ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

# *ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ ΤΟΥ ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ LEISHMANIA ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΕΝΖΥΜΙΚΩΝ ΔΟΚΙΜΑΣΙΩΝ*

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΝΕΚΤΑΡΙΟΣ ΣΙΩΤΑΣ

ΑΜ: 62114021

ΑΘΗΝΑ 2019

ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΠΑΣΤΕΡ
INSTITUT PASTEUR HELLENIQUE

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ**

Βογιατζάκη Χρυσάνθη
Λέκτορας
Εργαστήριο Ανοσολογίας,
Μοριακής Μικροβιολογίας
Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

**ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΣ ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ**

Σμυρλή Δέσποινα
Ερευνήτρια Γ'
Εργαστήριο Μοριακής Παρασιτολογίας
Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

University of West Attica

# *Production and purification of recombinant Leishmania kinases for the development of enzyme assays*

Bachelor's Thesis

George Nektarios Siotas
Register Number:
62114021

Athens, 201

SUPERVISING TUTOR
Voyiatzaki Chryssa
Ph.D. Lecturer
Laboratory of Immunology and
Molecular Microbiology
University of West Attica

SCIENTIFIC DIRECTOR
Smirlis Despina
C' Researcher
Molecular Parasitology Laboratory
Hellenic Pasteur Institute

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES

***Ευχαριστίες***

Η παρούσα Διπλωματική Εργασία με θέμα «Παραγωγή και Καθαρισμός Ανασυνδυασμένων Κινασών του Παρασίτου *Leishmania* για την Ανάπτυξη Ενζυμικών Δοκιμασιών» πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο εκπόνησης Διπλωματικής Εργασίας του τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, σε συνεργασία με το Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ το έτος 2018-2019

Ευχαριστώ θερμά το προσωπικό του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ για την συνεργασία μας και συγκεκριμένα την επιβλέπουσα ερευνήτρια του Τμήματος Μοριακής Παρασιτολογίας, Δρ. Δέσποινα Σμυρλή για την καθοδήγηση και την πολύτιμη γνώση που μου παρείχε καθ' όλη την διάρκεια εκπόνησης της Διπλωματικής Εργασίας. Αλλά και τον μοριακό βιολόγο Daniel Carrasco Navarro για την συμπληρωματική βοήθεια του στην ανάπτυξη των μεθόδων·

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την καθηγήτρια μου, Δρ. Χρυσάνθη Βογιατζάκη, λέκτορα Ανοσολογίας και Παρασιτολογίας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, για την επιλογή και την ανάθεση του θέματος, τις συμβουλές της και την εμπιστοσύνη στο πρόσωπό μου όλον αυτόν τον καιρό.

Ακόμη, είμαι ευγνώμων για την παραχώρηση εργαστηριακού εξοπλισμού, αναλωσίμων και αντιδραστηρίων του Τμήματος Μοριακής Παρασιτολογίας, χωρίς τα οποία δεν θα ήταν εφικτή η ολοκλήρωση του ερευνητικού μέρους της εργασίας μου.

Ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω και στους φίλους-συναδέλφους μου που ήταν πάντα εκεί για εμένα, για τα όμορφα φοιτητικά χρόνια που περάσαμε μαζί και για τις ευχάριστες στιγμές που μου χάρισαν.

Τέλος πάνω από όλα, θέλω να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για ό,τι μου έχει προσφέρει από την αρχή μέχρι το τέλος των σπουδών μου και όχι μόνο.

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

1 ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΉΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ..... 11
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ ..... 12
2 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ..... 13
2.1 Λεϊσμανίαση ..... 13
2.2 Ιστορικά Στοιχεία ..... 13
3 ΤΟ ΠΑΡΑΣΙΤΟ ..... 15
3.1 Συστηματική ταξινόμηση ..... 15
3.2 Μορφολογικά χαρακτηριστικά ..... 16
3.2.1 Προμαστιγωτή μορφή ..... 16
3.2.2 Αμαστιγωτή μορφή ..... 17
4 ΕΝΔΙΑΜΕΣΟΣ ΞΕΝΙΣΤΗΣ ..... 18
5 ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ..... 20
6 ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗΣ ..... 22
6.1 Δερματική Λεϊσμανίαση (Cutaneous Leishmaniasis - CL) ..... 23
6.2 Βλεννογονοδερματική Λεϊσμανίαση ( Mucocutaneous Leishmaniasis - MCL) ..... 23
6.3 Σπλαχνική Λεϊσμανίαση (Visceral Leishmaniasis - VL) ..... 24
6.4 Υποτροπιάζουσα Λεϊσμανίαση (Leishmaniasis Recidivans - LR) ..... 25
6.5 Δερματική Μετά-Kala azar Λεϊσμανίαση (Post-Kala azar Dermal Leishmaniasis, PKDL) ..... 25
7 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ..... 26
8 ΣΥΛΛΟΙΜΩΞΗ HIV - LEISHMANIA ..... 29
9 ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗΣ ..... 31
9.1 Διαγνωστικοί μέθοδοι ανεύρεσης παρασίτων ..... 31
9.2 Ανοσολογικές μέθοδοι διάγνωσης ..... 32
9.3 Μοριακές τεχνικές ..... 33
10 ΘΕΡΑΠΕΙΑ ..... 34
10.1 Ενώσεις πεντασθενούς Αντιμονίου ..... 34
10.2 Αμφοτερικίνη Β ..... 35
10.3 Μιλτεφοσίνη ..... 35
10.4 Πενταμιδίνη ..... 36
10.5 Παρομομυκίνη ..... 37
10.6 Στοχευμένη θεραπεία ..... 37

11 ΚΙΝΑΣΕΣ ..... 39
11.1 Παρασιτικές Κινάσες ..... 40
11.1.1 Κινάσες Aurora ..... 40
11.1.2 Κινάσες DYRKs ..... 42
ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ ..... 47
12 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ..... 48
12.1 ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΚΑΙ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ..... 48
12.1.1 Αναλώσιμα ..... 48
12.1.2 Εξοπλισμός ..... 48
12.2 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ..... 49
12.2.1 Διαλύματα βακτηριακών κυττάρων ..... 49
12.2.2 Διαλύματα πλύσης και έκλουσης σφαιριδίων ..... 50
12.2.3 Διαλύματα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών (SDS-PAGE) ..... 50
12.2.4 Διαλύματα διαπίδυσης πρωτεϊνών ..... 52
12.2.5 Διαλύματα ενζυμικής δοκιμασίας ..... 52
12.3 Αρχές Μεθόδων ..... 54
12.3.1 Παραγωγή πρωτεϊνών ..... 54
12.3.2 Χρωματογραφία συγγενείας - Ετικέτες (Tags) ..... 59
12.3.3 Διαπίδυση ..... 60
12.3.4 Ηλεκτροφόρηση ..... 61
12.3.5 Φωταύγεια ..... 63
12.4 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ ..... 65
12.4.1 Μετασχηματισμός κυττάρων E. coli BL21 ..... 65
12.4.2 Ανάπτυξη των κυττάρων και επαγωγή πρωτεϊνών ..... 65
12.4.3 Λύση των κυττάρων - Απομόνωση πρωτεϊνών ..... 66
12.4.4 Καθαρισμός πρωτεϊνών με χρωματογραφία συγγενείας ..... 66
12.4.5 Διαλυτοποίηση του βακτηριακού ιζήματος με διάλυμα 8M ουρίας. ..... 67
12.4.6 Διαπίδυση πρωτεϊνών- LinAuroraK ..... 67
12.4.7 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών, SDS-PAGE ..... 68
12.4.8 Ενζυμική δοκιμασία ενεργότητας ..... 69
13 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ..... 70
13.1 LinAuroraK ..... 70
13.2 DYRK 21 (LinJ.21.2010) ..... 72

13.3 DYRK1 και DYRK1 (ePK) ..... 73
13.4 Ενζυμική δοκιμασία DYRK1 ePK ..... 74
14 ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ..... 75
15 ΠΕΡΙΛΗΨΗ ..... 78
16 ABSTRACT ..... 79
17 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ..... 80

# 1 ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στο πλαίσιο των περιορισμένων επιλογών αποτελεσματικών φαρμάκων για την λεϊσμανίαση, ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η παραγωγή και ο καθαρισμός ανασυνδυασμένων κινασών των ομάδων DYRK και Aurora του παρασίτου *Leishmania infantum* με απώτερο στόχο τη δημιουργία ενζυμικών δοκιμασιών κινάσης μέτριας σάρωσης για τον έλεγχο φαρμάκων που αναστέλλουν αυτές τις παρασιτικές κινάσες.

# ***ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ***

# 2 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 2.1 Λεϊσμανίαση

Η λεϊσμανίαση είναι ένας παγκόσμιος όρος για την περιγραφή δερματικών και σπλαχνικών ανθρωπονοτικών και ζωονοτικών νοσημάτων που προκαλούνται από τα παράσιτα του γένους *Leishmania*. Είναι μια παραμελημένη τροπική νόσος και θεωρείται ασθένεια των φτωχών. Παρά το γεγονός ότι είναι πιο συχνή στις αναπτυσσόμενες χώρες της Ασίας, της Ανατολικής Αφρικής και της Λατινικής Αμερικής, η λεϊσμανίαση είναι επίσης ενδημική και σε αρκετές μεσογειακές χώρες, καθιστώντας την επικίνδυνη τόσο για τους κατοίκους όσο και για τους ταξιδιώτες. Εκδηλώνεται με ένα φάσμα κλινικών χαρακτηριστικών που κυμαίνονται από ιάσιμα δερματικά έλκη μέχρι μαζική καταστροφή των ιστών, ακόμη και θάνατο [1]. Κατέχει την δεύτερη θέση θνησιμότητας μεταξύ όλων των παρασιτικών νόσων μετά από την ελονοσία, και την τρίτη συνηθέστερη αιτία νοσηρότητας μετά από ελονοσία και την σχιστοσωμίαση, ενώ το μεγαλύτερο ποσοστό των ατόμων που νοσούν αφορά παιδιά ηλικίας μικρότερης των 15 ετών [2]. Η νόσος μεταδίδεται στον άνθρωπο μέσω ενδιάμεσου ξενιστή, και συγκεκριμένα με δήγμα του δέρματος από θηλυκές σκνίπες. Ποικιλία ζώων χρησιμεύει ως φυσική δεξαμενή του παρασίτου και περιλαμβάνει τόσο οικόσιτα όσο και άγρια ζώα (σκύλοι, τρωκτικά, αλεπούδες, τσακάλια, λύκους, ρακούν, υρακοειδή και βραδύποδες). Επειδή η λεϊσμανίαση είναι ευκαιριακή νόσος, υψηλό κίνδυνο εμφάνισης παρουσιάζουν οι ανοσοκατασταλμένοι ασθενείς. Η αύξηση του αριθμού τους (παραδείγματος χάριν από τη λοίμωξη με τον ιό HIV), καθώς και άλλοι παράγοντες όπως η κλιματική αλλαγή και η αύξηση των σκνιπών, οι μετακινήσεις πληθυσμών κ.α., έχουν οδηγήσει σε κλιμάκωση των κρουσμάτων της νόσου [3].

## 2.2 Ιστορικά Στοιχεία

**Εικόνα 1** William Boog Leishman (wikipedia.com).

Η ταυτοποίηση του παρασίτου ήταν πρακτικά αδύνατη μέχρι την ανακάλυψη του οπτικού μικροσκοπίου, ωστόσο οι εμφανείς παραμορφωτικές καταστάσεις στο δέρμα και στους χόνδρους που προκαλούνται από τη δερματική και τη βλεννογονοδερματική λεϊσμανίαση ήταν ικανές για την αναγνώριση της ασθένειας. Υπάρχουν αναφορές για τέτοια περιστατικά στην βιβλιοθήκη του βασιλέως Ashurbanipal, μερικά από τα οποία πιστεύεται ότι έχουν προέλθει από προηγούμενα κείμενα του 1500-2500 π.Χ. Ακόμη έχουν αναγνωρισθεί γλυπτά από τον 5ο μ.Χ. αιώνα και κείμενα Ισπανών ιεραποστόλων το 16ο μ.Χ. αιώνα όπου διακρίνονται τα χαρακτηριστικά της νόσου.

Το 1862 η νόσος είχε εξαπλωθεί στο Bardhaman της Ινδίας, σε διαστάσεις επιδημίας, με αρκετούς ιατρούς της εποχής να είναι πεπεισμένοι ότι ήταν μια λοιμογόνος μορφή ελονοσίας. Η παρατήρηση των παρασίτων *Leishmania* πραγματοποιήθηκε για πρώτη

φορά λίγα χρόνια μετά από τον David D. Cuningham το 1885 και τον Peter Borovsky το 1898 ενώ η λεπτομερής περιγραφή τους έγινε στη συνέχεια από τον William Boog Leishman το 1900 και τον Charles Donovan το 1903, προς τιμή των οποίων ονομάστηκαν τα παράσιτα [4].

# 3 ΤΟ ΠΑΡΑΣΙΤΟ

## 3.1 Συστηματική ταξινόμηση

Η ταξινόμηση του παρασίτου *Leishmania* αρχικά βασίστηκε σε οικοβιολογικά κριτήρια σε συσχέτιση με τον ενδιάμεσο φορέα ξενιστή, τη γεωγραφική κατανομή, τον τροπισμό και την κλινική εκδήλωση των συμπτωμάτων. Ωστόσο, οι βιοχημικές και μοριακές αναλύσεις έδειξαν ότι τα κριτήρια αυτά ήταν συχνά ανεπαρκή και συνεπώς άλλα κριτήρια όπως η αλληλουχία του γονιδιακού υλικού του πυρήνα και του κινητοπλάστη (kDNA), πρωτεΐνες ή αντιγόνα έλαβαν καταλυτικό ρόλο στην ταξινόμηση του παρασίτου [5]. Η χρήση αυτών των μοριακών τεχνικών οδήγησε στη δημοσίευση ενός ταξινομικού σχεδίου από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (Π.Ο.Υ. ή W.H.O.) [6], όπως φαίνεται και στον πίνακα 1. Έκτοτε ανά τακτικά χρονικά διαστήματα οι επιστήμονες με την εξέλιξη των τεχνικών μέσων και της έρευνας προτείνουν μικρές τροποποιήσεις του σχεδίου αυτού.

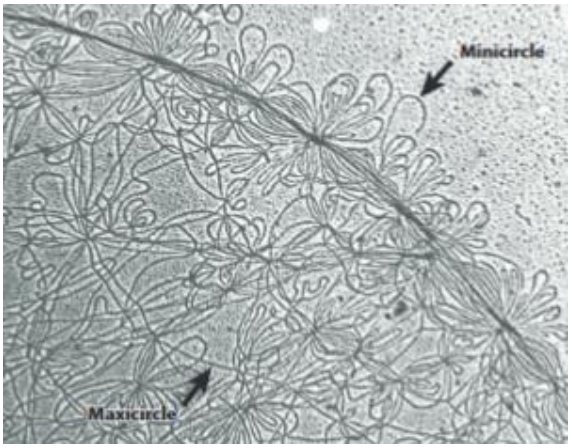
**Πίνακας 1** Η ταξινόμηση του παρασίτου Leishmania από τον W.H.O. [6].

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Βασίλειο** | Πρώτιστα *(Protista)* | | | | | | |
| **Υποβασίλειο** | Πρωτόζωα (*Protozoa*) | | | | | | |
| **Συνομοταξία** | Σαρκομαστιγοφόρα (*Sarcomastigophora*) | | | | | | |
| **Υπο συνομοταξία** | Μαστιγοφόρα (*Mastigophora*) | | | | | | |
| **Κλάση** | Ζωομαστιγοφόρα (*Zoomastigophorea*) | | | | | | |
| **Τάξη** | Κινητοπλαστοειδή (*Kinetoplastida*) | | | | | | |
| **Υποτάξη** | Τρυπανοσωματίνες (*Trypanosomatina*) | | | | | | |
| **Οικογένεια** | Τρυπανοσωματίδες (*Trypanosomatidae*) | | | | | | |
| **Γένος** | Λεϊσμάνια *(Leishmania)* | | | | | | |
| **Υπογένος** | *Viannia* | | *Leishmania* | | | | |
| **Σύμπλεγμα** | *L.brasiliensis* | *L.guyanensis* | *L.donovani* | *L.maior* | *L.tropica* | *L.aethiopica* | *L.mexicana* |
| **Είδος** | *L.braziliensis*<br>*L. peruviana* | *L.guyanensis*<br>*L.panamensis*<br>*L.shawi* | *L.donovani*<br>*L.infantum*<br>*L.chagasi*<br>*L.archibaldi* | *L.major* | *L.tropica*<br>*L. killicki* | *L.aethiopica* | *L.mexicana*<br>*L.amazone*<br>*L.pifanoi*<br>*L.garnham*<br>*L.venezueles* |

## 3.2 Μορφολογικά χαρακτηριστικά

Το παράσιτο *Leishmania* ανήκει στην οικογένεια των τρυπανοσωματίδων. Αυτά τα πρωτόζωα εναλλάσσονται ανάμεσα στις σκνίπες και σε σπονδυλωτούς ξενιστές καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους και για το λόγο αυτό είναι απαραίτητα διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια, ώστε να είναι ικανά να ζουν μέσα στα κύτταρα-ξενιστές ή στο έντερο των εντόμων. Οι δυο κύριες μορφές στον κυτταρικό κύκλο του παρασίτου είναι η προμαστιγωτή και η αμαστιγωτή μορφή. Ένα άλλο σημαντικό χαρακτηριστικό αυτών των παρασίτων είναι η παρουσία ειδικών οργανιδίων που απουσιάζουν σε άλλους ευκαρυωτικούς οργανισμούς ή έχουν λειτουργίες που βρίσκονται αποκλειστικά στις Τρυπανοσωματίδες. Για παράδειγμα, το μιτοχόνδριο είναι μοναδικό. Έχει μια συγκεκριμένη δομή γνωστή ως κινητοπλάστης (kinetoplast) και στεγάζει το μιτοχονδριακό DNA [7].

Αν και αρχικά υπήρχε η εντύπωση ότι ο κινητοπλάστης συνδέεται με την κίνηση των κυττάρων (εξ΄ ου και η ονομασία του), βρέθηκε ότι είναι μία πιο σύνθετη δομή. Περιέχει ένα δίκτυο γενετικού υλικού kDNA (kinetoplast DNA) που αποτελείται από χιλιάδες αλληλοσυνδεόμενους δακτυλίους DNA δύο τύπων α) Μικρόκυκλοι (0.5 -2.5 kbp) και β) Μεγάκυκλοι (20-40 kbp) [8], όπως φαίνεται και στην Εικόνα 2.




**Εικόνα 2** Το δίκτυο kDNA. Οι μικροί βρόχοι DNA είναι οι μικρόκυκλοι (Minicircle) και οι μακριές έλικες είναι μέρη των μεγάκυκλων (Maxicircle) [8].

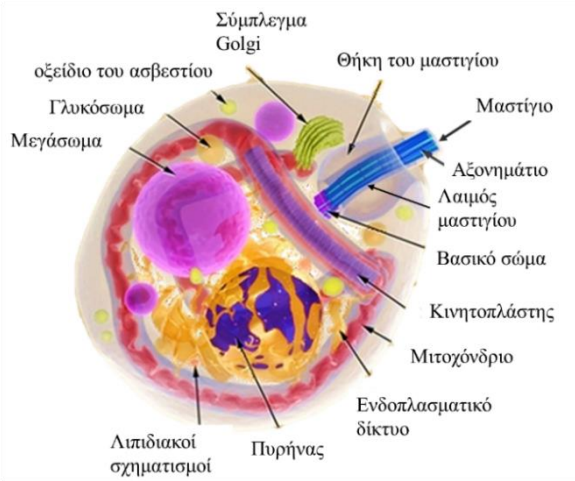
### 3.2.1 Προμαστιγωτή μορφή

**Εικόνα 3** Προμαστιγωτή μορφή Λεϊσμάνιας [9].

Η μορφή αυτή εντοπίζεται στον ενδιάμεσο ξενιστή (σκνίπα) και χαρακτηρίζεται ως κινητό μολυσματικό παράσιτο. Είναι ατρακτοειδές κύτταρο, μεγέθους 15-25 μm x 2-3 μm, που φέρει ένα ενιαίο μαστίγιο μήκους 15-30 μm. Κεντρικά του κυττάρου υπάρχει ένας μεγάλος σφαιρικός πυρήνας. Πρόσθια του πυρήνα είναι ο κινητοπλάστης όπου στεγάζεται το μιτοχονδριακό DNA, το οποίο είναι άμεσα συνδεδεμένο με το βασικό σώμα από το οποίο εκτείνεται το μαστίγιο. Στη βάση του μαστίγιου είναι μια εγκόλπωση της κυτταρικής μεμβράνης σχηματίζοντας μία δομή που ονομάζεται θήκη του μαστιγίου «flagellar pocket» (Εικόνα 3),

και είναι εξαιρετικής σημασίας για τα παράσιτα, καθώς είναι η μόνη περιοχή της ενδοκύττωσης και εξωκύττωσης [9,10].

### 3.2.2 Αμαστιγωτή μορφή




**Εικόνα 4** Αμαστιγωτή μορφή Leishmania [9].

Είναι η ενδοκυτταρική μορφή του παρασίτου, βρίσκεται εντός των κυττάρων του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος, σε μακροφάγα του σπλήνα, μονοκύτταρα, ουδετερόφιλα, στο ήπαρ και στο μυελό των οστών. Εντοπίζεται λιγότερο συχνά στον εντερικό βλεννογόνο και τους μεσεντέριους λεμφαδένες. Είναι ωοειδές κύτταρο, διαμέτρου 2.4-3.5μm. Όπως και στην προμαστιγωτή μορφή, εντός του κυττάρου εντοπίζεται ο πυρήνας και ένα σύνολο κοινών οργανιδίων μεταξύ των οποίων είναι το μιτοχόνδριο, η συσκευή Golgi, ο κινητοπλάστης, το ενδοπλασματικό δίκτυο κ.α. (εικόνα 4) [9].

Εκτός από την αλλαγή στο μέγεθος και το σχήμα, συναντάται ένα μικρό μαστίγιο με βολβοειδές άκρο. Ακόμα υπάρχει μια μεγάλη αναδιάρθρωση της θήκης του μαστιγίου και της περιοχής του λαιμού του μαστιγίου, έτσι ώστε να μην υπάρχει κενό μεταξύ μαστιγίου και της μεμβράνης της θήκης. Δεδομένου ότι είναι η μόνη περιοχή της εξωκυττάρωσης και ενδοκυττάρωσης στο κύτταρο, η αναδιάρθρωση μοιάζει περισσότερο με τη λειτουργία βαλβίδας που εξυπηρετεί την ελάττωση του μεταβολικού ρυθμού, προκειμένου το κύτταρο να επιβιώσει ενδοκυττάρια [10].

# 4 ΕΝΔΙΑΜΕΣΟΣ ΞΕΝΙΣΤΗΣ

Τα παράσιτα μεταδίδονται από το δήγμα θηλυκής σκνίπας. Η θηλυκή σκνίπα χρειάζεται αίμα για να αποκτήσει την πρωτεΐνη που είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη των αυγών της. Κατά την αναζήτηση του αίματος καλύπτουν μια ακτίνα μερικών έως αρκετών εκατοντάδων μέτρων γύρω από τον τόπο που κατοικούν. Οι σκνίπες εντοπίζονται κοντά σε ανθρώπινες κατοικίες, από όπου τρέφονται με οργανικά απόβλητα όπως κόπρανα (ανθρώπινα και άλλων ζώων) ή άλλα απορρίματα. Δημιουργούν αποικίες κυρίως σε θερμά σκοτεινά σημεία με υψηλή υγρασία, όπως σε ρωγμές τοίχων, σε σπηλιές, και σε κοιλότητες στις ρίζες των δέντρων, έχουν όμως παατηρηθεί και σε ξηρές περιοχές. Αναζητούν τροφή κυρίως σε συνθήκες χαμηλής ηλιοφάνειας, την αυγή, το σούρουπο και σε συννεφιασμένες μέρες, καθώς είναι κατά κανόνα νυκτόβια έντομα [11,12]. Υπάρχουν πάνω από 800 γνωστά είδη σκνίπας από τα οποία περίπου 30 είδη έχουν βρεθεί ότι είναι ικανά να μεταδώσουν παράσιτα του γένους *Leishmania*. Η κατανομή των σκνιπών εξαρτάται από τις τοπικές γεωγραφικές συνθήκες και τους κλιματικούς παράγοντες. Στο «Νέο Κόσμο» (δυτικό ημισφαίριο) βρίσκονται περίπου 464 είδη και ανήκουν στα ακόλουθα τρία γένη: *Lutzomyia*, *Warileya* και *Brumptomyia*. Στον «Παλαιό Κόσμο» (ανατολικό ημισφαίριο) βρίσκονται τα υπόλοιπα 375 είδη, και οι σκνίπες ανήκουν ξανά σε τρία γένη: *Phlebotomus*, *Sergentomyia* και *Chinius*. Σημαντικό για την ανθρώπινη λεϊσμανίαση αποτελεί το γένος *Phlebotomus* (εικόνα 5) καθώς είναι υπεύθυνο για το μεγαλύτερο μέρος της δερματικής και σπλαχνικής λεϊσμανίασης που βρέθηκαν στην Ευρασία και την Αφρική. Αντίστοιχα στον Νέο Κόσμο ισχύει το ίδιο για το γένος *Lutzomyia* (εικόνα 6). Τα βιολογικά χαρακτηριστικά κάθε είδους σκνίπας είναι ξεχωριστά και έχουν άμεση σχέση με την κατανομή των διαφόρων ειδών του παρασίτου [13].

**Εικόνα 5** *Phlebotomus Papatasi.* Πηγή: James Gathany, Scientific Photographer, CDC.

**Εικόνα 6** *Lutzomyia longipalpis.* Πηγή: Dr. Ray Wilson, Scientific Photographer, www.raywilsonbirdphotography.co.uk

Ο έλεγχος του ενδιάμεσου ξενιστή μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην εξάλειψη και τον έλεγχο της λεϊσμανίασης. Η προσέγγιση για τον σκοπό αυτό περιλαμβάνει: ψεκασμούς για σκνίπες, χρήση εντομοαπωθητικών σκευασμάτων αλλά και προστατευτικών διχτυών, περιβαλλοντική διαχείριση των αποχετεύσεων και των λιμναζόντων νερών, συχνό

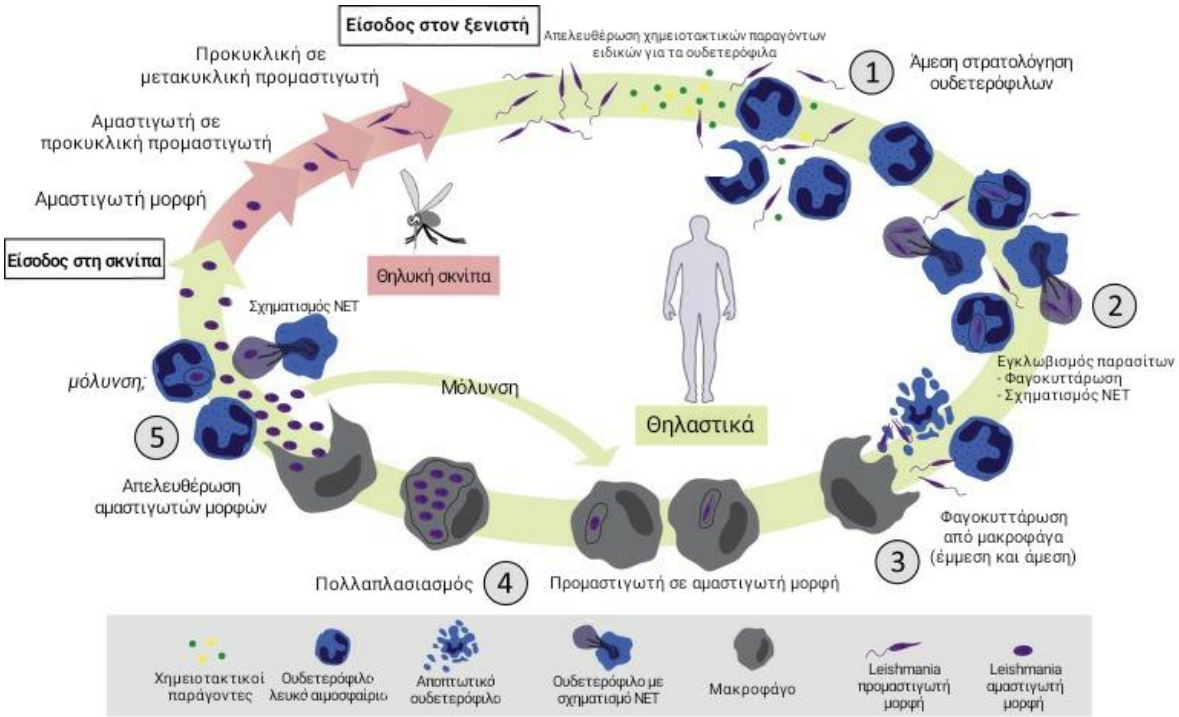
κούρεμα του γρασιδιού, βελτιστοποίηση των συνθηκών στέγασης με σίτες, καθώς και χρήση εντομοαπωθητικών περιλαίμιων στους σκύλους που είναι η σημαντικότερη δεξαμενή του παρασίτου. Σε περιοχές που αντιμετωπίζουν σοβαρό πρόβλημα με την ανθεκτικότητα των παρασίτων στις φαρμακευτικές ουσίες, όπως η Ινδία, ο έλεγχος μέσω ψεκασμών έδειξε ότι μπορεί να περιορίσει την μετάδοση της νόσου, μειώνοντας τα νέα κρούσματα έως και 60% [11,14].

# 5 ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ

Το παράσιτο *Leishmania* μεταδίδεται στους τελικούς ξενιστές, τα θηλαστικά, από μολυσμένες θηλυκές σκνίπες οι οποίες είναι ικανές να μεταφέρουν το παράσιτο στον σπονδυλωτό ξενιστή κατά την λήψη αίματος. Τα μετακυκλικά προμαστιγωτά δεν βρίσκονται στους σιελογόνους αδένες, αλλά στο πρόσθιο τμήμα του εντέρου. Η λοίμωξη της σκνίπας με παράσιτα του γένους *Leishmania* οδηγεί σε δυσλειτουργία μιας βαλβίδας στο πρώτο τμήμα του μεσέντερου. Όταν η σκνίπα λαμβάνει γεύμα αίματος η βαλβίδα δεν μπορεί να κλείσει και το αίμα κινείται προς τα πίσω, εντός των στοματικών της κοιλοτήτων και στην πληγή που έχει πραγματοποιηθεί από το σημείο νύξης. Αυτή η παλινδρόμηση έχει ως αποτέλεσμα την αποβολή των προμαστιγωτών από το πρόσθιο τμήμα του έντερου στο σημείο της νύξης του δέρματος του τελικού ξενιστή (θηλαστικό) [15]. Μετά την είσοδο των μετακυκλικών προμαστιγωτών εντός του σπονδυλωτού ξενιστή, τα παράσιτα δεν μπορούν να εισβάλουν μόνα τους στα κύτταρα του ξενιστή και εκμεταλλεύονται την φαγοκυτταρική δραστικότητα των ουδετεροφίλων, των μακροφάγων του αίματος και των δενδριτικών κυττάρων. Τα ουδετερόφιλα λόγω χημειοτακτικών παραγόντων φτάνουν γρήγορα στο σημείο του δήγματος, ενεργοποιούνται και φαγοκυτταρώνουν τα παράσιτα. Αφού εγκολπωθεί το παράσιτο, σχηματίζεται το φαγόσωμα που στην συνέχεια οδηγεί τα παράσιτα στα λυσοσώματα του κυττάρου και σχηματίζεται το φαγολυσόσωμα. Αν και φυσιολογικά ένα παθογόνο καταστρέφεται στο προκύπτον φαγολυσόσωμα, το παράσιτο είναι ανθεκτικό στο όξινο pH και στα υδρολυτικά ένζυμα που αυτό περιέχει [15,16]. Σε αυτό το σημείο μπορεί να πραγματοποιηθεί η δημιουργία ουδετεροφιλικών εξωκυτταρικών παγίδων (neutrophil extracellular traps, NETs). Η δομή αυτή εγκλωβίζει και μπορεί να καταστρέψει νέα παράσιτα. Στην συνέχεια τα ουδετερόφιλα οδηγούνται σε απόπτωση. Κατά την διάρκεια της διαδικασίας αυτής φτάνουν στην περιοχή και μακροφάγα τα οποία είναι σε θέση να φαγοκυτταρώσουν τα παράσιτα. Σε αυτά, η προμαστιγωτή μορφή μετατρέπεται σε αμαστιγωτή εντός του φαγολυσοσώματος με την απώλεια του μαστίγιου της και τα παράσιτα γίνονται πιο σφαιρικά. Τα αμαστιγωτά αναπαράγονται με δυαδική σχάση και γεμίζουν το μολυσμένο μακροφάγο το οποίο ρήγνυται, τα αμαστιγωτά απελευθερώνονται από το κύτταρο ξενιστή και φαγοκυτταρώνονται από ένα νέο μακροφάγο, γεγονός που οδηγεί σε νέο κύκλο αναπαραγωγής του παρασίτου. [15,17,18].

