

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών  
«Εφαρμογές Μοριακής Βιολογίας – Μοριακή Γενετική, Διαγνωστικοί  
Δείκτες»

**ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΛΟΤΥΠΩΝ LEISHMANIA ΣΕ ΣΚΥΛΟΥΣ ΤΗΣ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**



*ΑΧΙΛΛΕΑΣ Χ. ΚΡΗΤΙΚΟΣ*

*ΜΑΡΤΙΟΣ 2012*

*ΛΑΡΙΣΑ*

## *Τριμελής Επιτροπή*

*Ματθιόπουλος Κωνσταντίνος,*

*Αναπληρωτής Καθηγητής του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.*

*Πτεινάκη Ευθυμία,*

*Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.*

*Μόσιαλος Δημήτριος*

*Επίκουρος Καθηγητής του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.*

# ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Επιβλέπων υπήρξε ο κ. Ματθιόπουλος Κωνσταντίνος, Αναπληρωτής Καθηγητής του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω θερμά για την παραχώρηση του εργαστηριακού χώρου, την υπόδειξη του θέματος, τη συνεχή καθοδήγηση και βοήθειά του, καθώς και τις χρήσιμες συμβουλές του.

Ιδιαίτέρως, θέλω να ευχαριστήσω τα μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, την κα Πετεινάκη Ευθυμία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και τον κ. Μόσιαλο Δημήτριο, Επίκουρο Καθηγητή του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Γκουγκουλή Δημήτριο, καθώς και την Κτηνιατρική Κλινική Λάρισας, για την παροχή των κλινικών δειγμάτων, τα οποία ήταν απαραίτητα για τη διεξαγωγή των πειραμάτων.

Ευχαριστώ θερμά τον κ. Λουλέ Γεδεών, για την συνεργασία μας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στους συναδέλφους μου στο εργαστήριο, για τη βοήθειά τους, για την άψογη συνύπαρξή μας και τις ευχάριστες και όμορφες στιγμές: Μαριλένα, Βαλάντη, Γιώργο, Έφη και Κώστα.

Ευχαριστώ το φίλο Ενωτιάδη Απόστολο, για τη βοήθειά του στη συλλογή πληροφοριών, κατά το στάδιο της συγγραφής της παρούσας διπλωματικής.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στους γονείς μου και τη Γιούλη, καθώς δεν έπαψαν στιγμή να είναι δίπλα μου, να στηρίζουν την κάθε επιλογή μου και να μου συμπαραστέκονται, δίνοντάς μου κουράγιο και δύναμη να συνεχίσω..

# Περιεχόμενα

1. Περίληψη	1
2. Εισαγωγή	2
3. Θεωρητικό μέρος	3
3.1 Γενικά στοιχεία	4
3.2 Το παράσιτο <i>Leishmania</i> ssp.	5
3.2.1 Βιολογικός κύκλος	7
3.2.2 Το γονιδίωμα του παρασίτου <i>Leishmania</i>	9
3.2.3 Ταξινόμηση των ειδών <i>Leishmania</i>	12
3.2.4 Γεωγραφική κατανομή των ειδών <i>Leishmania</i>	14
3.2.5 Η λεισμανίαση στην Ελλάδα	18
3.3 Kinetoplastida	18
3.3.1 Δομή δικτύου kDNA	20
3.3.2 Δομικά συστατικά του δικτύου kDNA	22
3.3.2.1 Maxicircles	22
3.3.2.2 Minicircles	23
3.4 Αντιγραφή δικτύου kDNA	24
3.4.1 Αντιγραφή minicircles	25
3.4.2 Αντιγραφή maxicircles	28
3.5 RNA editing – Μηχανισμός μετα-μεταγραφικών τροποποιήσεων	30
3.6 Διάγνωση της νόσου	32
3.6.1 Παρασιτολογικές μελέτες	33
3.6.2 Ορολογικές μελέτες	33
3.6.3 Μοριακή διάγνωση	34
3.7 Στόχος	35
4. Πειραματικό μέρος	36
4.1 Απομόνωση DNA από αίμα	38
4.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	41
4.3 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης	47
4.4 Gel extraction	49
4.5 Μοριακή κλωνοποίηση	51
4.5.1 Αντίδραση σύνδεσης	52
4.5.2 Ηλεκτροδιάτρηση (Electroporation)	56
4.5.3 Επίστρωση τρυβλίων	57
4.5.4 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA	59
4.5.5 Πέψη πλασμιδιακού DNA	61
4.5.6 Καθαρισμός πλασμιδιακού DNA	63
4.6 Εργαλεία βιοπληροφορικής	64

<b>5. Αποτελέσματα</b>	<b>66</b>
5.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	67
5.2 Πέψη πλασμιδιακού DNA	70
5.3 Αποτελέσματα αλληλούχισης	71
5.4 Αποτελέσματα στοίχισης	78
<b>6. Συζήτηση</b>	<b>86</b>
<b>7. Βιβλιογραφία</b>	<b>96</b>

# 1. Περίληψη

Τα παράσιτα του γένους *Leishmania*, είναι διφασικά πρωτόζωα, τα οποία χαρακτηρίζονται από την παρουσία ενός μοναδικού στη φύση του μιτοχονδριακού τύπου οργανιδίου, του κινητοπλάστη. Ο κινητοπλάστης αποτελεί το εργοστάσιο παραγωγής ενέργειας του παρασίτου και φέρει μία από τις πολυπλοκότερες δομές μιτοχονδριακού DNA που απαντάται σήμερα στη φύση, το δίκτυο μορίων kDNA. Τα μόρια του δικτύου, παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία ανάμεσα στα διάφορα είδη της οικογένειας Trypanosomatidae και εξαιτίας της έντονης παρουσίας τους στο παράσιτο, μπορούν να αποτελέσουν τους πλέον ευαίσθητους στόχους μοριακής διάγνωσης μέσω PCR.

Σκοπός της παρούσας μελέτης, ήταν η ανίχνευση κάποιων πιθανών πολυμορφισμών (SNPs) στην αλληλουχία των minicircles του δικτύου kDNA, οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την ανάπτυξη ανθρωποφιλικών και ζωοφιλικών χαρακτηριστικών στα διάφορα είδη του παρασίτου *Leishmania*. Το γεγονός ότι το 40% των σκύλων της Θεσσαλίας, έχει βρεθεί θετικοί στο παράσιτο, γεννά πολλά και αναπάντητα ερωτήματα, σχετικά με την προτίμηση του παρασίτου στα ζώα, έναντι του ανθρώπου. Τα ποσοστά ανθρώπινων κρουσμάτων που έχουν καταγραφεί είναι ελάχιστα. Η ανάλυση της αλληλουχίας ενός πολύ ιδιαίτερου και πολυμορφικού γενετικού τύπου, όπως είναι τα μόρια του kDNA, ίσως να μπορέσει να δώσει απαντήσεις σ' αυτό το πολύ περίεργο γεγονός. Για το σκοπό της μελέτης μας, 16 δείγματα σκύλων και ένα αντίστοιχο ανθρώπινο, απομονώθηκαν από την ευρύτερη περιοχή της Θεσσαλίας και ανιχνεύτηκαν για την παρουσία του παρασίτου. Η αλληλούχιση των προϊόντων ενίσχυσης της PCR, κρίθηκε αναγκαία σε πρώτη φάση για τον προσδιορισμό του είδους *Leishmania* σε κάθε δείγμα. Η στοίχιση των αποτελεσμάτων μας και η σύγκρισή τους με τις πρότυπες αλληλουχίες kDNA από τη βάση δεδομένων, μας έδωσε τη δυνατότητα προσδιορισμού και αξιολόγησης της σημασίας των πολυμορφισμών (SNPs) για την εξαγωγή συμπερασμάτων, σχετικά με τον πιθανό ρόλο τους στον παρασιτισμό που αναπτύσσουν τα διάφορα στελέχη του γένους *Leishmania*.

## 2. Εισαγωγή

Η λεισμανίαση είναι ζωννόσος, γνωστή από πολύ παλιά. Σχέδια σε αντικείμενα εποχής αποδεικνύουν την ύπαρξη της ασθένειας εδώ και πολλά χρόνια. Μοριακά αποτυπώματα του παρασίτου, έχουν ανιχνευτεί και ταυτοποιηθεί στις μούμιες της αρχαίας Αιγύπτου (Kupfer et al. 2006). Η νόσος φαίνεται να έκανε την εμφάνισή της στην Αφρική και στην Ασία, τουλάχιστον από τα μέσα του 18<sup>ου</sup> αιώνα. Σήμερα, υπολογίζεται ότι υπάρχουν πάνω από 14.000.000 περιπτώσεις καταγεγραμμένες σε όλη την υφήλιο και κάθε χρόνο προστίθενται 2.000.000 νέα κρούσματα (WHO 2006).

Το παράσιτο περιγράφηκε το 1903 από τον Άγγλο στρατιωτικό χειρουργό William Boog Leishman και χωριστά από τον Charles Donovan σε δείγματα σπλήνας με μικροσκοπικές παρατηρήσεις. Προς τιμή των ερευνητών, το πρώτο παράσιτο που απομονώθηκε, ονομάστηκε *Leishmania donovani* (Gibson 1983). Η σχέση των φλεβοτόμων (σκνίπα) με τη μετάδοση της ασθένειας αποδείχθηκε το 1931-1934 στην Ινδία. Σήμερα, ένα αιώνα μετά, τα χαρακτηριστικά της νόσου, καθώς και τα κλινικά σύνδρομα που προκαλεί παραμένουν ίδια. Ωστόσο, η εξέλιξη της τεχνολογίας έχει δώσει νέες δυνατότητες μελέτης και κατανόησης του μηχανισμού δράσης της ασθένειας. Η επέκταση της νόσου σε νέες περιοχές, σε χώρες ανεπτυγμένες, καθώς και η συνεξέλιξή της με την ασθένεια του AIDS (Alvar et al. 2008) έχουν προκαλέσει πολλά ερωτήματα, τα οποία οδήγησαν στην ανάγκη για μία πιο εκτεταμένη έρευνα.

### ***3. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ***



### 3.1 Γενικά στοιχεία

Τα πρωτόζωα που ανήκουν στο γένος *Leishmania*, φύλο *Sarcomastigophora*, τάξη *Kinetoplastida*, οικογένεια *Trypanosomatidae* (Kassai et al. 1988), είναι διφασικά ενδοκυττάρια παράσιτα και αποτελούν το βασικό αίτιο της λεισμανιάσης τόσο στον άνθρωπο, όσο και στα ζώα. Τα περίπου 30 είδη του γένους *Leishmania*, μπορούν να μολύνουν τον άνθρωπο, το σκύλο, τα είδη της οικογένειας *Canidae* (αλεπού, τσακάλια), το άλογο, το πρόβατο, τη γάτα, καθώς και ένα μεγάλο αριθμό πτηνών και ερπετών (Gramiccia 2005). Η νόσος εκδηλώνεται με δύο πολύ βασικές μορφές, τη δερματική (CL) και τη σπλαχνική λεισμανίαση (VL), ενώ απαντώνται και ενδιάμεσες μορφές της ασθένειας, όπως η δερματοβλενογόνος λεισμανίαση (MCL) (Pavli 2010) .

Το παράσιτο μεταδίδεται με το νύγμα της θηλυκής σκνίπας του γένους *Phlebotomus* sp., το οποίο αποτελεί και τον ενδιάμεσο ξενιστή. Κύριος ξενιστής του παρασίτου θεωρείται ο σκύλος, αν και πολλά είδη *Leishmania* έχουν χαρακτηριστεί και ως ανθρωποφιλικά (Zavitsanou et al. 2008).

Η κλινική εκδήλωση της ασθένειας, εξαρτάται από το είδος του παρασίτου και την ευαισθησία του ξενιστή (Bray 1974). Η σπλαχνική λεισμανίαση θεωρείται και η πιο σοβαρή μορφή της νόσου, καθώς επιφέρει το θάνατο στο 75-95 % των περιπτώσεων, αν δεν εφαρμοστεί σύντομα κατάλληλη φαρμακευτική αγωγή (Guerin et al. 2002).

Η λεισμανίαση απαντάται γεωγραφικά σε πέντε ηπείρους (εκτός από Αυστραλία και Ανταρκτική) και είναι ενδημική στις τροπικές και υποτροπικές περιοχές 88 χωρών. Τελευταία δεδομένα, δείχνουν ότι εκατομμύρια άνθρωποι σε όλο τον κόσμο, μολύνονται κάθε χρόνο από το παράσιτο (1,5 με 2 εκατομμύρια περιστατικά καταγράφονται επισήμως), ενώ δεδομένου της έλλειψης βασικών τεχνολογικών μέσων στις υπανάπτυχτες χώρες, δεν υπάρχει καμία αμφιβολία ότι τα πραγματικά περιστατικά είναι πολλαπλάσια από τα επίσημα (Desjeux 2004).

### 3.2 Το παράσιτο *Leishmania* ssp.

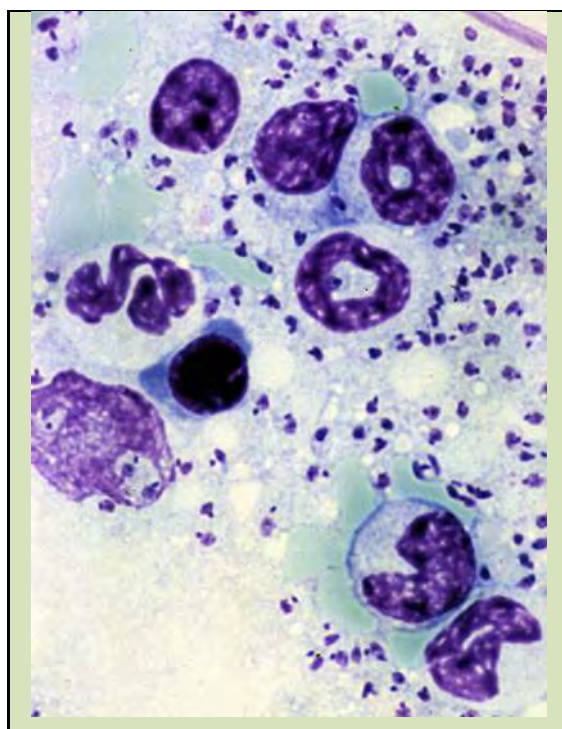
Το παράσιτο του γένους *Leishmania*, φαίνεται να εμφανίζει δύο μορφολογικά στάδια, τα οποία εναλλάσσονται μέσα στον βιολογικό του κύκλο: την εξωκυττάρια προμαστιγωτή μορφή ή λεπτομονάδα που αναπτύσσεται και πολλαπλασιάζεται στο έντερο του ασπόνδυλου, ενδιάμεσου ξενιστή (σκνίπα) και την ενδοκυττάρια αμαστιγωτή μορφή, η οποία απαντάται στα μονοπύρηνα/μακροφάγα του τελικού ξενιστή (σπονδυλωτά).

Στην προμαστιγωτή μορφή, το σώμα του παρασίτου είναι επίμηκες, με διαστάσεις περίπου 9-12  $\mu\text{m}$  μήκος και 2-3  $\mu\text{m}$  πλάτος. Φέρει μαστίγιο που εκφύεται από το πρόσθιο σώμα του παρασίτου και το οποίο βοηθάει στην κίνηση (Waki et al. 2007). Στο κέντρο του σώματος εντοπίζεται ένας μεγάλος σφαιρικός πυρήνας με διακεκριμένο πυρηνίσκο και περιφερική χρωματίνη. Στο κυτταρόπλασμα συναντώνται πολυάριθμα ριβοσωμάτια, συσκευή Golgi, λυσοσώματα, καθώς και πλήρως ανεπτυγμένο λείο και αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο (De Souza 2010). Κοντά στη βάση του μαστιγίου, εντοπίζεται ένα οργανίδιο μιτοχονδριακής φύσης, χαρακτηριστικό της οικογένειας Trypanosomatidae, το οποίο ονομάζεται κινητοπλάστης. Το οργανίδιο αυτό, αποτελεί το εργοστάσιο παραγωγής ενέργειας του παρασίτου και φέρει την πολυπλοκότερη μορφή μιτοχονδριακού DNA που συναντάμε σήμερα στη φύση, το δίκτυο των μορίων kDNA (Kallinikova 1981). Εάν παρεμποδιστεί η αντιγραφή του DNA του κινητοπλάστη με την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου, η παραγωγή ενέργειας μειώνεται δραματικά μέσα στο παράσιτο, οδηγώντας με μαθηματική ακρίβεια στον κυτταρικό του θάνατο (Biscardi et al. 2001).

Η αμαστιγωτή μορφή, είναι ωοειδής με διάμετρο περίπου 2-6  $\mu\text{m}$  και πάχος 1,5-2  $\mu\text{m}$  και φέρει έναν έκκεντρο πυρήνα με πυρηνίσκο και έναν κινητοπλάστη, που καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο μέρος του κυττάρου. Το υπόλοιπο τμήμα περιλαμβάνει τα ίδια οργανίδια με την προμαστιγωτή μορφή του παρασίτου, που όμως είναι λιγότερο ανεπτυγμένα. Οι αμαστιγώτες πολλαπλασιάζονται μέσα στα φαγολυσosώματα των μακροφάγων (De Souza 2010).



**Εικόνα 3.1:** Παράσιτα *Leishmania* στο στάδιο του προμαστιγώτη. Το βέλος δείχνει την θέση του κινητοπλάστη, κοντά στην βάση του μαστιγίου.



**Εικόνα 3.2:** Ενδοκυττάρειες αμαστίγωτες μορφές *leishmania* σε φαγολυσσώματα μακροφάγων, μετά από χρώση Giemsa.

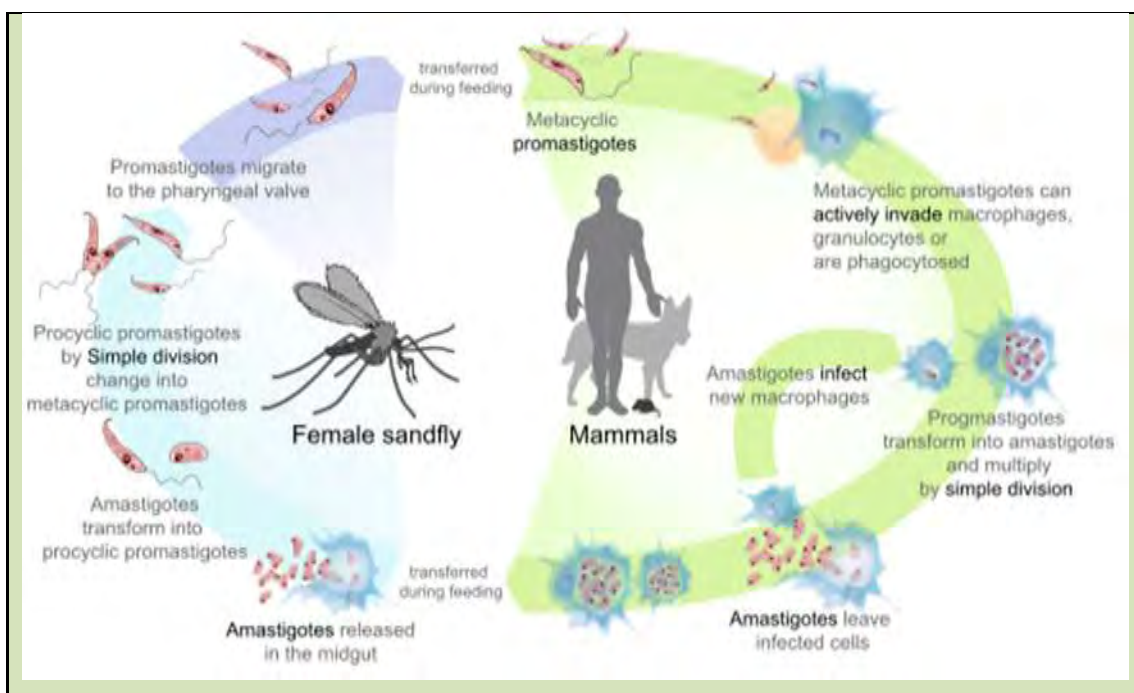
### 3.2.1 Βιολογικός κύκλος

Τα παράσιτα του γένους *Leishmania* είναι διφασικά πρωτόζωα, τα οποία εναλλάσσονται μεταξύ της προμαστιγοφόρου και αμαστιγοφόρου μορφής και ολοκληρώνουν το βιολογικό τους κύκλο σε σπονδυλωτούς και ασπόνδυλους ξενιστές (Wheeler et al. 2011). Ως ενδιάμεσοι ξενιστές, θεωρούνται κυρίως οι θηλυκές σκνίπες του γένους *Phlebotomus* sp. στις χώρες του Παλαιού Κόσμου (Ευρώπη, Αφρική, Ασία) και του γένους *Lutzomyia* sp. στις χώρες του Νέου Κόσμου (Αμερική) (Kato et al. 2010).

Οι ωοειδείς αμαστιγοφόρες μορφές, χαρακτηρίζονται από την παρουσία ενός ιδιαίτερου οργανιδίου μιτοχονδριακής φύσης, του κινητοπλάστη, το οποίο φέρει μία από τις πιο περίπλοκες μορφές μιτοχονδριακού DNA στη φύση, το δίκτυο kDNA (Lukes et al. 2002). Όπως διακρίνουμε στην εικόνα 3.3, οι αμαστιγοφόρες μορφές προσλαμβάνονται από τη σκνίπα κατά την απομύζηση αίματος, απελευθερώνονται στο πίσω τμήμα του μεσεντέρου, μετατρέπονται σε κινητές προμαστιγοφόρες μορφές, πολλαπλασιάζονται ταχύτατα με δυαδική διχοτόμηση και προσκολλώνται σε διάφορα σημεία του μεσεντέρου του εντόμου, μέσω μιας λιποφωσφογλυκάνης (Volf et al. 2008). Στη συνέχεια, μετατρέπονται σε μολυσματικές μετακυκλικές προμαστιγοφόρες μορφές, οι οποίες μεταναστεύουν στην οισοφαγική βαλβίδα και από εκεί στα στοματικά μόρια της σκνίπας). Η μορφή που έχει το παράσιτο σε αυτή τη φάση είναι και η μολυσματική. Αυτές οι μολυσματικές μορφές, μεταδίδονται στους σπονδυλωτούς ξενιστές με το νύγμα (τσίμπημα) των φλεβοτόμων, κυρίως με αναγωγή από το θωρακικό μεσέντερο στο δέρμα του ξενιστή. Εκεί, οι μολυσματικές προμαστιγοφόρες μορφές φαγοκυτταρώνονται από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα Langerhans (επιδερμίδα), από τα δεντριτικά κύτταρα στο χόριο και από τα μακροφάγα, όπου μεταπίπτουν και πάλι στην ωοειδή αμαστιγοφόρο μορφή (Bates 2007). Οι αμαστιγοφόρες μορφές του παρασίτου καταφέρνουν να επιζήσουν και να πολλαπλασιαστούν στο όξινο περιβάλλον των φαγολυσσωμάτων των μακροφάγων. Τελικά, επέρχεται η λύση των κυττάρων αυτών και οι αμαστιγώτες ελευθερώνονται έτοιμοι να μολύνουν άλλα μονοπύρηνα/μακροφάγα κύτταρα (Antoine et al. 1990). Η καταστροφή των κυττάρων και η προσβολή νέων είναι μία διαδικασία που επαναλαμβάνεται, συνήθως, κάθε 12-24 ώρες. Όταν η

ενδοκυττάρια ανάπτυξη των αμαστιγωτών παραμένει εντοπισμένη στο σημείο του ενοφθαλμισμού, οι κυτταροκίνες που ελευθερώνονται οδηγούν στην εντοπισμένη δερματική αλλοίωση (Cutaneous Leishmaniasis). Σε άλλες περιπτώσεις, τα μολυσμένα μακροφάγα μεταναστεύουν από το αίμα σε άλλους ιστούς, μολύνοντας έτσι το σπλήνα, το συκώτι και το μυελό των οστών. Στην περίπτωση αυτή, αναφερόμαστε στη σπλαχνική μορφή της λείσμανιάσης (Hommel 1999).

Οι θηλυκές φλεβοτόμοι μολύνονται, όταν με τη σειρά τους απομυζήσουν αίμα από μολυσμένους σκύλους ή άλλους ξενιστές, προσλαμβάνοντας τις αμαστιγοφόρες μορφές, οι οποίες φέρονται μέσα στα μακροφάγα. Μέσα στο γεύμα αίματος, οι αμαστίγωτες μορφές μετατρέπονται και πάλι σε κινούμενους προμαστιγώτες (μετακυκλικοί προμαστιγώτες) και ο κύκλος ζωής του παρασίτου επαναλαμβάνεται (Volf et al. 2008).



**Εικόνα 3.3:** Ο βιολογικός κύκλος της Leishmania: Κατά το τσίμπημα ενός μολυσμένου σπονδυλωτού, η σκνίπα προσλαμβάνει αμαστιγοφόρες μορφές του παρασίτου. Οι αμαστιγοφόρες μορφές, μετατρέπονται σε κινητές προμαστιγοφόρες μορφές μέσα σε διάφορα τμήματα του μεσεντέρου του εντόμου, πολλαπλασιάζονται ταχύτατα και μεταφέρονται ως μολυσματικές μετακυκλικές προμαστιγοφόρες μορφές στην οισοφαγική κοιλότητα και από εκεί στα στοματικά μόρια της σκνίπας. Μετά το τσίμπημα ενός θηλαστικού από τη μολυσμένη σκνίπα, οι μετακυκλικοί

προμαστιγώτες διοχετεύονται στο δέρμα του σπονδυλωτού, όπου φαγοκυτταρώνονται από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα Langerhans (επιδερμίδα), από τα δεντριτικά κύτταρα στο χόριο και από τα μακροφάγα, οπότε μεταπίπτουν και πάλι στην ωοειδή αμαστιγοφόρο μορφή. Οι αμαστιγώτες πολλαπλασιάζονται προκαλώντας λύση των μακροφάγων, όπου μπορούν να μολύνουν νέα μακροφάγα. Ένας νέος κύκλος αρχίζει με την απομύζηση αίματος από ένα μολυσμένο θηλαστικό.

### 3.2.2 Το γονιδίωμα του παρασίτου *Leishmania*

Το απλοειδές γονιδίωμα του πυρήνα του παρασίτου *Leishmania* ssp., έχει μήκος 32.816.678 bp και οργανώνεται σε 36 χρωμοσώματα (Ivens et al. 2005), με ένα συνολικό αριθμό 911 γονιδίων RNA, καθώς και 39 ψευδογονίδια (Peacock et al. 2007)). Ο συνολικός αριθμός των γονιδίων που φέρει, ανέρχεται στα 8272.

Τα RNA γονίδια του πυρήνα, λαμβάνουν μέρος άμεσα σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένου της αντιγραφής του γονιδιώματος (ως εκκινητήρια μόρια της αντιγραφής και δομικά συστατικά της τελομεράσης), του μηχανισμού ολίσθησης trans-splicing (μικρά πυρηνικά RNAs-snRNAs), της μετάφρασης (rRNAs και tRNAs), της μεταφραστικής ρύθμισης (microRNAs και αντινοσηματικά RNAs), καθώς και της διαμεμβρανικής μεταφοράς πρωτεϊνών, ως δομικά συστατικά συμπλόκων μεταγωγής σήματος (Ivens et al. 2005).

Ο διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων της *Leishmania*, έγινε δυνατός μόνο με τη χρησιμοποίηση της τεχνικής της ηλεκτροφόρησης εναλλασσόμενου πεδίου (PFGE). Αυτή η τεχνική έδειξε ότι ο καρυότυπος του παρασίτου αποτελείται από 36 χρωμοσώματα για τα είδη του Παλαιού Κόσμου (*L. major*, *L. infantum*, *L. tropica* και *L. aethiopica*) και από 34 με 35 χρωμοσώματα στα είδη του Νέου Κόσμου, *L. braziliensis* και *L. mexicana*, αντίστοιχα (Wincker et al. 1996; Britto et al. 1998). Αυτή η διαφορά στον αριθμό των χρωμοσωμάτων, είναι το αποτέλεσμα της σύντηξης τους και πιο συγκεκριμένα των 8+29 και 30+36 για το είδος *L. mexicana*, καθώς και των 20+34 στην περίπτωση του *L. braziliensis*. Τα διάφορα είδη του γένους, εμφανίζουν διαφορές και στο μέγεθος των χρωμοσωμάτων.

Συγκριτικές μελέτες, έχουν δείξει ότι η δομική οργάνωση του γονιδιώματος, δεν διαφέρει σημαντικά ανάμεσα στα διάφορα είδη του παρασίτου. Ωστόσο,

παρόλο το γεγονός ότι το 90% του γονιδιώματος αποτελείται από συντηρημένες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (Leon et al. 1978), διάφοροι ερευνητές έχουν συγκεντρώσει την προσοχή τους στον πιθανό ρόλο που μπορεί να διαδραματίζουν οι αλληλουχίες αυτές, κωδικές ή μη, στην γονιδιακή έκφραση και ρύθμιση (Ravel et al. 1996). Επιπλέον, είναι πολύ πιθανό αυτή η στασιμότητα του γενετικού υλικού να εξισορροπεί τη σπάνια γενετική ανταλλαγή που συμβαίνει, ως απόκριση σ' ένα στρεσογόνο ερέθισμα, όπως η επίδραση με διάφορα φάρμακα. Μερικά γονίδια μπορούν ακόμα να ενισχυθούν αυθόρμητα, δίνοντας ένα τεράστιο αριθμό επαναλήψεων μέσα το χρωμόσωμα, είτε πιο σπάνια ως γραμμικές ή κυκλικές μορφές εξωχρωμοσωμικού DNA (Iovannisci 1989).

Σε αντίθεση με τα άλλα μέλη της οικογένειας Trypanosomatidae, το γονιδίωμα της *Leishmania* δεν διαθέτει υπο-τελομερικές περιοχές. Επίσης δεν έχει γίνει καμία αναφορά μηχανισμού αποσιώπησης RNAi σε αυτούς τους οργανισμούς (Peacock et al. 2007). Το γονιδίωμά της οργανώνεται στον πυρήνα, ο οποίος περιέχει χρωμοσωματικό και επισωματικό DNA, καθώς και το DNA του κινητοπλάστη, το οποίο αποτελεί ένα ανεξάρτητο δίκτυο μορίων. Η ανάλυση του γονιδιώματος της *Leishmania*, έχει γεννήσει ερωτηματικά σχετικά με την εναλλαγή των καρυωτύπων στα διάφορα είδη, καθώς και για τον αριθμό των γονιδίων που συναντάμε σε κάθε χρωμόσωμα (Lighthall et al. 1992). Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων αποδεικνύει απλοειδή, διπλοειδή και πολυπλοειδή οργάνωση. Τα χρωμοσώματα κυμαίνονται από 400-900 kbp και φέρουν περιοχές μικρών εξονίων (mini exons). Οι καρυότυποι φαίνεται να διατηρούνται μεταξύ προμαστιγωτών και αμαστίγωτων μορφών του παρασίτου. Μεταξύ των γονιδίων που έχουν αναγνωριστεί, συμπεριλαμβάνονται και γονίδια ανθεκτικότητας σε διάφορα φάρμακα. Το παράσιτο έχει τη δυνατότητα να πολλαπλασιάζει την έκφραση των εν λόγω γονιδίων σε καταστάσεις στρες, όπως η ανταπόκριση στο φάρμακο μεθοτρεξάτη. Τα γονίδια αυτά εντοπίζονται σε κωδικές περιοχές, οι οποίες ονομάζονται R-DNA και H-DNA και κωδικοποιούν αντίστοιχα μια σειρά από ένζυμα, ρεντουκτάσης και θυμιδικής συνθάσης, τα οποία παρέχουν αντίσταση των παρασίτων *Leishmania* σε διάφορες φαρμακευτικές λύσεις (Ouellette 1993; Segovia 1994).

Εκτός από τον πυρήνα, τα παράσιτα του γένους *Leishmania*, φέρουν και ένα ιδιαίτερο οργανίδιο μιτοχονδριακής φύσης, τον κινητοπλάστη. Το DNA του κινητοπλάστη (kDNA), διαμορφώνεται σε ένα δισδιάστατο δίκτυο μορίων, το οποίο εντοπίζεται συμπυκνωμένο μέσα στο οργανίδιο του κινητοπλάστη. Το δίκτυο αποτελείται από δύο διαφορετικούς τύπους δίκλωνων κυκλικών μορίων DNA, τα maxicircles (20-40 kb) και τα minicircles (0,7-0,9 kb). Τα maxicircles οργανώνουν το δικό τους υποδίκτυο, το οποίο αποτελείται από 10-20 συνδεδεμένα μόρια και περιορίζονται στην περιφέρεια του βασικού δικτύου, ενώ τα minicircles, χιλιάδες στον αριθμό, (~10000 μόρια/κύτταρο) διαμορφώνουν ένα δισδιάστατο εσωτερικό πυρήνα (Stuart 1983). Τα minicircles, παρουσιάζουν μεγάλο βαθμό ετερογένειας στην νουκλεοτιδική τους αλληλουχία και χωρίζονται σε διάφορες ομάδες, ακόμα και μέσα στο ίδιο παράσιτο, μερικές από τις οποίες φαίνεται να κυριαρχούν (Kidane et al. 1984). Ωστόσο, σε διαφορετικά είδη *Leishmania*, η ετερογένεια αυτή αφορά κυρίως το μέγεθος των μορίων minicircles και έχει χρησιμοποιηθεί κατά καιρούς ως γενετικός δείκτης χαρακτηρισμού των ειδών, καθώς και ως εργαλείο μοριακής διαγνωστικής μέσω PCR (Smyth et al. 1992). Εκτενέστερη περιγραφή της δομής και της λειτουργίας του δικτύου kDNA της τάξης των Kinetoplastida, ακολουθεί στη συνέχεια της μελέτης μας.

Μερικές δομές ιϊκής φύσης, έχουν ανευρεθεί στο κυτταρόπλασμα διαφόρων παρασίτων *Leishmania* και έχουν περιγραφεί κατά καιρούς, είτε ως εξωχρωμοσωμικό DNA, είτε ως δίκλωνοι RNA ιοί (Molyneux 1974). Αυτές οι δομές διατηρούνται κατά την κυτταρική διαίρεση του παρασίτου, καθώς και υπό φυσιολογικές συνθήκες στο στάδιο μεταφοράς τους από τους ενδιάμεσους ξενιστές, ως αμαστιγωτικές μορφές. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί η συνεξέλιξη τους με το παράσιτο, ενώ ο ρόλος ύπαρξής τους δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένος (Tarr et al. 1988).



### 3.2.3 Ταξινόμηση των ειδών *Leishmania*

Το γένος *Leishmania* έχει διαιρεθεί στα υπογένη *Vianna* (V) και *Leishmania* (L), ανάλογα με τη θέση ανάπτυξης των προμαστιγωτών μορφών στο έντερο του αρthropόδου φορέα που μεταδίδει τη νόσο. Τα μέλη του υπογένους *Vianna*, αναπτύσσονται στο οπίσθιο, πριν μεταναστεύσουν στο μέσο και πρόσθιο έντερο του φλεβοτόμου. Το υπογένος *Leishmania* περιλαμβάνει είδη, τα οποία έχουν χάσει την ικανότητα να αναπτύσσονται στο οπίσθιο και εγκαθίστανται εξ' αρχής στο μέσο και πρόσθιο μέρος του εντέρου (Lainson and Shaw, 1987). Για την τυποποίηση των ειδών, η ισοενzymική ανάλυση των καλλιεργημένων προμαστιγωτών μορφών παραμένει η πιο διαδεδομένη μέθοδος. Διαλυτά ενzymικά παράγωγα, τα οποία προκύπτουν από τη λύση των προμαστιγωτών μορφών του παρασίτου, ηλεκτροφορούνται, συνήθως, σε όξινη κυτταρίνη (cellulose acetate) και με τη χρήση κατάλληλων υποστρωμάτων και χρωστικών μεθόδων εμφάνισης των ενzymικών παραγώγων επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός και η τυποποίηση των ειδών (Tzanetou 1984). Άλλες μέθοδοι τυποποίησης αφορούν τον υβριδισμό του DNA του κινετοπλάστη. Μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης (PCR), οι οποίες στοχεύουν την ενίσχυση γονιδίων χαρακτηριστικών για το είδος *Leishmania* (kDNA minicircles), σε καλλιέργειες ή κατευθείαν στους ιστούς, έχουν αναπτυχθεί και εφαρμοστεί για το διαχωρισμό και την τυποποίηση των ειδών (Rodriguez et al. 1994).

Έχουν προταθεί πολλοί τρόποι ταξινόμησης για το γένος *Leishmania*. Ωστόσο, ο επικρατέστερος παραμένει μέχρι και σήμερα, η φυλογενετική κατάταξη των ειδών στα δύο βασικά υποείδη που προαναφέραμε, τα οποία υποδιαιρούνται περαιτέρω σε διάφορα συμπλέγματα, σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα (Rioux et al. 1990).

