



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ–ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ

*Μελέτη της αντιγονικότητας μορίων
του παρασίτου *Leishmania infantum*
και διαφορική γονιδιωματική
έκφραση των κυτταρικών
υποπληθυσμών του ξενιστή*

ΕΛΙΣΑΒΕΤ ΤΣΙΦΤΣΑΚΗ, ΒΙΟΛΟΓΟΣ
ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΑΘΗΝΑ 2015





ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑΣ-ΕΛΛΗΝΙΚΟ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΠΑΣΤΕΡ

*Μελέτη της αντιγονικότητας μορίων
του παρασίτου *Leishmania infantum*
και διαφορεική γονιδιωματική
έκφραση των κυτταρικών
υποπληθυσμών του ξενιστή*

ΕΛΙΣΑΒΕΤ ΤΣΙΦΤΣΑΚΗ, ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΕΣ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΕΣ: ΓΑΪΤΑΝΑΚΗ
ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
Ε.Κ.Π.Α, ΚΑΡΑΓΚΟΥΝΗ ΕΥΔΟΚΙΑ ΕΡΥΝΗΤΡΙΑ Ά Ε.Ι.Π

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ: ΓΑΪΤΑΝΑΚΗ
ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ, ΚΑΡΑΓΚΟΥΝΗ ΕΥΔΟΚΙΑ, ΣΚΟΡΙΛΑΣ
ΑΝΔΡΕΑΣ

Περιεχόμενα

Πίνακας Συντμήσεων.....	
I. Πρόλογος.....	i
II. Περίληψη.....	iv
II Abstract	vi
1. Εισαγωγή	1
1.1 Ταξινόμηση του παρασίτου.....	1
1.2.1 Μορφολογία του παρασίτου	4
1.2.2 Μόρια επιφάνειας του παρασίτου	7
1.3 Βιολογικός κύκλος και μετάδοση του παρασίτου.....	8
1.4 Κλινικές μορφές του νοσήματος.....	11
1.4.1 Δερματική λεισμανίαση.....	12
1.4.2 Βλεννογονοδερματική λεισμανίαση.....	13
1.4.3 Σπλαγχνική λεισμανίαση	13
1.4.4 Μετά-Καλά-αζάρ δερματική λεισμανίαση (PKDL).....	14
1.5 Επιδημιολογία του νοσήματος	15
1.6 Διάγνωση της λεισμανίασης	17
1.7 Θεραπεία του νοσήματος	18
1.8 Εμβόλια κατά της <i>Leishmania</i>	19
1.9 Η ανοσολογική απόκριση στη μόλυνση με <i>Leishmania</i>	21
1.9.1 Τα κύτταρα στόχοι του παρασίτου	22
1.9.1.1 Αλληλεπίδραση του παρασίτου με τα μακροφάγα.....	23
1.9.1.2 Αλληλεπίδραση του παρασίτου με τα δενδριτικά κύτταρα.....	24
1.10 Τα δενδριτικά κύτταρα.....	26
1.10.1 Τύποι δενδριτικών κυττάρων	26
1.10.2 Ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων.....	27

1.10.3 Δενδριτικά κύτταρα και υποδοχείς τύπου Toll.....	28
1.10.4.1 Μονοπάτια αντιγονοπαρουσίασης των δενδριτικών κυττάρων	30
1.10.4.2 Διασταυρούμενη αντιγονοπαρουσίαση	32
1.10.5 Αλληλεπίδραση των δενδριτικών κυττάρων με τα T λεμφοκύτταρα.....	33
1.10.6 Διάκριση των διαφοροποιούμενων από CD4+ κύτταρα υποπληθυσμών T	35
1.10.7 Τα δενδριτικά κύτταρα ως εργαλεία για την παραγωγή εμβολίων ενάντια στη <i>Leishmania-ex vivo</i> δοκιμασίες με τη χρήση δενδριτικών	38
1.11 Πειραματικά μοντέλα για τη μελέτη της λεισμανίασης.....	41
1.12 Η πρωτεΐνη elongation factor 2 (παράγοντας επιμήκυνσης 2) της <i>Leishmania infantum</i>	42
2 Σκοπός της μελέτης	45
3. Υλικά και Μέθοδοι	46
3.1 Υλικά.....	46
3.2 Παρασκευή του αμινοτελικού τμήματος της πρωτεΐνης EF2-1 με τη χρήση ετερόλογου συστήματος έκφρασης.....	46
3.2.1 Καλλιέργεια βακτηρίων <i>E.coli</i> BL21(DE3) pLysS με ακόλουθη επαγωγή έκφρασης του <i>LdeEF-2</i> (1-357 α.α)	48
3.2.2 Απομόνωση και καθαρισμός του πρωτεϊνικού προϊόντος <i>LdeEF-2</i> (1-357 α.α).....	50
3.2.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου (Sodium Dodecyl Sulphate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE)	52
3.2.4 Υπολογισμός της συγκέντρωσης του <i>LdeEF-2</i> στα κλάσματα	54
3.2.5 Προσδιορισμός επιπέδων ενδοτοξινών στα πρωτεϊνικά κλάσματα	55
3.3.1 Αξιοποίηση πειραματόζων	55
3.3.2 Κυτταροκαλλιέργειες	56
3.4 Απομόνωση και καλλιέργεια αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων από μυελό των οστών αρσενικών BALB/c ποντικών και κατευθυνόμενη διαφοροποίηση αυτών προς δενδριτικά κύτταρα.....	56

3.5 Αξιοποίηση των δενδριτικών κυττάρων	58
3.6 Ανάλυση με Κυτταρομετρία Ροής (Fluorescence Activated Cell Sorting-FACS analysis).....	59
3.7 Δοκιμασία <i>in vitro</i> αντιγονοπαρουσίασης- Ag-presentation Assay.....	63
3.8 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου με αντίστροφη μεταγραφή (real time RT-PCR, Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction)	65
3.8.1 Απομόνωση ολικού RNA	68
3.8.2 Κατασκευή τράπεζας cDNA	69
3.9.3 Επιλογή ανοσολογικών γονιδίων και των εκκινητών τους	69
3.9.4 qRT-PCRs.....	69
3.10 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων.....	70
4. Αποτελέσματα.....	71
4.1 Ανίχνευση και προσδιορισμός της συγκέντρωσης του πρωτεϊνικού προϊόντος <i>LdeEF-2</i>	71
4.1.1 Υπολογισμός της συγκέντρωσης του πρωτεϊνικού προϊόντος <i>LdeEF-2</i> (1-357 α.α).....	72
4.2 Ταυτοποίηση των μυελοειδών δενδριτικών κυττάρων (BM-DCs).....	74
4.3 Αξιολόγηση της δράσης του <i>LdeEF-2</i> στην ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων	76
4.4 Αξιολόγηση της δράσης του <i>LdeEF-2</i> στη λειτουργική διαφοροποίηση των δενδριτικών κυττάρων.....	79
4.5 Μελέτη της αντιγονικότητας του <i>LdeEF-2</i> με τη δοκιμασία <i>in vitro</i> αντιγονοπαρουσίασης-Ag-presentation Assay.....	84
4.6.1 Ποσοτικοποίηση RNA με τη χρήση φασματοφωτομετρίας (Nanodrop).....	87
4.6.2 Ταυτοποίηση του λεμφοκυτταρικού πληθυσμού	87
5. Συζήτηση.....	89
5.1 Αξιοποίηση των πρωτεϊνικών κλασμάτων του <i>LdeEF-2</i> στον έλεγχο της αντιγονικότητάς του	89
5.2 Αξιοποίηση των μυελογενούς προέλευσης δενδριτικών κυττάρων.....	90

5.3 Επίδραση του <i>LdeEF-2</i> στην ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων	91
5.4 Επίδραση του <i>LdeEF-2</i> στη λειτουργική διαφοροποίηση των δενδριτικών κυττάρων	93
5.5 Η λειτουργική διαφοροποίηση των δενδριτικών κυττάρων επάγει λεμφοκυτταρικό πολλαπλασιασμό.....	95
5.6 Τ λεμφοκυτταρικοί υποπληθυσμοί που επάγονται έπειτα από επίδραση με <i>LdeEF-2</i>	98
6.Συμπεράσματα	101
7. Βιβλιογραφία	103
8. Παραρτήματα.....	115

Πίνακας Συντμήσεων

Σύντμηση	Αγγλικός όρος	Ελληνικός όρος
Ag	Antigen	Αντιγόνο
Amp	Ampicillin	Αμπικιλίνη
APCs	Antigen-Presenting Cells,	Αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα
ATP	Adenosine triphosphate	Τριφωσφορική αδενοσίνη
BCG	Bacillus Calmette-Guerin	Εμβόλιο των Bilié Calmette και Guérin
BM-DCs	Bone Marrow Derived Dendritic Cells	Μυελογενούς προέλευσης δενδριτικά κύτταρα
C3	Complement 3	Παράγοντας του συμπληρώματος 3
C3b	Complement protein 3b	Παράγοντας συμπληρώματος 3b
CCL21	Chemokine (C-C motif) ligand 21	Χημειοκίνη-προσδέτης με μοτίβο C-C 21
CCR7	C-C chemokine receptor type 7	C-C υποδοχέας χημειοκίνης τύπου 7
CD 4, 8, 11c, 28, 40, 54, 83, 86, 209	Cluster of Differentiation 4, 8, 11c, 28, 40, 83, 86, 209	Σύμπλεγμα διαφοροποίησης 4, 8, 11c, 28, 40, 54, 83, 89, 209
CD40L	CD40 ligand	Προσδέτης του CD40
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic Acid	Συμπληρωματικό Δεοξυριβονουκλεϊκό Οξύ
CL	Cutaneous Leishmaniasis	Δερματική λεισμανίαση
CLIP	Class II-associated invariant chain peptide	Πεπτίδιο της αμετάβλητης αλυσίδας σχετιζόμενο με μόρια τάξης II
c-Maf	V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog	Μυοαπονευρωτικό ομόλογο ογκογονίδιο του ινοσαρκώματος V-maf
Con A	Concanavalin A	Κονκαναβαλίνη A
CR1	Complement Receptor 1	Υποδοχέας του παράγοντα συμπληρώματος 1
CR2	Complement Receptor 2	Υποδοχέας του παράγοντα συμπληρώματος 2
CR3	Complement Receptor 3	Υποδοχέας παράγοντα συμπληρώματος 3
CREB	CREB-binding protein	Πρωτεΐνη προσδέτης του CREB
CTLs	Cytotoxic T Lymphocytes	Κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα
CXCL-10	C-X-C motif chemokine 10	Χημειοκίνη 10 μοτίβου C-X-C
DAT	Direct Agglutination Test	Δοκιμασία άμεσης συγκόλλησης
DCL	Diffuse Cutaneous Leishmaniasis	Διάχυτη δερματική λεισμανίαση
DCs	Dendritic Cells	Δενδριτικά κύτταρα

DC-SIGN	Dendritic Cell Specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3) grabbing nonintergrin	Υποδοχέας C-τύπου λεκτίνης 3 των δενδριτικών κυττάρων
EF-2	Elongation factor 2	Παράγοντας επιμήκυνσης 2
EL-1B	Elongation 1B protein	Πρωτεΐνη επιμήκυνσης 1B
EL-1α	Elongation 1α protein	Πρωτεΐνη επιμήκυνσης 1α
EL-4a	Elongation protein 4a	Πρωτεΐνη επιμήκυνσης 4a
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay	Ενζυμικά συζευγμένη δοκιμασία ανοσοπροσρόφησης
FACS analysis	Fluorescence Activated Cell Sorting analysis	Ανάλυση με Κυτταρομετρία Ροής
FcγR	Fcγ Receptor	Υποδοχέας του σταθερού τμήματος των γ σφαιρινών
FcγR I	Fcγ Receptor I	Υποδοχέας του σταθερού τμήματος των γ σφαιρινών 1
FcγR II	Fcγ Receptor II	Υποδοχέας του σταθερού τμήματος των γ σφαιρινών 2
FcγR III	Fcγ Receptor III	Υποδοχέας του σταθερού τμήματος των γ σφαιρινών 3
FITC	Fluorescein isothiocyanate	Ισοθειοκυανική φλουοροσκεΐνη
FnR	Fibronectin Receptor	Υποδοχέας της ινωδοδεκτίνης
Foxp3	Forkhead box P3	Μεταγραφικός παράγοντας FoxP3
FSC	Forward-scattered light	Πρόσθια σκεδαζόμενο φως
GAPDH gene	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Αφυδρογονάση της 3 φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης
GATA-3	Trans-acting T-cell-specific transcription factor GATA-3	Τρανς-Ενεργός ειδικός για τα T κύτταρα μεταγραφικός παράγοντας GATA3
GM-CSF	Granulocyte/macrophage stimulating colony factor	Παράγοντας διέγερσης αποικιών των κοκκιοκυττάρων/μακροφάγων
gp63	Glycoprotein 63	Γλυκοπρωτεΐνη 63
GTP	Guanosine triphosphate	Τριφωσφορική γουανοσίνη
HSP70	Heat Shock Protein 70	Πρωτεΐνη θερμικού σοκ 70
IFAT	Indirect Fluorescent Antibody	Έμμεσος ανοσοφθορισμός
IFNα	Interferon α	Ιντερφερόνη α
IgG	Immunoglobulin G	Ανοσοσφαιρίνη γ
Ii	Invariant chain i	Αμετάβλητη αλυσίδα Ii

IL-1	Interleukin 1	Ιντερλευκίνη 1
IL-10	Interleukin 10	Ιντερλευκίνη 10
IL-12p70 (IL-12)	Interleukin 12p70	Ιντερλευκίνη 12p70 (ιντερλευκίνη 12)
IL-12R	Interleukin 12 Receptor	Υποδοχέας της ιντερλευκίνης 12
IL-13	Interleukin 13	Ιντερλευκίνη 13
IL-17	Interleukin 17	Ιντερλευκίνη 17
IL-18	Interleukin 18	Ιντερλευκίνη 18
IL-1R	Interleukin 1 receptor	Υποδοχέας ιντερλευκίνης 1
IL-2	Interleukin 2	Ιντερλευκίνη 2
IL-22	Interleukin 22	Ιντερλευκίνη 22
IL-23	Interleukin 23	Ιντερλευκίνη 23
IL-2R	Interleukin Receptor 2	Υποδοχέας ιντερλευκίνης 2
IL-4	Interleukin 4	Ιντερλευκίνη 4
IL-5	Interleukin 5	Ιντερλευκίνη 5
IL-6	Interleukin 6	Ιντερλευκίνη 6
IMAC	Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography	Χρωματογραφίας συγγένειας σε στήλη με φορτισμένα ιόντα
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside	β-ισοπρόπυλο-D-θειογαλακτοζίδιο
iTreg	Inducible T regulatory	Επαγόμενα T ρυθμιστικά κύτταρα
kDNA	kinetoplastid Deoxyribonucleic Acid	Κινητοπλαστικό δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
KMP-11	Kinetoplastid Membrane Protein-11	Κινητοπλαστική μεμβρανική πρωτεΐνη 11
LACK	<i>Leishmania</i> homolog of receptors for activated C-kinase	Υποδοχέας της ενεργού κινάσης C της <i>Leishmania</i>
LB	Luria Bertani	Θρεπτικό υλικό Luria Bertani
LCL	Local Cutaneous Leishmaniasis	Εντοπισμένη δερματική λείσμανίαση
LCs	Langerhans Cells	Κύτταρα του Langerhans
LdeEF-2	<i>Leishmania donovani</i> element Elongation Factor 2	Στοιχείο του παράγοντα επιμήκυνσης 2 της <i>Leishmania donovani</i>
LMP10	Proteasome subunits LMP10	Υπομονάδα πρωτεασώματος LMP10
LMP2	Proteasome subunits LMP2	Υπομονάδα πρωτεασώματος LMP2
LMP7	Proteasome subunits LMP7	Υπομονάδα πρωτεασώματος LMP7
LMW	Low molecular weight	Χαμηλή μοριακή μάζα

LPG	lipophosphoglycan,	Λιποφωσφογλυκάνη
LPS	Lipopolysaccharide	λιποπολυσακχαρίτης
MCL	Mucocutaneous Leishmaniasis	Βλενογονοδερματική λείσμανίαση
medRNA	Miniexon-derived Ribonucleic Acid	Μικρού μήκους εξώνια προερχόμενα από ριβονουκλεϊκό οξύ
MFI	Mean Fluorescence Index	Δείκτης μέσου φθορισμού
MFI	Mean Fluorescence Index	Μέσος δείκτης φθορισμού
MHC I	Major Histocompatibility Complex I	Μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας I
MHC II	Major Histocompatibility Complex II	Μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας II
MIP-1β	Macrophage Inflammatory Protein 1-beta	Προφλεγμονώδης πρωτεΐνη των μακροφάγων 1-βήτα
MR	Mannose Receptor	Υποδοχέας της μαννόζης-φουκόζης
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid	Μήνυμα Ριβονουκλεϊκό Οξύ
MyD88	Myeloid Differentiation Primary Response 88	Πρωτεΐνη μυελοειδούς διαφοροποίησης πρωτογενούς απόκρισης 88
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells	Πυρηνικός παράγοντας των ενεργοποιημένων T κυττάρων
NFκB	Nuclear factor-kappaB	Πρωτεϊνικός πυρηνικός παράγοντας κάπα Β
NK	Natural Killers cells	Φυσικά φονικά κύτταρα
nTreg	Natural T regulatory	Φυσικά T ρυθμιστικά κύτταρα
O.D.	Optical Density	Οπτική πυκνότητα
ODN CpG	Oligo Dinucleotide Cytocine Gouanine	Ολιγοδινουκλεοτίδιο κυτοσίνης γουανίνης
PALS	Periartariolar lymphatic seath	Περιαρτηριακό λεμφικό στρώμα
PAMPS	Pathogen Associated Molecular Patterns	Συντηρημένες μοριακές δομές παθογόνων μικροοργανισμών
PBS	Phosphate-buffered saline	Ρυθμιστικό διάλυμα φωφορικών αλάτων
PCR	Polymerase Chaine Reaction	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
PE	Phycoerythrin	Φυκοερυθρίνη
PKDL	Post Kalaazar Dermal Leishmaniasis	Μετά Καλά-αζάρ δερματική λείσμανίαση
PLGA	Poly(lactic-co-glycolic acid)	Πολυμερές λακτικού-γλυκολικού οξέος
PPGs	Proteophosphoglycans	Πρωτεοφωσφογλυκάνες
PRRs	Pattern Recognition Receptors	Υποδοχείς αναγνώρισης δομικού προτύπου
PSA	Promastigite Surface Antigen	Επιφανειακό αντιγόνο των προμαστιγωτών
pTriex 1.1	Plasmid Triex 1.1	Πλασμίδιο Triex 1.1

qPCR	Quantitive Polymerase Chain Reaction	Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
real time RT-PCR	Real timeReverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου με αντίστροφη μεταγραφή
rK39	Recombinant Antigen K 39	Ανασυνδυασμένο αντιγόνο rK39
rLdEL-2	Recombinant <i>L. donovani</i> Elongation Factor 2	Ανασυνδυασμένος παράγοντας επιμήκυνσης 2 της <i>L. donovani</i>
rLdHSP70	Recombinant <i>L. donovani</i> Heat Shock Protein 70	Ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη θερμικού σοκ70 της <i>L. donovani</i>
rLdPDI	Recombinant <i>L. donovani</i> Protein Disulfode Isomerase	Ανασυνδυασμένη δισουλφιδική πρωτεϊνική ισομερασή της <i>L. donovani</i>
rLdTPI	Recombinant <i>L. donovani</i> Triose Phosphate Isomerase	Ανασυνδυασμένη φωσφορική ισομεράση της τριόζης της <i>L. donovani</i>
rLelF-2	Recombinant Elongation Factor 2	Ανασυνδυασμένος παράγοντας επιμήκυνσης 2
rm	Recombinant mouse	Ανασυνδυασμένο προερχόμενο από ποντίκι
ROR γ T (Rorc)	RAR-related orphan receptor gamma	Σχετιζόμενος με RAR ορφανός υποδοχέας γ
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium	Θρεπτικό υλικό κυτταροκαλλιιεργειών λεμφικών κυττάρων RPMI
rRNA-genes	Ribonucleic Acid genes	Ριβοσωμικά γονίδια
Sb	Pentavalent antimony,	Πεντασθενές αντιμόνιο
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulphate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis	Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου
SSC	Side-scattered light	Πλάγια σκεδαζόμενο φως
STAT1	Signal Transducer and Activator of Transcription 1	Πρωτεϊνικός μεταγωγέας σήματος και ενεργοποιητής μεταγραφής 1
STAT4	Signal Transducer and Activator of Transcription 4	Πρωτεϊνικός μεταγωγέας σήματος και ενεργοποιητής μεταγραφής 4
STAT6.	Signal Transducer and Activator of Transcription 6	Πρωτεϊνικός μεταγωγέας σήματος και ενεργοποιητής μεταγραφής 6
T-bet (Tbx21)	T-box transcription factor	Μεταγραφικός παράγοντας T bet
TCR	T-cell Receptor	Υποδοχέας T λεμφοκυττάρων
TGF- β	Tumor Growth Factor β	Παράγοντας ανάπτυξης όγκων β

T _{H1}	T helper 1	T βοηθητικά κύτταρα/απόκριση τύπου 1
T _{H17}	T helper 17	T βοηθητικά κύτταρα τύπου 17
T _{H2}	T helper 2	T βοηθητικά κύτταρα/απόκριση τύπου 2
TLRs	Toll-like Receptors	Υποδοχείς τύπου Toll
TNF α	Tumor Nekrosis Factor α	Παράγοντας νέκρωσης όγκων α
T _{reg}	T regulatory	T ρυθμιστικά κύτταρα
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β	Πρωτεϊνικός προσαρμογέας με επικράτεια TIR που επάγει την ιντερφερόνη γ
VL	Visceral Leishmaniasis,	Σπλαγγική λεισμανίαση
WHO, Π.Ο.Υ	World Health Organization	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας
$\alpha.\alpha$	-	Αριθμός αμινοξέων
Δ cpm	Main difference between counts per minute	Διαφορά τιμών κρούσεων ανά λεπτό της ώρας
MLEE	Multilocus Enzyme Electrophoresis	Πολυεστιακή ισοενζυμική ηλεκτροφόρηση
NTA	nitrilotriacetic acid	Νιτριλοτρίακετικό οξύ

I. Πρόλογος

Η εκπόνηση μίας διπλωματικής εργασίας στο πλαίσιο ενός μεταπτυχιακού διπλώματος ειδίκευσης αποτελεί μία προσπάθεια με τέσσερις συνιστώσες: Διάθεση για γνώση, Καλοπροαίρετη Περιέργεια, Μεράκι και Υπομονή. Θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς όλους εκείνους που συνετέλεσαν από τη μία στην πραγματοποίησή της και από την άλλη στο να κερδίσω το στοίχημα με τον εαυτό μου.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στις επιβλέπουσες καθηγήτριές μου, στην κυρία Γαϊτανάκη Αικατερίνη και στην κυρία Καραγκούνη Ευδοκία για την πολύτιμη καθοδήγησή τους και την υπομονή τους τόσο στην πειραματική όσο και στη συγγραφική εκτέλεση της εργασίας. Στην κυρία Αγάλλου Μαρία, το ευχαριστώ είναι λίγο για τη συμβολή της τόσο στην πειραματική όσο και στη θεωρητική κατάρτισή μου, καθώς μου διέγειρε συνεχώς το ενδιαφέρον, ενώ η φράση της «Να είσαι πάντα ένα βήμα μπροστά!» με βοήθησε να διαμορφώσω ορθότερη στάση μέσα στο εργαστήριο αλλά και έξω από αυτό. Ευχαριστώ θερμά την κυρία Σμυρλή Δέσποινα που με μύησε στα μυστικά της μικροβιολογίας και της μοριακής βιολογίας. Στις κυρίες Αθανασίου Εβίτα, Κουτσώνη Όλγα, Ντότσικα Ελένη, Μαργαρώνη Μαρίτσα και Τουμπανάκη Δήμητρα αποδίδω τις αμέριστες ευχαριστίες μου για τη βοήθειά τους στο εργαστήριο, τη φιλική τους διάθεση και το χιούμορ τους.

Κλείνοντας, ευχαριστώ τους γονείς μου, Βαγγέλη και Λένα που μου στάθηκαν τόσο υλικά όσο και ηθικά σε όλες τις ευχάριστες αλλά και δύσκολες στιγμές, ευχαριστώ την αδερφή μου Κωνσταντίνα και το Μάριο που ήταν πάντα παρόντες με κάθε τρόπο.

Η παρούσα ερευνητική εργασία πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο του διατμηματικού μεταπτυχιακού προγράμματος ειδίκευσης με τίτλο: *Κλινική Βιοχημεία και Μοριακή Διαγνωστική* του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, ενώ η εκπόνησή της έλαβε χώρα στο Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ στο πλαίσιο του ερευνητικού προγράμματος με τίτλο: "Λοιμώδη και νευροεκφυλιστικά νοσήματα στον 21ο αιώνα: από τη μελέτη των βασικών μηχανισμών στην ανάπτυξη μεταφραστικής έρευνας και τεχνολογιών αιχμής με στόχο τη διάγνωση, την πρόληψη

και τη θεραπεία" της Δράσης Εθνικής Εμβέλειας Αναπτυξιακές προτάσεις
ερευνητικών φορέων-ΚΡΗΠΙΣ που χρηματοδοτείται από την Ευρωπαϊκή Ένωση
(ΕΤΠΑ) και εθνικούς πόρους, ΕΣΠΑ 2007-2013.



Στους γονείς μου

II. Περίληψη

Μολύνσεις που οφείλονται σε παράσιτα του γένους *Leishmania*, οδηγούν σε ένα σύνολο παθολογικών καταστάσεων που περιγράφονται με τον όρο λείσμανίαση. Ένας σημαντικός αριθμός ειδών του παρασίτου είναι παθογόνα για αρκετές κατηγορίες θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου, ενώ οι βασικές κλινικές μορφές του νοσήματος είναι η δερματική, η βλεννογονοδερματική και η σπλαγχνική, με την τελευταία να μπορεί να αποβεί θανατηφόρος. Τα είδη *L. infantum* και *L. donovani* ανήκουν στην κατηγορία εκείνων που προκαλούν τη σπλαγχνική μορφή του νοσήματος. Η γεωγραφική κατανομή της λείσμανίασης αφορά σε 98 ώρες παγκοσμίως ενώ 350 εκατομμύρια άνθρωποι εντοπίζονται σε περιοχές υψηλού κινδύνου, με 12 εκατομμύρια αυτών να είναι μολυσμένοι. Τα παράσιτα της *Leishmania* είναι μονοκύτταρης μορφής και περιλαμβάνουν διάφορα αναπτυξιακά στάδια και έναν κύκλο ζωής που διαμορφώνεται μεταξύ δύο ειδών ξενιστών, τη φλεβοτόμο σκνίπα και το θηλαστικό. Τα κύρια κύτταρα-στόχοι του παρασίτου στο θηλαστικό είναι τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα της πρώτης γραμμής άμυνας του ανοσοποιητικού συστήματος, ενώ η επιτυχής ανοσολογική απόκριση του ξενιστή βασίζεται σε κυτταρομεσολαβητικές αντιδράσεις που ενεργοποιούνται μέσω επίκτητων μηχανισμών, όπως η T_{H1} απόκριση. Μέχρι σήμερα, η θεραπεία του νοσήματος βασίζεται κυρίως σε χημειοθεραπευτικούς παράγοντες ενώ η παρασκευή ενός αποτελεσματικού και ασφαλούς εμβολίου αποτελεί επιτακτική ανάγκη με πολλές ερευνητικές προσπάθειες να στρέφονται προς αυτήν την κατεύθυνση.

Στην παρούσα ερευνητική εργασία, μελετήθηκε η αντιγονικότητα του αμινοτελικού τμήματος του μορίου elongation factor 2 (EF-2, *LdeEF-2*: 1-357 α.α) του παρασίτου *L. infantum* και η γονιδιωματική έκφραση των κυτταρικών υποπληθυσμών του ξενιστή, προκειμένου να διαπιστωθεί εάν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υποψήφιο μόριο για την ανάπτυξη εμβολίου, με τη χρήση δενδριτικών κυττάρων ως οχήματα μεταφοράς του αντιγόνου. Το σύνολο των μεθοδολογιών που αξιοποιήθηκαν περιλάμβανε την καλλιέργεια μετασχηματισμένων βακτηρίων που εξέφραζαν το προαναφερθέν μόριο, τη χρωματογραφία συγγένειας, την αξιοποίηση των ευαίσθητων ποντικών BALB/c ως πειραματόζωα, την καλλιέργεια ευκαρυωτικών κυττάρων, την κυτταρομετρία ροής, τη δοκιμασία της *in*

in vitro αντιγονοπαρουσίασης και την πραγματικού χρόνου ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με αντίστροφη μεταγραφή (qRT-PCR). Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν την αντιγονικότητα του μορίου, ωστόσο η ανοσολογική απόκριση των πειραματόζωων εμφανίστηκε ως μικτή T_{H1}/T_{H2} με την αναλογία να στρέφεται υπέρ της T_{H2} επίκτητης απόκρισης. Κατά συνέπεια διαπιστώθηκε ότι το συγκεκριμένο τμήμα του μορίου δεν ενδείκνυται ως προς την αξιοποίησή του ως εμβόλιο. Παρά ταύτα, η συγκεκριμένη ερευνητική προσπάθεια μπορεί να αποτελέσει εφαλτήριο για την περαιτέρω διερεύνηση των κατάλληλων αντιγονικών επιτόπων επί του συγκεκριμένου μορίου, οι οποίοι οδηγούν στην επιθυμητή ανοσολογική απόκριση, τόσο με την αξιοποίηση *in silico* όσο και με την αξιοποίηση *in vivo* και *in vitro* προσεγγίσεων, σε συνδυασμό με μελέτες που αφορούν σε άλλα μόρια του παρασίτου, έτσι ώστε να σχεδιαστεί το πλέον αποτελεσματικό εμβόλιο για την αντιμετώπιση του νοσήματος.

Η παρούσα ερευνητική εργασία πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο του διατμηματικού μεταπτυχιακού προγράμματος ειδίκευσης με τίτλο: *Κλινική Βιοχημεία και Μοριακή Διαγνωστική* του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, ενώ η εκπόνησή της έλαβε χώρα στο Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ στο πλαίσιο του ερευνητικού προγράμματος *KPHHΠΣ*.

II Abstract

Infections caused by parasites of the genus *Leishmania*, lead to a set of pathological conditions described by the term leishmaniasis. A number of species of this parasite can infect several classes of mammals, including humans and the main clinical forms of the disease are dermal, mucocutaneous and visceral, the latter can be fatal. The species *L. infantum* and *L. donovani* are categorized as those that cause the visceral form of the disease. The geographical distribution of leishmaniasis refers to 98 countries worldwide and 350 million people are located in high risk areas, with 12 million of them being infected. *Leishmania* parasites are of unicellular form and include various developmental stages while their life cycle is formed between two types of hosts, the phlebotomine sand fly and the mammal. The main target cells of the parasite in mammals are macrophages and dendritic cells that are included in the first line of defense of the immune system, while successful immunological host response is based on cell-mediated responses that are activated by mechanisms acquired as the T_{H1} response. To date, the treatment of the disease is mainly based on chemotherapeutic agents while preparing an effective and safe vaccine is imperative with many research efforts along these lines.

This research project studied antigenicity of the amino portion of the molecule elongation factor 2 (EF-2, *LdeEF-2*: 1-357 a.a) of the parasite *L. infantum* and the genomic expression of cell subsets of the host, to determine whether it can be used as a candidate molecule for the development of a vaccine with the use of dendritic cells as antigen delivery vehicles. All methodologies utilized included culturing transformed bacteria expressing said molecule, affinity chromatography, recovery of sensitive BALB / c mice as experimental animals, the eukaryotic cell culture, flow cytometry, the assay of the *in vitro* antigen presentation and the real time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR). The results confirmed the antigenicity of the molecule, but the immune response of test animals occurred as a mixed T_{H1} / T_{H2} with the ratio being directed to the acquired T_{H2} response. Therefore it was found that this part of the molecule is not appropriate in terms of utilization as a vaccine. However, this research effort can be a springboard for further exploration of appropriate antigenic epitopes on this molecule, which leads to the desired immune response, both by using *in silico* and by using *in vivo* and *in vitro* approaches, in

combination with studies of other molecules of the parasite, so to design the most effective vaccine to treat the disease.

This research work was part of the interdisciplinary postgraduate specialization program entitled: Clinical Biochemistry and Molecular Diagnostics at the National University of Athens, while its preparation took place in the laboratories of Hellenic Pasteur Institute supervised by the program KRIPIS.

1. Εισαγωγή

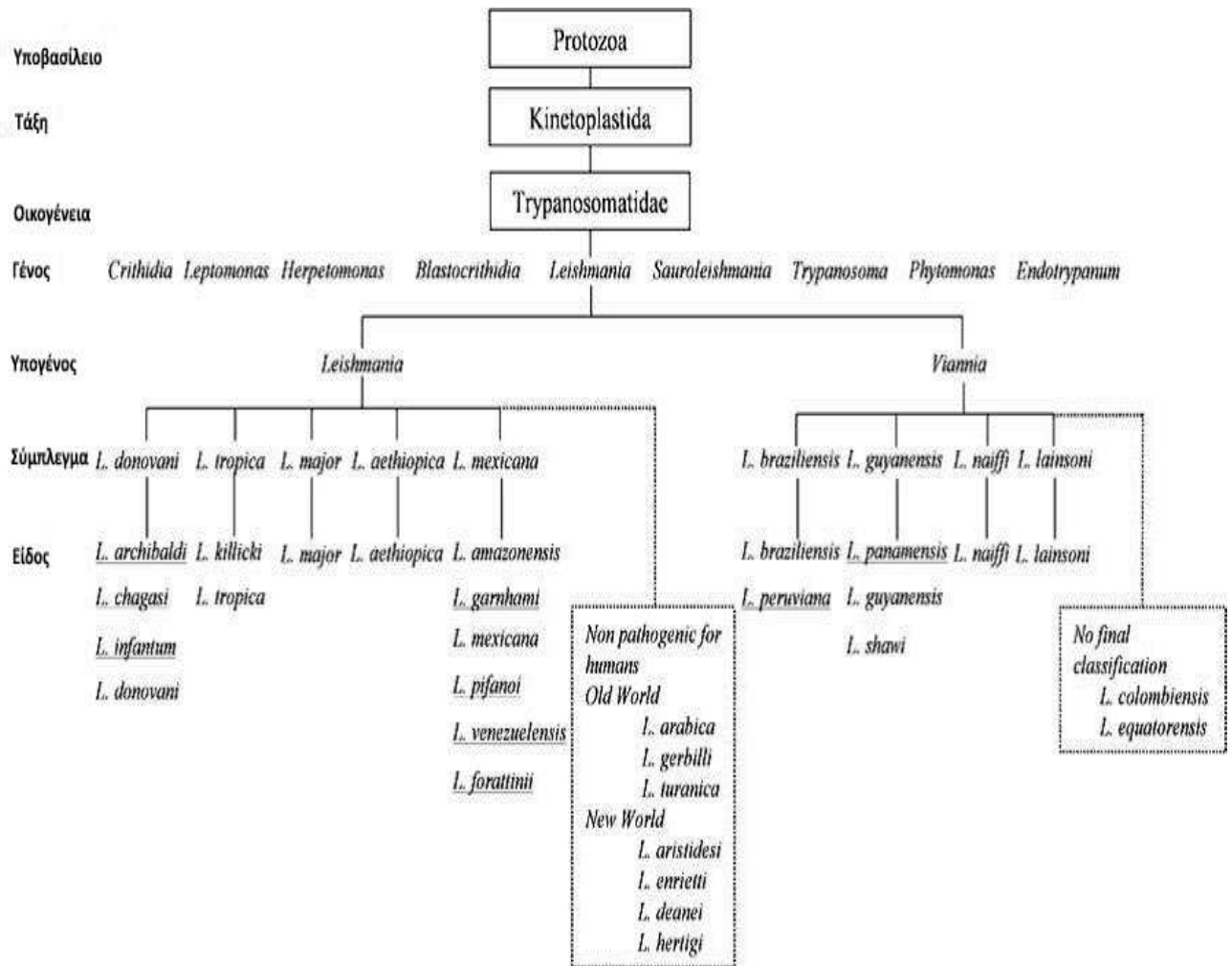
Ο όρος λείσμανίαση αναφέρεται στο σύνολο των παθολογικών καταστάσεων που οφείλονται σε μόλυνση από το πρωτόζωο του γένους *Leishmania* (Van Assche, Deschacht, da Luz, Maes, & Cos, 2011). Από ιστορική άποψη, διάφορες μορφές της λείσμανίασης του Παλαιού Κόσμου, περιγράφονται ήδη από τον 7^ο π.Χ. αιώνα, ωστόσο η ανακάλυψη του αιτιολογικού παράγοντα της σπλαγχνικής μορφής της νόσου, επετεύχθη από τον στρατιωτικό ιατρό William Leishman και τον καθηγητή φυσιολογίας του πανεπιστημίου του Madras, Charles Donovan, κατά τη δεκαετία του 1900. Ανεξάρτητα ο ένας από τον άλλο, τόσο ο W. Leishman όσο και ο C. Donovan, ανακάλυψαν το παθογόνο παράσιτο, σε σπλήνες ασθενών με Καλά-αζάρ. Ακολούθως, το 1921, οι αδερφοί Sergent, απέδειξαν πειραματικά τη μετάδοση του παρασίτου, μέσω της σκνίπας του γένους *Phlebotomus*, ορίζοντας κατά αυτόν τον τρόπο τον φορέα του μολυσματικού παράγοντα. Στο Νέο Κόσμο, η δερματική και η βλεννογονοδερματική μορφή της λείσμανίασης έχουν περιγραφεί ήδη από τον 5^ο μ.Χ. αιώνα και σε γραφές ισπανικών αποστολών του 16^{ου} μ.Χ. αιώνα. Αρχικά, πιστευόταν ότι η λείσμανίαση του Νέου Κόσμου και αυτή του Παλαιού οφείλονταν στο ίδιο είδος παρασίτου. Ωστόσο, το 1911 ο Gaspar Vianna ανακάλυψε ότι τα παράσιτα της Νότιας Αμερικής διέφεραν από αυτά της Αφρικής και της Ινδίας. Αργότερα, το 1922, ανακαλύφθηκε και ο διαφορετικός φορέας των παρασίτων του Νέου Κόσμου, ο οποίος ανήκει στο γένος *Lutzomyia* (Cox, 2002).

1.1 Ταξινόμηση του παρασίτου

Η αρχική ταξινόμηση του παρασίτου *Leishmania*, βασίστηκε σε οικοβιολογικά κριτήρια, όπως οι φορείς, η γεωγραφική κατανομή, ο τροπισμός, οι αντιγονικές ιδιότητες και οι κλινικές εκδηλώσεις (Banuls, Hide, & Prugnolle, 2007). Πλέον, τα διάφορα είδη του γένους *Leishmania*, ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες-υπογένη, *Leishmania*, *Viannia* και *Sauroleishmania*. Το υπογένος *Leishmania*, περιλαμβάνει είδη του Παλαιού Κόσμου, των οποίων ο δίπτερος φορέας ανήκει στο γένος *Phlebotomus* και είδη του Νέου Κόσμου με φορέα που ανήκει στο γένος *Lutzomyia*. Το υπογένος *Viannia* αφορά σε είδη του Νέου Κόσμου αποκλειστικά, ενώ το υπογένος *Sauroleishmania* σε είδη του Παλαιού Κόσμου με φορέα που υπάγεται στο γένος *Sergentomyia*. Τα υπογένη *Leishmania* και *Viannia* περιλαμβάνουν ένα σημαντικό αριθμό ειδών τα οποία είναι παθογόνα για αρκετές κατηγορίες

θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου. Αντίθετα, τα είδη του υπογένους *Sauroleishmania* δεν είναι παθογόνα για τον άνθρωπο (Bates, 2007).

Βιοχημικές και μοριακές αναλύσεις έχουν δείξει ότι τα παθολογικά και τα γεωγραφικά στοιχεία είναι συχνά ανεπαρκή, κατά συνέπεια η ταξινόμηση του παρασίτου βασίζεται σε άλλα κριτήρια όπως το πρότυπο των πολυμορφισμών που εμφανίζεται στο κινητοπλαστικό δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (kinetoplastid Deoxyribonucleic acid, kDNA), πρωτεΐνες ή αντιγόνα. Από το 1970, για τη διάκριση των ειδών του γένους *Leishmania* αξιοποιούνται εγγενή κριτήρια όπως ανοσολογικά, βιοχημικά και γενετικά δεδομένα. Η χρήση μοριακών τεχνικών οδήγησε στη δημοσίευση ενός ταξινομικού σχήματος από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization, WHO, Π.Ο.Υ). Ένα πρόσφατο σχήμα ταξινόμησης της *Leishmania*, παρουσιάζεται στην Εικ. 1.1, όπου με τη χρήση ανάλυσης ισοενζύμων, τα δύο υπογένη *Leishmania* και *Viannia* διαχωρίζονται. Νεότερες μέθοδοι ανίχνευσης, απομόνωσης και ταυτοποίησης του παρασίτου, είχαν ως αποτέλεσμα τη μαζική αύξηση του αριθμού των ειδών που περιγράφονται. Μέχρι σήμερα, είναι γνωστά περί τα 30 είδη και περίπου 20 είναι παθογόνα προς τον άνθρωπο (Banuls et al., 2007).



Εικόνα 1.1: Σχηματική αναπαράσταση της ταξινόμησης του παρασίτου *Leishmania*, τα υπογραμμισμένα είδη βρίσκονται υπό διερεύνηση. Το σχήμα βασίστηκε στο δημοσιευμένο σχήμα του Π.Ο.Υ το 1990, με βιβλιογραφικές προσθήκες (Banuls et al., 2007)

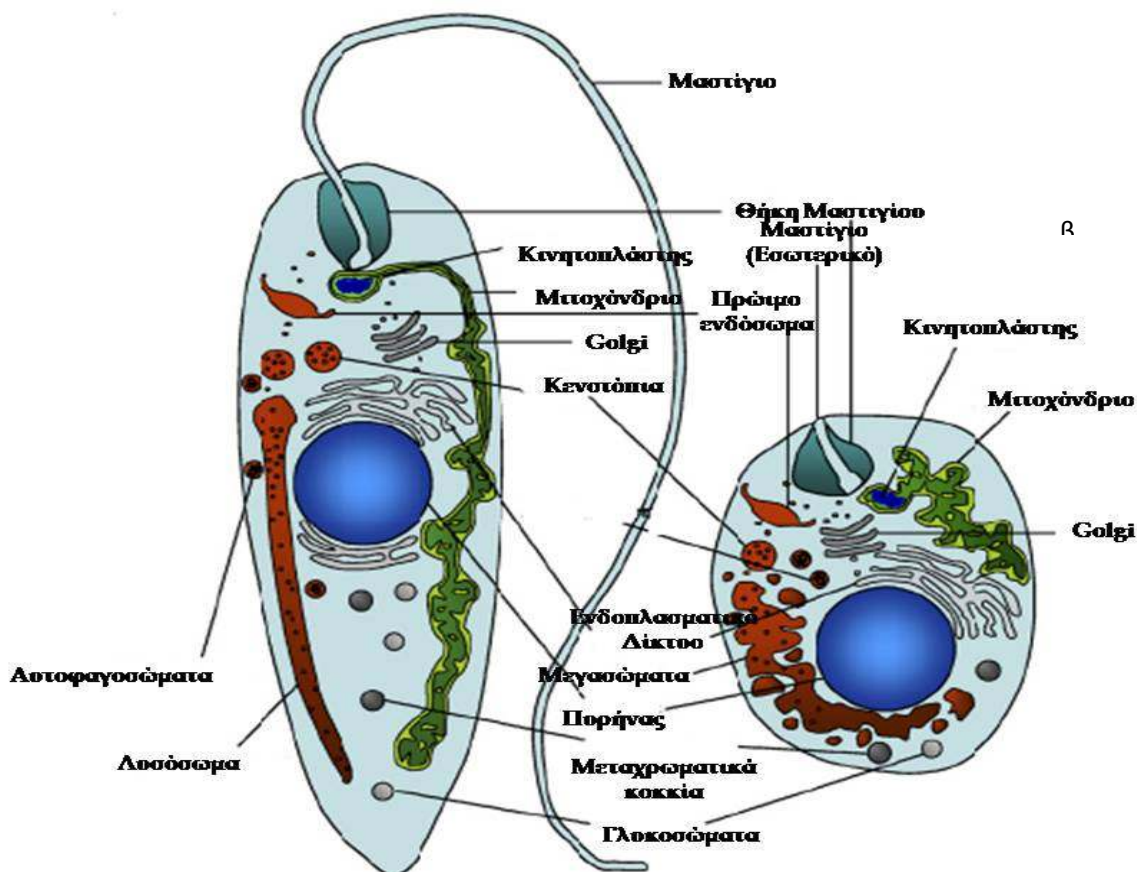
Για επιδημιολογικούς σκοπούς, η καθιερωμένη αλλά και χρησιμότερη τεχνική ταξινόμησης είναι η ισοενζυμική ανάλυση ή αλλιώς πολυεστιακή ισοενζυμική ηλεκτροφόρηση (Multilocus Enzyme Electrophoresis, MLEE). Με την τεχνική MLEE, ανιχνεύονται διαφορετικά αλληλόμορφα (housekeeping) γονιδίων που εκφράζονται με σταθερό ρυθμό, μέσω του διαφορετικού προτύπου μετανάστευσης των ενζύμων που κωδικοποιούν στο ηλεκτροφόρημα. Διαφορές στην κινητικότητα αντικατοπτρίζουν, συνήθως, διαφορές στο φορτίο (αμινοξική αλληλουχία) των πρωτεϊνών και κατ' επέκταση νουκλεοτιδικές διαφορές στα γονίδια που τις κωδικοποιούν. Κατά την ανάλυση δεδομένων που προκύπτουν από την εφαρμογή της MLEE, θεωρείται ότι κλάσματα που εμφανίζουν την ίδια κινητικότητα για ένα δεδομένο ένζυμο, περιέχουν το ίδιο αλληλόμορφο του υποκείμενου γονιδίου. Ένα ζυμόδεμα, περιλαμβάνει όλα τα υπό μελέτη παρασιτικά στελέχη τα οποία

εμφανίζουν, το ίδιο πρότυπο για όλα τα ενζυμικά συστήματα ("Control of the leishmaniasis," 2010; Evans, Lanham, Baldwin, & Peters, 1984; M. A. Miles, Povoas, de Souza, Lainson, & Shaw, 1980; Rioux et al., 1990).

1.2.1 Μορφολογία του παρασίτου

Το παράσιτο *Leishmania* υφίσταται σε δύο διακριτές μορφές:

- την προμαστιγωτή μορφή: πρόκειται για εξωκυττάρια, επιμήκη, κινητή μορφή που φέρει μαστίγιο με εύρος μεγέθους 2 μm x 2-20 μm (Εικ.1.2 α). Αυτή η μορφή εντοπίζεται στη φλεβοτόμο σκνίπα και σε *in vitro* καλλιέργειες.
- την αμαστιγωτή μορφή: πρόκειται για ενδοκυττάρια, σφαιρική έως ελλειπτική, μη κινητή μορφή, η οποία δεν φέρει μαστίγιο, με εύρος μεγέθους 2-5 μm (Εικ.1.2 β). Αυτή η μορφή εδρεύει και πολλαπλασιάζεται στο εσωτερικό των φαγολυσοσωμάτων των μακροφάγων του δικτυενδοθηλιακού συστήματος των σπονδυλωτών ξενιστών (Emanuela Handman, 1999).



Εικόνα 1.2: Σχηματική αναπαράσταση των κύριων ενδοκυττάρων οργανιδίων της προμαστιγωτής (α) και της αμαστιγωτής (β) μορφής του παρασίτου *Leishmania* (Besteiro, Williams, Coombs, & Mottram, 2007)

Καθότι το γένος *Leishmania*, ανήκει στην ευρύτερη οικογένεια των Τρυπανοσωματίδων (Trypanosomatidae), η κυτταρική δομή των παρασίτων διαθέτει τα χαρακτηριστικά υποκυτταρικά οργανίδια της οικογένειας, τα οποία ωστόσο απουσιάζουν από άλλους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Ορισμένες χαρακτηριστικές δομές στο κυτταρικό σώμα των παρασίτων της *Leishmania* είναι η ιδιαίτερη δομή της πλασματικής μεμβράνης, το μαστίγιο (το οποίο απουσιάζει στην αμαστιγωτή μορφή), οι ιδιάζουσες δομές του κυτταροσκελετού, το μοναδικής δομής μιτοχόνδριο με την παρουσία του kDNA και η παρουσία οργανιδίων που συμμετέχουν σε εξειδικευμένες μεταβολικές οδούς όπως τα σωματίδια γλυκογόνου και τα οξυασβεστιοσωμάτια.

Η κυτταρική επιφάνεια των παρασίτων, χαρακτηρίζεται από την παρουσία των εξής συστατικών: την κυτταρική μεμβράνη, το γλυκοκάλυκα και τους υπομεμβρανώδεις μικροσωληνίσκους. Ο γλυκοκάλυκας συμμετέχει ως βασικό λειτουργικό στοιχείο στην αλληλεπίδραση των διαφόρων αναπτυξιακών μορφών του

παρασίτου με την επιφάνεια των κυττάρων του θηλαστικού-ξενιστή ή με τα επιθηλιακά κύτταρα του πεπτικού συστήματος στη σκνίπα. Ο γλυκοκάλυκας συνίσταται από επιμέρους πρωτεϊνικά συστατικά όπως γλυκοπρωτεΐνες και γλυκολιπίδια και ένα σύμπλεγμα γλυκοφωσφολιπιδίων γνωστό ως λιποφωσφογλυκάνη (lipophosphoglycan, LPG) (Rodrigues, Godinho, & de Souza, 2014).

Η πλασματική μεμβράνη των τρυπανοσωματιδίων, αποτελείται από το κυτταρικό σώμα (cell body), το μαστίγιο (flagellum) και τη θήκη του μαστιγίου (flagellar pocket). Η πλασματική μεμβράνη που περιβάλλει το κυτταρικό σώμα συνδέεται με τους υποκυτταρικούς μικροσωληνίσκους διαμέσου μικρού μήκους νηματοειδών συνδέσεων του κυτταροσκελετού. Τέτοιου είδους συνδέσεις διαμορφώνονται και μεταξύ των υποκυτταρικών οργανιδίων. Ο ρόλος του κυτταροσκελετού είναι η διατήρηση του σχήματος του κυττάρου ανάλογα με το αναπτυξιακό στάδιο του παρασίτου και συμμετέχει στην κινητικότητα και στην προσκόλληση αυτού (Rodrigues et al., 2014).

Το μαστίγιο, αποτελείται από αξονήμα της δομής «9+2». Η δομή του μαστιγίου διαμορφώνεται από το βασικό σωματίο και διέρχεται από μια μεγάλη μεμβρανική εγκόλπωση, η οποία ονομάζεται θήκη του μαστιγίου. Το βασικό σωματίο διαθέτει δομή όμοια με αυτή που παρατηρείται και σε άλλα ευκαρυωτικά κύτταρα, με εννέα τριπλέτες μικροσωληνίσκων (Rodrigues et al., 2014).

Το μιτοχόνδριο είναι μοναδικό και πλαισιώνεται από μικροσωληνίσκους, ενώ ταυτόχρονα εμφανίζεται διογκωμένο στην περιοχή όπου εντοπίζεται το kDNA. Η δομή του μιτοχονδρίου μπορεί να ποικίλλει, εξαρτώμενη από το γένος και το είδος του παρασίτου (Rodrigues et al., 2014).

Τα σωματίδια γλυκογόνου (glycosomes) είναι εξειδικευμένα σφαιρικά μεμβρανοσυνδεδεμένα οργανίδια για την παραγωγή ATP (γλυκόλυση και β-οξείδωση λιπαρών οξέων), για τη σύνθεση πυριμιδινών και για την αποθήκευση πουρινών. Τα οξυασβεστιοσωμάτια είναι πυκνά, με όξινο περιεχόμενο, οργανίδια, τα οποία περιέχουν υψηλή συγκέντρωση φωσφόρου (P) στη μορφή πυροφωσφόρου και πολυφωσφόρου (poly-P), ασβεστίου (Ca) και άλλων κατιόντων (Mg, Na, Zn, και Fe). Η λειτουργία αυτών των οργανιδίων σχετίζεται με την αποθήκευση των ανωτέρω

ιόντων και φωσφόρου, με την ομοιόσταση του ασβεστίου, με τη διατήρηση της ομοιόστασης του ενδοκυττάριου pH και την ωσμωρύθμιση (Rodrigues et al., 2014).

1.2.2 Μόρια επιφάνειας του παρασίτου

Η επιφάνεια του κυτταρικού σώματος των παρασίτων *Leishmania* καλύπτεται από ένα σύνολο μορίων ορισμένα από τα οποία έχουν περιγραφεί τόσο ως προς τη δομή τους όσο και ως προς τη συνεισφορά τους στη μολυσματικότητα του παρασίτου. Η κατανομή των μορίων αλλά και η δραστηριότητά τους διαφέρει ανάμεσα στην προμαστιγωτή και στην αμαστιγωτή μορφή έτσι ώστε το παράσιτο να μπορεί να επιβιώνει σε διαφορετικά μικροπεριβάλλοντα, όπως το όξινο φαγολυσόσωμα του μακροφάγου και το έντερο της φλεβοτόμου. Ορισμένα από τα μόρια είναι τα εξής:

- Αποφωσφογλυκάνη (lipophosphoglycan, LPG)

Πρόκειται για το κύριο επιφανειακό αντιγόνο του παρασίτου *Leishmania* (Ueno & Wilson, 2012). Η LPG είναι ένα τριμερές μόριο αποτελούμενο από επαναλαμβανόμενες μονάδες φωσφορυλιωμένων σακχάρων που συνδέονται στα λιπίδια ενός μορίου λυσοαλκυλοφωσφατίδυλοϊνοσιτόλης με πυρήνα μανόζης (Orlandi & Turco, 1987; Turco et al., 1989).

