

ΕΚΤΕΝΗΣ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ

Συνοπτική περιγραφή του έργου

Η ελονοσία είναι μια από της σημαντικότερες μολυσματικές ασθένειες. Οφείλεται στα παράσιτα του γένους *Plasmodium* που μεταδίδονται μέσω των κουνουπιών. Πολλές προσπάθειες γίνονται για την πρόληψη και την παρεμπόδιση της μετάδοσης. Αρκετές έρευνες εστιάζουν στην μελέτη των δύο ισομορφών ακτίνης του παρασίτου, καθώς αποτελούν δυνητικό φαρμακευτικό στόχο. Αυτές ονομάζονται ακτίνη 1 και ακτίνη 2 και είναι ζωτικής σημασίας για το παράσιτο. Ενδιαφέρον επίσης παρουσιάζει το γεγονός ότι αποκλίνουν εξελικτικά από τις υπόλοιπες ευκαρυωτικές ακτίνες. Κρίσιμες διαφορές εντοπίζονται και μεταξύ των δύο ισομορφών, ως προς την αλληλουχία, την δομή, αλλά και την λειτουργία.

Σκοπός μας είναι να συνεχίσουμε τις έρευνές μας για τις παρασιτικές ακτίνες, εστιάζοντας στην μελέτη των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, καθώς είναι γνωστό ότι κατέχουν σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στην λειτουργία των ευκαρυωτικών ακτίνων. Οι γνώσεις μας για τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις στις παρασιτικές ακτίνες είναι ελάχιστες. Πρώτος στόχος της παρούσας έρευνας ήταν η ταυτοποίηση των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων με πρωτεομική ανάλυση φασματομετρίας μάζας. Επιπλέον δημιουργήθηκαν γενετικά τροποποιημένα παράσιτα που φέρουν μεταλλαγές των ισομορφών παρεμποδίζοντας μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Τα παράσιτα μελετήθηκαν ως προς τον φαινότυπο στα διάφορα στάδια του κύκλου ζωής, για να κατανοήσουμε τον λειτουργικό ρόλο των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων. Τέλος εξετάστηκε η υπόθεση τροποποίησης με SUMO (sumoylation) της πυρηνικής ακτίνης 1. Συνεπώς για πρώτη φορά ξεκίνησε μια συστηματική καταγραφή των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων και προσέγγιση της λειτουργίας τους στις ακτίνες.

Το έργο χωρίζεται σε τρεις ενότητες. Τα αποτελέσματα της ερευνητικής εργασίας που έλαβε χώρα για κάθε ενότητα περιγράφονται παρακάτω. Να σημειωθεί ότι κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε το παρασιτικό μοντέλο *Plasmodium berghei* που μολύνει τρωκτικά. Το συγκεκριμένο παρασιτικό μοντέλο επιδέχεται γενετικό μετασχηματισμό. Επιπλέον μπορούν να απομονωθούν μεγάλες ποσότητες δειγμάτων από τα στάδια του κύκλου ζωής που μας ενδιαφέρουν, κατάλληλα για πρωτεομική ανάλυση με φασματομετρία μάζας.

ΕΝΟΤΗΤΑ 1: Ταυτοποίηση των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων με φασματομετρία μάζας

Διαθέσιμα στοιχεία δείχνουν ότι οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις ποικίλουν στα διάφορα στάδια του κύκλου ζωής του παρασίτου (Foth & συν., 2008). Οι παρατηρήσεις μας υποδεικνύουν ότι αυτό αφορά και τις ισομορφές ακτίνης. Η πρωτεομική ανάλυση με φασματομετρία μάζας δίνει πληροφορίες για τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Οι ισομορφές ακτίνης απομονώθηκαν από τρία παρασιτικά αναπτυξιακά στάδια, στα οποία είναι γνωστό ότι οι ακτίνες έχουν διαφορετικές λειτουργίες (σχίζοντες, γαμετοκύτταρα, ωοκινέτες).

Οι σχίζοντες απομονώθηκαν από στέλεχος που δεν παράγει γαμετοκύτταρα, ενώ τα γαμετοκύτταρα και οι ωοκινέτες απομονώθηκαν από αγρίου τύπου παράσιτα. Επιπλέον απομονώθηκαν γαμετοκύτταρα από στέλεχος όπου έχει γίνει απαλοιφή του γονιδίου της

ακτίνης 2. Σε αυτά η υποκυτταρική θέση της ακτίνης 1 είναι διαφορετική σε σχέση με τα αγρίου τύπου γαμετοκύτταρα. Έτσι θα θέλαμε να δούμε την σχέση των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων με αυτήν την διαδικασία. Τρις ή περισσότερες βιολογικές επαναλήψεις από κάθε παρασιτικό στάδιο εξετάστηκαν με φασματομετρία μάζας.

