντικό ρόλο στη μίτωση. Στις τρυπανοσωματίδες έχουν βρεθεί 11 μέλη της οικογένειας στην *L. major* και στο *T. brucei* και 10 μέλη στο *T. cruzi*, που ονομάζονται CRK (cdc2-related kinase) [196]. Οι τρυπανοσωμικές CDKs καθίστανται ενεργές με την παρουσία κυκλινών

(CYC2, CYC3, CYC6 για το *T. brucei*, και CYC1, CYCA και CYC6 για τη *Leishmania*) [196, 200, 202, 211, 213-216]. Δύο μέλη της οικογένειας έχουν μελετηθεί στην *L. mexicana* και το *T. brucei*: οι CRK1 και CRK3 κινάσες, οι οποίες και έχουν αποδειχθεί απαραίτητες για την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Η CRK1 εκφράζεται σε όλα τα στάδια του κύκλου ζωής της *L. mexicana*, παρόλα αυτά είναι ενεργή μόνο στα προκυκλικά και μετακυκλικά προμαστιγωτά [217], γεγονός που αποκαλύπτει τη μετα-μεταφραστική της ρύθμιση. Στην αμαστιγωτή μορφή των παρασίτων δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί ο ρόλος της CRK1 [217, 218]. Παράλληλα, επαγωγή παρεμβατικού RNAi της CRK1 στις τρυπομαστιγωτές και τις αμαστιγωτές μορφές του παρασίτου *T. brucei*, έδειξε μείωση της ανάπτυξης των παρασίτων και αύξηση των κυττάρων στην G1 φάση που αποδεικνύει ότι η κινάση είναι απαραίτητη για τη μετάβαση από τη G1 στην S φάση του κυτταρικού κύκλου [200]. Τα δεδομένα αυτά από μόνα τους όμως δε μπορούν ακόμα να χαρακτηρίσουν την κινάση αυτή ως φαρμακευτικό στόχο στη *Leishmania* και στο *Trypanosoma*. Στο *T. cruzi* έχει δείχτεί ότι η CRK1 φωσφορυλιώνει την ιστόνη H1 του τρυπανοσώματος [219].

Η CRK3 είναι μία *cdc2*-σχετιζόμενη κινάση και αποτελεί το CDK1 ομόλογο των τρυπανοσωματίδων. Το γονίδιο της CRK3 κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη 35.6 kDa στη *Leishmania*. Η λείσμανιακή CRK3 έχει 54% ταυτότητα με την ανθρώπινη CDK1 και 78% ταυτότητα με την *T. brucei* CRK3 ενώ είναι πανομοιότυπη στην *L. infantum* και *L. donovani* και παρουσιάζει 99% ταυτότητα και 99% ομοιότητα με την CRK3 στην *L. major* και *L. mexicana*. Η CRK3 έχει χαρακτηριστεί ως φαρμακευτικός στόχος στις τρυπανοσωματίδες. Στην *L. mexicana* η CRK3 έχει δείχθει ότι είναι απαραίτητη για την επιβίωση του κυττάρου και ρυθμίζει την κυτταρική μίτωση. Συγκεκριμένα, η CRK3 βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στο παράσιτο στη φάση G2/M του κυτταρικού κύκλου και με την αναστολή της η εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου του κυττάρου παρεμποδίζεται [199]. Η ίδια ακριβώς παρεμπόδιση φαίνεται να συμβαίνει μετά από την επαγωγή RNAi της τρυπανοσωμικής CRK3 στα *T. brucei* παράσιτα προκυκλικής και τρυπομαστιγωτής μορφής [200, 220]. Οι αζαπουρίνες και οι ιντιρουμπίνες έχουν δείχθει ότι επάγουν αναστολή της κινάσης CRK3 στη *Leishmania* [218, 221]. Έχει παρατηρηθεί όμως ανακολουθία σε κάποιες περιπτώσεις αναστολέων ανάμεσα στην

αντιλειψμανιακή δράση και τη δράση έναντι της κινάσης που μετρίεται με χρήση του απομονωμένου συμπλόκου κινάσης-κυκλίνης CRK3–CYC6 [198] που μπορεί να οφείλεται στην ποικιλία κυκλινών που προσδένονται και ενεργοποιούν την κινάση μέσα στο κύτταρο [218, 222].

1.6.2 GSK-3

Η GSK-3 είναι μια πολυλειτουργική κινάση σερίνης/θρεονίνης που απαντάται σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και παίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές φυσιολογικές λειτουργίες συμπεριλαμβανομένου του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt, του κυτταρικού κύκλου και της διαφοροποίησης [223]. Η δυσλειτουργία της κινάσης αυτής εμπλέκεται σε πολλές ανθρώπινες ασθένειες όπως ο καρκίνος, το Αλσχάιμερ, ο σακχαρώδης διαβήτης και πολλές άλλες [223]. Στο ανθρώπινο γονιδίωμα απαντώνται δύο ισομορφές της κινάσης, η GSK-3α («μεγάλη» ισομορφή) και η GSK-3β («μικρή» ισομορφή). Οι 2 αυτές ισομορφές εμφανίζουν 98% ταυτότητα στις καταλυτικές τους περιοχές.

Στις τρυπανοσωματίδες και πιο συγκεκριμένα στη *Leishmania* και το *T. brucei* κωδικοποιούνται επίσης 2 ισομορφές της GSK-3, η GSK-3s (short) και η GSK-3l (long), από τις οποίες η πρώτη είναι η πιο μελετημένη [191, 205]. Επίσης, η GSK-3s έχει πρόσφατα αναδειχθεί ως ιδανική για φαρμακευτικός στόχος τόσο στη *Leishmania* όσο και στο *T. brucei* [191, 205]. Στη *Leishmania* η GSK-3s έχει δείχθει ότι είναι απαραίτητη για την επιβίωση του κυττάρου ενώ η παρεμπόδιση της οδηγεί σε δυσλειτουργία του κυτταρικού κύκλου που τελικά καταλήγει σε θάνατο που ομοιάζει με απόπτωση [191]. Μελέτες επεμβατικού RNA (RNA interference) για τις 2 ισομορφές της GSK-3 στο *T. brucei* οδηγεί σε αναστολή της ανάπτυξης των παρασίτων και ανώμαλη μορφολογία, γεγονός που δείχνει ότι είναι απαραίτητα γονίδια για την κυτταρική επιβίωση και ότι η GSK-3 του παρασίτου αποτελεί στόχο χημειοθεραπείας για τη θεραπεία της αφρικανικής τρυπανοσωμιάσης [205]. Έχει γίνει σάρωση βιβλιοθήκης αναστολέων της GSK-3 τόσο στη *Leishmania* όσο και στο *T. brucei*. Στη περίπτωση του *T. brucei* η σάρωση αποκάλυψε ότι η ουσία GW85104 αναστέλλει την *TbGSK-3s* με τιμή IC_{50} 1nM και την ανάπτυξη της τρυπομαστιγώτης μορφής του παρασίτου με τιμή IC_{50} 100nM [205]. Στη *Leishmania* αναδείχθηκαν οι ιντιρουμπίνες ως αναστολείς

ανάπτυξης του παρασίτου με κύριες αντιπρόσωπους την 6BIO και την 5-Me-6BIO με τιμή IC_{50} περίπου $1\mu M$ και με αναστολή της GSK-3s με τιμή 0,15 και 0,09 μM αντίστοιχα. Παρόλο που οι 6-βρώμο ιντιρουμπίνες είναι ισχυροί ATP ανταγωνιστές της GSK-3 στα θηλαστικά [189], η παρεμπόδιση της σε ενήλικα θηλαστικά είναι ανεκτή [224, 225].

Εφόσον, η ανθρώπινη GSK-3 είναι φαρμακευτικός στόχος για πολλές ασθένειες υπάρχει μια τεράστια βιβλιοθήκη αναστολέων για την κινάση που μπορεί να διερευνηθεί η δράση τους έναντι της παρασιτικής κινάσης και των παρασίτων. Μια τέτοια προσπάθεια με 16000 αναστολείς έγινε από ένα συνεταιρισμό ιδιωτικών και δημόσιων εταιρών με συντονισμό του Παγκοσμίου Οργανισμού Υγείας για ανάδειξη εν δυνάμει φαρμάκων για θεραπεία της HAT και παρεμπόδιση της τρυπανοσωμικής GSK-3s [226]. Η προσπάθεια αυτή αναγνώρισε 2 ουσίες οι οποίες εμφάνισαν επιλεκτικότητα 7 φορές μεγαλύτερη έναντι της *TbGSK3s* αντί της *HsGSK-3β*.

Οι διαφορές που έχουν δειχθεί στο καταλυτικό κέντρο των παρασιτικών GSK-3 με το κέντρο της ανθρώπινης κινάσης αλλά και μεταξύ τους σε συνδυασμό με την ύπαρξη της κρυσταλλικής δομής της *L. major* GSK-3s, δίνει την ευκαιρία για σχεδιασμό καινούριων αναστολέων που να στοχεύουν ειδικά τις παρασιτικές κινάσες [191, 205]. Συγκεκριμένα, το καταλυτικό κέντρο την ανθρώπινης και της τρυπανοσωμικής GSK-3 είναι μεγαλύτερο από αυτό της λείσμανιακής GSK-3, αλλά στο λείσμανιακό κέντρο υπάρχουν τα αμινοξέα His155^{LdGSK-3s} και Met100^{LdGSK-3s} αντί των Gln185^{hGSK-3β} και Leu132^{hGSK-3β} της ανθρώπινης κινάσης [191]. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με το πως αυτά τα διαφορετικά αμινοξέα στην λείσμανιακή κινάση είναι διατηρημένα και στην τρυπανοσωμική κινάση μπορούν να αποτελέσουν τη βάση για σχεδίαση καινούριων αντιπαρασιτικών αναστολέων της GSK-3.

1.7 Μοριακή βιολογία και ειδικές λειτουργίες των παρασίτων

Έχει ήδη αναφερθεί ότι το γονιδίωμα των παρασίτων *Leishmania* και *Trypanosoma* αποτελείται κατά κύριο λόγο από δυο διακριτούς τύπους DNA, το πυρηνικό και το μιτοχονδριακό ή κινητοπλαστικό DNA. Σε αντίθεση με τα τυπικά ευκαρυωτικά συστήματα, τα χρωμοσώματα του παρασίτου δεν παρουσιάζουν εμφανή συμπύκνωση κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Παρόλα αυτά, η δομή και ο μηχανισμός διατήρησης των χρωμοσωμικών

άκρων είναι παρόμοια με αυτά των υπόλοιπων ευκαρυωτικών, καθώς έχει ανιχνευθεί η δράση της τελομεράσης με παρόμοιες ιδιότητες με αυτές άλλων ευκαρυωτικών τελομερασών [227]. Στις τρυπανοσωματίδες εκτός από το μιτοχονδριακό DNA υπάρχουν και άλλα χαρακτηριστικά που δεν απαντώνται στα ανώτερα θηλαστικά όπως η ύπαρξη γλυκοσωμάτων και το μάτισμα του mRNA (trans splicing) [228, 229]. Επίσης, ο κυτταρικός κύκλος και ο κυτταρικός θάνατος στις τρυπανοσωματίδες εμφανίζουν κάποια διαφορετικά χαρακτηριστικά σε σχέση με τα κύτταρα θηλαστικών.

1.7.1 Ο κυτταρικός κύκλος στις τρυπανοσωματίδες

Κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου στις τρυπανοσωματίδες *Trypanosoma* και *Leishmania*, ο πυρήνας, ο κινητοπλάστης και το βασικό σωματίο που συγκρατεί το μαστίγιο πρέπει να διπλασιαστούν και να διαχωριστούν με ακρίβεια. Ο πυρήνας και ο κινητοπλάστης έχουν διακριτές περιοδικές S φάσεις, ενώ η χρωματίνη δεν συμπυκνώνεται σε κανένα στάδιο του κυτταρικού κύκλου και δεν παρατηρείται εκτεταμένη αποδιοργάνωση του κυτταροσκελετού.

Σε έρευνες που έχουν γίνει σε προκυκλικές μορφές *T. brucei* παρατηρήθηκε ότι αρχικά πραγματοποιείται η ωρίμανση του προ-βασικού σωματίου και η δημιουργία δύο βασικών σωματίων. Η S φάση του κινητοπλάστη συμβαίνει ετεροχρονισμένα από την πυρηνική S φάση και μάλιστα ξεκινά λίγο πριν από αυτή και έχει μικρότερη διάρκεια. Μετά την ολοκλήρωση και της πυρηνικής S φάσης και στην έναρξη της G2 φάσης γίνεται ο διαχωρισμός των διπλασιασμένων βασικών σωματίων, κινητοπλαστών και μαστιγίου. Πρώτος πραγματοποιείται μέσω των μικροσωληνίσκων του κυτταροσκελετού, ο διαχωρισμός του βασικού σωματίου ο οποίος και είναι απαραίτητος για τον επερχόμενο διαχωρισμό του κινητοπλάστη. Τελευταία πραγματοποιείται η μίτωση του πυρήνα και έτσι ένας θυγατρικός πυρήνας επανατοποθετείται μεταξύ των δύο κινητοπλαστών. Τέλος, ακολουθεί ο διαχωρισμός του κυττάρου που ονομάζεται κυτοκίνηση και γίνεται κατά μήκος του επιμήκους άξονα του κυττάρου [211, 230].

Ο κυτταρικός κύκλος της *Leishmania* διαφέρει σε κάποια στοιχεία από αυτόν του *T. brucei*. Σε μελέτες που έχουν γίνει στο είδος *L. mexicana* έχει επίσης παρατηρηθεί στενή σχέση μεταξύ των S φάσεων του πυρήνα και του

κινητοπλάστη, όμως στη προκειμένη περίπτωση η μίτωση του πυρήνα προηγείται της διαίρεσης του κινητοπλάστη. Συγκεκριμένα, οι δύο πυρήνες μετά τη μίτωση, τοποθετούνται κατά μήκος του επιμήκη άξονα του κυττάρου. Στη συνέχεια ο κινητοπλάστης διαιρείται κατά μήκος του κυττάρου και οι πυρήνες επανατοποθετούνται σε κάθε πλευρά του σχεδίου διαίρεσης για να ακολουθήσει η κυτοκίνηση. Η επανατοποθέτηση των οργανιδίων η οποία πραγματοποιείται προς όφελος της αμφίπλευρης συμμετρίας για την κυτοκίνηση, έχουν ως αποτέλεσμα την αυξημένη χρονική περίοδο που απαιτείται για διαίρεση και διαχωρισμό των οργανιδίων σε σχέση με αυτή στο *T. brucei*. Αντίθετα όμως, το φαινόμενο αυτό δε παρατηρείται στην αμαστιγωτή μορφή της *Leishmania* καθώς τα κύτταρα αυτά έχουν ωοειδές σχήμα και είναι μικρά σε μέγεθος. Έτσι, η εκτενής ανακατανομή των διπλασιασμένων οργανιδίων δεν απαιτείται με αποτέλεσμα η κυτοκίνηση να συμβαίνει αμέσως μετά την ολοκλήρωση της μίτωσης [211, 230]. Πρέπει επίσης να αναφερθεί ότι στην τρυπομαστιγωτή μορφή τα κύτταρα *T. cruzi* δεν διπλασιάζονται και επομένως δεν μπορεί να μελετηθεί σε αυτά ο κυτταρικός κύκλος.

Οι CDK ομόλογες πρωτεΐνες των τρυπανοσωματίδων *Leishmania* και *Trypanosoma* παίζουν σημαντικό ρόλο στη μετάβαση του κυτταρικού κύκλου από τη μία φάση στην επόμενη. Συγκεκριμένα, η CRK1 παίζει σημαντικό ρόλο στη μετάβαση από την G1 στην S φάση του κυτταρικού κύκλου, ενώ η CRK3 παίζει σημαντικό ρόλο στη μετάβαση από την G2 στην M φάση του κυτταρικού κύκλου [191, 200]. Η μετακασπάση MCA έχει επίσης βρεθεί στην *L. major* να παίζει σημαντικό ρόλο στην κυτοκίνηση και στο σωστό διαχωρισμό του πυρήνα και του κινητοπλάστη [231]. Η MCA της *L. major* έχει διάστικτη κατανομή σε κύτταρα που βρίσκονται στη μεσόφαση και μετατοπίζεται στον πυρήνα κατά τη διάρκεια της μίτωσης [231]. Παρόμοια κατανομή και μετατόπιση κατά τη διάρκεια της μίτωσης βρέθηκε να έχει και η GSK-3 στα παράσιτα *L. donovani* [191]. Μάλιστα η αναστολή της δράσης της GSK-3 με την ιντιρουμπίνη 5-Me-6BIO έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της μετάβασης του παρασίτου από την G1 στην S φάση του κυτταρικού κύκλου [191].

Η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου έχει μελετηθεί κυρίως στο *Trypanosoma* λόγω της δυνατότητας πραγματοποίησης πειραμάτων τόσο

επεμβατικού RNA τα οποία δε μπορούν να γίνουν σε κύτταρα *Leishmania* όσο και υπερέκφρασης. Η Polo-like κινάση (PLK) έχειδειχθεί ότι είναι απαραίτητη για τον διπλασιασμό του βασικού σωματίου, το διαχωρισμό του κινητοπλάστη και την κυτοκίνηση [230, 232], ενώ η κινάση Aurora είναι απαραίτητη για το διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων. Οι μετακασπάσες MCA παίζουν σημαντικό ρόλο στην κυτοκίνηση και στο διπλασιασμό των οργανιδίων [230]. Πειράματα επεμβατικού RNA (RNAi) στις κινάσες CRK3 και GSK-3 σε τρυπομαστιγωτά αλλά και προκυκλικά παράσιτα *T. brucei*, έχουν δείξει ότι τα παράσιτα δε μπορούν να μεταβούν από την G2 στην M φάση του κυτταρικού κύκλου στη πρώτη περίπτωση, ενώ στη δεύτερη περίπτωση φαίνεται να παρεμποδίζεται η μίτωση του κυττάρου και η κυτοκίνηση με αποτέλεσμα να παρουσιάζονται πολυπλοειδείς στα παράσιτα [200, 233]. Τέλος, η CRK3 έχειδειχθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην μίτωση των παρασίτων *T. cruzi* [234], ενώ η GSK-3 δεν έχει μελετηθεί μέχρι σήμερα στα παράσιτα αυτά.

1.7.2 Απόπτωση

Σε όλους τους πολυκύτταρους οργανισμούς ο κυτταρικός θάνατος παίζει σημαντικό ρόλο κατά τη διάρκεια φυσιολογικών διαδικασιών, ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης και της μεταμόρφωσης. Η διαδικασία κατά την οποία ένας πολυκύτταρος οργανισμός επάγει κυτταρικό θάνατο με μια σειρά ελεγχόμενων σταδίων που οδηγούν σε τοπικά και χρονικά ορισμένη αυτό-καταστροφή στα κύτταρα του, ονομάστηκε το 1964 προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος (programmed cell death, PCD). Με αυτό τον τρόπο διαχωρίστηκε ο κυτταρικός θάνατος ο οποίος είναι ελεγχόμενος από τη νέκρωση η οποία έχει τα χαρακτηριστικά οξείας βλάβης του ιστού και προκαλεί φλεγμονώδη αντίδραση. Ανάλογα με το διαφορετικό μηχανισμό ο οποίος οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο, προκύπτουν και διαφορετικές μορφολογίες στα κύτταρα [235]. Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος (PCD) μπορεί να επιτευχθεί επίσης με διαφορετικούς μηχανισμούς. Η απόπτωση και η αυτοφαγία είναι κάποιοι από αυτούς. Η συμπύκνωση της χρωματίνης δεν αποτελεί χαρακτηριστικό της αυτοφαγίας η οποία πραγματοποιείται μέσω εκτεταμένου αυτοφαγικού εγκλεισμού του κυτταροπλάσματος σε κενोटόπια [235].

Με τον όρο απόπτωση περιγράφεται η διαδικασία που ακολουθείται μέσω βιοχημικών διεργασιών που οδηγούν σε ελεγχόμενη κυτταρική αυτοκαταστροφή και σε μορφολογικά χαρακτηριστικά όπως η στρογγυλοποίηση του κυττάρου, η συμπύκνωση της χρωματίνης, η κατάτμηση του πυρήνα, η απώλεια του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης ($\Delta\Psi_m$) κ.α. Έχουν περιγραφεί δύο κύρια μονοπάτια της απόπτωσης, το «ενδογενές» (intrinsic) και το «εξωγενές» (extrinsic), με το πρώτο να πραγματοποιείται μέσω μετάδοσης σημάτων από τη διάτρηση της μιτοχονδριακής μεμβράνης, με ρύθμιση της οικογένειας πρωτεϊνών Bcl2/Bax, ενώ το δεύτερο μέσω ενεργοποίησης των TNF υποδοχέων θανάτου (death receptors, DRs). Τα δύο αυτά μονοπάτια μπορεί να απαντηθούν και ταυτόχρονα στο κύτταρο.

Στα κύτταρα των πολυκύτταρων οργανισμών, οι κασπάσες, μια ομάδα πρωτεασών κυστεΐνης με υψηλό βαθμό συντήρησης οι οποίες ενεργοποιούνται ειδικά στα αποπτωτικά κύτταρα έχουν συνδεθεί άμεσα με τη διαδικασία της απόπτωσης [236]. Με την ενεργοποίησή τους, οι κασπάσες κόβουν επιλεκτικά συγκεκριμένες πρωτεΐνες αμέσως μετά από ένα αμινοξύ ασπαρτικού οξέος ή γλουταμικού οξέος της αμινοξικής αλληλουχίας με αποτέλεσμα την απενεργοποίηση της πρωτεΐνης αυτής [237-239]. Έχει αναφερθεί σε κάποιες περιπτώσεις οι κασπάσες να ενεργοποιούν κάποιες πρωτεΐνες είτε άμεσα, αποκόπτοντας ένα αρνητικό τομέα ρύθμισης, είτε έμμεσα απενεργοποιώντας μια ρυθμιστική υπομονάδα. Πρόσφατα, έχουν διαπιστωθεί μονοπάτια που οδηγούν στην απόπτωση στα οποία δεν λαμβάνουν μέρος οι κασπάσες αλλά γίνονται με τη βοήθεια των κατεψινών, των καλπαϊνών και των πρωτεάσων του πρωτεασώματος [235].

Στους μονοκύτταρους οργανισμούς όπως τα κινητοπλαστοειδή *Trypanosoma* και *Leishmania* έχει βρεθεί μια διαδικασία που προσομοιάζει με την απόπτωση. Χαρακτηριστικά αποπτωτικού θανάτου όπως η στρογγυλοποίηση του κυττάρου, η εμφάνιση φωσφατιδυλοσερίνης στην εξωτερική πλευρά της πλασματικής μεμβράνης, η απώλεια του δυναμικού της μεμβράνης των μιτοχονδρίων, η διάσπαση του DNA σε πολλαπλά διανουκλεοσωματικά κλάσματα (DNA ladder formation), η παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), η υπεροξειδωση λιπιδίων, η αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων Ca^{2+} , η διατήρηση της συνέχειας της

πλασματικής μεμβράνης μέχρι τα τελευταία στάδια της διαδικασίας, η απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και η μετατόπιση της μιτοχονδριακής ενδονουκλεάσης G (EndoG) από το μιτοχόνδριο στον πυρήνα, παρατηρήθηκαν σε *in vitro* καλλιέργειες *L. donovani* προμαστιγωτών στατικής φάσης μετά από στέρηση θρεπτικών συστατικών [240] ή μετά από επαγωγή κυτταρικού θανάτου στο παράσιτο από παράγοντες που ενεργοποιούν την απόπτωση και στα κύτταρα θηλαστικών, όπως αναστολείς κινασών (σταυροσπορίνη, withaferin A, ανάλογα ιντιρουμπίνης 6BIO και 5-Me-6BIO) και το υπεροξειδίο του υδρογόνου [191, 235, 241-246]. Παρόμοια χαρακτηριστικά, στρογγυλοποίηση του κυττάρου και διάσπαση του DNA σε πολλαπλά διανουκλεοσωματικά κλάσματα παρατηρούνται και στο *T. brucei* μετά από επαγωγή RNAi κινασών όπως η GSK-3 και η CRK3 [233]. Στις τρυπανοσωματίδες δεν έχουν βρεθεί ομόλογες πρωτεΐνες με τις κασπάσες των θηλαστικών. Παρόλα αυτά, κατά τη διάρκεια του κυτταρικού θανάτου που προσομοιάζει με απόπτωση, έχειδειχθεί ότι ενεργοποιούνται πρωτεάσες σχετιζόμενες με κασπάσες οι οποίες έχουν ονομαστεί μετακασπάσες [231]. Επιπλέον, υποδοχείς TNF και μέλη της οικογένειας Bcl, τα οποία συνδέονται άρρηκτα με την απόπτωση στα ανώτερα ευκαρυωτικά κύτταρα, δεν υπάρχουν στις τρυπανοσωματίδες που σημαίνει πως τα μονοπάτια της απόπτωσης διαφέρουν ανάμεσα στους πρώιμους αυτούς εξελικτικά ευκαρυωτικούς οργανισμούς και στα ανώτερα θηλαστικά αλλά το γεγονός αυτό δεν μπορεί να αποκλείσει την παραδοχή ότι τα παράσιτα αυτά φαίνεται να διαθέτουν τους βασικούς μηχανισμούς «αυτοκαταστροφής». Στα ενδοκυττάρια παράσιτα *Leishmania* έχει ανακαλυφθεί και η άμεση και ολοκληρωτική διάσπαση του πυρηνικού DNA μέσω του L-arginine-μονοξειδίου του αζώτου (NO) μεταβολικού μονοπατιού το οποίο παράγουν τα μακροφάγα του θηλαστικού ξενιστή. Ο κυτταρικός αυτό θάνατος των ενδοκυττάρων παρασίτων προσομοιάζει με την μη-εξαρτώμενη από κασπάσες απόπτωση, αφού ρυθμίζεται από πρωτεάσες άλλες εκτός των κασπασών του πρωτεοσώματος [247-249].

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι έχει βρεθεί πως τα παράσιτα *Leishmania* 'εκμεταλλεύονται' τη διαδικασία της απόπτωσης για να μπορέσουν να επιβιώσουν ενδοκυτταρικά στα κύτταρα του ξενιστή. Πιο συγκεκριμένα, έχειδειχθεί ότι μετά την εισαγωγή των προμαστιγωτών στο

θηλαστικό τελικό ξενιστή, υπάρχει υψηλό ποσοστό αποπτωτικών παρασίτων, που χαρακτηρίζονται από στρογγυλή κυτταρική μορφολογία, συμπύκνωση του γενετικού υλικού του πυρήνα καθώς και αναστολή της ανάπτυξης και κυτταρικής διαίρεσης τους [250]. Πειράματα διαχωρισμού κυτταρικών πληθυσμών (cell sorting) έχουν δείξει ότι εάν αφαιρεθούν τα αποπτωτικά παράσιτα, μειώνεται η μολυσματικότητα των ζωντανών παρασίτων που σημαίνει ότι κάποια παράσιτα 'θυσιάζονται' έτσι ώστε να γίνει εφικτή η ενδοκυτταρική επιβίωση των ζωντανών μολυσματικών παρασίτων στο κύτταρο-ξενιστή [245, 251].

Οι διαφορές στους μηχανισμούς της απόπτωσης ανάμεσα στο παράσιτο και στον ξενιστή, μπορεί να βοηθήσουν στην ανακάλυψη θεραπείας για τις παρασιτικές ασθένειες [252]. Έχουν βρεθεί διάφοροι παράγοντες που επάγουν την αποπτωτική διαδικασία στα παράσιτα όπως το θερμικό σοκ [253-256], οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) [242, 248, 249], οι συνθήκες στέρησης τροφής [257], τα αντιμικροβιακά πεπτιδία [258, 259] οι μεταλλάξεις σε κυκλο-ρυθμιζόμενα γονίδια [260], καθώς και τα αντιπαρασιτικά φάρμακα [261-265]. Τα περισσότερα αντιπαρασιτικά φάρμακα έχουν βρεθεί ότι επάγουν αποπτωτικό θάνατο στα παράσιτα. Ειδικότερα, επώαση των παρασίτων *L. donovani* με άλατα του αντιμονίου (Pentostam) προκαλεί παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS), αύξηση της συγκέντρωσης των ενδοκυτταρικών επιπέδων Ca^{2+} στο παράσιτο και στον ξενιστή και τελικά διάσπαση του πυρηνικού DNA των παρασίτων και έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης στην εξωτερική επιφάνεια της κυτταρικής τους μεμβράνης [240, 266, 267]. Με παρόμοιο τρόπο δρουν και τα φάρμακα Αμφοτερικίνη Β και Μιλτεφοσίνη τα οποία επάγουν κυτταρικό θάνατο με αποπτωτικά χαρακτηριστικά [240, 268, 269]. Τέλος, σε πειραματικό επίπεδο έχειδειχθεί ότι οι ιντιρουμπίνες 6BIO και 5-Me-6BIO μέσω της αναστολής των κινασών CRK3 και GSK-3, οδηγούν τα παράσιτα *L. donovani* σε αποπτωτικό θάνατο [191].

Σκοπός

Κεφάλαιο **2**

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΣΚΟΠΟΣ

Όπως ήδη περιγράφηκε, η λεισμανίαση, η ανθρώπινη αφρικάνικη τρυπανοσωμίαση και η αμερικάνικη τρυπανοσωμίαση αποτελούν τις λεγόμενες παραμελημένες ασθένειες που όμως απειλούν μεγάλο ποσοστό του ανθρώπινου πληθυσμού και είναι αιτία θνησιμότητας κυρίως στις αναπτυσσόμενες χώρες. Παράλληλα, οι αναπτυσσόμενες χώρες απειλούνται ολοένα και περισσότερο από τις ασθένειες αυτές καθώς εξωγενείς παράγοντες όπως οι ραγδαίες μεταβολές των περιβαλλοντικών και κλιματολογικών συνθηκών (αύξηση της θερμοκρασίας, συχνότητα βροχοπτώσεων) και οι κοινωνικοπολιτικές αλλαγές (μετανάστευση πληθυσμών, αύξηση της φτώχειας σε αναπτυσσόμενες χώρες) βοηθούν στην εξάπλωση των ασθενειών σε χώρες μη ενδημικές μέχρι στιγμής. Μάλιστα, η λεισμανίαση αποτελεί σημαντικό πρόβλημα Δημόσιας Υγείας και Κτηνιατρικής σημασίας στις Μεσογειακές χώρες [89, 270] ενώ τα περιστατικά ανθρώπινων αλλά και κτηνιατρικών κρουσμάτων στην Ελλάδα αυξάνονται ραγδαία [96]. Εφόσον η ανάπτυξη εμβολίων είναι αρκετά δύσκολο να πραγματοποιηθεί και η χημειοθεραπεία που χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση των ασθενειών αυτών είναι γενικά αναποτελεσματική, κυρίως εξαιτίας της εμφάνισης ανθεκτικότητας στη φαρμακευτική αγωγή και των ισχυρών παρενεργειών [90], είναι επιτακτική ανάγκη να αναπτυχθούν νέα, αποτελεσματικά φάρμακα για τη στοχευμένη θεραπεία των νόσων αυτών [90, 271].

Τα παράσιτα που προκαλούν τις ασθένειες (*Leishmania*, *T. brucei*, *T. cruzi*) όπως περιγράφηκε ανήκουν στις τρυπανοσωματίδες και έχουν διγενετικό κύκλο ζωής. Τα παράσιτα αυτά είναι ικανά να προσαρμόζονται στο περιβάλλον τόσο του ασπόνδυλου όσο και του σπονδυλωτού ξενιστή λόγω της μοναδικής τους κυτταρικής βιολογίας. Τα διαφορετικά γένη παρασίτων παρουσιάζουν ομοιότητες αλλά και κάποιες σημαντικές διαφορές τόσο στο κυτταρικό κύκλο όσο και στη κυτταρική τους βιολογία όπως περιγράφεται παραπάνω. Η μοναδική κυτταρική βιολογία των παρασίτων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση μορίων-στόχων του παρασίτου οι οποίοι διαφέρουν από τα μόρια του θηλαστικού ξενιστή. Η ταυτοποίηση των μορίων

αυτών θα βοηθήσει στην ανάπτυξη νέων στοχευμένων χημειοθεραπευτικών προσεγγίσεων [195, 209, 210, 272]. Πιθανά μόρια-στόχοι των παρασίτων θεωρούνται οι πρωτεϊνικές κινάσες όπως οι CDK, MAP, GSK, DYRK και AURORA [191, 195, 196, 209, 218]. Μάλιστα, οι περισσότερες προσπάθειες εύρεσης θεραπείας γίνονται με έλεγχο αντιπαρασιτικής δράσης βιβλιοθηκών αναστολέων κινασών και με προσδιορισμό αναστολέων που να στοχεύουν επιλεκτικά τις κινάσες του παρασίτου, χωρίς να προκαλούν βλάβη στον τελικό ξενιστή [196, 211]. Πρόσφατα έχειδειχθεί ότι η GSK-3 κινάση του *T. brucei* αποτελεί πιθανό μόριο-στόχο για τη θεραπεία της τρυπανοσωμίας [205] ενώ μια ομάδα ουσιών, οι ιντιρουμπίνες οι οποίες στοχεύουν τη λεισμανιακή *LdGSK-3s* και τη CRK3 έχουν ισχυρή αντιλεισμανιακή δράση *in vitro* [191].

Στο εργαστήριο Μοριακής Παρασιτολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ, μελετήθηκε μια βιβλιοθήκη ιντιρουμπινών και ανέδειξε ισχυρούς αναστολείς της λεισμανιακής ανάπτυξης [191]. Στη συνέχεια, στην ίδια μελέτη ταυτοποιήθηκε η CRK3 ως κύριος στόχος των αναστολέων αντί της *LdGSK-3s* (με εξαίρεση των 5-Me-6BIO και 6-BIA) σε αντίθεση με το κύριο στόχο στα κύτταρα θηλαστικών ο οποίος είναι η GSK-3β [191]. Η διαφοροποίηση αυτή στην επιλεκτικότητα του στόχου των ιντιρουμπινών που ελέγχτηκαν, οφείλεται στις διαφορές που βρέθηκαν στα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της λεισμανιακής και της ανθρώπινης GSK-3 [191]. Σε διαφορετικές μελέτες έχειδειχθεί ότι η στόχευση της λεισμανιακής κινάσης CRK3 από αναστολείς, δεν αντιστοιχεί πάντα σε αντιλεισμανιακή δράση [218, 222]. Για το λόγο αυτό, η επιλεκτικότητα ενός πιθανού αντιπαρασιτικού αναστολέα προς την κινάση *LdGSK-3s* έναντι της CRK3 είναι επιθυμητό χαρακτηριστικό για την εύρεση στοχευμένης θεραπείας. Στο *T. cruzi* έχουν μελετηθεί οι CDK ομόλογες κινάσες του παρασίτου, οι TzCRK3 και TzCRK1 [219] αλλά μέχρι στιγμής δεν έχει μελετηθεί η TzGSK-3. Στα παράσιτα *T. brucei* και *T. cruzi* δεν έχει μελετηθεί η αντιπαρασιτική δράση των ιντιρουμπινών, οι οποίοι είναι ισχυροί αναστολείς της ανθρώπινης GSK-3 και άλλων κινασών (CDKs, DYRKs, Aurora).

Κύριος στόχος της παρούσας διατριβής είναι η μελέτη αναστολέων (ιντιρουμπίνες) ως προς την αντιπαρασιτική τους δράση *in vitro* ή/και *in vivo* έναντι των ειδών *Leishmania donovani*, *Trypanosoma brucei* και *Trypanosoma cruzi* και η διερεύνηση της πιθανής επιλεκτικότητας των

αναστολέων αυτών έναντι των παρασιτικών κινασών και ειδικότερα προς την παρασιτική GSK-3. Η μελέτη αυτή έχει ως σκοπό να διερευνηθεί ο ρόλος της GSK-3 στα γένη των παρασίτων *Leishmania* και *Trypanosoma* και να αναγνωριστούν πιθανοί στοχευμένοι GSK-3 αναστολείς για ορθολογικό σχεδιασμό καινούριων και αποτελεσματικών φαρμάκων για την αντιμετώπιση αυτών των παρασιτικών ασθενειών. Για την επίτευξη των στόχων αυτών πραγματοποιήθηκαν οι παρακάτω επιμέρους διεργασίες:

- έλεγχος καινούριας βιβλιοθήκης ιντιρουμπινών με ποικιλία υποκαταστάσεων για προσδιορισμό καινούριων αντιλεϊσμανιακών αναστολέων,
- διερεύνηση ιντιρουμπινικών υποκαταστάσεων που να παρουσιάζουν αυξημένη επιλεκτικότητα προς την *LdGSK-3s* έναντι της CRK3
- έλεγχος επιλεγμένων ιντιρουμπινών ως προς την αντιλεϊσμανιακή τους δράση *in vivo* σε πειραματικό μοντέλο σπλαχνικής λεϊσμανίασης
- έλεγχος βιβλιοθήκης ιντιρουμπινών με ποικιλία υποκαταστάσεων για προσδιορισμό της αντιρυπανοσωμικής τους δράσης *in vitro* έναντι των παρασίτων *T. brucei*
- έλεγχος βιβλιοθήκης ιντιρουμπινών με ποικιλία υποκαταστάσεων για προσδιορισμό αναστολής της *TbGSK-3s*
- μελέτη της δράσης της κινάσης *TbGSK-3s* του παρασίτου *T. brucei* με τη χρήση χημικών αναστολέων της και γενετικών μελετών στο κυτταρικό κύκλο και τον κυτταρικό θάνατο του παρασίτου
- έλεγχος βιβλιοθήκης ιντιρουμπινών με ποικιλία υποκαταστάσεων για προσδιορισμό της αντιρυπανοσωμικής τους δράσης *in vitro* έναντι των παρασίτων *T. cruzi*
- έλεγχος επιλεγμένων ιντιρουμπινών ως προς την αντιρυπανοσωμική τους δράση *in vivo* σε πειραματικό μοντέλο αμερικάνικης τυπανοσωμίας

Οι χημικοί αναστολείς που χρησιμοποιήθηκαν (ιντιρουμπίνες) συντέθηκαν στο εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων του Τμήματος Φαρμακευτικής του ΕΚΠΑ, σε συνεργασία με τον Καθηγητή Α.-Λ. Σκαλτσούνη.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν αναμένεται να συμβάλουν στην διαλεύκανση του βιολογικού ρόλου της GSK-3 στα παράσιτα, καθώς και στη διερεύνηση/ταυτοποίηση της GSK-3 σαν μόριο-στόχο θεραπευτικών προσεγγίσεων που να βασίζονται στην αναστολή του κυτταρικού κύκλου και στο σχεδιασμό καινούριων πιο αποτελεσματικών φαρμάκων για αυτές τις παραμελημένες παρασιτικές ασθένειες.

ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ

Κεφάλαιο 3

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Υλικά

3.1.1 Αντιδραστήρια

Χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια:

- Κοινά χημικά αναλυτικού τύπου καθώς και χημικά υψηλού βαθμού καθαρότητας (>99%) για τις τεχνικές Μοριακής Βιολογίας (Sigma, Fluka, Merck, BDH, Applichem).
- Περιοριστικές ενδονουκλεάσες (NEB, Roche), DNA πολυμεράση (Phusion high-fidelity, Finnzymes), T4 λιγάση (Roche), αλκαλική φωσφατάση (NEB).
- Πρωτεΐνάση K (Macherey-Nagel, Applichem), Λυσοζύμη (Sigma), Rnase A (Sigma), Απροτινίνη (Applichem), Πεπτοστατίνη (Sigma).
- DNA δείκτες μοριακών μεγεθών, 100bp και 1kb DNA ladder (NEB).
- Πρωτεΐνες αναφοράς χαμηλού μοριακού βάρους (Low Molecular Weight Calibration kit for SDS electrophoresis, GE Healthcare).
- Μόρια εκκινητές για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Thermo).
- Σύστημα απομόνωσης πλασμιδιακού DNA από βακτήρια (Macherey-Nagel).
- Σύστημα για τον καθαρισμό DNA από πήκτωμα αγαρόζης NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel).
- Θρεπτικά υλικά για τις βακτηριακές καλλιέργειες: Τρυπτόνη, εκχύλισμα ζύμης, άγαρ (Applichem).
- Θρεπτικά υλικά για τις κυτταροκαλλιέργειες: RPMI-1640 (Life Technologies), M199 (Biochrom AG), Schneider's (SIGMA, S-9895) ορός από έμβρυο μόσχου (FBS, Gibco), απενεργοποιημένος στους 56°C για 30 λεπτά (min).
- Διάλυμα HEPES (Gibco).
- Αντιβιοτικά για τις κυτταροκαλλιέργειες: πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη (Gibco), υγρομυκίνη B (Invitrogen), Geneticin (G418) (Applichem), Nourseothricin (Jena Bioscience),
- Άλλα αντιβιοτικά: αμπικιλλίνη (Bristol-Myers Squibb)
- Alamar Blue αντιδραστήριο για τα πειράματα κυτταρικής επιβίωσης (Biosource AG).

- Για την ανίχνευση της απόπτωσης: Apoptosis detection kit (R&D systems), TUNEL fluorescein apoptosis detection kit (Roche).
- Στήλη νικελίου (Ni-NTA Superflow resin, Quiagen, Macherey-Nagel).
- Kinase-Glo® Luminescent Kinase Assay kit

3.1.2 Αναλώσιμα υλικά

- Δοκιμαστικοί σωλήνες 15 και 50ml (Sarstedt, Greiner).
- Πλαστικά ακρορύγχια (tips) (Greiner).
- Αποστειρωμένες πλαστικές ορολογικές πιπέτες (Sarstedt).
- Πλαστικοί σωλήνες “eppendorf” 1,5ml (Greiner).
- Πλαστικοί σωλήνες για PCR 0,2ml (Kisker).
- Κυψελίδες 0,1cm για ηλεκτροδιάταση (Gene Pulser Cuvette Biorad) για βακτήρια.
- Πλαστικές κυψελίδες μιας χρήσης (Sarstedt).
- Φίλτρα με διάμετρο πόρου 0,2 και 0,45μm (Sartorius).
- Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης για μεταφορά πρωτεϊνών Hybond C (GE Healthcare).
- Φλάσκες καλλιέργειας παρασίτων 25 και 50cm² (Nunc).
- Τρυβλία κυτταροκαλλιιεργειών και πλάκες 24 και 96 φρεατίων για κυτταροκαλλιιεργειες (Sarstedt).
- Αποστειρωμένοι πλαστικοί ξύστες (Sarstedt).
- Κρυστοπροστατευτικοί σωλήνες 1,5ml (Nunc).
- Αιμοκυτταρόμετρα (Malassez, για τη μέτρηση παρασίτων/ Neubauer για τη μέτρηση κυττάρων θηλαστικών).
- Πλαστικοί σωλήνες κυτταρομετρίας των 5ml (BD Biosciences).
- Χαρτί διήθησης 3MM (Whatmann).
- Τρυβλία για στερεές καλλιιεργειες βακτηρίων (Sarstedt, Greiner).
- Μεμβράνη διαπίδωσης (Spectrum)
- Τρυβλία κυτταροκαλλιιεργειών και πλάκες 96 φρεατίων για κυτταροκαλλιιεργειες (Sarstedt).

3.1.3 Εργαστηριακός εξοπλισμός

- Συσκευές κάθετης ηλεκτροφόρησης (Mini-Protean II, Maxi-Protean Biorad) για την ανάλυση πρωτεϊνών και συσκευή μεταφοράς πρωτεϊνών σε νιτροκυτταρίνη (Mini Trans-Blot, Biorad).

- Συσκευές οριζόντιας ηλεκτροφόρησης για την ανάλυση DNA (Owl Buffer Puffer™, Model A5 της ThermoFischer Scientific).
- Ζυγοί: μικροζυγός ακριβείας και αναλυτικός ζυγός (430-33, Kern και AE50, Mettler αντίστοιχα).
- Υδατόλουτρο (ED13, Julabo).
- Πεχάμετρο (Orion 2-Star pH Benchtop Meter, Thermo Scientific).
- Vortex, θερμαινόμενη πλάκα, μαγνητικοί αναδευτήρες (MS2 minishaker της IKA, Bioblock Scientific της Sybron/Thermolyne και SB162 της Stuart αντίστοιχα).
- Πιππέτες μεταβλητού όγκου 1000μl/200μl/20μl και 2μl (Pipetman P1000, P200, P20 και U2 της Gilson αντίστοιχα).
- Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής (Eurocyt 120, FluFrance).
- Επωαστήρας για την καλλιέργεια ευκαρυωτικών κυττάρων (Heraeus Hera cell 150).
- Επωαστήρας 25°C για την καλλιέργεια παρασίτων (Shel-lab).
- Επωαστήρας για την καλλιέργεια βακτηρίων υπό ανάδευση (Lab Tech).
- Κυτταρομετρητής ροής (FACS CALIBUR, Becton-Dickinson).
- Φασματοφωτόμετρο (Perkin Elmer, Lambda Bio10).
- Συσκευή PCR (MJ Research, PTC-200).
- Μικροφυγόκεντρος και επιτραπέζια φυγόκεντρος (Eppendorf 5410 και Thermo, αντίστοιχα).
- Φυγόκεντρος εξάτμισης υπό κενό Centrifugal Evaporator (Labconco CentriVac Concentrator).
- Σύστημα 3 συσκευών για μετασχηματισμό βακτηρίων και παρασίτων με ηλεκτροδιάταση (Gene Pulser, Pulse Controller, Gene Transformer, Biorad).
- Ξηραντήρας πηκτών υπό κενό (Model 583 Gel Dryer/ HydroTech Vacuum Pump, Bio-Rad).
- Σύστημα σάρωσης οθονών αποτύπωσης ραδιενέργειας (PhosphorImager, Molecular Dynamics Storm).
- Συσκευή υπερήχων (Virsonic 475 Ultrasonic Cell Disrupter, Virtis).
- Σύστημα φωτογράφισης πηκτών αгарόζης σε UV (Alphaimager, AlphaInnotech Corp.)

•Μικροσκόπια: Ανάστροφο μικροσκόπιο (Axiovert 40C, Zeiss), TCSSP Leica
 συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού, μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss.

3.1.4 Αντισώματα

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα ακόλουθα:

- Συζευγμένα με υπεροξειδάση αντι-ισοτυπικά αντισώματα, έναντι των ανοσοσφαιρινών του κουνελιού και του ποντικού (Pierce).
- Πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης Ran-GTPase, που παρασκευάστηκε στο εργαστήριο.
- Πολυκλωνικό αντίσωμα ποντικού IgG His-probe (Acris antibodies).
- Πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού (anti-rabbit IgG), συζευγμένο με την πράσινη φθορίζουσα χρωστική Alexa Fluor 488 (Mol. probes). Χρησιμοποιήθηκε σαν δεύτερο αντίσωμα σε ανοσοφθορισμούς.
- Πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού (anti-rabbit IgG), συζευγμένο με την κόκκινη φθορίζουσα χρωστική Alexa Fluor 546 (Mol. probes). Χρησιμοποιήθηκε σαν δεύτερο αντίσωμα σε ανοσοφθορισμούς.
- Πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης LdGSK-3short, που παρασκευάστηκε στο εργαστήριο.
- Πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι της β-τουμπουλίνης (Santa Cruz Biotechnology).

3.1.5 Διαλύματα

Για την παρασκευή όλων των διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε δις-απεσταγμένο απιονισμένο νερό (ddH₂O). Τα θρεπτικά υλικά για τις καλλιέργειες των βακτηρίων, καθώς και τα ρυθμιστικά διαλύματα για τις διάφορες τεχνικές DNA και τις καλλιέργειες των ευκαρυωτικών κυττάρων, αποστειρώθηκαν σε υγρό κλίβανο για 20 λεπτά (min) σε συνθήκες 15lb/in² και θερμοκρασία 120°C, ή φιλτραρίστηκαν σε φίλτρα με διάμετρο πόρων 0,2μm.

PBS pH 7,4 (1lt), 10X	
NaCl	80g
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	12g
KCl	2g
KH ₂ PO ₄	2g

Διαλύματα ηλεκτροφόρησης DNA

Ρυθμιστικό διάλυμα (pH 8,0) ηλεκτροφόρησης TBE (1lt), 10X	
Tris-base	108g
H ₃ BO ₃	55g
0,5M EDTA pH 8,0	40ml

Διάλυμα “φόρτωσης” δείγματος DNA (loading buffer), 6X	
Χρωστική μπλέ της βρωμοφαινόλης	0,25% (w/v)
Σουκρόζη	40% (w/v)

Διαλύματα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών (SDS-PAGE)

Διάλυμα ακρυλαμιδίου 30% (w/v) (100ml)	
Ακρυλαμίδιο (C ₃ H ₅ NO)	29,2g
N,N-μεθυλεν-δισακρυλαμίδιο(C ₇ H ₁₀ N ₂ O ₂)	0,8g

Πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel) 12% (5ml) (pH 8,8)	
1,5M Tris-HCl pH 8.8	1,3ml
SDS 10% (w/v)	0,05ml
Διάλυμα ακρυλαμιδίου 30% (w/v)	2ml
Υπερθεϊκό αμμώνιο 10% (w/v) (APS)	50μl
TEMED	2μl
ddH ₂ O	1,7ml

Πήκτωμα συσσώρευσης (stacking gel) 4% (w/v) (5ml) (pH 6,8)	
1M Tris-HCl pH6,8	0,63ml
SDS 10% (w/v)	0,05ml
Διάλυμα ακρυλαμιδίου 30% (w/v)	0,83ml
Υπερθεϊκό αμμώνιο 10% (w/v) (APS)	50μl
TEMED	5μl
ddH ₂ O	3,4ml

Διάλυμα «φόρτωσης» δείγματος πρωτεϊνών (5X Laemli sample buffer, 20ml)	
SDS 2% (w/v)	2g
60mM Tris-HCl pH6,8	4ml
β-μερκαπτοαιθανόλη 5% (v/v)	5ml
Γλυκερόλη 10% (v/v)	10ml
Μπλε της βρωμοφαινόλης 0,01% (w/v)	1ml 1% (w/v) μπλε της βρωμοφαινόλης

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

Διάλυμα χρώσης (Coomasie stain)	
Χρωστική Coomassie R-250	0,25% (w/v)
Μεθανόλη	40% (v/v)
Οξικό οξύ	10% (v/v)

Διάλυμα χρώσης (Colloidal Coomassie stain)	
Χρωστική Coomassie G-250	0,25% (w/v)
Μεθανόλη	25% (v/v)
Θειικό αμμώνιο	8% (w/v)
Ορθο-φωσφορικό οξύ	1,6% (v/v)

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

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

Διαλύματα ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών (Western blot)

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

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

TBS pH7,4 (1lt) 10X	
Tris-base	60,57g
NaCl	87,66g

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

Διαλύματα απομόνωσης πλασμιδιακού DNA

Διάλυμα P1	
Tris-HCl, pH 8,0	50mM
EDTA	10mM
RNase A	100μg/ml
Διάλυμα P3	
Οξικό κάλιο (pH 5,0)	3M

Διάλυμα P2	
NaOH	200mM
SDS	1% (w/v)

Διαλύματα για την απομόνωση πρωτεϊνών με τη χρήση στήλης νικελίου

Διάλυμα λύσης βακτηρίων	
NaH ₂ PO ₄	50mM
NaCl	300mM
Λυσοζύμη	Μερικοί κόκκοι
Triton X-100	0,1% (v/v)
PMSF	1mM
Πεπστατίνη	4μg/ml
Απροτινίνη	4μg/ml
Ιμιδαζόλιο	20mM

Διάλυμα NPI10 (pH 8,0 με NaOH)	
NaH ₂ PO ₄	50mM
NaCl	300mM
Ιμιδαζόλιο	10mM

Διάλυμα λύσης για: <i>L. donovani</i> (LG13-LdGSK-3s-Sat) SF-9- <i>Tb</i> GSK-3s	
NaH ₂ PO ₄	50mM
NaCl	300mM
EDTA	1mM
EGTA	1mM
NaVO ₃	1mM
NaF	10mM
Triton X-100	1% (v/v)
PMSF	1mM
Πεπστατίνη	5μg/ml
Απροτινίνη	1:500
Φαιναθρολίνη	1mM
Ιμιδαζόλιο	10mM

Διάλυμα λύσης <i>L. mexicana</i> -CRK3	
MOPS	50mM
NaCl	100mM
EDTA	1mM
EGTA	1mM
NaVO ₃	1mM
NaF	10mM
Triton X-100	1% (v/v)
PMSF	1mM
Πεπστατίνη	5μg/ml
Απροτινίνη	1:500
Φαιναθρολίνη	1mM
Ιμιδαζόλιο	10mM

Διάλυμα DNPI20 (pH 8,0 με NaOH)	
NaH ₂ PO ₄	50mM
NaCl	300mM
Ιμιδαζόλιο	20mM

Διάλυμα DNPI50 (pH 8,0 με NaOH)	
NaH ₂ PO ₄	50mM
NaCl	300mM
Ιμιδαζόλιο	50mM

Διάλυμα DNPI150 (pH 8,0 με NaOH)	
NaH ₂ PO ₄	50mM
NaCl	300mM
Ιμιδαζόλιο	150mM

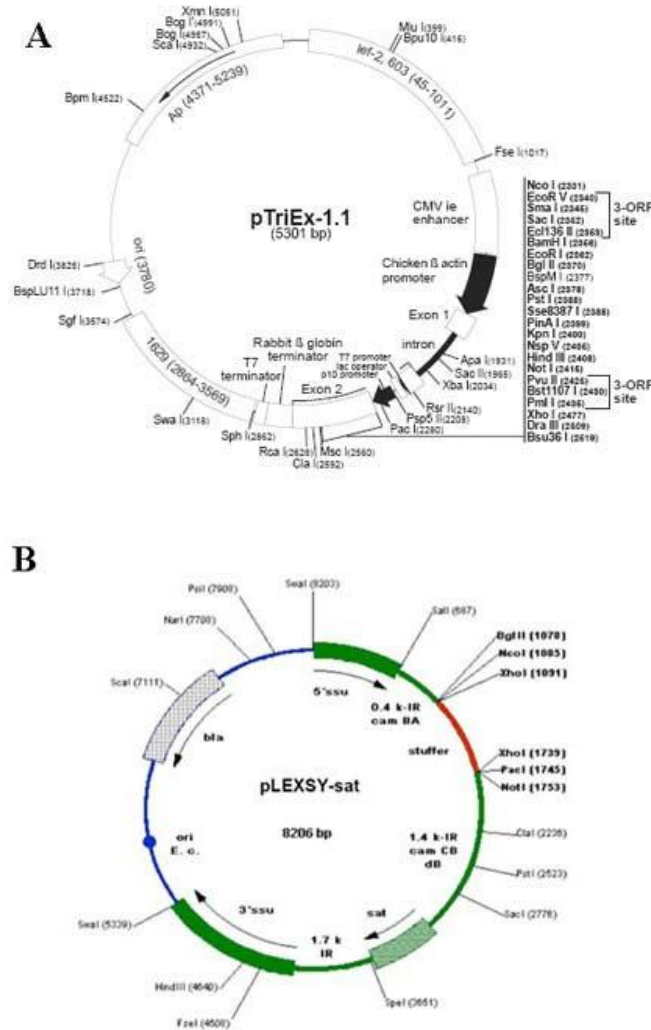
Διάλυμα DNPI250 (pH 8,0 με NaOH)	
NaH ₂ PO ₄	50mM
NaCl	300mM
Ιμιδαζόλιο	250mM

3.1.6 Φορείς κλωνοποίησης

Ο πλασμιδιακός φορέας pTriex 1.1 (Novagen) χρησιμοποιήθηκε για την ετερόλογη έκφραση της *TbGSK-3s* σε βακτήρια και σε βακιλοϊούς. Το γονίδιο κλωνοποιήθηκε στη θέση BamHI-XhoI του πολυσυνδέτη, η οποία επιτρέπει την προσθήκη μιας αλληλουχίας έξι συνεχών αμινοξέων ιστιδίνης (6xHis tag) στο καρβόξυ-τελικό άκρο της *TbGSK-3s* (Εικόνα 28A). Το πλασμίδιο pTriex 1.1 φέρει γονίδιο, που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη. Επίσης περιέχει τον υποκινητή T7 της λακτόζης, ο οποίος επάγεται από το μόριο-επαγωγέας β-ισοπροπυλο-D-θειογαλακτοζίδιο (IPTG), με αποτέλεσμα την έκφραση της *TbGSK-3s* συντηγμένης με την αλληλουχία 6xHis-tag. Τα βακτήρια έκφρασης BL21(DE3)pLysS και ο βακιλοϊός χρησιμοποιήθηκαν για την έκφραση της ανασυνδυασμένης *TbGSK-3s*.

Ο πλασμιδιακός φορέας pLEXY-sat (pF4X1.4sat) (Jena Bioscience) χρησιμοποιήθηκε για την επισωματική έκφραση της *TbGSK-3s* στην *Leishmania*. Το γονίδιο *TbGSK-3s* συντηγμένο με αλληλουχία (His)₆ κλωνοποιήθηκε στη θέση NcoI/NotI της περιοχής stuffer (Εικόνα 28B). Το

πλασμίδιο pLEXSY-sat κωδικοποιεί την streptothricine acetyltransferase, που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό nourseothricin.



Εικόνα 28. Α) Ο πλασμιδιακός φορέας pTriEx-1.1., Β) Ο πλασμιδιακός φορέας pLexsy-sat.

3.1.7 Εναρκτήρια μόρια

Οι αλληλουχίες των εναρκτήριων μορίων που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου *TbGSK-3s* (*Tb*427.10.13780) από *T. brucei* (BSF90-13 Lister 427) γενωμικό DNA είναι οι εξής:

TbGSK-3s F: 5'-GTGTGGATCCAATGTCGCTCAACCTTACCGA-3'

TbGSK-3s R: 5'-GAGACTCGAGCTTCTTCAGCAGATACTCCC-3'

Η αλληλουχία του εναρκτήριου μορίου *TbGSK-3s* F (Forward), είναι συμπληρωματική του 5' άκρου του γονιδίου της *TbGSK-3s*. Η αλληλουχία του εναρκτήριου μορίου *TbGSK-3s* R (Reverse), είναι συμπληρωματική του 3' άκρου του γονιδίου της *TbGSK-3s*. Το προϊόν της αντίδρασης PCR που ενισχύεται, έχει μήκος 1059 ζευγαριών βάσεων (bp).

3.1.8 Στελέχη παρασίτων – Κυτταρικές σειρές

Χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη παρασίτων:

- *Leishmania donovani*, LG13, MON-31, MHOM/ET/0000/HUSSEN
- *Trypanosoma brucei*, BSF90-13 Lister 427
- *Trypanosoma cruzi* (Y strain, discrete typing unit II) Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν τα ανασυνδυασμένα παράσιτα:
- *Leishmania donovani* LG13-sat
- *Leishmania donovani* LG13-sat–LdGSK-3short
- *Leishmania donovani* sat-LdGSK-3short-K49R
- *L. mexicana mexicana* (MNYC/BZ/62/M379) με γονότυπο CRK3::Hyg, CRK3::Ble, pTEXCRK3 his [199].
- *T. brucei*, BSF90-13 Lister 427, GSK1

Επίσης χρησιμοποιήθηκαν: η κυτταρική σειρά μακροφάγων ποντικού J774.1 της ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA), η κυτταρική σειρά LLC-MK2 κυττάρων και η κυτταρική σειρά εντόμων SF-9 από το έντομο *Spodoptera frugiperda*.

3.1.9 Χημική βιβλιοθήκη

Η χημική βιβλιοθήκη αποτελείται από 69 ιντιρουμπίνες, που προσφέρθηκαν από το εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων του Τμήματος Φαρμακευτικής του ΕΚΠΑ. Οι ιντιρουμπίνες διαλυτοποιήθηκαν στον οργανικό διαλύτη dimethylsulfoxide (DMSO), σε αρχική συγκέντρωση 10 mM, και με διαδοχικές αραιώσεις, σε συγκεντρώσεις 1mM και 100 μM σε DMSO. Στην πορεία του πειράματος, οι ιντιρουμπίνες αραιώθηκαν στο υλικό κυτταροκαλλιέργειας, ώστε να επιτευχθούν οι επιθυμητές τελικές συγκεντρώσεις. Τα ανάλογα ιντιρουμπινών που ελέγχθηκαν για την αντιπαρασιτική δράση τους περιλαμβάνουν υποκαταστάσεις στις θέσεις 3', 5, 6 και 7 του μορίου της ιντιρουμπίνης. Επίσης, δύο ανάλογα ελέγχθηκαν ταυτόχρονα με τις N-μέθυλο υποκαταστάσεις τους, καθώς αυτή η τροποποίηση καθιστά τα μόρια αδρανή ως αναστολείς κινασών [182].

3.2 Μέθοδοι

3.2.1 Κλωνοποιήσεις

3.2.1.1 Απομόνωση γενωμικού DNA από παράσιτα

Η μέθοδος της φαινόλης χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση γενωμικού DNA από τα παράσιτα. Αρχικά τα παράσιτα φυγοκεντρούνται στις 1700 στροφές ανά λεπτό (rpm) για 10 λεπτά (min). Αποχύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα το οποίο περιέχει τα παράσιτα, πλένεται με ίσο όγκο παγωμένο PBS και τα παράσιτα φυγοκεντρούνται στις ίδιες συνθήκες. Το πλύσιμο επαναλαμβάνεται μία ακόμα φορά. Τελικά, στο ίζημα των παρασίτων προστίθεται διάλυμα λύσης παρασίτων σε τέτοιο αναλογία ώστε 10^8 παράσιτα να περιέχονται ανά 0,5ml διαλύματος λύσης παρασίτων. Αφού αναδιαλυθεί το ίζημα στο διάλυμα λύσης, προσθέτουμε SDS 0,5% (w/v), πρωτεΐνάση K 100 $\mu\text{g/ml}$ και RNase A 100 $\mu\text{g/ml}$. Το δείγμα μας επωάζεται για 16 ώρες (h) στους 55°C . Μετά το πέρας των 16h προσθέτουμε ίσο όγκο φαινόλης και το δείγμα φυγοκεντρείται στις 3500rpm για 10 min. Συλλέγουμε την ανώτερη υδατική φάση στην οποία περιέχεται το DNA. Σε αυτή προσθέτουμε ίσο όγκο διαλύματος φαινόλης/χλωροφορμίου 1:1 (v/v) και φυγοκεντρούμε στις 3500rpm για 10 min. Η ανώτερη υδατική φάση συλλέγεται εκ νέου και προστίθεται σε αυτή ίσος όγκος χλωροφορμίου. Επαναφυγοκεντρούμε στις 3500rpm για 10 min και συλλέγουμε την ανώτερη υδατική φάση, στην οποία το DNA κατακρημνίζεται με προσθήκη 1/10 του όγκου οξικού νατρίου 3M με pH 5,2 και 2,5 όγκους αιθανόλης 100% (v/v). Το δείγμα αφήνεται στους 4°C για 10 min για να κατακρημνιστεί το DNA. Αν δεν παρατηρηθεί καταβύθιση ιζήματος στο δείγμα μας, τότε αυτό τοποθετείται στους -20°C για 16h. Στη συνέχεια, το δείγμα φυγοκεντρείται στις 3500rpm για 15 min και στο ίζημα που προκύπτει προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος αιθανόλης 70% (v/v) και ξαναφυγοκεντρούμε στις 3500rpm για 15 min. Ακολουθεί εξάτμιση του διαλύτη και αναδιάλυση του DNA σε ddH₂O. Η συγκέντρωση του DNA στο παρασκεύασμα προσδιορίζεται με μέτρηση της απορρόφησης στα 260nm από τη σχέση $1 \text{ OD}_{260\text{nm}} = 50 \mu\text{g DNA/ml}$ διαλύματος, ενώ η καθαρότητα του προσδιορίζεται από το λόγο $\text{O.D.}_{260\text{nm}}/\text{O.D.}_{280\text{nm}}$. Καθαρά παρασκευάσματα DNA έχουν $\text{O.D.}_{260\text{nm}}/\text{O.D.}_{280\text{nm}}=1,8-2,00$. Τέλος, η ποιότητα του DNA ελέγχεται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

3.2.1.2 Ενίσχυση αλληλουχίας DNA με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Με την ενίσχυση μιας αλληλουχίας DNA με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) καθίσταται δυνατή η ανίχνευση αυτής της αλληλουχίας. Η μέθοδος αυτή καταλύεται από μια DNA πολυμεράση, ανθεκτική σε υψηλές θερμοκρασίες, η οποία χρησιμοποιεί μονόκλωνο DNA ως εκμαγείο για να συνθέσει μια νέα συμπληρωματική αλυσίδα. Προκειμένου η DNA πολυμεράση να ξεκινήσει τη σύνθεση της αλυσίδας αυτής, είναι απαραίτητη η παρουσία ενός μικρού τμήματος δίκλωνου DNA και για το λόγο αυτό προστίθενται στην αντίδραση δύο ολιγονουκλεοτίδια ως εναρκτήρια μόρια (εκκινητές, primers) για το πολυμερισμό των συμπληρωματικών αλυσίδων DNA. Οι εκκινητές κατασκευάζονται έτσι ώστε να είναι συμπληρωματικοί με τις αλυσίδες της μήτρας DNA στα δύο άκρα του τμήματος DNA που πρόκειται να ενισχυθεί. Το μέγεθος των εκκινητών πρέπει να είναι μεγαλύτερο από 17 βάσεις, η θερμοκρασία τήξης του δίκλωνου DNA, όπου λαμβάνει χώρα ο αποχωρισμός των αλυσίδων (T_m), να είναι 50-65°C και η περιεκτικότητα στις βάσεις GC να είναι 40-60%, έτσι ώστε να πληρούν οι εκκινητές τα κριτήρια για να εξασφαλίζεται η πιστότητα της διαδικασίας.

Στο πρώτο στάδιο της διαδικασίας πραγματοποιείται αποδιάταξη της μήτρας DNA με θέρμανση. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται πτώση της θερμοκρασίας έτσι ώστε να υβριδοποιηθούν οι εκκινητές με τις συμπληρωματικές αλυσίδες της μήτρας DNA. Γενικός κανόνας είναι η θερμοκρασία υβριδοποίησης T_a να είναι μεγαλύτερη από την T_m των εκκινητών. Τέλος, με τη βοήθεια της DNA πολυμεράσης πραγματοποιείται ο πολυμερισμός των νέων αλυσίδων DNA. Τα τρία παραπάνω στάδια αποτελούν έναν κύκλο στην αντίδραση PCR. Ο κύκλος αυτός επαναλαμβάνεται πολλές φορές ενώ τα προϊόντα κάθε κύκλου χρησιμοποιούνται ως μήτρα DNA στους επόμενους κύκλους.

Στα πλαίσια αυτής της εργασίας, η PCR χρησιμοποιήθηκε για:

- A.** Ενίσχυση της αλληλουχίας της *TbGSK-3s* από γενωμικό DNA
- B.** Ενίσχυση της αλληλουχίας της *TbGSK-3s*-(His)6 από το κλωνοποιημένο πλασμίδιο pTriex 1.1

A. Ενίσχυση της αλληλουχίας της *TbGSK-3short* από γενωμικό DNA

Η μήτρα DNA που χρησιμοποιήθηκε ήταν *T. brucei* (BSF90-13, Lister 427) γενωμικό DNA και το γονίδιο που ενισχύθηκε είχε μήκος 1059 ζευγών βάσεων. Το μείγμα των αντιδράσεων PCR περιείχε:

Ρυθμιστικό διάλυμα Phusion DNA πολυμεράσης (5x)	10μl
dNTPs (10mM)	1μl
<i>TbGSK-3s</i> πρόσθιος εκκινητής (50 pmol/μl)	1μl
<i>TbGSK-3s</i> οπίσθιος εκκινητής (50 pmol/μl)	1μl
dd H ₂ O	35,5μl
Γενωμικό DNA (100 ng/ μl)	1μl
<u>Phusion DNA πολυμεράση (2U/ μl)</u>	<u>0,5μl</u>
Τελικός όγκος αντίδρασης	50μl

Το πρόγραμμα της αντίδρασης PCR που χρησιμοποιήθηκε ήταν το εξής:

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	95°C	4 min

Ακολουθούν επτά κύκλοι με τις παρακάτω συνθήκες:

Αποδιάταξη	95°C	30s (δευτερόλεπτα)
Υβριδοποίηση	55°C	30s
Πολυμερισμός	72°C	40s

Ακολουθούν είκοσι-οκτώ κύκλοι με τις παρακάτω συνθήκες:

Αποδιάταξη	95°C	30s
Υβριδοποίηση	60°C	30s
Πολυμερισμός	72°C	30s

Ακολουθεί τελικός πολυμερισμός:

Τελικός πολυμερισμός	72°C	10 min
----------------------	------	--------

Η αντίδραση τερματίζεται στους 4°C.

