



ΤΟΜΕΑΣ ΒΟΤΑΝΙΚΗΣ  
ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

*Μελέτη του ρόλου της κινάσης  
LinDYRK1 του παρασίτου  
Leishmania infantum*

Διπλωματική εργασία

**Φωτεινή Κολοκούση**  
**A.M. 1113201000123**

Επιβλέπουσα: Δρ. Δέσποινα Σμυρλή, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ  
Υπεύθυνος: Γεώργιος Διαλλινάς, Μέλος ΔΕΠ

Αθήνα 2016





## Περιεχόμενα

---

1.Εισαγωγή.....	1
1.1 Το παράσιτο και η νόσος Λεισμανίασης.....	1
1.1.1. Γενικά στοιχεία.....	1
1.1.2. Ιστορική αναδρομή.....	1
1.1.3 Προέλευση και συστηματική κατάταξη του γένους <i>Leishmania</i> .....	1
1.1.4 Ενδιάμεσος ξενιστής του παρασίτου.....	3
1.1.5 .Κύκλος ζωής του παρασίτου <i>Leishmania</i> .....	3
1.1.6.Κλινική μορφή της λεισμανίασης.....	6
1.1.7.Επιδημιολογία και γεωγραφική κατανομή.....	9
1.2.Διάγνωση.....	12
1.2.1.Καλλιέργεια και μικροσκοπική παρατήρηση.....	12
1.2.2 Ανοσολογική διάγνωση.....	12
1.3.Θεραπεία.....	15
1.3.1.Πεντασθενές αντιμόνιο (sb).....	15
1.3.2.Αμφοτερίνη Β.....	16
1.3.3.Πενταμιδίνη.....	16
1.3.4.Παρομομυκίνη.....	16
1.3.5.Μιτελφοσίνη.....	17
1.3.6.Πρωτεϊνικές κινάσες ως φαρμακευτικοί στόχοι.....	17
1.4.Κινάσες της οικογένειας DYRK.....	18
1.4.1.Γενικά.....	18
1.4.2.Οι κινάσες DYRK στα θηλαστικά.....	21
1.4.3.Οι κινάσες DYRK στη <i>Drosophila melanogaster</i> .....	22
1.4.4.Οι κινάσες DYRK στον <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	22
1.4.5.Οι κινάσες DYRK στους κατώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς.....	23
1.4.6.Οι κινάσες DYRK και η DYRK1 του παρασίτου <i>Leishmania</i> .....	25
2.Σκοπός.....	27
3.Υλικά και Μέθοδοι.....	27
3.1.Υλικά.....	28
3.1.1 Εργαστηριακός εξοπλισμός.....	28
3.1.2. Αναλώσιμα υλικά.....	28
3.1.3.Αντιδραστήρια.....	28

3.1.4. Διαλύματα .....	29
3.1.5. Κυτταρικές σειρές.....	30
3.2. Μέθοδοι .....	31
3.2.1. Κυτταροκαλλιέργειες .....	31
3.2.2. Έλεγχος μολυσματικότητας παρασίτων σε μακροφάγα J774 .....	32
3.2.3. Κυτταρομετρία Ροής (FACS-Flow cytometry analysis) .....	32
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	35
5. Συζήτηση-Συμπεράσματα.....	49
6. Περίληψη .....	52
7. Βιβλιογραφία.....	55



## ***Ευχαριστίες***

---

Ευχαριστώ θερμά την επιβλέπουσα ερευνήτρια δρ.Δ.Σμυρλή για την επιστημονική καθοδήγηση που μου παρείχε καθώς και για την υπομονή και την στήριξη της στην όλη προσπάθεια ολοκλήρωσης της διπλωματικής μου εργασίας. Ακόμη, ευχαριστώ τον υπεύθυνο καθηγητή κ.Γ.Διαλλινά για την εμπιστοσύνη και την καθοριστική συμβολή του στην διεκπόνηση αυτής της εργασίας.







## 1.Εισαγωγή

### 1.1 Το παράσιτο και η νόσος Λεισμανίασης

#### 1.1.1. Γενικά στοιχεία

Η λεισμανίαση είναι μια ασθένεια με παγκόσμια διάπλωση που οφείλεται στο πρωτόζωο του γένους *Leishmania* και μεταδίδεται μέσω της θηλυκής μολυσμένης σκνίπας. Τα παράσιτα *Leishmania* αποτελούν μια διακριτή ομάδα παρασίτων που φέρουν μαστίγιο. Ο φορέας-ξενιστής μπορεί να ανήκει στο γένος *Phlebotomus* το οποίο εντοπίζεται στον Παλαιό Κόσμο (Άνω και Μέση Ανατολή, κεντρική, δυτική και ανατολική Ευρώπη και Αφρική) ή στο γένος *Lutzomyia* στο Νέο Κόσμο (κεντρική και νότια Αμερική).

Η λεισμανίαση είναι ανθρωποζωνόσος. Ρόλο τελικού ξενιστή παίζουν διάφορα θηλαστικά όπως ο άνθρωπος, ο σκύλος ή είδη τρωκτικών. Η νόσος εμφανίζεται σε διάφορες μορφές μεταξύ αυτών η πιο συχνή είναι η δερματική λεισμανίαση ενώ η σπλαγχνική λεισμανίαση που προσβάλλει εσωτερικά όργανα αποτελεί την πιο κρίσιμη μορφή η οποία μπορεί να οδηγήσει σε θάνατο, αν δεν ληφθεί θεραπεία. Άλλες κλινικές μορφές της ασθένειας είναι η περιοδική, η διάχυτη και βλεννογοδερματική λεισμανίαση.

#### 1.1.2. Ιστορική αναδρομή

Στην ανακάλυψη του παρασίτου *Leishmania* συνέβαλαν δύο επιστήμονες. Πιο συγκεκριμένα, ο William Boog *Leishman* ο οποίος ήταν Σκωτσέζος στρατιωτικός ιατρός, και ο καθηγητής Φυσιολογίας στο πανεπιστήμιο Madras, Charles Donovan. Αρχικά ο *Leishman* το 1900 παρατήρησε το παθογόνο παράσιτο σε επίχρισμα αίματος ανθρώπου που πέθανε από την ασθένεια που προκαλούσε αυτό. Πέρασε αρκετός καιρός και η δημοσίευση της έρευνας του έγινε το 1903, όταν ο *Donovan* επίσης παρατήρησε το παράσιτο σε επίχρισμα αίματος από ασθενή που βρισκόταν σε θανάσιμο στάδιο. Προς τιμή των δύο επιστημόνων το παράσιτο πήρε το όνομα *Leishman-Donovan*. Πριν την ανακάλυψη του παρασίτου η ασθένεια που προκαλούσε αποκαλούνταν *Kala-azar* (στα ινδικά:μαύρος πυρετός) και *Dum-Dum*. Σήμερα η ασθένεια είναι γνωστή με το όνομα λεισμανίαση (*Weyers, 2016*).

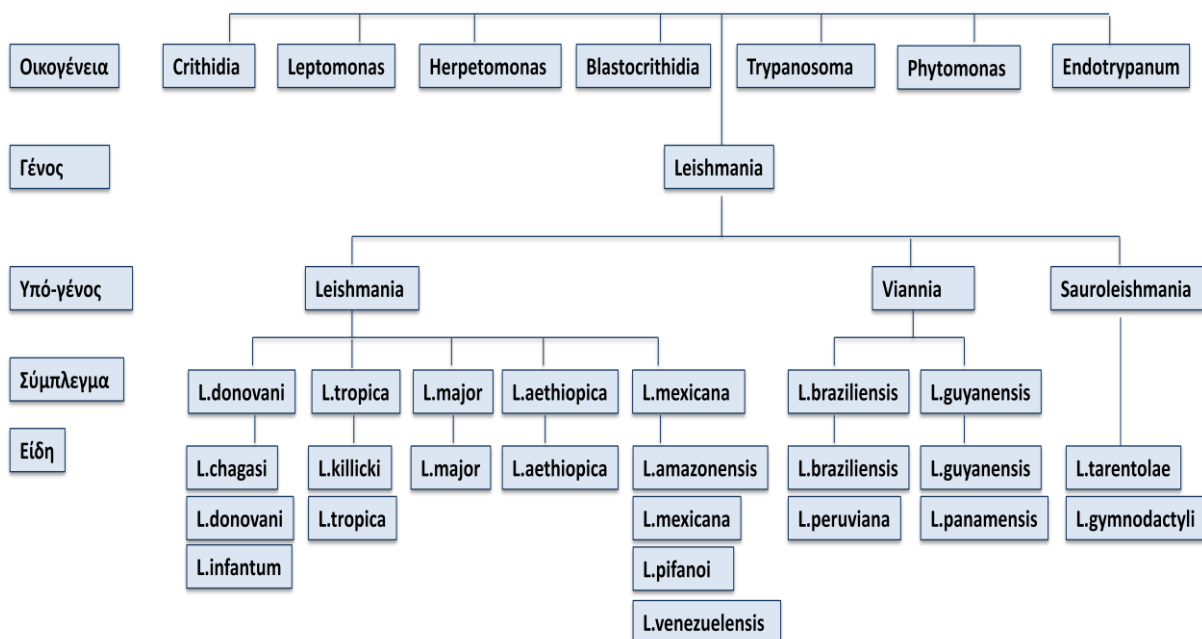
#### 1.1.3 Προέλευση και συστηματική κατάταξη του γένους *Leishmania*

Η κατάταξη των ειδών του γένους *Leishmania* πραγματοποιήθηκε έπειτα από μελέτες που βασίζονταν στην οικολογική και γεωγραφική εξέλιξη αυτών καθώς και σε μοριακές μεθόδους και αναλύσεις που αφορούσαν την εξέλιξη του παρασίτου σε σχέση με τον ξενιστή (*Kerr, 2006*). Διαπιστώθηκε πως η εμφάνιση του πρωτόζωου χρονολογείται την περίοδο όπου η Γη καλύφθηκε με νερό και οι συγκεντρώσεις οξυγόνου ήταν χαμηλές (*Cavalier-Smith, 2006; Scamardella, 1999*). Πιθανόν οι πρώτοι ξενιστές να ήταν ψάρια και αμφίβια. Όμως με την πάροδο του χρόνου, εμφανίστηκαν τα πρώτα έντομα με ικανότητα πτήσης τα οποία σε προνυμφικό στάδιο συμβίωναν σε περιβάλλον με ελεύθερους μαστιγοφόρους οργανισμούς με χαρακτηριστικά τρυπανοσωματίδων (*Cavalier-Smith, 2006; Poinar & Poinar, 2004a, 2004b; Poinar Jr, 2007*;

Scamardella, 1999). Τα μαστιγοφόρα παράσιτα προσαρμόστηκαν να συμβιώνουν στον οργανισμό των εντόμων και πλέον τα ενήλικα έντομα ήταν ικανά να μεταφέρουν το παράσιτο στα σπονδυλόζωα (Tuon, Neto, & Amato, 2008). Παρακάτω φαίνεται αναλυτικά η συστηματική κατάταξη και η σύγχρονη ταξινόμηση των ειδών του γένους *Leishmania* (Real et al., 2013) (Εικόνα 1,2).

Βασίλειο	Πρώτιστα
Συνομοταξία	Σαρκομαστιγοφόρα
Υποσυνομοταξία	Μαστιγοφόρα
Κλάση	Ζωομαστιγοφόρα
Τάξη	Κινητοπλαστίδια
Υπό-τάξη	Τρυπανοσωματίνες
Οικογένεια	Τρυπανοσωματίδες

Εικόνα 1. Συστηματική κατάταξη του παρασίτου *Leishmania*



Εικόνα 2. Συστηματική κατάταξη των ειδών του γένους *Leishmania*

#### 1.1.4 Ενδιάμεσος ξενιστής του παρασίτου

Σήμερα είναι πλέον γνωστό ότι οι ενδιάμεσοι ξενιστές (φορείς) του παρασίτου *Leishmania* είναι τα δίπτερα έντομα του γένους *Phlebotomus* και *Lutzomyia* (σκνίπες)(Εικόνα 3). Η μετάδοση της οφείλεται στις θηλυκές σκνίπες διότι καταναλώνουν γεύματα αίματος προκειμένου να γεννήσουν τα αυγά τους. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας ([WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniases. & World Health Organization., 2010](#)) από τα 800 περίπου γνωστά είδη, τα 93 από αυτά είναι υπεύθυνα για την μετάδοση της Λείσμανιάσης.

Η δράση των εντόμων είναι ιδιαίτερα ενεργή τους ζεστούς μήνες του καλοκαιριού στην περιοχή της Μεσογείου. Τα περισσότερα είδη απομυζούν αίμα σε εξωτερικούς χώρους από το σούρουπο μέχρι την αυγή ([Galvez et al., 2010](#)). Ωστόσο υπάρχουν είδη τα οποία δραστηριοποιούνται σε εσωτερικούς χώρους στο φως της ημέρας. Φαίνεται ότι οι σκνίπες που φέρουν το παράσιτο *Leishmania* τείνουν να τρέφονται αρκετές φορές από τον ίδιο ξενιστή γεγονός το οποίο αυξάνει την πιθανότητα μετάδοσης ([Ready, 2013](#)). Ωστόσο, οι σκνίπες μπορούν να πετούν κάθετα κατορθώνοντας να διανύουν μικρές αποστάσεις λιγότερο από 1 μέτρο με αποτέλεσμα να περιορίζεται η ικανότητα απομύζησης αίματος από άτομα που βρίσκονται σε υψηλότερο σημείο ([Hewitt, Reyburn, Ashford, & Rowland, 1998](#)).

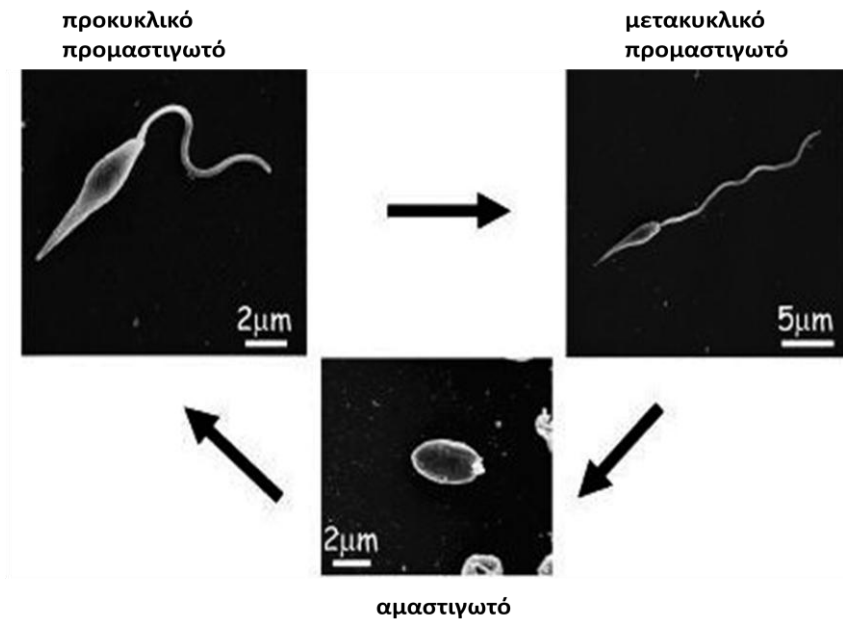


Εικόνα 3. Ο ενδιάμεσος ξενιστής: *Lutzomyia spp* (αριστερά), *Phlebotomus spp* (δεξιά)

#### 1.1.5 .Κύκλος ζωής του παρασίτου *Leishmania*

Ο κύκλος ζωής του παρασίτου *Leishmania* περιλαμβάνει την εναλλαγή μεταξύ ενός σπονδυλωτού (θηλαστικά) και όπως έχει αναφερθεί ενός ασπόνδυλου ξενιστή (σκνίπα) Η σκνίπα χαρακτηρίζεται ως διαβιβαστής καθώς είναι υπεύθυνη για την φυσική μετάδοση του παρασίτου από ξενιστή σε ξενιστή κατά την απομύζηση αίματος μέσω νύγματος. Τα θηλαστικά αποτελούν τον τελικό ξενιστή και είναι οι οργανισμοί οι οποίοι εκδηλώνουν τα συμπτώματα της ασθένειας που προκαλεί το παράσιτο. Τα παράσιτα προκειμένου να εξασφαλίσουν την επιβίωση τους στο εσωτερικό των δύο ξενιστών υφίστανται μορφολογικές και λειτουργικές αλλαγές. Υπάρχουν τρεις κύριες μορφολογικές μορφές: η ενδοκυτταρική αμαστιγωτή που εντοπίζεται στο εσωτερικό των θηλαστικών και οι δύο εξωκυτταρικές μορφές στο έντερο της σκνίπας, η προκλυκτική προμαστιγωτή

και η μετακυκλική προμαστιγωτή όπου τα κύτταρα φέρουν μαστίγιο (Killick-Kendrick, 1990) (Εικόνα 4).



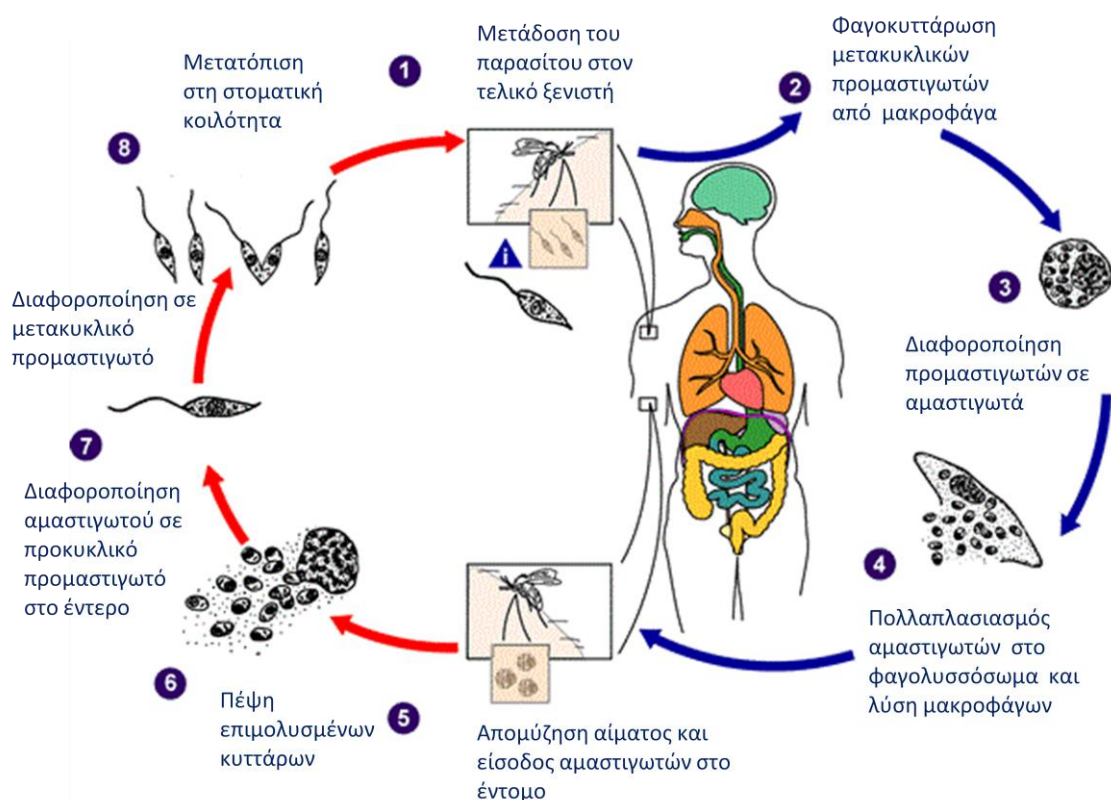
**Εικόνα 4. Μορφολογικά στάδια του παρασίτου *Leishmania*. Φωτογραφίες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (Besteiro, 2007)**

Μόλις η ενήλικη σκνίπα θηλυκού γένους απομυζήσει αίμα από τον μολυσμένο σπονδυλωτό ξενιστή, τα κύτταρα βρίσκονται στην προκυκλική αμαστιγωτή μορφή και αμέσως μεταφέρονται στο οπίσθιο κοιλιακό έντερο. Εκεί, τα αμαστιγωτά μετατρέπονται σε μικρά βραδυκίνητα προκυκλικά προμαστιγωτά παράσιτα με κοντό μαστίγιο. Έπειτα ξεκινούν τον πρώτο πολλαπλασιασμό τους στο εσωτερικό της σκνίπας. Αυτή η μορφή των παρασίτων υπάρχει αρχικά στο αίμα που απομύζησε το έντομο και διαχωρίζεται από το έντερο μέσω του τύπου I περιτροφικής μήτρας (type 1 peritrophic matrix)(PM). Κατόπιν, προκειμένου τα κύτταρα να μεταναστεύσουν στο πρόσθιο έντερο τα προκυκλικά παράσιτα μεταπίπτουν στις λεγόμενες νεκτομονάδες. Οι νεκτομονάδες είναι μεγαλύτερα και λεπτά κύτταρα των οποίων η λειτουργία είναι να διαπερνούν την περιτροφική μήτρα (PM), αγκυροβολούν στα επιθηλιακά κύτταρα που περιβάλλουν το μεσεντέριο και καταλήγουν στο πρόσθιο θωρακικό έντερο (Rogers, Chance, & Bates, 2002). Εκεί, οι νεκτομονάδες μειώνουν το μήκος τους και μετατρέπονται σε κύτταρα που χαρακτηρίζονται ως λεπτομονάδες και υπόκεινται σε δεύτερο κύκλο πολλαπλασιασμού στο εσωτερικό της σκνίπας. Τελικά τα παράσιτα μετακινούνται στη στοματική κοιλότητα του εντόμου και εντοπίζονται ως μετακυκλικά προμαστιγωτά παράσιτα. Τα μετακυκλικά αποτελούν την μολυσματική μορφή και έχοντας εξέλθει από τον κυτταρικό κύκλο, σταματούν να πολλαπλασιάζονται. Έχουν μικρό σώμα με επιμήκη μαστίγιο και χαρακτηρίζονται από ελεύθερη, γρήγορη κίνηση μια προσαρμογή που βοηθά στην αποτροπή λύσης τους από το συμπλήρωμα και επιπλέον την επιτυχή μετάδοση τους στον τελικό ξενιστή (Kamhawi, 2006).

Ο κύκλος ζωής συνεχίζεται όταν κατά την διάρκεια πρόσληψης της τροφής η σκνίπα μεταφέρει ξανά στο αίμα του σπονδυλωτού ξενιστή τα μολυσματικά παράσιτα (Besteiro, Williams, Coombs, &

Mottram, 2007). Με αυτόν τον τρόπο τα προμαστιγωτά μετακυκλικά προσλαμβάνονται από τα μακροφάγα/μονοπύρρηνα κύτταρα των ιστών και του δέρματος για φαγοκυττάρωση. Τα προμαστιγωτά μετατρέπονται σε αμαστιγωτά, αποκτούν στρογγυλό σχήμα και το μαστίγιο μικραίνει ώσπου χάνεται και τα παράσιτα δεν έχουν πλέον την ικανότητα κίνησης (Anez et al., 2003).

Αυτή η διαφοροποίηση ευνοείται από το γεγονός ότι το φαγολυσσόσωμα των μακροφάγων είναι άφθονο σε οξυγόνο και πλούσιο σε αμινοξέα, έχει όξινο pH (pH=5) (συνθήκες στις οποίες τα αμαστιγωτά παράσιτα έχουν προσαρμοστεί των μεταβολισμό τους και έχουν αποκτήσει ανθεκτικότητα στην πρωτεόλυση) και θερμοκρασία 37°C. Τελικά, το παρασιτικό φορτίο ανά μακροφάγο αυξάνεται υπέρμετρα (20-100) παράσιτα (ανάλογα το είδος) ώστε να προκληθεί λύση των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων. Κατά συνέπεια, τα αμαστιγωτά απελευθερώνονται στους περιφερειακούς ιστούς όπου προσλαμβάνονται από τα μη μολυσμένα μακροφάγα. Τόσο τα παράσιτα όσο και τα μολυσμένα μακροφάγα μπορούν να υποβληθούν σε μετάσταση είτε στο εσωτερικό του δέρματος είτε στα σπλαγχνικά όργανα προκαλώντας την εκδήλωση των διαφόρων μορφών της νόσου (Killick-Kendrick, Molyneux, & Ashford, 1974).



Εικόνα 5. Σχηματική απεικόνιση του κύκλου ζωής του παρασίτου *Leishmania* στον άνθρωπο και τον ενδιάμεσο ξενιστή (<http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.htm>)

### 1.1.6.Κλινική μορφή της λεισμανίασης

Οι κλινικές μορφές της λεισμανίασης φαίνονται παρακάτω και σχετίζονται με συγκεκριμένα είδη παρασίτων (πίνακας 1):

- Δερματική (cutaneous leishmaniasis, CL)
- Βλεννογοδερματική (mucocutaneous, MCL)
- Σπλαγχνική (visceral leishmaniasis, VL)
- Διάχυτη δερματική λεισμανίαση (DCL, diffused cutaneous leishmaniasis)

Η δερματική είναι πιο διαδεδομένη μορφή ενώ η σπλαγχνική αποτελεί την πιο σοβαρή μορφή της νόσου και είναι συνήθως θανατηφόρα. Η μετα καλά-αζάρ δερματική λεισμανίαση (post-kala azar diffused leishmaniasis, PKDL) αποτελεί μια επιπλοκή της σπλαγχνική λεισμανίασης.

Μορφή Λεισμανίασης	Είδος παρασίτου	
	Παλιός Κόσμος	Νέος Κόσμος
<b>Δερματική Λεισμανίαση</b>		
CL	<i>L. major</i> <i>L. tropica</i> <i>L. infantum</i>	<i>L. mexicana</i> <i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. panamensis</i>
Χρόνια μορφή (περιοδική)	<i>L. tropica</i>	<i>L. braziliensis</i>
DCL	<i>L. aethiopica</i> <i>L. major</i>	<i>L. aethiopica</i> <i>L. major</i> <i>L. mexicana</i> <i>L. L. amazonensis</i> <i>L. V. guyanensis</i> <i>L. V. braziliensis</i>
<b>Βλεννογοδερματική Λεισμανίαση</b>		
Περίπου 5 % αθεράπευτες μορφές της δερματικής λεισμανίασης (MCL)		<i>L. V. braziliensis</i> <i>L. V. peruvia</i> <i>L. V. guyanensis</i> <i>L. V. panamensis</i>
<b>Σπλαγχνική Λεισμανίαση</b>		
Σπλαγχνική μορφή (kala-azar)(VL)	<i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i>	<i>L. L. chagasi</i>
Post kala-azar δερματική λεισμανίαση (PKDL)	<i>L. donovani</i> <i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i>	<i>L. L. chagasi</i>

**Πίνακας 1. Παθογόνα παράσιτα Leishmania ανά τον κόσμο και η συσχέτιση τους με τις κλινικές μορφές της Λεισμανίασης (Von Stebut,2015)**



### **Δερματική Λεισμανίαση (cutaneous leishmaniasis, CL)**

Τα συμπτώματα της CL εντοπίζονται σε ακάλυπτα σημεία του σώματος όπως το πρόσωπο, τους αγκώνες και τα άκρα των ποδιών (Εικόνα 6). Στην απλή της μορφή εμφανίζεται ως οζώδης ή ελκώδης δερματίτιδα στο σημείο το οποίο εκτέθηκε στο έντομο ή κοντά σε αυτό και τα πρώτα συμπτώματα παρουσιάζονται έπειτα από βδομάδες έως μήνες. Αντίθετα στη διάχυτη δερματίτιδα η βλάβη υφίσταται σε ποικίλα μεγέθη και συνήθως μακριά από το σημείο δράσης του εντόμου. Το ιδιαίτερο γνώρισμα της απλής δερματικής λεισμανίασης είναι ότι συχνά αυτοθεραπεύεται όμως σε μερικές περιπτώσεις μπορεί να εξελιχθεί και να προσβάλλει τον βλεννογοδερματικό ιστό (David & Craft, 2009). Ωστόσο, με την κατάλληλη αγωγή μπορεί να επιταχυνθεί η θεραπεία της και να αποφευχθεί η επιδείνωση της νόσου (McGwire & Satoskar, 2014).



**Εικόνα 6. Κλινική μορφή δερματικής λεισμανίασης στον άνθρωπο**

### **Βλεννογοδερματική Λεισμανίαση (mucocutaneous leishmaniasis, MLC)**

Αυτή η μορφή της νόσου προκαλείται λόγω επέκτασης ή μετάστασης του παρασίτου από την τοπική δερματική βλάβη και διείσδυσης αυτού στον ιστό της βλεννογόνου. Η ασθένεια εκδηλώνεται μετά από βδομάδες έως μήνες από την αντιμετώπιση των πρώιμων συμπτωμάτων της δερματικής (McGwire & Satoskar, 2014). Η χρόνια τοπική καταστροφή του ιστού της μύτης, του στόματος, των βλεφάρων, του στοματοφάρυγγα και του ρινοφάρυγγα οδηγεί σε παραμορφώσεις του ρινοφάρυγγα με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η φυσιολογική λειτουργία της αναπνευστικής λειτουργίας και της διατροφής (de Oliveira & Brodskyn, 2012). Η ασθένεια συχνά δεν αναταποκρίνεται στη χημειοθεραπεία με απακόλουθο οι ασθενείς να πεθαίνουν λόγω της υπέρλοιμωξης και του υποσιτισμού (Calvopina, Armijos, & Hashiguchi, 2004).

### **Σπλαγγχνική λεισμανίαση/Kala-azar (visceral leishmaniasis, VL)**

Η σπλαγγχνική λεισμανίαση είναι η πιο σοβαρή μορφή της νόσου και αν δεν ληφθεί θεραπεία εγκαίρως οδηγεί στο θάνατο. Η έναρξη μπορεί να είναι οξεία, υποξεία ή χρόνια. Τα συνήθη



συμπτώματα περιλαμβάνουν: πυρετό, ρίγος, νυκτερινές εφιδρώσεις, σημαντική απώλεια βάρους (καχεξία), ανορεξία, σπληνομεγαλία (με ή χωρίς ηπατομεγαλία), πανκυτταροπενία λόγω καταστολής του μυελού των οστών (αναιμία, λευκοπενία, θρομβοπενία). Μπορεί επίσης να αναπτυχθεί λεμφαδενοπάθεια. Σε σπάνιες περιπτώσεις στην Ινδία εμφανίζεται υπέρχρωση στο δέρμα του προσώπου, των άκρων και της κοιλίας. Από αυτά τα συμπτώματα προέκυψε και ο όρος «*kala-azar*», που σημαίνει μαύρος πυρετός στη γλώσσα Hindi και συχνά χρησιμοποιείται για σοβαρές περιπτώσεις. Ωστόσο όροι *kala azar* και σπλαγχνική λεισμανίαση χρησιμοποιούνται μερικές φορές αδιακρίτως (Von Stebut, 2015). Επιπλέον συμπτώματα της σπλαγχνικής λεισμανίασης φαίνεται πως είναι δερματικές ή βλεννογονικές βλάβες, ενώ άλλα συμπτώματα (οίδημα, αλλοιώσεις δέρματος και τριχών) παρουσιάζονται με την εξέλιξη της νόσου. Επιπρόσθετα, ασθενείς που έχουν λοίμωξη με HIV παρουσιάζουν άτυπες εκδηλώσεις, όπως συμμετοχή της γαστρεντερικής οδού, του αναπνευστικού συστήματος και άλλων συστημάτων (Okwor & Uzonna, 2013)

Η σπλαγχνική λεισμανίαση θεωρείται βαριά νόσος που χρήζει θεραπευτικής αγωγής καθώς είναι θανατηφόρα. Οι ασθενείς πεθαίνουν είτε άμεσα από την ασθένεια ή έμμεσα λόγω επιπλοκών (δευτερογενείς βακτηρίασης λοιμώξεως ή αιμορραγίες). Εκτιμάται ότι η θνησιμότητα κυμαίνεται από 75,95% και φτάνει έως το 100% στις αναπτυσσόμενες χώρες, εντός 2ετίας. Πάρα το γεγονός ότι η αυτό-ίαση είναι σπάνια, υπάρχουν λίγες αναφορές για ήπια, αυτό-περιοριζόμενα περιστατικά. Τα παράσιτα *Leishmania* (ως ενδοκυττάρια) έχει φανεί ότι μπορεί να παραμένουν σε ιστούς (αίμα, δέρμα, λεμφαδένες) ασυμπτωματικών ή κλινικά ιαθέντων ασθενών για δεκαετίες μετά την πρωτολοίμωξη και προκαλούν αναζωπύρωση της λοίμωξης έπειτα από ανοσοκαταστολής (McGwire & Satoskar, 2014).

### **Post-kala-azar/Δερματική Λεισμανίαση (PDKL)**

Μερικοί ασθενείς αναπτύσσουν ως επιπλοκή της VL ένα σύνδρομο δερματικής λεισμανίασης που χαρακτηρίζεται από δερματικές βλάβες, πρωτίστως κυρίως στο πρόσωπο, που αναπτύσσονται συνήθως μετά από 6 μήνες της φαινομενικής ίασης της VL (ή και νωρίτερα). Η μορφή αυτή περιγράφεται κυρίως σε περιπτώσεις λοίμωξης από *L. donovani* και παρατηρείται συνήθως στην ανατολική Αφρική (έως στο 50% των ασθενών με VL) και στη νότια Ασία, Ινδική χερσόνησο (στο 5 με 10% των ασθενών). Άτομα με αυτήν την επιπλοκή θεωρούνται δυνητική δεξαμενή μετάδοσης της VL (McGwire & Satoskar, 2014). Στον Παλαιό Κόσμο, η ασθένεια οφείλεται στο είδος *L. donovani* και το *L. infantum*. Στον Νέο Κόσμο, οφείλεται επίσης στο είδος *L. infantum* γνωστό και ως *L. chagasi* ή *L. infantum chagasi*, το οποίο βρέθηκε αρχικά στην Βραζιλία. Έχουν γίνει επίσης αναφορές για τη νασθένεια στην Μέση Ανατολή που προκαλείται από σπλαγχνοτρόπο στέλεχος του *L. tropica*, το οποίο έχει θεωρηθεί ως κλασικός εκπρόσωπος της σπλαγχνικής λεισμανίασης (Zijlstra, Musa, Khalil, el-Hassan, & el-Hassan, 2003).

