

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ Γ. Β. ΛΙΓΓΡΗ

Βιοχημικός-Βιοτεχνολόγος

*«Δομική και βιοχημική μελέτη πρωτεϊνών δέσμευσης οσφρητικών
μορίων από έντομα»*

Λάρισα, 2022

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

*«Δομική και βιοχημική μελέτη πρωτεϊνών δέσμευσης οσφρητικών
μορίων από έντομα»*

*“Structural and Biochemical studies of Insects' Odorant Binding
Proteins”.*

Παναγιώτα Γ. Β. Λίγγρη

A.M.:Δ1815008

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ

- ♦ Σπυρίδων Ζωγράφος, Διευθυντής Ερευνών Ινστιτούτου Χημικής Βιολογίας Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών (Επιβλέπων καθηγητής)
- ♦ Δημήτριος Λεωνίδας, Καθηγητής Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- ♦ Γεώργιος Κοντοπίδης, Καθηγητής Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- ♦ Σπυρίδων Ζωγράφος, Διευθυντής Ερευνών Ινστιτούτου Χημικής Βιολογίας Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών (Επιβλέπων καθηγητής)
- ♦ Δημήτριος Λεωνίδας, Καθηγητής Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- ♦ Γεώργιος Κοντοπίδης, Καθηγητής Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
- ♦ Βασιλική Σκαμνάκη, Επίκουρη Καθηγήτρια Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- ♦ Νικόλαος Μπαλατσός, Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- ♦ Παναγιώτης Ζουμπουλάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής
- ♦ Πέτρος Γκιάστας, Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Βιοτεχνολογίας Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Μέρος της παρούσας διδακτορικής διατριβής έχει παρουσιασθεί στις ακόλουθες δημοσιεύσεις:

1. **Panagiota G.V. Liggri**, Katerina E. Tsitsanou, Evgenia C.V. Stamati, Francesca Saitta³, Christina E. Drakou, Demetres D. Leonidas, Dimitrios Fessas and Spyros E. Zographos (2022) The structure of AgamOBP5 in complex with the natural insect repellents Carvacrol and Thymol: Crystallographic, fluorescence and thermodynamic binding studies (υποβληθείσα *Cellular and Molecular Life Sciences*)
2. **Panagiota G.V. Liggri**, Alfonso Pérez-Garrido, Katerina E. Tsitsanou, K.V. Dileep Antonios Michaelakis, Dimitrios P. Papachristos, Horacio Pérez-Sánchez, Spyros E. Zographos (2022) 2D finger-printing and molecular docking studies identified potent mosquito repellents targeting Odorant Binding Protein 1 (υποβληθείσα *Insect Biochemistry and Molecular Biology*)
3. ¹Kritsi, E, ¹**Liggri, PGV**, Stamati, ECV, Tsitsanou, KE, Zographos SE*, Michaelakis, A, Papachristos, D, and Zoumpoulakis, P (2022) A Combined Computational Methodology for the Discovery of Hit Compounds with Putative Insect Repellency Properties. *ChemMedChem* 2022 Aug 17;17(16):e202200271. doi: 10.1002/cmdc.202200271. Epub 2022 Jul 8 PMID: 35754000 (¹Equal contribution)
4. Chatzidaki, MD, Demisli, S, Zingkou, E, **Liggri, PGV**, Papachristos, DP, Balatsos, G, Karras, V, Nallet, F, Michaelakis, A, Sotiropoulou, G, Zographos, SE, Papadimitriou, V* (2022) Essential oil-in-water microemulsions for topical application: structural study, cytotoxic effect and insect repelling activity. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 654, 130159. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2022.130159>

Μέρος της παρούσας διδακτορικής διατριβής έχει παρουσιασθεί στα ακόλουθα επιστημονικά συνέδρια :

- Sotiria Demisli, Maria D. Chatzidaki, **Panagiota G.V. Liggri**, Dimitrios P. Papachristos, George Balatsos, Vasilios Karras, Antonios Michaelakis, Spyros E. Zographos, Vassiliki Papadimitriou (2022) Geraniol-in-water nano-dispersions for topical application: A micro- VS nano- encapsulation study. 10ο Πανελλήνιο Συνέδριο, ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΤΑΣΕΙΣ ΣΤΟΝ ΤΟΜΕΑ ΤΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ, Ελληνικό Φόρουμ Επιστήμης και Τεχνολογίας Λιπιδίων (Greek Lipid Forum), Μέλος της Euro Fed Lipid, Αθήνα 25 Νοεμβρίου 2022, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών
- Stamati, E.C.V., Tsitsanou, K.E., **Liggri, P.G.V.**, Christodoulou, E., Michaelakis, A., Zographos S.E., (2022). OBP-guided Identification of Essential Oils and Bioactive Compounds with Mosquito Repellent Properties. 6th International Symposium on Phytochemicals in Medicine and Food (6th ISPMF), August 7-9, 2022, Hangzhou, China. August 5-13, 2022, [online](#) (Online Oral Presentation OL57); [Abstract](#)
- Stamati, E.C.V., **Liggri P.G.V.**, Tsitsanou, K.E., Christodoulou, E. & Zographos, S.E. (2022). Interaction of Origanum vulgare Essential Oil with two female-specific Odorant-Binding Proteins from the mosquito Anopheles gambiae. Trends in Natural Products Research: A Young Scientists' Meeting, 23-26 May 2022, Kolymbari, Crete, Greece <https://pse-ysm.marinenatprod.gr/> in Abstracts book p.271-272 (Poster Presentation P60); [Abstract](#)
- Evgenia C.V. Stamati, Katerina E. Tsitsanou, **Panagiota G.V. Liggri**, Eleanna Christodoulou, Sotiria Demisli, Maria. D. Chatzidaki, Vasiliki Papadimitriou, Antonios Michaelakis, Dimitrios Papachristos, Spyros E. Zographos. Identification of Greek Essential Oils with mosquito repellent properties through Odorant Binding Proteins-based screening. In Proceedings of the 10th International Conference of the Hellenic Crystallographic Association (HeCrA), pp.77-78. NCSR "Demokritos", Athens, Greece, 15-17 October 2021. (*Αναρτημένη Παρουσίαση*). <https://sites.google.com/view/hecra2020/home/book-of-abstracts>
- **Panagiota G.V. Liggri**, Eftichia Kritsi, Katerina E. Tsitsanou, Spyros E. Zographos, Antonios Michaelakis, Dimitrios Papachristos and Panagiotis Zoumpoulakis. A combined computational methodology for the discovery of hit compounds with putative insect repellency properties. In Proceedings of the 10th International Conference of the Hellenic Crystallographic Association (HeCrA), pp.93-94. NCSR "Demokritos", Athens, Greece, 15-17 October 2021. (*Αναρτημένη Παρουσίαση*). <https://sites.google.com/view/hecra2020/home/book-of-abstracts>

- **Panagiota G.V. Liggri**, Alfonso Pérez-Garrido, Katerina E. Tsitsanou, Kalarickal V. Dileep, Antonios Michaelakis, Dimitrios P. Papachristos, Horacio Pérez-Sánchez and Spyros E. Zographos. Combination of 2D-fingerprint screening and blind-docking filtering as an effective approach for the identification of potent mosquito repellents targeting Odorant Binding Protein 1. In Proceedings of the 10th International Conference of the Hellenic Crystallographic Association (HeCrA), pp.98-99. NCSR “Demokritos”, Athens, Greece, 15-17 October 2021. (*Αναρτημένη Παρουσίαση*). <https://sites.google.com/view/hecra2020/home/book-of-abstracts>
- **Panagiota G.V. Liggri**, Dimitris Matiadis, Eftichia Kritsi, Niki Tzioumaki, Panagiotis Zoumpoulakis, Dimitrios P. Papachristos, George Balatsos, Marina Sagnou and Antonios Michaelakis. Curcumin derivatives as potential mosquito larvicidal agents against two mosquito vectors, Culex pipiens and Aedes albopictus 10th International Conference of the Hellenic Crystallographic Association (HeCrA), pp.98-99. NCSR “Demokritos”, Athens, Greece, 15-17 October 2021. (*Αναρτημένη Παρουσίαση*). <https://sites.google.com/view/hecra2020/home/book-of-abstracts>
- **Panagiota G.V. Liggri**, Katerina E. Tsitsanou, Spyros E. Zographos. Structural and biochemical studies of an Odorant Binding Protein from the malaria vector Anopheles gambiae. The 44th FEBS congress, 6-11 July 2019, Krakow, Poland. (*Αναρτημένη Παρουσίαση*). FEBS Open Bio, 9: P-27-070. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12675>
- **T. Tsiaka, P.G.V. Liggri**, P. Zoumpoulakis, S.E. Zographos. Natural Mosquito Repellents: Discovering Novel Ligands Of Insect Odorant Binding Proteins (OBPs) By Implementing Lc-MS-Based Ligand Fishing. Natural Products in Drug Discovery and Human Health (NatProdDDH)”, 28-31 July 2019, Lisbon, Portugal. (*Αναρτημένη Παρουσίαση*).
- **Προφορική ομιλία με τίτλο:** «Δομικές και κρυσταλλογραφικές μελέτες πρωτεϊνών οσφρητικού συστήματος του κώνωπα», Λάρισα 2019 Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
- **Προφορική ομιλία με τίτλο:** The crystal structure of Anophelesgambiae OBP5 and a tale of two "temperaments". 69thPanhellenic Conference of the Hellenic Society for Biochemistry and Molecular Biology, November 23-25, 2018, Larisa Greece
- **Προφορική ομιλία με τίτλο:** «Θερμοδυναμική ανάλυση πρωτεϊνών οσφρητικού συστήματος του κώνωπα Anopheles gambiae» 2 η Εαρινή Συνάντηση Νέων Ερευνητών της Ελληνικής Κρυσταλλογραφικής Εταιρίας (ΕΚΕ), 5-6 Μαΐου2018, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Λάρισα
- **Προφορική ομιλία με τίτλο:** «Οι πρωτεΐνες ως μόρια- στόχοι για σχεδιασμό φαρμάκων» Πανεπιστήμιο φίλων του Λαού (2018)
- **Προφορική ομιλία με τίτλο:** «Απομόνωση αδιάλυτων πρωτεϊνών από έγκλειστα σωματίδια». 1η Εαρινή Συνάντηση Νέων Ερευνητών της Ελληνικής Κρυσταλλογραφικής Εταιρίας (ΕΚΕ), 27-28 Μαΐου 2017, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Αθήνα
- **Panagiota G.V. Liggri**, EftichiaKritsi , AntoniosMichaelakis , Dimitrios P. Papachristos ,Katerina E. Tsitsanou, PanagiotisZoumpoulakis, Spyros E. Zographos “Discovering Novel Ligands for Mosquito Odorant Binding Proteins (OBPs) using a combined computational methodology”. Instruct Biennial Structural Biology Conference Structural Biology: Deeper into the Cell 22nd - 24th May, 2019 Alcalá de Henares, Madrid, Spain (*Αναρτημένη Παρουσίαση*).
- **Panagiota G.V. Liggri**, Francesca Saitta, Katerina E. Tsitsanou, Christina E. Drakou, Kostas Iatrou, Spyros E. Zographos, DimitriosFessas. “Thermodynamic studies of AgamOBP4 and AgamOBP5 from Anopheles gambiae with different semiochemicals”. Poster presentation, AICAT 2018, XL National Congress on Calorimetry Thermal Analysis and Applied Thermodynamics (*Αναρτημένη Παρουσίαση*).
- **Panagiota G.V. Liggri**, Katerina E. Tsitsanou, Francesca Saitta, Christina E. Drakou, Kostas Iatrou, DimitriosFessas, Spyros E. Zographos. “X-ray crystal structure and binding studies of the Odorant Binding Protein 5 from the malaria vector Anopheles gambiae”. Poster presentation, 9th International Conference of the Hellenic Crystallographic Association (HECRA)October 5-7, 2018Patra, Greece (Nikos Oikonomakos awardfor the best poster presentation in Structural Biology) (*Αναρτημένη Παρουσίαση*).
- **Christos N. Petroulias, Panagiota G.V. Liggri**, Katerina E. Tsitsanou, Spyros E. Zographos “Cloning, expression and purification studies of the Odorant Binding Protein 7 from the malaria mosquito Anopheles stephensi”. Poster presentation, 69thPanhellenic Conference of the Hellenic Society for Biochemistry and Molecular Biology, November 23-25, 2018, Larisa Greece (*Αναρτημένη Παρουσίαση*).

- **Panagiota G.V. Liggri**, Christina E. Drakou, Katerina E. Tsitsanou, Spyros E. Zographos “Protein expression, purification and crystallization of the odorant-binding protein 5 from the African *Anopheles gambiae*.” Solution Methods: From NMR to Xray Scattering And Biophysics” September 18-22, 2017. Department of Pharmacy, University of Patras (**Αναρτημένη Παρουσίαση**).
- **Panagiota G.V. Liggri**, Christina E. Drakou, Katerina E. Tsitsanou, Spyros E. Zographos “Protein expression, purification and crystallization of the odorant-binding protein 5 from the African *Anopheles gambiae*.” 68^ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας (**Αναρτημένη Παρουσίαση**).

Διπλώματα Ευρεσιτεχνίας

- ♦ Mosquito repellent composition comprising yarrow essential Oil. (2022) European Patent Office (EPO), Application Number EP22193561.2/01.09.2022
- ♦ Σύνθεση απωθητικού κουνουπιών που περιλαμβάνει αιθέριο έλαιο Αχιλλέας (Yarrow). (2022). Οργανισμός Βιομηχανικής Ιδιοκτησίας (OBI), Αρ. αίτησης: 20220100673/10.08.2022

Μέρος της Διδακτορικής Διατριβής θα περιληφθεί στις παρακάτω δημοσιεύσεις υπό προετοιμασία:

- ♦ Interaction of plant derived repellents with mosquito Odorant Binding Protein 1: fluorescence, NMR and behavioral studies. Identification of plant metabolites with in vivo mosquito repellent activity and their interaction with the mosquito Odorant Binding Protein 1 as evidenced by fluorescence and NMR studies Elina Dima, Katerina E. Tsitsanou, Christina E. Drakou, **Panagiota G.V. Liggri**, Antonios Michaelakis, Dimitrios P. Papachristos, Efstathia Ioannou, Vassilios Roussis, Maria Zervou and Spyros E. Zographos (Αφορά στην συμμετοχή στην in vivo μελέτη δράσης μεταβολιτών από παράκτια φυτά βλ. Ενότητα 8.2)
- ♦ Design and Synthesis of amines targeting OBP1, using dynamic combinatorial chemistry (DCC) combined with nuclear magnetic resonance spectroscopy (STD-NMR) and study of their interaction with the mosquito olfactory protein OBP1. Hazapi E., [...] **Panagiota G.V. Liggri**, Christina E. Drakou, Katerina E. Tsitsanou, Spyros E. Zographos, Antonios Michaelakis, Dimitrios P. Papachristos [...] and Calogeropoulou T*. (Αφορά στην διενέργεια in vivo μελέτη δράσης συνθετικών ενώσεων που στοχεύουν την OBP1. Βλ. Ενότητα 8.1.1).

Συμμετοχή σε άλλες Δημοσιεύσεις σχετικές με το αντικείμενο της Διδακτορικής Διατριβής

1. Dimitris Matiadis ¹, **Panagiota G V Liggri** ^{2,3}, Eftichia Kritsi ^{4,5}, Niki Tzioumaki ^{2,3}, Panagiotis Zoumpoulakis ^{4,5}, Dimitrios P Papachristos ³, George Balatsos ³, Marina Sagnou ¹, Antonios Michaelakis ³ Curcumin Derivatives as Potential Mosquito Larvicidal Agents against Two Mosquito Vectors, *Culex pipiens* and *Aedes albopictus* (**2021**) Int J Mol Sci . 2021 Aug 18;22(16):8915. doi: 10.3390/ijms22168915.
2. Iatrou, K., Kythreoti, G., Thireou, T., Karoussiotis, C., Georgoussi, Z., **Zographos, S.E., Liggri, P.G.V.**, Michaelakis, A., Schulz, S. (2022) Novel Anosmia-Inducing Compounds for Environmentally Friendly Mosquito Vector Control: Structural Determinants of ORco Ligands Antagonizing Odorant Receptor Function. Experimental Biology Annual Meeting (EB 2022), 2-5 April 2022, Philadelphia, PA, USA. **FASEB J.** 36, Suppl. 1. DOI: 10.1096/fasebj.2022.36.S1.R4433 |

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την παρούσα διατριβή ολοκληρώνεται ένας κύκλος που ξεκίνησε το Φεβρουάριο του 2013 στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας. Σε αυτό το διάστημα γνώρισα και συνεργάστηκα με σπουδαίους ανθρώπους. Ολοκληρώνοντας τη διατριβή νιώθω πιο πλούσια τόσο σε γνώσεις (!) αλλά κυρίως σε ανθρώπους. Δεν περίμενα ποτέ όταν θα ήταν τόσο δύσκολο να ευχαριστήσεις τα άτομα που σε στήριξαν και σε βοήθησαν!! Κι όμως! Είναι το πιο δύσκολο κομμάτι!

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω -αν και η λέξη είναι τόσο μικρή- τον Επιβλέποντα Καθηγητή Δρ. Σπύρο Ζωγράφο. Πρώτα απ' όλα που με εμπιστεύτηκε τον Ιούλιο του 2016 για να ξεκινήσουμε τη συνεργασία μας, αλλά κυρίως γιατί ήταν και είναι το πρότυπό μου σε πολλά, ακόμα κι αν δεν το ξέρει. Τον ευχαριστώ για τη στήριξή του, την καθοδήγησή του και την έμπνευση που μου έδινε μέσα από τις συνεχείς συζητήσεις μας. Μα πάνω από όλα, γιατί με έκανε να αγαπήσω ακόμη περισσότερο την έρευνα.

Η παρούσα διατριβή δεν θα είχε εκπονηθεί χωρίς τον Καθηγητή Δημήτρη Λεωνίδα. Τον άνθρωπο από τον οποίο ξεκίνησαν όλα! Ένα μεγάλο ευχαριστώ για την καθοδήγησή του στα πρώτα μου βήματα στο χώρο της έρευνας, μα κυρίως επειδή δεν με ξέχασε ποτέ -παρόλο που είχα φύγει από το εργαστήριό του- και την κομβική στιγμή με σύστησε στον Δρ. Σ. Ζωγράφο. Ευχαριστώ, ακόμα, επειδή το εργαστήριό του είναι πάντα ανοιχτό και ο ίδιος πάντα διαθέσιμος να βοηθήσει σε ότι χρειαστεί.

Νιώθω, επίσης, τυχερή επειδή είχα την ευκαιρία να συνεργαστώ με τον Καθηγητή Γιώργο Κοντοπίδη, κυρίως κατά την επίσκεψή του στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών. Ένας αισιόδοξος άνθρωπος, πάντα πρόθυμος να διδάξει και να εμπνεύσει τους νέους ερευνητές. Με το χιούμορ του πάντα -και τις μαγειρικές του ικανότητες- δημιουργούσε ένα ευχάριστο κλίμα στο εργαστήριο.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Δρ. Βασιλική Σκαμνάκη και στον Δρ. Νικόλαο Μπαλατσό. Από το προπτυχιακό στάδιο ήταν πάντα πρόθυμοι να με βοηθήσουν και να μου εξηγήσουν τα δύσκολα μονοπάτια της Μοριακής Βιολογίας. Είναι τιμή μου που δέχτηκαν να είναι στην επταμελή επιτροπή. Επίσης, ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Δρ. Παναγιώτη Ζουμπουλάκη για την άψογη συνεργασία που είχαμε στα διάφορα projects, αλλά και για τις εύστοχες

πάντα ερωτήσεις και παρατηρήσεις του. Τέλος, στον Δρ. Πέτρο Γκιάστα, έναν άνθρωπο που θαυμάζω και χαίρομαι που είχα την ευκαιρία να συνεργαστούμε.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα διάφορα εργαστήρια που με φιλοξένησαν και συνεργαστήκαμε κατά τη διάρκεια του διδακτορικού μου. Συγκεκριμένα, τον Καθηγητή Δημήτρη Φέσσα για τη φιλοξενία του στο Πανεπιστήμιο του Μιλάνου για τα πειράματα θερμοδομετρίας. Επίσης, τον Δρ. Αντώνη Μιχαηλάκη για την εκπαίδευση και την επίβλεψη για τις *in vivo* δοκιμές στο Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο. Άκόμα, ήταν μεγάλη μου χαρά η συνεργασία με τον Καθηγητή Γεώργιο Σπυρούλια και την ερευνητική του ομάδα.

Πολλά ευχαριστώ στην ερευνητική ομάδα της Δρ. Μαρίας Ζερβού και του Δρ. Π. Ζουμπουλάκη και συγκεκριμένα στους Δρ. Θάλεια Τσιάκα, Δρ. Ευτυχία Κρίτση και Msc Πάρη Χριστοδούλου. Τους ευχαριστώ για την ψυχολογική υποστήριξη, για τη βοήθεια αλλά και για τις ατελείωτες συζητήσεις μας για το χώρο της έρευνας και όχι μόνο. Χαίρομαι γιατί οι άνθρωποι αυτοί είναι φίλοι και όχι απλοί συνεργάτες.

Ιδιαίτερη θέση θα έχει πάντα για μένα το εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας. Ευχαριστώ όλα τα μέλη του γιατί ήταν πάντα εκεί να με βοηθήσουν και να μου απαντήσουν σε οποιαδήποτε απορία ότι ώρα και να ήταν. Κυρίως, όμως, στη Δρ. Νατάσα Καντσάδη και Δρ. Δήμητρα Χατζηλεοντιάδου. Σε αυτά τα δυο κορίτσια οφείλω πολλά, καθώς αυτές έσπειραν το σπόρο της έρευνας και με έκαναν να αγαπήσω τον πάγκο! Τις ευχαριστώ γιατί ήταν πάντα δίπλα μου από την αρχή μέχρι και στις τελικές πρόβες του διδακτορικού. Επίσης, δεν μπορώ να παραλείψω τους Δρ. Γεώργιο Στραβοδήμο και Δρ. Χριστίνα Δράκου, για την καθοδήγησή τους σε επιστημονικά θέματα αλλά και για την ψυχολογική υποστήριξη.

Και φυσικά ένα ΤΕΡΑΣΤΙΟ ΕΥΧΑΡΙΣΤΩ στον άνθρωπο που ανέχτηκε την γκρίνια μου κυρίως κατά τα τελευταία πειράματα!!! Την Δρ. Κατερίνα Τσιτσάνου, τον θεμέλιο λίθο του εργαστηρίου μας!!! Χωρίς την πολύτιμη βοήθειά της θα πάλευα ακόμα ανάμεσα στις πιπέτες!!! Στις Msc Ευγενία Σταμάτη και Ελεάννα Χριστοδούλου εύχομαι καλή επιτυχία στα πειράματα τους και υπομονή!

Πέρα, όμως, από τον «επιστημονικό κόσμο» οφείλω πολλά στους φίλους μου που είναι εκτός έρευνας. Ένα μεγάλο ΣΥΓΓΝΩΜΗ για τις άπειρες ώρες πουμίλαγα σε μια ακαταλαβίστικη γλώσσα, για πράγματα που δεν ξέρατε και δεν μπορούσατε να βοηθήσετε!! Εσείς, όμως, με ακούγατε χωρίς γκρίνια!! Επομένως, Μπάμπη (εσύ είσαι η εξαίρεση είσαι του χώρου), Γιώργο, Ελευθερία, Νίκο, Θανάση, Γιάννη, Χριστίνα, Μάχη, Έλενα ΣΑΣ ΕΥΧΑΡΙΣΤΩ!

Last but not least, δεν μπορώ να μην αναφερθώ στην οικογένειά μου. Στην αδερφή μου, Ελεάνα και στου γονείς μου Γιώργο και Βασιλική Λύγγρη. Τους ανθρώπους που με έμαθαν από μικρή να προσπαθώ και να παλεύω για όσα ονειρεύομαι. Το μεγάλο μου στήριγμα σε όλες τις στιγμές, στις χαρές και στις λύπες. Μα κυρίως το στήριγμά μου την ώρα που ετοιμαζόμουν να τα παρατήσω! Χωρίς εσάς τίποτα από όλα αυτά δεν θα είχε γίνει πραγματικότητα! Μαμά, μπαμπά ευχαριστώ...

*Στου γονείς μου Γιώργο και Βάσω,
που μου έμαθαν να ονειρεύομαι..*

*“The path from dreams to success does exist. May you have the vision to find
it, the courage to get on to it, and the perseverance to follow it.”*

Kalpana Chawla

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	14
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	15
Κεφάλαιο 1 ^ο : Εντομοαπωθητικά.....	18
1. Συνθετικά απωθητικά.....	20
1.1 DEET.....	20
1.2 Ικαριδίνη.....	24
1.3 IR3535.....	24
1.4 DEPA.....	26
2. Εντομοαπωθητικά φυτικής προέλευσης.....	26
2.1 Φυσικά έλαια και γαλακτώματα.....	29
2.2 Αιθέρια έλαια.....	30
2.2.1 Αιθέριο έλαιο λεμονιού ευκαλύπτου (<i>Corymbia citriodora</i>).....	30
2.2.2. Αιθέριο έλαιο κιτρονέλας (<i>Cymbopogon nardus</i>).....	31
2.2.3. Αιθέριο έλαιο Neem (<i>Azadirachta indica</i>).....	31
2.2.4. Αιθέριο έλαιο θυμαριού (<i>Thymus vulgaris</i>).....	32
2.2.5. Αιθέριο έλαιο γληχώματος /γαλεόφιλον (<i>Catnip oil</i>).....	32
Κεφάλαιο 2: Κουνούπια φορείς ασθενειών	35
2.1 <i>Anopheles gambiae</i> , ο φορέας της ελονοσίας.....	35
2.1.1 Ελονοσία.....	37
2.1.2 Αρβοϊοί.....	39
2.2 <i>Aedes albopictus</i> , ο φορέας του ιού Ζίκα και του ιού του Δυτικού	
Νείλου.....	40
2.2.1 Ιός Ζίκα.....	41
2.2.2 Ιός του Δυτικού Νείλου.....	41
2.2.3 Ιός Κίτρινου Πυρετού.....	42
Κεφάλαιο 3 ^ο : Οσφρητικό σύστημα κουνουπιών.....	43
3.1 Ανατομία οσφρητικού συστήματος.....	43
3.2 Χημειοαισθητικοί υποδοχείς αντίχενωσης οσμογόνων μορίων.....	44
Κεφάλαιο 4 ^ο : Πρωτεΐνες πρόσδεσης οσφρητικού συστήματος (OBPs).....	49
4.1 Λειτουργία.....	49
4.2 Μορφολογία.....	50
4.3 Εφαρμογή των OBPs Στην Βιοτεχνολογία.....	51
4.4 Πρωτεΐνες- στόχοι.....	53
Κεφάλαιο 5 ^ο : Κρυστάλλωση πρωτεϊνών.....	57
5.1. Αρχές κρυστάλλωσης πρωτεϊνών.....	58
5.2. Παράγοντες που επηρεάζουν την κρυστάλλωση.....	59
5.3. Μέθοδοι Κρυστάλλωσης.....	63
Κεφάλαιο 6 ^ο : Κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ.....	67
Ακτίνες Χ.....	67
Ανάλυση δεδομένων.....	69
Το πρόβλημα της φάσης.....	70
Εξίσωση ηλεκτρονιακής πυκνότητας.....	71
Δείκτες Miller <i>h,k,l</i>	71
Νόμος Bragg.....	72
Αναλυτική επεξήγηση παραγόντων των κρυσταλλογραφικών δεδομένων.....	73
Υπολογισμός ηλεκτρονιακής πυκνότητας.....	75
Έλεγχος Δομικού μοντέλου- Διάγραμμα Ramachandran.....	76
ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	77
Σκοπός της εργασίας.....	78

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	80
Κεφάλαιο 1 ^ο : Αντιδραστήρια και εργαστηριακός εξοπλισμός.....	81
<u>Αντιδραστήρια</u>	81
<u>Εργαστηριακός εξοπλισμός-Υλικά</u>	82
<u>Εργαστηριακός εξοπλισμός-Όργανα</u>	83
<u>Βακτηριακά στελέχη</u>	84
<u>Ένζυμα</u>	84
<u>Στήλες χρωματογραφίας</u>	84
i. Πλασμιδιακός Φορέας pET-22b (+).....	85
ii. Βακτηριακά στελέχη <i>E. coli</i>	86
iii. Ένζυμα περιορισμού.....	87
iv Αντιβιοτικά.....	89
Κεφάλαιο 2 ^ο : Υπερέκφραση και απομόνωση της <i>AgamOBP5</i>	91
2.1 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων <i>E. coli Origami B</i> (<i>DE3</i>).....	91
2.2 Υπερέκφραση της <i>AgamOBP5</i> με επαγωγή.....	92
2.3 Συλλογή κυττάρων.....	94
2.4 Λύση των κυττάρων.....	95
2.5 Κλασμάτωση των υποκυτταρικών σωματιδίων.....	96
2.5.1 Επεξεργασία έγκλειστων σωματιδίων.....	97
2.6 Αποδιάταξη των σωματίων εγκλεισμού και αναδίπλωση της πρωτεΐνης.....	98
2.7 Συμπύκνωση της πρωτεΐνης	101
2.8 Διαπίδυση της πρωτεΐνης	101
2.9 Καθαρισμός της <i>AgamOBP5</i> με ταχεία υγρή χρωματογραφία πρωτεϊνών FPLC.....	102
2.9.1 Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής.....	103
2.9.2 Χρωματογραφία μοριακής διήθησης.....	105
2.10 Απολιπίδωση	106
2.11 Ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες σε πηκτή πολυ-ακρυλαμίδιου (<i>SDS- PAGE</i>).....	107
2.12 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνικού δείγματος με τη μέθοδο Bradford).....	110
2.13 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνικού δείγματος με φωτομέτρηση στα 280nm.....	113
Κεφάλαιο 3 ^ο : Υπερέκφραση και απομόνωση της <i>AgamOBP4</i>	114
Κεφάλαιο 4 ^ο : Υπερέκφραση και απομόνωση της <i>AgamOBP1</i>	115
Κεφάλαιο 5 ^ο : Υπερέκφραση και απομόνωση της <i>AealOBP1</i>	117
5.1 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων <i>E. coli DH5α</i>	117
5.2 Πολλαπλασιασμός και απομόνωση του πλασμιδίου <i>puc57- AealOBP1</i> από κύτταρα <i>E. coli DH5α</i>	117
5.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του πλασμιδίου με φωτομέτρηση στα 260nm.....	118
5.4 Πέψη του απομονωμένου πλασμιδίου με περιοριστικές ενδονουκλεάσες.....	120
5.5 Απομόνωση των προϊόντων της πέψης με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.....	120
5.6 Εκχύλιση των προϊόντων της πέψης από την πηκτή αγαρόζης (<i>Gel extraction</i>).....	122
5.7 Υποκλωνοποίηση γονιδίου <i>AealOBP1</i> σε πλασμιδιακό φορέα pET- 22b(+).	122

5.8 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων <i>E. coli</i> DH5α.....	123
5.9 Σάρωση επιλογής κλώνων μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης PCR.....	123
5.10 Απομόνωση του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pET-22b(+)-AealOBP1 από κύτταρα <i>E. coli</i> DH5α.....	125
5.11 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων <i>E. coli</i> Origami B (DE3) και Origami 2 (DE3).....	126
5.12 Δοκιμή έκφρασης της πρωτεΐνης AealOBP1.....	126
5.13 Υπερέκφραση και απομόνωση της πρωτεΐνης AealOBP1.....	127
Κεφάλαιο 6ο: <i>in vitro</i> φθορισμομετρικές μελέτες.....	128
6.1 Μελέτη της πρόσδεσης ενώσεων με πιθανή βιοδραστική δράση στην πρωτεΐνη AgamOBP5.....	129
6.1.1 Υπολογισμός της σταθεράς πρόσδεσης K_d του I-NPN για την AgamOBP5.....	129
6.1.2 Αξιολόγηση συγγένειας εν δυνάμει προσδετών της AgamOBP5 σε μια σταθερή συγκέντρωση προσδέτη (<i>one point screening</i>).....	130
6.1.3 Υπολογισμός της σταθεράς πρόσδεσης K_i των προσδετών για την AgamOBP5.....	130
6.2 Μελέτη της πρόσδεσης ενώσεων με πιθανή βιοδραστική δράση στην πρωτεΐνη AgamOBP4.....	132
6.3 Μελέτη της πρόσδεσης ενώσεων με πιθανή βιοδραστική δράση στην πρωτεΐνη AgamOBP1.....	134
Κεφάλαιο 7ο: Κρυσταλλογραφικές μελέτες.....	136
7.1 Προσδιορισμός της τριδιάστατης κρυσταλλικής δομής της AgamOBP5.....	136
7.2 Προσδιορισμός της τριδιάστατης κρυσταλλικής δομής των συμπλόκων AgamOBP5-καρβακρόλη και AgamOBP5-θυμόλη.....	138
7.3 Προσδιορισμός της τριδιάστατης κρυσταλλικής δομής της πρωτεΐνης AealOBP1.....	140
Κεφάλαιο 8ο : Θερμοδυναμικές μελέτες.....	141
8.1 Αδιαβατική θερμιδομετρία διαφορικής σάρωσης (DSC).....	141
Κεφάλαιο 9ο : <i>in vivo</i> μελέτες συμπεριφοράς.....	144
9.1 Εκτροφή κουνουπιών <i>Aedes albopictus</i>	144
9.2 <i>in vivo</i> αξιολόγηση εντομοαπωθητικής δράσης (<i>The arm-in- cage- test</i>).....	145
9.3 Προσδιορισμός δείκτη απωθητικότητας (RI) και στατιστική ανάλυση.....	146
9.4 Πειράματα εντομοαπώθησης σε κουνούπια <i>Culex pipiens</i>	146
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	148
Κεφάλαιο 1ο: Υπερέκφραση και απομόνωση της AgamOBP5.....	149
Κεφάλαιο 2ο: Υπερέκφραση και απομόνωση της AgamOBP4.....	153
Κεφάλαιο 3ο: Υπερέκφραση και απομόνωση της AgamOBP1.....	156
Κεφάλαιο 4ο: Υπερέκφραση και απομόνωση της AealOBP1.....	160
Κεφάλαιο 5ο: <i>in vitro</i> φθορισμομετρικές μελέτες.....	164
5.1 Μελέτη της πρόσδεσης επιλεγμένων ενώσεων στην πρωτεΐνη AgamOBP5.....	164
5.1.1. Υπολογισμός της σταθεράς πρόσδεσης K_d του I-NPN για την AgamOBP5.....	164
5.1.2. Αξιολόγηση συγγένειας πιθανών προσδετών με την AgamOBP5 σε μια σταθερή συγκέντρωση (Δοκιμασίες διαλογής ενός σημείου; <i>one point screening assays</i>).....	165
5.1.3. Υπολογισμός της σταθεράς πρόσδεσης K_i των προσδετών για την AgamOBP5.....	166

5.2 Μελέτη της πρόσδεσης επιλεγμένων ενώσεων στην πρωτεΐνη AgamOBP4.....	169
5.3 Μελέτη της πρόσδεσης επιλεγμένων ενώσεων στην πρωτεΐνη AgamOBP1.....	172
5.3.1. Υπολογισμός της σταθεράς πρόσδεσης K_d του 1-NPN για την AgamOBP1.....	172
5.3.2. Προσδιορισμός νέων εντομοαπωθητικών ενώσεων με εικονική επιλογή βάσει φαρμακοφόρου (Pharmacophore based virtual screening) και υπολογιστικές μελέτες μοριακής πρόσδεσης στην AgamOBP1.....	173
5.3.3. Προσδιορισμός νέων εντομοαπωθητικών ενώσεων με εικονική επιλογή βάσει χημικής δομής (2D-fingerprint based virtual screening) και υπολογιστικές μελέτες μοριακής πρόσδεσης στην AgamOBP1.....	175
Κεφάλαιο 6 ^ο : Κρυσταλλογραφικές μελέτες.....	180
6.1 Προσδιορισμός της τριτοταγούς δομής της AgamOBP5.....	180
6.2 Προσδιορισμός της τρισδιάστατης δομής των συμπλόκων AgamOBP5- καρβακρόλη και AgamOBP5-θυμόλη.....	184
6.3 Προσδιορισμός της τριτοταγούς δομής της AealOBP1.....	195
Κεφάλαιο 7 ^ο : Θερμοδυναμικές μελέτες.....	199
Κεφάλαιο 8 ^ο : <i>in vivo</i> μελέτες συμπεριφοράς.....	201
8.1 Αξιολόγηση απωθητικής δράσης των νέων προσδετών της AgamOBP1.....	201
8.1.1. Προσδιορισμός νέων πιθανών προσδετών της AgamOBP1, με βάση τη δομή του συμπλόκου AgamOBP1- DEET εφαρμόζοντας τη δυναμική συνδυαστική χημεία.....	204
8.2 Αξιολόγηση απωθητικής δράσης μεταβολιτών απομονωμένων από αλόφυτα.....	206
8.3 Αξιολόγηση απωθητικής δράσης ελεύθερων και ενθυλακωμένων αιθέριων ελαίων.....	208
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	214
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	226
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	229
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	232

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

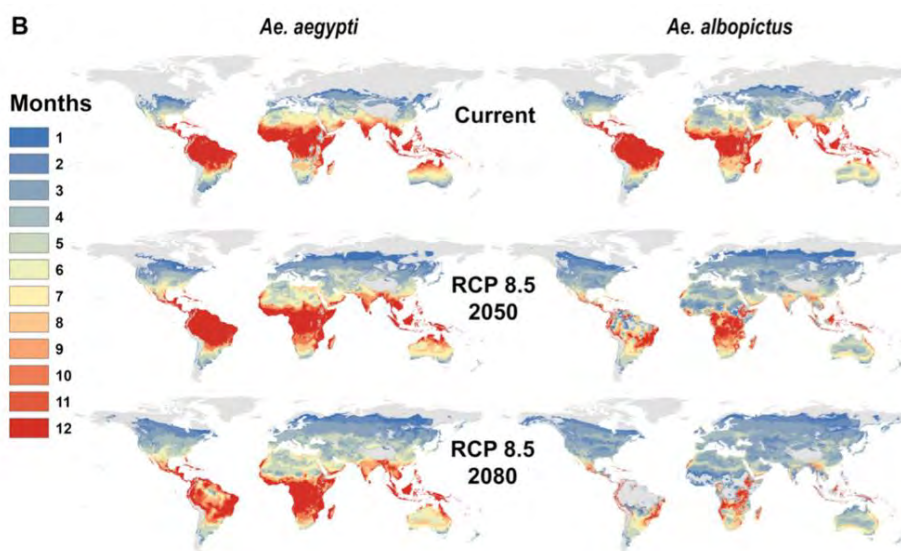
Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας κάθε χρόνο καταγράφονται περισσότεροι από 700.000 θάνατοι λόγω ασθενειών που προκαλούνται από παράσιτα, ιούς και βακτήρια, όπως η ελονοσία, ο δάγκειος πυρετός, η σχιστοσωμίαση, η ανθρώπινη αφρικανική τρυπανοσωμίαση, η λεϊσμανίαση, η ασθένεια Chagas, ο κίτρινος πυρετός, η ιαπωνική εγκεφαλίτιδα και η ογκοκερσίωση. Ως διαβιβαστές δρουν ζωντανοί οργανισμοί, οι οποίοι προσβάλλονται από ένα παθογόνο μικροοργανισμό κατά τη διάρκεια ενός γεύματος αίματος από έναν μολυσμένο ξενιστή (άνθρωπο ή ζώο) και εν συνεχεία τον μεταδίδουν σε έναν νέο ξενιστή. Οι πιο γνωστοί διαβιβαστές είναι τα κουνούπια καθώς και συγκεκριμένα είδη από κρότωνα (τσιμπούρια), μύγες, φλεβοτόμοι (σκνίπες), αφανίπτερα (ψύλλοι) και σαλιγκάρια γλυκού νερού (1).

Η μετάδοση τέτοιου είδους ασθενειών είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη στις τροπικές και υποτροπικές περιοχές σε όλο τον κόσμο, από τη Νότια Αμερική και την Αφρική έως τη Νοτιοανατολική Ασία και τον Ειρηνικό. Ως αποτέλεσμα, μεγάλο ποσοστό του παγκόσμιου πληθυσμού κινδυνεύει από τις ασθένειες που προκαλούν τα παθογόνα που διαβιβάζονται από έντομα. Σχεδόν 200 εκατομμύρια άνθρωποι μολύνονται κάθε χρόνο από παράσιτα όπως το *Plasmodium falciparum*, το *Trypanosoma brucei* και το *Leishmania donovani* και ιούς όπως αυτούς που προκαλούν δάγκειο πυρετό (DENV), Zika (ZIKV) και chikungunya (CHIKV) (1) (2) (3). Επίσης, η αλληλεπίδραση του ανθρώπου με τα συγκεκριμένα παράσιτα έχει ως αποτέλεσμα την πρόκληση μεταλλάξεων στο ανθρώπινο γονιδίωμα, οι οποίες χαρακτηρίζονται ως «υπογραφές φυσικής επιλογής». (4) (5)

Όπως προαναφέρθηκε, τα κουνούπια αποτελούν πρωτεύοντες φορείς πολλαπλών παρασίτων και ιών που προκαλούν σοβαρές ασθένειες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα η ελονοσία -μια από τις σημαντικότερες αιτίες παιδικής θνησιμότητας παγκοσμίως, με περισσότερο από 1 εκατομμύριο θανάτους παιδιών ετησίως μόνο στην Αφρική- που προκαλείται από τα παράσιτα *Plasmodium falciparum* και *Plasmodium vivax*. Τα παράσιτα αυτά μεταδίδονται αποκλειστικά μέσω του νύγματος μολυσμένου θηλυκού κουνουπιού του γένους *Anopheles* (6) (7). Τα κουνούπια του γένους *Aedes* και *Culex* ευθύνονται επίσης για τη μετάδοση παθογόνων προκαλώντας σοβαρές διαβίου αναπηρίες που καθώς είναι ορατές (ελεφαντίαση), συνοδεύονται και με κοινωνικό στίγμα όταν (8) (9).

Η παγκοσμιοποίηση των ταξιδιών και του εμπορίου, η άναρχη και χωρίς σχέδιο αστικοποίηση καθώς και οι περιβαλλοντικές αλλαγές, επιφέρουν σημαντικές επιπτώσεις στη μετάδοση ασθενειών τα τελευταία χρόνια (Εικόνα 1). Ενδεικτικά, αναφέρεται το παράδειγμα των αρβοϊών, δηλαδή το σύνολο των ιών που προκαλούνται από αρθρόποδα. Πρόκειται για μια μεγάλη απειλή κυρίως στις υποτροπικές και τροπικές περιοχές. Ωστόσο, η κλιματική αλλαγή έχει προκαλέσει τη μετανάστευση των κουνουπιών σε παγκόσμια κλίμακα, με αποτέλεσμα η μετάδοση των φλαβοϊών όπως οι DENV, ZIKV και ιός κίτρινου πυρετού (YFV), να αποτελεί ανησυχία για την δημόσια υγεία σε παγκόσμιο επίπεδο. Οι κύριοι φορείς των ιών είναι τα κουνούπια του γένους *Aedes*, *Aedes aegypti* (το κουνούπι του κίτρινου πυρετού) και *Aedes albopictus* (το ασιατικό κουνούπι τίγρης). (10) (11)

Το ασιατικό κουνούπι *Aedes albopictus*, ένα ενδημικό είδος της Αφρικής, της Ασίας και της Νότιας Αμερικής, εξαπλώθηκε στην Ευρώπη και την Αμερική, μέσω του εμπορίου μεταχειρισμένων ελαστικών αλλά και διακοσμητικών φυτών. Τα συγκεκριμένα αντικείμενα επιτρέπουν τη συγκέντρωση νερού στα κοιλάματά τους, παρέχοντας στα κουνούπια τη δυνατότητα εναπόθεσης αυγών. Με αυτό τον τρόπο τα αυγά των ασιατικών κουνουπιών διανεμήθηκαν σε διάφορες χώρες της Ευρώπης. Το γένος *Aedes* παρουσιάζει εξαιρετική προσαρμοστικότητα στο περιβάλλον και μπορεί να επιβιώσει τόσο σε αγροτικές όσο και σε αστικές περιοχές. Τα αυγά τους μπορούν να αφυδατωθούν και να επιβιώσουν για αρκετούς μήνες, διευκολύνοντας την παγκόσμια εξάπλωσή τους (3) (12) (13).