Η κατάποση των μολυσμένων μακροφάγων από σκνίπες έχει ως αποτέλεσμα τη μετατροπή των αμαστιγωτών σε προμαστιγωτά. Αρχικά, μετά την είσοδό τους στο έντερο τα αμαστιγωτά επικαλύπτονται με μια περιτροφική μεμβράνη αποτελούμενη από σύμπλεγμα χιτίνης και πρωτεϊνών. Με αυτό τον τρόπο τα παράσιτα προστατεύονται από τα πεπτικά ένζυμα της σκνίπας. Στην συνέχεια σε διάστημα 1-3 ημερών μετατρέπονται σε προκυκλικά προμαστιγωτά. Αυτά εκκρίνουν την λιποφωσφογλυκάνη (LPG), νευροπεπτίδιο το οποίο σταματά την περισταλτικότητα του εντέρου και βοηθάει στη πρόσδεση του παρασίτου στο επιθήλιο. Σε διάρκεια 4-7 ημερών, η περιτροφική μεμβράνη αποικοδομείται από τη δράση ενζύμων (χιτινασών) απελευθερώνοντας τα πιο ενεργά προμαστιγωτά

(νεκτομονάδες) τα οποία μετακινούνται στο πρόσθιο τμήμα του μεσέντερου. Εκεί μετασχηματίζονται σε «λεπτομονάδες», μορφές πλήρως κινητές και ικανές για πολλαπλασιασμό με δυαδική σχάση. Σε αυτή την φάση εκκρίνουν μία γέλη (δωδεκυλο-θειικό πολυακρυλαμίδιο ή PSG) η οποία αποτελείται από όξινη φωσφατάση και φωσφογλυκοπρωτεΐνες. Η ουσία αυτή, μεταξύ άλλων, ευθύνεται για την παρεμπόδιση της λειτουργίας της βαλβίδας στο πρόσθιο τμήμα του μεσέντερου της σκνίπας [19]. Τέλος το παράσιτο ωριμάζει σε μετακυκλική προμαστιγωτή μορφή μεταβάλλοντας τις βιοχημικές ιδιότητες του. Η ανάπτυξη σε μετακυκλικό προμαστιγωτό (μολυσματική μορφή) συνδέεται με διακοπή του πολλαπλασιασμού έως ότου το κύτταρο αυτό εισέλθει εκ νέου σε έναν νέο σπονδυλωτό οργανισμό [15,20].




**Εικόνα 7** Ο κύκλος ζωής του παρασίτου *Leishmania*. Το παράσιτο εναλλάσσει μορφές ανάλογα τον ξενιστή στο οποίο βρίσκεται. (1) Η μετάδοση μολυσματικών μετακυκλικών προμαστιγωτών σε ξενιστές προκαλεί την απελευθέρωση χημειοτακτικών παραγόντων. (2) Τα ουδετερόφιλα ανταποκρίνονται ταχέως και φαγοκυτταρώνουν τα παράσιτα. (3) Στα μακροφάγα, τα προμαστιγωτά μετασχηματίζονται σε αμαστιγωτά και αναπαράγονται με απλή διαίρεση (4) Ημέρες ή εβδομάδες μετά την αρχική μόλυνση τα αμαστιγωτά απελευθερώνονται και μολύνουν νέα φαγοκύτταρα. (5) Θηλυκές σκνίπες λαμβάνουν αμαστιγωτά που μετασχηματίζονται μετά από μια διαδικασία σε μολυσματικά μετακυκλικά προμαστιγωτά που τελικά θα μεταδοθούν σε άλλους ξενιστές [15].

# 6 ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗΣ

Η λεϊσμανίαση προκαλεί τρεις βασικές και μερικές λιγότερο επικρατούσες κλινικές εκδηλώσεις που καθορίζονται από την γενική ευαισθησία του ξενιστή και το είδος του μολυσματικού παρασίτου.

**Πίνακας 2** Συγκεντρωτικός πίνακας είδους παρασίτου, ενδιάμεσου ξενιστή, φορέα, κλινικής εικόνας και εντόπισης [21].

| Είδη Leishmania (L.) | Είδος σκνίπας Phlebotomus (P.) Lutzomyia (L.) | Κύριες Περιοχές Εντόπισης | Δεξαμενή Του Παρασίτου | Κλινικές Εκδηλώσεις Λεϊσμανίασης |
|---|---|---|---|---|
| *L. aethiopica* | *P. longipes*<br>*P. pedifer* | Αιθιοπία<br>Κένυα | Υρακοειδή | Δερματική<br>Διάχυτη δερματική<br>Βλεννογονοδερματική |
| *L. amazonensis* | *L. flaviscutellata* | Ανατολικές Άνδεις | Τρωκτικά | Δερματική<br>Διάχυτη δερματική |
| *L. braziliensis* | *L. ovallesi*<br>*L. wellcomei*<br>*L. neivai*<br>*L. whitmani* | Ανατολικές και Δυτικές Άνδεις | Τρωκτικά<br>Μαρσιποφόρα<br>Σκύλος | Δερματική<br>Βλεννογονοδερματική |
| *L. donovani* | *P. argentipes*<br>*P. martini*<br>*P. orientalis* | Ινδία<br>Μπαγκλαντές<br>Νεπάλ<br>Μπουτάν<br>Σουδάν<br>Αιθιοπία | Άνθρωπος | Σπλαχνική |
| *L. guyanensis* | *L. umbratilis* | Ανατολικές Άνδεις | Θηλαστικά | Δερματική<br>Βλεννογονοδερματική |
| *L. infantum* | *P. ariasi*<br>*P. perniciosus*<br>*L. longipalpis* | Μεσόγειος<br>Λατινική Αμερική | Σκύλος | Σπλαχνική<br>Δερματική |
| *L. major* | *P. duboscqi*<br>*P. papatasi* | Υποσαχάρια Αφρική<br>Βόρεια Αφρική<br>Μέση Ανατολή<br>Ιράν<br>Πακιστάν<br>Ινδία | Τρωκτικά<br>Γέρβιλος | Δερματική |
| *L. mexicana* | *L. olmeca olmeca* | Δυτικές Άνδεις | Τρωκτικά,<br>Μαρσιποφόρα | Δερματική<br>Διάχυτη δερματική<br>Βλεννογονοδερματική |
| *L. panamensis* | Δεν έχει αποδειχθεί | Δυτικές Άνδεις | Θηλαστικά | Δερματική<br>Βλεννογονοδερματική |
| *L. peruviana* | Δεν έχει αποδειχθεί | Περού | Τρωκτικά<br>Μαρσιποφόρα<br>Σκύλος | Δερματική<br>Βλεννογονοδερματική |
| *L. tropica* | *P. Sergenti*<br>*P. arabicus*<br>*P. guggisbergi* | Βόρεια Αφρική<br>Ιράν<br>Αφγανιστάν<br>Βόρεια και Υποσαχάρια Αφρική | Άνθρωπος<br>Υρακοειδή | Δερματική |

## 6.1 Δερματική Λεϊσμανίαση (Cutaneous Leishmaniasis - CL)

Είναι η λιγότερο σοβαρή μορφή της νόσου και προκαλείται από διάφορα είδη του παρασίτου (π.χ. *L. major*, *L. tropica* και *L. mexicana*). Συναντάται με δύο μορφές, την απλή δερματική λεϊσμανίαση και την διάχυτη δερματική λεϊσμανίαση (Diffused Cutaneous leishmaniasis, DCL). Η απλή δερματική νόσος εμφανίζεται ως βλατίδες ή ελκώδεις αλλοιώσεις κοντά ή επάνω στο σημείο νύξης των εντόμων (εικόνα 8) και εκδηλώνονται μέσα σε εβδομάδες έως μήνες. Συνήθως εντοπίζονται σε ακάλυπτες περιοχές του σώματος όπως το πρόσωπο, οι βραχίονες και τα πόδια. Οι απλές δερματικές αλλοιώσεις είναι συνήθως αυτοϊάσιμες. Μάλιστα, το 90% των περιπτώσεων επουλώνεται σε χρονικό διάστημα 6-12 μηνών με παραμονή μιας ατροφικής ουλής στο σημείο της αρχικής εντόπισης. Στην διάχυτη δερματική λεϊσμανίαση (π.χ. από *L. amazonensis*) παρατηρούνται ευρείες οζώδεις αλλοιώσεις, μεταβλητού μεγέθους και σχήματος, σε διάφορες θέσεις συχνά απομακρυσμένες από το σημείο έκθεσης στο έντομο. Η μορφή αυτή έχει την τάση να υποτροπιάζει και εμφανίζει ανθεκτικότητα στη θεραπεία. Σε ορισμένες περιπτώσεις, όπως αυτές που προκαλούνται από το *L. panamensis* και το *L. braziliensis*, μπορεί να προχωρήσει στην αλλοίωση και του βλεννογονοδερματικού ιστού. Η ίαση των δερματικών αλλοιώσεων μπορεί να επισπευσθεί με θεραπευτική αγωγή [17,21].

**Εικόνα 8** Ελκώδεις δακτυλιοειδείς αλλοιώσεις δερματικής λεϊσμανίασης. Α) 2 εβδομάδες μετά την έναρξη της θεραπείας. Β) 3 εβδομάδες μετά τη διακοπή της θεραπείας. C) 7 εβδομάδες μετά το τέλος της θεραπείας. [17].

## 6.2 Βλεννογονοδερματική Λεϊσμανίαση ( Mucocutaneous Leishmaniasis - MCL)

**Εικόνα 9** Ανδρας με βλεννογονοδερματική λεϊσμανίαση. Παρατηρείται μερική καταστροφή του ρινικού διαφράγματος [17].

Η βλεννογονοδερματική νόσος μπορεί να οφείλεται σε επέκταση ή παρασιτική μετάσταση από τοπική δερματική νόσο στον βλεννογονοδερματικό ιστό. Η MCL μπορεί να εκδηλωθεί μήνες έως χρόνια μετά την ίαση των πρωτογενών βλαβών. Πρόκειται συχνά για ένα τρομερά παραμορφωτικό νόσημα (εικόνα 9) που προκύπτει από τη χρόνια τοπική καταστροφή των μαλακών μορίων της μύτης, του στόματος και των βλεφάρων, ενώ μπορεί να προχωρήσει επηρεάζοντας τους χόνδρους του λάρυγγα και του φάρυγγα και με αυτόν τον τρόπο να παρεμποδίσει την κατάποση τροφής. Λόγω της φύσης των βλαβών

αυτών τα άτομα που προσβάλει στιγματίζονται και περιθωριοποιούνται. Η παθογένεια της MCL δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί και είναι πιθανά αποτέλεσμα μιας πολύπλοκης αλληλεπίδρασης ξενιστή και παρασίτου. Η νόσος είναι συχνά ανθεκτική στη φαρμακευτική αγωγή και οι ασθενείς συνήθως καταλήγουν από δευτερογενείς μολύνσεις και υποσιτισμό. Η MCL εντοπίζεται σε χώρες της Νότιας Αμερικής, με την πλειοψηφία αυτών στη Βραζιλία, το Περού και τη Βολιβία, και σε μικρότερο βαθμό στην Κολομβία, τον Ισημερινό, την Παραγουάη και τη Βενεζουέλα, στις πεδιάδες του Αμαζονίου, με μικρότερη συχνότητα στις παράκτιες περιοχές μεταξύ των Άνδεων και του Ειρηνικού [17,21].

## 6.3 Σπλαχνική Λεϊσμανίαση (Visceral Leishmaniasis - VL)

**Εικόνα 10** Παιδί που νοσεί από σπλαχνική λεϊσμανίαση με εμφανή ήπατο-σπληνομεγαλία [22].

Στη σπλαχνική λεϊσμανίαση ή Kala azar (μαύρος πυρετός στην Ινδική γλώσσα), το παράσιτο μεταναστεύει από το δέρμα μέσω του αίματος και της λέμφου στα ζωτικά όργανα του σώματος, ιδιαίτερα στο ήπαρ, στο σπλήνα, και στο μυελό των οστών. Στον Παλαιό κόσμο, η VL προκαλείται από τα είδη *L. donovani* (στις περιοχές της Ινδίας, το Πακιστάν, την Κίνα και την Αφρική) και *L. infantum* (στην περιοχή της Μεσογείου). Στο Νέο Κόσμο, η VL προκαλείται επίσης από *L. Infantum* και το *L. chagasi*, που ενδημεί κυρίως στη Βραζιλία. Ο πολλαπλασιασμός των παρασίτων στα μακροφάγα δημιουργεί ηπατομεγαλία, σπληνομεγαλία και καταστολή του μυελού των οστών (εικόνα 10). Οι ασθενείς εμφανίζουν πυρετό με εξάρσεις, απώλεια βάρους, παγκυτταροπενία και ανοσοκαταστολή και είναι επιρρεπείς σε δευτερογενείς λοιμώξεις. Χωρίς θεραπεία το 95% των ασθενών με VL θα καταλήξουν. Άτομα που έχουν μολυνθεί από τον ιό HIV είναι ιδιαίτερα ευπαθή στην ανάπτυξη της νόσου [17,22].

## 6.4 Υποτροπιάζουσα Λεϊσμανίαση (Leishmaniasis Recidivans - LR)

Χαρακτηρίζεται από υποτροπή της δερματικής νόσου στα σημεία των προηγούμενων επουλωμένων δερματικών αλλοιώσεων CL. Μπορεί να συμβεί έως και δεκαετίες μετά την πρωτογενή μόλυνση και συνδέεται με την ανοσολογική κατάσταση του ξενιστή. Προκαλείται κυρίως από *L. tropica* και *L. brasiliensis*. Σχηματίζεται συνηθώς στα όρια της προηγούμενης ουλής. Οι βλάβες της υποτροπιάζουσας λεϊσμανίασης (LR) εμφανίζονται ως κυανέρυθρες βλατίδες (εικόνα 11) [23].

**Εικόνα 2** Υποτροπιάζουσα Λεϊσμανίαση σε παιδία [27,28].

## 6.5 Δερματική Μετά-Kala azar Λεϊσμανίαση (Post-Kala azar Dermal Leishmaniasis, PKDL)

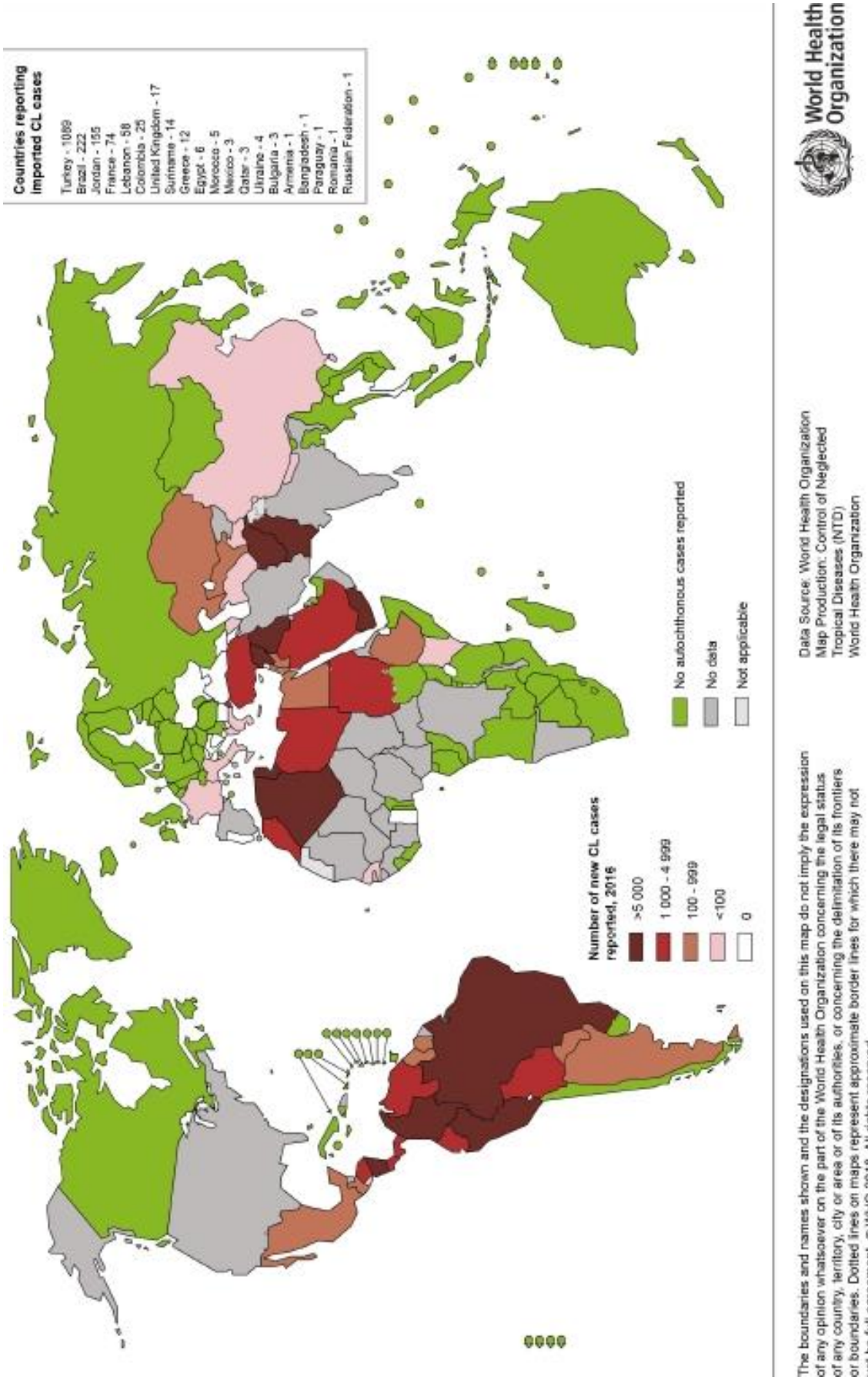
**Εικόνα 12** Εξανθήματα σε ασθενή με δερματική μετά Kala-azar λεϊσμανίαση [22].

Πρόκειται για κλινικό σύνδρομο το οποίο εκδηλώνει μια ομάδα ασθενών που υποβλήθηκαν σε επιτυχή αγωγή για VL και οι οποίοι έμειναν ασυμπτωματικοί για μήνες έως χρόνια. Κλινικά εκδηλώνεται με την εμφάνιση στο δέρμα εξελκώμενων οζιδίων αρχικά εντοπισμένων γύρω από τη στοματική κοιλότητα και ακολούθως σε άλλα μέρη του σώματος (εικόνα 12). Η PKDL παρατηρείται κυρίως στην Ινδία και το Σουδάν σε ασθενείς που έχουν μολυνθεί με *L. donovani*. Στο Σουδάν η PDKL μπορεί να προκύψει σε ποσοστό έως και 50% των ασθενών μέσα σε 6 μήνες, ενώ στην Ινδία έχει συχνότητα 5-10% εντός 2-3 ετών μετά την θεραπεία της VL. Η παθογένεση του συνδρόμου δεν είναι πλήρως κατανοητή, αλλά φαίνεται ότι σχετίζεται με την ιντερφερόνη-γ που παράγεται από ανοσοαπόκριση του ξενιστή. Η βιοψία από το σημείο των οζιδίων δείχνει μακροφάγα με μεγάλο αριθμό αμαστιγωτών μορφών στο κυτταρόπλασμα, οι οποίες είναι γενοτυπικά πανομοιότυπες με τα παράσιτα που προκάλεσαν την VL [24].

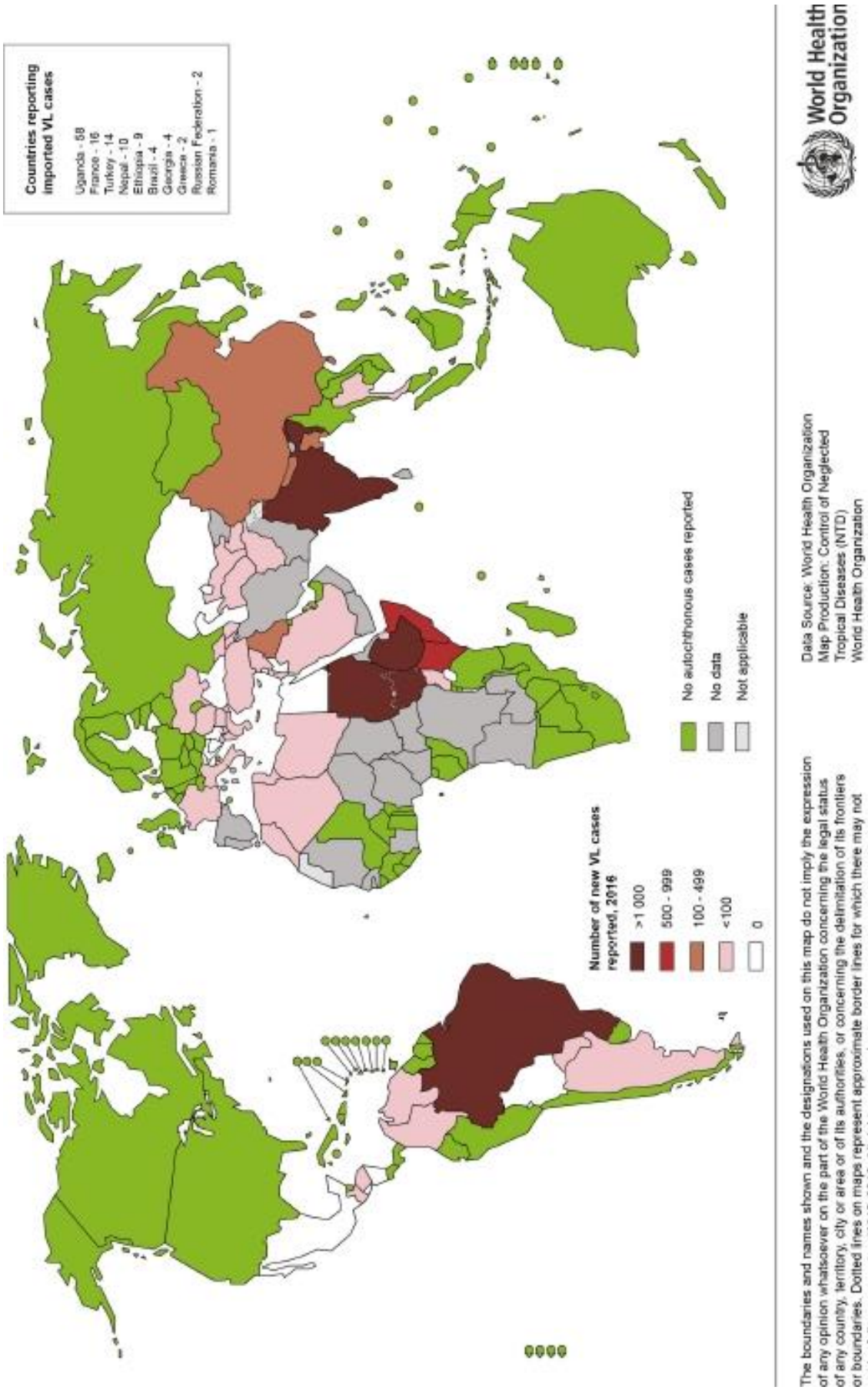
# 7 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Η λεϊσμανίαση αποτελεί σήμερα ένα σημαντικό παγκόσμιο πρόβλημα δημόσιας υγείας. Η νόσος προσβάλλει κυρίως τους ανθρώπους με χαμηλή ποιότητα ζωής και συνθήκες διαβίωσης στην Αφρική, την Ασία και τη Λατινική Αμερική, συνδέεται με τη πληθυσμιακή μετανάστευση, τις κακές συνθήκες διαμονής και την καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος [3]. Σε παγκόσμιο επίπεδο, 700.000-1.000.000 νέα περιστατικά καταγράφονται κάθε χρόνο, εκτιμάται ότι 350 εκατομμύρια κινδυνεύουν να νοσήσουν και σύμφωνα με τις τελευταίες μελέτες προκαλούνται 26.000-65.000 θάνατοι ετησίως [25,26]. Ακόμη, εκτιμάται ότι 2,5 εκατομμύρια σκύλοι έχουν προσβληθεί στη λεκάνη της Μεσογείου [13]. Το 2012, ο W.H.O. άρχισε την καταγραφή των περιστατικών της λεϊσμανίασης σε 102 χώρες σε όλο τον κόσμο προκειμένου να εντοπίσει κρούσματα δερματικής και σπλαχνικής λεϊσμανίασης. Συγκεκριμένα, πάνω από το 90% των περιπτώσεων σπλαχνικής λεϊσμανίασης παγκοσμίως εντοπίζεται σε πέντε χώρες: Μπαγκλαντές, Βραζιλία, Αιθιοπία, Ινδία και Νότιο Σουδάν. Η δερματική λεϊσμανίαση είναι ευρέως διαδεδομένη σε όλη την Αμερική, στη λεκάνη της Μεσογείου και στη Δυτική Ασία. Οι δέκα χώρες στις οποίες εντοπίζεται το 75% των κρουσμάτων δερματικής λεϊσμανίασης παγκοσμίως είναι το Αφγανιστάν, η Αλγερία, η Βραζιλία, η Κολομβία, η Κόστα Ρίκα, η Αιθιοπία, το Ιράν, το Περού, το Βόρειο Σουδάν και η Συρία [3].

Σημαντικό παράγοντα για την επιδημιολογία και τη γεωγραφική κατανομή των κρουσμάτων αποτελεί η λοιμογόνος δράση όπως και η ικανότητα μετάδοσης των ειδών του παρασίτου στον άνθρωπο. Το είδος *L. donovani* (Νότια Ασία και Ανατολική Αφρική) έχει σημαντική λοιμογόνο δράση και μπορεί να προσβάλει άτομα όλων των ηλικιών. Σε περιοχές με ανθρωπονοτική μετάδοση (η βασική δεξαμενή του παρασίτου είναι οι άνθρωποι), η αποτελεσματική θεραπεία των ασθενών μπορεί να βοηθήσει στον έλεγχο της εξάπλωσης του παρασίτου. Αντίθετα, το είδος *L. infantum* το οποίο εμφανίζεται στη Μεσόγειο, στη Μέση Ανατολή, στο Αφγανιστάν, στο Ιράν, στο Πακιστάν, στην Βραζιλία (σποραδικά κρούσματα έχουν αναφερθεί και στην Κεντρική Ασία, την Κίνα, το Μεξικό, την Κεντρική και την Λατινική Αμερική), δεν έχει μεγάλη λοιμογόνο δράση και σε ανοσολογικά επαρκή άτομα συνήθως δεν εκδηλώνει συμπτώματα (ασυμπτωματικός φορέας). Αντίθετα, τα παιδιά και οι ανοσοκατασταλμένοι ενήλικες διατρέχουν υψηλότερο κίνδυνο. Η μετάδοση θεωρείται κυρίως ζωονοσογόνος, με τους σκύλους να είναι η κύρια δεξαμενή του παρασίτου [27]. Ο υψηλός επιπολασμός των ασυμπωματικών φορέων *L. infantum* στη Νότια Ευρώπη δείχνει ότι το παράσιτο είναι μια απειλή για τη δημόσια υγεία [28]. Αν και τα περισσότερα ανοσοεπαρκή άτομα δεν θα αναπτύξουν συμπτώματα μετά από την παρασιτική μόλυνση, η επίκτητη ανάπτυξη ανοσοκαταστολής όπως με τον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV), η μεταμόσχευση ή η χημειοθεραπεία ακόμα και μέσω μετάγγισης αίματος, έχει οδηγήσει σε σοβαρή κλινική νόσο. Κάποιες ακόμη ευπαθείς ομάδες πληθυσμού είναι τα παιδιά ηλικίας μικρότερης των 5 ετών, στα οποία δεν έχει αναπτυχθεί πλήρως το ανοσοποιητικό τους σύστημα, καθώς και άνθρωποι μεγάλης ηλικίας [28].



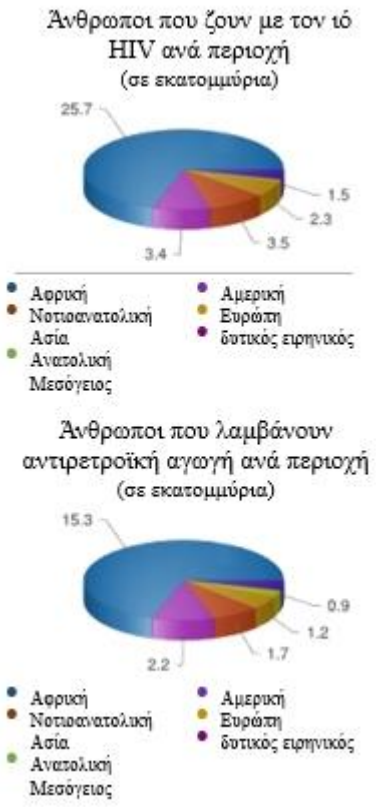

**Εικόνα 13** Παγκόσμιος χάρτης νέων περιστατικών δερματικής λεϊσμανίαση το έτος 2016 [29].




**Εικόνα 14** Παγκόσμιος χάρτης νέων περιστατικών σπλαγχνικής λεϊσμανίαση το έτος 2016 [29].

## 8 ΣΥΛΛΟΙΜΩΞΗ HIV - LEISHMANIA

Η πρώτη περίπτωση λεϊσμανίασης που σχετίζεται με HIV λοίμωξη αναφέρθηκε το 1985. Τα επόμενα χρόνια ο αριθμός των κρουσμάτων συλλοίμωξης αυξήθηκε ταχύτατα, όμως μετά την εισαγωγή της αντιρετροϊκής θεραπείας το ποσοστό αυτό μειώθηκε σημαντικά, κυρίως στις ευρωπαϊκές ενδημικές χώρες που έχουν την οικονομική δυνατότητα για την κάλυψη του κόστους της αγωγής. Το πρόβλημα ωστόσο έχει επεκταθεί στις αναπτυσσόμενες χώρες [30]. Η αλληλεπίδραση μεταξύ του ιού HIV και του παρασίτου *leishmania* αποτελεί μία από τις σημαντικότερες απειλές για τον έλεγχο της σπλαχνικής λεϊσμανιάσης. Η μόλυνση από τον ιό αυξάνει τον κίνδυνο ανάπτυξης VL κατά 100 έως 2.320 φορές σε ενδημικές περιοχές, μειώνει την πιθανότητα θεραπευτικής ανταπόκρισης και αυξάνει σε μεγάλο βαθμό την πιθανότητα υποτροπής. Οι δύο ασθένειες ασκούν αρνητική επίδραση στο κυτταρικό ανοσοποιητικό σύστημα επειδή στοχεύουν παρόμοια ανοσοκύτταρα. Οι ασθενείς με λεϊσμανίαση είναι ιδιαίτερα ευαίσθητοι στη λοίμωξη από τον ιό HIV, ενώ σε ασθενείς που έχουν προσβληθεί από τον ιό, η συλλοίμωξη με Leishmania επιταχύνει την εμφάνιση του AIDS με ανοσοκαταστολή και διέγερση της αντιγραφής του ιού [31].




**Εικόνα 3** Συγκεντρωτικά διαγράμματα για τον ιό HIV [31].

Ο W.H.O. το έτος 1991 δημιούργησε ένα δίκτυο επιτήρησης 28 ιδρυμάτων με την επωνυμία Leishnet με σκοπό να κάνει διακριτή την έκταση του προβλήματος και να παρακολουθήσει τις τάσεις. Δημιουργήθηκε για τον λόγο αυτό ένα τυποποιημένο έντυπο αναφοράς για τη συλλογή πληροφοριών σχετικά με τα δημογραφικά, κλινικά και διαγνωστικά χαρακτηριστικά της νόσου και στην ανάπτυξη κατευθυντήριων γραμμών για την διαχείρισή της. Αν και αρχικά οι περιοχές που εμπλέκονταν στο δίκτυο ήταν κυρίως ευρωπαϊκές, τα τελευταία χρόνια το δίκτυο έχει επεκταθεί στις περισσότερες ενδημικές περιοχές, περιλαμβάνοντας ιδρύματα από την Αφρική, τη Νότια Αμερική και την Ασία. Παρατηρήθηκε επίσης ότι οι περισσότερες από τις περιπτώσεις συλλοίμωξης που αναφέρθηκαν στην Αφρική ήταν σε άνδρες (94,8%)[31].