A. Ακτίνη 1

Η ακτίνη 1 βρέθηκε με μεγάλη επικάλυψη σε όλες τις επαναλήψεις δειγμάτων για σχίζοντες που στάλθηκαν για φασματομετρία μάζας εκτός από δύο περιοχές της. Αυτό ίσως να οφείλετε σε κάποια αλληλεπίδραση εκεί αλλά μπορεί και σε κάποια ασυνήθιστη τροποποίηση.

Στα γαμετοκύτταρα η ακτίνη 1 βρέθηκε με μεγάλη επικάλυψη και στις τρις επαναλήψεις δειγμάτων που στάλθηκαν για φασματομετρία μάζας τόσο στα αγρίου τύπου παράσιτα όσο και σε αυτά που απουσιάζει η ακτίνη 2. Ωστόσο κάποιες περιοχές της δεν ταυτοποιήθηκαν σε όλα τα δείγματα. Προσπάθειες για βελτίωση αλλάζοντας κάποιες συνθήκες, δεν είχαν ιδιαίτερο αποτέλεσμα.

Στους ωοκινέτες η ακτίνη 1 βρέθηκε με χαμηλή επικάλυψη σε πάνω από τρις επαναλήψεις δειγμάτων που στάλθηκαν για φασματομετρία μάζας. Η ακτίνη 1 εντοπίζεται σε αυτό το στάδιο σε επαρκείς ποσότητες για να ανιχνευτεί με ανοσοαποτύπωμα κατά Western και ανοσοφθορισμό. Όμως είναι πιθανό πρωτεΐνες που βρίσκονται σε αφθονία να καλύπτουν τα πεπτίδια προς αναζήτηση. Για αυτό ο καλύτερος διαχωρισμός των πρωτεϊνικών ζωνών στο πήκτωμα ακρυλαμίδης θα δώσει λύση.

Συνολικά βρήκαμε ότι η ακτίνη 1 επιδέχεται πολλές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Από το σύνολο των 372 αμινοξέων της πρωτεΐνης τα 67 φέρουν τροποποιήσεις και τα 57 εξ αυτών ταυτοποιήθηκαν σε δύο ή και περισσότερες επαναλήψεις του δείγματος. Η σύγκριση με άλλες ευκαρυωτικές ακτίνες αποκαλύπτει τόσο ομοιότητες αλλά και διαφορές. Τα διαφορετικά ήδη τροποποιήσεων που ταυτοποιήθηκαν δίνονται παρακάτω.

Οξειδωση

Οξειδωτικές τροποποιήσεις ταυτοποιήθηκαν σε 9 κατάλοιπα μεθειονίνης, εκ των οποίων τα 8 έχουν ήδη περιγραφεί σε άλλες ευκαρυωτικές ακτίνες (Met45, Met48, Met83, Met177, Met191, Met228, Met326, Met356). Η οξειδωση στο κατάλοιπο Met306 δεν έχει βρεθεί σε άλλες ακτίνες παρόλο που το αμινοξύ είναι συντηρημένο στους ανώτερους ευκαρυώτες. Η οξειδωση στο Met45 επάγει τον πολυμερισμό της ακτίνης στη *Drosophila* (Hung & συν., 2011).

Μεθυλίωση

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι πολλές μεθυλιώσεις σε σχέση με ακτίνες των ανώτερων ευκαρυωτών (Terman & Kashina, 2013) που καμία δεν είχε μέχρι τώρα αναφερθεί. Οι Lys19 και Arg(255-257) βρέθηκαν σε όλα τα παρασιτικά στάδια, ενώ οι Arg29, Lys51, Arg63, Lys69, Lys85, Lys229, Lys239, Lys270, Lys292, Lys327, Lys329, Arg336 βρέθηκαν στους σχίζοντες και στα γαμετοκύτταρα.

Ακετυλίωση

Η ακετυλίωση στο αμινοτελικό άκρο που είναι γνωστή τροποποίηση στις ακτίνες βρέθηκε σε όλα τα δείγματα (Terman & Kashina, 2013). Ωστόσο βρέθηκε και σε άλλα

κατάλοιπα(Lys19, Lys327, Lys329) αλλά μόνο στα γαμετοκύτταρα και τους σχίζοντες. Ενώ η ακετυλίωση στο κατάλοιπο Lys19 δεν έχει μέχρι τώρα καταγραφεί, η ακετυλίωση των καταλοίπων Lys327 και Lys329 φαίνεται να είναι σημαντική για την λειτουργία συγκεκριμένων μυϊκών κυττάρων στη *Drosophila* (Viswanathan & συν, 2015).