Κλινικές μορφές λεισμανίασης	Είδος παρασίτου	Γεωγραφική κατανομή	Ξενιστής δεξαμενή
CL, DCL, MCL	<i>L.aethiopica</i>	Αιθιοπία, Κένυα	Ύραξ
CL, DCL	<i>L.amazonensis</i>	Ανατολικές Άνδεις	Τρωκτικά
CL, MCL	<i>L.braziliensis</i>	Ανατολικές και δυτικές Άνδεις	Τρωκτικά, σκύλος, μαρσιποφόρα
VL, PKDL	<i>L.donovani</i>	Ινδία, Μπαγκλαντές, Νεπάλ, Σουδάν, Αιθιοπία	Άνθρωπος
CL, MCL	<i>L.guyanensis</i>	Ανατολικές Άνδεις	Δενδρόβια θηλαστικά χωρίς δόντια
VL, CL	<i>L.infantum</i> <i>L.chagasi</i>	Μεσόγειος Λατινική Αμερική	Σκύλος
CL	<i>L. major</i>	Υπό-σαχάρια Αφρική, Νότια Αφρική, Μέση Ανατολή, Ιράν, Ινδία Πακιστάν	Γερβίλοι Τρωκτικά
CL, DCL, MCL	<i>L.mexicana</i>	Δυτικές Άνδεις	Τρωκτικά Μαρσιποφόρα
CL	<i>L. tropica</i>	Βόρια Αφρική Μέση Ανατολή, Ιράν, Αφγανιστάν, Βόρια και υπό-σαχάρια Αφρική	Άνθρωπος Ύραξ
CL, MCL	<i>L.panamensis</i>	Δυτικές Άνδεις	Δενδρόβια θηλαστικά χωρίς δόντια
CL, MCL	<i>L.peruviana</i>	Περού	Θηλαστικά, Τρωκτικά, Σκύλος

**Πίνακας 2.Επιδημιολογία των σημαντικότερων ειδών Leishmania**

**VL:**σπλαχνική λεισμανίαση, **CL:**δερματική λεισμανίαση, **MCL:**βλεννογονοδερματική λεισμανίαση, **DCL:**διάχυτη δερματική λεισμανίαση (Pace, 2014)

**1.1.7.Επιδημιολογία και γεωγραφική κατανομή**

Η ανθρώπινη λεισμανίαση είναι ενδημική σε 98 χώρες ανά τον κόσμο και τρεις Ηπείρου με εξαίρεση την Αυστραλία και την Ανταρκτική, ενώ είναι γεγονός ότι το βάρος των περισσότερων ασθενειών φέρουν 16 αναπτυσσόμενες χώρες (Pace, 2014).

Τα περιστατικά που αφορούν την σπλαχνική λεισμανίαση (VL) οφείλονται κυρίως στα είδη *L. infantum* και *L. donovani*. Τα άτομα που προσβάλλονται από την VL υπολογίζονται σε 0,2 έως 0,4 εκατομμύρια ετησίως. Πάνω από 90% των περιστατικών συμβαίνουν στην Ινδία (κυρίως στην πολιτεία Μπιχάρ), το Μπαγκλαντές, το Σουδάν, την Αιθιοπία και την Βραζιλία (Control of leishmaniasis, 2007; WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniases. & World Health Organization., 2010) Η θνησιμότητα της ασθένεια υπολογίζεται σε 10 έως 20%, ειδικά στις φτωχές περιοχές. Μετά την εμφάνιση του ιού HIV στη δεκαετία του 1990, υπήρξε αύξηση στα κρούσματα με συλλοίμωξη VL/HIV σε ενδημικές χώρες καθώς ο HIV αυξάνει την ευαισθησία στη σπλαχνική

λεισμανίαση(Okwor & Uzonna, 2013).

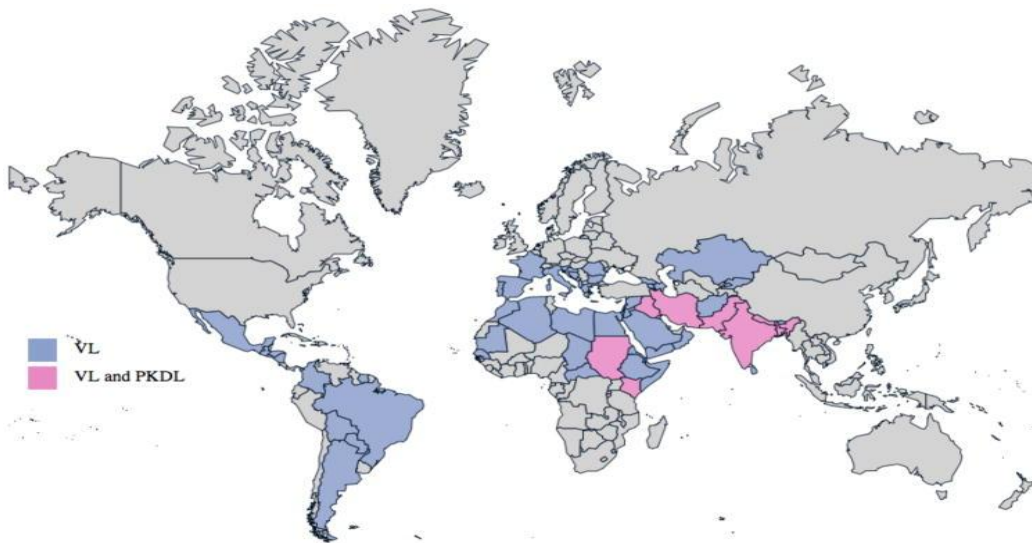
Η κλινική μορφή *Post-kala-azar* (PKDL) είναι διαδεδομένη σε περιοχές όπου το είδος *L. donovani* είναι ενδημικό, όπως η Ινδία και η Ανατολική Αφρική (Zijlstra et al., 2003). Εντοπίζεται σε ποσοστό 50 έως 60% στους Σουδανούς και σε 10 έως 20% σε ασθενείς στην Ινδία που έπασχαν από σπλαγχνική λεισμανίαση και έπειτα από 6 μήνες έως 2 με 7 έτη μετά την αρχική λοίμωξη. Από τις περιπτώσεις αυτές περίπου το 15 με 20% (Ινδία) και 8% (Σουδαν) των ασθενών παρουσίασαν την ασυμπτωματική ασθένεια (Desjeux, Ghosh, Dhalaria, Strub-Wourgaft, & Zijlstra, 2013). Έχουν αναφερθεί λίγες περιπτώσεις όπου η PKDL προκαλείται από το *L. infantum* ή το *L. tropica*. Επίσης έχει αποδειχθεί ότι η παρουσία ενός μικρού πληθυσμού μολυσμένων ατόμων (0,5%) μπορεί να οδηγήσει σε εκτεταμένη επιδημία της λοίμωξης της σπλαχνικής λεισμανίασης στην Ινδία και σε άλλες περιοχές της Ασίας. Συνεπώς, οι ασθενείς με PKDL παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξάπλωση της νόσου (Desjeux et al., 2013).

Τα περιστατικά της δερματικής λεισμανίασης (cutaneous leishmaniasis, CL) υπολογίζονται σε 0,7 έως 12 εκατομμύρια και συμβαίνουν κυρίως στα παράκτια της Μεσόγειου, την Αμερική, την Μέση Ανατολή και την Κεντρική Ασία. Πάνω από 75% των περιπτώσεων εντοπίστηκαν στις χώρες: Αφγανιστάν, Αλγερία, Κολομβία, Βραζιλία, Ιράν, Συρία, Αιθιοπία, Βόρειο Σουδάν, Κόστα Ρίκα και Περού (World Health Organization., 2010). Η ασθένεια προκαλείται από τα είδη *L. tropica*, *L. major* και *L. aethiopicum* στον Παλιό Κόσμο ή τα *L. mexicana*, *L. braziliensis* καθώς και άλλα είδη στον Νέο Κόσμο (Goto & Lauletta Lindoso, 2012). Ένας αυξανόμενος αριθμός των περιπτώσεων CL έχουν αναφερθεί σε άτομα που έχουν υπηρετήσει στον στρατό, τους διεθνείς ταξιδιώτες και σε μετανάστες. Στην πραγματικότητα η CL είναι μία από τις πιο συχνές μορφές της λεισμανίασης στο Νέο Κόσμο, και αντιπροσωπεύει περίπου το 60% όλων των περιπτώσεων στις μη ενδημικές περιοχές.

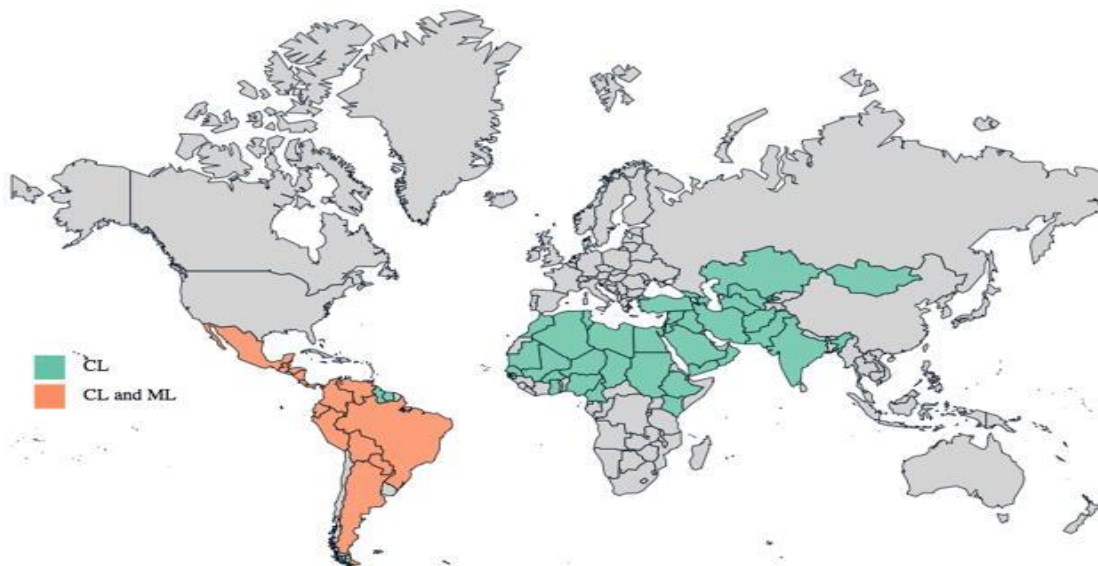
Η βλεννογροδερματική λεισμανίαση (MCL) παρουσιάζει περίπου 35,000 περιστατικά ετησίως. Έχει εντοπιστεί στην νότια Αμερική και σε μεγάλο ποσοστό στη Βραζιλία, το Περού και τη Βολιβία (World Health Organization., 2010). Σε χαμηλότερο ποσοστό βρέθηκε στην Κολομβία, την Παραγουάη, την Βενεζουέλα και το Εκουαδόρ. Στο Εκουαδόρ, οι περισσότερες περιπτώσεις αφορούν τις πεδιάδες του Αμαζονίου, με μικρότερη επίπτωση στις παράκτιες περιοχές (Calvopina et al., 2004). Η βλεννογροδερματική λεισμανίαση (MCL) και η διάχυτη δερματική λεισμανίαση (DCL) αποτελούν επιπλοκές της CL που συμβαίνουν κυρίως στο Νέο Κόσμο (S. Singh, 2006).

Στις ευρωπαϊκές χώρες μόνο δύο είδη του παρασίτου είναι ενδημικά: α) *L. infantum* το οποίο προκαλεί την ζωνοσογόνο δερματική και συστηματική λεισμανίαση στην Μεσόγειο όπου ο εγχώριος σκύλος είναι ο κύριος ξενιστής και β) *L. tropica* στο οποίο οφείλονται σποραδικές προσβολές της δερματικής λεισμανίασης σε ανθρώπους, κυρίως στην Ελλάδα (Ready, 2010). Άλλες Ευρωπαϊκές χώρες που έχουν αναφερθεί περιστατικά τοπικής μετάδοσης της νόσου (αυτόχθονα περιστατικά) περιλαμβάνουν την Πορτογαλία, την Ισπανία, τη Γαλλία, την Ιταλία, την Ελλάδα, τη Μάλτα, τη Κύπρο, τη Κροατία, την Αλβανία, τη Βουλγαρία και την Τουρκία. Η επιβάρυνση της νόσου είναι χαμηλή καθώς μόνο 2752 κρούσματα αφορούσαν χώρες της Νότιας Ευρώπης, τα 2237 από αυτά εντοπίστηκαν την Τουρκία (Pace, 2014).

Γενικά, υπολογίζεται ότι η νοσηρότητα από όλες τις μορφές της λεισμανίασης σε όλες τις ηλικίες εκτιμάται ότι φτάνει τον αριθμό 3, 500,000 (Pace, 2014).



**Εικόνα 7. Παγκόσμια εξάπλωση της VL και PKDL σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniases. & World Health Organization., 2010)**



**Εικόνα 8. Παγκόσμια εξάπλωση της CL και MCL σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniases. & World Health Organization., 2010).**

## 1.2. Διάγνωση

---

### Διάγνωση δερματικής και βλεννογοδερματικής λεισμανίασης

Η διάγνωση της CL και MCL πραγματοποιείται στο εργαστήριο με τη μέθοδο μικροσκοπίας όπου γίνεται άμεση αναγνώριση των αμαστιγωτών από μολυσμένα δείγματα που προήλθαν είτε από βιοψία είτε από κατάλοιπα ή αποτυπώματα βιοψίας πρώτα δείγματα χρησιμοποιούνται για μικροσκοπία και τα τελευταία για καλλιέργεια ώστε να ελαχιστοποιηθεί ο κίνδυνος μόλυνσης (Vega-Lopez, 2003). Επίσης, άλλη τεχνική διάγνωσης είναι η ανίχνευση αντιλεισμανικών αντισωμάτων με ορολογικές εξετάσεις όμως η μέθοδος δεν εφαρμόζεται σε ασθενείς που πάσχουν από AIDS καθώς τα αντισώματα έχουν την τάση να είναι μη ανιχνεύσιμα ή να υπάρχουν σε χαμηλούς τίτλους γεγονός που οφείλεται σε κακή χυμική απόκριση (Ahluwalia, Lawn, Kanagalingam, Grant, & Lockwood, 2004; Romero et al., 2005). Τέλος, η καλλιέργεια και ανίχνευση του DNA με PCR θεωρούνται ευαίσθητες τεχνικές αλλά δεν είναι επί του παρόντος πρακτικές στις αναπτυσσόμενες χώρες.

### Διάγνωση σπλαγχνικής λεισμανίασης

Για την διάγνωση της σπλαγχνικής λεισμανίασης πραγματοποιούνται οι παρακάτω μέθοδοι:

- Η μικροσκοπική παρατήρηση σε επιχρίσματα ιστών και κυτταροκαλλιέργειες.
- Η ανοσολογική διάγνωση του παρασίτου η οποία περιλαμβάνει την ανίχνευση μέσω ειδικών αντιγόνων στα ούρα, στο αίμα και σε ιστούς καθώς και την ανίχνευση ειδικών και μη αντι-λεισμανιακών αντισωμάτων.
- Η μοριακή μέθοδος διάγνωσης που περιλαμβάνει την ανίχνευση του γενετικού υλικού του παρασίτου σε δείγματα ιστών.

#### 1.2.1. Καλλιέργεια και μικροσκοπική παρατήρηση

---

Κατάλληλα και αξιόπιστα δείγματα προέρχονται από τον σπλήνα ή τον μυελό των οστών. Επιπλέον δείγματα για την ανίχνευση των αμαστιγωτών μπορούν να ληφθούν από το ήπαρ, τους λεμφαδένες και από στρώμα λεμφοκυττάρων του περιφερειακού αίματος. Για να αυξηθεί η ευαισθησία της διάγνωσης χρησιμοποιούνται αντισώματα τα οποία είναι συζευγμένα με φθορίζουσα χρωστική (Zijlstra et al., 1992). Αντίθετα, τα επιχρίσματα από το περιφερειακό αίμα εμφανίζουν χαμηλή ευαισθησία, ιδιαίτερα σε άτομα με χαμηλή παρασιταίμια. Επιπλέον, τα αποτελέσματα εξαρτώνται από την σωστή και αποτελεσματική εκτέλεση της τεχνικής, καθώς και από την ποιότητα της αντικειμενοφόρου. Η βελτίωση της διαγνωστικής ευαισθησίας πραγματοποιείται με την καλλιέργεια του παρασίτου. Ωστόσο, η διαδικασία είναι επίπονη, χρονοβόρα και δαπανηρή και επομένως σπάνια χρησιμοποιείται για κλινική διάγνωση.

#### 1.2.2 Ανοσολογική διάγνωση

---

Η ανοσολογική διάγνωση βασίζεται στην παραγωγή υψηλών τίτλων αντισωμάτων που παράγονται ως απόκριση στην χυμική ανοσία έπειτα από μόλυνση από το παράσιτο *Leishmania* στον οργανισμό του θηλαστικού ξενιστή. Τα αντισώματα αυτά είναι ειδικά έναντι του παρασίτου και μπορούν να ανιχνευθούν με διάφορες ορολογικές δοκιμές. Οι ανοσολογικές μέθοδοι είναι



απλές και μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνο για την διάγνωση της διάχυτης και σπλαχνικής λεισμανίασης. Στην περίπτωση της δερματικής λεισμανίασης είναι αδύνατη η εφαρμογή τους αφού τα παράσιτα βρίσκονται σε ελεύθερη μορφή.

Διακρίνονται δύο κατηγορίες ανοσολογικής διάγνωσης. Η ανίχνευση αντιγόνου και η ορολογική διάγνωση όπου γίνεται η ανίχνευση των αντισωμάτων.

### **Ανίχνευση αντιγόνου στα ούρα**

Όπως έχει αποδειχθεί από αρκετές μελέτες οι ασθενείς με σπλαχνική λεισμανίαση φέρουν στα ούρα τους αντιγόνα έναντι του παρασίτου λεισμάνια. Στην περίπτωση που τα παραχθέντα αντισώματα είναι επαρκή η διάγνωση γίνεται με τη μέθοδο, δοκιμή συγκόλλησης Latex (LAT), η οποία αποτελεί μία από της πιο πρόσφατα ανεπτυγμένες δοκιμές με κύριο χαρακτηριστικό τη δυνατότητα διάγνωσης σε σύντομο χρονικό διάστημα (Elmahallawy et al., 2014). Η τεχνική βασίζεται στην ανίχνευση αντισωμάτων έναντι του αντιγόνου A<sub>2</sub> που προέρχεται από την αμαστιγωτή μορφή του παρασίτου καθώς και σε αντιγόνα που προέρχονται από συνολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα που εντοπίζονται στην προμαστιγωτή μορφή ενός ιρανικού στελέχους *L. infantum*. Γενικά, η LAT θεωρείται μια απλή και εύκολη στην εκτέλεση της δοκιμασία και επιπλέον είναι φθηνή και γρήγορη με αποτέλεσμα να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διαγνωστική δοκιμή.

### **Ορολογική διάγνωση**

Η ορολογικές δοκιμές βασίζονται στην ειδική χυμική απόκριση. Γενικά, φαίνεται πως η ευαισθησία των ορολογικών δοκιμών εξαρτάται από την δοκιμασία και την μεθοδολογία άλλα η ειδικότητα είναι συνυφασμένη με το αντιγόνο. Επιπλέον, αναφέρεται πως όλες οι δοκιμές ανίχνευσης αντισωμάτων μοιράζονται τα ίδια μειονεκτήματα. Τα αντισώματα παραμένουν θετικά για μήνες αφού ο ασθενής έχει θεραπευτεί και δεν κάνουν διάκριση μεταξύ της τρέχουσας και της προηγούμενης λοίμωξης. Σε ενδημικές περιοχές, ασυμπτωματικά μολυσμένα άτομα μπορεί επίσης να είναι θετικά σε αυτές τις δοκιμές. Για την ανίχνευση της ασθένειας είναι δυνατόν να πραγματοποιηθούν μία από τις τέσσερις τρέχουσες ορολογικές δοκιμές:

- **Δοκιμασία IFAT (Immunofluorescence antibody Test).** Χρησιμοποιείται αντιγόνα που προέρχονται από συνολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα προμαστιγωτών μορφών *L. infantum* (CSA). Το αντίσωμα είναι δυνατόν να ανιχνευτούν πολύ νωρίς έπειτα από την μόλυνση ενώ μετά από 6 έως 9 μήνες θεραπείας είναι μη ανιχνεύσιμο. Συνεπώς, εάν τα αντισώματα βρίσκονται παρατεταμένα σε χαμηλούς τίτλους τότε υπάρχει ένδειξη υποτροπής (S. Singh & Sivakumar, 2003).
- **Ανοσοενζυμική δοκιμασία ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).** Για την εκτέλεση της τεχνικής χρησιμοποιείται συχνά το αντιγόνο CSA το οποίο αυξάνει την ειδικότητα, αφού η τεχνική από μόνη της εμφανίζει υψηλή ευαισθησία (Rajasekariah et al., 2001; Ryan et al., 2002).
- **Ανοσοαποτυπώματος κατά Western.** Κατά την εκτέλεση της μεθόδου απομονώνονται προμαστιγωτά κύτταρα που βρίσκονται στην λογαριθμική φάση, λύνονται και έπειτα γίνεται διαχωρισμός των πρωτεϊνών οι οποίες μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Από την

τεχνική αυτή φαίνεται η λεπτομερής απόκριση των αντισωμάτων σε διάφορα παρασιτικά αντιγόνα (Brito, Mendonca, Gomes, Jardim, & Abath, 2000; Ravindran et al., 2004).

- Δοκιμασία άμεσης συγκόλλησης (direct agglutination test, DAT). Βασίζεται στην άμεση συγκόλληση των προμαστιγωτών τα οποία αντιδρούν ειδικά με αντί-λεϊσμανιακά αντισώματα. Υπάρχουν σημαντικοί περιορισμοί στη χρήση αυτής της μεθόδου όπως το μεγάλο χρονικό διάστημα επώασης (18 ώρες) καθώς και οι διαδοχικές αραιώσεις (Gomez-Ochoa et al., 2003).

### Μοριακή μέθοδος διάγνωσης (PCR-Polymerase chain reaction)

Παρά τις διάφορες μοριακές τεχνικές που έχουν χρησιμοποιηθεί για την διάγνωση της λείσμανιασης η πιο κοινή είναι η τεχνική της PCR η οποία είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική σε ασθενείς που βρίσκονται σε καταστολή (Antinori et al., 2007; Lachaud et al., 2000; Piarroux et al., 1994). Μία επίσης ενδιαφέρουσα προσέγγιση αποτελεί μια ταχεία τεχνική φθορίζουσας PCR, η οποία βασίζεται στην χρήση ενός φθορίζοντα ανιχνευτή DNA για ένα συντηρημένο γονίδιο rRNA (Wortmann et al., 2001). Επιπλέον, η τεχνική PCR πραγματικού χρόνου έχει το πλεονέκτημα ότι είναι ποσοτική και θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την παρακολούθηση της θεραπείας, επιτρέποντας την εκτίμηση της ποσότητας του παρασίτου (Bossolasco et al., 2003; Mary, Faraut, Lascombe, & Dumon, 2004). Η ευαισθησία της PCR εξαρτάται από το δείγμα και τους εκκινητές. Τα δείγματα για την ανίχνευση του DNA των παρασίτων με την χρήση της PCR προέρχονται από τον σπλήνα, τον λεμφαδένα, τον μυελό των οστών, το αίμα και το στρώμα λεμφοκυττάρων (da Silva, Gontijo, Pacheco Rda, & Brazil, 2004; Gangneux et al., 2003; Liarte et al., 2001; Martin-Sanchez et al., 2004; Otero et al., 2000; Owens et al., 2001; Wortmann et al., 2001). Οι αλληλουχίες στόχοι περιλαμβάνουν τα γονίδια ριβοσωμικού RNA, DNA κινητοπλάστη, mini-εξώνιο προερχόμενο από RNA (medRNA) και την περιοχή του γονιδίου β-Ζουμπουλάκης.

Μέθοδος διάγνωσης	Ευαισθησία (%)	Ειδικότητα (%)
<b>Μικροσκοπία</b>	50-70 (Παλαιό Κόσμο) 15-30 (Νέο Κόσμο)	100
<b>Κυτταροκαλλιέργεια</b>	41-89	100
<b>Ανίχνευση αντιγόνου</b>		
<b>Δοκιμασία Latex</b>	79-100 (VL)	60-100
<b>ELISA</b>	60-88 (Παλαιό Κόσμο) 66,9 (Νέο Κόσμο-CL) 93,3 (Νέο Κόσμο-MCL)	50-63
<b>Ανίχνευση αντισώματος</b>		
<b>IFAT</b>	27,7 (CL) 56,7 (MCL) 87-100 (VL)	81 (CL, MCL) 77-100 (VL)

<i>Western blot</i>	90-95 (VL)	98-100
<i>DAT</i>	85-100(VL)	91-100
<b>Μοριακές τεχνικές</b>		
<i>PCR</i>	100(CL) 97,1(MCL) 93,1(VL)	95,6

**Πίνακας 4. Συγκεντρωτικός πίνακας της αξιοπιστίας των διαφόρων μεθόδων διάγνωσης της λεισμανίασης.** **ELISA:** Enzyme-linked immunosorbent assay, **IFAT:** Immunofluorescence antibody Test, **PCR:** Polymerase chain reaction, **DAT:** direct agglunation test (Elmahallawy et al., 2014; Torpiano & Pace, 2015)

### 1.3. Θεραπεία

Φάρμακα κατά της Λεισμανίασης

Καθώς δεν υπάρχουν σήμερα εμβόλια για τον άνθρωπο κατά της λεισμανίασης ο μόνος τρόπος ελέγχου και αντιμετώπισης της νόσου είναι η χημειοθεραπεία. Παρακάτω περιγράφονται τα λίγα εγκεκριμένα φάρμακα κατά της λεισμανίασης που χρησιμοποιούνται σήμερα για τη θεραπεία της.

#### 1.3.1. Πεντασθενές αντιμόνιο (*sb*)

Το φάρμακο αυτό αποτελεί το πιο συχνό φάρμακο για την θεραπεία της λεισμανίασης τόσο της σπλαχνικής όσο και της δερματικής (Marovich et al., 2001; Okwor & Uzonna, 2013; Oliveira-Neto, Mattos, Souza, Fernandes, & Pirmez, 1998; ter Horst, Collin, Ritmeijer, Bogale, & Davidson, 2008). Το φάρμακο υφίσταται ως meglumine antimonate (εμπορική ονομασία 'Glucantime') ή sodium stibogluconate (εμπορική ονομασία Pentostam). Ο ακριβής μηχανισμός δράσης του αντιμονίου κατά της λεισμανίασης δεν είναι πλήρως κατανοητός όμως είναι πιθανό να δρά και στο παράσιτο αλλά και στα κύτταρα του ξενιστή αυξάνοντας τη παρασιτοκτόνο δράση τους (Baiocco, Colotti, Franceschini, & Ilari, 2009).

Λόγω της συσσώρευσης στους ιστούς το αντιμόνιο μπορεί να προκαλέσει σοβαρές παρενέργειες. Σ' αυτές περιλαμβάνονται ο εμετός, η ναυτία, η ανορεξία, η μυαλγία, ο πόνος στην κοιλιά, η κεφαλαλγία, η αρθραλγία και ο λήθαργος. Σπάνια μπορεί να προκαλέσει θανατηφόρο καρδιακή αρρυθμία (Berman, 1997; Croft & Coombs, 2003; Croft & Yardley, 2002; Melaku et al., 2007; Thakur, Narayan, & Ranjan, 2004). Οι ανεπιθύμητες παρενέργειες οφείλονται σε καρδιοτοξικότητα, παγκρεατίτιδα και νεφροτοξικότητα ενώ απαιτούν νοσηλεία και στενή παρακολούθηση των ασθενών (Croft & Coombs, 2003; Freitas-Junior, Chatelain, Kim, & Siqueira-Neto, 2012; van Griensven et al., 2010). Δυστυχώς, μετά από μια μακρά περίοδο η θεραπεία σταματά λόγω των δυσμενών επιπτώσεων στον οργανισμό του ασθενή καθώς και μη συμμόρφωσης σε αυτήν με αποτέλεσμα να ευνοείται η εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών λεισμανία.



### 1.3.2.Αμφοτερίνη Β

Παρά την υψηλή τοξικότητα η αμφοτερίνη Β είναι ένα από τα φάρμακα πρώτης γραμμής κυρίως στην Ευρώπη και τις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής για την θεραπεία της λείσμανίασης (Arana, Mendoza, Rizzo, & Kroeger, 2001; Sundar et al., 2011). Το φάρμακο δεσμεύεται στη εργοστερόλη της κυτταρικής μεμβράνης του παρασίτου προκαλώντας μεμβρανική διάτρηση Η ενδοφλέβια χορήγηση της συχνά προκαλεί,ρίγος και πυρετό που συνδέονται με μυοκαρδίτιδα και νεφροτοξικότητα.

Τα λιποσωμικά σκευάσματα αμφοτερικίνης Β (εμπορική ονομασία AmBisome) αναπτύχθηκαν με στόχο την μείωση της τοξικότητας της Αμφορερικίνης (McGwire & Satoskar, 2014). Παρά το γεγονός ότι η λιποσωμική Αμφοτερικίνη παρουσιάζει μειωμένη τοξικότητα, η χρήση της είναι περιορισμένη στις ανεπτυγμένες χώρες λόγω του υψηλού κόστους και λόγω της γρήγορης αλλοίωσης της σε υψηλές θερμοκρασίες (Croft & Olliaro, 2011; Meheus et al., 2010). Η ενδοφλέβια χορήγηση της συχνά προκαλεί, ρίγος και πυρετό που συνδέονται με μυοκαρδίτιδα και νεφροτοξικότητα (Croft & Coombs, 2003; Croft & Yardley, 2002).

### 1.3.3.Πενταμιδίνη

Ένα άλλο φάρμακο που χρησιμοποιείται σήμερα για την θεραπεία της λείσμανίασης είναι η πενταμιδίνη (εμπορικές ονομασίες «Pentacrinat» και «Pentam»). Ο ακριβής μηχανισμός δράσης είναι άγνωστος όμως είναι γνωστό ότι παρεμβαινει στη βιοσύνθεση μακρομορίων όπως RNA, DNA, φωσφολιπιδίων και πρωτεϊνών (McGwire & Satoskar, 2014). Το φάρμακο αυτό είναι ιδιαίτερα τοξικό και προκαλεί σημαντικές παρενέργειες όπως σακχαρώδη διαβήτη, σοβαρή υπογλυκαιμία, υπόταση, μυοκαρδίτιδα, νεφρική τοξικότητα και μπορεί να οδηγήσει σε θάνατο (N. Singh, Kumar, & Singh, 2012).

Η πενταμιδίνη χρησιμοποιείται πολύ συχνά λόγω της εμφάνισης περιστατικών αντίστασης στις ενώσεις αντιμονίου (Bray, Barrett, Ward, & de Koning, 2003). Το φάρμακο αυτό παρουσιάζει υψηλή τοξικότητα και αναποτελεσματικότητα.Όπως έχει καταγραφεί, εθελόντης πέθανε έπειτα από χορήγηση πενταμιδίνης σε συνδυαστική θεραπεία (Fernandes et al., 2016). Ενώ σε πολλές χώρες έχει αποσυρθεί λόγω της τοξικότητας που επιφέρει,σήμερα εξακολουθεί να χορηγείται τοπικά σε περιστατικά κατά της δερματικής λείσμανίασης (Soto et al., 2016) και συνίσταται κατά κύριο λόγο όταν χρησιμοποιείται σε συνδυαστικά θεραπευτικά πρωτόκολλα (Croft & Coombs, 2003; Croft & Olliaro, 2011).

### 1.3.4.Παρομομυκίνη

Ως εναλλακτικό φάρμακο για την θεραπεία της λείσμανίασης χρησιμοποιείται η παραμομυκίνη. Πρόκειται για ένα αντιβιοτικό που δρά αναστέλλοντας την πρωτεϊνική σύνθεση καθώς έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά με την 16S υπομονάδα του ριβοσωμικού RNA (McGwire & Satoskar, 2014). Σοβαρές ανεπιθύμητες παρενέργειες μπορεί να επιφέρει και αυτό το είδος φαρμάκου όπως νεφροτοξικότητα, ωτοτοξικότητα και σπάνια ηπατοτοξικότητα (Fong et al., 1994; Hendrickx et al., 2012).

### 1.3.5.Μιτελφοσίνη

Το φάρμακό αυτό χρησιμοποιείται κατά τις λεισμανίασης και έχει το πλεονέκτημα της χορήγησης από το στόμα. Η μιτελφοσίνη ανακαλήφθηκε ως αντι-νεοπλασματικός παράγοντας (εμπορικές επωνυμίες «Impravido» και «Miltex») (McGwire & Satoskar, 2014). Στις παρενέργειες περιλαμβάνονται η ναυτία και ο εμετός. Ωστόσο η χρήση του πρέπει να αποφεύγεται στις έγκυες δεδομένου ότι οι πιο σοβαρές παρενέργειες αυτού του φαρμάκου είναι η δημιουργία τερατογένεσης και επίσης έχει υψηλό ποσοστό αποτυχίας (Arana et al., 2001; Soto et al., 2007).

### 1.3.6.Πρωτεϊνικές κινάσες ως φαρμακευτικοί στόχοι

Οι πρωτεϊνικές κινάσες είναι μια από τις μεγαλύτερες υπεροικογένειες στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Με την πάροδο των χρόνων αποδείχθηκε ο σημαντικός τους ρόλος στη ρύθμιση βασικών κυτταρικών διεργασιών. Η λειτουργία τους βασίζεται στην ιδιότητά τους να φωσφορυλιώνουν πρωτεΐνες με αποτέλεσμα να χαρακτηρίζονται ένζυμα-κλειδιά, καθοριστικής σημασίας για την επιβίωση του κυττάρου. Συγκεκριμένα, οι πρωτεϊνικές κινάσες είναι ένζυμα που καταλύουν τη μεταφορά της τελικής φωσφορικής ομάδας του ATP σε συγκεκριμένες πρωτεΐνες, διαδραματίζοντας ως εκ τούτου σπουδαίο ρόλο σε όλες σχεδόν τις κυτταρικές διεργασίες. Στην έρευνα για την ανάπτυξη μορίων μικρού μοριακού βάρους έναντι του καρκίνου και άλλων ασθενειών, οι πρωτεϊνικές κινάσες αποτελούν ελκυστικούς στόχους και η αναστολή τους έχει αναγνωριστεί ως μία καινοτόμα θεραπευτική προσέγγιση, καθώς ορισμένες εξ αυτών συμβάλλουν, μεταξύ άλλων, στην εμφάνιση ασθενειών, όπως του καρκίνου, του διαβήτη και άλλων παρασιτικών νόσων, συμπεριλαμβανόμενης και της λεισμανίασης. Για το παραπάνω λόγο, είναι σημαντική η μελέτη των πρωτεϊνικών κινάσων που μπορούν να αξιοποιηθούν για την ταυτοποίηση νέων φαρμάκων.