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

B. Ενίσχυση της αλληλουχίας της *TbGSK-3s*-(His)₆ από το κλωνοποιημένο πλασμίδιο pTriex 1.1

Η μήτρα DNA που χρησιμοποιήθηκε ήταν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pTriEx-1.1-*TbGSK-3s*-(His)₆. Το μείγμα των αντιδράσεων PCR περιείχε:

Ρυθμιστικό διάλυμα Phusion DNA πολυμεράσης (5x)	10μl
dNTPs (10mM)	1μl
<i>TbGSK-3short</i> πρόσθιος εκκινητής (50 pmol/μl)	1μl
<i>TbGSK-3short-6His</i> οπίσθιος εκκινητής (50 pmol/μl)	1μl
dd H ₂ O	35,5μl
Γενωμικό DNA (100 ng/ μl)	1μl
Phusion DNA πολυμεράση (2U/ μl)	0,5μl
Τελικός όγκος αντίδρασης	50 μl

Το πρόγραμμα της αντίδρασης PCR που χρησιμοποιήθηκε ήταν το εξής:

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	98°C	30s
Ακολουθούν επτά κύκλοι με τις παρακάτω συνθήκες:		
Αποδιάταξη	98°C	10s
Υβριδοποίηση	55°C	20s
Πολυμερισμός	72°C	20s
Ακολουθούν είκοσι-οκτώ κύκλοι με τις παρακάτω συνθήκες:		
Αποδιάταξη	98°C	10s
Υβριδοποίηση	60°C	20s
Πολυμερισμός	72°C	20s
Ακολουθεί τελικός πολυμερισμός:		
Τελικός πολυμερισμός	72°C	10 min

Η αντίδραση τερματίζεται στους 4°C.

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

3.2.1.3 Ανάλυση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου σε οριζόντιο πήκτωμα αγαρόζης (ηλεκτροφόρηση) διαχωρίζονται τα μόρια DNA με βάση το μέγεθος τους. Πιο συγκεκριμένα, τα μόρια DNA είναι φορτισμένα αρνητικά λόγω του ιονισμού των φωσφορικών ομάδων τους και επομένως μετακινούνται προς το θετικό πόλο. Η μετακίνηση αυτή γίνεται με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη προς το μέγεθος των μορίων DNA και έτσι τα μόρια αυτά διαχωρίζονται μεταξύ τους στο πήκτωμα. Πηκτώματα αγαρόζης 0,8-2% (w/v) χρησιμοποιήθηκαν ανάλογα με το μέγεθος των μορίων DNA που έπρεπε να διαχωριστούν. Η ηλεκτροφόρηση του πηκτώματος έγινε σε θερμοκρασία δωματίου, σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης TBE 1x στο οποίο είχε προστεθεί 0,5mg/ml βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr). Τα δείγματα DNA μετά από προσθήκη διαλύματος “φόρτωσης” δείγματος, ηλεκτροφορήθηκαν με σταθερό ρεύμα τάσης 100volts. Για το σωστό προσδιορισμό του μεγέθους των προς εξέταση μορίων DNA, παράλληλα με αυτά αναλύθηκαν και τμήματα DNA γνωστών μοριακών μεγεθών. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV) μήκους κύματος 302nm, οπότε και προσδιορίζονται οι θέσεις που έχουν μεταναστεύσει τα μόρια του DNA, με βάση το μέγεθός τους. Αυτό οφείλεται στην ενσωμάτωση της φθορίζουσας χρωστικής EtBr μεταξύ των αζωτούχων βάσεων του DNA. Στη συνέχεια, το πήκτωμα αγαρόζης φωτογραφίζεται με τη συσκευή φωτογράφησης.

3.2.1.4 Απομόνωση και καθαρισμός DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Για τον καθαρισμό DNA κατασκευάζονται παρασκευαστικά πηκτώματα αγαρόζης στα οποία ηλεκτροφορούνται τα δείγματά μας. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης το τμήμα του πηκτώματος που περιέχει τη ζώνη του DNA με το επιθυμητό μέγεθος, κόβεται και από αυτό γίνεται καθαρισμός του DNA με τη χρήση του Nucleospin Extract II (Macherey- Nagel) και ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συνοπτικά, στο τμήμα πηκτώματος το οποίο έχει κοπεί και περιέχει το τμήμα DNA που μας ενδιαφέρει, προστίθεται διάλυμα NTI σε ποσότητα ανάλογη του βάρους του κομματιού πηκτώματος (200μl NTI/100mg πηκτώματος). Το δείγμα θερμαίνεται σε θερμοκρασία 50°C για

5-10 min μέχρι να λιώσει το πήκτωμα. Στη συνέχεια, το δείγμα τοποθετείται στην ειδική στήλη η οποία περιέχεται στο κιτ και φυγοκεντρείται για 30s στα 11.000g. Η στήλη πλένεται μια φορά με 700μl διαλύματος NT3 και ακολούθως αφήνεται να στεγνώσει. Τέλος, το DNA που έχει προσδεθεί στη στήλη εκλύεται με προσθήκη 25μl ddH₂O.

Η συγκέντρωση καθώς και η ποιότητα του απομονωμένου DNA ελέγχεται με ηλεκτροφόρηση σε καινούριο πήκτωμα αγαρόζης.

3.2.1.5 Καθαρισμός προϊόντων PCR

Στις περιπτώσεις που πρέπει να απομακρυνθούν τα άλατα, τα ένζυμα, τα ολιγονουκλεοτίδια καθώς και άλλες προσμίξεις από το υδατικό διάλυμα των προϊόντων PCR, χρησιμοποιήθηκε το Nucleospin Extract II (Macherey-Nagel), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συνοπτικά, στο δείγμα της PCR προστίθεται διπλάσιος όγκος διαλύματος NTI και στη συνέχεια το δείγμα τοποθετείται στην ειδική στήλη που περιέχεται στο κιτ. Ακολουθεί φυγοκέντρωση 30s στα 11.000g. Η στήλη πλύθηκε μια φορά με 700μl διαλύματος NT3 και αφήνεται να στεγνώσει. Τέλος, το DNA που έχει προσδεθεί στη στήλη εκλύεται με προσθήκη 25μl ddH₂O.

Η συγκέντρωση καθώς και η ποιότητα του απομονωμένου DNA ελέγχεται με ηλεκτροφόρηση σε καινούριο πήκτωμα αγαρόζης.

3.2.1.6 Πέψη DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Η πέψη των δειγμάτων DNA γίνεται με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες, οι οποίες αναγνωρίζουν μικρές αλληλουχίες DNA και κόβουν τη δίκλωνη αλυσίδα DNA σε ειδικές θέσεις στο εσωτερικό ή σε γειτονικό σημείο της αλληλουχίας αναγνώρισης. Μια μονάδα (1U) περιοριστικής ενδονουκλεάσης αντιστοιχεί στη ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για την πλήρη πέψη 1μg καθαρού DNA σε διάστημα 1h. Κατά τις πειραματικές συνθήκες, το DNA που χρησιμοποιούμε προς πέψη είναι μερικώς καθαρισμένο, επομένως συνήθως απαιτείται μεγαλύτερος χρόνος επώασης του δείγματος μας με την περιοριστική ενδονουκλεάση ή και περισσότερη ποσότητα αυτής ανά μg DNA έτσι ώστε να επιτευχθεί πλήρης πέψη. Παρόλα αυτά, ο όγκος του περιοριστικού ενζύμου που προστίθεται δεν πρέπει να ξεπερνά το 1/10 του τελικού όγκου της αντίδρασης, γιατί η γλυκερόλη που

περιέχεται στο διάλυμα φύλαξης του ενζύμου μπορεί να επηρεάσει την αντίδραση.

Για τα πειράματα της παρούσας διατριβής χρησιμοποιήθηκε η παρακάτω αναλογία για την πέψη των δειγμάτων DNA: 2-3U περιοριστικού ενζύμου/1μg DNA/20μl (τελικός όγκος αντίδρασης). Η συγκέντρωση αλάτων και η θερμοκρασία της πέψης εξαρτώνται από τα περιοριστικά ένζυμα που χρησιμοποιούνται στην εκάστοτε πειραματική διαδικασία και ορίζονται από τον παρασκευαστή των περιοριστικών ενδονουκλεάσων.

3.2.1.7 Κλωνοποίηση του προϊόντος της αντίδρασης PCR σε πλασμιδιακό φορέα

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η κλωνοποίηση του προϊόντος PCR στον πλασμιδιακό φορέα επιλογής, πρέπει να πραγματοποιηθεί πέψη και στον ίδιο τον πλασμιδιακό φορέα και μάλιστα με τις ίδιες περιοριστικές ενδονουκλεάσες που χρησιμοποιήθηκαν για την πέψη του προϊόντος PCR. Αφού πραγματοποιηθεί η πέψη στο πλασμιδιακό φορέα, ακολουθεί αποφωσφορυλίωση αυτού με τη χρήση αλκαλικής φωσφατάσης από έντερο μοσχαριού (calf intestinal alkaline phosphatase, CIP), η οποία αποφωσφορυλώνει τα 5' άκρα του γραμμικού πλασμιδιακού DNA. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται προς αποφυγή επανασύνδεσης των άκρων του πλασμιδιακού φορέα που έχουν προκύψει από τη δράση των περιοριστικών ενδονουκλεασών.

Συγκεκριμένα, σε 10μg γραμμικού πλασμιδιακού DNA προστίθενται 10U CIP σε ρυθμιστικό διάλυμα αποφωσφορυλίωσης και το μείγμα επωάζεται στους 37°C για 20 min. Ακολούθως, πραγματοποιείται η κλωνοποίηση του γραμμικού πλασμιδιακού DNA με το προϊόν της PCR με τη χρήση της T4 DNA λιγάσης. Σε τελικό όγκο 10μl περιέχεται το γραμμικό πλασμιδιακό DNA, η αντίστοιχη ποσότητα του προς κλωνοποίηση μορίου DNA, 1U T4 DNA λιγάσης (1U/μl) και 1μl ρυθμιστικού διαλύματος λιγάσης (10x) και η αντίδραση πραγματοποιείται στους 16°C για 16h. Τέλος, η επιτυχία της αντίδρασης ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

3.2.1.8 Μετασχηματισμός βακτηρίων

Ο μετασχηματισμός των βακτηρίων εξαρτάται από τα επιδεκτικά βακτήρια που χρησιμοποιούνται. Συγκεκριμένα, γίνεται χημικός

μετασχηματισμός στα βακτήρια *E. coli* TOP10F και στα βακτήρια έκφρασης *E. coli* BL21(DE3)pLysS, ενώ στα βακτήρια *E. coli* DH5a ο μετασχηματισμός γίνεται με ηλεκτροδιάτρηση.

Η διαδικασία που ακολουθείται για την πραγματοποίηση του χημικού μετασχηματισμού περιγράφεται παρακάτω:

Σε 100μl επιδεκτικών βακτηρίων που φυλάσσονται στους -80°C προστίθεται 1μl (που περιέχει 50ng DNA) από την αντίδραση κλωνοποίησης και το μείγμα διατηρείται στον πάγο για 20 min. Στη συνέχεια, τα βακτήρια τοποθετούνται στους 42°C για 90s και αμέσως μεταφέρονται στον πάγο για 5 min. Ακολουθεί προσθήκη 1ml προθερμασμένου στους 37°C θρεπτικό υλικό LB χωρίς αντιβιοτικό. Τα μετασχηματισμένα πλέον βακτήρια τοποθετούνται σε επωαστικό θάλαμο στους 37°C για 1h υπό ανάδευση (200rpm). Τέλος, επιστρώνονται σε στέρεο θρεπτικό υλικό που περιέχει αμπικιλίνη (100μg/ml). Το τρυβλίο επωάζεται στους 37°C για 16h έτσι ώστε να προκύψουν αποικίες. Από τις αποικίες που θα προκύψουν επιλέγονται περίπου 10 για να ελέγξουμε την αντίδραση ανασυνδυασμού.

Η διαδικασία που ακολουθείται για την πραγματοποίηση της ηλεκτροδιάτρησης (electroporation) στα βακτήρια DH5a περιγράφεται παρακάτω:

Σε 50 μl επιδεκτικών βακτηρίων προστίθεται 1-2 μl (50 ng DNA) από την αντίδραση κλωνοποίησης και το μείγμα μεταφέρεται σε κυψελίδα 0,1 cm. Αφού επωαστεί στον πάγο για 1 min, στα άκρα της κυψελίδας εφαρμόζεται τάση με την ενεργοποίηση της συσκευής που παράγει τον ηλεκτρικό παλμό. Για το σκοπό αυτό η συσκευή Gene Pulser έχει ρυθμιστεί στα 25 μF και 1,8 KV και η συσκευή Pulse Controller στα 200 Ωhm. Για να είναι επιτυχής ο μετασχηματισμός των βακτηρίων ο ηλεκτρικός παλμός πρέπει να παρουσιάζει χρόνο εκπόλωσης (time constant) 4,5-5 msec. Αμέσως μετά τον παλμό, προστίθεται 1 ml θρεπτικού υλικού LB χωρίς αντιβιοτικό στην κυψελίδα και τα μετασχηματισμένα βακτήρια επωάζονται στους 37°C για 1h. Μετά την επώαση, τα βακτήρια επιστρώνονται σε στερεό θρεπτικό σε τρυβλίο Petri παρουσία αμπικιλίνης (100μg/ml). Το τρυβλίο επωάζεται στους 37°C για 16h έτσι ώστε να προκύψουν αποικίες. Από τις αποικίες που θα προκύψουν επιλέγονται περίπου 10 για να ελέγξουμε την αντίδραση ανασυνδυασμού.

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

Βακτήρια προερχόμενα από αποθηκευμένο κλώνο στους -80°C , επιστρώθηκαν σε στερεό θρεπτικό LB σε τρυβλίο παρουσία αντιβιοτικού επιλογής (στη συγκεκριμένη περίπτωση αμπικιλίνη, $100\mu\text{g/ml}$) και επωάστηκαν στους 37°C για 16h. Την επόμενη ημέρα μια αποικία επιλέχθηκε και επωάστηκε σε 10ml υγρού θρεπτικού υλικού LB παρουσία αντιβιοτικού επιλογής (στη συγκεκριμένη περίπτωση αμπικιλίνη, $100\mu\text{g/ml}$) σε θερμοκρασία 37°C . Τα βακτήρια αναπτύχθηκαν μέχρι την μέση-λογαριθμική φάση ανάπτυξης έτσι ώστε η συγκέντρωσή τους να μην υπερβαίνει τα 10^8 κύτταρα/ml. Στη συνέχεια τα βακτήρια επωάστηκαν στον πάγο για 10 min και φυγοκεντρήθηκαν στα 2500g για 10 min σε θερμοκρασία 4°C . Στη συνέχεια, το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το βακτηριακό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 10ml στείρου παγωμένου διαλύματος $0,1\text{M CaCl}_2$. Τα επαναιωρημένα βακτήρια επωάστηκαν στον πάγο για ακόμα 10 min. Επαναλήφθηκε η φυγοκέντρωση όπως και προηγουμένως. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το βακτηριακό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 2ml $0,1\text{M CaCl}_2$. Τα επαναιωρημένα βακτήρια μοιράζονται σε ποσότητες 100-200μl και φυλάσσονται στους -80°C .

3.2.1.8.2 Προετοιμασία επιδεκτικών κυττάρων *E. coli* DH5a

Βακτήρια προερχόμενα από αποθηκευμένο κλώνο στους -80°C , επιστρώθηκαν σε στερεό θρεπτικό LB σε τρυβλίο παρουσία αντιβιοτικού επιλογής (στη συγκεκριμένη περίπτωση αμπικιλίνη, $100\mu\text{g/ml}$) και επωάστηκαν στους 37°C για 16h. Την επόμενη ημέρα μια αποικία επιλέχθηκε και επωάστηκε σε 10ml υγρού θρεπτικού υλικού LB παρουσία αντιβιοτικού επιλογής (στη συγκεκριμένη περίπτωση αμπικιλίνη, $100\mu\text{g/ml}$) σε θερμοκρασία 37°C για 16h. Στη συνέχεια, η καλλιέργεια των 10ml ενσωματώθηκε σε 1l θρεπτικού υλικού LB και επωάστηκε μέχρι η τιμή της οπτικής πυκνότητας να φτάσει την τιμή 0.6 ($\text{OD}_{600}=0.6$). Ακολούθησε επώαση της βακτηριακής καλλιέργειας στον πάγο για 15 min και φυγοκέντρωση στα 1500g για 15 min σε θερμοκρασία 4°C . Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το βακτηριακό ίζημα πλύθηκε δυο φορές με 250ml παγωμένου ddH₂O, ενώ στη συνέχεια επαναιωρείται με την προσθήκη 10ml παγωμένου διαλύματος 10% (v/v) γλυκερόλης. Τα βακτήρια φυγοκεντρήθηκαν και το υπερκείμενο απορρίφθηκε. Τέλος, το βακτηριακό ίζημα επαναιωρήθηκε

σε ίσο όγκο παγωμένου διαλύματος 10% (v/v) γλυκερόλης. Τα επαναιωρημένα βακτήρια μοιράζονται σε ποσότητες 100-200μl και φυλάσσονται στους -80°C.

3.2.1.9 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργεια βακτηρίων

Για να μπορέσουμε να ταυτοποιήσουμε την ύπαρξη θετικών αποικιών απομονώνουμε πλασμιδιακό DNA σε μικρή κλίμακα (mini prep). Έτσι, από υγρές καλλιέργειες εμβολιασμένες με αποικίες μετασχηματισμένων βακτηρίων απομονώνεται γρήγορα μικρή ποσότητα πλασμιδιακού DNA όπως περιγράφεται παρακάτω.

Αρχικά, μια αποικία μετασχηματισμένων βακτηρίων εμβολιάζεται σε 5 ml θρεπτικό υλικό αντιβιοτικού επιλογής (στη συγκεκριμένη περίπτωση αμπικιλίνη, 100μg/ml) και ακολουθεί επώαση με ανάδευση στους 37°C για περίπου 16h. Το ίζημα των βακτηριακών κυττάρων, μετά από φυγοκέντρηση, διαλύεται με έντονη ανάδευση σε 100μl διαλύματος P1 και στη συνέχεια προστίθενται 200μl διαλύματος P2 (διάλυμα λύσης). Ακολουθεί επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια προστίθενται 150μl διαλύματος P3 και το δείγμα φυγοκεντρείται στις 10.000 rpm για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο περιέχει πλασμιδιακό DNA και RNA, ενώ το μεγαλύτερο χρωμοσωμικό DNA συμπαρασύρεται από τα βακτηριακά υπολείμματα στο ίζημα. Στο υπερκείμενο προστίθεται 1 ml αιθανόλης, η οποία κατακρημνίζει το πλασμιδιακό DNA και το RNA. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 10.000 rpm για 10 min και απομάκρυνση του υπερκειμένου. Το ίζημα ξεπλένεται με αιθανόλη 70% (v/v) και μετά την εξάτμιση του διαλύτη, αναδιαλύεται σε 40 μl ddH₂O. Το πλασμιδιακό DNA ελέγχεται στη συνέχεια με πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες, οπότε και εντοπίζονται οι κλώνοι που φέρουν το επιθυμητό ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.

Με την απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα (maxi prep) πραγματοποιείται απομόνωση μεγάλης ποσότητας υψηλής καθαρότητας πλασμιδιακού DNA, που απαιτείται σε περιπτώσεις κλωνοποίησης τμημάτων DNA, βακτηριακού μετασχηματισμού και έκφρασης ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε ένα πλασμιδιακό φορέα. Συγκεκριμένα, μία αποικία μετασχηματισμένων βακτηρίων εμβολιάζεται σε 5 ml θρεπτικό υλικό αντιβιοτικού επιλογής (στη συγκεκριμένη περίπτωση αμπικιλίνη, 100μg/ml)

και ακολουθεί επώαση με ανάδευση στους 37°C για περίπου 16h. Όγκος 1 ml από την παραπάνω καλλιέργεια εμβολιάζεται σε 500 ml θρεπτικό υλικό και ακολουθεί επώαση με ανάδευση στους 37°C για περίπου 16h. Την επόμενη μέρα, η καλλιέργεια φυγοκεντρείται στις 5.000 rpm για 10 min στους 4°C. Το βακτηριακό ίζημα αναδιαλύεται με ισχυρή ανάδευση σε 10 ml διαλύματος P1 και το δείγμα τοποθετείται σε πάγο. Στη συνέχεια, προσθέτουμε 10 ml διαλύματος P2 και ύστερα από ήπια ανάδευση και επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου, προσθέτουμε και 10 ml διαλύματος P3. Το δείγμα επωάζεται στον πάγο για 20 min και το υπερκείμενο διηθείται με υαλοβάμβακα και μεταφέρεται σε καθαρό σωλήνα. Ταυτόχρονα, γίνεται προετοιμασία της κολώνας, με προσθήκη 10 ml διαλύματος QBT. Στην κολώνα τοποθετείται το υπερκείμενο και στη συνέχεια διάλυμα QC (2 x 30 ml). Τελικά, γίνεται έκλουση του πλασμιδιακού DNA με 15ml διαλύματος QF. Στο έκλουσμα, προστίθενται 10,5ml ισοπροπανόλης και το μείγμα φυγοκεντρείται στις 11.000 rpm για 30 min στους 4°C, οπότε και καθιζάνει το πλασμιδιακό DNA. Το ίζημα ξεπλένεται με αιθανόλη 70% (v/v) και μετά την εξάτμιση του διαλύτη αναδιαλύεται σε 300 µl ddH₂O.

3.2.1.10 Υγρή και στερεή καλλιέργεια βακτηρίων-Φύλαξη βακτηρίων

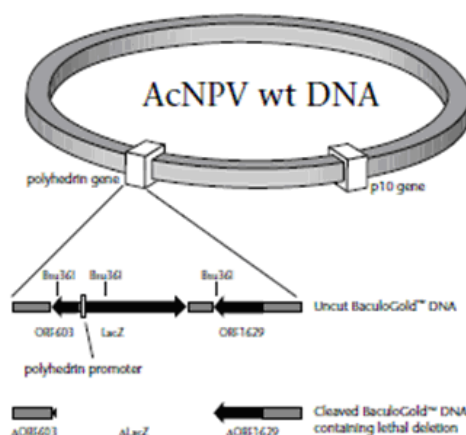
Τα διάφορα βακτηριακά στελέχη *E. coli* καλλιεργούνται σε υγρό θρεπτικό υλικό LB, παρουσία αντιβιοτικού επιλογής (στη συγκεκριμένη περίπτωση αμπικιλίνη, 100µg/ml) με συνεχή ανάδευση σε επωαστικό θάλαμο στους 37°C. Οι στερεές καλλιέργειες γίνονται σε τρυβλία Petri, σε LB που περιέχει άγαρ 1,5% (w/v), παρουσία αντιβιοτικού επιλογής (στη συγκεκριμένη περίπτωση αμπικιλίνη, 100µg/ml), για 16-24h στους 37°C. Τα βακτήρια φυλάσσονται για μεγάλα χρονικά διαστήματα στους -20°C και -80°C σε θρεπτικό υλικό παρουσία γλυκερόλης 50% (v/v). Οι υγρές καλλιέργειες μπορούν να διατηρηθούν στους 4°C για διάστημα 1-2 ημερών. Οι στερεές καλλιέργειες διατηρούνται επίσης στους 4°C για μικρό χρονικό διάστημα.

3.2.1.11 Παραγωγή, συμπύκνωση, τιτλοποίηση και συντήρηση ανασυνδιασμένων Βακιλοϊών

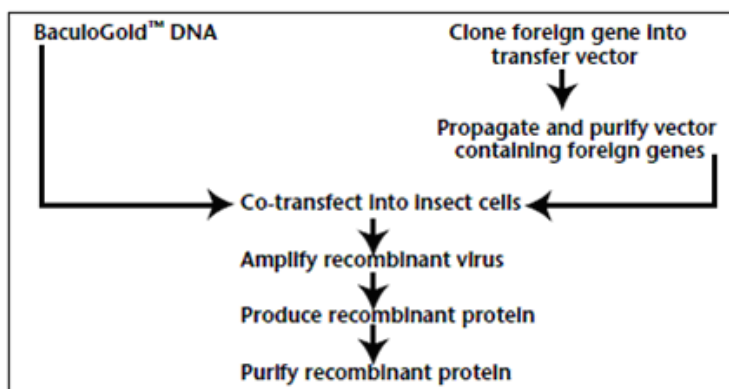
Για τη δημιουργία των ανασυνδιασμένων βακιλοϊών χρησιμοποιείται το BaculoGold DNA ο οποίος είναι ένας τροποποιημένος AcNPV DNA βακιλοϊός που περιέχει μια θανατηφόρα διαγραφή και δεν κωδικοποιεί βιώσιμο ιό

(Εικόνα 29). Συν-μετασχηματισμός του BaculoGold DNA με έναν συμπληρωματικό φορέα Baculovirus Transfer διασώζει τη θανατηφόρα διαγραφή με ομόλογο ανασυνδιασμό. Οι 'flanking' αλληλουχίες της περιοχής του υποκινητή του συμπληρωματικού φορέα πρέπει να προέρχονται από την περιοχή της πολυεδρίνης ενός AcNPV DNA αγρίου τύπου. Η θανατηφόρα διαγραφή στο BaculoGold είναι 1,7kb καθοδικά του γονιδίου της πολυεδρίνης. Καθώς μόνο ο ανασυνδιασμένος BaculoGold παράγει βιώσιμο ιό, η συχνότητα του ανασυνδιασμού ξεπερνά το 99%.

Ο συμπληρωματικός φορέας Baculovirus Transfer που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία είναι το πλασμίδιο p-Triex 1.1 στο οποίο έχει κλωνοποιηθεί η *TbGSK-3s*-(His)₆. 5μg DNA του φορέα Baculovirus Transfer προστίθενται σε 3ml SF900 το οποίο έχει αποστειρωθεί με φιλτράρισμα από φίλτρο 0,2μm. Στη συνέχεια, προσθέτουμε 4μl BaculoGold DNA και 40μl DOTAP και το μείγμα επωάζεται για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου. Παράλληλα, για την δημιουργία ανασυνδιασμένων βακιλοϊών χρησιμοποιούμε κύτταρα SF-9 σε εκθετική φάση ανάπτυξης τα οποία είναι ήδη καλλιεργημένα σε μια 75F φλάσκα. 3.000.000 από τα SF-9 κύτταρα στρώνονται ομοιόμορφα στη 25F φλάσκα σε 1ml SF900 με 5% FBS. Αφού προσκολληθούν τα κύτταρα, απομακρύνεται το υλικό και τα κύτταρα ξεπλένονται μια φορά με υλικό χωρίς ορό για να απομακρυνθούν τα υπολείμματα του. Έπειτα προστίθεται σε αυτά το μείγμα του DNA και επωάζονται για 5h στους 27°C. Μετά το πέρας των 5h αφαιρείται το υλικό και προστίθενται 5ml SF900 με 5% FBS και τα κύτταρα επωάζονται για 7 ημέρες στους 27°C. Κατά τη διάρκεια των ημερών αυτών τα κύτταρα ελέγχονται στο μικροσκόπιο και παρατηρείται η διαδικασία της μόλυνσης από τη μορφολογία των κυττάρων. Η γενική μεθοδολογία που χρησιμοποιείται παρουσιάζεται στην εικόνα 30.



Εικόνα 29: Περιγραφή του AcNPV BaculoGold DNA. Η περιοχή της πολυεδρίνης στο AcNPV DNA έχει τροποποιηθεί με του ακόλουθους τρόπους: 1) το γονίδιο lacZ έχει αντικαταστήσει το ιικό γονίδιο της πολυεδρίνης, 2) τρεις θέσεις πέψης για το ενζυμο Bsu361 έχουν προστεθεί, στα ORF 603, 1629 και μέσα στο lacZ, τα οποία δεν επηρεάζουν την αμινοξική αλληλουχία της κωδικοποιούμενης περιοχής. Το τροποποιημένο AcNPV DNA ευθυγραμμίστηκε στις θέσεις πέψης του Bsu361 διαγράφοντας έτσι μεγάλα κομμάτια από το ORF 1629.



Εικόνα 30: Συνολική σχηματική απεικόνιση της πειραματικής μεθοδολογίας για την κατασκευή ανασυνδιασμένων βακιλοϊών. Αρχικά γίνεται η επιλογή του κατάλληλου φορέα μεταφοράς και κλωνοποίηση σε αυτόν του ξένου γονιδίου. Γίνεται πολλαπλασιασμός του φορέα μεταφοράς που περιέχει το επιθυμητό γονίδιο με τη χρήση δεκτικών κυττάρων και καθαρισμός του. Έπειτα γίνεται συν-μετασχηματισμός του BaculoGold DNA και του ανασυνδιασμένου φορέα μεταφοράς σε SF-9 κύτταρα εντόμων. Ακολουθεί ο πολλαπλασιασμός του ανασυνδιασμένου ιού που προκύπτει στα κύτταρα αυτά. Το ενισχυμένο ιικό απόθεμα χρησιμοποιείται για την έκφραση της επιθυμητής πρωτεΐνης.

3.2.1.12 Απομόνωση ανασυνδιασμένου Βακιλοϊού με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων

Μετά το πέρας των 7 ημερών τα κύτταρα και το υλικό τους συλλέγονται μαζί και φυγοκεντρώνται στις 1000rpm για 5 min. Το υπερκείμενο που περιέχει τον ανασυνδιασμένο ιό, μεταφέρεται σε ένα falcon ενώ το ίζημα (pellet) των κυττάρων καταψύχεται στους -80°C. Ο ιός μπορεί να φυλαχθεί στο σκοτάδι στους 4°C ή στους -80°C. Έπειτα πραγματοποιείται η επιλογή ανασυνδιασμένων κλώνων με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων. Κατά τη

διαδικασία αυτή στρώνονται σε μια πλάκα με 96 φρεάτια (wells) SF-9 κύτταρα με συγκέντρωση $2,5 \times 10^4$ κύτταρα/50μl θρεπτικού υλικού εμπλουτισμένο με 10%FBS ανά φρεάτιο. Τα κύτταρα αφήνονται να προσκολληθούν και ύστερα προστίθενται 150μl ανά φρεάτιο από τις αραιώσεις του ιού. Οι αραιώσεις που χρησιμοποιούνται είναι από 10^{-3} έως 10^{-5} . Η κάθε αραιώση τοποθετείται σε τρεις σειρές των 8 φρεάτια (18 φρεάτια για κάθε αραιώση). Στη πλάκα επίσης υπάρχει μία σειρά η οποία χρησιμοποιείται ως αρνητικός μάρτυρας μόλυνσης, όπου αντί για αραιώση του ιού προστίθενται στα κύτταρα 150μl υλικού καλλιέργειας. Ακολουθεί επώαση για 7 ημέρες στους 27°C . Την έβδομη μέρα συλλέγονται οι πιο μολυσματικοί κλώνοι από την μεγαλύτερη δυνατή αραιώση και ακολουθεί ο πολλαπλασιασμός των κλώνων. Για τον ανασυνδιασμένο βακιλοϊό της παρούσας εργασίας αποκτήθηκαν 2 κλώνοι.

3.2.1.13 Ενίσχυση κλώνων

Στρώνονται 3.000.000 κύτταρα SF-9 σε μια φλάσκα 25F τα οποία μολύνουμε με τους 2 κλώνους του ανασυνδιασμένου βακιλοϊού. Για το σκοπό αυτό 100μl από κάθε κλώνο χρησιμοποιούνται για μόλυνση μιας 25F φλάσκας με 1ml θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με 10% FBS. Ακολουθεί αργή ανάδευση της φλάσκας για 1,5 h σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι. Έπειτα προστίθενται στη φλάσκα άλλα 4ml θρεπτικού υλικού με ορό και τα κύτταρα επωάζονται στους 27°C για 7 ημέρες. Μετά τις 7 μέρες, το υπερκείμενο υλικό περιέχει τον ανασυνδυασμένο ιό, ο οποίος συλλέγεται (p1 stock).

Το p1 stock του επιλεγμένου κλώνου χρησιμοποιείται για επιπλέον πολλαπλασιασμό. Για το σκοπό αυτό στρώνονται σε μια 75F φλάσκα κύτταρα SF-9 έτσι ώστε να καλύπτουν περίπου το 80% της επιφάνειας ανάπτυξης. Τα κύτταρα μολύνονται με 800μl από το p1 stock με την ίδια διαδικασία που περιγράφηκε στην παραπάνω παράγραφο. Μετά από 7 ημέρες συλλέγεται το p2 stock και ακολουθεί η ίδια διαδικασία σε 75F φλάσκα για τη συλλογή του p3 stock το οποίο τιτλοποιείται.

3.2.1.14 Έλεγχος έκφρασης ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε κύτταρα SF-9

Μετά το πέρας των 7 ημερών τα κύτταρα συλλέγονται μαζί με το υλικό καλλιέργειας και φυγοκεντρώνονται στις 1000rpm για 5 min. Το υπερκείμενο

(ενισχυμένος κλώνος p1 stock) μεταφέρεται σε ένα falcon και αλικοτάρεται για φύλαξη στους -80°C . Το pellet των κυττάρων καταψύχεται στους -80°C και μέρος αυτού χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της έκφρασης της πρωτεΐνης *TbGSK-3s* με τη μέθοδο την ανοσοαποτύπωσης με Western Blot. Με τον τρόπο αυτό ελέγχεται ποιος κλώνος εκφράζει την επιθυμητή πρωτεΐνη και αυτός ο κλώνος επιλέγεται για περαιτέρω πολλαπλασιασμό.

3.2.1.15 Τιτλοποίηση ιϊκών αποθεμάτων

Η τιτλοποίηση γίνεται σε 96 φρεατίων πλάκα όπως και προηγουμένως με αραιώσεις του ιού από 10^{-8} έως 10^{-11} . Σε κάθε πλάκα στρώνονται κύτταρα εντόμων σε συγκέντρωση 3×10^6 κύτταρα/6ml θρεπτικού υλικού. Η μόλυνση αναμένεται να είναι επιτυχής στην αραιώση 10^{-9} . Ο τίτλος υπολογίζεται με τον τύπο:

$$\text{PFU/ml} = \frac{\text{αριθμός πηγαδιών που μολύνθηκαν}}{\text{αραίωση} \times \text{ml αραίωσης συνολικά}}$$

Ο τίτλος από τον ιό που παρασκευάστηκε είναι *Bac-TbGSK-3s* = $2,7 \times 10^7$ PFU/ml.

3.2.1.16 Μόλυνση κυττάρων εντόμων SF-9 με ανασυνδυασμένο Βακιλοϊό

Κύτταρα εντόμων SF-9 στρώνονται σε 25F ή 75F φλάσκες έτσι ώστε να καλύπτουν περίπου το 80% της επιφάνειας ανάπτυξης και αφήνονται 24h να προσκολληθούν στην επιφάνεια των πηγαδιών. Μετά από 24h τα κύτταρα ξεπλένονται δυο φορές με PBS για να απομακρυνθεί ο ορός. Προσθέτουμε 500μl θρεπτικό υλικό χωρίς ορό και έπειτα γίνεται εμβολιασμός του ιού με MOI 1 και ακολουθεί επώαση για 3h στους 37°C . Ακολουθεί απομάκρυνση του υλικού που περιέχει τον ιό και προσθήκη ίσου όγκου θρεπτικού υλικού εμπλουτισμένου με ορό. Τα κύτταρα συλλέγονται μετά από 7 μέρες επώασης στους 37°C και ακολουθεί απομόνωση της *TbGSK-3s*. Το υπερκείμενο των κυττάρων που περιέχει τον ανασυνδυασμένο ιό, φυλάσσεται στους -80°C . Για βελτιστοποίηση της ποσότητας παραγωγής της *TbGSK-3s* σε σχέση με το χρόνο επώασης των κυττάρων εντόμων SF-9 με τον ανασυνδυασμένο ιό πρέπει να πραγματοποιηθούν μελλοντικά πειράματα.

3.2.2 Απομόνωση πρωτεϊνών από βακτήρια και ευκαρυωτικά κύτταρα

3.2.2.1. Επαγωγή των βακτηρίων έκφρασης BI21

Η επαγωγή των βακτηρίων γίνεται με χρήση IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) στο υλικό της καλλιέργειας. Πιο συγκεκριμένα, μια αποικία μετασχηματισμένων βακτηρίων εμβολιάζεται σε υγρή καλλιέργεια με θρεπτικό υλικό LB των 10 ml και επωάζεται στους 37°C για 16h. Στην συνέχεια, τα 10 ml καλλιέργειας που έχουν προκύψει εμβολιάζονται σε 500 ml θρεπτικό υλικό LB στο οποίο έχει προστεθεί 100μg/ml αμπικιλίνη. Ακολουθεί ανάδευση στους 37°C έως ότου η O.D._{600nm} της καλλιέργειας να γίνει ίση με 0,6. Στο σημείο αυτό προστίθεται το IPTG στην καλλιέργεια με τελική συγκέντρωση 1mM και συνεχίζεται η επώαση υπό ανάδευση στους 37°C για άλλες 3h. Μετά το πέρας των 3h, η καλλιέργεια συλλέγεται και φυγοκεντρείται στις 4.000rpm για 30 min στους 4°C. Αποχύνουμε το υπερκείμενο και το ίζημα μπορεί να φυλαχτεί στους -80°C αλλιώς προστίθεται σε αυτό διάλυμα λύσης 50 ml και αφού διαλυτοποιηθεί το ίζημα γίνεται χρήση υπερήχων 6-10 φορές για 30s με διαλλείματα 30s. Το βακτηριακό λύμα φυγοκεντρείται στις 14.000rpm για 15 min στους 4°C και συλλέγεται το υπερκείμενο που περιέχει το σύνολο των βακτηριακών πρωτεϊνών σε αποδιατεταγμένη μορφή και το pH ρυθμίζεται στο 8. Επίσης, φυλλάσουμε το ίζημα στους -20°C.

3.2.2.2 Απομόνωση της *TbGSK-3s*-(His)₆ από βακτήρια

Η αλληλουχία έξι συνεχών αμινοξέων ιστιδίνης στο τέλος του πρωτεϊνικού λύματος *TbGSK-3s* επιτρέπει τον καθαρισμό της με χρωματογραφία συγγένειας σε στήλη νικελίου (Ni²⁺-NTA-ρητίνη). Η πρωτεΐνη προσδένεται με υψηλή συγγένεια ($K_d=10^{-13}$) στη στήλη σε pH 8, καθώς σε αυτή την τιμή pH τα αμινοξέα ιστιδίνης φορτίζονται αρνητικά και σχηματίζουν ένα δακτύλιο γύρω από το κατιόν νικελίου. Η ικανότητα της στήλης νικελίου να προσδένει 6xHis-επισημασμένες πρωτεΐνες είναι 5-10 mg πρωτεΐνης/ml στήλης. Το NTA (nitrilotriacetic acid) αποτελεί ένα τετραδοντικό χηλικό συνδότη που καταλαμβάνει τις τέσσερις από τις έξι διαθέσιμες θέσεις δέσμησης του Ni²⁺. Οι υπόλοιπες δυο θέσεις δέσμησης καταλαμβάνονται συνήθως από μόρια H₂O τα οποία μπορούν να αντικατασταθούν από τα αμινοξέα ιστιδίνης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Εφόσον οι πρωτεΐνες που μας ενδιαφέρουν συνδεθούν στη ρητίνη, η έκλουση τους

πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας ιμιδαζόλιο (δομικό ανάλογο της ιστιδίνης) σε υψηλή συγκέντρωση που δρα ανταγωνιστικά ως προς τις πρωτεΐνες.

Για την απομόνωση της *TbGSK-3s* χρησιμοποιήθηκε το Protino Ni-NTA agarose kit (Macherey-Nagel) ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η μέθοδος ακολουθεί συνοπτικά:

Αρχικά, γίνεται εξισορρόπηση της Ni^{2+} -NTA-ρητίνης με περίσσεια ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων pH 8 με αναλογία 1:10 και πραγματοποιείται φυγοκέντρωση στις 1.000rpm για 5 min και απομακρύνεται το υπερκείμενο. Επαναλαμβάνουμε άλλες 2 φορές. Μετά την τελευταία πλύση, τα εξισορροπημένα σφαιρίδια Ni^{2+} -NTA-ρητίνης αναμιγνύονται με το βακτηριακό λύμα (προερχόμενου από 500 ml βακτηριακής καλλιέργειας) και ακολουθεί επώαση με ήπια ανάδευση για 16h στους 4°C όπου και πραγματοποιείται η πρόσδεση της *TbGSK-3s*-(His)₆ στα σφαιρίδια της ρητίνης. Την επόμενη μέρα, το μείγμα φυγοκεντρείται στις 2.500rpm για 5 min στους 4°C και απομακρύνεται το υπερκείμενο. Το ίζημα αναδιαλύεται σε 10 ml διαλύματος 50mM NaH_2PO_4 , 300mM NaCl, 10mM ιμιδαζόλιο (pH 8) και επαναλαμβάνεται φυγοκέντρωση στις ίδιες συνθήκες. Η πλύση επαναλαμβάνεται άλλη μία φορά. Στο στάδιο αυτό απομακρύνονται οι βακτηριακές πρωτεΐνες που δεν προσδένονται στη στήλη νικελίου. Ακολουθούν οι εκλούσεις από 2 φορές με προσθήκη 2 όγκων από το καθένα από τα διαλύματα που περιέχουν 50mM NaH_2PO_4 /300mM NaCl και αυξανόμενης συγκέντρωσης ιμιδαζολίου pH=8 (20mM, 50mM, 75mM, 150mM, 250mM, 400mM). Στα στάδια με συγκέντρωση ιμιδαζολίου 50-150mM εκλούεται η μεγαλύτερη ποσότητα της *TbGSK-3s*-(His)₆. Η απόδοση του καθαρισμού ελέγχεται με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και η συγκέντρωση της 6xHis-επισημασμένης πρωτεΐνης προσδιορίζεται με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 280nm ($1,4 \text{ O.D.}_{280\text{nm}} = 1 \text{ mg πρωτεΐνης /ml διαλύματος}$). Στα εκλούσματα (διαφορετικών συγκεντρώσεων ιμιδαζολίου) προστίθεται διάλυμα “φόρτωσης” δείγματος και αναλύονται σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου παρουσία SDS (SDS-PAGE), για να ελεγχθεί η απόδοση του καθαρισμού.

3.2.2.3 Απομόνωση *LdGSK-3s* και *CRK3* από ανασυνδυασμένα παράσιτα

Ο καθαρισμός της *LdGSK-3s* από τα παράσιτα που την υπερεκφράζουν, γίνεται με λύση 10^{10} παρασίτων στατικής φάσης sat-*LdGSK-3s* με 30 ml διαλύματος λύσης. Αντίστοιχα, ο καθαρισμός της *CRK3* από τα ανασυνδυασμένα παράσιτα *L. mexicana*, γίνεται με λύση 10^{10} παρασίτων στατικής φάσης *L. mexicana* CRK3his με 30 ml διαλύματος λύσης. Το λύμα των παρασίτων και στις δύο περιπτώσεις επωάζεται στον πάγο για 10 min. Στη συνέχεια διαλυτοποιείται επιπλέον με τη χρήση ομογενοποιητή (dounce) και φυγοκεντρείται στις 14.000rpm για 30 min στους 4°C. Ακολουθεί συλλογή του υπερκλειμένου, που περιέχει το σύνολο των πρωτεϊνών, ρύθμιση του pH στο 8 και φιλτράρισμα του υπερκλειμένου με φίλτρο διαμέτρου πόρων 0,2 μm. Ακολουθεί προετοιμασία των σφαιριδίων Ni^{2+} -NTA-ρητίνης όπως περιγράφηκε παραπάνω. Η διαδικασία απομόνωσης των πρωτεϊνών που ακολουθείται είναι η ίδια που περιγράφηκε στο παραπάνω κεφάλαιο (3.2.2.2), με τη διαφορά ότι για την *LdGSK-3s*-(His)₆ χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα με 50mM NaH_2PO_4 , 300mM NaCl, 10mM NaF, 1mM ορθοβαναδικό νάτριο με αυξανόμενες συγκεντρώσεις ιμιδαζολίου, ενώ για την απομόνωση της *CRK3*-(His)₆ χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα με 50mM MOPs, 100mM NaCl, 10mM NaF, 1mM ορθοβαναδικό νάτριο με αυξανόμενες συγκεντρώσεις ιμιδαζολίου.

Τα εκλούσματα διαφορετικών συγκεντρώσεων ιμιδαζολίου και στις δύο περιπτώσεις υφίστανται διαπίδυση σε ειδικούς σωλήνες Amicon, ώστε να απομακρυνθεί το ιμιδαζόλιο, που πιθανώς να δημιουργεί πρόβλημα στις δοκιμασίες αναστολής κινασών, που ακολουθούν. Για την ανάλυση των εκλουσμάτων σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου SDS-PAGE, στα δείγματα προστίθεται διάλυμα «φόρτωσης» που περιέχει SDS και β-μερκαπτοαιθανόλη και θερμαίνονται στους 100°C για 3 min. Στη συνέχεια, τα δείγματα αναλύονται με ανοσοαποτύπωμα χρησιμοποιώντας τα αντίσωμα anti-*LdGSK-3s* ή His-probe για να ελεγχθεί η απόδοση του καθαρισμού (Κεφάλαιο 3.2.3). Στα εκλούσματα προστίθεται 10% γλυκερόλη και φυλάσσονται στους -80°C για να χρησιμοποιηθούν στις δοκιμασίες αναστολής κινασών. Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι στα στάδια με συγκέντρωση ιμιδαζολίου 50mM εκλούεται η μεγαλύτερη ποσότητα της *CRK3*-(His)₆ ενώ στην απομόνωση της

LdGSK-3s-(His)₆, η μεγαλύτερη ποσότητα της εκλούεται στα στάδια με συγκέντρωση ιμιδαζολίου 150mM.

3.2.2.4 Απομόνωση *TbGSK-3s*-(His)₆ από SF-9 κύτταρα εντόμων μολυσμένων με ανασυνδιασμένο βακιλοϊό

Ακολουθώ της διαδικασίας μόλυνσης των SF-9 κυττάρων με ανασυνδιασμένο βακιλοϊό που περιγράφηκε στην παράγραφο 3.2.1.16, πραγματοποιείται η απομόνωση της *TbGSK-3s*-(His)₆ που έχει εκφραστεί στο διάστημα των 7 ημερών επώασης των κυττάρων με τον βακιλοϊό μέσα στα SF-9 κύτταρα. Εφόσον συλλεχθεί το υπερκείμενο και τα SF-9 κύτταρα από τη φλάσκα, φυγοκεντρούνται στις 1000rpm για 5 min. Το υπερκείμενο στο οποίο περιέχεται ο ανασυνδυασμένος βακιλοϊός με το *TbGSK-3s* γονίδιο, φυλάσσεται στους -80°C. Το ίζημα των κυττάρων SF-9 στο οποίο περιέχεται η *TbGSK-3s*-(His)₆, λύεται με τη προσθήκη του διαλύματος λύσης για SF-9 κύτταρα εντόμων και αναδεύεται για 1h στους 4°C. Στη συνέχεια, το λύμα των κυττάρων διαλυτοποιείται επιπλέον με τη χρήση ομογενοποιητή (dounce) και φυγοκεντρείται στις 14.000rpm για 30 min στους 4°C. Ακολουθεί συλλογή του υπερκειμένου, που περιέχει το σύνολο των πρωτεϊνών, ρύθμιση του pH στο 8 και φιλτράρισμα του υπερκειμένου με φίλτρο διαμέτρου πόρων 0,2 μm. Ακολουθεί προετοιμασία των σφαιριδίων Ni²⁺-NTA-ρητίνης όπως περιγράφηκε παραπάνω. Η διαδικασία απομόνωσης των πρωτεϊνών που ακολουθείται είναι η ίδια που περιγράφηκε στο παραπάνω κεφάλαιο (3.2.2.3) για την *LdGSK-3s*-(His)₆. Τα εκλούσματα διαφορετικών συγκεντρώσεων ιμιδαζολίου που λαμβάνουμε υφίστανται διαπίδση σε ειδικούς σωλήνες Amicon, ώστε να απομακρυνθεί το ιμιδαζόλιο, που πιθανώς να δημιουργεί πρόβλημα στις δοκιμασίες αναστολής κινασών, που ακολουθούν. Για την ανάλυση των εκλουσμάτων σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου SDS-PAGE, στα δείγματα προστίθεται διάλυμα «φόρτωσης» που περιέχει SDS και β-μερκαπτοαιθανόλη και θερμαίνονται στους 100°C για 3 min. Στη συνέχεια, τα δείγματα αναλύονται με ανοσοαποτύπωμα χρησιμοποιώντας τα αντίσωμα anti-*LdGSK-3s* ή His-probe για να ελεγχθεί η απόδοση του καθαρισμού (Κεφάλαιο 3.2.3). Στα εκλούσματα προστίθεται 10% γλυκερόλη και φυλάσσονται στους -80°C για να χρησιμοποιηθούν στις δοκιμασίες αναστολής κινασών. Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι στα στάδια με συγκέντρωση ιμιδαζολίου 250mM εκλούεται η μεγαλύτερη ποσότητα της *TbGSK-3s*-(His)₆.

3.2.3. Ανοσοαποτύπωμα Western

3.2.3.1. Ανάλυση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

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

Κατά την ηλεκτροφόρηση οι πρωτεΐνες τοποθετούνται αρχικά σε πήκτωμα με χαμηλή περιεκτικότητα σε ακρυλαμίδιο για να πακεταριστούν ομοιόμορφα και να εισέλθουν ταυτόχρονα έτσι ώστε να διαχωριστούν σωστά στο υψηλής περιεκτικότητας σε ακρυλαμίδιο πήκτωμα διαχωρισμού (12% w/v). Παράλληλα με τα δείγματα, γίνεται ανάλυση μείγματος πρωτεϊνών αναφοράς. Στα δείγματα έχει γίνει κατάλληλη προεργασία καθώς αραιώνονται σε διάλυμα “φόρτωσης” δείγματος και θερμαίνονται στους 100°C για 3 min. Οι συνθήκες αυτές είναι αποδιατακτικές για τις πρωτεΐνες καθώς ο βρασμός και η παρουσία του SDS καταστρέφουν τους ασθενείς δεσμούς (υδρογόνου, ιοντικούς, υδρόφοβους, van der Waals) ενώ η παρουσία της β-μερκαπτοαιθανόλης έχει ως αποτέλεσμα την αναγωγή των ισχυρών ομοιοπολικών δισουλφιδικών δεσμών. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε διάλυμα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών με σταθερή τάση 200V σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα υπόκειται εναλλακτικά στις εξής διαδικασίες: (α) Χρώση των πρωτεϊνικών ζωνών με διάλυμα χρωστικής (stain buffer), (β) Μεταφορά των διαχωρισμένων πρωτεϊνών σε νιτροκυτταρίνη. Στην πρώτη περίπτωση, οι ζώνες των πρωτεϊνών εμφανίζονται μετά από χρώση του πηκτώματος για 1h στους 37°C ή για 16h στους 4°C. Ακολουθεί αποχρωματισμός του πηκτώματος, με επανειλημμένες πλύσεις σε διάλυμα αποχρωματισμού (destain buffer).

3.2.3.2. Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Western blot)

Για τη μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα στη μεμβράνη, χρησιμοποιείται διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς πρωτεϊνών. Για τη μεταφορά των πρωτεϊνών ετοιμάζεται ένα σύστημα sandwich με την εξής σειρά: α) ένα λεπτό φύλλο σφουγγαριού, β) ένα φύλλο διηθητικού χαρτιού Whatmann 3MM, γ) το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, δ) ένα κομμάτι νιτροκυτταρίνης στο μέγεθος του πηκτώματος, ε) ένα φύλλο διηθητικού χαρτιού Whatmann 3MM, στ) ένα λεπτό φύλλο σφουγγαριού. Το σύστημα sandwich, τοποθετείται στην ειδική συσκευή μεταφοράς, έτσι ώστε η νιτροκυτταρίνη να βρίσκεται στην άνοδο. Η μεταφορά των πρωτεϊνών πραγματοποιείται με ρεύμα σταθερής έντασης 300 mA για 1-2h στους 4⁰C. Μετά τη μεταφορά, η μεμβράνη χρωματίζεται για περίπου 1 min με διάλυμα χρωστικής Ponceau S το οποίο βάφει μη ειδικά όλες τις πρωτεΐνες και κατόπιν ξεπλένεται με TBS για να απομακρυνθεί η περίσσεια της χρωστικής. Οι ζώνες των πρωτεϊνών γίνονται ορατές και ελέγχεται η επιτυχία της μεταφοράς.

3.2.3.3. Ανοσοενζυμική ανίχνευση των πρωτεϊνών

Η παραπάνω μεμβράνη στη συνέχεια επώαζεται υπό ανάδευση με διάλυμα 5% (w/v) λυοφιλομένου άπαχου γάλακτος σε TBS, για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να καλυφθούν οι μη ειδικές θέσεις στην μεμβράνη και να εμποδιστεί η μη ειδική πρόσδεση των αντισωμάτων σε αυτές τις θέσεις. Στη συνέχεια, ακολουθεί επώαση της μεμβράνης με το ειδικό αντίσωμα, αραιωμένο σε διάλυμα 2% (w/v) λυοφιλομένου άπαχου γάλακτος σε TBS, για 16h στους 4⁰C με συνεχή ανάδευση. Πραγματοποιούνται τρεις διαδοχικές πλύσεις με TBS που περιέχει Tween-20 1‰ (v/v) και τρεις διαδοχικές πλύσεις με διάλυμα TBS (10 min/πλύση). Ακολουθεί επώαση της μεμβράνης με αντί-ισοτυπικό αντίσωμα, σε διάλυμα 2% (w/v) λυοφιλομένου γάλακτος σε TBS, για 1-2h σε θερμοκρασία δωματίου με συνεχή ανάδευση. Το αντίσωμα αυτό φέρει ομοιοπολικά συνδεδεμένο το ένζυμο της υπεροξειδάσης. Πραγματοποιούνται τρεις διαδοχικές πλύσεις με TBS που περιέχει Tween-20 1‰ (v/v) και τρεις διαδοχικές πλύσεις με διάλυμα TBS (10 min/πλύση). Ακολουθεί επώαση της μεμβράνης σε ρυθμιστικό διάλυμα εμφάνισης υποστρώματος. Το διάλυμα περιέχει ως υπόστρωμα για το ένζυμο της υπεροξειδάσης την 3,3' DAB. Η 3,3' DAB οξειδώνεται, παρουσία

υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2), από το ένζυμο της υπεροξειδάσης και παράγει ένα έντονο σκούρο καφέ χρώμα. Με τον τρόπο αυτό οι ζώνες των πρωτεϊνών που έχουν προσδέσει ειδικά το αντίσωμα και κατ' επέκταση και το αντι-ισοτυπικό αντίσωμα, εμφανίζονται μετά από 2-3 min. Η νιτροκυτταρίνη στη συνέχεια πλένεται με ddH₂O, για να σταματήσει η αντίδραση και τοποθετείται πάνω σε χαρτί Whatmann 3MM για να στεγνώσει. Εναλλακτικά, όταν απαιτήθηκε μεγαλύτερη ευαισθησία ή ποσοτικοποίηση των ζωνών των πρωτεϊνών, χρησιμοποιήθηκε το ECL Advance Western Blotting Detection kit (GE Healthcare) ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Επειδή, το ανωτέρω σύστημα στηρίζεται στη χημειοφωταύγεια, η νιτροκυτταρίνη εμφανίζεται και φωτογραφίζεται στο Storm 860 Phosphoimager (Molecular Dynamics).

3.2.4 Ανοσοφθορισμός

Ο ανοσοφθορισμός χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό αντιγόνων των ιστών ή των κυττάρων, με τη χρήση αντισωμάτων σημασμένων με φθορίζουσα ουσία. Ο έμμεσος ανοσοφθορισμός εφαρμόζεται με χρήση ενός αντισώματος ειδικού για την υπό μελέτη πρωτεΐνη και ενός δεύτερου αντι-ισοτυπικού (σημασμένου με φθορίζουσα ουσία) αντισώματος. Τα δείγματα προετοιμάζονται ως εξής: Τα παράσιτα φυγοκεντρούνται στις 1.400rpm για 10 min και πλένονται με παγωμένο PBS. Στη συνέχεια μονιμοποιούνται με 1 ml PBS που περιέχει 2% φορμαλδεΰδη και 0,05% γλουταραλδεΰδη για 30 min. Τα μονιμοποιημένα κύτταρα πλένονται με PBS και επαναδιαλύονται σε 1 ml PBS. Επιστρώνονται 50μl εναιωρήματος παρασίτων/καλυπτρίδα (οι καλυπτρίδες είναι επεξεργασμένες με 1mg/ml poly-L-lysine). Μετά από επώαση 1h τα κύτταρα που δεν προσκολλήθηκαν απομακρύνονται με πλύσιμο με PBS. Τα προσκολλημένα κύτταρα μπλοκάρονται για 30 min σε 50mM χλωριούχο αμμώνιο (NH_4Cl) που περιέχει 3% BSA σε PBS και επεξεργάζονται με 50 μg/ml RNase A στους 37°C για 1h. Οι πυρήνες βάφονται με 10μg/ml φθορίζουσας χρωστικής PI και ακολουθεί επώαση για 5h με το αντίσωμα σε PBS που περιέχει 0,1% Triton X-100 και 3% BSA. Η BSA χρησιμοποιείται για την κάλυψη των μη ειδικών θέσεων σύνδεσης. Το αντίσωμα που δεν έχει δεσμευθεί, απομακρύνεται με την εμβάπτιση της καλυπτρίδα σε διάλυμα PBS. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται 3 φορές

(10 min/εμβάπτιση). Το προσδεμένο αντίσωμα στη συνέχεια εντοπίζεται με τη χρήση δεύτερου αντισώματος, σημασμένου με φθορίζουσα ουσία για 1h σε θερμοκρασία δωματίου. Οι καλυπτρίδες πλένονται με εμβάπτιση τους σε διάλυμα PBS και μοντάρονται σε αντικειμενοφόρους πλάκες. Τα κύτταρα *Leishmania* παρατηρούνται με μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss ή με TCSSP Leica συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού.

Η ίδια διαδικασία ακολουθείται και για τον εντοπισμό αντιγόνων στον κυτταροσκελετό των κυττάρων, με τη χρήση αντισωμάτων σημασμένων με φθορίζουσα ουσία με τη μόνη διαφορά ότι τα παράσιτα επωάζονται στην αρχή της διεργασίας με SSB/PEM-Nonidet 1% το οποίο απομακρύνει όλα τα διαλυτά κλάσματα των παρασίτων αλλά αφήνει ανέπαφο των κυτταροσκελετό τους.

3.2.5 Κυτταροκαλλιέργειες

3.2.5.1 Παράσιτα *Leishmania*

Οι προμαστιγωτές μορφές *L. donovani* LG13 καλλιεργούνται στους 25°C απουσία CO₂, σε θρεπτικό υλικό RPMI-1640 (Life Technologies) εμπλουτισμένο με 10% (v/v) FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco), 10mM Hepes (Gibco) και αντιβιοτικά πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη σε τελική συγκέντρωση 100U/ml, Gibco). Όταν κατά τον εμβολιασμό της καλλιέργειας προμαστιγωτών μορφών χρησιμοποιηθούν 10⁶ παράσιτα/ml, ο αριθμός των παρασίτων που συλλέγονται στην στατική φάση ανάπτυξης (5η-6η ημέρα καλλιέργειας) είναι περίπου 2-2,5x10⁷ παράσιτα/ml. Η περισυλλογή των παρασίτων γίνεται με φυγοκέντρηση στα 1.400rpm για 10 min στους 4°C. Το ίζημα των παρασίτων αναδιαλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS και ακολουθούν 2-3 εκπλύσεις με φυγοκέντρηση όπως προηγούμενως.

Τα ανασυνδυασμένα παράσιτα LG13-sat, LG13-sat-LdGSK-3s και LG13-sat-LdGSK-3s/K49R καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό M199, εμπλουτισμένο με 10% FBS, 40mM Hepes και αντιβιοτικά (5μg/ml στρεπτομυκίνη, 5U/ml πενικιλίνη), παρουσία του αντιβιοτικού επιλογής nourseothricin σε συγκέντρωση 100μg/ml. Τα ανασυνδυασμένα παράσιτα *L. mexicana mexicana* (MNYC/BZ/62/M379) με γονότυπο CRK3::Hyg, CRK3::Ble, pTEXCRK3 his [199] προσφέρθηκαν από την Δρ. K. Grant, Lancaster University, UK) και καλλιεργήθηκαν σε υλικό κυτταροκαλλιέργειας

M199, με 10% FBS και αντιβιοτικά (75μg/ml hygromycin B, 15μg/ml zeocin και 75μg/ml G418).

Για τη διατήρηση των διαφόρων στελεχών *Leishmania* για μικρό χρονικό διάστημα, $\sim 10^7$ παράσιτα σε DMEM/30% FBS/10% DMSO, φυλάσσονται στους -80°C σε ειδικούς κρυοπροστατευτικούς σωλήνες 1,5ml. Η διατήρησή τους για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα απαιτεί τη μεταφορά τους σε δοχείο που περιέχει υγρό άζωτο.

3.2.5.2 Παράσιτα *Trypanosoma*

Τα παράσιτα *Trypanosoma brucei* bloodstream form (BSF90-13 Lister 427) τα οποία προσφέρθηκαν από τον George Cross καλλιεργούνται σε υλικό HMI-9 παρασκευασμένο στο εργαστήριο εμπλουτισμένο με 10% (v/v) FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco), 10mM Hepes και παρουσία αντιβιοτικού (Neomycin 3μg/ml). Τα τροποποιημένα RNAi^{TbGSK-3s} παράσιτα που φέρουν το πλασμίδιο GSK1 καλλιεργούνται όπως παραπάνω με επιπλέον προσθήκη υδρομυκίνης (5μg/ml). Τα παράσιτα επωάζονται σε θάλαμο θερμοκρασίας 37°C σε ατμόσφαιρα 5% CO_2 και ανακαλλιεργούνται κάθε 2 μέρες. Για την επαγωγή του RNAi στα τροποποιημένα παράσιτα προσθέτουμε στο υλικό καλλιέργειας 1μg/ml τετρακυκλίνη για 24, 48 και 72h.

Τα μετακυκλικής τρυπομαστιγωτής μορφής παράσιτα *Trypanosoma cruzi* (Y strain, discrete typing unit II) συλλέγονται από το υπερκείμενο των LLC-MK2 κυττάρων και καλλιεργούνται στους 37°C παρουσία 5% CO_2 , σε θρεπτικό υλικό RPMI-1640 (Life Technologies) εμπλουτισμένο με 10% (v/v) FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco) και αντιβιοτικό γενταμυκίνη 50μg/mL. Η κυτταρική σειρά LLC-MK2 κυττάρων προέρχεται από νεφρικά επιθηλιακά κύτταρα μαϊμούς *Macaca mulatta* και καλλιεργείται σε θρεπτικό υλικό MEM (EBSS) εμπλουτισμένο με 10% (v/v) FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco). Τα τρυπομαστιγωτά *T. cruzi* μολύνουν τα LLC-MK2 κύτταρα, πολλαπλασιάζονται μέσα σε αυτά και στη συνέχεια ελευθερώνονται στο υπερκείμενο της καλλιέργειας.

3.2.5.3 Μακροφάγα J774.1

Τα μακροφάγα της σειράς J774.1 προερχόμενα από μύες (American Type Culture Collection, Manassas, VA) καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό RPMI-1640 (Life Technologies) εμπλουτισμένο με 10% (v/v) FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco), 10mM Hepes (Gibco) και αντιβιοτικά

πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη σε τελική συγκέντρωση 100U/ml (Gibco). Για τον εμβολιασμό της καλλιέργειας μακροφάγων χρησιμοποιούνται 10^5 μακροφάγα/ml. Τα μακροφάγα διατηρούνται σε επωαστικό κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 37°C, σε ατμόσφαιρα 5% CO₂ για 7 περίπου ημέρες, μέχρι να καλυφθεί ο τάπητας της φλάσκας κατά 80% περίπου. Όσα μακροφάγα είναι προσκολλημένα στον τάπητα είναι ζωντανά, ενώ όσα αιωρούνται στο υλικό κυτταροκαλλιέργειας είναι νεκρά. Ο αριθμός των μακροφάγων στη στατική φάση ανάπτυξης είναι περίπου 2×10^6 μακροφάγα/ml. Κατά την ανακαλλιέργεια, απομακρύνουμε το υπερκείμενο υλικό το οποίο περιέχει τα νεκρά μακροφάγα, προσθέτουμε φρέσκο υλικό και με 'scraper' σηκώνουμε τα ζωντανά μακροφάγα, που χρησιμοποιούνται για εμβολιασμό σε νέα κυτταροκαλλιέργειας. Ο χρόνος διπλασιασμού των μακροφάγων J774.1 είναι 24h. Η περισυλλογή των μακροφάγων J774.1 γίνεται με φυγοκέντρηση (1.000rpm) για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Η κυτταρική σειρά J774.1 διατηρείται σε RPMI/30% FBS/10% DMSO για μικρό χρονικό διάστημα στους -80°C ή εναλλακτικά για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε υγρό άζωτο.

3.2.5.4 Κύτταρα σειράς SF-9 προερχόμενη από έντομα

Για την παραγωγή ανασυνδιασμένων βακιλοϊών χρησιμοποιείται η κυτταρική σειρά εντόμων SF-9 από το έντομο *Spodoptera frugiperda* τα οποία απομονώνονται από την ωοθήκη της νύμφης των εντόμων. Τα κύτταρα αυτά έχουν επιθηλιακή μορφολογία και καλλιεργούνται στην παρούσα εργασία προσκολλημένα. Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιείται είναι το Sf900 II (GIBCOBRL) με 5% FBS. Προστίθεται επίσης αντιβιοτικό γκενταμικίνη (GIBCO) σε τελική συγκέντρωση 50μg/ml. Τα κύτταρα αυτά καλλιεργούνται στους 27°C, χωρίς ατμόσφαιρα CO₂.

3.2.6 Έλεγχος *in vitro* κυτταρικής επιβίωσης/πολλαπλασιασμού.

3.2.6.1 Εφαρμογή της μεθόδου Alamar blue σε προμαστιγωτά *L. donovani*

Το Alamar blue είναι ένας δείκτης οξειδωσης-αναγωγής, μη τοξικός για τα κύτταρα και χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση της ανάπτυξης και της βιωσιμότητας κυττάρων επωασμένων με ουσίες [273]. Το Alamar blue μπορεί να αναχθεί από μεταβολικά ενδιάμεσα των ζωντανών κυττάρων, όπως το NADH, FADH, NADPH και αυτή η αναγωγή του συνοδεύεται από μία

μετρήσιμη μετατροπή στο χρώμα, δηλαδή μετατροπή από την οξειδωμένη μορφή (μη φθορίζουσα-μπλε) στην αναγμένη μορφή (φθορίζουσα- κόκκινη).

Χρησιμοποιούνται καλλιέργειες προμαστιγωτών που βρίσκονται στη στατική φάση ($2,5 \times 10^7$ παράσιτα/ml). Επιστρώνονται 5×10^5 παράσιτα σε 200λ υλικού κυτταροκαλλιέργειας/φρεάτιο ($2,5 \times 10^6$ παράσιτα/ml). Σε κάθε φρεάτιο προστίθεται ιντιρουμπίνη σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ή ο ίδιος όγκος του διαλύτη DMSO (φρεάτια-μάρτυρες), ώστε η τελική συγκέντρωση του DMSO στα φρεάτια να είναι $<1\%$ (v/v) καθώς συγκέντρωση DMSO μεγαλύτερη από 2% μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη των παρασίτων. Κάθε συγκέντρωση ιντιρουμπίνης ή DMSO ελέγχεται σε τριπλά φρεάτια. Ως αρνητικό μάρτυρα στο πείραμα περιλαμβάνονται και φρεάτια μόνο με υλικό κυτταροκαλλιέργειας, όπου η ανάπτυξη είναι 0%. Τα παράσιτα επωάζονται για 72h στους 26°C , οπότε προστίθεται 20μl Alamar blue/φρεάτιο και ακολουθεί επώαση για 24h. Ακολουθεί φωτομέτρηση σε Elisa plate reader στα 550nm, με αναφορικό μήκος κύματος στα 620 nm. Οι τιμές οπτικής πυκνότητας (OD) που λαμβάνονται στα φρεάτια-θετικούς μάρτυρες, που έχει προστεθεί DMSO είναι περίπου 0,9-1 και αντιστοιχούν σε 100% ανάπτυξη των παρασίτων. Σύγκριση των τιμών OD στα φρεάτια με ιντιρουμπίνες, σε σχέση με τα φρεάτια-μάρτυρες, επιτρέπει τον υπολογισμό της κατάλληλης συγκέντρωσης ιντιρουμπίνης, που μειώνει τον αριθμό των προμαστιγωτών κατά 50% (IC_{50}).