<b>1. Sub-genus <i>Leishmania</i> Ross, 1903</b>	
<b>L. donovani complex</b>	<b>L. donovani (Laveran &amp; Mesnil, 1903)</b> <b>L. archibaldi Castellani &amp; Chalmers, 1919</b>
<b>L. infantum complex</b>	<b>L. infantum Nicolle, 1908</b> <b>(syn. L. chagasi Cunha &amp; Chagas, 1937)</b>
<b>L. tropica complex</b>	<b>L. tropica (Wright, 1903)</b>
<b>L. killicki complex</b>	<b>L. killicki Rioux, Lanotte &amp; Pratlong, 1986</b>

<b>L. aethiopica complex</b>	<b>L. aethiopica Bray, Ashford &amp; Bray, 1973</b>
<b>L. major complex</b>	<b>L. major Yakimoff &amp; Schokhor, 1914</b>
<b>L. turanica complex</b>	<b>L. turanica Strelkova, Peters &amp; Evans, 1990</b>
<b>L. gerbilli complex</b>	<b>L. gerbilli Wang, Qu &amp; Guan, 1964</b>
<b>L. arabica complex</b>	<b>L. arabica Peters, Elbihari &amp; Evans, 1986</b>
<b>L. mexicana complex</b>	<b>L. mexicana Biagi, 1953</b> <b>(syn. L. pifanoi Medina &amp; Romero, 1959)</b>
<b>L. amazonensis complex</b>	<b>L. amazonensis Lainson &amp; Shaw, 1972</b> <b>(syn. L. garnhami Scorza et al., 1979)</b> <b>L. aristidesi Lainson &amp; Shaw, 1979</b>
<b>L. enriettii complex</b>	<b>L. enriettii Muniz &amp; Medina, 1948</b>
<b>L. hertigi complex</b>	<b>L. hertigi Herrero, 1971</b> <b>L. deanei Lainson &amp; Shaw, 1977</b>

**Πίνακας 3.1:** Υπογένος *Leishmania*.

## **2. Sub-genus Vianna Lainson and Shaw, 1987**

<b>L. braziliensis complex</b>	<b>L. braziliensis Vianna, 1911.</b> <b>L. peruviana Velez, 1913</b>
<b>L. guyanensis complex</b>	<b>L. guyanensis Floch, 1954</b> <b>L. panamensis Lainson &amp; Shaw, 1972</b> <b>L. shawi Lainson et al., 1989</b>
<b>L. naiffi complex</b>	<b>L. naiffi Lainson &amp; Shaw, 1989</b>
<b>L. lainsoni complex</b>	<b>L. lainsoni Silveira et al., 1987</b>

**Πίνακας 3.2:** Υπογένος *Vianna*.

### 3.2.4 Γεωγραφική κατανομή των ειδών *Leishmania*

Η λεισμανίαση είναι διαδεδομένη σε όλες της ηπείρους, με εξαίρεση την Αυστραλία και την Ανταρκτική, ενώ θεωρείται ενδημική στις τροπικές και υποτροπικές περιοχές 88 χωρών. Από αυτές, οι 22 είναι χώρες του Νέου Κόσμου (Κεντρική και Νότια Αμερική), ενώ οι 66 ανήκουν στον Παλιό Κόσμο (Αφρική, Ινδία, Μέση Ανατολή, Ασία, Νότια Ευρώπη και Μεσόγειο (WHO 1998). Σύμφωνα με τον WHO, το 90% των περιπτώσεων σπλαχνικής λεισμανίασης παρατηρείται στο Μπανγκλαντές, τη Βραζιλία, την Ινδία, το Νεπάλ και το Σουδάν, το 90% της βλεννογονοδερματικής μορφής στη Βολιβία, τη Βραζιλία και το Περού και το 90% της δερματικής λεισμανίασης στο Αφγανιστάν, τη Βραζιλία, το Ιράν, το Περού, τη Σαουδική Αραβία και τη Συρία (WHO). Στις χώρες αυτές, εξαιρουμένης της Βραζιλίας, η σπλαχνική λεισμανίαση εμφανίζεται ως ανθρωπονόσος ή και ανθρωποζωνόσος και το υπεύθυνο είδος είναι η *L. donovani*, σε αντίθεση με τις χώρες της Μεσογείου, της Νότιας Αμερικής και της Ασίας, όπου εμφανίζεται αποκλειστικά ως ζωνόσος και το υπεύθυνο είδος είναι η *L. infantum* (Seaman et al. 1996). Στον παρακάτω πίνακα, παρατίθενται στοιχεία σχετικά με την γεωγραφική κατανομή της λεισμανίασης, το είδος του παρασίτου που ευδοκιμεί, καθώς και τη μορφή εκδήλωσης της νόσου (Bryceson and Hay 1998; Grevelink et al. 1996).

### 1. Εντοπισμένη δερματική λεϊσμανίαση (cutaneous Leishmaniasis/CL)

#### α) Παλαιού Κόσμου

Είδος παρασίτου	Κυριότερες γεωγραφικές εντοπίσεις
L. major	Μέση Ανατολή, Βόρεια Αφρική, Ινδία
L. tropica	Μεσόγειος, Μέση Ανατολή, Κεντρική Ασία
L. aethiopica	Αιθιοπία, Σουδάν, Κένυα (Ανατολική Αφρική)
L. infantum	Μεσόγειος, Μέση Ανατολή, Κίνα

#### β) Νέου Κόσμου

Είδος παρασίτου	Κυριότερες γεωγραφικές εντοπίσεις
L. mexicana	Μεξικό, Γουατεμάλα, Μπελίζ
L. braziliensis	Βραζιλία, Κεντρική-Νότια Αμερική
L. amazonensis	Βραζιλία, Αμαζόνιος

### 2. Διάχυτη δερματική λεϊσμανίαση (diffuse anergic cutaneous Leishmaniasis/DCL)

#### α) Παλαιού Κόσμου

Είδος παρασίτου	Κυριότερες γεωγραφικές εντοπίσεις
L. aethiopica	Αιθιοπία, Σουδάν, Κένυα

#### β) Νέου Κόσμου

Είδος παρασίτου	Κυριότερες γεωγραφικές εντοπίσεις
L. mexicana	Μεξικό, Κεντρική Αμερική
L. braziliensis	Βραζιλία, Νότια Αμερική

### 3. Υποτροπιάζουσα λεϊσμανίαση (Leishmaniasis recidivans/LR)

#### α) Παλαιού Κόσμου

Είδος παρασίτου	Κυριότερες γεωγραφικές εντοπίσεις
L. tropica	Μέση Ανατολή, Κεντρική Ασία

β) Νέου Κόσμου

**Είδος παρασίτου**

**Κυριότερες γεωγραφικές εντοπίσεις**

L. braziliensis

Βραζιλία, Νότια Αμερική

**4. Δερματοβλεννογόνος λεισμανίαση (mucocutaneous Leishmaniasis/MCL)**

**Είδος παρασίτου**

**Κυριότερες γεωγραφικές εντοπίσεις**

L. braziliensis

Νότια Αμερική

L. panamensis

Παναμάς, Κόστα Ρίκα, Κολομβία

**5. Σπλαχνική λεισμανίαση (visceral Leishmaniasis/VL)**

**Είδος παρασίτου**

**Κυριότερες γεωγραφικές εντοπίσεις**

L. donovani

Μπαγκλαντές, Ινδία, Ανατολική Αφρική

L. infantum

Μεσόγειος, Μέση Ανατολή, Κεντρική Ασία

**6. Μετά καλαζάρ λεισμανίαση (post kala-azar dermal Leishmaniasis/PKADL)**

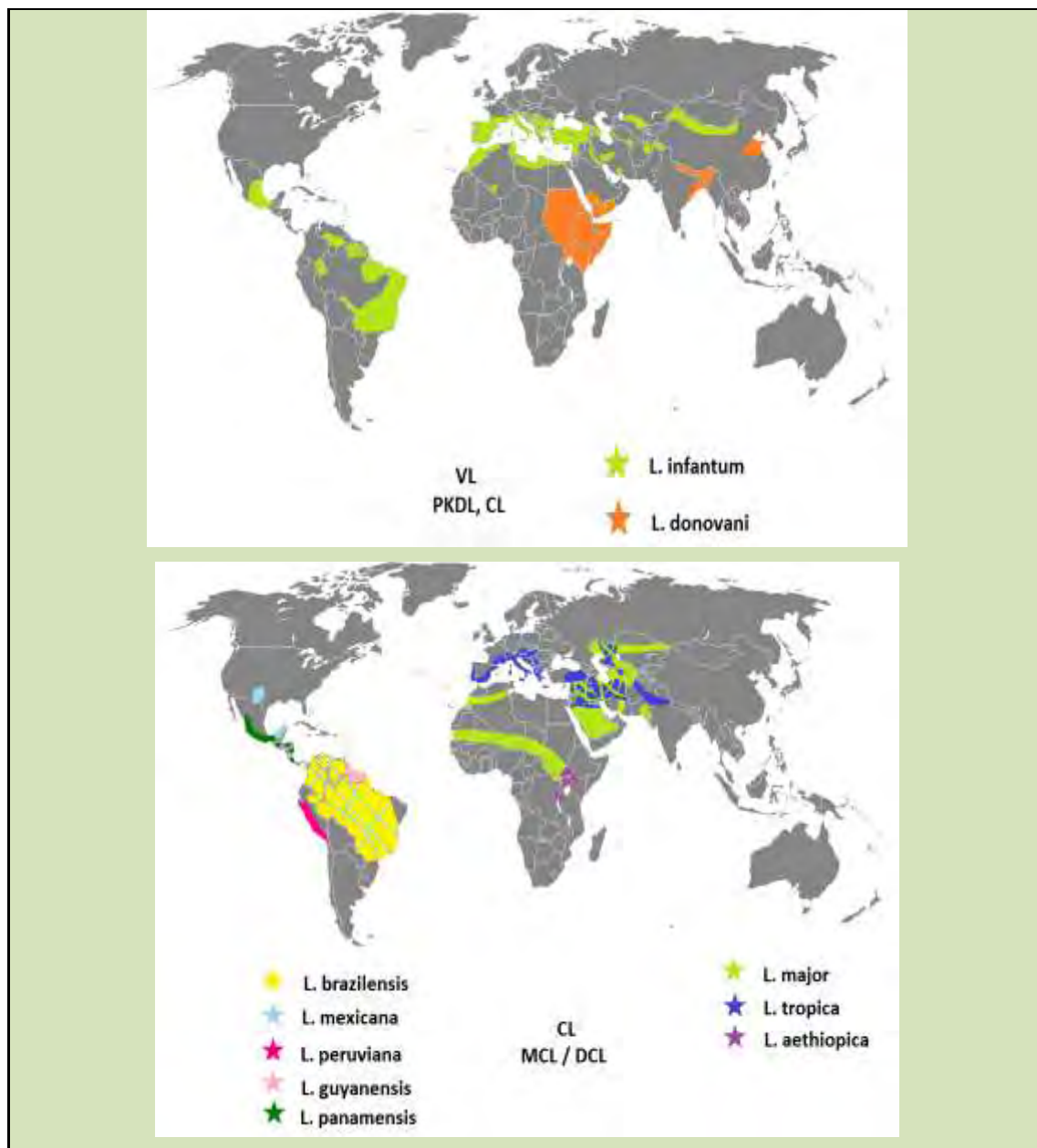
**Είδος παρασίτου**

**Κυριότερες γεωγραφικές εντοπίσεις**

L. donovani

Μπαγκλαντές, Ινδία, Ανατολική Αφρική

**Πίνακας 3.3:** Οι κυριότερες γεωγραφικές εντοπίσεις του παρασίτου *Leishmania* και τα είδη που ευδοκιμούν.



**Εικόνα 3.4:** Γεωγραφική κατανομή ειδών *Leishmania* ανά την υφήλιο. Τα είδη που είναι υπεύθυνα για την σπλαχνική λεισμανίαση (VL) απεικονίζονται στον πρώτο χάρτη ενώ τα είδη που προκαλούν δερματική και βλενογονοδερματική λεισμανίαση απεικονίζονται στον κάτω χάρτη.

### 3.2.5 Η λεισμανίαση στην Ελλάδα

Η πρώτη περίπτωση σπλαχνικής λεισμανίασης σε άνθρωπο της χώρας μας περιγράφηκε στην Κρήτη. Κατά την περίοδο 1984-1999 αναφέρονται στον άνθρωπο 18-106 περιστατικά σπλαχνικής λεισμανίασης ανά έτος και η σχέση κρουσμάτων ανθρώπου/σκύλου είναι 1/940-5550 (Χαραλαμπίδης 2001). Αυξημένος επιπολασμός της ασθένειας έχει αναφερθεί στην Ανατολική Κρήτη, σε περιοχές όπως το Λασιθί, όπου τα κρούσματα σπλαχνικής λεισμανίασης που καταγράφονται, ανέρχονται σε 2-5 ετησίως. Έχει αναφερθεί ότι το ποσοστό των οροθετικών ασυμπτωματικών ανθρώπων κυμαίνεται από 0,5 έως 9,2%, ενώ στους συμπτωματικούς από 12,6 έως 33,4% (Paradourou et al. 2005)

Τα παράσιτα, τα οποία προκαλούν σπλαχνική λεισμανίαση στον άνθρωπο και στο σκύλο στην Ελλάδα, βρέθηκε ότι ανήκουν στο είδος *L. infantum* και οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι σκύλοι είναι οι ενδιάμεσοι φορείς για την μετάδοση του παρασίτου στον άνθρωπο. Το παράσιτο έχει ανιχνευτεί σε πολλές περιοχές της Ελλάδας, αλλά κυρίως στην Κρήτη, στην ευρύτερη περιοχή της Αθήνας και στα Ιόνια νησιά (Ζάκυνθος). Επιπλέον, έχει απομονωθεί και χαρακτηριστεί το είδος *L. tropica* ως υπεύθυνο για την εμφάνιση της δερματικής λεισμανίασης στην χώρα μας και η ασθένεια θεωρείται ανθρωπονόσος (βασικός φορέας μετάδοσης ο άνθρωπος) (Frank et al. 1993).

## 3.3 Kinetoplastida

Τα πρωτόζωα της τάξης Kinetoplastida, αποτελούν μια ιδιαίτερη ομάδα μικροοργανισμών και παρασίτων, τα οποία μολύνουν διαφορετικά είδη ασπόνδυλων, σπονδυλωτών και φυτών. Πολλά μέλη της ομάδας αυτής, τα οποία ανήκουν στην οικογένεια των Trypanosomatidae, αποτελούν τους βασικούς παράγοντες πρόκλησης μιας τεράστιας γκάμας, παγκοσμίως διαδεδομένων τροπικών ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου του αφρικάνικου πυρετού, της ασθένειας Chagas, καθώς και ποικίλων μορφών δερματικής και σπλαχνικής λεισμανίασης (Shlomai 2004). Οι οργανισμοί αυτοί απέκλιναν νωρίς από την κύρια γενεολογία των ευκαρυωτικών οργανισμών και στην πορεία της εξέλιξης, έχουν

αναπτύξει μοναδικούς μοριακούς μηχανισμούς. Μεταξύ αυτών, συμπεριλαμβάνεται ο μηχανισμός επεξεργασίας των μιτοχονδριακών μεταγράφων τους (RNA editing) (Stuart 1991), ο μηχανισμός trans-splicing (Gopal et al. 2005), κατά τον οποίο εξόνια διαφορετικών πρόδρομων RNA μεταγράφων ενώνονται με τη βοήθεια λιγάσης, καθώς και η χρήση ειδικών μορφών γλουταθειόνης (τρυπανοθειόνη) ως άμυνα ενάντια στο οξειδωτικό στρες (Krauth-Siegel et al. 2003). Έχουν επίσης αναπτύξει μοναδικές ενδοκυττάρειες δομές, όπως τα γλυκοσωμάτια, τα οποία περιέχουν γλυκολυτικά ένζυμα (Tetley and Vickerman 1991), καθώς και ένα ιδιαίτερο οργανίδιο, τον κινητοπλάστη, ο οποίος φέρει μια από τις πολυπλοκότερες μορφές μιτοχονδριακού DNA στη φύση, το μιτοχονδριακό δίκτυο kDNA (Shlomai 2004).

Το DNA του κινητοπλάστη (kDNA), αποτελεί μια ιδιάζουσα μορφή μιτοχονδριακού DNA, η οποία συναντάται στο μοναδικό μιτοχόνδριο των ειδών της τάξης Kinetoplastida. Το kDNA διαμορφώνεται σε ένα δισδιάστατο δίκτυο μορίων, το οποίο εντοπίζεται συμπυκνωμένο μέσα στο οργανίδιο του κινητοπλάστη. Το δίκτυο αποτελείται από δύο διαφορετικούς τύπους δίκλωνων κυκλικών μορίων DNA, τα minicircles και τα maxicircles. Τα minicircles έχουν σχετικά μικρό μοριακό βάρος, από 0,5 έως 10 kb και ο αριθμός τους κυμαίνεται από 5000-10000 μόρια, ανά κύτταρο, καθιστώντας το έναν αξιόλογο στόχο μοριακής διαγνωστικής. Από την άλλη πλευρά, τα maxicircles εμφανίζονται σε πολύ μικρότερο αριθμό (25-50 ανά κύτταρο), αλλά το μοριακό τους βάρος είναι κατά πολύ μεγαλύτερο σε σχέση με τα minicircles και κυμαίνεται μεταξύ 20-40 kb στα διαφορετικά είδη Kinetoplastida. Ωστόσο, τα μόρια αυτά μέσα στο δίκτυο, δεν είναι ανεξάρτητα, αλλά αλληλοσυνδέονται, σχηματίζοντας ένα τεράστιο πλέγμα μορίων DNA (catenanes) (Newton 1980).

Τα maxicircles περιέχουν γονίδια, τα οποία κωδικοποιούν για τα τυπικά μιτοχονδριακά γονιδιακά προϊόντα, όπως ριβοσωμικά RNAs (rRNAs), καθώς και διάφορες υπομονάδες ενζύμων του μεταβολισμού (Lukes et al. 2002). Τα μεταγράφα τους υφίστανται ειδική επεξεργασία μέσω του μηχανισμού RNA editing, με την προσθήκη και αφαίρεση καταλοίπων ουριδίνης, ώστε να δημιουργηθούν ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης. Η γενετική πληροφορία, η υπεύθυνη για το RNA editing



εμφανίζεται κατά κύριο λόγο στην αλληλουχία των minicircles (Madison-Antenucci 2002).

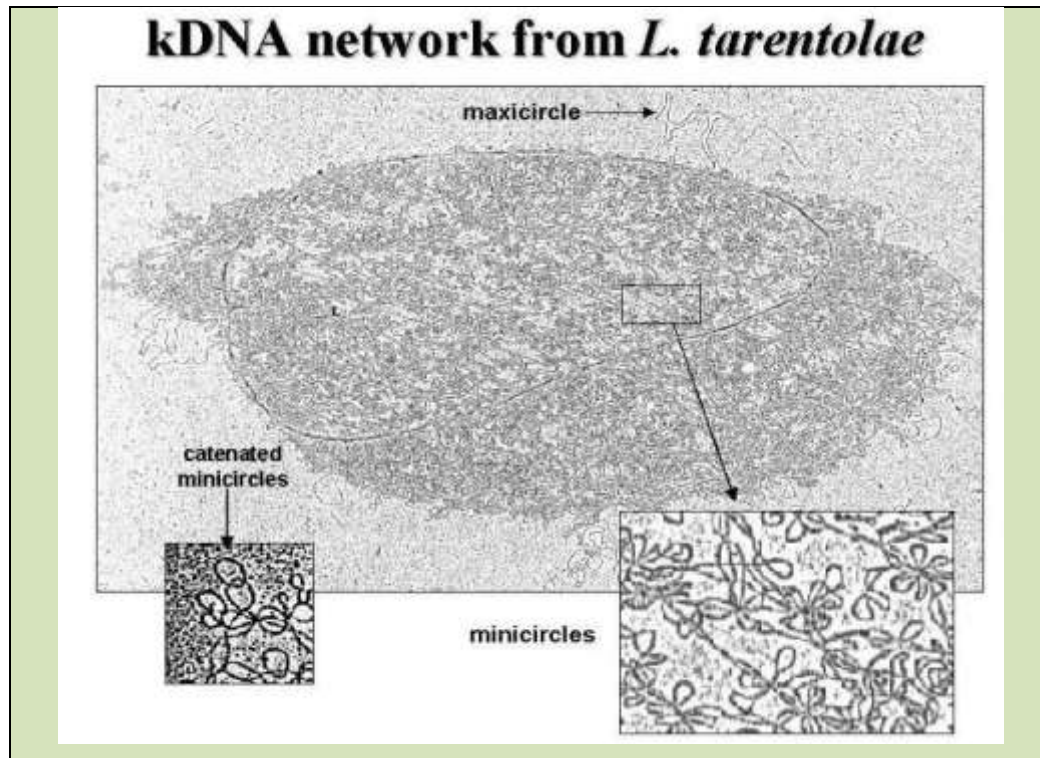
### 3.3.1 Δομή δικτύου kDNA

Οι περισσότερες γνώσεις για τη δομή του δικτύου kDNA, έρχονται μέσα από μελέτες σε διάφορα είδη της οικογένειας Trypanosomatidae, συμπεριλαμβανομένου των μη παθογόνων στελεχών *Crithidia fasciculata* και *Leishmania tarentolae*, καθώς και των παθογόνων ειδών για τον άνθρωπο και για άλλα θηλαστικά, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* και *Leishmania* spp (Lukes et al.2002)

Τα μόρια minicircles του δικτύου kDNA, παρουσιάζονται συνδεδεμένα διαδοχικά, σχηματίζοντας επίπεδες συστοιχίες, με αριθμό σθένους (το μέσο όρο των μορίων, ανά συστοιχία) κατά μέσο όρο 3, προσομοιάζοντας περισσότερο με κρίκους αλυσίδας. Η δομή αυτή είναι αρκετά ευέλικτη, έτσι ώστε να επιτρέπεται η οργάνωσή της σε μορφή επίπεδου φύλλου (Chen et al. 1995). Μελέτες φθορισμού έχουν δείξει ότι μέσα στη μιτοχονδριακή μήτρα, το δίκτυο των μορίων minicircles συμπυκνώνεται σε μια δομή, η οποία μοιάζει με δίσκο (kDNA disk), με διάμετρο περίπου 1μm (Ferguson et al. 1992). Η διάταξη των μορίων μέσα σε αυτή τη δομή, γίνεται κάθετα στον άξονα του δικτύου. Τα μικρά μόρια kDNA εμφανίζονται ομοιοπολικώς κλειστά μέσα στο δίκτυο, με εξαίρεση τη φάση της αντιγραφής τους. Επιπλέον, σε αντίθεση με τα κυκλικά μόρια DNA άλλων κυτταρικών τύπων, δεν εμφανίζονται ποτέ υπερελικωμένα (Rauch et al, 1993).

Τα μόρια maxicircles του δικτύου δεν διατάσσονται τυχαία μέσα στο σύμπλεγμα των minicircles. Τα δύο μόρια, αν και αποτελούν συστατικά ενός ενιαίου δικτυού, φαίνεται να οργανώνονται ανεξάρτητα το ένα από το άλλο. Μελέτες σε πρωτόζωα, με επιλεκτική αφαίρεση του δικτύου των minicircles, απέδειξαν τον παραπάνω ισχυρισμό. Ενώ τα minicircles, όπως προαναφέραμε, οργανώνονται σε συστάδες ανά τριμερή, διαμορφώνοντας ένα δισδιάστατο δίκτυο μορίων, τα σύμπλοκα maxicircles σχηματίζουν ένα είδος ροζέτας, με ένα πυκνό εσωτερικό πυρήνα και προεξέχοντες θηλιές. Ωστόσο αυτά τα δύο σύμπλοκα μορίων,

ενώνονται για να σχηματίσουν ένα ενιαίο δίκτυο μορίων, το οποίο ουσιαστικά έχει τη μορφή “δικτύου μέσα σε δίκτυο” (Shapiro 1993).



**Εικόνα 3.5:** Η οργάνωση του δικτύου kDNA στην *L.tarentolae*. Τα χιλιάδες μόρια minicircles σχηματίζουν συστάδες τριμερών στο εσωτερικό και οργανώνονται σε δισκοειδής δομές (kDNA disks) οι οποίες διατάσσονται κάθετα στον άξονα του δικτύου. Τα μόρια maxicircles, περιορίζονται στην περιφέρεια του δικτύου σχηματίζοντας προεξέχοντες θηλίες, αποτελώντας μόλις το 1-2% του συνόλου του δικτύου kDNA.

### 3.3.2 Δομικά συστατικά του δικτύου Kdna

#### 3.3.2.1 Maxicircles

Οι μεγάλες υπομονάδες του δικτύου kDNA (maxicircles), αποτελούν λειτουργικά ανάλογα των μιτοχονδριακών μορίων στους ευκαρυώτες και σε διαφορετικά είδη του γένους *Trypanosomatida*, το μέγεθός τους κυμαίνεται από 20 έως 40 kb. Ωστόσο, ο αριθμός τους στα παράσιτα είναι πολύ περιορισμένος (25-30/παράσιτο) και γι' αυτό το λόγο δεν προτιμούνται ως μοριακοί στόχοι διάγνωσης των παρασίτων. Τα μόρια αυτά κυρίως κωδικοποιούν για ριβοσωμικά RNAs, καθώς και για πλήθος πρωτεϊνικών μορίων, η πλειοψηφία των οποίων εμπλέκεται σε διεργασίες μεταφοράς ενέργειας μέσα κύτταρο (κυτόχρωμα C, υπομονάδες της οξειδάσης του κυτοχρώματος, υπομονάδες της δεϋδρογονάσης NADH, ένζυμα και συνένζυμα του κύκλου του Krebs (Chen et al. 1995; Martynkina et al. 1989). Επιπλέον, δεν φαίνεται να φέρουν γονίδια που να κωδικοποιούν για μεταφορικά tRNAs. Τα μιτοχονδριακά tRNAs, φαίνεται να κωδικοποιούνται από πυρηνικά γονίδια (Hancock and Hajduk 1990). Ένα από τα πιο αξιοσημείωτα χαρακτηριστικά αυτών των μορίων, είναι η επεξεργασία που υφίστανται (RNA editing) τα μετάγρατά τους, προκειμένου να διαμορφώσουν λειτουργικά mRNAs (Benne et al. 1986). Η επεξεργασία τους περιλαμβάνει προσθήκη ή απαλοιφή καταλοίπων ουριδίνης (U) σε ποικίλες αλληλουχίες του μεταγράφου και σε μερικά αγγελιοφόρα μόρια mRNAs, περισσότερα από τα μισά νουκλεοτίδια της κωδικής τους περιοχής, προκύπτουν μ' αυτόν τον τρόπο (Feagin et al. 1988) Μέσα σε κάθε κυκλικό μόριο, εδρεύετε μια μη κωδική περιοχή, η οποία ποικίλει σε μέγεθος από είδος σε είδος και η οποία περιέχει πολλές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (12 kb για τη *leishmania*) (Muhich et al. 1983). Ωστόσο, η περιοχή αυτή έχει μελετηθεί μόνο για το είδος *T. brucei* και έχει διαπιστωθεί ότι περιέχει δύο αντίγραφα μιας αλληλουχίας, η οποία συνδέεται άμεσα με την αντιγραφή των μικρών κύκλων DNA του δικτύου (minicircles) (Myler et al. 1993).

Το μέγεθος των maxicircles, μπορεί να διαφέρει ανάμεσα στα γένη του ίδιου είδους. Αυτές οι διαφορές, μπορεί να συμπεριλαμβάνουν ποικιλία στον αριθμό των γονιδίων, στο μέγεθος των γονιδίων, καθώς και την παρουσία ιντρονίων και μη κωδικοποιούσων περιοχών. Επιπλέον, διαφορές ανάμεσα στα μόρια εμφανίζονται

και σε επίπεδο νουκλεοτιδίου, χαρακτηριζόμενες ως SNPs (single nucleotide polymorphism). Ο έλεγχος αυτού του είδους πολυμορφισμών, έχει γίνει με την χρήση εξειδικευμένων ενζύμων, των ενδονουκλεασών περιορισμού (restriction enzymes) (Borst et al. 1981).

### 3.3.2.2 Minicircles

Οι μικρές υπομονάδες του δικτύου kDNA (minicircles) καλύπτουν το μεγαλύτερο μέρος του δικτύου, αγγίζοντας το ποσοστό του 90%. Το μήκος τους, ανάλογα με το είδος κυμαίνεται από 0,5 έως 2,9 kb. Στα περισσότερα είδη, όλα τα μόρια ενός δικτύου έχουν σε γενικές γραμμές το ίδιο μέγεθος, αλλά παρουσιάζουν μια σχετική ετερογένεια στην αλληλουχία τους (Simpson 1987). Μια κρίσιμη γενετική λειτουργία αυτών των μορίων, αποτελεί η κωδικοποίηση μικρών RNA οδηγών (guide RNAs). Τα gRNAs είναι ολιγονουκλεοτίδια μήκους 70 βάσεων, τα οποία φέρουν στο 3' άκρο τους μια σειρά από βάσεις ουρακίλης (oligo-U tail). Τα μόρια αυτά, είναι οι βασικοί τελεστές της διαδικασίας RNA editing, που περιγράφηκε και παραπάνω (Sturm and Simpson 1990). Ωστόσο, κάποια μεγάλα μόρια DNA του δικτύου, εμπλέκονται επίσης στην κωδικοποίηση των gRNAs (Blum et al. 1990). Στο γένος *leishmania*, βρέθηκε ένα μόνο μόριο RNA οδηγού (Sturm and Simpson 1991). Στα περισσότερα είδη της τάξης Kinetoplastida, τα minicircles σε ένα δίκτυο εμφανίζουν μεγάλη ετερογένεια, όσον αφορά την αλληλουχία τους και ο βαθμός της ετερογένειας φαίνεται να είναι ανάλογος με τον αριθμό των gRNAs, που απαιτούνται για τη διαδικασία RNA editing. Στη *leishmania* και συγκεκριμένα στο είδος *L. tarantolae*, καθώς το RNA editing εμφανίζεται σε πιο ήπιο βαθμό, εμφανίζει πολύ μικρότερη ετερογένεια σε σχέση με τα υπόλοιπα μέλη των Trypanosomes (Maslov and Simpson 1992).

Εκτός από την περιοχή, η οποία κωδικοποιεί για τα gRNAs (variable region), τα minicircles φέρουν και μια συντηρημένη περιοχή (conserved region) μήκους 100-180 νουκλεοτιδίων, υπεύθυνη για την αντιγραφή του μορίου και η οποία παραμένει ίδια για όλα τα μόρια του δικτύου kDNA. Μερικά μόρια minicircles του δικτύου kDNA, όπως στο γένος της *leishmania*, φέρουν μόνο μία συντηρημένη περιοχή (Kidane et al. 1984; Chen and Donelson 1980), μήκους 120 bp, προκειμένου να

αρχίσει η αντιγραφή, ενώ σε άλλα είδη εμφανίζονται περισσότερες πχ *T. cruzi*, το οποίο φέρει τέσσερις συντηρημένες περιοχές (Degrave et al. 1988).

Το μέγεθος των μορίων minicircles διαφέρει ανάμεσα στα διάφορα γένη της οικογένειας των Trypanosomatids, ενώ αξιοσημείωτες διαφορές εντοπίζονται και μέσα στα είδη του ίδιου γένους. Χαρακτηριστικό παράδειγμα, αποτελεί το γένος *Leishmania*, όπου το μήκος των μορίων minicircles κυμαίνεται μεταξύ 600-850 bp στα διάφορα είδη. Η έντονη παρουσία των μορίων στα παράσιτα, τα καθιστούν ένα άριστο και με μεγάλη ευαισθησία στόχο μοριακής διάγνωσης. Επιπλέον, η ετερογένεια μεγέθους που εμφανίζεται, μπορεί να χρησιμεύσει ως εργαλείο προσδιορισμού των ειδών, μέσω PCR. Ο σχεδιασμός εκκινητών οι οποίοι αναγνωρίζουν την συντηρημένη περιοχή των μορίων, καθιστά δυνατή την ενίσχυση ολόκληρης της αλληλουχίας τους. Η διαφορετικές ζώνες που προκύπτουν κατά την ηλεκτροφόρηση, καθώς και η αλληλούχιση των προϊόντων ενίσχυσης, μπορούν να μας οδηγήσουν στην ταυτοποίηση του είδους του παρασίτου που μελετάμε (Mahboudi et al. 2002).

### 3.4 Αντιγραφή δικτύου kDNA

Η αντιγραφή του DNA του κινητοπλάστη, περιορίζεται στην φάση S του κυτταρικού κύκλου. Η αντιγραφή περιλαμβάνει τον αναδιπλασιασμό τόσο των μικρών (minicircles), όσο και των μεγάλων μορίων (maxicircles) DNA, καθώς και τη δημιουργία δύο πρόδρομων δικτύων kDNA, τα οποία διαχωρίζονται με την κυτταρική διαίρεση. Ενώ η αντιγραφή των δύο τύπων kDNA είναι απολύτως συγχρονισμένη, η διαδικασία διαφέρει σημαντικά. Τα minicircles αποσπώνται από το δίκτυο και αντιγράφονται ως ανεξάρτητα ελεύθερα μόρια, μέσω σχηματισμού μιας ενδιάμεσης δομής θ, ενώ τα maxicircles παραμένουν συνδεδεμένα με το δίκτυο σχεδόν σε όλη τη διάρκεια της αντιγραφής τους και αντιγράφονται μέσω ενός ιδιαίτερου μηχανισμού κυλιόμενου κύκλου (Hajduk et al 1984).

Ένα σημαντικό πρόβλημα που προκύπτει με την αντιγραφή των μικρών μορίων του δικτύου, έχει να κάνει με τη χωροδιάταξη των μορίων αυτών. Τα μόρια αυτά εμφανίζονται σε ένα ενιαίο δίκτυο συνδεδεμένα, προσομοιάζοντας με κρίκους

αλυσίδας. Πώς λοιπόν ένα κυκλικό μόριο DNA αυτής της μορφής, μπορεί και πολλαπλασιάζεται; Το παράσιτο μπορεί και λύνει αυτό το πρόβλημα χρησιμοποιώντας ένα ένζυμο, μια τοποϊσομεράση II, η οποία απελευθερώνει το μόριο από το δίκτυο για να αντιγραφεί (Englund 1979). Η παραπάνω διαδικασία δεν απαιτεί πολύ χρόνο για την ολοκλήρωσή της. Έτσι σε κάθε στάδιο της φάσης S, υπάρχουν εκατοντάδες μικρά ελεύθερα μόρια minicircles, τα οποία αντιγράφονται αυτόνομα (Englund 1981). Ένα άλλο πρόβλημα που παρουσιάζεται στην αντιγραφή των minicircles, έχει να κάνει με την ακρίβεια της αντιγραφής. Πώς μπορεί το παράσιτο να διασφαλίσει ότι κάθε μόριο αντιγράφεται μία και μόνο φορά ανά κυτταρικό κύκλο; Φαίνεται ότι εγκοπές ή κενά (gaps) στην αλληλουχία των πρόδρομων μικρών μορίων κατά την διάρκεια του αναδιπλασιασμού καθιστούν δυνατή τη διάκριση μεταξύ αυτών που έχουν αντιγραφεί και αυτών που δεν έχουν ξεκινήσει ακόμα τη διαδικασία αντιγραφής. Μόλις ολοκληρωθεί ένας πετυχημένος κύκλος αντιγραφής όλων των μορίων minicircles, τότε επιδιορθώνονται και τα κενά στα νεοσυντιθέμενα μόρια (Englund 1978).

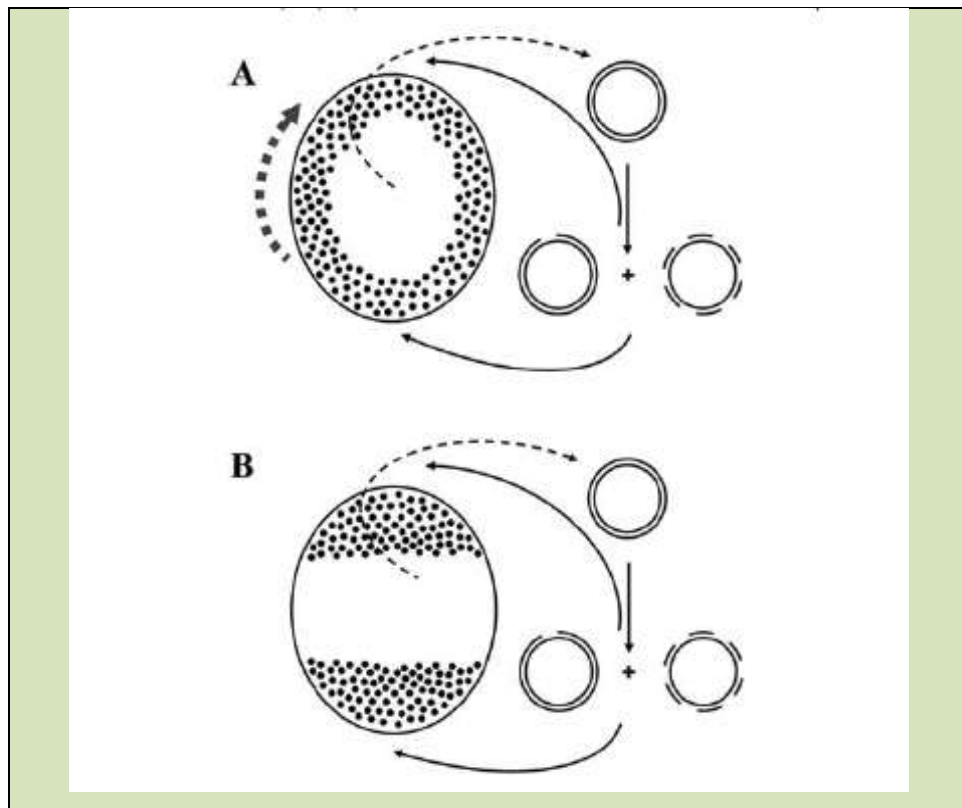
### **3.4.1 Αντιγραφή minicircles**

Η αντιγραφή ξεκινά με την απόσπαση ενός μορίου από την αλυσίδα, στην οποία είναι διευθετημένα, με την βοήθεια της τοποϊσομεράσης ii. Στη συνέχεια, αρχίζει να συντίθεται ο νέος κλώνος, συμπληρωματικός με την μητρική αλυσίδα, με μόριο εκκινητή το ολιγονουκλεοτίδιο GGGGTTGGTGTA, το οποίο είναι παρόν στην συντηρημένη περιοχή του μορίου (conserved region), σε όλα τα είδη των Kinetoplastida (Ntambi et al 1986; Ray 1989). Σε μερικά είδη, μάλιστα, η αλληλουχία επαναλαμβάνεται για δύο έως και τέσσερις φορές πάνω στο μόριο. Σ' αυτήν την περίπτωση, οι αλληλουχίες διατάσσονται διαμετρικά αντίθετα και η καθεμιά από αυτές, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εναρκτήριο μόριο (Birkenmeyer et al 1987). Μια δεύτερη, λιγότερο συντηρημένη αλληλουχία, ACGCCC, εντοπίζεται 70-90 νουκλεοτίδια καθοδικά της αλληλουχίας εκκινητή και το πρώτο τμήμα Okazaki, συντίθεται συμπληρωματικά με αυτήν (Ryan and Englund 1989). Έτσι, στην μία αλυσίδα η αντιγραφή πραγματοποιείται συνεχώς και στην άλλη ασυνεχώς,

ακολουθώντας πιστά τον παραδοσιακό ημισυντηρητικό τρόπο αναδιπλασιασμού του γενετικού υλικού στα θηλαστικά.