Συμπερασματικά, η λεισμανίαση είναι μια νόσος η οποία αντιμετωπίζεται κυρίως από την χημειοθεραπεία. Τα φάρμακα πρώτης γραμμής που χορηγούνται σήμερα, όπως προαναφέρθηκε πιο πάνω, ανακλύφθηκαν πριν από 50 χρόνια, ωστόσο ο αριθμός τους είναι περιορισμένος. Η μεγάλη αντίσταση, τοξικότητα ή/και υψηλό κόστος καθιστούν τα φάρμακα αυτά πέρα από ιδανικά. Για το λόγο αυτό, η ανακάλυψη καινούριων φαρμάκων αποτελεί επιτακτική ανάγκη. Έτσι, οι σύγχρονες έρευνες επικεντρώνονται στην αναζήτηση και την ταυτοποίηση νέων φαρμακευτικών στόχων. Στα πλαίσια αυτά οι κινάσες του παρασίτου πληρούν πολλές προϋποθέσεις για την επιλογή τους ως υποψήφιοι μοριακοί στόχοι καθώς συμμετέχουν στην ρύθμιση σημαντικών σηματοδοτικών μονοπατιών και κυτταρικών διεργασιών. Μεταξύ αυτών είναι ο μεταγραφικός έλεγχος, η εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, η διαφοροποίηση και η μολυσματικότητα των παρασίτων (Naula, Parsons, & Mottram, 2005; Smirlis & Soares, 2014). Παρόλα αυτά από τις 189 λεισμανιακές κινάσες μόνο λίγες έχουν ταυτοποιηθεί ως πιθανοί μοριακοί στόχοι. Ανάμεσά τους οι κινάσες GSK-3 (Glycogen Synthase Kinase 3) (Xingi et al., 2009), και CK1.2 (Casein Kinase 1.2) (Rachidi et al., 2014) έχουν ταυτοποιηθεί φαρμακολογικά, καθώς ειδικοί αναστολείς που στοχεύουν σε αυτές τις κινάσες σκότώνουν τα παράσιτα, ενώ οι κινάσες CRK3 (cyclin-dependent related kinase 3) (Duncan et al., 2016) και MPK4 (MAP Kinase 4) (Dacher et al., 2014) έχουν ταυτοποιηθεί γενετικά, καθώς η γονιδιακή απαλοιφή τους καθιστά τα παράσιτα μη βιώσιμα.

## 1.4.Κινάσες της οικογένειας DYRK

### 1.4.1.Γενικά

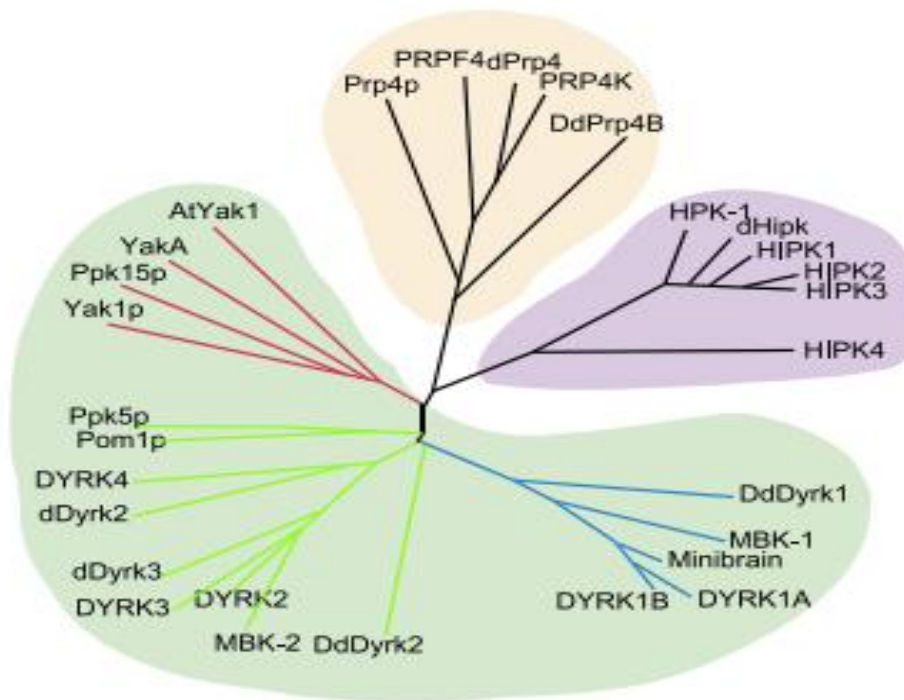
Οι πρωτεϊνικές κινάσες Dualspecificity tyrosine (Y)-regulated kinase (DYRK) είναι κινάσες διπλής ειδικότητας τυροσίνης/σερίνης-θρεονίνης οι οποίες ανήκουν στην ομάδα κινασών CMGC (Karin & Hunter, 1995), όπου ανήκουν κινάσες όπως οι κυκλο-εξαρτώμενες κινάσες (CDKs), οι κινάσες που ενεργοποιούνται με μιτογόνο (MAPKs) και οι κινάσες της συνθετάσης του γλυκογόνου (GSK-3). Οι κινάσες CMGC έχουν ένα μοτίβο χαρακτηριστικό της ομάδας (το CMGC-ένθεμα) που εντοπίζεται μεταξύ των υπο-περιοχών επικράτειας X και XI, και παίζει ρόλο στην αναγνώριση της ενεργοποιημένης κινάσης από το υπόστρωμα (T. Lee et al., 2004) καθώς και η πλευρική αλυσίδα HRD (ή HCD για τις πρωτεΐνες DYRK) αλληλεπιδρά με τον βρόγχο ενεργοποίησης και τον υποβοήθα να προσδεθεί στο υπόστρωμα του (Johnson, Noble, & Owen, 1996). Οι κινάσες που ανήκουν στην οικογένεια DYRK διακρίνονται σε 3 υποοικογένειες: στην υποοικογένεια i) των DYRK, ii) των HIPK (homeodomain interacting protein kinases) και τέλος iii) των PRP4 (pre-mRNA processing protein 4 kinases). Η υποοικογένεια των DYRK κινασών διακρίνεται σε τρεις υποομάδες: τη ν ομάδα Yak, που βρίσκεται μόνο σε κατώτερους ευκαρυώτες και τις ομάδες DYRK1 και DYRK2 (Aranda, Laguna, & de la Luna, 2011).

Μέλη της οικογένειας των DYRK κινασών έχουν βρεθεί σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και η μελέτη της λειτουργίας τους έδειξε ότι είναι σημαντικά μόρια για την διεκπεραίωση πολύπλοκων κυτταρικών διεργασιών. Συγκεκριμένα, η πρωτεϊνική κινάση Yak1 βρέθηκε στον μύκητα *Saccharomyces cerevisiae* αποτελεί το πρώτο μέλος της οικογένειας και δρα ως αρνητικός ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου. Επιπλέον, στον οργανισμό *Schizosaccharomyces pombe* εντοπίστηκε η κινάση Pom1, που ελέγχει την πολικότητα και την κυτοκίνηση ενώ στον οργανισμό *Dictyostelium discoideum* βρέθηκε η κινάση YakA η οποία δρα έτσι ώστε να εξέλθει το κύτταρο από τον κυτταρικό κύκλο (Go) και επιπλέον εμπλέκεται στη διαφοροποίηση από τη μονοκύτταρη στη πολυκύτταρη μορφή του οργανισμού.

Στην *Drosophila* βρέθηκε η Yak1/DYRK1 που σχετίζεται με την πολλαπλασιασμό των νευροβλαστών και την ανάπτυξη του εγκεφάλου. Τέλος ιδιαίτερης σημασίας αποτελούν οι κινάσες DYRK των θηλαστικών όπου η μεγάλη ομοιότητα τους με τους κατώτερους οργανισμούς που αναφέρθηκαν, αποδεικνύει και την συντηρητικότητα των κινασών. Πιο συγκεκριμένα, βρέθηκαν πέντε ισόμορφα πρωτεϊνών (DYRK1A, DYRK1B, DYRK2, DYRK3 και DYRK4) των οποίων η λειτουργία αφορά τον πολλαπλασιασμό, την κυτταρική διαφοροποίηση, την ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου καθώς και άλλες λειτουργίες (Soppa & Becker, 2015).

Γενικά, οι κινάσες DYRK διακρίνονται σε δύο τάξεις, την τάξη 1 η οποία περιλαμβάνει τις κινάσες DYRK1A και DYRK1B και την τάξη 2 όπου ανήκουν οι κινάσες DYRK2, DYRK3 και DYRK4. Και οι δύο κατηγορίες μοιράζονται μια κεντρική περιοχή (Kinase domain), την περιοχή επικράτειας και μία ομόλογη περιοχή στο N-τελικό άκρο (DH-box). Οι περιοχές εκτός της περιοχής επικράτειας είναι διακριτές μεταξύ των διαφόρων πρωτεϊνικών κινασών και καθορίζουν τις διαφορετικές πρωτεϊνικές λειτουργίες όπως η υποκυτταρική θέση, η ειδικότητα στο υπόστρωμα και η κατανομή στους ιστούς. Τέλος, οι κινάσες DYRK είναι εξελικτικά συντηρημένες από τους κατώτερους

οργανισμούς έως τα θηλαστικά και ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό, την διαφοροποίηση, την κυτταρική επιβίωση και την απόπτωση.



**Εικόνα 9.φυλογενετικό δένδρο χωρίς ρίζα.**Απεικονίζει την εξελικτική απόκλιση της περιοχής επικράτειας(kinase domain) στα διαφορετικά μέλη της DYRK οικογένειας. Με βάση των βαθμό συντηρητικότητας της περιοχής επικράτεια διακρίνονται τρεις υποοικογένειες: i) DYRK (πράσινο), ii) HIPK (βιολετί) και iii)PRP4K (πορτοκαλί). Στο κλάδο των DYRK διακρίνονται τρεις κλάδοι: ο κλάδος της Yak1p στο μύκητα *S.cerevisiae* (κόκκινες γραμμές) που δεν εντοπίζεται σε ζώα, ο κλάδος της DYRK1 και της DYRK2 με μέλη τους από τον *S.cerevisiae* έως τον άνθρωπο (μπλε και πράσινες γραμμές) (Aranda et al., 2011)

### Μηχανισμός ενεργοποίησης

Όλες οι κινάσες DYRK περιλαμβάνουν μία συντηρητική καταλυτική περιοχή επικράτειας η οποία προηγείται από μία ομόλογη περιοχή που χαρακτηρίζεται ως DYRK ομόλογη περιοχή (DH-box). Οι DYRK λοιπόν ορίζονται ως πρωτεϊνικές κινάσες διπλής-ειδικότητας επειδή έχουν την ιδιότητα να φωσφορυλιώνουν κατάλοιπα τυροσίνης, σερίνης και θρεονίνης. Η ενεργότητα τους βασίζεται στη συντηρητική αλληλουχία **YxY** του ενεργού βρόγχου στην περιοχή επικράτειας. Η αναδίπλωση της ενεργής και παροδικά μεταβαλλόμενης πρωτεΐνης που συντίθενται συμβαίνει κατά την μετάφραση της στο ριβόσωμα. Εκεί καταλύεται και η αυτόφωσφορυλίωση στη δεύτερη τυροσίνη του μοτίβου YxY, με αποτέλεσμα την πλήρη ενεργότητα του ενεργοποιημένου βρόγχου. Έπειτα, η πρωτεϊνική κινάση χάνει την ειδικότητάς της να φωσφορυλιώνει κατάλοιπα τυροσίνης και περιορίζεται στην φωσφορυλίωση καταλοίπων σερίνης-θρεονίνης (Lochhead et al., 2003). Η παραπάνω διαδικασία επιβεβαιώθηκε από πειράματα που βασίστηκαν σε μεταλλαγμένες πρωτεΐνες σε αυτά τα κατάλοιπα και οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι οι κινάσες DYRK απαιτούν την φωσφορυλίωση του

ενεργοποιημένου βρόγχου ώστε να πετύχουν την πλήρη ενεργοποίηση (όπως στη Yak1p και της Pom1p στο *S. pombe*, την MBK2 στο *C. elegans*, την dDyrk2 και την Mnb της *Drosophila* και την DYRK1A, DYRK1B, DYRK3 και DYRK4 των θηλαστικών) (Kentrup et al., 1996; K. Lee, Deng, & Friedman, 2000; Li, Zhao, Karur, & Wojchowski, 2002). Φαίνεται πως η ικανότητα της ώριμης κινάσης να φωσφορυλιώνει μόνο κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης στο υπόστρωμα όπου προσδένεται, σχετίζεται με διαφορετικές βιοχημικές ιδιότητες του αυτοφωσφορυλιωμένου μορίου που συντίθενται. Αυτές αφορούν την ευαισθησία των δύο πρωτεϊνικών μορφών ως προς του πρωτεϊνικούς αναστολείς συμπεραίνοντας πως η διπλή ειδικότητα της κινάσης συνάδει με την διπλή ευαισθησία σε πρωτεϊνικούς αναστολείς (Lochhead, Sibbet, Morrice, & Cleghon, 2005). Μελετώντας την εξελικτική διαφοροποίηση και τον τρόπο ενεργοποίησης του καταλυτικού βρόγχου φάνηκε πως η διαδικασία αυτόφωσφορυλίωσης της τυροσίνης είναι μηχανικά διαφορετική μεταξύ των τάξεων I (ή ομάδα DYRK1) και II (ή ομάδα DYRK2) των DYRK κινάσεων (Lochhead et al., 2003). Η διαφορά εντοπίζεται στην ύπαρξη του μοτίβου NAPA στην αμινοτελική περιοχή των DYRK2,3 και 4 (τάξεως II) και λειτουργεί ως συνοδός για την ενδιάμεση μορφή με δραστηριότητα αυτοφωσφορυλίωσης της τυροσίνης (Kinstrie et al., 2010).

### **Η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου από τις κινάσες DYRK**

Οι κινάσες DYRK1A, DYRK1B και DYRK3 εμπλέκονται στην κυτταρική διαφοροποίηση διαφόρων κυττάρων και εμφανίζουν διακριτές λειτουργίες. Σημαντική είναι οι λειτουργία τους στις διαδικασίες που συνδέουν την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και την κυτταρική διαφοροποίηση. Συγκεκριμένα, υποστηρίζεται ότι η DYRK1A και η DYRK1B των θηλαστικών εμπλέκονται κατά την G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> φάση του κυτταρικού κύκλου (Deng, Mercer, Shah, Ewton, & Friedman, 2004; Park et al., 2010; Yabut, Domogauer, & D'Arcangelo, 2010; Zou, Ewton, Deng, Mercer, & Friedman, 2004). Ενώ, η αποσιώπηση (knockdown) της DYRK2 των θηλαστικών έχει ως αποτέλεσμα την παύση του κυτταρικού κύκλου στη G<sub>2</sub>/M φάση, με αποτέλεσμα να θεωρείται πιθανή η συμμετοχή της στην εξέλιξη της M φάσης (Maddika & Chen, 2009). Αντίθετα, στα ευθροποιητικά κύτταρα η DYRK3 των θηλαστικών, εξαρτώμενη από την δραστηριότητα της PKA (Protein Kinase A), επάγει την φωσφορυλίωση και την δραστηριότητα του μεταγραφικού παράγοντα CREB, με αποτέλεσμα την αναστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας του παράγοντα NFAT (Bogacheva et al., 2008; Li et al., 2002). Θεωρείται επομένως ρυθμιστής της ύστερης ερυθροποίησης και παράγοντας επιβίωσης των αιμοποιητικών κύτταρων (Li et al., 2002).

Από την μελέτη νευρικών κυττάρων αποδείχθηκε πως η κινάση DYRK1A παίζει καθοριστικό ρόλο στην διαφοροποίηση και την αναστολή του κυτταρικού κύκλου. Για παράδειγμα η υπερέκφραση της DYRK1A τροποποιεί σημαντικά τα επίπεδα του νεύρο-περιοριστικού παράγοντα σιώπησης (NRSF ή REST), ενός βασικού ρυθμιστή της πλειοδυναμίας και του προγράμματος έκφρασης των γονιδίων της νευρικής διαφοροποίησης (Canzonetta et al., 2008). Επιπλέον, η υπερέκφραση της DYRK1A προωθεί την διαφοροποίηση που επάγεται από τον νευροτροφικό αυξητικό παράγοντα (NGF) αυξάνοντας τη σηματοδότηση του μονοπατιού Ras/MAPK (Kelly & Rahmani, 2005) και την έξοδο των προγονικών νευρώνων από τον κυτταρικό κύκλο (Yabut et al., 2010). Κατόπιν, η DYRK1A φωσφορυλιώνει την p53 στο κατάλοιπο S15 με αποτέλεσμα όταν η DYRK1A υπερεκφράζεται επάγει τον πρόωρο τερματισμό του κυτταρικού



κύκλου (Park et al., 2010). Τέλος, σε ώριμα βλαστικά κύτταρα νευρώνων, η DYRK1A φαίνεται να συμμετέχει σε μοριακό μονοπάτι που οδηγεί το κύτταρο σε κυτταρικό θάνατο επαγόμενο από τον αυξητικό παράγοντα EGF (Ferron et al., 2010).

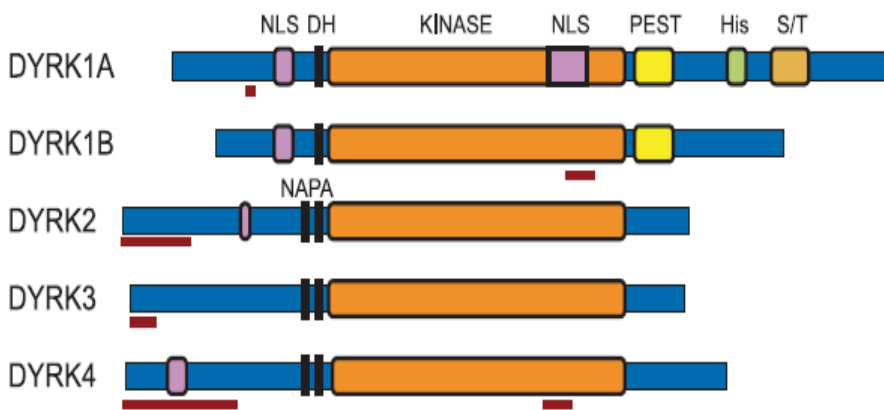
Η DYRK1B σχετίζεται με την κυτταρική διαφοροποίηση των μυοβλαστών. Φαίνεται πως τα υποστρώματά της, η p27 και η κυκλίνη D1, συμβάλλουν στην αναστολή του πολλαπλασιασμού, επειδή η φωσφορυλίωση τους από την DYRK1B οδηγεί στην σταθεροποίηση και την αποσταθεροποίηση τους, αντίστοιχα (Deng et al., 2004; Zou et al., 2004).

#### 1.4.2. Οι κινάσες DYRK στα θηλαστικά

Οι κινάσες DYRK των θηλαστικών είναι ιδιαίτερα σημαντικές αφού η λειτουργία τους σχετίζεται με σοβαρές ασθένειες. Η DYRK1A παίζει σημαντικό ρόλο στη παθολογία του συνδρόμου Down καθώς εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 21 και η υπερέκφραση της έχει συσχετιστεί με μη φυσιολογική ανάπτυξη του εγκεφάλου και νοητική καθυστέρηση. Επιπλέον, σε άτομα που δε παρουσιάζουν χρωμοσωμική ανωμαλία, η υπερέκφραση αυτής της κινάσης προκαλεί νευροαναπτυξιακή δυσλειτουργία αλλά και την εμφάνιση του Alzheimer. Επιπλέον, η DYRK1A συσχετίζεται και με τον αυτισμό. Τέλος, το γονίδιο της DYRK1B βρέθηκε να υπερεκφράζεται σε ορισμένους τύπους καρκίνου προάγοντας την κυτταρική επιβίωση σε συνθήκες στρες (Soppa & Becker, 2015).

Όπως ήδη αναφέρθηκε στα θηλαστικά η υποοικογένεια της DYRK αποτελείται από πέντε μέλη: την DYRK1A, την DYRK1B (γνωστή και ως Mirk), την DYRK2, την DYRK3 (γνωστή και REDK) και την DYRK4 (Becker et al., 1998). Έπειτα από μελέτη του βαθμού συντηρητικότητας της περιοχής επικράτειας των κινάσων αυτών αποδείχθηκε ότι όλα τα γονίδια της DYRK προέκυψαν από γονιδιακούς διπλασιασμούς (Becker et al., 1998). Έτσι, τα ζεύγη DYRK1A, DYRK1B και DYRK2 DYRK3 είναι παράλογα γονίδια με κοινά ορθόλογα γονίδια στους *C.elegans* (mbk-1 και mbk-2, αντίστοιχα) και στη *Drosophila* (mnb και dDyrk3, αντίστοιχα), ενώ ο κοντινός πρόγονος της DYRK είναι η dDyrk2 της *Drosophila*.

Σε πρωτεϊνικό επίπεδο, η συντηρητικότητα ανάμεσα στις διαφορετικές DYRK κινάσες αφορά την περιοχή επικράτειας της κινάσης (kinase domain), και την αλληλουχία ανοδικά της περιοχής επικράτειας, την DYRK ομόλογη περιοχή (DYRK homology box, DH-box), χαρακτηριστική της υποοικογένειας. Όπως φαίνεται στο σχήμα (Εικόνα 9) η DYRK1A και η DYRK1B έχουν κοινή ομόλογη περιοχή, εκτός της περιοχής επικράτειας της κινάσης, ένα σήμα πυρηνικού εντοπισμού (nuclear localization signal, NLS) και ένα PEST μοτίβο, πλούσιο σε προλίνη, γλουταμινικό οξύ, σερίνη και κατάλοιπα θρεονίνης στη C-τελική περιοχή που παίζει σημαντικό ρόλο στη πρωτεόλυση της κινάσης. Επιπλέον η DYRK1A περιέχει μία αλληλουχία πολυιστιδίνης και την περιοχή S/T πλούσια σε κατάλοιπα θρεονίνης και σερίνης, που δεν υπάρχουν στις υπόλοιπες κινάσες των θηλαστικών. Οι κινάσες DYRK2, DYRK3 και DYRK4 χαρακτηρίζονται στην αμινοτελική περιοχή από τη NAPA περιοχή (αμινοτελική βοηθούμενη περιοχή αυτοφωσφορυλίωσης), η οποία μπορεί να εντοπιστεί στις κινάσες DYRK άλλων ειδών, που ανήκουν στο τμήμα της DYRK2 (Kinstrie et al., 2010). Επισημαίνεται ότι οι κόκκινες περιοχές στο σχήμα προσδιορίζουν πρωτεϊνικές περιοχές που έχουν υποστεί εναλλακτικό μάτισμα (Aranda et al., 2011).



**Εικόνα 10.** Η πρωτεΐνες DYRK στα θηλαστικά. Σχηματική απεικόνιση της δομής της πρωτεΐνης των πέντε DYRKs των θηλαστικών (Aranda et al., 2011)

#### 1.4.3. Οι κινάσες DYRK στη *Drosophila melanogaster*

Στη *Drosophila melanogaster* έχουν ταυτοποιηθεί τρία μέλη της υποοικογένειας της DYRK: η *minibrain* (*mnb*), η *dDyrk2* (*smell-impaired 35A, smi35A*) και η *dDyrk3* (CG40478; <http://flybase.org>). Από μελέτες διαπιστώθηκε ότι η *mnb* παίζει σημαντικό ρόλο κατά την μετεμβρυϊκή νευρογένεση. Η απενεργοποίηση της σε προνυμφικό στάδιο προκαλεί μια ασυνήθιστη διάταξη των νευροβλαστών στα εξωτερικά κέντρα πολλαπλασιασμού του εγκεφάλου. Αυτό έχει αντίκτυπο στον εγκέφαλο των ενηλίκων καθώς παρατηρείται ειδική και σημαντική μείωση του μεγέθους των οπτικών λοβών και των κεντρικών ημισφαιρίων του εγκεφάλου (Tejedor et al., 1995). Αυτές οι μορφολογικές αλλαγές σχετίζονται με ειδικές συμπεριφορικές ανωμαλίες στην μάθηση, την μνήμη και στις οπτικές και οσφρητικές διεργασίες (Tejedor et al., 1995). Στη συνέχεια, η *dDyrk2* φαίνεται να έχει υψηλό βαθμό ομολογίας με την DYRK4 των θηλαστικών. Επιπλέον, η καταλυτική της ιδιότητα είναι ενεργή κατά την διάρκεια όλων των σταδίων ανάπτυξης των μυγών και εμφανίζεται σε αυξημένα επίπεδα κατά την εμβρυογένεση και τη διαφοροποίηση σε χρυσαλλίδα (Lochhead et al., 2003). Τέλος, η *dDyrk3* βρέθηκε να εμπλέκεται στη φωσφορυλίωση του μεταγραφικού παράγοντα NFAT των ενεργοποιημένων T-κυττάρων.

#### 1.4.4. Οι κινάσες DYRK του νηματώδους *Caenorhabditis elegans*

Στον *Caenorhabditis elegans* έχουν ταυτοποιηθεί δύο γονίδια της κινάσης DYRK: το *mbk-1* και *mbk-2* (*MiniBrain Kinase homologue-1 and-2*). Μελετώντας το γονίδιο *mbk-1* βρέθηκε πως οι μεταλλάξεις απώλειας λειτουργικότητας (*loss of function mutations*) είναι βιώσιμες και δεν παρουσιάζουν εμφανείς μορφολογικές αλλαγές. Όμως, επιπλέον αντίγραφα του γονιδίου αυτού προκαλούν ανωμαλίες στη χημειοταξία κατά την ασταθή χημειοπροσέγγιση (Raich et al., 2003). Αντίθετα, φαίνεται πως οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *mbk-2* και οι αλλαγές στην πρωτεϊνική κινάση επιφέρουν σημαντικές αρνητικές επιπτώσεις στην φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων του οργανισμού (Raich et al., 2003).

Η *MBK-2* λοιπόν είναι απαραίτητη για την διεκπεραίωση της μετάβασης από το ωκύτταρο στο

έμβρυο δρώντας σε διάφορα στάδια. Αυτό πραγματοποιείται με την ενεργοποίηση της κινάσης λόγω απομάκρυνση ενός άγνωστου καταστολέα και την πρόσβαση της στο υπόστρωμα (Cheng, Klancer, Singson, & Seydoux, 2009; Parry et al., 2009). Επιπλέον, η *MBK-2* εμπλέκεται στην κυτταροκίνηση, ρυθμίζοντας το σωστό προσανατολισμό της μιτωτικής ατράκτου κατά την ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση. Συνεπώς, φαίνεται πως οι ουδέτερες μεταλλαγές στο γονίδιο της πρωτεΐνης είναι μη βιώσιμες (Cheng et al., 2009; Parry et al., 2009). Ακόμη, η *MBK-2* φαίνεται πως ελέγχει την αποδόμηση των μητρικών πρωτεϊνών *OMA-1/OMA2* και της *MEI1* που είναι ομόλογης της αποκοπτόμενης από τους μικροσωληνίσκους πρωτεΐνης, κατανίνη (Nishi & Lin, 2005; Pang et al., 2004; Pellettieri, Reinke, Kim, & Seydoux, 2003; Quintin, Mains, Zinke, & Hyman, 2003; Shirayama et al., 2006). Επιπλέον, κατά τα πρώιμα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης, η φωσφορυλιωμένη *MBK-2* ρυθμίζει την ενεργότητα των πολικών πρωτεϊνών *MEX5* και *MEX6* καθώς και τον γενικού μεταγραφικού καταστολέα *OMA-1* (Guven-Ozkan, Nishi, Robertson, & Lin, 2008; Nishi, Rogers, Robertson, & Lin, 2008). Τέλος, το σύμπλεγμα πρωτεϊνών αποτελούμενο από τις ψευδοφωσφατάσες *EGG3*, *EGG4*, *EGG5* και η φωσφορυλίωση της *MBK-2* από την *CDK-1* (Cheng et al., 2009; Parry et al., 2009; Stitzel, Cheng, & Seydoux, 2007) εμπλέκεται στην ρύθμιση των ανωτέρων μηχανισμών.

#### 1.4.5. Οι κινάσες *DYRK* στους κατώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς

Στους μύκητες συναντώνται δύο κινάσες τις υπο-οικογένειας των *DYRK* που έχουν περιγραφεί διεξοδικά: η *Yak1p* στον *Saccharomyces cerevisiae* και η *Pom1p* στον *Schizosaccharomyces pombe*. Στην ίδια ομάδα με την *Yak1p* ανήκει και η κινάση *YakA* που βρέθηκε στον οργανισμό *Dictyostelium discoideum* και η οποία έχει μελετηθεί διεξοδικά. Γενικά, φαίνεται πως οι τρεις κινάσες σχετίζονται με τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, την κυτταρογένεση και την κυτταρική διαφοροποίηση. Μια ακόμη κινάση ομόλογη της *Yak1p*, η *Yak1*, έχει μελετηθεί στον νηματώδη παθογόνο μήκητα, *Candida albicans* και φαίνεται πως σχετίζεται με την διαφοροποίηση (Goyard et al., 2008).

Η *Yak1p* εντοπίζεται σε διαφορετικές υποκυτταρικές περιοχές και σχετίζεται με την ρύθμιση και τον έλεγχο διαφορετικών σηματοδοτικών μονοπατιών. Επιπλέον, ελέγχει αρνητικά τον πολλαπλασιασμό σε συνθήκες θρεπτικού στρες. Στην περίπτωση αυτή ανταγωνίζεται το μονοπάτι *RAS/cAMP* (Garrett & Broach, 1989) καθώς και την κινάση *TOR* (Target Of Rapamycin) (Martin, Soulard, & Hall, 2004), δύο μονοπάτια που δρουν ελέγχοντας την απόκριση στη παρουσία θρεπτικών συστατικών και κατά συνέπεια την κυτταρική ανάπτυξη στα ευκαρυωτικά κύτταρα (Martin et al., 2004; Moriya et al., 2001). Συγκεκριμένα, παρουσία ραπαμυκίνης στο υλικό καλλιέργειας, απουσία γλυκόζης, η πρωτεϊνική κινάση *Yak1p* μετατοπίζεται στον πυρήνα. Εκεί εντοπίζονται τα περισσότερα υποστρώματα της, δηλαδή μεταφραστικοί παράγοντες και πρωτεΐνες που ελέγχουν το μηχανισμό του κυτταρικού κύκλου. Μεταξύ των πιο γνωστών υποστρωμάτων είναι τα *Msn2p* και *Hsf1p*, δύο βασικοί μεταγραφικοί παράγοντες που αποκρίνονται σε συνθήκες στρες κατά μήκος του μονοπατιού *RAS/cAMP*. Ακόμη, η πρωτεΐνη *rop2* αποτελεί βασικό δομικό συστατικό του συμπλέγματος μεταγραφικού παράγοντος *CCR4* και του συμπλέγματος πολυαδενυλίωσης. Άλλο υπόστρωμα είναι ο ανασταλτικός παράγοντας, *Crf1p*, της



μεταγραφής γονιδίων ριβοσωμικών πρωτεϊνών κατά μήκος της TOR σηματοδότησης και της *Bcy1p* που δρα ως ρυθμιστής της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA). Συνεπώς, η πρωτεϊνική κινάση *Yak1p* αποτελεί μόριο κλειδί στη ρύθμιση του μηχανισμού του θρεπτικού και οξειδωτικού στρες υποβάλλοντας τα σήματα στο έλεγχο της μεταγραφής (Aranda et al., 2011).

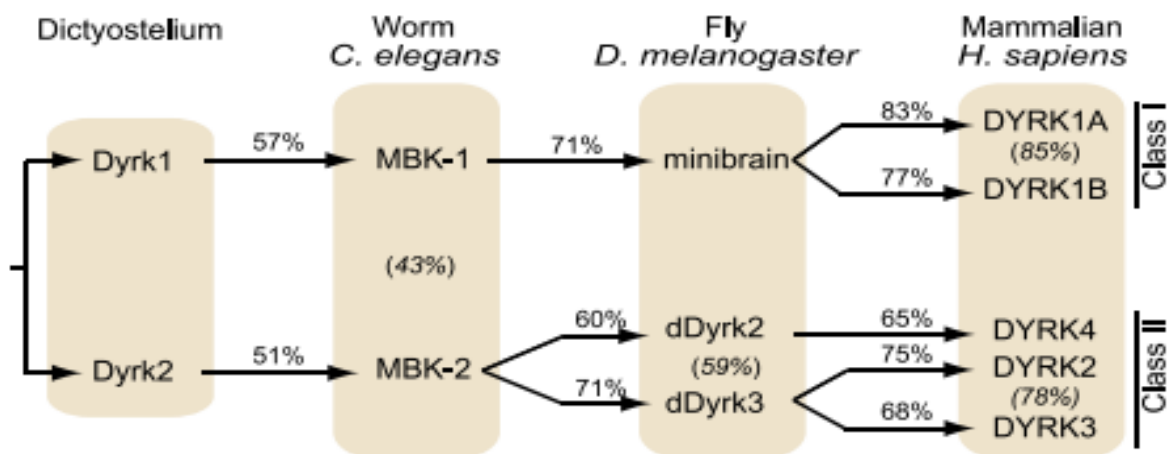
Στην περίπτωση της *C. albicans*, η ομόλογή κινάση **Yak1** φαίνεται πως σχετίζεται με το μονοπάτι cAMP/PKA, φωσφορυλιώνοντας μια συντηρημένη θέση που εντοπίζεται επίσης στον *S. cerevisiae* και σχετίζεται με την ανάπτυξη του (Zappacosta et al., 2002). Υποστηρίζεται πως η φωσφορυλίωση σε αυτή την θέση από την *Yak1* σχετίζεται με την PKA, κατά την έναρξη της νηματοποίησης και επιπλέον συμβάλλει στην ρύθμιση γονιδίων που την επάγουν. Ακόμη, βρέθηκε ότι η *Yak1* τροποποιεί την ρύθμιση του γονιδίου *Turp1*, καταστέλλοντας το ή προκαλεί αναδιαμόρφωση της χρωματίνης με αποτέλεσμα τα καταστέλλεται ή να ενεργοποιείται η διαφοροποίηση (Garcia-Sanchez et al., 2005; Kadosh & Johnson, 2001). Συνεπώς, φαίνεται πως η κινάση *Yak1* παίζει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της ανάπτυξης των υφών στον οργανισμό *C. albicans* και η δράση της είναι παρόμοια με την ομόλογη *Yak1* στον οργανισμό *Candida glabrata* (Goyard et al., 2008). Η αδρανοποίηση του γονιδίου έκφρασης της κινάσης *Yak1* επιδρά αρνητικά στην ανάπτυξη των υφών καθώς επηρεάζει την έκφραση γονιδίων που φυσιολογικά ρυθμίζουν την μορφογένεση των υφών. Φαίνεται πως και στους δύο οργανισμούς η κινάση εμπλέκεται στην διαδικασία της νηματοποίησης, αναστέλλοντας την έκφραση γονιδίων τα οποία σχετίζονται με την αλληλεπίδραση των κυττάρων προσκόλλησης προς σχηματισμό της νηματώδους μορφής (Goyard et al., 2008).