Εικόνα 1: Γεωγραφική κατανομή του κουνουπιού *Aedes aegypti* και του ασιατικού κουνουπιού τίγρης (*Ae. albopictus*) κάτω από ένα σενάριο ακραίας κλιματικής αλλαγής, (πάνω) στις ημέρες μας, (μεσαίο) το 2050 και (κάτω) το 2080 (14)

Έχει καταστεί σαφής ο κίνδυνος που ελλοχεύει με τη μετάδοση των ασθενειών μέσω των διαβιβαστών. Μια αποτελεσματική μέθοδος αντιμετώπισης του προβλήματος είναι ο περιορισμός της εξάπλωσης των φορέων. Αυτό αποδεικνύεται και από την εκτίμηση του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας ότι «ο έλεγχος των κουνουπιών είναι η μόνη παρέμβαση που μπορεί να μηδενίσει τη μετάδοση [ελονοσίας]».

Πράγματι, η χρήση διχτύων εμποτισμένων με εντομοκτόνα περιόρισε τη δράση των κουνουπιών *Anopheles*, μειώνοντας το ποσοστό θανάτων από ελονοσία κατά 75% κατά το διάστημα 2000 με 2015 (15). Η εφαρμογή παγίδων και διχτύων εμποτισμένα με εντομοκτόνα αλλά και ο εναέριος ψεκασμός εντομοαπωθητικών είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικά έναντι διάφορων φορέων- εντόμων που λαμβάνουν γεύμα αίματος, όπως η μύγα τσετσέ. (16) (17) Δυστυχώς, η αλόγιστη κατανάλωση εντομοκτόνων έχει ως αποτέλεσμα την αντοχή των εντόμων έναντι των συγκεκριμένων χημικών. Παράλληλα, η προσαρμοστικότητα των κουνουπιών *Aedes* στο νέο περιβάλλον εγκαθίδρυσή τους, εντείνει το πρόβλημα ελέγχου των κουνουπιών, με αποτέλεσμα να θέτονται σε κίνδυνο μεγάλο μέρος του πληθυσμού. (18) Επιπλέον, η στρατηγική που ακολουθείται για την αντιμετώπιση της ελονοσίας με την χρήση παγίδων και διχτύων, εφαρμόζεται μόνο έναντι των κουνουπιών που κινούνται και τρέφονται σε εσωτερικούς χώρους. Επομένως, η συγκεκριμένη μέθοδος δεν παρέχει προστασία σε εξωτερικούς χώρους. (19)

Συμπερασματικά, είναι επιτακτική η ανάγκη για την ανάπτυξη εναλλακτικών στρατηγικών για την αποτελεσματική αντιμετώπιση της μετάδοσης παθογόνων από έντομα. Από το 2017, ο ΠΟΥ έθεσε σε εφαρμογή το πρόγραμμα "Global Vector Control Response (GVCR) 2017-2030", το οποίο παρέχει στρατηγική καθοδήγηση σε χώρες που υποφέρουν από την μετάδοση των συγκεκριμένων ασθενειών. Βασικό πυλώνα του προγράμματος, αποτελεί η εφαρμογή μιας ολοκληρωμένης προσέγγισης με στόχο των έλεγχου των εντόμων- διαβιβαστών.

Κεφάλαιο 1^ο: Εντομοαπωθητικά

Η τρέχουσα ολοκληρωμένη στρατηγική για τον έλεγχο των διαβιβαστών περιλαμβάνει γενετικά τροποποιημένα κουνούπια, εντομοκτόνα, δίκτυα, ελκυστικές παγίδες και απωθητικά. Σύμφωνα με τις οδηγίες του Εθνικού Οργανισμού Δημόσιας Υγείας (ΕΟΔΥ) προς τους πολίτες, η χρήση κατάλληλων ρούχων (που καλύπτουν μεγάλη επιφάνεια του ανθρώπινου σώματος) και η εφαρμογή προστατευτικών μέσων στο χώρο (κουνουπιέρες, σήτες, εντομοαπωθητικά χώρου) περιορίζει σε μεγάλο βαθμό τη δράση των κουνουπιών. (20) Παράλληλα, η απομάκρυνση στάσιμων νερών και η αποφυγή συσσώρευσης νερού παρεμποδίζει την εναπόθεση αυγών από τα έντομα στον περιβάλλοντα χώρο.

Τα εντομοαπωθητικά αποτελούν ένα αναπόσπαστο μέσο αντιμετώπισης του προβλήματος. Ως τοπικό εντομοαπωθητικό ορίζεται μια χημική ένωση που καθιστά την ατμόσφαιρα σε απόσταση 4 εκατοστών από το ανθρώπινο δέρμα τόσο επιβλαβή για τα έντομα, ώστε να αποθαρρύνονται από την επαφή και κατά συνέπεια τη λήψη γεύματος (21). Στο εμπόριο διατίθεται ένα ευρύ φάσμα εντομοαπωθητικών προϊόντων σε ποικίλες μορφές (σπρέι, τζελ, λοσιόν), με διάφορες κύριες δραστικές ουσίες που απευθύνονται σε διάφορες ομάδες καταναλωτών (**Πίνακας 1**). Ωστόσο, σε κάθε περίπτωση ένα «ιδανικό» εντομοαπωθητικό προϊόν, οφείλει να φέρει ορισμένα χαρακτηριστικά, όπως χαμηλή τοξικότητα, ευχάριστο άρωμα, χαμηλό κόστος κ.λπ. (**Πίνακας 2**). (22)

Λόγω των πρόσφατων επιδημιών από ιούς που μεταδίδονται από τα κουνούπια, όπως Zika, δάγκειου πυρετού και chikungunya στην Αμερική, η χρήση εντομοαπωθητικών έχει αυξηθεί εντυπωσιακά (Εικόνα 2). Ενδεικτικό παράδειγμα αποτελεί η κατακόρυφη αύξηση των πωλήσεων εντομοαπωθητικών κατά την πρόσφατη επιδημία του ιού Ζίκα στη Βραζιλία, όπου οι πωλήσεις εντομοαπωθητικών αυξήθηκαν κατά 115% τον Δεκέμβριο του 2015 (ο κορυφαίος μήνας για λοιμώξεις) σε σύγκριση με το προηγούμενο έτος (23).

Από τη δεκαετία του 1960, οι δύο ευρύτερα χρησιμοποιούμενες εντομοαπωθητικές συνθέσεις περιέχουν είτε τη δραστική ένωση DEET (N, N-δισουλ-μ-τολουαμίδιο), είτε το δραστικό συστατικό πικαριδίνη (επίσης γνωστό ως ικαριδίνη, αλατιδίνη, Bayrepel και KBR) (24) (25). Παράλληλα, τα τελευταία χρόνια πολλά σκευάσματα έχουν ως δραστική ένωση το IR3535, ένα συνθετικό παράγωγο της β-αλανίνης (βουτυλακετυλαμινοπροπιονικός αιθυλεστέρας) (EB), καθώς και αιθέρια έλαια. (22)

Πίνακας 1. Ιδανικά χαρακτηριστικά ενός εντομοαπωθητικού προϊόντος ⁽²²⁾

Ιδανικά χαρακτηριστικά ενός εντομοαπωθητικού προϊόντος

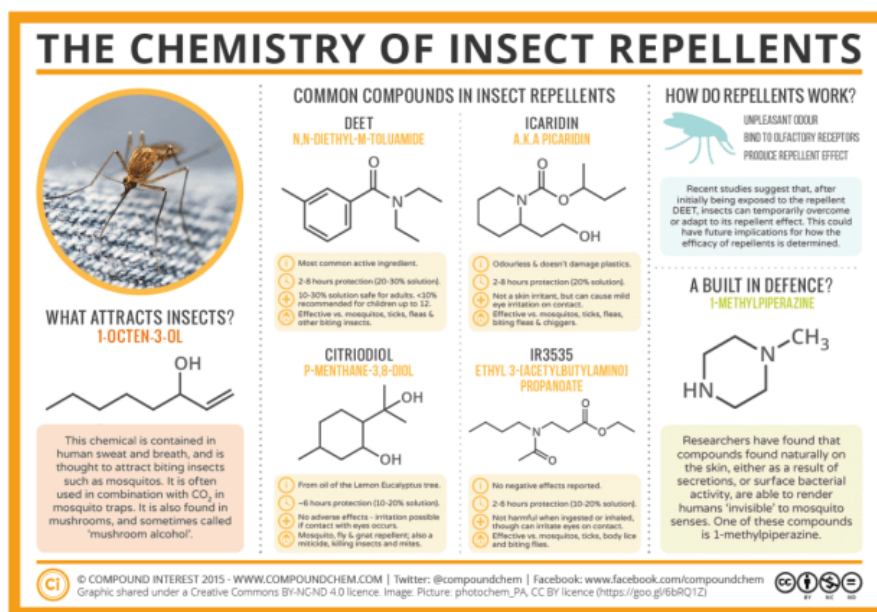
Χαμηλή τοξικότητα/Χαμηλή διαπερατότητα του δέρματος/Μη ερεθιστικό για το δέρμα, τον βλεννογόνο και μάτια
Άοσμο ή ευχάριστο άρωμα
Απωθητική δράση μεγάλης διάρκειας για την αποφυγή διαδοχικών επαναληπτικών εφαρμογών
Ευρεία δράση πάνω στα έντομα κυρίως τα κουνούπια (<i>Aedes aegypti</i> , <i>Culex</i> sp., <i>Anopheles</i> sp), μύγες, τσιμπούρια, μέλισσες και σφήκες
Καλλυντικές ιδιότητες, χωρίς την αίσθηση λιπαρότητας στο δέρμα
Αντίσταση στο νερό και τον ιδρώτα
Υψηλή χημική σταθερότητα και αδρανή σε επαφή με πλαστικά, συνθετικές ίνες, ακρυλικά και γυαλί
Μη πρόκληση αλλοιώσεων σε ρούχα κατά την εφαρμογή του
Χαμηλό κόστος

Πίνακας 2. Παράμετροι για την επιλογή του κατάλληλου εντομοαπωθητικού. ⁽²²⁾

Παράμετρος	Δυνατότητες	
Δραστική ουσία	Συνθετική (DEET, IR3535, Icaridin)	Φυτικής προέλευσης (εκχυλίσματα και αιθέρια έλαια)
Μορφή Σκευάσματος	Κλασικά σπρέι, λοσιόν, κρέμα, τζελ,	Συστήματα εκτεταμένης απελευθέρωσης μικρο και νανοσωματίδια λιπιδίων, πολυμερής μικροκάψουλες, γαλακτώματα Nano, μικρογαλακτώματα, λιποσώματα και κυκλοδεξτρίνες
Καταναλωτής	Ενήλικες, έγκυες γυναίκες, παιδιά άνω των 2 ετών, νεογέννητο άνω των 6 μηνών	
Διάρκεια δράσης	Σύντομο (κάτω από 3 ώρες), μεσαίο (από 3 έως 8 ώρες) ή μεγάλο (πάνω από 8 ώρες)	
Περιβάλλον εφαρμογής	Ανοιχτό (δάσος, παραλία) ή κλειστό (σπίτι)	

1. Συνθετικά απωθητικά

Οι συνθετικές απωθητικές ουσίες παρασκευάζονται από τη χημική βιομηχανία σε μεγάλη κλίμακα. Τα κύρια συνθετικά απωθητικά -όπως προαναφέρθηκε- είναι το DEET, η Ικαριδίνη (Πικαριδίνη), το IR3535, η DEPA (N, N-διαιθυλφαινυλακεταμίδη) και η Περμεθρίνη (συνθετικό πυρεθροειδές) (Εικόνα 2).



Εικόνα 2 Τα κύρια συνθετικά εντομοαπωθητικά (26)

1.1. DEET

Το DEET είναι ένα μικρό, πτητικό, συνθετικό μόριο, το οποίο ανακαλύφθηκε κατά τον Β΄ Παγκόσμιο Πόλεμο για την προστασία του στρατιωτικού προσωπικού από ασθένειες που μεταδίδονται από κουνούπια, όπως η ελονοσία και ο κίτρινος πυρετός (27). Παρέχει προστασία από νύγματα εντόμων όπως οι βδέλλες, τα τσιμπούρια και τα κουνούπια (28) (29) (30) (31). Η συγκέντρωση της δραστικής στα διάφορα προϊόντα κυμαίνεται από 5 έως 100%. Η χρήση του επιτρέπεται σε άτομα άνω των 2 ετών, ενώ δεν ενδείκνυται η εφαρμογή του σε βρέφη ηλικίας κάτω των 6 μηνών. Σε συγκεντρώσεις 7-10% παρατηρείται σύντομη απωθητική δράση (έως 2 ώρες), ενώ σε υψηλότερη συγκέντρωση 20-30% η δράση του διαρκεί έως και 6 ώρες. (22) Παρά την αποτελεσματική δράση του και το χαμηλό του κόστος, παρατηρούνται ορισμένες ανεπιθύμητες ιδιότητες, οι οποίες περιορίζουν την χρήση του. Συγκεκριμένα, παρουσιάζει έντονη λιπαρότητα γεγονός που προκαλεί μια δυσάρεστη αίσθηση στον καταναλωτή, διαβρώνει τις συνθετικές ίνες των ρούχων και τα πλαστικά, ενώ παρέχει

προστασία για 6 ώρες. (22) Επομένως, απαιτείται εκ νέου εφαρμογή, γεγονός που δεν είναι πάντα πρακτικό, ιδιαίτερα στις τροπικές περιοχές. (32)

Το τελευταίο διάστημα πραγματοποιείται ένας δημόσιος διάλογος σχετικά με την ασφαλή χρήση του DEET. Οι απόψεις για την πιθανή τοξικότητα του απωθητικού δίστανται πλήρως. Μια δημοσίευση στο BBC, η οποία ανέφερε χαρακτηριστικά ότι *«το DEET λειτουργεί με τον ίδιο τρόπο όπως και τα παραλυτικά νευρικά αέρια που χρησιμοποιούνται στον πόλεμο»* προκάλεσε ανησυχία στο ευρύ κοινό για την κατανάλωση του συγκεκριμένου προϊόντος. (33) Το άρθρο του BBC στηριζόταν σε έρευνα η οποία υποστηρίζει ότι το DEET προκαλεί αναστολή της ακετυλοχολινεστεράσης (AChE) μέσω του νευροτοξικού μηχανισμού δράσης. (34) Ωστόσο, μελέτες υποδεικνύουν ότι το DEET παρουσιάζει ανεπιθύμητες ιδιότητες μόνο σε υψηλές συγκεντρώσεις (>1mM). (35) (36) Παράλληλα, υποστηρίζεται και η άποψη ότι το DEET είναι ασφαλές εάν εφαρμόζεται σύμφωνα με τις επισημασμένες οδηγίες. (37) (38)

Η συγκεκριμένη διχογνωμία έχει ως αποτέλεσμα την παρανόηση των κινδύνων που ενέχει η χρήση DEET και περιόρισε την εφαρμογή του ως προστατευτικό μέτρο. Ενδεικτικό παράδειγμα αποτελεί μια ανώνυμη έρευνα που πραγματοποιήθηκε στις νότιες Ηνωμένες Πολιτείες σε κυοφορούσες γυναίκες. Το 50% των γυναικών δεν θα χρησιμοποιούσαν το εντομοαπωθητικό κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (39). Παράλληλα, επιστημονικές έρευνες αποδεικνύουν ότι ο κίνδυνος συσσώρευσης DEET στο έμβρυο είναι χαμηλός, γεγονός που καθιστά τη χρήση του ασφαλή κατά την εγκυμοσύνη. (40) (41)

Η ασφαλής χρήση του απωθητικού αποδεικνύεται από την καταγραφή μόλις εννέα περιστατικών θανάτου κατά τα τελευταία 60 χρόνια, εκ των οποίων τα τέσσερα προέκυψαν ύστερα από σκόπιμη κατάποση του προϊόντος. Τα υπόλοιπα πέντε περιστατικά οφείλονται σε έκθεση σε υψηλές συγκεντρώσεις, παρακάμπτοντας τις οδηγίες για ασφαλή χρήση. Ακόμα και στα τέσσερα περιστατικά κατάποσης, δεν είναι σαφής η πρόκληση θανάτου από το DEET καθώς οι θανόντες είχαν καταναλώσει υπερβολικές ποσότητες συνταγογραφούμενων αντιψυχωτικών φαρμάκων ή αλκοόλ και ναρκωτικών ουσιών. (42) Η πιο συχνή παρενέργεια της έκθεσης σε DEET είναι η δερματίτιδα και μπορεί να προκαλέσει ερυθρότητα, κνησμό, φυσαλίδες έως και τοπική νέκρωση. Επίσης, έχουν καταγραφεί περιστατικά εγκεφαλοπαθειών λόγω χρόνιας ή οξείας έκθεσης στη δραστική και προκαλείται κώμα, υπέρταση και επιληπτικές κρίσεις. Το καρδιαγγειακό σύστημα είναι ένας ακόμη σημαντικός στόχος που

επηρεάζεται από το DEET και πλήττεται κυρίως με υπόταση και βραδυκαρδία. Παρόλα αυτά, σε όλες τις περιπτώσεις, η διακοπή της εφαρμογής DEET και η χορήγηση της κατάλληλης φαρμακευτικής αγωγής οδήγησε σε πλήρη ανάρρωση. (42) (43)

Όσον αφορά την χρήση του DEET σε παιδιά, δεν ενδείκνυται η άμεση εφαρμογή του στο δέρμα παιδιών κάτω των 2 ετών, αλλά η χρήση άλλων προστατευτικών μέσων, όπως οι κουνουπιέρες. Σε μεγαλύτερα παιδιά, συνίσταται η τοποθέτηση του προϊόντος στα ρούχα και όχι η άμεση χρήση του στο δέρμα. Επίσης, να αποφεύγεται η επαφή με το πρόσωπο και να ακολουθούνται πιστά οι οδηγίες χρήσης. (42) (41)

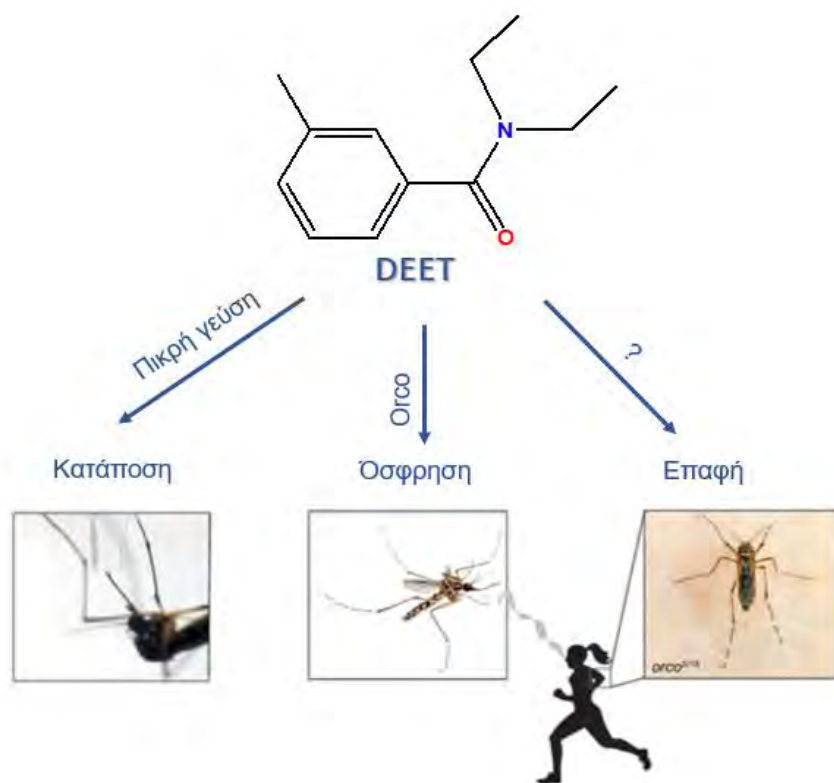
Επομένως, παρόλο που υπάρχουν ενδείξεις ότι η χρήση του DEET ως απωθητικό ενέχει κάποιο μικρό κίνδυνο, δυο μεγάλες έρευνες από το Κέντρο Δηλητηριάσεων των ΗΠΑ κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το DEET παρουσιάζει ελάχιστο ή μηδαμινό κίνδυνο όταν εφαρμόζεται σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσεως. Επιπλέον, παρόλο που η έκθεση ανθρώπων σε DEET έχει συσχετιστεί με κάποιες αρνητικές, αν και μικρές επιπτώσεις στην υγεία, πρέπει να σημειωθεί ότι λαμβάνοντας υπόψη τα εκατομμύρια καταναλωτών DEET ετησίως, τα σοβαρά περιστατικά που καταγράφονται είναι ελάχιστα. Η συνεχιζόμενη και σωστή χρήση του DEET – ενός πολύ αποτελεσματικού και οικονομικού εντομοαπωθητικού- είναι επιτακτική για την ανθρώπινη υγεία, καθώς παρατηρείται επανεμφάνιση παθογόνων που μεταδίδονται μέσω κουνουπιών και προκαλούν επιβλαβείς συνέπειες για την υγεία των ανθρώπων. (33)

Μια ακόμη ανησυχία είναι η ανθεκτικότητα και η αντίσταση του παρουσιάζουν πλέον τα κουνούπια έναντι της συγκεκριμένης δραστικής. Ορισμένα είδη κουνουπιών, όπως τα κουνούπια που ανήκουν στο γένος *Aedes* και *Culex* χαρακτηρίζονται από εξαιρετική προσαρμοστικότητα στο περιβάλλον που τα φιλοξενεί. (3) Η υπερβολική κατανάλωση του DEET οδήγησε στην εμφάνιση ανθεκτικότητας των συγκεκριμένων ειδών, με αποτέλεσμα η δράση του DEET να περιορίζεται στο διάστημα των τριών ωρών. (44)

Παρόλες τις ανησυχίες και τους προβληματισμούς, το DEET παραμένει το εντομοαπωθητικό αναφοράς (gold standard). Αξίζει να σημειωθεί, ότι ο μηχανισμός δράσης του είναι τόσο περίπλοκος όσο και αμφιλεγόμενος. Σύμφωνα πειράματα συμπεριφοράς που πραγματοποιήθηκαν, η δράση του οφείλεται στην όσφρηση, την κατάποση (*ingestion*) και την επαφή (Εικόνα 3), μέσω ενός μηχανισμού που περιλαμβάνει τον οσφρητικό συν-υποδοχέα *ORco* (*Odorant Receptor coreceptor*). Προηγούμενα ευρήματα απέδειξαν ότι θηλυκά κουνούπια *Aedes aegypti* που φέρουν

μεταλλάξεις στο γονίδιο *Orco* παρόλο που πλησιάζουν ανθρώπους παρουσία *DEET*, όταν έρθουν σε επαφή με το δέρμα, τελικά απωθούνται. (32)

Όσον αφορά το μηχανισμό απώθησης μέσω επαφής, το ταρσικό τμήμα του ποδιού του κουνουπιού είναι καλυμμένο με ειδικά τριχίδια τα οποία διαθέτουν πόρους που επιτρέπουν στις γευστικές ενώσεις να εισέλθουν και να ενεργοποιήσουν τους κατάλληλους αισθητήριους νευρώνες. Το *DEET* πιθανόν να ενεργοποιεί γευστικούς υποδοχείς απόκρισης στην πικρή γεύση που είναι πιο εκλεκτικοί ή πιο ευαίσθητοι από τους συμβατικούς υποδοχείς πικρού. Εναλλακτικά το *DEET* πιθανόν να επιδρά σε άλλη κατηγορία υποδοχέων που δεν εμπλέκονται στη γεύση και εκφράζονται μόνο στο ταρσικό τμήμα του ποδιού. Γεγονός το οποίο επιβεβαιώνεται από την έκφραση συγκεκριμένων χημειοαισθητικών υποδοχέων όπως: ιονοτροπικοί, *pickpocket* (υποδοχείς με παρόμοια κέντρα σύνδεσης) και κανάλια ιόντων *TRP* που εκφράζονται μόνο στα πόδια του κουνουπιού και όχι στην προβοσκίδα. (32)



Εικόνα 3 Οι πολλαπλοί μηχανισμοί δράσης του *DEET*. Εικόνα προσαρμοσμένη από (32)

1.2 Ικαριδίνη

Η ικαριδίνη ή πικαριδίνη ($C_{12}H_{23}NO_3$) αποτελεί ένα σχετικά νεότερο εντομοαπωθητικό, το οποίο αναπτύχθηκε από τη Bayer τη δεκαετία του 1990. Πρόκειται για ένα πτητικό, ελαφρώς διαλυτό στο νερό έλαιο ιδιαίτερα αποτελεσματικό έναντι σε κουνούπια, μύγες, μέλισσες, τσιμπούρια και ψύλλους. Η μεγάλη δημοτικότητα του οφείλεται στις βελτιωμένες καλλυντικές του ιδιότητες σε σύγκριση με το DEET, καθώς είναι άοσμο, δεν δημιουργεί αίσθηση λιπαρότητας στο δέρμα και δεν διαβρώνει πλαστικά και υφάσματα. Παράλληλα, εξατμίζεται με χαμηλότερο ρυθμό από το δέρμα, γεγονός που αυξάνει τη διάρκεια της εντομοαπωθητικής του δράσης. Οι εντομοαπωθητικές της ικανότητες είναι συγκρίσιμες ή και καλύτερες σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις σε σύγκριση με το DEET, κυρίως έναντι των κουνουπιών του γένους *Aedes*, *Culex* και *Anopheles*. (21) (22) (45)

Ο μηχανισμός δράσης της παραμένει άγνωστος σε μεγάλο βαθμό. Μελέτες υποδεικνύουν ότι παράγει ένα «φράγμα ατμών», το οποίο επηρεάζει στους οσφρητικούς νευρώνες του εντόμου και προφυλάσσει τον άνθρωπο από το νύγμα των εντόμων (45).

Η ικαριδίνη είναι ένα εγκεκριμένο προϊόν σε παγκόσμια κλίμακα. Οι συγκεντρώσεις της στα διάφορα προϊόντα κυμαίνονται από 5% έως 20%. Σκευάσματα σε μορφή σπρέι τα οποία περιέχουν 7-15% της δραστικής, παρέχουν προστασία για 3 έως 5 ώρες, ενώ προϊόντα (μαντηλάκια ή διαλύματα) με μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ικαριδίνης (7-20%) έχουν διάρκεια δράσης 8-10 ώρες. Κλινικές μελέτες σε ζώα και ανθρώπους αποδεικνύουν ότι η ένωση δεν επιφέρει τοξικολογικές επιπτώσεις στις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιείται. Παρόλα αυτά, μπορεί να προκαλέσει ερεθισμό των ματιών κι του δέρματος σε άτομα με ευαισθησία. Ωστόσο, είναι λιγότερο τοξικό και ανεκτό από το DEET και εφαρμόζεται ως εναλλακτική λύση σε παιδιά άνω των 6 μηνών (σε συκέντρωση μέχρι 10%). (21) (22) (45)

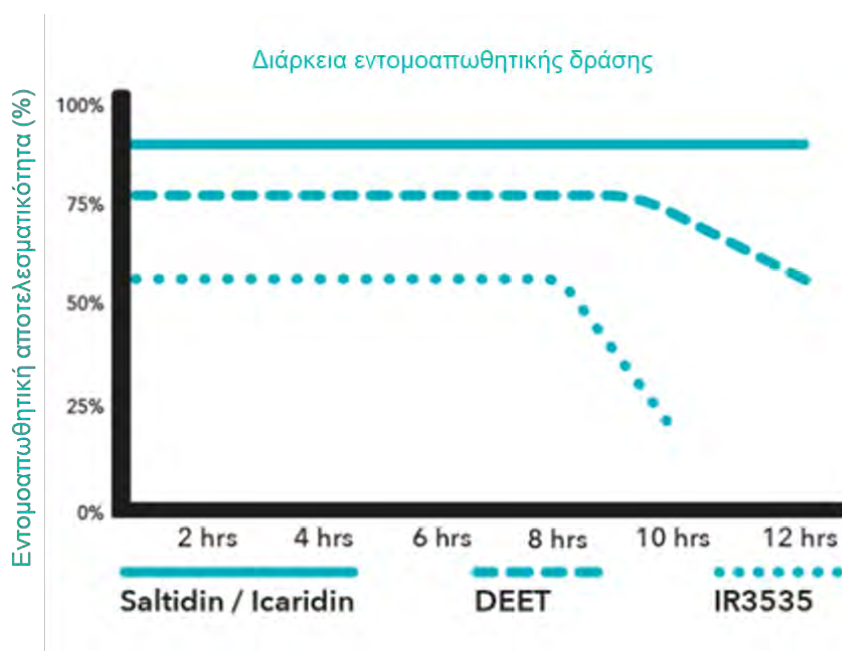
1.3 IR3535

Το IR3535 είναι μια συνθετική ένωση βασισμένη στο αμινοξύ αλανίνη, η οποία αναπτύχθηκε από τη Merck και εγκρίθηκε στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής από τον FDA το 1999 ως ενυδατική κρέμα με εντομοαπωθητική δράση. Πρόκειται για μια υγρή, λιπαρή, οργανική ένωση, ελαφρώς διαλυτή στο νερό, άοσμη και διαφανή. Είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικό έναντι σε διάφορα είδη κουνουπιών (*An. gambiae*, *An. funestus*, *Ae. aegypti* και *Ae. albopictus*), ψείρες (*Pediculus humanus*), μύγες

(*Stomoxys calcitrans*, *Simuliidae*, *Tabanidae* και *Musca domestica*), σφήκες (*Polistes galliens*) και μέλισσες (*Apis mellifera*). Η αποθητική του ικανότητα έναντι των κουνουπιών είναι χαμηλότερη σε σύγκριση με το DEET και την ικαριδίνη (Εικόνα 4), αλλά παρουσιάζει καλύτερα αποτελέσματα έναντι των μαύρων μυγών που μεταδίδουν ογκοκοκκίαση. Επίσης, είναι βιοδιασπώμενο και με χαμηλή τοξικότητα. (21) (22) (45)

Ο μηχανισμός δράσης του είναι παρόμοιος με το μηχανισμός δράσης της ικαριδίνης. Το IR3535 είναι πτητικό και κατά την εξάτμισή του σχηματίζει ένα «φράγμα ατμών» που εμποδίζει την επαφή των εντόμων με το δέρμα λόγω της δυσάρεστης οσμής του στο κουνούπι παρά το γεγονός ότι είναι άοσμο για τον άνθρωπο. (46)

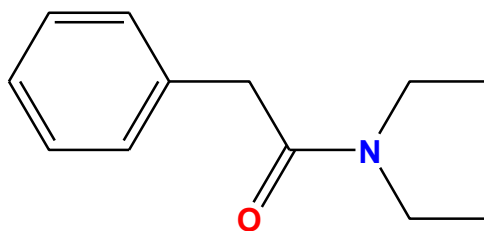
Στην παγκόσμια αγορά υπάρχουν σκευάσματα σε ποικίλες μορφές (σπρέι, λοσιόν και μαντηλάκια) στα οποία η συγκέντρωση της δραστικής κυμαίνεται από 10% έως 30%. Η εφαρμογή του συνίσταται για παιδιά κάτω των 2 ετών και κυοφορούσες γυναίκες. Δεν ενδείκνυται η χρήση καθαρού IR3535 στο δέρμα, καθώς είναι ιδιαίτερα λιπαρό προκαλώντας δυσάρεστη αίσθηση στον καταναλωτή, αλλά κυρίως λόγω του χαμηλού μοριακού του βάρους, το οποίο επιτρέπει την εισχώρηση του στους πόρους του δέρματος. Μειονεκτήματα της ουσίας αποτελούν ο ερεθισμός των ματιών και η διάβρωση ρούχων και πλαστικών. (21) (22) (45) (46)



Εικόνα 4. Μελέτη για τη διάρκεια δράσης του DEET, της ικαριδίνης και του IR3535. Εικόνα προσαρμοσμένη. (47)

1.4 DEPA

Το DEPA (N, N-Διαιθυλ Φαινυλακεταμίδιο) αποτελεί ένα εντομοαπωθητικό προϊόν το οποίο παρασκευάστηκε από τον Οργανισμό Αμυντικής Έρευνας και Ανάπτυξης (Defense Research Development Establishment, DRDE) της Ινδίας (Εικόνα 5). Χρησιμοποιείται ευρέα από τις ινδικές ένοπλες δυνάμεις έναντι αιμοφάγων αρθροπόδων, όπως κουνούπια, μαύρες μύγες, κλπ. Η έλλειψη ενός χημικού συστατικού απαραίτητο για την παραγωγή του DEET στην Ινδία, οδήγησε στη μελέτη για το σχεδιασμό ενός αποτελεσματικού, ασφαλούς και εναλλακτικού εντομοαπωθητικού για χρήση στην Ινδία. Το DEPA αποτέλεσε μια ασφαλή και οικονομική λύση, η οποία παρέχει προστασία έναντι των κουνουπιών έως 8 ώρες σε συγκέντρωση 20%. (22)



Εικόνα 5 Ο χημικός τύπος του DEPA (48)

2. Εντομοαπωθητικά φυτικής προέλευσης

Τα εντομοαπωθητικά αποτελούν ένα αναπόσπαστο μέσο στις σύγχρονες ολοκληρωμένες στρατηγικές ελέγχου των διαβιβαστών. Στον τομέα των απωθητικών, καταβάλλεται προσπάθεια για αντικατάσταση των υπαρχόντων τοπικών εντομοαπωθητικών με νέα προϊόντα, ασφαλέστερα μεγαλύτερης διάρκειας, αποτελεσματικότερα σε μικρότερες δόσεις και δραστικά έναντι ευρέως φάσματος εντόμων. Τα τελευταία χρόνια, η έρευνα για νέα εντομοαπωθητικά έχει κατευθυνθεί προς τα φυσικά προϊόντα, ανταποκρινόμενη στην αντίληψη που επικρατεί για όλο και μεγαλύτερη χρήση φυσικών (αγνών), υγιεινών, οικολογικών και βιώσιμων υλικών. Τα προϊόντα αυτά θεωρούνται από τους καταναλωτές ασφαλέστερα και φιλικότερα προς το περιβάλλον σε σχέση με τα υφιστάμενα συνθετικά.

Τα φυτά διαθέτουν έναν αμυντικό μηχανισμό έναντι των καρποφάγων εντόμων, ο οποίος στηρίζεται στην παραγωγή απωθητικών δευτερογενών μεταβολιτών,

τερπενοειδών και φαινολών. Καθώς τα καρποφάγα και αιματοφάγα είδη εντόμων εξελίχθηκαν από κοινούς προγόνους πολλές από αυτές τις ενώσεις απωθούν και τα κουνούπια. Τα τερπενοειδή αποτελούν τη μεγαλύτερη κατηγορία φυσικών προϊόντων και παρουσιάζουν ισχυρές εντομοαπωθητικές ιδιότητες. Επίσης, τα μονοτερπένια που περιέχονται σε πολλά αιθέρια έλαια, αποτελούν την πιο σημαντική κατηγορία φυσικών εντομοαπωθητικών. Επιπλέον, οι φαινόλες μια κατηγορία χημικών ενώσεων που αποτελείται από μια υδροξυλομάδα ($-OH$) προσαρτημένη σε μια αρωματική ομάδα υδρογονανθράκων, παρουσιάζουν επίσης εντομοαπωθητική δράση. Τέλος, τα φλαβονοειδή είναι φαινολικά απωθητικά, τα οποία ταξινομούνται σε τρεις κύριες υποκατηγορίες: α) φλαβόνες, β) ισοφλαβονοειδή και γ) τανίνες. (22)

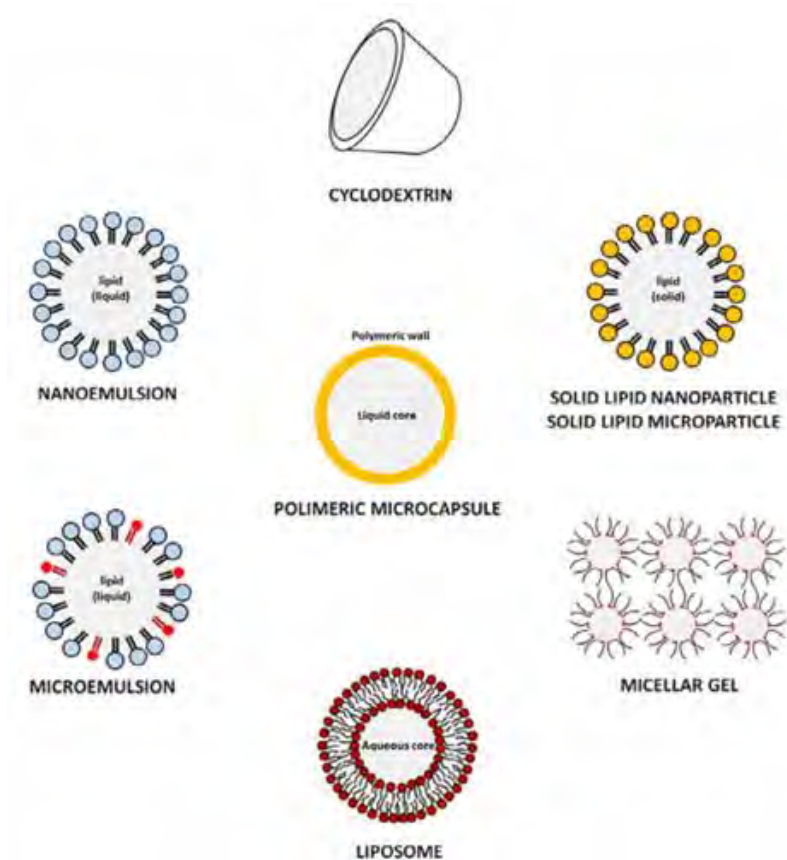
Τα αιθέρια έλαια που εξάγονται από φυτά, έχουν χρησιμοποιηθεί ως εντομοαπωθητικά από την αρχαιότητα. Οι ιθαγενείς χρησιμοποιούν τα φυτά με εντομοαπωθητικές ιδιότητες με τρεις βασικούς τρόπους: α) καύση των φυτών για την παραγωγή καπνού, β) τοποθέτηση φυτών μέσα στο σπίτι και γ) εφαρμογή αιθέριων ελαίων ή σκευασμάτων που περιέχουν φυτικά εκχυλίσματα σε διάφορα μέρη του σώματος. Τα φυτικά απωθητικά εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται ευρέως με αυτόν τον παραδοσιακό τρόπο σε όλες τις αγροτικές κοινότητες στις τροπικές περιοχές, καθώς αποτελούν ένα οικονομικό, ασφαλές και αποτελεσματικό τρόπο προστασίας από τα έντομα. (22) (49)

Οι ενώσεις φυσικής προέλευσης αποτελούν μια κατηγορία εντομοαπωθητικών που έχει εγκριθεί από τον FDA και περιλαμβάνει μια μεγάλη ποικιλία αιθέριων φυτικών ελαίων ή των δραστικών τους ενώσεων, που λειτουργούν ως το κύριο δραστικό συστατικό. Τα συγκεκριμένα προϊόντα θεωρούνται γενικά ασφαλέστερα για ανθρώπινη χρήση και πιο οικολογικά σε σύγκριση με συνθετικά και μη βιοδιασπώμενα προϊόντα όπως το DEET. Ο κατάλογος των απωθητικών που προέρχονται από φυτά είναι πολυάριθμος. (45) Τα πιο διαδεδομένα αιθέρια έλαια είναι το αιθέριο έλαιο λεμονιού ευκαλύπτου (*Corymbia citriodora*), η κιτρονέλλα (*Cymbopogon sp.*), το έλαιο Neem (*Azadirachta indica*) και το έλαιο γληχώματος το γαλεόφιλον (*Catnip oil*). Στο εμπόριο διατίθενται προϊόντα τα οποία περιέχουν ως δραστική ουσία αιθέρια έλαια βοτάνων. Ενδεικτικά αναφέρονται το Repel Essential InsectTM (με λάδι ευκαλύπτου λεμονιού και με 6 ώρες διάρκεια δράσης) και το Buzz AwayTM (με αιθέριο έλαιο citronella). (22)

Τα βασικά μειονεκτήματα των ελαίων είναι ο γρήγορος ρυθμός εξάτμισής τους - γεγονός που μειώνει αισθητά τη διάρκεια δράσης τους-, η έντονη και χαρακτηριστική

οσμή τους καθώς και η έντονη λιπαρή φύση τους. Η μειωμένη διάρκεια δράσης του αλλά και η δυσάρεστη λιπαρή αίσθηση στο δέρμα, αντιμετωπίζονται μέσω της φαρμακευτικής νανοτεχνολογίας. Τα σημαντικότερα συστήματα, είναι (Εικόνα 6):

- ♦ Πολυμερής μικροκάψουλες (συνθετικά ή φυσικά μικρά πολυμερή και λιπίδια, ο πυρήνας μπορεί να είναι υγρό υλικό τυλιγμένο με πολυμερές τοίχωμα)
- ♦ Μίκρο- και Νάνο- σωματίδια στερεών λιπιδίων (μονή λιπιδική στιβάδα)
- ♦ Μίκρο- και Νάνο- γαλακτώματα (πυρήνας υγρού λιπιδικού υλικού που περιβάλλεται με επιφανειοδραστική μονοστιβάδα).
- ♦ Λιποσώματα (υδατικό πυρήνας που περιβάλλεται από μια διπλοστοιβάδα φωσφολιπιδίων).
- ♦ Νανοδομημένες υδρογέλες (μικκύλια που σχηματίζονται από επιφανειοδραστικά πολυμερή).
- ♦ Κυκλοδεξτρίνες (κυκλικοί ολιγοσακχαρίτες β-D-γλυκοπυρανόζης που αποτελούνται από μία υδρόφιλη επιφάνεια και μία υδρόφοβη κοιλότητα) όπου χρησιμοποιούνται ευρέως στα σκευάσματα «νέας γενιάς». (22)



Εικόνα 6 Συστήματα ενθυλάκωσης εντομοαπωθητικών φυτικής προέλευσης (50)

Υπάρχουν πολλά σκευάσματα που βασίζονται σε μικρο- και νανοκάψουλες που περιέχουν DEET και αιθέρια έλαια για την αύξηση της διάρκειας της απωθητικής δράσης και τη μείωση της διείσδυσης και κατά συνέπεια της συστημικής τοξικότητας. Επιπλέον, επιτυγχάνεται αποτελεσματικότερη επικάλυψη του δέρματος, αυξάνοντας το βαθμό προστασίας. (22) Χαρακτηριστικό παράδειγμα, αποτελεί το έλαιο κιτρονέλας το οποίο έχει ενθυλακωθεί σε διάφορα συστήματα ελεγχόμενης απελευθέρωσης (controlled release systems, CRS). (51) (52)

2.1. Φυσικά έλαια και γαλακτώματα

Αρκετά έλαια παρουσιάζουν απωθητικότητα έναντι των κουνουπιών. Οι πιθανοί μηχανισμοί αυξημένης δράσης τους σε σχέση με τις απομονωμένες δραστικές ενώσεις είναι 1) η μείωση της επίδρασης ελκυστικών παραγόντων και οι καϊρομόνες, 2) η μείωση του ρυθμού εξάτμισης των απωθητικών δραστικών ουσιών λόγω της παρουσίας λιπαρών μορίων μακράς αλυσίδας και 3) η παρουσία λιπαρών οξέων σε υψηλές συγκεντρώσεις, τα οποία είναι απωθητικά στα κουνούπια. Για παράδειγμα, το εμπορικό σκεύασμα Bite Blocker™, ένα εμπορικό σκεύασμα που περιέχει γλυκερίνη, λεκιθίνη, βανιλίνη, έλαια καρύδας, γερανιόλη και 2% σογιέλαιο μπορεί να επιτύχει παρόμοια απωθητική δράση με το DEET, παρέχοντας 7,2 ώρες μέσο χρόνο προστασίας από τα κουνούπια. Άλλα φυτικά έλαια που παρουσιάζουν αξιόλογη απωθητική δράση είναι το λάδι καρύδας, τα φοινικέλαια και το έλαιο andiroba. Αν και τα τρία έλαια είναι πολύ λιγότερο αποτελεσματικά από το DEET, είναι χρήσιμα ως φορείς για άλλα δραστικά απωθητικά, καθώς είναι οικονομικά και περιέχουν ακόρεστα λιπαρά οξέα και γαλακτωματοποιητές, βελτιώνοντας την απωθητική κάλυψη και επιβραδύνοντας την εξάτμιση πτητικών απωθητικών μορίων. (49)

2.2. Αιθέρια έλαια

Τα αιθέρια έλαια από φυτά *Lamiaceae* (οικογένεια μέντας που περιλαμβάνει τα περισσότερα μαγειρικά βότανα), *Poaceae* (αρωματικά χόρτα) και *Pinaceae* (οικογένεια πεύκου και κέδρου) αποτελούν δημοφιλή εντομοαπωθητικά σε παγκόσμια κλίμακα. Σχεδόν όλα τα φυτά που χρησιμοποιούνται ως απωθητικά χρησιμοποιούνται επίσης στη βιομηχανία τροφίμων και αρωμάτων, γεγονός που μπορεί να ερμηνεύσει την επιλογή τους ως ασφαλέστερες φυσικές εναλλακτικές του DEET, παρά τη δερματίτιδα που προκαλεί η απευθείας εφαρμογή τους στο δέρμα. Πολλά απωθητικά του εμπορίου περιέχουν πολλά φυτικά αιθέρια έλαια είτε για άρωμα είτε ως απωθητικά, συμπεριλαμβανομένης της μέντας, του λεμονόχορτου, της γερανιόλης, του πεύκου, της πενυρόγιας, του κέδρου, του θυμαριού και του πατσουλί (Πίνακας 3). Τα πιο αποτελεσματικά από αυτά περιλαμβάνουν έλαιο θυμαριού, γερανιόλη, έλαιο μέντας, έλαιο κέδρου, πατσουλί και γαρύφαλλο, τα οποία έχει αποδειχθεί ότι απωθούν τα κουνούπια για διάστημα από 1 έως 3 ώρες. Τα περισσότερα από αυτά τα αιθέρια έλαια είναι εξαιρετικά πτητικά, γεγονός που συμβάλλει στη μειωμένη διάρκεια δράσης τους ως απωθητικά κουνουπιών. Αν και τα αιθέρια έλαια εξαιρούνται από την καταχώριση μέσω του EPA (Environmental Protection Agency, Οργανισμός Προστασίας Περιβάλλοντος), μπορεί να προκαλέσουν ερεθισμούς και η δράση τους να μεταβάλλεται, ανάλογα με τη σύνθεση και τη συγκέντρωση των σκευασμάτων. (49)

2.2.1. Αιθέριο έλαιο λεμονιού ευκαλύπτου (*Corymbia citriodora*)

Κατά τη δεκαετία του 1960 ήρθαν στο προσκήνιο τα έλαια που χρησιμοποιούνται στην παραδοσιακή κινέζικη ιατρική. Ως επακόλουθο, το έλαιο λεμονιού ευκαλύπτου άρχισε να χρησιμοποιείται ευρέως ως εντομοαπωθητικό. Τη δεκαετία του 1990, η επιστημονική κοινότητα των ΗΠΑ, προσδιόρισε ως κύριο δραστικό συστατικό του ελαίου το PMD, ενώ το 2000 η EPA χαρακτήρισε το PMD ως εντομοαπωθητικό. (45) Αποτελεί ίσως το πιο διαδεδομένο αιθέριο έλαιο με εντομοαπωθητική δράση. Το βασικό συστατικό του ακατέργαστου ελαίου είναι η κιτρονελλάλη, η οποία παρουσιάζει μειωμένη χρονική διάρκεια δράσης λόγω της ταχείας πτητικότητας του. Το PMD (P-Mentano 3.8-diol) περιέχεται, επίσης, στο συγκεκριμένο έλαιο σε μεγάλη συγκέντρωση (Πίνακας 3). Παράλληλα, η κιτριδιάλη - το εμπλουτισμένο έλαιο- περιέχει 70-80% PMD. Συστατικό με ισχυρή απωθητική

ικανότητας και μεγαλύτερη διάρκεια δράσης από την κιτρονελλάλη λόγω του μειωμένου ρυθμού εξάτμισής του. (22) Οι εντομοαπωθητικές ικανότητες του ελαίου είναι εξαιρετικές και συγκρίσιμες με τις αντίστοιχες του DEET σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Στο εμπόριο διατίθενται σκευάσματα που περιέχουν PMD σε συγκεντρώσεις 10-40%. (45)

2.2.2. Αιθέριο έλαιο κιτρονέλλας (*Cymbopogon nardus*)

Το έλαιο της κιτρονέλλας εξάγεται από το *Cymbopogon nardus*, ένα είδος χόρτου, και αρχικά χρησιμοποιήθηκε για αρωματοποιία στη Γαλλία γύρω στο 1858. Το έλαιο αποτελεί ένα μείγμα συστατικών, συμπεριλαμβανομένης της κιτρονελλάλης, κιτρονελόλης, γερανιόλης, citral, α-πινένιου και λιμονένιου, ενώσεις με εντομοαπωθητική δράση (Πίνακας 3). (22) Οι εντομοαπωθητικές ιδιότητες του ελαίου ανακαλύφθηκαν το 1901, ενώ καταχωρήθηκε ως εγκεκριμένη ουσία στις Η.Π.Α. το 1948. Σκευάσματα ελαίου κιτρονέλλας μπορούν να βρεθούν σε λάδια μπάνιου, κεριά και λοσιόν (σε συγκεντρώσεις 0,5-20%). Η EPA έχει καταχωρίσει 3 προϊόντα που περιέχουν στο έλαιο κιτρονέλλας.