Ουβικουιτινίωση

Βρέθηκε ως diGly στα αμινοξικά κατάλοιπα Lys19, Lys40, Lys51, Lys62, Lys207, Lys292, Lys329 and Lys360.

Φωσφορυλίωση

Βρέθηκε στα αμινοξικά κατάλοιπα Ser15, Ser30, Ser34 Ser/Thr(277-282), Thr(319-320), Ser/Thr(324-325) στους σχίζοντες και τα γαμετοκύτταρα. Η φωσφορυλίωση στη Ser266 έχει αναφερθεί στο παρελθόν στα παράσιτα της ελονοσίας (Treeck & συν., 2011).

Τα αποτελέσματα αποκαλύπτουν ένα διαφορετικό μοτίβο μεθυλίωσεων και φωσφορυλίωσεων μεταξύ των διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων του παρασίτου της ελονοσίας. Τα κατάλοιπα Tyr295 και Tyr307 που είναι φωσφορυλιωμένα μόνο στους σχίζοντες είναι επίσης φωσφορυλιωμένα και σε άλλους ευκαρυώτες αν και η λειτουργική σημασία τους δεν μας είναι ακόμη γνωστή. Τα κατάλοιπα Ser351 και Thr359 είναι φωσφορυλιωμένα μόνο στα γαμετοκύτταρα και δεν έχουν μέχρι τώρα περιγραφεί σε κάποιο οργανισμό. Επίσης οι μοναδικές μεθυλίωσεις (Lys114, Lys192, Lys207, Lys284) στους σχίζοντες περιγράφονται για πρώτη φορά, ενώ οι μεθυλίωσεις στα His74 και His88 αποκλειστικά στα γαμετοκύτταρα έχουν βρεθεί και σε άλλες ακτίνες. Η μεθυλίωση στο His74 έχει δειχθεί ότι επηρεάζει τη σταθερότητα και την ευελιξία της ακτίνης (Yao & συν., 1999). Πρόσφατα πειράματα συνεργατών μας έδειξαν ότι στο παράσιτο η μετάλλαξη στην ακτίνη 1 από ιστιδίνη σε γλουταμίνη οδηγεί σε πολύ αργό πολυμερισμό *in vitro* (Kursula, αδημοσίευτα αποτελέσματα). Αυτό ενισχύει τα ευρήματα ότι στα γαμετοκύτταρα τα ινίδια ακτίνης είναι σταθερά ή σχηματίζονται ασυνήθιστα πολυμερή.

Συνολικά η σύγκριση γαμετοκυττάρων και σχίζοντων αποκαλύπτει ενδιαφέρουσες διαφορές όσον αφορά τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και πιθανόν αυτό αντανακλά και διαφορές στη λειτουργία. Η λειτουργία της ακτίνης είναι διαφορετική στους δύο κυτταρικούς τύπους. Στους σχίζοντες η ακτίνη 1 είναι μέρος του κινητήρα ακτο-μυοσίνης, ενώ στα γαμετοκύτταρα η λειτουργία δεν είναι γνωστή αλλά μπορεί να έχει ένα κυτταροσκελετικό ρόλο.

Τέλος η υποκυτταρική θέση της ακτίνης 1 στα γαμετοκύτταρα όπου απουσιάζει η ακτίνη 2 διαφέρει από τα αγρίου τύπου γαμετοκύτταρα και για αυτό περιμέναμε ότι ίσως έχουμε και διαφορές στις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις μεταξύ μεταλλαγμένων και μη γαμετοκυττάρων. Όμως τα αποτελέσματά μας δεν επιβεβαίωσαν αυτή την υπόθεση.

B. Ακτίνη 2

Στην πρώτη ενότητα υπήρξαν δυσκολίες στη βιοπληροφορική ανάλυση των αποτελεσμάτων για την ακτίνη 2, καθώς δεν ήταν εφικτή η ανάκτηση πληροφορίας για αρκετές περιοχές της πρωτεΐνης. Η ποσότητα της ακτίνης 2 είναι αρκετά χαμηλότερη από την ακτίνη 1, και αυτό φαίνεται να αποτελεί πρόβλημα. Για να προσπεράσουμε αυτή τη δυσκολία με την ακτίνη 2, δημιουργήσαμε παράσιτα που εκφράζουν σημασμένη ακτίνη 2 με επίτοπο ώστε με πειράματα ανοσοκατακρήμνισης να γίνει απομόνωση της ακτίνης 2 από

δείγματα που προέρχονται από διαφορετικά στάδια του παρασίτου τα οποία στη συνέχεια θα αναλυθούν με φασματομετρία μάζας.