Στα τελικά στάδια της αντιγραφής, η τοποϊσομεράση *ii* διαχωρίζει τις νεοσυντιθέμενες αλυσίδες. Εάν αυτή η διαδικασία παρεμποδιστεί για οποιοδήποτε λόγο, τα νεοσυντιθέμενα μόρια συναθροίζονται σχηματίζοντας συσσωματώματα.

Μετά το διαχωρισμό, οι κλώνοι που περιέχουν τις συνεχώς νεοσυντιθέμενες αλυσίδες, διατηρούν ένα κενό στην αλληλουχία τους, το οποίο επικαλύπτει το ολιγονουκλεοτίδιο εκκίνησης GGGTTGGTGTA (Ntambi 1985), ενώ οι κλώνοι οι οποίοι έχουν συντεθεί ασυνεχώς, φέρουν ένα κενό στην πλευρά της αλληλουχίας ACGCCC, καθώς και κατά μήκος ολόκληρης της αλυσίδας. Η ασυνεχώς νεοσυντιθέμενη αλυσίδα, σταδιακά ωριμάζει πριν και μετά την είσοδό της στο δίκτυο (Kitchin et al. 1985). Ωστόσο, τα κενά που δημιουργούνται στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα, καθώς και τα πλευρικά χάσματα στο πρώτο τμήμα Okazaki, επιδιορθώνονται τελευταία (Ryan and Englund 1989). Πριν το διαχωρισμό των πρόδρομων δικτύων στα νέα κύτταρα, τα μόρια κλείνουν ομοιοπολικά σχηματίζοντας την τελική αλυσιδωτή δομή του δικτύου (Perez-Morga and Englund 1993). Η DNA πολυμεράση  $\beta$  είναι το μόριο, το οποίο συμβάλλει στην επούλωση των τελευταίων χασμάτων των νεοσυντιθέμενων μορίων, ακριβώς πριν αυτά διαχωριστούν στα δύο νέα θυγατρικά δίκτυα.



**Εικόνα 3.6:** Η αντιγραφή των minicircles του δικτύου kDNA. Η διαδικασία περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενους κύκλους αποδέσμευσης και επανασύνδεσης στο δίκτυο kDNA από το σύμπλοκο των τοποϊσομερασών.

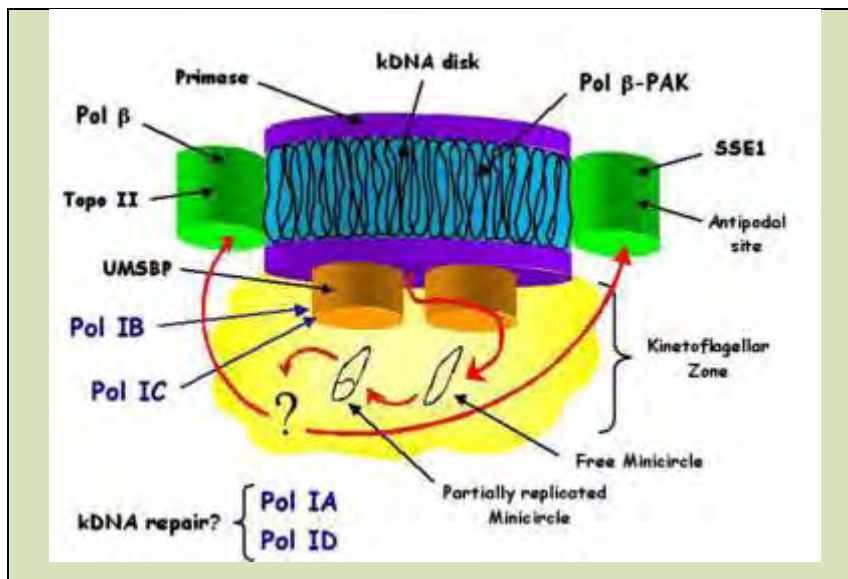
Όταν όλα τα μόρια minicircles ολοκληρώσουν την αντιγραφή τους στον S κύκλο, ο συνολικός αριθμός τους έχει διπλασιαστεί και όλα περιέχουν χάσματα και κενά όπως προαναφέραμε, τα οποία τελικά επιδιορθώνονται. Ωστόσο κάποιες δομικές και μορφολογικές αλλαγές του δικτύου είναι απαραίτητες για τη σωστή λειτουργία του. Από την ανατομία του δικτύου, είναι γνωστό το γεγονός ότι κάθε μόριο minicycle συνδέεται τουλάχιστον με τρία γειτονικά μόρια. Κατά την αντιγραφή, καθώς ο αριθμός των αντιγράφων διπλασιάζεται, αυξάνεται ταυτόχρονα και ο αριθμός των γειτονικών μορίων, φτάνοντας τα 6 σε αριθμό. Αυτή η αλλαγή, είναι το αποτέλεσμα της αύξησης των μορίων, δίχως ταυτόχρονη αύξηση του διαθέσιμου χώρου στο δίκτυο. Το γεγονός αυτό, προκαλεί μεγάλη συνάθροιση μορίων στον ίδιο χώρο. Όταν η αντιγραφή ολοκληρωθεί, η επιφάνεια του δικτύου διπλασιάζεται, προφανώς λόγω της μεγέθυνσης της μιτοχονδριακής μήτρας και ο



αριθμός των γειτονικών μορίων επανέρχεται στον αρχικό. Αυτές οι αλλαγές στην τοπολογία του δικτύου, είναι αποτέλεσμα της δράσης της τοποϊσομεράσης II (Chen et al. 1995).

### **3.4.2 Αντιγραφή maxicircles**

Η αντιγραφή των maxicircles, πραγματοποιείται κατά την S φάση του κυτταρικού κύκλου και είναι αλληλένδετη και απόλυτα συγχρονισμένη με την αντιγραφή των minicircles. Ο τρόπος αντιγραφής είναι ημισυντηρητικός, με το σχηματισμό της χαρακτηριστικής δομής θ. Ωστόσο, σε αντίθεση με τα minicircles, η αντιγραφή τους διεξάγεται ενώ αυτά είναι ακόμα προσκολλημένα στο δίκτυο (Carpenter and Englund 1995). Οι θέσεις, οι υπεύθυνες για την έναρξη της αντιγραφής, εντοπίζονται στις ευμετάβλητες περιοχές των μορίων και η αλληλουχία τους διαφέρει σε μήκος κατά μόλις ένα νουκλεοτίδιο σε σχέση με τα minicircles (GGGGTTGGTG). Η παρουσία στοιχείων UMS στα maxicircles ενθαρρύνουν την άποψη του κοινού μηχανισμού ρύθμισης της αντιγραφής για τα δύο μόρια του δικτύου, μέσω της δράσης της πρωτεΐνης UMSBP (UMS binding protein) (Shlomai 1994). Ωστόσο, η χαρτογράφηση τους, 2,5 με 3 kb μακριά από τις θέσεις έναρξης της αντιγραφής των μορίων, αντικρούει την παραπάνω θεωρία. Προφανώς τα δύο μόρια του δικτύου, χρησιμοποιούν διαφορετικές πρωτεΐνες, προκειμένου να ελέγξουν το σύστημα αναδιπλασιασμού τους. Η RNA πολυμεράση, αποτελεί ένα τέτοιο χαρακτηριστικό παράδειγμα, καθώς η παρουσία της κρίνεται απαραίτητη μόνο κατά τη διαδικασία αντιγραφής των maxicircles (Grams et al. 2002)



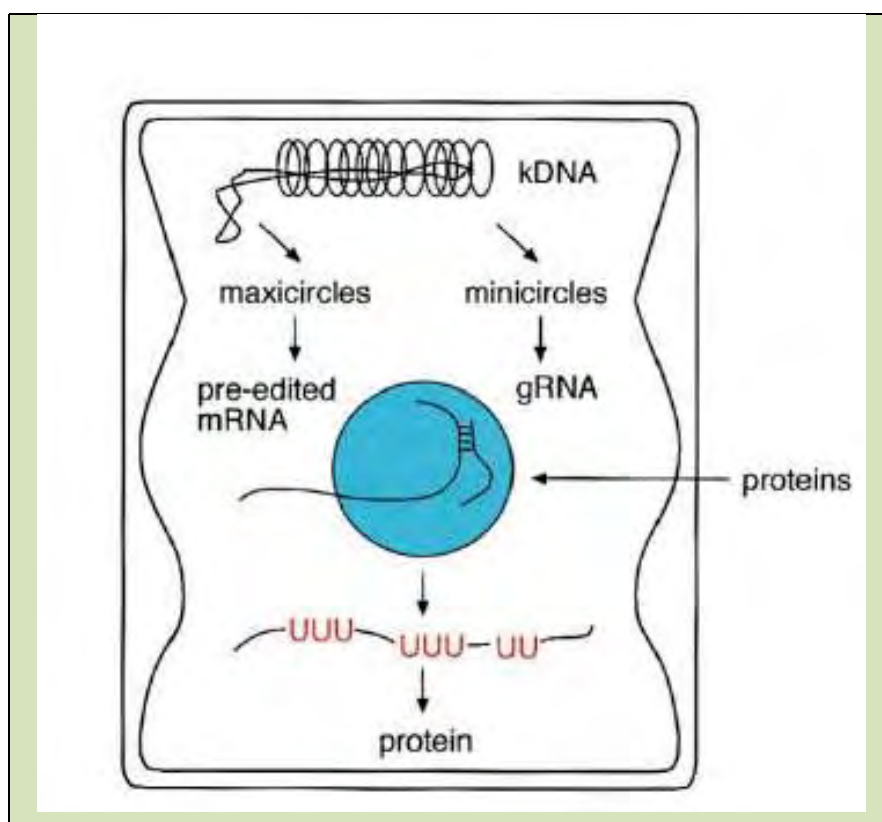
**Εικόνα 3.7:** Τα βασικά στάδια της αντιγραφής του kDNA. Η δισκοειδής μορφή (kDNA disk), η οποία φέρει τα μόρια minicycles παράλληλα διατεταγμένα στον άξονα του, περιβάλλεται από πρωτεΐνες της αντιγραφής. Τα μόρια minicircles απελευθερώνονται από το δίκτυο με τη δράση της DNA τοποϊσομεράσης II και αντιγράφονται με το σχηματισμό της δομής θ. Στην αντιγραφή λαμβάνει μέρος πλήθος πρωτεϊνικών μορίων (DNA πριμάση, DNA πολυμεράση, UMS binding protein κα.) Τα πρόδρομα ελεύθερα μόρια στη συνέχεια μεταναστεύουν στον πλευρικό άξονα (Antipodal site), όπου και πραγματοποιούνται τα επόμενα στάδια της αντιγραφής (αφαίρεση RNA εκκινητών από την πρωτεΐνη SSE1, επιδιόρθωση κενών από την DNA πολυμεράση β, σφράγισμα τις πλειοψηφίας των χασμάτων που δημιουργούνται κατά την αντιγραφή από την DNA λιγάση) Τα νεοσυντιθέμενα μόρια, τα οποία περιέχουν ακόμα ένα τουλάχιστον κενός την αλληλουχία τους, μεταφέρονται και συνδέονται στην περιφέρεια του δικτύου, μέσω της δράσης της τοποϊσομεράσης II. Τα τελευταία κενά στην αλληλουχία των μορίων επιδιορθώνονται μέσω της δράσης την DNA πολυμεράσης β-PAK.

### 3.5 RNA editing - Μηχανισμός μετα-μεταγραφικών τροποποιήσεων

Το RNA editing, αποτελεί ένα μετα-μεταγραφικό φαινόμενο τροποποίησης του RNA, το οποίο εμφανίζεται κατά κύριο λόγο στα μιτοχόνδρια της τάξης των Kinetoplastida (Estevez and Simpson 1999). Ο μηχανισμός περιλαμβάνει την αρχική υβριδοποίηση ενός ανώριμου μορίου (pre-mRNA), το οποίο έχει μόλις συντεθεί, με ένα συμπληρωματικό του μόριο οδηγό (gRNA). Το γεγονός αυτό προσελκύει στο σημείο μια ενδονουκλεάση, η οποία αναγνωρίζει τα συμπληρωματικά τμήματα (10-15 bp) μεταξύ των δύο μορίων και κόβει το mRNA στην πλευρά 3', αφαιρώντας το πρώτο ζεύγος ασύζευκτων βάσεων. Κατόπι, είτε μια τερματική ουριδυλο-τρανσφεράση (TUTase) προσθέτει κατάλοιπα ουριδίνης (U) με προσανατολισμό 3'-5', είτε με την δράση μίας ουριδυλο-εξωνουκλεάσης, αφαιρούνται κατάλοιπα ουριδίνης με τον ίδιο προσανατολισμό (Stuart and Feagin 1987). Τελικά με τη δράση μιας λιγάσης, ενώνονται οι ασυνέχειες στο μόριο του mRNA. Το μόριο gRNA αποδεσμεύεται από το σύμπλοκο, επιτρέποντας τον υβριδισμό νέων μορίων gRNAs στο μετάγραφο. Με τον μηχανισμό αυτό, η γενετική πληροφορία που φέρεται μέσα στα μόρια οδηγούς (gRNAs), μεταφέρεται στο μόριο του mRNA, διαμορφώνοντας ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORF) στα μετάγραφα των maxicircles του δικτύου (Madison-Antenucci et al. 2002).

Ο μηχανισμός του RNA editing, είναι υψίστης σημασίας για τα παράσιτα, καθώς η σωστή λειτουργία του είναι απαραίτητη προϋπόθεση για τη διεξαγωγή σημαντικών διεργασιών παραγωγής ενέργειας μέσα στο οργανίδιο του κινητοπλάστη των Trypanosomes, όπως η οξειδωτική φωσφορυλίωση. Η γενετική πληροφορία για το RNA editing εμφανίζεται, κατά κύριο λόγο, στην αλληλουχία των minicircles με την παρουσία γονιδίων που κωδικοποιούν για μόρια RNA οδηγούς (gRNAs). Η ετερογένεια νουκλεοτιδικής αλυσίδας που εμφανίζουν τα μόρια minicircles, ακόμα και στον ίδιο οργανισμό, φαίνεται να είναι ανάλογη με τον αριθμό των gRNAs που απαιτούνται για τη διαδικασία RNA editing (Benne 1993). Η διαδικασία περιλαμβάνει αφαιρέσεις, αντικαταστάσεις και προσθήκες βάσεων στα ανώριμα μετάγραφα mRNAs των maxicircles, τα οποία χαρακτηρίζονται και ως

κρυπτογονίδια (cryptogenes). Σε μερικές περιπτώσεις μάλιστα, το λειτουργικό μόριο mRNA που προκύπτει, μπορεί να έχει έως και τα μισά του νουκλεοτίδια τροποποιημένα. Ακόμα όμως και σε περιπτώσεις που η αλλαγή είναι μικρή, το προκύπτον αποτέλεσμα μπορεί να είναι εξίσου σημαντικό. Χαρακτηριστικό παράδειγμα, αποτελεί η αντικατάσταση μιας βάσης κυτοσίνης (C) από μια βάση ουρακίλης (U) στην νουκλεοτιδική αλυσίδα του μεταγράφου της Β λιποπρωτεΐνης, από την οποία προκύπτει ένα πρόωρο κωδικόνιο τερματισμού. Ωστόσο, είναι σημαντικό να αναφέρουμε το γεγονός ότι παρόλο που η διαδικασία είναι άμεσα συνδεδεμένη με το μιτοχόνδριο, πρωτεϊνικά μόρια, τα οποία κωδικοποιούνται από το γονιδίωμα του πυρήνα, λαμβάνουν μέρος στην αντίδραση (Grosjean and Benne 1998).



**Εικόνα 3.8:** Ο μηχανισμός επεξεργασίας των mRNA μεταγράφων (RNA editing) του δικτύου kDNA.

Τα μόρια gRNAs δημιουργούν ολιγονουκλεοτιδικά (12μερή) σύμπλοκα, υβριδίζοντας με τα πρώιμα μεταγγραφα των γονιδίων maxicircles (pre-mRNAs). Η επεξεργασία των πρώιμων μορίων mRNAs, με προσθήκη ή αφαίρεση καταλοίπων ουριδίνης, τα καθιστά μεταγραφικά ενεργά. Στον μηχανισμό, εμπλέκονται πρωτεΐνες οι οποίες κωδικοποιούνται από γονίδια του πυρηνικού DNA και μεταφέρονται μέσα στους κινητοπλάστες.

### 3.6 Διάγνωση της νόσου

Διάφορα είναι τα δείγματα βιολογικών υλικών, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εργαστηριακή διάγνωση της νόσου (Alvar et al. 1997):

- Τεμάχιο βιοψίας δέρματος για μικροσκοπική εξέταση και καλλιέργεια. Η λήψη γίνεται, συνήθως, από την περιφέρεια της δερματικής βλάβης.
- Βιοψία σπλήνας, ήπατος ή λεμφαδένων για μικροσκοπική εξέταση. Ο σπλήνας, θεωρείται το καταλληλότερο όργανο για τη μικροσκοπική παρατήρηση του παρασίτου, καθώς είναι το κύριο όργανο που προσβάλλουν τα μολυσμένα με τις αμαστιγωτικές μορφές του παρασίτου, μακροφάγα (Visceral Leishmaniasis).
- Δείγμα μυελού των οστών για μικροσκοπική εξέταση και καλλιέργεια, καθώς και για μοριακή διάγνωση.
- Δείγμα αίματος για μικροσκοπική εξέταση, καλλιέργεια και μοριακές μεθόδους.
- Ούρα για ανίχνευση αντιγόνων του παρασίτου.

Η διάγνωση της λεισμανίασης βασίζεται αρχικά στην κλινική παρατήρηση, στα επιδημιολογικά δεδομένα και σε μη-ειδικές βιολογικές παραμέτρους και επιβεβαιώνεται συνήθως τόσο με παρασιτολογικές, όσο και με ορολογικές και μοριακές μελέτες (Sundar and Rai 2002).

### 3.6.1 Παρασιτολογικές μελέτες

Οι τεχνικές αυτές βασίζονται κυρίως στην οπτικοποίηση του παρασίτου και παρατήρησή του με χρήση μικροσκοπίου. Η εξέταση παρασκευασμάτων από ιστούς (μυελός των οστών, δείγμα βιοψίας από σπλήνα ή ήπαρ, δείγμα λεμφαδένα) μετά από χρώση με Giemsa, παραμένει η πιο συνηθισμένη μέθοδος για την αναζήτηση του παρασίτου και πιο συγκεκριμένα των αμαστιγωτών μορφών, που είναι και η μόνη μορφή του παρασίτου που εντοπίζεται στους ιστούς. Αυτή η μέθοδος, αν και έχει 100% εξειδίκευση, παρουσιάζει συνήθως πολύ χαμηλό βαθμό ευαισθησίας. Ο εξεταστής πρέπει να διαθέτει εμπειρία, καθώς πρέπει να εξετάζει το χαρακτηριστικό μέγεθος και σχήμα των αμαστιγωτών μορφών του παρασίτου, καθώς και την παρουσία των ιδιαίτερων οργανιδίων του παρασίτου (κινητοπλάστη). Με τη χρώση, το κυτταρόπλασμα βάφεται μπλε, ενώ πυρήνας και κινητοπλάστης, κόκκινο ή ιώδες χρώμα. Άλλη μέθοδος αποτελεί η απομόνωση του παρασίτου από τις καλλιέργειες των ιστών (δείγματα από σπλήνα, μυελό των οστών, ήπαρ, λεμφαδένες) ή ενοφθαλμισμός σε πειραματόζωα (αρουραίους ή ποντίκια). Ωστόσο, η τεχνική είναι χρονοβόρα καθώς απαιτείται επώαση 2-3 μηνών. Για την καλλιέργεια του παρασίτου, χρησιμοποιείται το υλικό NNN (Novy-Nicolle-McNeal), επώαση στους 22°C για 3 βδομάδες, οπότε και αναπτύσσονται οι προμαστιγωτές μορφές του παρασίτου (Herwaldt 1999).

### 3.6.2 Ορολογικές δοκιμές

Η διάγνωση της νόσου μπορεί να στηριχτεί στην ανίχνευση των ειδικών αντισωμάτων με ανοσοδιαγνωστικές μεθόδους, η ευαισθησία και η ειδικότητα των οποίων εξαρτάται από την κλινική εικόνα εμφάνισης της νόσου. Σοβαρό μειονέκτημα των παραπάνω μεθόδων, αποτελεί η δυσκολία διάκρισης παλιάς και νέας λοίμωξης. Επίσης, η ανίχνευση των αντισωμάτων μπορεί να αποδειχτεί πολύ χρήσιμη στην περίπτωση της σπλαχνικής μορφής λεισμανίασης. Αντίθετα στη δερματική μορφή δεν έχει μεγάλα ποσοστά επιτυχίας, καθώς η πλειοψηφία των ασθενών δεν αναπτύσσουν αντισώματα έναντι του παρασίτου

(<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>). Η ανίχνευση IgG αντισωμάτων, κυρίως, συμβάλει στη διάγνωση, ενώ ο προσδιορισμός των IgM αντισωμάτων δε φαίνεται να είναι αξιόπιστος. Οι μέθοδοι προσδιορισμού των αντισωμάτων είναι η μέθοδος ELISA, ο έμμεσος ανοσοφθορισμός, η έμμεση αιμοσυγκόλληση και το Western Blot (Ryan et al. 2002; Arya 2002). Ο έμμεσος ανοσοφθορισμός χαρακτηρίζεται από 70-89% ειδικότητα και 55-70% ευαισθησία, το τεστ ELISA από 84-100% ειδικότητα και 63-100% ευαισθησία και τέλος η έμμεση αιμοσυγκόλληση από 72-95% ειδικότητα και 91-100% ευαισθησία (Sundar and Ray 2002).

### **3.6.3 Μοριακή διάγνωση**

Η τεχνική της PCR, αποτελεί την πιο ευαίσθητη και ειδική διαγνωστική μέθοδο, καθώς στηρίζεται στην ανίχνευση του DNA του παρασίτου. Οι μοριακές μέθοδοι διάγνωσης, εφαρμόζονται όλο και περισσότερο τα τελευταία χρόνια σε διάφορους τύπους δειγμάτων, όπως ο μυελός των οστών, ο σπλήνας, το αίμα και το δέρμα. Η ευαισθησία της μεθόδου, φαίνεται να επηρεάζεται σημαντικά από το κλινικό δείγμα, το οποίο χρησιμοποιείται (Iniesta et al. 2002) Η εφαρμογή της PCR σε περιφερικό αίμα και δέρμα παρουσιάζει υψηλά ποσοστά ευαισθησίας της τάξης του 94% και 95%, αντίστοιχα (Muller et al. 2003). Ωστόσο, επειδή κατά την διάρκεια της μόλυνσης το παράσιτο περιορίζεται κατά κύριο λόγο στους ιστούς, η ευαισθησία της μεθόδου, όπου χρησιμοποιείται περιφερειακό αίμα μειώνεται στο 50-70% και το υλικό των βιοψιών δέρματος θεωρείται καταλληλότερο, ειδικά στην περίπτωση της δερματικής μορφής λεισμανίασης (CL). (Manna et al. 2004). Η χρησιμοποίηση άλλων ιστών, όπως ο μυελός των οστών και η βιοψία σπλήνας και ήπατος, αυξάνουν την ευαισθησία σε ποσοστό έως και 100%. (Ashford et al. 1995).

Τα περισσότερα πρωτόκολλα PCR, στοχεύουν στην ανίχνευση διάφορων γονιδίων του παρασίτου. Διάφορες αλληλουχίες-στόχοι έχουν χρησιμοποιηθεί κατά καιρούς, αλλά αυτές που παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη ευαισθησία είναι όσες επαναλαμβάνονται πολλές φορές στο γονιδίωμα. Οι βασικότερες από αυτές είναι: α) γονίδια SSU rRNA (40-200 αντίγραφα/παράσιτο), β) η μη κωδική περιοχή ITS των γονιδίων rRNA (40-200/ παράσιτο) (Schönian et al. 2003), γ) το DNA του κινητοπλάστη και συγκεκριμένα τα minicircles μόρια του δικτύου (10000

μόρια/παράσιτο) (Rodgers et al. 1990), δ) γονίδια mini-exons (100-200 αντίγραφα/παράσιτο) (Katakura et al. 1999) ε) επαναλαμβανόμενες μη κωδικές περιοχές (Nasereddin et al. 2010). Τα περισσότερα διαγνωστικά κέντρα σήμερα, βασίζονται στην ενίσχυση του DNA του κινετοπλάστη (kDNA) του παρασίτου *Leishmania* και συγκεκριμένα των μικρόκυκλων του δικτύου (minicircles), τα οποία λόγω της έντονης παρουσίας τους στο παράσιτο (10000 μόρια/παράσιτο), αυξάνουν σημαντικά την ευαισθησία της αντίδρασης, σε ποσοστό έως και 100% (Rodgers et al. 1990). Η ενίσχυση των περιοχών ITS των γονιδίων rRNAs αποτελούν, επίσης, έναν αξιόλογο, αλλά με λιγότερο ευαισθησία, στόχο για την PCR (Parvizi et al. 2008).

### 3.7 Στόχος

Σκοπός της παρούσας μελέτης, ήταν η ανίχνευση κάποιων πιθανών πολυμορφισμών (SNPs) στην αλληλουχία των minicircles του δικτύου kDNA, οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την ανάπτυξη ανθρωποφιλικών και ζωοφιλικών χαρακτηριστικών στα διάφορα είδη του παρασίτου *Leishmania*. Το γεγονός ότι το 40% των σκύλων στην ευρύτερη περιοχή της Θεσσαλίας έχουν βρεθεί θετικοί στο παράσιτο, σε συνδυασμό με τα ελάχιστα κρούσματα ανθρώπινης λείσμανιάσης που έχουν καταγραφεί, οδήγησε στην ανάγκη μελέτης του φαινομένου σε γενετικό πλέον επίπεδο. Η ανάλυση ενός τόσο πολυμορφικού γενετικού τύπου, όπως τα μόρια του kDNA, αποτελούν ιδανικό στόχο για μία τέτοια μελέτη. Ο σχεδιασμός εκκινητών, οι οποίοι αναγνωρίζουν τη συντηρημένη περιοχή των minicircles του παρασίτου, έδωσε τη δυνατότητα προσδιορισμού του είδους του παρασίτου, μέσω προγραμμάτων βιοπληροφορικής. Η στοίχιση των αλληλουχιών που λάβαμε και η σύγκρισή τους με πρότυπες αλληλουχίες των μορίων από τη βάση δεδομένων, κρίθηκε καθοριστική για την αξιολόγηση της σημασίας των πολυμορφισμών (SNPs) και την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με το πιθανό ρόλο τους στον παρασιτισμό που αναπτύσσουν τα διάφορα στελέχη του γένους *Leishmania*.



## *4. ΠΕΙΡΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ*

Σκοπός μας σε πρώτη φάση, ήταν η απομόνωση του συνολικού αριθμού μορίων DNA από δείγματα αίματος σκύλων, τα οποία είχαν απομονωθεί από διάφορες περιοχές της Θεσσαλίας. Οι σκύλοι ήταν, είτε δεσποζόμενοι, είτε αδέσποτοι και εμφάνιζαν ή όχι κλινικά συμπτώματα λεισμανίασης, τα οποία καταγράφηκαν από το προσωπικό του κτηνιατρείου, προκειμένου να έχουμε μία πρώτη εικόνα και γενική εκτίμηση της κατάστασης. Βεβαίως, η εξακρίβωση των αποτελεσμάτων έγινε με χρήση μοριακών τεχνικών και συγκεκριμένα με ενίσχυση της μικρής υπομονάδας DNA του κινητοπλάστη της λεισμάνια (kDNA) με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), όπως θα αναλυθεί και στη συνέχεια.

Παρακάτω, παρατίθεται ένας πίνακας με όλα τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή της PCR. Ο πίνακας μας δίνει πληροφορίες σχετικά με την περιοχή απομόνωσης του δείγματος, το φύλο, την ηλικία, την κατάσταση (δεσποζόμενο ή αδέσποτο), καθώς και τα πιθανά συμπτώματα της λεισμανίασης που εμφάνιζαν οι σκύλοι.

Δείγμα	Ηλικία	Φύλο	Κατάσταση	Υγεία	Περιοχή
1	15	ΑΡΡΕΝ	Α	ΔΑ	ΚΑΡΔΙΤΣΑ
2	24	ΘΗΛΥ	ΔΣ	Άρρωστο	ΛΑΡΙΣΑ
3	120	ΑΡΡΕΝ	ΔΣ	ΔΑ	ΤΡΙΚΑΛΑ
4	60	ΑΡΡΕΝ	Α	ΔΑ	ΛΑΡΙΣΑ
5	28	ΘΗΛΥ	Α	Υγιείς	ΤΥΡΝΑΒΟΣ
6	30	ΑΡΡΕΝ	Α	Τραύμα	ΕΛΑΣΣΟΝΑ
7	42	ΑΡΡΕΝ	ΔΣ	Άρρωστο	ΟΛΥΜΠΙΑΔΑ
8	36	ΘΗΛΥ	ΔΣ	Υγιείς	ΛΑΡΙΣΑ
9	18	ΑΡΡΕΝ	Α	Ωτίτιδα	ΤΥΡΝΑΒΟΣ
10	12	ΑΡΡΕΝ	Α	ΔΑ	ΛΑΡΙΣΑ
11	132	ΘΗΛΥ	ΔΣ	Μάζα	ΛΑΡΙΣΑ
12	126	ΑΡΡΕΝ	ΔΣ	Πυρετός	ΛΑΡΙΣΑ
13	48	ΘΗΛΥ	Α	Υγιείς	ΤΥΡΝΑΒΟΣ
14	48	ΑΡΡΕΝ	Α	Τραύμα	ΦΑΡΚΑΔΟΝΑ

15	36	ΘΗΛΥ	A	ΔΑ	ΛΑΡΙΣΑ
16	12	ΑΡΡΕΝ	ΔΣ	ΔΑ	ΤΡΙΚΑΛΑ

\*ΔΣ: δεσποζόμενο

\*\*Α: αδέσποτο.

\*\*\*ΔΑ: δερματικές αλλοιώσεις

Πίνακας 4.1: Δείγματα περιφερειακού αίματος σκύλων για την ανίχνευση του παρασίτου *Leishmania*, μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.

Επιπλέον, χρησιμοποιήσαμε και τα δείγματα από προηγούμενη διπλωματική εργασία, τα οποία είχαν ταυτοποιηθεί θετικά με PCR, η οποία είχε ως στόχο τις ITS (rRNA) μη κωδικές περιοχές του παρασίτου.

Δείγματα θετικά με ITS ενίσχυση: 3,4,6,11,18,19,22,26,28,30,32,49,50,54,74,78.

## 4.1 Απομόνωση DNA από αίμα

Αρχικά, απομονώθηκε ολικό DNA από τα δείγματα αίματος με τη χρήση του «Wizard Genomic DNA Purification Kit» της εταιρίας promega ([www.promega.com](http://www.promega.com)). Το kit περιέχει τα εξής αντιδραστήρια:

- **Cell Lysis solution:** χρησιμοποιείται για τη λύση των κυττάρων και την απελευθέρωση του περιεχομένου τους.
- **Nuclei Lysis Solution:** βοηθά στη λύση των πυρήνων
- **Rnase solution:** απομακρύνει τα μόρια RNA του διαλύματος, ώστε να απομονώσουμε καθαρότερο DNA.
- **Protein Precipitation Solution:** βοηθά στον κατακερματισμό των διάφορων πρωτεϊνών του διαλύματος.
- **DNA rehydration solution:** χρησιμοποιείται για τη αναδιάλυση του ιζήματος DNA.

Η διαδικασία έχει ως εξής:

1) Προσεχτικά, αφού αφήσουμε να ξεπαγώσει το δείγμα μας, πιπετάρουμε μερικές φορές τον όγκο αίματος. Στη συνέχεια, μεταφέρουμε σε αποστειρωμένο σωληνάκι 300 μl όγκου από το δείγμα μας. Εδώ πρέπει να σημειωθεί ότι η συλλογή των δειγμάτων έγινε μέσα σε διάλυμα EDTA, προκειμένου να αποφευχθεί η πήξη τους, έναντι της ηπαρίνης, η οποία αποτελεί αποδεδειγμένο αναστολέα της PCR. Ακολούθως, προστίθενται 900 μl **Cell Lysis Solution** στο δείγμα και ανακινούμε μερικές φορές ώστε να γίνει ομοιόμορφο το μίγμα.

2) Αποθηκεύουμε το μίγμα για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, αναδεύοντας ελαφρά ανά τακτά χρονικά διαστήματα, προκειμένου να γίνει η λύση των κυττάρων. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000-16000 στροφές σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, απομακρύνουμε όσον το δυνατόν περισσότερο υπερκείμενο, προσέχοντας να μην αναταράξουμε ή απορροφήσουμε το ορατό λευκό ίζημα που σχηματίζεται στον πάτο του tube. Σ' αυτή τη φάση, το ορατό ίζημα φέρει όλα τα περιεχόμενα των κυττάρων μετά τη λύση (DNA, RNA, πρωτεΐνες). Γι' αυτό το λόγο είναι καλό να αφήνουμε μικρό όγκο υπερκείμενου υγρού της τάξης των 10-20 μl μαζί με το ίζημα του περιεχομένου των κυττάρων.

3) Κατόπι, αναδεύουμε το σωληνάκι με έντονο vortex, έως ότου το ίζημα να επαναιωρηθεί. Αυτό το βήμα είναι αναγκαίο, προκειμένου να επιτύχουμε μία αποτελεσματική λύση των κυττάρων μας.

4) Ακολουθεί η προσθήκη 300μl **Nuclei Lysis Solution** στο tube που περιέχει το επαναιωρημένο ίζημα και η ανάδευση του μίγματος που δημιουργήθηκε με προσεχτικό πιπετάρισμα 4-5 φορές, ώστε να γίνει η λύση των πυρήνων. Εάν η παραπάνω διαδικασία είναι επιτυχής, πρέπει το διάλυμά μας να γίνει ιξώδες. Εάν υπολείμματα κυττάρων είναι ορατά μετά την προσθήκη του διαλύματος λύσης πυρήνων, αποθηκεύουμε το μίγμα στους 37 °C, έως ότου αναδιαλυθούν.

5) Προαιρετικά σ' αυτό το βήμα, μπορούμε να προσθέσουμε διάλυμα RNAσης, προκειμένου να απομακρύνουμε τα μόρια RNA που απελευθερώθηκαν από τη λύση του πυρήνα και να έχουμε καθαρότερο DNA, δίχως προσμίξεις στο τελικό μας

διάλυμα. (1.5μl **RNase solution**, ανάδευση του tube και αποθήκευση στους 37 °C για 15 λεπτά.

6) Προσθέτουμε 100 μl **Protein Precipitation Solution** στο διάλυμά μας και κάνουμε έντονο vortex για 10-20 δευτερόλεπτα. Μικρά συσσωματώματα πρωτεϊνών γίνονται ορατά με το μάτι μετά από την ανάδευση. Φυγοκεντρούμε στις 13000-16000 στροφές/λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου για 3 λεπτά. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης εμφανίζεται ένα μαύρο ίζημα στον πάτο του tube, το οποίο αντιστοιχεί στις κατακερματισμένες πρωτεΐνες του προηγούμενου μας δείγματος.