Το βασικό μειονέκτημα του ελαίου είναι η μειωμένη σταθερότητα του παρουσία αέρα και σε υψηλή θερμοκρασία, περιορίζοντας τις πρακτικές εφαρμογές του ελαίου. Επιπλέον, το έλαιο citronella έχει μικρή διάρκεια δράσης, έως 2 ώρες λόγω ταχείας εξάτμισης. Τέλος, η εφαρμογή του στο δέρμα προκαλεί ερεθισμό και αλλεργική δερματίτιδα. (45)

2.2.3. Αιθέριο έλαιο Neem (*Azadirachta indica*)

Το Neem είναι ένα ινδικό φυτό, το έλαιο του οποίου χρησιμοποιείται στη Βραζιλία ως εναλλακτική επιλογή αντί του DEET. Το εκχύλισμα Neem δεν μπορεί να εφαρμοστεί απευθείας στο δέρμα λόγω των ενοχλήσεων και του ερεθισμού που προκαλεί. Προϊόντα που περιέχουν Neem παρουσιάζουν μειωμένες απωθητικές ικανότητες καθώς και μικρό χρόνο διάρκειας σε σύγκριση με τις συνθετικές ουσίες. (22)

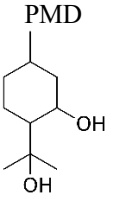
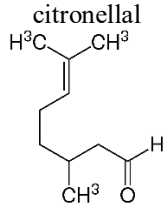
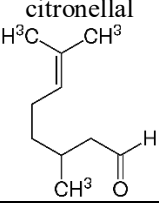
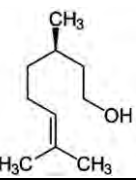
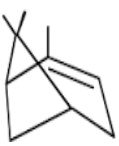
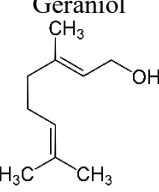
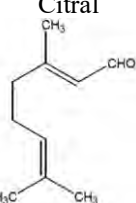
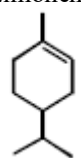
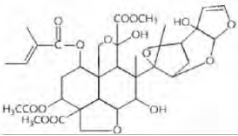
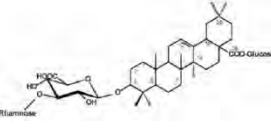
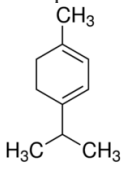
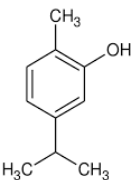
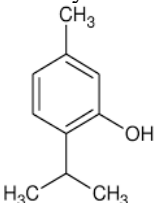
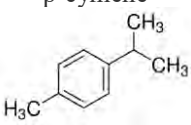
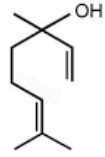
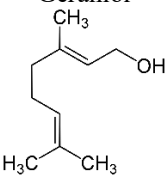
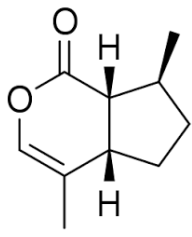
2.2.4. Αιθέριο έλαιο θυμαριού (*Thymus vulgaris*)

Τα χημικά συστατικά του ελαίου, στα οποία οφείλεται η εντομοαπωθητική του δράση, είναι η καρβακρόλη, το π-κυμένιο, η λιναλοόλη, το α-τερπενένιο και η θυμόλη (Πίνακας 3). Εφαρμογή καθαρού ελαίου σε ρούχα επιτυγχάνει απόθεση κουνουπιών για τουλάχιστον 30 λεπτά. (22)

2.2.5. Αιθέριο έλαιο γληχώματος /γαλεόφιλον (*Catnip oil*)

Το γαλεόφιλον (κοινώς «λάδι της γάτας») εξάγεται από το *Nepeta cataria* (κοινώς catnip), που προέρχεται από εύκρατες και τροπικές ζώνες στην Ασία και την Ευρώπη. Το έλαιο είναι ένα μείγμα συστατικών, με τη νεπεταλακτόνη να είναι το κύριο εντομοαπωθητικό συστατικό (Πίνακας 3). Επιπλέον, παρουσιάζει ένα πιο ασφαλές προφίλ σε σύγκριση με το DEET. Το «λάδι της γάτας» καταχωρήθηκε από την EPA το 2008. Αυτή τη στιγμή υπάρχουν 4 προϊόντα που έχουν καταχωρηθεί από την EPA στις ΗΠΑ και έχουν σχεδιαστεί για να στοχεύουν κουνούπια και μαύρες μύγες. Και τα 4 προϊόντα δηλώνουν ότι έχουν 7 ώρες προστασίας από τα κουνούπια. Επί του παρόντος, δεν υπάρχουν ικανοποιητικές ερευνητικές μελέτες που έχουν γίνει για το έλαιο της γάτας και τη νεπαταλακτόνη. Τα σκευάσματα του ελαίου διατίθενται σε σπρέι και λοσιόν με συγκεντρώσεις που κυμαίνονται μεταξύ 7 και 15%. (45)

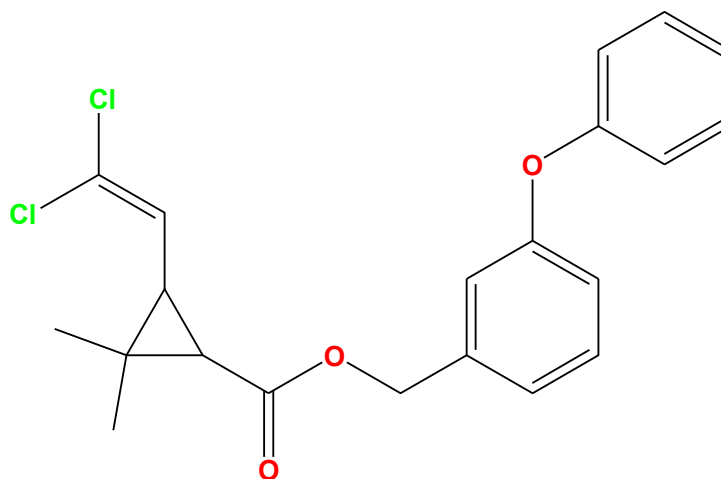
Πίνακας 3 Τα πιο διαδεδομένα αιθέρια έλαια, το φυτό προέλευσής τους και τα δραστικά συστατικά τους.

Αιθέριο Έλαιο	Φυτό προέλευσης	Δραστικές Ουσίες		
Έλαιο λεμονώδους ευκαλύπτου	<i>Corymbia citriodora</i> 	PMD 	citronellal 	
Έλαιο κιτρονέλας	<i>Cymbopogon nardus</i> 	citronellal 	Citronellol 	a-pinene 
		Geraniol 	Citral 	Limonene 
Έλαιο Neem	<i>Azadirachta indica</i> 	Azadirachtin 		Saponins 
Έλαιο θυμαριού	<i>Thymus vulgaris</i> 	α-terpinene 	Carvacrol 	Thymol 
		p-cymene 	Linalool 	Geraniol 
Έλαιο γληχώματος /γαλεόφιλον (Catnip oil)	<i>Nepeta cataria</i> 	Nepelactone 		

♦ Περμεθρίνη

Μια ιδιαίτερη περίπτωση αποτελεί η περμεθρίνη, ένα φυτικό εκχύλισμα το οποίο δεν εφαρμόζεται στο δέρμα, αλλά σε ρούχα ή εξοπλισμό εξωτερικών χώρων. Η περμεθρίνη είναι ένα ιξώδες πυρεθροειδές τύπου 1, εργαστηριακά παραγόμενο εντομοαπωθητικό, που προέρχεται από τα θρυμματισμένα αποξηραμένα άνθη του φυτού *Chrysanthemum cinerarifolium*. Εφαρμόζεται για την προστασία έναντι των κουνουπιών τόσο στον άνθρωπο όσο και στα κατοικίδια ζώα. Χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1970, από ένοπλες δυνάμεις που εμβάπτιζαν τη στρατιωτική στολή σε υδατικό διάλυμα 0,6% περμεθρίνης. Σκευάσματα με τη συγκεκριμένη δραστική μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε τρόφιμα και ζωοτροφές κατοικίδιων ζώων, σε ανοιχτούς χώρους, σε κτίρια, εστιατόρια και σε ρούχα. (21) (53)

Τα πυρεθροειδή απορροφούνται ταχύτατα μέσω της εισπνοής αλλά και από τους πόρους του δέρματος, δια μέσω των οποίων διαπερνούν σταδιακά στη συστηματική κυκλοφορία. Η κατανάλωση φρούτων και λαχανικών αποτελεί τον κύριο τρόπο έκθεσης στα πυρεθροειδή και τις πυρεθρινες εφόσον αυτά χρησιμοποιούνται ως εντομοκτόνα. Λόγω της τυχαίας έκθεσης σε περμεθρίνη μέσω του στόματος, της αναπνευστικής οδού ή του δέρματος, ελλοχεύει ο κίνδυνος τοξικών επιπλοκών, καθώς ο οργανισμός εκτίθεται σε υπερβολική δόση της ουσίας (άνω του 2% που αποτελεί το επιτρεπόμενο όριο). Η περμεθρίνη φέρεται να είναι υπεύθυνη για το «σύνδρομο του Κόλπου» σε στρατιώτες, λόγω της τοξικότητας που προκαλεί. Όσον αφορά τις επιπτώσεις της στο περιβάλλον, λόγω της εκτεταμένης εφαρμογής της παρατηρείται επιμόλυνση σε υπόγεια ύδατα καθώς και συσσώρευση στα φυτά και τα ζώα προκαλώντας περιβαλλοντικά προβλήματα. (22)



Εικόνα 7. Ο χημικός τύπος της περμεθρίνης (48)

Κεφάλαιο 2^ο: Κουνούπια, φορείς ασθενειών

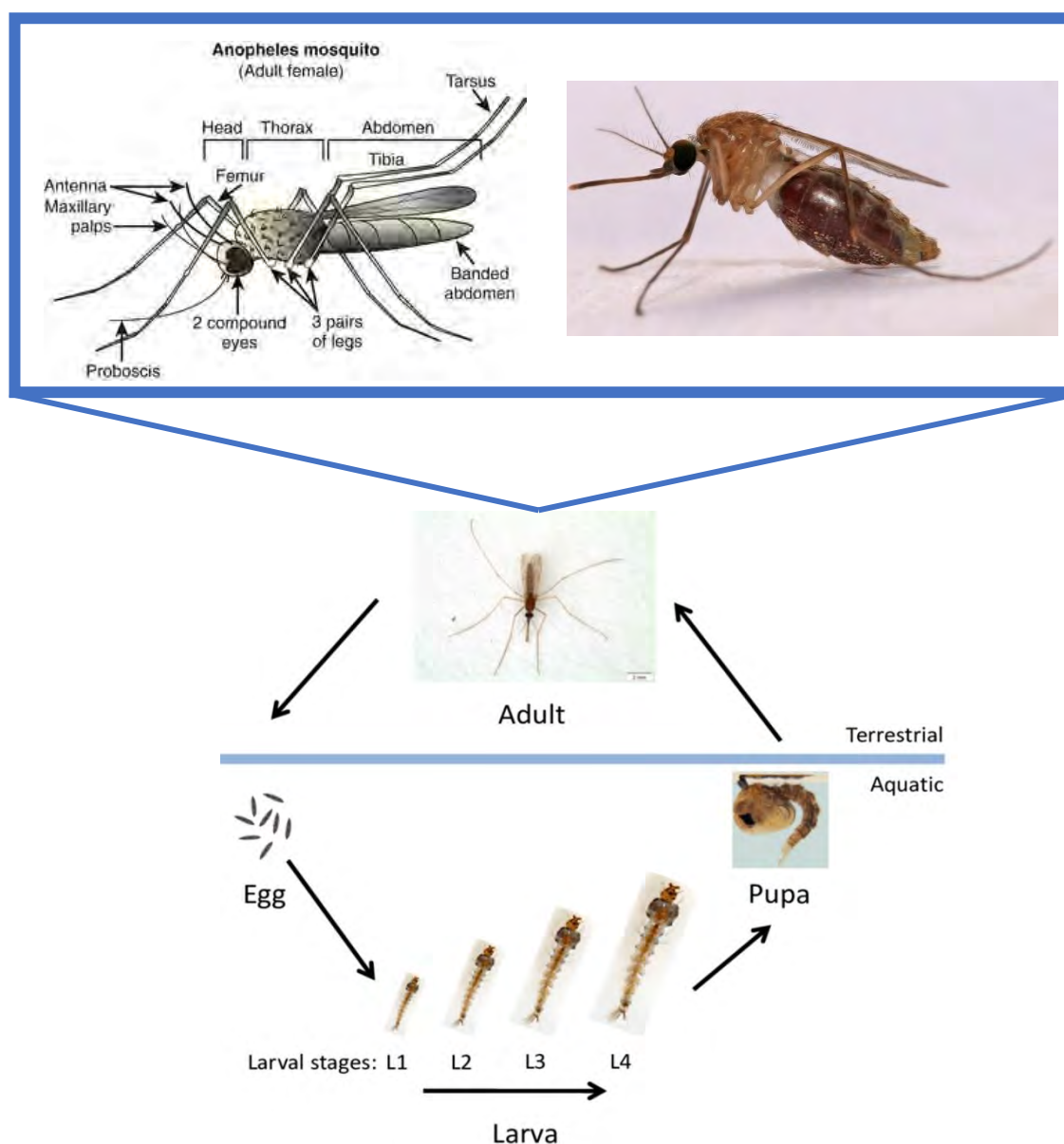
2.1 *Anopheles gambiae*, ο φορέας της ελονοσίας

Το *Anopheles* εισήχθη ως γένος κουνουπιών το 1818 από τον Johann Wilhelm Meigen, έναν Γερμανό εντομολόγο διάσημο για τις επαναστατικές του μελέτες για τα Δίπτερα. Κατά τις δύο τελευταίες δεκαετίες του 19ου αιώνα, όταν διαπιστώθηκε ότι τα κουνούπια μεταδίδουν μικροφιλάρια και πρωτόζωα ελονοσίας, πραγματοποιήθηκε μια προσπάθεια συλλογής, ονομασίας και ταξινόμησης αυτών των εντόμων. (54) Στο γένος *Anopheles* εντάσσονται 450 είδη κουνουπιών, εκ των οποίων το *Anopheles gambiae* αποτελεί τον πιο γνωστό, τον πιο αποτελεσματικό και πλέον μελετημένο φορέα ανθρώπινης ελονοσίας. Πρόκειται για ένα σχετικά μακρόβιο είδος, με σύντομο στάδιο ανάπτυξης προνυμφών, το οποίο προσαρμόζεται εύκολα σε ανθρωπογενές περιβάλλον. (55)

Το *An. gambiae* αποτελεί τον πιο αποτελεσματικό αλλά όχι το μοναδικό φορέα ελονοσίας. Περίπου 40 είδη του γένους *Anopheles* μεταδίδουν το παράσιτο της ελονοσίας, καθώς κατά τη συνέυρεση, τα αρσενικά κουνούπια μεταφέρουν στα θηλυκά μεγάλη ποσότητα της στεροειδούς ορμόνης 20-υδροξυεκδυσόνης, καθιστώντας ευνοϊκές τις συνθήκες για την ανάπτυξη του πρωτόζωου *Plasmodium falciparum*. Τα είδη του συγκεκριμένου γένους εντοπίζονται σε όλη την έκταση του πλανήτη, καθιστώντας την αντιμετώπισή τους παγκόσμιο πρόβλημα. Το πρώτο Παγκόσμιο Πρόγραμμα Εξάλειψης της Ελονοσίας του ΠΟΥ (1955–1972) περιλάμβανε, εκτός από θεραπείες με βάση τη χλωροκίνη, εκστρατείες εντομοκτονίας μεγάλης κλίμακας με χρήση διχλωροδιφαινυλοτριχλωροαιθανίου (DDT) που είχαν στόχο τον περιορισμό των φορέων. Η συγκεκριμένη στρατηγική αποδείχτηκε αρκετά αποτελεσματική έναντι της διάδοσης του *P. falciparum*. αν και τα κουνούπια σταδιακά επανήλθαν, καθώς ανέπτυξαν ανοχή στο συγκεκριμένο εντομοκτόνο. (56)

Ο κύκλος ζωής του *An. gambiae* -όπως και όλων των κουνουπιών- αποτελείται από τέσσερα στάδια: αυγό, προνύμφη, νύμφη και ενήλικα. Τα ενήλικα κουνούπια τρέφονται με νέκταρ φυτών, ενώ τα θηλυκά χρειάζονται γεύμα αίματος σπονδυλωτών, για να προμηθευτούν απαραίτητα θρεπτικά συστατικά για την ωοτοκία. Το συγκεκριμένο είδος δραστηριοποιείται κυρίως τις νυχτερινές ώρες -ιδιαίτερα κατά τα μεσάνυκτα και έως τις 4:00 πμ. Η προτίμησή τους στο ανθρώπινο αίμα έναντι στο αίμα άλλων ζώων, τα καθιστά ως έναν σημαντικό φορέα της ανθρώπινης ελονοσίας. (57)

Τα ενήλικα θηλυκά εναποθέτουν τα αυγά τους στην επιφάνεια στάσιμων νερών, εντός των οποίων εκκολάπτονται και αναπτύσσονται οι προνύμφες. Μόλις ολοκληρωθεί το τέταρτο στάδιο ανάπτυξης και με τη λήψη της απαιτούμενης ποσότητας τροφής, οι προνύμφες μεταπηδούν στη μορφή της νύμφης, ένα μη διατροφικό, κινητό στάδιο, κατά το οποίο σχηματίζεται το ενήλικο σώμα του κουνουπιού (Εικόνα 8). Το *An. gambiae* μπορεί να αναπτυχθεί από αυγό σε ενήλικα σε διάστημα 10-11 ημερών υπό βέλτιστες συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας. (57)



Εικόνα 8. Ο κύκλος ζωής του *Anopheles gambiae*.

2.1.1 Ελονοσία

Η ελονοσία εξακολουθεί να αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα για τους κατοίκους των περιοχών με περιορισμένους πόρους στην Αφρική, την Ασία, την Κεντρική και Νότια Αμερική. Το 2015 σημειώθηκαν 214 εκατομμύρια κρούσματα ελονοσίας, με την Αφρική να παρουσιάζει το 88% των κρουσμάτων, ακολουθούμενη από τη Νοτιοανατολική Ασία (10%), την περιοχή της Ανατολικής Μεσογείου (2%) και την Κεντρική και Νότια Αμερική (1%). Ο αριθμός των θυμάτων της ελονοσίας είναι τρεις φορές μεγαλύτερος από αυτών των ένοπλων συγκρούσεων. Παράλληλα, σε περιοχές συνεχούς μετάδοσης της ελονοσίας, τα παιδιά ηλικίας κάτω των 5 ετών, καθώς και τα έμβρυα των μολυσμένων εγκύων παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη νοσηρότητα και θνησιμότητα από τη νόσο. Στην πραγματικότητα, ενήλικες και παιδιά των συγκεκριμένων περιοχών, αναπτύσσουν μερική προστατευτική ανοσία λόγω της επανειλημμένης έκθεσης στο παράσιτο. (56)

Από το 2000 έως το 2015, η εξάπλωση της ελονοσίας μειώθηκε κατά 37% με παράλληλη μείωση θνησιμότητας κατά 60% παγκοσμίως. Σύμφωνα με τον ΠΟΥ, η επιτυχία οφείλεται στη χρήση κλινοσκεπασμάτων εμποτισμένων με εντομοκτόνα (69% της μείωσης), στις συνδυαστικές θεραπείες με βάση την αρτεμισινίνη (ACTs, 21%) και τέλος στην άμεση εφαρμογή εντομοκτόνων (10%). Η χορήγηση ACT επέφερε θεαματικά αποτελέσματα και βοήθησε στην αντιμετώπιση του τέλματος που είχε επέλθει, λόγω της ανοχής των στελεχών *P. falciparum* στη χλωροκίνη και στη σουλφαδοξίνη- πυριμεθαμίνη. Πλέον, αποτελεί το επιλεγμένο φάρμακο έναντι της ελονοσίας, καθώς επιφέρει ταχεία κάθαρση των παρασίτων, αυξημένη αποτελεσματικότητα (σε σύγκριση με άλλα κλινικά εγκεκριμένα φάρμακα) και εξαιρετικά υψηλά ποσοστά ίασης (>98%). (56)

Στην Ελλάδα η ελονοσία εξαλείφθηκε το 1974, μέσω ενός συστηματικού προγράμματος καταπολέμησης (1946-1960). Έως και σήμερα, τα κρούσματα ελονοσίας στον ελλαδικό χώρο παραμένουν ελεγχόμενα και είναι κυρίως εισαγόμενα, καθώς πρόκειται για περιπτώσεις ταξιδιωτών ή μεταναστών που προσβλήθηκαν σε χώρα του εξωτερικού. Καθώς αυξάνεται το πλήθος των ταξιδιών αλλά και η μετακίνηση των πληθυσμών παγκοσμίως, ο αριθμός κρουσμάτων στην Ευρώπη αυξάνεται. Στην Ελλάδα, όμως, δεν παρατηρείται κάτι αντίστοιχο. Κατά το έτος 2021 σύμφωνα με τον Ε.Ο.Δ.Υ επιβεβαιώθηκαν μόλις 32 κρούσματα ελονοσίας, εκ των

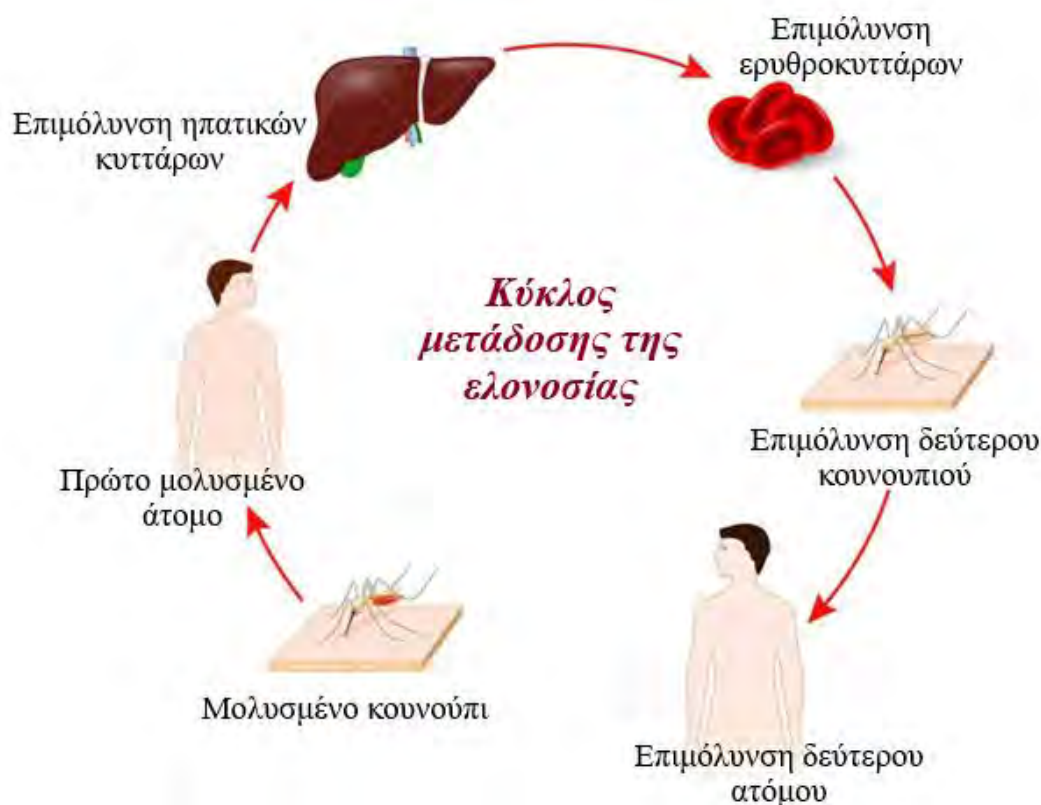
οποίων τα 28 ήταν εισαγόμενα (18 περιπτώσεις μεταναστών/προσφύγων και 10 περιπτώσεις ταξιδιωτών). (58)

Το πιο θανατηφόρο παράσιτο της ελονοσίας -το *P. falciparum*- εντοπίζεται μόνο σε τροπικές περιοχές, καθώς τα γαμετοκύτταρά του χρειάζονται επώαση σε θερμοκρασία άνω των 21°C για 10–18 ημέρες, για να επιτευχθεί η σύζευξη και η μετάβαση σε μολυσματικά σποροζωΐδια.. Το συγκεκριμένο πρόγραμμα ανάπτυξης επιτυγχάνεται μόνο σε ζεστές, τροπικές συνθήκες, όπου η θερμοκρασία περιβάλλοντος είναι κατάλληλη για περαιτέρω πολλαπλασιασμό των κουνουπιών. Σε περιοχές με χαμηλή θερμοκρασία, η ωρίμανση των σποροζωϊτών επιβραδύνεται με αποτέλεσμα ο κύκλος ζωής του παρασίτου να ολοκληρώνεται με τον θάνατο των κουνουπιών. Καθώς το *P. falciparum* ευδοκimeί σε υψηλές θερμοκρασίες, μια προβλεπόμενη παγκόσμια άνοδος της θερμοκρασίας κατά 2–3 °C αναμένεται να επιφέρει αύξηση των κρουσμάτων ελονοσίας. (56)

Η ελονοσία μεταδίδεται μέσω του νύγματος θηλυκών κουνουπιών, τα οποία έχουν προσβληθεί με παθογόνα του γένους *Plasmodium*. Κατά τη διάρκεια ενός γεύματος αίματος, τα μολυσμένα κουνούπια εγχέουν - μαζί με το αντιπηκτικό σάλιο τους - σποροζωΐτια, τα οποία αποτελούν το μολυσματικό, κινητικό στάδιο του *Plasmodium*. Σε διάστημα 30–60 λεπτών, τα σποροζωΐδια εισβάλλουν στα ηπατικά κύτταρα, όπου αναπαράγονται και διαιρούνται ως μεροζωΐτες. Το μολυσμένο ηπατικό κύτταρο διαρρηγνύεται, απελευθερώνοντας τους μεροζωΐτες στην κυκλοφορία του αίματος, οι οποίοι εισβάλλουν στα ερυθρά αιμοσφαίρια, σηματοδοτώντας την έναρξη του ασεξουαλικού αναπαραγωγικού σταδίου, το οποίο αποτελεί το συμπτωματικό στάδιο της νόσου (Εικόνα 9). Τα συμπτώματα αναπτύσσονται σε διάστημα 4-8 ημερών μετά την αρχική εισβολή ερυθρών αιμοσφαιρίων. Ο κύκλος αντιγραφής των μεροζωϊτών εντός των ερυθρών αιμοσφαιρίων διαρκεί 36-72 ώρες (από την εισβολή των ερυθρών αιμοσφαιρίων έως την αιμόλυση).

Η βαρύτητα των συμπτωμάτων της μόλυνσης ποικίλλει ανάλογα με το είδος και το ιστορικό -σε προηγούμενη έκθεση- του ξενιστή. Η ελονοσία ταξινομείται σε ασυμπτωματική, μη επιπλεγμένη ή σοβαρή. Εκδηλώνεται με αρχικά συμπτώματα χαμηλό πυρετό, ρίγη, μυϊκούς πόνους και -σε περιστατικά παιδιών- πεπτικά συμπτώματα. Η εκδήλωση των συμπτωμάτων (εφίδρωση, υψηλός πυρετός και εξάντληση) είναι αιφνίδια (παροξυσμός) και στη συνέχεια εξελίσσονται σε διαρκή, λόγω της αιμόλυσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Η σοβαρή ελονοσία είναι συχνά θανατηφόρα και εκδηλώνεται με σοβαρή αναιμία και πολλαπλές πολυοργανικές

βλάβες. Οι σοβαρές επιπλοκές της ελονοσίας οφείλονται σε μικροαγγειακή απόφραξη που προκαλείται από την παρουσία παρασίτων στο στάδιο των ερυθρών αιμοσφαιρίων στα τριχοειδή αγγεία.



Εικόνα 9. Σχηματική αναπαράσταση μετάδοσης ελονοσίας μέσω των κουνουπιών. Εικόνα προσαρμοσμένη (59)

2.1.2 Αρβοϊοί

Τα κουνούπια του γένους *Anopheles* αποτελούν φορείς διάφορων ιών. Καθώς η μελέτη του *An. gambiae* εστιάζεται στη συσχέτισή του με την ασθένεια της ελονοσίας, οι πληροφορίες για τους ιούς που μεταδίδει το συγκεκριμένο είδος είναι περιορισμένες. Οι ιοί που έχουν συσχετιστεί με το γένος *Anopheles* είναι ο αρβοϊός ο'nyong -nyong (ONNV, γένος *Alphavirus*, οικογένεια *Togaviridae*), ο οποίος σχετίζεται στενά με τον CHIKV, καθώς και διάφοροι RNA ιοί (π.χ. *Flaviviridae*, *Togaviridae*, *Peribunyaviridae*, *Rhabdoviridae*, *Mesoniviridae*, *Reoviridae* και *Dicistroviridae*). Παρόλο που αρκετοί ιοί έχουν ανιχνευθεί τόσο σε θηλυκά όσο και σε αρσενικά κουνούπια *Anopheles*, υπάρχουν σαφείς ενδείξεις μόνο για την μετάδοση του

ιού ONNV. Ωστόσο, οι ανθρωπόφιλοι φορείς της ελονοσίας *Anopheles* εκτίθενται συνεχώς σε αρβοϊούς, μέσω μολυσμένων γευμάτων αίματος. Είναι πιθανό στις ενδημικές ζώνες της ελονοσίας, τα εμπύρετα συμπτώματα να συγκαλύπτουν συμπτώματα λοίμωξης από αρβοϊό και να προκαλούν λανθασμένη διάγνωση. (60)

2.2 *Aedes albopictus*, ο φορέας του ιού Ζίκα και του ιού του Δυτικού Νείλου

Τα κουνούπια του γένους *Aedes* ανήκουν στην υποοικογένεια *Culicinae* και αποτελούν σημαντικούς φορείς παθογόνων ιών (του δάγκειου πυρετού, chikungunya, κίτρινου πυρετού και του ιού Ζίκα). Οι πιο διαδεδομένοι εκπρόσωποι του γένους είναι το είδος *Aedes aegypti* (το κουνούπι του κίτρινου πυρετού) και το *Aedes albopictus* (το ασιατικό κουνούπι τίγρης). Αυτά παρουσιάζουν μια ιδιαίτερη μορφή, καθώς διακρίνονται από χαρακτηριστικές λευκές ρίγες στο σκούρο καφέ ή μαύρο κεντρικό κορμό. (3)

Το *Ae. albopictus* χαρακτηρίζεται από εξαιρετική προσαρμοστικότητα στο περιβάλλον του και εντοπίζεται τόσο σε αγροτικές όσο και σε αστικές περιοχές. Παρουσιάζουν δραστηριότητα σε όλη τη διάρκεια της ημέρας, με ώρες αιχμής νωρίς το πρωί αλλά και αργά το απόγευμα. Τα κουνούπια του συγκεκριμένου είδους είναι ανθεκτικά σε ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών από 10° C μέχρι 32° C, με βέλτιστη θερμοκρασία τους 21° C, γεγονός που ευνοεί την εγκαθίδρυσή τους σε πολλές χώρες παγκοσμίως. (61)

Το *Aedes albopictus* προέρχεται από τα τροπικά δάση της Νοτιοανατολικής Ασίας και κατατάσσεται μεταξύ των 100 κορυφαίων χωροκατακτητικών ειδών παγκοσμίως. Η ανθεκτικότητα των αυγών του στην ξηρασία, ο μεγάλος αριθμός γενεών ανά έτος (5-17) αλλά και η ανθεκτικότητά του σε ποικίλες θερμοκρασίες, αποτελούν βασικά χαρακτηριστικά τα οποία ευνοούν την παγκόσμια εξάπλωσή τους αλλά και την εύκολη προσαρμογή τους σε νέα περιβάλλοντα. Η άνθηση του εμπορίου, η παγκοσμιοποίηση των ταξιδιών και η κλιματική αλλαγή, συνέβαλαν στην εξάπλωση του είδους σε παγκόσμια κλίμακα, ενώ η αντίστασή του σε ευρέως χρησιμοποιούμενα προνυμφοκτόνα και εντομοκτόνα διευκόλυνε στην εγκαθίδρυσή του στις νέες χώρες. (62)

2.2.1 Ιός Ζίκα

Ο ιός Ζίκα ανήκει στην οικογένεια φλαβοϊών και χαρακτηρίζεται ως ο «πέμπτος ορότυπος του δάγκειου πυρετού», λόγω της έντονης ομοιότητας μεταξύ των δυο ιών. Μεταδίδεται κυρίως μέσω των κουνουπιών *Aedes*, και ιδίως μέσω του *Ae. Aegypti* και του *Ae. Albopictus*, καθώς και με κάθετη μετάδοση από τη μητέρα στο έμβρυο αλλά και κατά τη σεξουαλική επαφή. Τα τελευταία χρόνια έχει εκδηλωθεί μεγάλο ενδιαφέρον για το συγκεκριμένο ιό, καθώς συσχετίζεται με μικροκεφαλία και μεταλλάξεις σε έμβρυα που γεννήθηκαν από νοσούσες μητέρες. Η ασθένεια εκδηλώνεται με πυρετό, εξάνθημα, πόνο στους μύες και τις αρθρώσεις, συμφόρηση και άλλα συμπτώματα κοινά με γρίπη. (61)

Ο Ζίκα εμφανίστηκε για πρώτη φορά σε ανθρώπους στην Ουγκάντα το 1952 και, μέχρι το 2007, ήταν κυρίως ενδημικός σε χώρες της Αφρικής και της Ασίας. Η πρώτη περίπτωση εκτός των ενδημικών περιοχών εμφανίστηκε στο νησί Υαρ, στην Ιαπωνία ενώ στη συνέχεια εξαπλώθηκε στη Γαλλική Πολυνησία, προκαλώντας μια μεγάλη κρίση το 2013 και εγκαθιδρύθηκε στη Βραζιλία το 2015. Κατά το πρώτο διάστημα εξάπλωσης του Ζίκα στη Βραζιλία, παρατηρήθηκαν υψηλά ποσοστά μικροκεφαλίας στα νεογνήνητα και του συνδρόμου Guillain-Barré στους ενήλικες, τα οποία συνδέθηκαν άμεσα με τον Ζίκα. Έκτοτε έχει εξαπλωθεί σε όλη τη Νότια Αμερική και έχουν αναφερθεί περιπτώσεις σε 80 χώρες παγκοσμίως. Δυστυχώς, οι γνώσεις για τον τρόπο εξάπλωσής του είναι περιορισμένες, ενώ έως σήμερα δεν έχει ανακαλυφθεί θεραπευτική αγωγή ή εμβόλιο για την αντιμετώπισή του, γεγονός που υποδεικνύει την άμεση ανάγκη για έλεγχο και περιορισμό του φορέα. (61)

2.2.2 Ιός του Δυτικού Νείλου

Ο ιός του Δυτικού Νείλου αποτελεί ένα ακόμα μέλος της οικογένειας των φλαβοϊών, που σχετίζεται πιο στενά με την ιαπωνική εγκεφαλίτιδα και την εγκεφαλίτιδα του Σεντ Λούις. Παρότι είναι ιδιαίτερα σοβαρός μέχρι και θανατηφόρος, μόνο το 20% περίπου των μολυσμένων ατόμων εκδηλώνουν συμπτώματα, όπως πυρετό, ναυτία, εμετό, πόνους στο σώμα και πονοκεφάλους. Η σοβαρή νόσος του Δυτικού Νείλου εμφανίζεται σε ποσοστό 0,67% των μολυσμένων και περιλαμβάνει τα κλασσικά συμπτώματα με πρόσθετες νευρολογικές επιπλοκές, οι οποίες καταλήγουν σε κώμα και θάνατο. Προσβάλλει κυρίως ανθρώπους και άλογα, με τα πουλιά και άλλα

μη θηλαστικά, όπως οι αλιγάτορες, να λειτουργούν ως δεξαμενές και ενισχυτές της ασθένειας. (61)

Ο ιός εμφανίστηκε για πρώτη φορά στην Ουγκάντα το 1937 και εντοπίζεται στην Αφρική, τη Μέση Ανατολή, την Ευρώπη και την Αυστραλία μέχρι και σήμερα. Μόλις το 1999 καταγράφηκε το πρώτο κρούσμα στις ΗΠΑ προκαλώντας μεγάλη εστία. Ο ιός του Δυτικού Νείλου μπορεί να μεταδοθεί από ποικίλα γένη κουνουπιών, συμπεριλαμβανομένων του *Culex* (με κύριο φορέα το *Cx. pipiens*), του *Ochlerotatus* και του *Aedes*, με κύριο φορέα το *Ae. Albopictus*. Όπως οι περισσότεροι αρβοϊοί, ο ιός μεταδίδεται ιδιαίτερα κατά τους βροχερούς και ζεστούς μήνες, σε περιόδους δηλαδή που ευδοκیمی ο πολλαπλασιασμός των κουνουπιών. (61)

2.2.3 Ιός Κίτρινου Πυρετού

Ο συγκεκριμένος ιός αποτελεί έναν αρβοϊό της οικογένειας των φλαβοϊών. Στις περισσότερες των περιπτώσεων δεν εκδηλώνονται συμπτώματα. Στα περιστατικά, που προκαλούνται παρενέργειες, αρχικά παρατηρούνται πυρετός, μυϊκός πόνος και εμετός, ενώ στη συνέχεια προκαλείται ίκτερος, νεφρική ανεπάρκεια και αιμορραγία. Η εξέλιξη της νόσου είναι τάχιστη, καθώς είναι πιθανόν να επέλθει θάνατος σε διάστημα μόλις 7 ημερών. Η έλλειψη θεραπευτικής αγωγής καθιστά απαραίτητο τον έλεγχο των φορέων του, παρεμποδίζοντας με το συγκεκριμένο τρόπο την εξάπλωση του ιού. (61)

Ο ιός του κίτρινου πυρετού είναι πλέον ενδημικός σε πολλές χώρες της Αφρικής και της Νότιας Αμερικής, ενώ στα τέλη του 17^{ου} αιώνα προκάλεσε επιδημίες κατά την εγκαθίδρυσή του στην Αμερική και την Ευρώπη. Εντοπίζεται στη φύση σε δύο μορφές: μια επιθετική στους πιθήκους -ζωικές δεξαμενές μόλυνσης (sylvatic)- και μια αστική (Urban) πιο ήπια μορφή στους ανθρώπους. Παρόλο που ο ιός είχε σχεδόν εξαλειφθεί πλήρως στην Αμερική κατά τα μέσα της δεκαετίας του 1920, η ασθένεια επανεμφανίστηκε. Δυστυχώς, η ύπαρξη του ιδιαίτερα αποτελεσματικού εμβολίου έναντι του ιού, δεν οδήγησε στην εξάλειψη της νόσου, καθώς σε περιοχές όπου δεν καθίσταται συστηματικός ο εμβολιασμός -λόγω της ταχείας εξάπλωσής του- σχηματίζονται εύκολα εστίες μόλυνσης. (61)