Σύμφωνα με στατιστικά στοιχεία από τον W.H.O. για το έτος 2017 εκτιμάται ότι 36,9 εκατομμύρια άνθρωποι παγκοσμίως ζουν με τον ιό HIV εκ των οποίων περίπου το 59% λαμβάνει αντιρετροϊκή θεραπεία [31]. Μέχρι σήμερα 35 χώρες παγκοσμίως έχουν αναφέρει περιστατικά συλλοίμωξης VL/HIV. Το μεγαλύτερο μέρος των κρουσμάτων καταγράφεται στη Νότια Ευρώπη με ποσοστό 70% σε ενήλικες. Η πλειοψηφία των παρασίτων που απομονώθηκαν από τις περιπτώσεις αυτές ανήκουν στο είδος *L. infantum* και ο μεγαλύτερος

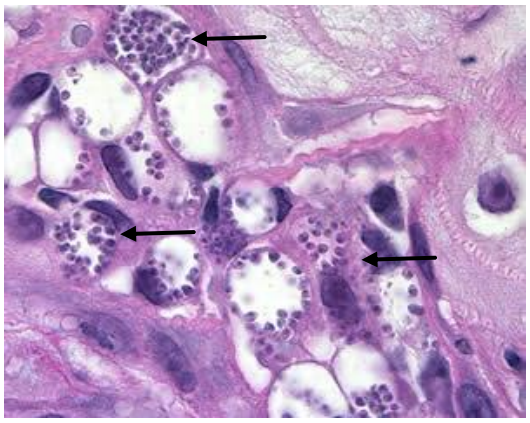
αριθμός τους συναντάται στην Ισπανία, Γαλλία, Ιταλία και Πορτογαλία κατά φθίνουσα σειρά αριθμού κρουσμάτων [31]. Ωστόσο στις περισσότερες ενδημικές περιοχές υπάρχει ανεπαρκής αναφορά των περιστατικών, γεγονός που οφείλεται στην έλλειψη εγκαταστάσεων και υποδομών για τη διάγνωση μίας ή και των δύο νόσων [30,31].

# 9 ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗΣ

Υπάρχουν πολλές μέθοδοι εργαστηριακής διάγνωσης της λεϊσμανίασης που περιλαμβάνουν την άμεση ανίχνευση των παρασίτων μέσω μικροσκοπικής εξέτασης βιοψίας οργάνων ή ξεσμάτων δέρματος και την καλλιέργεια των παρασίτων ή έμμεση ανίχνευση μέσω ορολογικών και μοριακών τεχνικών δοκιμασιών ανίχνευσης παρασιτικού DNA (PCR). Οι μοριακές δοκιμές είναι πιο ευαίσθητες από τις μικροσκοπικές στην διάγνωση, αλλά παραμένουν περιορισμένες στα κέντρα αναφοράς και στα ερευνητικά κέντρα. Η ορολογική διάγνωση είναι ένα άλλο εναλλακτικό εργαλείο για μη επεμβατικές μεθόδους. Μπορεί να γίνει με πολλές δοκιμασίες, όπως ο έμμεσος ανοσοφθορισμός (Immunofluorescence Assay, IFA), ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία (Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA), ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western blot), δοκιμή ανοσοχρωματογραφίας (Immunochromatography assay, ICA), άμεση δοκιμή συγκόλλησης (Direct Antiglobulin Test, DAT) ή ανίχνευση αντιγόνου του παρασίτου *Leishmania* στα ούρα με συγκόλληση λατέξ (performance of latex agglutination test, KAtex). Επιλογή της ορολογικής εξέτασης κατά τη διάγνωση θα πρέπει να βασίζεται σε διάφορες παραμέτρους όπως η περιοχή, το κόστος, η ευαισθησία και η ειδικότητα της κάθε μεθόδου [32].

## 9.1 Διαγνωστικοί μέθοδοι ανεύρεσης παρασίτων

Ο μυελός των οστών και ο σπλήνας είναι τα όργανα πρώτης επιλογής ανεύρεσης των παρασίτων με ευαισθησία 40-70% και 96% αντίστοιχα [33]. Παρόλα αυτά, η σπληνική αναρρόφηση συνδέεται με τον αυξημένο κίνδυνο ρήξης σπληνός και εσωτερικής αιμορραγίας ή διάτρησης του εντέρου. Οι επιπλοκές αυτές, αν και σπάνιες, μπορεί να είναι θανατηφόρες. Η βιοψία ήπατος είναι λιγότερο πιθανό να διαγνώσει την νόσο σε σχέση με αυτή του σπληνός. Η παρακέντηση ή η βιοψία λεμφαδένων μπορεί να έχει διαγνωστική αξία όταν υπάρχουν διευρυμένοι λεμφαδένες [34]. Ακολούθως απαιτείται η μικροσκόπιση των ιστών μετά από χρώση ή καλλιέργεια προκειμένου να ταυτοποιηθούν οι αμαστιγωτές μορφές των παρασίτων [35].



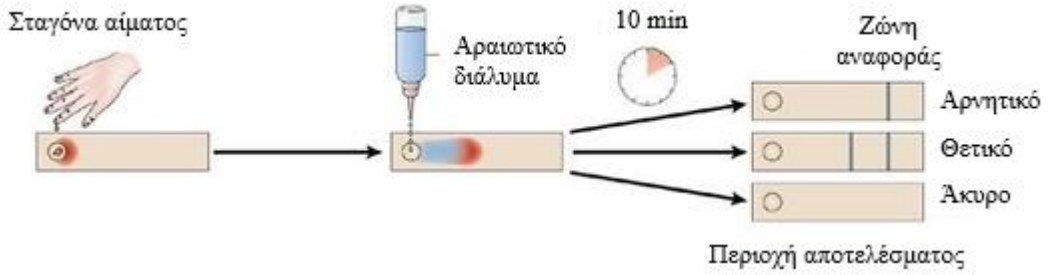
**Εικόνα 4** Βιοψία δέρματος με, χρώση H&E, Πολυάριθμες ενδοκυττάριες αμαστιγωτές μορφές (μαύρα βέλη) [35].

Η καλλιέργεια των παρασίτων μπορεί να εκτελεστεί στο θρεπτικό υλικό Novy-McNeal-Nicolle (NNN) ή σε άλλα καλλιεργητικά υλικά. Σε αυτά τα υλικά η αμαστιγωτή μορφή μετατρέπεται σε προμαστιγωτή και στη συνέχεια τα παράσιτα πολλαπλασιάζονται *in vitro*. Η ευαισθησία των μεθόδων καλλιέργειας εξαρτάται από το φορτίο των παρασίτων, αλλά υπολογίζεται ότι κυμαίνεται μεταξύ 60% και 85%. Οι μέθοδοι καλλιέργειας είναι χρονοβόρες, δαπανηρές και απαιτούν εξιδεικευμένο

προσωπικό, επομένως σπάνια χρησιμοποιούνται για κλινική διάγνωση [36].

## 9.2 Ανοσολογικές μέθοδοι διάγνωσης

Η VL προκαλεί έντονη απόκριση των ανοσοποιητικών οδών με την παραγωγή αντισωμάτων έναντι του παρασίτου τα οποία μέσω ανοσολογικών δοκιμασιών επιβεβαιώνουν την διάγνωση. Ωστόσο υπάρχει κίνδυνος αδυναμίας έγκυρης διάγνωσης. Για παράδειγμα, η ευαισθησία των ορολογικών εξετάσεων είναι γενικά χαμηλότερη σε ασθενείς που έχουν μολυνθεί από τον HIV, ιδιαίτερα αν η μόλυνση από τον ιό προηγήθηκε. Επιπλέον, οι δοκιμασίες που χρησιμοποιούν ολόκληρα αντιγόνα παρασίτων έχουν υψηλότερη ευαισθησία αλλά σχετικά μικρότερη ειδικότητα λόγω διασταυρούμενης αντιδραστικότητας με αντιγόνα της νόσου Chagas, της ελονοσίας και άλλων λοιμώξεων, καθώς και των μη ειδικών αντισωμάτων (αντισώματα από αυτοάνοση ηπατίτιδα ή συστηματικό ερυθηματώδη λύκο) [3]. Ο έμμεσος ανοσοφθορισμός και η ELISA είναι χρήσιμα διαγνωστικά εργαλεία. Η άμεση δοκιμή συγκόλλησης (DAT) είναι εύκολη διαγνωστική δοκιμασία και απαιτεί λιγότερο εξοπλισμό. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι ασθενείς μετά την επιτυχή θεραπεία της VL συνεχίζουν να εμφανίζουν αντισώματα ορού έναντι των παρασίτων για αρκετούς μήνες έως χρόνια. Επομένως οι δοκιμασίες αυτές δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν αξιόπιστα ως δοκιμές απόκρισης θεραπείας. Ομοίως, μια θετική ορολογική εξέταση δεν είναι πάντα απόδειξη ενεργής νόσου [3]. Πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα λαμβάνονται από την εντόπιση του αντιγόνου «rk39» με ευαισθησία 100% και ειδικότητα 96. Επιπλέον οι τίτλοι αντισωμάτων έναντι του rk39 αντιγόνου συνδέονται άμεσα με την ενεργό νόσο και έχουν το πλεονέκτημα παρακολούθησης της νόσου κατά την διάρκεια της αντιπαρασιτικής θεραπείας [37]. Αυτό το αντιγόνο έχει επίσης χρησιμοποιηθεί σε ανοσοχρωματογραφικές ταινίες ως ταχεία δοκιμή που απαιτεί ελάχιστο εξοπλισμό και είναι εύκολη στη χρήση (εικόνα 17) [38]. Η δοκιμασία ανίχνευσης λεϊσμανιακού αντιγόνου στα ούρα μέσω συγκόλλησης λάτεξ (KAtex) είναι επίσης ένα χρήσιμο διαγνωστικό τεστ, ειδικά σε δύσκολες συνθήκες, καθώς είναι απλή και εύκολη να εκτελεστεί, δεν απαιτεί εξοπλισμό και το αποτέλεσμα εκτιμάται οπτικά. Το KAtex έχει υψηλή ειδικότητα, αλλά η ευαισθησία του είναι <70%, περιορίζοντάς το στη διάγνωση [39].




**Εικόνα 5** Αναπαράσταση ενός “rapid test” rk39 με ανοσοχρωματογραφική ταινία.
Πηγή: (https://microbeonline.com)

## 9.3 Μοριακές τεχνικές

Οι διαγνωστικές μέθοδοι που βασίζονται σε μοριακές τεχνικές Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) συνδυάζουν υψηλά επίπεδα ευαισθησίας και ειδικότητας και είναι κατάλληλες για την ανίχνευση του DNA των παρασίτων ακόμη και σε αρχικά στάδια της νόσου. Είναι επίσης ικανές για διαφορική διάγνωση των ειδών *Leishmania*. Η ευαισθησία της ανάλυσης PCR εξαρτάται από το δείγμα που χρησιμοποιήθηκε. Είναι υψηλότερη (κοντά στο 100%) στο σπλήνα ή σε δείγματα μυελού των οστών για VL. Το δείγμα είναι συνήθως περιφερικό αίμα λόγω της μη επεμβατικής λήψης του. Χρησιμοποιώντας περιφερικό αίμα, οι τιμές ευαισθησίας κυμαίνονται από 70% έως 100% [32]. Η τεχνική της PCR θεωρείται η πιο αποτελεσματική μέθοδος και σε περιπτώσεις ασθενών με συλλοίμωξη με τον HIV παρουσιάζει ευαισθησία έως και 100% [3].

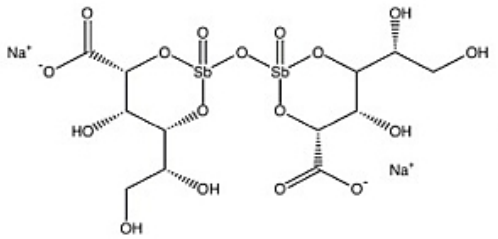
**Πίνακας 3** Τεχνικές ανίχνευσης ορολογικών μεθόδων που χρησιμοποιούνται συνήθως στην διάγνωση της λεϊσμανίασης με τα κύρια πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα της κάθε μίας [32].

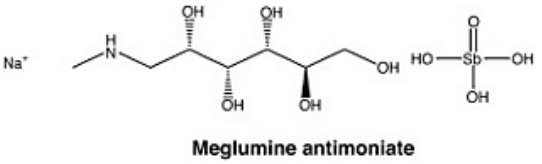
| Δοκιμασία ή μέθοδος | Ευαισθησία % | Ειδικότητα % | Πλεονεκτήματα | Μειονεκτήματα |
|---|---|---|---|---|
| Ανίχνευση αντισωμάτων | | | | |
| IFA test | 87-100 | 77-100 | Ανίχνευση αντισωμάτων από τα πρώτα στάδια της μόλυνσης. | Απαιτεί εξελιγμένο εργαστήριο |
| ELISA (CSA αντιγόνο) (rKJ9 αντιγόνο) | 80-100<br>75-98 | 84-95<br>79-89 | Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εξέταση μεγάλης κλίμακας επιδημιολογικών μελετών. | Η ευαισθησία και η ειδικότητα επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από το χρησιμοποιούμενο αντιγόνο.<br>Απαιτεί εξειδικευμένο προσωπικό, εξελιγμένο εξοπλισμό, |
| Western blot | 90-98 | 98-100 | Διάκριση αντισωμάτων έναντι διαφόρων λεϊσμανιακών αντιγόνων. | Χρονοβόρα, δύσκολη τεχνικά και δαπανηρή. |
| DAT | 85-100 | 91-100 | Ταχεία δοκιμή. | Τα αντιδραστήρια είναι ευαίσθητα. Διασταυρούμενες αντιδράσεις με άλλα νοσήματα<br>Σε HIV θετικούς ασθενείς, μπορεί να είναι ψευδώς αρνητική |
| Δοκιμή ICA με rK39 | 90-100 | 93-100 | Φθηνό, γρήγορο, απλό, μπορεί να γίνει από ανειδίκευτο άτομο | |
| Ανίχνευση αντιγόνου | | | | |
| Δοκιμή συγκόλλησης λατέξ (KAtex) | 79-100 | 60-100 | Απλή, εύκολη εκτέλεση. Χρήσιμο στη διάγνωση των ανοσοκατασταλμένων ασθενών. | Δύσκολη διάκριση ασθενώς θετικών από αρνητικών αποτελεσμάτων. Τα ούρα πρέπει να θερμανθούν σε σημείο βρασμού για να αποφευχθούν τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα. |

# 10 ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Χωρίς αντιπαρασιτική θεραπεία, το ποσοστό θνησιμότητας της VL (Kala azar) εκτιμάται ότι είναι μεγαλύτερο από 95% [40]. Αρκετές ουσίες συμπεριλαμβανομένων των ενώσεων πεντασθενούς αντιμονίου, αμφοτερικίνης Β, της παρομομυκίνης, της πενταμιδίνης και της μιλτεφοσίνης είναι προς το παρόν διαθέσιμες για την θεραπεία της λεϊσμανίασης. Ωστόσο, αυτά τα χημικοθεραπευτικά είτε θα επιφέρουν αρκετές ανεπιθύμητες ενέργειες με κυτταροτοξικότητα, είτε είναι ακριβά για τις ενδημικές χώρες, είτε απαιτούν καθημερινή νοσηλεία για περιόδους που κυμαίνονται από 3 έως 5 εβδομάδες. Επιπλέον, η εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών στα φάρμακα αυτά αυξάνεται ραγδαία παγκοσμίως και αυτές οι θεραπείες αποτυγχάνουν να προκαλέσουν πλήρη ίαση του ξενιστή. Συνεπώς, υπάρχει ανάγκη για νέες θεραπείες κατά της λεϊσμανίασης που θα είναι ασφαλείς, αποτελεσματικές στην πρόκληση για μακροπρόθεσμη θεραπεία και με ευκολότερη διαχείριση. Οι συνδυασμένες θεραπείες έχουν ως πλεονέκτημα την μείωση της διάρκειας της θεραπείας, του κόστους και της συνολικής δόσης των φαρμάκων, περιορίζοντας έτσι τόσο την τοξικότητα όσο και την εμφάνιση αντοχής [21].

## 10.1 Ενώσεις πεντασθενούς Αντιμονίου

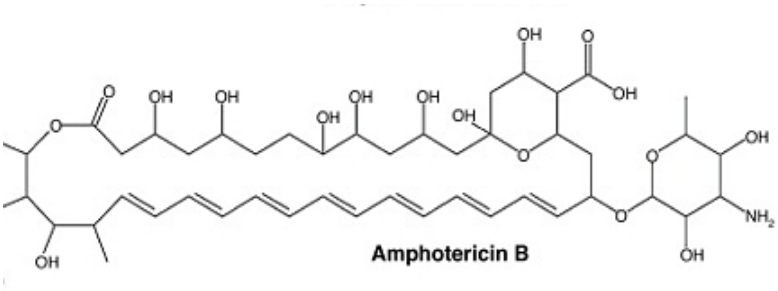



Το φάρμακο επιλογής για τις περισσότερες μορφές λεϊσμανίασης είναι χρήση πεντασθενούς αντιμονίου (Sb), κατέχει συνολικά ποσοστό μεγαλύτερο από 90% στην θεραπεία της νόσου (εμπορική ονομασία «Glucantime» ή «Pentostam»). Ωστόσο τονίζεται ότι η ανθεκτικότητα των παρασίτων είναι σημαντική με κύριες εστίες το Bihar της Ινδίας και το Νεπάλ, όπου η ανθεκτικότητα αγγίζει το 60% [21]. Η ακριβής δράση του Sb στη λεϊσμανίαση δεν είναι πλήρως κατανοητή, αλλά πιθανώς είναι πολυπαραγοντική και λαμβάνει ρόλο σε αρκετές μοριακές διεργασίες του παρασίτου [41]. Μπορεί να χορηγηθεί ενδοφλεβίως (IV) ή ενδομυϊκά (IM). Η δόση της ουσίας είναι 20 mg/kg καθημερινά ενώ η διάρκεια της αγωγής για τις περισσότερες κλινικές μορφές της νόσου κυμαίνεται από 28-30 ημέρες έως και 60 ημέρες για PKDL. Συνήθως η ουσία χορηγείται σε συνδυασμό με άλλους παράγοντες προκειμένου να μειωθούν οι ημέρες χορήγησης και οι ανεπιθύμητες ενέργειες του φαρμάκου. Τέτοιες ουσίες είναι η παρομομυκίνη (VL Ανατολικής Αφρικής), η πεντοξυφυλλίνη (CL και DCL από *L.aethiopica* και MCL από *L.major*) και η αλλοπουρινόλη. (CL και LR από *L. tropica*) [42]. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες είναι συχνές και πολύ σημαντικές στη χρήση συστηματικής θεραπείας και σχετίζονται με τη

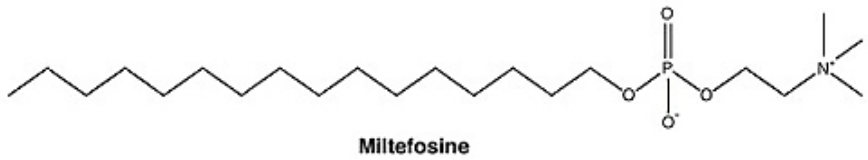
συσσώρευση δόσης, κυμαίνονται από ανωμαλίες ηλεκτρολυτών, αύξηση των ηπατικών και παγκρεατικών ενζύμων, παγκυτταροπενία, καρδιοτοξικότητα, έως και ξαφνικό θάνατο. Για αυτό τον λόγο απαιτείται προσεκτική παρακολούθηση των ασθενών κατά τη διάρκεια της θεραπείας [3,43].

## 10.2 Αμφοτερικίνη Β




Η αμφοτερικίνη Β είναι ένα αποτελεσματικό φάρμακο κατά της λεϊσμανίασης που λειτουργεί με σύνδεση στην εργοστερόλη της μεμβράνης των κυττάρων και κατά συνέπεια προκαλεί αστάθεια της μεμβράνης. Η δεσοξυχολική και η λιποσωμική αμφοτερικίνη Β (εμπορική ονομασία «AmBisome») έχουν χρησιμοποιηθεί κλινικά στη λεϊσμανίαση [44]. Η δεσοξυχολική αμφοτερικίνη Β χρησιμοποιείται IV σε δόση 0,75-1 mg/kg την ημέρα για 15-20 δόσεις για VL που προκλήθηκε από *L. donovani* ή μέχρι 30 ημέρες για VL που προκαλείται από L. infantum. Η δοσολογία στο PKDL είναι καθημερινή ή ανά δύο ημέρες έως και 4 μήνες. Για CL που προκαλείται από *L. braziliensis* η διάρκεια της θεραπείας είναι 25-30 ημέρες, και για το MCL είναι έως και 45 ημέρες. Η λιποσωμική αμφοτερικίνη Β χρησιμοποιείται τυπικά σε δόση 2,5-10 mg/kg την ημέρα μειώνοντας το συνολικό μήκος της θεραπείας στο μισό με αυτή την μορφή. Λιποσωμική αμφοτερικίνη Β μόνη της δίδεται σε δόση 10 mg/kg σε VL που προκαλείται από *L. donovani* ή στα 5 mg/kg σε συνδυασμό με μιλτεφοσίνη ή παρομομυκίνη καθημερινά για 10 ημέρες [45]. Αναμφισβήτητα, η λιποσωμική αμφοτερικίνη Β είναι το φάρμακο επιλογής για τη θεραπεία της VL διότι έχει την υψηλότερη θεραπευτική αξία και ταυτόχρονα είναι πιο ασφαλές. Δυστυχώς φτωχές χώρες όπως η Ινδία, όπου ανευρίσκεται το μεγαλύτερο ποσοστό ασθενών με VL, το κόστος είναι απαγορευτικό και η πρόσβαση σε αυτό το φάρμακο καθίσταται αδύνατη. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες της αμφοτερικίνης Β είναι σε μερικές περιπτώσεις πυρετός, ρίγη και πόνος στην πλάτη, διαταραχές των ηλεκτρολυτών, παροδική νεφροτοξικότητα, σπάνια, αναστρέψιμη μυοκαρδίτιδα ωστόσο οι ανεπιθύμητες ενέργειες είναι σημαντικά μειωμένες με την λιποσωμική μορφή [3,46].

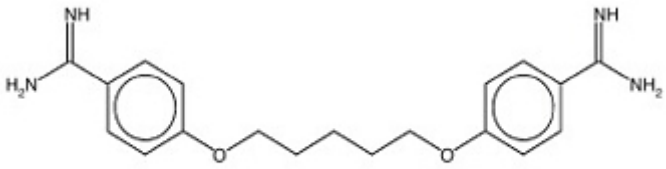
## 10.3 Μιλτεφοσίνη




Ένα σχετικά νέο φάρμακο για τη θεραπεία της VL είναι η μιλτεφοσίνη (εμπορικές ονομασίες «Impavido» και «Miltex»). Αν και αρχικά αναπτύχθηκε ως αντινεοπλασματικό φάρμακο, χορηγείται έναντι της VL στην Ανατολική Αφρική. Το 2002

κατοχυρώθηκε και για την θεραπεία VL στην Ινδία [47]. Είναι ακόμη αποτελεσματικό σε περιπτώσεις MCL και σε CL που προκαλείται από *L. mexicana, L. guyanensis* και *L. panamensis* αλλά όχι *L. braziliensis*. Η μιλτεφοσίνη δίδεται για 28 ημέρες σε δόση 2,5 mg/kg ημερησίως για 28 ημέρες σε παιδιά ηλικίας 2-11 ετών και για άτομα ηλικίας 12 ετών και άνω σε δόση 50 mg την ημέρα για εκείνους που ζυγίζουν λιγότερο από 25 kg, 100 mg την ημέρα για άτομα 25-50 kg σωματικού βάρους και 150 mg την ημέρα για ασθενείς με σωματικό βάρος μεγαλύτερο των 50 kg [48]. Πρόσφατα, αποδείχθηκε ότι η μιλτεφοσίνη είναι αποτελεσματική και σε PKDL με επέκταση της διάρκειας αγωγής της μέχρι 12 εβδομάδες [49]. Συχνά προκαλεί γαστρεντερικές ανεπιθύμητες ενέργειες όπως ανορεξία, ναυτία, έμετο (38%), διάρροια (20%) και αυξημένα ηπατικά ένζυμα. Επιπλέον, είναι δυνητικά τερατογόνο και δεν πρέπει να χρησιμοποιείται κατά την εγκυμοσύνη και σε γυναίκες με δυνατότητα αναπαραγωγής, αν αυτό είναι δυνατόν [47]. Το γεγονός ότι χορηγείται για μεγάλο χρονικό διάστημα έχει προκαλέσει ανησυχία ότι θα οδηγήσει στην ανάπτυξη μηχανισμών αντίστασης από τα παράσιτα, υποψία που επιβεβαιώνεται από μελέτες με τα ποσοστά αποτυχίας στο φάρμακο να φτάνουν το 10% σε 6 μήνες και 20% σε 12 μήνες [3,50].

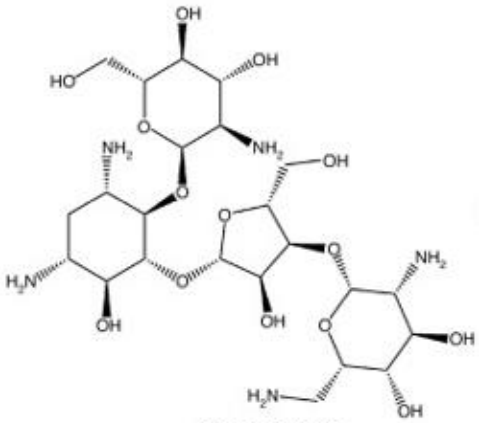
## 10.4 Πενταμιδίνη



**Pentamidine**

Οι αντιμικροβιακοί μηχανισμοί της πενταμιδίνης (εμπορικά ονόματα «Pentacrinat» και «Pentam») αφορούν στην παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης μακρομορίων όπως το DNA, το RNA, τα φωσφολιπίδια και οι πρωτεΐνες. Έχει χρησιμοποιηθεί σε δόσεις κάθε δεύτερη ημέρα για 3-5 ημέρες των 4 mg/kg σωματικού βάρους για τη θεραπεία CL της Νοτίου Αμερικής που προκαλείται από *L. guyanensis* και *L. panamensis*. Υπάρχουν ορισμένα στοιχεία που δείχνουν ότι είναι επίσης αποτελεσματική σε CL στο παλαιό κόσμο από *L. tropica* και *L. infantum*. Ευρύ φάσμα ανεπιθύμητων ενεργειών έχουν αναφερθεί, μερικές από τις οποίες είναι η υπογλυκαιμία, η ηπατοτοξικότητα, κυτταροπενίες όπως η λευκοπενία και η αναιμία, ακόμη και νεφροτοξικότητα, καρδιοτοξικότητα με αρρυθμίες, υπόταση και καρδιακή ανεπάρκεια. Δεδομένου των ανεπιθύμητων ενεργειών αυτών οι ασθενείς που λαμβάνουν το συγκεκριμένο φάρμακο απαιτούν συνεχή επιτήρηση [21].

## 10.5 Παρομομυκίνη




Η παρομομυκίνη, ανήκει στις αμινογλυκοσίδες, λειτουργεί παρεμποδίζοντας τη σύνθεση πρωτεϊνών με δέσμευση του rRNA των παρασίτων. Αποδείχθηκε ότι ήταν αποτελεσματική στην ινδική VL και έλαβε άδεια χρήσης στην Ινδία το 2006 σε δόση 15 mg/kg για 21 ημέρες οδηγώντας σε οοσοστό θεραπείας 93-95% [3]. Ωστόσο η αποτελεσματικότητα ήταν χαμηλότερη (80-85%) στην Ανατολική Αφρική, και για τον λόγο αυτό η δόση αυξήθηκε σε 20 mg/kg ημερησίως για 21 ημέρες [51]. Ακόμη χρησιμοποιείται τοπικά ή και από του στόματος για μορφές CL. Πολλοί ερευνητές παγκοσμίως προτείνουν την παρομομυκίνη σε συνδυασμένα θεραπευτικά σχήματα για VL σε ενδημικές περιοχές. Έτσι χορηγείται σε συνδυασμό με λιποσωμική αμφοτερικίνη B για VL στην Ινδία και στην Ανατολική Αφρική. Ένας άλλος συνδυασμός για CL περιλαμβάνει αλοιφή 15% μαζί με 12% χλωριούχο μεθυλο-βενζοθειόνιο καθημερινά για 20 μέρες [52]. Παρόλα ταύτα, η τοπική θεραπεία δεν είναι αποτελεσματική σε MCL. Δεν υπάρχουν πολλά δεδομένα για αυτό το φάρμακο έναντι των παρασίτων *L. infantum* στην Μεσόγειο και στην Νότια Αμερική. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες του φαρμάκου περιλαμβάνουν παροδική αύξηση στα ηπατικά ένζυμα, αναστρέψιμη ωτοτοξικότητα και νεφρική ανεπάρκεια [3,39].

## 10.6 Στοχευμένη θεραπεία

Οπως αναφέρθηκε, ο περιορισμός της λεϊσμανίασης βασίζεται κυρίως στην φαρμακευτική αγωγή μέχρι σήμερα. Η αντίσταση σε φάρμακα πεντασθενούς αντιμονίου, τα οποία έχουν αποτελέσει τα φάρμακα πρώτης γραμμής για τη θεραπεία της σπλαχνικής λεϊσμανίασης είναι πλέον δεδομένη. Στο Bihar της Ινδίας έχει αναφερθεί αντίσταση άνω του 60%. Νέα σκευάσματα όπως η λιποσωμική αμφοτερικίνη B και η μιλτεφοσίνη έχουν δείξει μεγάλη αποτελεσματικότητα για την θεραπεία της λεϊσμανίασης αλλά το υψηλό κόστος και οι ανεπιθύμητες ενέργειες τους περιορίζουν τη χρησιμότητά τους, ειδικά στις φτωχές ενδημικές περιοχές που πλήττονται από την νόσο [53]. Επιπλέον, ακανόνιστη και ακατάλληλη χρήση αυτών των φαρμάκων δεύτερης γραμμής σε ενδημικές περιοχές όπως η περίπτωση στην περιοχή Bihar, αποτελεί παράγοντα για την ανάπτυξη αντίστασης από το παράσιτο. Σύμφωνα με μελέτες, στο Bihar έχει παρατηρηθεί ότι μόνο μια μειοψηφία ασθενών (26%) αντιμετωπίστηκαν σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές [54].

Στο πλαίσιο των περιορισμένων επιλογών φαρμάκων και της μη διαθεσιμότητας προληπτικών ή προφυλακτικών εμβολίων, υπάρχει επιτακτική ανάγκη να αναπτυχθούν νέα ειδικά αντιλεϊσμανιακά φάρμακα για να περιοριστεί και να αντιμετωπιστεί αποτελεσματικά η νόσος. Μία στρατηγική για το σκοπό αυτό που απαιτεί συνήθως λιγότερα χρήματα και

χρόνο είναι η στοχευμένη θεραπεία, η ανακάλυψη ενός φαρμάκου που στοχεύει σε ένα μοριακό στόχο. Η αναζήτηση τέτοιων πιθανών στόχων επικεντρώνεται κυρίως σε μόρια που εμπλέκονται σε βιοχημικές και μεταβολικές οδούς που είναι απαραίτητες για την επιβίωση του παρασίτου. Ένα ακόμη πλεονέκτημα της στρατηγικής αυτής είναι ότι δύναται η τροποποίηση υπάρχοντος φαρμάκου ώστε να το κάνει πιο ειδικό για τον μοριακό στόχο που στοχεύει, έτσι ώστε το φάρμακο να μην προκαλεί τοξικότητα στον ανθρώπινο οργανισμό κάνοντάς το ασφαλέστερο και αποτελεσματικότερο [55].

# 11 ΚΙΝΑΣΕΣ

Οι πρωτεϊνικές κινάσες είναι μια βασική υπεροικογένεια των ενζύμων. Εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα και ρυθμίζουν τις οδούς φωσφορυλίωσης πρωτεϊνών και μεταγωγής σήματος που είναι κρίσιμες για διάφορες κυτταρικές λειτουργίες [56]. Οι κινάσες καταλύουν τη μεταφορά μιας φωσφορικής ομάδας από ένα μόριο τριφωσφορικής αδενοσίνης (adenosine triphosphate ATP) στην πλευρική αλυσίδα ενός αμινοξέος που φέρει μια ομάδα υδροξυλίου (φωσφορυλίωση).