3.2.6.2 Εφαρμογή της μεθόδου Alamar blue σε ενδοκυτταρικά αμαστιγωτά *L. donovani*

Στην περίπτωση αυτή, μολυσμένα με προμαστιγωτά μακροφάγα επωάζονται για 72h με τις ιντιρουμπίνες και στη συνέχεια ελέγχεται η επιβίωση των παρασίτων με λύση των μακροφάγων και έμμεση ποσοτικοποίηση των ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών με τη μέθοδο του Alamar blue.

Συγκεκριμένα, αρχικά επιστρώνονται 4×10^4 μακροφάγα σε 200μl υλικού κυτταροκαλλιέργειας RPMI/φρεάτιο (2×10^5 μακροφάγα/ml) σε πλάκα κυτταροκαλλιέργειας 96 φρεατίων και επωάζονται σε θάλαμο θερμοκρασίας 37°C σε ατμόσφαιρα 5% CO_2 , για 18h, ώστε να γίνει η προσκόλληση των κυττάρων. Ακολουθεί απομάκρυνση του υπερκείμενου υλικού και προσθήκη 8×10^5 μετακυκλικών προμαστιγωτών (4×10^6 παράσιτα/ml) σε 200μl υλικού κυτταροκαλλιέργειας/φρεάτιο. Μετά από επώαση των μακροφάγων με τα

παράσιτα για 24h στους 37°C, όπου γίνεται η μόλυνση των μακροφάγων από τα παράσιτα, απομακρύνεται το υπερκείμενο υλικό και ξεπλένονται τα προσκολλημένα κύτταρα 3 φορές με υλικό RPMI χωρίς ορό ή με αποστειρωμένο PBS 1x, ώστε να απομακρυνθούν όσα παράσιτα δεν έχουν εισέλθει στα μακροφάγα.

Τέλος γίνεται προσθήκη 200μl RPMI/φρεάτιο και σε κάθε φρεάτιο προστίθεται ιντιρουμπίνη σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ή ο ίδιος όγκος του διαλύτη DMSO (φρεάτια-control) και τα μολυσμένα μακροφάγα επωάζονται παρουσία των φαρμάκων στους 37°C σε ατμόσφαιρα 5% CO₂ για 72h. Μετά το πέρας των 72h γίνεται απομάκρυνση του υπερκείμενου υλικού και προσθήκη 100μl/φρεάτιο διαλύματος 0,01% SDS σε 1xPBS και ακολουθεί επώαση στους 37°C σε ατμόσφαιρα 5% CO₂ για 30 min. Στο διάστημα αυτό λύνονται τα μακροφάγα, ενώ τα αμαστιγωτά που απελευθερώνονται παραμένουν ανέπαφα [274]. Μετά τα 30 min προσθέτουμε 100μl/φρεάτιο υλικό Schneider's-20% FBS και επωάζουμε στους 37°C σε ατμόσφαιρα 5% CO₂ για 48h περίπου. Τέλος, προστίθεται 20μl Alamar blue/φρεάτιο για 24h και γίνεται φωτομέτρηση όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο 3.2.6.1. Σύγκριση των τιμών OD στα φρεάτια με ιντιρουμπίνες, σε σχέση με τα φρεάτια-μάρτυρες, επιτρέπει τον υπολογισμό της κατάλληλης συγκέντρωσης ιντιρουμπίνης, για να μειωθεί ο αριθμός των αμαστιγωτών κατά 50% (IC₅₀).

3.2.6.3 Απομόνωση μακροφάγων περιτοναϊκής κοιλότητας για εφαρμογή της μεθόδου Alamar blue σε ενδοκυτταρικά αμαστιγωτά *L. donovani*

Τα μακροφάγα τα οποία απομονώνονται από την περιτοναϊκή κοιλότητα χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερη ικανότητα φαγοκυττάρωσης σε σύγκριση με τους άλλους πληθυσμούς μακροφάγων [275]. Για το λόγο αυτό παράλληλα ελέγχτηκε η δράση των ιντιρουμπινών σε ενδοκυττάρια αμαστιγωτά *L. donovani* τα οποία είχαν φαγοκυτταρωθεί από περιτοναϊκά μακροφάγα. Τα αποτελέσματα τα οποία συλλέξαμε ήταν παρόμοια με αυτά τα οποία συλλέχτηκαν με τη χρήση της κυτταρικής σειράς μακροφάγων J774.1, και για το λόγο αυτό τα πειράματα συνεχίστηκαν με τη χρησιμοποίηση των μακροφάγων της κυτταρικής σειράς.

Η περισυλλογή των μακροφάγων περιτοναϊκής κοιλότητας έγινε από BALB/c μύες ηλικίας 6-8 εβδομάδων. Αρχικά, γίνεται έκχυση 1ml 4%

αποστειρωμένου θειογλυκολικού ζωμού (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) και ύστερα από 72h τα πειραματόζωα θανατώνονται με αυχενική παρεκτόπιση ενώ τα μακροφάγα της περιτοναϊκής κοιλότητας συλλέγονται με 3 εκπλύσεις της κοιλότητας του 1ml θρεπτικού υλικού RPMI-1640. Τα κύτταρα τοποθετούνται σε κωνικούς πλαστικούς σωλήνες των 50ml και φυγοκεντρούνται στις 1.200rpm για 10 min στους 4°C. Το υπερκείμενο αποχύνεται και στο ίζημα προστίθεται 2ml ψυχρού διαλύματος ACK το οποίο βοηθάει στη λύση των ερυθροκυττάρων. Η διακοπή της λύσης των ερυθροκυττάρων γίνεται με προσθήκη ψυχρού θρεπτικού υλικού RPMI-1640 και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες. Γίνεται έκπλυση 2 φορές των κυττάρων και στη συνέχεια τα κύτταρα μετριοούνται σε αιματοκυτταρόμετρο Neubauer και τοποθετούνται στα φρεάτια της πλάκας κυτταροκαλλιέργειας 96 φρεατίων. Τα μακροφάγα παρέμειναν στους 37°C παρουσία 5% CO₂ για να προσκολληθούν και να διαχωριστούν από τα υπόλοιπα λευκοκύτταρα της περιτοναϊκής κοιλότητας, αλλά και για να εισέλθουν σε κατάσταση ηρεμίας πριν χρησιμοποιηθούν για την πειραματική διαδικασία. Στη συνέχεια ακολουθείται η ίδια διαδικασία που περιγράφηκε στο κεφάλαιο 3.2.6.2 και πραγματοποιήθηκε εφαρμογή της μεθόδου Alamar blue σε ενδοκυτταρικά αμαστιγωτά *L. donovani* με χρήση μακροφάγων περιτοναϊκής κοιλότητας.

3.2.6.4 Εφαρμογή της μεθόδου Alamar blue σε μακροφάγα J774.1

Επιστρώνονται 4×10^4 μακροφάγα σε 200μl υλικού κυτταροκαλλιέργειας RPMI/φρεάτιο (2×10^5 μακροφάγα/ml) σε πλάκα κυτταροκαλλιέργειας 96 φρεατίων και επωάζονται σε θάλαμο θερμοκρασίας 37°C σε ατμόσφαιρα 5% CO₂ για 18h, ώστε να γίνει η προσκόλληση των κυττάρων. Ακολουθεί απομάκρυνση του υπερκείμενου υλικού και προσθήκη ιντιρουμπίνης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ή ίδιου όγκου του διαλύτη DMSO (φρεάτια-control) και επώαση στους 37°C σε ατμόσφαιρα 5% CO₂ για 72h. Στη συνέχεια, προστίθενται 20μl Alamar blue/φρεάτιο για 12h και φωτομέτρηση όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο 3.2.6.1. Οι τιμές OD των φρεατίων με ιντιρουμπίνες συγκρίνονται με τις τιμές των φρεατίων-μάρτυρες, έτσι ώστε να υπολογιστεί η κατάλληλη συγκέντρωση ιντιρουμπίνης, που αναστέλλει τα μακροφάγα κατά 50% (IC₅₀).

3.2.6.5 Εφαρμογή της μεθόδου Alamar blue σε BSF *T. brucei*

Επιστρώνονται 2×10^4 παράσιτα σε 200μl υλικού κυτταροκαλλιέργειας HMI-9/φρεάτιο (1×10^5 μακροφάγα/ml) σε πλάκα κυτταροκαλλιέργειας 96 φρεατίων και επωάζονται σε θάλαμο θερμοκρασίας 37°C σε ατμόσφαιρα 5% CO_2 μαζί με διαφορετικές συγκεντρώσεις ιντιρουμπινών ή ίδιου όγκου του διαλύτη DMSO (φρεάτια-control) για 72h. Στη συνέχεια, προστίθενται 20μl Alamar blue/φρεάτιο για 12h και γίνεται φωτομέτρηση όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο 3.2.6.1. Οι τιμές OD των φρεατίων με ιντιρουμπίνες συγκρίνονται με τις τιμές των φρεατίων-μάρτυρες, έτσι ώστε να υπολογιστεί η κατάλληλη συγκέντρωση ιντιρουμπίνης που αναστέλλει τα μακροφάγα κατά 50% (IC_{50}).

3.2.6.6 Έλεγχος *in vitro* κυτταρικής επιβίωσης/πολλαπλασιασμού σε τρυπομαστιγωτά *T. cruzi*.

Τρυπομαστιγωτής μορφής *T. cruzi* παράσιτα συλλέγονται από το υπερκείμενο κυττάρων LLC-MK2 και επιστρώνονται σε πλάκα 96 φρεατίων (4×10^5 παράσιτα ανά ml) σε 200μl υλικού κυτταροκαλλιέργειας/φρεάτιο. Σε κάθε φρεάτιο προστίθεται ιντιρουμπίνη σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ή ο ίδιος όγκος του διαλύτη DMSO (φρεάτια-μάρτυρες), ώστε η τελική συγκέντρωση του DMSO στα φρεάτια να είναι $\leq 1\%$ (v/v). Κάθε συγκέντρωση ιντιρουμπίνης ή DMSO ελέγχεται σε τριπλά φρεάτια. Ως αρνητικοί μάρτυρες στο πείραμα περιλαμβάνονται και φρεάτια μόνο με υλικό κυτταροκαλλιέργειας, όπου η ανάπτυξη είναι 0%. Τα παράσιτα επωάζονται για 24h στους 37°C παρουσία 5% CO_2 . Στη συνέχεια, τα ζωντανά παράσιτα μετριοούνται με τη βοήθεια αιματοκυτόμετρου Neubauer και η % αναστολή υπολογίζεται με βάση των αριθμό των ζωντανών παρασίτων στα φρεάτια που προστέθηκε μόνο διαλύτης DMSO.

3.2.6.7 Έλεγχος *in vitro* κυτταρικής επιβίωσης/πολλαπλασιασμού σε ενδοκυττάρια αμαστιγωτά *T. cruzi*.

Στην περίπτωση αυτή, μολυσμένα με τρυπομαστιγωτά μακροφάγα επωάζονται για 96h με τις ιντιρουμπίνες και στη συνέχεια ελέγχθηκε η επιβίωση των παρασίτων με χρώση των κυττάρων και μέτρηση των παρασίτων που επιβίωσαν μέσα στα μακροφάγα.

Συγκεκριμένα, αρχικά επιστρώνονται 2×10^5 μακροφάγα σε πλάκα κυτταροκαλλιέργειας 24 φρεατίων στο πάτο των οποίων έχουν προστεθεί καλυπτρίδες και επωάζονται σε θάλαμο θερμοκρασίας 37°C σε ατμόσφαιρα

5% CO₂, για 24h, ώστε να γίνει η προσκόλληση των κυττάρων. Ακολουθεί απομάκρυνση του υπερκείμενου υλικού και προσθήκη τρυπομαστιγωτών σε αναλογία 10 παράσιτα ανά μακροφάγο σε 1ml υλικού κυτταροκαλλιέργειας/φρεάτιο. Μετά από επώαση των μακροφάγων με τα παράσιτα για 2h στους 37°C, όπου γίνεται η μόλυνση των μακροφάγων από τα παράσιτα, απομακρύνεται το υπερκείμενο υλικό και ξεπλένονται τα προσκολλημένα κύτταρα 3 φορές με υλικό RPMI χωρίς ορό ή με αποστειρωμένο PBS 1x, ώστε να απομακρυνθούν όσα παράσιτα δεν έχουν εισέλθει στα μακροφάγα.

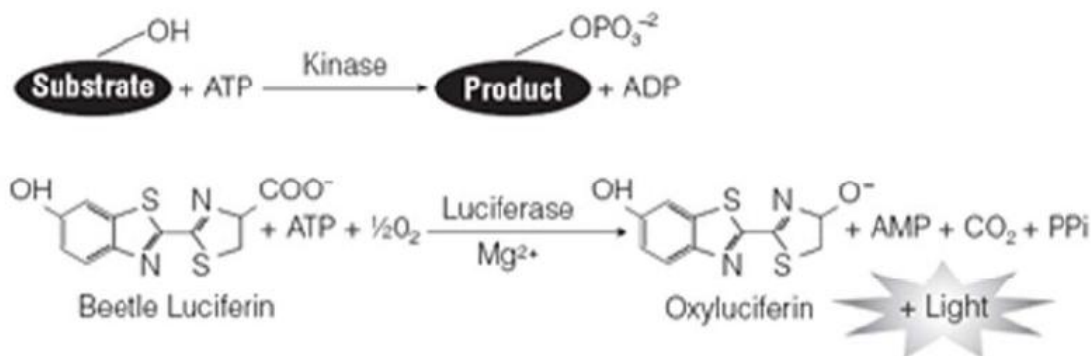
Ακολουθεί προσθήκη 1ml RPMI/φρεάτιο και σε κάθε φρεάτιο προστίθεται ιντιρουμπίνη σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ή ο ίδιος όγκος του διαλύτη DMSO (φρεάτια-control) και τα μολυσμένα μακροφάγα επωάζονται παρουσία των φαρμάκων στους 37°C σε ατμόσφαιρα 5% CO₂ για 6h. Μετά το πέρας των 6h γίνεται απομάκρυνση του υπερκείμενου υλικού και προσθήκη 1ml RPMI/φρεάτιο και ακολουθεί επώαση στους 37°C σε ατμόσφαιρα 5% CO₂ για 4 μέρες. Στη συνέχεια, τα μολυσμένα μακροφάγα μονιμοποιούνται με μεθανόλη και γίνεται χρώση Giemsa. Τέλος, τα παράσιτα που περιέχονται στα μακροφάγα μετριοούνται με χρήση οπτικού μικροσκοπίου (Model CX41, Olympus, Tokyo, Japan). Τουλάχιστον, 100 μολυσμένα μακροφάγα μετριοούνται για κάθε αραίωση ιντιρουμπίνης. Σύγκριση των τιμών στα φρεάτια με ιντιρουμπίνες, σε σχέση με τα φρεάτια-μάρτυρες, επιτρέπει τον υπολογισμό της κατάλληλης συγκέντρωσης ιντιρουμπίνης, για να μειωθεί ο αριθμός των αμαστιγωτών κατά 50% (IC₅₀).

3.2.7 Ενζυμολογία

3.2.7.1. *In vitro* πείραμα αναστολής των *LdGSK-3s*, *CRK3* και *TbGSK-3s*

Η ενεργότητα των κινασών *LdGSK-3s* και *CRK3* στα διάφορα εκλούσματα ιμιδαζολίου μελετήθηκε χρησιμοποιώντας ως υποστρώματα το συνθετικό πεπτιδίο GS-1 (YRRAAVPPSPSLSRHSSPHQSpEDEEE) για τις *LdGSK-3s* και *TbGSK-3s* και την ιστόνη H1 των θηλαστικών για την *CRK3*. Το GS-1 πεπτιδίο συντίθενται με βάση την αλληλουχία αμινοξέων της συνθετάσης του γλυκογόνου των θηλαστικών, στις περιοχές φωσφορυλίωσης από την GSK-3 και χρησιμοποιείται στις δοκιμασίες της κινάσης GSK-3β των

θηλαστικών [276, 277], ενώ η ιστόνη H1 των θηλαστικών είναι το φυσιολογικό υπόστρωμα της ομόλογης της CRK3 κινάσης των θηλαστικών, CDK1. Για την γρήγορη ανάλυση/σάρωση (highthroughput screening) όσον αφορά τη μέτρηση της ενεργότητας κινασών στις δοκιμασίες αναστολής κινασών, χρησιμοποιείται το Kinase-Glo® Luminescent Kinase Assay kit. Με τη συγκεκριμένη μέθοδο, η μέτρηση της ενεργότητας γίνεται με ποσοτικοποίηση του ATP που παραμένει στο διάλυμα μετά από την αντίδραση κινάσης (Εικόνα 31). Στην εικόνα φαίνεται ότι αρχικά γίνεται φωσφορυλίωση του υποστρώματος από την κινάση, με κατανάλωση του ATP. Όσο πιο έντονη η αναστολή της φωσφορυλίωσης, τόσο λιγότερο ATP θα καταναλώνεται στο διάλυμα της αντίδρασης. Το ATP που παραμένει μετά το τέλος της αρχικής αντίδρασης, χρησιμοποιείται από τη λουσιφεράση, η οποία καταλύει την οξυγόνωση του υποστρώματος της, της λουσιφερίνης. Η αντίδραση της λουσιφεράσης παράγει ένα φωτόνιο σε κάθε αντίδραση. Η βιοφωταύγεια που μετρείται είναι ανάλογη με την ποσότητα του ATP που χρησιμοποιείται από τη λουσιφεράση και επομένως είναι αντιστρόφως ανάλογη με την ενεργότητα της κινάσης.



Εικόνα 31. Αντιδράσεις στις οποίες βασίζεται η μέθοδος Kinase-Glo®.

Αρχικά έγιναν αντιδράσεις προκειμένου να καθοριστεί η ενεργότητα των κινασών στα διάφορα εκλούσματα ιμιδαζολίου (50, 150, 250 και 400mM ιμιδαζολίου). Η αντίδραση πραγματοποιείται στους 30°C για 30 min ώστε να συμφωνούν με ήδη δημοσιευμένα πειραματικά δεδομένα.

Η κάθε αντίδραση δοκιμασίας της *LdGSK-3s* περιείχε τα εξής:

<i>LdGSK-3s</i> (εκλούσματα 50, 150, 250 και 400 mM ιμιδαζολίου)	10 μ l
Διάλυμα δοκιμασίας κινασών (10x)	4 μ l
GS-1 πεπτιδίο (τελική συγκέντρωση 10 μ M)	1,2 μ l
ATP (τελική συγκέντρωση 10 μ M)	1 μ l
ddH ₂ O	23,8 μ l
Τελικός όγκος	40 μl

Η κάθε αντίδραση δοκιμασίας της *CRK3* περιείχε τα εξής:

<i>CRK3</i> (εκλούσματα 50, 150, 250 και 400 mM ιμιδαζολίου)	10 μ l
Διάλυμα δοκιμασίας κινασών (10x)	4 μ l
Ιστονή H1 (τελική συγκέντρωση 10 μ M)	5,2 μ l
ATP (τελική συγκέντρωση 10 μ M)	1 μ l
ddH ₂ O	19,8 μ l
Τελικός όγκος	40 μl

Η κάθε αντίδραση δοκιμασίας της *TbGSK-3s* περιείχε τα εξής:

<i>TbGSK-3s</i> (εκλούσματα 50, 150, 250 και 400 mM ιμιδαζολίου)	10 μ l
Διάλυμα δοκιμασίας κινασών (10x)	4 μ l
GS-1 πεπτιδίο (τελική συγκέντρωση 10 μ M)	1,2 μ l
ATP (τελική συγκέντρωση 10 μ M)	1 μ l
ddH ₂ O	23,8 μ l
Τελικός όγκος	40 μl

Μετά το τέλος της αντίδρασης της κινάσης προστίθεται ίσος όγκος Kinase Glo® Max Reagent (40 μ l). Ακολουθεί 10 min ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου και υπό σκοτάδι και έπειτα μετρείται η βιοφωταύγεια σε λουμινόμετρο για να καθοριστεί ενεργότητα των εκλουσμάτων. Η μεγαλύτερη παρατηρούμενη ενεργότητα των κινασών *LdGSK-3s*, *CRK3* και *TbGSK-3s* παρατηρείται στα εκλούσματα 150mM, 50mM και 250mM ιμιδαζολίου αντίστοιχα, τα οποία και χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα αναστολής των κινασών. Στη συνέχεια, έγιναν μελέτες κινητικής, προκειμένου να προσδιοριστούν οι σταθερές K_m των ενζύμων για το ATP και το

υπόστρωμα και τελικά προσδιορίστηκε η ιδανική ποσότητα κινάσης για τις δοκιμασίες αναστολής.

Τα πειράματα αναστολής των κινασών έγιναν με το ίδιο πρωτόκολλο, με προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων αναστολέων, έτσι ώστε οι τελικές συγκεντρώσεις του αναστολέα στις αντιδράσεις να είναι: 0,01μM, 0,03μM, 0,1μM, 0,33μM, 1μM και 3,33μM.

Η κάθε αντίδραση αναστολής της *LdGSK-3s* περιείχε τα εξής:

<i>LdGSK-3s</i>	1 μl
Αναστολέας	4 μl
Διάλυμα δοκιμασίας κινασών (10x)	4 μl
GS-1 πεπτιδίο (τελική συγκέντρωση 8,3 μM)	1,2 μl
ATP (τελική συγκέντρωση 15 μM)	1 μl
<u>dd H₂O</u>	<u>28,8 μl</u>
Τελικός όγκος	40 μl

Η κάθε αντίδραση αναστολής της *CRK3* περιείχε τα εξής:

<i>CRK3</i>	1,5 μl
Αναστολέας	4 μl
Διάλυμα δοκιμασίας κινασών (10x)	4 μl
Ιστονή H1 (τελική συγκέντρωση 5 μM)	5,2 μl
ATP (τελική συγκέντρωση 15 μM)	1 μl
<u>dd H₂O</u>	<u>24,3 μl</u>
Τελικός όγκος	40 μl

Η κάθε αντίδραση αναστολής της *TbGSK-3s* περιείχε τα εξής:

<i>TbGSK-3s</i>	2 μl
Αναστολέας	4 μl
Διάλυμα δοκιμασίας κινασών (10x)	4 μl
GS-1 πεπτιδίο (τελική συγκέντρωση 8,3 μM)	1,2 μl
ATP (τελική συγκέντρωση 15 μM)	1 μl
<u>dd H₂O</u>	<u>27,8 μl</u>
Τελικός όγκος	40 μl

Ως θετικός μάρτυρας στις αντιδράσεις χρησιμοποιείται δείγμα στο οποίο δεν έχει προστεθεί αναστολέας, όπου μετρίεται η μικρότερη τιμή βιοφωταύγειας και ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιείται δείγμα στο οποίο δεν έχει προστεθεί κινάση, όπου μετρίεται η μέγιστη τιμή βιοφωταύγειας. Ο τύπος που χρησιμοποιήθηκε για να υπολογιστούν τα ποσοστά αναστολής των κινάσων από τους αναστολείς ήταν ο εξής:

$$\% \text{ αναστολή} = 100 \times \frac{(\text{τιμή δείγματος-θετικός μάρτυρας})}{(\text{αρνητικός μάρτυρας-θετικός μάρτυρας})}$$

Στη συνέχεια δημιουργήθηκαν καμπύλες δόσης-απόκκρισης για κάθε αναστολέα, από τις οποίες καθορίστηκαν οι τιμές IC₅₀. Επιπλέον, οι τιμές IC₅₀ εξαρτώνται από την ενδογενή συγγένεια του αναστολέα, τη σταθερά διάστασης του συμπλόκου ενζύμου-αναστολέα Ki, καθώς και από τον ανταγωνισμό από το ATP (συγκέντρωση του ATP) και την σταθερά Km του ενζύμου για το ATP. Οι τιμές αυτές συσχετίζονται μεταξύ τους με την εξίσωση Cheng- Prusoff:

$$Ki = \frac{IC_{50}}{(1+[ATP]/Km, ATP)}$$

3.2.8 Κυτταρομετρία ροής (FACS-Fluorescence-activated cell sorting)

Η κυτταρομετρία ροής είναι μια μέθοδος η οποία επιτρέπει τον έλεγχο πολλών δεικτών ταυτόχρονα, μετά από σήμανση των κύτταρων με φθορίζουσες χρωστικές ή αντισώματα συνδεδεμένα με διαφορετικά φθοριοχρώματα. Παράλληλα, προσδιορίζει την πυκνότητα κάθε δείκτη ανά μονάδα κυτταρικής επιφάνειας, με βάση την ένταση του φθορισμού και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των κυττάρων [πρόσθιος σκεδασμός FSC- μέγεθος κυττάρων και πλάγιος σκεδασμός SSC-εσωτερική πολυπλοκότητα (κοκκία, οργανίδια) του κυττάρου]. Η κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία για τη μελέτη του κυτταρικού κύκλου των παρασίτων, καθώς και για τη μελέτη της απόπτωσης.

3.2.8.1 Ανάλυση κυτταρικού κύκλου των *L. donovani* προμαστιγωτών.

L. donovani προμαστιγωτά στατικής φάσης (2×10^7 κύτταρα/ml) ανακαλλιεργήθηκαν σε 10^6 κύτταρα/ml και επωάστηκαν στους 26°C με την παρουσία 0,01% DMSO ή με τη συγκέντρωση κάθε ιντιρουμπίνης που προκαλεί 50% αναστολή ανάπτυξης των παρασίτων (IC_{50}). Δείγματα από κάθε καλλιέργεια προετοιμάστηκαν για ανάλυση με FACS μετά από επώαση για 24, 48 ή 72h. Η προετοιμασία των δειγμάτων για ανάλυση του κυτταρικού κύκλου με FACS, περιλαμβάνει σήμανση των παρασίτων με τη χρωστική Propidium Iodide (PI), η οποία προσδένεται στο DNA καθώς και στο RNA των κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, καλλιέργειες παρασίτων φυγοκεντρούνται στις 1.400rpm για 10 min και πλένονται με 10ml PBS. Το υπερκείμενο αποχύνεται και το κυτταρικό ίζημα αναδιαλύεται σε 1ml διαλύματος PBS που περιέχει 70% παγωμένη μεθανόλη έτσι ώστε να μονιμοποιηθούν τα παράσιτα. Μετά από 3 min, τα μονιμοποιημένα πλέον παράσιτα φυγοκεντρούνται και το ίζημα επωάζεται με διάλυμα PBS, που περιέχει 50μg/ml φθορίζουσας χρωστικής PI και RNase A (1mg/ml σε PBS). Στη συνέχεια, τα δείγματα μεταφέρονται για ανάλυση του κυτταρικού κύκλου των παρασίτων (20.000 παράσιτα/δείγμα) χρησιμοποιώντας τον κυτταρομετρητή ροής (Becton Dickinson FACSCalibur). Η ανάλυση των αποτελεσμάτων γίνεται με τη χρήση του προγράμματος CellQuest (BD Biosciences).

3.2.8.2 Ανάλυση κυτταρικού κύκλου των BSF *T. brucei*.

Η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω, στο κεφάλαιο 3.2.8.1, ακολουθείται και για την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου των παρασίτων BSF *T. brucei* με τη μόνη διαφορά ότι τα παράσιτα ανακαλλιεργήθηκαν σε 2×10^4 κύτταρα/ml και επωάστηκαν στους 37°C σε ατμόσφαιρα 5% CO_2 με την παρουσία 0,01% DMSO ή με τη συγκέντρωση κάθε ιντιρουμπίνης που προκαλεί 50% αναστολή ανάπτυξης των παρασίτων (IC_{50}). Μετά την επώαση, οι καλλιέργειες παρασίτων φυγοκεντρούνται στις 3.500rpm για 10 min και ακολουθείται η παραπάνω διεργασία για την ανάλυση του κυτταρικού τους κύκλου.

3.2.9 Τεχνικές εντόπισης αποπτωτικών κυττάρων

Οι τεχνικές εντόπισης αποπτωτικών κυττάρων βασίζονται σε μορφολογικές παρατηρήσεις, βιοχημικές και ανοσοϊστοχημικές μεθόδους και

στην ανίχνευση του κερματισμένου DNA *in situ*. Η μελέτη του κυτταρικού κύκλου που περιγράφηκε στο κεφάλαιο 3.2.8.1 επίσης συνεισφέρει στην ανίχνευση της απόπτωσης, με εντόπιση κυττάρων που έχουν διασπασμένο γενετικό υλικό. Η μετατόπιση της φωσφατιδυλοσερίνης προηγείται του κερματισμού του DNA και συνεπώς επιτρέπει την ανίχνευση των αποπτωτικών κυττάρων στα αρχικά στάδια της διεργασίας.

3.2.9.1 Σήμανση *in vivo* με Ανεξίνη V και PI.

Η εκτεθειμένη φωσφατιδυλοσερίνη στην εξωτερική μεμβράνη των κυττάρων καθώς και η ακεραιότητα της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων μελετήθηκαν χρησιμοποιώντας τη διπλή χρώση με Ανεξίνη V- FITC και PI (Apoptosis Detection kit, R&D Systems). *L. donovani* προμαστιγωτά στατικής φάσης ανακαλλιεργούνται σε 10^6 κύτταρα/ml και επωάζονται στους 26°C παρουσία 0,01% DMSO ή με τη συγκέντρωση κάθε ιντιρουμπίνης που προκαλεί 50% αναστολή ανάπτυξης των παρασίτων (IC_{50}). Επίσης, BSF *T. brucei* ανακαλλιεργούνται σε 2×10^4 κύτταρα/ml και επωάζονται στους 37°C σε ατμόσφαιρα 5% CO_2 με την παρουσία 0,01% DMSO ή με τη συγκέντρωση κάθε ιντιρουμπίνης που προκαλεί 50% αναστολή ανάπτυξης των παρασίτων (IC_{50}). Δείγματα από κάθε καλλιέργεια προετοιμάζονται για ανάλυση με FACS μετά από επώαση για 24, 48 ή/και 72h. Τέλος, τα τρυπομαστιγωτά *T. cruzi* ανακαλλιεργούνται σε 4×10^5 κύτταρα/ml και επωάζονται στους 37°C σε ατμόσφαιρα 5% CO_2 με την παρουσία 0,01% DMSO ή με τη συγκέντρωση κάθε ιντιρουμπίνης που προκαλεί 50% αναστολή ανάπτυξης των παρασίτων (IC_{50}). Δείγματα από κάθε καλλιέργεια προετοιμάζονται για ανάλυση με FACS μετά από επώαση για 24h. Τα παράσιτα που είναι εκτεθειμένα σε 4mM υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) για 40 min χρησιμοποιούνται σαν θετικοί μάρτυρες για την απόπτωση [242]. Τα παράσιτα που επεξεργάζονται με 0,1% Triton X-100 για 5 min χρησιμοποιούνται σαν θετικοί μάρτυρες για τη νέκρωση. Για την προετοιμασία των δειγμάτων για ανάλυση με FACS, αρχικά τα κύτταρα φυγοκεντρούνται και το κυτταρικό ίζημα πλένεται με παγωμένο PBS. Συνολικά 10^6 κύτταρα αραιώνονται σε διάλυμα επώασης Ανεξίνης V [10μl διαλύματος πρόσδεσης, 10μl PI (τελική συγκέντρωση 5μg/ml), 1μl συμπλόκου ανεξίνης VFITC και 79μl αποσταγμένου νερού] και ακολουθεί επώαση για 15 min στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου, πριν γίνει η

ανάλυση των κυττάρων σε κυτταρομετρητή ροής. Είκοσι χιλιάδες (20.000) παράσιτα ανά δείγμα μελετήθηκαν και τα δεδομένα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Cell Quest. Τα αποτελέσματα είναι ενδεικτικά τριών ξεχωριστών πειραμάτων.

3.2.9.2 *In situ* σήμανση κατακερματισμένων τμημάτων DNA με TUNEL.

Η τεχνική TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase TdT-mediated dUTP Nick end labeling) στηρίζεται στη σύνδεση του ενζύμου TdT με τα 3'-OH άκρα των θραυσμάτων DNA και στην προσθήκη βιοτινυλιωμένου νουκλεοτιδίου στις θέσεις εντομής. Χρησιμοποιήθηκε το Cell Death Fluorescein Detection kit (Roche Applied Science), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Παράσιτα *L. donovani* προμαστιγωτά ή BSF *T. brucei* ανακαλλιεργούνται όπως παραπάνω (κεφάλαιο 3.2.9.1) παρουσία αναστολέα ή DMSO. Τα κύτταρα μονιμοποιούνται με 4% παραφορμαλδεύδη για 1h και στη συνέχεια επωάζονται με 0,1% Triton X-100 σε 0,1% διάλυμα κιτρικού νατρίου, για 2 min για αύξηση της διαπερατότητας των μεμβρανών. Ακολουθεί πλύσιμο των κυττάρων με PBS και επικάλυψη με το μείγμα της αντίδρασης TUNEL (TUNEL reaction mixture) για 60 min στους 37°C. Τέλος, τα κύτταρα πλένονται με PBS και παρατηρούνται σε μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss σε μεγέθυνση $\times 120$. Ως TUNEL-θετικά κύτταρα (αποπτωτικά κύτταρα που έχουν εισέλθει στη διαδικασία της απόπτωσης), χαρακτηρίστηκαν τα κύτταρα στα οποία είχε επισημανθεί ο πυρήνας. Το ποσοστό της απόπτωσης καθορίστηκε με τη μέτρηση τουλάχιστον 300 κυττάρων ανά κατηγορία από τρία ανεξάρτητα πειράματα.

3.2.9.3 Κυτταρική και πυρηνική μορφολογία.

Για τον προσδιορισμό της κυτταρικής και πυρηνικής μορφολογίας, δείγματα από παράσιτα *L. donovani* προμαστιγωτά ή BSF *T. brucei* ανακαλλιεργούνται όπως παραπάνω (κεφάλαιο 3.2.9.1) παρουσία αναστολέα ή DMSO. Τα παράσιτα φυγοκεντρούνται και το κυτταρικό ίζημα πλένεται με παγωμένο PBS. Τα κύτταρα μονιμοποιούνται στη συνέχεια με 2% παραφορμαλδεύδη και 50μl εναιωρήματος κυττάρων τοποθετούνται σε καλυπτρίδες οι οποίες είναι προ-επεξεργασμένες με 1mg/ml poly-L-lysine). Τα κύτταρα στη συνέχεια επεξεργάζονται με 50μg/ml RNase A στους 37°C για 1h και επωάζονται με 10μg/ml φθορίζουσας χρωστικής Propidium Iodide (PI). Οι

παρατηρήσεις έγιναν με συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού (TCSSP Leica Confocal fluorescence microscope). Τουλάχιστον 100 κύτταρα από τρία ανεξάρτητα πειράματα καταγράφηκαν για κάθε περίπτωση.

3.2.9.4 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία σε *T. cruzi* τρυπομαστιγωτά.

4×10^5 τρυπομαστιγωτά *T. cruzi*/ml επωάζονται στους 37°C σε ατμόσφαιρα 5% CO_2 με την παρουσία 0,01% DMSO ή με τη συγκέντρωση κάθε ιντιρουμπίνης που προκαλεί 50% αναστολή ανάπτυξης των παρασίτων (IC_{50}). Δείγματα από κάθε καλλιέργεια προετοιμάζονται για ανάλυση μετά από επώαση για 24h. Τα παράσιτα αρχικά μονιμοποιούνται με διάλυμα κακοδυλικού νατρίου (0,1M, pH 7,2) που περιέχει 2% φορμαλδεΰδη και 2,5% γλουταραλδεΰδη για 1h σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί πλύση των παρασίτων τρεις φορές με διάλυμα κακοδυλικού νατρίου (0,1M, pH 7,2) και μετά-μονιμοποίηση με 1% διάλυμα τετροξειδίου του οσμίου (Sigma-Aldrich) για 1h. Μετά από την αφυδάτωση με αυξανόμενες συγκεντρώσεις ακετόνης (30, 50, 70, 90, 100%) για 10 min σε κάθε στάδιο, τα παράσιτα ενσωματώνονται σε Poly/Bed ρητίνης (PolyScience, Dallas, TX, USA). Υπέρλεπτα τμήματα δημιουργούνται με χρήση του ultramicrotome Leica UC7 (οι τομές γίνονται στα 300 mesh copper grids) και χρωματίζονται με αντίθεση με κιτρικό μόλυβδο και οξικό ουρανύλιο. Τα δείγματα παρατηρούνται σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο μετάδοσης (transmission) JEOL TEM-1230 (Acworth, GA, USA).

Για ανάλυση των δειγμάτων με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (scanning) ακολουθείται η ίδια διαδικασία με την παραπάνω, με τη διαφορά ότι η αφυδάτωση των παρασίτων γίνεται με αυξανόμενες συγκεντρώσεις αιθανόλης (30, 50, 70, 90, 100%) για 10 min σε κάθε στάδιο. Στη συνέχεια, κρίσιμο σημείο είναι η ξηρασία του δείγματος σε συσκευή Baltec CPD 030 όπου τα δείγματα τοποθετούνται σε ειδικά δοχεία. Στα δείγματα επιστρώνεται 2-3nm στρώμα χρυσού για αποφυγή της διασκόρπισης ιόντων. Τα δείγματα παρατηρούνται σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (scanning) JEOL 6340 (Acworth, GA, USA) το οποίο λειτουργεί στα 5.0kV και 12μΑ.

3.2.10 Πολλαπλή στοίχιση αλληλουχιών-Μοντέλο ομολογίας-Μοριακές προσομοιώσεις

Η πολλαπλή στοίχιση των αλληλουχιών των πρωτεϊνών δημιουργήθηκε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα BioEdit Sequence Alignment

Editor και διορθώθηκε ώστε να επανατοποθετηθούν τα κενά που υπήρχαν στα στοιχεία δευτεροταγούς δομής, δηλαδή στις α-έλικες ή στις β-πτυχωτές επιφάνειες. Οι απεικονίσεις των στοιχήσεων των αλληλουχιών δημιουργήθηκαν με το ESPript [278]. Η κρυσταλλική δομή της ανθρώπινης GSK-3β χρησιμοποιήθηκε σαν καλούπι (pdb 1Q41) για την κατασκευή του μοντέλου ομολογίας της *LdGSK-3s*. Το μοντέλο δημιουργήθηκε με τη χρήση του λογισμικού MODELLER v.6 [279].

Επιπλέον βελτιώσεις έγιναν με διαδοχικές ελαχιστοποιήσεις ενέργειας χρησιμοποιώντας το λογισμικό MACROMODEL v.9 [280]. Τέλος, η σταθερότητα του μοντέλου ελέγχθηκε με προσομοίωση στοχαστικής δυναμικής (Stochastic Dynamics simulation). Η μελέτη πρόσδεσης των αναστολέων στις κινάσες έγινε χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο Monte Carlo του λογισμικού Macromodel v.9. Το μοντέλο ομολογίας και οι μοριακές προσομοιώσεις έγιναν σε συνεργασία με τον τομέα Φαρμακογνωσίας και Φαρμακευτικής Χημείας της Φαρμακευτικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών.

3.2.11 *In vivo* μελέτη αντιπαρασιτικής δράσης ιντιρουμπινών

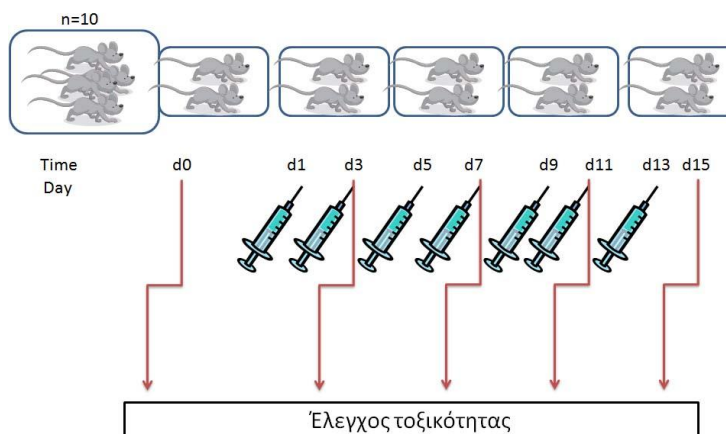
Η χρήση πειραματοζώων εγκρίθηκε από την επιτροπή Βιοηθικής Πειραματοζώων του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστερ (Ε.Ι.Π., Αθήνα, Ελλάδα) που λειτουργεί σύμφωνα με την οδηγία της Ευρωπαϊκής Επιτροπής 1986/609 και το νόμο 1992/2015. Οι μύες παραλήφθηκαν από τη μονάδα πειραματοζώων του Ε.Ι.Π. όπου και αναπαράγονται. Οι εγκαταστάσεις του ινστιτούτου όπου εκτρέφονται οι μύες και όπου έλαβαν χώρα τα *in vivo* πειράματα είναι ελεύθεροι από παθογόνα και οι μύες λαμβάνουν εμπορική τροφή σε μορφή σβόλων (pellet) και νερό *ad libitum*.

3.2.11.1 *In vivo* μελέτη τοξικότητας ιντιρουμπινών

Πριν τη μελέτη της αντιπαρασιτικής δράσης των ιντιρουμπινών, ελέγχτηκε αν προκαλούν τοξικότητα *in vivo* σε πειραματικό μοντέλο με μύες και για να προσδιοριστεί ο πειραματικός χρόνος και η δόση της δοκιμασίας. Συγκεκριμένα, ελέγχθηκαν 2 ιντιρουμπίνες οι οποίες ξεχώρισαν από τις υπόλοιπες και στοχεύουν πιο ειδικά τη λείσμανιακή GSK-3s: 5-Me-6BIO [191] και η 3'-piperazine-6BIO σε 2 διαφορετικές συγκεντρώσεις (10mg/kg και 20mg/kg) και 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις (1mg/kg, 10mg/kg και 20mg/kg)

αντίστοιχα. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής (Εικόνα 32): κάθε δεύτερη μέρα ($t = 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13$ ημέρες) σε αρσενικούς BALB/c ($H-2^d$) μύες (20-28g) ηλικίας (8-10 εβδομάδων) χορηγείται ενδοπεριτονιακά η εκάστοτε ουσία και σε συγκεκριμένη συγκέντρωση. Σε 5 διαφορετικά χρονολογικά σημεία ($t = 0, 3, 7, 11, 15$ ημέρες, όπου 0 ημέρες αντιπροσωπεύει τα δείγματα ελέγχου-control στα οποία δεν έχει γίνει καμία χορήγηση ουσίας) διαλέγονται τυχαία 2 ποντίκια και θανατώνονται με αυχενική παρεκτόπιση. Συλλέγεται αίμα στο οποίο τον ορό γίνεται αιματολογικός έλεγχος των ηπατικών ενζύμων ενώ συλλέγονται και τα όργανα (ήπαρ, σπλήνα, νεφρά, καρδιά, πνεύμονες και εγκέφαλος) ώστε να πραγματοποιηθεί σε αυτά μεταβολικός έλεγχος. Τα όργανα φυλάσσονται στους -80°C . Το αίμα που συλλέγεται παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου για 4h και μετά φυγοκεντρείται για 5 min σε 1.000rpm και συλλέγεται ο ορός στον οποίο γίνεται έλεγχος των ηπατικών ενζύμων κρεατινίνη, τρανσαμινάση AST (SGOT), τρανσαμινάση ALT (SGPT) και CRP (ποσοτική). Παράλληλα, συλλέγονται και τα ούρα από 2 μύες για 24h μετά από κάθε χορήγηση της ουσίας και σε αυτά γίνεται ανάλυση μικροαλβουμίνης και κρεατινίνης 24ώρου.

Ανεξάρτητο πείραμα επιβίωσης των μυών για 1 βδομάδα μετά από χορήγηση συγκεκριμένης δόσης ιντιρουμπίνης πραγματοποιήθηκε για να ελεγχθεί η τοξικότητα της ιντιρουμπίνης. Σε τέσσερις ομάδες των 3 θηλυκών BALB/c ($H-2^d$) μυών (20-28g) ηλικίας (8-10 εβδομάδων) χορηγείται 20mg/kg, 60mg/kg, 120mg/kg ιντιρουμπίνης και PBS που περιέχει DMSO 10% (v/v) αντίστοιχα, για μια φορά. Η επιβίωση και ο φαινότυπος υγείας των μυών παρατηρείται για μία βδομάδα.



Εικόνα 32: Σχηματική αναπαράσταση διαδικασίας για *in vivo* μελέτη τοξικότητας ιντιρουμπινών

3.2.11.2 *In vivo* μελέτη αντιπαρασιτικής δράσης ιντιρουμπινών σε πειραματικό μοντέλο σπλαχνικής λεισμανίασης

Αρσενικοί BALB/c (H-2^d) μύες (20-28g) ηλικίας (8-10 εβδομάδων) επιμολύνονται με 10⁷ στατικής φάσης ανάπτυξης παράσιτα *L. Infantum* MON-1 προμαστιγωτής μορφής σε 0,1ml PBS [281]. Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε στην ουραία φλέβα με χρήση βελόνας 29G.

Για την οξεία φάση της ασθένειας, δεκαπέντε ημέρες μετά τη μόλυνση, οι μύες χωρίστηκαν τυχαία σε ομάδες των 5. Στην μία ομάδα χορηγήθηκαν ενδοπεριτονιακά 3 δόσεις συγκέντρωσης ιντιρουμπίνης (η οποία δεν προκαλεί τοξικότητα) κάθε δεύτερη μέρα (t= 16, 18, 20 ημέρες μετά τη μόλυνση). Στην δεύτερη ομάδα χορηγήθηκαν ενδοπεριτονιακά 7 δόσεις στην ίδια συγκέντρωση ιντιρουμπίνης κάθε δεύτερη μέρα (t= 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 ημέρες μετά τη μόλυνση). Η τρίτη ομάδα έλαβε κάθε δεύτερη μέρα 0,1ml PBS-DMSO μείγμα (1:1) και λειτούργησε ως αρνητικός μάρτυρας.

Για τη χρόνια φάση, εβδομήντα πέντε ημέρες μετά τη μόλυνση, οι μύες χωρίστηκαν τυχαία σε ομάδες των 5. Στην μία ομάδα χορηγήθηκαν ενδοπεριτονιακά 7 δόσεις συγκέντρωσης ιντιρουμπίνης (η οποία δεν προκαλεί τοξικότητα) κάθε δεύτερη μέρα (t= 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88 ημέρες μετά τη μόλυνση). Η δεύτερη ομάδα έλαβε κάθε δεύτερη μέρα 0,1ml PBS-DMSO μείγμα (1:1) και λειτούργησε ως αρνητικός μάρτυρας.

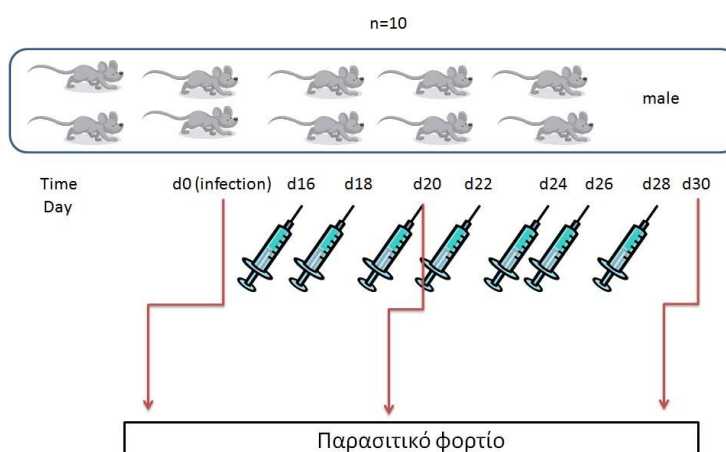
Δύο ημέρες μετά τη χορήγηση της τελευταίας δόσης σε κάθε ομάδα, οι μύες θανατώνονται με αυχενική παρεκτόπιση και συλλέγεται αίμα από το οποίο συλλέγεται ο ορός (όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο 3.2.12.1) και φυλάσσεται στους -80°C. Επίσης, συλλέγονται υπό άσηπτες συνθήκες τα όργανα ήπαρ και σπλήνα και τοποθετούνται σε προζυγισμένους κωνικούς αποστειρωμένους πλαστικούς σωλήνες των 15 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) που περιείχαν 3ml RPMI-1640 και ζυγίζεται το βάρος τους σε mg. Μέρος των οργάνων φυλάσσεται στους -80°C για να πραγματοποιηθεί αργότερα μεταβολικός έλεγχος και έλεγχος παρασιτικού φορτίου με τη μέθοδο της RT-PCR.

Μικρό βάρος των οργάνων ήπαρ και σπλήνα (<10mg) χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του παρασιτικού φορτίου προκειμένου να εξεταστεί η άμεση επίδραση της ιντιρουμπίνης στην εξέλιξη της μόλυνσης. Το όργανο ομογενοποιείται και αναδιαλύεται σε θρεπτικό υλικό Schneider's

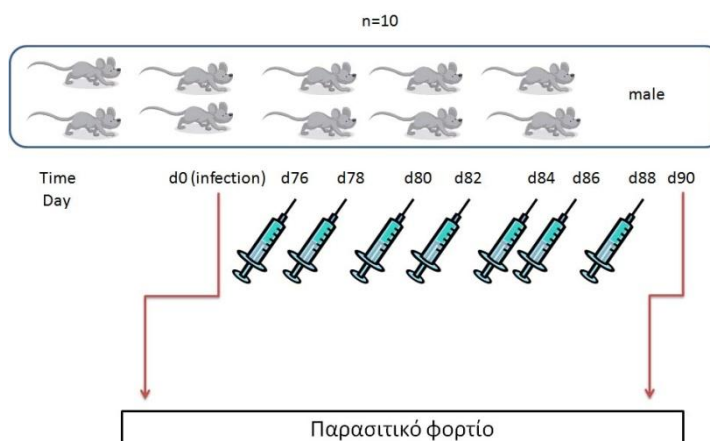
εμπλουτισμένο με 20% (v/v) FBS σε τελική συγκέντρωση 1mg/ml. Τα κύτταρα των οργάνων στρώθηκαν εις τετραπλούν σε πλάκα κυτταροκαλλιέργειας 96 φρεατίων ακολουθώντας τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων. Οι πλάκες τοποθετούνται για 7 ημέρες στους 26°C. Μετά το πέρας των 7-15 ημερών, παρατηρείται στο μικροσκόπιο η τυχόν ανάπτυξη προμαστιγωτών παρασίτων στα φρεάτια.

Αυτή η τεχνική συνίσταται στη διαδοχική αραιώση ενός αρχικού ομογενοποιημένου που προέρχεται από δεδομένο όργανο (ήπαρ, σπλήνα) μέχρι μια συγκεκριμένη ελάχιστη συγκέντρωση [282]. Η συγκέντρωση εκείνη στην οποία υπάρχει ένα μόνο παράσιτο στην προμαστιγωτή μορφή, είναι η συγκέντρωση που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό του φορτίου των παρασίτων στο παρασιτούμενο όργανο σύμφωνα με τη σχέση:

$$\text{Π.Φ.} = -\log(\text{συγκέντρωση})^{\text{αραίωση}}$$



Εικόνα 33: Σχηματική αναπαράσταση διαδικασίας για *in vivo* μελέτη αντιπαρασιτικής δράσης ιντιρουμπινών σε πειραματικό μοντέλο οξείας φάσης σπλαχνικής λείσμανιασης.



Εικόνα 34: Σχηματική αναπαράσταση διαδικασίας για *in vivo* μελέτη αντιπαρασιτικής δράσης ιντιρουμπινών σε πειραματικό μοντέλο χρόνιας φάσης σπλαχνικής λείσμανιασης.

3.2.11.3 *In vivo* μελέτη αντιπαρασιτικής δράσης ιντιρουμπινών σε πειραματικό μοντέλο αμερικάνικης τρυπανοσωμίας (Chagas Disease)

Θηλυκοί BALB/c (H-2^d) επίμυες (20-28g) ηλικίας (6-8 εβδομάδων) επιμολύνονται με 10⁴ παράσιτα *T. cruzi* (Y strain) τρυπομαστιγωτής μορφής σε 0,1ml PBS. Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε ενδοπεριτονιακά με χρήση βελόνας.

Για την οξεία φάση της ασθένειας, πέντε ημέρες μετά τη μόλυνση, οι μύες χωρίστηκαν τυχαία σε 3 ομάδες των 6. Στη μία ομάδα χορηγήθηκαν ενδοπεριτονιακά 5 δόσεις συγκέντρωσης ιντιρουμπίνης (η οποία δεν προκαλεί τοξικότητα) κάθε μέρα (t= 5, 6, 7, 8, 9 ημέρες μετά τη μόλυνση). Στη δεύτερη ομάδα χορηγήθηκαν ενδοπεριτονιακά 5 δόσεις 100mg βενζιμιδαζολίου (t= 5, 6, 7, 8, 9 ημέρες μετά τη μόλυνση), το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μαρτυρας. Η τρίτη ομάδα έλαβε κάθε μέρα για 5 μέρες (t= 5, 6, 7, 8, 9 ημέρες μετά τη μόλυνση) 0,1ml PBS-DMSO μείγμα (1:1) και λειτούργησε ως αρνητικός μάρτυρας.

Η παρασιταιμία ελέγχθηκε με μέτρηση των παρασίτων στο αίμα (5μl) που συλλέγεται από την ουραία φλέβα τις μέρες 6, 8, 10 και 12 μετά τη μόλυνση [283]. Επίσης, ελέγχεται και η θνησιμότητα των μυών μέχρι και 30 μέρες μετά τη μόλυνση.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Κεφάλαιο **4**

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Λεισμάνια (*Leishmania donovani*)

4.1.1 Καθορισμός της αντιλεισμανιακής δραστικότητας (IC_{50}) βιβλιοθήκης ιντιρουμπινών στα παράσιτα

Από προηγούμενες μελέτες γνωρίζουμε ότι κάποια ανάλογα ιντιρουμπίνης κατέχουν αντιλεισμανιακή δράση [191, 218]. Μάλιστα, η μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Παρασιτολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ [191] ανέδειξε 2 ανάλογα ιντιρουμπίνης (6BIO και 5-Me-6BIO) τα οποία είναι πολλά υποσχόμενα μόρια για τη μελέτη του μηχανισμού δράσης των ιντιρουμπινών έναντι των παρασίτων *L. donovani* και για την ανάπτυξη καινούριων φαρμάκων έναντι της ασθένειας που προκαλούν τα παράσιτα αυτά. Τα χαρακτηριστικά που αναδεικνύουν τους αναστολείς αυτούς ως πολλά υποσχόμενους είναι το χαμηλό IC_{50} έναντι τόσο της προμαστιγωτής αλλά και της αμαστιγωτής μορφής των παρασίτων ($\approx 1\mu M$), καθώς και η χαμηλή τοξικότητα στα κύτταρα του ξενιστή (μακροφάγα). Εξίσου σημαντικό είναι το γεγονός ότι στα πλαίσια της εργασίας που προαναφέρθηκε ταυτοποιήθηκαν οι κυριότερες κινάσες-στόχοι τους. Ειδικότερα, βρέθηκε ότι η 6BIO αναστέλλει 7 φορές πιο εκλεκτικά τη λεισμανιακή CRK3 αντί της *LdGSK-3s*, ενώ η 5-Me-6BIO αναστέλλει 7 φορές πιο εκλεκτικά τη λεισμανιακή *LdGSK-3s* αντί της CRK3 [191]. Για να ξεπεραστεί το πρόβλημα αυτό καθώς και για να ταυτοποιήσουμε νέους αναστολείς με αυξημένη εκλεκτικότητα ως προς τη λεισμανιακή *LdGSK-3s* (που έχουμε επιλέξει σαν μόριο στόχο για τους λόγους που αναφέρθηκαν στην Εισαγωγή) έναντι της CRK3, μια καινούρια βιβλιοθήκη από 49 ανάλογα ιντιρουμπινών μελετήθηκε αρχικά ως προς την αντιλεισμανιακή τους δράση και στη συνέχεια έναντι των δύο κινασών. Το σημαντικό χαρακτηριστικό αυτής της βιβλιοθήκης ήταν ότι παρασκευάστηκε αρχικά για τη μελέτη της δράσης αυτών των νέων ιντιρουμπινών έναντι της ανθρώπινης GSK-3 και άλλων κινασών όπως οι DYRKs [178, 188]. Η βιβλιοθήκη αυτή αποτελείται από α) 7-υποκατεστημένες ιντιρουμπίνες οι οποίες δεν έχουν ελεγχθεί ποτέ ξανά για την αντιπαρασιτική τους δράση, β) 6BIO ανάλογα στα οποία έχουν προστεθεί ογκώδεις

υδρόφιλες αμινο-αλυσίδες στην 3' θέση του σκελετού της ιντιρουμπίνης με σκοπό την αύξηση της διαλυτότητας των αναλόγων αυτών και γ) 5-νίτρο υποκατεστημένες ιντιρουμπίνες. Αξίζει να σημειωθεί ότι το στέλεχος *L. donovani* LG13 που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματά μας είναι ανθεκτικό στα άλατα του αντιμονίου τα οποία αποτελούν την πρώτη γραμμή θεραπείας στην Αιθιοπία όπου απομονώθηκε.

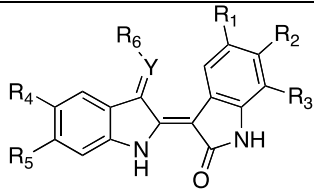
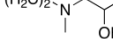
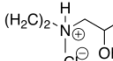
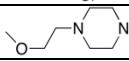
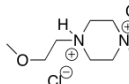
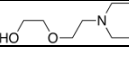
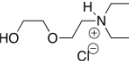
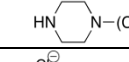
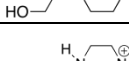
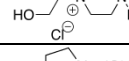
Τα 49 αυτά ανάλογα ελέγχθηκαν για την αντιλειτουργική τους δράση έναντι τόσο της προμαστιγωτής όσο και της αμαστιγωτής μορφής του παρασίτου *L. donovani*. Για τον έλεγχο της αναστολής της ανάπτυξης των παρασίτων από τα ανάλογα ιντιρουμπίνης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Alamar blue [273] σε πλάκα κυτταροκαλλιέργειας 96 φρεατίων. Το Alamar blue είναι ένας δείκτης οξειδωσης-αναγωγής, που ανάγεται από μεταβολικά ενδιάμεσα των ζωντανών κυτάρων (NADH, FADH, NADPH) και η αναγωγή του συνοδεύεται από μετρήσιμη μετατροπή στο χρώμα, από την οξειδωμένη μορφή (μη φθορίζουσα-μπλε) στην ανηγμένη μορφή (φθορίζουσα-κόκκινη). Η διαδικασία που ακολουθείται για τη μελέτη της δράσης των αναλόγων έναντι των προμαστιγωτών παρασίτων περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.6.1 στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Η διαδικασία που ακολουθείται για τη μελέτη της δράσης τους έναντι των αμαστιγωτών παρασίτων με έμμεση ποσοτικοποίηση του αριθμού των ζωντανών αμαστιγωτών 48h μετά τη λύση των μολυσμένων μακροφάγων [274], περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.6.2 στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Στον αρχικό έλεγχο, οι 49 ιντιρουμπίνες ελέγχθηκαν σε συγκέντρωση 3μM, από τις οποίες μόνο 9 φαίνεται να αναστέλλουν σημαντικά την ανάπτυξη της προμαστιγωτής μορφής των παρασίτων *L. donovani* (πίνακας 3). Στη συνέχεια, για τις 9 αυτές ιντιρουμπίνες προσδιορίστηκε τόσο το IC₅₀ τους έναντι των προμαστιγωτών παρασίτων όσο και η κυτταροτοξικότητα τους σε μακροφάγα J774.1 όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.6.4 στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Καθορίσαμε ότι οι ιντιρουμπίνες που άξιζε να μελετηθούν περαιτέρω ήταν αυτές που ο λόγος της τιμής LC₅₀ της κυτταροτοξικότητας προς το IC₅₀ τους έναντι των προμαστιγωτών παρασίτων είναι μεγαλύτερο του 8 (δείκτης επιλεκτικότητας, selectivity index>8). Από τον πίνακα 3 φαίνεται πως οι ιντιρουμπίνες 4 και 5 έχουν σχεδόν την ίδια τιμή LC₅₀ και IC₅₀ (1.5 και 1.15μM αντίστοιχα για την 4, 1.5 και 0.9μM αντίστοιχα για την 5), και επομένως τα 2 αυτά ανάλογα δεν

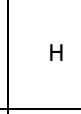
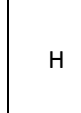
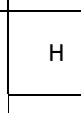
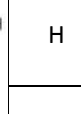
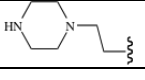
μελετήθηκαν περαιτέρω για τη δράση τους έναντι της αμαστιγωτής μορφής του παράσιτου. Για τις υπόλοιπες 7 ιντιρουμπίνες, προσδιορίστηκε το IC_{50} τους έναντι των ενδοκυττάριων αμαστιγωτών παρασίτων *L. donovani* και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 3. Είναι σημαντικό να παρατηρήσουμε ότι τα 7 αυτά ανάλογα ιντιρουμπίνης τα οποία κατέχουν ικανοποιητική αντιλειτουργική δράση (IC_{50} έναντι της προμαστιγωτής μορφής 0.65-1.5 μ M και IC_{50} έναντι της αμαστιγωτής μορφής 0.59-2.44 μ M) ανήκουν όλα στην ομάδα των 6BIO υποκατεστημένων αναλόγων με ογκώδη υδρόφιλες αμινο-αλυσίδες στην 3' θέση του σκελετού της ιντιρουμπίνης.

Από τα 7 αυτά αναλόγια ιντιρουμπινών, τα ανάλογα **11** και **17** φαίνεται να έχουν καλή αντιλειτουργική δράση και ικανοποιητικό δείκτη επιλεκτικότητας ($SI > 8$). Τα υπόλοιπα ανάλογα όπως φαίνεται από τον πίνακα έχουν καλή αντιλειτουργική δράση αλλά έχουν και ιδιαίτερα υψηλή τοξικότητα έναντι της κυτταρικής σειράς των μακροφάγων J774.1 (πίνακας 3). Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στην αυξημένη διαλυτότητα των ιντιρουμπινών που πιθανόν να έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη διείσδυση όχι μόνο μέσω της μεμβράνης των παρασίτων αλλά και μέσω της μεμβράνης των κυττάρων στα θηλαστικά.

Παράλληλα με τη βιβλιοθήκη των ιντιρουμπινών, στη μελέτη μας χρησιμοποιήθηκαν ως φάρμακα αναφοράς η Αμφοτερικίνη Β (Fungizone), η οποία βρέθηκε να αναστέλλει τα *L. donovani* προμαστιγωτά και ενδοκυτταρικά αμαστιγωτά με IC_{50} 0.10 $\pm$ 0.01 μ M και 0.20 $\pm$ 0.02 μ M αντίστοιχα. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν σαν αναστολείς αναφοράς οι ιντιρουμπίνες 6BIO με IC_{50} 0.80 $\pm$ 0.05 μ M και 0.70 $\pm$ 0.10 μ M αντίστοιχα και 5-Me-6BIO με IC_{50} 1.20 $\pm$ 0.20 μ M και 1.00 $\pm$ 0.10 μ M αντίστοιχα, τιμές που είναι όμοιες με τις αναμενόμενες (πίνακας 3). Όλα τα αποτελέσματα προέρχονται από πραγματοποίηση τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

Πίνακας 3. Αντιλεϊσμανιακή δράση των 49 αναλόγων ιντιρουμπίνης που ελέγχθηκαν έναντι των *L. donovani* προμαστιγωτών και ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών με τη μέθοδο του Alamar blue. Παράλληλα παρουσιάζονται και οι ουσίες αναφοράς 6BIO, 5-Me-6BIO και Amphotericin B. Τέλος, φαίνεται η κυτταροτοξικότητα των ουσιών έναντι της κυτταρικής σειράς μακροφάγων J774.1. Όλα τα αποτελέσματα προέρχονται από πραγματοποίηση τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

								<i>L. donovani</i> (IC ₅₀ μM)		ΜΦ J774.1 (GI ₅₀ μM)
Cpd	Y	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	Promastigotes	Intracellular amastigotes	
1	NO	H	Br	H	H	H		>3μM	>3μM	-
2	NO	H	Br	H	H	H		>3μM	>3μM	-
3	NO	H	Br	H	H	H		>3μM	>3μM	-
4	NO	H	Br	H	H	H		1.15±0.06	-	1.5±0.07
5	NO	H	Br	H	H	H		0.9±0.11	-	1.5±0.08
6	NO	H	Br	H	H	H		>3μM	>3μM	-
7	NO	H	Br	H	H	H		>3μM	>3μM	> 10
8	NO	H	Br	H	H	H		>3μM	>3μM	>10
9	NO	H	Br	H	H	H		>3μM	>3μM	>10
10	NO	H	Br	H	H	H		>3μM	>3μM	> 10
11	NO	H	Br	H	H	H		0.75±0.05	0.59±0.07	6.25±0.08
12	NO	H	Br	H	H	H		0.65±0.09	0.80±0.12	2.60±0.05
13	NO	H	Br	H	H	H		0.82±0.21	0.85±0.16	2.41±0.11
14	NO	H	Br	H	H	H		1.40±0.10	1.71±0.09	9.20±0.15
15	NO	H	Br	H	H	H		1.50±0.14	2.44±0.17	6.00±0.08
16	NO	H	Br	H	H	H		0.76±0.03	1.54±0.11	5.93±0.04
17	NO	H	Br	H	H	H		0.76±0.04	1.22±0.06	10.00±0.02
18	NO	H	Br	H	H	H		>3μM	>3μM	-
19	NO	H	Br	H	H	H		>3μM	>3μM	-
20	O	H	H	Br	H	H	-	>3μM	>3μM	-
21	NO	H	H	Br	H	H	H	>3μM	>3μM	> 10
22	O	H	H	Br	COOH	H	-	>3μM	>3μM	-
23	NO	H	H	Br	COOH	H	H	>3μM	>3μM	-

24	O	H	H	Br	H	COOH	-	>3μM	>3μM	-
25	NO	H	H	Br	H	COOMe	H	>3μM	>3μM	-
26	NO	H	H	Br	H	COOH	H	>3μM	>3μM	-
27	NO	H	H	CF ₃	H	H	H	>3μM	>3μM	-
28	NO	H	H	CF ₃	COOMe	H	H	>3μM	>3μM	-
29	O	H	H	CF ₃	COOH	H	-	>3μM	>3μM	-
30	NO	H	H	CF ₃	COOH	H	H	>3μM	>3μM	-
31	O	H	H	CF ₃	H	COOH	-	>3μM	>3μM	-
32	NO	H	H	CF ₃	H	COOMe	H	>3μM	>3μM	> 10
33	NO	H	H	CF ₃	H	COOH	H	>3μM	>3μM	-
34	O	H	H	CF ₃		H	-	>3μM	>3μM	-
35	NO	H	H	CF ₃		H	H	>3μM	>3μM	-
36	NO	NO ₂		H	H	H	H	>3μM	>3μM	> 10
37	NO	NO ₂		H	COOH	H	H	>3μM	>3μM	-
38	NO	NO ₂		H	H	H	H	>3μM	>3μM	-
39	NO	NO ₂		H	COOH	H	H	>3μM	>3μM	-
40	NO	NO ₂		H	COOMe	H	H	>3μM	>3μM	-
41	NO	H	H	CF ₃	H	COOMe		>3μM	>3μM	>10
42	NO	-	-	-	-	-	-	>3μM	>3μM	-
43	NO	-	-	-	-	-	-	>3μM	>3μM	-
44	NO	-	-	-	-	-	-	>3μM	>3μM	-
45	NO	-	-	-	-	-	-	>3μM	>3μM	-
46	NO	-	-	-	-	-	-	>3μM	>3μM	-
47	NO	-	-	-	-	-	-	>3μM	>3μM	-
48	NO	-	-	-	-	-	-	>3μM	>3μM	-
49	NO	-	-	-	-	-	-	>3μM	>3μM	-
6BIO	NO	H	Br	H	H	H	H	0.85±0.05	0.70±0.10	>25
5-Me-6BIO	NO	CH ₃	Br	H	H	H	H	1.2±0.2	1.0±0.1	>25
Amphoteric in B	-	-	-	-	-	-	-	0.10±0.01	0.20±0.02	-

4.1.2 Αντιδράσεις αναστολής των *LdGSK-3s* και *CRK3*

Με σκοπό να ελεγχθούν οι ιντιρουμπίνες με αντιλεισμανιακή δράση ως προς την αναστολή των κινάσων *LdGSK-3s* και *CRK3* σε *in vitro* πειράματα, οι κινάσες αυτές απομονώθηκαν από τα ανασυνδυασμένα παράσιτα *L. donovani* sat-*LdGSK-3s* και *L. mexicana* CRK3his με χρωματογραφία συγγένειας, όπως περιγράφεται στη παράγραφο 3.2.7.1 στο κεφάλαιο Υλικά

και Μέθοδοι. Η αλληλουχία αμινοξέων ιστιδίνης, επέτρεψε τον καθαρισμό των δύο κινασών με σωματίδια νικελίου (Ni^{2+} -NTA-ρητίνη), όπου εκλούσθηκαν σε συγκεντρώσεις ιμιδαζολίου 50, 150, 250 και 400mM. Η παρουσία της *LdGSK-3s* και της *CRK3* στα εκλούσματα έγινε με τη βοήθεια του πολυκλωνικού αντισώματος IgG His-probe (1:100 αραίωση). Η ενεργότητα των *LdGSK-3s* και *CRK3* προσδιορίστηκε στα εκλούσματα διαφορετικών συγκεντρώσεων ιμιδαζολίου μετά τη διαπίδυση ώστε να απομακρυνθεί το ιμιδαζόλιο το οποίο προσδένεται μη αντιστρεπτά στο ενεργό κέντρο των ενζύμων και τα απενεργοποιεί. Τα εκλούσματα που κατά την απομόνωση είχαν 50mM ιμιδαζολίου ήταν τα πιο ενεργά για την κινάση *CRK3* ενώ όσον αφορά την κινάση *LdGSK-3s*, τα εκλούσματα με τη μεγαλύτερη ενεργότητα ήταν αυτά με συγκέντρωση ιμιδαζολίου 150mM. Η κινητική μελέτη των ενζύμων *CRK3* και *LdGSK-3s* πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια μιας προηγούμενης διδακτορικής διατριβής [284] αλλά επαναλήφθηκε και τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν στα απομονωμένα ένζυμα της παρούσας εργασίας. Πιο συγκεκριμένα, η σταθερά Michaelis-Menten (K_m) της *LdGSK-3s* για το ATP βρέθηκε να είναι 15,2μM και για το GS-1 πεπτίδιο 8,3μM ενώ για την *CRK3* για το ATP βρέθηκε να είναι 14,7μM και για την ιστόνη H1 5μM. Επιπλέον, προσδιορίστηκαν οι ιδανικές ποσότητες ενζύμου *LdGSK-3s* και *CRK3* που χρειάζονται για τις δοκιμασίες αναστολής οι οποίες είναι 1μl/αντίδραση για την *LdGSK-3s* και 1,5μl/αντίδραση για την *CRK3*. Τέλος, η ειδική ενεργότητα των *LdGSK-3s* και *CRK3* είναι 800U/mg και 750U/mg αντίστοιχα (1U ενζύμου ορίζεται η ενσωμάτωση 1nM ATP στο πρωτεϊνικό υπόστρωμα ανά λεπτό αντίδρασης στους 30°C και σε τελική συγκέντρωση ATP 15μM). Για τις ανταγωνιστικές αντιδράσεις αναστολής, στις οποίες το μόριο-αναστολέας ανταγωνίζεται την πρόσδεση του υποστρώματος (ATP και πρωτεϊνικό υπόστρωμα), ιδανικά χρησιμοποιείται συγκέντρωση υποστρώματος περίπου ίση ή χαμηλότερη από την αντίστοιχη τιμή K_m . Στις παρούσες αντιδράσεις λοιπόν χρησιμοποιήθηκαν οι συνθήκες που καθορίστηκαν, για την *LdGSK-3s* (1μl ενζύμου/αντίδραση, 15μM ATP και 8,3μM GS-1) και για την *CRK3* (1,5μl ενζύμου/αντίδραση, 15μM ATP και 5μM H1), παρουσία των αναστολέων και χρησιμοποιήθηκαν καμπύλες δόσης-απόκρισης για να καθοριστούν οι τιμές IC_{50} , που αντιστοιχούν στη συγκέντρωση αναστολέα η οποία αναστέλλει το 50% της ενεργότητας της κινάσης.