Κεφάλαιο 3^ο: Οσφρητικό σύστημα κουνουπιών

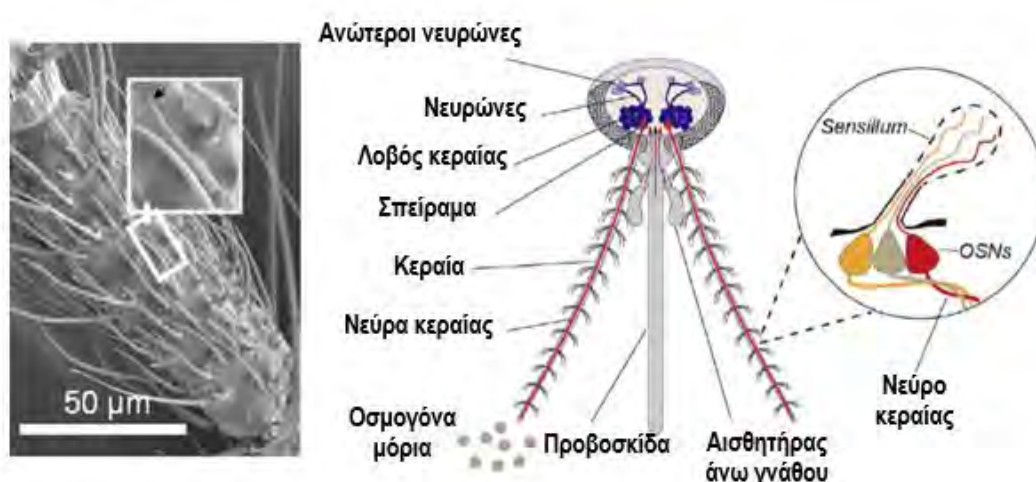
Τα έντομα χρησιμοποιούν το οσφρητικό τους σύστημα σε αρκετές διαδικασίες απαραίτητες για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό τους, όπως η επιλογή συντρόφου και θέσεων ωοτοκίας αλλά και ο εντοπισμός του ξενιστή από τον οποίο τα θηλυκά θα λάβουν γεύμα αίματος. Η μυρωδιά του ανθρώπου αποτελεί ένα σύνθετο μείγμα εκατοντάδων πτητικών οργανικών ενώσεις, οι οποίες αναμειγνύονται μεταξύ τους και προσελκύουν τα κουνούπια, τα οποία ανάλογα με το είδος στο οποίο ανήκουν, αναγνωρίζουν διαφορετικό τύπο οσμογόνων μορίων. Ενδεικτικά, το κουνούπι *Anopheles arabiensis* ανταποκρίνεται πιο έντονα στο διοξείδιο του άνθρακα (CO₂), ενώ το *An. gambiae* βασίζεται σε πιο εξειδικευμένες οσμές. Για την ανίχνευση των συγκεκριμένων μορίων τα κουνούπια χρησιμοποιούν ένα καλά συντονισμένο οσφρητικό σύστημα, το οποίο περιλαμβάνει τρία κύρια αισθητηριακά όργανα: οι κεραίες, οι ψηλαφίες της άνω γνάθου και η προβοσκίδα. Το μεταγωγικό μονοπάτι σηματοδότησης για την αναγνώριση και τον διαχωρισμό των οσμών από τα έντομα έχει μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό, χωρίς όμως να έχει αποσαφηνιστεί πλήρως. (63) (64) (65)

3.1 Ανατομία οσφρητικού συστήματος

Τα οσφρητικά όργανα των εντόμων καλύπτονται από αισθητήρια τριχίδια, τα οποία ονομάζονται αισθητήρια τριχίδια (*sensilla*). Τα *sensilla* ταξινομούνται σε οσφρητικά, γευστικά, μηχανοαισθητικά, και εντοπίζονται σε διάφορα μέρη του σώματος του εντόμου, όπως στις κεραίες, στα γεννητικά όργανα, στα πόδια και στα φτερά. Τα οσφρητικά τριχίδια διαθέτουν πολυάριθμους πόρους στα τοιχώματά τους και στεγάζουν τους οσφρητικούς νευρώνες (OSNs). Οι δενδρίτες των OSNs διαθέτουν υποδοχείς για συγκεκριμένα οσμογόνα μόρια. Ένα οσφρητικό μόριο για να φτάσει στη μεμβράνη του δενδρίτη, πρέπει να διέλθει μέσα από τους πόρους του τοιχώματος του αισθητηριακού τριχιδίου, μέσω ενός συστήματος καναλιών ή σωληνίσκων, και τελικά να διασχίσει την υδατική λέμφο του τριχιδίου που περιβάλλει τους δενδρίτες. Η δέσμευση και η μεταφορά πτητικών μορίων πραγματοποιείται μέσω υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών (OBPs), οι οποίες εντοπίζονται σε πολύ ψηλές συγκεντρώσεις στη λέμφο. (63) (64)

Στις κεραίες των κουνουπιών διακρίνονται πέντε διαφορετικοί είδη *sensilla*, τα οποία χρησιμοποιούνται στην ανίχνευση διαφορετικών οσμών (Εικόνα 10). Οι

συγκεκριμένοι τύποι τριχιδίων παρουσιάζουν ευαισθησία σε αλκοόλες, καρβοξυλικά οξέα, εστέρες αλλά και στο L-γαλακτικό οξύ που απελευθερώνεται από τον άνθρωπο. Αντίθετα, στην άνω γνάθο εντοπίζονται δυο είδη *sensilla* με ευαισθησία στο CO₂. Στην προβοσκίδα περιέχονται τρεις διαφορετικοί τύποι τριχιδίων, οι οποίοι ανταποκρίνονται σε ένα μικρό πλήθος αρωματικών ενώσεων που σχετίζονται με τον άνθρωπο (κετόνες, ισοβαλερικό οξύ, βουτυλαμίνη, οξοκαρβοξυλικά οξέα), γεγονός που υποδηλώνει το διττό ρόλο του οργάνου τόσο στην αίσθηση της γεύσης όσο και στην όσφρηση. (63) (64)



Εικόνα 10. Τα οσφρητικά τριχίδια στην κεραία των εντόμων. Εικόνα προσαρμοσμένη. ⁽¹⁷³⁾

3.2 Χημειοαισθητικοί υποδοχείς αντίχνευσης οσμογόνων μορίων

Τα οσφρητικά συστήματα των εντόμων και των θηλαστικών έχουν παρόμοια λογική για την αντίχνευση και τη διάκριση οσμών. Οι χημειοαισθητικοί υποδοχείς διακρίνονται σε τρεις μεγάλες κατηγορίες: στους οσφρητικούς υποδοχείς (Odorant receptors, ORs), στους ιοντοτροπικούς υποδοχείς (Ionotropic receptors, IRs) και στους γευστικούς (Gustatory Receptors, GRs). Κάθε οσφρητικός αισθητήριος νευρώνας εκφράζει μόνο ένα μέλος μιας μεγάλης οικογένειας υποδοχέων, το οποίο αναγνωρίζει μια κατηγορία οσμογόνων μορίων. Οι οσφρητικοί υποδοχείς των εντόμων αποτελούν μια ομάδα καναλιών ιόντων, τα οποία απαρτίζονται από δυο υπομονάδες: μια υπομονάδα- οσφρητικό υποδοχέα (OR) -που ευαισθητοποιείται σε συγκεκριμένη κατηγορία οσμών-, και μια συντηρημένη υπομονάδα- συνυποδοχέα (Orco). Επομένως,

ο κάθε υποδοχέας διαφοροποιείται ως προς την υπομονάδα OR, με αποτέλεσμα να αναγνωρίζει διαφορετική κατηγορία ενώσεων. (63)

Ο συνυποδοχέας εκφράζεται σε οσφρητικούς αισθητήριους νευρώνες και είναι συντηρημένος σε αρκετά είδη εντόμων, γεγονός που μαρτυρά τον καθοριστικό του ρόλο στην οσφρητική μεταγωγή. Απουσία του Orco δεν πραγματοποιείται η συναρμολόγηση καθώς και η λειτουργία των ORs, ενώ απουσία των ORs ο συνυποδοχέας σχηματίζει αυτόνομα κανάλια ιόντων, τα οποία ενεργοποιούνται μέσω αγωνιστών. Καθώς οι οσφρητικοί υποδοχείς (ORs) των εντόμων δεν παρουσιάζουν ομολογία με οποιαδήποτε άλλη οικογένεια πρωτεϊνών, πολλά από τα πιο στοιχειώδη λειτουργικά και δομικά χαρακτηριστικά τους παρέμεναν άγνωστα.

Ο προσδιορισμός της δομής της υπομονάδας του συνυποδοχέα αποτέλεσε σημείο-σταθμό για τη μελέτη του οσφρητικού συστήματος των εντόμων. Το Orco αποτελείται από τέσσερις διαμεμβρανικές περιοχές, οι οποίες περιβάλλουν ένα κεντρικό κανάλι ιόντων καθώς και μια ενδοκυτταρική περιοχή, μέσω της οποίας πραγματοποιείται η σύνδεση των δύο υπομονάδων του υποδοχέα (Εικόνα 11). Μέσω της συγκεκριμένης περιοχής, ενώνεται ένα πλήθος ORs, σχηματίζοντας διαφορετικούς υποδοχείς, οι οποίοι αναγνωρίζουν διαφορετικές κατηγορίες οσμογόνων μορίων. (66)



Εικόνα 11. Κάτοψη του Orco, όπου διακρίνεται η συνολική οργάνωση των καναλιών ιόντων (66)

Τα οσμογόνα μόρια διαπερνούν τους πόρους της κεραίας ώστε να εισέλθουν στη λέμφο. Η υδατική λέμφος είναι πλούσια σε υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες, οι οποίες μεταφέρουν τα μόρια στους οσφρητικούς υποδοχείς. Η μεταφορά των ενώσεων πραγματοποιείται από δύο είδη πρωτεϊνών: από τις πρωτεΐνες δέσμευσης οσμογόνων μορίων (OBPs) καθώς και από τις χημειοαισθητηριακές πρωτεΐνες (chemosensory proteins, CSPs). Πρόκειται για πρωτεΐνες μικρού μοριακού βάρους, οι οποίες συνδέονται με μόρια πτητικών ενώσεων. Ωστόσο, οι δυο κατηγορίες παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές στη δομή τους.

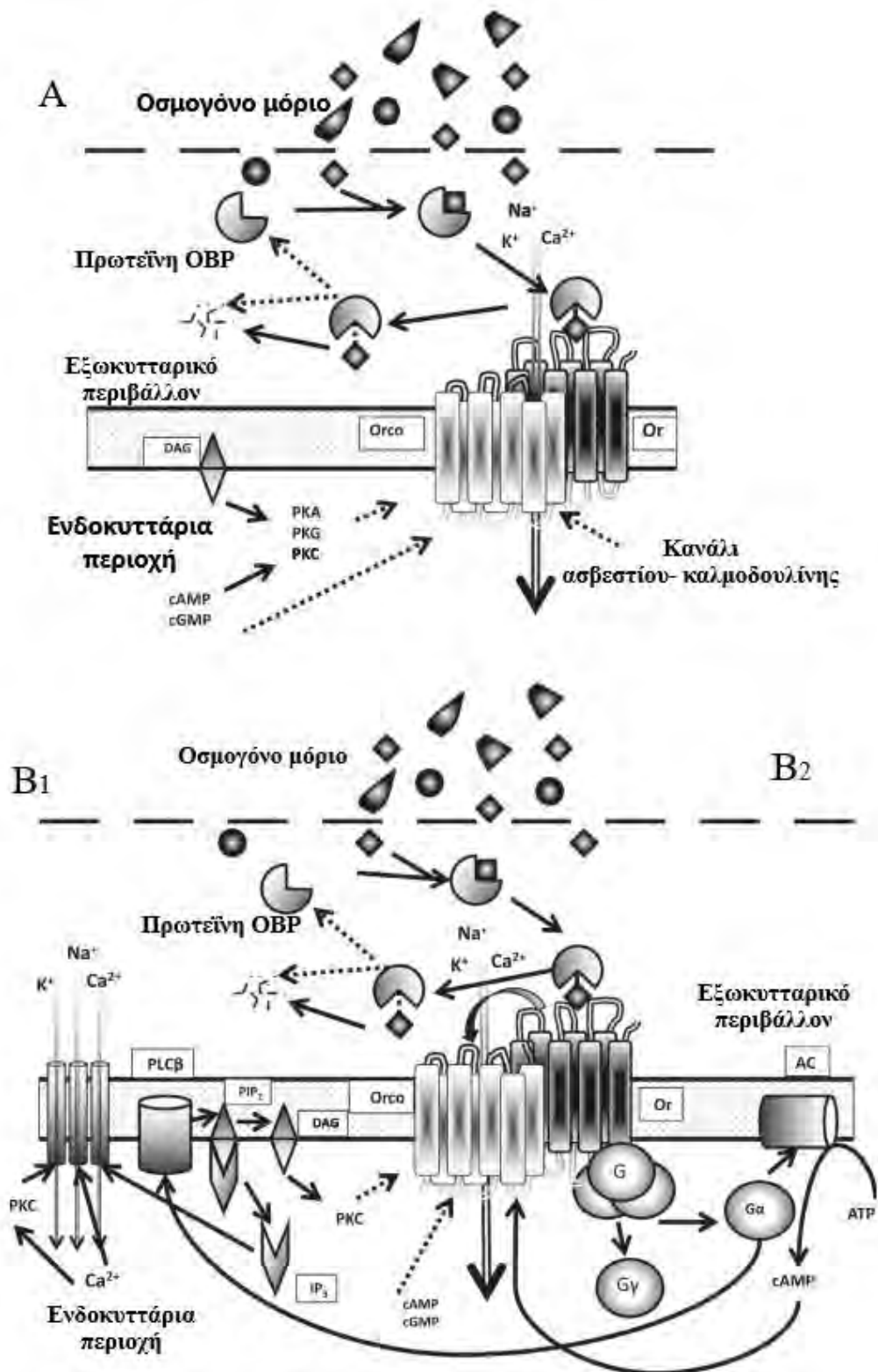
Τα μόρια- συνδέτες δεσμεύονται στις πρωτεΐνες- μεταφορείς, μεταφέρονται στους δενδρίτες των οσφρητικών νευρώνων και ενεργοποιούν μια σειρά γεγονότων, με αποτέλεσμα τη μεταγωγή του χημικού σήματος. Με την ενεργοποίηση της μεταγωγής, ολοκληρώνεται ο ρόλος του οσμογόνου μορίου. Το σύμπλοκο μόριο- πρωτεΐνη αποικοδομείται από ειδικά ένζυμα (ODE) ή σύμφωνα με μια εναλλακτική θεωρία, το οσμογόνο μόριο αποσυντίθεται ενώ η πρωτεΐνη είναι διαθέσιμη για την επόμενη σύνδεση. (63)

Για τη μεταγωγή σήματος στο οσφρητικό σύστημα έχουν προταθεί τρία πιθανά μονοπάτια:

Ιονοτροπικό: Σύμφωνα με αυτή την υπόθεση το ετερομερές OR-Orco σχηματίζει ένα προσδετο- εξαρτώμενο (προσδέτης του οποίου είναι το οσμογόνο μόριο), μη ειδικό κανάλι ιόντων. Η σύνδεση του προσδέτη πυροδοτεί ένα δυναμικό μέσω αυτού του καναλιού. Το παραγόμενο δυναμικό φαίνεται να ρυθμίζεται μέσω ενός μεταβοτροπικού καταρράκτη στο οποίο εμπλέκονται άγνωστοι μεταβοτροπικοί υποδοχείς που καθορίζουν την ευαισθησία και την ταχύτητα της απόκρισης στο οσμογόνο μόριο (Εικόνα 12^A).

Παράλληλο ιονοτροπικό και μεταβοτροπικό: Σύμφωνα με αυτή την υπόθεση ο Orco, αυτοτελώς, αποτελεί κανάλι κατιόντων που ενεργοποιείται μέσω δύο μονοπατιών. Στο πρώτο, ιονοτροπικό (γρήγορη απόκριση), ο προσδέτης ενεργοποιεί τον OR ο οποίος με την σειρά του ενεργοποιεί τον Orco. Στο δεύτερο, μεταβοτροπικό (αργή απόκριση) η ενεργοποίηση του OR έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση μίας τριμερούς G-πρωτεΐνης η οποία με την σειρά της ενεργοποιεί μία αδενυλική κυκλάση (AC), η ενεργοποίηση της οποίας έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του δυναμικού δράσης, μόνο στην περίπτωση όπου ο Orco έχει φωσφορυλιωθεί από την πρωτεϊνική κινάση C (PKC) (Εικόνα 12^{B2}).

Μεταβοτροπικό: Η πρόσδεση του οσμογόνου στον OR ενεργοποιεί μία G-πρωτεΐνη και ως εκ τούτου ενεργοποιείται η φωσφολιπάση Cb (PLCb). Η PLCβ με την σειρά της προκαλεί αύξηση της τριφωσφορικής ινositόλης IP3 που έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων Ca^{2+} , μέσω εξαρτώμενων από IP3 καναλιών Ca^{2+} . Η αύξηση του ενδοκυτταρικού Ca^{2+} οδηγεί στο άνοιγμα τασεοεξαρτώμενων καναλιών κατιόντων προκαλώντας ένα παροδικό δυναμικό δράσης. Η παρατεταμένη αύξηση των επιπέδων ενδοκυτταρικού Ca^{2+} σε συνδυασμό με την αύξηση της διακυλογλυκερόλης DAG έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της PKC η οποία με την σειρά της ενεργοποιεί κανάλια κατιόντων, συμπεριλαμβανομένου και του $OrcO$, αυξάνοντας περαιτέρω την αγωγιμότητά του (Εικόνα 12^{B1}). (63)



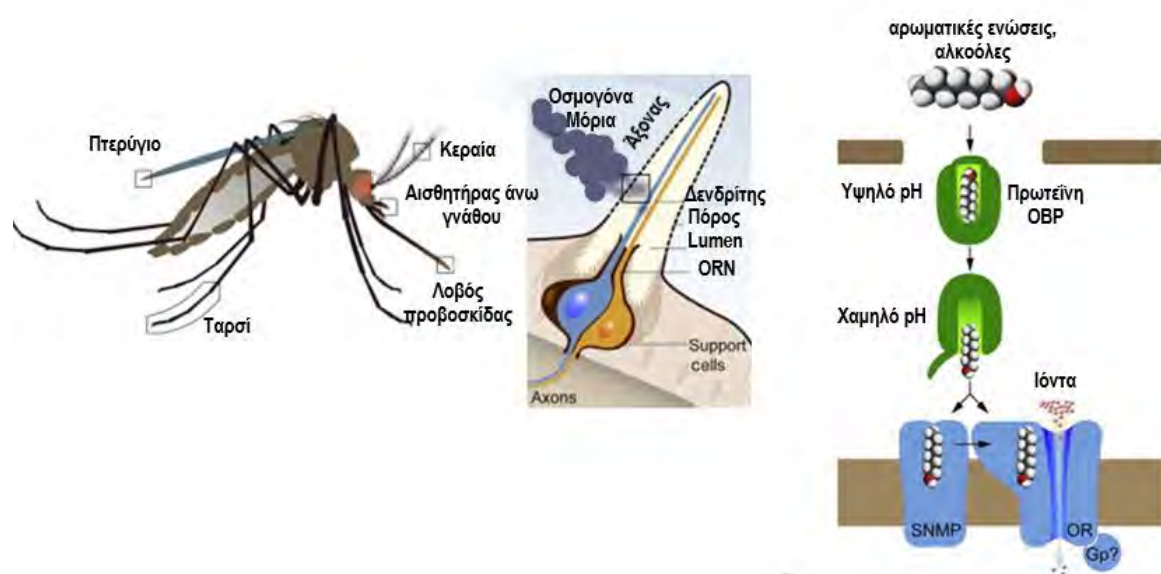
Εικόνα 12. Σχηματική αναπαράσταση των πιθανών μονοπατιών μεταγωγής σήματος του οσφρητικού συστήματος.
 Α) Ιονοτροπικό μονοπάτι. Β1) Μεταβοτροπικό Β2) Παράλληλο ιονοτροπικό και μεταβοτροπικό μονοπάτι.
 Προσαρμοσμένη εικόνα. (63)

Κεφάλαιο 4^ο: Πρωτεΐνες πρόσδεσης οσφρητικού συστήματος (OBPs)

Οι πρωτεΐνες δέσμησης του οσφρητικού συστήματος (OBPs) αποτελούν μια βασική κατηγορία μορίων, η οποία εμπλέκεται στα πρώτα στάδια του οσφρητικού μονοπατιού. Πρόκειται για διαλυτές πρωτεΐνες, μικρού μοριακού βάρους (120-150 αμινοξέων), με υψηλή συγκέντρωση στην αισθητήρια λέμφο του τριχοειδούς αισθητήρα. Διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην αρχική φάση της οσφρητικής αντίληψης, καθώς δεσμεύουν και διαλυτοποιούν οσμογόνα μόρια, τα οποία μεταφέρουν σε συγκεκριμένους οσφρητικούς υποδοχείς, ενώ παράλληλα τα προστατεύουν από την δράση των ενζύμων αποικοδόμησης (ODE). (67) (68)

4.1 Λειτουργία

Οι OBPs εκκρίνονται σε υψηλή συγκέντρωση στη λέμφο, όπου αναγνωρίζουν και δεσμεύουν τα μόρια. Όπως προαναφέρθηκε, οι γνώσεις για το οσφρητικό μονοπάτι είναι περιορισμένες, με αποτέλεσμα να προτείνονται διάφοροι μηχανισμοί για τη μεταγωγή του οσφρητικού σήματος. Για τα κουνούπια, ο επικρατέστερος μηχανισμός στηρίζεται στην μεταβολή του pH. Συγκεκριμένα, κατά την πρόσδεση του οσμογόνου μορίου στην πρωτεΐνη, το καρβοξυτελικό άκρο της λειτουργεί ως κάλυμμα, το οποίο προστατεύει το μόριο. Η σύνδεση πραγματοποιείται στην περιοχή της λέμφου, η οποία χαρακτηρίζεται από υψηλό pH. Κατά τη μεταφορά του συμπλόκου στην μεμβράνη του νευρώνα- περιοχή με ιδιαίτερα χαμηλό pH- το καρβοξυτελικό άκρο ξεδιπλώνεται με αποτέλεσμα να απελευθερώνεται το μόριο (Εικόνα 13). (69)



Εικόνα 13. Επικρατέστερος μηχανισμός οσφρητικού συστήματος στα κουνούπια. Εικόνα προσαρμοσμένη (69)

Αξίζει να σημειωθεί, ότι οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες αναγνωρίζουν μια ομάδα δομικά συγγενικών προσδετών και όχι ένα μοναδικό μόριο, όπως προτείνει το μοντέλο «κλειδί- κλειδαριά» για τα ένζυμα. Επομένως, ενώ τα έντομα παρουσιάζουν μια υψηλή εκλεκτικότητα στην αναγνώριση των φερορμονών τους, η εκλεκτικότητα για τα οσμογόνα μόρια είναι περιορισμένη (εξειδίκευση ομάδας).

4.2 Μορφολογία

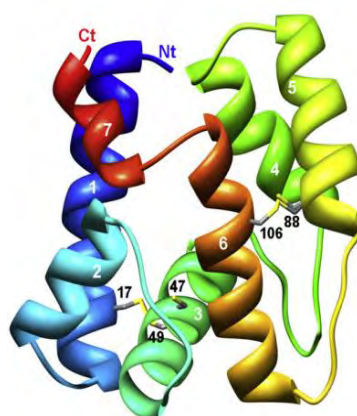
Οι OBPs παρουσιάζουν μια χαρακτηριστική δομή, η οποία αποτελείται από έξι α- έλικες. Παρά τις μεγάλες διαφορές στην πρωτοταγή τους δομή, η τριτοταγής διαμόρφωση είναι συντηρημένη στα διάφορα είδη εντόμων. Με κριτήριο τον αριθμό των καταλοίπων κυστεΐνης -επομένως και τον αριθμό των δισουλφιδικών δεσμών- ταξινομούνται στις εξής κατηγορίες:

- i. Κλασσικές OBPs: περιέχουν έξι συντηρημένα κατάλοιπα κυστεΐνης
- ii. C-minus OBPs: περιέχουν τέσσερα ή πέντε κατάλοιπα κυστεΐνης
- iii. Μη τυπικές: πρωτεΐνες μεγαλύτερου μοριακού βάρους (25-35 kDa) με μεγαλύτερο μήκος καρβοξυτελικού άκρου
- iv. Plus-C OBPs: με οκτώ ως δώδεκα κατάλοιπα κυστεΐνης
- v. διμερείς OBP (dimer OBPs): απαρτίζονται από δυο μοτίβα κλασσικών OBPs.

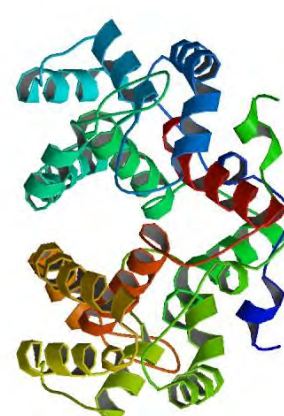
Η πλειοψηφία των πρωτεϊνών ανήκουν στις κλασσικές OBPs. Μεταξύ των καταλοίπων κυστεΐνης αναπτύσσονται δισουλφιδικοί δεσμοί και μάλιστα με συγκεκριμένο τρόπο (Cys1-Cys3, Cys2-Cys5 και Cys4-Cys6), με σκοπό να σταθεροποιηθεί η δομή των έξι α- ελίκων. (70) (71)



AgamOBP1, a classic OBP



AmelOBP14, a C-minus OBP



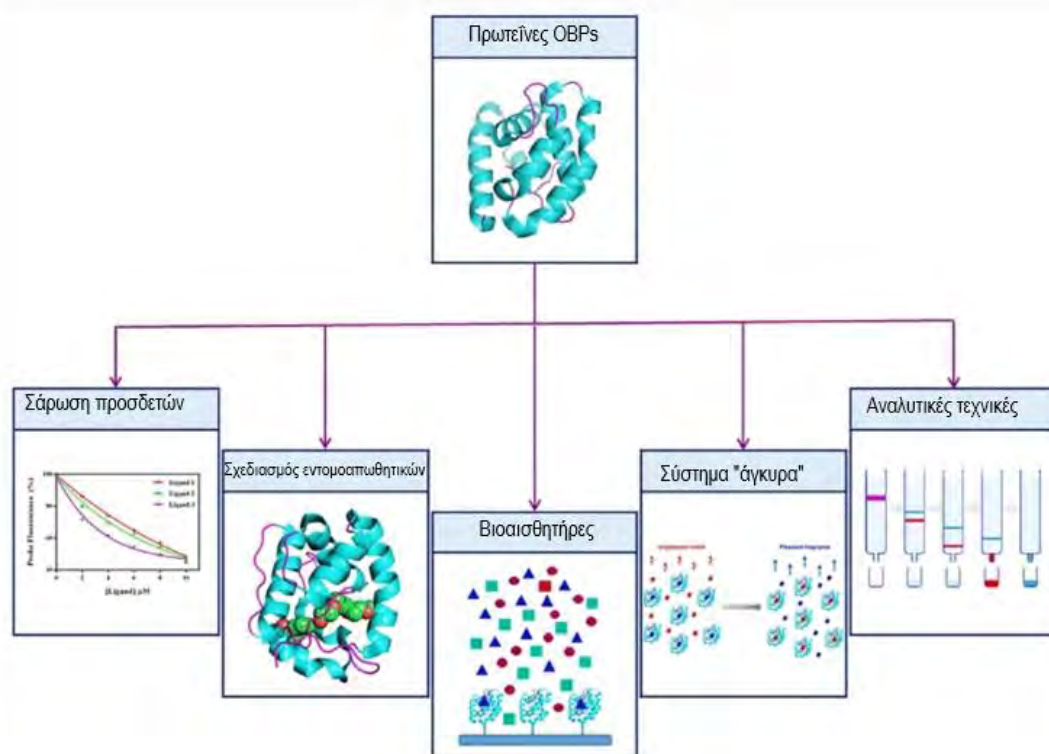
AgamOBP48, a Plus-C OBP

Εικόνα 14: Η τριτοταγής δομή της AgamOBP1 (72), AmelOBP14 (73) και της AgamOBP48. (74)

4.3 Εφαρμογή των OBPs στη Βιοτεχνολογία

Οι OBPs τα τελευταία χρόνια έχουν τοποθετηθεί στο επίκεντρο της έρευνας, καθώς η ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με ένα ευρύ φάσμα υδρόφοβων ενώσεων σε συνδυασμό με τα ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά τους όπως το μικρό μοριακό βάρος, η σταθερότητα σε υψηλές θερμοκρασίες και pH, αλλά και η εύκολη και γρήγορη παράγωγή τους, τις καθιστά κατάλληλους στόχους για εφαρμοσμένη έρευνα σε διάφορους βιομηχανικούς τομείς. Οι συγκεκριμένες ιδιότητες επιτρέπουν το σχεδιασμό και τη σύνθεση μεταλλαγμάτων αλλά και νέων δραστικών ενώσεων.

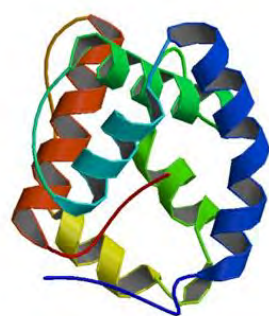
Οι OBPs χρησιμοποιούνται για την ανακάλυψη και σχεδιασμό με βάση τη δομή, απωθητικών ή ελκυστικών ενώσεων με επιθυμητά χαρακτηριστικά. Παράλληλα, η εμπλουτισμένη γνώση για το οσφρητικό μονοπάτι σε συνδυασμό με την πρόοδο της νανοτεχνολογίας, αξιοποιούν τα βασικά χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών για τη δημιουργία νέων και σύγχρονων βιοαισθητήρων. Τέλος, έχουν πραγματοποιηθεί οι πρώτες προσπάθειες για χρήση των OBPs ως συστήματα ακινητοποίησης (anchorage systems), μια μέθοδος που βρίσκει εφαρμογή σε ποικίλους τομείς (κλωστοϋφαντουργία, φαρμακευτικές βιομηχανίες) καθώς χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό και των διαχωρισμό διάφορων μιγμάτων (Εικόνα 15). (75)



Εικόνα 15: Σχηματική αναπαράσταση των βιοτεχνολογικών εφαρμογών των OBPs. Εικόνα προσαρμοσμένη (75)

Έτσι με τις ποικίλες αναδυόμενες εφαρμογές των OBPs, η περαιτέρω μελέτη τους καθίσταται σημαντικού βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος.

Σύμφωνα με μελέτες, παρατηρούνται διαφορές στα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών ανάλογα με το φύλλο των κουνουπιών αλλά και σχετικά με τον χρόνο λήψης γεύματος αίματος. Συγκεκριμένα, οι πρωτεΐνες 5, 48, 1, 17, 9, 47, 3, 7, 4 και 20 στο κουνούπι *Anopheles gambiae*, παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα έκφρασης στις κεραίες του θηλυκού κουνουπιού (Εικόνα 16). Παράλληλα, η έκφραση των συγκεκριμένων πρωτεϊνών μειώνεται μετά τη λήψη γεύματος αίματος (με εξαίρεση την AgamOBP9). Για τις πρωτεΐνες 1, 4, 7, 20, 47 και 48 έχει πραγματοποιηθεί ο προσδιορισμός της τριτοταγούς δομής τους. Επομένως, οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες αποτελούν κατάλληλα μόρια στόχους για περαιτέρω μελέτη καθώς φαίνεται να εμπλέκονται στην αναγνώριση του ξενιστή. (76)



AgamOBP1

Wogulis M. *et al* (2006)



AgamOBP7

Lagarde, A. *et al* (2011)



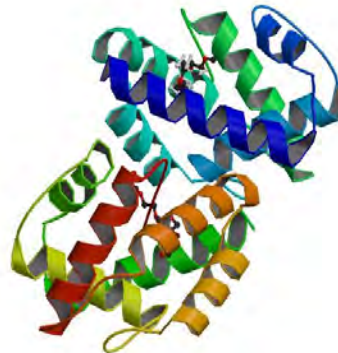
AgamOBP47

Lagarde, A. *et al* (2011)



AgamOBP4

Davrazou F. *et al* (2011)



AgamOBP20

Ziemba, B.P. *et al* (2013)



AgamOBP48

Tsitsanou, K.E. *et al* (2013)

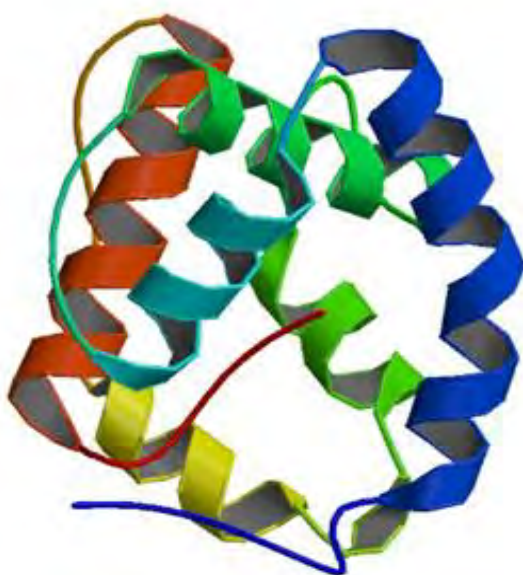
Εικόνα 16: Η τριτοταγής δομή ορισμένων OBPs του κουνουπιού An. gambiae

4.4 Πρωτεΐνες- στόχοι

♦ Πρωτεΐνη πρόσδεσης οσμών 1 του κουνουπιού *Anopheles gambiae* (*AgamOBP1*)

Το γονίδιο της πρωτεΐνης πρόσδεσης οσμών 1 του Αφρικανού φορέα ελονοσίας *An. gambiae* (*AgamOBP1*, Εικόνα 17), παρουσιάζει υψηλά επίπεδα mRNA στις κεραίες θηλυκού κουνουπιού -σε σύγκριση με τις κεραίες του αρσενικού- τα οποία μειώνονται αισθητά έπειτα από τη λήψη ενός γεύματος αίματος, γεγονός που υποδεικνύει τη πιθανή συμμετοχή της πρωτεΐνης στην ανίχνευση των οσμών του ξενιστή. Σύμφωνα με μελέτες, το ινδόλιο – βασικό συστατικό του ιδρώτα- αποτελεί ειδικό προσδέτη της *AgamOBP1*. Τα συγκεκριμένα ευρήματα καθιστούν την πρωτεΐνη ως ένα πιθανό μόριο- στόχο για τον σχεδιασμό νέων εντομοαπωθητικών ή ελκυστικών ενώσεων. (77)

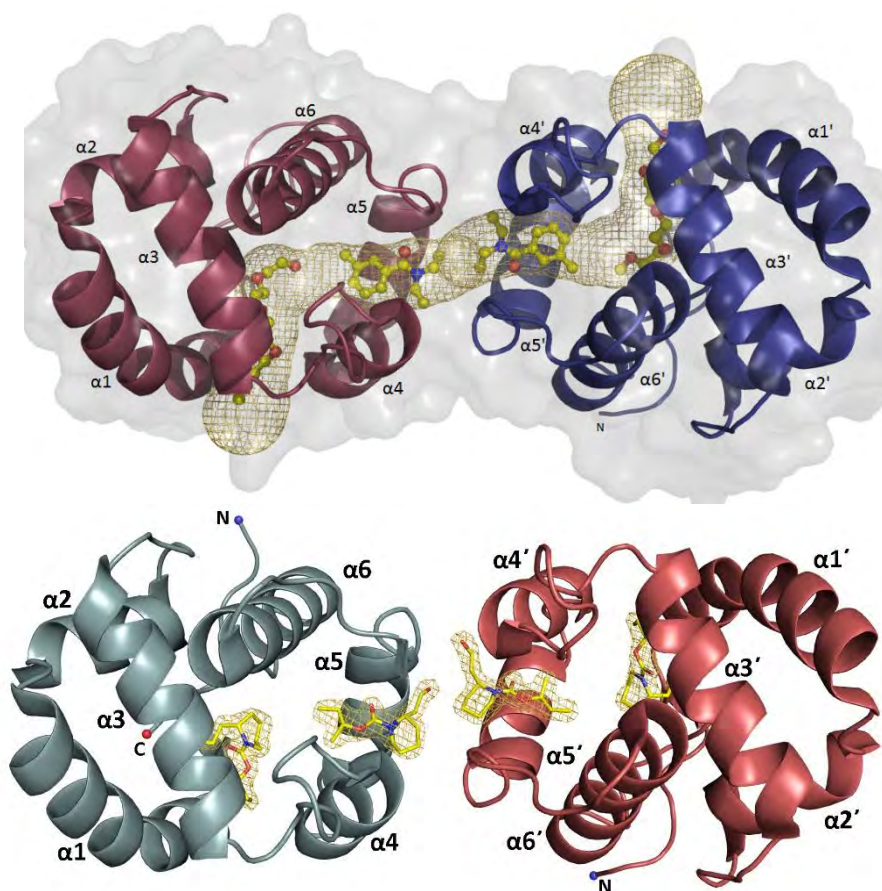
Ο προσδιορισμός της τριτοταγούς δομής της πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε το 2005 σε ευκρίνεια 1.5Å και αποτέλεσε μια από τις πρώτες δομές OBP εντόμων που επιλύθηκαν με πρωτεϊνική κρυσταλλογραφία ακτινών X. Η πρωτεΐνη κρυσταλλώθηκε ως διμερές και χαρακτηρίζεται από ένα κανάλι πρόσδεσης το οποίο διατρέχει και τις δυο υπομονάδες και τη μεσεπιφάνεια του διμερούς, ενώ η είσοδος του σχηματίζεται από αμινοξικά κατάλοιπα στις έλικες 1, 3 και 4. Σε αυτή τη δομή ο χώρος του καναλιού καταλαμβάνεται από ένα μόριο πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG), το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως παράγοντας καθίζησης για την κρυστάλλωση της πρωτεΐνης. (72)



Εικόνα 17: Τριτοταγής δομής της πρωτεΐνης *AgamOBP1* (PDB: 2ERB)

Ο προσδιορισμός της κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου AgamOBP1-DEET σε ευκρίνεια 1,6Å υπέδειξε την πρόσδεση ενός μορίου DEET σε κάθε υπομονάδα του διμερούς, σε μία θέση που βρίσκεται κοντά στη μεσεπιφάνεια μεταξύ των δύο μονομερών. Το κανάλι διασπάται σε δυο ίσα τμήματα μήκους 28Å, ενώ παράλληλα στον ελεύθερο χώρο του καναλιού που δεν καταλαμβάνεται από μόρια DEET, προσδένεται ένα μόριο PEG (5 μονάδες αιθυλενογλυκόλης). (78) Παράλληλα, το σύμπλοκο AgamOBP1-Icaridin σε ευκρίνεια 1,75Å προσδιόρισε τον τρόπο σύνδεσης της ικαριδίνης. Συγκεκριμένα, το μόριο της ικαριδίνης προσδένεται στο κέντρο δέσμευσης του DEET με δυο εναλλακτικές διαμορφώσεις αλλά και σε μια νέα δεύτερη θέση πρόσδεσης κοντά στην καρβοξυτελική περιοχή (Εικόνα 18) . (79)

Τα συγκεκριμένα ευρήματα είναι ιδιαίτερα σημαντικά, καθώς η ύπαρξη δυο κέντρων δέσμευσης πιθανό να καθιστά αποτελεσματικότερη τη μεταφορά ενός οσμογόνου ή ακόμα και να επιτρέπει την ταυτόχρονη μεταφορά διαφορετικών οσμογόνων μορίων. Η δυνατότητα για ταυτόχρονη πρόσδεση δυο δραστικών αποθητικών μορίων στην πρωτεΐνη αποτελεί βασικό πλεονέκτημα για το σχεδιασμό καινοτόμων προϊόντων με νέες δραστικές ή/και μιγμάτων τους.



Εικόνα 18: Απεικόνιση της AgamOBP1 με μόρια DEET και PEG (επάνω) και Ικαριδίνη (κάτω)· (78)

♦ Πρωτεΐνη πρόσδεσης οσμών 4 του κουνουπιού *Anopheles gambiae* (AgamOBP4)

Μια ακόμη πρωτεΐνη με ιδιαίτερο ενδιαφέρον είναι η πρωτεΐνη πρόσδεσης οσμών 4 του *An. gambiae* (AgamOBP4). Αρχικά, *in vitro* και *in vivo* μελέτες υποδεικνύουν το σχηματισμό συμπλόκου της AgamOBP4 με την πρωτεΐνη AgamOBP48, η οποία ανήκει στην κατηγορία Plus-C OBPs. (80) Παράλληλα, ευρήματα από πρόσφατα πειράματα υποστηρίζουν τη δημιουργία συμπλόκου της AgamOBP4 και με την AgamOBP1. Συγκεκριμένα, υποστηρίζεται η άποψη ότι η πρόσδεση ινδολίου στην AgamOBP4 προκαλεί αλλαγή της στερεοδιάταξής της με αποτέλεσμα να σχηματίζεται θέση πρόσδεσης για την AgamOBP1, ενώ παράλληλα πιθανόν να διασπά τα διμερή της AgamOBP1 ώστε να επιτραπεί η σύνδεσή της OBP4. Αξίζει να σημειωθεί ότι απουσία ινδολίου δεν παρατηρούνται αξιοσημείωτες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο πρωτεϊνών. (81) Σύμφωνα με μια ακόμα προσέγγιση, η AgamOBP4 διαδραματίζει κομβικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται ανάμεσα σε διάφορες OBPs, καθώς αποτελέσματα ερευνών υποστηρίζουν τη διαμεσολάβηση της AgamOBP4 στην αλληλεπίδραση των OBPs. (82)

Τα αποτελέσματα των ερευνών σε συνδυασμό με τον προσδιορισμό της κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου AgamOBP4-ινδόλιο, παρέχουν πολλές πληροφορίες, οι οποίες συμβάλλουν στην κατανόηση του μηχανισμού δράσης των OBPs. Ειδικότερα, η πρόσδεση του ινδολίου στην πρωτεΐνη σταθεροποιεί τη διαμόρφωση της πρωτεΐνης, η οποία από μια εύπλαστη σφαίρα (molten globule) μεταβαίνει μια συμπαγή αναδιπλωμένη διαμόρφωση, με αποτέλεσμα να σχηματίζεται η θέση πρόσδεσης της AgamOBP1. Η AgamOBP4 ανήκει στις κλασσικές OBPs και αποτελείται από έξι α-έλικες, οι οποίες σταθεροποιούνται από τρεις δισουλφιδικούς δεσμούς. Το ινδόλιο προσδένεται στο κέντρο της πρωτεΐνης σε μια μεγάλη κοιλότητα, το άνοιγμα της οποίας σχηματίζεται από τις έλικες 1, 3 και 4 (Εικόνα 19). (81)



Εικόνα 19: Η τριτοταγής δομή της πρωτεΐνης AgamOBP4 (PDB: 3Q8I)

♦ Πρωτεΐνη πρόσδεσης οσμών 5 του κουνουπιού *Anopheles gambiae* (AgamOBP5)

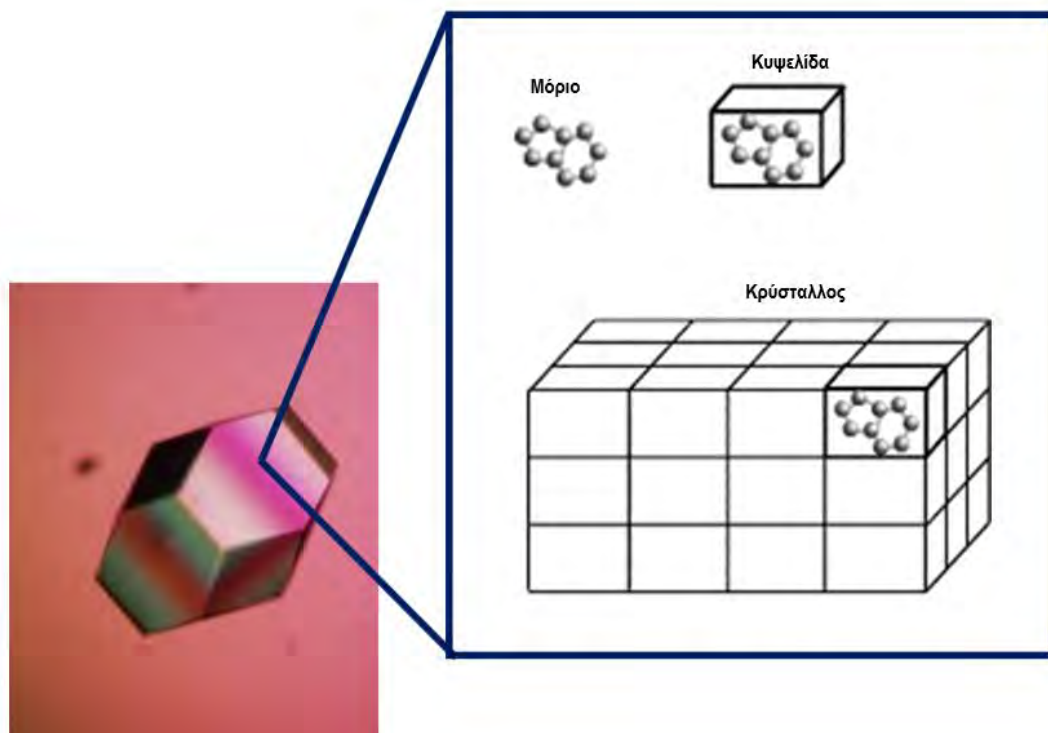
Η πρωτεΐνη πρόσδεσης οσμογόνων μορίων 5 του κουνουπιού *An. gambiae* (AgamOBP5), θεωρείται ένας κατάλληλος μοριακός στόχος για την εύρεση νέων απωθητικών ή ελκυστικών ενώσεων, καθώς τα επίπεδα έκφρασής της στις θηλυκές κεραίες μεταβάλλονται έπειτα από ένα γεύμα αίματος. Επιπλέον, η ανάλυση του κινκάρδιου μεταγραφώματος αποκάλυψε ότι η AgamOBP5, καθώς και άλλοι υποψήφιοι στόχοι, εμφανίζουν διαφορετική έκφραση υπό συνθήκες περιβάλλοντος φωτός/σκότους (LD) και συνθήκες σταθερού-σκότους (DD). Η έκφρασή της αυξάνεται κατά την μετάβαση ημέρας-νύχτας, φτάνοντας σε μια πρώτη κορύφωση 3 ώρες πριν από το σούρουπο και μια δεύτερη στο τέλος του σούρουπου/νωρίς τη νύχτα, πιθανώς προετοιμάζοντας το οσφρητικό σύστημα για αυξημένη ανίχνευση οσμών κατά τη νυχτερινή αναζήτηση των ξενιστών. (83) Σε συνθήκες LD και κατά τη διάρκεια του αρχικού κύκλου μετάβασης σε DD (περίοδος 24 ωρών), η έκφραση της AgamOBP5 καθοδηγείται από τη συνδυαστική δράση του κινκάρδιου ρολογιού και του φωτός και φτάνει σε υψηλότερους ρυθμούς έκφρασης από αυτούς που προκαλούνται μόνο από το ρολόι. Ωστόσο, σε επόμενους κύκλους DD, η OBP5 εμφανίζει ένα χαμηλότερο επίπεδο έκφρασης το οποίο οφείλεται εξ ολοκλήρου στο ενδογενές κινκάρδιο ρολόι. (84)

♦ Πρωτεΐνη πρόσδεσης οσμών 1 του κουνουπιού *Aedes albopictus* (AealOBP1)

Η πρωτεΐνη πρόσδεσης οσμών 1 του κουνουπιού *Ae. albopictus* (AealOBP1) αποτελεί ένα διαφορετικό μοριακό στόχο, καθώς επικεντρώνεται στην αναγνώριση βασικών οσμογόνων μορίων που σχετίζονται με το κυρίως γεύμα των κουνουπιών με νέκταρ. Τα επίπεδα έκφρασης της AealOBP1 είναι περίπου ίδια και στα δύο φύλλα και δεν επηρεάζονται από τη λήψη γεύματος αίματος, ενώ παράλληλα, τα επίπεδα mRNA είναι αυξημένα σε νηστικά κουνούπια. Εναλλακτικά, ένα τέτοιο γονιδιακό προϊόν μπορεί ενδεχομένως να έχει μια πιο γενική λειτουργία στη μεταγωγή χημειοαισθητηριακών σημάτων ή/και μπορεί να λειτουργεί μέσω διαμοριακών αλληλεπιδράσεων με άλλες OBPs. (80) Επομένως, η περαιτέρω μελέτη της AealOBP1 μπορεί να συμβάλει στην κατανόηση της συμβολής των OBPs στην εύρεση τροφής, αλλά και στην εύρεση ελκυστικών ενώσεων για την παραγωγή παγίδων. (85)

Κεφάλαιο 5^ο: Κρυστάλλωση πρωτεϊνών

Ως κρύσταλλος ορίζεται ως «η φάση της στερεής κατάστασης που χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη μιας περιοδικής διευθέτησης των ατόμων και των μορίων που τον αποτελούν». (86) Οι κρύσταλλοι είναι φυσικά ομοιογενή στερεά με καθορισμένο γεωμετρικό σχήμα, κανονικές όψεις και αιχμηρές ακμές. (87) Η δημιουργία τους βασίζεται στην επανάληψη μέσω απλής μετάθεσης ενός παραλληλεπίπεδου με 4 ακμές και 6 έδρες που αποκαλείται μοναδιαία κυψελίδα, διαδοχικά παρατεταγμένες κυψελίδες (σε τρισδιάστατο επίπεδο) σχηματίζουν τον κρύσταλλο (Εικόνα 20). (86) Η μοναδιαία κυψελίδα είναι η μικρότερη στοιχειώδης ομάδα που είναι απαραίτητη για την δημιουργία ενός κρυστάλλου με επαναλαμβανόμενη συμμετρία. Οι αλληλεπιδράσεις εντός του κρυσταλλικού πλέγματος μέσω των οποίων συγκρατούνται οι πρωτεΐνες αποκαλούνται κρυσταλλικές επαφές και είναι ίδιες σε κάθε οργανωμένη βασική μονάδα μορίων που περιέχεται σε κάθε μοναδιαία κυψελίδα. Η ασύμμετρη μονάδα είναι το στοιχείο της μοναδιαία κυψελίδας που δεν χαρακτηρίζεται από κανένα στοιχείο συμμετρίας. (88)

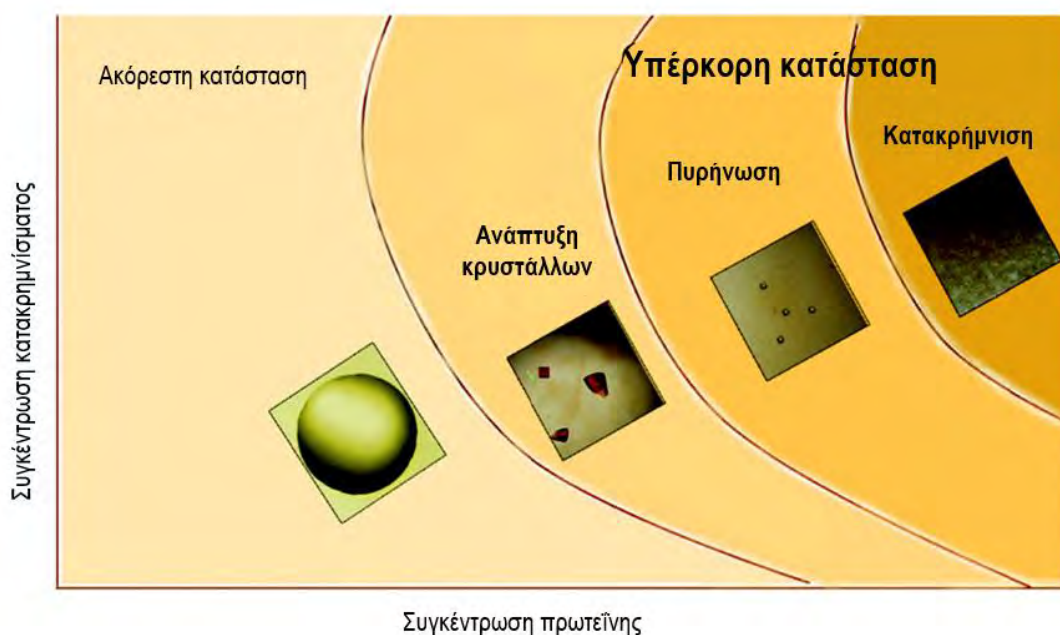


Εικόνα 20: Ο κρύσταλλος σχηματίζεται με επανάληψη της μοναδιαίας κυψελίδας.