Αν και η κινάση *Ppk15p* του μύκητα *S. rombe* είναι η ομόλογη της *Yak1p*, στον οργανισμό αυτό η πιο μελετημένη κινάση της υποοικογένειας DYRK είναι η **Pom1p**. Η κινάση αυτή εμπλέκεται στην κυτταρική ανάπτυξη και την διαίρεση (Bahler & Pringle, 1998). Η ενεργότητα της ρυθμίζεται κατά την διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, η οποία είναι υψηλή κατά την διπολική ανάπτυξη και την κυτταρική διαίρεση και χαμηλή μετά την διαίρεση. Επίσης, φαίνεται ότι λειτουργεί συζευγνύοντας το κυτταρικό μέγεθος κατά την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου μέσω ρύθμισης της μετάβασης στη φάση *G<sub>2</sub>-M* (Moseley, Mayeux, Paoletti, & Nurse, 2009). Όπως και η *Yak1p*, η ενεργότητα της *Pom1p* ρυθμίζεται από την υπό-κυτταρική περιοχή στην οποία εντοπίζεται. Κατά τη διάρκεια της ενδιάμεσης φάσης, η *Pom1p* βρίσκεται στα αυξανόμενα άκρα των κυττάρων όπου αλληλεπιδρά και ρυθμίζει την *Rag4p*, μία πρωτεΐνη με ενεργότητα GTPάσης, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της *Cdc42p* και τελικά πυροδοτεί την πόλωση της F-ακτίνης, λειτουργία απαραίτητη για την αύξηση των κυτταρικών άκρων (Tatebe, Nakano, Maximo, & Shiozaki, 2008).

Η **YakA** του *Dictyostelium discoideum* ρυθμίζει την μετάβαση μεταξύ της φάσης φυτικής ανάπτυξης και της φάσης ανάπτυξης που επάγεται από την έλλειψη θρεπτικών συστατικών, ρυθμίζοντας την έξοδο από τον κυτταρικό κύκλο (Souza, Lu, & Kuspa, 1998). Επιπλέον, η *YakA* ελέγχει την ενεργότητα της PKA παρεμποδίζοντας την έκφραση του *PfuA*, ενός μεταγραφικού αναστολέα της καταλυτικής υπό-μονάδας της PKA (Taminato et al., 2002). Παρομοίως με την *Yak1p*, η *YakA* εμπλέκεται στη ρύθμιση του ρυθμού ανάπτυξης και της κυτταρικής επιβίωσης ανταποκρινόμενη σε διάφορες κυτταρικές πιέσεις (υπεροξειδωση, οξειδωση και θερμικού σοκ) (Arana et al., 2001).

Πρόσφατα, στο παράσιτο *Trypanosoma brucei* που ανήκει στα κινητοπλαστίδια, μία ομόλογη

κινάση DYRK βρέθηκε να εμπλέκεται στην διαφοροποίηση από την προκυκλική λεπτή μορφή "proliferative slender" στην μετακυκλική κοντόχονδρη μορφή "arrested stump" μορφή η οποία είναι η διαβιβάσιμη μορφή (transmissible form) που μεταφέρεται στην μύγα τσε-τσε, τον ενδιάμεσο ξενιστή του παρασίτου.



#### Εικόνα 11.Εξελικτική συσχέτιση των μελών της υπο-οικογένειας των κινασών DYRK

Τα μέλη της υπο-οικογένειας DYRK ταξινομούνται σε δύο βασικές ομάδες: τάξη I και II.

Ενώ η MBK-1 και η minibrain παρουσιάζουν μεγαλύτερη ομολογία με τη DYRK1A και τη DYRK1B των θηλαστικών, η dDyrk2 σχετίζεται με την DYRK4 των θηλαστικών. Τέλος, η MBK-2 και η dDyrk3 σχετίζονται με τη DYRK2 και τη DYRK3 των θηλαστικών. Το ποσοστό επί τις εκατό της συντηρητικότητας των πρωτεϊνικών επιπέδων ανάμεσα στα ορθόλογα υποδεικνύεται πάνω από τα βέλη και ανάμεσα σε δύο παράλογα υποδεικνύεται σε παρένθεση εντός των κουτιών (Aranda et al., 2011).

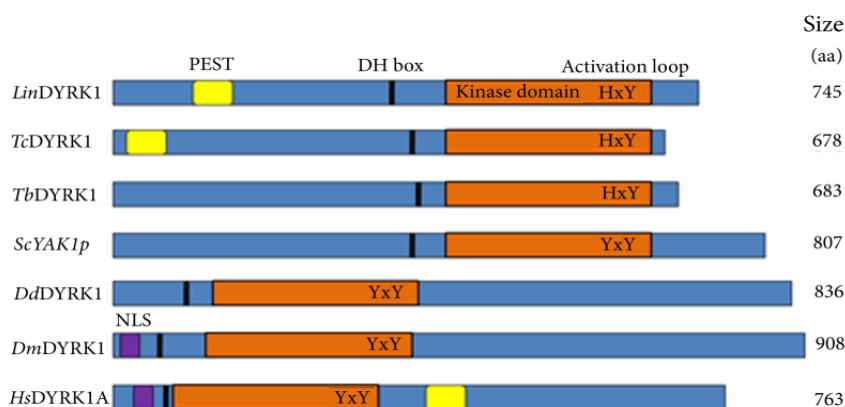
#### 1.4.6.Οι κινάσες DYRK και η DYRK1 του παρασίτου *Leishmania*

Στο πρωτόωμα των παρασίτων *Leishmania* υπάρχουν 8 μέλη της ομάδας των DYRK κινασών. Από αυτές, οι πέντε πρωτεϊνικές κινάσες ανήκουν στις τρεις γνωστές υποοικογένειες των DYRK κινασών δηλαδή την DYRK: [LinJ.15.0180](#), [LinJ.14.0890](#), [LinJ.33.1930](#), την HIPK: [LinJ.19.0360](#) και την Prp4 : [Lin.J.36.4460](#) . Οι υπόλοιπες τρεις κινάσες δεν ανήκουν στις γνώστες υποοικογένειες όμως φαίνεται ότι η [LinJ.21.2010](#) σχετίζεται με την [LinJ.14.1140](#). Ενδιαφέρον παρουσιάζει η ύπαρξη της άτυπης άγκυρας του ATP (DXAXXS για την [LinJ.21.2010](#), και GXAXXS για την [LinJ.14.1140](#) αντί για τη κλασσική αλληλουχία GXGXXGXV, οι οποίες θυμίζουν την άγκυρα των προκαρυωτικών κινασών. Οι πρωτεϊνική κινάση DYRK [LinJ.35.1850](#) αποκλίνει από τα υπόλοιπα μέλη και δεν ανήκει σε καμία γνωστή υποοικογένεια. Στα παράσιτα του γένους *Leishmania* τα μέλη των κινασών DYRK εξελικτικά φαίνεται να σχετίζονται περισσότερο με την τάξη I ([LinJ.15.0180](#), [LinJ.14.1140](#)) και την τάξη II ([LinJ.33.1930](#)) και λιγότερο με τις κινάσες YAK των κατώτερων ευκαρυωτικών κυττάρων. Από αυτές η κινάση [LinJ.14.1140](#) έχει ένα ένθεμα 165 αμινοξέων στη περιοχή επικράτειας κι έτσι η ενεργότητα της είναι υπόθεση που χρήζει περαιτέρω διερεύνησης (Σμυρλή μη δημοσιευμένα αποτελέσματα (εικόνα 13).

Η πρωτεϊνική κινάση [LinJ.15.0180](#) (*LinDYRK1*) εμφανίζεται πλήρως λειτουργική όσον αφορά την

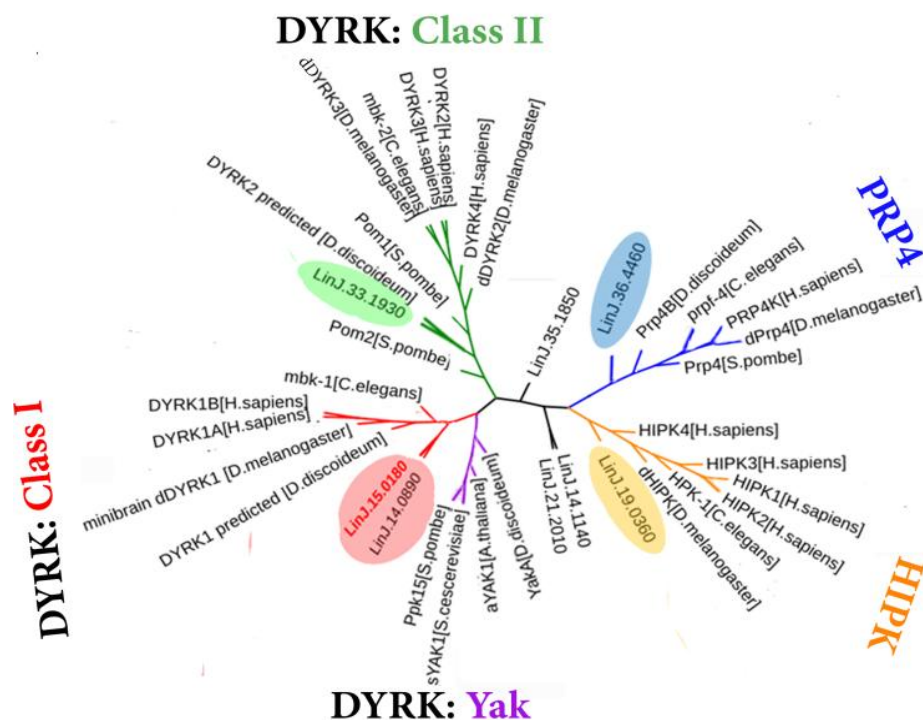
ενεργότητα της. Από εξελικτική σκοπιά, θεωρείται σχεδόν ταυτόσημη με τις ανθρώπινες κινάσες DYRK1A και DYRK1B καθώς παρουσιάζει ομοιότητα της τάξης του 43 και 44% στην περιοχή ενεργότητας. Επιπλέον, η *LinDYRK1* χαρακτηρίζεται από την ειδική αλληλουχία των 361 αμινοξέων καταλοίπων στην N-τελική περιοχή, όμως η περιοχή αυτή είναι μοναδική για το παράσιτο *Leishmania* καθώς δε παρουσιάζει μεγάλη συντηρητικότητα με αμινοτελικές περιοχές άλλων DYRK κινασών. Επιπλέον η DYRK1 του *Leishmania* παρουσιάζει ένα PEST μοτίβο στο αμινοτελικό άκρο, υπεύθυνο για τη πρωτεόλυση πρωτεϊνών, ένα συντηρημένο μοτίβο DH box πριν από τη περιοχή της επικράτειας, ένα μοτίβο HCD χαρακτηριστικό των DYRK στον καταλυτικό βρόγχο, ενώ το ενεργό κέντρο αποτελείται από ένα μοτίβο HxY αντί του συντηρημένου YxY (εικόνα 12).

Για να μελετηθεί ο ρόλος της DYRK1 του παράσιτου *Leishmania*, και αφού η απαλοιφή ενός γονιδίου καταλήγει συχνά σε μη βιώσιμο φαινότυπο, πραγματοποιήθηκε 'διευκολυνόμενη απάλειψη' (generation of facilitated null mutants) του γονιδίου (Σμυρλή μη δημοσιευμένα αποτελέσματα), όπως έχει προαναφερθεί (Dacher et al., 2014) σε προμαστιγωτές μορφές *Leishmania infantum*. Για το σκοπό αυτό έγινε πρώτα υπερέκφραση του γονιδίου σε λεισμανιακό φορέα έκφρασης (pXNG, Steven Beverley, σε συνεργασία με το G. Spaeth, ο οποίος έδωσε το πλασμίδιο) που φέρει το γονίδιο μάρτυρα GFP και το γονίδιο της κινάσης της θυμιδίνης και ύστερα ακολούθησε αντικατάσταση των δύο αλληλομόρφων με κασέτες που φέρουν αντίσταση στη πουρομυκίνη και υγρομυκίνη. Το "σύστημα διευκολυνόμενης εξάλειψης" βασίζεται στην αρνητική επιλογή του επισώματος pXNG-DYRK1 σε παράσιτα DYRK1<sup>+/+</sup> και DYRK1<sup>-/-</sup>. Κατά την αρνητική επιλογή, που γίνεται με το αντι-ικό φάρμακο ganciclovir, δημιουργείται από τη φωσφορυλίωση της κινάσης της θυμιδίνης ένας τοξικός μεταβολίτης. Το επίσωμα χάνεται γρήγορα σε παράσιτα αγρίου τύπου και σε παράσιτα απαλειμμένα στη πρωτεΐνη υπο μελέτη όταν η τελευταία δεν είναι απαραίτητη για τη βιωσιμότητα. Όταν όμως η υπό μελέτη πρωτεΐνη είναι απαραίτητη για τη βιωσιμότητα του παρασίτου τότε το επίσωμα δεν μπορεί να εξαλειφθεί. Με το τρόπο αυτό η απώλεια ή μη, αλλά και ο ρυθμός απώλειας του επισώματος μπορεί να δώσει σημαντικές πληροφορίες για το βιολογικό ρόλο του γονιδίου. Η διευκολυνόμενη εξάλειψη της παρασιτικής DYRK1, έδειξε ότι η κινάση αυτή δεν είναι απαραίτητη για τη βιωσιμότητα λογαριθμικών προμαστιγωτών μορφών μια και η εξάλειψη του επισώματος pXNG-LinDYRK1 ήταν ανεκτή σε παράσιτα LinDYRK1<sup>-/-</sup>.



**Εικόνα 12.** Σχηματική απεικόνιση ομοιοτήτων και διαφορών στη δομή των ομόλογων κινασών DYRK και YAK. Αριστερά βρίσκεται ο αριθμός των αμινοξικών καταλοίπων και δεξιά η ονομασία

των κινάσεων των οργανισμών (*LinDYRK1:L.infantum*, *TcDYRK1:T.cruzi*, *TbDYRK1:T.bruci*, *ScYAK1p:S.cerevisiae*, *DdDYRK1:D.discoideum*, *DmDYRK1:D.melanogaster*, *HsDYRK1A:H.sapiens*).  
 Μοτίβο PEST:κατάλοιπα σερίνης,θρεονίνης,γλουταμινικό οξύ,και προλίνη(κίτρινο),DH-box (μάυρο),NLS:σήμα πυρηνικού εντοπισμού(μώβ),Περιοχή επικράτειας (μωβ) περιλαμβάνει και τον βρόγχο ενεργοποίησης XxY (ευγενική παραχώρηση του Δρ.Vinicious Pinto Rocha και Δρ Δ. Σμυρλή).



**Εικόνα 13.** Σχηματική απεικόνιση φυλογενετικού δέντρου χωρίς ρίζα των κινάσεων DYRK. Παρουσιάζονται οι οικογένειες και υπεριοικογένειες των κινάσεων DYRK. Με χρώματα απεικονίζονται οι κινάσεις του παρασίτου *L.infantum* που εμφανίζουν ομολογία με τις αντίστοιχες οικογένειες πρωτεϊνών. Η προς μελέτη κινάση *LinDYRK1* απεικονίζεται με κόκκινο (*LinJ.150180*). (ευγενική παραχώρηση του Δρ.Vinicious Pinto Rocha και Δρ Δ. Σμυρλή)

## 2. Σκοπός

Ο στόχος της εργασίας αφορά τη μελέτη του βιολογικού ρόλου της πρωτεϊνικής κινάσης DYRK1 και πιο συγκεκριμένα η απάντηση στο ερώτημα για το αν η πρωτεϊνική κινάση είναι σημαντικός παράγοντας στη στατική φάση (μολυσματική) ανάπτυξης των προμαστιγωτών μορφών, στην απόκριση στις στρεσογόνες συνθήκες, στην διαφοροποίηση από την προμαστιγωτή στην αμαστιγωτή μορφή του παρασίτου και τέλος αν είναι άμεσα συνδεδεμένη με την μολυσματικότητα. Οι απαντήσεις στα παραπάνω ερωτήματα και η αναζήτηση της σύνδεσης του βιολογικού ρόλου της κινάσης με τη μολυσματικότητα του παρασίτου, αναμένεται να δώσουν απαντήσεις στο αν η κινάση *LinDYRK1* του παρασίτου *Leishmania* θα μπορούσε να θεωρηθεί φαρμακευτικός στόχος για τη θεραπεία της λεισμανίασης.

### 3.Υλικά και Μέθοδοι

---

#### 3.1.Υλικά

---

##### 3.1.1 Εργαστηριακός εξοπλισμός

---

- Μικροφυγόκεντρος επιτραπέζια φυγόκεντρος (Eppendorf 5410 και Thermo αντίστοιχα)
- Κυτταρομετρητής ροής (FACS calibur- Becton Dickinson)
- Επωαστήρας 25 °C για την καλλιέργεια παρασίτων (Shel-lab)
- Επωαστήρας 37 °C για την καλλιέργεια μακροφάγων (New Brunswick, Galaxy 170s)
- Πιπέτες μεταβλητού όγκου 1000/200/20μl και 2 μl (Pipetman P1000, P200, P20 και U2 της Gibson αντίστοιχα)
- Πεχάμετρο ακριβείας (Orion 2-Star pH Benchtop Meter, Thermo Scientific)
- Μικρόζυγος ακριβείας και αναλυτικός ζυγός
- Μικροσκόπια: TCSSP Leica συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού, ανάστροφο μικροσκόπιο (Axiovert 40C, Zeiss) και ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

##### 3.1.2. Αναλώσιμα υλικά

---

- Φλάσκες καλλιέργειας παρασίτων και μακροφάγων των 25 και 50 cm<sup>2</sup> (Nunc)
- Πλαστικοί σωλήνες erpendorf του 1,5 ml (Greiner)
- Φίλτρα αποστείρωσης με διάμετρο 0,2 και 0,45 μm (Santorius)
- Σωλήνες κυτταρομετρία (facs)
- Αιμοκυτταρόμετρα (Malassez, για την μέτρηση παρασίτων/Neubauer, για την μέτρηση μακροφάγων)
- Αποστειρωμένοι πλαστικοί ξύστες
- Αποστειρωμένες πλαστικές πιπέτες μιας χρήσεως των 2, 5 και των 10 mL (Sarstedt)
- Πλαστικά ακρορύγχια (tips) των 10, 200 και 1000 μL (Greiner)
- Δοκιμαστικοί σωλήνες 15 και 50 ml (Sarstedt)
- Αποστειρωμένοι πλαστικοί ξύστες (για την απόξυση μακροφάγων από τις φλάσκες)
- (Sarstedt)
- Πλάκες 24 φρεατίων για κυτταροκαλλιέργειες (Sarstedt)

##### 3.1.3. Αντιδραστήρια

---

- Θρεπτικό υλικό για την κυτταροκαλλιέργεια μακροφάγων και παρασίτων RPMI (Gibco)
- Ορός από έμβρυο μόσχου FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco) σε αναλογία 10% για τις κυτταροκαλλιέργειες παρασίτων και μακροφάγων, ο ορός πριν από την χρήση του θερμαίνεται για 30 λεπτά σε υδατόλουτρο στους 56°C (για την απενεργοποίηση του συμπληρώματος).
- Ρυθμιστικό HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid ) διάλυμα, pH7.4 (Biochrom)
- Αντιβιοτικά: Nourseothricin για την ανάπτυξη μόνο των ανασυνδυασμένων στελεχών των παρασίτων, πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη (Gibco)

- Χρωστική PI Propidium iodide και RNase (Sigma)
- Triton -100 (Sigma)
- 8CPT-cAMP(Abcam)

### 3.1.4. Διαλύματα

Για την Παρασκευή όλων των διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε δις-απεσταγμένο και απιονισμένο νερό (dd H<sub>2</sub>O). Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για τις διάφορες τεχνικές αποστειρώθηκαν σε υγρό κλίβανο για 20 λεπτά σε 15lb/in<sup>2</sup> ή υποβλήθηκαν σε διήθηση με φίλτρα 0,2 μm.

<b>Διάλυμα PI/RNase A</b>	
RNase A	100mg/ml
PBS	1x
PI	50mg/ml
<b>Phosphate Buffered Saline 10x, pH 7,4 (1lt)</b>	
NaCl	80 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	14,4g
KCl	2g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,4g

<b>Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας προμαστιγωτών παρασίτων</b>	
<i>M199 medium (supplemented with 10% heat-inactivate FCS)</i>	
HEPES pH 6.9	25 mM
NaHCO <sub>3</sub> 7.5%	4.2 mM
γλουταμίνη	2 mM
<b>1x RPMI 1640 vitamin mix</b>	
φολικό οξύ	10 μg/mL
αδενίνη	100 μM
hemin	30 μM
Πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη(Pen/Step)	100 U/mL

<b>Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας μακροφάγων</b>	
<i>RPMI medium (supplemented with 10% heat-inactivate FCS)</i>	
HEPES pH 7.4	10 mM
Πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη(Pen/Step)	100 U/mL



### 3.1.5. Κυτταρικές σειρές

- Κύτταρα αγρίου τύπου του παρασίτου *Leishmania infantum* L4 (Wt) (L4, MHOM/GR/78/L4): ***LinDYRK1*<sup>+/+</sup>**

Τα ανασυνδιασμένα παράσιτα:

- Κύτταρα του παράσιτα του παρασίτου *Leishmania infantum* επιμολυσμένα με το πλασμίδιο pXNG: ***LinDYRK1*<sup>+/+</sup> [pXNG]**
- Κύτταρα του παράσιτα του παρασίτου *Leishmania infantum* επιμολυσμένα με το πλασμίδιο pXNG στο οποίο έχει εισαχθεί το γονίδιο που εκφράζει την κινάση DYRK1: ***LinDYRK1*<sup>+/+</sup> [pXNG-*LinDYRK1*]**
- Κύτταρα του παράσιτα του παρασίτου *Leishmania infantum* KNOCKOUT1 (KO1) στα οποία έγινε απαλοιφή της κινάσης DYRK1 και είναι επιμολυσμένα με το πλασμίδιο pXNG-*LinDYRK1*: ***LinDYRK1*<sup>-/-</sup> [pXNG-*LinDYRK1*]KO1**
- Κύτταρα του παράσιτα του παρασίτου *Leishmania Infantum* προερχόμενα από των πολλαπλασιασμό των KO1 κυττάρων και έχουν αποβάλλει το πλασμίδιο pXNG-*LinDYRK1*: ***LinDYRK1*<sup>-/-</sup> cI4 KO1**
- Κύτταρα του παράσιτα του παρασίτου *Leishmania Infantum* KNOCKOUT2(KO2) στα οποία έγινε απαλοιφή της κινάσης DYRK1 και είναι επιμολυσμένα με το πλασμίδιο pXNG-*LinDYRK1*: ***LinDYRK1*<sup>-/-</sup> [pXNG-*LinDYRK1*]KO2**
- Κύτταρα του παράσιτα του παρασίτου *Leishmania Infantum* προερχόμενα από των πολλαπλασιασμό των KO2 κυττάρων και έχουν αποβάλλει το πλασμίδιο pXNG *LinDYRK1*: ***LinDYRK1*<sup>-/-</sup> cI5 KO2** και ***LinDYRK1*<sup>-/-</sup> cI2 KO2**
- Κύτταρα του παράσιτα του παρασίτου *Leishmania Infantum* επιμολυσμένα με το πλασμίδιο pXNG στο οποίο έχει εισαχθεί το γονίδιο που εκφράζει την κινάση DYRK1 ύστερα από 15 και με το φάρμακο ganciclovir με αποτέλεσμα η πλειοψηφία τους να έχει αποβάλει το πλασμίδιο : ***LinDYRK1*<sup>+/+</sup> [pXNG-*LinDYRK1*]:GCV (ganciclovir)**

## 3.2.Μέθοδοι

---

### 3.2.1.Κυτταροκαλλιέργειες

---

#### **Παράσιτα *Leishmania***

Οι προμαστιγωτές μορφές *Leishmania infantum* L4 αγρίου τύπου καλλιεργήθηκαν στους 25°C απουσία CO<sub>2</sub> σε υλικό RPMI ή M199, (όπως φαίνεται στον αντίστοιχο πίνακα). Για τα παράσιτα που έφεραν το επίσωμα [pXNG] ή [pXNGLinDYRK1] προστέθηκε στο υλικό αντιβίωση noursethrycin (NTC), σε συγκέντρωση 100µg/ml.

Για τη ανάλυση της ανάπτυξης των παρασίτων, πραγματοποιήθηκε καθημερινή καταμέτρηση του αριθμού των παρασίτων από την ημέρα εμβολιασμού της καλλιέργειας έως την στατική φάση (7<sup>η</sup> ημέρα ανάπτυξης). Για την καταμέτρηση χρησιμοποιήθηκε PBS(1x) και ποσότητα κυττάρων από κάθε καλλιέργεια σε αραιώση 1/10. Σταγόνες φορμαλδεΐδης (10%) προστέθηκαν ώστε να ακινητοποιηθούν τα παράσιτα και καταμετρήθηκαν στη Malassez.

#### **Ανάπτυξη παρασίτων σε θερμοκρασία 37°C**

Έγινε εμβολιασμός της καλλιέργειας όπως προαναφέρθηκε για τις φυσιολογικές συνθήκες. Τα παράσιτα μεταφέρθηκαν για ανάπτυξη σε επωαστικό κλίβανο σταθερής θερμοκρασία 37 °C, ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub> και pH=7. Ακολούθησε καταμέτρηση και παρατήρηση του ρυθμού ανάπτυξης

#### **Ανάπτυξη παρασίτων σε pH 5,2 και θερμοκρασία 25°C**

Στο θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την συγκεκριμένη καλλιέργεια έγινε προσθήκη ηλεκτρικού οξέος (succinic acid) ώστε να επιτευχθεί μεταβολή του pH από ουδέτερο σε όξινο (4,5-5,5). Η ρύθμιση του pH έγινε σε πεχάμετρο ακριβείας και ακολούθησε αποστείρωση του θρεπτικού υλικού μετά από διήθηση σε φίλτρο 0.2µm. Η καλλιέργεια εμβολιάστηκε με συγκέντρωση 10<sup>6</sup> παράσιτα/ml. Επώαση στους 25 °C και παρακολούθηση του ρυθμού ανάπτυξης με καθημερινή καταμέτρηση αυτών.

#### **Ανάπτυξη παρασίτων παρουσία 8CPT-cAMP**

Προστέθηκαν δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις 8CPT-cAMP ,10mM και 20mM. Ακολούθησε επώαση στους 25 °C και καθημερινή καταμέτρηση.

#### **Μακροφάγα J774.1**

Τα μακροφάγα της σειράς J774.1 προερχόμενα από μύες (American Type Culture Collection, Manassas, VA) καλλιεργήθηκαν σε υλικό RPMI-1640 (όπως φαίνεται στον αντίστοιχο πίνακα). Για τον εμβολιασμό της καλλιέργειας μακροφάγων χρησιμοποιήθηκαν 10<sup>5</sup> μακροφάγα/10 ml σε τρυβλίο T25. Τα μακροφάγα διατηρήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 37 °C, σε ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub> για 7 περίπου ημέρες, μέχρι να καλυφθεί ο τάπητας της φλάσκας κατά 80% περίπου. Κατά την ανακαλλιέργεια, το υπερκείμενο υλικό το οποίο περιείχε τα νεκρά μακροφάγα απομακρύνθηκε, και προστέθηκε φρέσκο υλικό και με πλαστικό ξύστη (scraper



προσκολλημένα στον τάπητα του τρυβλίου μακροφάγα ανασηκώθηκαν, και εμβολιάστηκαν σε φρέσκο υλικό σε αραιώση 1 προς 5. Η περισυλλογή των μακροφάγων J774.1 έγινε ύστερα από φυγοκέντρηση (1.000g) για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η κυτταρική σειρά J774.1 διατηρήθηκε σε RPMI /30% FBS /10% DMSO για μικρό χρονικό διάστημα στους  $-80^{\circ}\text{C}$  ή εναλλακτικά για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε υγρό άζωτο.

### *3.2.2. Έλεγχος μολυσματικότητας παρασίτων σε μακροφάγα J774*

Για το πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία 24 φρεατίων όπου στον πυθμένα τοποθετήθηκαν λαμέλες οι οποίες είχαν πρωτύτερα επωαστεί με διάλυμα 1mg/ml πολυλυσίνης (L-polylysine). Η πολυλυσίνη συμβάλλει ώστε τα μακροφάγα κύτταρα να προσκολληθούν στη λαμέλα και να μπορούν τελικά να παρατηρηθούν στο μικροσκόπιο. Αρχικά σε κάθε φρεάτιο (24) προστέθηκαν 400μl μακροφάγα ( $1.2 \cdot 10^5$  μακροφάγα) και επώαστηκαν σε επωαστικό κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας  $37^{\circ}\text{C}$  για 30-60 λεπτά. Ακολούθησε επιμόλυνση προμαστιγωτών παρασίτων στατικής φάσης. Για το σκοπό αυτό τα μακροφάγα επώαστηκαν με  $1.2 \cdot 10^6$  παρασίτων (αναλογία παρασίτων/μακροφάγων 10:1) για 16 ώρες. Έπειτα τα ελεύθερα παράσιτα απομακρύνθηκαν με τρεις εκπλύσεις με PBS. Τέλος το PBS αντικαταστάθηκε με υλικό κυτταροκαλλιέργειας μέχρι 72 ώρες. Ανά 24 ώρες τα μολυσμένα μακροφάγα επιστρωμένα σε λαμέλες μονιμοποιούνται με 100μl παραφορμαλδεύδη 2%(PF) σε κάθε φρεάτιο για 10 λεπτά.

Ακολούθησε πάλι έκπλυση με PBS και τοποθέτηση κάθε λαμέλας σε αντικειμενοφόρο οι οποίες σταθεροποιούνται με μικρή ποσότητα Mowiol. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε για τις υπόλοιπες επώσεις. Ο έλεγχος για την μολυσματικότητα πραγματοποιείται σε συνεστιακό μικροσκόπιο Zeiss με TCSSP Leica.

### *3.2.3. Κυτταρομετρία Ροής (FACS-Flow cytometry analysis)*

Πρόκειται για αυτοματοποιημένη μέθοδο ανάλυσης των φυσικών και χημικών χαρακτηριστικών μεμονωμένων κυττάρων τα οποία σημαίνονται με φθορίζουσες χρωστικές ή με αντισώματα συνδεδεμένα με διαφορετικά φθοριοχρώματα.

Η ανάλυση γίνεται με βάση τον εκπεμπόμενο φθορισμό και την σκέδαση του φωτός. Η κυτταρομετρία ροής επιτρέπει τον προσδιορισμό της πυκνότητας ανά μονάδα κυτταρικής επιφάνειας με βάση την ένταση του φθορισμού και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των κυττάρων. Συγκεκριμένα, ο πρόσθιος σκεδασμός FSC προσδιορίζει το μέγεθος των κυττάρων και ο πλάγιος σκεδασμός SSC την εσωτερική πολυπλοκότητα του κυττάρου.

Στην εργασία που παρουσιάζεται η κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη και τον προσδιορισμό των φάσεων του κυτταρικού κύκλου και για την μελέτη της απόπτωσης.

### **Ανάλυση κυτταρικού κύκλου και συγχρονισμός με υδροξυουρία**

Από αρχική καλλιέργεια παρασίτων τα οποία βρίσκονταν στη στατική φάση ανακαλλιεργήθηκαν σε  $10^6$  παράσιτα/ml και επώαστηκαν στους  $25^{\circ}\text{C}$ . Για την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου

ασυγχρόνιστων παρασίτων στις διάφορες φάσης ανάπτυξης, κύτταρα στη μέση λογαριθμική φάση (3η ημέρα), στο τέλος λογαριθμικής (5<sup>η</sup> ημέρα) και στην στατική φάση(7<sup>η</sup> ημέρα) προετοιμάζονται για ανάλυση του κυτταρικού κύκλου με FACS. Για την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου των παρασίτων έπρεπε να γίνει σήμανση του DNA αυτών και αποσύνθεση του RNA. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η χρωστική Propidium Iodide η οποία προσδένεται στο DNA ενώ η προσθήκη RNAase A διασπά το RNA των κυττάρων.

#### Διαδικασία

- Από κάθε καλλιέργεια απομονώθηκαν 500μl σε eppendorf και φυγοκεντρώνται για 5 λεπτά στις 3000rpm και θερμοκρασία 17°C.
- Ακολούθησε αφαίρεση υπερκείμενου, επαναιώρηση του κυτταρικού ιζήματος σε 100% κρύας αιθανόλης. Τα παράσιτα παρέμειναν στην αιθανόλη για 2 λεπτά.
- Τα μονιμοποιημένα παράσιτα φυγοκεντρήθηκαν, για 5 λεπτά στις 3000rpm και θερμοκρασία 17°C) και το ίζημα επώαζεται σε διάλυμα PBS που περιέχει την φθορίζουσα χρωστική PI σε συγκέντρωση 50μg/ml και 100 μg/ml RNase A.

Ύστερα, έγινε ανάλυση του κυτταρικού κύκλου των παρασίτων σε κυτταρομετρητή ροής (FACS). Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα CellQuest και Modfit.

#### **Ανάλυση του κυτταρικού κύκλου σε συνθήκες θερμικού σοκ (26-->37°C)**

Για τη ανάλυση του κυτταρικού κύκλου σε συνθήκες θερμικού σοκ πραγματοποιήθηκε ανακαλλιέργεια των παρασίτων σε 10<sup>6</sup> παράσιτα/ml από αρχική καλλιέργεια που βρισκόταν στην στατική φάση. Όταν τα κύτταρα βρίσκονταν στην μέση λογαριθμική φάση ανάπτυξης (3<sup>η</sup> ημέρα) όπου ο αριθμός των κυττάρων ήταν 8-15\*10<sup>6</sup>/ml απομονώθηκαν και επώαστηκαν στους 37°C σε ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub>. Σκοπός σε αυτήν την καλλιέργεια παρασίτων ήταν ο έλεγχος της ευαισθησίας και του ποσοστού επιβίωσης των κυττάρων σε υψηλή θερμοκρασία. Για την πραγματοποίηση της ανάλυσης τα κύτταρα σημάθηκαν με φθορίζουσα χρωστική, ιωδιούχο προπίδιο (Propidium Iodide, PI) όπως προαναφέρθηκε παραπάνω.

Η διαδικασία ήταν όμοια με την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου σε κύτταρα που αναπτύχθηκαν σε θερμοκρασία 25°C. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε μέσω του κυτταρομετρητή ροής και η επεξεργασία των αποτελεσμάτων με το πρόγραμμα CellQuest και Modfit.

#### **Έλεγχος του ποσοστού των νεκρών κυττάρων (διάτρησης μεμβράνης Membrane permeability)**

Προμαστιγωτά κύτταρα στατικής φάσης ανακαλλιιεργήθηκαν σε φρέσκο θρεπτικό υλικό, σε συγκέντρωση 10<sup>6</sup> παράσιτα/ml και επώαστηκαν σε θερμοκρασία 25 °C.

