



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

**ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ
ΣΠΟΥΔΩΝ**

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΚΑΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗ ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΗ

**Ταυτοποίηση πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την Νεξίνη
Διαλογής που κωδικοποιείται από το γονίδιο *LdBK_352470.1* του
παρασιτικού πρωτοζώου *Leishmania donovani***

Πετσανά Μαρίνα

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Επιβλέπουσες

Δρ. Χαραλαμπία Μπολέτη, Διευθύντρια Ερευνών

Αναπλ. Καθηγήτρια Γεωργία Μπράλιου,

Αθήνα, Δεκέμβριος 2022



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF SCIENCE
INFORMATICS AND COMPUTATIONAL
BIOMEDICINE

**Identification of molecular partners of the *Leishmania donovani*
Sorting Nexin encoded by the *LdBK_352470.1* gene**

Marina Petsana

MASTER THESIS

Supervisors:

Dr Haralabia Boleti, Research director

Associate professor Georgia Braliou

Athens, December 2022



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΚΑΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗ ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΗ
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ:
«ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΑ»

**Ταυτοποίηση πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την νεξίνη
διαλογής που κωδικοποιείται από το γονίδιο *LdBPK_352470.1* του
παρασιτικού πρωτοζώου *Leishmania donovani***

Μαρίνα Πετσανά

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Επιβλέπουσες

Δρ. Χαραλαμπία Μπολέτη, Διευθύντρια Ερευνών

Αναπλ. Καθηγήτρια Γεωργία Μπράλιου,

Αθήνα, Δεκέμβριος 2022

«Υπεύθυνη Δήλωση μη λογοκλοπής και ανάληψης προσωπικής ευθύνης»

Με πλήρη επίγνωση των συνεπειών του νόμου περί πνευματικών δικαιωμάτων, και γνωρίζοντας τις συνέπειες της λογοκλοπής, δηλώνω υπεύθυνα και ενυπογράφως ότι η παρούσα εργασία με τίτλο «Ταυτοποίηση πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την νεξίνη διαλογής που κωδικοποιείται από το γονίδιο *LdBPK_352470.1* του παρασιτικού πρωτοζώου *Leishmania donovani*» αποτελεί προϊόν αυστηρά προσωπικής εργασίας και όλες οι πηγές από τις οποίες χρησιμοποίησα δεδομένα, ιδέες, φράσεις, προτάσεις ή λέξεις, είτε επακριβώς (όπως υπάρχουν στο πρωτότυπο ή μεταφρασμένες) είτε με παράφραση, έχουν δηλωθεί κατάλληλα και ευδιάκριτα στο κείμενο με την κατάλληλη παραπομπή και η σχετική αναφορά περιλαμβάνεται στο τμήμα των βιβλιογραφικών αναφορών με πλήρη περιγραφή. Αναλαμβάνω πλήρως, ατομικά και προσωπικά, όλες τις νομικές και διοικητικές συνέπειες που δύναται να προκύψουν στην περίπτωση κατά την οποία αποδειχθεί, διαχρονικά, ότι η εργασία αυτή ή τμήμα της δεν μου ανήκει διότι είναι προϊόν λογοκλοπής.

Η ΔΗΛΟΥΣΑ

Ημερομηνία

Υπογραφή

**Ταυτοποίηση πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την Νεξίνη
Διαλογής που κωδικοποιείται από το γονίδιο *LdBK_352470.1* του
παρασιτικού πρωτοζώου *Leishmania donovani***

Μαρίνα Πετσανά

Τριμελής Επιτροπή:

Ονοματεπώνυμο, Χαραλαμπία Μπολέτη

Ονοματεπώνυμο, Γεωργία Μπράλιου

Ονοματεπώνυμο, Παντελεήμων Μπάγκος

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	9
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	10
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	11
1.1 Μικροβιολογία	11
1.2 Αρθρόποδος Ξενιστής του παρασίτου <i>Leishmania</i>	11
1.3 Μορφολογία του παρασίτου <i>Leishmania</i>	12
1.4 Ο κύκλος ζωής του παρασίτου <i>Leishmania</i>	13
1.5 Επιδημιολογία	13
1.6 Κλινικές μορφές της λείσμανίασης.....	18
1.7 Θεραπευτική αγωγή.....	21
1.8 Φωσφοϊνοσιτίδια	22
1.9 Δομική περιοχή PX.....	25
1.10 Πρωτεΐνες SNX-BAR	30
1.11 Η πρωτεΐνη <i>LdSNX_i</i>	31
Στόχος της μελέτης.....	32
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	33
2.1 ΜΕΘΟΔΟΙ ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ.....	33
2.1.1 Προσδιορισμός και απεικόνιση των δομικών στοιχείων της <i>LdSNX_i</i>	33
2.1.2 Κατά ζεύγη στοίχιση πρωτεϊνών της υπο-οικογένειας SNX PX-BAR	33
2.1.3 Εξελικτικές σχέσεις της <i>LdSNX_i</i> με τις ανθρώπινες νεξίνες διαλογής της υπο-οικογένειας SNX PX-BAR	33
2.1.4 Δίκτυα Πρωτεϊνικών Αλληλεπιδράσεων	34
2.2 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	34
2.2.1 Πέψη πλασμιδιακού DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες	34
2.2.2 Μετασχηματισμός χημειοδεκτικών βακτηριακών κυττάρων <i>E. coli</i> (στελέχος BL21)..	35
2.2.3 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αραρόζης.....	37
2.2.4 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργεια μικρής έκτασης (miniprep plasmid DNA).....	39
2.2.5 Κρυοσυντήρηση βακτηρίων σε διάλυμα γλυκερόλης (Cryopreservation)	40
2.2.6 Έκφραση της πρωτεΐνης <i>LdSNX_i</i> από βακτηριακό στέλεχος <i>E. coli</i> BL21 που φέρει το πλασμίδιο pGEX-4T1- <i>ldsnx_i</i>	40
2.2.7 Λύση μετασχηματισμένων βακτηριακών κυττάρων <i>E. coli</i> BL21	41

2.2.8 Απομόνωση και καθαρισμός της GST- <i>LdSNX</i> _i από βακτήρια.....	42
2.2.9 Λύση ευκαρυωτικών κυττάρων (~10 ⁸ κύτταρα)	43
2.2.10 Pull-Down Assay	44
2.2.11 Ανοσοαποτύπωση Western (Western Blot).....	45
2.2.11.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου με SDS (SDS-PAGE)....	45
2.2.11.2 Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.....	49
2.2.11.3 Ανοσοενζυμική ανίχνευση πρωτεϊνών.....	50
2.2.11.4 Αποδέσμευση αντισωμάτων και επαναχρησιμοποίηση της μεμβράνης	52
2.2.12 Silver Stain πηκτής πολυακρυλαμιδίου	53
2.2.13 Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford.....	54
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	56
3.1 Βιοπληροφορική Ανάλυση.....	56
3.1.1 Πρόβλεψη των δομικών στοιχείων της <i>LdSNX</i> _i τα οποία την κατατάσσουν στην SNX-BAR υπο-οικογένεια των νεξινών διαλογής (Sorting Nexins).....	56
3.1.2 Η πρωτεΐνη <i>LdSNX</i> _i είναι υψηλά συντηρημένη στο γένος <i>Leishmania</i>	57
3.1.3 Σύγκριση της πρωτεΐνης <i>LdSNX</i> _i με τις ανθρώπινες νεξίνες διαλογής της υπο-οικογένειας PX-BAR.....	58
3.1.3.1 Κατά ζεύγη στοιχίσεις της <i>LdSNX</i> _i με τις ανθρώπινες νεξίνες διαλογής της υπο-οικογένειας PX-BAR.....	58
3.1.3.2 Δομική στοίχιση (υπέρθηση) της πρωτεΐνης <i>LdSNX</i> _i και της λυμένης με κρυσταλλογραφία δομικής περιοχής PX της ανθρώπινης SNX7.....	60
3.1.3.3 Η πρωτεΐνη <i>LdSNX</i> _i εξελικτικά βρίσκεται πιο κοντά στην ανθρώπινη SNX2.....	61
3.1.3.4 Αλληλεπιδράσεις της <i>LdSNX</i> _i με άλλες πρωτεΐνες.....	62
3.2 Εργαστηριακή Πειραματική προσέγγιση.....	68
3.2.1 Διερεύνηση και προσδιορισμός πρωτοκόλλου επαγωγής της έκφρασης σε βακτήρια της ανασυνδιασμένης πρωτεΐνης GST- <i>LdSNX</i> _i	68
3.2.2 Διερεύνηση πρωτοκόλλου λύσης μετασχηματισμένων βακτηριακών κυττάρων <i>E. coli</i> <i>BL21</i> και διαλυτοποίησης της πρωτεΐνης GST- <i>LdSNX</i> _i	73
3.2.3.1 Επιλογή μεθοδολογίας για την πρόσδεση της πρωτεΐνης <i>LdSNX</i> _i με μεθόδους χρωματογραφίας υψηλής χημικής συγγένειας (high affinity chromatography).....	76
3.2.3.2 Διερεύνηση πρωτοκόλλου πρόσδεσης της πρωτεΐνης GST- <i>LdSNX</i> _i σε σφαιρίδια αγαρόζης με γλουταθιόνη (Glutathione agarose beads).....	76
3.2.3.3 Απομόνωση και καθαρισμός της πρωτεΐνης GST- <i>LdSNX</i> _i	78
3.2.4 Λύση ευκαρυωτικών κυττάρων	79
3.2.5 Pull-Down Assays σε εκχυλίσματα κυττάρων <i>leishmania donovani</i> και ανθρώπινα μακροφάγα THP1 για ανίχνευση πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη GST- <i>LdSNX</i> _i	81

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	83
5. ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....	86

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

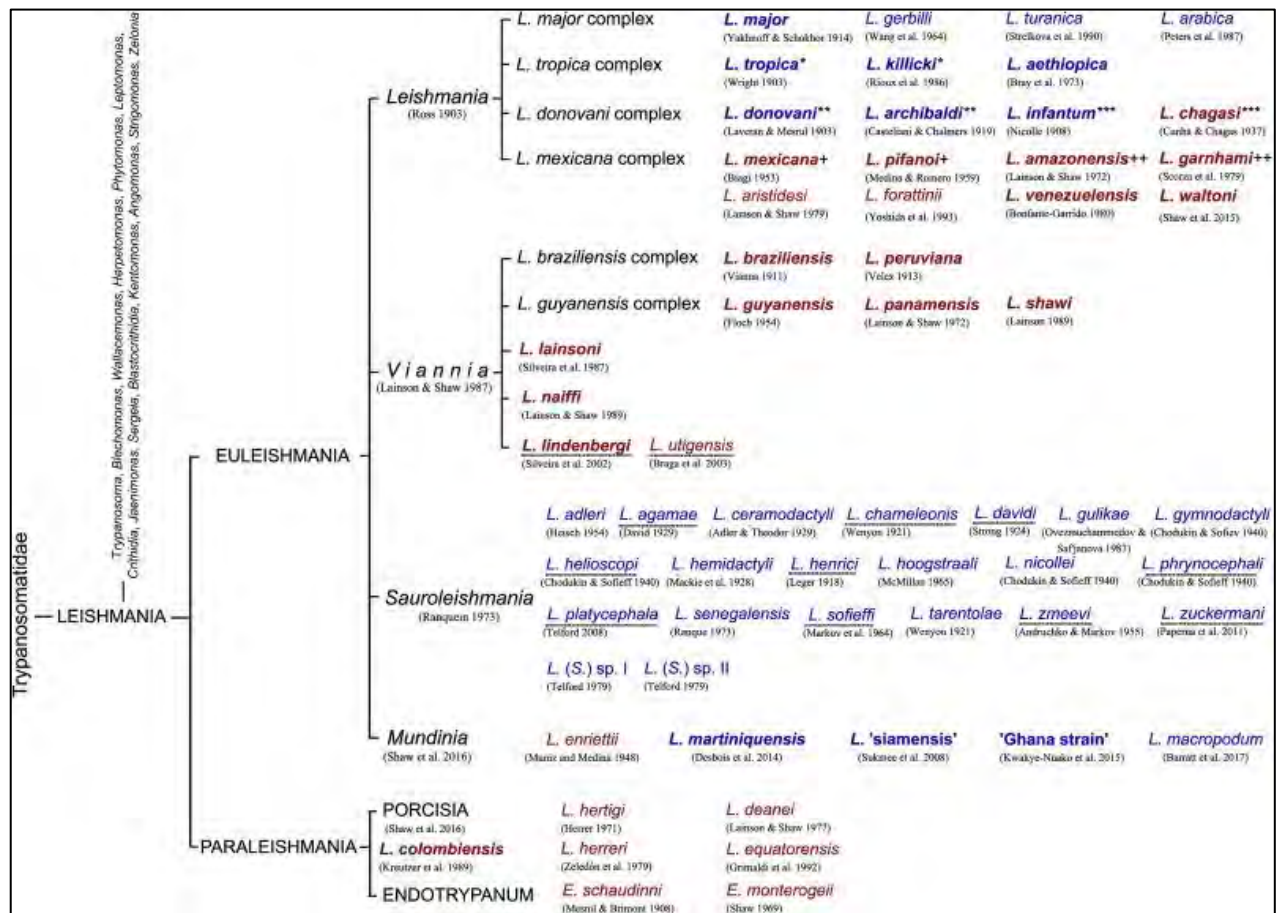
Η παρούσα εργασία, αποτελεί συνέχεια της πρωτότυπης ερευνητικής προσέγγισης που ξεκίνησε το 2020 και αποτέλεσε την προπτυχιακή πτυχιακή εργασία μου με τίτλο «Βιοπληροφορική ανάλυση της πρωτεΐνης που εκφράζεται από το γονίδιο *LdBPK_352470.1* του πρωτόζωου *Leishmania donovani*» και εμπεριέχει πειραματική επαλήθευση ορισμένων αποτελεσμάτων της βιοπληροφορικής ανάλυσης που πραγματοποιήθηκε. Για την εκπόνηση της παρούσας διατριβής, αξιοποιήθηκαν τα ευρήματα που προέκυψαν από τη χρήση υπολογιστικών αλγορίθμων και συνδιάστηκαν με αποτελέσματα βιοχημικών πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο ώστε να ενισχυθούν οι προβλέψεις σχετικά με τις λειτουργικές ιδιότητες της υπό μελέτη πρωτεΐνης – ένα καίριο βήμα προς την κατεύθυνση του πλήρους προσδιορισμού της λειτουργίας της. Σύμφωνα με τα δεδομένα που προέκυψαν από τα μοντέλα βιοπληροφορικής, η πρωτεΐνη αυτή κατατάσσεται στην οικογένεια των Νεξινών Διαλογής (Sorting Nexin) και αποτελεί την πρώτη χαρακτηρισμένη Νεξίνη στο γένος του παρασιτικού πρωτόζωου *Leishmania*. Γι' αυτόν τον λόγο η πρωτεΐνη ονομάστηκε στο εργαστήριο *LdSNXi* (*Leishmania donovani* Sorting NeXin -i-). Τα βιοχημικά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν (Pull down assays με ανασυνδιασμένη πρωτεΐνη GST- *LdSNXi* που απομονώθηκε από βακτήρια) συνδυαστικά με τις προβλέψεις των μοριακών συνοδών που εντοπίστηκαν με τη χρήση βιοπληροφορικής ανέδειξαν κάποιες υποψήφιες αλληλοεπιδρώσες πρωτεΐνες της *LdSNXi*. Τελικό βήμα της διαδικασίας της εργαστηρικής μελέτης, θα αποτελέσει η μελλοντική ανάλυση του υλικού που προκύπτει από τα pull down assays με φασματογραφία μάζα για να γίνει ταυτοποίηση και προσδιορισμός των πρωτεϊνών που δεσμεύτηκαν από την GST-*LdSNXi* σε κυτταρικά εκχυλίσματα από κύτταρα *Leishmania* και ανθρώπινα μακροφάγα THP1. Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν το στήσιμο και η επαλήθευση πρωτοκόλλων για 1) έκφραση της πρωτεΐνης GST-*LdSNXi* σε βακτήρια στο διαλυτό κλάσμα, 2) απομόνωσή της σε επαρκή ποσότητα και 3) χρήση της απομονωμένης GST-*LdSNXi* δεσμευμένης σε σφαιρίδια γλουταθιόνης σε Pull down assays.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα Διπλωματική Διατριβή εκπονήθηκε στα πλαίσια των μεταπτυχιακών μου σπουδών στο τμήμα Πληροφορικής με Εφαρμογές στη Βιοϊατρική (ΔΠΣΜ Πληροφορική και Υπολογιστική Βιοϊατρική, Κατεύθυνση Υπολογιστική Ιατρική και Βιολογία), του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά την διάρκεια του ακαδημαϊκού έτους 2021-2022 σε συνεργασία με το Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ. Θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τις επιβλέπουσες μου, κ. Χαραλαμπία Μπολέτη και κ. Γεωργία Μπράλιου για την πολύτιμη καθοδήγησή τους κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής μου. Με τις ανεκτίμητες συμβουλές τους, άνοιξε ένας καινούριος δρόμος για εμένα, αυτός της βιοχημείας. Αισθάνομαι πως, συμπληρώθηκε ένα κομμάτι που έλειπε από τις μέχρι τώρα γνώσεις μου, το οποίο συνετέλεσε στην επιστημονική μου εξέλιξη. Συνεπώς, θα ήθελα να τις ευχαριστήσω διπλά για αυτό. Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης, τον κ. Παντελή Μπάγκο, διευθυντή του εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας, Γενετικής και Βιοπληροφορικής του τμήματος μας, που ήταν δίπλα μας, πρόθυμος να μοιραστεί τις γνώσεις και τις συμβουλές του και την κ. Ολύβια Τζιουβάρα, υποψήφια διδάκτορα στο Εργαστήριο Ενδοκυτταρικού Παρασιτισμού του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ. Η Ολύβια, βρισκόταν στο πλευρό μου καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης, προσπαθώντας να μου μεταλαμπαδεύει τις γνώσεις της και να με βοηθήσει στην εργαστηριακή εκπαίδευση μου. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη του Εργαστηρίου «Ενδοκυττάριος Παρασιτισμός», για όλες τις συμβουλές που μου παρείχαν καθώς και τους καθηγητές του τμήματος Πληροφορικής με Εφαρμογές στη Βιοϊατρική, για τα ερεθίσματα και τις γνώσεις που προσέφεραν σε μένα και τους συν-σπουδαστές μου, όλο το διάστημα της φοίτησης μας στο τμήμα.

1.1 Μικροβιολογία

Το γένος Λείσμανια (*Leishmania*), ανήκει στην οικογένεια των Τρυπανοσωματιδών (Trypanosomatidae) και στην τάξη των Κινετοπλαστίδων (Kinetoplastea). Τα είδη *Leishmania* είναι ενδημικά σε χώρες που χαρακτηρίζονται από τροπικό ή υποτροπικό κλίμα.¹ Μέχρι σήμερα έχουν καταγραφεί 54 διαφορετικά είδη *Leishmania*, 21 από τα οποία είναι παθογόνα για τον άνθρωπο.²



Εικόνα 1.1 Η ταξινόμηση των ειδών *Leishmania*.²

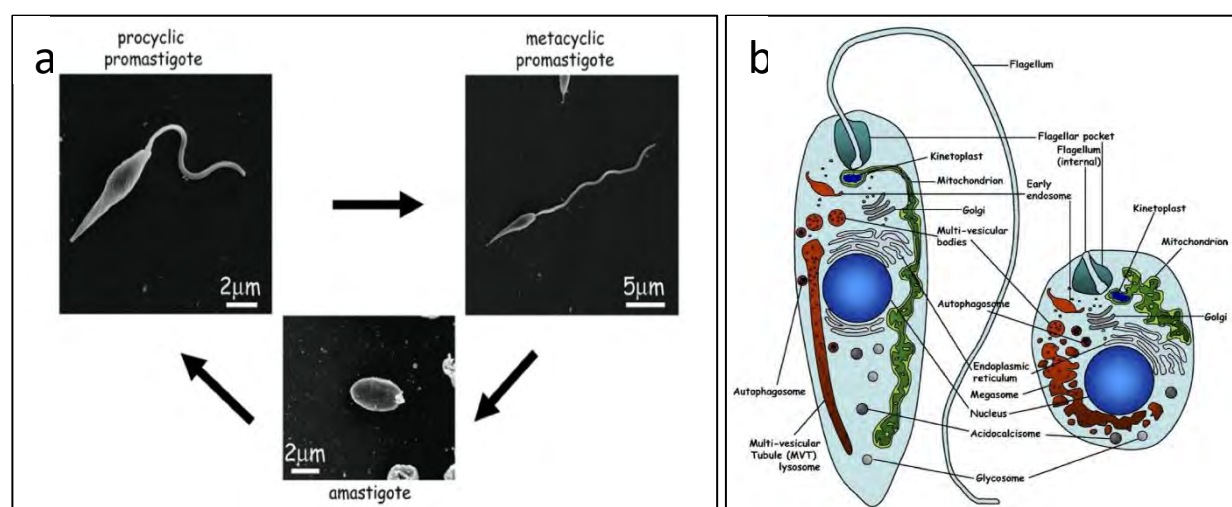
1.2 Αρθρόποδος Ξενιστής του παρασίτου *Leishmania*

Η θηλυκή σκνίπα, που ανήκει στο γένος *Phlebotomus* (στην περίπτωση του Παλαιού Κόσμου) και στο γένος *Lutzomyia* (στον Νέο Κόσμο), είναι ο μοναδικός φορέας που ευθύνεται για τη μετάδοση της μολυσματικής νόσου της λείσμανιάσης. Ενενήντα τρία από τα περίπου 800 γνωστά είδη σκνίπας μεταδίδουν τη λείσμανιάση. Στην περιοχή της Μεσογείου, οι σκνίπες δραστηριοποιούνται κυρίως τους ζεστούς καλοκαιρινούς μήνες. Τα περισσότερα είδη σκνίπας

δρουν στους εξωτερικούς χώρους, όπου τσιμπούν τους ξενιστές για να τραφούν με αίμα από το σούρουπο μέχρι την αυγή. Υπάρχουν όμως και ορισμένα είδη που δραστηριοποιούνται σε εσωτερικούς χώρους και υπό το φως της ημέρας. Οι σκνίπες που έχουν μολυνθεί με το παράσιτο *Leishmania* το μεταδίδουν στον ξενιστή κατά την διάρκεια του γεύματος αίματος μέσω της προβοσκίδας τους.¹

1.3 Μορφολογία του παρασίτου *Leishmania*

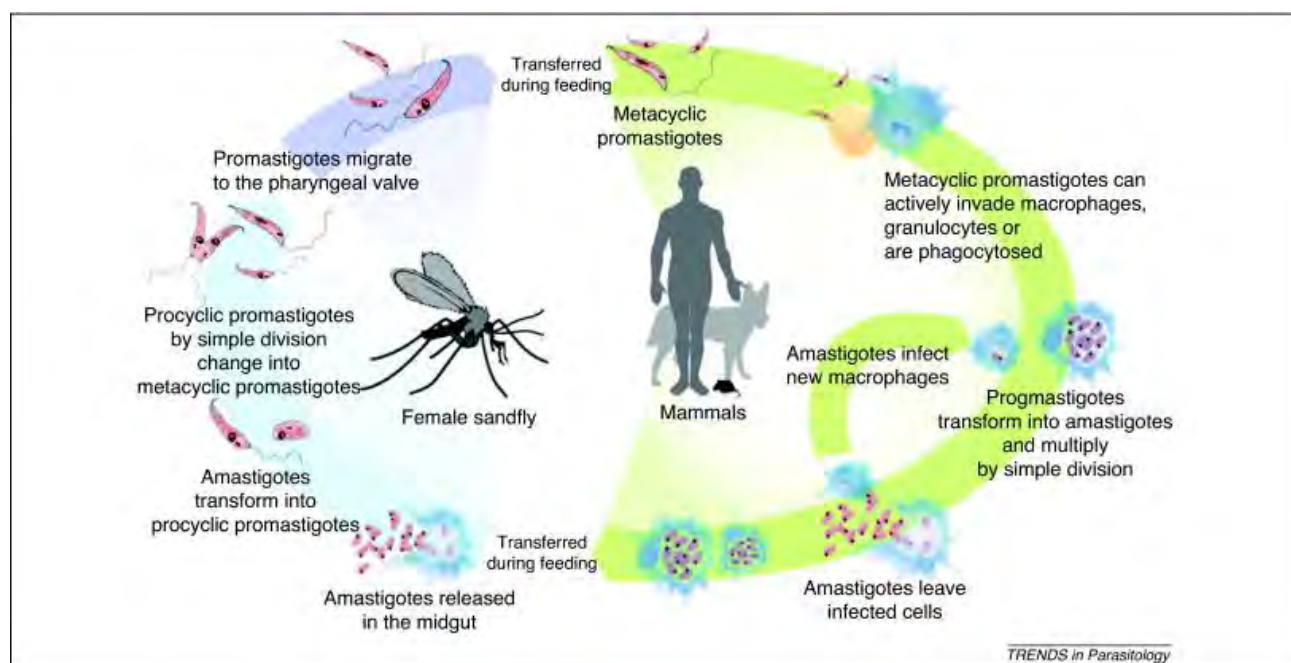
Το παράσιτο *Leishmania* συναντάται σε δύο μορφές, την προμαστιγωτή και την αμαστιγωτή. Η προμαστιγωτή μορφή απαντάται εντός του εντέρου του αρθρόποδου ξενιστή αλλά μπορεί να αναπτυχθεί και σε εργαστηριακές καλλιέργειες. Τα πλήρως ανεπτυγμένα προμαστιγωτά παράσιτα έχουν σχήμα ατράκτου και φέρουν μαστίγιο. Το κυτταρικό σώμα του παρασίτου έχει μήκος από 6,5 and 12 μm^3 ανάλογα με τη φάση του κυτταρικού κύκλου (προκυκλικό, νεκτομονάδα, λεπτομονάδα, μετακυκλικό) και πλάτος από 1,5 μm έως 3,5 μm . Ο πυρήνας βρίσκεται στο κέντρο ενώ ο κινητόπλαστης (δηλ. το μιτοχονδριακό DNA), χαρακτηριστικό όλων των παρασίτων της τάξης των Κινετοπλαστιδών, εντοπίζεται κοντά στο πρόσθιο άκρο του κυτταρικού σώματος. Το μαστίγιο έχει μέγεθος 5–15 μm^3 . Αμαστιγωτή είναι η μορφή που συναντάται εντός των θηλαστικών ξενιστών. Βρίσκονται κατά κύριο λόγο σε μακροφάγα, ουδετερόφιλα ή δενδριτικά κύτταρα. Είναι μικρά, το σχήμα τους είναι στρογγυλό/οβάλ ενώ η διάμετρός τους κυμαίνεται στα 2–3 μm . (Εικόνα 1.2). Έχουν ένα πολύ μικρό μαστίγιο που συχνά δεν διακρίνεται.



Εικόνα 1.2 Οι μορφές του παρασίτου κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής του, προμαστιγωτή και αμαστιγωτή. **(Α)** Στιγμιότυπα εικόνων μικροσκοπίου. **(Β)** Σχηματική αναπαράσταση.⁴

1.4 Ο κύκλος ζωής του παρασίτου *Leishmania*

Ο κύκλος ζωής του παρασίτου *Leishmania* περιλαμβάνει δύο στάδια. Αρχικά, εκτυλίσσεται εντός ενός αρθρόποδου ξενιστή και στη συνέχεια ολοκληρώνεται εντός ενός σπονδυλωτού. Εισέρχεται στον αρθρόποδο ξενιστή μέσω γεύματος αίματος από θηλαστικό που έχει μολυνθεί από *Leishmania*. Τα πρωτόζωα εντός του μολυσμένου θηλαστικού βρίσκονται στην αμαστιγωτή τους μορφή κυρίως στα μακροφάγα κύτταρα. Στο έντερο του αρθρόποδου ξενιστή, μετατρέπονται στην προμαστιγωτή τους μορφή και αγκιστρώνονται στο εντερικό επιθήλιο (Εικόνα 1.2). Έχει αποδειχθεί ότι τα αναπτυξιακά στάδια του παρασίτου εντός της σκνίπας διαρκούν οχτώ με είκοσι ημέρες από την έναρξη της μόλυνσης. Μετά τη διαδικασία πολλαπλασιασμού τους στο έντερο, τα προμαστιγωτά παράσιτα *Leishmania* διαφοροποιούνται στην μετακυκλική μορφή και προχωρούν στον φάρυγγα της σκνίπας. Εκεί, μπλοκάρουν το σύστημα αναρρόφησης της σκνίπας δημιουργώντας την ανάγκη ενός νέου γεύματος αίματος. Κατά τη διάρκεια ενός νέου γεύματος αίματος τα παράσιτα μεταδίδονται σε κάποιο θηλαστικό ξενιστή. (Εικόνα 1.3)^{5,6}



Εικόνα 1.3 Ο κύκλος ζωής του παρασίτου *Leishmania*⁷

1.5 Επιδημιολογία

Τα παράσιτα *Leishmania*, που αποτελούν ένα γένος μονοκύτταρων μαστιγωτών πρωτόζωων της οικογένειας των Τρυπανοσωματιδών της τάξης *Kinetoplastea* και παρασιτίζουν τόσο αρθρόποδους ξενιστές (σκνίπες του γένους *Phlebotomus* ή *Lutzomyia*) όσο και σπονδυλωτούς ξενιστές (ένα ευρύ φάσμα θηλαστικών συμπεριλαμβανομένων των ανθρώπων). Όταν τα

παράσιτα *Leishmania* εισέλθουν εντός ενός θηλαστικού ξενιστή (μέσω γεύματος αίματος μολυσμένης σκνίπας), προκαλούν λείσμανίαση, μια ασθένεια με ευρύ φάσμα συμπτωμάτων, η οποία σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ) είναι μία από τις επτά πιο σημαντικές τροπικές ασθένειες και αποτελεί σοβαρή απειλή για την παγκόσμια υγεία. Περισσότερα από 20 είδη *Leishmania* (spp.), είναι παθογόνα για ανθρώπους και ορισμένα κατοικίδια ζώα. Εκτιμάται ότι κάθε χρόνο τα νέα κρούσματα λείσμανίασης κυμαίνονται από 700.000 έως 1 εκατομμύριο ενώ καταγράφονται περίπου 26.000 - 65.000 θάνατοι σε παγκόσμια κλίμακα.⁸ Σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό ΠΟΥ (WHO European Region), η σπλαχνική λείσμανίαση (VL, η πιο σοβαρή μορφή της νόσου που μπορεί να καταστεί θανατηφόρα εάν δεν ληφθεί η απαραίτητη θεραπεία) είναι ενδημική στην Αλβανία, τη Γεωργία, την Ιταλία, την Ισπανία και την Ελλάδα.⁸ Αξίζει να αναφερθεί το γεγονός ότι η λείσμανίαση αποτελεί τη μόνη παραμελημένη ενδημική τροπική ασθένεια στην Ευρώπη, με την επιδημιολογία της να αλλάζει ραγδαία, τόσο ως αποτέλεσμα των ανθρωπογενών περιβαλλοντικών αλλαγών όσο και λόγω των έντονων φαινομένων μετακίνησης πληθυσμών (μετανάστες / πρόσφυγες). Η αναζωπύρωση και η εξάπλωση της VL έχει πλέον καταστεί ορατή απειλή για τη δημόσια υγεία στις δυτικές κοινωνίες, και ιδιαίτερα στις μεσογειακές χώρες.^{9,10} Η ασθένεια της λείσμανίασης, θα πρέπει να αποτελεί προτεραιότητα για τη δημόσια υγεία στην Ελλάδα, καθώς τα τελευταία 40 χρόνια, η VL επανεμφανίστηκε και εξαπλώθηκε στις περισσότερες περιοχές της χώρας με σοβαρά συμπτώματα που επηρεάζουν κυρίως παιδιά.^{11,12} Επιπλέον, η Ελλάδα είναι μια από τις ευρωπαϊκές χώρες στις οποίες εμφανίζεται τα τελευταία χρόνια μεγάλη εισροή προσφύγων από περιοχές στις οποίες ενδημούν τα είδη *Leishmania* που προκαλούν την ανθρωπονοωτική μορφή της λείσμανίασης.⁸ Μια πρόσφατη μελέτη ανέδειξε πως εμφανίζονται υψηλά ποσοστά μόλυνσης από *Leishmania donovani* (που προκαλεί την ανθρωπονοωτική σπλαχνική μορφή της ασθένειας και είναι πιο επιθετικό από το είδος *L. infantum* που συναντάται στην Ευρώπη) σε σκνίπες που συλλέχθηκαν από προσφυγικούς καταυλισμούς στην Ελλάδα.¹³ Αυτό υποδηλώνει πως υπάρχει αυξημένος κίνδυνος μετάδοσης της σπλαχνικής λείσμανίασης στους προσφυγικούς πληθυσμούς, καθώς και στις γύρω κοινότητες. Είναι λοιπόν εξαιρετικά σημαντική η εύρεση των πρώτων αυτόχθονων κρουσμάτων *Leishmania donovani* στη Νοτιοανατολική Ευρώπη.¹⁰

Δεδομένου ότι δεν υπάρχει αποτελεσματικό εμβόλιο για την ανθρώπινη λείσμανίαση και η θεραπευτική προσέγγιση που περιλαμβάνει χημειοθεραπείες παρουσιάζει προβλήματα τόσο λόγω της τοξικότητας που προκαλεί όσο και λόγω της αντίστασης που αναπτύσσουν τα παράσιτα.¹⁴ Η λείσμανίαση ως πολύπλοκη πολυπαραγοντική νόσος αποτελεί έναν αυξανόμενο κίνδυνο για τους πιο ευάλωτους πληθυσμούς (δηλαδή παιδιά, έγκυες γυναίκες, ηλικιωμένους και

ανοσοκατασταλαμένους) στις ενδημικές περιοχές.^{9,15} Σε ανοσοκατεσταλαμένους ασθενείς, τα παράσιτα *Leishmania* μπορούν να παραμείνουν σε λανθάνουσα κατάσταση για δεκαετίες μετά τη θεραπεία με πιθανότητα μελλοντικής επανενεργοποίησης της λοίμωξης. Επομένως, υπάρχει επείγουσα ανάγκη για την ανάπτυξη νέων ειδικών και ασφαλών αντιπαρασιτικών εμβολίων και θεραπειών. Στο πλαίσιο αυτό, ο εντοπισμός των μορίων που δρουν ως μολυσματικοί παράγοντες κατά τη διάρκεια του πολύπλοκου κύκλου ζωής αυτών των παρασίτων θα συντελέσει στο σχεδιασμό νέων αντιπαρασιτικών προσεγγίσεων.

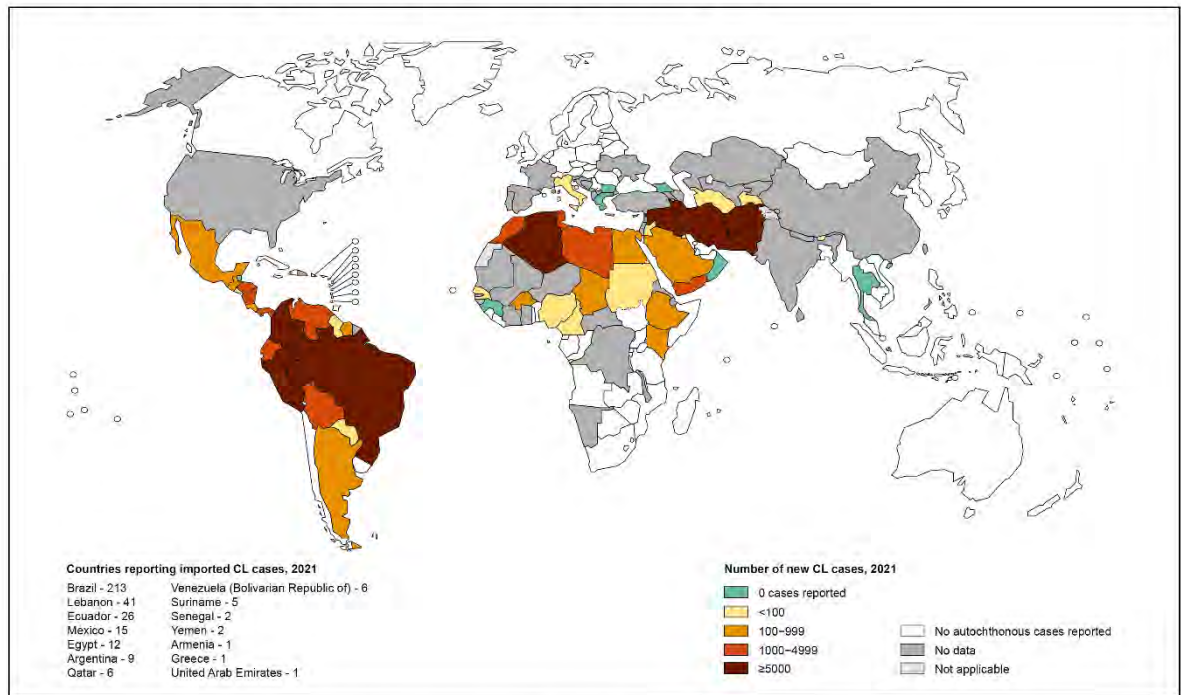
1.5.1 Παγκόσμια Γεωγραφική Κατανομή

Η ασθένεια επηρεάζει κυρίως πληθυσμούς στην Αφρική, την Ασία και τη Λατινική Αμερική. Σχετίζεται με τον υποσιτισμό, την κακή στέγαση, το αδύναμο ανοσοποιητικό σύστημα των ξενιστών και την έλλειψη πόρων που χαρακτηρίζουν τους κατοίκους τους. Ανάμεσα στις 200 χώρες που αναφέρονται στον ΠΟΥ, οι 99 έχουν καταγραφεί ως ενδημικές για τη λείσμανίαση το 2021. Από αυτές, οι 71 είναι ενδημικές τόσο για τη VL όσο και για τη CL, οι 9 είναι ενδημικές μόνο για VL ενώ οι υπόλοιπες 19 χώρες είναι ενδημικές μόνο για τη CL. Από τον Νοέμβριο του 2022, 51 ενδημικές χώρες της VL (64%) και 53 ενδημικές χώρες της CL (59%) ανέφεραν στον ΠΟΥ δεδομένα σχετικά με κρούσματα λείσμανίασης που καταγράφηκαν το 2021. Περίπου το 89% των παγκόσμιων κρουσμάτων VL αφορούσαν τις χώρες: Βραζιλία, Ερυθραία, Αιθιοπία, Ινδία, Κένυα, Σομαλία, Νότιο Σουδάν και Σουδάν. Το 2021, οι χώρες: Αφγανιστάν, Αλγερία, Βραζιλία, Κολομβία, Ιράν (Ισλαμική Δημοκρατία), Ιράκ, Πακιστάν, Περού και Αραβική Δημοκρατία της Συρίας ανέφεραν περισσότερα από 5000 κρούσματα CL, τα οποία αντιπροσωπεύουν το 88% της παγκόσμιας αναφερόμενης συχνότητας εμφάνισης CL. Το 2021, καταγράφηκαν 340 εισαγόμενα κρούσματα δερματικής λείσμανίασης και 54 εισαγόμενα κρούσματα σπλαχνικής λείσμανίασης παγκοσμίως.⁸ Από την έναρξη της πανδημίας του HIV τη δεκαετία του 1990, έχει σημειωθεί αύξηση των αναφερόμενων περιπτώσεων συνλοίμωξης *Leishmania*-HIV σε ενδημικές περιοχές, καθώς ο HIV αυξάνει την ευαισθησία στην VL.