4.1 Αρχές κρυστάλλωσης πρωτεϊνών

Η διαδικασία της κρυστάλλωσης αποτελείται από τρία στάδια (Εικόνα 21):

- ♦ Δημιουργία πυρήνων κρυστάλλωσης: Σχηματισμός πρώτων διατεταγμένων συσσωματωμάτων, τα οποία διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην επόμενη φάση. Η πυρήνωση αποτελεί ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα τόσο σε θεωρητικό όσο και σε πειραματικό επίπεδο, καθώς πρόκειται για τη μετάβαση των μορίων από μία κατάσταση πλήρους αταξίας σε μία διατεταγμένη. (89)
- ♦ Ανάπτυξη πυρήνων κρυστάλλωσης: Στην ζώνη υπερκορεσμού αυξάνεται το μέγεθος των πυρήνων κρυστάλλωσης καθώς μόρια πρωτεΐνης ενσωματώνονται από το διάλυμα στους πυρήνες μέσω διάχυσης. Η πυρήνωση και η ανάπτυξη των κρυστάλλων οφείλεται στον υπερκορεσμό του διαλύματος πρωτεΐνης – καταβυθιστικού(ών) παραγόντων. (89)
- ♦ Τερματισμός της ανάπτυξης των πυρήνων κρυστάλλωσης: Η ανάπτυξη μεγάλων, καλά διαμορφωμένων κρυστάλλων θα πρέπει να γίνεται σε τέτοιες συνθήκες ώστε η ανάπτυξή τους να ξεκινά με το σχηματισμό ενός μοναδικού πυρήνα ή ενός περιορισμένου αριθμού πυρήνων στη ζώνη πυρήνωσης. Καθώς αναπτύσσονται οι κρύσταλλοι το διάλυμα επανέρχεται στην μετασταθερή ζώνη και δεν δημιουργούνται περισσότεροι πυρήνες. (89)



Εικόνα 21: Στάδια κρυστάλλωσης πρωτεϊνών. Προσαρμοσμένη εικόνα (90)

Με σκοπό να προσδιοριστεί η δομή μίας πρωτεΐνης με κρυσταλλογραφία ακτινών Χ είναι κρίσιμη η σωστή προετοιμασία του προς μελέτη δείγματος. Συνοπτικά ακολουθούνται συγκεκριμένα βήματα προκειμένου να καταλήξουμε στο προς μελέτη δείγμα. Δηλαδή, το γονίδιο της πρωτεΐνης- στόχου κλωνοποιείται σε κατάλληλο φορέα έκφρασης, απομονώνεται, καθαρίζεται, κρυσταλλώνεται, συλλέγονται δεδομένα περίθλασης και τελικά προσδιορίζονται οι θέσεις των ατόμων σε τρεις διαστάσεις. Η παραγωγή κρυστάλλων υψηλής ποιότητας είναι αρκετά δύσκολη, καθώς δεν υπάρχουν προφανείς συσχετισμοί ανάμεσα στις συνθήκες κρυστάλλωσης και την δομή μίας πρωτεΐνης. Τέλος, η παραγωγή κρυστάλλων είναι αποτέλεσμα πολλών δοκιμών τόσο συνθηκών όσο και τεχνικών κρυστάλλωσης, και όχι ακριβής εφαρμογή ενός συγκεκριμένου κανόνα. (91)

4.2 Παράγοντες που επηρεάζουν την κρυστάλλωση

Αρκετοί είναι οι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν τη προσπάθεια κρυστάλλωσης μιας πρωτεΐνης, εκ των οποίων οι κυριότεροι είναι:

- ♦ Η καθαρότητα του δείγματος
- ♦ Η σταθερότητά του ως προς τη θερμοκρασία, το pH και τους πρωτεολυτικούς παράγοντες
- ♦ Η διαλυτότητά της πρωτεΐνης.

Η ποιότητα του δείγματος ελέγχεται με μεθόδους όπως η Δυναμικής Σκεδάσεως Φωτός (*Dynamic Light Scattering*), ο Κυκλικός Διχρωϊσμός (*Circular Dichroism*), η φασματοσκοπία μάζας (*MS*) και διάφορες τεχνικές ηλεκτροφόρησης. (92) Η πιο κοινή μέθοδος που εφαρμόζεται για την εύρεση της κατάλληλης συνθήκης κρυστάλλωσης είναι η μέθοδος της δοκιμής-σφάλματος (*trial & error method*). Σε κάθε δοκιμή ελέγχονται γνωστές συνθήκες κρυστάλλωσης πρωτεϊνών με παραλλαγές σε ορισμένες από τις παραμέτρους που μπορεί να επηρεάζουν την κρυστάλλωση. Για το σκοπό αυτό έχουν αναπτυχθεί συστήματα ρομποτικής για τη γρηγορότερη ανάλυση και βελτιστοποίηση των συνθηκών, ελαχιστοποιώντας την ποσότητα της πρωτεΐνης που απαιτείται.

Θερμοκρασία: Το ποσοστό της επίδρασης της ενθαλπίας και εντροπίας στην συνολική ελεύθερη ενέργεια επηρεάζεται από την θερμοκρασία. Ο τρόπος με τον οποίο προκαλείται η κρυστάλλωση των πρωτεϊνών (σχέση ενθαλπίας-εντροπίας) μπορεί να επηρεάζεται με διαφορετικό τρόπο από τη θερμοκρασία, καθώς η αύξηση της

θερμοκρασίας μπορεί να αυξάνει ή να μειώνει την διαλυτότητα της πρωτεΐνης. Αύξηση της θερμοκρασίας έχει ως επακόλουθο να αυξάνεται η αταξία των διαλυμένων μορίων με αποτέλεσμα να γίνονται επιτρεπτές διευθετήσεις υψηλότερης ελεύθερης ενέργειας, με την προϋπόθεση ότι η παράμετροι της εντροπίας επικρατούν αυτών την ενθαλπίας. Επίσης, η εξάρτηση της διαλυτότητας από την θερμοκρασία οφείλεται στην μεταβολή των σταθερών αντίδρασης μεταξύ των πλευρικών αμινοξικών ομάδων συναρτήσει της θερμοκρασίας.

Οι τιμές pK_a των ιονισμένων ομάδων σχετίζονται αυστηρά με την μέση ιοντική ισχύ. Οι πρωτεΐνες μπορούν να κρυσταλλωθούν σε θερμοκρασίες από 4 °C με σκοπό την ελαχιστοποίηση της πρωτεολυτικής διάσπασης των πρωτεϊνών και την ανάπτυξη βακτηρίων έως και θερμοκρασία δωματίου (15 °C- 25 °C). Κατά την διαδικασία της κρυστάλλωσης είναι σημαντικό να παραμένει σταθερή η θερμοκρασία καθώς τυχόν μεταβολές της να επηρεάσουν την ιοντική ισχύ και το pH του διαλύματος. Η μείωση της διαλυτότητας επιτυγχάνεται κατά κόρον αυξάνοντας την συγκέντρωση του παράγοντα κατακρήμνισης. (93) (94) (95)

pH : Η διαλυτότητας μιας πρωτεΐνης μπορεί να επηρεαστεί από την μεταβολή του pH ακόμα και έως μισή μονάδα, γεγονός το οποίο οφείλεται στις πολυάριθμες ιοντικές ομάδες που διαθέτει ένα μόριο πρωτεΐνης. Το pH μπορεί να επηρεάσει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων πρωτεΐνης τροποποιώντας την δημιουργία δεσμών υδρογόνου και γεφυρών άλατος. (96) Σε μία συγκεκριμένη τιμή pH για κάθε πρωτεΐνη (ισοηλεκτρικό σημείο pI) τα θετικά φορτία του μορίου αντισταθμίζουν τα αρνητικά. (97) (98) Όταν το pH είναι χαμηλότερο από το pI , τότε υπάρχει πλεόνασμα θετικών φορτίων στην επιφάνεια της πρωτεΐνης, ενώ όταν το pH είναι υψηλότερο από το pI τότε υπάρχει πλεόνασμα αρνητικών φορτίων στην επιφάνεια της πρωτεΐνης, γεγονός που μεταβάλλει τις αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνικών μορίων μεταξύ τους και με φορτισμένους παράγοντες κατακρήμνισης. Στις περισσότερες περιπτώσεις οι πρωτεΐνες κρυσταλλώνονται σε τιμή pH που προσεγγίζει το ισοηλεκτρικό σημείο (pI). Όσο μεγαλύτερη είναι η απόκλιση της τιμής pH από το pI τόσο περισσότερο αυξάνεται και η διαλυτότητα μίας πρωτεΐνης, ενώ ισχύει το αντίθετο καθώς η τιμή pH προσεγγίζει το pI . Η τιμή του pH πρέπει να παραμένει σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια της κρυστάλλωσης για αυτόν τον λόγο καθίσταται αναγκαία η χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων. (93) Τα ευρέως χρησιμοποιούμενα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιούνται στην κρυστάλλωση των πρωτεϊνών είναι:

- ♦ *HEPES*
- ♦ *MES*
- ♦ *PIPES*
- ♦ *TRIS* κ.λ.π.

Οι συνηθέστερες τιμές *pH* για την κρυστάλλωση πρωτεϊνών κυμαίνονται μεταξύ των τιμών 5 έως 8. (96) (97)

Άλατα: Τα άλατα διαταράσσουν τη σφαίρα ενυδάτωσης των πρωτεϊνικών μορίων. Ανταγωνίζονται με τα πρωτεϊνικά μόρια για τη δέσμευση των μορίων νερού αυξάνοντας έτσι τις ελκτικές αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Ενδεικτικά:

- ♦ Αλληλεπιδρούν με φορτισμένα αμινοξέα (*Arg, Lys, Asn, Gln*) στην επιφάνεια της πρωτεΐνης.
- ♦ Καθορίζουν την ιοντική ισχύ με αποτέλεσμα να επηρεάζουν τις μακρομοριακές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις.
- ♦ Σχηματίζουν μη πολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ υδρόφοβων αμινοξέων που εκτίθενται στον διαλύτη και των υδρόφοβων τμημάτων των οργανικών αλάτων.
- ♦ Συνήθως, μικρά άλατα χρησιμοποιούνται ως συμπράγοντες κρυστάλλωσης.
- ♦ Η διαλυτότητα μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης σε ένα υδατικό διάλυμα εξαρτάται από τη σύνθεση του διαλύτη (ιονική ισχύ, διηλεκτρική σταθερά) και από το *pH*. (93) (99)

Η κλίμακα *Hofmeister* είναι μια εμπειρική κλίμακα που ορίζει την ισχύ συγκεκριμένων ιόντων που κατακρημνίζουν τις πρωτεΐνες σε ένα υδατικό διάλυμα. Σε κάποιες περιπτώσεις τα ιόντα είναι απαραίτητα για τη διατήρηση της βιολογικής ενεργότητας των πρωτεϊνών και συνεισφέρουν στα δομικά χαρακτηριστικά του μορίου όπως στη κρυστάλλωση των πρωτεϊνικών κινασών. Σε άλλες περιπτώσεις, μεταλλικά ιόντα σταθεροποιούν τις διαδομοριακές αλληλεπιδράσεις του κρυστάλλου. (100)

Αμφιπαθή μόρια (Απορρυπαντικά): Πλέον χρησιμοποιούνται και για την κρυστάλλωση μη μεμβρανικών πρωτεϊνών με σκοπό την δημιουργία κρυστάλλων καλύτερης ποιότητας. Η υδρόφοβη περιοχή των απορρυπαντικών αλληλοεπιδρά με το υδρόφοβο μέρος της πρωτεΐνης ενώ η υδρόφιλη κεφαλή της διαλυτοποιεί όλο το μόριο. (101)

Ανταγωνιστές δεσμών υδρογόνου: Η ουρία, το φορμαμίδιο και τα άλατα γουανιδίνης, σε μεγάλες συγκεντρώσεις (μεγαλύτερες από 4 M) λειτουργούν ως χαοτροπικοί παράγοντες, δηλαδή ανταγωνίζονται τους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των μορίων νερού αλλά και των ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου της πρωτεΐνης.

Οργανικοί διαλύτες: Οι πιο διαδεδομένοι οργανικοί διαλύτες που χρησιμοποιούνται κατά την κρυστάλλωση πρωτεϊνών είναι:

- Αιθανόλη
- Αιθυλενογλυκόλη
- Ισοπροπανόλη
- 1,3-προπανοδιόλη
- 2-μέθυλο-2,4-πεντανοδιόλη

Οι οργανικοί διαλύτες δεσμεύουν τα μόρια του νερού και τα εκτρέπουν από την αλληλεπίδρασή τους με τα άτομα πρωτεΐνης, μειώνοντας έτσι τη χημική δραστηριότητα του νερού. Στην πράξη αυτό σημαίνει ότι «κλέβουν» μόρια νερού μέσω δεσμών υδρογόνου και μειώνουν την αποτελεσματικότητα της ηλεκτροστατικής διαλογής του διαλύτη. Μειώνουν επίσης τη διηλεκτρική σταθερά του μέσου, ενισχύοντας έτσι τις αλληλεπιδράσεις *Coulomb* μεταξύ των μορίων, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η έλξη ανάμεσα στα μακρομόρια, λειτουργώντας ως παράγοντες κατακρήμνισης. (89) (99) Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως επειδή ορισμένοι οργανικοί διαλύτες μπορούν να μετουσιώνουν πρωτεΐνες, μέσω αλληλοεπίδρασης με τις υδρόφοβες περιοχές τους, η χρήση τους πρέπει να γίνεται με προσοχή σε χαμηλές συγκεντρώσεις. (93)

Αυτά τα αποτελέσματα μειώνουν την ικανότητα του συστήματος να διαλυτοποιεί πλήρως τα μόρια της πρωτεΐνης και μειώνει την ηλεκτροστατική θωράκιση, η οποία με τη σειρά της αναγκάζει τα μόρια πρωτεΐνης να βγουν από το διάλυμα.

Πολυμερή καταβυθιστικά PEGs (Poly(ethylene glycols)):

Όπως τα άλατα, οι PEG ανταγωνίζονται τις διαλυμένες πρωτεΐνες για τη δέσμευση των μορίων νερού και όπως οι οργανικοί διαλύτες μειώνουν τις διηλεκτρικές ιδιότητες του μέσου.

Στην πράξη, ωστόσο, η δύναμή τους έγκειται στις επιδράσεις που ασκούν. Οι PEG καθώς και άλλα κατακρημνιστικά πολυμερή είναι μακριά, αδόμετα και εύκαμπτα

μόρια. Περιστρέφονται και θρυμματίζονται σε διάλυμα. Κατά συνέπεια, καταλαμβάνουν πολύ περισσότερο όγκο από ό,τι θα αναμενόταν σύμφωνα με τις μάζες τους.

Συγκέντρωση της πρωτεΐνης: Για πειραματικές δοκιμές χρησιμοποιείται συνήθως συγκέντρωση πρωτεΐνης 10-20 mg/mL. (102)

4.3 Μέθοδοι Κρυστάλλωσης

Η ανάπτυξη πρωτεϊνικών κρυστάλλων πραγματοποιείται με ορισμένες τεχνικές, σκοπός των οποίων είναι να φέρουν το πρωτεϊνικό διάλυμα σε κατάσταση υπερκορεσμού. Μερικές από αυτές είναι:

- ♦ Η τεχνική διάχυσης ατμών (*Vapour diffusion*)
- ♦ Η τεχνική άμεσης προσθήκης παράγοντα κατακρήμνισης (*Batch Method*)
- ♦ Η διάχυση μεταξύ ελεύθερων επιφανειών (*Free Interface diffusion*)
- ♦ Η διαπίδυση (*Dialysis*)

Η χρήση αυτών των τεχνικών κρυστάλλωσης έχει ως αποτέλεσμα την σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης του παράγοντα κατακρήμνισης που οδηγεί στη μείωση της διαλυτότητας της πρωτεΐνης και τελικά στην κρυστάλλωσή της. (91) (99) (103) (104)

i. Διάχυση ατμών

Η διάχυση ατμών αποτελεί την πιο διαδεδομένη μέθοδο κρυστάλλωσης. Η συγκεκριμένη τεχνική εκμεταλλεύεται την εξάτμιση και τη διάχυση του νερού, καθώς και άλλων πτητικών μορίων, μεταξύ μίας μικρής σταγόνας (0,5-10 μ L) και μιας δεξαμενής (βοθρίο). Η σταγόνα περιέχει πρωτεΐνη, και παράγοντα κατακρήμνισης σε ρυθμιστικό διάλυμα, ενώ το βοθρίο περιέχει το ίδιο διάλυμα απουσία πρωτεΐνης σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από την σταγόνα. Κατά τη διαδικασία, το σύστημα -η καθήμενη ή επικρεμάμενη σταγόνα και το βοθρίο- κλείνονται αεροστεγώς. Σε αυτές τις συνθήκες από το πρωτεϊνικό διάλυμα (σταγόνα) απομακρύνεται νερό, λόγω διάχυσης ατμών καθιστώντας το υπέρκορο, με αποτέλεσμα το σχηματισμό των κρυστάλλων.

Στην επικρεμάμενη σταγόνα, η σταγόνα τοποθετείται στην κάτω πλευρά μιας γυάλινης καλυπτρίδας που καλύπτει το βοθρίο και στεγανοποιείται με σιλικόνη. Στην περίπτωση της καθήμενης σταγόνας, αυτή τοποθετείται στην εσοχή μία πλαστικής ή γυάλινης επιφάνειας επάνω από την επιφάνεια του βοθρίου και το όλο σύστημα στεγανοποιείται με καλυπτρίδα ή κολλητική ταινία (Εικόνα 22). Οι αρχές κρυστάλλωσης και για τις δύο τεχνικές είναι οι ίδιες, παρατηρούνται ωστόσο κάποιες διαφορές όσον αφορά τον χρόνο εξισορρόπησης, τον όγκο της σταγόνας αλλά και τον τρόπο συλλογής κρυστάλλων.

Με την τεχνική της επικρεμάμενης σταγόνας, η συλλογή του κρυστάλλου είναι πιο εύκολη, ενώ αντίθετα, με την τεχνική της καθήμενης μειώνεται ο χρόνος εξισορρόπησης. (105) (106) (107)

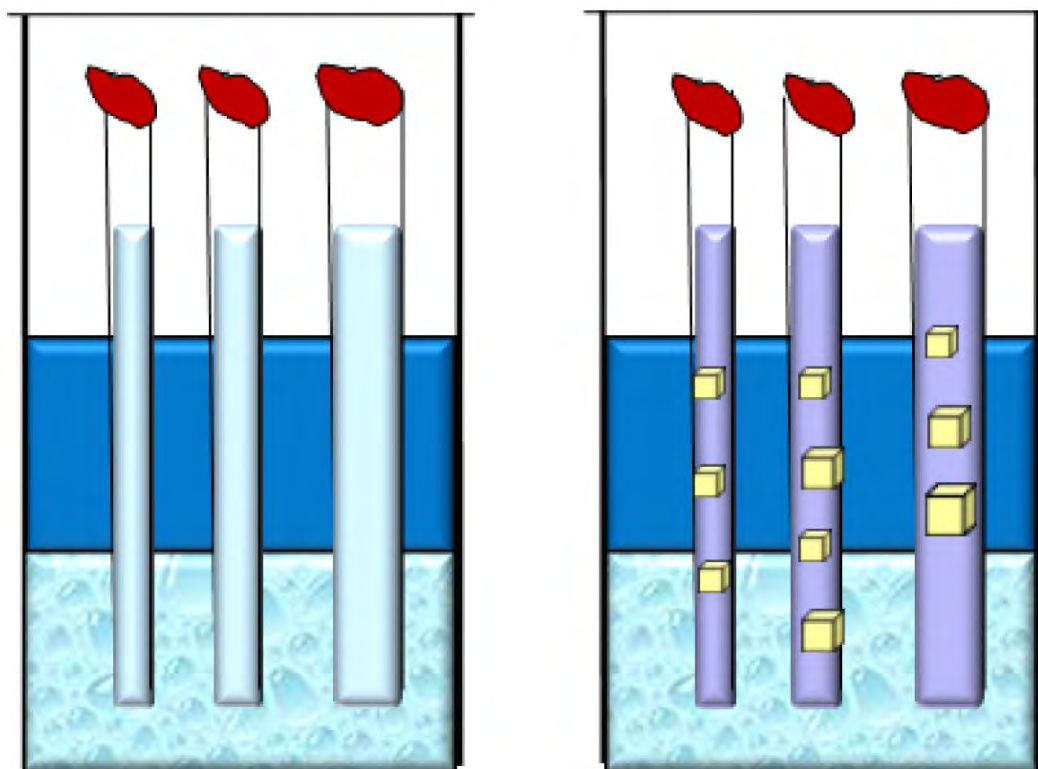


Εικόνα 22: Διάχυση ατμών: η μέθοδος της καθήμενης και της κρεμάμενης σταγόνας. Προσαρμοσμένη εικόνα (108)

ii. Τεχνική ολικής ανάμειξης

Η τεχνική ολικής ανάμειξης (*batch method*) είναι η πιο παλιά και πιο απλή τεχνική κρυστάλλωσης. Η τεχνική αυτή πραγματοποιείται με άμεση ανάμειξη ενός ακόρεστου διαλύματος πρωτεΐνης μαζί με το διάλυμα στο οποίο βρίσκεται ο παράγοντας κατακρήμνισης. Ως επακόλουθο μεταβάλλεται η διαλυτότητα της πρωτεΐνης και το πρωτεϊνικό διάλυμα καθίσταται απευθείας υπέρκορο δηλαδή επιτυγχάνονται συνθήκες στις οποίες μπορεί να κρυσταλλωθεί η πρωτεΐνη.

Η χρήση τριχοειδών σωληνίσκων καθώς και ο σχηματισμός μικροσταγόνων καλυμμένες από στρώμα ελαίου για την ανάμειξη των διαλυμάτων έδωσε λύση στο παλαιότερο πρόβλημα της τεχνικής αυτής που απαιτούσε μεγάλη ποσότητα πρωτεΐνης (Εικόνα 23). Με αυτόν τον τρόπο η ποσότητα της πρωτεΐνης που απαιτείται για την συγκεκριμένη τεχνική έγινε περίπου ίση με αυτή που απαιτείται στην διάχυση ατμών. Ωστόσο το γεγονός ότι δεν ενδείκνυται σε περιπτώσεις που είναι αναγκαία η αργή εξισορρόπηση καθώς και η ακαταλληλότητά της για τον έλεγχο πολλαπλών συνθηκών σε μία σταγόνα (όπως μπορεί να γίνει με την τεχνική της διαπύδησης και της διάχυσης ατμών) την καθιστούν μια τεχνική με μικρό φάσμα εφαρμογών. (109) (110) (111)



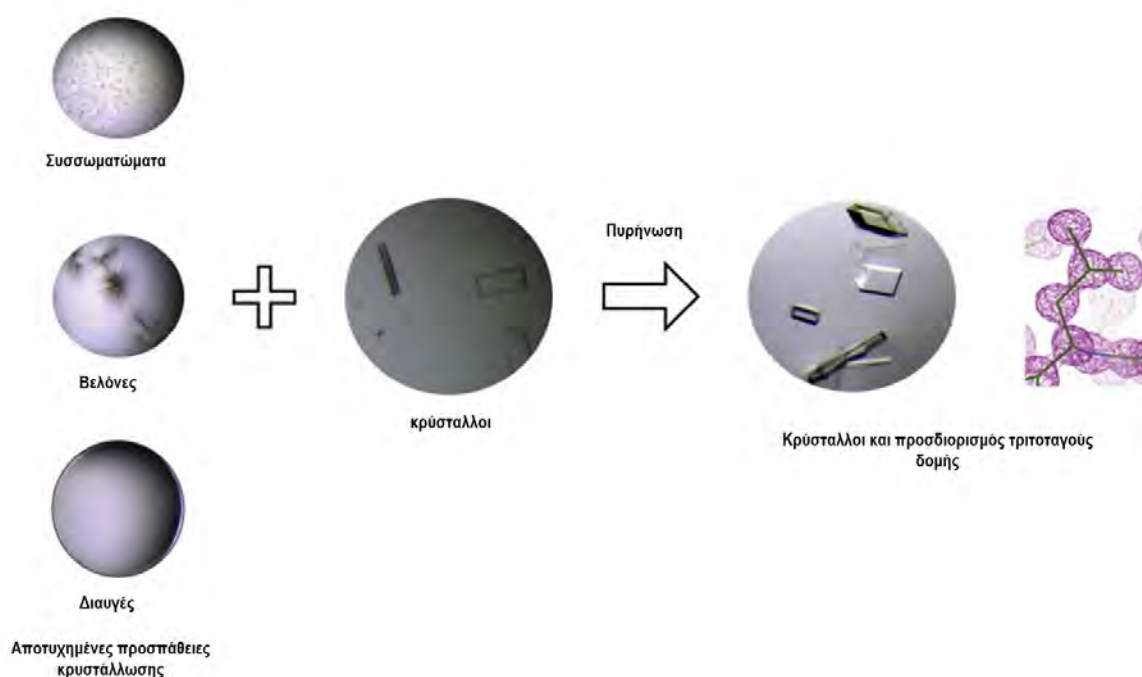
Εικόνα 23: Τεχνική ολικής ανάμειξης (112)

iii. Σπορά πυρήνων (seeding)

Κατά την τεχνική σποράς η διαδικασία σχηματισμού πυρήνων διαχωρίζεται από αυτή της ανάπτυξης των κρυστάλλων. Στόχος της είναι η βελτιστοποίηση της ποιότητας, του μεγέθους και της ταχύτητας ανάπτυξης των κρυστάλλων. Σε αυτή την τεχνική, πυρήνες κρυστάλλωσης που προέρχονται από προηγούμενες απόπειρες κρυστάλλωσης τοποθετούνται σε διάλυμα υπερκορεσμού (Εικόνα 24). Η τεχνική της σποράς ταξινομείται σε δύο κατηγορίες:

Μικροπυρήνωση (microseeding): Αποτελεί την πιο συνηθισμένη μέθοδο κατά την οποία οι κρύσταλλοι από προηγούμενη απόπειρα διαχωρίζονται από το μητρικό υγρό, καθαρίζονται, θρυμματίζονται και αραιώνονται στο διάλυμα κατακρήμνισης. Έπειτα, μέσω σκληρής τρίχα ή μικροπιπέτας μεταφέρονται σε σταγόνα που περιέχει την πρωτεΐνη και τον παράγοντα κατακρήμνισης. Απαραίτητη προϋπόθεση είναι η σταγόνα να έχει τέτοια συγκέντρωση ούτως ώστε να είναι αδύνατη η δημιουργία πυρήνων κρυστάλλωσης αλλά και ταυτόχρονα να είναι δυνατή η ανάπτυξη των κρυστάλλων.

Μακροπυρήνωση (macroseeding): Η μέθοδος αυτή πραγματοποιείται κατά παρόμοιο τρόπο με την προαναφερθείσα με την διαφορά ότι ως πυρήνες κρυστάλλωσης χρησιμοποιούνται μη θρυμματισμένοι μονοκρύσταλλοι με μέγεθος που ανέρχεται τα 5-50 μm . (113) (114)



Εικόνα 24: Σχηματική αναπαράσταση της τεχνικής της πυρήνωσης. (115)

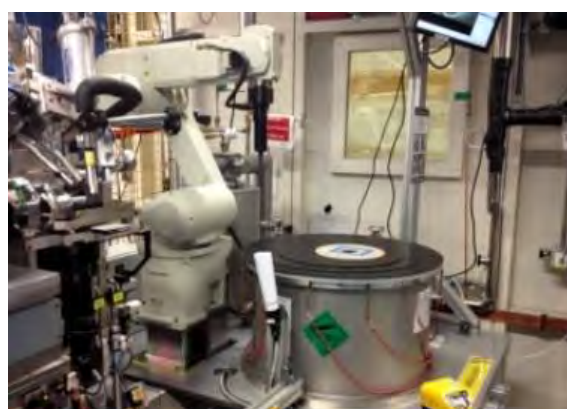
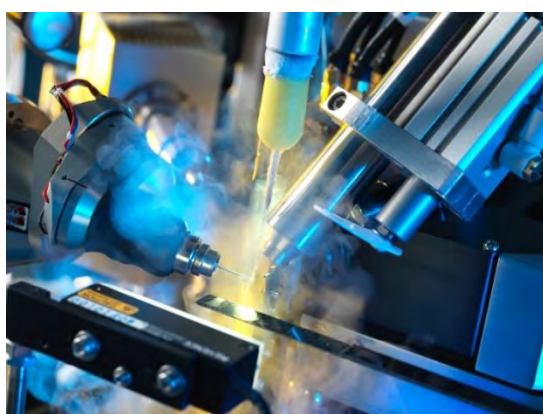
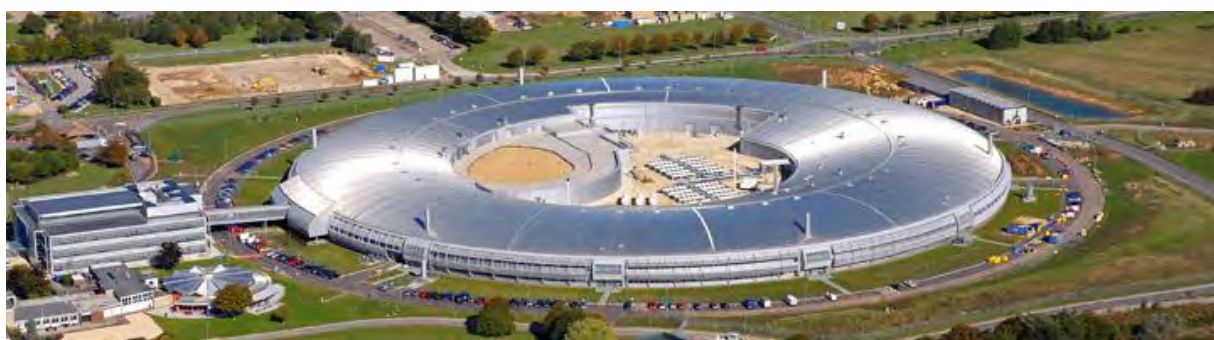
Κεφάλαιο 6^ο: Κρυσταλλογραφία ακτίνων X

Η ικανότητα καλοσχηματισμένων κρυστάλλων να περιθλούν ακτίνες X οδήγησε στην ανάπτυξη της κρυσταλλογραφίας ακτίνων X. Η πρόσπτωση των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων ακτίνων X σε ένα αντικείμενο όπως ο κρύσταλλος, έχει ως αποτέλεσμα την σκέδαση της ακτινοβολίας από τα ηλεκτρόνια των ατόμων που απαρτίζουν τον κρύσταλλο. Τα ηλεκτρόνια εξαναγκάζονται σε ταλάντωση με αποτέλεσμα να εκπέμπουν ακτινοβολία προς όλες τις διευθύνσεις. (116)

Ακτίνες X

Η μέση απόσταση ανάμεσα σε ομοιοπολικά συνδεδεμένα άτομα στα μόρια των πρωτεϊνών είναι περίπου 1,4 Å. Η χρήση ακτινοβολίας με μήκος κύματος παρόμοιο σε διαστάσεις με αυτή των παραπάνω αποστάσεων επιτρέπει ατομική ευκρίνεια. (117) (118) (119) Οι ακτίνες X ή ακτίνες *Röntgen* εντοπίζονται στο ηλεκτρομαγνητικό φάσμα μεταξύ της περιοχής των 10 nm- 10 pm (0,1-10 Å). Η πρόσπτωση δέσμης ηλεκτρονίων μεγάλης ταχύτητας στον πρωτεϊνικό κρύσταλλο έχει ως αποτέλεσμα την εξαναγκασμένη ταλάντωση πρωτονίων και ηλεκτρονίων και την εκπομπή ακτινοβολίας με ίδια συχνότητα με αυτή της προσπίπτουσας. Οι πηγές ακτίνων X μπορεί να είναι:

- ♦ Συγχροτρονικές πηγές: Είναι επιταχυντές σωματιδίων που αναγκάζουν τα σωματίδια να κινούνται με μεγάλες ταχύτητες. Όταν αυτά αλλάζουν κατεύθυνση εκπέμπουν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Τα ηλεκτρόνια κινούνται σε κυκλική τροχιά με την βοήθεια μαγνητών. Η υπεροχή των πηγών αυτών σε σχέση με τις συμβατικές πηγές είναι ότι παράγουν ακτινοβολία σημαντικά μεγαλύτερης έντασης και επιπλέον επιτρέπουν την ρύθμιση της διαμέτρου της δέσμης και του μήκους κύματος της ακτινοβολίας. (Εικόνα 25)
- ♦ Συμβατικές πηγές: Εκπέμπουν ακτινοβολία μέσω επιτάχυνσης ηλεκτρονίων και πρόσκρουσή τους σε μεταλλικό υλικό (χαλκός ή μολυβδαίνιο) (Εικόνα 26) (120) (121)



Εικόνα 25: Συγχροτρονική πηγή ακτίνων Χ. 103 station at the Diamond Light Source (Oxford, UK).



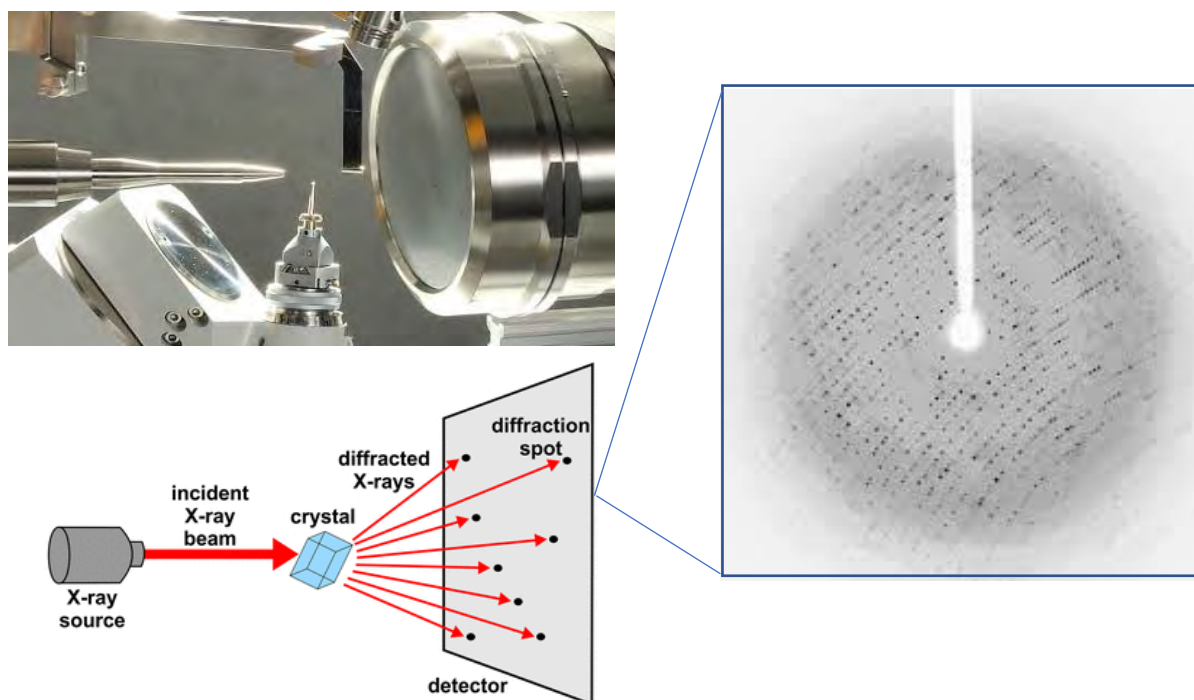
Εικόνα 26: Συμβατική πηγή ακτίνων Χ (Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών)

Ανάλυση δεδομένων

Η περίθλαση ακτίνων X οδηγεί στη συλλογή δεδομένων που αφορούν την μοναδιαία κυψελίδα του κρυστάλλου. Τα δεδομένα αυτά λαμβάνονται ως κατανομές έντασης ανακλάσεων και των κατευθύνσεων τους. Οι μετασχηματισμοί *Fourier* συμβάλλουν στη δημιουργία της τελική εικόνας του κρυσταλλωμένου μορίου. Ο μετασχηματισμός *Fourier* είναι μια μαθηματική σχέση που περιγράφει:

- ♦ Τα πλάτη των συντελεστών δομής που υπολογίζονται από τις εντάσεις των αμαυρώσεων στο περιθλασίγραμμα
- ♦ Τη σχετική κατεύθυνση που αντιστοιχεί σε κάθε περίθλαση (162).

Για να ανακτηθεί η πληροφορία των τριών διαστάσεων ο κρύσταλλος πρέπει να περιστρέφεται σταδιακά στον άξονα κάθετα από αυτόν των ακτίνων X και τα δεδομένα να συλλέγονται με σκοπό την δημιουργία ενός πλήρους συνόλου δεδομένων (*data set*). Ο ακτινοβολούμενος κρύσταλλος σταθεροποιείται πάνω σε ένα βρόχο (*loop*) είτε τοποθετείται στο εσωτερικό ενός τριχοειδούς σωλήνα (*capillary*), σταθερά μπροστά από τη δέσμη ακτινοβολίας. Με την βοήθεια ενός ανιχνευτή καταγράφεται το φάσμα περίθλασης που αποτυπώνεται σε ένα περιθλασίγραμμα ως αμαυρώσεις (*spots*) των οποίων η ένταση είναι ανάλογη με την ένταση των κυμάτων (Εικόνα 27). (86) (120)



Εικόνα 27: Σχηματικό διάγραμμα της περίθλασης ακτίνων-X από κρυστάλλους.