7) Μεταφέρουμε το υπερκείμενο, αφήνοντας πίσω μερικά μl μαζί με το ίζημα, προκειμένου να μην μολύνουμε το DNA μας, σε αποστειρωμένο tube, το οποίο περιέχει 300 μl ισοπροπανόλης. Η ισοπροπανόλη, όπως και η αιθανόλη, η προσθήκη της οποίας ακολουθεί, βοηθά στην κατακρήμνιση του DNA. Φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου στις 13000-16000 στροφές/min. Μετά την φυγοκέντρηση, το DNA είναι ορατό σαν ένα λευκό ίζημα στον πάτο του tube. Εάν το ίζημα δεν εμφανιστεί, δεν σημαίνει απαραίτητα ότι δεν έχουμε και DNA, καθώς πολλά δείγματα που δεν έδωσαν ίζημα, έδωσαν θετικό αποτέλεσμα στην PCR. Ωστόσο, μπορούμε να συμβάλουμε στη κατακρήμνιση με την τοποθέτηση των δειγμάτων μας σε πάγο για 15 λεπτά.

8) Αδειάζουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε ίδιο όγκο παγωμένης αιθανόλης 70% (300μl). Ανακινούμε πάνω κάτω το tube, ώστε να ξεπλύνουμε το ίζημα και τα τοιχώματα του tube. Ακολουθεί μία δεύτερη φυγοκέντρηση στις 13000-16000 στροφές, απομάκρυνση του υπερκειμένου με πιπέτα, με μεγάλη προσοχή καθώς σε αυτό το στάδιο το ίζημα είναι πολύ ευαίσθητο και τοποθέτηση των δειγμάτων σε ειδικό φουρνάκι σε θερμοκρασία 45 °C, προκειμένου να στεγνώσει το ίζημα, με χαρτί πάνω από τα ανοιχτά tubes για να απόφευχθούν τυχόν μολύνσεις. Αφού στεγνώσει το ίζημα, προσθέτουμε 100 μl **DNA rehydration solution** , το οποίο βοηθά στην αναδιάλυση του ιζήματος και είτε αποθηκεύουμε το δείγμα σε υδατόλουτρο στους 65 °C για μία ώρα, εάν πρόκειται να το χρησιμοποιήσουμε αυθημερόν, ανακινώντας το ανά τακτά χρονικά διαστήματα, είτε στο ψυγείο overnight.

## 4.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μία σύγχρονη τεχνική, η οποία στηρίζεται στον επιλεκτικό πολλαπλασιασμό, κατά μερικά εκατομμύρια φορές, ενός μορίου στόχου, είτε αυτό πρόκειται για γονίδιο, ή τμήμα γονιδίου ή μη κωδικοποιούσα περιοχή. Η μέθοδος, αναπτύχθηκε το 1985 από τους Mullis και Silverstein και άρχισε να χρησιμοποιείται ευρέως το 1987 με την χρήση θερμοανθετικών DNA πολυμερασών. Η ευαισθησία και ταχύτητα της μεθόδου αυτής έχει επιφέρει επανάσταση στη Μοριακή Γενετική, δίνοντας καινούργιες προοπτικές για τη μελέτη και ανάλυση γονιδίων, καθώς και διάφορων ασθενειών που συνδέονται με τα γονίδια αυτά (Watson et al. 2007).

Η βασική αρχή της μεθόδου, στηρίζεται στην επαναλαμβανόμενη αντιγραφή ενός τμήματος DNA (γνωστού ή αγνώστου) με τη βοήθεια ενός θερμοανθεκτικού ενζύμου-πολυμεράσης και δύο ολιγονουκλεοτιδικών εναρκτήριων μορίων-εκκινητών, σχεδιασμένων πάνω σε γνωστές αλληλουχίες. Αποτελείται από επαναλαμβανόμενους κύκλους, κάθε ένας από τους οποίους χωρίζεται περαιτέρω σε επιπλέον στάδια. Κάθε διακριτό στάδιο, χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένη θερμοκρασία, προκειμένου να γίνει η θερμική αποδιάταξη και η αντιγραφή του μορίου στόχου (<http://www.fermentas.com>).

Τα συστατικά που περιέχονται στο μίγμα της αντίδρασης είναι τα εξής:

**Μήτρα DNA:** Είναι το μόριο στόχος το οποίο περιέχει ολόκληρη ή μέρος της αλληλουχίας, την οποία θέλουμε να ενισχύσουμε (Markoulatos et al. 2002).

**Εκκινητικά μόρια (primers):** Είναι τα μόρια που χρησιμοποιεί η DNA πολυμεράση, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η έναρξη της αντιγραφής ([www.fermentas.com](http://www.fermentas.com)).

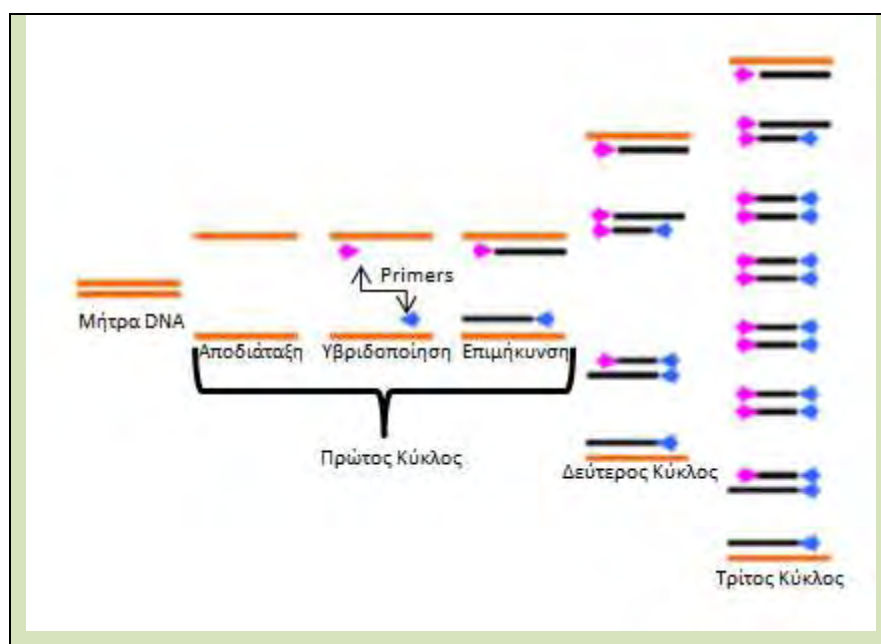
**MgCl<sub>2</sub>:** Τα δισθενή ιόντα Mg<sup>2+</sup> που προέρχονται από τη διάσταση του χλωριούχου μαγνησίου, είναι απαραίτητα για την δράση της Taq πολυμεράσης, καθώς η τελευταία για να δράσει, απαιτεί ως μεταλλικό συμπράγοντα το μαγνήσιο (Markoulatos et al. 2002).

**PCR Buffer:** Είναι το ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης, το οποίο παρέχει το κατάλληλο χημικό περιβάλλον για τη βέλτιστη δραστητικότητα της Taq πολυμεράσης.

**dNTPs (τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια):** Είναι οι δομικοί λίθοι της αντίδρασης, τους οποίους θα χρησιμοποιήσει η Taq πολυμεράση για τη σύνθεση του νέου κλώνου σε κάθε επαναλαμβανόμενο κύκλο της PCR.

**Taq DNA πολυμεράση:** Είναι το θερμικά σταθερό ένζυμο, το οποίο καταλύει την αντίδραση πολυμερισμού της PCR.

Η αντίδραση της PCR αποτελείται συνήθως από μία σειρά επαναλαμβανόμενων κύκλων. Κάθε κύκλος PCR περιλαμβάνει τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες για τα 3 στάδια, αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης. Η αποδιάταξη του DNA επιτυγχάνεται συνήθως σε θερμοκρασία 94-95°C για 30 sec περίπου, ο υβριδισμός ανάλογα με τη σύνθεση των βάσεων A/T, G/C των εκκινητών σε θερμοκρασία 50-65°C επί 20 sec έως 1 min και τέλος η επέκταση των εκκινητών στους 72-74°C επί 30 sec έως 1 min, ανάλογα του μεγέθους του προϊόντος της PCR και της ποιότητας της Taq DNA πολυμεράσης.



**Εικόνα 4.1:** Τα βασικά βήματα της PCR.

Πιο αναλυτικά, κατά την αντίδραση PCR πραγματοποιείται:

**Αρχική αποδιάταξη:** Η αρχική αποδιάταξη του DNA είναι το πρώτο βήμα της αντίδρασης. Πραγματοποιείται σε διάστημα 1-9 min στους 94-96 °C (Sharkey et al. 1994).

**Αποδιάταξη:** Το βήμα της αποδιάταξης, πραγματοποιείται στην αρχή κάθε νέου κύκλου της PCR και αποτελεί το σπάσιμο των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων των απέναντι αλυσίδων του μορίου-στόχου με θερμική αποδιάταξη. Η θερμοκρασία αποδιάταξης ορίζεται κατά μέσο όρο στους 94-96 °C, για χρονικό διάστημα 20-30 sec.

**Υβριδοποίηση:** Το στάδιο αυτό, περιλαμβάνει τη σύνδεση των εναρκτηρίων μορίων στη μονόκλωνη μήτρα DNA που έχει προκύψει από τη θερμική αποδιάταξη. Η θερμοκρασία υβριδισμού (Τα) είναι συνήθως 5 °C χαμηλότερη από τη θερμοκρασία αποδιάταξης των εκκινήτων (Tm) και κυμαίνεται από 50 έως 65 °C. Το βήμα της υβριδοποίησης, διαρκεί συνήθως 30-40 sec (Mullis and Faloona 1987).

**Επέκταση (πολυμερισμός):** Είναι το βήμα της επιμήκυνσης της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας από το ένζυμο της Tag πολυμεράσης, η οποία παρουσιάζει βέλτιστη δραστηριότητα στους 75-80 °C. Ωστόσο, το βήμα του πολυμερισμού πραγματοποιείται στους 72 °C. Ο πολυμερισμός, όπως και η αντιγραφή του DNA in vivo, έχει προσανατολισμό 5'-3'.

### **Αριθμός κύκλων**

Ο βέλτιστος αριθμός κύκλων σε μία PCR πρέπει να προσδιορίζεται πειραματικά με βάση την επιθυμητή παραγωγή προϊόντος, αλλά και την αποφυγή σχηματισμού μη ειδικού προϊόντος. Συνήθως, ο βέλτιστος αριθμός κύκλων είναι 30-40, αλλά αυτό μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με την εφαρμογή (Innis 1990).

**Τελική επέκταση:** Σ' αυτό το βήμα, λαμβάνει χώρα η συμπλήρωση των προεξεχόντων άκρων των νεοσυντιθέμενων προϊόντων της αντίδρασης. Επίσης, κατά τη διάρκεια του βήματος αυτού, προστίθενται επιπλέον νουκλεοτίδια



αδενίνης (A) στο 3' άκρο των PCR προϊόντων. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της δράσης της τερματικής τρανσφεράσης που διαθέτει η Tag πολυμεράση.

Στην παρούσα εργασία, 16 δείγματα ολικού αίματος σκύλων, ύποπτα προς λεισμανίαση, απομονώθηκαν από την ευρύτερη περιοχή της Θεσσαλίας, από το προσωπικό του κτηνιατρείου. Οι σκύλοι, εμφάνιζαν τα τυπικά συμπτώματα της ασθένειας σε ένα μεγάλο ποσοστό, ωστόσο χρησιμοποιήθηκαν και δείγματα αίματος υγιών ατόμων, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν ως αρνητικό control στην ταυτοποίηση με PCR. Στόχος της PCR, ήταν το DNA του κινητοπλάστη της λεισμανίας (kDNA), το οποίο αποτελεί ένα αξιόλογο στόχο, καθώς εμφανίζεται σε χιλιάδες αντίγραφα μέσα σε κάθε παράσιτο (10000 minicircles/παράσιτο).

Τα βήματα της αντίδρασης PCR της μελέτης μας ήταν τα εξής:

1. 93 ° C για 4 min
2. 93 ° C για 30 sec
3. 53 ° C για 1 min
4. 72 ° C για 1,5 min
5. Το βήμα 2 επαναλαμβάνεται για 35 κύκλους
6. 72 ° C για 5 min
7. 4 ° C forever(διατήρηση)

Η αντίδραση της PCR, πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 20 μl για κάθε δείγμα.

**Η διαδικασία έχει ως εξής:** Τα αντιδραστήρια της PCR, τα οποία είναι αποθηκευμένα στους -20 °C, εφόσον χρησιμοποιηθούν επανατοποθετούνται και πάλι στο πάγο. Γενικά, προτιμάμε πάντοτε να δουλεύουμε μέσα στον πάγο κατά την προετοιμασία των δειγμάτων μας για τη σωστή διατήρησή τους . Όσον αφορά την καθαυτού διαδικασία, επειδή η αντίδραση εκτελέστηκε ταυτόχρονα για όλα τα δείγματα, προετοιμάσαμε αρχικά ένα mix, το οποίο περιείχε όλα τα αντιδραστήρια για τη διεξαγωγή της αντίδρασης, εκτός από το DNA, σε αναλογίες αντίστοιχες με τον αριθμό των δειγμάτων μας. Το mix περιέχει αποστειρωμένο νερό, το PCR Buffer, τα dNTPs, τους εκκινητές και την Taq

πολυμεράση και παρασκευάζεται σε αποστειρωμένο errendorf, χωρητικότητας 1,5 ml. Εδώ πρέπει να σημειωθεί ότι η Taq πολυμεράση προστίθεται τελευταία στο mix, πριν αυτό διαμοιραστεί στα PCR tubes που φέρουν το DNA των προς ενίσχυση δειγμάτων μας, καθώς το ένζυμο είναι ευαίσθητο και η ενεργότητά του εξασθενεί σημαντικά, εάν παραμείνει αρκετή ώρα εκτός κατάψυξης. Επιπλέον, καθώς η πολυμεράση αρχίζει να λειτουργεί άμεσα μετά την προσθήκη της, τα δείγματα πρέπει να διατηρούνται στον πάγο κατά το διάστημα της διαμοίρασης, όπου το ένζυμο αδρανοποιείται μερικώς. Μέσα σε σχετικά σύντομο διάστημα από την προσθήκη της Taq, τα δείγματα πρέπει να εισαχθούν στην συσκευή PCR, προκειμένου να αποφευχθούν μη ειδικές ενσωματώσεις από το ένζυμο. Η αντίδραση μας, όπως προαναφέραμε, πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 20 μl για κάθε δείγμα. Έτσι, σε κάθε PCR tube, προστέθηκαν 18 μl από το mix μας και 2μl δείγματος DNA. Όλα τα αντιδραστήρια αναδεύτηκαν ελαφρώς με vortex πριν την χρησιμοποίησή τους, πλην των dNTPs και της Taq πολυμεράσης. Στον παρακάτω πίνακα, εμφανίζεται αναλυτικά η σύσταση του μίγματος της αντίδρασης:

	Αρχική συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση	Όγκος (μl)
DNA	-	-	2,0
PCR Buffer	10x	1x	2,0
MgCl <sub>2</sub>	50mM	1.5mM	0,6
dNTPs	40mM (10mM each)	0,8mM	0,4
IRAN kDNA-R	10mM	0,4mM	0,8
IRAN kDNA-F	10mM	0,4mM	0,8
Taq polymerase	5u/μl	1u	0,2
H <sub>2</sub> O	-	-	13,2
Τελικός όγκος			20μl

**Πίνακας 4.2:** Αντιδραστήρια PCR.

Η PCR έγινε με τη χρήση εκκινητών, ειδικά σχεδιασμένους για τη *Leishmania*. Ο σχεδιασμός τους πραγματοποιήθηκε στο τμήμα βιοτεχνολογίας του ινστιτούτου Pasteur, το οποίο εδρεύει στο Ιράν (Cimagen-Iran) (Mahboudi et al. 2002). Το συγκεκριμένο ζεύγος εκκινητών, σχεδιάστηκε για την ταυτοποίηση και διαφοροποίηση των ειδών *Leishmania* μεταξύ του παλαιού και του νέου κόσμου. Οι εκκινητές αυτοί, οδηγούν στην ενίσχυση του DNA του κινετοπλάστη (k-DNA) της *Leishmania*, στοχεύοντας τόσο τις συντηρημένες (conserved), όσο και τις ευμετάβλητες περιοχές (variable), ενισχύοντας ουσιαστικά ολόκληρη την αλληλουχία των minicircles (μικρών κυκλικών μορίων) του κινητοπλάστη του παρασίτου. Ανάλογα με το είδος *leishmania*, οι εκκινητές ενισχύουν διαφορετικά μεγέθη του kDNA, χαρακτηριστικό του κάθε είδους, με αποτέλεσμα να μπορεί να γίνει διάκριση των ειδών μετά από ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης. Οι αλληλουχίες των εκκινητών, είναι:

**IRAN-kDNA-R: 5'-AGGGGTTGGGTGTAAAATAGGC-3'**

**IRAN-kDNA-F: 5'-TCGCAGAACGCCCCTACC-3'**

Το προϊόν της αντίδρασης PCR είναι το kDNA ενισχυμένο και επειδή το μέγεθος του μορίου ποικίλλει ανάμεσα στα διάφορα είδη *leishmania*, το προϊόν μας κυμαίνεται μεταξύ 650 bp (*L.infantum*), 800 bp (*L.donovani*), 850bp (*L.tropica*) και δύο μπάντες των 620 και 850 bp (*L.major*) (Mahboudi et al. 2002).

## 4.3 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης

Ο έλεγχος της επιτυχίας της PCR γίνεται με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της σε πήκτωμα αγαρόζης. Η μέθοδος αυτή, διαχωρίζει τα μόρια DNA (ή RNA) με βάση το μέγεθός τους. Η αρχή της μεθόδου, βασίζεται στην ιδιότητα που έχουν τα αρνητικά φορτισμένα μόρια του DNA να μετακινούνται προς τον θετικά φορτισμένο πόλο ενός ηλεκτρικού πεδίου, μέσα από τους πόρους ενός πηκτώματος αγαρόζης (Sambrook and Russel 2001).

Οι παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν την ηλεκτροφορητική κινητικότητα ενός μορίου DNA, είναι οι εξής ([www.edvotek.com](http://www.edvotek.com)):

1. **Το μέγεθος του μορίου:** ουσιαστικά, όσο μεγαλύτερο είναι ένα μόριο DNA, τόσο μεγαλύτερη δυσκολία θα έχει να περάσει μέσα από τους πόρους του πηκτώματος αγαρόζης.
2. **Η στερεοδιάταξη του μορίου:** ένα γραμμικό μόριο, ένα κυκλικό μη υπερελικωμένο και ένα υπερελικωμένο κυκλικό μόριο με το ίδιο μοριακό βάρος θα εμφανίζουν διαφορετική κινητικότητα σ' ένα πήκτωμα αγαρόζης.
3. **Η συγκέντρωση της αγαρόζης:** μεγάλες συγκεντρώσεις αγαρόζης ( π.χ 2 %), χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό μικρότερων μορίων DNA, ενώ ο διαχωρισμός μεγαλύτερων μορίων επιτυγχάνεται καλύτερα σε μικρότερες συγκεντρώσεις αγαρόζης.
4. **Η εφαρμοζόμενη τάση:** Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα αυξάνεται, καθώς αυξάνει η τάση του πεδίου. Ωστόσο, σε χαμηλής ισχύος πεδίο, η κίνηση είναι ανάλογη της ισχύος του πεδίου, ενώ σε υψηλής ισχύος πεδίο, μειώνεται η διακριτική ικανότητα.

Η οπτικοποίηση του DNA στο πήκτωμα αγαρόζης, επιτυγχάνεται με τη χρήση του βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) ([www.edvotek.co](http://www.edvotek.co)).

Για την παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης, χρησιμοποιήθηκε αγαρόζη σε μορφή σκόνης και ένα ρυθμιστικό διάλυμα TBE (Tris-Borate EDTA), το οποίο περιέχει Tris-boric acid και EDTA.

Πριν τη φόρτωση των δειγμάτων μας στα πηγαδάκια του gel ηλεκτροφόρησης, το DNA αναμιγνύεται με ένα διάλυμα χρωστικής (loading buffer). Η χρωστική αυτή είναι, συνήθως, το μπλε της βρωμοφαινόλης ή το κυανό της ξυλόλης και χρησιμοποιείται ως δείκτης της πορείας της αντίδρασής μας. Οι χρωστικές αυτές έχουν την ιδιότητα να φαίνονται με γυμνό μάτι και να συμπεριφέρονται στην ηλεκτροφόρηση ως ανεξάρτητα κομμάτια DNA, συγκεκριμένου μεγέθους ([http://en.Wikipedia.org/wiki/Gel\\_electrophoresis](http://en.Wikipedia.org/wiki/Gel_electrophoresis)).

Σε κάθε ηλεκτροφόρηση, είναι απαραίτητη η φόρτωση ενός πηγαδιού με τον DNA ladder. Ο ladder περιέχει ένα σύνολο μορίων DNA διαφορετικών μεγεθών, με αποτέλεσμα το κάθε ένα μόριο να έχει τη δική του ηλεκτροφορητική κινητικότητα μέσα στο gel αγαρόζης και να αποτελεί δείκτη υπολογισμού του μεγέθους των μπαντών που προκύπτουν από την ηλεκτροφόρηση.

### **Ακολουθήσε η παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης για την ηλεκτροφόρηση.**

#### **Η διαδικασία που ακολουθήσαμε, ήταν η εξής:**

Αρχικά, φτιάχνουμε το διάλυμα αγαρόζης. Το gel μας, μπορεί να έχει 8, 16 ή 32 θέσεις ανάλογα με τα δείγματα που έχουμε προς φόρτωση κάθε φορά. Συνήθως, φτιάχναμε gel με περιεκτικότητα σε αγαρόζη 1%. Ζυγίζουμε 1,6 gr αγαρόζης και τα προσθέτουμε σε κωνική φιάλη που περιέχει 160 ml διαλύματος TBE συγκέντρωσης 0,5 (gel 8 θέσεων φόρτωσης). Ακολουθεί ήπια ανάδευση με το χέρι. Ζυγίζουμε τη φιάλη και την εισάγουμε στο φούρνο μικροκυμάτων, έως ότου διαλυθούν οι κρύσταλλοι της αγαρόζης και το διάλυμα να είναι διαυγές. Ανοιγοκλείνουμε συχνά το φουρνάκι, προκειμένου να αποφύγουμε τον αναβρασμό. Κατόπι, κρύνουμε το διάλυμα αγαρόζης κάτω από τη βρύση, έως ότου να μπορούμε να το αγγίξουμε για 10 sec συνεχόμενα. Όταν κρύνει αρκετά, προσθέτουμε 1,5 μl βρωμιούχου αιθιδίου και αναδεύουμε. Αδειάζουμε το περιεχόμενο της κωνικής φιάλης στη βάση του gel για στερεοποίηση, εφόσον προηγουμένως έχουμε τοποθετήσει την ειδική

χτένα για την δημιουργία των πηγαδιών της ηλεκτροφόρησης. Αναμένουμε έως ότου στερεοποιηθεί το gel και απομακρύνουμε προσεχτικά τη χτένα. Το gel με γάντι, μεταφέρεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει μέχρι το σημείο max διάλυμα TBE 0,5X. Πριν τη φόρτωση των δειγμάτων στα πηγαδάκια, προσθέτουμε το loading buffer δείγματα (3  $\mu$ l) για να παρακολουθήσουμε την πορεία της ηλεκτροφόρησης. Φορτώνουμε τα δείγματα και ρυθμίζουμε τη συσκευή στις 100 V, έως ότου ανοίξουν ξεκάθαρα οι μπάντες μας και ο ladder και να έχουμε τη δυνατότητα να διακρίνουμε ξεκάθαρα το μέγεθος των προϊόντων μας. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το gel ελέγχεται για την ύπαρξη μπαντών στην UV και εφόσον διαπιστωθούν επιθυμητά προϊόντα, προχωράμε στη λήψη φωτογραφίας. Η αποθήκευση και επεξεργασία των αποτελεσμάτων στον υπολογιστή, μας δίνει την δυνατότητα καλύτερης εκτίμησης των προϊόντων της PCR.

Ακολούθησε η απομόνωση των DNA από το gel (gel extraction) προκειμένου τα ενισχυμένα προϊόντα της PCR (PCR products), να αποσταλούν για αλληλούχιση, είτε άμεσα, είτε έμμεσα με κλωνοποίηση σε πλασμιδιακό φορέα.

## 4.4 Gel extraction

Η απομόνωση του DNA από το πήκτωμα αγαρόζης, έγινε με κοπή των ζωνών από το gel, κάτω από τη UV, με ειδικό νυστέρι και εισαγωγή σε αριθμημένα erppendorf. Το kit που χρησιμοποιήθηκε, ήταν της εταιρίας **Wizard** (SV gel and PCR Clean up system). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε, έχει ως εξής:

1. Ρυθμίζουμε το υδατόλουτρο στους 55-60 °C, προκειμένου να προθερμάνουμε το Nucleases Free Water.
2. Υπολογίζουμε το βάρος του gel στο ζυγό. Αν το gel ζυγίζει περισσότερο από 0.5 gr, το μοιράζουμε σε δύο διαφορετικά tubes.
3. Προσθέτουμε το Membrane binding solution, σε αναλογία 10  $\mu$ l/10 mg. Το διάλυμα προστίθεται για τη διάλυση του gel, παρουσία ισοθειοκυανινικής γουανιδίνης. Κάνουμε έντονο vortex και επώαση στο υδατόλουτρο, στους

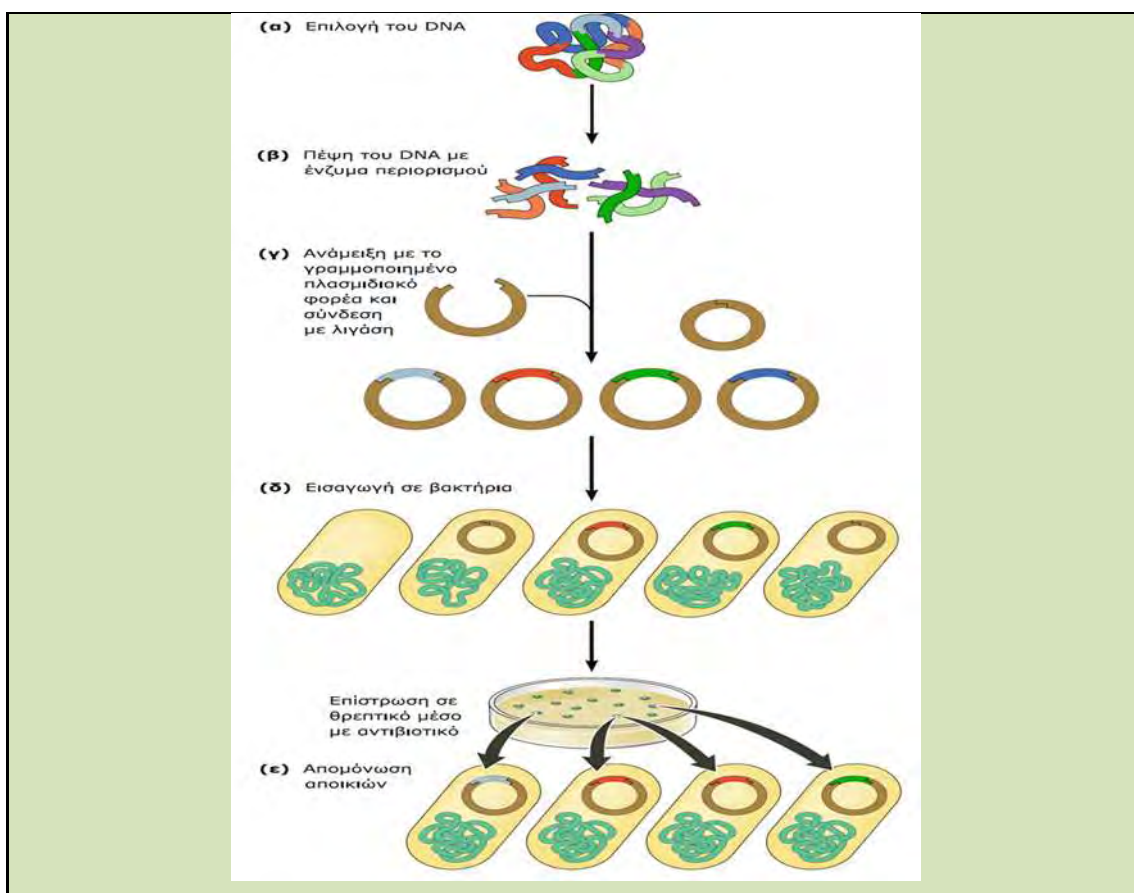
50-65 °C, έως ότου διαλυθεί το gel. Περιοδικά, ελέγχουμε και αναδεύουμε με vortex για πιο αποτελεσματική αναδιάλυση.

4. Τοποθετούμε τις ειδικές στήλες SV minicolumn σε σωληνάκια συλλογής (collection tubes). Μεταφέρουμε το αναδιαλυμένο gel με πιπέτα στη στήλη και επωάζουμε για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου. Η προσθήκη του Membrane binding solution, βοήθησε στην κατακράτηση του DNA στην μεμβράνη της στήλης.
5. Φυγοκεντρούμε για 1 min στις 13000-16000 rpm και απορρίπτουμε το υγρό από τον σωλήνα. Η μεμβράνη έχει πλέον κατακρατήσει το DNA μας.
6. Προσθέτουμε 700 µl Membrane Wash Solution, το οποίο περιέχει αιθανόλη και το οποίο χρησιμοποιείται για την πλύση του DNA. Φυγοκεντρούμε για 1 min σε max rpm, απορρίπτουμε το υγρό. Επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία αλλά αυτή τη φορά προσθέτοντας 500µl Membrane Wash Solution και φυγοκεντρώντας για 5 min σε μέγιστες στροφές.
7. Απορρίπτουμε το υγρό από το σωληνάκι και φυγοκεντρούμε για 1 min με ανοικτό καπάκι για απομάκρυνση της αιθανόλης.
8. Μεταφέρουμε τη στήλη SV minicolumn που φέρει το DNA, σε καθαρό erppendorf 1,5 ml και προσθέτουμε 25 µl σε κάθε δείγμα από το Nucleases Free Water στο κέντρο, δίχως να αγγίξει το φίλτρο. Επωάζουμε για 1 min και φυγοκεντρούμε για 1 min.
9. Επαναλαμβάνουμε το βήμα 8, προσθέτοντας 25 µl Nucleases Free Water και φυγοκεντρώντας. Τελικά το DNA μας συλλέγεται σε τελικό όγκο 50 µl και φυλάσσεται στο ψυγείο για περαιτέρω χρήση.
10. Μπορούμε να τρέξουμε μικρή ποσότητα (συνήθως 2 µl) από το δείγμα μας σε πήκτωμα αгарόζης, προκειμένου να γίνει ποσοτικοποίηση του δείγματος (ng/µl). Ανάλογα με την ένταση της μπάντας στην ηλεκτροφόρηση, υπολογίζουμε την αντίστοιχη συγκέντρωση. Συνήθως, ο υπολογισμός γίνεται με βάση την πιο αχνή κύρια μπάντα του ladder της ηλεκτροφόρησης (500 bp), καθώς πρόκειται για τον ladder (333), η οποία υπολογίζεται στα 50 ng.

Το επόμενο βήμα, ήταν η αλληλούχιση των προϊόντων της PCR. Η τεχνική την οποία χρησιμοποιήσαμε για αυτό το σκοπό ήταν η μοριακή κλωνοποίηση, δηλαδή η ενσωμάτωση των PCR products σε ειδικούς φορείς κλωνοποίησης, μέσω των οποίων μπορούμε να λάβουμε πιο αξιόπιστα αποτελέσματα στην αλληλούχιση. Η τεχνική θα περιγραφεί αναλυτικά παρακάτω.

## 4.5 Μοριακή κλωνοποίηση

Η τεχνική της μοριακής κλωνοποίησης, επιτρέπει τον *in vivo* πολλαπλασιασμό μιας αλληλουχίας DNA, την οποία εμείς έχουμε απομονώσει, μέσα σε βακτηριακές καλλιέργειες, χρησιμοποιώντας ως φορέα κλωνοποίησης, κατά κύριο λόγο, κυκλικά πλασμίδια (Watson et al. 2007). Η διαδικασία, περιγράφεται συνοπτικά στην παρακάτω εικόνα:





**Εικόνα 4.2:** Τα πέντε βασικά βήματα της κλωνοποίησης με πλασμιδιακό φορέα. Το προς κλωνοποίηση DNA εισάγεται στον πλασμιδιακό φορέα. Το πλασμίδιο, φέρει ένα γονίδιο ανθεκτικότητας σε κάποιο αντιβιοτικό. Τα ανασυνδιασμένα πλασμίδια, εισάγονται στα βακτηριακά κύτταρα με ηλεκτροδιάτρηση, όπου και πολλαπλασιάζονται. Ακολουθεί επίστρωση των βακτηριακών κυττάρων σε θρεπτικό μέσο, το οποίο φέρει αντιβιοτικό (συνήθως αμπικιλίνη ή τετρακυκλίνη). Συνεπώς, επιβιώνουν μόνο τα βακτήρια που φέρουν το πλασμίδιο, οπότε και το γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό. Στο τελικό στάδιο, γίνεται η επιλογή των αποικιών που φέρουν το ανασυνδιασμένο (με το ένθεμα) πλασμίδιο, με βάση το χρώμα της αποικίας ( μπλε-άσπρο) (Watson et al. 2007).

Παρακάτω, περιγράφεται η μέθοδος της μοριακής κλωνοποίησης του DNA του κινητοπλάστη (kDNA) της *leishmania*, που ενισχύθηκε από την PCR.

#### 4.5.1 Αντίδραση σύνδεσης

Το πρώτο βήμα για την κλωνοποίηση του ενθέματός μας, είναι η ενσωμάτωσή του στον φορέα κλωνοποίησης. Ο φορέας που χρησιμοποιήθηκε, ήταν ο **pbluescript ii SK(+)**, ένα πλασμίδιο συνολικού μήκους 2961 bp. Η ενσωμάτωση έγινε μέσω της αντίδρασης σύνδεσης (ligation). Η αντίδραση αυτή πραγματοποιείται με τη χρήση του ενζύμου **T4 DNA λιγάση**, η οποία καταλύει την αντίδραση σύνδεσης των δύο μορίων DNA.

Γενικά, σε μία αντίδραση σύνδεσης, υπολογίζουμε την ποσότητα του ενθέματος μας που θέλουμε να κλωνοποιήσουμε. Αυτή, εξαρτάται από τις βάσεις του ενθέματός μας και δίνεται από τον παρακάτω τύπο:

$$\text{ng ενθέματος} = \text{ng φορέα} \times \frac{\text{μέγεθος ενθέματος (kb)}}{\text{μέγεθος φορέα (kb)}} \quad (1)$$

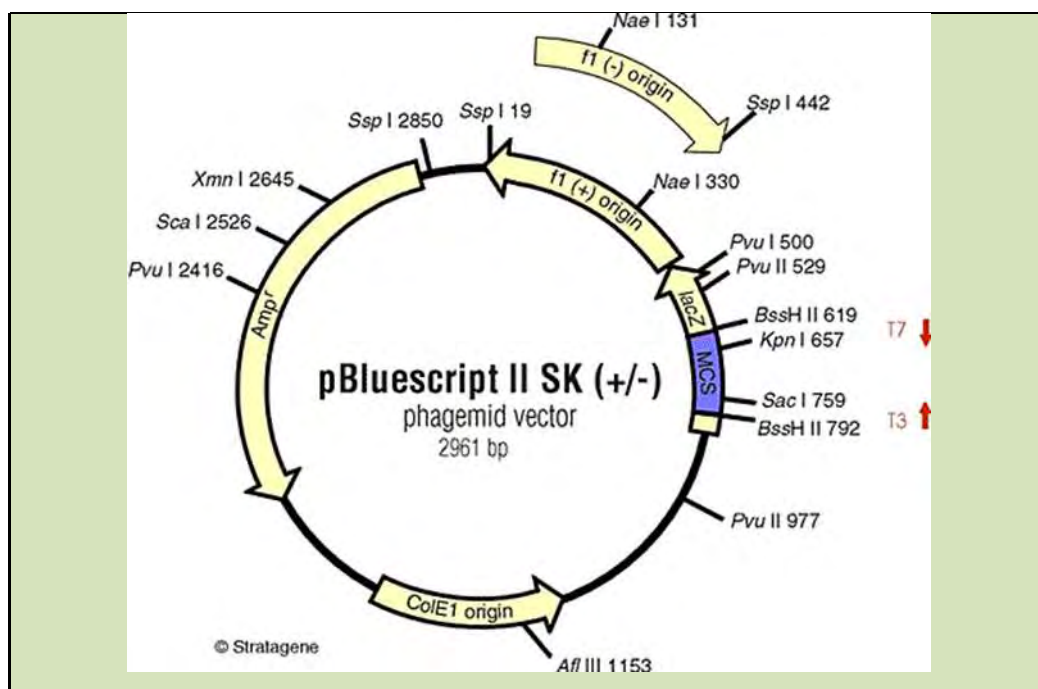
Συνήθως, η αναλογία ενθέματος προς φορέα κλωνοποίησης, είναι 3:1.