Η δερματική λείσμανίαση (CL) υπολογίζεται ότι εμφανίζεται σε 0,7–1,2 εκατομμύρια ανθρώπους κυρίως στην παράκτια Μεσόγειο, την Αμερική και τη δυτική Ασία, με κάθε περιοχή να συνεισφέρει κατά 30% περίπου στα καταγραφόμενα κρούσματα (αν και περίπου το 75% αυτών των περιπτώσεων εντοπίζονται στη Βραζιλία, τη Συρία και το Αφγανιστάν).

Τέλος, περίπου 35.000 περιπτώσεις λείσμανίασης του βλεννογόνου (βλενογονοδερματική) παρουσιάζονται ετησίως κυρίως στη Βραζιλία, το Περού και τη Βολιβία. Η νοσηρότητα από όλες τις μορφές λείσμανίασης σε όλες τις ηλικίες έχει πρόσφατα υπολογιστεί ότι φθάνει τα 3.754.202.¹

Status of endemicity of cutaneous leishmaniasis worldwide, 2021



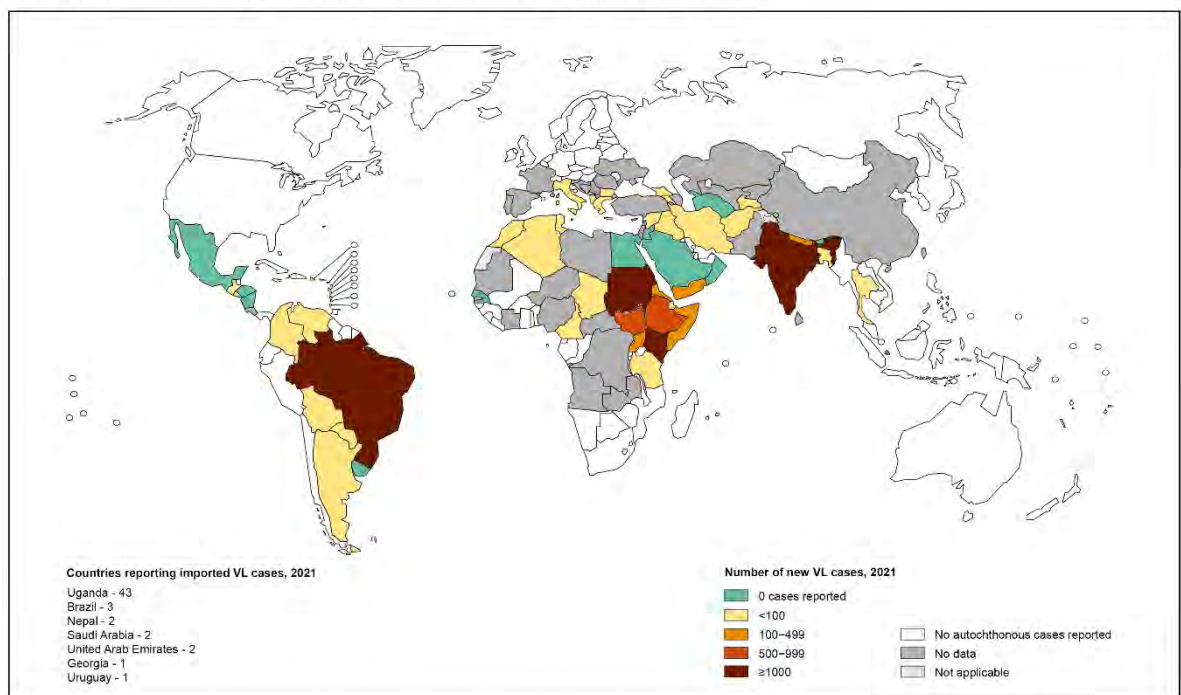
The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2022. All rights reserved.

Data Source: World Health Organization
Map Production: Control of Neglected Tropical Diseases (NTD)
World Health Organization



Εικόνα 1.4 Γεωγραφική κατανομή της δερματικής λείσμανιάσης στον παγκόσμιο χάρτη.⁸

Status of endemicity of visceral leishmaniasis worldwide, 2021



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2022. All rights reserved.

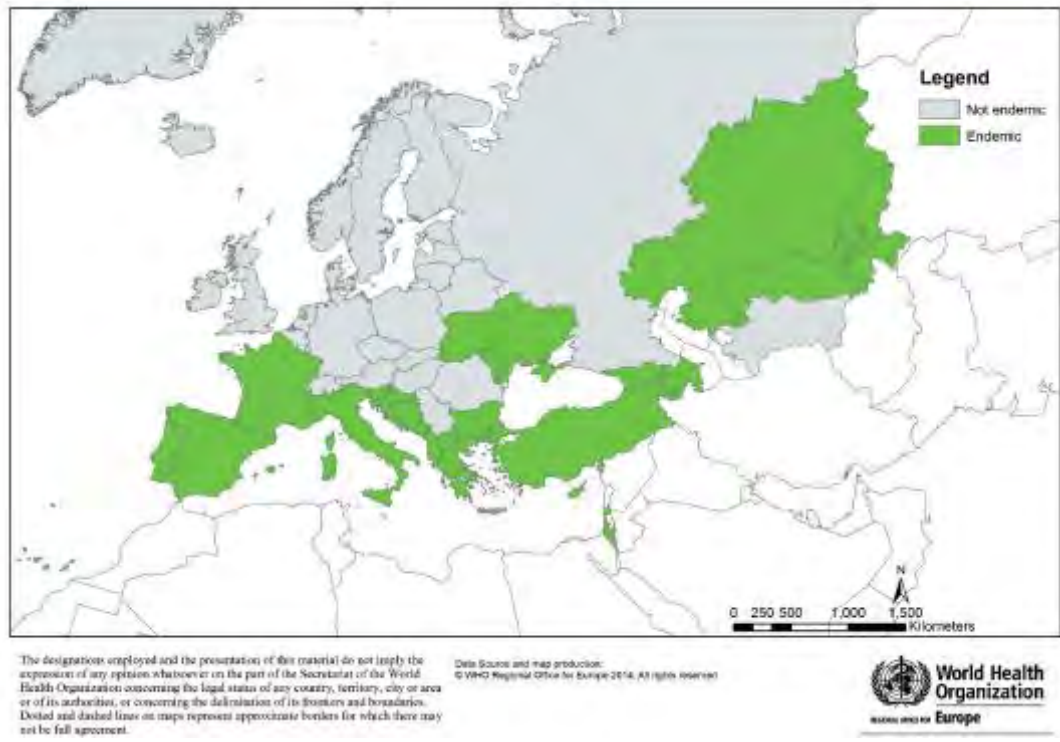
Data Source: World Health Organization
Map Production: Control of Neglected Tropical Diseases (NTD)
World Health Organization



Εικόνα 1.5 Γεωγραφική κατανομή της σπλαχνικής λείσμανιάσης στον παγκόσμιο χάρτη.⁸

1.5.2 Γεωγραφική Κατανομή στην περιοχή της Ευρώπης

Στην περιοχή της Ευρώπης εκτιμάται πως τα κρούσματα λεισμανίασης αφορούν ποσοστό μικρότερο από το 2% των παγκόσμιων κρουσμάτων. Αναφορικά με τη δερματική λεισμανίαση, το 80% των περιπτώσεων που είναι καταγεγραμμένα στον Π.Ο.Υ. της Ευρώπης, αφορούν περιστατικά στην Τουρκία και σε γειτονικές της χώρες που ανήκουν στην Κεντρική Ασία. Κρούσματα έχουν καταγραφεί επίσης στα Βαλκάνια, σε περιοχές του νοτίου Καυκάσου και της κεντρικής Ασίας. Στην Ευρώπη, η ασθένεια προκαλείται κυρίως από τα είδη *Leishmania major*, *Leishmania tropica* και *Leishmania infantum* ενώ οι κύριοι φορείς για τη δερματική λεισμανίαση είναι οι σκνίπες *Phlebotomus sergenti* και *Phlebotomus papatasi*. Η σπλαχνική λεισμανίαση στην Ευρώπη προκαλείται κυρίως από το παράσιτο *Leishmania infantum*. Έχουν αναφερθεί κρούσματα σπλαχνικής λεισμανίασης σε περιοχές της νοτιοδυτικής Ευρώπης, στην περιοχή των Βαλκανίων, στην κεντρική Ασία και τις νότιες περιοχές του Καυκάσου, όπως και στη Τουρκία. Η συντριπτική πλειοψηφία των κρουσμάτων (σχεδόν το 75%) εντοπίστηκε στην Αλβανία, τη Γεωργία, την Ιταλία και την Ισπανία. Από τα μέσα της δεκαετίας 1990 μέχρι και το 2007, ο αριθμός περιπτώσεων σπλαχνικής λεισμανίασης στη Γεωργία, ιδιαίτερα σε παιδιά κάτω των 5 ετών, αυξήθηκε περισσότερο από εννεα φορές. Τα τελευταία χρόνια όμως έχει αυξηθεί και ο αριθμός των ενηλίκων ασθενών με σπλαχνική λεισμανίαση. Αυτό καθιστά την ανθρώπινη λεισμανίαση ένα επανεμφανιζόμενο πρόβλημα σε ορισμένες περιοχές της νότιας Ευρώπης με σταθερή αύξηση του επιπολασμού της σπλαχνικής λεισμανίασης, που αποτελεί και τη σοβαρότερη μορφή της ασθένειας.⁸



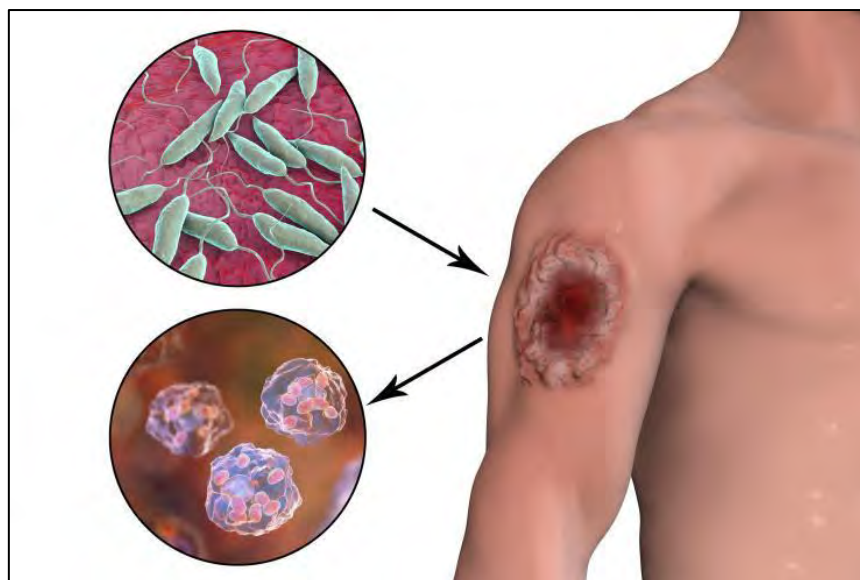
Εικόνα 1.6 Η γεωγραφική κατανομή των πρωτοζώων *Leishmania* στην Ευρώπη.⁸

1.6 Κλινικές μορφές της λεισμανίασης

Η λεισμανίαση εκδηλώνεται με τρεις διαφορετικές μορφές συμπτωμάτων. Τα συμπτώματα της νόσου που εκδηλώνονται εξαρτώνται από το είδος του παρασίτου *leishmania* που μολύνει τον ξενιστή καθώς και το γενετικό υπόβαθρο του ξενιστή.

1.6.1 Δερματική λεισμανίαση (CL)

Η δερματική λεισμανίαση (CL) είναι η πιο ήπια μορφή της ασθένειας και προκαλείται από πολλά είδη του παρασίτου [*Leishmania major* και *Leishmania tropica* στον Παλαιό Κόσμο (Ευρώπη, Ασία) και *Leishmania mexicana*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania guyanensis*, *Leishmania panamensis* και *Leishmania braziliensis* σε διάφορες περιοχές της Νότιας Αμερικής]. Η κλινική εικόνα της δερματικής νόσου χαρακτηρίζεται από μεμονωμένες ελκώδεις ή οζώδεις βλάβες στο σημείο του τσιμπήματος του θηλαστικού ξενιστή από την σκνίπα ή κοντά σε αυτό. Συνήθως εντοπίζονται σε ακάλυπτες περιοχές του σώματος όπως το πρόσωπο, οι πτυχές και το κάτω μέρος των ποδιών και η εξέλιξή τους διαρκεί εβδομάδες έως μήνες. Οι απλές δερματικές βλάβες τις περισσότερες φορές αυτο-θεραπεύονται. Η επούλωση των δερματικών βλαβών μπορεί συχνά να επιταχυνθεί με τη θεραπεία (Εικόνα 1.7).¹⁶



Εικόνα 1.7 Απεικόνιση πληγής που προκλήθηκε από δερματική λείσμανίαση. Στις στρογγυλές εικόνες αριστερά απεικονίζονται τα προμαστιγωτά παράσιτα (επάνω αριστερά) και τα μολυσμένα μακροφάγα (κάτω αριστερά).¹⁷

1.6.2 Βλεννογονοδερματική λείσμανίαση (Mucocutaneous Leishmaniasis; MCL)

Η βλεννογονοδερματική λείσμανίαση (MCL) προκαλείται από το παράσιτο *L. braziliensis*, και οφείλεται σε επέκταση ή μετάσταση της δερματικής μόλυνσης στον βλεννογονοδερμικό ιστό. Η MCL μπορεί να εμφανιστεί μήνες έως και χρόνια μετά την υποχώρηση των πρωτογενών βλαβών. Αυτή είναι συχνά μια φρικτά παραμορφωτική λοίμωξη που προκύπτει από τη χρόνια τοπική καταστροφή του ιστού της μύτης, του στόματος και του ρινοφάρυγγα καθώς και των βλεφάρων και μπορεί να εξελιχθεί και να επηρεάσει την αναπνευστική λειτουργία και να εμποδίσει τη διατροφή. Η υποκείμενη παθογένεση που οδηγεί σε MCL δεν είναι καλά κατανοητή και είναι πιθανώς αποτέλεσμα μιας πολύπλοκης αλληλεπίδρασης παραγόντων ξενιστή και παρασίτου. Η νόσος είναι συχνά ανθεκτική στη χημειοθεραπεία και οι ασθενείς συνήθως καταλήγουν σε θάνατο από δευτερογενείς λοιμώξεις και υποσιτισμό. Η MCL απαντάται σε χώρες της Νότιας Αμερικής, κυρίως στις Βραζιλία, Περού και Βολιβία, αλλά βρίσκεται επίσης σε μικρότερο βαθμό στις Κολομβία, Ισημερινό, Παραγουάη και Βενεζουέλα. Στο Εκουαδόρ, τα περισσότερα κρούσματα εντοπίζονται στις πεδιάδες του Αμαζονίου, με μικρότερη συχνότητα στις παράκτιες περιοχές μεταξύ των Άνδεων και του Ειρηνικού.¹⁶

1.6.3 Σπλαχνική λείσμανίαση (Visceral Leishmaniasis; VL)

Η σπλαχνική λείσμανίαση (VL, επίσης γνωστή ως Καλα-Αζάρ) προκύπτει από μετάσταση παρασίτων και μολυσμένων από παράσιτα μακροφάγων προερχόμενων από την αρχική θέση της

δερματικής μόλυνσης στα αιμοποιητικά όργανα (ήπαρ, σπλήνα και μυελό των οστών). Στον Παλαιό κόσμο, η VL προκαλείται από *Leishmania donovani* (σε περιοχές της Ινδίας, Πακιστάν, Κίνας και Αφρικής) και *Leishmania infantum* (στην περιοχή της Μεσογείου). Στον Νέο Κόσμο, η VL προκαλείται επίσης από το παράσιτο *L. infantum* (επίσης γνωστό ως *Leishmania chagasi* ή *L. infantum chagasi*), το οποίο συναντάται κυρίως στη Βραζιλία. Έχουν αναφερθεί περιστατικά σπλαχνικής λείσμανιάσης στη Μέση Ανατολή προκαλούμενα από σπλαχνοειδή στελέχη *L. tropica*, που προκαλεί κυρίως CL. Ο πολλαπλασιασμός των παρασίτων στα μακροφάγα του ήπατος, του σπλήνα και του μυελού των οστών ασθενών με VL προκαλεί προοδευτική ηπατοσπληνομεγαλία και καταστολή της αιμοποιητικής λειτουργίας του μυελού των οστών (Εικόνα 1.8). Αν δεν αντιμετωπιστεί, οι ασθενείς αναπτύσσουν πανκυτταροπενία και ανοσοκαταστολή και είναι επιρρεπείς σε λοιμώξεις από άλλα μικρόβια. Χωρίς θεραπεία, οι ασθενείς με VL τελικά υποκύπτουν στη νόσο. Τα άτομα που έχουν ταυτόχρονη μόλυνση με HIV έχουν ιδιαίτερη ευαισθησία στην ανάπτυξη άτυπων εκδηλώσεων και αυξημένη σοβαρότητα της VL. Η ανάπτυξη της VL σε ασθενείς με HIV είναι μια ασθένεια καθοριστική για το AIDS. Αυτό πιθανώς οφείλεται στις ταυτόχρονες επιδράσεις απορρύθμισης και των δύο παραγόντων στο ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή.¹⁶



Εικόνα 1.8 Εικόνες ασθενών με σπλαχνική λείσμανιάση.¹⁸

1.6.4 Μετα-σπλαχνική δερματική λείσμανιάση

Σε ένα υποσύνολο ασθενών που έλαβαν επιτυχώς θεραπεία για VL και που παραμένουν ασυμπτωματικοί για μήνες έως χρόνια, αναπτύσσεται ένας προοδευτικός πολλαπλασιασμός παρασίτων στο δέρμα που προκαλεί διάχυτες οζώδεις βλάβες. Η μετα-σπλαχνική δερματική λείσμανιάση (PKDL) εμφανίζεται κυρίως στην Ινδία και το Σουδάν σε ασθενείς που έχουν μολυνθεί με *L. donovani*. Στο Σουδάν, η PKDL μπορεί να εμφανιστεί σε ένα ποσοστό που αγγίζει το 50% των ασθενών, και εμφανίζεται νωρίτερα (σε έως και 6 μήνες) από ό,τι σε ασθενείς στην

Ινδία (όπου η επίπτωση κυμαίνεται κοντά στο ~5-10% σε διάστημα εντός 2-3 ετών μετά την κάθαρση της VL).¹⁶

1.7 Θεραπευτική αγωγή

Οι θεραπευτικές προσεγγίσεις έναντι της λείσμανιάσης ποικίλουν ανάλογα με τον τύπο της νόσου. Τα διάφορα φάρμακα που είναι διαθέσιμα, παρά τα οφέλη που προσφέρουν εμφανίζουν σημαντικούς περιορισμούς. Τα φάρμακα πρώτης γραμμής περιλαμβάνουν το πεντασθενές αντιμόνιο (Sb5+), το οποίο αποτελεί εδώ και καιρό τη βάση της χημειοθεραπείας κατά της μόλυνσης με λείσμανία. Ωστόσο, η αυξανόμενη δημιουργία στελεχών παρασίτου ανθεκτικών στο φάρμακο έχει περιορίσει τα οφέλη του. Τα φάρμακα δεύτερης γραμμής, που χρησιμοποιούνται επίσης για τη θεραπεία αυτής της λοίμωξης, είναι κυρίως η πενταμιδίνη και η αμφοτερικίνη. Ωστόσο, η αναδυόμενη ανθεκτικότητα των παρασίτων στη δράση της πενταμιδίνης καθώς και η τοξικότητα που προκαλεί σταμάτησε τη χρήση της. Περιορισμοί υπάρχουν και στη χορήγηση της αμφοτερικίνης Β, λόγω του ότι η χρήση της μπορεί να προκαλέσει οξεία τοξικότητα και απαιτεί νοσοκομειακή νοσηλεία. Άλλος ένας ανασταλτικός παράγοντας στη χορήγηση της αμφοτερικίνης Β στις αναπτυσσόμενες χώρες όπου ενδημεί η ασθένεια είναι το υψηλό κόστος της. Άλλη μια ουσία που χρησιμοποιείται ως χημειοθεραπευτικός παράγοντας στη θεραπεία της VL και της CL είναι η μιλτεφοσίνη. Το γεγονός ότι χορηγείται από το στόμα καθώς και η αποτελεσματικότητα της θεραπείας σε σύντομο χρονικό διάστημα αποτελούν τα κύρια πλεονεκτήματα της χρήσης της. Ωστόσο, έχει σημαντικούς περιορισμούς στη θεραπεία της λείσμανιάσης λόγω της πρόκλησης τερατογένεσης. Επίσης λόγω της μακράς διάρκειας ζωής που την χαρακτηρίζει, θα μπορούσε να ευνοήσει τη δημιουργία στο παράσιτο μηχανισμών ανθεκτικότητας σε αυτήν.

Η χημειοθεραπεία είναι η πιο πρακτική και αποτελεσματική θεραπεία που εφαρμόζεται και στις τρεις κύριες μορφές λείσμανιάσης. Όμως, όπως ήδη αναφέρθηκε, οι περιορισμοί στην χορήγηση της υπάρχουσας χημειοθεραπείας που περιλαμβάνουν την τοξικότητα, το υψηλό κόστος και τη μακροχρόνια θεραπεία τονίζουν πόσο σημαντικό είναι να αναπτυχθούν νέοι θεραπευτικοί τρόποι. Έχει προταθεί η συνδυαστική θεραπεία με χρήση των διαφορετικών φαρμάκων που είναι διαθέσιμα, η οποία θα μπορούσε να είναι πιο αποτελεσματική και με λιγότερες παρενέργειες. Για παράδειγμα, ένας συνδυασμός αμφοτερικίνης Β με μιλτεφοσίνη έχει συσταθεί και συνταγογραφηθεί για την αναστολή της ανθεκτικής στο αντιμόνιο VL στην Ινδία. Ωστόσο, και πάλι υπάρχει πιθανότητα το παράσιτο *Leishmania* να αναπτύξει αντίσταση και σε αυτόν τον συνδυασμό¹⁹, ενώ οι ανεπιθύμητες παρενέργειες των υπαρχόντων αντιλείσμανικών φαρμάκων παραμένουν σοβαρές. (πχ. καρδιακή αρρυθμία, ηπατίτιδα, θρομβοφλεβίτιδα και νεφρική

δυσλειτουργία). Επιπλέον, η ακατάλληλη χρήση του φαρμάκου έχει οδηγήσει σε αναποτελεσματικότητα της δράσης του λόγω της αντίστασης. Για όλους τους παραπάνω λόγους ο Π.Ο.Υ., κρίνει απαραίτητη την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων με λιγότερες παρενέργειες.⁸

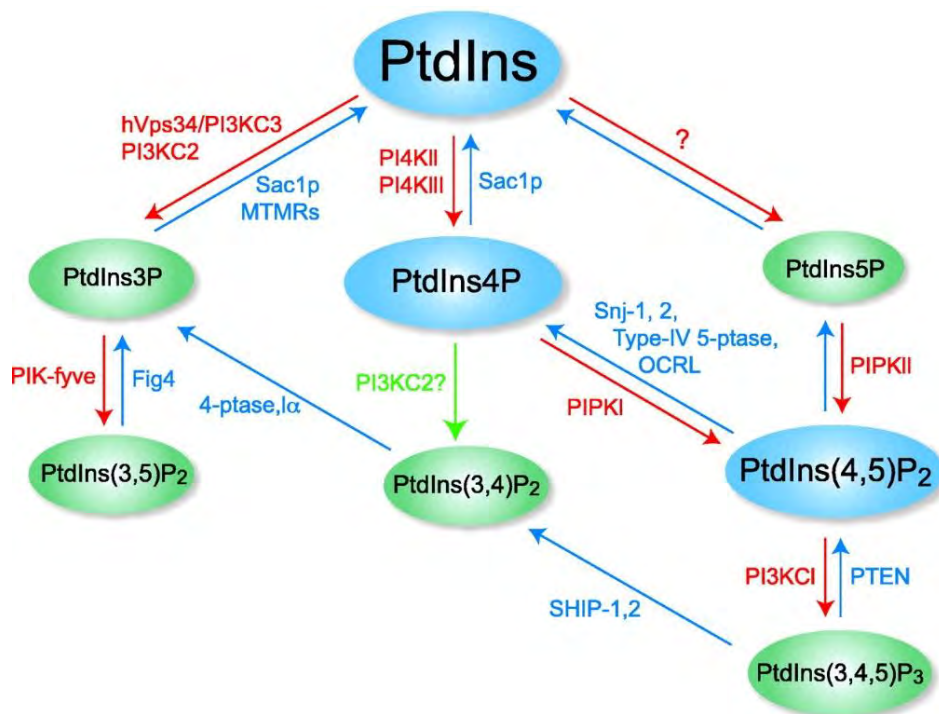
1.8 Φωσφοϊνοσιτίδια

Τα φωσφοϊνοσιτίδια [φωσφολιπίδια φωσφατιδυλικής ινοσιτόλης (PIs)], εκτελούν βασικές ρυθμιστικές λειτουργίες στο κύτταρο, συμπεριλαμβανομένης της σηματοδότησης λιπιδίων, της μεταφοράς και διαλογής πρωτεϊνών, της διακίνησης μεμβρανών καθώς και της αναδιαμόρφωσης του κυτταροσκελετού και των μεμβρανών.²⁰ Οι ρυθμιστικές αυτές ικανότητες, ενορχηστρώνονται από την εντοπισμένη λειτουργία των ενζύμων που μεταβολίζουν PIs καθώς και των πρωτεϊνών που δεσμεύονται σε αυτά και επιτελούν σηματοδοτικό ρόλο. Επίσης, βασίζεται σε μεταβολίτες φωσφοϊνοσιτιδίων, που με τις δράσεις τους και τις αλλαγές στη συγκέντρωσή τους ανταποκρίνονται στις περιβαλλοντικές αλλαγές μέσω μεταγωγής σημάτων. Όλα αυτά τα μόρια αποτελούν το ρυθμιστικό σύστημα των PIs. Λόγω της υψηλής σημασίας του για τη ζωή των ευκαρυωτικών κυττάρων, το ρυθμιστικό σύστημα των PIs εμπεριέχει υποψήφιους πρωτεϊνικούς στόχους φαρμάκων για ευκαρυωτικά παθογόνα, ειδικά όταν υπάρχουν σημαντικές διαφορές από τα ομόλογα τους στον ξενιστή ή οι λειτουργίες τους (στον ξενιστή) είναι λιγότερο ζωτικής σημασίας από ότι στο παθογόνο.²¹ Επιπλέον, με την αναστολή των βασικών ενζύμων που μεταβολίζουν τα PIs στα παθογόνα, θα μπορούσαν να διαταραχθούν βασικές διαδικασίες που ρυθμίζονται από PIs και επιτρέπουν στα παθογόνα να διαφύγουν από την άμυνα του ξενιστή. Οι ρυθμιστικοί ρόλοι των PIs ερευνώνται εκτενώς τόσο σε θηλαστικά^{22,23,24} όσο και σε άλλους ευκαρυωτικούς οργανισμούς.²¹

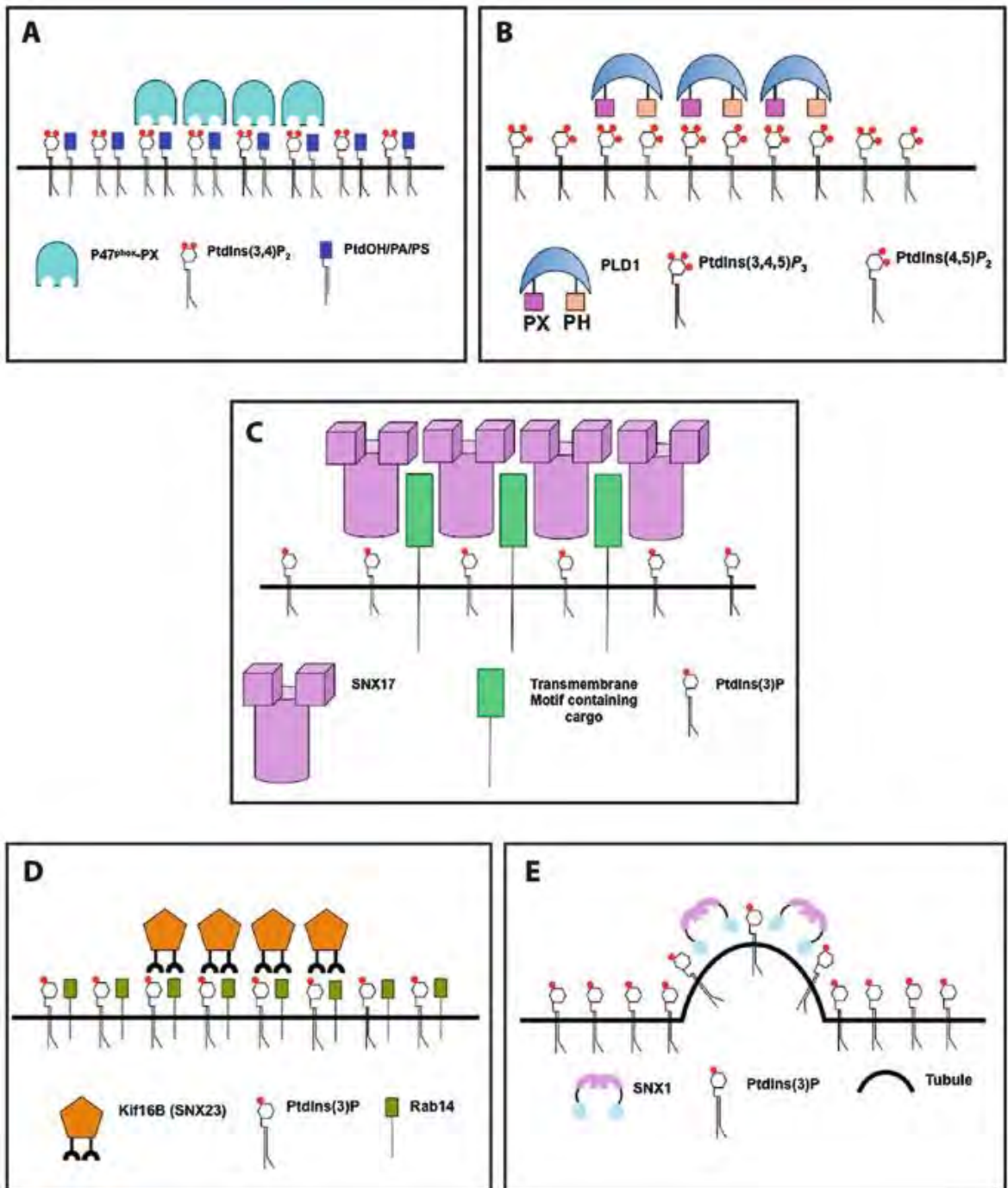
Η παρουσία των PtdIns σε όλους τους ευκαρυώτες^{25,20,25} υποδηλώνει ότι κάποια μορφή PI εμφανίστηκε πιθανώς σε έναν αγνώστου ταυτότητας πρόγονο όλων των υπαρχόντων ευκαρυωτών, και αυτό, με τη σειρά του, υποδηλώνει ότι η ανάπτυξη ορισμένων λειτουργιών των PtdIns στη διακίνηση κυστιδίων και τη ρύθμιση του κυτταροσκελετού μπορεί να ήταν σε εξέλιξη πριν από την πρόιμη διαφοροποίηση των ευκαρυωτικών οργανισμών.^{26,27,28} Εντός των ευκαρυωτικών κυττάρων, τα PtdIns αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες μέσω εξαιρετικά συντηρημένων πρωτεϊνικών περιοχών στις οποίες προσδένονται και επιτελούν τις λειτουργίες τους.

Μέσω αυτών των αλληλεπιδράσεων, τα PtdIns ασκούν πλήθος σηματοδοτικών ρόλων. Μέχρι σήμερα, έχουν αναγνωριστεί και χαρακτηριστεί αρκετά, διακριτά, μοτίβα πρόσδεσης PtdIns, συμπεριλαμβανομένων των περιοχών ENTH, Fab1, YOTB, Vac1, της περιοχής EEA1 (FYVE)²⁹,

PH³⁰ και PX.^{31,32} Τέτοιες περιοχές που βρίσκονται σε μια ποικιλία πρωτεϊνών που διαθέτουν διαφορετικές δομικές περιοχές, μεσολαβούν στη «στρατολόγηση» συγκεκριμένων πρωτεϊνών-συνεργατών με συγκεκριμένες λειτουργίες σε περιοχές των κυτταρικών μεμβρανών που είναι εμπλουτισμένες στα συγκεκριμένα αλληλεπιδρώντα PtdIns.³³ Μπορούν επίσης να χρησιμεύσουν ως αλλοστερικοί ρυθμιστές της ενζυμικής δράσης ή να επηρεάσουν τις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Η σύνδεση των PtdIns σε αυτές τις περιοχές είναι γενικά χαμηλής συγγένειας και ταχέως αναστρέψιμη, ευνοώντας έτσι ένα σύστημα με υψηλή ευελιξία.



Εικόνα 1.9 Απεικόνιση του δικτύου αλληλομετατροπών των φωσφοϊνοσιτιδίων και των ενζύμων που εμπλέκονται. Τα φωσφοϊνοσιτιδία φωσφορυλιώνονται (κόκκινα βέλη) από τις κινάσες και αποφωσφορυλιώνονται (μπλε βέλη) από τις φωσφοϊνοσιτιδικές φωσφατάσες. Οι περισσότερες (αλλά όχι όλες) από τις κινάσες είναι αρκετά ειδικές και φωσφορυλιώνουν μόνο ένα υπόστρωμα σε μια συγκεκριμένη θέση στον δακτύλιο ινοσιτόλης. Αυτό το σχήμα δείχνει μόνο τις πιο καθιερωμένες διαδρομές, όλες οι άλλες δυνατότητες αλληλομετατροπής, περιγράφονται στη δημοσίευση των Abel et al. (2001).³⁴



Εικόνα 1.10 Διάφοροι μηχανισμοί αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών με φωσφοϊνοσιτιδία στις κυτταρικές μεμβράνες δίνονται ως παραδείγματα για διαφορετικά μέλη της οικογένειας πρωτεϊνών που διαθέτουν δομική περιοχή PX. **(A)** Διπλή αναγνώριση λιπιδίων – ανίχνευση φωσφοϊνοσιτιδίων και άλλων λιπιδίων της μεμβράνης. Παράδειγμα αποτελεί η εξαρτώμενη από ανίχνευση των $\text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2$ και PtdOH/PA/PS πρόσδεση της πρωτεΐνης $p47^{\text{phox}}$.²⁹ **(B)** Δύο περιοχές δέσμευσης λιπιδίων και ανίχνευση δύο διαφορετικών φωσφοϊνοσιτιδίων. Ο εξαρτώμενος από τα $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ - και $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ εντοπισμός της πρωτεΐνης PLD1 μέσω των δύο δομικών περιοχών που διαθέτει (PX και PH).²⁹ **(C)** Η ανίχνευση φωσφοϊνοσιτιδίων και διαμεμβρανικού μοτίβου που περιέχει φορτίο και ο εξαρτώμενος από το $\text{PtdIns}(3)\text{P}$ εντοπισμός της πρωτεΐνης SNX17 στην ενδοσωμική μεμβράνη. **(D)** Η ανίχνευση των φωσφοϊνοσιτιδίων που είναι συνδεδεμένα με τη μεμβράνη των μικρών μονομερών GTPασών που χαρακτηρίζεται από

τον εξαρτώμενο από Rab14 και PtdIns(3)*P* εντοπισμό της πρωτεΐνης Kif16B (SNX23).²⁹ (E) Η ανίχνευση φωσφοϊνοσιτιδίων που χαρακτηρίζεται από το PtdIns(3)*P* και τον εξαρτώμενο από την καμπυλότητα εντοπισμό της πρωτεΐνης SNX1 στα ενδοσώματα.