Η LPG παρουσιάζει πολυμορφισμούς στα φωσφορυλιωμένα σάκχαρα μεταξύ των μετακυκλικών προμαστιγωτών μορφών των ειδών *Leishmania* (McConville, Bacic, Mitchell, & Handman, 1987; David L. Sacks, Brodin, & Turco, 1990). Αλλαγές στη δομή του μορίου της LPG καθιστούν τις μετακυκλικές μορφές του παρασίτου, ανθεκτικές στη λυτική δράση των παραγόντων του συμπληρώματος (Puentes, Sacks, da Silva, & Joiner, 1988). Η ανθεκτικότητα οφείλεται σε επιμήκυνση της LPG, επί της οποίας εναποτίθεται ο παράγοντας του συμπληρώματος C3b. Με τον τρόπο αυτό παρεμποδίζεται η ενεργοποίηση των επόμενων παραγόντων του συμπληρώματος και η καταστροφή του παρασίτου (D. L. Sacks & da Silva, 1987). Επιπλέον, οι αλλαγές στη δομή της LPG έχουν σημαντικό ρόλο για τη σύνδεση των προμαστιγωτών μορφών του παρασίτου στο επιθήλιο του μεσεντέρου της σκνίπας. Οι αμαστιγωτές μορφές του παρασίτου εμφανίζουν μείωση των επαναλαμβανόμενων μονάδων της LPG, με αποτέλεσμα τη μείωση έως και τη εξαφάνιση του γλυκοκάλυκα, οποίος περιβάλλει τις προμαστιγωτές μορφές (Pimenta, Saraiva, & Sacks, 1991)

➤ Κύρια γλυκοπρωτεΐνη επιφάνειας gr63

Η gr63 αποτελεί μία συντηρημένη γλυκοπρωτεΐνη μεταξύ των ειδών *Leishmania*, η οποία συνδέεται με τη μεμβράνη του παρασίτου με ένα μόριο φωσφατίδουλοϊνοσιτόλης. Η έκφρασή της αυξάνεται κατά τη μεταμόρφωση του παρασίτου στη μολυσματική μετακυκλική μορφή. Στην αμαστιγωτή μορφή του παρασίτου απουσιάζει από την επιφάνεια, ενώ εμφανίζεται με διάφορες ισομορφές σε συγκεκριμένη θέση, στη θήκη του μαστιγίου (Dumonteil, 2007; Kweider et al., 1987; Medina-Acosta, Karess, Schwartz, & Russell, 1989; Russell & Alexander, 1988).

Η gr63 ως πρωτεύση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην επιβίωση του παρασίτου, καθώς αποδομεί τον παράγοντα C3 του συμπληρώματος, ο οποίος εναποτίθεται στην επιφάνεια των προμαστιγωτών μορφών πριν εισβάλλουν στα μονοκύτταρα/μακροφάγα (Chaudhuri & Chang, 1988). Αυτή η δράση της gr63 εξασφαλίζει και τη σύνδεση του παρασίτου με τον εποδοχέα CR3 των μακροφάγων, ο οποίος σχετίζεται με την επιβίωση του παρασίτου στο εσωτερικό των φαγοσωμάτων των φαγοκυττάρων (Ueno & Wilson, 2012).

Η gr63, στις αμαστιγωτές μορφές (θήκη του μαστιγίου), συμβάλλει στην αποδόμηση ποικίλων μακρομορίων, λειτουργία που στοχεύει στην προστασία των δομικών συστατικών της μεμβράνης της θήκης του μαστιγίου καθώς και στη διατροφή της αμαστιγωτής μορφής.

➤ Όξινη φωσφατάση

Η κυτταρική μεμβράνη και η θήκη του μαστιγίου των προμαστιγωτών μορφών του παρασίτου χαρακτηρίζονται από τη δράση της όξινης φωσφατάσης με τη μορφή διαφορετικών ενζύμων. Η όξινη φωσφατάση της μεμβράνης (Gottlieb & Dwyer, 1981) αποτελεί αναστολέα του υπεροξειδίου του υδρογόνου που παράγεται από τα ουδετερόφιλα κύτταρα, προσφέροντας ένα ισχυρό πλεονέκτημα για την επιβίωση του παρασίτου (Glew, Saha, Das, & Remaley, 1988).

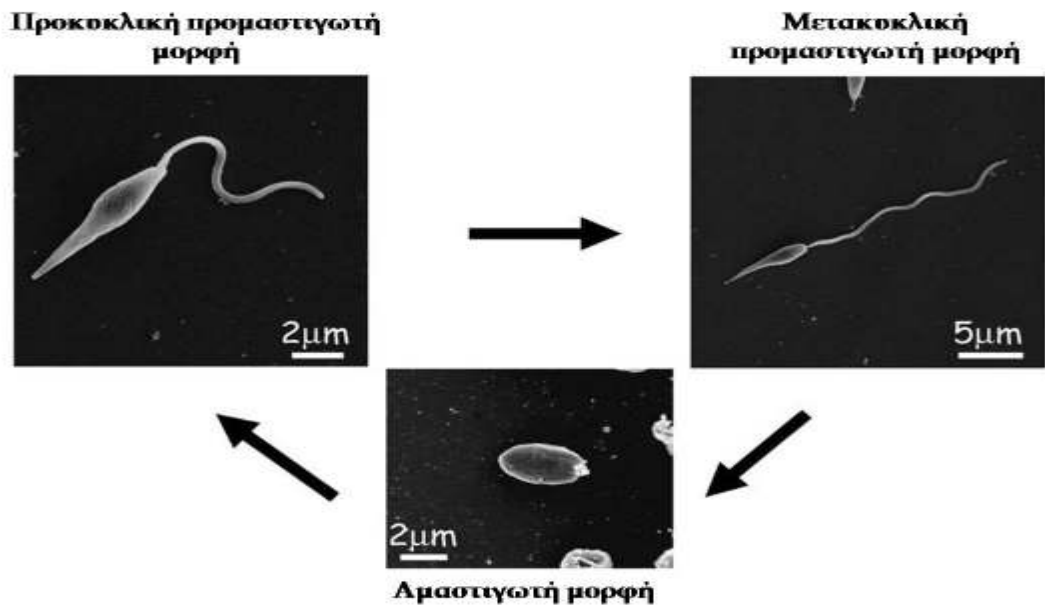
1.3 Βιολογικός κύκλος και μετάδοση του παρασίτου

Τα παράσιτα *Leishmania* διαθέτουν έναν σχετικά απλό κύκλο ζωής ο οποίος συνίσταται από δύο κύρια στάδια: το στάδιο της κινητής μορφής του παρασίτου που φέρει μαστίγιο (προμαστιγωτή μορφή), όπου το παράσιτο διαβιώνει στο πεπτικό σύστημα της φλεβοτόμου και το στάδιο με τη μη κινητή αμαστιγωτή μορφή, όπου το

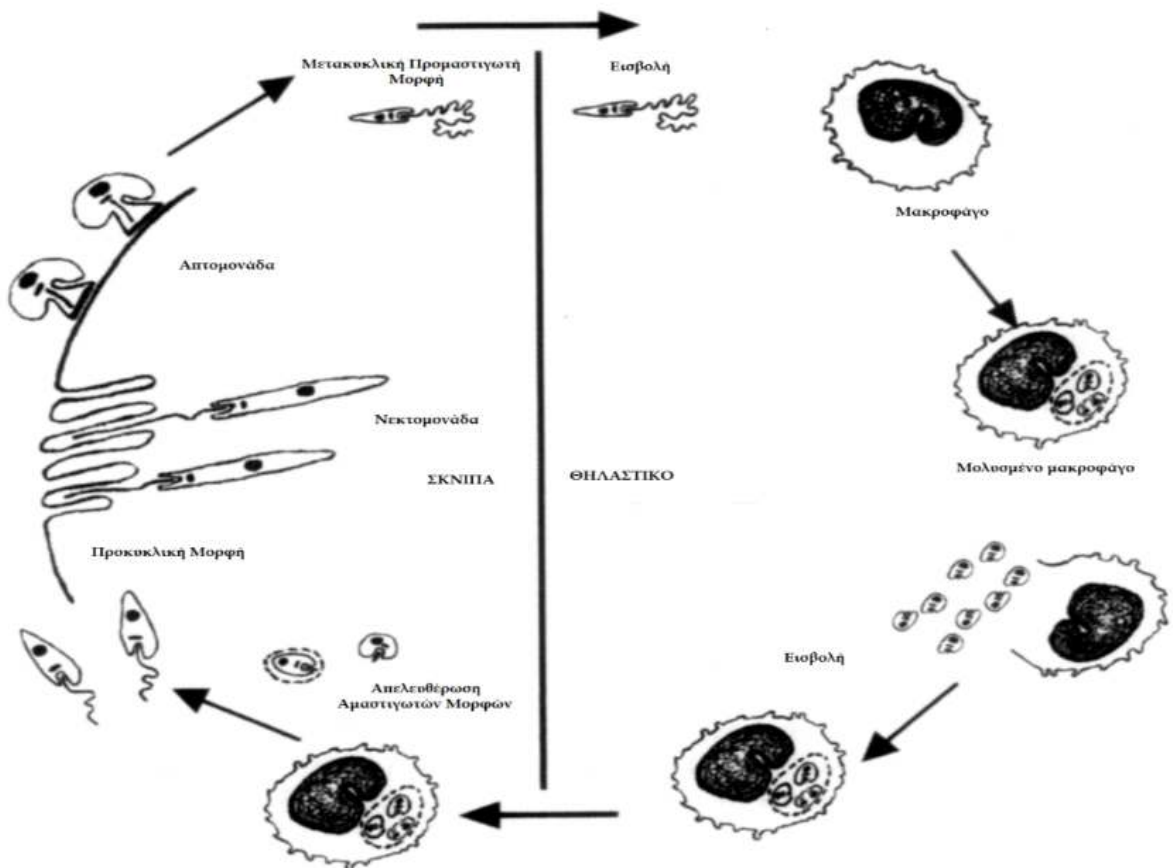
παράσιτο εντοπίζεται στο εσωτερικό των φαγολυσοσωμάτων των μακροφάγων των σπονδυλωτών ξενιστών (Van Assche et al., 2011).

Μολυσμένες θηλυκές φλεβοτόμοι σκνίπες μεταδίδουν τη νόσο μέσω ενοφθαλμισμού της προμαστιγωτής μορφής στο δέρμα του νέου ξενιστή, καθώς τρέφονται με αίμα από αυτόν. Στο εσωτερικό του σπονδυλωτού ξενιστή, τα παράσιτα φαγοκυτταρώνονται από τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα που εντοπίζονται στη δερμίδα. Οι προμαστιγωτές μορφές εντοπίζονται στο εσωτερικό των φαγοσωμάτων, το οποίο συντήκεται με το λυσόσωμα, για να προκύψει το φαγολυσόσωμα, στο οποίο διαβιούν τα παράσιτα. Κατά τη διάρκεια της σύντηξης, οι προμαστιγωτές μορφές μεταμορφώνονται σε αμαστιγωτές εντός 12-24 ωρών και συνεχίζουν να αναπτύσσονται και να διαιρούνται στο φαγολυσόσωμα. Καθώς μία φλεβοτόμος σκνίπα τρέφεται με αίμα από ένα μολυσμένο σπονδυλωτό ξενιστή, προσλαμβάνει μακροφάγα και μονοκύτταρα που περιέχουν αμαστιγωτά. Η αλλαγή των συνθηκών διαβίωσης του παρασίτου *Leishmania* (μείωση της θερμοκρασίας, άνοδος του pH) στο μεσέντερο της σκνίπας, προκαλεί τη μεταμόρφωση του παρασίτου σε προμαστιγωτή μορφή (Bates, 2007).

Οι προμαστιγωτές μορφές ακολουθούν μία διαδικασία η οποία καλείται μετακυκλογένεση, όπου οι διαιρούμενες μη μολυσματικές προκυκλικές μορφές αποκτούν μολυσματικές ιδιότητες και μεταμορφώνονται σε μη διαιρούμενες μολυσματικές μετακυκλικές μορφές. Τα μετακυκλικά προμαστιγωτά μεταναστεύουν στα στοματικά εξαρτήματα της φλεβοτόμου έτσι ώστε να ξεκινήσει ένας νέος κύκλος μετάδοσης με το επόμενο γεύμα του εντόμου (Van Assche et al., 2011).



Εικόνα 1.3: Κύριες μορφές της *Leishmania* με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (Besteiro et al., 2007)



Εικόνα 1.4: Σχηματική αναπαράσταση του βιολογικού κύκλου της *Leishmania* (Hommel)

Τα αναπτυξιακά στάδια της *Leishmania* στο έντομο-ξενιστή περιλαμβάνουν τις εξής μορφές: προκυκλικό προμαστιγωτό ➔ προμαστιγωτή νεκτομονάδα ➔ προμαστιγωτή λεπτομονάδα ➔ προμαστιγωτή απτομονάδα ➔ μετακυκλικό προμαστιγωτό. Η προκυκλική μαστιγωτή μορφή, αποτελεί μία ελαφρά κινητική μορφή του παρασίτου που πολλαπλασιάζεται στο υπό πέψη αίμα στο μεσέντερο του εντόμου. Ακολουθεί μία χρονική περίοδος στην οποία το παράσιτο παρουσιάζει μειωμένο ρυθμό πολλαπλασιασμού. Στο σημείο αυτό διαφοροποιείται σε προμαστιγωτή νεκτομονάδα με έντονη κινητικότητα. Αυτή, είναι η μορφή που μεταναστεύει και εγκαθίσταται στα τροφικά εξαρτήματα του εντόμου. Στην παραπάνω διαδικασία, η *Leishmania* εκκρίνει στην επιφάνεια της LPG. Τελικά, κάποιες από τις λεπτομονάδες διαφοροποιούνται σε μετακυκλικές προμαστιγωτές μορφές οι οποίες και θα μολύνουν το σπονδυλωτό ξενιστή οδηγώντας στη μετάδοση της ασθένειας (Bates, 2007).

1.4 Κλινικές μορφές του νοσήματος

Οι περισσότερες μορφές λεισμανίασης ανήκουν στην κατηγορία των ζωνοσώων ωστόσο υπάρχει και η μορφή της ανθρωπονόσου όπου η αποκλειστική δεξαμενή του παθογόνου είναι ο άνθρωπος. Σε αντίθεση με τον ασπόνδυλο ξενιστή, οι ξενιστές-«δεξαμενές» περιλαμβάνουν τις κυνίδες, τα τρωκτικά και τα μαρσιποφόρα, τα οποία είναι υπεύθυνα για τη μακροχρόνια διατήρηση της *Leishmania* στη φύση (Van Assche et al., 2011).

Οι βασικές κλινικές μορφές της νόσου στον άνθρωπο είναι η δερματική (cutaneous leishmaniasis, CL), η βλεννογονοδερματική (mucocutaneous leishmaniasis, MCL), η σπλαγγχνική ή Καλά-αζάρ (visceral leishmaniasis, VL) και η μετά Καλά-αζάρ δερματική λεισμανίαση (Post kalaazar dermal leishmaniasis, PKDL) (Van Assche et al., 2011).

1.4.1 Δερματική λειψμανίαση

Η δερματική λειψμανίαση προκαλείται από αρκετά είδη του παρασίτου *Leishmania*, με σημαντικότερο εκπρόσωπο την *L. major*. Ασθενείς με αυτή τη μορφή της νόσου, εμφανίζουν έλκη και οζίδια, συνήθως σε εκτεθειμένα τμήματα του σώματος, όπως τα χέρια, τα πόδια, ο λαιμός και το πρόσωπο (Chappuis et al., 2007).



Εικόνα 1.5: Παιδί με χαρακτηριστική δερματική βλάβη CL
(<http://www.who.int/campaigns/world-health-day/2014/photos/leishmaniasis/en/>)

Η εντοπισμένη δερματική λειψμανίαση (Local Cutaneous Leishmaniasis, LCL) χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη βλάβης στην περιοχή του δήγματος της σκνίπας. Στην LCL, οι βλάβες ξεκινούν με την ανάπτυξη ερυθήματος, το οποίο εξελίσσεται σε μία μικρή βλατίδα, η οποία σταδιακά, σε περίοδο εβδομάδων ή/και μηνών, μετατρέπεται σε έλκος, καθώς το παράσιτο εξαπλώνεται στους λεμφαδένες και ενεργοποιεί ανοσολογικές αποκρίσεις. Το χρονικό της ανάπτυξης, της εξέλιξης και της υποχώρησης της βλάβης ποικίλλει, εξαρτώμενο από το είδος της μόλυνσης καθώς και από την ανοσολογική κατάσταση του ξενιστή (Reithinger et al., 2007). Στη CL, οι βλάβες μπορούν να αναπτυχθούν οπουδήποτε, σε χρονικό διάστημα εβδομάδων έως και μηνών, μετά την αρχική μόλυνση (David & Craft, 2009). Η LCL προκαλείται από τα είδη *Leishmania L. major*, *L. tropica* και *L. aethiopica* στις περιοχές της Βόρειας και Ανατολικής Αφρικής, της Κεντρικής Ασίας και της Μέσης Ανατολής. Η *L. mexicana* και η *L. amazonensis*, προκαλούν LCL σε τμήματα της Κεντρικής και Νότιας Αμερικής, στις Η.Π.Α και στο Μεξικό (Chappuis et al., 2007).

Υπό συγκεκριμένες συνθήκες, η *L. aethiopica*, η *L. mexicana* και η *L. amazonensis* προκαλούν επίσης μία διάχυτη μορφή της νόσου η οποία

χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη μη-ελκωδών βλαβών σε απομακρυσμένα σημεία από την περιοχή του δήγματος. Αυτές οι βλάβες είναι γνωστές ως διάχυτη δερματική λεισμανίαση (diffuse cutaneous leishmaniasis, DCL), οι οποίες συνήθως δεν αυτοθεραπεύονται. Τόσο η LCL όσο και η DCL δεν αποτελούν απειλητικές καταστάσεις για τη ζωή, ωστόσο στην περίπτωση καθυστερημένης διάγνωσης, η αύξηση του μεγέθους των βλαβών οδηγεί σε παραμόρφωση και δευτερογενείς βακτηριακές μολύνσεις (David & Craft, 2009).

1.4.2 Βλεννογονοδερματική λεισμανίαση

Η μετανάστευση των παρασίτων σε στοματοφαρυγγικές βλεννογόνες περιοχές οδηγεί σε παραμορφωτικές βλάβες, οι οποίες στο σύνολό τους καλούνται βλεννογονοδερματική λεισμανίαση (mucocutaneous leishmaniasis, MCL). Αυτή η μορφή οφείλεται στο παράσιτο *L. braziliensis* που εντοπίζεται στην Νότια Αμερική, σε τμήματα της Κεντρικής Αμερικής και στο Μεξικό (Chappuis et al., 2007). Ασθενείς με MCL, εμφανίζουν έντονη φλεγμονή του βλεννογόνου και ευερεθιστότητα, ενώ υποφέρουν από σταδιακά εμφανιζόμενα καταστροφικά έλκη του βλεννογόνου, τα οποία εκτείνονται από την περιοχή της μύτης και του στόματος προς τα εσωτερικά στοματοφαρυγγικά όργανα, με πιθανή διάτρηση του ρινικού διαφράγματος (Chappuis et al., 2007; Reithinger et al., 2007). Η MCL όπως και η DCL, δεν θεραπεύονται αυθόρμητα, καθώς οι βλάβες εμφανίζονται έπειτα από μήνες ή/και χρόνια μετά την εκδήλωση της CL και μπορούν να αποβούν θανατηφόρες (Chappuis et al., 2007).

1.4.3 Σπλαγγχνική λεισμανίαση

Αντίθετα με τη δερματική και τη βλεννογονοδερματική λεισμανίαση, η σπλαγγχνική μορφή της νόσου (visceral leishmaniasis, VL) αποτελεί μία συστηματική ασθένεια η οποία είναι θανατηφόρος, εφόσον δε θεραπευτεί. Η VL οφείλεται στο παράσιτο *L. donovani* στην Ανατολική Αφρική και στην Ινδία και στην *L. infantum/chagasi* στη Βόρεια Αφρική, στην Ευρώπη και στην Λατινική Αμερική (Chappuis et al., 2007). Η κλινική εκδήλωση της μόλυνσης συνήθως εμφανίζεται εντός 2-6 μηνών μετά την αρχική επαφή με τη μολυσμένη σκνίπα. Τα παράσιτα, εισάγονται ενδοδερμικά, οδεύουν, μέσω των αιμοφόρων αγγείων, σε αιμοδιθητικά όργανα και εισβάλλουν στο δικτυοενδοθηλιακό σύστημα στο οποίο συμπεριλαμβάνονται οι λεμφαδένες, ο σπλήνας και το ήπαρ, προκαλώντας διόγκωση

των οργάνων (Chappuis et al., 2007; McCall, Zhang, & Matlashewski, 2013). Ασθενείς με VL, εμφανίζουν διάφορα συμπτώματα όπως καταβολή δυνάμεων, πυρετό, απώλεια βάρους και ανορεξία (Chappuis et al., 2007). Ωστόσο, αρκετοί άνθρωποι που μολύνονται με σπλαγγικά είδη *Leishmania*, εμφανίζονται ασυμπτωματικοί (Chappuis et al., 2007; McCall et al., 2013).



Εικόνα 1.6: Ασθενής με VL όπου παρατηρείται διόγκωση του σπλήνα (<http://www.who.int/campaigns/world-health-day/2014/photos/leishmaniasis/en/>)

Υπάρχουν δύο τύποι VL, οι οποίοι διαφέρουν στα χαρακτηριστικά του τρόπου μετάδοσής τους:

(α) Ο τύπος της ζωννόσου, όπου η μετάδοση του παρασίτου πραγματοποιείται μεταξύ ζώου-εντόμου-ανθρώπου. Σε αυτή την περίπτωση οι άνθρωποι αποτελούν ευκαιριακούς ξενιστές ενώ οι σκύλοι συγκροτούν τη βασική δεξαμενή του παρασίτου.

(β) Ο τύπος της ανθρωπονόσου, όπου η μετάδοση του παρασίτου πραγματοποιείται μεταξύ άνθρωπου-εντόμου-ανθρώπου.

Η ζωννόσος εμφανίζεται σε περιοχές όπου ενδημεί η *L. infantum*, ενώ η ανθρωπονόσος εμφανίζεται σε ενδημικές περιοχές της *L. donovani* (Chappuis et al., 2007).

1.4.4 Μετά-Καλά-αζάρ δερματική λεισμανίαση (PKDL)

Στο Σουδάν και στην Ανατολική Αφρική, παρατηρείται μία επιπλοκή της σπλαγγικής λεισμανίασης, σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς με VL, η οποία ονομάζεται μετά-Καλά-αζάρ δερματική λεισμανίαση (postkala-azar dermal

leishmaniasis, PKDL). Η κατάσταση αυτή χαρακτηρίζεται από οζώδεις δερματικές βλάβες, οι οποίες περιέχουν μεγάλο αριθμό παρασίτων.



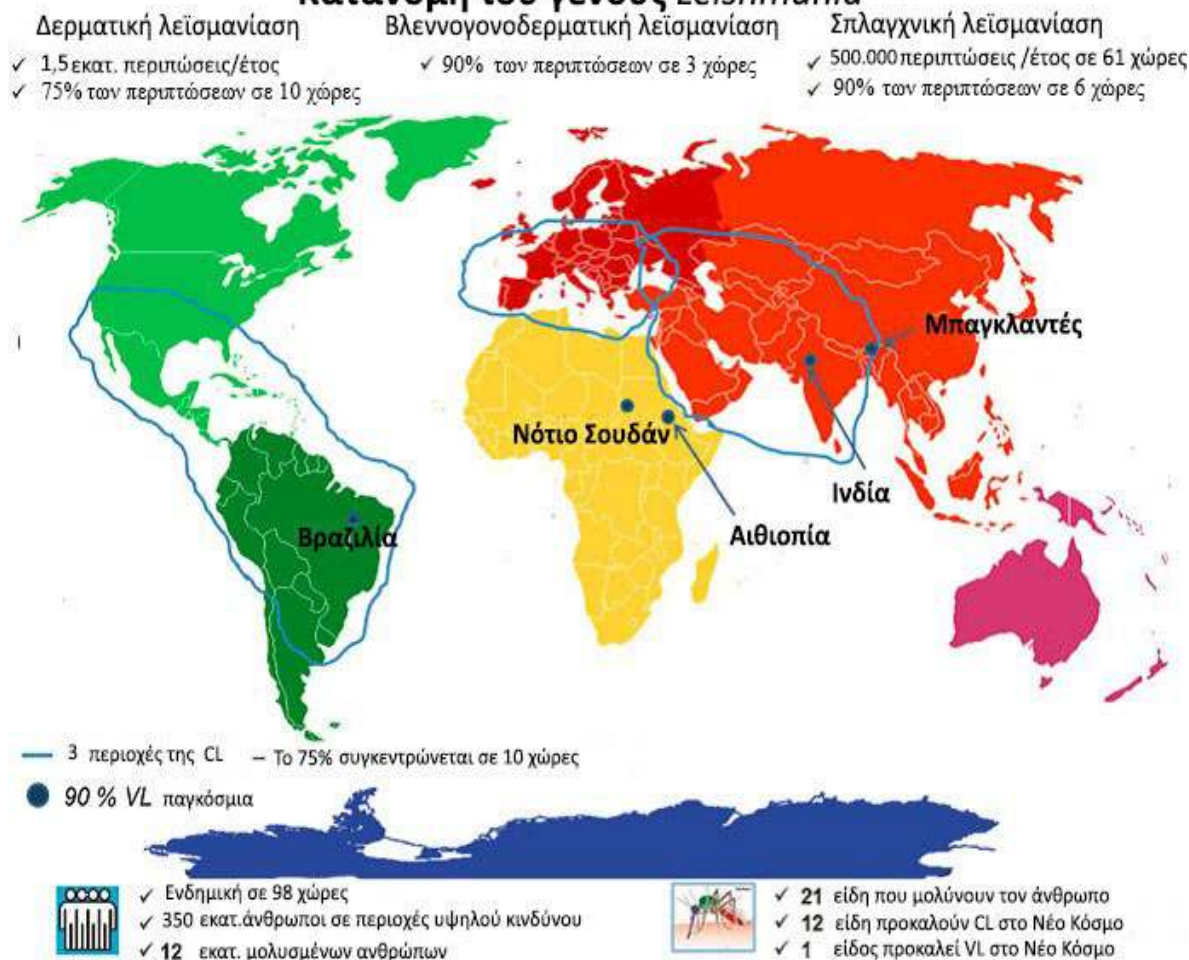
Εικόνα 1.7: Ασθενής με δερματικές βλάβες PKDL στο πρόσωπο (<http://www.who.int/campaigns/world-health-day/2014/photos/leishmaniasis/en/>)

Οι περιπτώσεις PKDL χαρακτηρίζονται ως ιδιαίτερα μολυσματικές καθώς οι δερματικές βλάβες περιέχουν υψηλό παρασιτικό φορτίο, αποτελώντας την βασική δεξαμενή του παρασίτου στον κύκλο μετάδοσης της ανθρωπονόσου, μεταξύ κύκλων επιδημίας (Chappuis et al., 2007).

1.5 Επιδημιολογία του νοσήματος

Σύμφωνα με μελέτες του Π.Ο.Υ 350 εκατομμύρια άνθρωποι κινδυνεύουν να νοσήσουν, ενώ 12 εκατομμύρια μολύνθηκαν παγκοσμίως, με δυνατότητα εμφάνισης 2 εκατομμυρίων νέων περιπτώσεων κάθε έτος ("Control of the leishmaniases," 2010). Επιπλέον, σύμφωνα με μία πρόσφατη μελέτη, φάνηκε ότι σε 98 χώρες σε όλο τον κόσμο, υπάρχει δυνατότητα μετάδοσης του παρασίτου (Alvar et al., 2012).

Κατανομή του γένους *Leishmania*



Εικόνα 1.8: Παγκόσμια κατανομή των κλινικών εκδηλώσεων της λείσμανίασης (Rodrigues et al., 2014)

Κατά προσέγγιση, κάθε έτος εμφανίζονται 0,2-0,4 εκατομμύρια περιπτώσεις VL και 0,7-1,2 εκατομμύρια περιπτώσεις CL. Το 90% των περιπτώσεων VL εντοπίζονται στις εξής έξι χώρες: Ινδία, Μπαγκλαντές, Σουδάν, Νότιο Σουδάν, Αιθιοπία και Βραζιλία. Η κατανομή της CL είναι ευρύτερη, με το ένα τρίτο των περιπτώσεων να συγκεντρώνονται στις εξής τρεις περιοχές: στην Αμερική, στη Λεκάνη της Μεσογείου και στη Δυτική Ασία. Πιο συγκεκριμένα, οι ακόλουθες δέκα χώρες εμφανίζουν τον υψηλότερο ρυθμό επίπτωσης για τη CL: Αφγανιστάν, Αλγερία, Κολομβία, Βραζιλία, Ιράν, Συρία, Αιθιοπία, Νότιο Σουδάν, Κόστα Ρίκα και Περού. Συνολικά, αυτές οι χώρες, αντιστοιχούν στο 70-75% της παγκόσμιας εμφάνισης της CL (Alvar et al., 2012).

1.6 Διάγνωση της λεισμανίασης

Στην εργαστηριακή διάγνωση της CL και της MCL πραγματοποιείται άμεση ταυτοποίηση των αμαστιγωτών μορφών του παρασίτου με χρώση Giemsa σε επιχρίσματα βιοψιών, ξεσμάτων και επιχρισμάτων. Ο συνδυασμός μικροσκοπικής παρατήρησης και καλλιέργειας του παρασίτου αυξάνει σημαντικά τη διαγνωστική ευαισθησία >85%. Αντισώματα έναντι της *Leishmania* μπορούν να ανιχνευτούν με ορολογικές δοκιμασίες, ωστόσο αυτές οι μέθοδοι δεν είναι συνήθειες διότι τα αντισώματα τείνουν να μην είναι ανιχνεύσιμα ή να είναι παρόντα σε χαμηλούς τίτλους εξαιτίας της ανεπαρκούς χυμικής απόκρισης (Elmahallawy et al., 2014).

Η εργαστηριακή διάγνωση της VL περιλαμβάνει μικροσκοπική παρατήρηση και καλλιέργεια από δείγματα, ανίχνευση αντιγόνων, ορολογικές δοκιμασίες και ανίχνευση του παρασιτικού DNA. Κατά τη μικροσκοπική παρατήρηση χρησιμοποιούνται δείγματα που προέρχονται από το σπλήνα, το μυελό των οστών, το ήπαρ, τους λεμφαδένες και επιχρίσματα του περιφερικού αίματος, όπου επιβεβαιώνεται η παρουσία των αμαστιγωτών. Στις ορολογικές δοκιμασίες, η διάγνωση βασίζεται στην παρουσία αντισωμάτων, μέσω του έμμεσου ανοσοφθορισμού (Indirect Fluorescent Antibody, IFAT), της ενζυμικά συζευγμένης δοκιμασίας ανοσοπροσρόφησης (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), της ανάλυσης πρωτεϊνών κατά Western και της άμεσης δοκιμασίας συγκόλλησης (direct agglutination test, DAT). Μεταξύ όλων, η ELISA αποτελεί την κατεξοχήν εφαρμοζόμενη τεχνική, καθώς εμφανίζει υψηλή ευαισθησία, ωστόσο η ειδικότητά της εξαρτάται από το προς ανάλυση δείγμα. Η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη μοριακή μέθοδος για την ανίχνευση παρασιτικού γενετικού υλικού είναι η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR), με την οποία στοχεύονται διάφορες ακολουθίες γενετικού υλικού, όπως ριβοσωμικά γονίδια (rRNA-genes), κινητοπλαστικό DNA, μικρού μήκους εξώνια, προερχόμενα από RNA (miniexon-derived RNA, medRNA) και το γονίδιο που εκφράζει τη β-σωληνίνη. Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί πολλές μέθοδοι PCR για τη διάγνωση της VL με διαφορετικά ποσοστά ευαισθησίας και ειδικότητας, τα οποία εξαρτώνται από το προς ανάλυση δείγμα (Elmahallawy et al., 2014).

Εκτός των ανωτέρω εφαρμοζόμενων διαγνωστικών μεθόδων, υπάρχει και η ανοσοχρωματογραφική δοκιμασία έναντι του αντιγόνου rK39, το οποίο είναι ένα

ανασυνδυασμένο αντιγόνο που προέρχεται από την *L. chagasi* με επαναλήψεις 39 αμινοξικών καταλοίπων. Πρόκειται για μία ποιοτική ανοσοδοκιμασία που βασίζεται στη χρήση ταινιών, όπου υπάρχει δεσμευμένο το αντιγόνο rK39. Στις ταινίες εφαρμόζεται μία σταγόνα αίματος ή ορού και κατόπιν αυτές εμβαπτίζονται σε ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα. Πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η ταχεία ανάγνωση του αποτελέσματος. Το αποτέλεσμα της δοκιμασίας είναι ορατό εντός λίγων λεπτών (Elmahallawy et al., 2014).

1.7 Θεραπεία του νοσήματος

Οι θεραπευτικές προσεγγίσεις κατά της λείσμανίασης ποικίλλουν, ενώ η προτίμηση για θεραπεία πρώτης ή δεύτερης γραμμής βασίζεται στον τύπο της ασθένειας και συχνά καθοδηγείται από τις τοπικές πρακτικές σε σχέση με το τι είναι αποτελεσματικό και διαθέσιμο. Η χρήση των παραγώνων του πεντασθενούς αντιμονίου θεωρείται η επικρατέστερη φαρμακολογική αντιμετώπιση της νόσου για δεκαετίες, ωστόσο τα συγκεκριμένα σκευάσματα εμφανίζουν πολλαπλούς τύπους τοξικότητας και ταυτόχρονα καθίσταται αναποτελεσματικά εξαιτίας της εμφάνισης ανθεκτικότητας από το παράσιτο. Σύμφωνα με τον Π.Ο.Υ, οι χρησιμοποιούμενες φαρμακευτικές ουσίες για την αντιμετώπιση της λείσμανίασης είναι οι εξής: το πεντασθενές αντιμόνιο (pentavalent antimony, Sb), η αμφοτερικίνη Β (amphotericin B), η παρομομυκίνη (paromomycin), η πενταμιδίνη (pentamidine), η μιλτεφοσίνη (miltefosine) και η ιμικιμόδη (imiquimod). Εναλλακτικές θεραπευτικές πρακτικές αποτελούν η κρυοθεραπεία, η θερμική θεραπεία και η ανοσοθεραπεία με τη χρήση εμβολίων ("Control of the leishmaniasis," 2010). Οι χημειοθεραπευτικές πρακτικές αν και εφαρμόζονται ευρέως για την αντιμετώπιση της νόσου, χαρακτηρίζονται αναποτελεσματικές καθώς εμφανίζουν πολλαπλές παρενέργειες ή οδηγούν στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας από το παράσιτο.

Η κρυοθεραπεία αφορά στην εφαρμογή υγρού αζώτου επί των βλαβών σε περιπτώσεις CL του Παλαιού Κόσμου που προκαλούνται από τα παράσιτα *L. tropica*, *L. aethiopica*, *L. infantum* και *L. major* (Asilian, Sadeghinia, Faghihi, & Momeni, 2004; Asilian, Sadeghinia, Faghihi, Momeni, & Amini Harandi, 2003; Negera et al., 2012). Η θερμική θεραπεία αφορά στην έκθεση δερματικών βλαβών σε θερμοκρασία 50°C για 30 δευτερόλεπτα σε τρεις επαναλήψεις, προκειμένου να περιοριστεί η

εξάπλωση των βλαβών CL ενώ η αποτελεσματικότητά της είναι συγκρίσιμη με αυτή της χρήσης του Sb (Bumb et al., 2013; Reithinger et al., 2005).

Στην περίπτωση της ανοσοθεραπείας, χρησιμοποιούνται εμβόλια που περιέχουν είτε θερμικώς θανατωμένα παράσιτα σε συνδυασμό με BCG (*Bacillus Calmette-Guerin*), είτε ανασυνδυασμένα αντιγόνα σε συνδυασμό με GM-CSF (*Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor*). Η ανοσοθεραπεία μέχρι σήμερα έχει εφαρμοστεί σε μικρό αριθμό ασθενών με MCL ή DCL σε πειραματικό επίπεδο (Badaro et al., 2006; Badaro et al., 2001; Convit et al., 2004; Convit et al., 2003; Garcia Bustos et al., 2011).

1.8 Εμβόλια κατά της *Leishmania*

Η θεραπεία της λεισμανίασης βασίζεται κυρίως στην εφαρμογή χημειοθεραπείας, η οποία χαρακτηρίζεται από υψηλό κόστος, τοξικότητα, μεγάλη διάρκεια, δυσκολία στη χορήγηση (για παράδειγμα, ενδοφλέβια χορήγηση) και ανάπτυξη ανθεκτικών παρασίτων. Παρά την πρόοδο στις χημειοθεραπευτικές επιλογές, αμφισβητείται η ικανότητά τους να οδηγήσουν σε εξάλειψη του νοσήματος με αποκλειστική χρήση αυτών. Για να επιτευχθούν οι μακροπρόθεσμοι στόχοι του ελέγχου και της εξάλειψης της νόσου, αποτελεί επιτακτική ανάγκη η δημιουργία ενός αποτελεσματικού εμβολίου (Rajiv Kumar & Engwerda, 2014).

Ανεξαρτήτως του γεγονότος ότι διαφορετικά είδη *Leishmania* προκαλούν ένα εύρος κλινικών εκδηλώσεων, γονιδιωματικές αναλύσεις έχουν δείξει ότι υπάρχει ένα υψηλός βαθμός ομολογίας αλληλουχιών μεταξύ των ειδών, υποδεικνύοντας ότι είναι δυνατό να παραχθούν ευρέως αποτελεσματικά εμβόλια ενάντια σε κλινικά διαφορετικές νόσους (Rajiv Kumar & Engwerda, 2014).

Κατά το παρελθόν ο εμβολιασμός γινόταν με τη χορήγηση ζωντανών, μολυσματικών παρασίτων σε μία διαδικασία γνωστή ως «λεισμανιοποίηση» (*leishmanization*). Ωστόσο, αυτή η πρακτική εγκαταλείφθηκε από τις χώρες που την εφάρμοσαν καθώς δημιουργήθηκαν προβλήματα ασφάλειας, εξαιτίας της ανάπτυξης μη θεραπεύσιμων βλαβών και εμφάνισης ανοσοκαταστολής, σε ορισμένα άτομα (Rajiv Kumar & Engwerda, 2014).

Άλλες προσεγγίσεις περιλαμβάνουν τη χρήση ανοσογονικών επιφανειακών αντιγόνων των παρασίτων *Leishmania*, ως υπογήφια εμβόλια. Αρκετά από αυτά έχουν δοκιμαστεί σε μοντέλα ποντικών και σκύλων για τη VL, με τα προκείμενα

δεδομένα να υποδεικνύουν ότι η προστασία έναντι του παρασίτου επάγεται από διακριτές πρωτεΐνες (Rajiv Kumar & Engwerda, 2014).

Σήμερα, οι διαφορετικές κατηγορίες εμβολίων που αφορούν στην αντιμετώπιση της λείσμανίασης κατηγοριοποιούνται σε τρεις γενιές ως εξής:

Εμβόλια πρώτης γενιάς: πρόκειται για εμβόλια των οποίων η σύνθεση περιλαμβάνει ολόκληρα θανατωμένα παράσιτα, τα οποία έχουν προταθεί για θεραπεία (Singh, Stober, Singh, Blackwell, & Sundar, 2012) ή/και πρόληψη της νόσου (Campos-Neto et al., 2001). Ποικίλα εξασθενημένα παράσιτα έχουν δοκιμαστεί σε ζωικά μοντέλα, όπως αδρανοποιημένα με ραδιενέργεια και βιοχημικά τροποποιημένα παράσιτα, τα οποία έχει αποδειχθεί ότι οδηγούν στην ανάπτυξη προστασίας σε μοντέλα ποντικών και χάμστερ. Ωστόσο, ανησυχίες σχετικές με τη μεταστροφή του παρασίτου στην αρχική μολυσματική του μορφή, οδηγούν σε αμφισβήτηση την εφαρμογή της προηγούμενης πρακτικής στον άνθρωπο (Rajiv Kumar & Engwerda, 2014).

Εμβόλια δεύτερης γενιάς: τα εμβόλια αυτά περιέχουν ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες, οι οποίες παράγονται μέσω της διαδικασίας της DNA κλωνοποίησης. Οι πιο πρόσφατες προσπάθειες παραγωγής αυτής της κατηγορίας εμβολίων, περιλαμβάνουν τη χρήση γενετικών ανοσοενισχυτικών προκειμένου να ενισχυθεί η ανοσογονικότητά τους (M. A. Liu, Wahren, & Karlsson Hedestam, 2006). Ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες, α) αποκλειστικά, β) παρουσία ανοσοενισχυτικού ή γ) με τη χρήση βακτηριακού ή τροποποιημένου ιϊκού οχήματος, έχουν εξεταστεί ως εμβόλια σε προκλινικές δοκιμές (Rajiv Kumar & Engwerda, 2014). Ακριβέστερα, έχουν πραγματοποιηθεί σημαντικές προσπάθειες στην ταυτοποίηση ανασυνδυασμένων αντιγόνων που μπορούν να προστατέψουν από τη μόλυνση με *Leishmania*, σε πειραματικά μοντέλα. Μερικά από αυτά τα αντιγόνα είναι: η κινητοπλαστική μεμβρανική πρωτεΐνη 11 (kinetoplastid membrane protein-11, KMP-11) (Agallou, Margaroni, & Karagouni, 2011; Carrillo et al., 2008), η 24-c-μεθυλοτρανσφεράση της στερόλης (sterol 24-c-methyltransferase) (Y. Goto, Bogatzki, Bertholet, Coler, & Reed, 2007), η ειδική πρωτεΐνη των αμαστιγωτών A2 (amastigote specific protein A2) (A. Ghosh, Zhang, & Matlashewski, 2001), η πρωτεΐνωση B της κυστεΐνης (Rafati, Zahedifard, & Nazgouee, 2006), ο παράγοντας έναρξης και επιμήκυνσης της *L. braziliensis* (elongation and initiation factor) (Skeiky et al., 1998), το αντιγόνο K26/HASPB (Stager, Smith, & Kaye, 2000), η ενεργοποιούμενη

από *Leishmania* κινάση C (*Leishmania*-activated C kinase) (Benhnini et al., 2009), το επιφανειακό αντιγόνο 2 των προμαστιγωτών (promastigote surface antigen 2) (E. Handman, Symons, Baldwin, Curtis, & Scheerlinck, 1995), η νουκλεοσιδική υδρολάση (nucleoside hydrolase) και η επιφανειακή γλυκοπρωτεΐνη gp63 (Connell, Medina-Acosta, McMaster, Bloom, & Russell, 1993). Αν και η πλειονότητα αυτών των αντιγόνων, έχει ελεγχθεί σε ζωικά μοντέλα ως προς την ανοσογονικότητα και την προληπτική αποτελεσματικότητά τους, μόνο ορισμένα από αυτά έχουν προαχθεί σε κλινικές δοκιμές σε πρωτεύοντα (πίθηκοι), σε σκύλους και σε προκλινικές μελέτες σε ανθρώπους (R. Kumar et al., 2010; Singh et al., 2012).

Εμβόλια τρίτης γενιάς (εμβόλια «γυμνού» DNA): σε αυτήν την προσέγγιση, γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες-στόχους του παρασίτου κλωνοποιούνται σε πλασμιδιακούς φορείς οι οποίοι εκφράζονται σε κύτταρα θηλαστικών και ενίονται ενδοδερμικά ή ενδομυϊκά. Τα DNA εμβόλια περιλαμβάνουν ένα ή περισσότερα μόρια DNA που κωδικοποιούν για ποικιλία αντιγόνων και αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση συνδυασμού πλασμιδίων. Ο μηχανισμός δράσης αυτών βασίζεται στην ενεργοποίηση της έμφυτης ανοσίας λόγω της παρουσίας μη μεθυλιωμένων DNA αλληλουχιών βακτηρίων στο πλασμιδιακό φορέα και τον έντονο πολλαπλασιασμό (replicate) αυτών στο εσωτερικό του ξενιστή, οδηγώντας στην έκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Τα εμβόλια αυτά είναι εξαιρετικά ασφαλή καθώς δεν περιέχουν παθογόνους μικροοργανισμούς (Dumonteil, 2007).

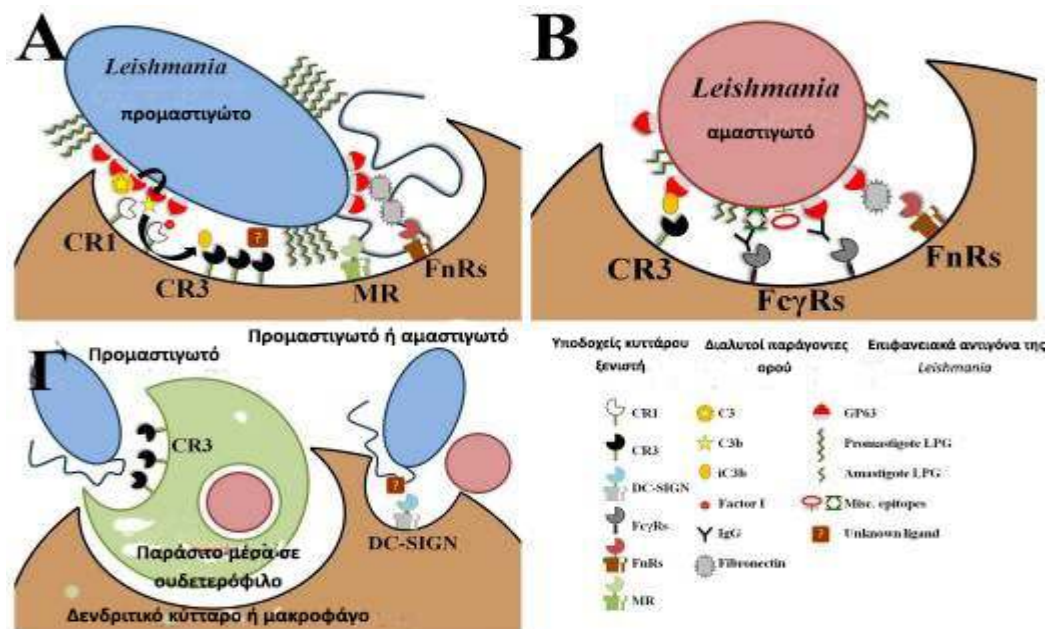
1.9 Η ανοσολογική απόκριση στη μόλυνση με *Leishmania*

Στα θηλαστικά η επιτυχής ανοσολογική απόκριση έναντι ενός παθογόνου παράγοντα αναπτύσσεται με την αλληλεπίδραση της έμφυτης και της επίκτητης ανοσολογικής απόκρισης. Η έμφυτη ανοσολογική απόκριση χαρακτηρίζεται από ταχεία αφομοίωση και έλλειψη ειδικότητας ενώ είναι περιορισμένης διάρκειας. Περιλαμβάνει εκκρινόμενους παράγοντες όπως είναι το συμπλήρωμα, οι κυτταροκίνες και οι ανοσοσφαιρίνες. Οι κυτταρικοί πληθυσμοί που ενεργοποιούνται είναι τα φυσικά κυτταροκτόνα κύτταρα (NK, natural killers), τα ουδετερόφιλα κύτταρα, τα μονοκύτταρα/μακροφάγα, τα εωσινόφιλα κύτταρα και τα γδ T-λεμφοκύτταρα. Η επίκτητη ανοσολογική απόκριση αναπτύσσεται με αργούς ρυθμούς αλλά διαρκεί περισσότερο. Σημαντικό ρόλο στην επικοινωνία μεταξύ της έμφυτης και της επίκτητης ανοσίας κατέχουν τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (antigen-

presenting cells, APCs), που περιλαμβάνουν τα μονοκύτταρα/μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα. Κύριος ρόλος των APCs είναι η παρουσίαση επίτοπων προερχόμενων από πρωτεΐνες των εισβαλλόντων παθογόνων μικροοργανισμών στα Β και αβΤ-βοηθητικά λεμφοκύτταρα.

1.9.1 Τα κύτταρα στόχοι του παρασίτου

Αν και τα παράσιτα της *Leishmania* αλληλεπιδρούν και μολύνουν μία ποικιλία κυττάρων του ξενιστή, τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα αποτελούν τους σημαντικότερους στόχους, καθώς ρυθμίζουν την τελική έκβαση της μόλυνσης. Τα προαναφερθέντα, αποτελούν τα κύρια APCs που διαθέτουν σημαντικό ρόλο στη εμφάνιση της ανθεκτικότητας ή της ευαισθησίας απέναντι στη μόλυνση με το παράσιτο. Τα μακροφάγα αποτελούν τα πρωταρχικά κύτταρα «διαμονής» του παρασίτου *Leishmania*, καθώς το φαγοκυτταρώνουν και επιτρέπουν τον πολλαπλασιασμό του στο εσωτερικό τους. Ωστόσο, τα ίδια αποτελούν και τη δραστική συνιστώσα για την εξάλειψη της μόλυνσης. Η αποτελεσματική κάθαρση του παρασίτου από τα μακροφάγα, εξαρτάται από την ενεργοποίηση της κατάλληλης ανοσοαπόκρισης, η οποία συνήθως ξεκινά από τα δενδριτικά κύτταρα (D. Liu & Uzonna, 2012).



Εικόνα 1.9: Αλληλεπίδραση της προμαστιγωτής μορφής (A) και της αμαστιγωτής μορφής (B) με υποδοχείς των φαγοκυττάρων καθώς και ο ρόλος των ουδετερόφιλων (Γ) στην εισβολή του παρασίτου στα μακροφάγα ή/και στα δενδριτικά κύτταρα (Ueno & Wilson, 2012)

1.9.1.1 Αλληλεπίδραση του παρασίτου με τα μακροφάγα

Καθώς τα παράσιτα των ειδών *Leishmania* είναι υποχρεωτικά ενδοκυττάρια, τα μακροφάγα είναι απαραίτητα για την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση τους. Μετά την είσοδο του παρασίτου, στην περιοχή της μόλυνσης, στρατολογούνται ταυτόχρονα μακροφάγα και πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα, ενώ η αλληλεπίδρασή τους με το παράσιτο καθορίζει το αποτέλεσμα της μόλυνσης (Ribeiro-Gomes et al., 2004).

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι στην περιοχή της μόλυνσης συγκεντρώνονται κατά κύριο λόγο ουδετερόφιλα κύτταρα, τα οποία είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικά στην πρόσληψη του παρασίτου (Peters et al., 2008; Peters & Sacks, 2009) και δρουν ως «Δούρειος Ίππος» για την σιωπηλή είσοδο του παρασίτου στα μακροφάγα (Laufs et al., 2002; van Zandbergen et al., 2004). Πράγματι, μόλυνση των ουδετερόφιλων από την *L. major*, οδηγεί σε αξιοσημείωτη καθυστέρηση του προγραμματισμένου κυτταρικού τους θανάτου και στην έκκριση του παράγοντα MIP-1β, ο οποίος είναι γνωστό ότι προσελκύει τα μακροφάγα στην περιοχή της μόλυνσης. Μετά την άφιξή τους, τα μακροφάγα φαγοκυτταρώνουν τόσο τα ελεύθερα παράσιτα όσο και τα μολυσμένα/αποπτωτικά ουδετερόφιλα και έτσι καθίστανται οριστικοί ξενιστές για τον πολλαπλασιασμό του παρασίτου αλλά και δραστικοί μεσολαβητές για την καταστροφή του (van Zandbergen et al., 2004).

Για την επιτυχή είσοδο της προμαστιγωτής μορφής του παρασίτου συμμετέχουν επιφανειακοί υποδοχείς των μακροφάγων, όπως οι υποδοχείς του συμπληρώματος 1 και 2 (Complement Receptor: CR, CR1 και CR2), ο υποδοχέας της ινωδονεκτίνης (Fibronectin Receptor: FnR) και ο υποδοχέας της μαννόζης-φουκόζης (Mannose Receptor, MR)(Kane & Mosser, 2000). Οι υποδοχείς αυτοί αλληλεπιδρούν με επιφανειακά μόρια της *L. major*, όπως η LPG, η gp63 και οι πρωτεοφωσφογλυκάνες (proteophosphoglycans, PPGs) (Naderer & McConville, 2008; Yao, Donelson, & Wilson, 2003). Η αλληλεπίδραση αυτών των μορίων με τους υποδοχείς του συμπληρώματος των μακροφάγων εξασφαλίζεται μέσω της σύνδεσής τους με παράγοντες οψωνοποίησης, όπως τα προϊόντα διάσπασης του παράγοντα C3 του συμπληρώματος (C3b/iC3b) (Brittingham & Mosser, 1996), η πρωτεΐνη που δεσμεύει μαννόζη (Green et al., 1994) και οι γαλεκτίνες (Kamhawi et al., 2004; Pelletier et al., 2003). Σημειώνεται ότι, ανεπάρκεια σε ένα και μόνο μόριο του

παρασίτου (όπως το LPG) δεν είναι επιζήμια για την προσκόλλησή του στα κύτταρα του ξενιστή, καθώς η φαγοκυττάρωση μεταλλαγμένων, ως προς το LPG, παρασίτων δεν παρεμποδίζεται ή/και είναι περισσότερο επιτυχής σε σχέση με τα παράσιτα άγριου τύπου (McNeely & Turco, 1990). Ωστόσο τέτοιου είδους ανεπάρκειες έχουν σημαντικές επιπτώσεις ως προς την ενδοκυττάρια επιβίωση των παρασίτων (McNeely & Turco, 1990), υποδεικνύοντας ότι τέτοιου είδους μόρια είναι καθοριστικά ως προς την αναστολή ή τη μεταστροφή της λειτουργίας των μηχανισμών εξουδετέρωσης του κυττάρου-ξενιστή.