Κατόπι, επιλέγουμε τον κατάλληλο φορέα για κλωνοποίηση, ανάλογα με το μέγεθος του ενθέματός μας. Εάν το ένθεμά μας είναι μέχρι 5-10 kb, οι πλασμιδιακοί φορείς είναι οι καταλληλότεροι και οι πιο εύχρηστοι. Τόσο τα πλασμίδια, όσο και οι

υπόλοιποι φορείς, πρέπει να φέρουν κάποια ιδιαίτερα χαρακτηριστικά στο μόριο τους, τα οποία καθιστούν πιο αποτελεσματική τη διαδικασία της κλωνοποίησης (Pherson and Parish 1987).

- Μια περιοχή **oriC**, η οποία είναι υπεύθυνη για την έναρξη της αντιγραφής.
- Ένα γονίδιο, το οποίο προσδίδει ανθεκτικότητα σε κάποιο αντιβιοτικό.
- Το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης (lacZ), το οποίο κωδικοποιεί για το ένζυμο της β-γαλακτοσιδάσης και μας δίνει τη δυνατότητα διάκρισης των κλώνων που φέρουν το ανασυνδιασμένο πλασμίδιο με το ένθεμά μας.
- Τον πολυσύνδετη, ο οποίος αποτελεί μια περιοχή με πολλαπλές θέσεις αναγνώρισης περιοριστικών ενζύμων, ώστε να μπορέσουμε να ανοίξουμε το φορέα και να βάλουμε το ένθεμα.

Στην παρούσα κλωνοποίηση, ο φορέας που χρησιμοποιήθηκε είναι ο **pbluescript ii SK(+/-)**. Η δομή του περιγράφεται στο παρακάτω σχήμα:



**Εικόνα 4.3:** Ο πλασμιδιακός φορέας pbluescript ii SK(+/-). Όπως διακρίνουμε από την παραπάνω δομή, ο φορέας μας έχει όλα τα χαρακτηριστικά εκείνα για μια επιτυχημένη κλωνοποίηση. Διαθέτει την περιοχή ColE1, η οποία αντιστοιχεί στην περιοχή έναρξης της αντιγραφής, ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη για την διαλογή των μετασχηματισμένων βακτηριακών κλώνων, τον πολυσύνδετη MCS, με πολλαπλές θέσεις αναγνώρισης περιοριστικών ενζύμων, και το γονίδιο lacZ για τη διάκριση των αποικιών που φέρουν το ανασυνδιασμένο πλασμίδιο (Altting-Mees and Short 1989).

Σε αυτό το σημείο, πρέπει να τονίσουμε μία πολύ σημαντική λεπτομέρεια. Προκειμένου να γίνει η αντίδραση σύνδεσης ενθέματος και φορέα, πρέπει τα δύο μόρια να έχουν συμπληρωματικά άκρα, έτσι ώστε να γίνει επιτυχημένο ligation. Ο ρόλος της T4 DNA λιγάσης, είναι ακριβώς αυτός, δηλαδή η ένωση των συμπληρωματικών άκρων και ο σχηματισμός ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ του 5' φωσφορικού άκρου και του 3' υδροξυλικού άκρου δύο δίκλωνων μορίων DNA. Η Taq πολυμεράση στην αντίδραση PCR, έχει δράση τερματικής τρανσφεράσης, καταλύοντας την αδενυλίωση του 3' άκρου του παραγόμενου προϊόντος (προσθήκη poly-A ουράς). Επιπλέον ο φορέας κλωνοποίησης μας, είναι ήδη κομμένος με το ένζυμο EcoRI στην περιοχή του πολυσύνδετη και επεξεργασμένος με την προσθήκη μιας θυμίνης στο 3' άκρο του. Έτσι διευκολύνεται

η αντίδραση σύνδεσης των δύο μορίων από την T4 DNA λιγάση, με το σχηματισμό συμπληρωματικών τυφλών άκρων (Marchuk et al. 1991).

Η αντίδραση σύνδεσης για κάθε δείγμα μας, πραγματοποιήθηκε σε PCR tubes. Για κάθε αντίδραση, υπολογίστηκε αρχικά η ποσότητα του ενθέματος για κλωνοποίηση. Σύμφωνα με την εξίσωση (1), η ποσότητα του ενθέματος υπολογίζεται στα 35 ng για ένα προϊόν 700 bp (kDNA leishmania). Σε κάθε δείγμα PCR, πραγματοποιήθηκε προηγουμένως ποσοτικοποίηση για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας του μορίου (ng/μl). Οπότε, υπολογίστηκαν ανάλογα για κάθε tube και τα ανάλογα μl κάθε δείγματος, που αντιστοιχούσαν στα 35 ng/μl της αντίδρασης. Στο παρακάτω πίνακα, αναλύονται οι αρχικές και τελικές συγκεντρώσεις της αντίδρασης:

	Carχικό	CTελικό	VTελικό
DNA	-	-	*
Φορέας	60ng/μl	50ng/μl	0,8μl
Buffer	10x	1x	1,0μl
Ligase T4	1u/μl	1u/μl	1,0μl
H <sub>2</sub> O	-	-	**

(\*) ανάλογα την ποσοτικοποίηση κάθε δείγματος.

(\*\*)προσθήκη νερού για τελικό όγκο 10μl

**Πίνακας 4.3:** Αντιδραστήρια αντίδρασης σύνδεσης (ligation).

Μετά την προετοιμασία των δειγμάτων, ακολουθεί επώαση στη συσκευή PCR για 2,5 h στους 22 °C για να ολοκληρωθεί το ligation. Μετά το πέρας της αντίδρασης, τα δείγματα τοποθετούνται στην κατάψυξη (-20 °C), όπου αναστέλλεται και η δράση της λιγάσης.

#### 4.5.2 Ηλεκτροδιάτρηση (Electroporation)

Το επόμενο βήμα στην κλωνοποίηση του ενθέματός μας, ήταν ο μετασχηματισμός των βακτηριακών κυττάρων E.coli (κύτταρα EC) με το ανασυνδιασμένο πλασμίδιο. Αυτό επιτυγχάνεται με την εφαρμογή ηλεκτρικής τάσης στα κύτταρα δέκτες, η οποία έχει ως αποτέλεσμα τη διατάραξη του δυναμικού της πλασματικής μεμβράνης των βακτηρίων. Έτσι, αυξάνεται η διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης, καθώς δημιουργούνται προσωρινοί πόροι-υδρόφιλα κανάλια, μέσω των οποίων μπορούν να περάσουν τα πολικά μόρια του DNA (Weaver and Chizmadzhev 1996).

##### Αντιδραστήρια ηλεκτροδιάτρησης

- Βακτηριακά κύτταρα E.coli (40  $\mu$ l) σε eppendorf του 1,5 ml, τα οποία παρασκευάζονται από το προσωπικό του εργαστηρίου και διατηρούνται στους  $-180^{\circ}\text{C}$ .
- Κυψελίδες ειδικά σχεδιασμένες για την ηλεκτροδιάτρηση. Φέρουν σχισμή μέσα στην οποία θα τοποθετηθεί το mix των κυττάρων και του ανασυνδιασμένου πλασμιδίου και μέσω της οποίας θα εφαρμοστεί ηλεκτρικό πεδίο στα κύτταρα. Οι κυψελίδες διατηρούνται παγωμένες στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- Διάλυμα SOC\*(2% tryptone, 0.5% yeast extract, 10 mM sodium chloride, 2.5 mM potassium chloride, 10 mM magnesium chloride, 10 mM magnesium sulfate, 20 mM glucose). Το διάλυμα αυτό, αποκαθιστά την ιοντική ισορροπία των κυττάρων, η οποία έχει διαταραχτεί μετά την ηλεκτροδιάτρηση και παράλληλα είναι και θρεπτικό υλικό. Διατηρείται στους  $-20^{\circ}\text{C}$  και πριν την ηλεκτροπόρωση, τοποθετείται στο υδατόλουτρο στους  $60^{\circ}\text{C}$  για ξεπάγωμα.
- Συσκευή ηλεκτροπόρωσης, η οποία φέρει ιδική θέση για την τοποθέτηση της κυψελίδας.

### **Το πρωτόκολλο με το οποίο πραγματοποιήθηκε ο μετασχηματισμός των βακτηριακών κυττάρων, περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω:**

Αρχικά, το προϊόν της αντίδρασης σύνδεσης (ligation), αραιώνεται 1/10. Από το αραιωμένο διάλυμα, συλλέγονται 2 μl και τοποθετούνται στα κύτταρα E.Coli. Ακολουθεί ήπια ανάδευση με pipetting και επώαση του μίγματος για 1 min στον πάγο. Κατόπι, ανοίγουμε την παγωμένη κυψελίδα που βρίσκεται στον πάγο και μεταφέρουμε το mix των κυττάρων προσεχτικά στη σχισμή. Σκουπίζουμε την κυψελίδα και την τοποθετούμε στην ειδική θέση της συσκευής ηλεκτροδιάτρησης. Εφαρμόζουμε τάση με το πλήκτρο Pulse και από τη στιγμή αυτή, μέσα σε χρονικό διάστημα 1 min, πρέπει να γίνει η προσθήκη 700 μl του διαλύματος SOC\* στην κυψελίδα και η συλλογή του διαλύματος σε αριθμημένο σωλήνα. Αυτό βέβαια με την προϋπόθεση ότι η ηλεκτροδιάτρηση είναι επιτυχής, γιατί πάντα υπάρχει το ενδεχόμενο να καούν τα κύτταρα και να χρειαστεί να επαναλάβουμε τη διαδικασία. Σ' αυτήν την περίπτωση, ακούγεται ένας χαρακτηριστικός ήχος προειδοποίησης από τη συσκευή. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα, μεταφέρονται για επώαση στις 180 στροφές/min για 45 min, σε θερμοκρασία 37 °C. Στο χρονικό διάστημα αυτό, τα κύτταρα αναρρώνουν από την ηλεκτροδιάτρηση και αποκαθίσταται η ιοντική τους ισορροπία από την παρουσία του διαλύματος SOC medium.

#### **4.5.3 Επίστρωση τρυβλίων**

Το επόμενο βήμα της κλωνοποίησης, ήταν η παρασκευή θρεπτικού υλικού για την ανάπτυξη των κυττάρων μας. Η επίστρωση της υγρής καλλιέργειας των κυττάρων έγινε σε τρυβλία Petri, τα οποία περιείχαν το θρεπτικό υλικό των κυττάρων, καθώς και το αντιβιοτικό αμικιλίνη για την διαλογή των μετασχηματισμένων βακτηριακών κλώνων, δηλαδή όσων είχαν το πλασμίδιο, ανασυνδιασμένο ή μη. Το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμικιλίνη το έφεραν όλοι οι κλώνοι που έφεραν και το πλασμιδιακό φορέα, οπότε θα είναι και αυτοί που αναπτύσσονται τελικά στο τρυβλίο. Από τις αποικίες των βακτηρίων που επιβιώνουν και αναπτύσσονται στο τρυβλίο, κάποιες φέρουν το ανασυνδιασμένο πλασμίδιο με το ένθεμα, οπότε είναι και αυτές που θα απομονώσουμε και κάποιες το φορέα δίχως το ένθεμα. Η

διάκριση αυτή γίνεται με την προσθήκη στην υγρή καλλιέργεια ενός χημικού αναλόγου της λακτόζης, του X-gal. Το μόριο αυτό έχει την ιδιότητα όταν διασπάται να δίνει χαρακτηριστικό μπλε χρώμα στην αποικία. Η διάσπαση του επιτελείται από τη β-γαλακτοσιδάση, ένα ένζυμο που κωδικοποιείται από το γονίδιο lacZ. Όλοι οι πλασμιδιακοί φορείς φέρουν το γονίδιο lacZ στον πολυσυνδέτη του μορίου τους. Όταν έχει γίνει η προσθήκη του ενθέματός μας στον πολυσύνδετη του μορίου, το lacZ του πλασμιδίου απενεργοποιείται, καθώς διαταράσσεται το αναγνωστικό του πλαίσιο και δεν παράγεται αρκετή ενεργή β-γαλακτοσιδάση για να μεταβολίσει το X-gal. Οπότε, η αποικία που φέρει το ανασυνδιασμένο πλασμίδιο, παραμένει άσπρη.

### **Παρασκευή στερεού θρεπτικού μέσου καλλιέργειας**

Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήσαμε θρεπτικό μέσο LB άγαρ (10g/l Tryptone, 5g/l Yeast extract, 10g/l NaCl) σε μορφή σκόνης. Ανάλογα με τον αριθμό των πιάτων μας, θα είναι και η ποσότητα του θρεπτικού υλικού που θα παρασκευάσουμε. Συνήθως, φτιάχνουμε 4 τρυβλία για κάθε δείγμα μας, καθώς σε κάθε τρυβλίο προστίθενται 150 μl από την υγρή καλλιέργεια των κυττάρων μας από το σύνολο των 700 μl. Για την παρασκευή ενός λίτρου θρεπτικού, διαλύουμε 40 g άγαρ σε ένα λίτρο νερό. Μετά την αποστείρωση και μόλις κρυώσει το θρεπτικό, προσθέτουμε 1 μg/ml αντιβιοτικού αμπικιλίνης. Σε κάθε πιάτο, τοποθετούμε 30 μl θρεπτικού υλικού, οπότε ανάλογα υπολογίζεται ο τελικός όγκος του θρεπτικού που απαιτείται. Το θρεπτικό, μοιράζεται στα πιάτα κάτω από στείρες συνθήκες με τη χρήση φλόγας. Μετά την κατανομή, τα τρυβλία αφήνονται να στεγνώσουν, ώστε να γίνει η επίστρωση της υγρής καλλιέργειας. Κατά διαστήματα, γίνεται έλεγχος για τυχόν υδρατμούς, προκειμένου να αποφύγουμε την επιμόλυνση.

### **Προετοιμασία υγρής καλλιέργειας**

Μετά το πέρας των 45 min, η υγρή καλλιέργεια των κυττάρων μας πρέπει να επεξεργαστεί, ώστε να γίνει επίστρωση. Σε στείρες συνθήκες, μοιράζουμε τόσα erpendorf, όσα και τα τρυβλία που θα επιστρώσουμε. Σε κάθε erpendorf αναγράφεται ο αριθμός του δείγματος από το οποίο προέρχεται και το τρυβλίο στο

οποίο θα καταλήξει (πχ. 4.1-4.2κ κτλ). Εν συνεχεία, προσθέτουμε σε κάθε ένα 150 μl από την υγρή καλλιέργεια, 30 μl Xgal και 3 μl IPTG. Το mix μεταφέρεται στα τρυβλία όπου και επιστρώνεται κάτω από πλήρως ασηπτικές συνθήκες. Αφού στεγνώσουν τα τρυβλία, μεταφέρονται στο φούρνο στους 37 °C, όπου και παραμένουν για 16 τουλάχιστον ώρες, προκειμένου να αναπτυχθούν οι αποικίες.

#### **Διαλογή αποικιών και παρασκευή υγρού θρεπτικού σωληνακίων**

Την επόμενη μέρα, συγκεντρώνουμε τα τρυβλία προκειμένου να διαλέξουμε όσο το δυνατόν περισσότερες άσπρες αποικίες, οι οποίες θα φέρουν το πλασμίδιο με το ένθεμά μας. Παρασκευάζουμε το θρεπτικό υλικό για τις αποικίες. Το θρεπτικό περιέχει τα συστατικά LB-Broth (15g/l) και NaCl (5G/L). Σε κάθε σωλήνα προστίθενται 3 ml θρεπτικού, οπότε ανάλογα με τον αριθμό των αποικιών, φτιάχνουμε και την ανάλογη ποσότητα. Στο θρεπτικό προστίθεται επίσης αμπικιλίνη σε αναλογία 1 μl/ml. Αφού διαλέξουμε αποικίες, φτιάχνουμε ανάλογο αριθμό σωληνακίων, τα οποία και ονομάζουμε με το όνομα του δείγματος από το οποίο προέρχεται, το τρυβλίο προέλευσης και τον αριθμό της αποικίας (πχ.3-3-1). Κατόπι, μοιράζουμε το θρεπτικό στους σωλήνες. Ακολουθεί η συλλογή των άσπρων αποικιών από τα τρυβλία με οδοντογλυφίδα αποστειρωμένη και η τοποθέτησή τους μέσα στα σωληνάκια για να αναπτυχθούν. Η επώαση γίνεται για 12 ώρες στις 210 στροφές/min σε θερμοκρασία 37 ° C. Σκοπός μας είναι να αναπτυχθούν τα κύτταρα που φέρουν το ανασυνδιασμένο πλασμίδιο, προκειμένου να το απομονώσουμε εν συνεχεία με mini-preps.

#### **4.5.4 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA (mini preps)**

Σκοπός μας σε αυτό το στάδιο, είναι η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA από τις άσπρες αποικίες που διαλέξαμε από τα πιάτα και επώασαμε σε υγρή καλλιέργεια overnight (12 ώρες). Η διαδικασία που ακολουθήσαμε, ήταν η εξής:

Αρχικά, αναδεύουμε ήπια την καλλιέργεια μας με το χέρι και εισάγουμε 1,5 ml κορεσμένης καλλιέργειας σε αριθμημένα erppendorf. Η υπόλοιπη καλλιέργεια



φυλάσσεται για τη δημιουργία του glycerol stock, όπως θα δούμε παρακάτω. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 3 min στις 3000 rpm/min και αφού αδειάσουμε το υπερκείμενο, πραγματοποιούμε για ένα επιπλέον λεπτό φυγοκέντρηση full speed, ώστε να κολλήσει καλύτερα το ίζημα των κυττάρων. Στο ίζημα προσθέτουμε 100 μl παγωμένου διαλύματος GET\* και κάνουμε έντονο vortex, ώστε να αναδιαλυθεί το ίζημα. Επωάζουμε για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπι, τοποθετούμε τα δείγματα στον πάγο, όπου και προσθέτουμε σε κάθε ένα και 200 μl διαλύματος alkali\*\*. Η προσθήκη του διαλύματος, προκαλεί λύση των κυττάρων και απελευθέρωση του περιεχομένου τους. Η λύση πραγματοποιείται στον πάγο για διάστημα 7-8 min και ενισχύεται με ήπια ανάδευση των erpendorf κατά διαστήματα. Μετά το πέρας του διαστήματος αυτού, ακολουθεί η προσθήκη 150 μl διαλύματος CH<sub>3</sub>COOK\*\*\*, το οποίο σταματά τη λύση των κυττάρων. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 9 min σε full speed και μεταφορά του υπερκειμένου σε καθαρά σημασμένα erpendorf. Το υπερκείμενο φέρει τα πλασμιδικά μόρια, ενώ το ίζημα που δημιουργείται, περιέχει τα υπολείμματα των κυττάρων που έχουν προέλθει από τη λύση τους. Εν συνεχεία, εισάγουμε 2x τον όγκο αιθανόλης (περίπου 1ml) 100% σε κάθε erpendorf και τα τοποθετούμε στην κατάψυξη στους -20 °C για κατακρήμνιση του DNA. Επαναλαμβάνουμε φυγοκέντρηση για 10 min σε full speed και αδειάζουμε προσεκτικά με πιπέτα το υπερκείμενο. Το ίζημα που προκύπτει, ξεπλένεται με προσθήκη 1x όγκου αιθανόλης και προσεκτική ανακίνηση του erpendorf, ώστε να συλλέξουμε και το DNA από τα τοιχώματα. Σειρά έχει μία τελευταία φυγοκέντρηση για 5 min σε full speed, απόρριψη του υπερκειμένου και τοποθέτηση των δειγμάτων στους 37 °C για να στεγνώσει το ίζημα. Τέλος, το ίζημα αναδιαλύεται με την προσθήκη 50 μl TE-Rnase και περιοδικό vortex.

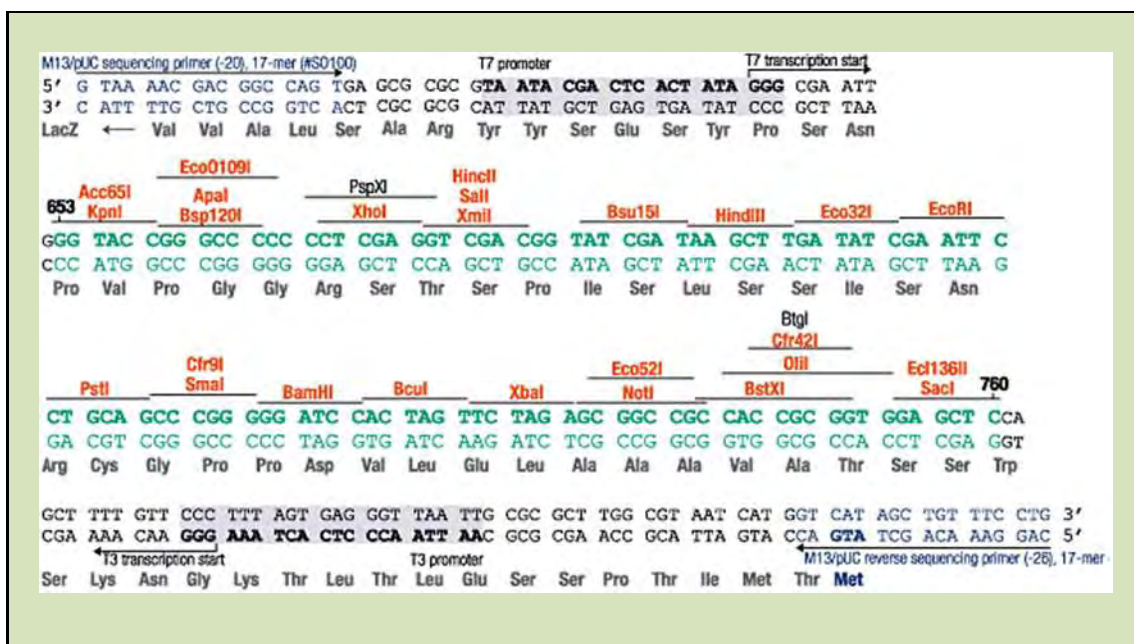
\*GET: 50 mM glucose, 25 mM Tris®Cl (PH=8), 10mM EDTA (PH=8).

\*\*Alkali: 0, 2 N NaOH (diluted from a 10 N stock)

\*\*\*CH<sub>3</sub>COOK: 5M potassium 60 ml, glacial acetic acid 11,5 ml, H<sub>2</sub>O 28,5 ml.

#### 4.5.5 Πέψη πλασμιδιακού DNA

Σκοπός μας σε αυτό το σημείο, είναι να διαπιστώσουμε εάν όντως οι πλασμιδιακοί μας φορείς, έφεραν το ένθεμα. Γι' αυτό το λόγο, ακολούθησε πέψη του πλασμιδιακού DNA με ένζυμα περιορισμού, προκειμένου να διαπιστώσουμε στην ηλεκτροφόρηση που ακολουθεί, εάν τα μεγέθη που πήραμε είναι αντίστοιχα του φορέα και του ενθέματός μας. Ο φορέας που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο **pbluescript ii SK(+)**, ένα πλασμίδιο συνολικού μήκους 2961 bp. Οπότε μία μπάντα περίπου των 3 Kb θα αντιστοιχούσε στο φορέα μας. Από την άλλη πλευρά, το ένθεμά μας, το οποίο είναι το DNA του κινετοπλαστη της λεισμάνια (kDNA), πλήρως ενισχυμένο, έχει μέσο όρο μήκος 700 bp και ανάλογα με το είδος του παρασίτου, κυμαίνεται από 600 έως 850 bp. Η πέψη πραγματοποιήθηκε με τα ένζυμα περιορισμού XhoI και EcoRI, τα οποία όπως διαπιστώνεται και στο παρακάτω σχήμα, κόβουν στην περιοχή του πολυσυνδέτη, ανάμεσα από το ένζυμο Eco32I, το οποίο έκοψε για την ενσωμάτωση του ενθέματος. Οπότε, εάν όντως έχει γίνει η ενσωμάτωση, τα ένζυμα XhoI και θα πέψουν δεξιά και αριστερά της θέσης ενσωμάτωσης του ενθέματος και στην ηλεκτροφόρηση θα πάρουμε την μπάντα των περίπου 700 bp, καθώς και την μπάντα των 3 kb του πλασμιδίου. Οι μερικές επιπλέον βάσεις του φορέα, που περιέχονται μέσα στο όριο των δύο ενζύμων πέψης, δεν αποτελούν σημαντικό παράγοντα για την εκτίμηση του μεγέθους του ενθέματος κατά την ηλεκτροφόρηση.



**Εικόνα 4.4:** Στην παραπάνω εικόνα εμφανίζεται η περιοχή του πολυσυνδέτη του πλασμιδιακού φορέα pbluescript ii SK(+/-) καθώς και μία σειρά από περιοριστικά ένζυμα που κόβουν μέσα στην περιοχή αυτή. Ο πλασμιδιακός φορέας είναι ήδη κομμένος με το ένζυμο Eco21I στην περιοχή του πολυσύνδετη και επεξεργασμένος με την προσθήκη μιας θυμίνης στο 3' άκρο του για την αντίδραση σύνδεσης με το ένθεμα μας. Το ένζυμο Eco21I, κόβει την αλληλουχία στο σημείο TGAT-AT, ενώ τα ένζυμα XhoI και EcoRI τα οποία χρησιμοποιήσαμε κατά την πέψη κόβουν εκατέρωθεν αυτού του σημείου, αφήνοντας υπόλειμμα μερικών βάσεων, ποσό αμελητέο κατά την ηλεκτροφόρηση (Alting-Mees and Short 1989).

Η αντίδραση πέψης, πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 15 μl. Η ποσότητα του πλασμιδιακού DNA που χρησιμοποιήθηκε για την πέψη, αντιστοιχούσε σε 2,5 μl. Τα αντιδραστήρια καθώς και οι συνθήκες της πέψης, συνοψίζονται στον ακόλουθο πίνακα:

	Caρχικό	Cτελικό	Όγκος (μl)
Πλασμιδιακό DNA	-	-	2,5 μl
Buffer αντίδρασης	10x	1x	1,5 μl
Ένζυμο 1 XhoI	10u/μl	3 u	0,3 μl
Ένζυμο 2 EcoRI	15u/μl	3 u	0,2 μl
H <sub>2</sub> O	-	-	10,5 μl
Τελικός όγκος			15 μl

Η αντίδραση πέψης, πραγματοποιήθηκε με επώαση στους 37 °C για 1 ώρα. Μετά την πέψη, τα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης 1% στα 100 kV. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, στα δείγματα τα οποία διαπιστώθηκε η επιτυχημένη κλωνοποίηση, ακολούθησε καθαρισμός με διάλυμα φαινόλης-χλωροφορμίου, προκειμένου να αποσταλούν για αλληλούχηση.

#### 4.5.6 Καθαρισμός πλασμιδιακού DNA

Ο καθαρισμός του πλασμιδιακού DNA από υπολείμματα πρωτεϊνών έγινε με τα αντιδραστήρια φαινόλη-χλωροφόρμιο. Η φαινόλη έχει την ιδιότητα να αποδιατάζει τις πρωτεΐνες, ενώ το χλωροφόρμιο αυξάνει την πυκνότητα της οργανικής φάσης, διευκολύνοντας το διαχωρισμό. Τα βήματα τα οποία ακολουθούμε, είναι τα εξής:

Αυξάνουμε τον όγκο του διαλύματος σε κάθε erpendorf (50 μl), με την προσθήκη 350 μl αποσταγμένου νερού για τελικό όγκο 400 μl. Εν συνεχεία, προσθέτουμε επιπλέον 200 μl φαινόλης και 200 μl χλωροφορμίου σε κάθε δείγμα και ανακινούμε έντονα. Από τη φυγοκέντρηση που ακολουθεί (3 min, full speed), διαχωρίζεται η οργανική (κάτω) από την υδατική φάση (πάνω). Μεταφέρουμε προσεκτικά την υδατική φάση σε νέο σημασμένο erpendorf, αφήνοντας λίγο πίσω, προκειμένου να πάρουμε και οργανική φάση και να βρωμίσουμε το δείγμα μας. Ακολουθεί η προσθήκη 400 μl χλωροφορμίου, ανάδευση, φυγοκέντρηση και μεταφορά της υδατικής φάσης σε νέο erpendorf, όπου είναι και αυτό που τελικά θα κρατήσουμε. Ακολουθεί κατακρήμνιση του DNA με προσθήκη άλατος CH<sub>3</sub>COONa (2,31M→0,3 M), 2,5 όγκων αιθανόλης (100%) παγωμένης, vortex και τοποθέτηση στους -20 °C για 15 min. Το επόμενο βήμα είναι η φυγοκέντρηση για 15 min full speed, απόρριψη του υπερκειμένου και προσθήκη μισού όγκου αιθανόλης 70%. Ανακινούμε το σωλήνα erpendorf μερικές φορές για να ξεπλύνουμε τα τοιχώματα, φυγοκεντρούμε για 5 min full speed και πετάμε την αιθανόλη με πιπέτα.

Τα δείγματα τοποθετούνται στους 37 °C ανοικτά, ώστε να στεγνώσει το ίζημα. Αφού εξατμιστεί η αιθανόλη, το ίζημα επαναιωρείται σε 100 μl νερού.

## 4.6 Εργαλεία Βιοπληροφορικής

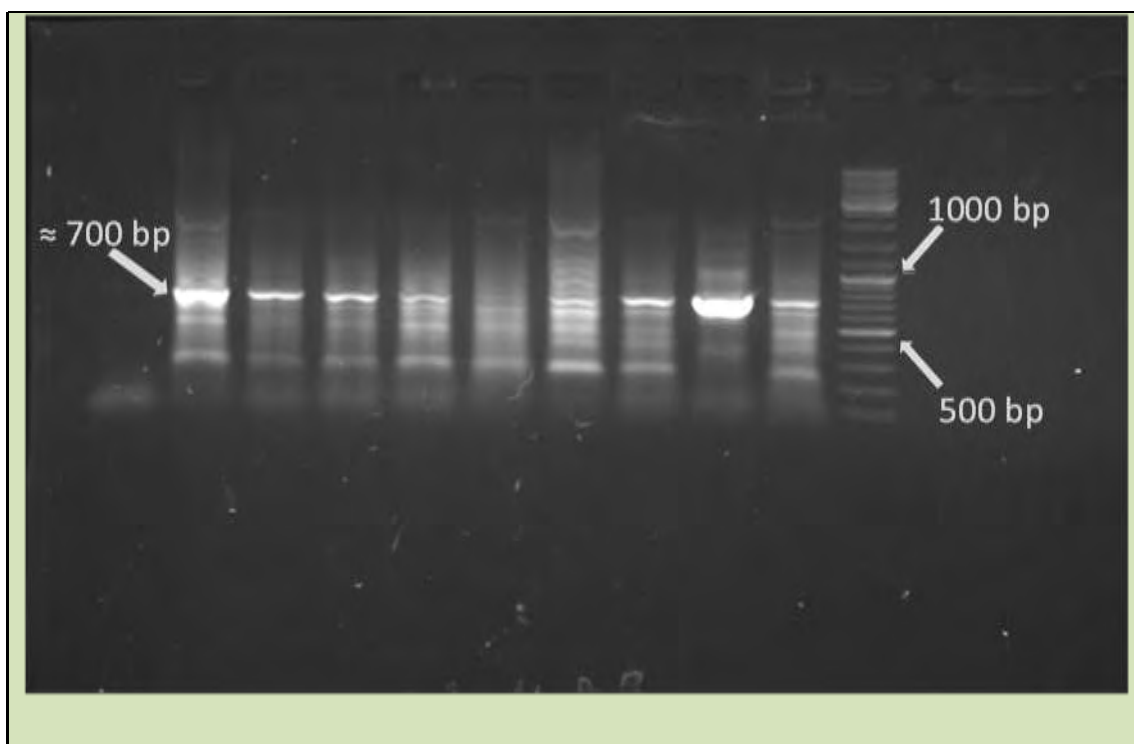
Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων μας, έγινε με τη χρήση υπολογιστικών προγραμμάτων βιοπληροφορικής. Χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) και συγκεκριμένα ο blastn, μέσω του οποίου μπορούμε να συγκρίνουμε μια αλληλουχία, με μια βάση καταχωρημένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών (Preciado et al. 2009). Το πρόγραμμα μας δίνει τη δυνατότητα να επιλέξουμε κάποιες παραμέτρους, ώστε να διευκολύνουμε την αναζήτηση και να έχουμε όσο το δυνατόν πιο αξιόπιστο αποτέλεσμα. Γι' αυτό το λόγο, υπάρχουν επιλογές που περιορίζουν την αναζήτηση, για παράδειγμα, αποκλείοντας κάποιες βάσεις δεδομένων, όπως τις ανθρώπινες, εάν έχουμε να κάνουμε με γονιδίωμα μικροοργανισμών. Επιπλέον, υπάρχει μια πολύ σημαντική παράμετρος, μέσω της οποίας μπορούμε να αξιολογήσουμε το αποτέλεσμα της σύγκρισης και αυτό είναι ο αλγόριθμος e-value. Το e-value αποτελεί μέτρο της στατιστικής σημαντικότητας του αποτελέσματος μας και είναι αναγκαίο προκειμένου να διαχωρίσουμε τυχαία ευρήματα από σημαντικά. Όσο το e-value τείνει προς την τιμή μηδέν, τόσο πιο αξιόπιστο θεωρείται το αποτέλεσμα μας, καθώς τόσο μικρότερη είναι η πιθανότητα να είναι τυχαία η αντιστοίχιση της αλληλουχίας μας στη βάση δεδομένων. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία του μορίου στόχου, το οποίο εμείς έχουμε ενισχύσει με PCR και έχουμε στείλει για αλληλούχιση, λαμβάνεται σε μορφή FASTA και μπορεί να χρησιμοποιηθεί άμεσα για σύγκριση στο BLAST. Ωστόσο, εάν η αλληλουχία μας έχει αποσταλεί κλωνοποιημένη σε πλασμιδιακό φορέα, πριν την εισαγωγή της στο BLAST, καθαρίζεται τόσο από το τέλος, όσο και από την αρχή, αφαιρώντας αντίστοιχα την ακολουθία που δεν μπορεί να διαβαστεί μέσω του χρωματογραφήματος Chromas Lite, καθώς και την αντίστοιχη αρχική του πλασμιδιακού φορέα, ώστε να διευκολύνουμε τη σύγκριση. Επιπλέον, με το πρόγραμμα Omiga, μας δίνεται η δυνατότητα να επεξεργαστούμε περαιτέρω τις νουκλεοτιδικές μας αλληλουχίες, να

τις στοιχίσουμε (align) με βάση το dot plot και να τις συγκρίνουμε, ώστε να διαπιστώσουμε περιοχές με σχετική ομολογία μεταξύ τους, καθώς και πολυμορφισμούς (SNPs).

## *5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ*

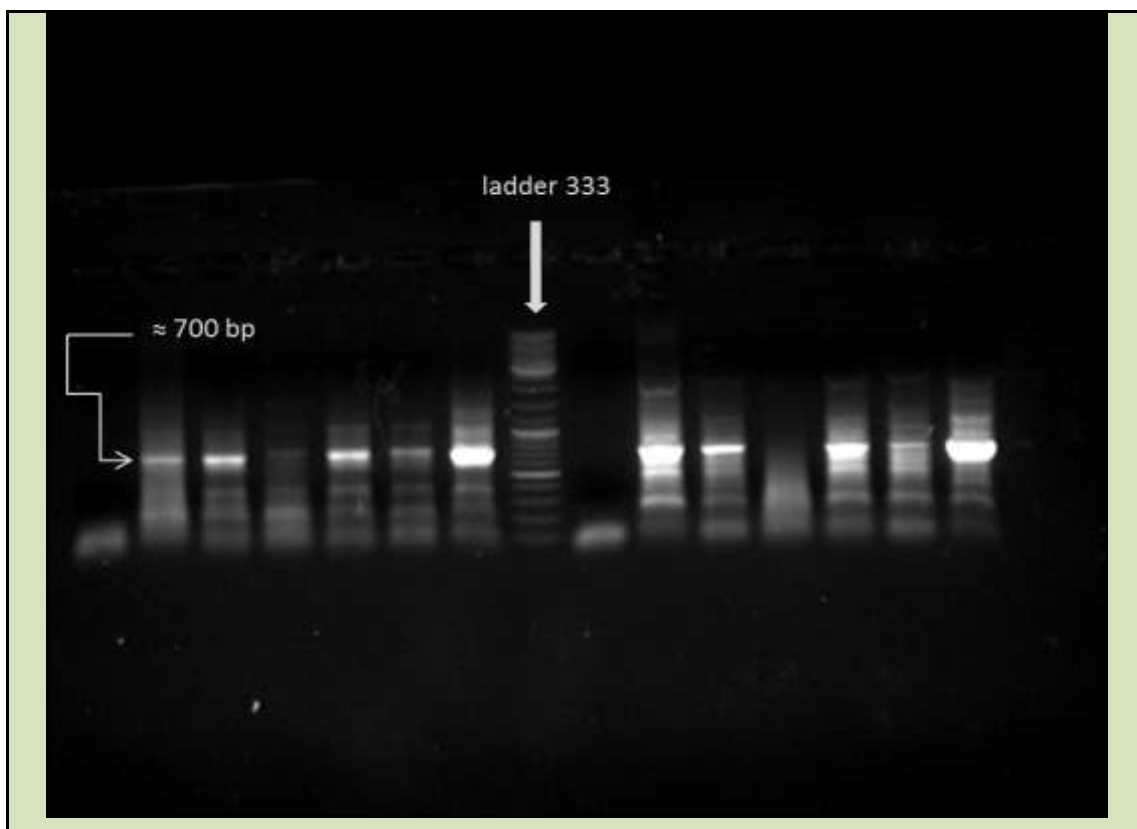
## 5.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Η τεχνική PCR, χρησιμοποιήθηκε στα πλαίσια του πειράματός μας, για την μοριακή ανίχνευση του παρασίτου **Leishmania**, σε 16 δείγματα περιφερειακού αίματος σκύλου και ενός αντίστοιχου ανθρώπινου. Στόχο της PCR, αποτέλεσε το kDNA της *Leishmania* και συγκεκριμένα η ενίσχυση των minicircles του δικτύου, τα οποία εξαιτίας της συχνής παρουσίας τους στο παράσιτο (10000 μόρια/παράσιτο), αυξάνουν την ευαισθησία της αντίδρασης σε ποσοστό που αγγίζει το 100%. Η PCR, οδήγησε στην ενίσχυση ολόκληρης της αλληλουχίας των minicircles, τόσο των συντηρημένων (conserved region), όσο και των ευμετάβλητων περιοχών του μορίου (variable region), το μήκος των οποίων εξαρτάται από το είδος του παρασίτου και κυμαίνεται από 600 έως 850 bp. Όλοι οι σκύλοι, οι οποίοι εμφάνιζαν τυπικά συμπτώματα λεισμανίασης (συνήθως δερματικές αλλοιώσεις), έδωσαν θετικό αποτέλεσμα στην PCR, όπως και το ανθρώπινο δείγμα, επιβεβαιώνοντας τη μεγάλη ευαισθησία της αντίδρασης. Παρακάτω, παρουσιάζονται κάποιες εικόνες των ηλεκτροφορήσεων της παραπάνω τεχνικής, απ' όπου μπορούμε να διακρίνουμε το ενισχυμένο προϊόν (kDNA) στις 700 περίπου βάσεις.