1.9 Δομική περιοχή PX

Η περιοχή PX αναγνωρίστηκε αρχικά ως ένα συντηρημένο μοτίβο περίπου 130 αμινοξικών καταλοίπων εντός των υπομονάδων p40^{phox} και p47^{phox} του συμπλόκου NADPH.³² Παρουσιάζει μεγάλο βαθμό δομικής συντήρησης και ανιχνεύεται σε όλες τις Νεξίνες Διαλογής (Sorting Nexins). Παρόλο που η περιοχή PX παρουσιάζει μικρή συντήρηση σε επίπεδο αλληλουχίας αμινοξέων στα μέλη της οικογένειας SNX³⁵, εμφανίζει την ίδια τρισδιάστατη δομή, που αποτελείται από τρία αντιπαράλληλα β-φύλλα (β1-β3) και τρεις α-έλικες (α1-α3). Κρυσταλογραφική μελέτη της περιοχής PX έχει δείξει ότι οι έλικες αυτές σχηματίζουν τη δομή που απαιτείται για την πρόσδεση της με PtdIns*P*.²⁹

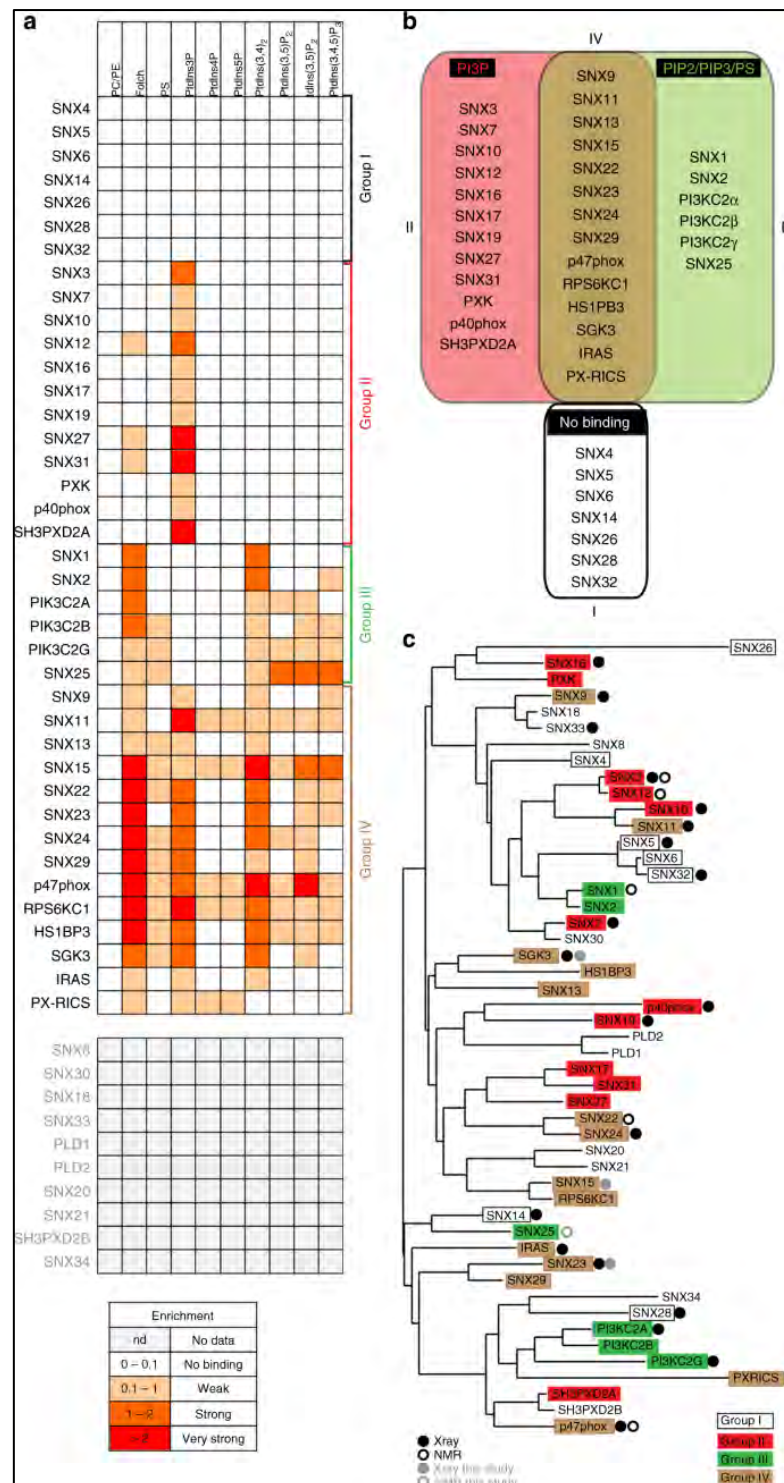
Οι περιοχές PX των πρωτεϊνών που ανήκουν στην οικογένεια των SNXs, δεσμεύουν κυρίως την 3-μονοφωσφορική φωσφατιδυλινοσιτόλη (PtdIns(3)*P*) εμπλουτισμένη στην μεμβράνη πρώιμων ενδοσωμάτων.^{35,36} Ωστόσο, μπορούν επίσης να συνδεθούν και με άλλα PtdInPs όπως τα PtdIns(3,4)*P2*, PtdIns(3,5)*P2*, PtdIns(4,5)*P2* και PtdIns(3,4,5)*P3*.³⁵ Στοιχεία για το ρόλο της περιοχής PX ως μονάδας στόχευσης μεμβράνης κατευθυνόμενης από PtdIns(3)*P* έχουν παραχθεί από την ανάλυση της ανθρώπινης νεξίνης διαλογής SNX3.³⁷ Η περιοχή PX συναντάται σε διαφορετικά είδη πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη σηματοδότηση των κυττάρων (πχ φωσφολιπάση D1 και D2, κατηγορίας II PI 3-κινάσες κ.λπ.), διακίνηση κυστιδίων (πχ νεξίνες διαλογής στον άνθρωπο, Vam7p στον ζυμομύκητα κ.λπ.). Επί του παρόντος, έχουν ταυτοποιηθεί τουλάχιστον 47 νεξίνες διαλογής που εμπεριέχουν περιοχή PX από τον άνθρωπο και 14 από τον ζυμομύκητα (UniProt v.2021_03 πρόσβαση στις 12/06/2022). Παρόλο που οι μελέτες για τις αλληλεπιδράσεις των νεξινών διαλογής με PtdInPs τόσο στον άνθρωπο όσο και στον ζυμομύκητα αποτελούν στόχους ενεργής έρευνας, στην περίπτωση των αρχαίων ευκαρυωτών όπως είναι η κατηγορία των πρωτοζώων της τάξης Kinetoplastea, δεν υπάρχουν σχεδόν καθόλου μελέτες.

Sub-family	Protein	Phosphorylation sites				PDB Files
		3-phosphate	inositol	1-phosphate	4,5-hydroxyls	
PX-BAR	SNX1		F			2I4K
	SNX2		F			
	SNX4					
	SNX5	Q	H		T	3HPB, 3HPC, 5TGI, 5TGJ, 5TGH
	SNX6	Q	H		T	
	SNX7					3IQ2
	SNX8					
	SNX30					
	SNX32	Q	H		T	
SH3-PX-BAR	SNX9					2RAI, 2RAJ, 2RAK, 3DYT, 3DYU
	SNX18					
	SNX33					4AKV
RGS-PX	SNX13					
	SNX14				K	4BGJ, 4PQO, 4PQP
	SNX19					4P2I, 4P2J
	SNX25		L		S	5XDZ, 5WOE
PX-FERM	SNX17					3FOG, 3LUI
	SNX27					4HAS
	SNX31					
PX-only	SNX3					2YPS, 5F0J, 5F0L
	SNX10					4ON3, 4PZG
	SNX11					4IKB, 4IKD
	SNX12					2CSK
	SNX22					2ETT
	SNX24					4AZ9
PX-SH3	SH3PXD2A					
	SH3PXD2B					
	SNX28	S	W	L		2L73
	p40phox					1H6H, 2DYB
	p47phox		F	P		1O7K, 1KQ6, 1GD5
PX-S/T kinase	PXK					
	RPS6KC1					
	SGK3					1XTE, 1XTN, 4OXW
PX-SH3-GAP	SNX26	S		P	L	
	PX-RICS	S		R	V	
PX-PI3-kinase	PIK3C2A	T	F	R		2AR5, 2REA, 2RED, 2IWL
	PIK3C2B	T	F	R		
	PIK3C2G	S	F	W		2WWE
PX-PH-PLD	PLD1	K	F	R		
	PLD2	K		R		
PX-PXB	SNX20					
	SNX21					
Kinesin-PX	SNX23					2V14
PX-MIT	SNX15			R		
PX-LRR-IRAS	IRAS					3P0C
PX-SNX16	SNX16					5GW0, 5GW1
	SNX29-PX	SNX29				
PX-SNX34	SNX34		S	R		
Yeast	Bem1p	Y		P		2V6V, 2CZO
	Snx3p					1OCS, 1OCU
	Vam7p					1KMD

□ no change □ similar ■ different

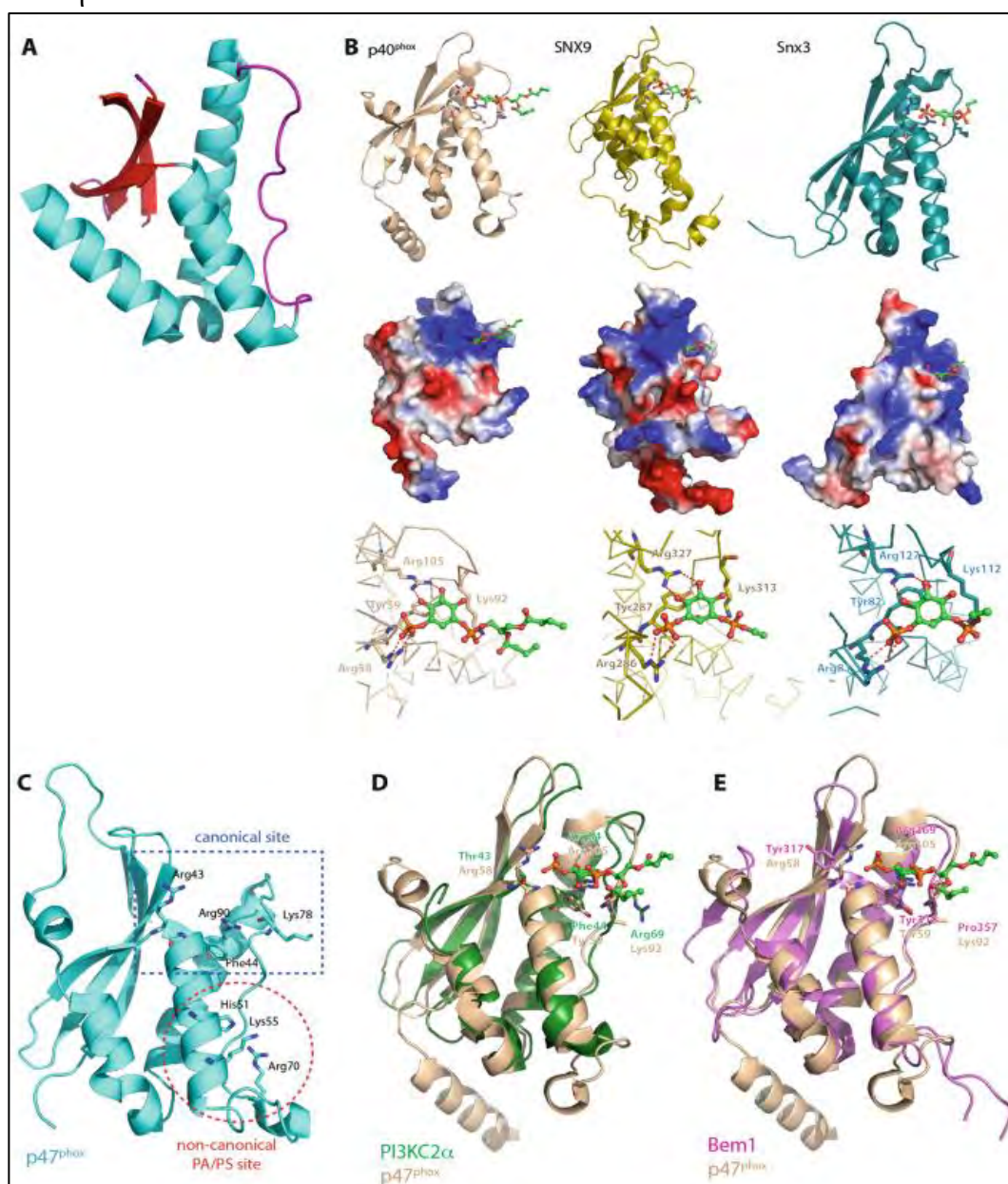
Εικόνα 1.11 Λίστα από τις γνωστές ανθρώπινες πρωτεΐνες που περιέχουν δομική περιοχή PX, ταξινομημένες σε υπο-οικογένειες. Οι κωδικοί PDB για γνωστές δομές από NMR ή κρυσταλλογραφικές μελέτες παρουσιάζονται στην δεξιά στήλη. Οι κεντρικές στήλες παρουσιάζουν τις τέσσερις πλευρικές ομάδες στα αμινοξέα-κλειδιά που συντονίζουν την είσοδο του PtdIns(3)P στη βασική περιοχή πρόσδεσης (binding pocket). Οι συντηρημένες

αντικαταστάσεις σε αυτές τις πλευρικές ομάδες των αμινοξέων είναι σημασμένες με γκρι ενώ οι μεγάλες διαφοροποιήσεις υποδεικνύονται με μαύρο. Για λόγους σύγκρισης παρατίθενται και τρεις PX πρωτεΐνες του ζυμομύκητα (*yeast*) με γνωστές δομές.²⁹



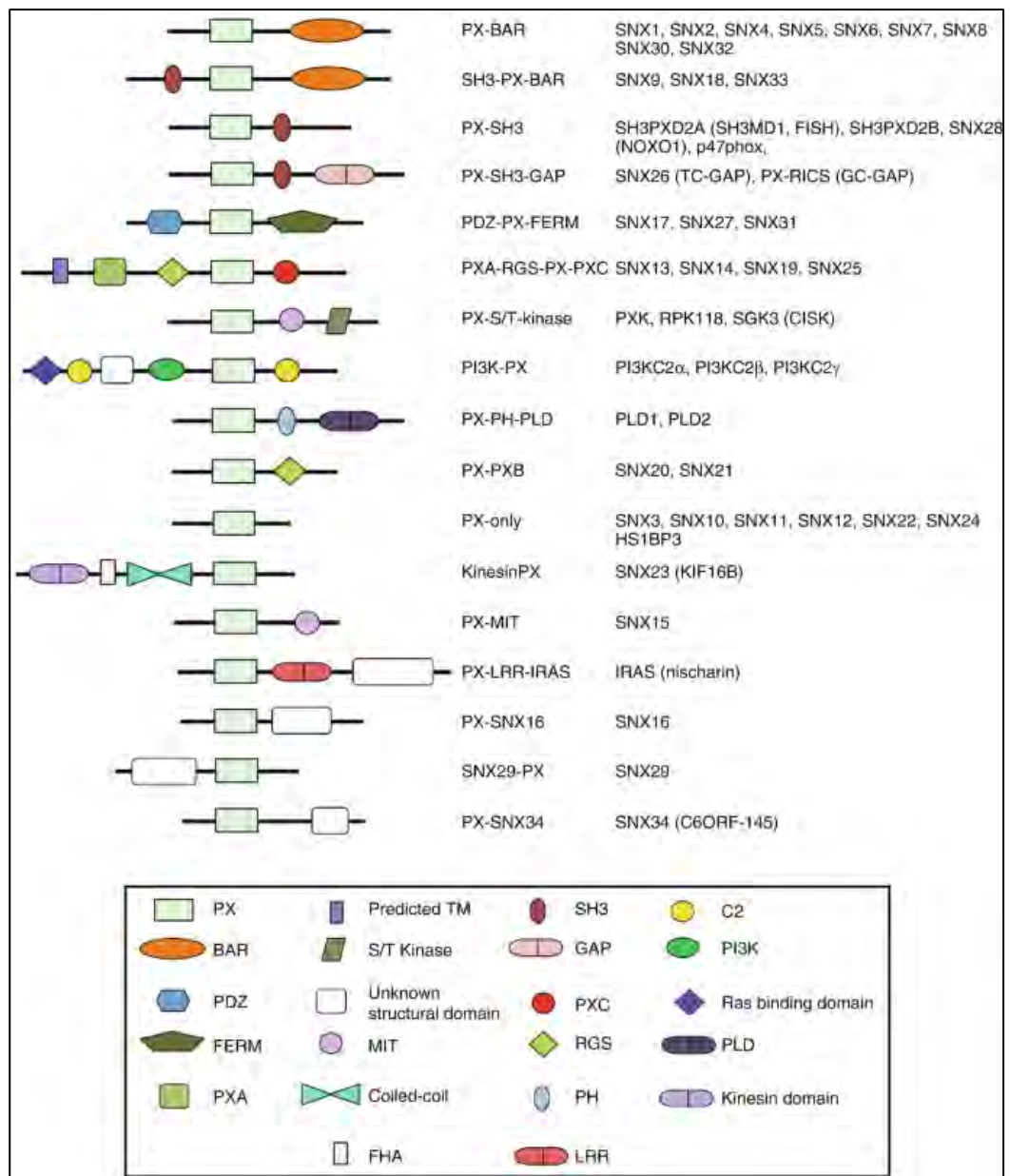
Εικόνα 1.12 Ειδικότητα πρόσδεσης των φωσφοϊνοσιτιδίων στη δομική περιοχή PX του ανθρώπου. **(A)** Πίνακας προσδιορισμού της ειδικότητας πρόσδεσης σε φωσφοϊνοσιτιδία για κάθε περιοχή PX υπολογισμένη με βάση τις εντάσεις των ζωνών αντίστοιχης πηκτής πολυακρυλαμιδίου που χρωματίστηκε με Coomassie-Stain.²⁹ Η ισχύς της πρόσδεσης ορίζεται ως η αναλογία της έντασης της ζώνης που παρατηρείται στο σφαιρίδιο (P) σε σύγκριση με τα

κλάσματα υπερκειμένου (S) (αναλογία P/S). Οι πρωτεΐνες PX που δεν ήταν εφικτό να καθαριστούν (δηλαδή, δεν υπάρχουν δεδομένα) εμφανίζονται με λευκό χρώμα. **(B)** Οι PX πρωτεΐνες που απεικονίζονται κατατάσσονται σε τέσσερις ομάδες. Οι πρωτεΐνες της ομάδας I δεν δεσμεύονται σε κανένα λιπίδιο υπό τις συνθήκες που δοκιμάστηκαν. Η ομάδα II περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες που συνδέονται ειδικά με το PtdIns(3)P. Τα μέλη της ομάδας III συνδέονται με PIP2 [PtdIns(3,4)P₂/PtdIns(3,5)P₂/PtdIns(4,5)P₂] και/ή PIP3 [PtdIns(3,4,5)P₃] και/ή PS, αλλά όχι το PtdIns(3)P. Η ομάδα IV περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες PX που συνδέονται τόσο με το PtdIns(3)P όσο και με το PIP2/PIP3/PS. **(C)** Η φυλογενετική ανάλυση των ανθρώπινων περιοχών PX πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του αλγορίθμου PRALINE-51. Οι πρωτεΐνες είναι χρωματικά κωδικοποιημένες με βάση την ομαδοποίησή που αναφέρθηκε, σχετικά με την πρόσδεση τους σε φωσφοϊνοσιτίδια και επισημαίνονται εκείνες με γνωστές κρυσταλλικές δομές ακτινών X ή NMR.²⁹



Εικόνα 1.13 Σχηματικές αναπαραστάσεις της δομικής περιοχής PX από πρωτεΐνες που έχουν μελετηθεί με κρυσταλλογραφία μάζας. **(A)** Σχηματική αναπαράσταση της δομικής περιοχής PX που ανήκει στην ανθρώπινη SNX17 (PDB code 3LUI) που αποτελείται από τρία αντιπαράλληλα

β-φύλλα (β1 – β3, που απεικονίζονται με κόκκινο χρώμα) ακολουθούμενα από τρεις α-έλικες (α1 – α3, που απεικονίζονται με κυανό). Η εκτεταμένη περιοχή μεταξύ των ελίκων α1 και α2, που ονομάζεται βρόχος πολυπρολίνης (polyproline loop) και περιέχει το μοτίβο ΨPxxPxK, εμφανίζεται με μοβ χρώμα. **(B)** Οι γνωστές δομές των περιοχών PX που συνδέονται με την κανονική ομάδα κεφαλής λιπιδίων PtdIns(3)P [canonical PtdIns(3)P lipid headgroup]. Αυτά είναι η ανθρώπινη p40^{phox} (κωδικός PDB 1H6H), η ανθρώπινη SNX9 (κωδικός PDB 2RAK) και η SNX3 του ζυμομήκντα (κωδικός PDB 1OCU). Η ομάδα κεφαλής PtdIns(3)P εμφανίζεται με πράσινες σφαίρες και ευθείες γραμμές. Στο επάνω τμήμα απεικονίζεται η τρισδιάστατη δομή κορδέλας (ribbon structure), στο μεσαίο τμήμα παρουσιάζεται η αντίστοιχη ηλεκτροστατική επιφάνεια ενώ στο κάτω τμήμα εμφανίζεται μια μεγεθυμένη όψη της θέσης πρόσδεσης PtdIns(3)P που επισημαίνει τις τέσσερις πλευρικές βασικές αλυσίδες που δημιουργούν άμεση επαφή με το PtdIns(3)P. Οι αλληλεπιδράσεις των δεσμών υδρογόνου εμφανίζονται ως κόκκινες διακεκομμένες γραμμές. **(C)** Η κρυσταλλική δομή της δομικής περιοχής PX της πρωτεΐνης p47^{phox} (κωδικός PDB 1KQ6) εμφανίζει δύο διακριτές θέσεις πρόσδεσης λιπιδίων. Η πρώτη θέση, που επισημαίνεται με μπλε διακεκομμένο πλαίσιο, είναι ανάλογη με την κανονική θέση πρόσδεσης PtdIns(3)P της p40^{phox} και κατά προτίμηση συνδέεται με το PtdIns(3,4)P₂. Η δεύτερη θέση, που επισημαίνεται ως κόκκινος διακεκομμένος κύκλος, συνδέεται με το φωσφατιδικό οξύ (PA, phosphatidic acid) ή φωσφατιδυλοσερίνη (PS, phosphatidylserine). Τα βασικά υπολείμματα που πιστεύεται ότι εμπλέκονται στη σύνδεση φωσφοϊνοσιτιδίων σε καθεμία από τις αντίστοιχες θέσεις επισημαίνονται με ευθεία γραμμή. **(D)** Δομική υπέρθεση της δομικής περιοχής PX της πρωτεΐνης PI3KC2α (κωδικός PDB 2AR5) (εμφανίζεται με πράσινο χρώμα) και το δεσμευμένο στο p40^{phox} (κωδικός PDB 1H6H) PtdIns(3)P (εμφανίζεται με χρώμα μπλε) που δείχνει την παρουσία τροποποιημένων PtdIns(3)P -δεσμευτικών αλυσίδων (binding side chains) στην πλευρά δεσμεύσεως PtdIns(3)P-αPIK. **(E)** Η δομική υπέρθεση της δομικής περιοχής PX της πρωτεΐνης Bem1p (κωδικός PDB 2V6V) εμφανίζεται με ιώδες χρώμα και το δεσμευμένο στο p40^{phox} (κωδικός PDB 1H6H) PtdIns(3)P εμφανίζεται με χρώμα μπλε και δείχνει τη σημαντική αλλαγή στην ακολουθία των καταλοίπων στη θέση πρόσδεσης φωσφολιπιδίων (canonical phospholipid binding pocket).²⁹

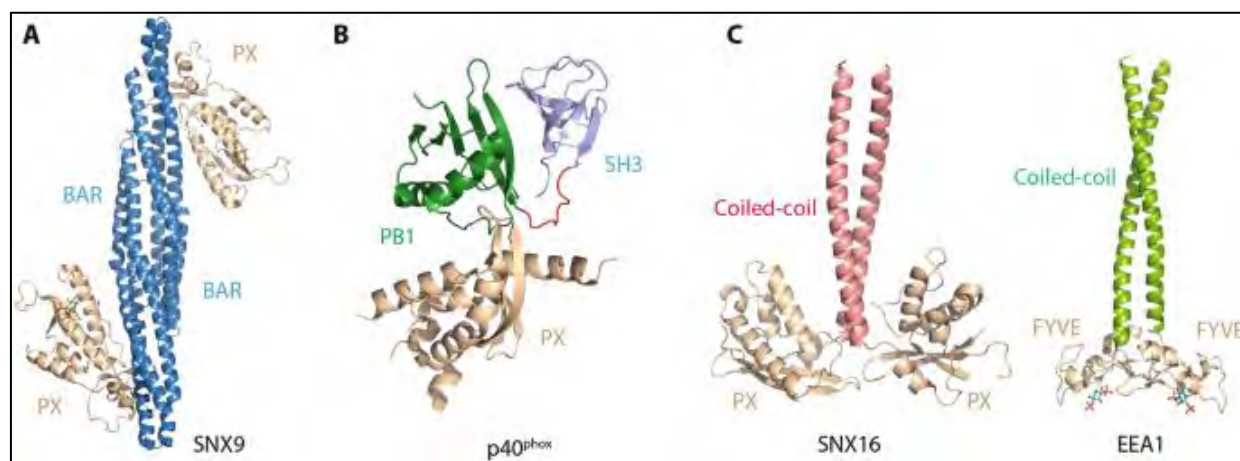


Εικόνα 1.14 Σχηματική αναπαράσταση των δομικών αρχιτεκτονικών των γνωστών PX πρωτεϊνών του ανθρώπου.²⁹

1.10 Πρωτεΐνες SNX-BAR

Η υπο-οικογένεια των Νεξινών Διαλογής, SNX-BAR εκτός από την περιοχή PX, περιέχει μια επιπλέον περιοχή BAR (Bin/Amphiphysin/Rvs), ένα δομικό μοτίβο διμερισμού που σχηματίζει μια άκαμπτη δομή διπλής έλικας.³⁸ Αυτή η δομή επιτρέπει στις περιοχές BAR να προκαλέσουν παραμόρφωση της μεμβράνης εισάγοντας καμπυλότητες και σωληνοειδείς δομές.³⁶ Η ικανότητα αυτή των SNX-BARs είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα δεδομένου ότι, τα στοιχεία των σωληνοειδών δομών του πρώιμου ενδοκυτταρικού συστήματος αποτελούν «μοριακές πλατφόρμες» διαλογής πρωτεϊνών.³⁹ Τα τρέχοντα μοντέλα προτείνουν ότι και οι δύο περιοχές PX και BAR

πρέπει να προσδένονται με τη μεμβράνη για να διασφαλιστεί η ειδικότητα και η αποτελεσματική σύνδεση. Στον άνθρωπο έχουν ταυτοποιηθεί δώδεκα μέλη της οικογένειας SNX-BAR (SNX1, SNX2, SNX4, SNX5, SNX7, SNX8, SNX9, SNX18, SNX30, SNX32 και SNX33).⁴⁰ Η SNX1 σύμφωνα με *in vitro* μελέτες, βρέθηκε να συσχετίζεται πιο έντονα με μεμβράνες μεγάλης καμπυλότητας και εντοπίζεται σε κυρτές μεμβρανικές περιοχές.⁴¹ Πολλές πρωτεΐνες SNX-BAR (SNX1, SNX2, SNX5, SNX6 και SNX32) σχηματίζουν ετεροδιμερή σύμπλοκα σημαντικά για την ανακύκλωση των μεμβρανών μέσω ενδοσωμάτων.⁴² Οι μελετημένες SNX-BARs, εντοπίζονται σε προεκβολές των μεμβρανών και στις μεμβράνες κυστιδίων σε όλο το εύρος του ενδοκυτταρικού συστήματος και έχουν συσχετιστεί με κλαθρινο-εξαρτώμενα και μη μονοπάτια ενδοκύττωσης, καθώς και με μία ποικιλία διαδικασιών διαλογής πρωτεϊνών.³⁶



Εικόνα 1.15 Τρισδιάστατες απεικονίσεις πρωτεϊνών που ανήκουν στην υπο-οικογένεια PX-BAR. Οι δομικές περιοχές PX απεικονίζονται με μπεζ χρώμα ενώ οι επιπλέον δομικές περιοχές που παρουσιάζονται εμφανίζονται με εναλλακτικά χρώματα. Οι κωδικοί PDB είναι: SNX5 (3HPB), SNX10 (4ON3), SNX11 (4IKB), p40^{phox} (1H6H) και ζύμη Bem1p (2V6V).²⁹

1.11 Η πρωτεΐνη *LdSNXi*

Το προϊόν του γονιδίου *LdBPK_352470.1*, αποτελεί καταχώρηση σε πολλές από τις βιοπληροφορικές βάσεις δεδομένων και χαρακτηρίζεται ως «Πρωτεΐνη που προσδένεται σε φωσφοϊνοσιτίδια». Είναι ορθόλογο του γονιδιακού προϊόντος LmjF.35.2420, το οποίο ταυτοποιήθηκε ως εκκρινόμενο στην μελέτη των Silverman et al 2008.⁴³ Στην Uniprot συναντάται με το id E9BSB7_LEIDB. Σύμφωνα με τις βάσεις Pfam και InterPro, η πρωτεΐνη διαθέτει τη δομική περιοχή PX, καθώς και την περιοχή BAR, δεδομένα που την κατατάσσουν στην υπο-οικογένεια των Νεξινών Διαλογής SNX-BAR. Ονομάσαμε αυτήν την πρωτεΐνη *LdSNXi* [*Leishmania donovani* Sorting Nexin i (i είναι ο λατινικός αριθμός 1)], καθώς είναι η πρώτη νεξίνη διαλογής που περιγράφεται σε παρασιτικό οργανισμό του γένους *Leishmania*.

Στόχος της μελέτης

Η παρούσα μελέτη αποτελεί ένα πρόδρομο στάδιο του λειτουργικού προσδιορισμού της πρωτεΐνης *LdSNXi* (προϊόν του γονιδίου *LdBPK_352470.1*) μέσω της ταυτοποίησης των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με αυτή καθώς και με τη χρήση της βιοπληροφορικής.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΜΕΘΟΔΟΙ ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

2.1.1 Προσδιορισμός και απεικόνιση των δομικών στοιχείων της *LdSNXi*

Η δομική αρχιτεκτονική της πρωτεΐνης προσδιορίστηκε σύμφωνα με τη βάση δεδομένων InterPro. Η απεικόνιση της τριτοταγούς δομής, πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τα δεδομένα της βάσης δεδομένων AlphaFold (Release 2021_07) και οπτικοποιήθηκε με τη χρήση του MOE (v). Τα δεδομένα κρυσταλλογράφησης των δομικών στοιχείων PX και BAR της ανθρώπινης νεξίνης 1 (SNX1), συλλέχθηκαν από τη βάση δεδομένων PDB (Protein Data Bank) και η υπέρθεση των δομών για τις *LdSNXi* και SNX1 πραγματοποιήθηκε με τον αλγόριθμο SuperPose (v.1.0).

2.1.2 Κατά ζεύγη στοίχιση πρωτεϊνών της υπο-οικογένειας SNX PX-BAR

Οι ορθόλογες πρωτεΐνες του γένους *Leishmaniae* καθώς και η ακολουθία της *LdSNXi* (*LdBK_352470.1*) συλλέχθηκαν από τη βάση δεδομένων TryTripDB (Release 2022_11). Οι ακολουθίες των ανθρώπινων νεξινών διαλογής συλλέχθηκαν από τη βάση δεδομένων UniProt (Release 2022_04). Οι κατά ζεύγη στοίχισεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του αλγορίθμου Blastp (v.2.13.0).

2.1.3 Εξελικτικές σχέσεις της *LdSNXi* με τις ανθρώπινες νεξίνες διαλογής της υπο-οικογένειας SNX PX-BAR

Οι ακολουθίες των ανθρώπινων νεξινών διαλογής συλλέχθηκαν από τη βάση δεδομένων UniProt (Release 2022_04) ενώ η ακολουθία της *LdSNXi* (*LdBK_352470.1*) από τη βάση δεδομένων TryTripDB (Release 2022_11). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε πολλαπλή στοίχιση με τη χρήση του αλγορίθμου Clustal Omega (v.1.2.2) και κατασκευή του φυλογενετικού δέντρου με το εργαλείο iTOL (v.6).

2.1.4 Δίκτυα Πρωτεϊνικών Αλληλεπιδράσεων

Εξαιτίας της απουσίας σχετικής καταχωρησης της *LdSNXi* (*LdBK_352470*), χρησιμοποιήθηκε η ομόλογη της στο παράσιτο *Leishmania infantum* (complex *Leishmania donovani*, κωδικός στη βάση δεδομένων UniProt A4IBF2) που εμφανίζει 99.76% ομοιότητα με την *LdSNXi*. Για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων και την κατασκευή δικτύων χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων STRING (v.11.5).

2.2 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1 Πέψη πλασμιδιακού DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα που αναγνωρίζουν ειδικά παλίνδρομες αλληλουχίες DNA μήκους 6-12 ζευγών βάσεων και τέμνουν τη διπλή έλικα διασπώντας φωσφοδιεστερικούς δεσμούς (έναν δεσμό / αλυσίδα). Παράγονται από βακτήρια και η λειτουργία τους αφορά την προστασία των βακτηρίων από ιούς, τέμνοντας εξειδικευμένα το ιικό γονιδίωμα, εφόσον το βακτηριακό γονιδίωμα είναι μεθυλιωμένο στα σημεία πρόσδεσης των νουκλεασών, οπότε προστατεύεται από τη δράση τους. Οι περισσότερες περιοριστικές ενδονουκλεάσες τέμνουν το δίκλωνο μόριο σε απόσταση μερικών ζευγών βάσεων και δημιουργούνται με αυτόν τον τρόπο δύο τμήματα με μονόκλινα άκρα που είναι συμπληρωματικά μεταξύ τους. Υπό συγκεκριμένες συνθήκες, τα μονόκλινα αυτά άκρα συνδέονται και πάλι εάν προστεθεί το ένζυμο λιγάση. Μια από τις πιο συχνές χρήσεις των περιοριστικών ενδονουκλεασών είναι η αποκοπή ενός συγκεκριμένου γονιδίου ενός τμήματος DNA και η ένθεση του σε κάποιον φορέα κλωνοποίησης. Η εξειδικευμένη δράση των ενζύμων αυτών καθώς και η ποικιλότητα τους, επιτρέπουν τη χρήση τους για την τομή οποιουδήποτε τμήματος είναι επιθυμητό.

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Περιοριστικές ενδονουκλεάσες της εταιρείας TAKARA που χρησιμοποιήθηκαν:
 1. EcoRI (1040A)
 2. BamH1(1010A)
- Συσσκευή ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας, Heraeus (Thermo)

Πειραματική διαδικασία

Για την πραγματοποίηση της διαδικασίας πέψης ενός πλασμιδίου από κάποια περιοριστική ενδονουκλεάση, είναι σημαντική η ρύθμιση της αλατότητας και του pH με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα. Αν και μερικά ένζυμα απαιτούν εξειδικευμένα ρυθμιστικά διαλύματα για να έχουν 100% της δράσης τους, στην πλειοψηφία τους οι περισσότερες περιοριστικές ενδονουκλεάσες μπορούν να δράσουν ικανοποιητικά σε ένα κοινό ρυθμιστικό διάλυμα. Αυτό δίνει τη δυνατότητα πραγματοποίησης διπλής πέψης από δύο διαφορετικές περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Σε μια τέτοια περίπτωση γίνεται χρήση κοινού ρυθμιστικού διαλύματος στο οποίο ενισχύει την δράση και των δύο ενζύμων σε ικανοποιητικό βαθμό. Η θερμοκρασία που πραγματοποιήθηκαν οι αντιδράσεις ήταν 37 °C. Για τον προσδιορισμό της ποσότητας των ενζύμων που χρησιμοποιούνται ακολουθείται ο κανόνας που ορίζει πως 1 Unit είναι η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για να κόψει 1 μg DNA σε 1 ώρα στους 37 °C.

2.2.2 Μετασχηματισμός χημειοδεκτικών βακτηριακών κυττάρων *E. coli* (στελέχος BL21)

Ως μετασχηματισμός ορίζεται η διεργασία με την οποία γίνεται πρόσληψη ξένου γενετικού υλικού που κληρονομείται και στις επόμενες γενιές από ένα βακτηριακό κύτταρο. Αυτό το γενετικό υλικό εισέρχεται στο βακτηριακό κύτταρο μέσω της βακτηριακής μεμβράνης που έχει καταστεί διαπερατή παρουσία ιόντων ασβεστίου ή β-μερκαπτοαιθανόλης. Τα κύτταρα αρχικά επωάζονται στον πάγο και στη συνέχεια υπόκεινται θερμικό σοκ για να προσληφθεί από αυτά το γενετικό υλικό. Τα πλασμίδια που εισέρχονται, περιέχουν στην αλληλουχία τους την ειδική για το βακτήριο θέση έναρξης της αντιγραφής έτσι ώστε να μπορούν να πολλαπλασιαστούν καθώς και ένα ή περισσότερα γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά, τα οποία προσδίδουν την ιδιότητα ανθεκτικότητας στα βακτηριακά κύτταρα. Αυτό το φαινόμενο, χρησιμοποιείται για την επιλογή των κλώνων που προσέλαβαν το πλασμίδιο, μιας και μόνο αυτοί θα επιβιώσουν σε συνθήκες καλλιέργειας παρουσία του συγκεκριμένου αντιβιοτικού.

