



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΤΟΜΕΑΣ ΒΟΤΑΝΙΚΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

«ΜΙΚΟΒΙΑΚΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»

**Κατασκευή και χαρακτηρισμός διαγονιδιακών στελεχών
παρασίτων *Leishmania tarentolae* για ετερόλογη έκφραση της
κόκκινης φθορίζουσας πρωτεΐνης mCherry και του μεταφορέα
νουκλεοβάσεων rSNBT1 (από τον *Rattus norvegicus*).**

ΑΝΑΡΓΥΡΟΣ Α. ΔΟΥΚΑΣ

AM: 238004

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Επιβλέποντες :

Διαλλινάς Γεώργιος, Καθηγητής, ΕΚΠΑ

Χαραλαμπία Μπολέτη, Ερευνήτρια Β', Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

Αθήνα 2015

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία ειδίκευσης εκπονήθηκε στο Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, στην Ομάδα Ενδοκυττάριου Παρασιτισμού, του τμήματος Μικροβιολογίας, υπό την επίβλεψη και καθοδήγηση της Ερευνήτριας Β' Δρ. Χαραλαμπίας Μπολέτη.

Από τη θέση αυτή θα ήθελα να ευχαριστήσω ολόθερμα όλους όσους με τη βοήθεια τους συνέβαλαν στην πραγματοποίηση της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας και πιο συγκεκριμένα :

Τη Δρ. Χαραλαμπία Μπολέτη για την εμπιστοσύνη της και για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω τη διπλωματική μου εργασία στην ομάδα της και να γνωρίσω όλες τις τεχνικές που περιγράφω στην πτυχιακή μου εργασία. Την ευχαριστώ, επίσης, για το αμείωτο ενδιαφέρον και τη συμπαράστασή της σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης και συγγραφής της διατριβής μου.

Τον επιβλέποντα Καθηγητή της εργασίας Καθηγητή κ. Γεώργιο Διαλλινά για τις πολύτιμες συμβουλές του, οι οποίες ήταν καθοριστικές στο ξεκίνημα αλλά και στην ολοκλήρωση του μεταπτυχιακού μου διπλώματος ειδίκευσης στη Μικροβιακή Βιοτεχνολογία.

Τον Καθηγητή κ. Ευστάθιο Φριλλίγγο συντονιστή του προγράμματος Θαλής-ΕVOTRANS που χρηματοδότησε μεγάλο μέρος αυτής της μελέτης, για την πολύ γόνιμη συνεργασία μας και για την βοήθειά του στο σχεδιασμό ορισμένων πειραμάτων, την βελτιστοποίηση πειραματικών πρωτοκόλλων και την αξιολόγηση αποτελεσμάτων.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω, ιδιαίτερω την υποψήφια διδάκτορα Αμαλία Παπαδάκη για την συνεχή βοήθειά της στο πειραματικό μέρος της διπλωματικής μου εργασίας και για την μετάγχιση γνώσης και εμπειρίας της για τον οργανισμό *Leishmania tarentolae* και τη μεταπτυχιακή Αναστασία Κοτοπούλη.

Τους μεταδιδακτορικούς συνεργάτες Κώστα Παπακώστα για την κλωνοποίηση του γονιδίου rSNBT1 στον πλασμιδιακό φορέα pLexsy-sat-mRFP και τον Χρήστο Γουρνά για την βοήθεια του στα πειράματα πρόσληψης νουκλεοβάσεων του πειραματικού μέρους αυτής της εργασίας.

Τέλος ευχαριστώ τους γονείς μου Άγγελο και Μαρία καθώς και τα αδέρφια μου για τη διαρκή στήριξή τους.

Ανάργυρος Α. Δούκας

Αθήνα 2014

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Κατασκευή και χαρακτηρισμός διαγονιδιακών στελεχών του πρωτοζωικού οργανισμού *Leishmania tarentolae* για ετερόλογη έκφραση της κόκκινης φθορίζουσας πρωτεΐνης mCherry και του μεταφορέα νουκλεοβάσεων rSNBT1 από τον *Rattus norvegicus*.

Construction and characterization of transgenic strains of the protozoan *Leishmania tarentolae* for heterologous expression of red fluorescent protein mCherry and nucleobase transporter rSNBT1 from *Rattus norvegicus*.

Ανάργυρος Δούκας

A.M. : 238004

ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΕΣ ΚΑΘΗΓΗΤΕΣ :

Διαλλινάς Γεώργιος, Καθηγητής, ΕΚΠΑ

Χαραλαμπία Μπολέτη, Ερευνήτρια Β', Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Διαλλινάς Γεώργιος, Καθηγητής, ΕΚΠΑ

Χατζηνικολάου Δημήτριος, Επίκουρος Καθηγητής, ΕΚΠΑ

Βοριάς Κωνσταντίνος, Καθηγητής, ΕΚΠΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία ειδίκευσης έγινε κατασκευή διαγονιδιακών παρασίτων *Leishmania tarentolae* (*L.tarentolae*) που εκφράζουν τη μονομερή κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη mCherry από τον οργανισμό *Discosoma sp.* ή τον μεταφορέα νουκλεοσιδικών βάσεων rSNBT1 από τον *Rattus norvegicus*, σημασμένο με την κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη mRFP1.

Ο οργανισμός *Leishmania tarentolae* (*L.tarentolae*) είναι ένα είδος του πρωτοζωικού παρασίτου *Leishmania* από την οικογένεια των Τρυπανοσωματίδων. Απομονώθηκε για πρώτη φορά από τη σαύρα *Moorish gecko Tarentola mauritanica* και ανήκει στο γένος *Sauroleishmania*, που δεν θεωρείται παθογόνο για τον άνθρωπο, σε αντίθεση με άλλα είδη *Leishmania* που όταν μεταφερθούν στο θηλαστικό ξενιστή με τσίμπημα του εντόμου ξενιστή (σκνίπες του γένους *Phlebotomus* ή *Lutzomyia*) προκαλούν ένα ευρύ φάσμα ασθενειών που ονομάζεται Λεισμανίαση.

Λόγω της μη παθογένειας στον άνθρωπο, το πρωτόζωο *L. tarentolae* μπορεί να αναπτυχθεί σε συνθήκες βιοασφάλειας S1 και σε μεγάλο όγκου καλλιέργειες στους 25°C. Επιπλέον, το πρωτόζωο *L. tarentolae* έχει σύντομο κυτταρικό κύκλο (~10 ώρες), επιτρέπει αποτελεσματική N-γλυκοζυλίωση πρωτεϊνών των θηλαστικών και εμφανίζει φυσική αυξοτροφία σε διάφορα αμινοξέα που επιτρέπει ενσωμάτωση στις πρωτεΐνες του αμινοξέων σημασμένων με βαρέα άτομα για δομικές μελέτες με NMR. Για όλους αυτούς τους λόγους έχει προταθεί ως εναλλακτικό σύστημα ετερόλογης έκφρασης πρωτεϊνών κατώτερων και ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών για δομικές και λειτουργικές μελέτες τους και για βιοτεχνολογικές εφαρμογές.

Χρησιμοποιήσαμε αυτό τον οργανισμό *L. tarentolae* για να εκφράσουμε α) την κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη mCherry προκειμένου να μελετήσουμε τη χρησιμότητά της ως βιοαισθητήρα (biosensor) σε μελέτες σε παθογόνα είδη *Leishmania* (π.χ. *Leishmania donovani*, *Leishmania major* κλπ) καθώς επίσης και για τη χρήση των διαγονιδιακών παρασίτων *L. tarentolae*-mCherry για έλεγχο αντιλεισμανιακών φαρμάκων και β) τον διαμεμβρανικό μεταφορέα rSNBT1 νουκλεοσιδικών βάσεων της οικογένειας μεταφορέων NAT/NCS2, προκειμένου να μελετηθούν λειτουργικά χαρακτηριστικά του σε έναν ευκαρυωτικό οργανισμό που πολλαπλασιάζεται σχετικά γρήγορα σε σχέση με κυτταρικές σειρές θηλαστικών έτσι ώστε στη συνέχεια να χρησιμοποιηθεί για απομόνωση ικανής ποσότητας της πρωτεΐνης rSNBT1 για κρυστάλλωση και δομικές μελέτες.

Αρχικά έγινε κλωνοποίηση των γονιδίων *mcherry* και *rsnbt1* σε πλασμιαδικούς φορείς, ειδικούς για έκφραση σε παρασιτικά πρωτόζωα της οικογένειας των Τρυπανοσωματίδων (π.χ.

pLexsy-sat), μετά από ενίσχυσή τους με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) από πλασμίδια που τα περιείχαν και εισαγωγή των προϊόντων της PCR στον φορέα pLexsy-sat μετά από πέψη με κατάλληλα για την κλωνοποίηση ένζυμα περιορισμού και σύνδεση με ένζυμο λιγάσης. Η δημιουργία των διαγονιδιακών στελεχών *L. tarentolae* έγινε με εισαγωγή των αντίστοιχων πλασμιδίων με ηλεκτροδιάτρηση σε κύτταρα *L. tarentolae* στελέχους parrot και επιλογή διαγονιδιακών πληθυσμών με καλλιέργεια σε κατάλληλο αντιβιοτικό (Nourseothricin). Η έκφραση της mCherry από τα διαγονιδιακά παράσιτα επιβεβαιώθηκε με μικροσκοπία φθορισμού. Το πλασμιδιακό όχημα pLexsy-sat-mcherry που κατασκευάστηκε στο πλαίσιο αυτής της διπλωματικής εργασίας θα χρησιμοποιηθεί ως φορέας κλωνοποίησης για έκφραση χμιαϊκών mCherry πρωτεϊνών σε κύτταρα του πρωτόζωου *Leishmania* για μελέτη του υποκυτταρικού εντοπισμού τους και των λειτουργικών τους ιδιοτήτων καθώς επίσης και για τη χρήση των διαγονιδιακών παρασίτων *L. tarentolae*-mCherry για έλεγχο αντιλεϊσμανιακών φαρμάκων.

Το γονίδιο του μεταφορέα rSNBT1 κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pLexsy-sat-mrfp1 στο 5' άκρο του γονιδίου που εκφράζει την μονομερή φθορίζουσα πρωτεΐνη mRFP1 με συνεχόμενο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης. Τα παράσιτα *L. tarentolae* που φέρουν το πλασμίδιο pLexsy-sat-rsnbt1-mrfp1, μετά από ηλεκτροδιάτρηση με το κυκλικό πλασμίδιο για επισωμική έκφραση ή το ευθυγραμμισμένο πλασμίδιο για χρωμοσωμική ενσωμάτωση, επιλέχθηκαν με καλλιέργεια στο αντιβιοτικό Nourseothricin και τα χαρακτηριστικά ανάπτυξης των διαγονιδιακών πληθυσμών μελετήθηκαν σε σύγκριση με κύτταρα *L. tarentolae* αγρίου τύπου. Η επιβεβαίωση της έκφρασης του μεταφορέα rSNBT1-mRFP1 ως προς τον σωστό εντοπισμό του στην πλασματική μεμβράνη του παρασίτου έγινε με συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού. Η έκφραση του σωστού μεγέθους της υβριδικής πρωτεΐνης rSNBT1-mRFP1 (~92 KDa) επιβεβαιώθηκε με ανοσοαποτύπωμα Western σε πρωτεϊνικό εκχύλισμα του παρασίτου, εμπλουτισμένο σε μεμβρανικές πρωτεΐνες, με χρήση ειδικού πολυκλωνικού αντισώματος έναντι της mRFP1.

Τέλος επιβεβαιώθηκε η λειτουργικότητα του rSNBT1-mRFP1 ως μεταφορέα νουκλεοβάσεων στα κύτταρα *L-tarentolae-rsnbt1-mrfp1* με έλεγχο πρόσληψης [³H]-Υποξανθίνης και πείραμα ανταγωνισμού-πρόσληψης [³H]-Υποξανθίνης από άλλες νουκλεοβάσεις.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Βιοτεχνολογία, Παρασιτολογία

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: *Leishmania tarentolae* Lexsy, Διαγονιδιακά πρωτόζωα *L. tarentolae*, Φθορίζουσες πρωτεΐνες, mCherry, Διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, μεταφορέας νουκλεοσιδικών βάσεων rSNBT1.

ABSTRACT

Aim of the present MSc thesis was to construct transgenic *Leishmania tarentolae* (*L. tarentolae*) strains expressing the red fluorescent monomeric protein mCherry from the organism *Discosoma sp.* or the nucleobase transporter rSNBT1 from *Rattus norvegicus* tagged with the red fluorescent protein mRFP1.

The *Leishmania tarentolae* organism (*L. tarentolae*) is a species of the protozoan parasite *Leishmania* from the Trypanosomatidae family belonging to the *Sauroleishmania* genus. It was initially isolated from the lizard *Tarentolae annularis*. *L. tarentolae* is considered non-pathogenic to humans, unlike other types of *Leishmania* which when they are transferred to the mammalian host by the bite of the insect vector (sandflies of the genus *Phlebotomus* and *Lutzomyia*) are causing a wide range of diseases called leishmaniasis.

As *L. tarentolae* is non-pathogenic to humans, it can be cultured in S1 biosafety conditions and in large volumes at 25 °C. Furthermore, the protozoan *L. tarentolae* has a short cell cycle (~ 10 hours), allows efficient N-glycosylation of mammalian proteins and exhibits natural auxotrophy in several amino acids which allows incorporation into proteins of labeled amino acids with heavy metals, essential step for NMR structural studies. For all these reasons, *L. tarentolae* has been proposed as an alternative system for heterologous expression of proteins from lower and higher eukaryotes in order to perform structural and functional studies and for biotechnological applications.

We used the *L. tarentolae* organism to express 1) the red fluorescent protein mCherry in order to study its utility as a biosensor in studies for pathogenic *Leishmania* species (e.g. *Leishmania donovani*, *Leishmania major* etc.) also use the transgenic parasites *L. tarentolae*-mCherry for antileishmanial drug screening and 2) the nucleobase transmembrane transporter rSNBT1 which belongs to the NAT / NCS2 transporters' family in order to study its functional characteristics in an eukaryotic organism dividing faster and growing in less expensive medium than mammalian cell lines with the aim to isolate from these cells a sufficient amount of the transporter for crystallization and structural studies.

Initially, we performed cloning of the *mcherry* and *rsnbt1* genes in plasmid vectors specific for protein expression in protozoan cells from the *Trypanosomatidea* family (e.g. pLexsy-sat). These genes were amplified by PCR from plasmid DNA containing them and the PCR products obtained were inserted into digested with the appropriate restriction enzymes pLexsy-sat vector. Generation of the *L. tarentolae parrot II* transgenic strains was performed by electroporating the corresponding plasmids into the protozoan cells followed by selection with antibiotic pressure (Nourseothricin). Expression of the mCherry from transgenic cells

was confirmed by fluorescence microscopy. The plasmid vector pLexsy-sat-*mcherry* constructed in this work will be further used as a cloning vector for expression of chimeric proteins with mCherry in cells of other *Leishmania* species in order to study their subcellular localization and functional properties and also use the transgenic parasites *L. tarentolae*-mCherry for antileishmanial drug screening.

The gene coding for the rSNBT1 transporter was cloned into the pLexsy-sat-*mrfp1* expression vector at the 5' end and in frame with the gene coding for the monomeric mRFP1 fluorescent protein. Following electroporation, the *L. tarentolae* cells carrying the pLexsy-sat-*rsnbt1*-*mrfp1* plasmid, covalent closed circular for episomal expression or a 7800bp fragment of the linearized plasmid for chromosomal integration, were selected by culturing in the presence of the antibiotic Nourseothricin as mentioned above for the mCherry expressing transgenic populations. The growth characteristics of all the *L. tarentolae* transgenic populations were studied in comparison to wild type cells. Confirmation of the rSNBT1-mRFP1 expression and correct localization to the protozoan plasma membrane was followed by confocal fluorescence microscopy. The correct size of the expressed rSNBT1-mRFP1 hybrid protein was confirmed by Western blotting using a specific anti-mRFP1 antibody in protein cell extracts enriched in membrane proteins.

Finally, the function of rSNBT1-mRFP1 as nucleobase transporter in the transgenic *L. tarentolae*-rSNBT1-mRFP1 cells was confirmed by an uptake assay using [³H]-hypoxanthine as transport substrate and in competition of [³H]-hypoxanthine uptake experiments with other nucleobases.

SUBJECT AREA: Biotechnology, Protozoan parasite biology

KEYWORDS: *Leishmania tarentolae* LEXSY, recombinant protein expression, Fluorescent proteins, mCherry, Transmembrane proteins, Nucleobase transporter rSNBT1.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΚΟΠΟΣ	21
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	22
1 Εισαγωγή	23
1.1 Το πρωτόζωο <i>Leishmania</i>	23
1.1.1 Συστηματική κατάταξη του πρωτοζωικού παρασίτου <i>Leishmania</i>	23
1.1.2 Μορφολογικά στάδια και βιολογικός κύκλος	24
1.2 Η νόσος της Λεισμανίασης	26
1.3 Το πρωτόζωο <i>Leishmania tarentolae</i>	27
1.4 Φθορίζουσα πρωτεΐνη mCherry	31
1.4.1 Εφαρμογές και χρήσεις των φθορίζουσών πρωτεϊνών στη Βιολογία και την Ιατρική.....	31
1.4.2 Δομή της μονομερούς mCherry	32
1.5 Μεταφορείς Νουκλεοβάσεων	36
1.5.1 Μεταφορέας rSNBT1 / Slc23a4	39
1.5.2 Δομή του μεταφορέα rSNBT1	40
2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ	43
2.1 Βιοπληροφορική μελέτη του γονιδίου του μεταφορέα rSNBT1 και της πρωτεΐνης mCherry	43
2.2 Κλωνοποίηση των γονιδίων της mCherry (<i>mcherry</i>) και του rSNBT1 (<i>rsnbt1</i>) σε πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης	43
2.2.1 Ενίσχυση των γονιδίων <i>mcherry</i> και <i>rsnbt1</i> με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).....	43
2.2.2 Μέτρηση της συγκέντρωσης του DNA	45
2.2.3 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.....	45
2.2.4 Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης (gel extraction)	46
2.2.5 Απομόνωση του DNA από το διάλυμα της αντίδρασης της PCR.....	47

2.2.6 Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες.....	47
2.2.7 Αποφωσφορυλίωση του DNA.....	48
2.2.8 Αντίδραση σύνδεσης του πλασμιδιακού φορέα με το ένθεμα (ligation)	49
2.2.9 Μετασηματισμός επιδεκτικών κυττάρων <i>E. coli</i> (στελέχη TOP10F' και BL21) με τη μέθοδο του θερμικού σοκ	49
2.2.10 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργεια μικρής έκτασης (miniprep) ...	51
2.2.11 Αποθήκευση βακτηρίων σε διάλυμα γλυκερόλης (cryopreservation).....	52
2.2.12 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργεια μεγάλης έκτασης (midiprep).....	53
2.3 Αλληλούχιση του DNA (sequencing).....	54
2.4 Έκφραση, απομόνωση και καθαρισμός ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών από βακτήρια.....	55
2.4.1 Έκφραση της mCherry σε βακτήρια έκφρασης BL21	55
2.4.2 Επαγωγή της έκφρασης της mCherry σε βακτήρια έκφρασης BL21.....	56
2.5 Ανοσοαποτύπωση Western (Western blot).....	57
2.5.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου με SDS (SDS-PAGE)	57
2.5.2 Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης	60
2.5.3 Ανοσοενζυμική ανίχνευση πρωτεϊνών	61
2.6 Αποδέσμευση αντισωμάτων και επαναχρησιμοποίηση της μεμβράνης.....	62
2.7 Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford	63
2.8 Κυτταροκαλλιέργειες	64
2.8.1 Πρωτοζωικά κύτταρα	64
2.9 Ηλεκτροδιάτρηση πρωτοζωικών κυττάρων.....	66
2.10 Κλασμάτωση πρωτεϊνών με τη χρήση του απορρυπαντικού διγιτονίνη (digitonin fractionation).....	68
2.11 Ταυτοποίηση / καταμέτρηση των κυτταρικών πληθυσμών με κυτταρομετρία ροής (FACS).....	71
2.12 Μονιμοποίηση κυττάρων και μικροσκοπία φθορισμού.....	72

2.13 Λειτουργικός χαρακτηρισμός του μεταφορέα rSNBT1-mRFP1 στα παράσιτα <i>Leishmania tarentolae</i> . Πρόσληψη [³ H]-Υποξανθίνης.....	74
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ	77
3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	78
3.1 Κατασκευή πλασμιδιακών φορέων έκφρασης που φέρουν τα γονίδια <i>mcherry</i> και του <i>rsnbt1</i>	78
3.1.1 Κλωνοποίηση του γονιδίου <i>mcherry</i> στους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης pTriex 1.1 και pLexsy-sat με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	78
3.1.2 Ενσωμάτωση του γονιδίου <i>mcherry</i> στους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης pTriex 1.1 και pLexsy-sat.....	81
3.1.3 Απομόνωση θετικών κλώνων κυττάρων <i>E. coli</i> που περιέχουν τα πλασμίδια pTriex1.1- <i>mCherry</i> , pLexsy-sat- <i>mcherry</i>	87
3.1.4 Ταυτοποίηση της αλληλουχίας <i>mcherry</i> σε θετικούς κλώνους των πλασμιδίων pTriex1.1- <i>mcherry</i> και pLexsy-sat- <i>mcherry</i>	90
3.1.5 Κλωνοποίηση, ενσωμάτωση του γονιδίου <i>rsnbt1</i> στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pLexsy-sat- <i>mrfp1</i> με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) ...	91
3.1.6 Απομόνωση θετικών κλώνων κυττάρων <i>E. coli</i> που περιέχουν το πλασμίδιο pLexsy-sat- <i>rsnbt1-mrfp1</i> και ταυτοποίηση της αλληλουχίας <i>rsnbt1</i> σε θετικούς κλώνους του πλασμιδίου pLexsy-sat- <i>rsnbt1-mrfp1</i>	91
3.2 Ετερόλογη έκφραση των πρωτεϊνών mCherry και rSNBT1-mRFP1 σε πρωτόζωα <i>Leishmania tarentolae</i>	91
3.2.1 Κατασκευή διαγονιδιακών πρωτοζώων <i>L. tarentolae</i> που εκφράζουν τις πρωτεΐνες mCherry ή rSNBT1-mRFP1	91
3.2.2 Βιοχημικός υποκυτταρικός εντοπισμός της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης rSNBT1-mRFP1	101
3.2.3 Έλεγχος λειτουργικότητας του μεταφορέα rSNBT1-mRFP1 στα διαγονιδιακά πρωτόζωα <i>L. tarentolae</i> -rSNBT1-mRFP1	103
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	109
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ-ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ	111
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ	112

4	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	117
4.1	Κλωνοποίηση του γονιδίου <i>rsnbt1</i> στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pLexsy-sat <i>mrfp1</i>	117
4.2	Ενσωμάτωση του γονιδίου <i>rsnbt1</i> στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης και pLexsy-sat	119
4.3	Έκφραση και απομόνωση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης mCherry-8His από κύτταρα <i>E. coli</i>	120

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1. Συστηματική κατάταξη του γένους <i>Leishmania</i> [1].....	23
Πίνακας 1.2. Σύγκριση μεταξύ τεσσάρων συστημάτων έκφρασης [15].....	30
Πίνακας 1.3. Φασματοσκοπικές ιδιότητες της mCherry. Σύγκριση με την GFP, mRFP1, DsRed και άλλες φθορίζουσες πρωτεΐνες (http://www.olympusconfocal.com/applications/fpcolorpalette.html). Ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης εκφράζει πόσο αποδοτικά μια χημική ουσία απορροφά φως σε συγκεκριμένο μήκος κύματος.	34
Πίνακας 2.1. Μίγμα αντίδρασης PCR για την ενίσχυση του γονιδίου <i>mcherry</i>	44
Πίνακας 2.2. Πήκτωμα διαχωρισμού.....	58
Πίνακας 2.3. Πήκτωμα επιστοίβασης.....	59
Πίνακας 3.1. Εκκινητές PCR για την κλωνοποίηση του <i>mcherry</i>	79
Πίνακας 3.2. Παράμετροι που εφαρμόστηκαν στον κυτταρομετρητή ροής για ανάλυση των κυτταρικών πληθυσμών <i>L. tarentolae</i> αγρίου τύπου και <i>L. tarentolae-mCherry</i>	94
Πίνακας 3.3. Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της Εικόνας 3.20	94
Πίνακας 3.4. Στον πίνακα αναγράφονται οι κωδικοί των αλληλουχιών DNA στο γονιδίωμα της <i>L. tarentolae ParrotTarII</i> που κωδικοποιούν για υποθετικούς μεταφορείς της οικογένειας NT. Η εύρεση έγινε με ανάλυση BLAST από τη βάση δεδομένων TriTryp και NCBI, χρησιμοποιώντας ως αλληλουχία σύγκρισης τις αλληλουχίες DNA των NT1(LmjF.15.1230), NT2 (LmjF.36.1940), NT3 (LmjF.13.1210) και NT4 (Lmj.110590) του είδους <i>Leishmania major</i> . Με τον όρο Score συμβολίζεται το ποσοστό ταύτισης του γονιδίου της <i>L. tarentolae Parrot TarII</i> με την αλληλουχία του μεταφορέα της <i>L. major</i> . Με τον όρο P (N) συμβολίζεται η πιθανότητα του γονιδίου να ανήκει στην οικογένεια του μεταφορέα που βρέθηκε μέσω του BLAST. Αναφέρεται επίσης και το ποσοστό ομοιότητας με τον ομόλογο μεταφορέα της <i>L. major</i> . Όσο μεγαλύτερος ο αρνητικός εκθέτης του e τόσο μεγαλύτερη η πιθανότητα ομολογίας.	104
Πίνακας 3.5. Μεταφορείς πουρινών και πυριμιδινών στις <i>Leishmania donovani</i> και <i>Leishmania major</i> [44].....	108
Πίνακας 4.1. Εκκινητές PCR για τον rSNBT1.....	117

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1. Κλαδόγραμμα του γένους <i>Leishmania</i> βασισμένο σε MLEE ανάλυση (τυποποίηση 80 στελεχών με 13 ισοένζυμα) [2]. Στο κλαδόγραμμα παρατηρείται η ομαδοποίηση των ειδών του Παλιού Κόσμου (Ευρώπη - Ασία) που φαίνεται να έχουν ένα κοινό πρόγονο με τα υπόλοιπα είδη του υπογένους <i>Leishmania</i> στον Νέο Κόσμο (Αμερική). Παρουσιάζεται επίσης ότι τα συμπλέγματα του υπογένους <i>Viannia</i> έχουν και αυτά κοινή καταγωγή.....	24
[7]Εικόνα 1.2. Προμαστιγωτή και αμαστιγωτή μορφή του πρωτόζωου <i>Leishmania</i> [8].....	25
Εικόνα 1.3. Εικόνες των εντόμων <i>Phlebotomus</i> (αριστερά) και <i>Lutzomyia</i> (δεξιά) (http://www.keele.ac.uk/depts/aep/images/rdw%20phleb.jpg) (http://www.pragas.com.br/noticias/destaques/images/infeccao_bacteriana01.jpg)	26
Εικόνα 1.4. Κύκλος ζωής του παρασίτου <i>Leishmania</i> στον ασπόνδυλο και στο σπονδυλωτό ξενιστή (http://www3.niaid.nih.gov/NR/rdonlyres/leishDiagram1.jpg)	26
Εικόνα 1.5. Α. Κορίτσι από την Καμπούλ με δερματική λεισμανίαση και Β. Πληγή Δερματικής Λεισμανίασης.	27
Εικόνα 1.6. Α. Βλεννογονοδερματική λεισμανίαση (αριστερά) και Β. αγόρι με σπλαχνική λεισμανίαση (https://web.stanford.edu/class/humbio103/ParaSites2006/Leishmaniasis/Mucocutaneous.htm) (http://web.stanford.edu/group/parasites/ParaSites2003/Leishmania/leishmaniasis_boy2.jpg)	27
Εικόνα 1.7. Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης (Western blot) από υπερκείμενα καλλιέργειας του στελέχους <i>L. tarentolae</i> που εκφράζει την ανθρώπινη ερυθροποιητίνη (huEPO) με ετικέτα 6 ιστιδινών στο C-τελικό της άκρο [12].....	29
Εικόνα 1.8. Εικόνες έμμεσου ανοσοφθορισμού από παράσιτα <i>L. tarentolae</i> wt λογαριθμικής φάσης (πάνω) και στατικής φάσης (κάτω) με συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού. Για τον έμμεσο ανοσοφθορισμό χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό αντίσωμα αντι- α -Tubulin (1:300) από ποντίκι και δεύτερο αντίσωμα anti-mouse συζευγμένο με την πράσινη φθορίζουσα χρωστική Alexa Fluor 488. Οι εικόνες δεξιά είναι αντίθεση φάσης. Scale bar: 4 μ m.[<i>A. Δούκας & X. Μπολέτη, αδημοσίευτα αποτελέσματα</i>].	30
Εικόνα 1.9. Εικόνες από θαλάσσιες ανεμώνες του γένους <i>Discosoma</i>	33
Εικόνα 1.10. Διαγραμματική απεικόνιση της κατασκευής μονομερούς φθορίζοντος πολυπεπτιδίου από την τετραμερή DsRed. Σε κόκκινο πλαίσιο είναι η mCherry [28].	33

Εικόνα 1.11. Φάσμα διέγερσης και εκπομπής διαφόρων φθορίζουσών πρωτεϊνών συμπεριλαμβανόμενης και της mCherry.....	35
Εικόνα 1.12. Νουκλεοτιδική και αμινοξική αλληλουχία της mCherry (GenBank: AY678264.1).....	35
Εικόνα 1.13. Α. Δομικό μοντέλο 3D αναπαράστασης της φθορίζουσας πρωτεΐνης mCherry, Β. Στερεοχημική δομή του χρωμοφόρου της mCherry.....	36
Εικόνα 1.14. Α. Κρυσταλλογραφικός χάρτης του καταλυτικού κέντρου της GFP. Β. Αντιδράσεις που δημιουργούν το Χρωμοφόρο της GFP [29]	36
Εικόνα 1.15. Δομές των πέντε κοινών νουκλεοβάσεων και αντιπροσωπευτικών νουκλεοσιδίων και νουκλεοτιδίων http://what-when-how.com/molecular-biology/nucleotides-nucleosides-and-nucleobases-molecular-biology/	37
Εικόνα 1.16. Φυλογενετική απεικόνιση της οικογένειας NAT/NCS2 (κατασκευάστηκε με το πρόγραμμα MEGA). Με κόκκινο πλαίσιο τονίζεται ο μεταφορέας rSNBT1 [62].....	40
Εικόνα 1.17. Μοντέλο δομής του μεταφορέα rSNBT1 με βάση την ομολογία του με τον μεταφορέα UraA του οποίου η δομή είναι λυμένη (3QE7): Οι έλικες του τομέα του πυρήνα φαίνονται στη χωροπληρωτική αναπαράσταση (TM 1-3 και 8-10) (κόκκινο) και του τομέα της πύλης με τις κορδέλες (μπλε) (<i>Εργαστήριο Ευστάθιου Φριλλίγγου, αδημοσίευτα αποτελέσματα</i>).....	41
Εικόνα 2.1. Το μόριο της διγυτονίνης.....	69
Εικόνα 3.1. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v των προϊόντων της πέψης του pcDNAIII- <i>mcherry</i> με τα ένζυμα περιορισμού BamHI / EcoRI. 1) Πλασμίδιο pcDNAIII- <i>mcherry</i> πριν την πέψη, 2) πλασμίδιο pcDNAIII- <i>mcherry</i> μετά την πέψη, M) μάρτυρας μοριακών μεγεθών	79
Εικόνα 3.2. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v των προϊόντων της αντίδρασης PCR, με ανάστροφο εκκινητή κατάλληλο για τον φορέα pTriex1.1 και pLexsy-sat. 1) <i>mcherry</i> . M) μάρτυρας μοριακών μεγεθών 100bp.....	81
Εικόνα 3.3. Χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pTriex1.1.....	82
Εικόνα 3.4. Οι θέσεις περιορισμού για κλωνοποίηση γονιδίων στον πλασμιδιακό φορέα pTriex1.1 καθώς και ρυθμιστικά στοιχεία για έκφραση των εισαχθέντων γονιδίων σε προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά συστήματα (σε μπλε πλαίσιο οι θέσεις εισαγωγής της	

<i>mcherry</i>). Παρουσιάζεται επίσης η αλληλουχία που κωδικοποιεί τη μοριακή ετικέτα των 8 ιστιδινών (His-Tag)(σε κόκκινο πλαίσιο).	83
Εικόνα 3.5. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v των προϊόντων της αντίδρασης πέψης 1) του πλασμιδιακού φορέα (pTriex1.1) και 2) του ενθέματος (<i>mcherry</i>) με τα ίδια ένζυμα περιορισμού BglII/XhoI. M) μάρτυρας μοριακών μεγεθών (Kb και bp)	83
Εικόνα 3.6. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v των προϊόντων της αντίδρασης σύνδεσης (ligation). 1) Αναλογία ενθέματος-πλασμιδίου 1:3, 2) Αναλογία ενθέματος-πλασμιδίου 1:5, 3) Αρνητικός μάρτυρας (άδειο πλασμίδιο χωρίς ένθεμα, M) μάρτυρας μοριακών μεγεθών (bp και Kb).....	84
Εικόνα 3.7. Α. Πλασμιδιακός φορέας pLexsy-sat και θέσεις κλωνοποίησης. Β. Πλασμίδιο pLexsy-sat- <i>Ldmacp-mrfp1</i> . Η αλληλουχία του γονιδίου <i>mcherry</i> εισήχθη στις θέσεις BglII/XhoI.	85
Εικόνα 3.8. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%w/v των προϊόντων πέψης του πλασμιδίου pLexsy-sat- <i>Ldmacp-mrfp1</i> . M: Μάρτυρας μοριακών μεγεθών (Kb) Οι δύο ζώνες που εμφανίζονται στις 976 και 690 Kb αντιστοιχούν στα ενθέματα των γονιδίων <i>Ldmacp</i> (βέλος α.) και <i>mrfp1</i> (βέλος β.) αντίστοιχα.	86
Εικόνα 3.9. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v των προϊόντων της αντίδρασης σύνδεσης (ligation). 1) Αρνητικός μάρτυρας (πλασμιδιακός φορέας χωρίς ένθεμα), 2) Αναλογία ενθέματος-πλασμιδιακού φορέα 1:3, 3) Αναλογία ενθέματος-πλασμιδιακού φορέα 1:5, M) Μάρτυρας μοριακών μεγεθών (Kb)	86
Εικόνα 3.10. Ηλεκτροφόρηση της αντίδρασης διπλής πέψης του πλασμιδίου pTriex1.1- <i>mcherry</i> με τα ένζυμα BglII/XhoI σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v. M) μοριακός μάρτυρας (1Kb και bp), A) 1-10: πλασμίδιο pTriex1.1- <i>mCherry</i> (1:3) από τις 20 αποικίες μετά από την πέψη και B) 1-10: πλασμίδιο pTriex1.1- <i>mCherry</i> (1:5). Για αλληλούχιση επιλέχθηκαν οι κλώνοι A) 10. B) 5, με ένθεμα 717 ζευγών βάσεων.	88
Εικόνα 3.11. Προβλεπόμενη εμφάνιση των ζωνών του πλασμιδίου pTriex1.1- <i>mcherry</i> μετά τη διπλή πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα BglII/XhoI, όπως αναφέρεται στην προηγούμενη εικόνα, σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v, σύμφωνα με τον υπολογιστικό αλγόριθμο της εταιρείας New England Biolabs (http://tools.neb.com/NEBcutter2/), M) Μοριακός μάρτυρας (Kb). ..	88
Εικόνα 3.12. Ηλεκτροφόρηση της αντίδρασης διπλής πέψης του πλασμιδίου pLexsy-sat- <i>mcherry</i> με τα ένζυμα BglII/XhoI σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v M) μοριακός μάρτυρας (Kb), 1-10) πλασμίδια pLexsy-sat- <i>mCherry</i> από 20 θετικές αποικίες μετά από την πέψη. Για	

αλληλούχιση επιλέχθηκαν οι κλώνοι 9 και 10 από τους συνολικά πέντε θετικούς κλώνους με ένθεμα 717 ζευγών βάσεων..... 88

Εικόνα 3.13. Προβλεπόμενη εμφάνιση των ζωνών του πλασμιδίου pLexsy-mCherry μετά τη διπλή πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα BglIII και XhoI, όπως αναφέρεται στην προηγούμενη εικόνα, σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v, σύμφωνα με τον υπολογιστικό αλγόριθμο της εταιρείας New England Biolabs (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>), M) μοριακός μάρτυρας (Kb)... 89

Εικόνα 3.14. Ηλεκτροφόρηση της αντίδρασης πέψης του πλασμιδίου pLexsy-sat-rsnbt1-mrfp1 με τα ένζυμα BglIII/XhoI σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v. M) Μοριακός μάρτυρας (Kb), πλασμιδιακό DNA pLexsy-sat-rsnbt1-mrfp1. Οι δύο ζώνες που εμφανίζονται χαμηλότερα αφορούν τον μεταφορέα rSNBT1 και την mRFP1 αντίστοιχα..... 89

Εικόνα 3.15. Αναμενόμενη εμφάνιση των ζωνών του πλασμιδίου pLexsy-sat-rsnbt1-mrfp1 μετά την πέψη, όπως αναφέρεται στην εικόνα 3.17, σύμφωνα με τον υπολογιστικό αλγόριθμο της εταιρείας New England Biolabs (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>). M) Μοριακός μάρτυρας (Kb και bp)..... 90

Εικόνα 3.16. Ηλεκτροφόρηση της αντίδρασης πέψης του πλασμιδίου pLexsy-sat-rsnbt1-mrfp1 με το ένζυμο SmaI, για χρωμοσωμική έκφραση, σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v. M) Μοριακός μάρτυρας (Kb). Με βέλος υποδεικνύεται το ευθύγραμμο τμήμα του πλασμιδίου μετά από την πέψη που φέρει το γονίδιο *rsnbt1-mrfp1*. Η δεύτερη ζώνη που εμφανίζεται χαμηλότερα αφορά το κομμάτι από το πλασμίδιο που αφαιρείται και δεν χρησιμοποιείται για την χρωμοσωμική έκφραση. 92

Εικόνα 3.17. Εντοπισμός της mCherry σε διαγονιδιακά παράσιτα, *L. tarentolae*-mCherry με συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού (βλ. παράγραφο 2.12). A.1) Ο κόκκινος φθορισμός της mCherry ανιχνεύτηκε με την γραμμή laser Argon, 543 nm. A.2). Η ίδια εικόνα παρατίθεται σε ασπρόμαυρη για καλύτερη αντίθεση. A.3) Αντίθεση φάσης και κόκκινος φθορισμός μαζί (merge). Κλίμακα μεγέθους (Scale bar): 20 μ m. 93

Εικόνα 3.18. Ανάλυση με FACS των παρασίτων *L. tarentolae* αγρίου τύπου (wt) και *L. tarentolae*-mCherry. Έγινε ανάλυση 10.000 κυττάρων για κάθε δείγμα. A) (αριστερά) ιστογράμματα των παραμέτρων Texas Red-A/FSC-A και SSC-A/FSC-A. B) (δεξιά): dot plots των παραμέτρων FSC-H και SSC. Τα αποτελέσματα ελήφθησαν με τις ρυθμίσεις: FSC-A=355, SSC-A=325, Texas Red-A=600..... 94

Εικόνα 3.19. Φωτογραφίες συνεστιακής μικροσκοπίας από διαγονιδιακά παράσιτα *L. tarentolae*-rSNBT1-mRFP1 που εκφράζουν επισωμικά τον μεταφορέα rSNBT1-mRFP1 (*L.*

tarentolae-rSNBT1-mRFP1-EP). Ο κόκκινος φθορισμός ελήφθη με τη γραμμή Argon laser 543 nm. Χρησιμοποιήθηκε φακός Arochromat 63X και έγινε ηλεκτρονική μεγέθυνση της εικόνας 2X. Κάθε εικόνα που αντιπροσωπεύει ένα διαφορετικό πεδίο έχει μέγεθος 1024X1024 pixels. Ο κόκκινος φθορισμός παρουσιάζεται και σε ασπρόμαυρη εικόνα για καλύτερη αντίθεση. Στη δεξιά στήλη το κάθε πεδίο απεικονίζεται με μικροσκοπία αντίθεσης φάσης. Η κάθε εικόνα είναι max projection από 5 οπτικές τομές που ελήφθησαν με step size 0,5 μm. Η κλίμακα μεγέθους είναι 8μm..... 95

Εικόνα 3.20. Φωτογραφίες συνεστιακής μικροσκοπίας από διαγονιδιακά κύτταρα *L. tarentolae*-rSNBT1-mRFP1 που εκφράζουν επισωματικά τον μεταφορέα rSNBT1-mRFP1 (*L. tarentolae*-rSNBT1-mRFP1-EP). A.1) Ο κόκκινος φθορισμός του rSNBT1-mRFP1 ανιχνεύτηκε με τις συνθήκες που περιγράφηκαν στην Εικόνα 3.24. A.2) Η ίδια εικόνα παρατίθεται σε ασπρόμαυρη για καλύτερη αντίθεση. A.3) Αντίθεση φάσης. Ηλεκτρονική μεγέθυνση της εικόνας 6X. Η κλίμακα μεγέθους είναι 4 μm. Με αστερίσκο υποδεικνύεται ο πυρήνας των πρωτοζωικών κυττάρων και με κεφαλή βέλους η περιοχή έκφυσης του μαστιγίου (flagellar pocket). 96

Εικόνα 3.21. Φωτογραφίες συνεστιακής μικροσκοπίας από διαγονιδιακά παράσιτα *L. tarentolae*-rSNBT1-mRFP1 που εκφράζουν χρωμοσωμικά τον μεταφορέα rSNBT1-mRFP1 (*L. tarentolae*-rSNBT1-mRFP1-CH). Οι εικόνες ελήφθησαν ακριβώς με τις ίδιες παραμέτρους έντασης laser, και ενίσχυσης φωτοπολλαπλασιαστή (PMT gain) όπως αυτές που παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.21. 96

Εικόνα 3.22. Φωτογραφίες συνεστιακής μικροσκοπίας από διαγονιδιακά παράσιτα *L. tarentolae*-rSNBT1-mRFP1 που εκφράζουν χρωμοσωμικά τον μεταφορέα rSNBT1-mRFP1 (*L. tarentolae*-rSNBT1-mRFP1-CH). Η λήψη και η παρουσίαση των εικόνων γίνεται με τις ίδιες παραμέτρους όπως περιγράφεται στην Εικόνα 3.22. Με αστερίσκο υποδεικνύεται ο πυρήνας, με βέλος περιοχή της επιφανειακής μεμβράνης και με κεφαλή βέλους η περιοχή έκφυσης του μαστιγίου (flagellar pocket). Ηλεκτρονική μεγέθυνση της εικόνας 6X. Κλίμακα μεγέθους:4 μm..... 97

Εικόνα 3.23. Φωτογραφίες από συνεστιακή μικροσκοπία που απεικονίζουν τον rSNBT1-mRFP1 και την α-Τουμπουλίνη σε στατικής φάσης *L. tarentolae*-rSNBT1-mRFP1. Για σήμανση της α-Τουμπουλίνης με έμμεσο ανοσοφθορισμό χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό αντίσωμα α-Τουμπουλίνης (1:300) από ποντίκι και δεύτερο αντι-ποντικίσιο αντίσωμα συζευγμένο με την πράσινη φθορίζουσα χρωστική Alexa 488 (βλ. παράγραφο 2.12). Ο κόκκινος (mRFP1) (A.1) και πράσινος (Alexa 488) φθορισμός (A.2) παρουσιάζονται χωριστά

ως ασπρόμαυρες εικόνες και η αλληλεπικάλυψη τους στην εικόνα A.3 (merge). A.4) Αντίθεση φάσης. Η κλίμακα μεγέθους είναι 4 μm 100

Εικόνα 3.24. Φωτογραφίες από συνεστιακή μικροσκοπία που απεικονίζουν τον rSNBT1-mRFP1 και την την BiP/GRP78 (ΕΔ) σε στατικής φάσης *L. tarentolae*-rSNBT1-mRFP1 (βλ. παράγραφο 2.12). Για τον έμμεσο ανοσοφθορισμό χρησιμοποιήθηκε πολυκλωνικό αντίσωμα αντι- BiP/GRP78 από κουνέλι (αραίωση 1:500) και δεύτερο αντίσωμα anti-Rabbit συζευγμένο με την πράσινη φθορίζουσα χρωστική Alexa Fluor 488. Ο κόκκινος (mRFP1) (A.1) και ο πράσινος (Alexa 488) φθορισμός (A.2) παρουσιάζονται χωριστά ως ασπρόμαυρες εικόνες και η αλληλεπικάλυψη των δύο χρωστικών στην εικόνα A.3 (merge). A.4) Αντίθεση φάσης. Η κλίμακα μεγέθους είναι 4 μm 101

Εικόνα 3.25. Ανοσοαποτύπωση Western διαγονιδιακών παρασίτων *L. tarentolae*-rSNBT1-mRFP1 των κλασμάτων 1 έως 5 (6 ίζημα που έμεινε μετά από κατεργασία του κλάσματος 5 με 2% v/v Triton X-100) μετά από κλασμάτωση των πρωτεϊνών με διγλιτονίνη και ανάλυση σε SDS-PAGE 10% w/v. Η μεμβράνη επώαστηκε με καθαρισμένο αντι-mRFP1 αντίσωμα από κουνέλι που είχε παρασκευαστεί στο εργαστήριο, (συγκέντρωση 0,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) και, στη συνέχεια, με δεύτερο αντίσωμα έναντι ορού κουνελιού (anti-rabbit), συζευγμένα με HRP. Η εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών έγινε με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας (ECL). (M) Μοριακοί μάρτυρες (KDa). Τα βέλη υποδεικνύουν τον rSNBT1-mRFP1 και διάφορα πρωτεολυτικά κλάσματα με την mRFP1. Η χρώση της μεμβράνης με Ponceau-S παρατίθεται για έλεγχο της ποσότητας που φορτώθηκε στην γέλη πολυακρυλαμίδης. 102

Εικόνα 3.26. Ανοσοαποτύπωση Western διαγονιδιακών παρασίτων *L.tarentolae*-rSNBT1-mRFP1(επισωμικών και χρωμοσωμικών), *L. tarentolae*-wt και *L. tarentolae*-mRFP1 των κλασμάτων 4 και 5, μετά από κλασμάτωση των πρωτεϊνών με διγλιτονίνη και ανάλυση σε SDS-PAGE 10% w/v. Η μεμβράνη επώαστηκε με καθαρισμένο αντι-mRFP1 σε συγκέντρωση 0,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ και στη συνέχεια, με δεύτερο αντίσωμα έναντι ορού κουνελιού (anti-rabbit), συζευγμένα με HRP. Η εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών έγινε με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας (ECL). (M) Μοριακοί μάρτυρες (KDa). Τα βέλη υποδεικνύουν τον rSNBT1-mRFP1. Η χρώση της μεμβράνης με Ponceau-S παρατίθεται για έλεγχο της ποσότητας που φορτώθηκε στο gel. 103

Εικόνα 4.1. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v των προϊόντων πέψης του προϊόντος PCR *rsnbt1* και του pLexsy-sat-*mrfp1* με το ένζυμο περιορισμού BglII. 1) Ένθεμα (*rsnbt1*) 1845bp, 2) πλασμίδιο (pLexsy-sat-*mrfp1*) ~8000 bp, M) μάρτυρας μοριακών μεγεθών. 117

Εικόνα 4.2.Χάρτης του πλασμιδίου pLexsy-sat-rsnbt1-mrffp1..... 119

Εικόνα 4.3. Προσδιορισμός του ποσοστού του διαλυτού κλάσματος της mCherry-8His σε βακτηριακό ομογενοποίημα *E. coli* BL21 μετά από επώαση των βακτηρίων με IPTG (0,5mM, 3 ώρες, 37 °C). Ολικό ομογενοποίημα *E.coli* υποβλήθηκε σε φυγοκέντρηση (14000×g, 30 λεπτά) και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε ίσο όγκο διαλύματος λύσης. Ίσοι όγκοι του διαλυτού υπερκειμένου και του ιζήματος αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 12% w/v και έγινε μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης που ακολουθήθηκε από χρώση με Ponceau-S (αριστερή εικόνα). Στη συνέχεια η μεμβράνη επώαστηκε με αντι-His αντίσωμα (mouse monoclonal 1:1500 (stock 1mg/ml)) και δεύτερο αντίσωμα συζευγμένο με HRP (Μέθοδοι 2.5). Η εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών έγινε μετά από εμφάνιση με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας με αντιδραστήριο ECL και εμφάνιση με φωτοευαίσθητο φιλμ (Kodak)). Διαδρομή **1:** υπερκείμενο μετά από φυγοκέντρηση του ολικού ομογενοποιημάτος; Διαδρομή **2:** ίζημα μετά τη φυγοκέντρηση (14000×g, 30 λεπτά). Μ) Μοριακοί μάρτυρες (KDa). Το βέλος υποδεικνύει την ζώνη της mCherry..... 120