Με βάση τα παραπάνω πραγματοποιήθηκαν οι αντιδράσεις αναστολής των κινασών *LdGSK-3s* και *CRK3* παρουσία των ιντιρουμπινών που βρέθηκαν να κατέχουν αντιλειτουργική δράση έναντι και των δύο μορφών του παρασίτου δηλαδή των *L. donovani* προμαστιγωτών και ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών. Οι ιντιρουμπίνες αυτές είναι όπως φαίνεται και στον πίνακα 4, οι **11, 12, 13, 14, 15, 16** και **17**. Σημειώνεται ότι ως αναστολείς αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν οι ιντιρουμπίνες 5-Me-6BIO και 6BIO. Από προηγούμενη μελέτη γνωρίζουμε ότι οι 6-βρωμο υποκατεστημένες ιντιρουμπίνες αναστέλλουν επιλεκτικά τη λειτουργική *CRK3* (την ομόλογη λειτουργική κινάση της ανθρώπινης *CDK1*), εκτός από την 5-Me-6BIO η οποία στοχεύει επιλεκτικά την *LdGSK-3s* και την 6-BIA η οποία στοχεύει εξίσου καλά και τις 2 κινάσες του παρασίτου [191]. Το εύρημα αυτό παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον γιατί δείχνει ότι η επιλεκτικότητα αυτή των 6-βρωμο υποκατεστημένων ιντιρουμπινών είναι αντίστροφη από την εκλεκτικότητα που έχει ήδη βρεθεί έναντι της ανθρώπινης *GSK-3* [182, 189]. Ειδικότερα, για τις ιντιρουμπίνες αναφοράς, η 6BIO αναστέλλει την *LdGSK-3s* με τιμή IC_{50} 0,15 μ M και την *CRK3* 7,5 φορές ισχυρότερα με τιμή IC_{50} 0,02 μ M, ενώ η 5-Me-6BIO αναστέλλει την *CRK3* με τιμή IC_{50} 0,65 μ M και την *LdGSK-3s* 7,2 φορές ισχυρότερα με τιμή IC_{50} 0,09 μ M. Οι τιμές αυτές επιβεβαιώθηκαν και στην παρούσα διδακτορική διατριβή.

Όπως φαίνεται στον πίνακα 4, οι ιντιρουμπίνες με αντιλειτουργική δράση οι οποίες είναι ανάλογα της 6BIO, αναστέλλουν πιο επιλεκτικά την *LdGSK-3s* έναντι της *CRK3* την οποία αναστέλλει η 6BIO. Η αναστροφή αυτή της εκλεκτικότητας οφείλεται πιθανόν στην υποκατάσταση της 3' θέσης της ιντιρουμπίνης με μια ογκώδη υδρόφιλη αμινο-αλυσίδα. Η αναστροφή αυτή είναι επιθυμητή καθώς στόχος μας ήταν να βρούμε ισχυρούς και εκλεκτικούς αναστολείς της *LdGSK-3s* ώστε να αποτελέσουν το δομικό σκελετό για νέες συνθέσεις και ως εκ' τούτου νέα υποψήφια μόρια για την ανάπτυξη νέας γενιάς στοχευόμενων φαρμάκων έναντι της λεισμανίασης [218].

Οι ιντιρουμπίνες όπως έχουμε ήδη αναφέρει είναι ATP-ανταγωνιστικοί αναστολείς επομένως οι τιμές IC_{50} έναντι των κινασών εξαρτώνται από την ενδογενή συγγένεια του αναστολέα, τη σταθερά διάστασης του συμπλόκου ενζύμου-αναστολέα K_i , καθώς και από τον ανταγωνισμό από το ATP (συγκέντρωση του ATP) και τη σταθερά K_m του ενζύμου για το ATP. Η σχέση

που ενώνει τις μεταβλητές αυτές είναι η εξίσωση Cheng-Prusoff: $K_i = IC_{50} / (1 + [ATP]/K_m ATP)$.

Πίνακας 4. Αναστολή της *LdGSK-3s* και *CRK3* της *Leishmania* από τις ιντιρουμπίνες 11-17 που εμφάνισαν αντιλεϊσμανιακή δράση. Όλα τα αποτελέσματα προέρχονται από πραγματοποίηση τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων

Ανάλογα ιντιρουμπίνης	IC ₅₀ (μM)	
	<i>LdGSK-3s</i>	<i>CRK3</i>
6BIO	0.15±0.06	0.02±0.01
5-Me-6BIO	0.09±0.02	0.65±0.09
11	0.10±0.07	>3.33
12	0.20±0.08	0.99±0.19
13	1.65±0.17	>3.33
14	1.95±0.11	>3.33
15	0.17±0.25	0.14±0.06
16	0.36±0.18	>3.33
17	0.88±0.26	>3.33

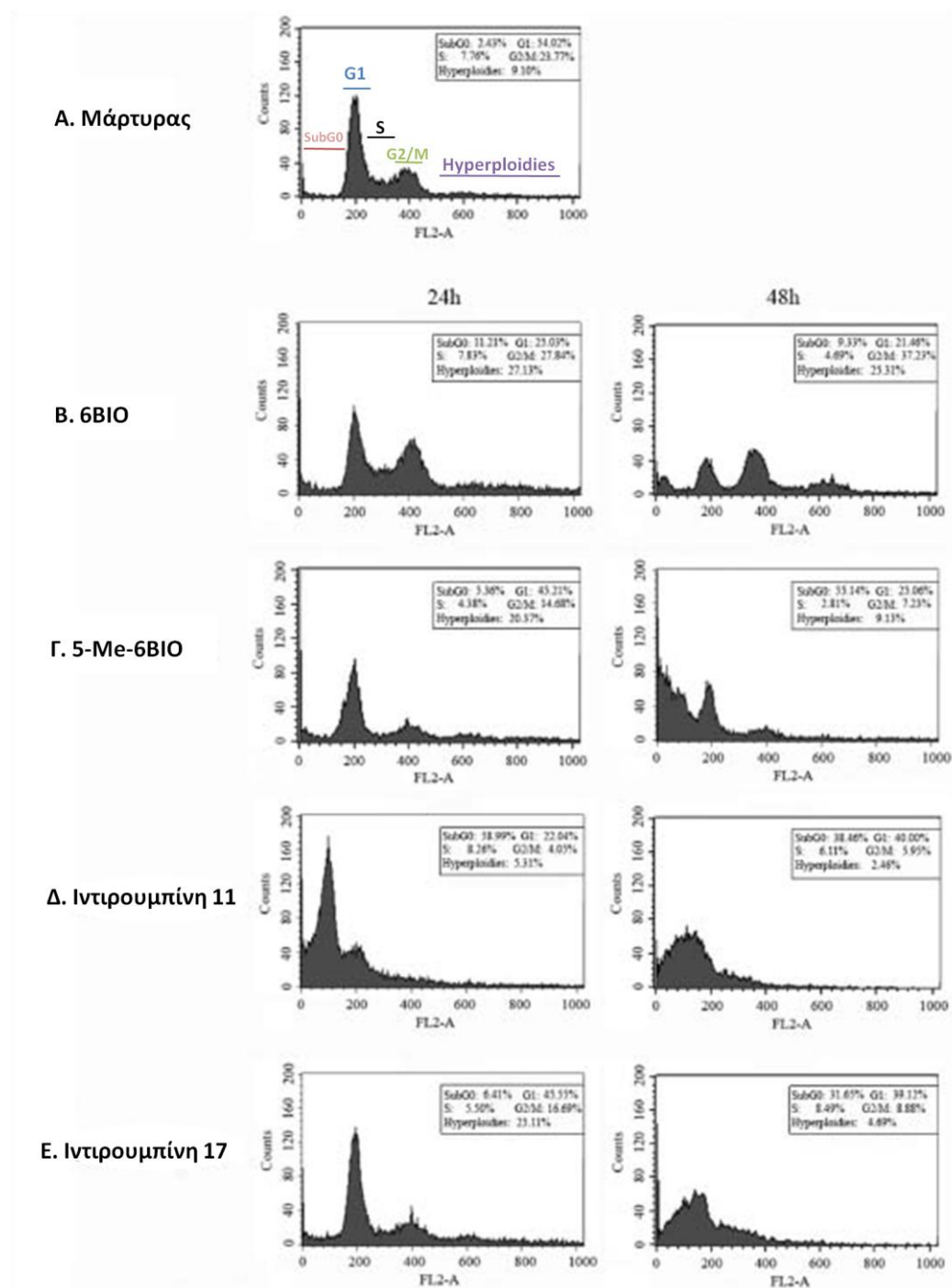
Επομένως, η σύγκριση της ανασταλτικής ικανότητας των ιντιρουμπινών έναντι της *LdGSK-3s* και της *CRK3*, γίνεται μετά τη μετατροπή των τιμών IC₅₀ σε τιμές K_i των αναστολέων για κάθε κινάση. Συγκεκριμένα, οι δοκιμασίες αναστολής γίνονται σε συγκέντρωση ATP ίση με τη σταθερά K_m για το ATP άρα οι τιμές K_i των αναστολέων είναι ίσες με το ½ των τιμών IC₅₀. Από τις 7 ιντιρουμπίνες, αυτές που παρουσιάζουν ενδιαφέρον, για τους λόγους που αναφέρθηκαν πιο πάνω, είναι οι ιντιρουμπίνη **11** (3'-piperazine-6BIO) η οποία έχει K_i=0,05μM και K_i=1,665μM για την *LdGSK-3s* και την *CRK3* αντίστοιχα (δηλαδή >33 φορές περισσότερο επιλεκτική προς την *LdGSK-3s*) και η ιντιρουμπίνη **17** (3'-pyrrolidine-6BIO) η οποία έχει K_i=0,44μM για την *LdGSK-3s* και πάνω από K_i=1,665μM για την *CRK3* (> 3,8 φορές περισσότερο επιλεκτική προς την *LdGSK-3s*). Όπως, έχει προηγουμένως παρατηρηθεί για τις 5-Me-6BIO και την 6BIO, έτσι και για τις ιντιρουμπίνες **11** και **17** παρατηρείται διαφορά ανάμεσα στην κυτταρική δηλαδή στο παράσιτο και ενζυμική τους ενεργότητα. Αυτό είναι σύνηθες γιατί οι ATP-ανταγωνιστικοί αναστολείς είναι δραστικοί στα κύτταρα σε συγκεντρώσεις 10-100 φορές

υψηλότερες από το K_i τους. Το γεγονός αυτό παρατηρείται, επειδή οι δοκιμασίες αναστολής κινάσων γίνονται σε συγκεντρώσεις ATP της τάξης των μM . Αυτή η συγκέντρωση είναι πολλές φορές χαμηλότερη από την ενδοκυτταρική συγκέντρωση, η οποία είναι της τάξης των mM [285, 286] για λόγους που θα αναφερθούν στη συζήτηση. Όλα τα αποτελέσματα προέρχονται από πραγματοποίηση τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων

4.1.3 Επίδραση των ιντιρουμπινών 11 και 17 στον κυτταρικό κύκλο των *L. donovani* προμαστιγωτών παρασίτων

Με σκοπό να ελέγξουμε εάν η στροφή αυτή της επιλεκτικότητας για την CRK3 των 6- υποκατεστημένων αναλόγων προς την *LdGSK-3s* μετά από υποκατάσταση της 3'-θέσης στο σκελετό της ιντιρουμπίνης με μια ομάδα πυρρολιδίνης ή πιπεραζίνης, που εμφανίζεται στα *in vitro* πειράματα αναστολής των απομονωμένων κινάσων, αντικατοπτρίζεται και σε κυτταρικό επίπεδο (*in cellulo*), μελετήθηκε η επίδραση των ιντιρουμπινών **11** και **17** στον κυτταρικό κύκλο και στον κυτταρικό θάνατο. Επίσης, ως αναστολείς αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν και οι ιντιρουμπίνες 5-Me-6BIO και 6BIO των οποίων η δράση στον κυτταρικό κύκλο και στον κυτταρικό θάνατο είναι γνωστή από προηγούμενη μελέτη [191].

Όσον αφορά στην επίδρασή τους στον κυτταρικό κύκλο των προμαστιγωτών παρασίτων *L. donovani* αυτό μελετήθηκε με κυτταρομετρία ροής μετά από χρώση του πυρηνικού και κινητοπλαστικού DNA με PI όπως περιγράφεται στη παράγραφο 3.2.8.1 στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Σε προηγούμενη εργασία βρέθηκε ότι η 5-Me-6BIO αναστέλλει τη μετάβαση των παρασίτων από την G1 στην S φάση του κυτταρικού κύκλου των παρασίτων (G1 arrest) μέσω της παρεμπόδισης της λειτουργίας της *LdGSK-3s* [191]. Από την άλλη μεριά, η 6BIO στοχεύοντας την CRK3, έχει ως αποτέλεσμα να παρεμποδίζει την κυτοκίνηση ή/και τη μίτωση του παρασίτου (G2/M arrest) [191]. Τα αποτελέσματα αυτά για τις 2 ιντιρουμπίνες αναφοράς επιβεβαιώθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή.



Εικόνα 35: Ιστογράμματα ανάλυσης με κυτταρομετρία ροής του κυτταρικού κύκλου των *L. donovani* προμαστιγωτών στατικής φάσης, που επωάστηκαν με τα ανάλογα **11 και **17**. Α) Μάρτυρας (0,01% ή 0,02% DMSO), Β) επώαση με 1μM 6BIO για 24 και 48 h, Γ) επώαση με 1μM 5-Me-6BIO για 24 και 48 h, Δ) επώαση με 0,75μM (IC₅₀) αναλόγου **11** για 24 και 48 h, Ε) επώαση με 0,76μM (IC₅₀) αναλόγου **17** για 24 και 48 h. Όλα τα αποτελέσματα προέρχονται από πραγματοποίηση τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.**

Παράλληλα, η επώαση των παρασίτων με τα 3'υποκατεστημένα ανάλογα της 6BIO **11** και **17** για 24 και 48 h, είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή του κυτταρικού κύκλου στην G1 φάση και την εκθετική αύξηση του πληθυσμού των παρασίτων με κατακερματισμένο DNA (subG0/G1 φάση)

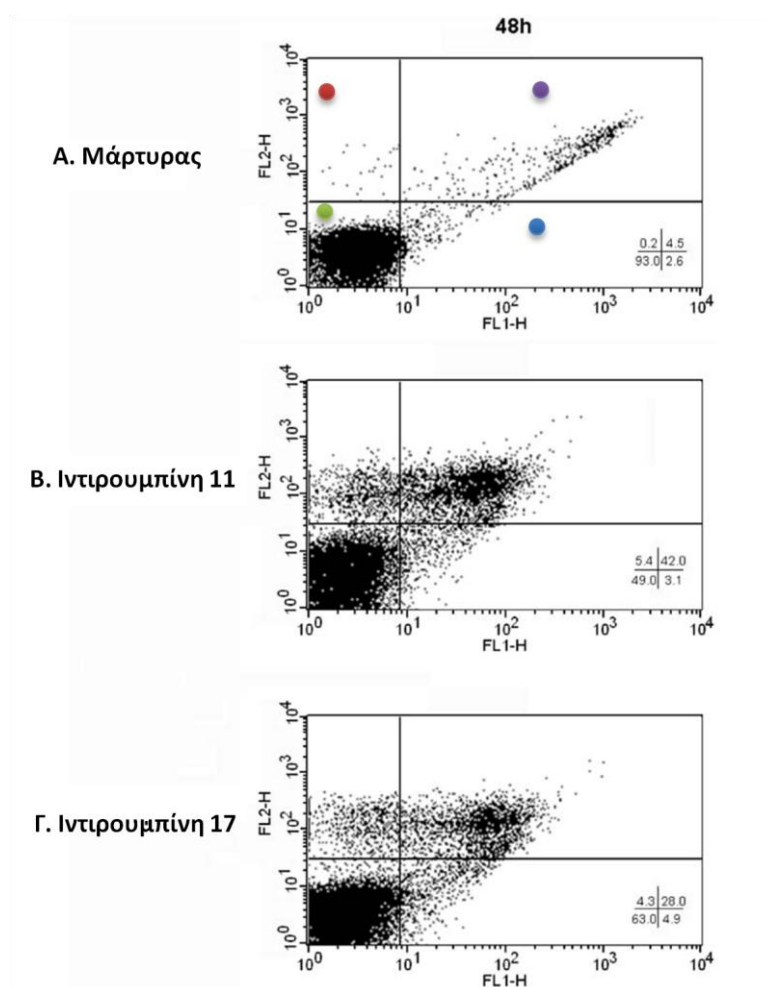
(εικόνα 35). Η δράση των ιντιρουμπινών **11** και **17** στο κυτταρικό κύκλο προσομοιάζει με αυτή της 5-Me-6BIO και ενισχύει τα *in vitro* αποτελέσματα εκλεκτικότητας των ουσιών αυτών προς την *LdGSK-3s* έναντι της CRK3. Τέλος, η εκθετική αύξηση του πληθυσμού subG0/G1 μόλις 24 h μετά την επώαση με την ιντιρουμπίνη **11** που φέρει την πιπεραζίνη στη 3' θέση, μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι στοχεύει πάνω από 33 φορές πιο εκλεκτικά την *LdGSK-3s* από την CRK3, σε σχέση με την ιντιρουμπίνη **17** με τον πυρρολιδικό δακτύλιο στη θέση 3' αλλά και την 5-Me-6BIO που στοχεύουν μόλις 3,8 και 7,2 φορές περισσότερο την *LdGSK-3s* από την CRK3. Όλα τα αποτελέσματα προέρχονται από πραγματοποίηση τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

4.1.4 Επίδραση των ιντιρουμπινών 11 και 17 στον κυτταρικό θάνατο των *L. donovani* προμαστιγωτών παρασίτων

Η επίδραση των ιντιρουμπινών στον κυτταρικό θάνατο των προμαστιγωτών παρασίτων των *L. donovani* μελετήθηκε με κυτταρομετρία ροής μετά από διπλή χρώση AnnexinV/PI όπως περιγράφηκε στη παράγραφο 3.2.9.1 στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Η διαδικασία αυτή μελετά την διαπερατότητα και την κατάτμηση του DNA μέχρι τα τελευταία στάδια του κυτταρικού θανάτου. Έτσι, τα παράσιτα εμφανίζουν θετική χρώση μόνο σε AnnexinV-FITC όταν βρίσκονται στην αρχή της απόπτωσης (early apoptotic), διπλή θετική χρώση AnnexinV-FITC και PI όταν βρίσκονται στα τελικά στάδια της απόπτωσης (late apoptotic) που πιθανότατα ένα μεγάλο ποσοστό θα γίνουν νεκρωτικά (necrotic, θετικά μόνο στη χρώση PI). Τα ζωντανά παράσιτα δεν εμφανίζουν καμία χρώση (unstained) [235, 287-290].

Η 5-Me-6BIO μετά από 48 h επώασης με τα παράσιτα προκαλεί άμεσα αύξηση του πληθυσμού των μεταγενέστερων αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων μέσω της παρεμπόδισης της λειτουργίας της *LdGSK-3s* [191]. Από την άλλη μεριά, η 6BIO στοχεύοντας την CRK3, έχει ως αποτέλεσμα την αρχική αύξηση του πληθυσμού των αρχικών αποπτωτικών στις 48h, τα οποία μετατρέπονται σε μεταγενέστερα αποπτωτικά με την πρόοδο του κυτταρικού θανάτου [191]. Η 48h επώαση των παρασίτων με τα 3'υποκατεστημένα ανάλογα της 6BIO **11** και **17**, είχε ως αποτέλεσμα την άμεση αύξηση του πληθυσμού των μεταγενέστερων αποπτωτικών κυττάρων (42% και 28% αντίστοιχα) και των νεκρωτικών κυττάρων (5,4% και 4,3% αντίστοιχα), χωρίς

να έχει προηγηθεί αύξηση του πληθυσμού των αρχικών αποπτωτικών κυττάρων (3,1% και 4,9% αντίστοιχα) σε σχέση με αυτά που παρατηρούνται σε παράσιτα μάρτυρες που έχουν επωαστεί μόνο με DMSO 0,02% v/v (2,6% αρχικά αποπτωτικά παράσιτα) (εικόνα 36). Η δράση των ιντιρουμπινών **11** και **17** λοιπόν προσομοιάζει με αυτή της 5-Me-6BIO όσον αφορά και τον κυτταρικό θάνατο και επιβεβαιώνει έτσι τα *in vitro* αποτελέσματα εκλεκτικότητας των ουσιών αυτών προς την *LdGSK-3s* έναντι της CRK3. Όλα τα αποτελέσματα προέρχονται από πραγματοποίηση τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

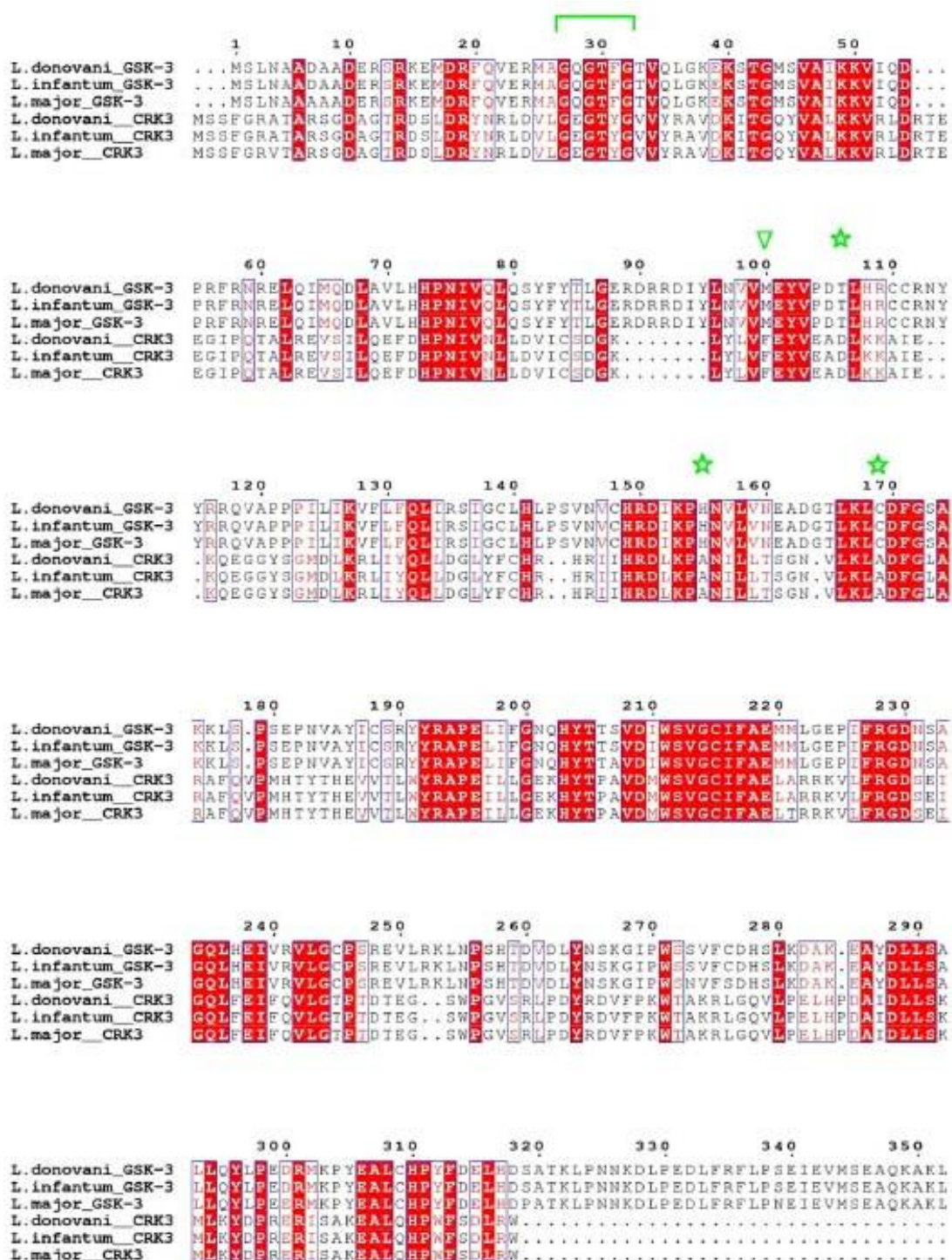


Εικόνα 36. Η έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης και η κυτταρική διαπερατότητα των *L. donovani* προμαστιγωτών έτσι όπως φαίνεται με κυτταρομετρία ροής μετά απο διπλή σήμανση με Ανεξίνη V-FITC και PI. Α) Μάρτυρας, Β) επώαση με 0,75μM (IC_{50}) αναλόγου 11 για 48h, Γ) επώαση με 0,76μM (IC_{50}) αναλόγου 17 για 48h. Άξονας FL1-H: AnnexinV, Άξονας FL2-H:PI. Πράσινη περιοχή: ζωντανά κύτταρα. Μπλε περιοχή: πρώιμα αποπτωτικά κύτταρα. Μωβ περιοχή: μεταγενέστερα αποπτωτικά κύτταρα. Κόκκινη περιοχή: νεκρωτικά κύτταρα.

4.1.5 Μελέτη μοριακής προσομοίωσης των κινασών LGSK-3s και CRK3 στη *Leishmania*

Για να μπορέσουμε να εξηγήσουμε περαιτέρω τη στρόφη στην εκλεκτικότητα των 3'υποκατεστημένων αναλόγων της 6BIO προς την LGSK-3s αντί της CRK3, έγινε μελέτη μοριακής προσομοίωσης χρησιμοποιώντας 3 ομόλογα ζευγάρια κινασών LGSK-3s έναντι της CRK3 (εικόνα 37) των τριών ειδών *L. major*, *L. donovani* και *L. infantum* [278, 291]. Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε στο τμήμα φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών υπό την επίβλεψη του καθηγητή Ε. Μικρό και του καθηγητή Α.-Λ. Σκαλτσούνη. Αρχικά, η μελέτη έδειξε υψηλή ομολογία στο ενεργό κέντρο των 2 κινασών μεταξύ τους με τη μόνη σημαντική διαφορά να είναι η αντικατάσταση του αμινοξέος που βρίσκεται στην είσοδο του ενεργού κέντρου (gatekeeper), (M100^{LGSK-3s} σε F99^{CRK3}). Παρόλα αυτά, σε αμινοξέα τα οποία βρίσκονται κοντά στο ενεργό κέντρο παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην πλούσια σε γλυκίνη θηλιά (Gly-loop) και στα σημεία πρόσδεσης ριβόζης και φωσφατάσης των κινασών.

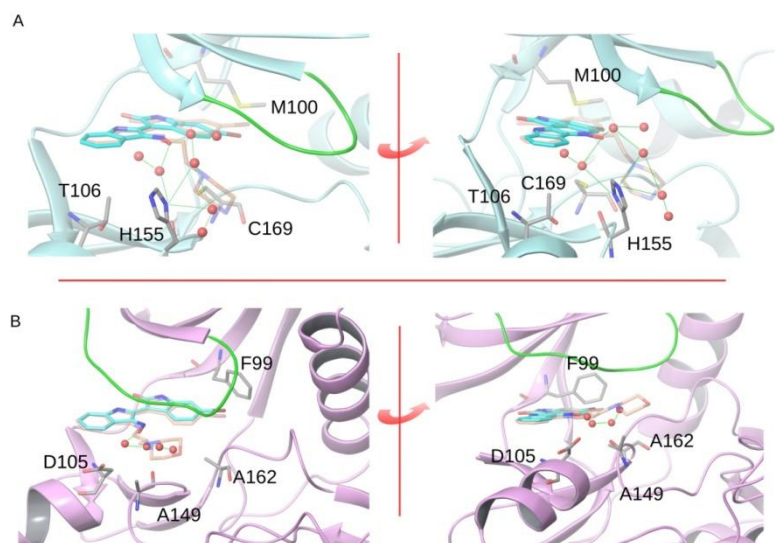
Στην LGSK-3s, το μοτίβο της Gly-loop είναι ²⁷GQGTFG³² ενώ στην CRK3 είναι ³⁰GEGTYG³⁵. Παράλληλα, στο σημείο πρόσδεσης της ριβόζης η T106^{LGSK-3s} αντικαθιστάται με την D105^{CRK3} και στο σημείο πρόσδεσης της φωσφατάσης η H155^{LGSK-3s} αντικαθιστάται από την A149^{CRK3} και η C169^{LGSK-3s} από την A162^{CRK3}. Οι διαφορές αυτές πιθανόν παίζουν σημαντικό ρόλο στον έμμεσο καθορισμό του μοτίβου ενυδάτωσης του ενεργού κέντρου των 2 αυτών παρασιτικών κινασών. Πιο συγκεκριμένα, οι διαφορές στα αμινοξέα της Gly-loop επηρεάζει την ευκαμψία της θηλιάς η οποία με τη σειρά της αλληλεπιδρά με τα μόρια νερού τα οποία επιδρούν στα σημεία πρόσδεσης ριβόζης και φωσφατάσης. Για να προσδιορίσουμε αν αυτή η διαφορά παίζει σημαντικό ρόλο στη πρόσδεση των ιντιρουμπινών στις κινάσες και επηρεάζει την εκλεκτικότητα των 3'υποκατεστημένων αναλόγων της 6BIO, πραγματοποιήθηκε υπολογιστική χαρτογράφηση (computational mapping) των μοτίβων ενυδάτωσης των κινασών χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο Szmap [292, 293].



Εικόνα 37. Πολλαπλή ευθυγράμμιση αλληλουχίας της GSK-3 και CRK3 τριών ειδών *Leishmania*. Η πολλαπλή ευθυγράμμιση αλληλουχίας απεικονίζει την υψηλή ομολογία μεταξύ της GSK-3 και CRK3 τριών ειδών *Leishmania* (*L. donovani*, *L. infantum* και *L. major* - κωδικοί Uniprot: A6N857, A4HXQ3, Q4QE15 για GSK-3 και Q4K8Z1, A4ICT0, Q96526 για CRK3, αντίστοιχα). Οι θέσεις gatekeeper καθώς και τα μη-διατηρημένα κατάλοιπα ριβόζης σημειώνονται με πράσινα αστέρια ενώ η Gly-loop με πράσινη παρένθεση. Ευθυγράμμιση έγινε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα ClustalW με τις προεπιλεγμένες ρυθμίσεις και η απεικόνιση παρασκευάστηκε χρησιμοποιώντας λογισμικό ESPript.

Η ανάλυση αυτή ανέδειξε μια σαφή διαφορά στις προβλεπόμενες θερμοδυναμικές ιδιότητες των μορίων νερού τα οποία θα έπρεπε να

δημιουργούν το πρώτο κέλυφος ενυδάτωσης δίπλα στα σημεία πρόσδεσης της ριβόζης και της φωσφατάσης στις 2 κινάσες.



Εικόνα 38. Σύγκριση των σημείων ενυδάτωσης των ενεργών κέντρων των LGSK-3 και CRK3 με τη βοήθεια του αλγόριθμου Szmap. Οι θέσεις ενυδάτωσης οι οποίες έχουν θετική ελεύθερη ενέργεια απεικονίζονται ως κόκκινες σφαίρες στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης (απεικονίζεται σαν κορδέλα). Οι θέσεις ενυδάτωσης που συνδέονται με πράσινες γραμμές απεικονίζουν ενδεχόμενους δεσμούς υδρογόνου που θα μπορούσαν να σχηματίζονται μεταξύ αυτών και των γειτονικών αμινοξέων. Οι θέσεις αυτές που απεικονίζονται ενδεχομένως να επικαλύπτονται με τα ογκώδη 3'-υποκατάστατα των δΒΙΟ αναλόγων που έχουν τα ανάλογα 11 και 17. Η μετατόπιση λοιπόν και απελευθέρωση των εν λόγω μορίων ύδατος από το ενεργό κέντρο αυξάνει την εντροπία και θα ευνοούσε τη συγγένεια δέσμευσης με τα ανάλογα. Α) Στην LGSK-3, η υποκαταστάτη της θέσης 3 'καταλαμβάνει μια περιοχή η οποία επικαλύπτεται με διάφορα ασταθή μόρια νερού των σημείων ενυδάτωσης της πρωτεΐνης, Β) Στην CRK3, η περιοχή που καταλαμβάνεται από τα αντίστοιχα ασταθή μόρια του νερού είναι μικρότερη και έχει αισθητά μικρότερη επικάλυψη με την περιοχή που καταλαμβάνεται από τον υποκαταστάτη της ιντιρουμπίνης. Ως αποτέλεσμα, η συγγένεια δέσμευσης δεν αναμένεται να επηρεαστεί σοβαρά από τον εκτοπισμό τους.

Πιο συγκεκριμένα, ένα σύμπλεγμα από μόρια ύδατος με ελεύθερη θετική ενέργεια βρίσκεται στις προαναφερθέντες θέσεις στις κινάσες LGSK-3s αλλά λείπει στα CRK3 ομόλογα (εικόνα 38). Το σύμπλεγμα αυτό καθορίζει μια περιοχή όπου η υποκατάσταση του αναστολέα με πολικές ογκώδεις ομάδες θα ευνοούσε την συγγένεια δέσμευσης ενώ η αντικατάσταση του από υδρόφοβες ομάδες θα επηρέαζε τη συγγένεια με δυσμενή τρόπο. Λαμβάνοντας υπόψη ότι οι ενώσεις, που δεσμεύονται στις κινάσες μέσω ειδικών αλληλεπιδράσεων, φιλοξενούνται σε αυτό το συγκεκριμένο τμήμα της κοιλότητας, θα μπορούσε να προσδίδει στο γεγονός αυτό μια διαφορετική χημική συγγένεια μεταξύ των κατά τα άλλα παρόμοιων δραστικών θέσεων των LGSK-3s και CRK3. Έτσι, οι ιντιρουμπίνες με αντιλεϊσμμανιακή δράση, οι

οποίες κατέχουν μια ογκώδη υδρόφιλη αμινο-αλυσίδα στη 3' θέση της 6BIO (**11-17**, πίνακας 3) προσδένονται πιο επιλεκτικά δίπλα στην περιοχή αυτή του ενεργού κέντρου της LGSK-3s, επικαλύπτοντας έτσι τις θέσεις ενυδάτωσης και αυξάνοντας τη σύνδεση λόγω της εντροπίας από την εκτόπιση των σχετικά ασταθών μορίων νερού από το πρώτο κέλυφος ενυδάτωσης της κινάσης, πράγμα που δε μπορεί να συμβεί με την πρόσδεση στη κινάση CRK3.

4.2 *In vivo* πειράματα σε πειραματικό μοντέλο σπλαχνικής λεισμανίασης

4.2.1 Έλεγχος τοξικότητας ιντιρουμπινών 11 και 5-Me-6BIO

Όπως περιγράφεται στη παράγραφο του κεφαλαίου 3.2.11.1 Υλικά και Μέθοδοι, μελετήθηκε η τοξικότητα των ιντιρουμπινών **11** και 5-Me-6BIO σε ποντίκια Balb/C σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και στο σχήμα θεραπείας που ακολουθήθηκε αργότερα στο μοντέλο σπλαχνικής λεισμανίασης.

Πίνακας 5. Έλεγχος τοξικότητας ιντιρουμπινών 11 και 5-Me-6BIO

	Balb/C						Φυσιολογικές τιμές
	Αναφοράς	DMSO/PBS	1 δόση 20mg/Kg αναλόγου 5-Me-6BIO	3 δόσεις 20mg/Kg αναλόγου 5-Me-6BIO	5 δόσεις 20mg/Kg αναλόγου 5-Me-6BIO	7 δόσεις 20mg/Kg αναλόγου 5-Me-6BIO	
Κρεατινίνη	0,36	0,36	0,42	0,36	0,47	0,39	0,2-0,9 mg/dL
Τρανσαμινάση AST (SGOT)	178	191	155	97	143	118	54-298 (U/l)
Τρανσαμινάση (SGPT)	63	57	37	30	39	31	17-77 (U/l)
CRP (ποσοτική)	0,02	0,04	0,03	0,04	0,02	0,02	<50 mg/dL
Μικροαλβουμί-νη ούρων	11	12	4	20	11	8	< 20 mg/l
Κρεατινίνη ούρων 24ώρου	54,88	53,89	51,03	66,72	54,88	51,69	65,00-148,00 mg/2h
	Balb/C						Φυσιολογικές τιμές
	Αναφοράς	Μετά από θεραπεία με DMSO/PBS	1 δόση 20mg/Kg αναλόγου 11	3 δόσεις 20mg/Kg αναλόγου 11	5 δόσεις 20mg/Kg αναλόγου 11	7 δόσεις 20mg/Kg αναλόγου 11	
Κρεατινίνη	0,38	0,36	0,38	0,4	0,36	0,37	0,2-0,9 mg/dL
Τρανσαμινάση AST (SGOT)	112	130	123	94	194	146	54-298 (U/l)
Τρανσαμινάση (SGPT)	27	38	24	24	58	31	17-77 (U/l)
CRP (ποσοτική)	<0,02	<0,02	0,02	<0,02	<0,02	0,02	<50 mg/dL
Μικροαλβουμί-νη ούρων	35	34	13	11	8	9	< 20 mg/l
Κρεατινίνη ούρων 24ώρου	147,22	120,03	70,16	64,64	56,59	62,93	65,00-148,00 mg/2h

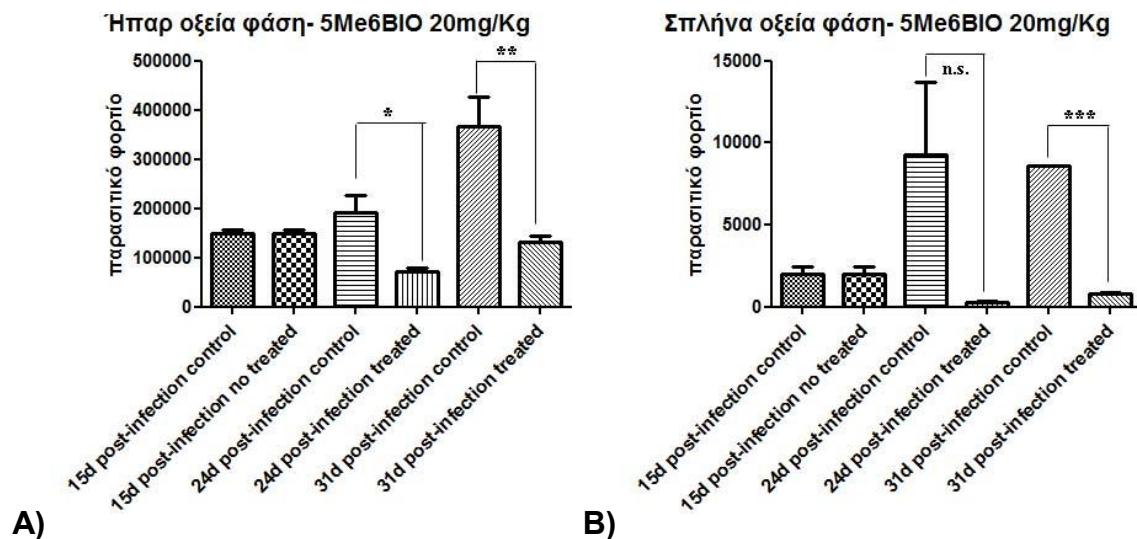
Στον πίνακα 5 φαίνονται οι τιμές των ηπατικών ενζύμων στο αίμα (κρεατινίνη, τρανσαμινάση ALT και τρανσαμινάση AST) και στα ούρα (κρεατινίνη και μικροαλβουμίνη) καθώς και της CRP των ποντικών που είναι δείκτες τοξικότητας, μετά από 1, 3, 5, 7 δόσεις από κάθε συγκέντρωση ιντιρουμπίνης. Η παρατήρηση της όρεξης, του βάρους και της κινητικότητας των πειραματόζων καθώς και οι αιματολογικές και ουρολογικές τιμές των δεικτών φανερώνουν πως και οι 2 ιντιρουμπίνες δεν είναι τοξικές σε συγκεντρώσεις από 1-20mg/kg και στο δεδομένο δοσολογικό σχήμα που εξετάστηκε.

4.2.2 Έλεγχος δράσης ιντιρουμπινών 11 και 5-Me-6BIO σε πειραματικό μοντέλο σπλαχνικής λεισμανίασης οξείας και χρόνιας φάσης

Τα *in vivo* πειράματα πραγματοποιήθηκαν όπως περιγράφονται στη παράγραφο του κεφαλαίου 3.2.11.2 Υλικά και Μέθοδοι, και υπολογίστηκε η επίδραση των ιντιρουμπινών στο παρασιτικό φορτίο του ήπατος και του σπλήνα των ποντικών τόσο στη οξεία όσο και στη χρόνια φάση της ασθένειας. Και οι 2 ιντιρουμπίνες που ελέχθησαν είναι επιλεκτικοί αναστολείς της *LdGSK-3s* όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Ως φάρμακο ελέγχου χρησιμοποιήθηκε η αντιμονιακή μεγλουμίνη (glucantime) η οποία ανήκει στα πεντασθενή αντιμόνια και οι ιδιότητες της είναι παρόμοιες με το φάρμακο Pentostam (sodium stibogluconate). Και τα 2 αυτά φάρμακα χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία τόσο της σπλαχνικής όσο και της δερματικής λεισμανίασης [64]. Η χορήγηση του φαρμάκου αυτού έγινε 31 μέρες μετά τη μόλυνση, ενδοπεριτοναϊκά σε συγκέντρωση 40mg/Kg σε 2 κύκλους των 5 ενέσιμων θεραπειών. Το μεσοδιάστημα ανάμεσα στους 2 κύκλους θεραπείας ήταν 14 μέρες (1^{ος} κύκλος 31 μέρες μετά τη μόλυνση, 2^{ος} κύκλος 50 μέρες μετά τη μόλυνση). Η θεραπεία αυτή μειώνει μέχρι και 91,27% το παρασιτικό φορτίο στο μοντέλο σπλαχνικής λεισμανίασης [294, 295].

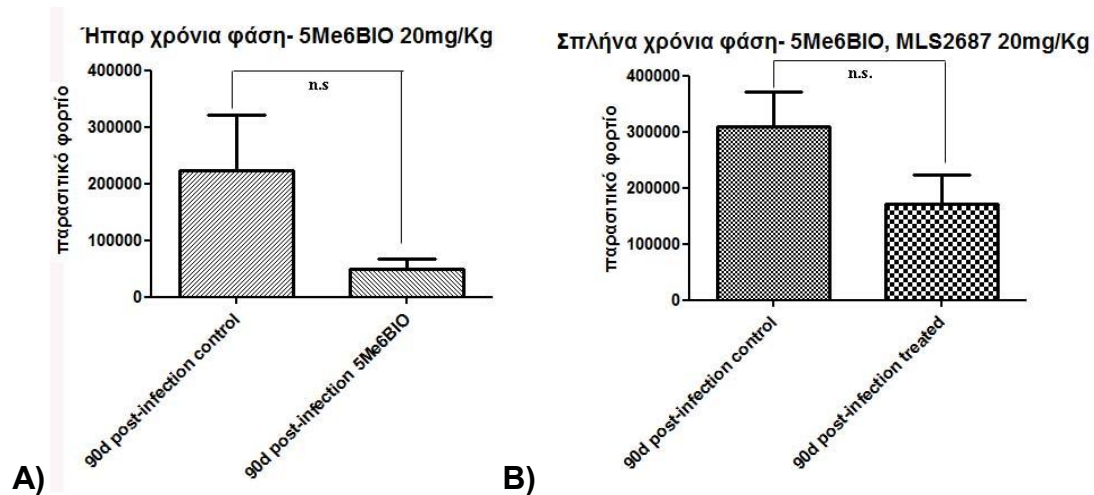
Αρχικά, το δοσολογικό σχήμα της θεραπείας που ακολουθήθηκε στα μολυσμένα με *L. infantum* MON-1 παράσιτα, Balb/C ποντίκια με την 5-Me-6BIO ήταν 7 δόσεις οι οποίες πραγματοποιήθηκαν σε διάστημα 14 ημερών (1 κάθε δεύτερη μέρα) όπου κάθε δόση περιείχε την ιντιρουμπίνη σε συγκέντρωση 20mg/Kg. Στην οξεία φάση της νόσου, παρατηρούμε ότι τα ποντίκια που δέχθηκαν 3 δόσεις της θεραπείας με 5-Me-6BIO (20mg/Kg),

παρουσίασαν 63% μείωση του παρασιτικού φορτίου στο ήπαρ ($p=0,0169$) και 97% μείωση του παρασιτικού φορτίου στο σπλήνα ($p=0,0525$) σε σχέση με τα ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε απλά μείγμα διαλύτη DMSO-PBS (γράφημα 1). Μετά από 7 δόσεις της θεραπείας με 5-Me-6BIO (20mg/Kg), τα ποντίκια παρουσίασαν 63,8% μείωση του παρασιτικού φορτίου στο ήπαρ ($p=0,0090$) και 91% μείωση του παρασιτικού φορτίου στο σπλήνα ($p<0,0001$) (γράφημα 1). Η μεγαλύτερη μείωση του παρασιτικού φορτίου στο σπλήνα σε σχέση με το ήπαρ εξηγείται από το γεγονός ότι σε αυτή τη φάση της ασθένειας το παρασιτικό φορτίο είναι αυξημένο στο ήπαρ ($3-6 \times 10^6$ παράσιτα) αλλά όχι στο σπλήνα ($8-10 \times 10^3$ παράσιτα). Επομένως, με χαμηλότερο παρασιτικό φορτίο στο σπλήνα είναι πιο εύκολο για την ιντιρουμπίνη να αναστείλει την ανάπτυξη των παρασίτων.



Γράφημα 1. Παρασιτικό φορτίο στο ήπαρ (Α) και στο σπλήνα (Β) μετά από 3 και 7 δόσεις του αναλόγου 5-Me-6BIO με συγκέντρωση 20mg/Kg σε πειραματικό μοντέλο σπλαχνικής λεισμανίασης οξείας φάσης. P-value: n.s = no-significant, * ($<0,05$), ** ($<0,01$), *** ($<0,001$).

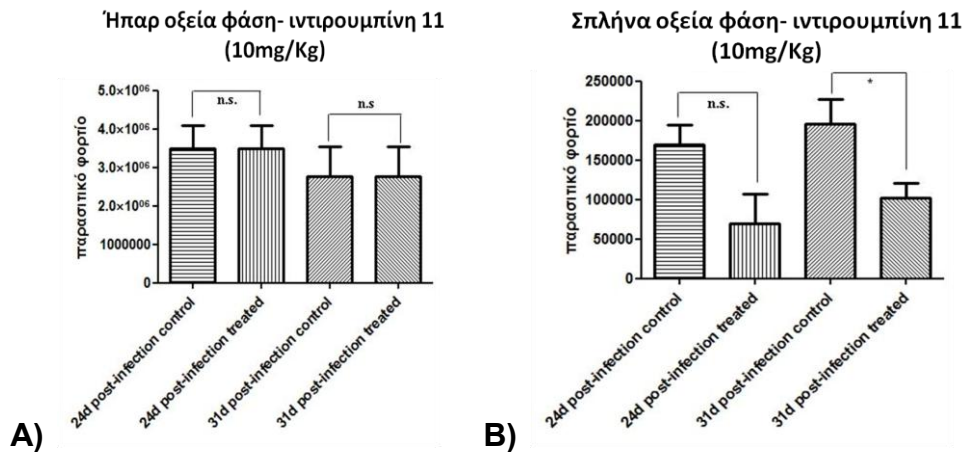
Στη χρόνια φάση της νόσου, παρατηρούμε ότι τα ποντίκια που δέχθηκαν 7 δόσεις της θεραπείας με 5-Me-6BIO (20mg/Kg), παρουσίασαν 78% μείωση του παρασιτικού φορτίου στο ήπαρ ($p=0,0896$) και 44,8% μείωση του παρασιτικού φορτίου στο σπλήνα ($p=0,1305$) σε σχέση με τα ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε απλά μείγμα διαλύτη DMSO-PBS (γράφημα 2).



Γράφημα 2. Παρασιτικό φορτίο στο ήπαρ (Α) και στο σπλήνα (Β) μετά από 7 δόσεις του αναλόγου 5-Me-6BIO με συγκέντρωση 20mg/Kg σε πειραματικό μοντέλο σπλαχνικής λεισμανίασης χρόνιας φάσης. P-value: n.s = no-significant, * (<0,05), **(<0,01), ***(<0,001).

Η μεγαλύτερη μείωση του παρασιτικού φορτίου στο ήπαρ σε σχέση με το σπλήνα στη χρόνια φάση της νόσου εξηγείται από το γεγονός ότι σε αυτή τη φάση υπάρχει αυτοθεραπεία του ήπατος ενώ το παρασιτικό φορτίο στο σπλήνα συνεχώς αυξάνεται ($3-6 \times 10^6$ παράσιτα). Επομένως, ο συνδυασμός θεραπείας με την ιντιρουμπίνη και της αυτοθεραπείας του ήπατος έχει ως αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη μείωση του παρασιτικού φορτίου στο όργανο αυτό σε σχέση με το όργανο του σπλήνα.

Στη συνέχεια, ελέγξαμε και τη δράση της ιντιρουμπίνης **11** (γράφημα 3) στο πειραματικό μοντέλο σπλαχνικής λεισμανίασης. Το δοσολογικό σχήμα της θεραπείας που ακολουθήθηκε στα μολυσμένα με *L. infantum* MON-1 παράσιτα, Balb/C ποντίκια με την ιντιρουμπίνη **11** ήταν 7 δόσεις οι οποίες πραγματοποιήθηκαν σε διάστημα 14 ημερών (1 κάθε δεύτερη μέρα) όπου κάθε δόση περιείχε την ιντιρουμπίνη σε συγκέντρωση 10mg/Kg. Στην οξεία φάση της νόσου, παρατηρούμε ότι τα ποντίκια που δέχθηκαν 3 δόσεις της θεραπείας με ιντιρουμπίνη **11** (10mg/Kg), δεν παρουσίασαν μείωση του παρασιτικού φορτίου στο ήπαρ αλλά παρουσίασαν 59,1% μείωση του παρασιτικού φορτίου στο σπλήνα ($p=0,0782$) σε σχέση με τα ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε απλά μείγμα διαλύτη DMSO-PBS (γράφημα 3). Μετά από 7 δόσεις της θεραπείας με ιντιρουμπίνη **11** (10mg/Kg), τα ποντίκια πάλι δε παρουσίασαν μείωση του παρασιτικού φορτίου στο ήπαρ αλλά παρουσίασαν 48% μείωση του παρασιτικού φορτίου στο σπλήνα ($p=0,0300$) (γράφημα 3).

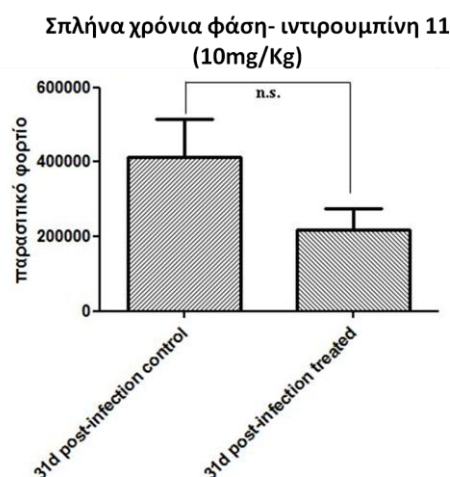
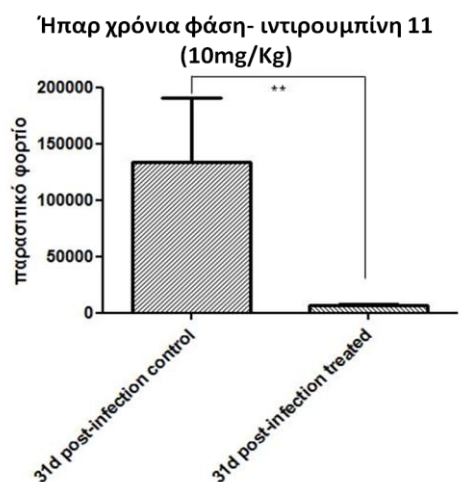


Γράφημα 3. Παρασιτικό φορτίο στο ήπαρ (Α) και στο σπλήνα (Β) μετά από 3 και 7 δόσεις του αναλόγου 11 με συγκέντρωση 10mg/Kg σε πειραματικό μοντέλο σπλαχνικής λείσμανιάσης οξείας φάσης. P-value: n.s = no-significant, * (<0,05), **(<0,01), ***(<0,001).

Στη χρόνια φάση της νόσου, παρατηρούμε ότι τα ποντίκια που δέχθηκαν 7 δόσεις της θεραπείας με ιντιρουμπίνη **11** σε συγκέντρωση 10mg/Kg, παρουσίασαν 94,9% μείωση του παρασιτικού φορτίου στο ήπαρ ($p=0,0059$) και 47,1% μείωση του παρασιτικού φορτίου στο σπλήνα ($p=0,0895$) σε σχέση με τα ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε απλά μείγμα διαλύτη DMSO-PBS (γράφημα 4). Παράλληλα, τα ποντίκια που δέχθηκαν 7 δόσεις της θεραπείας με ιντιρουμπίνη **11** συγκέντρωσης 20mg/Kg, παρουσίασαν 75,6% μείωση του παρασιτικού φορτίου στο ήπαρ ($p=0,1040$) και 56% μείωση του παρασιτικού φορτίου στο σπλήνα ($p=0,1057$) σε σχέση με τα ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε απλά μείγμα διαλύτη DMSO-PBS (γράφημα 5). Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι στη χρόνια φάση της ασθένειας δεν υπάρχει σημαντική διαφορά στη μείωση του παρασιτικού φορτίου ούτε στο ήπαρ ούτε στο σπλήνα όταν η δόση της ιντιρουμπίνης μεταβάλλεται από 10 σε 20mg/Kg. Επομένως για τη βελτιστοποίηση της θεραπείας ίσως θα πρέπει να ακολουθηθεί διαφορετικό δοσολογικό σχήμα.

Γενικά, παρατηρούμε ότι οι ιντιρουμπίνες παρουσιάζουν καλή αντιλειτουργική δράση και *in vivo* χωρίς να παρουσιάζουν τοξικότητα στα ποντίκια Balb/C, με την 5-Me-6BIO να είναι η πιο υποσχόμενη από τις 2 που εξετάστηκαν. Παρόλα αυτά, η θεραπεία με τις ιντιρουμπίνες στην οξεία φάση της σπλαχνικής λείσμανιάσης μετά από 3 και 7 δόσεις παρουσιάζει παρόμοια ποσοστά μείωσης του παρασιτικού φορτίου στο ήπαρ και στο σπλήνα. Δηλαδή, η χορήγηση 7 δόσεων δεν μειώνει περαιτέρω το παρασιτικό φορτίο

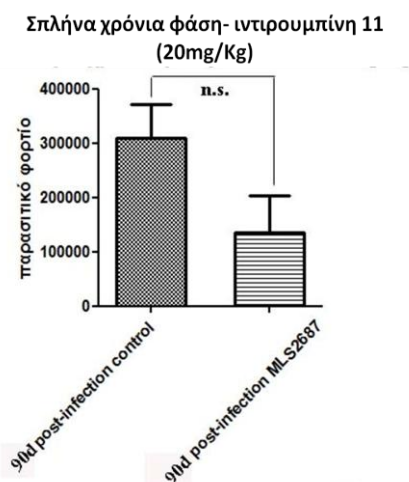
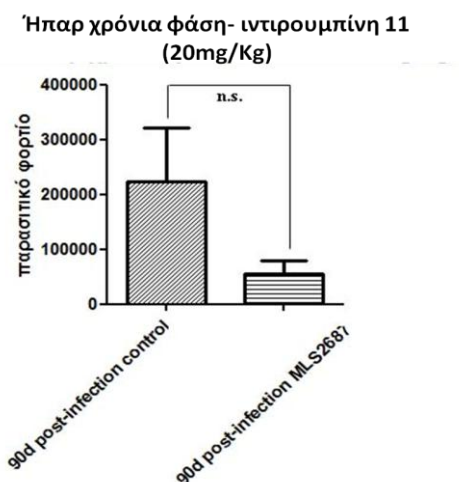
αλλά αναστέλλει την εκθετική μείωση της αύξησης του παρασιτικού φορτίου που παρατηρείται στην ομάδα αναφοράς και κρατά χαμηλά επίπεδα παρασίτων στα όργανα. Το γεγονός αυτό πιθανόν να σημαίνει ότι η δράση των ιντιρουμπινών που εμφανίζεται μπορεί να οφείλεται στην απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή στις ιντιρουμπίνες και πρέπει να πραγματοποιηθούν περαιτέρω διευκρινιστικά πειράματα για την επαλήθευση αυτής της υπόθεσης.



A)

B)

Γράφημα 4 Παρασιτικό φορτίο στο ήπαρ (A) και στο σπλήνα (B) μετά από 7 δόσεις του αναλόγου 11 με συγκέντρωση 10mg/Kg σε πειραματικό μοντέλο σπλαχνικής λεισμανίασης χρόνιας φάσης. P-value: n.s = no-significant, * (<0,05), **(<0,01), ***(<0,001).



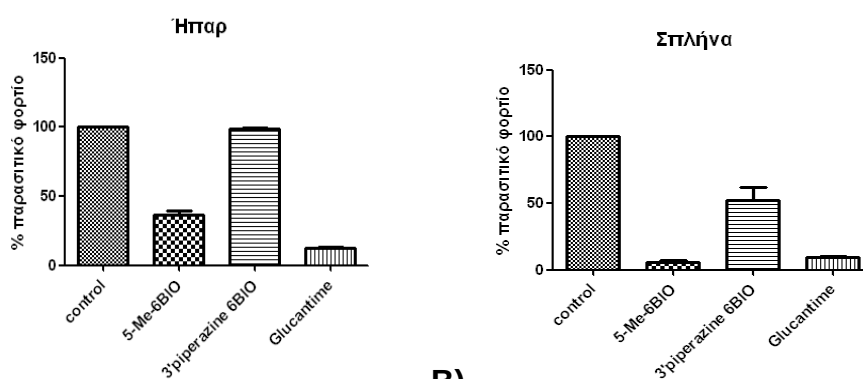
A)

B)

Γράφημα 5. Παρασιτικό φορτίο στο ήπαρ (A) και στο σπλήνα (B) μετά από 7 δόσεις του αναλόγου 11 με συγκέντρωση 20mg/Kg σε πειραματικό μοντέλο σπλαχνικής λεισμανίασης χρόνιας φάσης. P-value: n.s = no-significant, * (<0,05), **(<0,01), ***(<0,001).

Τέλος, έγινε σύγκριση της μείωσης του παρασιτικού φορτίου στο ήπαρ και στο σπλήνα που παρατηρείται στην οξεία φάση της σπλαχνικής λεισμανίασης μετά από τη χορήγηση των αναλόγων 11 και 5-Me-6BIO με τη

μείωση που παρατηρείται μετά από χορήγηση του φαρμάκου ελέγχου Glucantime. Φυσικά, το φάρμακο ελέγχου χορηγήθηκε σε διαφορετικό δοσολογικό σχήμα από αυτό των ιντιρουμπινών καθώς ακολουθήθηκε το καθιερωμένο πρωτόκολλο του φαρμάκου αυτού. Στο γράφημα 6 παρατηρείται ότι το φάρμακο ελέγχου τόσο στο σπλήνα όσο και στο ήπαρ μειώνει το παρασιτικό φορτίο 91% και 91,27% αντίστοιχα. Παρόλο που το φάρμακο ελέγχου συνολικά φαίνεται να μειώνει το παρασιτικό φορτίο σε μεγαλύτερο βαθμό από τα ανάλογα ιντιρουμπινών που χρησιμοποιήθηκαν, δεν εξαλείφει ούτε αυτό πλήρως το παρασιτικό φορτίο στα όργανα. Επίσης, το φάρμακο ελέγχου χρησιμοποιείται σε μεγαλύτερη δόση (40mg/kg) από αυτή που χρησιμοποιήθηκε στη θεραπεία με τα ανάλογα ιντιρουμπινών (20mg/Kg) και οι συνολικές δόσεις ανά ποντίκι ήταν περισσότερες στο δοσολογικό σχήμα του φαρμάκου ελέγχου (10 δόσεις) από ότι στο δοσολογικό σχήμα που χρησιμοποιήσαμε για τις ιντιρουμπίνες (7 δόσεις). Έτσι, οι ιντιρουμπίνες **11** και 5-Me-6BIO ίσως μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε πειραματικό μοντέλο σε συνδυασμό με το φάρμακο ελέγχου Glucantime για να ελεγχθεί αν μπορεί να υπάρξει πιθανότητα καλύτερης απόδοσης έναντι του παρασιτικού φορτίου στη σπλαχνική λείσμανίαση με την συνδυαστική αυτή θεραπεία.



A) **B)**
Γράφημα 6. Σύγκριση παρασιτικού φορτίου στο ήπαρ (A) και στο σπλήνα (B) μετά από 7 δόσεις των αναλόγων **11** και 5-Me-6BIO με συγκέντρωση 20mg/Kg και μετά από χορήγηση δοσολογικού σχήματος συνολικά 10 δόσεων (40mg/Kg) του φαρμάκου ελέγχου Glucantime, σε πειραματικό μοντέλο σπλαχνικής λείσμανίασης οξείας φάσης.

Επομένως, οι ιντιρουμπίνες **11** και 5-Me-6BIO θα μπορούσαν να μελετηθούν σε διαφορετικό δοσολογικό σχήμα ή να αποτελέσουν πρότυπες ουσίες για τη δημιουργία πιο αποτελεσματικών ως προς τη θεραπεία της νόσου αναλόγων, να μελετηθούν συνδυαστικά με την ήδη υπάρχουσα θεραπεία για τη πιθανή δημιουργία μιας καινούριας συνεργαστικής μη τοξικής

θεραπείας ή/και να αποτελέσουν ένα καλό εργαλείο για την μελέτη του μηχανισμού δράσης μείωσης του παρασιτικού φορτίου από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή μέσω της δράσης αναστολέων της κινάσης GSK-3.

4.3 *Trypanosoma brucei*

4.3.1 Καθορισμός της αντιρυπανοσωμικής δραστικότητας (IC_{50}) βιβλιοθήκης ιντιρουμπινών στα παράσιτα *T. brucei*

Οι ιντιρουμπίνες έχουν δειχθεί τόσο στην παρούσα εργασία όσο και σε προηγούμενες [191, 218] ότι διαθέτουν καλή αντιλειτουργική δράση και αποτελούν ιδανικούς υποψήφιους για ανάπτυξη μιας νέας θεραπείας ενάντια στην ασθένεια της λείσμανιασης. Παρόλα αυτά, καμία προσπάθεια μέχρι σήμερα δεν έχει γίνει για τη διερεύνηση της δράσης των ιντιρουμπινών έναντι των τρυπανοσωμάτων *T. brucei* τα οποία ανήκουν και αυτά στην οικογένεια των τρυπανοσωματίδων. Το γεγονός ότι η *TbGSK-3s* έχει μελετηθεί πρόσφατα και έχει αναδειχθεί ως πιθανός στόχος για τη θεραπεία της HAT [205] σε συνδυασμό με το υψηλό ποσοστό ταυτότητας (65%) της *TbGSK-3s* με την λείσμανιακή *LmajGSK-3s*, μας ώθησε να ελέγξουμε τις ιντιρουμπίνες ως προς την αντιρυπανοσωμική τους δράση. Μάλιστα, υποθέσαμε ότι οι ιντιρουμπίνες που βρέθηκαν να έχουν αντιλειτουργική δράση και στοχεύουν την *LdGSK-3s* πιθανόν να έχουν και αντιρυπανοσωμική δράση,

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή λοιπόν, 69 ανάλογα ιντιρουμπίνης (49 ανάλογα τα οποία ελέγξαμε για πρώτη φορά στη παρούσα διατριβή και 20 τα οποία είχαν ελεγχθεί στο παρελθόν [191] έναντι των παρασίτων *Leishmania*) χρησιμοποιήθηκαν για να προσδιοριστούν καινούριοι αναστολείς με αντιρυπανοσωμική δράση. Σε αυτά περιέχονται η ιντιρουμπίνη, η 3'-μεθοξίμη της ιντιρουμπίνης, 6-βρώμο και 5-βρώμο υποκατεστημένες ιντιρουμπίνες, 5-άμινο υποκατεστημένες και 6-αλογόνο υποκατεστημένες ιντιρουμπίνες, 3'-υποκατεστημένες 6BIO ανάλογα, 6-υποκατεστημένες 5-νίτρο ιντιρουμπίνες και 7-υποκατεστημένες ιντιρουμπίνες. Όπως έχει ήδη αναφερθεί τα τρυπανοσώματα του γένους *T. brucei* αναπτύσσονται εξωκυττάρια ως τρυπομαστιγωτά στον θηλαστικό ξενιστή. Έτσι, είναι ικανή η καλλιέργεια των τρυπομαστιγωτών παρασίτων *T. brucei* σε θρεπτικό υλικό χωρίς να χρειάζεται επώαση τους παρουσία κυττάρων θηλαστικών. Το γεγονός αυτό μας δίνει τη δυνατότητα να ελέγξουμε τη δράση των ιντιρουμπινών απευθείας στη

‘θηλαστική’ μορφή του παρασίτου με τη μέθοδο Alamar blue [273] σε πλάκα κυτταροκαλλιέργειας 96 φρεατίων, όπως περιγράφεται στη παράγραφο 3.2.6.5 στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι.