Αντιδραστήρια – Όργανα

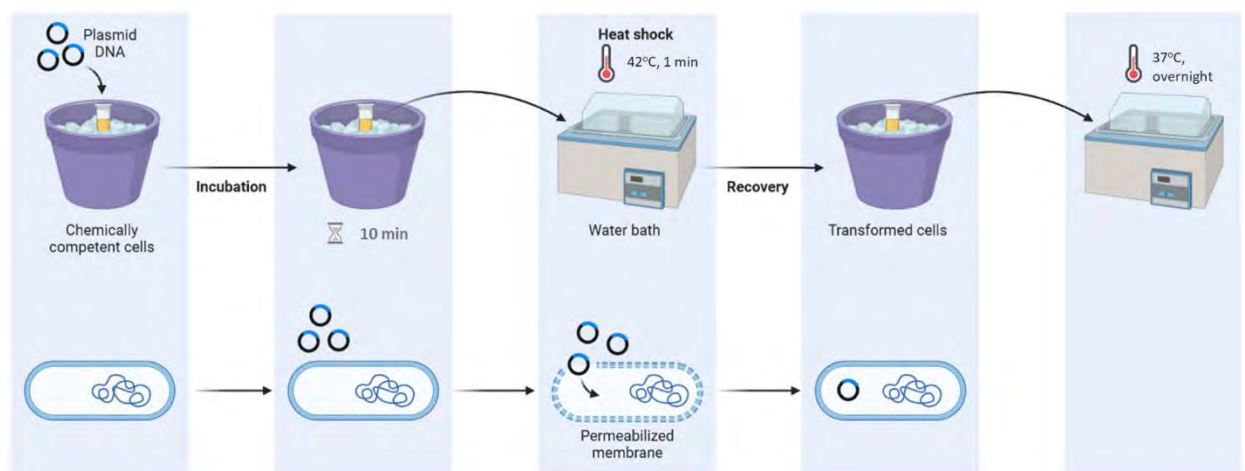
- Κύτταρα *E. coli* (BL21)
- Θρεπτικό μέσο LB (Luria-Bertani): Για 100 ml: 1 g Tryptone (1% w/v) (Biochemica, Applichem), 1 g NaCl (0,17 M) (Applichem), 0,5 g Yeast Extract (0,5% w/v) (Applichem)
- Άγαρ για βακτηριολογία (Bacto Agar, BD Biosciences)
- Διάλυμα Αμπικιλλίνης (100 mg/mL, sodium salt, Applichem)

- Διάλυμα LB-Άγαρ: 1,5% (w/v) άγαρ σε διάλυμα LB, το οποίο αποστειρώνεται στους 121°C για 30 λεπτά και κατόπιν, όταν η θερμοκρασία κυμαίνεται μεταξύ 40-50 °C προστίθεται αμπικιλίνη σε τελική συγκέντρωση 100 mg/mL.
- Αποστειρωμένα ρύγχι για συλλογή αποικιών (Greiner bio-one)
- Τρυβλία Petri για στερεές καλλιέργειες βακτηρίων (Sarstedt)
- Επωαστήρας για την καλλιέργεια βακτηρίων υπό ανάδευση (Lab Tech)

Πειραματική διαδικασία

A. Μετασηματισμός

- Απόψυξη των κυττάρων σε πάγο
- Επώαση των βακτηρίων με το πλασμιδιακό DNA
- Παραμονή 20' στον πάγο με συχνή ανακίνηση
- Θερμικό σοκ με επώαση των κυττάρων στους 42 °C για 1' και στη συνέχεια επώαση 10' στον πάγο
- Προσθήκη 1 mL προθερμασμένου θρεπτικού μέσου LB απουσία αντιβιοτικού
- Επώαση του δείγματος για 1 ώρα στους 37 °C υπό ανάδευση



Εικόνα 2.1 Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας μετασηματισμού βακτηριακών κυττάρων *E. coli* BL21.

B. Επιστροφή βακτηρίων σε τρυβλία Petri με στερεό θρεπτικό μέσο LB και κατάλληλο αντιβιοτικό (Αμπικιλίνη).

Μετά τη διαδικασία μετασηματισμού, τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται για 20' σε 4000 rpm, το υπερκείμενο απορρίπτεται και τα εναπομείναντα κύτταρα αναδιαλύονται σε όσο όγκο θρεπτικού μέσου έχει απομείνει και επιστρώνονται σε τρυβλία Petri με στερεό θρεπτικό υλικό LB-Άγαρ

(παρουσία Αμικιλλίνης 100 mg/mL). Από τα βακτήρια θα αναπτυχθούν μόνο τα μετασχηματισμένα βακτήρια που έχουν προσλάβει το πλασμιδιακό DNA αφού μόνο αυτά θα έχουν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό. Η διαδικασία επίστρωσης των κυττάρων στο στερεό υλικό πραγματοποιείται σε ασηπτικές συνθήκες με τη βοήθεια αποστειρωμένου ρύγχους. Τα κύτταρα επιστρώνονται σε όλη την επιφάνεια του τρυβλίου, το οποίο τοποθετείται στον επωαστήρα στους 37°C overnight (~16 ώρες). Την επόμενη ημέρα, απομονώνεται μονή αποικία με τη βοήθεια αποστειρωμένου ρύγχους και τοποθετείται σε 1 mL θρεπτικού μέσου LB για τη δημιουργία υγρής καλλιέργειας. Η καλλιέργεια επωάζεται υπό ανάδευση στους 37 °C overnight.

2.2.3 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης αποτελεί την πιο διαδεδομένη τεχνική διαχωρισμού, ταυτοποίησης και απομόνωσης DNA. Είναι βασισμένη στην ιδιότητα του DNA να είναι αρνητικά φορτισμένο λόγω των φωσφορικών ομάδων του σε ουδέτερο pH. Έτσι, τα μόρια DNA έχουν την ιδιότητα να κινούνται προς το θετικό ηλεκτρόδιο με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη του λογαρίθμου του αριθμού των βάσεων όταν τεθούν σε ηλεκτρικό πεδίο συγκεκριμένου δυναμικού (100-120 V). Τα μόρια DNA με μεγαλύτερο μέγεθος λοιπόν θα κινούνται με μικρότερη ταχύτητα και θα εντοπίζονται στο άνω τμήμα της πηκτής, ενώ τα μικρότερα μόρια θα κινηθούν ταχύτερα, διανύοντας έτσι πιο μεγάλη απόσταση στο ίδιο χρονικό πλαίσιο. Η βασική ιδιότητα της πηκτής έγκειται στο ότι δεν επιτρέπει την τυχαία διάχυση των μορίων, οπότε τα μόρια που έχουν διαφορετικό μέγεθος διαχωρίζονται σε «ζώνες». Οι ζώνες αυτές, γίνονται ορατές με τη βοήθεια χημικών ουσιών, όπως είναι το βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr). Οι ουσίες αυτές, παρεμβάλλονται στη διπλή έλικα και σχηματίζουν φθορίζοντα σύμπλοκα με τα μόρια DNA μετά από έκθεση σε ακτινοβολία UV. Η τεχνική της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης εφαρμόζεται για τμήματα DNA μήκους 100-17000 kb. Η πηκτή ηλεκτροφορείται σε 100 V και παρακολουθείται έτσι ώστε να μην περάσει το όριο της πηκτής η χρωστική (μπλε της βρωμοφαινόλης), η οποία κινείται γρηγορότερα από ότι το DNA κατά μήκος της πηκτής.

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Αγαρόζη (Agarose basic, Applichem)
- EtBr (10 mg/mL, Fluka)
- Ρυθμιστικό διάλυμα 10x TBE (0,9M Tris-HCl, 0,9M Boric Acid (Applichem), 0,02M EDTA).

- 6x Loading dye solution (10 mM Tris-HCl (pH=7,6) ,0,03% κυανό της βρωμοφαινόλης (Merck), 0,03% κυανό του ξυλενίου (Merck), 60% γλυκερόλη (Applichem), 60 mM EDTA (VWR International).
- Διαλύματα δείκτη μεγέθους 1 kb (500-10000 bp), 100 kb (100-1500 kb) (New England Biolabs). Τα διαλύματα περιέχουν τμήματα DNA μεγέθους 500-10000 και 100-1500 kb αντίστοιχα.
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης (Mini-PROTEAN Tetra System, Biorad)
- Συσκευή εμφάνισης (ChemiDoc Imaging System, Biorad)

Πειραματική διαδικασία

Στην παρούσα διατριβή, χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα αγαρόζης 1% (w/v) εντός ρυθμιστικού διαλύματος 1x TBE παρουσία 0,5 μg/ml EtBr. Ανάλογα με την περιεκτικότητα του διαλύματος σε αγαρόζη σχηματίζονται πόροι διαφορετικού μεγέθους στην πηκτή. Τα μόρια του DNA έχουν διαφορετικό μοτίβο μετακίνησης ανάλογα με το μέγεθος των πόρων. Έτσι, μεταβάλλοντας την περιεκτικότητα σε αγαρόζη έχουμε μεγαλύτερη αναλυτική ικανότητα στην πηκτή σε διαφορετικό εύρος μεγέθους μορίων DNA. Το διάλυμα θερμαίνεται εντός φούρνου μικροκυμάτων έτσι ώστε να μην υπάρχουν αδιάλυτα μόρια αγαρόζης. Όταν η θερμοκρασία προσεγγίσει τους 50 °C προστίθεται το βρωμιούχο αιθίδιο. Ακολουθεί αναμονή για να στερεοποιηθεί η πηκτή. Τα δείγματα DNA υπόκεινται σε διαδικασία ηλεκτροφόρησης με σταθερή τάση 100 V για 1 ώρα. Η απεικόνιση του πηκτώματος γίνεται με τη χρήση της συσκευής Chemi-doc.

Προσοχή: Το Βρωμιούχο αιθίδιο είναι πτητικό και τοξικό για τον άνθρωπο. Για τον λόγο αυτό πρέπει να χρησιμοποιούνται γάντια και γυαλιά κατά την χρήση του και να το προστίθεται στο διάλυμα αγαρόζης μόνο όταν αυτό έχει κρυώσει αρκετά.

2.2.4 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργεια μικρής έκτασης (miniprep plasmid DNA)

Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό θετικών κλώνων. Με τη χρήση αυτής της τεχνικής επιτρέπεται η απομόνωση μιας μικρής ποσότητας πλασμιδιακού DNA από υγρές καλλιέργειες μετασχηματισμένων βακτηρίων.

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Tris-HCl, pH=8, 50 mM (Applichem)
- EDTA 10 mM (VWR International)
- RNase 100 µg/mL (Sigma)
- NaOH, 200 mM (Applichem)
- SDS 1% (w/v) (Applichem)
- 3M Οξικό οξύ, pH 5
- 100% Αιθανόλη (VWR International)
- 70% (v/v) Αιθανόλη (VWR International)

Πειραματική διαδικασία

Μία αποικία μετασχηματισμένων βακτηρίων εμβολιάζεται σε 4 ml θρεπτικό υλικό παρουσία αντιβιοτικού και ακολουθεί επώαση με ανάδευση στους 37 °C για 16 περίπου ώρες. Τα βακτήρια συλλέγονται μετά από φυγοκέντρηση, και αναδιαλύονται με έντονη ανάδευση σε 100 µl διαλύματος P1 (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase, pH 8). Προστίθενται 200 µl διαλύματος P2 [διάλυμα λύσης, 200 mM NaOH, 1% (w/v) SDS] και ακολουθεί επώαση για 5 λεπτά το πολύ σε θερμοκρασία δωματίου. Παρουσία του ανιονικού απορρυπαντικού SDS και του υψηλού pH το κυτταρικό τοίχωμα και η πλασματική μεμβράνη των βακτηριακών κυττάρων λύνονται. Παράλληλα αποδιατάσσονται οι πρωτεΐνες και το DNA. Το πλασμιδιακό DNA αν και αποδιατάσσεται παραμένει συνδεδεμένο λόγω της υπερελίκωσης. Στη συνέχεια προστίθενται 150 µl διαλύματος P3 (3M Οξικό οξύ, pH 5). Η αλλαγή του pH επαναδιατάσσει το πλασμιδιακό DNA. Οι πρωτεΐνες και το χρωμοσωμικό DNA κατακρημνίζονται. Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 20000 x g για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στο υπερκείμενο προστίθεται 1 mL παγωμένης (-20 °C) αιθανόλης υψηλής καθαρότητας η οποία κατακρημνίζει το πλασμιδιακό DNA και ακολουθεί σύντομη ανάδευση. Στη συνέχεια γίνεται φυγοκέντρηση στις 20000 x g για 15 λεπτά και απομακρίνεται το υπερκείμενο. Το ίζημα (DNA) ξεπλένεται με 1 mL αιθανόλη 70% (v/v) και, μετά από εξάτμιση του διαλύτη (με ξήρανση υπό κενό), αναδιαλύεται σε 20 µL H₂O.

2.2.5 Κρυοσυντήρηση βακτηρίων σε διάλυμα γλυκερόλης (Cryopreservation)

Υπάρχει η δυνατότητα αποθήκευσης της πλειονότητας των βακτηριακών στελεχών για μεγάλα χρονικά διαστήματα (ως 2 χρόνια) στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ και για ακόμη περισσότερα χρόνια στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Στους $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ υπάρχει η δυνατότητα αποθήκευσης υγρής καλλιέργειας μέχρι και 7 ημέρες καθώς και τρυβλίου με αποικίες για περίπου έναν μήνα.

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Γλυκερόλη 99% (v/v) (Applichem)
- Κρυοπροστατευτικοί αποστειρωμένοι σωλήνες φύλαξης κυττάρων, NUNC

Πειραματική διαδικασία

Η κρυοσυντήρηση των βακτηρίων πραγματοποιείται με προσθήκη 150 μL αποστειρωμένης Γλυκερόλης σε 850 μL βακτηριακής καλλιέργειας που έχει τοποθετηθεί σε πάγο σε ειδικούς αποστειρωμένους κρυοπροστατευτικούς σωλήνες (85% (v/v) LB και 15% (v/v) Γλυκερόλη) και μεταφορά τους στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2.6 Έκφραση της πρωτεΐνης *LdSNXi* από βακτηριακό στέλεχος *E. coli* BL21 που φέρει το πλασμίδιο pGEX-4T1-*ldsni*

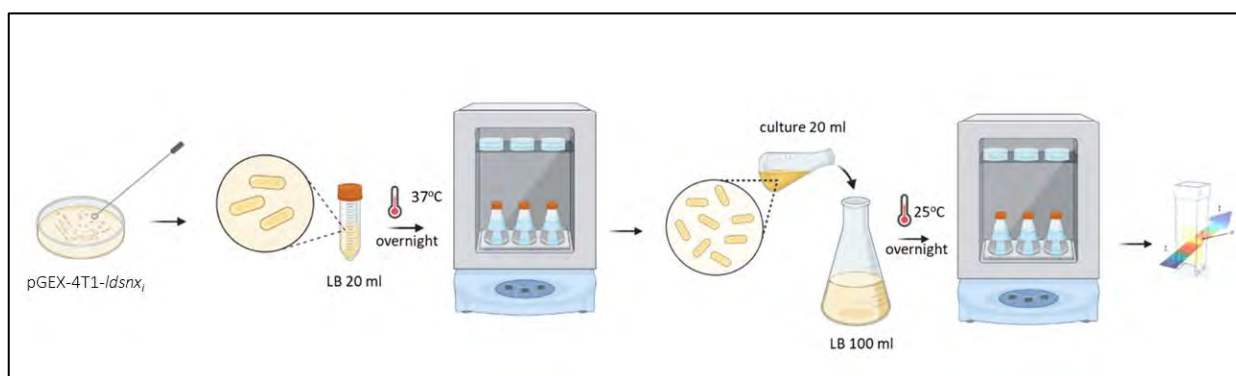
Για την πραγματοποίηση ετερόλογης έκφρασης της *LdSNXi* σε βακτήρια με μοριακή ετικέτα Glutathione transferase (GST) χρησιμοποιήθηκε ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pGEX-4T1-*ldsni*; με ένθεση του γονιδίου που κωδικοποιεί την *LdSNXi* στη θέση αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης EcoRI, σε ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης με την GST, ώστε να προκύψει η ανασυνδυασμένη rGST- *LdSNXi*. (Βλ. Πρόλογος)

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Θρεπτικό μέσο LB
- Διάλυμα Αμπικιλίνης 100 mg/mL (Applichem)
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος, Jouan CR3i multifunction (Thermo)
- Μικροφυγόκεντρος, Eppendorf 5417R
- Ισοπρόπυλο- β -D θειογαλακτοπυρανόζη (IPTG) (Applichem)

Πειραματική διαδικασία

Η διαδικασία ξεκινά με την ανάπτυξη 20 mL βακτηριακής καλλιέργειας *E. coli BL21* pGEX-4T1-*ldsnx_i* c1 2.4 εντός θρεπτικού μέσου LB με επώαση υπό ανάδευση στους 37 °C overnight. Ακολουθεί αραιώση της αρχικής καλλιέργειας σε 100 ml LB και επώαση υπό ανάδευση στους 25 °C overnight. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 600 nm (OD₆₀₀) έτσι ώστε να προσδιοριστεί ο αριθμός των κυττάρων εντός της καλλιέργειας. Όταν η τιμή OD₆₀₀ βρίσκεται μεταξύ 0,4 - 0,6 και τα κύτταρα βρίσκονται στην εκθετική φάση ανάπτυξης ακολουθεί η προσθήκη του επαγωγέα ισοπρόπυλο-β-D θειογαλακτοπυρανόζη (IPTG) σε τελική συγκέντρωση 0,6 mM. Όταν προστεθεί ο επαγωγέας, τα κύτταρα επωάζονται στους 25 °C για 3 ώρες υπό ανάδευση. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 4000 rpm για 30 min στους 4 °C και λύση των βακτηριακών κυττάρων ή αποθήκευση της βακτηριακού ιζήματος στους -80 °C.



Εικόνα 2.2 Σχηματική αναπαράσταση διαδικασίας καλλιέργειας *E. coli BL21* pGEX-4T1-*ldsnx_i* c1 2.4 εντός θρεπτικού μέσου LB.

2.2.7 Λύση μετασχηματισμένων βακτηριακών κυττάρων *E. coli BL21*

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Πρωτεολυτικοί αναστολείς (stock 100x, Sigma S8830)
- Λυσοζύμη (stock 100 mg/mL, Sigma)
- 10x PBS (Biosera)
- Triton-X-100 (Sigma)
- Συσκευή Υπερήχων, Virsonic 475 Ultrasonic Cell Disrupter (Virtis)

Πρωτόκολλο A

Πειραματική διαδικασία

Αρχικά πραγματοποιείται απόψυξη των κυττάρων (pellet προερχόμενο από 10 ml καλλιέργεια *E. coli BL21* pGEX-4T1-*ldsnx_i*) από τους -80 °C. Στη συνέχεια προστίθενται 10 μL

πρωτεολυτικοί αναστολείς (αναλογία 1:100), 10 μ L λυσοζύμη (αναλογία 1:100) και 1 mL dH₂O και το ίζημα αναδιαλύεται και επωάζεται για 30 λεπτά εντός του πάγου με συχνή ανάδευση. Έπειτα, πραγματοποιούνται 5-8 κύκλοι υπερήχων (max intensity, large probe) 1 min με ενδιάμεση παύση του 1 min στον πάγο, μέχρι το εναιώρημα να αποκτήσει αυξημένο ιξώδες. Προστίθενται στη συνέχεια 100 μ L 10x PBS και 120 μ L Triton-X (10% v/v διάλυμα σε 1x PBS) και το διάλυμα αναδεύεται καλά. Ακολουθεί επώαση στους 4 °C υπό ανάδευση. Τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται στα 10,000 x g για 30 λεπτά στους 4 °C.

Πρωτόκολλο Β

Πειραματική διαδικασία

Αρχικά πραγματοποιείται απόψυξη των κυττάρων (pellet προερχόμενο από 10 ml καλλιέργεια *E. coli* BL21 pGEX-4T1-*ldsnx_i*) από τους -80 °C. Στη συνέχεια προστίθενται 1 mL 0,3x PBS, 10 μ L πρωτεολυτικοί αναστολείς (αναλογία 1:100) και 10 μ L λυσοζύμης (αναλογία 1:100) και τα κύτταρα επωάζονται στους 37 °C για 10 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρωση σε 4000 rpm για 20 λεπτά στους 4 °C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται, το ίζημα αναδιαλύεται σε 1 mL παγωμένο dH₂O και επωάζεται για 30 λεπτά εντός του πάγου με συχνή ανάδευση. Έπειτα, πραγματοποιούνται 5-8 κύκλοι υπερήχων (max intensity, large probe) 1 min με ενδιάμεση παύση του 1 min στον πάγο, μέχρι το εναιώρημα να αποκτήσει αυξημένο ιξώδες. Προστίθενται στη συνέχεια 100 μ L 10x PBS και 120 μ L Triton-X [10% (v/v) διάλυμα σε 1x PBS] και το διάλυμα αναδεύεται καλά. Ακολουθεί επώαση στους 4°C υπό ανάδευση. Τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται στα 10,000 x g για 30 λεπτά στους 4 °C.

2.2.8 Απομόνωση και καθαρισμός της GST-LdSNXi από βακτήρια

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Pellet βακτηριακών κυττάρων που έχουν υποστεί λύση (βλ παράγραφο «Λύση μετασχηματισμένων βακτηριακών κυττάρων *E. coli* BL21)
- Σφαιρίδια αγαρόζης (Protino Glutathione Agarose 4B, Macherey-Nagel)
- Διάλυμα εξισορρόπησης
 1. Triton-X [0,5% (v/v) διάλυμα σε 1x PBS] (Applichem)
- Διάλυμα έκπλυσης
 1. 1x PBS (Biosera)
- Διάλυμα έκλουσης

1. 50 mM TrisHCl PH=8 (Appllichem)
 2. 10 mM Glutathione (Sigma)
- Περιστροφικός αναδευτήρας, Spectra Movil ROD
 - Επιτραπέζια φυγόκεντρος, Jouan CR3i multifunction, Thermo
 - Μικροφυγόκεντρος, Eppendorf 541 7R
 - Μαγνητικός αναδευτήρας SB162 (Stuart)

Πειραματική διαδικασία

Αρχικά η διαδικασία ξεκινάει με την προετοιμασία των σφαιριδίων αγαρόζης (100 μ L slurry, 75% suspension per mL). Πραγματοποιείται μια πλύση με dH₂O (10 bed volumes) που ακολουθείται από φυγοκέντρηση 500 x g για 5 λεπτά και δύο αντίστοιχες πλύσεις με 1x PBS (10 bed volumes). Στη συνέχεια έπεται η διαδικασία της πρόσδεσης της πρωτεΐνης με ετικέτα GST στα σφαιρίδια αγαρόζης που φέρουν γλουταθιόνη (προσδέτης στην GST), όπου τα σφαιρίδια αγαρόζης επωάζονται στο διαλυτό κλάσμα βακτηριακών κυττάρων που έχουν εκφράσει την προς απομόνωση πρωτεΐνη για 2 ώρες στους 4 °C υπό ανάδευση. Στη συνέχεια ακολουθεί φυγοκέντρηση 500 x g για 5 λεπτά και 3x πλυσίματα με 1x PBS (10 bed volumes). Στη συνέχεια πραγματοποιείται το στάδιο της έκλουσης (elution) κατά το οποίο τα σφαιρίδια αγαρόζης με γλουταθιόνη στα οποία είναι προσδεμένη η προς απομόνωση πρωτεΐνη επωάζονται σε διάλυμα έκλουσης (1 bed volume, 50 mM Tris base, 10 mM glutathione, pH adjustment to 8) για 5-10 λεπτά (RT) έτσι ώστε να απελευθερωθεί η πρωτεΐνη που έχει ετικέτα GST και φυγοκεντρούνται 500 x g για 5 λεπτά. Η διαδικασία της έκλουσης επαναλαμβάνεται δύο φορές.

2.2.9 Λύση ευκαρυωτικών κυττάρων (~10⁸ κύτταρα)

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Πρωτεολυτικοί αναστολείς (stock 100x, Sigma S8830)
- 10x PBS (Biosera)
- Triton-X [0,5% (v/v) διάλυμα σε 1x PBS] (Appllichem)
- Συσκευή Υπερήχων, Virsonic 475 Ultrasonic Cell Disrupter (Virtis)

Πειραματική διαδικασία

Αρχικά πραγματοποιείται απόψυξη των κυττάρων από τους -80 °C. Στη συνέχεια προστίθενται 2 μ L πρωτεολυτικοί αναστολείς (αναλογία 1:1000) και 200 μ L dH₂O και τα κύτταρα αναδεύονται

πολύ καλά με τη χρήση vortex. Ακολουθεί προσθήκη 22,2 μL 10x PBS και 22,2 μL PBS 1% (v/v) Triton-X-100 και επώαση για 1 ώρα στους 4 °C υπό ανάδευση. Τέλος, τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται στα 10,000 x g για 30 λεπτά στους 4 °C.

2.2.10 Pull-Down Assay

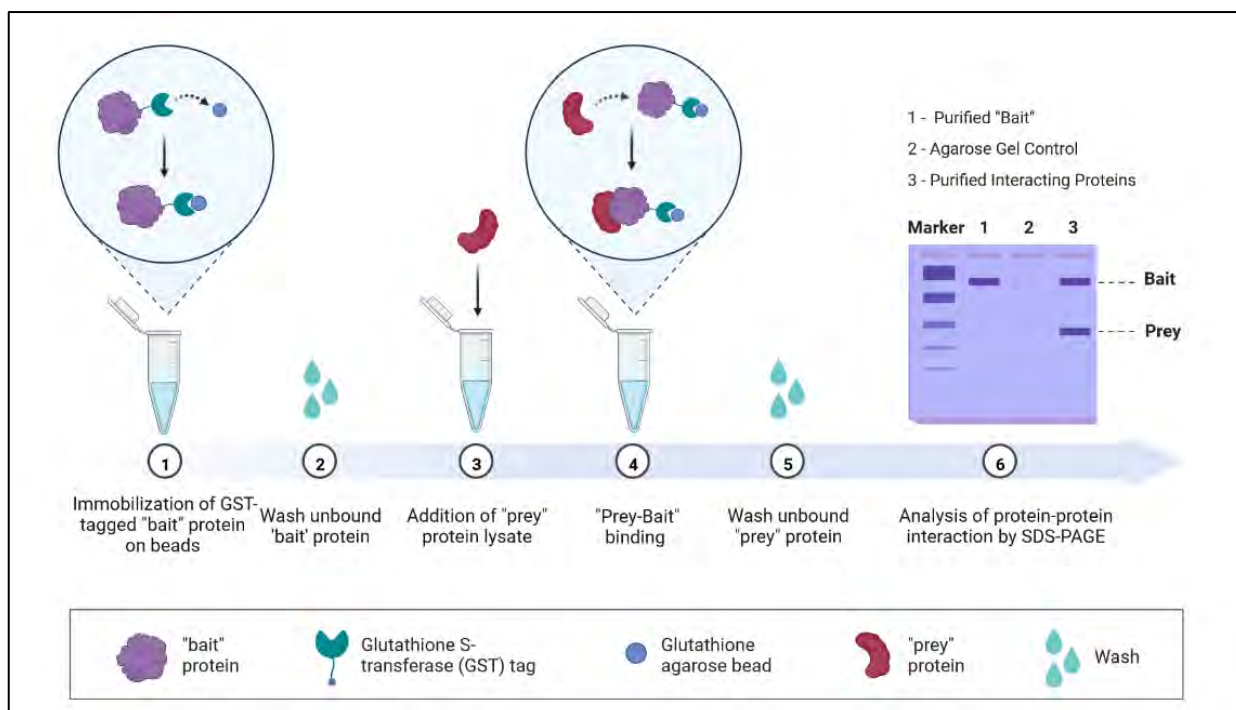
Οι αναλύσεις Pull-down περιλαμβάνουν την απομόνωση ενός συμπλόκου πρωτεΐνης μέσω της προσκόλλησης του συμπλόκου σε σφαιρίδια χρωματογραφικού υλικού. Οι πρωτεΐνες συνδέονται στα σφαιρίδια ειδικά με ένα συστατικό του συμπλόκου, είτε μέσω μιας ετικέτας συγγένειας (π.χ. GST, ιστιδίνης, πρωτεΐνης δέσμευσης μαλτόζης, κ.λπ.) είτε μέσω αντισώματος. Οι αναλύσεις pull-down χρησιμοποιούνται συχνά για την απομόνωση πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων που βρίσκονται σε μικρές ποσότητες (μg), κυρίως με σκοπό την αναγνώριση μεμονωμένων υπομονάδων. Έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση υλικού για περιορισμένες λειτουργικές μελέτες πρωτεϊνών. Τα συστατικά του συμπλόκου που προσδένονται, συχνά αναλύονται τελικά με φασματομετρία μάζας για την αναγνώριση των υπομονάδων. Οι αναλύσεις pull-down είναι σημαντικά εργαλεία για τη χαρτογράφηση δικτύων αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε παγκόσμια κλίμακα για τη χαρτογράφηση των αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης σε αρκετούς οργανισμούς (π.χ. σακχαρομύκητας, *E. coli*, *C. elegans*). Τα ψευδώς θετικά είναι μια σημαντική ανησυχία που σχετίζεται με τη χαρτογράφηση των αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης σε παγκόσμια κλίμακα. Επομένως, εκτός από τα σχετικά πειράματα ελέγχου, είναι χρήσιμο να πραγματοποιούνται και ανεξάρτητα πειράματα σύνθετης απομόνωσης για την επικύρωση των δεδομένων των pull down assays σε περιβάλλον που μοιάζει περισσότερο με το *in vivo* μικροπεριβάλλον της πρωτεΐνης.

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Όμοια με τα υλικά των παραγράφων 2.7, 2.8 και 2.9.

Πειραματική διαδικασία

Αρχικά, ακολουθείται το πρωτόκολλο της παραγράφου 2.8 για βακτήρια που παράγουν τις πρωτεΐνες GST-LdSNX1 και GST μέχρι το στάδιο πρόσδεσης της πρωτεΐνης στα σφαιρίδια αгарόζης. Στη συνέχεια, προστίθενται τα σφαιρίδια αгарόζης με την προσδεδεμένη πρωτεΐνη σε διαλυτό κλάσμα ανθρώπινων κυττάρων THP1 και λείσμανιακών *L. donovani* LG13 και επωάζονται για 3 ώρες στους 4 °C υπό ανάδευση. Στη συνέχεια, ακολουθεί φυγοκέντρηση 500 x g για 5 λεπτά και τρία πλυσίματα με 1x PBS.



Εικόνα 2.3 Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων της ανάλυσης Pull-Down.

2.2.11 Ανοσοαποτύπωση Western (Western Blot)

2.2.11.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου με SDS (SDS-PAGE)

Με τη μέθοδο SDS-PAGE γίνεται διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση τη διαφορετική μοριακή μάζα τους. Το παρασκεύασμα της πρωτεΐνης αντιδρά με περίσσεια μίας διαλυτής θειόλης (β-μερκαπτοαιθανόλη) και SDS (που βρίσκονται στο διάλυμα φόρτωσης). Η β-μερκαπτοαιθανόλη ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς των πρωτεϊνών, ενώ το απορρυπαντικό SDS καταστρέφει τους μη ομοιοπολικούς δεσμούς και αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες έτσι ώστε να προκύψουν οι υπομονάδες τους ως ανιοντικές αλυσίδες πολυπεπτιδίων. Το SDS δίνει ένα σταθερό λόγο αρνητικού φορτίου προς μάζα στις πολυπεπτιδικές αλυσίδες, ενώ η πηκτή δρα σαν μοριακό “κόσκινο”. Έτσι, η σχετική κινητικότητα κάθε πολυπεπτιδικής αλυσίδας είναι λογαριθμική συνάρτηση του μοριακού βάρους της. Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου σχηματίζεται με αντίδραση συμπολυμερισμού ακρυλαμιδίου και N,N'-μεθυλενο-δισ-ακρυλαμιδίου (αντιδραστήριο διασύνδεσης cross linker). Ο πολυμερισμός γίνεται παρουσία υπερθειικού αμμωνίου, που παρέχει ελεύθερες ρίζες, και TEMED, που καταλύει την αντίδραση σχηματισμού των ελευθέρων ριζών. Οι ελεύθερες ρίζες καταλύουν την αντίδραση πολυμερισμού και δημιουργούν την πηκτή. Η ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου παρουσία SDS (SDS-PAGE) είναι μία μη συνεχής ηλεκτροφόρηση πηκτής αφού η πηκτή αποτελείται από δύο τμήματα: την πηκτή επιστοίβασης

και την πηκτή διαχωρισμού. Ο ρόλος της πηκτής επιστοίβασης, που έχει μεγαλύτερο μέγεθος πόρων και μικρότερο pH από την πηκτή διαχωρισμού, είναι να συσσωρεύει τις πρωτεΐνες σε μία στενή ζώνη, ώστε να εισέλθουν στην πηκτή διαχωρισμού ως μία λεπτή ταινία και να επιτευχθεί καλύτερος διαχωρισμός. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε διάλυμα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών με σταθερή τάση 200 V σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την ηλεκτροφόρηση, μπορεί να γίνει: α) ανίχνευση των διαχωρισμένων πρωτεϊνών με χρώση με Coomassie Blue. Η χρώση αυτή γίνεται σε ελαφρώς όξινο περιβάλλον, που ευνοεί τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στη χρωστική και τις αμινομάδες των πρωτεϊνών, ενώ αναπτύσσονται και αλληλεπιδράσεις χρωστικής-πρωτεϊνών μέσω δυνάμεων Vander Waals, β) μεταφορά των διαχωρισμένων πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Η πηκτή πολυακρυλαμίδιου τοποθετείται σε ειδική διάταξη που δημιουργεί ηλεκτρικό πεδίο σε όλη την επιφάνεια της. Στους πίνακες 3.2 και 3.3 παρουσιάζονται οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των πηκτών διαχωρισμού και επιστοίβασης, αντίστοιχα.

Αντιδραστήρια – Όργανα

-Πηκτή διαχωρισμού [10% ή 12% (w/v)], pH 8,8

- Υπερκάθαρο νερό
- Ακρυλαμίδιο, Applichem
- N,N'-μεθυλενο-δις-ακρυλαμίδιο, Sigma
- Tris-HCl 1,5 M (Applichem)
- SDS 10% (w/v) (Applichem)
- Υπερθεικό αμμώνιο (APS) 10% (w/v), BioRad
- Τετραμεθυλενο-αιθυλενο-διαμίνη (TEMED), BioRad

-Πηκτή επιστοίβασης [4% (w/v)], pH 6,8

- Υπερκάθαρο νερό
- Ακρυλαμίδιο (Applichem)
- N,N'-μεθυλενο-δις-ακρυλαμίδιο (Sigma)
- Tris-HCl 1,0 M (Applichem)
- SDS 10% w/v (Applichem)
- APS 10% w/v (BioRad)
- TEMED (BioRad)

-Διάλυμα ηλεκτροφόρησης (electrode buffer, pH 8,3), 1x, 500 mL

- Trisma base 1,5 g (Applichem)

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

B) Σύσταση διαλύματος για 0,75 mm πηκτή πολυακρυλαμιδίου [10 % (w/v)]			
Separating gel [V=5 ml]		Stacking gel [V= 3 ml]	
dH ₂ O	1,9 mL	dH ₂ O	2,1 mL
30% (w/v) acrylamide mix	1,7 mL	30% (w/v) acrylamide mix	0,5 mL
1,5M Tris [PH=8,8]	1,3 mL	1,0 M Tris [PH=6,8]	0.38 mL
10% (w/v) SDS	0,05 mL	10% (w/v) SDS	0.03 mL
10% (w/v) APS	0,05 mL	10% (w/v) APS	0,03 mL
TEMED	0,004 mL	TEMED	0,003 mL

A) Σύσταση διαλύματος για 1,5 mm πηκτή πολυακρυλαμιδίου [10 % (w/v)]			
Separating gel [V=10 ml]		Stacking gel [V= 3 ml]	
dH ₂ O	4 mL	dH ₂ O	2,1 mL
30% (w/v) acrylamide mix	3,3 mL	30% (w/v) acrylamide mix	0,5 mL
1,5M Tris [PH=8,8]	2,5 mL	1,0 M Tris [PH=6,8]	0.38 mL
10% SDS	0,1 mL	10% (w/v) SDS	0.03 mL
10% (w/v) APS	0,1 mL	10% (w/v) APS	0,03 mL
TEMED	0,004 mL	TEMED	0,003 mL

Πίνακας 2.1: Σύσταση διαλυμάτων για κατασκευή 10% (w/v) πηκτής πολυακρυλαμιδίου **A)** 1,5 mm **B)** 0,75 mm.