Στην περίπτωση των αμαστιγωτών μορφών, έχει ποταθεί ότι τα παράσιτα της *Leishmania* καλύπτονται από IgG αντισώματα του ξενιστή και κατόπιν συνδέονται με τους υποδοχείς FcγR (υποδοχείς σταθερής περιοχής των γ σφαιρινών) στην επιφάνεια των μακροφάγων, εξασφαλίζοντας την είσοδό τους σε αυτά. Τέτοιου είδους αλληλεπιδράσεις και η επακόλουθη είσοδος του παρασίτου στο κύτταρο, ενεργοποιούν σηματοδοτικές οδούς οι οποίες αποτρέπουν την εξουδετέρωσή του και παράλληλα προάγουν την ενδοκυττάρια ανάπτυξή του (S. A. Miles, Conrad, Alves, Jeronimo, & Mosser, 2005).

Τα μακροφάγα αποτελούν τα κύρια δραστικά κύτταρα ως προς την εξουδετέρωση της *Leishmania* και μπορούν να ενεργοποιηθούν μετά από ενεργοποίηση διαφορετικών οδών σηματοδότησης, οι οποίες καθορίζουν την έκβαση της νόσου σύμφωνα με την ενεργοποίηση διακριτών, ως προς τη δράση τους, κυτταρικών υποπληθυσμών. Κατά συνέπεια, η κατάλληλη ενεργοποίηση των μακροφάγων είναι καθοριστική για την εξάλειψη του ενδοκυττάρου παθογόνου (D. Liu & Uzonna, 2012).

1.9.1.2 Αλληλεπίδραση του παρασίτου με τα δενδριτικά κύτταρα

Η είσοδος του παρασίτου στα δενδριτικά κύτταρα, όπως και στα μακροφάγα, μεσολαβείται από υποδοχείς επιφανείας που αναγνωρίζουν το παράσιτο αλλά και μέσω των ουδετερόφιλων, ενώ εξαρτάται τόσο από τη μορφή του παρασίτου (προμαστιγωτή ή αμαστιγωτή) όσο και από το είδος του.

Τα ουδετερόφιλα που έχουν προσλάβει το παράσιτο στο σημείο της μόλυνσης φαγοκυτταρώνονται από τα δενδριτικά κύτταρα με αποτέλεσμα την είσοδο του παρασίτου σε αυτά. Κατά συνέπεια, τα ουδετερόφιλα λειτουργούν και σε αυτήν την

περίπτωση ως Δούρειος Ίππος προς όφελος της *Leishmania* (Ueno & Wilson, 2012). Σε ό,τι αφορά την απευθείας πρόσληψη των προμαστιγωτών μορφών από τα δενδριτικά, υπάρχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα. Ειδικότερα, ορισμένες μελέτες υποστηρίζουν ότι στην πρόσληψη της *L. major* εμπλέκεται ο υποδοχέας CR3, εφόσον οι προμαστιγωτές μορφές έχουν οψωνοποιηθεί, ενώ άλλες υποστηρίζουν το αντίθετο. Σε κάποιες περιπτώσεις αναφέρεται ότι η αλληλεπίδραση του CR3 με τον υποδοχέα του σταθερού τμήματος των γ-σφαιρινών (FcγR) εξασφαλίζει την είσοδο των προμαστιγωτών στα δενδριτικά (Kautz-Neu, Schwonberg, Fischer, Schermann, & von Stebut, 2012). Οι αμαστιγωτές μορφές των *L. amazonensis*, *L. major*, *L. mexicana* και *L. rifanoi*, εξασφαλίζουν την είσοδό τους στα δενδριτικά έπειτα από τη σύνδεση των ανοσοσυμπλεγμάτων που δημιουργούνται μεταξύ αυτών και IgG αντισωμάτων (οψωνοποίηση μεσολαβούμενη από αντισώματα) στους υποδοχείς FcγRI, II και III (Ueno & Wilson, 2012).

Ένας υποδοχέας που επίσης εμπλέκεται στην είσοδο τόσο των προμαστιγωτών (*L. donovani*, *L. infantum* και *L. rifanoi*) όσο και των αμαστιγωτών μορφών (*L. infantum* και *L. rifanoi*) είναι ο υποδοχέας C-τύπου λεκτίνης DC-SIGN [Dendritic Cell Specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3) grabbing nonintergrin] ή CD209 (Cluster of Differentiation, CD). Αν και δεν έχει προσδιοριστεί το μόριο του παρασίτου με το οποίο συνδέεται, η δέσμευση φαίνεται να είναι ανεξάρτητη της LPG (Colmenares, Corbi, Turco, & Rivas, 2004; Colmenares, Puig-Kroger, Pello, Corbi, & Rivas, 2002). Η είσοδος των αμαστιγωτών μορφών της *L. infantum* με τη μεσολάβηση του DC-SIGN σε ανώριμα μονοκυτταρικής προέλευσης δενδριτικά, δεν επάγει την έκφραση των επιφανειακών μορίων CD83, CD86 και του μορίου MHCII. Η απουσία αυτών των δεικτών ωρίμανσης υποδεικνύει ότι αυτός ο τρόπος εισόδου, επιτρέπει στο παράσιτο να διαφεύγει της ανοσοεπιτήρησης (Cararros et al., 2005).

Σε σχέση με την επίδραση της εισόδου του παρασίτου στην πόλωση της ανοσολογικής απόκρισης του ξενιστή, παλαιότερες εργασίες (von Stebut, Belkaid, Jakob, Sacks, & Udey, 1998) υποστηρίζουν ότι η είσοδος της *L. major* σε εμβρυϊκής προέλευσης επιδερμικά δενδριτικά κύτταρα ενισχύει την έκφραση συνδιεγερτικών μορίων και την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως η IL-12p70, ενώ νεότερες υποστηρίζουν το αντίθετο. Πιο συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ότι στην

περίπτωση των επιδερμικών δενδριτικών κυττάρων (Langerhans) BALB/c ποντικών, παρουσιάζεται αυξημένη έκφραση του υποδοχέα της IL-4 και μειωμένη παραγωγή της κυτταροκίνης IL-12p70 (Moll, Scharner, & Kampgen, 2002). Σε αυτές τις περιπτώσεις εξετάστηκε η επίδραση της εισόδου του παρασίτου στην ικανότητα των δενδριτικών να επάγουν πόλωση της ανοσοαπόκρισης προς την T_{H1} κατεύθυνση, με τα πιο πρόσφατα δεδομένα να υποστηρίζουν ότι η *Leishmania* αναστέλλει την εν λόγω πόλωση, διαφεύγοντας την ανοσοαπόκριση εναντίον της.

1.10 Τα δενδριτικά κύτταρα

Τα δενδριτικά κύτταρα αποτελούν τα επαγγελματικά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, τα οποία στην ανώριμη κατάσταση περιπολούν τους περιφερικούς ιστούς για την πρόσληψη και επεξεργασία παθογόνων μικροοργανισμών ή αντιγόνων τους, η οποία επάγει την ωρίμανσή τους. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μετανάστευσή τους σε περιοχές T-λεμφοκυττάρων στα λεμφικά όργανα. Στις περιοχές αυτές παρουσιάζουν τα αντιγόνα σε παρθένα T-λεμφοκύτταρα και ταυτόχρονα ρυθμίζουν τις αποκρίσεις τους (Reis e Sousa, 2004). Πιο συγκεκριμένα, τα δενδριτικά που βρίσκονται στους ιστούς προσλαμβάνουν τους παθογόνους μικροοργανισμούς ή τα αντιγόνα τους με φαγοκυττάρωση, πινοκυττάρωση ή με τη μεσολάβηση υποδοχέων, όπως οι υποδοχείς Fcγ, οι υποδοχείς του συμπληρώματος, οι υποδοχείς της οικογένειας των λεκτινών και οι υποδοχείς τύπου Toll (Guermonprez, Valladeau, Zitvogel, Thery, & Amigorena, 2002).

1.10.1 Τύποι δενδριτικών κυττάρων

Στο ποντίκι έχουν ταυτοποιηθεί δύο τύποι δενδριτικών κυττάρων, τα δενδριτικά κύτταρα της μυελοειδούς κυτταρικής σειράς και τα δενδριτικά κύτταρα της λεμφοειδούς κυτταρικής σειράς. Σύμφωνα με *in vitro* μελέτες, τα μυελοειδή δενδριτικά κύτταρα προέρχονται από αρχέγονα κύτταρα του μυελού των οστών υπό την επίδραση του παράγοντα διέγερσης αποικιών των κοκκιοκυττάρων/μακροφάγων (Granulocyte/macrophage stimulating colony factor, GM-CSF) (Inaba et al., 1992).

Ο διαχωρισμός των δύο τύπων δενδριτικών κυττάρων γίνεται με βάση την έκφραση του επιφανειακού μορίου CD8, το οποίο εκφράζεται ως ομοδιμερές μόριο στα λεμφοειδή δενδριτικά κύτταρα, ενώ απουσιάζει από τα μυελοειδή δενδριτικά κύτταρα. Όμως και οι δύο τύποι κυττάρων εκφράζουν στην επιφάνειά τους υψηλά ποσοστά του μορίου CD11c, των μορίων του μείζονος συμπλέγματος

ιστοσυμβατότητας τάξης II (Major Histocompatibility Complex II, MHC II) και των συνδεδεγμένων μορίων CD80, CD86 και CD40 (Vremec & Shortman, 1997).

Τα λεμφοειδή και τα μυελοειδή δενδριτικά κύτταρα πέραν της διαφορικής έκφρασης των επιφανειακών μορίων, διαφέρουν επίσης και ως προς την εντόπιση τους. Ειδικότερα, τα λεμφοειδή δενδριτικά κύτταρα εντοπίζονται στο περιαρτηριακό λεμφικό στρώμα (Periarteriolar lymphatic sheath, PALS) του σπλήνα και των λεμφαδένων ενώ τα μυελοειδή εντοπίζονται στην οριακή ζώνη (marginal zone) του σπλήνα. Αυτά μετακινούνται προς την περιοχή PALS, υπό την επίδραση ερεθισμάτων όπως ο βακτηριακός λιποπολυσακχαρίτης (Lipopolysaccharide, LPS) ή αντιγόνα μικροοργανισμών.

Επιπλέον υπάρχουν και άλλοι τύποι δενδριτικών που εντοπίζονται σε άλλους ιστούς όπως το δέρμα με χαρακτηριστικότερο πληθυσμό τα κύτταρα Langerhans (Langerhans Cells, LCs), οι επιφάνειες των βλεννογόνων του πνεύμονα και του εντέρου (Trombetta & Mellman, 2005).

1.10.2 Ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων

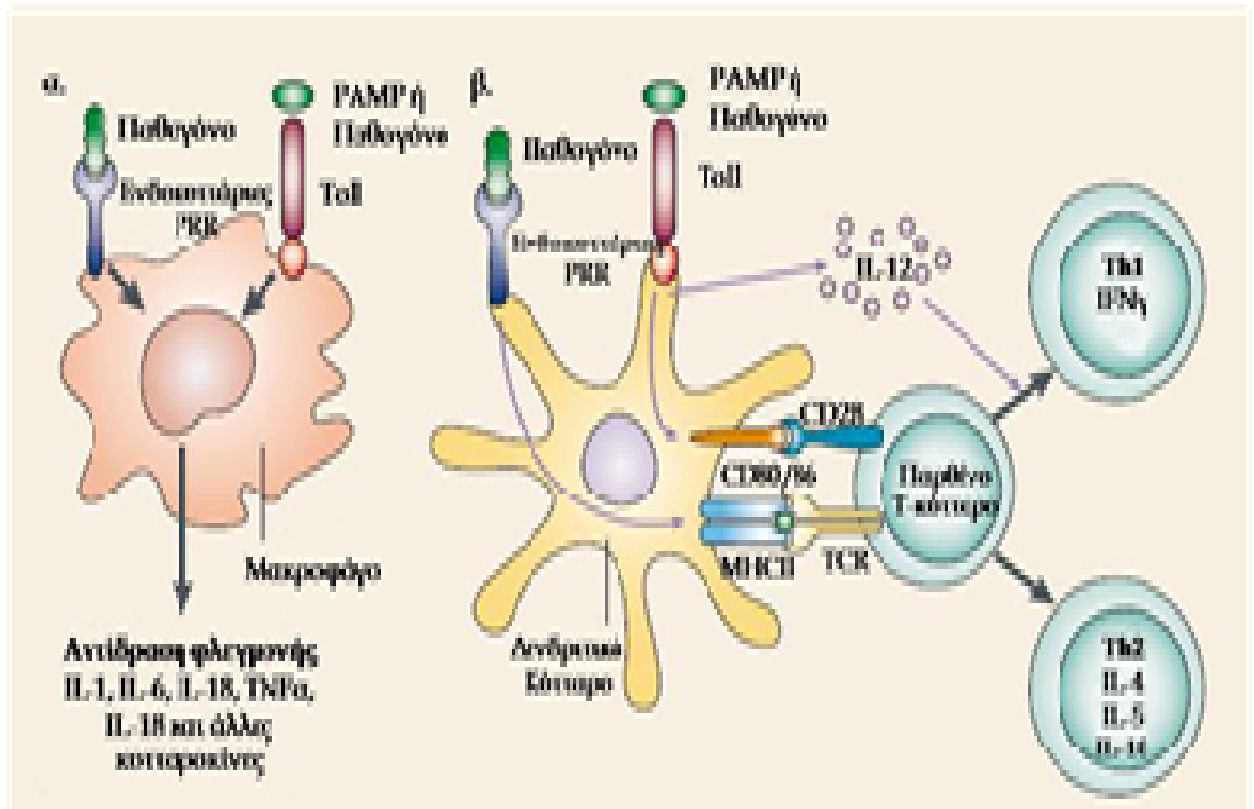
Η ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων αποτελεί μία σύνθετη διαδικασία η οποία οδηγεί τα δενδριτικά κύτταρα στο τελικό στάδιο της διαφοροποίησής τους. Στο στάδιο αυτό τα δενδριτικά κύτταρα καθίστανται ικανά να ενεργοποιήσουν τα T λεμφοκύτταρα. Η ωρίμανση των δενδριτικών επάγεται από σήματα στα οποία περιλαμβάνονται προφλεγμονώδεις ή αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκων α (Tumor Necrosis Factor α , TNF α), οι ιντερλευκίνες 1, 6 και 10 (interleukins 1, 6, 10, IL-1, IL-6, IL-10) και η ιντερφερόνη α (Interferon α , IFN α), η αλληλεπίδραση του CD40 προσδέτη (CD40 ligand, CD40L) που εντοπίζεται στην επιφάνεια των T λεμφοκυττάρων με το συνδεδεγμένο μόριο CD40, μικροβιακά προϊόντα και μόρια που απελευθερώνονται από κατεστραμένους ιστούς, τα οποία προσδένονται στους υποδοχείς τύπου Toll (Toll-like Receptors, TLRs). Οι διαφορετικοί τύποι των TLRs έχουν διαφορετική κατανομή έκφρασης και αναγνωρίζουν διαφορετικές κατηγορίες μορίων (Adams, O'Neill, & Bhardwaj, 2005).

Η ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων χαρακτηρίζεται από την αυξημένη έκφραση των μορίων του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC, major histocompatibility complex), των συνδεδεγμένων μορίων CD40, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2) και των μορίων προσκόλλησης όπως το CD54, τη μειωμένη ικανότητα

φαγοκυττάρωσης και πρόσληψης αντιγόνων, την αυξημένη παραγωγή κυτταροκινών (π.χ. IL-12), τα διαφορετικά πρότυπα έκφρασης υποδοχέων χημειοκινών και παραγωγής χημειοκινών. Κατά αυτόν τον τρόπο τα δενδριτικά κύτταρα μεταναστεύουν και στρατολογούν άλλους τύπους κυττάρων (Moll, 2003; Sundquist, Rydstrom, & Wick, 2004).

1.10.3 Δενδριτικά κύτταρα και υποδοχείς τύπου Toll

Οι υποδοχείς τύπου Toll (Toll-like receptors, TLRs) αποτελούν μία οικογένεια υποδοχέων η οποία αριθμεί 11 μέλη. Ανήκουν στην ευρύτερη κατηγορία των υποδοχέων αναγνώρισης δομικού προτύπου (Pattern Recognition Receptors, PRRs), οι οποίοι συνδέονται σε συντηρημένες μοριακές δομές παθογόνων μικροοργανισμών (Pathogen Associated Molecular Patterns, PAMPS) (Medzhitov, 2007). Έχουν εντοπιστεί στα έντομα και στα θηλαστικά και ο ρόλος τους είναι η ενεργοποίηση των μηχανισμών της έμφυτης ανοσίας. Οι TLRs περιλαμβάνονται στην υπεροικογένεια των υποδοχέων της ιντερλευκίνης 1 (interleukin 1 receptors, IL-1R) λόγω της αξιοσημείωτης ομολογίας τους με το συγκεκριμένο υποδοχέα στην κυτταροπλασματική τους περιοχή, ενώ η εξωκυττάρια περιοχή διαφέρει. Η ομόλογη κυτταροπλασματική περιοχή αποτελείται από περίπου 200 αμινοξέα και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μεταγωγή εξωκυττάρια μηνυμάτων στο κυτταρόπλασμα (Slack et al., 2000).



Εικόνα 1.10: Ο ρόλος των TLRs στην ανοσολογική απόκριση κατά την εισβολή παθογόνων μικροοργανισμών (Buer & Balling, 2003)

Η ενεργοποίηση των κυττάρων μέσω των TLRs, χαρακτηρίζεται από τις οδούς σηματοδότησης που εμπεριέχουν τα μόρια MyD88 και TRIF και ρυθμίζουν την ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων όπως ο NFκB. Η ενεργοποίηση του NFκB έχει ως αποτέλεσμα την ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων, την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών και την έκφραση υποδοχέων χημειοκινών, όπως ο CCR7, με αποτέλεσμα τη μετανάστευσή τους στα περιφερικά λεμφικά όργανα. Επίσης οι TLRs, συμβάλλουν στην επεξεργασία αντιγόνων για την παρουσίασή τους από τα δενδριτικά κύτταρα στα T λεμφοκύτταρα (van Vliet, den Dunnen, Gringhuis, Geijtenbeek, & van Kooyk, 2007). Επιπρόσθετα, η TLR μεσολαβούμενη σηματοδότηση, οδηγεί σε μεταβολή της έκφρασης των υποδοχέων των χημειοκινών στα δενδριτικά κύτταρα, με συνέπεια τη μετανάστευσή τους στους περιφερειακούς λεμφοειδείς ιστούς. Πιο συγκεκριμένα, επάγεται η ενισχυμένη έκφραση του υποδοχέα CCR7, γεγονός που καθιστά τα δενδριτικά πιο ευαίσθητα στη χημειοκίνη CCL21 η οποία παράγεται από λεμφοειδείς ιστούς και έτσι επάγεται η μετανάστευση των δενδριτικών προς αυτούς (Murphy, 2008).

Μεταξύ των υποδοχέων που έχουν μελετηθεί εκτενώς είναι οι TLR4 και TLR9. Ο TLR4 συνδέεται με το βακτηριακό λιποπολυσακχαρίτη (LPS) και επάγει την ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων (Pandey & Agrawal, 2006), ενώ ο TLR9 συνδέεται σε μη μεθυλιωμένα πρότυπα του ολιγοδινουκλεοτιδίου κυτοσίνης-γουανίνης (ODN CpG), τα οποία απουσιάζουν από το γενετικό υλικό των θηλαστικών, οδηγώντας στην παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών και στην επαγωγή T_H1 τύπου ανοσολογικής απόκρισης (Kumagai, Takeuchi, & Akira, 2008).

Μελέτες έχουν δείξει ότι το βακτηριακό DNA (προκαρυωτικό DNA) περιέχει σε αφθονία CpG ολιγονουκλεοτίδια τα οποία ενεργοποιούν ανοσολογικές αποκρίσεις. Ειδικότερα, το CpG ενεργοποιεί τα φυσικά φονικά κύτταρα (Natural Killers, NKs), τα μακροφάγα, τα Β λεμφοκύτταρα και τα δενδριτικά κύτταρα προκαλώντας την αύξηση των επιπέδων έκφρασης συγκεκριμένων επιφανειακών μορίων όπως του CD69, των μορίων MHC I και MHC II, καθώς επίσης και συνδιεγερτικών μορίων όπως το CD80 και το CD86. Επιπλέον το CpG διεγείρει την έκκριση κυτταροκινών, όπως η IL-1, η IL-6 και η IFN- γ , από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (Behboudi, Chao, Klenerman, & Austyn, 2000) μέσω της ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα NF κ B και της οδού σηματοδότησης των ενεργοποιημένων από μιτογόνα πρωτεϊνικών κινασών (mitogen-activated protein kinases, MAPKs). Οι κυτταροκίνες δρουν αυτοκρινώς στα ίδια τα δενδριτικά, ενισχύοντας την έκφραση συνδιεγερτικών μορίων (Murphy, 2008). Σε *in vitro* μελέτες έχειδειχθεί ότι το CpG επιδρά στα δενδριτικά κύτταρα του ποντικού επάγοντας την ωρίμανσή τους, καθώς παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων έκφρασης των μορίων MHC II, CD40 και CD86, ενώ ταυτόχρονα ενισχύθηκε η παραγωγή της IL-12 (Behboudi et al., 2000).

1.10.4.1 Μονοπάτια αντιγονοπαρουσίασης των δενδριτικών κυττάρων

Τα δενδριτικά κύτταρα, αποτελώντας επαγγελματικά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα εκφράζουν στην επιφάνειά τους μόρια MHC II και παρουσιάζουν συνδιεγερτική δραστηριότητα ώστε να ενεργοποιούν παρθένα T βοηθητικά κύτταρα (T-helpers CD4+, T_H) μέσω του υποδοχέα τους (T-cell Receptor, TCR). Επιπλέον διαθέτουν και μόρια MHC I, όπως και οποιοδήποτε εμπύρηνο κύτταρο του οργανισμού, μέσω των οποίων μπορούν να παρουσιάσουν αντιγόνα σε κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα (Cytotoxic T Lymphocytes, CD8+, CTLs) (Goldsby, 2007).

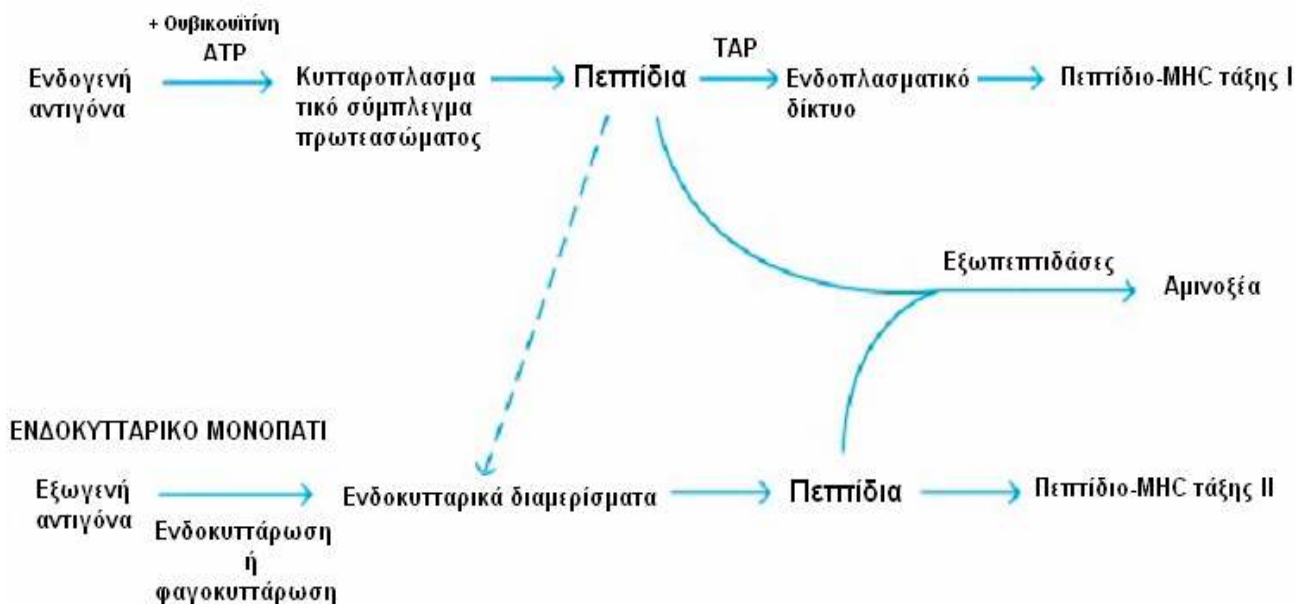
Ο όρος αντιγονοπαρουσίαση αναφέρεται στη διαδικασία κατά την οποία τα πεπτίδια ενός πρωτεϊνικού αντιγόνου, συνδέονται με μόρια MHC στο εσωτερικό του κυττάρου και τα συμπλέγματα μορίου MHC-πεπτιδίου μεταφέρονται στη μεμβράνη όπου και παρουσιάζονται. Τα μόρια MHC I και MHC II συνδέονται με πεπτίδια που υφίστανται επεξεργασία σε διαφορετικά ενδοκυτταρικά διαμερίσματα. Η επιλογή της σύνδεσης ενός αντιγονικού πεπτιδίου με τα μόρια τάξης I ή τάξης II, εξαρτάται από τον τρόπο εισόδου του στο κύτταρο και από τη θέση που θα λάβει χώρα η επεξεργασία του. Οι οδοί μέσω των οποίων παραγματοποιείται η αντιγονοπαρουσίαση είναι δύο: η κυτταροπλασματική οδός που αφορά σε ενδογενή αντιγόνα και η ενδοκυτταρική που αφορά σε εξωγενή (Goldsby, 2007).

Στην κυτταροπλασματική οδό πραγματοποιείται η σύνδεση των ενδογενών αντιγονικών πεπτιδίων με τα μόρια MHC I, σε μία διαδικασία όπου συμμετέχουν το πολυλειτουργικό σύστημα πρωτεασών (πρωτεάσωμα) με τις πρωτεϊνικές υπομονάδες του LMP2, LMP7 και LMP10, το αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο με τις πρωτεΐνες μεταφορείς που σχετίζονται με την επεξεργασία αντιγόνου, TAP1 και TAP2, και τις πρωτεΐνες μοριακές συνοδούς (τσαπερόνες) καλνεξίνη, καλρετικουλίνη και ταπασίνη. Το αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι η μεταφορά μέσω κυστιδίων του συστήματος Golgi, του συμπλέγματος των μορίων MHC I με το πεπτίδιο μήκους 8-10 αμινοξέων, στην επιφάνεια του κυττάρου (Goldsby, 2007).

Στην ενδοκυτταρική οδό, τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα επεξεργάζονται αντιγόνα που έχουν προσλάβει με φαγοκυττάρωση ή/και με ενδοκυττάρωση. Σε αυτήν την οδό συμμετέχουν τα εξής τρία ενδοκυττάρια διαμερίσματα αυξανόμενης οξύτητας: τα πρώιμα ενδοσώματα (pH 6.0-6.5), τα όψιμα ενδοσώματα (pH 5.0-6.0) και τα λυσοσώματα (pH 4.5-5.0). Σε αυτά, το αντιγόνο διασπάται σε ολιγοπεπτίδια των 13-18 αμινοξικών κατάλοιπων, τα οποία συνδέονται με τα μόρια MHC τάξης II. Τα μόρια MHC II συντίθενται στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο (ΑΕΔ) και εντοπίζονται συνδεδεμένα με ένα πρωτεϊνικό τριμερές, την αμετάβλητη αλυσίδα Ii (Invariant chain), η οποία βοηθά στη μεταφορά του MHC II από το ΑΕΔ στο δίκτυο trans Golgi. Το τμήμα της αμετάβλητης αλυσίδας Ii, που ονομάζεται πεπτίδιο της αμετάβλητης αλυσίδας σχετιζόμενο με μόρια τάξης II (Class II-associated invariant chain peptide, CLIP) παρεμποδίζει την πρόωρη δέσμευση οποιουδήποτε αντιγονικού πεπτιδίου. Όταν τα μόρια MHC II συνδεθούν με ένα πεπτίδιο, το σύμπλεγμα

πεπτιδίου-MHC II μεταφέρεται στην πλασματική μεμβράνη του αντιγονοπαρουσιαστικού κυττάρου (Goldsby, 2007).

ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ



Εικόνα 1.11: Σχηματική αναπαράσταση του κυτταροπλασματικής και του ενδοκυτταρικής οδού αντιγονοπαρουσίασης (Goldsby, 2007).

1.10.4.2 Διασταυρούμενη αντιγονοπαρουσίαση

Η διασταυρούμενη αντιγονοπαρουσίαση είναι εκείνη η διαδικασία μέσω της οποίας τα δενδριτικά κύτταρα προσλαμβάνουν εξωγενή αντιγόνα και τα παρουσιάζουν σε συνδυασμό με μόρια MHC I. Η διασταυρούμενη αντιγονοπαρουσίαση θεωρείται ότι προκύπτει μέσω δύο βασικών οδών (Joffre, Segura, Savina, & Amigorena, 2012). Η πρώτη είναι η «κανονική» οδός που περιλαμβάνει το ενδόσωμα και το κυτταρόπλασμα. Σε αυτήν, τα εξωγενή αντιγόνα μεταφέρονται μέσω ενδοσωμάτων στο κυτταρόπλασμα, όπου διασπώνται και κατεργάζονται από το πρωτεάσωμα και ακολούθως συνδέονται σε MHC I μόρια στο ενδοπλασματικό δίκτυο, όπως συμβαίνει με τα ενδογενή αντιγόνα (Hoeffel et al., 2007). Η δεύτερη οδός, είναι ανεξάρτητη του πρωτεασώματος και θεωρείται ότι τα δενδριτικά κύτταρα χρησιμοποιούν ενδοσωμικές πρωτεάσες προκειμένου να κατεργαστούν και να συνδέσουν τα αντιγόνα απευθείας στα MHC I μόρια στο εσωτερικό των ενδοσωμικών διαμερισμάτων (Di Pucchio et al., 2008). Η διασταυρούμενη αντιγονοπαρουσίαση συμβάλλει στην ενεργοποίηση των CD8⁺ T

κυτταρικών αποκρίσεων ενάντια ενδοκυττάρων παθογόνων και όγκων, και θεωρείται απαραίτητη για τη διατήρηση της αυτοανοχής. Μυελοειδή δενδριτικά κύτταρα που παράγονται *in vitro* υπό την επίδραση GM-CSF αποκλειστικά ή σε συνδυασμό με IL-4, πραγματοποιούν τέτοιου είδους αντιγονοπαρουσίαση σε αντιγόνα που προέρχονται από κύτταρα, είναι σε μορφή ανοσοσυμπλεγμάτων, ή εντοπίζονται ενσωματωμένα σε νανοσωματίδια PLGA [poly(lactic-co-glycolic acid)], σε μικροσφαιρίδια πολυστυρενίου κ.α (Joffe et al., 2012).

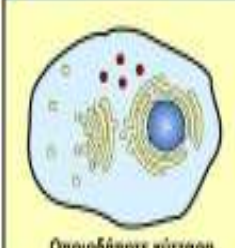

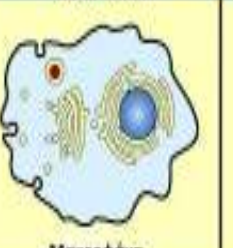
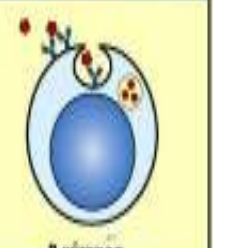
	Κυτταρική παθόγνα	Διασπασμένη αντιγονοπαρουσίαση ελιγμένων αντιγόνων	Παθόγνα στο εσωτερικό ενδοκυττάρων οργανιδίων	Εξοκυττάρια παθόγνα και τοξίνες
	 Όποιοδήποτε κύτταρο		 Μακροφάγα	 B κύτταρα
Αποικοδομούνται σε	Κυτταρόπλασμα	Κυτταρόπλασμα μέσω ενδοκυττάρωσης	Ενδοκυττάρια οργανίδια με χαμηλό pH	Οργανίδια ενδοκυττάρωσης με χαμηλό pH
Πεπτίδια συνδέονται σε	MHC τάξης I	MHC τάξης I	MHC τάξης II	MHC τάξης II
Παρουσιάζονται σε	Δραστικά CD8 T κύτταρα	Παρθένα CD8 T κύτταρα	Δραστικά CD4 T κύτταρα	Δραστικά CD4 T κύτταρα
Επίδραση στο αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο	Κυτταρικός θάνατος	Το αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο ενεργός δενδριτικό κύτταρο ενεργοποιεί τα CD8 T κύτταρα	Ενεργοποίηση για θανάτωση βακτηρίων και παρασίτων σε ενδοκυττάρια οργανίδια	Ενεργοποίηση B κυττάρων προς παραγωγή Ig, προεπιμένου να εξουδετερωθούν εξοκυττάρια βακτήρια/τοξίνες

Figure 5-2 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

Εικόνα 1.12: Οι διαφορετικές οδοί αντιγονοπαρουσίασης σε σχέση με τα διαφορετικής «τοπολογίας» αντιγόνα (Murphy, 2008)

1.10.5 Αλληλεπίδραση των δενδριτικών κυττάρων με τα T λεμφοκύτταρα

Η ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων από τα δενδριτικά κύτταρα πραγματοποιείται μέσω μίας πολύπλοκης δομής που ονομάζεται ανοσολογική σύναψη, η οποία αποτελεί μία ειδική μοριακή οργάνωση στην περιοχή επαφής των δενδριτικών κυττάρων με τα T-λεμφοκύτταρα. Η ανοσολογική σύναψη περιλαμβάνει τον υποδοχέα των T λεμφοκυττάρων και το MHC μόριο, το οποίο παρουσιάζει το αντιγονικό πεπτίδιο, συνδιεγερτικά μόρια και μόρια προσκόλλησης (CD40-CD40L

και CD28-CD80), κυτταροκίνες και υποδοχείς κυτταροκινών. Επιπλέον τα δενδριτικά κύτταρα είναι ιδιαίτερα εύπλαστα και μπορούν να προάγουν T βοηθητικούς (T_{H1} ή T_{H2}) ή ρυθμιστικούς (T regulatory) φαινότυπους. Το αποτέλεσμα εξαρτάται από τα διεγερτικά σήματα που προέρχονται από μικροβιακούς και ιστικούς παράγοντες (Murphy, 2008).

Η ενεργοποίηση των παρθένων T κυττάρων από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα ελέγχεται από το σύνολο τριών σημάτων. Το σήμα 1 περιλαμβάνει την αντιγονοειδική σύνδεση μεταξύ MHC-πεπτιδίου με τον υποδοχέα των T λεμφοκυττάρων, σύνδεση η οποία ενεργοποιεί τα T κύτταρα. Το σήμα 2 αφορά στη σύνδεση των συνδιεγερτικών μορίων B7 (CD80 και CD86) του αντιγονοπαρουσιαστικού κυττάρου με τον υποδοχέα CD28 του T κυττάρου, οδηγώντας στον κλωνικό πολλαπλασιασμό των T κυττάρων. Πρόκειται για μία διαδικασία όπου το συνδιεγερτικό σήμα προωθεί το T κύτταρο να εισαχθεί στην G1 φάση του κυτταρικού κύκλου και να συνθέσει ιντερλευκίνη 2 (IL-2). Η IL-2 δρα αυτοκρινώς στα T κύτταρα, μέσω του υποδοχέα της, προάγοντας τον πολλαπλασιασμό των T κυττάρων. Το σήμα 3 εξαρτάται από το τοπικό μικροπεριβάλλον που αναπτύσσεται μεταξύ του αντιγονοπαρουσιαστικού κυττάρου και του παρθένου T, ενώ καθορίζει την ανάπτυξη συγκεκριμένου υποπληθυσμού δραστικών κυττάρων από τα $CD4^+$ και τα $CD8^+$ κύτταρα. Οι υποπληθυσμοί στους οποίους μπορούν να διαφοροποιηθούν τα $CD4^+$ T κύτταρα είναι: ο T_{H1} , ο T_{H2} , ο T_{H17} και ο πληθυσμός των T ρυθμιστικών κυττάρων, ενώ τα $CD8^+$ T κύτταρα διαφοροποιούνται σε κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα (Murphy, 2008).





	CD8 T κύτταρα	CD4 T _H 1 T κύτταρα	CD4 T _H 2 T κύτταρα	CD4 T _H 17 T κύτταρα	CD4 Ρυθμιστικά T κύτταρα (διάφοροι τύποι)
Τύποι δραστικών T κυττάρων					
Κύριες λειτουργίες στην προσαρμοστική ανοσολογική απόκριση	Θανατώνουν μολυσμένα με ιούς κύτταρα	Ενεργοποιούν μαλυσμένα μακροφάγα. Παρέχουν βοήθεια στα B κύτταρα για την παραγωγή αντισωμάτων	Παρέχουν βοήθεια στα B κύτταρα για την παραγωγή αντισωμάτων επιδικά στην αναστροφή σε IgE	Ενισχύουν την απόκριση των ουδετερόφιλων	Καταστέλλουν τις T κυτταρικές αποκρίσεις
Παθογόνα που στοχοποιούνται	Ιοί(π.χ ,influenza ,rabies,vaccinia) Ορισμένα ενδοκυττάρια βακτήρια	Μικρόβια που διάβιούν σε οργάνισμα μακροφάγων, πχ μυκοβακτήρια, <i>Listeria</i> <i>Leishmania donovani</i> <i>Pneumocystis carinii</i> Εξωκυττάρια βακτήρια	Παράσιτα όπως οι Ελμινθες	Εξωκυττάρια βακτήρια π.χ <i>Salmonella</i> <i>enterica</i>	

Figure 8-1 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

Εικόνα 1.13: Διάκριση των κυτταρικών υποπληθυσμών που προκύπτουν από τα CD8+ και CD4+ κύτταρα (Murphy, 2008)

1.10.6 Διάκριση των διαφοροποιούμενων από CD4+ κύτταρα υποπληθυσμών T

Τα T_{H1} εκκρίνουν IFN-γ και λεμφοτοξίνη και ενεργοποιούν τους μηχανισμούς άμυνας του ξενιστή ενάντια σε ενδοκυττάρια παθογόνα. Σημαντικές για την ανάπτυξη των T_{H1} κυττάρων είναι οι κυτταροκίνες IL-12, IFN-γ και IL-18. Πηγή της IL-12 είναι τα μακροφάγα και τα δενδριτικά, τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί από διάφορους παράγοντες, όπως τα ενδοκυτταρικά παράσιτα ή βακτηριακά προϊόντα. Σημαντική για την ανάπτυξη του T_{H1} υποπληθυσμού είναι και η IFN-γ. Η κυτταροκίνη αυτή αυξάνει την παραγωγή της IL-12 από τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα, ενώ παράλληλα ενεργοποιεί και τον υποδοχέα της IL-12 στα T κύτταρα (Goldsby, 2007). Η σύνδεση της IL-12 στον υποδοχέα της ενεργοποιεί το μεταγραφικό παράγοντα STAT4 ο οποίος συνδέεται στον εκκινητή του γονιδίου που κωδικοποιεί για IFN-γ (Agnello et al., 2003). Επίσης, η παραγωγή της IFN-γ επάγεται και μέσω του μονοπατιού του TCR το οποίο είναι ανεξάρτητο του STAT4 (Moser & Murphy, 2000). Στη συνέχεια, η IFN-γ ενεργοποιεί την οδό σηματοδότησης η οποία τελικά ενεργοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα STAT1, ο οποίος σε συνδυασμό με το μονοπάτι του TCR, ενισχύει την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα T-bet. Ο T-bet προκαλεί αναδιοργάνωση της χρωματίνης στην περιοχή του γονιδίου της IFN-γ,

διευκολύνοντας την πρόσβαση μίας επαγόμενης από τον STAT4 πρωτεΐνης, της πρωτεΐνης δέσμευσης του CREB (CREB-binding protein), ενισχύοντας την έκφραση του γονιδίου της IFN- γ . Παράλληλα, ο T-bet ενισχύει ο ίδιος την έκφρασή του, σταθεροποιώντας την έκφραση της $\beta 2$ αλυσίδας του υποδοχέα IL-12R (Agnello et al., 2003; Grogan & Locksley, 2002).

Τα T_{H2} κύτταρα εκκρίνουν IL-4, IL-5 και IL-13 (Mosmann & Coffman, 1989), οι οποίες αναστέλλουν την T_{H1} απόκριση, ευνοώντας την ανάπτυξη της χυμικής ανοσίας, η οποία προστατεύει από τα εξωκυττάρια παθογόνα (Abbas, Murphy, & Sher, 1996). Τα δενδριτικά κύτταρα δρουν έμμεσα στη διαφοροποίηση προς T_{H2} κύτταρα με την παραγωγή των κυτταροκινών IL-10 και TGF- β που παρεμποδίζουν την παραγωγή της IL-12. Επίσης, το συνδιεγερτικό μόριο CD86 φαίνεται να απαιτείται *in vitro* και *in vivo* στη διαφοροποίηση των T_{H2} κυττάρων, ενώ το CD80 θεωρείται περισσότερο ουδέτερο μόριο. Σύμφωνα με τα παραπάνω, η διαφοροποίηση των T_{H2} κυττάρων γίνεται αυθόρμητα απουσία της IL-12 (Moser & Murphy, 2000). Τα T_{H2} κύτταρα παράγουν IL-4, η οποία ενεργοποιεί το μεταγραφικό παράγοντα STAT6. Αυτός με τη σειρά του προκαλεί την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα GATA3. Ο συγκεκριμένος μεταγραφικός παράγοντας έχει την ικανότητα να αυτορυθμίζει την έκφρασή του, καθώς και να αναδιατάσσει τη χρωματίνη στην περιοχή των γονιδίων που κωδικοποιούν τις κυτταροκίνες IL-4 και IL-13. Παράλληλα, ενεργοποιούνται οι μεταγραφικοί παράγοντες c-Maf και NFAT, οι οποίοι ρυθμίζουν την έκφραση των κυτταροκινών IL-4, IL-5 και IL-13 (Agnello et al., 2003; Grogan & Locksley, 2002).

Ο πληθυσμός των T ρυθμιστικών κυττάρων διακρίνεται από την παραγωγή των κυτταροκινών IL-10 και TGF- β , οι οποίες αναστέλλουν τις T αποκρίσεις. Η ρυθμιστική ικανότητα αυτών των κυττάρων είναι σημαντική για τη διατήρηση της αυτοανοχής κατά τη διάρκεια έντονων ανοσοαποκρίσεων ενάντια σε παθογόνα (Murphy, 2008). Έως σήμερα έχουν χαρακτηριστεί δύο υποομάδες ρυθμιστικών κυττάρων: τα φυσικά ρυθμιστικά T-κύτταρα (natural regulatory T cells, nTreg) και τα επαγόμενα ρυθμιστικά T-κύτταρα (inducible regulatory T cells, iTreg). Τα nTreg αναπτύσσονται στο θύμο αδένος και η επιλογή τους εξαρτάται από την ικανότητα πρόσδεσης του TCR στα μόρια MHC II. Ειδικότερα, χαμηλή πρόσδεση οδηγεί στη θετική επιλογή των συμβατικών $CD4^+$ T-λεμφοκυττάρων ενώ μέτρια πρόσδεση

οδηγεί στη θετική επιλογή των $CD4^+CD25^+$ T ρυθμιστικών κυττάρων (Martha S. Jordan et al., 2001). Αυτά αποτελούν το 5-10% των $CD4^+$ T-λεμφοκυττάρων της περιφέρειας και θεωρείται ότι αποτελούν υποομάδα των $CD4^+$ T-λεμφοκυττάρων που εκφράζει στην επιφάνειά τους την α -αλυσίδα του υποδοχέα IL-2R (CD25) (Sakaguchi, Sakaguchi, Asano, Itoh, & Toda, 1995). Χαρακτηριστική είναι επίσης η έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα FoxP3, ο οποίος εμπλέκεται ενεργά στη διαφοροποίηση των nTregs (Hori, Nomura, & Sakaguchi, 2003).

Ο πληθυσμός των T_{H17} διακρίνεται από την παραγωγή της κυτταροκίνης IL-17 και έχει χαρακτηριστεί ως μία διακριτή κατηγορία δραστικών κυττάρων. Η IL-17 δρα σε περιοχές μόλυνσης επάγοντας την έκκριση κυτταροκινών και χημειοκινών από τα τοπικά κύτταρα, οι οποίες προσελκύουν τα ουδετερόφιλα κύτταρα. Επιπλέον, τα T_{H17} κύτταρα παράγουν και την κυτταροκίνη IL-22, η οποία δρα συνεργιστικά με την IL-17 επάγοντας την τοπική παραγωγή αντιμικροβιακών πεπτιδίων (Murphy, 2008). Η διαφοροποίηση των παρθένων $CD4^+$ T-λεμφοκυττάρων σε T_{H17} καθορίζεται από την παρουσία των κυτταροκινών TGF- β και IL-6 στο μικροπεριβάλλον τους (Bettelli et al., 2006; Li, Wan, & Flavell; Mangan et al., 2006). Η IL-6 παράγεται από τα δενδριτικά κύτταρα καθώς και από άλλα APCs, όπως είναι τα μακροφάγα, μετά την αναγνώριση των PAMPs κατά την πρόσδεσή τους στους υποδοχείς PRRs. Αντίθετα, ο TGF- β παράγεται από τα Treg. Η συνδυασμένη δράση αυτών των κυτταροκινών προκαλεί τη διαφοροποίηση των $CD4^+$ T-λεμφοκυττάρων σε T_{H17} και παράλληλα παρεμποδίζει τη διαφοροποίησή τους σε Treg με την παρεμπόδιση της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα Foxp3 (Bettelli et al., 2006; Mangan et al., 2006). Επιπλέον, σημαντικό ρόλο κατέχει και η κυτταροκίνη IL-23 (Veldhoen, Hocking, Atkins, Locksley, & Stockinger, 2006). Αυτή αποτελεί μία ετεροδιμερή κυτταροκίνη, η οποία συνίσταται από τις υπομονάδες IL-12/23p40 και p19. Παράγεται από τα APCs μετά την αναγνώριση των PAMPs. Ωστόσο, η παρουσία της IL-23 προάγει τον πολλαπλασιασμό και όχι τη διαφοροποίηση των T_{H17} κυττάρων, καθώς και την παραγωγή της IL-17 από αυτά (Dong, 2006). Ο μηχανισμός διαφοροποίησης είναι ανεξάρτητος των μεταγραφικών παραγόντων STAT4 και STAT6 που είναι υπεύθυνοι για την ανάπτυξη των T_{H1} και T_{H2} κυττάρων, αντίστοιχα. Παρά ταύτα, η διαφοροποίηση των T_{H17} φαίνεται να επηρεάζεται από την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα STAT-3, ο οποίος ενεργοποιείται από τις κυτταροκίνες IL-23 και IL-6 και προσδένεται στους εκκινητές των γονιδίων που

κωδικοποιούν για την IL-17 και την IL-17F (Chen, Laurence, & O'Shea, 2007). Τα παρθένα CD4⁺ T κύτταρα διαφοροποιούνται σε T_{H17} όταν είναι ταυτόχρονα παρούσες οι κυτταροκίνες IL-6 και TGF-β και απύσες οι κυτταροκίνες IL-4 και IL-12. Επιπρόσθετα, τα T_{H17} κύτταρα εκφράζουν τον υποδοχέα της IL-23 αντί του υποδοχέα της IL-12 που εκφράζεται από τα T_{H1} κύτταρα. Η διαφοροποίηση σε T_{H17} κύτταρα φαίνεται να βρίσκεται υπό τον έλεγχο του μεταγραφικού παράγοντα RORγT, ο οποίος επάγεται υπό αυτές τις συνθήκες και ο οποίος οδηγεί στην έκφραση του υποδοχέα της IL-23 (Murphy, 2008).

1.10.7 Τα δενδριτικά κύτταρα ως εργαλεία για την παραγωγή εμβολίων ενάντια στη *Leishmania-ex vivo* δοκιμασίες με τη χρήση δενδριτικών

Επιδημιολογικά δεδομένα έχουν δείξει ότι άνθρωποι που είχαν μολυνθεί στο παρελθόν από το παράσιτο *Leishmania* αναπτύσσουν ανθεκτικότητα στην επαναμόλυνση, το οποίο υποδεικνύει ότι υπάρχει δυνατότητα ανάπτυξης ενός αποτελεσματικού εμβολίου έναντι της νόσου. Το εμβόλιο έναντι της λείσμανιάσης πρέπει: 1) να είναι ασφαλές, 2) να είναι άμεσα διαθέσιμο, 3) να ενεργοποιεί τα CD4⁺ και CD8⁺ T-λεμφοκύτταρα και να επάγει τη δημιουργία T-κυττάρων μνήμης, 4) να είναι αποτελεσματικό έναντι της δερματικής και της σπλαγχνικής λείσμανιάσης, 5) να είναι σταθερό σε θερμοκρασία δωματίου και 6) να χρησιμοποιείται ως εμβόλιο πρόληψης και θεραπείας.

Πρόσφατες μελέτες έχουν καταδείξει τη χρήση των δενδριτικών κυττάρων ως φορείς αντιγόνων για την ανάπτυξη εμβολίων έναντι παθογόνων μικροοργανισμών ή καρκινικών κυττάρων, καθώς αποτελούν το συνδετικό κρίκο μεταξύ της έμφυτης και της προσαρμοστικής ανοσίας. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο σχεδιασμός ενός εμβολίου (Sipuleucel-T, Provenge®) βασισμένου στη χρήση των δενδριτικών κυττάρων έναντι του καρκίνου του προστάτη που έχει ήδη εγκριθεί από τον FDA των ΗΠΑ. (Kantoff et al., 2010). Επίσης, ενθαρρυντικά αποτελέσματα έχουν δώσει κλινικές μελέτες που αφορούν στον προληπτικό εμβολιασμό ή στη θεραπεία έναντι του ιού HIV (Human Immunodeficiency Virus, Ιός ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας). Αν και υπάρχουν αρκετές μελέτες για το σχεδιασμό εμβολίων με τη χρήση των δενδριτικών κυττάρων ενάντια σε μολυσματικές νόσους, δεν υπάρχει ακόμα κάποιο διαθέσιμο εμβόλιο ή θεραπεία (Masic, Hurdal, Nieuwenhuizen, Brombacher, & Moll, 2012). Οι περισσότερες μελέτες προέρχονται από τον *ex vivo* χειρισμό των

δενδριτικών και από *in vitro* δοκιμασίες όπου τα δενδριτικά «φορτώνονται» με επιθυμητά αντιγόνα.

Προκειμένου να γίνει ορθολογική χρήση των δενδριτικών κυττάρων ως οχήματα μεταφοράς αντιγόνων θα πρέπει να διευκρινιστεί η επιθυμητή επαγόμενη ανοσολογική απόκριση. Αυτή καθορίζεται από το εμβολιαστικό σχήμα που περιλαμβάνει την οδό χορήγησης των δενδριτικών κυττάρων, τον αριθμό των χορηγήσεων και την κατάλληλη επιλογή του ανοσοενισχυτικού. Επίσης, επηρεάζεται από τον βαθμό ωρίμανσής των δενδριτικών κυττάρων και το γενετικό υπόβαθρο του δέκτη. Σχετικά με την οδό χορήγησης, είναι γνωστό ότι αυτή μπορεί να επηρεάσει το είδος της επαγόμενης ανοσολογικής απόκρισης, καθώς το αντιγόνο προσλαμβάνεται από διαφορετικές κατηγορίες δενδριτικών κυττάρων, τα οποία στη συνέχεια μεταναστεύουν σε διαφορετικά λεμφικά όργανα. Ειδικότερα, η ενδοδερμική (intradermal, i.d) και η υποδόρια (subcutaneous, s.c.) χορήγηση των δενδριτικών κυττάρων οδηγεί σε μετανάστευσή τους κατά κύριο λόγο στις περιοχές των Τ-λεμφοκυττάρων των επιχώριων λεμφαδένων, ενώ η ενδοφλέβια (intravenous, i.v.) χορήγησή τους οδηγεί στη μετανάστευσή τους στο σπλήνα. Επομένως, η ενδοπεριτοναϊκή και η ενδολεμφική χορήγηση των δενδριτικών κυττάρων χαρακτηρίζεται από βιοδιασπορά (κατανομή σε διάφορα όργανα) (Eggert et al., 1999). Μάλιστα, ενδοφλέβια χορήγηση δενδριτικών κυττάρων στο πειραματικό μοντέλο του ποντικού έχει ως αποτέλεσμα την παραμονή τους στο σπλήνα για χρονικά διαστήματα μεγαλύτερα των πέντε ημερών. Επίσης, η εντόπιση των δενδριτικών κυττάρων επηρεάζει σημαντικά την επαγόμενη ανοσολογική απόκριση σε σχέση με το πρότυπο των παραγόμενων κυτταροκινών, εξαιτίας των ενδογενών διαφορών στην αρχιτεκτονική και λειτουργία μεταξύ των λεμφικών οργάνων (Colino & Snapper, 2003). Ειδικότερα, ο τύπος της επαγόμενης από τα δενδριτικά κύτταρα ανοσολογικής απόκρισης επηρεάζεται από τις κυτταροκίνες του μικροπεριβάλλοντος όπου γίνεται η διέγερση των Τ-λεμφοκυττάρων. Σε ό,τι αφορά τη λεισμανίαση, στα πειραματικά μοντέλα ποντικών, προστασία έναντι του παρασίτου αναπτύσσεται με ενδοφλέβια χορήγηση δενδριτικών και όχι με ενδοδερμική ή ενδοπεριτοναϊκή (Moll & Berberich, 2001). Σε ό,τι αφορά το βαθμό ωρίμανσής τους, είναι γνωστό ότι πλήρης ωρίμανση *ex vivo* παρεμποδίζει τη μετανάστευσή τους στα δευτερογενή λεμφικά όργανα *in vivo*. Αντίθετα, η ανοσοποίηση με ανώριμα δενδριτικά κύτταρα καταλήγει στην επαγωγή ανοχής (Colino & Snapper, 2003; Steinman & Pope, 2002).