Κατασκευάστηκαν δύο πλασμιδιακοί φορείς για τον μετασχηματισμό παρασίτων που θα εκφράζουν την ακτίνη 2 με επίτοπο FLAG και παρασίτων που θα εκφράζουν την ακτίνη 2 με επίτοπο 6xHis. Και οι δύο επίτοποι τοποθετήθηκαν στο αμινοτελικό άκρο της ακτίνης 2, καθώς είναι γνωστό ότι η τοποθέτηση επιτόπων στο καρβοξυτελικό άκρο στις ακτίνες επηρεάζει αρνητικά την λειτουργία της πρωτεΐνης. Το γονίδιο της ακτίνης 2 που φέρει τον ένα ή τον άλλο επίτοπο εισήχθη στον γενετικό τόπο της ακτίνης 2 σε παράσιτα όπου έχει γίνει απαλοιφή του ενδογενούς γονιδίου της ακτίνης 2. Έτσι λοιπόν τα παράσιτα εκφράζουν μόνο την ακτίνη 2 που φέρει επίτοπο. Η ίδια στρατηγική αντικατάστασης της ακτίνης 2 έχει εφαρμοστεί με επιτυχία στο παρελθόν (Andreadaki & συν., 2014).

Αρχικά έγινε θετική επιλογή των μετασχηματισμένων παρασίτων με το κατάλληλο φάρμακο. Ο μετασχηματισμός των παρασίτων και η σωστή τοποθέτηση στο γονιδίωμα επιβεβαιώθηκε με γονοτυπικό έλεγχο με PCR και ακολούθησε κλωνοποίηση των μετασχηματισμένων παρασίτων με την μέθοδο της διαδοχικής αραίωσης. Η έκφραση της σημασμένης πρωτεΐνης με τον ένα ή τον άλλο επίτοπο επιβεβαιώθηκε με ανάλυση εκχυλίσματος παρασίτων στα διάφορα στάδια με ανοσοαποτύπωμα κατά Western όπου χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα ειδικά για τους επίτοπους. Σε κάθε περίπτωση τα μετασχηματισμένα παράσιτα ελέγχθηκαν ως προς τον φαινότυπό τους για να βεβαιωθούμε ότι οι επίτοποι δεν επηρεάζουν την λειτουργία της ακτίνης 2 και άρα τη βιωσιμότητα ή την ανάπτυξη των παρασίτων. Όλα τα παρασιτικά στάδια του κύκλου ζωής ελέγχθηκαν μολύνοντας ποντίκια αλλά και κουνούπια με καλά εδραιωμένες τεχνικές που εφαρμόζουμε στο εργαστήριο μας. Η σύγκριση με τα αγρίου τύπου παράσιτα δεν παρουσιάζει κάποια αξιοσημείωτη διαφορά στο φαινότυπο των μετασχηματισμένων παρασίτων, τα οποία αναπτύσσονται φυσιολογικά.

Έγινε συλλογή δειγμάτων από τα διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια και η ακτίνη 2 που φέρει επίτοπο απομονώθηκε με επιτυχία με πειράματα ανοσοκατακρήμνισης. Ως δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα από αγρίου τύπου παράσιτα. Μετά την ανοσοκατακρήμνιση ένα μικρό μέρος του δείγματος ελέγχετε με Western blot και το υπόλοιπό προορίζεται για ανάλυση με φασματομετρία μάζας. Τουλάχιστον τρεις βιολογικές επαναλήψεις θα ελεγχθούν. Ήδη πραγματοποιείτε η ανάλυση για το στάδιο των γαμετοκυττάρων και τα αποτελέσματα αναμένονται άμεσα.

ΕΝΟΤΗΤΑ 2: Μελέτη του λειτουργικού ρόλου συγκεκριμένων μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων *in vivo*

Σε ετερόλογο ευκαρυωτικό σύστημα έκφρασης, η His⁻⁷³ φαίνεται μεθυλιωμένη στην ακτίνη 2 αλλά όχι στην ακτίνη 1 (μη δημοσιευμένα στοιχεία). Η μεθυλίωση σε αυτήν την θέση έχει δείχθει ότι παίζει ρόλο στην υδρόλυση ATP και στην σταθερότητα των ινιδίων. Ο D-βρόγχος στις ακτίνες είναι μια κρίσιμη περιοχή για την σταθερότητα των ινιδίων (Vahokoski & συν., 2014). Στην θέση 53 του D-βρόγχου της ακτίνης 2 υπάρχει το αμινοξικό κατάλοιπο Tyr⁻⁵³, ενώ στην ακτίνη 1 υπάρχει Phe⁻⁵³. Με βάση τις πληροφορίες που έχουμε από την δομή, υποθέτουμε ότι η φωσφορυλίωση της Tyr⁻⁵³ στην ακτίνη 2 ίσως συμβάλλει στην αυξημένη σταθερότητα των ινιδίων σε σχέση με την ακτίνη 1.