Οι κινάσες διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, ανάλογα με το κατάλοιπο αμινοξέος που φωσφοριλιώνουν σε πρωτεΐνες στόχους. Δηλαδή σε κινάσες σερίνης/θρεονίνης και σε κινάσες τυροσίνης. Η δομή μιας μέσης κινάσης περιλαμβάνει δύο επικράτειες (domains) και ανάμεσά τους το ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης. Η μικρότερη, N-τελική επικράτεια περιέχει κυρίως β-αλυσίδες και μία έλικα που ονομάζεται έλικα C. Η μεγαλύτερη C-τελική επικράτεια είναι κυρίως ελικοειδής, με έλικες E και F ιδιαιτέρα συντηρημένες.

Σημαντικά δομικά μοτίβα περιλαμβάνουν τον βρόχο δέσμευσης των φωσφορικών ομάδων (P-Loop), ο οποίος περιέχει ένα πλούσιο σε γλυκίνη μοτίβο και εμπλέκεται στην δέσμευση του ATP, και τον βρόχο ενεργοποίησης (A-loop) που συχνά περιέχει θέσεις φωσφορυλίωσης για την σύνδεση του πεπτιδικού υποστρώματος. [57].

Ο βρόχος ενεργοποίησης (A-loop) είναι ένα πολύπλοκο στοιχείο της δομής της πρωτεϊνικής κινάσης. Έχει την ικανότητα να αναδιατάσσεται όταν φωσφορυλιώνεται. Πρέπει να είναι σε γραμμική διαμόρφωση ώστε να επιτρέπεται η σύνδεση του υποστρώματος. Πολλές κινάσες απαιτούν ενεργοποίηση με φωσφορυλίωση στον βρόχο σε κατάλοιπα αργινίνης ή άλλου αμινοξέος, κοντά συνήθως σε ένα διατηρημένο ασπαρτικό οξύ προκειμένου να ενεργοποιηθούν. Η θέση πρόσδεσης του πεπτιδικού υποστρώματος βρίσκεται στην αυλάκωση μεταξύ των N- και C-τελικών επικρατειών, με τον βρόχο ενεργοποίησης να αποτελεί μέρος αυτού. Συχνά η πρόσδεση παρεμποδίζεται μέσω ενδοστερικών μηχανισμών (εσωτερικές αλληλουχίες που μοιάζουν με το υπόστρωμα), ή ρυθμίζεται μέσω της διαμόρφωσης του βρόχου.

Η διαμόρφωση του βρόχου δέσμευσης των φωσφορικών ομάδων διαφέρει ελάχιστα μεταξύ των ενεργών κινασών. Το κλασικό μοτίβο βρόχου είναι GXGXXG, αλλά μερικές κινάσες έχουν μόνο δύο από τις γλυκίνες. Είναι πιθανά ευέλικτο ώστε να μπορεί και να συνδεθεί με το ATP παρά τις μικρές αλλαγές στον προσανατολισμό των δύο λοβών και να ανταποκριθεί σε ρυθμιστές. Ο αποκλεισμός της θέσης σύνδεσης ATP είναι ένας κοινός μηχανισμός για τη ρύθμιση της δραστικότητας μιας πρωτεϊνικής κινάσης.

Εκτός από τις ενεργές κινάσες, σε ένα κύτταρο συναντώνται και οι ψευδοκινάσες. Ως ψευδοκινάση ορίζεται κάθε πρωτεΐνη που, παρά το ότι έχει ταξινομηθεί (συνήθως με βάση την ομολογία αλληλουχίας) στην ομάδα των κινασών, δεν έχει καμία καταλυτική δραστικότητα. Ο ρόλος τους στο κύτταρο είναι κατά βάση ρυθμιστικός. Συγκεκριμένα, κάθε ψευδοκινάση λειτουργεί με τουλάχιστον έναν από τους παρακάτω τρόπους: (i) ως

ρυθμιστής, ελέγχει τη δραστηκότητα άλλων κινασών λειτουργώντας ως εταίρος διμερισμού ή συμπαράγοντας αναστέλλοντας ή επιταχύνοντας έτσι την κινάση, πιθανώς με αλλοστερικό τρόπο, (ii) ως ανταγωνιστής, δεσμεύει τα υποστρώματα και επομένως εμποδίζει ανταγωνιστικά την πρόσβαση άλλων κινασών ή σηματοδοτικών μορίων σε αυτά, (iii) ως άγκυρα που παγιδεύει ένα υπόστρωμα σε συγκεκριμένες ενδοκυττάριες θέσεις και (iv) ως ενσωματωτής («integrator»), αλληλεπιδρώντας με διάφορα στοιχεία οδών σηματοδότησης ή με πολλαπλά συστατικά ενός καταρράκτη αντιδράσεων [57,58].

Οι κινάσες με βάση την δομή, την λειτουργία τους και τα βιολογικά τους χαρακτηριστικά διαχωρίστηκαν σε δυο μεγάλες κατηγορίες. Τις ePK (eukaryotic protein kinases) και τις aPK (atypical protein kinases). Οι περισσότερες κινάσες ανήκουν στην κατηγορία των κινασών ePK που περιλαμβάνει 8 κύριες ομάδες: AGC, CAMK, CK 1, CMGC, RGC, STE, TK, TKL η καθεμία από αυτές αποτελείται από μικρότερες υποομάδες κινασών. Οι κινάσες aPK διακρίνονται σε 4 οικογένειες: Alpha, PIKK, PDHK, RIO [59].

## 11.1 Παρασιτικές Κινάσες

Οι πρωτεϊνικές κινάσες των παρασίτων Leishmania καθώς και οι αντίστοιχες άλλων ευκαρυωτικών πρωτόζωων θεωρούνται ελκυστικοί φαρμακευτικοί στόχοι για διάφορους λόγους. Πρώτον, είναι δυνατό να ανασταλούν με μικρά μόρια που προσδένονται στο θύλακα πρόσδεσης ATP αλλά και σε άλλα σημεία της κινάσης. Δεύτερον, η αναστολή των κινασών αναμένεται να έχει σημαντικά αποτελέσματα για την αναστολή της νόσου, καθώς οι κινάσες κατέχουν θεμελιώδη ρόλο στην ζωή των παρασίτων μέσω των μονοπατιών φωσφορυλίωσης που εμπλέκονται σε όλες τις κρίσιμες διαδικασίες του κυττάρου, όπως ο κυτταρικός κύκλος, η διαφοροποίηση και άλλα. Είναι ενδιαφέρον ότι οι Τρυπανοσωματίδες έχουν σημαντικό αριθμό γονιδίων που κωδικοποιούν κινάσες [60]. Αρκετές από αυτές τις κινάσες, κυρίως μέλη της ομάδας CMGC, έχουν ήδη επικυρωθεί ως στόχοι φαρμάκων για τη θεραπεία παρασιτικών νόσων [55]. Μεταξύ αυτών είναι κάποιες κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες (CDKs) και κάποιες μιτογόνες ενεργοποιημένες πρωτεϊνικές κινάσες (mitogen-activated protein kinase, MPK) [55]. Στο εργαστήριο Μοριακής Παρασιτολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ (ΕΙΠ), έχει δειχθεί ότι και η κινάση συνθετάσης γλυκογόνου 3 (glycogen synthase kinase, GSK-3) και η κινάση Aurora (Smirli μη δημοσιευμένα αποτελέσματα) είναι απαραίτητες για τη βιωσιμότητα του παρασίτου, ενώ κάποιες κινάσες της οικογένειας DYRK (dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase) είναι απαραίτητες για τη μολυσματικότητά του και άρα είναι δυνητικοί μοριακοί στόχοι για τη θεραπεία της λεϊσμανίασης (Smirlis μη δημοσιευμένα αποτελέσματα) [61].

### 11.1.1 Κινάσες Aurora

Οι κινάσες Aurora είναι μία κατηγορία πρωτεϊνικών κινασών σερίνης/θρεονίνης που έχουν πολλαπλές λειτουργίες στην κυτταρική διαίρεση. Το 1995 η πρώτη κινάση Aurora ανακαλύφθηκε ως αποτέλεσμα μιας γενετικής μετάλλαξης στο είδος *Drosophila* που είχε

ως αποτέλεσμα την αποτυχία στον διαχωρισμό των κεντροσωμάτων κατά την κυτταρική διαίρεση. Ονομάστηκε έτσι επειδή η εμφάνιση του ελαττωματικού μιτωτικού άξονα της ατράκτου μοιάζει με την προβολή φωτός (Aurora) στον πολικό νυχτερινό ουρανό. Οι κινάσες Aurora έχουν βρεθεί ότι ρυθμίζουν πολλαπλές πλευρές της μίτωσης και της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου, συμπεριλαμβανομένου του διπλασιασμού και του διαχωρισμού κεντροσωμάτων, της διπολικής συναρμογής ατράκτου, της συμπύκνωσης χρωμοσωμάτων και των μικροσωληνίσκων. Στον ανθρώπινο οργανισμό συναντάμε τρείς κινάσες τύπου Aurora (Aurora A, Aurora B και Aurora C) [62].

Η ομόλογη κινάση Aurora του συγγενούς με τη *Leishmania* παρασίτου *Trypanosoma brucei* (*Tb*) AUK1 διαδραματίζει εξίσου σημαντικό ρόλο στον κυτταρικό κύκλο των παρασίτων. Η αποσιώπηση της έκφρασης της *Tb*AUK1 είχε ως αποτέλεσμα αποτυχημένη μίτωση των προμαστιγωτών της φάσης M, τα οποία εμφάνιζαν δυο κινητοπλάστες, διογκωμένο πυρήνα και επιμήκη οπίσθιο άκρο [63].

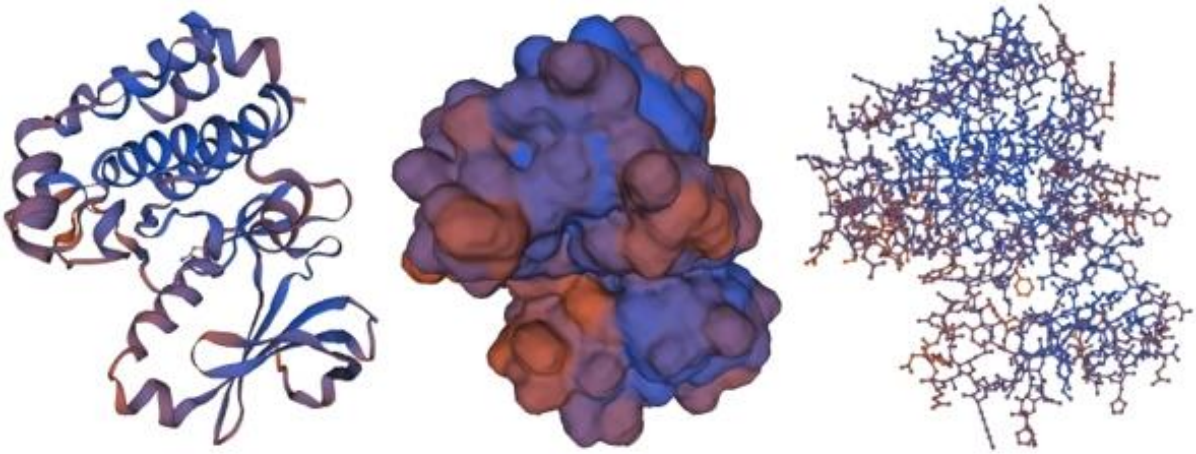
Το παράσιτο *L. donovani* διαθέτει μια ομόλογη κινάση χαρακτηρισμένη ως *Ld*AIRK. Έχει μελετηθεί και αποδείχτηκε εξίσου σημαντική με την *Tb*AUK1, λόγω της αποτυχίας αναπαραγωγής των παρασίτων που δεν εκφράζουν την *Ld*AIRK. Η έκφραση της *Ld*AIRK φαίνεται να μεταβάλλεται καθώς ο κυτταρικός κύκλος εξελίσσεται από την φάση G1 έως την S και τελικά στην φάση G2/M. Μελέτες κινητικής καταδεικνύουν την πυρηνική πρωτεΐνη ιστιδίνη-3 (histidine-3, H3) ως το φυσιολογικό υπόστρωμά της [64].

Ενώ όλα τα παραπάνω υποδηλώνουν έμμεσα ότι η κινάση Aurora του παρασίτου είναι απαραίτητη για τη βιωσιμότητά του, στο εργαστήριο Μοριακής Παρασιτολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ αυτό έχει δειχθεί με άμεσο τρόπο. Πιο συγκεκριμένα έχει πραγματοποιηθεί απαλοιφή της κινάσης Aurora από το γονιδίωμα παρασίτων και στα δύο αλληλόμορφα παρουσία ενός επισώματος που την εκφράζει. Το επίσωμα αυτό χάνεται σε παράσιτα αγρίου τύπου, με τη παρουσία του αντι-ιικού φαρμάκου Gancinclovir, ενώ σε παράσιτα που έχει απαλειφθεί το γονίδιο της κινάσης από το γονιδίωμα, το επίσωμα δεν είναι δυνατό να χαθεί γιατί τα παράσιτα δεν μπορούν να επιβιώσουν ελλείψει της κινάσης (Smirlis μη δημοσιευμένα αποτελέσματα).

### LinAuroraK

Πρόσφατα μελετήθηκε, με την πρακτική των επικρατούντων αρνητικών μεταλλάξεων, η ομόλογη κινάση Aurora για το παράσιτο *L. infantum* η οποία χαρακτηρίστηκε ως LinAuroraK (ομόλογη της *Ld*AIRK). Στην μελέτη αυτή δημιουργήθηκαν 3 τροποποιημένες μορφές της κινάσης οι οποίες έφεραν σημειακές μεταλλάξεις σε συγκεκριμένα αμινοξέα που είχαν προβλεφθεί ως σημαντικά για τη λειτουργία της κινάσης (καταλυτικό κέντρο K60R, βρόχος ενεργοποίησης T186D και θέση σουμοϋλίωσης K156R) και έτσι δείχθηκε ότι οι μεταλλάξεις αυτές δεν μπορούν να αντικαταστήσουν τη μη μεταλλαγμένη Aurora, γεγονός που υποδηλώνει ότι ελέγχουν τη λειτουργία της. Μέσω των πειραμάτων αυτών αναδείχθηκε το πόσο σημαντική είναι η κινάση αυτή, καθώς η *Lin*AuroraK είναι απαραίτητη όχι μόνο

για την ολοκλήρωση της μίτωσης (G2/M του κυτταρικού κύκλου), αλλά και για τη κυτταρική διαίρεση και την ολοκλήρωση της κυτταροκίνησης του παρασίτου [65].



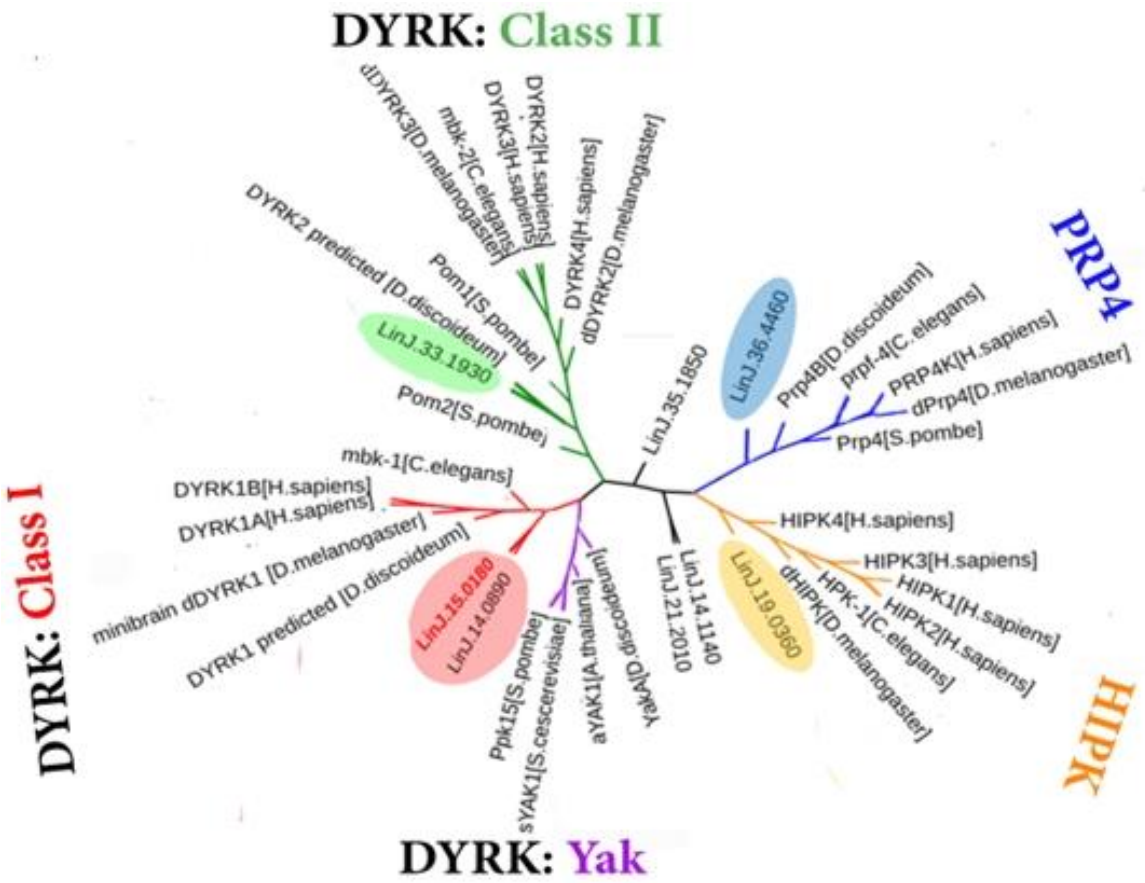
**Εικόνα 6** Η υποθετική 3D δομή της LinAuroraK όπως δημιουργήθηκε από το SWISS-MODEL (https://swissmodel.expasy.org/).

### 11.1.2 Κινάσες DYRKs

Οι DYRKs (Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinases) είναι μέλη της ομάδας κινασών CMGC και χαρακτηρίζονται από τη διπλή ειδικότητά τους, παρουσιάζοντας μια δραστικότητα αυτοφωσφορυλίωσης ενός υπολείμματος τυροσίνης του βρόχου ενεργοποίησης καθώς και δραστικότητα κινάσης σερίνης-θρεονίνης έναντι υποστρωμάτων. Οι κινάσες DYRK περιλαμβάνουν μια κεντρική περιοχή (kinase domain), την περιοχή επικράτειας, καθώς και μία ομόλογη περιοχή στο αμινοτελικό άκρο (DYRK homology box, DH box). Οι περιοχές αυτές, εκτός από την περιοχή επικράτειας, είναι διακριτές μεταξύ των διαφόρων πρωτεϊνικών κινασών και είναι υπεύθυνες για τις διαφορετικές πρωτεϊνικές λειτουργίες που ελέγχουν την υποκυτταρική εντόπιση, τη συγγένεια του υποστρώματος και τη κατανομή στους ιστούς. Τα μέλη της οικογένειας με βάση την ομολογία τους χωρίζονται σε 3 υποοικογένειες: στην υποοικογένεια DYRK, στις HIPKs (homeodomain interacting protein kinases) και τέλος στις PRP4s (pre-mRNA processing protein 4 kinases). Οι HPKs είναι γνωστό ότι ρυθμίζουν μια ευρεία ποικιλία σημάτων που σχετίζονται με καταστάσεις στρες, όπως βλάβες του DNA, υποξία και άλλα. Οι PRP4s είναι γνωστό ότι εμπλέκονται στην επεξεργασία του προ-rnRNA και στη μεταγραφική ρύθμιση. Η υποοικογένεια DYRK αποτελείται από τις κινάσες YAK που συναντώνται σε κατώτερους ευκαρυώτες και τις ομάδες 1 (DYRK1A, DYRKIB) και 2 (DYRK2, DYRK3 και DYRK4). Οι λειτουργικές μελέτες έχουν τοποθετήσει διάφορα μέλη της υποοικογένειας DYRK ως βασικούς παράγοντες σε μια μεγάλη ποικιλία κυτταρικών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένης της γονιδιακής έκφρασης, της πρωτεασωματικής

αποικοδόμησης, της αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, της κυτταροκίνησης, της ασύμμετρης κυτταρικής διαίρεσης και άλλων. Ωστόσο η ρύθμιση της κατάστασης ηρεμίας (quiescent state) και η διαφοροποίηση είναι το χαρακτηριστικό της δραστικότητας των DYRKs [66].

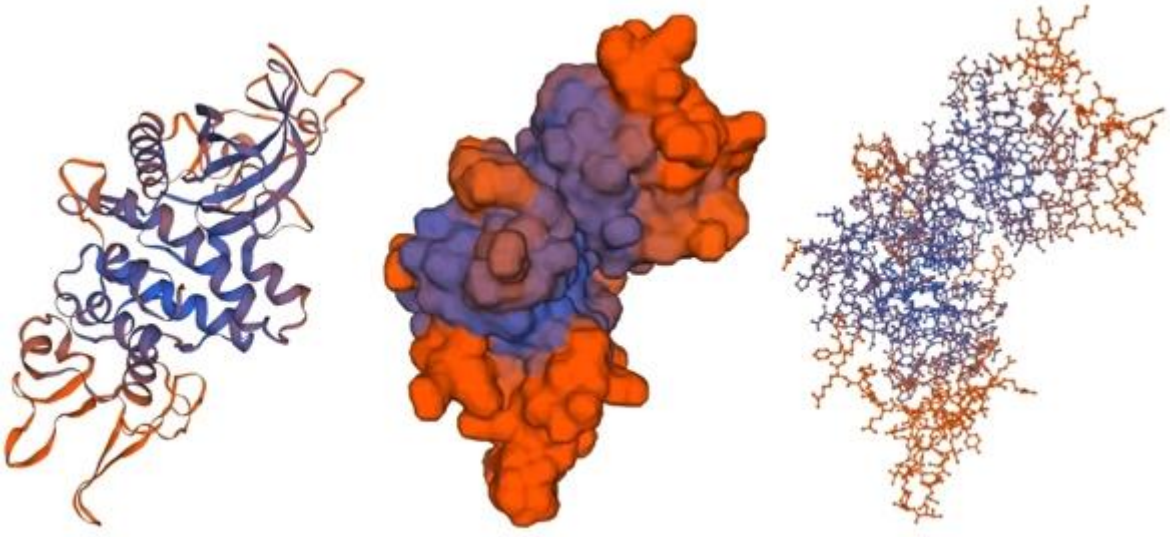
Στα θηλαστικά η υποοικογένεια DYRK αποτελείται από πέντε μέλη: την DYRK1A, την DYRK1B, την DYRK2, την DYRK3 και τέλος την DYRK4. Δυσλειτουργία αυτών των κινασών φαίνεται να σχετίζεται με νοσήματα όπως το σύνδρομο Down, διανοητική στέρηση, Alzheimer (DYRK1A) ακόμα και καρκίνο (DYRK1B). Μελέτες έχουν δείξει ότι στο *Trypanosoma brucei* δυσλειτουργία των κινασών DYRK συνδέεται με ελαττωματική διαφοροποίηση και παρεμπόδιση μετάδοσης στις μύγες tsetse [67]. Στο πρωτέωμα των παρασίτων Leishmania συναντώνται οχτώ μέλη της ομάδας DYRK: οι DYRK LinJ.15.0180, LinJ.14.0890 και LinJ.33.1930 της υποοικογένειας DYRK, η LinJ.19.0360 της υποοικογένειας HIPK και Lin.J.36.4460 της υποοικογένεια PRP4. Οι υπόλοιπες τρείς κινάσες: LinJ.21.2010, LinJ.14.1140 και Lin.J.36.4460 δεν ανήκουν στις γνώστες υποοικογένειες. Η λειτουργία αυτών των πρωτεϊνικών κινασών έχει μελετηθεί ελάχιστα στα παράσιτα Leishmania [66].



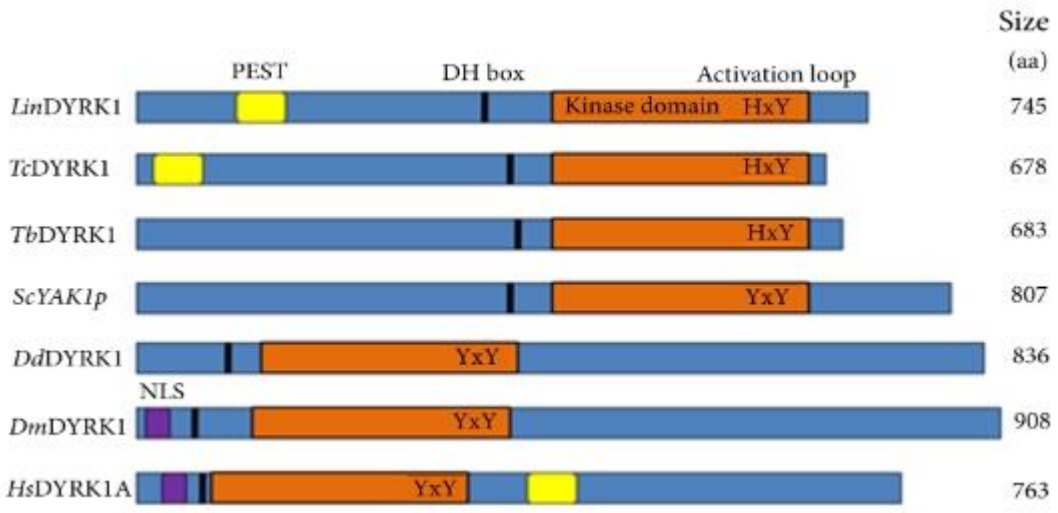

**Εικόνα 7** Φυλογενετικό δένδρο απεικόνισης των κινασών DYRK (Ευγενική παραχώρηση του Δρ.Vinicious Pinto Rocha και Δρ Δ. Σμυρλή).

## DYRK1 (LinJ.15.0180)

Η παρασιτική κινάση του *L.infantum* DYRK1 ή LinJ.15.0180 (εικόνα 20) έχει την υψηλότερη ομολογία με αυτές των θηλαστικών DYRK1A και DYRK1B (ταυτότητα αλληλουχίας 43% και 44%, αντίστοιχα). Στην αλληλουχία των αμινοξέων της κινάσης διακρίνουμε ένα μοτίβο PEST (πλούσιο σε προλίνη (P), γλουταμικό οξύ (E), σερίνη (S) και θρεονίνης (T)) στο αμινοτελικό της άκρο. Ακόμη διαθέτει το συντηρημένο μοτίβο DH box των κινασών DYRK, ένα μοτίβο HCD το οποίο αλληλεπιδρά με τον βρόχο ενεργοποίησης προκειμένου να προσδεθεί το υπόστρωμα, ενώ το ενεργό κέντρο της κινάσης αποτελείται από ένα μοτίβο HxY αντί του συντηρημένου YxY (εικόνα 21). Είναι μια πλήρως λειτουργική κινάση και φαίνεται πως δρα ως αρνητικός ρυθμιστής για την ανάπτυξη των παρασίτων, και είναι σημαντική πρωτεΐνη για την επιβίωσή τους με βασικό ρόλο στη στατική φάση ανάπτυξης (μολυσματικές μορφές του παρασίτου). Τα παράσιτα που υπερεκφράζουν την κινάση LinDYRK1 καθυστερούν να αναπτυχθούν σε σχέση με τα κύτταρα που εκφράζουν την κινάση σε φυσιολογικά επίπεδα. Η πλήρης εξάλειψή της παρουσιάζει αυξημένη ευαισθησία, με αποτέλεσμα τα κύτταρα να μην μπορούν να εξέλθουν από το κυτταρικό κύκλο και να οδηγούνται σε ανεπιτυχείς κυτταρικές διαιρέσεις, με θρυμματισμό του DNA και κατ' επέκταση κυτταρικό θάνατο. Τα κύτταρα δεν αποκρίνονται κατάλληλα στις εκάστοτε αλλαγές των περιβαλλοντικών συνθηκών, όπως είναι η θερμοκρασία, η μειωμένη παροχή τροφής και γενικότερα στρεσσογόνες συνθήκες, με αποτέλεσμα να μειώνεται η μολυσματικότητά τους [55,66].



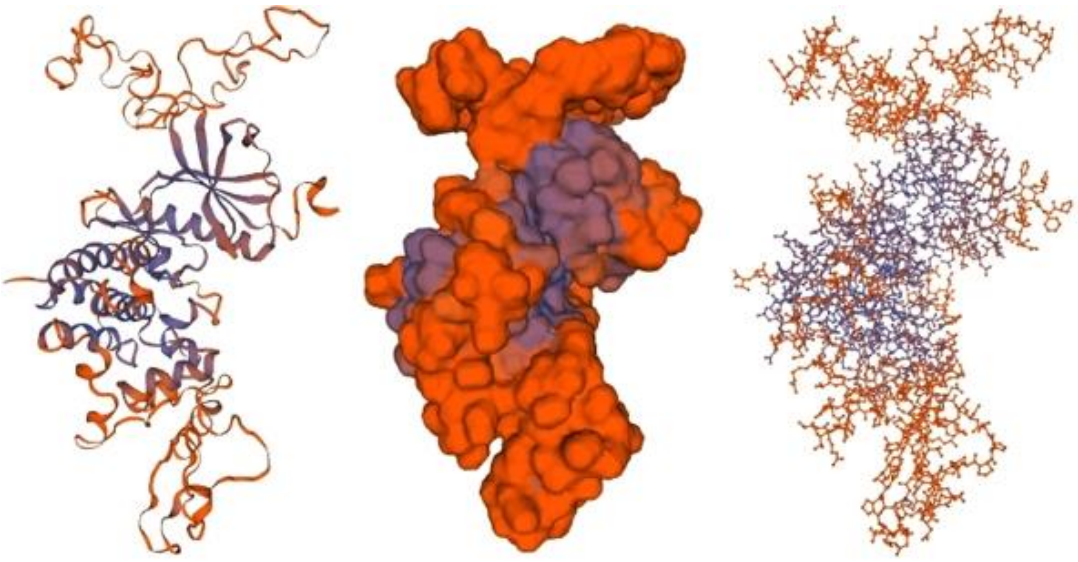
**Εικόνα 8** Η υποθετική 3D δομή της LinDYRK1 όπως δημιουργήθηκε από το SWISS-MODEL (https://swissmodel.expasy.org/).



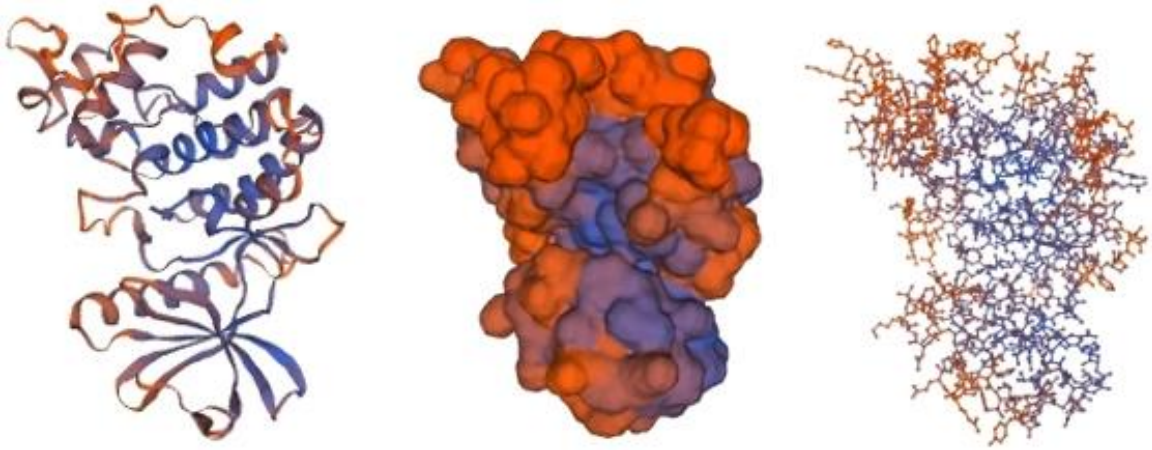

**Εικόνα 9** Σχηματική απεικόνιση της δομής της κινάσης LinDYRK1 σε συνδυασμό με ομόλογες κινάσες DYRK άλλων ειδών. Όπου Lin: Leishmania infantum, Tc: Trypanosoma cruzi, Tb: Trypanosoma brucei, Sc: Saccharomyces cerevisiae, Dd: Dictyostelium discoideum, Dm: Drosophila melanogaster, Hs: homo sapiens [66].