Πειραματική διαδικασία

Αρχικά, το διάλυμα της πηκτής διαχωρισμού τοποθετείται στο χώρο μεταξύ των δύο γυάλινων πλακών της συσκευής SDS-PAGE, επικαλύπτεται με μία στοιβάδα νερού και αφήνεται να πολυμεριστεί. Έπειτα, αποχύνεται το νερό και προστίθεται το διάλυμα της πηκτής επιστοίβασης, που έχει ήδη προετοιμαστεί, μέχρι να πληρωθεί τελείως ο χώρος ανάμεσα στις γυάλινες πλάκες και τοποθετείται η ειδική κτένα, με προσοχή, ώστε να μην εγκλωβίσει φυσαλίδες αέρα. Αφού πολυμεριστεί η πηκτή επιστοίβασης, απομακρύνεται η κτένα. Τα φρεάτια που έχουν δημιουργηθεί είναι οι θέσεις, στις οποίες θα τοποθετηθούν στη συνέχεια τα δείγματα, στα οποία έχει προστεθεί ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης και έχουν υποστεί βρασμό (95 °C, 5 λεπτά). Στη συνέχεια, πραγματοποιείται η τοποθέτηση των δειγμάτων και με το ρυθμιστικό διάλυμα

ηλεκτροφόρησης πληρούται η άνω μονάδα της συσκευής ηλεκτροφόρησης, επομένως και τα φρεάτια. Εφόσον δεν παρατηρηθούν διαρροές, τοποθετείται το υπόλοιπο ρυθμιστικό διάλυμα στην κάτω μονάδα της συσκευής. Στα φρεάτια της πηκτής επιστοιβάσης τοποθετούνται μέχρι 25 μL (για πάχος 0,75 mm) ή μέχρι 40 μL (για πάχος 1,5 mm) από κάθε δείγμα και 12 μL από τα πρότυπα. Αναφορικά με την ηλεκτροφόρηση, συνδέεται το ηλεκτρόδιο της άνω μονάδας της συσκευής με την κάθοδο (-) και το ηλεκτρόδιο της κάτω μονάδας με την άνοδο (+) της συσκευής παροχής ηλεκτρικού ρεύματος και η τάση ρυθμίζεται στα 200 V και η ηλεκτροφόρηση λαμβάνει χώρα για 45 λεπτά. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, αποσυνδέονται τα ηλεκτρόδια από τους πόλους της πηγής ρεύματος και απομακρύνεται η πηκτή από τη συσκευή. Διαχωρίζονται οι δύο πλάκες με προσοχή, αποκολλάται η πηκτή και τοποθετείται στο διάλυμα της χρωστικής για 16 ώρες, υπό ανακίνηση. Στη συνέχεια, γίνεται αποχρωματισμός του υποβάθρου της πηκτής με διαδοχικές εκπλύσεις σε διάλυμα αποχρωματισμού υπό ανακίνηση και τελικά τοποθετείται σε υπερκάθαρο νερό και οξεικό οξύ 4% (v/v) για να διατηρηθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα. Έτσι γίνεται η εμφάνιση των πρωτεϊνών στην πηκτή.

2.2.11.2 Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Για τη μεταφορά πρωτεϊνών από την πηκτή πολυακρυλαμιδίου στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης χρησιμοποιείται διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς πρωτεϊνών. Τα αρνητικά φορτισμένα πρωτεϊνικά μόρια μετακινούνται προς τον θετικό πόλο της συσκευής προσκολλώμενα στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης που παρεμβάλλεται και συγκρατεί ειδικά τις πρωτεΐνες με υδρόφοβες και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις (Burnette, W.N., 1981). Ετοιμάζεται μία «κατασκευή» με την εξής σειρά: α) ένα λεπτό φύλλο σφουγγαριού, β) δύο φύλλα διηθητικού χαρτιού Whatmann 3MM, γ) η πηκτή πολυακρυλαμιδίου, δ) ένα κομμάτι νιτροκυτταρίνης στο μέγεθος της πηκτής, ε) δύο φύλλα διηθητικού χαρτιού και στ) ένα λεπτό φύλλο σφουγγαριού.

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Πηκτή πολυακρυλαμιδίου (βλ. παράγραφο 2.11.1)
- Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Amersham ή Macherey-Nagel)
- Διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς πρωτεϊνών (transfer buffer)
 1. Trisma base 3 g (Applichem)
 2. Γλυκίνη 14 g (Applichem)
 3. Μεθανόλη 20% (v/v) (Applichem)

- Διάλυμα χρώσης νιτροκυτταρίνης Ponceau-S
 1. Ponceau-S, 1 mg/mL (Sigma)
 2. Οξικό οξύ (CH₃COOH) 7% (v/v), υψηλού βαθμού καθαρότητας (Applichem)
- Λεπτά σφουγγάρια
- Χαρτί διήθησης Whatmann 3MM
- Συσκευή μεταφοράς πρωτεϊνών σε νιτροκυτταρίνη Mini Trans-Blot (BioRad)

Πειραματική διαδικασία

- Το σύστημα τοποθετείται στην ειδική συσκευή μεταφοράς έτσι, ώστε η νιτροκυτταρίνη να βρίσκεται προς την πλευρά της ανόδου
- Η μεταφορά πρωτεϊνών πραγματοποιείται με ρεύμα σταθερής έντασης 300 mA για μία ώρα και 30 λεπτά (*Ο χρόνος αυτός διαφέρει ανάλογα με το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης*).
- Μετά τη μεταφορά, η μεμβράνη χρωματίζεται με διάλυμα χρωστικής Ponceau-S και ξεπλένεται με υπερκάθαρο νερό για να απομακρυνθεί η περίσσεια της χρωστικής και να γίνουν ορατές οι ζώνες των πρωτεϊνών.

2.2.11.3 Ανοσοενζυμική ανίχνευση πρωτεϊνών

Η ανίχνευση της πρωτεΐνης στη μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης γίνεται συνήθως με τη μέθοδο της 3',3'-διαμινοβενζιδίνης (για πρωτεΐνες απομονωμένες από βακτήρια) και με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας (electrochemiluminescence ή electrogenerated chemiluminescence (ECL), για πρωτεΐνες απομονωμένες από τα παράσιτα. Η πρώτη μέθοδος είναι λιγότερο ευαίσθητη και χρησιμοποιείται όταν έχουμε μεγαλύτερες ποσότητες πρωτεΐνης προς ανίχνευση στη μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης. Η μεμβράνη, μετά το πέρας της ηλεκτρομεταφοράς, επώαζεται με αντίσωμα που αναγνωρίζει την προς ανίχνευση πρωτεΐνη και, στη συνέχεια, επώαζεται με δεύτερο αντίσωμα συζευγμένο με το ένζυμο της υπεροξειδάσης HRP (Horse Radish Peroxidase), το οποίο αναγνωρίζει το πρώτο αντίσωμα. Υποστρώματα της HRP αποτελούν, στην πρώτη περίπτωση, το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂) και η 3',3'-διαμινοβενζιδίνη, η οποία οξειδώνεται δίνοντας ένα σκούρο καφέ χρώμα που μπορεί να ενισχυθεί με την προσθήκη χλωριδίου του νικελίου. Για 10 mL διαλύματος DAB, σε 10 mL PBS 1X προστίθενται 100 μL DAB (η 3',3'-διαμινοβενζιδίνη διατηρείται διαλυμένη σε υπερκάθαρο νερό, στους -20 °C, σε συγκέντρωση 0,7 mg/mL), 3 μL υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂) 30% (v/v) και 0,3% (w/v) NiCl₂·6H₂O. Η χημειοφωταύγεια, για τη δεύτερη περίπτωση, είναι ένα είδος φωταύγειας που

παράγεται κατά τη διάρκεια χημικής αντίδρασης, στην οποία δημιουργούνται ενδιάμεσα προϊόντα που διεγείρονται και αποδιεγειρόμενα, εκπέμπουν ένα φωτόνιο. Η διέγερση μπορεί να προκληθεί από μεταφορά ηλεκτρονίων σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής, όπως στην περίπτωση του μορίου της 3-αμινοφθαλδραζίνης που οξειδώνεται (μετατρέπεται σε 3-αμινοφθαλικό οξύ) από το H_2O_2 και διεγείρεται οπότε, με τη χρήση φωτογραφικών μεθόδων και πιο συγκεκριμένα με X-ray ακτίνες, οπτικοποιείται η παρουσία της υπεροξειδάσης και κατ' επέκταση της πρωτεΐνης που μελετάται.

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Amersham, Macherey-Nagel)
- PBS (βλ. παράγραφο 3.2)
- BS (Applichem)
- Απορρυπαντικό Tween-20 (Applichem)
- Πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού (καθαρισμένο) έναντι της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης MBP-LdSNXi (παρασκευάστηκε στο εργαστήριο στο πλαίσιο της διδακτορικής διατριβής της Αμαλίας Παπαδάκη)
- Συζευγμένα με υπεροξειδάση αντισώματα αίγας έναντι των IgG ανοσοσφαιρινών κουνελιού και ποντικού, Pierce (41460 και 31230 αντίστοιχα)
- Διάλυμα 3',3'-διαμινοβενζιδίνης (DAB)
 1. PBS 1X
 2. DAB 1:1000, Sigma
 3. Χλωρίδιο του νικελίου(II) ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$), Merck
 4. Διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) 30% (v/v), (Applichem)
- Διάλυμα ECL
 1. Υπερκάθαρο νερό (για τα διαλύματα 1 και 2) με πέρασμα από στήλες ιονανταλλαγής και αντίστροφης όσμωσης
 2. Tris-HCl 1 M, pH 8,8 (περιέχεται στο διάλυμα 1 και 2) (Applichem)
 3. Κουμαρικό οξύ (περιέχεται στο διάλυμα 1) (Sigma)
 4. 3-αμινοφθαλδραζίνη (Luminol), $C_8H_7N_3O_2$ (περιέχεται στο διάλυμα 1) (Sigma)
 5. Διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου 30% (v/v) (περιέχεται στο διάλυμα 2) (Applichem)
- Συσκευή εμφάνισης (ChemiDoc Imaging System, Biorad)

Πειραματική διαδικασία

Αρχικά πραγματοποιείται επώαση της μεμβράνης της νιτροκυτταρίνης στην οποία έχουν μεταφερθεί οι πρωτεΐνες σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα με TBST + 5% (w/v) BSA, ώστε να εμποδιστεί η μη ειδική προσκόλληση των αντισωμάτων. Στη συνέχεια, προστίθεται το πρώτο αντίσωμα. Η επώαση με το πρώτο αντίσωμα πραγματοποιείται σε TBST + 2,5% (w/v) BSA στην κατάλληλη αραιώση σε θερμοκρασία δωματίου για 1-2 ώρες, υπό ανακίνηση ή στους 4 °C για 16 ώρες (για πιο ειδική πρόσδεση). Μετά, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης υπόκειται σε διαδοχικές εκπλύσεις με PBS που περιέχει 0,1% (v/v) Tween-20 (3×5 λεπτά) και στη συνέχεια προστίθεται το δεύτερο αντίσωμα. Η επώαση της μεμβράνης με δεύτερο αντίσωμα αντι-IgG γίνεται σε διάλυμα TBST + 2,5% (w/v) BSA στην κατάλληλη αραιώση (1:10000) σε θερμοκρασία δωματίου για 1-2 ώρες, υπό ανάδευση. Το αντίσωμα αυτό φέρει ομοιοπολικά συνδεδεμένο το ένζυμο της υπεροξειδάσης (DAKO Code No PO214). Ακολουθούν στη συνέχεια δύο διαδοχικές εκπλύσεις της μεμβράνης της νιτροκυτταρίνης με TBST (5 λεπτά) και, τέλος, με PBS 1X. Αναφορικά με την εμφάνιση ποικίλει ανάλογα με την μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε:

Μέθοδος με δευτερογενές φθορίζον αντίσωμα: Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης τοποθετείται στη συσκευή απεικόνισης ChemiDoc.

Μέθοδος DAB: Προστίθεται στην νιτροκυτταρίνη το διάλυμα εμφάνισης και αναμένεται η ανάπτυξη του χρώματος. Η πορεία της αντίδρασης διακόπτεται με έκπλυση με νερό βρύσης και στέγνωμα.

Μέθοδος ECL: Σε θάλαμο εμφάνισης, α) αναμιγνύονται τα διαλύματα 1 και 2 και μία ποσότητα του υγρού απλώνεται στη μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης και αφήνεται για 2 λεπτά, ώστε να ολοκληρωθεί η αντίδραση, έπειτα τοποθετείται στη συσκευή απεικόνισης ChemiDoc.

2.2.11.4 Αποδέσμευση αντισωμάτων και επαναχρησιμοποίηση της μεμβράνης

Αντιδραστήρια – Όργανα

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

Πειραματική διαδικασία

Η ανάπτυξη τεχνικών ανίχνευσης των αντιγόνων στα ανοσοαποτυπώματα που βασίζονται στη μέθοδο της χημειοφωταύγειας παρέχει τη δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης των μεμβρανών με τη χρήση διαφορετικών αντισωμάτων καθώς δεν έχει πραγματοποιηθεί αλλοίωση της μεμβράνης

αλλά και των μεταφερόμενων σε αυτήν αντιγόνων. Κατά τη διαδικασία της αποδέσμευσης των αντισωμάτων (stripping), η μεμβράνη επωάζεται σε διάλυμα γλυκίνης, pH 2,6. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η διάσπαση του συμπλόκου αντιγόνου-αντισώματος και η απελευθέρωση των αντισωμάτων από την μεμβράνη. Οι μοναδικές πρωτεΐνες που παραμένουν στη μεμβράνη είναι εκείνες, οι οποίες είναι ισχυρά δεσμευμένες λόγω των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων κατά την ηλεκτρομεταφορά τους. Στη συνέχεια, η μεμβράνη εκπλένεται και πραγματοποιείται εκ νέου επώασή της με PBS + 5% (w/v) άπαχο γάλα σε σκόνη + 0,05% (v/v) Tween-20 για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να εμποδιστεί η μη ειδική προσκόλληση των αντισωμάτων και ακολουθείται η διαδικασία όπως περιγράφηκε στην προηγούμενη παράγραφο

2.2.12 Silver Stain πηκτής πολυακρυλαμιδίου

Η χρώση Silver Stain αποτελεί μια από τις πιο γρήγορες και ευαίσθητες μεθόδους για την ανίχνευση πρωτεϊνών που βρίσκονται σε πολύ μικρή ποσότητα στην πηκτή πολυακρυλαμίδης. Αναφορικά με την ευαισθησία της μεθόδου, χρησιμοποιείται για ανίχνευση πρωτεϊνών μέχρι ~ 10 ng. Η πηκτή εμποτίζεται με διαλυμένα ιόντα αργύρου (νιτρικός αργυρος) και υπόκειται σε επεξεργασία με χρήση φορμαλδεΰδης, η οποία ανάγει τα ιόντα αργύρου και προκαλεί τον σχηματισμό ενός αδιάλυτου καφέ ιζήματος μεταλλικού αργύρου. Ο μεταλλικός άργυρος προσδένεται στις ιστιδίνες των πρωτεϊνών. Για την επίτευξη αυτής της μεθόδου απαιτείται χρονική ακρίβεια, υψηλής ποιότητας αντιδραστήρια, αφού η καθαρότητα είναι ουσιαστικής σημασίας για την διεξαγωγή υψηλής ποιότητας αποτελεσμάτων και την αποφυγή χρωματισμού του υποστρώματος (background noise).

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Sodium Carbonate Anhydrous, Na₂CO₃ (Mallinckrodt)
- Silver Nitrate, AgNO₃ (Fluka)
- Formaldehyde 37 % (v/v) (Applichem)
- Natriumthiosulfate-Pentahydrate, Na₂S₂O₃ · 5H₂O (Merck)
- Οξικό οξύ (CH₃COOH) 10% (v/v), υψηλού βαθμού καθαρότητας, Applichem
- Υπερκάθαρο νερό dH₂O
- Αιθανόλη (C₂H₆O) 99,95% (v/v), Applichem

Πειραματική διαδικασία

Αρχικά, πραγματοποιείται η προετοιμασία των δειγμάτων και η διαδικασία ηλεκτροφόρησης (SDS-PAGE, παράγραφος 2.11.1). Στη συνέχεια, η πηκτή πολυακρυλαμιδίου τοποθετείται σε

δοχείο και επωάζεται υπό ανάδευση σε διάλυμα Fixer [40% (v/v) αιθανόλη, 10% (v/v) οξικό οξύ και 50% (v/v) dH₂O] για 1 ώρα. Έπειτα, ακολουθεί μια πλύση με dH₂O για τουλάχιστον 30 λεπτά (RT). Στη συνέχεια η πηκτή επωάζεται σε διάλυμα 0,02% (w/v) sodium thiosulfate Na₂S₂O₃ (0,063 g Na₂S₂O₃ · 5H₂O και 200 mL H₂O) για αυστηρά ένα λεπτό και ακολουθούν 3 x 20'' πλυσίματα με dH₂O και επώαση με dH₂O για 5 λεπτά υπό ανάδευση. Έπειτα ακολουθεί επώαση της πηκτής σε διάλυμα 0.1% (w/v) silver nitrate [0,2 g AgNO₃, 200 mL dH₂O, 0,002% (v/v) Formaldehyd 37% (v/v)] για 20 λεπτά στους 4 °C. Στη συνέχεια ακολουθούν 3 x 20'' πλυσίματα με dH₂O και τοποθέτηση της πηκτής σε διαφορετικό δοχείο. Η πηκτή υπόκειται σε πλύση με dH₂O για 1 ώρα και στη συνέχεια επωάζεται με διάλυμα 3% (w/v) sodium carbonate (7,5 g Na₂CO₃, 250 mL dH₂O) μέχρι να υπάρξει το επιθυμητό ποσοστό χρώσης. Το διάλυμα 3% (w/v) sodium carbonate θα πρέπει να αντικαθίσταται αμέσως μόλις εμφανίσει κίτρινη απόχρωση. Όταν φτάσει το επιθυμητό ποσοστό χρώσης της πηκτής, η διαδικασία χρώσης τερματίζεται με την προσθήκη διαλύματος 5% (v/v) acetic acid για 5 λεπτά. Η πηκτή υπόκειται σε 3 (x 10 λεπτά) πλυσεις και μπορεί να αποθηκευτεί στους 4 °C εντός διαλύματος 1% (v/v) acetic acid.

2.2.13 Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford

Η δοκιμή Bradford βασίζεται στην άμεση πρόσδεση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBBG) στα κατάλοιπα αργινίνης, τρυπτοφάνης, τυροσίνης, ιστιδίνης και φαινυλαλανίνης των πρωτεϊνών. Ανιοντικά σύμπλοκα CBBG προσδεδεμένα σε κατάλοιπα αμινοξέων απορροφούν στα 595 nm, ενώ η ελεύθερη χρωστική σε διάλυμα έχει μέγιστη απορρόφηση στα 470 nm. Υπολογίζεται η ποσότητα της ολικής πρωτεΐνης του δείγματος βάσει πρότυπης καμπύλης αναφοράς. Ως πρότυπο διάλυμα χρησιμοποιήθηκε είτε αλβουμίνη βοδινού ορού (BSA) 1 mg/mL, είτε IgG βοδιού (Bovine Gamma Globulin) 1 mg/mL.

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Αντιδραστήριο της Bradford (BioRad)
- Πρωτεΐνη γνωστής συγκέντρωσης για την καμπύλη αναφοράς, BSA ή BGG (PIERCE)
- Υπερκάθαρο νερό (πέρασμα από στήλες ιονανταλλαγής και αντίστροφης όσμωσης)
- Πλαστικές κυψελίδες μίας χρήσης (Sarstedt)
- Φασματοφωτόμετρο, Smart Spec Plus Spectrophotometer, 170-2525 (BioRad)

Πειραματική διαδικασία

Αρχικά πραγματοποιείται η προετοιμασία των πρωτεϊνικών δειγμάτων που περιέχουν BSA ή BGG (PIERCE) σε ποσότητες από 1 έως 20 μg σε συνολικό όγκο 800 μL (σε νερό). Ακολουθεί

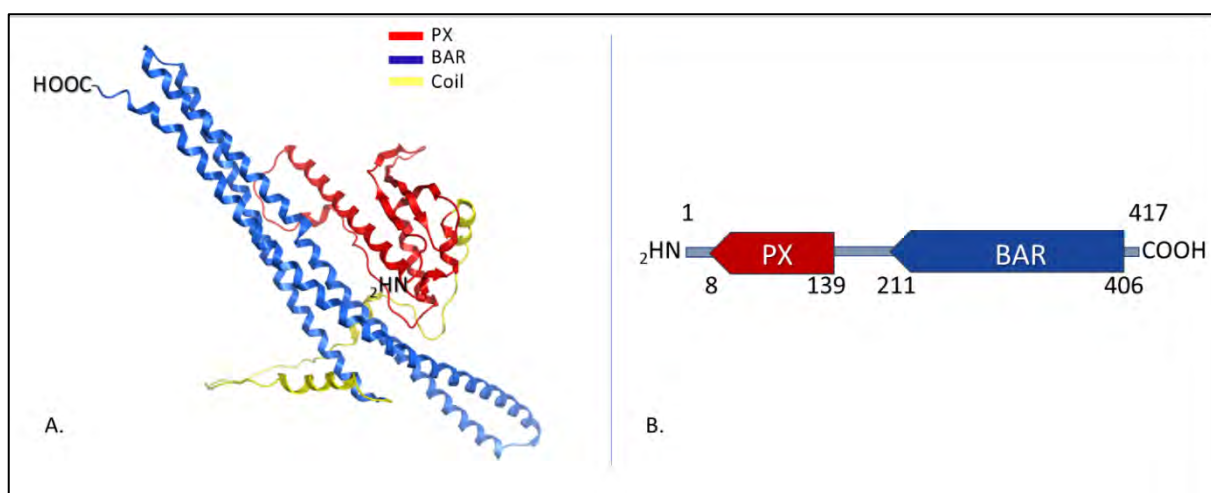
η προετοιμασία αγνώστων διαλυμάτων πρωτεϊνικών δειγμάτων σε ποσότητες από 1 έως 20 μL σε συνολικό όγκο 800 μL (σε νερό) και η προσθήκη 200 μL αντιδραστηρίου Bradford. Έπειτα γίνεται ανάδευση των δειγμάτων και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φωτομέτρηση στα 595 nm.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Βιοπληροφορική Ανάλυση

3.1.1 Πρόβλεψη των δομικών στοιχείων της *LdSNX*i τα οποία την κατατάσσουν στην SNX-BAR υπο-οικογένεια των νεξινών διαλογής (Sorting Nexins)

Η πρωτεΐνη *LdSNX*i απαρτίζεται από 417 αμινοξέα και έχει δύο γνωστές δομικές περιοχές, μια PX και μια BAR. Η δομική περιοχή PX, η οποία σύμφωνα με την βιβλιογραφία είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση πρωτεϊνών σε φωσφοϊνοσιτίδια⁴⁴ εκτείνεται ανάμεσα στα αμινοξέα 8-139 σύμφωνα με τη βάση δεδομένων InterPro. Η δομική περιοχή BAR, μέσω της οποίας οι πρωτεΐνες που την περιέχουν αλληλοεπιδρούν με άλλες πρωτεΐνες (molecular partners) εντοπίζεται μεταξύ των αμινοξέων 211-406. Επειδή οι πρωτεΐνες που έχουν την δομική περιοχή PX ανήκουν στις νεξίνες διαλογής (Sorting Nexins), είναι ιδιαίτερα πιθανό και η *LdSNX*i να ανήκει στην υπο-οικογένεια των νεξινών διαλογής PX-BAR.³⁶



Εικόνα 3.1.1 (Α) Μοντελοποίηση της τριτοταγούς δομής της πρωτεΐνης *LdSNX*i με χρήση του προγράμματος MOE και των δεδομένων της βάσης Alpha Fold. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζεται η δομική περιοχή PX, με μπλε χρώμα η δομική περιοχή BAR και με κίτρινο οι ελικοειδής μορφές που εκτείνονται μεταξύ των περιοχών PX και BAR. **(Β)** Σχηματική αναπαράσταση της δομικής αρχιτεκτονικής της πρωτεΐνης *LdSNX*i σύμφωνα με τη βάση δεδομένων InterPro.

3.1.2 Η πρωτεΐνη *LdSNXi* είναι υψηλά συντηρημένη στο γένος *Leishmania*

Μετά από έρευνα στην βάση δεδομένων TriTrypDB δείχθηκε ότι υπάρχουν ορθόλογες πρωτεΐνες της *LdSNXi* σχεδόν σε όλα τα είδη του γένους *Leishmania* (Εικόνα 3.1.2). Οι πρωτεΐνες αυτές στοιχήθηκαν κατά ζεύγη με την *LdSNXi* και διαπιστώθηκε πως εμφανίζουν εξαιρετικά υψηλά ποσοστά συντήρησης (75,59 % - 100 %). Το γεγονός πως η *LdSNXi* εμφανίζεται σχεδόν σε όλα τα είδη του γένους υποδηλώνει πως πιθανότατα επιτελεί κάποια θεμελιώδη λειτουργία για τα παράσιτα.

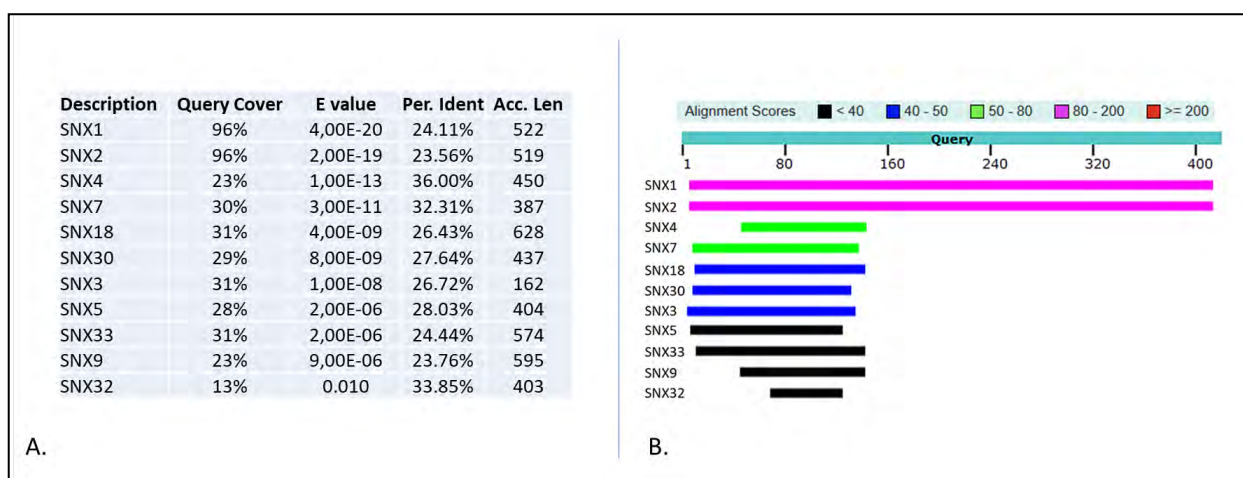
Scientific Name	Query Cover	E-value	Per. Ident	Acc. Len
LDHU3_35.3170_Leishmania_donovani	100%	0.0	100.00%	417
LINF_350029500_Leishmania_infantum	100%	0.0	99.76%	417
LdCL_350029600_Leishmania_donovani	100%	0.0	99.76%	417
LTRL590_350029600_Leishmania_tropica	100%	0.0	97.84%	417
LmjF.35.2420_Leishmania_major	100%	0.0	97.60%	417
LGELEM452_350030200_Leishmania_gerbilli	100%	0.0	97.60%	417
LMJLV39_350031000_Leishmania_major	100%	0.0	97.36%	417
LARLEM1108_350030500_Leishmania_arabica	100%	0.0	97.36%	417
LAEL147_000774600_Leishmania_aethiopica	100%	0.0	97.12%	417
LmxM.34.2420_Leishmania_mexicana	99%	0.0	97.12%	418
LTULEM423_350030400_Leishmania_turanica	100%	0.0	97.12%	417
LAMA_000790800_Leishmania_amazonensis	99%	0.0	96.40%	418
LtaP35.2450_Leishmania_tarentoloe	100%	0.0	92.11%	418
LtaPh_3524500_Leishmania_tarentoloe	100%	0.0	92.11%	418
LPAL13_340028800_Leishmania_panamensis	100%	0.0	92.82%	418
LPMP_342280_Leishmania_panamensis	100%	0.0	92.82%	418
LBRM2903_340031200_Leishmania_braziliensis	100%	0.0	92.82%	418
LbrM.34.2.002370_Leishmania_braziliensis	100%	0.0	92.34%	418
LbrM.34.2370_Leishmania_braziliensis	100%	0.0	92.34%	418
LENLEM3045_350030200_Leishmania_enrietti	100%	0.0	90.91%	418
Lsey_0008_0590_Leptomonas_seymouri	99%	0.0	77.18%	426
LpyrH10_01_4540_Leptomonas_pyrrhocoris	99%	0.0	75.59%	427

Εικόνα 3.1.2 Κατά ζεύγη στοιχίση της πρωτεΐνης *LdSNXi* με τις ορθόλογές της στο γένος *Leishmania*. Scientific Name: Το όνομα της καταχώρησης εντός της βάσης TriTrypDB; Query Cover: Το ποσοστό της εκάστοτε ακολουθίας που στοιχήθηκε με την *LdSNXi*; E-value: Το e-value της κάθε στοιχίσης; Per. Ident: Η ποσοστιαία ομοιότητα των στοιχισμένων πρωτεϊνών; Acc. Len: Αριθμός αμινοξέων της κάθε καταχωρημένης πρωτεΐνης.

3.1.3 Σύγκριση της πρωτεΐνης *LdSNX*i με τις ανθρώπινες νεξίνες διαλογής της υπο-οικογένειας PX-BAR

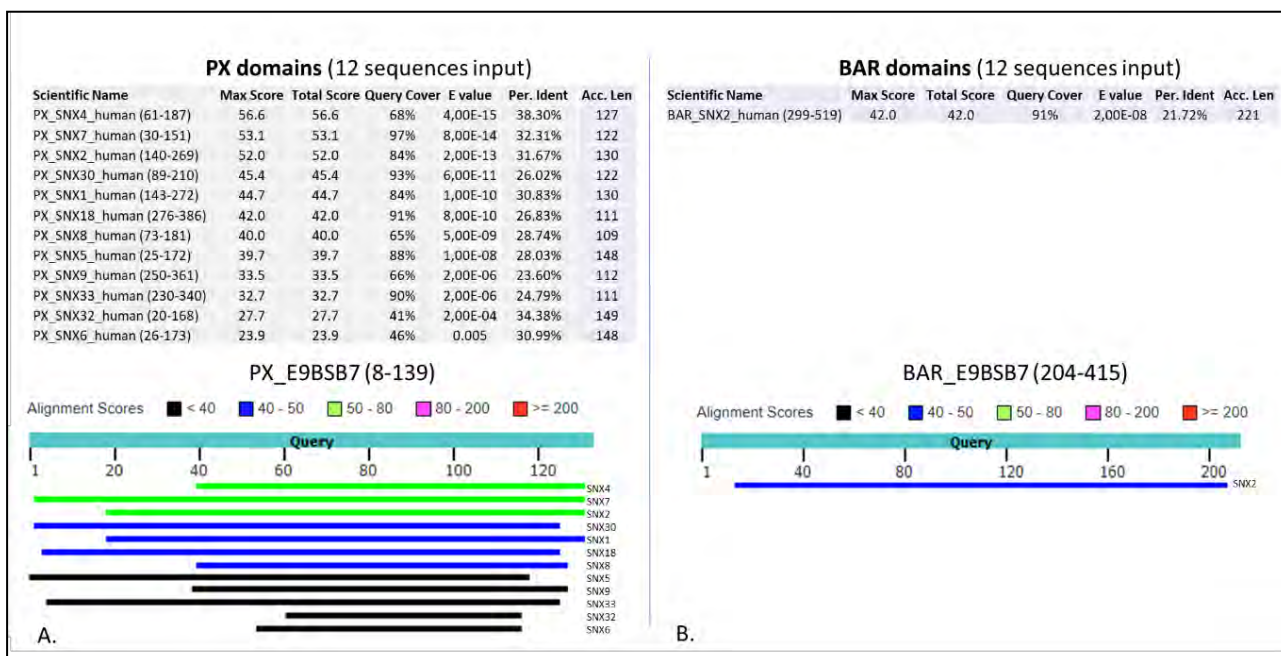
3.1.3.1 Κατά ζεύγη στοιχίσεις της *LdSNX*i με τις ανθρώπινες νεξίνες διαλογής της υπο-οικογένειας PX-BAR.

Εφόσον, η πρωτεΐνη *LdSNX*i κατατάσσεται δομικά στην υπο-οικογένεια των νεξινών διαλογής PX-BAR, μια υπο-οικογένεια συντηρημένη σχεδόν σε όλα τα είδη των ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών, επόμενο βήμα της μελέτης μου αποτέλεσε η εύρεση εξελικτικών σχέσεων με τις νεξίνες διαλογής της ίδιας υπο-οικογένειας που εντοπίζονται στον άνθρωπο, ο οποίος στην περίπτωση της *Leishmania donovani*, αποτελεί τον θηλαστικό ξενιστή του παρασίτου. Στη βάση δεδομένων TriTrypDB, ως ορθόλογη της *LdSNX*i αναφέρεται η ανθρώπινη νεξίνη 4 (SNX4) πιθανότατα λόγω του γεγονότος ότι εμφανίζει την μεγαλύτερη ποσοστιαία ομοιότητα σε επίπεδο ακολουθίας αμινοξέων. Ωστόσο, η κατά ζεύγη στοιχίση της *LdSNX*i με όλες τις ανθρώπινες νεξίνες διαλογής της υπο-οικογένειας PX-BAR, ανέδειξε πως μολονότι η ανθρώπινη SNX4 και η *LdSNX*i εμφανίζουν όντως την μεγαλύτερη ποσοστιαία ομοιότητα στις ακολουθίες τους (36%), η στοιχίση των δύο πρωτεϊνών αφορά μόνο το 23% της ακολουθίας της *LdSNX*i (Εικόνα 3.1.3). Στον αντίποδα, οι ανθρώπινες νεξίνες 1 και 2 (SNX1, SNX2) εμφανίζουν κατά 10% περίπου μικρότερη ποσοστιαία ομοιότητα (24,11% και 23,56% αντίστοιχα), όμως η στοιχίση μεταξύ των πρωτεϊνών και στις δύο περιπτώσεις αφορά το 96% της ακολουθίας της *LdSNX*i. Ενδιαφέρον εύρημα, αποτελεί επίσης η στοιχίση με την ανθρώπινη νεξίνη 7 (SNX7) με ποσοστιαία ομοιότητα 32,31% και στοιχίση που εκτείνεται στο 30% της ακολουθίας της *LdSNX*i (Εικόνα 3.6.3.1.1).



Εικόνα 3.1.3 (A) Αποτελέσματα της κατά ζεύγη στοιχίσης της ακολουθίας της πρωτεΐνης *LdSNX*i και των ανθρώπινων νεξινών διαλογής της υπο-οικογένειας PX-BAR. **(B)** Οπτικοποίηση του εύρους στοιχίσης της πρωτεΐνης *LdSNX*i (query) και των ανθρώπινων νεξινών διαλογής της υπο-οικογένειας PX-BAR.

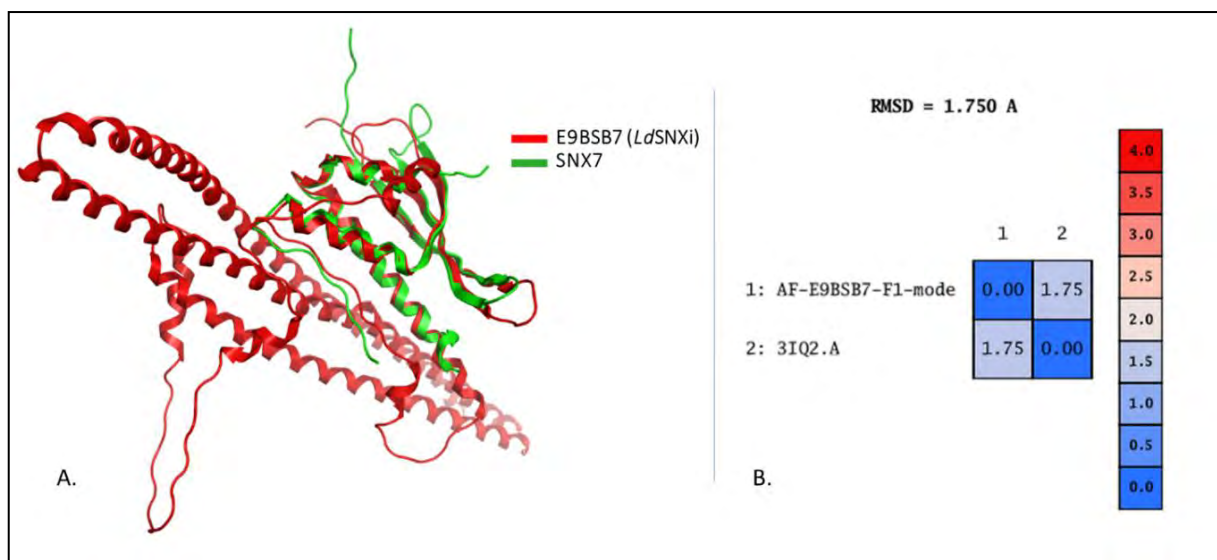
Επειδή οι περιοχές PX και BAR είναι λειτουργικές, αναμένεται να είναι και ιδιαίτερα συντηρημένες σε λειτουργικά όμοιες πρωτεΐνες. Για να ελεγχθεί η πιθανή λειτουργική εξελικτική πορεία και ομοιότητα της *LdSNXi* με τις ανθρώπινες SNX1, SNX2, SNX4 και SNX7 πραγματοποιήθηκαν στοιχίσεις κατά ζεύγη μόνο για τις επιμέρους δομικές περιοχές των πρωτεϊνών PX και BAR. Στη στοιχίση για τη δομική περιοχή PX (υπεύθυνη για την πρόσδεση των PX-BAR πρωτεϊνών στα φωσφοϊνοσιτίδια) εμφανίζεται μεγαλύτερη συντήρηση αμινοξέων σε σχέση με την στοιχίση στην οποία συμπεριλαμβάνονταν ολόκληρες οι ακολουθίες. Τη μεγαλύτερη ποσοστιαία ομοιότητα εμφανίζει η SNX4 (38,3%) σε εύρος στοιχίσης 68%, ακολουθούμενη από την SNX7 με ποσοστό ομοιότητας 32,31% και εύρος στοιχίσης 97% καθώς και την SNX2 με ποσοστιαία ομοιότητα 31,65% και εύρος στοιχίσης 84%. Όσον αφορά τη δομική περιοχή BAR, που είναι υπεύθυνη για τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις (PPIs, Protein-Protein Interactions) των PX-BAR πρωτεϊνών, ως στατιστικά σημαντική όμοια πρωτεΐνη προέκυψε από τον αλγόριθμο μόνο μία στοιχίση, αυτή της περιοχής BAR (BAR domain) της *LdSNXi* με το BAR domain της SNX2, με ποσοστό ομοιότητας 21,72% και εύρος στοιχίσης 91% (Εικόνα 3.6.4 B).