Το πρόβλημα της φάσης

Η σύγκλιση της περιθλώμενης ακτινοβολίας X, είναι αδύνατη, καθώς δεν υπάρχουν κατάλληλοι φακοί για αυτό το σκοπό. Ως εκ τούτου, είναι αδύνατη η συγκρότηση του ειδώλου που την περιθλά και επομένως, πειραματικά, δεν μπορεί να καταγραφεί η φάση των περιθλώμενων κυμάτων. Το πρόβλημα της φάσης επομένως, αποτελεί από τα σημαντικότερα ζητήματα του προσδιορισμού της κρυσταλλικής δομής μέσω κρυσταλλογραφίας ακτινών X. Η ακτινοβολία που περιθλάται κατά μία διεύθυνση (hkl) του αντίστροφου πλέγματος είναι το άθροισμα της ακτινοβολίας που περιθλάται από όλα τα άτομα (x,y,z) προς αυτή τη διεύθυνση. Αυτό το κύμα περιγράφεται από ένα διάνυσμα που καλείται παράγοντας δομής (*structure factor*, $F(hkl)$). Η διεύθυνση των περιθλώμενων ακτινών X και ως εκ τούτου και η συχνότητα της περιθλώμενης ακτινοβολίας, είναι δυνατό να προσδιοριστεί μέσω της θέσης πρόσπτωσής τους στον ανιχνευτή και χαρακτηρίζεται μέσω τριών ακέραιων αριθμών, γνωστοί ως δείκτες h, k, l . (86) Η ένταση περίθλασης $I(hkl)$ είναι ανάλογη του τετραγώνου του μέτρου του παράγοντα δομής F κάθε δέσμης που περιθλάται (hkl) και όχι του διανυσματικού μεγέθους στο οποίο περιέχεται και η φάση. Η αναλογία $I(hkl) \sim |F(hkl)|^2$ επιτρέπει τον υπολογισμό του εύρους του παράγοντα δομής, του περιθλώμενου κύματος. Το πρόβλημα ενέχεται στο γεγονός ότι στα κρυσταλλικά δεδομένα που συλλέγονται, μετρείται η απόλυτη τιμή του παράγοντα δομής και η συχνότητα, χωρίς να διατίθενται πληροφορίες για τις γωνίες φάσεως. Πιο συγκεκριμένα κατά την πρωτεϊνική κρυσταλλογραφία, λόγω του μεγέθους των μορίων (μεγάλου αριθμού ατόμων) που μελετώνται το πρόβλημα αυτό εντείνεται. Η επίλυση του προβλήματος της φάσης πραγματοποιείται με τις εξής μεθόδους:

- ♦ Ισόμορφη αντικατάσταση
 - a. Απλή ισόμορφη αντικατάσταση (*Single Isomorphous Replacement*)
 - b. Πολλαπλή ισόμορφη αντικατάσταση (*Multiple Isomorphous Replacement*)
- ♦ Ανώμαλη σκέδαση
 - a. Σε ένα μήκος κύματος (*Single-wavelength Anomalous Diffraction, SAD*)
 - b. Σε πολλαπλά μήκη κύματος (*Multi-wavelength Anomalous Diffraction, MAD*)
- ♦ Μοριακή αντικατάσταση. (122)

Χρησιμοποιούνται οι φάσεις που εξάγονται από τις θέσεις ατόμων της ίδιας ή μιας ομόλογης πρωτεΐνης με γνωστή τρισδιάστατη δομή. Ο προσδιορισμός των φάσεων

οδηγεί σε μία αρχική κατανομή ηλεκτρονιακής πυκνότητας, της οποίας οι φάσεις (θέσεις των ατόμων) βελτιώνονται με σκοπό να αντικατοπτρίζουν πιστά το μοντέλο της πρωτεΐνης που μελετάται.

Ο χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας είναι ένα από τα πρώτα αποτελέσματα που προκύπτουν από ένα πείραμα περίθλασης ακτινών Χ. Η κατανομή της πυκνότητας αντιστοιχίζεται σε μεμονωμένα άτομα και μόρια. Το ατομικό μοντέλο βελτιστοποιείται έπειτα από μεταβολές διάφορων παραμέτρων ούτως ώστε να επιτευχθεί η καλύτερη σχέση ανάμεσα στα παρατηρούμενα πλάτη (F_{obs}) και αυτά που υπολογίζονται από το μοντέλο (F_{calc}). (122)

Εξίσωση ηλεκτρονιακής πυκνότητας

Η ηλεκτρονιακή πυκνότητα (ρ) αντιστοιχεί στο αριθμό των ηλεκτρονίων ανά μονάδα όγκου. Εξαιτίας της περιοδικότητας του κρυστάλλου υπάρχει η δυνατότητα να περιγραφεί ως τρισδιάστατη περιοδική συνάρτηση και να εκφραστεί ως μία τριπλή σειρά *Fourier*:

Όπου:

- ♦ V είναι ο όγκος της στοιχειώδους κυψελίδας
- ♦ hkl οι δείκτες της ανακλώμενης ακτίνας από τα επίπεδα hkl
- ♦ F_{hkl} ο παράγοντας δομής στη διεύθυνση hkl . (123)

Δείκτες Miller h,k,l

Πρόκειται για ακέραιους αριθμούς που χρησιμοποιούνται για τη περιγραφή του κρυσταλλικού πλέγματος. Αναφέρονται σε κρυσταλλικά επίπεδα, οικογένειες επιπέδων, σε κρυσταλλογραφικές διευθύνσεις και σε οικογένειες διευθύνσεων. Ως οικογένεια αναφέρονται ισοδύναμες καταστάσεις όπως για παράδειγμα παράλληλες έδρες. Η σταθερά h αντιστοιχεί στον αριθμό των επιπέδων στον άξονα x ή αντίστοιχα, στον αριθμό των τμημάτων στα οποία τέμνεται η πλευρά a της στοιχειώδους κυψελίδας από μια οικογένεια επιπέδων. Οι σταθερές k και l , αντιστοιχούν στον αριθμό των επιπέδων στους άξονες y και z , αντίστοιχα.

Νόμος Bragg

Η πρόσπτωση μίας ακτίνας X σε ένα άτομο έχει ως αποτέλεσμα την σκέδαση και επανεκπομπή της ως σφαιρικό κύμα. Η μελέτη της περίθλασης ακτινών X από μονοκρυστάλλους στηρίζεται στη παρατηρούμενη συμβολή των ελαστικά σκεδαζόμενων κυμάτων καθώς η ανελαστική σκέδαση θεωρείτε “θόρυβος”. Η συμβολή ή μη των κυμάτων καθορίζεται από την πορεία που ακολουθούν οι ακτίνες X από την πηγή προς τον ανιχνευτή. Εάν τα ηλεκτρόνια που σκεδάζουν την ακτινοβολία απέχουν ακέραιο πολλαπλάσιο του μήκους κύματος, τότε η ακτινοβολία που σκεδάζεται έχει ίδια φάση και το πλάτος του κύματος που προκύπτει οφείλεται στο άθροισμα των πλατών του κύματος. Στην περίπτωση ωστόσο που απέχουν ημιακέραιο πολλαπλάσιο, λαμβάνει χώρα συμβολή σε αντίθετη φάση και αυτά αλληλοεξουδετερώνονται. Η μαθηματική σχέση μέσω της οποίας συνδέεται η γωνία σκέδασης με το διάστημα των δύο επιπέδων αποδίδεται από τον νόμο του Bragg. (123)

$$n\lambda = 2d \sin(\theta)$$

Όπου:

- n : ακέραιος αριθμός
- λ : μήκος κύματος ακτινοβολίας
- d : η απόσταση των παράλληλων επιπέδων του πλέγματος
- θ : η γωνία της περίθλασης

Η εξίσωση περιγράφει τις διευθύνσεις που θα παρατηρηθεί περίθλαση, γεγονός που καθορίζεται από τις διαστάσεις της στοιχειώδους κυψελίδας και δεν παρέχει πληροφορίες για το πλάτος ή τις φάσεις των κυμάτων. Από το άθροισμα όλων των κυμάτων κάθε ηλεκτρονίου στον κρύσταλλο προς μια διεύθυνση προκύπτει το πλάτος και η φάση του κύματος. (117)

Αναλυτική επεξήγηση παραγόντων των κρυσταλλογραφικών δεδομένων

Τα χαρακτηριστικά της στοιχειώδους κυψελίδας καθορίζουν την κατεύθυνση της περιθλώμενης ακτινοβολίας (συχνότητα), το είδος των ατόμων καθορίζει την ένταση (πλάτος) και η θέση (συντεταγμένες) των ατόμων καθορίζει την φάση. Την ποιότητα των μακρομοριακών δομών καθορίζει η ποιότητα των δεδομένων περίθλασης που συλλέγονται. Οι σημαντικότεροι παράμετροι που καθορίζουν την ποιότητα των δεδομένων είναι οι εξής:

- ♦ **Ευκρίνεια (resolution):** ορίζεται η ελάχιστη απόσταση ανάμεσα στα επίπεδα του κρυσταλλικού πλέγματος που έχουν μετρήσιμη περίθλαση ακτινών X, μετράται σε Å και αποτελεί μία από τις σημαντικότερες παραμέτρους κατά την αξιολόγηση της αξιοπιστίας μία μακρομοριακής δομής. Η ευκρίνεια καθορίζει την ελάχιστη απόσταση μεταξύ δομικών χαρακτηριστικών που διακρίνονται σε χάρτες ηλεκτρονικής πυκνότητας. Όσο μικρότερη είναι η απόσταση, τόσο μεγαλύτερη είναι η ευκρίνεια άρα και η λεπτομέρεια της κρυσταλλικής δομής που προκύπτει έπειτα από συλλογή δεδομένων. Η ευκρίνεια καθορίζεται από την ποιότητα του κρυστάλλου αλλά και την πηγή της ακτινοβολίας. Ο βαθμός της μπορεί να είναι:
 1. Χαμηλός (πληροφορίες που αφορούν το σχήμα του μακρομορίου)
 2. Ενδιάμεσος (δεν παρέχουν αξιόπιστες πληροφορίες για τις περιοχές που είναι ευκίνητες)
 3. Υψηλός
 4. Ατομικός
- ♦ **Λόγος σήματος/θορύβου ($I/\sigma(I)$):** Ο λόγος εντάσεων σήματος/θορύβου είναι άλλο ένα σημαντικό κριτήριο που καθορίζει τη ποιότητα των κρυσταλλογραφικών δεδομένων. Το όριο περίθλασης ορίζεται σε ανάλυση τέτοια ώστε ο λόγος των εντάσεων να είναι πλησίον του 2. Σε περίπτωση που η τιμή αυτή είναι μεγαλύτερη από το 2 σημαίνει εισαγωγή σφάλματος (γεγονός που μπορεί να οφείλεται στην πηγή των ακτινών X).
- ♦ **Πολλαπλότητα:** Εκφράζεται ως ο μέσος όρος του αριθμού των μετρήσεων για κάθε ξεχωριστή, συμμετρικά μοναδική ανάκλαση. Όσο αυξάνεται η πολλαπλότητα τόσο ακριβέστερη είναι και η τελική εκτίμηση για τον μέσο όρο της έντασης κάθε ανάκλασης. Είναι επιθυμητό η πολλαπλότητα να είναι μεγάλη, ωστόσο λόγω της ισχυρής ακτινοβολίας είναι πιθανόν το κρυσταλλικό πλέγμα να υφίσταται βλάβη (radiation damage) .

- ♦ R_{merge} : Οι ανακλάσεις μαζί με τις συμμετρικά ισοδύναμες τους, μετρούνται πολλές φορές, για αυτόν τον λόγο οι εντάσεις τους πρέπει να συγχωνευτούν αφού έχουν πρώτα εφαρμοστεί οι απαραίτητες διορθώσεις. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται *scaling* ή *merging* και δημιουργεί ένα σύνολο μοναδικών εντάσεων των ανακλάσεων συμπεριλαμβάνοντας το ποσοστό σφάλματος. Η παρατήρηση μίας ανάκλασης πολλές φορές δίνει την ευκαιρία απόρριψης ακραίων τιμών. Το ποσοστό των τιμών που απορρίπτονται πρέπει να είναι μικρότερο του 1%. Η ακρίβεια των μέσων όρων των εντάσεων εκτιμάται από τη έκταση των μεμονωμένων εντάσεων συμμετρικά ισοδύναμων ανακλάσεων, από τον παράγοντα R_{merge} . Η σχέση του δείκτη:
$$R_{merge} = \frac{\sum_h \sum_i (| < I_h > - I_{h,i} |)}{\sum_h \sum_i I_{h,i}}$$

Όπου:

1. h : Αριθμός μοναδικών ανακλάσεων
 2. i : Αριθμός συμμετρικά ισοδύναμων ανακλάσεων
- ♦ $CC_{1/2}$: Ο δείκτης $CC_{1/2}$ βασίζεται στην τυχαία διαίρεση του πλήρους συνόλου των αντανάκλασεων σε δύο ίσα μέρη και υπολογίζει τη συσχέτιση μεταξύ των εκτιμήσεων έντασης των δυο υποσυνόλων (δηλαδή, πόσο καλά το ένα ήμισυ των δεδομένων προβλέπει το άλλο μισό). Η τιμή 1 υποδηλώνει τέλεια ταύτιση. Τιμές $CC_{1/2}$ μεγαλύτερες από 0,3 υποδηλώνουν πως τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα είναι αποδεκτά και χρήσιμα στον προσδιορισμό της δομής ανεξάρτητα από τις τιμές των R_{merge} και $I/\sigma(I)$.
 - ♦ R_{factor} R_{free} : Δείκτες της ποιότητας της κρυσταλλικής δομής (γωνίες, μήκη δεσμών, στερεοχημικά χαρακτηριστικά) αποτελούν οι παράγοντες R_{factor} και R_{free} . Για να είναι αποδεκτή μια λύση (φάσεις) ενός συνόλου δεδομένων περίθλασης θα πρέπει να χαρακτηρίζονται από μία τιμή R_{factor} μικρότερη από 40-50%. Οι συντελεστές R εκφράζονται ως ποσοστά και μετρούν την απόκλιση ανάμεσα στους πειραματικούς (F_{obs}) και τους υπολογισμένους (F_{calc}) συντελεστές δομής. Δομές πρωτεϊνών με τιμές R μικρότερες του 20% θεωρούνται αξιόπιστες. Ο παράγοντας R_{free} υπολογίζεται όπως και ο R_{factor} , ωστόσο μόνο για ~ 5-10% τυχαίων ανακλάσεων που δεν έχουν συμπεριληφθεί στον υπολογισμό του F_{obs} . Με αυτόν τον τρόπο όταν το μοντέλο της δομής περιλαμβάνει παραμέτρους που δεν αιτιολογούνται από πειραματικά δεδομένα ο R_{free} αυξάνεται και αντίστροφα. Η τιμή του R_{free} πρέπει να είναι μικρότερη από 7% του R_{factor} . Υψηλή τιμή του ή διαφορά μπορεί να προκύψει από την ύπαρξη σοβαρού ασυμφωνίας μεταξύ του μοντέλου και των κρυσταλλογραφικών δεδομένων. (122)

Υπολογισμός ηλεκτρονιακής πυκνότητας

Από την περίθλαση των ακτινών X από τα ηλεκτρόνια του κρυστάλλου λαμβάνεται ένα σετ εικόνων στον ηλεκτρονικό υπολογιστή που απεικονίζουν δυσδιάστατα πλέγματα αμαυρώσεων και περιλαμβάνουν τις εντάσεις μεμονωμένων ανακλάσεων. Η επεξεργασία των εικόνων περίθλασης και η μετατροπή αυτών σε μια λίστα δεικτών hkl με τις αντίστοιχες εντάσεις και τα σφάλματα των εντάσεων πραγματοποιείται με τη χρήση κατάλληλων υπολογιστικών προγραμμάτων. Οι εικόνες συνδυάζονται μεταξύ τους και οι ισοδύναμες ανακλάσεις συγχωνεύονται (*scaling*), έτσι προκύπτει ένα αρχείο (*mtz*) που περιέχει το σύνολο των μοναδικών ανακλάσεων του κρυστάλλου.

Ο χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας κατασκευάζεται μέσω μετασχηματισμού *Fourier*, χρησιμοποιώντας τα πλάτη του συνόλου των πειραματικών ανακλάσεων (F_{obs}) και τις φάσεις ενός πρωτεϊνικού μοντέλου (ϕ_{calc}). Ο χάρτης αυτός (F_{obs} , ϕ_{calc}), αντιπροσωπεύει την προσέγγιση της πραγματικής δομής ενώ η ακρίβειά του εξαρτάται απόλυτα από την ακρίβεια των φάσεων που έχουν χρησιμοποιηθεί. Ο χάρτης διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας ($F_{obs} - F_{calc}$, ϕ_{calc}) είναι ένα άλλο είδος χάρτη, που κατασκευάζεται από διαφορές που προκύπτουν ανάμεσα στους πειραματικούς παράγοντες δομής και στους παράγοντες δομής του μοντέλου. Σαν χάρτης απεικονίζει τις διαφορές μεταξύ της πραγματικής δομής σε σχέση με αυτή του μοντέλου ενώ χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη θετικής ηλεκτρονιακής πυκνότητας στα τμήματα της πραγματικής δομής, τα οποία απουσιάζουν από το μοντέλο και αντίστοιχα αρνητικής πυκνότητας για τα τμήματα τα οποία απουσιάζουν από την πραγματική δομή αλλά υπάρχουν στο υπό κατασκευή μοντέλο. Στη πρωτεϊνική κρυσταλλογραφία χρησιμοποιούνται οι χάρτες ($2F_{obs} - F_{calc}$, ϕ_{calc}) οι οποίοι προκύπτουν μετά την συγχώνευση των δύο προηγούμενων χαρτών. Απεικονίζουν το χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας που προσμοιάζει την μοριακή επιφάνεια του μοντέλου και υποδεικνύει τα χαρακτηριστικά εκείνα που χρειάζονται διορθώσεις. Η ποιότητα ενός χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας καθώς και οι πληροφορίες που μπορούν να αντληθούν επηρεάζεται σημαντικά από την ευκρίνεια των δεδομένων περίθλασης. (122)

Έλεγχος δομικού μοντέλου-Διάγραμμα Ramachandran

Αφού το δομικό μοντέλο βελτιστοποιηθεί, ελέγχεται με σκοπό να διασφαλιστεί πως τα αποτελέσματα έχουν ερμηνευθεί σωστά. Τα μόρια που συμμετέχουν σε συγκεκριμένα στερεοχημικά και γεωμετρικά χαρακτηριστικά όπως γωνίες και μήκη δεσμών είναι αναγκαίο να μην αποκλίνουν από συγκεκριμένα ενεργειακά επιτρεπτά όρια. Ο *N. G. Ramachandran*, διαπίστωσε πως πολλοί συνδυασμοί γωνιών ϕ και ψ δεν είναι δυνατοί λόγω στερεοχημικών παρεμποδίσεων (~75%). Από το ομώνυμο διάγραμμα προκύπτουν οι αποδεκτές τιμές γωνιών ϕ και ψ που μπορούν να τοποθετηθούν σε ένα σχήμα δύο διαστάσεων. Στο διάγραμμα που προκύπτει από ένα μοντέλο, πρέπει όλα τα κατάλοιπα αμινοξέων να εντοπίζονται σε επιτρεπτές περιοχές, ειδάλλως το μοντέλο πρέπει να επανεξεταστεί για κατάλοιπα που παρουσιάζουν λάθος στερεοχημεία. (122)

ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της εργασίας

Τα κουνούπια, κύριοι φορείς πολλαπλών παρασίτων και ιών, ευθύνονται για τη μετάδοση σοβαρών ασθενειών στον άνθρωπο όπως η ελονοσία, ο δάγκειος πυρετός, και ο πυρετός του Δυτικού Νείλου, γεγονός που τα καθιστά από τα πιο επικίνδυνα ζώα στον πλανήτη καθώς προκαλούν πάνω από ένα εκατομμύριο θανάτους ετησίως. Η τρέχουσα στρατηγική για τον έλεγχο τους περιλαμβάνει γενετικώς τροποποιημένα κουνούπια, εντομοκτόνα, δίκτυα, ελκυστικές παγίδες και απωθητικά. Καθώς, η χρήση των εντομοαπωθητικών αποτελεί έναν από τους πιο αποτελεσματικούς τρόπους περιορισμού της μετάδοσης των ασθενειών, το ενδιαφέρον επικεντρώνεται στην ανάπτυξη νέων απωθητικών με προηγμένες ιδιότητες σε σχέση με τα υπάρχοντα, ως προς τη διάρκεια δράσης, την ελάχιστη αποτελεσματική δόση, την αποτελεσματικότητα έναντι μιας μεγάλης ποικιλίας εντόμων, συμπεριλαμβανομένων των ανθεκτικών ή μη ευαίσθητων ειδών και την ασφάλεια.

Προς αυτή την κατεύθυνση, η διατριβή επικεντρώνεται στη δομική και βιοχημική μελέτη οσφρητικών πρωτεϊνών δέσμευσης οσμογόνων μορίων (OBPs) με σκοπό την ανακάλυψη νέων πιθανών εντομοαπωθητικών ή ελκυστικών ενώσεων με βάση τη δομή. Απαραίτητη προϋπόθεση για την υλοποίηση της συγκεκριμένης προσέγγισης είναι ο προσδιορισμός των τρισδιάστατων δομών των πρωτεϊνών πρόσδεσης οσμογόνων μορίων, δηλαδή των μοριακών στόχων, σε συνδυασμό με τον *in vitro* προσδιορισμό των χαρακτηριστικών πρόσδεσης μικρών μορίων και την *in vivo* μελέτη της δράσης τους με βιοδοκιμές συμπεριφοράς. Στο πλαίσιο της διατριβής μελετήθηκαν οι πρωτεΐνες δέσμευσης οσμογόνων μορίων του ανωφελή κώνωπα AgamOBP1, AgamOBP4 και AgamOBP5, καθώς και η πρωτεΐνη πρόσδεσης οσμών 1 του κουνουπιού *Ae. albopictus* (AealOBP1). Ειδικότερα προσδιορίστηκε η τριτοταγής δομή των πρωτεϊνών AgamOBP5 και AealOBP1 μέσω πρωτεϊνικής κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ. Πραγματοποιήθηκε έκφραση, απομόνωση, κρυστάλλωση και κρυσταλλογραφική μελέτη των πρωτεϊνών απουσία και παρουσία προσδέτη. Για την μελέτη της συγγένειας των πρωτεϊνών με ένα ευρύ φάσμα ενώσεων, πραγματοποιήθηκαν *in vitro* φθορισμομετρικές και θερμιδομετρικές μελέτες για την προσδιορισμό της εξειδίκευσης των στόχων και για την ανακάλυψη νέων προσδετών, ενώ μέσω πρωτεϊνικής κρυσταλλογραφίας προσδιορίστηκε ο τρόπος σύνδεσης επιλεγμένων ενώσεων με τους μοριακούς στόχους. Τέλος μέρος της

διδακτορικής διατριβής αποτέλεσαν *in vivo* μελέτες απόθησης επιλεγμένων ενώσεων και αιθέριων ελαίων με σκοπό την επικύρωση των *in vitro* αποτελεσμάτων.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1^ο: Αντιδραστήρια και εργαστηριακός εξοπλισμός

Πίνακας 4: Κατάλογος αντιδραστηρίων

Αντιδραστήρια

DNA ladder 1kb	<i>Invitrogen</i>
30% Acrylamide/Bis Solution 29:1	<i>Bio-Rad</i>
Acetic Acid	<i>Sigma</i>
Agar bacteriological	<i>Oxoid Ltd</i>
Agarose	<i>Sigma</i>
Alkaline Phosphatase (SAP)	<i>Roche</i>
Ammonium persulfate (APS)	<i>Bio-Rad</i>
Ampicillin Sodium Salt	<i>SERVA</i>
Bovine Serum Albumin (BSA)	<i>Sigma</i>
Bradford protein assay 5X	<i>Bio-Rad</i>
Carbenicillin	<i>SERVA</i>
Complete EDTA free protease inhibitor cocktail tablets	<i>Roche</i>
Coomassie Brilliant Blue R-250	<i>Fluka</i>
Ethanol Absolute	<i>Sigma</i>
Ethidium bromide	<i>Sigma</i>
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	<i>SERVA</i>
Glycerol	<i>SERVA</i>
Glycine for electrophoresis	<i>Sigma</i>
Guanidine hydrochloride	<i>SERVA</i>
Hydrochloric Acid	<i>Sigma</i>
Isopropyl β-D-1-thiogalacto-pyranoside (IPTG)	<i>SERVA</i>
Kanamycine	<i>Sigma</i>
L-Arginine	<i>SERVA</i>
L-Glutathione oxidized (GSSG)	<i>SERVA</i>
L-Glutathione reduced (GSH)	<i>SERVA</i>
Methanol	<i>Appllichem</i>
N-phenyl-1-naphthylamine (1-NPN)	<i>Sigma</i>

Πίνακας 5: Κατάλογος εργαστηριακού εξοπλισμού

Εργαστηριακός εξοπλισμός- Υλικά

eppendorf (1.7ml)	<i>CORNING</i>
falcon (15ml, 50ml)	<i>CORNING</i>
CrystalClear Sealing Tape (2 Inch wide)	<i>Hampton Research</i>
Disposable Serological Pipette sterile 10 mL, 5 mL, 2 mL	<i>CORNING</i>
Κυψελίδα χαλαζία	<i>Hellma Analytics</i>
96 well crystallization plates, sitting x 2 drops	<i>Douglas Instruments</i>
24 well crystallization plates, sitting – hanging	<i>Hampton Research</i>
Vivaspin centrifugal concentrators 10000 MWCO	<i>Sartorius</i>
Tips (0.1-10 µL, 10-200 µL, 200-1000 µL)	<i>Gilson</i>
Siliconized Glass Circle Cover Slides, 22 mm	<i>Hampton Research</i>
Mounted LithoLoops	<i>Molecular Dimensions</i>
Minisart filters 0.2 µm	<i>Sartorius</i>
Minisart filters 0.45 µm	<i>Sartorius</i>
Membrane dialysis tubing 10000 cutoff	<i>sigma</i>
GE Bayer Silicone Grease	<i>Jena Bioscience</i>
inoculation loops	<i>Life Sciences</i>
Test tubes 10ml	
Millex-GV Syringe Driven Filter Unit 0.22µm	<i>Millipore</i>
47mm Express Plus Membrane 0.22µm	<i>Millipore</i>
Κασέτα συμπίκνωσης Pellicon XL	<i>Millipore</i>
Gel drying frames extra cellophane sheets	<i>sigma</i>
Πιπέτες ακριβείας	<i>Gilson</i>
Πλαστικές κυψελίδες φωτομέτρου (1.6ml)	
96-well microplates PS, F-Bottom (chimney well) black	<i>Greiner Bio-One</i>
MRC 2-well crystallization plate	<i>Jena Bioscience</i>

Πίνακας 6: Κατάλογος οργάνων

Εργαστηριακός εξοπλισμός- Όργανα

Σύστημα αυτοματοποιημένης κρυστάλλωσης πρωτεϊνών Oryx Nano	<i>Douglas Instruments</i>
Σύστημα χρωματογραφίας Äkta purifier UPC-900 με συσκευή συλλογής κλασμάτων FRAC-900	<i>GE Healthcare</i>
Αναδεδυόμενος επωαστήρας ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας	<i>JFL 3033</i>
Αναδεδυόμενος επωαστήρας ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας	<i>Labtech</i>
Φυγόκεντρος K280R	<i>Centurion Scientific Ltd</i>
Φυγόκεντρος Kubota	<i>Kubota 7780</i>
Υπερφυγόκεντρος Optima LE-80K	<i>Beckman-Coulter</i>
Homogenizer	<i>Heidolph</i>
Συσκευή υπερήχων	
Πεχάμετρο	<i>MetrOhm</i>
Συσκευή PCR MiniCycler PTC-150	<i>MJ Research</i>
Dry bath incubator	<i>Kisker</i>
Συσκευή ηλεκτροφόρησης DNA Hoefer HE 33	<i>Amersham Biosciences</i>
Συσκευή ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών Mini-Protean 3 cell	<i>Biorad</i>
Συσκευή ήπιας ανάδευσης Super roller K.L.-600S	<i>Kisker</i>
Συσκευή ανάδευσης ZX3	<i>VELP Scientifica</i>
Περισταλτική αντλία	<i>Gilson</i>
Φασματοφωτόμετρο Novaspec II	<i>Pharmacia Biotech</i>
Θερμοστατούμενο φασματοφωτόμετρο Cary 100 Conc UV/Vis	<i>Varian</i>
Θερμοστατούμενο φθορισμόμετρο VarioScan UV/Vis	<i>Thermo Scientific</i>
Σύστημα κρυσταλλογραφίας ακτίνων X	<i>Oxford Diffraction</i>
DSC	

Πίνακας 7: Κατάλογος βακτηριακών στελεχών, πλασμιδιακών φορέων, ενζύμων και στηλών χρωματογραφίας

Βακτηριακά στελέχη

<i>E. coli</i> DH5α	<i>Takara</i>
<i>E.Coli</i> Origami B (DE3)	<i>Novagen</i>
<i>E.Coli</i> Origami 2 (DE3)	<i>Novagen</i>

Πλασμιδιακοί φορείς

pET-22b(+)	<i>Novagen</i>
------------	----------------

Ένζυμα

Benzonase Nuclease	<i>Sigma</i>
KapaTaq DNA polymerase	<i>KAPA Biosystems</i>
T4 DNA ligase	<i>New England Biosciences</i>
XhoI	<i>Takara</i>
NdeI	<i>Takara</i>

Στήλες χρωματογραφίας

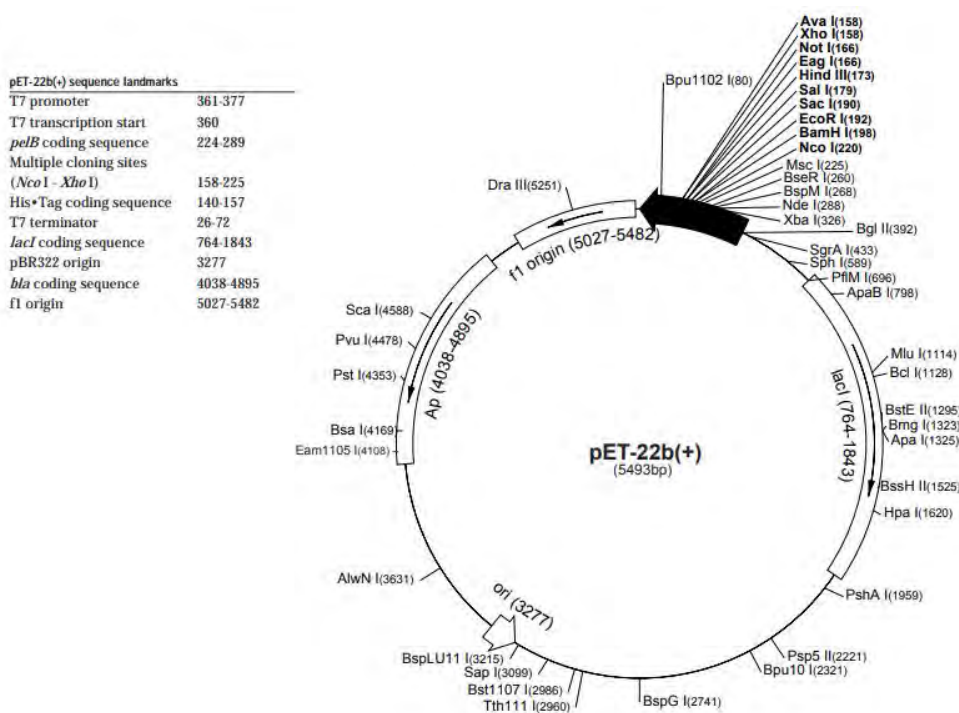
HiTrap Q FF 5ml	<i>GE Healthcare</i>
Resource Q 1ml	<i>GE Healthcare</i>
Resource Q 6ml	<i>GE Healthcare</i>
Resource S 1ml	<i>GE Healthcare</i>
Superdex 75	<i>GE Healthcare</i>

i. Πλασμιδιακός Φορέας pET-22b(+)

Ως πλασμίδια ορίζονται «*τμήματα γενετικού υλικού, μικρού μεγέθους, τα οποία εντοπίζονται σε προκαρυωτικά κύτταρα, προσδίδουν τας τους νέες ιδιότητες, όπως ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά*». (124) Πρόκειται, κυρίως, για δίκλιωνα κυκλικά μόρια DNA (έχουν παρατηρηθεί και γραμμικά) ανεξάρτητα από το γενετικό υλικό των κυττάρων, καθώς δε φέρουν γονίδια απαραίτητα για τη βασική λειτουργία του κυττάρου.

Τα πλασμίδια χρησιμοποιούνται ευρέως ως φορείς κλωνοποίησης, λόγω ορισμένων ιδιοτήτων που παρουσιάζουν: 1) μικρό μέγεθος (εύκολη απομόνωση και διαχείριση), 2) ανεξάρτητη έναρξη αντιγραφής (η παραγωγή του πλασμιδίου στα κύτταρα πραγματοποιείται ανεξάρτητα), 3) μεγάλος αριθμός αντιγράφων (ενίσχυση του DNA) και 4) δείκτες επιλογής όπως ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά, με αποτέλεσμα την εύκολη ανίχνευση και επιλογή των κυτταρικών κλώνων, οι οποίοι εμπεριέχουν τα συγκεκριμένα πλασμίδια). (125)

Για την κλωνοποίηση και την παραγωγή των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pET-22b(+) της εταιρείας Novagen, με μέγεθος 5493 bp και ανθεκτικότητα στην αμικικιλίνη (50-100μg/ml) (Εικόνα 28).



Εικόνα 28: Ο πλασμιδιακός φορέας pET-22b(+) (126)

ii. Βακτηριακά στελέχη E.coli

Το βακτηριακό στέλεχος *Escherichia coli* (*E. coli*) αποτελεί τον πιο διαδεδομένο ξενιστή για την κλωνοποίηση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, καθώς αναπτύσσεται εύκολα και γρήγορα, με χαμηλό κόστος. Βασικό του μειονέκτημα είναι η παραγωγή των περισσότερων ευκαρυωτικών πρωτεϊνών ως αδιάλυτα έγκλειστα σωματίδια (inclusion bodies), τα οποία απαιτούν περαιτέρω επεξεργασία. Παράλληλα, η παρουσία πολλαπλών δισουλφιδικών δεσμών, σπάνιων κωδικονίων και η κυτταροτοξικότητα, δε συνιστούν τη χρήση του *E. coli* ως ξενιστή σε αρκετές περιπτώσεις. (127)

E. coli DHa: Το στέλεχος DHa χρησιμοποιείται κατά το τελευταίο στάδιο της κλωνοποίησης, για την ενίσχυση και τον πολλαπλασιασμό του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου. Το συγκεκριμένο στέλεχος δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την επαγόμενη έκφραση πρωτεϊνών καθώς στερείται του απαραίτητου γονιδίου *lacI^q*. (128)

E. coli Origami B (DE3): Χαρακτηριστικό του συγκεκριμένου στελέχους είναι οι μεταλλάξεις στα γονίδια *trxB* και *gor*, τα οποία κωδικοποιούν αντίστοιχα την αναγωγή της γλουταθειόνης και της αναγωγή της θειορεδοξίνης, ένζυμα που επάγουν το σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών στο κυτταρόπλασμα. Παράλληλα, οι μεταλλάξεις προσδίδουν αντίσταση σε καναμυκίνη και τετρακυκλίνη αντίστοιχα, γεγονός που αποκλείει τη χρήση τους σε πλασμίδια επιλέξιμα μόνο με τα συγκεκριμένα αντιβιοτικά. Επίσης, το στέλεχος Origami B αποτελεί μετάλλαγμα *lacZY* του βακτηριακού στελέχους BL21, στο οποίο τα επίπεδα έκφρασης ελέγχονται μέσω ρύθμισης της συγκέντρωσης του επαγωγέα IPTG. Το DE3 υποδεικνύει ότι ο ξενιστής είναι ένα λυσογόνο λDE3, και επομένως φέρει ένα χρωμοσωμικό αντίγραφο του γονιδίου πολυμεράσης T7 RNA υπό τον έλεγχο του προαγωγέα *lacUV5*. Τα συγκεκριμένα στελέχη είναι κατάλληλα για την επαγόμενη από IPTG υπερέκφραση γονιδίων κλωνοποιημένων σε φορείς PET, για την παραγωγή πρωτεϊνών που απαιτούν το σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών. (129) (130)

iii. Ένζυμα περιορισμού

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα βακτηριακής προέλευσης, τα οποία αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες βάσεων στη διπλή έλικα του DNA και εν συνεχεία τεμαχίζουν το DNA σε αυτές τις θέσεις αναγνώρισης. Η φυσιολογική λειτουργία των περιοριστικών ενδονουκλεασών είναι η προστασία των βακτηρίων από παθογόνους οργανισμούς, κυρίως βακτηριοφάγους, διασπώντας το DNA τους. Το DNA του βακτηρίου προστατεύεται από τη δράση τους μεθυλιώνοντας το στις θέσεις αναγνώρισης των ενδονουκλεασών του με την βοήθεια ειδικών μεθυλτρανφερασών. Η τροποποίηση του DNA με την προσθήκη μεθυλομάδων εμποδίζει την πέψη του από τις ενδονουκλεάσες. Η περιγραφή του συστήματος περιοριστικών ενδονουκλεασών - ενζύμων τροποποίησης του DNA σαν αμυντικού μηχανισμού των βακτηρίων έγινε το 1965 από τον Werner Aber, εργασία για την οποία τιμήθηκε με το βραβείο Νόμπελ το 1978. (131)

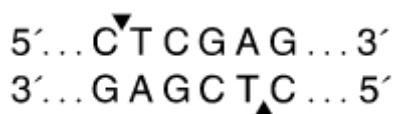
Υπάρχουν τέσσερις κατηγορίες περιοριστικών ενδονουκλεασών: τύποι I, II, III και IV. Όλοι οι τύποι ενζύμων αναγνωρίζουν συγκεκριμένες μικρές αλληλουχίες DNA και πραγματοποιούν την ενδονουκλεολυτική διάσπαση του DNA για να δώσουν συγκεκριμένα δίκλωνα θραύσματα. Διαφέρουν ως προς την ακολουθία αναγνώρισης, τη σύνθεση των υπομονάδων, τη θέση διάσπασης και τις απαιτήσεις συμπαράγοντα, όπως συνοψίζεται παρακάτω:

- ♦ Τα ένζυμα τύπου I: θρυμματίζουν το DNA σε σημεία απομακρυσμένα από την θέση αναγνώρισης (απόσταση έως και 1000 βάσεις), γεγονός που δεν τα καθιστά ιδιαίτερα εύχρηστα.
- ♦ Τα ένζυμα τύπου II: τεμαχίζουν εντός ή σε μικρές συγκεκριμένες αποστάσεις από την θέση αναγνώρισης. Τα περισσότερα απαιτούν μαγνήσιο, ενώ πρόκειται για ένζυμα απλής λειτουργίας (περιορισμού).
- ♦ Τα ένζυμα τύπου III: δρουν σε σημεία σε μικρή απόσταση από την θέση αναγνώρισης και απαιτούν ATP (χωρίς να το υδρολύουν). Η S-αδενοσυλ-L-μεθειονίνη διεγείρει την αντίδραση αλλά δεν απαιτείται.
- ♦ Τα ένζυμα τύπου IV στοχεύουν μεθυλιωμένο DNA. (132)

NdeI: ένζυμο περιορισμού τύπου II, το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως στην κλωνοποίηση γονιδίων καθώς το θραύσμα περιέχει το κωδικόνιο έναρξης ATG. Το *NdeI* δημιουργεί μόνο μια προεξοχή δύο βάσεων, επομένως τα δημιουργούμενα θραύσματα παρουσιάζουν χαμηλότερη θερμοκρασία τήξης σε σύγκριση με αυτά που παράγονται από άλλα περιοριστικά ένζυμα που δημιουργούν μια προεξοχή τεσσάρων βάσεων. Η σύνδεση των συμπληρωματικών άκρων που δημιουργούνται από το *NdeI* εκτελείται καλύτερα με υψηλότερη συγκέντρωση λιγάνης, είτε σε θερμοκρασία δωματίου, 14-16°C, είτε σε 4°C. (133)



XhoI: περιοριστική ενδονουκλεάση, η οποία έχει καθαριστεί από ένα στέλεχος *E. coli* που φέρει το γονίδιο *XhoI* από το *Xanthomonas holcicola*. Η δραστηριότητα του εξασθενεί από τη μεθυλίωση του CpG (η μεθυλάση CG διασπά το CT5mCGAG πολύ αργά). (134)



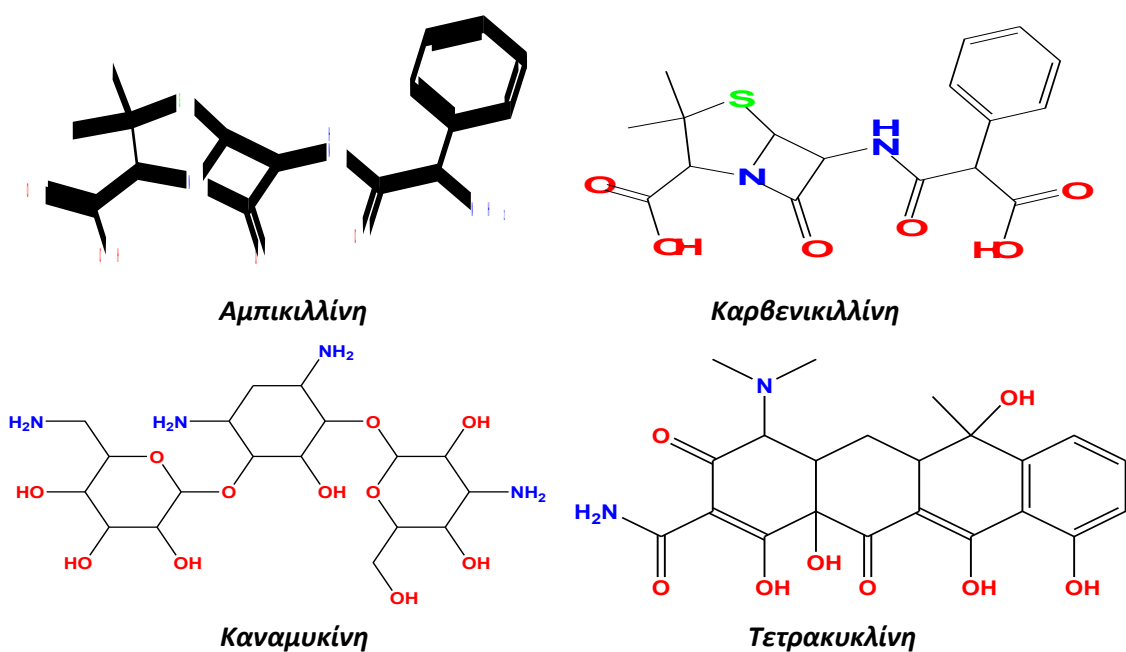
iv. Αντιβιοτικά

Ως αντιβιοτικά ορίζονται «χημικοί παράγοντες, οι οποίοι συντίθενται από έναν οργανισμό (π.χ *Streptomyces*) και έχουν επιβλαβείς επιπτώσεις για άλλους οργανισμούς». Δρουν αναστέλλοντας την έναρξη ή την επιμήκυνση της πρωτεϊνοσύνθεσης, παρεμποδίζοντας την σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος ή των νουκλεϊκών οξέων ή καταστρέφοντας τη κυτταρική μεμβράνη. Η εφαρμογή τους στις καλλιέργειες έχουν διττό ρόλο, καθώς χρησιμοποιούνται αρχικά για την αποφυγή επιμόλυνσης των καλλιεργειών αλλά παράλληλα και για την επιλογή των κυττάρων, τα οποία φέρουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο που προσφέρει αντίσταση στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό. (125)

Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία για την απομόνωση των πρωτεϊνών είναι τα εξής:

- ♦ Αμπικιλλίνη: Ανήκει στη κατηγορία των β-λακταμών και δρα παρεμποδίζοντας τη βιοσύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος. Ο τρόπος δράσης των συγκεκριμένων αντιβιοτικών περιλαμβάνει δυο στάδια. Κατά το αρχικό στάδιο, η δραστική ουσία συνδέεται με πρωτογενείς υποδοχείς που ονομάζονται πρωτεΐνες δέσμευσης πενικιλίνης (PBPs), αναστέλλοντας τη δράση τους. Κατά τη δεύτερη φάση, το σύμπλοκο υποδοχέα- αντιβιοτικού, επηρεάζει τη σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης, βασικού συστατικού του κυτταρικού τοιχώματος. (135)
- ♦ Καρβενικιλλίνη: ανήκει στην οικογένεια των πενικιλινών και χρησιμοποιείται έναντι των βακτηριακών στελεχών *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus* και *Escherichia coli*. Παρουσιάζει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα έναντι των Gram αρνητικών βακτηρίων και περιορισμένη για τα κατά Gram θετικά. (136) (137)
- ♦ Καναμυκίνη: Ανήκει στην οικογένεια των αμινογλυκοσιδών. Πρόκειται για υδατοδιαλυτούς πολυκατιονικούς ψεύδο-ολιγοσακχαρίτες, οι οποίοι επηρεάζουν τη διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης. Ειδικότερα, η σύνδεσή του στην υπομονάδα 30S του ριβοσώματος παρεμποδίζει την ομαλή ευθυγράμμιση με το mRNA, με αποτέλεσμα την εσφαλμένη ανάγνωση και τοποθέτηση των αμινοξέων στο πεπτίδιο, επομένως την παραγωγή μη λειτουργικών πεπτιδικών αλυσίδων. (138)
- ♦ Τετρακυκλίνη: Οι τετρακυκλίνες ανακαλύφθηκαν τη δεκαετία του 1940 και χρησιμοποιούνται έναντι ενός ευρέος φάσματος μικροοργανισμών συμπεριλαμβανομένων των θετικών και αρνητικών κατά gram βακτηρίων, των χλαμυδίων, των μυκοπλάσμάτων, και των πρωτοζωικών παρασίτων. Οι

τετρακυκλίνες αναστέλλουν τη σύνθεση βακτηριακών πρωτεϊνών εμποδίζοντας τη σύνδεση του αμινοακυλ-tRNA με το βακτηριακό ριβόσωμα. (139)



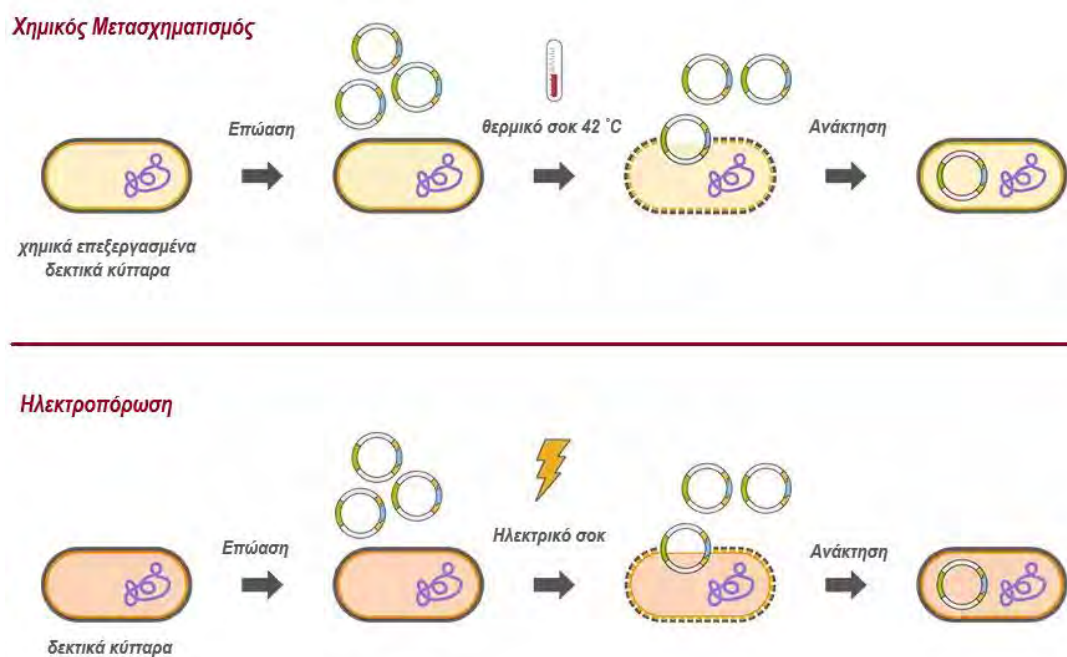
Εικόνα 29: Η δομή των τεσσάρων αντιβιοτικών. (48)

Κεφάλαιο 2^ο: Υπερέκφραση και απομόνωση της *AgamOBP5*

2.1 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων *E. coli Origami B (DE3)*

Ο όρος «γενετικός μετασχηματισμός» χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1928 από τον Άγγλο ιατρό Frederick Griffith κατά τα πειράματά του με τα βακτηριακά στελέχη του πνευμονιόκοκκου (*Diplococcus pneumoniae*). (140) Στη σύγχρονη μοριακή βιολογία, ως μετασχηματισμός ορίζεται η εισαγωγή ανασυνδυασμένων μορίων DNA σε δεκτικά κύτταρα- ξενιστές, προσδίδοντάς τους νέα χαρακτηριστικά. Η οριζόντια μεταφορά γενετικού υλικού σε ένα κύτταρο πραγματοποιείται με τρεις διαφορετικούς τρόπους: με μετασχηματισμό, μεταγωγή και σύζευξη.