### DYRK14 και 21 (LinJ.14.1140 και LinJ.21.2010.)

Οι κινάσες DYRK LinJ.14.1140 (εικόνα 22) και LinJ.21.2010 (εικόνα 23), χαρακτηρίζονται από τους άτυπους βρόχους DXAXXSXXV και GXAXXSXXV αντίστοιχα που αντικαθιστούν τον εξαιρετικά διατηρημένο βρόχο GXGXXGXV που απαιτείται για την τοποθέτηση του ATP. Επιπλέον, στην LinJ.14.1140 το μοτίβο HCD της ομάδας DYRK αντικαθίσταται από HTD ενώ αυτές οι κινάσες διατηρούν όλα τα άλλα ειδικά χαρακτηριστικά των κινασών DYRK. Μια άλλη ενδιαφέρουσα παρατήρηση είναι η εισαγωγή 128 αμινοξέων στην ενεργή περιοχή της κινάσης DYRK LinJ.14.0890. Οι κινάσες αυτές έχουν μελετηθεί ελάχιστα και δεν υπάρχουν δεδομένα για τη λειτουργία τους. Λόγω της αναλογίας όμως των κινασών DYRK ως προς τον συνολικό αριθμό των κινασών των παρασίτων *Leishmania* εικάζεται ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον κύκλο ζωής του παρασίτου [55].



**Εικόνα 10** Η υποθετική 3D δομή της DYRK LinJ.14.1140. όπως δημιουργήθηκε από το SWISS-MODEL (https://swissmodel.expasy.org/).



**Εικόνα 11** Η υποθετική 3D δομή της DYRK LinJ.21.2010. όπως δημιουργήθηκε από το SWISS-MODEL (https://swissmodel.expasy.org/).

# ***ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ***

# 12 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

## 12.1 ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΚΑΙ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

### 12.1.1 Αναλώσιμα

| | |
|---|---|
| Πλαστικά τρυβλία Petri: | SARSTEDT™ |
| Σωλήνες/Falcons (15mL, 50mL): | Greiner Bio-One™ |
| Eppendorfs (1,5mL): | Greiner Bio-One™ |
| Ρύγχη πιπετών μίας χρήσης (1000μL, 200μL, 20μL): | Greiner Bio-One™ |
| Πλαστικές κυψελίδες: | SARSTEDT™ |
| Μεμβράνη διαπίδυσης: | Spectra/Por |

### 12.1.2 Εξοπλισμός

| | |
|---|---|
| Πιπέτες μεταβλητού όγκου (P1000, P200, P20): | Pipetman Gilson™ |
| Αναλυτικός Ζυγός: | 430-33 KERN |
| Ζυγός ακριβείας: | AE50 Mettler Toledo |
| Επωαστικός κλίβανος με ανάδευση: | LabTech |
| Μετρητής pH: | Orion™ 2-Star Benchtop pH Meter Thermo Scientific™ |
| Λύχνος Bunsen: | Campingaz |
| Μικροφυγόκεντρος: | 5417C Eppendorf™ |
| Φυγόκεντρος: | CR3i multifunction Thermo Scientific™ |
| Φασματοφωτόμετρο: | NanoDrop 2000/2000c Thermo Scientific™ |
| Φασματοφωτόμετρο: | SmartSpec™ Plus Spectrophotometer Bio-Rad™ |
| Λουμινόμετρο | GloMax 20/20 Promega™ |
| Συσκευή εκπομπής UV/ φωτογράφισης πηκτώματος: | AlphaImager-2200 AlphaInnoteck™ |
| Συσκευή υπερήχων | UP100H Hielscher |
| Υδατόλουτρο: | Julabo ED-13 (Stirred Waterbath) |
| Θερμαινόμενη πλάκα/ heat block: | 17600 Dri-Bath Thermolyne |
| Μαγνητική θερμαινόμενη πλάκα ανάδευσης: | Heat-Stir sb162 Stuart™ |
| Αναδευτήρας σωληνάριων: | Mobile-Rod, JPSELECTA® |
| Αναδευτήρας/Vortex : | Vortex 3 IKA |
| Συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης: | Mini-Protean® II Electrophoresis system Bio-Rad™ |
| Τροφοδοτικό ηλεκτροφόρησης: | PowerPac™ (Basic Power Supply) Bio-Rad™ |

## 12.2 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Για την παρασκευή όλων των υδάτινων διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε απιονισμένο και δισ-απεσταγμένο νερό (dd $H_2O$). Τα υλικά και τα διαλύματα αποστειρώθηκαν σε αυτόκαυστο (121$^oC$, 1.2 atm, 20 min).

### 12.2.1 Διαλύματα βακτηριακών κυττάρων

*LB (Luria-Bertani) 1L*

| | |
|---|---|
| NaCl | 10 g (0.17M) |
| Bacto-tryptone | 10 g (1% w/v) |
| Yeast-extract | 5 g (0.5% w/v) |
| dd $H_2O$ | Τελικός όγκος 1L |

*Διάλυμα λύσης βακτηριακών κυττάρων (Triton)*

| | |
|---|---|
| MOPS | 50mM |
| Triton | 1% |
| NaCl | 0,1M |
| NaF | 50mM |
| PMSF | 1mM |
| $Na_3VO_4$ | 1mM |
| $Na_2P_2O_7$*10 $H_2O$ | 2,5mM |
| Β-μερκαπτοαιθανόλη | 0,1% |

*Διάλυμα λύσης βακτηριακών κυττάρων (RIPA buffer, 25mL)*

| | |
|---|---|
| Tris-HCl pH 7,5 | 50 mM |
| NaCl | 150 mM |
| Sodium Deoxycholate | 0,5% |
| NP-40 | 1% |
| SDS | 0,1% |
| PMSF | 1mM |
| dd $H_2O$ | Τελικός όγκος 25 mL |

*Διάλυμα λύσης για ενζυμική δοκιμασία, pH 7.5 (kinase activity-lysis buffer, 25mL)*

| | |
|---|---|
| β-glycerolphosphate | 60mM |
| p-nitrophenylphosphate | 0.5mM |
| Sodium Vanadate | 1mM |
| NaF | 1mM |
| NaCl | 150mM |
| PMSF | 1mM |
| Aprotinin | 0,3mM |
| Phenanthroline | 0.5 mM |
| Lysozyme | 1 mg/mL |
| dd $H_2O$ | Τελικός όγκος 25 mL |

### 12.2.2 Διαλύματα πλύσης και έκλουσης σφαιριδίων

*Διάλυμα πλύσης σφαιριδίων Ni-NTA pH 8.0 (ρύθμιση με NaOH)*

| | |
|---|---|
| $NaH_2PO_4$ | 50 mM |
| NaCl | 300 mM |
| Imidazole | 20 mM |

*Διάλυμα έκλουσης σφαιριδίων Ni-NTA pH 8.0 (ρύθμιση με NaOH)*

| | |
|---|---|
| $NaH_2PO_4$ | 50 mM |
| NaCl | 300 mM |
| Imidazole | 250 mM |

*Phosphate-buffered saline (PBS)*

| | |
|---|---|
| NaCl | 137 mM |
| KCL | 2.7 mM |
| $Na_2HPO_4$ | 10 mM |
| $KH_2PO_4$ | 1.8 mM |

*Διάλυμα έκλουσης L-Glutathione*

| | |
|---|---|
| Tris (pH=8) | 50 mM |
| L-Glutathione | 10 mM |
| Glycerol | 5% |
| NaCl | 20 mM |

### 12.2.3 Διαλύματα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών (SDS-PAGE)

*Διάλυμα Ακρυλαμιδίου 30% (w/v) (100mL)*

| | |
|---|---|
| Ακρυλαμίδιο | 29.2 g (29.2% w/v) |
| N,N-μεθυλεν-δισακρυλαμίδιο | 0,8 g (0.8% w/v) |
| dd $H_2O$ | Τελικός όγκος 100 mL |

*1 M Tris-HCl 4x pH 8,8 + 0,4% (w/v) SDS (0,5L)*

| | |
|---|---|
| Tris | 91 g |
| 1N HCl | Έως ότου pH=8,8 |
| SDS | 2 g (προστίθεται τελευταίο) |
| dd $H_2O$ | Τελικός όγκος 0,5 L |

*1 M Tris-HCl 4x pH 6,8 + 0,2% (w/v) SDS 100mL)*

| | |
|---|---|
| Tris | 6,05 g |
| 1N HCl | Έως ότου pH=6,8 |
| SDS | 0,2 g (προστίθεται τελευταίο) |
| dd $H_2O$ | Τελικός όγκος 100 mL |

*Πήκτωμα Διαχωρισμού (Separating Gel) 12% (w/v) (5 mL)*

(για πήκτωμα πάχους 0,75 mm)

| | |
|---|---|
| 1 M Tris-HCl 4x pH 8,8 + 0,4% (w/v) SDS | 1,25 mL |
| Διάλυμα ακρυλαμιδίου 30% (w/v) | 2 mL |
| Υπερθειϊκό αμμώνιο 10% (w/v) (APS) | 50 μL |
| TEMED | 5 μL |
| dd $H_2O$ | 1,75 mL |

*Πήκτωμα Συσσώρευσης (Stacking Gel) 4% (w/v) (2,5 mL)*

(για πήκτωμα πάχους 0,75 mm)

| | |
|---|---|
| 1 M Tris-HCl 4x pH 6,8 + 0,2% (w/v) SDS | 625 μL |
| Διάλυμα ακρυλαμιδίου 30% (w/v) | 250 μL |
| Υπερθειϊκό αμμώνιο 10% (w/v) (APS) | 25 μL |
| TEMED | 5 μL |
| dd $H_2O$ | 1,625 mL |

*Ρυθμιστικό Διάλυμα «Φόρτωσης» Πρωτεινών 6x PLB (Protein Loading Buffer) (10 mL)*

| | |
|---|---|
| SDS | 1,2 g |
| Μπλε της βρωμοφαινόλης | 6 mg |
| Γλυκερόλη | 7,7 mL |
| 100 mM Tris- HCl pH 6,8 | 1,2 mL |
| DTT | 0,93 g |

*SDS-PAG Running Buffer (1L)*

| | |
|---|---|
| *Tris-base* | *7 g* |
| *Γλυκίνη* | *14 g* |
| *SDS* | *1 g* |

*Ρυθμιστικό Διάλυμα Ηλεκτροφόρησης TBE 10x, pH 8 (0,5 L)*

| | |
|---|---|
| Tris-Base | 54 g |
| Βορικό οξύ | 27,5 g |
| EDTA(0,5 M), pH 8 | 20 mL |
| dd $H_2O$ | Τελικός όγκος 0,5 L |

*Διάλυμα Χρωματισμού Πηκτώματος (Stain Buffer)*

| | |
|---|---|
| Χρωστική Coomassie R-250 | 0,25% (w/v) |
| Μεθανόλη | 40% (v/v) |
| Οξικό οξύ | 10% (v/v) |
| dd $H_2O$ | Έως το 100% (v/v) |

*Διάλυμα Αποχρωματισμού Πηκτώματος (Destain Buffer)*

| | |
|---|---|
| Μεθανόλη | 40% (v/v) |
| Οξικό οξύ | 10% (v/v) |
| dd $H_2O$ | 50% (v/v) |

### 12.2.4 Διαλύματα διαπίδυσης πρωτεϊνών

*Διάλυμα έκπλυσης της μεμβράνης (50 mL)*

| | |
|---|---|
| EDTA | *10 mM* |
| dd $H_2O$ | |

*(Διάλυμα Α) 10x $NaH_2PO_4$ –NaCl (100 mL)*

| | |
|---|---|
| $NaH_2PO_4$ | 200 mM |
| NaCl | 5 mM |
| dd $H_2O$ | |

*(Διάλυμα Β) 10x $Na_2HPO_4$ –NaCl (100 mL)*

| | |
|---|---|
| $Na_2HPO_4$ | 200 mM |
| NaCl | 5 mM |
| dd $H_2O$ | Τελικός όγκος 100 mL |

*Διάλυμα φωσφορικών pH 8 (100 mL)*

| | |
|---|---|
| Διάλυμα Α | 580 μL |
| Διάλυμα Β | 9,42mL |
| SDS | 1 g |
| dd $H_2O$ | Τελικός όγκος 100 mL |

*Διάλυμα 6M Ουρίας – φωσφορικών pH 8 (100 mL)*

| | |
|---|---|
| Διάλυμα Α | 580 μL |
| Διάλυμα Β | 9,42 mL |
| Ουρία | 36 g |
| dd $H_2O$ | Τελικός όγκος 100 mL |

*Διάλυμα Tris pH 8 - 8M Ουρίας (50 mL)*

| | |
|---|---|
| Tris | 10 mM |
| Ουρία | 8M |
| dd $H_2O$ | Έως τα 50 mL |

### 12.2.5 Διαλύματα ενζυμικής δοκιμασίας

*5x TPC ρυθμιστικό διάλυμα*

| | |
|---|---|
| β-glycerolphosphate | 125 mM |
| MOPS | 125 mM |
| EGTA | 25 mM |
| $MgCl_2$ | 75 mM |
| DTT | 5 mM |
| Sodium Vanadate | 0,5 mM |
| p-nitrophenylphosphate | 2,5 mM |

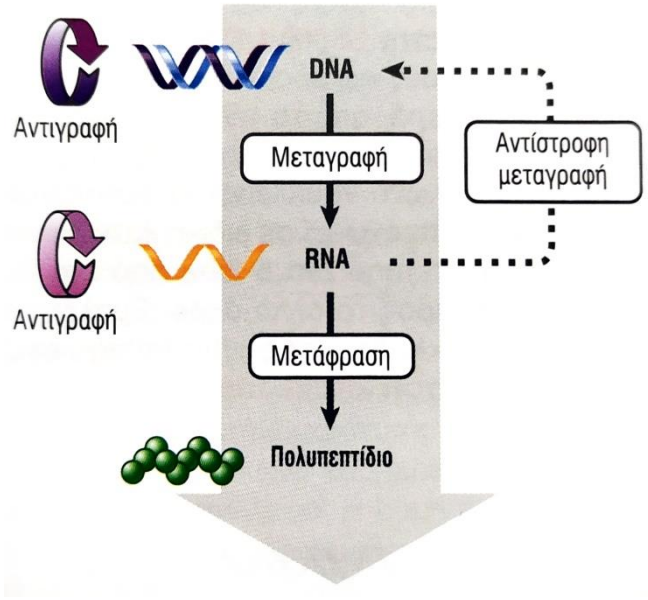
Διάλυμα ενεργότητας (*Activity buffer)*

| | Ανά αντίδραση | 10x αντιδράσεις |
|---|---|---|
| 5xTPC | 6 μL | 60 μL |
| ATP (100 μM) | 1,5 μL (5 μM) | 15 μL |
| Peptide Woodtide (1 mg/mL) | 1 μL (21 μM) | 10 μL |
| dd $H_2O$ | 9,5 μL | 95 μL |

## 12.3 Αρχές Μεθόδων

### 12.3.1 Παραγωγή πρωτεϊνών

Οι πρωτεΐνες είναι μεγάλα βιομόρια ή μακρομόρια, που αποτελούνται από μια ή περισσότερες αλυσίδες αμινοξέων. Συντίθενται και ρυθμίζονται ανάλογα με τις λειτουργικές ανάγκες του κυττάρου. Η πληροφορία για την παραγωγή τους βρίσκεται αποθηκευμένη στο DNA και η αποκωδικοποίησή τους γίνεται από πολύ καλά ρυθμισμένες μεταγραφικές διεργασίες για την παραγωγή αγγελιαφόρου RNA (mRNA). Μεταγραφή είναι η μεταφορά των πληροφοριών από το DNA προς mRNA, και η μετάφραση είναι η σύνθεση της πρωτεΐνης με βάση μία αλληλουχία που ορίζεται από το mRNA (εικόνα 24) [68].




**Εικόνα 12** Σχηματική απεικόνιση του κεντρικού δόγματος της βιολογίας. Το κεντρικό δόγμα δηλώνει ότι οι πληροφορίες των νουκλεϊκών οξέων μπορεί να διαιωνίζονται αλλά η μεταφορά των πληροφοριών στις πρωτεΐνες είναι μη αντιστρεπτή [69].

Δεδομένου του μεγέθους και της πολυπλοκότητας των πρωτεϊνών, η σύνθεσή τους με χημικό τρόπο δεν είναι εύκολη υπόθεση. Σε αντίθεση με τις πρωτεΐνες, το DNA είναι απλό στην κατασκευή του in vitro χρησιμοποιώντας καθιερωμένες τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA. Ως εκ τούτου, τα πρότυπα DNA συγκεκριμένων γονιδίων μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρότυπα για έκφραση πρωτεΐνης. Οι πρωτεΐνες που παράγονται από τέτοια πρότυπα DNA ονομάζονται ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες. Η έκφραση και ο καθαρισμός μίας ανασυνδιασμένης πρωτεΐνης απαιτεί έναν φορέα κλωνοποίησης, ένα σύστημα έκφρασης και συνήθως μία ετικέτα (tag) που εξυπηρετεί την απομόνωση και το καθαρισμό της.

## Σύστημα έκφρασης

Υπάρχουν πολλά συστήματα έκφρασης που περιλαμβάνουν φάγους, βακτήρια, ζυμομύκητες, υφομύκητες, φυτά, κύτταρα εντόμων ή θηλαστικών. Η επιλογή του ξενιστή επηρεάζει την παραγωγή και την απομόνωση της πρωτεΐνης, αλλά επίσης και τον τρόπο με τον οποίο το προϊόν μπορεί να καθαριστεί εκ των υστέρων. Ένας βακτηριακός ξενιστής μπορεί να εκκρίνει την πρωτεΐνη είτε στο μέσο ανάπτυξης, είτε να την παράγει στον κυτταροπλασματικό χώρο, είτε να τη παράγει στο ίζημα ως αδιάλυτη (σωμάτια εγκλεισμού). Η τελική επιλογή του οργανισμού που θα επιλεχθεί για τη παραγωγή της πρωτεΐνης θα εξαρτηθεί από τις ειδικές απαιτήσεις και εφαρμογές για την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη (πίνακας 4) [70,71].

**Πίνακας 4** Πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα των πλέον χρησιμοποιούμενων συστημάτων έκφρασης [70].

| Σύστημα έκφρασης | Πλεονεκτήματα | Μειονεκτήματα |
|---|---|---|
| *Escherichia coli (E. coli)* | Πολλές αναφορές και μεγάλη εμπειρία<br>Μεγάλη ποικιλία φορέων κλωνοποίησης<br>Η γονιδιακή έκφραση ελέγχεται εύκολα - πολλές παράμετροι μπορούν να τροποποιηθούν για τη βελτιστοποίηση της έκφρασης<br>Εύκολο να αναπτυχθεί με υψηλές αποδόσεις (το προϊόν μπορεί να αποτελέσει έως το 50% της ολικής κυτταρικής πρωτεΐνης)<br>Το προϊόν μπορεί να σχεδιαστεί για έκκριση στα μέσα ανάπτυξης<br>Απλές συνθήκες καλλιέργειας και ταχεία ανάπτυξη | Δεν υπάρχει μετα-μεταφραστική τροποποίηση<br>Η βιολογική δραστικότητα και η ανοσογονικότητα μπορεί να διαφέρουν από τη φυσική πρωτεΐνη<br>Υψηλή περιεκτικότητα ενδοτοξίνης σε αρνητικά κατά Gram βακτήρια<br>Κακή αναδίπλωση των πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα - Σχηματισμός σωματίων εγκλεισμού |
| *Ζυμομύκητες* | Έλλειψη ανιχνεύσιμων ενδοτοξινών<br>Η καλλιέργεια είναι σχετικά φθηνή<br>Διευκολύνει τον σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών<br>Μόνο 0,5% από τις πρωτεΐνες της ζύμης εκκρίνονται, έτσι λαμβάνονται πρωτεΐνες υψηλής καθαρότητας<br>Καλά μελετημένη παραγωγή μεγάλης κλίμακας και μεταγενέστερη επεξεργασία | Η γονιδιακή έκφραση ελέγχεται λιγότερο εύκολα<br>Η γλυκοζυλίωση διαφέρει από τα κύτταρα των θηλαστικών |
| *Κύτταρα εντόμων μολυσμένα με βακιλοϊούς* | Πολλοί μηχανισμοί επεξεργασίας παρόμοιοι με τα κύτταρα των ευκαρυωτικών<br>Ασφαλής, αφού λίγα αρθρόποδα είναι κατάλληλοι ξενιστές για βακιλοϊούς<br>Ο φορέας βακουλοϊού είναι εγκεκριμένος από τον FDA για κλινικές δοκιμές<br>Ο ιός σταματά την έκφραση των πρωτεϊνών του ξενιστή (υψηλή έκφραση του προϊόντος) | Έλλειψη πληροφοριών σχετικά με τους μηχανισμούς γλυκοζυλίωσης<br>Το προϊόν δεν είναι πάντα πλήρως λειτουργικό<br>Δυσκολία στον ανοσολογικό διαχωρισμό του προϊόντος από τις πρωτεΐνες του ξενιστή |

### Μετασχηματισμός βακτηρίων

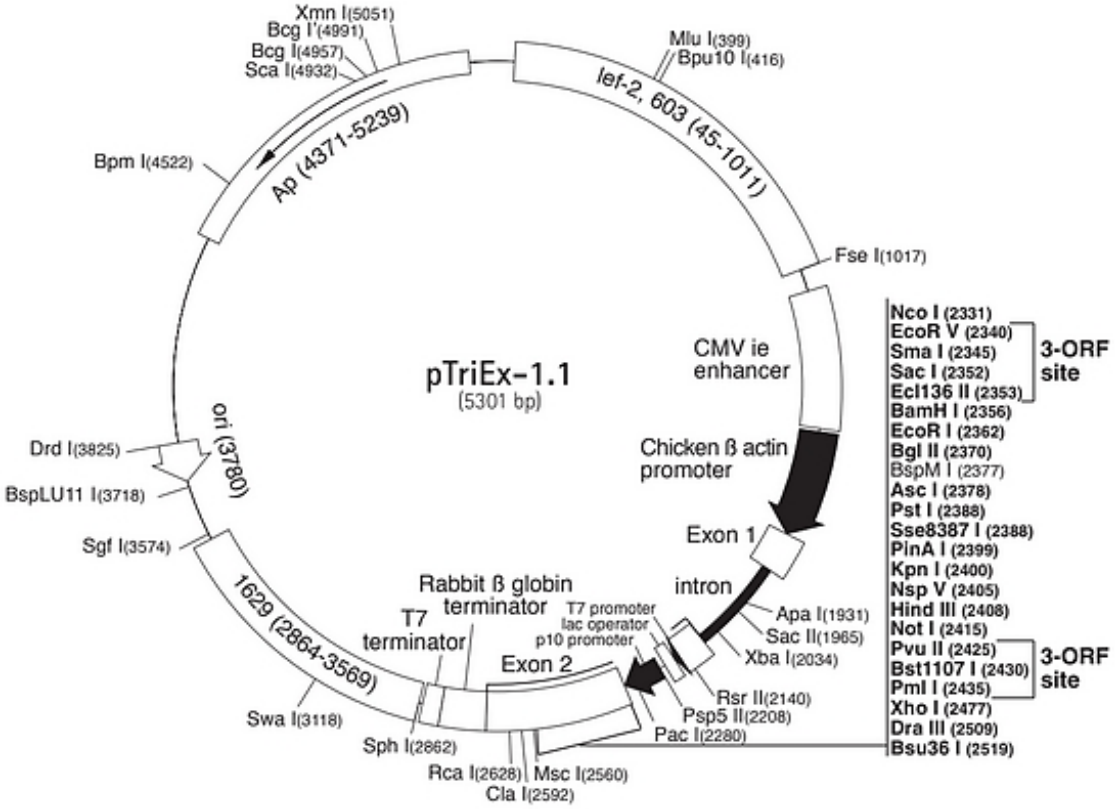
Τα βακτήρια μπορούν να αποκτήσουν νέες γενετικές πληροφορίες μέσω τριών διαφορετικών μηχανισμών, τη σύζευξη, τη μεταγωγή και το μετασχηματισμό. Μεταφορά του DNA απευθείας από έναν οργανισμό σε έναν άλλο ονομάζεται σύζευξη. Στη μεταγωγή του DNA η μεταφορά του γενετικού υλικού συμβαίνει με τη βοήθεια ενός βακτηριοφάγου. Τέλος, ο μετασχηματισμός μπορεί να συμβεί είτε φυσικά είτε τεχνητά. Ο φυσικός μετασχηματισμός είναι σπάνιος. Στον τεχνητό μετασχηματισμό, τα βακτηριακά κύτταρα θα πρέπει να είναι ευπαθή υπό ορισμένες εργαστηριακές συνθήκες. Υπάρχουν δύο κύριες μέθοδοι για την τεχνική του μετασχηματισμού, το θερμικό σοκ (heat shock) και η ηλεκτροδιάτρηση. Κατά το θερμικό σοκ η μεμβράνη του βακτηρίου γίνεται παθητικά διαπερατή στο DNA. Τυπικά τα κύτταρα επωάζονται σε ένα διάλυμα που περιέχει δισθενή κατιόντα (συχνά χλωριούχο ασβέστιο) υπό ψυχρές συνθήκες, πριν να εκτεθούν απότομα σε υψηλή θερμοκρασία (θερμικό σοκ). Το χλωριούχο ασβέστιο βοηθά στην εξουδετέρωση της ηλεκτροστατικής άπωσης μεταξύ του πλασμιδιακού DNA και της βακτηριακής κυτταρικής μεμβράνης, έτσι επιτρέπει το ανασυνδυασμένο DNA να εισέλθει στο κύτταρο-ξενιστή. Τα κύτταρα που είναι σε θέση να δεχτούν το DNA ονομάζονται επιδεκτικά κύτταρα [72].

### Φορείς κλωνοποίησης

Οι φορείς κλωνοποίησης είναι χρήσιμοι για την παραγωγή πολλών αντιγράφων του γονιδίου. Φορείς έκφρασης σχετίζονται με την έκφραση του γονιδίου σε mRNA και πρωτεΐνες στον οργανισμό στόχο. Πριν την επιλογή φορέα θα πρέπει να εξεταστούν παράγοντες όπως είναι:

- Οι θέσεις περιορισμού οι οποίες σχετίζονται με την εισαγωγή ή την αφαίρεση των θραυσμάτων DNA.
- Γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά καθώς μόνο τα κύτταρα που ενσωμάτωσαν τον φορέα θα μπορούν να επιβιώσουν παρουσία αντιβιοτικών.
- Ο αριθμός των αντιγράφων του φορέα εντός του συστήματος έκφρασης (πρέπει να δοθεί προσοχή γιατί όταν υπάρχει μεγάλος αριθμός αντιγράφων μπορεί να γίνει τοξικός για το σύστημα έκφρασης, και να δημιουργηθούν σωμάτια εγκλεισμού).
- Η παρουσία υποκινητή και καταστολέα, έτσι ώστε να επιτρέπεται η ελεγχόμενη έκφραση του γονιδίου (π.χ. μηχανισμός του οπερονίου της λακτόζης).
- Ο ρυθμός παραγωγής της πρωτεΐνης, ο οποίος δεν πρέπει να είναι μεγαλύτερος από τον ρυθμό αναδίπλωσής της προκειμένου να παράγεται διαλυτή η πρωτεΐνη [70].

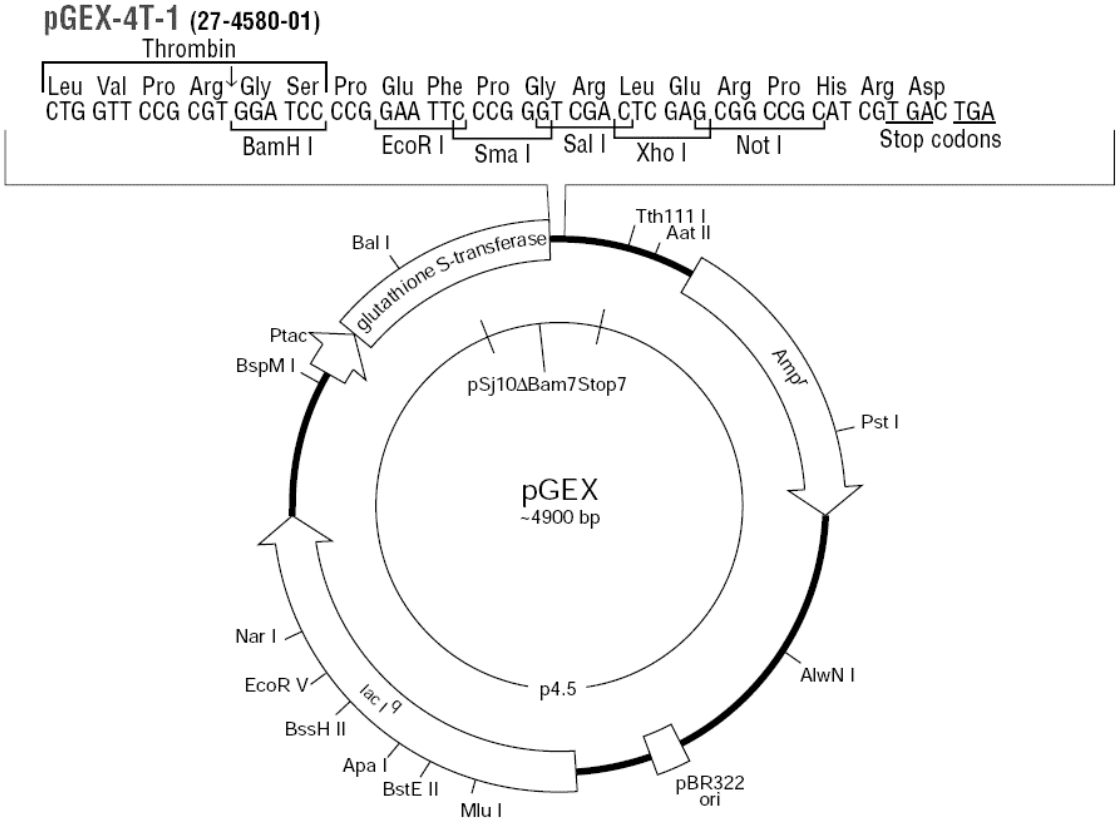
Το πλασμίδιο pTriEx-1.1™ (εικόνα 25) επιτρέπει τον ταχύ χαρακτηρισμό των γονιδίων-στόχων σε πολλαπλά συστήματα έκφρασης. Με αυτόν τον φορέα ένα μόνο ανασυνδυασμένο πλασμίδιο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο της έκφρασης σε *E. coli*, κύτταρα εντόμων και σπονδυλωτών. Παροδική έκφραση σε σπονδυλωτό διαμεσολαβείται από ένα υβριδικό εκκινητή που αποτελείται από τον CMV ενισχυτή συγχωνευμένο με τον υποκινητή β-ακτίνη. Για την έκφραση σε κύτταρα εντόμων, ο φορέας pTriEx-1.1 περιέχει πλευρικές αλληλουχίες ραβδοϊού για να επιτραπεί η δημιουργία ανασυνδυασμένων βακιλλοϊών. Η έκφραση σε *E. coli* ρυθμίζεται από τον αυστηρά ελεγχόμενο T7 Lac υποκινητή. Εναλλακτικά, ανασυνδυασμένα πλασμίδια μπορούν να μεταφερθούν σε έναν ξενιστή pLacI που επιτρέπει την επαγωγή μέσω Ισοπροπυλο-β-D-1-θειογαλακτοπυρανοσίδη (Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside, IPTG) [73].




**Εικόνα 13** Αναλυτικός χάρτης της δομής του πλασμιδίου pTriEx-1.1-DNA-Novagen [73].

Ένας ακόμα φορέας που χρησιμοποιείται για την παραγωγή ανασυνδιασμένων πρωτεϊνών είναι το πλασμίδιο pGEX. Δεκατρείς φορείς pGEX είναι διαθέσιμοι. Εννέα από αυτούς έχουν μια εκτεταμένη θέση πολλαπλής κλωνοποίησης (MCS) που περιέχει έξι θέσεις περιορισμού. Η περιοχή MCS διευκολύνει την κλωνοποίηση των ένθετων cDNA προς μία κατεύθυνση. Ένας τρόπος κατασκευής μιας GST-ανασυνδιασμένης πρωτεΐνης (σύντηξη πρωτεΐνης με την τρανσφεράση-s της γλουταθειόνης) είναι με την εισαγωγή ενός γονιδίου ή θραύσματος γονιδίου εντός της MCS περιοχής ενός φορέα pGEX. Τα πλασμίδια pGEX-6P-1, pGEX-6P-2, και pGEX-6P-3 κωδικοποιούν την αλληλουχία αναγνώρισης για τοπο-ειδική διάσπαση από PreScission πρωτεάση μεταξύ της GST και της MCS περιοχής. Τα

pGEX-4T-1, pGEX-4T-2, και pGEX-4T-3 προέρχονται από pGEX-2T και περιέχουν μία θέση αναγνώρισης από το ένζυμο θρομβίνη (εικόνα 26). Τα pGEX-5X-1, pGEX-5X-2, και pGEX-5X-3 είναι παράγωγα του pGEX-3X και διαθέτουν μια θέση αναγνώρισης για τον παράγοντα Xa .Η έκφραση γίνεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή Tac του οπερονίου της λακτόζης και επάγεται από IPTG, διατηρώντας έτσι αυστηρό έλεγχο στην έκφραση του ενθέματος [74].