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1.1. N-γλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών στο στέλεχος *L. tarentolae* parrotII σε σύγκριση με τη γλυκοζυλίωση σε άλλα συστήματα έκφρασης πρωτεϊνών. Σημειωτέον ότι τα πρότυπα γλυκοζυλίωσης που λαμβάνονται σε κύτταρα θηλαστικών και σε *L. tarentolae* διαφέρουν μόνο στην παρουσία τελικού σιαλικού οξέος (N-acetylneuraminic acid) στα άκρα των αλυσίδων της διπλής αντένας των N-γλυκανών. 28

Σχήμα 2.1. Καμπύλη ανάπτυξης διαγονιδιακών παρασίτων *L. tarentolae*-mCherry και *L. tarentolae*-mRFP σε σύγκριση με κύτταρα *L. tarentolae* άγριου τύπου συναρτήσει της οπτικής απορρόφησης των κυττάρων στα 600 nm. Ο μέσος χρόνος διπλασιασμού του αριθμού των πρωτοζώων (doubling time) υπολογίστηκε σε 10±2 ώρες. 65

Σχήμα 2.2. Καμπύλη ανάπτυξης διαγονιδιακών παρασίτων *L. tarentolae*-rSNBT1-mRFP CH (Chromosomal) και *L. tarentolae*-rSNBT1-MRFP EP (Episomal) σε σύγκριση με κύτταρα *L. tarentolae* άγριου τύπου συναρτήσει της οπτικής απορρόφησης των κυττάρων στα 600 nm. Ο μέσος χρόνος διπλασιασμού του αριθμού των πρωτοζώων (doubling time) υπολογίστηκε σε 10±2 ώρες..... 65

Σχήμα 2.4. Διάγραμμα Venn που παρουσιάζει τον υποθετικό υποκυτταρικό εντοπισμό των πρωτεϊνών που προκύπτουν από την κλασμάτωση με διγτονίνη [77]. Στο διαλυτό κλάσμα 1 και 2 ανακτώνται κυρίως διαλυτές πρωτεΐνες. Στο κλάσμα 3 ανακτώνται κυρίως πρωτεΐνες μεμβρανικών οργανιδίων και στο κλάσμα 4 μιτοχονδρίων και κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Στο κλάσμα 5 συλλέγονται πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού, πυρήνα και της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Η ανάλυση έγινε με φασματομετρία μάζας..... 69

Σχήμα 3.1. Γραφική αναπαράσταση του **A)**, ποσοστού των παρασίτων *L. tarentolae*-rSNBT1-mRFP1 (EP και CH) που εκφράζουν ανιχνεύσιμα επίπεδα rSNBT1-mRFP1 και **B)**, μέσου όρου της έντασης φθορισμού/παρασίτο στους δύο διαγονιδιακούς πληθυσμούς (*L. tarentolae*-rSNBT1-mRFP1 EP (γκρίζο χρώμα) και rSNBT1-mRFP1-CH (μαύρο χρώμα)). Η ποσοτικοποίηση έγινε σε 8 οπτικά πεδία ανά περίπτωση σε συνολικά 100-150 παράσιτα που προσδιορίστηκαν από τις αντίστοιχες εικόνες αντίθεσης φάσης. Η καταμέτρηση των κυττάρων και των επιπέδων έντασης κόκκινου φθορισμού (mRFP1) στις ψηφιακές εικόνες έγινε σε max projections 5 οπτικών τομών (0,5 μm step size) με το πρόγραμμα Icy (<http://icy.bioimageanalysis.org/>, με εφαρμογή των αλγορίθμων: Intensity Projection και HK-means) με εφαρμογή των ίδιων παραμέτρων για όλα τα οπτικά πεδία..... 98

Σχήμα 3.2. Πρόσληψη [³H]-υποξανθίνης από πρωτόζωα *L. tarentolae*-rSNBT1-mRFP1 και *L. tarentolae* αγρίου τύπου. Στο διάγραμμα φαίνονται οι κρούσεις / 10⁸ κύτταρα ραδιοσημασμένης [³H]-Υποξανθίνης που τελικά μεταφέρθηκε μέσα στο παράσιτο, σε συνάρτηση με τον χρόνο επώασης των κυττάρων με το ραδιενεργό νουκλεοσίδιο. Τελική συγκέντρωση [³H]-Υποξανθίνης: 67nM και τελική συγκέντρωση ψυχρής Υποξανθίνης : 0,67μM. Η ειδική ενεργότητα [³H]-Υποξανθίνης είναι 31,5 Ci/mmol). Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο σχήμα προέρχονται από τρία ανεξάρτητα πειράματα εις διπλούν για κάθε χρόνο και για κάθε στέλεχος. 106

Σχήμα 3.3. Ανταγωνισμός πρόσληψης (κρούσεις/10⁸ κύτταρα/5 λεπτά) [³H]-Υποξανθίνης από μη ραδιοσημασμένες νουκλεοβάσεις Αδενίνης, Γουανίνης, Κυτοσίνης, Ουρακίλης και Υποξανθίνης (1mM) σε παράσιτα *L. tarentolae*-rSNBT1-mRFP1 CH και *L. tarentolae* wt. Η συγκέντρωση της [³H]-Υποξανθίνης στις αντιδράσεις πρόσληψης ήταν 67nM και της μη ραδιοσημασμένης Υποξανθίνης 0.67 μM. Η ειδική ενεργότητα [³H]-Υποξανθίνης που χρησιμοποιήθηκε ήταν 31,5 Ci/mmol (κρούσεις / 10⁸ κύτταρα). Τα αποτελέσματα στο σχήμα προέρχονται από δύο ανεξάρτητα πειράματα εις διπλούν για κάθε νουκλεοβάση..... 107

ΣΚΟΠΟΣ

Στην παρούσα εργασία, μελετάμε την ετερόλογη έκφραση μιας διαλυτής κόκκινης φθορίζουσας πρωτεΐνης από έναν κατώτερο ευκαρυωτικό οργανισμό, στο μη παθογόνο για τον άνθρωπο πρωτόζωο *Leishmania tarentolae*, καθώς και τις δυνατότητες των παρασίτων αυτών να εκφράσουν ετερόλογα μεμβρανικές πρωτεΐνες μεταφοράς πουρινών και πυριμιδινών από ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Για τη μελέτη της ετερόλογης έκφρασης της διαλυτής φθορίζουσας πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε η mCherry, που προέρχεται από ένα είδος μαλακών κοραλλιών, το *Discosoma sp.* Ως παράδειγμα για την ετερόλογη έκφραση μεμβρανικών πρωτεϊνών από ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, χρησιμοποιήθηκε ο μεταφορέας νουκλεοβάσεων αρουραίου rSNBT1 εκφρασμένος ως χιμαιρική πρωτεΐνη με την κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη mRFP1. Περαιτέρω στόχοι αυτής της εργασίας είναι α) το πλασμίδιο έκφρασης της mCherry να αξιοποιηθεί για την έκφραση σε κύτταρα *Leishmania* άλλων πρωτεϊνών ως υβριδικές με την mCherry για δομικές και λειτουργικές τους μελέτες β) τα διαγονιδιακά παράσιτα που εκφράζουν την mCherry να χρησιμοποιηθούν για τον έλεγχο αντιλειτουργικών φαρμάκων γ) τα διαγονιδιακά παράσιτα που εκφράζουν τον μεταφορέα rSNBT1-mRFP1 να χρησιμοποιηθούν για μελέτες δομής και λειτουργίας του συγκεκριμένου μεταφορέα που μέχρι στιγμής μπορεί να εκφραστεί επιτυχώς μόνο σε κύτταρα θηλαστικών και δ) η επιτυχής έκφραση του μεταφορέα rSNBT1 (διαμεμβρανική πρωτεΐνη με 14 διαμεμβρανικές περιοχές) να αποτελέσει προηγούμενο για προσπάθειες έκφρασης και άλλων μεμβρανικών ευκαρυωτικών πρωτεϊνών που δεν μπορούν ή είναι δύσκολο να εκφραστούν στα ήδη υπάρχοντα ετερόλογα συστήματα πρωτεϊνικής έκφρασης.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στην **εισαγωγή** της εργασίας γίνεται αναφορά

- 1) στο πρωτοζωικό παράσιτο *Leishmania*, στα διάφορα είδη του οποίου εντάσσονται και αρκετά παθογόνα για τον άνθρωπο
- 2) στο είδος της *Leishmania-tarentolae* και το σύστημα LEXSY που αποτελεί ένα εναλλακτικό σύστημα έκφρασης πρωτεϊνών από ανώτερα ευκαρυωτικά
- 3) στις φθορίζουσες πρωτεΐνες και τις σημαντικές εφαρμογές τους ως μοριακά εργαλεία στις Βιοϊατρικές επιστήμες
- 4) στους μεταφορείς νουκλεοσιδίων και νουκλεοβάσεων
- 5) στις τεχνικές και τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση των πειραμάτων.

1 Εισαγωγή

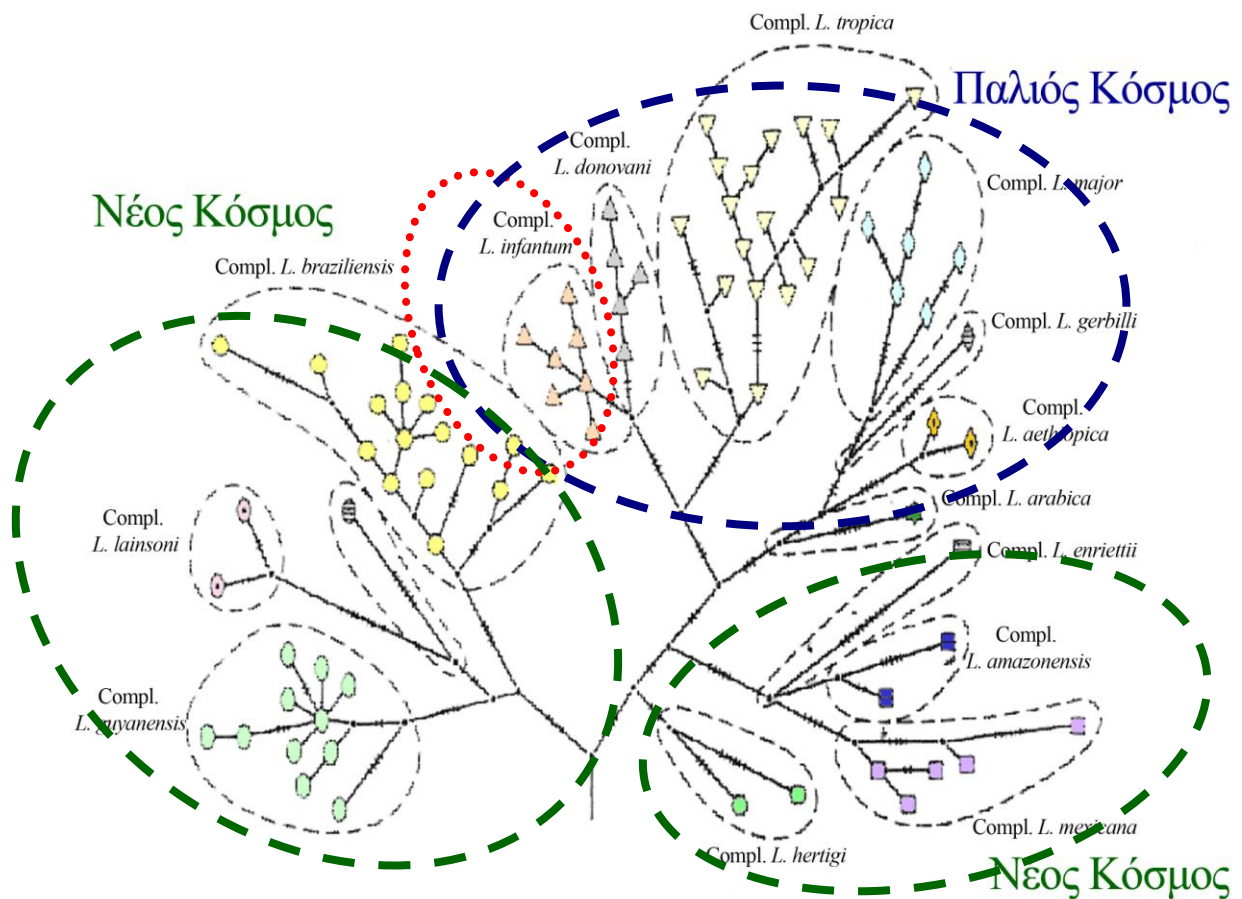
1.1 Το πρωτόζωο *Leishmania*

1.1.1 Συστηματική κατάταξη του πρωτοζωικού παρασίτου *Leishmania*

Το πρωτόζωο *Leishmania* ανήκει στην τάξη των κινητοπλαστειδών και στην εξελικτικά αρχαία οικογένεια των τρυπανοσωματιδών. Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει παράσιτα διαφόρων οργανισμών, συμπεριλαμβανομένων των φυτών, των εντόμων, των ψαριών, των αμφιβίων, των ερπετών και των θηλαστικών (*Trypanosoma*, *Leishmania*, *Endotrypanum*). Το γένος *Leishmania* περιλαμβάνει περίπου 20 είδη. Τα περισσότερα από αυτά έχει βρεθεί ότι είναι ικανά να μολύνουν τον άνθρωπο.

Πίνακας 1.1. Συστηματική κατάταξη του γένους *Leishmania* [1]

Βασίλειο	Πρώτιστα (Protista)				
Υπο-βασίλειο	Πρωτόζωα (<i>Protozoa</i>)				
Συνομοταξία	Σαρκομαστιγοφόρα (<i>Sarcomastigophora</i>)				
Υπο-συνομοταξία	Μαστιγοφόρα (<i>Mastigophora</i>)				
Κλάση	Ζωομαστιγοφόρα (<i>Zoomastigophorea</i>)				
Τάξη	Κινητοπλαστοειδή (<i>Kinetoplastida</i>)				
Υπο-τάξη	Τρυπανοσωματίνες (<i>Trypanosomatina</i>)				
Οικογένεια	Τρυπανοσωματίδες (<i>Trypanosomatidae</i>)				
Γένος	Λεϊσμάνια (<i>Leishmania</i>)				
Υπό-γένος	<i>Viannia</i>		<i>Leishmania</i>		<i>Sauroleishmania</i>
Είδος	<i>L. braziliensis</i> <i>L. peruviana</i>	<i>L. guyanensis</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. shawi</i>	<i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i> <i>L. chagasi</i> <i>L. archibaldi</i>	<i>L. major</i> <i>L. tropica</i> <i>L. killicki</i>	<i>L. ceramodactyli</i> <i>L. gulikae</i> <i>L. nicollei</i> <u><i>L. tarentolae</i></u>



Εικόνα 1.1. Κλαδόγραμμα του γένους *Leishmania* βασισμένο σε MLEE ανάλυση (τυποποίηση 80 στελεχών με 13 ισοένζυμα) [2]. Στο κλαδόγραμμα παρατηρείται η ομαδοποίηση των ειδών του Παλιού Κόσμου (Ευρώπη - Ασία) που φαίνεται να έχουν ένα κοινό πρόγονο με τα υπόλοιπα είδη του υπογένους *Leishmania* στον Νέο Κόσμο (Αμερική). Παρουσιάζεται επίσης ότι τα συμπλέγματα του υπογένους *Viannia* έχουν και αυτά κοινή καταγωγή.

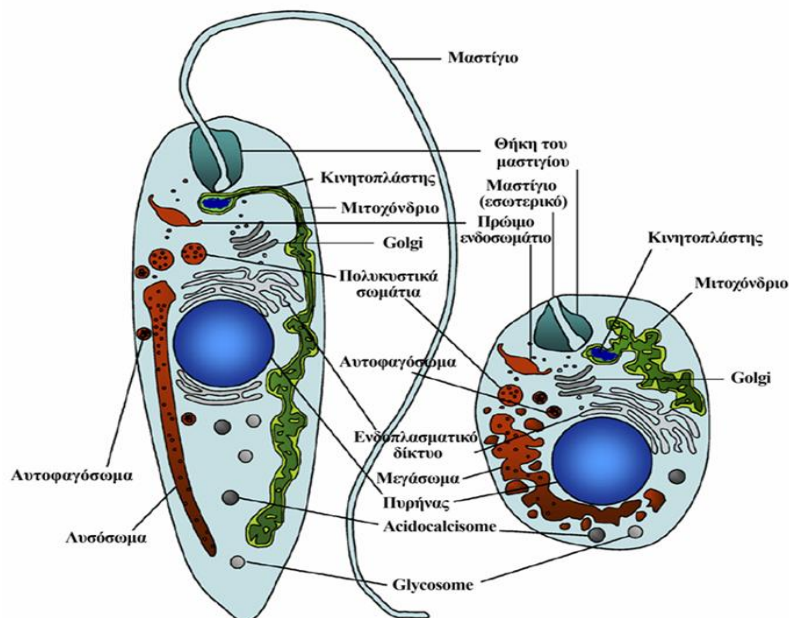
1.1.2 Μορφολογικά στάδια και βιολογικός κύκλος

Τα παράσιτα πρωτόζωα του γένους *Leishmania* εμφανίζονται σε δύο κύριες μορφές: στην προμαστιγωτή μορφή που απαντάται στον ασπόνδυλο ξενιστή (σκνίπα) και στην αμαστιγωτή μορφή που απαντάται σε «επαγγελματίες» φαγοκύτταρα (μακροφάγα, ουδετερόφιλα και δενδριτικά) αλλά και σε ινοβλάστες του δέρματος του σπονδυλωτού ξενιστή [3-5].

Η προμαστιγωτή μορφή είναι επιμήκης με μέγεθος 9-12 μm x 2-3 μm, φέρει μαστίγιο που εκφύεται από το πρόσθιο τμήμα του σώματος και έχει ίσο ή μεγαλύτερο μήκος από αυτό του σώματος του παρασίτου [6] (Εικόνα 1.2). Στο κέντρο υπάρχει ένας μεγάλος, σφαιρικός πυρήνας με σαφή πυρηνίσκο και περιφερική χρωματίνη. Στο κυτταρόπλασμα απαντώνται πολυάριθμα ριβοσώματα, συσκευή Golgi, κυστίδια λίπους, κοκκώδες, λείο ενδοπλασματικό δίκτυο και λυσοσώματα. Κοντά στην βάση του μαστιγίου υπάρχει ένας τροποποιημένος τύπος μιτοχονδρίου που περιέχει ένα δισκοειδή κινητοπλάστη, μια χαρακτηριστική δομή των

παρασίτων που ανήκουν στην τάξη των κινητοπλαστοειδών. Αυτός περιέχει δύο τύπους κυκλικών μορίων DNA που είναι γνωστά και ως kDNA. Η αμαστιγωτή μορφή είναι ωοειδής με διάμετρο 2-6 μm x 1,5-2 μm και φέρει έναν έκκεντρο πυρήνα με πυρηνίσκο και έναν κινητοπλάστη που καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο μέρος του κυττάρου. Ο υπόλοιπος χώρος του κυττάρου περιλαμβάνει τα ίδια οργανίδια με τη προμαστιγωτή μορφή του παρασίτου που όμως είναι λιγότερο ανεπτυγμένα. Επιπλέον η αμαστιγωτή μορφή περιέχει ένα ενδοκυτταρικό μαστίγιο (Εικόνα 1.2).

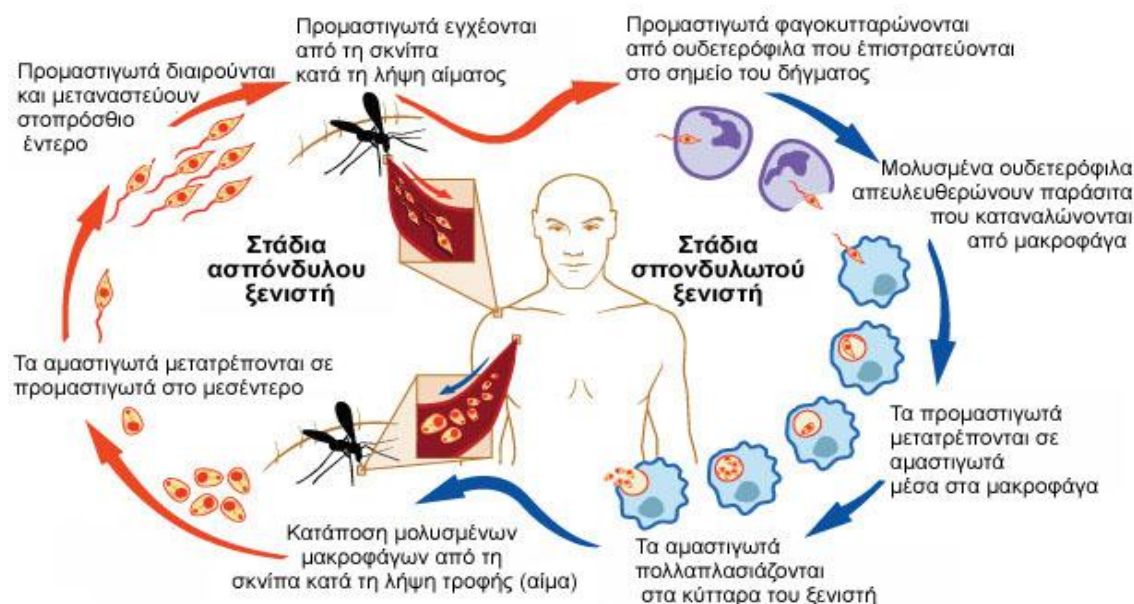
Οι ασπόνδυλοι ξενιστές του γένους *Phlebotomus* ή *Lutzomyia* (Εικόνα 1.3) προσλαμβάνουν, κατά τη λήψη αίματος από σπονδυλωτό ξενιστή, την αμαστιγωτή μορφή του παρασίτου που βρίσκεται μέσα σε μακροφάγα ή ελεύθερη στο αίμα μετά από την έξοδο των αμαστιγωτών από τα μακροφάγα. Μέσα στο έντερο των εντόμων το παράσιτο μετατρέπεται στην προμαστιγωτή μορφή σε χρονικό διάστημα περίπου μιας εβδομάδας. Τα προμαστιγωτά, που βρίσκονται στο έντερο του ασπόνδυλου ξενιστή (σκνίπα), αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται και μεταφέρονται στο πρόσθιο μέρος του εντέρου, όπου μετατρέπονται σε μετακυκλικά. Τα μετακυκλικά προμαστιγωτά είναι μικρότερα σε μέγεθος, έχουν χαμηλότερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και είναι περισσότερο μολυσματικά. Η μορφή αυτή διαιρείται γρήγορα και μεταναστεύει στα στοματικά μόρια του εντόμου. Σε επόμενο νύγμα τα μετακυκλικά παράσιτα ενίονται στον τελικό ξενιστή. Στα φαγολυσοσώματα των μονοπύρηνων/μακροφάγων του τελικού ξενιστή τα μετακυκλικά παράσιτα μετατρέπονται σε αμαστιγωτά (Εικόνα 1.4).



[7]Εικόνα 1.2. Προμαστιγωτή και αμαστιγωτή μορφή του πρωτόζωου *Leishmania* [8].



Εικόνα 1.3. Εικόνες των εντόμων *Phlebotomus* (αριστερά) και *Lutzomyia* (δεξιά) (<http://www.keele.ac.uk/depts/aep/images/rdw%20phleb.jpg>) (http://www.pragas.com.br/noticias/destaques/images/infeccao_bacteriana01.jpg)

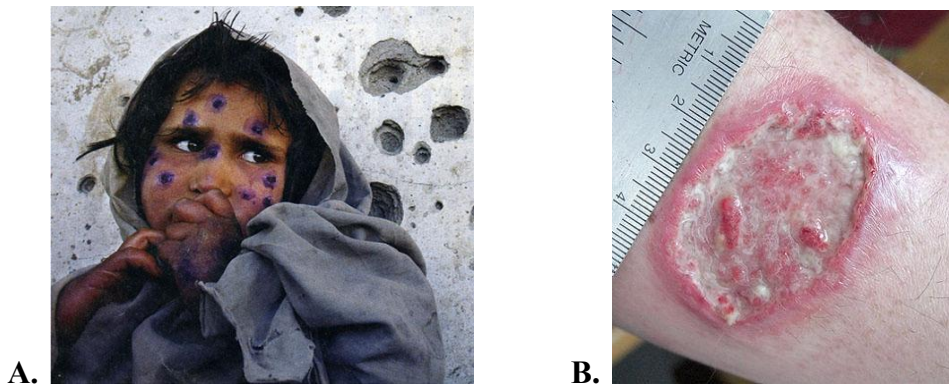


Εικόνα 1.4. Κύκλος ζωής του παρασίτου *Leishmania* στον ασπόνδυλο και στο σπονδυλωτό ξενιστή (<http://www3.niaid.nih.gov/NR/rdonlyres/leishDiagram1.jpg>)

1.2 Η νόσος της Λεισμανίασης

Με τον όρο λεισμανίαση περιγράφεται μια ομάδα νοσημάτων με ευρύ φάσμα κλινικών εκδηλώσεων, που προκαλούνται από τα παράσιτα του γένους *Leishmania*. Πρόκειται για ενδοκυτταρικά παρασιτικά πρωτόζωα που μολύνουν πολλά διαφορετικά είδη θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου και μεταφέρονται μέσω του νύγματος των ασπόνδυλων ξενιστών (σκνίπα) των γενών *Phlebotomus* και *Lutzomyia*. Οι κλινικές μορφές της λεισμανίασης σχετίζονται άμεσα με το είδος του παρασίτου που έχει προκαλέσει τη μόλυνση και την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή [9]. Οι τρεις βασικές κλινικές μορφές λεισμανίασης είναι: η σπλαχνική λεισμανίαση (VL, visceral leishmaniasis) (Εικόνα 1.7), η

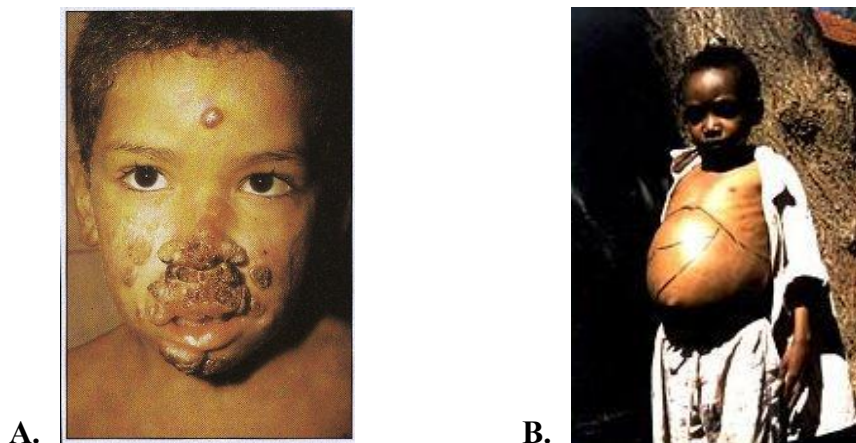
δερματική λείσμανίαση (CL, cutaneous leishmaniasis) (Εικόνα 1.5 και 1.6) και η βλεννογονοδερματική λείσμανίαση (MCL, mucocutaneous leishmaniasis) [10].



Εικόνα 1.5. Α. Κορίτσι από την Καμπούλ με δερματική λείσμανίαση και Β. Πληγή Δερματικής Λείσμανίασης.

(<http://www.noorderlicht.com/en/archive/paula-bronstein/>)

(http://wpcontent.answers.com/wikipedia/commons/thumb/6/6e/Leishmaniasis_ulcer.jpg/350px-Leishmaniasis_ulcer.jpg),



Εικόνα 1.6. Α. Βλεννογονοδερματική λείσμανίαση (αριστερά) και Β. αγόρι με σπλαχνική λείσμανίαση

(<https://web.stanford.edu/class/humbio103/ParaSites2006/Leishmaniasis/Mucocutaneous.htm>)

(http://web.stanford.edu/group/parasites/ParaSites2003/Leishmania/leishmaniasis_boy2.jpg)

1.3 Το πρωτόζωο *Leishmania tarentolae*

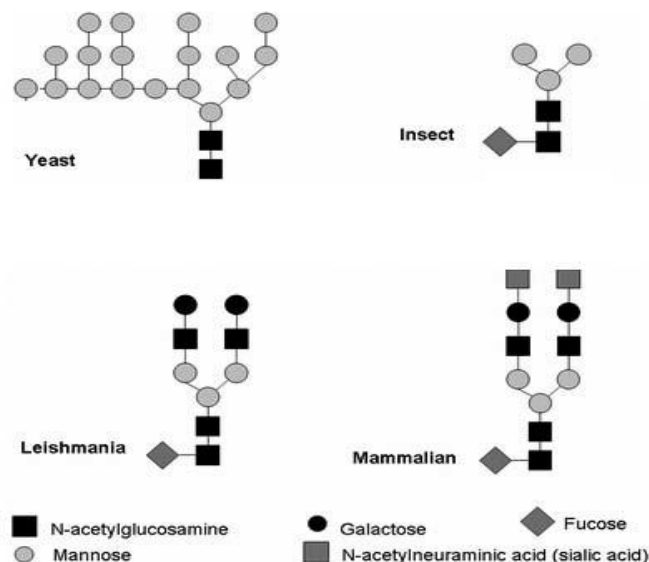
Το μονοκύτταρο πρωτόζωο *Leishmania tarentolae* (*L. tarentolae*) ανήκει στην οικογένεια των Τρυπανοσωματίδων, στο γένος *Sauroleishmania* (Πίνακας 1.1) και απομονώθηκε από το Moorish gecko *Tarentola mauritanica* (Εικόνα 1.8). Δεν είναι παθογόνο για τα θηλαστικά (βιοασφάλεια επιπέδου S1) [11]. Ο οργανισμός αυτός χρησιμοποιείται για την παραγωγή ευκαρυωτικών πρωτεϊνών με το πλασμιδιακό σύστημα έκφρασης LEXSY που είναι πατενταρισμένο από τη Jena Biosciences

(http://www.jenabioscience.com/cms/en/1/browse/1838_eukaryotic_expression_system_lexsy.html).

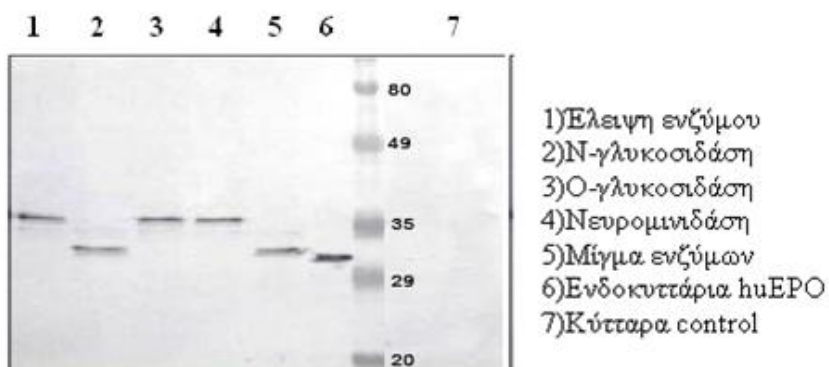
Παρόλο ότι υπάρχει μεγάλη ποικιλία σε συστήματα έκφρασης πρωτεϊνών (Πίνακας 1.2) που περιλαμβάνουν βακτήρια, μύκητες, κύτταρα εντόμων, κύτταρα θηλαστικών, διαγονιδιακά ζώα και φυτά κανένα δεν είναι γενικής εφαρμογής.

Το πρωτόζωο *Leishmania tarentolae* ως σύστημα ετερόλογης έκφρασης πρωτεϊνών έρχεται να συμπληρώσει κενά που υπάρχουν από τα υπόλοιπα ευρέως χρησιμοποιούμενα πρωτεϊνικά συστήματα έκφρασης.

Ένα βασικό πλεονέκτημα του *L. tarentolae* είναι ότι εξασφαλίζει μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις των ετερόλογα εκφραζόμενων πρωτεϊνών αντίστοιχες με αυτών των θηλαστικών, όπως π.χ. γλυκοζυλίωση (Σχήμα 1.1), φωσφορυλίωση ή πρενυλίωση. Ανασυνδυασμένη ανθρώπινη ερυθροποιητίνη (EPO) η οποία καθαρίστηκε από το σύστημα *L. tarentolae* (Εικόνα 1.7) ήταν βιολογικά ενεργή και N-γλυκοζυλιωμένη [12]. Το προφίλ της N-γλυκοζυλίωσης στην περίπτωση αυτή ήταν εξαιρετικά ομοιογενές, με μια διπλή αντένα ολιγοσακχαρίτη και δομή πυρήνα Man3GlcNAc2, που αντιπροσωπεύει πάνω από το 90% των γλυκανών. Το πρωτόζωο *L. tarentolae* είναι ο πρώτος βιοτεχνολογικά χρήσιμος μονοκύτταρος ευκαρυωτικός οργανισμός που παράγει διπλής αντένας, πλήρως γαλακτοζυλιωμένο, πυρήνα-α-1,6-φουκοζυλιωμένων N-γλυκανών. Αυτό το προφίλ της N-γλυκοζυλίωσης, που εκφράζεται στον οργανισμό *L. tarentolae* με το σύστημα LEXSY, συμπίπτει με το προφίλ της ανθρώπινης ανασυνδυασμένης ιντερφερόνης-γ ή της γλυκοπρωτεΐνης gr63 [12].



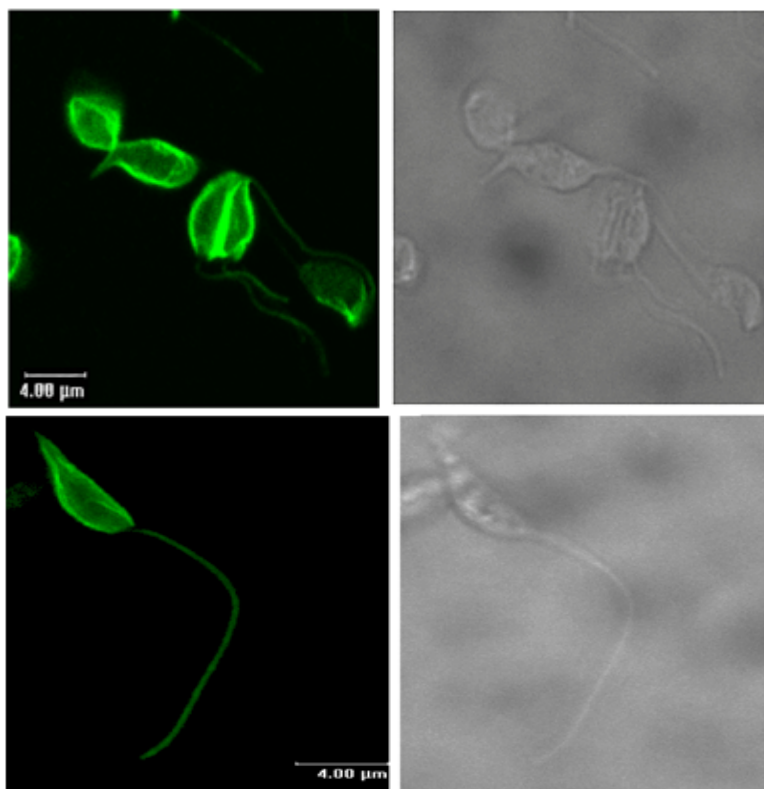
Σχήμα 1.1. N-γλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών στο στέλεχος *L. tarentolae* parrotII σε σύγκριση με τη γλυκοζυλίωση σε άλλα συστήματα έκφρασης πρωτεϊνών. Σημειωτέον ότι τα πρότυπα γλυκοζυλίωσης που λαμβάνονται σε κύτταρα θηλαστικών και σε *L. tarentolae* διαφέρουν μόνο στην παρουσία τελικού σιαλικού οξέος (N-acetylneuraminic acid) στα άκρα των αλυσίδων της διπλής αντένας των N-γλυκανών.



Εικόνα 1.7. Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης (Western blot) από υπερκείμενα καλλιέργειας του στελέχους *L. tarentolae* που εκφράζει την ανθρώπινη ερυθροποιητίνη (huEPO) με ετικέτα 6 ιστιδινών στο C-τελικό της άκρο [12].

Επίσης έχει σχετικά μικρό χρόνο διπλασιασμού (6-10 ώρες), η κατασκευή διαγονιδιακών πρωτοζώων είναι απλή και εύκολη, ο χρόνος κατασκευής σταθερής κυτταρικής σειράς κυμαίνεται 14-30 ημέρες και απαιτεί οικονομικά θρεπτικά υλικά καθώς μπορεί να αναπτυχθεί και σε Yeast extract σε πολύ πυκνή καλλιέργεια 1×10^9 κύτταρα/ml [13].

Για όλους τους παραπάνω λόγους το πρωτόζωο *L. tarentolae* (Εικόνα 1.8) έχει προταθεί ως ένα εναλλακτικό σύστημα έκφρασης ανασυνδυασμένων ευκαρυωτικών πρωτεϊνών που φέρουν μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις ή σηματοδοτικές αλληλουχίες για ερευνητικές ή βιοτεχνολογικές εφαρμογές [13, 14].



Εικόνα 1.8. Εικόνες έμμεσου ανοσοφθορισμού από παράσιτα *L. tarentolae* wt λογαριθμικής φάσης (πάνω) και στατικής φάσης (κάτω) με συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού. Για τον έμμεσο ανοσοφθορισμό χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό αντίσωμα αντι- α -Tubulin (1:300) από ποντίκι και δεύτερο αντίσωμα anti-mouse συζευγμένο με την πράσινη φθορίζουσα χρωστική Alexa Fluor 488. Οι εικόνες δεξιά είναι αντίθεση φάσης. Scale bar: 4 μ m.[A. Δούκας & X. Μπολέτη, αδημοσίευτα αποτελέσματα].

Η ετερόλογη έκφραση διαμεμβρανικών πρωτεϊνών έχει ένα επιπλέον επίπεδο δυσκολίας σε σχέση με τις διαλυτές πρωτεΐνες. Για την έκφραση-υπερέκφραση διαμεμβρανικών πρωτεϊνών ευκαρυωτικών οργανισμών και δη των θηλαστικών, έχουν χρησιμοποιηθεί αρκετά κυτταρικά συστήματα (Πίνακας 1.2 [15]) μέχρι σήμερα. Παρ' όλα αυτά, η πιθανότητα επιτυχούς αναδίπλωσης, τοπολογίας και εντοπισμού τους διαφέρει από σύστημα σε σύστημα έκφρασης και είναι συγκριτικά χαμηλότερη με αυτά των διαλυτών πρωτεϊνών. Η έκφραση διαμεμβρανικών πρωτεϊνών από θηλαστικά ιδιαίτερα αυτών που φέρουν μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις θα πρέπει να γίνεται σε συστήματα έκφρασης που έχουν τη δυνατότητα να πραγματοποιήσουν αυτές τις τροποποιήσεις. Θα πρέπει επίσης οι οργανισμοί αυτοί να έχουν συμβατά εκκριτικά μονοπάτια και μηχανισμούς ενδοκυττάριας μεμβρανικής μετακίνησης για να εξασφαλιστεί ο σωστός εντοπισμός και η λειτουργικότητα της ετερόλογα εκφρασμένης πρωτεΐνης. Το πρωτόζωο *L. tarentolae* παρέχει αυτή τη δυνατότητα και είναι ένα σύστημα που έχει μέχρι στιγμής διερευνηθεί ελάχιστα ως εναλλακτικό σύστημα έκφρασης διαμεμβρανικών πρωτεϊνών από θηλαστικά.

Πίνακας 1.2. Σύγκριση μεταξύ τεσσάρων συστημάτων έκφρασης [15]

Σύστημα έκφρασης	<i>E. coli</i>	Yeast (Pichia)	Insect cell (Sf9)	Mammalian cell (HEK293)
Διάρκεια μέχρι την κατασκευή διαγονιδίων (Μέρες)	3–5	6–8	25–30	Transient:3–5 Stable: at least 30
Χρόνος καλλιέργειας (Μέρες)	1–2	3–7	2–4	2–4
Κόστος (\$) για 1L (Κίνα)	15–20	20–25	200–250	200–250
Αριθμός διαθέσιμων δομών ευκαρυωτικών διαμεμβρανικών πρωτεϊνών	4	20	34	3

1.4 Φθορίζουσα πρωτεΐνη mCherry

Οι φθορίζουσες πρωτεΐνες ανακαλύφθηκαν το 1962 από τον Osamu Shimomura με την απομόνωση της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (GFP) από τον οργανισμό *Aequoria Victoria* [16, 17]. Στη συνέχεια απομονώθηκαν και άλλες φθορίζουσες πρωτεΐνες από θαλάσσιους οργανισμούς (κοράλλια) που δεν έχουν βιοφωταύγεια σε αντίθεση με την *Aequoria Victoria* (Εικόνα 1.9) [18, 19].

Οι πρωτεΐνες αυτές έχουν φασματοσκοπικές ιδιότητες πολύ διαφορετικές από την GFP και εκπέμπουν φως στις περιοχές του κίτρινου και του κόκκινου φάσματος του ορατού φωτός (Εικόνα 1.11) [14]. Μια από αυτές είναι η τετραμερής DsRed (κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη) που προέρχεται από ανθόζωα του γένους *Discosoma* (Εικόνα 1.9) από την οποία με μεταλλαξηγένεση έχει προκύψει η μονομερής μορφή της mRFP1 [15]. Κατευθυνόμενη μεταλλαξηγένεση της mRFP1 είχε σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία πρωτεϊνών με τροποποιημένες φασματοσκοπικές ιδιότητες, ανάμεσα στις οποίες είναι και μέλη της σειράς των φθορίζουσών πρωτεϊνών "φρούτων" mStrawberry, mCherry, και tdTomato (Εικόνα 1.10).

Οι πρωτεΐνες, mCherry και mStrawberry (κορυφές εκπομπής στα 610 και 596 nm αντίστοιχα), έχουν επίπεδα φωτεινότητας περίπου 50 και 75 % της EGFP, αλλά η mCherry είναι πολύ πιο φωτοσταθερή από την mStrawberry και είναι η καλύτερη επιλογή αισθητήρα (biosensor) για να αντικαταστήσει την mRFP1 για μακροσκελή πειράματα οπτικής απεικόνισης ζωντανών κυττάρων (Πίνακας 1.3).

1.4.1 Εφαρμογές και χρήσεις των φθορίζουσών πρωτεϊνών στη Βιολογία και την Ιατρική

Οι φθορίζουσες πρωτεΐνες έχουν χρησιμοποιηθεί ως εργαλεία σε πλήθος εφαρμογών στη Βιολογία και Ιατρική [20, 21] μερικές από τις οποίες αναφέρονται παρακάτω.

Οι φθορίζουσες πρωτεΐνες μας επιτρέπουν να δούμε στο εσωτερικό των κυττάρων και να παρατηρήσουμε τις βιολογικές διεργασίες τοπικά και χρονικά *in vivo*. Σε αυτή την βάση έχουν μελετηθεί με φθορίζουσες πρωτεΐνες αλλαγές του κυτταροσκελετού ή της χρωματίνης κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, αλλαγή του εντοπισμού ενός σηματοδότη κατά την μεταγωγή σήματος, εντοπισμός της δράσης των γονιδίων και των μεταγράφων τους κατά την εμβρυογένεση, μελέτη της ρύθμισης γονιδίων στην εμβρυική ανάπτυξη (χρονομέτρης φθορισμού DsRed-E5), ανάλυση δυναμικής των πρωτεϊνών (χρόνος ημιζωής, πρωτεόλυση), μετακίνηση μεμβρανικών κυστιδίων στο εκκριτικό μονοπάτι και η δυναμική των ενδοκυττάρων μεμβρανικών πρωτεϊνών. Επίσης χρησιμοποιούνται στη σήμανση κυττάρων

για ανίχνευση και διαλογή συγκεκριμένων πληθυσμών καθώς και ως μοριακές ετικέτες πρωτεϊνών για τον εντοπισμό τους σε κύτταρα και ιστούς, επαλήθευση της έκφρασής τους και της αλληλεπίδρασης τους με άλλες πρωτεΐνες και σήμανση παθογόνων μικροοργανισμών για παρακολούθηση της ενδοκυττάριας ζωής τους σε κύτταρα ξενιστές.

Η μονομερής κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη mCherry, αλλά και άλλες φθορίζουσες πρωτεΐνες που εκπέμπουν σε μήκη κύματος στην περιοχή του κόκκινου, είναι ιδανικά μόρια για *in vivo* απεικόνιση διεργασιών σε ολόκληρους οργανισμούς (έμβρυα, μικρά ζώα) γιατί ο φθορισμός στην περιοχή του κόκκινου είναι ορατός από μεγαλύτερο βάθος ιστών. Το φως με μεγαλύτερο μήκος κύματος σκεδάζεται λιγότερο στα βιολογικά δείγματα και για το λόγο αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να γίνει απεικόνιση βαθύτερα μέσα στους ιστούς [21].

Οι φθορίζουσες πρωτεΐνες παρουσιάζουν επίσης το πλεονέκτημα ότι μπορούν να εκφραστούν ως υβριδικές πρωτεΐνες και με αυτό τον τρόπο επιτρέπουν τον εντοπισμό άλλων πρωτεϊνών και την παρακολούθησή τους *in vivo*. Σε αυτή την κατεύθυνση έχουν γίνει πειράματα παρακολούθησης της επιμόλυνσης κυττάρων ή οργανισμών από παθογόνα μικρόβια που εκφράζουν φθορίζουσες πρωτεΐνες. Επίσης μια πολύ σημαντική εφαρμογή τους στην Ιατρική είναι η παρακολούθηση της ανάπτυξης όγκων σε πειραματόζωα από καρκινικά κύτταρα που εκφράζουν φθορίζουσες πρωτεΐνες και η ανταπόκρισή τους σε χημειοθεραπευτικά πρωτόκολλα [22].

Τέλος, η συμβολή των φθορίζουσών πρωτεϊνών έχει υπάρξει σημαντική στις τεχνικές μικροσκοπίας φθορισμού όπως η FRAP (ανάκτηση φθορισμού μετά από φωτολεύκανση) [23, 24], FLIP (απώλεια φθορισμού μετά από φωτολεύκανση) [25] και FRET (μεταφορά ενέργειας με συντονισμό φθορισμού) [26, 27]. Η φωτολεύκανση και φωτοενεργοποίηση χαρακτηρίζουν τις φθορίζουσες πρωτεΐνες και ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες των κυττάρων με φθορίζουσες ετικέτες και εξυπηρετούν στην παρατήρηση της δυναμικής των πρωτεϊνών και της αλληλεπίδρασης μεταξύ πρωτεϊνών σε ζωντανά κύτταρα.

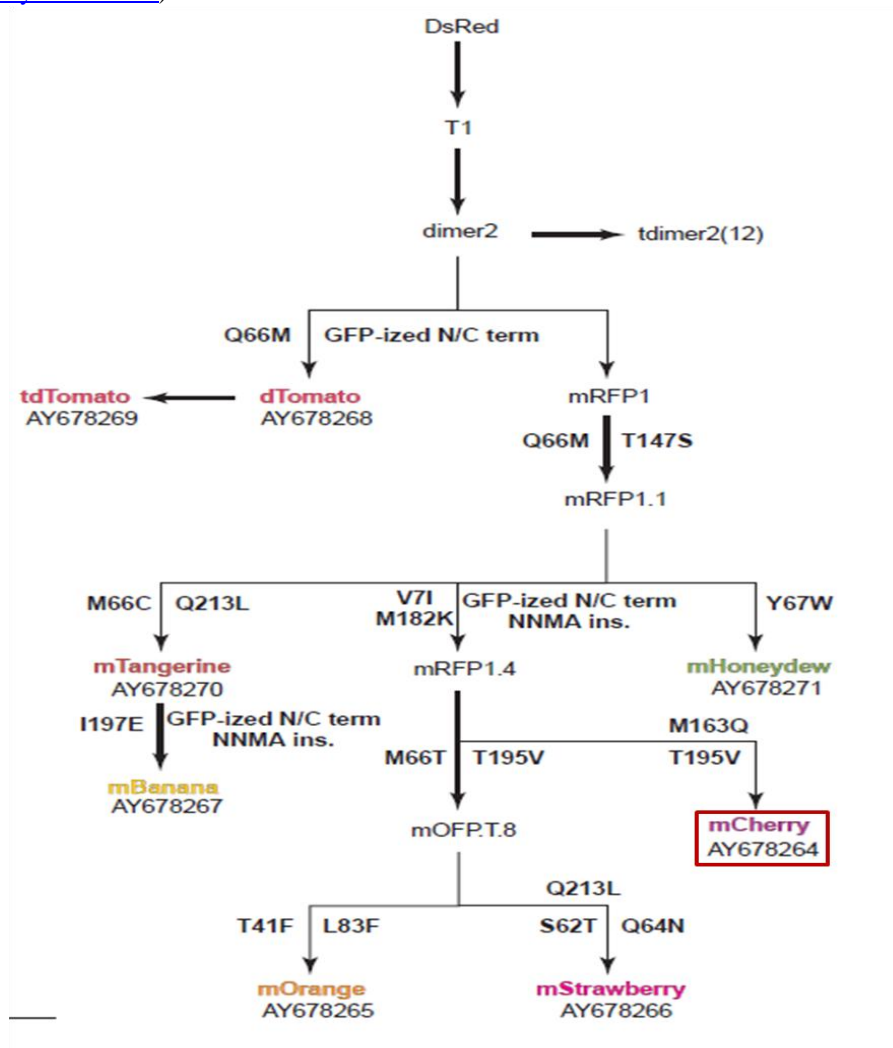
1.4.2 Δομή της μονομερούς mCherry

Η πρωτεΐνη mCherry (GenBank: AY678264.1) που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, δημιουργήθηκε με κατευθυνόμενη μεταλλαξήγνεση, στοχεύοντας τα κατάλοιπα χρωμοφόρου M163Q και T195V της mRFP1. Έχει 236 αμινοξέα, θεωρητικό μοριακό βάρος MW= 27007.49 και ισοηλεκτρικό σημείο PI=5.62 (Εικόνα 1.12). Η υπερδευτεροταγής δομή της mCherry είναι β-βαρελίου. Έντεκα β-πτυχωτές επιφάνειες εξωτερικά προστατεύουν το χρωμογόνο που δημιουργείται στο εσωτερικό του μορίου (Εικόνα 1.13). Το καταλυτικό κέντρο και υπόστρωμα εμφανίζονται στο ίδιο μόριο. Η δημιουργία του χρωμογόνου είναι

αποτέλεσμα σειράς αντιδράσεων (κυκλοποίησης, οξειδωσης), ύστερα από αναδίπλωση του μορίου, όπου το ενζυμικό κέντρο έρχεται κοντά με το υπόστρωμα (πλευρικές ομάδες αμινοξέων, Εικόνα 1.14).