Εικόνα 3.1.4 A) Αποτελέσματα της στοιχίσης κατά ζεύγη μόνο της δομικής περιοχής PX τόσο της πρωτεΐνης *LdSNXi* όσο και των ανθρώπινων νεξινών διαλογής της υπο-οικογένειας PX-BAR. **B)** Αποτελέσματα της στοιχίσης κατά ζεύγη μόνο της δομικής περιοχής BAR τόσο της πρωτεΐνης *LdSNXi* όσο και των ανθρώπινων νεξινών διαλογής της υπο-οικογένειας PX-BAR.

3.1.3.2 Δομική στοίχιση (υπέρθηση) της πρωτεΐνης *LdSNX1* και της λυμένης με κρυσταλλογραφία δομικής περιοχής PX της ανθρώπινης SNX7

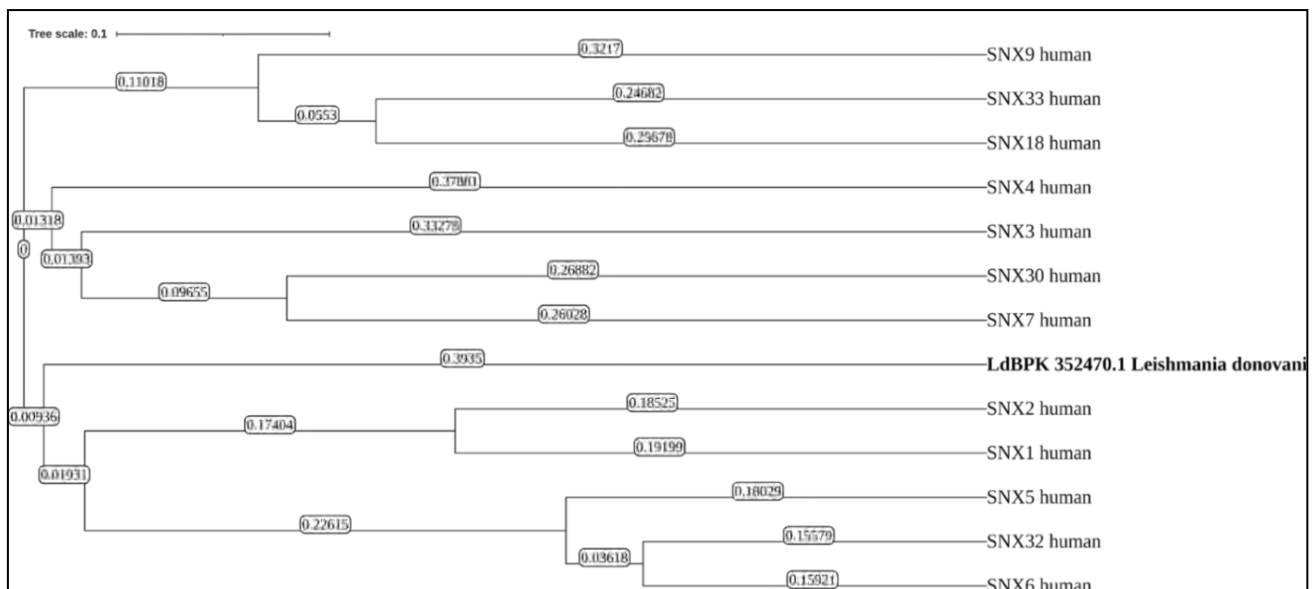
Λαμβάνοντας υπόψιν τη στοίχιση κατά ζεύγη που πραγματοποιήθηκε στην παράγραφο 3.6.3.1, σύμφωνα με την οποία η SNX7 αποτελεί την ανθρώπινη PX-BAR νεξίνη που εμφανίζει την μεγαλύτερη ομοιότητα με την *Ldsnxi* στη δομική περιοχή PX, πραγματοποιήθηκε υπέρθεση του τρισδιάστατου μοντέλου AlphaFold της *LdSNX1* και της λυμένης δομής της PX δομικής περιοχής της ανθρώπινης SNX7 με σκοπό τη διερεύνηση της δομικής συνάφειας που εμφανίζεται μεταξύ τους. Όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 3.1.5A, η υπέρθεση των δύο δομών υποδεικνύει πως οι δομικές περιοχές των δύο πρωτεϊνών είναι υψηλά συντηρημένες και όμοιες. Για την ποσοτικοποίηση των επιπέδων ομοιότητας των δύο μοντέλων, υπολογίστηκε ο δείκτης RMSD (Root-Mean-Square Deviation), ο οποίος υποδηλώνει το κατά πόσο δύο πρωτεϊνικές δομές που έχουν υποστεί δομική υπέρθεση εμφανίζουν κοινή τρισδιάστατη μορφή στον χώρο. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του δείκτη RMSD, τόσο μεγαλύτερη ομοιότητα εμφανίζεται μεταξύ των εξεταζόμενων πρωτεϊνικών δομών (η τιμή 0 Å αντιστοιχεί σε σύγκριση δύο πανομοιότυπων πρωτεϊνικών δομών). Όταν ο δείκτης RMSD λάβει τιμές μεγαλύτερες από 2 Å, οι εξεταζόμενες πρωτεϊνικές δομές εμφανίζουν μη σημαντικά επίπεδα ομοιότητας στη δομή τους. Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.1.5B, στην περίπτωση της σύγκρισης των δομικών περιοχών PX από τις πρωτεΐνες *LdSNX1* και SNX7, ο δείκτης RMSD έλαβε τιμή ίση με 1.75 Å, που πρακτικά σημαίνει πως οι υπό σύγκριση τρισδιάστατες πρωτεϊνικές δομές εμφανίζουν στατιστικά σημαντική ομοιότητα. Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι η ομοιότητα των υπό εξέταση δομικών περιοχών PX είναι σαφώς σημαντικότερη στο επίπεδο της τριτοταγούς δομής σε σχέση με το επίπεδο της αμινοξικής ακολουθίας, στο οποίο η ομοιότητα δεν ξεπερνάει το 32% (Παράγραφος 3.6.3.1). Η υλοποίηση της ίδιας μεθοδολογίας στην δομική περιοχή BAR, που εμφανίζει στατιστικά σημαντική συντήρηση αμινοξέων με την ανθρώπινη SNX2 θα αποτελούσε το επόμενο βήμα της προσέγγισης. Ωστόσο η δομή της δομικής περιοχής BAR της SNX2 δεν έχει κρυσταλλογραφηθεί μέχρι σήμερα, επομένως η εν λόγω σύγκριση καθίσταται αδύνατη λόγω έλλειψης δεδομένων.



Εικόνα 3.1.5 Α) Δομική στοίχιση (υπέρθηση) της τρισδιάστατης δομής της πρωτεΐνης *LdSNX1* και της τρισδιάστατης πρωτεϊνικής δομής PX της ανθρώπινης νεξίνης διαλογής 7 (*SNX7*). **Β)** Η ομοιότητα των δύο πρωτεϊνικών δομών είναι ιδιαίτερα μεγάλη καθώς ο δείκτης RMSD που αφορά τη σύγκριση της ομοιότητας τους είναι μικρότερος του 2.

3.1.3.3 Η πρωτεΐνη *LdSNX1* εξελικτικά βρίσκεται πιο κοντά στην ανθρώπινη *SNX2*

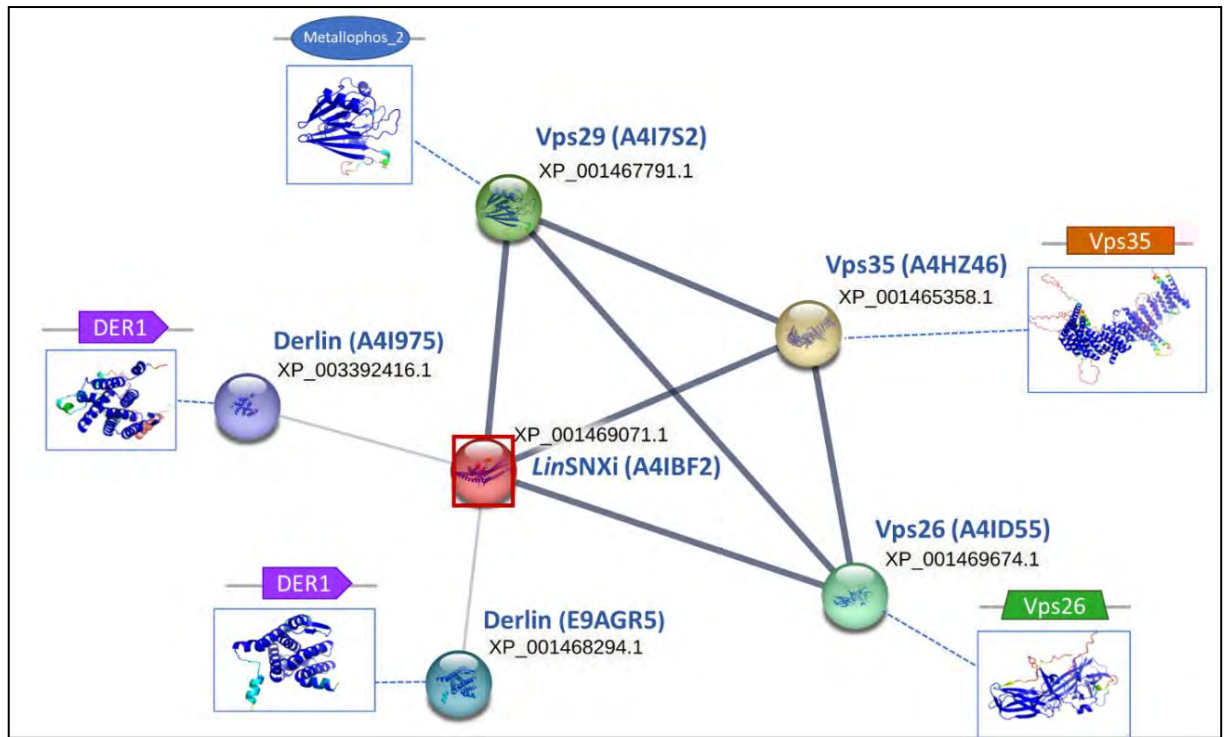
Προκειμένου να διερευνηθούν περαιτέρω οι εξελικτικές σχέσεις της πρωτεΐνης *LdSNX1* και των ανθρώπινων νεξινών διαλογής της υπο-οικογένειας PX-BAR, οι στοιχήσεις των ακολουθιών (με τον αλγόριθμο ClustalW) εισήχθησαν στο εργαλείο iTOL με σκοπό την κατασκευή ενός neighbor-joining φυλογενετικού δέντρου, το οποίο συμπεριελάμβανε όλες τις ανθρώπινες νεξίνες διαλογής της υποοικογένειας PX-BAR καθώς και την παρασιτική *LdSNX1* (γονιδιακό προϊόν *LdBK352470.1*) (**Εικόνα 3.1.6**). Σύμφωνα με αυτό το φυλογενετικό δέντρο, πιο κοντά στην *LdSNX1* βρίσκεται εξελικτικά η ανθρώπινη νεξίνη 2 (*SNX2*). Το εύρημα αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό αν ληφθεί υπόψη πως η *SNX2* αποτελεί τη μοναδική ανθρώπινη νεξίνη που εμφανίζει στατιστικά σημαντική ομοιότητα στο επίπεδο της δομικής περιοχής BAR σε σχέση με την *LdSNX1* (21,2%). Η πληροφορία αυτή, σε συνδυασμό με το γεγονός πως η *LdSNX1* εμφανίζει τη μεγαλύτερη ομοιότητα στην περιοχή PX με την ανθρώπινη *SNX7* σε επίπεδο δομικής στοίχισης, ανοίγει τον δρόμο για περαιτέρω διερεύνηση της λειτουργικής δράσης της *LdSNX1* σχεδιάζοντας στοχευμένες λειτουργικές μελέτες.



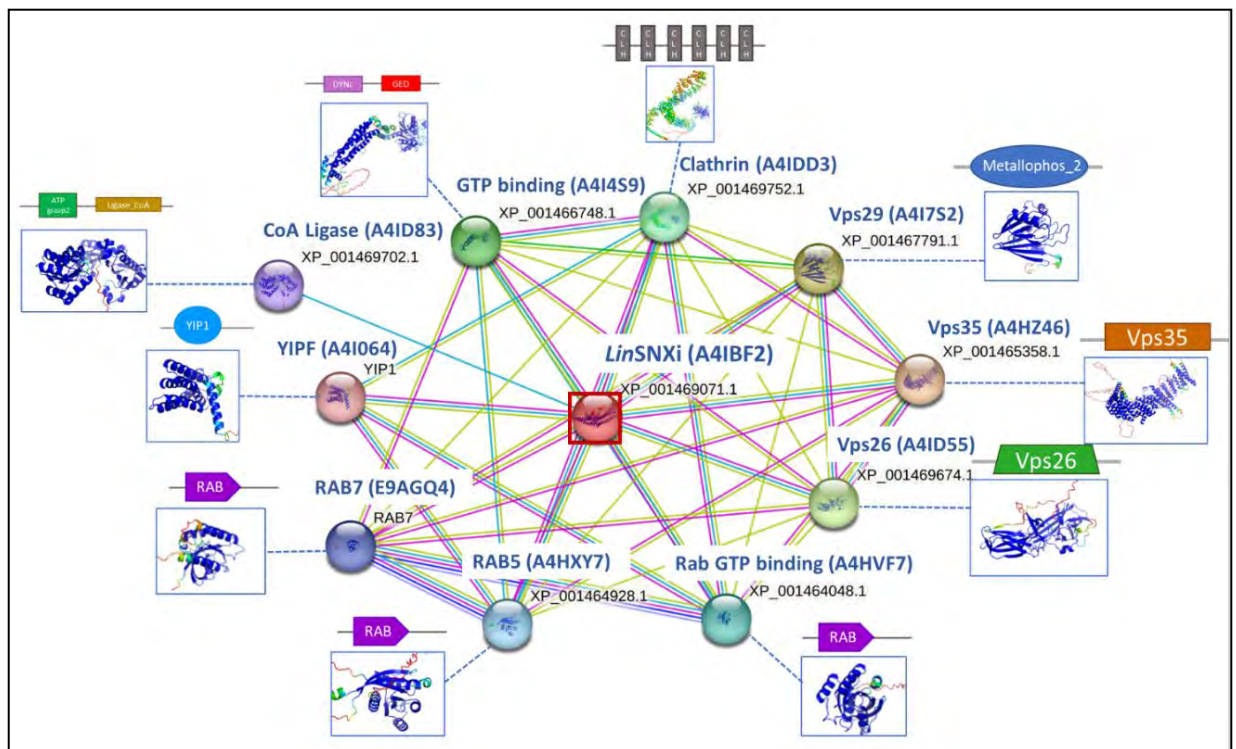
Εικόνα 3.1.6 Φυλογενετικό δέντρο που απεικονίζει τις εξελικτικές σχέσεις των ανθρώπινων νεζινών διαλογής της υπο-οικογένειας PX-BAR και της πρωτεΐνης *LdSNXi*.

3.1.3.4 Αλληλεπιδράσεις της *LdSNXi* με άλλες πρωτεΐνες

Εξαιτίας της απουσίας καταχώρησης για την *LdSNXi* (*LdBK_352470*) από το είδος *Leishmania donovani* εντός της βάσης δεδομένων STRING, στην έρευνα χρησιμοποιήθηκε η ομόλογή της από το παράσιτο *Leishmania infantum* (ανήκει στο complex *Leishmania donovani*), η οποία βρίσκεται καταχωρημένη στη βάση δεδομένων Uniprot με κωδικό A4IBF2 (A4IBF2_LEIN; XP_001469071.1). Τα δίκτυα πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων (PPI Networks, Protein-Protein Interactions Networks) που παρατίθενται στις εικόνες 3.1.7 και 3.1.8, παρουσιάζουν τις προβλέψεις των μοριακών συνοδών της πρωτεΐνης *LinSNXi* που προέκυψαν με βάση μόνο πειραματικά δεδομένα από αναλύσεις άλλων παρόμοιων πρωτεϊνών (**Εικόνα 3.1.7**) ή επιπρόσθετα και από βάσεις δεδομένων (**Εικόνα 3.1.8**). Αξίζει να σημειωθεί ότι το γονιδίωμα του είδους *Leishmania L. infantum* αποκωδικοποιήθηκε και καταχωρήθηκε στις βάσεις δεδομένων πολύ ενωρίτερα από το γονιδίωμα της *L. donovani* και αυτός είναι πιθανόν ο λόγος της εύρεσης της *LinSNXi* στα PPI Networks και όχι της *LdSNXi*. Η πρωτεΐνη αυτή δεν έχει μελετηθεί πειραματικά μέχρι τώρα. Στο πρώτο δίκτυο αλληλεπιδράσεων βρέθηκε ότι η *LinSNXi* συσχετίζεται με 3 πρωτεΐνες του retromer complex (VPS29, VPS35 και VPS26) και δύο διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που σχετίζονται με ER stress response (A4I975; E9AGR5;). Από την πρόβλεψη του δεύτερου δικτύου αλληλεπιδράσεων προκύπτει ότι οι πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την *LinSNXi* εμπλέκονται πέρα από το retromer (ανακύκλωση κυστιδίων ενδοκυττάρωσης) και με την διαδικασία ωρίμανσης του ενδοσώματος.



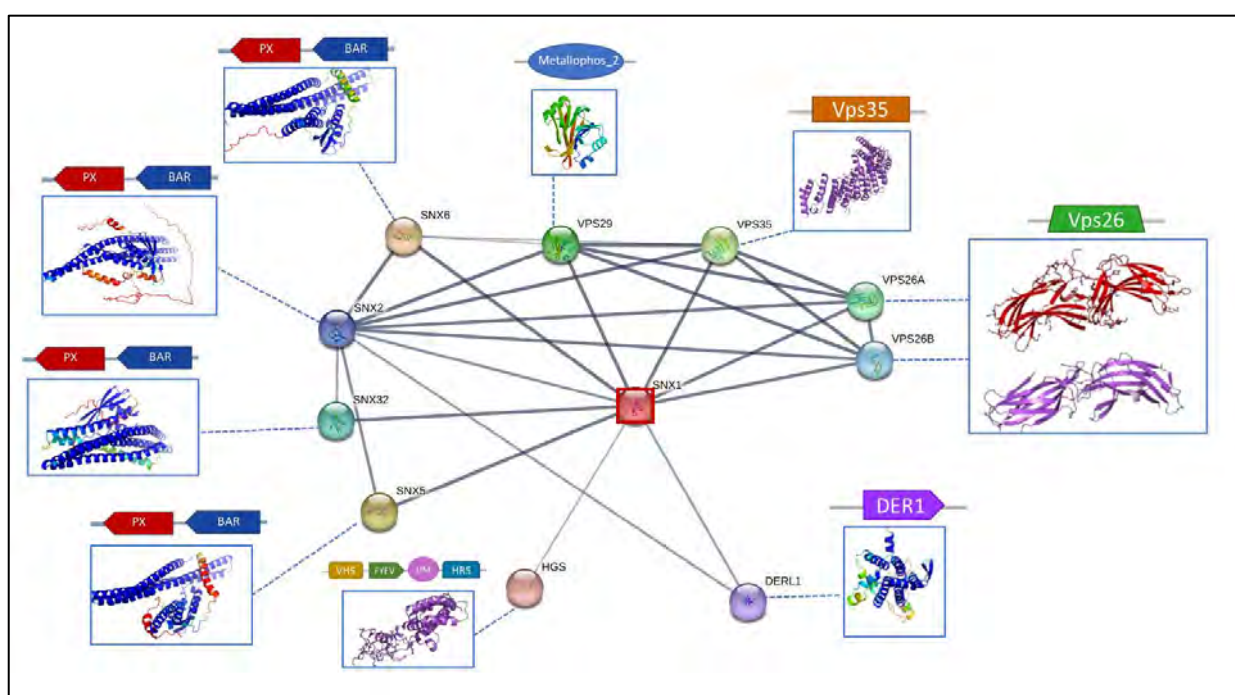
Εικόνα 3.1.7 Δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της *LinSNXi*, ορθόλογης της πρωτεΐνης *LdSNXi* στο παράσιτο *Leishmania infantum* με προβλέψεις που στηρίζονται σε πειραματικά δεδομένα, όπως προκύπτει από την STRING. Δίπλα στον κάθε κόμβο του δικτύου παρατίθεται η πρόβλεψη της τριτοταγούς δομής της κάθε πρωτεΐνης (AlphaFold). LINJ_19_0120 LINJ_33_1900



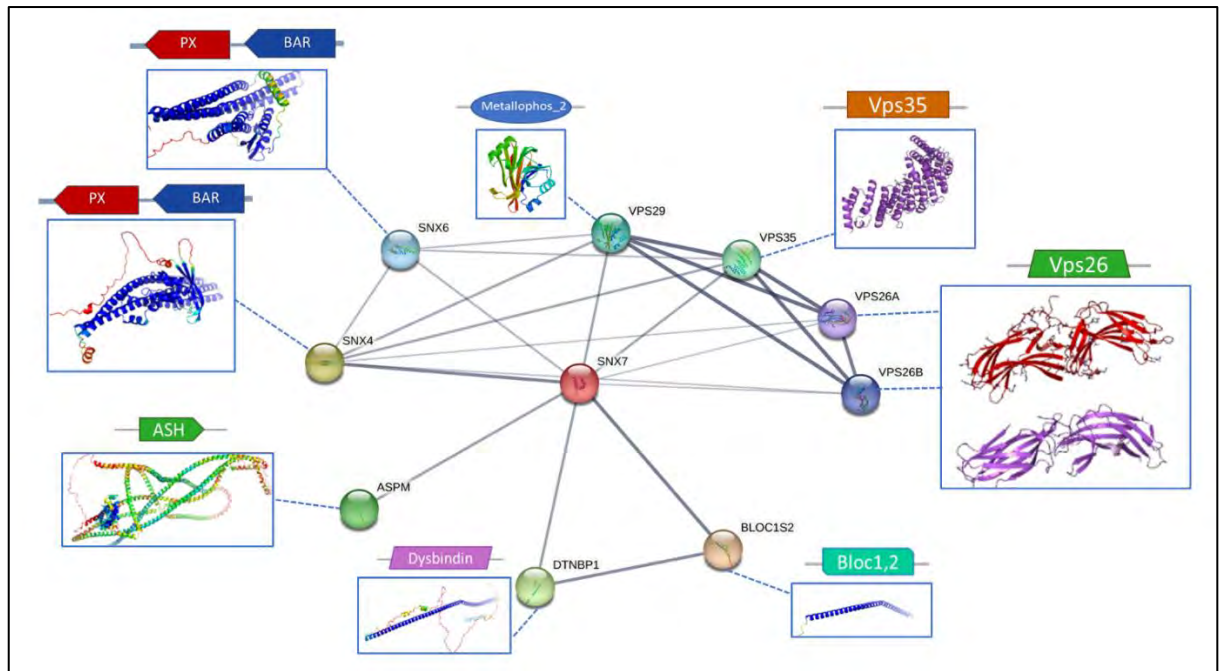
Εικόνα 3.1.8 Δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της *LinSNXi*, ορθόλογης της πρωτεΐνης *LdSNXi* στο παράσιτο *Leishmania infantum*, με προβλέψεις που στηρίζονται σε βάσεις

δεδομένων και πειραματικά δεδομένα, όπως προκύπτει από την STRING. Δίπλα στον κάθε κόμβο του δικτύου παρατίθεται η πρόβλεψη της τριτοταγούς δομής της κάθε πρωτεΐνης (AlphaFold) καθώς και η δομική της αρχιτεκτονική.

Ένας τρόπος εκτίμησης της λειτουργικής ομοιότητας ορθόλογων πρωτεϊνών είναι και η ύπαρξη αλληλεπιδράσεων με πρωτεΐνες που παρουσιάζουν αντίστοιχη λειτουργία ή είναι μεταξύ τους ορθόλογες. Με βάση αυτή την υπόθεση μελετήθηκαν τα δίκτυα αλληλεπιδράσεων των ανθρώπινων νεξινών διαλογής της οικογένειας PX-BAR που εμφανίζουν το μεγαλύτερο ποσοστό ομοιότητας με την παρασιτική πρωτεΐνη *LdSNXi*, έτσι ώστε να γίνει αντιπαραβολή των μοριακών συνοδών τους με αυτούς της *LdSNXi* (Εικόνες 3.1.9 – 3.1.12).



Εικόνα 3.1.9 Δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της ανθρώπινης *SNX1*, με προβλέψεις που στηρίζονται σε πειραματικά δεδομένα, όπως προκύπτει από την STRING. Δίπλα στον κάθε κόμβο του δικτύου παρατίθεται η πρόβλεψη της τριτοταγούς δομής της κάθε πρωτεΐνης (PDB ή AlphaFold) καθώς και η δομική της αρχιτεκτονική.

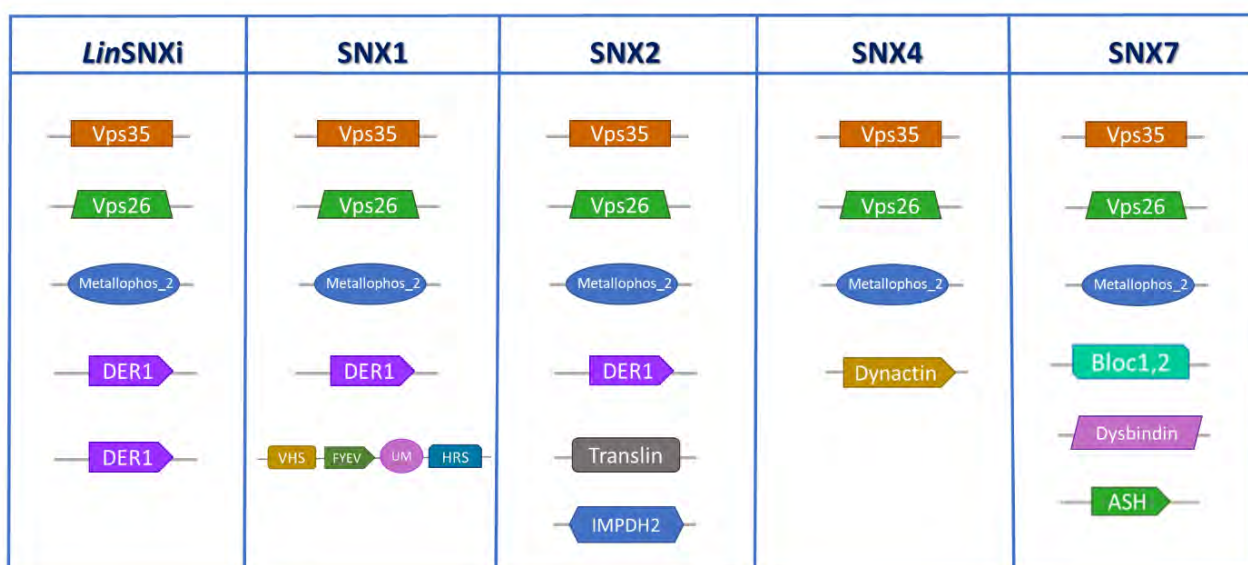


Εικόνα 3.1.12 Δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της ανθρώπινης *SNX7*, με προβλέψεις που στηρίζονται σε πειραματικά δεδομένα. Δίπλα στον κάθε κόμβο του δικτύου παρατίθεται η πρόβλεψη της τριτοταγούς δομής των πρωτεϊνών (PDB ή AlphaFold) ή η δομική τους αρχιτεκτονική.

Οι αλληλεπιδράσεις των τεσσάρων ανθρώπινων νεξινών καθώς και της *LinSNXi* με άλλες πρωτεΐνες συνοψίζονται στον πίνακα 3.1.1. Είναι φανερό πως όλες οι νεξίνες αλληλεπιδρούν με τις *Vps35*, *Vps26* και *Metallophos_2* (*Vps29*). Κατ' επέκταση, και η *LdSNXi* προβλέπεται να αλληλοεπιδρά ισχυρά με αυτές τις πρωτεΐνες που έχουν διαφορετικές δομικές αρχιτεκτονικές και λειτουργίες. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι οι *Vps35*, *Vps26* και *Metallophos_2* (*Vps29*) αποτελούν το «retromer complex», ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών που έχει αποδειχθεί ότι είναι σημαντικό για την ανακύκλωση διαμεμβρανικών υποδοχέων από τα ενδοσώματα στο δίκτυο trans-Golgi (TGN).⁴⁵ Ένα επιπλέον εύρημα από τη σύγκριση των μοριακών συνοδών (molecular partners) των νεξινών που ελέγχθηκαν είναι το γεγονός ότι μόνο η *LinSNXi*, *SNX1* και *SNX2* αλληλοεπιδρούν με την πρωτεΐνη Derlin (degradation in endoplasmic reticulum protein 1), μια μεμβρανική πρωτεΐνη που στον άνθρωπο κωδικοποιείται από το γονίδιο *DERL1*. Η πρωτεΐνη αυτή βρίσκεται στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου (ER) και εμπλέκεται στην οπισθομετατόπιση (retrotranslocation) συγκεκριμένων πρωτεϊνών με λανθασμένη στερεοδιαταξη καθώς και στο λεγόμενο ER stress.⁴⁶ Οι *SNX4* και *SNX7* παρουσιάζουν διαφορές στο πρωτεϊνικό δίκτυο αλληλεπιδράσεων τους.

Αναφορικά με τις ανθρώπινες νεξίνες, σε όλες τις περιπτώσεις υπάρχουν ως αλληλοεπιδρώσες οι πρωτεΐνες του retromer complex, ωστόσο μόνο στην περίπτωση των *SNX1* και *SNX2* η

συσχέτιση είναι ισχυρή. Έχει αναφερθεί ότι η ανθρώπινη νεξίνη 4 (SNX4) δεν αλληλεπιδρά με το retromer complex άμεσα⁴⁷ και ότι η εμπιστοσύνη (confidence) της αλληλεπίδρασης των SNX4 και SNX7 με τις Vps35, Vps26 και Metallophos_2 (Vps29) είναι σαφέστατα μικρότερη από αυτή των SNX1, SNX2 και *LinSNXi* ενισχύει την υπόθεση για ομοιότητες στη λειτουργία αυτών των τριών πρωτεϊνών. Η ανάδειξη τους στο δίκτυο πιθανότατα οφείλεται στο γεγονός ότι το «retromer complex» αλληλεπιδρά με τους molecular partners της SNX4 παρόλο που δεν αλληλοεπιδρά άμεσα με την ίδια την πρωτεΐνη. Με βάση όλα τα παραπάνω δεδομένα μπορεί να προταθεί ότι η πρωτεΐνη *LinSNXi* και κατ' επέκταση η ορθόλογή της *LdSNXi*, έχουν ομοιότητες στη λειτουργία με τις SNX1 και SNX2. Έτσι, η *LdSNXi* αναδεικνύεται ως μια καλή υποψήφια πρωτεΐνη για να μελετηθούν πειραματικά οι συνοδές της πρωτεΐνες, ώστε να διερευνηθεί περαιτέρω η λειτουργική της δράση.



Πίνακας 3.1.1 Οι δομικές περιοχές των προβλεπόμενων μοριακών συνοδών της *LinSNXi* και των ανθρώπινων SNX1, SNX2, SNX4, SNX7.

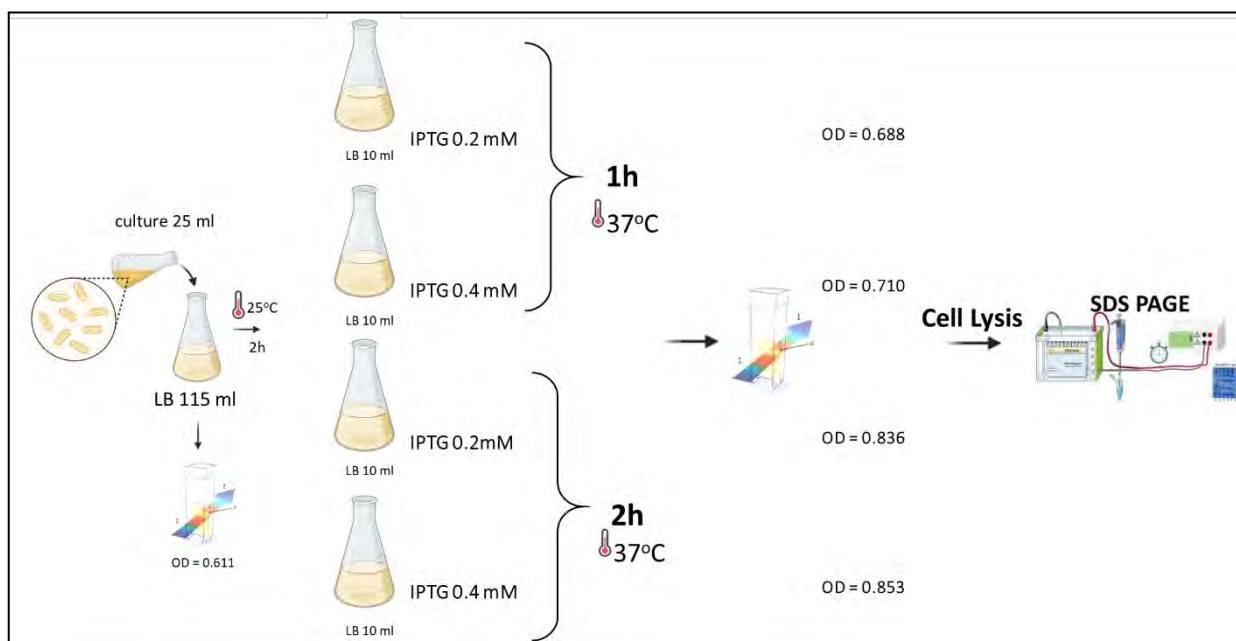
3.2 Εργαστηριακή Πειραματική προσέγγιση

3.2.1 Διερεύνηση και προσδιορισμός πρωτοκόλλου επαγωγής της έκφρασης σε βακτήρια της ανασυνδιασμένης πρωτεΐνης GST-LdSNX_i

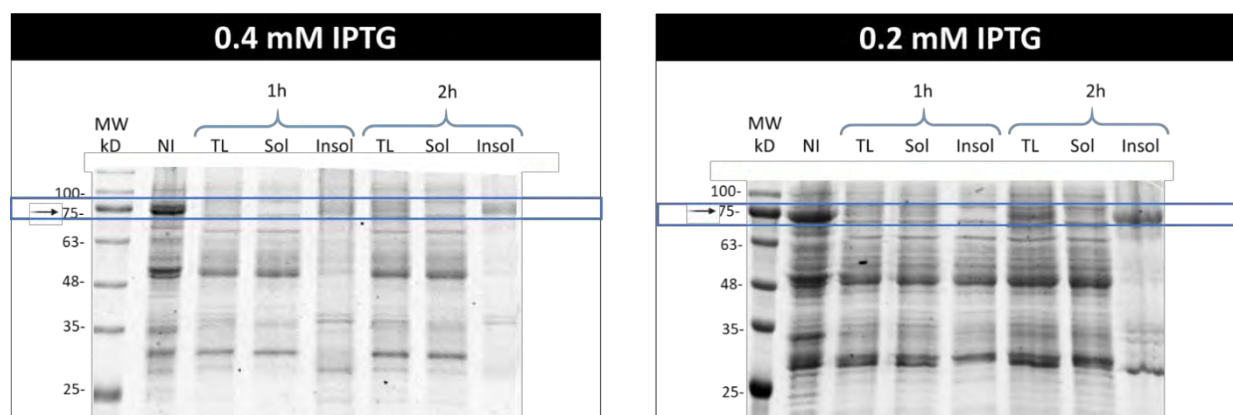
Η ένθεση στον πλασμιδιακό φορέα pGEX-4T1 τμήματος DNA που περιέχει την αλληλουχία του γονιδίου *LdBPK_352470* είχε ήδη ολοκληρωθεί στο εργαστήριο Ενδοκυττάριου Παρασιτισμού. Το πλασμίδιο αυτό οδηγεί στην έκφραση της διαγονιδιακής GST-LdSNX_i σε βακτήρια *Escherichia coli* στέλεχος BL21 μετά από επαγωγή με την χημική ουσία Isopropyl β-d-1-thiogalactopyranoside (IPTG). Στόχος της επαγόμενης έκφρασης της GST-LdSNX_i είναι η χρήση της για βιοχημικές μελέτες των ιδιοτήτων της LdSNX_i καθώς και για απομόνωση και ταυτοποίηση των μορίων που προσδένονται στις λειτουργικές περιοχές της LdSNX_i, δηλαδή στις περιοχές PX και BAR. Πιλοτικά πειράματα που είχαν προηγηθεί στο εργαστήριο ενδοκυττάριου παρασιτισμού δεν είχαν οδηγήσει σε καθορισμό βέλτιστων συνθηκών για την επαγωγή της πρωτεΐνης ούτε στην ανάκτηση ικανού ποσοστού αυτής στο διαλυτό κλάσμα των βακτηριακών κυττάρων. Ως εκ τούτου πραγματοποιήθηκαν τρεις κύκλοι πειραμάτων με σκοπό τη βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου.