**Εικόνα 14** Αναλυτικός χάρτης της δομής του πλασμιδίου pGEX-4T-1. Πηγή: https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/gst-gene-fusion-system/pgex-vectors.htmL.

## Ισοπροπυλο-β-D-1-θειογαλακτοπυρανοσίδη

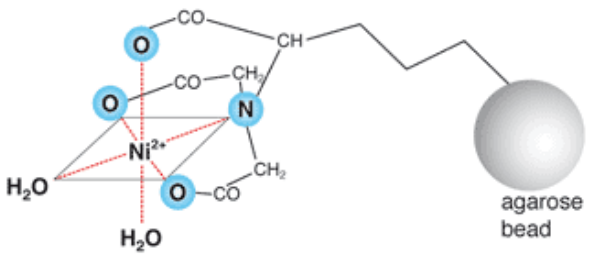
Η Ισοπροπυλο-β-D-1-θειογαλακτοπυρανοσίδη ή αλλιώς IPTG (Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside) είναι μία ένωση που μιμείται την αλλολακτόζη που προκαλεί τη μεταγραφή του οπερονίου λακτόζης (Lac). Ως εκ τούτου, χρησιμοποιείται για την επαγωγή έκφρασης πρωτεΐνης από *E. coli*, όπου το γονίδιο είναι υπό τον έλεγχο του χειριστή. Όπως η αλλολακτόζη, έτσι και το IPTG προσδένεται στον καταστολέα του οπερονίου με αλλοστερικό τρόπο και απελευθερώνει τον τετραμερή καταστολέα από το χειριστή, επιτρέποντας έτσι τη μεταγραφή των γονιδίων. Σε αντίθεση όμως με την αλλολακτόζη το άτομο θείου που περιέχει δημιουργεί ένα χημικό δεσμό ο οποίος είναι μη υδρολύσιμος από το κύτταρο, εμποδίζοντας το κύτταρο να το μεταβολίσει. Συνεπώς, η συγκέντρωση του IPTG παραμένει σταθερή και η έκφραση των γονιδίων του οπερονίου δεν θα αναστέλλεται κατά τη διάρκεια του πειράματος [75].

### 12.3.2 Χρωματογραφία συγγενείας - Ετικέτες (Tags)

Με την σύντηξη του ενδιαφερομένου πολυπεπτιδίου με ένα φορέα που έχει υψηλή συγγένεια για ένα ειδικό μόριο σύνδεσης, σχεδόν οποιαδήποτε πρωτεΐνη σύντηξης (fusion proteins) μπορεί να καθαριστεί μέσω της χρωματογραφίας συγγένειας. Περισσότερα από 20 διαφορετικά συστήματα σύντηξης έχουν σχεδιαστεί για τον καθαρισμό πρωτεϊνών με χρωματογραφία συγγένειας. Η GST (τρανσφεράση-s της γλουταθειόνης) και η ετικέτα πολυιστιδίνης (His-tag) είναι οι δύο συνηθέστερα χρησιμοποιούμενες ετικέτες για τον καθαρισμό πρωτεϊνών με χρωματογραφία συγγένειας. Όσον αφορά την επιλογή της ετικέτας, η απόφαση χρήσης γίνεται σύμφωνα με τις ανάγκες της εκάστοτε εφαρμογής. Η χρήση ετικέτας προϋποθέτει την εισαγωγή της κατά την διαδικασία της δημιουργίας του ανασυνδυασμένου DNA. Ο καθαρισμός της πρωτεΐνης υπάγεται στην αρχή μεθόδου της χρωματογραφίας συγγενείας κατά την οποία βιολογικά μακρομόρια, όπως ένζυμα και άλλες πρωτεΐνες, αλληλεπιδρούν με άλλα μόρια με υψηλή ειδικότητα με διάφορους τύπους δεσμών. Τέτοιες αλληλεπιδράσεις περιλαμβάνουν σύνδεση υδρογόνου, ιονική αλληλεπίδραση, δισουλφιδικές γέφυρες, υδρόφοβη αλληλεπίδραση κ.λ.π. Η υψηλή εκλεκτικότητα της χρωματογραφίας συγγένειας πραγματοποιείται διότι το επιθυμητό μόριο αλληλεπιδρά με τη στατική φάση και δεσμεύεται εντός της στήλης προκειμένου να διαχωριστεί από το ανεπιθύμητο υλικό το οποίο δεν θα αλληλεπιδράσει, και άρα δεν θα συνδεθεί. Η παρουσία διαλύτη έκλουσης δημιουργεί μια ανταγωνιστική αλληλεπίδραση μεταξύ της επιθυμητής πρωτεΐνης και των ακινητοποιημένων μορίων και επιτρέπει τελικά τις πλέον καθαρισμένες πρωτεΐνες να απελευθερωθούν [76].

#### Ετικέτα πολυϊστιδίνης

Η ετικέτα πολυϊστιδίνης ή His tag είναι μια σειρά καταλοίπων ιστιδίνης είτε στο N- είτε στο C- τελικό άκρο μιας ανασυνδιασμένης πρωτεΐνης. Μπορεί να υπάρχουν 4-10 κατάλοιπα σε μια σειρά, αν και συνήθως υπάρχουν έξι (6-His tag). Ο καθαρισμός με ετικέτα πολυϊστιδίνης χρησιμοποιεί την τεχνική χρωματογραφίας συγγενείας ακινητοποιημένου μετάλλου. Στην τεχνική αυτή, τα ιόντα μετάλλων ακινητοποιούνται επί ενός πλέγματος ρητίνης χρησιμοποιώντας ένα χηλικό παράγοντα (εικόνα 27). Τα πιο κοινά ιόντα είναι το $Ni^{2+}$, $Co^{2+}$, $Cu^{2+}$, και $Zn^{2+}$. Η ετικέτα ιστιδίνης έχει υψηλή συγγένεια με τα ιόντα $Ni^{2+}$ και συνδέεται ισχυρά με τη στήλη. Οι υπόλοιπες πρωτεΐνες που υπάρχουν στο προϊόν λύσης δεν συνδέονται με τη ρητίνη ή δεσμεύονται μόνο ασθενώς. Η χρήση μίας His-tag μπορεί να παρέχει στον ερευνητή σχετικά καθαρή ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη απευθείας από ένα διάλυμα με προσμίξεις. Το ιμιδαζόλιο ανταγωνίζεται με την His-tag για δέσμευση




**Εικόνα 15** Δομή σφαιριδίων Ni-NTA για την απομόνωση και τον καθαρισμό His-tag πρωτεϊνών. Πηγή: https://www.Histagproteins/ProtinoNiNTAAgarose

με το μέταλλο ρητίνης και έτσι χρησιμοποιείται για την έκλουση της πρωτεΐνης από τα σφαιρίδια [77].

#### Ετικέτα τρανσφεράσης-s της γλουταθειόνης

Για ετικέτες GST η αρχή καθαρισμού βασίζεται στο γεγονός ότι η πρωτεΐνη GST έχει ισχυρή συγγένεια με την γλουταθειόνη (GSH-σφαιρίδια ρητίνης). Τα σφαιρίδια αφού πλυθούν για την απομάκρυνση των προσμίξεων, θα υποστούν έκλουση με ελεύθερη GSH για να αποσπαστεί η επιθυμητή πρωτεΐνη από τα σφαιρίδια, με αποτέλεσμα την συλλογή καθαρής πρωτεΐνης. Η πρωτεΐνη GST έχει μοριακό βάρος 27-30 kD και πιο συχνά συντήκεται με την πρωτεΐνη-στόχο στο N-τελικό άκρο, αν και μπορεί να λειτουργήσει καλά με C-τερματικές συντήξεις. Ετικέτες GST μπορεί να χρησιμοποιηθούν και για την αύξηση της διαλυτότητας της ανασυνδιασμένης πρωτεΐνης [78].

**Πίνακας 5** Χαρακτηριστικά των ετικετών 6 His και GST [70].

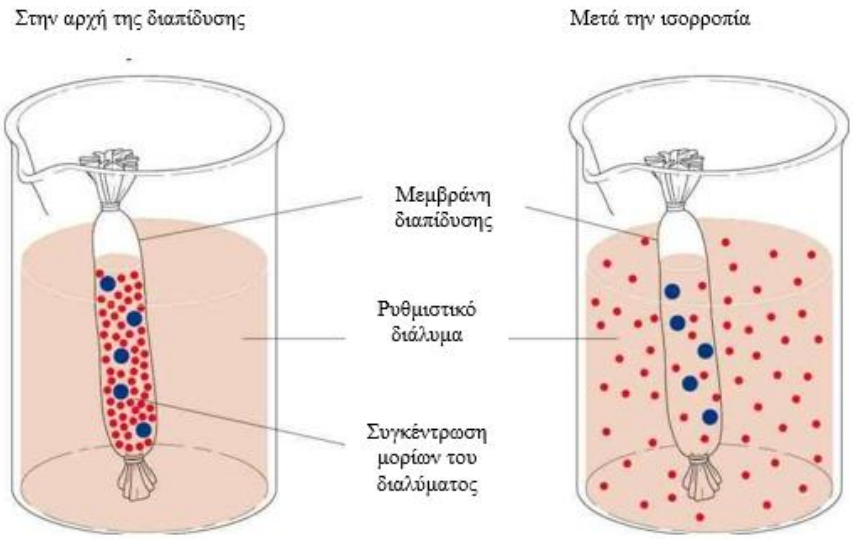
| 6 His-Tag | GST-Tag |
|---|---|
| Πολλαπλοί φορείς έκφρασης διαθέσιμοι.<br>Επιλογή διαθέσιμων προϊόντων καθαρισμού για οποιαδήποτε κλίμακα.<br>Υψηλή απόδοση σε καθαρό προϊόν.<br>Εύκολα ανιχνεύεται σε έναν ανοσοδοκιμασία.<br>Εύκολος καθαρισμός.<br>Η αφαίρεση των ετικετών δεν είναι πάντα απαραίτητη.<br>Ελάχιστη έως καμία επίδραση στην δομή ή λειτουργία της πρωτεΐνης.<br>Σταθεροποιεί τα μικρά πεπτίδια κατά την έκφραση.<br>Διαθέσιμες πρωτεάσες για διάσπαση της ετικέτας. | Πολλαπλοί φορείς έκφρασης διαθέσιμοι.<br>Επιλογή διαθέσιμων προϊόντων καθαρισμού για οποιαδήποτε κλίμακα.<br>Υψηλή απόδοση σε καθαρό προϊόν.<br>Μπορεί να αυξήσει την διαλυτότητα της πρωτεΐνης.<br>Εύκολα ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας ένα ένζυμο ή ανοσοδοκιμασία.<br>Εύκολος καθαρισμός.<br>Ήπιες συνθήκες έκλουσης ελαχιστοποιούν πιθανές ζημίες στη λειτουργία ή την αντιγονικότητα της πρωτεΐνης.<br>Η αφαίρεση των ετικετών δεν είναι πάντα απαραίτητη.<br>Διαθέσιμες πρωτεάσες για διάσπαση της ετικέτας.<br>Οι πρωτεΐνες μπορεί να σχηματίσουν διμερή. |

### 12.3.3 Διαπίδυση

Η διαπίδυση είναι μία τεχνική που βασίζεται στην επιλεκτική διάχυση των μορίων δια μέσου μιας ημιδιαπερατής μεμβράνης για το διαχωρισμό μορίων με βάση το μέγεθος τους. Χρησιμοποιείται για ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών: αφαλάτωση, ανταλλαγή ρυθμιστικού

διαλύματος, απομάκρυνση των αντιδραστηρίων επισήμανσης, μελέτες πρόσδεσης φαρμακευτικών ουσιών, κυτταρική ανάπτυξη, καθαρισμός του ιού και επεξεργασία αίματος. Τυπικά, το δείγμα τοποθετείται σε σωλήνα αποτελούμενο από ημιδιαπερατή μεμβράνη διαπίδυσης που περιέχει πόρους συγκεκριμένου μεγέθους και στην συνέχεια εντός ρυθμιστικού διαλύματος. Τα μόρια του δείγματος που είναι μεγαλύτερα από τους πόρους, διατηρούνται εντός της μεμβράνης, ενώ άλλα μικρά μόρια περνούν μέσω της μεμβράνης, μειώνοντας τη συγκέντρωση των εν λόγω μορίων στο δείγμα. Εναλλακτικά, επιθυμητά συστατικά του εξωτερικού ρυθμιστικού διαλύματος μπορεί να μεταφερθούν αργά στο δείγμα [79].

Ο χρόνος που απαιτείται για να επιτευχθεί διαπίδυση καθορίζεται από παράγοντες που επηρεάζουν το ρυθμό διάχυσης ενός μορίου. Επειδή η θερμοκρασία επηρεάζει τη θερμοδυναμική των μορίων, η αύξησή της επιταχύνει την διάχυση. Έτσι η διαπίδυση πραγματοποιείται γρηγορότερα σε θερμοκρασία δωματίου παρά στους 4°C. Ο ρυθμός της διαπίδυσης είναι επίσης ανάλογος με το εμβαδόν επιφανείας της μεμβράνης και αντιστρόφως ανάλογος προς το πάχος της. Επιπλέον η συνεχής ανάδευση του ρυθμιστικού διαλύματος κατά τη διάρκεια της διαδικασίας αυξάνει το ρυθμό διάχυσης των μορίων [80].




**Εικόνα 16** Τρόπος λειτουργίας διαπίδυσης μέσω μεμβράνης (συνήθως ένα φύλλο αναγεννημένης κυτταρίνης), η διαπίδυση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτέλεση του καθαρισμού ή για ανταλλαγή διαλύτη σε δείγματα που περιέχουν μακρομόρια. Πηγή: (https://schoolworkhelper.net)

## 12.3.4 Ηλεκτροφόρηση

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό πρωτεϊνών ή DNA ενός δείγματος, την ποσοτικοποίηση και τον έλεγχο της καθαρότητας του. Βασική αρχή της μεθόδου αποτελεί ο διαχωρισμός των μορίων αυτών ανάλογα με το μέγεθος και το φορτίο τους, όταν τους ασκηθεί σταθερό ηλεκτρικό πεδίο. Με την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου τα φορτισμένα μόρια κινούνται προς τον θετικό πόλο με διαφορετικές ταχύτητες. Η ταχύτητα αυτή είναι ανάλογη με το φορτίο τους και αντιστρόφως

ανάλογη με το μέγεθός τους. Τα περισσότερο φορτισμένα και παράλληλα μικρότερα μόρια κινούνται πιο γρήγορα, ενώ τα λιγότερο φορτισμένα και μεγαλύτερα μόρια με μικρότερη ταχύτητα, γεγονός που οδηγεί στον διαχωρισμό τους. Ο ρυθμός μετακίνησης εξαρτάται και από άλλους παράγοντες, όπως είναι η διαμόρφωση των μορίων, η θερμοκρασία, το είδος και η σύσταση του πηκτώματος, το pH του ρυθμιστικού διαλύματος και το μέγεθος της εφαρμοζόμενης τάσης. Προκειμένου να περιορίσουμε τους παραπάνω παράγοντες και να διατηρήσουμε σταθερές συνθήκες, πριν τη τοποθέτηση του δείγματος στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, το δείγμα επεξεργάζεται χημικά με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο προσδίδει σε όλες τις ενώσεις το ίδιο φορτίο και τις αποδιατάσσει έτσι ώστε η κίνηση των ουσιών να εξαρτάται αποκλειστικά από το μοριακό τους βάρος [81].

### Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών και SDS-PAGE

Ο τύπος πηκτώματος που ενδείκνυται για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών είναι τα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου (Poly Acrylamide Gel Electrophoresis, PAGE). Τα πηκτώματα αυτά προκύπτουν από τον πολυμερισμό μονομερούς ακρυλαμιδίου, με την δημιουργία μακριών αλυσίδων πολυακρυλαμιδίου, οι οποίες ενώνονται μεταξύ τους με μόρια N.N'-μεθυλενο-δις-ακρυλαμίδης (bis). Ο πολυμερισμός επιτυγχάνεται με τη βοήθεια δύο παραγόντων, του υπερθειϊκού αμμωνίου (ammonium per sulfate, APS) και του TEMED (N.N.N\N'-τετραμεθυλο-1.2-διαμινοαιθάνιο). Το TEMED καταλύει τον σχηματισμό ελεύθερων ριζών από το APS, με αποτέλεσμα την δημιουργία ενός πορώδους πλέγματος με μέγεθος πόρων ανάλογο με την ολική συγκέντρωση και την αναλογία bis/ακρυλαμιδίου. Σε μία ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών, προκειμένου οι πρωτεΐνες να μπορούν να διαχωριστούν με κριτήριο το μοριακό τους βάρος και όχι τη δομή τους, χρησιμοποιούνται αποδιατακτικοί παράγοντες. Ένας αποδιατακτικός παράγοντας είναι το δωδεκυλοθειικό νάτριο (sodium dodecyl sulfate, SDS). Το SDS είναι ένα ανιονικό απορρυπαντικό που αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες, ενώ παράλληλα σχηματίζει ένα σύμπλοκο πολυπεπτιδικής αλυσίδας-SDS το οποίο είναι φορτισμένο αρνητικά. Συμπληρωματικά ακολουθεί θέρμανση για καλύτερο αποτέλεσμα και προσθήκη μερκαπτοαιθανόλης ή διθειοθρεϊτόλης, που ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς [82].

Μία παραλλαγή της παραπάνω μεθόδου είναι η ασυνεχής ηλεκτροφόρηση, στην οποία το πήκτωμα αποτελείται από δύο μέρη που διαφέρουν ως προς την συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου άρα και το μέγεθος των πόρων τους. Το δείγμα διέρχεται πρώτα από ένα πήκτωμα με μεγάλους πόρους (πήκτωμα συσσώρευσης) και στην συνέχεια σε ένα πήκτωμα με μικρότερους πόρους (πήκτωμα διαχωρισμού). Έτσι το πήκτωμα συσσώρευσης συμπυκνώνει το δείγμα και εξασφαλίζει ότι οι πρωτεΐνες θα φθάσουν ταυτόχρονα στο πήκτωμα διαχωρισμού. Σε αυτό το πήκτωμα υπό την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου, θα διανύσουν απόσταση αντιστρόφως ανάλογη ως προς την μάζα τους. Αφού η ηλεκτροφόρηση ολοκληρωθεί, ακολουθεί χρώση του πηκτώματος με Coomassie (Coomassie Brilliant Blue), ή άλλη χρώση [81,83].

### 12.3.5 Φωταύγεια

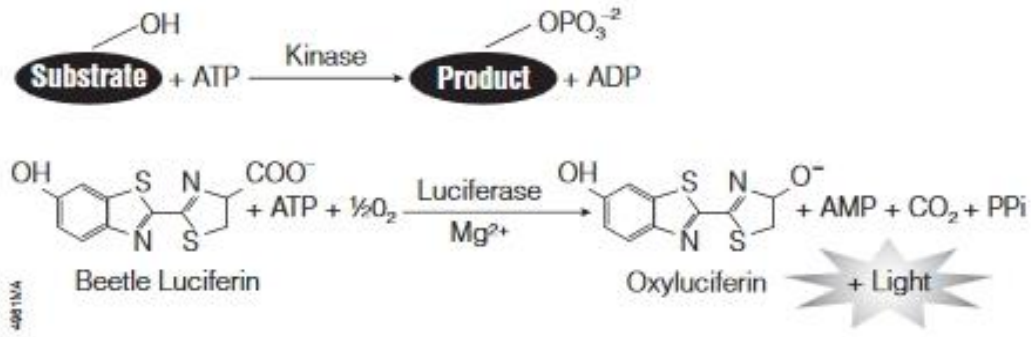
Η φωταύγεια είναι η αυθόρμητη εκπομπή φωτός από μια ουσία που δεν προκύπτει από τη θερμότητα (ψυχρό φως). Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στην μετάπτωση ηλεκτρονίων από εξωτερικές ηλεκτρονιακές στιβάδες σε στοιβάδες χαμηλότερης ενέργειας. Όταν ένα ηλεκτρόνιο απορροφά ένα συγκεκριμένο ποσό ενέργειας (κβαντισμένο) από κάποια πηγή ενέργειας π.χ. βιοχημικές αντιδράσεις, τριβή, ιοντίζουσα ή φωτεινή ακτινοβολία, διεγείρεται σε ενεργειακά υψηλότερη στιβάδα λόγω της ενέργειας που του παρέχεται. Κατά τη μετάπτωσή του στην αρχική θεμελιώδη κατάσταση (στιβάδα n=1) εκπέμπει ένα ποσό ενέργειας με την μορφή ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας συγκεκριμένου μήκους κύματος (φωτόνιο συγκεκριμένου $\lambda$). Η φωταύγεια μπορεί να διαχωριστεί σε διάφορους τύπους ανάλογα τον χώρο και τον τρόπο που παρατηρείται. Μερικές από τις βασικότερες είναι η βιοφωταύγεια (το φως εκπέμπεται από μια βιολογική πηγή κατά την πορεία μιας ενζυμικής αντίδρασης), η χημειοφωταύγεια (το φως εκπέμπεται από μη-βιολογική πηγή ως αποτέλεσμα μιας χημικής αντίδρασης), ο φθορισμός (μετάπτωση ηλεκτρονίων χωρίς μεταβολή του ηλεκτρονιακού spin), ο φωσφορισμός και τέλος η ραδιοφωταύγεια (έκθεση σε ιοντίζουσα ακτινοβολία) [84].

#### Δοκιμασία Kinase-Glo®

Η δοκιμασία Kinase-Glo® είναι μια μέθοδος υψηλής απόδοσης για τη μέτρηση της δραστικότητας μιας κινάσης με τον ποσοτικό προσδιορισμό της ποσότητας του ATP που παραμένει στο διάλυμα μετά από την δράση της. Η μέθοδος στηρίζεται στην φωταύγεια. Το φωταυγές σήμα είναι ανάλογο με την ποσότητα του ATP που απομένει στην αντίδραση και είναι αντιστρόφως ανάλογο με το μέγεθος της δραστικότητας κινάσης. Οι δοκιμασίες αυτές μπορούν να πραγματοποιηθούν με σχεδόν οποιονδήποτε συνδυασμό κινάσης και υποστρώματος και δεν απαιτούν ραδιενεργά επισημασμένα συστατικά. Η αντίδραση πραγματοποιείται χάρη στις ιδιότητες μιας θερμοσταθερής λουσιφεράσης (Ultra-Glo™ ανασυνδιασμένης λουσιφεράσης) η οποία είναι διαμορφωμένη για να παράγει ένα σταθερό σήμα (εικόνα 29). Το φωτεινό σήμα το οποίο παράγεται από τη δράση της έχει χρόνο ημιζωής μεγαλύτερο από πέντε ώρες. Αυτός ο παρατεταμένος χρόνος ημιζωής επιτρέπει την κατά παρτίδες επεξεργασία αντιδράσεων. Επιπρόσθετα, ο συνδυασμός ανασυνδιασμένης λουσιφεράσης-ρυθμιστικού διαλύματος έχει ως αποτέλεσμα την ελαχιστοποίηση παρεμβολών από ενώσεις σε σχέση με άλλα αντιδραστήρια ανίχνευσης ATP [85].

**Πίνακας 6** Πλεονεκτήματα της δοκιμασίας Kinase-Glo [85].

| **Πλεονεκτήματα της δοκιμασίας Kinase-Glo** | |
|---|---|
| 1. | Μπορούν να χρησιμοποιηθούν υψηλές συγκεντρώσεις ATP (γραμμική απόκριση έως 500 μM ATP) |
| 2. | Λειτουργικό με οποιοδήποτε συνδυασμό κινάσης-υποστρώματος, συμπεριλαμβανομένων των υποστρωμάτων πεπτιδίων, πρωτεϊνών, λιπιδίων και σακχάρων. |
| 3. | Πραγματοποιείται χωρίς τροποποιήσεις υποστρώματος. |
| 4. | Σταθερό σήμα φωταύγειας, με τουλάχιστον το 50% του σήματος να παραμένει έως 5 ώρες (διάβασμα πολλών αντιδράσεων με ασφάλεια) |
| 5. | Επιτρέπει την διάκριση ανταγωνιστών του ATP και αναστολέων κινάσης. |
| 6. | Ομοιογενής, μη ραδιενεργός προσδιορισμός. |
| 7. | Αυξημένη επαναληψιμότητα (τιμές συντελεστών Z> 0,7). |
| 8. | Μείωση ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων μέσω του συνδυασμού ανασυνδιασμένης λουσιφεράσης-ρυθμιστικού διαλύματος. |




**Εικόνα 17** Η περίσσια του ATP μετά την δράση της κινάσης χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα από την Kinase-Glo™ λουσιφεράση για να καταλύσει την προσθήκη οξυγόνου στην λουσιφερίνη. Η αντίδραση παράγει φως ανά κύκλο που σχετίζεται αντιστρόφως με τη δραστικότητα της κινάσης [85].

## 12.4 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ

Όλα τα διαλύματα και ο εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκαν στα παρακάτω πρωτόκολλα αναφέρονται αναλυτικά σε ξεχωριστά κεφάλαια (12.1 και 12.2).

### 12.4.1 Μετασχηματισμός κυττάρων E. coli BL21

Επιδεκτικά κύτταρα E. coli BL21 επιλέχθηκαν για την παραγωγή των πρωτεϊνών καθώς στερούνται των lon και OmpT πρωτεασών, λόγω γενετικής τροποποίησης (για αυξημένη σταθερότητα της παραγόμενης πρωτεΐνης). Συγκεκριμένα 1 mL αποψύχθηκε και παρέμεινε σε πάγο για 10 min. Έπειτα προστέθηκε 1 μL του επιθυμητού πλασμιδίου συγκέντρωσης 50 ng/μL. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε ελαφρά ανάδευση και τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε θερμικό σοκ δηλαδή τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο στους $42^0$C για 90 sec και στην συνέχεια κατευθείαν σε πάγο για 10 min. Το θερμικό σοκ των κυττάρων προκαλεί προσωρινή αποδιάταξη των κυτταρικών μεμβρανών και έτσι τα πλασμίδια εισέρχονται εντός των κυττάρων.

Ακολουθεί μεταφορά των κυττάρων σε falcon tubes και προσθήκη 1 mL καλλιεργητικού υλικού LB (Luria-Bertani) χωρίς την προσθήκη αμπικιλλίνης ή άλλου αντιβιοτικού, και επώαση των κυττάρων στους $37^0$C σε επωαστικό κλίβανο με αυτόματη ανάδευση για 1 ώρα. Στο στάδιο αυτό πραγματοποιείται ανάνηψη των κυττάρων και δίνεται η δυνατότητα στα κύτταρα που έχουν μετασχηματιστεί να εκφράσουν το γονίδιο της β-λακταμάσης που φέρει το πλασμίδιο.

Στην επόμενη φάση επιστρώνεται το δείγμα των κυττάρων σε τρυβλία ως εξής: φυγοκεντρείται (4.000 rpm, 1 min) και απορρίπτεται το υπερκείμενο (περίπου μέχρι τα 300μL). Το ίζημα επαναιωρείται και 100μL επιστρώνονται με ασηπτικές συνθήκες (κοντά σε λυχνία bunsen) σε τρυβλία petri με καλλιεργητικό υλικό LB-Agar εμπλουτισμένο με αντιβιοτικό αμπικιλλίνη συγκέντρωσης 100μg/mL με τη βοήθεια αποστειρωμένης γυάλινης πιπέτας Pasteur (δημιουργία άγκυστρου μετά από πέρασμα σε φλόγα).

Αφήνεται το τρυβλίο σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να απορροφήσει το υλικό με τα κύτταρα και επωάζεται ανεστραμμένο στους $37^0$C για 16-18 ώρες (overnight). Τα μετασχηματισμένα κύτταρα θα είναι τα μόνα που θα καταφέρουν να επιβιώσουν και να αναπτυχθούν καθώς μόνο αυτά θα έχουν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό λόγω του γονιδίου ανθεκτικότητας που φέρει το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.

### 12.4.2 Ανάπτυξη των κυττάρων και επαγωγή πρωτεϊνών

Μία μεμονωμένη αποικία BL21 μετασχηματισμένων κυττάρων που έχει αναπτυχθεί στο τρυβλίο petri το προηγούμενο βράδυ μεταφέρεται σε 5mL θρεπτικού υλικού LB Amp+ και επωάζεται για 16-18 ώρες στους $37^0$C σε επωαστικό κλίβανο με ανάδευση.

Η καλλιέργεια προστίθεται σε 395mL θρεπτικού υλικού LB Amp+ έτσι ώστε να προκύψει μια καλλιέργεια τελικού όγκου 400mL. Τα κύτταρα επωάζονται στους $37^0$C σε

επωαστικό κλίβανο με ανάδευση και ανά διαστήματα προσδιορίζεται η οπτική πυκνότητα (OD) του υλικού σε φασματοφωτόμετρο στα 600nm, μέχρι να φτάσουν στη μέση της εκθετικής φάσης ($OD_{600}$=0,6).

Ακολουθεί προσθήκη του IPTG (ισοπροπυλο-β-D-1-θειογαλακτοπυρανοσίδη) σε τελική συγκέντρωση 1mM για μετασχηματισμένα κύτταρα με το πλασμίδιο pTriEx-1.1 LiAurora ενώ για το πλασμίδιο pGEX-4T-1 σε τελική συγκέντρωση 100μM. Τα κύτταρα επωάζονται για 3 ώρες με συνεχή ανάδευση. Στο στάδιο αυτό παράγεται η επιθυμητή πρωτεΐνη. Έπειτα το εναιώρημα των κυττάρων φυγοκεντρείται (4.000 rpm, 15 min) και συλλέγεται το ίζημα.

### 12.4.3 Λύση των κυττάρων - Απομόνωση πρωτεϊνών

Επαναδιαλυτοποίηση των κυττάρων που είχαν προέλθει από την φυγοκέντρηση της καλλιέργειας σε 10mL lysis buffer-Triton για μετασχηματισμένα βακτήρια με τον φορέα pTriEx-1.1 ή 10mL RIPA buffer (ή kinase activity-lysis buffer) για μετασχηματισμένα βακτήρια με τον φορέα pGEX-4T-1, επώαση για 30 min στον πάγο προκειμένου να πραγματοποιηθεί χημική λύση των βακτηριακών κυττάρων, ρύθμιση pH και αδρανοποίηση πρωτεολυτικών ενζύμων (PMSF). Ακολουθεί συμπληρωματική μηχανική λύση των κυττάρων του εναιωρήματος με υπέρηχους στα 30kHz σε τρείς κύκλους του 1 λεπτού με 1 λεπτό αναμονή. Η διαδικασία της λύσης των βακτηρίων πραγματοποιείται εξ' ολοκλήρου σε πάγο. Ακολουθέι φυγοκέντρηση σε ψυχόμενη φυγόκεντρο (4000 g, 15 min, 4$^{o}$C) και συλλογή του υπερκειμένου στο οποίο αναμένεται να βρίσκεται η επιθυμητή πρωτεΐνη σε διαλυτή μορφή.

### 12.4.4 Καθαρισμός πρωτεϊνών με χρωματογραφία συγγενείας

Ανάλογα με την ετικέτα που επιλέχθηκε για την κατασκευή της κάθε ανασυνδιασμένης πρωτεΐνης προβαίνουμε στον καθαρισμό της είτε μέσω Ni-NTA (ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη με ετικέτα πολυιστιδίνης), είτε μέσω GSH (ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη με ετικέτα GST), ως εξής:

#### Απομόνωση και καθαρισμός μέσω Ni-NTA

Για τον διαχωρισμό των σφαιριδίων από το αραιωτικό μέσο (αιθανόλη), 300μL Protino® Ni-NTA (200μL bed volume) φυγοκεντρούνται (800 g, 1 λεπτό), και το υπερκείμενο απορρίπτεται. Ακολουθεί έκπλυση των σφαιριδίων με 1mL ρυθμιστικού διαλύματος (μπορεί να χρησιμοποιηθεί το ίδιο διάλυμα με το οποίο έγινε προηγουμένως η λύση των κυττάρων), ήπια ανακίνηση στο χέρι για 5 min και φυγοκέντρηση (800 g, 1 λεπτό), απορρίπτοντας το υπερκείμενο. Το στάδιο αυτό επαναλαμβάνεται για άλλες δύο φορές. Στη συνέχεια τα σφαιρίδια Ni-NTA αναμιγνύονται με το υπερκείμενο που έχει προέλθει από την λύση των βακτηριακών κυττάρων και επωάζονται overnight στους 4$^{o}$C σε μηχάνημα

ανάδευσης (shaker). Μετά το πέρας της επώασης ακολουθεί εκ νέου φυγοκέντρηση και τρείς συνολικά πλύσεις των σφαιριδίων που φέρουν δεσμευμένη την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη. Για την έκλουση προστίθενται 200μL elution buffer (ίσος όγκος με το bed volume των σφαιριδίων), ακολουθεί ήπια ανάδευση στο χέρι για 5 min και φυγοκέντρηση (800 g, 1 λεπτό, 4$^{o}$C). Το υπερκείμενο συλλέγεται σε eppendorf και διατηρείται στον πάγο. Με τον ίδιο τρόπο επαναλαμβάνουμε δυο ακόμη εκλούσεις των σφαιριδίων. Στο τέλος προστίθεται γλυκερόλη τελικής συγκέντρωσης 10% v/v στο κάθε προϊόν της έκλουσης και τα eppendorf αποθηκεύονται στους -80$^{o}$C.