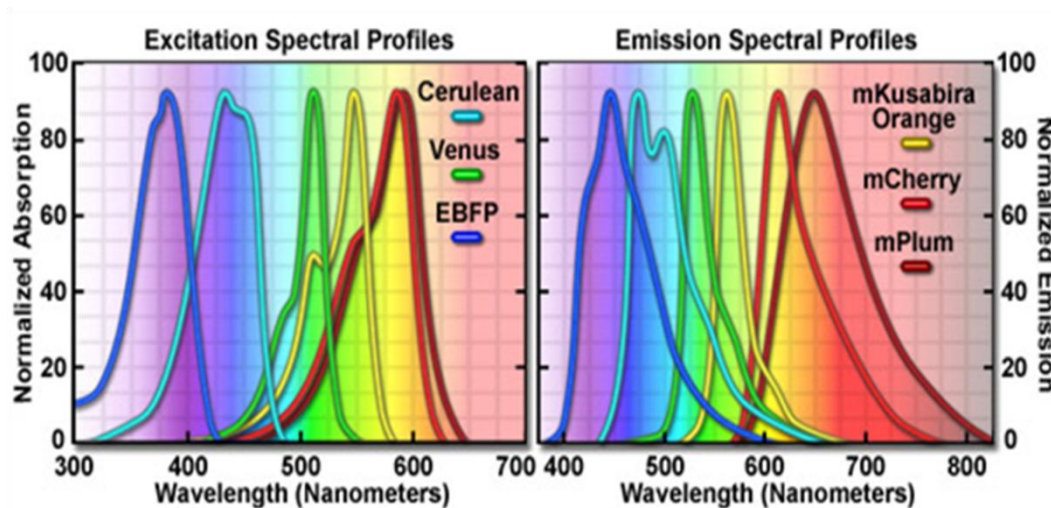
Εικόνα 1.9. Εικόνες από θαλάσσιες ανεμώνες του γένους *Discosoma* (http://z.about.com/d/saltaquarium/1/0/2/X/redmushroomtom_400.JPG)(<http://www.reefpedia.com/index.php/Category:Discosoma>)



Εικόνα 1.10. Διαγραμματική απεικόνιση της κατασκευής μονομερούς φθορίζοντος πολυπεπτιδίου από την τετραμερή DsRed. Σε κόκκινο πλαίσιο είναι η mCherry [28].

Πίνακας 1.3. Φασματοσκοπικές ιδιότητες της mCherry. Σύγκριση με την GFP, mRFP1, DsRed και άλλες φθορίζουσες πρωτεΐνες (<http://www.olympusconfocal.com/applications/fpcolorpalette.html>). Ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης εκφράζει πόσο αποδοτικά μια χημική ουσία απορροφά φως σε συγκεκριμένο μήκος κύματος.

Πρωτεΐνη (Ακρωνύμιο)	Διέγερση (nm)	Εκπομπή (nm)	Συντελεστής μοριακής απορρόφησης	Δομή <i>in vivo</i>	Σχετική Φωτεινότητα (% of EGFP)
GFP (wt)	395/475	509	21,000	Monomer*	48
Sapphire	399	511	29,000	Monomer*	55
T-Sapphire	399	511	44,000	Monomer*	79
ECFP	439	476	32,500	Monomer*	39
mCFP	433	475	32,500	Monomer	39
Midori-Ishi Cyan	472	495	27,300	Dimer	73
EGFP	484	507	56,000	Monomer*	100
AcGFP	480	505	50,000	Monomer*	82
ZsGreen	493	505	43,000	Tetramer	117
EYFP	514	527	83,400	Monomer*	151
YPet	517	530	104,000	Monomer*	238
ZsYellow1	529	539	20,200	Tetramer	25
mOrange	548	562	71,000	Monomer	146
dTomato	554	581	69,000	Dimer	142
DsRed	558	583	75,000	Tetramer	176
DsRed2	563	582	43,800	Tetramer	72
DsRed-Express (T1)	555	584	38,000	Tetramer	58
DsRed-Monomer	556	586	35,000	Monomer	10
mStrawberry	574	596	90,000	Monomer	78
AsRed2	576	592	56,200	Tetramer	8
mRFP1	584	607	50,000	Monomer	37
<u>mCherry</u>	587	610	72,000	Monomer	47
mRaspberry	598	625	86,000	Monomer	38



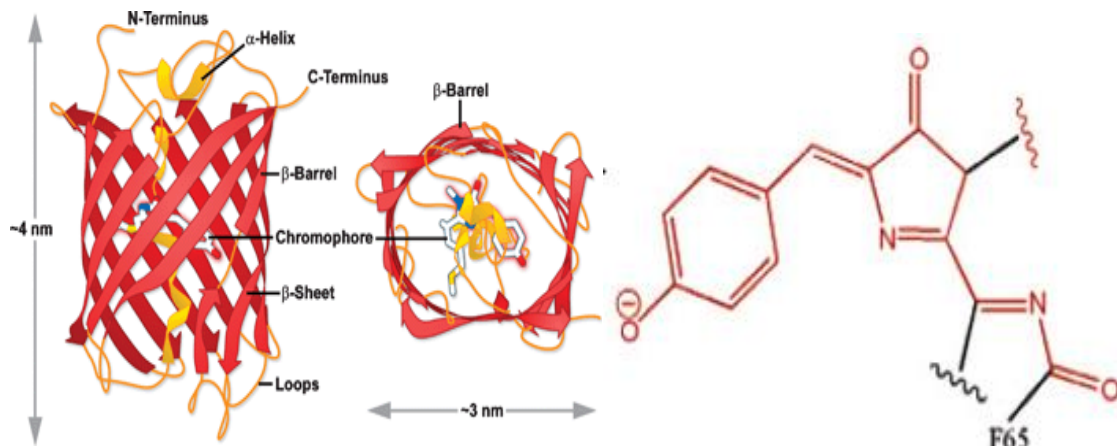
Εικόνα 1.11. Φάσμα διέγερσης και εκπομπής διαφόρων φοριζουσών πρωτεϊνών συμπεριλαμβανόμενης και της mCherry (<http://www.olympusconfocal.com/applications/fpcolorpalette.html>)

```

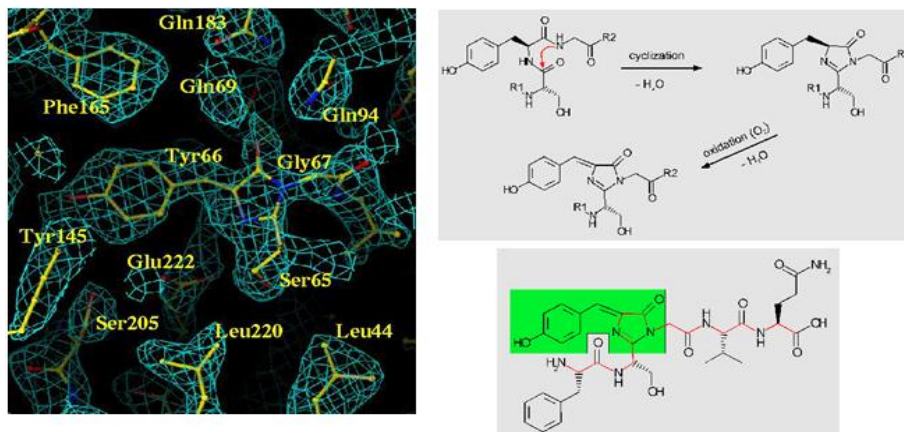
atggtgagcaagggcgaggaggataacatggccatcatcaaggagtcatgcgcttcaag
M V S K G E E D N M A I I K E F M R F K
gtgcacatggagggtccgtgaacggccacgagttcgagatcgagggcgagggcgagggc
V H M E G S V N G H E F E I E G E G E G
cgccctacgagggcaccagaccgccaagctgaagggtgaccaagggtgccccctgcc
R P Y E G T Q T A K L K V T K G G P L P
ttcgctgggacatcctgtcccctcagttcatgtacggctccaaggcctacgtgaagcac
F A W D I L S P Q F M Y G S K A Y V K H
cccgccgacatccccgactacttgaagctgtccttccccgagggcttcaagtgaggcgc
P A D I P D Y L K L S F P E G F K W E R
gtgatgaacttcgaggacggcggcgtgggtgaccgtgaccaggactcctcctgcaggac
V M N F E D G G V V T V T Q D S S L Q D
ggcgagttcatctacaaggtgaagctgcgcgccaccaacttcccctccgacggccccgta
G E F I Y K V K L R G T N F P S D G P V
atgcagaagaagaccatgggctgggaggcctcctccgagcggatgtaccccgaggacggc
M Q K K T M G W E A S S E R M Y P E D G
gccctgaagggcgagatcaagcagaggctgaagctgaaggacggcgggcactacgacgct
A L K G E I K Q R L K L K D G G H Y D A
gaggtcaagaccactacaagccaagaagcccgtgcagctgcccggcgcctacaacgctc
E V K T T Y K A K K P V Q L P G A Y N V
aacatcaagttggacatcacctcccacaacgaggactacaccatcgtggaacagtacgaa
N I K L D I T S H N E D Y T I V E Q Y E
cgcgccgagggcccgccactccaccggcgccatggacgagctgtacaagtaa
R A E G R H S T G G M D E L Y K -

```

Εικόνα 1.12. Νουκλεοτιδική και αμινοξική αλληλουχία της mCherry (GenBank: AY678264.1)



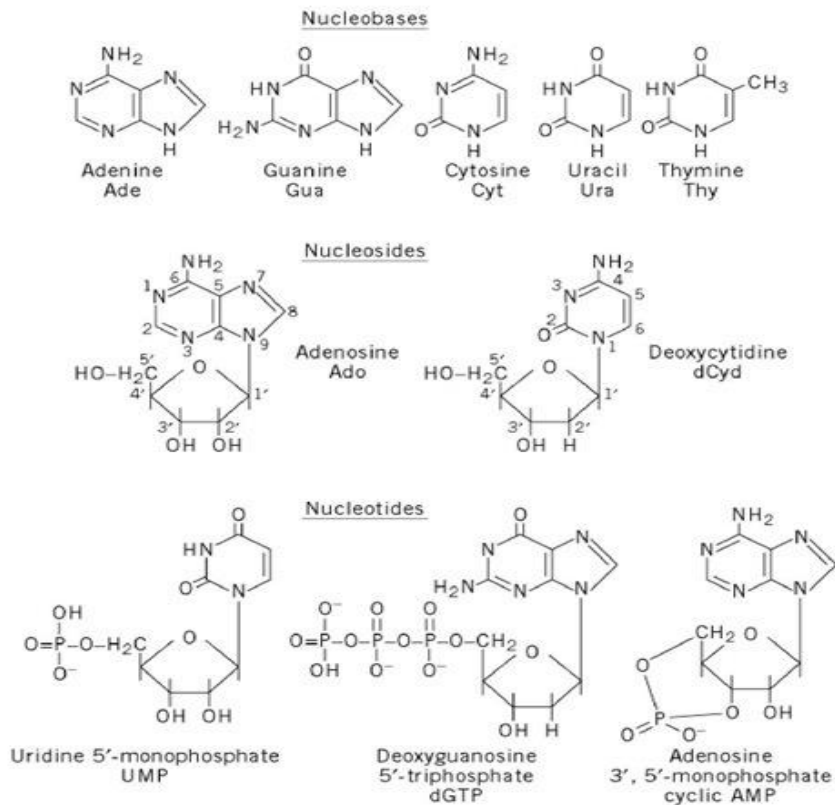
Εικόνα 1.13. Α. Δομικό μοντέλο 3D αναπαράστασης της φθορίζουσας πρωτεΐνης mCherry, Β. Στερεοχημική δομή του χρωμοφόρου της mCherry
<http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/probes/anthozoafps.html>



Εικόνα 1.14. Α. Κρυσταλλογραφικός χάρτης του καταλυτικού κέντρου της GFP. Β. Αντιδράσεις που δημιουργούν το Χρωμοφόρο της GFP [29]
<http://www-bioc.rice.edu/Bioch/Phillips/Papers/gfpbio.html>

1.5 Μεταφορείς Νουκλεοβάσεων

Οι Νουκλεοβάσεις είναι αζωτούχες οργανικές βάσεις, βασικά δομικά συστατικά των νουκλεοζιτών (νουκλεοσιδίων) (Εικόνα 1.15) και των νουκλεοτιδίων που απαρτίζουν το DNA και RNA. Εμπλέκονται επίσης στη φυσιολογία των κυττάρων ως πηγές ενέργειας και σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος [7, 30]. Στα θηλαστικά, οι νουκλεοβάσεις μπορούν να συντεθούν από την αρχή (de novo) από μικρά πρόδρομα μόρια, όπως ασπαρτικό, γλουταμίνη, γλυκίνη και 10-φορμυλοτετραϋδροφολικό, αλλά και να ανακτηθούν από τον εξωκυττάριο χώρο μέσω του μονοπατιού ανάκτησης/ανακύκλωσης νουκλεοβάσεων (nucleobase salvage) [31]. Παράλληλα, νουκλεοβάσεις μπορούν να ανακτηθούν από τα κύτταρα των ανώτερων ευκαρυωτικών με ανακύκλωση των δομικών στοιχείων των νουκλεϊνικών οξέων μετά από αποικοδόμηση / πέψη τους στον εντερικό σωλήνα [32, 33].



Εικόνα 1.15. Δομές των πέντε κοινών νουκλεοβάσεων και αντιπροσωπευτικών νουκλεοσιδίων και νουκλεοτιδίων <http://what-when-how.com/molecular-biology/nucleotides-nucleosides-and-nucleobases-molecular-biology/>

Αρκετοί μεταφορείς νουκλεοβάσεων έχουν ταυτοποιηθεί σε όλους τους οργανισμούς και έχουν μελετηθεί εκτενώς κυρίως σε εξελικτικά κατώτερους οργανισμούς όπως βακτήρια [34], μύκητες [35-37], φυτά και πρωτόζωα [38]. Κατηγοριοποιούνται με βάση τον λειτουργικό και μοριακό χαρακτηρισμό τους σε τέσσερις εξελικτικά διαφορετικές οικογένειες πρωτεϊνών μεταφορέων νουκλεοβάσεων που είναι α) συμμεταφορείς νουκλεοβάσεων / κατιόντων-1 (NCS1), γνωστοί και ως PRT μεταφορείς (Purine Related Transporters) [33], β) μεταφορείς νουκλεοβάσεων / ασκορβικού (Nucleobase-Ascorbate Transporter) NAT ή NCS2, γ) η οικογένεια AzgA και δ) οι εξισορροπητικοί μεταφορείς νουκλεοβάσεων ENTs (Equilibrative Nucleobase Transporters).

Η οικογένεια NCS1 περιλαμβάνει συμμεταφορείς νουκλεοβάσεων / H^+ από προκαρυωτικά, μύκητες και φυτά. Τα πλέον γνωστά μέλη της μεταφέρουν πουρίνες ή/και πυριμιδίνες (αδενίνη, υποξανθίνη, γουανίνη, ουρακίλη, κυτοσίνη). Μερικοί όμως μεταφορείς, μέλη αυτής της οικογένειας παρουσιάζουν εξειδίκευση, και για άλλες ενώσεις σχετικές με τις πουρίνες όπως αλλαντοΐνη, υδαντοΐνη, θειαμίνη, ενώσεις με βάση την πυριδοξάλη και νικοτιναμδικό ριβοζίτη [39].

Η οικογένεια NAT / NCS2 περιλαμβάνει συµµεταφορείς ουρικού οξέος / ξανθίνης / ουρακίλης- H^+ και παραδόξως και τα οµόλογα του µεταφορέα θηλαστικών L-ασκορβικού/ Na^+ από βακτήρια, µύκητες και φυτά [40, 41]. Σηµαντικό είναι να αναφερθεί ότι η οικογένεια NAT δεν εκφράζεται στα πρωτόζωα [39].

Τα µόνα µέλη της οικογένειας µεταφορέων AzgA που έχουν µελετηθεί λειτουργικά είναι εκείνα του ασκοµύκητα *Aspergillus nidulans* [37] και *Aspergillus fumigatus* [42] και του φυτού *Arabidopsis thaliana* [43], που είναι αυστηρά ειδικοί συµµεταφορείς πουρινών (Αδενίνη, Υποξανθίνη, Γουανίνη) / H^+ .

Τέλος, ειδικοί µεταφορείς νουκλεοβάσεων της οικογένειας ENT υπάρχουν σε πρωτόζωα και θηλαστικά [44-46]. Οι περισσότεροι φαίνεται να είναι συµµεταφορείς H^+ και µερικοί µπορεί επίσης να αναγνωρίζουν νουκλεοσιδικές βάσεις [39] (Εικόνα 1.15).

Στα θηλαστικά, πολλαπλοί µεταφορείς οργανικών ανιόντων, που ανήκουν σε εξελικτικά διαφορετικές οικογένειες, έχουν αναφερθεί να συµβάλλουν στη νεφρική απέκκριση του ουρικού οξέος (URAT1, UAT, OAT1, OAT3, MRP2, MRP4 και Oatv1) [47, 48]. Το γονίδιο του µεταφορέα SLC2A9, θεωρείται ότι κωδικοποιεί για έναν µεταφορέα φρουκτόζης που µε έκφραση σε ωκύτταρα *Xenopus laevis*, δείχθηκε ότι είναι µεταφορέας [49] ουρικού οξέος (µέλος της MFS=Major Facilitator Superfamily) µε δράσεις που σχετίζονται µε τη ρύθμιση της συγκέντρωσης ουρικού οξέος στον ορό, υπερουριχαιµία, ουρική αρθρίτιδα και ενδεχόµενα καρδιαγγειακές ασθένειες και διαβήτη [50].

Η οικογένεια NAT συστάθηκε µε την κλωνοποίηση και χαρακτηρισµό των περµεασών UapA27,28 και UapC29 ουρικού οξέος-ξανθίνης από τον ασκοµύκητα *Aspergillus nidulans* και των περµεασών UraA30 και Pyp31 ουρακίλης από τα βακτήρια *Escherichia coli* και *Bacillus subtilis*, αντίστοιχα. [39]

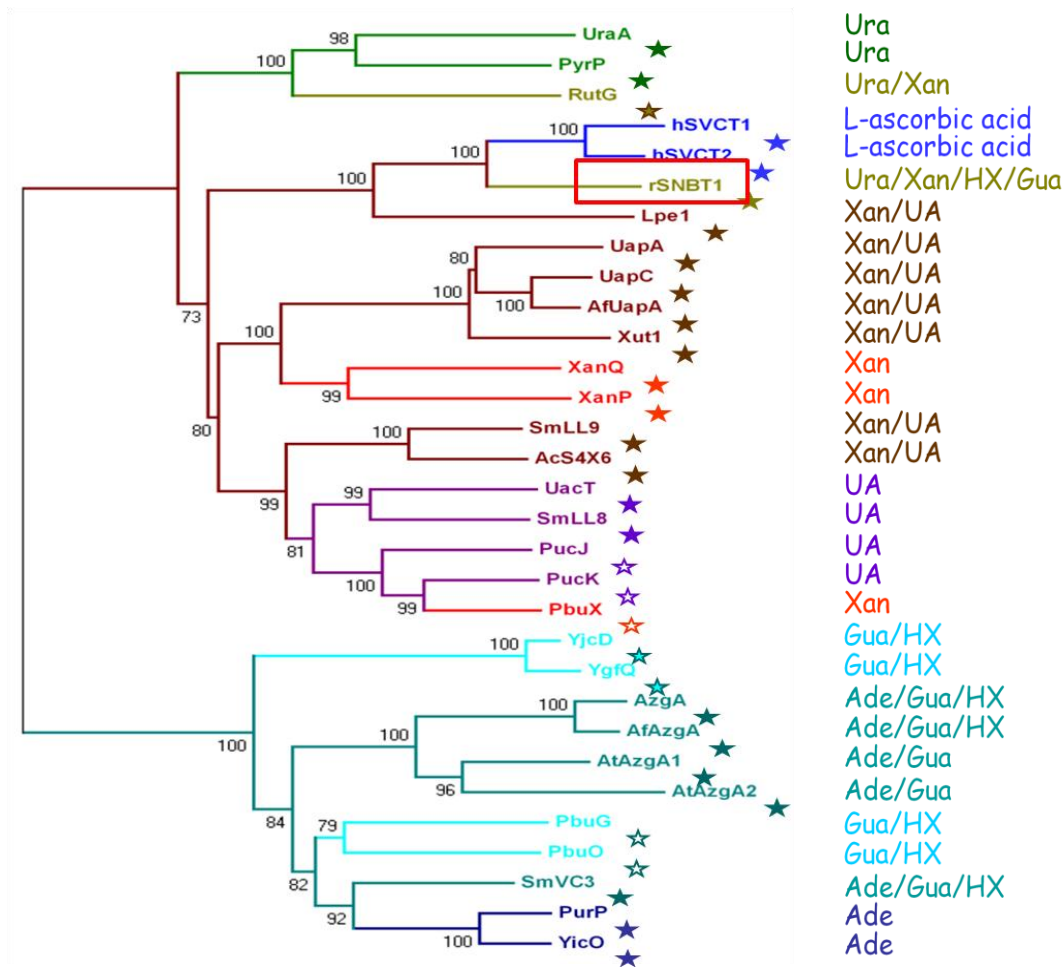
Όλοι οι έξι µέχρι τώρα µελετηµένοι µεταφορείς θηλαστικών της οικογένειας NAT (SVCT1 και SVCT2) µεταφέρουν L-ασκορβικό οξύ αντί για πουρίνες ή πυριµιδίνες. Έτσι, η οικογένεια µεταφορέων NAT υποδιαιρείται σε τρεις υπο-οικογένειες ανάλογα µε την εξειδίκευση υποστρώµατος. Η πρώτη, που εντοπίζεται σε βακτήρια, µύκητες και φυτά, είναι ειδική για τις οξειδωµένες πουρίνες, ξανθίνη ή/και ουρικό οξύ. Η δεύτερη, έχει βρεθεί µόνο σε βακτήρια και είναι ειδική για ουρακίλη και η τρίτη έχει βρεθεί στα σπονδυλωτά και είναι ειδική για τη µεταφορά L-ασκορβικού οξέος. Όλοι οι γνωστοί µεταφορείς NAT από βακτήρια, µύκητες και φυτά είναι υψηλής συγγένειας συµµεταφορείς H^+ , ενώ οι SVCTs θηλαστικών συµµεταφέρουν Na^+ µε L-ασκορβικό [39, 51]. Εκατοντάδες οµόλογοι µεταφορείς NAT έχουν ταυτοποιηθεί σε όλους σχεδόν τους οργανισµούς, µε εξέχουσες εξαιρέσεις τον *Saccharomyces cerevisiae* και αρκετά πρωτόζωα στα οποία συγκαταλέγεται και η *Leishmania tarentolae*.

Δεδομένης της σημασίας του μεταβολισμού και ανάκτησης/ανακύκλωσης πουρινών (purine salvage and metabolism) για την ζωή και την ομαλή λειτουργία όλων των κυττάρων, αλλά και του ότι ενώσεις ανάλογα πουρίνης και πυριμιδίνης χρησιμοποιούνται ευρέως ως χημειοθεραπευτικά φάρμακα για την αντιμετώπιση λοιμώξεων από διάφορους λοιμογόνους παράγοντες (ιούς, πρωτόζωικά παράσιτα) και σοβαρών ασθενειών, όπως ο καρκίνος, αλλά και για την πρόληψη απόρριψης μεταμοσχευμένων οργάνων [52-58], οι μεταφορείς νουκλεοβάσεων και νουκλεοσιδίων συγκεντρώνουν το έντονο ενδιαφέρον της ερευνητικής κοινότητας.

1.5.1 Μεταφορέας rSNBT1 / Slc23a4

Μέχρι στιγμής μεταφορείς νουκλεοβάσεων έχουν βρεθεί και μελετηθεί εκτενώς σε κατώτερους οργανισμούς (βακτήρια, μύκητες και πρωτόζωα), όπως αναφέρθηκε και παραπάνω [31]. Σύμφωνα με βιοπληροφορική ανάλυση, τα θηλαστικά έχουν μόνο μια οικογένεια μεταφορέων νουκλεοβάσεων, την SLC23, τα μέλη της οποίας είναι ομόλογα με τη NAT [51, 59]. Η οικογένεια SLC23 έχει τέσσερα μέλη, δύο εκ των οποίων είναι οι SVCT1/SLC23A1 και SVCT2/SLC23A2 και είναι χαρακτηρισμένοι ως νάτριο-εξαρτώμενοι μεταφορείς ασκορβικού (SVCTs). Είναι ενδιαφέρον ότι οι μεταφορείς αυτοί δεν μεταφέρουν νουκλεοβάσεις [40]. Πρόσθετα, στην οικογένεια αυτή ανήκει και ο μεταφορέας SLC23A3, με άγνωστες μέχρι στιγμής ιδιότητες, για τον οποίο αναφέρεται ότι δεν μεταφέρει ασκορβικό και νουκλεοβάσεις [60, 61]. Με βιοπληροφορική ανάλυση έχει εντοπιστεί και ο μεταφορέας SLC23A4, ως πρώτος μεταφορέας νουκλεοβάσεων στα θηλαστικά [31].

Ο μεταφορέας rSNBT1/Slc23a4 ([GenBank: AB511909](#)) απομονώθηκε από το λεπτό έντερο αρουραίου (*Rattus norvegicus*) και χαρακτηρίστηκε ως νάτριο-εξαρτώμενος μεταφορέας ορισμένων νουκλεοβάσεων: ουρακίλης, θυμίνης, γουανίνης, υποξανθίνης και ξανθίνης (οικογένεια NAT/NCS2) (Εικόνα 1.16).

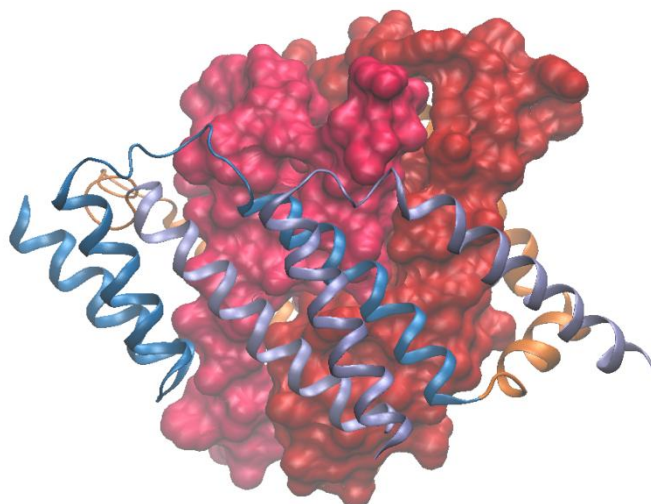


Εικόνα 1.16. Φυλογενετική απεικόνιση της οικογένειας NAT/NCS2 (κατασκευάστηκε με το πρόγραμμα MEGA). Με κόκκινο πλαίσιο τονίζεται ο μεταφορέας rSNBT1 [62].

Σημαντικό είναι ότι ο rSNBT1/Slc23a4, είναι ο πρώτος μεταφορέας νουκλεοβάσεων που έχει ταυτοποιηθεί σε θηλαστικά. Ορθόλογα γονίδια του rSNBT1 είναι γενετικά ελαττωματικά στον άνθρωπο, γεγονός που υποδηλώνει την πιθανότητα η λειτουργία αυτή να έχει χαθεί εξελικτικά στον άνθρωπο και ενδεχομένως και σε άλλα ανώτερα πρωτεύοντα [31].

1.5.2 Δομή του μεταφορέα rSNBT1

Όπως και για άλλους μεταφορείς με πολλές υδρόφοβες διαμεμβρανικές περιοχές, [39], έτσι και για τον rSNBT1/Slc23a4 οι δομικές μελέτες είναι εξαιρετικά δύσκολες. Από την κλωνοποίηση του γονιδίου του (GenBank: AB511909) [31] γνωρίζουμε ότι ο μεταφορέας rSNBT1 κωδικοποιείται από ένα γονίδιο 1842 ζευγών βάσεων και έχει 614 αμινοξέα. Το προβλεπόμενο μοριακό βάρος του είναι MW= 66174.21 με ισοηλεκτρικό σημείο PI= 7.50. Μοντέλο 3D αναπαράστασης της υπερδευτεροταγούς δομής του βασισμένο στην λυμένη δομή μιας βακτηριακή ομόλογης πρωτεΐνης, του μεταφορέα *UraA* (3QE7) (Εικόνα 1.17) [63] προβλέπει την ύπαρξη 14 διαμεμβρανικών περιοχών.



Εικόνα 1.17. Μοντέλο δομής του μεταφορέα rSNBT1 με βάση την ομολογία του με τον μεταφορέα UgaA του οποίου η δομή είναι λυμένη (3QE7): Οι έλικες του τομέα του πυρήνα φαίνονται στη χωροπληρωτική αναπαράσταση (TM 1-3 και 8-10) (κόκκινο) και του τομέα της πύλης με τις κορδέλες (μπλε) (Εργαστήριο Ευστάθιου Φριλλίγγου, αδημοσίευτα αποτελέσματα)

Μέχρι τώρα έχουν γίνει πολλές προσπάθειες έκφρασης-υπερέκφρασης, απομόνωσης και κρυστάλλωσης, βακτηριακών ομολόγων ή μυκητικών ομολόγων, των μεταφορέων της οικογένειας NAT, από τις οποίες δεν έχουν παραχθεί ικανοποιητικά αποτελέσματα, παρά μόνο στην περίπτωση του βακτηριακού συμμεταφορέα Ουρακίλης UraA και του μεταφορέα πουρινών/ H^+ AzgA από τον μύκητα *Aspergillus nidulans* [63, 64]. Υπάρχουν ωστόσο δυσκολίες στην προσπάθεια κρυστάλλωσης των συγκεκριμένων μεταφορέων [65-67].

Κατά την έκφραση ανθρώπινων μεμβρανικών πρωτεϊνών και μεταφορέων στα συνήθη ετερόλογα συστήματα έκφρασης, π.χ. σακχαρομύκητα [68, 69] ή κύτταρα εντόμων *Spodoptera frugiperda* [70], η ποσότητα των πρωτεϊνών που παράγεται δεν είναι επαρκής για δομικές μελέτες, είτε λόγω ατελούς μετα-μεταφραστικής ωρίμανσης, είτε ανεπαρκούς στόχευσης προς την κυτταροπλασματική μεμβράνη είτε λόγω κυτταροτοξικών φαινομένων [54].

Σε αντίθεση με την έλλειψη των δομικών μελετών πάνω στους μεταφορείς, υπάρχει πληθώρα γενετικών και βιοχημικών προσεγγίσεων που ακολουθούνται, τα τελευταία χρόνια για δομικές μελέτες, ως επί το πλείστον στον μύκητα *Aspergillus nidulans* και στο βακτήριο *Escherichia coli*, που συμβάλλουν σημαντικά στην αποκωδικοποίηση των δομικών χαρακτηριστικών των μεταφορέων νουκλεοβάσεων [51, 62, 64]. Επίσης, με βάση προβλέψεις δομών από ανάλυση της αμινοξικής αλληλουχίας (καθ. Διαλλινάς Γ., αδημοσίευτα αποτελέσματα) διαφαίνεται ότι οι μεταφορείς NCS1 θα μπορούσαν να παρουσιάζουν ομοιότητα στη δομή τους με τους βακτηριακούς μεταφορείς λευκίνης (LeuT)

του *Aquifex aeolicus* και γαλακτόζης p(vSGLT) του *Vibrio arahaemolyticus*, από διαφορετικές οικογένειες συµµεταφορέων, η δοµή των οποίων λύθηκε πρόσφατα [71, 72]. Επίσης, οι µεταφορείς NCS1, NAT/NCS2 και AzgA, θα µπορούσαν να έχουν µακρινή συγγένεια, αλλά αυτό δεν υποστηρίζεται από την οµολογία της πρωτεϊνικής αλληλουχίας [73].

Μια λεπτοµερής γνώση των δοµικών χαρακτηριστικών των µεταφορέων νουκλεοβάσεων ή νουκλεοσιδίων είναι απαραίτητη στην κατανόηση της αλληλεπίδρασης φαρµάκου-µεταφορέα και οδηγεί σε βελτίωση στο σχεδιασµό νέων φαρµάκων. Επίσης, αυτό θα βοηθήσει να κατανοήσουµε πώς συγκεκριµένοι πολυµορφισµοί στη δοµή τους µπορούν να οδηγήσουν σε διατάραξη της λειτουργίας τους, τροποποιώντας τελικά τη φαρµακοδυναµική του φαρµάκου. Εν κατακλείδι, η µελέτη του ρόλου των πρωτεϊνικών µεταφορέων στην κυτταρική φυσιολογία θα αποκαλύψει νέους φαρµακολογικούς στόχους στη θεραπεία πολλών ασθενειών.

Επιλέξαµε να µελετήσουµε τον µεταφορέα **rSNBT1** µε ετερόλογη έκφραση του στο µη παθογόνο για τον άνθρωπο πρωτόζωο *Leishmania tarentolae* διότι αυτό είναι ένα σύστηµα που παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήµατα ως προς την δυνατότητα λειτουργικής έκφρασης µεµβρανικών πρωτεϊνών και µεταφορέων ανώτερων ευκαρυωτικών, για τους λόγους που αναφέρθηκαν στο κεφάλαιο 1.3 [13, 14].

2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

2.1 Βιοπληροφορική μελέτη του γονιδίου του μεταφορέα rSNBT1 και της πρωτεΐνης mCherry

Η βιοπληροφορική ανάλυση ενός γονιδίου και της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί αποτελεί ένα πρώτο και εξαιρετικά χρήσιμο βήμα για τη μελέτη τους. Αυτή περιλαμβάνει μεταξύ άλλων την εύρεση δομικών περιοχών (μοτίβων) στην πρωτεϊνική αλληλουχία με πιθανή λειτουργική σημασία και την εύρεση ομολογίας με άλλες πρωτεΐνες.

Για την ανάλυση της αλληλουχίας των πρωτεϊνών που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το ExPasy Bioinformatics Resource (<http://expasy.org/>) και, πιο συγκεκριμένα, οι αλγόριθμοι Translate, Blast, ProtParam, TMHMM και TMPred. Επιπλέον χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος clustal omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) για την σύγκριση των αλληλουχιών DNA.

Για την εύρεση των σημείων πέψης από περιοριστικά ένζυμα για τα γονίδια των mCherry και rSNBT1, η επεξεργασία της αλληλουχίας των πλασμιδιακών φορέων που χρησιμοποιήθηκαν και του ενθέματος έγινε ηλεκτρονικά με τον αλγόριθμο NEBCutter 2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>).

Τέλος, για τον έλεγχο των ολιγονουκλεοτιδίων που σχεδιάστηκαν ως εκκινητές στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για την ενίσχυση του γονιδίου της mCherry, χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό OligoAnalyzer 3.1 (<http://eu.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>).

2.2 Κλωνοποίηση των γονιδίων της mCherry (*mcherry*) και του rSNBT1 (*rsnbt1*) σε πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης

2.2.1 Ενίσχυση των γονιδίων *mcherry* και *rsnbt1* με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

Αντιδραστήρια – Όργανα

mCherry

- Προκατασκευασμένα αντιδραστήρια KAPA2G Robust PCR Kits (KAPA BIOSYSTEMS), στα οποία περιέχεται η πολυμεράση και τα ρυθμιστικά διαλύματα του ενζύμου

- Διάλυμα τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοζιτών (dNTP), το οποίο περιέχει dATP, dGTP, dTTP και dCTP σε διάλυμα φωσφορικών συγκέντρωσης 10 mM το καθένα, KAPA BIOSYSTEMS
- Εκκινητές (primers) σχεδιάστηκαν στο εργαστήριο και έγινε η σύνθεση από την εταιρεία Lieferschein, μέσω της Ελληνικής εταιρείας Lab Supplies. Οι αλληλουχίες τους αναφέρονται στο κεφάλαιο των Αποτελεσμάτων (παράγραφος 3.1.1, Πίνακας 3.1)
- Σωλήνες PCR, Kisker
- Υπερκάθαρο αποστειρωμένο νερό
- Θερμοκυκλοποιητής, MJ Research, PTC-200

rSNBT1

Η ενίσχυση του γονιδίου του μεταφορέα rSNBT1 πραγματοποιήθηκε από το εργαστήριο του καθηγητή Ευστάθιου Φριλλίγγου, Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων. Οι αλληλουχίες των εκκινητών αναφέρονται στο κεφάλαιο των Αποτελεσμάτων (παράγραφος 3.1.1, Πίνακας 3.2)

Μέθοδος

Αρχικά, παρασκευάζεται το μίγμα (master mix), το οποίο περιέχει το εκμαγείο του DNA, το ζεύγος των εκκινητών, τα τέσσερα dNTP και το ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει και ιόντα Mg^{2+} , απαραίτητα για τη δράση της πολυμεράσης. Σε περίπτωση που είναι αναγκαία μεγαλύτερη ποσότητα Mg^{2+} προστίθενται με τη μορφή του χλωριδίου ($MgCl_2$). Στο τέλος προστίθεται η DNA πολυμεράση, η οποία φυλάσσεται στους $-20^{\circ}C$.

Η πιστότητα της αντιγραφής του DNA είναι χαρακτηριστικό ποιότητας της εκάστοτε πολυμεράσης, η οποία αν έχει και διορθωτική δράση εξωνουκλεάσης όπως η Kapa2G πολυμεράση, προκαλεί πολύ λιγότερες μεταλλάξεις λόγω λαθών στην αντιγραφή. Στον πίνακα 2.1 φαίνονται οι τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν και τα στάδια της διαδικασίας.

Πίνακας 2.1. Μίγμα αντίδρασης PCR για την ενίσχυση του γονιδίου *mcherry*

Αντιδραστήρια	Ποσότητες	Τελικές συγκεντρώσεις
Ρυθμιστικό διάλυμα 5x (περιέχει 1,5 mM Mg^{2+})	20 μ L	1x
dNTPs 10 mM	2 μ L	200 μ M
Πρόσθιος εκκινητής 5' BglII 10 μ M	5 μ L	0.5 μ M

Ανάστροφος εκκινητής 3' XhoI 10 μ M	5 μ L	0.5 μ M
Εκμαγείο DNA (pcDNAIII-mCherry stock 4,715 μ g/ul)	8.48 μ L	5 ng/αντίδραση
Πολυμεράση ΚΑΡΑ2G (5 U/ μ L)	0.8 μ L	2.5 U/αντίδραση
Mg ²⁺	-	
Νερό	58.72 μ L	
Συνολικά	100 μL	

2.2.2 Μέτρηση της συγκέντρωσης του DNA

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Φασματοφωτόμετρο Nanodrop ND 2000/2000c (Thermo Scientific)

Μέθοδος

Ποσότητα 1-2 μ L δείγματος διαλύματος DNA τοποθετείται στο άκρο μιας οπτικής ίνας. Μετράται η απορρόφηση του δείγματος στα 230 nm, στα 260 nm και στα 280 nm. Ο λόγος 260/280 πρέπει να κυμαίνεται ανάμεσα στο 1.8-2.0 για να θεωρείται το δείγμα καθαρό και απαλλαγμένο από πρωτεΐνες. Ο λόγος 260/230 πρέπει να είναι μεγαλύτερος από τον προηγούμενο και να κυμαίνεται ανάμεσα στο 2 (0-2.2) για να θεωρείται το δείγμα απαλλαγμένο από φαινόλες και άλλα χημικά αντιδραστήρια (π.χ. EDTA) που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του DNA.

2.2.3 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Αγαρόζη (Agarose Basic, Applichem)
- Βρωμιούχο αιθίδιο, 10 mg/mL, Fluka
- Ρυθμιστικό διάλυμα 10X TBE (0.9 M Tris-HCl, 0.9 M Βορικό οξύ υψηλής καθαρότητας (Applichem), 0.02 M EDTA)
- Ρυθμιστικό διάλυμα 1X TBE (διάλυμα ηλεκτροφόρησης)
- Διάλυμα φόρτωσης 6X (loading dye solution), το οποίο περιέχει 10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.03% w/v κυανό της βρωμοφαινόλης (Merck), 0.03% w/v κυανό του ξυλενίου (Merck), 60% v/v γλυκερόλη (Applichem) και 60 mM EDTA (VWR International). Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4° C

- Διαλύματα δείκτη μεγέθους 1 kb (500-10,000 bp) και 100 bp (100-1,500 bp) (New England Biolabs, NEB). Τα διαλύματα περιέχουν τμήματα DNA μεγέθους 500-10,000 bp και 100-1,500 bp, αντίστοιχα και φυλάσσονται στους -20°C
- Συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης και συσκευή παροχής ηλεκτρικού ρεύματος (Power Pac), Owl Buffer Puffer™, Model A5 της Thermo Fischer Scientific
- Συσκευή εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) συνδεδεμένη με κάμερα, AlphaImager της Alpha Innoteck
- Φούρνος μικροκυμάτων, R.S Concave Reflex System

Μέθοδος

Για την ανάλυση DNA με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκαν πηκτώματα αγαρόζης 0.8-1.5% w/v. Για τη δημιουργία τους προστέθηκαν 0.8-1.5 g αγαρόζης σε 100 mL διαλύματος 1X TBE και το διάλυμα θερμάνθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων έως ότου καταστεί διαυγές χωρίς ορατά στερεά υπολείμματα αγαρόζης. Στη συνέχεια έγινε προσθήκη 5 μL βρωμιούχου αιθιδίου και απόχυση του διαλύματος στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, στην οποία έχει ήδη τοποθετηθεί το "κτενάκι" για τη δημιουργία των θέσεων (τα φρεάτια) φόρτωσης του DNA. Μετά τη φόρτωση του δείγματος DNA, γίνεται εφαρμογή τάσης ηλεκτρικού ρεύματος 100-120 V για 30-60 λεπτά, αναλόγως του μεγέθους των προς διαχωρισμό μορίων DNA.

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η παρατήρηση των διαχωρισμένων ζωνών του DNA γίνεται με τοποθέτηση του πηκτώματος σε συσκευή εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας και φωτογράφιση με ειδική ψηφιακή κάμερα.

2.2.4 Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης (gel extraction)

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Προκατασκευασμένα αντιδραστήρια εκχύλισης από πηκτή (Nucleospin extract II kit, Macherey-Nagel). Περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα πρόσδεσης NT (χαοτροπικό αντιδραστήριο), ρυθμιστικό διάλυμα NT3 (αιθανολικό διάλυμα έκπλυσης), διάλυμα έκλουσης (αλκαλικό διάλυμα Tris-HCl που προκαλεί έκλυση του DNA σε χαμηλές ιοντικές συνθήκες, pH 8.5)
- Αποστειρωμένη χειρουργική λεπίδα
- Συσκευή εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) συνδεδεμένη με κάμερα, AlphaImager της AlphaInnoteck

- Μάσκα προστασίας από την υπεριώδη ακτινοβολία
- Υδατόλουτρο, ED13, Julabo
- Κυκλοαναδευτήρας, Labnet VX100
- Μικροζυγός ακριβείας, 430-33, Kern
- Μικροφυγόκεντρος, Eppendorf 5417R

Μέθοδος

Με αποστειρωμένη λεπίδα κόβονται οι ζώνες από το πήκτωμα. Η διαδικασία πρέπει να είναι γρήγορη για να μην εκτεθεί πολλή ώρα το DNA στο UV, επειδή υπάρχει κίνδυνος καταστροφής της δομής του DNA, όπως με δημιουργία διμερών θυμίνης. Το πήκτωμα τοποθετείται σε αποστειρωμένο σωλήνα erppendorf. Η υπόλοιπη διαδικασία είναι αυτοματοποιημένη και σύμφωνη με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας.

2.2.5 Απομόνωση του DNA από το διάλυμα της αντίδρασης της PCR

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Προκατασκευασμένα αντιδραστήρια απομόνωσης DNA από το διάλυμα της PCR (Nucleospin extract II kit, Macherey-Nagel). Περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα πρόσδεσης NT (χαοτροπικό αντιδραστήριο), ρυθμιστικό διάλυμα NT3 (αιθανολικό διάλυμα έκπλυσης), διάλυμα έκλουσης (αλκαλικό διάλυμα Tris-HCl που προκαλεί έκλυση του DNA σε χαμηλές ιοντικές συνθήκες, pH 8.5)
- Υδατόλουτρο, ED13, Julabo
- Κυκλοαναδευτήρας, Labnet VX100
- Μικροφυγόκεντρος, Eppendorf 5417R

Μέθοδος

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι σύμφωνη με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας Nucleospin extract II kit, Macherey-Nagel.

Ακολουθείται, στη συνέχεια, η διαδικασία που αναφέρεται στην παράγραφο 2.1.4.

2.2.6 Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Περιοριστικές ενδονουκλεάσες (Takara, New England Biolabs) που χρησιμοποιήθηκαν
 - BglII
 - XhoI
 - EcoRI
 - BamHI
 - PstI
 - SmaI
- Συσκευή ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας, Heraeus

Μέθοδος

Η πέψη ενός πλασμιδίου από μία νουκλεάση περιορισμού έγινε παρουσία του κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος που ρυθμίζει το pH και την συγκέντρωση αλάτων του διαλύματος.

Η θερμοκρασία της πέψης ήταν σχεδόν πάντα 37°C για όλα τα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν, με πολύ σπάνιες εξαιρέσεις ενζύμων που χρειάζονται θερμοκρασία 25°C.

Για τις ποσότητες των ενζύμων που χρησιμοποιούνται πρέπει να λαμβάνεται υπ' όψιν ότι 1unit είναι η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για να κόψει 1 μg DNA σε 1 ώρα στους 37°C. Η συνιστώμενη ποσότητα ενζύμου είναι 5-10 units/μg DNA όταν η δραστηριότητα του ενζύμου στο χρησιμοποιούμενο ρυθμιστικό διάλυμα είναι 50-100% και όταν υπάρχει μία μόνο θέση κοπής από το ένζυμο στο πλασμίδιο. Υπερβολική περίσσεια ενζύμου, μπορεί να προκαλέσει μη ειδικές πέψεις στο DNA. Ο συνιστώμενος χρόνος της αντίδρασης, υπό ιδανικές συνθήκες, είναι 1,5 ώρα. Έτσι, μία πέψη μπορεί να διαρκέσει από 1,5 μέχρι και 16 ώρες. Όταν επιδιώκεται πέψη πολύ μεγάλης ποσότητας DNA, πάνω από 3-4 μg, πρέπει η αντίδραση να γίνεται σε μεγαλύτερο όγκο, για να αποφευχθεί ο κίνδυνος μη ειδικής και μη ποσοτικής πέψης του DNA.

2.2.7 Αποφωσφορυλίωση του DNA

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Αλκαλική φωσφατάση (calf intestinal alkaline phosphatase, CIAP της New England Biolabs)
- Συσκευή ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας, Heraeus
- Υδατόλουτρο, ED13, Julabo

Μέθοδος

Στο διάλυμα της πέψης προστίθεται 1 μL του ενζύμου αλκαλική φωσφατάση και ύστερα από επώαση 30 λεπτών στους 37°C το ένζυμο της αλκαλικής φωσφατάσης απενεργοποιείται, με επώαση στους 75°C (heat inactivation).

2.2.8 Αντίδραση σύνδεσης του πλασμιδιακού φορέα με το ένθεμα (ligation)

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Προπαρασκευασμένα αντιδραστήρια τα οποία περιέχουν το ένζυμο T4 DNA λιγάση και το ρυθμιστικό διάλυμα του ενζύμου, Roche
- Συσκευή ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας, Heraeus

Μέθοδος

Η DNA λιγάση είναι ένα ένζυμο που καταλύει το σχηματισμό ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ της 3'-OH ομάδας στο άκρο μίας αλυσίδας του DNA και της 5'-φωσφορικής ομάδας στο άκρο μίας άλλης. Χρησιμοποιείται εδώ για την ενσωμάτωση αλληλουχίας DNA ενθέματος σε πλασμιδιακό φορέα με συμπληρωματικά άκρα θέσεων περιοριστικών ενζύμων για τη δημιουργία κυκλικών πλασμιδίων. Ο συνολικός όγκος αντίδρασης πρέπει να είναι περίπου 10 μL, ώστε ο φορέας και το ένθεμα να μπορέσουν να αλληλεπιδράσουν και να συνδεθούν. Μετά την προσθήκη του ρυθμιστικού διαλύματος, του ενθέματος και της λιγάσης, γίνεται επώαση στους 16°C για 16 ώρες. Από το συνολικό όγκο του μίγματος της αντίδρασης, 1 μL χρησιμοποιείται για έλεγχο της επιτυχίας της αντίδρασης (ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης) και 5 μL για το μετασχηματισμό βακτηρίων. Το υπόλοιπο μίγμα μπορεί να αποθηκευτεί στους -20°C.