Καθώς αρκετές πρωτεΐνες είναι ελάχιστα ανοσογονικές, είναι απαραίτητη η χρήση ανοσοενισχυτικών ουσιών προκειμένου να επιτευχθούν οι επιθυμητές ανοσολογικές αποκρίσεις (Murphy, 2008) (Nierkens, Tel, Janssen, & Adema, 2013). Ρόλος των ανοενοισχυτικών είναι η ενίσχυση της ανοσογόνου δράσης ενός αντιγόνου μέσω της κατάλληλης ενεργοποίησης των δενδριτικών κυττάρων. Οι αποκρίσεις σε διαλυτές πρωτεΐνες κυμαίνονται από μηδενικές σε χαμηλές έως και υψηλές. Αποκρίσεις που είναι κατώτερες των προσδοκώμενων μπορούν να ενισχυθούν με τη χρήση ενός ανοσοενισχυτικού (Nierkens et al., 2013). Ανοσοενισχυτική είναι οποιαδήποτε ουσία ενισχύει τη ανοσογονικότητα (immunogenicity) ουσιών που αναμιγνύονται με αυτή. Τα ανοσοενισχυτικά είναι απαραίτητα εν μέρει, για την ενεργοποίηση των δενδριτικών κυττάρων προκειμένου να αποκτήσουν το πλήρες αντιγονοπαρουσιαστικό τους δυναμικό, απουσία μόλυνσης. Διαλυτές πρωτεΐνες είναι ελάχιστα ανοσογονικές ή και καθόλου όταν εκτίθενται κατά αποκλειστικότητα στο ανοσοποιητικό σύστημα (Murphy, 2008). Αναφορικά με αυτό, σε μελέτες ανάπτυξης εμβολίου έναντι της λείσμανιάσης με τη χρήση δενδριτικών ως φορέων αντιγόνων χρησιμοποιείται κυρίως ως ανοσοενισχυτικό το δινοκλεοτίδιο CpG (CpG-ODN), το οποίο αποτελεί προσδέτη του υποδοχέα TLR9 (Majumder, Bhattacharjee, Paul Chowdhury, & Majumdar, 2012). Το CpG-ODN επιδρά στα δενδριτικά επάγοντας τη λειτουργική διαφοροποίηση τους.

Μέχρι σήμερα, ποικίλες μελέτες έχουν δείξει ενθαρρυντικά αποτελέσματα σε εμβολιασμένους ποντικούς με δενδριτικά κύτταρα, τα οποία είχαν επωαστεί *ex vivo* με διαλυτό αντιγόνο ή συγκεκριμένα πρωτεϊνικά μόρια του παρασίτου *Leishmania* (Masic et al., 2012; Schwarz et al., 2013). Τα ζώα αυτά εμφάνισαν μειωμένα επίπεδα παρασιτικού φορτίου και υψηλά επίπεδα κυτταροκινών της προστατευτικής T_{H1} απόκρισης. Στα εν λόγω πρωτόκολλα, τα δενδριτικά υπερέκφραζαν IL-12 και χρησιμοποιήθηκαν με επιτυχία τόσο για τον εμβολιασμό όσο και για την ανοσοθεραπεία των ποντικών που ήδη εμφάνιζαν εγκατεστημένη μόλυνση (Ahuja et al., 1999) και σε συγκεκριμένες περιπτώσεις χορηγήθηκαν σε συνδυασμό με χημειοθεραπευτικά μέσα (παράγωγα του πεντασθενούς αντιμονίου) (M. Ghosh et al., 2003).

1.11 Πειραματικά μοντέλα για τη μελέτη της λεισμανίασης

Τα πειραματικά ζωικά μοντέλα που χρησιμοποιούνται για τη μελέτη της λεισμανίασης μιμούνται σε μεγάλο βαθμό την παθολογία και τις ανοσολογικές αποκρίσεις που παρατηρούνται στον άνθρωπο. Έχουν αναπτυχθεί πολλά πειραματικά μοντέλα, το κάθε ένα από τα οποία εμφανίζει συγκεκριμένα χαρακτηριστικά, ωστόσο κανένα δεν προσομοιάζει επακριβώς τι συμβαίνει στον άνθρωπο. Για τον *in vivo* έλεγχο εμβολίων κατά της σπλαγγχικής λεισμανίασης χρησιμοποιούνται διάφορα είδη ζώων, τα οποία είναι: τα BALB/c ποντίκια, το Συριακό χρυσό χάμστερ, οι σκύλοι και τα μη ανθρωποειδή πρωτεύοντα (Garg & Dube, 2006).

Τα μοντέλα των ποντικών (*Mus musculus*) χρησιμοποιούνται εκτεταμένα για τη μελέτη των μηχανισμών παθογένεσης της λεισμανίασης, αλλά και για τον έλεγχο νέων θεραπευτικών και ανοσοπροφυλακτικών παραγόντων, των οποίων η χρήση απαιτεί σχετικά μικρές ποσότητες. Τα ζώα αυτά διαβιώνουν σε στείρες συνθήκες SPF (Specific Pathogen Free), ενώ διατίθενται συγκεκριμένες γενετικές σειρές αυτών, έτσι ώστε τα αποτελέσματα να είναι αναπαραγώγιμα. Τα ποντίκια είναι ευαίσθητα στα περισσότερα στελέχη και είδη του παρασίτου *Leishmania*. Παραταύτα, το συριακό χρυσό χάμστερ (*Mesocricetus auratus*) αποτελεί καλύτερο μοντέλο μελέτης της σπλαγγχικής λεισμανίασης, καθώς προσομοιάζει περισσότερο τις χρόνιες μη ιάσιμες μολύνσεις που παρατηρούνται στον άνθρωπο. Επίσης, η μόλυνση σκύλων με *L. infantum* ή *L. chagasi* αποτελεί σημαντικό πειραματικό μοντέλο, καθώς αναπαράγει τη φυσική μόλυνση με όμοιο τρόπο, όπως συμβαίνει στον άνθρωπο (S. Gupta & Nishi, 2011).

Αρκετές παρατηρήσεις που προκύπτουν από τα παραπάνω μοντέλα τρωκτικών ίσως να μην είναι όμοιες ή σχετικές με αυτές από τον ξενιστή-άνθρωπο, εξαιτίας της μεγάλης φυλογενετικής απόστασης. Η ανάπτυξη μοντέλων της λεισμανίασης από μη ανθρωποειδή πρωτεύοντα προσομοιάζει καλύτερα την ανθρώπινη κατάσταση, ενώ περιγράφεται σε μελέτες διαφορετικών εκφάνσεων της νόσου, οι οποίες δεν θα μπορούσαν να πραγματοποιηθούν σε ανθρώπους για ηθικούς λόγους (S. Gupta & Nishi, 2011).

1.12 Η πρωτεΐνη elongation factor 2 (παράγοντας επιμήκυνσης 2) της *Leishmania infantum*

Η επιλογή του κατάλληλου αντιγόνου είναι καθοριστικής σημασίας για την ανάπτυξη ενός επιτυχημένου εμβολίου. Μεταξύ των υποψήφιων αντιγόνων για την ανάπτυξη ενός αποτελεσματικού εμβολίου έναντι της λείσμανιάσης είναι και ο παράγοντας επιμήκυνσης 2 (elongation factor 2, EF-2) του παρασίτου *Leishmania*, ο οποίος έχει φανεί ότι μπορεί να επάγει την ενεργοποίηση T_{HI} ανοσοαποκρίσεων. Η πρωτεΐνη αυτή ανήκει στο κλάσμα των διαλυτών πρωτεϊνών του παρασίτου με μοριακή μάζα 94,147 kDa. Κωδικοποιείται από ένα γονίδιο το οποίο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 36 του παρασίτου και έχει μήκος 2.538 νουκλεοτίδια (Εικ. 1.14). Η νουλεοτιδική αλληλουχία της βρίσκεται κατατεθειμένη στη βάση δεδομένων UniProt υπό την επίσημη ονομασία EF2-1 και με συνώνυμες ονομασίες τις εξής: EF2-2, LINJ_36_190, LINJ_36_200 και LINJ_36_210. Το μήκος της παραγόμενης πρωτεΐνης ανέρχεται στα 845 αμινοξικά κατάλοιπα (Εικ. 1.15).

Ο EF-2 συμμετέχει στο μηχανισμό της πρωτεϊνοσύνθεσης του παρασίτου *L. infantum*. Ειδικότερα, ο ρόλος του αφορά στην επιμήκυνση πολυπεπτιδικών αλυσίδων κατά τη βιοσύνθεση πρωτεϊνών, μέσω της ενεργότητας GTPάσης που διαθέτει (<http://www.uniprot.org/uniprot/A4ICW8>).

>ENA|CAM72697|CAM72697.1 *Leishmania infantum* JPCM5 elongation factor 2

```
ATGGTGAAC TTTACCGTCGATCAGGTCCGCGAGCTGATGGACTATCCGGACCAGATCCGGAACATGT
CCGTGATTGCTCACGTCGACCACGGCAAGTCGACGCTGTCCGACTCTCTCGTTGGTGCTGCCGGC
ATCAAGATGGAGGAGGCCGGCGATAAGCGGATCATGGATACGCGCGCGGATGAGATCGCGCGTGGT
ATCACGATCAAGTCCACCGCCATCTCCATGCACTACCACGTGCCGAAGGAGATGATTGGCGATCTGG
ATGACGACAAGCGCGACTTCTTGATCAACCTGATCGACTCCCCGGACACGTCGACTTCAGCTCCGA
GGTGA CTGCCGCTCTTCGTGTGACGGACGGCGCGCTGGTTCGTGGTGGACTGCGTGGAGGGCGTGTGC
GTGCAGACGGAGACGGTGCTGCGCCAGGCGCTGACGGAGCGCATCCGCCCTGTTGTGTTTCATCAACA
AGGTGGACCGCGCCATCCTTGAGCTCCAACCTGGACCCCGAGGAGGCGTACCAGGGCTTCGTGAAGAC
GCTGCAGAACGTGAACGTGGTGGTTGCCACGTACAATGACCCCGAGCATGGGCGACGTGCAGGTGTCC
CCCGAGAAGGGCACTGTGGCGATCGGCTCTGGCCTGCAGGCGTGGGCGTTCTCGCTGACCCGCTTTG
CGAACATGTATGCGGCGAAGTTCGGCGTGGACGAGCTGAAGATGCGCGAGCGCCTGTGGGGCGACA
ACTTCTTCGACGCGAAGAACAAGAAGTGATCAAGCAGGAGACGAACGCCGATGGCGAGCGCGTGC
GCCGCGCTTCTGCCAGTCTGCCTAGACCCCATCTACCAGATCTTCGACGCTGTGATGAACGAGAA
GAAGGACAAGGTGGACAAGATGCTCAAGTCGCTGCACGTGACGCTGACGGCTGAGGAGCGCGAGCA
GGTGCCGAAGAAGCTTCTGAAGACGGTGATGATGAAGTTCCTGCCGGCTGCTGAGACGCTGCTGCAG
ATGATCGTGGCGCACCTGCCGTCGCCAAGAAGGCGCAGGCGTACCGCGCGGAGATGCTGTACTCTG
GCGAGGCGTCGCCGGAGGACAAGTACTTCATGGGTATCAAGA ACTGCGACCCCGCTGCGCCGCTCAT
GCTGTACATCAGCAAGATGGTGCCGACGGCCGACCGCGGCCGCTTCTTTGCCTTTGGCCGCATCTTCT
CCGGTAAGGTGCGCAGCGGCCAGAAGGTGCGCATCATGGGTAACAAC TACGTCTACGGCAAGAAGC
```

AGGACCTGTACGAGGACAAGCCTGTGCAGCGCTCCGTGCTGATGATGGGCCGCTACCAGGAGGCCGT
GGAGGACATGCCGTGCGGTAACGTGGTGGGCCTTGTGGGCGTGGACAAGTACATTGTGAAGTCCGCG
ACGATCACGGACGACGGCGAGAGCCCGCACCCGCTGCGCGACATGAAGTACTCTGTGTCGCCCCGTCG
TGCGTGTGGCCGTGGAGGCGAAGAACCCGTCCGACCTGCCGAAGCTTGTGGAGGGCCTGAAGCGCCT
TGCCAAGTCCGACCCGCTGGTGGTGTGCAGCATTGAGGAGTCTGGCGAGCACATTGTTGCCGGCGCT
GGCGAGCTTACCTTGAGATTTGCCTGAAGGATCTCCAGGAGGACTTCATGAACGGCGCGCCGCTGA
AGATCTCCGAGCCGGTGGTGTGCTTCCGCGAGACCGTGACGGACGTGTGTCGTCGAGCAGTGCCTGTC
GAAGTCTGCGAACAAGACAACCGTCTCTTCTGCCGCGGTGCGCCGCTGACAGAGGAGCTGGCGCTG
GCGATGGAGGAGGGCACCCGCTGGCCCCGAGGCGGATCCGAAGGTGCGCGCGCGCTTCCCTTGCCGAC
AACTACGAGTGGGATGTGCAGGAGGCCCGCAAGATCTGGTGCTACGGCCCCGACAACCCGCGGCCCG
AACGTGGTTCGTGGATGTGACGAAGGGTGTCCAGAACATGGCTGAGATGAAGGACTCCTTTGTTGCGG
CGTGGCAGTGGGCGACCCGCGAGGGTGTGCTGTGCGACGAGAACATGCGCGGCGTGCAGCTGAACG
TGGAGGACGTGACGATGCACGCGGATGCCATTCACCGTGGTGGCGGCCAGATCATCCCGACGGCGC
GCCGCGTGTCTACGCGTGTGCTGACGGCGTGCCTGACGGCGCTGCGCCGCGCTGATGGAGCCGATGTTG
CATCCAGACCGTGGAGCACGCCATGGGCGCATCTACGGTGTGCTGACCCGCCGCCGCTGGCGTGTGATC
ATTGGCGAGGAGAACCGCCCGGCACGCCATCTACAATGTGCGCGCGTACCTGCCGTTGCGGAGT
CGTTCCGGCTTACTGCCGACCTGCGCGCTGGAAGTGGCGGTCAGGCCTTCCCGCAGTGCCTGTTGCGAC
CACTGGCAGGAGTACCCCGCGACCCGCTGGAGCCGAAGTCGCTGGCCAACACGACGACGCTTGCC
ATCCGCACGCGCAAGGGCCTGAAGCCGGATATCCCGGCCTGGACCAGTTCATGGATAAGTTGTAA

Εικόνα 1.14: Η νουκλεοτιδική ακολουθία του γονιδίου EF2-1 (πηγή UniProt)

>tr|A4ICW8|A4ICW8_LEIIN Elongation factor 2 OS=Leishmania infantum GN=EF2-1 PE=4 SV=1

MVNFTVDQVRELMYDPDQIRNMSVIAHVDHGKSTLSDSLVGAAGIIKMEEAGDKRIMDR
ADEIARGITIKSTAISMHYHVPKEMIGDLDDDKRDFLINLIDSPGHVDFSSEVTAALRVT
DGALVVVDCVEGVVQVQVETVLRQALTERIRPVVFINVKVDRAILELQLDPEEAYQGFVKTL
QNVNVVVATYNDPSMGDVQVSPEKGTVAIGSLQAWAFSLTRFANMYAAKFGVDELKMRE
RLWGDNFFDAKNKKWIKQETNADGERVRRAFQCFLDPIYQIFDAVMNEKKDKVDKMLKS
LHVTLTAEEREQVPKLLKTVMMKFLPAAETLLQMIVAHLPSPKKAQAYRAEMLYSGEAS
PEDKYFMGIKNCPPAAPLMLYISKMVPTADRGRFFAFGRIFSGKVRSGQKVRIMGNVYVY
GKKQDLYEDKPVQRSVLMMGRYQEAVEDMPCGNVVGLVGVVDKYIVKSATITDDGESPHPL
RDMKYSVSPVVRVAEAKNPSDLPKLVGLKRLAKSDPLVVCSEESGEHIVAGAGELHL
EICLKDLEDFMNGAPLKISEPVVVFRETVDVSSQQCLSKSANKHNRLFRCGAPLTEL
ALAMEEGTAGPEADPKVRARFLADNYEWDVQEARKIWCYGPDNRGPNVVVDVTKGVQNMA
EMKDSFVAAWQWATREGVLCDENMRGVRVNVEDVTMHADAIHRGGGQIIPARRVYFVYACC
LTASPRLMEPMFVVDIQTVEHAMGGIYGVLTTRRRGVIIIEENRPGTPIYNVRAVLPVAES
FGFTADLRAGTGGQAFQCVFDHWQEYPGDPLEPKSLANTTTLAIRTRKGLKPDIPGLDQ
FMDKL

Εικόνα 1.15: Η αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης EF2-1 (πηγή UniProt)

Ο EF2-1, αν και εμπλέκεται στην πρωτεϊνοσύνθεση, δεν έχει ακόμα χαρακτηριστεί πλήρως ο ρόλος του ανάμεσα στα είδη της *Leishmania* (Kushawaha, Gupta, Sundar, Sahasrabuddhe, & Dube, 2011). Μόρια που ανήκουν σε μία ανάλογη

οικογένεια πρωτεϊνών, όπως το EL-1α, το EL-1B και το EL-4a, έχουν αναφερθεί σε διάφορα είδη της *Leishmania* (Nandan, Cherkasov, Sabouti, Yi, & Reiner, 2003; Skeiky et al., 1998; Vickers, Wyllie, & Fairlamb, 2004). Ανάμεσά τους, το μόριο της πρωτεΐνης EL-1α, το οποίο έχει κλωνοποιηθεί και χαρακτηριστεί στη *L. donovani* (Nandan et al., 2003), κατέχει κεντρικό ρόλο στην επιβίωση του παρασίτου και κατά συνέπεια αποτελεί έναν καλό φαρμακευτικό στόχο (Lopez, Cherkasov, & Nandan, 2007). Τα άλλα δύο μόρια, το EL-1B (Vickers et al., 2004) και το EL-4a (Skeiky et al., 1998) έχουν χαρακτηριστεί βιοχημικά και ανοσολογικά αντίστοιχα, στην *L. major*.

Ο EF-2 (παράγοντας επιμήκυνσης 2) έχει αναγνωριστεί σε μελέτες πρωτεομικής ως παράγοντας ενεργοποίησης T_{H1} τύπου ανοσοαποκρίσεων, (S. K. Gupta et al., 2007; Kumari et al., 2008). Επίσης, το πεπτίδιο rLeIF-2 (70 kDa) της *L. donovani*, έχει αξιολογηθεί από τους Kushawaha και συν., ως προς την ικανότητά του να επάγει T_{H1} τύπου ανοσοαποκρίσεις σε κύτταρα απομονωμένα από θεραπευμένους ανθρώπους με σπλαγγχική λεισμανίαση. Επιπλέον, το ίδιο πεπτίδιο οδήγησε σε προστασία των χάμστερ από μόλυνση με *Leishmania*. Επιπρόσθετα, σε μία πρόσφατη εργασία των Jaiswal και συν., διαπιστώθηκε ότι η χορήγηση του EF2-1 σε συνδυασμό με την HSP70 του παρασίτου *Leishmania* προήγαγε την ανάπτυξη προστασίας σε μολυσμένα/θεραπευμένα χάμστερ και σε μολυσμένους/θεραπευμένους ασθενείς με λεισμανίαση από το είδος της *L. donovani* μέσω των αυξημένων επιπέδων παραγωγής των κυτταροκινών IFN- γ και IL-12 και των αντισωμάτων IgG2a (Jaiswal et al., 2014).

2 Σκοπός της μελέτης

Μέχρι σήμερα, η θεραπεία της λεισμανίασης βασίζεται κυρίως σε χημειοθεραπευτικούς παράγοντες, οι οποίοι, ωστόσο, εμφανίζουν ένα σύνολο μειονεκτημάτων. Προβλήματα όπως το κόστος, η τοξικότητα, η διάρκεια της θεραπείας, η οδός χορήγησης και η ανάπτυξη ανθεκτικότητας από το παράσιτο, καθιστούν επιτακτική ανάγκη την ανάπτυξη ενός αποτελεσματικού εμβολίου. Αρκετές ερευνητικές προσπάθειες αφορούν στη μελέτη αντιγονικών μορίων του παρασίτου, τα οποία θα μπορούσαν να αποτελέσουν υποψήφια εμβόλια. Παράλληλα, η εύρεση κατάλληλων «οχημάτων» μεταφοράς των αντιγονικών μορίων αποτελεί μία επιπλέον ερευνητική συνιστώσα. Δεδομένου ότι τα δενδριτικά κύτταρα αποτελούν ένα σημαντικό πληθυσμό αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων με την ικανότητα να επάγουν πρωτογενείς ανοσολογικές αποκρίσεις, τα ίδια μπορούν να αξιοποιηθούν ως οχήματα μεταφοράς εμβολίων.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν ο έλεγχος της αντιγονικότητας του αμινοτελικού τμήματος της πρωτεΐνης elongation factor 2 (EF2-1, παράγοντας επιμήκυνσης 2) του παρασίτου *L. infantum* προκειμένου να διαπιστωθεί εάν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υποψήφιο μόριο στην ανάπτυξη ενός εμβολίου έναντι της λεισμανίασης. Η αντιγονικότητα του μορίου ελέγχθηκε αρχικά μέσω του χαρακτηρισμού της λειτουργικής διαφοροποίησης των μυελογενών δενδριτικών κυττάρων απομονωμένων από γενετικά ευαίσθητους στο παράσιτο BALB/c ποντικούς, μετά την επώαση τους με το συγκεκριμένο αντιγόνο παρουσία ή όχι του ανοσοενισχυτικού CpG. Επίσης, πραγματοποιήθηκε διερεύνηση της επαγόμενης ανοσολογικής απόκρισης στο πειραματικό μοντέλο των BALB/c ποντικών μετά από τον εμβολιασμό τους με τα *ex vivo* ενεργοποιημένα δενδριτικά κύτταρα, με ανάλυση της διαφορικής έκφρασης γονιδίων που χαρακτηρίζουν διαφορετικούς υποπληθυσμούς των CD4⁺ T-λεμφοκυττάρων.

3. Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Υλικά

Κατά τη διεξαγωγή των πειραματικών διαδικασιών χρησιμοποιήθηκαν ορισμένα, διαλύματα, αναλώσιμα υλικά, σκεύη και τεχνολογικός εξοπλισμός, τα οποία παρατίθενται στα παραρτήματα I, II, III και IV στο Κεφάλαιο 8.

3.2 Παρασκευή του αμινοτελικού τμήματος της πρωτεΐνης EF2-1 με τη χρήση ετερόλογου συστήματος έκφρασης

Η εργαστηριακή αξιοποίηση συστημάτων καλλιέργειας του βακτηρίου *Escherichia coli*, αποτελεί σύστημα επιλογής για την έκφραση ετερόλογων πρωτεϊνών. Αυτό το σύστημα επιλέγεται επειδή το συγκεκριμένο βακτήριο χαρακτηρίζεται από ένα σύνολο πλεονεκτημάτων, στα οποία περιλαμβάνονται τα εξής: οικονομικές συνθήκες καλλιέργειας, εξαιρετικά μελετημένο γενετικό υπόβαθρο, σχετικά εύκολος χειρισμός του μικροοργανισμού και επιδεκτικότητα σε διαδικασίες ζύμωσης υψηλής πυκνότητας. Το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο στέλεχος είναι το BL21(DE3)-pLysS, με το οποίο εξασφαλίζεται η έκφραση ετερόλογων πρωτεϊνών χωρίς παρεμπόδιση στην κωδικοποίηση τους (Mirzahoseini, Mafakheri, Mohammadi, & Enayati, 2011).

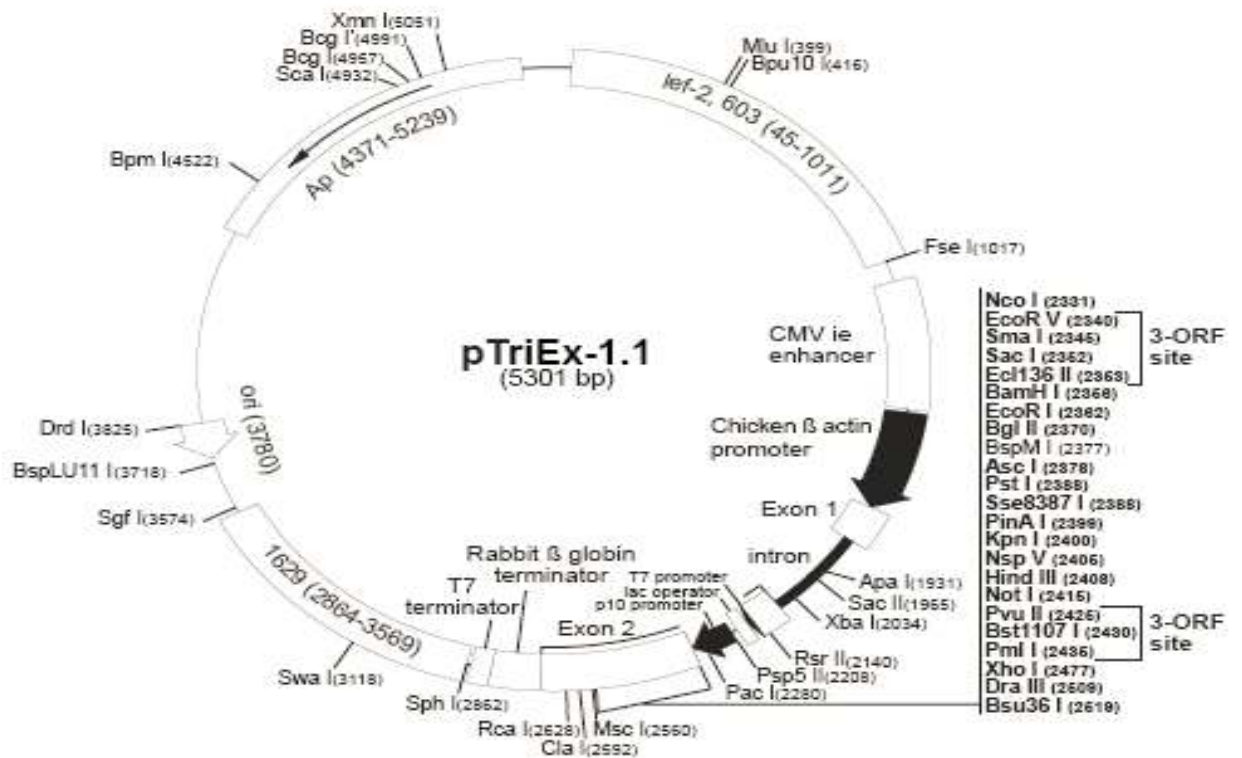
Γενικά, οι υπερεκφραζόμενες ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες, συσσωματώνονται είτε στο κυτταρόπλασμα είτε στον περιπλασμικό χώρο. Συχνότερα, το κυτταρόπλασμα αποτελεί την πρώτη επιλογή για την ετερόλογη έκφραση των πρωτεϊνών, καθώς στο χώρο αυτό, εμφανίζεται ο υψηλότερος βαθμός συσσώρευσής τους (Terpe, 2006).

Η πιθανότητα επιτυχούς έκφρασης μίας πρωτεΐνης σε αυτού του είδους τα ετερόλογα συστήματα, μειώνεται όταν η μοριακή μάζα των εκφραζόμενων πρωτεϊνών υπερβαίνει τα 60 kDa. Επιπρόσθετα, πρωτεΐνες οι οποίες δεν εκφράζονται σε διαλυτή μορφή, συσσωρεύονται υπό μορφή πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων στο εσωτερικό του βακτηρίου. Σε αυτές τις περιπτώσεις το υπό έκφραση πρωτεϊνικό προϊόν συνοδεύεται από μία συντηγμένη αλληλουχία στο ένα άκρο του, προκειμένου να υποβοηθηθεί η απομόνωση και ο καθαρισμός του μορίου. Η αλληλουχία αυτή

(affinity tag) σπάνια επηρεάζει τη βιολογική δράση της πρωτεΐνης (Structural Genomics et al., 2008).

Για την ετερόλογη έκφραση του αμινοτελικού τμήματος της πρωτεΐνης EF2-1 (*LdeEF-2*, αμινοξέα 1-357, LinJ36_V3.0190) χρησιμοποιούνται βακτήρια έκφρασης *E.coli* BL21(DE3)-pLysS. Το εν λόγω βακτηριακό στέλεχος είχε μετασχηματισθεί στο εργαστήριό μας (Alexandratos et al., 2013), με τη χρήση του πλασμιδιακού φορέα κλωνοποίησης pTriex 1.1, προκειμένου να είναι δυνατή η επαγωγή της έκφρασης του *LdeEF-2* ως προϊόν ανασυνδυασμού. Το τμήμα του γονιδίου ενισχύθηκε από πυρηνικό DNA *L. donovani* και κλωνοποιήθηκε στη θέση NcoI/XhoI του πολυσυνδέτη, η οποία επιτρέπει την προσθήκη μιας αλληλουχίας έξι συνεχών καταλοίπων ιστιδίνης (6×His tag) στο καρβόξυτελικό τμήμα της *LdeEF-2*. Το εκμαγείο DNA που χρησιμοποιήθηκε ήταν πυρηνικό DNA από παράσιτα *L. donovani*, LG13. Το προϊόν DNA που προέκυψε, κατόπιν ενίσχυσης, αλληλουχίστηκε και βρέθηκε να εμφανίζει ταύτιση με το αντίστοιχο ομόλογο γονίδιο της *L. infantum* (Alexandratos et al., 2013).

Ο πλασμιδιακός φορέας pTriex 1.1 φέρει γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμικικιλίνη. Επίσης, περιέχει τον υποκινητή T7 της λακτόζης, ο οποίος επάγεται από το μόριο επαγωγή β-ισοπρόπυλο-D-θειογαλακτοζίδιο (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside, IPTG) με αποτέλεσμα την έκφραση του *LdeEF-2* συντηγμένου με την αλληλουχία 6xHis tag. Η συγκεκριμένη αλληλουχία χρησιμεύει στην απομόνωση και τον καθαρισμό του πρωτεϊνικού προϊόντος, με την εφαρμογή της μεθόδου της χρωματογραφίας συγγένειας.



Εικόνα 3.1: Ο πλασμιδιακός φορέας pTriex-1.1

3.2.1 Καλλιέργεια βακτηρίων *E.coli* BL21(DE3) pLysS με ακόλουθη επαγωγή έκφρασης του LdeEF-2 (1-357 α.α)

Για την ανάπτυξη της βακτηριακής καλλιέργειας παρασκευάζονται στερεά και υγρά καλλιεργητικά θρεπτικά υλικά με τη χρήση δις απεσταγμένου ύδατος (ddH₂O), τα οποία στη συνέχεια αποστειρώνονται σε υγρό κλίβανο για 20 λεπτά σε συνθήκες πίεσης 15lb/in² και θερμοκρασίας 120 °C.

Ειδικότερα, η καλλιέργεια του χρησιμοποιούμενου βακτηριακού στελέχους *E. coli*

πραγματοποιείται στο θρεπτικό μέσο LB (Παράρτημα I), παρουσία 100 μg/ml αμπικιλίνης (LB^{Amp⁺}). Οι υγρές καλλιέργειες των βακτηρίων πραγματοποιούνται σε πλαστικούς σωλήνες των 15 και 50 ml και σε κωνικές φιάλες των 2.000 ml, υπό συνεχή ανάδευση σε επωαστήρα, στους 37 °C και για τον απαιτούμενο χρόνο επώασης. Οι στερεές καλλιέργειες πραγματοποιούνται σε τρυβλία petri, με θρεπτικό υλικό LB^{Amp⁺} που περιέχει 1.5% (w/v) Άγαρ. Η επώαση γίνεται σε θάλαμο επώασης για 16-24 ώρες στους 37 °C. Τα βακτήρια φυλάσσονται για μεγάλα χρονικά διαστήματα στους -20 °C ή -80 °C σε θρεπτικό υλικό παρουσία 50% (v/v) γλυκερόλης. Οι υγρές καλλιέργειες διατηρούνται στους 4 °C για διάστημα 3-4

ημερών. Οι στερεές καλλιέργειες διατηρούνται, επίσης στους 4 °C, για διάστημα που κυμαίνεται από αρκετές ημέρες έως και μερικές εβδομάδες. Για την επαγωγή της έκφρασης του LdeEF-2 από το βακτήριο ακολουθούνται τα εξής στάδια καλλιέργειάς του:

Στάδιο 1^ο : Υπό στείρες συνθήκες, με τη χρήση λύχνου Bunsen, επιστρώνονται καλλιέργειες του βακτηριακού στελέχους BL21, σε στερεό θρεπτικό μέσο LB^{Amp⁺}. Το μετασχηματισμένο βακτηριακό στέλεχος, προέρχεται από αποθηκευμένα κλάσματα βακτηριακής καλλιέργειας σε υγρό LB^{Amp⁺}, παρουσία γλυκερόλης 50% (v/v), στους -80 °C. Ακολουθεί επώαση για χρονικό διάστημα 16-18 ωρών, σε θάλαμο επώασης σε θερμοκρασία 37 °C.

Στάδιο 2^ο: Με τη βοήθεια κρίκου εμβολιασμού πραγματοποιείται, υπό στείρες συνθήκες, ενοφθαλμισμός μίας μονής αποικίας μετασχηματισμένων βακτηρίων, εντός πλαστικού σωλήνα όγκου 15 ml που περιέχει 2,5 ml υγρού θρεπτικού μέσου LB^{Amp⁺}. Η παραπάνω υγρή καλλιέργεια επωάζεται για 16 ώρες στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση (170 rpm) σε επωαστήρα καλλιέργειας βακτηρίων. Από την παραπάνω υγρή καλλιέργεια, μεταγγίζονται 2 ml, σε πλαστικό σωλήνα όγκου 50 ml, που περιέχει 10 ml υγρού θρεπτικού LB^{Amp⁺}. Τα βακτήρια επωάζονται για 16 ώρες στις ίδιες συνθήκες όπως περιγράφεται παραπάνω. Ο όγκος των 0,5 ml, χρησιμοποιείται για την δημιουργία νέου κλάσματος αποθήκευσης του βακτηριακού στελέχους, παρουσία γλυκερόλης 50% (v/v), το οποίο διατηρείται στους -80 °C, για επόμενη χρήση. Στη συνέχεια, τα 10 ml από την καλλιέργεια του προηγούμενου σταδίου μεταγγίζονται σε 1.000 ml θρεπτικού υλικού LB^{Amp⁺} και ακολουθεί επώαση υπό ανάδευση (170 rpm) στους 37°C, μέχρι η οπτική πυκνότητα (O.D_{600nm}) της καλλιέργειας να είναι ίση με 0,6. Σε αυτό το χρονικό σημείο πραγματοποιείται η επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης από τα μετασχηματισμένα βακτήρια με προσθήκη 1 mM IPTG, στους 37 °C για 3 ώρες, υπό ανάδευση. Στο τέλος της επώασης, η καλλιέργεια συλλέγεται σε πλαστικά κυλινδρικά δοχεία φυγοκέντρησης, όγκου 250 ml και φυγοκεντρείται σε φυγόκεντρο με μεταβλητή γωνιακή κλίση, στις 4.000 rpm, για 30 λεπτά, στους 4 °C. Το υπερκείμενο θρεπτικό υλικό απορρίπτεται, ενώ το βακτηριακό ίζημα διατηρείται στους -80 °C, μέχρι τη λύση του.

3.2.2 Απομόνωση και καθαρισμός του πρωτεϊνικού προϊόντος *LdeEF-2* (1-357 α.α)

Η απομόνωση και ο καθαρισμός του πρωτεϊνικού προϊόντος *LdeEF-2* πραγματοποιείται με την εφαρμογή της μεθόδου χρωματογραφίας συγγένειας σε στήλη νικελίου (Ni^{2+} -NTA-ρητίνη). Η μέθοδος χρωματογραφίας συγγένειας σε στήλη με φορτισμένα ιόντα (Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography, IMAC), αποτελεί έναν τύπο χρωματογραφίας συγγένειας με ευρεία χρήση στη βιοχημική ανάλυση. Η IMAC μεθοδολογία, βασίζεται στην αξιοποίηση αλληλεπιδράσεων μεταξύ φορτισμένων μεταλλικών ιόντων και μορίων στόχων όπως αμινοξέα, πεπτίδια, πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα. Τα μεταλλικά ιόντα φορτίζονται στη στήλη με τη χρήση χηλικών παραγόντων, όπως το ιμινοδιακετικό οξύ, το νιτριλοακετικό οξύ, το καρβοξυμεθυλιωμένο ασπαρτικό οξύ και το L-γλουταμικό οξύ. Τα συνηθέστερα μεταλλικά ιόντα που χρησιμοποιούνται σε αυτές τις περιπτώσεις είναι τα εξής: Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} και Fe^{2+} . Η IMAC μεθοδολογία, αρχικά είχε αναπτυχθεί για την απομόνωση και το διαχωρισμό πρωτεϊνών που περιείχαν είτε κάποιο μέταλλο είτε το αμινοξύ ιστιδίνη. Κατά τη διεξαγωγή της μεθόδου, το δείγμα προς ανάλυση, διέρχεται από μία στήλη IMAC και έτσι οι προς απομόνωση παράγοντες συνδέονται και συγκρατούνται από τα φορτισμένα ιόντα. Κατόπιν, οι παράγοντες εκλύονται με την προσθήκη ενός ανταγωνιστικού παράγοντα (για παράδειγμα το ιμιδαζόλιο) ή/και με την τροποποίηση του pH (Hage et al., 2012).

Στη παρούσα εργασία, η αλληλουχία των έξι συνεχόμενων καταλοίπων ιστιδίνης στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης *LdeEF-2* επιτρέπει την απομόνωση και τον καθαρισμό της, καθώς τέτοιου είδους πρωτεΐνες προσδέονται με υψηλή συγγένεια στη στήλη νικελίου σε τιμή pH 8.0. Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι σε αυτήν την τιμή pH, τα κατάλοιπα ιστιδίνης φορτίζονται αρνητικά με αποτέλεσμα να μπορούν να συνδεθούν με τα θετικά κατιόντα του νικελίου. Το νιτριλοτρίακετικό οξύ (nitrilotriacetic acid, NTA) αποτελεί έναν τετραδοντικό χηλικό προσδέτη ο οποίος καταλαμβάνει τις τέσσερις από τις έξι διαθέσιμες θέσεις δέσμευσης του Ni^{2+} . Οι υπόλοιπες δύο θέσεις καταλαμβάνονται από μόρια ύδατος (H_2O), τα οποία μπορούν να αντικατασταθούν από τα κατάλοιπα ιστιδίνης του ανασυνδυσμένου πρωτεϊνικού μορίου. Η έκλυση των πρωτεϊνών πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας ιμιδαζόλιο (δομικό ανάλογο της ιστιδίνης) σε υψηλή συγκέντρωση, το οποίο δρα ανταγωνιστικά ως προς τις πρωτεΐνες.

Για την απομόνωση του αμινοτελικού τμήματος του LdeEF-2 χρησιμοποιείται η στήλη ιόντων νικελίου (Protino Ni-NTA agarose kit Macherey-Nagel GmbH & Co. KG).

Ειδικότερα, το βακτηριακό ίζημα, που έχει προκύψει στην προηγούμενη διαδικασία, λύεται με τη χρήση 10 ml διαλύματος λύσης βακτηρίων (Παράρτημα I), στους 4°C. Το λύμα που προκύπτει, μεταγγίζεται σε πλαστικό δοκιμαστικό σωλήνα όγκου 15 ml, ο οποίος διατηρείται στους 4 °C. Ακολουθούν 10-12 κύκλοι θραύσης του λύματος με τη χρήση συσκευής υπερήχων. Κάθε κύκλος θραύσης διαρκεί ένα λεπτό με ενδιάμεση παύση ίσης χρονικής διάρκειας. Κατόπιν, το χαμηλού ιξώδους λύμα, μοιράζεται σε ίσους όγκους σε πλαστικούς σωλήνες τύπου erpendorf και φυγοκεντρείται σε επιτραπέζια μικροφυγόκεντρο στις 14.000 rpm, για 30 λεπτά, στους 4 °C. Στη συνέχεια, τα υπερκείμενα συλλέγονται σε άσηπτο πλαστικό δοκιμαστικό σωλήνα όγκου 15 ml και αποθηκεύονται στους -20 °C, ενώ τα ιζήματα που προκύπτουν είτε αποθηκεύονται στις ίδιες συνθήκες, είτε χρησιμοποιούνται απευθείας για την εκτέλεση του επόμενου σταδίου της διαδικασίας. Αξίζει να σημειωθεί ότι, πριν την εκτέλεση του επόμενου σταδίου, εφόσον τα ιζήματα έχουν αποθηκευτεί, πρέπει να φυγοκεντρηθούν εκ νέου στις 14.000 rpm, για 20 λεπτά στους 4 °C.

Ακολούθως, τα ιζήματα διαλυτοποιούνται με τη χρήση του διαλύματος DNPI10 (Παράρτημα I) όγκου 3 ml σε πλαστικό δοκιμαστικό σωλήνα όγκου 15 ml και αναδεύονται κυκλικά για 1 ώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος προκειμένου να διασπαστούν τα πρωτεϊνικά συσσωματώματα (inclusion bodies). Μετά την ολοκλήρωση της επώασης, το εναιώρημα μοιράζεται ισομερώς σε σωλήνες τύπου erpendorf και φυγοκεντρείται στις 14.000 rpm, για 20 λεπτά στους 20 °C.

Παράλληλα με το προηγούμενο στάδιο, πραγματοποιείται η ανάκτηση των μικροσφαιριδίων αгарόζης ως εξής: Κάθε όγκος του διαλύματος μικροσφαιριδίων αгарόζης αντιστοιχεί σε 50% καθαρά μικροσφαιρίδια. Βάσει του καθαρού όγκου των μικροσφαιριδίων, χρησιμοποιούνται 10 όγκοι του διαλύματος NPI10 (Παράρτημα I). Εν προκειμένω, χρησιμοποιούνται 0,300ml διαλύματος μικροσφαιριδίων, τα οποία μεταγγίζονται σε 1,5 ml διαλύματος NPI10 σε πλαστικό δοκιμαστικό σωλήνα όγκου 15 ml και το συνολικό εναιώρημα φυγοκεντρείται στα 1.000g για 5 λεπτά στους 20 °C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται, ενώ το ίζημα χρησιμοποιείται για την απομόνωση και τον καθαρισμό της πρωτεΐνης.

Μετά τη λήξη της φυγοκέντρησης, συλλέγονται από κοινού τα υπερκείμενα και αναμιγνύονται με τα μικροσφαιρίδια αγαρόζης. Το μίγμα τοποθετείται σε συσκευή κυκλικής ανάδευσης σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, για 2 ώρες.

Ακολούθως, το εναιώρημα φυγοκεντρείται στα 500g, για 5 λεπτά στους 20 °C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται, ενώ το ίζημα υποβάλλεται σε τρεις διαδοχικές πλύσεις με διάλυμα NPI20 (Παράρτημα I), όγκου ίσου με 10 όγκους καθαρών μικροσφαιριδίων (1,5 ml). Η διαδικασία των πλύσεων περιλαμβάνει κυκλική ανάδευση του εναιωρήματος για 10 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, που ακολουθείται από φυγοκέντρηση αυτού στα 500g, για 5 λεπτά, στους 20 °C.

Στο τέλος, πραγματοποιείται η λήψη των τελικών κλασμάτων έκλουσης με τη χρήση του διαλύματος NPI250 (Παράρτημα I). Ειδικότερα, το ίζημα του προηγούμενου σταδίου, διαλυτοποιείται σε όγκο NPI250 ίσο ως προς τον καθαρό όγκο των μικροσφαιριδίων, δηλαδή 0,15 ml. Το εναιώρημα μεταφέρεται σε δοκιμαστικό σωλήνα τύπου erpendorf και αναδεύεται σε συσκευή κυκλικής ανάδευσης στους 37°C, για 10 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 500g, για 10 λεπτά, στους 20 °C. Το υπερκείμενο μεταγγίζεται σε νέο σωλήνα τύπου erpendorf. Το στάδιο αυτό επαναλαμβάνεται συνολικά πέντε φορές, καταλήγοντας στη λήψη πέντε πρωτεϊνικών κλασμάτων έκλουσης. Σε κάθε κλάσμα, προστίθεται γλυκερόλη σε τελική περιεκτικότητα 10% (v/v), προκειμένου να αποφευχθεί η κατακρήμνιση της πρωτεΐνης κατά τη διατήρησή της στους -20 °C. Από κάθε κλάσμα, λαμβάνονται δείγματα όγκου 0,020 ml, προκειμένου να γίνει η επιβεβαίωση της έκφρασης της πρωτεΐνης, καθώς και η ποσοτικοποίησή της με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, όπως περιγράφεται παρακάτω.

3.2.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (Sodium Dodecyl Sulphate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE)

Ο χαρακτηρισμός και η απομόνωση μακρομορίων (για παράδειγμα πρωτεϊνών), μπορεί να γίνει με ηλεκτροφόρηση, όπου ο διαχωρισμός μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο (που καθορίζεται από την αναλογία θετικά/αρνητικά φορτισμένων αμινοξέων), είτε με βάση το μοριακό τους βάρος, έπειτα από κάλυψη των πολυπεπτιδικών αλυσίδων με αρνητικά φορτισμένο δωδεκακυλικό θειικό νάτριο (sodium dodecyl sulfate, SDS). Μετά την προετοιμασία των δειγμάτων και την κατάλληλη επεξεργασία τους, ακολουθεί «φόρτωμα» στο ήδη ετοιμασμένο πήκτωμα και διαχωρισμός (ενεργοποίηση ηλεκτρικού πεδίου) υπό

σταθερή τάση ή ένταση. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, το SDS έχει την ιδιότητα να εμπλέκεται στις υδρόφοβες περιοχές μιας πρωτεΐνης, μεταβάλλοντας τη δομή της σε μια ανοιχτή πολυπεπτιδική αλυσίδα δίνοντάς της αρνητικό φορτίο. Κατά συνέπεια, το μέγεθος του συμπλέγματος SDS-πρωτεΐνης είναι ανάλογο της μοριακής μάζας της πρωτεΐνης. Σε ένα τέτοιο σύστημα οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται μόνο με βάση τη μοριακή μάζα τους με ακρίβεια 5-10% (Λ.Χ. Μαργαρίτης, 2004).

Η προετοιμασία του πηκτώματος μπορεί να γίνει είτε σε κυλινδρικά σωληνάρια είτε σε επίπεδη μορφή (slab). Στη μορφή πηκτώματος slab gel, ο πολυμερισμός αυτού πραγματοποιείται σε πλάκα από ορθογώνια τζάμια παρουσία μίας «χτένας» που αφήνει κενές αύλακες για να τοποθετηθούν τα ανάλογα δείγματα. Το όλο σύστημα ονομάζεται ηλεκτροφόρηση κατά Laemmli, από τον Άγγλο βιοχημικό που το πρωτοεφάρμοσε (John N. Clark, 1992).

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

Τα (πέντε) δείγματα όγκου 0,020 ml που προκύπτουν από τα κλάσματα, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.2, χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση της έκφρασης και την ταυτοποίηση της πρωτεΐνης.

Αρχικά, τα δείγματα αραιώνονται σε διάλυμα φόρτωσης δείγματος (ρυθμιστικό διάλυμα κατεργασίας δείγματος, Παράρτημα I) σε αναλογία 0,020 ml δείγματος: 0,005 ml διαλύματος φόρτωσης και παραμένουν στους 95-100 °C για 5 λεπτά. Οι συνθήκες αυτές είναι αποδιατακτικές για τις πρωτεΐνες, καθώς η υψηλή θερμοκρασία και η παρουσία του SDS καταστρέφουν τους ασθενείς δεσμούς (υδρογόνου, ιοντικούς, υδρόφοβους, van der Waals), ενώ η παρουσία της β-μερκαπτοαιθανόλης έχει ως αποτέλεσμα την αναγωγή των ισχυρών ομοιοπολικών δισουλφιδικών δεσμών.

Στη συνέχεια, τα δείγματα τοποθετούνται στο πήκτωμα συσσώρευσης 4% (v/v) (Παράρτημα I) που είναι χαμηλής περιεκτικότητας σε ακρυλαμίδιο και στη συνέχεια διαχωρίζονται στο πήκτωμα διαχωρισμού 12% (v/v) (Παράρτημα I). Παράλληλα με τα δείγματα πραγματοποιείται ανάλυση μίγματος πρωτεϊνών αναφοράς γνωστού μοριακού βάρους (Παράρτημα I). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών (Παράρτημα I), υπό σταθερή τάση 200V, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, σε ειδική συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης. Η ηλεκτροφόρηση ολοκληρώνεται με την απομάκρυνση της χρωστικής του διαλύματος κατεργασίας από το πήκτωμα διαχωρισμού και στη συνέχεια το πήκτωμα υποβάλλεται σε χρώση με διάλυμα χρωστικής ουσίας Coomassie (Παράρτημα I). Ειδικότερα, το πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου πλένεται μία φορά με ddH₂O και ακολούθως επώάζεται με ικανή ποσότητα χρωστικής Coomassie, για 12 ώρες, υπό ήπια ανάδευση, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Μετά το τέλος της επώασης το πήκτωμα πλένεται μια φορά με ddH₂O και ακολούθως υποβάλλεται σε διαδοχικές πλύσεις (~4-5) με διάλυμα αποχρωματισμού μέχρις ότου να αποχρωματιστεί και να παραμείνουν μόνο οι πρωτεϊνικές ζώνες χρωματισμένες. Η ταυτοποίηση της πρωτεΐνης και ο προσδιορισμός της περιεκτικότητάς της (mg/ml) πραγματοποιείται σύμφωνα με τη θέση, την πυκνότητα και τον αριθμό των ζωνών επί του πηκτώματος σε σύγκριση με τις ζώνες του μίγματος πρωτεϊνών γνωστής μοριακής μάζας. Το πήκτωμα φωτογραφίζεται με το σύστημα φωτογράφισης Alpha Innotech και οι εικόνες επεξεργάζονται με τη χρήση λογισμικού (Alphaimager).

Το μοριακό βάρος του *LdeEF-2* υπολογίζεται με την εφαρμογή του υπολογιστικού εργαλείου από την βάση δεδομένων βιοπληροφορικής ExPASy. Το εν λόγω εργαλείο επιτρέπει τον υπολογισμό της μοριακής μάζας ενός πρωτεϊνικού μορίου, σύμφωνα με την αμινοξική του αλληλουχία, όταν αυτή εισάγεται υπό μορφή αρχείου FASTA. Επιλέγοντας το σύνολο των αμινοξέων 1-357 και με την προσθήκη έξι ιστιδινών στο καρβόξυτελικό άκρο του επιλεγμένου τμήματος, πραγματοποιείται ο υπολογισμός της μοριακής μάζας του μορίου.

3.2.4 Υπολογισμός της συγκέντρωσης του *LdeEF-2* στα κλάσματα

Η συγκέντρωση του πρωτεϊνικού προϊόντος *LdeEF-2* για κάθε ένα από τα κλάσματα προσδιορίζεται πυκνομετρικά με την αξιοποίηση του λογισμικού ImageJ

και τη χρήση των εικόνων των πηκτωμάτων ακρυλαμιδίου (Schneider, Rasband, & Eliceiri, 2012).

3.2.5 Προσδιορισμός επιπέδων ενδοτοξινών στα πρωτεϊνικά κλάσματα

Τα πρωτεϊνικά κλάσματα του LdeEF-2 (1-357 α.α), αποτελούν προϊόν ανασυνδυασμού με την αξιοποίηση του gram αρνητικού βακτηρίου *E.coli*. Το πρωτεϊνικό προϊόν χρησιμοποιείται για την εκτέλεση *in vitro* και *in vivo* δοκιμασιών οπότε και ελέγχεται ως προς την περιεκτικότητά του σε ενδοτοξίνες. Οι ενδοτοξίνες, αποτελούν τμήμα του λιποπολυσακχαριτικού συμπλέγματος που διαμορφώνει τον εξωτερικό φάκελο των gram αρνητικών βακτηρίων (Lipopolysaccharide, LPS) και έχουν την ικανότητα να οδηγούν σε εμφάνιση πληθώρας παθοφυσιολογικών επιδράσεων, μέσω του ανοσοποιητικού συστήματος (Joiner, Kraus, & Kupiec, 2002). Στην παρούσα εργασία, η ποσοτικοποίηση των επιπέδων ενδοτοξίνης σε πρωτεϊνικό δείγμα, πραγματοποιείται με φωτομετρική μέθοδο με τη χρήση kit σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Pierce LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit, Thermo Scientific, USA).

3.3.1 Αξιοποίηση πειραματόζωων

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί ο έλεγχος της αντιγονικότητας του πρωτεϊνικού προϊόντος LdeEF-2 (1-357 α.α) χρησιμοποιούνται ποντίκια της φυλής BALB/c. Τα ποντίκια αξιοποιούνται για την απομόνωση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, για την εκτέλεση ανοσοποιήσεων με δενδριτικά κύτταρα που έχουν διεγερθεί με συγκεκριμένους παράγοντες και για την απομόνωση κυττάρων σπλήνα. Τα συγκεκριμένα ποντίκια είναι ηλικίας 6-8 εβδομάδων καθώς επίσης η αναπαραγωγή, η ανάπτυξη και η εκτροφή αυτών, πραγματοποιείται στις ειδικά διαμορφωμένες εγκαταστάσεις του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ (ΕΙΠ).

Στην περίπτωση της απομόνωσης αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων από μυελό των οστών, χρησιμοποιούνται αρσενικά ποντίκια της φυλής BALB/c, από τα οποία απομονώνονται τα οστά της κνήμης και του μηρού.