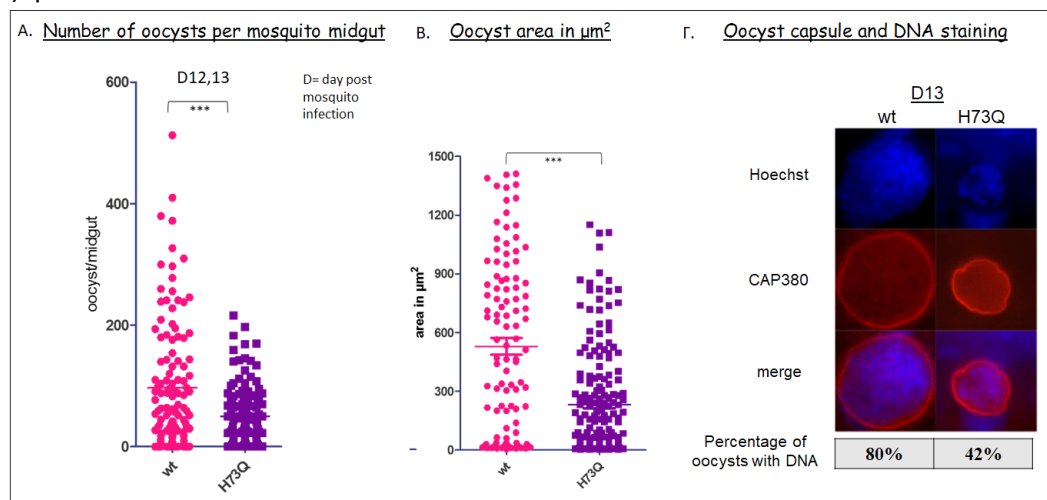
Με τη μέθοδο της τοπο-κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης, η Tyr-53 αντικαταστάθηκε με Phe στην ακτίνη 2 για να ελέγξουμε τον ρόλο της μεθυλίωσης στο συγκεκριμένο αμινοξύ και η His-73 αντικαταστάθηκε με Gln στην ακτίνη 2 για να ελέγξουμε τον ρόλο της μεθυλίωσης στο συγκεκριμένο αμινοξύ. Το γονίδιο της ακτίνης 2 που φέρει την μία ή την άλλη μετάλλαξη εισήχθη στον γενετικό τόπο της ακτίνης 2 σε παράσιτα όπου έχει γίνει απαλοιφή του ενδογενούς γονιδίου της ακτίνης 2. Έτσι λοιπόν τα παράσιτα εκφράζουν μόνο την μεταλλαγμένη ακτίνη 2. Η ίδια στρατηγική αντικατάστασης της ακτίνης 2 έχει εφαρμοστεί με επιτυχία στο παρελθόν (Andreadaki & συν., 2014). Αρχικά έγινε θετική επιλογή των μετασηματισμένων παρασίτων με το κατάλληλο φάρμακο. Ο μετασηματισμός των παρασίτων και η σωστή τοποθέτηση στο γονιδίωμα επιβεβαιώθηκε με γονοτυπικό έλεγχο με PCR και ακολούθησε κλωνοποίηση των μετασηματισμένων παρασίτων με την μέθοδο της διαδοχικής αραιώσης.

Σε κάθε περίπτωση τα μετασηματισμένα παράσιτα ελέγχθηκαν ως προς τον φαινότυπό τους. Όλα τα παρασιτικά στάδια του κύκλου ζωής ελέγχθηκαν μολύνοντας ποντίκια αλλά και κουνούπια με καλά εδραιωμένες τεχνικές που εφαρμόζουμε στο εργαστήριό μας. Έμφαση δόθηκε στα παρασιτικά στάδια όπου η ακτίνη 2 έχει δειχθεί ότι έχει σημαντικό ρόλο για την ανάπτυξη του παρασίτου.

Η σύγκριση με τα αγρίου τύπου παράσιτα δεν παρουσιάζει κάποια αξιοσημείωτη διαφορά στο φαινότυπο των μεταλλαγμένων παρασίτων όπου η Tyr-53 αντικαταστάθηκε με Phe, τα οποία αναπτύσσονται φυσιολογικά και ο κύκλος ζωής του παρασίτου από το κουνούπι στο ποντίκι ολοκληρώνεται με επιτυχία. Αντιθέτως η μετάλλαξη της His-73 σε Gln στην ακτίνη 2, για να ελέγξουμε τον ρόλο της μεθυλίωσης στο συγκεκριμένο αμινοξύ, αποκάλυψε τον κρίσιμο ρόλο που έχει για την ανάπτυξη των παρασίτων. Τώρα θα προχωρήσουμε σε ανάλυση με φασματομετρία μάζας δειγμάτων από τα μεταλλαγμένα παράσιτα μετά από πειράματα ανοσοκατακρήμνισης για την μεταλλαγμένη ακτίνη 2 που θα φέρει επίτοπο όπως αυτό πραγματοποιήθηκε στην ενότητα 1 για την αγρίου τύπου ακτίνη 2 που φέρει επίτοπο. Με τον ίδιο τρόπο μπορούν να εξεταστούν τροποποιήσεις που προκύπτουν από την ενότητα 1.