Οι ποσότητες ενθέματος και φορέα που χρησιμοποιούνται μπορούν να υπολογιστούν με τον εξής τύπο:

$$\text{ng ενθέματος} = \frac{\text{ng του φορέα} \times \text{μέγεθος του ενθέματος σε χιλιοστοβάσεις}}{\text{μέγεθος του φορέα σε χιλιοστοβάσεις}} \times \frac{3}{1}$$

2.2.9 Μετασχηματισμός επιδεικτικών κυττάρων *E. coli* (στελέχη TOP10F' και BL21) με τη μέθοδο του θερμικού σοκ

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Κύτταρα *E. coli* (στελέχη TOP10F' ή BL21)

- Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας, LB (Luria-Bertani): Το 1 L περιέχει 10 g tryptone (1% w/v) (Tryptone Biochemica, Applichem), 10 g NaCl (0,17 M, Applichem), 5 g ομογενοποιημένου ζύμης (0,5% w/v) (Applichem)
- Άγαρ για βακτηριολογία, Bacto Agar, BD Biosciences
- Διάλυμα αμπικιλίνης, 100 mg/mL, sodium salt, Applichem
- Διάλυμα LB-άγαρ: 1,5% (w/v) άγαρ σε διάλυμα LB, το οποίο αποστειρώνεται στους 121°C για 30 λεπτά και κατόπιν προστίθεται αμπικιλίνη σε τελική συγκέντρωση 100 µg/mL
- Αποστειρωμένα ρύγχη για συλλογή βακτηριακών αποικιών, Greiner bio-one
- Τρυβλία Petri για στερεές καλλιέργειες βακτηρίων, Sarstedt
- Επωαστήρας για την καλλιέργεια βακτηρίων υπό ανάδευση, Lab Tech

Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι κύτταρα *E. coli* TOP10F' για χρήση του εισαγόμενου DNA και απομόνωσή του από καλλιέργεια μικρής έκτασης (miniprep) ή μεγάλης έκτασης (midiprep) και κύτταρα BL21 που περιέχουν το γονίδιο της T7 πολυμεράσης για παραγωγή της πρωτεΐνης mCherry σε μεγάλη κλίμακα.

Μέθοδος

A. Μετασχηματισμός

- Απόψυξη των κυττάρων σε πάγο
- Προσθήκη του πλασμιδιακού DNA (τουλάχιστον 100 ng όταν πρόκειται για καθαρισμένο πλασμιδιακό DNA ή 5 µL από τα 10 µL της αντίδρασης σύνδεσης)
- Παραμονή για 20 λεπτά στον πάγο με συχνή ελαφρά ανακίνηση για να μη μένει το δείγμα στον πυθμένα του erpendorf
- Το θερμικό σοκ προκαλείται με παραμονή των κυττάρων για 1 λεπτό και 30 δευτερόλεπτα ακριβώς, στους 42°C, αμέσως μετά, τοποθετείται στον πάγο για 10 λεπτά
- Προσθήκη 1 mL θρεπτικού μέσου LB χωρίς αντιβιοτικό
- Επώαση του δείγματος των κυττάρων, στους 37°C για μία ώρα, υπό ανάδευση

B. Εμβολιασμός τρυβλίων Petri

Μετά τη μία ώρα, για έκφραση του γονιδίου ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη, τα μετασχηματισμένα κύτταρα φυγοκεντρούνται (20,000×g, 10 min) το υπερκείμενο αποχύνεται, αναδιαλύονται σε όσο όγκο θρεπτικού μέσου έχει απομείνει και επιστρώνονται σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό μέσο LB που περιέχει αμπικιλίνη (100 µg/mL). Μόνο τα μετασχηματισμένα κύτταρα που έχουν προσλάβει το πλασμίδιο με το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη

θα μπορέσουν να αναπτυχθούν. Οι αποικίες που θα αναπτυχθούν στο τρυβλίο πρέπει να είναι αραιές για να μπορούν να απομονωθούν εύκολα για μεταφορά σε υγρό θρεπτικό μέσο για περαιτέρω ανάπτυξη. Η διαδικασία επίστρωσης είναι η εξής: με αποστειρωμένο ρύγχος και σε ασηπτικές συνθήκες (με χρήση φλόγας), παραλαμβάνεται η ποσότητα του δείγματος και τοποθετείται στο κέντρο του τρυβλίου. Στη συνέχεια, τα κύτταρα «απλώνονται» σε όλη την επιφάνεια του τρυβλίου με τη βοήθεια γυάλινης ράβδου η οποία κάθε φορά αποστειρώνεται με αιθανόλη και πέρασμα από φλόγα.

Στη συνέχεια, τα τρυβλία τοποθετούνται στον επωαστήρα στους 37°C χωρίς ανακίνηση, για 16-18 ώρες (αν περάσουν 18 ώρες τα τρυβλία πρέπει να μπουν στο ψυγείο για να σταματήσει η βακτηριακή ανάπτυξη). Την επόμενη μέρα, μονές αποικίες παραλαμβάνονται με τη βοήθεια αποστειρωμένου ρύγχους και ολόκληρο το ρύγχος τοποθετείται σε 4 mL υγρού θρεπτικού μέσου LB. Η ενοφθαλμισμένη καλλιέργεια επωάζεται στους 37°C, με ανάδευση για 16 ώρες.

2.2.10 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργεια μικρής έκτασης (miniprep)

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Διάλυμα αναδιάλυσης P1
 - Tris-HCl (pH 8.0) 50 mM, Applichem
 - EDTA 10 mM, VWR International
 - RNάση A 100 µg/mL, Sigma
- Διάλυμα λύσης P2
 - NaOH 200 mM, Applichem
 - SDS 1% w/v, Applichem
- Διάλυμα εξουδετέρωσης P3
 - Οξικό κάλιο 3 M (pH 5.0), VWR International
- Αιθανόλη 70%, παγωμένη (-20°C), VWR International
- Απόλυτη αιθανόλη, παγωμένη (-20°C), VWR International
- Υπερκάθαρο και αποστειρωμένο νερό
- Μικροφυγόκεντρος, Eppendorf 5417R

Μέθοδος

- Απομονώνεται μία βακτηριακή αποικία από τρυβλίο με τη βοήθεια ενός αποστειρωμένου ρύγχους και ολόκληρο το ρύγχος τοποθετείται σε σωλήνα που περιέχει 4 mL υγρού θρεπτικού μέσου LB με αμπικιλίνη (100 µg/mL). Η καλλιέργεια αναπτύσσεται για 16

ώρες στους 37°C υπό ανάδευση και 1.5 mL φυγοκεντρείται στα 20.000×g για 15 λεπτά στους 4°C (σε σωλήνα erpendorf)

- Το ίζημα αναδιαλύεται με έντονη ανάδευση σε κυκλοαναδευτήρα σε 100 μL του διαλύματος P1
- Προστίθενται 200 μL διαλύματος P2 που περιέχει NaOH και SDS, το δείγμα ανακινείται ελαφρώς με το χέρι και παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά για να γίνει λύση των βακτηριακών κυττάρων
- Προστίθενται 150 μL διαλύματος P3 για εξουδετέρωση του pH, ο σωλήνας ανακινείται ελαφρώς με το χέρι 6-8 φορές και τοποθετείται για 5 λεπτά στον πάγο
- Το δείγμα φυγοκεντρείται (20.000×g, 5 λεπτά, 4°C) και επαναλαμβάνεται το στάδιο αυτό αν το υπερκείμενο δεν είναι απόλυτα διαυγές
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καθαρό erpendorf
- Προστίθεται 1 mL απόλυτης παγωμένης αιθανόλης για κατακρήμνιση του πλασμιδιακού DNA και το δείγμα φυγοκεντρείται (20.000×g, 10 λεπτά, 4°C)
- Αποχύνεται το υπερκείμενο υγρό, προστίθενται 500 μL παγωμένης αιθανόλης 70% και το δείγμα φυγοκεντρείται (20.000×g, 10 λεπτά 4°C)
- Αποχύνεται προσεκτικά το υπερκείμενο υγρό και το ίζημα του πλασμιδιακού DNA αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου να στεγνώσει (σε ρεύμα αέρα απαγωγού) ή σε μηχανήμα φυγοκεντρικής εξάτμισης υπό κενό, στους 37°C
- Το πλασμιδιακό DNA αναδιαλύεται σε 20 μL υπερκάθαρου και αποστειρωμένου νερού και μπορεί να αποθηκευτεί στους -20°C

Η ποσότητα του διαλύματος έκλουσης που χρησιμοποιείται καθορίζει και την πυκνότητα της συγκέντρωσης του DNA στο τελικό διάλυμα.

2.2.11 Αποθήκευση βακτηρίων σε διάλυμα γλυκερόλης (cryopreservation)

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Γλυκερόλη 99% v/v, Applichem
- Διάλυμα γλυκερόλης 30% v/v
- Κρυοπροστατευτικοί αποστειρωμένοι σωλήνες φύλαξης κυττάρων, NUNC

Μέθοδος

Σε αποστειρωμένα φιαλίδια φύλαξης κυττάρων προστίθενται 500 μL καλλιέργειας βακτηρίων σε ίσο όγκο αποστειρωμένου διαλύματος 30% γλυκερόλης έτσι ώστε η συγκέντρωση της

γλυκερόλης στο τελικό διάλυμα να είναι 15% v/v. Το φιαλίδιο αποθηκεύεται στους -80°C. Η ανάκτηση μικρής ποσότητας από την επιφάνεια των παγωμένων βακτηρίων γίνεται με αποστειρωμένο ρύγχος και μεταφέρεται σε υγρή καλλιέργεια θρεπτικού μέσου LB για επώαση υπό ανάδευση στους 37°C για 16 ώρες. Η καλλιέργεια των βακτηρίων σε γλυκερόλη δεν πρέπει να βγαίνει από την κατάψυξη παρά μόνο για ελάχιστο χρονικό διάστημα έτσι, ώστε να μην αποψύχεται. Τα περισσότερα στελέχη βακτηρίων μπορούν να αποθηκευτούν για μεγάλα χρονικά διαστήματα, έως και 2 χρόνια, σε κατεψυγμένη μορφή στους -20°C ή ακόμα και για πολλά χρόνια στους -80°C. Στους 4°C, μία υγρή καλλιέργεια διατηρείται για 7 ημέρες και ένα τρυβλίο με αποικίες για ένα μήνα.

2.2.12 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργεια μεγάλης έκτασης (midiprep)

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Προκατασκευασμένα αντιδραστήρια καθαρισμού πλασμιδιακού DNA (NucleoBond Xtra Midi kit, Macherey-Nagel). Περιέχει διάλυμα αναδιάλυσης RES (το οποίο περιέχει και RNάση A, αποθηκεύεται στους 4°C), διάλυμα αλκαλικής λύσης LYS (περιέχει NaOH, SDS), διάλυμα εξουδετέρωσης NEU (περιέχει οξικό κάλιο), διάλυμα εξισορρόπησης EQU, αιθανολικό διάλυμα έκπλυσης WASH, αλκαλικό διάλυμα έκλυσης ELU και στήλες ιοντοανταλλαγής με βάση το διοξείδιο του πυριτίου (silica)
- Ισοπροπανόλη, Applichem
- Αιθανόλη 70% v/v, VWR International
- Υπερκάθαρο νερό
- Διάλυμα TE (10 mM Tris/HCl (Applichem), pH 7.5, 1 mM EDTA, VWR International)
- Κυκλοαναδευτήρας, Labnet VX100
- Μικροφυγόκεντρος, Eppendorf 5417R
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος, Jouan CR3i multifunction, Thermo

Μέθοδος

Από βακτηριακό stock γλυκερόλης λαμβάνεται μία μικρή ποσότητα βακτηρίων ή από μικρή καλλιέργεια 4 mL λαμβάνεται ποσότητα 500 µL και εμβολιάζεται σε 200 mL θρεπτικού μέσου LB παρουσία κατάλληλου αντιβιοτικού σε τελική συγκέντρωση 100 µg/mL. Η διαδικασία πραγματοποιείται κοντά σε φλόγα, για διατήρηση στείρων συνθηκών. Η καλλιέργεια αφήνεται να αναπτυχθεί σε επωαστήρα, στους 37° C, υπό ανάδευση, για 16 ώρες.

Την επόμενη ημέρα, πραγματοποιείται η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA από τα βακτήρια, με την παρακάτω διαδικασία.

- Η καλλιέργεια φυγοκεντρείται στα $2,700\times g$ για 30 λεπτά στους $4^{\circ}C$
- Το βακτηριακό ίζημα αναδιαλύεται με ισχυρή ανάδευση σε 10 mL διαλύματος RES και το δείγμα τοποθετείται σε πάγο
- Ακολουθεί προσθήκη 8 mL διαλύματος LYS, ήπια ανάδευση και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Προστίθενται 8 mL διαλύματος NEU, το δείγμα αναδεύεται ήπια και
- μεταφέρεται σε χρωματογραφική στήλη που περιέχει φίλτρο κατακράτησης των πρωτεϊνών, του χρωμοσωμικού DNA και των κυτταρικών θραυσμάτων, ενώ έχει ήδη γίνει προετοιμασία / εξισορρόπηση της στήλης με προσθήκη 12 mL διαλύματος EQU
- Το φίλτρο και η στήλη εκπλένονται με 5 mL διαλύματος EQU, το φίλτρο απομακρύνεται και η στήλη εκπλένεται με 8 mL διαλύματος WASH
- Το πλασμιδιακό DNA εκλύεται με 5 mL διαλύματος ELU
- Στο έκλουσμα προστίθενται 3.5 mL ισοπροπανόλης σε θερμοκρασία δωματίου και το δείγμα αναδεύεται ισχυρά σε κυκλοαναδευτήρα
- Το δείγμα φυγοκεντρείται στα $15,000\times g$, για 30 λεπτά, στους $4^{\circ}C$, οπότε καθιζάνει το πλασμιδιακό DNA
- Το ίζημα εκπλένεται με αιθανόλη 70% και φυγοκεντρείται στα $15,000\times g$, για 5 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου
- Αποχύνεται προσεκτικά το υπερκείμενο υγρό και το DNA αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να στεγνώσει (σε ρεύμα αέρα απαγωγού) ή σε μηχανήμα φυγοκεντρικής εξάτμισης υπό κενό, στους $37^{\circ}C$
- Μετά την εξάτμιση του διαλύτη, το πλασμιδιακό DNA αναδιαλύεται σε 150-200 μL διαλύματος TE ή υπερκάθαρου και απιονισμένου νερού

Η συγκέντρωση του DNA προσδιορίζεται με μέτρηση οπτικής απορρόφησης στα 260 nm (βλ. παράγραφο 2.1.2) και η ποιότητα του ελέγχεται σε πηκτή αгарόζης (βλ. παράγραφο 2.1.3).

2.3 Αλληλούχιση του DNA (sequencing)

Η αλληλούχιση δείγματος πλασμιδιακού DNA (10 μL DNA με συγκέντρωση 4-5 $\mu g/\mu L$) έγινε από την Εταιρεία VBC Biotech (<http://www.vbc-biotech.at/cms/index.php>). Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης ελέγχθηκαν για ομολογία με την αλληλουχία του γονιδίου της mCherry με τα προγράμματα ClustalW2 και BioEdit Sequence Alignment Editor.

Ο έλεγχος γίνεται σε δύο αντιδράσεις, με δύο διαφορετικούς εκκινητές, έναν πρόσθιο και έναν ανάστροφο, για διασταύρωση του αποτελέσματος και για κάλυψη ολόκληρης της αλληλουχίας, επειδή η αντίδραση έχει χαμηλή ακρίβεια στην ανάλυση των πρώτων βάσεων.

2.4 Έκφραση, απομόνωση και καθαρισμός ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών από βακτήρια

2.4.1 Έκφραση της mCherry σε βακτήρια έκφρασης BL21

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Θρεπτικό μέσο LB (Luria-Bertani) (βλ. παράγραφο 2.1.9)
- Διάλυμα αμπικιλίνης, 100 mg/mL, Applichem
- Διάλυμα λύσης βακτηρίων, pH 8.0
 - Tris-HCl 50 mM, Applichem
 - NaCl 300 mM, Applichem
 - Ιμιδαζόλιο 10 mM, Invitrogen
 - 0,1% v/v Triton X-100, C₁₄H₂₂O(C₂H₄O)_n, n=9-10, Sigma
 - Αναστολείς πρωτεασών, Sigma
 - Λυσοζύμη, Sigma
- Υγρό άζωτο
- Πλαστικές κυψελίδες μίας χρήσης, Sarstedt
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος, Jouan CR3i multifunction, Thermo
- Μικροφυγόκεντρος, Eppendorf 5417R
- Υδατόλουτρο, ED13, Julabo
- Συσκευή υπερήχων, Virsonic 475 Ultrasonic Cell Disrupter, Virtis

Μέθοδος

Για την ετερόλογη έκφραση της mCherry σε βακτήρια, ενισχύθηκε το γονίδιο της (mCherry) με τη μέθοδο της PCR από πλασμιδιακό DNA (pcDNAIII-mCherry) και κλωνοποιήθηκε στις θέσεις BglIII και XhoI του πλασμιδίου pTriex 1.1 (Novagen) (Εικόνα 3.7). Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη εκφράστηκε σε βακτήρια BL21, τα οποία φέρουν το γονίδιο της πολυμεράσης T7, ενώ το συγκεκριμένο πλασμίδιο περιέχει τον υποκινητή T7 μετά το οπερόνιο της λακτόζης. Το πλασμίδιο φέρει επίσης γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη.

- Ανάπτυξη υγρής βακτηριακής καλλιέργειας BL21-pTriex1.1-mCherry, 100 mL με 100 µg/mL αμπικιλίνη (αρχική καλλιέργεια) για 16 ώρες, στους 37°C, υπό ανάδευση
- Ανάμιξη της αρχικής καλλιέργειας με 1-2 L θρεπτικού μέσου LB και επώαση για 16 ώρες, στους 37°C, υπό ανάδευση
- Μέτρηση της οπτικής πυκνότητας της καλλιέργειας στα 600 nm (OD₆₀₀) μετά τη συλλογή της και πριν τη φυγοκέντρωση, για να είναι γνωστός ο αριθμός των κυττάρων
- Φυγοκέντρωση στα 2,700×g για 30 λεπτά στους 4°C. Το ίζημα μπορεί να φυλαχθεί στους -80°C
- Ακολουθεί λύση των βακτηρίων με 40-80 mL ρυθμιστικού διαλύματος κυτταρικής λύσης (pH 8.0), που περιέχει και λυσοζύμη για την πέψη του τοιχώματος των πεπτιδογλυκάνων
- Η λύση των βακτηρίων υποβοηθείται με ψύξη/απόψυξη (3 διαδοχικές επώσεις σε υγρό άζωτο και στους 37°C) και, στη συνέχεια, με υπερήχηση (6-8 εφαρμογές των 30 δευτερολέπτων έως ενός λεπτού στα 100 W με ενδιάμεσα διαστήματα 30 δευτερολέπτων έως 1 λεπτού ψύξης στον πάγο)
 - Φυλάσσονται 100 µL από το ολικό ομογενοποίημα, στα οποία προστίθεται διάλυμα φόρτωσης (Laemmli buffer, βλ. παράγραφο 3.5.1) και υποβάλλονται σε βρασμό (95°C, 5 λεπτά)
- Ακολουθεί φυγοκέντρωση (14,000×g, 30 λεπτά, 4°C)
- Συλλέγεται το σύνολο των διαλυτών πρωτεϊνών (υπερκείμενο), φυλάσσονται 100 µL από αυτό (όπως προηγουμένως), ενώ το ίζημα που περιέχει τις μη διαλυτές πρωτεΐνες (σε σωματίδια εγκλεισμού, inclusion bodies) αναδιαλύεται στον ίδιο όγκο που χρησιμοποιήθηκε για την λύση των κυττάρων. Φυλάσσονται 100 µL (όπως προηγουμένως) στους -20°C για ανάλυση
- Το υπερκείμενο που περιέχει τις διαλυτές πρωτεΐνες μπορεί να αποθηκευτεί προσωρινά στους -80°C με γρήγορη ψύξη σε υγρό άζωτο. Σε περίπτωση απομόνωσης ενζύμου συνιστάται η άμεση απομόνωση της πρωτεΐνης. Η ψύξη-απόψυξη του πρωτεϊνικού διαλύματος μειώνει τη δραστηριότητά του λόγω μερικής αποδιάταξης.

2.4.2 Επαγωγή της έκφρασης της mCherry σε βακτήρια έκφρασης BL21

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Ισοπροπυλο-β-D-1-θειογαλακτοπυρανόζη (IPTG), Applichem
- Τα υπόλοιπα αντιδραστήρια-όργανα είναι όμοια με αυτά της προηγούμενης παραγράφου

Μέθοδος

- Ανάπτυξη υγρής βακτηριακής καλλιέργειας BL21-pTriex1.1-mCherry, 100 mL που περιέχει αμπικιλίνη 100 µg/mL (αρχική καλλιέργεια) για 16 ώρες, στους 37° C, υπό ανάδευση
- Ανάμιξη της αρχικής καλλιέργειας με 1-2 L θρεπτικού μέσου LB και επώαση για 16 ώρες, στους 25° C, υπό ανάδευση
- Μέτρηση της οπτικής πυκνότητας της καλλιέργειας στα 600 nm (OD₆₀₀)
- Προσθήκη του επαγωγέα IPTG σε τελική συγκέντρωση 0,5 mM
- Επώαση της καλλιέργειας για 4 ώρες, στους 25° C, υπό ανάδευση
- Μέτρηση OD₆₀₀

Στη συνέχεια ακολουθείται η ίδια διαδικασία όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 2.3.1

2.5 Ανοσοαποτύπωση Western (Western blot)

2.5.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου με SDS (SDS-PAGE)

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Πήκτωμα διαχωρισμού (8%, 10% ή 12% w/v), pH 8,8
 - Υπερκάθαρο νερό
 - Ακρυλαμίδιο, Applichem
 - *N,N'*-μεθυλενο-δισ-ακρυλαμίδιο, Sigma
 - Tris-HCl 1,5 M, Applichem
 - SDS 10% w/v, Applichem
 - Υπερθεικό αμμώνιο (APS) 10% w/v, BioRad
 - Τετραμεθυλενο-αιθυλενο-διαμίνη (TEMED), BioRad
- Πήκτωμα επιστοιίβασης (4% w/v), pH 6,8
 - Υπερκάθαρο νερό
 - Ακρυλαμίδιο, Applichem
 - *N,N'*-μεθυλενο-δισ-ακρυλαμίδιο, Sigma
 - Tris-HCl 1,0 M, Applichem
 - SDS 10% w/v, Applichem
 - APS 10% w/v, BioRad
 - TEMED, BioRad
- Διάλυμα ηλεκτροφόρησης (electrode buffer, pH 8,3), 1x, 500 mL

- Trisma base 1,5 g, Applichem
- Γλυκίνη 7 g, Applichem
- SDS σε τελική συγκέντρωση 10% v/v, Applichem
- Διάλυμα φόρτωσης δείγματος πρωτεϊνών 1x (Laemmli buffer)
 - Γλυκερόλη 10% v/v, Applichem
 - Β-μερκαπτοαιθανόλη 50 μ L, Sigma
 - Κυανό της βρωμοφαινόλης 0,01% w/v BBB, Merck
 - Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8, Applichem
 - SDS 2% w/v, Applichem
- Coomassie Brilliant Blue R-250, BioRad
- Διάλυμα αποχρωματισμού σε νερό
 - Μεθανόλη (CH₃OH) 40% v/v, Applichem
 - Οξικό οξύ (CH₃COOH) 10% v/v, υψηλού βαθμού καθαρότητας, Applichem
- Πρωτεΐνες αναφοράς, Amersham / Heath care
- Γυάλινες πλάκες για ρύθμιση του πάχους το πήκτωμα (0,75 ή 1,5 mm), BioRad
- Ειδική κτένα (comb) για το σχηματισμό των θέσεων τοποθέτησης δείγματος (wells) στο πήκτωμα (10 θέσεις)
- Συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης Mini-Protean II, Biorad
- Συσκευή παροχής ηλεκτρικού ρεύματος Model 1000/500, Biorad

Με τη μέθοδο SDS-PAGE γίνεται διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση τη διαφορετική μοριακή μάζα τους [74].

Στους Πίνακες 2.2 και 2.3 παρουσιάζονται οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των πηκτών διαχωρισμού και επιστοιβάσης, αντίστοιχα.

Πίνακας 2.2. Πήκτωμα διαχωρισμού

Αντιδραστήρια	10% w/v	12% w/v
Μίγμα ακρυλαμιδίου	3,3 mL	4,0 mL
Tris-HCl, 1,5 M	2,5 mL	2,5 mL
SDS 10%	0,1 mL	0,1 mL
APS 10%	0,1 mL	0,1 mL
TEMED	0,004 mL	0,004 mL
Νερό	4,0 mL	3,3 mL

Πίνακας 2.3. Πήκτωμα επιστοιίβασης

Αντιδραστήρια	4% w/v
Μίγμα ακρυλαμιδίου	0,67 mL
Tris-HCl, 1,5 M	0,5 mL
SDS 10%	0,04 mL
APS 10%	0,04 mL
TEMED	0,004 mL
Νερό	2,7 mL

Μέθοδος

- Το διάλυμα του πηκτώματος διαχωρισμού τοποθετείται στο χώρο μεταξύ των δύο γυάλινων πλακών, επικαλύπτεται με μία στοιβάδα νερού και αφήνεται να πολυμεριστεί
- Αποχύνεται το νερό και προστίθεται το διάλυμα του πηκτώματος επιστοιίβασης, που έχει ήδη προετοιμαστεί, μέχρι να πληρωθεί τελείως ο χώρος ανάμεσα στις πλάκες
- Τοποθετείται η ειδική κτένα, με προσοχή, ώστε να μην εγκλωβίσει φυσαλίδες αέρα
- Αφού πολυμεριστεί το πήκτωμα επιστοιίβασης, απομακρύνεται η κτένα. Τα φρεάτια που έχουν δημιουργηθεί είναι οι θέσεις στις οποίες θα τοποθετηθούν στη συνέχεια τα δείγματα, στα οποία έχει προστεθεί ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης και έχουν υποστεί βρασμό (95° C, 5 λεπτά)
- Τοποθέτηση των δειγμάτων:
 - με το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης πληρούται η άνω μονάδα της συσκευής ηλεκτροφόρησης, επομένως και τα φρεάτια. Εφόσον δεν παρατηρηθούν διαρροές, τοποθετείται το υπόλοιπο ρυθμιστικό διάλυμα στην κάτω μονάδα της συσκευής
 - στα φρεάτια του πηκτώματος επιστοιίβασης τοποθετούνται μέχρι 25 μ L (για πάχος 0,75 mm) ή μέχρι 40 μ L (για πάχος 1,5 mm) από κάθε δείγμα και 12 μ L από τα πρότυπα
- Ηλεκτροφόρηση: συνδέεται το ηλεκτρόδιο της άνω μονάδας της συσκευής με την κάθοδο (-) και το ηλεκτρόδιο της κάτω μονάδας με την άνοδο (+) της συσκευής παροχής ηλεκτρικού ρεύματος
- Ρυθμίζεται η τάση στα 200 V
- Εμφάνιση των πρωτεϊνών στο πήκτωμα: μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, αποσυνδέονται τα ηλεκτρόδια από τους πόλους της πηγής ρεύματος και απομακρύνεται η πηκτή από τη συσκευή. Διαχωρίζονται οι δύο πλάκες με προσοχή, αποκολλάται το πήκτωμα και τοποθετείται στο διάλυμα της χρωστικής για 16 ώρες, υπό ανακίνηση. Στη

συνέχεια, γίνεται αποχρωματισμός του υποβάθρου το πήκτωμα με διαδοχικές εκπλύσεις σε διάλυμα αποχρωματισμού υπό ανακίνηση και τελικά τοποθετείται σε υπερκάθαρο νερό και οξικό οξύ 4% v/v για να διατηρηθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα.

2.5.2 Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου (βλ. παράγραφο 2.4.1)
- Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, Amersham, Macherey-Nagel
- Διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς πρωτεϊνών (transfer buffer)
 - Trisma base 3 g, Applichem
 - Γλυκίνη 14 g, Applichem
 - Μεθανόλη 20% v/v, Applichem
- Διάλυμα χρώσης νιτροκυτταρίνης Ponceau-S
 - Ponceau-S, 1 mg/mL, Sigma
 - Οξικό οξύ (CH₃COOH) 7% v/v, υψηλού βαθμού καθαρότητας, Applichem
- Λεπτά σφουγγάρια
- Χαρτί διήθησης Whatmann 3MM
- Συσκευή μεταφοράς πρωτεϊνών σε νιτροκυτταρίνη Mini Trans-Blot, BioRad

Για τη μεταφορά πρωτεϊνών από το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης χρησιμοποιείται διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς πρωτεϊνών. [75].

Μέθοδος

Ετοιμάζεται μία «κατασκευή» με την εξής σειρά: α) ένα λεπτό φύλλο σφουγγαριού, β) δύο φύλλα διηθητικού χαρτιού Whatmann 3MM, γ) η πηκτή πολυακρυλαμίδιου, δ) ένα κομμάτι νιτροκυτταρίνης στο μέγεθος της πηκτής, ε) δύο φύλλα διηθητικού χαρτιού και στ) ένα λεπτό φύλλο σφουγγαριού.

- Το σύστημα τοποθετείται στην ειδική συσκευή μεταφοράς έτσι ώστε η νιτροκυτταρίνη να βρίσκεται προς την πλευρά της ανόδου
- Η μεταφορά πρωτεϊνών πραγματοποιείται με ρεύμα σταθερής έντασης 300 mA για μία ώρα και 30 λεπτά.

- Μετά τη μεταφορά, η μεμβράνη χρωματίζεται με διάλυμα χρωστικής Ponceau-S και ξεπλένεται με υπερκάθαρο νερό για να απομακρυνθεί η περίσσεια της χρωστικής και να γίνουν ορατές οι ζώνες των πρωτεϊνών.

2.5.3 Ανοσοενζυμική ανίχνευση πρωτεϊνών

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, Amersham, Macherey-Nagel
- PBS (βλ. παράγραφο 2.4.2)
- Άπαχο γάλα σε σκόνη, Regilait
- Απορρυπαντικό Tween-20, Applichem
- Πολυκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι της ετικέτας των οκτώ ιστιδινών (8His)
- Πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι της μονομερούς κόκκινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (mRFP)
- Συζευγμένα με υπεροξειδάση αντισώματα έναντι των IgG ανοσοσφαιρινών κουνελιού και ποντικού, Pierce (41460 και 31230 αντίστοιχα)
- Amersham ECL kit
- Διαλύματα φωτογραφικής εμφάνισης, Applichem
- X-ray φιλμ
- Συσκευή οριζόντιας κυκλικής ανακίνησης, 3005 GLF, Buch & Holm

Μέθοδος

Η ανίχνευση της πρωτεΐνης στη μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης γίνεται είτε με τη μέθοδο της 3',3'-διαμινοβενζιδίνης (για πρωτεΐνες απομονωμένες από βακτήρια) είτε με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας (Electrochemiluminescence ή electrogenerated chemiluminescence (ECL) για πρωτεΐνες απομονωμένες από τα παράσιτα).

Η μεμβράνη, μετά το πέρας της ηλεκτρομεταφοράς, επωάζεται με αντίσωμα που αναγνωρίζει την προς ανίχνευση πρωτεΐνη και στη συνέχεια, επωάζεται με δεύτερο αντίσωμα συζευγμένο με το ένζυμο της υπεροξειδάσης HRP (Horse Radish Peroxidase), το οποίο αναγνωρίζει το πρώτο αντίσωμα.

Υποστρώματα της HRP αποτελούν, στην πρώτη περίπτωση, το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂) και η 3',3'-διαμινοβενζιδίνη, η οποία οξειδώνεται δίνοντας ένα σκούρο καφέ χρώμα που μπορεί να ενισχυθεί με την προσθήκη γλωριδίου του νικελίου(II).

- Επώαση της μεμβράνης της νιτροκυτταρίνης στην οποία έχουν μεταφερθεί οι πρωτεΐνες σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα με PBS + 5% άπαχο γάλα σε σκόνη + 0,05% Tween-20, ώστε να εμποδιστεί η μη ειδική προσκόλληση των αντισωμάτων
- Προσθήκη πρώτου αντισώματος: επώαση με το πρώτο αντίσωμα σε PBS + 2% w/v γάλα σε σκόνη + 0,05% v/v Tween-20 στην κατάλληλη αραιώση σε θερμοκρασία δωματίου για 1-2 ώρες, υπό ανακίνηση ή στους 4° C για 16 ώρες (για πιο ειδική πρόσδεση)
- Εκπλύσεις: διαδοχικές εκπλύσεις της μεμβράνης της νιτροκυτταρίνης με PBS που περιέχει 0,1% v/v Tween-20 (3×5 λεπτά)
- Δεύτερο αντίσωμα: επώαση της μεμβράνης με δεύτερο αντίσωμα αντι-IgG σε διάλυμα PBS + 1% w/v γάλα σε σκόνη + 0,05% Tween-20 στην κατάλληλη αραιώση (1:1000) σε θερμοκρασία δωματίου για 1-2 ώρες, υπό ανακίνηση. Το αντίσωμα αυτό φέρει ομοιοπολικά συνδεδεμένο το ένζυμο της υπεροξειδάσης (DAKO Code No PO214)
- Διαδοχικές εκπλύσεις της μεμβράνης της νιτροκυτταρίνης με 0,3% Tween-20 σε PBS (5 λεπτά), με 0,2% v/v Tween-20 σε PBS (5 λεπτά), με 0,1% v/v Tween-20 σε PBS (5 λεπτά) και, τέλος, με PBS 1X
- Εμφάνιση:
 - Μέθοδος DAB: προσθέτουμε στην νιτροκυτταρίνη το διάλυμα εμφάνισης και περιμένουμε την ανάπτυξη του χρώματος. Η πορεία της αντίδρασης διακόπτεται με έκπλυση με νερό βρύσης και στέγνωμα.
 - Μέθοδος ECL: σε θάλαμο εμφάνισης, α) αναμιγνύονται τα διαλύματα 1 και 2 που εμπεριέχονται στο κιτ, μία ποσότητα του υγρού απλώνεται στη μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης και αφήνεται για 2-5 λεπτά, ώστε να ολοκληρωθεί η αντίδραση, β) αφού απομακρυνθεί το υγρό, η μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης καλύπτεται με πλαστική μεμβράνη για να μην έρχεται σε απευθείας επαφή με το φιλμ που τοποθετείται πάνω από αυτή, γ) αφήνεται για χρονικό διάστημα λίγων δευτερολέπτων έως και αρκετών λεπτών, ανάλογα με την ποσότητα της πρωτεΐνης που ανιχνεύουμε, δ) το φιλμ αφαιρείται και εμβαπτίζεται στο υγρό ανάπτυξης μέχρι να εμφανιστούν οι ζώνες των πρωτεϊνών, στη συνέχεια ξεπλένεται με νερό και εμβαπτίζεται στο υγρό σταθεροποίησης. Εναλλακτικά η εμφάνιση μπορεί να γίνει με τη χρήση Phosphorimager STORM 830 (Κόκκινο: Διέγερση=635nm / Εκπομπή=650nm, Μπλέ: Διέγερση=450nm / Εκπομπή=520nm).

2.6 Αποδέσμευση αντισωμάτων και επαναχρησιμοποίηση της μεμβράνης

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης
- Διάλυμα γλυκίνης 0,2 M σε υπερκάθαρο νερό, pH 2,6
- Τα υπόλοιπα αντιδραστήρια είναι όμοια με αυτά της προηγούμενης παραγράφου

Μέθοδος

Η ανάπτυξη τεχνικών ανίχνευσης των αντιγόνων στα ανοσοαποτυπώματα που βασίζονται στη μέθοδο της χημειοφωταύγειας παρέχει τη δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης των μεμβρανών με τη χρήση διαφορετικών αντισωμάτων, καθώς δεν έχει πραγματοποιηθεί αλλοίωση της μεμβράνης αλλά και των μεταφερθέντων σε αυτήν αντιγόνων. Κατά τη διαδικασία της αποδέσμευσης των αντισωμάτων (stripping), η μεμβράνη επωάζεται σε διάλυμα γλυκίνης pH 2,6. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η διάσπαση του δεσμών υδρογόνου συμπλόκου αντιγόνου-αντισώματος και η απελευθέρωση των αντισωμάτων από τη μεμβράνη. Οι μοναδικές πρωτεΐνες που παραμένουν στη μεμβράνη είναι εκείνες οι οποίες είναι ισχυρά δεσμευμένες λόγω των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων κατά την ηλεκτρομεταφορά τους. Στη συνέχεια, η μεμβράνη εκπλένεται και πραγματοποιείται εκ νέου επώασή της με PBS + 5% w/v άπαχο γάλα σε σκόνη + 0,05% v/v Tween-20 για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να εμποδιστεί η μη ειδική προσκόλληση των αντισωμάτων και ακολουθείται η διαδικασία όπως περιγράφηκε στην προηγούμενη παράγραφο.

2.7 Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Αντιδραστήριο της Bradford, BioRad
- Πρωτεΐνη γνωστής συγκέντρωσης για την καμπύλη αναφοράς, BSA ή BGG, PIERCE
- Υπερκάθαρο νερό
- Πλαστικές κυψελίδες μίας χρήσης, Sarstedt
- Φασματοφωτόμετρο, SmartSpec Plus Spectrophotometer, 170-2525, BioRad

Μέθοδος

Ανιοντικά σύμπλοκα CBBG προσδεδεμένα σε κατάλοιπα αμινοξέων απορροφούν στα 595 nm, ενώ η ελεύθερη χρωστική σε διάλυμα έχει μέγιστη απορρόφηση στα 470 nm. Υπολογίζεται η ποσότητα της ολικής πρωτεΐνης του δείγματος βάσει πρότυπης καμπύλης αναφοράς. Ως πρότυπο διάλυμα χρησιμοποιήθηκε είτε αλβουμίνη βοδινού ορού (BSA) 1 mg/mL, είτε IgG βοδινού (Bovine Gamma Globuline) 1 mg/mL.

- Προετοιμασία των πρωτεϊνικών δειγμάτων που περιέχουν BSA ή BGG σε ποσότητες από 1 έως 20 μg σε συνολικό όγκο 800 μL
- Προετοιμασία αγνώστων πρωτεϊνικών δειγμάτων σε ποσότητες από 1 έως 20 μL σε συνολικό όγκο 800 μL
- Προσθήκη 200 μL αντιδραστηρίου Bradford. Ανάδευση των δειγμάτων και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Φωτομέτρηση στα 595 nm.

2.8 Κυτταροκαλλιέργειες

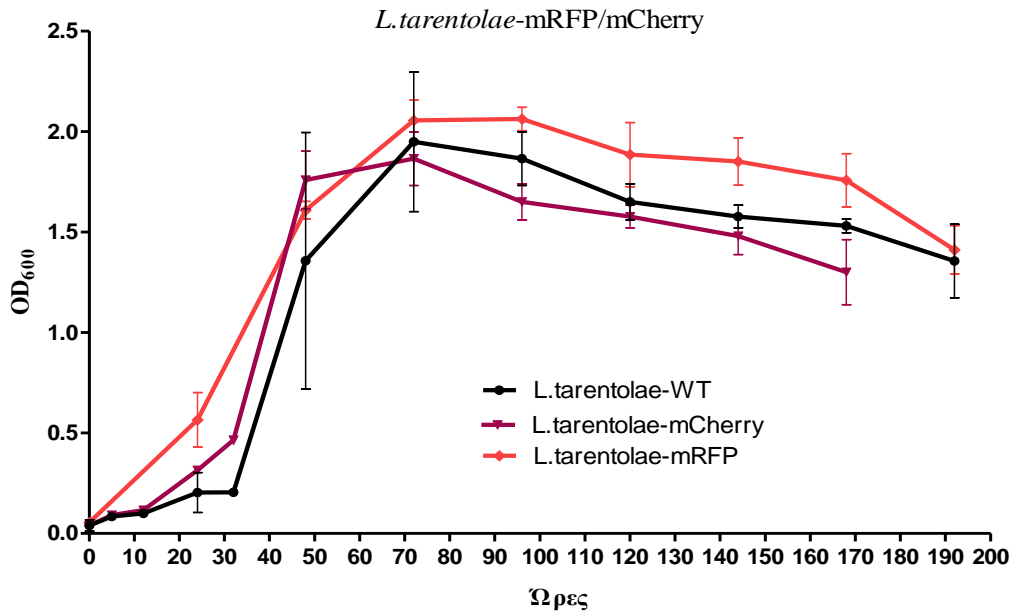
2.8.1 Πρωτοζωικά κύτταρα

Τα μη παθογόνα παράσιτα *Leishmania tarentolae* καλλιεργούνται στους 25° C, απουσία CO₂, σε θρεπτικό υλικό brain heart infusion (Lexsy Broth BHI) που περιέχει και αιμίνη (Bovine Hemin Chloride, Sigma).

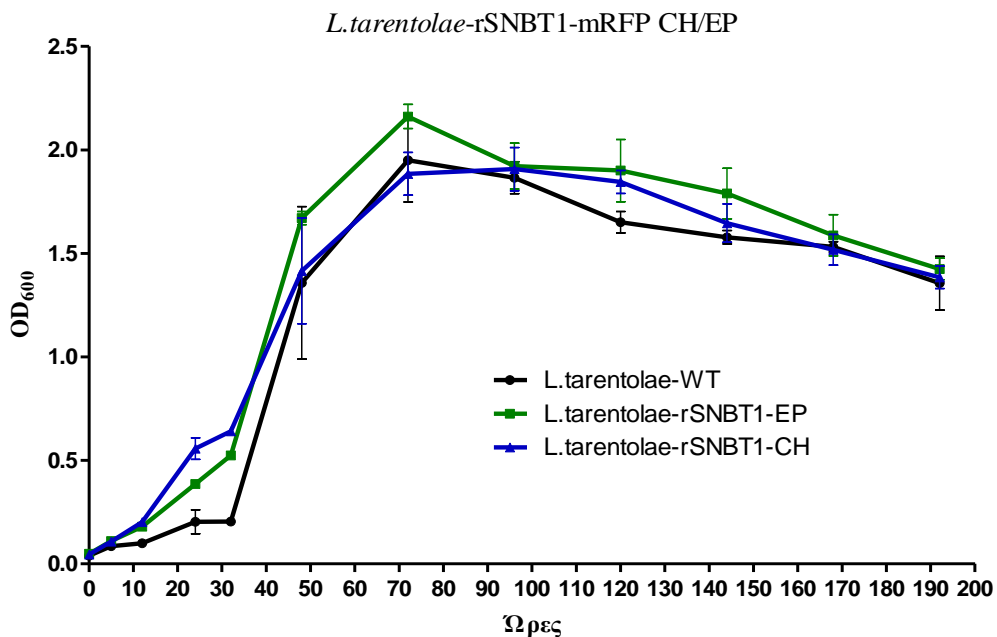
Κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας πραγματοποιείται μέτρηση των παρασίτων, ώστε να παρακολουθείται ο ρυθμός ανάπτυξής τους. Ενδεικτικά, όταν για τον εμβολιασμό της καλλιέργειας χρησιμοποιηθούν 10⁶ παράσιτα/mL, ο αριθμός των παρασίτων που συλλέγονται στη στατική φάση ανάπτυξης (5^η-6^η ημέρα καλλιέργειας) είναι περίπου 2,5-3×10⁸ παράσιτα/mL. Η συλλογή των παρασίτων πραγματοποιείται με φυγοκέντρηση στα 1000×g για 6 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου σε επιτραπέζια φυγόκεντρο (Thermo). Το ίζημα των παρασίτων αναδιασπείρεται στο ρυθμιστικό διάλυμα PBS και ακολουθούν 2-3 εκπλύσεις στις ίδιες συνθήκες φυγοκέντρησης.

Για τη διατήρηση των παρασίτων *L. tarentolae* για μικρό χρονικό διάστημα φυλάσσονται σε 80% w/v BHI, 20% v/v γλυκερόλη (~10⁷ παράσιτα/mL), σε ειδικούς κρυοπροστατευτικούς σωλήνες 1,5 mL (NUNC), στους -80°C. Για να διατηρηθούν μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, απαιτείται η μεταφορά τους σε δοχείο που περιέχει υγρό άζωτο.

Ο έλεγχος του ρυθμού ανάπτυξης των παρασίτων στην καλλιέργεια *in vitro* πραγματοποιείται και με καμπύλη ανάπτυξης (growth curve), στην οποία φαίνεται ο χρόνος διπλασιασμού των κυττάρων. Στα σχήματα 2.1, 2.2 και 2.3, που ακολουθούν, παρουσιάζονται οι καμπύλες ανάπτυξης των παρασίτων *L.tarentolae* συναρτήσει της μέτρησης της οπτικής απορρόφησης στα 600 nm ή της μέτρησης των κυττάρων σε αιματοκυτταρόμετρο (Malassez), αντίστοιχα. OD₆₀₀=1 αντιστοιχεί σε 10⁸ κύτταρα/ml καλλιέργειας. Ο μέσος χρόνος διπλασιασμού του αριθμού των πρωτοζώων (doubling time) στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης υπολογίστηκε από τις καμπύλες ανάπτυξης [76].



Σχήμα 2.1. Καμπύλη ανάπτυξης διαγονιδιακών παρασίτων *L. tarentolae*-mCherry και *L. tarentolae*-mRFP σε σύγκριση με κύτταρα *L. tarentolae* άγριου τύπου συναρτήσει της οπτικής απορρόφησης των κυττάρων στα 600 nm. Ο μέσος χρόνος διπλασιασμού του αριθμού των πρωτοζώων (doubling time) υπολογίστηκε σε 10 ± 2 ώρες.



Σχήμα 2.2. Καμπύλη ανάπτυξης διαγονιδιακών παρασίτων *L. tarentolae*-rSNBT1-mRFP CH (Chromosomal) και *L. tarentolae*-rSNBT1-mRFP EP (Episomal) σε σύγκριση με κύτταρα *L. tarentolae* άγριου τύπου συναρτήσει της οπτικής απορρόφησης των κυττάρων στα 600 nm. Ο μέσος χρόνος διπλασιασμού του αριθμού των πρωτοζώων (doubling time) υπολογίστηκε σε 10 ± 2 ώρες.

2.9 Ηλεκτροδιάτρηση πρωτοζωικών κυττάρων

Διαμόλυνση των κυττάρων *L. tarentolae* με τον πλασμιδιακό φορέα pLexsy-sat-*mcherry* και pLexsy-sat-*rsnbt1-mrfp1* έγινε με ηλεκτροδιάτρηση. Ο πλασμιδιακός φορέας pLexsy-sat (Jena Bioscience) (κεφάλαιο αποτελεσμάτων, Εικόνα 3.8) χρησιμοποιήθηκε για την επισωμική (*mcherry* και *rsnbt1-mrfp1*) και χρωμοσωμική (rSNBT1-mRFP) έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης rSNBT1 με τη μοριακή ετικέτα της μονομερούς κόκκινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (rSNBT1-mRFP1). Τα γονίδια κλωνοποιήθηκαν στις θέσεις περιορισμού BglII/BglIII και BglII/XhoI. Το πλασμίδιο pLexsy-sat κωδικοποιεί την ακετυλοτρανσφεράση της στρεπτοθρισίνης (streptothricine acetyltransferase) που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό Nourseothricin.

Στην περίπτωση της επισωμικής έκφρασης των γονιδίων, ο πλασμιδιακός φορέας εισάγεται ως κλειστό κυκλικό υπερελικομένο πλασμίδιο στα παράσιτα, ενώ για την χρωμοσωμική έκφραση ο πλασμιδιακός φορέας πρέπει πρώτα να υποστεί πέψη με το ένζυμο περιορισμού SwaI (Εικόνα 3.8) που βρίσκεται στα άκρα των αλληλουχιών που επιτρέπουν ομόλογο ανασυνδυασμό στις θέσεις 5'SSU και 3'SSU του γενωμικού DNA (<http://www.jenabioscience.com/images/ae3a4f50f1/EGE-1300.pdf>).

Στην περίπτωση αυτή εισήχθη με ηλεκτροδιάτρηση στα κύτταρα *L. tarentolae* το ευθύγραμμο τμήμα 7.8 Kb.

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Διάλυμα ηλεκτροδιάτρησης:
 - HEPES 21 mM, pH 7,5, Gibco
 - Na₂HPO₄ 0,7 mM, Applichem
 - NaCl 137 mM, Applichem
 - Γλυκόζη 6 mM, Applichem
 - KCl 5 mM, Merck
- Απαγωγός κάθετης νηματικής ροής, laminar flow hood, Eurocyt 120
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος, Jouan CR3i multifunction, Thermo
- Συσκευή ηλεκτροδιάτρησης: σύστημα τριών συσκευών Gene Pulser, Pulse Controller, Gene Transformer της BioRad
- Κυψελίδες ηλεκτροδιάτρησης 0,1 cm, BioRad
- Αποστειρωμένοι σωλήνες falcon (Greiner bio-one)
- Αιματοκυτταρόμετρο Malassez, Marienfeld
- Ανάστροφο μικροσκόπιο, Axiovert 40 C, Zeiss

- Συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού, TCS-SP Leica

Μέθοδος

Το ηλεκτρικό ρεύμα που παράγεται από τη συσκευή ηλεκτροδιάτρησης, ανοίγει οπές στη μεμβράνη των παρασίτων από όπου εισέρχεται το πλασμιδιακό DNA στα κύτταρα.