Για τις ανοσοποιήσεις και την απομόνωση κυττάρων σπλήνα χρησιμοποιούνται ομάδες από θηλυκά ποντίκια της ίδιας φυλής. Οι ανοσοποιήσεις πραγματοποιούνται με ενδοφλέβια έγχυση των διεγερμένων δενδριτικών κυττάρων στη βάση της ουράς των ζώων, ούτως ώστε να επιτευχθούν όσο το δυνατόν

ισχυρότερες αποκρίσεις των σπληνοκυττάρων (Kruisbeek, Shevach, & Thornton, 2004).

Για την απομόνωση του μυελού των οστών και των κυττάρων του σπλήνα, σε κάθε περίπτωση, πραγματοποιείται ανατομία των ποντικών έπειτα από ευθανασία αυτών με τη διαδικασία της εγκεφαλικής παρεκτόμησης (εξάρθρωση του αυχένα), σύμφωνα με τους κανόνες που διέπουν τον ορθό χειρισμό των πειραματόζωων. Ο περαιτέρω χειρισμός των απομονωμένων οργάνων πραγματοποιείται σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής προς αποφυγή επιμολύνσεων των κυτταροκαλλιέργειών που προκύπτουν από την κατεργασία αυτών.

3.3.2 Κυτταροκαλλιέργειες

Η καλλιέργεια των κυττάρων γίνεται υπό αυστηρά άσηπτες συνθήκες, καθώς τα κύτταρα των θηλαστικών πολλαπλασιάζονται με πολύ χαμηλότερους ρυθμούς από ότι άλλοι μικροοργανισμοί, όπως τα βακτήρια και οι μύκητες. Επομένως για να αποφευχθούν οι μολύνσεις, όλες οι διαδικασίες που αφορούν στις κυτταροκαλλιέργειες γίνονται μέσα σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής, ο οποίος προστατεύει από μολύνσεις και σκόνη. Απαραίτητη είναι και η ακτινοβολία του θαλάμου με ακτίνες UV για περίπου 20 λεπτά πριν την έναρξη οποιασδήποτε εργασίας σε αυτόν. Επιπλέον, γίνεται και ψεκασμός των αντικειμένων που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν στο θάλαμο με διάλυμα αιθανόλης 70%.

3.4 Απομόνωση και καλλιέργεια αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων από μυελό των οστών αρσενικών BALB/c ποντικών και κατευθυνόμενη διαφοροποίηση αυτών προς δενδριτικά κύτταρα

Τα δενδριτικά κύτταρα (Dendritic Cells, DCs) αποτελούν σπάνιους πληθυσμούς κυττάρων *in vivo*. Συνεπώς η απομόνωση σε μεγάλες ποσότητες εξασφαλίστηκε από αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα του μυελού των οστών (Bone Marrow Derived Dendritic Cells, BM-DCs) αρσενικών BALB/c ποντικών. Η παραγωγή ικανοποιητικού αριθμού δενδριτικών κυττάρων με μικρό ποσοστό προσμείξεων B-λεμφοκυττάρων και κοκκιοκυττάρων, πραγματοποιείται από το μυελό των οστών υπό την επίδραση του παράγοντα διέγερσης αποικιών των κοκκιοκυττάρων/μακροφάγων σύμφωνα με τη μέθοδο των Lutz και συν. (Lutz et al., 1999).

Η λήψη των κυττάρων του μυελού των οστών γίνεται από τα μηριαία και κνημιαία οστά. Τα οστά αποστειρώνονται με την εμβάπτισή τους σε αιθανόλη 70% (v/v) σε τρυβλίο petri για 1-2 λεπτά της ώρας και έπειτα μεταφέρονται σε τρυβλίο που περιέχει θρεπτικό υλικό RPMI προκειμένου να εκπλυθούν. Έπειτα με τη χρήση ψαλιδιού και λαβίδας αφαιρούνται οι επιφύσεις των οστών και με τη χρήση σύριγγας που φέρει βελόνα διαμέτρου 27GX1/2 inch, εγχέεται θρεπτικό υλικό στο εσωτερικό του οστού. Το εναιώρημα, συλλέγεται σε τρυβλίο, όπου, διαλύονται τα συσσωματώματα με ήπια ανάδευση με τη χρήση ορολογικού σιφωνίου. Στη συνέχεια, το εναιώρημα μεταγγίζεται σε πλαστικό δοκιμαστικό σωλήνα 15 ml διαμέσου φίλτρου με διάμετρο πόρων 70 μm. Κατόπιν, το κυτταρικό εναιώρημα φυγοκεντρείται σε επιτραπέζια φυγόκεντρο με μεταβλητή γωνιακή κλίση, στις 1.300 rpm, για 10 λεπτά, στους 4°C. Έπειτα, το ίζημα επαναιωρείται σε 3 ml ψυχρού διαλύματος ACK (Παράρτημα I) για τη λύση των ερυθροκυττάρων, με ήπιες αναδεύσεις αυτού για 1-2 λεπτά. Η επαναφορά της ώσμωσης του διαλύματος πραγματοποιείται με προσθήκη ίσου όγκου θρεπτικού υλικού RPMI. Το κυτταρικό εναιώρημα φυγοκεντρείται εκ νέου, στις 1.300 rpm, για 10 λεπτά, στους 4 °C. Ακολούθως, το ίζημα επαναιωρείται σε 5 ml θρεπτικού υλικού RPMI. Ο αριθμός των κυττάρων προσδιορίζεται μετά τη χρώση τους σε διάλυμα χρωστικής Trypan blue (αραίωση 1:10) και την καταμέτρησή τους σε πλάκα Malassez, σε οπτικό μικροσκόπιο. Η συγκεκριμένη χρωστική έχει την ιδιότητα να διαπερνά τη μεμβράνη μόνο των νεκρών κυττάρων, χρωματίζοντάς τα γαλαζόχροα.

Η πυκνότητα των κυττάρων υπολογίζεται σύμφωνα με τον τύπο:

$$\frac{\text{Αριθμός κυττάρων}}{\text{Αριθμός τετραγώνων Malassez που μετρήθηκαν}} \times \frac{1}{\text{Αραίωση}} \times \frac{10^6}{\text{mL}}$$

Ο αριθμός των κυττάρων που συλλέγονται σε κάθε πειραματική εκτέλεση, κυμαίνεται σε $1,8-2,3 \times 10^7$ λευκοκύτταρα/πειραματόζωο.

Στη συνέχεια, γίνονται 2 εκπλύσεις σε θρεπτικό υλικό RPMI, με φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες και τελικά το ίζημα επαναιωρείται σε 10 ml θρεπτικού υλικού RPMI. Η διαφοροποίηση των κυττάρων του μυελού των οστών πραγματοποιείται σε βακτηριολογικά τρυβλία petri, σε 10 ml πλήρους θρεπτικού υλικού (Παράρτημα I) εμπλουτισμένου με 20 ng/ml ανασυνδυασμένου (προϊόν ποντικίου, recombinant mouse, rm) παράγοντα διέγερσης αποικιών των

κοκκιοκυττάρων/μακροφάγων (rmGM-CSF). Σε κάθε τρυβλίο ενοφθαλμίζονται $3,5 \times 10^6$ κύτταρα και επωάζονται σε θερμοκρασία 37 °C, 5% CO₂ και 95% υγρασία.

Την 3η ημέρα της καλλιέργειας προστίθενται 10 ml πλήρους θρεπτικού υλικού με rmGM-CSF σε τελική συγκέντρωση 20 ng/ml. Την 6η μέρα, 10 ml από την καλλιέργεια, φυγοκεντρώνονται στις 1.300 rpm για 10 λεπτά στους 4 °C και το ίζημα επαναιωρείται σε 10 ml πλήρους θρεπτικού υλικού παρουσία 20 ng/ml rmGM-CSF και μεταγγίζεται στην καλλιέργεια. Την 8η ημέρα, το σύνολο των καλλιεργειών συλλέγεται σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες όγκου 50 ml και φυγοκεντρείται στις 1.300 rpm για 10 λεπτά στους 25 °C. Ακολουθεί καταμέτρηση των κυττάρων, καθώς επίσης και δύο εκπλύσεις με φυγοκέντρωση, σε 5 ml RPMI, στις ίδιες συνθήκες. Η ταυτοποίηση των δενδριτικών κυττάρων στο εναιώρημα, ελέγχεται με κυτταρομετρία ροής με τη χρήση σημασμένου με φυκοερυθρίνη (PE) ειδικού αντισώματος που αναγνωρίζει την αλυσίδα α_α της ιντεγκρίνης gp150 (CD11c), η οποία εκφράζεται στην επιφάνεια των δενδριτικών κυττάρων.

***In vitro* διεγερση των δενδριτικών κυττάρων**

Την 8^η ημέρα της καλλιέργειας, τα κύτταρα συλλέγονται και επαναιωρούνται σε κατάλληλο όγκο πλήρους θρεπτικού υλικού, προκειμένου να επιτευχθεί κυτταρική πυκνότητα 5×10^5 κύτταρα/ml και μεταφέρονται σε πλάκα κυτταροκαλλιέργειας 24 φρεατίων, έτσι ώστε να περιέχεται 1 ml κυτταρικού εναιωρήματος ανά φρεάτιο. Τα κύτταρα επωάζονται για 24 ώρες σε περιβάλλον 37 °C, CO₂ 5% και υγρασία 95% παρουσία κατάλληλων διεγερτών. Ειδικότερα, τα δενδριτικά κύτταρα διεγείρονται με: α) LdeEF2 (10 µg/ml), β) CpG (20 µg/ml) ή γ) LdeEF2 (10 µg/ml), ταυτόχρονα με CpG (20 µg/ml). Τα δενδριτικά κύτταρα τα οποία επωάζονται μόνο στο θρεπτικό υλικό αποτελούν τον αρνητικό μάρτυρα ελέγχου.

3.5 Αξιοποίηση των δενδριτικών κυττάρων

Η κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιείται για την *in vitro* ταυτοποίηση και το λειτουργικό χαρακτηρισμό των δενδριτικών κυττάρων έπειτα από έκθεση αυτών στον LdeEF2 (10 µg/ml), στον LdeEF-2 (10 µg/ml) με ταυτόχρονη παρουσία CpG (20 µg/ml) και στο CpG (20 µg/ml).

Σε ότι αφορά το κυτταρικό εναιώρημα που προορίζεται για την ανοσοποίηση των ζώων (*in vivo* μελέτη), τα δείγματα συλλέγονται σε πλαστικούς σωλήνες όγκου 15 ml και φυγοκεντρώνονται σε φυγόκεντρο με μεταβλητή γωνιακή κλίση στις 1.350

rpm, για 10 λεπτά, στους 4 °C. Το υπερκείμενο διάλυμα συλλέγεται σε πλαστικούς σωλήνες τύπου erpendorf και αποθηκεύεται στους -20°C, ενώ το ίζημα πλένεται με 10 ml αποστειρωμένου PBS και φυγοκεντρείται εκ νέου με τον ίδιο τρόπο. Εν τέλει, το ίζημα επαναιωρείται σε αποστειρωμένο PBS, σε τέτοιο όγκο ούτως ώστε η κυτταρική πυκνότητα να είναι 5×10^5 κύτταρα/ 0,1ml PBS.

Οι ομάδες των ποντικών που αξιοποιούνται για τις ανοσοποιήσεις, είναι οι εξής:

- ομάδα ποντικών ελέγχου (μη ανοσοποιημένο ποντίκι, control)
- ανοσοποιημένα ποντίκια εις διπλούν σε μεσοδιάστημα 15 ημερών, με 5×10^5 μυελογενούς προέλευσης δενδριτικά κύτταρα, σε 0,1ml αποστειρωμένου PBS (BM-DCs, n=3)
- ανοσοποιημένα ποντίκια εις διπλούν σε μεσοδιάστημα 15 ημερών, με 5×10^5 μυελογενούς προέλευσης δενδριτικά κύτταρα διεγερμένα με CpG (20 µg/ml), σε 0,1ml αποστειρωμένου PBS (BM-DCs+CpG, n=3)
- ανοσοποιημένα ποντίκια εις διπλούν σε μεσοδιάστημα 15 ημερών, με 5×10^5 μυελογενούς προέλευσης δενδριτικά κύτταρα διεγερμένα με LdeEF-2 (10 µg/ml), σε 0,1ml αποστειρωμένου PBS (BM-DCs+LdeEF-2, n=3)
- ανοσοποιημένα ποντίκια εις διπλούν σε μεσοδιάστημα 15 ημερών, με 5×10^5 μυελογενούς προέλευσης δενδριτικά κύτταρα διεγερμένα με LdeEF-2 (10 µg/ml) και CpG (20 µg/ml), σε 0,1ml αποστειρωμένου PBS (BM-DCs+LdeEF-2+CpG, n=3)

Η δοκιμασία της αντιγονοπαρουσίασης, περιλαμβάνει τη χρήση δενδριτικών κυττάρων τα οποία ενοφθαλμίζονται από κοινού με λεμφοκύτταρα των ποντικών των (BM-DCs+ LdeEF-2, n=3) και (BM-DCs+ LdeEF-2+ CpG, n=3) ομάδων, προκειμένου να αξιολογηθεί *in vitro* η ανοσορυθμιστική ικανότητα του LdeEF-2.

3.6 Ανάλυση με Κυτταρομετρία Ροής (Fluorescence Activated Cell Sorting-FACS analysis)

Η τεχνική της κυτταρομετρίας ροής χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση και το λειτουργικό χαρακτηρισμό των δενδριτικών κυττάρων. Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί μία ποσοτική πολυπαραμετρική αυτοματοποιημένη μέθοδο μέτρησης κυττάρων με βάση τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους (μέγεθος και κοκκίωση) αλλά και την έκφραση συγκεκριμένων μορίων δεικτών που εκφράζονται τόσο στη

μεμβράνη των κυττάρων όσο και ενδοκυτταρικά. Το δεύτερο, επιτυγχάνεται με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι αυτών των μορίων που είναι συζευγμένα με φθορίζουσες ουσίες, όπως η φυκοερυθρίνη (PE) και η φλουοροσκεΐνη (FITC). Τα χαρακτηριστικά αυτά προσδιορίζονται άμεσα και ξεχωριστά σε καθένα από τα κύτταρα του υπό εξέταση δείγματος κατά την αλληλεπίδρασή τους με δέσμη ακτίνων Laser .

Οι ευαίσθητοι φωτοπολλαπλασιαστές του κυτταρομέτρου ανιχνεύουν:

- (α) τον οριζόντιο σκεδασμό του φωτός (Forward-scattered light, FSC) που δίνει πληροφορίες για το μέγεθος (όγκο) του κυττάρου,
- (β) τον ορθογώνιο ή κάθετο σκεδασμό του φωτός (Side-scattered light, SSC) που δίνει πληροφορίες για το σχήμα και την κοκκίωση του κυττάρου και
- (γ) τον φθορίζοντα πλάγιο σκεδασμό που δίνει πληροφορίες για την έκφραση επιφανειακών ή ενδοκυττάρων πρωτεϊνών (Γαϊτανάκη Κ., 2003).

Ένα συνδεδεμένο σύστημα υπολογιστή παράγει τη γραφική παράσταση του αριθμού των κυττάρων στον άξονα y και της έντασης του φθορισμού στον άξονα x. Πιο εξελιγμένες εκδόσεις του οργάνου είναι ικανές να κατανέμουν κυτταρικούς πληθυσμούς σε διαφορετικές θέσεις σύμφωνα με το πρότυπο φθορισμού τους. Η χρήση του οργάνου για τον ποιοτικό και τον ποσοτικό προσδιορισμό των κυττάρων ενός πληθυσμού που δεσμεύουν αντισώματα, σημασμένα με φθορίζουσες χρωστικές, ονομάζεται ανάλυση. Η χρήση του οργάνου για διοχέτευση με διαφορετικά πρότυπα σε διαφορετικά σωληνάρια, ονομάζεται κυτταρικός διαχωρισμός (Goldsby, 2007).

Τα αποτελέσματα εμφανίζονται με τη μορφή γραφικών παραστάσεων ανάλογα με τις εσωτερικές ρυθμίσεις του οργάνου (ιστογράμματα [histograms] ή στικτογράμματα [dot plots]) και εκατοστιαίων ποσοστών σημανθέντων κυττάρων (Γαϊτανάκη Κ., 2003).

Η προετοιμασία των δειγμάτων για κυτταρομετρία ροής περιλαμβάνει ένα σύνολο σταδίων, το οποίο τροποποιήθηκε ανάλογα με το αν η χρώση των μορίων των κυττάρων αφορά σε επιφανειακό ή εκκρινόμενο δείκτη.

Η πειραματική πορεία που περιγράφεται παρακάτω αφορά στην προετοιμασία δειγμάτων που πρόκειται να επισημανθούν τόσο για εξωκυττάρους επιφανειακούς δείκτες (Clusters of Differentiation, CD: CD11c, CD8a, CD40, CD86, MHC- II, Major Histocompatibility Complex II), όσο και για τους εκκρινόμενους δείκτες-κυτταροκίνες ιντερλευκίνη 12 (interleukin-12, IL-12) και ιντερλευκίνη 10 (interleukin

10, IL-10). Τα αντισώματα που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της διαφοροποίησης των δενδριτικών κυττάρων είναι:

(α) αντίσωμα για την ταυτοποίηση των δενδριτικών κυττάρων που αναγνωρίζει την αλλυσίδα α_χ της ιντεγκρίνης gp150 (anti-mouse CD11c) και (β) αντίσωμα που αναγνωρίζει τις αλυσίδες α και α' του αντιγόνου διαφοροποίησης CD8 (anti-mouse CD8 α [Ly-2]),

(γ) αντίσωμα που αναγνωρίζει μία γλυκοπρωτεΐνη με μοριακό βάρος 40 έως 50 kDa, η οποία εκφράζεται στην επιφάνεια των διεγερμένων B-λεμφοκυττάρων, των μακροφάγων και των δενδριτικών κυττάρων (anti-mouse CD40),

(δ) αντίσωμα που αναγνωρίζει το συνδιεγερτικό μόριο B7-2 (ή CD86) που εκφράζεται στην επιφάνεια της πλειοψηφίας των λευκοκυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των B-λεμφοκυττάρων, των επαγόμενων από θειογλυκολικό ζωμό μακροφάγων της περιτοναϊκής κοιλότητας και των δενδριτικών κυττάρων (anti-mouse CD86),

(ε) αντίσωμα έναντι των μορίων MHC II που αναγνωρίζει έναν πολυμορφικό επίτοπο που υπάρχει στα I-A^b, I-A^d, I-A^q, I-E^d και I-E^k αλλοαντιγόνα (anti-mouse I-A/I-E),

(στ) αντίσωμα έναντι της IL12p40/p70, (ζ) αντίσωμα έναντι της IL-10.

Για τη σήμανση των επιφανειακών μορίων, τα δενδριτικά κύτταρα συλλέγονται από κάθε φρεάτιο της πλάκας καλλιέργειας 24 θέσεων (5×10^5 κύτταρα/ml) σε ξεχωριστό δοκιμαστικό σωλήνα τύπου erppendorf. Κατόπιν τα δείγματα φυγοκεντρώνται σε επιτραπέζια μικροφυγόκεντρο στις 4.000 rpm, για 10 λεπτά και στους 25 °C. Ακολουθούν δύο εκπλύσεις με 0,5 ml FACs buffer με φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες. Τα κύτταρα μονιμοποιούνται σε 0,1 ml διαλύματος PBS-2% (w/v) παραφορμαλδεΐδης για 20 λεπτά, στους 4°C. Ακολουθεί μία έκπλυση με 0,5 ml FACs buffer με φυγοκέντρηση, όπως προωότερα. Τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 0,1 ml FACs buffer με το συζευγμένο, με φθοριόχρωμα αντίσωμα σε αραιώση 1:100 και επωάζονται στον πάγο, στο σκοτάδι, για 30 λεπτά. Στο τέλος της επώασης προστίθενται 0,3 ml FACs buffer και τα δείγματα φυγοκεντρώνται στις ίδιες συνθήκες. Ακολουθούν δύο εκπλύσεις σε 0,1 ml FACs buffer με φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες και το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε 0,5 ml PBS, στους κατάλληλους πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες, που προορίζονται για την εκτέλεση της κυτταρομετρίας ροής. Το εναιώρημα των κυττάρων αναλύεται άμεσα ή διατηρείται στους 4 °C, στο σκοτάδι για 24 ώρες.

Για να επιτευχθεί επισημανση των εκκρινόμενων κυτταροκινών IL-12 και IL-10 στο εσωτερικό των κυττάρων, απαιτείται η προσθήκη ενός αναστολέα έκκρισης των κυτταροκινών στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας των κυττάρων, όπως η μπρεφελδίνη Α. Η μπρεφελδίνη Α εξασφαλίζει την ανίχνευση εκκρινόμενων κυτταροκινών με υψηλή ευαισθησία. Για τη διαπερατοποίηση της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων, ο εν λόγω αναστολέας χρησιμοποιείται ταυτόχρονα με χημικούς συμπαράγοντες όπως η σαπωνίνη (Maino & Picker, 1998). Η εν λόγω προσθήκη, πραγματοποιείται στα δείγματα που προορίζονται για τέτοιου είδους χρώση 4 ώρες νωρίτερα της επεξεργασίας του συνόλου των δειγμάτων. Στο χρονικό διάστημα αυτό ολοκληρώνεται η αναστολή της έκκρισης των κυτταροκινών και τα κύτταρα μπορούν να επισημανθούν ως προς αυτές. Η μπρεφελδίνη Α προστίθεται στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας των κυττάρων σε τελική συγκέντρωση 2,5 µg/ml και η καλλιέργεια αυτών συνεχίζεται για χρονικό διάστημα 4 ωρών. Επιπλέον, προκειμένου να είναι εφικτή η επισημανση των κυτταροκινών στο εσωτερικό των κυττάρων, το επισημασμένο αντίσωμα έναντι αυτών αραιώνεται σε 0,1 ml διαλύματος διαπερατοποίησης (permabilization buffer), σε αραιώση 1:100. Η επώαση των δειγμάτων διαρκεί 15 λεπτά, στο σκοτάδι, στον πάγο. Κατόπιν πραγματοποιείται προσθήκη 0,05 ml permabilization buffer και επώαση για επιπλέον 5 λεπτά στις ίδιες συνθήκες. Τα επόμενα στάδια επεξεργασίας των δειγμάτων είναι ίδια με εκείνα που προαναφέρθηκαν.

Στον κυτταρομετρητή ροής αναλύονται 10.000 γεγονότα (κύτταρα) ανά δείγμα. Η ανάλυση πραγματοποιείται στον κυτταρομετρητή ροής FACS Calibur της Becton Dickinson, ενώ η επεξεργασία των αποτελεσμάτων γίνεται με το λογισμικό CellQuest.

Τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής απεικονίζονται (α) με το στικτόγραμμα (dot plot) των χαρακτηριστικών σκέδασης των κυττάρων όπου στην τεταγμένη παρουσιάζονται ο ορθογώνιος ή κάθετος σκεδασμός (Side-scattered light, SSC) και στην τετμημένη ο οριζόντιος σκεδασμός (Forward-scattered light, FSC) και (β) το στικτόγραμμα των παραμέτρων FL1 και FL2 οι οποίες συσχετίζονται σε καθορισμένη ποσοστιαία αναλογία ώστε να αντιστοιχούν στο μήκος κύματος του φθοριοχρώματος φυκοερυθρίνη (PE). Για την ανάλυση των δεδομένων η γραφική παράσταση χωρίζεται σε 4 τμήματα με ένα σταυρόνημα, επί του οποίου ορίζεται η

περιοχή μελέτης. Εκτός της περιοχής μελέτης κάτω αριστερά αντιστοιχεί ο «θόρυβος», ενώ πάνω και κάτω δεξιά βρίσκονται οι περιοχές εκτός πεδίου ανάλυσης.

3.7 Δοκιμασία *in vitro* αντιγονοπαρουσίασης- Ag-presentation Assay

Οι *in vitro* αποκρίσεις πολλαπλασιασμού των T-λεμφοκυττάρων παρουσία ιών, πρωτεϊνικών αντιγόνων, αντιγόνων μεταμόσχευσης κ.α. απαιτούν την *in vivo* ανοσοποίηση η οποία ακολουθείται από *in vitro* ενεργοποίηση αυτών. Η μέθοδος της αντιγονοπαρουσίασης (Ag presentation assay) βασίζεται στη μέτρηση και στον υπολογισμό της ικανότητας των T-λεμφοκυττάρων ανοσοποιημένου δέκτη, να πολλαπλασιάζονται μετά την αναγνώριση ετερόλογων αντιγόνων στην επιφάνεια αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων δότη, του ίδιου είδους (Kruisbeek et al., 2004).

Εν προκειμένω, για να μελετηθεί η ανοσορυθμιστική δυναμική του πρωτεϊνικού αντιγόνου *LdeEF-2* και ταυτόχρονα να αξιολογηθεί η ικανότητα της επιτυχούς αντιγονοπαρουσίασης των δενδριτικών, μέσω επαγωγής λεμφοκυτταρικού πολλαπλασιασμού T-κυττάρων, ανοσοποιούνται 2 ομάδες ποντικών η (BM-DCs+*LdeEF-2*)_{n=3} και η (BM-DCs+*LdeEF-2*+CpG)_{n=3} ενώ ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιείται ποντίκι στο οποίο δεν επιτελείται κάποια παρέμβαση (control).

Ακριβέστερα, έπειτα από απομόνωση λεμφοκυττάρων από σπλήνα BALB/c ανοσοποιημένων και μη ποντικών, τα λεμφοκύτταρα καλλιεργούνται με δενδριτικά κύτταρα προερχόμενα από μυελό των οστών του ίδιου είδους. Τα λεμφοκύτταρα των ποντικών της ομάδας (BM-DCs+*LdeEF-2*)_{n=3} καλλιεργούνται με δενδριτικά, παρουσία *LdeEF-2* (10 μg/ml) ενώ αυτά της ομάδας (BM-DCs+*LdeEF-2*+CpG)_{n=3} με δενδριτικά κύτταρα, παρουσία *LdeEF-2* (10 μg/ml) και CpG (20 μg/ml). Τα λεμφοκύτταρα καλλιεργούνται με τα δενδριτικά σε δύο αναλογίες: 5 λεμφοκύτταρα: 1 δενδριτικό και 10 λεμφοκύτταρα:1 δενδριτικό. Επιπρόσθετα διαμορφώνονται ομάδες ελέγχου της δοκιμασίας, ως εξής: δύο ομάδες καλλιέργειας δενδριτικών κυττάρων, αποκλειστικά, εκτεθειμένων σε *LdeEF-2* (10 μg/ml) και *LdeEF-2* (10 μg/ml) και CpG (20 μg/ml) αντίστοιχα, μία ομάδα λεμφοκυττάρων, αποκλειστικά, χωρίς την προσθήκη κάποιου παράγοντα (αρνητικός μάρτυρας) και μία ομάδα λεμφοκυττάρων αποκλειστικά εκτεθειμένων στη μιτογόνο ουσία κονκαναβαλίνη A (*concanavalin A*, Con A), σε τελική συγκέντρωση 3 μg/ml (θετικός μάρτυρας). Η Con A, αποτελεί μία λεκτίνη με μιτογόνο δραστηριότητα κατά προτίμηση επί των T-λεμφοκυττάρων (Krauss, Buttgerit, & Brand, 1999).

Κατόπιν απομόνωσης του σπλήνα των ποντικών, κάθε όργανο που περιέχεται στον ανάλογο πλαστικό σωλήνα παρουσία θρεπτικού υλικού RPMI, τοποθετείται εντός άσηπτου τρυβλίου petri και ομογενοποιείται με τη χρήση εμβόλου αποστειρωμένης σύριγγας. Το τρυβλίο τοποθετείται υπό μικρή κλίση, ούτως ώστε να κατακρημνίζονται τα μεγαλύτερα θραύσματα του οργάνου. Με τη χρήση γυάλινου σιφωνίου Παστέρ και ηλεκτρικής πιπέτας, το ελαιώρημα του τρυβλίου αναρροφάται και μεταγγίζεται σε νέο άσηπτο πλαστικό σωλήνα όγκου 15 ml. Το ελαιώρημα φυγοκεντρείται σε επιτραπέζια φυγόκεντρο με μεταβλητή γωνιακή κλίση στις 1.400 rpm, για 10 λεπτά στους 4 °C. Κατόπιν, το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα επαναιωρείται σε 2 ml ACK αναδεδυμένο ήπια για 1-2 λεπτά, προκειμένου να επιτευχθεί λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Η δράση του ACK αναστέλλεται με προσθήκη 3 ml RPMI και το ελαιώρημα φυγοκεντρείται στις ίδιες συνθήκες. Έπειτα από απόρριψη του υπερκείμενου, προστίθενται 5 ml RPMI και πραγματοποιείται καταμέτρηση των λεμφοκυττάρων σε πλάκα Malassez, σε αραιώση 1:10, σε διάλυμα χρωστικής Trypan Blue. Κατά αυτόν τον τρόπο υπολογίζονται οι όγκοι του κυτταρικού ελαιωρήματος που απαιτούνται ούτως ώστε να επιτευχθεί κυτταρική πυκνότητα T λεμφοκυττάρων 2×10^5 λεμφοκύτταρα ανά 0,2 ml πλήρους θρεπτικού μέσου. Σε αυτόν τον όγκο υπολογίζονται και οι τελικές συγκεντρώσεις των χρησιμοποιούμενων αντιδραστηρίων, LdeEF2 (10 µg/ml), CpG (20 µg/ml), ConA (3 µg/ml). Ταυτόχρονα, από την καλλιέργεια των δενδριτικών κυττάρων έχουν υπολογισθεί κυτταρικές πυκνότητες της τάξης 2×10^4 δενδριτικά για την αναλογία 1:10 και 4×10^4 δενδριτικά, για την αναλογία 1:5. Κάθε ομάδα δειγμάτων, επιστρώνεται σε πλάκα των 96 κοίλων φρεατίων εις τριπλούν. Τα κύτταρα επωάζονται για 72 ώρες σε επωαστικό κλίβανο στους 37 °C, σε περιβάλλον 5% CO₂ και 95% υγρασίας. Κατόπιν, η πλάκα φυγοκεντρείται σε επιτραπέζια φυγόκεντρο με μεταβλητή γωνιακή κλίση στις 700 rpm, για 5 λεπτά στους 25 °C. Ακολούθως προστίθεται τριτωμένη θυμιδίνη στο θρεπτικό μέσο, σε τελική συγκέντρωση 2 µCi/ml και τα κύτταρα επωάζονται για 18 ώρες στις ίδιες συνθήκες. Η θυμιδίνη ενσωματώνεται στο νεοσυντιθέμενο DNA των λεμφοκυττάρων και η μέτρηση του ποσοστού ενσωμάτωσής της αποτελεί το δείκτη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Τα κύτταρα που πολλαπλασιάζονται, περισυλλέγονται σε διηθητικό χαρτί επικαλυμμένο με πλέγμα από μικροσκοπικές ίνες γυαλιού με τη χρήση ειδικής συσκευής περισυλλογής κυττάρων. Τα φίλτρα στεγνώνουν σε ξηρό κλίβανο

θερμοκρασίας 60°C για 30 λεπτά και στη συνέχεια τοποθετούνται σε ειδικές μεμβράνες, όπου διαποτίζονται με υγρό σπινθηρισμού. Η εκπεμπόμενη β-ακτινοβολία μετρείται σε ειδικό μετρητή και οι τιμές εκφράζονται σε κρούσεις ανά λεπτό (counts per minute, cpm). Κατόπιν, για κάθε ομάδα λεμφοκυττάρων υπολογίζεται ο η μέση διαφορά κρούσεων ($\Delta cpm = \text{μέσος όρος κρούσεων διεγερμένων κυττάρων} - \text{μέσος όρος κρούσεων αδιέγερτων κυττάρων}$) ή/και ο μέσος δείκτης ενεργοποίησης (stimulation Index, $S.I. = \text{μέσος όρος κρούσεων διεγερμένων κυττάρων} / \text{μέσος όρος κρούσεων αδιέγερτων κυττάρων}$). Η μέση διαφορά κρούσεων αποδίδει τον καθαρό πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων κατόπιν αντιγονοπαρουσίασης ενώ ο μέσος δείκτης ενεργοποίησης αποδίδει το βαθμό ενεργοποίησης των λεμφοκυττάρων.

3.8 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου με αντίστροφη μεταγραφή (real time RT-PCR, Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) αποτελεί μία τεχνική της μοριακής βιολογίας η οποία χρησιμοποιείται προκειμένου να ενισχυθεί σε αρκετές τάξεις μεγέθους, ένα ή μερικά αντίγραφα ενός τμήματος DNA, παράγοντας χιλιάδες ή και εκατομμύρια αντίγραφα μίας συγκεκριμένης DNA αλληλουχίας. Η PCR αναπτύχθηκε από τον Kary Mullis το 1983 (Bartlett & Stirling, 2003; Mullis et al., 1987), ο οποίος μαζί με τον Michael Smith βραβεύτηκε το 1993 με βραβείο Νόμπελ χημείας. Μέχρι σήμερα έχουν αναπτυχθεί διάφορες παραλλαγές της PCR, με ποικιλία εφαρμογών σε εργαστήρια βιολογικής έρευνας καθώς και στην ιατρική (Saiki et al., 1988; Saiki et al., 1985). Στις εφαρμογές αυτές περιλαμβάνονται η DNA κλωνοποίηση για την εφαρμογή αλληλούχισης, η λειτουργική ανάλυση γονιδίων, η διάγνωση γενετικών νοσημάτων, η ταυτοποίηση γενετικών αποτυπωμάτων (στην εγκληματολογία και στον έλεγχο πατρότητας) και η ανίχνευση και η διάγνωση μολυσματικών νοσημάτων. Η PCR αντίστροφης μεταγραφής (reverse transcriptase PCR, RT-PCR) αποτελεί μία από τις παραλλαγές της PCR και χρησιμοποιείται κατεξοχήν στη μοριακή βιολογία προκειμένου να ανιχνευθεί η έκφραση του ριβονουκλεοτιδικού οξέος (ribonucleic acid, RNA) και κατ' επέκταση να μελετηθεί ποιοτικά η γονιδιακή έκφραση, μέσω της δημιουργίας αντίστροφων μεταγράφων συμπληρωματικού DNA (cDNA) με μήτρα RNA. Η πραγματικού χρόνου PCR (real time PCR ή qPCR, quantitative PCR) είναι μία τεχνική κατά την

οποία ποσοτικοποιείται η ενίσχυση του DNA με τη χρήση φθορίζοντων ανιχνευτών (Livak & Schmittgen, 2001) κατά τη διάρκεια της αντίδρασης πολλαπλασιασμού του νουκλεϊκού οξέος.

Το πρώτο βήμα για τη διεξαγωγή της RT-PCR περιλαμβάνει την απομόνωση RNA από βιολογικά δείγματα. Η διαδικασία απομόνωσης καθίσταται πολύπλοκη λόγω της παρουσίας ενζύμων-ριβονουκλεάσες στα κύτταρα και στους ιστούς, τα οποία μπορούν να διασπάσουν ταχέως το RNA (Peirson & Butler, 2007). Το επόμενο βήμα για την εκτέλεση της τεχνικής, αφορά στη μετατροπή του RNA σε συμπληρωματικό DNA (complementary DNA, cDNA) με τη χρήση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση. Κατόπιν, το cDNA χρησιμοποιείται ως μήτρα για τον εκθετικό πολλαπλασιασμό του. Η ενίσχυση του mRNA με RT-PCR μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με αντίδραση ενός βήματος είτε με αντίδραση δύο βημάτων. Στην αντίδραση ενός βήματος η συνολική αντίδραση από τη σύνθεση του cDNA έως και την PCR ενίσχυση, λαμβάνει χώρα σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα. Η αντίδραση ενός βήματος θεωρείται ότι περιορίζει τις πειραματικές αποκλίσεις καθώς το σύνολο των ενζυμικών αντιδράσεων πραγματοποιούνται σε ένα ενιαίο περιβάλλον. Επιπλέον προτιμάται, όταν χρησιμοποιούνται φθορίζοντες ανιχνευτές για το δίκλωνο DNA, όπως το SYBR Green, καθώς ο περιορισμός ανάπτυξης διμερών των εκκινητών γίνεται με μία απλή αλλαγή στη θερμοκρασία αποδιάταξης. Στην αντίδραση δύο βημάτων η σύνθεση του cDNA και η αντίδραση PCR, πραγματοποιούνται σε ξεχωριστούς δοκιμαστικούς σωλήνες. Αν και η αντίδραση δύο βημάτων θεωρείται περισσότερο ακριβής, μειονεκτεί εξαιτίας της μεγαλύτερης πιθανότητας επιμολύνσεων λόγω του συχνότερου χειρισμού των δειγμάτων (Rajeevan, Vernon, Taysavang, & Unger, 2001). Η χρήση της RT-PCR για την ανίχνευση RNA μεταγράφων, αποτελεί μία από τις πιο ευαίσθητες διαθέσιμες μεθόδους (Schmittgen et al., 2000).

Η ανάδειξη νέων τεχνικών με τις οποίες η επισήμανση του DNA γίνεται με τη χρήση φθορίζοντων ανιχνευτών, επιτρέπει την ανίχνευση και την ανάλυση των προϊόντων της PCR σε πραγματικό χρόνο, με αποτέλεσμα την εκτεταμένη υιοθέτηση της τεχνικής της real-time RT-PCR για την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης καθώς και για την ποσοτικοποίηση αυτής. Μέχρι τώρα, υπάρχουν τέσσερις διαφορετικοί φθορίζοντες ανιχνευτές διαθέσιμοι για την εκτέλεση της real-time RT-PCR (SYBR

Green, TaqMan, Molecular Beacons και Scorpions) οι οποίοι επιτρέπουν την ανίχνευση των προϊόντων PCR, παράγοντας σήμα φθορισμού (Holden & Wang, 2008). Η τεχνική εκτελείται σε ένα θερμικό κυκλοποιητή οποίος έχει τη δυνατότητα να εκπέμπει μία δέσμη φωτός συγκεκριμένου μήκους κύματος και να ανιχνεύει το φθορισμό που εκπέμπεται από τους φθορισμοφόρους ανιχνευτές. Επιπλέον, ο θερμικός κυκλοποιητής μπορεί να θερμαίνει και να ψύχει τα δείγματα, με αποτέλεσμα να αξιοποιούνται οι φυσικοχημικές ιδιότητες των νουκλεϊκών οξέων και της DNA πολυμεράσης. Η PCR εκτελείται σε μία σειρά μεταβολών της θερμοκρασίας που επαναλαμβάνονται 25-40 φορές. Οι κύκλοι αυτοί, συνήθως περιλαμβάνουν τρία στάδια: Στο πρώτο η θερμοκρασία ανέρχεται στους 95 °C, όπου διαχωρίζονται οι αλυσίδες του δίκλωνου νουκλεϊκού οξέος, στο δεύτερο η θερμοκρασία κατέρχεται στους 50-60 °C, επιτρέποντας τη σύνδεση των εκκινητών με τη μήτρα του DNA και τέλος στο τρίτο, σε θερμοκρασία 68-72 °C, πραγματοποιείται ο πολυμερισμός από την DNA πολυμεράση. Η ποσοτικοποίηση των παραγόμενων νουκλεϊκών οξέων μπορεί να γίνει με δύο μεθόδους: τη σχετική και την απόλυτη ποσοτικοποίηση (Dhanasekaran, Doherty, & Kenneth, 2010). Η απόλυτη ποσοτικοποίηση αποδίδει τον απόλυτο αριθμό των στοχοποιημένων μορίων DNA μέσω σύγκρισης προτύπων δειγμάτων DNA με τη χρήση μίας καμπύλης βαθμονόμησης. Κατά συνέπεια είναι σημαντικό τόσο η PCR των δειγμάτων όσο και αυτή των προτύπων να έχουν την ίδια αποτελεσματικότητα στην ενίσχυση. Η σχετική ποσοτικοποίηση βασίζεται σε ένα σύνολο ενδογενών γονιδίων αναφοράς προκειμένου να καθοριστούν οι προκύπτουσες διαφορές στην έκφραση του γονιδίου στόχου. Η ποσοτικοποίηση εκφράζεται ως αλλαγή στα επίπεδα έκφρασης του μηνύματος RNA (messenger RNA, mRNA) όπως αυτά ερμηνεύονται βάσει του συμπληρωματικού DNA. Η σχετική ποσοτικοποίηση είναι ευκολότερη στην εκτέλεση καθώς δεν απαιτεί τη χρήση καμπύλης βαθμονόμησης αφού η ποσοστιαία έκφραση του γονιδίου στόχου συγκρίνεται με αυτή του γονιδίου ελέγχου. Ο λόγος για τον οποίο χρησιμοποιείται ένα ή περισσότερα συντηρημένα γονίδια είναι για να διορθωθούν μη ειδικές αποκλίσεις, όπως αυτές που προκύπτουν εξαιτίας της ποσότητας και της ποιότητας του χρησιμοποιούμενου RNA, οι οποίες μπορούν να επιδράσουν στην αποτελεσματικότητα της αντίστροφης μεταγραφής και κατά συνέπεια στη συνολική διαδικασία της PCR. Ωστόσο, η κρίσιμότερη παράμετρος που

λαμβάνεται υπόψη είναι η σταθερότητα της έκφρασης του γονιδίου αναφοράς (Brunner, Yakovlev, & Strauss, 2004).

Στην παρούσα εργασία, εκτελείται ποσοτική RT-PCR πραγματικού χρόνου, προκειμένου να μελετηθεί η διαφορική έκφραση των γονιδίων σε κυττατικούς πληθυσμούς ανοσοποιημένων ποντικών με *ex vivo* διεγερμένα δενδριτικά κύτταρα με *LdeEF-2* (10μg/ml) παρουσία ανοσοενισχυτικού CpG (20μg/ml)

3.8.1 Απομόνωση ολικού RNA

Από δείγματα ιστών σπλήνα φυσιολογικού (n=1) και ανοσοποιημένων (n=3) BALB/c ποντικών, απομονώνεται ολικό RNA και δημιουργείται τράπεζα, η οποία φυλάσσεται στους -80 °C . Η απομόνωση του ολικού RNA γίνεται με το RNeasy Plus Universal kit (Qiagen), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το πρωτόκολλο που ακολουθείται παρατίθεται εν συντομία παρακάτω:

Με τη χρήση αποστειρωμένων χειρουργικών εργαλείων, συλλέγεται τεμάχιο (έως 30 mg) από ιστούς σπλήνα πειραματοζώων. Κατόπιν με την προσθήκη διαλύματος QIAzol για τη λύση των κυττάρων, πραγματοποιείται μηχανική ομογενοποίηση του τεμαχίου με τη βοήθεια σύριγγας 1 ml και βελόνας διαμέτρου 23G. Εν συνεχεία, τα ομογενοποιημένα διαλύματα αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να αποδιαταχθούν τα νουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα και προστίθεται διάλυμα εξάλειψης πυρηνικού DNA. Μετά από προσθήκη χλωροφορμίου, τα διαλύματα επώζονται σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρώνονται σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στους 4 °C . Κατά τη φυγοκέντρωση τα διαλύματα διαχωρίζονται σε τρεις φάσεις: την ανώτερη υδατική (άχρωμη) που περιέχει RNA, μια λευκή ενδιάμεση φάση και την κατώτερη οργανική φάση (κόκκινη). Η ανώτερη υδατική φάση μεταφέρεται σε καθαρό σωληνάριο, προστίθεται ίσος όγκος 70% αιθανόλης και το προκύπτον διάλυμα μεταφέρεται στις στήλες. Ακολουθεί φυγοκέντρωση των στηλών για την απομάκρυνση των προσμίξεων και την προσρόφηση του RNA στη μεμβράνη πυριτίου. Πραγματοποιούνται εκπλύσεις της μεμβράνης με τη χρήση διαλυμάτων θειοκυανιούχου γουανιδίνης και αιθανόλης για την περαιτέρω απομάκρυνση των προσμίξεων. Τέλος πραγματοποιείται έκλυση του RNA με την προσθήκη υπερκάθαρου νερού στις στήλες. Ακολουθεί φωτομέτρηση και ποσοτικοποίηση των δειγμάτων RNA με τη χρήση φασματοφωτομετρίας (Nanodrop).

3.8.2 Κατασκευή τράπεζας cDNA

Όπως προαναφέρθηκε, για την ανάλυση επιπέδων έκφρασης των γονιδίων η πλέον χρησιμοποιούμενη μέθοδος είναι η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (PCR). Προκειμένου να παραχθεί υλικό κατάλληλο για PCR απαιτείται η μετατροπή του RNA που απομονώνεται από τα δείγματα, σε cDNA. Για την παραγωγή cDNA χρησιμοποιείται το RT² HT First Strand Kit (Qiagen), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το πρώτο βήμα περιλαμβάνει την προσθήκη ειδικού διαλύματος για την απομάκρυνση κάθε ίχνους πυρηνικού DNA (gDNA) από τα δείγματα RNA. Συγκεκριμένα, σε σταθερή ποσότητα RNA για κάθε δείγμα (1μg) προστίθεται το διάλυμα εξάλειψης πυρηνικού DNA (genomic DNA, gDNA) και ακολουθεί επώαση για 10 λεπτά της ώρας. Στη συνέχεια, σε κάθε δείγμα προστίθεται διάλυμα αντίστροφης μεταγραφής, που περιέχει όλα τα συστατικά για την παραγωγή cDNA, όπως τυχαία εξαμερή, ολιγονουκλεοτίδια oligo-dT και MMLV αντίστροφη μεταγραφάση, σε τελικό όγκο 0,020 ml. Το πρωτόκολλο της αντίδρασης που εφαρμόζεται στο θερμικό κυκλοποιητή GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Singapore) είναι: δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης στους 42 °C για 15 λεπτά της ώρας και απενεργοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης με θερμικό σοκ στους 95 °C για 5 λεπτά της ώρας. Τα προϊόντα της αντίδρασης αποθηκεύτηκαν στους -20 °C.

3.9.3 Επιλογή ανοσολογικών γονιδίων και των εκκινήτών τους

Έπειτα από βιβλιογραφική ανασκόπηση, προσδιορίστηκε το σύνολο των ανοσολογικών γονιδίων και των γονιδίων αναφοράς, των οποίων η έκφραση θα είχε ενδιαφέρον να διερευνηθεί. Τα γονίδια που επιλέγονται είναι τα εξής: Stat1, Stat4, Tbx21, Ifng, Stat6, Gata3, Il4, Stat3, Rorc, Il17a, Foxp3 και το γονίδιο Gapdh ως γονίδιο αναφοράς. Χρησιμοποιήθηκαν επίσης, δείγματα ελέγχου για την επιμόλυνση από πυρηνικό DNA ποντικού (MGDC) και για την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (RTC), καθώς και ένα θετικό δείγμα ελέγχου της PCR.

3.9.4 qRT-PCR

Προκειμένου να προσδιοριστούν τα επίπεδα έκφρασης των επιλεγμένων γονιδίων υπό βέλτιστες συνθήκες, οι ποσοτικές PCRs πραγματοποιούνται με το RT² Profiler PCR Array (CAPM13028), που αποτελεί ένα ειδικά σχεδιασμένο Mouse RT²

Profiler PCR Array από την εταιρία Qiagen, προσαρμοσμένο στις απαιτήσεις της παρούσας εργασίας.

Για τη διεξαγωγή των RT-PCRs χρησιμοποιείται το RT² SYBR Green qPCR Mastermix, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το RT² SYBR Green qPCR Mastermix περιλαμβάνει Hot start DNA Taq πολυμεράση, νουκλεοτίδια και τη χρωστική SYBR Green σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα. Κάθε αντίδραση πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 0,025 ml που περιέχει το cDNA στόχο, 2× RT² qPCR Primer Assay και ddH₂O, μέχρι τον τελικό όγκο. Οι συνθήκες της αντίδρασης που εφαρμόζονται στο θερμικό κυκλοποιητή StratageneTM Mx3005P (Aligent Technologies, Santa Clara, CA) είναι: αρχική αποδιάταξη στους 95 °C για 15 δευτερόλεπτα, υβριδισμός και επιμήκυνση των εκκινητών στους 60 °C για 30 δευτερόλεπτα για 40 κύκλους, συμπλήρωση μονόκλωνων άκρων στους 72 °C για 5 λεπτά της ώρας και ολοκλήρωση της διαδικασίας με αποθήκευση στους 4 °C επ' άπειρον.

3.10 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων

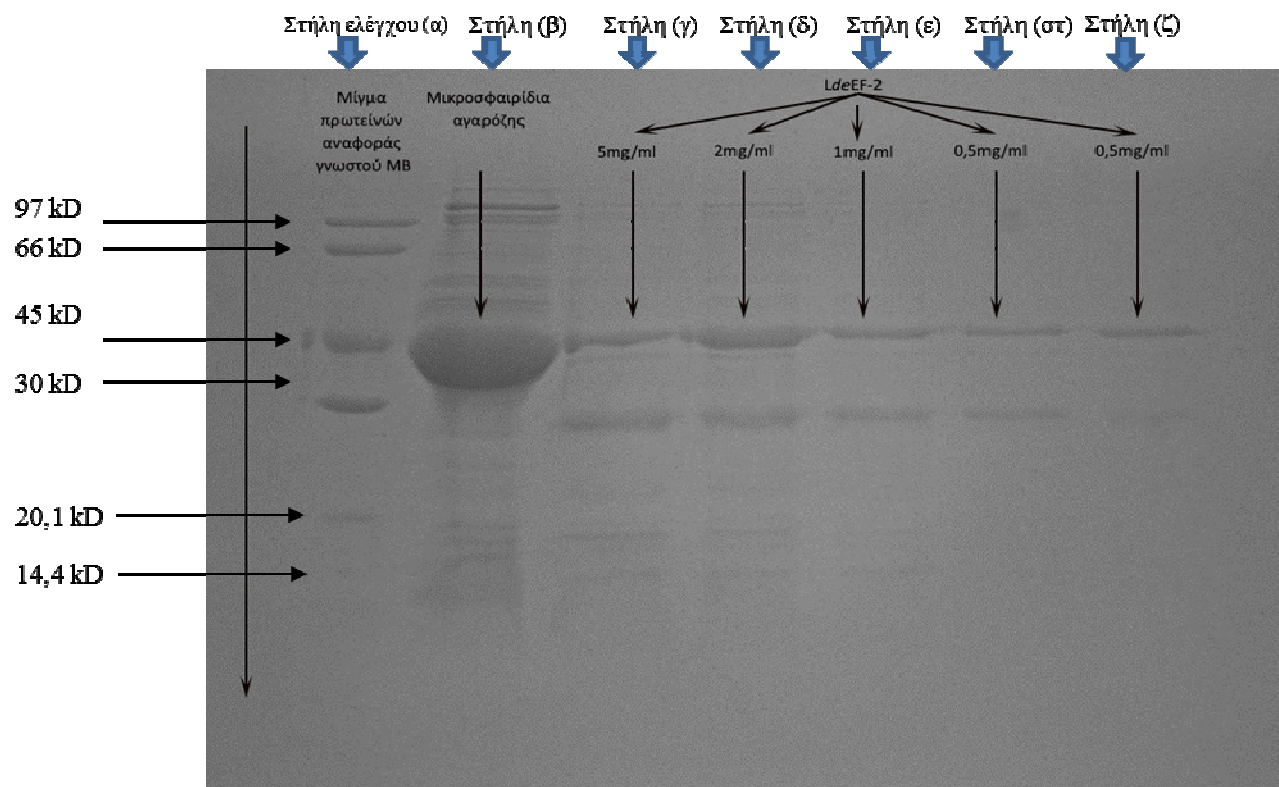
Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιείται το υπολογιστικό εργαλείο Excel του λογισμικού Microsoft Office. Τα αποτελέσματα παρατίθενται ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση, ενώ οι στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων υπό διερεύνηση και των δειγμάτων ελέγχου αναδεικνύονται με το student's *t-test*.

4. Αποτελέσματα

4.1 Ανίχνευση και προσδιορισμός της συγκέντρωσης του πρωτεϊνικού προϊόντος LdeEF-2

Η απομόνωση και ο καθαρισμός της πρωτεΐνης LdeEF-2 από το ετερόλογο σύστημα έκφρασης *E.coli* (BL21) πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της χρωματογραφίας συγγένειας σε στήλη νικελίου, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.2, ενώ η πιστοποίηση έκφρασης αυτής βασίστηκε στη μέθοδο του Laemmli, με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση. Από κάθε υγρή καλλιέργεια όγκου 1.000 ml, του βακτηριακού στελέχους *E.coli* (BL21), εξασφαλίζεται η λήψη πέντε πρωτεϊνικών κλασμάτων, όγκου 0,150 ml έκαστου. Τα κλάσματα λαμβάνονται από διαδοχικές εκπλύσεις της στήλης μικροσφαιριδών αгарόζης με διάλυμα που περιέχει ιμιδαζόλιο σε συγκέντρωση 250 mM. Ο όγκος του διαλύματος που χρησιμοποιείται για κάθε έκλουση καθορίζεται από τις οδηγίες του κατασκευαστή του kit Protino Ni-NTA Agarose, Macherey-Nagel και αντιστοιχεί στον ακριβή όγκο των μικροσφαιριδίων της στήλης ο οποίος ήταν 0,150ml. Κάθε κλάσμα μεταγγίζεται σε ξεχωριστό σωλήνα τύπου erpendorf. Από κάθε κλάσμα λαμβάνεται ξεχωριστό δείγμα όγκου 0,025 ml για την εφαρμογή SDS-PAGE ηλεκτροφόρησης.