#### Απομόνωση και καθαρισμός μέσω GSH

Το υπερκείμενο που έχει προέρθει από την λύση των βακτηριακών κυττάρων επωάζεται για 3 ώρες με σφαιρίδια γλουταθειόνης (glutathione beads) τα οποία υπέστησαν την εξής επεξεργασία: 300μL σφαιριδίων μεταφέρθηκαν σε falcon και πλύθηκαν 3 φορές με δεκαπλάσιο όγκο PBS αναδεύοντας ελαφρά σε shaker για 5 min και φυγοκεντρήθηκαν (1000 rpm, 5 min) απορρίπτοντας το υπερκείμενο. Η έκλουσή τους πραγματοποιήθηκε 3 φορές με 200μL L-Glutathione buffer με τις ίδιες συνθήκες φυγοκέντρησης όπως προηγουμένως. Τέλος, στο κάθε eppendorf της έκλουσης προστίθεται γλυκερόλη τελικής συγκέντρωσης 10% v/v και αποθηκεύονται στους -80$^{o}$C.

### 12.4.5 Διαλυτοποίηση του βακτηριακού ιζήματος με διάλυμα 8M ουρίας.

Ύστερα από την λύση των βακτηριακών κυττάρων συλλέχθηκε το ίζημα και σε σωληνάριο falcon διαλυτοποιήθηκε μαζί με 10mL διαλύματος Tris - ουρία 8M. Το falcon παρέμεινε για χρονικό διάστημα 3 ωρών σε θερμοκρασία δωματίου με συνεχή ανάδευση σε αναδευτήρα σωληνάριων. Μετά το πέρας της ώρας φυγοκεντρείται στις 20000 rpm και συλλέγεται το υπερκείμενο προκειμένου η πρωτεΐνη να δεθεί σε σφαιρίδια Ni.

### 12.4.6 Διαπίδυση πρωτεϊνών- LinAuroraK

Η διαπίδυση πραγματοποιήθηκε για να αφαιρεθεί η ουρία από το διάλυμα σταδιακά ώστε η αποδιατεταγμένη πρωτεΐνη να μπορεί να αναδιπλωθεί. Για το σκοπό αυτό, ημιδιαπερατή μεμβράνη διαπίδυσης μεγέθους πόρων 10kD τοποθετήθηκε σε υδατικό διάλυμα 10mM EDTA όγκου 50mL, θερμάνθηκε σε σημείο βρασμού και αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min πριν την προσθήκη του δείγματος προκειμένου να επανενυδατωθεί και να απομακρυνθούν προσμίξεις όπως ενώσεις θείου, ίχνη βαρέων μετάλλων και γλυκερόλης. Στην συνέχεια προστέθηκαν εντός της μεμβράνης 200μL εκλουσμένης πρωτεΐνης LinAuroraK, σφραγίστηκε με ειδικά «κλιπς» και τοποθετήθηκε στο πρώτο ρυθμιστικό διάλυμα συγκέντρωσης 6M ουρίας – φωσφορικών pH 8 και όγκου 50mL, με συνεχή ανάδευση όπου και παρέμεινε για χρονικό διάστημα 2 ωρών σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας του χρόνου ακολούθησε αλλαγή του ρυθμιστικού διαλύματος διαπίδυσης

(4M ουρίας) και διαπίδυση για άλλες 2 ώρες. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε με τον ίδιο τρόπο και για τα επόμενα διαλύματα διαπίδυσης (2M, 1M ουρίας), ενώ στο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών-1% SDS πραγματοποιήθηκε για 12-16 ώρες (overnight). Την επόμενη μέρα συλλέχθηκε ο όγκος της έκλουσης.

### 12.4.7 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών, SDS-PAGE

Σε κάθετο σύστημα ηλεκτροφόρησης (Bio-Rad™) μεγέθους πηκτώματος 0.75mm παρασκευάστηκε και τοποθετήθηκε διάλυμα πηκτώματος διαχωρισμού (separating gel) στο εκμαγείο μεταξύ των δυο γυάλινων πλακών, γεμίζοντας έως περίπου 0,7cm κάτω από το επίπεδο της χτένας. Στη συνέχεια προστέθηκε ένας μικρός όγκος dd $H_2O$ στην επιφάνεια του πηκτώματος και πριν από τον πολυμερισμό του για την ευθυγράμμιση της επιφάνειας του πηκτώματος διαχωρισμού. Μετά τον πολυμερισμό του πηκτώματος απορρίπτεται το νερό, προστίθεται το διάλυμα του πηκτώματος συσσώρευσης (stacking gel) έως την κορυφή του εκμαγείου και τοποθετείται η ειδική «χτένα». Μετά από χρονικό διάστημα 5-10 λεπτών αφαιρείται προσεκτικά η χτένα.

Για την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων έκλουσης ή εναιωρήματος σφαιριδίων προστίθεται 15μL από κάθε δείγμα σε eppendorf και 3μL 6xPLB (Protein Loading Buffer), ενώ για βακτηριακό ίζημα που έχει προέλθει από την φυγοκέντρηση 1,5mL διαλύματος κυττάρων απαιτείται πρώτα διαλυτοποίηση με αναδεύσεις σε διάλυμα 133μL 6xPLB και 666μL $H_2O$. Ακολουθεί αποδιάταξη των πρωτεϊνών σε θερμαινόμενη πλάκα (heat block) στους 95 $^oC$ για 10 min και στη συνέχεια φυγοκέντρηση των δειγμάτων στα 2.000 g για 30 sec προκειμένου να καθιζάνουν τυχών υδρατμοί που δημιουργήθηκαν κατά το προηγούμενο στάδιο. Τα δείγματα παραμένουν σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να τοποθετηθεί το πήκτωμα και το ρυθμιστικό διάλυμα (running buffer) στην συσκευή ηλεκτροφόρησης.

Αφού τοποθετηθεί το πήκτωμα στην συσκευή και καλυφθούν τα πηγαδάκια με ρυθμιστικό διάλυμα, φορτώνονται με την σειρά 12μL πρωτεινών αναφοράς γνωστού μοριακού βάρους και 15μL δείγματος. Έπειτα συνδέεται το δοχείο ηλεκτροφόρησης με την παροχή ηλεκτρικού ρεύματος και το πήκτωμα ηλεκτροφορείται σε σταθερή τάση 200V για 20-30 min.

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης απομακρίνουμε προσεκτικά το πήκτωμα από τις γυάλινες πλάκες ηλεκτροφόρησης με την βοήθεια της ειδικής σφήνας με την οποία κόβεται και απορρίπτεται το πήκτωμα συσσώρευσης. Ακολουθούν 3 εκπλήσσεις με απιονισμένο νερό για την απομάκρυνση του SDS και του ρυθμιστικού διάλυματος αλάτων, τα οποία παρεμβαίνουν στην πρόσδεση της χρωστικής με την πρωτεΐνη. Έπειτα βυθίζεται σε διάλυμα χρωματισμού (Coomassie) για 1-3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου με ήπια ανακίνηση. Για την απομάκρυνση της μη ειδικής χρώσης πραγματοποιούνται 3 εκπλύσεις με απιονισμένο νερό και προστίθεται το διάλυμα αποχρωματισμού για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με ήπια ανάδευση (αν κριθεί απαραίτητο πραγματοποιείται ενδιάμεσα αλλαγή του διαλύματος). Τέλος το πήκτωμα είναι έτοιμο για φωτογράφηση.

### 12.4.8 Ενζυμική δοκιμασία ενεργότητας

Για την δοκιμασία ενεργότητας της κινάσης DYRK1 ePK επιλέχτηκε ως υπόστρωμα το πεπτίδιο BML-P261-0001 (επίσης γνωστό ως Woodtide). Αυτό το πεπτίδιο προέρχεται από τον παράγοντα μεταγραφής FKHR με την προσθήκη δύο αμινοξέων λυσίνης. Είναι ένα υπόστρωμα που χρησιμοποιείται για την οικογένεια των κινασών DYRK. Τα χαρακτηριστικά του προϊόντος που είναι τα εξής:

Αλληλουχία: H-Lys-Lys-Ile-Ser-Gly-Arg-Leu-Ser-Pro-Ile-Met-Thr-Glu-Gln-OH

MW: 1585.3

Καθαρότητα: ≥95% (HPLC)

Συγκέντρωση: 1mg/mL

Ως αναστολέας της ενεργότητας της κινάσης χρησιμοποιήθηκε η χημική ένωση Harmine (7-Μεθοξυ-1-μεθυλ-9Η-πυριδο[3,4-b]ινδόλη), ένα αλκαλοειδές βήτα-καρβολίνης, καθώς είναι γνωστό ότι είναι ισχυρός ανταγωνιστικός αναστολέας για την πρόσδεση του ATP της οικογένειας των κινασών DYRK, ιδιαίτερα της κινάσης DYRK1A των θηλαστικών ($IC_{50}$=33 nM).

Σε οκτώ διαφορετικά eppendorf προστέθηκαν αντιδραστήρια με την σειρά στην οποία αναγράφονται στον ακόλουθο πίνακα:

**Πίνακας 7** Αντιδραστήρια/Eppendorf

| Αντιδραστήριο (μL) | Eppendorf | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| $H_2O$ | 12 | 11 | 10 | 9 | 8 | 6 | 3 | 0 |
| Κινάση | 0 | 1 | 2 | 3 | 3 | 6 | 9 | 12 |
| Harmine (400μM) | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Activity buffer | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 |

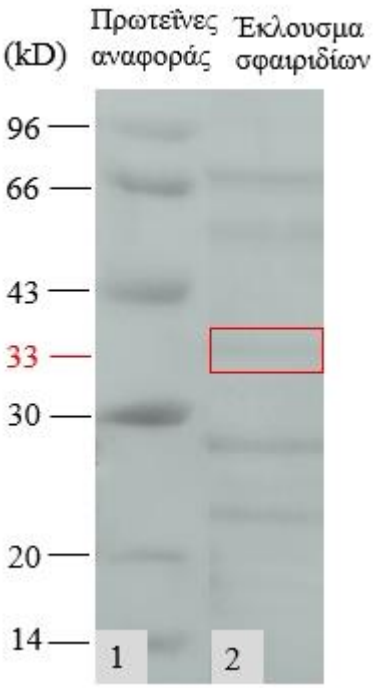
Ακολούθησε ανάμιξη και επώαση σε υδατόλουτρο (30 min, 30$^o$ C) (όλα τα αντιδραστήρια πριν τη χρήση τους είχαν αποψυχθεί και τοποθετηθεί σε πάγο). Κατά το στάδιο αυτό η κινάση, εφόσον είναι ενεργή, θα ξεκινήσει να καταναλώνει το ATP προκειμένου να φωσφορυλιώσει το υπόστρωμα. Στην πέμπτη αντίδραση έχει τοποθετηθεί ο αναστολέας Harmine, άρα αναμένεται μείωση της ενεργότητας του ενζύμου.

Μετά την επώαση ακολουθεί φυγοκέντρηση των δειγμάτων στα 2.000 g για 30 sec και προστίθεται στην κάθε αντίδραση 30 μL του αντιδραστηρίου Kinase-Glo® (13μM). Αναμιγνύουμε και επωάζουμε για ακόμη 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος καταγράφουμε την φωταύγεια.

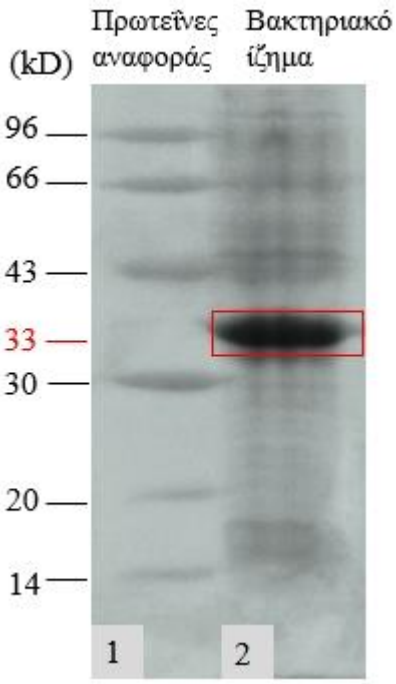
# 13 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

## 13.1 LinAuroraK

Μετά την SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση των εκλούσεων της κινάσης LinAuroraK αναμένουμε την εμφάνιση ζώνης μοριακού βάρους 33kD. Ωστόσο παρατηρείται πολύ μικρή ποσότητα διαλυτής πρωτεΐνης να έχει απομονωθεί από τα σφαιρίδια Ni-NTA όπως φαίνεται και στην εικόνα 30. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει σφάλμα, είτε κατά την διαδικασία της παραγωγής της κινάσης, είτε κατά την πρόσδεσή της στα σφαιρίδια, είτε κατά την έκλουσή της από αυτά. Για να διερευνηθούν τα αίτια του προβλήματος υποβλήθηκε το βακτηριακό ίζημα σε SDS-PAGE ανάλυση για να ανιχνευθεί η συγκέντρωση της πρωτεΐνης σε αυτό (εικόνα 31). Παρατηρούμε μία εμφανή ζώνη μοριακού βάρους 33kD από όπου καταλαβαίνουμε ότι η επιθυμητή πρωτεΐνη έχει παραχθεί αλλά κατακρημνίστηκε και δημιούργησε σωμάτια εγκλεισμού.




**Εικόνα 180** (1) Πρωτεΐνες αναφοράς μοριακού βάρους. (2) Διαλυτή πρωτεΐνη LinAuroraK μετά την έκλουση της από τα σφαιρίδια Ni-NTA.

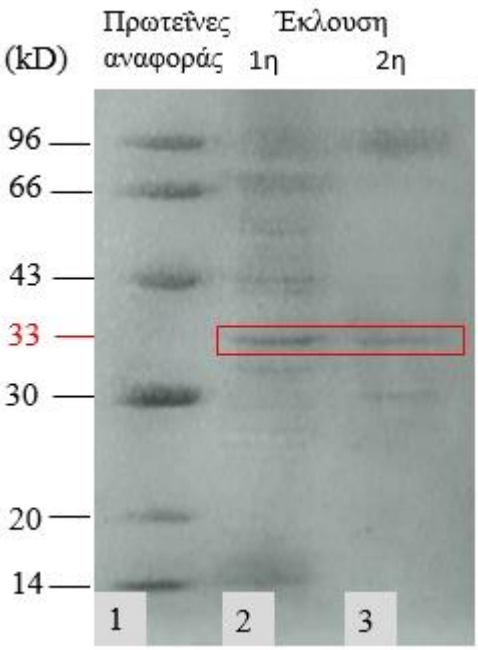



**Εικόνα 19** (1) Πρωτεΐνες αναφοράς μοριακού βάρους. (2) Βακτηριακό ίζημα κυττάρων BL21 μετά την έκφραση της πρωτεΐνης LinAuroraK.

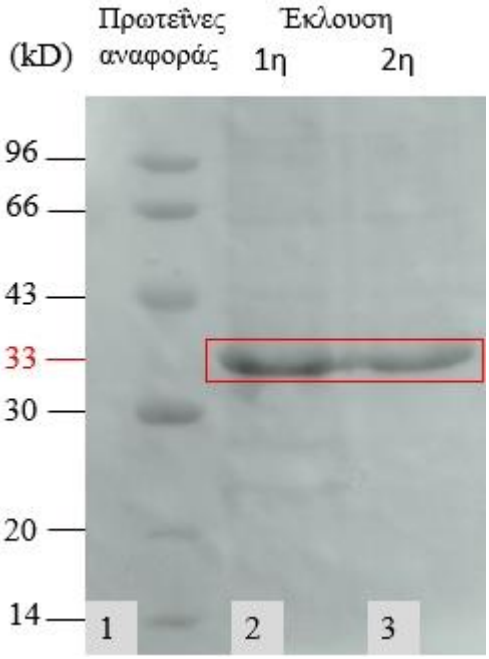
Για την βελτιστοποίηση παραγωγής της πρωτεΐνης, το πείραμα επαναλήφθηκε με την διαφορά ότι η επαγωγή έγινε στους 4$^{o}$C (εικόνα 32). Παρατηρήθηκε μια μικρή βελτίωση κατά την παραγωγή της διαλυτής πρωτεΐνης ωστόσο η συγκέντρωσή της εξακολουθεί να είναι μικρή.

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα και εφόσον δεν υπήρξε σημαντική διαφορά αλλάζοντας τις συνθήκες επαγωγής, πραγματοποιήθηκε διαλυτοποίηση του ιζήματος με έναν ισχυρό αναγωγικό παράγοντα όπως η ουρία σε συγκέντρωση 8M. Η ουρία ανήκει σε

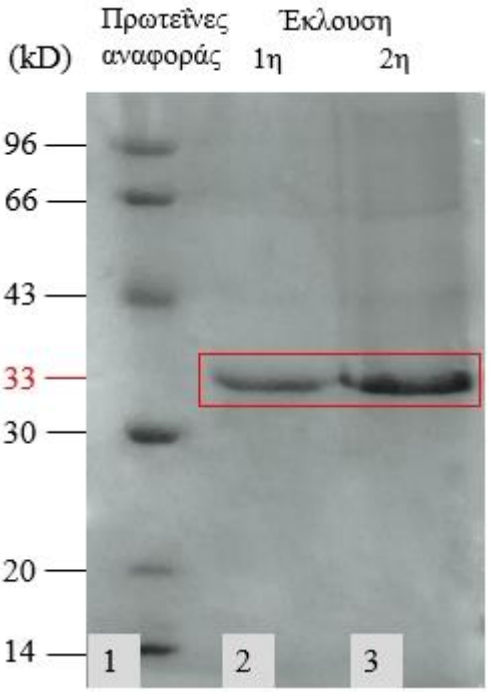
μια κατηγορία ενώσεων γνωστών ως χαοτροπικοί μετουσιωτές, η οποία ξετυλίγει την τριτοταγή δομή των πρωτεϊνών με αποσταθεροποίηση των ετεροπολικών δεσμών μεταξύ των ατόμων. Μετά την αποδιάταξη ακολούθησε εκ νέου πρόσδεση σε σφαιρίδια Ni-NTA και καθαρισμός. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης έδειξαν ότι η πρωτεΐνη διαλυτοποιήθηκε και απομονώθηκε (εικόνα 33).




**Εικόνα 32** (1) Πρωτεΐνες αναφοράς μοριακού βάρους. (2) και (3) διαλυτή πρωτεΐνη LinAuroraK μετά την έκλουση της από τα σφαιρίδια Ni-NTA, ελαττώνοντας την θερμοκρασία επαγωγής.




**Εικόνα 33** (1) Πρωτεΐνες αναφοράς μοριακού βάρους. (2) πρώτη έκλουση και (3) δεύτερη έκλουση των σφαιριδίων Ni-NTA μετά την διαλυτοποίηση του βακτηριακού ιζήματος με διάλυμα 8M Ουρίας.

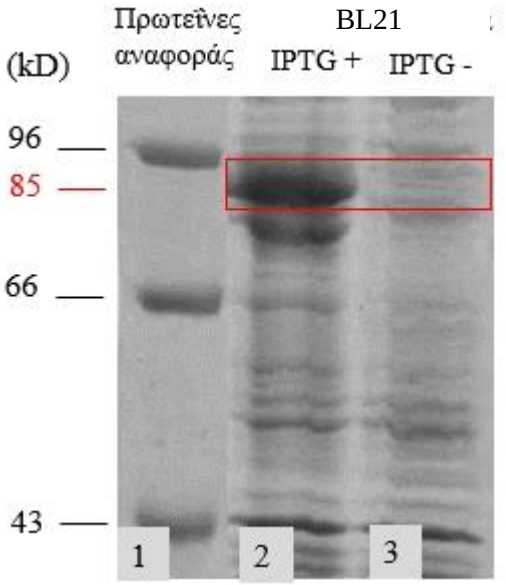



Κατά την προηγούμενη διαδικασία η πρωτεΐνη που έχει απομονωθεί βρίσκεται ακόμη σε μετουσιωμένη μορφή. Με σκοπό την αφαίρεση της ουρίας από το διάλυμα και την αναδίπλωση της πρωτεΐνης, προβαίνουμε σε διαπίδυση ελαττώνοντας σταδιακά την συγκέντρωση της ουρίας.

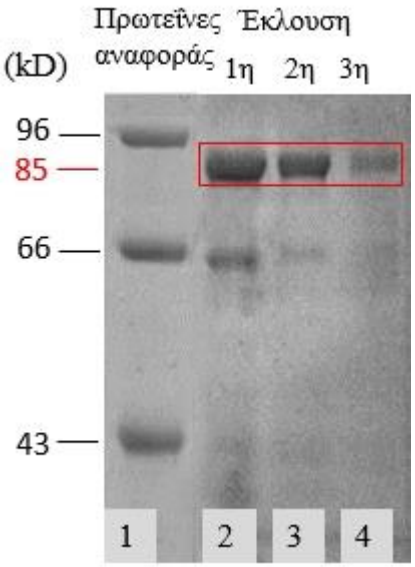
**Εικόνα 34** (1) Πρωτεΐνες αναφοράς μοριακού βάρους. (2) πρώτη έκλουση και (3) δεύτερη έκλουση της πρωτεΐνης LinAuroraK μετά από διαπίδυση ελαττώνοντας την συγκέντρωση της ουρίας.

## 13.2 DYRK 21 (LinJ.21.2010)

Για την παραγωγή και τον καθαρισμό της κινάσης LinJ.21.2010, μετασχηματισμένα βακτηριακά κύτταρα BL21 καλλιεργήθηκαν και ελέγχθηκαν σε SDS-PAGE με και χωρίς την επαγωγή του γονιδίου του παρασίτου (εικόνα 35). Η LinJ.21.2010 είναι μια πρωτεΐνη μήκους 499 αζωτούχων βάσεων και μάζας 55619 Da. Μαζί με την σύντηξή της με την πρωτεΐνη GST (27-30kDa), η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη ανέρχεται περίπου στα 85kDa. Μετά από την επαγωγή της και την λύση των κυττάρων, ακολούθησε η πρόσδεση της σε σφαιρίδια γλουταθιόνης προκειμένου να καθαριστεί. Τελος πραγματοποιήθηκε η έκλουση της (εικόνα 36).




**Εικόνα 35** (1) Πρωτεΐνες αναφοράς μοριακού βάρους. (2) Προϊόν λύσης βακτηριακών κυττάρων (BL21) με επαγωγή της έκφρασης από IPTG για την LinJ 21_2010. και (3) χωρίς επαγωγή της έκφρασης.



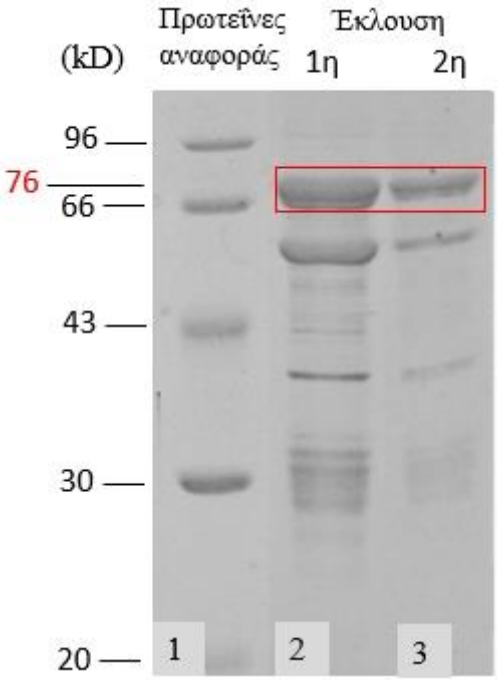

**Εικόνα 36** (1) Πρωτεΐνες αναφοράς βάρους. (2),(3),(4) SDS-PAGE των τριών εκλούσεων των σφαιριδίων γλουταθειόνης για την κινάση LinJ 21_2010.

## 13.3 DYRK1 και DYRK1 (ePK)

Η παρασιτική κινάση DYRK1 όπως αναφέρθηκε δρα ως αρνητικός ρυθμιστής για την ανάπτυξη των παρασίτων. Είναι μια πρωτεΐνη 80517 Da. Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη που εκφράστηκε αναμένεται στα 110- 120kD μαζί με την GST. Μετά από την ηλεκτροφόρηση σε SDS-PAGE με μια σειρά από επαναλαμβανόμενα πειράματα με διαφορετικές συνθήκες, αυτό που παρατηρούμε είναι ότι η DYRK1 εντοπίζεται σε πολύ μικρή συγκέντρωση καθώς και με μικρή σταθερότητα ως μόριο (εικόνα 37).

**Εικόνα 37** (1) Πρωτεΐνες αναφοράς μοριακού βάρους. (2),(3),(4) SDS-PAGE για τις εκλούσεις της DYRK1. Παρατηρείται μεγάλη αστάθεια της πρωτεΐνης. Η πρωτεΐνη φαίνεται κατακερματισμένη.

Με βάση το προηγούμενο πείραμα, αποφασίστηκε η παραγωγή και ο καθαρισμός όχι ολόκληρης της πρωτεΐνης αλλά μιας ανασυνδιασμένης πρωτεΐνης που αποτελείται από την GST και το ενεργό κέντρο (kinase domain) της πρωτεΐνης DYRK1. Η ανασυνδιασμένη πρωτεΐνη αυτή (ePK) αναμένεται να είναι πιο σταθερή από την DYRK1. Η προβλεπόμενη μάζα της πρωτεΐνης DYRK1 ePK είναι 76kD (46kD το ενεργό κέντρο και 30kD η GST) (εικόνα 38).



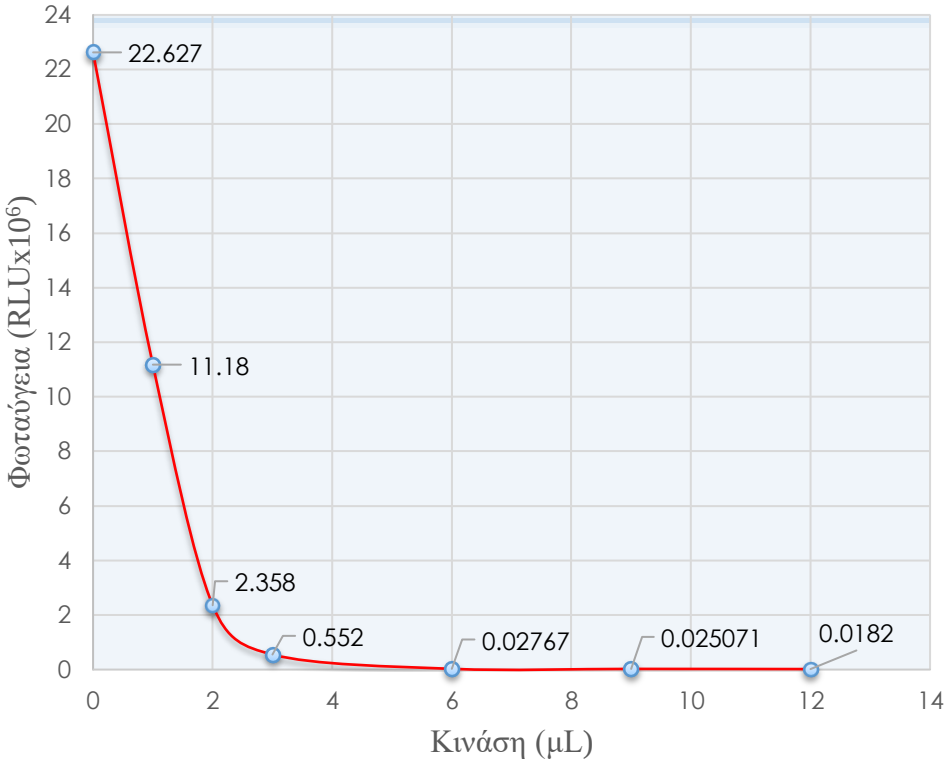

**Εικόνα 38** (1) Πρωτεΐνες αναφοράς μοριακού βάρους. (2),(3) SDS-PAGE των εκλούσεων για την DYRK1 EPK όπου διακρίνεται η μεγαλύτερη σταθερότητα της πρωτεΐνης σε σχέση με την DYRK1 μετά την έκλουση.

## 13.4 Ενζυμική δοκιμασία DYRK1 ePK

Η κινάση DYRK1 ePK ελέγχθηκε για την ενεργότητα της. Για την ενζυμική δοκιμασία επιλέχτηκε ως υπόστρωμα το πεπτίδιο Woodtide (BML-P261-0001), ενώ ως αναστολέας χρησιμοποιήθηκε η ένωση Harmine. Τα αποτελέσματα μετά την μέτρηση με λουμινόμετρο παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα. Το φωταυγές σήμα είναι ανάλογο με την ποσότητα του ATP που απομένει στην αντίδραση και αντιστρόφως ανάλογο της δραστικότητας της κινάσης. Τα αρχικά αποτελέσματα της ενζυμικής δοκιμασίας έδειχναν ότι η κινάση δεν ήταν ενεργή. Η ενζυμική δοκιμασία επαναλήφθηκε, με αλλαγή του διαλύματος λύσης των κυττάρων και ρυθμιστικού διαλύματος TPC. Αυτό που παρατηρούμε είναι ότι το σήμα της φωταύγειας όντως μειώνεται όσο η συγκέντρωση της κινάσης αυξάνει (πίνακας 8), εκτός της αντίδρασης που περιέχει τον αναστολέα, καθώς εκεί αναμένεται σήμα πολύ μεγαλύτερο από εκείνο που περιέχει ίση συγκέντρωση κινάσης χωρίς αναστολέα. Έτσι, αποδεικνύεται ότι η κινάση είναι ενεργή και η ένωση Harmine αναστέλλει σε ένα βαθμό την ενεργότητα της παρασιτικής κινάσης.

**Πίνακας 8** αποτελέσματα ανά αντίδραση μετά την μέτρηση της φωταύγειας.

| Harmine 400μM (μL) | Κινάση (μL) | Φωταύγεια (RLU) |
|---|---|---|
| 0 | 0 | 22627000 |
| 0 | 1 | 11180000 |
| 0 | 2 | 2358000 |
| 0 | 3 | 552000 |
| 1 | 3 | 12831000 |
| 0 | 6 | 27670 |
| 0 | 9 | 25071 |
| 0 | 12 | 18200 |




**Διάγραμμα 1** Απεικόνιση των αποτελεσμάτων της ενζυμικής δοκιμασίας ενεργότητας της DYRK1 ePK (χωρίς την παρουσία αναστολέα).

# 14 ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε η απομόνωση και ο καθαρισμός ανασυνδυασμένων κινασών του παρασίτου *L. infantum* (της LinAuroraK, της DYRK 21, της DYRK1 και της DYRK1 ePK) και η ανάπτυξη ενζυμικής δοκιμασίας ενεργότητας για την DYRK1 ePK. Με αυτόν τον τρόπο αναδεικνύεται η δυνατότητα παραγωγής κινασών του παρασίτου *Leishmania* και οι μέθοδοι που πρέπει να ακολουθηθούν για την ανάπτυξη δοκιμασιών ενεργότητας μέτριας σάρωσης για τον έλεγχο φαρμάκων που αναστέλλουν παρασιτικές κινάσες, προκειμένου να βρεθούν νέα αντιλεϊσμανιακά φάρμακα.