Κατά τη διάρκεια του πειράματος ο φυσιολογικός ρυθμός ανάπτυξης των παρασίτων ελεγχόταν καθημερινά με Malassez. Παράλληλα τα παράσιτα προετοιμάζονταν για τον έλεγχο του ποσοστού των νεκρών κυττάρων στη καλλιέργεια με FACS. Τα κύτταρα επώαστηκαν με PI χωρίς μονιμοποίηση. Η λογική της μεθόδου αυτής είναι ότι το PI εξαιρείται από την άθικτη κυτταρική μεμβράνη ζωντανών κυττάρων με αποτέλεσμα να μη μπορεί να τα σημάνει. Αντίθετα στα νεκρά κύτταρα καθώς οι μεμβράνες έχουν αποδιαταχθεί η χρωστική διεισδύει μέσα στα κύτταρα.

### Διαδικασία

- Κύτταρα από τις καλλιέργειες φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά σε 3000rpm.
- Ακολούθησε αφαίρεση υπερκείμενου και επαναιώρηση του ιζήματος των κυττάρων σε PBS που περιείχε PI σε συγκέντρωση 50μg/ml.

Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε με το κυτταρομετρητή ροής FACS CALIBUR. Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα CellQuest (Becton Dickinson).

Για το συγχρονισμό των παρασίτων στη G<sub>1</sub>/S φάση του κυτταρικού κύκλου με υδροξουρία επώαστηκαν λογαριθμικά παράσιτα με 2,5mM υδροξουρία σε υλικό κυτταροκαλλιέργειας για 12 ώρες. Για την παρακολούθηση της προόδου του κυτταρικού κύκλου ύστερα από υδροξουρία έγινε έκπλυση της υδροξουρίας 3 φορές με PBS και αντικατάσταση του υλικού κυτταροκαλλιέργειας με φρέσκο υλικό που δε περιέχει υδροξουρία. Η ανάλυση του κυτταρικού κύκλου έγινε όπως αναφέρεται πιο πάνω.

### **Έλεγχος μορφολογίας και ύπαρξης θρυμματισμένου DNA κατά την ανάπτυξη των κυττάρων με μικροσκοπία φθορισμού**

Αρχικά φρέσκο υλικό καλλιέργειας εμβολιάστηκε με 10<sup>6</sup> παράσιτα/ml στατικής φάσης και η νέα καλλιέργεια επώαστηκε σε θερμοκρασία 25°C. Έγινε παράλληλη παρατήρηση του ρυθμού ανάπτυξης πραγματοποιώντας καθημερινή καταμέτρηση την 3<sup>η</sup>-μέση λογαριθμικής, 5<sup>η</sup>-τέλος λογαριθμικής και 6<sup>η</sup> ημέρα -στατικής φάσης και τέλος απομονώθηκαν κύτταρα και μονιμοποιήθηκαν έπειτα από σήμανση με τη φθορίζουσα χρωστική PI.

### Διαδικασία

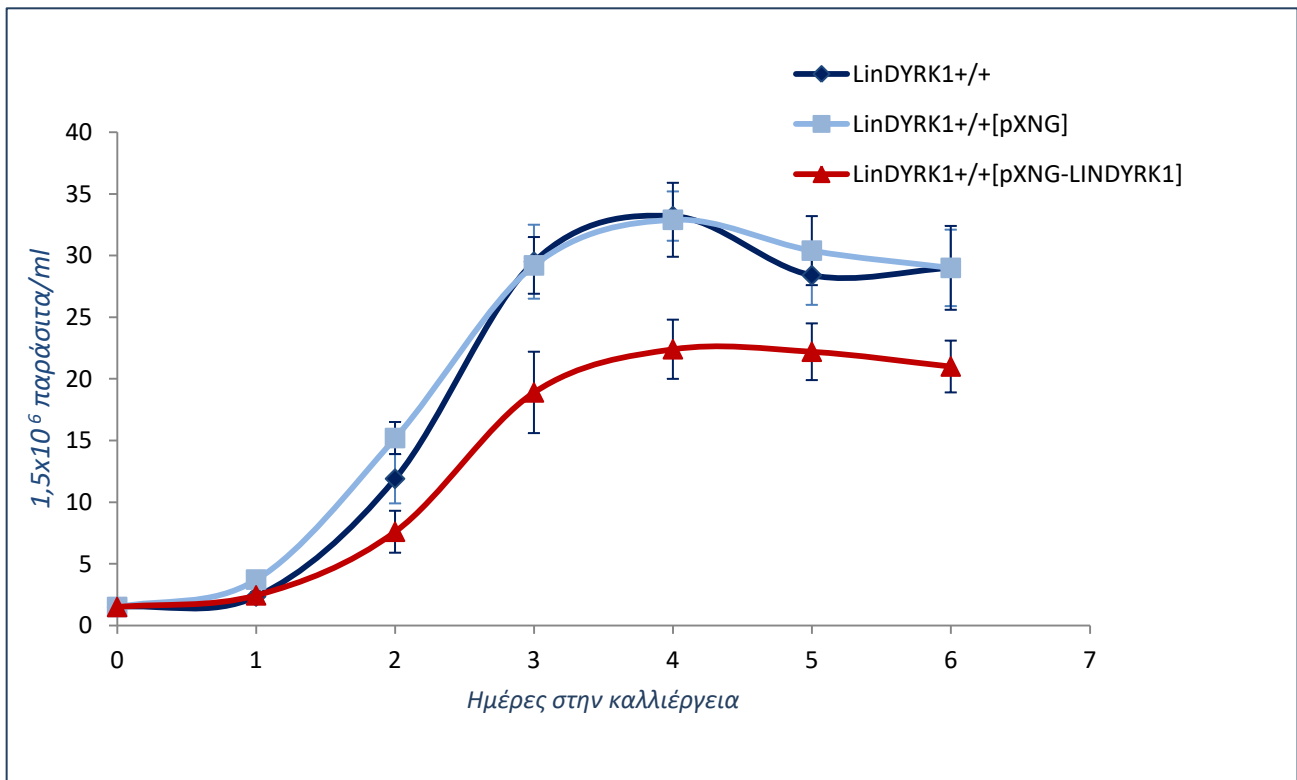
- Κύτταρα από κάθε καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά σε 3000rpm.
- Στη συνέχεια αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και επαναιωρήθηκε το ίζημα κυττάρων σε PBS/2% (w/v) παραφορμαλδεΐδη (PF)
- Μερικός όγκος (50μl) από τα κύτταρα τοποθετήθηκε σε λαμέλες και επωάζεται για 15 λεπτά.
- Ακολούθησε έκπλυση με διάλυμα PBS(1x) , 0.1% (v/v) Triton-X-100. Το Triton-X-100 συμβάλλει ώστε να δημιουργήσει ανοίγματα στις μεμβράνες.
- Αφού αφαιρέθηκε το διάλυμα προστέθηκε νέο διάλυμα PBS το οποίο περιέχει την φθορίζουσα χρωστική PI σε συγκέντρωση 10μg/ml και RNase A συγκέντρωσης 100mg/ml.
- Ακολουθήθηκε επώαση για 8 λεπτά.
- Τα κύτταρα ξεπλυνθήκαν με διάλυμα PBS και η λαμέλες τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρους όπου μονιμοποιήθηκαν με την χρήση της ουσίας Mowiol.

Ο έλεγχος της μορφολογίας έγινε σε συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss ή με TCSSP Leica.

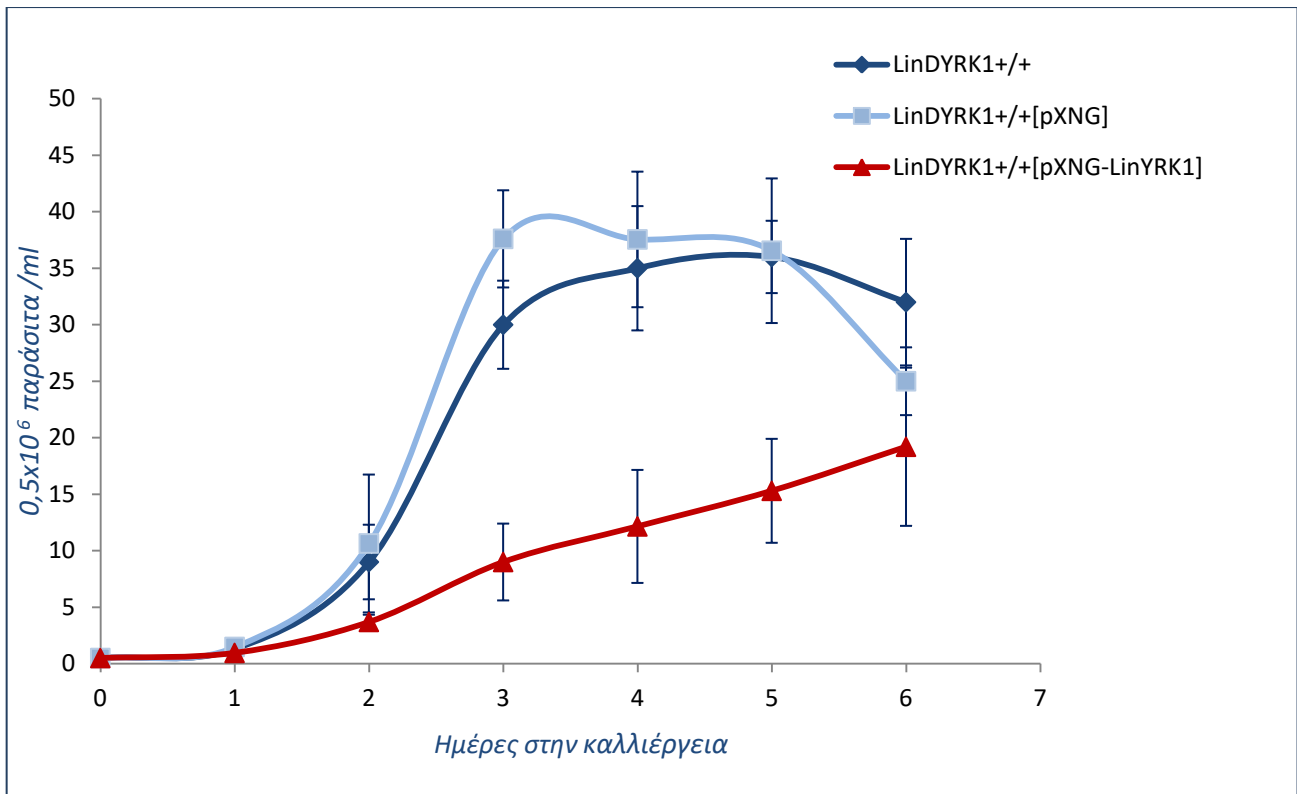
#### 4.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

##### Η *LinDyrk1* ελέγχει αρνητικά την ανάπτυξη του παρασίτου

Ένας κοινός φαινότυπος των DYRK κινασών σε άλλους οργανισμούς, είναι η λειτουργία τους ως αρνητικοί ρυθμιστές της ανάπτυξης και του κυτταρικού κύκλου. Για να ελέγξουμε αν η κινάση *LinDyrk1* του παρασίτου *Leishmania* λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής της ανάπτυξης των παρασίτων, επιλέξαμε προμαστιγιωτές μορφές *L. infantum*, που υπερεκφράζουν επισωματικά την *LinDyrk1* (*LinDyrk1*<sup>+/+</sup>[pXNG-*LinDyrk1*]) και συγκρίναμε την ανάπτυξη τους με παράσιτα αγρίου τύπου (*LinDyrk1*<sup>+/+</sup>) και παράσιτα ελέγχου που φέρουν μόνο το επίσωμα pXNG (*LinDyrk1*<sup>+/+</sup>[pXNG]). Για τον έλεγχο του ρυθμού ανάπτυξης έγινε έλεγχος με κανονικό υλικό (RPMI) [κεφάλαιο 2] και με πλούσιο υλικό (M199), με υψηλό εμβολιασμό παρασίτων [αριθμός παρασίτων ( $1,5 \cdot 10^6$ /ml)] (διάγραμμα 1) και με χαμηλό εμβολιασμό [αριθμός παρασίτων ( $0,5 \cdot 10^6$ /ml)] (διάγραμμα 2) αντίστοιχα.



**Διάγραμμα 1.** Απεικόνιση του ρυθμού αύξησης των παρασίτων ως συνάρτηση του χρόνου και της συγκέντρωσης των παρασίτων στο κανονικό μέσο ανάπτυξης-RPMI. Οι μπάρες σφάλματος αντιπροσωπεύουν τις τυπικές αποκλίσεις από τρία ανεξάρτητα πειράματα.

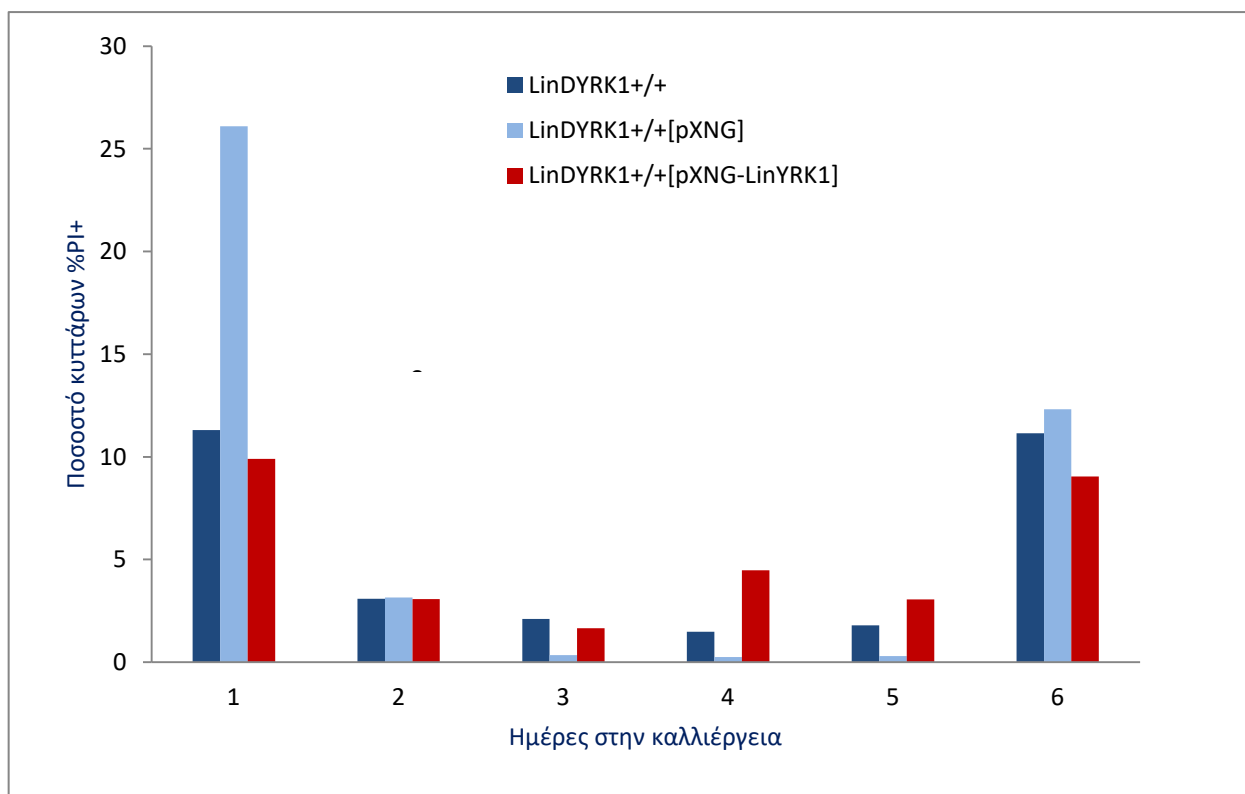


**Διάγραμμα 2.** Απεικόνιση του ρυθμού αύξησης των παρασίτων ως συνάρτηση του χρόνου και της συγκέντρωσης των παρασίτων στο 'πλούσιο' μέσο ανάπτυξης M199. Οι μπάρες σφάλματος αντιπροσωπεύουν τις τυπικές αποκλίσεις από τρία ανεξάρτητα πειράματα.

Με βάση την καμπύλη ανάπτυξης των παρασίτων (διάγραμμα 1,2) φαίνεται πως τα παράσιτα που υπερεκφράζουν την κινάση *LinDYRK1* καθυστερούν να αναπτυχθούν σε σχέση με τα κύτταρα που εκφράζουν την κινάση σε φυσιολογικά επίπεδα (*LinDYRK<sup>+/+</sup>*, *LinDYRK1<sup>+/+</sup>[pXNG]*). Αυτό φαίνεται να είναι ανεξάρτητο από το μέσο ανάπτυξης ωστόσο ο υψηλός εμβολιασμός της καλλιέργειας συμβάλλει σε πιο γρήγορο ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων *LinDYRK1<sup>+/+</sup>[pXNG-LinDYRK1]* (διάγραμμά 1) παρά το περιορισμό του θρεπτικού υλικού. Για να διερευνηθεί ο μηχανισμός που τα παράσιτα καθυστερούν την ανάπτυξή τους (α) έγινε έλεγχος του ποσοστού του κυτταρικού τους θανάτου και (β) του κυτταρικού τους κύκλου.

Ο έλεγχος του κυτταρικού τους θανάτου έγινε με χρώση ιωδιούχου προπιδίου και με κυτταρομετρία ροής. Κύτταρα θετικά στη χρώση, είναι νεκρά καθότι η κυτταρική τους μεμβράνη έχει διατηρηθεί και είναι περατή στο ιωδιούχο προπίδιο. Ανάλυση του κυτταρικού θανάτου έγινε σε χρονικά σημεία που αντιστοιχούν σε όλες τις μέρες ανάπτυξης του παρασίτου στη καλλιέργεια (μέρα 1-6). Η σήμανση με ιωδιούχο προπίδιο ήταν μεγαλύτερη σε όλες τις κυτταρικές σειρές τη πρώτη και έκτη μέρα ανάπτυξης. Αυτό το αποτέλεσμα είναι αναμενόμενο καθώς αυτά τα παράσιτα την πρώτη μέρα ανάπτυξης έχουν αραιωθεί σε καινούργιο θρεπτικό υλικό και μεταβάλλονται οι συνθήκες ανάπτυξης τους (lag φάση) και άρα ο βιώσιμος αριθμός κυττάρων, ενώ τα παράσιτα της έκτης μέρας (στατικής φάσης) βρίσκονται πλέον σε υλικό περιορισμένης θρεπτικής διαθεσιμότητας. Έπειτα από την δεύτερη ημέρα τα νεκρά κύτταρα μειώνονται

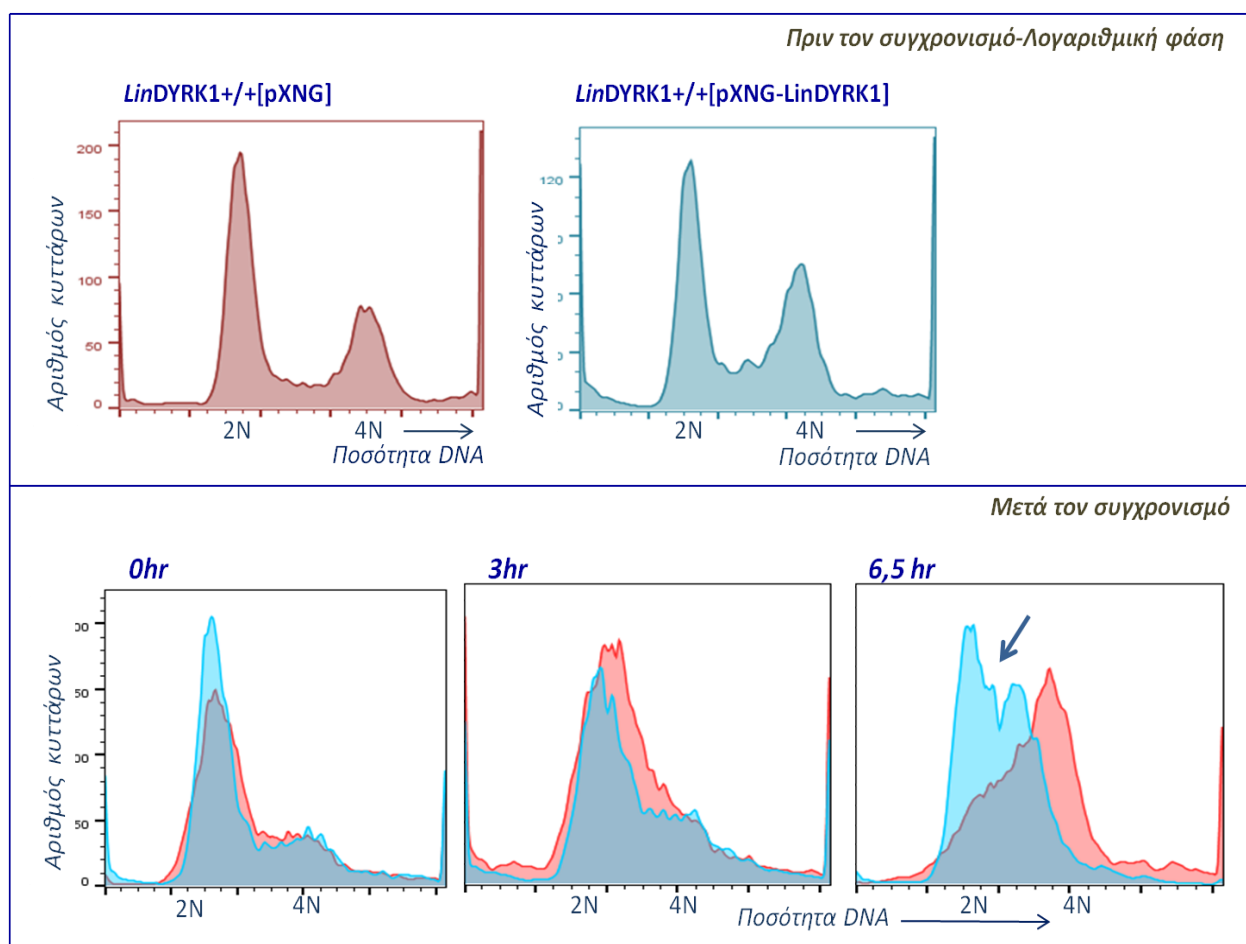
σημαντικά καθώς τα παράσιτα προσαρμόζονται στις νέες συνθήκες και πολλαπλασιάζονται ξανά, έως ότου φθάσουν και πάλι στην στατική φάση ανάπτυξης. Συμπερασματικά, τα πειράματα έδειξαν ότι δεν υπάρχει μεγάλη διαφορά στα παράσιτα *LinDyrk1*<sup>+/+</sup>[pXNG-*LinDyrk1*] σε σχέση με τα παράσιτα ελέγχου *LinDyrk1*<sup>+/+</sup>[pXNG] και τα παράσιτα αγρίου τύπου *LinDyrk1*<sup>+/+</sup> (**Διάγραμμα 3**) και άρα το γεγονός ότι τα παράσιτα που υπερεκφράζουν τη *LinDyrk1* παρουσιάζουν καθυστερημένη ανάπτυξη στη κυτταροκαλλιέργεια πιθανώς να οφείλεται στο κυτταρικό τους κύκλο.



**Διάγραμμα 3.** Απεικόνιση του % ποσοστού των νεκρών παρασίτων στην καλλιέργεια σε συνάρτηση με το χρόνο αύξησης. Παρατηρούνται οι μικρές διαφορές στο ποσοστό των νεκρών κυττάρων ανάμεσα στα διαφορετικά στελέχη με την πάροδο του χρόνου.

Για το λόγο αυτό έγινε ανάλυση του κυτταρικού κύκλου. Για την ανάλυση αυτή χρησιμοποιήθηκαν λογαριθμικά ασυγχρόνιστα παράσιτα *LinDyrk1*<sup>+/+</sup>[pXNG], *LinDyrk1*<sup>+/+</sup>[pXNG-*LinDyrk1*] και παράσιτα συγχρονισμένα στη G<sub>1</sub>/S φάση του κυτταρικού κύκλου ύστερα από επώαση με το φάρμακο υδροξυουρία (2,5 mM) αναστολέα της ριβονουκλεοτιδικής αναγωγής. Για να συγκριθεί η πορεία του κυτταρικού κύκλου μεταξύ των δύο κυτταρικών σειρών συγχρονισμένα κύτταρα εκπλύθηκαν και έγινε ανάλυση του κυτταρικού τους κύκλου, 3 και 6,5 ώρες μετά την έκπλυση από την υδροξυουρία. Στο **διάγραμμα 4** φαίνεται ότι η υπέρεκφραση της *LinDyrk1* εμποδίζει την μετάβαση G<sub>1</sub> στην S φάση και την ολοκλήρωση τα S φάσης. Πιο συγκεκριμένα φαίνεται ότι τρεις ώρες μετά την αφαίρεση της υδροξυουρίας υπάρχει μεγαλύτερο ποσοστό κυττάρων *LinDyrk1*<sup>+/+</sup>[pXNG-*LinDyrk1*], στο όριο G<sub>1</sub>/S από τα κύτταρα ελεγχού, *LinDyrk1*<sup>+/+</sup>[pXNG], στα

οποία ένα μεγαλύτερο ποσοστό βρίσκεται ήδη στην S φάση. Αντίστοιχα, 6,5 ώρες μετά ένα μεγάλο ποσοστό *LinDYRK1*<sup>+/+</sup>[pXNG-*LinDYRK1*] βρίσκονται στην S φάση του κυτταρικού κύκλου ενώ το μεγαλύτερο ποσοστό των κυττάρων ελέγχου βρίσκονται στην G2/M φάση του κυτταρικού κύκλου .



**Διάγραμμα 4.** Απεικόνιση του κυτταρικού κύκλου των στελεχών παρασίτων *LinDYRK1*<sup>+/+</sup>[pXNG-*DYRK1*] (ροζ) και *LinDYRK1*<sup>+/+</sup>[pXNG] (γαλάζιο) πριν και μετά τον συγχρονισμό με υδροξουρία. Ιστόγραμμα απεικονίζει το φθορισμό του ιωδιούχου προπιδίου (κανάλι FL2, ποσότητα DNA) σε ασυγχρόνιστα κύτταρα, σε κύτταρα συγχρονισμένα με υδροξουρία (0hr) και σε κύτταρα που είχαν εκπλυθεί από την υδροξουρία και έχουν αφεθεί να ολοκληρώσουν το κυτταρικό κύκλο 3 και 6,5 ώρες μετά την έκπλυση.

### Η εξάλειψη του πλασμιδίου έκφρασης *LinDYRK1* αντιστρέφει την καθυστέρηση στην ανάπτυξη και στον κυτταρικό τους κύκλο

Για να μελετηθεί περαιτέρω ο βιολογικός ρόλος της *LinDYRK1* χρησιμοποιήθηκε ένα σύστημα διευκολυμένης εξάλειψης της *LinDYRK1* (Smirlis et al, μη δημοσιευμένο). Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, η διευκολυμένη εξάλειψη προϋποθέτει την υπερέκφραση του γονιδίου υπό μελέτη από ένα πλασμίδιο pXNG (Steven Beverley) που επίσης εκφράζει ένα γονίδιο δείκτη GFP και ένα γονίδιο της κινάσης της θυμιδίνης που λειτουργεί ως γονίδιο αρνητικής επιλογής στο

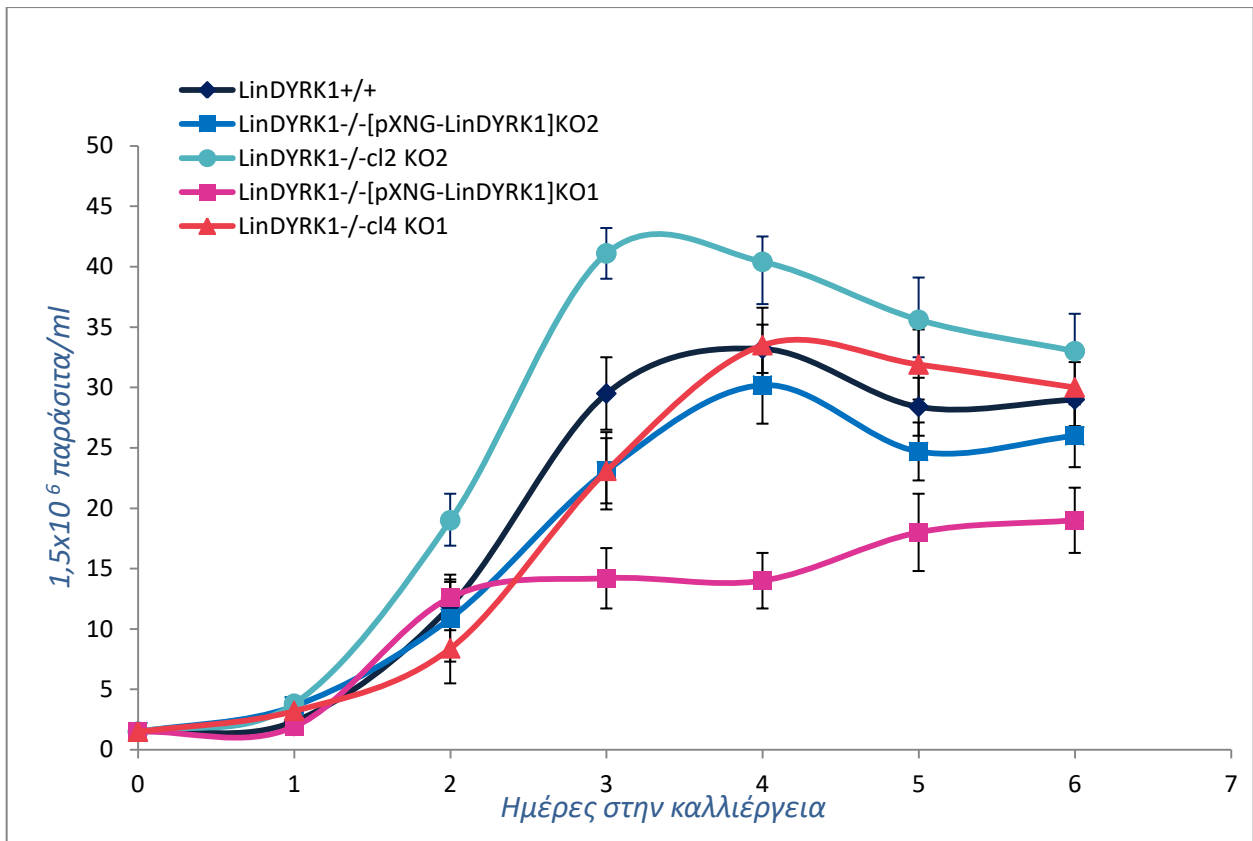


επίσωμα έκφρασης που φέρει τη *pXNG-LinDYRK1*. Η κινάση της θυμιδίνης φωσφορυλιώνει το φάρμακο GCV σε ένα τοξικό ανάλογο και έτσι τα κύτταρα που έχουν επωαστεί με GCV, έχουν τη τάση να εξαλείφουν διαδοχικά το επίσωμα που φέρει την κινάση της θυμιδίνης. Όταν το γονίδιο είναι απαραίτητο για τη βιωσιμότητα του παρασίτου το επίσωμα παραμένει, παρά την αρνητική επιλογή, με το φάρμακο GCV. Το σύστημα της διευκολυμένης εξάλειψης είναι χρήσιμο γιατί προστατεύει από ένα φαινότυπο κυτταρικού θανάτου, όπου η εξάλειψη του υπο μελέτη γονιδίου δεν καθιστά δυνατή τη δημιουργία ενός βιώσιμου γονιδιακού παρασίτου. Πειράματα στο εργαστήριο Μοριακής Παρασιτολογίας έδειξαν ότι η διευκολυμένη εξάλειψη του γονιδίου *LinDYRK1*, μετά από 15 διαδοχικές ανακαλλιέργειες (passages) από την στατική φάση, ότι στη πλειοψηφία (>70%) τα κύτταρα *LinDYRK1*<sup>-/-</sup> έφεραν το επίσωμα, ενώ στα αντίστοιχα *LinDYRK1*<sup>+/+</sup> παράσιτα μόνο το 0,6% έφερε το επίσωμα *LinDYRK1*<sup>-/-</sup> (Smirlis et al, μη δημοσιευμένο). Σε διαδοχικές ανακαλλιέργειες όπου πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός από την λογαριθμική φάση ανάπτυξης, το επίσωμα χανόταν με την ίδια ευκολία όπως από τα κύτταρα ελέγχου *LinDYRK1*<sup>+/+</sup>.

Για κάθε περίπτωση τα πειράματα όλα έγιναν με δύο ή πάνω από δύο κυτταρικές σειρές που είχαν δημιουργηθεί αντίστοιχα από διαφορετικούς ετερόλογους κλώνους ώστε να εξαλειφθούν φαινότυποι που να σχετίζονται με τη φυσική ποικιλομορφία του παρασίτου. Για να μελετήσουμε το φαινότυπο των παρασίτων *LinDYRK1*<sup>-/-</sup> επιλέχθηκαν κλώνοι που είχαν χάσει παντελώς το επίσωμα *pXNG-LinDYRK1*, και τα αντίστοιχα παράσιτα της γονεϊκής κυτταρικής σειράς *LinDYRK1*<sup>-/-</sup> [*pXNG-LinDYRK1*].

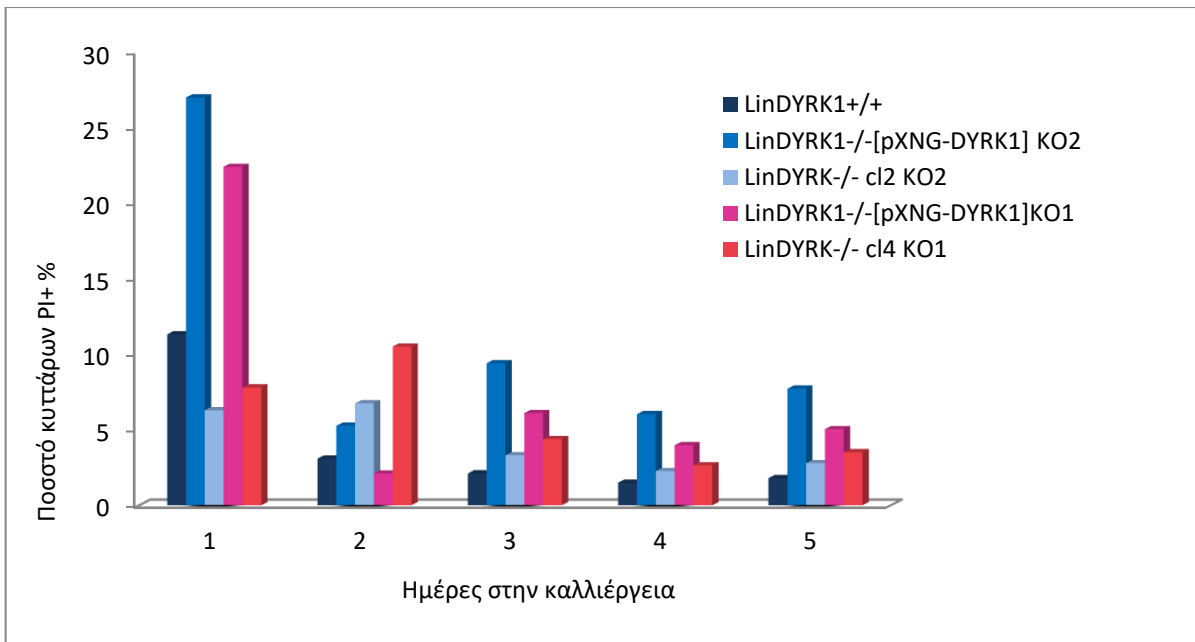
Πιο συγκεκριμένα επιλέχθηκαν οι κλώνοι *LinDYRK1*<sup>-/-</sup> cl2 KO2 και *LinDYRK1*<sup>-/-</sup> cl4 KO1 οι οποίοι προέρχονται από τις κυτταρικές σειρές *LinDYRK1*<sup>-/-</sup> [*pXNG-LinDYRK1*] KO2 και *LinDYRK1*<sup>-/-</sup> [*pXNG-LinDYRK1*] KO1 αντίστοιχα. Αρχικά ελέγχθηκε η ανάπτυξη των παρασίτων στη κυτταροκαλλιέργεια, ώστε να μελετηθεί ο ρόλος της *LinDYRK1* στην ανάπτυξη των παρασίτων. Επίσης έγινε έλεγχος της περατότητας της κυτταρικής μεμβράνης (έλεγχος κυτταρικού θανάτου) με ιωδιούχο προπίδιο, που έδειξε ότι τα παράσιτα δεν παρουσίαζαν μεγαλύτερη από τις γονεϊκές σειρές *LinDYRK1*<sup>-/-</sup> [*pXNG-LinDYRK1*] KO1 και KO2 και τα κύτταρα ελέγχου περατότητα στη κυτταρική μεμβράνη (**διάγραμμα 6**).