- Συλλογή παρασίτων από 10 mL καλλιέργειας που βρίσκεται στο τέλος της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης (2×10^7 κύτταρα/mL) με φυγοκέντρωση στα $1000 \times g$ για 6 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Απόχυση του υπερκειμένου σε ασηπτικές συνθήκες
- Αναδιασπορά των κυττάρων σε ίσο όγκο (10 mL) διαλύματος ηλεκτροδιάτρησης και παραμονή στον πάγο για 10 λεπτά
- Φυγοκέντρωση στα $1000 \times g$ για 6 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και απόχυση του υπερκειμένου σε ασηπτικές συνθήκες
- Αναδιασπορά των παρασίτων σε 1 mL διαλύματος ηλεκτροδιάτρησης
- Προσθήκη 400 μ L σε, ήδη τοποθετημένο στον πάγο, σωλήνα erpendorf που περιέχει 20-50 μ g DNA διαλυμένο σε 50 μ L νερού (μέγιστη ποσότητα), ανάμιξη και μεταφορά σε παγωμένη κυψελίδα ηλεκτροδιάτρησης
- Ηλεκτροδιάτρηση των παρασίτων στις συνθήκες: 450 V, 450 μ F, ένταση πεδίου 2,25 KV/cm. Η κυψελίδα τοποθετείται στο θάλαμο ηλεκτροδιάτρησης και στα άκρα της εφαρμόζεται τάση με ενεργοποίηση της συσκευής που παράγει τον ηλεκτρικό παλμό. (Για να είναι επιτυχής ο μετασχηματισμός των παρασίτων, ο ηλεκτρικός παλμός πρέπει να παρουσιάζει χρόνο εκπόλωσης ~ 4 msec).
- Επανατοποθέτηση της κυψελίδας στον πάγο για ακριβώς 10 λεπτά
- Μεταφορά των κυττάρων σε 10 mL brain heart infusion (BHI) + αιμίνη
- Επώαση στους 25° C για 16 ώρες
- Προσθήκη την επόμενη μέρα, έτσι ώστε τα κύτταρα να έχουν ανακάμψει από το σοκ του ηλεκτρικού ρεύματος, αντιβιοτικού Nourseothricin (10 μ g/mL). Για την επιλογή των διαγονιδιακών παρασίτων αυξάνεται σταδιακά η συγκέντρωση του αντιβιοτικού μέχρι τα 100 μ g/mL. Για να επιβεβαιωθεί η παρουσία ζωντανών παρασίτων που φθορίζουν (αν υπάρχουν κύτταρα που έχουν επιβιώσει στο αντιβιοτικό, τότε αυτά έχουν προσλάβει το πλασμίδιο οπότε εκφράζουν και την κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη), τα κύτταρα παρατηρούνται στο μικροσκόπιο φθορισμού και όταν η καλλιέργεια φθάσει σε μεταλογαριθμική φάση γίνεται ψύξη ενός μέρους της σε υγρό άζωτο.

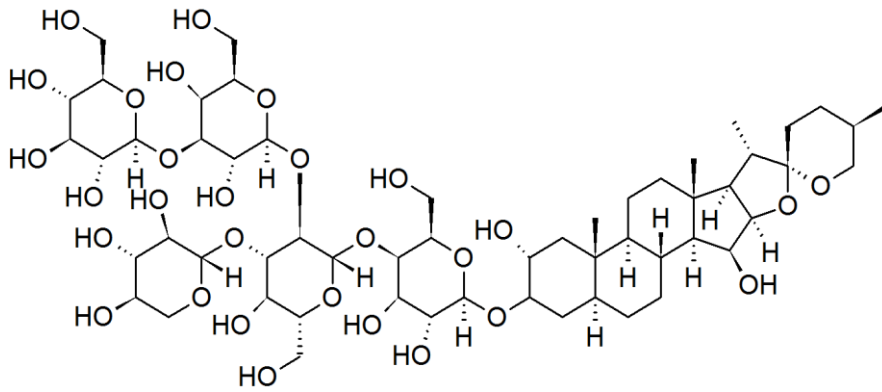
- Το αντιβιοτικό προστίθεται σε κάθε ανακαλλιέργεια με μέγιστη συγκέντρωση 100 µg/mL
- Ακολουθεί χαρακτηρισμός των διαγονιδιακών φθοριζόντων παρασίτων με μικροσκοπία φθορισμού

2.10 Κλασμάτωση πρωτεϊνών με τη χρήση του απορρυπαντικού διγιτονίνη (digitonin fractionation)

Αντιδραστήρια – Όργανα

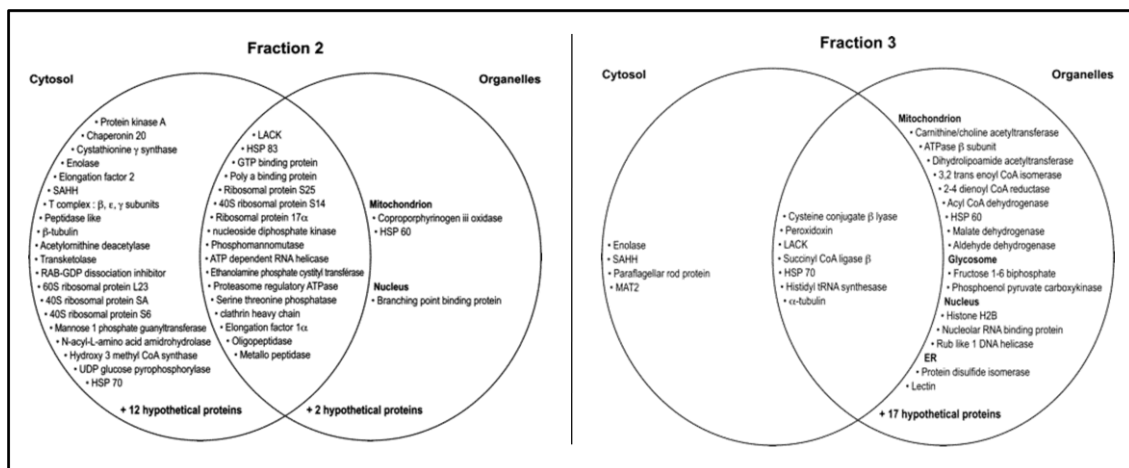
- Καλλιέργεια παρασίτων *L. tarentolae*
- Διάλυμα PBS 1X
- Διάλυμα αναδιάλυσης (διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου)
 - Tris-HCl 75 mM, pH 7,4, Applichem
 - NaCl 145 mM, Applichem
 - KCl 11 mM, Merck
- Διάλυμα διγιτονίνης (Sigma) 100 mM (stock): 0,84 g σε 6,7 mL νερού και 0,35 mL μεθανόλης 100%.
 - Αραίωση με υπερκάρθο νερό σε τελικές συγκεντρώσεις 20 µM, 200 µM, 1 mM και 10 mM
- Αναστολείς πρωτεασών, Sigma
- Διάλυμα σακχαρόζης 0,3 M: 5,13 g σε 50 mL νερού
- Διάλυμα Triton X-100 1% σε PBS 1X
- Ακετόνη 100%, Applichem
- Διάλυμα φόρτωσης πρωτεϊνών (Laemmli buffer), (βλ. παράγραφο 2.4.1)
- Μικροφυγόκεντρος, Eppendorf 5417R
- Κυκλοαναδευτήρας, Labnet VX100
- Υδρόλουτρο, ED13, Julabo

Η διγιτονίνη (Εικόνα 2.2) είναι ένας γλυκοζίτης που λαμβάνεται από το φυτό *Digitalis purpurea*. Το άγλυκο τμήμα του ονομάζεται διγιτογενίνη και είναι στεροειδές. Χρησιμοποιείται ως απορρυπαντικό, διαλυτοποιώντας αποτελεσματικά λιπίδια, όπως η χοληστερόλη, καθιστώντας έτσι διαπερατή την κυτταρική μεμβράνη αλλά και τις μεμβράνες των οργανιδίων των κυττάρων. Ανάλογα με τη συγκέντρωσή της στο δείγμα λαμβάνονται πρωτεΐνες από διαφορετικά τμήματα του κυττάρου (κλάσματα) ξεκινώντας από τις διαλυτές (κυτταροπλασματικές), στη συνέχεια τις πρωτεΐνες οργανιδίων, μιτοχονδρίων, και τέλος, τις κυτταροσκελετικές, μεμβρανικές και πυρηνικές.



Εικόνα 2.1. Το μόριο της διγιτονίνης

Στο σχήμα 2.4 παρουσιάζεται διάγραμμα Venn του υποκυτταρικού εντοπισμού πρωτεϊνών μετά την κλασμάτωση με διγιτονίνη [77]. Ένα διάγραμμα Venn δείχνει όλες τις πιθανές λογικές σχέσεις μεταξύ ενός πεπερασμένου συνόλου πραγμάτων (συνυπολογισμός πραγμάτων). Τέτοια διαγράμματα σχεδιάστηκαν γύρω στο 1880 από τον John Venn και χρησιμοποιούνται για να διδάξουν στοιχειώδη θεωρία των συνόλων, καθώς και να απεικονίσουν απλές σχέσεις συνόλων πιθανότητας, στατιστικών στοιχείων, γλωσσολογίας και επιστήμης των υπολογιστών.



Σχήμα 2.3. Διάγραμμα Venn που παρουσιάζει τον υποθετικό υποκυτταρικό εντοπισμό των πρωτεϊνών που προκύπτουν από την κλασμάτωση με διγιτονίνη [77]. Στο διαλυτό κλάσμα 1 και 2 ανακτώνται κυρίως διαλυτές πρωτεΐνες. Στο κλάσμα 3 ανακτώνται κυρίως πρωτεΐνες μεμβρανικών οργανιδίων και στο κλάσμα 4 μιτοχονδρίων και κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Στο κλάσμα 5 συλλέγονται πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού, πυρήνα και της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Η ανάλυση έγινε με φασματομετρία μάζας.

Μέθοδος

- Καλλιέργεια παρασίτων *L. tarentolae* με OD₆₀₀ ~1,0 φυγοκεντρείται στα 1000×g, στους 25° C, για 6 λεπτά

- Τα κύτταρα εκπλένονται με 10 mL παγωμένου PBS 1X και φυγοκεντρώνονται
- Αναδιασπείρονται σε 0,5 mL διαλύματος αναδιάλυσης, προστίθενται αναστολείς πρωτεασών και 0,5 mL διαλύματος διγτονίνης σε συγκέντρωση 20 μ M (τα κύτταρα σε αυτή τη συγκέντρωση δεν λύνονται)
- Το δείγμα, μετά από ισχυρή ανάδευση, επωάζεται στους 37° C για 5 λεπτά
- Λαμβάνονται 10-20 μ L για προσδιορισμό πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford
- Προστίθενται 200 μ L σακχαρόζης 0,3 M και ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 18000 \times g για 5 λεπτά, στους 4° C
- Το υπερκείμενο αποτελεί το κλάσμα 1 (F1, διαλυτές κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες)
- Το ίζημα αναδιαλύεται στο διάλυμα αναδιάλυσης και ακολουθεί η ίδια διαδικασία (προσθήκη διαλύματος διγτονίνης 200 μ M)
- Το κλάσμα αυτού του βήματος (κλάσμα 2, F2) περιέχει επίσης διαλυτές πρωτεΐνες
- Το ίζημα αναδιαλύεται στο διάλυμα αναδιάλυσης και ακολουθεί η ίδια διαδικασία (προσθήκη διαλύματος διγτονίνης 1 mM)
- Το κλάσμα αυτού του βήματος (κλάσμα 3, F3) περιέχει πρωτεΐνες οργανιδίων (κάποιες είναι των μιτοχονδρίων)
- Το ίζημα αναδιαλύεται στο διάλυμα αναδιάλυσης και ακολουθεί η ίδια διαδικασία (προσθήκη διγτονίνης 10 mM)
- Το κλάσμα αυτού του βήματος (κλάσμα 4, F4) περιέχει πρωτεΐνες οργανιδίων (μιτοχονδρίων, πυρήνα, ενδοπλασματικού δικτύου)
- Το ίζημα της τελευταίας φυγοκέντρωσης (κλάσμα 5, F5) αναδιαλύεται σε 50 μ L διαλύματος 2% Triton X-100 σε PBS 1X και επωάζεται για μία ώρα στους 4° C, υπό περιστροφή, στη συνέχεια φυγοκεντρείται στα 20000 \times g, στους 4° C, για 20 λεπτά
- Το υπερκείμενο (F5 S) περιέχει τις διαλυτές σε 2% Triton X-100 μεμβρανικές πρωτεΐνες του κλάσματος 5, ενώ το ίζημα (F5 P) που αναδιαλύεται σε διάλυμα φόρτωσης πρωτεϊνών 1X ίσου όγκου με το υπερκείμενο και θερμαίνεται στους 95° C, περιέχει αδιάλυτες, μεμβρανικές και πυρηνικές πρωτεΐνες και πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού. Το κλάσμα F5 S είναι εμπλουτισμένο σε μεμβρανικές πρωτεΐνες της κυτταροπλασματικής μεμβράνης.
- Το υπερκείμενο αναδιαλύεται σε διάλυμα φόρτωσης πρωτεϊνών 6X
- Προστίθεται στα κλάσματα 1 έως 4 ίσος όγκος παγωμένης ακετόνης 100% και τα δείγματα επωάζονται για 16 ώρες στους -20° C

- Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30 λεπτά, στους 4°C, στα 18000×g, το υπερκείμενο αποχύνεται και το ίζημα των πρωτεϊνών αφήνεται σε ρεύμα αέρα απαγωγού για να στεγνώσει πλήρως
- Αναδιαλύονται οι πρωτεΐνες στον κατάλληλο όγκο διαλύματος φόρτωσης πρωτεϊνών, θερμαίνονται στους 95°C για 5 λεπτά και αποθηκεύονται στους -20°C.

2.11 Ταυτοποίηση / καταμέτρηση των κυτταρικών πληθυσμών με κυτταρομετρία ροής (FACS)

Αντιδραστήρια – Όργανα

- FACS (BECTON-DICKINSON FACSAria)
- Δοκιμαστικοί σωλήνες για FACS (BD)
- PBS 1X

Μέθοδος

Η κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία για τον ποσοτικό και μορφολογικό προσδιορισμό του υποπληθυσμού των διαγονιδιακών παρασίτων *Leishmania tarentolae* που εκφράζουν την πρωτεΐνη mCherry.

Με την μέθοδο αυτή ο πληθυσμός των κυττάρων που φθορίζει είτε μετά από σήμανση με α) φθορίζουσες χρωστικές (π.χ. ιωδιούχο προπίδιο) ή β) αντισώματα (μονοκλωνικά ή πολυκλωνικά) συζευγμένα με φθοριοχρώματα είτε γιατί εκφράζει φθορίζουσες πρωτεΐνες προσδιορίζεται με βάση την ένταση του φθορισμού που εκπέμπεται ύστερα από διέγερση με μονοχρωματική ακτινοβολία laser που προσπίπτει σε κάθε κύτταρο καθώς αυτά περνούν σε ροή ενός κυττάρου μπροστά από τη γραμμή laser. Είναι δυνατό να προσδιοριστούν μορφολογικά χαρακτηριστικά των κυττάρων, με την παράμετρο του πρόσθιου σκεδασμού (FSC) προσδιορίζεται το μέγεθος των κυττάρων και με αυτήν του πλάγιου σκεδασμού (SSC) η εσωτερική πολυπλοκότητα (κοκκία, οργανίδια) του κυττάρου. Οι δύο αυτές παράμετροι απεικονίζονται σε ιστογράμματα και τα δύο ιστογράμματα συνδυάζονται για την παραγωγή του λεγόμενου «διαγράμματος FSC/SSC» σε δισηρθογώνιο σύστημα αξόνων. Στο διάγραμμα αυτό, οι ομάδες κυττάρων απεικονίζονται σαν «νέφη σημείων» (dots), ανάλογα με τα χαρακτηριστικά τους. Κάθε σημείο (dot) αντιστοιχεί στις παραμέτρους ενός κυττάρου. Ο πληθυσμός του κάθε «νέφους» μπορεί να καταμετρηθεί με μεγάλη ακρίβεια από το λογισμικό του υπολογιστή. Η κυτταρομετρία ροής είναι μέθοδος που γρήγορα και με μεγάλη ευαισθησία παρέχει τη δυνατότητα ανάλυσης αρκετών εκατοντάδων κυττάρων ανά

δευτερόλεπτο. Στα πειράματά μας έγινε ανάλυση 20.000 γεγονότων (events)/δείγμα πραγματοποιήθηκε στον κυτταρομετρητή ροής BECTON-DICKINSON FACSAria.

- 1ml καλλιέργειας παρασίτων στη μεταλογαριθμική
- Έκπλυση με 10ml PBS1X
- Συλλογή των παρασίτων με φυγοκέντρηση (1000 x g για 6 λεπτά)
- Επαναδιάλυση σε 1ml PBS 1X
- Ανάλυση στο FACS

2.12 Μονιμοποίηση κυττάρων και μικροσκοπία φθορισμού

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Παραφολμαδεύδη (PFA)
 - Διάλυμα 4% w/v, τελικού όγκου 100 mL, παρασκευάζεται ως εξής: 4 g PFA διαλύονται σε 60 mL υπερκάθαρου νερού και θερμαίνονται στους 60-70° C με μαγνητική ανάδευση. Προστίθενται σταγόνες υδροξειδίου του νατρίου (NaOH 1 N, Applichem) που βοηθούν στη διαύγαση του διαλύματος, 10 mL PBS 10X και 4 g σακχαρόζης που βοηθά στη διατήρηση της μεμβράνης των κυττάρων. Το διάλυμα φιλτράρεται, μοιράζεται σε erpendorf ανά 1 mL και φυλάσσεται στους -20° C
- Triton X-100 0,1% v/v (Sigma) σε διάλυμα PBS 1X (βλ. παράγραφο 3.2), pH 7,4
- RNάση A, Sigma
- Ιωδιούχο προπίδιο (propidium iodide, PI)
- Διάλυμα αντιδραστηρίου μονιμοποίησης Mowiol 4-88, Calbiochem (περιέχει 10% w/v Mowiol, 25% v/v γλυκερόλη, 100 mM Tris-HCl, pH 8,5)
- Αντικειμενοφόροι πλάκες (VWR International) και καλυπτρίδες επεξεργασμένες με 1 mg/mL poly-L-λυσίνη (Sigma)
- Χλωριούχο αμμώνιο (NH₄Cl) 50 mM σε PBS 1X
- Αλβουμίνη βόειου ορού (BSA)
- Πρώτα αντισώματα:
 - Μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι της α-τουμπουλίνης, Sigma (T5168)
 - Πολυκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι της πρωτεΐνης BiP/GRP78[78]
- Δεύτερα αντισώματα:
 - Πολυκλωνικό αντίσωμα αίγας anti-rabbit IgG, συζευγμένο με την πράσινη φθορίζουσα χρωστική Alexa Fluor 488, Molecular Probes (A11008)

- Πολυκλωνικό αντίσωμα αίγας anti-mouse IgG, συζευγμένο με την πράσινη φθορίζουσα χρωστική Alexa Fluor 488, Molecular Probes (A11001)
- Συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού, TCS-SP Leica
- Μικροσκόπιο ευρέως πεδίου Olympus X81
- Μικροφυγόκεντρος, Eppendorf 5417R

Μέθοδος

Ο έμμεσος ανοσοφθορισμός περιλαμβάνει τη σήμανση επιτόπων του κυττάρου με ειδικά αντισώματα και δεύτερα αντισώματα συζευγμένα με φθορίζουσες χρωστικές και χρησιμοποιείται για την παρατήρηση της υποκυτταρικής κατανομής των βιομορίων. Η γενική αρχή της μεθόδου είναι σχετικά απλή: το πρώτο βήμα περιλαμβάνει την επώαση των κυττάρων με ειδικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης που θέλουμε να ανιχνεύσουμε ενώ, κατά το δεύτερο βήμα, πραγματοποιείται επώαση με ειδικό δεύτερο φθορίζον αντίσωμα, το οποίο αναγνωρίζει το πρώτο αντίσωμα. Τμήματα ιστών ή κυττάρων που είναι σημασμένα μελετώνται με την τεχνική του ανοσοφθορισμού σε μικροσκόπιο φθορισμού ευρέως πεδίου ή σε συνεστιακό μικροσκόπιο.

Το συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού προσφέρει πλεονεκτήματα έναντι των κοινών οπτικών μικροσκοπίων ευρέως πεδίου. Σε αυτά περιλαμβάνονται το επιφανειακό βάθος πεδίου (including shallow depth of field), η εξάλειψη της μη εστιασμένης ακτινοβολίας (elimination of out-of-focus glare) και η λήψη διαδοχικών οπτικών τομών με τη δυνατότητα ανάλυσης του βάθους των δειγμάτων, εφαρμογές ιδιαίτερα χρήσιμες για την ανάλυση δειγμάτων με μεγάλο πάχος (π.χ. τμημάτων ιστών ή εμβρύων πειραματοζώων).

Εφαρμόστηκε άμεσος και έμμεσος ανοσοφθορισμός με χρήση αντισωμάτων ειδικών για την υπό μελέτη πρωτεΐνη και δευτέρων αντισωμάτων σημασμένων με φθορίζουσα ουσία.

Παράσιτα

- Παράσιτα από μεταλογαριθμική φάση ανάπτυξης φυγοκεντρώνται στα 1000×g για 6 λεπτά και εκπλένονται με παγωμένο PBS 1X
- Το υπερκείμενο αποχύνεται, τα κύτταρα μονιμοποιούνται με αναδιάλυση σε PBS 1X, 0,4% w/v PFA (αραιώση 1:7) για να μειωθεί ο αριθμός των κυττάρων που θα επιστρωθούν στην καλυπτρίδα (16 ώρες στους 4⁰C). Ένα δείγμα με μεγάλη πυκνότητα παρασίτων είναι δύσκολο να μελετηθεί
- 50 μL εναιωρήματος παρασίτων επιστρώνονται στην καλυπτρίδα και αφήνονται να προσκολληθούν σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι την επόμενη ημέρα

- Η PFA που δεν έχει αντιδράσει εξουδετερώνεται με χλωριούχο αμμώνιο (NH₄Cl), αρχικά με μία γρήγορη έκπλυση και στη συνέχεια με επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Ακολουθούν δύο εκπλύσεις με PBS 1X και μία με 0,1% v/v Triton X-100 σε διάλυμα PBS 1X για να γίνει διαπερατή η κυτταρική μεμβράνη
- Χρώση με φθορίζουσες ουσίες
 - Τα παράσιτα επώάζονται για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με το πρώτο αντίσωμα, το διάλυμα του οποίου περιέχει: 1-10 µg/mL καθαρισμένου αντισώματος ή, αν πρόκειται για ορό, ποσότητα 1:50 έως 1:1000 σε σχέση με τον τελικό όγκο του διαλύματος και 10% w/v BSA για κάλυψη των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης. Για κάθε καλυπτρίδα χρησιμοποιείται συνολικός όγκος 50-100 µL PBS 1X, με 1% v/v Triton X-100
 - Ακολουθούν 3 εκπλύσεις με διάλυμα PBS 1X, 0,1% v/v Triton X-100
 - Τα παράσιτα επώάζονται για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με το δεύτερο αντίσωμα, το διάλυμα του οποίου περιέχει σε συγκέντρωση 1:1000 το αντίσωμα με τη φθορίζουσα ουσία και 10% w/v BSA, σε συνολικό όγκο 50-100 µL PBS 1X, 0,1% v/v Triton X-100
 - Ακολουθεί μία έκπλυση με PBS 1X, 0,1% v/v Triton X-100 και δύο με PBS 1X
 - Αν χρειάζεται να απεικονίσουμε τους πυρήνες των παρασίτων τότε προστίθεται
 - Η κόκκινη φθορίζουσα χρωστική PI (propidium iodide) σε συγκέντρωση 10 µg/mL για 10 λεπτά, αφού έχει γίνει πρώτα κατεργασία με RNάση σε συγκέντρωση 100 µg/mL για 10 λεπτά
- Σε αντικειμενοφόρο πλάκα τοποθετούνται 5-10 µL αντιδραστηρίου επικάλυψης Mowiol και στη συνέχεια η καλυπτρίδα με τα κύτταρα προς την πλευρά της αντικειμενοφόρου πλάκας. Άσκηση μικρής πίεσης είναι απαραίτητη, ώστε να εφάπτεται πλήρως η καλυπτρίδα με την πλάκα και ακολουθεί επώαση για 16 ώρες στους 4° C για να πολυμεριστεί το Mowiol
- Την επόμενη μέρα πραγματοποιείται αεροστεγής έγκλειση του δείγματος με βερνίκι
- Το δείγμα των παρασίτων παρατηρείται με μικροσκόπιο φθορισμού

2.13 Λειτουργικός χαρακτηρισμός του μεταφορέα rSNBT1-mRFP1 στα παράσιτα *Leishmania tarentolae*. Πρόσληψη [³H]-Υποξανθίνης

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Καλλιέργειες παρασίτων
- Διάλυμα μεταφοράς (uptake buffer)
 - 140 mM NaCl
 - 5 mM KCl
 - 0.4 mM KH₂PO₄
 - 1 mM CaCl₂
 - 25 mM Glucose
 - 10 mM Hepes
 - 0.8 mM MgSO₄
- Ραδιοσημασμένη [³H]-υποξανθίνη (HOT Hypoxanthine) (31,5 Ci/mmol=32μM)
- Μη ραδιοσημασμένη υποξανθίνη (Cold Hypoxanthine)
- Μη ραδιοσημασμένη Αδενίνη
- Μη ραδιοσημασμένη Γουανίνη
- Μη ραδιοσημασμένη Κυτοσίνη
- Μη ραδιοσημασμένη Ουρακίλη
- Υγρό σπινθηρισμού (scintillation fluid)
- Φυγόκεντρος, KUBOTA 7780
- Συσκευή ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας, Heraeus
- Μετρητής έντασης σπινθηρισμού (scintillation counter), Beckman/PerkinElmer

Μέθοδος

Τα πειράματα ελέγχου λειτουργικότητας ενός μεταφορέα πραγματοποιούνται με τη μέτρηση μεταφοράς-πρόσληψης ραδιοσημασμένων υποστρωμάτων. Η γενική αρχή της μεθόδου περιλαμβάνει την επώαση των κυττάρων με συγκεκριμένη κάθε φορά συγκέντρωση ραδιοσημασμένου υποστρώματος, σε διάφορους χρόνους. Μετά από το σταμάτημα της αντίδρασης πρόσληψης, η περίσσεια ραδιοσημασμένης ουσίας απομακρύνεται και μετράται μόνο η ποσότητα που πρακτικά βρίσκεται μέσα στα κύτταρα. Έτσι γνωρίζοντας την αρχική ποσότητα ραδιενέργειας που χρησιμοποιήθηκε ανά αντίδραση και μετρώντας τελικά πόση βρέθηκε μέσα στο κύτταρο και σε συνάρτηση με το χρόνο επώασης (παράσιτα-ραδιενεργή ουσία) μπορεί να υπολογιστεί η ενεργότητα του μεταφορέα ως προς το συγκεκριμένο υπόστρωμα.

Τα πειράματα ανταγωνισμού-εκλεκτικότητας υποστρώματος από μεταφορείς περιλαμβάνουν τη χρήση ενός ραδιοσημασμένου υποστρώματος μαζί με διαφορετικά μη ραδιενεργά υποστρώματα (ένα διαφορετικό σε κάθε διαφορετική αντίδραση), για τον έλεγχο

της εκλεκτικότητας του μεταφορέα που μελετάται. Η γενική αρχή της μεθόδου περιλαμβάνει την επώαση των κυττάρων με συγκεκριμένη συγκέντρωση ραδιοσημασμένου υποστρώματος παρουσία γνωστής συγκέντρωσης μη ραδιενεργού υποστρώματος, διαφορετικού κάθε φορά, για μία μόνο χρονική τιμή. Μετά το σταμάτημα της αντίδρασης πρόσληψης η περίσσεια ραδιοσημασμένης ουσίας απομακρύνεται και μετράται μόνο η ποσότητα που βρίσκεται μέσα στα κύτταρα. Έτσι γνωρίζοντας την αρχική ποσότητα ραδιενέργειας που χρησιμοποιήθηκε ανά αντίδραση, μετρώντας τελικά πόση βρέθηκε μέσα στο κύτταρο και σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της μη ραδιοσημασμένης ουσίας μπορεί να υπολογιστεί η εξειδίκευση του μεταφορέα ως προς το συγκεκριμένο υπόστρωμα.

- Παράσιτα από λογαριθμική φάση ανάπτυξης φυγοκεντρώνται στα $1000\times g$ για 6 λεπτά και εκπλένονται με διάλυμα μεταφοράς (η διαδικασία επαναλαμβάνεται δύο φορές)
- Το υπερκείμενο αποχύνεται και τα παράσιτα αναδιαλύονται σε κατάλληλο όγκο διαλύματος μεταφοράς ώστε στην τελική αντίδραση να έχουμε 1×10^8 κύτταρα
- 90 μL εναιωρήματος παρασίτων διανέμονται σε eppendorf
- Τα eppendorf με τα παράσιτα τοποθετούνται σε πλάκα ρυθμιζόμενης θέρμανσης (heat block) και επωάζονται για 10 λεπτά στους 25°C
- Για το πείραμα ελέγχου λειτουργικότητας προστίθενται στο eppendorf με τα παράσιτα 10 μl υποστρώματος για πρόσληψη (τελική συγκέντρωση υποξανθίνης 0.6 μM και Hot υποξανθίνης 0.06 μM)
- Για το πείραμα ανταγωνισμού προστίθενται στο eppendorf με τα παράσιτα 10 μl υποστρώματος για πρόσληψη (π.χ. τελική συγκέντρωση Cold υποξανθίνης 0.6 μM , Hot υποξανθίνης 0.06 μM και Cold αδερίνης 1 mM)
- Ακολουθεί σταμάτημα της αντίδρασης πρόσληψης υποστρώματος με την προσθήκη 200 μl παγωμένης μη ραδιοσημασμένης υποξανθίνης, σε τελική συγκέντρωση 1mM
- Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 4000 g για 4 λεπτά
- Αναρροφάται το υπερκείμενο, προστίθενται 400 μl παγωμένης μη ραδιοσημασμένης υποξανθίνης και φυγοκεντρώνται ξανά στις 6000 g για 4 λεπτά

Αφού αναρροφηθεί το υπερκείμενο, προστίθεται 1 ml διαλύματος σπινθηρισμού, τοποθετείται το eppendorf σε φιαλίδια κατάλληλα για το μηχάνημα μέτρησης σπινθηρισμού.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ

Το **πειραματικό μέρος** περιλαμβάνει αρχικά την ενίσχυση των γονιδίων που εκφράζουν τις πρωτεΐνες mCherry και rSNBT1-mRFP1 με την τεχνική της PCR και την κλωνοποίησή τους σε κατάλληλα πλασμιδιακά οχήματα για έκφρασή στον πρωτοζωικό οργανισμό *Leishmania tarentolae*.

Ακολουθεί η κατασκευή των διαγονιδιακών πρωτοζωικών πληθυσμών και ο χαρακτηρισμός τους, με βιοχημικές μεθόδους και συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού, ως προς την ετερόλογη έκφραση της κόκκινης φθορίζουσας πρωτεΐνης mCherry (από το *Discosoma* sp.) και του μεταφορέα νουκλεοβάσεων rSNBT1 (από τον *Rattus norvegicus*) συζευγμένου με την κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη mRFP1.

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Κατασκευή πλασμιδιακών φορέων έκφρασης που φέρουν τα γονίδια *mcherry* και του *rsnbt1*.

3.1.1 Κλωνοποίηση του γονιδίου *mcherry* στους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης pTriex 1.1 και pLexsy-sat με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

A) Κατασκευή του pTriex 1.1- *mcherry*

Για την έκφραση της διαλυτής/κυτταροπλασματικής πρωτεΐνης mCherry στα κύτταρα *L. tarentolae* χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pLexsy-sat (Εικόνα 3.8). Για την κλωνοποίηση του γονιδίου *mcherry* χρησιμοποιήθηκε αρχικά ο φορέας pTriex 1.1 διότι α) λόγω του μικρού του μεγέθους η κλωνοποίηση είναι πιο εύκολη σε αυτόν και β) διότι επιτρέπει την έκφραση της πρωτεΐνης σε προκαρυωτικούς και ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς με την μοριακή ετικέτα 8 Ιστιδινών (8His). Το πλασμίδιο αυτό θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για έκφραση της mCherry σε άλλα κυτταρικά συστήματα σε διαφορετικές μελέτες του εργαστηρίου. Το γονίδιο *mcherry* μεταφέρθηκε στη συνέχεια από τον pTriex 1.1-*mcherry* στις κατάλληλες θέσεις περιοριστικών ενζύμων στο πλασμίδιο pLexsy-sat με υποκλωνοποίηση.

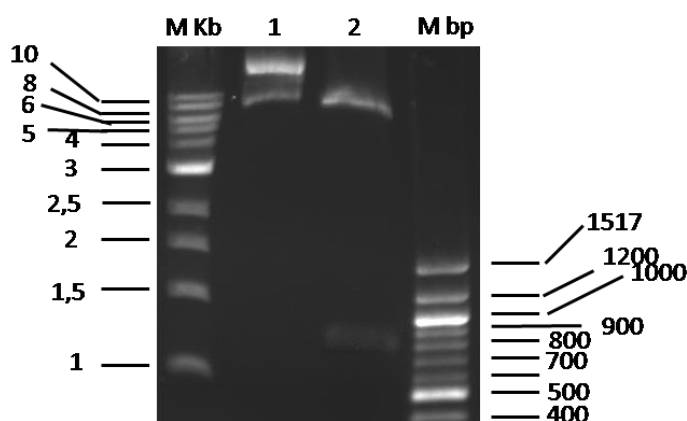
Αρχικά, το γονίδιο *mcherry* ενισχύθηκε με τη μέθοδο της PCR από πλασμίδιο που φέρει την αλληλουχία του. Για την mCherry, ως εκμαγείο για την PCR χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pCDNAIII-*mcherry* (δώρο από τον Δρ. Πάνο Κουκλή, εργαστήριο Βιολογίας, Σχολή Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων) με κατάλληλα ολιγονουκλεοτίδια-εκκινητές που περιλαμβάνουν αλληλουχία από το 5' άκρο και το 3' άκρο του γονιδίου *mcherry* (βλ. Πίνακα 3.1). Για τον μεταφορέα rSNBT1 χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pCI-neo (από τον Δρ. Hiroaki Yuasa, Nagoya City University, Japan) και η ενίσχυση με PCR του *rsnbt1* πραγματοποιήθηκε από το εργαστήριο του καθηγητή Ευστάθιου Φριλλίγγου.

Στη συνέχεια, το προϊόν της PCR, μετά από πέψη με κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα εισήχθη στους πλασμιδιακούς φορείς pTriex 1.1 και pLexsy-sat για την mCherry και στον pLexsy-sat-mRFP1 [52] για τον rSNBT1, σύμφωνα με τις τεχνικές που περιγράφηκαν στην παράγραφο 2.9.

Όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη παράγραφο, για την κλωνοποίηση της mCherry, ως εκμαγείο για την ενίσχυση του γονιδίου της με PCR χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pCDNAIII-*mcherry* που έχει ενσωματωμένο του γονιδίου *mcherry* στις θέσεις περιορισμού BamHI/EcoRI.

Αρχικά έγινε έλεγχος του πλασμιδίου για το σωστό μέγεθος και την παρουσία του ενθέματος, με πέψη με τα ένζυμα περιορισμού BamHI και EcoRI (Εικόνα 20). Η πέψη έγινε σε πλασμιδιακό DNA που απομονώθηκε από 200 ml υγρή καλλιέργεια *E.coli*-TOP10F-*pcDNAIII-mcherry* (βλ. παράγραφο 2.2.6).

Στην Εικόνα 3.1 παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της πέψης του πλασμιδιακού φορέα *pcDNAIII-mcherry* με τα ένζυμα περιορισμού BamHI και EcoRI. Στην διαδρομή 2 διακρίνεται το ευθύγραμμο DNA τμήμα του φορέα (6000 bp) και το απομακρυσθέν ένθεμα (*mcherry*: 750 bp) από τον οποίο απομονώθηκε η mCherry.



Εικόνα 3.1. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτομα αγαρόζης 1% w/v των προϊόντων της πέψης του *pcDNAIII-mcherry* με τα ένζυμα περιορισμού BamHI / EcoRI. 1) Πλασμίδιο *pcDNAIII-mcherry* πριν την πέψη, 2) πλασμίδιο *pcDNAIII-mcherry* μετά την πέψη, M) μάρτυρας μοριακών μεγεθών

Για την κλωνοποίηση του γονιδίου *mcherry* στους δύο πλασμιδιακούς φορείς pTriex1.1 και pLexsy-sat πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR κατά την οποία προστέθηκαν στα 5' και 3' άκρα της αλληλουχίας του γονιδίου θέσεις πέψης με τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα προκειμένου να εισαχθεί το ένθεμα στον επιλεγμένο πλασμιδιακό φορέα έκφρασης (Εικόνα 3.2). Πιο συγκεκριμένα, οι εκκινητές της PCR περιείχαν την αλληλουχία που αναγνωρίζει το ένζυμο περιορισμού BglIII, στο 5' άκρο, και αυτήν που αναγνωρίζει το ένζυμο περιορισμού XhoI στο 3' άκρο (Πίνακας 3.1), για σύνδεση με τους πλασμιδιακούς φορείς pTriex1.1 και pLexsy-sat, αντίστοιχα.

Πίνακας 3.1. Εκκινητές PCR για την κλωνοποίηση του *mcherry*

Πλασμιδιακοί φορείς έκφρασης	Εκκινητές	Αλληλουχία	Αριθμός βάσεων	Tm
pTriex 1.1	<i>mcherry</i> -πρόσθιος	5'GA <u>AGATCT</u> ACCATGGTGAGCAA GGGCGAG 3'	29	69,3
	<i>mcherry</i> -	5' <u>CCGCTC</u> GAGCTTGTACAGCTCG	29	72,4

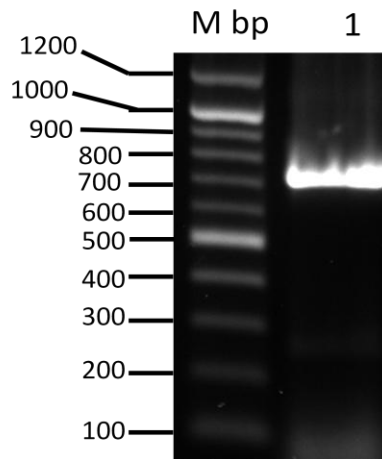
	ανάστροφος	TCCATGC 3'		
--	------------	-------------------	--	--

Οι υπογραμμισμένες βάσεις αποτελούν τις αλληλουχίες δράσης των ενζύμων περιορισμού ενώ, εκατέρωθεν των αλληλουχιών αυτών και πριν τα κωδικόνια έναρξης και λήξης, είναι απαραίτητο να υπάρχουν κάποιες βάσεις που βοηθούν στην αναγνώριση της αλληλουχίας από τα περιοριστικά ένζυμα για να γίνει ποσοτική πέψη. Στην περίπτωση που το γονίδιο που μας ενδιαφέρει κλωνοποιείται στο 5' ή στο 3' αλληλουχίας που κωδικοποιεί μοριακή ετικέτα (π.χ. 8His ή mRFP) θα πρέπει να διατηρείται το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης της χιμαιρικής πρωτεΐνης. Αυτό επιτυγχάνεται με προσθήκη μία ή δύο βάσεων στο αντίστοιχο ολιγονουκλεοτίδιο της PCR.

Η αλληλουχία που κωδικοποιεί την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη mCherry-His όπως προκύπτει μετά την ενίσχυση και κλωνοποίηση στους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης pTriex1.1 ή pLexsy-sat είναι οι εξής:

AGATCTaccatggtgagcaagggcgaggagataacatggccatcatcaaggagttcatgcctcaaggtgcacatggagggtccgtgaacggccacgagttcgagatcgagggcgagggcgagggcgcccctacgagggcacccagaccgccaagctgaaggtgaccaaggggtgccccctgcccttcgctgggacatcctgtcccctcagttcatgtacggctccaaggcctacgtgaagcaccgccgacatccccgactactgaagctgtccttccccgagggctcaagtgggagcgcgtgatgaacttcgaggacggcggcgtgggtgaccgtgaccagggactcctccctgcaggacggcgagttcatctacaaggtgaagctgcgcggcaccacttcccctccgacggccccgtaatgcaagaagaccatgggctgggagggcctcctccgagcggatgtaccccaggacggcggcctgaagggcgagatcaagcagaggctgaagctgaaggacggcggccactacgacgctgaggtcaagaccactacaaggccaagaagcccgtgcagctgcccggcgcctaacgtcaacatcaagttggacatcacctcccacaacgaggactacaccatcgtggaacagtacgaacgcggcggaggccgactccaccggcggcatggacgagctgtacaag**CTCGAG**caccacatcaccatcaccatcac **taa**

Η παραπάνω αλληλουχία DNA αποτελείται από **750** ζεύγη βάσεων που κωδικοποιούν την πρωτεΐνη mCherry-8His στον πλασμιδιακό φορέα **pTriex1.1**. Η αλληλουχία που παρουσιάζεται με μαύρα γράμματα ενισχύθηκε με PCR με το ζευγάρι των εκκινήτων *mcherry*-πρόσθιος και *mcherry*-ανάστροφος. Οι αλληλουχίες που παρουσιάζονται με μαύρα κεφαλαία **έντονα γράμματα** είναι οι θέσεις περιορισμού που αναγνωρίζουν τα ένζυμα BglII/XhoI και με κόκκινα γράμματα είναι η αλληλουχία των 8 ιστιδινών (Πίνακας 3.1)



Εικόνα 3.2. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v των προϊόντων της αντίδρασης PCR, με ανάστροφο εκκινητή κατάλληλο για τον φορέα pTriex1.1 και pLexsy-sat. 1) *mcherry*. Μ) μάρτυρας μοριακών μεγεθών 100bp

B) Κατασκευή του pLexsy-sat-*mcherry*

Η κλωνοποίηση του γονιδίου *mcherry* στον φορέα pLexsy-sat έγινε με απομόνωση από το πλασμίδιο pTriex1.1-*mcherry* με πέψη με τα ένζυμα περιορισμού BglIII/XhoI (βλ. παράγραφο 2.2.6) και εισαγωγή στο πλασμίδιο pLexsy-sat-*mrfp1* στη θέση του γονιδίου *mrfp1* στις ίδιες θέσεις περιοριστικών ενζύμων (βλ. παράγραφο 2.2.7).

Το πρωτόκολλο PCR που χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση του γονιδίου *mcherry* παρουσιάζεται στην παράγραφο 2.2.1. Οι δοκιμαστικές αντιδράσεις για την ανεύρεση των κατάλληλων συνθηκών ενίσχυσης του *mcherry* είχαν συνολικό όγκο 25 μ L. Για παραγωγή προϊόντος ποσότητας περίπου 500 μ g DNA που απαιτείται για τις κλωνοποιήσεις έγιναν συνολικά 4 αντιδράσεις των 100 μ L. Οι τελικές συγκεντρώσεις των εκκινητών, dNTP και $MgCl_2$ καθώς και η ποσότητα εκμαγείου DNA που χρησιμοποιήθηκε αναγράφονται στον Πίνακα 2.1, παράγραφος 2.2.1. Στην Εικόνα 3.3 παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της αντίδρασης PCR για την ενίσχυση του γονιδίου της *mcherry*.

Η αντίδραση PCR έδωσε μόνο ένα κύριο προϊόν με το αναμενόμενο μέγεθος (740 bp) που απομονώθηκε απευθείας από το διάλυμα της PCR αντίδρασης με προπαρασκευασμένα αντιδραστήρια Nucleospin extract II kit, Macherey-Nagel (βλ. παράγραφο 2.2.5).

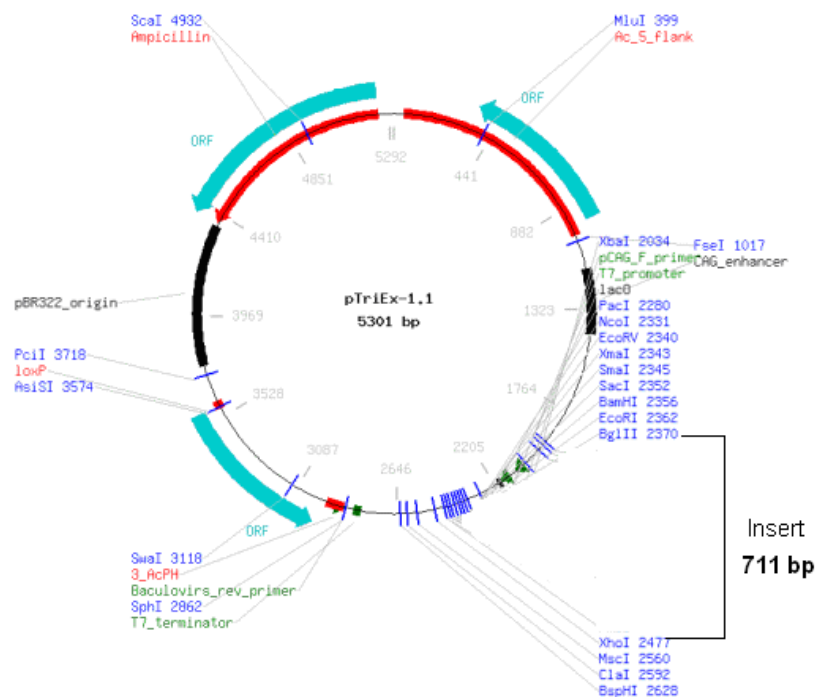
3.1.2 Ενσωμάτωση του γονιδίου *mcherry* στους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης pTriex 1.1 και pLexsy-sat

A) pTriex 1.1-*mcherry*

Για την εισαγωγή του γονιδίου *mcherry* στους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης πραγματοποιήθηκε, αρχικά, διπλή πέψη του φορέα για 16 ώρες στους 37°C με τα κατάλληλα

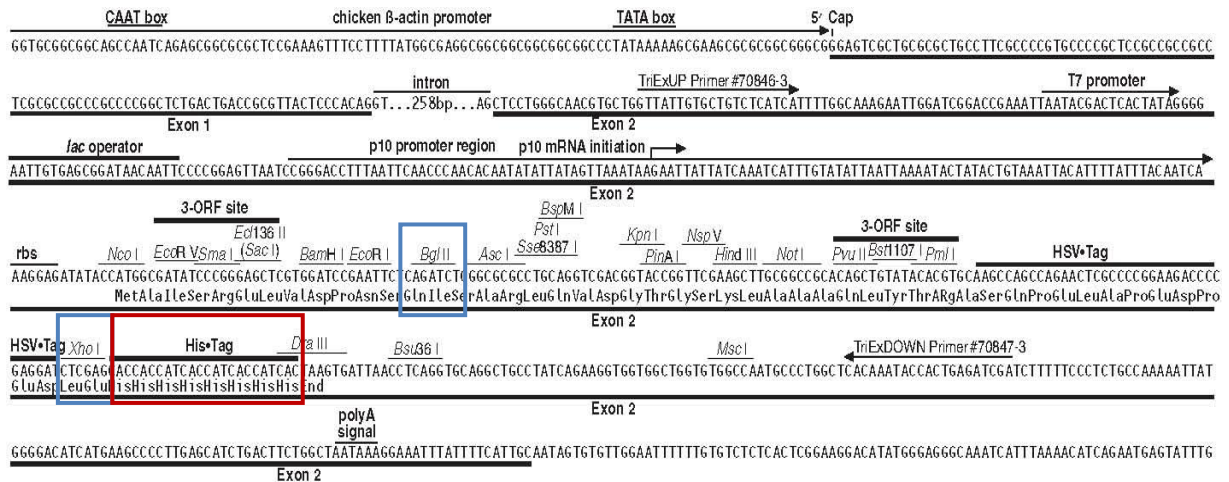
για την κάθε κλωνοποίηση περιοριστικά ένζυμα και στη συνέχεια, έγινε αποφωσφορλίωση του 5' άκρου του γραμμικού πλασμιδίου με το ένζυμο της αλκαλικής φωσφατάσης (βλ. παράγραφοι 2.2.6 και 2.2.7). Τα προϊόντα της PCR επωάστηκαν με τα ίδια περιοριστικά ένζυμα, όπως οι αντίστοιχοι πλασμιδιακοί φορείς, για 16 ώρες στους 37° C, για πέψη των θέσεων περιορισμού στα 5' και 3' άκρα τους. Ο φορέας και το ένθεμα για κάθε κλωνοποίηση καθαρίστηκαν μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (Εικόνα 3.6) (βλ. παράγραφο 2.1.4). Το ένθεμα ενσωματώθηκε στον φορέα λόγω συμπληρωματικότητας των θέσεων πέψης των περιοριστικών ενζύμων ενώ, με τη βοήθεια της λιγάσης που έχει προστεθεί στο διάλυμα της αντίδρασης, με σχηματισμό ομοιοπολικών φωσφοδιεστερικών δεσμών δημιουργούνται κυκλικά πλασμίδια (βλ. παράγραφο 2.2.8). Η αντίδραση της σύνδεσης (ligation reaction) έγινε για 16 ώρες στους 16 °C σε τελικό όγκο 10 μ L και με αναλογία φορέα-ενθέματος 1:5 ή 1:3 (Εικόνες 3.5, 3.6).