4.1.1 Υπολογισμός της συγκέντρωσης του πρωτεϊνικού προϊόντος LdeEF-2 (1-357 α.α)



Εικόνα 4.1.1: Πήκτωμα διαχωρισμού (12% ακρυλαμίδιο) όπου εμφανίζονται από τα αριστερά προς τα δεξιά οι πρωτεϊνικές ζώνες (α) του δείκτη πρωτεϊνών χαμηλής μοριακής μάζας (LMW, στήλη ελέγχου), (β) του δείγματος των μικροσφαιριδίων αγαρόζης (β) και τα κλάσματα έκλυσης 1-5 (γ)-(ζ)

Στην Εικόνα 4.1.1 εμφανίζονται οι πρωτεϊνικές ζώνες στο πήκτωμα διαχωρισμού (ακρυλαμίδιο 12%) έπειτα από χρώση με διάλυμα χρώσης

Coomassie. Στην στήλη ελέγχου (α), στο αριστερό τμήμα του πηκτώματος, εμφανίζονται οι ζώνες του μίγματος πρωτεϊνών αναφοράς γνωστής μοριακής μάζας, ενώ οι στήλες δεξιά αντιστοιχούν κατά σειρά στο δείγμα μικροσφαιριδίων αγαρόζης της στήλης νικελίου που περιέχουν προσκολλημένες πρωτεΐνες (στήλη β) και στα πρωτεϊνικά κλάσματα 1-5 που λαμβάνονται με διαδοχικές εκπλύσεις της στήλης (στήλες γ-ζ). Ακριβέστερα στη στήλη β, των μικροσφαιριδίων αγαρόζης, παραμένει δεσμευμένη υψηλή ποσότητα της πρωτεΐνης η οποία δεν αξιοποιείται πειραματικά. Τα κλάσματα 1-5, στις στήλες γ-ζ αποτελούν τα αποδεσμευμένα κλάσματα πρωτεΐνης από τη στήλη μικροσφαιριδίων αγαρόζης τα οποία και χρησιμοποιούνται για επόμενους πειραματισμούς.

Αρχικά, η μοριακή μάζα του μορίου που αντιστοιχεί στα αμινοξέα 1-357 υπολογίζεται με τη χρήση του υπολογιστικού εργαλείου από την βάση δεδομένων βιοπληροφορικής του αλγόριθμου ExPASy. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η προβλεπόμενη μοριακή μάζα της επιλεχθείσας αλληλουχίας ήταν 40,96 KDa έχοντας προϋπολογίσει και την ετικέτα των έξι κατάλοιπων ιστιδίνης που απαιτούνται για την απομόνωσή της και με ισοηλεκτρικό σημείο 6,02 (Εικ. 4.1.2). Σύμφωνα με το πρότυπο ζωνών του πηκτώματος ηλεκτροφόρησης (Εικ. 4.1.1), η θέση αυτή αντιστοιχεί ανάμεσα στην τρίτη και τέταρτη ζώνη του μίγματος πρωτεϊνών αναφοράς. Πράγματι, οι πυκνές ζώνες στην αντίστοιχη θέση στις στήλες (γ)-(ζ) επιβεβαιώνουν την έκφραση του επιθυμητού πρωτεϊνικού μορίου. Οι στήλες (γ)- (ζ) όπως εμφανίζονται στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου και με βάση τα αποτελέσματα της πυκνομέτρησης εμφανίζουν σταδιακή μείωση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης καθώς αντιστοιχούν σε διαδοχικές εκπλύσεις της ίδιας στήλης μικροσφαιριδίων, όπως αυτή απεικονίζεται στη στήλη (β) του πηκτώματος.



Εικόνα 4.1.2: Η αμινοξική αλληλουχία του *LdeEF-2* (1-357 α.α) με την προσθήκη 6 ιστιδινών στο καρβόξυτελικό άκρο του μορίου, στο υπολογιστικό εργαλείο του ExPASy

Με βάση την πυκνομέτρηση, μέσω του λογισμικού ImageJ, των ζωνών που αντιστοιχούν στην εκφρασμένη πρωτεΐνη, έχοντας ως πρότυπο το μίγμα πρωτεϊνών αναφοράς, προσδιορίζεται η συγκέντρωσή της σε κάθε κλάσμα. Αυτή κυμαίνεται μεταξύ 0,5–5 mg/ml, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 4.1

Πίνακας 4.1: Συγκεντρώσεις του LdeEF-2 για κάθε ένα από τις εκλούσεις κατά την εκτέλεση της χρωματογραφίας συγγένειας, όπως προκύπτουν από πυκνομετρική ανάλυση. Κάθε έκλυση αντιστοιχεί σε ορισμένη στήλη του πηκτώματος ακρυλαμιδίου 12% στην εικόνα 4.1.

Εκλούσεις/στήλη πηκτώματος	1-γ στήλη	2-δ στήλη	3-ε στήλη	4-ζ στήλη	5-στ στήλη
Συγκέντρωση LdeEF-2 ανά έκλυση	5 mg/ml	2 mg/ml	1 mg/ml	0,5 mg/ml	0,5 mg/ml

Επομένως από κάθε πείραμα έκφρασης απομονώνονται συνολικά 1,275 mg πρωτεΐνης. Το πείραμα επαναλαμβάνεται 10 φορές εξασφαλίζοντας τη λήψη 12,75 mg πρωτεΐνης η οποία και χρησιμοποιείται για τα πειράματα που ακολουθούν.

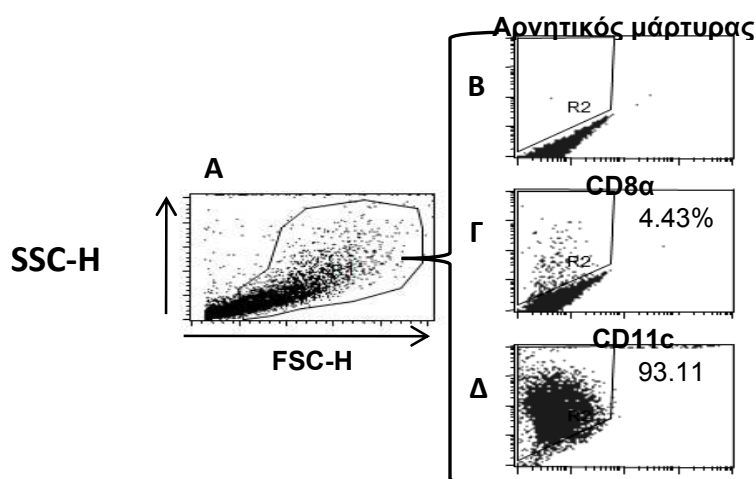
Παράλληλος προσδιορισμός της ύπαρξης ενδοτοξινών στα πρωτεϊνικά κλάσματα με εφαρμογή της φωτομετρικής μεθόδου LAL (παράγραφος 3.2.5, Υλικά και Μέθοδοι) δείχνει ότι οι προσμίξεις ενδοτοξινών κυμαίνονται σε ανεκτά επίπεδα (<10 µg/ml πρωτεΐνης).

4.2 Ταυτοποίηση των μυελοειδών δενδριτικών κυττάρων (BM-DCs)

Όπως είναι γνωστό τα δενδριτικά κύτταρα είναι τα «επαγγελματικά» αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, τα οποία είναι ικανά να προσλαμβάνουν μικροοργανισμούς ή αντιγόνα τους και μετά από κατάλληλη επεξεργασία, να τα παρουσιάζουν στην επιφάνειά τους σε συνδυασμό με τα MHC μόρια τάξης I ή II, προκειμένου να ενεργοποιήσουν στη συνέχεια ειδικές ανοσοαποκρίσεις.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιούνται προγονικά κύτταρα του μυελού των οστών BALB/c ποντικών και υπό την επίδραση rm-GM-CSF (recombinant mouse GM-CSF) διαφοροποιούνται *in vitro* σε δενδριτικά κύτταρα. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η επώαση αυτή δίνει γένεση σε δενδριτικά κύτταρα της μυελογενούς σειράς, τα οποία εκφράζουν στην επιφάνειά τους το επιφανειακό μόριο CD11c, ενώ δεν εκφράζουν το επιφανειακό μόριο CD8α. Προκειμένου να διαπιστωθεί αν τα χαρακτηριστικά του πληθυσμού των δενδριτικών κυττάρων που παρασκευάζονται

συμφωνούν με τα βιβλιογραφικά δεδομένα γίνεται έλεγχος του πληθυσμού για την έκφραση των μορίων CD11c και CD8α. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι, κατά μέσο όρο, ένα ποσοστό 93,11% των κυττάρων που λαμβάνονται μετά τις 9 ημέρες καλλιέργειας υπό την επίδραση του rm-GM-CSF είναι CD11c+, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό για τον δείκτη CD8α είναι 4,43%. Συνεπώς, σύμφωνα με τα αποτελέσματα διαπιστώνεται η ομοιογένεια του χρησιμοποιούμενου κυτταρικού πληθυσμού.



Εικόνα 4.2: Στικτογράμματα στα οποία γίνεται η ταυτοποίηση των μυελοειδών δενδριτικών κυττάρων BALB/c ποντικών με τη χρήση anti-CD8α και anti-CD11c μονοκλωνικών αντισωμάτων σημασμένων με R-PE. Η εικόνα είναι αντιπροσωπευτική τριών διαφορετικών πειραματισμών.

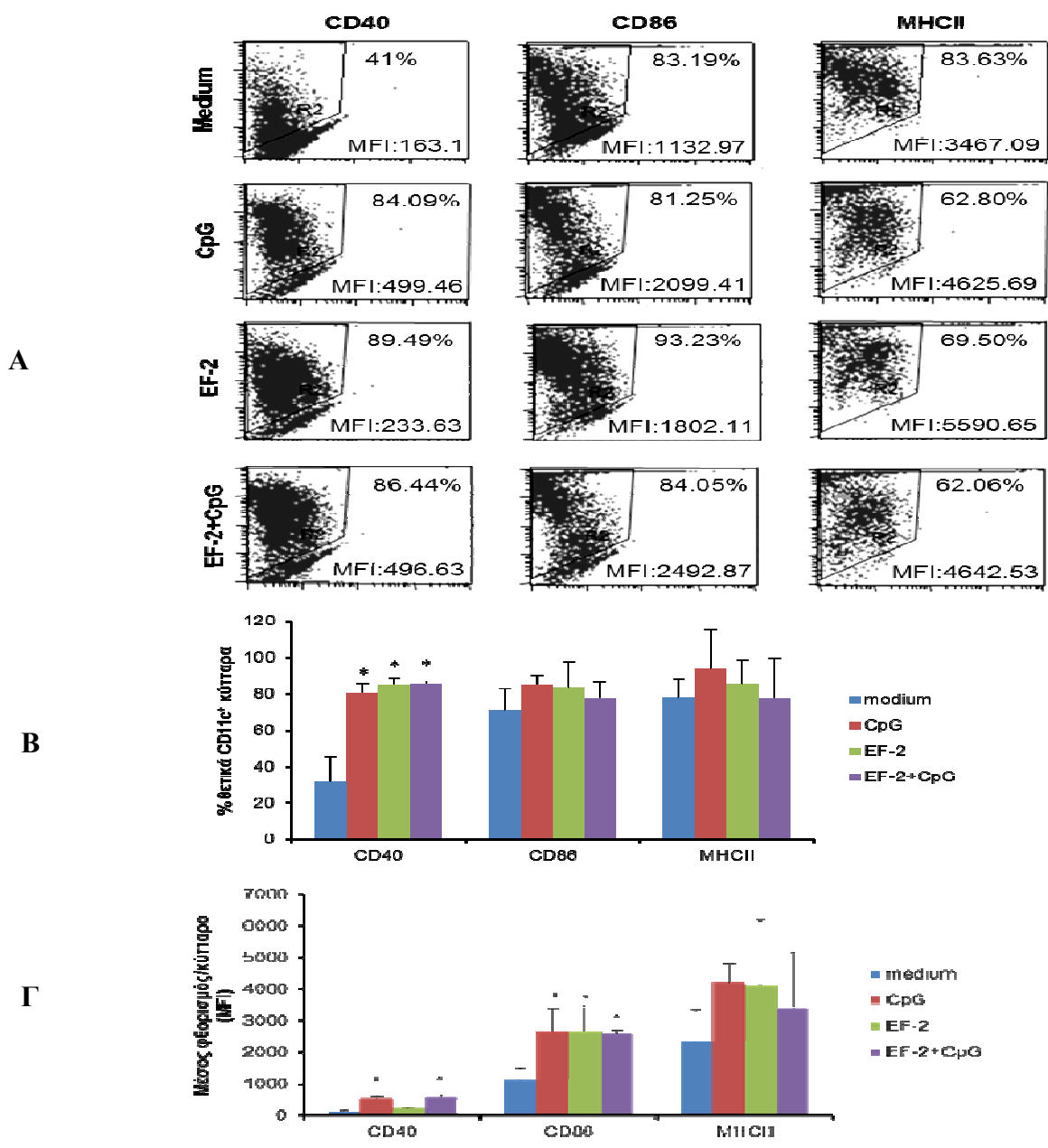
Στην Εικ.4.2 γίνεται απεικόνιση των αποτελεσμάτων με μία μορφή, η οποία στην κυτταρομετρία ροής αποκαλείται ανάλυση κουκίδων-στικτόγραμμα (dot plot). Η ανάλυση γίνεται ως εξής: Αρχικά αναλύεται το δείγμα των κυττάρων με βάση του παράγοντες του πρόσθιου και του πλάγιου σκεδασμού (FSC και SSC) (Στικτόγραμμα 4.2 A). Από αυτόν τον πληθυσμό γίνεται η επιλογή των κυττάρων, των οποίων τα χαρακτηριστικά (μέγεθος και κοκκίωση) θεωρείται ότι αντιπροσωπεύουν τα δενδριτικά κύτταρα. Έτσι, αποκλείονται από την ανάλυση τα μικρά και νεκρά κύτταρα. Στο στικτόγραμμα 4.2 B απεικονίζεται η ανάλυση του ίδιου δείγματος για δύο παραμέτρους φθορισμού (FL1 και FL2), όταν δεν έχει γίνει σήμανση των κυττάρων έναντι κάποιου μορίου. Απεικονίζεται, δηλαδή ο αυτοφθορισμός των κυττάρων. Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω και με τη χρήση του λογισμικού του κυτταρομετρητή ροής (παράγραφος 3.6, Υλικά και Μέθοδοι) ορίζεται η περιοχή που

θεωρείται θετική (R2). Στο στικτόγραμμα 4.2 Γ εμφανίζεται ο πληθυσμός των κυττάρων που είναι θετικά για τον επιφανειακό δείκτη CD8α, ενώ στο στικτόγραμμα 4.2 Δ εμφανίζεται ο πληθυσμός των κυττάρων που είναι θετικά για τον επιφανειακό δείκτη CD11c και που είναι δενδριτικά κύτταρα.

4.3 Αξιολόγηση της δράσης του LdeEF-2 στην ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων

Ο έλεγχος ωρίμανσης των δενδριτικών κυττάρων αξιολογείται με βάση την έκφραση των μορίων MHC II και των συνδιεγερτικών μορίων CD40, CD86 τα οποία συμβάλλουν στη δημιουργία και στη σταθεροποίηση της ανοσολογικής σύναψης μεταξύ των δενδριτικών και των T κυττάρων. Για το σκοπό αυτό, τα δενδριτικά κύτταρα, την όγδοη ημέρα καλλιέργειας τους και για 24 ώρες εκτίθενται στο πρωτεϊνικό προϊόν LdeEF-2 (10 µg/ml) αποκλειστικά αλλά και με ταυτόχρονη παρουσία CpG (20 µg/ml). Ως αρνητικός μάρτυρας στην όλη διαδικασία χρησιμοποιείται πληθυσμός δενδριτικών κύτταρων ο οποίος καλλιεργείται αποκλειστικά σε πλήρες θρεπτικό μέσο. Την ένατη μέρα, τα κύτταρά συλλέγονται, κατεργάζονται, επισημαίνονται με τα κατάλληλα αντισώματα (παράγραφος 3.6, Υλικά και Μέθοδοι) και κατόπιν αναλύονται με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής.

Τα αποτελέσματα ως προς τους επιφανειακούς δείκτες MHC II, CD40 και CD86 εκφράζονται ως επί τοις εκατό ποσοστό (%) θετικών κυττάρων αλλά και ως μέσος φθορισμός ανά κύτταρο, μέσω του δείκτη μέσου φθορισμού (Mean Fluorescence Index, MFI), που αντιστοιχεί στη μέση έκφραση καθενός εκ των ανωτέρω μορίων ανά κύτταρο. Τα αποτελέσματα των % θετικών κυττάρων ως προς τους επιφανειακούς δείκτες, προκύπτουν από τους μέσους όρους ανεξάρτητων πειραμάτων. Πιο συγκεκριμένα έλεγχος ως προς τους προαναφερθέντες δείκτες, για τα δενδριτικά κύτταρα κατόπιν διέγερσης σε διαφορετικές συνθήκες, πραγματοποιείται σε 3 ανεξάρτητα πειράματα. Στην Εικ.4.3 παρουσιάζονται τα στικτογράμματα που αφορούν στους επιφανειακούς δείκτες CD40, CD86 και MHC II για κάθε μία από τις επιδράσεις καθώς και τα αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας των εξαγόμενων αποτελεσμάτων που αφορούν στο % ποσοστό των θετικών κυττάρων (B) και του μέσου φθορισμού ανά κύτταρο (Γ).



Εικόνα 4.3: Στικτογράμματα για τον έλεγχο της ωρίμανσης των μυελοειδών δενδριτικών κυττάρων BALB/c ποντικών υπό την επίδραση θρεπτικού υλικού, CpG, ανασυνδυασμένου EF-2 (*LdeEF-2*) ή συνδυασμού τους με κυτταρομετρία ροής με τη χρήση anti-CD40, anti-CD86 και anti-MHC II μονοκλωνικών αντισωμάτων σημασμένων με R-PE. (Α) Η εικόνα είναι αντιπροσωπευτική τριών διαφορετικών πειραματισμών. Τα αποτελέσματα εκφράζονται (Β) ως % ποσοστό θετικών κυττάρων επί του συνόλου των CD11c⁺ κυττάρων και (Γ) ως μέσος φθορισμός ανά κύτταρο. Τα αποτελέσματα αποτελούν M.O. τριών διαφορετικών πειραματισμών.

*: στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διεγερμένων δενδριτικών κυττάρων και των δενδριτικών κυττάρων σε ηρεμία, $P < 0,05$.

Σύμφωνα με αποτελέσματα και όπως φαίνεται στην Εικ. 4.3 Β το $31,51 \pm 13,86\%$ των δενδριτικών κυττάρων (CD11c+) που αναπτύσσονται χωρίς καμία επίδραση (θρεπτικό μέσο αποκλειστικά, medium) εκφράζουν το δείκτη CD40. Επίδραση με CpG οδηγεί σε στατιστικά σημαντική αύξηση του ποσοστού των δενδριτικών κυττάρων που εκφράζουν το CD40 ($P < 0,05$) σε ποσοστό $80,57 \pm 4,98$ σε σχέση με το θρεπτικό μέσο αποκλειστικά. Επίδραση με LdeEF-2 οδηγεί σε σημαντική αύξηση του ποσοστού των θετικών κυττάρων για το CD40 με ποσοστό $85,03 \pm 3,87\%$, ενώ ανάλογη είναι και η αύξηση στην περίπτωση της ταυτόχρονης επίδρασης με CpG με ποσοστό $85,50 \pm 1,33\%$. Σε σχέση με τον επιφανειακό δείκτη CD86, η έκφρασή του αφορά στο $70,66 \pm 12,44\%$ των δενδριτικών κυττάρων στο θρεπτικό μέσο αποκλειστικά. Ο ίδιος δείκτης εκφράζεται σε μεγαλύτερο ποσοστό των κυττάρων στις επιδράσεις με CpG, LdeEF-2 και στην περίπτωση ταυτόχρονης επίδρασης με τους δύο διεγέρτες σε ποσοστά $85,02 \pm 5,32\%$, $83,45 \pm 14,39\%$ και $77,88 \pm 8,73\%$ αντίστοιχα, ωστόσο η αύξηση αυτή δεν εμφανίζεται στατιστικά σημαντική. Σε σχέση με την έκφραση MHC II, το ποσοστό των κυττάρων που εμφανίζονται θετικά χωρίς κάποια επίδραση με διεγέρτες, είναι $78,01 \pm 10,38\%$. Το ποσοστό των θετικών κυττάρων για τον ίδιο δείκτη κατόπιν επίδρασης με CpG ανέρχεται στο $93,46 \pm 21,68$ ενώ στις επιδράσεις με LdeEF-2 και LdeEF-2 ταυτόχρονα με CpG τα αντίστοιχα ποσοστά είναι $85,32 \pm 13,75\%$ και $77,78 \pm 22,23\%$, όμως και σε αυτές τις περιπτώσεις η αύξηση δεν εμφανίζεται στατιστικά σημαντική. Επομένως συμπεραίνεται ότι τα % θετικά κύτταρα για τον επιφανειακό δείκτη CD40, έπειτα από επίδραση με CpG, LdeEF-2 και LdeEF-2 παρουσία CpG σε σχέση με την απουσία διέγερσης, εμφανίζουν παραπάνω από διπλάσια αύξηση. Μικρότερη αύξηση των % θετικών κυττάρων παρατηρείται για το δείκτη CD86 και MHC II σε κάθε μία από τις διεγέρσεις.

Τα αποτελέσματα που αφορούν στη μέση έκφραση των μορίων CD40, CD86 και MHC II ανά κύτταρο αποδίδονται γραφικά στην Εικ.4.3 Γ. Σε αυτήν την περίπτωση, ο μέσος φθορισμός του επιφανειακού δείκτη CD40 για τα δενδριτικά κύτταρα στο θρεπτικό μέσο αποκλειστικά εμφανίζει τιμή $127,48 \pm 50,37$, ενώ ο διεγέρτης CpG οδηγεί σε στατιστικά σημαντική αύξηση του μέσου φθορισμού ανά κύτταρο για τον ίδιο δείκτη ($P < 0,05$), με τιμή $547,51 \pm 67,95$. Σημαντική είναι η αύξηση του μέσου φθορισμού ανά κύτταρο και στις επιδράσεις με LdeEF-2 και LdeEF-2 και CpG, με τιμές $239,38 \pm 8,13$ και $558,68 \pm 87,74$ αντίστοιχα. Σε σχέση με

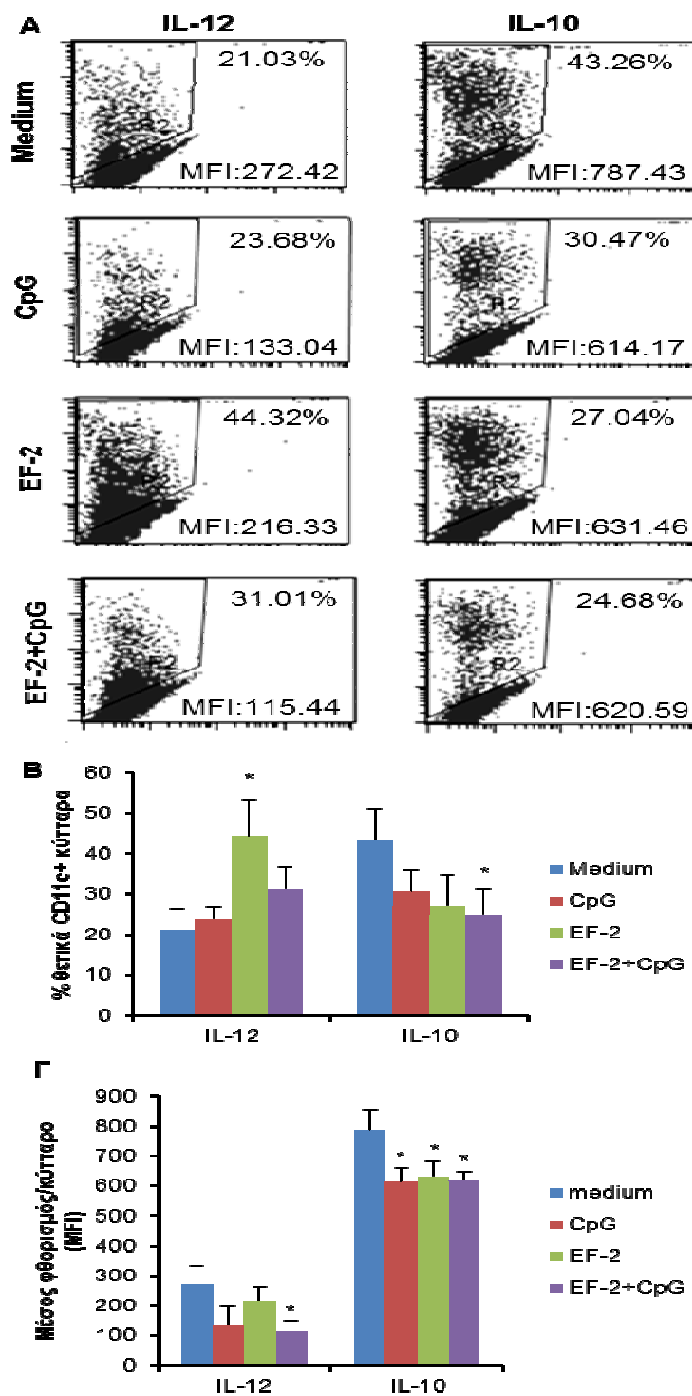
το δείκτη CD86 ο μέσος φθορισμός ανά κύτταρο για τα δενδριτικά κύτταρα που αναπτύσσονται αποκλειστικά στο θρεπτικό μέσο ανέρχεται σε $1.130,40 \pm 339,77$, ενώ παρατηρείται στατιστικά σημαντικός διπλασιασμός του στις επιδράσεις με CpG, *LdeEF-2* και *LdeEF-2* και CpG με αντίστοιχες τιμές $2.629,73 \pm 749,99$, $2.651,02 \pm 816,38$, $2.586,47 \pm 132,37$. Ο μέσος φθορισμός ανά κύτταρο για το επιφανειακό μόριο MHC II στα δενδριτικά κύτταρα σε θρεπτικό μέσο αποκλειστικά ανέρχεται σε τιμή $2.343,34 \pm 1.002,63$. Ο ίδιος δείκτης για τις επιδράσεις με CpG, *LdeEF-2* και *LdeEF-2* και CpG εμφανίζει αύξηση στο μέσο φθορισμό ανά κύτταρο με τιμές $4.203,27 \pm 597,40$, $4.140,35 \pm 2.051,04$ και $3.397,42 \pm 1.760,85$ αντίστοιχα, η οποία όμως δεν είναι στατιστικά σημαντική. Συμπερασματικά προκύπτει ότι, ο μέσος φθορισμός ανά κύτταρο για το δείκτη CD40 σε κάθε μία από τις διεγέρσεις σε σχέση με την απουσία διέγερσης, αυξάνεται σημαντικά, με την επίδραση του CpG να οδηγεί σε σχεδόν τετραπλάσια αύξηση της μέσης έκφρασης του μορίου ανά κύτταρο ενώ αποκλειστική επίδραση με τον *LdeEF-2* οδηγεί στο διπλασιασμό της. Τετραπλάσιασμός της μέσης έκφρασης ανά κύτταρο του CD40 εμφανίζεται και στην ταυτόχρονη επίδραση *LdeEF-2* και CpG υποδηλώνοντας την επίδραση του CpG αυτού καθαυτού στο αποτέλεσμα. Σε σχέση με τον επιφανειακό δείκτη CD86 σε όλες τις διεγέρσεις εμφανίζεται στατιστικά σημαντικός διπλασιασμός της μέσης έκφρασης του μορίου ανά κύτταρο σε σχέση με την απουσία διέγερσης χωρίς αύξηση του ποσοστού των κυττάρων που το εκφράζουν, ενώ η αύξηση της μέσης έκφρασης και του % θετικών κυττάρων του μορίου MHC II στις διεγέρσεις δεν φαίνεται σημαντική.

4.4 Αξιολόγηση της δράσης του *LdeEF-2* στη λειτουργική διαφοροποίηση των δενδριτικών κυττάρων

Ο ρόλος των δενδριτικών κυττάρων επεκτείνεται με την ικανότητά τους να καθορίζουν τη φύση και την έκταση ειδικών ανοσοαποκρίσεων που μεσολαβούνται από τα T βοηθητικά λεμφοκύτταρα (T-helpers, T_H). Τα δενδριτικά κύτταρα καθορίζουν το είδος της T-απόκρισης μέσω του προτύπου των εκκρινόμενων κυτταροκινών. Η παραγωγή της ιντερλευκίνης 12 (interleukin 12, IL-12) από τα δενδριτικά κύτταρα επάγει T_{H1} τύπου ανοσοαποκρίσεις, οι οποίες συνδέονται με κυτταρομεσολαβητικές ανοσολογικές αποκρίσεις, ενώ η παραγωγή της ιντερλευκίνης 10 (interleukin 10, IL-10) επάγει την παραγωγή T ρυθμιστικών κυττάρων με ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες. Κατά συνέπεια, ο έλεγχος των εκκρινόμενων

κυτταροκινών από τα ώριμα δενδριτικά κύτταρα, οδηγεί στον προσδιορισμό της λειτουργικότητάς τους ως προς τη ρύθμιση ειδικών ανοσολογικών αποκρίσεων.

Ο λειτουργικός χαρακτηρισμός των δενδριτικών κυττάρων, πραγματοποιείται βάσει του προτύπου των εκκρινόμενων κυτταροκινών IL-12 και IL-10 σε κάθε μία από τις επιδράσεις με τους παράγοντες CpG (20 μg/ml), *LdeEF-2* (10 μg/ml) και *LdeEF-2* (10 μg/ml) ταυτόχρονα με CpG (20 μg/ml). Για το σκοπό αυτό, τα δενδριτικά κατεργάζονται με τον αναστολέα έκκρισης κυτταροκινών μπρεφελδίνη A και αναλύονται με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής (παράγραφος 3.6, Υλικά και Μέθοδοι). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως επί τοις εκατό ποσοστό θετικών κυττάρων αλλά και ως μέσος φθορισμός ανά κύτταρο, μέσω του δείκτη μέσου φθορισμού, σε δύο πειράματα. Στην Εικ.4.4. εμφανίζονται τα στικτογράμματα που αφορούν στις εκκρινόμενες κυτταροκίνες IL-12 και IL-10 (A) καθώς επίσης και τα αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας των αποτελεσμάτων που εκφράζονται τόσο ως % θετικά κύτταρα (B) όσο και ως μέσος φθορισμός ανά κύτταρο (Γ).

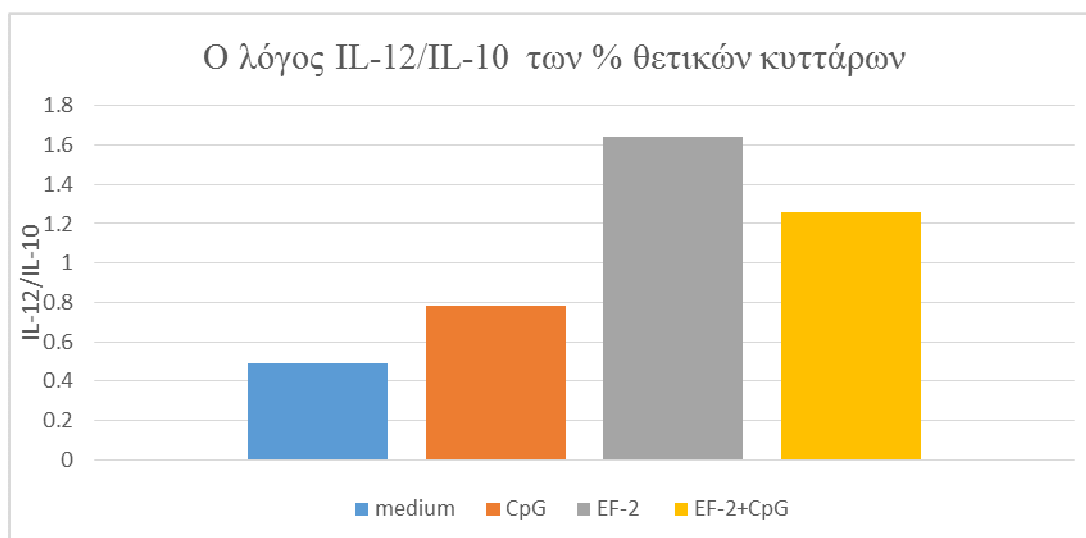


Εικόνα 4.4: Έλεγχος παραγωγής των κυτταροκινών IL-12 και IL-10 από τα μυελοειδή δενδριτικά κύτταρα BALB/c ποντικών υπό την επίδραση θρεπτικού υλικού, CpG, ανασυνδυασμένου EF-2 ή συνδυασμού τους με κυτταρομετρία ροής με τη χρήση anti-IL-12 και anti-IL-10 μονοκλωνικών αντισωμάτων σημασμένων με R-PE. (A) Η εικόνα είναι αντιπροσωπευτική τριών διαφορετικών πειραματισμών. Τα αποτελέσματα εκφράζονται (B) ως % ποσοστό θετικών κυττάρων επί του συνόλου των CD11c⁺ κυττάρων και (C) ως μέσος φθορισμός ανά κύτταρο. Τα αποτελέσματα αποτελούν M.O. τριών διαφορετικών πειραματισμών.

*: στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διεγερμένων δενδριτικών κυττάρων και των δενδριτικών κυττάρων σε ηρεμία, $P < 0,05$.

Σύμφωνα με την Εικ.4.4, η αυθόρμητη παραγωγή της IL-12 από δενδριτικά κύτταρα στο θρεπτικό μέσο απουσία διέγερσης (medium), προέρχεται από το $21,03 \pm 5,2\%$ των $CD11c^+$ κυττάρων. Επίδραση με CpG, οδηγεί σε παρόμοια επίπεδα έκφρασης της IL-12 από το $23,68 \pm 3,1\%$ των δενδριτικών κυττάρων. Ωστόσο, το % ποσοστό των θετικών κυττάρων διπλασιάζεται σε σχέση με τις προαναφερθείσες επιδράσεις, στην περίπτωση έκθεσης των κυττάρων στον LdeEF-2 ($44,32 \pm 8,9\%$). Ταυτόχρονη έκθεση των δενδριτικών σε LdeEF-2 και CpG, οδηγεί στη εμφάνιση ποσοστού της τάξης των $31,01 \pm 5,8\%$, το οποίο ήταν υψηλότερο σε σχέση με τις περιπτώσεις του αρνητικού μάρτυρα ελέγχου και της διέγερσης με CpG, αλλά χαμηλότερο σε σχέση με την αποκλειστική έκθεση σε LdeEF-2.

Στην ίδια εικόνα, η παραγωγή της IL-10 από τα δενδριτικά κύτταρα, απουσία διέγερσης, παρατηρείται στο $43,26 \pm 7,8\%$ των κυττάρων. Στην περίπτωση έκθεσης στο CpG, το ποσοστό των κυττάρων που εκφράζει την IL-10 αντιστοιχεί στο $30,47 \pm 5,4\%$. Παρουσία του LdeEF-2, το ποσοστό των θετικών κυττάρων είναι σημαντικά μειωμένο ($27,04 \pm 7,5\%$), σε σχέση τόσο με την απουσία διέγερσης όσο και σε σχέση με την έκθεση σε CpG. Αντίστοιχα χαμηλό είναι και το ποσοστό των κυττάρων που εκφράζουν IL-10, επιδρώντας ταυτόχρονα με LdeEF-2 και CpG, με τιμή $24,68 \pm 6,5\%$.



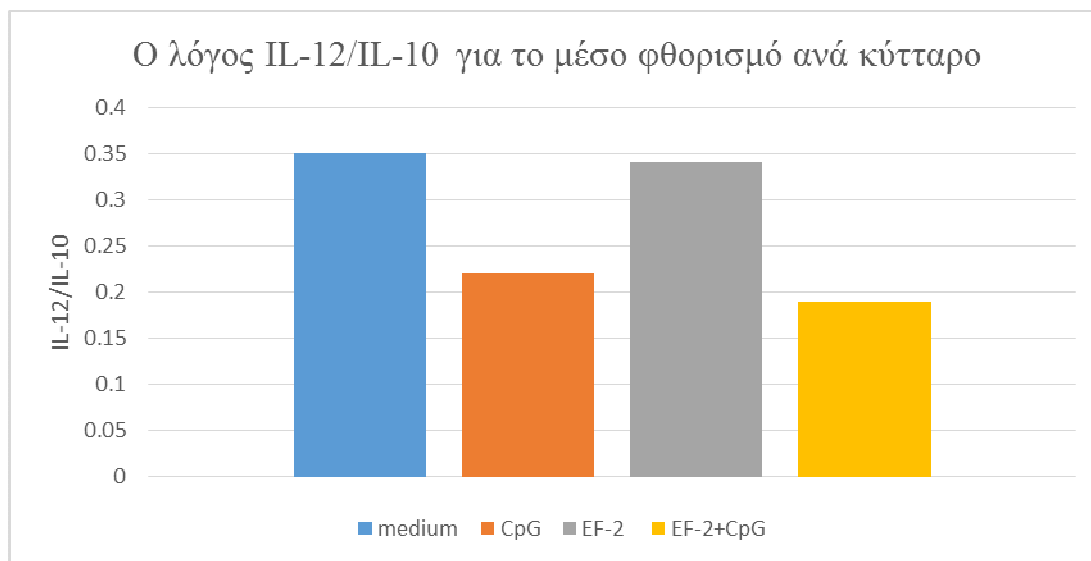
Εικόνα 4.4 Ε: Γραφική απεικόνιση της αναλογίας IL-12/IL-10 σε σχέση με το % θετικών κυττάρων για κάθε μία από τις διεγέρσεις.

Βάσει της Εικ.4.4 Β και όσων αναφέρθηκαν στις δύο προηγούμενες παραγράφους, είναι δυνατή η σύγκριση της αναλογίας IL-12/IL-10 στις διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας των δενδριτικών. Στην περίπτωση καλλιέργειας των κυττάρων απουσία διέγερσης, η αναλογία IL-12/IL-10 αντιστοιχεί σε τιμή 0,49, με την IL-10 να εκφράζεται από μεγαλύτερο ποσοστό των κυττάρων. Κατά τη διέγερση των δενδριτικών με CpG, η αναλογία λαμβάνει τιμή 0,78 λόγω του μειωμένου αριθμού των δενδριτικών κυττάρων που εκφράζουν IL-10 σε σχέση με την περίπτωση των αδιέγερτων δενδριτικών κυττάρων. Αντίθετα, η έκθεση των κυττάρων στο αντιγόνο *LdeEF-2* οδηγεί σε αναστροφή του λόγου IL-12/IL-10 με τιμή 1,64. Παρόμοιο πρότυπο παρατηρείται κατά την ταυτόχρονη διέγερση των κυττάρων με *LdeEF-2* και CpG, καθώς ο λόγος IL-12/IL-10 ισούται με 1,26. Ωστόσο, το ποσοστό των κυττάρων που εκφράζουν την IL-12 είναι χαμηλότερο. Οι ανωτέρω αναλογίες αναπαρίστανται γραφικά στην Εικ. 4.4 Ε, όπου φαίνεται ότι ο υψηλότερος λόγος IL-12/IL-10 στο % θετικών κυττάρων εμφανίζεται στην περίπτωση της διέγερσης με *LdeEF-2*.

Παρατηρώντας την Εικ.4.4 Γ, ο μέσος φθορισμός ανά κύτταρο (MFI) για την IL-12 απουσία διέγερσης (medium) λαμβάνει τιμή $272,42 \pm 58,9$. Κατά την έκθεση στο CpG, ο MFI εμφανίζει χαμηλότερη τιμή της τάξης του $133,04 \pm 64,3$. Η διέγερση με τον *LdeEF-2* αυξάνει τον MFI στην τιμή $216,33 \pm 47,8$, που είναι υψηλότερη σε σχέση με την περίπτωση του CpG, αλλά χαμηλότερη σε σχέση με την περίπτωση του medium. Ταυτόχρονη έκθεση σε *LdeEF-2* και CpG οδηγεί σε τιμή MFI $115,44 \pm 36,1$ που είναι χαμηλότερη σε σχέση τόσο με την περίπτωση medium, όσο και με τις περιπτώσεις *LdeEF-2* και CpG αποκλειστικά.

Στην ίδια εικόνα, ο MFI για την IL-10 απουσία διέγερσης είναι $787,43 \pm 63,1$, ενώ οι αντίστοιχες τιμές για τις περιπτώσεις διέγερσης με CpG, *LdeEF-2* και *LdeEF-2* παρουσία CpG είναι $614,17 \pm 45,2$, $631,46 \pm 52,4$ και $620,59 \pm 26,8$. Παρατηρείται ότι, σε κάθε μία από τις προαναφερθείσες περιπτώσεις, ο μέσος φθορισμός ανά κύτταρο για την IL-10 είναι χαμηλότερος σε σχέση με αυτόν στα αδιέγερτα δενδριτικά ωστόσο σε κάθε περίπτωση παρατηρείται αυξημένη έκφραση της IL-10 σε σχέση με την IL-12. Ειδικότερα, διέγερση με CpG, οδηγεί σε MFI 614, 17 για την IL-10 έναντι 133,04 για την IL-12. Αντίστοιχα, οι τιμές MFI για την IL-10 έναντι αυτών για την

IL-12 σε κάθε μία από τις διεγέρσεις είναι: *LdeEF-2*: 631,46 έναντι 216,33 και *LdeEF-2* παρουσία CpG: 620,59 έναντι 115,44.



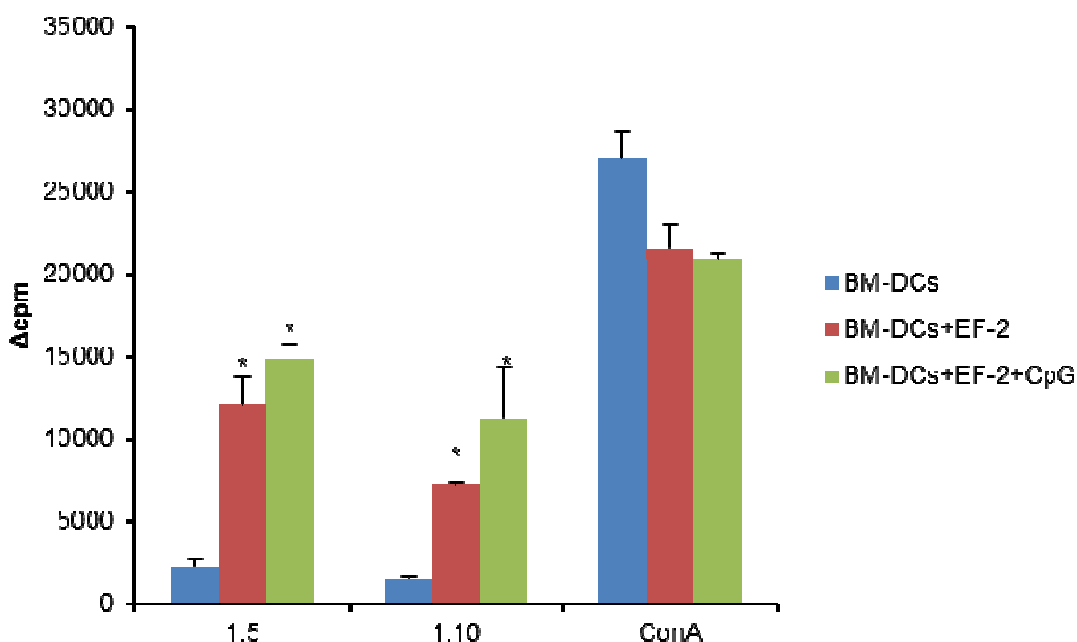
Εικόνα 4.4 ΣΤ:Γραφική απεικόνιση της αναλογίας IL-12/IL-10 σε σχέση με τη μέση έκφραση των εκκρινόμενων κυτταροκινών ανά κύτταρο για κάθε μία από τις διεγέρσεις.

Οι τιμές της αναλογίας IL-12/IL-10 για το μέσο φθορισμό ανά κύτταρο, σε κάθε μία από τις περιπτώσεις θρεπτικό μέσο αποκλειστικά (medium), CpG, *LdeEF-2* και *LdeEF-2* παρουσία CpG είναι 0,35, 0,22, 0,34 και 0,19, αντίστοιχα γεγονός το οποίο επισημαίνει την επικράτηση της έκφρασης της IL-10 από τα δενδριτικά κύτταρα, στην περίπτωση διέγερσης με *LdeEF-2* όπως άλλωστε συμβαίνει και στην περίπτωση της απουσίας διέγερσης. Κατά συνέπεια μπορεί να υποστηριχθεί ότι το μόριο *LdeEF-2* είναι μεν αντιγονικό, αλλά προς την κατεύθυνση της επαγωγής ρυθμιστικών ανοσοαποκρίσεων. Η αυξημένη μέση έκφραση της IL-12 στις διεγέρσεις με CpG και *LdeEF-2* παρουσία CpG, αποδίδεται στην επίδραση του ανοσοενισχυτικού CpG και όχι σε αυτή του *LdeEF-2*. Στην Εικ.4.4 ΣΤ αναπαρίσταται γραφικά ο λόγος IL-12/IL-10 σε σχέση με τη μέση έκφραση των εκκρινόμενων κυτταροκινών ανά κύτταρο.

4.5 Μελέτη της αντιγονικότητας του *LdeEF-2* με τη δοκιμασία *in vitro* αντιγονοπαρουσίασης-Ag-presentation Assay

Τα δενδριτικά κύτταρα, κατόπιν πρόσληψης και επεξεργασίας του αντιγόνου, μετακινούνται προς τους γειτονικούς λεμφαδένες όπου έρχονται σε επαφή με τα Τ-λεμφοκύτταρα στα οποία παρουσιάζουν τα αντιγόνα. Προκειμένου να αξιολογηθεί η

λειτουργικότητα των δενδριτικών κυττάρων, συγκαλλιεργούνται μυελογενούς προέλευσης δενδριτικά κύτταρα με ομόλογο λεμφοκυτταρικό πληθυσμό, προερχόμενο από σπλήνες ανοσοποιημένων BALB/c ποντικών με δενδριτικά που είχαν ενεργοποιηθεί παρουσία *LdeEF-2* (BM-DCs+*LdeEF-2*+CpG)_{n=3} με ή χωρίς CpG (BM-DCs+*LdeEF-2*)_{n=3}. Με τις παραπάνω ανοσοποιήσεις εξασφαλίζεται η παραγωγή ενεργοποιημένων T-κυτταρικών πληθυσμών μνήμης (T-primed), τα οποία καλλιεργούνται με δενδριτικά κύτταρα κατόπιν διέγερσης με *LdeEF-2* και *LdeEF-2* παρουσία CpG (BM-DCs sensitized). Τα αποτελέσματα από τη δοκιμασία παρουσιάζονται στην Εικ.4.5 και αφορούν στη μέση διαφορά των κρούσεων (Δ Cpm) αποδίδοντας τον καθαρό πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων.



Εικόνα 4.5: Γραφική αναπαράσταση των αποτελεσμάτων του λεμφοκυτταρικού πολλαπλασιασμού (Δ Cpm) μικτών καλλιεργειών ευαισθητοποιημένων BM-DCs με ανασυνδυασμένο EF-2 (*LdeEF-2*) παρουσία ή απουσία CpG και παρθένα σπληνοκύτταρα BALB/c ποντικών σε αναλογία 1:5 και 1:10. Η επώαση των σπληνοκυττάρων με κονκαναβαλίνη (ConA) αποτελεί το θετικό μάρτυρα ελέγχου. Η λεμφοβλαστική ικανότητα εκτιμήθηκε με την ενσωμάτωση 3 [H]-TdR 18 ώρες πριν τη λήξη των καλλιεργειών. Τα αποτελέσματα αποτελούν Μ.Ο. τριών διαφορετικών καλλιεργειών.

*: στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διεγερμένων δενδριτικών κυττάρων και των δενδριτικών κυττάρων σε ηρεμία, $P < 0,05$.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα T-κύτταρα που καλλιεργήθηκαν παρουσία αδιέγερτων μυελοειδών δενδριτικών κυττάρων (bone marrow dendritic cells, BM-DC), εμφανίζουν αυθόρμητο πολλαπλασιασμό σε κάθε μία από τις περιπτώσεις των

αναλογιών 5:1, 10:1 και κατόπιν επίδρασης με ConA (ανά ομάδα που διερευνάται), 2.173,33±457,14, 1.551,33±100,54 και 27.076±1.576, 34-21.551,33±1.501,956, 20.896,5±354,26 αντίστοιχα. Η ομάδα των λεμφοκυττάρων που διεγείρονται με ConA, εξυπηρετεί στην επιβεβαίωση της δυνατότητας των λεμφοκυττάρων να πολλαπλασιάζονται. Επισημαίνεται ότι τα δενδριτικά κύτταρα δεν πολλαπλασιάζονται καθώς αποτελούν πλήρως διαφοροποιημένο κυτταρικό πληθυσμό.

Τα λεμφοκύτταρα της ομάδας (BM-DCs+LdeEF-2)_{n=3} παρουσιάζουν ικανότητα πολλαπλασιασμού στις αναλογίες 5:1 και 10:1 με ΔCpm 12.0798±1.689,79 και 7.229,67±210,99, αντίστοιχα με στατιστικά σημαντική αύξηση. Μεταξύ των αναλογιών, η αναλογία 5:1 παρουσιάζει υψηλότερα επίπεδα κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε σχέση με την αναλογία 10:1, ωστόσο και στις δύο περιπτώσεις ο λεμφοκυτταρικός πολλαπλασιασμός είναι αυξημένος κατά 6 και 7 φορές αντίστοιχα σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα. Το ίδιο πρότυπο κυτταρικού πολλαπλασιασμού παρατηρείται μεταξύ των αναλογιών 5:1 και 10:1 για την ομάδα (BM-DCs+LdeEF-2+CpG)_{n=3}, με τιμές 14.767,5±1.018,94 και 11.216,5±3.222,29 αντίστοιχα επίσης σημαντικά αυξημένες κατά 7 και 10 φορές αντίστοιχα σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα. Επισημαίνεται ότι τα δενδριτικά κύτταρα που συγκαλλιεργούνται με τα T-λεμφοκύτταρα των ομάδων (BM-DCs+LdeEF-2)_{n=3} και (BM-DCs+LdeEF-2+CpG)_{n=3}, διεγείρονται δευτερογενώς *in vitro* με τους διεγέρτες LdeEF-2 και LdeEF-2+CpG.

Συμπερασματικά προκύπτει ότι η βέλτιστη αναλογία για την ανάπτυξη λεμφοκυτταρικού πολλαπλασιασμού είναι η 5:1 και στις δύο ομάδες που διερευνώνται. Αυτό που προκύπτει από τα αποτελέσματα είναι ότι στη συγκεκριμένη αναλογία και σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (T-κύτταρα από μη ανοσοποιημένο ποντίκι BALB/c με αδιέγερτα BM-DCs), τα λεμφοκύτταρα της ομάδας (BM-DCs+LdeEF-2+CpG)_{n=3} εμφανίζουν το υψηλότερο δυναμικό πολλαπλασιασμού, καθώς είναι 7 φορές υψηλότερο σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα. Συνεπώς υποστηρίζεται ότι η ταυτόχρονη διέγερση των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων με ένα αντιγονικό μόριο και ένα ανοσοενισχυτικό (στην προκειμένη περίπτωση το CpG) ενισχύει τον πολλαπλασιασμό των κυτταρικών πληθυσμών του επίκτητου κλάδου της ανοσίας.

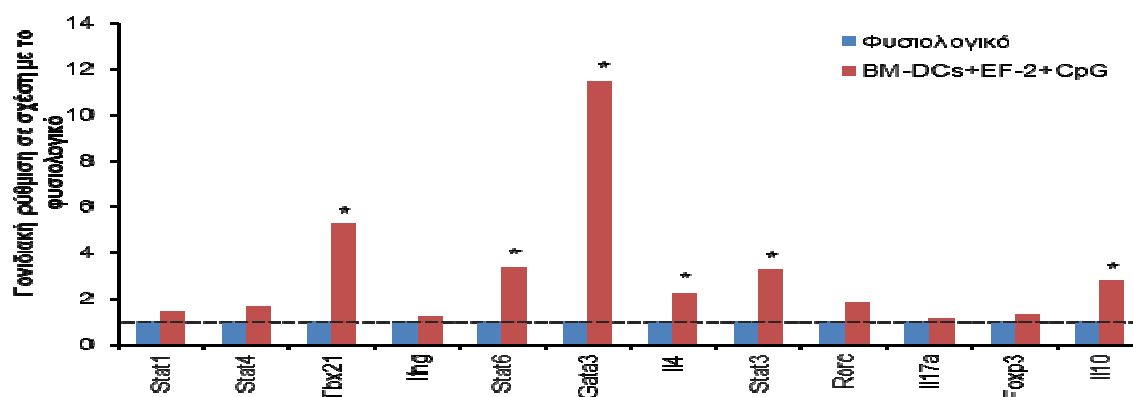
4.6.1 Ποσοτικοποίηση RNA με τη χρήση φασματοφωτομετρίας (Nanodrop)

Προκειμένου να κατασκευαστεί η τράπεζα cDNA, ούτως ώστε να εκτελεσθεί η qRT-PCR, ποσοτικοποιείται το RNA που απομονώνεται από τα δείγματα ιστών σπλήνα των ποντικών της ομάδας (BM-DCs+LdeEF-2+CpG)_{n=3}. Τα αποτελέσματα από τη ζύγιση των ιστοτεμαχίων, της απορρόφησης από τη φασματοφωτομετρία καθώς και η αντίστοιχη συγκέντρωση RNA των δειγμάτων παρατίθενται στον Πίνακα 4.6.

Πίνακας 4.6: Αποτελέσματα βάρους ιστοτεμαχίων, απορρόφησης ($A_{260/280}$) δειγμάτων RNA, καθώς και συγκέντρωση RNA στα δείγματα.