Σύμφωνα με το διάγραμμα 5, ο έλεγχος της ανάπτυξης των παρασίτων έδειξε ότι οι γονεϊκές σειρές *LinDYRK1*<sup>-/-</sup> [*pXNG-LinDYRK1*] KO1 και *LinDYRK1*<sup>-/-</sup> [*pXNG-LinDYRK1*] KO2 έχουν καθυστερημένη ανάπτυξη σχετικά με τα παράσιτα αγρίου τύπου. Ωστόσο, η διαφορά στην ανάπτυξη μεταξύ των δύο κυτταρικών σειρών πιθανολογείται ότι οφείλεται είτε στην φυσική ποικιλομορφία των κλώνων αυτών, είτε στη διαφορετική υπερέκφραση της *LinDYRK1*. Από το διάγραμμα φαίνεται ότι όταν τα παράσιτα *LinDYRK1*<sup>-/-</sup> [*pXNG-LinDYRK1*] KO1 και *LinDYRK1*<sup>-/-</sup> [*pXNG-LinDYRK1*] KO2 που έχουν αποβάλλει το επίσωμα τους αναπτύσσονται πιο γρήγορα.

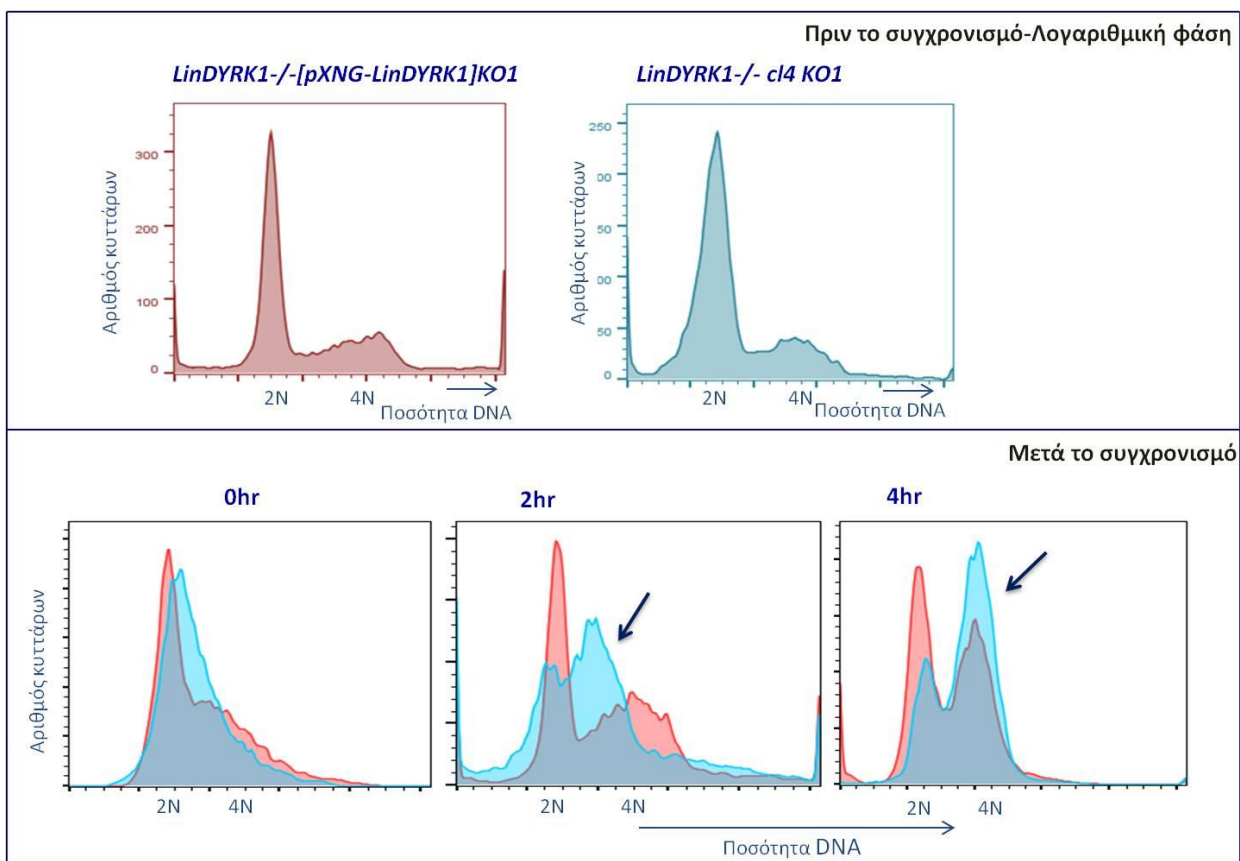


**Διάγραμμα 5.** Απεικόνιση του ρυθμού αύξησης των παρασίτων ως συνάρτηση του χρόνου και της συγκέντρωσης των παρασίτων στο φτωχό μέσο ανάπτυξης. Οι μπάρες σφάλματος αντιπροσωπεύουν τις τυπικές αποκλίσεις από τρία ανεξάρτητα πειράματα.

Η αναστροφή της καθυστέρησης της ανάπτυξης των γονεϊκών σειρών *LinDYRK1*<sup>-/-</sup>[pXNG-*LinDYRK1*] και από τα παράσιτα *LinDYRK1*<sup>-/-</sup> που έχουν χάσει το επίσωμα συμπληρώθηκε με πειράματα κυτταρικού κύκλου. Από την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου έπειτα από το συγχρονισμό με υδροξουρία στην λογαριθμική φάση φαίνεται ότι τα παράσιτα *LinDYRK1*<sup>-/-</sup>cl4 KO1 που δεν εκφράζουν την κινάση μεταβαίνουν ταχύτερα στην S φάση του κυτταρικού κύκλου σε αντίθεση με τα *LinDYRK1*<sup>-/-</sup>[pXNG-*LinDYRK1*]KO1 (4hr, **διάγραμμα 5**). Συμπερασματικά, η παρουσία της *LinDYRK1* προκαλεί ανάστροφη επίδραση στην πρόοδο του κυτταρικού και σχετίζεται με την επιμήκυνση της φάσης G<sub>1</sub>.



**Διάγραμμα 6.** Απεικόνιση του % ποσοστού των νεκρών παρασίτων στην καλλιέργεια σε συνάρτηση με το χρόνο αύξησης. Παρατηρούνται οι μικρές διαφορές στο ποσοστό των νεκρών κυττάρων ανάμεσα στα διαφορετικά στελέχη με την πάροδο του χρόνου.



**Διάγραμμα 7.** Απεικόνιση του κυτταρικού κύκλου των στελεχών παρασίτων *LinDYRK1*<sup>-/-</sup> [pXNG-*LinDYRK1*]KO1 (ροζ) και *LinDYRK1*<sup>-/-</sup> cl4 (γαλάζιο) πριν και μετά τον συγχρονισμό με υδροξουρία. Ιστόγραμμα απεικονίζει το φθορισμό του ιωδιούχου προπιδίου (κανάλι FL2,

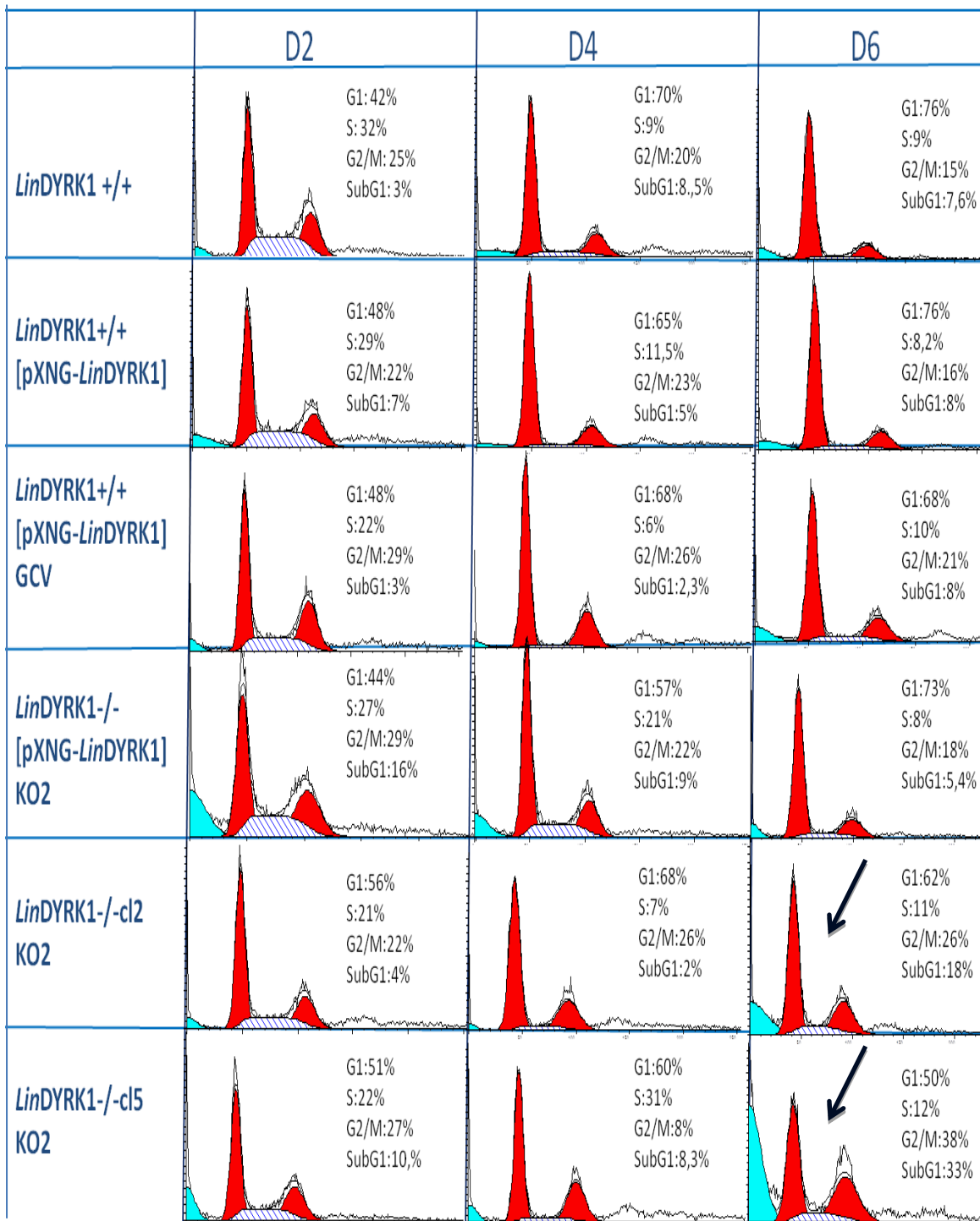
ποσότητα DNA) σε ασυγχρόνιστα κύτταρα, σε κύτταρα συγχρονισμένα με υδροξουρία (0hr) και σε κύτταρα που είχαν εκπλυθεί από την υδροξουρία και έχουν αφεθεί να ολοκληρώσουν το κυτταρικό κύκλο 2 και 4 ώρες μετά την έκπλυση.

### Η έκφραση της *LinDYRK1* είναι σημαντική για την στατική φάση ανάπτυξης των παρασίτων

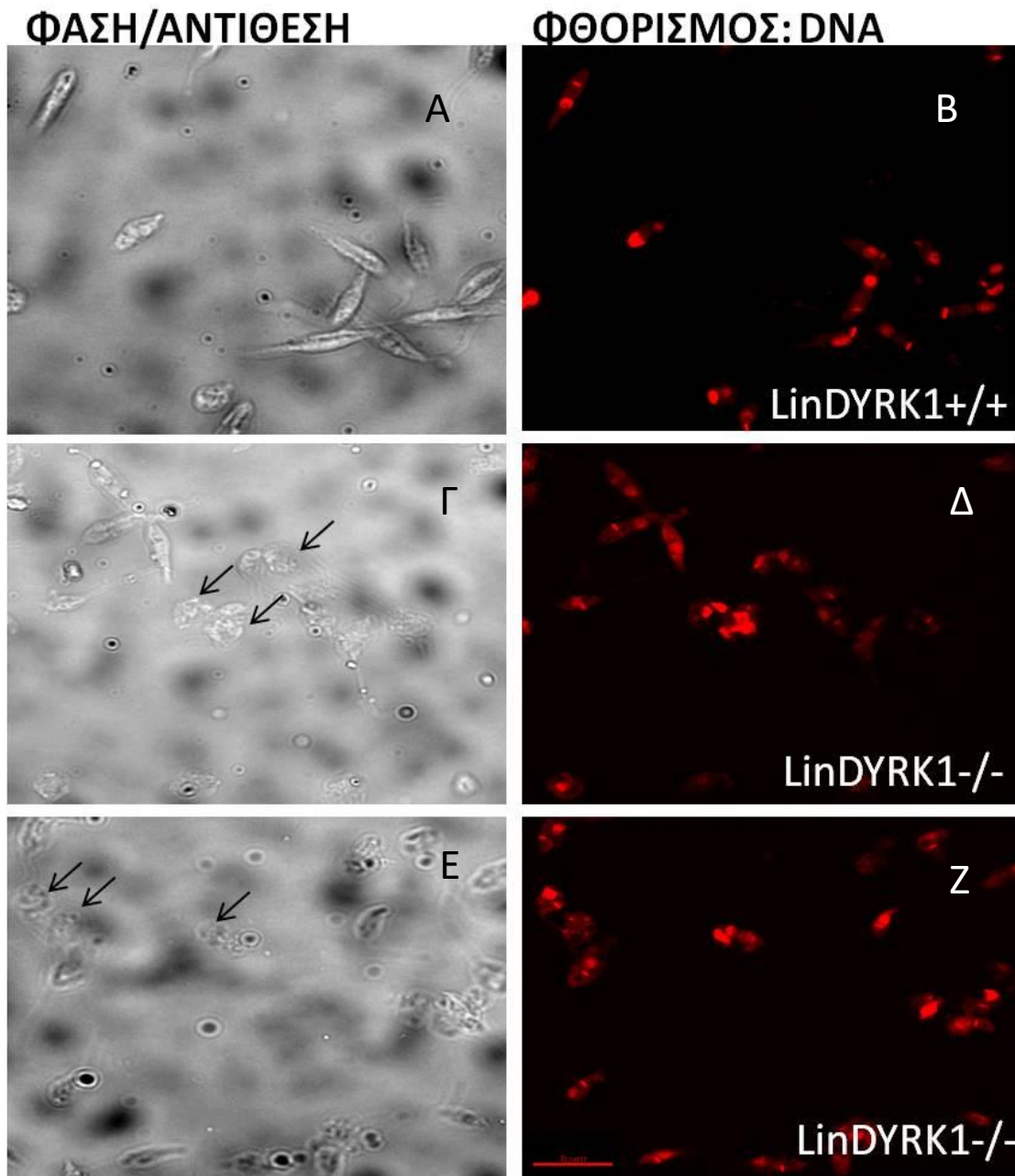
Όπως αναφέρθηκε πιο πριν η υπερέκφραση της *LinDYRK1* προκαλεί ανωμαλίες στο κυτταρικό κύκλο και σχετίζεται με την επιμήκυνση της φάσης  $G_1$ . Είναι επίσης γνωστό ότι η ακριβής ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου σχετίζεται άμεσα με την ικανότητα των παρασίτων να είναι μολυσματικά, καθότι τα μολυσματικά παράσιτα είναι μετακυκλικά δηλαδή έχουν σταματήσει να διαιρούνται και έχουν εξέλθει στη  $G_0/G_1$  φάση του κυτταρικού κύκλου. Αξενικά παράσιτα στατικής φάσης μοιάζουν μεταβολικά και βιοχημικά με τα μετακυκλικά παράσιτα του ενδιάμεσου ξενιστή. Για το σκοπό αυτό έγινε σύγκριση του κυτταρικού κύκλου διαγονιδιακών παρασίτων σε διάφορες φάσεις της *in vitro* ανάπτυξης (λογαριθμική φάση- ημέρα 2, τέλος λογαριθμικής/ αρχής στατικής- ημέρα 4 και

στη μολυσματική στατική φάση-ημέρα 6). Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήσαμε παράσιτα αγρίου τύπου *LinDYRK1*<sup>+/+</sup> και αυτά που υπερεκφράζουν την κινάση *LinDYRK1*<sup>+/+</sup>[pXNG-*LinDYRK1*] και παράσιτα ελέγχου που έχουν προέρθει από τα τελευταία αλλά έχουν χάσει το επίσωμα- *LinDYRK1*<sup>+/+</sup>[pXNG-*LinDYRK1*]GCV. Επίσης, επιλέχθηκαν τα παράσιτα κλώνοι *LinDYRK1*<sup>-/-</sup>c12 KO2, *LinDYRK1*<sup>-/-</sup>c15 KO2 και ο γονεϊκός τύπος αυτών *LinDYRK1*<sup>-/-</sup>[pXNG-*LinDYRK1*]KO2.

Η ανάλυση του κυτταρικού κύκλου των παρασίτων έδειξε το ποσοστό των κυττάρων στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Στους κλώνους *LinDYRK1*<sup>-/-</sup>c12 KO2, *LinDYRK1*<sup>-/-</sup>c15 KO2 παρατηρείται στην στατική φάση (ημέρα 6) υψηλό ποσοστό νεκρών κυττάρων, ενώ αυξάνεται το ποσοστό των παρασίτων που βρίσκονται στη  $G_2/M$ . Το γεγονός αυτό επιβεβαιώθηκε και με πειράματα μικροσκοπίας φθορισμού, ύστερα από σήμανση του DNA των παρασίτων (πυρήνα και κινητοπλάστη) με ιωδιούχου προπίδιο παρουσία RNάσης A. Στην εικόνα 12, φαίνεται ότι κύτταρα με απαλειμμένη τη *LinDYRK1* παρουσιάζουν θρυμματισμένο DNA σε σχέση με τα κύτταρα αγρίου τύπου. Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι η κατάτμηση του DNA στη στατική φάση των παρασίτων *LinDYRK1*<sup>-/-</sup>, δε σχετίζεται με μείωση των ποσοστών ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης, που υποδηλώνει ότι οι δύο διαδικασίες είναι ανεξάρτητες ή ότι τα κύτταρα *LinDYRK1*<sup>-/-</sup> πασουσιάζουν διαφορές στη περατότητα της κυτταρικής μεμβράνης.



**Διάγραμμα 8.** Απεικόνιση του κυτταρικού κύκλου των στελεχών παρασίτων στην αρχή της λογαριθμικής φάσης (D2), στην μέση λογαριθμική φάση (D4), και στην στατική φάση ανάπτυξης (D6). Τα βέλη δείχνουν το υψηλό ποσοστό αποπτωτικών κυττάρων στους κλώνους *LinDYRK1<sup>-/-</sup>cl5* KO2 και *LinDYRK1<sup>-/-</sup>cl2* KO2 .

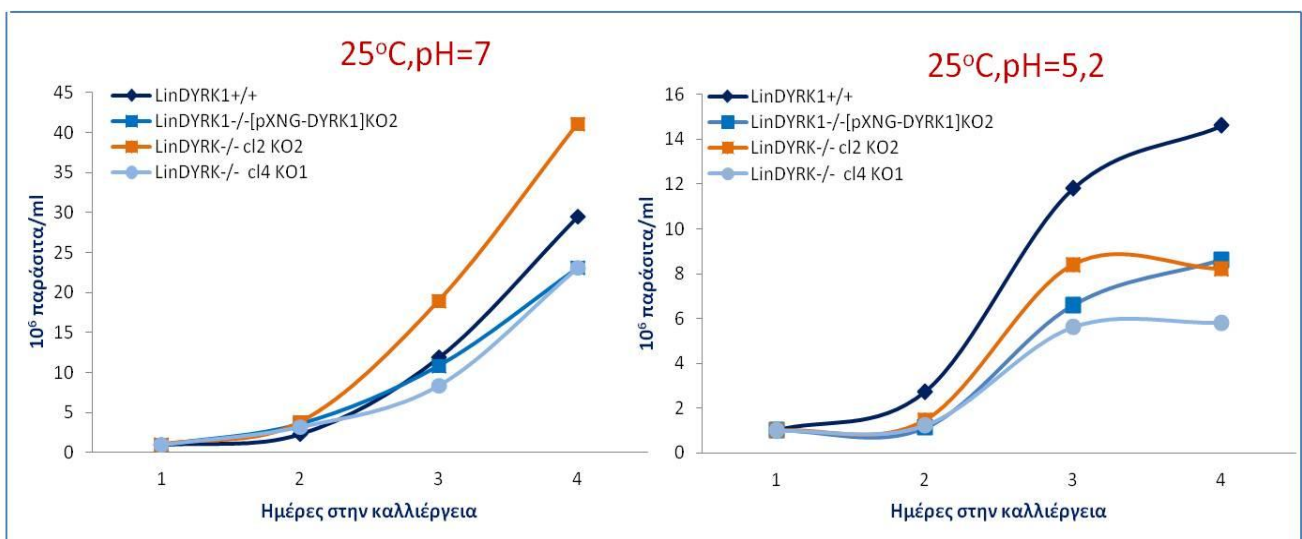


**Εικόνα 14. Φωτογραφίες από συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού στην στατική φάση ανάπτυξης των παρασίτων. Τα βέλη δείχνουν τα παράσιτα όπου το DNA έχει υποστεί θρυμματισμό (εικόνα Γ και Δ)**

## Τα παράσιτα με απαλειμμένη την *LinDYRK1* παρουσιάζουν αυξημένη ευαισθησία στο θερμικό σοκ

Κατά τη διαφοροποίηση των παρασίτων από την προμαστιγωτή μορφή στο έντερο της σκνίπας στη αμαστιγωτή μορφή στο ενδολυσσόσωμα του μακροφάγου του τελικού ξενιστή, τα παράσιτα συναντούν και προσαρμόζονται σε στρεσογόνες συνθήκες όπως στη ξαφνική αύξηση της θερμοκρασίας ( $26^{\circ}\text{C} \rightarrow 37^{\circ}\text{C}$ ) και πτώση του pH ( $7 \rightarrow 5,5$ ). Αφού έχει δειχθεί σε άλλους οργανισμούς ότι πρωτεΐνες της οικογένειας DYRK παίζουν σημαντικό ρόλο στην απόκριση συνθηκών στρες, υποθέσαμε ότι η *LinDYRK1* συμμετέχει σε σηματοδοτικά μονοπάτια που σχετίζονται με την απόκριση στο στρες κατά τις συνθήκες διαφοροποίησης του παρασίτου. Για το λόγο αυτό κρίθηκε απαραίτητο να μελετηθεί ο ρόλος της *LinDYRK1* στις συνθήκες διαφοροποίησης, δηλαδή κατά τη διάρκεια μεταβολής του pH ( $7 \rightarrow 5,5$ ) και θερμικού σοκ ( $26^{\circ}\text{C} \rightarrow 37^{\circ}\text{C}$ ).

Αρχικά μελετήθηκε η ανάπτυξη των διαγονιδιακών παρασίτων κατά τη διάρκεια της μεταβολής του pH ( $7 \rightarrow 5,5$ ). Πιο συγκεκριμένα μελετήσαμε την ανάπτυξη των παρασίτων αγρίου τύπου *LinDYRK1*<sup>+/+</sup>, τους κλώνους *LinDYRK1*<sup>-/-</sup>cl4 KO1, *LinDYRK1*<sup>-/-</sup>cl2 KO2 καθώς και τον γονεϊκό τύπο *LinDYRK1*<sup>-/-</sup>[pXNG-*LinDYRK1*]KO2. Οι καμπύλες ανάπτυξης των γονεϊκών σειρών *LinDYRK1*<sup>-/-</sup>[pXNG-*LinDYRK1*] και των παρασίτων *LinDYRK1*<sup>-/-</sup>, είναι παρόμοιες σε pH=5,5. Από το αποτέλεσμα αυτό φαίνεται ότι η έκφραση ή μη της *LinDYRK1*, δε μεταβάλλει σημαντικά την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό του παρασίτου στο όξινο pH.

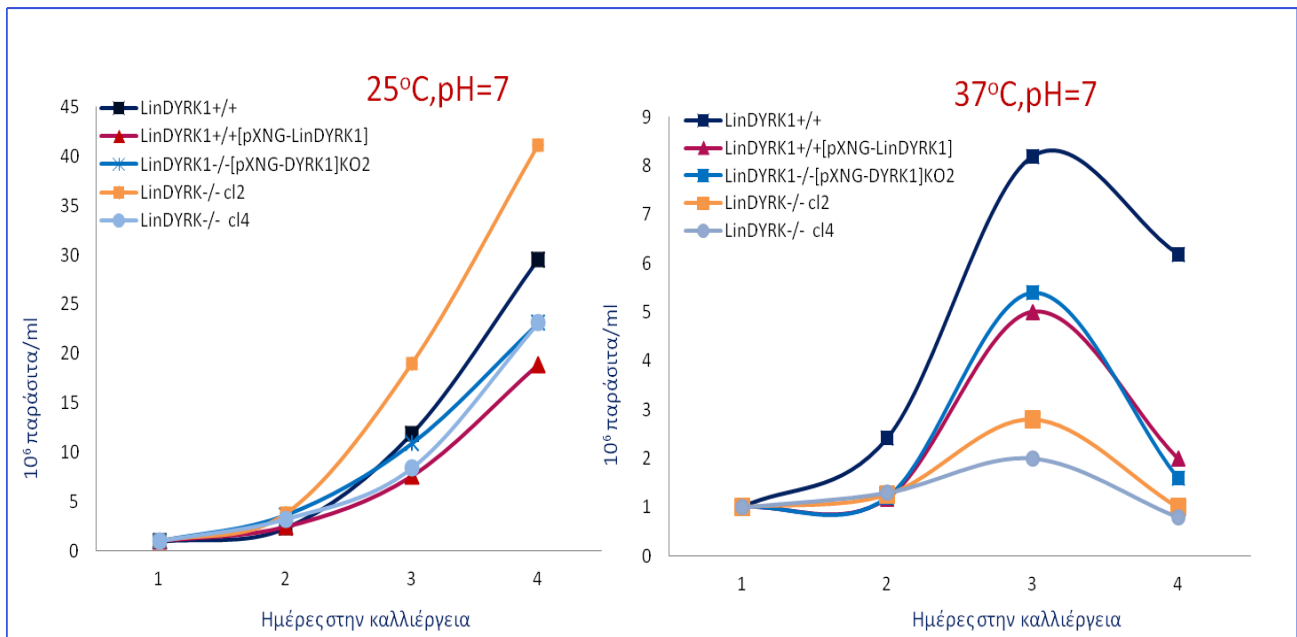


**Διάγραμμα 9.** Απεικόνιση του ρυθμού αύξησης των παρασίτων ως συνάρτηση του χρόνου και της συγκέντρωσης των παρασίτων σε pH=7 και pH=5,2.

Για τη μελέτη του φαινοτύπου των παρασίτων κατά τη διάρκεια του θερμικού σοκ, μελετήθηκε η ανάπτυξη παρασίτων στους  $37^{\circ}\text{C}$  και στους  $25^{\circ}\text{C}$ . Απομονώθηκαν κύτταρα αγρίου τύπου *LinDYRK1*<sup>+/+</sup>, κύτταρα που υπερεκφράζουν την κινάση *LinDYRK1*<sup>+/+</sup>[pXNG-*LinDYRK1*], οι κλώνοι *LinDYRK1*<sup>-/-</sup>cl4 KO1, *LinDYRK1*<sup>-/-</sup>cl2 KO2 και οι γονεϊκοί τύποι αυτών *LinDYRK1*<sup>-/-</sup>[pXNG-*LinDYRK1*]KO1 και *LinDYRK1*<sup>-/-</sup>[pXNG-*LinDYRK1*]KO2, αντίστοιχα. Με βάση το διάγραμμα ανάπτυξης των κυττάρων συμπεραίνουμε ότι τα παράσιτα παρουσίασαν σημαντική μείωση της συγκέντρωσης τους στους



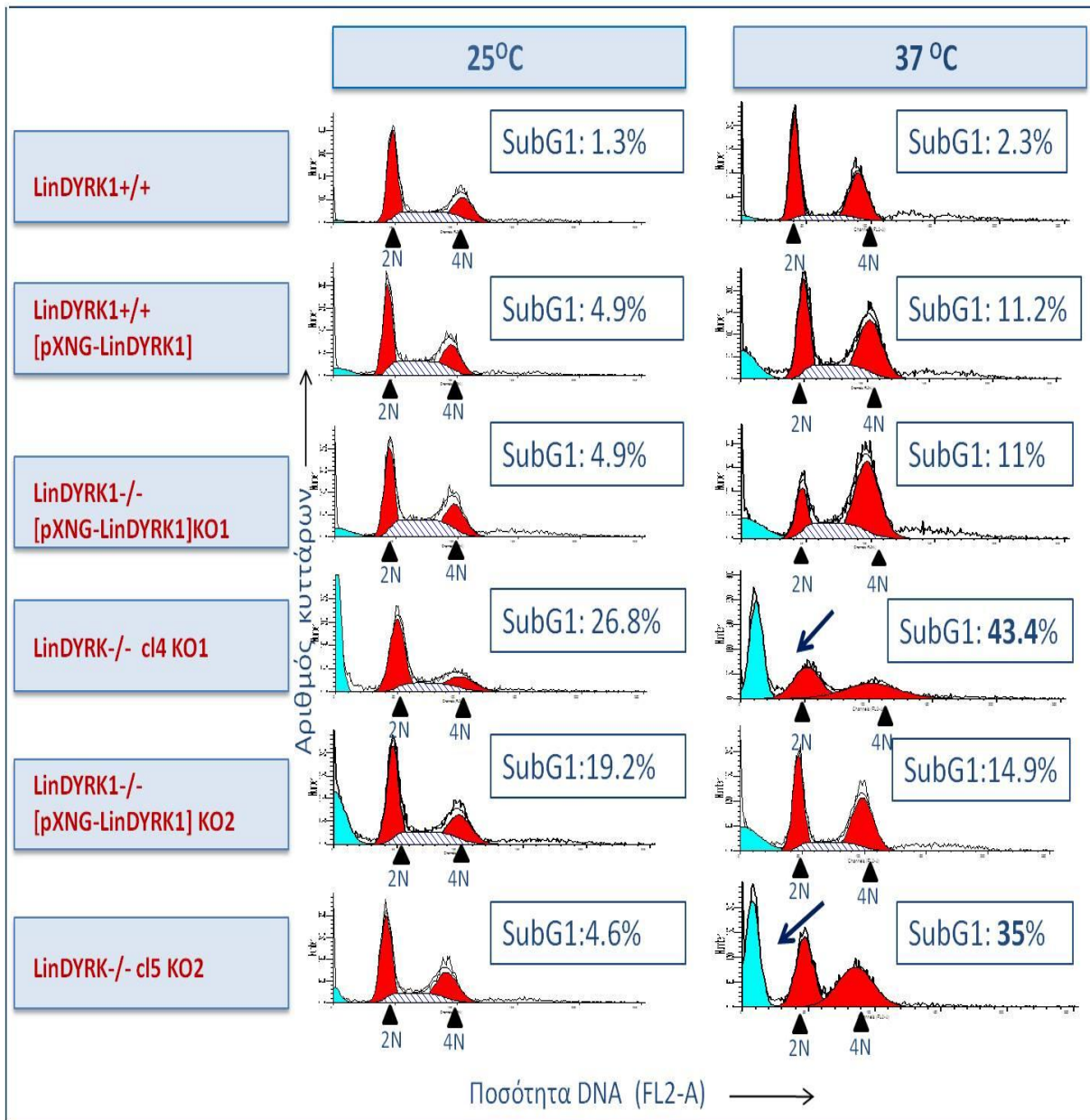
37°C. Οι κλώνοι που δεν εκφράζουν την *LinDYRK1* είναι πιο ευαίσθητα στο θερμικό σοκ με αποτέλεσμα να εμφανίζουν το μεγαλύτερο ποσοστό νεκρών κυττάρων. Συνεπώς, τα κύτταρα δεν επιβιώνουν έπειτα από την 4<sup>η</sup> ημέρα στην καλλιέργεια.



**Διάγραμμα 10.** Απεικόνιση του ρυθμού αύξησης των παρασίτων ως συνάρτηση του χρόνου και της συγκέντρωσης των παρασίτων σε θερμοκρασία 37 °C και 25°C.

Το γεγονός ότι η εξάλειψη της *LinDYRK1* προκαλεί αυξημένη θερμοευαισθησία στα παράσιτα, επιβεβαιώθηκε και με ανάλυση του κυτταρικού τους κύκλου. Πιο συγκεκριμένα, για την ανάλυση αυτή χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα αγρίου τύπου *LinDYRK1*<sup>+/+</sup>, κύτταρα που υπερεκφράζουν την κινάση *LinDYRK1*<sup>+/+</sup>[pXNG-DYRK1], οι κλώνοι *LinDYRK1*<sup>-/-</sup>cl4 KO1, *LinDYRK1*<sup>-/-</sup>cl2 KO2 και οι γονεϊκοί τύποι αυτών *LinDYRK1*<sup>-/-</sup>[pXNG-DYRK1] KO1 και *LinDYRK1*<sup>-/-</sup>[pXNG-DYRK1]KO2, αντίστοιχα. Κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης οι παραπάνω κυτταρικές σειρές επώαστηκαν για 12 ώρες σε θερμοκρασία 37 °C.