**Εικόνα 5.1 :** Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR. Η μπάντα των 700 bp αντιστοιχεί στο ενισχυμένο DNA του κινητοπλάστη της *Leishmania*. Το αριστερό πηγαδάκι αντιστοιχεί στο αρνητικό control. Η σειρά φόρτωσης, από αριστερά προς τα δεξιά, αντιστοιχεί στα δείγματα 3,4, 18, 19, 50, 51, 74 και 78, τα οποία είχαν ήδη ταυτοποιηθεί θετικά στο παράσιτο *Leishmania*, με ενίσχυση της ITS μη κωδικής περιοχής του RNA. Το τελευταίο πηγαδάκι, αντιστοιχεί στο ανθρώπινο δείγμα *Leishmania* (A).

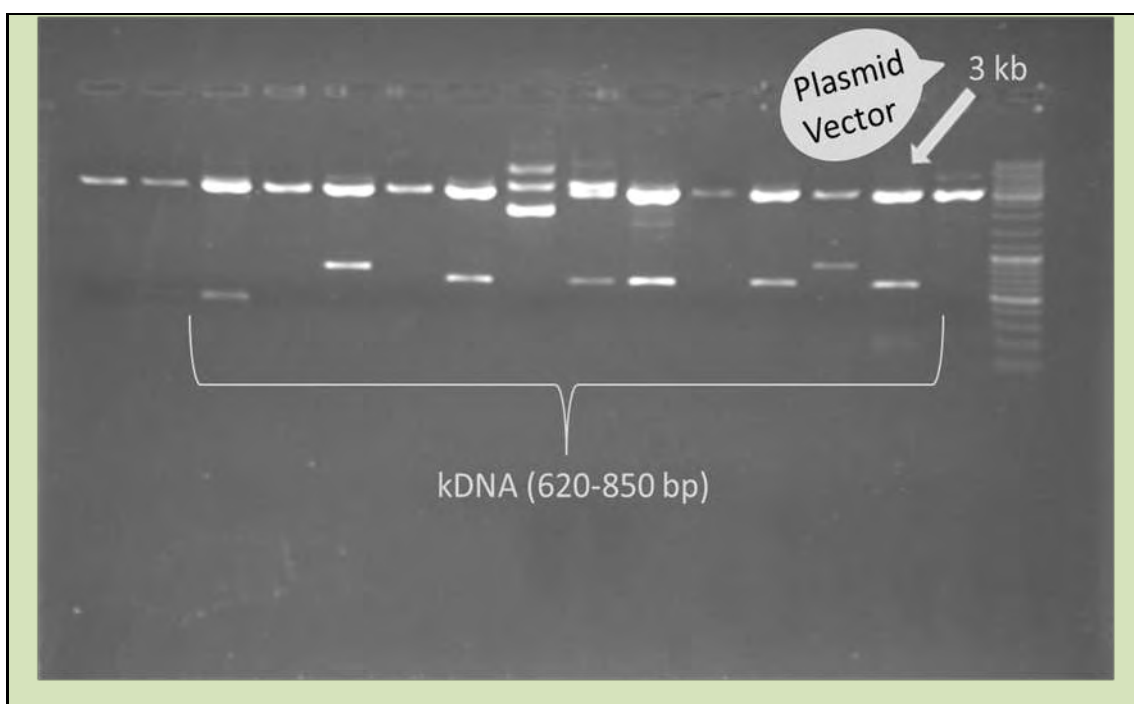


**Εικόνα 5.2:** Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR. Δεξιά και αριστερά του ladder, έχουμε τα προϊόντα ενίσχυσης της αντίδρασης (kDNA) τα οποία προέκυψαν από την ενίσχυση διαφορετικής προέλευσης δειγμάτων. Στα πρώτα έξι πηγαδάκια, τοποθετήθηκαν τα δείγματα σκύλων που απομονώθηκαν από την ευρύτερη περιοχή της Θεσσαλίας και τα οποία εμφάνιζαν δερματικές, κατά κύριο λόγο, αλλοιώσεις. Και τα έξι ύποπτα δείγματα, ανιχνεύτηκαν θετικά στο παράσιτο. Δείγματα 1,3,4,10,15,16. Δεξιά του ladder, παρουσιάζονται τα προϊόντα ενίσχυσης kDNA των ήδη ταυτοποιημένων με ITS ενίσχυση, δειγμάτων *Leishmania*. Δείγματα 11, 22, 26, 28, 30, 32. Οι ζώνες που εμφανίζονται κάτω από το κύριο προϊόν, είναι το αποτέλεσμα μη ειδικών συνδέσεων των εκκινητών, εξαιτίας διαφόρων παραγόντων της PCR.(Tm, MgCl<sub>2</sub>).

Μετά την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης, ακολούθησε η συλλογή των ζωνών από το πήκτωμα για όλα τα δείγματα, τα οποία ήταν θετικά στην αντίδραση. Η ζώνη των  $\approx 700$  bp, η οποία αντιστοιχεί στο ενισχυμένο kDNA της *Leishmania*, αφαιρέθηκε προσεκτικά με τη χρήση νυστεριού και τοποθετήθηκε σε αριθμημένο eppendorf. Στη συνέχεια, απομονώσαμε το DNA από το gel με τη χρήση του kit της εταιρίας **Wizard** (SV gel and PCR Clean up system). Στόχος μας ήταν ο προσδιορισμός του είδους του παρασίτου *Leishmania* σε κάθε δείγμα, με βάση την αλληλουχία του kDNA και με τη χρήση ειδικών υπολογιστικών προγραμμάτων βιοπληροφορικής (Blast). Για το σκοπό αυτό, τα δείγματα εστάλησαν για αλληλούχιση, είτε ως PCR products, είτε μετά από κλωνοποίηση των τμημάτων σε πλασμιδιακό φορέα. Η κλωνοποίηση σε πλασμιδιακό φορέα, απέδωσε καλύτερα αποτελέσματα αλληλούχισης, καθώς τα δείγματά μας ήταν πιο καθαρά και εμφάνιζαν λιγότερο θόρυβο στο χρωματογράφημα Chromas lite. Η κλωνοποίηση ξεκίνησε με την ένθεση των προϊόντων της PCR (kDNA minicircles) σε πλασμιδιακό φορέα (αντίδραση σύνδεσης-ligation). Ο φορέας κλωνοποίησης που χρησιμοποιήσαμε ήταν ο **pbluescript ii SK(+)**, ένα πλασμίδιο συνολικού μήκους 2961 bp. Ακολούθησε ο μετασχηματισμός των βακτηριακών κυττάρων *E. coli* με τον ανασυνδιασμένο φορέα, με τη διαδικασία της ηλεκτροδιάτρησης και καλλιέργεια των κυττάρων σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο LB-άγαρ και αντιβιοτικό αμπικιλίνη. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα θα επιβίωναν και θα έδιναν αποικίες. Ωστόσο, η διάκριση των αποικιών που έφεραν τον ανασυνδιασμένο φορέα, έγινε με τη χρήση της ουσίας X-gal, η οποία έδινε χαρακτηριστικό λευκό χρώμα στις αποικίες. Ακολούθησε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA (mini-preps) από τις αποικίες αυτές και πέψη του πλασμιδίου με περιοριστικά ένζυμα, προκειμένου να διαπιστώσουμε εάν όντως έφερε το ένθεμά μας.

## 5.2 Πέψη πλασμιδιακού DNA.

Η πέψη πραγματοποιήθηκε με τα ένζυμα περιορισμού XhoI και EcoRI, τα οποία όπως διαπιστώνεται και στον περιοριστικό χάρτη, πέπτουν στην περιοχή του πολυσυνδέτη, ανάμεσα από το ένζυμο Eco32I το οποίο έκοψε για την ενσωμάτωση του ενθέματος. Οπότε, εάν όντως έχει γίνει η ενσωμάτωση, τα ένζυμα XhoI και EcoRI θα πέψουν δεξιά και αριστερά της θέσης ενσωμάτωσης του ενθέματος και στην ηλεκτροφόρηση θα πάρουμε τη ζώνη των περίπου 700 bp, που αντιστοιχεί στο ένθεμα μας, καθώς και την μπάντα των 3 kb του πλασμιδιακού φορέα. Οι μερικές βάσεις του φορέα που περιέχονται μέσα στα όρια πέψης των δύο ενζύμων, δεν υπολογίζονται κατά την ηλεκτροφόρηση, καθώς τα δύο ένζυμα κόβουν σε πολύ κοντινή απόσταση μεταξύ τους. Αντίστοιχα, ένας μη ανασυνδυασμένος φορέας, θα δώσει μόνο την μπάντα των 3 kb. Παρακάτω, παρατίθενται οι ηλεκτροφορήσεις των προϊόντων πέψης με τα παραπάνω ένζυμα.



**Εικόνα 5.3:** Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης του πλασμιδιακού φορέα pbluescript ii SK(+) με τα ένζυμα περιορισμού XhoI και EcoRI. Όπως διακρίνουμε στο gel, τα δείγματα 3,5,7,9,10,12,13 και 14 φέρουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, καθώς με πέψη δίνουν την μπάντα των περίπου 700 bp, η οποία αντιστοιχεί στο ένθεμά μας και την μπάντα των 3kb του φορέα. Τα υπόλοιπα δείγματα φέρουν το μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, καθώς δίνουν μόνο τη μπάντα των 3 kb. Ωστόσο, όπως

διακρίνουμε και στην ηλεκτροφόρηση, το μέγεθος του ενθέματος (kDNA) ποικίλει στα διάφορα δείγματα και κυμαίνεται από 600 έως 850 kb, ανάλογα με το είδος του παρασίτου *Leishmania*. Το δείγμα 5, αντιστοιχεί στο ανθρώπινο δείγμα *Leishmania* (800 bp περίπου ένθεμα.). Το αντίστοιχο σκυλίσιο που έδωσε το ίδιο αποτέλεσμα στο blast (*L.chagasi*), παρουσιάζεται στο 12 πηγαδάκι.

Ακολούθησε καθαρισμός των δειγμάτων, που έφεραν τον ανασυνδιασμένο πλασμιδιακό φορέα, μέσω εκχύλισης με φαινόλη/χλωροφόρμιο, ώστε να αποσταλούν για αλληλούχιση. Επιπλέον, τα δείγματα ποσοτικοποιήθηκαν πριν την αποστολή τους, προκειμένου να πληρούν τις προϋποθέσεις του υπεύθυνου εργαστηρίου. Αυτές ήταν: **PCR products** (50 ng/μl, min 5 μl); **Πλασμιδιακό DNA** (100 ng/μl, min 10 μl).

### 5.3 Αποτελέσματα αλληλούχισης

Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της αλληλούχισης, έγινε με τη χρήση υπολογιστικών προγραμμάτων βιοπληροφορικής και συγκεκριμένα του αλγορίθμου NCBI Blast. Το πρόγραμμα δίνει την δυνατότητα σύγκρισης της αλληλουχίας μας με μια βάση καταχωρημένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών (blastn), ώστε να καθοριστεί η μέγιστη ομολογία με κάποια απ' αυτές και να εξάγουμε συμπεράσματα σχετικά με την προέλευσή της. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, κλωνοποιήσαμε το DNA του κινητοπλάστη της *Leishmania* και συγκεκριμένα ολόκληρη την αλληλουχία των minicircles, η οποία όπως προαναφέραμε κυμαίνεται μεταξύ 650-850 bp, ανάλογα με το είδος του παρασίτου. Με το πρόγραμμα Blast, μπορούμε αρχικά να διαπιστώσουμε εάν η εν λόγω αλληλουχία που κλωνοποιήσαμε, αφορούσε όντως το DNA του κινητοπλάστη και όχι κάποιο άλλο μόριο που προέκυψε με επιμόλυνση. Ένα σημαντικό ποσοστό των αλληλουχίσεων του πλασμιδιακού φορέα, επέφερε θετικό αποτέλεσμα στο Blast και επιβεβαίωσε την κλωνοποίηση της αλληλουχίας μας. Μία άλλη πολύ σημαντική πληροφορία την οποία παρέχει το πρόγραμμα Blast, αποτελεί το είδος του παρασίτου από το οποίο προέρχεται η εν λόγω αλληλουχία, καθώς είναι υψίστης σημασίας για τα αποτελέσματά μας. Το πρόγραμμα δίνει ποσοστό ομολογίας με την συγκρινόμενη αλληλουχία, καθώς και μέτρο της στατιστικής σημαντικότητας του αποτελέσματος,

μέσω του υπολογισμού E-value. Όσο το E-value τείνει στο μηδέν, τόσο πιο στατιστικά σημαντικό είναι το αποτέλεσμα και τόσο μικρότερη είναι η πιθανότητα να είναι αποτέλεσμα της τύχης η αντιστοίχιση της αλληλουχίας μας,. Ο καθορισμός του είδους είναι πολύ μεγάλης σημασίας για το πείραμα το οποίο διεξαγάγαμε, καθώς εξετάσαμε τόσο ανθρώπινα, όσο και σκυλίσια δείγματα για το παράσιτο. Το μοναδικό ανθρώπινο δείγμα, το οποίο είχαμε στην διάθεση μας, αποτέλεσε το outgroup στην όλη υπόθεση και η σύγκρισή του με τα σκυλίσια ήταν καθοριστική για την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την ανθρωποφιλία και την ζωοφιλία που εμφανίζει το παράσιτο *Leishmania*. Οι αλληλουχίες που εστάλθηκαν σε μορφή fasta, αξιολογήθηκαν αρχικά με τη χρήση του χρωματογραφήματος Chromas lite. Το χρωματογράφημα μας δίνει πληροφορίες σχετικά με την αλληλουχία μας, μέχρι που μπορεί να διαβαστεί με βάση τις κορυφές του, καθώς και το θόρυβο που συνάντησε η αλληλούχιση. Εάν ο θόρυβος είναι μεγάλος, τότε η αλληλουχία μας δεν μπορεί να αξιοποιηθεί για περαιτέρω επεξεργασία στο Blast και στο Omiga, όπως θα δούμε παρακάτω. Οι αλληλουχίες με τη χρήση πλασμιδιακού φορέα, έδωσαν πιο αξιόπιστα και καθαρά αποτελέσματα σε σχέση με τα PCR products, στα οποία ο θόρυβος στο χρωματογράφημα είναι συνήθως μεγάλος.

Το πρόγραμμα Omiga, χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να επεξεργαστούμε τις αλληλουχίες μας, να τις στοιχίσουμε και να τις συγκρίνουμε, ώστε να διαπιστώσουμε περιοχές ομολογίας, καθώς και τα SNPs, μέσω του dot plot. Σε πολλές περιπτώσεις, χρειάστηκε οι αλληλουχίες μας να διαβαστούν και από τις δύο πλευρές, με χρήση των ανάλογων εκκινητών (forward-reverse), ώστε μέσω της αλληλοεπικάλυψης να έχουμε ολόκληρη την αλληλουχία στα χέρια μας. Η σύγκριση των αλληλουχιών μέσω του dot plot, μας έδωσε ακριβώς αυτήν τη δυνατότητα. Συνήθως, η reverse αλληλουχία αναστρέφεται, ώστε να έχει την ίδια διεύθυνση με την forward και συγκρίνονται με dot plot. Εάν πρόκειται για την ίδια αλληλουχία, οι περιοχές τους αλληλεπικαλύπτονται. Επιπλέον, στο Omiga μπορούμε να επεξεργαστούμε την αλληλουχία μας, αφαιρώντας από το τέλος τις βάσεις που δεν έχουν διαβαστεί και από την αρχή την αλληλουχία του φορέα μας. Η καθαρή πλέον αλληλουχία fasta, τοποθετείται στο blastn για σύγκριση.

Οι αλληλουχίες του ανθρώπινου δείγματος και δύο σκυλίσιων, κλωνοποιήθηκαν και αλληλουχήθηκαν. Η ανθρώπινη αλληλουχία στο blastn, με τις κατάλληλες παραμέτρους, έδωσε 98% ομολογία και E-value=0 με το DNA του κινητοπλάστη της *Leishmania chagasi* (strain AJS-PPECO). Παρακάτω, παρατίθεται η αλληλουχία του kDNA από το ανθρώπινο δείγμα σε μορφή fasta, μετά την επεξεργασία της στο πρόγραμμα Omiga:

>Human sample

```
AGGGGTGGTGTWAAATAGGCCGGGTGGTGGGCGGGAAATTGGCTGGAATTGGACTTCT
TGGGCTGGGTGGCCTGAAACCCTGGGTCCTGGGCGTGCTTTTGGAGCTGGCTGGCTTTTG
GGCTTGAATTTGGCTTAAATTTGTGGTGGACGTTTGTTCCTTGGTGGATGTGGCTTGGGGAC
CTGTGTGCTTTGACGTTTGGCTGACGTTTTTCGCTTGATTTGAGGCTTGAGTTTGCTTTGGA
ATATGGGCTGGATTTTGGATGGTGGTAGTTGGTAGATGGATGGCTACGAGGGTTGGGTGT
TGACGCTCTTTAGGTATTGGATGTGATAACTTATCTATAGAATAAAGGGAATATCTAATTTG
CTGGCGATCAGAGCCTTGGTAGTGGAGACTTGTCGGACACATAGATAAATATAGCCTTTAT
AGCGTAATGAATAACATGGGTTATGATAGTAGCTGTGGTAAGGGTATACATATTAATAGCC
GTAATAGACTATACATTGAC
```

Η εισαγωγή της παραπάνω αλληλουχίας στο πρόγραμμα blast, έδωσε τα ακόλουθα αποτελέσματα:

Sequences producing significant alignments:						
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">Z35276.1</a>	<i>L.chagasi</i> (AJS-PPECO) kinetoplast DNA	809	809	99%	0.0	98%
<a href="#">AF082586.1</a>	<i>Leishmania donovani</i> strain GD329 clone GD329-1 kinetop	145	145	25%	3e-31	89%
<a href="#">AJ275331.1</a>	<i>Leishmania infantum</i> kinetoplast partial minicircle DNA, st	143	143	27%	9e-31	85%
<a href="#">AJ275323.1</a>	<i>Leishmania infantum</i> kinetoplast partial minicircle DNA, st	138	138	27%	4e-29	85%

```
>emb|Z35276.1| L.chagasi (AJS-PPECO) kinetoplast DNA
Length=800

Score = 809 bits (896), Expect = 0.0
Identities = 468/479 (98%), Gaps = 2/479 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 2 GGGGTTGGTGTWAAATAGGCCGGGTGGTGGGCGGG-AAATTGGCTGGAATTGGACTTCTT 60
      |||
Sbjct 142 GGGGTTGGTGTAAAATAGGCCGGATGGTGGGCGGGGAAATTGGCTGGAATTGGACTTCTT 201

Query 61 GGGCTGGGTGGCCTGAAACCCTGGGTCCTGGGCGTGCTTTTGGAGCTGGCTGGCTTTTG 120
      |||
Sbjct 202 GGGCTGGGTGGCCTGAAACCCTGGGTCCTGGGCGTGCTTTTGGAGCTGGCTGGCTTTTG 261

Query 121 GGCTTGAATTTGGCTTAAATTTGTGGTGGACGTTTGTTCCTTGGTGGATGTGGCTTGGGG 180
      |||
Sbjct 262 GGCTTGAATGTGGCTTAAATTTGTGGTGGACGTTTGTTCCTTGGTGGATGTGGCTTGGGG 321

Query 181 ACCTGTGTGCTTTGACGTTTGGCTGACGTTTTTCGCTTTGATTGAGGCTTGAGTTTGCT 240
      |||
Sbjct 322 ACCTGTGTGCTTTGACGTTTGGCTGACGTTTTTCGCTTTGATTGAGGCTTGAGTTTGCT 381

Query 241 TTGGAATATGGGCTGGATTTTGGATGGTGGTAGTTGGTAGATGGATGGCTACGAGGGTTG 300
      |||
Sbjct 382 TTGGAATATGGGCTGGATTTTGGGTGGTGGTAGTTGGTAGATGGATGGCTACGAGGGTTG 441

Query 301 GGTGTTGACGCTCTTTAGGTATTGGATGTGATAACTTATCTATAGAATAAAGGGAATATC 360
      |||
Sbjct 442 GGTGTTGACGCTCTTTAGGTATTGGATGTGATAACTTATCTATAGAATAAAGGGGATATC 501

Query 361 TAATTTGCTGGCGATCAGAGCCTTGGTAGTGGAGACTTGTCGGACACATAGATAAATATA 420
      |||
Sbjct 502 TAA-TTGCTGGCGAATAGAGCCTTGGTAGTGGAGACTTGTCGGACACATAGATAAATATA 560

Query 421 GCCTTTATAGCGTAATGAATAACATGGGTTATGATAGTAGCTGTGGTAAGGGTATACAT 479
      |||
Sbjct 561 GCTTTTATAGCGCAATGAATAACATGGGTTATGATAGTAGCTGTGGTAAGGGTATACAT 619
```

**Εικόνα 5.4:** NCBI Blast. Όπως διακρίνουμε, η ανθρώπινη αλληλουχία εμφανίζει 98% ομοιότητα με το kDNA της *L.chagasi*. Το 2% απόκλιση, μπορεί να οφείλεται σε λάθος ενσωμάτωση νουκλεοτιδίων στην αντίδραση PCR, ή να είναι το αποτέλεσμα εμφάνισης SNPs.

Ένα επόμενο δείγμα, το οποίο αλληλουχήθηκε, αφορούσε την κλωνοποιημένη αλληλουχία kDNA ενός παρασίτου *Leishmania*, απομονωμένο από σκύλο. Η εισαγωγή της τροποποιημένης αλληλουχίας fasta στο Blast, επέφερε παρόμοια αποτελέσματα με το ανθρώπινο, βρίσκοντας μεγάλα ποσοστά ομολογίας της τάξης του 98% με το kDNA της *L.chagasi*. Παρακάτω, παρατίθεται η τροποποιημένη και καθαρισμένη αλληλουχία fasta από το δείγμα του σκύλου:



>Dog sample 1

AGGGGTTGGTGAAAATAGGCCGGGTGGTGGGCGGGAAATTGGCTGGAATTGGACTTCTTG  
GGCTGGGTTGGCCTGAAACCCTGGGTCCTGGGCGTGCTTTTGGAGCTGGCTGGCTTTTGGG  
CTTGAATTTGGCTTAAATTTGTGGTGGACGTTTGTTCCTGGTGGATGTGGCTTTGGGACCT  
GTGTGCTTTGACGTTTGGCTGACGTTTTTCGCTTTGATTTGAGGCTTGAGTTTGCTTTGGAAT  
ATGGGCTGGATTTTGGATGGTGGTAGTTGGTAGATGGATGGCTACGAGGGT

Η εισαγωγή της παραπάνω αλληλουχίας στο Blast, επέφερε τα ακόλουθα αποτελέσματα:

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">Z35276.1</a>	L.chagasi (AJS-PPECO) kinetoplast DNA	504	504	99%	1e-139	98%
<a href="#">A1275331.1</a>	Leishmania infantum kinetoplast partial minicircle DNA, str	138	138	43%	2e-29	85%
<a href="#">A1275323.1</a>	Leishmania infantum kinetoplast partial minicircle DNA, str	132	132	43%	1e-27	85%
<a href="#">AF239702.1</a>	Leishmania donovani isolate MHOM/KE/75/MUTINGA-H9 kin	120	120	45%	6e-24	80%

```
> emb|Z35276.1| L.chagasi (AJS-PPECO) kinetoplast DNA
Length=800

Score = 504 bits (558), Expect = 1e-139
Identities = 292/298 (98%), Gaps = 2/298 (1%)
Strand=Plus/Plus

Query 2 GGGGTTGGTG-AAAATAGGCCGGGTGGTGGGCGGG-AAATTGGCTGGAATTGGACTTCTT 59
      |||
Sbjct 142 GGGGTTGGTGTA AAAATAGGCCGGATGGTGGGCGGGAAATTGGCTGGAATTGGACTTCTT 201

Query 60 GGGCTGGGTTGGCCTGAAACCCTGGGTCCTGGGCGTGCTTTTGGAGCTGGCTGGCTTTTG 119
      |||
Sbjct 202 GGGCTGGGTTGGCCTGAAACCCTGGGTCCTGGGCGTGCTTTTGGAGCTGGCTGGCTTTTG 261

Query 120 GGCTTGAATTTGGCTTAAATTTGTGGTGGACGTTTGTTCCTGGTGGATGTGGCTTTGGG 179
      |||
Sbjct 262 GGCTTGAATGTGGCTTAAATTTGTGGTGGACGTTTGTTCCTGGTGGATGTGGCTTTGGG 321

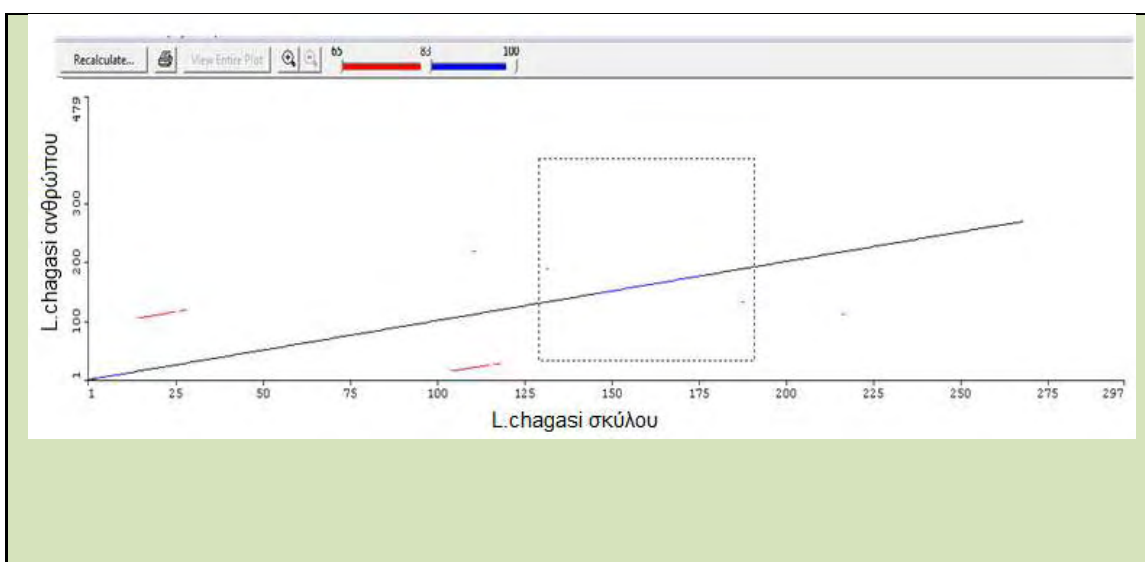
Query 180 ACCTGTGTGCTTTGACGTTTGGCTGACGTTTTTCGCTTTGATTTGAGGCTTGAGTTTGCT 239
      |||
Sbjct 322 ACCTGTGTGCTTTGACGTTTGGCTGACGTTTTTCGCTTTGATTTGAGGCTTGAGTTTGCT 381

Query 240 TTGGAATATGGGCTGGATTTTGGATGGTGGTAGTTGGTAGATGGATGGCTACGAGGGT 297
      |||
Sbjct 382 TTGGAATATGGGCTGGATTTTGGGTTGGTGGTAGTTGGTAGATGGATGGCTACGAGGGT 439
```



**Εικόνα 5.5:** NCBI Blast. Η αλληλούχηση του σκυλίσσιου δείγματος *Leishmania*, έδωσε παρόμοια αποτελέσματα με το ανθρώπινο δείγμα *L.chagasi*.

Στη συνέχεια, κάναμε χρήση του προγράμματος Omita, όπου μέσω του dot plot, συγκρίναμε τις δύο αλληλουχίες kDNA, από το ανθρώπινο δείγμα και το δείγμα του σκύλου, τα οποία έδωσαν το ίδιο αποτέλεσμα στο blast, προκειμένου να διαπιστώσουμε τυχόν SNPs, όσον αφορά την αλληλουχία του DNA του κινητοπλάστη της *L. chagasi*. Επιπλέον, οι δύο αλληλουχίες συγκρίθηκαν με την πρότυπη αλληλουχία kDNA της *L.chagasi* από την βάση δεδομένων. Όπως διαπιστώνουμε και στο παρακάτω διάγραμμα του dot plot, οι κλωνοποιημένες αλληλουχίες kDNA από τον σκύλο και τον άνθρωπο, εμφάνιζαν μεγάλο ποσοστό ομολογίας με την πρότυπη αλληλουχία της *L. chagasi* από τη βάση δεδομένων, αλλά παράλληλα εντοπίστηκαν και αρκετοί πολυμορφισμοί μονού νουκλεοτιδίου (SNPs), καθ' όλο το μήκος του μορίου. Παρακάτω, παρατίθεται το αποτέλεσμα σύγκρισης dot plot των αλληλουχιών kDNA της *L. chagasi*, από το ανθρώπινο και σκυλίσιο δείγμα.



### Alignments based on a 65% minimum score.

L.chagasi ανθρώπου = 1 - 479

L.chagasi σκύλου = 1 - 297

```
L.chagasi σκύλου : 130 TGGCTTAAATTTGTGGTGGACGTTTGTTCTTGGTGGATGTGGCTTTG 177
      |||
L.chagasi ανθρώπου : 131 TGGCTTAAATTTGTGGTGGACGTTTGTTCTTGGTGGATGTGGCTTGG 178

L.chagasi σκύλου : 178 GGACCTGTGTGCTTTTGACGTTTGGCTGACGTTTTTCGCTTTGA 220
      |||
L.chagasi ανθρώπου : 179 GGACCTGTGTGCTTTTGACGTTTGGCTGACGTTTTTCGCTTTGA 221

L.chagasi σκύλου : 132 GCTTAAATTTGTGGTGGACGTTTGTTCTT 161
      ||| | | ||| ||||| | |||
L.chagasi ανθρώπου : 189 GCTTTGACGTTTGGCTGACGTTTTTCGCTT 218

L.chagasi σκύλου : 188 GCTTTGACGTTTGGCTGACGTTTTTCGCTT 217
      ||| | | ||| ||||| | |||
L.chagasi ανθρώπου : 133 GCTTAAATTTGTGGTGGACGTTTGTTCTT 162
```

**Εικόνα 5.6:** Σύγκριση αλληλουχίας ανθρώπινου και σκυλίσιου kDNA *L. chagasi*. Όπως παρατηρούμε, στη συγκεκριμένη περιοχή οι δύο αλληλουχίες εμφανίζουν αρκετούς πολυμορφισμούς μονού νουκλεοτιδίου (SNPs).

Παρακάτω, παρατίθεται η αλληλουχία του kDNA από το δεύτερο σκυλίσιο δείγμα σε μορφή fasta, μετά την επεξεργασία της στο πρόγραμμα Omega:

>Dog sample 2

```
AGGGGTTGGTGTAAATAGGCCGGGTGGTGGTCGGAAATTGGCTCCCCTGGGCTGAAGTG
ACCTGAAACCCTGGGTCCTGGGCGTACTTTTTGGGATGACTGGCTTTTTGGTGGTTTTGGAG
TCTAATTTGACCTGGATTGCGGTGGATTGCAATGGCTGGCGTGTTTGCGGGGCTGGAGG
TTTGGTTGGCGGTGCCCTTTTGGATT
```

Η τοποθέτηση της παραπάνω αλληλουχίας στο αλγόριθμο blast, έδωσε τα ακόλουθα αποτελέσματα:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">AJ010086.1</a>	Leishmania donovani kinetoplast minicircle DNA, isolate MH	143	143	43%	5e-31	95%
<a href="#">AJ010085.1</a>	Leishmania donovani kinetoplast minicircle DNA, isolate MH	143	143	43%	5e-31	95%
<a href="#">AJ010084.1</a>	Leishmania donovani kinetoplast minicircle DNA, isolate MH	143	143	43%	5e-31	95%
<a href="#">Z35272.1</a>	L.infantum (AJS-IPTKP) kinetoplast DNA	137	137	50%	2e-29	90%
<a href="#">AJ010075.2</a>	Leishmania donovani kinetoplast minicircle DNA, isolate MH	134	134	56%	3e-28	87%

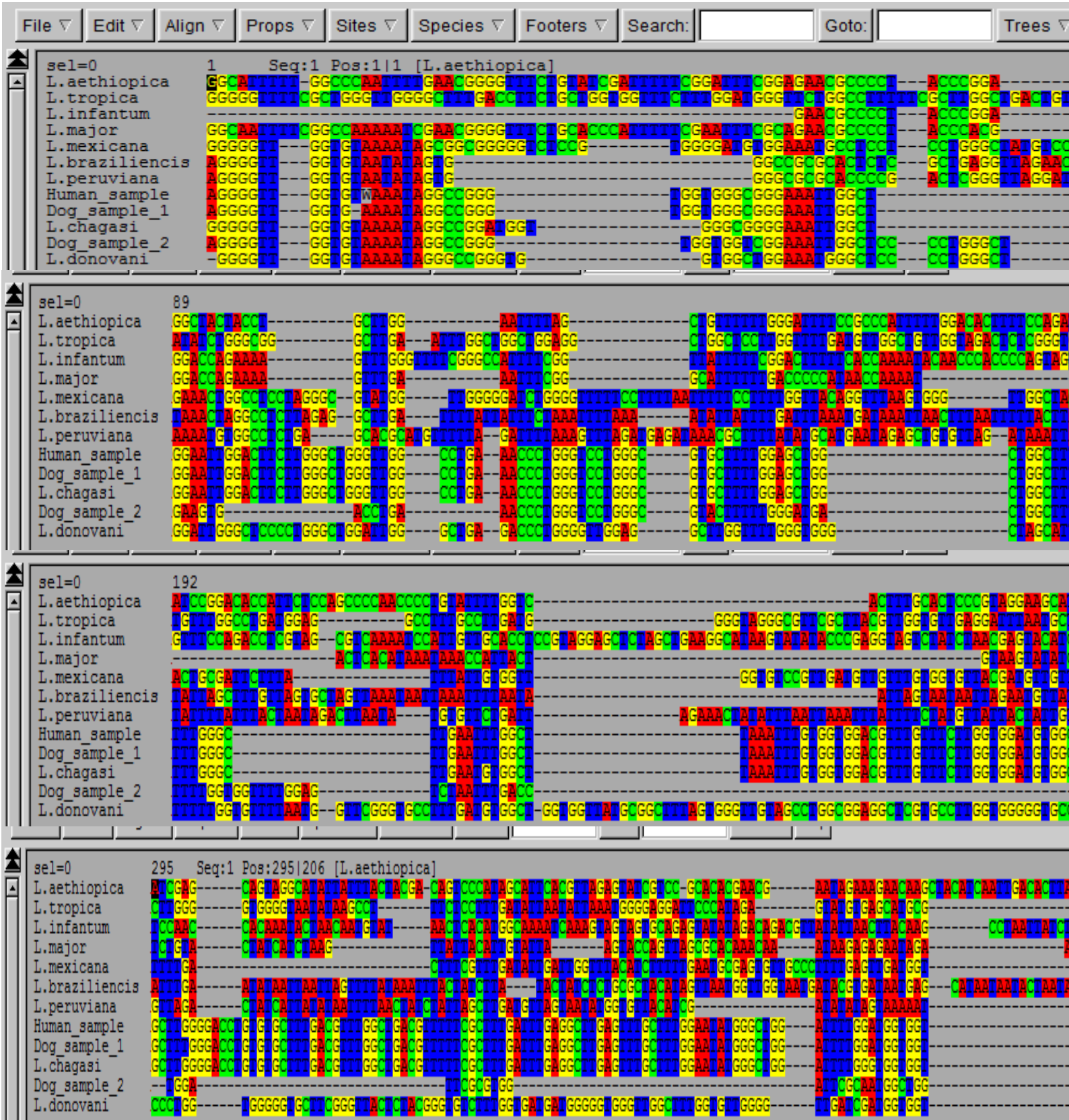
<a href="#">emb AJ010086.1 </a> Leishmania donovani kinetoplast minicircle DNA, isolate MHOM/IN/80/DD8		Length=803				
Score = 143 bits (77), Expect = 5e-31		Identities = 88/93 (95%), Gaps = 2/93 (2%)				
Strand=Plus/Plus						
Query	2	GGGGTTGGTGTAATAAATA-GGCCGGGTGGTGGTCGGAAATTGGCTCCCCTGGGCTGAAGTG	60			
Sbjct	1	GGGGTTGGTGTAATAATAGGGCCGGATGGTGGTCGGAAA-TGGCTTCCCTGGGCTGGAGTG	59			
Query	61	ACCTGAAACCCTGGGTCCTGGGCGTACTTTTTG	93			
Sbjct	60	ACCTGAAACCCTGGGTCCTGGGCGTACTTTTTG	92			

**Εικόνα 5.7:** Αποτελέσματα blast για το δεύτερο σκυλίσιο δείγμα Leishmania. Η τοποθέτηση της παραπάνω αλληλουχίας στον αλγόριθμο blastn, έδωσε σημαντικά ποσοστά ομολογίας (95%) με την πρότυπη αλληλουχία της L.donovani.