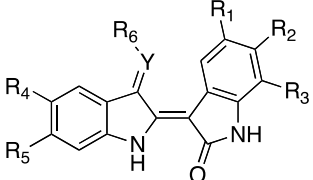
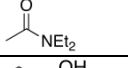
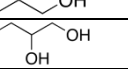
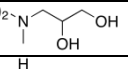
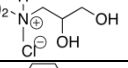
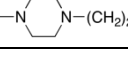
Ακολουθώντας ίδιο σκεπτικό με αυτό που ακολουθήσαμε στη μελέτη του παρασίτου *L. donovani*, αρχικά έγινε έλεγχος της αντιτρυπανοσωμικής δράσης των αναλόγων *in vitro* σε συγκέντρωση 10μM στα παράσιτα *T. brucei*, ο οποίος ανέδειξε 42 από τις 69 ιντιρουμπίνες οι οποίες προκαλούν πλήρη αναστολή της ανάπτυξης των παρασίτων στη συγκέντρωση αυτή (100% αναστολή). Με σκοπό να προσδιορίσουμε τους ισχυρότερους από αυτούς, στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε έλεγχος της αναστολής της ανάπτυξης των παρασίτων από αυτές τις 42 ιντιρουμπίνες σε συγκέντρωση 1μM. Έτσι τελικά αναγνωρίστηκαν 32 ανάλογα ιντιρουμπίνης τα οποία εμφάνισαν αντιτρυπανοσωμική δράση *in vitro* στη συγκέντρωση 1μM και προσδιορίστηκε για αυτές το IC₅₀ (πίνακας 6). Όπως φαίνεται στον πίνακα 6, οι ιντιρουμπίνες αποτελούν ισχυρούς αναστολείς της ανάπτυξης των παρασίτων *T. brucei* καθώς παρουσιάζουν πολύ χαμηλό IC₅₀ (0,050-3,2μM) (πίνακας 6). Παράλληλα, φαίνεται πως τα τρυπανοσώματα *T. brucei* αναστέλλονται πιο ισχυρά σε σύγκριση με τα *L. donovani* παράσιτα, και από ιντιρουμπίνες με μεγαλύτερη γκάμα υποκαταστάσεων. Μόλις 13 ιντιρουμπίνες (πίνακας 6- κόκκινο χρώμα) από τις 69 αναστέλλουν την ανάπτυξη των *L. donovani* παρασίτων όπως φαίνεται και στον πίνακα 3 και από προηγούμενη μελέτη [191], έναντι των 32 από τις 69 που αναστέλλουν την τρυπομαστιγωτή μορφή του τρυπανόσωματος. Για παράδειγμα, οι ιντιρουμπίνες με αντιλεϊσμανιακή δράση 6BIO, 6-BIA και 5-Me-6BIO με IC₅₀ 0,8±0,1, 1,2±0,2μM και 0,9±0,1 αντίστοιχα στην προμαστιγωτή μορφή *L. donovani* και 0,75±0,05, 1±0,2μM και 1±0,2μM αντίστοιχα στην αμαστιγωτή μορφή [191], παρουσιάζουν και αντιτρυπανοσωμική δράση με IC₅₀ 0,17±0,1, 0,19±0,1 και 0,6±0,2μM αντίστοιχα (πίνακας 6). Η 5-BIO φαίνεται να παρεμποδίζει το ίδιο καλά την ανάπτυξη των ενδοκυττάρων αμαστιγωτών *L. donovani* παρασίτων (IC₅₀ =1±0,2μM [191]) και τη τρυπομαστιγωτή εξωκυττάρια μορφή των *T. brucei* παρασίτων (IC₅₀ =0,92±0,3μM, πίνακας 6), δηλαδή τις μορφές των παρασίτων που βρίσκονται στο θηλαστικό ξενιστή. Αντίθετα το ίδιο ανάλογο δηλαδή η 5-BIO αναστέλλει σαφώς λιγότερο καλά την προμαστιγωτή μορφή των παρασίτων *L. donovani* (IC₅₀ =5,2±1,6μM, [191]) που απαντώνται στον

ασπόνδυλο ξενιστή. Επίσης, τα 3'-υποκατεστημένα 6BIO ανάλογα εμφανίζουν αντιλεϊσμανιακή δράση με το $IC_{50}=0,65-1,5\mu M$ έναντι της προμαστιγωτής μορφής *L. donovani* και $0,59-2,44\mu M$ έναντι της αμαστιγωτής μορφής (πίνακας 3). Όσον αφορά τη αντιπρυπανοσωμική δράση αυτών των αναλόγων, φαίνεται να είναι 10 φορές ισχυρότερη. Το IC_{50} τους έναντι της τρυπομαστιγωτής μορφής *T. brucei* παρουσιάζεται στον πίνακα 6 ($IC_{50}=0,05-0,6\mu M$).

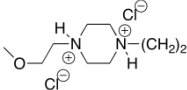
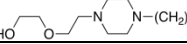
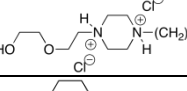
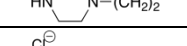
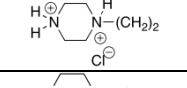
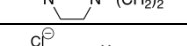
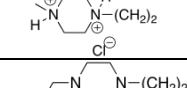
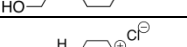
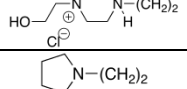
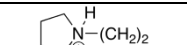
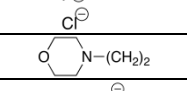
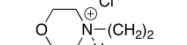
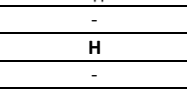
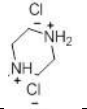
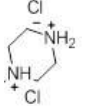
Εκτός από τα ανάλογα τα οποία εμφανίζουν παράλληλα αντιλεϊσμανιακή και αντιπρυπανοσωμική δράση (πίνακας 6 με κόκκινη γραμματοσειρά), παρουσιάζονται και 19 ανάλογα τα οποία εμφανίζουν μόνο αντιπρυπανοσωμική δράση (πίνακας 6- έντονη μαύρη γραμματοσειρά bold). Τα 19 αυτά ανάλογα όπως φαίνεται στον πίνακα 6 είναι υποκατεστημένα με πιο ογκώδεις ομάδες (NO_2 , NH_2 , F, Cl, I) στην 5 ή 6 θέση του σκελετού της ιντιρουμπίνης, ή είναι 7-υποκατεστημένες ιντιρουμπίνες ή είναι ανάλογα υποκατεστημένα με μακριές εύκαμπτες αλυσίδες στην 3' θέση, γεγονός που μπορεί να επηρεάζει την εμφάνιση δράσης στα 2 διαφορετικά παράσιτα. Πρέπει επίσης να τονιστεί ότι τα N1-μεθυλο υποκατεστημένα ανάλογα των 6BIO και 6-BIA δεν εμφανίζουν αντιπρυπανοσωμική δράση και συμφωνούν με τα αποτελέσματα που προέκυψαν έναντι των παρασίτων *L. donovani* [191] και με τα δεδομένα που αναφέρονται στη βιβλιογραφία τα οποία δείχνουν πως η τροποποίηση αυτή καθιστά τις ιντιρουμπίνες ανενεργές ως προς την αναστολή κινασών [182].

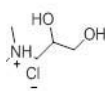
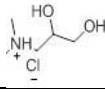
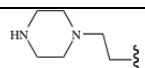
Τέλος, είναι άξιο να αναφερθεί ότι η *in vitro* σύγκριση της κυτταροτοξικότητας των ιντιρουμπινών έναντι κυττάρων θηλαστικών (κυτταρική σειρά μακροφάγων J774.1 και περιτονίακά μακροφάγα από ποντίκια Balb/c), με την αντιπρυπανοσωμική τους δράση, τις αναδεικνύει ως ισχυρούς αναστολείς για την αντιμετώπιση της ανθρώπινης αφρικανικής τρυπανοσωμίας (HAT) με την πλειοψηφία αυτών (25 ανάλογα από τα 32) να εμφανίζει $S.I>10$ (πίνακας 6).

Πίνακας 6. Αντιπρυπανοσωμική δράση των 69 αναλόγων ιντιρουμπίνης που ελέγχθηκαν έναντι των *T. brucei* BSF με τη μέθοδο του Alamar blue. Με κόκκινη γραμματοσειρά απεικονίζονται οι ιντιρουμπίνες που παρουσιάζουν και αντιπρυπανοσωμική και αντιλεϊσμανιακή δράση. Με έντονη μαύρη γραμματοσειρά (bold) απεικονίζονται οι ιντιρουμπίνες που παρουσιάζουν μόνο έντονη αντιπρυπανοσωμική δράση. Με απλή μάρυρη γραμματοσειρά παρουσιάζονται οι ιντιρουμπίνες που δεν έχουν έντονη αντιπρυπανοσωμική δράση. Παράλληλα, φαίνεται η κυτταροτοξικότητα των ουσιών έναντι της κυτταρικής σειράς μακροφάγων J774.1. Όλα τα αποτελέσματα προέρχονται από πραγματοποίηση τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

										
Cpd	Y	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	-NH	<i>T. brucei</i> BSF 90-13 (IC ₅₀ μM)	MΦ J774.1 (IC ₅₀ μM)
6BIO	NO	H	Br	H	H	H	H	-	0,17	>25
5-Me-6BIO	NO	Me	Br	H	H	H	H	-	0,6	>25
6-BIA	NO	H	Br	H	H	H	Ac	-	0,19	>25
5-BIO	NO	Br	H	H	H	H	H	-	0,92	>25
6-Br- 5nitroindirubin- 3'oxime	NO	NO ₂	Br	H	H	H	H	-	0,27	>25
5-Br-indirubin	O	Br	H	H	H	H	-	-	2,2	>25
6-Br-5amino- 3'monoxime indirubin	NO	NH ₂	Br	H	H	H	H	-	2,7	>25
6-Br-5amino- indirubin	O	NH ₂	Br	H	H	H	-	-	0,3	>25
5amino- 3'monoxime indirubin	NO	NH ₂	H	H	H	H	H	-	0,4	>25
6-Br- 5nitroindirubin	O	NO ₂	Br	H	H	H	-	-	0,49	>25
Indirubin-3'- methoxime	NO	H	H	H	H	H	CH ₃	-	0,9	>25
6-Br-indirubin	O	H	Br	H	H	H	-	-	3,2	>25
6-Br-indirubin- 3'diethyl phosphatoxime	NO	H	Br	H	H	H	PO(OEt) ₂	-	0,51	>25
indirubin	O	H	H	H	H	H	-	-	>5	>25
6-Br-5methyl- indirubin	O	CH ₃	Br	H	H	H	-	-	>5	>25
6-Br-N-methyl- indirubin- 3'oxime	NO	H	Br	H	H	H	H	CH ₃	>5	>25
6-Br-N-methyl- indirubin- 3'acetoxime	NO	H	Br	H	H	H	Ac	CH ₃	>5	>25
6-FIO	NO	H	F	H	H	H	H	-	0,45	>25
6-ClIO	NO	H	Cl	H	H	H	H	-	0.15	>25
6-IIO	NO	H	I	H	H	H	H	-	0,5	>25
1	NO	H	Br	H	H	H		-	>5	-
2	NO	H	Br	H	H	H		-	>10	-
3	NO	H	Br	H	H	H		-	0,096	>10
4	NO	H	Br	H	H	H		-	0,055	1,5±0,07
5	NO	H	Br	H	H	H		-	0,052	1,5±0,08
6	NO	H	Br	H	H	H		-	>5	-

Διδακτορική διατριβή Αντωνίας Ευσταθίου

7	NO	H	Br	H	H	H		-	>5	>10
8	NO	H	Br	H	H	H		-	0,54	>20
9	NO	H	Br	H	H	H		-	0,65	>20
10	NO	H	Br	H	H	H		-	0,078	>10
11	NO	H	Br	H	H	H		-	0,05	6,25±0,08
12	NO	H	Br	H	H	H		-	0,38	2,60±0,05
13	NO	H	Br	H	H	H		-	0,54	2,41±0,11
14	NO	H	Br	H	H	H		-	0,56	9,20±0,15
15	NO	H	Br	H	H	H		-	0,6	6,00±0,08
16	NO	H	Br	H	H	H		-	0,16	5,93±0,04
17	NO	H	Br	H	H	H		-	0,2	10,00±0,02
18	NO	H	Br	H	H	H		-	>5	-
19	NO	H	Br	H	H	H		-	>5	-
20	O	H	H	Br	H	H	-	-	>5	-
21	NO	H	H	Br	H	H	H	-	1,35	>10
22	O	H	H	Br	COOH	H	-	-	>5	-
23	NO	H	H	Br	COOH	H	H	-	>5	-
24	O	H	H	Br	H	COOH	-	-	>5	-
25	NO	H	H	Br	H	COOMe	H	-	>5	-
26	NO	H	H	Br	H	COOH	H	-	>5	-
27	NO	H	H	CF ₃	H	H	H	-	>5	-
28	NO	H	H	CF ₃	COOMe	H	H	-	>5	-
29	O	H	H	CF ₃	COOH	H	-	-	>5	-
30	NO	H	H	CF ₃	COOH	H	H	-	>5	-
31	O	H	H	CF ₃	H	COOH	-	-	>5	-
32	NO	H	H	CF ₃	H	COOMe	H	-	>5	>10
33	NO	H	H	CF ₃	H	COOH	H	-	>5	-
34	O	H	H	CF ₃		H	-	-	>5	-
35	NO	H	H	CF ₃		H	H	-	>5	-
36	NO	NO ₂		H	H	H	H	-	1,25	>10
37	NO	NO ₂		H	COOH	H	H	-	>5	-
38	NO	NO ₂		H	H	H	H	-	>5	-

39	NO	NO ₂		H	COOH	H	H	-	>5	-
40	NO	NO ₂		H	COOMe	H	H	-	>5	-
41	NO	H	H	CF ₃	H	COOMe		-	0,78	>10
42	NO	-	-	-	-	-	-	-	>5	-
43	NO	-	-	-	-	-	-	-	>5	-
44	NO	-	-	-	-	-	-	-	>5	-
45	NO	-	-	-	-	-	-	-	>5	-
46	NO	-	-	-	-	-	-	-	>5	-
47	NO	-	-	-	-	-	-	-	>5	-
48	NO	-	-	-	-	-	-	-	>5	-
49	NO	-	-	-	-	-	-	-	>5	-

4.3.2 Μοριακός χαρακτηρισμός της GSK-3s του *T. brucei*

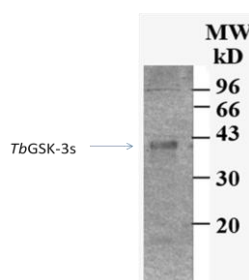
Η *TbGSK-3s* έχει μελετηθεί πρόσφατα και έχει αναδειχθεί ως πιθανός στόχος για τη θεραπεία της HAT [205]. Σε προηγούμενες μελέτες έχει γίνει επίσης σύγκριση της *TbGSK-3s* με τη λεισμανιακή *LmajGSK-3s* και έχει μάλιστα βρεθεί ότι οι αμινοξικές τους αλληλουχίες παρουσιάζουν 65% ταυτότητα. Τα 2 αυτά δεδομένα σε συνδυασμό αφ'ενός με το γεγονός ότι οι ιντιρουμπίνες που αρχικά συνετέθησαν για να στοχεύουν τις ανθρώπινες κινάσες (GSK-3, CDKs, DYRKs, Aurora), επίσης στοχεύουν τις λεισμανιακές κινάσες CRK3 και *LdGSK-3s*, αλλά και το γεγονός ότι αυτή η διδακτορική διατριβή εστιάζεται στη μελέτη της παρασιτικής GSK-3 των τρυπανοσωματιδίων σαν μόριο στόχο των αναλόγων των ιντιρουμπινών ή άλλων συνθετικών ή μη φυσικών προϊόντων, μας ώθησε πρώτα να μελετήσουμε το ρόλο της *TbGSK-3s* στη βιωσιμότητα του παρασίτου *T. brucei* και στη συνέχεια στην πιθανή εύρεση δυνητικών φαρμάκων (όπως οι ιντιρουμπίνες) που να στοχεύουν την τρυπανοσωμική αυτή κινάση.

4.3.2.1 Μελέτη του ρόλου της *TbGSK-3s* στη βιωσιμότητα του παρασίτου μετά από επαγωγή επεμβατικού RNA (RNAi)

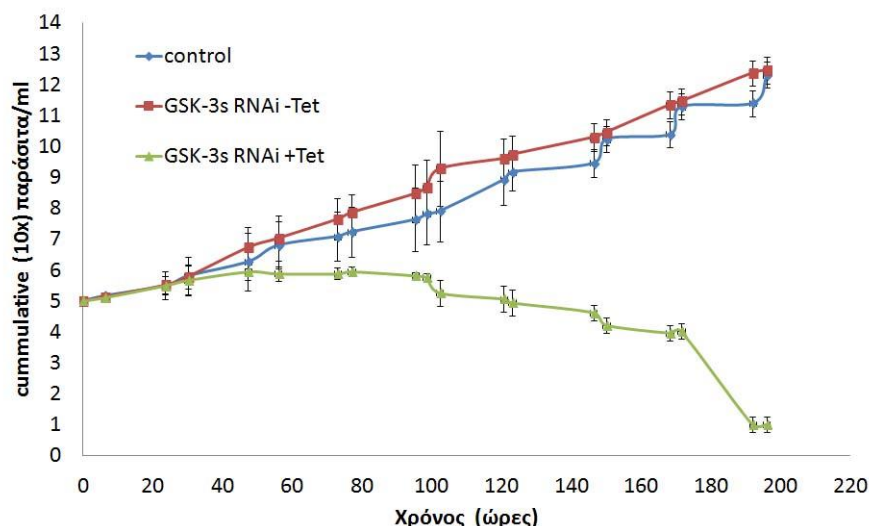
Έχοντας στη διάθεση μας τη κατασκευή RNAi για την κινάση *TbGSK-3s*, την οποία ευγενώς μας πρόσφερε ο καθηγητής Wesley C. Van Voorhis, πραγματοποιήθηκαν πειράματα μετασχηματισμού τρυπομαστιγωτών παρασίτων *T. brucei* για παραλαβή κλώνων παρασίτων με επεμβατικό RNAi^{*TbGSK-3s*}. Τα πειράματα αυτά πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο του Dr. Philippe Bastin στο Γαλλικό Ινστιτούτο Παστέρ στο Παρίσι.

Αρχικά, ελέγξαμε την ανάπτυξη των παρασίτων μετά από επαγωγή του επεμβατικού RNAi^{TbGSK-3s} με χρήση της τετρακυκλίνης όπως περιγράφεται στη παράγραφο 3.2.5.2 στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Όπως φαίνεται στο σχήμα 2, μετά από 48h επώασης με την τετρακυκλίνη, η ανάπτυξη των παρασίτων εμφανίζει μια πτωτική τάση σε σχέση τόσο με τα παράσιτα αναφοράς (control) όσο και με τα παράσιτα τα οποία περιέχουν ανενεργό RNAi^{TbGSK-3s} καθώς δεν επωάζονται με τετρακυκλίνη. Η πτωτική αυτή τάση της ανάπτυξης των παρασίτων όπως φαίνεται στο σχήμα αυξάνεται με τη πάροδο του χρόνου και οφείλεται στην αναστολή ανάπτυξης των τρυπανοσωμάτων λόγω της μείωσης της έκφρασης της *TbGSK-3s* σε αυτά, που οδηγεί τελικά στο θάνατο των παρασίτων.

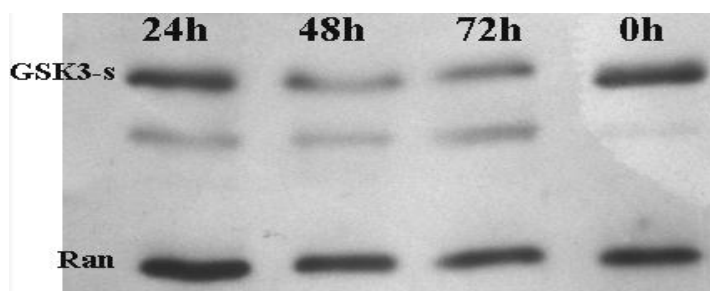
Παράλληλα, επιβεβαιώσαμε τη μείωση της έκφρασης της *TbGSK-3s* στα παράσιτα μετά από επαγωγή του επεμβατικού RNAi^{TbGSK-3s} με χρήση της τετρακυκλίνης. Για την ανίχνευση της *TbGSK-3s* χρησιμοποιήθηκε πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι της λεϊσμανιακής GSK-3s η οποία έχει παραχθεί στο εργαστήριο Μοριακής Παρασιτολογίας του ΕΙΠ. Λόγω της μεγάλης ταυτότητας στην αμινοξική αλληλουχία των 2 πρωτεϊνών, το αντίσωμα αναγνωρίζει την *TbGSK-3s* στο αναμενόμενο μοριακό βάρος 41KDa (εικόνα 39). Στο γράφημα 7, παρατηρούμε τη σταδιακή μείωση των επιπέδων έκφρασης της κινάσης στα παράσιτα *T. brucei* μετά από 24, 48 και 72h επώασης με τετρακυκλίνη, ενώ τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης αναφοράς (*TbRan*) παραμένουν σχετικά σταθερά. Επομένως, επαληθεύεται η συσχέτιση της αναστολής ανάπτυξης των τρυπανοσωμάτων με τη μείωση στα επίπεδα έκφρασης της *TbGSK-3s* [205] και κατ'επέκταση η *TbGSK-3s* αναδिकνύεται ως δυνητικός φαρμακευτικός στόχος για την αντιμετώπιση της HAT. Όλα τα αποτελέσματα προέρχονται από πραγματοποίηση τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.



Εικόνα 39. Ανίχνευση της *TbGSK-3s* στο αναμενόμενο μοριακό βάρος 41KDa με χρήση πολυκλωνικού αντισώματος κουνελιού έναντι της λεϊσμανιακής GSK-3s.



Γράφημα 7. Ανάπτυξη παρασίτων BSF *T. brucei* συναρτήση του χρόνου. Με μπλε χρώμα παρουσιάζεται η ανάπτυξη παρασίτων αναφοράς BSF *T. brucei* 90-13 (wild-type, wt), με κόκκινο η ανάπτυξη των ανασυνδυασμένων παρασίτων BSF *T. brucei* που φέρουν το πλασμίδιο RNAi^{TbGSK-3s} απουσία όμως τετρακυκλίνης και με πράσινο η ανάπτυξη των ανασυνδυασμένων παρασίτων BSF *T. brucei* που φέρουν το πλασμίδιο RNAi^{TbGSK-3s} παρουσία τετρακυκλίνης. Όλα τα αποτελέσματα προέρχονται από πραγματοποίηση τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.



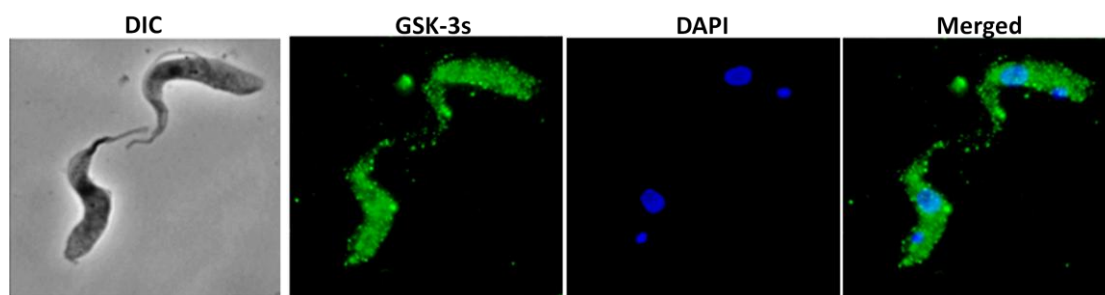
Εικόνα 40. Επίπεδα έκφρασης της *TbGSK-3s* μετά από 0, 24, 48 και 72h επαγωγής του RNAi^{TbGSK-3s}. Χρησιμοποιήθηκε πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι της λείσμανιακής GSK-3s. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η *TbRan*-GTPase η οποία ανιχνεύθηκε με πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι της λείσμανιακής *Ran*-GTPase.

4.3.2.2 Ενδοκυτταρική εντόπιση της *TbGSK-3s* στα *T. brucei* προκυκλικά και τρυπομαστιγωτά παράσιτα

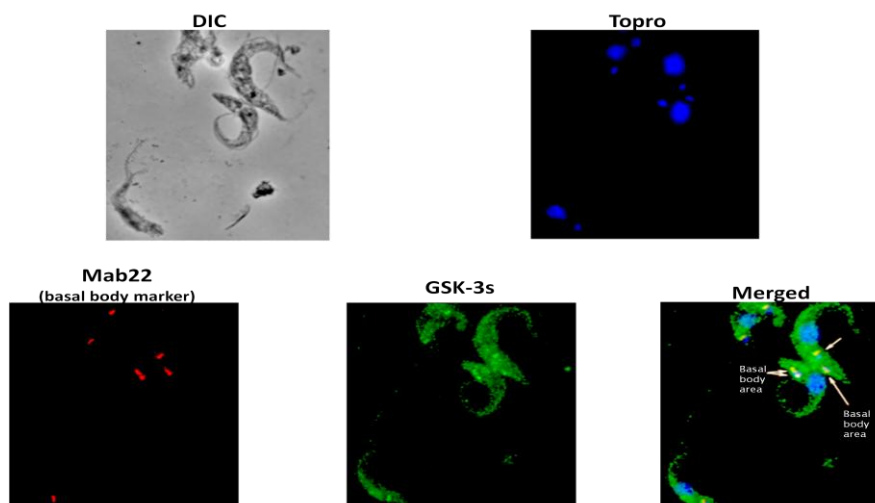
Η ενδοκυτταρική εντόπιση της *TbGSK-3s* σε *T. brucei* τρυπομαστιγωτά και προκυκλικά μπορεί να συμβάλει στη κατανόηση του πιθανού βιολογικού ρόλου που παίζει αυτή η κινάση-στόχος στο παράσιτο και επομένως να κατανοήσουμε το λόγο ή τους λόγους που οδηγούν σε θάνατο τα παράσιτα όταν αναστέλλεται η δράση της ή έκφρασή της. Η ενδοκυτταρική εντόπιση της *TbGSK-3s* σε *T. brucei* ανιχνεύθηκε με ανοσοφθορισμό χρησιμοποιώντας το πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι της *LdGSK-3s* (5μg/ml) ενώ σαν δεύτερο αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε το πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού

συζευγμένο με την πράσινη φθορίζουσα χρωστική. Ειδικότερα, ο πυρήνας και ο κινητοπλάστης ανιχνεύονται με τη βοήθεια είτε της χρωστικής TOPRO ή της χρωστικής DAPI όπως περιγράφεται στη παράγραφο 3.2.4 στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Ο προ-ανοσοποίησης ορός, χρησιμοποιήθηκε σαν αρνητικός μάρτυρας για τον ανοσοφθορισμό και δεν παρατηρήθηκε φθορισμός των κυττάρων.

Αρχικά, σε προκυκλικά παράσιτα μετά από μονιμοποίηση με φορμαλδεΰδη όπως περιγράφεται στη παράγραφο 3.2.4 στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι, η *TbGSK-3s* βρέθηκε να έχει παρόμοια κατανομή με αυτή που εμφανίζει η *LdGSK-3s* στα *L. donovani* προμαστιγωτά λογαριθμικής φάσης. Συγκεκριμένα, η *TbGSK-3s* εμφανίζει μία διάσπαρτη κατανομή στο κυτταρόπλασμα του παρασίτου αλλά εντοπίζεται και στο κινητοπλάστη και στο μαστίγιο (εικόνα 41).



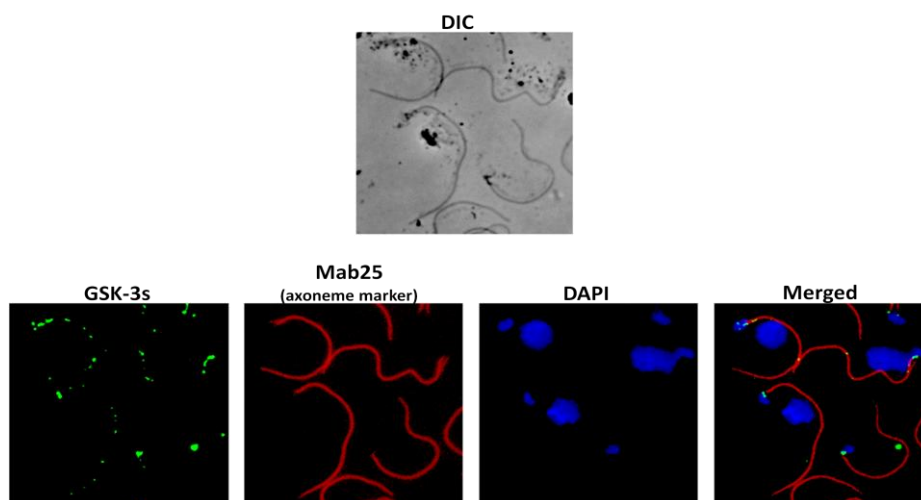
Εικόνα 41. Εντόπιση της *TbGSK-3s* σε προκυκλικά παράσιτα *T. brucei* 90-13 μετά από μονιμοποίηση με PF.



Εικόνα 42. Συνεντοπισμός της *TbGSK-3s* με την Mab22 (basal body marker) σε προκυκλικά παράσιτα *T. brucei* 90-13 μετά από μονιμοποίηση με μεθανόλη.

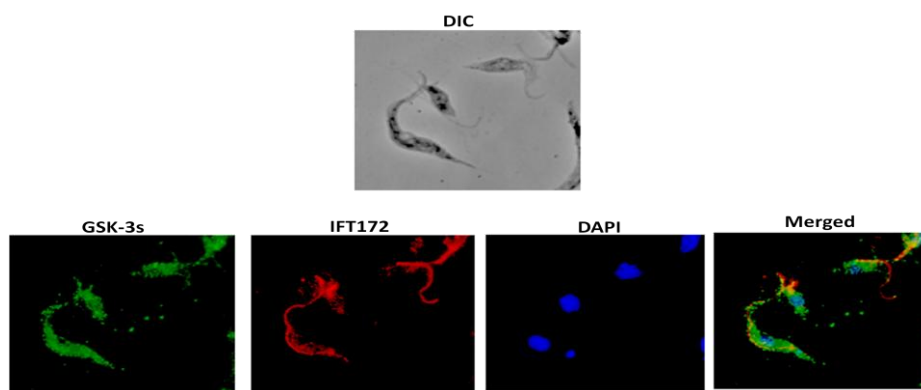
Ο εντοπισμός στον κινητοπλάστη και στο μαστίγιο επιβεβαιώθηκε και με χρώση του κυτταροσκελετού των παρασίτων μετά από απομάκρυνση των

διαλυτών κλασμάτων των παρασίτων με SSB/PEM-Nonidet 1%. Παράλληλα, έγινε έλεγχος της εντόπισης της *TbGSK-3s* στον κινητοπλάστη ολικών προκυκλικών παρασίτων με τη χρήση αντισώματος Mab22 που είναι δείκτης του βασικού σωματίου (εικόνα 42) και με χρήση αντισώματος Mab25 που είναι δείκτης του αξονημίου (εικόνα 43).



Εικόνα 43. Συνεντοπισμός της *TbGSK-3s* με την Mab25 (axoneme marker) σε προκυκλικά παράσιτα *T. brucei* 90-13 μετά από μονιμοποίηση με μεθανόλη.

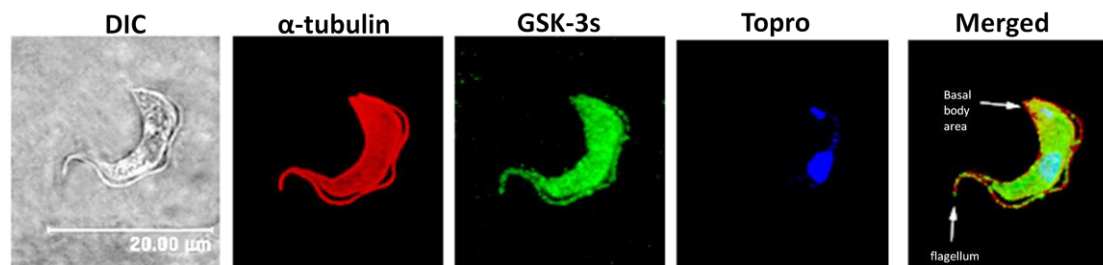
Λόγω της εντόπισης της κινάσης στο μαστίγιο του παρασίτου, έγινε έλεγχος για την πιθανότητα λειτουργίας της *TbGSK-3s* ως πρωτεΐνης μεταφοράς άλλων πρωτεϊνών και στοιχείων μέσα στο μαστίγιο (intraflagellar transport protein-IFT). Για το λόγο αυτό, μελετήθηκε αν η κινάση αναγνωρίζεται ταυτόχρονα και από το αντίσωμα αντί-*LdGSK-3s* και το IFT172. Όπως φαίνεται στην εικόνα 44 δεν υπάρχει συν-εντοπισμός και επομένως δεν μπορεί να χαρακτηριστεί σαν πρωτεΐνη μεταφοράς. Άρα πιθανότατα ο ρόλος της *TbGSK-3s* στο μαστίγιο είναι διαφορετικός από αυτόν που παίζει μία πρωτεΐνη μεταφοράς.



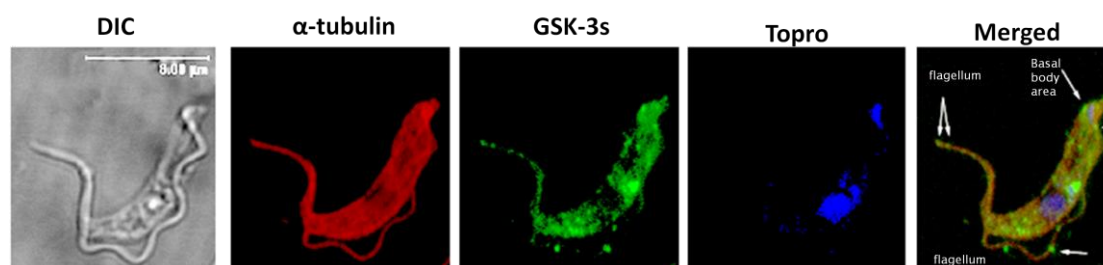
Εικόνα 44. Μη-συνεντοπισμός της *TbGSK-3s* με την IFT172 (IFT marker) σε προκυκλικά παράσιτα *T. brucei* 90-13 μετά από μονιμοποίηση με μεθανόλη.

Τέλος, η κινάση *TbGSK-3s* δείχνει ίδιο εντοπισμό και στη τρυπομαστιγώτη μορφή του παρασίτου είτε σε ολόκληρα παράσιτα είτε μόνο στον κυτταροσκελετό αυτών (εικόνα 45).

A)



B)

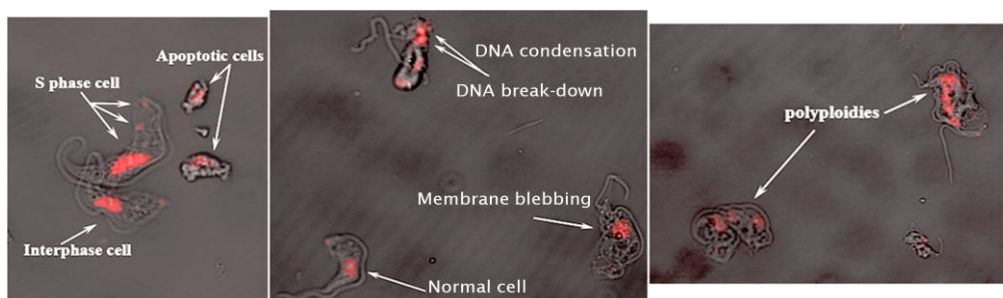


Εικόνα 45. A) Εντόπιση της *TbGSK-3s* σε BSF παράσιτα *T. brucei* 90-13 μετά από μονιμοποίηση με PF, B) Εντόπιση της *TbGSK-3s* στον κυτταροσκελετό των παρασίτων BSF παράσιτα *T. brucei* 90-13 μετά από απομάκρυνση των διαλυτών κλασμάτων των παρασίτων με SSB/PEM-Nonidet 1%.

4.3.2.3 Επαγόμενες μορφολογικές και πυρηνικές αλλαγές μετά την επαγωγή του επεμβατικού RNAi^{*TbGSK-3s*}

Εφόσον η *TbGSK-3s* παίζει σημαντικό ρόλο στην κυτοκίνηση ή/και τη μίτωση του παρασίτου στην τρυπομαστιγώτη μορφή των *T. brucei* παρασίτων [233], η επαγωγή του επεμβατικού RNAi^{*TbGSK-3s*} θα προκαλούσε μορφολογικές καθώς και πυρηνικές αλλαγές στα παράσιτα. Οι μορφολογικές και πυρηνικές αλλαγές στα παράσιτα παρατηρούνται με συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού μετά από σήμανση με τη φθορίζουσα χρωστική ιωδιούχο προπύδιο (PI). Η μελέτη των μορφολογικών και πυρηνικών αλλαγών όπως φαίνεται στην εικόνα 46 επιβεβαίωσε το ρόλο της κινάσης στη μίτωση ή/και την κυτοκίνηση και έρχεται σε συμφωνία με πολύ πρόσφατα δεδομένα από άλλη μελέτη [233]. Πιο συγκεκριμένα, μετά από 72h επαγωγής επεμβατικού RNAi^{*TbGSK-3s*} με τη χρήση τετρακυκλίνης παρουσιάζονται παράσιτα με αλλοιωμένη κυτταρική μεμβράνη, με συμπυκνωμένη πυρηνική χρωματίνη και τεμαχισμένο DNA που αντιστοιχεί σε χαρακτηριστικό

αποπτωτικών κυττάρων. Παράλληλα, αυξάνονται σημαντικά τα πολυπλοειδή παράσιτα δηλαδή τα παράσιτα τα οποία διαθέτουν πάνω από 2 πυρήνες ή/και κινητοπλάστες, γεγονός που δείχνει ότι ο κυτταρικός κύκλος και διπλασιασμός των παρασίτων συνεχίζει να λειτουργεί αλλά τα παράσιτα δεν μπορούν να διαχωριστούν με μίτωση ή να ολοκληρώσουν την κυτοκίνηση. Τα κύτταρα που δε μπορούν να διαχωριστούν στη συνέχεια οδηγούνται σε θάνατο και εμφανίζουν διαφορετική μορφολογία καθώς έχουν στρογγυλό κυτταρικό σχήμα και ελαττωμένο όγκο αντί της φυσιολογικής επιμηκυμένης μορφολογίας των κυττάρων-μαρτύρων που διαθέτουν ένα πυρήνα (N) και έναν κινητοπλάστη (K) (εικόνα 46). Στον πίνακα 7 φαίνονται επίσης τα αυξανόμενα ποσοστά των παρασίτων με πολυπλοειδείς και ανώμαλων κυτταρικών τύπων χωρίς πυρήνα με ένα κινητοπλάστη (zooids) ή με έναν πυρήνα αλλά χωρίς κινητοπλάστη. Οι κυτταρικοί αυτοί τύποι παρατηρούνται γενικά στις τρυπανοσωματίδες και προέρχονται από ανώμαλη κυτταρική διαίρεση [218, 296]. Ταυτόχρονα, παρατηρείται μείωση του πληθυσμού των παρασίτων που βρίσκονται στην G1 φάση και αύξηση των παρασίτων που βρίσκονται στην S φάση του κυτταρικού κύκλου (πίνακας 7). Τα πιο πάνω αποτελέσματα συμφωνούν πλήρως με τα πρόσφατα δημοσιευμένα δεδομένα του Jones *et al.*, 2014 [233]. Επίσης, τα χαρακτηριστικά προσομοιάζουν με τα χαρακτηριστικά των παρασίτων *L. donovani* μετά από αναστολή της *LdGSK-3s* μετά από επώαση με τη 5-Me-6BIO [191].



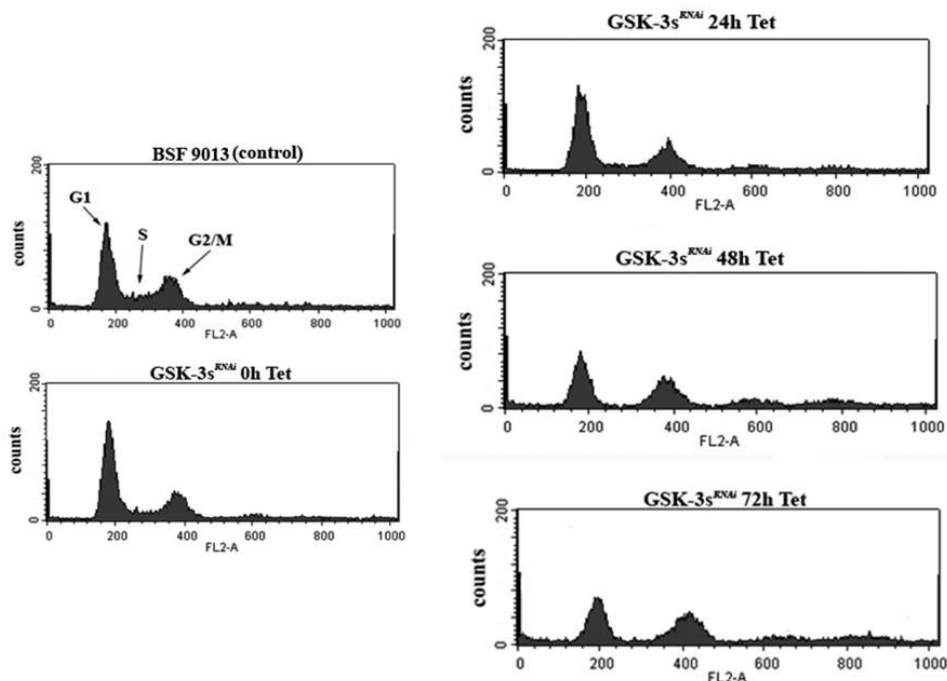
Εικόνα 46. Μορφολογικές και πυρηνικές αλλαγές παρασίτων BSF *T. brucei* μετά την επαγωγή του επεμβατικού RNAi^{TbGSK-3s}.

Πίνακας 7. Ποσοστά παρασίτων στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου πριν και μετά την επαγωγή του επεμβατικού RNAi^{TbGSK-3s}. Όλα τα αποτελέσματα προέρχονται από πραγματοποίηση τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων

	BSF wt	GSK1 -Tet	GSK1 +72hTet
1N1K	62%	67%	60%
1N2K	12,30%	12%	16%
2N2K	24,10%	16%	5%
ανώμαλα	1,6%	5%	19%

4.3.2.4 Επίδραση της επαγωγής του επεμβατικού RNAi^{TbGSK-3s} στον κυτταρικό κύκλο τρυπομαστιγωτής μορφής *T. brucei* παρασίτων

Για τη μελέτη του κυτταρικού κύκλου και τη ποσοτικοποίηση της κατανομής των παρασίτων στις διαφορετικές φάσεις του κυτταρικού κύκλου μετά την επαγωγή του επεμβατικού RNAi^{TbGSK-3s} πραγματοποιήθηκε με κυτταρομετρία ροής (FACS), μετά από αύξηση της διαπερατότητας του κυττάρου και σήμανση με PI όπως περιγράφεται στη παράγραφο 3.2.8.2 στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Όπως φαίνεται στην εικόνα 47, τα BSF *T. brucei* παράσιτα που επώαστηκαν με 0,02% DMSO (μάρτυρες) είχαν κανονική κατανομή στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου σε όλες τις χρονικές στιγμές που μελετήθηκαν ($59,77 \pm 2,3\%$ G0/G1, $6,31 \pm 0,5\%$ S, $20,04 \pm 1,5\%$ G2/M), ενώ τα παράσιτα με τεμαχισμένο DNA είναι σε ποσοστό μόνο 0,8% και τα πολυπλοειδή κύτταρα (>4N) σε ποσοστό 5,72%. Τα πολυπλοειδή κύτταρα εμφανίζονται στην κυτταροκαλλιέργεια λόγω της ιδιομορφίας των παρασίτων *T. brucei* να ακολουθούν συνέχεια εκθετική ανάπτυξη και το μικρό ποσοστό πολυπλοειδών κυττάρων παρουσιάζεται μετά από 48h λόγω του κορεσμού της καλλιέργειας από παράσιτα. Ακολούθησε ανάλυση με FACS του κυτταρικού κύκλου παρασίτων μετά από επαγωγή επεμβατικού RNAi^{TbGSK-3s} για 24, 48 και 72h. Στον πίνακα 8 παρουσιάζεται η ποσοτικοποίηση των κυττάρων στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου έτσι όπως προκύπτουν από την εικόνα 47. Παρατηρούμε ότι με την πάροδο του χρόνου επώασης το ποσοστό των κυττάρων που βρίσκονται στην G1 φάση συνεχώς μειώνεται (έως 25,33% στις 72h) ενώ τα πολυπλοειδή κύτταρα και τα κύτταρα με τεμαχισμένο DNA σημειώνουν αύξηση (19,97% και 2,44% αντίστοιχα στις 72h). Τα κύτταρα που βρίσκονται στην G2/M φάση μέχρι τις 48h επαγωγής αυξάνονται σε ποσοστό 31,94% και στη συνέχεια ακολουθούν πτωτική τάση (25,05% στις 72h επώασης). Αυτό επιβεβαιώνει ότι τα παράσιτα αρχικά συσσωρεύονται στην G2/M φάση και ο κυτταρικός κύκλος διενεργείται φυσιολογικά αλλά λόγω μη πραγματοποίησης της μίτωσης ή/και της κυτοκίνησης, τα κύτταρα στη συνέχεια μετατρέπονται σε πολυπλοειδή μπαίνοντας σε καινούριο κυτταρικό κύκλο και διπλασιασμό του πυρήνα και κινητοπλάστη ή πεθαίνουν αποπτωτικά.



Εικόνα 47. Κυτταρικός κύκλος BSF *T. brucei* παρασίτων πριν και μετά την επαγωγή του επεμβατικού RNAi^{TbGSK-3s}.

Πίνακας 8. Ποσοστά BSF *T. brucei* παρασίτων στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου πριν και μετά την επαγωγή του επεμβατικού RNAi^{TbGSK-3s}. Όλα τα αποτελέσματα προέρχονται από πραγματοποίηση τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

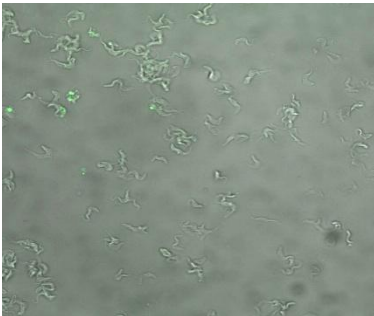
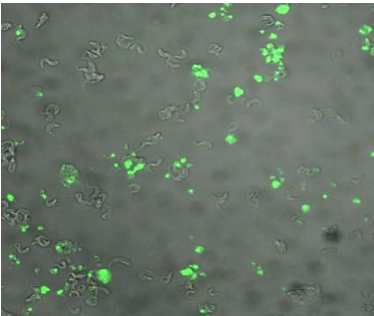
	BSF 9013 (wt)	GSK-3s ^{RNAi}			
		0h Tet	24h Tet	48h Tet	72h Tet
SubG0	0,54	0,8	1,18	1,3	2,44
G1	51,18	59,77	57,96	41,94	25,33
S	8,33	6,31	5,13	2,18	3,1
G2/M	21,29	20,04	20,99	31,94	25,05
n=3	6,61	3,56	2,93	4,93	9,03
n>3	4,02	2,16	3,06	6,32	10,94

4.3.2.5 Επίδραση της επαγωγής του επεμβατικού RNAi^{TbGSK-3s} στον κυτταρικό θάνατο των BSF *T. brucei* παρασίτων

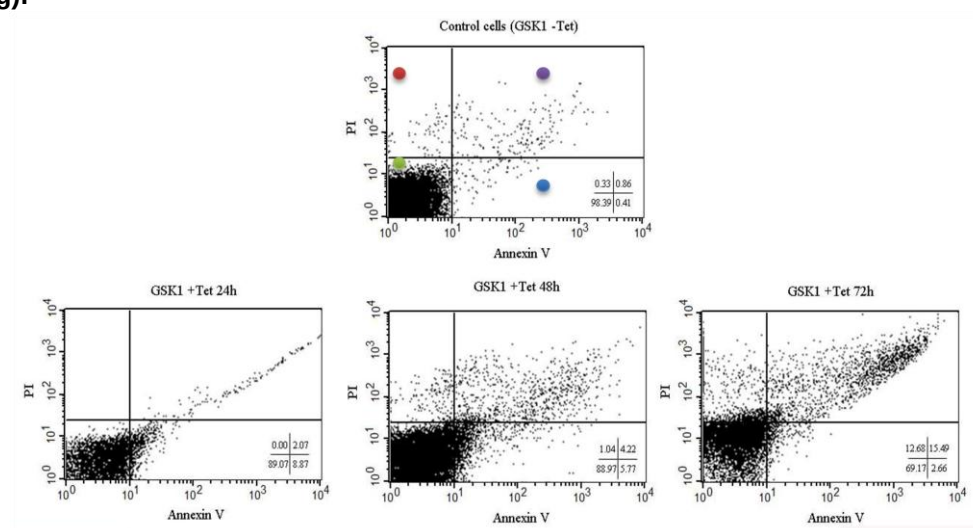
Επειδή η επαγωγή του επεμβατικού RNAi^{TbGSK-3s} οδηγεί σε αναστολή της ανάπτυξης των παρασίτων και τα κύτταρα αποκτούν μορφολογικά και πυρηνικά χαρακτηριστικά τα οποία προσομοιάζουν με κυτταρική απόπτωση, μελετήσαμε εάν η επαγωγή αυτή επηρεάζει τον κυτταρικό θάνατο των παρασίτων. Αρχικά μελετήσαμε την επίδραση αυτή χρησιμοποιώντας την τεχνική TUNEL (terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nick end labeling), με την οποία μπορεί να ανιχνευθεί η διάσπαση του γενωμικού

DNA σε επίπεδο ενός κυττάρου (παράγραφος 3.2.9.1 στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι). Τα κύτταρα-μάρτυρες, που επωάστηκαν με 0,02% DMSO) και περιέχουν άθικτο γενωμικό DNA, δεν σημαίνονται, ενώ παρατηρούμε ότι περίπου 40,9% των κυττάρων έχουν θετική πυρηνική χρώση τεμαχισμένου γενωμικού DNA μετά από 72h επαγωγής του επεμβατικού RNAi^{TbGSK-3s} (εικόνα 48).

Στη συνέχεια εξετάσαμε την ρευστότητα και την ακεραιότητα της παρασιτικής μεμβράνης με την πιθανή έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης στην επιφάνεια των κυττάρων και την ύπαρξη τεμαχισμένου DNA με τη χρήση της Ανεξίνης V-συζευγμένης με Ισοθειοκυανική Φλουορεσκεΐνη (FITC), η οποία προσδένεται στις: φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (PE), φωσφατιδυλοινωσιτόλη (PI), φωσφατιδικό οξύ (PA) και φωσφατιδυλογλυκερόλη (PG) στα παράσιτα [297] και το PI με το οποίο γίνεται χρώση του πυρηνικού και κινητοπλαστικού DNA. Ο συνδυασμός σήμανσης με Ανεξίνη V-FITC και PI όπως έχει ήδη αναφερθεί επιτρέπει τη διάκριση μεταξύ: κυττάρων σε πρώιμα στάδια απόπτωσης (Ανεξίνη V-FITC θετικά), κυττάρων σε προχωρημένα στάδια απόπτωσης (Ανεξίνη V-FITC και PI θετικά), νεκρωτικών κυττάρων (PI θετικά) και ζωντανών κυττάρων (μη σημειωμένα) [298]. Η επώαση των κυττάρων με 0,02% (v/v) DMSO (αρνητικός μάρτυρας) δεν έδειξε σήμανση για την Ανεξίνη V-FITC και το PI, καθώς 98,39% των κυττάρων ήταν ζωντανά σε όλες τις χρονικές στιγμές που μελετήθηκαν (εικόνα 49). Τα τρυπομαστιγωτά που επωάστηκαν με 4mM υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂) για 40 min και θεωρούνται ως θετικός μάρτυρας για την απόπτωση [242], βρέθηκαν να είναι αποπτωτικά σε ποσοστό 69,15% (61,33% των κυττάρων ήταν στα αρχικά στάδια της απόπτωσης) ενώ η επώαση με Triton X-100 για 5 min που χρησιμοποιείται σαν θετικός μάρτυρας για την επαγωγή της νέκρωσης είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση των PI θετικών κυττάρων σε ποσοστό 23±3%.

	0h Tet (control cells)	72h Tet
Tunel positive (%)	7,5	40,9
		

Εικόνα 48. Ποσοστά θετικών παρασίτων BSF *T. brucei* με τεμαχισμένο γενωμικό DNA πριν και μετά την επαγωγή του επεμβατικού RNAi^{TbGSK-3s} χρησιμοποιώντας την τεχνική TUNEL (terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nick end labeling).



Εικόνα 49. Η έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης και η κυτταρική διαπερατότητα των BSF *T. brucei* έτσι όπως φαίνεται με κυτταρομετρία ροής μετά απο διπλή σήμανση με Ανεξίνη V-FITC και PI, πριν και μετά την επαγωγή του επεμβατικού RNAi^{TbGSK-3s}. Πράσινη περιοχή: ζωντανά κύτταρα. Μπλε περιοχή: πρώιμα αποπτωτικά κύτταρα. Μωβ περιοχή: μεταγενέστερα αποπτωτικά κύτταρα. Κόκκινη περιοχή: νεκρωτικά κύτταρα.

Η επαγωγή του επεμβατικού RNAi^{TbGSK-3s} των παρασίτων οδηγεί σε επαγωγή της απόπτωσης, καθώς αρχικά στις 24h μετά την επαγωγή έχουμε αύξηση των πρώιμων αποπτωτικών κυττάρων (8,87%) που στη συνέχεια σταδιακά μετατρέπονται σε αποπτωτικά τελικής φάσης και νεκρωτικά κύτταρα (15,49% και 12,68% στις 72h αντίστοιχα) (εικόνα 49). Τα ζωντανά κύτταρα επίσης μειώνονται σταδιακά στο 69,17% μετά από 72h επαγωγής του RNAi (εικόνα 49). Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με αυτά μίας πρόσφατης μελέτης που αφορά στο βιολογικό ρόλο της *TbGSK-3s* στα τρυπανοσώματα [233] αλλά προσομοιάζουν και με αυτά που αφορούν στο ρόλο της *LdGSK-3s* στο κυτταρικό θάνατο των *L. donovani* παρασίτων [191]. Το σύνολο των

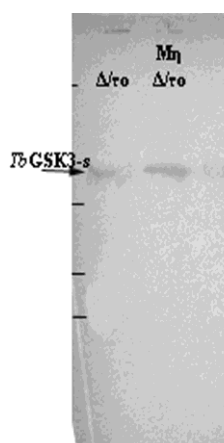
αποτελεσμάτων που αναλύθηκαν πιο πάνω επιβεβαιώνουν την αρχική μας υπόθεση που αφορούσε στο σημαντικό βιολογικό ρόλο που παίζει αυτή η κινάση στα τρυπομαστιγωτά *T. brucei* και αποδεικνύουν ότι η παρεμπόδιση της (δηλαδή η αναστολή της δράσης ή της έκφρασης της) οδηγεί σε αποπτωτικό θάνατο των παρασίτων

4.3.3 Κλωνοποίηση και έκφραση της *TbGSK-3s*

Με σκοπό να μελετηθεί η δράση των αναλόγων έναντι της *TbGSK-3s* και να διερευνηθεί αν η μερική ή σε μεγάλο βαθμό αναστολή της δράσης επάγει τις ίδιες μορφολογικές επιπτώσεις, το ίδιο μοτίβο κυτταρικού θανάτου και παρόμοια απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου με τα παράσιτα στα οποία έχει γίνει επαγωγή του παρεμβατικού RNAi^{*TbGSK-3s*}, η *TbGSK-3s* εκφράστηκε σε 2 συστήματα και απομονώθηκε.

4.3.3.1 Κλωνοποίηση και έκφραση της *TbGSK-3s* σε βακτήρια

Το *GSK-3s* γονίδιο του *T. brucei* κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pTriex 1.1 και η *TbGSK-3s*-(His)₆ εκφράστηκε σε ετερόλογο σύστημα (βακτήρια *E. coli*BI21), με μια αλληλουχία που αποτελείται από έξι συνεχή αμινοξέα ιστιδίνης (6xHis tag) στο καρβοξυτελικό της άκρο. Η αλληλουχία αυτή, επιτρέπει τον καθαρισμό της *TbGSK-3s* με χρωματογραφία συγγένειας σε στήλη νικελίου (Ni²⁺-NTA-ρητίνη). Σε αντίθεση με την *LdGSK-3s* όμως, η *TbGSK-3s* βρίσκεται σε μεγαλύτερο ποσοστό στο μη διαλυτό κλάσμα των κυττάρων και όχι στο υπερκείμενο με τις διαλυτές πρωτεΐνες (εικόνα 50).



Εικόνα 50. Ανίχνευση έκφρασης *TbGSK-3s* σε βακτήρια *E. coli*BI21. 1^η στήλη: διαλυτό κλάσμα πρωτεϊνών. 2^η στήλη: μη διαλυτό κλάσμα πρωτεϊνών.

Εφόσον, η *TbGSK-3s* θα χρησιμοποιηθεί σε έλεγχο αναστολής από τις ιντιρουμπίνες, πρέπει να απομονωθεί στην ενεργή της μορφή πράγμα που δε

μπορεί να συμβεί στη περίπτωση που βρίσκεται στο μη διαλυτό κλάσμα των κυττάρων αφού στο κλάσμα αυτό για την απομόνωση πρωτεϊνών χρησιμοποιείται ουρία η οποία αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες. Για το λόγο αυτό, η *TbGSK-3s*-(His)₆ κλωνοποιήθηκε στη συνέχεια σε διαφορετικά συστήματα έκφρασης.

4.3.3.2 Κλωνοποίηση και έκφραση της *TbGSK-3s* σε παράσιτα *L. donovani*

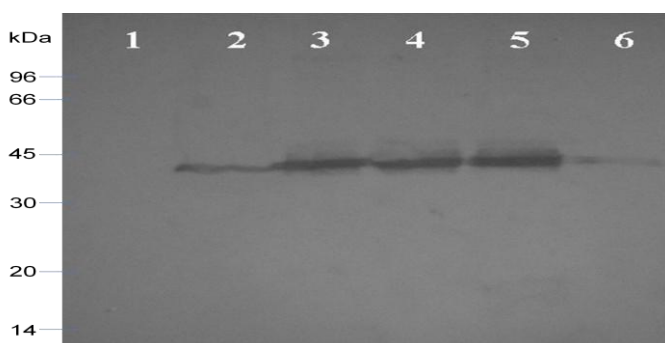
Για να μπορέσει να εκφραστεί η *TbGSK-3s*-(His)₆ στα παράσιτα *L. donovani* πρέπει τα παράσιτα να μετασχηματιστούν με την κλωνοποιημένη κινάση σε συμβατό με τα παράσιτα φορέα. Για το λόγο αυτό, η κινάση *TbGSK-3s*-(His)₆ κλωνοποιήθηκε από τον πλασμιδιακό φορέα pTriex 1.1 στον πλασμιδιακό φορέα pLEXY-sat (pF4X1.4sat). Ενώ παραλάβαμε κλώνους όπου η κλωνοποίηση *TbGSK-3s*-(His)₆ είχε γίνει με επιτυχία στον pLEXY-sat, παρ' όλα αυτά κατά την απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα (maxiprep) των κλώνων αυτών, το πλασμίδιο χάνει το γονίδιο της *TbGSK-3s*-(His)₆ και επομένως είναι αδύνατος ο μετασχηματισμός των παρασίτων *L. donovani* με τον φορέα pLEXY-sat που να περιέχει την *TbGSK-3s*-(His)₆. Γι' αυτό το λόγο η έκφραση της *TbGSK-3s*-(His)₆ στα παράσιτα *L. donovani* δεν ήταν δυνατή.

4.3.3.3 Κλωνοποίηση και έκφραση της *TbGSK-3s* σε κύτταρα εντόμου SF-9 με χρήση βακιλοϊού

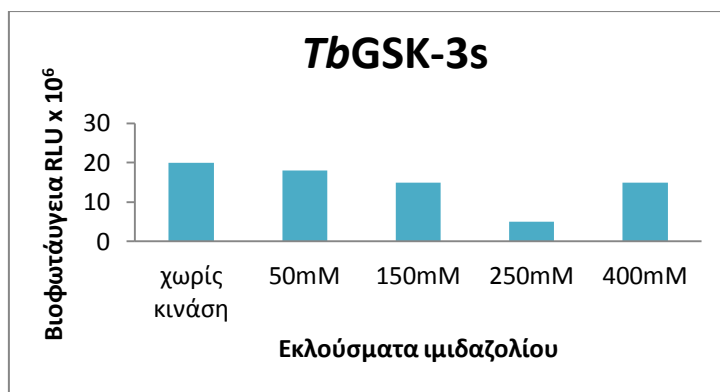
Στη συνέχεια, έγινε προσπάθεια κλωνοποίησης της *TbGSK-3s*-(His)₆ που βρίσκεται στον φορέα pTriex 1.1 με χρήση βακιλοϊού σε κυτταρική σειρά SF-9 από έντομα όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.1.11 στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Σε αυτή τη περίπτωση η κινάση εκφράζεται και απομονώνεται από το διαλυτό κλάσμα των κυττάρων SF-9. Έτσι επιτυγχάνεται ο καθαρισμός της *TbGSK-3s* με χρωματογραφία συγγένειας σε στήλη νικελίου (Ni²⁺-NTA-ρητίνη) και η κινάση εκλούεται σε μεγαλύτερη ποσότητα στο έκλουσμα ιμιδαζολίου συγκέντρωσης 250mM όπως περιγράφεται παρακάτω, το οποίο μετά από απομάκρυνση του ιμιδαδοζολίου χρησιμοποιείται για τα πειράματα αναστολής της κινάσης από τις ιντιρουμπίνες.

4.3.4 Απομόνωση *TbGSK-3s*-(His)₆ από τα κύτταρα εντόμου SF-9 και καθορισμός της ενεργότητας τους

Η κινάση *TbGSK-3s* θα ελεγχθεί σε *in vitro* πειράματα αναστολής από τις ιντιρουμπίνες που εμφάνισαν αντιρυπανοσωμική δράση, επομένως μετά την απομόνωση της από την κυτταρική σειρά SF-9 από έντομα με χρωματογραφία συγγένειας σε στήλη νικελίου (Ni²⁺-NTA-ρητίνη) παρελήφθησαν εκλούσματα σε συγκεντρώσεις ιμιδαζολίου 50, 150, 250 και 400mM τα οποία περιέχουν την κινάση. Η αναγνώριση της *TbGSK-3s* έγινε με τη βοήθεια του πολυκλωνικού αντισώματος IgG His-probe (1:100 αραιώση) (εικόνα 51). Προκειμένου να διαπιστωθεί η ενεργότητα των *TbGSK-3s* στα εκλούσματα διαφορετικών συγκεντρώσεων ιμιδαζολίου, εφόσον έχει προηγηθεί διαπίδυση για την απομάκρυνση του ιμιδαζολίου το οποίο απενεργοποιεί τα ένζυμα [191], έγινε έλεγχος των εκλουσμάτων ιμιδαζολίου: 50, 150, 250 και 400 mM. Τα εκλούσματα 250mM ιμιδαζολίου τα οποία παρουσίασαν τη χαμηλότερη βιοφωταύγεια, ήταν τα πιο ενεργά και αυτά χρησιμοποιήθηκαν για τις δοκιμασίες αναστολής (γράφημα 8).



Εικόνα 51. Ηλεκτροφόρηση των εκλούσεων της ανασυνδυασμένης κινάσης *TbGSK-3s*-(His)₆ που απομονώθηκε από τα κύτταρα εντόμου SF-9 μετά τη χρωματογραφία συγγένειας. Διαδρομή 1: Σφαιρίδια νικελίου (Ni²⁺-NTA-ρητίνη) μετά από τις εκλούσεις. Διαδρομή 2: Υπερκείμενο λύματος κυττάρων που δεν προσδέθηκε στη στήλη νικελίου. Διαδρομή 3: Έκλουση με 50mM ιμιδαζόλιο. Διαδρομή 4: Έκλουση με 150mM ιμιδαζόλιο. Διαδρομή 5: Έκλουση με 250mM ιμιδαζόλιο. Διαδρομή 6: Έκλουση με 400mM ιμιδαζόλιο. Τα μοριακά μεγέθη επισημαίνονται σε kDa.



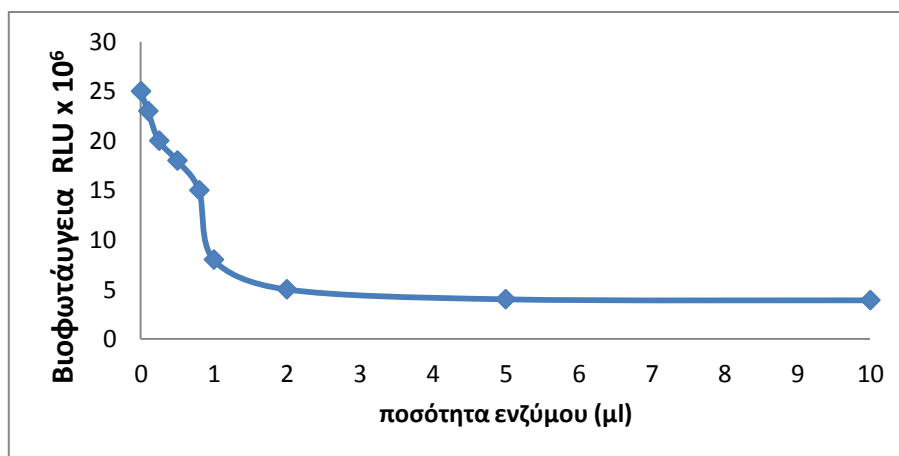
Γράφημα 8. Έλεγχος της ενεργότητας της *TbGSK-3s* στα εκλούσματα διαφορετικών συγκεντρώσεων ιμιδαζολίου.

4.3.5 Μελέτη της κινητικής των ενζυμικών αντιδράσεων

Ο υπολογισμός των σταθερών Michaelis-Menten (K_m) του ενζύμου για τα δύο υποστρώματα (ATP και πρωτεϊνικό υπόστρωμα) είναι απαραίτητος για την μελέτη της κινητικής των ενζυμικών αντιδράσεων σύμφωνα με το μοντέλο κινητικής Michaelis-Menten και τα διαγράμματα Lineweaver-Burk. Έτσι, αρχικά πραγματοποιείται μέτρηση της ταχύτητας της αντίδρασης παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων ATP και πρωτεϊνικού υποστρώματος σε διάφορα λεπτά αντίδρασης. Στην περίπτωση που το ένζυμο έχει δύο υποστρώματα, η σταθερά K_m για το ένα υπόστρωμα καθορίζεται χρησιμοποιώντας κορεσμένες συγκεντρώσεις του δεύτερου υποστρώματος. Σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος (για το ATP: 1, 2, 5, 10, 20, 30 και 50 μM , ενώ για το πρωτεϊνικό υπόστρωμα πεπτιδίο GS-1: 2, 5, 10, 20, 30 και 50 μM) μετρήθηκε η συγκέντρωση του προϊόντος της αντίδρασης και δημιουργήθηκε η γραφική παράσταση της συγκέντρωσης προϊόντος ($\Delta\Psi$) με τον χρόνο της αντίδρασης (ΔX) για τις διάφορες συγκεντρώσεις υποστρώματος. Η κλίση της ευθείας αντιστοιχεί στην ταχύτητα της αντίδρασης για κάθε συγκέντρωση υποστρώματος ($V = \Delta\Psi / \Delta X$). Τα διαγράμματα Lineweaver-Burk συσχετίζουν την $1/V$ σε συνάρτηση με την $1/S$. Στα διαγράμματα αυτά η τετμημένη επί της αρχής είναι ίση με $-1/K_m$ και η σταθερά K_m του ενζύμου για κάθε υπόστρωμα είναι ίση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος, στην οποία η ταχύτητα της αντίδρασης είναι ίση με το $1/2$ της μέγιστης ταχύτητας ($V_{max}/2$). Έτσι, η σταθερά K_m της *TbGSK-3s* για το ATP υπολογίστηκε πως είναι $6,3 \pm 1,3 \mu\text{M}$ και για το GS-1 πεπτιδίο $5,8 \pm 1,5 \mu\text{M}$.