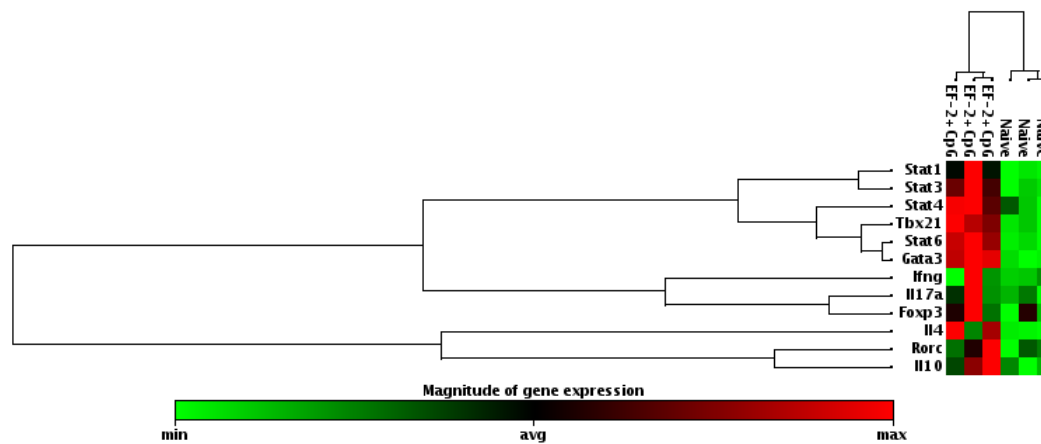
Δείγμα	Βάρος Ιστοτεμαχίων (mg)	Απορρόφηση ($A_{260/280}$)	Συγκέντρωση (ng/ml)
(BM-DCs+LdeEF-2+CpG) ₁	8,3	2,09	354,7
(BM-DCs+LdeEF-2+CpG) ₂	7,6	2,09	422,5
(BM-DCs+LdeEF-2+CpG) ₃	6,2	2,10	467,2

4.6.2 Έκφραση των γονιδίων του λεμφοκυτταρικού πληθυσμού



Εικόνα 4.6.1: Ρύθμιση (fold regulation) των γονιδίων Stat1, Stat4, Tbx21, Ifng, Stat6, Gata3, Il4, Stat3, Rorc, Il17a, Foxp3 και Il10 σε ιστοτεμάχια σπληνός από φυσιολογικά ή BALB/c ποντίκια εμβολιασμένα με ευαισθητοποιημένα BM-DCs με ανασυνδυασμένο EF-2 (LdeEF-2) και CpG.

*: στατιστικά σημαντικές διαφορές της γονιδιακής ρύθμισης μεταξύ των εμβολιασμένων και των φυσιολογικών BALB/c ποντικών, $P < 0,05$.



Εικόνα 4.6.2: Δενδρόγραμμα που απεικονίζει την έκφραση των γονιδίων Stat1, Stat4, Tbx21, Ifng, Stat6, Gata3, Il4, Stat3, Rorc, Il17a, Foxp3 και Il10 σε ιστοτεμάχια σπληνός από φυσιολογικούς ή BALB/c ποντικούς εμβολιασμένους με ευαισθητοποιημένα BM-DCs με ανασυνδυασμένο EF-2 (*LdeEF-2*) και CpG.

Η έκφραση των γονιδίων Stat1, Stat4, Tbx21 και Ifng αφορά στον T_{H1} υποπληθυσμό των CD4⁺ Tα κυττάρων. Η έκφραση των γονιδίων Stat6, Gata3, Il4 και Stat3 αφορά στον T_{H2} υποπληθυσμό ενώ η έκφραση των γονιδίων Rorc και Il17a αφορά στον υποπληθυσμό T_{H17} . Τα γονίδια Foxp3 και Il10 συνδέονται με την ανάπτυξη του πληθυσμού των T ρυθμιστικών κυττάρων.

Με βάση την ανάλυση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από την qRT-PCR, διαπιστώθηκαν τα εξής: Η πρωτεΐνη *LdeEF-2* παρουσία του ανοσοενισχυτικού CpG, προκάλεσε υπερέκφραση του γονιδίου Gata3 κατά 11 φορές σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (control) για το ίδιο γονίδιο, με τάξη στατιστικότητας $P=0,00002$. Επίσης η πρωτεΐνη προκαλεί υπερέκφραση του γονιδίου Stat6 ($P=0,0001$) καθώς και του γονιδίου Il4 κατά 2 φορές ($P=0,04$). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ενεργοποίηση της T_{H2} ανοσοαπόκρισης. Επιπλέον, σημειώθηκε υπερέκφραση του ενδεικτικού γονιδίου της T_{H1} απόκρισης Tbx21(Tbet) κατά 6 φορές ($P=0,0005$), χωρίς όμως να παρατηρηθεί έκφραση της IFN γ . Επιπρόσθετα παρατηρείται υπερέκφραση των γονιδίων Stat3 ($P=0,003$) και Il10 ($P=0,04$) κατά 3 φορές. Η έκφραση του γονιδίου της IL-10 υποδεικνύει την ενεργοποίηση T ρυθμιστικού πληθυσμού. Ο συγκεκριμένος υποπληθυσμός ενεργοποιείται στο πλαίσιο ρύθμισης της ανοσολογικής απόκρισης του ξενιστή.

5. Συζήτηση

5.1 Αξιοποίηση των πρωτεϊνικών κλασμάτων του *LdeEF-2* στον έλεγχο της αντιγονικότητάς του

Τα τελευταία χρόνια έχει καταδειχθεί η ανάγκη προσδιορισμού των αντιγονικών επιτόπων που εμπεριέχονται σε υποψήφιες ως προς τη χρήση τους στην ανάπτυξη εμβολίων πρωτεΐνες, καθόσον συγκεκριμένα τμήματα αυτών μπορούν να επιφέρουν τις επιθυμητές ανοσολογικές αποκρίσεις. Μάλιστα σε μία πρόσφατη μελέτη, εμβολιασμός BALB/c ποντικών με δενδριτικά κύτταρα που είχαν διεγερθεί με το πεπτίδιο (154 -169α.α) της gr63 προήγαγε T_{H1} απόκριση έναντι του παρασίτου *L. major*. Αντίθετα, ο εμβολιασμός με δενδριτικά κύτταρα που είχαν επωαστεί με το πεπτίδιο (467-482 α.α) οδήγησε σε ενεργοποίηση μίας T_{H2} απόκρισης με αποτέλεσμα την επιδείνωση της έκβασης του νοσήματος (Tsagozis, Karagouni, & Dotsika, 2004). Σε αυτή τη βάση, η υπολογιστική ανοσολογία (immunoinformatics) αποκτά ιδιαίτερη αξία, καθώς πλέον χρησιμοποιούνται ποικίλες *in silico* προσεγγίσεις για τον προσδιορισμό πιθανών αντιγονικών επιτόπων που θα χρησιμοποιηθούν στην παρασκευή εμβολίων, καθώς οι πειραματικές μέθοδοι που εφαρμόζονται είναι δύσκολες και χρονοβόρες (Flower, Macdonald, Ramakrishnan, Davies, & Doytchinova, 2010). Επιπλέον, η αλληλούχηση του DNA είναι οικονομικότερη, με αποτέλεσμα πολλά γονιδιώματα παρασίτων να μπορούν να αλληλουχηθούν και τα προβλεπόμενα πρωτεώματά τους να μελετηθούν, προκειμένου να ανευρεθούν υποψήφια αντιγόνα για την ανάπτυξη εμβολίων. Κατά συνέπεια, μέθοδοι που βασίζονται στη δομή, στην αλληλουχία και στην ποικιλομορφία διακριτών μορίων μπορούν να βοηθήσουν στην αναζήτηση νέων αντιγόνων (Patronov & Doytchinova, 2013). Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, με εφαρμογή πρωτεομικής ανάλυσης έχει καταδειχθεί η αντιγονικότητα της πρωτεΐνης παράγοντας επιμήκυνσης 2 καθώς έχει την ικανότητα να ενεργοποιεί T_{H1} τύπου ανοσοαποκρίσεις (S. K. Gupta et al., 2007; Kumari et al., 2008). Με βάση αυτά τα δεδομένα στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε η δυνατότητα το αμινοτελικό τμήμα της πρωτεΐνης παράγοντας επιμήκυνσης 2 (EF-2, *LdeEF-2*) του παρασίτου *L. infantum* να αποτελέσει υποψήφιο μόριο για την ανάπτυξη ενός αποτελεσματικού εμβολίου έναντι της λείσμανίασης. Η

έκφραση του συγκεκριμένου τμήματος έγινε με τη χρήση του μετασηματισμένου βακτηριακού στελέχους *E.coli* BL21(DE3)pLysS, ενός συστήματος που χρησιμοποιείται ευρέως για την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων πρωτεΐνης. Σύμφωνα με τους *Kushawaha και συν.*, οι οποίοι εφάρμοσαν ανάλογη μεθοδολογία, εξασφαλίστηκαν επαρκείς συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης rLelF-2 προκειμένου να εξετασθεί η αντιγονικότητα του ανασυνδυασμένου μορίου (*Kushawaha et al.*, 2011). Σε αυτή τη μελέτη, κλωνοποιήθηκε τμήμα του γονιδίου του EF2-1 με μήκος 1932 bp, ενώ για την έκφραση του πεπτιδίου χρησιμοποιήθηκε πλασμιδιακός φορέας (pET28a) και το βακτήριο *E.coli* (Rosseta strain) (*Kushawaha et al.*, 2011). Ανάλογη προσέγγιση, πραγματοποιήθηκε και από τους *Jaiswal και συν.* για τον ανοσολογικό έλεγχο πρωτεϊνών με δυναμική επαγωγής T_{H1} αποκρίσεων στο πειραματικό μοντέλο των χάμστερ. Σε αυτήν την περίπτωση, παρήχθησαν οι πρωτεΐνες ανασυνδυασμένη πρωτεϊνική ιστόνη 70 της *L. donovani* (recombinant *L. donovani* Histone Protein 70, rLdHSP70), ανασυνδυασμένη φωσφορική ισομεράση της τριόζης της *L. donovani* (recombinant *L. donovani* Triose Phosphate Isomerase, rLdTPI), ανασυνδυασμένη δισουλφιδική πρωτεϊνική ισομεραση της *L. donovani* (recombinant *L. donovani* Protein Disulfide Isomerase, rLdPDI) και ανασυνδυασμένος παράγοντας επιμήκυνσης 2 της *L. donovani* (recombinant *L. donovani* Elongation Factor 2, rLdEL-2) (*Jaiswal et al.*, 2014).

5.2 Αξιοποίηση των μυελογενούς προέλευσης δενδριτικών κυττάρων

Ο έλεγχος της αντιγονικότητας του μορίου LdeEF-2 (EF-2: 1-357 α.α) έγινε σε μυελογενή δενδριτικά κύτταρα που προήλθαν από το αρχέγονα κύτταρα του μυελού των οστών BALB/c ποντικών υπό την επίδραση του παράγοντα GM-CSF σύμφωνα με τη μέθοδο των *Lutz και συν* (*Lutz et al.*, 1999). Ανάλυση με κυτταρομετρία ροής έδειξε ότι ο διαφοροποιημένος πληθυσμός αποτελείται κατά κύριο λόγο (>90%) από δενδριτικά κύτταρα μυελογενούς προέλευσης και επομένως μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τον *in vitro* έλεγχο του πρωτεϊνικού παράγοντα LdeEF-2, ως προς την ικανότητά του να επάγει τη λειτουργική διαφοροποίηση των δενδριτικών κυττάρων.

Τα δενδριτικά κύτταρα επιλέχθηκαν καθώς είναι τα «επαγγελματικά» αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, τα οποία είναι ικανά να προσλαμβάνουν μικροοργανισμούς ή αντιγόνα τους και μετά από κατάλληλη επεξεργασία, να τα

παρουσιάζουν στην επιφάνειά τους σε συνδυασμό με τα MHC μόρια τάξης I ή II, προκειμένου να ενεργοποιήσουν, στη συνέχεια, ειδικές ανοσοαποκρίσεις. Ο ρόλος των δενδριτικών κυττάρων στο ανοσοποιητικό σύστημα μελετάται εκτενώς τα τελευταία έτη, τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές κατάστασεις, ανάμεσα στις οποίες συγκαταλέγεται και η λειψμανίαση. Βιβλιογραφικά δεδομένα, υποστηρίζουν ότι διαφορετικοί υποπληθυσμοί δενδριτικών κυττάρων επάγουν διαφορετικές αποκρίσεις, όταν τα δενδριτικά κύτταρα χρησιμοποιούνται σε εμβολιασμούς, ως οχήματα μεταφοράς αντιγόνων. Μάλιστα, σε πρόσφατες μελέτες έχει γίνει χρήση των μυελογενών δενδριτικών κυττάρων προκειμένου να ελεγχθεί η αντιγονικότητα των πρωτεϊνών KMP-11 και ιστόνης H1 της *L. infantum* (Agallou et al., 2011; Agallou, Smirlis, Soteriadou, & Karagouni, 2012). Στις εν λόγω μελέτες, στόχος ήταν η παρασκευή αποτελεσματικών εμβολίων έναντι της σπλαγγικής *L. infantum*, στα οποία η μεταφορά των προαναφερθέντων πρωτεϊνικών αντιγόνων θα εξασφαλιζόνταν από τα δενδριτικά κύτταρα. Και στις δύο περιπτώσεις, τα μυελογενούς προέλευσης δενδριτικά κύτταρα προέρχονταν από αρχέγονα κύτταρα BALB/c ποντικών, τα οποία καλλιεργήθηκαν παρουσία gmGM-CSF. Μέχρι σήμερα, ποικίλες μελέτες έχουν δείξει ενθαρρυντικά αποτελέσματα σε εμβολιασμένα ποντίκια με δενδριτικά κύτταρα, τα οποία είχαν επωαστεί *ex vivo* με διαλυτό αντιγόνο ή συγκεκριμένα πρωτεϊνικά μόρια του παρασίτου *Leishmania* (Masic et al., 2012; Schwarz et al., 2013). Επιπλέον, αναφέρθηκε ότι διαφορετικοί υποπληθυσμοί δενδριτικών επάγουν διαφορετικές αποκρίσεις κατόπιν εμβολιασμού. Εμβολιασμός BALB/c ποντικών με πλασμακυτταροειδή δενδριτικά που είχαν διεγερθεί με πλήρες αντιγόνο της *L. major*, οδήγησε σε προστασία έναντι επακόλουθης μόλυνσης (Remer, Apetrei, Schwarz, Linden, & Moll, 2007).

5.3 Επίδραση του LdeEF-2 στην ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων

Στην παρούσα μελέτη, επώαση των δενδριτικών κυττάρων με τον LdeEF-2 προκάλεσε την στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασης των συνδιεγερτικών μορίων σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα. Ειδικότερα, παρατηρήθηκε αύξηση του ποσοστού των δενδριτικών κυττάρων που εκφράζουν τα συνδιεγερτικά μόρια CD40 και CD86, όπως επίσης και το μόριο MHC II. Επίσης, διαπιστώθηκε και αύξηση της έκφρασης αυτών των μορίων ανά κύτταρο. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η

ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων αποτελεί μία σύνθετη διαδικασία η οποία καταλήγει στο τελικό στάδιο διαφοροποίησής τους. Η ωρίμανση των δενδριτικών επάγεται από σήματα στα οποία περιλαμβάνονται προφλεγμονώδη μόρια του ξενιστή, μικροβιακά προϊόντα και μόρια που απελευθερώνονται από κατεστραμένους ιστούς, τα οποία ενεργοποιούν τους υποδοχείς τύπου Toll (Adams et al., 2005). Η διαδικασία ωρίμανσης των δενδριτικών κυττάρων συνίσταται από την αυξημένη έκφραση μορίων MHC II και συνδιεγερτικών μορίων (Moll, 2003; Sundquist et al., 2004), καθιστώντας τα δενδριτικά ικανά να ενεργοποιήσουν T λεμφοκύτταρα διαμέσου της αναπτυσσόμενης ανοσολογικής σύναψης. Η ανοσολογική σύναψη περιλαμβάνει την αντιγονοειδική σύνδεση του MHC-πεπτιδίου με τον υποδοχέα των T κυττάρων, καθώς και τη σύνδεση των συνδιεγερτικών μορίων του αντιγονοπαρουσιαστικού κυττάρου με τον υποδοχέα CD28 των T κυττάρων [109-111].

Η ικανότητα αντιγονοπαρουσίασης των δενδριτικών κυττάρων ενισχύεται με την ταυτόχρονη παρουσία ανοσοενισχυτικών ουσιών, πολλές από τις οποίες είναι μικροβιακής προέλευσης. Μεταξύ αυτών διακρίνεται το ολιγονουκλεοτίδιο CpG, το οποίο τόσο στην παρούσα μελέτη όσο και σε προηγούμενες μελέτες προκάλεσε την ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων (Behboudi et al., 2000). Βιβλιογραφικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι διαφορετικοί τύποι του συγκεκριμένου δινουκλεοτιδίου επενεργούν με διαφορετικό τρόπο στην έκκριση κυτταροκινών από τα δενδριτικά κύτταρα. Στην περίπτωση χρήσης CpG ολιγονουκλεοτιδίου τύπου B, όπως και στην παρούσα μελέτη, οι Liu και συν. έδειξαν ότι το συγκεκριμένο δινουκλεοτίδιο επάγει λειτουργική διαφοροποίηση των δενδριτικών κυττάρων που προήλθαν από ποντίκια C57BL/6, όπως χαρακτηρίστηκε από την αύξηση της έκφρασης των συνδιεγερτικών μορίων και της παραγωγή της IL-12 (Y. C. Liu et al., 2010). Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, σε μελέτες ανάπτυξης εμβολίου έναντι της λείσμανίασης με τη χρήση δενδριτικών ως φορέων αντιγόνων χρησιμοποιείται κυρίως ως ανοσοενισχυτικό το δινουκλεοτίδιο CpG (CpG-ODN), το οποίο αποτελεί προσδέτη του υποδοχέα TLR9 (Majumder et al., 2012). Μάλιστα, όταν τα δενδριτικά κύτταρα επώαστηκαν με *LdeEF-2* παρουσία CpG παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της μέσης έκφρασης ανά κύτταρο του μορίου MHC II σε σχέση με τα δενδριτικά κύτταρα που είχαν επωαστεί μόνο με τον *LdeEF-2*. Αυτό συνοδεύτηκε από αυξημένη παραγωγή της IL-12 σε σχέση με την IL-10 σε επίπεδο ποσοστού θετικών κυττάρων που τις εκφράζουν, το οποίο συνάδει με τη διαφοροποίηση των δενδριτικών κυττάρων προς το φαινότυπο

DC1 που επάγει T_{H1} αποκρίσεις. Ωστόσο η παραγωγή της IL-10 ανά κύτταρο σε σχέση με την παραγωγή της IL-12 εμφανίζεται υψηλότερη, καταλήγοντας στο γεγονός της επαγωγής T_{H2} ανοσοαπόκρισης. Αποτελέσματα ως προς την επικράτηση της T_{H1} ανοσοαπόκρισης παρατηρήθηκαν στη μελέτη των *Kushawaha και συν.*, στην οποία η επώση μονοκυττάρων από μολυσμένα/θεραπευμένα με λείσμανίαση χάμστερ και μονοκυττάρων περιφερικού αίματος θεραπευμένων ασθενών με λείσμανίαση προκάλεσε αύξηση των επιπέδων της IL-12 και μείωση των επιπέδων της IL-10 (Kushawaha et al., 2011). Ωστόσο, σε αυτή τη μελέτη η επαγόμενη προστασία κατόπιν εμβολιασμού των πειραματόζωων με τον EF-2 αφορούσε μεγαλύτερο τμήμα του πρωτεϊνικού μορίου σε σχέση με εκείνο που αξιοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη. Κατά συνέπεια υπήρχαν διαθέσιμοι, περισσότεροι αντιγονικοί επίτοποι εξαιτίας του μεγαλύτερου μήκους της πρωτεΐνης.

5.4 Επίδραση του LdeEF-2 στη λειτουργική διαφοροποίηση των δενδριτικών κυττάρων

Είναι γνωστό ότι το πρότυπο των εκκρινόμενων κυτταροκινών από τα δενδριτικά κύτταρα κατέχει σημαντικό ρόλο για την ανάπτυξη των κατάλληλων ανοσολογικών αποκρίσεων. Ειδικότερα, η ικανότητα των δενδριτικών κυττάρων να παράγουν IL-12 σε απόκριση μικροβιακών ερεθισμάτων αποτελεί καθοριστική συνιστώσα στην επαγωγή T_{H1} απόκρισης (Macatonia et al., 1995; Reis e Sousa et al., 1997). Κατά συνέπεια, τα δενδριτικά κύτταρα που είχαν επωαστεί ταυτόχρονα με LdeEF-2 και CpG θα μπορούσαν να ρυθμίσουν τον πολλαπλασιασμό των T κυττάρων με κατεύθυνση προς τον T_{H1} φαινότυπο, την παραγωγή IFN- γ και τη μικροβιοκτόνο δράση των μακροφάγων σε μία κρίσιμη διαδικασία για την περίπτωση μολύνσεων από ενδοκυττάρια παθογόνα, όπως η *Leishmania* (Colino & Snapper, 2003).

Ανάλογα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν στη μελέτη του *Berberich και συν.*, στην οποία φάνηκε ότι η προστασία ενάντια σε ενδοκυττάρια παθογόνα, εξαρτάται από την παραγωγή της IL-12 από τα δενδριτικά κύτταρα. Μάλιστα, τα δενδριτικά κύτταρα που χορηγήθηκαν στα BALB/c ποντίκια είχαν επωαστεί με πέντε διαφορετικά πρωτεϊνικά αντιγόνα της *Leishmania*, το LACK (υποδοχέας της ενεργού κινάσης C), το LeIF4a (ριβωσωμικός παράγοντας επιμήκυνσης και ενεργοποίησης 4a), τη gp63, το PSA (επιφανειακό αντιγόνο των προμαστιγωτών) και την KMP-11

(κινητοπλαστική πρωτεΐνη 11). Τα αποτελέσματα της μελέτης επισήμαναν την ικανότητα των δενδριτικών κυττάρων να προστατέψουν ενάντια στη λεισμανίαση, όταν αυτά χρησιμοποιούνται ως εμβόλια και ότι αυτή εξαρτάται από την παραγωγή της IL-12. Επιπρόσθετα, υποστηρίχθηκε ότι διακριτά αντιγόνα σε έναν εμβολιασμό που βασίζεται σε δενδριτικά κύτταρα, είναι ικανά να επάγουν προστασία έναντι της *Leishmania* (Berberich et al., 2003).

Η παραγωγή της αντιφλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-10, αν και συνδέεται με την ανάπτυξη T ρυθμιστικών πληθυσμών, εξυπηρετεί και στην αποτροπή ανεξέλεγκτης ανοσολογικής απόκρισης (Colino & Snapper, 2003). Στην προκειμένη περίπτωση η παραγωγή της IL-10 θα μπορούσε να διαμορφώνει ένα μηχανισμό εξισορρόπησης στο πλαίσιο μίας μικτής T_{H1}/T_{H2} απόκρισης.

Μελέτες έχουν δείξει ότι η αντίσταση του ξενιστή στην λεισμανίαση και η αντιμετώπιση της από το ανοσοποιητικό σύστημα, εξαρτάται από την επικράτηση του T_{H1} υποπληθυσμού και την ενεργοποίηση των CD8⁺ T κυττάρων (Engwerda, Murphy, Cotterell, Smelt, & Kaye, 1998; Murray, 1997; Stager & Rafati, 2012)

Τα ενεργοποιημένα δενδριτικά κύτταρα παράγουν την κυτταροκίνη IL-12p70, η οποία ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό των T_{H1} κυττάρων και την παραγωγή της IFN- γ , καθώς επίσης και τη μικροβιοκτόνο δράση των ενεργοποιημένων μακροφάγων. Πρόκειται για μία κρίσιμη διαδικασία για την περίπτωση μολύνσεων που οφείλονται σε ενδοκυττάρια παθογόνα, συμπεριλαμβανομένης και της *Leishmania*. Ωστόσο πρόκειται για έναν στενά ρυθμιζόμενο μηχανισμό που απαιτεί τη μεσολάβηση του μορίου CD40L, προκειμένου ο ξενιστής να προστατεύεται από εν δυνάμει βλαβερές T_{H1} μεσολαβούμενες ανοσοπαθολογικές αντιδράσεις. Η έκκριση της αντιφλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-10 από τα δενδριτικά κύτταρα, μπορεί επίσης να αποτρέπει από την ανεξέλεγκτη ανοσολογική απόκριση (Colino & Snapper, 2003) καθώς επάγει την ανάπτυξη T ρυθμιστικών (T regulatory) κυττάρων (Shao et al., 2012). Ωστόσο, η ίδια κυτταροκίνη εμπλέκεται στην επιβίωση των παρασίτων της *Leishmania* στα μακροφάγα ευνοώντας ιδιαίτερα την παθογένεση της σπλαγχνικής μορφής της νόσου (Roatt et al., 2014), ενώ ταυτόχρονα και με την παράλληλη δράση της IL-4 οδηγεί στη μειωμένη παραγωγή της IL-12 από τα δενδριτικά κύτταρα καταστέλλοντας την ανάπτυξη T_{H1} απόκρισης και ευνοώντας την ανάπτυξη T_{H2} απόκρισης (Murphy, 2008).

Η πειραματική μόλυνση ποντικών με *L. major* αποτελεί ένα από τα καλύτερα χαρακτηρισμένα μοντέλα για τη μελέτη ανοσολογικής απόκρισης σε σχέση διαφοροποίηση των T λεμφοκυττάρων (Ebrahimpoor, Pakzad, & Ajdary, 2013). Το αποτέλεσμα της μόλυνσης εξαρτάται από τον τύπο της ανοσολογικής απόκρισης που επάγεται. Για παράδειγμα, μόλυνση με *L. major*, ανθεκτικής σειράς ποντικών επάγει την ανάπτυξη T_{H1} απόκρισης, η οποία σχετίζεται με υψηλά επίπεδα παραγωγής IFN- γ , η οποία ενεργοποιεί τα μακροφάγα να εξοντώσουν τα παράσιτα μέσω του δραστικού μορίου του μονοξειδίου του αζώτου (NO). Σε αυτά τα ποντίκια, οι βλάβες επουλώνονται αυθόρμητα και τα ζώα εμφανίζουν προστασία σε επόμενη μόλυνση. Αντίθετα, μόλυνση με *L. major* σε ευαίσθητα BALB/c ποντίκια, οδηγεί σε T_{H2} απόκριση με παραγωγή υψηλών επιπέδων IL-4, IL-5 και IL-13, με αποτέλεσμα η νόσος να είναι θανατηφόρα (Belkaid et al., 2001; D. Sacks & Noben-Trauth, 2002). Επιπλέον, η παραγωγή της IL-10 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης ενάντια στη *Leishmania*. Στα ποντίκια, τα επίπεδα των IgG1 αντισωμάτων συσχετίζονται με την εγκαθίδρυση T_{H2} προτύπου ανοσολογικής απόκρισης, ενώ τα IgG2a αντισώματα υποδεικνύουν την εγκαθίδρυση του προτύπου T_{H1} (Coffman, Lebman, & Rothman, 1993; Snapper & Paul, 1987). Εφόσον ο ισότυπος των παραγόμενων αντισωμάτων εξαρτάται από διαφορετικούς CD4+ υποπληθυσμούς, η γνώση των ορολογικών ειδικοτήτων μπορεί να αποτελεί ένδειξη της υποκείμενης T_{H1} ή T_{H2} απόκρισης έναντι αντιγόνων της *Leishmania* (Ebrahimpoor et al., 2013).

5.5 Η λειτουργική διαφοροποίηση των δενδριτικών κυττάρων επάγει λεμφοκυτταρικό πολλαπλασιασμό

Ο έλεγχος της λειτουργικότητας των δενδριτικών ως προς το LdeEF-2, πραγματοποιήθηκε με τη δοκιμασία της *in vitro* αντιγονοπαρουσίασης.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα δενδριτικά κύτταρα που είχαν επωαστεί με τον LdeEF-2 ήταν ικανά να επάγουν ισχυρές ανοσολογικές αποκρίσεις, δεδομένου ότι η ανοσοποίηση των BALB/c ποντικών με αυτά προκάλεσε τη δημιουργία ειδικών ως προς το αντιγόνο T-κυττάρων μνήμης, όπως φάνηκε στην *in vitro* δοκιμασία της αντιγονοπαρουσίασης. Επιπλέον, σε ανάλογη μελέτη που αφορούσε στην αξιολόγηση της αντιγονικότητας του rLelF2 (Kushawaha et al., 2011), παρατηρήθηκε έντονος

λεμφοκυτταρικός πολλαπλασιασμός που προερχόταν από τα θεραπευμένα χάμστερ, μετά από έκθεσή τους *in vitro* στον rLefF2. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, όταν τα δενδριτικά εκφράζουν σταθερά υψηλά επίπεδα μορίων MHC τάξης I και II, καθώς επίσης και υψηλά επίπεδα B7-1 (CD80) και B7-2 (CD86), χαρακτηριστικά που διέθεταν και τα δενδριτικά κύτταρα που είχαν επωαστεί με τον LdeEF-2, αποτελούν ισχυρούς διεγέρτες των παρθένων, των δραστικών T κυττάρων και των κυττάρων μνήμης. Επομένως, όταν αυτά χορηγηθούν ενδοφλέβια, μεταναστεύουν κυρίως στο σπλήνα μέσα στον οποίο αλληλεπιδρούν με τα T λεμφοκύτταρα μέσω της ανοσολογικής σύναψης (Goldsby, 2007).

Αν ένα παρθένο T κύτταρο αναγνωρίσει ένα σύμπλεγμα αντιγονικού πεπτιδίου πάνω σε ένα κατάλληλο αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο ή κύτταρο στόχο, θα ενεργοποιηθεί ξεκινώντας μία πρωτογενή απόκριση. Περίπου 48 ώρες μετά την ενεργοποίησή του, το παρθένο T κύτταρο διογκώνεται, λαμβάνει τη μορφή βλαστικού κυττάρου και αρχίζει να υφίσταται πολλαπλές κυτταρικές διαιρέσεις. Η ενεργοποίηση του T κυττάρου εξαρτάται από την ύπαρξη ενός σήματος που προέρχεται από τον υποδοχέα του (TCR) και ενός δεύτερου συνδιεγερτικού σήματος που είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης CD28-B7. Τα σήματα αυτά επάγουν την είσοδο του T κυττάρου στη φάση G₁ του κυτταρικού κύκλου και, συγχρόνως, επάγουν τη μεταγραφή των γονιδίων της IL-2 και της α αλυσίδας του υψηλής συγγένειας υποδοχέα της IL-2. Επιπρόσθετα, το συνδιεγερτικό σήμα αυξάνει το χρόνο ημιζώης του mRNA της IL-2. Η αύξηση του ρυθμού μεταγραφής της IL-2, σε συνδυασμό με τη σταθεροποίηση του mRNA της, αυξάνει κατά 100 φορές την παραγωγή της IL-2 στο ενεργοποιημένο T κύτταρο. Η έκκριση της IL-2 και η πρόσδεσή της στον υψηλής συγγένειας υποδοχέα της επάγει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση του ενεργοποιημένου T κυττάρου. Τα T κύτταρα που ενεργοποιούνται με τον τρόπο αυτό, διαιρούνται 2-3 φορές την ημέρα για 4-5 ημέρες, δίνοντας γένεση σε ένα κλώνο κυττάρων που θα διαφοροποιηθούν σε κύτταρα μνήμης και δραστικά T κύτταρα. Τα διάφορα δραστικά T κύτταρα έχουν συγκεκριμένες λειτουργίες όπως η βοηθητική δράση στα B λεμφοκύτταρα και η κυτταροτοξική δράση. Οι πληθυσμοί των δραστικών και των παρθένων T κυττάρων εκφράζουν διαφορετικά μόρια στην κυτταρική τους μεμβράνη, τα οποία παίζουν ρόλο στον τρόπο της επανακυκλοφορίας τους. Ο πληθυσμός των T κυττάρων μνήμης προέρχεται τόσο από τα παρθένα, όσο και από τα δραστικά T κύτταρα, μετά την

αναγνώριση του αντιγόνου. Τα T κύτταρα μνήμης δημιουργούνται παρουσία του αντιγόνου, έχουν μεγάλο χρόνο ζωής και βρίσκονται σε λανθάνουσα κατάσταση μέχρι την επόμενη εισβολή του ίδιου αντιγόνου, οπότε και εμφανίζουν αυξημένη αντιδραστικότητα, δίνοντας γένεση στη δευτερογενή ανοσοαπόκριση (Goldsby, 2007).

Η επώαση των δενδριτικών κυττάρων με τον LdeEF-2 παρουσία CpG ενίσχυσε την ικανότητα της αντιγονοπαρουσίασης, καθώς παρατηρήθηκε αύξηση του δείκτη ενεργοποίησης των λεμφοκυττάρων. Επισημαίνεται ότι όταν τα δενδριτικά κύτταρα «παγιδεύσουν» ένα αντιγόνο απουσία ταυτόχρονης ενεργοποίησης μπορεί να οδηγήσουν στην ανάπτυξη αντιγονοειδικής ανοχής. Συνεπώς, όταν ένα αντιγόνο δεν ενεργοποιεί από μόνο του το δενδριτικό κύτταρο, απαιτείται η παρουσία ενός ανοσοενισχυτικού, έτσι ώστε να προκύψει η κατάλληλη ανοσολογική επαγωγή. Τα δενδριτικά κύτταρα ενεργοποιούνται μέσω του υποδοχέα TLR9 από ολιγοδεοξυνουκλεοτίδια, όπως το CpG (Colino & Snapper, 2003). Τα ενεργοποιητικά δεοξυνουκλεοτίδια σε συνδυασμό και με άλλους παράγοντες έχει δείχθει ότι είναι αποτελεσματικά στην ενίσχυση ειδικών χυμικών και κυτταρικών αποκρίσεων που προκαλούνται από διαλυτές πρωτεΐνες και στην αντικαρκινική ανοσία στα πειραματικά μοντέλα των ποντικών (Merad, Sugie, Engleman, & Fong, 2002).

Βασιζόμενοι στα πλεονεκτήματα της υπολογιστικής βιολογίας, οι Agallou και συν. (Agallou, Athanasiou, Koutsoni, Dotsika, & Karagouni, 2014) έχουν συνθέσει ένα πεπτιδικό εμβόλιο πολλαπλών επιτόπων ενάντια στην λειψμανίαση, κατόπιν ανάλυσης τεσσάρων γνωστών πρωτεϊνών της *L. infantum*. Σε αυτή τη μελέτη, κάποιες από τις πρωτεΐνες (ιστόνη H1 και KMP-11) είχαν πρωτότερα ελεγχθεί ως εμβόλια με τη χρήση δενδριτικών κυττάρων ενάντια στη *L. infantum* (Agallou et al., 2011; Agallou et al., 2012). Τα δενδριτικά κύτταρα εμπλέκονται στην επαγωγή της T_{H1} απόκρισης μέσω της παραγωγής IL-12, όπως έχει φανεί σε πειράματα με ανθεκτικά στελέχη ποντικών C57BL/6 και C3H. Σε διαφορετικές μελέτες με τη χρήση ευαίσθητων ποντικών BALB/c, τα οποία εμφανίζουν T_{H2} αποκρίσεις παρουσία των κυτταροκινών IL-4, IL-5 και IL-13, ποντίκια IL-4^{-/-} ήταν ικανά να ελέγξουν εν μέρει τη μόλυνση από ορισμένα στελέχη της *L. major* (Kopf et al., 1996). Έχει δείχθει ότι η IL-4 στην αρχική φάση ενεργοποίησης των δενδριτικών μπορεί να οδηγήσει σε T_{H1} απόκριση που επάγεται από την IL-12. Στην περίπτωση εμβολίων με δενδριτικά, έχει

αναφερθεί ότι η IL-4 μπορεί να δράσει ως ανοσοενισχυτικό καθώς η σηματοδότηση μέσω του υποδοχέα της (IL-4Ra) κατέχει ρόλο κλειδί στην προαγωγή T_{H1} απόκρισης (Masic et al., 2012). Επιπλέον, μελέτες έχουν συσχετίσει την παρουσία της IL-10 με επιδείνωση της νόσου μέσω καταστολής της αντιλειτουργικής ανοσοαπόκρισης τόσο σε ανθρώπους όσο και σε ποντίκια. Οι Schwarz και συν. (Schwarz et al., 2013), έδειξαν ότι τα T κύτταρα αποτελούν την κύρια πηγή της IL-10 στα νωρίτερα στάδια της μόλυνσης, ωστόσο BALB/c ποντίκια που εμβολιάστηκαν με τμήματα δένδριτικών που είχαν διεγερθεί με διαλυτό αντιγόνο από την *L. major*, παρουσία του δινουκλεοτιδίου CpG (CpG-ODN), κατέστειλαν την παραγωγή της IL-10 με αποτέλεσμα η μόλυνση να ελεγχθεί. Ένα από τα κύρια θέματα στην ανάπτυξη εμβολίων είναι η χρήση ανοσοενισχυτικών. Αναφορικά με αυτό, σε μελέτες της λεισμανίασης με τη χρήση δένδριτικών χρησιμοποιείται κυρίως το δινουκλεοτίδιο CpG (CpG-ODN) το οποίο αποτελεί συνδέτη του υποδοχέα TLR9 (Majumder et al., 2012). Η επίδραση του CpG-ODN στα δένδριτικά αφορά στην επαγωγή της ενεργοποίησης και της ωρίμανσής τους. Επιπρόσθετα ενισχύονται χυμικές αποκρίσεις με την παραγωγή αντισωμάτων IgG2a, ενδεικτικών της T_{H1} απόκρισης ενώ, ταυτόχρονα, επάγεται και η δραστηριότητα των κυτταροτοξικών T κυττάρων (Chu, Targoni, Krieg, Lehmann, & Harding, 1997; Warren et al., 2000). Ακόμα, έχει φανεί ότι το CpG-ODN επάγει την παραγωγή της CXCL-10, μίας χημειοκίνης με αντιλειτουργικές ιδιότητες, ενώ παράλληλα οδηγεί στον περιορισμό του παρασιτικού φορτίου και των CD4⁺ CD25⁺ ρυθμιστικών T κυττάρων, σε ποντίκια που είχαν μολυνθεί με παράσιτα της *L. donovani* (G. Gupta et al., 2009; G. Gupta et al., 2011). Σε όλες αυτές τις περιπτώσεις, της *ex vivo* ενεργοποίησης των δένδριτικών, υπάρχουν αρκετά ζητήματα που έχουν να κάνουν με την επιλογή του τύπου του αντιγόνου και της μέθοδου που ακολουθείται, η οποία στις περισσότερες περιπτώσεις είναι χρονοβόρα, εργοβόρα και ενέχει το ρίσκο των επιμολύνσεων (Freitas-Silva, Brelaz-de-Castro, Rezende, & Pereira, 2014).

5.6 T λεμφοκυτταρικοί υποπληθυσμοί που επάγονται έπειτα από επίδραση με *LdeEF-2*

Χαρακτηρισμός των επαγόμενων υποπληθυσμών των T-λεμφοκυττάρων μετά τον εμβολιασμό BALB/c ποντικών μέσω της ανάλυσης της διαφορικής έκφρασης χαρακτηριστικών γονιδίων, έδειξε ότι προκλήθηκε μικτή T_{H1}/T_{H2} απόκριση με

επικράτηση της T_{H2} απόκρισης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης τα επίπεδα έκφρασης συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων υποδηλώνουν την ύπαρξη συγκεκριμένων κυτταρικών υποπληθυσμών. Ειδικότερα, η υπερέκφραση των γονιδίων *Gata3*, *Stat6* και *Stat3* συσχετίζεται απόλυτα με τον T_{H2} υποπληθυσμό των $CD4^+$ T λεμφοκυττάρων (Luckheeram, Zhou, Verma, & Xia, 2012). Πιο συγκεκριμένα, ο μεταγραφικός παράγοντας STAT6 αυξάνει τα επίπεδα έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα GATA3, ο οποίος καταστέλλει την ανάπτυξη του T_{H1} υποπληθυσμού καθώς δρα κατασταλτικά επί της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα STAT4 (Glimcher & Murphy, 2000; Kaplan, Schindler, Smiley, & Grusby, 1996; Usui, Nishikomori, Kitani, & Strober, 2003; Zhu, Guo, Watson, Hu-Li, & Paul, 2001; Zhu, Yamane, Cote-Sierra, Guo, & Paul, 2006). Ταυτόχρονα η αλληλεπίδραση του STAT6 με συγκεκριμένες θέσεις επί του γονιδιώματος εξαρτάται από τη μεσολάβηση του μεταγραφικού παράγοντα STAT3 (Stritesky & Kaplan, 2011; Stritesky et al., 2011). Επιπλέον, ο T_{H2} υποπληθυσμός χαρακτηρίζεται από την παραγωγή της κυτταροκίνης IL-4 (Abbas et al., 1996), του οποίου η έκφραση παρατηρήθηκε σημαντικά ενισχυμένη. Η παρουσία του T_{H1} υποπληθυσμού επιβεβαιώθηκε από την αυξημένη έκφραση του γονιδίου *Tbx21* (Tbet) καθώς και την έκφραση των γονιδίων *Infγ* και *Stat4*, αν και σε χαμηλότερα επίπεδα. Ωστόσο η ανάπτυξη του T_{H1} υποπληθυσμού είναι περιορισμένη γεγονός που μπορεί να αποδοθεί στην περιορισμένη έκφραση της IL-12 από τα δενδριτικά και στην αυξημένη έκφραση της IL-4 από τον T_{H2} υποπληθυσμό. Η αυξημένη έκφραση της IL-10 σε μεταγραφικό επίπεδο, υποδηλώνει την παρουσία T ρυθμιστικού υποπληθυσμού (M. S. Jordan et al., 2001) στο πλαίσιο ρύθμισης της ανοσολογικής απόκρισης που λαμβάνει χώρα.

Μελέτες έχουν δείξει ότι το επίπεδο προστασίας που παρέχεται από εμβόλια έναντι της σπλαγγινικής λεισμανίασης στο πειραματικό μοντέλο των ποντικών, εξαρτάται από την ισορροπία των παραγόμενων κυτταροκινών η οποία επηρεάζει τον τύπο της επίκτητης ανοσολογικής απόκρισης που επάγεται καθώς και από τη λεισμανιοκτόνο δράση των μολυσμένων μακροφάγων. Επιπλέον, έχει προταθεί ότι σε αντίθεση με τη δερματική λεισμανίαση, η ευαισθησία απέναντι στη σπλαγγινική καθορίζεται από έλλειψη της T_{H1} απόκρισης παρά από την παρουσία T_{H2} απόκρισης (H. Goto & Lindoso, 2004; Kaye, Curry, & Blackwell, 1991). Ωστόσο η ανάπτυξη ενός εμβολίου που περιλαμβάνει καθορισμένα αντιγόνα του παρασίτου *Leishmania*

και ανοσοενισχυτικά που ενεργοποιούν ή επικουρούν την T_{H1} ανοσοαπόκριση ή/και κυτταροτοξικές ανοσολογικές αποκρίσεις, αποτελεί το βασικότερο στόχο για την πρόληψη της λεισμανίασης ή τη θεραπεία ασθενών που έχουν μολυνθεί με ανθεκτικά στελέχη του παρασίτου (Agallou et al., 2011).

6. Συμπεράσματα

Στην παρούσα μελέτη αξιολογήθηκε η αντιγονικότητα του αμινοτελικού τμήματος της πρωτεΐνης EF-2 (*LdeEF-2*, 1-357 α.α.) του είδους *L. Infantum* καθώς επίσης μελετήθηκε και η διαφορική γονιδιωματική έκφραση των επαγόμενων κυτταρικών υποπληθυσμών των BALB/c ποντικών στα οποία χορηγήθηκαν δενδριτικά κύτταρα που είχαν διεγερθεί με το υπό μελέτη μόριο τόσο αποκλειστικά όσο και παρουσία ανοσοενισχυτικού. Τα αποτελέσματα επισημαίνουν ότι το υπό μελέτη μόριο είναι αντιγονικό καθώς επάγει την ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων τα οποία αποτελούν επαγγελματικά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Η ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων επιβεβαιώθηκε από την αυξημένη έκφραση των μορίων μείζονος ιστοσυμβατότητας τάξης II (MHC II) καθώς και των συνδιεγερτικών μορίων CD40 και CD86. Επιπρόσθετα επιβεβαιώθηκε η ικανότητα του μορίου να προάγει τη λειτουργική διαφοροποίηση των δενδριτικών κυττάρων, μέσω της επαγωγής της έκφρασης κυτταροκινών όπως η IL-12 και η IL-10. Ταυτόχρονα ταυτοποιήθηκαν οι T κυτταρικοί υποπληθυσμοί, οι οποίοι επάγονται κατόπιν ανοσοποιήσεων με δενδριτικά κύτταρα που είχαν διεγερθεί με την πρωτεΐνη *LdeEF-2* παρουσία/απουσία του ανοσοενισχυτικού CpG. Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν την ανάπτυξη μικτής ανοσολογικής απόκρισης T_{H1}/T_{H2} με την αναλογία να στρέφεται υπέρ της T_{H2} απόκρισης.

Συμπερασματικά προκύπτει ότι η αντιγονικότητα του αμινοτελικού τμήματος της πρωτεΐνης EF-2 είναι ενισχυμένη όπως επιβεβαιώνεται και από μελέτες που αφορούν σε ολόκληρη την πρωτεΐνη. Ωστόσο, η ανοσορυθμιστική δράση του αμινοτελικού τμήματος δεν επάγει την ανάπτυξη ενισχυμένης T_{H1} ανοσοαπόκρισης, η οποία είναι καθοριστική για την ανάπτυξη προστασίας έναντι του παρασίτου *L. Infantum*. Παραταύτα, η αξιοποίηση δενδριτικών κυττάρων που έχουν διεγερθεί με μόρια υποψήφια για την ανάπτυξη εμβολίων, φάνηκε επιτυχής από το γεγονός της ύπαρξης ειδικής ανοσολογικής απόκρισης. Οι ερευνητικές προσπάθειες που αφορούν στη μελέτη ανάπτυξης εμβολίου κατά της σπλαγγχνικής λεισμανίασης θα πρέπει να επικεντρωθούν στην αναζήτηση αντιγονικών επιτόπων επί του μορίου EF-2, στο καρβοξυτελικό άκρο του μορίου ή και κατά μήκος αυτού με αλληλεπικαλυπτόμενες περιοχές. Στην προσπάθεια αυτή θα μπορούσε να συμμετέχει και ο κλάδος της

υπολογιστικής ανοσολογίας με *in silico* προσεγγίσεις. Ταυτόχρονα η μελέτη πρόσθετων μορίων των παρασίτων της *Leishmania* ως προς το ρόλο τους στον κύκλο ζωής του παρασίτου αλλά και ως προς την ανοσογονικότητά τους, θα μπορούσε να συμβάλει στον καλύτερο σχεδιασμό ενός σύνθετου και αποτελεσματικού εμβολίου. Σε κάθε περίπτωση, οι μελέτες σε μόρια των παρασίτων της *Leishmania* μπορούν να συμβάλλουν στην κατανόηση της βιολογίας του παρασίτου και των μηχανισμών της ανοσολογικής απόκρισης του ξενιστή, στη διερεύνηση υποψήφιων φαρμακολογικών στόχων και στο σχεδιασμό αποτελεσματικών εμβολίων.

7. Βιβλιογραφία

- Abbas, A. K., Murphy, K. M., & Sher, A. (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, 383(6603), 787-793. doi: 10.1038/383787a0
- Adams, S., O'Neill, D. W., & Bhardwaj, N. (2005). Recent advances in dendritic cell biology. *J Clin Immunol*, 25(3), 177-188.
- Agallou, M., Athanasiou, E., Koutsoni, O., Dotsika, E., & Karagouni, E. (2014). Experimental Validation of Multi-Epitope Peptides Including Promising MHC Class I- and II-Restricted Epitopes of Four Known *Leishmania infantum* Proteins. *Front Immunol*, 5, 268. doi: 10.3389/fimmu.2014.00268
- Agallou, M., Margaroni, M., & Karagouni, E. (2011). Cellular vaccination with bone marrow-derived dendritic cells pulsed with a peptide of *Leishmania infantum* KMP-11 and CpG oligonucleotides induces protection in a murine model of visceral leishmaniasis. *Vaccine*, 29(31), 5053-5064. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.04.089
- Agallou, M., Smirlis, D., Soteriadou, K. P., & Karagouni, E. (2012). Vaccination with *Leishmania* histone H1-pulsed dendritic cells confers protection in murine visceral leishmaniasis. *Vaccine*, 30(34), 5086-5093. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.05.075
- Agnello, D., Lankford, C. R., Bream, J., Morinobu, A., Gadina, M., O'Shea, J., & Frucht, D. (2003). Cytokines and Transcription Factors That Regulate T Helper Cell Differentiation: New Players and New Insights. *J Clin Immunol*, 23(3), 147-161. doi: 10.1023/A:1023381027062
- Ahuja, S. S., Reddick, R. L., Sato, N., Montalbo, E., Kostecki, V., Zhao, W., . . . Ahuja, S. K. (1999). Dendritic cell (DC)-based anti-infective strategies: DCs engineered to secrete IL-12 are a potent vaccine in a murine model of an intracellular infection. *J Immunol*, 163(7), 3890-3897.
- Alexandratos, A., Clos, J., Samiotaki, M., Efstathiou, A., Panayotou, G., Soteriadou, K., & Smirlis, D. (2013). The loss of virulence of histone H1 overexpressing *Leishmania donovani* parasites is directly associated with a reduction of HSP83 rate of translation. *Mol Microbiol*, 88(5), 1015-1031. doi: 10.1111/mmi.12240
- Alvar, J., Velez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., . . . den Boer, M. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*, 7(5), e35671. doi: 10.1371/journal.pone.0035671
- Asilian, A., Sadeghinia, A., Faghihi, G., & Momeni, A. (2004). Comparative study of the efficacy of combined cryotherapy and intralesional meglumine antimoniate (Glucantime) vs. cryotherapy and intralesional meglumine antimoniate (Glucantime) alone for the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Int J Dermatol*, 43(4), 281-283. doi: 10.1111/j.1365-4632.2004.02002.x
- Asilian, A., Sadeghinia, A., Faghihi, G., Momeni, A., & Amini Harandi, A. (2003). The efficacy of treatment with intralesional meglumine antimoniate alone, compared with that of cryotherapy combined with the meglumine antimoniate or intralesional sodium stibogluconate, in the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol*, 97(5), 493-498. doi: 10.1179/000349803225001373
- Badaro, R., Lobo, I., Munos, A., Netto, E. M., Modabber, F., Campos-Neto, A., . . . Reed, S. G. (2006). Immunotherapy for drug-refractory mucosal leishmaniasis. *J Infect Dis*, 194(8), 1151-1159. doi: 10.1086/507708
- Badaro, R., Lobo, I., Nakatani, M., Muinos, A., Netto, E. M., Coler, R. N., & Reed, S. G. (2001). Successful use of a defined antigen/GM-CSF adjuvant vaccine to treat mucosal Leishmaniasis refractory to antimony: A case report. *Braz J Infect Dis*, 5(4), 223-232.