## 5.4 Αποτελέσματα στοίχισης

Το πρόγραμμα βιοπληροφορικής seaview, χρησιμοποιήθηκε στα πλαίσια του πειράματός μας, προκειμένου να στοιχίσουμε και να συγκρίνουμε τα αποτελέσματα της αλληλούχισης. Το πρόγραμμα, μας δίνει τη δυνατότητα να ομοπαράθεσουμε τις αλληλουχίες μας, την μία κάτω από την άλλη, ώστε να είναι πιο εύκολη η μελέτη των πολυμορφισμών. Επιπλέον, μπορούμε να κατασκευάσουμε φυλογενετικό δέντρο αποστάσεων, βασισμένο στην αλληλουχία των μορίων μας, όπου στην προκειμένη περίπτωση είναι τα μόρια του kDNA της Leishmania. Ουσιαστικά, αυτό που επιτυγχάνουμε, είναι η μελέτη της εξέλιξης του μορίου kDNA και μέσω αυτής

να κάνουμε εικασίες σχετικά με την εξέλιξη των ειδών. Δυστυχώς δεν μπορούμε να βγάλουμε κάποιο συμπέρασμα από τα δένδρα, σχετικά με τις τροποποιήσεις που έχει υποστεί το kDNA. Δηλαδή δεν μπορούμε να ξέρουμε αν έχει υποστεί κάποιον διπλασιασμό ή απαλοιφή βάσεων ή κάποια άλλη τροποποίηση στην νουκλεοτιδική του αλληλουχία, παρά μόνον εάν έχει διαφοροποιηθεί από έναν οργανισμό σε έναν άλλο. Μία ακόμη σημαντική πληροφορία, αποτελεί το πόσο κοντά γενετικά είναι τα είδη του παρασίτου, πάντα βασισμένοι στην αλληλουχία του kDNA. Παρακάτω, παρατίθεται η στοίχιση των αποτελεσμάτων που λάβαμε από την αλληλούχιση του kDNA από το ανθρώπινο και τα δύο δείγματα σκύλου, καθώς και οι πρότυπες αλληλουχίες του μορίου από τη βάση δεδομένων. Για λόγους σύγκρισης, χρησιμοποιήθηκαν οι πρότυπες αλληλουχίες kDNA ειδών του Παλαιού και του Νέου Κόσμου.



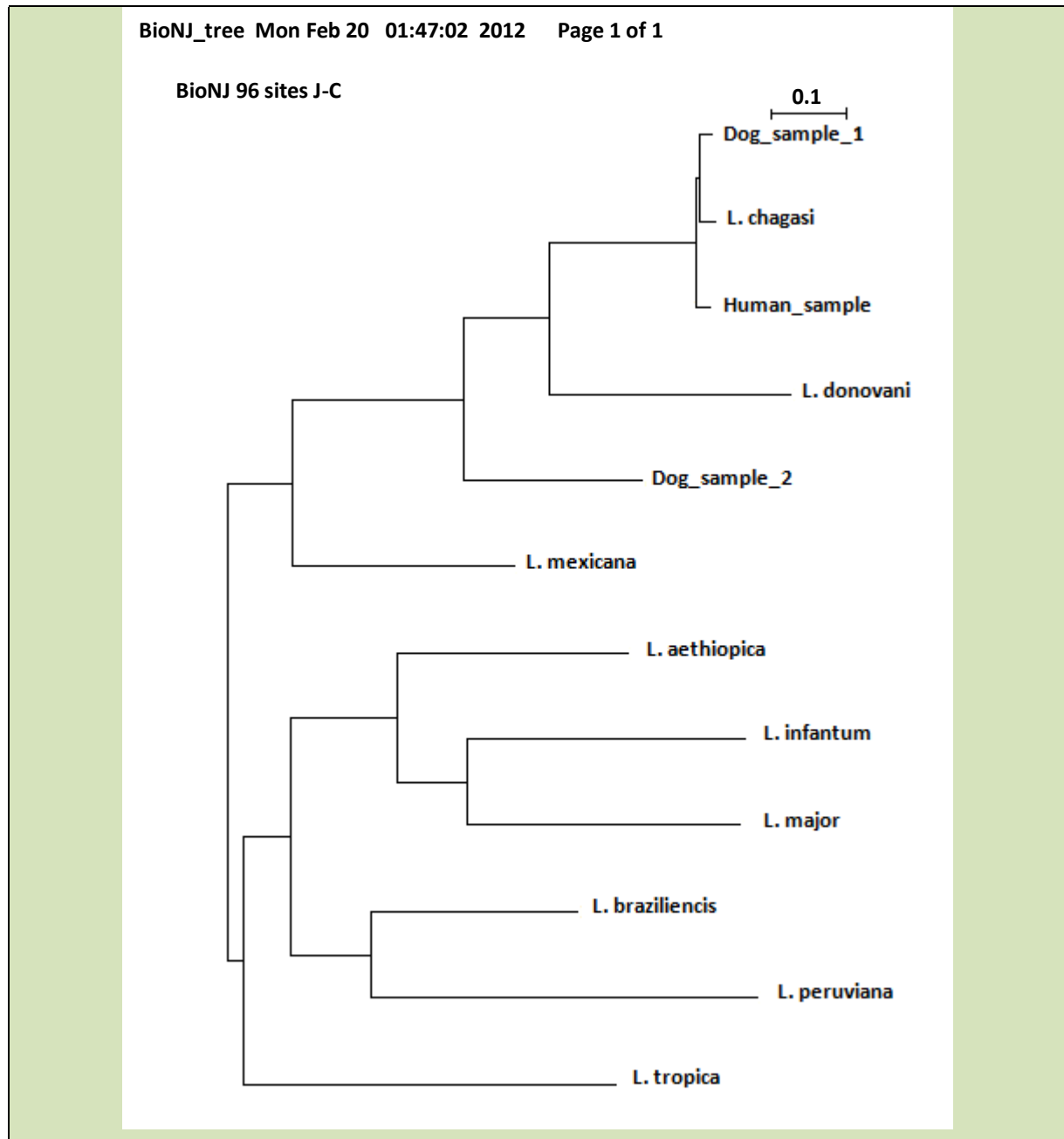


**Εικόνα 5.8:** Στοίχιση και σύγκριση των αλληλουχιών kDNA των σκυλίσσιων (Dog samples) και του ανθρώπινου δείγματος (Human sample). *Leishmania*. Στη στοίχιση συμπεριλάβαμε και της πρότυπες αλληλουχίες kDNA των παρασίτων *L.chagasi* και *L.donovani*, που αντιστοιχούσαν στα δείγματα μας, προκειμένου να διαπιστώσουμε τους πολυμορφισμούς που εμφανίζονται (SNPs), καθώς και τις αντίστοιχες από είδη του Νέου και του Παλαιού Κόσμου, προκειμένου να μελετήσουμε την εξέλιξη του μορίου kDNA, στα διάφορα είδη.

Η στοίχιση των αλληλουχιών kDNA, φανερώνει την έντονη ετερογένεια που διακατέχει τα μόρια minicircles του δικτύου, ανάμεσα στα διαφορετικά είδη. Στην παρούσα φάση, χρησιμοποιήθηκαν ορισμένα στελέχη των ειδών από τη βάση δεδομένων minicircles kDNA, προκειμένου να έχουμε μια εικόνα των πολυμορφισμών που εμφανίζονται και οι οποίοι διαφοροποιούν τα διάφορα είδη. Η παρουσία ορισμένων SNPs στην αλληλουχία kDNA του ίδιου είδους, ίσως μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη μοριακή διάγνωση για την ανίχνευση ενός συγκεκριμένου στελέχους (strain), με την τεχνική της RFLP. Οι πολυμορφισμοί που προκύπτουν στο ανθρώπινο δείγμα *L.chagasi*, ίσως να ευθύνονται για την ανάπτυξη ανθρωποφιλίας, ίσως και όχι. Σε κάθε περίπτωση όμως, η αλληλούχιση ενός μεγαλύτερου αριθμού δειγμάτων ανθρώπινου *L.chagasi*, απαιτείται ώστε να διαπιστώσουμε εάν όντως τα SNPs, είναι αποτέλεσμα της διαφοροποίησης του παρασίτου να προσβάλει τον άνθρωπο, ή απλώς πρόκειται για το αποτέλεσμα της ενίσχυσης παραπλήσιων τάξεων minicircles μέσα στο παράσιτο *L.chagasi* ή ακόμα και αποτέλεσμα λανθασμένων ενσωματώσεων της PCR. Η ταυτοποίηση του ίδιου στελέχους *L.chagasi* (AJS PECCO) στο ανθρώπινο και στο σκυλίσιο δείγμα, πιθανόν να φανερώνει πιθανή επικράτεια του παρασίτου στην περιοχή που εξετάσαμε.

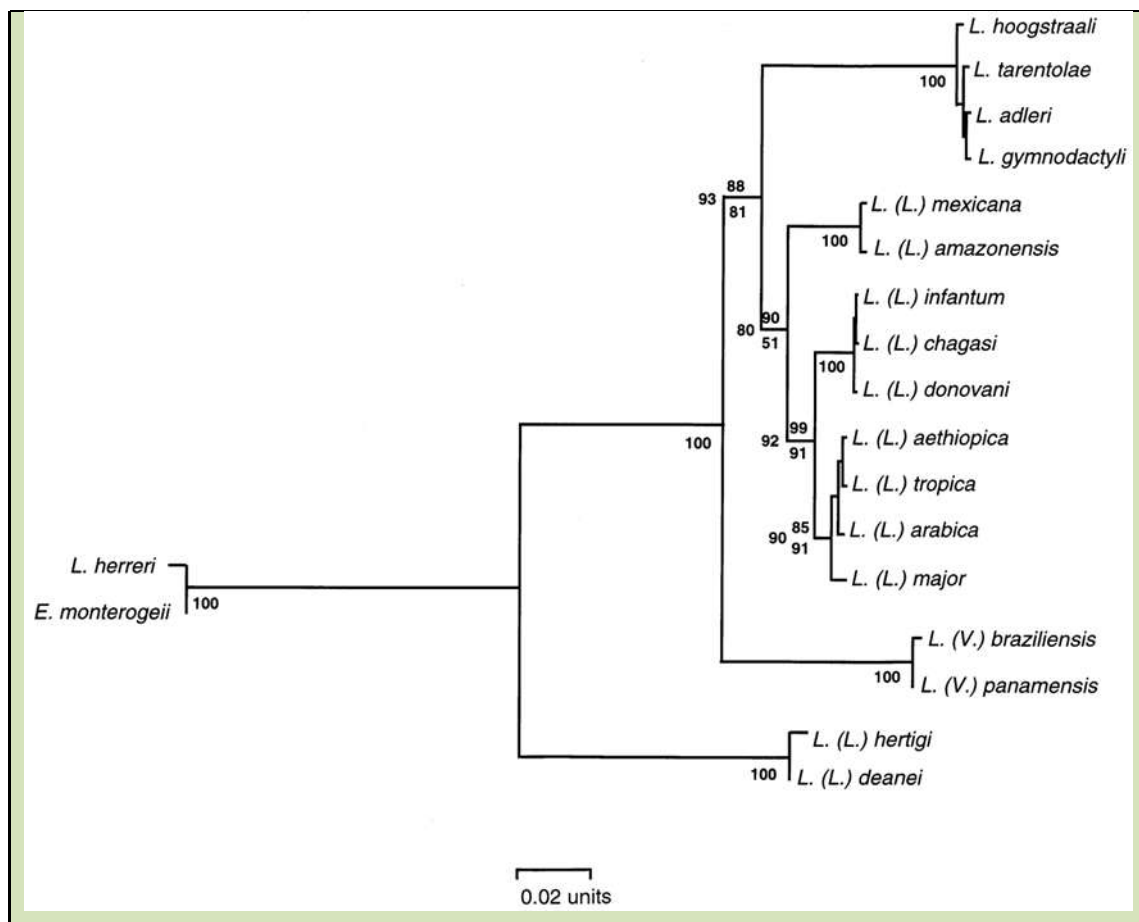
Παρακάτω, παρατίθεται ένα φυλογενετικό δέντρο γενετικών αποστάσεων των ειδών *Leishmania* του Παλαιού και του Νέου Κόσμου, βασισμένο στην αλληλουχία των μορίων kDNA minicircles από τη βάση δεδομένων (Kinoplast Minicircle Sequence Database), με τη χρήση του προγράμματος βιοπληροφορικής seaview. Τα είδη *L.infantum*, *L.tropica*, *L.donovani* και *L.major*, τα οποία είναι υπεύθυνα για την ανάπτυξη δερματικών και σπλαχνικών μορφών λεισμανίασης στις χώρες της

Μεσογείου, συγκρίθηκαν στο φυλογενετικό δέντρο με τα αντίστοιχα είδη, τα υπεύθυνα για τις παραπάνω μορφές λεισμανίασης στις χώρες του Νέου Κόσμου, κυρίως στην Νότια Αμερική. Τα είδη αυτά, απαρτίζονται κυρίως από την *L.braziliensis*, την *L.mexicana* και την *L.peruviana*. Στο δέντρο, συμπεριλάβαμε και τις αλληλουχίες των τριών δειγμάτων που είχαμε στην διάθεση μας.



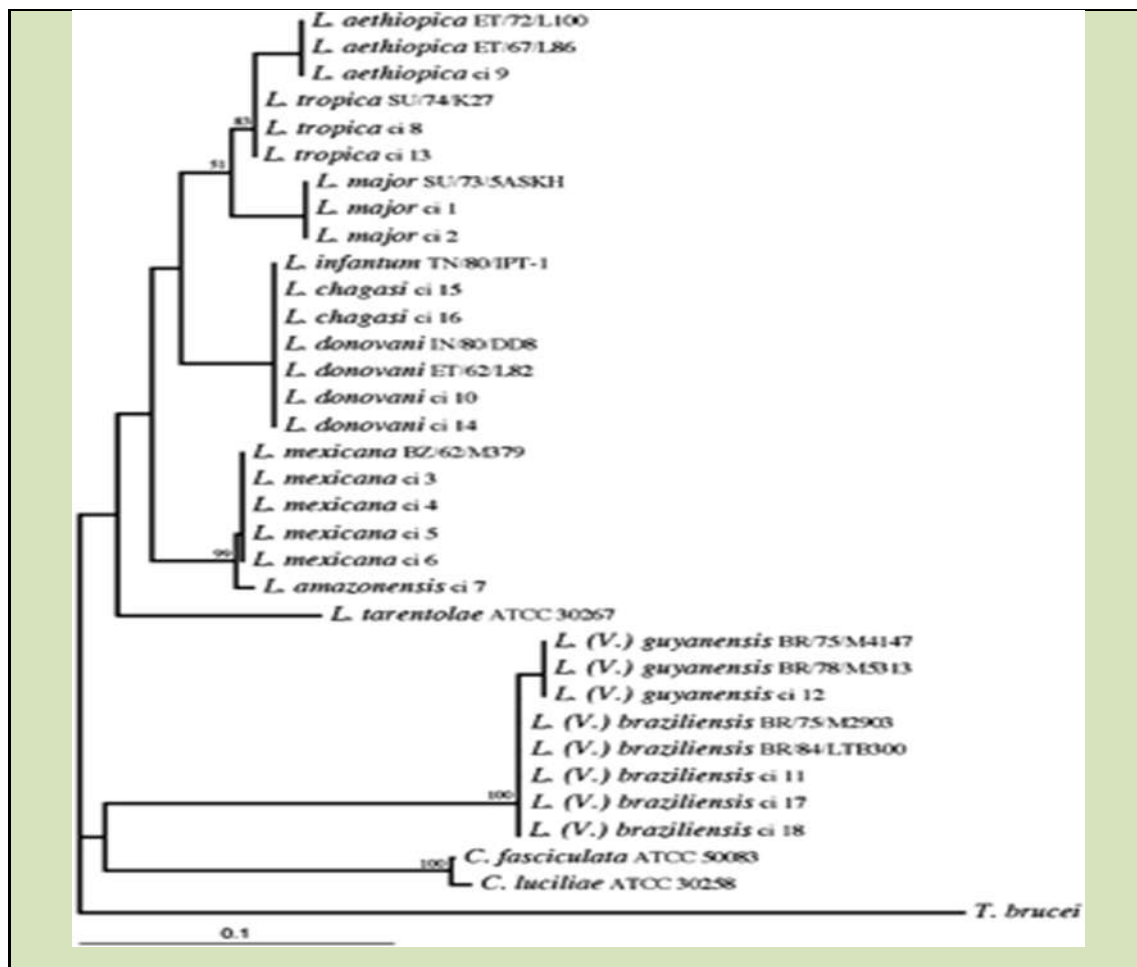
**Εικόνα 5.9:** Φυλογενετικό δέντρο ειδών *Leishmania*, βασισμένο στην αλληλουχία των kDNA minicircles.

Προκειμένου να αξιολογήσουμε καλύτερα τα παραπάνω αποτελέσματα, προχωρήσαμε στη αναζήτηση βιβλιογραφίας, σχετικά με την κατασκευή φυλογενετικών δέντρων των ειδών *Leishmania*, τα οποία στηρίζονται στην ενίσχυση άλλων γενετικών τόπων του παρασίτου. Παρακάτω, παρατίθενται δύο φυλογενετικά δέντρα βασισμένα στην ενίσχυση και αλληλούχιση γονιδίων που κωδικοποιούν για τις πολυμεράσες του παρασίτου (DNA και RNA), καθώς και την μη κωδική περιοχή 7LS του RNA (Croan et al. 1997; Zelazny et al. 2005).



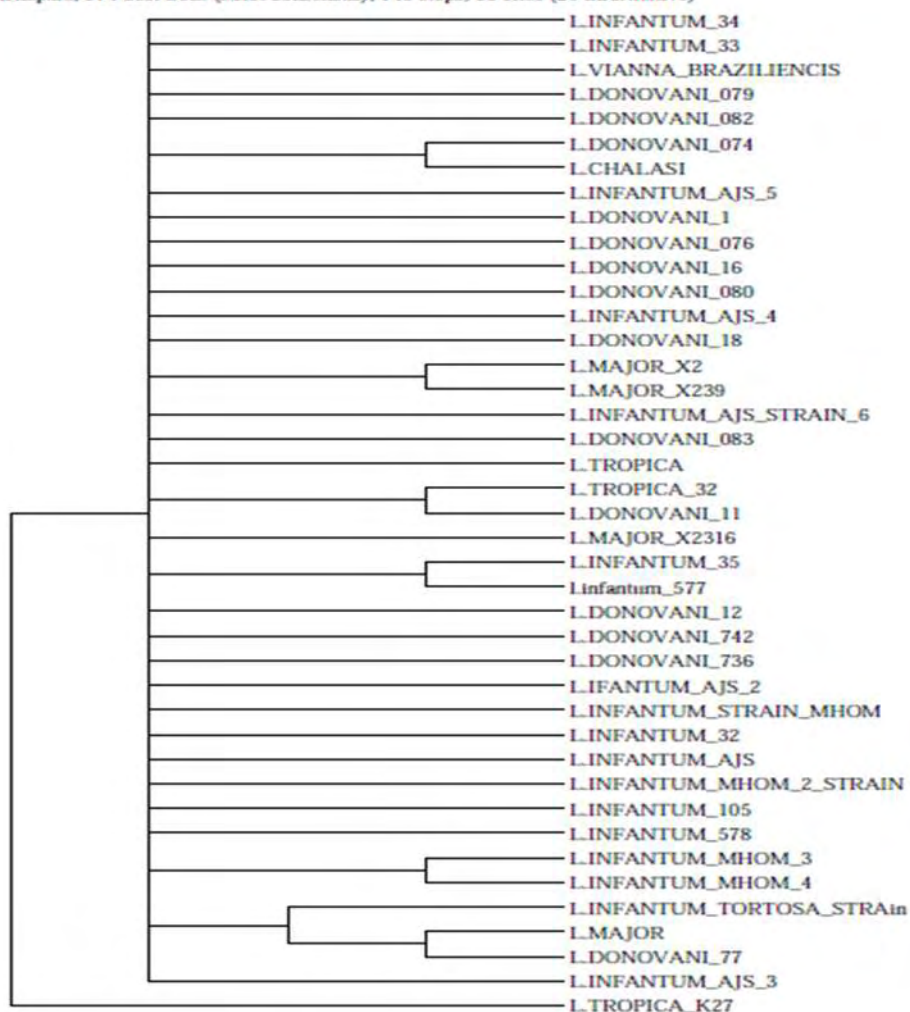
**Εικόνα 5.10:** Φυλογενετικό δέντρο ειδών *Leishmania* του Παλαιού και του Νέου Κόσμου, βασισμένο στην αλληλούχια των γονιδίων που κωδικοποιούν για την DNA και RNA πολυμεράση του παρασίτου.





**Εικόνα 5.11:** Φυλογενετικό δέντρο των ειδών *Leishmania*, που στηρίζεται στην αλληλουχία του 7SL RNA. Για την κατασκευή του δέντρου, χρησιμοποιήθηκαν πολλά διαφορετικά στελέχη (strains) κάθε είδους.

Dnapars, 374 best trees (strict consensus), 145 steps, 35 sites (26 informative)



**Εικόνα 5.12:** Φυλογενετικό δέντρο όλων των στελεχών των παρασίτων *L.infantum*, *L.donovani*, *L.major* και *L.tropica*, στηριζόμενο στην αλληλουχία του kDNA.

## 6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στα πλαίσια του πειράματος μας, μελετήσαμε με μοριακές μεθόδους ανίχνευσης (PCR), την εξάπλωση του παρασίτου *Leishmania* στην ευρύτερη περιοχή της Θεσσαλίας. Στην διάθεση μας, είχαμε ένα σημαντικό αριθμό δειγμάτων περιφερειακού αίματος σκύλων, οι οποίοι εμφάνιζαν τυπικά συμπτώματα λεισμανίασης (δερματικές αλλοιώσεις) και τα οποία καταγράφηκαν από το προσωπικό του κτηνιατρείου. Στόχο της PCR, αποτέλεσε το DNA του κινητοπλάστη του παρασίτου (kDNA) και συγκεκριμένα η ενίσχυση των μορίων minicircles (10000 μόρια/παράσιτο) του δικτύου kDNA, τα οποία λόγω της έντονης παρουσίας τους στο παράσιτο, αυξάνουν την ευαισθησία της αντίδρασης σε ποσοστά έως και 100%. Ένα εξίσου σημαντικό, αλλά με μικρότερη ευαισθησία, στόχο της PCR, αποτελεί η ενίσχυση της μη κωδικής περιοχής ITS των γονιδίων rRNA (40-200/παράσιτο) του παρασίτου, η οποία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια προηγούμενης Μεταπτυχιακής Διπλωματικής εργασίας. Τα δείγματα, τα οποία έδωσαν θετικό αποτέλεσμα στην PCR με στόχο το rRNA, χρησιμοποιήθηκαν και στην παρούσα εργασία, προκειμένου να γίνει μία σχετική σύγκριση της αποτελεσματικότητας και της ευαισθησίας της μεθόδου, όσον αφορά την επιλογή του μοριακού στόχου. Πράγματι, και τα 16 δείγματα απομονωμένου DNA σκύλων, τα οποία είχαν δώσει θετικό αποτέλεσμα στην προηγούμενη PCR, διαπιστώθηκαν θετικά στο παράσιτο και με ενίσχυση του kDNA της *Leishmania*. Ωστόσο, ένα ποσοστό των νέων δειγμάτων *Leishmania*, το οποίο αναλύθηκε, έδωσε θετικό αποτέλεσμα μόνο στην PCR, η οποία είχε ως στόχο το kDNA, επιβεβαιώνοντας την μεγάλη ευαισθησία της μεθόδου.

Σκοπός της παρούσας μελέτης, ήταν η ανίχνευση κάποιων πιθανών πολυμορφισμών (SNPs) στην αλληλουχία των minicircles του δικτύου kDNA, οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την ανάπτυξη ανθρωποφιλικών και ζωοφιλικών χαρακτηριστικών στα διάφορα είδη του παρασίτου *Leishmania*. Το γεγονός ότι το 40% των σκύλων της Θεσσαλίας, έχει βρεθεί θετικοί στο παράσιτο, γεννά πολλά και αναπάντητα ερωτήματα σχετικά με την προτίμηση του παρασίτου στα ζώα, έναντι του ανθρώπου. Τα ποσοστά ανθρώπινων κρουσμάτων που έχουν καταγραφεί είναι ελάχιστα. Η ανάλυση της αλληλουχίας ενός πολύ ιδιαίτερου και πολυμορφικού γενετικού τύπου, όπως είναι τα μόρια του kDNA, ίσως να μπορέσει να δώσει απαντήσεις σε αυτό το πολύ περίεργο γεγονός. Η ανάπτυξη SNPs στην αλληλουχία

αυτών των μορίων ίσως έχει να κάνει με τις παρασιτικές προτιμήσεις που αναπτύσσεται στα διαφορετικά στελέχη των ειδών της *Leishmania*. Πριν όμως αναλύσουμε τις αλληλουχίες των minicircles, πρέπει να λάβουμε υπόψη δύο πολύ σημαντικές παραμέτρους, οι οποίες αφορούν άμεσα την μελέτη μας και πιθανόν να την περιορίζουν. Όπως ήδη έχουμε αναφέρει, τα μόρια minicircles του δικτύου kDNA των Trypanosomatids, εμφανίζουν μεγάλη ετερογένεια, όσον αφορά την νουκλεοτιδική τους αλληλουχία, ακόμα και μέσα στο ίδιο είδος. Η εμφάνιση διαφορετικών τάξεων minicircles μέσα στο ίδιο παράσιτο, αποτελεί από μόνο του περιοριστικό παράγοντα για την μελέτη των πολυμορφισμών μεταξύ των ειδών, καθώς δεν εξασφαλίζεται η ενίσχυση των ίδιων μορίων κάθε φορά στο παράσιτο. Η ετερογένεια αυτή, αφορά την ευμετάβλητη περιοχή των minicircles, τα οποία αν και έχουν το ίδιο μέγεθος, παρουσιάζουν πολυμορφισμούς (SNPs) μέσα στο ίδιο δίκτυο μορίων. Αναφορικά για την *Leishmania*, έχουν αναφερθεί 17 διαφορετικές τάξεις minicircles μέσα στο ίδιο είδος παρασίτου. Η ετερογένεια αυτή, είναι πολύ μικρότερη σε σχέση με άλλα μέλη της οικογένειας των Trypanosomatidae, όπως το *C. fasciculata*, το οποίο εμφανίζει έως και 250 διαφορετικές τάξεις μορίων minicircles. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η ετερογένεια των minicircles μέσα στο ίδιο παράσιτο, είναι ανάλογη της επεξεργασίας που υφίστανται τα μετάγραφα των maxicircles του δικτύου (RNA editing). Η γενετική πληροφορία, η υπεύθυνη για την διαδικασία του RNA editing, είναι κωδικοποιημένη στην αλληλουχία των minicircles του δικτύου kDNA (gRNAs). Στο γένος *Leishmania*, το φαινόμενο RNA editing δεν είναι ιδιαίτερα έντονο, γι'αυτό και οι τάξεις minicircles που συναντάμε, είναι σαφώς λιγότερες.

Πέρα από την ετερογένεια, η οποία εμφανίζεται μέσα στο ίδιο είδος και η οποία αφορά την νουκλεοτιδική αλληλουχία των minicircles, στα διαφορετικά είδη του γένους *Leishmania*, εμφανίζεται έντονη ετερογένεια μήκους αλυσίδας των μορίων του δικτύου kDNA. Έτσι, κάθε είδος *Leishmania*, χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένο μέγεθος μορίων minicircles, γεγονός το οποίο διαπιστώνεται και από την ηλεκτροφόρηση των ενισχυμένων προϊόντων της PCR. Η κλωνοποίηση των ενθεμάτων μας σε πλασμιδιακό φορέα και η πέψη με ένζυμα, τα οποία κόβουν εκατέρωθεν της θέσης ενσωμάτωσης, μετά από ηλεκτροφόρηση, αποτελεί έναν πιο

αποτελεσματικό τρόπο διάκρισης των διαφορετικών ζωνών, που προκύπτουν και οι οποίες αντιστοιχούν σε διαφορετικά είδη. Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήσαμε ένα ζεύγος εκκινητών για την PCR, οι οποίοι είναι ειδικά σχεδιασμένοι να αναγνωρίζουν τη συντηρημένη περιοχή (conserved region) των minicircles, η οποία φαίνεται να διατηρείται μεταξύ των διαφορετικών ειδών *Leishmania* και με αυτό τον τρόπο καταφέρνουν να ενισχύσουν ολόκληρη την αλληλουχία των παραπάνω μορίων. Έτσι, ανάλογα με το είδος του παρασίτου *Leishmania*, παίρνουμε και τα αντίστοιχα προϊόντα στην PCR. Με αυτό τον τρόπο, καθίσταται δυνατή η διάκριση του είδους του παρασίτου, σε πρώτη φάση μέσω ηλεκτροφόρησης. Έτσι, το προϊόν μας κυμαίνεται μεταξύ 650 bp (*L. infantum*), 800 bp (*L. donovani*), 850bp (*L. tropica*) και δύο μπάντες των 620 και 850 bp (*L. major*), για τα είδη του Παλαιού Κόσμου. Ωστόσο, η αλληλούχιση κρίνεται αναγκαία, προκειμένου να έχουμε ένα πιο αξιόπιστο αποτέλεσμα τυποποίησης των ειδών *Leishmania*, αλλά και για να διερευνήσουμε την ύπαρξη πολυμορφισμών στην περιοχή αυτή που είναι δυνατόν να σχετίζονται με προσαρμογή του παρασίτου σε συγκεκριμένες συνθήκες.

Προκειμένου να έχουμε μια σαφή εικόνα των αλληλουχιών των minicircles που αντιστοιχούν σε διαφορετικά είδη, τα ενισχυμένα προϊόντα της PCR, εστάλησαν για αλληλούχιση, σε πρώτη φάση ως PCR products, και σε δεύτερη ως κλωνοποιημένα προϊόντα σε πλασμιδιακό φορέα. Εκτός από τα δείγματα *Leishmania* που αντιστοιχούσαν σε σκύλους, ενισχύθηκε και κλωνοποιήθηκε η αντίστοιχη αλληλουχία minicircles από παράσιτο, το οποίο είχε μολύνει άνθρωπο, στην περιοχή της Θεσσαλίας. Η εισαγωγή της αλληλουχίας του kDNA, το οποίο προέρχονταν από το ανθρώπινο δείγμα, στον αλγόριθμο blast, έδωσε 98% ομολογία με το αντίστοιχο kDNA της *Leishmania chagasi*, ένα είδος του Νέου Κόσμου. Παρομοίως, η αλληλούχιση ενός εκ των προϊόντων της PCR που αντιστοιχούσε σε δείγμα σκύλου, έδωσε παρόμοιο αποτέλεσμα στο blastn, με ομολογία 98% και πάλι με το kDNA του παρασίτου *L. chagasi*. Το στέλεχος *L.chagasi* και στις δύο περιπτώσεις ήταν το ίδιο (AJS PECCO). Η ομοπαράθεση των δύο αλληλουχιών kDNA, του ανθρώπινου και του σκυλίσιου δείγματος, μέσω του προγράμματος Omiga (dot plot), έδωσε σημαντικά ποσοστά αλλά όχι πλήρη ομολογία μεταξύ των δύο

αλληλουχιών. Αρκετά SNPs εντοπίστηκαν μεταξύ των δύο ακολουθιών, τα οποία μπορεί να οφείλονται, είτε στην νουκλεοτιδική ετερογένεια των minicircles που εμφανίζεται μέσα στο ίδιο είδος *Leishmania*, είτε μερικά να είναι αποτέλεσμα λανθασμένης ενσωμάτωσης της PCR, κατά την ενίσχυση του μορίου στόχου. Η σύγκριση των δύο αυτών ακολουθιών με την πρότυπη αλληλουχία kDNA της *L. chagasi* από τη βάση δεδομένων εμφάνισε και πάλι αρκετά SNPs, σ' όλο το μήκος της αλληλουχίας. Παράδοξο, ωστόσο, στην όλη υπόθεση, αποτελεί το γεγονός ότι ένα είδος *Leishmania* του Νέου Κόσμου, εμφανίστηκε σε δύο από τα δείγματα μας, προσβάλλοντας τόσο τον άνθρωπο, όσο και το σκύλο. Μέχρι πρόσφατα, το παράσιτο *L. chagasi*, αποτελούσε ένα αυτόνομο είδος το οποίο ευδοκίμούσε στις χώρες του Νέου Κόσμου. Ωστόσο, η γενετική ανάλυση με τη χρήση μικροδορυφορικών δεικτών απέδειξε ότι το συγκεκριμένο είδος αποτελεί, πιθανόν, έναν υποπληθυσμό της *L. infantum*. Μελέτες PCR-RFLP που αφορούσαν τις ITS μη κωδικές περιοχές, καθώς και το kDNA διαφορετικών υποτύπων (strains) *L. chagasi*, εμφάνισαν 99% ομολογία με αντίστοιχες του είδους *L. infantum*, ενισχύοντας την παραπάνω υπόθεση. Η μεταφορά του παρασίτου από την Ευρώπη στην Αμερική, έγινε προφανώς μέσω μετανάστευσης ενός πληθυσμού μολυσμένων ατόμων, προφανώς σκύλων, από την Πορτογαλία στις χώρες της Κεντρικής Αμερικής και της Βραζιλίας, στα μέσα του 16<sup>ου</sup> αιώνα (Maurício et al., 2000; Leblois 2011). Επομένως, η εμφάνιση του συγκεκριμένου υποείδους, τόσο στον άνθρωπο όσο και στον σκύλο, αποδεικνύει ότι το συγκεκριμένο παράσιτο πιθανότατα να μην εμφανίζει ιδιαίτερη προτίμηση, όσον αφορά τον ξενιστή του. Η μελέτη των SNPs αποδείχτηκε δύσκολη, εξ' αιτίας της μεγάλης ετερογένειας που εμφανίζουν οι μικρόκυκλοι kDNA, ακόμα και μέσα στο ίδιο παράσιτο, πόσο μάλλον σε διαφορετικά άτομα του είδους. Πολυμορφισμοί μπορούν να προκύψουν και με την ενίσχυση του kDNA από το ίδιο δείγμα *Leishmania*, καθώς δεν μπορεί να εξασφαλιστεί η ενίσχυση της ίδιας τάξης minicircles κάθε φορά. Επιπλέον, η PCR δεν μας εξασφαλίζει την ενίσχυση μίας και μόνο τάξης μορίων minicircles μέσα στο παράσιτο. Το χρωματογράφημα Chromas Lite, αποτελεί τον πιο αξιόπιστο τρόπο διαπίστωσης της τυχών ετεροζυγωτίας που μπορεί να προκύψει από την ενίσχυση πολλαπλών τάξεων minicircles. Η εμφάνιση πολλαπλών κορυφών στο διάγραμμα, μαρτυρά το γεγονός αυτό. Έτσι, τα SNPs που εμφανίζονται δεν μπορούν να χαρακτηριστούν με σιγουριά ως υπεύθυνα για την

ανάπτυξη ανθρωποφιλίας ή ζωοφιλίας στα παράσιτα του γένους *Leishmania*. Προφανώς, πρέπει να στοχεύσουμε σε πιο συντηρημένες περιοχές του γονιδιώματος της *Leishmania*, προκειμένου να εξάγουμε ασφαλέστερα συμπεράσματα.