4.3.6 Καθορισμός της ιδανικής ποσότητας ενζύμου για τις αντιδράσεις αναστολής.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε τιτλοδότηση του ενζύμου *TbGSK-3s* για να προσδιοριστεί η ιδανική ποσότητα ενζύμου για τις δοκιμασίες αναστολής. Αυτό είναι αναγκαίο επειδή οι τιμές IC_{50} της αναστολής των ιντιρουμπινών στην κινάση πρέπει να υπολογιστούν στο γραμμικό μέρος της καμπύλης τιτλοδότησης και όχι σε συνθήκες κορεσμού των ενζύμων. Για τις αντιδράσεις αναστολής χρησιμοποιήθηκαν 15μM ATP και 8,3μM GS-1, ώστε να μπορούμε να συγκρίνουμε βάση των τιμών IC_{50} των αναστολέων τη δύναμή τους. Με βάση των τιμών της βιοφωταύγειας που λαμβάνονται κατασκευάζεται το γράφημα 9. Από το γραμμικό τμήμα του γραφήματος προσδιορίζεται ότι η ιδανική ποσότητα ενζύμου είναι 2μl/αντίδραση. Η ειδική ενεργότητα της *TbGSK-3s* βρέθηκε ίση με 800 U/mg, όπου 1 U ενζύμου ορίζεται η ενσωμάτωση 1nM ATP στο πρωτεϊνικό υπόστρωμα ανά λεπτό αντίδρασης στους 30°C και σε τελική συγκέντρωση ATP 15μM. Η ειδική ενεργότητα είναι της ίδιας τάξης με την αυτή των λειψμανιακών κινασών *LdGSK-3s* και *CRK3* που βρέθηκαν σε προηγούμενη μελέτη [191].



Γράφημα 9. Καμπύλη τιτλοδότησης της *TbGSK-3s*. Ενδεικτικό γράφημα καμπύλης από το μέσο όρο τιμών που προκύπτουν από τουλάχιστον 3 ανεξάρτητα πειράματα.

4.3.7 Αντιδράσεις αναστολής της *TbGSK-3s*

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στις ανταγωνιστικές αντιδράσεις αναστολής για ATP ανταγωνιστικούς αναστολείς είναι ιδανικό να χρησιμοποιείται συγκέντρωση υποστρώματος περίπου ίση ή χαμηλότερη από την αντίστοιχη τιμή K_m . Στις αντιδράσεις για την *TbGSK-3s* χρησιμοποιήθηκαν οι συνθήκες που καθορίστηκαν παραπάνω και που περιγράφονται επίσης στη παράγραφο στο κεφάλαιο 3.2.7.1 Υλικά και Μέθοδοι (2μl ενζύμου/αντίδραση, 15μM ATP

και 8,3μM GS-1). Κάτω από αυτές τις συνθήκες ελέγχθηκαν οι 32 ιντιρουμπίνες που εμφάνισαν ισχυρή αντιπρυπανοσωμική δράση και δημιουργήθηκαν καμπύλες δόσης-απόκρισης για να καθοριστούν οι τιμές IC_{50} , που αντιστοιχούν στη συγκέντρωση αναστολέα στην οποία αναστέλλεται το 50% της ενεργότητας της κινάσης (πίνακας 9). Όπως φαίνεται στον πίνακα 9, οι 29 ιντιρουμπίνες από τις 32 στοχεύουν ισχυρά ή ικανοποιητικά την *TbGSK-3s* καθώς εμφανίζουν τιμές $IC_{50} < 1\mu M$ (0,021μM -0,847μM) (πίνακας 9- έντονη μαύρη ή κόκκινη γραμματοσειρά- bold). Η 6-FIO στοχεύει την κινάση με IC_{50} ίσο με 1,077μM, ενώ το ανάλογο **15** της 6BIO δεν στοχεύει τόσο ισχυρά την *TbGSK-3s* (IC_{50} : 2,277μM). Τέλος, η 7-BIO (**21**) φαίνεται να μην έχει ως στόχο την τρυπανοσωμική GSK-3s ($IC_{50} > 3,33\mu M$). Μάλιστα, η 7-BIO έχει πρόσφατα δειχτεί ότι στα ανθρώπινα κύτταρα στοχεύει τις κινάσες DYRK1α και DYRK2 ενώ δε στοχεύει καθόλου ($> 10\mu M$) την GSK-3 και την CDK5 [188]. Η ομόλογη κινάση της DYRK1α ή/και της DYRK2 στα *T. brucei* παράσιτα λοιπόν ίσως αποτελεί το στόχο του αντιπρυπανοσωμικού αυτού αναστολέα.

Από τους 29 πιο ισχυρούς αναστολείς της *TbGSK-3s* παρόλο που μερικοί από αυτούς στοχεύουν τη κινάση με $IC_{50} < 0,1\mu M$, στοχεύουν επίσης την ανθρώπινη GSK-3 και μάλιστα ισχυρά. Από αυτούς τους αναστολείς παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον το ανάλογο **36** και το ανάλογο **41** (πίνακας 9- έντονη κόκκινη γραμματοσειρά) γιατί αναστέλλουν καλύτερα την *TbGSK-3s* από ότι την αντίστοιχη ανθρώπινη κινάση σύμφωνα με δεδομένα συνεργατών μας (δεν παρουσιάζονται στη παρούσα διατριβή). Συγκεκριμένα, το ανάλογο **36** όπως φαίνεται στον πίνακα 9 έχει IC_{50} ίσο με 0,047μM έναντι της *TbGSK-3s* ενώ έχει $IC_{50} = 2,2\mu M$ έναντι της ανθρώπινης GSK-3 και το ανάλογο **41** (7-trifluoromethyl-3'-oxim-6'-carboxymethyl-indirubin) το οποίο στοχεύει ικανοποιητικά της τρυπανοσωμική κινάση ($IC_{50} = 0,847 \pm 0,303\mu M$) αλλά δεν φαίνεται να στοχεύει την ομόλογη ανθρώπινη κινάση ($> 10\mu M$). Επίσης, οι 2 αυτές ιντιρουμπίνες δεν εμφανίζουν ικανοποιητική αντιλεϊσμανική δράση γιατί το IC_{50} τους έναντι των *L. donovani* παρασίτων δεν είναι $< 3\mu M$ που θέσαμε σαν όριο. Το αποτέλεσμα αυτό παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον γιατί υποδηλώνει ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μοριακές μελέτες σχέσης δομής-δράσης της τρυπανοσωμικής κινάσης καθώς και να

αποτελέσουν το σκελετό ανάπτυξης νέων αναλόγων για μια επιλεκτική αντιρυπανοσωμική θεραπεία.

Πίνακας 9. Αναστολή της *TbGSK-3s* από τις ιντιρουμπίνες που εμφάνισαν αντιρυπανοσωμική δράση έναντι των BSF *T. brucei*. Με έντονη μαύρη ή κόκκινη γραμματοσειρά εμφανίζονται οι ιντιρουμπίνες οι οποίες έχουν έντονη δράση έναντι της *TbGSK-3s* ($IC_{50} < 1 \mu M$). Με κόκκινη έντονη γραμματοσειρά εμφανίζονται οι 2 υποσχόμενες ιντιρουμπίνες οι οποίες αναστέλλουν την *TbGSK-3s* αλλά δεν στοχεύουν καθόλου ή στοχεύουν σε μικρότερο βαθμό την ομόλογη ανθρώπινη κινάση. Όλα τα αποτελέσματα προέρχονται από πραγματοποίηση τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

Ουσίες	<i>T. brucei</i> BSF IC_{50} (μM)	ΜΦ J774.1	<i>TbGSK-3s</i> (μM)
5-BIO	0,92	>10	0,053±0,024
6BIO	0,17	>10	0,133±0,009
6-BIA	0,19	>10	0,050±0,012
6BIO-Phos	0,51	>10	0,153±0,099
6-CLIO	0,15	>10	0,040±0,023
6-FIO	0,45	>10	1,077±0,635
6-IIO	0,5	>10	0,037±0,006
5-Me-6BIO	0,6	>10	0,283±0,229
6BIO-5-NO ₂	0,27	>10	0,040±0,035
6BIO-5-NH ₂	2,7	>10	0,040±0,034
5- NO ₂ -3'-monoxime indirubin	0,4	>10	0,07±0,05
Indirubin-3'-methoxime	0,9	>10	0,330±0,012
5-Br-indirubin	2,2	>25	0,203±0,040
6-Br-5-NH ₂ -indirubin	0,3	>25	0,023±0,015
6-Br-5- NO ₂ -indirubin	0,49	>25	0.029±0,013
6-Br-indirubin	3,2	>25	0,073±0,006
3	0,096	>10	0,190±0,012
4	0,055	1,5	0,130±0,082
5	0,052	1,5	0,163±0,076
8	0,540	>20	0,337±0,167
9	0,650	>20	0,060±0,021
10	0,078	>10	0,077±0,031
11	0,05	6,25	0,173±0,042
12	0,38	2,6	0,213±0,205
13	0,54	2,4	0,057±0,006
14	0,56	9,2	0,107±0,042
15	0,6	6	2,277±0,040
16	0,16	5,9	0,023±0,016
17	0,2	10	0,021±0,016
21 (7-BIO)	1,350	>10	>3,33
36	1,250	>10	0,047±0,034
41	0,780	>10	0,847±0,303

Τέλος, αξίζει να τονιστεί πως όλες οι ιντιρουμπίνες φαίνεται να κατέχουν πιο έντονη αντιτρυπανοσωμική παρά αντιλεισμανιακή δράση. Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε: α) στο μεγαλύτερο μέγεθος του ενεργού κέντρου της κινάσης *TbGSK-3s* σε σχέση με το ενεργό κέντρο της *LmajGSK-3s* [226], ή β) σε διαφορετικά επίπεδα έκφρασης της κινάσης στα κύτταρα *Leishmania* και *T. brucei*. Όλα τα αποτελέσματα προέρχονται από πραγματοποίηση τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων

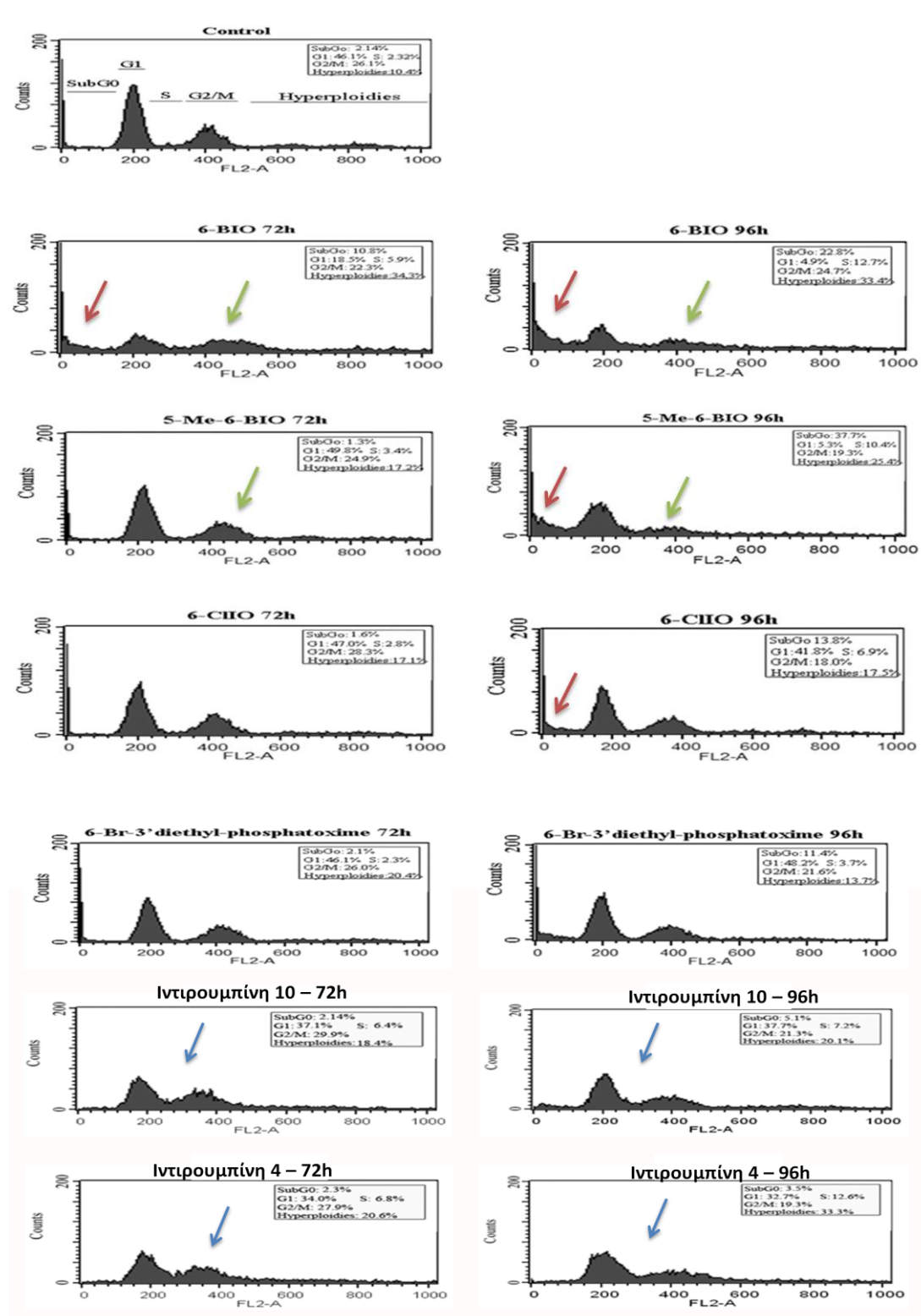
4.3.8 Επίδραση των ιντιρουμπινών στον κυτταρικό κύκλο των BSF *T. brucei* παρασίτων

Μετά τα πειράματα αναστολής της απομονωμένης *TbGSK-3s* από τις ιντιρουμπίνες *in vitro*, παρατηρήσαμε ότι δεν υπάρχει πάντα απόλυτη συσχέτιση της ικανότητας της εκάστοτε ιντιρουμπίνης να αναστέλλει την κινάση, με το πόσο ισχυρή αντιτρυπανοσωμική δράση εμφανίζει. Για το λόγο αυτό έγινε έλεγχος της επίδρασης κάποιων αναλόγων στον κυτταρικό κύκλο των BSF *T. brucei* παρασίτων για να διαπιστωθεί αν το μοτίβο δράσης που εμφανίζουν αυτές στον κυτταρικό κύκλο των παρασίτων είναι το ίδιο με αυτό που εμφανίζουν τα παράσιτα μετά από επαγωγή του παρεμβατικού RNAi^{*TbGSK-3s*}. Είναι λογικό να υποθέσουμε ότι η αναστολή της κινάσης από τις ιντιρουμπίνες στα παράσιτα *T. brucei* θα έπρεπε να προκαλεί παρόμοια απορρύθμιση κυτταρικού κύκλου με αυτή που προκαλείται στα τρυπομαστιγωτά ύστερα από ελάττωση της ενδογενούς κινάσης με επαγωγή του RNAi^{*TbGSK-3s*}.

Όπως φαίνεται από την εικόνα 52, η απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου μετά την επώαση των παρασίτων με διάφορες ιντιρουμπίνες που εμφάνισαν αντιτρυπανοσωμική δράση, εμφανίζει διαφορετικό μοτίβο για κάθε μία ιντιρουμπίνη. Από αυτές, οι ιντιρουμπίνες **10** , **4** (εικόνα 52), η 6-ClIO και η 5-Me-6BIO εμφανίζουν παρόμοιο προφίλ με την απορρύθμιση που εμφανίζεται στο κυτταρικό κύκλο μετά από την επαγωγή του RNAi^{*TbGSK-3s*}. Μετά την επώαση των ιντιρουμπινικών αυτών με τα παράσιτα, ο πληθυσμός που βρίσκεται στην G1 φάση μειώνεται δραματικά, ο πληθυσμός G2/M αρχικά αυξάνεται και στη συνέχεια μειώνεται και τα πολυπλοειδή κύτταρα αυξάνονται. Όμως μετά από επώαση με την 5-Me-6BIO και την 6-ClIO έχουμε ταυτόχρονα

πιο έντονη αύξηση των κυττάρων με τεμαχισμένο DNA (υπό-G0/G1 φάση: 37,7% και 13,8% αντίστοιχα στις 72h) σε σχέση με τα παράσιτα που έχουν υποστεί RNAi^{TbGSK-3s} για 72h (υπό-G0/G1 φάση: 2,44%). Πρέπει να σημειωθεί ότι η 6-ClIO στα παράσιτα *L. donovani* στοχεύει πιο επιλεκτικά την CRK3 αντί της *LdGSK-3s* (IC₅₀: 0,04 και 0,2μM αντίστοιχα) [191] ενώ η 5-Me-6BIO στοχεύει πιο επιλεκτικά την *LdGSK-3s* (IC₅₀: 0,09μM) [191] αλλά στοχεύει επίσης και την CRK3 (IC₅₀: 0,65μM) [191]. Είναι γνωστό ότι η CRK3 στα τρυπανοσώματα *T. brucei* παίζει σημαντικό ρόλο στην ολοκλήρωση της G2/M φάσης των παρασίτων [299]. Ίσως λοιπόν, οι ιντιρουμπίνες αυτές να μην στοχεύουν τόσο επιλεκτικά την *TbGSK-3s*, αλλά να στοχεύουν εκτός της *TbGSK-3s*, και την CRK3 στα BSF *T. brucei*, όπως και στα παράσιτα *L. donovani*. Αυτή η υπόθεση θα μπορούσε να εξηγήσει το ελαφρώς διαφοροποιημένο προφίλ που εμφανίζουν στον κυτταρικό κύκλο των παρασίτων από ότι αυτό που προκύπτει όταν αναστέλλεται μόνο η *TbGSK-3s*.

Από την άλλη μεριά, η 6BIO και η 6-βρώμο-3'διεθυλοφωσφατοξίμη (6-Br-3'diethylphosphatoxime ή 6BIO-Phos) φαίνεται να απορρυθμίζουν διαφορετικά το κυτταρικό κύκλο μετά από επώαση με τα παράσιτα. Η 6BIO που στα παράσιτα *L. donovani* στοχεύει πιο επιλεκτικά την CRK3 αντί της *LdGSK-3s* (IC₅₀: 0,02 και 0,15μM αντίστοιχα) [191], φαίνεται να μειώνει δραματικά τα παράσιτα που βρίσκονται στην G1 φάση (4,9% στις 72h) και αυξάνει τα πολυπλοειδή κύτταρα (33,4% στις 72h) καθώς και τα κύτταρα με τεμαχισμένο DNA (υπό-G0/G1 φάση: 22,8% στις 72h). Παράλληλα, παρατηρήθηκε ότι όταν τα παράσιτα επωάζονται με την 6-βρώμο-3'διεθυλοφωσφατοξίμη που όπως δείχτηκε προηγουμένως δεν έχει αντιλεϊσμμανιακή δράση, αυξάνονται τα πολυπλοειδή κύτταρα (13,7% στις 72h) καθώς και τα κύτταρα με τεμαχισμένο DNA (υπό-G0/G1 φάση: 11,4% στις 72h) αλλά δεν μειώνεται ο πληθυσμός των παρασίτων που βρίσκονται στην G1 φάση (48,2% στις 72h), ενώ μειώνεται ελάχιστα ο πληθυσμός των παρασίτων που βρίσκονται στην G2/M φάση του κυτταρικού κύκλου (21,6% στις 72h).



Εικόνα 52. Κυτταρικός κύκλος BSF *T. brucei* παρασίτων μετά από επώαση με ανάλογα ιντιρουμπίνης για 72 και 96h. Με κόκκινα βέλη υποδεικνύεται η αύξηση του τεμαχισμένου DNA και με πράσινα η μείωση του ποσοστού των παρασίτων στην G2/M Φάση του κυτταρικού κύκλου. Με μπλε βέλη υποδεικνύονται τα προφίλ των ιντιρουμπινών που προσομοιάζουν με δράση αναστολής της *TbGSK-3s*.

Συμπερασματικά, τα διαφορετικά προφίλ του κυτταρικού κύκλου που προκύπτουν μετά από επώαση με διαφορετικά ανάλογα ιντιρουμπίνης

υποδηλώνουν ότι κάποιες από τις ιντιρουμπίνες αυτές πιθανόν να στοχεύουν και άλλες τρυπανοσωμικές πρωτεΐνες/κινάσες εκτός της *TbGSK-3s* στα τρυπομαστιγωτά *T. brucei*. Η υπόθεση αυτή εν μέρει επιβεβαιώνεται και από τη διαφοροποίηση μερικών από αυτά τα προφίλ δράσης τους, από το προφίλ του κυτταρικού κύκλου που προκύπτει μετά από επαγωγή του επεμβατικού RNAi^{*TbGSK-3s*}.

4.3.9 Επίδραση των ιντιρουμπινών στον κυτταρικό θάνατο των BSF *T. brucei* παρασίτων

Για επιπλέον επιβεβαίωση της παραπάνω υπόθεσης, έγινε επίσης έλεγχος και σύγκριση των προφίλ του κυτταρικού θανάτου, μετά από επώαση των παρασίτων BSF *T. brucei* με διάφορα ανάλογα ιντιρουμπίνης, με αυτό που προκύπτει μετά από επαγωγή του επεμβατικού RNAi^{*TbGSK-3s*}.

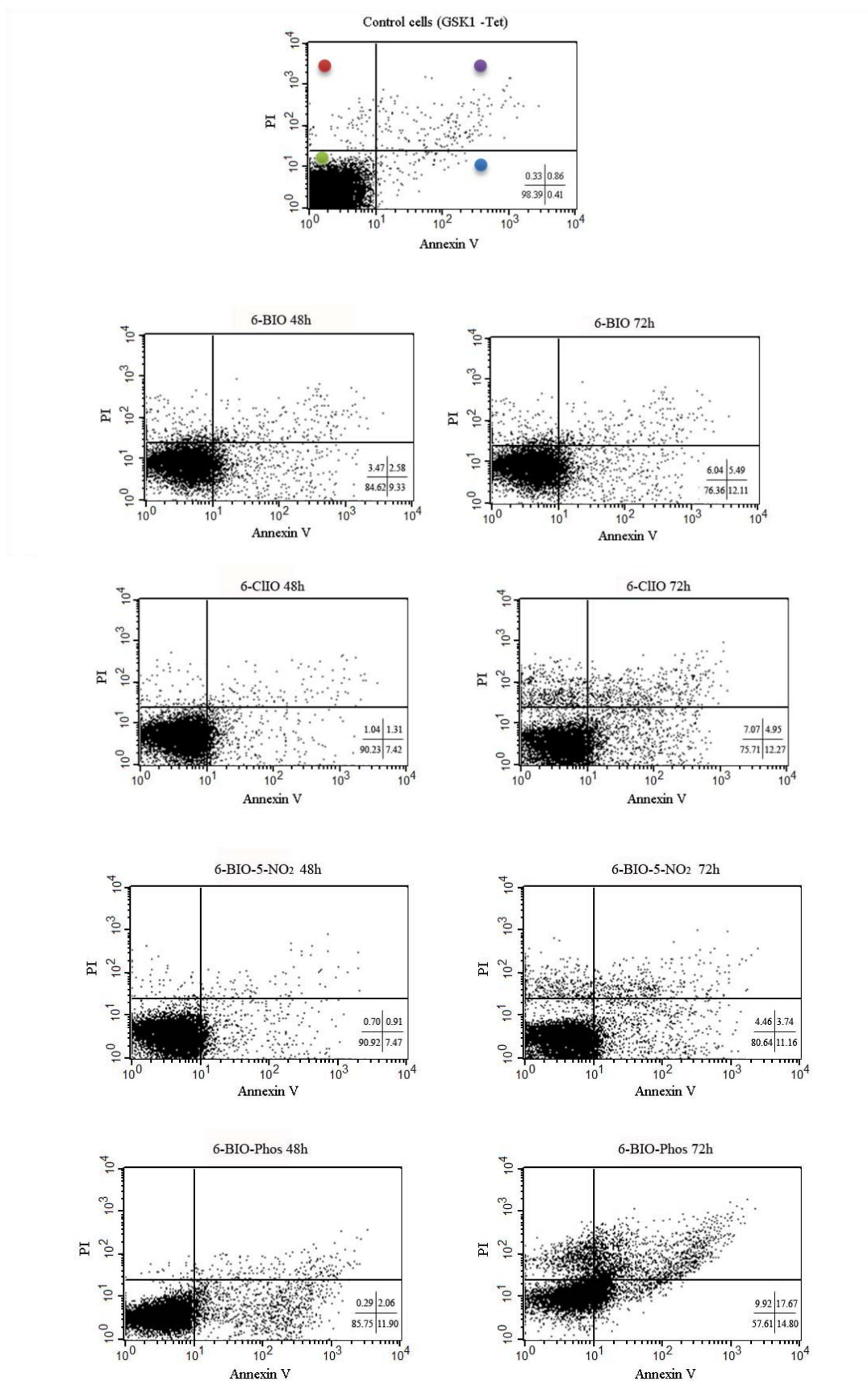
Η ρευστότητα και η ακεραιότητα της παρασιτικής μεμβράνης ελέγχθηκε με κυτταρομετρία ροής που ανιχνεύει την πιθανή έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης στην επιφάνεια των κυττάρων και την ύπαρξη τεμαχισμένου DNA όπως περιγράφηκε παραπάνω με τη χρήση της Ανεξίνης V-συζευγμένης με Ισοθειοκυανική Φλουορεσκεΐνη (FITC) και του PI. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 53, τα διάφορα ανάλογα προκαλούν διαφορετικά μοτίβα κυτταρικού θανάτου στα παράσιτα *T. brucei* όπως ακριβώς συμβαίνει με την επίδραση που έχουν στον κυτταρικό κύκλο. Το γεγονός αυτό πιθανόν να οφείλεται όπως προαναφέρθηκε στις διάφορες πρωτεΐνες/κινάσες που παράλληλα με την *TbGSK-3s*, στοχεύουν οι ιντιρουμπίνες ανάλογα με το είδος και τη θέση των υποκαταστάσεων τους.

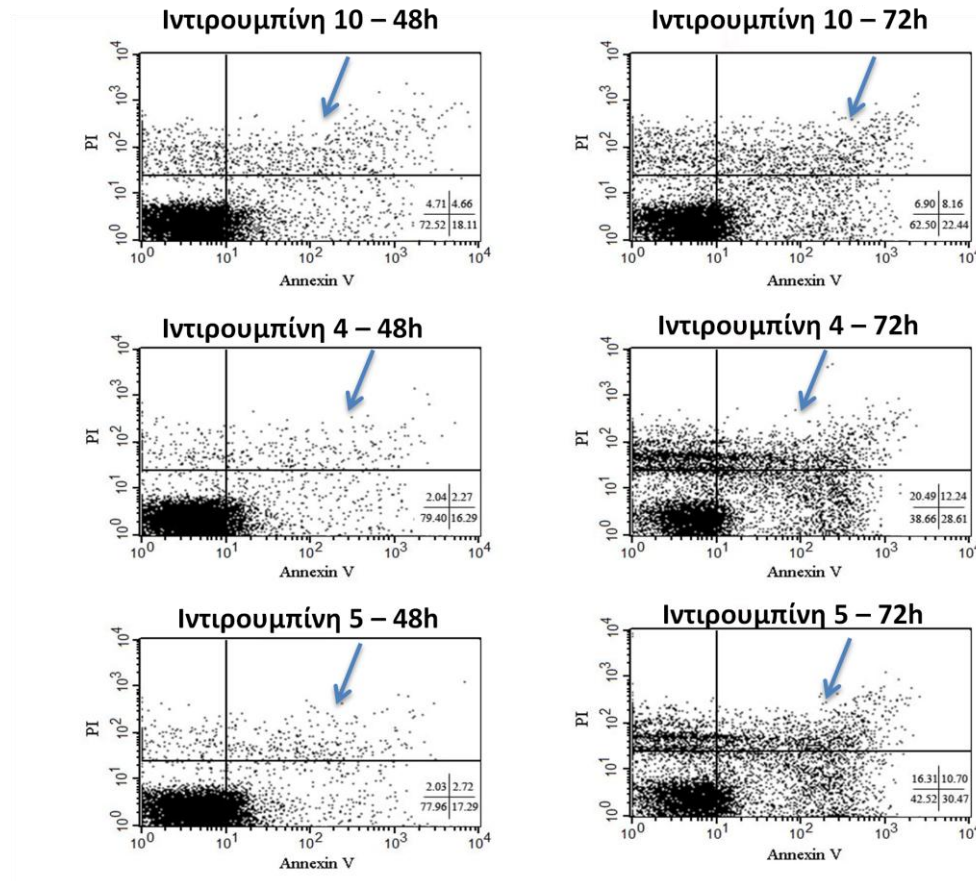
Πιο συγκεκριμένα, οι ιντιρουμπίνες **4** και **10** (εικόνα 53) φαίνεται να οδηγούν τα παράσιτα *T. brucei* στο ίδιο μοτίβο θανάτου που οδηγεί η επαγωγή του επεμβατικού RNAi^{*TbGSK-3s*}. Μετά από επώαση των τρυπομαστιγωτών με τις ιντιρουμπίνες **4** και **10** (εικόνα 53), παρατηρείται αύξηση των παρασίτων που χαρακτηρίζονται ως αποπτωτικά πρώιμου σταδίου στις 48 (16,8 και 15,4% αντίστοιχα) και στις 72h (19,9 και 23% αντίστοιχα) τα οποία σταδιακά μετατρέπονται σε αποπτωτικά παράσιτα μεταγενέστερων σταδίων και νεκρωτικά παράσιτα. Από την άλλη μεριά όμως, οι ιντιρουμπίνες 6BIO, 6-CIIO, 6-βρώμο-3'διεθυλοφωσφατοξίμη (6-Br-3'diethylphosphatoxime ή 6BIO-Phos) και 5-Me-6BIO επάγουν την αύξηση των νεκρωτικών και μεταγενέστερα αποπτωτικών παρασίτων χωρίς την παρουσία

αποπτωτικών κυττάρων πρώιμου σταδίου. Από αυτές, η επώαση των κυττάρων με την ιντιρουμπίνη 5-Me-6BIO προκαλεί αύξηση κυρίως του πληθυσμού των μεταγενέστερων αποπτωτικών παρασίτων και όχι τόσο των νεκρωτικών κυττάρων σε αντίθεσή με τις άλλες 3 ιντιρουμπίνες, οι οποίες επάγουν την αύξηση κυρίως του νεκρωτικού πληθυσμού (εικόνα 53).

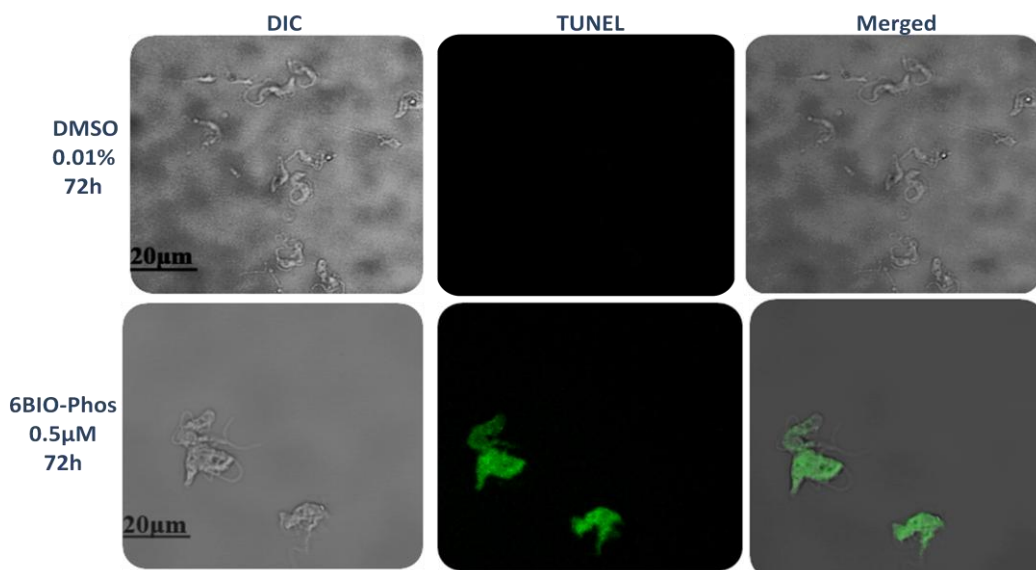
Τα παραπάνω αποτελέσματα συμφωνούν με την επίδραση των ιντιρουμπινών στο κυτταρικό κύκλο των τρυπανοσωμάτων. Έτσι, οι ιντιρουμπίνες **4** και **10** φαίνεται να δρουν σχεδόν αποκλειστικά μέσω της παρεμπόδισης της *TbGSK-3s* στα παράσιτα, αφού προσομοιάζει η δράση τους με αυτή της επαγωγής επεμβατικού RNAi για την κινάση, τόσο στο κυτταρικό κύκλο όσο και στον κυτταρικό θάνατο. Αξίζει να σημειωθεί ότι αυτές οι ιντιρουμπίνες ανήκουν στην ομάδα των 3'υποκατεστημένων αναλόγων της 6BIO, οι οποίες βρέθηκαν παραπάνω να έχουν αυξημένη επιλεκτικότητα προς την *LdGSK-3s* έναντι της CRK3 στα παράσιτα *L. donovani*. Τα υπόλοιπα ανάλογα που ελέγξαμε, φαίνεται να στοχεύουν παράλληλα με την *TbGSK-3s*, διαφορετικές πρωτεΐνες/κινάσες στόχους στα BSF *T. brucei* παράσιτα καθώς διαφοροποιούν, με διαφορετικό τρόπο η καθεμία, τόσο τον κυτταρικό κύκλο όσο και τον κυτταρικό θάνατο των παρασίτων από το μοτίβο που λαμβάνεται στα παράσιτα μετά από επαγωγή του RNAi^{*TbGSK-3s*}.

Τέλος, παρατηρήθηκε μέσω της τεχνικής TUNEL, διαφορετική μορφολογία των τρυπομαστιγωτών παρασίτων *T. brucei* μετά από 72h με την 6-βρώμο-3'διεθυλοφωσφατοξίμη. Πιο συγκεκριμένα, αντί για την κλασσική αποπτωτική εικόνα των παρασίτων (τεμαχισμένο DNA, σμίκρυνση και στρογγυλοποίηση παρασίτων) που επάγεται τόσο με τις άλλες ιντιρουμπίνες όσο και με την επαγωγή του RNAi^{*TbGSK-3s*}, παρατηρούμε διογκωμένα σε μέγεθος παράσιτα που υποδηλώνουν την ύπαρξη πολυπλοειδιών και τον διαφορετικό μηχανισμό δράσης του αναστολέα αυτού, ο οποίος οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο τα τρυπανοσώματα (Εικόνα 54).





Εικόνα 53. Η έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης και η κυτταρική διαπερατότητα των BSF *T. brucei* μετά από επώαση με ανάλογα ιντιρουμπίνης για 48 και 72h, έτσι όπως φαίνεται με κυτταρομετρία ροής, μετά από διπλή σήμανση με Ανεξίνη V-FITC και PI. Πράσινη περιοχή: ζωντανά κύτταρα. Μπλε περιοχή: πρώιμα αποπτωτικά κύτταρα. Μωβ περιοχή: μεταγενέστερα αποπτωτικά κύτταρα. Κόκκινη περιοχή: νεκρωτικά κύτταρα. Με μπλε βέλη υποδεικνύονται τα προφίλ των ιντιρουμπινών που προσομοιάζουν με δράση αναστολής της *TbGSK-3s*.



Εικόνα 54. Μορφολογία παρασίτων BSF *T. brucei* μετά από επώαση 72h με την 6-βρώμο-3'διεθυλοφωσφατοξίμη, έτσι όπως παρατηρήθηκε μέσω της τεχνικής TUNEL.

4.4 *Trypanosoma cruzi*

4.4.1 Καθορισμός της αντιρυπανοσωμικής δραστικότητας (IC₅₀) βιβλιοθήκης ιντιρουμπινών στα παράσιτα *T. cruzi*

Οι ιντιρουμπίνες έχουνδειχθεί, τόσο στην παρούσα εργασία όσο και σε προηγούμενες [191, 218], ότι διαθέτουν αρκετά ικανοποιητική αντιλεϊσμανιακή αλλά και αντιρυπανοσωμική δράση έναντι των παρασίτων *T. brucei*. Πρέπει να τονιστεί ότι μέχρι σήμερα, είναι η πρώτη φορά που γίνεται διερεύνηση της δράσης των ιντιρουμπινών έναντι των τρυπανοσωμάτων *T. cruzi*, τα οποία επίσης ανήκουν στην οικογένεια των τρυπανοσωματίδων. Τα πειράματα που αφορούν στο γένος *T. cruzi*, πραγματοποιήθηκαν στο ινστιτούτο Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz -Fiocruz στο Σαλβαδόρ Βραζιλίας υπό την επίβλεψη της Dr. Milena Soares και στα πλαίσια του προγράμματος FP7-Chembiofight.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή λοιπόν, τα 69 ανάλογα ιντιρουμπίνης που ελέγχθηκαν έναντι των παρασίτων *L. donovani* και *T. brucei* (πίνακας 6), χρησιμοποιήθηκαν για να προσδιοριστούν καινούριοι αναστολείς με αντιρυπανοσωμική δράση έναντι των παρασίτων *T. cruzi*. Όπως έχει προαναφερθεί στην εισαγωγή, τα *T. cruzi* παράσιτα σε αντίθεση με τα *T. brucei* πολλαπλασιάζονται ενδογενώς στα κύτταρα του θηλαστικού ξενιστή σε αμαστιγωτή μορφή. Παράλληλα, όταν βρίσκονται στην τρυπομαστιγωτή μορφή στο θηλαστικό ξενιστή στη κυκλοφορία του αίματος δε μπορούν να πολλαπλασιαστούν.

Αρχικά λοιπόν έγινε έλεγχος της αντιρυπανοσωμικής δράσης των αναλόγων *in vitro* σε συγκέντρωση 10μM στα τρυπομαστιγωτά παράσιτα *T. cruzi* σε πλάκα κυτταροκαλλιέργειας 96 φρεατίων, όπως περιγράφεται στη παράγραφο 3.2.6.6 στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Προς μεγάλη έκπληξη, μόνο 7 ιντιρουμπίνες παρουσίασαν δράση έναντι της μορφής αυτής των παρασίτων. Από αυτές, οι 6 ιντιρουμπίνες ανήκουν στην ομάδα των 3'υποκατεστημένων-6BIO αναλόγων ενώ η μία είναι 7-υποκατεστημένη ιντιρουμπίνη (πίνακας 10). Αξιοσημείωτο είναι επίσης το γεγονός ότι οι ιντιρουμπίνες οι οποίες είναι ισχυροί αναστολείς των *L. donovani* και *T. brucei* παρασίτων (π.χ. 6BIO, 5-Me-6BIO), δεν εμφανίζουν κάποια δράση έναντι των *T. cruzi* τρυπομαστιγωτών. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται: α) στα διαφορετικά επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών/κινασών στόχων των

ιντιρουμπινών στα 3 διαφορετικά γένη παρασίτων, β) στη διαφορετική λειτουργία των πρωτεϊνών/κινασών αυτών στα 3 διαφορετικά γένη παρασίτων, γ) στη διαφορετική πρόσδεση των ιντιρουμπινών στα διαφοροποιημένα ενεργά κέντρα των ομόλογων πρωτεϊνών ή/και δ) στη στόχευση διαφορετικών πρωτεϊνών/κινασών στα διάφορα γένη παρασίτων.

Στη συνέχεια, προσδιορίστηκαν τα IC₅₀ των 7 ιντιρουμπινών που εμφάνισαν αντιτρυπανοσωμική δράση *in vitro* στην τρυπομαστιγωτή μορφή των *T. cruzi* παρασίτων (πίνακας 10). Παράλληλα, χρησιμοποιήθηκε και το βενζιμιδαζόλιο (BDZ) ως θετικός μάρτυρας το οποίο εμφανίζει IC₅₀ 11,30 και 13,39μM έναντι της τρυπομαστιγωτής και αμαστιγωτής μορφής των παρασίτων αντίστοιχα (πίνακας 10). Όπως φαίνεται από τον πίνακα, οι ιντιρουμπίνες αυτές αποτελούν ισχυρούς αναστολείς της ανάπτυξης των τρυπομαστιγωτών παρασίτων *T. cruzi* καθώς παρουσιάζουν πολύ χαμηλό IC₅₀ (0,251-1,303 μM) σε σύγκριση με το θετικό μάρτυρα BDZ (πίνακας 10). Παράλληλα, 4 από αυτές φαίνεται πως έχουν και ικανοποιητικό S.I σε σχέση με την κυτταροτοξικότητα τους στα μακροφάγα κύτταρα του ξενιστή (πίνακας 10). Για αυτές τις ιντιρουμπίνες προσδιορίστηκε και το IC₅₀ έναντι της αμαστιγωτής μορφής των παρασίτων όπως περιγράφεται στη παράγραφο 3.2.6.7 στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι, και παρουσιάζεται στον πίνακα 10. Όλα τα αποτελέσματα προέρχονται από πραγματοποίηση τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

Πίνακας 10. Αντιτρυπανοσωμική δράση των 7 αναλόγων ιντιρουμπίνης από τις 69 που ελέγχθηκαν έναντι των *T. cruzi* τρυπομαστιγωτά. Παράλληλα, φαίνεται η κυτταροτοξικότητα των ουσιών έναντι της κυτταρικής σειράς μακροφάγων J774.1. Όλα τα αποτελέσματα προέρχονται από πραγματοποίηση τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

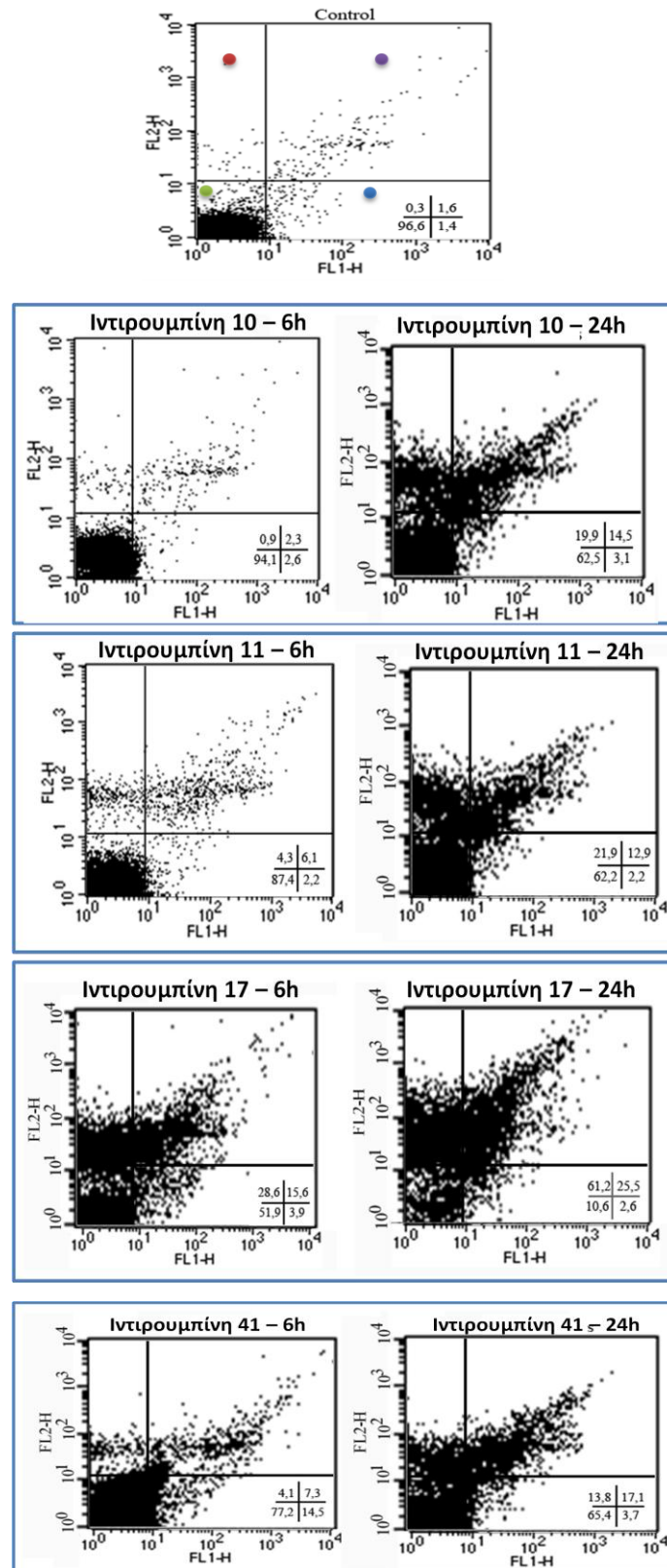
	IC ₅₀ (μM)			
	<i>T. cruzi</i> Τρυπομαστιγωτά	<i>T. cruzi</i> αμαστιγωτά	ΜΦ J774.1	S.I (ΜΦ/Τρυπομασ τιγωτά)
5	0,366±0,163	-	1,5	4x
10	0,704±0,207	0,615	>10	>14x
11	0,251±0,051	0,218	6,25	24x
12	0,489±0,226	0,512	2,6	5x
13	0,454±0,157	-	2,4	5x
17	0,448±0,145	0,900	10	22x
41	1,303±0,458	1,518	>10	>7,6x
BDZ	11,30±1,83	13,39±0,39	>10	-

Οι ιντιρουμπίνες **11** και **17**, φαίνεται πως έχουν την ισχυρότερη δράση έναντι της ανάπτυξης τόσο των τρυπομαστιγωτών (IC_{50} : 0,251 και 0,448 μ M αντίστοιχα) όσο και των αμαστιγωτών παρασίτων (IC_{50} : 0,218 και 0,9 μ M αντίστοιχα), με ταυτόχρονο υψηλό S.I έναντι των κυττάρων του ξενιστή (κυτταρική σειρά μακροφάγων J774.1) (S.I: 24 και 22 αντίστοιχα). Η ιντιρουμπίνη **10**, η οποία είναι η βασική μορφή του αναλόγου **11** (άλας της ιντιρουμπίνης), φαίνεται να έχει παρόμοια δράση αλλά ελάχιστη ηπιότερη δράση από το άλας της (IC_{50} : 0,704 και 0,615 μ M έναντι της τρυπομαστιγωτής και της αμαστιγωτής μορφής αντίστοιχα και S.I>14), που πιθανόν να οφείλεται στη μικρότερη διαλυτότητα της βάσης του αναλόγου σε σχέση με το άλας της. Η 7-υποκατεστημένη ιντιρουμπίνη βρέθηκε όπως έναντι των *T. brucei* παρασίτων, έτσι και έναντι των *T. cruzi* παρασίτων να εμφανίζει ικανοποιητική αντιτρυπανοσωμική δράση (IC_{50} : 1,303 και 1,518 μ M έναντι της τρυπομαστιγωτής και της αμαστιγωτής μορφής αντίστοιχα και S.I=7,6) αλλά ηπιότερη από τις 6-υποκατεστημένες ιντιρουμπίνες (πίνακας 10).

4.4.2 Επίδραση των ιντιρουμπινών στον κυτταρικό θάνατο των *T. cruzi* τρυπομαστιγωτών παρασίτων

Λόγω της ιδιαιτερότητας των τρυπομαστιγωτών παρασίτων *T. cruzi* να μην πολλαπλασιάζονται δεν είναι δυνατόν να μελετηθεί ο κυτταρικός τους κύκλος με κυτταρομετρία ροής. Η επίδραση των ιντιρουμπινών *in cellulo* στα παράσιτα *T. cruzi* επομένως μπορεί να μελετηθεί μόνο ως προς τον κυτταρικό θάνατο που προκαλούν με κυτταρομετρία ροής με διπλή χρώση Ανεξίνης V και PI όπως περιγράφεται στη παράγραφο 3.2.9.1 στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι.

Οι 3 ιντιρουμπίνες που ανήκουν στην ομάδα των 3'-υποκατεστημένων 6BIO αναλόγων **10**, **11** και **17** όπως φαίνεται στην εικόνα 55, προκαλούν μέσα σε μόλις 24h επώασης με τα παράσιτα δραματική αύξηση στα μεταγενέστερα αποπτωτικά παράσιτα (14,5, 12,9 και 25,5% αντίστοιχα) και στα νεκρωτικά παράσιτα (19,9, 21,9 και 25,5% αντίστοιχα), χωρίς παράλληλη εμφάνιση πρώιμων αποπτωτικών κυττάρων (3,1, 2,2 και 2,6% αντίστοιχα). Μάλιστα, το ανάλογο **17** (εικόνα 55) το οποίο φέρει πυρρολιδικό δακτύλιο στη 3'θέση της 6BIO, προκαλεί αύξηση των μεταγενέστερων αποπτωτικών και νεκρωτικών παρασίτων σε μόλις 6h επώασης με τα κύτταρα (15,6 και 28,6% αντίστοιχα).



Εικόνα 55. Η έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης και η κυτταρική διαπερατότητα των *T. cruzi* τρυπομαστιγωτών παρασίτων μετά από επώαση με ανάλογα ιντιρουμπίνης για 6 και 24h, έτσι όπως φαίνεται με κυτταρομετρία ροής μετά απο διπλή σήμανση με **Ανεξίνη V-FITC** και **PI**. Άξονας FL1-H: AnnexinV, Άξονας FL2-H:PI. Πράσινη περιοχή: ζωντανά κύτταρα. Μπλε περιοχή: πρώιμα αποπτωτικά κύτταρα. Μωβ περιοχή: μεταγενέστερα αποπτωτικά κύτταρα. Κόκκινη περιοχή: νεκρωτικά κύτταρα.

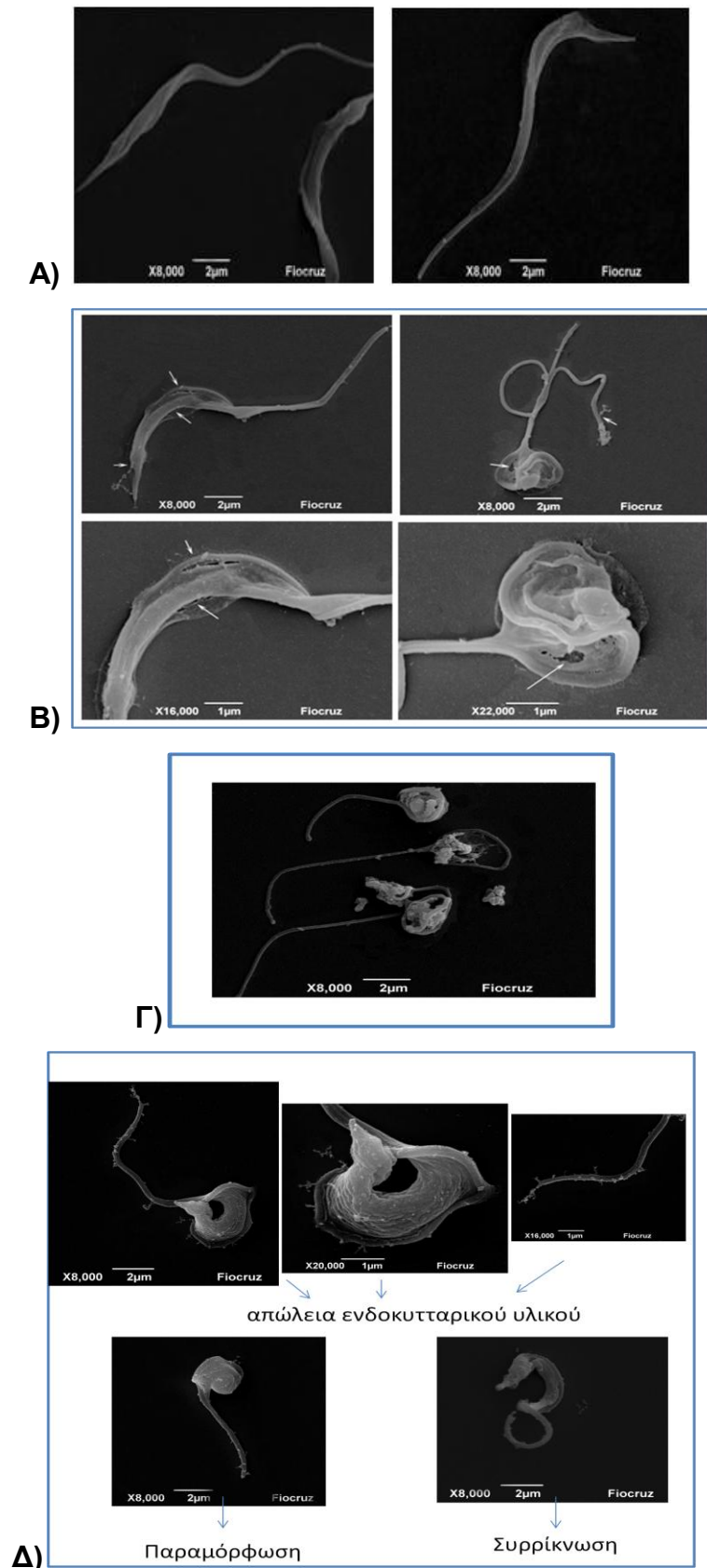
Είναι έκδηλο ότι τα ανάλογα αυτά προκαλούν διαφορετικό μοτίβο κυτταρικού θανάτου στα τρυπανοσώματα *T. cruzi* από αυτό που είδαμε νωρίτερα στα παράσιτα *T. brucei* και *L. donovani*. Σε αυτά τα 2 τελευταία είδη δείχτηκε ότι αρχικά εμφανίζεται αύξηση στον πληθυσμό πρώιμων αποπτωτικών κυττάρων, τα οποία στη συνέχεια μετατρέπονται σε μεταγενέστερα αποπτωτικά και νεκρωτικά κύτταρα. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται είτε στο γεγονός ότι στοχεύουν άλλη κινάση αντί της GSK-3s στα *T. cruzi* παράσιτα, είτε ενδεχομένως στη διαφορετική λειτουργία της κινάσης αυτής στα παράσιτα *T. cruzi*.

Η επώαση των παρασίτων με το 7-υποκατεστημένο ανάλογο της ιντιρουμπίνης **41** (εικόνα 55) παρουσιάζει διαφορετικό προφίλ κυτταρικού θανάτου καθώς μετά από 6h εμφανίζεται αύξηση των πρώιμων αποπτωτικών κυττάρων (14,5%), τα οποία στις 24h έχουν μετατραπεί σε μεταγενέστερα αποπτωτικά και νεκρωτικά παράσιτα (17,1 και 13,8% αντίστοιχα). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η 7-υποκατεστημένη ιντιρουμπίνη έχει διαφορετική πρωτεΐνη/κινάση ή διαφορετικό συνδυασμό πρωτεϊνών/κινασών ως στόχο στα *T. cruzi* παράσιτα από ότι οι 6-υποκατεστημένες ιντιρουμπίνες.

4.4.3 Μελέτη της επίδρασης των ιντιρουμπινών στα *T. cruzi* τρυπομαστιγωτά παράσιτα μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης

Η επίδραση των 6-υποκατεστημένων ιντιρουμπινών **11** και **12** στα *T. cruzi* τρυπομαστιγωτά παράσιτα έγινε στη συγκέντρωση IC₅₀ των αναστολέων μετά από 24h επώασης με αυτά και μελετήθηκε σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (παράγραφος 3.2.9.4 , Υλικά και Μέθοδοι).

Η επίδραση του αναλόγου **11** φαίνεται να προκαλεί αλλοιώσεις στην επιφάνεια των παρασίτων καθώς χάνεται η ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης και παρατηρείται απώλεια ενδοκυτταρικού υλικού (εικόνα 56). Παρόμοια χαρακτηριστικά εμφανίζονται στα παράσιτα μετά από επίδραση του αναλόγου **12** (απώλεια ενδοκυτταρικού υλικού) αλλά και με παράλληλη εμφάνιση παρασίτων τα οποία έχουν συρρικνωθεί ή παραμορφωθεί (εικόνα 56). Παρόλα αυτά, η δράση του αναλόγου **12** δεν έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης. Πιθανότατα λοιπόν, οι διάφορες 3'-υποκατεστημένες-6BIO ιντιρουμπίνες, ανάλογα με την υποκατάστασή τους, στοχεύουν με διαφορετικό τρόπο ή σε διαφορετικό βαθμό τις πρωτεΐνες-στόχους στα παράσιτα *T. cruzi*.

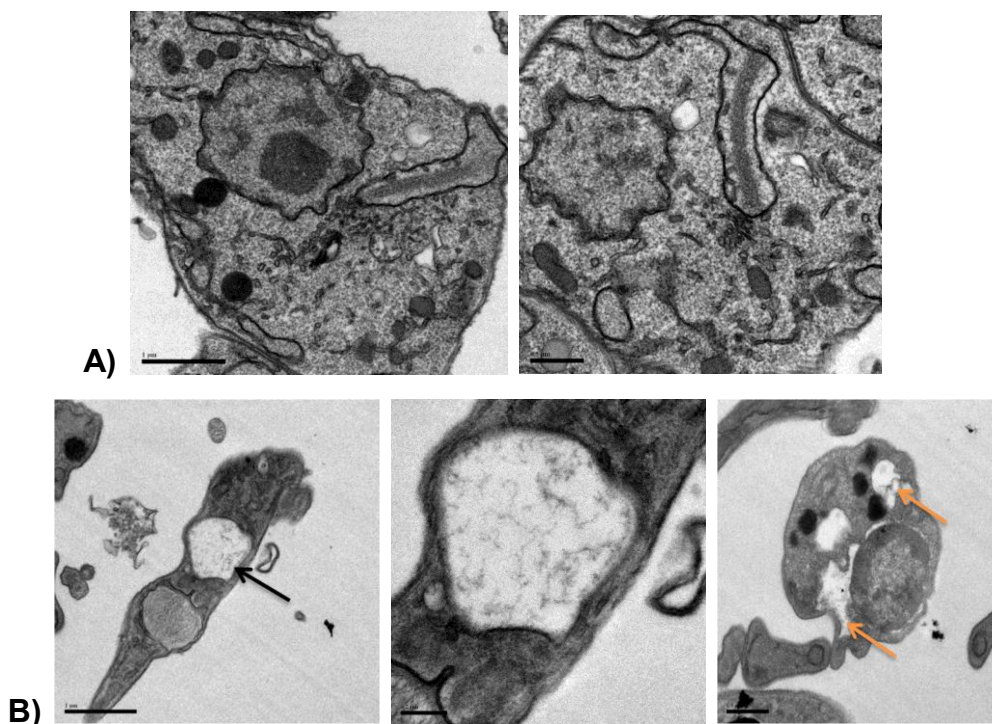


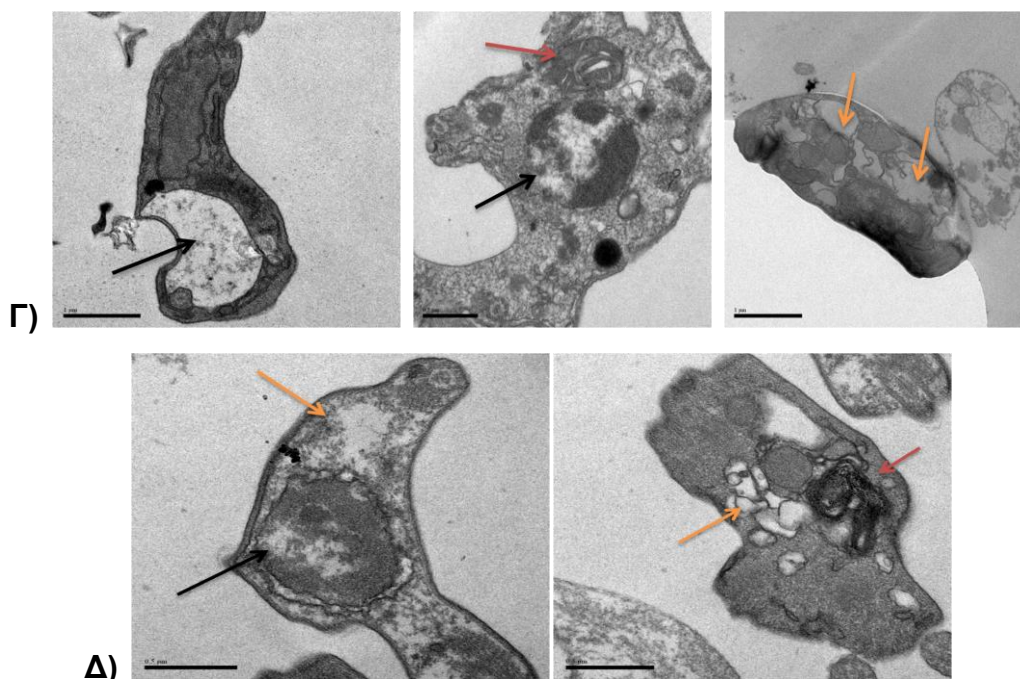
Εικόνα 56. Εικόνες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης τρυπομαστιγιωτών παρασίτων *T. cruzi*: **A)** παράσιτα αναφοράς (control), **B)** παράσιτα μετά από επώαση 24h με συγκέντρωση IC_{50} του αναλόγου 11, **Γ)** παράσιτα μετά από επώαση 24h με συγκέντρωση $2XIC_{50}$ του αναλόγου 11 και **Δ)** παράσιτα μετά από επώαση 24h με συγκέντρωση IC_{50} του αναλόγου 12.

4.4.4 Μελέτη της επίδρασης των ιντιρουμπινών στα *T. cruzi* τρυπομαστιγωτά παράσιτα μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας μετάδοσης

Στη συνέχεια, η επίδραση της 7-υποκατεστημένης και των 6-υποκατεστημένων ιντιρουμπινών στα *T. cruzi* τρυπομαστιγωτά παράσιτα μελετήθηκε σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο μετάδοσης (παράγραφος 3.2.9.4, Υλικά και Μέθοδοι). Με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο μετάδοσης μπορούν να παρατηρηθούν οι αλλαγές στα οργανίδια των παρασίτων στα οποία επιδρούν τα διάφορα ανάλογα ιντιρουμπίνης.

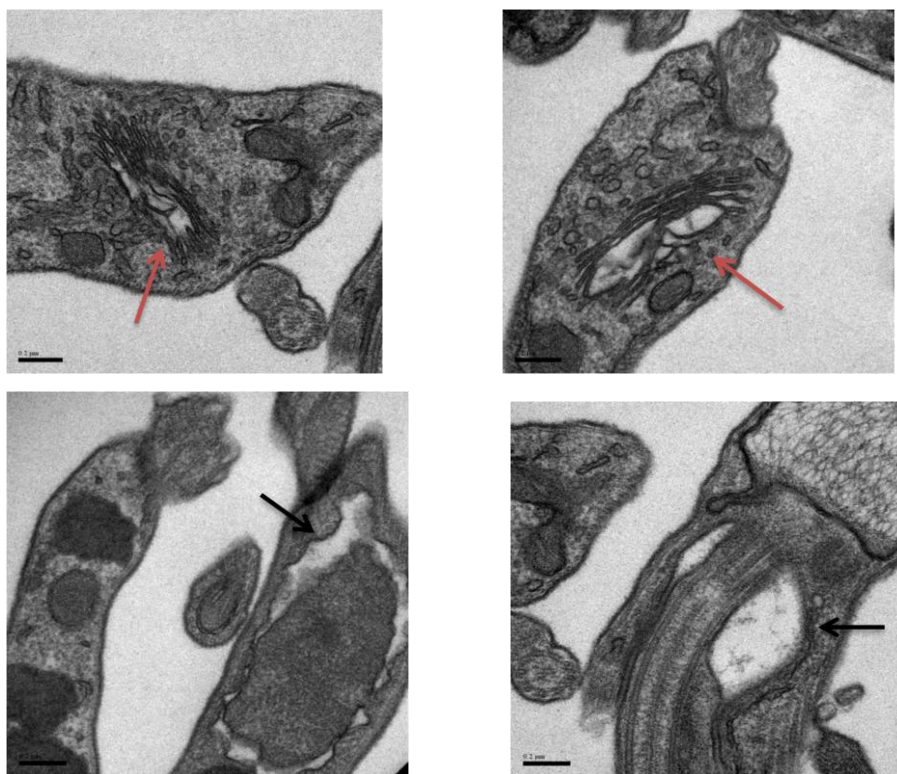
Στα παράσιτα μετά από την επίδραση των 6-υποκατεστημένων ιντιρουμπινών **10**, **11** και **17** φαίνεται να προκαλείται απώλεια της ακεραιότητας της κυτταρικής αλλά και των εσωτερικών (πυρηνική) μεμβρανών (εικόνα 57) που συμφωνεί με την ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης. Παράλληλα, κύριο χαρακτηριστικό της επίδρασης των αναλόγων αυτών είναι η παρουσία τεμαχισμένου DNA (εικόνα 57) το οποίο συμφωνεί με τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής όπου παρατηρούνται αυξημένα ποσοστά θετικών κυττάρων σημασμένα με PI. Τέλος, στην εικόνα 57 υπάρχει ένδειξη πιθανής ύπαρξης επαγωγής αυτοφαγίας στα *T. cruzi* τρυπομαστιγωτά παράσιτα μετά από επώαση με τις ιντιρουμπίνες **11** και **17**, η οποία όμως θα πρέπει να επιβεβαιωθεί με επιπλέον πειράματα.





Εικόνα 57. Εικόνες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου μετάδοσης τρυπομαστιγωτών παρασίτων *T. cruzi*: Α) παράσιτα αναφοράς (control), Β) παράσιτα μετά από επώαση 24h με συγκέντρωση IC_{50} του αναλόγου 10, Γ) παράσιτα μετά από επώαση 24h με συγκέντρωση IC_{50} του αναλόγου 11 και Δ) παράσιτα μετά από επώαση 24h με συγκέντρωση IC_{50} του αναλόγου 17. Με μαύρα βέλη φαίνεται η αποικοδόμηση του DNA. Με κόκκινο βέλος φαίνεται η πιθανή αυτοφαγία. Με πορτοκαλί βέλη φαίνεται η απώλεια της ακεραιότητας της κυτταρικής αλλά και των εσωτερικών (πυρηνική) μεμβρανών και επομένως η απώλεια κυτταρικού υλικού.

Τα παράσιτα μετά από την επίδραση της 7-υποκατεστημένης ιντιρουμπίνης (41) φαίνεται να διαφοροποιούνται ελαφρώς από τα παράσιτα που επωάζονται με τις 6-υποκατεστημένες ιντιρουμπίνες, γεγονός που παρατηρήθηκε και στη μελέτη του κυτταρικού θανάτου με κυτταρομετρία ροής. Παράλληλα λοιπόν με την απώλεια της ακεραιότητας των εσωτερικών μεμβρανών του κυττάρου (πυρηνική) (εικόνα 58) και την παρουσία τεμαχισμένου DNA (εικόνα 58) το οποίο συμφωνεί με τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής όπου παρατηρούνται αυξημένα ποσοστά θετικών κυττάρων σημασμένα με PI, παρατηρείται επίσης αλλοίωση του ενδοπλασματικού δικτύου Golgi (εικόνα 58). Από τα παραπάνω δεδομένα, επιβεβαιώνεται πως οι στόχοι των 6- και 7- υποκατεστημένων ιντιρουμπινών είναι διαφορετικοί στα *T. cruzi* παράσιτα.



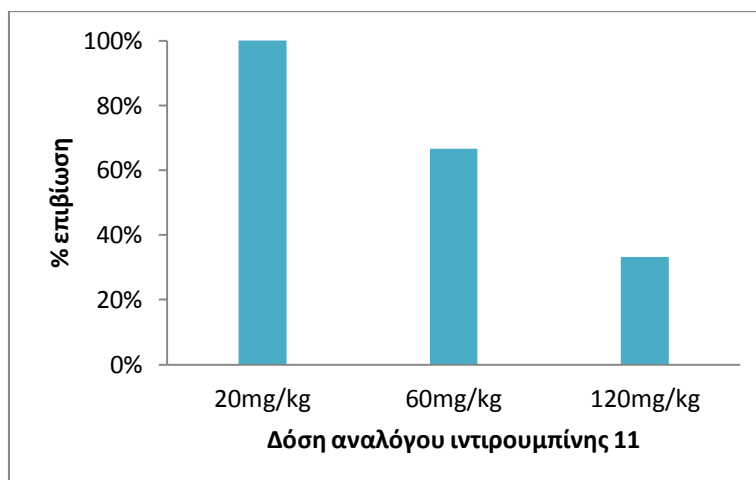
Εικόνα 58. Εικόνες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου μετάδοσης τρυπομαστιγωτών παρασίτων *T. cruzi* μετά από επώαση 24h με συγκέντρωση IC_{50} του 7-υποκατεστημένου αναλόγου 41. Με κόκκινο βέλος φαίνεται η αλλοίωση του ενδοπλασματικού δικτύου Golgi. Με μαύρα βέλη φαίνεται η απώλεια της ακεραιότητας των εσωτερικών (πυρηνική) μεμβρανών και η παρουσία τεμαχισμένου DNA.