Για τον κλώνο *LinDYRK1*<sup>-/-</sup>cl4 KO1 το ποσοστό της subG1 είναι 43,4% και για τον *LinDYRK1*<sup>-/-</sup>cl5 KO2 είναι 35%. Αντιθέτως τα αγρίου τύπου παράσιτα έχουν μικρό αριθμό κυττάρων που εμφανίζουν υποδιπλοειδία στο DNA τους (26 °C/subG1=1,3%-37°C /subG1=2,3%). Επίσης, χαμηλά ποσοστά έχουν και τα κύτταρα που υπερεκφράζουν την *LinDYRK1* (26°C/subG1=4,9%-37°C/subG1=11,2%). Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα από τις διάφορες κυτταρικές σειρές φαίνεται πως η απαλοιφή της *LinDYRK1* αυξάνει την ευαισθησία των παρασίτων στην υψηλή θερμοκρασία

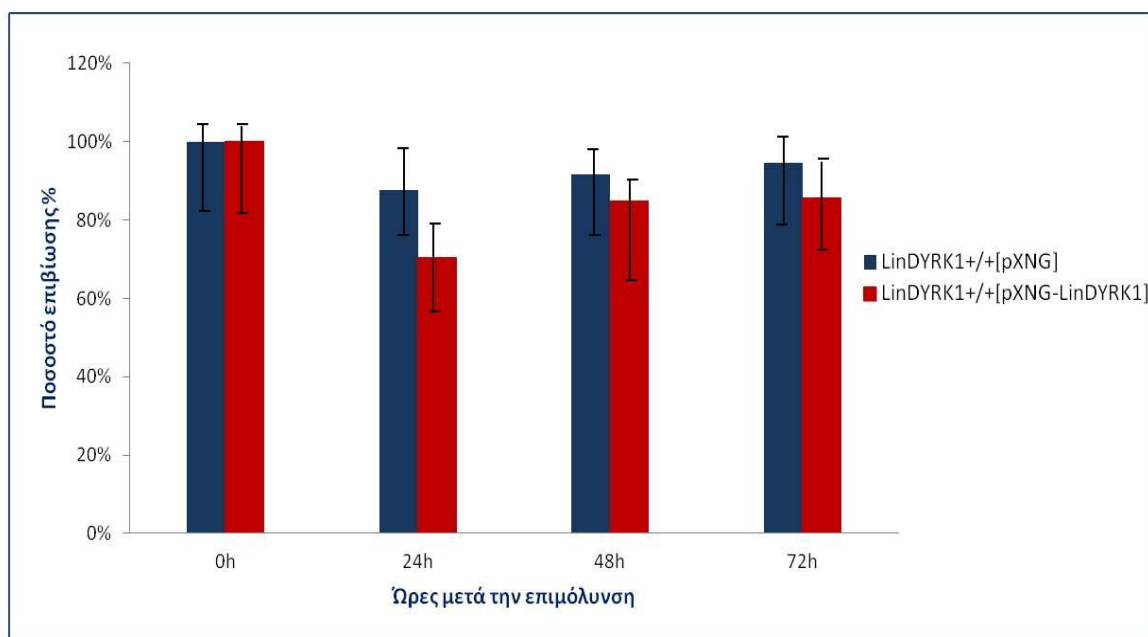


**Διάγραμμα 12.** Απεικόνιση του κυτταρικού κύκλου των στελεχών παρασίτων στην λογαριθμική φάση σε θερμοκρασία 37 °C και 25°C. Τα βέλη δείχνουν το υψηλό ποσοστό αποπτωτικών κυττάρων στους κλώνους *LinDYRK1*<sup>-/-</sup> c15 KO2 και *LinDYRK1*<sup>-/-</sup> c12 KO2.

**Η υπερέκφραση της *LinDYRK1* δεν επηρεάζει σημαντικά την μολυσματικότητα του παρασίτου**

Οι προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι τα παράσιτα που έχουν εξαλειμμένη τη κινάση *LinDYRK1*, δε μπορούν να διαφοροποιηθούν στη στατική μορφή- τη μολυσματική μορφή- και άρα η εξάλειψη της *LinDYRK1* επηρεάζει αρνητικά τη μολυσματικότητα του παρασίτου. Για να μελετήσουμε αν η υπερέκφραση της κινάσης αυτής προστατεύει το παράσιτο από το περιβάλλον που συναντά μέσα στο μακροφάγο του τελικού ξενιστή, πραγματοποιήσαμε δοκιμασία μολυσματικότητας *in vitro*. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη,

*LinDYRK1*<sup>+/+</sup>[pXNG-DYRK1] και κύτταρα ελέγχου που εκφράζουν την πρωτεΐνη σε φυσιολογικά επίπεδα και φέρουν το επίσωμα, *LinDYRK1*<sup>+/+</sup>[pXNG]. Τα κύτταρα αυτά απομονώθηκαν κατά την στατική φάση ανάπτυξης με σκοπό την επιμόλυνση μακροφάγων κυττάρων, σε χρονικό διάστημα 3-6 ωρών. Στη συνέχεια αφού πραγματοποιήθηκε έκπλυση των ελευθέρων παρασίτων σε 24, 48 και 72 ώρες ακολούθησε παρατήρηση σε συνεστιακό μικροσκόπιο. Η μελέτη της μολυσματικότητας έγινε με καταμέτρηση των φθορίζοντων ενδοκυτταρικών παρασίτων. Φαίνεται επομένως πως μετά από 24 ώρες το ποσοστό των κυττάρων που υπερεκφράζουν την *LinDYRK1* καθώς και τα κύτταρα ελέγχου μειώνονται. Μετά από 72 ώρες ανακάμπτουν και αυξάνεται ο αριθμός τους ωστόσο υπάρχει μικρή διαφορά σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου *LinDYRK1*<sup>+/+</sup>[pXNG] (**διάγραμμα 13**). Φαίνεται λοιπόν πως τα επίπεδα μολυσματικότητας των κυττάρων που υπερεκφράζουν την κινάση *LinDYRK1* δεν εμφανίζουν μεγάλη απόκλιση από τα κύτταρα ελέγχου *LinDYRK1*<sup>+/+</sup>[pXNG].

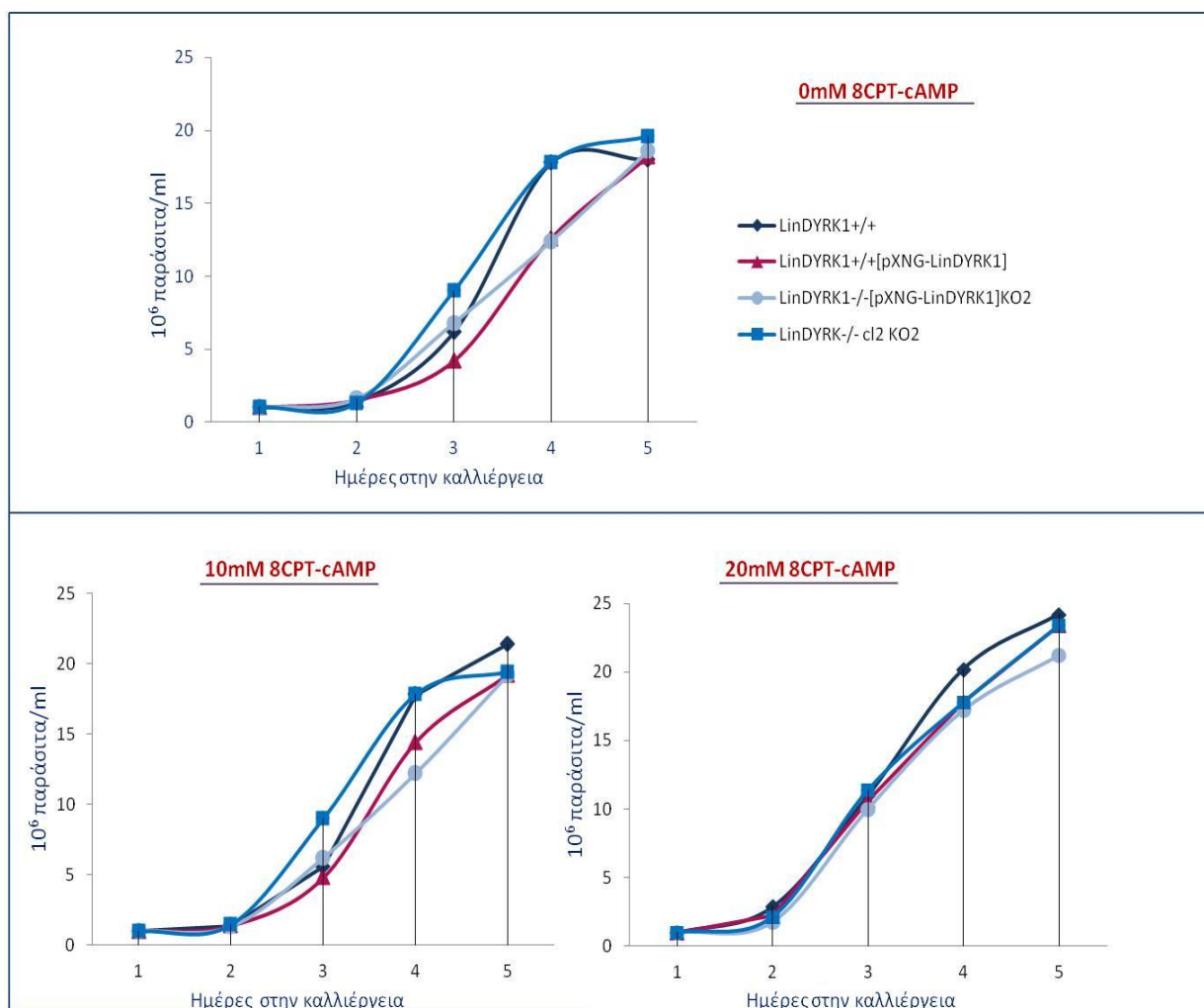


**Διάγραμμα 13.** Απεικόνιση του % ποσοστού επιβίωσης των παρασίτων στα μακροφάγα

### Έλεγχος του ρόλου του cAMP στην ανάπτυξη των παρασίτων αγρίου τύπου και *LinDYRK1* διαγονιδιακών παρασίτων

Στα παράσιτα *T. brucei* η σηματοδότηση από το κυκλικό AMP (cAMP) είναι σημαντική για την *in vitro* διαφοροποίηση από τη διαιρούμενη μορφή επιμήκη μορφή (slender) στη πιο πεπλατυσμένη μορφή (stumpy), η οποία δεν διαιρείται. Πειράματα έδειξαν ότι ανάμεσα στις πρωτεΐνες που δρουν στο σηματοδοτικό μονοπάτι του cAMP, είναι μία πρωτεΐνη της οικογένειας DYRK (*Mony et al., 2014*). Θέλοντας να μελετήσουμε αν το μονοπάτι cAMP παίζει σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση της *Leishmania* στη μετακυκλική μορφή και αν εμπλέκεται σε αυτό το μονοπάτι η *LinDYRK1*, χρησιμοποιήσαμε ένα ανάλογο cAMP, το 8-CPT, περατό στη κυτταρική μεμβράνη. Αν το cAMP και άρα το ανάλογο 8-CPT, παίζει ρόλο στη διαφοροποίηση αναμένεται η αναστολή της ανάπτυξης των παρασίτων. Για το πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκαν παράσιτα αγρίου τύπου *LinDYRK1*<sup>+/+</sup>, παράσιτα που υπερεκφράζουν τη κινάση *LinDYRK1* *LinDYRK1*<sup>+/+</sup>[pXNG-*LinDYRK1*] και παράσιτα στα οποία έχει απαλειφεί το γονίδιο *LinDYRK1*, *LinDYRK1*<sup>-/-</sup> καθώς και οι γονεϊκή τους

σειρά *LinDYRK1*<sup>-/-</sup>[pXNG-*LinDYRK1*]. Προκειμένου να εξεταστεί ο ρόλος του κυκλικού AMP στον πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη των παρασίτων *Leishmania* προστέθηκαν στην καλλιέργεια 10 και 20 mM και 8CPT-cAMP. Αναπτύσσοντας τα παράσιτα παρουσία 8CPT-cAMP, φαίνεται ότι ο πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση τους δεν επηρεάζονται από την παρουσία αυτού. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι η δράση του cAMP, δεν επηρεάζει διαφοροποίηση της *Leishmania* από την προκυκλική στη μετακυκλική μορφή και ότι η κινάση *LinDYRK1* δρα με άλλο μηχανισμό στο να συμβάλλει στην διαφοροποίηση του παρασίτου από το συγγενικό παράσιτο *T. brucei*



**Διάγραμμα 14.** Απεικόνιση του ρυθμού αύξησης των παρασίτων ως συνάρτηση του χρόνου και της συγκέντρωσης των παρασίτων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του αναλόγου 8CPT-cAMP.

## 5. Συζήτηση-Συμπεράσματα

---

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν η ανάπτυξη και ο πολλαπλασιασμός των παρασίτων *Leishmania infantum* με εξαλειμμένη ή υπερεκφραζόμενη την κινάση DYRK1 σε διάφορες συνθήκες ανάπτυξης. Σκοπός της μελέτης ήταν να διερευνηθεί ο βιολογικός ρόλος της *LinDYRK1* στην ανάπτυξη και τη μολυσματικότητα του παρασίτου.

Η *LinDYRK1* σε προμαστιγωτά παράσιτα *L. infantum* εμπλέκεται στην ισορροπία του κυτταρικού κύκλου ώστε να προωθήσει τη διαφοροποίηση και την απόκριση στο στρες. Αντίθετα στα θηλαστικά οι ομόλογες κινάσες DYRK1A και DYRK1B φαίνεται πως επιδρούν αρνητικά στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Αρχικά, στα παράσιτα, η υπερέκφραση της *LinDYRK1* δρα αρνητικά στο κυτταρικό κύκλο όταν τα κύτταρα αναπτύσσονται σε κανονικές συνθήκες ανάπτυξης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την επιμήκυνση της διάρκειας παραμονής στην  $G_1$  φάση του κυτταρικού κύκλου. Αντίθετα, η πλήρης εξάλειψη της παρουσιάζει αναστροφή επίδραση στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου αφού μειώνεται ο χρόνος παραμονής στην  $G_1$  φάση. Στον άνθρωπο, οι ομόλογες κινάσες DYRK1A και DYRK1B φωσφορυλιώνουν και οδηγούν για πρωτεόλυση τις σεσημασμένες με ουμπικουϊτίνη πρωτεΐνες, κυκλίνη D1 και p27 (Kip1), οι οποίες εμπλέκονται στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου στη φάση  $G_1$  (Ewton, Lee, Deng, Lim, & Friedman, 2003; Sopra et al., 2014; Zou et al., 2004). Ακόμη, η αποσιώπηση του γονιδίου που είναι υπεύθυνο για την έκφραση των δύο κινασών έχει αρνητική επίπτωση στο κυτταρικό κύκλο καθώς προκαλεί την παύση του κυτταρικού κύκλου στην φάση  $G_2/M$  (Deng et al., 2004; Zou et al., 2004), το οποίο πραγματοποιείται μέσω της φωσφορυλίωσης της κυκλίνης D. Συνεπώς, οι κινάσες εμπλέκονται στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και φαίνεται πως η αποσιώπηση του γονιδίου έκφρασης σχετίζεται άμεσα με την επιβίωση των κυττάρων. Στα παράσιτα *Leishmania* δεν έχει βρεθεί καμία ομόλογη πρωτεΐνη της κυκλίνης D1 και των p27 (Kip1), επομένως η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου διαφέρει. Παρ'όλα αυτά τα παράσιτα *Leishmania* κωδικοποιούν άτυπες κυκλίνες και έτσι, θα ήταν ενδιαφέρον να μελετηθούν ως πιθανά υποστρώματα της παρασιτικής κινάσης *LinDYRK1*.

Στους κατώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς οι κινάσες DYRK έχουν παρόμοια λειτουργία με τους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς καθώς και στις δύο περιπτώσεις δρουν ως αρνητικοί ρυθμιστές της ανάπτυξης και ως θετικοί ρυθμιστές της διαφοροποίησης. Στον *S. cerevisiae* η αρνητική δράση της κινάσης *Yak1p* σχετίζεται με στον πολλαπλασιασμό σε συνθήκες θρεπτικού στρες, όπου ανταγωνίζεται το μονοπάτι RAS/cAMP και την κινάση TOR (TOR of Rapamycin) (Garrett & Broach, 1989; Martin et al., 2004). Ακόμη, στο *C. albicans* το μονοπάτι cAMP/PKA εξαρτάται από την κινάση *Yak1* η οποία εμπλέκεται στην αρχική φάση της νηματοποίησης. Στον οργανισμό *Distyostelium discoideum*, η *YakA* ελέγχει την έξοδο από τον κυτταρικό κύκλο και την αύξηση των επιπέδων PKA και cAMP με αποτέλεσμα να επάγεται ο πολλαπλασιασμός σε συνθήκες έλλειψης θρεπτικών συστατικών (Souza et al., 1998; Taminato et al., 2002). Όσον αφορά το κινητοπλαστίδιο *T. brucei*, το cAMP επιφέρει την διαφοροποίηση, σε ένα μονοπάτι το οποίο εμπλέκεται και μια πρωτεΐνη της οικογένειας DYRK. Συγκεκριμένα, αποδείχθηκε ότι το 8-CPT, ανάλογο του cAMP, επηρεάζει αρνητικά τον πολλαπλασιασμό στο κινητοπλαστίδιο



*T. brucei* (Mony et al., 2014). Στο παράσιτο *Leishmania* τα μονοπάτια αυτά, TOR/ PKA (Madeira da Silva & Beverley, 2010) είναι ενεργά και ενδέχεται να επικοινωνούν με τα σηματοδοτικά μονοπάτια της *LinDYRK1*. Σε αυτή τη μελέτη δείξαμε ότι cAMP δε παίζει σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση. Από το αποτέλεσμα αυτό δεν μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η *LinDYRK1* λειτουργεί ανεξάρτητα της PKA που σε άλλους οργανισμούς ρυθμίζεται από το cAMP. Στη *Leishmania* έχει δειχθεί ότι η λειτουργία της PKA πιθανό να ρυθμίζεται από τα επίπεδα cGMP και γι αυτό θα πρέπει να διευρύνουμε τις μελέτες μας με αυτό το δεύτερο διαβιβαστή (Tagoe, Kalejaiye, & de Koning, 2015).

Στα παράσιτα, η κινάση DYRK1 είναι μια σημαντική πρωτεΐνη για την επιβίωση των παρασίτων στη στατική φάση ανάπτυξης δηλαδή των μολυσματικών μορφών του παρασίτου. Η πλήρης εξάλειψη της προκαλεί αυξημένη ευαισθησία, δεν μπορούν να εξέλθουν από το κυτταρικό κύκλο ( $G_1/G_0$ ) και οδηγούνται σε ανεπιτυχείς κυτταρικές διαιρέσεις με αυξημένο ποσοστό θρυμματισμού του DNA και άρα κυτταρικό θάνατο. Έτσι, μια υπόθεση είναι τα κύτταρα με πλήρη εξάλειψη της *LinDYRK1* δεν "αντιλαμβάνονται" και δεν αποκρίνονται κατάλληλα στις εκάστοτε αλλαγές των περιβαλλοντικών συνθηκών όπως της έλλειψης διατροφικής διεθεσιμότητας και ακόλουθης ενεργειακής ανεπάρκειας επομένως οδηγούνται σε κυτταρικό θάνατο. Ως συνθήκες ενεργειακής ανεπάρκειας, δεν αναγνωρίζονται μόνο οι συνθήκες έλλειψης διατροφικής διεθεσιμότητας αλλά και όλες σχεδόν οι στρεσογόνες συνθήκες (Baena-Gonzalez & Sheen, 2008). Υποθέτοντας ότι η έλλειψη της *LinDYRK1* σχετίζεται με την μη απόκριση σε συνθήκες ενεργειακής έλλειψης, εύκολα θα μπορούσε να εξηγήσει γιατί τα παράσιτα με εξαιρετική *LinDYRK1* είναι πιο θερμοευαίσθητα. Ο ακριβής μηχανισμός που τα παράσιτα επάγουν την προστασία τους στις συνθήκες στρες, στατικής φάσης ή άλλης ενεργειακής έλλειψης στον οποίο δύναται να συμμετέχει η *LinDYRK1* δεν είναι ακόμα γνωστός. Έχει δειχθεί ότι η ανάπτυξη σε συνθήκες θερμικού στρες αλλά και η στατική φάση των παρασίτων σχετίζεται με την επαγωγή των αντιοξειδωτικών μηχανισμών (Miller et al., 2000; Zarley, Britigan, & Wilson, 1991) και για το λόγο αυτό αξίζει να μελετηθεί αν ο φαινότυπος της έλλειψης της *LinDYRK1* στις προμαστιγώτες μορφές σχετίζεται με ανεπαρκή επαγωγή αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Ένας τέτοιος μηχανισμός έχει δειχθεί σε ανθρώπινα κύτταρα, όπου σε συνθήκες στρες, η ομόλογη Mirk/DYRK1B αυξάνει τη βιωσιμότητα καρκινικών κυττάρων μειώνοντας τα επίπεδα των δραστικών μορφών οξυγόνου μέσω ρύθμισης της έκφρασης γονιδίων όπως η υπεροξειδική δισμουτάση και η φερροξειδάση (Deng, Ewton, & Friedman, 2009). Επίσης σε άλλους κατώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, όπως στον *Distyostelium discoideum* και *S. cerevisiae* έχει δειχθεί η *YakA* στον και η *Yak1p* αντίστοιχα στο εμπλέκονται στην κυτταρική επιβίωση σε συνθήκες κυτταρικού στρες συμπεριλαμβανομένου του οξειδωτικού και θερμικού στρες (Taminato et al., 2002).

Ένας άλλος ενδιαφέρον φαινότυπος των κυττάρων με εξαιρετική *LinDYRK1* είναι ότι τα κύτταρα νεκρώνονται λόγω θρυμματισμού του γενετικού υλικού, ενώ η κυτταρική μεμβράνη παραμένει άθικτη. Αυτό θα μπορούσε να δικαιολογηθεί αν τα κύτταρα *LinDYRK1* παρουσίαζαν διαφορές στη περατότητα της μεμβράνης λόγω διαφορετικής σύστασης των λιπιδίων της –ακόρεστα/κορεσμένα-, και στην ενδοκυτταρική διαλογή, μία υπόθεση που σήμερα είναι υπό μελέτη.

Συμπερασματικά, η κινάση *LinDYRK1* αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή του πολλαπλασιασμού και είναι απαραίτητη για την βιωσιμότητα στη στατική φάση ανάπτυξης-μολυσματική. Χρειάζονται περαιτέρω μελέτες πλέον χρησιμοποιώντας ειδικούς αναστολείς της παρασιτικής κινάσης για να

ερευνηθεί αν οι αμαστιγωτές μορφές των παρασίτων μπορούν να πολλαπλασιαστούν στο θηλαστικό ξενιστή ή αν έχουν μεγαλύτερη ευαισθησία σε άλλα αντί-λεϊσμανιακά φάρμακα για να θεωρηθεί κατάλληλο μόριο-στόχος για απλή φαρμακευτική ή ακόμα και για συνδυαστική θεραπεία με δύο φάρμακα κατά της λεϊσμανίαση.



## 6.Περίληψη

Ο όρος λεισμανίαση μια ασθένεια που οφείλεται σε ενδοκυτταρικά πρωτοζωϊκά παράσιτα του γένους *Leishmania*, περιλαμβάνει μία ομάδα νοσημάτων όπως τη δερματική, τη βλεννογονοδερματική και τη σπλαγχνική, η τελευταία είναι και η πλέον σοβαρή αφού προκαλεί βέβαιο θάνατο χωρίς τη χορήγηση θεραπείας. Τα παράσιτα *Leishmania* μεταδίδονται στο τελικό ξενιστή με το τσίμπημα μολυσμένης σκνίπας του γένους *Phlebotomus* or *Lutzomyia*. Ο βιολογικός κύκλος του παρασίτου *Leishmania* απαιτεί την παρουσία δύο ξενιστών. Οι φλεβοτόμοι-διαβιβαστές φιλοξενούν την εξωκυτταρική μορφή εντερικών μαστιγωτών (flagellate), τη λεγόμενη προμαστιγωτή, ενώ τα θηλαστικά φιλοξενούν την ενδοκυτταρική μορφή που ονομάζεται αμαστιγωτή, η οποία ζει και πολλαπλασιάζεται στο όξινο ενδολυσσόσωμα των μακροφάγων. Η απόκριση στα ερεθίσματα της διαφοροποίησης της θερμοκρασία ( $26 \rightarrow 37^{\circ}\text{C}$ ), του pH ( $7,4 \rightarrow 5,5$ ) στο ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή είναι καθοριστικά για την εξέλιξη της νόσου.

Η λεισμανίαση, αν και εκτιμάται ότι προκαλεί το ένατο μεγαλύτερο φορτίο νόσου όλων των λοιμωδών νοσημάτων, η επίπτωσή της στη Δημόσια Υγεία υποεκτιμάται σε μεγάλο βαθμό, λόγω της πολύπλοκης επιδημιολογίας/οικολογίας της, της έλλειψης αποτελεσματικών μέτρων αντιμετώπισης και της ανεπαρκούς επιδημιολογικής επιτήρησής της. Παράλληλα, τα λίγα φάρμακα που χορηγούνται σήμερα παρουσιάζουν σημαντικούς περιορισμούς, όπως ανάπτυξη αντοχής, μειωμένη αποτελεσματικότητα, υψηλή τοξικότητα και μεγάλο κόστος. Οι περιορισμοί αυτοί έχουν καταστήσει επιτακτική ανάγκη την ανακάλυψη νέων και πιο αποτελεσματικών θεραπειών. Για αυτό το λόγο, γίνονται προσπάθειες για την ταυτοποίηση μορίων-στόχων. Μια πολύ καλή πηγή φαρμακευτικών στόχων είναι οι πρωτεϊνικές κινάσες αφού ρυθμίζουν σχεδόν όλα τα μονοπάτια του κυττάρου.

Οι πρωτεϊνικές κινάσες DYRK είναι κινάσες διπλής ειδικότητας και αποτελούν κεντρικούς ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου και της κυτταρικής διαφοροποίησης. Το παράσιτο *Leishmania* κωδικοποιεί 8 DYRK κινάσες και ανάμεσά τους τη DYRK1. Στην συγκεκριμένη εργασία διερευνήθηκε η επίδραση της πλήρους εξάλειψης ή της υπερέκφρασης της πρωτεϊνικής κινάσης DYRK1 του παρασίτου *Leishmania infantum* (*Lin*) και πως επηρεάζουν την ανάπτυξη, τον κυτταρικό κύκλο και τη μολυσματικότητα του παρασίτου. Επιπλέον μελετήθηκε η συμπεριφορά των διαγονιδιακών παρασίτων σε στρεσογόνες συνθήκες που συναντά το παράσιτο μέσα στο τελικό ξενιστή όπως η μεταβολή της θερμοκρασίας ( $26 \rightarrow 37^{\circ}\text{C}$ ) και του όξινου pH ( $7,4 \rightarrow 5,5$ ). Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η υπό μελέτη κινάση είναι ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου καθώς η υπερέκφραση του επιμηκύνει τη G1 φάση. Επίσης δείξαμε ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην επιβίωση του παρασίτου σε στρεσογόνες συνθήκες καθώς και σε συνθήκες διαφοροποίησης, αφού η εξάλειψη της προκαλεί αυξημένη ευαισθησία και κυτταρικό θάνατο, στη στατική φάση (μολυσματική) της προμαστιγωτής μορφής και σε θερμικό σοκ ( $26 \rightarrow 37^{\circ}\text{C}$ ). Επομένως δείξαμε ότι η *LinDYRK1* είναι ένας αρνητικός ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου που βοηθά το παράσιτο να διαφοροποιηθεί και να επιβιώσει στο τελικό ξενιστή. Συμπερασματικά η *LinDYRK1* θεωρείται ένας πιθανός φαρμακευτικός στόχος για χημειοπροφύλαξη. Μελλοντικές μελέτες σκοπεύουν να διερευνήσουν το ρόλο της κινάσης ύστερα από τη διαφοροποίηση του παρασίτου σε αμαστιγωτή μορφή και αναμένεται να μας διαφωτίσουν αν μπορεί να ταυτοποιηθεί ως φαρμακευτικός στόχος για τη χημειοθεραπεία της λεισμανίασης.

## Abstract

The term leishmaniasis, caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania* is an umbrella term of diseases with multiple manifestations including cutaneous and mucocutaneous forms, and visceral, the latter of which is lethal if left untreated. Leishmaniasis is spread by the bite of sandflies of the genera *Phlebotomus* or *Lutzomyia*. *Leishmania* has a digenic life-cycle and undergoes cellular differentiation from the sandfly promastigote form into the amastigote form, which survives and replicates in the acidic endolysosomal environment of mammalian macrophages. The adaptation of the parasite to the alternating environmental stimuli (temperature upshift (26→37°C), pH change and the immune system of the host) is critical for the completion of its life cycle and the outcome of the disease. Leishmaniasis, although it is estimated to cause the ninth largest disease burden of all infectious diseases, with two million new cases occurring worldwide each year, the impact on public health is underestimated largely due to its complex epidemiology/ecology, the lack of effective countermeasures and poor epidemiological surveillance.

The control of leishmaniasis relies mainly on chemotherapy and the armory of available treatments today is very small with only a handful of antileishmanial drugs in the market. Moreover current chemotherapy has important limitations, including increase of drug resistance, toxicity and high cost. To this end, there is an urgent need to discover new treatments for combating leishmaniasis. Thus many research efforts today, focus on the identification of molecular drug targets. Eukaryotic protein kinases are considered important drug targets for the treatment of leishmaniasis, as they are central mediators of almost all cellular processes in the lifecycle of the parasite. Dual-specificity tyrosine-regulated kinases (DYRKs) comprise a family of protein kinases that are central regulators of cell cycle and differentiation. Interestingly, the parasite *Leishmania* encodes for 8 members of the DYRK family.

Herein, we examined how deletion and over-expression of *Leishmania infantum* (Lin) DYRK1 affects the growth, cell cycle and infectivity of *Leishmania infantum*. We also studied the phenotype of *LinDYRK1* transgenic parasites and null mutants under the differentiation stress conditions, which the parasite encounters in the host environment, namely increased temperature (26→37°C) and acidic pH (7.4→5.5). Our results showed that the kinase *LinDYRK1* delays growth, as it prolongs the G1 phase of the cell-cycle. Moreover we showed that *LinDYRK1* is essential for the establishment of stationary phase promastigotes (the infective stage of the parasite) and has a protective role under a temperature upshift (26→37°C), the natural condition the parasite encounters in the host essential for differentiation. Thus, *LinDYRK1* is negative regulator of cell cycle but also a prosurvival kinase required for promastigote to amastigote differentiation and for parasite infectivity. Overall from this study, we have showed is a validated drug target for prophylactic therapy. Future studies investigating the role of *LinDYRK1* after the promastigote to amastigote differentiation are required to enlighten us on the role of this kinase as a chemotherapeutic drug target for the treatment of leishmaniasis.