Ο πλασμιδιακός φορέας pTriex1.1 (Εικόνα 3.4) έχει ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη και περιέχει την αλληλουχία που κωδικοποιεί μοριακή ετικέτα οκτώ ιστιδινών και την αλληλουχία υποκινητή της T7 πολυμεράσης. Η παρουσία της αλληλουχίας του υποκινητή της β -ακτίνης από κοτόπουλο (chicken b-actin promoter) επιτρέπει την μεταγραφή του ενθέματος και κατά συνέπεια την έκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από αυτό σε ανώτερα ευκαρυωτικά κύτταρα.

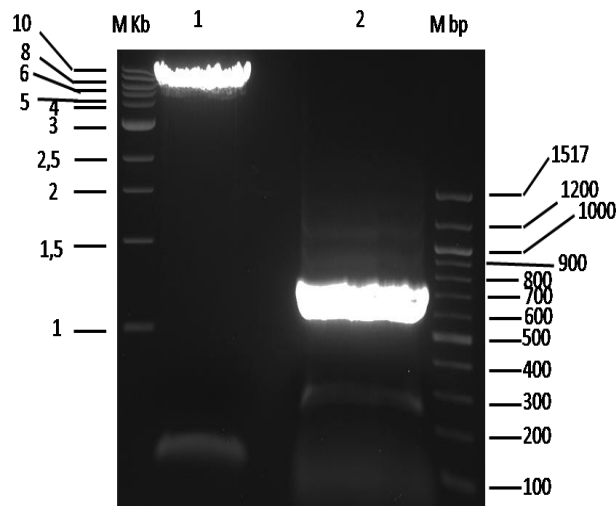


Εικόνα 3.3. Χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pTriex1.1

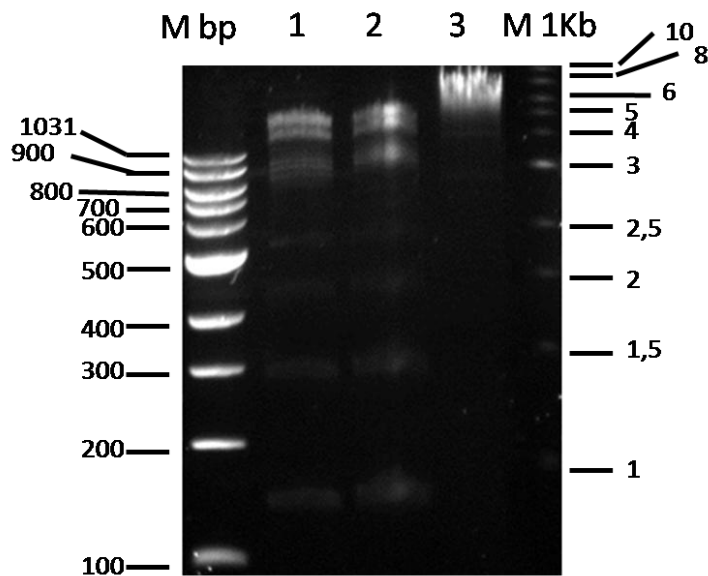
Για τη δημιουργία του πλασμιδίου pTriex1.1-*mcherry*, το ένθεμα που προέκυψε από τις αντιδράσεις PCR με τα ζεύγη εκκινητών (βλ. Πίνακα 3.1) εισήχθη ανάμεσα στις θέσεις περιορισμού BglIII και XhoI του πλασμιδίου pTriex1.1 (Εικόνα 3.5).



Εικόνα 3.4. Οι θέσεις περιορισμού για κλωνοποίηση γονιδίων στον πλασμιδιακό φορέα pTriex1.1 καθώς και ρυθμιστικά στοιχεία για έκφραση των εισαχθέντων γονιδίων σε προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά συστήματα (σε μπλε πλαίσιο οι θέσεις εισαγωγής της *mcherry*). Παρουσιάζεται επίσης η αλληλουχία που κωδικοποιεί τη μοριακή ετικέτα των 8 ιστιδινών (His-Tag)(σε κόκκινο πλαίσιο).



Εικόνα 3.5. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1% w/v των προϊόντων της αντίδρασης πέψης 1) του πλασμιδιακού φορέα (pTriex1.1) και 2) του ενθέματος (*mcherry*) με τα ίδια ένζυμα περιορισμού BglIII/XhoI. M) μάρτυρας μοριακών μεγεθών (Kb και bp)



Εικόνα 3.6. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αραρόζης 1% w/v των προϊόντων της αντίδρασης σύνδεσης (ligation). 1) Αναλογία ενθέματος-πλασμιδίου 1:3, 2) Αναλογία ενθέματος-πλασμιδίου 1:5, 3) Αρνητικός μάρτυρας (άδειο πλασμίδιο χωρίς ένθεμα, M) μάρτυρας μοριακών μεγεθών (bp και Kb)

Η αναμενόμενη αλληλουχία της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης mCherry-8His είναι :

MVSKGEEDNMAI I K E F M R F K V H M E G S V N G H E F E I E G E G E G R
 P Y E G T Q T A K L K V T K G G P L P F A W D I L S P Q F M Y G S K A Y V K H P A
 D I P D Y L K L S F P E G F K W E R V M N F E D G G V V T V T Q D S S L Q D G E F I
 Y K V K L R G T N F P S D G P V M Q K K T M G W E A S S E R M Y P E D G A L K G
 E I K Q R L K L K D G G H Y D A E V K T T Y K A K K P V Q L P G A Y N V N I K L D
 I T S H N E D Y T I V E Q Y E R A E G R H S T G G M D E L Y K L E H H H H H H H H

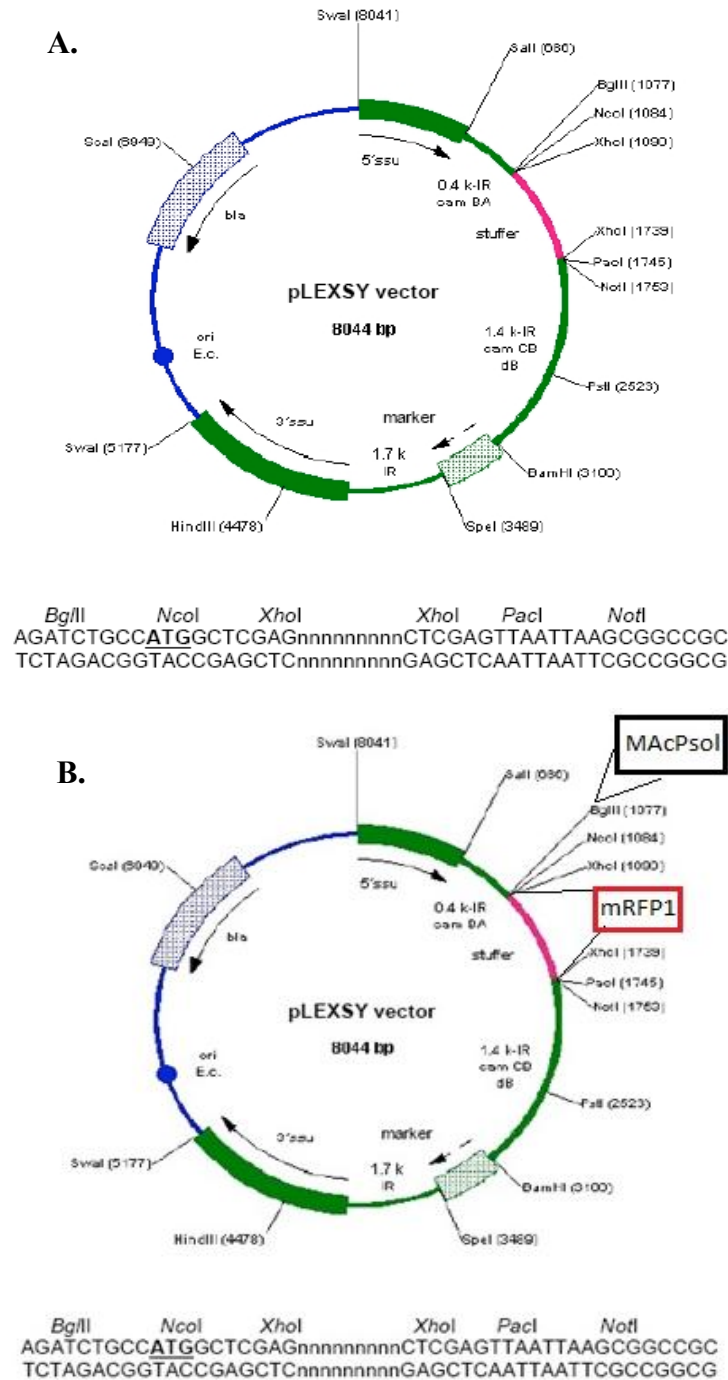
με 246 αμινοξέα, θεωρητικό μοριακό βάρος **28061.59** και ισοηλεκτρικό σημείο **6.06**.

B) pLexsy-sat-mcherry

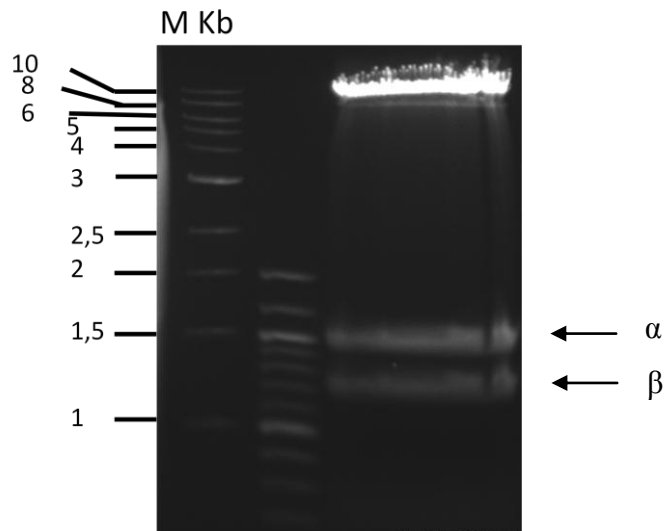
Ο pLexsy-sat (Εικόνα 3.8), όπως ήδη αναφέρθηκε, είναι φορέας έκφρασης ειδικός για τα πρωτόζωα της οικογένειας *Trypanosomatidae*, στην οποία ανήκει και το γένος *Leishmania*. Το πλασμίδιο αυτό μπορεί να αντιγραφεί σε βακτήρια *E. coli* με ανθεκτικότητα στην αμικικιλίνη, φέρει επίσης αλληλουχία του ενζύμου που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό Nourseothricin στα κύτταρα *Leishmania* που φέρουν αυτό το πλασμίδιο. Ο συγκεκριμένος φορέας είχε τροποποιηθεί (Κοτίνη ΜΠ. & Μπολέτη Χ. [79]) ώστε να περιέχει το γονίδιο της πρωτεΐνης mRFP1 ανάμεσα στις θέσεις περιορισμού BglIII και XhoI. Στη συνέχεια εισήχθη σε αυτόν αλληλουχία με το ανοιχτό πλαίσιο της επιφανειακής όξινης φωσφατάσης *LdMAcP* [80, 81] στη θέση BglIII/BglIII σε συνεχές ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης με αυτό της μονομερούς κόκκινης φθορίζουσας πρωτεΐνης mRFP1. Στην μελέτη μας χρησιμοποιήθηκε το συγκεκριμένο πλασμίδιο pLexsy-sat-*Ldmacp-mrfp1* για κλωνοποίηση

του γονιδίου *mcherry* στις θέσεις BglIII/XhoI και δημιουργία του πλασμιδίου pLexsy-sat-*mcherry*. Ουσιαστικά, στην κατασκευή αυτή, έγινε αντικατάσταση των ενθεμάτων *Ldmacp* και *mrfp1* με το γονίδιο *mcherry* που απομονώθηκε από τον pTriex1.1-*mcherry*. με πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα BglIII και XhoI (Εικόνα 3.9).

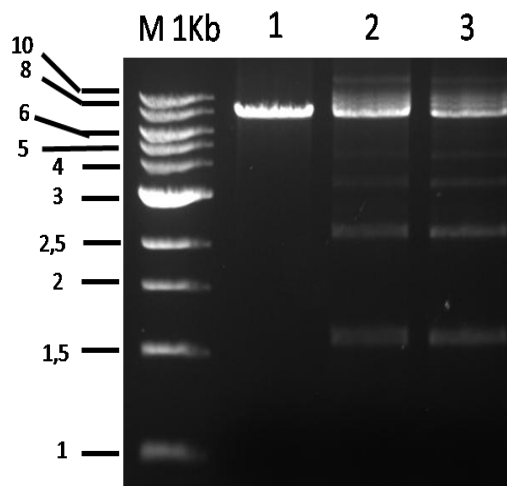
Η αντίδραση της σύνδεσης έγινε για 16 ώρες στους 16 °C σε τελικό όγκο 10 μL και με αναλογία φορέα-ενθέματος 1:3 ή 1:5 (Εικόνα 3.10)



Εικόνα 3.7. Α. Πλασμιδιακός φορέας pLexsy-sat και θέσεις κλωνοποίησης. Β. Πλασμίδιο pLexsy-sat-*Ldmacp-mrfp1*. Η αλληλουχία του γονιδίου *mcherry* εισήχθη στις θέσεις BglIII/XhoI.



Εικόνα 3.8. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%w/v των προϊόντων πέψης του πλασμιδίου pLexsy-sat-*Ldmacp-mrfp1*. M: Μάρτυρας μοριακών μεγεθών (Kb) Οι δύο ζώνες που εμφανίζονται στις 976 και 690 Kb αντιστοιχούν στα ενθέματα των γονιδίων *Ldmacp* (βέλος α.) και *mrfp1* (βέλος β.) αντίστοιχα.

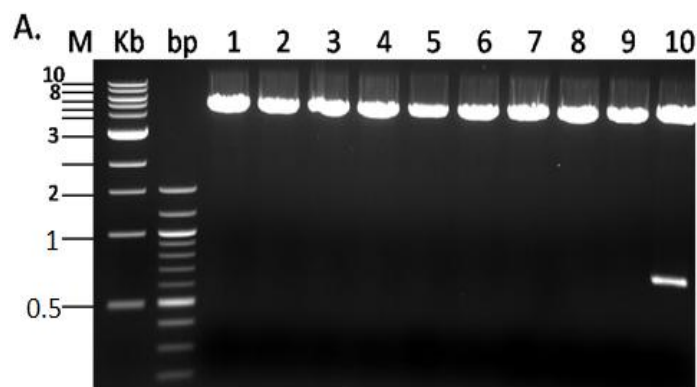


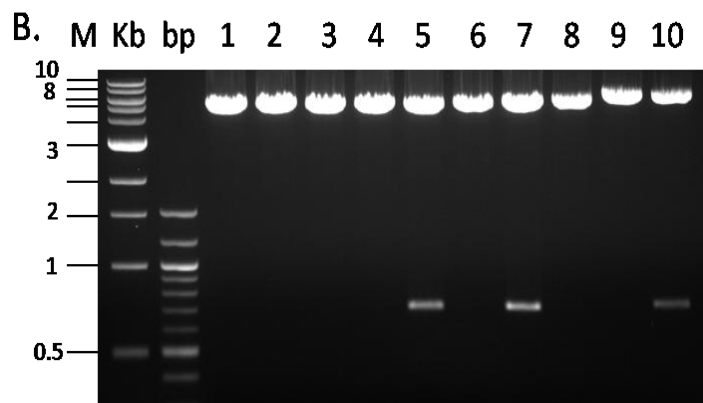
Εικόνα 3.9. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v των προϊόντων της αντίδρασης σύνδεσης (ligation). 1) Αρνητικός μάρτυρας (πλασμιδιακός φορέας χωρίς ένθεμα), 2) Αναλογία ενθέματος-πλασμιδιακού φορέα 1:3, 3) Αναλογία ενθέματος-πλασμιδιακού φορέα 1:5, M) Μάρτυρας μοριακών μεγεθών (Kb)

Το πλασμίδιο pLexsy-sat-*mcherry* χρησιμοποιήθηκε στην διαμόλυνση παρασίτων *L. tarentolae*, μέσω ηλεκτροδιάτρησης (παράγραφο 2.9), για δημιουργία παρασίτων που θα υπερεκφράζουν την υπό μελέτη πρωτεΐνη για παρατήρηση με μικροσκοπία φθορισμού (βλ. παράγραφο 2.13). Επίσης θα χρησιμοποιηθεί στο εργαστήριο για την έκφραση άλλων πρωτεϊνών ως υβριδικές πρωτεΐνες με την mCherry για τον εντοπισμό τους και για περαιτέρω μελέτες της λειτουργίας τους.

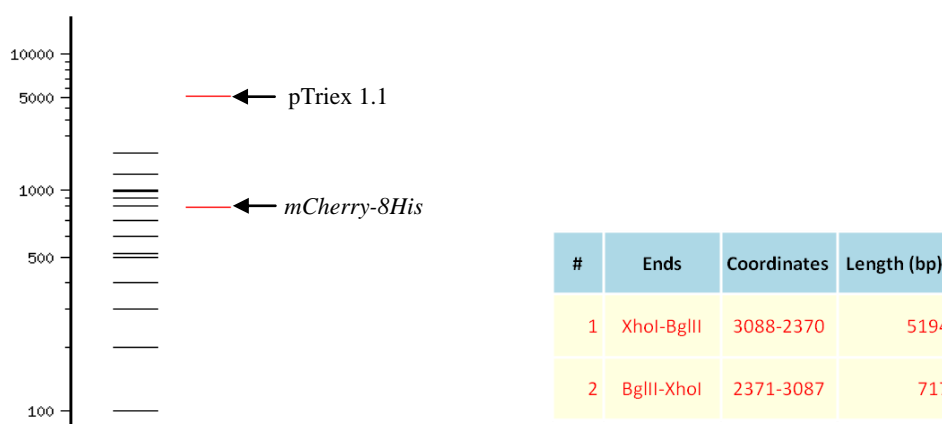
3.1.3 Απομόνωση θετικών κλώνων *E. coli* που περιέχουν τα πλασμίδια pTriex1.1-*mCherry*, pLexsy-sat-*mcherry*

Η επιλογή θετικών κλώνων *E. coli* με τα πλασμίδια pTriex1.1-*mcherry* pLexsy-sat-*mcherry* και pLexsy-sat-*rsnbt1-mrfp1* έγινε με μετασχηματισμό χημειοδεκτικών στελεχών *E. coli* TOP10F⁷ με υλικό από τις αντιδράσεις λιγάσης (Εικόνες 3.6, 3.10, 3.12) και πρωτόκολλο που περιγράφηκε στις μεθόδους (βλ. παράγραφο 2.2.9). Είκοσι αποικίες επιλέχθηκαν από κάθε τρυβλίο για κάθε διαφορετικό πλασμίδιο και με αυτές ενοφθαλμίστηκαν 20 υγρές καλλιέργειες θρεπτικού μέσου LB μικρού όγκου (4 mL) με το κατάλληλο αντιβιοτικό και επώασθηκαν για 16 ώρες στους 37°C. Από κάθε καλλιέργεια απομονώθηκε πλασμιδιακό DNA σύμφωνα με πρωτόκολλο για απομόνωση μικρής κλίμακας πλασμιδιακού DNA (βλ. παράγραφο 2.2.10). Ο έλεγχος του πλασμιδίου για παρουσία του σωστού ενθέματος έγινε με διπλή πέψη του πλασμιδιακού DNA από κάθε κλώνο με τα ένζυμα των θέσεων σύνδεσης του φορέα και του ενθέματος (βλ. παράγραφο 2.2.6). Με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης ανιχνεύθηκαν δυο ζώνες για τους pTriex1.1-*mcherry* και pLexsy-sat-*mCherry*, μία που αντιπροσωπεύει τον πλασμιδιακό φορέα και μία το ένθεμα καθώς και τρεις ζώνες για τον pLexsysat-*rsnbt1-mrfp1*, μία που αντιπροσωπεύει τον πλασμιδιακό φορέα, μία το ένθεμα rSNBT1 και μία για την mRFP1 (Εικόνες 3.12, 3.14, 3.16). Τα αναμενόμενα μεγέθη (αριθμός ζευγών βάσεων) του φορέα και του ενθέματος μετά από την πέψη των πλασμιδίων pTriex1.1-*mcherry*, pLexsy-sat-*mCherry* και pLexsy-sat-*rsnbt1-mrfp1* με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες προβλέπονται από τον υπολογιστικό αλγόριθμο NEBcutter2 (Εικόνες 3.13, 3.15, 3.17), σύμφωνα με τη θεωρητική αλληλουχία του κάθε πλασμιδίου.

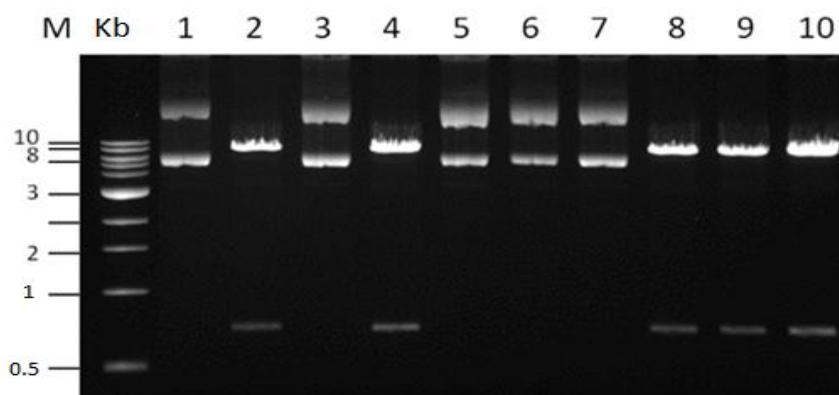




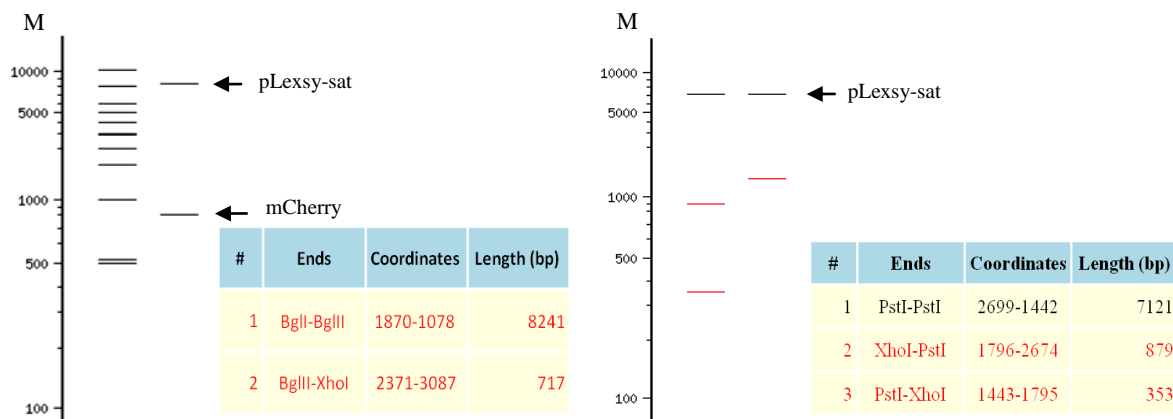
Εικόνα 3.10. Ηλεκτροφόρηση της αντίδρασης διπλής πέψης του πλασμιδίου pTriex1.1-*mCherry* με τα ένζυμα BglIII/XhoI σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v. M) μοριακός μάρτυρας (1Kb και bp), A) 1-10: πλασμίδια pTriex1.1-*mCherry* (1:3) από τις 20 αποικίες μετά από την πέψη και B) 1-10: πλασμίδια pTriex1.1-*mCherry* (1:5). Για αλληλούχιση επιλέχθηκαν οι κλώνοι A) 10. B) 5, με ένθεμα 717 ζευγών βάσεων.



Εικόνα 3.11. Προβλεπόμενη εμφάνιση των ζωνών του πλασμιδίου pTriex1.1-*mCherry* μετά τη διπλή πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα BglIII/XhoI, όπως αναφέρεται στην προηγούμενη εικόνα, σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v, σύμφωνα με τον υπολογιστικό αλγόριθμο της εταιρείας New England Biolabs (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>), M) Μοριακός μάρτυρας (Kb).

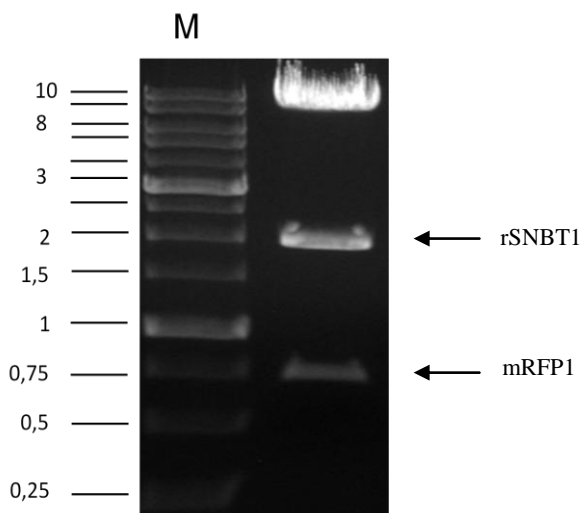


Εικόνα 3.12. Ηλεκτροφόρηση της αντίδρασης διπλής πέψης του πλασμιδίου pLexsy-sat-*mCherry* με τα ένζυμα BglIII/XhoI σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v M) μοριακός μάρτυρας (Kb), 1-10) πλασμίδια pLexsy-sat-*mCherry* από 20 θετικές αποικίες μετά από την πέψη. Για αλληλούχιση επιλέχθηκαν οι κλώνοι 9 και 10 από τους συνολικά πέντε θετικούς κλώνους με ένθεμα 717 ζευγών βάσεων.

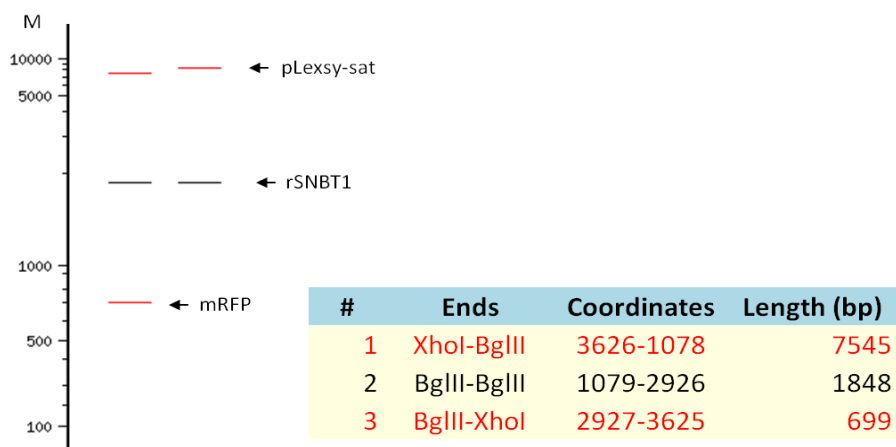


Εικόνα 3.13. Προβλεπόμενη εμφάνιση των ζωνών του πλασμιδίου pLexsy-mCherry μετά τη διπλή πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα BglII και XhoI, όπως αναφέρεται στην προηγούμενη εικόνα, σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v, σύμφωνα με τον υπολογιστικό αλγόριθμο της εταιρείας New England Biolabs (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>), M) μοριακός μάρτυρας (Kb).

Η πέψη του πλασμιδίου pLexsy-sat-mcherry με τα ένζυμα περιορισμού PstI και XhoI έγινε για να επιβεβαιωθεί το μέγεθος του πλασμιδίου, κάτι που δεν ελέγχεται με την αλληλούχιση, αφού μόνο το ένθεμα αλληλουχείται. Με τον τρόπο αυτό ελέγχονται πιθανές απώλειες ή προσθήκες τμήματος του πλασμιδίου από γενετικούς ανασυνδυασμούς που μπορεί να λάβουν χώρα κατά την αντιγραφή του πλασμιδίου στα κύτταρα *E. coli*.



Εικόνα 3.14. Ηλεκτροφόρηση της αντίδρασης πέψης του πλασμιδίου pLexsy-sat-rsnbt1-mrfp1 με τα ένζυμα BglII/XhoI σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v. M) Μοριακός μάρτυρας (Kb), πλασμιδιακό DNA pLexsy-sat-rsnbt1-mrfp1. Οι δύο ζώνες που εμφανίζονται χαμηλότερα αφορούν τον μεταφορέα rSNBT1 και την mRFP1 αντίστοιχα.



Εικόνα 3.15. Αναμενόμενη εμφάνιση των ζωνών του πλασμιδίου pLexsy-sat-rsnbt1-mrfp1 μετά την πέψη, όπως αναφέρεται στην εικόνα 3.17, σύμφωνα με τον υπολογιστικό αλγόριθμο της εταιρείας New England Biolabs (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>). Μ) Μοριακός μάρτυρας (Kb και bp).

3.1.4 Ταυτοποίηση της αλληλουχίας *mcherry* σε θετικούς κλώνους των πλασμιδίων pTriex1.1-*mcherry* και pLexsy-sat-*mcherry*

Η ταυτοποίηση της αλληλουχίας του ενθέματος *mcherry*, στο πλασμιδιακό DNA που απομονώθηκε από δύο θετικούς κλώνους, έγινε για το πλασμίδιο pTriex1.1-*mcherry*, σύμφωνα με τα πρωτόκολλα της εταιρείας VBC Biotech (<http://www.vbc-biotech.at/>). Το πλασμίδιο απομονώθηκε από καλλιέργεια μέσης κλίμακας (midi prep, βλ. παράγραφο 2.2.12). Η ταυτοποίηση της αλληλουχίας του ενθέματος έγινε με σκοπό να εντοπιστούν πιθανές μεταλλάξεις που θα μπορούσαν να έχουν προκληθεί κατά την αντιγραφή του DNA στις αντιδράσεις PCR ή από πιθανές μεταλλάξεις κατά την αντιγραφή του πλασμιδίου στα βακτήρια. Παρόλο που η πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε (KAPA2G Robust, KAPA BIOSYSTEMS) έχει δράση εξωνουκλεάσης, είναι απαραίτητη η επιβεβαίωση της αλληλουχίας του ενθέματος ως μέρους του υποχρεωτικού πρωτοκόλλου ελέγχου των θετικών κλώνων. Η αλληλούχιση έγινε με τους εκκινητές (*mcherry*-πρόσθιος και *mcherry*-ανάστροφος, βλ. παράγραφο 3.1.1, Πίνακας 3.1) που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου στην αντίδραση PCR. Οι αλληλουχίες που προέκυψαν ελέγχθηκαν με το πρόγραμμα Clustalw για το επίπεδο ομοιότητας με την αλληλουχία του γονιδίου της *mcherry* (όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 2.3).

Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης είναι κοινά για όλους τους κλώνους που ελέγχθηκαν, με επίπεδο ομοιότητας που αγγίζει το 100%.

3.1.5 Κλωνοποίηση, ενσωμάτωση του γονιδίου *rsnbt1* στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pLexsy-sat-*mrfp1* με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

3.1.6 Απομόνωση θετικών κλώνων κυττάρων *E. coli* που περιέχουν το πλασμίδιο pLexsy-sat-*rsnbt1-mrfp1* και ταυτοποίηση της αλληλουχίας *rsnbt1* σε θετικούς κλώνους του πλασμιδίου pLexsy-sat-*rsnbt1-mrfp1*

Τα πειράματα που αφορούν την κλωνοποίηση και ενσωμάτωση του γονιδίου *rsnbt1* στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pLexsy-sat-*mrfp1*, καθώς και την απομόνωση των θετικών κλώνων που περιέχουν το πλασμίδιο pLexsy-sat-*rsnbt1-mrfp1* και την ταυτοποίηση της αλληλουχίας *rsnbt1* σε θετικούς κλώνους του πλασμιδίου pLexsy-sat-*rsnbt1-mrfp1* πραγματοποιήθηκαν από τον Διδάκτορα Κώστα Παπακώστα, στο εργαστήριο του καθ. Ευστάθιου Φριλλίγγου στα πλαίσια συνεργασίας μέσω του προγράμματος Θαλής EVOTRANS(<http://excellence.minedu.gov.gr/thales/el/thalesprojects/375578>). Αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών παρουσιάζονται, ύστερα από παραχώρηση του Δρ. Κ. Παπακώστα, στο παράρτημα (βλ. Κεφ. 4.1, 4.2)

3.2 Ετερόλογη έκφραση των πρωτεϊνών mCherry και rSNBT1-mRFP1 σε πρωτόζωα *Leishmania tarentolae*

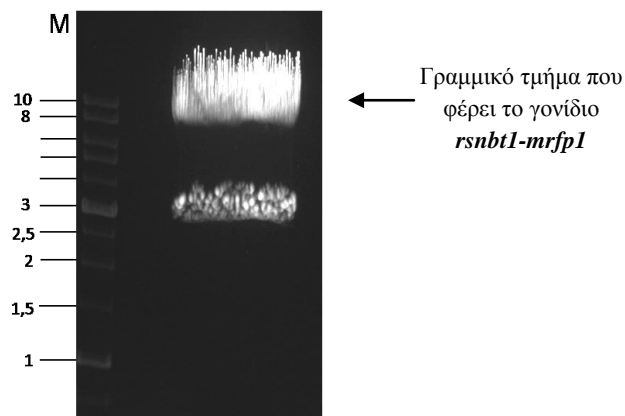
Η ετερόλογη έκφραση της πρωτεΐνης mCherry στα διαγονιδιακά πρωτόζωα *L. tarentolae* που κατασκευάστηκαν με επιμόλυνση με τα πλασμίδια pLexsy-sat-*mcherry* διερευνήθηκε με άμεση παρατήρηση του κόκκινου φθορισμού της mCherry με συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού.

Η ετερόλογη έκφραση και ο υποκυτταρικός εντοπισμός της πρωτεΐνης rSNBT1-mRFP1 στα *L. tarentolae* που επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο pLexsy-sat-*rsnbt1-mrfp1* διερευνήθηκε με άμεση παρατήρηση και έμμεσο ανοσοφθορισμό (βλ. παράγραφο 2.12) σε συνεστιακό μικροσκόπιο. Επιπρόσθετα επιβεβαιώθηκε βιοχημικά με την τεχνική του ανοσοστυπώματος Western σε πρωτεϊνικά κλάσματα μετά από κλασματοποίηση με το απορυπαντικό διγλιτονίνη.

3.2.1 Κατασκευή διαγονιδιακών πρωτοζώων *L. tarentolae* που εκφράζουν τις πρωτεΐνες mCherry ή rSNBT1-mRFP1

Στελέχη των πρωτοζώων *L. tarentolae* αγρίου τύπου (WT) στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης μετασχηματίστηκαν με τα πλασμίδια pLexsy-sat-*mcherry* και pLexsy-sat-*rsnbt1-mrfp1* (για επισωματική και χρωμοσωμική έκφραση) με ηλεκτροδιάτρηση, όπως αναφέρεται στην παράγραφο 2.9 [82]. Στην περίπτωση της χρωμοσωμικής έκφρασης έγινε πέψη του πλασμιδίου pLexsy-sat-*rsnbt1-mrfp1* με το ένζυμο περιορισμού SmaI το οποίο κόβει σε δύο σημεία μέσα στον φορέα και χρησιμοποιούμε για την ηλεκτροδιάτρηση το ευθύγραμμο πλέον

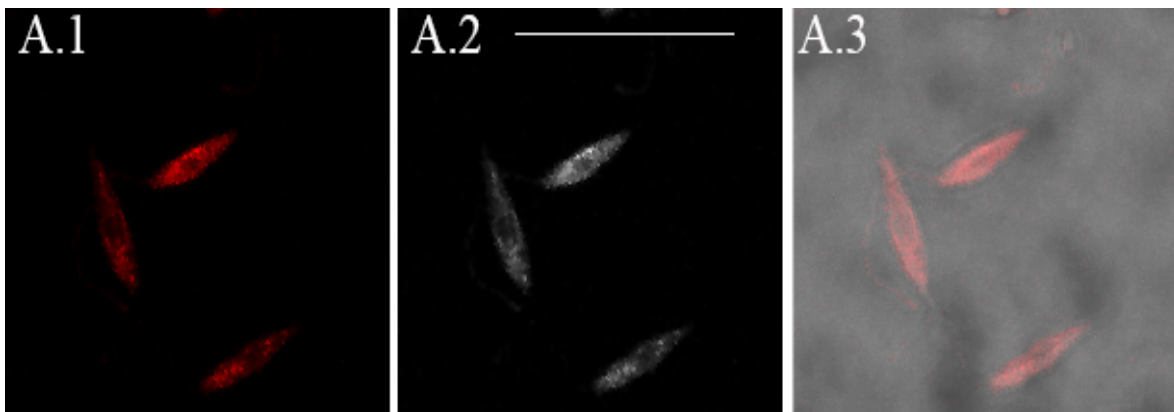
τιμήμα που δημιουργείται και φέρει το επιθυμητό γονίδιο (Εικόνα 3.18). Τα μετασχηματισμένα κύτταρα διατηρήθηκαν σε συνθήκες καλλιέργειας όπως και αυτά αγρίου τύπου με μόνη διαφορά τη σταδιακά αυξανόμενη προσθήκη του αντιβιοτικού Nourseothricin (μέχρι τελικής συγκέντρωσης 100 µg/mL) για επιλογή κυττάρων που φέρουν το πλασμίδιο *mcherry* ή *rsnbt1-mrfp1*. Όταν έγινε εύκολος ο εντοπισμός αρκετών ζωντανών κυττάρων στην καλλιέργεια (~3 εβδομάδες μετά την διαμόλυνση), η ύπαρξη διαγονιδιακών πληθυσμών επιβεβαιώθηκε με παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού (Εικόνα 3.19) για να πιστοποιηθεί η έκφραση της mCherry ή της mRFP1 από το φθορισμό τους ($E_{x_{max}}=587/E_{m_{max}}=610$ nm ή $E_{x_{max}}=584/E_{m_{max}}=607$ nm αντίστοιχα).

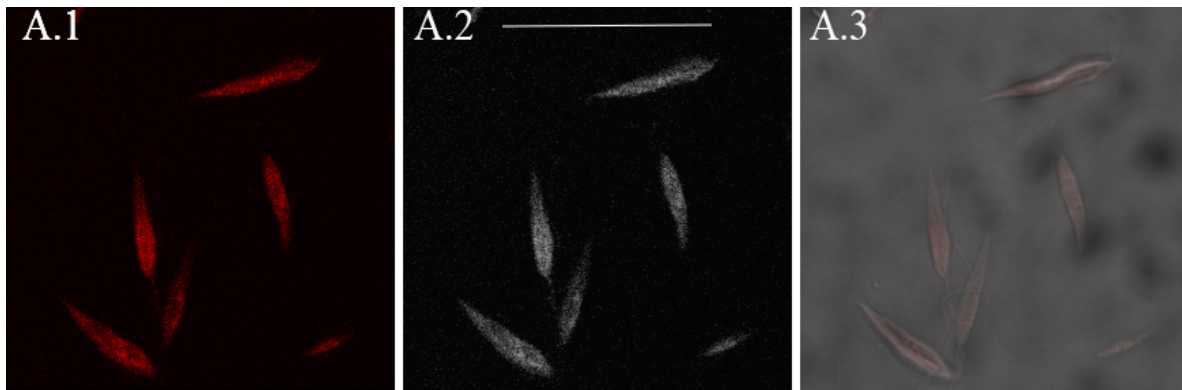


Εικόνα 3.16. Ηλεκτροφόρηση της αντίδρασης πέψης του πλασμιδίου pLexsy-sat-*rsnbt1-mrfp1* με το ένζυμο *SwaI*, για χρωμοσωμική έκφραση, σε πηκτή αгарόζης 1% w/v. M) Μοριακός μάρτυρας (Kb). Με βέλος υποδεικνύεται το ευθύγραμμο τμήμα του πλασμιδίου μετά από την πέψη που φέρει το γονίδιο *rsnbt1-mrfp1*. Η δεύτερη ζώνη που εμφανίζεται χαμηλότερα αφορά το κομμάτι από το πλασμίδιο που αφαιρείται και δεν χρησιμοποιείται για την χρωμοσωμική έκφραση.

A) Κατασκευή των διαγονιδιακών πρωτοζώων *L. tarentolae*-mCherry

Η mCherry στα διαγονιδιακά παράσιτα *L. tarentolae*-mCherry εντοπίστηκε με διάχυτο φθορισμό σε όλο το σώμα του παρασίτου, όπως θα αναμενόταν για μια διαλυτή κυτταροπλασματική πρωτεΐνη.





Εικόνα 3.17. Εντοπισμός της mCherry σε διαγονιδιακά παράσιτα, *L. tarentolae*-mCherry με συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού (βλ. παράγραφο 2.12). A.1) Ο κόκκινος φθορισμός της mCherry ανιχνεύτηκε με την γραμμή laser Argon, 543 nm. A.2). Η ίδια εικόνα παρατίθεται σε ασπρόμαυρη για καλύτερη αντίθεση. A.3) Αντίθεση φάσης και κόκκινος φθορισμός μαζί (merge). Κλίμακα μεγέθους (Scale bar): 20 μ m.

Στη συνέχεια ελέγχθηκε με κυτταρομετρία ροής (FACS) το ποσοστό των διαγονιδιακών κυττάρων *L. tarentolae*-mCherry σε μεταλογαριθμική φάση ανάπτυξης της καλλιέργειας καθώς και τα επίπεδα έκφρασης της mCherry σε αυτά τα διαγονιδιακά πρωτόζωα. Αυτό έγινε με προσδιορισμό του επί τοις εκατό (%) ποσοστού κυττάρων με κόκκινο φθορισμό (κανάλι PE-Texas Red-A) μεγαλύτερο από τον αυτοφθορισμό των *L. tarentolae* αγρίου τύπου και με υπολογισμό της μέσης τιμής έντασης του κόκκινου φθορισμού στον πληθυσμό αυτό. Οι τιμές των παραμέτρων FSC (πρόσθιος σκεδασμός), SSC (πλάγιος σκεδασμός) και PE-Texas Red-A (κόκκινος φθορισμός) που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση αναγράφονται στον Πίνακα 3.3.

Το ποσοστό κυττάρων με κόκκινο φθορισμό (περιοχή P1 Εικόνα 3.20/A) στο δείγμα *L. tarentolae*-mCherry ανέρχεται περίπου στο 66,8% του ολικού πληθυσμού. Η περιοχή P2 (Εικόνα 3.20/A) αντιστοιχεί σε «θόρυβο» (background) όπως προκύπτει από ανάλυση του μάρτυρα *L. tarentolae* αγρίου τύπου. Στον πληθυσμό αυτό καταμετρώνται επίσης και ένας σημαντικός πληθυσμός διαγονιδιακών κυττάρων με χαμηλότερα επίπεδα έντασης φθορισμού (Πίνακας 3.4)

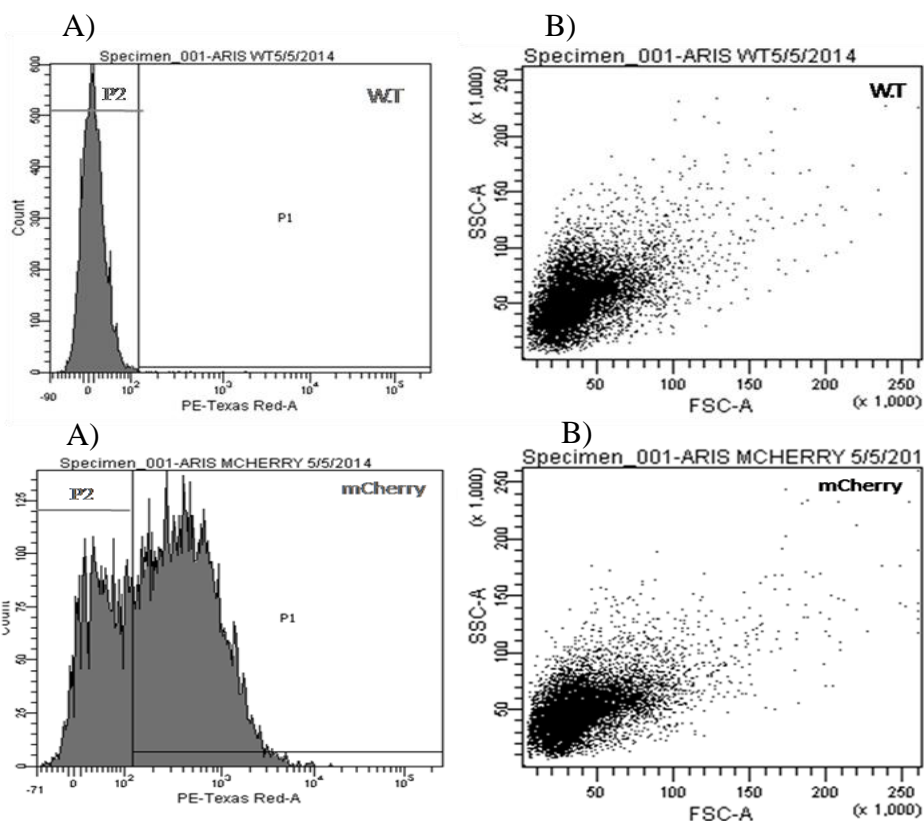
Εξέταση των γραφικών παραστάσεων FSC και SSC δείχνει ότι οι πληθυσμοί των *L. tarentolae* αγρίου τύπου και *L. tarentolae*-mCherry παρουσιάζουν μια ανομοιογένεια στο μέγεθος (FSC τιμές μεταξύ 100-200) που δηλώνει την ταυτόχρονη παρουσία προκυκλικών, διαιρούμενων κυττάρων και μετακυκλικών μορφών, καθώς επίσης και συστάδες σε μορφές «ροζέτας» που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των πρωτοζώων στην καλλιέργεια.

Το μεγαλύτερο μέρος του πληθυσμού πάντως έχει ομοιόμορφο μέγεθος όπως δηλώνεται από τη συσσώρευση μεγάλου πληθυσμού γύρω από την τιμή 100 στην παράμετρο FSC-A και στα

δύο δείγματα (Εικόνα 3.20).