Τα μεταλλαγμένα παράσιτα όπου η His-73 αντικαταστάθηκε σε Gln αδυνατούν να ολοκληρώσουν τον κύκλο ζωής τους, καθώς η μετάδοση από μολυσμένα κουνούπια σε υγιή ποντίκια ήταν αδύνατη και στις τρεις επαναλήψεις του πειράματος σε αντίθεση με τα αγρίου τύπου παράσιτα, τα οποία μεταδόθηκαν και μόλυναν τα ποντίκια. Γνωρίζουμε ότι η μετάδοση των παρασίτων της ελονοσίας από τα κουνούπια στα ποντίκια οφείλεται στο παρασιτικό στάδιο των σποροζωιδίων. Τα σποροζωίδια δημιουργούνται μέσα στις παρασιτικές ωκύστες που σχηματίζονται στο έντερο του κουνουπιού όταν αυτές ωριμάσουν μετά από σχεδόν 11 μέρες μετά το τάισμα του κουνουπιού με αίμα μολυσμένο με παράσιτα. Από εκεί τα σποροζωίδια απελευθερώνονται και μεταναστεύουν στους σιελογόνους αδένες του κουνουπιού από όπου και θα μεταδοθούν. Σε καμία επανάληψη των πειραμάτων μας δεν βρέθηκαν σποροζωίδια στους σιελογόνους αδένες. Μια εκτενής εξέταση στο στάδιο των ωκυστών ανέδειξε ένα σοβαρό πρόβλημα στην ανάπτυξη των ωκυστών, οι οποίες ναι μεν σχηματίζονται αλλά δεν αναπτύσσονται φυσιολογικά, το μέγεθός τους είναι μικρότερο από τις αγρίου τύπου και το ποσοστό ωκυστών που περιέχουν DNA είναι στο μισό σε σχέση με τις αγρίου τύπου (εικόνα 1). Όμως το μέγεθος και η περιεκτικότητα σε DNA είναι βασικά στην ωρίμανση των ωκυστών που χρειάζεται για την δημιουργία φυσιολογικών σποροζωιδίων. Συνεπώς οι ωκύστες δεν ωριμάζουν και δεν σχηματίζονται σποροζωίδια. Σε προηγούμενες

μελέτες μας βρήκαμε ότι η ακτίνη 2 είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη και ωρίμανση των ωοκυστών. Απουσία ολόκληρης της ακτίνης 2 οι ωοκύστες δεν αναπτύσσονται (Andreadaki & συν., 2014). Ενώ η ακτίνη 2 δεν εντοπίζεται στο στάδιο των ωοκυστών, η παρουσία της στο στάδιο του ζυγωτού, ένα προηγούμενο αναπτυξιακό στάδιο του παρασίτου στο κουνούπι, είναι σημαντική για την μετέπειτα ανάπτυξη των ωοκυστών. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης είναι σημαντικά καθώς δείχνουν ότι η μετάλλαξη ενός και μόνο ενός αμινοξέος έχει μέγιστη επίδραση στη λειτουργία της ακτίνης στο στάδιο του ζυγωτού.



Εικόνα 1: Α. Σύγκριση αριθμού ωοκυστών ανά έντερο κουνουπιού μεταξύ αγρίου τύπου και μεταλλαγμένων παρασίτων όπου η His₋₇₃ αντικαταστάθηκε σε Gln (H73Q). Η αφαίρεση των εντέρων έγινε μετά από 12 με 13 μέρες από την μόλυνση των κουνουπιών με τα παράσιτα. Η διαφορά είναι στατιστικά σημαντική. Β. Σύγκριση του εμβαδού των ωοκυστών. Η διαφορά είναι στατιστικά σημαντική. Γ. Ανοσοφθορισμός σε μονιμοποιημένα έντερα κουνουπιών. Οι πυρήνες βάφονται με χρωστική Hoechst (μπλε) και η κάψουλα των ωοκυστών με ειδικό αντίσωμα CAP380 (κόκκινο). Επιπλέον παρουσιάζεται το ποσοστό των ωοκυστών που έχουν DNA. *** $P < 0.0001$ Kruskal–Wallis.