- Banuls, A. L., Hide, M., & Prugnolle, F. (2007). Leishmania and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Adv Parasitol*, *64*, 1-109. doi: 10.1016/S0065-308X(06)64001-3
- Bartlett, J. M., & Stirling, D. (2003). A Short History of the Polymerase Chain Reaction *PCR Protocols* (Vol. 226, pp. 3-6).
- Bates, P. A. (2007). Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology*, *37*(10), 1097-1106. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.04.003>
- Behboudi, S., Chao, D., Klenerman, P., & Austyn, J. (2000). The effects of DNA containing CpG motif on dendritic cells. *Immunology*, *99*(3), 361-366.
- Belkaid, Y., Hoffmann, K. F., Mendez, S., Kamhawi, S., Udey, M. C., Wynn, T. A., & Sacks, D. L. (2001). The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of Leishmania major in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. *J Exp Med*, *194*(10), 1497-1506.
- Benhni, F., Chenik, M., Laouini, D., Louzir, H., Cazenave, P. A., & Dellagi, K. (2009). Comparative evaluation of two vaccine candidates against experimental leishmaniasis due to Leishmania major infection in four inbred mouse strains. *Clin Vaccine Immunol*, *16*(11), 1529-1537. doi: 10.1128/cvi.00153-09
- Berberich, C., Ramirez-Pineda, J. R., Hambrecht, C., Alber, G., Skeiky, Y. A., & Moll, H. (2003). Dendritic cell (DC)-based protection against an intracellular pathogen is dependent upon DC-derived IL-12 and can be induced by molecularly defined antigens. *J Immunol*, *170*(6), 3171-3179.
- Besteiro, S., Williams, R. A. M., Coombs, G. H., & Mottram, J. C. (2007). Protein turnover and differentiation in Leishmania. *International Journal for Parasitology*, *37*(10), 1063-1075. doi: 10.1016/j.ijpara.2007.03.008
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T. B., Oukka, M., . . . Kuchroo, V. K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, *441*(7090), 235-238. doi: 10.1038/nature04753
- Brittingham, A., & Mosser, D. M. (1996). Exploitation of the complement system by Leishmania promastigotes. *Parasitol Today*, *12*(11), 444-447.
- Brunner, A. M., Yakovlev, I. A., & Strauss, S. H. (2004). Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies. *BMC Plant Biol*, *4*, 14. doi: 10.1186/1471-2229-4-14
- Buer, J., & Balling, R. (2003). Mice, microbes and models of infection. *Nat Rev Genet*, *4*(3), 195-205.
- Bumb, R. A., Prasad, N., Khandelwal, K., Aara, N., Mehta, R. D., Ghiya, B. C., . . . Satoskar, A. R. (2013). Long-term efficacy of single-dose radiofrequency-induced heat therapy vs. intralesional antimonials for cutaneous leishmaniasis in India. *Br J Dermatol*, *168*(5), 1114-1119. doi: 10.1111/bjd.12205
- Campos-Neto, A., Porrozzini, R., Greeson, K., Coler, R. N., Webb, J. R., Seiky, Y. A. W., . . . Grimaldi, G. (2001). Protection against Cutaneous Leishmaniasis Induced by Recombinant Antigens in Murine and Nonhuman Primate Models of the Human Disease. *Infect Immun*, *69*(6), 4103-4108. doi: 10.1128/IAI.69.6.4103-4108.2001
- Caparros, E., Serrano, D., Puig-Kroger, A., Riols, L., Lasala, F., Martinez, I., . . . Colmenares, M. (2005). Role of the C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN in Leishmania interaction with host phagocytes. *Immunobiology*, *210*(2-4), 185-193. doi: 10.1016/j.imbio.2005.05.013
- Carrillo, E., Crusat, M., Nieto, J., Chicharro, C., Thomas Mdel, C., Martinez, E., . . . Moreno, J. (2008). Immunogenicity of HSP-70, KMP-11 and PFR-2 leishmanial antigens in the experimental model of canine visceral leishmaniasis. *Vaccine*, *26*(15), 1902-1911. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.01.042
- Chappuis, F., Sundar, S., Hailu, A., Ghalib, H., Rijal, S., Peeling, R. W., . . . Boelaert, M. (2007). Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol*, *5*(11), 873-882. doi: 10.1038/nrmicro1748

- Chaudhuri, G., & Chang, K. P. (1988). Acid protease activity of a major surface membrane glycoprotein (gp63) from *Leishmania mexicana* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol*, 27(1), 43-52.
- Chen, Z., Laurence, A., & O'Shea, J. J. (2007). Signal transduction pathways and transcriptional regulation in the control of Th17 differentiation. *Semin Immunol*, 19(6), 400-408. doi: 10.1016/j.smim.2007.10.015
- Chu, R. S., Targoni, O. S., Krieg, A. M., Lehmann, P. V., & Harding, C. V. (1997). CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. *J Exp Med*, 186(10), 1623-1631.
- Coffman, R. L., Leberman, D. A., & Rothman, P. (1993). Mechanism and regulation of immunoglobulin isotype switching. *Adv Immunol*, 54, 229-270.
- Colino, J., & Snapper, C. M. (2003). Dendritic cells, new tools for vaccination. *Microbes Infect*, 5(4), 311-319.
- Colmenares, M., Corbi, A. L., Turco, S. J., & Rivas, L. (2004). The dendritic cell receptor DC-SIGN discriminates among species and life cycle forms of *Leishmania*. *J Immunol*, 172(2), 1186-1190.
- Colmenares, M., Puig-Kroger, A., Pello, O. M., Corbi, A. L., & Rivas, L. (2002). Dendritic cell (DC)-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin (DC-SIGN, CD209), a C-type surface lectin in human DCs, is a receptor for *Leishmania* amastigotes. *J Biol Chem*, 277(39), 36766-36769. doi: 10.1074/jbc.M205270200
- Connell, N. D., Medina-Acosta, E., McMaster, W. R., Bloom, B. R., & Russell, D. G. (1993). Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with recombinant bacille Calmette-Guérin expressing the *Leishmania* surface proteinase gp63. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(24), 11473-11477.
- Control of the leishmaniasis. (2010). *World Health Organ Tech Rep Ser*(949), xii-xiii, 1-186, back cover.
- Convit, J., Ulrich, M., Polegre, M. A., Avila, A., Rodriguez, N., Mazzedo, M. I., & Blanco, B. (2004). Therapy of Venezuelan patients with severe mucocutaneous or early lesions of diffuse cutaneous leishmaniasis with a vaccine containing pasteurized *Leishmania* promastigotes and bacillus Calmette-Guérin: preliminary report. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 99(1), 57-62.
- Convit, J., Ulrich, M., Zerpa, O., Borges, R., Aranzazu, N., Valera, M., . . . Tomedes, I. (2003). Immunotherapy of american cutaneous leishmaniasis in Venezuela during the period 1990-99. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 97(4), 469-472.
- Cox, F. E. G. (2002). History of Human Parasitology. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(4), 595-612. doi: 10.1128/CMR.15.4.595-612.2002
- David, C. V., & Craft, N. (2009). Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatol Ther*, 22(6), 491-502. doi: 10.1111/j.1529-8019.2009.01272.x
- Dhanasekaran, S., Doherty, T. M., & Kenneth, J. (2010). Comparison of different standards for real-time PCR-based absolute quantification. *J Immunol Methods*, 354(1-2), 34-39. doi: 10.1016/j.jim.2010.01.004
- Di Pucchio, T., Chatterjee, B., Smed-Sorensen, A., Clayton, S., Palazzo, A., Montes, M., . . . Connolly, J. E. (2008). Direct proteasome-independent cross-presentation of viral antigen by plasmacytoid dendritic cells on major histocompatibility complex class I. *Nat Immunol*, 9(5), 551-557. doi: http://www.nature.com/ni/journal/v9/n5/suppinfo/ni.1602_S1.html
- Dong, C. (2006). Diversification of T-helper-cell lineages: finding the family root of IL-17-producing cells. *Nat Rev Immunol*, 6(4), 329-333. doi: 10.1038/nri1807
- Dumonteil, E. (2007). DNA Vaccines against Protozoan Parasites: Advances and Challenges. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2007, 90520. doi: 10.1155/2007/90520
- Ebrahimpoor, S., Pakzad, S.-R., & Ajdary, S. (2013). IgG1 and IgG2a Profile of Serum antibodies to *Leishmania* major Amastigote in BALB/c and C57BL/6 Mice. *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology*, 12(4), 361-367.

- Eggert, A. A., Schreurs, M. W., Boerman, O. C., Oyen, W. J., de Boer, A. J., Punt, C. J., . . . Adema, G. J. (1999). Biodistribution and vaccine efficiency of murine dendritic cells are dependent on the route of administration. *Cancer Res*, 59(14), 3340-3345.
- Elmahallawy, E. K., Sampedro Martinez, A., Rodriguez-Granger, J., Hoyos-Mallecot, Y., Agil, A., Navarro Mari, J. M., & Gutierrez Fernandez, J. (2014). Diagnosis of leishmaniasis. *J Infect Dev Ctries*, 8(8), 961-972. doi: 10.3855/jidc.4310
- Engwerda, C. R., Murphy, M. L., Cotterell, S. E., Smelt, S. C., & Kaye, P. M. (1998). Neutralization of IL-12 demonstrates the existence of discrete organ-specific phases in the control of *Leishmania donovani*. *Eur J Immunol*, 28(2), 669-680. doi: 10.1002/(sici)1521-4141(199802)28:02<669::aid-immu669>3.0.co;2-n
- Evans, D. A., Lanham, S. M., Baldwin, C. I., & Peters, W. (1984). The isolation and isoenzyme characterization of *Leishmania braziliensis* subsp. from patients with cutaneous leishmaniasis acquired in Belize. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 78(1), 35-42.
- Flower, D. R., Macdonald, I. K., Ramakrishnan, K., Davies, M. N., & Doytchinova, I. A. (2010). Computer aided selection of candidate vaccine antigens. *Immunome Res*, 6 Suppl 2, S1. doi: 10.1186/1745-7580-6-s2-s1
- Freitas-Silva, R., Brelaz-de-Castro, M. C. A., Rezende, A. M., & Pereira, V. R. (2014). Targeting Dendritic Cells as a Good Alternative to Combat *Leishmania* spp. *Front Immunol*, 5, 604. doi: 10.3389/fimmu.2014.00604
- Garcia Bustos, M. F., Barrio, A. B., Parodi Ramoneda, C. M., Ramos, F., Mora, M. C., Convit, J., & Basombrio, M. A. (2011). Immunological correlates of cure in the first American cutaneous leishmaniasis patient treated by immunotherapy in Argentina. A case report. *Invest Clin*, 52(4), 365-375.
- Garg, R., & Dube, A. (2006). Animal models for vaccine studies for visceral leishmaniasis. *Indian J Med Res*, 123(3), 439-454.
- Ghosh, A., Zhang, W. W., & Matlashewski, G. (2001). Immunization with A2 protein results in a mixed Th1/Th2 and a humoral response which protects mice against *Leishmania donovani* infections. *Vaccine*, 20(1-2), 59-66.
- Ghosh, M., Pal, C., Ray, M., Maitra, S., Mandal, L., & Bandyopadhyay, S. (2003). Dendritic cell-based immunotherapy combined with antimony-based chemotherapy cures established murine visceral leishmaniasis. *J Immunol*, 170(11), 5625-5629.
- Glew, R. H., Saha, A. K., Das, S., & Remaley, A. T. (1988). Biochemistry of the *Leishmania* species. *Microbiological Reviews*, 52(4), 412-432.
- Glimcher, L. H., & Murphy, K. M. (2000). Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. *Genes Dev*, 14(14), 1693-1711.
- Goldsby, R., Kindt, T., and Kuby, J. (2007). *Ανοσολογία*. Αθήνα: Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης.
- Goto, H., & Lindoso, J. A. (2004). Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res*, 37(4), 615-623.
- Goto, Y., Bogatzki, L. Y., Bertholet, S., Coler, R. N., & Reed, S. G. (2007). Protective immunization against visceral leishmaniasis using *Leishmania* sterol 24-c-methyltransferase formulated in adjuvant. *Vaccine*, 25(42), 7450-7458. doi: 10.1016/j.vaccine.2007.08.001
- Gottlieb, M., & Dwyer, D. M. (1981). *Leishmania donovani*: Surface membrane acid phosphatase activity of promastigotes. *Exp Parasitol*, 52(1), 117-128. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0014-4894\(81\)90067-9](http://dx.doi.org/10.1016/0014-4894(81)90067-9)
- Green, P. J., Feizi, T., Stoll, M. S., Thiel, S., Prescott, A., & McConville, M. J. (1994). Recognition of the major cell surface glycoconjugates of *Leishmania* parasites by the human serum mannan-binding protein. *Mol Biochem Parasitol*, 66(2), 319-328.
- Grogan, J. L., & Locksley, R. M. (2002). T helper cell differentiation: on again, off again. *Curr Opin Immunol*, 14(3), 366-372.
- Guermontprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Thery, C., & Amigorena, S. (2002). Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, 20, 621-667. doi: 10.1146/annurev.immunol.20.100301.064828

- Gupta, G., Bhattacharjee, S., Bhattacharyya, S., Bhattacharya, P., Adhikari, A., Mukherjee, A., . . . Majumdar, S. (2009). CXC chemokine-mediated protection against visceral leishmaniasis: involvement of the proinflammatory response. *J Infect Dis*, 200(8), 1300-1310. doi: 10.1086/605895
- Gupta, G., Majumdar, S., Adhikari, A., Bhattacharya, P., Mukherjee, A. K., Majumdar, S. B., & Majumdar, S. (2011). Treatment with IP-10 induces host-protective immune response by regulating the T regulatory cell functioning in Leishmania donovani-infected mice. *Medical Microbiology and Immunology*, 200(4), 241-253. doi: 10.1007/s00430-011-0197-y
- Gupta, S., & Nishi. (2011). Visceral leishmaniasis: Experimental models for drug discovery. *Indian J Med Res*, 133(1), 27-39.
- Gupta, S. K., Sisodia, B. S., Sinha, S., Hajela, K., Naik, S., Shasany, A. K., & Dube, A. (2007). Proteomic approach for identification and characterization of novel immunostimulatory proteins from soluble antigens of Leishmania donovani promastigotes. *Proteomics*, 7(5), 816-823. doi: 10.1002/pmic.200600725
- Hage, D. S., Anguizola, J. A., Bi, C., Li, R., Matsuda, R., Papastavros, E., . . . Zheng, X. (2012). PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL APPLICATIONS OF AFFINITY CHROMATOGRAPHY: RECENT TRENDS AND DEVELOPMENTS. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 69, 93-105. doi: 10.1016/j.jpba.2012.01.004
- Handman, E. (1999). Cell Biology of Leishmania. In R. M. J.R. Baker & D. Rollinson (Eds.), *Adv Parasitol* (Vol. Volume 44, pp. 1-39): Academic Press.
- Handman, E., Symons, F. M., Baldwin, T. M., Curtis, J. M., & Scheerlinck, J. P. (1995). Protective vaccination with promastigote surface antigen 2 from Leishmania major is mediated by a TH1 type of immune response. *Infect Immun*, 63(11), 4261-4267.
- Hoeffel, G., Ripoche, A. C., Matheoud, D., Nascimbeni, M., Escriou, N., Lebon, P., . . . Maranon, C. (2007). Antigen crosspresentation by human plasmacytoid dendritic cells. *Immunity*, 27(3), 481-492. doi: 10.1016/j.immuni.2007.07.021
- Holden, M., & Wang, L. (2008). Quantitative Real-Time PCR: Fluorescent Probe Options and Issues. In U. Resch-Genger (Ed.), *Standardization and Quality Assurance in Fluorescence Measurements II* (Vol. 6, pp. 489-508): Springer Berlin Heidelberg.
- Hommel, M. Visceral leishmaniasis: biology of the parasite. *Journal of Infection*, 39(2), 101-111. doi: 10.1016/S0163-4453(99)90000-2
- Hori, S., Nomura, T., & Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 299(5609), 1057-1061. doi: 10.1126/science.1079490
- <http://www.uniprot.org/uniprot/A4ICW8>.
- <http://www.who.int/campaigns/world-health-day/2014/photos/leishmaniasis/en/>. (1 November 2013 12:33 CET). Retrieved 07/04/2015
- Inaba, K., Inaba, M., Romani, N., Aya, H., Deguchi, M., Ikehara, S., . . . Steinman, R. M. (1992). Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med*, 176(6), 1693-1702.
- Jaiswal, A. K., Khare, P., Joshi, S., Kushawaha, P. K., Sundar, S., & Dube, A. (2014). Th1 Stimulatory Proteins of Leishmania donovani: Comparative Cellular and Protective Responses of rTriose Phosphate Isomerase, rProtein Disulfide Isomerase and rElongation Factor-2 in Combination with rHSP70 against Visceral Leishmaniasis. *PLoS ONE*, 9(9), e108556. doi: 10.1371/journal.pone.0108556
- Joffre, O. P., Segura, E., Savina, A., & Amigorena, S. (2012). Cross-presentation by dendritic cells. *Nat Rev Immunol*, 12(8), 557-569.
- John N. Clarck, J. R. L. S. (1992). ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ. Ηράκλειο, Κρήτης.
- Joiner, T. J., Kraus, P. F., & Kupiec, T. C. P. (2002). Comparison of Endotoxin Testing Methods for Pharmaceutical Products. *Int J Pharm Compd*, 6(6), 408-409.

- Jordan, M. S., Boesteanu, A., Reed, A. J., Petrone, A. L., Hohenbeck, A. E., Lerman, M. A., Caton, A. J. (2001). Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol*, 2(4), 301-306.
- Jordan, M. S., Boesteanu, A., Reed, A. J., Petrone, A. L., Hohenbeck, A. E., Lerman, M. A., Caton, A. J. (2001). Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol*, 2(4), 301-306. doi: 10.1038/86302
- Kamhawi, S., Ramalho-Ortigao, M., Pham, V. M., Kumar, S., Lawyer, P. G., Turco, S. J., Valenzuela, J. G. (2004). A role for insect galectins in parasite survival. *Cell*, 119(3), 329-341.
- Kane, M. M., & Mosser, D. M. (2000). Leishmania parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. *Curr Opin Hematol*, 7(1), 26-31.
- Kantoff, P. W., Higano, C. S., Shore, N. D., Berger, E. R., Small, E. J., Penson, D. F., Schellhammer, P. F. (2010). Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med*, 363(5), 411-422. doi: 10.1056/NEJMoa1001294
- Kaplan, M. H., Schindler, U., Smiley, S. T., & Grusby, M. J. (1996). Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity*, 4(3), 313-319.
- Kautz-Neu, K., Schwonberg, K., Fischer, M., Schermann, A., & von Stebut, E. (2012). Dendritic cells in Leishmania major infections: mechanisms of parasite uptake, cell activation and evidence for physiological relevance. *Medical Microbiology and Immunology*, 201(4), 581-592. doi: 10.1007/s00430-012-0261-2
- Kaye, P. M., Curry, A. J., & Blackwell, J. M. (1991). Differential production of Th1- and Th2-derived cytokines does not determine the genetically controlled or vaccine-induced rate of cure in murine visceral leishmaniasis. *J Immunol*, 146(8), 2763-2770.
- Kopf, M., Brombacher, F., Kohler, G., Kienzle, G., Widmann, K. H., Lefrang, K., Solbach, W. (1996). IL-4-deficient Balb/c mice resist infection with Leishmania major. *J Exp Med*, 184(3), 1127-1136.
- Krauss, S., Buttgereit, F., & Brand, M. D. (1999). Effects of the mitogen concanavalin A on pathways of thymocyte energy metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1412(2), 129-138. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0005-2728\(99\)00058-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0005-2728(99)00058-4)
- Kruisbeek, A. M., Shevach, E., & Thornton, A. M. (2004). Proliferative assays for T cell function. *Curr Protoc Immunol*, Chapter 3, Unit 3.12. doi: 10.1002/0471142735.im0312s60
- Kumagai, Y., Takeuchi, O., & Akira, S. (2008). TLR9 as a key receptor for the recognition of DNA. *Adv Drug Deliv Rev*, 60(7), 795-804. doi: 10.1016/j.addr.2007.12.004
- Kumar, R., & Engwerda, C. (2014). Vaccines to prevent leishmaniasis. *Clin Trans Immunol*, 3, e13. doi: 10.1038/cti.2014.4
- Kumar, R., Goto, Y., Gidwani, K., Cowgill, K. D., Sundar, S., & Reed, S. G. (2010). Evaluation of ex vivo human immune response against candidate antigens for a visceral leishmaniasis vaccine. *Am J Trop Med Hyg*, 82(5), 808-813. doi: 10.4269/ajtmh.2010.09-0341
- Kumari, S., Samant, M., Misra, P., Khare, P., Sisodia, B., Shasany, A. K., & Dube, A. (2008). Th1-stimulatory polyproteins of soluble Leishmania donovani promastigotes ranging from 89.9 to 97.1 kDa offers long-lasting protection against experimental visceral leishmaniasis. *Vaccine*, 26(45), 5700-5711. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.08.021
- Kushawaha, P. K., Gupta, R., Sundar, S., Sahasrabudhe, A. A., & Dube, A. (2011). Elongation factor-2, a Th1 stimulatory protein of Leishmania donovani, generates strong IFN-gamma and IL-12 response in cured Leishmania-infected patients/hamsters and protects hamsters against Leishmania challenge. *J Immunol*, 187(12), 6417-6427. doi: 10.4049/jimmunol.1102081
- Kweider, M., Lemesre, J. L., Darcy, F., Kusnierz, J. P., Capron, A., & Santoro, F. (1987). Infectivity of Leishmania braziliensis promastigotes is dependent on the increasing expression of a 65,000-dalton surface antigen. *J Immunol*, 138(1), 299-305.

- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Laufs, H., Muller, K., Fleischer, J., Reiling, N., Jahnke, N., Jensenius, J. C., . . . Laskay, T. (2002). Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. *Infect Immun*, 70(2), 826-835.
- Li, M. O., Wan, Y. Y., & Flavell, R. A. T Cell-Produced Transforming Growth Factor- β Controls T Cell Tolerance and Regulates Th1- and Th17-Cell Differentiation. *Immunity*, 26(5), 579-591. doi: 10.1016/j.immuni.2007.03.014
- Liu, D., & Uzonna, J. E. (2012). The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2, 83. doi: 10.3389/fcimb.2012.00083
- Liu, M. A., Wahren, B., & Karlsson Hedestam, G. B. (2006). DNA vaccines: recent developments and future possibilities. *Hum Gene Ther*, 17(11), 1051-1061. doi: 10.1089/hum.2006.17.1051
- Liu, Y. C., Gray, R. C., Hardy, G. A., Kuchtey, J., Abbott, D. W., Emancipator, S. N., & Harding, C. V. (2010). CpG-B oligodeoxynucleotides inhibit TLR-dependent and -independent induction of type I IFN in dendritic cells. *J Immunol*, 184(7), 3367-3376. doi: 10.4049/jimmunol.0903079
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402-408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
- Lopez, M., Cherkasov, A., & Nandan, D. (2007). Molecular architecture of leishmania EF-1alpha reveals a novel site that may modulate protein translation: a possible target for drug development. *Biochem Biophys Res Commun*, 356(4), 886-892. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.03.077
- Luckheeram, R. V., Zhou, R., Verma, A. D., & Xia, B. (2012). CD4+T Cells: Differentiation and Functions. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012, 12. doi: 10.1155/2012/925135
- Lutz, M. B., Kukutsch, N., Ogilvie, A. L., Rossner, S., Koch, F., Romani, N., & Schuler, G. (1999). An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods*, 223(1), 77-92.
- Macatonia, S. E., Hosken, N. A., Litton, M., Vieira, P., Hsieh, C. S., Culpepper, J. A., . . . O'Garra, A. (1995). Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol*, 154(10), 5071-5079.
- Maino, V. C., & Picker, L. J. (1998). Identification of functional subsets by flow cytometry: intracellular detection of cytokine expression. *Cytometry*, 34(5), 207-215.
- Majumder, S., Bhattacharjee, S., Paul Chowdhury, B., & Majumdar, S. (2012). CXCL10 is critical for the generation of protective CD8 T cell response induced by antigen pulsed CpG-ODN activated dendritic cells. *PLoS One*, 7(11), e48727. doi: 10.1371/journal.pone.0048727
- Mangan, P. R., Harrington, L. E., O'Quinn, D. B., Helms, W. S., Bullard, D. C., Elson, C. O., . . . Weaver, C. T. (2006). Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature*, 441(7090), 231-234. doi: 10.1038/nature04754
- Masic, A., Hurdal, R., Nieuwenhuizen, N. E., Brombacher, F., & Moll, H. (2012). Dendritic cell-mediated vaccination relies on interleukin-4 receptor signaling to avoid tissue damage after *Leishmania major* infection of BALB/c mice. *PLoS Negl Trop Dis*, 6(7), e1721. doi: 10.1371/journal.pntd.0001721
- McCall, L.-I., Zhang, W.-W., & Matlashewski, G. (2013). Determinants for the Development of Visceral Leishmaniasis Disease. *PLoS Pathogens*, 9(1), e1003053. doi: 10.1371/journal.ppat.1003053
- McConville, M. J., Bacic, A., Mitchell, G. F., & Handman, E. (1987). Lipophosphoglycan of *Leishmania major* that vaccinates against cutaneous leishmaniasis contains an alkylglycerophosphoinositol lipid anchor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(24), 8941-8945.

- McNeely, T. B., & Turco, S. J. (1990). Requirement of lipophosphoglycan for intracellular survival of *Leishmania donovani* within human monocytes. *J Immunol*, *144*(7), 2745-2750.
- Medina-Acosta, E., Karess, R. E., Schwartz, H., & Russell, D. G. (1989). The promastigote surface protease (gp63) of *Leishmania* is expressed but differentially processed and localized in the amastigote stage. *Mol Biochem Parasitol*, *37*(2), 263-273.
- Medzhitov, R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*, *449*(7164), 819-826. doi: 10.1038/nature06246
- Merad, M., Sugie, T., Engleman, E. G., & Fong, L. (2002). In vivo manipulation of dendritic cells to induce therapeutic immunity. *Blood*, *99*(5), 1676-1682.
- Miles, M. A., Povaia, M. M., de Souza, A. A., Lainson, R., & Shaw, J. J. (1980). Some methods for the enzymic characterization of Latin-American *Leishmania* with particular reference to *Leishmania mexicana amazonensis* and subspecies of *Leishmania hertigi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, *74*(2), 243-252.
- Miles, S. A., Conrad, S. M., Alves, R. G., Jeronimo, S. M., & Mosser, D. M. (2005). A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. *J Exp Med*, *201*(5), 747-754. doi: 10.1084/jem.20041470
- Mirzahoseini, H., Mafakheri, S., Mohammadi, N. S., & Enayati, S. (2011). Heterologous Proteins Production in *Escherichia coli*: An Investigation on the Effect of Codon Usage and Expression Host Optimization. *Cell Journal*.
- Moll, H. (2003). Dendritic cells and host resistance to infection. *Cell Microbiol*, *5*(8), 493-500.
- Moll, H., & Berberich, C. (2001). Dendritic cell-based vaccination strategies: induction of protective immunity against leishmaniasis. *Immunobiology*, *204*(5), 659-666. doi: 10.1078/0171-2985-00105
- Moll, H., Scharner, A., & Kampgen, E. (2002). Increased interleukin 4 (IL-4) receptor expression and IL-4-induced decrease in IL-12 production by Langerhans cells infected with *Leishmania major*. *Infect Immun*, *70*(3), 1627-1630.
- Moser, M., & Murphy, K. M. (2000). Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat Immunol*, *1*(3), 199-205. doi: 10.1038/79734
- Mosmann, T. R., & Coffman, R. L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*, *7*, 145-173. doi: 10.1146/annurev.iy.07.040189.001045
- Mullis, K. B., Erlich, H. A., Arnheim, N., Horn, G. T., Saiki, R. K., & Scharf, S. J. (1987). One of the first Polymerase Chain Reaction (PCR) patents: Google Patents.
- Murphy, K., Travers, P., and Walport, M., . (2008). *Janeway's Immunobiology*. New York, US: Garland Science, Taylor & Francis Group.
- Murray, H. W. (1997). Endogenous interleukin-12 regulates acquired resistance in experimental visceral leishmaniasis. *J Infect Dis*, *175*(6), 1477-1479.
- Naderer, T., & McConville, M. J. (2008). The *Leishmania*-macrophage interaction: a metabolic perspective. *Cell Microbiol*, *10*(2), 301-308. doi: 10.1111/j.1462-5822.2007.01096.x
- Nandan, D., Cherkasov, A., Sabouti, R., Yi, T., & Reiner, N. E. (2003). Molecular cloning, biochemical and structural analysis of elongation factor-1 alpha from *Leishmania donovani*: comparison with the mammalian homologue. *Biochem Biophys Res Commun*, *302*(4), 646-652.
- Negera, E., Gadisa, E., Hussein, J., Engers, H., Kuru, T., Gedamu, L., & Aseffa, A. (2012). Treatment response of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania aethiopia* to cryotherapy and generic sodium stibogluconate from patients in Silti, Ethiopia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, *106*(8), 496-503. doi: 10.1016/j.trstmh.2012.02.006
- Nierkens, S., Tel, J., Janssen, E., & Adema, G. J. (2013). Antigen cross-presentation by dendritic cell subsets: one general or all sergeants? *Trends Immunol*, *34*(8), 361-370. doi: 10.1016/j.it.2013.02.007

- Orlandi, P. A., Jr., & Turco, S. J. (1987). Structure of the lipid moiety of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *J Biol Chem*, 262(21), 10384-10391.
- Pandey, S., & Agrawal, D. K. (2006). Immunobiology of Toll-like receptors: Emerging trends. *Immunol Cell Biol*, 84(4), 333-341.
- Patronov, A., & Doytchinova, I. (2013). T-cell epitope vaccine design by immunoinformatics. *Open Biol*, 3(1), 120139. doi: 10.1098/rsob.120139
- Peirson, S. N., & Butler, J. N. (2007). RNA extraction from mammalian tissues. *Methods Mol Biol*, 362, 315-327. doi: 10.1007/978-1-59745-257-1_22
- Pelletier, I., Hashidate, T., Urashima, T., Nishi, N., Nakamura, T., Futai, M., . . . Sato, S. (2003). Specific recognition of *Leishmania major* poly-beta-galactosyl epitopes by galectin-9: possible implication of galectin-9 in interaction between *L. major* and host cells. *J Biol Chem*, 278(25), 22223-22230. doi: 10.1074/jbc.M302693200
- Peters, N. C., Egen, J. G., Secundino, N., Debrabant, A., Kimblin, N., Kamhawi, S., . . . Sacks, D. (2008). In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science*, 321(5891), 970-974. doi: 10.1126/science.1159194
- Peters, N. C., & Sacks, D. L. (2009). The impact of vector-mediated neutrophil recruitment on cutaneous leishmaniasis. *Cell Microbiol*, 11(9), 1290-1296. doi: 10.1111/j.1462-5822.2009.01348.x
- Pimenta, P. F., Saraiva, E. M., & Sacks, D. L. (1991). The comparative fine structure and surface glycoconjugate expression of three life stages of *Leishmania major*. *Exp Parasitol*, 72(2), 191-204.
- Puentes, S. M., Sacks, D. L., da Silva, R. P., & Joiner, K. A. (1988). Complement binding by two developmental stages of *Leishmania major* promastigotes varying in expression of a surface lipophosphoglycan. *J Exp Med*, 167(3), 887-902.
- Rafati, S., Zahedifard, F., & Nazgouee, F. (2006). Prime-boost vaccination using cysteine proteinases type I and II of *Leishmania infantum* confers protective immunity in murine visceral leishmaniasis. *Vaccine*, 24(12), 2169-2175. doi: 10.1016/j.vaccine.2005.11.011
- Rajeevan, M. S., Vernon, S. D., Taysavang, N., & Unger, E. R. (2001). Validation of array-based gene expression profiles by real-time (kinetic) RT-PCR. *J Mol Diagn*, 3(1), 26-31. doi: 10.1016/s1525-1578(10)60646-0
- Reis e Sousa, C. (2004). Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity. *Curr Opin Immunol*, 16(1), 21-25.
- Reis e Sousa, C., Hieny, S., Scharon-Kersten, T., Jankovic, D., Charest, H., Germain, R. N., & Sher, A. (1997). In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *J Exp Med*, 186(11), 1819-1829.
- Reithinger, R., Dujardin, J. C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B., & Brooker, S. (2007). Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis*, 7(9), 581-596. doi: 10.1016/s1473-3099(07)70209-8
- Reithinger, R., Mohsen, M., Wahid, M., Bismullah, M., Quinnell, R. J., Davies, C. R., . . . David, J. R. (2005). Efficacy of thermotherapy to treat cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica* in Kabul, Afghanistan: a randomized, controlled trial. *Clin Infect Dis*, 40(8), 1148-1155. doi: 10.1086/428736
- Remer, K. A., Apetrei, C., Schwarz, T., Linden, C., & Moll, H. (2007). Vaccination with plasmacytoid dendritic cells induces protection against infection with *Leishmania major* in mice. *Eur J Immunol*, 37(9), 2463-2473. doi: 10.1002/eji.200636780
- Ribeiro-Gomes, F. L., Otero, A. C., Gomes, N. A., Moniz-De-Souza, M. C., Cysne-Finkelstein, L., Arnholdt, A. C., . . . DosReis, G. A. (2004). Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. *J Immunol*, 172(7), 4454-4462.
- Rioux, J. A., Lanotte, G., Serres, E., Pratlong, F., Bastien, P., & Perieres, J. (1990). Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Annales de parasitologie humaine et comparee*, 65(3), 111-125.

- Roatt, B. M., Aguiar-Soares, R. D., Coura-Vital, W., Ker, H. G., Moreira, N., Vitoriano-Souza, J., . . . Reis, A. B. (2014). Immunotherapy and Immunochemotherapy in Visceral Leishmaniasis: Promising Treatments for this Neglected Disease. *Front Immunol*, *5*, 272. doi: 10.3389/fimmu.2014.00272
- Rodrigues, J., Godinho, J., & de Souza, W. (2014). Biology of Human Pathogenic Trypanosomatids: Epidemiology, Lifecycle and Ultrastructure. In A. L. S. Santos, M. H. Branquinha, C. M. d'Avila-Levy, L. F. Kneipp & C. L. Sodr  (Eds.), *Proteins and Proteomics of Leishmania and Trypanosoma* (Vol. 74, pp. 1-42): Springer Netherlands.
- Russell, D. G., & Alexander, J. (1988). Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with defined membrane antigens reconstituted into liposomes. *J Immunol*, *140*(4), 1274-1279.
- Sacks, D., & Noben-Trauth, N. (2002). The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol*, *2*(11), 845-858. doi: 10.1038/nri933
- Sacks, D. L., Brodin, T. N., & Turco, S. J. (1990). Developmental modification of the lipophosphoglycan from *Leishmania major* promastigotes during metacyclogenesis. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *42*(2), 225-233. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0166-6851\(90\)90165-I](http://dx.doi.org/10.1016/0166-6851(90)90165-I)
- Sacks, D. L., & da Silva, R. P. (1987). The generation of infective stage *Leishmania major* promastigotes is associated with the cell-surface expression and release of a developmentally regulated glycolipid. *J Immunol*, *139*(9), 3099-3106.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., . . . Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, *239*(4839), 487-491.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., & Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, *230*(4732), 1350-1354.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., & Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*, *155*(3), 1151-1164.
- Schmittgen, T. D., Zakrajsek, B. A., Mills, A. G., Gorn, V., Singer, M. J., & Reed, M. W. (2000). Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. *Anal Biochem*, *285*(2), 194-204. doi: 10.1006/abio.2000.4753
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*, *9*(7), 671-675.
- Schwarz, T., Remer, K. A., Nahrendorf, W., Masic, A., Siewe, L., Muller, W., . . . Moll, H. (2013). T cell-derived IL-10 determines leishmaniasis disease outcome and is suppressed by a dendritic cell based vaccine. *PLoS Pathog*, *9*(6), e1003476. doi: 10.1371/journal.ppat.1003476
- Shao, Q., Ning, H., Lv, J., Liu, Y., Zhao, X., Ren, G., . . . Qu, X. (2012). Regulation of Th1/Th2 polarization by tissue inhibitor of metalloproteinase-3 via modulating dendritic cells. *Blood*, *119*(20), 4636-4644. doi: 10.1182/blood-2011-08-376418
- Singh, O. P., Stober, C. B., Singh, A. K., Blackwell, J. M., & Sundar, S. (2012). Cytokine responses to novel antigens in an Indian population living in an area endemic for visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*, *6*(10), e1874. doi: 10.1371/journal.pntd.0001874
- Skeiky, Y. A., Kennedy, M., Kaufman, D., Borges, M. M., Guderian, J. A., Scholler, J. K., . . . Reed, S. G. (1998). LeIF: a recombinant *Leishmania* protein that induces an IL-12-mediated Th1 cytokine profile. *J Immunol*, *161*(11), 6171-6179.
- Slack, J. L., Schooley, K., Bonnert, T. P., Mitcham, J. L., Qwarnstrom, E. E., Sims, J. E., & Dower, S. K. (2000). Identification of two major sites in the type I interleukin-1

- receptor cytoplasmic region responsible for coupling to pro-inflammatory signaling pathways. *J Biol Chem*, 275(7), 4670-4678.
- Snapper, C. M., & Paul, W. E. (1987). Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science*, 236(4804), 944-947.
- Stager, S., & Rafati, S. (2012). CD8(+) T cells in leishmania infections: friends or foes? *Front Immunol*, 3, 5. doi: 10.3389/fimmu.2012.00005
- Stager, S., Smith, D. F., & Kaye, P. M. (2000). Immunization with a recombinant stage-regulated surface protein from *Leishmania donovani* induces protection against visceral leishmaniasis. *J Immunol*, 165(12), 7064-7071.
- Steinman, R. M., & Pope, M. (2002). Exploiting dendritic cells to improve vaccine efficacy. *J Clin Invest*, 109(12), 1519-1526. doi: 10.1172/jci15962
- Stritesky, G. L., & Kaplan, M. H. (2011). Changing the STATus quo in T helper cells. *Transcription*, 2(4), 179-182. doi: 10.4161/trns.2.4.16614
- Stritesky, G. L., Muthukrishnan, R., Sehra, S., Goswami, R., Pham, D., Travers, J., . . . Kaplan, M. H. (2011). The transcription factor STAT3 is required for T helper 2 cell development. *Immunity*, 34(1), 39-49. doi: 10.1016/j.immuni.2010.12.013
- Structural Genomics, C., Architecture et Fonction des Macromolécules, B., Berkeley Structural Genomics, C., China Structural Genomics, C., Integrated Center for, S., Function, I., . . . Complexes, S. (2008). Protein production and purification. *Nature methods*, 5(2), 135-146. doi: 10.1038/nmeth.f.202
- Sundquist, M., Rydstrom, A., & Wick, M. J. (2004). Immunity to *Salmonella* from a dendritic point of view. *Cell Microbiol*, 6(1), 1-11.
- Terpe, K. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol*, 72(2), 211-222. doi: 10.1007/s00253-006-0465-8
- Trombetta, E. S., & Mellman, I. (2005). Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu Rev Immunol*, 23, 975-1028. doi: 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104538
- Tsagozis, P., Karagouni, E., & Dotsika, E. (2004). Dendritic cells pulsed with peptides of gp63 induce differential protection against experimental cutaneous leishmaniasis. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 17(3), 343-352.
- Turco, S. J., Orlandi, P. A., Jr., Homans, S. W., Ferguson, M. A., Dwek, R. A., & Rademacher, T. W. (1989). Structure of the phosphosaccharide-inositol core of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *J Biol Chem*, 264(12), 6711-6715.
- Ueno, N., & Wilson, M. E. (2012). Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival. *Trends in Parasitology*, 28(8), 335-344. doi: 10.1016/j.pt.2012.05.002
- Usui, T., Nishikomori, R., Kitani, A., & Strober, W. (2003). GATA-3 suppresses Th1 development by downregulation of Stat4 and not through effects on IL-12Rbeta2 chain or T-bet. *Immunity*, 18(3), 415-428.
- Van Assche, T., Deschacht, M., da Luz, R. A. I., Maes, L., & Cos, P. (2011). *Leishmania*-macrophage interactions: Insights into the redox biology. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(2), 337-351. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.011>
- van Vliet, S. J., den Dunnen, J., Gringhuis, S. I., Geijtenbeek, T. B., & van Kooyk, Y. (2007). Innate signaling and regulation of Dendritic cell immunity. *Curr Opin Immunol*, 19(4), 435-440. doi: 10.1016/j.coi.2007.05.006
- van Zandbergen, G., Klinger, M., Mueller, A., Dannenberg, S., Gebert, A., Solbach, W., & Laskay, T. (2004). Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol*, 173(11), 6521-6525.
- Veldhoen, M., Hocking, R. J., Atkins, C. J., Locksley, R. M., & Stockinger, B. (2006). TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*, 24(2), 179-189. doi: 10.1016/j.immuni.2006.01.001

- Vickers, T. J., Wyllie, S., & Fairlamb, A. H. (2004). Leishmania major elongation factor 1B complex has trypanothione S-transferase and peroxidase activity. *J Biol Chem*, 279(47), 49003-49009. doi: 10.1074/jbc.M407958200
- von Stebut, E., Belkaid, Y., Jakob, T., Sacks, D. L., & Udey, M. C. (1998). Uptake of Leishmania major amastigotes results in activation and interleukin 12 release from murine skin-derived dendritic cells: implications for the initiation of anti-Leishmania immunity. *J Exp Med*, 188(8), 1547-1552.
- Vremec, D., & Shortman, K. (1997). Dendritic cell subtypes in mouse lymphoid organs: cross-correlation of surface markers, changes with incubation, and differences among thymus, spleen, and lymph nodes. *J Immunol*, 159(2), 565-573.
- Warren, T. L., Bhatia, S. K., Acosta, A. M., Dahle, C. E., Ratliff, T. L., Krieg, A. M., & Weiner, G. J. (2000). APC stimulated by CpG oligodeoxynucleotide enhance activation of MHC class I-restricted T cells. *J Immunol*, 165(11), 6244-6251.
- Yao, C., Donelson, J. E., & Wilson, M. E. (2003). The major surface protease (MSP or GP63) of Leishmania sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. *Mol Biochem Parasitol*, 132(1), 1-16.
- Zhu, J., Guo, L., Watson, C. J., Hu-Li, J., & Paul, W. E. (2001). Stat6 is necessary and sufficient for IL-4's role in Th2 differentiation and cell expansion. *J Immunol*, 166(12), 7276-7281.
- Zhu, J., Yamane, H., Cote-Sierra, J., Guo, L., & Paul, W. E. (2006). GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors. *Cell Res*, 16(1), 3-10. doi: 10.1038/sj.cr.7310002
- Γαϊτανάκη Κ., Κ. Ε., Παπαζαφείρη Π., Τσιτσιλώνη Ο. (2003). *ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑΣ*. Αθήνα: Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Βιολογίας
- Λ.Χ. Μαργαρίτης, Ε. Σ. Μ., Ι.Σ. Παπασιδέρη, Δ.Ι. Στραβοπόδης, Ι.Π. Τρουγκάκος. (2004). *ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΥΤΤΑΡΟΥ* (ed.). Αθήνα: Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας.

8. Παραρτήματα

Παραρτήμα I

- **Θρεπτικά υλικά**

Θρεπτικό υλικό βακτηρίων LB (Luria-Bertani, 1lt)*: NaCl (Applichem, Germany) 0,01% w/v, Τρυπτόνη (Applichem, Germany) 0,01% w/v, Yeast extract (Applichem, Germany) 0,005% w/v, αντιβιοτικό αμπικιλίνη (Ampicillin, Applichem, Germany)

*για την παρασκευή στερεού θρεπτικού υλικού προστίθεται άγαρ (Bac to Agar της BDH, Germany) 1.5% (w/v)

Θρεπτικό υλικό κυτταροκαλλιιεργειών RPMI:** θρεπτικό υλικό RPMI₁₆₄₀ 1X, pH 7.0 (Biochrome GmbH, Germany), 50mM L-γλουταμίνη (Applichem, Germany), 100U/mL πενικιλίνη και 100μg/mL στρεπτομυκίνη (PEST, Gibco, Invitrogen, UK), 10mM HEPES (Euroclone, EU)

** Το θρεπτικό υλικό καθίσταται πλήρες, με την προσθήκη 10% (v/v) ορού εμβρύου βοοειδούς (FBS: Fetal Bovine Serum, Biochrome GmbH, Germany). Ο ορός καθίσταται αδραντοποιημένος ως προς τους παράγοντες του συμπληρώματος με θέρμανση στους 56 °C για 30 λεπτά.

- **Επαγωγέας πρωτεϊνοσύνθεσης**

β-ισοπρότυλο-D-θειογαλακτοζίδιο (IPTG, C₉H₁₈O₅S, Biochemica, Germany)

- **Διαλύματα απομόνωσης πρωτεΐνης LdeEF-2**

Διάλυμα λύσης βακτηρίων

50mM NaH₂PO₄ · 2H₂O (Fluka, Switzerland), 300mM NaCl (Applichem, Germany), μερικοί κόκκοι λυσοζύμης (Sigma, Germany), Triton X-100 (Fluka, Switzerland) 0,1% (v/v), 1mM PMSF (αναστολέας πρωτεασών: Phenylmethanesulfonyl fluoride, Sigma-Aldrich, Germany), Πεπστατίνη (Sigma-Aldrich, Germany) 4 μg/ml, 20mM Ιμιδαζόλιο (Fluka, Switzerland)

Διάλυμα NPI10 (pH 8.0 με NaOH)

50 mM NaH₂PO₄ · 2H₂O (Fluka, Switzerland), 300 mM NaCl (Applichem, Germany),
10 mM Ιμιδαζόλιο (Fluka, Switzerland)

Διάλυμα DNPI10 (pH 8.0 με NaOH)

50 mM NaH₂PO₄ · 2H₂O (Fluka, Switzerland), 300 mM NaCl (Applichem, Germany),
10 mM Ιμιδαζόλιο (Fluka, Switzerland), 8M Ουρία (Applichem, Germany)

Διάλυμα NPI20 (pH 8.0 με NaOH)

50 mM NaH₂PO₄ · 2H₂O (Fluka, Switzerland), 300 mM NaCl (Applichem, Germany),
20 mM Ιμιδαζόλιο (Fluka, Switzerland)

Διάλυμα NPI250 (pH 8.0 με NaOH)

50 mM NaH₂PO₄ · 2H₂O (Fluka, Switzerland), 300 mM NaCl (Applichem, Germany),
250 mM Ιμιδαζόλιο (Fluka, Switzerland)

Διαλυμα γλυκερόλης σε NPI250

Γλυκερόλη (Applichem, Germany) 10% (v/v)

- **Διαλύματα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών (SDS-PAGE)**

Διάλυμα ακρυλαμιδίου 30% (w/v) (100ml)

Ακρυλαμίδιο (C₃H₅NO, Sigma) 29,2 g, N,N-μεθυλεν-δισακρυλαμίδιο(C₇H₁₀N₂O₂,
Sigma, Germany) 0,8 g

Πήκτωμα διαχωρισμού (Separating gel) 12% (5ml)

1,5M Tris-HCl (Applichem, Germany) pH 8,8, 1,3 ml, SDS (Sigma,Germany) 10%
(w/v), 0,05 ml, διάλυμα ακρυλαμιδίου (Sigma, Germany) 30% (w/v) 2 ml, υπερθειικό
αμμώνιο (APS: Ammonium per sulfate,Applichem, Germany) 10% (w/v) 50 μl,
TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine, Bio-Rad, USA) 2 μl, ddH₂O 1.7 ml

Πήκτωμα συσσώρευσης (stacking gel) 4% (w/v) (5ml)

1M Tris-HCl (Applichem, Germany) pH 6,8, 0.63 ml, SDS (Sigma, Germany) 10% (w/v), 0,05 ml διάλυμα ακρυλαμιδίου (Sigma, Germany) 30% (w/v), 0.83 ml, υπερθειικό αμμώνιο (APS: Ammonium per sulfate, Applichem, Germany) 10% (w/v), 50 µl, TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine, Bio-Rad,USA) ,5 µl, ddH₂O , 3.4 ml

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (500ml)

Tris-base (Applichem, Germany) 1,5 g, Γλυκίνη (Applichem, Germany) 7 g, SDS (Sigma, Germany) 20% (w/v) 5 ml

Διάλυμα «φόρτωσης» δείγματος πρωτεϊνών (5X Laemli sample buffer, 20ml)

SDS 2% (w/v), 2 g, 60mM Tris-HCl (Applichem, Germany) pH 6.8, 4 ml, β-μερκαπτοαιθανόλη 5% (v/v), 5 ml, γλυκερόλη 10% (v/v), 10 ml, μπλε της βρωμοφαινόλης (Applichem, Germany) 0.01% (w/v), 1 ml

Μίγμα πρωτεϊνών αναφοράς γνωστού μοριακού βάρους

LMW (Amersham, BioSciences, UK)

Διάλυμα χρώσης (Coomasie stain)

Χρωστική Coomassie R-250 0,25% (w/v), μεθανόλη (CH₃OH, Applichem, Germany) 40% (v/v), οξικό οξύ (CH₃COOH, Applichem, Germany) 10% (v/v)

Διάλυμα αποχρωματισμού (Destain buffer)

Μεθανόλη (CH₃OH, Applichem, Germany) 25% (v/v), οξικό οξύ (CH₃COOH, Applichem, Germany) 10% (v/v)

- **Διαλύματα για την απομόνωση και καλλιέργεια κυττάρων από BALB/c ποντίκια**

Αιθανόλη 70% (v/v)

Χρωστική Trypan Blue (BDH Chemicals Ltd, Poole, England)

Διάλυμα λύσης χλωριούχου αμμωνίου ACK: 0,15M NH₄Cl (Sigma, Germany), 1 mM KHCO₃ (Sigma, Germany), 0,1 mM Na₂EDTA (Sigma,Germany)

Ανασυνδυσασμένος παράγοντας διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων/μακροφάγων (Recombinant Mouse Granulocyte Macrophage Cell Stimulating Factor rm-GM-CSF, Peprotech)

CpG ODN (Invivogen, USA)

LPS (Sigma-Aldrich, Germany)

- **Διαλύματα για την προετοιμασία και εκτέλεση της κυτταρομετρίας ροής**

PBS (Phosphate-buffered-saline) 10×, pH 7,4: 1,37M NaCl (Sigma, Germany), 27 mM KCl (Merck, Germany), 43 mM Na₂HPO₄ (Merck, Germany), 14 mM KH₂PO₄ (Merck, Germany)

FACs Buffer: PBS 1×, FBS 3%v/v

μπρεφελδίνη A (Applichem, Germany)

Διάλυμα μονιμοποίησης: παραφορμαλδεΰδη 2% w/v σε PBS 1×

Διάλυμα Διαπερατοποίησης (permeabilization buffer): σαπωνίνη (1×) 0,1% (v/v) σε FACs Buffer

Μονοκλωνικά αντισώματα συζευγμένα με φυκοερυθρίνη (PE): anti-mouse CD11c (clone HL3, BD Biosciences, Erembodegem, Belgium), anti-mouse CD8α (Ly-2) (clone 53-6.7, BD Biosciences, Erembodegem, Belgium), anti-mouse CD40 (clone 3/23, BD Biosciences, Erembodegem, Belgium), anti-mouse CD86 (clone GL-1, BD Biosciences, Erembodegem, Belgium), anti-mouse I-A/I-E (clone M5/114.15.2, BD Biosciences, Erembodegem, Belgium), anti-IL12p40/p7 (clone C15.6, BD Biosciences, Erembodegem, Belgium) anti-IL10 (clone JS5-16E3, BD Biosciences, Erembodegem, Belgium)

- **Διαλύματα για την προετοιμασία και εκτέλεση της *in vitro* αντιγονοπαρουσίασης**

Κονκαναβαλίνη A (Sigma, Germany)

Τριτιωμένη θυμιδίνη 5 mCi/ml (methyl-³H, Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA)

Υγρό σπινθηρισμού (Wallac, Turcu, Finland)

Παράρτημα II

- **Αναλώσιμα υλικά**

Τρυβλία “petri” για στερεή καλλιέργεια βακτηρίων διαμέτρου 100 mm (Greiner Bio-one, Germany)

Πλαστικά ορολογικά σιφώνια όγκου 2 ml, 5 ml, 10 ml (Greiner Bio-one, Germany)

Πλαστικοί δοκιμαστικοί σωλήνες όγκου 15 ml, 50 ml (Greiner Bio-one, Germany)

Πλαστικοί σωλήνες “erpendorf” 1,5 ml (Greiner Bio-one, Germany),

Πλαστικές κυψελίδες φωτομέτρησης μίας χρήσης (Sarstedt, USA),

Πλαστικά ακρορύγχια (tips) (Greiner Bio-one, Germany)

Parafilm M (Bemis Flexible Packaging, Neenah, WI)

Σύριγγες όγκου 5 ml (Nipro, Osaka, Japan)

Βελόνες 27GX1/2 inch (Nipro, Osaka, Japan)

Φίλτρα διαμέτρου πόρων 70 μm (Falcon, Germany)

Καλυπτρίδες (Knittel Gluss, Germany)

Πλάκα 24 φρεατίων για την καλλιέργεια κυττάρων (Cell Star Greiner Bio-one, cell culture plate, Germany)

Πλάκες μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων (Greiner bio-one, Germany)

Πλάκα 96 κοίλων φρεατίων για την καλλιέργεια κυττάρων (Sarstedt, Newton, NC, USA)

Πλαστικοί δοκιμαστικοί σωλήνες κυτταρομετρίας όγκου 5 ml (Sarstedt, Germany)

Διηθητικό χαρτί επικαλυμμένο με πλέγμα από ίνες γυαλιού (Wallac, Turcu, Finland)

Μεμβράνες εμποτισμού με υγρό σπινθηρισμού (Wallac, Turcu, Finland)

Παράρτημα III

- **Τεχνολογικός εξοπλισμός**

Λύχνος Bunsen

Ζυγοί: μικροζυγός ακριβείας και αναλυτικός ζυγός (Kern 430-33, Albstadt, Germany και Mettler AE50, Switzerland αντίστοιχα)

Πιπέτες μεταβλητού όγκου 1000 μl/200 μl/20 μl (Pipetman P1000, P200, P20, Gilson, France), 10 μl (Brand, Germany)

Πολυκάναλη πιπέτα μεταβλητού όγκου 200 μl (Brand Transferpette S-8, Germany)

Ηλεκτρικές πιπέτες (Accu-jet pro, Brand, Germany)

Πεχάμετρο (Orion 2-Star pH Benchtop Meter, Thermo Scientific, Germany)

Vortex (Heidolph Top-mix 94323 Bioblock, Germany)

Επιτραπέζια φυγόκεντρος (JOUAN CR3i multifunction centrifuge, Thermo Electron Corporation, France)

Επιτραπέζια μικροφυγόκεντρος (Heraeus, Sepatech, Biofuge 13 ,Thermo Electron Corporation, Germany)

Επιτραπέζια φυγόκεντρος με μεταβλητή γωνιακή κλίση (Centurion Scientific)

Επιτραπέζια φυγόκεντρος (Centrifuge 5417 R, Eppendorf, Germany)

Συσκευή υπερήχων (Hielscher up 100H, Germany)

Συσκευή κυκλικής ανάδευσης (P –Selecta, Abrera, Barcelona, Spain)

Επωαστήρας για την καλλιέργεια βακτηρίων υπό ανάδευση (Lab Tech, Korea)

Επωαστικός Θάλαμος (Heraeus, Thermo Electron Corporation, Germany)

Θερμαινόμενη πλάκα (Bioblock Scientific, Sybron/Thermolyne, Germany)

Συσκευές κάθετης ηλεκτροφόρησης για την ανάλυση πρωτεϊνών (Mini-Protean II, Maxi-Protean Biorad, USA)

Φασματοφωτόμετρο (SmartSpec Plus Spectrophotometer 273BR, 03522, Biorad, USA)

Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής (Telstar Class II Cabinet, France)

Οπτικό μικροσκόπιο (Olympus, Japan)

Ανάστροφο μικροσκόπιο (Olympus, Japan)

Πλάκα μικροσκοπικής αιμοκυτταρομέτρησης Malassez (WSCHRECH, HOFHEIN/TS)

Κλίβανος ανάπτυξης κυτταροκαλλιεργειών (Eppendorf Galaxy 170S, Germany)

Ξηρός κλίβανος 60 °C

Κυτταρομετρητής ροής (FACS Calibur, Becton Dickinson)

Συσκευή περισυλλογής κυττάρων (Cell harvester, Skatron, Norway)

Μετρητής β-ακτινοβολίας (Wallac, Turcu, Finland)

Φασματοφωτομετρικός μετρητής πλακών ELISA (MRX, Dynatech Laboratories, Great Britain)

Παράρτημα IV

- **Σκεύη**

Ογκομετρικοί κύλινδροι όγκου 1 lt

Γυάλινες κωνικές φιάλες όγκου 2 lt

Μεταλλικός κρίκος εμβολιασμού

Αποστειρωμένο μεταλλικό ψαλίδι ανατομίας με αιχμηρά άκρα

Αποστειρωμένη μεταλλική λαβίδα με πεπλατυσμένα άκρα

Αποστειρωμένα πλαστικά και γυάλινα δοχεία όγκου 500 ml, 1.000 ml αντίστοιχα

Πλαστικοί κύλινδροι φυγοκέντρωσης όγκου 250 ml