Πίνακας 3.2. Παράμετροι που εφαρμόστηκαν στον κυτταρομετρητή ροής για ανάλυση των κυτταρικών πληθυσμών *L. tarentolae* αγρίου τύπου και *L. tarentolae-mCherry*

FSC-A	355
SSC-A	325
PE-Texas Red-A	600



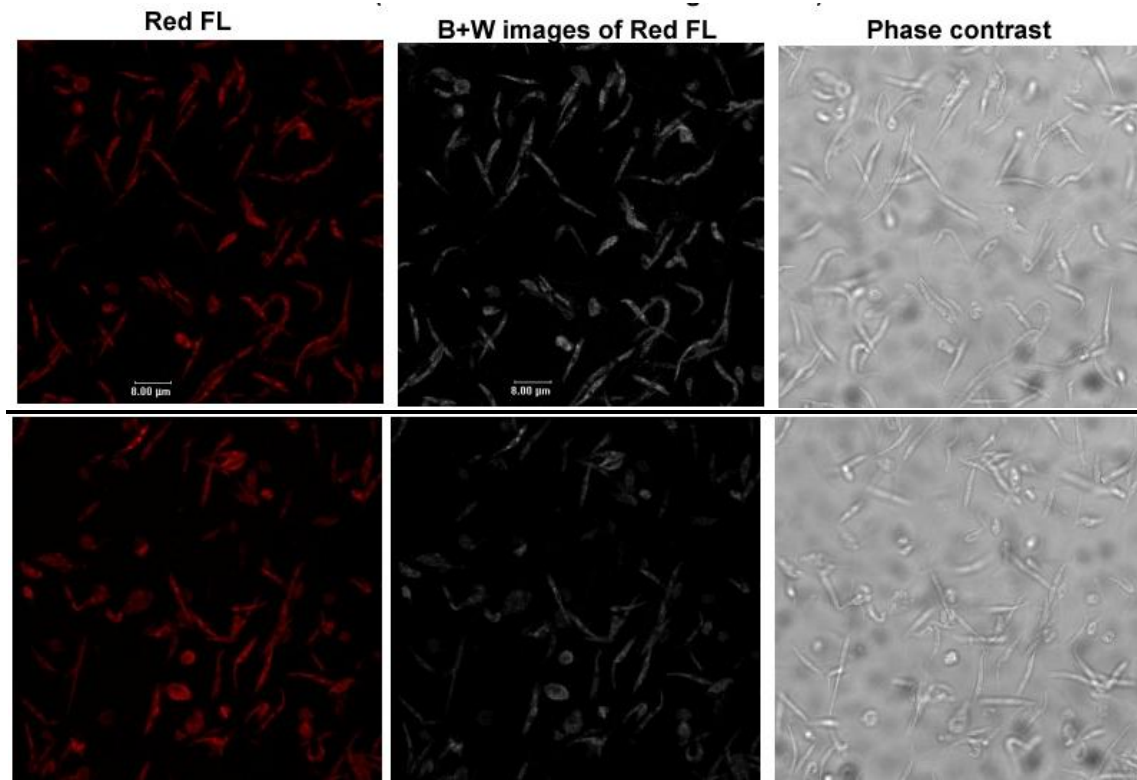
Εικόνα 3.18. Ανάλυση με FACS των παρασίτων *L. tarentolae* αγρίου τύπου (wt) και *L. tarentolae-mCherry*. Έγινε ανάλυση 10.000 κυττάρων για κάθε δείγμα. **Α)** (αριστερά) ιστογράμματα των παραμέτρων Texas Red-A/FSC-A και SSC-A/FSC-A. **Β)** (δεξιά): dot plots των παραμέτρων FSC-H και SSC. Τα αποτελέσματα ελήφθησαν με τις ρυθμίσεις: FSC-A=355, SSC-A=325, Texas Red-A=600

Πίνακας 3.3. Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της Εικόνας 3.20

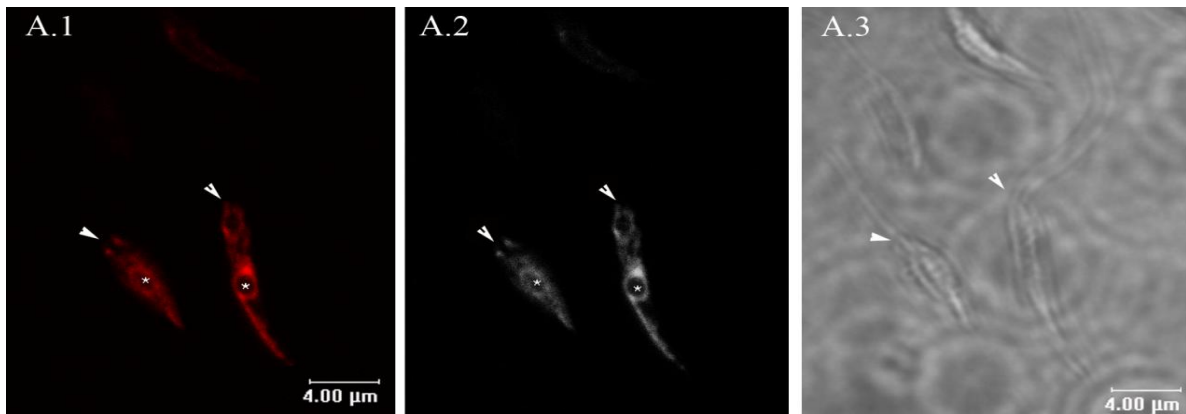
<i>L. tarentolae</i> wt	Γεγονότα (κύτταρα)	% συνόλου	Μέσος όρος έντασης φθορισμού
Όλα	10000	100.00	10
P1	14	0.1	418
P2	9986	99.9	9
<i>L. tarentolae-mCherry</i>			
Όλα	10000	100.00	429
P1	6682	66.8	618
P2	3318	33.2	350

B) Κατασκευή των διαγονιδιακών πρωτοζώων *L. tarentolae*-rSNBT1-mRFP1

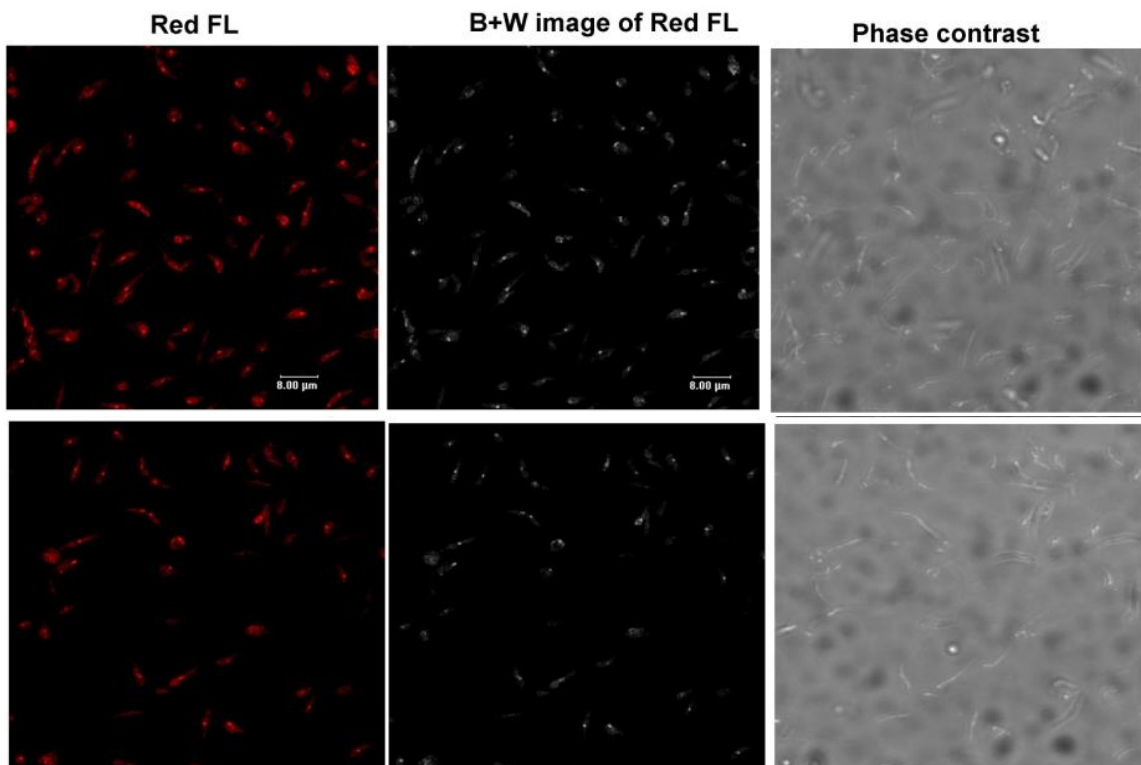
Η ύπαρξη διαγονιδιακών πρωτοζώων *L. tarentolae*-rSNBT1-mRFP1 επιβεβαιώθηκε με παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού για να πιστοποιηθεί η έκφραση της rSNBT1-mRFP1 χμαιρικής πρωτεΐνης. Όπως φαίνεται στις Εικόνες 3.21 - 3.24 και στο Σχήμα 3.1 ο μεγαλύτερος πληθυσμός των κυττάρων *L. tarentolae*-rSNBT1-mRFP1 εκφράζουν την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη rSNBT1-mRFP1 σε ανιχνεύσιμα επίπεδα.



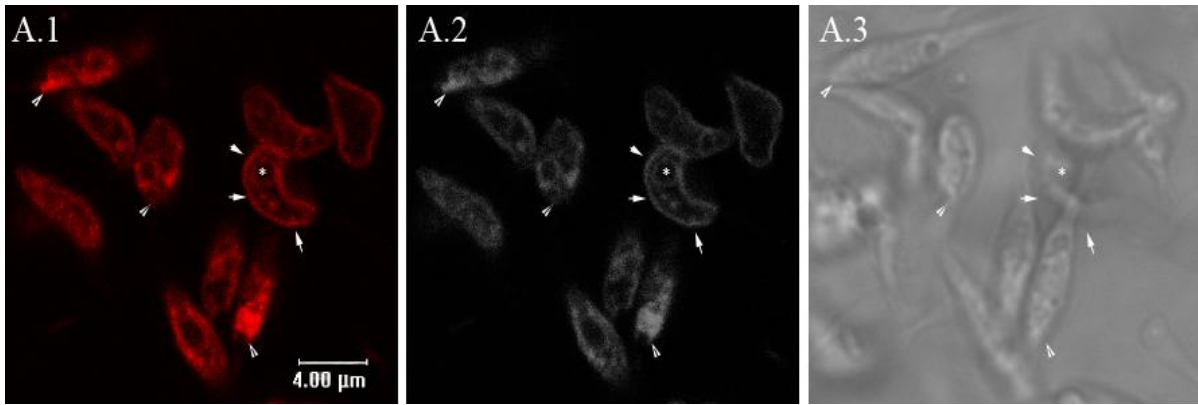
Εικόνα 3.19. Φωτογραφίες συνεστιακής μικροσκοπίας από διαγονιδιακά παράσιτα *L. tarentolae*-rSNBT1-mRFP1 που εκφράζουν επισωμικά τον μεταφορέα rSNBT1-mRFP1 (*L. tarentolae*-rSNBT1-mRFP1-EP). Ο κόκκινος φθορισμός ελήφθη με τη γραμμή Argon laser 543 nm. Χρησιμοποιήθηκε φακός Aplanachromat 63X και έγινε ηλεκτρονική μεγέθυνση της εικόνας 2X. Κάθε εικόνα που αντιπροσωπεύει ένα διαφορετικό πεδίο έχει μέγεθος 1024X1024 pixels. Ο κόκκινος φθορισμός παρουσιάζεται και σε ασπρόμαυρη εικόνα για καλύτερη αντίθεση. Στη δεξιά στήλη το κάθε πεδίο απεικονίζεται με μικροσκοπία αντίθεσης φάσης. Η κάθε εικόνα είναι max projection από 5 οπτικές τομές που ελήφθησαν με step size 0,5 μm. Η κλίμακα μεγέθους είναι 8μm.



Εικόνα 3.20. Φωτογραφίες συνεστιακής μικροσκοπίας από διαγονιδιακά κύτταρα *L. tarentolae*-rSNBT1-mRFP1 που εκφράζουν επισωματικά τον μεταφορέα rSNBT1-mRFP1 (*L. tarentolae*-rSNBT1-mRFP1-EP). A.1) Ο κόκκινος φθορισμός του rSNBT1-mRFP1 ανιχνεύτηκε με τις συνθήκες που περιγράφηκαν στην Εικόνα 3.24. A.2) Η ίδια εικόνα παρατίθεται σε ασπρόμαυρη για καλύτερη αντίθεση. A.3) Αντίθεση φάσης. Ηλεκτρονική μεγέθυνση της εικόνας 6X. Η κλίμακα μεγέθους είναι 4 μm. Με αστερίσκο υποδεικνύεται ο πυρήνας των πρωτοζωικών κυττάρων και με κεφαλή βέλους η περιοχή έκφυσης του μαστιγίου (flagellar pocket).



Εικόνα 3.21. Φωτογραφίες συνεστιακής μικροσκοπίας από διαγονιδιακά παράσιτα *L. tarentolae*-rSNBT1-mRFP1 που εκφράζουν χρωμοσωμικά τον μεταφορέα rSNBT1-mRFP1 (*L. tarentolae*-rSNBT1-mRFP1-CH). Οι εικόνες ελήφθησαν ακριβώς με τις ίδιες παραμέτρους έντασης laser, και ενίσχυσης φωτοπολλαπλασιαστή (PMT gain) όπως αυτές που παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.21.



Εικόνα 3.22. Φωτογραφίες συνεστιακής μικροσκοπίας από διαγονιδιακά παράσιτα *L. tarentolae*-rSNBT1-mRFP1 που εκφράζουν χρωμοσωμικά τον μεταφορέα rSNBT1-mRFP1 (*L. tarentolae*-rSNBT1-mRFP1-CH). Η λήψη και η παρουσίαση των εικόνων γίνεται με τις ίδιες παραμέτρους όπως περιγράφεται στην Εικόνα 3.22. Με αστερίσκο υποδεικνύεται ο πυρήνας, με βέλος περιοχή της επιφανειακής μεμβράνης και με κεφαλή βέλους η περιοχή έκφυσης του μαστιγίου (flagellar pocket). Ηλεκτρονική μεγέθυνση της εικόνας 6X. Κλίμακα μεγέθους:4 μm.

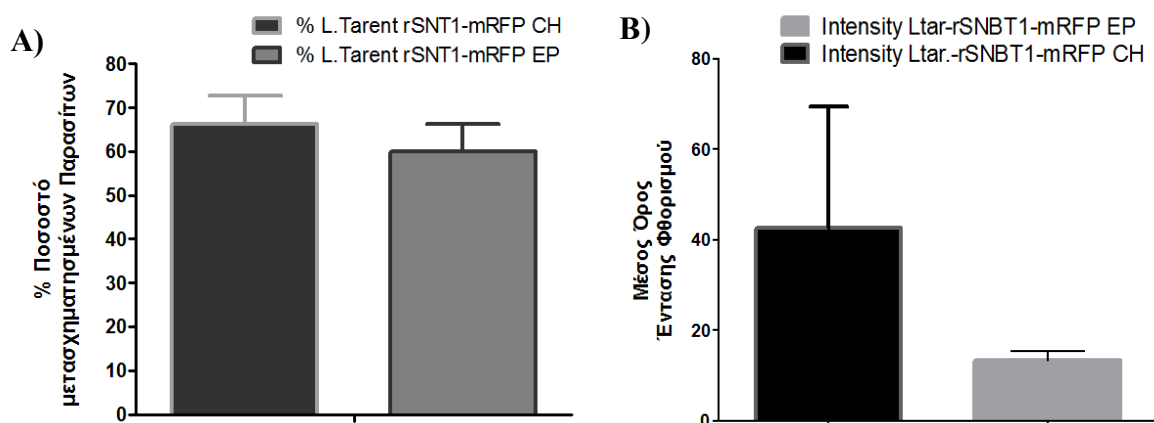
Ο χμαιοειδής μεταφορέας rSNBT1-mRFP1 και στους δύο πληθυσμούς των παρασίτων (δηλ. με επισωματική ή χρωμοσωμική έκφραση) εντοπίζεται κυρίως στο ενδοπλασματικό δίκτυο, στην περιοχή έκφυσης του μαστιγίου (flagellar pocket) (βέλος) και πιο αχνά στην επιφανειακή μεμβράνη του κυττάρου (Εικόνα 3.22). Η περιοχή έκφυσης του μαστιγίου είναι μια βαθιά εγκόλπωση στη βάση του μαστιγίου στην οποία γίνεται πρόσληψη θρεπτικών ουσιών μέσω της ενδοκύττωσης με υποδοχέα, έκκριση πρωτεϊνών στον εξωκυττάριο χώρο και διάχυση/ενσωμάτωση μεμβρανικών πρωτεϊνών στην επιφανειακή μεμβράνη του κυττάρου [83].

Στην περίπτωση του διαγονιδιακού πληθυσμού *L. tarentolae*-rSNBT1-mRFP1 που εκφράζουν χρωμοσωμικά τον χμαιοειδή μεταφορέα (Εικόνα 3.24), η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη ανιχνεύεται πιο έντονα στην επιφανειακή μεμβράνη του παρασίτου σε μεγαλύτερο αριθμό κυττάρων από την περίπτωση της επισωματικής έκφρασης υποδηλώνοντας ότι σε αυτά τα κύτταρα έχουμε πιο αποτελεσματική μετακίνηση μιας μεμβρανικής πρωτεΐνης στην επιφανειακή μεμβράνη του πρωτοζωικού κυττάρου.

Στη συνέχεια έγινε ποσοτικοποίηση του ποσοστού των κυττάρων που εκφράζουν τον rSNBT1-mRFP1, με μέτρηση του αριθμού των κυττάρων με κόκκινο φθορισμό καθώς και των επιπέδων φθορισμού της mRFP1/κύτταρο στους δύο διαγονιδιακούς πληθυσμούς. Η ποσοτικοποίηση έγινε σε 8 οπτικά πεδία στα οποία αναλύθηκαν συνολικά 100 -150 παράσιτα ανά περίπτωση (Εικόνες 3.25/3.27). Ο συνολικός αριθμός των παρασίτων σε κάθε πεδίο μετρήθηκε στις εικόνες αντίθεσης φάσης του κάθε πεδίου. Η καταμέτρηση των κυττάρων και των επιπέδων έντασης κόκκινου φθορισμού (mRFP1/κύτταρο) στις ψηφιακές εικόνες έγινε με το πρόγραμμα Icy (<http://icy.bioimageanalysis.org/>) με εφαρμογή των αλγορίθμων: Intensity

Projection και HK-means, ακολουθώντας πάντα τις ίδιες παραμέτρους για όλα τα οπτικά πεδία (Σχήμα 3.1, 3.2).

Το ποσοστό των μετασηματισμένων κυττάρων *L. tarentolae*-rSNBT1-mRFP1 με ανιχνεύσιμα επίπεδα κόκκινου φθορισμού (mRFP1) βρέθηκε να ανέρχεται σε 60-70% του συνόλου των κυττάρων στους διαγονιδιακούς πληθυσμούς και να είναι περίπου 10% υψηλότερο στα πρωτόζωα που εκφράζουν χρωμοσωμικά τον μεταφορέα rSNBT1-mRFP1 σε σύγκριση με αυτά που τον εκφράζουν επισωμικά (Σχήμα 3.1 A). Η ποσοτικοποίηση της έντασης κόκκινου φθορισμού ανά παράσιτο έδειξε ότι στην περίπτωση της χρωμοσωμικής έκφρασης του χιμαιρικού μεταφορέα ήταν ~2 φορές υψηλότερη σε σύγκριση με αυτήν της επισωμικής έκφρασης. Αυτό σημαίνει ότι στον διαγονιδιακό πληθυσμό *L. tarentolae*-rSNBT1-mRFP1 που εκφράζει χρωμοσωμικά τον rSNBT1-mRFP1 έχουμε υψηλότερα επίπεδα έκφρασης αλλά όμως και μεγαλύτερη διακύμανση στα επίπεδα έκφρασης της κόκκινης φθορίζουσας πρωτεΐνης όπως δηλώνεται από το μεγάλο εύρος απόκλισης στην μέση ένταση κόκκινου φθορισμού/κύτταρο (Σχήμα 3.1 B).



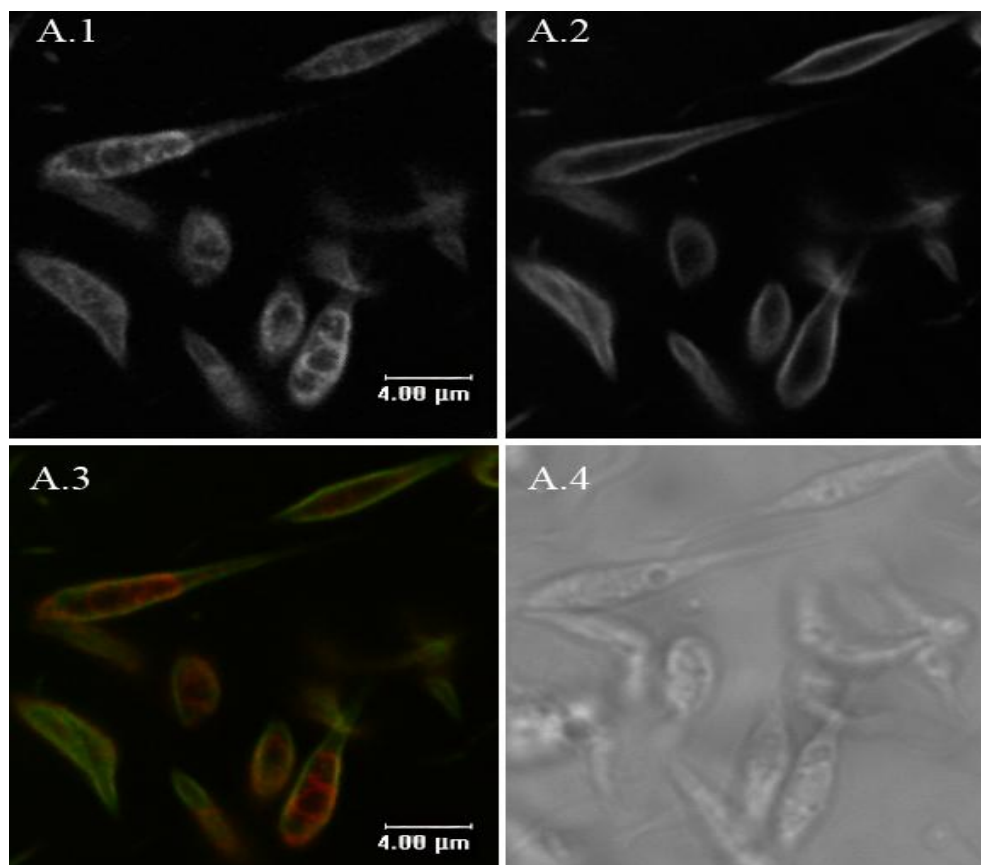
Σχήμα 3.1. Γραφική αναπαράσταση του **A)** ποσοστού των παρασίτων *L. tarentolae*-rSNBT1-mRFP1 (EP και CH) που εκφράζουν ανιχνεύσιμα επίπεδα rSNBT1-mRFP1 και **B)** μέσου όρου της έντασης φθορισμού/παράσιτο στους δύο διαγονιδιακούς πληθυσμούς (*L. tarentolae*-rSNBT1-mRFP1 EP (γκρίζο χρώμα) και rSNBT1-mRFP1-CH (μαύρο χρώμα)). Η ποσοτικοποίηση έγινε σε 8 οπτικά πεδία ανά περίπτωση σε συνολικά 100-150 παράσιτα που προσδιορίστηκαν από τις αντίστοιχες εικόνες αντίθεσης φάσης. Η καταμέτρηση των κυττάρων και των επιπέδων έντασης κόκκινου φθορισμού (mRFP1) στις ψηφιακές εικόνες έγινε σε max projections 5 οπτικών τομών (0,5 μm step size) με το πρόγραμμα Icy (<http://icy.bioimageanalysis.org/>, με εφαρμογή των αλγορίθμων: Intensity Projection και HK-means) με εφαρμογή των ίδιων παραμέτρων για όλα τα οπτικά πεδία.

Το υπόλοιπο της μελέτης έγινε με τα διαγονιδιακά παράσιτα (*L. tarentolae*-rSNBT1-mRFP1) που εκφράζουν χρωμοσωμικά τον χιμαιρικό μεταφορέα rSNBT1-mRFP1, διότι έχουν υψηλότερο ποσοστό (%) παρασίτων που εκφράζουν ανιχνεύσιμα επίπεδα mRFP1 και έχουν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης/ανά παράσιτο. Επίσης στον πληθυσμό αυτό

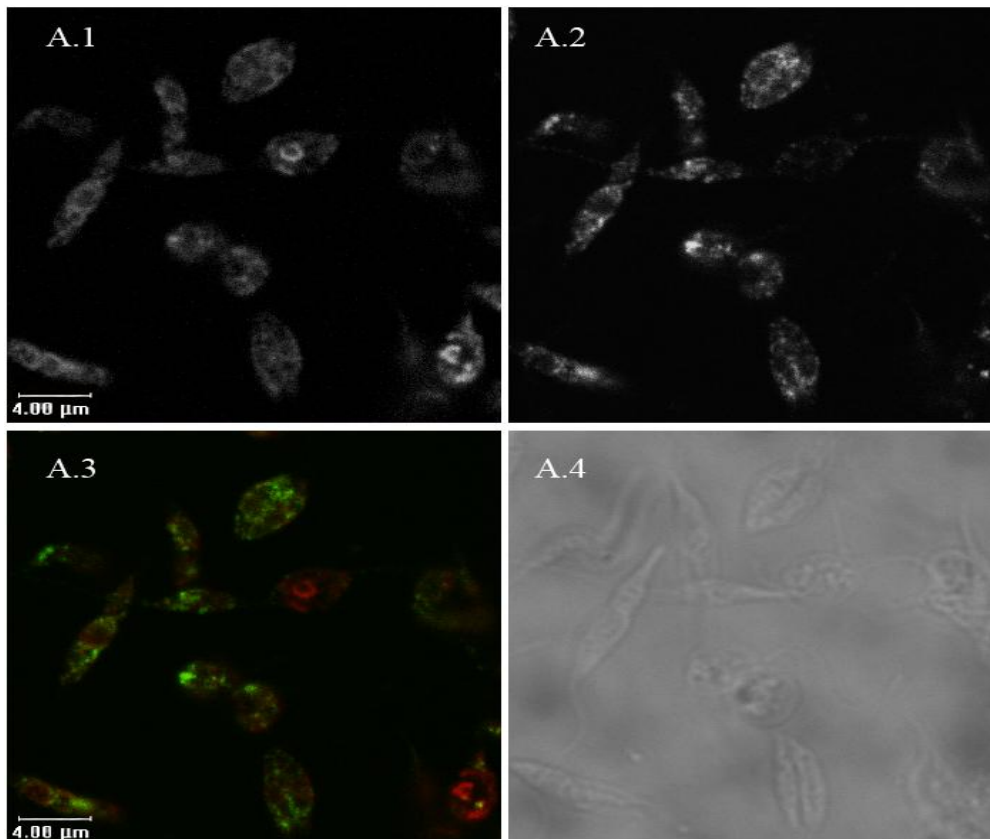
ανιχνεύουμε τον χημειρικό μεταφορέα στην επιφανειακή μεμβράνη περισσότερων παρασίτων σε αντίθεση με τον πληθυσμό των διαγονιδιακών παρασίτων με επισωματική έκφραση του rSNBT1-mRFP1 όπου ο rSNBT1-mRFP1 εντοπίζεται κυρίως στο Ενδοπλασματικό Δίκτυο (ΕΔ) και στην περιοχή έκφυσης του μαστιγίου.

Για επιβεβαίωση του υποκυτταρικού εντοπισμού της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης rSNBT1-mRFP1 στην επιφανειακή μεμβράνη και στο ΕΔ των παρασίτων έγινε έμμεσος ανοσοφθορισμός με αντισώματα έναντι της α -τουμπουλίνης (α -tubulin) (Εικόνα 3.23) ή της BiP/GRP78 Λεϊσμανιακής πρωτεΐνης βοηθού αναδίπλωσης (chaperone) (Εικόνα 3.24) αντίστοιχα [78] και κατάλληλα δευτέρα αντισώματα συζευγμένα με την χρωστική Alexa488. Το αντίσωμα έναντι της α -τουμπουλίνης αναγνωρίζει τον κυτταροσκελετό των μικροσωλινίσκων κάτω από την επιφανειακή μεμβράνη του πρωτοζώου (subpellicular microtubules), ενώ το αντίσωμα έναντι της BiP/GRP78 το ΕΔ και είναι ειδικό για τα πρωτόζωα των Τρυπανοσωματίδων.

Όπως φαίνεται στις Εικόνες 3.23 και 3.24, ο κόκκινος (mRFP1) και ο πράσινος (Alexa488) φθορισμός συνεντοπίζονται σε μεγάλο βαθμό γεγονός που επιβεβαιώνει την παρουσία του μεταφορέα rSNBT1-mRFP1 στο ΕΔ και την επιφανειακή μεμβράνη των διαγονιδιακών παρασίτων. Αυτό σημαίνει ότι το εκκριτικό σύστημα του πρωτοζωικού παρασίτου *L. tarentolae* αναγνωρίζει τις σηματοδοτικές αλληλουχίες του εκκριτικού συστήματος των θηλαστικών για μετακίνηση μιας κυτταροπλασματικής μεμβρανικής πρωτεΐνης στην επιφανειακή μεμβράνη του κυττάρου.



Εικόνα 3.23. Φωτογραφίες από συνεστιακή μικροσκοπία που απεικονίζουν τον rSNBT1-mRFP1 και την α-Τουμπουλίνη σε στατικής φάσης *L. tarentolae*-rSNBT1-mRFP1. Για σήμανση της α-Τουμπουλίνης με έμμεσο ανοσοφθορισμό χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό αντίσωμα α-Τουμπουλίνης (1:300) από ποντίκι και δεύτερο αντι-ποντικίσιο αντίσωμα συζευγμένο με την πράσινη φθορίζουσα χρωστική Alexa 488 (βλ. παράγραφο 2.12). Ο κόκκινος (mRFP1) (A.1) και πράσινος (Alexa 488) φθορισμός (A.2) παρουσιάζονται χωριστά ως ασπρόμαυρες εικόνες και η αλληλεπικάλυψη τους στην εικόνα A.3 (merge). A.4) Αντίθεση φάσης. Η κλίμακα μεγέθους είναι 4 μm.

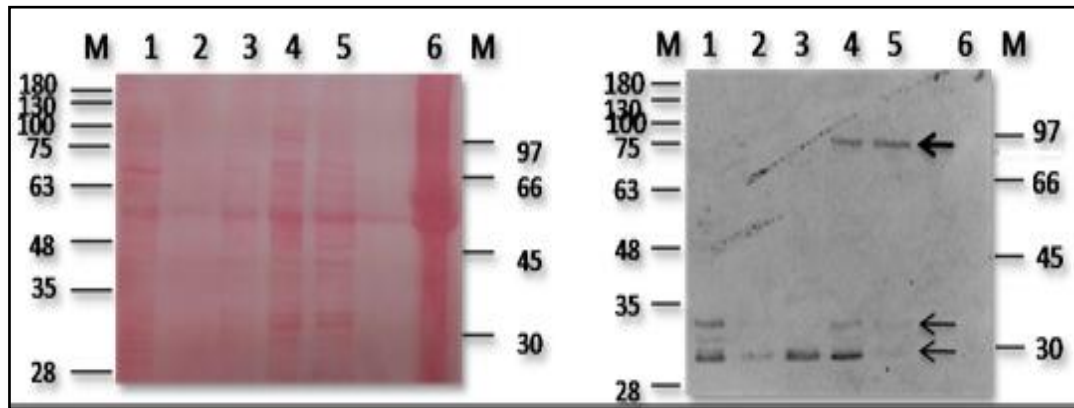


Εικόνα 3.24. Φωτογραφίες από συνεστιακή μικροσκοπία που απεικονίζουν τον rSNBT1-mRFP1 και την την BiP/GRP78 (ΕΔ) σε στατικής φάσης *L. tarentolae*-rSNBT1-mRFP1 (βλ. παράγραφο 2.12). Για τον έμμεσο ανοσοφθορισμό χρησιμοποιήθηκε πολυκλωνικό αντίσωμα αντι- BiP/GRP78 από κουνέλι (αραίωση 1:500) και δεύτερο αντίσωμα anti-Rabbit συζευγμένο με την πράσινη φθορίζουσα χρωστική Alexa Fluor 488. Ο κόκκινος (mRFP1) (A.1) και ο πράσινος (Alexa 488) φθορισμός (A.2) παρουσιάζονται χωριστά ως ασπρόμαυρες εικόνες και η αλληλεπικάλυψη των δύο χρωστικών στην εικόνα A.3 (merge). A.4 Αντίθεση φάσης. Η κλίμακα μεγέθους είναι 4 μm.

3.2.2 Βιοχημικός υποκυτταρικός εντοπισμός της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης rSNBT1-mRFP1

Η έκφραση της διαγονιδιακής πρωτεΐνης rSNBT1-mRFP1 με το αναμενόμενο μοριακό βάρος επαληθεύτηκε βιοχημικά στα διαγονιδιακά παράσιτα *L. tarentolae*, με ανοσοαποτύπωση Western μετά από κλασμάτωση των ολικών πρωτεϊνών του πρωτοζώου με ένα πρωτόκολλο στο οποίο χρησιμοποιούνται τα απορρυπαντικά διγτονίνη και Triton X-100 (παράγραφος 2.10) Στα 6 διαφορετικά κλάσματα που προκύπτουν από την επεξεργασία των κυττάρων με αυτή τη μέθοδο συλλέγονται δείγματα εμπλουτισμένα σε διαφορετικές διαλυτές ή κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες ή μεμβρανικές πρωτεΐνες από διαφορετικά οργανίδια και την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Η ανίχνευση της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει σε ένα συγκεκριμένο κλάσμα μας επιτρέπει να κάνουμε λογικές υποθέσεις για τον υποκυτταρικό εντοπισμό της.

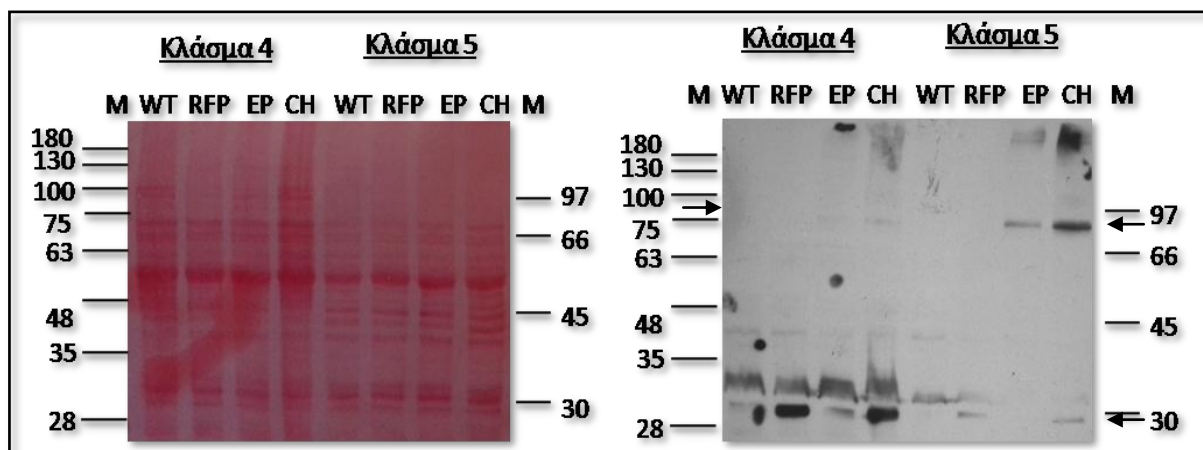
Όπως ήταν αναμενόμενο η πρωτεΐνη rSNBT1-mRFP1 εντοπίστηκε στα κλάσματα 4 και 5 που περιέχουν μεμβρανικές πρωτεΐνες του πρωτοζωικού κυττάρου και μάλιστα είναι εμπλουτισμένα (κλάσμα 5) σε πρωτεΐνες της επιφανειακής μεμβράνης (Εικόνα 3.25).



Εικόνα 3.25. Ανοσοαποτύπωση Western διαγονιδιακών παρασίτων *L. tarentolae*-rSNBT1-mRFP1 των κλασμάτων 1 έως 5 (6 ίζημα που έμεινε μετά από κατεργασία του κλάσματος 5 με 2% v/v Triton X-100) μετά από κλασμάτωση των πρωτεϊνών με διγτονίνη και ανάλυση σε SDS-PAGE 10% w/v. Η μεμβράνη επώαστηκε με καθαρισμένο αντι-mRFP1 αντίσωμα από κουνέλι που είχε παρασκευαστεί στο εργαστήριο, (συγκέντρωση 0,4 μg/mL) και, στη συνέχεια, με δεύτερο αντίσωμα έναντι ορού κουνελιού (anti-rabbit), συζευγμένα με HRP. Η εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών έγινε με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας (ECL). (M) Μοριακοί μάρτυρες (kDa). Τα βέλη υποδεικνύουν τον rSNBT1-mRFP1 και διάφορα πρωτεολυτικά κλάσματα με την mRFP1. Η χρώση της μεμβράνης με Ponceau-S παρατίθεται για έλεγχο της ποσότητας που φορτώθηκε στην γέλη πολυακρυλαμίδης.

Με το αντι-RFP1 αντίσωμα ανιχνεύτηκαν 3 ζώνες (Εικόνα 3.27) στα κλάσματα 4 και 5 που θεωρούμε ότι αντιστοιχούν στη διαγονιδιακή rSNBT1-mRFP1 πρωτεΐνη (φαινόμενο μοριακό βάρος ~95 KDa, πάνω βέλος) και σε πρωτεολυτικά κλάσματα του χιμαιρικού μεταφορέα που έχουν την mRFP1 (χαμηλότερης μοριακής μάζας ζώνες ~30-34 KDa, κάτω βέλη). Οι χαμηλότερης μοριακής μάζας ζώνες ανιχνεύτηκαν και στα κλάσματα 1-3 στα οποία απομονώνονται διαλυτές πρωτεΐνες.

Επίσης έγινε έλεγχος των επιπέδων έκφρασης του χιμαιρικού μεταφορέα rSNBT1-mRFP1 στους δύο πληθυσμούς διαγονιδιακών παρασίτων (CH: χρωμοσωμική έκφραση και EP: επισωμική έκφραση με Western blot στα κλάσματα 4 και 5 της κλασματοποίησης με διγτονίνη. Παράλληλα ελέγχθησαν αντίστοιχα κλάσματα από παράσιτα *L. tarentolae* αγρίου τύπου και παράσιτα που εκφράζουν την διαλυτή πρωτεΐνη mRFP1 ως αρνητικοί μάρτυρες (Εικόνα 3.26).



Εικόνα 3.26. Ανοσοαποτύπωση Western διαγονιδιακών παρασίτων *L.tarentolae*-rSNBT1-mRFP1(επισωμικών και χρωμοσωμικών), *L. tarentolae*-wt και *L. tarentolae*-mRFP1 των κλασμάτων 4 και 5, μετά από κλασμάτωση των πρωτεϊνών με διγλιτονίνη και ανάλυση σε SDS-PAGE 10% w/v. Η μεμβράνη επώαστηκε με καθαρισμένο αντι-mRFP1 σε συγκέντρωση 0,4 µg/mL και στη συνέχεια, με δεύτερο αντίσωμα έναντι ορού κουνελιού (anti-rabbit), συζευγμένα με HRP. Η εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών έγινε με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας (ECL). (M) Μοριακοί μάρτυρες (KDa). Τα βέλη υποδεικνύουν τον rSNBT1-mRFP1. Η χρώση της μεμβράνης με Ponceau-S παρατίθεται για έλεγχο της ποσότητας που φορτώθηκε στο gel.

Όπως ήταν αναμενόμενο η πρωτεΐνη rSNBT1-mRFP1 εντοπίστηκε ως μία ζώνη στα κλάσματα 4 και 5, κυρίως στο 5, εμπλουτισμένα σε μεμβρανικές πρωτεΐνες του ΕΔ και της κυτταροπλασματικής μεμβράνης πρωτόζωου (Εικόνα 3.25 και 3.26) με φαινόμενη μοριακή μάζα ~ 95 KDa πολύ κοντά στην υπολογιζόμενη μοριακή μάζα των 91.8 KDa του χιμαιρικού μεταφορέα. Προϊόντα πρωτεόλυσης του rSNBT1-mRFP1, προφανώς πεπτιδικά τμήματα από το C-τελικό του άκρο συνδεδεμένα με την mRFP1, ανιχνεύονται σε όλα τα πρωτεϊνικά κλάσματα.

Επίσης, η ένταση της πρωτεϊνικής ζώνης των ~95 KDa είναι πολύ υψηλότερη στον πληθυσμό *L. tarentolae*-rSNBT1-mRFP1 που εκφράζει τον μεταφορέα χρωμοσωμικά (Εικόνα 3.26. CH), αποτέλεσμα που συμφωνεί με την ποσοτικοποίηση της έντασης φθορισμού/κύτταρο από τις εικόνες της συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού.

Η ανίχνευση της ανασυνδυνασμένης πρωτεΐνης rSNBT1-mRFP1 στα μεμβρανικά πρωτεϊνικά κλάσματα είναι σε συμφωνία με την πρόβλεψη της δομής της ως πρωτεΐνη με 12-14 διαμεμβρανικές έλικες (Πίνακας 1.3, Εικόνα 1.18).

3.2.3 Έλεγχος λειτουργικότητας του μεταφορέα rSNBT1-mRFP1 στα διαγονιδιακά πρωτόζωα *L. tarentolae*-rSNBT1-mRFP1

Για την λειτουργική ανάλυση του μεταφορέα rSNBT1-mRFP1 επελέγησαν τα διαγονιδιακά πρωτόζωα *L. tarentolae*-rSNBT1-mRFP1 που εκφράζουν τον μεταφορέα χρωμοσωμικά λόγω υψηλότερων επιπέδων έκφρασης και μεγαλύτερου πληθυσμού παρασίτων στα οποία ο μεταφορέας ανιχνεύεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη (Εικόνα

3.26). Στις λειτουργικές δοκιμασίες ενεργού μεταφοράς, εξετάστηκε η πρόσληψη [³H]-υποξανθίνης που έχει δειχθεί ότι είναι εξ ίσου καλό υπόστρωμα με την ουρακίλη για τον μεταφορέα rSNBT1 (Km Υποξανθίνης = 17.4μM και Km Ουρακίλης = 21.2μM [31]), Στα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας σύγκρισης ο πληθυσμός των πρωτοζώων *L. tarentolae* wt.

Επειδή ο μεταφορέας rSNBT1 είναι εξαρτώμενος από την ηλεκτροχημική διαβάθμιση (Electrochemical gradient) ιόντων Na⁺ αναμένουμε ότι σε χαμηλή συγκέντρωση του ραδιενεργού υποστρώματος ([³H]υποξανθίνη = 67nM) που χρησιμοποιήσαμε στα πειράματά μας και παρουσία υψηλής συγκέντρωσης ιόντων Na⁺ στο ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης, η πρόσληψη της νουκλεοβάσης θα γίνεται πιο αποτελεσματικά από τον ανασυνδυασμένο μεταφορέα rSNBT1-mRFP1 σε σχέση με την πρόσληψη από τα φυσιολογικά συστήματα πρόσληψης νουκλεοσιδίων/νουκλεοτιδικών βάσεων NT1, NT2, NT3 και NT4 εξισορροπητικοί (equilibrative) μεταφορείς ENTs [44, 84-87] των ειδών *Leishmania* που αναμένονται να υπάρχουν και στο είδος *Leishmania tarentolae*. Το τελευταίο επιβεβαιώθηκε με ανάλυση BLAST στη βάση δεδομένων TrjTryp και έλεγχο των αλληλουχιών DNA στο γονιδίωμα της *L. tarentolae*. Η ανάλυση αυτή αποκάλυψε ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης ορθόλογα με αυτά των μεταφορέων NT1, NT2 και NT3 (Πίνακας 3.6) και μάλιστα σε περισσότερα από ένα αντίγραφα και σε διαφορετικά χρωμοσώματα (χρωμόσωμα 11, 13 και 36), με ομοιότητα 40- 48% προς τους ομόλογους μεταφορείς άλλων *Leishmania spp.* Σύγκριση των αλληλουχιών αυτών (πρόγραμμα Clustal Omega), ομόλογων με τους μεταφορείς NT1 (LmjF.15.1230), NT2 (LmjF.36.1940), NT3 (LmjF.13.1210), NT4 (LmjF.11.0590) της *Leishmania major* δεν ανέδειξε καμία σημαντική ομοιότητα με την αλληλουχία του μεταφορέα, rSNBT1, που μελετάμε.

Πίνακας 3.4. Στον πίνακα αναγράφονται οι κωδικοί των αλληλουχιών DNA στο γονιδίωμα της *L. tarentolae* ParrotTarII που κωδικοποιούν για υποθετικούς μεταφορείς της οικογένειας NT. Η εύρεση έγινε με ανάλυση BLAST από τη βάση δεδομένων TrjTryp και NCBI, χρησιμοποιώντας ως αλληλουχία σύγκρισης τις αλληλουχίες DNA των NT1(LmjF.15.1230), NT2 (LmjF.36.1940), NT3 (LmjF.13.1210) και NT4 (Lmj.110590) του είδους *Leishmania major*. Με τον όρο Score συμβολίζεται το ποσοστό ταύτισης του γονιδίου της *L. tarentolae* Parrot TarII με την αλληλουχία του μεταφορέα της *L. major*. Με τον όρο P (N) συμβολίζεται η πιθανότητα του γονιδίου να ανήκει στην οικογένεια του μεταφορέα που βρέθηκε μέσω του BLAST. Αναφέρεται επίσης και το ποσοστό ομοιότητας με τον ομόλογο μεταφορέα της *L. major*. Όσο

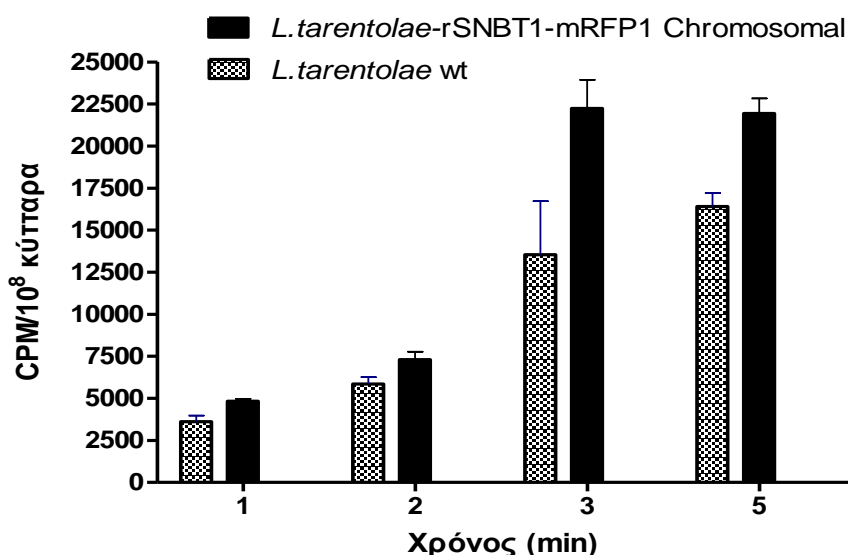
μεγαλύτερος ο αρνητικός εκθέτης του e τόσο μεγαλύτερη η πιθανότητα ομολογίας.

Sequences producing High-scoring Segment Pairs	Transporter	Identity (%)	Score	P(N)
LtaPcontig59-1	NT1	88	2127	4.0e-221
LtaP13.1110	NT1	87	513	1.8e-79
LtaP36.1940	NT2	87	2244	1.6e-233
LtaP13.1110	NT3	87	2208	1.0e-229
LtaP11.0590	NT4	84	482	4.7e-87

Στα πειράματα της πρόσληψης / μεταφοράς νουκλεοβάσεων στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήσαμε ως υπόστρωμα υποξανθίνη σημασμένη με τρίτιο σε συγκέντρωση 67nM και μη ραδιοσημασμένη υποξανθίνη σε συγκέντρωση 0.67μM στην τελική αντίδραση (βλ. παράγραφο 2.13).

Τα πειράματα μεταφοράς-πρόσληψης υποξανθίνης (Σχήμα 3.2) πραγματοποιήθηκαν σε χρόνους πρόσληψης 1, 2, 3 και 5 λεπτών.

Παρατηρήσαμε ότι η μεταφορά του υποστρώματος αυξάνεται σχεδόν γραμμικά από το 1 μέχρι και τα 3 λεπτά και φαίνεται να φτάνει σε εξισορρόπηση στα 5 λεπτά. Συγκριτικά βλέπουμε ότι τα διαγονιδιακά παράσιτα στα 3 λεπτά παρουσιάζουν 45% υψηλότερα επίπεδα πρόσληψης της [^3H]-Υποξανθίνης από τα παράσιτα αγρίου τύπου γεγονός που θεωρούμε ότι οφείλετε στην λειτουργία του ανασυνδυσμένου μεταφορέα rSNBT1-mRFP1 στην επιφανειακή μεμβράνη των διαγονιδιακών πρωτοζώων. Η πρόσληψη υποξανθίνης από τα πρωτόζωα αγρίου τύπου οφείλεται στους μεταφορείς (ENTs) που γνωρίζουμε από την βιβλιογραφία ότι υπάρχουν στα είδη της *Leishmania* και απο ανάλυση BLAST και στο στέλεχος *L. tarentolae*.

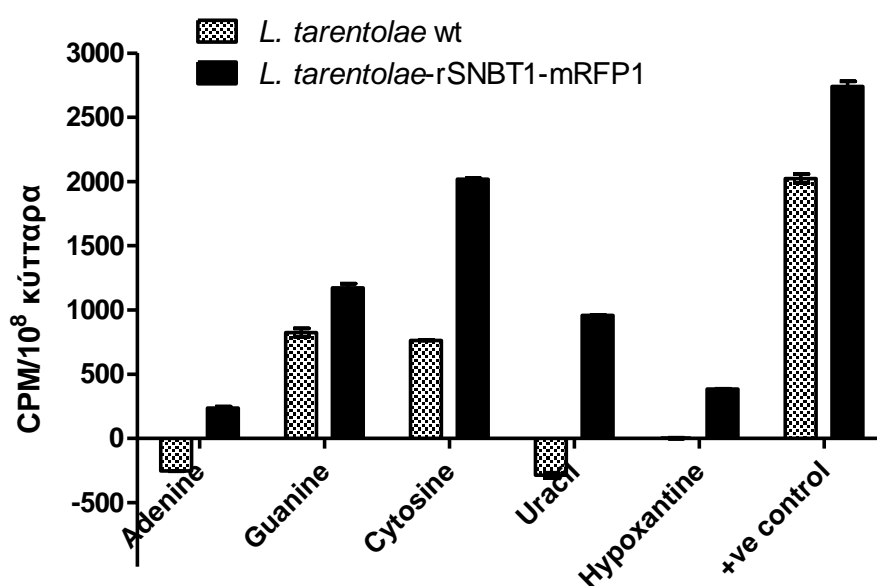


Σχήμα 3.2. Πρόσληψη [³H]-υποξανθίνης από πρωτόζωα *L. tarentolae*-rSNBT1-mRFP1 και *L. tarentolae* αγρίου τύπου. Στο διάγραμμα φαίνονται οι κρούσεις / 10⁸ κύτταρα ραδιοσημασμένης [³H]-Υποξανθίνης που τελικά μεταφέρθηκε μέσα στο παράσιτο, σε συνάρτηση με τον χρόνο επώασης των κυττάρων με το ραδιενεργό νουκλεοσίδιο. Τελική συγκέντρωση [³H]-Υποξανθίνης: 67nM και τελική συγκέντρωση ψυχρής Υποξανθίνης : 0,67μM. Η ειδική ενεργότητα [³H]-Υποξανθίνης είναι 31,5 Ci/mmol). Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο σχήμα προέρχονται από τρία ανεξάρτητα πειράματα εις διπλούν για κάθε χρόνο και για κάθε στέλεχος.