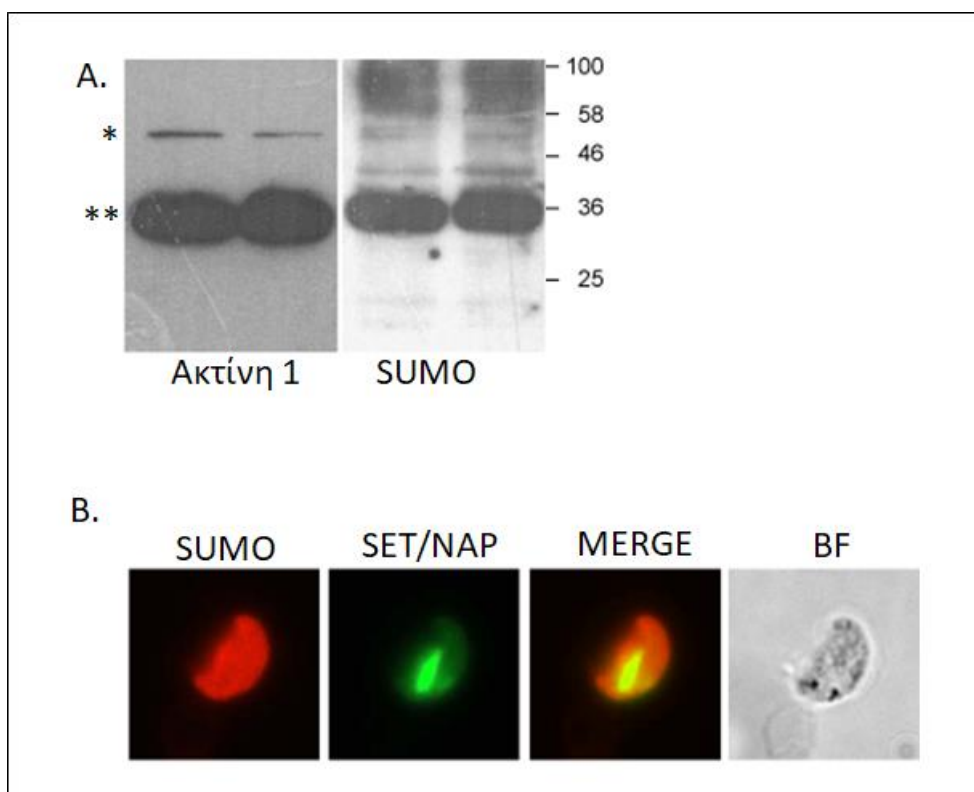
ΕΝΟΤΗΤΑ 3: Ταυτοποίηση της τροποποίησης με SUMO της πυρηνικής ακτίνης 1

Η ακτίνη 1 εντοπίζεται στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα στα μη φυλετικά στάδια του παρασίτου, αλλά και στα αρσενικά γαμετοκύτταρα του παρασίτου. Όταν όμως αυτά βρεθούν στο κουνούπι ενεργοποιούνται και η ακτίνη 1 περιορίζεται στο κυτταρόπλασμα (Deligianni & συν., 2011). Η πυρηνική ακτίνης 1 στα μη φυλετικά στάδια είναι γνωστό ότι συμβάλει στην μεταγραφική ρύθμιση, όμως ο ρόλος της στον πυρήνα των αρσενικών γαμετοκυττάρων δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί. Εδώ σκοπός ήταν να εξεταστεί η υπόθεση τροποποίησης με SUMO (sumoylation) της πυρηνικής ακτίνης 1 χρησιμοποιώντας ειδικό αντίσωμα που προσδένεται στην πρωτεΐνη SUMO. Εάν η ακτίνη φαίνεται να επιδέχεται τέτοια τροποποίηση, απώτερος στόχος είναι να δημιουργήσουμε μεταλλάγματα σημασμένης με επίτοπο ακτίνης 1 στα οποία θα γίνει φαινοτυπική ανάλυση, και στην πορεία φασματομετρία μάζας.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση κατά Western σε εκχύλισμα αγρίου τύπου γαμετοκυττάρων. Στο πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα για την ακτίνη και ειδικό αντίσωμα που προσδένεται στην πρωτεΐνη SUMO. Τα αποτελέσματα αυτού του πειράματος ήταν θετικά. Όταν χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα για την ακτίνη, όπως ήταν αναμενόμενο εμφανίζεται μια έντονη ζώνη που αντιστοιχεί στο μοριακό βάρος της ακτίνης 1, αλλά και μια λιγότερο έντονη σε υψηλότερο μοριακό βάρος. Η διαφορά αυτή συμφωνεί με πιθανή

τροποποίηση με SUMO (11 ή 15kDa). Αυτό επιβεβαιώθηκε με την χρήση του αντισώματος για SUMO στην ίδια μεμβράνη, όπου εμφανίζεται σήμα και σε αυτό το ύψος (εικόνα 2A). Το αποτέλεσμα αυτό επαληθεύτηκε και με πειράματα ανοσοκατακρήμνισης με το αντίσωμα για SUMO σε εκχύλισμα γαμετοκυττάρων και ξανά ανοσοαποτύπωση κατά Western όπου χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα για την ακτίνη 1.