4.5 *In vivo* πειράματα σε πειραματικό μοντέλο αμερικάνικης τρυπανοσωμίας (Chagas Disease)

4.5.1 Έλεγχος τοξικότητας της ιντιρουμπίνης 11

Για τον έλεγχο της τοξικότητας των ιντιρουμπινών που θα χρησιμοποιηθούν στο πειραματικό μοντέλο αμερικάνικης τρυπανοσωμίας πραγματοποιήθηκε ανεξάρτητο πείραμα επιβίωσης των μυών για 1 βδομάδα μετά από χορήγηση συγκεκριμένης δόσης ιντιρουμπίνης. Σε τέσσερις ομάδες των 3 θηλυκών BALB/c (H-2^d) μυών (20-28g) ηλικίας (8-10 εβδομάδων) χορηγείται 20mg/kg, 60mg/kg, 120mg/kg ιντιρουμπίνης και PBS που περιέχει DMSO 10% (v/v) αντίστοιχα, για μια φορά. Η επιβίωση και ο φαινότυπος υγείας των μυών παρατηρείται για μία βδομάδα. Από το γράφημα 10, φαίνεται πως ενώ όλα τα ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε δόση 20mg/kg ιντιρουμπίνης, παρουσίασαν κανονικό φαινότυπο και επιβίωσαν, στα ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε δόση 60 και 120mg/kg ιντιρουμπίνης, μόνο τα 2 και 1 από τα 3 ποντίκια αντίστοιχα παρουσίασαν κανονικό φαινότυπο και επιβίωσαν. Στα πειράματα που ακολουθήθηκαν χρησιμοποιήθηκαν οι

ιντιρουμπίνες σε τελική συγκέντρωση 20mg/Kg ανά δόση για τη θεραπεία της πειραματικής αμερικάνικης τρυπανοσωμίας (Chagas Disease).



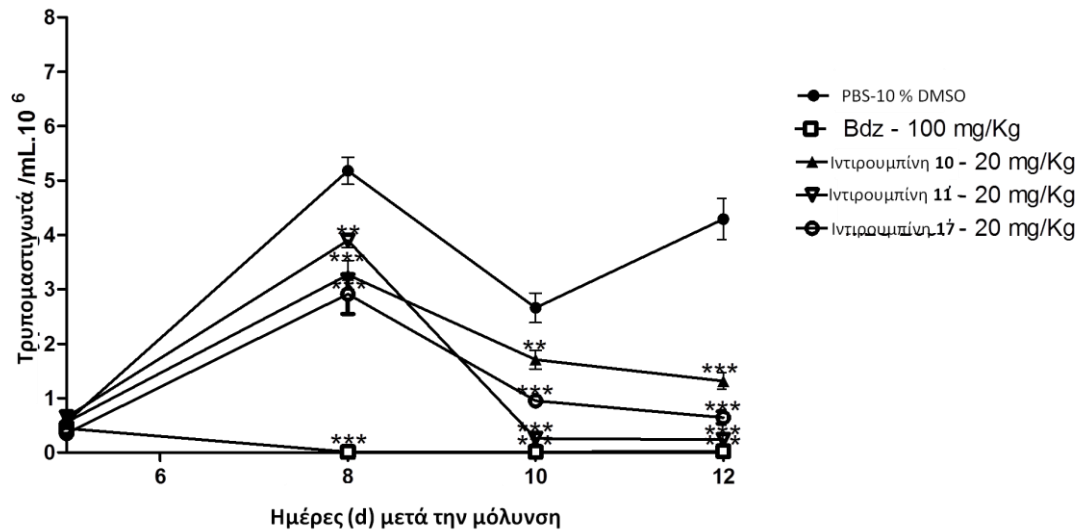
Γράφημα 10. % επιβίωση των ποντικών Balb/C μετά από χορήγηση δόσης αναλόγου ιντιρουμπίνης 11 σε συγκέντρωση 20mg/Kg, 60mg/Kg και 120mg/Kg.

4.5.2 Έλεγχος δράσης ιντιρουμπινών 10, 11, 17 και 41 σε πειραματικό μοντέλο αμερικάνικης τρυπανοσωμίας (Chagas Disease)

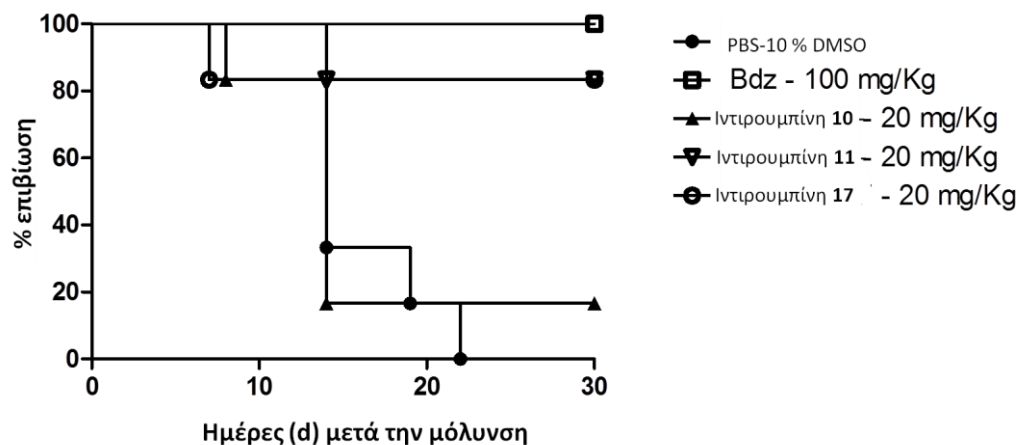
Τα *in vivo* πειράματα στο πειραματικό μοντέλο αμερικάνικης τρυπανοσωμίας (Chagas Disease) πραγματοποιήθηκαν όπως περιγράφονται στη παράγραφο του κεφαλαίου 3.2.11.3 Υλικά και Μέθοδοι, και υπολογίστηκε η επίδραση των ιντιρουμπινών στην παρασιταιμία του αίματος κατά την οξεία φάση της ασθένειας. Ως φάρμακο ελέγχου χρησιμοποιήθηκε το BDZ αλλά σε συγκέντρωση 100mg/Kg, το οποίο μειώνει κατά 100% τη παρασιταιμία μετά από 3 δόσεις θεραπείας (8^η μέρα μετά την μόλυνση).

Από το γράφημα 11, παρατηρούμε ότι μετά την ολοκλήρωση των 5 δόσεων θεραπείας (10^η μέρα μετά τη μόλυνση), οι 6-υποκατεστημένες ιντιρουμπίνες **10** (γράφημα 11A), **11** (γράφημα 11A) και **17** (γράφημα 11A) μείωσαν την παρασιταιμία στα ποντίκια κατά 63% ($p < 0,001$), 56,13% ($p < 0,001$) και 75,2% ($p < 0,01$) αντίστοιχα, με τα ποντίκια να εμφανίζουν φυσιολογικό φαινότυπο. Παρόλα αυτά, κατά την περαιτέρω παρατήρηση των πειραματοζώων μέχρι και 30 μέρες μετά τη μόλυνση, τα 5 από τα 6 ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε η ιντιρουμπίνη **10** (γράφημα 11B) κατέληξαν λόγω της νόσου (1 την 8^η μέρα και 4 την 14^η μέρα μετά τη μόλυνση) ενώ μόνο 1 από τα 6 ποντίκια στα οποία χορηγήθηκαν οι ιντιρουμπίνες **11** (γράφημα 11B) και **17** (γράφημα 11B) κατέληξαν από την εξέλιξη της ασθένειας (την 14^η μέρα και την 7^η μέρα αντίστοιχα μετά τη μόλυνση).

A)



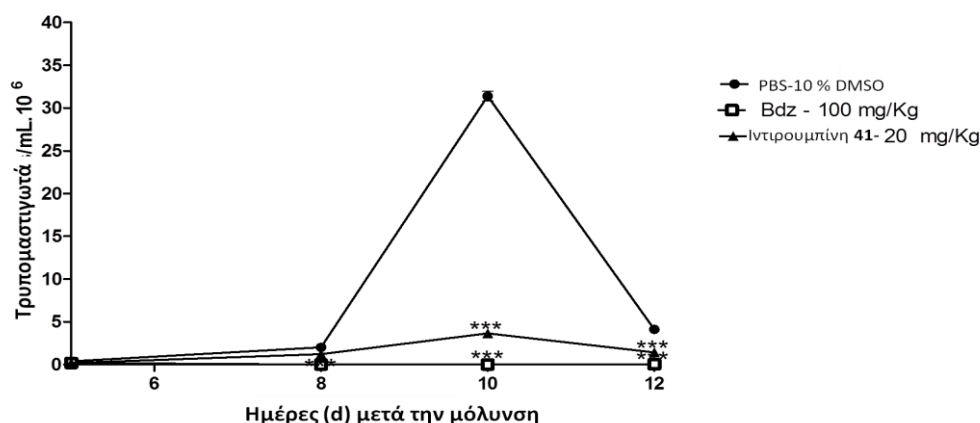
B)



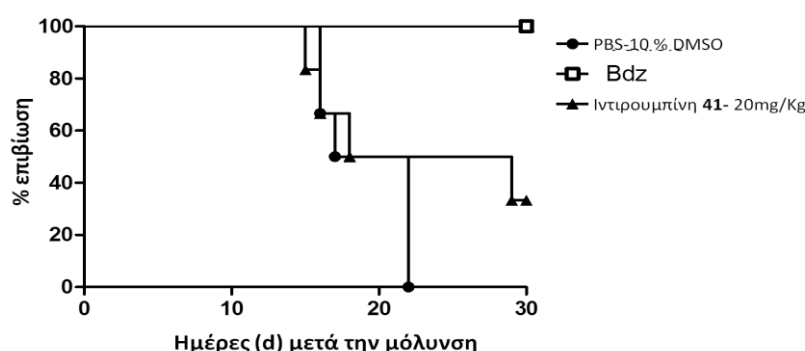
Γράφημα 11. A) Παρασιταίμια στο αίμα ποντικών Balb/C μολυσμένων με 10^4 *T. cruzi* τρυπομαστιγωτά (Y strain) μετά από θεραπεία με τις ιντιρουμπίνες 10, 11 και 17 και με βενζιμιδαζόλιο (BDZ) και PBS-10 % DMSO ως θετικές και αρνητικές ομάδες αναφοράς. Στατιστικά σημαντικό: ***, $p < 0,001$, **, $p < 0.01$ σε σύγκριση με την αρνητική ομάδα αναφοράς. B) % επιβίωση των ποντικών Balb/C σε κάθε ομάδα μετά τη μόλυνση και για 30 μέρες.

Παράλληλα, έγινε έλεγχος της *in vivo* δράσης της 7-υποκατεστημένης ιντιρουμπίνης 41 (γράφημα 12) έναντι της αμερικάνικης τρυπανοσωμίας. Την 10^η μέρα μετά τη μόλυνση και μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας, παρατηρήθηκε 81% μείωση της παρασιταίμιας στο αίμα ($p < 0,0001$) με καμία μέχρι τότε απώλεια πειραματόζωου. Στη συνέχεια όμως κατέληξαν 4 από τα 6 ποντίκια (15^η, 16^η, 18^η και 29^η μέρα μετά τη μόλυνση) (γράφημα 12).

A)



B)



Γράφημα 12. A) Παρασιταιμία στο αίμα ποντικών Balb/C μολυσμένων με 10^4 *T. cruzi* τρυπομαστιγωτά (Y strain) μετά από θεραπεία με την 7-υποκατεστημένης ιντιρουμπίνης 41 και με βενζιμιδαζόλιο και PBS-10 % DMSO ως θετικές και αρνητικές ομάδες αναφοράς. Στατιστικά σημαντικό: ***, $p < 0,001$, **, $p < 0,01$ σε σύγκριση με την αρνητική ομάδα αναφοράς. **B)** % επιβίωση των ποντικών Balb/C σε κάθε ομάδα μετά τη μόλυνση και για 30 μέρες.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνουμε ότι οι ιντιρουμπίνες μειώνουν τη παρασιταιμία στο αίμα των ποντικών Balb/C αλλά δεν μπορούν να αποτρέψουν τη κατάληξη σε θάνατο των πειραματόζων εκτός από την ιντιρουμπίνη **11** η οποία παρουσιάζει καλή αντιπρυπανοσωμική δράση και ταυτόχρονη αποτροπή της θνησιμότητας λόγω της ασθένειας. Παράλληλα, η δράση του BDZ φαίνεται να είναι καλύτερη από αυτή των ιντιρουμπινών. Επομένως, η ιντιρουμπίνη **11** μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε περαιτέρω πειράματα για μελέτη πιθανής ανάπτυξης συνδυαστικής θεραπείας με το BDZ ή να χρησιμοποιηθεί ο σκελετός της ως βάση για σχεδιασμό και σύνθεση νέων πιο δραστικών αναλόγων με αντιπρυπανοσωμική δράση.

Συζήτηση

Κεφάλαιο **5**

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1 *Leishmania*

Αρχικά, μελετήθηκε η αντιλεϊσμανιακή δραστικότητα μιας βιβλιοθήκης ιντιρουμπινών με ποικιλία υποκαταστάσεων σε παράσιτα *L. donovani* LG13, τα οποία προκαλούν σπλαχνική λεισμανίαση, τη σοβαρότερη κλινική εκδήλωση της ασθένειας. Σε προηγούμενες εργασίες βρέθηκε ότι οι ιντιρουμπίνες, γνωστοί αναστολείς των CDK κινασών και της GSK-3 των θηλαστικών έχουν ισχυρή αντιλεϊσμανιακή δράση [191, 218]. Πιο συγκεκριμένα, η 3'οξίμη (-NOH) της 5-SO₃Na ιντιρουμπίνης και η 3'οξίμη της 5-σουλφοναμιδο-N-2-διμεθυλαμινο-αίθυλ-ιντιρουμπίνης που αρχικά συντέθηκαν για να στοχεύουν τις ανθρώπινες CDKs και GSK-3, αναστέλλουν την ανάπτυξη των *L. mexicana* ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών με τιμές IC₅₀ ≥ 3,5 μM [218]. Παράλληλα, ιντιρουμπίνες με υποκαταστάσεις στις θέσεις 3', 5, 6 και N1 του σκελετού του μορίου, από το εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων του Τμήματος Φαρμακευτικής του ΕΚΠΑ, ελέγχθησαν έναντι των παρασίτων *L. donovani* στο εργαστήριο Μοριακής Παρασιτολογίας και τέσσερεις ιντιρουμπίνες: 3'οξίμη της 6-βρώμο-ιντιρουμπίνης (6BIO), 3'ακετοξίμη της 6-βρώμο-ιντιρουμπίνης (6-BIA), 3'οξίμη της 5-μέθυλο-6-βρώμο-ιντιρουμπίνης (5-Me-6-BIO) και 3'οξίμη της 5-βρώμο-ιντιρουμπίνης (5-BIO), οι οποίες στοχεύουν την ανθρώπινη GSK-3 [189], βρέθηκαν να αναστέλλουν την ανάπτυξη των προμαστιγωτών με τιμές IC₅₀ 0,8, 0,9, 1,2 και 5,2 μM αντίστοιχα. Παράλληλα, οι ιντιρουμπίνες αυτές ανέστειλαν την ανάπτυξη των ενδοκυττάρων αμαστιγωτών παρασίτων με τιμές IC₅₀ 0,75, 1, 1 και 1 μM αντίστοιχα. Στην ίδια εργασία δείχθηκε ότι οι 6-βρώμοιντιρουμπίνες (εκτός από την διυποκατεστημένη 5-Me-6BIO και μερικώς την 6-BIA) είχαν μεγαλύτερη επιλεκτικότητα προς της λείσμανιακή CRK3 έναντι της *LdGSK-3s*, αντίθετη δηλαδή επιλεκτικότητα από αυτή που αναμενόταν λόγω της επιλεκτικότητας που κατέχουν έναντι των αντίστοιχων κινασών στα κύτταρα θηλαστικών [191]. Η κατασκευή μοντέλου ομολογίας της *LGSK-3s* έχοντας σαν καλούπι τη κρυσταλλική δομή της ανθρώπινης GSK-3β και οι μοριακές προσομοιώσεις έδειξαν ότι η διαφοροποίηση αυτή πιθανόν να οφείλεται στο

γεγονός ότι υπάρχουν κάποιες διαφορές σε κάποια αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου της ανθρώπινης και λεισμανιακής κινάσης GSK-3 οι οποίες επηρεάζουν την πρόσδεση των 6-υποκατεστημένων ιντιρουμπινών [191].

Παράλληλα, σε προηγούμενες έρευνες, η λεισμανιακή GSK-3s έχειδειχθεί ότι μπορεί να αποτελέσει ιδανικό στόχο για τη θεραπεία της λεισμανίασης καθώς οι αναστολείς της κινάσης παρουσιάζουν αντιλεισμανιακή δράση, ενώ μπορούν να συντεθούν καινούριοι ειδικοί αναστολείς που να στοχεύουν αποκλειστικά την παρασιτική κινάση και όχι την ανθρώπινη κινάση, βάσει των σημαντικών διαφορών που υπάρχουν στη περιοχή πρόσδεσης του ATP των 2 κινάσων [191, 195, 205]. Δεν συμβαίνει το ίδιο όμως και με την CRK3 καθώς η παρεμπόδιση της από ειδικούς αναστολείς δεν αντιστοιχεί πάντα σε αναστολή της ανάπτυξης των παρασίτων [218]. Επομένως, στη παρούσα διδακτορική διατριβή, ένας από τους στόχους μας ήταν να προσπαθήσουμε να ανακαλύψουμε αντιλεισμανιακούς αναστολείς οι οποίοι να έχουν αυξημένη επιλεκτικότητα στην *LdGSK-3s* έναντι της CRK3. Για την επίτευξη αυτού του στόχου μια βιβλιοθήκη ιντιρουμπινών αποτελούμενη από ανάλογα με καινούργιες υποκαταστάσεις ελέγχθηκε αρχικά για την αντιλεισμανιακή τους δράση και τη δράση τους έναντι των 2 παρασιτικών κινάσων *LdGSK-3s* και CRK3. Η βιβλιοθήκη αυτή αποτελείται από: α) 7-υποκατεστημένες ιντιρουμπίνες οι οποίες ελέγχθηκαν για πρώτη φορά για την αντιπαρασιτική τους δράση, β) 6ΒΙΟ ανάλογα στα οποία έχουν προστεθεί ογκώδεις υδρόφιλες αμινο-αλυσίδες στην 3' θέση του σκελετού της ιντιρουμπίνης με σκοπό της αύξηση της διαλυτότητας των αναλόγων αυτών και γ) 5-νίτρο υποκατεστημένες ιντιρουμπίνες.

Ο έλεγχος αυτός ανέδειξε 7 ιντιρουμπίνες με ισχυρή αντιλεισμανιακή δράση έναντι τόσο της προμαστιγωτής όσο και της αμαστιγωτής μορφής των παρασίτων *L. donovani* ($IC_{50} < 3 \mu M$), αλλά μόνο 2 από αυτά, τα ανάλογα **11** και **17**, είχαν ικανοποιητικό δείκτη επιλεκτικότητας έναντι των μακροφάγων ποντικού ($S.I > 8$) (πίνακας 3). Τα υπόλοιπα ανάλογα όπως φαίνεται στον πίνακα έχουν ικανοποιητική αντιλεισμανιακή δράση αλλά έχουν και ιδιαίτερα υψηλή τοξικότητα έναντι της κυτταρικής σειράς των μακροφάγων ποντικού J774.1 (πίνακας 3). Παράλληλα, 2 ανάλογα ιντιρουμπίνης (**4**, **5**) παρόλο που εμφανίζουν αντιλεισμανιακή δράση έναντι των προμαστιγωτών παρασίτων με τιμές IC_{50} 1,0 και 0,9 μM αντίστοιχα, εμφανίζουν και ισχυρή κυτταροτοξικότητα

έναντι της κυτταρικής σειράς μακροφάγων J774.1 (LC_{50} : 1,5 μ M) και άρα δε μελετήθηκαν περαιτέρω. Η υψηλή σχετικά τοξικότητα κάποιων αναλόγων μπορεί να οφείλεται στην αυξημένη διαλυτότητα των ιντιρουμπινών που πιθανόν να έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη διείσδυση όχι μόνο μέσω της μεμβράνης των παρασίτων αλλά και μέσω της μεμβράνης των κυττάρων των θηλαστικών.

Και τα 7 ανάλογα ιντιρουμπίνης, που βρέθηκαν να έχουν αντιλεϊσμανιακή δράση, ανήκουν στα 3'-υποκατεστημένα, με ογκώδεις ομάδες, 6BIO ανάλογα. Γνωρίζοντας από προηγούμενη μελέτη [191] ότι η 6BIO στοχεύει περίπου 7 φορές πιο επιλεκτικά την CRK3 έναντι της *LdGSK-3s* (αντιστροφή επιλεκτικότητας σε σχέση με τις ανθρώπινες κινάσες), μελετήθηκε η επιλεκτικότητα των καινούριων αυτών αναστολέων έναντι των 2 λείσμανιακών κινασών CRK3 και *LdGSK-3s in vitro*. Οι παρασιτικές κινάσες απομονώθηκαν από ανασυνδυασμένα παράσιτα και πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις αναστολής. Τα 3'-υποκατεστημένα ανάλογα της 6BIO δείχνουν να έχουν αυξημένη επιλεκτικότητα έναντι της *LdGSK-3s* αντί της CRK3 (πίνακας 4). Μάλιστα, η ιντιρουμπίνη **11** (3'-piperazine-6BIO) και **17** (3'-pyrrolidine-6BIO) στοχεύουν πάνω από 33 φορές και 3,8 φορές αντίστοιχα, περισσότερο επιλεκτικά την *LdGSK-3s* με τιμές IC_{50} 0,1 και 0,88 μ M αντίστοιχα (πίνακας 4).

Όπως, έχει προηγουμένως παρατηρηθεί για τις 5-Me-6BIO και την 6BIO, έτσι και για τις ιντιρουμπίνες **11** και **17** παρατηρείται διαφορά ανάμεσα στην κυτταρική και μοριακής τους δράση έναντι της απομονωμένης κινάσης, επειδή οι δοκιμασίες αναστολής κινασών γίνονται σε συγκεντρώσεις ATP της τάξης των μ M, η οποία είναι πολλές φορές χαμηλότερη από την ενδοκυτταρική συγκέντρωση, η οποία είναι της τάξης των mM [285, 286]. Αυτό οφείλεται σε παράγοντες όπως η βιοδιαθεσιμότητα των αναστολέων στο κύτταρο (κυτταρική διαπερατότητα αναστολέων, αντλίες εκροής του αναστολέα από το κύτταρο –efflux pumps), η ύπαρξη φωσφατασών που δρουν σαν ενδογενείς αναστολείς κινασών, η ενδοκυτταρική συγκέντρωση της κινάσης-στόχου, ο μεταβολισμός των ουσιών στο παράσιτο ή στο μακροφάγο προς μη ενεργή μορφή, καθώς και η ανάγκη για ολική αναστολή του ενζύμου για να είναι εμφανής ο φαινότυπος της κυτταρικής επίδρασης της αναστολής του ενζύμου [285, 286]. Στην προκειμένη περίπτωση, η ιντιρουμπίνη **11** αναστέλλει τα αμαστιγωτά παράσιτα με IC_{50} 0,59 μ M, αλλά την *LdGSK-3s* με

Ki 0,05μM, δηλαδή υπάρχει 11,8 φορές διαφορά ανάμεσα στην κυτταρική και ενζυμική της ενεργότητα. Από την άλλη μεριά όμως, η ιντιρουμπίνη **17** αναστέλλει τα αμαστιγωτά παράσιτα με IC₅₀ 1,22μM, αλλά την *LdGSK-3s* με Ki 0,44μM, δηλαδή υπάρχει μόνο 2,7 φορές διαφορά ανάμεσα στην αναστολή της κυτταρικής και ενζυμικής της ενεργότητας.

Η παραπάνω στροφή της επιλεκτικότητας των αναλόγων 6BIO προς την *LdGSK-3s in vitro*, μετά από την υποκατάσταση της 3' θέσης του σκελετού της ιντιρουμπίνης με το δακτύλιο της πιπεραζίνης ή της πυρρολιδίνης επιβεβαιώθηκε ότι αντικατοπτρίζεται και *in cellulose*, με τη μελέτη της επίδρασης των αναλόγων **11** και **17** στον κυτταρικό κύκλο και τον κυτταρικό θάνατο των παρασίτων. Μετά από επώαση των προμαστιγωτών παρασίτων *L. donovani* με τις ιντιρουμπίνες στη συγκέντρωση που προκαλεί 50% αναστολή στην ανάπτυξη των παρασίτων (IC₅₀), παρατηρείται παρεμπόδιση της προόδου του κυτταρικού κύκλου από την G1 στην S φάση με παράλληλη εκθετική αύξηση του πληθυσμού των παρασίτων με κατακερματισμένο DNA (subG0/G1 φάση) (εικόνα 35). Η δράση των ιντιρουμπινών **11** και **17** στο κυτταρικό κύκλο προσομοιάζει με αυτή της 5-Me-6BIO και ενισχύει τα *in vitro* αποτελέσματα εκλεκτικότητας των ουσιών αυτών προς την *LdGSK-3s* έναντι της CRK3. Τέλος, η εκθετική αύξηση του πληθυσμού subG0/G1 μόλις 24h μετά την επώαση με την ιντιρουμπίνη **11** που φέρει την πιπεραζίνη στη 3' θέση, μπορεί να δικαιολογηθεί από το γεγονός ότι στοχεύει πάνω από 33 φορές πιο εκλεκτικά την *LdGSK-3s* από την CRK3, σε σχέση με την ιντιρουμπίνη **17** με τον πυρρολιδικό δακτύλιο στη θέση 3' αλλά και την 5-Me-6BIO. Οι τελευταίες 2 ιντιρουμπίνες στοχεύουν μόλις 3,8 και 7,2 φορές περισσότερο την *LdGSK-3s* από την CRK3. Από την άλλη μεριά, δεν παρατηρήθηκε παρεμπόδιση της κυτοκίνησης ή/και της μίτωσης του παρασίτου (G2/M arrest), χαρακτηριστικό της αναστολής της CRK3 [191].

Ταυτόχρονα, τα παράσιτα που επωάστηκαν με τις ιντιρουμπίνες **11** και **17** προκάλεσαν άμεσα αύξηση του πληθυσμού των μεταγενέστερων αποπτωτικών (42% και 28% αντίστοιχα) και νεκρωτικών κυττάρων (5,4% και 4,3% αντίστοιχα), χωρίς να έχει προηγηθεί αύξηση του πληθυσμού των αρχικών αποπτωτικών κυττάρων (3,1% και 4,9% αντίστοιχα) (εικόνα 36). Το μοτίβο αυτό κυτταρικού θανάτου προσομοιάζει με αυτό που προκαλεί η 5-Me-6BIO μέσω της παρεμπόδισης της δράσης της *LdGSK-3s* [191], ενώ αντίθετα

η 6BIO στοχεύοντας την CRK3, έχει ως αποτέλεσμα την αρχική αύξηση του πληθυσμού των αρχικών αποπτωτικών στις 48h, τα οποία μετατρέπονται σε μεταγενέστερα αποπτωτικά με την πάροδο του χρόνου [191].

Η στροφή της επιλεκτικότητας προς την *LdGSK-3s* αντί της CRK3, μετά από την υποκατάσταση της 3' θέσης του σκελετού της ιντιρουμπίνης με τον δακτύλιο της πιπεραζίνης ή της πυρρολιδίνης δικαιολογείται από τα αποτελέσματα της μελέτης μοριακής προσομοίωσης των κινασών *LGSK-3s* και CRK3 (εικόνα 37) των *L. major*, *L. donovani* και *L. infantum* [278, 291]. Παρόλο που υπάρχει υψηλή ομολογία στο ενεργό κέντρο των 2 κινασών, παρατηρείται μια αντικατάσταση του αμινοξέος που βρίσκεται στην είσοδο του ενεργού κέντρου (gatekeeper), (M100^{LGSK-3s} σε F99^{CRK3}). Επίσης, τα αμινοξέα που βρίσκονται κοντά στο ενεργό κέντρο των 2 κινασών σημειώνουν σημαντικές διαφορές στην πλούσια σε γλυκίνη θηλιά (Gly-loop) και στα σημεία πρόσδεσης ριβόζης και φωσφατάσης των κινασών. Συγκεκριμένα, στην *LGSK-3s*, το μοτίβο της Gly-loop είναι ²⁷GQGTFG³² ενώ στην CRK3 είναι ³⁰GEGTYG³⁵. Παράλληλα, στο σημείο πρόσδεσης της ριβόζης η T106^{LGSK-3s} αντικαθιστάται με την D105^{CRK3} και στο σημείο πρόσδεσης της φωσφατάσης η H155^{LGSK-3s} αντικαθίσταται από την A149^{CRK3} και η C169^{LGSK-3s} από την A162^{CRK3}. Οι μικρές αυτές διαφορές παίζουν σημαντικό ρόλο στον έμμεσο καθορισμό του μοτίβου ενυδάτωσης του ενεργού κέντρου των 2 αυτών παρασιτικών κινασών καθώς οι διαφορές στα αμινοξέα της Gly-loop επηρεάζουν την ευκαμψία της θηλιάς η οποία με τη σειρά της αλληλεπιδρά με τα μόρια νερού τα οποία επιδρούν στα σημεία πρόσδεσης ριβόζης και φωσφατάσης. Με υπολογιστική χαρτογράφηση (computational mapping) των μοτίβων ενυδάτωσης των κινασών χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο Szmap παρατηρείται διαφορά στις προβλεπόμενες θερμοδυναμικές ιδιότητες των μορίων νερού τα οποία θα έπρεπε να δημιουργούν το πρώτο κέλυφος ενυδάτωσης δίπλα στα σημεία πρόσδεσης της ριβόζης και της φωσφατάσης στις 2 κινάσες. Πιο συγκεκριμένα, ένα σύμπλεγμα από μόρια ύδατος με ελεύθερη θετική ενέργεια βρίσκεται στις προαναφερθέντες θέσεις στις κινάσες *LGSK-3s* αλλά λείπει στα CRK3 ομόλογα (εικόνα 38). Το σύμπλεγμα αυτό καθορίζει μια περιοχή όπου η υποκατάσταση του αναστολέα με πολικές ογκώδεις ομάδες θα ευνοούσε τη συγγένεια δέσμευσης, γεγονός που συμβαίνει με τις ιντιρουμπίνες **11** και **17**, ενώ η αντικατάσταση του από

υδρόφοβες ομάδες θα επηρέαζε τη συγγένεια με δυσμενή τρόπο. Λαμβάνοντας υπόψη ότι οι ενώσεις που δεσμεύονται στις κινάσες μέσω ειδικών αλληλεπιδράσεων φιλοξενούνται σε αυτό το συγκεκριμένο τμήμα της κοιλότητας, θα μπορούσε το γεγονός αυτό να προσδίδει μια διαφορετική χημική συγγένεια μεταξύ των κατά τα άλλα παρόμοιων δραστικών θέσεων των LGSK-3s και CRK3. Έτσι, οι ιντιρουμπίνες με αντιλεισμανιακή δράση, οι οποίες κατέχουν μια ογκώδη υδρόφιλη άμινο-αλυσίδα στη 3' θέση της 6BIO (11-17, πίνακας 3) προσδένονται πιο επιλεκτικά δίπλα στην περιοχή αυτή του ενεργού κέντρου της LGSK-3s, επικαλύπτοντας έτσι τις θέσεις ενυδάτωσης και αυξάνοντας τη σύνδεση λόγω της εντροπίας από την εκτόπιση των σχετικά ασταθών μορίων νερού από το πρώτο κέλυφος ενυδάτωσης της κινάσης, πράγμα που δε μπορεί να συμβεί με την πρόσδεση στη κινάση CRK3. Η αξιοποίηση αυτών των δεδομένων θα συμβάλει στη σύνθεση αναλόγων με κατάλληλες υποκαταστάσεις, έτσι ώστε να στοχεύουν αποκλειστικά την παρασιτική LdGSK-3s και να αποτελούν ιδανικούς αναστολείς και κατ' επέκταση δυνητικά φάρμακα για τη θεραπεία της λεισμανίασης.

Τέλος, η αντιλεισμανιακή δράση 2 αναστολέων της παρασιτικής LdGSK-3s και της ανάπτυξης των παρασίτων *in vitro*, της 5-Me-6BIO και της ιντιρουμπίνης 11, ελέγχθηκε και σε μοντέλο σπλαχνικής λεισμανίασης *in vivo*, αφού πρώτα διαπιστώθηκε ότι δεν είναι τοξικές για τα πειραματόζωα Balb/C ποντίκια σε συγκέντρωση 20mg/Kg. Ενώ είναι γνωστό ότι οι ιντιρουμπίνες αυτές είναι ισχυρότεροι αναστολείς της GSK-3 των θηλαστικών σε σχέση με την κινάση των παρασίτων [189] και ότι γενετικά τροποποιημένα ποντίκια που δεν εκφράζουν την GSK-3β εμφανίζουν εκφυλισμό ήπατος και αλλοιώσεις στη δομή των οστών που οδηγούν σε εμβρυικό θάνατο [300, 301], μελέτες έχουν δείξει ότι η *in vivo* παρεμπόδιση της GSK-3 με αναστολείς, δεν επιφέρει αλλαγές στο σώμα και στη βιοχημεία του αίματος των ποντικών [224, 225]. Επομένως, η μερική αναστολή της GSK-3 είναι ανεκτή στα κύτταρα θηλαστικών αλλά όχι στα παράσιτα και έτσι οι ιντιρουμπίνες θα μπορούν να αξιοποιηθούν για τη θεραπεία των παρασιτικών ασθενειών.

Το δοσολογικό σχήμα της θεραπείας που ακολουθήθηκε σε πειραματικό μοντέλο στα μολυσμένα Balb/C ποντίκια με *L. infantum* MON-1 παράσιτα, ήταν 7 δόσεις οι οποίες πραγματοποιήθηκαν σε διάστημα 14

ημερών (1 κάθε δεύτερη μέρα). Η δοσολογία αυτή επιλέχθηκε βάση προηγούμενης μελέτης που εξέταζε την ιντιρουμπίνη ακετοξίμη της 6-βρώμοιντιρουμπίνη (BIA) έναντι ποντικών που νοσούν από γλοιώμα [302]. Στην οξεία φάση της νόσου, στη θεραπεία με την 5-Me-6BIO, τα ποντίκια παρουσίασαν 63,8% μείωση του παρασιτικού φορτίου στο ήπαρ ($p=0,0090$) και 91% μείωση του παρασιτικού φορτίου στο σπλήνα ($p<0,0001$), ενώ η θεραπεία με την ιντιρουμπίνη **11**, είχε ως αποτέλεσμα μόνο την μείωση του παρασιτικού φορτίου στο σπλήνα με 48% ($p=0,0300$). Η μεγαλύτερη μείωση του παρασιτικού φορτίου στο σπλήνα σε σχέση με το ήπαρ εξηγείται από το γεγονός ότι σε αυτή τη φάση της ασθένειας το παρασιτικό φορτίο είναι ιδιαίτερα αυξημένο στο ήπαρ ($3-6 \times 10^6$ παράσιτα) αλλά όχι τόσο στο σπλήνα ($8-10 \times 10^3$ παράσιτα). Επομένως, με χαμηλότερο παρασιτικό φορτίο στο σπλήνα είναι πιο εύκολο για την ιντιρουμπίνη να αναστείλει την ανάπτυξη των παρασίτων.

Παρατηρείται ότι το παρασιτικό φορτίο στο ήπαρ δεν μειώνεται με την δράση της ιντιρουμπίνης **11** και η μείωση στο παρασιτικό φορτίο στο σπλήνα είναι χαμηλότερη από αυτή που παρατηρείται με τη δράση της 5-Me-6BIO. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται είτε στο μεταβολισμό της ιντιρουμπίνης **11** από το ήπαρ με αποτέλεσμα η συγκέντρωση που τελικά φτάνει στα παράσιτα να μην είναι επαρκής και αποτελεσματική, είτε το ανάλογο αυτό δεν στοχεύει το ήπαρ των ποντικών και δρα κατευθείαν στο σπλήνα. Στο τελευταίο μπορεί να οφείλεται επίσης η μακροσκοπική παρατήρηση του διογκωμένου σπλήνα των ποντικών που δέχονται τη θεραπεία αυτή. Για να διευκρινιστεί ο λόγος της μη ανταπόκρισης στη θεραπεία με την ιντιρουμπίνη **11**, στο μέλλον έχουν προγραμματιστεί να γίνουν πειράματα για το μεταβολισμό των ουσιών στα όργανα των ποντικών με ιστοπαθολογικό έλεγχο.

Η θεραπεία με την 5-Me-6BIO μετά από 3 και 7 δόσεις παρουσιάζει παρόμοια ποσοστά μείωσης του παρασιτικού φορτίου στο ήπαρ και στο σπλήνα. Παρόλα αυτά, η θεραπεία αναστέλλει την εκθετική αύξηση του παρασιτικού φορτίου που παρατηρείται στην ομάδα που χορηγήθηκε μόνο διαλύτης (DMSO-PBS) και κρατά χαμηλά επίπεδα παρασίτων στα όργανα (γράφημα 1).

Στη χρόνια φάση της νόσου, παρατηρούμε ότι τα ποντίκια που δέχθηκαν 7 δόσεις της θεραπείας με την 5-Me-6BIO, παρουσίασαν 78%

μείωση του παρασιτικού φορτίου στο ήπαρ ($p=0,0896$) και 44,8% μείωση του παρασιτικού φορτίου στο σπλήνα ($p=0,1305$), ενώ η θεραπεία με την ιντιρουμπίνη **11**, είχε ως αποτέλεσμα 75,6% μείωση του παρασιτικού φορτίου στο ήπαρ ($p=0,1040$) και 56% μείωση του παρασιτικού φορτίου στο σπλήνα ($p=0,1057$) σε σχέση με τα ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε απλά μείγμα διαλύτη DMSO-PBS. Η μεγαλύτερη μείωση του παρασιτικού φορτίου στο ήπαρ σε σχέση με το σπλήνα στη χρόνια φάση της νόσου εξηγείται από το γεγονός ότι σε αυτή τη φάση υπάρχει αυτοθεραπεία του ήπατος ενώ το παρασιτικό φορτίο στο σπλήνα συνεχώς αυξάνεται ($3-6 \times 10^6$ παράσιτα). Επομένως, ο συνδυασμός θεραπείας με την ιντιρουμπίνη και της μείωσης του παρασιτικού φορτίου στο ήπαρ από την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή, έχει ως αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη μείωση του παρασιτικού φορτίου στον ;όργανο αυτό σε σχέση με τον ;όργανο του σπλήνα.

Τέλος, μετά από χορήγηση του φαρμάκου ελέγχου Glucantime σε συγκεκριμένο δοσολογικό σχήμα που χρησιμοποιείται και ενδείκνεται για το φάρμακο αυτό, παρατηρείται ότι μειώνεται τόσο στο σπλήνα όσο και στο ήπαρ το παρασιτικό φορτίο κατά 91% και 91,27% αντίστοιχα (γράφημα 6). Επομένως, το φάρμακο ελέγχου δεν εξαλείφει ούτε αυτό πλήρως το παρασιτικό φορτίο στα όργανα. Επίσης, το φάρμακο ελέγχου χρησιμοποιείται σε μεγαλύτερη δόση (40mg/kg) από αυτή που χρησιμοποιήθηκε στη θεραπεία με τα ανάλογα ιντιρουμπινών (20mg/Kg) και οι συνολικές δόσεις ανά ποντίκι ήταν περισσότερες στο δοσολογικό σχήμα του φαρμάκου ελέγχου (10 δόσεις) από ότι στο δοσολογικό σχήμα που χρησιμοποιήσαμε για τις ιντιρουμπίνες (7 δόσεις). Έτσι, οι ιντιρουμπίνες **11** και 5-Me-6BIO ίσως μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε πειραματικό μοντέλο σε συνδυασμό με το φάρμακο ελέγχου Glucantime για να ελεγχθεί η πιθανότητα καλύτερης απόδοσης έναντι του παρασιτικού φορτίου στη σπλαχνική λεισμανίαση με την συνδυαστική αυτή θεραπεία.

Συμπερασματικά, παρατηρούμε ότι οι ιντιρουμπίνες παρουσιάζουν αρκετά καλή αντιλειτουργική δράση και *in vivo* χωρίς να παρουσιάζουν εμφανή τοξικότητα στα ποντίκια Balb/C, με την 5-Me-6BIO να είναι η πιο υποσχόμενη από τις 2 που εξετάστηκαν. Οι ιντιρουμπίνες αυτές θα μπορούσαν να μελετηθούν σε διαφορετικό δοσολογικό σχήμα ή να αποτελέσουν πρότυπες ουσίες για τη σύνθεση πιο αποτελεσματικών ως προς

τη θεραπεία της νόσου αναλόγων. Παράλληλα, θα πρέπει στο μέλλον να ελεγχθεί αν η επίδραση των ιντιρουμπινών αυτών κατά τη διάρκεια της θεραπείας, διατηρείται και μετά τη λήξη της θεραπείας αλλά και να διερευνηθεί αν οι ιντιρουμπίνες δρουν σε μονοπάτια του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή που εμπλέκονται στους αντιπαρασιτικούς μηχανισμούς έναντι της πειραματικής μόλυνσης.

5.2 *Trypanosoma brucei*

Οι ιντιρουμπίνες έχουν αναδειχθεί ως ιδανικοί αναστολείς για την στοχευμένη θεραπεία της λείσμανιάσης μέσω της αναστολής των κινασών CRK3 και *LdGSK-3s* [191, 218]. Παράλληλα, πειράματα επαγωγής επεμβατικού RNAi ανέδειξαν την τρυπανοσωμική *TbGSK-3s* ως απαραίτητη για την επιβίωση των BSF *T. brucei* ('θηλαστική' μορφή στη κυκλοφορία του αίματος) και ιδανική για να αποτελέσει στόχο φαρμάκων για τη θεραπεία της ανθρώπινης αφρικανικής τρυπανοσωμίας (HAT) [205]. Αναστολείς της παρασιτικής κινάσης έχουν ήδη προσδιοριστεί ότι κατέχουν αντιτρυπανοσωμική δράση [205, 226]. Παρόλα αυτά, μέχρι σήμερα οι ιντιρουμπίνες δεν έχουν ελεγχθεί για τις αντιτρυπανοσωμικές τους ιδιότητες.

Στην παρούσα εργασία, 69 ανάλογα ιντιρουμπίνης που περιλαμβάνουν την ιντιρουμπίνη, τη 3'-μεθοξίμη της ιντιρουμπίνης, τις 6-βρώμο και 5-βρώμο υποκατεστημένες ιντιρουμπίνες, τις 5-άμινο υποκατεστημένες και 6-αλογόνο υποκατεστημένες ιντιρουμπίνες, τα 3'-υποκατεστημένα 6BIO ανάλογα, τις 6-υποκατεστημένες 5-νίτρο ιντιρουμπίνες και τις 7-υποκατεστημένες ιντιρουμπίνες, μελετήθηκαν για την αντιτρυπανοσωμική τους δράση. Το πλεονέκτημα των *T. brucei* παρασίτων σε σχέση με τη *Leishmania* είναι ότι η αναστολή των ιντιρουμπινών πραγματοποιείται κατευθείαν στη 'θηλαστική' μορφή, η οποία αναπτύσσεται εξωκυττάρια, στο αίμα του ξενιστή. Αυτό καθιστά το *T. brucei* ως μοντέλο για ανθρώπινες ασθένειες που προκαλούνται από ένα παθογόνο οργανισμό κατευθείαν στο αίμα, σε αντίθεση με τη *Leishmania* που αποτελεί ιδανικό μοντέλο για τη μελέτη του ενδοκυτταρικού παρασιτισμού (ακόμα και για βακτήρια όπως το μυκοβακτήριο *tuberculosis* [303, 304]).

Από τις 69, 32 ιντιρουμπίνες εμφάνισαν ισχυρή αντιτρυπανοσωμική δράση *in vitro* IC₅₀: 0,050-3,2 μ M (πίνακας 6). Τα ανάλογα που αναστέλουν

την ανάπτυξη των *T. brucei* παρασίτων είναι περισσότερα και ανήκουν σε περισσότερες ομάδες υποκαταστάσεων από αυτά που βρέθηκαν να αναστέλουν την ανάπτυξη των *L. donovani* παρασίτων. Μόλις 13 ιντιρουμπίνες (πίνακας 6-κόκκινο χρώμα) από τις 69 αναστέλλουν την ανάπτυξη των *L. donovani* παρασίτων στη συγκέντρωση που έχουμε ορίσει σαν όριο ($<3\mu\text{M}$) όπως φαίνεται από τον πίνακα 6 και από προηγούμενες μελέτες [191], έναντι των 32 από τις 69 που αναστέλλουν την τρυπομαστιγωτή μορφή του τρυπανόσωματος. Οι ιντιρουμπίνες με αντιλεϊσμανιακή δράση όπως οι 6BIO, 6-BIA και 5-Me-6BIO παρουσιάζουν επίσης αντιτρυπανοσωμική δράση η οποία είναι ισχυρότερη με IC_{50} $0,17\pm 0,1$, $0,19\pm 0,1$ και $0,6\pm 0,2\mu\text{M}$ αντίστοιχα (πίνακας 6). Επίσης, τα 3'-υποκατεστημένα 6BIO ανάλογα εμφανίζουν αντιλεϊσμανιακή δράση με IC_{50} = $0,65$ - $1,5\mu\text{M}$ έναντι της προμαστιγωτής μορφής *L. donovani* και $0,59$ - $2,44\mu\text{M}$ έναντι της αμαστιγωτής μορφής *L. donovani* (πίνακας 3). Όσον αφορά τη αντιτρυπανοσωμική δράση αυτών των αναλόγων, φαίνεται να είναι 10 φορές ισχυρότερη έναντι της τρυπομαστιγωτής μορφής *T. brucei* (IC_{50} = $0,05$ - $0,6\mu\text{M}$, πίνακας 6). Από τη μελέτη αναγνωρίστηκαν και 19 ανάλογα (πίνακας 6-έντονη μαύρη γραμματοσειρά bold) τα οποία εμφανίζουν μόνο αντιτρυπανοσωμική δράση. Τα ανάλογα αυτά είτε είναι υποκατεστημένα με πιο ογκώδεις ομάδες (NO_2 , NH_2 , F, Cl, I) στην 5 ή 6 θέση του σκελετού της ιντιρουμπίνης, ή είναι 7-υποκατεστημένες ιντιρουμπίνες ή είναι ανάλογα υποκατεστημένα με μακριές εύκαμπτες αλυσίδες στην 3' θέση, γεγονός που μπορεί να επηρεάζει την εμφάνιση δράσης στα 2 διαφορετικά παράσιτα. Τα N1-μεθυλο υποκατεστημένα ανάλογα των 6BIO και 6-BIA δεν εμφανίζουν αντιτρυπανοσωμική δράση και συμφωνούν με τα αποτελέσματα έναντι των παρασίτων *L. donovani* [191] και τη βιβλιογραφία όπου αναφέρεται πως η τροποποίηση αυτή καθιστά τις ιντιρουμπίνες ανενεργές ως προς την αναστολή κινασών [182]. Γενικά, οι 32 αναστολείς της ανάπτυξης αναδεικνύονται ως ισχυροί αναστολείς για την αντιμετώπιση της ανθρώπινης αφρικανικής τρυπανοσωμίας (HAT) καθώς η πλειοψηφία αυτών (25 ανάλογα από τα 32) εμφανίζει δείκτη επιλεκτικότητας $\text{S.I.} > 10$ σε σχέση με τα κύτταρα θηλαστικών (κυτταρική σειρά μακροφάγων J774.1) (πίνακας 6).

Στη συνέχεια, μελετήθηκε εάν οι 32 ιντιρουμπίνες που αναγνωρίστηκαν ως αναστολείς της ανάπτυξης των παρασίτων, αναστέλουν επίσης την

TbGSK-3s. Η *TbGSK-3s* η οποία παρουσιάζει 65% ομοιότητα με την *LmajGSK-3s*, έχει μελετηθεί πρόσφατα και έχει αναδειχθεί ως πιθανός στόχος για τη θεραπεία της HAT [205]. Η κλωνοποίηση, η έκφραση και η απομόνωση της *TbGSK-3s* έγινε με βακιλοϊό σε κυτταρική σειρά εντόμων SF9.

Τα πειράματα αναστολής ανέδειξαν 29 ιντιρουμπίνες που στοχεύουν ισχυρά ή ικανοποιητικά την *TbGSK-3s* καθώς εμφανίζουν τιμές IC_{50} χαμηλότερες του $1\mu M$ ($0,021\mu M$ - $0,847\mu M$). Η 6-FIO στοχεύει την κινάση με IC_{50} ίσο με $1,077\mu M$, ενώ το ανάλογο **15** της 6BIO δεν στοχεύει τόσο ισχυρά την *TbGSK-3s* (IC_{50} : $2,277\mu M$). Τέλος, η 7-BIO φαίνεται να μην έχει ως στόχο την τρυπανοσωμική GSK-3s ($IC_{50} > 3,33\mu M$). Μάλιστα, η 7-BIO έχει συντεθεί και έχει πρόσφατα δειχτεί ότι στα ανθρώπινα κύτταρα στοχεύει τις κινάσες DYRK1α και DYRK2 ενώ δε στοχεύει καθόλου ($>10\mu M$) την GSK-3 και την CDK5 [188]. Η ομόλογη κινάση της DYRK1α ή/και της DYRK2 στα *T. brucei* παράσιτα λοιπόν ίσως αποτελεί το στόχο του αντιτρυπανοσωμικού αυτού αναστολέα.

Είναι αξιοσημείωτο πως αναγνωρίστηκαν και 2 αναστολείς, το ανάλογο **36** και το ανάλογο **41** τα οποία φαίνεται να είναι επιλεκτικοί προς τη παρασιτική κινάση έναντι της ανθρώπινης. Η ιντιρουμπίνη **36** έχει IC_{50} ίσο με $0,047\mu M$ έναντι της *TbGSK-3s* και $IC_{50}=2,2\mu M$ έναντι της ανθρώπινης GSK-3 ενώ η ιντιρουμπίνη **41** (7-trifluoromethyl-3'-oxim-6'-carboxymethyl-indirubin) στοχεύει ικανοποιητικά τη τρυπανοσωμική κινάση ($IC_{50}=0,847\pm 0,303\mu M$) αλλά δεν φαίνεται να στοχεύει την ομόλογη ανθρώπινη κινάση ($>10\mu M$) (πίνακας 9). Οι 2 αυτές ιντιρουμπίνες δεν εμφανίζουν ισχυρή αντιλεϊσμανική δράση ($IC_{50} > 3\mu M$) που σημαίνει ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για μοριακές μελέτες της τρυπανοσωμικής κινάσης, καθώς και να αποτελέσουν το σκελετό ανάπτυξης για μια αντιτρυπανοσωμική θεραπεία. Τέλος, παρατηρείται πως όλες οι ιντιρουμπίνες φαίνεται να κατέχουν πιο έντονη αντιτρυπανοσωμική αντί αντιλεϊσμανιακή δράση, γεγονός το οποίο μπορεί να οφείλεται είτε : α) στο μεγαλύτερο μέγεθος του ενεργού κέντρου της κινάσης *TbGSK-3s* σε σχέση με το ενεργό κέντρο της *LmajGSK-3s* [226], ή β) σε διαφορετικά επίπεδα έκφρασης της κινάσης στα κύτταρα *Leishmania* και *T. brucei*.

Η αναγκαιότητα της *TbGSK-3s* στη βιολογία των *T. brucei* επιβεβαιώθηκε με πειράματα επαγωγής του επεμβατικού RNAi^{*TbGSK-3s*} όπου με τη πάροδο του χρόνου και τη μείωση των επιπέδων έκφρασης της κινάσης,

μειώνεται η ανάπτυξη των παρασίτων (Γράφημα 7). Ταυτόχρονα, τα πειράματα αυτά επιβεβαίωσαν το ρόλο της κινάσης στη μίτωση ή/και την κυτοκίνηση και έρχονται σε συμφωνία με πρόσφατα δεδομένα από άλλη μελέτη [233]. Επίσης, προσομοιάζουν με τα χαρακτηριστικά των παρασίτων *L. donovani* μετά από αναστολή της *LdGSK-3s* μετά από επώαση με την 5-Me-6BIO. Πιο συγκεκριμένα, μετά από 72h επαγωγής επεμβατικού RNAi^{TbGSK} παρουσιάζονται παράσιτα με αλλοιωμένη κυτταρική μεμβράνη, με συμπυκνωμένη πυρηνική χρωματίνη και τεμαχισμένο DNA που αντιστοιχεί σε χαρακτηριστικό αποπτωτικών κυττάρων. Παράλληλα, αυξάνονται σημαντικά τα πολυπλοειδή παράσιτα δηλαδή τα παράσιτα τα οποία διαθέτουν πάνω από 2 πυρήνες ή/και κινητοπλάστες, γεγονός που δείχνει ότι ο κυτταρικός κύκλος και διπλασιασμός του DNA των παρασίτων συνεχίζει να λειτουργεί αλλά τα παράσιτα δεν μπορούν να διαχωριστούν με μίτωση ή παρεμποδίζεται σε αυτά η κυτοκίνηση (διαχωρισμός κυττάρων κατά τη μίτωση). Τα κύτταρα που δε μπορούν να διαχωριστούν στη συνέχεια οδηγούνται σε θάνατο και εμφανίζουν διαφορετική μορφολογία καθώς έχουν στρογγυλό κυτταρικό σχήμα και ελαττωμένο όγκο αντί της φυσιολογικής επιμηκυσμένης μορφολογίας των κυττάρων-μαρτύρων που διαθέτουν ένα πυρήνα (N) και έναν κινητοπλάστη (K) (εικόνα 46). Οι κυτταρικοί αυτοί τύποι παρατηρούνται γενικά στις τρυπανοσωματίδες και προέρχονται από ανώμαλη κυτταρική διαίρεση [218, 296]. Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώνονται επίσης από την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου όπου τα κύτταρα που βρίσκονται στην G1 φάση συνεχώς μειώνονται (έως 25,33% στις 72h) ενώ τα πολυπλοειδή κύτταρα και τα κύτταρα με τεμαχισμένο DNA σημειώνουν αύξηση (19,97% και 2,44% αντίστοιχα στις 72h) μετά την επαγωγή του RNAi. Τα κύτταρα που βρίσκονται στην G2/M φάση μέχρι τις 48h επαγωγής αυξάνονται σε ποσοστό 31,94% και στη συνέχεια ακολουθούν πτωτική τάση (25,05% στις 72h επώασης). Τέλος, η επαγωγή του επεμβατικού RNAi^{TbGSK-3s} των παρασίτων οδηγεί σε επαγωγή της απόπτωσης, καθώς αρχικά στις 24h μετά την επαγωγή έχουμε αύξηση των πρώιμων αποπτωτικών κυττάρων (8,87%) που στη συνέχεια σταδιακά μετατρέπονται σε αποπτωτικά τελικής φάσης και νεκρωτικά κύτταρα (15,49% και 12,68% στις 72h αντίστοιχα) (εικόνα 49). Τα ζωντανά κύτταρα επίσης μειώνονται σταδιακά στο 69,17% μετά από 72h επαγωγής του RNAi (εικόνα 49).

Στη συνέχεια, καθώς τα παραπάνω αποτελέσματα συμφωνούν με τη βιβλιογραφία ότι η *TbGSK-3s* είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη των παρασίτων *T. brucei* και ότι η μείωση των επιπέδων της οδηγεί τα παράσιτα σε θάνατο [205], ερευνήσαμε περαιτέρω τον πιθανό ρόλο της μέσω του ενδοκυτταρικού εντοπισμού. Ο εντοπισμός της *TbGSK-3s* σε *T. brucei* τρυπομαστιγωτά και προκυκλικά έχει παρόμοια κατανομή με αυτή που εμφανίζει η *LdGSK-3s* στα *L. donovani* προμαστιγωτά λογαριθμικής φάσης. Συγκεκριμένα, η *TbGSK-3s* εμφανίζει μία διάσπαρτη κατανομή στο κυτταρόπλασμα του παρασίτου αλλά εντοπίζεται και στο κινητοπλάστη και στο μαστίγιο (εικόνα 45). Στο φύκος *C. Reinhardtii*, η GSK-3 εντοπίζεται επίσης στο μαστίγιο και μάλιστα παίζει σημαντικό ρόλο στην επιμήκυνση αυτού ενώ φαίνεται να λειτουργεί ως πρωτεΐνη μεταφοράς άλλων πρωτεϊνών και στοιχείων μέσα στο μαστίγιο (intraflagellar transport protein-IFT) [305]. Η *TbGSK-3s* δε φαίνεται να λειτουργεί ως πρωτεΐνη μεταφοράς άλλων πρωτεϊνών και στοιχείων μέσα στο μαστίγιο καθώς δεν βρέθηκε συν-εντοπισμός της *TbGSK-3s* και του IFT172 (εικόνα 44). Ο σπικτός εντοπισμός της *TbGSK-3s* στο παράσιτο και ιδιαίτερα στο μαστίγιο και το βασικό σωμάτιο πιθανόν σχετίζεται με τη κυτταρική διαίρεση του παρασίτου. Στα κύτταρα θηλαστικών, η GSK-3 εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα ενώ στην S φάση του κυτταρικού κύκλου εντοπίζεται και στον πυρήνα [306, 307]. Γενικά, στα κύτταρα θηλαστικών η GSK-3 έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού, όπως η tau, η MAP2C και η MAP1B [308]. Στη *Leishmania*, έχει επίσης δειχθεί η μετατόπιση της *LdGSK-3s* στον πυρήνα σε προμαστιγωτά στατικής φάσης [191]. Καθώς τα προμαστιγωτά στατικής φάσης βρίσκονται ως επί το πλείστον στην G1 φάση του κυτταρικού κύκλου [309, 310], πιθανόν η μετατόπιση της *LdGSK-3s* στον πυρήνα σε αυτή τη φάση του κυτταρικού κύκλου δείχνει ότι είναι απαραίτητη η κινάση για τη μετάβαση των κυττάρων από την G1 στην S φάση του κυτταρικού κύκλου [191]. Όσον αφορά την *TbGSK-3s*, της έχει πρόσφατα αποδοθεί σημαντικός ρόλος στην κυτοκίνηση ή/και τη μίτωση του παρασίτου στην τρυπομαστιγωτή μορφή των *T. brucei* παρασίτων [233]. Ο ρόλος αυτός θα μπορούσε να εξηγηθεί από τον εντοπισμό της κινάσης τόσο στον κινητοπλάστη, στον κυτταροσκελετό, όσο και στο μαστίγιο του παρασίτου.

Παρατηρώντας αφενός την επίδραση που έχει η επαγωγή του επεμβατικού RNAi^{TbGSK-3s} στο κυτταρικό κύκλο και κυτταρικό θάνατο των παρασίτων και αφετέρου τη μη απόλυτη συσχέτιση στην ικανότητα της εκάστοτε ιντιρουμπίνης να αναστέλλει την κινάση με αυτή έναντι των παρασίτων, το επόμενο στάδιο της μελέτης ήταν ο έλεγχος της επίδρασης κάποιων αναλόγων στον κυτταρικό κύκλο και κυτταρικό θάνατο των *T. brucei* τρυπομαστιγωτών παρασίτων. Μελετήσαμε λοιπόν αν το μοτίβο δράσης που εμφανίζουν οι ιντιρουμπίνες που επιλέξαμε στον κυτταρικό κύκλο και θάνατο των παρασίτων είναι το ίδιο που εμφανίζουν τα παράσιτα μετά από επαγωγή του παρεμβατικού RNAi^{TbGSK-3s}. Η απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και θανάτου μετά την επώαση των παρασίτων με διάφορες ιντιρουμπίνες που εμφάνισαν αντιρυπανοσωμική δράση, εμφανίζει διαφορετικό μοτίβο για κάθε μία ιντιρουμπίνη. Από αυτές, οι ιντιρουμπίνες **10** και **4** εμφανίζουν παρόμοιο προφίλ με την απορρύθμιση που εμφανίζεται μετά την επαγωγή του RNAi^{TbGSK-3s} τόσο στον κυτταρικό κύκλο (εικόνα 52), όσο και στον κυτταρικό θάνατο (εικόνα 53). Η επώαση με την 5-Me-6BIO και την 6-ClIO παρουσιάζει παρόμοιο προφίλ με αυτή της επαγωγής του παρεμβατικού RNAi στο κυτταρικό κύκλο με ταυτόχρονα όμως πιο έντονη αύξηση των κυττάρων με τεμαχισμένο DNA (υπό-G0/G1 φάση: 37,7% και 13,8% αντίστοιχα στις 72h). Η 6-ClIO στα παράσιτα *L. donovani* στοχεύει πιο επιλεκτικά την CRK3 (IC₅₀: 0,04 και 0,2μM αντίστοιχα) και η 5-Me-6BIO στοχεύει την *LdGSK-3s* (IC₅₀: 0,09μM) αλλά και την CRK3 (IC₅₀: 0,65μM) [191]. Η CRK3 στα τρυπανοσώματα *T. brucei* παίζει σημαντικό ρόλο στην ολοκλήρωση της G2/M φάσης των παρασίτων [299]. Ίσως λοιπόν, οι ιντιρουμπίνες αυτές να στοχεύουν, εκτός της *TbGSK-3s*, και την CRK3 στα *T. brucei* τρυπομαστιγωτά, όπως και στα παράσιτα *L. donovani* και έτσι εμφανίζουν ελαφρώς διαφοροποιημένο προφίλ στον κυτταρικό κύκλο των παρασίτων από ότι η αναστολή μόνο της *TbGSK-3s*. Από την άλλη μεριά, η 6BIO και η 6-βρώμο-3'διεθυλοφωσφατοξίμη προκαλούν διαφορετικό προφίλ στο κυτταρικό κύκλο μετά από επώαση με τα παράσιτα καθώς αυξάνουν σημαντικά τα πολυπλοειδή κύτταρα καθώς και τα κύτταρα με τεμαχισμένο DNA.

Όσον αφορά το κυτταρικό θάνατο, ελέγχθηκε η ρευστότητα και η ακεραιότητα της παρασιτικής μεμβράνης και τα διάφορα ανάλογα φαίνεται επίσης να προκαλούν διαφορετικά μοτίβα κυτταρικού θανάτου στα παράσιτα

T. brucei. Σε αντίθεση λοιπόν με τις ιντιρουμπίνες **10** και **4**, οι ιντιρουμπίνες 6BIO, 6-CIIO, 6-βρώμο-3'διεθυλοφωσφατοξίμη και 5-Me-6BIO επάγουν την αύξηση των νεκρωτικών και μεταγενέστερα αποπτωτικών παρασίτων χωρίς την παρουσία αποπτωτικών κυττάρων πρώιμου σταδίου. Από αυτές, η επώαση των κυττάρων με την ιντιρουμπίνη 5-Me-6BIO προκαλεί αύξηση κυρίως του πληθυσμού των μεταγενέστερα αποπτωτικών παρασίτων και όχι τόσο των νεκρωτικών κυττάρων, σε αντίθεση με τις άλλες 3 ιντιρουμπίνες οι οποίες επάγουν την αύξηση κυρίως του νεκρωτικού πληθυσμού (εικόνα 53).

Συμπερασματικά, οι ιντιρουμπίνες **10** και **4** φαίνεται να δρουν σχεδόν αποκλειστικά μέσω της παρεμπόδισης της *TbGSK-3s* στα παράσιτα, αφού προσομοιάζει η δράση τους με αυτή της επαγωγής επεμβατικού RNAi για την κίνηση, τόσο στο κυτταρικό κύκλο όσο και στον κυτταρικό θάνατο. Αξίζει να σημειωθεί ότι αυτές οι ιντιρουμπίνες ανήκουν στην ομάδα των 3'υποκατεστημένων αναλόγων της 6BIO, οι οποίες βρέθηκαν να έχουν αυξημένη επιλεκτικότητα προς την *LdGSK-3s* έναντι της CRK3 στα παράσιτα *L. donovani*. Τα υπόλοιπα ανάλογα που ελέγξαμε, φαίνεται να στοχεύουν παράλληλα με την *TbGSK-3s*, διαφορετικές πρωτεΐνες στόχους στα τρυπομαστιγωτά *T. brucei* παράσιτα, καθώς διαφοροποιούν με διαφορετικό τρόπο η καθεμία τόσο τον κυτταρικό κύκλο όσο και τον κυτταρικό θάνατο των παρασίτων από το μοτίβο που λαμβάνεται στα παράσιτα μετά από επαγωγή του RNAi^{*TbGSK-3s*}.

Με τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώνεται ότι η *TbGSK-3s* μπορεί να αποτελέσει φαρμακευτικό στόχο για τη θεραπεία της HAT. Επίσης στα πλαίσια αυτής της διδακτορικής διατριβής αναγνωρίστηκαν ικανοί και πολλά υποσχόμενοι αναστολείς της ανάπτυξης των παρασίτων οι οποίοι ανήκουν στα ανάλογα των ιντιρουμπινών και λειτουργούν κυρίως μέσω της παρεμπόδισης της *TbGSK-3s*. Σε κάποιες περιπτώσεις όμως μερικά ανάλογα ιντιρουμπίνης φαίνεται πως πιθανόν έχουν και άλλους παρασιτικούς στόχους που πιθανότατα ανήκουν στην ομάδα των κινασών. Είναι αξιοσημείωτο πάντως ότι οι ιντιρουμπίνες **36** και **41** φαίνεται να είναι επιλεκτικοί αναστολείς της παρασιτικής κίνησης σε σχέση με την ανθρώπινη GSK-3 και μπορούν να αποτελέσουν πρότυπες δομές για την ανάπτυξη καινούριων φαρμάκων για τον έλεγχο της ανθρώπινης αφρικανικής τρυπανοσωμίας.

5.3 *Trypanosoma cruzi*

Στην τελευταία ενότητα της παρούσας εργασίας εξετάστηκε η αντιτρυπανοσωμική δράση των 69 ιντιρουμπινών έναντι των *T. cruzi* παρασίτων τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Είναι η πρώτη φορά που γίνεται διερεύνηση της δράσης των ιντιρουμπινών έναντι των τρυπανοσωμάτων *T. cruzi*, τα οποία επίσης ανήκουν στην οικογένεια των τρυπανοσωματίδων.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το εύρημα ότι μόνο 7 ιντιρουμπίνες παρουσίασαν δράση έναντι της τρυπομαστιγωτής (IC_{50} : 0,251-1,303 μ M) μορφής των παρασίτων. Μόνο 4 από αυτές μελετήθηκαν έναντι της αμαστιγωτής μορφής του παρασίτου καθώς οι υπόλοιπες παρουσίασαν υψηλή κυτταροτοξικότητα έναντι των μακροφάγων των θηλαστικών (πίνακας 10). Από αυτές, οι 3 ιντιρουμπίνες ανήκουν στην ομάδα των 3'υποκατεστημένων-6BIO αναλόγων ενώ η μία είναι 7-υποκατεστημένη ιντιρουμπίνη (πίνακας 10). Αξιοσημείωτο είναι το εύρημα πως ιντιρουμπίνες οι οποίες είναι ισχυροί αναστολείς των *L. donovani* και *T. brucei* παρασίτων (π.χ. 6BIO, 5-Me-6BIO), δεν εμφανίζουν κάποια δράση έναντι των *T. cruzi* τρυπομαστιγωτών. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στα ακόλουθα: α) στα διαφορετικά επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών στόχων των ιντιρουμπινών στα διαφορετικά γένη παρασίτων, β) στην ενδεχόμενη διαφορετική λειτουργία των πρωτεϊνών αυτών στα 3 γένη, γ) στη διαφορετική πρόσδεση των ιντιρουμπινών στα ενεργά κέντρα των ομόλογων κινασών ή/και δ) στη στόχευση διαφορετικών πρωτεϊνών/κινασών στα 3 γένη παρασίτων.

Σε γενικές γραμμές τα 3 αυτά γένη των τρυπανοσωματίδων όπως έχει αναφερθεί και στην εισαγωγή έχουν πολλές ομοιότητες αλλά διαφέρουν σε αρκετά σημεία και το καθένα από αυτά διαθέτει ένα διαφορετικό και χαρακτηριστικό κύκλο ζωής. Ίσως λοιπόν, ο ρόλος, η ποσότητα έκφρασης και ο εντοπισμός των κινασών/στόχων των ιντιρουμπινών κατά τη διάρκεια του εκάστοτε βιολογικού κυτταρικού κύκλου στα διάφορα γένη θα μπορούσαν να εξηγήσουν τους λόγους που διαφορετικές ιντιρουμπίνες φαίνεται να διαθέτουν δράση έναντι των τόσο κατά τα άλλα όμοιων παρασίτων.