Οι αλληλουχίες των υπολοίπων προϊόντων της PCR, δεν ήταν αρκετά ξεκάθαρες. Ωστόσο, αν και δεν είχαμε πλήρη την αλληλουχία kDNA στα υπόλοιπα δείγματα των σκύλων, η σύγκρισή τους μέσω blast, έδωσε μεγάλα ποσοστά ομολογίας με το είδος *L. donovani*. Η τοποθέτηση της εν λόγω αλληλουχίας στο πρόγραμμα seaview και η ομοπαράθεσή της με τις αντίστοιχες της *L. chagasi*, από το ανθρώπινο και το σκυλίσιο δείγμα, μέσω στοίχισης, επιβεβαίωσε τη μεγάλη ετερογένεια που εμφανίζει το kDNA, μεταξύ των ειδών της *Leishmania*. Όπως παρατηρούμε και από την σύγκριση των αλληλουχιών, το μόριο kDNA της *L. chagasi* εμφανίζει πολύ μικρό βαθμό ετερογένειας νουκλεοτιδικής αλυσίδας, σε σχέση με την πρότυπη της αλληλουχία, στα δύο δείγματα που αναλύσαμε. Οι δύο αλληλουχίες, μπορεί να εμφανίζουν πολυμορφισμούς μονού νουκλεοτιδίου (SNPs), ωστόσο αυτοί είναι ομοιόμορφα κατανεμημένοι σε ολόκληρη την αλληλουχία του μορίου kDNA. Από την άλλη πλευρά, η αλληλουχία kDNA από το σκυλίσιο δείγμα που απομονώσαμε, διαφέρει σημαντικά από την πρότυπη αλληλουχία του παρασίτου *L. donovani*, τουλάχιστον στην περιοχή την οποία καταφέραμε να αλληλουχίσουμε. Το γεγονός αυτό, ίσως να συνδέεται με την αυξημένη ετερογένεια που εμφανίζουν τα μόρια minicircles του είδους *L. donovani*, ίσως όμως να είναι και αποτέλεσμα της τύχης. Στην δεύτερη περίπτωση, η μικρότερη ετερογένεια που εμφάνισαν οι αλληλουχίες της *L. chagasi* στα δείγματα του σκύλου και του ανθρώπου σε σχέση με την πρότυπη, ίσως οφείλεται στο γεγονός της ενίσχυσης της ίδιας ή κοντινότερης τάξης μορίων minicircles μέσα στο παράσιτο, από την αντίστοιχη της *L. donovani*. Μία επιπλέον υπόθεση, μπορεί να αποτελεί το γεγονός ότι στις αλληλουχίες της *L. chagasi* που κλωνοποιήσαμε, εμφανίζονται οι συντηρημένες περιοχές του μορίου, οπότε παρουσιάζεται και μικρότερη ετερογένεια νουκλεοτιδικής αλυσίδας και πάλι σε σχέση με την *L. donovani*. Ωστόσο, προκειμένου να εξάγουμε ασφαλέστερα συμπεράσματα σχετικά με την ποικιλομορφία που παρουσιάζουν τα μόρια minicircles μέσα στο ίδιο είδος, καθώς



και σε διαφορετικά είδη, απαιτείται αλληλούχιση και στοίχιση ενός μεγαλύτερου αριθμού δειγμάτων από σκύλους και ανθρώπους. Αυτό θα αύξανε τη στατιστική σημαντικότητα των αποτελεσμάτων μας, καθώς θα μπορέσουμε να αξιολογήσουμε τη συχνότητα εμφάνισης των SNPs στα μόρια kDNA ανάμεσα στα διαφορετικά είδη.

Ένα τελευταίο χαρακτηριστικό που εξετάσαμε, ήταν η εξελικτική συγγένεια των ειδών της *Leishmania*, με την κατασκευή ενός εξελικτικού δέντρου γενετικών αποστάσεων, βασιζόμενο στην αλληλουχία των μορίων minicircles. Με αυτό τον τρόπο, μπορέσαμε να εξάγουμε συμπεράσματα σχετικά με την κοινή γενεολογία των ειδών, καθώς και την γενετική τους παρέκκλιση κατά την διάρκεια της εξέλιξης μέχρι σήμερα, ώστε να διαμορφωθεί η τελική μορφή των συμπλεγμάτων *Leishmania*. Καθότι δεν είχαμε στα χέρια μας αρκετά αποτελέσματα αλληλουχίσεων, η κατασκευή του δέντρου βασίστηκε, κυρίως, στη χρήση των πρότυπων αλληλουχιών του kDNA από τη βάση δεδομένων. Στο δέντρο, τοποθετήθηκαν τόσο είδη του Παλαιού Κόσμου όσο και του Νέου, προκειμένου να εξάγουμε συμπεράσματα με το διαχωρισμό και τη γεωγραφική κατανομή των ειδών, ανά τον κόσμο σήμερα. Χρησιμοποιήσαμε ως βάση τα δείγματα *L. chagasi* και *L. donovani*, τα οποία καταφέραμε να αλληλουχίσουμε και να συγκρίνουμε με τις πρότυπες αλληλουχίες της *L. infantum*, της *L. tropica* και τις *L. major*, είδη τα οποία είναι υπεύθυνα για ποικίλες μορφές δερματικής και σπλαχνικής λεισμανίασης στις χώρες της Μεσογείου. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν ως out-group, είδη του Νέου Κόσμου, όπως το *L. braziliensis*, το *L. peruviana* και το *L. mexicana*. Όπως διαπιστώνουμε και από το δέντρο, τα δείγματα τα οποία ταυτοποιήθηκαν ως *L. chagasi* στο πρόγραμμα blast, ομαδοποιούνται στο ίδιο επίπεδο με την πρότυπη αλληλουχία της *L. chagasi* από τη βάση δεδομένων, γεγονός το οποίο επιβεβαιώνει τα αποτελέσματά μας. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί το γεγονός ότι το ανθρώπινο δείγμα *L. chagasi*, παρουσιάζει μεγαλύτερη γενετική απόσταση από την πρότυπη αλληλουχία, σε σχέση με το σκυλίσιο, πράγμα το οποίο ερμηνεύεται ως εμφάνιση μεγαλύτερου αριθμού πολυμορφισμών στην αλυσίδα των minicircles του παρασίτου. Όπως προαναφέραμε, δεν είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε εάν αυτή η διαφοροποίηση είναι αρκετή για την ανάπτυξη ανθρωποφιλίας στο συγκεκριμένο παράσιτο. Η έντονη ετερογένεια νουκλεοτιδικής αλυσίδας που εμφανίζουν τα

minicircles μέσα στο ίδιο είδος, δεν μας επιτρέπουν μία τέτοια υπόθεση. Από την άλλη πλευρά, το σκυλίσιο δείγμα (Dog sample 2), το οποίο ταυτοποιήθηκε ως *L.donovani* στο blast, φαίνεται να αποκλίνει γενετικά σε μικρό βαθμό, σε σχέση με την πρότυπη αλληλουχία του παρασίτου. Το γεγονός αυτό, μπορεί αν ερμηνευτεί εύκολα με την παρουσία μεγαλύτερου αριθμού υποειδών (strains) στο συγκεκριμένο παράσιτο, οπότε και προφανώς μεγαλύτερη νουκλεοτιδική ετερογένεια στα μόρια των minicircles. Τα υπόλοιπα είδη, τοποθετούνται στο φυλογενετικό δέντρο με βάση την ομολογία που εμφανίζουν τα μόρια του kDNA τους. Εδώ γεννιέται το ερώτημα, είναι το kDNA το κατάλληλο μόριο για μία τέτοια φυλογενετική μελέτη; Η τεράστια ετερογένεια που εμφανίζεται στα μόρια minicircles, ακόμα και μέσα στο ίδιο είδος, σε τι βαθμό μπορεί να επηρεάσει τις γενετικές και εξελικτικές αποστάσεις κατά την κατασκευή ενός φυλογενετικού δέντρου; Σε αυτό το σημείο αξίζει να αναφέρουμε ότι η κατασκευή του φυλογενετικού μας δέντρου βασίστηκε αποκλειστικά και μόνο στην αλληλουχία του kDNA, το οποίο αποτελεί ουσιαστικά ένα γενετικό τόπο του παρασίτου. Η ανάγκη μελέτης ενός μεγαλύτερου αριθμού γενετικών τόπων, κρίνεται απαραίτητη για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από το φυλογενετικό δέντρο του kDNA. Οι περισσότερες μελέτες, στοχεύουν σε πιο συντηρημένες γενετικές περιοχές του παρασίτου για την κατασκευή φυλογενετικών δέντρων. Τα γονίδια τα οποία κωδικοποιούν για τις DNA και RNA πολυμεράσες του παρασίτου, καθώς και αντίστοιχα RNA γονίδια, αποτελούν τέτοιους γενετικούς τόπους. Όπως διαπιστώνουμε και από τα αντίστοιχα φυλογενετικά δέντρα, οι αλληλουχίες των 7LS γονιδίων RNA, φαίνεται να παρουσιάζουν μεγαλύτερη συντήρηση, τουλάχιστον στα άτομα του ίδιου είδους. Όπως διακρίνεται, τα υποείδη *Leishmania* στο δέντρο **5.11** ομαδοποιούνται ομοιόμορφα και διατηρούν μια σταθερή γενετική απόσταση. Στο φυλογενετικό δέντρο της εικόνας **5.12**, το οποίο βασίζεται στην αλληλουχία του kDNA και στο οποίο μελετήθηκαν οι σχέσεις μεταξύ διαφόρων στελεχών της *Leishmania*, η κατανομή παρουσιάζεται ακανόνιστη, και χωρίς καμία ομαδοποίηση. Εδώ, διαπιστώνεται για ακόμα μια φορά η έντονη ετερογένεια που εμφανίζεται στα minicircles του δικτύου kDNA μέσα στο ίδιο είδος. Η ανάλυση ενός άλλου γενετικού τόπου και συγκεκριμένα των γονιδίων που κωδικοποιούν για τα μόρια της αντιγραφής (DNA και RNA πολυμεράση) στη *Leishmania*, έδωσε το φυλογενετικό

δέντρο της εικόνας **5.10**. Όπως παρατηρούμε από τη σύγκριση των δέντρων στις εικόνες **5.9** και **5.10**, η *L.chagasi* φαίνεται να παρουσιάζει σταθερή σχετικά απόσταση από την *L.donovani*, για τους δύο γενετικούς τόπους που μελετήθηκαν. Επιπλέον, και για τον γενετικό τόπο 7LS RNA, τα παράσιτα φαίνεται να διατηρούνται ομαδοποιημένα. Ωστόσο, η *L.infantum*, ενώ στα υπόλοιπα δέντρα φαίνεται να παρουσιάζει μεγάλη γενετική συγγένεια με την *L.chagasi* και την *L.donovani*, στο δέντρο για το kDNA, τα δύο παράσιτα τοποθετούνται σε μεγαλύτερη απόσταση. Το γεγονός αυτό δεν προκαλεί έκπληξη, καθώς προφανώς οφείλεται στην ετερογένεια των minicircles, των συγκεκριμένων στελεχών *Leishmania* που χρησιμοποιήθηκαν από τη βάση δεδομένων για την κατασκευή του φυλογενετικού δέντρου. Άλλωστε, όπως έχουμε ήδη αναλύσει, η αναγνώριση της *L.chagasi* ως υποείδος της *L.infantum*, στηρίχτηκε στην ανάλυση ενός μεγαλύτερου αριθμού γενετικών τόπων και στελεχών του είδους. Οπότε, τα μόρια minicircles δεν αποτελούν τον καταλληλότερο γενετικό δείκτη για την εξαγωγή συμπερασμάτων, σχετικά με τη φυλογένεια των ειδών *Leishmania*. Απαιτείται η ανάλυση πολλαπλών γενετικών τόπων ταυτόχρονα, προκειμένου τα αποτελέσματα της φυλογένεσης των ειδών να είναι πιο αξιόπιστα. Αυτό όμως που είχε ιδιαίτερη σημασία στην παρούσα μελέτη ήταν το διαγνωστικό κομμάτι. Η παρουσία πολυμορφισμών SNPs, οι οποίοι διαφοροποιούν ένα είδος από τα υπόλοιπα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης στα πλαίσια της διάγνωσης, για τον προσδιορισμό του είδους του παρασίτου *Leishmania*. Η εφαρμογή μεθόδων RFLP με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων, μπορεί να ανιχνεύσει την ύπαρξη του παρασίτου που φέρει το συγκεκριμένο πολυμορφισμό. Η μελέτη των SNPs στο kDNA ανάμεσα στα διάφορα είδη *Leishmania*, μας έδωσε αυτή τη δυνατότητα. Ωστόσο, προκειμένου να μπορέσουμε να αξιολογήσουμε την συχνότητα εμφάνισης των πολυμορφισμών αυτών στο kDNA, απαιτείται στοίχιση ενός μεγαλύτερου αριθμού δειγμάτων από αυτόν που χρησιμοποιήσαμε στην παρούσα εργασία. Η ετερογένεια των minicircles, δεν μας άφησε και πολλά περιθώρια στην ανίχνευση των SNPs, στα δείγματα που αναλύθηκαν. Η ανάλυση μεγαλύτερου αριθμού δειγμάτων, σίγουρα θα αυξήσει σημαντικά τη στατιστική σημαντικότητα των αποτελεσμάτων μας. Το γεγονός εάν κάποιοι πολυμορφισμοί στο kDNA τείνουν να διαφοροποιούν κάποια στελέχη του παρασίτου από τα υπόλοιπα, μένει να αναλυθεί σε μελλοντικά πειράματα.

Ολοκληρώνοντας τη μελέτη μας πάνω στο kDNA της *Leishmania*, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι το μόριο αποτελεί ένα αξιόλογο και εξαιρετικά ευαίσθητο στόχο μοριακής διάγνωσης της ασθένειας, μέσω PCR. Η μεγάλη ετερογένεια που εμφανίζουν τα μόρια kDNA, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο ταυτοποίησης του είδους του παρασίτου, μέσω χρήσης εξειδικευμένων προγραμμάτων βιοπληροφορικής. Ωστόσο, η ανάπτυξη της ετερογένειας, ακόμα και σε μόρια του ίδιου δικτύου kDNA, δυσκολεύουν τη μελέτη των πολυμορφισμών μεταξύ των διαφόρων ειδών του παρασίτου. Η πληροφορία που ευθύνεται για την ανάπτυξη ανθρωποφιλικών ή ζωοφιλικών χαρακτηριστικών του παρασίτου, προφανώς βρίσκεται κωδικοποιημένη μέσα στο γονιδίωμα της *Leishmania*, αλλά τα μόρια του kDNA δεν αποτελούν τον κατάλληλο στόχο για μια τέτοια μελέτη, εξαιτίας της μεγάλης ποικιλομορφίας που εμφανίζουν. Απαιτείται σύγκριση ενός μεγάλου αριθμού διαφορετικών ειδών και στελεχών του παρασίτου, προκειμένου να αξιολογήσουμε την συχνότητα εμφάνισης των πολυμορφισμών στην αλληλουχία του kDNA τους. Η ανάπτυξη πολυμορφισμών σε συγκεκριμένα στελέχη, ίσως δώσει απαντήσεις σε ζητήματα που αφορούν την προτίμηση του ξενιστή. Επιπλέον, η μελέτη των πολυμορφισμών σε πιο συντηρημένες γενετικές περιοχές του παρασίτου, να μπορέσουν να δώσουν πιο σαφείς απαντήσεις σχετικά με τον παρασιτισμό που αναπτύσσουν τα διάφορα είδη *Leishmania*.

## ***7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ***

Altting-Mees MA., Short JM., 1989. pBluescript II: gene mapping vectors. *Nucleic Acids Res.* 25;17(22):9494.

Alvar J., Aparicio P., Aseffa A., Boer M.D., Cañavate C., Dedet J.P., Gradoni L., 2008. The Relationship between Leishmaniasis and AIDS: the Second 10 Years. *Clin. Microbiol. Rev.*, 21(2): 334.

Alvar J., Canavate C., Gutierrez-Solar B., Jimenez M., Laguna F., Lopez-Velez R., 1997. Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin Microbiol Rev* 10: 298-319.

Antoine J., Prina E., Jouanne C., Bongrand P., 1990. Parasitophorous Vacuoles of *Leishmania amazonensis*-Infected Macrophages Maintain an Acidic pH. *Infect Immun.*; 58(3): 779–787

Arya SC., 2002. Enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of leishmaniasis in patients coinfecting with Human Immunodeficiency Virus. *J Clin Microbiol*, 40: 3110.

Ashford DA., Bozza m., Freire M., Miranda JC., Sherlock I., Eulalio C., Lopes U., Fernandes O., Degraeve W., Barker RH., Badaro R., David JR., 1995. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 53:251–255.

Bates P.A., 2007. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sandflies. *Int. J. Parasitol.*, 37, 1097-1106.

Benne R., Van den Burg J., Brakenhoff JPJ., Sloof P. Van Boom JH., 1986. Major transcript of the frameshifted coxII gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA. *Cell* 46: 8 19-26.

Benne R., 1993. RNA editing in mitochondria of *Leishmania tarentolae* and *Crithidia fasciculata*. *Semin Cell Biol.* 4(4):241-9.

Birkenmeyer L., Sugisaki H., Ray DS., 1987. Structural characterization of site specific discontinuities associated with replication origins of minicircle DNA from *Crithidia fasciculata*. *J. Biol. Chem.* 262:2384-92.

Biscardi AM., Lopez LM., De Pahn EM, Pellegrino de Iraldi A., Stoppani AO. 2001. Effect of dyskinetoplastic agents on ultrastructure and oxidative phosphorylation in *Crithidia fasciculata*. *Biocell.*; 25(1):43-51.

Blum B., Bakalara N., Simpson LJ., 1990. A model for RNA editing in kinetoplastid mitochondria: "guide" RNA molecules transcribed from maxicircle DNA provide the edited information. *Cell* 60: 189-98.

Borst P., Fowler FF , Gibson WC., 1981. Quantitation of genetic differences between *Trypanosoma brucei gambiense*, *rhodesiense* and *brucei* by restriction enzyme analysis of kinetoplast DNA. Volume 3, Issue 2, , Pages 117–131.

Bray R.S., 1974. *Leishmania*. *Annual Review of Microbiology*, 28, pp. 189–217.

Britto C., Ravel C., Bastien P., Blaineau C., Pagès M., Dedet JP., Wincker P., 1998. Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal rearrangements between Old World and New World *Leishmania* genomes. *Gene* 222: 107-117.

Bryceson A., Hay R., 1998. Parasitic worms and protozoa. Blackwell Scientific Publications, United kingdom: pp 1410-1421.

Carpenter LR., Englund PT., 1995. Kinetoplast maxicircle DNA replication in *Crithidia fasciculata* and *Trypanosoma brucei*. *Mol. Cell Biol.* 15, 6794-6803.

CDC, Division of Parasitic Diseases (DPDx). Leishmaniasis. <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>.

Chen J., Englund PT., Cozzarelli NR., 1995. Changes in network topology during the replication of kinetoplast DNA. *EMBO J.* 14, 6339–6347.

Chen J., Rauch CA., White JH., Englund PT., Cozzarelli NR., 1995. The topology of the kinetoplast DNA network. *Cell* 80, 61-69.

Chen KK., Donelson JE., 1980. Sequences of two kinetoplast DNA minicircles of *Trypanosoma brucei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:2445-49.

Croan D., Morrison D., Ellis J., 1997. Evolution of the genus *Leishmania* revealed by comparison of DNA and RNA polymerase gene sequences. *Molecular and Biochemical Parasitology* 89 :149–159



Degrave W., Fragoso SP., Britto C., van Heuverswyn H., Kidane GZ., 1988. Peculiar sequence organization of kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma cruzi*; Mol. Biochem. Parasitol. 27:63-70.

Desjeux P., 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 27(5):305-18

De Souza W., 2010. Structures and Organelles in Pathogenic Protists. Microbiology Monographs, Vol. 17.

Englund PT., 1979. Free minicircles of kinetoplast DNA in *Crithidia fasciculata*. J. Biol. Chem. 254:4895-900.

Englund PT., 1981. Kinetoplast DNA. In Biochemistry and Physiology of Protozoa,. New York: Academic 4: 333-83.

Englund PT., 1978. The replication of kinetoplast DNA networks in *Crithidia fasciculata*. Cell 14: 1 57-68.

Estevez AM., Simpson L., 1999. Uridine insertion/deletion RNA editing in trypanosome mitochondria—a review. Gene, 240, 247–260.

Feagin JE., Abraham M., Stuan K., 1988. Extensive editing of the cytochrome c oxidase transcript in *Trypanosoma brucei*. Cell 53:4 1 3-22.

Ferguson M., Torri AF., Ward DC., Englund PT., 1992. *In Situ Hybridization to the Crithidia fasciculata*. Kinetoplast Reveals Two Antipodal Sites Involved in Kinetoplast DNA Replication. Martin Ferguson Cell 70, 621-629.

Frank C., Hadziandoniou M., Pratlong F., Garifallou A., Rioux JA., 1993. Leishmania tropica and Leishmania infantum responsible for cutaneous leishmaniasis in Greece: sixteen autochthonous cases Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 87, pp. 184–185.

Gel electrophoresis. [http://en.wikipedia.org/wiki/Gel\\_electrophoresis](http://en.wikipedia.org/wiki/Gel_electrophoresis).

Gibson E., 1983. The identification of KALA AZAR and the discovery of Leishmania donovani. Medical History, , 27: 203-213.

Gramiccia M., Gradoni L., 2005. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. Int J Parasitol.;35(11-12):1169-80.

Grams J., Morris JC., Drew M E., Wang Z., Englund PT., Hajduk SL., 2002. A trypanosome mitochondrial RNA polymerase is required for transcription and replication. J. Biol. Chem. 277, 16952-16959.

Grevelink MD., Suzanne A., Lerner Ea., 1996. Leishmaniasis. J Am Acad dermatol, 34:257-272.

Grosjean H., Benne R., 1998. Modification and editing of RNA. American Society for Microbiology.

Guerin P.J., Olliaro P., Sundar S., Boelaert M., Croft S.L., Desjeux P. Wasunna M.K., Bryceson A.D. 2002. Visceral Leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect. Dis.* 2(8):494-501.

Hajduk S.L., Klein V.A., Englund, P.T., 1984. The assembly of kinetoplast DNA. *Cell* 36,483-492.

Hancock K., Hajduk S.L., 1990. The mitochondrial tRNAs of *Trypanosoma brucei* are nuclear encoded *J. Biol. Chem.* 265, 19208- 19215

Herwaldt B.L., 1999. Leishmaniasis. *Lancet* 354: 1191-1199

Hommel M., 1999. Visceral Leishmaniasis: biology of the parasite. *J. Infect.*,39 pp.101–111.

<http://www.ebi.ac.uk/parasites/kDNA/Source.html>.

<http://www.obgynacademy.com/basicsciences/fetology/genetics>.

Iniesta L., Fernandez-Barredo S., Bulle B., Gomez MT., Piarroux R., Gallego M., Alunda JM., Portus M., 2002. Diagnostic techniques to detect cryptic leishmaniasis in dogs. *Clin. Diagn. Immunol* 9:1137-1141.

Innis M., 1990. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego, CA.

Iovannisci DM., Beverley SM., 1989. Structural alterations of chromosome 2 in *Leishmania major* as evidence for diploidy, including spontaneous amplification of the mini-exon array. *Mol Biochem Parasitol* 34: 177–188.

Ivens AC., Peacock CS., Worthey EA., Murphy L., Aggarwal G., Berriman M., 2005. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science*.; 309 (5733): 436-42.

Kallinikova VD., 1981. The Kinetoplast as a Cell Organelle. *Int Rev Cytol.*;69:105-56.

Kassai T., Cordero del Campillo M., Euzeby J., Gaafar S., Hiepe T., Himonas C.A. 1988. Standardized nomenclature of animal parasitic diseases (SNOAPAD). *Vet Parasitol* 29: 299-326

Katakura K., Kawazu SI., Sanjyoba C., Naya T., Matsumoto Y., Ito M., Nagakura K., Aikawa M., Hashiguchi Y., 1999. *Leishmania* Mini-exon Genes for Molecular Epidemiology of Leishmaniasis in China and Ecuador. *Tokai J Exp Clin Med.*, Vol. 23, No. 6, pp.393-399.

Kato H., Gomez EA., Cáceres AG., Uezato H., Mimori H., Hashiguchi Y., 2010. Molecular Epidemiology for Vector Research on Leishmaniasis. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 7, 814-826.

Kidane, GZ., Hughes D., Simpson L., 1984. Sequence heterogeneity and anomalous electrophoretic mobility of kinetoplast minicircles DNA from *Leishmania tarentolae*. *Gene* 27:265-277.

Kitchin PA., Klein VA., Englund PT., 1985. Intermediates in the replication of kinetoplast DNA minicircles. *J. Bio. Chem.* 260:3844-51.

Krauth-Siegel RL., Meiering SK, Schmidt H., 2003. The parasite-specific trypanothione metabolism of trypanosoma and leishmania. *Biol. Chem.* 384 (4): 539–49.

Kupfer B., Vehreschild J., Cornely O., Kaiser R., Plum G., Viazov S., Franzen C., 2006. Leishmaniasis in Ancient Egypt and Upper Nubia. *Emerging Infectious Diseases* Vol. 12, No. 10.

Lainson R., Shaw JJ., 1987. Evolution, classification and geographic distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R (eds) *The leishmaniasis in biology and medicine*. London, Academic Press, :1–120.

Leblois R., 2011. Guns, germs and dogs: On the origin of *Leishmania chagasi*. *Infection, Genetics and Evolution* 11 1091–1095.

Leon W., Fouts D.L., Manning J., 1978. Sequence arrangement of the 16S and 26S rRNA genes in the pathogenic haemoflagellate *Leishmania donovani*. *Nucleic Acids Research*, 5, pp. 491–501.

Lighthall GK., Giannini SH., 1992. The chromosomes of *Leishmania*. *Parasitol Today*; 8(6): 192-9.

Lukes J., Guilbride DL., Votypka J., Zikova A., Benne R., Englund PT., 2002. Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure. *Eukaryot. Cell*. 1:495–502.

Madison-Antenucci S., Grams J., Hajduk SL., 2002. Editing machines: the complexities of trypanosome RNA editing. *Cell*, 108.

Mahboudi F., Abolhassani M., Tehrani SR., Azimi M., Asmar M., 2002. Differentiation of Old and New World *Leishmania* Species at Complex and Species Levels by PCR. *Scand J Infect Dis* 34: 756–758, 2002.

Manna L., Vitale F., Reale S., Caracappa S., Pavone L.M., Morte R.D., Cringoli G., Staiano N., Gravino A.E. 2004. Comparison of different tissue sampling for PCR based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. *Vet Parasitol* 125: 251-262.

Marchuk D., Drumm M., Saulino A., Collins, FS., 1991. Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucleic Acids Res.*19:1154.

Markoulatos P., Siafakas N., Moncany M., 2002. Multiplex Polymerase Chain Reaction: A Practical Approach. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 16:47–51

Martynkina LP., Novikova EG., Kolesnikov AA., Strel'tsov SA., Semenov TE., Vengerov L., 1989. Structural organization of kinetoplast DNA and its compactization in a model system *in vitro*. *Mol Biol (Mosk)*.; 23(6):1645-57.

Maslov OA., Simpson L., 1992. The polarity of editing within a multiple gRNA-mediated domain is due to formation of anchors for upstream gRNAs by downstream editing. *Cell* 70:459-67.

Maurício IL., Stothard JR., Miles A., 2000. The Strange Case of *Leishmania chagasi*. *Parasitology Today*, vol. 16, no. 5.

Molyneux D.H., 1974. Virus-like particles in *Leishmania* parasites. *Nature* 249:588-589.

Muhich ML., Simpson L., Simpson AM., 1983. Comparison of maxicircle DNAs of *Leishmania tarentolae* and *Trypanosoma brucei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.80:4060-64.

Muller N., Zimmermann V., Forster U., Bienz M., Gottstein B., Welle M., 2003. PCR based detection of canine *Leishmania* infections in formalin-fixed and paraffin embedded skin biopsies: elaboration of a protocol for quality assessment of the diagnostic amplification reaction. *Vet Parasitol* 114: 223-229.

Mullis KB., Faloona FA., 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.*; 155:335-50.

Myler PJ., Glick D., Feagin JE., Morales TH., Stuart KD., 1993. Structural organization of the maxicircle variable region of *Trypanosoma brucei*: identification of potential replication origins and topoisomerase II binding sites. *Nucleic Acids Res.* 21 :687-94.

Nasereddin A., Jaffe C., 2010. Rapid Diagnosis of Old World Leishmaniasis by High-Resolution Melting Analysis of the 7SL RNA Gene. *J. Clin. Microbiol.* vol 48 no. 6 2240-2242.

Newton BA., 1980. Organization and function of kinetoplast DNA. In *Specific Eukaryotic Genes*. (In press).

Ntambi JM., Englund PT., 1985. A gap at a unique location in newly replicated kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma equiperdum*. *J. Biol. Chem.* 260:5574-79.

Ntambi JM., Shapiro TA., Ryan KA., Englund PT., 1986. Ribonucleotides associated with a gap in newly replicated kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma equiperdum*. *J. Biol. Chem.* 261 : 11890-95.

Nucleic acid amplification protocols and guidelines. <http://www.promega.com/paguide/chap1.htm>.



Ouellette M., Papadopoulou B., 1993. Mechanisms of drug resistance in Leishmania. *Parasitol Today*; 9(5): 150-3.

Papadopoulou C., Kostoula A, Dimitriou D., Panagiou A., Bobojianni C., Antoniadis G,. 2005. *Journal of Infection* 50 : 53-60.

Parvizi P., Moradi G., Akbari G., Farahmand M., Ready PD., 2008. PCR detection and sequencing of parasite ITS-rDNA gene from reservoirs host of zoonotic cutaneous leishmaniasis in central Iran. *Parasitology Research* Volume 104, Number 1, Pages 195-196.

Pavli A., Maltezou E.C., 2010. Leishmaniasis, an emerging infection in travelers. *International Journal of Infectious Disease*, Volume 14, Issue 12.

Peacock CS., Seeger K., Harris D., Murphy L., Ruiz JC., Quail MA., 2007 Comparative genomic analysis of three Leishmania species that cause diverse human disease. *Nat Genet.*; 39 (7): 839-47.

Perez-Morga D., Englund PT., 1993. The structure of replicating kinetoplast DNA networks. *J. Cell Biol.* 123:1069-79.

Pherson MJ., Parish JH., 1987. Applications of recombinant DNA in biotechnology. *Nat Prod Rep.* 1987 Jun;4(3):205-24.

Preciado A., Peimbert M., Merino E., 2009. Genome Sequence Databases: Types of Data and Bioinformatics Tools. *Encyclopedia of Microbiology*; 23:223:314.

Principles and Practice of Agarose Gel Electrophoresis. The Biotechnology Education Company. [www.edvotek.com](http://www.edvotek.com).

Protocol for PCR with Taq DNA Polymerase.  
<http://www.fermentas.com/techinfo/pcr/dnaamplprotocol.htm>.

Ravel C., Wincker P., Blaineau A., Britto C., Bastien P., Pagès M., 1996. Medium-range restriction maps of five chromosomes of *Leishmania infantum* and localization of size-variable regions. *Genomics*, 35, pp. 509–516.

Rauch CA., Perez-Morga D., Cozzarelli NR., Englund PT., 1993. The absence of supercoiling in kinetoplast DNA minicircles. *EMBO J.* 12:403–411.

Ray DS., 1989. Conserved sequence blocks in kinetoplast mini circles from diverse species of trypanosomes. *Mol. Cell Bioi.* 9:1365-67.

Rioux JA., Lanotte G., Serres E., Pratlong F., Bastien P., Perieres J., 1990. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 65, 111–125.

Rodgers MR., Popper SJ., Wirth DF., 1990. Application of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of leishmania. *Exp Parasitol* 71: 267–75.

Rodriguez N., Guzman B., Rodas A., Takiff H., Bloom BR., Convit J., 1994. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. *J Clin Microbiol* 32:2246–2252.

Ryan JR., Smithyman AM., Rajasekariah GH., Hochberg L., Stiteler JM., Martin SK., 2002. Enzyme-linked immunosorbent assay based on soluble promastigote antigen detects immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies in sera from cases of visceral and cutaneous leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 40: 1037-1043.

Ryan KA., Englund PT., 1989. Replication of kinetoplast DNA in *Trypanosoma equiperdum*. Minicircle H strand fragments which map at specific locations. *J. Bioi. Chem.* 264:823-30.

Ryan KA., Englund PT., 1989. Synthesis and processing of kinetoplast DNA mini circles in *Trypanosoma equiperdum*. *Mol. Cell Biol.* 9:3212-17.

Sambrook J., Russel DW., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY.

Schönian G., Nasereddin A., Dinse N., Schweynoch C., Schallig HD., Presber W., Jaffe CL. 2003. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Microbiol Infect Dis.*; 47(1):349-58.

Seaman J., Mercer AJ., Sondorp E., 1996. The epidemic of visceral leishmaniasis in western Upper Nile, southern Sudan: Course and impact from 1984 to 1994. *Int J Epidemiol*;25:862.

Segovia M., 1994. Leishmania gene amplification: A mechanism of drug resistance. *Ann Trop Med Parasitol.*; 88(2):123-30.

Sharkey D., Scalice ER., Christy K., Atwood SM., Daiss J., 1994. Antibodies as Thermolabile Switches: High Temperature Triggering for the Polymerase Chain Reaction. *Nature Biotechnology* 12, 506 – 509.

Shapiro TA., 1993. Kinetoplast DNA maxicircles: networks within networks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 7809-7813.

Shlomai J., 1994. The assembly of kinetoplast DNA. *Parasitol. Today* 10, 341-346.

Shlomai J., 2004. The Structure and Replication of Kinetoplast DNA, *Current Molecular Medicine*, 4, 623-647.

Simpson L., 1987. The Mitochondrial Genome of Kinetoplastid Protozoa: Genomic Organization, Transcription, Replication, and Evolution. *Ann. Rev. Microbiol.* 41:363-62.

Smyth A.J., Ghosh, A., Hassan M.Q., Basu D., De Bruijn M.H., Adhya S., Mallik, K.K., Barker, D.C., 1992. Rapid and sensitive detection of *Leishmania* kinetoplast DNA from spleen and blood samples of kala-azar patients. *Parasitology* 105: 183-192.

Stuart K., 1983. Kinetoplast DNA, mitochondrial DNA with a difference. *Mol. Biochem. Parasitol.* 9:93-104.

Stuart K., Feagin JE., 1987. Regulation of gene expression in trypanosomes by mRNA editing. *Molecular Genetics of Protozoa*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.

Stuart K., 1991. RNA editing in kinetoplastid protozoa. *Current Opinion in Genetics and Development*, 1:412-416.

Sturm NR., Simpson L., 1990. Kinetoplast DNA minicircles encode guide RNAs for editing of cytochrome oxidase subunit III mRNA. *Cell* 61:879—84.

Sturm NR., Simpson L., 1991 . *Leishmania tarentolae* minicircles of different sequence classes encode single guide RNAs located in the variable region approximately 150 bp from the conserved region. *Nucleic Acids Res.* 19:6277-81.

Sundar S., Rai M., 2002. Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis (Kala-azar). *American Society for Microbiology*; 221: 001.

Tarr PI., Aline RF., Smiley BL., Scholler J., Keithley J., Stuart K., 1988. LR1: A candidate Rna virus of Leishmania. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85-9572-9575.

Tetley L., Vickerman K., 1991. The glycosomes of trypanosomes: number and distribution as revealed by electron spectroscopic imaging and 3-D reconstruction. *J Microsc*, 62, pp. 83–90.

Tzanetou K., 1984. An evaluation of peptidase substrates for isoenzyme characterization of Leishmania spp. M. Sc. Thesis.:1–74.

Volf P., Hostomska J., Rohousova I., 2008. Molecular Crosstalks in Leishmania-Sandfly-Host Relationships. *Parasite*,15, 237-243.

Waki K., Dutta S., Ray D., Kolli B.K., Akman L., Kawazu S., Lin C.P., Chang K.P., 2007. Transmembrane molecules for phylogenetic analyses of pathogenic Protists: Leishmania-specific informative sites in hydrophilic loops of transendoplasmic reticulum N-acetylglucosamine-1-phosphate transferase. *Eukaryot. Cell* 6, 198–210.

Watson J.B., Myers RM., , Caudy AA., Witkowski JA., 2007. *Recombinant DNA: Genes and Genomes - A Short Course*.

Weaver J., Chizmadzhev Y., 1996. Theory of electroporation: A review. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* Volume 41, Issue 2.

Wheeler RJ., Gluenz E., Gull K., 2011. The cell cycle of Leishmania: morphogenetic events and their implications for parasite biology. *Mol Microbiol* ; 79(3):647-62.

WHO 1998. Leishmania and HIV in gridlock. Geneva, World Health Organization. WHO/UNAIDS report. 15-25.

WHO (2006). "Control of leishmaniasis." Geneva, World Health Organization, agenda item 5.1, document EB118/4.

Wincker P., Ravel C., Blaineau C., Pages M., Jauffret Y., Dedet J.P and Bastien P. 1996. The Leishmania genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. *Nucleic Acids Res* 24 (9):1688-94.

World Health Organization. Communicable diseases surveillance and response: geographical distribution.

Zavitsanou A., Koutis C., Babatsikou F., 2008. Leishmaniasis: an overlooked public health concern. *Health Science Journal*, 1108-7366.

Zelazny A., Fedorko D., LI L., Neva F., 2005. Evaluation of 7SL RNA Gene Sequences for the identification of *LEISHMANIA* SPP. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 72(4), pp. 415–420.

Χαραλαμπίδης Σ.Θ,. 2001. Κτηνιατρική Παρασιτολογία Θεσσαλονίκη, University Studio Press.