Σε **αρχικές** διερευνητικές μελέτες ανταγωνισμού πρόσληψης Υποξανθίνης με 1 mM μη ραδιοσημασμένης Αδενίνης, Γουανίνης, Κυτοσίνης, Ουρακίλης και Υποξανθίνης δείχθηκε ότι οι παραπάνω νουκλεοβάσεις αναστέλλουν τη μεταφορά Υποξανθίνης με σειρά μειούμενης δραστηριότητας Ουρακίλη > Αδενίνη > Γουανίνη > Κυτοσίνη (Σχήμα 3.3). Παρατηρούμε ότι η Ουρακίλη δεν ανταγωνίζεται πλήρως την πρόσληψη υποξανθίνης από τον διαγονιδιακό πληθυσμό *L. tarentolae*-rSNBT1-mRFP1 όπως θα αναμενόταν σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα από μελέτες στην κυτταρική σειρά θηλαστικών HEK293 που υπερεκφράζει τον μεταφορέα rSNBT1 [31]. Στην περίπτωση αυτή η ουρακίλη ήταν το καλύτερο υπόστρωμα από τις υπόλοιπες νουκλεοβάσεις που ελέγχθηκαν σε πειράματα ανταγωνισμού πρόσληψης. Πρόσθετα, θα περιμέναμε η Αδενίνη να μην ανταγωνίζεται την πρόσληψη Υποξανθίνης καλύτερα από την Ουρακίλη. Η μελέτη εξειδίκευσης υποστρώματος του ανασυνδυασμένου μεταφορέα rSNBT1 στα διαγονιδιακά κύτταρα *L. tarentolae*-rSNBT1-mRFP1 θα πρέπει να επαναληφθεί παρουσία αναστολέων για τους ενδογενείς μεταφορείς νουκλεοβάσεων/νουκλεοσιδίων (NT1-NT4) [53] έτσι ώστε να μελετηθεί η μεταφορά μόνο μέσω του rSNBT1-mRFP1.

Ενδιαφέρουσα είναι επίσης η παρατήρηση ότι στα πρωτόζωα αγρίου τύπου η Ουρακίλη και η Υποξανθίνη φαίνεται να έχουν παρόμοια ανταγωνιστική δράση στην πρόσληψη ραδιοσημασμένης Υποξανθίνης. Οι μέχρι τώρα μελέτες για τους μεταφορείς Νουκλεοσιδίων/Νουκλεοβάσεων στα πρωτόζωα *Leishmania* (π.χ. *L. major*) εμφανίζουν

απόλυτη εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα που μεταφέρουν [Πίνακας 3.5][44] γεγονός που δεν δικαιολογεί το παραπάνω αποτέλεσμα. Δεδομένου ότι το πρωτόζωο *Leishmania tarentolae* από την μελέτη του γονιδιώματος του (Πίνακας 3.4) [11] προβλέπεται να εκφράζει τους ομόλογους μεταφορείς NT1-NT4 που έχουν μελετηθεί σε άλλα είδη *Leishmania* και η συμπεριφορά που παρατηρούμε θα μπορούσε να οφείλεται σε συνδυασμό δράσης διαφορετικών ENTs (NT1-NT4) που εκφράζονται ίσως και σε διαφορετικά επίπεδα από ότι σε άλλα είδη *Leishmania* ή στην παρουσία και άλλων μεταφορέων που δεν έχουν ακόμα ταυτοποιηθεί. Σίγουρα η παρατήρηση αυτή χρήζει περαιτέρω μελέτης, παρουσία και εξειδικευμένων αναστολέων για κάθε είδος μεταφορέα για επιβεβαίωση ή διάψευση.



Σχήμα 3.3. Ανταγωνισμός πρόσληψης (κρούσεις/10⁸ κύτταρα/5 λεπτά) [³H]-Υποξανθίνης από μη ραδιοσημασμένες νουκλεοβάσεις Αδενίνης, Γουανίνης, Κυτοσίνης, Ουρακίλης και Υποξανθίνης (1mM) σε παράσιτα *L. tarentolae*-rSNBT1-mRFP1 CH και *L. tarentolae* wt. Η συγκέντρωση της [³H]-Υποξανθίνης στις αντιδράσεις πρόσληψης ήταν 67nM και της μη ραδιοσημασμένης Υποξανθίνης 0.67 μM. Η ειδική ενεργότητα [³H]-Υποξανθίνης που χρησιμοποιήθηκε ήταν 31,5 Ci/mmol (κρούσεις / 10⁸ κύτταρα). Τα αποτελέσματα στο σχήμα προέρχονται από δύο ανεξάρτητα πειράματα εις διπλούν για κάθε νουκλεοβάση.

Πίνακας 3.5. Μεταφορείς πουρινών και πυριμιδινών στις *Leishmania donovani* και *Leishmania major* [44]

Overview of <i>Leishmania</i> purine and pyrimidine transporters				
Species/ Transporter	Substrate	K_m (μM)	Expression	
<i>L. donovani</i>	NT1.1	Adenosine	0.17 ± 0.09	PM
		Uridine	5.6 ± 1.8	
		Thymidine		
		Cytidine		
		Tubercidin Formycin A		
	NT1.2	Adenosine	0.66 ± 0.15	PM?
		Uridine	40 ± 11	
	NT2	Inosine	0.3 ± 0.1	PM
		Guanosine	1.7 ± 0.5	
		Formycin B		
T1	Adenosine	1.14 ± 0.05	AM	
	Uridine			
	Thymidine			
	Cytidine Formycin A			
T2	Adenosine	2.09 ± 0.13	AM	
	Inosine			
	Guanosine			
	Formycin A			
	Formycin B			
<i>L. major</i>	NBT1	Hypoxanthine	0.71 ± 0.07	PM
		Adenine	4.6 ± 0.9	
		Guanine	2.8 ± 0.7^a	
		Xanthine	23 ± 8^a	
		Allopurinol	54 ± 3	
	NT3	Hypoxanthine	16.5 ± 1.5	PM
		Adenine	8.5 ± 1.1	
		Guanine	8.8 ± 4.0	
		Xanthine	8.5 ± 0.6	
	LmU1	Uracil	0.32 ± 0.07	PM
5-Fluorouracil		0.66 ± 0.14^a		

PM, promastigotes; AM, amastigotes.

^a K_i value (μM).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα εργασία είχε ως στόχους, α) την κατασκευή διαγονιδιακών πρωτοζώων *Leishmania tarentolae* (που εκφράζουν ετερόλογα την κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη mCherry ή τον μεταφορέα νουκλεοβάσεων rSNBT1 συζευγμένο με την κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη mRFP1) και β) τον έλεγχο λειτουργικότητας των ανασυνδυασμένων αυτών πρωτεϊνών στους συγκεκριμένους διαγονιδιακούς πληθυσμούς των πρωτοζώων με μικροσκοπία φθορισμού και βιοχημικές μεθόδους.

Και οι δύο στόχοι επιτεύχθηκαν. Δημιουργήθηκαν μοριακά (πλασμίδια) και κυτταρικά (πληθυσμοί διαγονιδιακών πρωτοζώων *L. tarentolae*) εργαλεία που θα χρησιμοποιηθούν σε περαιτέρω σημαντικές μελέτες του εργαστηρίου στα συγκεκριμένα θέματα. Επιπλέον, υιοθετήθηκαν νέα πρωτόκολλα και βελτιώθηκαν ήδη υπάρχοντα σύμφωνα με τις ανάγκες και τις δυσκολίες των πειραμάτων όπως αυτά για α) επιλογή των διαγονιδιακών πληθυσμών των πρωτοζώων με σταδιακή αύξηση του αντιβιοτικού στο θρεπτικό υλικό και β) χρήση της κλασματοποίησης των μεμβρανικών πρωτεϊνών των πρωτοζώων με τα απορρυπαντικά διγλιτονίνη και TritonX-100 έτσι ώστε να απομονωθεί πρωτεϊνικό κλάσμα εμπλουτισμένο σε μεμβρανικές πρωτεΐνες της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Αυτό επέτρεψε την ανίχνευση με Western Blot του μεμβρανικού μεταφορέα rSNBT1-mRFP1 που εκφράζεται σε χαμηλά σχετικά επίπεδα στο σύνολο των πρωτεϊνών του πρωτοζώου. Επίσης συσσωρεύτηκε σημαντική γνώση σχετικά με την ανάλυση των μεμβρανικών πρωτεϊνών με την τεχνική του Western Blot.

Τα κυτταρικά και μοριακά εργαλεία που κατασκευάστηκαν στη μελέτη αυτή είναι σημαντικά για την συνέχιση και δημιουργία νέων μελετών στο εργαστήριο ενδοκυττάριου παρασιτισμού. Το πλασμίδιο pLexsy-sat-mcherry θα χρησιμοποιηθεί για κατασκευή άλλων πλασμιδίων υπερέκφρασης Λεϊσμανιακών πρωτεϊνών σε κύτταρα *Leishmania* για μελέτη του εντοπισμού και λειτουργίας τους. Επίσης τα διαγονιδιακά πρωτόζωα *L. tarentolae*-mCherry θα χρησιμοποιηθούν για τον έλεγχο αντιλεϊσμανιακών φαρμάκων [88]. Η σειρά *L. tarentolae*-rSNBT1-mRFP1 θα χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω μελέτη της λειτουργίας του rSNBT1 ως μεταφορέα νουκλεοβάσεων, π.χ. εξειδίκευση υποστρώματος με τη δοκιμή και άλλων νουκλεοβάσεων και αναλόγων τους, την ευαισθησία του rSNBT1 στην εξωκυττάρια συγκέντρωση ιόντων όπως $KaCl$, $ChCl$ και Μανιτόλης, καθώς και για μόρια αναστολείς, όπως αυτά που δοκιμάστηκαν στην πρώτη δημοσιευμένη αναφορά για τον rSNBT1, από την ερευνητική ομάδα του Yamamoto [31]. Επίσης, τα κύτταρα αυτά θα χρησιμοποιηθούν για βιοχημικές μελέτες ανίχνευσης τυχόν μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων του rSNBT1-mRFP1 (π.χ. γλυκοζυλίωσης) που θα μπορούσαν να επηρεάζουν τη λειτουργία του. Σε σχέση

με το τελευταίο, το φαινόμενο μοριακό βάρος του ανασυνδιασμένου μεταφορέα rSNBT1-mRFP1 που ανιχνεύσαμε στη μελέτη αυτή ήταν ~95 KDa ενώ το αναμενόμενο 91.8 KDa. Ίσως αυτή η διαφορά να οφείλεται σε μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις.

Σημαντικό στάδιο για την συνέχιση των πειραμάτων εξειδίκευσης υποστρώματος είναι η εύρεση τρόπου απενεργοποίησης των ενδογενών μεταφορέων νουκλεοσιδίων / νουκλεοβάσεων ώστε να έχουμε πιο ξεκάθαρα αποτελέσματα πρόσληψης νουκλεοβάσεων από τα διαγονιδιακά πρωτόζωα που εκφράζουν τον χμιαρικό μεταφορέα rSNBT1-mRFP1 σε σχέση με αυτά του αγρίου τύπου [44, 84-86].

Συνοπτικά, η εργασία μας αποτελεί την πρώτη αναφορά στη βιβλιογραφία για ετερόλογη έκφραση λειτουργικής διαμεμβρανικής πρωτεΐνης με πολλές διαμεμβρανικές περιοχές (14 TMs) στον οργανισμό *L. tarentolae* [13, 14, 89]. Σημειωτέον είναι ότι η έκφραση αυτή έγινε χωρίς προσθήκη στην αλληλουχία του rSNBT1 σηματοδοτικών αλληλουχιών μεμβρανικής μετακίνησης ειδικών για τις Τρυπανοσωματίδες [90, 91]. Αυτό υποδεικνύει ότι ο οργανισμός *L. tarentolae* αναγνωρίζει τις σηματοδοτικές αλληλουχίες μεταφοράς στην κυτταροπλασματική μεμβράνη από πρωτεΐνες θηλαστικών οργανισμών. Η πληροφορία αυτή δημιουργεί τη βάση για χρήση του συστήματος *L. tarentolae* σε περαιτέρω προσπάθειες έκφρασης και άλλων μεμβρανικών πρωτεϊνών από ανώτερα ευκαρυωτικά που είναι δύσκολο να εκφραστούν σε άλλα κυτταρικά συστήματα έκφρασης πρωτεϊνών με βιοτεχνολογικές εφαρμογές.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ-ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους

EDTA	Αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ
SDS	Δωδεκακυλοθειικό νάτριο
Tris-HCl	Τρις-υδρολαξυμινομεθάνιο
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
Kb	Χίλια ζεύγη βάσεων
bp	Ζεύγη βάσεων
BSA	Αλβουμίνη βοδινού ορού
BGG	γ-σφαιρίνη βοδινού ορού
IgG	γ-ανοσοσφαιρίνη
LB	Θρεπτικό μέσο Luria-Bertani
IPTG	Ισοπροπυλο-β-D-1-θειογαλακτοπυρανόζη
NTA	N,N-δικαρβοξυ-μεθυλο-γλυκίνη
mRFP1	Μονομερής κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη
mCherry	Κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη της οικογένειας φρούτων
rSNBT1	Πρωτεΐνη-Μεταφορέας νουκλεοβάσεων
dNTP	Τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια
HRP	Υπεροξειδάση horseradish
anti-rabbit	Αντίσωμα έναντι ορού κουνελιού
anti-mouse	Αντίσωμα έναντι ορού ποντικού
<i>mrfp1</i>	Γονίδιο της Μονομερούς κόκκινης φθορίζουσας πρωτεΐνης
<i>mcherry</i>	Γονίδιο της κόκκινης φθορίζουσας πρωτεΐνης mCherry
<i>rsnbt1</i>	Γονίδιο του μεταφορέα νουκλεοβάσεων rSNBT1
pLexsy-sat- <i>mcherry</i>	Πλασμιδιακός φορέας που φέρει το γονίδιο της mCherry ειδικός για έκφραση σε κύτταρα <i>Leishmania</i>
pLexsy-sat- <i>rsnbt1-mrfp1</i>	Πλασμιδιακός φορέας που φέρει το γονίδιο του μεταφορέα rSNBT1 και της πρωτεΐνης mRFP1 ειδικός για έκφραση στη <i>Leishmania</i>

Συντμήσεις αμινοξέων και ανάπτυξή τους

A, Ala	αλανίνη	M, Met	μεθειονίνη
C, Cys	κυστεΐνη	N, Asn	ασπαραγίνη
D, Asp	ασπαραγινικό οξύ	Q, Gln	γλουταμίνη
E, Glu	γλουταμινικό οξύ	R, Arg	αργινίνη
F, Phe	φαινυλαλανίνη	S, Ser	σερίνη
G, Gly	γλυκίνη	T, Thr	θρεονίνη
H, His	ιστιδίνη	V, Val	βαλίνη
I, Ile	ισολευκίνη	W, Trp	τροπτοφάνη
K, Lys	λυσίνη	Y, Tyr	τυροσίνη
L, Leu	λευκίνη	P, Pro	προλίνη

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Κοτίνη, Μ.Π., *Κατασκευή και χαρακτηρισμός διαγονιδιακών παρασίτων Leishmania donovani που εκφράζουν την κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη mRFP1*, in *Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Μικροβιολογίας*. 2009, ΕΚΠΑ: Αθήνα.
2. Thomaz-Soccol, V., et al., *Phylogenetic taxonomy of New World Leishmania*. *Ann Parasitol Hum Comp*, 1993. **68**(2): p. 104-6.
3. Milon, G., *Perpetuation of Leishmania: some novel insight into elegant developmental programs*. *Vet Res*, 2009. **40**(2): p. 38.
4. Hervas Rodriguez, J., et al., *Leishmania infection of canine skin fibroblasts in vivo*. *Vet Pathol*, 1996. **33**(4): p. 469-73.
5. Chang, K.P. and D.M. Dwyer, *Multiplication of a human parasite (Leishmania donovani) in phagolysosomes of hamster macrophages in vitro*. *Science*, 1976. **193**(4254): p. 678-80.
6. 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.
7. Zollner, N., *Purine and pyrimidine metabolism*. *Proc Nutr Soc*, 1982. **41**(3): p. 329-42.
8. Besteiro, S., et al., *Protein turnover and differentiation in Leishmania*. *Int J Parasitol*, 2007. **37**(10): p. 1063-75.
9. Solbach, W. and T. Laskay, *The host response to Leishmania infection*. *Adv Immunol*, 2000. **74**: p. 275-317.
10. Herwaldt, B.L., *Leishmaniasis*. *Lancet*, 1999. **354**(9185): p. 1191-9.
11. Raymond, F., et al., *Genome sequencing of the lizard parasite Leishmania tarentolae reveals loss of genes associated to the intracellular stage of human pathogenic species*. *Nucleic Acids Res*, 2012. **40**(3): p. 1131-47.
12. Breitling, R., et al., *Non-pathogenic trypanosomatid protozoa as a platform for protein research and production*. *Protein Expr Purif*, 2002. **25**(2): p. 209-18.
13. Basile, G. and M. Peticca, *Recombinant protein expression in Leishmania tarentolae*. *Mol Biotechnol*, 2009. **43**(3): p. 273-8.
14. Phan, H.P., M. Sugino, and T. Niimi, *The production of recombinant human laminin-332 in a Leishmania tarentolae expression system*. *Protein Expr Purif*, 2009. **68**(1): p. 79-84.
15. He, Y., K. Wang, and N. Yan, *The recombinant expression systems for structure determination of eukaryotic membrane proteins*. *Protein Cell*, 2014. **5**(9): p. 658-72.
16. Shimomura, O., F.H. Johnson, and Y. Saiga, *Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea*. *J Cell Comp Physiol*, 1962. **59**: p. 223-39.
17. Shimomura, O., *The discovery of aequorin and green fluorescent protein*. *J Microsc*, 2005. **217**(Pt 1): p. 1-15.
18. Shrestha, S. and S.K. Deo, *Anthozoa red fluorescent protein in biosensing*. *Anal Bioanal Chem*, 2006. **386**(3): p. 515-24.
19. Chudakov, D.M., et al., *Fluorescent Proteins and Their Applications in Imaging Living Cells and Tissues*. *Physiological Reviews*, 2010. **90**(3): p. 1103-1163.
20. Razansky, D., et al., *Multispectral opto-acoustic tomography of deep-seated fluorescent proteins in vivo*. *Nature Photonics*, 2009. **3**(7): p. 412-417.
21. Shcherbo, D., et al., *Bright far-red fluorescent protein for whole-body imaging*. *Nat Methods*, 2007. **4**(9): p. 741-6.
22. Yang, M., et al., *A Transgenic Red Fluorescent Protein-Expressing Nude Mouse for Color-Coded Imaging of the Tumor Microenvironment*. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2009. **106**(2): p. 279-284.

23. Wu, J., et al., *FRAP analysis: accounting for bleaching during image capture*. PLoS One, 2012. **7**(8): p. e42854.
24. Morisaki, T. and J.G. McNally, *Photoswitching-free FRAP analysis with a genetically encoded fluorescent tag*. PLoS One, 2014. **9**(9): p. e107730.
25. Wustner, D., et al., *Quantitative fluorescence loss in photobleaching for analysis of protein transport and aggregation*. BMC Bioinformatics, 2012. **13**: p. 296.
26. Sun, Y., et al., *FRET microscopy in 2010: the legacy of Theodor Forster on the 100th anniversary of his birth*. Chemphyschem, 2011. **12**(3): p. 462-74.
27. Zhao, M., R. Huang, and L. Peng, *Quantitative multi-color FRET measurements by Fourier lifetime excitation-emission matrix spectroscopy*. Opt Express, 2012. **20**(24): p. 26806-27.
28. Shaner, N.C., et al., *Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein*. Nat Biotechnol, 2004. **22**(12): p. 1567-72.
29. Yang, F., L.G. Moss, and G.N. Phillips, Jr., *The molecular structure of green fluorescent protein*. Nat Biotechnol, 1996. **14**(10): p. 1246-51.
30. Burnstock, G., *Purine and pyrimidine receptors*. Cell Mol Life Sci, 2007. **64**(12): p. 1471-83.
31. Yamamoto, S., et al., *Identification and functional characterization of the first nucleobase transporter in mammals: implication in the species difference in the intestinal absorption mechanism of nucleobases and their analogs between higher primates and other mammals*. J Biol Chem, 2010. **285**(9): p. 6522-31.
32. Plagemann, P.G., R.M. Wohlhueter, and C. Woffendin, *Nucleoside and nucleobase transport in animal cells*. Biochim Biophys Acta, 1988. **947**(3): p. 405-43.
33. de Koning, H. and G. Diallinas, *Nucleobase transporters (review)*. Mol Membr Biol, 2000. **17**(2): p. 75-94.
34. Andersen, P.S., et al., *Uracil uptake in *Escherichia coli* K-12: isolation of *uraA* mutants and cloning of the gene*. J Bacteriol, 1995. **177**(8): p. 2008-13.
35. Diallinas, G. and C. Scazzocchio, *A gene coding for the uric acid-xanthine permease of *Aspergillus nidulans*: inactivational cloning, characterization, and sequence of a cis-acting mutation*. Genetics, 1989. **122**(2): p. 341-50.
36. Gorfinkiel, L., G. Diallinas, and C. Scazzocchio, *Sequence and regulation of the *uapA* gene encoding a uric acid-xanthine permease in the fungus *Aspergillus nidulans**. J Biol Chem, 1993. **268**(31): p. 23376-81.
37. Cecchetto, G., et al., *The *AzgA* purine transporter of *Aspergillus nidulans*. Characterization of a protein belonging to a new phylogenetic cluster*. J Biol Chem, 2004. **279**(5): p. 3132-41.
38. Ortiz, D., et al., *Molecular genetic analysis of purine nucleobase transport in *Leishmania major**. Mol Microbiol, 2007. **64**(5): p. 1228-43.
39. Diallinas, G. and C. Gournas, *Structure-function relationships in the nucleobase-ascorbate transporter (NAT) family: lessons from model microbial genetic systems*. Channels (Austin), 2008. **2**(5): p. 363-72.
40. Tsukaguchi, H., et al., *A family of mammalian Na⁺-dependent L-ascorbic acid transporters*. Nature, 1999. **399**(6731): p. 70-5.
41. Savini, I., et al., *SVCT1 and SVCT2: key proteins for vitamin C uptake*. Amino Acids, 2008. **34**(3): p. 347-55.
42. Goudela, S., et al., *Characterization and kinetics of the major purine transporters in *Aspergillus fumigatus**. Fungal Genet Biol, 2008. **45**(4): p. 459-72.
43. Mansfield, T.A., N.P. Schultes, and G.S. Mourad, *AtAzg1 and AtAzg2 comprise a novel family of purine transporters in *Arabidopsis**. FEBS Lett, 2009. **583**(2): p. 481-6.
44. de Koning, H.P., D.J. Bridges, and R.J. Burchmore, *Purine and pyrimidine transport in pathogenic protozoa: from biology to therapy*. FEMS Microbiol Rev, 2005. **29**(5): p. 987-1020.

45. Hyde, R.J., et al., *The ENT family of eukaryote nucleoside and nucleobase transporters: recent advances in the investigation of structure/function relationships and the identification of novel isoforms*. Mol Membr Biol, 2001. **18**(1): p. 53-63.
46. Landfear, S.M., et al., *Nucleoside and nucleobase transporters in parasitic protozoa*. Eukaryot Cell, 2004. **3**(2): p. 245-54.
47. Bakhiya, A., et al., *Human organic anion transporter 3 (hOAT3) can operate as an exchanger and mediate secretory urate flux*. Cell Physiol Biochem, 2003. **13**(5): p. 249-56.
48. Leal-Pinto, E., et al., *Molecular cloning and functional reconstitution of a urate transporter/channel*. J Biol Chem, 1997. **272**(1): p. 617-25.
49. Vitart, V., et al., *SLC2A9 is a newly identified urate transporter influencing serum urate concentration, urate excretion and gout*. Nat Genet, 2008. **40**(4): p. 437-42.
50. Doring, A., et al., *SLC2A9 influences uric acid concentrations with pronounced sex-specific effects*. Nat Genet, 2008. **40**(4): p. 430-6.
51. Gournas, C., I. Papageorgiou, and G. Diallinas, *The nucleobase-ascorbate transporter (NAT) family: genomics, evolution, structure-function relationships and physiological role*. Mol Biosyst, 2008. **4**(5): p. 404-16.
52. Elion, G.B., *The purine path to chemotherapy*. Science, 1989. **244**(4900): p. 41-7.
53. Kraupp, M. and R. Marz, *Membrane transport of nucleobases: interaction with inhibitors*. Gen Pharmacol, 1995. **26**(6): p. 1185-90.
54. Panneels, V. and I. Sinning, *Membrane protein expression in the eyes of transgenic flies*. Methods Mol Biol, 2010. **601**: p. 135-47.
55. Lu, H., C. Chen, and C. Klaassen, *Tissue distribution of concentrative and equilibrative nucleoside transporters in male and female rats and mice*. Drug Metab Dispos, 2004. **32**(12): p. 1455-61.
56. Molina-Arcas, M., et al., *Physiological and pharmacological roles of nucleoside transporter proteins*. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 2008. **27**(6): p. 769-78.
57. King, A.E., et al., *Nucleoside transporters: from scavengers to novel therapeutic targets*. Trends Pharmacol Sci, 2006. **27**(8): p. 416-25.
58. Pastor-Anglada, M., et al., *Cell entry and export of nucleoside analogues*. Virus Research, 2005. **107**(2): p. 151-164.
59. Takanaga, H., B. Mackenzie, and M.A. Hediger, *Sodium-dependent ascorbic acid transporter family SLC23*. Pflugers Arch, 2004. **447**(5): p. 677-82.
60. Guimaraes, M.J., et al., *A new approach to the study of haematopoietic development in the yolk sac and embryoid bodies*. Development, 1995. **121**(10): p. 3335-46.
61. Faaland, C.A., et al., *Molecular characterization of two novel transporters from human and mouse kidney and from LLC-PK1 cells reveals a novel conserved family that is homologous to bacterial and Aspergillus nucleobase transporters*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1442**(2-3): p. 353-60.
62. Papakostas, K., M. Botou, and S. Frilingos, *Functional identification of the hypoxanthine/guanine transporters YjcD and YgfQ and the adenine transporters PurP and YicO of Escherichia coli K-12*. J Biol Chem, 2013. **288**(52): p. 36827-40.
63. Lu, F., et al., *Structure and mechanism of the uracil transporter UraA*. Nature, 2011. **472**(7342): p. 243-6.
64. Kryptou, E., et al., *Modelling, substrate docking and mutational analysis identify residues essential for function and specificity of the major fungal purine transporter AzgA*. Mol Microbiol, 2014. **93**(1): p. 129-45.
65. Guan, L. and H.R. Kaback, *Properties of a LacY Efflux Mutant*. Biochemistry, 2009. **48**(39): p. 9250-9255.
66. Alguel, Y., et al., *Crystal structure of MexZ, a key repressor responsible for antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Structural Biology, 2010. **172**(3): p. 305-310.

67. Leung, J., et al., *Expression and purification of a functional uric acid-xanthine transporter (UapA)*. Protein Expr Purif, 2010. **72**(1): p. 139-46.
68. Midgett, C.R. and D.R. Madden, *Breaking the bottleneck: Eukaryotic membrane protein expression for high-resolution structural studies*. Journal of Structural Biology, 2007. **160**(3): p. 265-274.
69. Madden, D.R., et al., *PHYS 231-Glutamate receptor structure and function*. Abstracts of Papers of the American Chemical Society, 2007. **234**.
70. Madeo, M., et al., *Abundant expression and purification of biologically active mitochondrial citrate carrier in baculovirus-infected insect cells*. Journal of Bioenergetics and Biomembranes, 2009. **41**(3): p. 289-297.
71. Krishnamurthy, H. and E. Gouaux, *X-ray structures of LeuT in substrate-free outward-open and apo inward-open states*. Nature, 2012. **481**(7382): p. 469-74.
72. Faham, S., et al., *The crystal structure of a sodium galactose transporter reveals mechanistic insights into Na⁺/sugar symport*. Science, 2008. **321**(5890): p. 810-4.
73. Pantazopoulou, A. and G. Diallinas, *Fungal nucleobase transporters*. FEMS Microbiol Rev, 2007. **31**(6): p. 657-75.
74. Jensen, K., *A Simple Method for Protein Electrophoresis in Polyacrylamide Gel*. Scand J Clin Lab Invest, 1965. **17**: p. 192-4.
75. Burnette, W.N., *"Western Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A*. Analytical Biochemistry, 1981. **112**(2): p. 195-203.
76. Fritsche, C., et al., *Characterization of the growth behavior of Leishmania tarentolae: a new expression system for recombinant proteins*. J Basic Microbiol, 2007. **47**(5): p. 384-93.
77. Foucher, A.L., B. Papadopoulou, and M. Ouellette, *Prefractionation by digitonin extraction increases representation of the cytosolic and intracellular proteome of Leishmania infantum*. J Proteome Res, 2006. **5**(7): p. 1741-50.
78. Bangs, J.D., et al., *A soluble secretory reporter system in Trypanosoma brucei. Studies on endoplasmic reticulum targeting*. J Biol Chem, 1996. **271**(31): p. 18387-93.
79. Κοτίνη, Μ.Π., *Κατασκευή και χαρακτηρισμός διαγονιδιακών παρασίτων Leishmania donovani που εκφράζουν την κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη mRFPI 2009*, Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Μικροβιολογίας, ΕΚΠΑ: Αθήνα.
80. Shakarian, A.M., et al., *Molecular dissection of the functional domains of a unique, tartrate-resistant, surface membrane acid phosphatase in the primitive human pathogen Leishmania donovani*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(20): p. 17994-18001.
81. Papadaki, A., et al., *The Leishmania donovani histidine acid ecto-phosphatase LdMAcP: insight into its structure and function*. submitted, 2014.
82. Beverley, S.M. and C.E. Clayton, *Transfection of Leishmania and Trypanosoma brucei by electroporation*. Methods Mol Biol, 1993. **21**: p. 333-48.
83. Landfear, S.M. and M. Ignatushchenko, *The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids*. Mol Biochem Parasitol, 2001. **115**(1): p. 1-17.
84. Papageorgiou, I.G., et al., *Identification of the first pyrimidine nucleobase transporter in Leishmania: similarities with the Trypanosoma brucei U1 transporter and antileishmanial activity of uracil analogues*. Parasitology, 2005. **130**: p. 275-283.
85. Carter, N.S., et al., *Adaptive responses to purine starvation in Leishmania donovani*. Mol Microbiol, 2010. **78**(1): p. 92-107.
86. Al-Salabi, M.I., L.J. Wallace, and H.P. De Koning, *A Leishmania major nucleobase transporter responsible for allopurinol uptake is a functional homolog of the Trypanosoma brucei H2 transporter*. Mol Pharmacol, 2003. **63**(4): p. 814-20.

87. Sanchez, M.A., et al., *A novel purine nucleoside transporter whose expression is up-regulated in the short stumpy form of the Trypanosoma brucei life cycle*. Mol Biochem Parasitol, 2004. **136**(2): p. 265-72.
88. Taylor, V.M., et al., *Leishmania tarentolae: utility as an in vitro model for screening of antileishmanial agents*. Exp Parasitol, 2010. **126**(4): p. 471-5.
89. Pion, C., et al., *Characterization and immunogenicity in mice of recombinant influenza haemagglutinins produced in Leishmania tarentolae*. Vaccine, 2014. **32**(43): p. 5570-6.
90. Qiao, X., et al., *Sorting signals required for trafficking of the cysteine-rich acidic repetitive transmembrane protein in Trypanosoma brucei*. Eukaryot Cell, 2006. **5**(8): p. 1229-42.
91. Clayton, C., T. Hausler, and J. Blattner, *Protein trafficking in kinetoplastid protozoa*. Microbiol Rev, 1995. **59**(3): p. 325-44.

4 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

4.1 Κλωνοποίηση του γονιδίου *rsnbt1* στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pLexsy-sat *mrfp1*

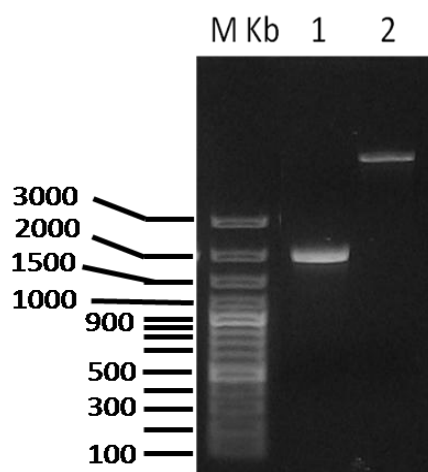
Η κλωνοποίηση του γονιδίου *rsnbt1* στο πλασμίδιο έκφρασης pLexsy-sat-*mrfp1* [52] πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο του καθ. Ευστάθιου Φριλλίγγου.

Οι εκκινητές της αντίδρασης PCR (Πίνακας 3.2) που χρησιμοποιήθηκαν έχουν την αλληλουχία που αναγνωρίζει το ένζυμο περιορισμού BglIII στο 5' άκρο τους έτσι ώστε το προϊόν PCR με το γονίδιο *rsnbt1* να μπορεί να εισαχθεί στο πλασμίδιο pLexsy-sat-*mrfp1* στη θέση BglIII και σε συνεχόμενο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης με το γονίδιο *mrfp1*.

Πίνακας 4.1. Εκκινητές PCR για τον rSNBT1

Πλασμιδιακοί φορείς έκφρασης	Εκκινητές	Αλληλουχία	Αριθμός βάσεων	Tm
pLexsy-sat-mRFP1	<i>rsnbt1</i> -πρόσθιος	5'GCTAGCAGATCTCCATGAACTCTGCAGTCTGC 3'	32	64.3
	<i>rsnbt1</i> -ανάστροφος	5'CGCAGCAGATCTCATCTTGGTCTCTGTAACACTCC 3'	35	64.6

Στην Εικόνα 3.3 παρουσιάζεται το προϊόν της αντίδρασης PCR για το *rsnbt1*, μετά από πέψη με το ένζυμο περιορισμού BglIII καθώς και το πλασμίδιο pLexsy-sat-*mrfp1* μετά από πέψη με το ίδιο ένζυμο. Το μέγεθος του προϊόντος της PCR (1) συμφωνεί με το αναμενόμενο μέγεθος 1845 bp του *rsnbt1* γονιδίου.



Εικόνα 4.1. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v των προϊόντων πέψης του προϊόντος PCR *rsnbt1* και του pLexsy-sat-*mrfp1* με το ένζυμο περιορισμού BglIII. 1) Ένθεμα (*rsnbt1*) 1845bp, 2) πλασμίδιο (pLexsy-sat-*mrfp1*) ~8000 bp, M) μάρτυρας μοριακών μεγεθών.

Η αλληλουχία που κωδικοποιεί την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη rSNBT1-mRFP1 από το πλασμίδιο έκφρασης pLexsy-sat-rsnbt1-mrfp1 αριθμεί σε σύνολο 2532 ζεύγη βάσεων και είναι η εξής:

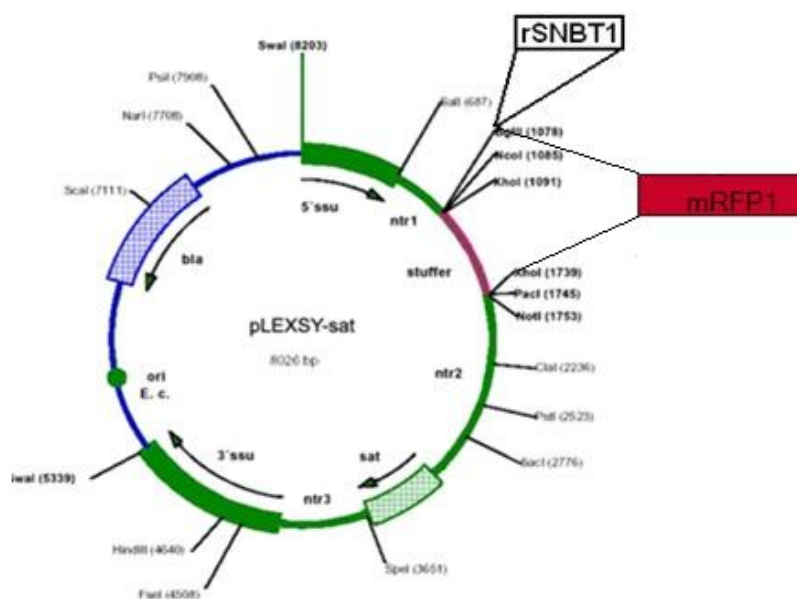
AGATCTATGAACTCTGCAGTCTGCAGCTTGGAGTCCCCAACAGCAGGAGGGGTGATGGTGGCCTTAGCTCCCAC
ACTGAAGACCAGGGGAAGACAAAGGACAGACAGCAGAAGGACTTCAGCAGCAGTACCTGGCCTATGGCATCCTG
GACCGCCCACCATGGTACCTCTGCATCTTCTGGGGATCCAGCACTTCTCACAGCCCTGGGCGCCTCGTGGCC
GTGCCGCTCATCCTGGCCAAGGACCTGTGCCTGCAGCATGACCCCTGACCCAAAGCTACCTCATCAGCACCATT
TTCTTTGTCTCAGGCATCTGCACCCTCTTGCAAGTGCTTTTAGGGGTGAGGCTGCCCATTTCTTCAAGGAGGGACC
TTCGCCTTCGTGGCTCCCTCTCTGGCCATGCTCTCTTCTTCTGCCTGGAAATGCCCAGAGTGGACTCTCAATGCC
AGCCTGGTGAACACCAGCTCTCCTGAATTCACCGAGGAGTGGCAGAAGAGGATCCGAGAGTTGCAGGGCGCTGTC
ATGGTGGCTTCTGCATCCAGATGCTGGTGGGTTTCTCGGGCCTCATCGGCTACCTCATGCGTTTCATTGGCCCC
TTGACCATCGCTCCAACCATTTCCCTCGTGGCCCTGCCTCTCTTCGATTCTGCTAGCAATGATGCCGGGACCCAC
TGGGGGATTTCTGCCCTGACCATCTTCTCATCGTGCTCTTTTCTCAGTACCTCAAAAACGTCATGGTTCTCTGTG
CCTGTTTATGGAGGAGGGAAGAGGTGTCACATCTCCAAGTTCAACCTGTTTCAGGTCTTCCCTGTGCTGCTAGCT
CTGTGCCTCTCGTGGCTCTTTTGTCTCGTGCTCACTGTACCAACACCTTCCCCGAGTCCCCACGGCCTATGGA
TACATGGCCCGCACAGACACCAAAGGCAGCGTTCTGAGCCAGGCCCCCTGGTTCCGCTTCCCTTACCCAGGACAG
TGGGGCCTCCCCACCATCAGCCTGGCTGGAGTCTTCGGAATCATCGCTGGAGTGATCTCCTCCATGGTAGAGTCT
GTGGGTGATTATCACGCCTGCGCTCGGCTGGTTGGGGCCCCGCCCTCCGAAGCACGCCATCAACCGTGGCATT
GGCATCGAGGGCCTCGGCTGCCTGCTGGCAGGGGCTGGGGAACCGGAAACGGTACCACGTCTACAGCGAGAAC
GTCGGTGCCTGGGCATCACCAGGGTGGGAGCAGGATGGTGATTGTGCTGCGGGCTGTGTGCTGCTCCTGATG
GGCATGTTCCGGAAGATCGGGGCGGCTTTTGGCCACCATCCCTACCCCGTGATTGGAGGCATGTTCTTGTGTCATG
TTCGGAATCATCAGCGCCGTGGGGATCTCCAACCTGCAGTATGTGGACATGAATTCATCTAGGAACCTCTTCGTG
TTTGGCTTCTCAATCTTCTGTGGGCTCGCCGTCCCTAACTGGGTGAACAAGAACCCTGAGAAGCTGCAGACAGGA
ATTCTCCAGCTGGACCAGGTTCATCCAAGTGCTCCTGACCACAGGCATGTTTCGTTGGTGGATTCTGGGCTTCGTC
TTGGACAACACCATACTGGCAGCCTGGAGGAGAGAGGCCCTTTTGGCATGGGGTGAATTCAGGAAGATTCTGAG
GAGACTCCGAAGGCCTCAAAGGTCTATGGCCTTCCCTGGGGGATTGGCACCAAGTTCTGCACATCCTCATGTACC
CGAATCCTCCCTTCTGGCCAGGATAGACCACCATGGAGATGAGGTGGGAGCGAGCCAGCTCACTCTATGTTCC
CAGACCTCCTCTGGAAAGCACCCATGGAGTGTACAGAAACCAAGATG**AGATCT**atggcctcctccgaggacgtc
atcaaggagttcatgctctcaaggtgctgatggagggctcctgtaacggccaagagttcgagatcgagggcgag
ggcgagggcgccccctacgagggcaccagaccgccaagctgaaggtgaccaagggcgccccctgcccttcgccc
tgggacatcctgtccccctcagttccagtaaggctccaaggcctacgtgaagcaccgcccgcacatccccgactac
ttgaagctgtccttccccgagggcttcaagtgaggagcgcgtgatgaaacttcgaggacggcgggcgtggtgaccgtg
accaggactcctccctgcaggacggcgagttcaatctacaaggtgaagctgctggcggcaccacttccccctccgac
ggccccgtaatgcagaagaagaccatgggctgggagggcctccaccgagcggatgtaccccgaggacggcgcccctg
aagggcgagatcaagatgaggctgaagctgaaggacggcgggcactacgacgcccaggtcaagaccacctacatg
gccaagaagcccgtgcagctgccccggcctacaagaaccgacatcaagctggacatcaacctcccacaacgaggac
tacaccatcgtggaacagtaagagcgcgcgagggcggcactccaccggcgcctaa**gaattcgaagcttga**
CTCGAG

Με κόκκινο παρουσιάζεται η αλληλουχία που κωδικοποιεί την mRFP1.

4.2 Ενσωμάτωση του γονιδίου *rsnbt1* στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης και pLexsy-sat

pLexsy-sat-*rsnbt1*-*mrfp1*

Η εισαγωγή του γονιδίου *rsnbt1* στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pLexsy-sat-*mrfp1* (Εικόνα 3.8B). Το γονίδιο *rsnbt1* εισήχθη στις θέσεις περιορισμού BglII/BglIII πριν από το 5' άκρο της mRFP1 με τη βοήθεια λιγάσης (βλ. παράγραφο 2.2.8) (Εικόνες 3.11, 3.12).



Εικόνα 4.2.Χάρτης του πλασμιδίου pLexsy-sat-*rsnbt1*-*mrfp1*

Η προβλεπόμενη αλληλουχία της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης rSNBT1-mRFP1 είναι :

```

M N S A V C S L E S P N S R R G D G A L S S H T E D Q G K T K D R Q
Q K D F S S S H L A Y G I L D R P P W Y L C I F L G I Q H F L T A L
G G L V A V P L I L A K D L C L Q H D P L T Q S Y L I S T I F F V S
G I C T L L Q V L L G V R L P I L Q G G T F A F V A P S L A V A S C
I Q M L V G F S G L I G Y L R F I G P L T I A P T I S L V A L P L F
D S A S N D A G T H W G I S A L T I F L I V L F S Q Y L K N V M V P
V P V Y G G G K R C H I S K F N L F Q V F P V L L A L C L S W L F C
F V L T V T N T F P E S P T A Y G Y M A R T D T K G S V L S Q A P W
F R F P Y P G Q W G L P T I S L A G V F G I I A G V I S S M V E S V
G D Y H A C A R L V G A P P P P K H A I N R G I G I E G L G C L L A
G A W G T G N G T T S Y S E N V G A L G I T R V G S R M V I V A A G
C V L L L M G M F G K I G A A F A T I P T P V I G G M F L V M F G I
I S A V G I S N L Q Y V D M N S S R N L F V F G F S I F C G L A V P
N W V N K N P E K L Q T G I L Q L D Q V I Q V L L T T G M F V G G F
L G F V L D N T I P G S L E E R G L L A W G E I Q E D S E E T P K A
S K V Y G L P W G I G T K F C T S S C T R I L P F W P R I D H H G D
E V G A S Q L T L C S Q T S S G K H P W S V T E T K M R S M A S S E
D V I K E F M R F K V R M E G S V N G H E F E I E G E G E G R P Y E
G T Q T A K L K V T K G G P L P F A W D I L S P Q F Q Y G S K A Y V
K H P A D I P D Y L K L S F P E G F K W E R V M N F E D G G V V T V
T Q D S S L Q D G E F I Y K V K L R G T N F P S D G P V M Q K K T M
G W E A S T E R M Y P E D G A L K G E I K M R L K L K D G G H Y D A

```

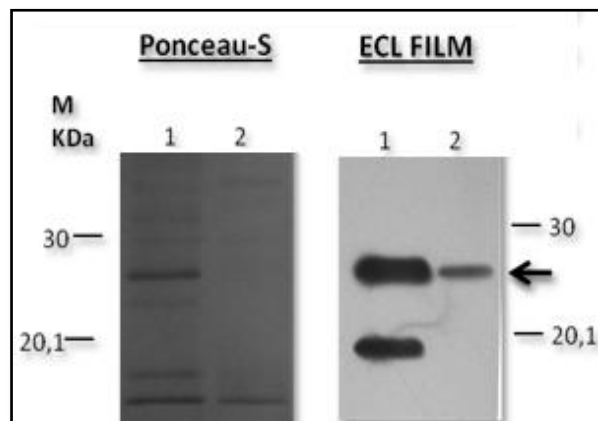
E V K T T Y A K K P V Q L P G A Y K T D I K L D I T S H N E D Y T I
V E Q Y E R A E G R H S T G A

με 850 αμινοξέα, θεωρητικό μοριακό βάρος **91823.17** και ισοηλεκτρικό σημείο 6.61. Με κόκκινο παρουσιάζεται η αλληλουχία της mRFP1.

4.3 Έκφραση και απομόνωση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης mCherry-8His από κύτταρα *E. coli*

Αρχικά η πρωτεΐνη mCherry-8His εκφράστηκε σε κύτταρα *E. coli*, στελέχους BL21 (βλ. παράγραφο 2.4.1). Η έκφραση δοκιμάστηκε σε συνθήκες επαγωγής με προσθήκη μορίου-επαγωγέα (IPTG) και χωρίς προσθήκη επαγωγέα (Εικόνα 3.23).

Έγινε έλεγχος της διαλυτότητας της πρωτεΐνης, δηλαδή προσδιορίστηκε το ποσοστό της πρωτεΐνης που βρίσκεται στο διαλυτό κλάσμα του βακτηριακού ομογενοποιημάτος μετά τη λύση των κυττάρων και το ποσοστό που παραμένει στο ίζημα μετά από φυγοκέντρηση του βακτηριακού ομογενοποιημάτος (14000×g, σωματίδια εγκλεισμού (inclusion bodies)). Για να πραγματοποιηθεί ο έλεγχος, αρχικά έγινε αναδιάλυση των κυττάρων σε διάλυμα λύσης, ακολούθησε διαδοχική ψύξη/απόψυξη του κυτταρικού εναιωρήματος σε υγρό άζωτο/υδρόλουτρο (37° C) και τέλος έγινε υπερήχηση, όπως αναφέρεται στην παράγραφο 2.4.2. Περισσότερο από το 75% της ποσότητας της πρωτεΐνης mCherry-8His ανιχνεύθηκε στο διαλυτό κλάσμα (Εικόνα 3.24). Η μεγαλύτερη ποσότητα της πρωτεΐνης, με την αναμενόμενη μοριακή μάζα της mCherry-8His (~28 KDa), ανακτάται στο υπερκείμενο του πρωτεϊνικού ομογενοποιημάτος (Εικόνα 3.24, διαδρομή 1, βέλος). Σε όλες τις εικόνες η πρωτεΐνη mCherry-8His ανιχνεύεται στα ~28 KDa, όπως αναμένεται από την υπολογιζόμενη μοριακή της μάζα (28,061 KDa). Επιπλέον, παρατηρήσαμε ότι ανιχνεύεται από το αντίσωμα και μια ζώνη χαμηλότερου μοριακής μάζας (~20 KDa). Πιθανότατα η πρωτεΐνη υπόκειται σε πρωτεόλυση κατά τη σύνθεσή της στα βακτήρια ή κατά την λύση των βακτηριακών κυττάρων.



Εικόνα 4.3. Προσδιορισμός του ποσοστού του διαλυτού κλάσματος της mCherry-8His σε βακτηριακό ομογενοποίημα *E. coli* BL21 μετά από επώαση των βακτηρίων με IPTG (0,5mM, 3 ώρες, 37 °C). Ολικό

ομογενοποίηση *E.coli* υποβλήθηκε σε φυγοκέντρηση (14000×g, 30 λεπτά) και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε ίσο όγκο διαλύματος λύσης. Ίσοι όγκοι του διαλυτού υπερκειμένου και του ιζήματος αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου 12% w/v και έγινε μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης που ακολουθήθηκε από χρώση με Ponceau-S (αριστερή εικόνα). Στη συνέχεια η μεμβράνη επώαστηκε με αντι-His αντίσωμα (mouse monoclonal 1:1500 (stock 1mg/ml)) και δεύτερο αντίσωμα συζευγμένο με HRP (Μέθοδοι 2.5). Η εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών έγινε μετά από εμφάνιση με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας με αντιδραστήριο ECL και εμφάνιση με φωτοευαίσθητο φιλμ (Kodak). Διαδρομή **1**: υπερκείμενο μετά από φυγοκέντρηση του ολικού ομογενοποιήματος; Διαδρομή **2**: ίζημα μετά τη φυγοκέντρηση (14000×g, 30 λεπτά). Μ) Μοριακοί μάρτυρες (kDa). Το βέλος υποδεικνύει την ζώνη της mCherry.