Ο πρώτος κύκλος πειραμάτων αφορούσε την επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης στους 37 °C, θερμοκρασία στην οποία η ανάπτυξη των βακτηρίων *E. coli BL21* γίνεται με τον μεγαλύτερο δυνατό ρυθμό. Η διαδικασία ξεκίνησε με την δημιουργία υγρής καλλιέργειας βακτηρίων σε θρεπτικό υλικό Luria Broth (LB), προερχόμενη από μια αποικία τρυβλίου πρόσφατα μετασχηματισμένων βακτηρίων. Η καλλιέργεια επωάστηκε στους 25 °C για 16 περίπου ώρες (overnight) υπό ανάδευση. Την επόμενη ημέρα, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της τιμής οπτικής πυκνότητας (OD) της καλλιέργειας και εφόσον η τιμή ήταν εντός του επιθυμητού εύρους τιμών (~0.5-0.6) που υποδηλώνει πως τα κύτταρα βρίσκονται σε εκθετική φάση ανάπτυξης πραγματοποιήθηκε επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης LdSNX_i με χρήση IPTG. Οι επαγωγές έγιναν με συγκεντρώσεις IPTG 0,2 mM και 0,4 mM για 1 και 2 ώρες αντίστοιχα. Μετά την επώαση μετρήθηκαν οι τιμές OD₆₀₀ κάθε δείγματος. Στην επαγωγή συγκέντρωσης 0,2 mM (1 ώρα) το OD₆₀₀ είχε τιμή 0,688 ενώ στην επαγωγή 0,4 mM (1 ώρα) 0,710. Αντίστοιχα, στην επαγωγή συγκέντρωσης 0,2 mM (2 ώρες) το OD₆₀₀ είχε τιμή 0,836 ενώ στην επαγωγή 0,4 mM (2 ώρες) 0,853. (Εικόνα 3.2.1.1). Τα αποτελέσματα του κύκλου διερεύνησης σε θερμοκρασία 37 °C παρουσιάζονται στην **Εικόνα 3.2.1.2**. Σε όλες τις περιπτώσεις, τα επίπεδα έκφρασης της

πρωτεΐνης ήταν χαμηλά ενώ οι πιο επιτυχημένες συνθήκες του κύκλου ήταν αυτές που τα κύτταρα επώαστηκαν για 2 ώρες ανεξαιρέτου συγκέντρωσης.



Εικόνα 3.2.1.1 Σχηματική αναπαράσταση του κύκλου πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν για την διερεύνηση του πρωτοκόλλου επαγωγή έκφρασης της πρωτεΐνης *LdSNX* στους 37 °C.

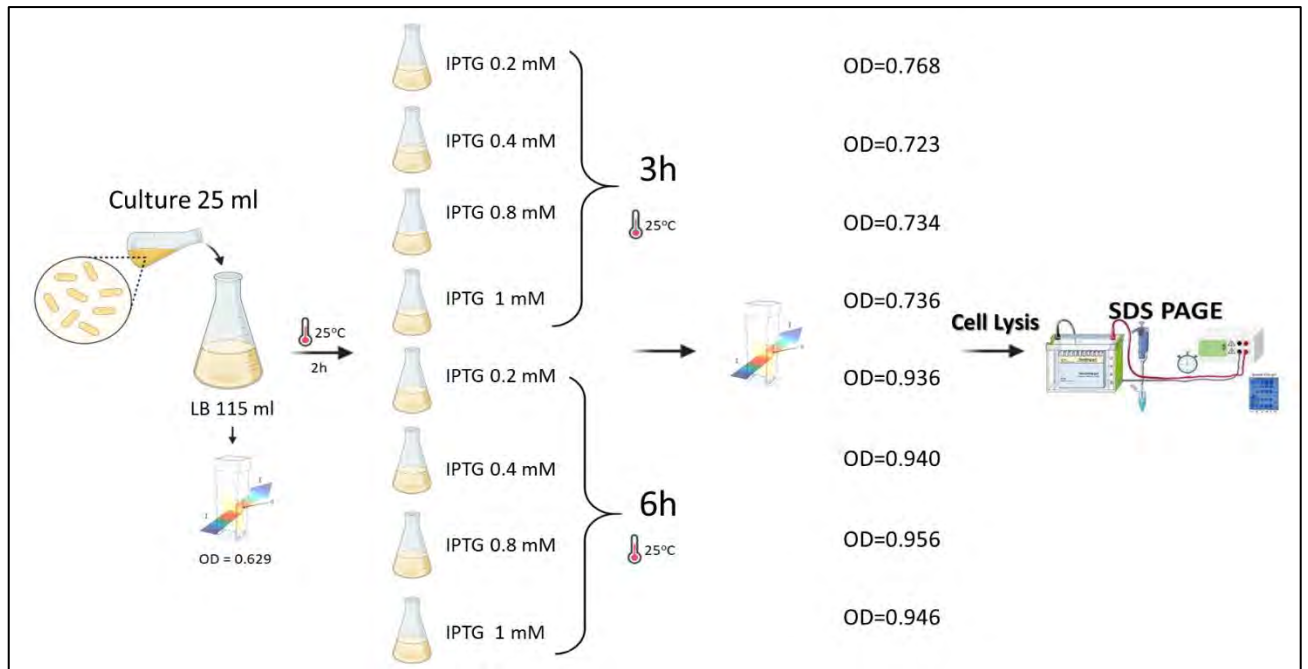


Εικόνα 3.2.1.2 Ανάλυση πρωτεϊνικών δειγμάτων σε SDS-PAGE από τον κύκλο πειραμάτων για την διερεύνηση του πρωτοκόλλου επαγωγής έκφρασης της πρωτεΐνης *GST-LdSNX* σε κύτταρα *E. coli BL21* στους 37 °C.

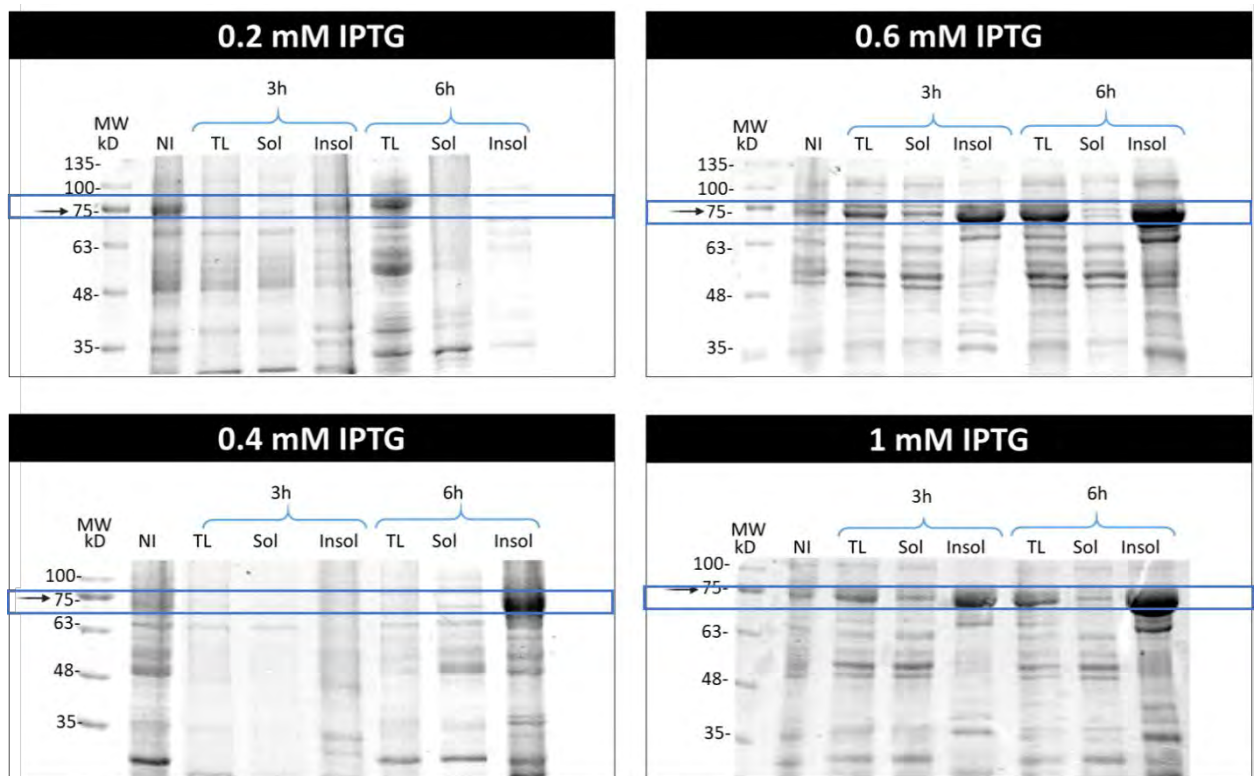
Στη συνέχεια μελετήθηκαν συνθήκες επαγωγής έκφρασης της πρωτεΐνης *GST-LdSNX* στους 25 °C, μια θερμοκρασία που προτείνεται στη βιβλιογραφία για την παραγωγή ανασυνδιασμένων πρωτεϊνών, ώστε αφενός να μην παράγεται η ανασυνδιασμένη πρωτεΐνη σε μεγάλες ποσότητες ώστε να μην μπορεί να αποκτήσει τοξική δράση στο ετερόλογο σύστημα έκφρασης των βακτηρίων και αφετέρου να επαρκούν οι πρωτεΐνες συνοδοί για την σωστή αναδίπλωση της στο ετερόλογο σύστημα έκφρασης ώστε να αποφεύγεται η καθίζηση σε συσσωματώματα που

ονομάζονται inclusion bodies. Η διαδικασία ξεκίνησε με την δημιουργία υγρής καλλιέργειας εντός θρεπτικού υλικού LB με ενοφθαλισμό με μια αποικία τρυβλίου πρόσφατα μετασχηματισμένων βακτηρίων. Η καλλιέργεια επώαστηκε στους 25 °C overnight υπό ανάδευση. Την επόμενη ημέρα, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της τιμής OD₆₀₀ της καλλιέργειας (OD₆₀₀ = 0.129) και αραίωση στα 100 ml. Η καλλιέργεια επώαστηκε και πάλι στους 25 °C overnight υπό ανάδευση. Η τιμή OD₆₀₀ την επόμενη ημέρα, ήταν 1,7, περισσότερο πυκνή από το επιθυμητό. Ακολούθησε αραίωση 25 ml της καλλιέργειας σε 100 ml θρεπτικό υλικό μέχρι όπου η τιμή OD₆₀₀ να προσεγγίσει το 0,6. Απαιτήθηκαν δύο ώρες επώασης υπό ανάδευση στους 25 °C. Έπειτα, ακολούθησε επαγωγή έκφρασης της πρωτεΐνης GST-LdSNXi με IPTG. Συνολικά πραγματοποιήθηκαν οχτώ επαγωγές, με διαφορετικές συγκεντρώσεις IPTG και διαφορετικό χρόνο επώασης. Οι πρώτες, αφορούσαν επαγωγή με χρόνο επώασης 3 ώρες. Δοκιμάστηκαν οι συγκεντρώσεις IPTG: 0,2 mM, 0,4 mM, 0,6 mM και 1 mM. Αντίστοιχα, έγιναν επώσεις για χρόνο 6 ωρών. Με την περάτωση του σταδίου επαγωγής έκφρασης της πρωτεΐνης σε κάθε συνθήκη, πραγματοποιήθηκαν σχετικές μετρήσεις OD₆₀₀. Για επαγωγές με επώαση 3 ώρες ήταν: 0,728, 0,723, 0,734 και 0,736 αντίστοιχα. Για επαγωγές 6 ωρών, οι τιμές του OD₆₀₀ ήταν: 0,936, 0,940, 0,956 και 0,946 αντίστοιχα (**Εικόνα 3.2.1.3**).

Επόμενο βήμα, αποτέλεσε ο έλεγχος διαλυτότητας της GST-LdSNXi στα βακτήρια που προέκυψαν από τις παραπάνω συνθήκες επαγωγής έκφρασης (χρήση του Πρωτοκόλλου Διαλυτότητας B) και ανάλυση των πρωτεϊνικών δειγμάτων με SDS-PAGE και εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών με χρώση Coomassie (Coomassie brilliant blue Stain). Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3.2.1.4**, στις 6 ώρες επώασης όλη σχεδόν η ποσότητα της πρωτεΐνης ανακτάται στο αδιάλυτο κλάσμα. Στις συνθήκες επαγωγής με συγκεντρώσεις IPTG 0,2 mM και 0,4 mM παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα της έκφρασης της πρωτεΐνης δεν ήταν υψηλά τόσο για τις 3 όσο και για τις 6 ώρες επώασης. Στο πρωτόκολλο που περιλαμβάνει 1 mM IPTG παρατηρήθηκε μια αρκετά επιτυχημένη επαγωγή στις 3 ώρες επώασης, ενώ στις 6 ώρες η πρωτεΐνη ανακτήθηκε σχεδόν εξ' ολοκλήρου στο ίζημα (αδιάλυτο κλάσμα), όπως ακριβώς συνέβει και στην περίπτωση του πρωτοκόλλου που περιλαμβάνει επαγωγή με συγκέντρωση IPTG 0.6 mM και 6 ώρες επώασης. Οι συνθήκες που έδωσαν το βέλτιστο αποτέλεσμα τόσο στην επαγωγή έκφρασης της πρωτεΐνης GST-LdSNXi όσο και στη διαλυτότητα της κατά τον πρώτο κύκλο διερεύνησης, ήταν η επαγωγή με συγκέντρωση IPTG 0,6 mM για 3 ώρες καθώς και η επαγωγή με 1 mM IPTG για 3 ώρες (**Εικόνα 3.2.1.4**).

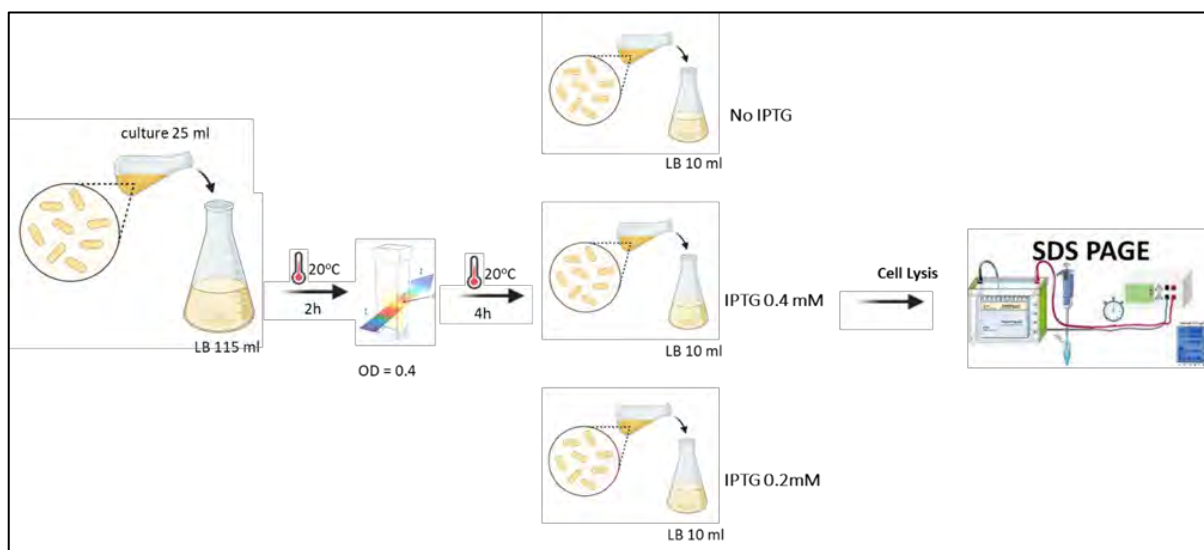


Εικόνα 3.2.1.3 Σχηματική αναπαράσταση του κύκλου πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν για την διερεύνηση του πρωτοκόλλου επαγωγής έκφρασης της πρωτεΐνης *LdSNX1* στους 25 °C.

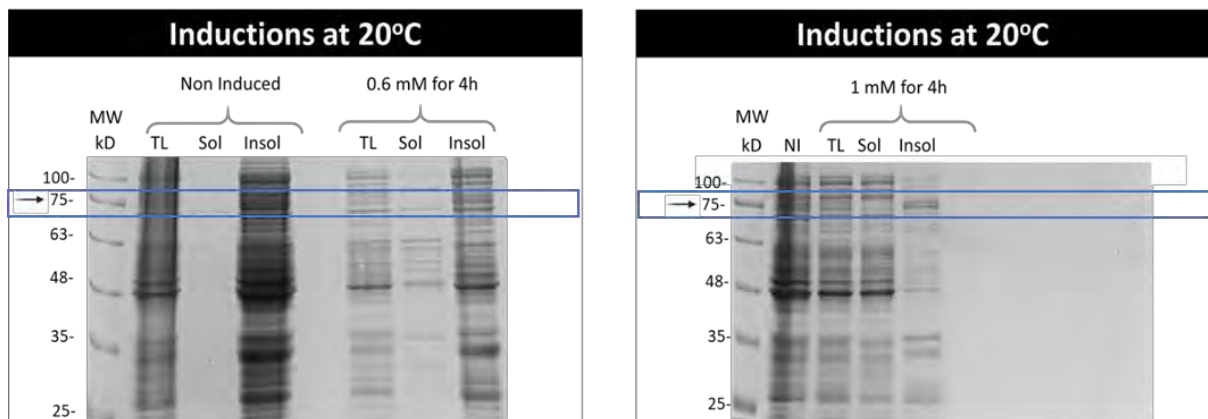


Εικόνα 3.2.1.4 Ανάλυση πρωτεϊνικών δειγμάτων σε SDS-PAGE από τον κύκλο πειραμάτων για την διερεύνηση του πρωτοκόλλου επαγωγής έκφρασης της πρωτεΐνης *GST-LdSNX1* σε κύτταρα *E. coli BL21* στους 25 °C.

Τέλος, μελετήθηκαν συνθήκες επαγωγής έκφρασης της πρωτεΐνης GST-*LdSNX*_i σε ακόμη μικρότερη θερμοκρασία, στους 20°C. Η διαδικασία ξεκίνησε και πάλι με τη δημιουργία υγρής καλλιέργειας εντός θρεπτικού υλικού LB, με εμβολιασμό με μια αποικία τρυβλίου βακτηρίων πρόσφατα μετασχηματισμένων με το πλασμίδιο pGEX-4T1-*ldsnx_i*. Η καλλιέργεια επώαστηκε στους 37 °C overnight υπό ανάδευση. Την επόμενη ημέρα, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της τιμής OD₆₀₀ της καλλιέργειας (τιμή: 1,7) και εφόσον η τιμή δεν βρέθηκε εντός του επιθυμητού εύρους που αφορά τη λογαριθμική φάση της ανάπτυξης των βακτηρίων (OD₆₀₀ : 0,4-0,6), πραγματοποιήθηκε αραίωση 25 ml καλλιέργειας σε 115 ml LB ώστε το OD₆₀₀ να είναι ~ 0,4. Στη συνέχεια ακολούθησε επαγωγή έκφρασης της πρωτεΐνης *LdSNX*_i με χρήση IPTG. Οι επαγωγές έγιναν με συγκεντρώσεις IPTG 0,2 mM και 0,4 mM για 4 ώρες. (Εικόνα 3.2.1.5). Ακολούθησε ο έλεγχος διαλυτότητας της GST-*LdSNX*_i στα κύτταρα που υπέστησαν επαγωγή, αλλά και σε μια καλλιέργεια στην οποία δεν προστέθηκε επαγωγέας. Τα αποτελέσματα του τρίτου κύκλου διερεύνησης παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.2.1.7. Σε όλες τις περιπτώσεις, η μείωση της θερμοκρασίας δεν επέφερε ικανοποιητική επαγωγή έκφρασης διαλυτής πρωτεΐνης GST-*LdSNX*_i (Εικόνα 3.2.1.6).



Εικόνα 3.2.1.5 Σχηματική αναπαράσταση του κύκλου πειραμάτων που πραγματοποιήθηκε για την διερεύνηση του πρωτοκόλλου επαγωγή έκφρασης της πρωτεΐνης GST-*LdSNX*_i στους 20 °C.



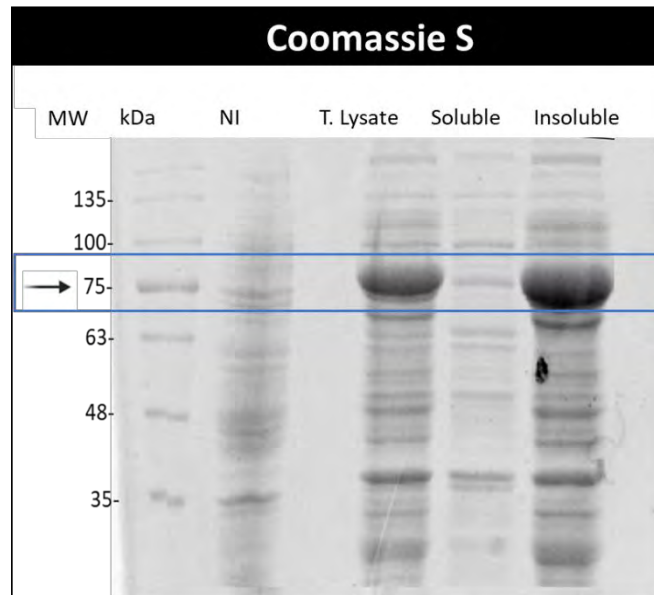
Εικόνα 3.2.1.6 Ανάλυση πρωτεϊνικών δειγμάτων σε SDS-PAGE από τον κύκλο πειραμάτων για την διερεύνηση του πρωτοκόλλου επαγωγής έκφρασης της πρωτεΐνης GST-*LdSNX*i σε κύτταρα *E. coli BL21* στους 20 °C.

Συμπερασματικά, με βάση τα αποτελέσματα των πειραμάτων που παρατέθηκαν ανωτέρω, ως βέλτιστες συνθήκες επαγωγής έκφρασης της πρωτεΐνης GST-*LdSNX*i και ανάκτησης ικανοποιητικής ποσότητας στο διαλυτό κλάσμα των βακτηριακών κυττάρων καθορίστηκαν αυτές που περιλαμβάνουν επώαση των βακτηρίων στους 25 °C και επαγωγή με συγκέντρωση IPTG 0,6 mM ή 1 mM για 3 ώρες.

3.2.2 Διερεύνηση πρωτοκόλλου λύσης μετασχηματισμένων βακτηριακών κυττάρων *E. coli BL21* και διαλυτοποίησης της πρωτεΐνης GST-*LdSNX*i

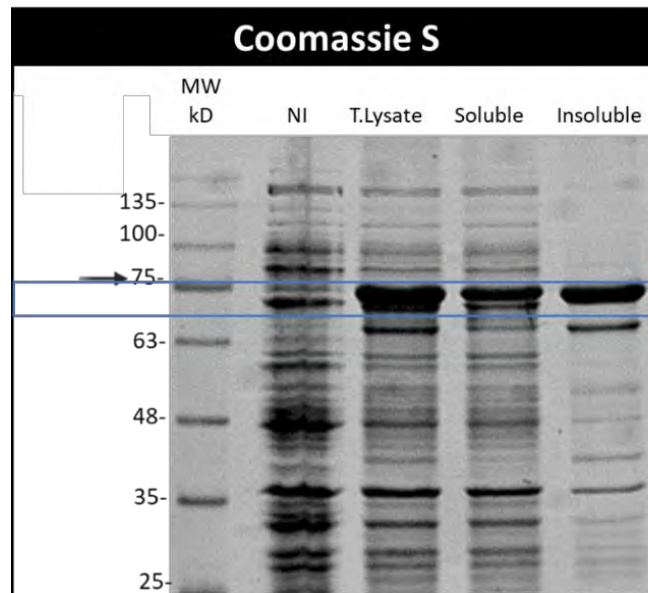
Εκτός από προσδιορισμό και βελτιστοποίηση των συνθηκών επαγωγής έκφρασης της πρωτεΐνης, έπρεπε να προσδιοριστούν και οι βέλτιστες συνθήκες λύσης των βακτηριακών κυττάρων και ανάκτησης της GST-*LdSNX*i στο διαλυτό κλάσμα του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος. Σε προηγούμενα πιλοτικά πειράματα που είχαν πραγματοποιηθεί στο εργαστήριο Ενδοκυττάρου Παρασιτισμού αλλά και στην πλειοψηφία των διαφορετικών συνθηκών που δοκιμάστηκαν στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, αντιμετωπίστηκε δυσκολία στο στάδιο αυτό, μιας και η πρωτεΐνη GST-*LdSNX*i έχει υψηλό μοριακό βάρος και υδρόφοβες περιοχές και κατά τη λύση των κυττάρων ανακτάται στο αδιάλυτο κλάσμα του κυτταρικού εκχυλίσματος. Για επίτευξη της απομόνωσής της αλλά και προσδιορισμό των μοριακών συνοδών της είναι απαραίτητο να ανακτάται επαρκής ποσότητα στο διαλυτό κλάσμα. Το **Πρωτόκολλο Α**, το οποίο αφορά τη θραύση βακτηριακών κυττάρων προήλθε από ένα σύνολο τροποποιήσεων σε ήδη δημοσιευμένα πρωτοκόλλα της βιβλιογραφίας. Παρόλο που η GST-*LdSNX*i ανακτάται στο διαλυτό κλάσμα η μεγαλύτερη της ποσότητα καθιζάνει με τα inclusion bodies στο αδιάλυτο κλάσμα (ίζημα). Η

προσπάθεια επαναδιάλυσης του ιζήματος με χρήση του ίδιου πρωτοκόλλου δεν επέφερε περαιτέρω διαλυτοποίηση της πρωτεΐνης (**Εικόνα 3.2.2.1**).



Εικόνα 3.2.2.1 Έλεγχος διαλυτότητας της πρωτεΐνης GST-LdSNXι με χρήση του Πρωτοκόλλου Α. Ανάλυση πρωτεϊνικών δειγμάτων από τη λύση βακτηριακών κυττάρων σε SDS-PAGE.

Με βάση το Πρωτόκολλο Α (Παράγραφος 2.2.7) καθώς και βιβλιογραφικά δεδομένα διαμορφώθηκε το Πρωτόκολλο Β (Παράγραφος 2.2.7), το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως βασική μεθοδολογία στα πειράματα που ακολούθησαν. Η διαφορά των δύο πρωτοκόλλων εντοπίζεται κυρίως στο στάδιο επώασης των κυττάρων με τη λυσοζύμη. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3.2.2.2**, η θραύση των κυττάρων ήταν αρκετά ικανοποιητική ενώ η διαλυτοποίηση της πρωτεΐνης επιτεύχθηκε σε ένα ποσοστό περίπου 40%, ικανό ώστε να είναι δυνατή η απομόνωσή της.



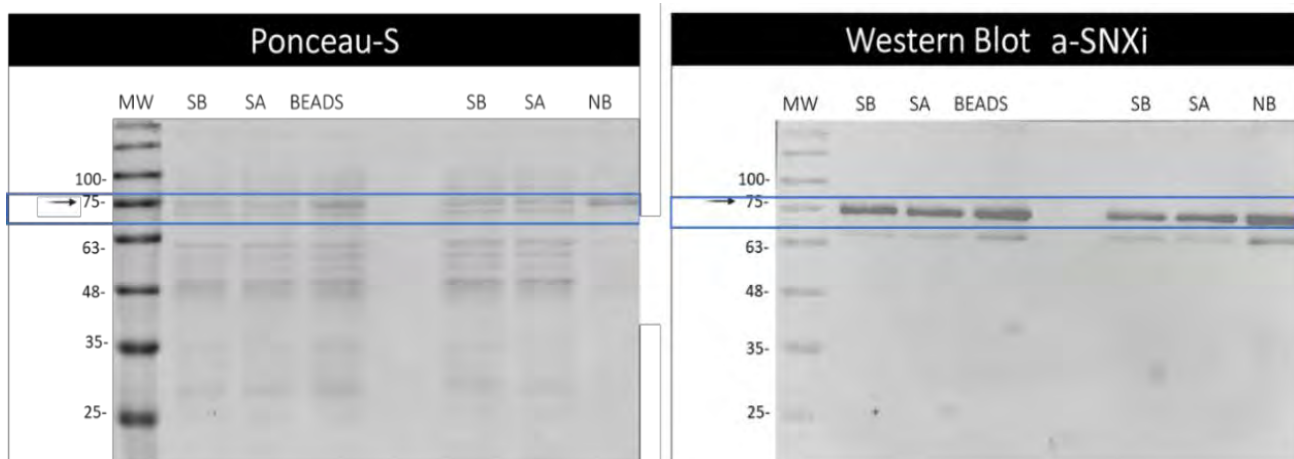
Εικόνα 3.2.2.2 Αποτελέσματα λύσης βακτηριακών κυττάρων με τη χρήση του Πρωτοκόλλου B, έλεγχος διαλυτότητας της πρωτεΐνης GST- *LdSNXi*.

3.2.3 Απομόνωση και καθαρισμός της πρωτεΐνης *LdSNXi* με μεθόδους χρωματογραφίας υψηλής χημικής συγγένειας (High Affinity Chromatography)

Οι περισσότερες από τις μεθόδους για τον καθαρισμό των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών βασίζονται στη χρωματογραφία συγγένειας. Οι τεχνικές χρωματογραφίας πραγματοποιούν έναν διαχωρισμό με βάση τις διαφορές μεταξύ των χημικών ιδιοτήτων της πρωτεΐνης που πρόκειται να απομονωθεί και των χημικών ιδιοτήτων των υπολοίπων μορίων του δείγματος. Αυτές οι ιδιότητες μπορεί να είναι μεταξύ άλλων χημική συγγένεια συγκεκριμένων δομών του μορίου προς συγκεκριμένα χρωματογραφικά υλικά, το ηλεκτρικό φορτίο ή το μέγεθος. Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για τον καθαρισμό πρωτεϊνών είναι η χρωματογραφία υψηλής χημικής συγγένειας, η οποία διαχωρίζει τις πρωτεΐνες με βάση την ειδική αλληλεπίδρασή τους με μια χημική ομάδα πάνω στο υλικό της χρωματογραφίας. Είναι μια από τις πιο αποτελεσματικές τεχνικές, καθώς εκμεταλλεύεται την ενσωμάτωση μιας επιλεγμένης δομικής περιοχής (που ονομάζεται «ετικέτα – tag») στην πρωτεΐνη. Τέτοια «ετικέτα» δεν υπάρχει σε κανένα άλλο μόριο του δείγματος, προσδίδοντας στην πρωτεΐνη-στόχο τα ειδικά χαρακτηριστικά που θα χρησιμοποιηθούν για τη διάκριση και τον διαχωρισμό από τα υπόλοιπα. Αφού διερευνήθηκαν και καθορίστηκαν τα πρωτόκολλα που αφορούν την έκφραση, την παραγωγή και τη διαλυτότητα της πρωτεΐνης *LdSNXi*, επόμενο στόχος ήταν ο προσδιορισμός των συνθηκών απομόνωσής της.

3.2.3.1 Επιλογή μεθοδολογίας για την πρόσδεση της πρωτεΐνης *LdSNX* με μεθόδους χρωματογραφίας υψηλής χημικής συγγένειας (high affinity chromatography)

Το πρώτο στάδιο της διαδικασίας, αποτέλεσε η δοκιμή δύο διαφορετικών μεθόδων για την πρόσδεση της *LdSNX* μέσω της ετικέτας GST (GST tag-glutathione transferase-26 kDa) που είναι ενσωματωμένη στην αλληλουχία της πρωτεΐνης (βλ Πρόλογος) σε μόρια γλουταθιόνης και Nanobodies ειδικών για την GST, προσδεδεμένα σε σφαιρίδια αγαρόζης (υλικό χρωματογραφίας). Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3.2.3.1** και στις δύο περιπτώσεις η πρόσδεση έγινε σε ικανοποιητικά ποσοστά με τα Nanobodies να παρουσιάζουν λιγότερη μη ειδική πρόσδεση άλλων βακτηριακών πρωτεϊνών. Παρ' όλα αυτά, επιλέχθηκε η μεθοδολογία με τα σφαιρίδια γλουταθιόνης λόγω μεγαλύτερης διαθεσιμότητας του υλικού στο εργαστήριο.



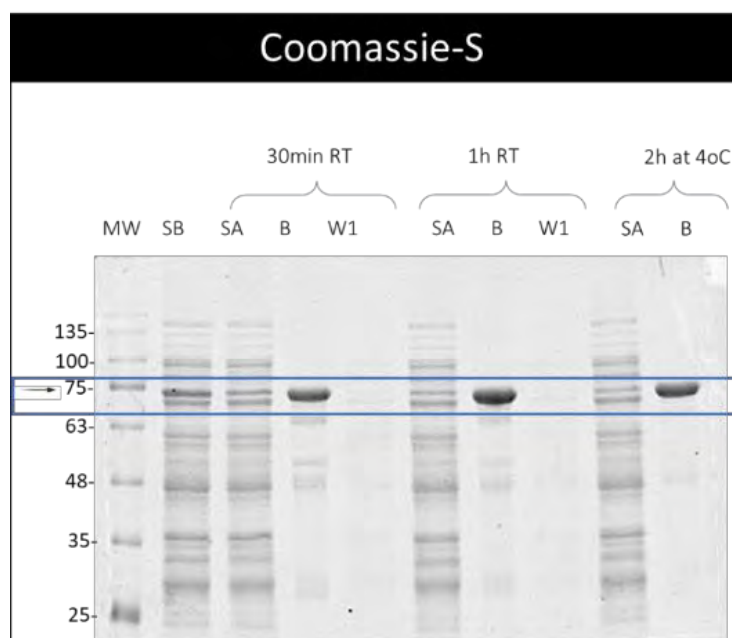
Εικόνα 3.2.3.1 Δοκιμή δύο μεθόδων πρόσδεσης της πρωτεΐνης *LdSNX* μέσω χρωματογραφίας υψηλής συγγένειας σε σφαιρίδια με Glutathione ή Nanobodies. SB: Διαλυτό κλάσμα των μετασχηματισμένων βακτηρίων που παράγουν *LdSNX* πριν τη διαδικασία πρόσδεσης; SA: Διαλυτό κλάσμα των μετασχηματισμένων βακτηρίων που παράγουν *LdSNX* μετά τη διαδικασία πρόσδεσης; BEADS: σφαιρίδια αγαρόζης με Glutathione; NB: σφαιρίδια Nanobodies.

3.2.3.2 Διερεύνηση πρωτοκόλλου πρόσδεσης της πρωτεΐνης GST-*LdSNX* σε σφαιρίδια αγαρόζης με γλουταθιόνη (Glutathione agarose beads)

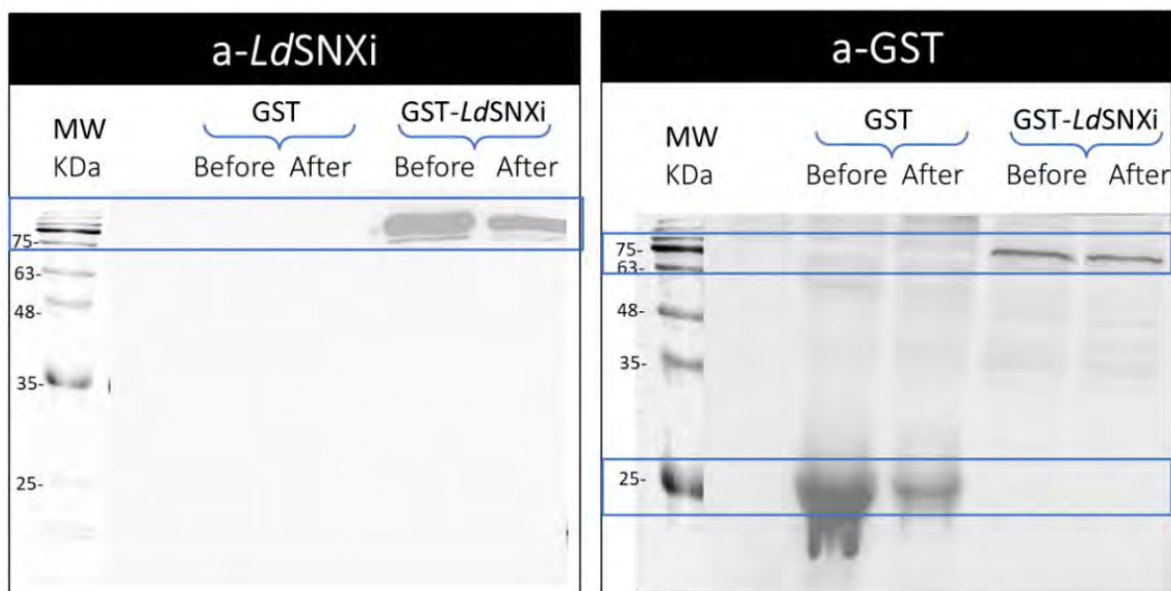
Εφόσον επιλέχθηκε η μεθοδολογία που θα ακολουθηθεί σχετικά για το χρωματογραφικό υλικό για την απομόνωση της GST-*LdSNX*, ακολούθησε προσδιορισμός των συνθηκών πρόσδεσης της ανασυνδιασμένης πρωτεΐνης στα σφαιρίδια αγαρόζης με γλουταθιόνη. Δοκιμάστηκαν τρεις διαφορετικές συνθήκες, που περιελάμβαναν 30 λεπτά πρόσδεσης σε θερμοκρασία δωματίου, 1 ώρα πρόσδεσης σε θερμοκρασία δωματίου και 2 ώρες πρόσδεσης στους 4 °C. Η πρόσδεση της GST-*LdSNX* στα σφαιρίδια γλουταθιόνης και στις τρεις συνθήκες πραγματοποιήθηκε σε

παρόμοια ποσοστά, όμως στην περίπτωση της συνθήκης που αφορά 2 ώρες πρόσδεση στους 4 °C παρατηρήθηκε ότι υπάρχουν οι λιγότερες μη ειδικές προσδέσεις. Επομένως επιλέχθηκαν οι συνθήκες που περιλαμβάνουν πρόσδεση για 2 ώρες στους 4 °C (Εικόνα 3.2.3.2.1).