Ο τεχνητός μετασχηματισμός επιτυγχάνεται με δυο διαφορετικές μεθόδους: το χημικό μετασχηματισμό και την ηλεκτροπόρωση (Εικόνα 30). (141) Κατά τον χημικό μετασχηματισμό τα βακτηριακά κύτταρα επεξεργάζονται με χλωριούχο ασβέστιο κατά τη λογαριθμική φάση της ανάπτυξής τους ώστε να γίνουν δεκτικά στο πλασμίδιο. Μετά από μια σύντομη επώαση σε πάγο, ένα μείγμα δεκτικών βακτηριακών κυττάρων με ανασυνδυασμένα πλασμίδια, τοποθετείται στους 42 °C για 45 δευτερόλεπτα (θερμικό σοκ) και στη συνέχεια επανατοποθετείται σε πάγο. Η απότομη μεταβολή της θερμοκρασίας προκαλεί διαστολή των πόρων της κυτταρικής μεμβράνης, με αποτέλεσμα να καθίσταται διαπερατή και να επιτρέπει την είσοδο των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων. (142)



Εικόνα 30: Σχηματική αναπαράσταση των δύο τεχνικών μετασχηματισμού. Εικόνα προσαρμοσμένη (143)

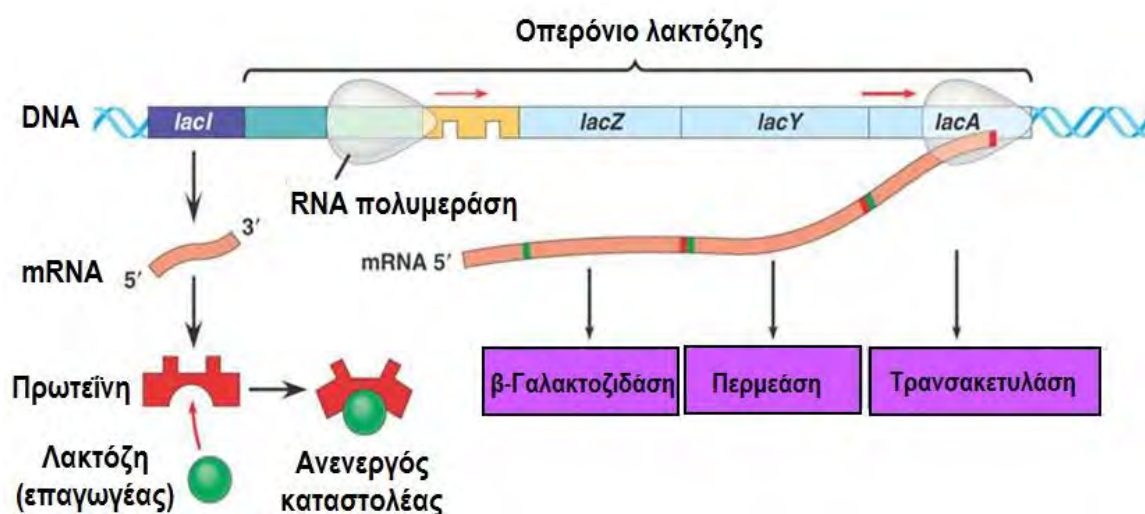
❖ Πειραματική διαδικασία

1. Ήπια ανάδευση μείγματος 1-5 μL πλασμιδίου ($\sim 100\text{ng}$) pET-22b(+)-AgamOBP5 (AgamOBP5 cDNA *Q876R6*(144)) με 20 μL δεκτικών κυττάρων *E.coli Origami B (DE3)*.
2. Επώαση κυττάρων σε πάγο για 30 λεπτά.
3. Μεταφορά κυττάρων στους 42°C για 45 δευτερόλεπτα (θερμικό σοκ).
4. Επανατοποθέτηση σε πάγο για 1-2 λεπτά.
5. Προσθήκη 250 μL θρεπτικού υλικού SOC medium, απουσία αντιβιοτικών προκειμένου να συντεθούν παράγοντες ανθεκτικότητας (π.χ. ένζυμο β -λακταμάση).
6. Επώαση στους 37°C υπό έντονη ανάδευση (200 rpm) για μία ώρα.
7. Επίστρωση 100 μL καλλιέργειας σε προ θερμασμένο στους 37°C τρυβλίο LB-άγαρ. Στο θρεπτικό μέσο έχουν προστεθεί τα κατάλληλα αντιβιοτικά (αντιβιοτικά στα οποία παρουσιάζει ανθεκτικότητα ο πλασμιδιακός φορέας και το βακτηριακό στέλεχος) για να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες επιλογής, καθώς παρουσία των συγκεκριμένων αντιβιοτικών θα επιβιώσουν και θα αναπτύξουν αποικίες μόνο τα μετασχηματισμένα κύτταρα. Το τρυβλίο περιείχε 50 $\mu\text{g/mL}$ Crib, 15 $\mu\text{g/mL}$ Kan και 12,5 $\mu\text{g/mL}$ Tet.
8. Επώαση τρυβλίου για 48 ώρες στους 37°C και αποθήκευσή του στους 4°C .

2.2 Υπερέκφραση της AgamOBP5 με επαγωγή

Οι πρωτοποριακές μελέτες των Jacob και Monod οδήγησαν στο μοντέλο του οπερονίου της λακτόζης για τη γονιδιακή ρύθμιση και στη θεωρία της αλλοστερικής ρύθμισης. Το οπερόνιο lac αποτελείται από το ρυθμιστικό γονίδιο, τον υποκινητή, το χειριστή και τρία δομικά γονίδια (Z,Y,A) ένα εκ των οποίων είναι και το γονίδιο της β -γαλακτοσιδάσης (lacZ). Απουσία λακτόζης, η πρωτεΐνη- καταστολέας (η οποία παράγεται από το ρυθμιστικό γονίδιο) προσδένεται στον χειριστή, παρεμποδίζοντας την δράση της RNA πολυμεράσης, επομένως και την έκφραση των γονιδίων (Εικόνα 31). Παρουσία λακτόζης πραγματοποιείται η έκφραση των γονιδίων (και επομένως ο μεταβολισμός της λακτόζης) καθώς η λακτόζη προσδένεται στον καταστολέα, παρεμποδίζοντας την πρόσδεσή του στην περιοχή του χειριστή. Επομένως, η λακτόζη λειτουργεί ως επαγωγέας. (145)

Για την έκφραση της AgamOBP5 ως επαγωγέας χρησιμοποιήθηκε η ένωση ισοπροπυλο-1-θειογαλακτοπυρανοζίτης (IPTG), η οποία παρουσιάζει σημαντικές δοκίμες ομοιότητες με την λακτόζη. Το IPTG δρα παρόμοια με την λακτόζη καθώς, προσδένεται στον καταστολέα, επάγοντας την μεταγραφή των δομικών γονιδίων. Η παρουσία ενός ατόμου θείου καθιστά τη συγκεκριμένη ένωση ως ένα συνεχή επαγωγέα, καθώς ο δεσμός που αναπτύσσει το θείο δεν υδρολύεται, διατηρώντας σταθερή τη συγκέντρωση του IPTG καθόλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.

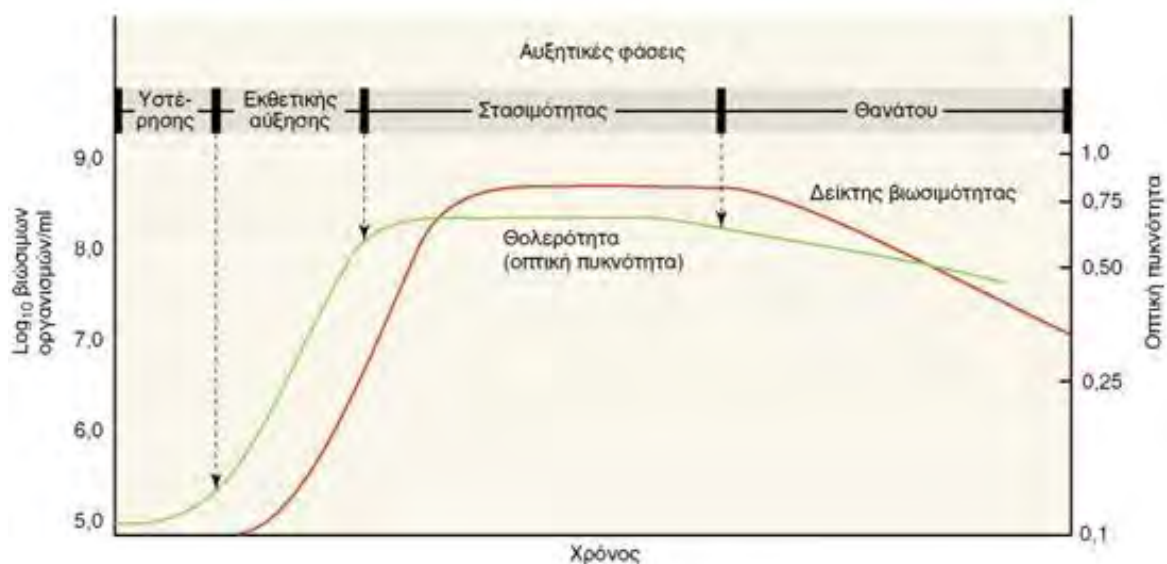


Εικόνα 31: Επαγωγή οπερονίου λακτόζης (146)

Κομβικά σημεία για την έκφραση της πρωτεΐνης σε μεγάλη κλίμακα είναι οι συνθήκες ανάπτυξης της καλλιέργειας (θερμοκρασία, pH, διάρκεια επώασης, παρουσία ή απουσία οξυγόνου), θρεπτικό υλικό (άνθρακας, άζωτο, μεταλλικά ιόντα), συγκέντρωση IPTG και τέλος θερμοκρασία επώασης (Εικόνα 32). Κατά τη διαδικασία καθορισμού των κατάλληλων συνθηκών έκφρασης -πριν την παραγωγή πρωτεΐνης σε μεγάλη κλίμακα- γίνεται διερεύνηση ως προς τον εντοπισμό της παραγόμενης πρωτεΐνης στο διαλυτό ή στο αδιάλυτο κλάσμα. Συγκεκριμένα, δοκιμάζονται διάφορες συνθήκες έκφρασης σε μικρή ποσότητα καλλιέργειας. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αλλά και με τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της πρωτεΐνης, σχεδιάζεται η πορεία έκφρασης και καθαρισμού της.

❖ Πειραματική διαδικασία

Αρχικά, πραγματοποιείται εμβολιασμός δύο αποστειρωμένων φιαλών των 250 mL, οι οποίες περιέχουν 50 mL θρεπτικού υλικού με τα κατάλληλα αντιβιοτικά (75 $\mu\text{g/mL}$ Amp, 15 $\mu\text{g/mL}$ Kan και 12,5 $\mu\text{g/mL}$ Tet). Για τον εμβολιασμό χρησιμοποιούνται μονές αποικίες των επιθυμητών κυττάρων από φρέσκο τρυβλίο. Οι προ- καλλιέργειες επωάζονται υπό ανάδευση σε 200 rpm στους 37°C για 16-18 ώρες. Στη συνέχεια, λαμβάνονται 20 mL από τις προ-καλλιέργειες για τον εμβολιασμό καλλιιεργειών (4 x 500 mL LB/αντιβιοτικών 75 $\mu\text{g/mL}$ Amp, 15 $\mu\text{g/mL}$ Kan και 12,5 $\mu\text{g/mL}$ Tet) για την παραγωγή της πρωτεΐνης σε μεγάλη κλίμακα. Οι καλλιέργειες επωάζονται υπό ανάδευση σε 200 rpm στους 37°C μέχρι η $\text{OD}_{600\text{nm}} \approx 0.6$ (τιμή που αντιστοιχεί στην εκθετική φάση ανάπτυξης των βακτηρίων), δηλαδή για 3,5-4 ώρες. Τέλος, προστίθεται 1mM IPTG και οι καλλιέργειες επωάζονται υπό ανάδευση σε 200 rpm για 4 ώρες στους 37°C.



Εικόνα 32: Τυπική καμπύλη αύξησης ενός βακτηριακού πληθυσμού. (125)

2.3 Συλλογή των κυττάρων

Επόμενο βήμα είναι η συλλογή των κυττάρων. Ανάλογα με το είδος της, μια πρωτεΐνη εντοπίζεται στο κυτταρικό ίζημα (ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες) ή στο υπερκείμενο (εξωκυτταρικές πρωτεΐνες). Οι καλλιέργειες φυγοκεντρώνονται σε 4.500g για 30 λεπτά στους 4°C. Η AgamOBP5 είναι μια ενδοκυτταρική πρωτεΐνη, επομένως εντοπίζεται στο κυτταρικό ίζημα, το οποίο συλλέγεται και αποθηκεύεται στους -20°C μετά τη φυγοκέντρωση.

2.4 Λύση των κυττάρων

Η πρωτεΐνη αποτελεί ενδοκυτταρικό συστατικό, επομένως απαιτείται λύση της κυτταρικής μεμβράνης για την απελευθέρωση και τη συλλογή της. Η λύση των κυτταρικών μεμβρανών αποτελεί καθοριστικό σημείο για την επιτυχία της διαδικασίας, καθώς μπορεί να επιφέρει σοβαρές επιπτώσεις στη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης καθώς και στην ποσότητά της. Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται ευρέως είναι:

1. *Ενζυμική λύση*: χρησιμοποιείται κυρίως σε περιπτώσεις όπου τα κύτταρα είναι σε εναίωρημα. Πραγματοποιείται κατάλληλων ενζύμων, όπως η λυσοζύμη. Συνοδεύεται από την παρουσία νουκλεασών (για αποικοδόμηση του DNA και του RNA μέσω υδρόλυσης φωσφοδιεστερικών δεσμών) για την μείωση τους ιξώδους του κυτταρικού λύματος.
2. *Μηχανική λύση με υπερήχους*: η συσκευή υπερήχων προκαλεί δονήσεις και έντονη ανάδευση, με αποτέλεσμα τη λύση της κυτταρικής μεμβράνης. Απαιτείται προσοχή στην ένταση της ανάδευσης και των δονήσεων, καθώς η υπερθέρμανση και ο σχηματισμός αφρού στο διάλυμα μπορεί να προκαλέσουν μετουσίωση της πρωτεΐνης.
3. *Λύση με αποδιατακτικά μέσα*: ως αποδιατακτικά μέσα χρησιμοποιούνται ήπια απορρυπαντικά ή οργανικοί διαλύτες, οι οποίοι προκαλούν λύση της μεμβράνης.
4. *Λύση με ωσμωτικό σοκ*: επώαζοντας τα κύτταρα σε υποτονικό διάλυμα, μέσω του φαινομένου της ώσμωσης, μόρια του διαλύτη διαπερνούν τη μεμβράνη προκαλώντας τη λύση του κυττάρου. (147) (148)

❖ Πειραματική διαδικασία

Αρχικά, ετοιμάζεται ρυθμιστικό διάλυμα λύσης το οποίο περιέχει:

- ♦ 10mM Tris-HCl pH 8.0 για ρύθμιση του pH
- ♦ 2mM EDTA
- ♦ 0.1% Triton X-100 ως αποδιατακτικός παράγοντας
- ♦ Αναστολείς πρωτεασών προς αποφυγή πρωτεόλυσης: 1mM PMSF και Complete EDTA free protease inhibitor cocktail (1X).

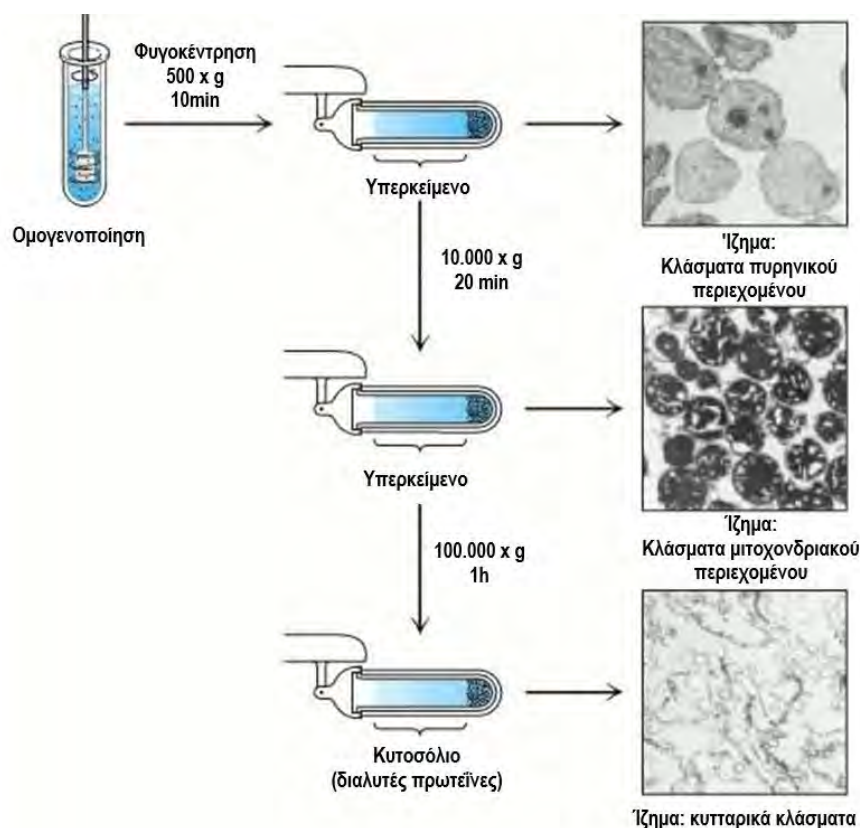
Το κυτταρικό ίζημα διαλυτοποιείται στο παραπάνω διάλυμα (20 mL Lysis Buffer / L καλλιέργειας). Ακολουθεί επώαση υπό ήπια ανάδευση στους 4°C για 15 λεπτά και στη συνέχεια λύση κυττάρων με υπερήχους (9 x 15sec με ενδιάμεσες παύσεις των 15 sec). Να σημειωθεί ότι η επεξεργασία του δείγματος με υπερήχους πραγματοποιείται σε χαμηλή θερμοκρασία για αποφυγή μετουσίωσης της πρωτεΐνης. Τέλος, προστίθεται 1

μL βενζονάση (DNA και RNA νουκλεάση) και το δείγμα αναδεύεται ήπια για 15 λεπτά στους 4°C, για μείωση του ιζώδους του.

2.5 Κλασμάτωση των υποκυττάρων σωματιδίων

Η κλασμάτωση των υποκυττάρων σωματιδίων αποτελεί μια διαδικασία κατά την οποία, διαφορετικές πρωτεΐνες διαχωρίζονται βάσει φυσικοχημικών χαρακτηριστικών, όπως η διαλυτότητα, το μέγεθος, το φορτίο κλπ. Πραγματοποιείται μέσω της διαφορικής φυγοκέντρωσης, όπου το δείγμα διαχωρίζεται σε ίζημα –στον πυθμένα του φυγοκεντρικού σωλήνα- και σε ένα ελαφρύτερο διαλυτό υπερκείμενο. Ακολουθεί εκ νέου φυγοκέντρωση του υπερκειμένου, το οποίο διαχωρίζεται επίσης σε ίζημα και υπερκείμενο (Εικόνα 33). Πυκνό δείγμα απαιτεί μικρότερη φυγόκεντρο δύναμη για την καταβύθιση του ιζήματος. Επομένως, όσο πιο αραιό είναι το δείγμα, τόσο μεγαλύτερη δύναμη απαιτείται. Η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος εντοπίζεται στο ίζημα –με τη μορφή έγκλειστων σωματιδίων- είτε στο υπερκείμενο. (124)

Στην παρούσα περίπτωση η AgamOBP5 εντοπίζεται στο ίζημα με τη μορφή έγκλειστων σωματιδίων. Επομένως το δείγμα χρειάζεται ειδική επεξεργασία.



Εικόνα 33: Διαδικασία κλασμάτωσης υποκυττάρων σωματιδίων. Εικόνα προσαρμοσμένη (124)

2.5.1 Επεξεργασία έγκλειστων σωματιδίων

Τα βακτηριακά συστήματα έκφρασης έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για την παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Δυστυχώς, οι πρωτεΐνες που είναι εκφρασμένες σε βακτήρια είναι συχνά δύσκολο να απομονωθούν ως διαλυτά κλάσματα, εξαιτίας της τάσης τους να καθιζάνουν μέσα στο κύτταρο, σχηματίζοντας πυκνά, άμορφα και αδιάλυτα συσσωματώματα, τα οποία ονομάζονται σωματίδια εγκλεισμού. Η μη σωστή αναδίπλωση της πρωτεΐνης στα έγκλειστα σωματίδια προκαλεί έλλειψη λειτουργικότητά της. Για την απομόνωση μιας βιολογικά ενεργής πρωτεΐνης απαιτείται επιπλέον διεργασία ώστε η πρωτεΐνη να αποκτήσει τη σωστά αναδιπλωμένη τριτοταγή δομή της.

Τα έγκλειστα σωματίδια σχηματίζονται κυρίως στο κυτταρόπλασμα των προκαρυωτικών κυττάρων λόγω υπερέκφρασης ετερόλογων πρωτεϊνών. Σε υψηλό επίπεδο έκφρασης, τα σώματα εγκλεισμού μπορεί να καταλαμβάνουν περίπου το 40-50% των συνολικών κυτταρικών πρωτεϊνών. Ο σχηματισμός τους εξαρτάται επίσης από τις ιδιότητες της συγκεκριμένης πρωτεΐνης αλλά και τις συνθήκες ανάπτυξης του ξενιστή. Λόγω της υψηλής ειδικής πυκνότητάς τους, τα έγκλειστα σώματα μπορούν εύκολα να διαχωριστούν από το κυτταρόλυμα με φυγοκέντρωση σε χαμηλή φυγοκεντρική δύναμη (g) μετά από κυτταρική λύση. Επιπλέον, τα σωματίδια εγκλεισμού δεν επηρεάζονται από τη δράση των πρωτεασών, με αποτέλεσμα οι πρωτεΐνες να προστατεύονται σε μεγάλο βαθμό από την πρωτεολυτική αποικοδόμηση λόγω της δράσης των ενζύμων του κυττάρου ξενιστή. Σε αρκετές περιπτώσεις το προϊόν έκφρασης είναι τοξικό για το κύτταρο ξενιστή, και ο σχηματισμός σωματίων εγκλεισμού σε ανενεργή μορφή αυξάνει τη βιωσιμότητα των κυττάρων και την απόδοση του προϊόντος. Ωστόσο, το κύριο πρόβλημα που προκύπτει από τον σχηματισμό σωματίων εγκλεισμού είναι η απομόνωση από αυτά μιας σωστά αναδιπλωμένης και λειτουργικής πρωτεΐνης.

Απαραίτητο στάδιο είναι ο καθαρισμός των έγκλειστων σωματίων από τα κυτταρικά συστατικά όπως το DNA, τα λιπίδια και οι διαλυτές πρωτεΐνες, καθώς παρεμβαίνουν στη σωστή αναδίπλωση της πρωτεΐνης. Παράλληλα, απομακρύνονται οι πρωτεάσες προφυλάσσοντας την πρωτεΐνη από πρωτεολυτική αποικοδόμηση κατά τα επόμενα στάδια απομόνωσης. Η έκπλυση των σωματίων εγκλεισμού είναι απαραίτητο όχι μόνο για τη σωστή αναδίπλωση αλλά και για την αύξηση της σταθερότητας και της καθαρότητας της πρωτεΐνης. Εάν Για την έκπλυση τους χρησιμοποιούνται ήπιοι

χαοτροπικοί παράγοντες ή απορρυπαντικά και ακολουθεί φυγοκέντρωση του δείγματος. (149)

❖ Πειραματική διαδικασία

Κατά την έκφραση της AgamOBP5 παρατηρήθηκε η δημιουργία έγκλειστων σωματίων. Όπως προαναφέρθηκε, απαιτείται έκπλυση των σωματίων με απορρυπαντικό και στη συνέχεια φυγοκέντρωση. Συγκεκριμένα παρασκευάστηκε ρυθμιστικό διάλυμα για την έκπλυση (Inclusion Bodies Wash Buffer: 50mM Tris-HCl pH 8.0, 2mM EDTA, 0.3M NaCl, 1mM PMSF), στο οποίο προστίθεται TritonX-100 σε τελική συγκέντρωση 0.1%. Η διαδικασία της έκπλυσης -ακολουθούμενη από φυγοκέντρωση σε 17.000g για μια ώρα στους 4°C- επαναλαμβάνεται δυο φορές παρουσία TritonX-100 και δυο φορές απουσία του απορρυπαντικού. Η διαλυτοποίηση του ιζήματος πραγματοποιείται με τη χρήση ομογενοποιητή. Τέλος, το δείγμα φυλάσσεται στους -20°C.

2.6 Αποδιάταξη των σωματίων εγκλεισμού και αναδίπλωση της πρωτεΐνης

Κατά το σχηματισμό των έγκλειστων σωματίων παρατηρούνται πολλαπλές λανθασμένες αναδιπλώσεις της πρωτεΐνης, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα μη λειτουργικές πρωτεΐνες. Απαιτείται, επομένως, αποδιάταξη και σωστή αναδίπλωση της πρωτεΐνης (Εικόνα 34). Η στρατηγική αναδίπλωσης που ακολουθείται διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην επιλογή του πρωτοκόλλου διαλυτοποίησης των σωματίων εγκλεισμού.

Ο πιο διαδεδομένος συνδυασμός είναι η υδροχλωρική γουανιδίνη και η ουρία σε υψηλές συγκεντρώσεις (6–8 M) μαζί με αναγωγικούς παράγοντες όπως διθειοθρεϊτόλη (DTT) ή β-μερκαπτοαιθανόλη, χρησιμοποιούνται ευρέως για τη διαλυτοποίηση σωματίων εγκλεισμού. Η υδροχλωρική γουανιδίνη αποτελεί ισχυρότερο χαοτροπικό παράγοντα από την ουρία, ο οποίος διαλυτοποιεί εξαιρετικά ανθεκτικά σωματίδια εγκλεισμού. Σε περιπτώσεις όπου χρησιμοποιείται ιονανταλλακτική χρωματογραφία στα στάδια καθορισμού, προτιμάται η χρήση ουρίας καθώς η γουανιδίνη σε μεγάλες συγκεντρώσεις παρεμποδίζει τη δέσμευση της πρωτεΐνης. Τα απορρυπαντικά - όπως η N-λαυροϋλσαρκοσίνη και το χλωριούχο κετυλοτριμεθυλαμμώνιο- χρησιμοποιούνται σε περιπτώσεις στις οποίες παρατηρείται ο σχηματισμός ολιγομερών της πρωτεΐνης. Η ισχυρή ηλεκτροστατική απώθηση του συμπλέγματος απορρυπαντικού-πρωτεΐνης εμποδίζει το σχηματισμό ολιγομερών γεγονός που οδηγεί σε αυξημένη απόδοση

αναδίπλωσης. Οι αναγωγικοί παράγοντες όπως το DTT, η διθειοερυθριτόλη (DTE), η γλουταθειόνη ή η β-μερκαπτοαιθανόλη ενισχύουν τη διαλυτοποίηση των σωμάτων εγκλεισμού (σε ορισμένες περιπτώσεις). Το EDTA χρησιμοποιείται ευρέως ως χηλικός παράγοντας αποτρέποντας την οξείδωση που προκαλούν ίχνη μεταλλικών ιόντων.

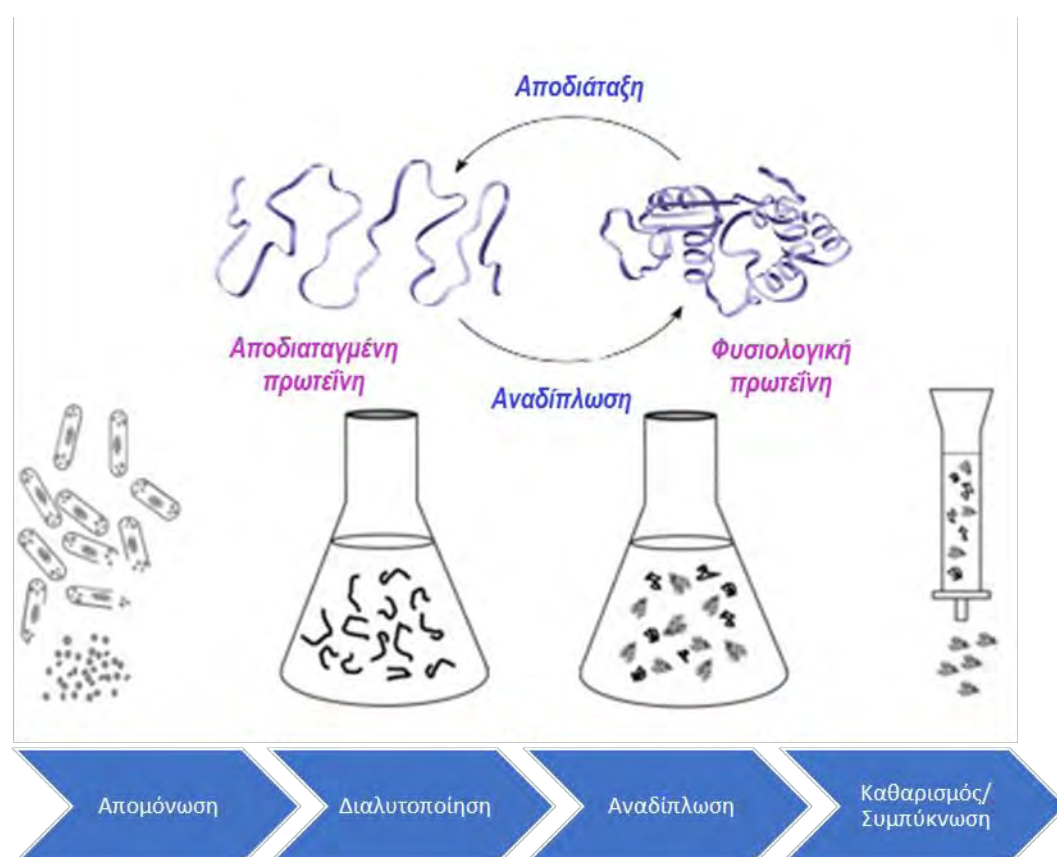
Για τη σωστή αναδίπλωση της πρωτεΐνης καθοριστικό ρόλο διαδραματίζει η συγκέντρωσή της, καθώς μπορεί να παρατηρηθούν συσσωματώματα της πρωτεΐνης. Η παρουσία μιας μικρής ποσότητας ενός «μολυντικού παράγοντα», όπως η κατεστραμμένη μορφή της ίδιας της πρωτεΐνης ή πρωτεΐνες του κυττάρου ξενιστή, μπορούν να αναπτύξουν με την πρωτεΐνη ιοντικές ή υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Σύμφωνα με έναν άλλο μηχανισμό, παρατηρείται ισορροπία μεταξύ των μη αναδιπλωμένων και των διπλωμένων πρωτεϊνικών μορίων στο δείγμα. Παράγοντες όπως υψηλή θερμοκρασία, ανακίνηση, επιφανειακή προσρόφηση και άλλες φυσικοχημικές καταπονήσεις, προάγουν το μερικό ξεδίπλωμα με αποτέλεσμα το σχηματισμό συσσωματωμάτων. Τέλος, η υψηλή συγκέντρωση της πρωτεΐνης είναι υπεύθυνη για τη δημιουργία ολιγομερών. Ωστόσο, τα αναστρέψιμα ολιγομερή διασπώνται πλήρως σε μονομερή κατά την αραίωση, δηλαδή τη μείωση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης. (149)

Μετά την επεξεργασία του δείγματος με τους αποδιατακτικούς και αναγωγικούς παράγοντες για τη μείωση μη-ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων και δισουλφιδικών δεσμών αντίστοιχα, απομακρύνεται το μέσο μετουσίωσης. Η αποτελεσματικότητα της αναδίπλωσης εξαρτάται από τον ανταγωνισμό μεταξύ σωστής αναδίπλωσης και συσσωμάτωσης. Όπως προαναφέρθηκε, για την αποφυγή συσσωματωμάτων χρησιμοποιείται χαμηλή συγκέντρωση πρωτεΐνης (10-100 $\mu\text{g/mL}$). Σε περίπτωση που η πρωτεΐνη περιέχει δισουλφιδικούς δεσμούς -όπως οι OBPs- προστίθεται ένα σύστημα οξειδοαναγωγής (1-3 mM ανηγμένη θειόλη σε αναλογία από 5:1 έως 1:1 οξειδωμένη θειόλη).

❖ Πειραματική διαδικασία

Τα σώματα εγκλεισμού αποδιατάσσονται με τη χρήση ομογενοποιητή σε 15 mL διαλύματος αποδιάταξης (Denaturation Buffer: 0.1M Tris-Acetate pH 8.5, 6 M GdnHCl, 2 mM EDTA, 80 mM GSH). Στη συνέχεια επωάζονται υπό ήπια ανάδευση για δυο ώρες στους 4°C. Ακολουθεί διαύγαση της αποδιαταγμένης πρωτεΐνης με φυγοκέντρηση σε 20000 g για 30 λεπτά στους 4°C. Προσδιορίζεται η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο υπερκείμενο του διαλύματος με τη μέθοδο Bradford για να

παρασκευαστεί το διάλυμα αναδίπλωσης της πρωτεΐνης (Refolding Buffer: 0.1M Tris-Acetate pH 8.5, 0.5M L-αργινίνη, και οξειδωμένης γλουταθειόνης GSSG σε συγκέντρωση που εξαρτάται από τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης. Στο διάλυμα αναδίπλωσης η πρωτεΐνη πρέπει να έχει τελική συγκέντρωση 100 $\mu\text{g/mL}$ και ο λόγος των συγκεντρώσεων ανηγμένης προς οξειδωμένης γλουταθειόνης να είναι ίσος με 4. Η αποδιατεταγμένη πρωτεΐνη προστίθεται στάγδην με προχοΐδα στο διάλυμα αναδίπλωσης υπό ήπια ανάδευση και παραμένει σε αυτό για 48-72 ώρες στους 4°C, ώστε να βελτιστοποιηθεί η διαδικασία της αναδίπλωσης.



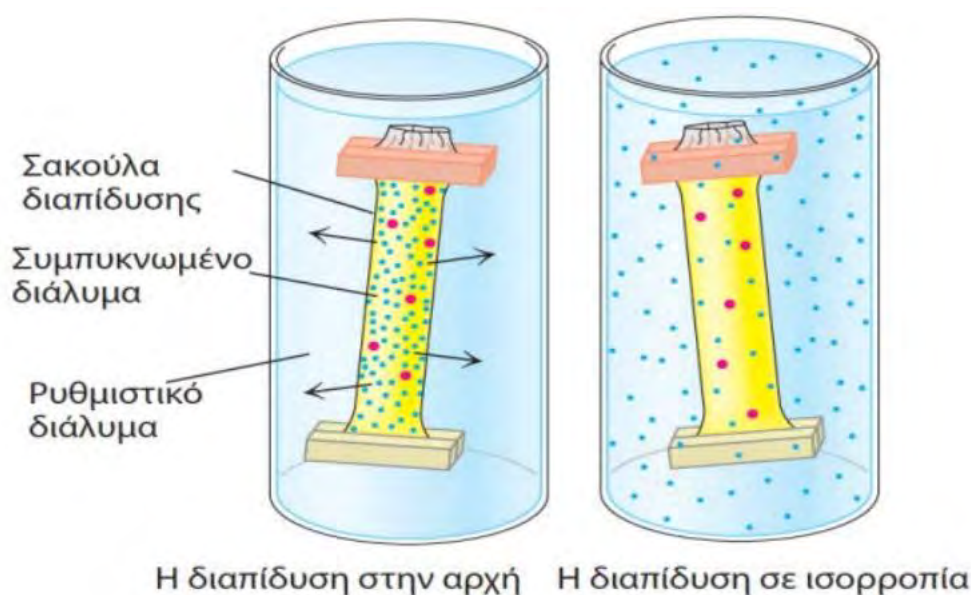
Εικόνα 34: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας αναδίπλωσης της πρωτεΐνης. Εικόνα προσαρμοσμένη (150)

2.7 Συμπύκνωση της πρωτεΐνης

Μετά τη διαδικασία της αναδίπλωσης, ακολουθεί διαύγαση του δείγματος μέσω φίλτρου διήθησης 0.22 μm (Millipore) και συμπύκνωση σε τελικό όγκο 30mL μέσω κασέτας συμπύκνωσης Pellicon XL Filter (Millipore) και τη βοήθεια περισταλτικής αντλίας στους 4°C.

2.8 Διαπίδυση της πρωτεΐνης

Με τη μέθοδο της διαπίδυσης επιτυγχάνεται απομάκρυνση μη επιθυμητών, μικρών μορίων από το πρωτεϊνικό δείγμα, μέσω μιας ημιπερατής μεμβράνης, όπως η πορώδης μεμβράνη κυτταρίνης (Εικόνα 35). Μόρια μικρότερα από τους πόρους της μεμβράνης, απομακρύνονται, ενώ τα μεγάλα μόρια –όπως οι πρωτεΐνες- συγκρατούνται εντός της μεμβράνης. Η συγκεκριμένη μέθοδος αποτελεί ιδανική επιλογή για τη απομάκρυνση άλατος από το διάλυμα, αλλά και για την εναλλαγή διαλύματος των πρωτεϊνών. (124)



Εικόνα 35: Η μέθοδος της διαπίδυσης (124)

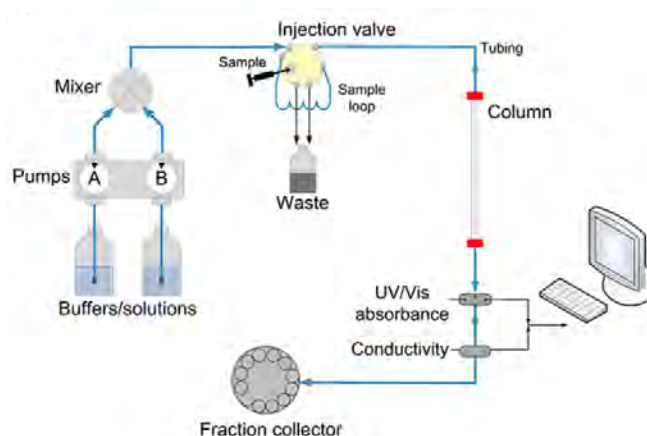
❖ Πειραματική διαδικασία

Η συμπυκνωμένη αναδιπλωμένη πρωτεΐνη τοποθετείται εντός μεμβράνης διαπίδυσης και τίθεται δύο φορές για διαπίδυση έναντι 1L διαλύματος Tris-HCl pH 8.0 στους 4°C για 6 και 18-20 ώρες αντίστοιχα.

2.9 Καθαρισμός της AgamOBP5 με ταχεία υγρή χρωματογραφία πρωτεϊνών FPLC

Η απομόνωση της πρωτεΐνης βασίζεται στη διαφορετική συγγένεια που παρουσιάζουν τα διάφορα συστατικά ενός διαλύματος για την κινητή και τη σταθερή, πορώδη, φάση της στήλης. Η κινητή φάση αποτελείται από το υγρό ρυθμιστικό διάλυμα ενώ η σταθερή φάση από μια ρητίνη σφαιριδίων τοποθετημένα μέσα σε μια κυλινδρική γυάλινη ή πλαστική στήλη. Το μέγεθος των πόρων, η φύση των σφαιριδίων, καθώς και οι παράγοντες που είναι συζευγμένοι στα σφαιρίδια, εξαρτώνται από τη χρωματογραφική τεχνική για την οποία προορίζεται.

Η ταχεία υγρή χρωματογραφία πρωτεϊνών (Fast Protein Liquid Chromatography; FPLC) είναι ένας τύπος υγρής χρωματογραφίας που χρησιμοποιείται για την απομόνωση πρωτεϊνών από ένα μίγμα. Η βασική αρχή της δεν διαφέρει από αυτή της απλής υγρής χρωματογραφίας συγγένειας, με τη διαφορά ότι το σύστημα είναι πιο αυτοματοποιημένο και τα διαλύματα περνούν μέσα από το σύστημα χρησιμοποιώντας αντλίες, οι οποίες μεταφέρουν υγρό μέσα στο σύστημα υπό υψηλή πίεση. Για την απομόνωση χρησιμοποιείται ένα διάλυμα εξισορρόπησης-έκπλυσης και ένα διάλυμα έκλουσης, τα οποία πριν χρησιμοποιηθούν για την απομόνωση φιλτράρονται υπό κενό με φίλτρο 0.45μm και απαερώνονται με χρήση υπερήχων. Τα διαλύματα εξισορρόπησης-έκπλυσης και έκλουσης τοποθετούνται στις αντίστοιχες αντλίες του συστήματος (ÄKTA purifier; GE Healthcare, Εικόνα 36). Η πορεία της χρωματογραφίας ελέγχεται από ηλεκτρονικό υπολογιστή εφοδιασμένο με κατάλληλο λογισμικό (Unicorn™).



Εικόνα 36: Απεικόνιση του συστήματος καθαρισμού πρωτεϊνών Äkta purifier UPC-900 του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών (151)

Η πορεία απομόνωσης της πρωτεΐνης AgamOBP5 περιλαμβάνει δύο στάδια χρωματογραφίες ιονανταλλαγής και ένα χρωματογραφίας μοριακής διήθησης.