## 7.Βιβλιογραφία

---

- Ahluwalia, S., Lawn, S. D., Kanagalingam, J., Grant, H., & Lockwood, D. N. (2004). Mucocutaneous leishmaniasis: an imported infection among travellers to central and South America. *BMJ*, *329*(7470), 842-844. doi: 10.1136/bmj.329.7470.842
- Anez, N., Tang, Y., Rojas, A., Crisante, G., Killick-Kendrick, M., & Killick-Kendrick, R. (2003). Detection of amastigote-like forms in the valve of *Phlebotomus papatasi* infected with *Leishmania major*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, *98*(4), 495-498.
- Antinori, S., Calattini, S., Longhi, E., Bestetti, G., Piolini, R., Magni, C., Orlando, G., Gramiccia M., Acquaviva, V., Foschi, A., Corvasce, S., Colomba, C., Titone, L., Parravicini, C., Cascio A., Corbellino, M. (2007). Clinical use of polymerase chain reaction performed on peripheral blood and bone marrow samples for the diagnosis and monitoring of visceral leishmaniasis in HIV-infected and HIV-uninfected patients: a single-center, 8-year experience in Italy and review of the literature. *Clin Infect Dis*, *44*(12), 1602-1610. doi: 10.1086/518167
- Arana, B. A., Mendoza, C. E., Rizzo, N. R., & Kroeger, A. (2001). Randomized, controlled, double-blind trial of topical treatment of cutaneous leishmaniasis with paromomycin plus methylbenzethonium chloride ointment in Guatemala. *Am J Trop Med Hyg*, *65*(5), 466-470.
- Aranda, S., Laguna, A., & de la Luna, S. (2011). DYRK family of protein kinases: evolutionary relationships, biochemical properties, and functional roles. *FASEB J*, *25*(2), 449-462. doi: 10.1096/fj.10-165837
- Baena-Gonzalez, E., & Sheen, J. (2008). Convergent energy and stress signaling. *Trends Plant Sci*, *13*(9), 474-482. doi: 10.1016/j.tplants.2008.06.006
- Bahler, J., & Pringle, J. R. (1998). Pom1p, a fission yeast protein kinase that provides positional information for both polarized growth and cytokinesis. *Genes Dev*, *12*(9), 1356-1370.
- Baiocco, P., Colotti, G., Franceschini, S., & Ilari, A. (2009). Molecular basis of antimony treatment in leishmaniasis. *J Med Chem*, *52*(8), 2603-2612. doi: 10.1021/jm900185q
- Becker, W., Weber, Y., Wetzels, K., Eirambter, K., Tejedor, F. J., & Joost, H. G. (1998). Sequence characteristics, subcellular localization, and substrate specificity of DYRK-related kinases, a novel family of dual specificity protein kinases. *J Biol Chem*, *273*(40), 25893-25902.
- Berman, J. D. (1997). Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clin Infect Dis*, *24*(4), 684-703.
- Besteiro, S., Williams, R. A., Coombs, G. H., & Mottram, J. C. (2007). Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *Int J Parasitol*, *37*(10), 1063-1075. doi: 10.1016/j.ijpara.2007.03.008
- Bogacheva, O., Bogachev, O., Menon, M., Dev, A., Houde, E., Valoret, E. I., Wojchowski, D. M. (2008). DYRK3 dual-specificity kinase attenuates erythropoiesis during anemia. *J Biol Chem*, *283*(52), 36665-36675. doi: 10.1074/jbc.M807844200
- Bossolasco, S., Gaiera, G., Olchini, D., Gulletta, M., Martello, L., Bestetti, A., Cinque, P. (2003). Real-time PCR assay for clinical management of human immunodeficiency virus-infected patients with visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol*, *41*(11), 5080-5084.
- Bray, P. G., Barrett, M. P., Ward, S. A., & de Koning, H. P. (2003). Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. *Trends Parasitol*, *19*(5), 232-239.
- Brito, M. E., Mendonca, M. G., Gomes, Y. M., Jardim, M. L., & Abath, F. G. (2000). Identification of potentially diagnostic *Leishmania braziliensis* antigens in human cutaneous leishmaniasis by immunoblot analysis. *Clin Diagn Lab Immunol*, *7*(2), 318-321.
- Calvopina, M., Armijos, R. X., & Hashiguchi, Y. (2004). Epidemiology of leishmaniasis in Ecuador: current status of knowledge -- a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, *99*(7), 663-672. doi: /S0074-02762004000700001
- Canzonetta, C., Mulligan, C., Deutsch, S., Ruf, S., O'Doherty, A., Lyle, R., Borel, C., Lin-Marq, N., Delom, F., Groet, J., Schnappauf, F., De Vita, S., Averill, S., Priestley, J. V., Martin, J. E., Shipley, J., Denyer, G., Epstein, C. J., Fillat, C., Estivill, X., Tybulewicz, V. L., Fisher, E. M., Antonarakis, S. E., Nizetic, D. (2008). DYRK1A-

- dosage imbalance perturbs NRSF/REST levels, deregulating pluripotency and embryonic stem cell fate in Down syndrome. *Am J Hum Genet*, 83(3), 388-400. doi: 10.1016/j.ajhg.2008.08.012
- Cavalier-Smith, T. (2006). Rooting the tree of life by transition analyses. *Biol Direct*, 1, 19. doi: 10.1186/1745-6150-1-19
- Cheng, K. C., Klancer, R., Singson, A., & Seydoux, G. (2009). Regulation of MBK-2/DYRK by CDK-1 and the pseudophosphatases EGG-4 and EGG-5 during the oocyte-to-embryo transition. *Cell*, 139(3), 560-572. doi: 10.1016/j.cell.2009.08.047
- Control of leishmaniasis*. (2007). Geneva: World Health Organization.
- Croft, S. L., & Coombs, G. H. (2003). Leishmaniasis--current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol*, 19(11), 502-508.
- Croft, S. L., & Olliaro, P. (2011). Leishmaniasis chemotherapy--challenges and opportunities. *Clin Microbiol Infect*, 17(10), 1478-1483. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03630.x
- Croft, S. L., & Yardley, V. (2002). Chemotherapy of leishmaniasis. *Curr Pharm Des*, 8(4), 319-342.
- da Silva, E. S., Gontijo, C. M., Pacheco Rda, S., & Brazil, R. P. (2004). Diagnosis of human visceral leishmaniasis by PCR using blood samples spotted on filter paper. *Genet Mol Res*, 3(2), 251-257.
- Dacher, M., Morales, M. A., Pescher, P., Leclercq, O., Rachidi, N., Prina, E., Cayla, M., Descoteaux, A., Spath, G. F. (2014). Probing druggability and biological function of essential proteins in *Leishmania* combining facilitated null mutant and plasmid shuffle analyses. *Mol Microbiol*, 93(1), 146-166. doi: 10.1111/mmi.12648
- David, C. V., & Craft, N. (2009). Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatol Ther*, 22(6), 491-502. doi: 10.1111/j.1529-8019.2009.01272.x
- de Oliveira, C. I., & Brodskyn, C. I. (2012). The immunobiology of *Leishmania braziliensis* infection. *Front Immunol*, 3, 145. doi: 10.3389/fimmu.2012.00145
- Deng, X., Ewton, D. Z., & Friedman, E. (2009). Mirk/Dyrk1B maintains the viability of quiescent pancreatic cancer cells by reducing levels of reactive oxygen species. *Cancer Res*, 69(8), 3317-3324. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2903
- Deng, X., Mercer, S. E., Shah, S., Ewton, D. Z., & Friedman, E. (2004). The cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is stabilized in G(0) by Mirk/dyrk1B kinase. *J Biol Chem*, 279(21), 22498-22504. doi: 10.1074/jbc.M400479200
- Desjeux, P., Ghosh, R. S., Dhalaria, P., Strub-Wourgaft, N., & Zijlstra, E. E. (2013). Report of the Post Kala-azar Dermal Leishmaniasis (PKDL) Consortium Meeting, New Delhi, India, 27-29 June 2012. *Parasit Vectors*, 6, 196. doi: 10.1186/1756-3305-6-196
- Duncan, S. M., Myburgh, E., Philipon, C., Brown, E., Meissner, M., Brewer, J., & Mottram, J. C. (2016). Conditional gene deletion with DiCre demonstrates an essential role for CRK3 in *Leishmania mexicana* cell cycle regulation. *Mol Microbiol*, 100(6), 931-944. doi: 10.1111/mmi.13375
- Elmahallawy, E. K., Sampedro Martinez, A., Rodriguez-Granger, J., Hoyos-Mallecot, Y., Agil, A., Navarro Mari, J. M., & Gutierrez Fernandez, J. (2014). Diagnosis of leishmaniasis. *J Infect Dev Ctries*, 8(8), 961-972. doi: 10.3855/jidc.4310
- Ewton, D. Z., Lee, K., Deng, X., Lim, S., & Friedman, E. (2003). Rapid turnover of cell-cycle regulators found in Mirk/dyrk1B transfectants. *Int J Cancer*, 103(1), 21-28. doi: 10.1002/ijc.10743
- Fernandes, A. C., Pedroso, R. B., Venazzi, E. A., Zanzarini, P. D., Aristides, S. M., Lonardon, M. V., & Silveira, T. G. (2016). American Cutaneous Leishmaniasis with Unusual Clinical Presentation and Response to Treatment. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 58, 20. doi: 10.1590/S1678-9946201658020
- Ferron, S. R., Pozo, N., Laguna, A., Aranda, S., Porlan, E., Moreno, M., Fillat, C., de la Luna, S., Sanchez, P., Arbones, M. L., Farinas, I. (2010). Regulated segregation of kinase Dyrk1A during asymmetric neural stem cell division is critical for EGFR-mediated biased signaling. *Cell Stem Cell*, 7(3), 367-379. doi: 10.1016/j.stem.2010.06.021
- Fong, D., Chan, M. M., Rodriguez, R., Gately, L. J., Berman, J. D., & Grogl, M. (1994). Paromomycin resistance in *Leishmania tropica*: lack of correlation with mutation in the small subunit ribosomal RNA gene. *Am J Trop Med Hyg*, 51(6), 758-766.

- Freitas-Junior, L. H., Chatelain, E., Kim, H. A., & Siqueira-Neto, J. L. (2012). Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it? *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*, 2, 11-19. doi: 10.1016/j.ijpddr.2012.01.003
- Galvez, R., Descalzo, M. A., Miro, G., Jimenez, M. I., Martin, O., Dos Santos-Brandao, F., Guerrero, I., Cubero, E. . . Molina, R. (2010). Seasonal trends and spatial relations between environmental/meteorological factors and leishmaniosis sand fly vector abundances in Central Spain. *Acta Trop*, 115(1-2), 95-102. doi: 10.1016/j.actatropica.2010.02.009
- Gangneux, J. P., Menotti, J., Lorenzo, F., Sarfati, C., Blanche, H., Bui, H., Derouin, F. (2003). Prospective value of PCR amplification and sequencing for diagnosis and typing of old world Leishmania infections in an area of nonendemicity. *J Clin Microbiol*, 41(4), 1419-1422.
- Garcia-Sanchez, S., Mavor, A. L., Russell, C. L., Argimon, S., Dennison, P., Enjalbert, B., & Brown, A. J. (2005). Global roles of Ssn6 in Tup1- and Nrg1-dependent gene regulation in the fungal pathogen, *Candida albicans*. *Mol Biol Cell*, 16(6), 2913-2925. doi: 10.1091/mbc.E05-01-0071
- Garrett, S., & Broach, J. (1989). Loss of Ras activity in *Saccharomyces cerevisiae* is suppressed by disruptions of a new kinase gene, YAK1, whose product may act downstream of the cAMP-dependent protein kinase. *Genes Dev*, 3(9), 1336-1348.
- Gomez-Ochoa, P., Castillo, J. A., Lucientes, J., Gascon, M., Zarate, J. J., Arbea, J. I., Larraga, V., Rodriguez, C. (2003). Modified direct agglutination test for simplified serologic diagnosis of leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol*, 10(5), 967-968.
- Goto, H., & Lauletta Lindoso, J. A. (2012). Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Infect Dis Clin North Am*, 26(2), 293-307. doi: 10.1016/j.idc.2012.03.001
- Goyard, S., Knechtle, P., Chauvel, M., Mallet, A., Prevost, M. C., Proux, C., Coppée JY, Schwarz P, Dromer F, Park H, Filler SG, Janbon G, d'Enfert, C. (2008). The Yak1 kinase is involved in the initiation and maintenance of hyphal growth in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell*, 19(5), 2251-2266. doi: 10.1091/mbc.E07-09-0960
- Guyen-Ozkan, T., Nishi, Y., Robertson, S. M., & Lin, R. (2008). Global transcriptional repression in *C. elegans* germline precursors by regulated sequestration of TAF-4. *Cell*, 135(1), 149-160. doi: 10.1016/j.cell.2008.07.040
- Hendrickx, S., Inocencio da Luz, R. A., Bhandari, V., Kuypers, K., Shaw, C. D., Lonchamp, J., Salotra, P., Carter, K., Sundar, S., Rijal, S., Dujardin, J. C., Cos, P., Maes, L. (2012). Experimental induction of paromomycin resistance in antimony-resistant strains of *L. donovani*: outcome dependent on in vitro selection protocol. *PLoS Negl Trop Dis*, 6(5), e1664. doi: 10.1371/journal.pntd.0001664
- Hewitt, S., Reyburn, H., Ashford, R., & Rowland, M. (1998). Anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Kabul, Afghanistan: vertical distribution of cases in apartment blocks. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 92(3), 273-274.
- Johnson, L. N., Noble, M. E., & Owen, D. J. (1996). Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell*, 85(2), 149-158.
- Kadosh, D., & Johnson, A. D. (2001). Rfg1, a protein related to the *Saccharomyces cerevisiae* hypoxic regulator Rox1, controls filamentous growth and virulence in *Candida albicans*. *Mol Cell Biol*, 21(7), 2496-2505. doi: 10.1128/MCB.21.7.2496-2505.2001
- Kamhawi, S. (2006). Phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes? *Trends Parasitol*, 22(9), 439-445. doi: 10.1016/j.pt.2006.06.012
- Karin, M., & Hunter, T. (1995). Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Curr Biol*, 5(7), 747-757.
- Kelly, P. A., & Rahmani, Z. (2005). DYRK1A enhances the mitogen-activated protein kinase cascade in PC12 cells by forming a complex with Ras, B-Raf, and MEK1. *Mol Biol Cell*, 16(8), 3562-3573. doi: 10.1091/mbc.E04-12-1085
- Kentrup, H., Becker, W., Heukelbach, J., Wilmes, A., Schurmann, A., Huppertz, C., Kainulainen, H., Joost, H. G. (1996). Dyrk, a dual specificity protein kinase with unique structural features whose activity is dependent on tyrosine residues between subdomains VII and VIII. *J Biol Chem*, 271(7), 3488-3495.

- Kerr, S. F. (2006). Molecular trees of trypanosomes incongruent with fossil records of hosts. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, *101*(1), 25-30. doi: /S0074-02762006000100006
- Killick-Kendrick, R. (1990). The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. *Ann Parasitol Hum Comp*, *65 Suppl 1*, 37-42.
- Killick-Kendrick, R., Molyneux, D. H., & Ashford, R. W. (1974). *Leishmania* in phlebotomid sandflies. I. Modifications of the flagellum associated with attachment to the mid-gut and oesophageal valve of the sandfly. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, *187*(1089), 409-419.
- Kinstrie, R., Luebbering, N., Miranda-Saavedra, D., Sibbet, G., Han, J., Lochhead, P. A., & Cleghon, V. (2010). Characterization of a domain that transiently converts class 2 DYRKs into intramolecular tyrosine kinases. *Sci Signal*, *3*(111), ra16. doi: 10.1126/scisignal.2000579
- Lachaud, L., Dereure, J., Chabbert, E., Reynes, J., Mauboussin, J. M., Oziol, E., Bastien, P. (2000). Optimized PCR using patient blood samples for diagnosis and follow-up of visceral Leishmaniasis, with special reference to AIDS patients. *J Clin Microbiol*, *38*(1), 236-240.
- Lee, K., Deng, X., & Friedman, E. (2000). Mirk protein kinase is a mitogen-activated protein kinase substrate that mediates survival of colon cancer cells. *Cancer Res*, *60*(13), 3631-3637.
- Lee, T., Hoofnagle, A. N., Kabuyama, Y., Stroud, J., Min, X., Goldsmith, E. J., Chen, L. Resing, K. A, Ahn, N. G. (2004). Docking motif interactions in MAP kinases revealed by hydrogen exchange mass spectrometry. *Mol Cell*, *14*(1), 43-55.
- Li, K., Zhao, S., Karur, V., & Wojchowski, D. M. (2002). DYRK3 activation, engagement of protein kinase A/cAMP response element-binding protein, and modulation of progenitor cell survival. *J Biol Chem*, *277*(49), 47052-47060. doi: 10.1074/jbc.M205374200
- Liarte, D. B., Mendonca, I. L., Luz, F. C., Abreu, E. A., Mello, G. W., Farias, T. J., Ferreira, A. F. Millington, M.A Costa, C. H. (2001). QBC for the diagnosis of human and canine american visceral leishmaniasis: preliminary data. *Rev Soc Bras Med Trop*, *34*(6), 577-581.
- Lochhead, P. A., Sibbet, G., Kinstrie, R., Cleghon, T., Rylatt, M., Morrison, D. K., & Cleghon, V. (2003). dDYRK2: a novel dual-specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase in *Drosophila*. *Biochem J*, *374*(Pt 2), 381-391. doi: 10.1042/BJ20030500
- Lochhead, P. A., Sibbet, G., Morrice, N., & Cleghon, V. (2005). Activation-loop autophosphorylation is mediated by a novel transitional intermediate form of DYRKs. *Cell*, *121*(6), 925-936. doi: 10.1016/j.cell.2005.03.034
- Maddika, S., & Chen, J. (2009). Protein kinase DYRK2 is a scaffold that facilitates assembly of an E3 ligase. *Nat Cell Biol*, *11*(4), 409-419. doi: 10.1038/ncb1848
- Madeira da Silva, L., & Beverley, S. M. (2010). Expansion of the target of rapamycin (TOR) kinase family and function in *Leishmania* shows that TOR3 is required for acidocalcisome biogenesis and animal infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(26), 11965-11970. doi: 10.1073/pnas.1004599107
- Marovich, M. A., Lira, R., Shepard, M., Fuchs, G. H., Kruetzer, R., Nutman, T. B., & Neva, F. A. (2001). *Leishmaniasis recidivans* recurrence after 43 years: a clinical and immunologic report after successful treatment. *Clin Infect Dis*, *33*(7), 1076-1079. doi: 10.1086/322643
- Martin-Sanchez, J., Pineda, J. A., Morillas-Marquez, F., Garcia-Garcia, J. A., Acedo, C., & Macias, J. (2004). Detection of *Leishmania infantum* kinetoplast DNA in peripheral blood from asymptomatic individuals at risk for parenterally transmitted infections: relationship between polymerase chain reaction results and other *Leishmania* infection markers. *Am J Trop Med Hyg*, *70*(5), 545-548.
- Martin, D. E., Soulard, A., & Hall, M. N. (2004). TOR regulates ribosomal protein gene expression via PKA and the Forkhead transcription factor FHL1. *Cell*, *119*(7), 969-979. doi: 10.1016/j.cell.2004.11.047
- Mary, C., Faraut, F., Lascombe, L., & Dumon, H. (2004). Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. *J Clin Microbiol*, *42*(11), 5249-5255. doi: 10.1128/JCM.42.11.5249-5255.2004
- McGwire, B. S., & Satoskar, A. R. (2014). *Leishmaniasis*: clinical syndromes and treatment. *QJM*, *107*(1), 7-14. doi: 10.1093/qjmed/hct116

- Meheus, F., Balasegaram, M., Olliaro, P., Sundar, S., Rijal, S., Faiz, M. A., & Boelaert, M. (2010). Cost-effectiveness analysis of combination therapies for visceral leishmaniasis in the Indian subcontinent. *PLoS Negl Trop Dis*, 4(9). doi: 10.1371/journal.pntd.0000818
- Melaku, Y., Collin, S. M., Keus, K., Gatluak, F., Ritmeijer, K., & Davidson, R. N. (2007). Treatment of kala-azar in southern Sudan using a 17-day regimen of sodium stibogluconate combined with paromomycin: a retrospective comparison with 30-day sodium stibogluconate monotherapy. *Am J Trop Med Hyg*, 77(1), 89-94.
- Miller, M. A., McGowan, S. E., Gantt, K. R., Champion, M., Novick, S. L., Andersen, K. A., Bacchi CJ, Yarlett N, Britigan BE, Wilson, M. E. (2000). *Inducible resistance* to oxidant stress in the protozoan *Leishmania chagasi*. *J Biol Chem*, 275(43), 33883-33889. doi: 10.1074/jbc.M003671200
- Mony, B. M., MacGregor, P., Ivens, A., Rojas, F., Cowton, A., Young, J., Horn D. , Matthews, K. (2014). Genome-wide dissection of the quorum sensing signalling pathway in *Trypanosoma brucei*. *Nature*, 505(7485), 681-685. doi: 10.1038/nature12864
- Moriya, H., Shimizu-Yoshida, Y., Omori, A., Iwashita, S., Katoh, M., & Sakai, A. (2001). Yak1p, a DYRK family kinase, translocates to the nucleus and phosphorylates yeast Pop2p in response to a glucose signal. *Genes Dev*, 15(10), 1217-1228. doi: 10.1101/gad.884001
- Moseley, J. B., Mayeux, A., Paoletti, A., & Nurse, P. (2009). A spatial gradient coordinates cell size and mitotic entry in fission yeast. *Nature*, 459(7248), 857-860. doi: 10.1038/nature08074
- Naula, C., Parsons, M., & Mottram, J. C. (2005). Protein kinases as drug targets in trypanosomes and *Leishmania*. *Biochim Biophys Acta*, 1754(1-2), 151-159. doi: 10.1016/j.bbapap.2005.08.018
- Nishi, Y., & Lin, R. (2005). DYRK2 and GSK-3 phosphorylate and promote the timely degradation of OMA-1, a key regulator of the oocyte-to-embryo transition in *C. elegans*. *Dev Biol*, 288(1), 139-149. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.09.053
- Nishi, Y., Rogers, E., Robertson, S. M., & Lin, R. (2008). Polo kinases regulate *C. elegans* embryonic polarity via binding to DYRK2-primed MEX-5 and MEX-6. *Development*, 135(4), 687-697. doi: 10.1242/dev.013425
- Okwor, I., & Uzonna, J. E. (2013). The immunology of *Leishmania*/HIV co-infection. *Immunol Res*, 56(1), 163-171. doi: 10.1007/s12026-013-8389-8
- Oliveira-Neto, M. P., Mattos, M., Souza, C. S., Fernandes, O., & Pirmez, C. (1998). Leishmaniasis recidiva cutis in New World cutaneous leishmaniasis. *Int J Dermatol*, 37(11), 846-849.
- Otero, A. C., da Silva, V. O., Luz, K. G., Palatnik, M., Pirmez, C., Fernandes, O., & Palatnik de Sousa, C. B. (2000). Short report: occurrence of *Leishmania donovani* DNA in donated blood from seroreactive Brazilian blood donors. *Am J Trop Med Hyg*, 62(1), 128-131.
- Owens, S. D., Oakley, D. A., Marrayott, K., Hatchett, W., Walton, R., Nolan, T. J., Newton, A. Steurer, F., Schantz, P., . . . Giger, U. (2001). Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 219(8), 1076-1083.
- Pace, D. (2014). Leishmaniasis. *J Infect*, 69 Suppl 1, S10-18. doi: 10.1016/j.jinf.2014.07.016
- Pang, K. M., Ishidate, T., Nakamura, K., Shirayama, M., Trzepacz, C., Schubert, C. M., Mello, C. C. (2004). The minibrain kinase homolog, mbk-2, is required for spindle positioning and asymmetric cell division in early *C. elegans* embryos. *Dev Biol*, 265(1), 127-139.
- Park, J., Oh, Y., Yoo, L., Jung, M. S., Song, W. J., Lee, S. H., Seo, H , Chung, K. C. (2010). Dyrk1A phosphorylates p53 and inhibits proliferation of embryonic neuronal cells. *J Biol Chem*, 285(41), 31895-31906. doi: 10.1074/jbc.M110.147520
- Parry, J. M., Velarde, N. V., Lefkovith, A. J., Zegarek, M. H., Hang, J. S., Ohm, J., Klancer, R. Maruyama, R., Druzhinina, M. K., Grant, B. D., Piano, F., Singson, A. (2009). EGG-4 and EGG-5 Link Events of the Oocyte-to-Embryo Transition with Meiotic Progression in *C. elegans*. *Curr Biol*, 19(20), 1752-1757. doi: 10.1016/j.cub.2009.09.015
- Pellettieri, J., Reinke, V., Kim, S. K., & Seydoux, G. (2003). Coordinate activation of maternal protein degradation during the egg-to-embryo transition in *C. elegans*. *Dev Cell*, 5(3), 451-462.



- Piarroux, R., Gambarelli, F., Dumon, H., Fontes, M., Dunan, S., Mary, C., Quilici, M. (1994). Comparison of PCR with direct examination of bone marrow aspiration, myeloculture, and serology for diagnosis of visceral Leishmaniasis in immunocompromised patients. *J Clin Microbiol*, *32*(3), 746-749.
- Poinar, G., Jr., & Poinar, R. (2004a). Evidence of vector-borne disease of Early Cretaceous reptiles. *Vector Borne Zoonotic Dis*, *4*(4), 281-284. doi: 10.1089/vbz.2004.4.281
- Poinar, G., Jr., & Poinar, R. (2004b). Paleoleishmania proterus n. gen., n. sp., (Trypanosomatidae: Kinetoplastida) from Cretaceous Burmese amber. *Protist*, *155*(3), 305-310. doi: 10.1078/1434461041844259
- Poinar Jr, G. (2007). Early Cretaceous trypanosomatids associated with fossil sand fly larvae in Burmese amber. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, *102*(5), 635-637.
- Quintin, S., Mains, P. E., Zinke, A., & Hyman, A. A. (2003). The mbk-2 kinase is required for inactivation of MEI-1/katanin in the one-cell Caenorhabditis elegans embryo. *EMBO Rep*, *4*(12), 1175-1181. doi: 10.1038/sj.embor.7400029
- Rachidi, N., Taly, J. F., Durieu, E., Leclercq, O., Aulner, N., Prina, E., Notredame, C., Meijer, L., Spath, G. F. (2014). Pharmacological assessment defines Leishmania donovani casein kinase 1 as a drug target and reveals important functions in parasite viability and intracellular infection. *Antimicrob Agents Chemother*, *58*(3), 1501-1515. doi: 10.1128/AAC.02022-13
- Raich, W. B., Moorman, C., Lacefield, C. O., Lehrer, J., Bartsch, D., Plasterk, R. H., Kandel, E. R., Hobert, O. (2003). Characterization of Caenorhabditis elegans homologs of the Down syndrome candidate gene DYRK1A. *Genetics*, *163*(2), 571-580.
- Rajasekariah, G. H., Ryan, J. R., Hillier, S. R., Yi, L. P., Stiteler, J. M., Cui, L., Smithyman, A. M., Martin, S. K. (2001). Optimisation of an ELISA for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis using in vitro derived promastigote antigens. *J Immunol Methods*, *252*(1-2), 105-119.
- Ravindran, R., Anam, K., Bairagi, B. C., Saha, B., Pramanik, N., Guha, S. K., Goswami, R. P. Banerjee, D., Ali, N. (2004). Characterization of immunoglobulin G and its subclass response to Indian kala-azar infection before and after chemotherapy. *Infect Immun*, *72*(2), 863-870.
- Ready, P. D. (2010). Leishmaniasis emergence in Europe. *Euro Surveill*, *15*(10), 19505.
- Ready, P. D. (2013). Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Annu Rev Entomol*, *58*, 227-250. doi: 10.1146/annurev-ento-120811-153557
- Real, F., Vidal, R. O., Carazzolle, M. F., Mondego, J. M., Costa, G. G., Herai, R. H., Wurtele, M. de Carvalho, L. M., Carmona e Ferreira, R., Mortara, R. A., Barbieri, C. L., Mieczkowski, P., da Silveira, J. F., Briones, M. R., Pereira, G. A., Bahia, D. (2013). The genome sequence of Leishmania (Leishmania) amazonensis: functional annotation and extended analysis of gene models. *DNA Res*, *20*(6), 567-581. doi: 10.1093/dnares/dst031
- Rogers, M. E., Chance, M. L., & Bates, P. A. (2002). The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of Leishmania mexicana by the sandfly Lutzomyia longipalpis. *Parasitology*, *124*(Pt 5), 495-507.
- Romero, G. A., de la Gloria Orge Orge, M., de Farias Guerra, M. V., Paes, M. G., de Oliveira Macedo, V., & de Carvalho, E. M. (2005). Antibody response in patients with cutaneous leishmaniasis infected by Leishmania (Viannia) braziliensis or Leishmania (Viannia) guyanensis in Brazil. *Acta Trop*, *93*(1), 49-56. doi: 10.1016/j.actatropica.2004.09.005
- Ryan, J. R., Smithyman, A. M., Rajasekariah, G. H., Hochberg, L., Stiteler, J. M., & Martin, S. K. (2002). Enzyme-linked immunosorbent assay based on soluble promastigote antigen detects immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies in sera from cases of visceral and cutaneous leishmaniasis. *J Clin Microbiol*, *40*(3), 1037-1043.
- Scamardella, J. M. (1999). Not plants or animals: a brief history of the origin of Kingdoms Protozoa, Protista and Protoctista. *Int Microbiol*, *2*(4), 207-216.
- Shirayama, M., Soto, M. C., Ishidate, T., Kim, S., Nakamura, K., Bei, Y., van den Heuvel, S., Mello, C. C. (2006). The Conserved Kinases CDK-1, GSK-3, KIN-19, and MBK-2 Promote OMA-1 Destruction to Regulate the Oocyte-to-Embryo Transition in C. elegans. *Curr Biol*, *16*(1), 47-55. doi: 10.1016/j.cub.2005.11.070

- Singh, N., Kumar, M., & Singh, R. K. (2012). Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. *Asian Pac J Trop Med*, *5*(6), 485-497. doi: 10.1016/S1995-7645(12)60084-4
- Singh, S. (2006). New developments in diagnosis of leishmaniasis. *Indian J Med Res*, *123*(3), 311-330.
- Singh, S., & Sivakumar, R. (2003). Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. *J Postgrad Med*, *49*(1), 55-60.
- Smirlis, D., & Soares, M. B. (2014). Selection of molecular targets for drug development against trypanosomatids. *Subcell Biochem*, *74*, 43-76. doi: 10.1007/978-94-007-7305-9\_2
- Soppa, U., & Becker, W. (2015). DYRK protein kinases. *Curr Biol*, *25*(12), R488-489. doi: 10.1016/j.cub.2015.02.067
- Soppa, U., Schumacher, J., Florencio Ortiz, V., Pasqualon, T., Tejedor, F. J., & Becker, W. (2014). The Down syndrome-related protein kinase DYRK1A phosphorylates p27(Kip1) and Cyclin D1 and induces cell cycle exit and neuronal differentiation. *Cell Cycle*, *13*(13), 2084-2100. doi: 10.4161/cc.29104
- Soto, J., Paz, D., Rivero, D., Soto, P., Quispe, J., Toledo, J., & Berman, J. (2016). Intralesional Pentamidine: A Novel Therapy for Single Lesions of Bolivian Cutaneous Leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*, *94*(4), 852-856. doi: 10.4269/ajtmh.15-0640
- Soto, J., Toledo, J., Valda, L., Balderrama, M., Rea, I., Parra, R., Ardiles, J., Soto, P., Gomez, A., Molleda, F., Fuentelsaz, C., Anders, G., Sindermann, H., Engel, J., Berman, J. (2007). Treatment of Bolivian mucosal leishmaniasis with miltefosine. *Clin Infect Dis*, *44*(3), 350-356. doi: 10.1086/510588
- Souza, G. M., Lu, S., & Kuspa, A. (1998). YAKA, a protein kinase required for the transition from growth to development in *Dictyostelium*. *Development*, *125*(12), 2291-2302.
- Stitzel, M. L., Cheng, K. C., & Seydoux, G. (2007). Regulation of MBK-2/Dyrk kinase by dynamic cortical anchoring during the oocyte-to-zygote transition. *Curr Biol*, *17*(18), 1545-1554. doi: 10.1016/j.cub.2007.08.049
- Sundar, S., Sinha, P. K., Rai, M., Verma, D. K., Nawin, K., Alam, S., Chakravarty, J., Vaillant, M., Verma, N., Pandey, K., Kumari, P., Lal, C. S., Arora, R., Sharma, B., Ellis, S., Strub- Wourgaft, N., Balasegaram, M., Olliaro, P., Das, P., Modabber, F. (2011). Comparison of short-course multidrug treatment with standard therapy for visceral leishmaniasis in India: an open-label, non-inferiority, randomised controlled trial. *Lancet*, *377*(9764), 477-486. doi: 10.1016/S0140-6736(10)62050-8
- Tagoe, D. N., Kalejaiye, T. D., & de Koning, H. P. (2015). The ever unfolding story of cAMP signaling in trypanosomatids: vive la difference! *Front Pharmacol*, *6*, 185. doi: 10.3389/fphar.2015.00185
- Taminato, A., Bagattini, R., Gorjao, R., Chen, G., Kuspa, A., & Souza, G. M. (2002). Role for YakA, cAMP, and protein kinase A in regulation of stress responses of *Dictyostelium discoideum* cells. *Mol Biol Cell*, *13*(7), 2266-2275. doi: 10.1091/mbc.01-11-0555
- Tatebe, H., Nakano, K., Maximo, R., & Shiozaki, K. (2008). Pom1 DYRK regulates localization of the Rga4 GAP to ensure bipolar activation of Cdc42 in fission yeast. *Curr Biol*, *18*(5), 322-330. doi: 10.1016/j.cub.2008.02.005
- Tejedor, F., Zhu, X. R., Kaltenbach, E., Ackermann, A., Baumann, A., Canal, I., Heisenberg, M., Fischbach, K.F., Pongs, O. (1995). minibrain: a new protein kinase family involved in postembryonic neurogenesis in *Drosophila*. *Neuron*, *14*(2), 287-301.
- ter Horst, R., Collin, S. M., Ritmeijer, K., Bogale, A., & Davidson, R. N. (2008). Concordant HIV infection and visceral leishmaniasis in Ethiopia: the influence of antiretroviral treatment and other factors on outcome. *Clin Infect Dis*, *46*(11), 1702-1709. doi: 10.1086/587899
- Thakur, C. P., Narayan, S., & Ranjan, A. (2004). Epidemiological, clinical & pharmacological study of antimony-resistant visceral leishmaniasis in Bihar, India. *Indian J Med Res*, *120*(3), 166-172.
- Torpiano, P., & Pace, D. (2015). Leishmaniasis: diagnostic issues in Europe. *Expert Rev Anti Infect Ther*, *13*(9), 1123-1138. doi: 10.1586/14787210.2015.1056160
- Tuon, F. F., Neto, V. A., & Amato, V. S. (2008). Leishmania: origin, evolution and future since the Precambrian. *FEMS Immunol Med Microbiol*, *54*(2), 158-166. doi: 10.1111/j.1574-695X.2008.00455.x
- van Griensven, J., Balasegaram, M., Meheus, F., Alvar, J., Lynen, L., & Boelaert, M. (2010). Combination therapy for visceral leishmaniasis. *Lancet Infect Dis*, *10*(3), 184-194. doi: 10.1016/S1473-3099(10)70011-6

- Vega-Lopez, F. (2003). Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis*, 16(2), 97-101. doi: 10.1097/01.aco.0000065077.06965.4d
- Von Stebut, E. (2015). Leishmaniasis. *J Dtsch Dermatol Ges*, 13(3), 191-200; quiz 201. doi: 10.1111/ddg.12595
- Weyers, W. (2016). William Boog Leishman-A Brief Reminder of His Life and Work on the Occasion of His 150th Birthday. *Am J Dermatopathol*, 38(6), 436-443. doi: 10.1097/DAD.0000000000000434
- WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniasis., & World Health Organization. (2010). *Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010*. Geneva: World Health Organization.
- World Health Organization. (2010). *Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: first WHO report on neglected tropical diseases: summary*. Geneva: World Health Organization.
- Wortmann, G., Sweeney, C., Houg, H. S., Aronson, N., Stiteler, J., Jackson, J., & Ockenhouse, C. (2001). Rapid diagnosis of leishmaniasis by fluorogenic polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg*, 65(5), 583-587.
- Xingi, E., Smirlis, D., Myrianthopoulos, V., Magiatis, P., Grant, K. M., Meijer, L., Mikros E, Skaltsounis AL, Soteriadou, K. (2009). 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*, 39(12), 1289-1303. doi: 10.1016/j.ijpara.2009.04.005
- Yabut, O., Domogauer, J., & D'Arcangelo, G. (2010). Dyrk1A overexpression inhibits proliferation and induces premature neuronal differentiation of neural progenitor cells. *J Neurosci*, 30(11), 4004-4014. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4711-09.2010
- Zappacosta, F., Huddleston, M. J., Karcher, R. L., Gelfand, V. I., Carr, S. A., & Annan, R. S. (2002). Improved sensitivity for phosphopeptide mapping using capillary column HPLC and microionspray mass spectrometry: comparative phosphorylation site mapping from gel-derived proteins. *Anal Chem*, 74(13), 3221-3231.
- Zarley, J. H., Britigan, B. E., & Wilson, M. E. (1991). Hydrogen peroxide-mediated toxicity for *Leishmania donovani* chagasi promastigotes. Role of hydroxyl radical and protection by heat shock. *J Clin Invest*, 88(5), 1511-1521. doi: 10.1172/JCI115461
- Zijlstra, E. E., Ali, M. S., el-Hassan, A. M., el-Toum, I. A., Satti, M., Ghalib, H. W., & Kager, P. A. (1992). Kala-azar: a comparative study of parasitological methods and the direct agglutination test in diagnosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 86(5), 505-507.
- Zijlstra, E. E., Musa, A. M., Khalil, E. A., el-Hassan, I. M., & el-Hassan, A. M. (2003). Post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Lancet Infect Dis*, 3(2), 87-98.
- Zou, Y., Ewton, D. Z., Deng, X., Mercer, S. E., & Friedman, E. (2004). Mirk/dyrk1B kinase destabilizes cyclin D1 by phosphorylation at threonine 288. *J Biol Chem*, 279(26), 27790-27798. doi: 10.1074/jbc.M403042200