Στην περίπτωση της GST-*LdSNX*i παρατηρείται πρόσδεση στα σφαιρίδια γλουταθιόνης σε ποσοστό περίπου 40% ενώ στην περίπτωση της GST που χρησιμοποιήθηκε ως control παρατηρείται πρόσδεση σε ποσοστό μεγαλύτερο από 90% (Εικόνα 3.2.3.2.1).



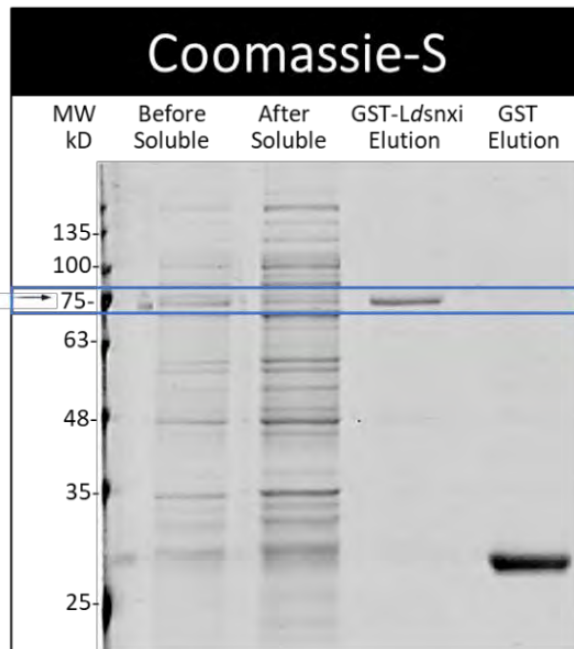
Εικόνα 3.2.3.2.1 Διερεύνηση πρωτοκόλλου πρόσδεσης της πρωτεΐνης GST-*LdSNX*i σε σφαιρίδια αγαρόζης με γλουταθιόνη. SB: Διαλυτό κλάσμα των μετασχηματισμένων βακτηρίων που παράγουν GST-*LdSNX*i πριν τη διαδικασία πρόσδεσης σε σφαιρίδια γλουταθιόνης; SA: Διαλυτό κλάσμα των μετασχηματισμένων βακτηρίων που παράγουν GST-*LdSNX*i μετά τη διαδικασία πρόσδεσης σε σφαιρίδια αγαρόζης με γλουταθιόνη; B: Σφαιρίδια αγαρόζης με γλουταθιόνη με προσδεμένη GST-*LdSNX*i; W: Εκπλύσεις των σφαιριδίων αγαρόζης με γλουταθιόνη με προσδεμένη GST-*LdSNX*i με σκοπό την απομάκρυνση των μη ειδικά προσδεμένων βακτηριακών πρωτεϊνών στα σφαιρίδια αγαρόζης με γλουταθιόνη.



Εικόνα 3.2.3.2.2 Έλεγχος πρόσδεσης της πρωτεΐνης GST-*LdSNXi* σε σφαιρίδια αγαρόζης με γλουταθιόνη με ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western Blot) τόσο με αντίσωμα a-GST όσο και με a-*LdSNXi*. Before: Διαλυτό κλάσμα των μετασχηματισμένων βακτηρίων που παράγουν GST-*LdSNXi* πριν τη διαδικασία πρόσδεσης σε σφαιρίδια αγαρόζης με γλουταθιόνη; After: Διαλυτό κλάσμα των μετασχηματισμένων βακτηρίων που παράγουν GST-*LdSNXi* μετά τη διαδικασία πρόσδεσης σε σφαιρίδια αγαρόζης με γλουταθιόνη.

3.2.3.3 Απομόνωση και καθαρισμός της πρωτεΐνης GST-*LdSNXi*

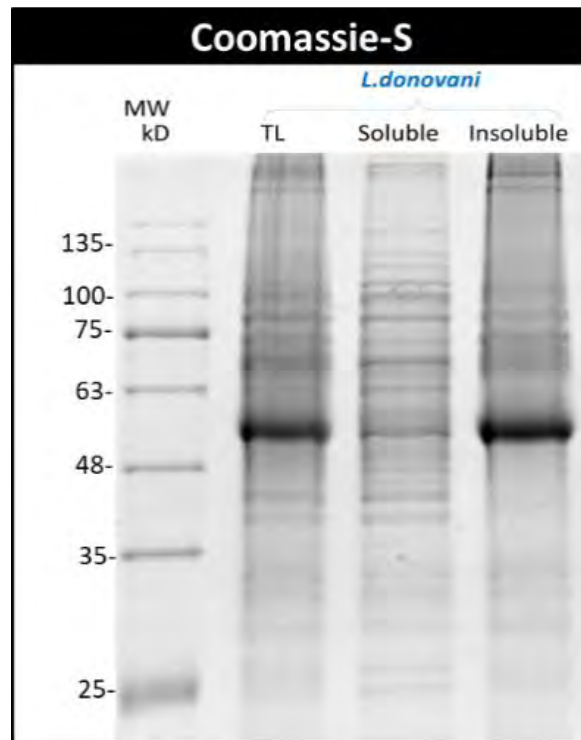
Τελικό στάδιο αυτής της πειραματικής μελέτης, αποτέλεσε η απομόνωση της πρωτεΐνης με έκλυση (elution) από τα σφαιρίδια αγαρόζης με γλουταθιόνη με χρήση διαλύματος γλουταθιόνης 10 mM. Όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 3.2.3.3.1, απομονώθηκε αρκετή πρωτεΐνη GST-*LdSNXi* (~ 1 μg - ποσοτικοποίηση μέσω επεξεργασίας της ψηφιακής εικόνας της πηκτής με το εργαλείο ImageJ) για τη χρήση της στα επόμενα στάδια της διατριβής.



Εικόνα 3.2.3.3.1 Απομόνωση πρωτεΐνης GST-*LdSNXi* και GST μετά από έκλουση από τα σφαιρίδια γλουταθιόνης με διάλυμα που περιέχει 10 mM γλουταθιόνης. Before Soluble: Διαλυτό κλάσμα των μετασχηματισμένων βακτηρίων που παράγουν GST-*LdSNXi* πριν τη διαδικασία πρόσδεσης σε σφαιρίδια γλουταθιόνης; After Soluble: Διαλυτό κλάσμα από το ολικό εκχύλισμα των μετασχηματισμένων βακτηρίων που παράγουν GST-*LdSNXi* μετά τη διαδικασία πρόσδεσης σε σφαιρίδια γλουταθιόνης; GST-*LdSNXi* elution: Απομονωμένη GST-*LdSNXi*; GST elution: Απομονωμένη GST (control).

3.2.4 Λύση ευκαρυωτικών κυττάρων

Μετά τον προσδιορισμό του πρωτοκόλλου για την απομόνωση της πρωτεΐνης GST-*LdSNXi*, ακολούθησε ο προσδιορισμός πρωτοκόλλου λύσης των ευκαρυωτικών κυττάρων (*Leishmania donovani* και ανθρώπινων THP1 μακροφάγων) προκειμένου να διαχωριστεί το κλάσμα του συνόλου των διαλυτών πρωτεϊνών και να χρησιμοποιηθεί για υλοποίηση δοκιμών για απομόνωση πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την GST-*LdSNXi* (Pull-down assays). Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.2.4.1, με το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε (Υλικά και Μέθοδοι, Κεφάλαιο 2.2.9) επιτυγχάνεται ικανοποιητική λύση των κυττάρων του πρωτοζώου *Leishmania donovani* (στέλεχος LG13) όπως φαίνεται από την ποσότητα των κυτταρικών πρωτεϊνών που ανακτήθηκε στο διαλυτό κλάσμα. Το ίδιο πρωτόκολλο εφαρμόστηκε και σε ανθρώπινα κύτταρα THP1.

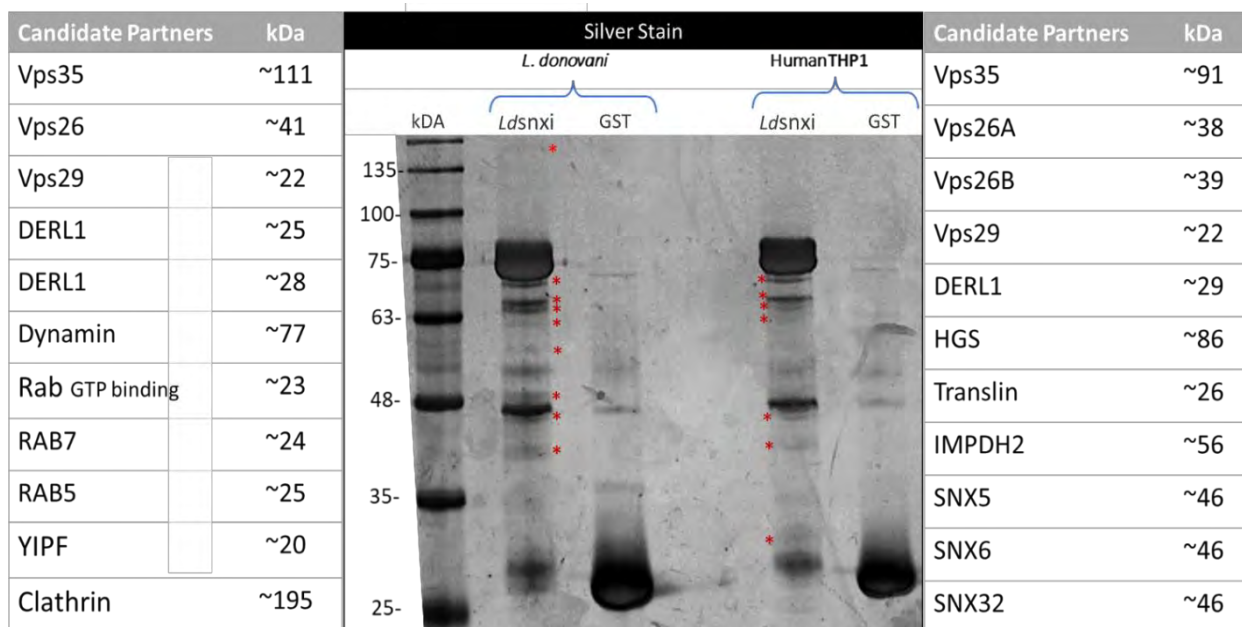


Εικόνα 3.2.4.1 Ανάλυση κυτταρικών εκχυλισμάτων από κύτταρα *Leishmania donovani* LG13. TL: Ολικό εκχύλισμα; Soluble: Διαλυτό κλάσμα; Insoluble: Αδιάλυτο κλάσμα. Η κύρια πρωτεϊνική ζώνη που ανιχνεύεται στο αδιάλυτο κλάσμα είναι η κύρια πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού των μικροσωληνίσκων τουμπουλίνη.

3.2.5 Pull-Down Assays σε εκχυλίσματα κυττάρων *leishmania donovani* και ανθρώπινα μακροφάγα THP1 για ανίχνευση πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη GST-*LdSNX1*

Μετά τη βελτιστοποίηση των απαιτούμενων πρωτοκόλλων πραγματοποιήθηκαν pull down assay τόσο σε ολικό κλάσμα διαλυτών πρωτεϊνών από κύτταρα *Leishmania donovani* LG13 και κύτταρα ανθρώπινων μακροφάγων THP1. Σε αυτά τα πειράματα ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο που περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.10 στις Μεθόδους. Οι πρωτεΐνες από τα δύο διαφορετικά εκχυλίσματα που προσδέθηκαν στα σφαιρίδια αγαρόζης που φέρουν την GST-*LdSNX1* ή την GST (δείγμα ελέγχου) αναλύθηκαν με SDS PAGE σε γειτονικές διαδρομές και εμφανίστηκαν με χρώση αργύρου (Silver stain) (Εικόνα 3.2.5.1). Υπάρχουν αρκετές πρωτεϊνικές ζώνες που ανιχνεύονται μόνο στην διαδρομή GST-*LdSNX1* που θα μπορούσαν να θεωρηθούν πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν ειδικά με την *LdSNX1* και όχι με την GST.

Για λόγους σύγκρισης, στην Εικόνα 3.5.1 έχουν τοποθετηθεί δύο πίνακες με τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών που έχουν προβλεφθεί (Κεφάλαιο 3.1.3.4, Εικόνες 3.1.7, 3.1.8) να αλληλεπιδρούν με την *LdSNX1* όσο και με τις νεξίνες 1 και 2 με βάση πειραματικά δεδομένα (Κεφάλαιο 3.1.3.4, Εικόνες 3.1.9, 3.1.10). Με αστερίσκο σημάνθηκαν οι πρωτεϊνικές ζώνες οι οποίες θα μπορούσαν να αντιπροσωπεύουν πρωτεΐνες από τους προβλεφθέντες μοριακούς partners με αντίστοιχα μοριακά βάρη. Σε ένα επόμενο στάδιο μελέτης θα γίνει ανάλυση των πρωτεϊνών που δεσμεύονται στα σφαιρίδια αγαρόζης που φέρουν προσδεσμένη GST-*LdSNX1* με φασματοσκοπία μάζας για ταυτοποίηση των πρωτεϊνών που ανιχνεύονται σε αυτό το gel.



Εικόνα 3.2.5.1 Pull-down Assays για ανίχνευση μοριακών partners της GST-*LdSNXi* σε *Leishmania donovani* (στελεχος LG13) και ανθρώπινα μακροφάγα THP1. Ανάλυση σε SDS PAGE των πρωτεϊνών που δεσμεύτηκαν σε GST-*LdSNXi* σφαιρίδια αγαρόζης και σε GST σφαιρίδια αγαρόζης και εμφάνιση με χρώση αργύρου (silver stain). Δεξιά και αριστερά των εικόνων της γέλης πολυακρυλαμίδης μετά από χρώση αργύρου έχουν τοποθετηθεί πίνακες με τα μοριακά βάρη των υποψήφιων πρωτεϊνών που προβλέπονται να αλληλεπιδρούν με την SNXi σύμφωνα με τις προβλέψεις που αναγράφονται στη βάση δεδομένων String και με τις νεξίνες 1 και 2 (SNX1, SNX2) με βάση πειραματικά δεδομένα. Με αστερίσκο σημάνθηκαν οι πρωτεϊνικές ζώνες οι οποίες θα μπορούσαν να αντιπροσωπεύουν πρωτεΐνες από τους προβλεφθέντες partners με αντίστοιχα μοριακά βάρη.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η νόσος της Λεισμανίασης προκαλείται από μόλυνση με ενδοκυττάρια παράσιτα του γένους *Leishmania*. Οι θεραπευτικές προσεγγίσεις που υπάρχουν για τη λεισμανίαση δεν επαρκούν για την αντιμετώπιση της ασθένειας καθώς τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται έχουν ηπατοτοξική ή καρδιοτοξική δράση. Ορισμένα χρειάζονται ενδοφλέβια χορήγηση που απαιτεί πρόσβαση σε εγκαταστάσεις νοσοκομείου κάτι που είναι δύσκολο στις περισσότερες χώρες του τρίτου κόσμου όπου ενδημεί η ασθένεια ενώ παράλληλα έχουν αναπτυχθεί ανθεκτικά στελέχη παρασίτου για τα φάρμακα πρώτης γραμμής. Τελευταία, ερευνητικό ενδιαφέρον υπάρχει για εκκρινόμενα στο εξωκυττάριο περιβάλλον μακρομόρια του γένους *Leishmania* ως στόχους για ανάπτυξη νέων φαρμάκων.

Πρόσφατες μελέτες ανέδειξαν πως τα ευκαρυωτικά (παθογόνα) παράσιτα *Phytophthora infestans* και *Plasmodium falciparum* χρησιμοποιούν στρατηγικές μολυσματικότητας που αξιοποιούν τη συντήρηση ορισμένων μοτίβων πρόσδεσης πρωτεϊνών (δηλ. RxLR-dEER στην περίπτωση του *P. infestans* και RxLxE/D/Q στο *P. falciparum*) η οποία εκτείνεται και στους οργανισμούς που αποτελούν υποψήφιους ξενιστές τους.⁴⁸ Η πρόσδεση των πρωτεϊνών αυτών πραγματοποιείται μέσω των ειδικών συντηρημένων στα παράσιτα μοτίβων που συσχετίζονται με το φωσφοϊνοσιτιδίο PI(3)P του ξενιστή, γεγονός που φαίνεται να αποτελεί κρίσιμο βήμα για την εισχώρηση των παρασίτων εντός του (ξενιστή). Η αλληλεπίδραση των παρασίτων με το PI(3)P των υποψήφιων ξενιστών τους (μέσω των αντίστοιχων μοτίβων πρόσδεσης), θα μπορούσε να αποτελέσει έναν νέο μηχανισμό δέσμευσης PI(3)P που αποσκοπεί στη λοιμογόνο δράση των διαφόρων ευκαρυωτικών παθογόνων.

Η πρόσδεση στο PI(3)P πραγματοποιείται από τρεις δομικές περιοχές σε πρωτεΐνες ευκαρυωτικών κυττάρων (τις FYVE, PX, και PROPPINS). Οι πρωτεΐνες που εμπεριέχουν αυτές τις περιοχές θα μπορούσαν να είναι υποψήφιοι μολυσματικοί παράγοντες.⁴⁹ Στο πλαίσιο αυτής της παραδοχής, η εκκρινόμενη πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο *LdBPK_352470*, θα μπορούσε να αποτελεί υποψήφιο μολυσματικό παράγοντα, δεδομένης της υψηλής συντήρησης που εμφανίζει στην δομική περιοχή PX σε σύγκριση με τις ομόλογες πρωτεΐνες του ανθρώπου, έναν από τους θηλαστικούς ξενιστές του παρασίτου. Το πρωτεϊνικό προϊόν του γονιδίου *LdBPK_352470* έχει ονομασθεί *LdSNXi* (ως *Leishmania donovani* Sorting NeXin i), μια ονομασία που προέρχεται από το γεγονός ότι αποτελεί την πρώτη λεισμανιακή πρωτεΐνη που χαρακτηρίζεται ως νεξίνη διαλογής (SNX).

Η παρούσα διπλωματική διατριβή είχε ως στόχο την διερεύνηση λειτουργικών ιδιοτήτων της πρωτεΐνης *LdSNX*_i μέσω των πρωτεϊνικών της αλληλεπιδράσεων. Αρχικά πραγματοποιήθηκαν σχετικές προβλέψεις και μοντελοποιήσεις με τη χρήση της βιοπληροφορικής, οι οποίες πλαισιώθηκαν στη συνέχεια από βιοχημικά πειράματα.

Η *LdSNX*_i, είναι συντηρημένη στα περισσότερα είδη *Leishmania*, γεγονός που υπογραμμίζει τη σημαντικότητα της στη βιωσιμότητα των παρασίτων. Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός πως η *LdSNX*_i είναι υψηλά συντηρημένη σε επίπεδο δομής σε σχέση με τις ανθρώπινες νεξίνες διαλογής που ανήκουν στην ίδια υπο-οικογένεια SNX-BAR. Σύμφωνα με τις κατά ζεύγη στοιχίσεις που πραγματοποιήθηκαν, η *LdSNX*_i δεν εμφανίζει πολύ υψηλά ποσοστά συντήρησης στην αλληλουχία των αμινοξέων. Δεδομένα που προέκυψαν από την υπέρθεση των τρισδιάστατων δομών PX της *LdSNX*_i και της ανθρώπινης νεξίνης 7 (SNX 7) καθώς και κατά ζεύγη στοιχίσεις, ανέδειξαν την SNX7 ως δομικά όμοια της παρασιτικής πρωτεΐνης στην περιοχή PX. Η περιοχή αυτή, όπως αναφέρθηκε, είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση των πρωτεϊνών σε φωσφοϊνοσιτιδία. Δεν βρέθηκε όμως ίδια συντήρηση στη δομή της περιοχής BAR των *LdSNX*_i και SNX7. Στατιστικά σημαντική ομοιότητα, εμφανίζει η *LdSNX*_i αποκλειστικά με την ανθρώπινη νεξίνη 2 (SNX2). Φυλογενετική ανάλυση ανέδειξε πως η *LdSNX*_i βρίσκεται εξελικτικά πιο κοντά και πάλι με την SNX2. Το γεγονός πως οι δύο δομικές περιοχές από τις οποίες απαρτίζεται η πρωτεΐνη, εμφανίζουν ομολογία με διαφορετική ανθρώπινη νεξίνη μπορεί να αποτελέσει βάση για τον περαιτέρω λειτουργικό χαρακτηρισμό της *LdSNX*_i. Επίσης, μπορεί η *LdSNX*_i να αποτελεί ένα πρόδρομο μόριο των ανθρώπινων PX-BAR νεξινών διαλογής και με αυτόν τον τρόπο να δικαιολογείται το γεγονός ότι οι δομικές της περιοχές εμφανίζουν ομοιότητα με τις αντίστοιχες περιοχές δύο διαφορετικών πρωτεϊνικών μορίων του ανθρώπου. Προβλέψεις αναφορικά με τους μοριακούς συνοδούς των *LdSNX*_i (μέσω της ομολογίας της *LinSNX*_i από το είδος *Leishmania infantum*) καθώς και των ανθρώπινων νεξινών διαλογής SNX1, SNX2, SNX4 και SNX7 ανέδειξαν τις νεξίνες διαλογής SNX1 και SNX2 ως υποψήφιες λειτουργικά ομόλογες πρωτεΐνες της *LdSNX*_i. Οι πρωτεΐνες αυτές προβλέπεται να μοιράζονται τέσσερις κοινούς μοριακούς συνοδούς (partners) με τους οποίους εμφανίζεται να υπάρχει ισχυρή αλληλεπίδραση. Οι partners περιλαμβάνουν τις πρωτεΐνες που αποτελούν το retromer complex (Vps26, Vps35, Vps29) καθώς και την πρωτεΐνη Derlin-1. Αξιοσημείωτο είναι ότι ως μοριακός συνοδός στο παράσιτο εντοπίζεται μια επιπλέον πρωτεΐνη που περιέχει τη δομική περιοχή DER1, της πρωτεΐνης Derlin-1, ενώ στις υπόλοιπες περιπτώσεις δεν έχει καταγραφεί κάτι τέτοιο.

Στο εργαστηριακό πειραματικό μέρος της διατριβής, πρώτο βήμα αποτέλεσε ο μετασχηματισμός χημειοδεκτικών βακτηρίων *E. coli* BL21 με το πλασμίδιο pGEX-4T1-*ldsni*, και η δημιουργία κλώνου μετασχηματισμένου στελέχους βακτηρίων που φέρει το πλασμίδιο. Στη συνέχεια

βελτιστοποιήθηκαν οι συνθήκες έκφρασης της πρωτεΐνης GST-*LdSNXi* σε αυτά τα βακτήρια. Οι συνθήκες αυτές περιλάμβαναν την επώαση των βακτηρίων για 3 ώρες στους 25 °C με τη προσθήκη επαγωγέα ισοπρόπυλο-β-D θειογαλακτοπυρανόζη (IPTG) σε τελική συγκέντρωση 0,6 mM. Εκτός από τις συνθήκες επαγωγής έκφρασης της πρωτεΐνης προέκυψε η ανάγκη βελτιστοποίησης των συνθηκών λύσης των βακτηριακών κυττάρων και ανάκτησης της GST-*LdSNXi* στο διαλυτό κλάσμα. Στο εργαστήριο αντιμετωπίστηκε μεγάλη δυσκολία στο στάδιο αυτό μιας και η πρωτεΐνη έχει υψηλό μοριακό βάρος και υδροφοβες περιοχές και ανακτάται στο αδιάλυτο κλάσμα των βακτηρίων. Με τροποίσεις του πρωτοκόλου επιτεύχθηκε η λύση των κυττάρων και η ανάκτηση ποσοστού 40-50% της πρωτεΐνης GST-*LdSNXi* στο διαλυτό κλάσμα-ποσοστό αρκετά ικανοποιητικό λαμβάνοντας υπόψιν τη φύση της πρωτεΐνης. Μετά τη λύση, ακολούθησε η βελτιστοποίηση των συνθηκών απομόνωσής της GST-*LdSNXi* χρησιμοποιώντας χρωματογραφία υψηλής συγγένειας και τέλος η υλοποίηση του πρωτοκόλλου Pull-Down Assay σε παρασιτικά κύτταρα *Leishmania donovani* και σε ανθρώπινα μακροφάγα THP1 κύτταρα. Η μέθοδος αυτή αποτελεί μια από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους μελέτης πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Οι πρωτεΐνες που ανακτήθηκαν με αυτή την τεχνική αναλύθηκαν με SDS-PAGE και εμφανίστηκαν με χρώση αργύρου (Silver Stain), μιας ευαίσθητης χρώσης πρωτεϊνών σε γέλη πολυακρυλαμίδης η οποία αποκαλύπτει πρωτεϊνικές ζώνες που προκύπτουν από >100 ng πρωτεϊνών. Η χρώση αυτή χρησιμοποιείται σε πρωτόκολλα ταυτοποίησης μοριακών συνοδών. Τα αποτελέσματα αυτής της τεχνικής ανέδειξαν την ύπαρξη αρκετών μοριακών συνοδών με μοριακά βάρη που θα μπορούσαν να αντιστοιχισθούν σε αυτά των πρωτεϊνών που προβλέφθηκαν ως μοριακοί συνοδοί από την βιοπληροφορική ανάλυση (Κεφάλαιο 3.1.3.4). Μελλοντικά πειράματα για την μελέτη της λειτουργίας της πρωτεΐνης *LdSNXi*, αποτελεί η ταυτοποίηση με χρήση ειδικών αντισώματα (Western Blot ανάλυση) κάποιων από τους μοριακούς συνοδούς που ευρέθησαν στην παρούσα διατριβή με το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε καθώς και η πραγματοποίηση φασματογραφίας μάζας (Mass Spectroscopy) για την ταυτοποίηση όλων των πρωτεϊνών που κατακριμνίζονται από τα εκχυλίσματα των κυττάρων *Leishmania* ή THP1 μακροφάγων με τα σφαιρίδια αγαρόζης GST-*LdSNXi*.

1. Pace D. Leishmaniasis. *J Infect.* 2014;69(S1):S10-S18. doi:10.1016/j.jinf.2014.07.016
2. Akhoundi M, Downing T, Votýpka J, et al. Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis. *Mol Aspects Med.* 2017;57:1-29. doi:10.1016/j.mam.2016.11.012
3. Wheeler RJ, Gluenz E, Gull K. The cell cycle of Leishmania: morphogenetic events and their implications for parasite biology. *Mol Microbiol.* 2011;79(3):647. doi:10.1111/J.1365-2958.2010.07479.X
4. Landfear SM. New Vistas in the Biology of the Flagellum—Leishmania Parasites. *Pathog 2022, Vol 11, Page 447.* 2022;11(4):447. doi:10.3390/PATHOGENS11040447
5. Bates PA. Leishmania sand fly interaction: progress and challenges. *Curr Opin Microbiol.* 2008;11(4):340. doi:10.1016/J.MIB.2008.06.003
6. Sunter J, Gull K. Shape, form, function and Leishmania pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. *Open Biol.* 2017;7(9). doi:10.1098/RSOB.170165
7. Harhay MO, Olliaro PL, Costa DL, Costa CHN. Urban parasitology: Visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends Parasitol.* 2011;27(9):403-409. doi:10.1016/j.pt.2011.04.001
8. Leishmaniasis. Accessed January 13, 2023. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
9. Arenas R, Torres-Guerrero E, Quintanilla-Cedillo MR, Ruiz-Esmenjaud J. Leishmaniasis: A review. *F1000Research.* 2017;6. doi:10.12688/F1000RESEARCH.11120.1/DOI
10. Dujardin JC, Campino L, Cañavate C, et al. Spread of vector-borne diseases and neglect of Leishmaniasis, Europe. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(7):1013-1018. doi:10.3201/EID1407.071589
11. Tzani M, Barrasa A, Vakali A, Georgakopoulou T, Mellou K, Pervanidou D. Surveillance data for human leishmaniasis indicate the need for a sustainable action plan for its management and control, Greece, 2004 to 2018. *Eurosurveillance.* 2021;26(18):2000159. doi:10.2807/1560-7917.ES.2021.26.18.2000159/CITE/PLAINTEXT
12. Gkolfinopoulou K, Bitsolas N, Patrinos S, et al. Epidemiology of human leishmaniasis in Greece, 1981-2011. *Eurosurveillance.* 2013;18(29):20532. doi:10.2807/1560-7917.ES2013.18.28.20532
13. Tsirigotakis N, Pavlou C, Christodoulou V, et al. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in the Greek Aegean Islands: Ecological approaches. *Parasites and Vectors.* 2018;11(1):1-14. doi:10.1186/S13071-018-2680-4/TABLES/6
14. Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19(1):111-126. doi:10.1128/CMR.19.1.111-126.2006
15. Toepp AJ, Bennett C, Scott B, Senesac R, Oleson JJ, Petersen CA. Maternal Leishmania infantum infection status has significant impact on leishmaniasis in offspring. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019;13(2). doi:10.1371/JOURNAL.PNTD.0007058
16. Mcgwire BS, Satoskar AR. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *QJM An Int J Med.* 2014;107(1):7-14. doi:10.1093/QJMED/HCT116
17. As 'Flesh-Eating' Leishmania Come Closer, a Vaccine Against Them Does, Too | Research. Accessed March 26, 2023. <https://research.gatech.edu/flesh-eating-leishmania-come-closer-vaccine-against-them-does-too>
18. Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet.* 2005;366(9496):1561-1577. doi:10.1016/S0140-6736(05)67629-5
19. Ghorbani M, Farhodi R. Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy? *Drug Des*

- Devel Ther.* 2018;12:25. doi:10.2147/DDDT.S146521
20. Balla T. Phosphoinositides: tiny lipids with giant impact on cell regulation. *Physiol Rev.* 2013;93(3):1019-1137. doi:10.1152/PHYSREV.00028.2012
 21. Cestari I, Stuart K. The phosphoinositide regulatory network in *Trypanosoma brucei*: Implications for cell-wide regulation in eukaryotes. *PLoS Negl Trop Dis.* 2020;14(10):1-21. doi:10.1371/JOURNAL.PNTD.0008689
 22. Hammond GRV, Burke JE. Novel roles of phosphoinositides in signaling, lipid transport, and disease. *Curr Opin Cell Biol.* 2020;63:57-67. doi:10.1016/J.CEB.2019.12.007
 23. Di Paolo G, De Camilli P. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature.* 2006;443(7112):651-657. doi:10.1038/NATURE05185
 24. Singh N, Reyes-Ordoñez A, Compagnone MA, et al. Redefining the specificity of phosphoinositide-binding by human PH domain-containing proteins. *Nat Commun.* 2021;12(1). doi:10.1038/S41467-021-24639-Y
 25. Cernikova L, Faso C, Hehl AB. Roles of Phosphoinositides and Their binding Proteins in Parasitic Protozoa. *Trends Parasitol.* 2019;35(12):996-1008. doi:10.1016/J.PT.2019.08.008
 26. Stahelin R V., Scott JL, Frick CT. Cellular and molecular interactions of phosphoinositides and peripheral proteins. *Chem Phys Lipids.* 2014;182:3-18. doi:10.1016/J.CHEMPHYSLIP.2014.02.002
 27. Cockcroft S, Raghu P. Phospholipid transport protein function at organelle contact sites. *Curr Opin Cell Biol.* 2018;53:52-60. doi:10.1016/J.CEB.2018.04.011
 28. Leonarditis G, Siokos J, Skaripa I, Galanopoulou D. Genome-wide analysis of the phosphoinositide kinome from two ciliates reveals novel evolutionary links for phosphoinositide kinases in eukaryotic cells. *PLoS One.* 2013;8(11). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0078848
 29. Chandra M, Collins BM. The Phox Homology (PX) Domain. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1111:1-17. doi:10.1007/5584_2018_185
 30. Lemmon MA. Pleckstrin Homology (PH) domains and phosphoinositides. *Biochem Soc Symp.* 2007;74(74):81. doi:10.1042/BSS0740081
 31. Chandra M, Collins BM. The Phox Homology (PX) Domain. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1111:1-17. doi:10.1007/5584_2018_185/COVER
 32. Ponting CP. Novel domains in NADPH oxidase subunits, sorting nexins, and PtdIns 3-kinases: binding partners of SH3 domains? *Protein Sci.* 1996;5(11):2353-2357. doi:10.1002/PRO.5560051122
 33. Cullen PJ, Cozier GE, Banting G, Mellor H. Modular phosphoinositide-binding domains-their role in signalling and membrane trafficking. *Curr Biol.* 2001;11(21). doi:10.1016/S0960-9822(01)00523-1
 34. Balla T. Phosphoinositide-derived messengers in endocrine signaling. *J Endocrinol.* 2006;188(2):135-153. doi:10.1677/JOE.1.06595
 35. Chandra M, Chin YKY, Mas C, et al. Classification of the human phox homology (PX) domains based on their phosphoinositide binding specificities. *Nat Commun.* 2019;10(1). doi:10.1038/S41467-019-09355-Y
 36. van Weering JRT, Verkade P, Cullen PJ. SNX-BAR proteins in phosphoinositide-mediated, tubular-based endosomal sorting. *Semin Cell Dev Biol.* 2010;21(4):371-380. doi:10.1016/J.SEMCDB.2009.11.009
 37. Xu Y, Hortsman H, Seet L, Wong SH, Hong W. SNX3 regulates endosomal function through its PX-domain-mediated interaction with PtdIns(3)P. *Nat Cell Biol.* 2001;3(7):658-666. doi:10.1038/35083051
 38. Carman PJ, Dominguez R. BAR domain proteins-a linkage between cellular membranes, signaling pathways, and the actin cytoskeleton. *Biophys Rev.* 2018;10(6):1587-1604. doi:10.1007/S12551-018-0467-7

39. van Weering JRT, Verkade P, Cullen PJ. SNX-BAR-mediated endosome tubulation is co-ordinated with endosome maturation. *Traffic*. 2012;13(1):94-107. doi:10.1111/J.1600-0854.2011.01297.X
40. Yong X, Zhao L, Deng W, et al. Mechanism of cargo recognition by retromer-linked SNX-BAR proteins. *PLoS Biol*. 2020;18(3). doi:10.1371/JOURNAL.PBIO.3000631
41. Carlton J, Bujny M, Peter BJ, et al. Sorting Nexin-1 Mediates Tubular Endosome-to-TGN Transport through Coincidence Sensing of High-Curvature Membranes and 3-Phosphoinositides. *Curr Biol*. 2004;14(20):1791-1800. doi:10.1016/J.CUB.2004.09.077
42. Van Weering JRT, Sessions RB, Traer CJ, et al. Molecular basis for SNX-BAR-mediated assembly of distinct endosomal sorting tubules. *EMBO J*. 2012;31(23):4466-4480. doi:10.1038/EMBOJ.2012.283
43. Maxwell MJ, Chan SK, Robinson DP, et al. Proteomic analysis of the secretome of *Leishmania donovani*. *Genome Biol*. 2008;9(2). doi:10.1186/GB-2008-9-2-R35
44. Dennis EA. Handbook of Cell Signaling. *Handb Cell Signal*. 2003;1-3:1-709. doi:10.1016/B978-0-12-124546-7.X5358-3
45. McGough IJ, de Groot REA, Jellett AP, et al. SNX3-retromer requires an evolutionary conserved MON2:DOPEY2:ATP9A complex to mediate Wntless sorting and Wnt secretion. *Nat Commun* 2018 91. 2018;9(1):1-13. doi:10.1038/s41467-018-06114-3
46. Rao B, Li S, Yao D, et al. The cryo-EM structure of an ERAD protein channel formed by tetrameric human Derlin-1. *Sci Adv*. 2021;7(10). doi:10.1126/SCIADV.ABE8591
47. Hettema EH, Lewis MJ, Black MW, Pelham HRB. Retromer and the sorting nexins Snx4/41/42 mediate distinct retrieval pathways from yeast endosomes. *EMBO J*. 2003;22(3):548-557. doi:10.1093/EMBOJ/CDG062
48. Jiang RHY, Stahelin R V., Bhattacharjee S, Haldar K. Eukaryotic virulence determinants utilize phosphoinositides at the ER and host cell surface. *Trends Microbiol*. 2013;21(3):145-156. doi:10.1016/j.tim.2012.12.004
49. Jiang RHY, Stahelin R V., Bhattacharjee S, Haldar K. Eukaryotic virulence determinants utilize phosphoinositides at the ER and host cell surface. *Trends Microbiol*. 2013;21(3):145-156. doi:10.1016/j.tim.2012.12.004