Οι ιντιρουμπίνες **11** και **17**, φαίνεται πως έχουν την ισχυρότερη δράση έναντι της ανάπτυξης τόσο των τρυπομαστιγωτών (IC_{50} : 0,251 και 0,448 μ M αντίστοιχα) όσο και των αμαστιγωτών παρασίτων (IC_{50} : 0,218 και 0,9 μ M

αντίστοιχα), με ταυτόχρονο υψηλό S.I έναντι των κυττάρων του ξενιστή (κυτταρική σειρά μακροφάγων J774.1) (S.I: 24 και 22 αντίστοιχα). Η ιντιρουμπίνη **10**, η οποία είναι η βασική μορφή του αναλόγου **11** (άλας της ιντιρουμπίνης), φαίνεται να έχει παρόμοια δράση αλλά ελάχιστα ηπιότερη δράση από το άλας της (IC₅₀: 0,704 και 0,615μM έναντι της τρυπομαστιγωτής και της αμαστιγωτής μορφής αντίστοιχα και S.I>14), που πιθανόν να οφείλεται στη μικρότερη διαλυτότητα της βάσης του αναλόγου σε σχέση με το άλας της. Η 7-υποκατεστημένη ιντιρουμπίνη, όπως έναντι των *T. brucei* παρασίτων, έτσι και έναντι των *T. cruzi* παρασίτων εμφανίζει ικανοποιητική αντιρυπανοσωμική δράση (IC₅₀: 1,303 και 1,518μM έναντι της τρυπομαστιγωτής και της αμαστιγωτής μορφής αντίστοιχα και S.I=7,6) αλλά ηπιότερη από τις 6-υποκατεστημένες ιντιρουμπίνες (πίνακας 10).

Οι 3'-υποκατεστημένες 6BIO ιντιρουμπίνες **10**, **11** και **17** (εικόνα 55), προκαλούν μέσα σε μόλις 24h επώασης με τα παράσιτα δραματική αύξηση των πληθυσμών των μεταγενέστερων αποπτωτικών (14,5, 12,9 και 25,5% αντίστοιχα) και νεκρωτικών παρασίτων (19,9, 21,9 και 25,5% αντίστοιχα), χωρίς παράλληλη εμφάνιση πρώιμων αποπτωτικών κυττάρων (3,1, 2,2 και 2,6% αντίστοιχα). Αντίθετα, το ανάλογο **17** το οποίο φέρει πυρρολιδικό δακτύλιο στη 3'θέση της 6BIO, προκαλεί αύξηση του ποσοστού των μεταγενέστερων αποπτωτικών και νεκρωτικών παρασίτων σε μόλις 6h επώασης με τα κύτταρα (15,6 και 28,6% αντίστοιχα). Τα ανάλογα αυτά προκαλούν διαφορετικό μοτίβο στο κυτταρικό θάνατο των τρυπανοσωμάτων *T. cruzi* από αυτό που είδαμε νωρίτερα στα παράσιτα *T. brucei* και *L. donovani*, στα οποία αρχικά εμφανίζεται αύξηση στον πληθυσμό πρώιμων αποπτωτικών κυττάρων και τα οποία στη συνέχεια μετατρέπονται σε μεταγενέστερα αποπτωτικά και νεκρωτικά κύτταρα. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται είτε σε διαφορετικό πρωτεϊνικό στόχο (πιθανότατα άλλη κινάση) αντί της GSK-3s στα *T. cruzi*, είτε σε διαφορετική λειτουργία της κινάσης αυτής στα παράσιτα αυτά.

Η διαφοροποίηση της δράσης της 7-υποκατεστημένης ιντιρουμπίνης φαίνεται στο διαφορετικό προφίλ κυτταρικού θανάτου όπου μετά από 6h εμφανίζεται αύξηση των πρώιμων αποπτωτικών κυττάρων (14,5%), τα οποία στις 24h έχουν μετατραπεί σε μεταγενέστερα αποπτωτικά και νεκρωτικά παράσιτα (17,1 και 13,8% αντίστοιχα). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η 7-

υποκατεστημένη ιντιρουμπίνη έχει διαφορετική πρωτεΐνη/κινάση ή διαφορετικό συνδυασμό πρωτεϊνών/κινασών ως στόχο στα *T. cruzi* παράσιτα από ότι οι 6-υποκατεστημένες ιντιρουμπίνες.

Η διαφοροποίηση αυτή της 7-υποκατεστημένης ιντιρουμπίνης σε σχέση με τη δράση των 6-υποκατεστημένων ιντιρουμπινών αντικατοπτρίζεται επίσης και στο φαινότυπο των κυττάρων που παρατηρείται στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Τα παράσιτα μετά από την επίδραση των 6-υποκατεστημένων ιντιρουμπινών **10**, **11** και **17** φαίνεται να προκαλούν απώλεια της ακεραιότητας της κυτταρικής αλλά και των εσωτερικών (πυρηνική) μεμβρανών (εικόνα 57) που συμφωνεί με την ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης. Παράλληλα, κύριο χαρακτηριστικό της επίδρασης των αναλόγων αυτών είναι η παρουσία τεμαχισμένου DNA (εικόνα 57), το οποίο συμφωνεί με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την κυτταρομετρία ροής όπου παρατηρούνται αυξημένα ποσοστά θετικών κυττάρων σημασμένων με PI. Τέλος, στην εικόνα 57 υπάρχει ένδειξη πιθανής ύπαρξης επαγωγής αυτοφαγίας στα *T. cruzi* τρυπομαστιγωτά παράσιτα μετά από επώαση με τις ιντιρουμπίνες **11** και **17**, η οποία όμως θα πρέπει να επιβεβαιωθεί με επιπλέον πειράματα. Αντίθετα, η επίδραση της 7-υποκατεστημένης ιντιρουμπίνης (**41**) στα παράσιτα, φαίνεται να προκαλεί επίσης απώλεια της ακεραιότητας των εσωτερικών μεμβρανών του κυττάρου (πυρηνική) (εικόνα 58) και την παρουσία τεμαχισμένου DNA αλλά επιπλέον προκαλεί αλλοίωση του ενδοπλασματικού δικτύου Golgi (εικόνα 58). Από τα παραπάνω δεδομένα, ενισχύεται η υπόθεση πως οι στόχοι των 6- και 7-υποκατεστημένων ιντιρουμπινών πιθανόν να είναι διαφορετικοί στα *T. cruzi* παράσιτα. Για να διερευνηθεί η υπόθεση αυτή θα πρέπει να γίνουν περαιτέρω πειράματα αναστολής κινασών από τις ιντιρουμπίνες στα *T. cruzi*.

Τα *in vivo* πειράματα με τις πιο δραστικές ιντιρουμπίνες πραγματοποιήθηκαν κατά την οξεία φάση της ασθένειας. Η μελέτη της χρόνιας φάσης της ασθένειας δεν είναι δυνατή, καθώς τα παράσιτα δεν μπορούν να ανιχνευθούν σε αυτή τη φάση και επομένως δεν θα μπορούσαμε να εκτιμήσουμε τη δράση των φαρμάκων. Από τις εξεταζόμενες ιντιρουμπίνες μόνο η ιντιρουμπίνη **11** παρουσίασε καλή αντιρυπανοσωμική δράση (μείωση της παρασιταιμίας στο αίμα κατά 56,13% ($p < 0,001$) και ταυτόχρονη αποτροπή της θνησιμότητας λόγω της ασθένειας. Συμπερασματικά, ο σκελετός της

ιντιρουμπίνης **11** θα μπορούσε είτε να διαφοροποιηθεί ώστε να δημιουργηθεί στο μέλλον ανάλογο ιντιρουμπίνης με ισχυρότερη δράση *in vivo* με απώτερο στόχο τη ανάπτυξη νέας γενιάς φαρμάκων για τη θεραπεία της αμερικάνικης τρυπανοσωμίας, ή να χρησιμοποιηθεί σε συνδυαστική θεραπεία με το βενδιμιδαζόλιο ώστε να δημιουργηθεί βέλτιστο σχήμα αντιμετώπισης της ασθένειας σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις των επιμέρους φαρμάκων.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ-ΑΡΤΙΚΟΛΕΞΑ-ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

AhR	aryl hydrocarbon receptor	LNA	Lymph node aspirate
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome	mAECT	mini Anion Exchange centrifugation technique
ALP	alkyl-lysophospholipids	MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
BSA	Bovine Serum Albumine	MCL	Mucocutaneous Leishmaniasis
BSF	Blood-stream Form	mHCT	mini haematocrit centrifugation technique
CATT	Card Agglutination Trypanosomiasis Test	MOPS	3-(N- morpholino)propanesulfonic acid
CDKs	Cyclin-dependent kinases	mRNA	Messenger RNA
CIP	calf intestinal alkaline phosphatase	NASBA	nucleic acid sequence based amplification
CK	Casein kinase	NO	nitric oxide
CL	Cutaneous Leishmaniasis	OC	oligochromatography
CLKs	cdc2-like kinases	PAF	<i>platelet-activating factor</i>
CML	Chronic myelogenous leukemia	PBS	Phosphate Buffered Saline
CRK	cdc2-related kinase	PCD	Programmed Cell-Death
c-Src	tyrosine-protein kinase Src	PCR	Polymerase Chain Reaction
DCL	diffuse cutaneous leishmaniasis	PI	Propidium Iodide
DMSO	Dimethyl-Sulfoxide	PKDL	Post-kala-azar dermal leishmaniasis
DRs	Death receptors	PLK	Polo-like kinases
DYRKs	Dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation-regulated kinases	PMSF	Phenyl-methanesulfonyl-fluoride
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	QBC	Quantitative buffy Coat
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	ROS	Reactive Oxygen Species
EtBr	Ethidium Bromide	RT-PCR	Real-time PCR
FACS	Fluorescence-activated cell sorting	SDS	Sodium Dodecyl-Sulfate
FAZ	flagellum attachment zone	spp.	species
FBS	Fetal Bovine Serum	SRA	serum-resistance-associated protein
FDA	Food and Drug Administration	SSC	Side Scattering
FSC	Forward Scattering	SSU rRNA	small subunit rRNA
GSK-3	Glycogen-synthase-kinase-3	STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
HAT	Human African Trypanosomiasis	TBF	Thick blood films
HIV	Human Immunodeficiency Virus	TgsGP	<i>T. b. gambiense</i> -specific glycoprotein
IFA	immunofluorescence assay	TK	tyrosine kinase
IFAT	indirect fluorescent antibody test	TKL	tyrosine kinase-like
INO-1	Myo-inositol-1 Phosphate-synthase	TNF	Tumor necrosis factors
IPTG	Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside	TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase TdT-mediated dUTP Nick end labeling
ITT	immune trypanolysis test	VL	Visceral Leishmaniasis
KATex	latex agglutination test	VSG	variable surface glycoprotein
kDNA	Kinetoplast DNA	ΔΨm	Inner mitochondrial membrane potential
LAMP	loop-mediated isothermal amplification	ΚΝΣ	Κεντρικό Νευρικό Σύστημα
LDL	Low-density lipoprotein		

Βιβλιογραφία

Κεφάλαιο 6

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Simpson, A.G., J.R. Stevens, and J. Lukes, *The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates*. Trends Parasitol, 2006. **22**(4): p. 168-74.
2. Podlipaev, S.A., *Insect trypanosomatids: the need to know more*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2000. **95**(4): p. 517-22.
3. Wallace, F.G., *The trypanosomatid parasites of insects and arachnids*. Exp Parasitol, 1966. **18**(1): p. 124-93.
4. Vickerman, K., "Not a very nice subject." *Changing views of parasites and parasitology in the twentieth century*. Parasitology, 2009. **136**(12): p. 1395-402.
5. Zidkova, L., et al., *Herpetomonas trimorpha* sp. nov. (Trypanosomatidae, Kinetoplastida), a parasite of the biting midge *Culicoides truncorum* (Ceratopogonidae, Diptera). Int J Syst Evol Microbiol, 2010. **60**(Pt 9): p. 2236-46.
6. Svobodova, M., et al., *Sergeia podlipaevi* gen. nov., sp. nov. (Trypanosomatidae, Kinetoplastida), a parasite of biting midges (Ceratopogonidae, Diptera). Int J Syst Evol Microbiol, 2007. **57**(Pt 2): p. 423-32.
7. Angela H. Lopes, T.S.-P., Felipe A. Dias, Marta T. Gomes, Giseli C. Rodrigues, Luciana T. Zimmermann, Thiago L. Alves e Silva and Alane B. Vermelho, *Trypanosomatids: Odd Organisms, Devastating Diseases*. The Open Parasitology Journal, 2010. **4**: p. 30-59.
8. Lukes, J., et al., *Evolutionary and geographical history of the Leishmania donovani complex with a revision of current taxonomy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(22): p. 9375-80.
9. Zemanova, E., et al., *The Leishmania donovani complex: genotypes of five metabolic enzymes (ICD, ME, MPI, G6PDH, and FH), new targets for multilocus sequence typing*. Int J Parasitol, 2007. **37**(2): p. 149-60.
10. Bray, R.S., *Leishmania*. Annu Rev Microbiol, 1974. **28**(0): p. 189-217.
11. Bryceson, A.D., R.S. Bray, and D.C. Dumonde, *Experimental cutaneous leishmaniasis. IV. Selective suppression of cell-mediated immunity during the response of guinea-pigs to infection with Leishmania enriettii*. Clin Exp Immunol, 1974. **16**(2): p. 189-202.
12. Steverding, D., *The history of African trypanosomiasis*. Parasit Vectors, 2008. **1**(1): p. 3.
13. Bruce, D., *Preliminary report on the tsetse fly disease or nagana in Zululand*. Durban: Bennett and Davis, 1895.
14. Dutton, J.E., *Preliminary note upon a trypanosome occurring in the blood of man*. Thompson Yates Lab Rep, 1902. **4**: p. 455-468.
15. JWW Stephens, H.F., *On the peculiar morphology of a trypanosome from a case of sleeping sickness and the possibility of its being a new species (T. rhodesiense)*. Proc R Soc Lond B 1910. **83**: p. 28-33.
16. Bastien, J., *The Kiss of Death: Chagas' Disease in the Americas*. University of Utah Press, Salt Lake City, 1998.
17. Kropf, S., *Carlos Chagas Virtual Library* (www4.prossiga.br/Chagas/centro.html).
18. Brener, Z., *Biology of Trypanosoma cruzi*. Annu Rev Microbiol, 1973. **27**: p. 347-82.
19. Besteiro, S., et al., *Protein turnover and differentiation in Leishmania*. Int J Parasitol, 2007. **37**(10): p. 1063-75.
20. Sherwin, T. and K. Gull, *The cell division cycle of Trypanosoma brucei brucei: timing of event markers and cytoskeletal modulations*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1989. **323**(1218): p. 573-88.

21. Sherwin, T. and K. Gull, *Visualization of deetyrosination along single microtubules reveals novel mechanisms of assembly during cytoskeletal duplication in trypanosomes*. Cell, 1989. **57**(2): p. 211-21.
22. Woods, A., et al., *Definition of individual components within the cytoskeleton of Trypanosoma brucei by a library of monoclonal antibodies*. J Cell Sci, 1989. **93 (Pt 3)**: p. 491-500.
23. Bastin, P., et al., *Flagellar morphogenesis: protein targeting and assembly in the paraflagellar rod of trypanosomes*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(12): p. 8191-200.
24. Bastin, P., et al., *Protein transport and flagellum assembly dynamics revealed by analysis of the paralysed trypanosome mutant snl-1*. J Cell Sci, 1999. **112 (Pt 21)**: p. 3769-77.
25. Kohl, L., T. Sherwin, and K. Gull, *Assembly of the paraflagellar rod and the flagellum attachment zone complex during the Trypanosoma brucei cell cycle*. J Eukaryot Microbiol, 1999. **46**(2): p. 105-9.
26. Ferrante, A. and A.C. Allison, *Alternative pathway activation of complement by African trypanosomes lacking a glycoprotein coat*. Parasite Immunol, 1983. **5**(5): p. 491-8.
27. Ferrante, A. and B. Rowan-Kelly, *Activation of the alternative pathway of complement by Acanthamoeba culbertsoni*. Clin Exp Immunol, 1983. **54**(2): p. 477-85.
28. Wikipedia, *Trypanosomatid*.
29. York, U.o.; Available from: <http://www.york.ac.uk/cii/media-library/>.
30. Lee, S.H., J.L. Stephens, and P.T. Englund, *A fatty-acid synthesis mechanism specialized for parasitism*. Nat Rev Microbiol, 2007. **5**(4): p. 287-97.
31. Trypanosomiasis. Available from: <http://www.ilri.org/InfoServ/Webpub/fulldocs/llrad90/Trypano.htm>.
32. de Souza, W., *A short review on the morphology of Trypanosoma cruzi: from 1909 to 1999*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 1999. **94 Suppl 1**: p. 17-36.
33. Docampo, R., et al., *Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man*. Nat Rev Microbiol, 2005. **3**(3): p. 251-61.
34. Alexander, J., A.R. Satoskar, and D.G. Russell, *Leishmania species: models of intracellular parasitism*. J Cell Sci, 1999. **112 Pt 18**: p. 2993-3002.
35. Peters, W., et al., *Leishmania infecting man and wild animals in Saudi Arabia. 8. The influence of prior infection with Leishmania arabica on challenge with L. major in man*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1990. **84**(5): p. 681-9.
36. Killick-Kendrick, R., *The life-cycle of Leishmania in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host*. Ann Parasitol Hum Comp, 1990. **65 Suppl 1**: p. 37-42.
37. Killick-Kendrick, R., D.H. Molyneux, and R.W. Ashford, *Ultrastructural observations on the attachment of Leishmania in the sandfly*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1974. **68**(4): p. 269.
38. Killick-Kendrick, R., D.H. Molyneux, and R.W. Ashford, *Leishmania in phlebotomid sandflies. I. Modifications of the flagellum associated with attachment to the mid-gut and oesophageal valve of the sandfly*. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1974. **187**(1089): p. 409-19.
39. Kamhawi, S., *Phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes?* Trends Parasitol, 2006. **22**(9): p. 439-45.
40. Sacks, D.L., *Leishmania-sand fly interactions controlling species-specific vector competence*. Cell Microbiol, 2001. **3**(4): p. 189-96.

41. Kamhawi, S., et al., *The vectorial competence of Phlebotomus sergenti is specific for Leishmania tropica and is controlled by species-specific, lipophosphoglycan-mediated midgut attachment*. Parasitology, 2000. **121** (Pt 1): p. 25-33.
42. Christodoulou, V., et al., *Re-emergence of visceral and cutaneous leishmaniasis in the Greek Island of Crete*. Vector Borne Zoonotic Dis, 2012. **12**(3): p. 214-22.
43. Killick-Kendrick, R. and J.A. Rioux, *Mark-release-recapture of sand flies fed on leishmanial dogs: the natural life-cycle of Leishmania infantum in Phlebotomus ariasi*. Parasitologia, 2002. **44**(1-2): p. 67-71.
44. Killick-Kendrick, R., *The biology and control of phlebotomine sand flies*. Clin Dermatol, 1999. **17**(3): p. 279-89.
45. Vouldoukis, I., et al., *CD23 and IgE expression during the human immune response to cutaneous leishmaniasis: possible role in monocyte activation*. Res Immunol, 1994. **145**(1): p. 17-27.
46. Cruz, I., et al., *Leishmania in discarded syringes from intravenous drug users*. Lancet, 2002. **359**(9312): p. 1124-5.
47. Mougneau, E., F. Bihl, and N. Glaichenhaus, *Cell biology and immunology of Leishmania*. Immunol Rev, 2011. **240**(1): p. 286-96.
48. Chang, K.P. and D. Fong, *Cell biology of host-parasite membrane interactions in leishmaniasis*. Ciba Found Symp, 1983. **99**: p. 113-37.
49. Villarreal, M.R., *Leishmania*.
50. <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/>.
51. <https://www.vectorbase.org/>.
52. Stuart, K., et al., *Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases*. J Clin Invest, 2008. **118**(4): p. 1301-10.
53. http://en.citizendium.org/wiki/trypanosoma_brucei.
54. <http://kids.britannica.com/comptons/art-7851/Tsetse-fly>.
55. Chagas, C., *Neue Trypanosomen: Vorlaufige mitteilung*. Archiv fur Schiffs-und Tropen-Hygiene. , 1909. **13**: p. 120-2.
56. Chagas, C., *Nouvelle espece de trypanosomiasse humaine*. . Bull Soc Pathol Exotique 1909. **2**: p. 304-7.
57. Chagas, C., *Nova tripanozomiasse humana: Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi n. Gen., n. Sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 1909. **1**: p. 159-218.
58. Julián González, F.A., Giuseppe Ambrosio and José Milei *Pathogenesis of Chronic Chagasic Myocarditis*, in *Diagnosis and Treatment of Myocarditis*, J.M.a.G. Ambrosio, Editor. 2013.
59. <http://news.co.cr/chagas-disease-as-the-new-aids-epidemic-is-target-of-much-misinformation/7557/>.
60. Coura, J.R., *[Transmission of chagasic infection by oral route in the natural history of Chagas disease]*. Rev Soc Bras Med Trop, 2006. **39** Suppl 3: p. 113-7.
61. Yoshida, N., *Molecular basis of mammalian cell invasion by Trypanosoma cruzi*. An Acad Bras Cienc, 2006. **78**(1): p. 87-111.
62. Schmunis, G.A., *Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2007. **102** Suppl 1: p. 75-85.
63. Teixeira, D.E., et al., *Interactive multimedia to teach the life cycle of Trypanosoma cruzi, the causative agent of Chagas disease*. PLoS Negl Trop Dis, 2012. **6**(8): p. e1749.
64. WHO, *Control of leishmaniasis*. WHO Technical Report Series, 2010(949).
65. den Boer, M., D. Argaw, J. Jannin & J. Alvar *Leishmaniasis impact and treatment access*. Clin Microbiol Infect, 2011. **17**: p. 1471-1477.

66. Solbach, W. and T. Laskay, *The host response to Leishmania infection*. Adv Immunol, 2000. **74**: p. 275-317.
67. Chappuis, F., et al., *Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?* Nat Rev Microbiol, 2007. **5**(11): p. 873-82.
68. Mofredj, A., et al., *Visceral leishmaniasis with pericarditis in an HIV-infected patient*. Scand J Infect Dis, 2002. **34**(2): p. 151-3.
69. Marsden, P.D., *Current concepts in parasitology. Leishmaniasis*. N Engl J Med, 1979. **300**(7): p. 350-2.
70. van Griensven, J. and E. Diro, *Visceral leishmaniasis*. Infect Dis Clin North Am, 2012. **26**(2): p. 309-22.
71. Zijlstra, E.E., et al., *Post-kala-azar dermal leishmaniasis*. Lancet Infect Dis, 2003. **3**(2): p. 87-98.
72. <http://www.icp.ucl.ac.be/~opperd/parasites/leish4.htm>, *Leishmaniasis: the Diseases*.
73. Desjeux, P., *Leishmaniasis: current situation and new perspectives*. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 2004. **27**(5): p. 305-18.
74. Nylen, S. and L. Eidsmo, *Tissue damage and immunity in cutaneous leishmaniasis*. Parasite Immunol, 2012. **34**(12): p. 551-61.
75. Bari, A.U., *Clinical spectrum of cutaneous leishmaniasis: an overview from Pakistan*. Dermatol Online J, 2012. **18**(2): p. 4.
76. Almeida, O.L. and J.B. Santos, *Advances in the treatment of cutaneous leishmaniasis in the new world in the last ten years: a systematic literature review*. An Bras Dermatol, 2011. **86**(3): p. 497-506.
77. Pearson, R.D., et al., *The immunobiology of leishmaniasis*. Rev Infect Dis, 1983. **5**(5): p. 907-927.
78. Vandana Mehta MD DNB, C.B.M., Raghavendra Rao MD, Sumeet Kaur Dil MD, Laxmi Indusri MD, *Diffuse Cutaneous Leishmaniasis in HIV*. Dermatol Online J, 2009. **4**: p. 9.
79. http://www.parasitologie.univ-montp1.fr/english_vers/en_leishmania.htm. *Leishmania and the leishmaniasis*.
80. Alvar, J., et al., *Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years*. Clin Microbiol Rev, 1997. **10**(2): p. 298-319.
81. Gillis, D., et al., *Diffusely disseminated cutaneous Leishmania major infection in a child with acquired immunodeficiency syndrome*. Pediatr Infect Dis J, 1995. **14**(3): p. 247-9.
82. Jarvis, J.N. and D.N. Lockwood, *Clinical aspects of visceral leishmaniasis in HIV infection*. Curr Opin Infect Dis, 2013. **26**(1): p. 1-9.
83. Morales, M.A., et al., *Relapses versus reinfections in patients coinfecting with Leishmania infantum and human immunodeficiency virus type 1*. J Infect Dis, 2002. **185**(10): p. 1533-7.
84. Pratlong, F., et al., *Leishmania-human immunodeficiency virus coinfection in the Mediterranean basin: isoenzymatic characterization of 100 isolates of the Leishmania infantum complex*. J Infect Dis, 1995. **172**(1): p. 323-6.
85. Jimenez, M.I., et al., *New Leishmania (Leishmania) infantum zymodemes responsible for visceral leishmaniasis in patients co-infected with HIV in Spain*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1995. **89**(1): p. 33.
86. Priscilla Alexandrino-de-Oliveira, J.R.S.-O., Maria Elizabeth cavalheiros Dorval, Francisco das chagas Brandão Da-costa, Gracy Regina Oliveira Leite Pereira, Rivaldo Venâncio da cunha, Anamaria Mello Miranda Paniago, Alda Maria Da-cruz, *HIV/AIDS-associated visceral leishmaniasis in patients from an endemic area in central-west Brazil*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2010. **105**(5): p. 692-697.

87. Desjeux, P., *Leishmaniasis. Public health aspects and control*. Clin Dermatol, 1996. **14**(5): p. 417-23.
88. Seaman, J., et al., *Epidemic visceral leishmaniasis in southern Sudan: treatment of severely debilitated patients under wartime conditions and with limited resources*. Ann Intern Med, 1996. **124**(7): p. 664-72.
89. Dujardin, J.C., et al., *Spread of vector-borne diseases and neglect of Leishmaniasis, Europe*. Emerg Infect Dis, 2008. **14**(7): p. 1013-8.
90. Croft, S.L., S. Sundar, and A.H. Fairlamb, *Drug resistance in leishmaniasis*. Clin Microbiol Rev, 2006. **19**(1): p. 111-26.
91. Croft, S.L., *Monitoring drug resistance in leishmaniasis*. Trop Med Int Health, 2001. **6**(11): p. 899-905.
92. Alvar, J., S. Yactayo, and C. Bern, *Leishmaniasis and poverty*. Trends Parasitol, 2006. **22**(12): p. 552-7.
93. Papadopoulos, B. and Y. Tselentis, *Sandflies in the Greater Athens region, Greece*. Parasite, 1994. **1**(2): p. 131-40.
94. Garifallou, A., et al., *Leishmaniasis in Greece II. Isolation and identification of the parasite causing cutaneous leishmaniasis in man*. Ann Trop Med Parasitol, 1984. **78**(4): p. 369-75.
95. Tzamouranis, N., et al., *Leishmaniasis in Greece I. Isolation and identification of the parasite causing human and canine visceral leishmaniasis*. Ann Trop Med Parasitol, 1984. **78**(4): p. 363-8.
96. Gouzelou, E., et al., *Genetic diversity and structure in Leishmania infantum populations from southeastern Europe revealed by microsatellite analysis*. Parasit Vectors, 2013. **6**: p. 342.
97. Antoniou, M., et al., *Leishmania donovani leishmaniasis in Cyprus*. Lancet Infect Dis, 2008. **8**(1): p. 6-7.
98. Cecchi, G., et al., *Towards the Atlas of human African trypanosomiasis*. Int J Health Geogr, 2009. **8**: p. 15.
99. Cecchi, G., et al., *Mapping sleeping sickness in Western Africa in a context of demographic transition and climate change*. Parasite, 2009. **16**(2): p. 99-106.
100. Raper, J., et al., *Trypanosome lytic factors: novel mediators of human innate immunity*. Curr Opin Microbiol, 2001. **4**(4): p. 402-8.
101. WHO, *Human African Trypanosomiasis*. 2010.
102. Barrett, M.P., et al., *The trypanosomiasis*. Lancet, 2003. **362**(9394): p. 1469-80.
103. Sternberg, J.M., *Human African trypanosomiasis: clinical presentation and immune response*. Parasite Immunol, 2004. **26**(11-12): p. 469-76.
104. Welburn, S.C., I. Maudlin, and P.P. Simarro, *Controlling sleeping sickness - a review*. Parasitology, 2009. **136**(14): p. 1943-9.
105. Louis, F.J., et al., *[The Mandoul human African trypanosomiasis focus in Chad: from evaluation to control]*. Med Trop (Mars), 2009. **69**(1): p. 7-12.
106. Hotez, P.J., et al., *The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination*. PLoS Negl Trop Dis, 2008. **2**(9): p. e300.
107. Moncayo, A. and M.I. Ortiz Yanine, *An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis)*. Ann Trop Med Parasitol, 2006. **100**(8): p. 663-77.
108. Rassi, A., Jr., A. Rassi, and J.A. Marin-Neto, *Chagas disease*. Lancet, 2010. **375**(9723): p. 1388-402.
109. Punukollu, G., et al., *Clinical aspects of the Chagas' heart disease*. Int J Cardiol, 2007. **115**(3): p. 279-83.
110. Murcia, L., et al., *[Diagnosis and treatment of Chagas disease]*. Enferm Infecc Microbiol Clin, 2013. **31 Suppl 1**: p. 26-34.

111. Bombeiro, A.L., et al., *Neurodegeneration and increased production of nitrotyrosine, nitric oxide synthase, IFN-gamma and S100beta protein in the spinal cord of IL-12p40-deficient mice infected with Trypanosoma cruzi*. Neuroimmunomodulation, 2010. **17**(2): p. 67-78.
112. Gattuso, J.M. and M.A. Kamm, *Review article: the management of constipation in adults*. Aliment Pharmacol Ther, 1993. **7**(5): p. 487-500.
113. Leiguarda, R., et al., *Acute CNS infection by Trypanosoma cruzi (Chagas' disease) in immunosuppressed patients*. Neurology, 1990. **40**(5): p. 850-1.
114. Walker, M. and J.R. Zunt, *Parasitic central nervous system infections in immunocompromised hosts*. Clin Infect Dis, 2005. **40**(7): p. 1005-15.
115. Schmunis, G.A. and Z.E. Yadon, *Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem*. Acta Trop, 2010. **115**(1-2): p. 14-21.
116. Hotez, P.J., *Neglected infections of poverty in the United States of America*. PLoS Negl Trop Dis, 2008. **2**(6): p. e256.
117. van Eys, G.J., et al., *Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of Leishmania parasites*. Mol Biochem Parasitol, 1992. **51**(1): p. 133-42.
118. Al-Jawabreh, A., et al., *The recent emergence of Leishmania tropica in Jericho (A'riha) and its environs, a classical focus of L. major*. Trop Med Int Health, 2004. **9**(7): p. 812-6.
119. Cortes, S., et al., *PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using Leishmania donovani s.l.-specific kinetoplastid primers*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2004. **98**(1): p. 12-7.
120. Marfurt, J., et al., *Identification and differentiation of Leishmania species in clinical samples by PCR amplification of the miniexon sequence and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(7): p. 3147-53.
121. Piarroux, R., et al., *Phylogenetic relationships between Old World Leishmania strains revealed by analysis of a repetitive DNA sequence*. Mol Biochem Parasitol, 1995. **73**(1-2): p. 249-52.
122. Lachaud, L., et al., *Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis*. J Clin Microbiol, 2002. **40**(1): p. 210-5.
123. Haralambous, C., et al., *Development of a molecular assay specific for the Leishmania donovani complex that discriminates L. donovani/Leishmania infantum zymodemes: a useful tool for typing MON-1*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2008. **60**(1): p. 33-42.
124. Sundar, S. and M. Rai, *Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis*. Clin Diagn Lab Immunol, 2002. **9**(5): p. 951-8.
125. Lutumba, P., et al., *[Validity, cost and feasibility of the mAECT and CTC confirmation tests after diagnosis of African of sleeping sickness]*. Trop Med Int Health, 2006. **11**(4): p. 470-8.
126. Henry, M.C., et al., *[Evaluation of field diagnosis of trypanosomiasis caused by Trypanosoma brucei gambiense]*. Ann Soc Belg Med Trop, 1981. **61**(1): p. 79-92.
127. Miezan, T.W., et al., *[Evaluation of the parasitologic technics used in the diagnosis of human Trypanosoma gambiense trypanosomiasis in the Ivory Coast]*. Bull Soc Pathol Exot, 1994. **87**(2): p. 101-4.
128. Chappuis, F., et al., *Options for field diagnosis of human african trypanosomiasis*. Clin Microbiol Rev, 2005. **18**(1): p. 133-46.
129. Duvallet, G., et al., *[African human trypanosomiasis: diagnosis by haematocrit centrifuge technique (author's transl)]*. Nouv Presse Med, 1979. **8**(3): p. 214-5.

130. Nantulya, V.M., *TrypTect CIATT--a card indirect agglutination trypanosomiasis test for diagnosis of Trypanosoma brucei gambiense and T. b. rhodesiense infections*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1997. **91**(5): p. 551-3.
131. Truc, P., et al., *A comparison of parasitological methods for the diagnosis of gambian trypanosomiasis in an area of low endemicity in Cote d'Ivoire*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1994. **88**(4): p. 419-21.
132. McNamara, J.J., et al., *Isolation of Trypanosoma brucei gambiense from northern Uganda: evaluation of the kit for in vitro isolation (KIVI) in an epidemic focus*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1995. **89**(4): p. 388-9.
133. Buscher, P., et al., *Improved Models of Mini Anion Exchange Centrifugation Technique (mAECT) and Modified Single Centrifugation (MSC) for sleeping sickness diagnosis and staging*. PLoS Negl Trop Dis, 2009. **3**(11): p. e471.
134. Camara, M., et al., *Sleeping sickness diagnosis: use of buffy coats improves the sensitivity of the mini anion exchange centrifugation test*. Trop Med Int Health, 2010. **15**(7): p. 796-9.
135. Mitashi, P., et al., *Human african trypanosomiasis diagnosis in first-line health services of endemic countries, a systematic review*. PLoS Negl Trop Dis, 2012. **6**(11): p. e1919.
136. Chappuis, F., et al., *Field evaluation of the CATT/Trypanosoma brucei gambiense on blood-impregnated filter papers for diagnosis of human African trypanosomiasis in southern Sudan*. Trop Med Int Health, 2002. **7**(11): p. 942-8.
137. Hasker, E., et al., *A new format of the CATT test for the detection of human African Trypanosomiasis, designed for use in peripheral health facilities*. Trop Med Int Health, 2010. **15**(2): p. 263-7.
138. Buscher, P., et al., *Improved latex agglutination test for detection of antibodies in serum and cerebrospinal fluid of Trypanosoma brucei gambiense infected patients*. Acta Trop, 1999. **73**(1): p. 11-20.
139. Van Meirvenne, N., E. Magnus, and P. Buscher, *Evaluation of variant specific trypanolysis tests for serodiagnosis of human infections with Trypanosoma brucei gambiense*. Acta Trop, 1995. **60**(3): p. 189-99.
140. Jamonneau, V., et al., *Revisiting the immune trypanolysis test to optimise epidemiological surveillance and control of sleeping sickness in West Africa*. PLoS Negl Trop Dis, 2010. **4**(12): p. e917.
141. Moser, D.R., et al., *Detection of Trypanosoma congolense and Trypanosoma brucei subspecies by DNA amplification using the polymerase chain reaction*. Parasitology, 1989. **99 Pt 1**: p. 57-66.
142. Radwanska, M., et al., *The serum resistance-associated gene as a diagnostic tool for the detection of Trypanosoma brucei rhodesiense*. Am J Trop Med Hyg, 2002. **67**(6): p. 684-90.
143. Njiru, Z.K., et al., *Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for rapid detection of Trypanosoma brucei rhodesiense*. PLoS Negl Trop Dis, 2008. **2**(1): p. e147.
144. Mugasa, C.M., et al., *Detection of Trypanosoma brucei parasites in blood samples using real-time nucleic acid sequence-based amplification*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2008. **61**(4): p. 440-5.
145. Matovu, E., et al., *Phase II evaluation of sensitivity and specificity of PCR and NASBA followed by oligochromatography for diagnosis of human African trypanosomiasis in clinical samples from D.R. Congo and Uganda*. PLoS Negl Trop Dis, 2010. **4**(7): p. e737.

146. Mugasa, C.M., et al., *Nucleic acid sequence-based amplification with oligochromatography for detection of Trypanosoma brucei in clinical samples*. J Clin Microbiol, 2009. **47**(3): p. 630-5.
147. Deborggraeve, S., et al., *Molecular dipstick test for diagnosis of sleeping sickness*. J Clin Microbiol, 2006. **44**(8): p. 2884-9.
148. Mercado, R., et al., *[A modified Strout test, used as a probe for the diagnosis of transplacental Chagas disease. I. Collection and preservation of the newborn's umbilical cord blood]*. Bol Chil Parasitol, 1993. **48**(3-4): p. 43-5.
149. CDC, *Parasites - American Trypanosomiasis (also known as Chagas Disease)*. 2014.
150. WHO, *Chagas Disease*. 2010.
151. Croft, S.L., R.N. Davidson, and E.A. Thornton, *Liposomal amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis*. J Antimicrob Chemother, 1991. **28 Suppl B**: p. 111-8.
152. Gradoni, L., et al., *Drug regimens for visceral leishmaniasis in Mediterranean countries*. Trop Med Int Health, 2008. **13**(10): p. 1272-6.
153. Demopoulos, C.A., R.N. Pinckard, and D.J. Hanahan, *Platelet-activating factor. Evidence for 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine as the active component (a new class of lipid chemical mediators)*. J Biol Chem, 1979. **254**(19): p. 9355-8.
154. Dutra, P.M., et al., *Stimulation of Leishmania tropica protein kinase CK2 activities by platelet-activating factor (PAF)*. Acta Trop, 2009. **111**(3): p. 247-54.
155. Chatzovoulos P, T.A., Samiotaki M, Panayotou G, Demopoulos C.A., Dotsika A, *PAF-metabolic enzymes and PAF-like activity in L. Infantum and L. Major promastigotes*. European Journal of Inflammation 2011. **9** (3): p. 231-239.
156. Lonardoni, M.V., M. Russo, and S. Jancar, *Essential role of platelet-activating factor in control of Leishmania (Leishmania) amazonensis infection*. Infect Immun, 2000. **68**(11): p. 6355-61.
157. Rosa, M.S., et al., *Platelet-activating factor (PAF) modulates peritoneal mouse macrophage infection by Leishmania amazonensis*. Curr Microbiol, 2001. **43**(1): p. 33-7.
158. Patra, P., et al., *Efficacy of oral miltefosine in visceral leishmaniasis in rural West Bengal, India*. Indian J Pharmacol, 2012. **44**(4): p. 500-3.
159. Sundar, S., et al., *Oral miltefosine for Indian post-kala-azar dermal leishmaniasis: a randomised trial*. Trop Med Int Health, 2013. **18**(1): p. 96-100.
160. Dorlo, T.P., et al., *Characterization and identification of suspected counterfeit miltefosine capsules*. Analyst, 2012. **137**(5): p. 1265-74.
161. Bacchi, C.J., *Chemotherapy of human african trypanosomiasis*. Interdiscip Perspect Infect Dis, 2009. **2009**: p. 195040.
162. Gehrig, P.A., L. Van Le, and W.C. Fowler, Jr., *The role of omentectomy during the surgical staging of uterine serous carcinoma*. Int J Gynecol Cancer, 2003. **13**(2): p. 212-5.
163. Barrett, M.P., et al., *Human African trypanosomiasis: pharmacological re-engagement with a neglected disease*. Br J Pharmacol, 2007. **152**(8): p. 1155-71.
164. Gehrig, S. and T. Efferth, *Development of drug resistance in Trypanosoma brucei rhodesiense and Trypanosoma brucei gambiense. Treatment of human African trypanosomiasis with natural products (Review)*. Int J Mol Med, 2008. **22**(4): p. 411-9.
165. Bridges, D.J., et al., *Loss of the high-affinity pentamidine transporter is responsible for high levels of cross-resistance between arsenical and diamidine drugs in African trypanosomes*. Mol Pharmacol, 2007. **71**(4): p. 1098-108.

166. Priotto, G., et al., *Nifurtimox-eflornithine combination therapy for second-stage African Trypanosoma brucei gambiense trypanosomiasis: a multicentre, randomised, phase III, non-inferiority trial*. Lancet, 2009. **374**(9683): p. 56-64.
167. Berriman, M., et al., *The genome of the African trypanosome Trypanosoma brucei*. Science, 2005. **309**(5733): p. 416-22.
168. Coura, J.R., et al., *Chagas disease in the Brazilian Amazon: IV. a new cross-sectional study*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 2002. **44**(3): p. 159-65.
169. Coura, J.R., et al., *Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil*. Trends Parasitol, 2002. **18**(4): p. 171-6.
170. Maya, J.D., et al., *Mode of action of natural and synthetic drugs against Trypanosoma cruzi and their interaction with the mammalian host*. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 2007. **146**(4): p. 601-20.
171. Soares, M.B. and R.R. Santos, *Current status and perspectives of cell therapy in Chagas disease*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2009. **104 Suppl 1**: p. 325-32.
172. Soares, M.B., et al., *Transplanted bone marrow cells repair heart tissue and reduce myocarditis in chronic chagasic mice*. Am J Pathol, 2004. **164**(2): p. 441-7.
173. Zerba, E.N., *Susceptibility and resistance to insecticides of Chagas disease vectors*. Medicina (B Aires), 1999. **59 Suppl 2**: p. 41-6.
174. Germano, M.D., C.V. Vassena, and M.I. Picollo, *Autosomal inheritance of deltamethrin resistance in field populations of Triatoma infestans (Heteroptera: Reduviidae) from Argentina*. Pest Manag Sci, 2010. **66**(7): p. 705-8.
175. Germano, M.D., et al., *New findings of insecticide resistance in Triatoma infestans (Heteroptera: Reduviidae) from the Gran Chaco*. J Med Entomol, 2010. **47**(6): p. 1077-81.
176. Jautelat, R., et al., *From the insoluble dye indirubin towards highly active, soluble CDK2-inhibitors*. Chembiochem, 2005. **6**(3): p. 531-40.
177. Ribas, J., et al., *7-Bromoindirubin-3'-oxime uncovers a serine protease-mediated paradigm of necrotic cell death*. Biochem Pharmacol, 2008. **76**(1): p. 39-52.
178. Vougianniopoulou, K. and A.L. Skaltsounis, *From Tyrian purple to kinase modulators: naturally halogenated indirubins and synthetic analogues*. Planta Med, 2012. **78**(14): p. 1515-28.
179. Davies, T.G., et al., *Inhibitor binding to active and inactive CDK2: the crystal structure of CDK2-cyclin A/indirubin-5-sulphonate*. Structure, 2001. **9**(5): p. 389-97.
180. Hoessel, R., et al., *Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases*. Nat Cell Biol, 1999. **1**(1): p. 60-7.
181. Leclerc, S., et al., *Indirubins inhibit glycogen synthase kinase-3 beta and CDK5/p25, two protein kinases involved in abnormal tau phosphorylation in Alzheimer's disease. A property common to most cyclin-dependent kinase inhibitors?* J Biol Chem, 2001. **276**(1): p. 251-60.
182. Meijer, L., et al., *GSK-3-selective inhibitors derived from Tyrian purple indirubins*. Chem Biol, 2003. **10**(12): p. 1255-66.
183. Adachi, J., et al., *Indirubin and indigo are potent aryl hydrocarbon receptor ligands present in human urine*. J Biol Chem, 2001. **276**(34): p. 31475-8.
184. Kosmopoulou, M.N., et al., *Binding of the potential antitumour agent indirubin-5-sulphonate at the inhibitor site of rabbit muscle glycogen phosphorylase b. Comparison with ligand binding to pCDK2-cyclin A complex*. Eur J Biochem, 2004. **271**(11): p. 2280-90.
185. Xie, Y., et al., *Indirubin-3'-oxime inhibits c-Jun NH2-terminal kinase: anti-apoptotic effect in cerebellar granule neurons*. Neurosci Lett, 2004. **367**(3): p. 355-9.
186. Nam, S., et al., *Indirubin derivatives inhibit Stat3 signaling and induce apoptosis in human cancer cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(17): p. 5998-6003.

187. Myrianthopoulos, V., et al., *An integrated computational approach to the phenomenon of potent and selective inhibition of aurora kinases B and C by a series of 7-substituted indirubins*. J Med Chem, 2007. **50**(17): p. 4027-37.
188. Myrianthopoulos, V., et al., *Novel Inverse Binding Mode of Indirubin Derivatives Yields Improved Selectivity for DYRK Kinases*. ACS Med Chem Lett, 2013. **4**(1): p. 22-26.
189. Polychronopoulos, P., et al., *Structural basis for the synthesis of indirubins as potent and selective inhibitors of glycogen synthase kinase-3 and cyclin-dependent kinases*. J Med Chem, 2004. **47**(4): p. 935-46.
190. Knockaert, M., et al., *Independent actions on cyclin-dependent kinases and aryl hydrocarbon receptor mediate the antiproliferative effects of indirubins*. Oncogene, 2004. **23**(25): p. 4400-12.
191. Xingi, E., et al., *6-Br-5methylindirubin-3'oxime (5-Me-6-BIO) targeting the leishmanial glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) short form affects cell-cycle progression and induces apoptosis-like death: exploitation of GSK-3 for treating leishmaniasis*. Int J Parasitol, 2009. **39**(12): p. 1289-303.
192. Damiens, E., et al., *Anti-mitotic properties of indirubin-3'-monoxime, a CDK/GSK-3 inhibitor: induction of endoreplication following prophase arrest*. Oncogene, 2001. **20**(29): p. 3786-97.
193. Ribas, J., et al., *7-Bromoindirubin-3'-oxime induces caspase-independent cell death*. Oncogene, 2006. **25**(47): p. 6304-18.
194. Ribas, J., J. Boix, and L. Meijer, *(R)-roscovitine (CYC202, Seliciclib) sensitizes SH-SY5Y neuroblastoma cells to nutlin-3-induced apoptosis*. Exp Cell Res, 2006. **312**(12): p. 2394-400.
195. D. Smirlis, M.B.P.S., *Selection of Molecular Targets for Drug Development Against Trypanosomatids*, in *Proteins and Proteomics of Leishmania and Trypanosoma*. 2013, springer. p. 43-76.
196. Naula, C., M. Parsons, and J.C. Mottram, *Protein kinases as drug targets in trypanosomes and Leishmania*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1754**(1-2): p. 151-9.
197. Parsons, M., et al., *Comparative analysis of the kinomes of three pathogenic trypanosomatids: Leishmania major, Trypanosoma brucei and Trypanosoma cruzi*. BMC Genomics, 2005. **6**: p. 127.
198. Grant, K.M., et al., *The crk3 gene of Leishmania mexicana encodes a stage-regulated cdc2-related histone H1 kinase that associates with p12*. J Biol Chem, 1998. **273**(17): p. 10153-9.
199. Hassan, P., et al., *The CRK3 protein kinase is essential for cell cycle progression of Leishmania mexicana*. Mol Biochem Parasitol, 2001. **113**(2): p. 189-98.
200. Tu, X. and C.C. Wang, *The involvement of two cdc2-related kinases (CRKs) in Trypanosoma brucei cell cycle regulation and the distinctive stage-specific phenotypes caused by CRK3 depletion*. J Biol Chem, 2004. **279**(19): p. 20519-28.
201. Wang, Q., et al., *LmxMPK4, a mitogen-activated protein (MAP) kinase homologue essential for promastigotes and amastigotes of Leishmania mexicana*. Kinetoplastid Biol Dis, 2005. **4**: p. 6.
202. Wang, Y., et al., *Stage-specific activity of the Leishmania major CRK3 kinase and functional rescue of a Schizosaccharomyces pombe cdc2 mutant*. Mol Biochem Parasitol, 1998. **96**(1-2): p. 139-50.
203. Wiese, M., *Leishmania MAP kinases--familiar proteins in an unusual context*. Int J Parasitol, 2007. **37**(10): p. 1053-62.
204. Wiese, M., *A mitogen-activated protein (MAP) kinase homologue of Leishmania mexicana is essential for parasite survival in the infected host*. EMBO J, 1998. **17**(9): p. 2619-28.

205. Ojo, K.K., et al., *Glycogen synthase kinase 3 is a potential drug target for African trypanosomiasis therapy*. Antimicrob Agents Chemother, 2008. **52**(10): p. 3710-7.
206. Knockaert, M., et al., *Intracellular targets of cyclin-dependent kinase inhibitors: identification by affinity chromatography using immobilised inhibitors*. Chem Biol, 2000. **7**(6): p. 411-22.
207. Rachidi, N., et al., *Pharmacological assessment defines Leishmania donovani casein kinase 1 as a drug target and reveals important functions in parasite viability and intracellular infection*. Antimicrob Agents Chemother, 2014. **58**(3): p. 1501-15.
208. Doerig, C., J. Endicott, and D. Chakrabarti, *Cyclin-dependent kinase homologues of Plasmodium falciparum*. Int J Parasitol, 2002. **32**(13): p. 1575-85.
209. Doerig, C., L. Meijer, and J.C. Mottram, *Protein kinases as drug targets in parasitic protozoa*. Trends Parasitol, 2002. **18**(8): p. 366-71.
210. Grant, K.M., *Targeting the cell cycle in the pursuit of novel chemotherapies against parasitic protozoa*. Curr Pharm Des, 2008. **14**(9): p. 917-24.
211. Hammarton, T.C., J.C. Mottram, and C. Doerig, *The cell cycle of parasitic protozoa: potential for chemotherapeutic exploitation*. Prog Cell Cycle Res, 2003. **5**: p. 91-101.
212. Kannan, N. and A.F. Neuwald, *Evolutionary constraints associated with functional specificity of the CMGC protein kinases MAPK, CDK, GSK, SRPK, DYRK, and CK2alpha*. Protein Sci, 2004. **13**(8): p. 2059-77.
213. Van Hellemond, J.J. and J.C. Mottram, *The CYC3 gene of trypanosoma brucei encodes a cyclin with a short half-life*. Mol Biochem Parasitol, 2000. **111**(2): p. 275-82.
214. Van Hellemond, J.J., et al., *Isolation of Trypanosoma brucei CYC2 and CYC3 cyclin genes by rescue of a yeast G(1) cyclin mutant. Functional characterization of CYC2*. J Biol Chem, 2000. **275**(12): p. 8315-23.
215. Gomes, F.C., et al., *Recombinant Leishmania mexicana CRK3:CYCA has protein kinase activity in the absence of phosphorylation on the T-loop residue Thr178*. Mol Biochem Parasitol, 2010. **171**(2): p. 89-96.
216. Banerjee, S., et al., *Leishmania donovani cyclin 1 (LdCyc1) forms a complex with cell cycle kinase subunit CRK3 (LdCRK3) and is possibly involved in S-phase-related activities*. FEMS Microbiol Lett, 2006. **256**(1): p. 75-82.
217. Mottram, J.C., et al., *A novel CDC2-related protein kinase from Leishmania mexicana, LmmCRK1, is post-translationally regulated during the life cycle*. J Biol Chem, 1993. **268**(28): p. 21044-52.
218. Grant, K.M., et al., *Inhibitors of Leishmania mexicana CRK3 cyclin-dependent kinase: chemical library screen and antileishmanial activity*. Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(8): p. 3033-42.
219. da Cunha, J.P., et al., *Trypanosoma cruzi histone H1 is phosphorylated in a typical cyclin dependent kinase site accordingly to the cell cycle*. Mol Biochem Parasitol, 2005. **140**(1): p. 75-86.
220. Yan, S., P.J. Myler, and K. Stuart, *Tetracycline regulated gene expression in Leishmania donovani*. Mol Biochem Parasitol, 2001. **112**(1): p. 61-9.
221. Walker, R.G., et al., *High throughput screens yield small molecule inhibitors of Leishmania CRK3:CYC6 cyclin-dependent kinase*. PLoS Negl Trop Dis, 2011. **5**(4): p. e1033.
222. Cleghorn, L.A., et al., *Identification of inhibitors of the Leishmania cdc2-related protein kinase CRK3*. ChemMedChem, 2011. **6**(12): p. 2214-24.
223. Phukan, S., et al., *GSK3beta: role in therapeutic landscape and development of modulators*. Br J Pharmacol, 2010. **160**(1): p. 1-19.
224. Kaidanovich-Beilin, O. and H. Eldar-Finkelman, *Long-term treatment with novel glycogen synthase kinase-3 inhibitor improves glucose homeostasis in ob/ob mice*:

- molecular characterization in liver and muscle*. J Pharmacol Exp Ther, 2006. **316**(1): p. 17-24.
225. Henriksen, E.J., et al., *Modulation of muscle insulin resistance by selective inhibition of GSK-3 in Zucker diabetic fatty rats*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003. **284**(5): p. E892-900.
 226. Oduor, R.O., et al., *Trypanosoma brucei glycogen synthase kinase-3, a target for anti-trypanosomal drug development: a public-private partnership to identify novel leads*. PLoS Negl Trop Dis, 2011. **5**(4): p. e1017.
 227. Cano, M.I., et al., *Telomerase in kinetoplastid parasitic protozoa*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(7): p. 3616-21.
 228. Waller, R.F., M.J. McConville, and G.I. McFadden, *More plastids in human parasites?* Trends Parasitol, 2004. **20**(2): p. 54-7.
 229. Martinez-Calvillo, S., et al., *Gene expression in trypanosomatid parasites*. J Biomed Biotechnol, 2010. **2010**: p. 525241.
 230. Hammarton, T.C., S. Monnerat, and J.C. Mottram, *Cytokinesis in trypanosomatids*. Curr Opin Microbiol, 2007. **10**(6): p. 520-7.
 231. Ambit, A., et al., *An essential role for the Leishmania major metacaspase in cell cycle progression*. Cell Death Differ, 2008. **15**(1): p. 113-22.
 232. Hammarton, T.C., et al., *Trypanosoma brucei Polo-like kinase is essential for basal body duplication, kDNA segregation and cytokinesis*. Mol Microbiol, 2007. **65**(5): p. 1229-48.
 233. Jones, N.G., et al., *Regulators of Trypanosoma brucei cell cycle progression and differentiation identified using a kinome-wide RNAi screen*. PLoS Pathog, 2014. **10**(1): p. e1003886.
 234. Santori, M.I., et al., *Evidence for CRK3 participation in the cell division cycle of Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol, 2002. **121**(2): p. 225-32.
 235. Smirlis, D., et al., *Targeting essential pathways in trypanosomatids gives insights into protozoan mechanisms of cell death*. Parasit Vectors, 2010. **3**: p. 107.
 236. Hengartner, M.O., *The biochemistry of apoptosis*. Nature, 2000. **407**(6805): p. 770-6.
 237. Hawkins, C.J., et al., *The Drosophila caspase DRONC cleaves following glutamate or aspartate and is regulated by DIAP1, HID, and GRIM*. J Biol Chem, 2000. **275**(35): p. 27084-93.
 238. Srinivasula, S.M., et al., *A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis*. Nature, 2001. **410**(6824): p. 112-6.
 239. Srinivasula, S.M., et al., *Isolation and assay of caspases*. Methods Cell Biol, 2001. **66**: p. 1-27.
 240. Lee, N., et al., *Programmed cell death in the unicellular protozoan parasite Leishmania*. Cell Death Differ, 2002. **9**(1): p. 53-64.
 241. Arnoult, D., et al., *On the evolution of programmed cell death: apoptosis of the unicellular eukaryote Leishmania major involves cysteine proteinase activation and mitochondrion permeabilization*. Cell Death Differ, 2002. **9**(1): p. 65-81.
 242. Das, M., S.B. Mukherjee, and C. Shaha, *Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in Leishmania donovani promastigotes*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 13): p. 2461-9.
 243. Sen, N., et al., *Apoptosis is induced in leishmanial cells by a novel protein kinase inhibitor withaferin A and is facilitated by apoptotic topoisomerase I-DNA complex*. Cell Death Differ, 2007. **14**(2): p. 358-67.
 244. Deponte, M., *Programmed cell death in protists*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1783**(7): p. 1396-405.
 245. Duszenko, M., et al., *Death of a trypanosome: a selfish altruism*. Trends Parasitol, 2006. **22**(11): p. 536-42.

246. Smirlis, D. and K. Soteriadou, *Trypanosomatid apoptosis: 'Apoptosis' without the canonical regulators*. Virulence, 2011. **2**(3): p. 253-6.
247. Holzmuller, P., et al., *Nitric oxide-mediated proteasome-dependent oligonucleosomal DNA fragmentation in Leishmania amazonensis amastigotes*. Infect Immun, 2002. **70**(7): p. 3727-35.
248. Holzmuller, P., et al., *Leishmania infantum amastigotes resistant to nitric oxide cytotoxicity: Impact on in vitro parasite developmental cycle and metabolic enzyme activities*. Infect Genet Evol, 2006. **6**(3): p. 187-97.
249. Holzmuller, P., R. Bras-Goncalves, and J.L. Lemesre, *Phenotypical characteristics, biochemical pathways, molecular targets and putative role of nitric oxide-mediated programmed cell death in Leishmania*. Parasitology, 2006. **132 Suppl**: p. S19-32.
250. van Zandbergen, G., et al., *Leishmania disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(37): p. 13837-42.
251. Debrabant, A. and H. Nakhasi, *Programmed cell death in trypanosomatids: is it an altruistic mechanism for survival of the fittest?* Kinetoplastid Biol Dis, 2003. **2**(1): p. 7.
252. Shaha, C., *Apoptosis in Leishmania species & its relevance to disease pathogenesis*. Indian J Med Res, 2006. **123**(3): p. 233-44.
253. Alzate, J.F., et al., *Heat-induced programmed cell death in Leishmania infantum is reverted by Bcl-X(L) expression*. Apoptosis, 2006. **11**(2): p. 161-71.
254. Alzate, J.F., et al., *Mitochondrial superoxide mediates heat-induced apoptotic-like death in Leishmania infantum*. Mol Biochem Parasitol, 2007. **152**(2): p. 192-202.
255. Moreira, M.E., et al., *Heat shock induction of apoptosis in promastigotes of the unicellular organism Leishmania (Leishmania) amazonensis*. J Cell Physiol, 1996. **167**(2): p. 305-13.
256. Raina, P. and S. Kaur, *Chronic heat-shock treatment driven differentiation induces apoptosis in Leishmania donovani*. Mol Cell Biochem, 2006. **289**(1-2): p. 83-90.
257. Zangger, H., J.C. Mottram, and N. Fasel, *Cell death in Leishmania induced by stress and differentiation: programmed cell death or necrosis?* Cell Death Differ, 2002. **9**(10): p. 1126-39.
258. Kulkarni, M.M., et al., *Antimicrobial peptide-induced apoptotic death of leishmania results from calcium-dependent, caspase-independent mitochondrial toxicity*. J Biol Chem, 2009. **284**(23): p. 15496-504.
259. Luque-Ortega, J.R. and L. Rivas, *Characterization of the leishmanicidal activity of antimicrobial peptides*. Methods Mol Biol, 2010. **618**: p. 393-420.
260. Selvapandian, A., et al., *Centrin gene disruption impairs stage-specific basal body duplication and cell cycle progression in Leishmania*. J Biol Chem, 2004. **279**(24): p. 25703-10.
261. Alzate, J.F., et al., *Edelfosine induces an apoptotic process in Leishmania infantum that is regulated by the ectopic expression of Bcl-XL and Hrk*. Antimicrob Agents Chemother, 2008. **52**(10): p. 3779-82.
262. Dutta, A., et al., *Aloe vera leaf exudate induces a caspase-independent cell death in Leishmania donovani promastigotes*. J Med Microbiol, 2007. **56**(Pt 5): p. 629-36.
263. Dutta, A., et al., *Racemoside A, an anti-leishmanial, water-soluble, natural steroidal saponin, induces programmed cell death in Leishmania donovani*. J Med Microbiol, 2007. **56**(Pt 9): p. 1196-204.
264. Singh, N., et al., *An orally effective dihydropyrimidone (DHPM) analogue induces apoptosis-like cell death in clinical isolates of Leishmania donovani overexpressing pteridine reductase 1*. Parasitol Res, 2009. **105**(5): p. 1317-25.

265. Li, Q., et al., *Apoptosis caused by Hsp90 inhibitor geldanamycin in Leishmania donovani during promastigote-to-amastigote transformation stage*. Parasitol Res, 2009. **105**(6): p. 1539-48.
266. Sereno, D., et al., *Antimonial-mediated DNA fragmentation in Leishmania infantum amastigotes*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(7): p. 2064-9.
267. 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.
268. 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.
269. Verma, N.K., G. Singh, and C.S. Dey, *Miltefosine induces apoptosis in arsenite-resistant Leishmania donovani promastigotes through mitochondrial dysfunction*. Exp Parasitol, 2007. **116**(1): p. 1-13.
270. Dujardin, J.C., *Risk factors in the spread of leishmaniases: towards integrated monitoring?* Trends Parasitol, 2006. **22**(1): p. 4-6.
271. Werbovetz, K.A., *Promising therapeutic targets for antileishmanial drugs*. Expert Opin Ther Targets, 2002. **6**(4): p. 407-22.
272. Barrett, W.C., et al., *Roles of superoxide radical anion in signal transduction mediated by reversible regulation of protein-tyrosine phosphatase 1B*. J Biol Chem, 1999. **274**(49): p. 34543-6.
273. 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.
274. Papageorgiou, F.T. and K.P. Soteriadou, *Expression of a novel Leishmania gene encoding a histone H1-like protein in Leishmania major modulates parasite infectivity in vitro*. Infect Immun, 2002. **70**(12): p. 6976-86.
275. Fortier, A.H., D.L. Hoover, and C.A. Nacy, *Intracellular replication of Leishmania tropica in mouse peritoneal macrophages: amastigote infection of resident cells and inflammatory exudate macrophages*. Infect Immun, 1982. **38**(3): p. 1304-8.
276. Eldar-Finkelman, H., et al., *Inactivation of glycogen synthase kinase-3 by epidermal growth factor is mediated by mitogen-activated protein kinase/p90 ribosomal protein S6 kinase signaling pathway in NIH/3T3 cells*. J Biol Chem, 1995. **270**(3): p. 987-90.
277. Droucheau, E., et al., *Plasmodium falciparum glycogen synthase kinase-3: molecular model, expression, intracellular localisation and selective inhibitors*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1697**(1-2): p. 181-96.
278. Gouet, P., et al., *ESPrpt: analysis of multiple sequence alignments in PostScript*. Bioinformatics, 1999. **15**(4): p. 305-8.
279. Sali, A. and T.L. Blundell, *Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints*. J Mol Biol, 1993. **234**(3): p. 779-815.
280. Mohamadi, F., Richards, N. G., Guida, W.C., Liskamp, R., Lipton, M., Caufield, C., Chang, G., Hendrickson, T., Still W.C. , *Macromodel-An integrated software system for modeling organic and bioorganic molecules using molecular mechanics*. . J. Comput. Chem. , 1990. **11**: p. 440-467.
281. Wozencraft, A.O. and J.M. Blackwell, *Increased infectivity of stationary-phase promastigotes of Leishmania donovani: correlation with enhanced C3 binding capacity and CR3-mediated attachment to host macrophages*. Immunology, 1987. **60**(4): p. 559-63.
282. Titus, R.G., et al., *A limiting dilution assay for quantifying Leishmania major in tissues of infected mice*. Parasite Immunol, 1985. **7**(5): p. 545-55.

283. Romanha, A.J., et al., *In vitro and in vivo experimental models for drug screening and development for Chagas disease*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2010. **105**(2): p. 233-8.
284. Ξύγγη, Ε., *Μελέτη του βιολογικού ρόλου της ιστόνης H1 και της κινάσης της συνθετάσης του γλυκογόνου (GSK-3) της Leishmania*. ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ, ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΠΑΡΑΣΙΤΟΛΟΓΙΑΣ, ΖΩΟΝΟΣΩΝ ΚΑΙ ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ- ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΠΑΣΤΕΡ, ΤΜΗΜΑ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΠΑΡΑΣΙΤΟΛΟΓΙΑΣ 2009.
285. Davies, S.P., et al., *Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors*. Biochem J, 2000. **351**(Pt 1): p. 95-105.
286. Knight, Z.A. and K.M. Shokat, *Features of selective kinase inhibitors*. Chem Biol, 2005. **12**(6): p. 621-37.
287. Smirlis, D., et al., *Leishmania donovani Ran-GTPase interacts at the nuclear rim with linker histone H1*. Biochem J, 2009. **424**(3): p. 367-74.
288. Jimenez-Ruiz, A., et al., *Apoptotic markers in protozoan parasites*. Parasit Vectors, 2010. **3**: p. 104.
289. Taylor-Brown, E. and H. Hurd, *The first suicides: a legacy inherited by parasitic protozoans from prokaryote ancestors*. Parasit Vectors, 2013. **6**(1): p. 108.
290. Kaczanowski, S., M. Sajid, and S.E. Reece, *Evolution of apoptosis-like programmed cell death in unicellular protozoan parasites*. Parasit Vectors, 2011. **4**: p. 44.
291. McWilliam, H., et al., *Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(Web Server issue): p. W597-600.
292. Grant JA, P.B., Nicholls A, *A smooth permittivity function for Poisson–Boltzmann solvation methods*. J Comput Chem, 2001. **22**(6): p. 608–640.
293. 1.2.0.7, S. *OpenEye Scientific Software*. 2013; Available from: <http://www.eyesopen.com>.
294. Joshi, J., N. Malla, and S. Kaur, *A comparative evaluation of efficacy of chemotherapy, immunotherapy and immunochemotherapy in visceral leishmaniasis-an experimental study*. Parasitol Int, 2014. **63**(4): p. 612-20.
295. Joshi, P.V., et al., *Non-cytotoxic dimedone derivatives: structure, antiradical and UV protective studies*. Drug Res (Stuttg), 2013. **63**(12): p. 650-6.
296. Ploubidou, A., et al., *Evidence for novel cell cycle checkpoints in trypanosomes: kinetoplast segregation and cytokinesis in the absence of mitosis*. J Cell Sci, 1999. **112** (Pt 24): p. 4641-50.
297. Weingartner, A., et al., *Leishmania promastigotes lack phosphatidylserine but bind annexin V upon permeabilization or miltefosine treatment*. PLoS One, 2012. **7**(8): p. e42070.
298. Mehta, A. and C. Shaha, *Apoptotic death in Leishmania donovani promastigotes in response to respiratory chain inhibition: complex II inhibition results in increased pentamidine cytotoxicity*. J Biol Chem, 2004. **279**(12): p. 11798-813.
299. XiaoMing, Z., et al., *Specific changes of somatostatin mRNA expression in the frontal cortex and hippocampus of diabetic rats*. J Anat, 2004. **204**(Pt 3): p. 221-5.
300. Kugimiya, F., et al., *GSK-3beta controls osteogenesis through regulating Runx2 activity*. PLoS One, 2007. **2**(9): p. e837.
301. Hoeflich, K.P., et al., *Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NF-kappaB activation*. Nature, 2000. **406**(6791): p. 86-90.
302. Williams, S.P., et al., *Indirubins decrease glioma invasion by blocking migratory phenotypes in both the tumor and stromal endothelial cell compartments*. Cancer Res, 2011. **71**(16): p. 5374-80.
303. Rohde, K., et al., *Mycobacterium tuberculosis and the environment within the phagosome*. Immunol Rev, 2007. **219**: p. 37-54.

304. Rohde, K.H., R.B. Abramovitch, and D.G. Russell, *Mycobacterium tuberculosis invasion of macrophages: linking bacterial gene expression to environmental cues*. Cell Host Microbe, 2007. **2**(5): p. 352-64.
305. Wilson, N.F. and P.A. Lefebvre, *Regulation of flagellar assembly by glycogen synthase kinase 3 in Chlamydomonas reinhardtii*. Eukaryot Cell, 2004. **3**(5): p. 1307-19.
306. Bijur, G.N. and R.S. Jope, *Proapoptotic stimuli induce nuclear accumulation of glycogen synthase kinase-3 beta*. J Biol Chem, 2001. **276**(40): p. 37436-42.
307. Meares, G.P. and R.S. Jope, *Resolution of the nuclear localization mechanism of glycogen synthase kinase-3: functional effects in apoptosis*. J Biol Chem, 2007. **282**(23): p. 16989-7001.
308. Wakefield, J.G., D.J. Stephens, and J.M. Tavaré, *A role for glycogen synthase kinase-3 in mitotic spindle dynamics and chromosome alignment*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 4): p. 637-46.
309. Wiesgigl, M. and J. Clos, *The heat shock protein 90 of Leishmania donovani*. Med Microbiol Immunol, 2001. **190**(1-2): p. 27-31.
310. Wiesgigl, M. and J. Clos, *Heat shock protein 90 homeostasis controls stage differentiation in Leishmania donovani*. Mol Biol Cell, 2001. **12**(11): p. 3307-16.

Δημοσιεύσεις Κεφάλαιο **7**

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