Για την παραγωγή της *LinAuroraK*, μετασχηματίστηκαν βακτήρια *E.coli* BL21 με ένα πλασμίδιο έκφρασης pTriEx-1.1 - *LinAuroraK* όπου η κινάση είχε κλωνοποιηθεί σε καρβοξυτελική σύζευξη με ετικέτα πολυιστιδίνης. Ακολούθησε έκφραση και καθαρισμός της ανασυνδιασμένης κινάσης, όπου παρατηρήθηκε ότι η κινάση εκφραζόταν στο ίζημα, σε σωμάτια εγκλεισμού. Τα σωμάτια εγκλεισμού είναι πυκνά σωματίδια συσσωματωμένης πρωτεΐνης που βρίσκονται στον κυτταροπλασματικό και περιπλασματικό χώρο του βακτηρίου [86]. Σε ένα προκαρυωτικό κύτταρο, παράγοντες όπως το pH και η οσμωτικότητα είναι πιθανό να διαφέρουν από εκείνα της αρχικής πηγής του γονιδίου και να αποτελούν αιτία μη φυσιολογικής αναδίπλωσης της πρωτεΐνης και σχηματισμό σωματίων εγκλεισμού. Η έκφραση πρωτεϊνών υπό τη μορφή σωματίων εγκλεισμού παρουσιάζει το πλεονέκτημα της απομόνωσης πρωτεϊνών υψηλής καθαρότητας, όμως η αναδιάταξή τους σε ενεργή μορφή είναι επίπονη διαδικασία που βασίζεται στη σταδιακή και αργή απομάκρυνση των αποδιατακτικών φορέων, στο συγκεκριμένο πείραμα της ουρίας. Στη παρούσα φάση η κινάση *Lin*AuroraK εκφράστηκε και καθαρίστηκε με αποδιατακτικές συνθήκες σε υψηλή καθαρότητα, ενώ με σταδιακή διαπίδυση απομακρύνθηκε η ουρία και η πρωτεΐνη παρέμεινε σε διαλυτή μορφή. Στη φάση αυτή θα πρέπει να μελετηθεί η ενεργότητα της πρωτεΐνης για να διαπιστωθεί αν η απομάκρυνση της ουρίας αρκεί για να παραχθεί μία ενεργή πρωτεΐνη, που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανακάλυψη καινούριων αναστολέων. Μια εναλλακτική προσέγγιση για να αντιμετωπιστεί το πρόβλημα της παραγωγής με την μορφή σωματίων εγκλεισμού είναι η κλωνοποίηση της σε άλλον φορέα έκφρασης. Ένας φορέας που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί είναι το pGEX σε βακτήρια *E.coli*, καθώς χρησιμοποιείται συζευγμένη με τρανσφεράση-s της γλουταθειόνης (GST), που τείνει να αυξάνει την διαλυτότητα της συζευγμένης πρωτεΐνης. Διαφορετικά συνιστάται να γίνει αλλαγή του συστήματος έκφρασης και να χρησιμοποιηθούν συστήματα όπως μύκητες ή καλύτερα βακιλοϊοί, που παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα έκφρασης και έχουν την δυνατότητα για μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, βοηθώντας έτσι στην σωστή αναδίπλωση και φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών.

Πέρα από το καθαρισμό της *LinAuroraK* πραγματοποιήθηκε η παραγωγή και ο καθαρισμός της κινάσης DYRK 21, σε βακτήρια *E. coli* BL21, ύστερα από σύζευξή της με την πρωτεΐνη GST από ένα φορέα έκφρασης pGEX-4T1, ενώ η πρωτεΐνη αυτή παράχθηκε σε διαλυτή μορφή, με υψηλή καθαρότητα και σε ικανοποιητικό βαθμό. Η πρωτεΐνη είναι

πλέον έτοιμη για δοκιμασίες ενεργότητας. Για την συγκεκριμένη κινάση δεν υπάρχουν δεδομένα για την λειτουργία της. Μερικά πρώτα πειράματα δείχνουν μια πολύ μικρή ενεργότητα με το κλασσικό υπόστρωμα της οικογενείας των DYRK (Woodtide), με συγκέντρωση ATP 7μM με τη παρουσία MOPS ως ρυθμιστικού διαλύματος και 15 mM $MgCl_2$. Οι συνθήκες αυτές είναι κατάλληλες για την ενεργότητα της DYRK1 του παρασίτου. Παρ ’όλα αυτά βασισμένοι στην ενζυμική δοκιμασία δεν είμαστε ακόμη σε θέση να γνωρίζουμε αν η κινάση είναι ενεργή ή όχι. Θα πρέπει πρώτα να ελεγχθεί αν οι συνθήκες δοκιμασίας για τη συγκεκριμένη κινάση είναι οι κατάλληλες. Να ταυτοποιηθεί δηλαδή το πεπτίδιο που χρησιμοποιεί φυσιολογικά ως υπόστρωμα, οι ιοντικές συνθήκες, το pH αλλά και τη συγκέντρωση του ATP για την οποία η κινάση παρουσιάζει την βέλτιστη ενεργότητά της ως ένζυμο. Με αυτόν τον τρόπο θα γίνει η επιλογή του κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος (MOPS, HEPES, TRITON) που θα χρησιμοποιηθεί, καθώς και του σωστού δισθενούς μετάλλου που χρειάζεται κάθε κινάση για τη λειτουργία της ($Mg^{2+}$ ή $Mn^{2+}$). Εφόσον διευκρινιστούν οι συνθήκες αυτές θα μπορέσει να δοθεί μια απάντηση για το αν η DYRK 21 είναι μια ενεργή κινάση ή όχι. Είναι άξιο αναφοράς ότι η κινάση αυτή διαθέτει έναν άτυπο βρόχο για την τοποθέτηση του ATP (glycine loop) και δημιουργεί υποψίες ότι πιθανώς μπορεί να είναι μια ψευδοκινάση, ωστόσο κάτι τέτοιο δεν έχει αποδειχτεί. Ένας από τους ρόλους μιας ψευδοκινάσης όπως έχει ήδη αναφερθεί (κεφάλαιο 10) είναι η ρύθμιση διάφορων μονοπατιών στο κύτταρο, παρεμποδίζοντας την σύνδεση με το υπόστρωμα άλλων κινασών με τις οποίες ομοιάζουν.

Τέλος έγινε προσπάθεια έκφρασης της ανασυνδιασμένης DYRK1 του παρασίτου, και αποδείχτηκε ότι είναι μια πλήρως λειτουργική κινάση. Κατά την έκφρασή της από βακτηριακά κύτταρα *E.coli* BL21, ως συζευγμένη με την GST στο αμινοτελικό της άκρο από έναν pGEX-4T1 φορέα, παρατηρήθηκε μειωμένη παραγωγή και σταθερότητα του μορίου και μεγάλη πρωτεολυτική ικανότητα. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται σε αλληλουχίες που επηρεάζουν την σταθερότητα της πρωτεΐνης. Στο αμινοτελικό της άκρο έχει δομές οι οποίες δεν διπλώνονται σωστά. Ακόμα περιέχει αλληλουχίες PEST. Οι αλληλουχίες αυτές χρησιμεύουν για την σηματοδότηση των πρωτεϊνών ως στόχους για ταχεία πρωτεόλυση. Μια άλλη υπόθεση, η οποία όμως δεν έχει αποδειχτεί, είναι ότι επειδή πρόκειται για μια πολύ μεγάλη ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη (110kD) είναι πιθανό να εμφανίζει τοξική επίδραση στα βακτηριακά κύτταρα (μειωμένη ταχύτητα ανάπτυξης στην καλλιέργεια).

Προκειμένου να αντιμετωπίσουμε το πρόβλημα της σταθερότητας και της μειωμένης παραγωγής της κινάσης, προχωρήσαμε στην παραγωγή μόνο του ενεργού κέντρου (kinase domain) της πρωτεΐνης DYRK1 (eykaryotic protein kinase domain, ή ePK). Όπως αναμενόταν αυτό το τμήμα της DYRK1, εμφανίζεται πιο σταθερό, ενώ παράγεται σε μεγάλη ποσότητα, χωρίς να συναντάται κάποιο εμπόδιο στην απομόνωση και τον καθαρισμό της. Η αυξημένη σταθερότητα του ενεργού κέντρου σε σχέση με τη πλήρη κινάση μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι απουσιάζει το αμινοτελικό άκρο της κινάσης που φέρει αλληλουχίες PEST, οι οποίες ελαττώνουν τη σταθερότητα της πρωτεΐνης.

Επίσης έχοντας απομονώσει με σταθερή και διαλυτή μορφή την κινάση DYRK1, προχωρήσαμε στην ανάπτυξη ενζυμικής δοκιμασίας ενεργότητας. Χρησιμοποιήθηκε το σύστημα φωταύγειας Kinase-Glo®. Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου αυτής είναι ότι αντικαθιστά το κυρίως χρησιμοποιούμενο σύστημα ραδιενεργών ισοτόπων ATP (γ32P-ATP) προσφέροντας μια πιο ασφαλή, γρήγορη, και οικονομική λύση για τον μαζικό έλεγχο της ενεργότητας των ενζύμων. Αναπτύχθηκε μία ενζυμική δοκιμασία αναστολής της ενζυμικής ενεργότητας, με υπόστρωμα το πεπτίδιο Woodtide (BML-P261-0001), ειδικό για την οικογένεια των κινασών DYRK. Η φωσφορυλίωση του πεπτιδίου αυτού από την ομόλογη κινάση του παρασίτου *Leishmania* δείχνει ότι η DYRK1 των θηλαστικών και η παρασιτική, έχουν την δυνατότητα να φωσφορυλιώνουν κοινά υποστρώματα. Η δοκιμασία Kinase-Glo βασίζεται στη προσθήκη ATP που παράγει φωτεινό σήμα (luminescence). Η ποσότητα του ATP που εναπομένει μετά το πέρας της αντίδρασης είναι αντιστρόφως ανάλογη προς την ενεργότητα της κινάσης, εφόσον η κινάση είναι υπεύθυνη για την μείωση της ποσότητας ATP. Η δοκιμασία αυτή έχει χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο μίας βιβλιοθήκης ιντιρουμπινικών αναλόγων με τις κινάσες GSK3 των παρασίτων *Leishmania* και *T. brucei*, ενώ έχει αναδείξει δύο ισχυρούς και ειδικούς αναστολείς που παρεμποδίζουν τις κινάσες αυτές [61,87,88]. Η ανάπτυξη του συστήματος αυτού για την λεϊσμανιακή κινάση DYRK1 κατέδειξε ότι η κινάση αυτή αναστέλλεται από τη harmine, τον ειδικό αναστολέα της οικογένειας κινασών DYRK των θηλαστικών. Η αναστολή αυτή είναι της τάξης $10^{-6}$ M, ενώ οι κινάσες DYRK των θυλαστικών αναστέλλονται πιο ειδικά σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις ($10^{-9}$ M) [89]. Η διαφορά αυτή πιθανώς να οφείλεται στον μικρότερο όγκο του βρόχου πρόσθεσης ATP της παρασιτικής κινάσης σε σχέση με τις ομόλογες των θηλαστικών. Παράλληλα αναδεικνύει ότι τέτοιες διαφορές πιθανώς να είναι χρήσιμες για την ανάδειξη αναστολέων ειδικών για τη λεϊσμανιακή κινάση και όχι για αυτές των θηλαστικών.

Συμπερασματικά, με βάση τα παραπάνω αναδεικνύεται η δυνατότητα ανάπτυξης μίας ενζυμικής δοκιμασίας της παρασιτικής κινάσης DYRK1 για την σάρωση αναστολέων της κινάσης και την ανακάλυψη νέων αντιπαρασιτικών φαρμάκων. Παράλληλα η παραγωγή και ο καθαρισμός σε ετερόλογο σύστημα, των λεϊσμανιακών κινασών LinAuroraK και DYRK21, ανοίγουν το δρόμο για τη ανάπτυξη δοκιμασιών ενεργότητας και τη σάρωση νέων φαρμάκων.

# 15 ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η λεϊσμανίαση είναι παρασιτική νόσος που προκαλείται από παράσιτα του γένους *Leishmania*. Τα παράσιτα αυτά προκειμένου να ολοκληρώσουν τον βιολογικό τους κύκλο εναλλάσσονται μεταξύ ασπόνδυλων και σπονδυλωτών ξενιστών. Στον άνθρωπο μεταδίδονται μέσω του δήγματος μολυσμένων δίπτερων εντομών με την κοινή ονομασία σκνίπες και μπορούν να προκαλέσουν ένα φάσμα κλινικών εκδηλώσεων. Η νόσος είναι ενδημική σε πάνω από 90 χώρες του κόσμου με κυριότερες εστίες στις αναπτυσσόμενες περιοχές καθιστώντας την ως τη «νόσο των πτωχών». Ο έλεγχος της νόσου μέχρι σήμερα βασίζεται κυρίως στην φαρμακευτική αγωγή, ωστόσο για τα υπάρχοντα σκευάσματα έχει αναφερθεί υψηλή τοξικότητα, ανάπτυξη αντίστασης, υψηλό κόστος και πληθώρα ανεπιθύμητων ενέργειων, περιορίζοντας τη χρήση τους. Λόγω των παραπάνω και της μη διαθεσιμότητας εμβολίων, υπάρχει η ανάγκη να αναπτυχθούν νέα αντιλεϊσμανιακά φάρμακα. Μία στρατηγική για το σκοπό αυτό είναι η στοχευμένη θεραπεία, η ανακάλυψη ενός φαρμάκου που στοχεύει σε συγκεκριμένα βιομόρια απαραίτητα για τη βιωσιμότητα του παρασίτου. Οι πρωτεϊνικές κινάσες των παρασίτων *Leishmania* θεωρούνται ελκυστικοί φαρμακευτικοί στόχοι. Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε η απομόνωση και ο καθαρισμός τριών πλήρων κινασών του παρασίτου *Leishmania infantum* (της LinAuroraK, της DYRK 21, της DYRK1) και του ενεργού κέντρου της κινάσης DYRK1 (ePK). Οι LinAuroraK, DYRK 21 και DYRK1 ePK, παράχθηκαν σε ικανοποιητικές ποσότητες και καθαρότητα. Η DYRK1 ePK ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη παράχθηκε σε διαλυτή μορφή, σταθερή και με υψηλή ενζυμική ενεργότητα. Η ανάπτυξη ενζυμικής δοκιμασίας ενεργότητας της βασίστηκε σε ένα μη ραδιενεργό σύστημα φωταύγειας (Kinase-GLO). Η κινάση DYRK1 ePK είχε την ικανότητα να φωσφορυλιώσει το υπόστρωμα της DYRK1A (Woodtide), ενώ παράλληλα η harmine, ειδικός αναστολέας των DYRK των θηλαστικών, ανέστειλε την λεϊσμανιακή DYRK1 ePK. Η παραγωγή και ο καθαρισμός σε ετερόλογο σύστημα των λεϊσμανιακών κινασών LinAuroraK, DYRK21 και DYRK1 ePK ανοίγουν το δρόμο για τη ανάπτυξη καινούριων δοκιμασιών ενεργότητας και τον έλεγχο νέων φαρμάκων.

## 16 ABSTRACT

Leishmaniasis is a parasitic disease caused by parasites of the genus *Leishmania*. In order to complete their cell cycle, these parasites alternate between invertebrate and vertebrate hosts. The parasites are transmitted to humans by insect bites from infected sand flies. The disease is endemic in more than 90 countries around the world with major outbreaks in developing areas, earning the reputation of "the disease of the poor". To this day, disease control is mainly based on chemotherapy. However, existing prescriptions have shown important limitations, including toxicity, drug resistance development, high cost and unwanted effects. One new anti-leishmanial treatment is targeted drug therapy that relies on the discovery of a drug that inhibits a specific target whose activity is required for the life cycle of the parasite. *Leishmania* kinases are considered attractive drug targets, due to their involvement in all critical processes of the cell. In the context of this thesis, three full length recombinant *Leishmania infantum* parasite kinases were isolated and purified (LinAuroraK, DYRK 21, DYRK1) and the kinase domain of DYRK1 (epK). Recombinant kinases were expressed in heterologous systems, while LinAuroraK, DYRK 21 and DYRK1 (epK) were all expressed in good amounts and purity. DYRK1 epK was expressed as a soluble and stable highly active kinase. The enzymatic assay set was based on the medium throughput luminescent kit (Kinase-GLO®). *Leishmania* DYRK1 was able to phosphorylate the mammalian DYRK peptide substrate (Woodtide), while the kinase was inhibited by harmine, a specific DYRK1 inhibitor. This highlights the establishment of a *Leishmania* DYRK1 kinase assay that will be useful in drug discovery efforts with kinase focused inhibitor libraries aiming to target DYRK1. Furthermore, the production and purification in a heterologous system of LinAuroaK and DYRK21, opens the possibility for establishing multiple enzymatic assays for drug screening.

# 17 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ


[1] Handman E. Cell biology of Leishmania. Adv Parasitol 1999. https://doi.org/10.1016/s0065-308x(08)60229-8.

[2] Pace D. Leishmaniasis. J Infect 2014. https://doi.org/10.1016/j.jinf.2014.07.016.

[3] Georgiadou SP, Makaritsis KP, Dalekos GN. Leishmaniasis revisited: Current aspects on epidemiology, diagnosis and treatment. J Transl Intern Med 2016;3:43–50. https://doi.org/10.1515/jtim-2015-0002.

[4] Cox FEG. History of human parasitology. Clin Microbiol Rev 2002. https://doi.org/10.1128/CMR.15.4.595-612.2002.

[5] Bañuls AL, Hide M, Prugnolle F. Leishmania and the Leishmaniases: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. Adv Parasitol 2007. https://doi.org/10.1016/S0065-308X(06)64001-3.

[6] Control of the leishmaniasis: Report of a WHO expert committee. World Heal Organ - Tech Rep Ser 1990.

[7] Ambit A, Woods KL, Cull B, Coombs GH, Mottram JC. Morphological events during the cell cycle of leishmania major. Eukaryot Cell 2011. https://doi.org/10.1128/EC.05118-11.

[8] Jensen RE, Englund PT. Network News: The Replication of Kinetoplast DNA. Annu Rev Microbiol 2012. https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150057.

[9] Teixeira DE, Benchimol M, Rodrigues JCF, Crepaldi PH, Pimenta PFP, de Souza W. The Cell Biology of Leishmania: How to Teach Using Animations. PLoS Pathog 2013. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003594.

[10] Sunter J, Gull K. Shape, form, function and Leishmania pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. Open Biol 2017. https://doi.org/10.1098/rsob.170165.

[11] Sharma U, Singh S. Insect vectors of Leishmania: Distribution, physiology and their control. J Vector Borne Dis 2008.

[12] Πόγγας Ν. Ιατρική Μικροβιολογία. Αθήνα: ΟΔΥΣΣΕΑΣ; 2011.

[13] Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P, et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. PLoS Negl Trop Dis 2016. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349.

[14] Elmore S, Ribeiro-Gomes FL, Roma EH, Carneiro MBH, Doria NA, Sacks DL, et al. WHO | Leishmaniasis. WHO 2016. https://doi.org/10.1128/IAI.01600-13.

[15] Wiser FTU. KINETOPLASTIDS 2013. https://www.tulane.edu/~wiser/protozoology/notes/kinet.htmL#leishmania.

[16] Vannier-Santos M, Martiny A, Souza W. Cell Biology of Leishmania spp.: Invading and Evading. Curr Pharm Des 2002. https://doi.org/10.2174/1381612023396230.

[17] Barral A, Costa J, Bittencourt A, Barral-Netto M, Carvalho E. Polar and subpolar diffuse cutaneous leishmaniasis... [Int J Dermatol. 1995] - PubMed result. Int J Dermatol 1995.

[18] Naderer T, McConville MJ. The Leishmania-macrophage interaction: A metabolic perspective. Cell Microbiol 2008. https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.01096.x.

[19] Rogers ME. The role of Leishmania proteophosphoglycans in sand fly transmission and infection of the mammalian host. Front Microbiol 2012. https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00223.

[20] Harhay MO, Olliaro PL, Costa DL, Costa CHN. Urban parasitology: Visceral leishmaniasis in Brazil. Trends Parasitol 2011. https://doi.org/10.1016/j.pt.2011.04.001.

[21] Mcgwire BS, Satoskar AR. Leishmaniasis: Clinical syndromes and treatment. QJM 2014. https://doi.org/10.1093/qjmed/hct116.

[22] WHO. Clinical forms of the leishmaniases n.d. https://www.who.int/leishmaniasis/disease/clinical_forms_leishmaniases/en/.

[23] Magill AJ. Leishmania Species: Visceral (Kala-Azar), Cutaneous, and Mucosal Leishmaniasis. Mand. Douglas, Bennett's Princ. Pract. Infect. Dis., 2014. https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-4801-3.00277-0.

[24] Zijlstra EE, Musa AM, Khalil EAG, El Hassan IM, El-Hassan AM. Post-kala-azar dermal leishmaniasis. Lancet Infect Dis 2003. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(03)00517-6.

[25] WHO. Leishmaniasis 2019. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis.

[26] Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS One 2012. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671.

[27] Ready PD. Leishmaniasis emergence in Europe. Eurosurveillance 2010. https://doi.org/10.2807/ese.15.10.19505-en.

[28] Antoniou M. Myths and Truths about Leishmaniasis. HCDCP 2015. http://www2.keelpno.gr/blog/?p=6428 (accessed May 26, 2015).

[29] WHO. Epidemiological situation 2018. https://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/.

[30] Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Cañavate C, Dedet JP, et al. The relationship between leishmaniasis and AIDS: The second 10 years. Clin Microbiol Rev 2008. https://doi.org/10.1128/CMR.00061-07.

[31] WHO. Leishmaniasis and HIV coinfection 2017.

[32] Elmahallawy EK, Sampedro Martínez A, Rodriguez-Granger J, Hoyos-Mallecot Y, Agil A, Navarro Mari JM, et al. Diagnosis of leishmaniasis. J Infect Dev Ctries 2014. https://doi.org/10.3855/jidc.4310.

[33] Zijlstra DE, Siddig Ali M, El-Hassan AM, El-Toum IA, Satti M, Ghalib HW, et al. Kala-azar: A comparative study of parasitological methods and the direct agglutination test in diagnosis. Trans R Soc Trop Med Hyg 1992. https://doi.org/10.1016/0035-9203(92)90086-R.

[34] Chatterjee M, Jaffe CL, Sundar S, Basu D, Sen S, Mandal C. Diagnostic and prognostic potential of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for leishmaniasis in India. Clin Diagn Lab Immunol 1999.

[35] CDC. Leishmaniasis 2017. https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.htmL.

[36] Sakkas H, Gartzonika C, Levidiotou S. Laboratory diagnosis of human Visceral Leishmaniasis. J Vector Borne Dis 2016. https://doi.org/10.1128/CDLI.9.5.951-958.2002.

[37] de Assis TSM, Braga AS d. C, Pedras MJ, Oliveira E, Barral A, de Siqueira IC, et al. Multi-centric prospective evaluation of rk39 rapid test and direct agglutination test for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg 2011. https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2010.09.004.

[38] Quinnell RJ, Carson C, Reithinger R, Garcez LM, Courtenay O. Evaluation of rK39 Rapid Diagnostic Tests for Canine Visceral Leishmaniasis: Longitudinal Study and Meta-Analysis. PLoS Negl Trop Dis 2013. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001992.

[39] Sundar S, Agrawal S, Pai K, Chance M, Hommel M. Detection of leishmanial antigen in the urine of patients with visceral leishmaniasis by a latex agglutination test. Am J Trop Med Hyg 2005. https://doi.org/73/2/269 [pii].

[40] Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. Lancet, 2005. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67629-5.

[41] Baiocco P, Colotti G, Franceschini S, Ilari A. Molecular basis of antimony treatment in Leishmaniasis. J Med Chem 2009. https://doi.org/10.1021/jm900185q.

[42] Esfandiarpour I, Dabiri SH. Treatment of cutaneous leishmaniasis recidivans with a combination of allopurinol and meglumine antimoniate: A clinical and histologic study. Int J Dermatol 2007. https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2007.03086.x.

[43] Herwaldt BL, Berman JD. Recommendations for treating leishmaniasis with sodium stibogluconate (pentostam) and review of pertinent clinical studies. Am J Trop Med Hyg 1992. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1992.46.296.

[44] Barratt G, Legrand P. Comparison of the efficacy and pharmacology of formulations of amphotericin B used in treatment of leishmaniasis. Curr Opin Infect Dis 2005. https://doi.org/10.1097/01.qco.0000191508.48481.f4.

[45] Sundar S, Sinha PK, Rai M, Verma DK, Nawin K, Alam S, et al. Comparison of short-course multidrug treatment with standard therapy for visceral leishmaniasis in India: An open-label, non-inferiority, randomised controlled trial. Lancet 2011. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)62050-8.

[46] Moyssakis I, Vassilakopoulos TP, Sipsas N V., Perakis A, Petrou A, Kosmas N, et al. Reversible dilated cardiomyopathy associated with amphotericin B treatment. Int J Antimicrob Agents 2005. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.02.015.

[47] Bhattacharya SK, Sinha PK, Sundar S, Thakur CP, Jha TK, Pandey K, et al. Phase 4 Trial of Miltefosine for the Treatment of Indian Visceral Leishmaniasis. J Infect Dis 2007. https://doi.org/10.1086/519690.

[48] Sundar S, Jha TK, Thakur CP, Bhattacharya SK, Rai M. Oral miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg 2006. https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2006.02.011.

[49] Sundar S, Sinha P, Jha TK, Chakravarty J, Rai M, Kumar N, et al. Oral miltefosine for Indian post-kala-azar dermal leishmaniasis: A randomised trial. Trop Med Int Heal 2013. https://doi.org/10.1111/tmi.12015.

[50] Sundar S, Singh A, Rai M, Prajapati VK, Singh AK, Ostyn B, et al. Efficacy of miltefosine in the treatment of visceral leishmaniasis in India after a decade of use. Clin Infect Dis 2012. https://doi.org/10.1093/cid/cis474.

[51] Musa AM, Younis B, Fadlalla A, Royce C, Balasegaram M, Wasunna M, et al. Paromomycin for the treatment of visceral leishmaniasis in Sudan: A randomized, open-label, dose-finding study. PLoS Negl Trop Dis 2010. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000855.

[52] Heras-Mosteiro J, Monge-Maillo B, Pinart M, Lopez Pereira P, Reveiz L, Garcia-Carrasco E, et al. Interventions for Old World cutaneous leishmaniasis. Cochrane Database Syst Rev 2017. https://doi.org/10.1002/14651858.CD005067.pub5.

[53] Singh N, Kumar M, Singh RK. Leishmaniasis: Current status of available drugs and new potential drug targets. Asian Pac J Trop Med 2012. https://doi.org/10.1016/S1995-7645(12)60084-4.

[54] Drug Resistance in Leishmania Parasites. 2018. https://doi.org/10.1007/978-3-319-74186-4.

[55] Smirlis D, Soares MBP. Selection of Molecular Targets for Drug Development Against Trypanosomatids. Subcell. Biochem., 2014, p. 43–76. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7305-9_2.

[56] T.J.Weber. Comprehensive Toxicology. Compr. Toxicol. Second Edi, Richland, WA, USA: 2010, p. 473–93. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00225-6.

[57] Kobe B, Kemp BE. Principles of Kinase Regulation. Handb. Cell Signaling, 2/e, 2010. https://doi.org//10.1016/B978-0-12-374145-5.00074-7.

[58] Reiterer V, Eyers PA, Farhan H. Day of the dead: Pseudokinases and

pseudophosphatases in physiology and disease. Trends Cell Biol 2014. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.03.008.

[59] Fabbro D, Cowan-Jacob SW, Moebitz H. Ten things you should know about protein kinases: IUPHAR Review 14. Br J Pharmacol 2015. https://doi.org/10.1111/bph.13096.

[60] Naula C, Parsons M, Mottram JC. Protein kinases as drug targets in trypanosomes and Leishmania. Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics, 2005. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.08.018.

[61] Efstathiou A, Gaboriaud-Kolar N, Smirlis D, Myrianthopoulos V, Vougogiannopoulou K, Alexandratos A, et al. An inhibitor-driven study for enhancing the selectivity of indirubin derivatives towards leishmanial Glycogen Synthase Kinase-3 over leishmanial cdc2-related protein kinase 3. Parasites and Vectors 2014. https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-234.

[62] XinZhang. Aurora kinases. Curr Biol 2008;18:146–8.

[63] Li Z, Tu X, Wang CC. Okadaic acid overcomes the blocked cell cycle caused by depleting Cdc2-related kinases in Trypanosoma brucei. Exp Cell Res 2006. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2006.07.022.

[64] Chhajer R, Bhattacharyya A, Didwania N, Shadab M, Das N, Palit P, et al. Leishmania donovani Aurora kinase: A promising therapeutic target against visceral leishmaniasis. Biochim Biophys Acta - Gen Subj 2016. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.06.005.

[65] Δεδούσης Γ. Μελέτη του ρόλου της κινάσης Aurora στο παράσιτο Leishmania spp., μέσω διαγονιδιακών στελεχών του παρασίτου. 2018.

[66] Κολοκούση Φ. Μελέτη του ρόλου της κινάσης LinDYRK1του παρασίτου Leishmania infantum. Αθήνα: 2016.

[67] Mony BM, MacGregor P, Ivens A, Rojas F, Cowton A, Young J, et al. Genome-wide dissection of the quorum sensing signalling pathway in Trypanosoma brucei. Nature 2014. https://doi.org/10.1038/nature12864.

[68] Brown TA. Γονιδιώματα Σύγχρονες Ερευνητικές Προσεγγίσεις. Π.Χ. Πασχαλίδης; 2010.

[69] Lewin B, Krebs JE, Kilpatrick ST, Goldstein ES. Genes and Chromosomes. Lewin's Genes X, 2012.

[70] Biotech AP. Protein Amplification and Simple Purification. Recomb. Protein Handb. AA, 2006.

[71] Terpe K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: From molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. Appl Microbiol Biotechnol 2006. https://doi.org/10.1007/s00253-006-0465-8.

[72] Rahimzadeh M, Sadeghizadeh M, Najafi F, Arab S, Mobasheri H. Impact of heat

shock step on bacterial transformation efficiency. Mol Biol Res Commun 2016.

[73] Merck, pTriEx ™ -1.1 DNA - Novagen 2019. http://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/pTriEx-1.1-DNA-Novagen,EMD_BIO-70840?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F&bd=1.

[74] Kaelin WG, Krek W, Sellers WR, DeCaprio JA, Ajchenbaum F, Fuchs CS, et al. Expression cloning of a cDNA encoding a retinoblastoma-binding protein with E2F-like properties. Cell 1992. https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90108-O.

[75] Zhang Z, Kuipers G, Niemiec Ł, Baumgarten T, Slotboom DJ, de Gier JW, et al. High-level production of membrane proteins in E. coli BL21(DE3) by omitting the inducer IPTG. Microb Cell Fact 2015. https://doi.org/10.1186/s12934-015-0328-z.

[76] Danielsson Å. Affinity Chromatography. Biopharm. Process. Dev. Des. Implement. Manuf. Process., 2018. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100623-8.00017-7.

[77] Amersham. Purification of (His)6-tagged proteins using HiTrap Chelating HP columns charged with different metal ions. Manual 2002.

[78] Healthcare GE, Sciences L. GST Gene Fusion System Handbook. J Mol Biol 2014.

[79] Paul Haney, Katherine Herting, B.S. SS. Thermo Scientific 2013. https://www.thermofisher.com/gr/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/protein-biology-application-notes/separation-characteristics-dialysis-membranes.htmL (accessed August 4, 2013).

[80] JM W. The Protein Protocols Handbook. Third. New York: Springer-Verlag; 2009.

[81] Protocol G. General Protocol for SDS-PAGE. Thermo Sci 2012.

[82] Rédei GP. SDS-PAGE. Encycl. Genet. Genomics, Proteomics Informatics, 2008. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6754-9_15184.

[83] Manns JM. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of proteins. Curr Protoc Microbiol 2011. https://doi.org/10.1002/9780471729259.mca03ms22.

[84] Valeur B, Berberan-Santos MN. A brief history of fluorescence and phosphorescence before the emergence of quantum theory. J Chem Educ 2011. https://doi.org/10.1021/ed100182h.

[85] Promega. ADP-Glo ™ Kinase Assay. Luminescence 2009.

[86] Singh A, Upadhyay V, Upadhyay AK, Singh SM, Panda AK. Protein recovery from inclusion bodies of Escherichia coli using mild solubilization process. Microb Cell Fact 2015. https://doi.org/10.1186/s12934-015-0222-8.

[87] Efstathiou A, Gaboriaud-Kolar N, Myrianthopoulos V, Vougogiannopoulou K, Subota I, Aicher S, et al. Indirubin analogues inhibit trypanosoma brucei glycogen synthase kinase 3 short and T. Brucei growth. Antimicrob Agents Chemother 2019.

https://doi.org/10.1128/AAC.02065-18.

[88] Xingi E, Smirlis D, Myrianthopoulos V, Magiatis P, Grant KM, Meijer L, et al. 6-Br-5methylindirubin-3′oxime (5-Me-6-BIO) targeting the leishmanial glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) short form affects cell-cycle progression and induces apoptosis-like death: Exploitation of GSK-3 for treating leishmaniasis. Int J Parasitol 2009. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.04.005.

[89] Göckler N, Jofre G, Papadopoulos C, Soppa U, Tejedor FJ, Becker W. Harmine specifically inhibits protein kinase DYRK1A and interferes with neurite formation. FEBS J 2009. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07346.x.