Επιπλέον το αντίσωμα για την SUMO χρησιμοποιήθηκε και σε πειράματα ανοσοφθορισμού και σήμα εντοπίζεται σε πυρήνα και κυτταρόπλασμα σε μονιμοποιημένα παράσιτα (εικόνα 2B). Με βάση αυτά τα θετικά αποτελέσματα από τα πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western και ανοσοφθορισμού, δημιουργήθηκε πλασμιδιακή κατασκευή που φέρει σημασμένη ακτίνη 1 με επίτοπο FLAG, η οποία ενσωματώθηκε στο γονιδίωμα των παρασίτων σε ετερόλογο γενετικό τόπο. Έγινε επιλογή των μετασηματισμένων παρασίτων, επιβεβαίωση του μετασηματισμού με γονοτυπικό έλεγχο με PCR και κλωνοποίηση των μετασηματισμένων παρασίτων με την μέθοδο της διαδοχικής αραίωσης. Ολοκληρώνεται η φαινοτυπική ανάλυση και αναμένεται να γίνει φασματομετρία μάζας.



Εικόνα 2: **A.** Ανοσοαποτύπωση κατά Western σε εκχύλισμα γαμετοκυττάρων που χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα για την ακτίνη και αντίσωμα ειδικό για SUMO. Με ένα αστερίσκο υποδεικνύεται η πιθανών τροποποιημένη με SUMO ακτίνη και με δύο αστερίσκους η μη τροποποιημένη ακτίνη. **B.** Πειράματα ανοσοφθορισμού. Στην εικόνα είναι ένα αρσενικό γαμετοκύτταρο όπου έχει χρησιμοποιηθεί αντίσωμα για SUMO (κόκκινο) και αντίσωμα για την πυρηνική πρωτεΐνη SET/NAP (πράσινο).

Για πρώτη φορά ξεκίνησε μια συστηματική καταγραφή των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων στις ακτίνες του παρασίτου. Επιπλέον βρέθηκε ότι μια μετα-μεταφραστική τροποποίηση είναι απαραίτητη από μόνη της για την ανάπτυξη του παρασίτου και την μετάδοση από τα κουνούπια. Αυτό είναι ένα σημαντικό εύρημα και μαζί με τις υπόλοιπες

πληροφορίες που συλλέξαμε από την παρούσα ερευνητική εργασία δίνονται νέες προοπτικές για την παρεμπόδιση της μετάδοσης των παρασίτων.

Βιβλιογραφία

- Andreadaki, M., et al., *Genetic crosses and complementation reveal essential functions for the Plasmodium stage-specific actin2 in sporogonic development*. Cell Microbiol. 2014. 16(5):751-67.
- Deligianni, E., et al., *Critical role for a stage-specific actin in male exflagellation of the malaria parasite*. Cell Microbiol. 2011. 13(11):1714-30.
- Foth, B.J., et al., *Quantitative protein expression profiling reveals extensive post-transcriptional regulation and post-translational modifications in schizont-stage malaria parasites*. Genome Biol, 2008. 9(12): p. R177.
- Hung, R.J., C.W. Pak, and J.R. Terman, *Direct redox regulation of F-actin assembly and disassembly by Mical*. Science, 2011. 334(6063): p. 1710-3.
- Terman, J.R. and A. Kashina, *Post-translational modification and regulation of actin*. Curr Opin Cell Biol, 2013. 25(1): p. 30-8.
- Treeck, M., et al., *The phosphoproteomes of Plasmodium falciparum and Toxoplasma gondii reveal unusual adaptations within and beyond the parasites' boundaries*. Cell Host Microbe, 2011. 10(4): p. 410-9.
- Vahokoski, J., et al., *Structural differences explain diverse functions of Plasmodium actins*. PLoS Pathog. 2014 10(4):e1004091.
- Viswanathan, M.C., et al., *Pseudo-acetylation of K326 and K328 of actin disrupts Drosophila melanogaster indirect flight muscle structure and performance*. Front Physiol, 2015. 6: p. 116.
- Yao, X., et al., *His(73), often methylated, is an important structural determinant for actin. A mutagenic analysis of HIS(73) of yeast actin*. J Biol Chem, 1999. 274(52): p. 37443-9.