2.9.1 Χρωματογραφία ιονανταλλαγής

Κατά τη χρωματογραφία κατιονανταλλαγής πραγματοποιείται διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση το φορτίο τους. Μια πρωτεΐνη θετικά φορτισμένη σε διάλυμα με pH μικρότερο του ισοηλεκτρικού της σημείου, μπορεί να δεσμευτεί σε στήλη η οποία φέρει κόκκους με ακινητοποιημένες ομάδες φορτισμένες αρνητικά (για παράδειγμα κατιονανταλλακτική ρητίνη S με ακινητοποιημένο μεθανοσουλφονικό οξύ). Οι υπόλοιπες πρωτεΐνες, οι οποίες φέρουν αρνητικό φορτίο, διαπερνούν τη στήλη χωρίς να δεσμεύονται σε αυτήν (Εικόνα 37).. Η προσδεμένη πρωτεΐνη εκλύεται με σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης άλατος στο διάλυμα έκλυσης που περιέχει NaCl. Το συγκεκριμένο γεγονός, οφείλεται στον συναγωνισμό των ιόντων νατρίου με τα θετικά ιόντα της πρωτεΐνης, για την πρόσδεση στη στήλη. Πρωτεΐνες με χαμηλό φορτίο θα εμφανιστούν στην αρχή της έκλυσης (δηλαδή σε χαμηλή συγκέντρωση άλατος). Αντίστοιχα, μια αρνητικά φορτισμένη πρωτεΐνη σε διάλυμα με pH μεγαλύτερο του pI της, μπορεί να δεσμευτεί σε στήλη η οποία φέρει θετικά ιόντα (για παράδειγμα ανιονανταλλακτική ρητίνη Q με ακινητοποιημένο τεταρτοταγές αμμώνιο. (124)



Εικόνα 37: Σχηματική αναπαράσταση της πρόσδεσης της πρωτεΐνης στη σταθερή φάση κατιονανταλλακτικής στήλης. Εικόνα προσαρμοσμένη (151)

❖ Πειραματική διαδικασία

Αρχικά, το δείγμα φυγοκεντρείται σε 15.000 g για 15 λεπτά στους 4°C. Κατά το πρώτο στάδιο απομόνωσης χρησιμοποιείται προπληρωμένη ανιονανταλλακτική στήλη Resource Q 1 mL της εταιρείας GE Healthcare Life Sciences. Για την εξισορρόπηση της στήλης χρησιμοποιείται διάλυμα έκπλυσης Q (Wash Buffer Q: 10 mM Tris-HCl pH 8.0), ενώ στη συνέχεια τοποθετείται σε αυτή το δείγμα. Το διάλυμα έκπλυσης διαπερνά τη στη στήλη μέχρι η $OD_{280nm}=0$. Ακολουθεί βαθμιδωτή έκλουση των προσδεμένων στη στήλη πρωτεϊνών με το διάλυμα έκπλυσης (Elution Buffer Q: 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1M NaCl) με αυξανόμενη συγκέντρωση άλατος NaCl από 0-500 mM. Τα κλάσματα στα οποία παρατηρείται αύξηση της OD_{280nm} συλλέγονται και αναλύονται σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου 15% (w/v). Βάση της ηλεκτροφόρησης υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE) επιλέγονται τα κλάσματα που περιέχουν την πρωτεΐνη και προσδιορίζεται η συγκέντρωσή τους σε πρωτεΐνη με τη μέθοδο Bradford.

Ακολουθήσε κλασμάτωση του δείγματος με μεταβολή pH. Το δείγμα τοποθετείται σε ειδικές μεμβράνες διαπίδυσης έναντι 1L ρυθμιστικού διαλύματος 150 mM Sodium acetate pH 5.0 στους 4°C για 18-20 ώρες υπό ήπια ανάδευση. Μετά το στάδιο της κλασμάτωσης πραγματοποιείται εκ νέου διαύγαση του πρωτεϊνικού δείγματος για απομάκρυνση των πρωτεϊνών που έχουν καταβυθιστεί σε pH 5.0.

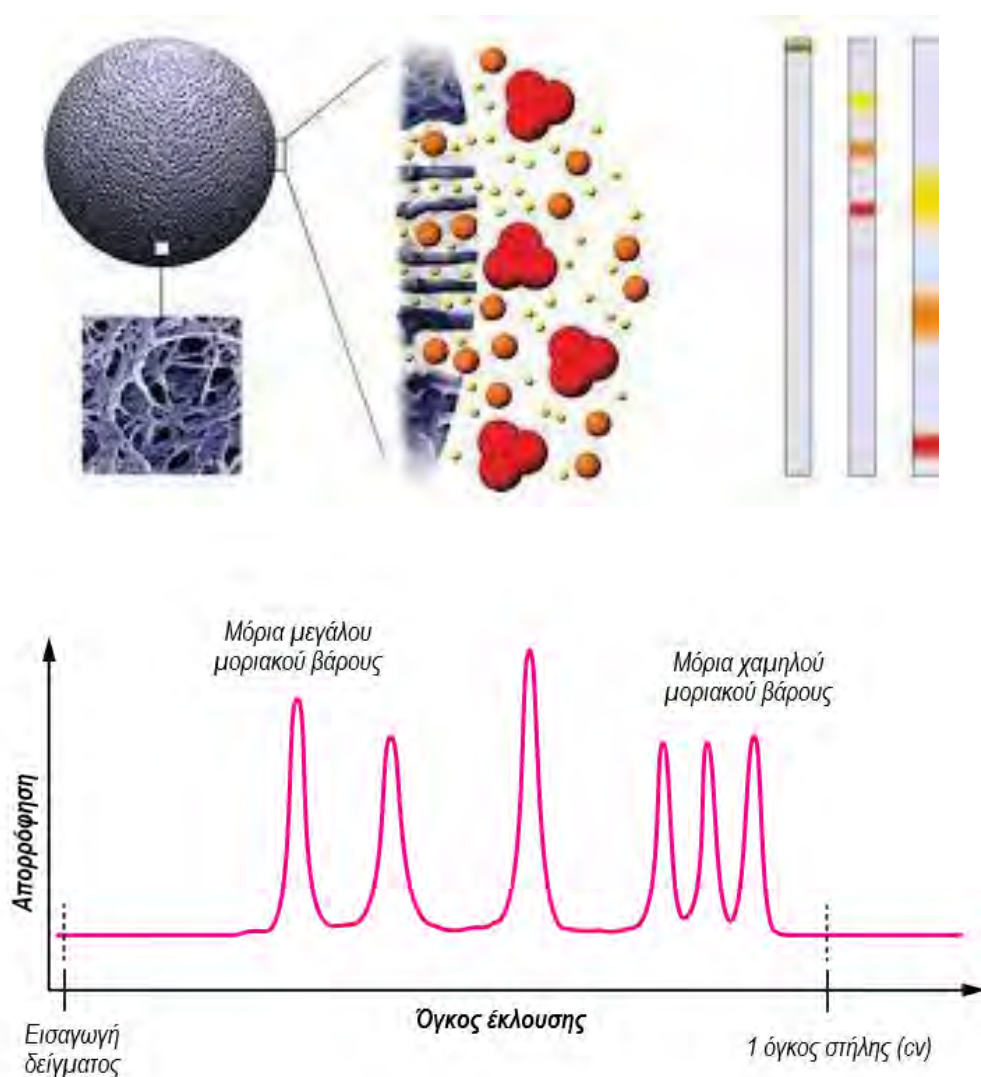
Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε μια κατιονανταλλακτική στήλη Resource S 1 mL της εταιρείας GE Healthcare Life Sciences. Για την εξισορρόπηση της στήλης χρησιμοποιείται διάλυμα έκπλυσης S (Wash Buffer S: 150 mM Sodium acetate pH 5.0), ενώ για τη βαθμιδωτή έκλουση των προσδεμένων στη στήλη πρωτεϊνών διάλυμα έκπλυσης S (Elution buffer S: 150 mM Sodium acetate pH 5.0, 2 M NaCl) με αυξανόμενη συγκέντρωση άλατος NaCl από 0-1 M. Ακολουθεί συλλογή και ηλεκτροφόρηση των κλασμάτων, σύμφωνα με την οποία πραγματοποιείται η επιλογή των κλασμάτων που περιέχουν την πρωτεΐνη. Το δείγμα συμπυκνώνεται σε όγκο 0.5 mL με φίλτρα συμπύκνωσης Amicon Ultra 10 MWCO της εταιρείας Millipore και φυλάσσεται στους 4°C μέχρι το επόμενο στάδιο.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η ανάλυση SDS-PAGE που πραγματοποιήθηκε για τα επιμέρους στάδια καθαρισμού της πρωτεΐνης, υπέδειξαν ότι το στάδιο της κατιονανταλλακτικής στήλης δεν είναι απαραίτητο, καθώς μετά τα δύο πρώτα βήματα καθαρισμού ανιονανταλλαγής και της κλασμάτωσης με μεταβολή pH απομακρύνεται η πλειονότητα των προσμίξεων. Επομένως, στις επόμενες απομονώσεις δεν

εφαρμόστηκε το βήμα κατιονανταλλαγής σε στήλη Resource S για να περιοριστούν οι απώλειες της AgamOBP5 και να επιταχυνθεί ο χρόνος χειρισμού του δείγματος.

2.9.1 Χρωματογραφία μοριακής διήθησης

Κατά τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης ο διαχωρισμός πραγματοποιείται με βάση το μέγεθος των πρωτεϊνών. Η στήλη αποτελείται από πορώδεις κόκκους από αδιάλυτο πολυμερές, όπως δεξτράνη, αραρόζη ή πολυακρυλαμίδης. Το δείγμα διέρχεται της στήλης, με τα μικρά μόρια να περνούν μέσα από τους πόρους, ενώ τα μεγάλα μόρια παραμένουν στον όγκο αποκλεισμού και ως εκ τούτου διατρέχουν μικρότερη διαδρομή, με αποτέλεσμα να εκλούνται πρώτα σε αντίθεση με τα μικρά μόρια τα οποία εκλούνται με καθυστέρηση (Εικόνα 38).. (124)



Εικόνα 38: Σχηματική αναπαράσταση της πορείας των μορίων στο εσωτερικό της στήλης (επάνω) και η εικόνα του χρωματογραφήματος (κάτω) Εικόνα προσαρμοσμένη . (151)

❖ Πειραματική διαδικασία

Τελευταίο στάδιο της απομόνωσης της AgamOBP5 είναι η στήλη μοριακής διήθησης Superdex 75. Η σταθερή φάση της στήλης αποτελείται από ένα μείγμα δεξτράνης και αгарόζης, και εφαρμόζεται για το διαχωρισμό πρωτεϊνών με μοριακό βάρος 3.000-70.000 Da. Η διάμετρος των σφαιριδίων είναι 13μm. Το συγκεκριμένο στάδιο πραγματοποιείται για την απομόνωση μοριακά ομογενούς μονομερούς της πρωτεΐνης και όχι πιθανών олиγομερών συσσωμάτων.

Για την εξισορρόπηση της στήλης χρησιμοποιείται διάλυμα μοριακής διήθησης (10mM Tris-HCl pH 8.0, 0.2M NaCl). Το δείγμα έχει συμπυκνωθεί σε όγκο 0.5ml καθώς ο όγκος του πρωτεϊνικού δείγματος πρέπει να καταλαμβάνει το 0.1-1% του όγκου της στήλης ενώ η συγκέντρωσή του να μην υπερβαίνει τα 70mg/ml. Πραγματοποιείται συλλογή των επιθυμητών κλασμάτων που περιέχουν την πρωτεΐνη και τα οποία αναλύονται περαιτέρω μέσω SDS-PAGE ηλεκτροφόρησης.

2.10 Απολιπίδωση

Επόμενο βήμα είναι η απολιπίδωση του δείγματος, ώστε να απομακρυνθούν λιπαρά οξέα τα οποία πιθανόν να έχουν προσδεθεί στην πρωτεΐνη, παρεμποδίζοντας τις επικείμενες μελέτες. Σε μία πλαστική στήλη τοποθετήθηκε το μέσο απολιπίδωσης Lipidex-1000 resin (PerkinElmer Inc.), το οποίο εκπλύθηκε με μεθανόλη και στη συνέχεια με ρυθμιστικό διάλυμα (25 mM sodium acetate buffer, pH:4.5). Το περιεχόμενο του συμπυκνωτή (ρυθμιστικό διάλυμα και Lipidex) απομακρύνεται και τοποθετείται σε πλαστικό σωλήνα τύπου falcon, όπου επώαστηκε με το δείγμα για μία ώρα υπό ήπια ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Το δείγμα επανατοποθετήθηκε στη στήλη, όπου το υλικό (Lipidex) στοιβάχτηκε ενώ το πρωτεϊνικό διάλυμα διήλθε και συλλέχθηκε. (152) Ακολουθεί διαπίδυση του δείγματος σε υπερκάθαρο νερό (HPLC water), προσδιορισμός της συγκέντρωσής του με τη μέθοδο Bradford και τέλος συμπύκνωση σε τελική συγκέντρωση ~12mg/mL με φίλτρα συμπύκνωσης Vivaspin 4 10MWCO, της εταιρείας Sartorius-Stedim. Ο τελικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης πραγματοποιείται με φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 280 nm. Η πρωτεΐνη φυλάσσεται στους 4°C μέχρι την χρήση της.

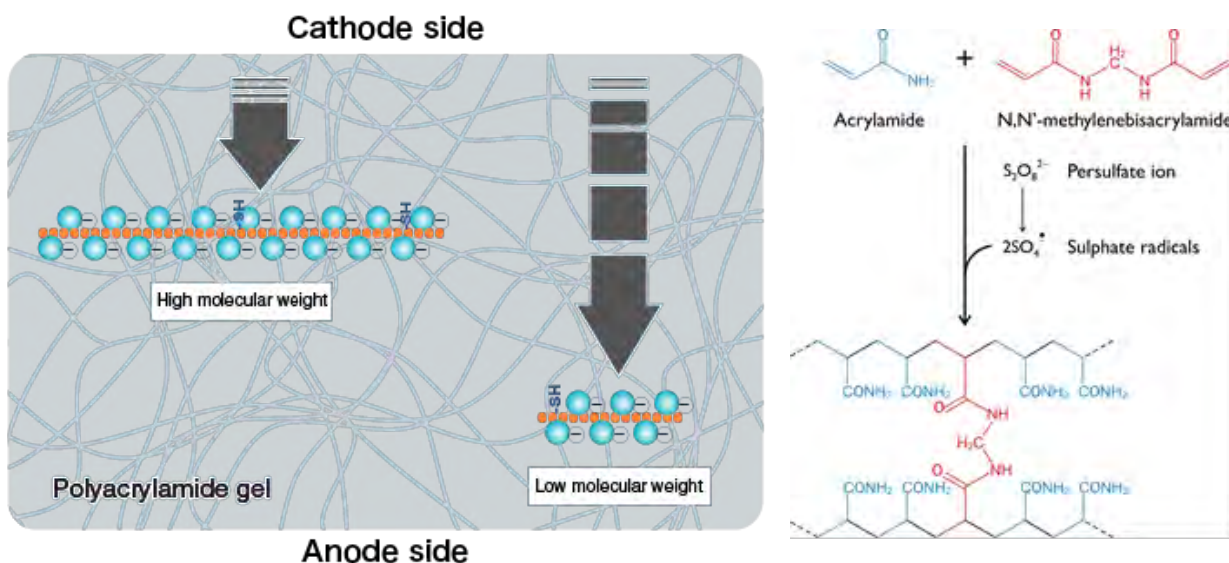
2.11 Ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες σε πηκτή πολυ-ακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Η ηλεκτροφόρηση πηκτής ακρυλαμιδίου αποτελεί μια αναλυτική μέθοδο διαχωρισμού των συστατικών ενός μίγματος πρωτεϊνών βάσει του μεγέθους τους. Βασίζεται στη δυνατότητα μετακίνησης φορτισμένων μορίων εντός ηλεκτρικού πεδίου. Η ταχύτητα μετακίνησης (u) της πρωτεΐνης (ή κάθε μορίου) σε ένα ηλεκτρικό πεδίο, εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου (E), το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης (z) και το συντελεστή τριβής (f), σύμφωνα με τη σχέση:

$$U = E \cdot x \cdot z/f$$

Όπως προκύπτει και από την παραπάνω σχέση, η ηλεκτροστατική δύναμη E που κατευθύνει το φορτισμένο μόριο προς το αντίθετα φορτισμένο ηλεκτρόδιο, είναι αντιστρόφως ανάλογη της τριβής που αναπτύσσεται ανάμεσα στο μόριο και το μέσο μετακίνησης. Ο συντελεστής τριβής επηρεάζεται από τη μάζα και το σχήμα του μορίου που μετακινείται, καθώς και από την πυκνότητα του μέσου. (124)

Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου είναι ένα τρισδιάστατο πλέγμα από μακριές αλειφατικές αλυσίδες πολυακρυλαμίδης που ενώνονται μεταξύ τους με μόρια N-N μεθυλενοδις-ακρυλαμίδης (MBA), τα οποία είναι ιδανικά για ηλεκτροφόρηση καθώς αποτελούνται από χημικά ουδέτερες ενώσεις και σχηματίζονται εύκολα. Για το σχηματισμό της πηκτής χρησιμοποιούνται δύο παράγοντες πολυμερισμού, το υπερθειϊκό αμμώνιο (ammonium persulfate, APS) και το TEMED (N,N,N,N-τετραμεθυλο1,2-διαμινο-αιθάνιο), το οποίο καταλύει το σχηματισμό ελεύθερων ριζών από το APS. Με αυτό τον τρόπο σχηματίζεται ένα πλέγμα, στο οποίο το μέγεθος των πόρων ρυθμίζεται από την αναλογία της συγκέντρωσης ακρυλαμίδης ως προς την MBA. Πηκτώματα με υψηλή συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης σχηματίζουν μικρούς πόρους. Τα μικρότερα μόρια μετακινούνται πιο εύκολα διαμέσου των πόρων του πηκτώματος, ενώ τα μεγαλύτερα καθυστερούν. Μόρια ενδιαμέσου μεγέθους μετακινούνται με διαφορετικές ταχύτητες (Εικόνα 39). (124)

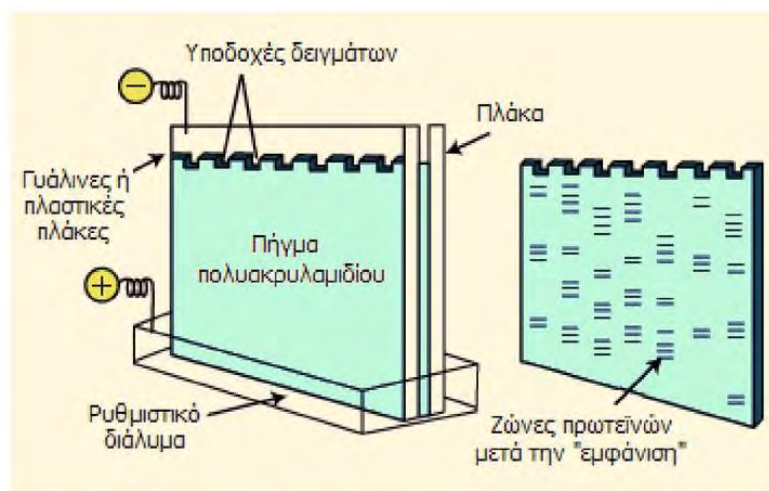


Εικόνα 39: Πηκτή πολυακρυλαμίδιου (124)

Στην ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών πραγματοποιείται κυρίως με βάση το μοριακό τους μέγεθος. Τα δείγματα αρχικά διαλύονται σε ένα ρυθμιστικό διάλυμα (Sample loading buffer: 0.25M Tris-HCl pH 6.8, 10% w/v SDS, 0.25% w/v Brilliant Blue, 0.5M DTT, 50% v/v γλυκερόλη) σε αναλογία δείγμα/sample loading buffer ίσο με 4/1. Το δωδεκακυλοθειικό νατρίου (SDS) αποτελεί ένα απορρυπαντικό το οποίο αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και τους προσδίδει συνολικά αρνητικό φορτίο. Η διθειοθρεϊτόλη (DTT) συμβάλει στην αποδιάταξη των πρωτεϊνών ανάγοντας τους δισουλφιδικούς δεσμούς. Η γλυκερόλη χρησιμοποιείται για να αυκήσει την πυκνότητα του δείγματος ώστε αυτό να παραμείνει στην βάση του φρεατίου, ενώ η χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης χρωματίζει το δείγμα ώστε να διακρίνεται το μέτωπο του δείγματος στην πηκτή.

Για την παραγωγή της πηκτής χρησιμοποιείται ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία περιλαμβάνει γυάλινες πλάκες και ειδικές διαχωριστικές ταινίες (spacers), οι οποίες σε κατάλληλη διάταξη λειτουργούν ως μήτρα για την παραγωγή της πηκτής. Στην επίπεδη ηλεκτροφόρηση όλα τα δείγματα διαχωρίζονται υπό τις ίδιες συνθήκες (εφόσον βρίσκονται στην ίδια πηκτή) με αποτέλεσμα να είναι περισσότερο αξιόπιστη η ποιοτική και ποσοτική σύγκριση των ζωνών μεταξύ τους. Η πηκτή ηλεκτροφόρησης αποτελείται από δυο επιμέρους πηκτές: την πηκτή επιστοίβασης και την πηκτή διαχωρισμού. Τα δείγματα τοποθετούνται αρχικά στην πηκτή επιστοίβασης, όπου συμπυκνώνονται σε μια μικρή ζώνη. Το συγκεκριμένο

στάδιο είναι ιδιαίτερα σημαντικό καθώς εξασφαλίζει την ταυτόχρονη είσοδο των δειγμάτων στην πηκτή διαχωρισμού, όπου θα επιτελεσθεί ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών (Εικόνα 40). (153)



Εικόνα 40: Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (124)

Μόλις ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων, η πηκτή υπόκειται σε περαιτέρω επεξεργασία με χρώση κυανού του Coomassie, χρώση αργύρου, ή χρώση ειδική για τα σιαλικά οξέα των γλυκοφορινών.

❖ Πειραματική διαδικασία

Για την παρασκευή της πηκτής χρησιμοποιείται η ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης, ώστε να σχηματιστεί η μήτρα. Στη συνέχεια ετοιμάζονται τα διαλύματα για την πηκτή διαχωρισμού και την πηκτή επιστοίβασης (Πίνακας 8) απουσία APS και TEMED. Μόλις η συσκευή είναι έτοιμη και έχει ελεγχθεί για τυχόν διαρροές, προστίθενται το APS και το TEMED στο διάλυμα της πηκτής διαχωρισμού, το οποίο τοποθετείται ταχέως στη συσκευή πριν την έναρξη πήξης λόγω δράσης των πολυμεριτών. Κατά την διάρκεια της πήξης η πηκτή καλύπτεται με βουτανόλη για προστασία της από το οξυγόνο. Μόλις ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός, απομακρύνεται η βουτανόλη και προστίθεται το διάλυμα της πηκτής επιστοίβασης, στο οποίο τοποθετούνται οι ειδικές χτένες (combs) για το σχηματισμό των φρεατίων δειγμάτων.

Για την προετοιμασία των δειγμάτων χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος 5X (Sample loading buffer: 0.25M Tris-HCl pH 6.8, 10% w/v SDS, 0.25% w/v Brilliant Blue, 0.5M DTT, 50% v/v γλυκερόλη) σε αναλογία δείγμα/sample

loading buffer ίσο με 4/1. Στη συνέχεια τα δείγματα θερμαίνονται για 15 λεπτά στους 95°C και φυγοκεντρώνονται για 10 λεπτά σε 11000g.

Πίνακας 8: Αντιδραστήρια για την παρασκευή της πηκτής ηλεκτροφόρησης.

Αντιδραστήριο	Πηκτή διαχωρισμού 15%	Πηκτή επιστοίβασης 5%
<i>H₂O</i>	2.3 mL	3.4 mL
30% ακρυλαμίδιο	5 mL	0.83 mL
1.5M Tris-HCl pH 8.8	2.5 mL	-
1.0 M Tris-HCl pH 6.8	-	0.63 mL
10% SDS	100 µL	50 µL
10% APS	100 µL	50 µL
TEMED	4 µL	5 µL

Στη συνέχεια, η πηκτή εισάγεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία συνδέεται με ηλεκτρόδια. Για το σχηματισμό κλειστού κυκλώματος μεταξύ πλακών και επιφάνειας πηκτής, χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (SDS Running Buffer: 25 mM Tris, 250 mM γλυκίνη, 0.1% w/v SDS pH 8.3). Τα δείγματα τοποθετούνται στα φρεάτια και εφαρμόζεται διαφορά δυναμικού 100V. Αφού τα δείγματα εισέλθουν στη πηκτή διαχωρισμού η τάση αυξάνεται σε 150 V και τερματίζεται όταν το μέτωπο της χρωστικής διατρέξει όλο το μήκος της πηκτής.

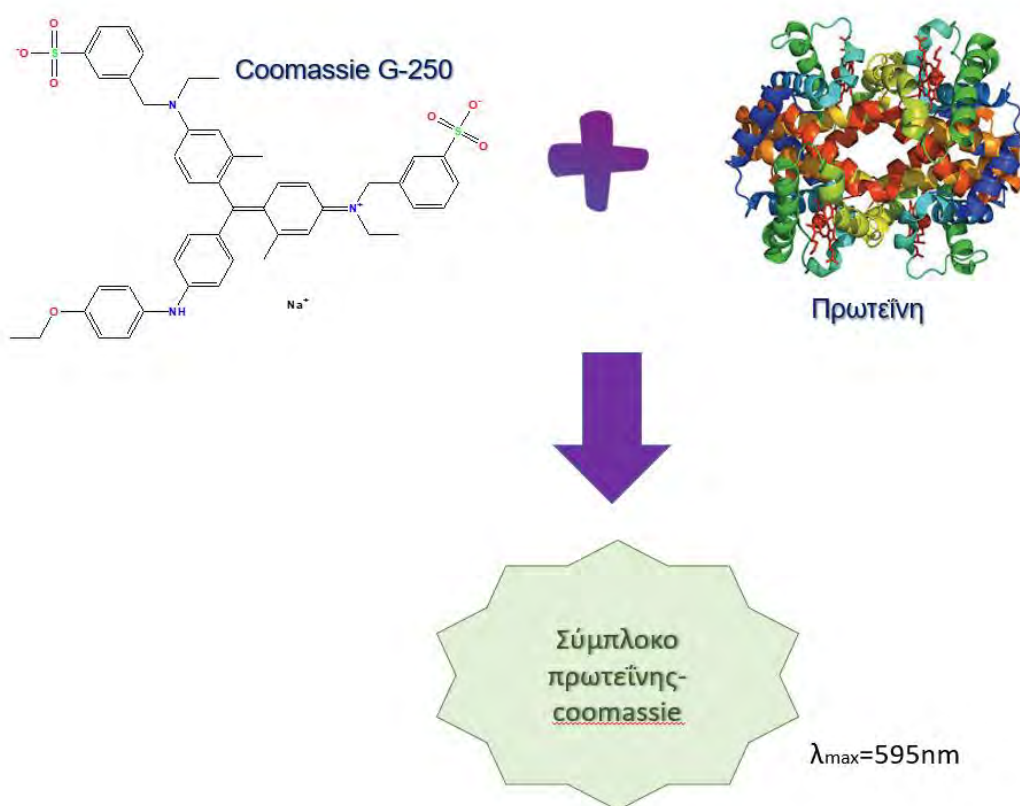
Τέλος, η πηκτή χρωματίζεται. Συγκεκριμένα, τοποθετείται για 20 λεπτά υπό ανάδευση σε διάλυμα χρώσης (Staining solution: 0.1% w/v Brilliant blue R-250, 50% μεθανόλη, 5% οξικό οξύ). Στη συνέχεια μεταφέρεται σε διάλυμα αποχρωματισμού (Destaining solution: 5% μεθανόλη, 5% οξικό οξύ) υπό ανάδευση, μέχρι να απομακρυνθεί η μη ειδικά συνδεδεμένη με την πηκτή χρωστική.

2.12 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνικού δείγματος με τη μέθοδο Bradford

Ένας κλασσικός τρόπος προσδιορισμού της συγκέντρωσης πρωτεϊνικού δείγματος, είναι η μέθοδος Bradford, μια μέθοδος που στηρίζεται στη δέσμευση του Coomassie Brilliant Blue G-250 με την πρωτεΐνη. Η δέσμευση της χρωστικής στην πρωτεΐνη προκαλεί μια μετατόπιση στο μέγιστο απορρόφησης της χρωστικής από 465 σε 595 nm. Κατά την πρόσδεση της ερυθρής μορφής της χρωστικής στην πρωτεΐνη,

διαταράσσεται η δομή του πρωτεϊνικού μορίου με αποτέλεσμα να εκτίθενται οι υδρόφοβες ομάδες του. Ανάμεσα στις συγκεκριμένες ομάδες και την μη- πολική περιοχή της χρωστικής αναπτύσσονται δυνάμεις van der Waals, οι οποίες σε συνδυασμό με ιοντικές αλληλεπιδράσεις, φέρουν τις αμινικές ομάδες της πρωτεΐνης κοντά στα αρνητικά φορτία της χρωστικής. Η ελεύθερη μορφή της χρωστικής έχει πράσινο ή ερυθρό χρώμα, ενώ το σύμπλοκο πρωτεΐνη- χρωστική μπλε (Εικόνα 41). Η αύξηση της απορρόφησης στα 595nm είναι ανάλογη της ποσότητας της προσδεδεμένης χρωστικής και συνεπώς της ποσότητας (συγκέντρωσης) της πρωτεΐνης στο διάλυμα.

Πρόκειται για μια γρήγορη και αποτελεσματική μέθοδο. Υπάρχει η πιθανότητα παρεμβολής λόγω κατιόντων μετάλλων όπως το νάτριο ή το κάλιο ή/και λόγω παρουσίας υδατανθράκων όπως η σακχαρόζη, στο δείγμα. Μια μικρή ενίσχυση του χρώματος άρα και της απορρόφησης παρατηρείται παρουσία ισχυρά αλκαλικών ρυθμιστικών παραγόντων, ενώ επίσης μεγάλες ποσότητες απορρυπαντικών όπως το δωδεκυλοθειικό νάτριο, το Triton X-100 και τα εμπορικά απορρυπαντικά μπορούν να προκαλέσουν υπέρμετρη αύξηση της απορρόφησης. Οι συγκεκριμένες αποκλίσεις προλαμβάνονται με τη χρήση δείγματος ελέγχου. (154)



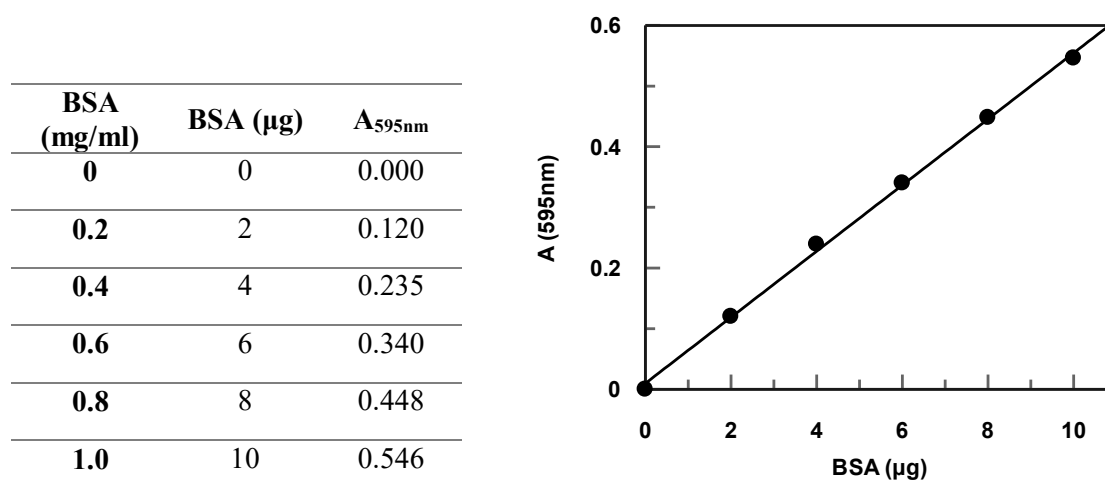
Εικόνα 41: Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνικού δείγματος με τη μέθοδο Bradford

❖ Πειραματική διαδικασία

Αρχικά πρέπει να κατασκευαστεί πρότυπη καμπύλη αναφοράς. Ετοιμάζεται διάλυμα BSA (*bovine serum albumin*) με συγκέντρωση 1mg/ml, και ακολουθούν διαδοχικές αραιώσεις συγκέντρωσης 0.2, 0.4, 0.6 και 0.8mg/ml, όγκου 100μl. Για την Παρασκευή των δειγμάτων χρησιμοποιούνται 790μl απιονισμένο νερό, 200μl Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent και 10μl από τα διαλύματα της BSA. Ακολουθεί ανάδευση των δειγμάτων και μέτρηση της απορρόφησης στα 595nm. Πραγματοποιούνται δύο επαναλήψεις του πειράματος και προσδιορίζεται ο μέσος όρος των απορροφήσεων κάθε συγκέντρωσης. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης, τοποθετείται η ποσότητα της BSA (μg) στον άξονα των x και η απορρόφηση στον άξονα των y. Από την κλίση της ευθείας προσδιορίζεται ο συντελεστής απορρόφησης (Σ.Α.=1/κλίση, μg/μ.α) (Εικόνα 42). Οι απορροφήσεις των άγνωστων πρωτεϊνικών δειγμάτων μετρήθηκαν στα 595nm και υπολογίστηκε η συγκέντρωσή τους σε πρωτεΐνη σύμφωνα με την εξίσωση:

$$C \text{ (mg/ml)} = A_{595\text{nm}} \cdot \Sigma.A. \cdot 1 / V\Delta \text{ (}\mu\text{l)}$$

Η πρότυπη καμπύλη για το συγκεκριμένο αντιδραστήριο που χρησιμοποιήσαμε έδωσε συντελεστή αποσβέσεως 18.35.



Εικόνα 42: Προσδιορισμός πρότυπης καμπύλης αναφοράς

2.13 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνικού δείγματος με φωτομέτρηση στα 280nm.

Η ύπαρξη των αρωματικών αμινοξέων έχει ως αποτέλεσμα την απορρόφηση των πρωτεϊνών στο υπεριώδες. Ο τελικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης του πρωτεϊνικού δείγματος πραγματοποιείται με φωτομέτρηση στα 280nm. Σύμφωνα με το νόμο Beer-Lambert η απορρόφηση ενός δείγματος δίνεται από την εξίσωση:

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c$$

όπου ε είναι ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης ($\text{cm} \cdot \text{L}/\text{mol}$), b το μήκος της οπτικής διαδρομής (το μήκος της κυψελίδας στην οποία γίνεται η μέτρηση) (cm) και c η συγκέντρωση της πρωτεΐνης (mol/L). (124)

Καθώς παρατηρείται μεγάλη διαφορά στον αριθμό των συγκεκριμένων αμινοξέων μεταξύ των πρωτεϊνών, ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης διαφέρει σε κάθε περίπτωση και υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$\varepsilon = (\text{αριθμός κατάλοιπων θρυπτοφάνης} \cdot 5500) + (\text{αριθμός κατάλοιπων τυροσίνης} \cdot 1490)$$

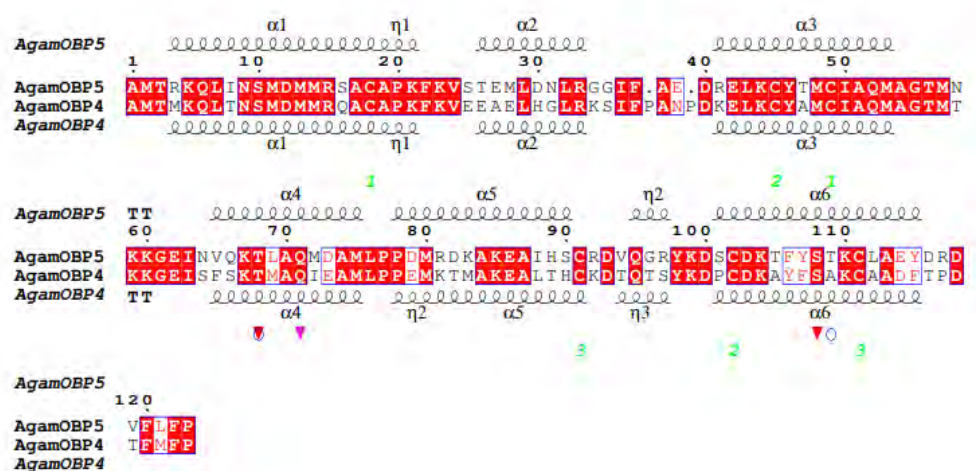
❖ Πειραματική διαδικασία

Για τη φωτομέτρηση στα 280nm χρησιμοποιείται κυψελίδα χαλαζία όγκου 200μl, κατάλληλη για μετρήσεις σε υπεριώδη ακτινοβολία. Αρχικά, μηδενίζεται η ένδειξη του φασματοφωτομέτρου με τη χρήση του δείγματος ελέγχου (ρυθμιστικό διάλυμα χωρίς πρωτεϊνικό δείγμα). Στη συνέχεια, φωτομετρείται 1μl δείγματος αραιωμένο στο ρυθμιστικό διάλυμα σε τελικό όγκο 200μl. Λαμβάνεται η τιμή απορρόφησης στα 280nm και προσδιορίζεται η τελική συγκέντρωση της πρωτεΐνης σύμφωνα με την παραπάνω εξίσωση.

Κεφάλαιο 3^ο: Υπερέκφραση και απομόνωση της *AgamOBP4*

Η πρωτεΐνη AgamOBP4 (AGAP010489-PA) παρουσιάζει μεγάλη ομολογία με την πρωτεΐνη AgamOBP5 (Εικόνα 43). Πρόκειται για δυο κλασσικές πρωτεΐνες πρόσδεσης οσμογόνων μορίων με έξι συντηρημένα κατάλοιπα κυστεΐνης. Για την υπερέκφραση της AgamOBP4 ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο που περιγράφεται από την Δράκου Ε. Χ. (2017). (155) Συγκεκριμένα, το πλασμίδιο pET-22b(+)-AgamOBP4 (AgamOBP4 cDNA AF437887 (81)) μετασχηματίζεται σε κύτταρα *E.coli* Origami B (DE3).

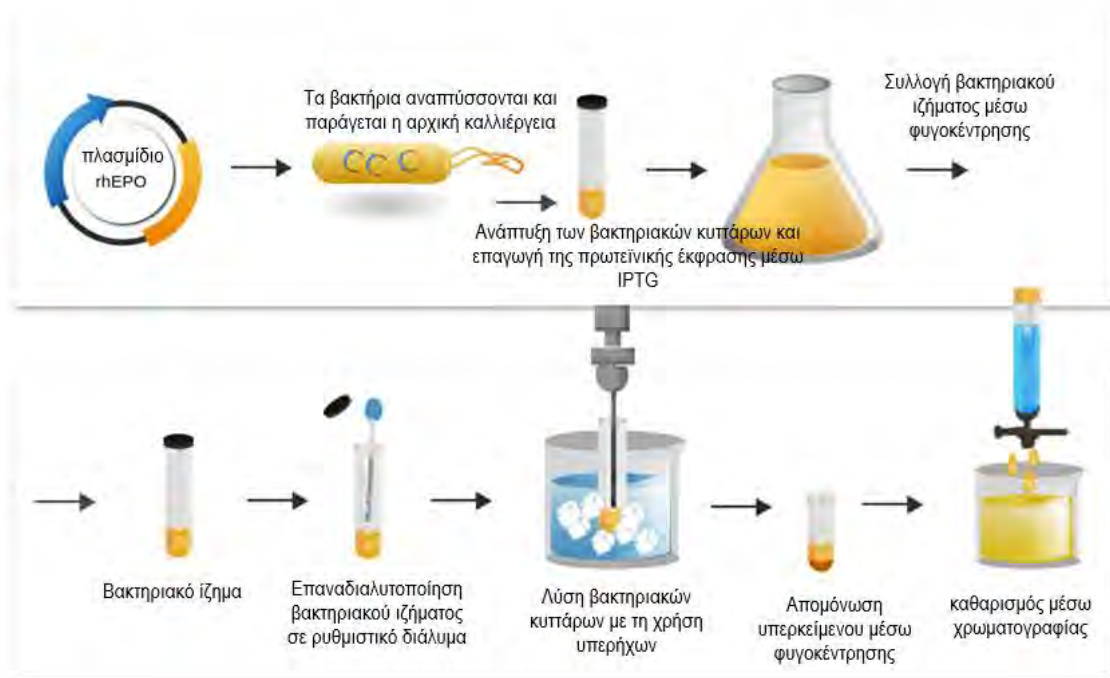
Για την παραγωγή της AgamOBP4 τροποποιήθηκε το πρωτόκολλο που περιγράφεται από την Δράκου Ε (2017). (155) Συγκεκριμένα, δεδομένου ότι η AgamOBP4 και AgamOBP5 έχουν παρόμοια φυσικοχημικά χαρακτηριστικά, όπως το μοριακό βάρος και το ισοηλεκτρικό τους σημείο ο σχεδιασμός του πρωτοκόλλου καθαρισμού βασίζεται κυρίως σε αυτές τις ιδιότητες, στην παρούσα εργασία ακολουθήθηκε επιτυχώς το πρωτόκολλο που περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2 για τον καθαρισμό της AgamOBP5. Συγκεκριμένα, μετά την επεξεργασία των σωμάτων εγκλεισμού ακολούθησε ένα βήμα ανιονανταλλακτικής χρωματογραφίας, κλασμάτωση με μεταβολή του pH και ένα τελικό στάδιο χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού.



Εικόνα 43: Σύγκριση της πεπτιδικής αλληλουχίας των πρωτεϊνών AgamOBP5- AgamOBP4 (144)

Κεφάλαιο 4^ο: Υπερέκφραση και απομόνωση της *AgamOBP1*

Για την υπερέκφραση της πρωτεΐνης AgamOBP1, το πλασμίδιο pET-22b(+)-AgamOBP1 (AgamOBP1 cDNA AF437884 (79)) μετασχηματίζεται σε κύτταρα *E.coli* Origami B (DE3). Η πρωτεΐνη υπερεκφράζεται και απομονώνεται σύμφωνα με την μέθοδο που περιγράφεται από την Tsitsanou et al. (78). Η βασική διαφορά με τις προαναφερθείσες OBP4 και OBP5, είναι πως η AgamOBP1 είναι διαλυτή πρωτεΐνη και εντοπίζεται στο υπερκείμενο. Επομένως, μετά τη λύση των κυττάρων, πραγματοποιείται υπερφυγοκέντρωση του δείγματος σε 130.000g για 30 λεπτά στους 4°C (Εικόνα 44). Το υπερκείμενο φιλτράρεται με φίλτρο Millex-GV Syringe Driven Filter Unit 0.22μm και διατηρείται στους 4°C μέχρι το επόμενο στάδιο. Τέλος, προσδιορίζεται η συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης του δείγματος με τη μέθοδο Bradford.



Εικόνα 44: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας έκφρασης και απομόνωσης της *AgamOBP1*. Προσαρμοσμένη εικόνα (156)

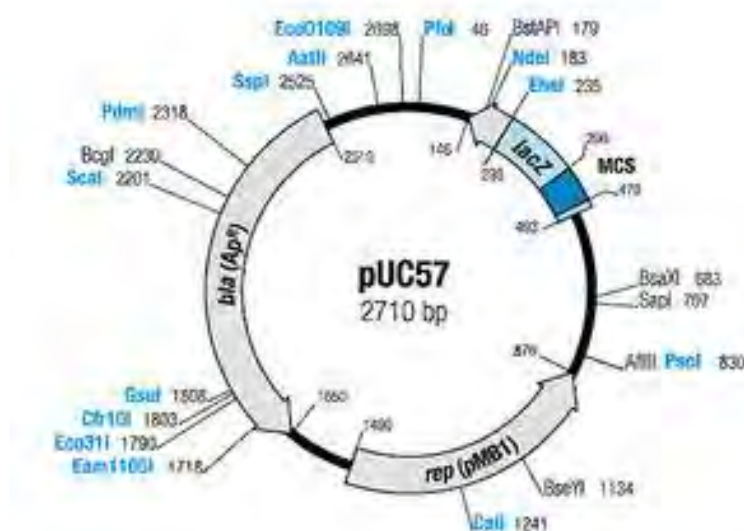
Για την απομόνωση της πρωτεΐνης εφαρμόζονται δύο βήματα χρωματογραφίας ιονανταλλαγής και ένα χρωματογραφίας μοριακής διήθησης. Συγκεκριμένα, κατά το πρώτο στάδιο, χρησιμοποιείται προπληρωμένη στήλη HiTrap Q FF 5ml της εταιρείας GE Healthcare Life Sciences, η σταθερή φάση της οποίας αποτελείται από 6% αгарόζη υψηλής διασταύρωσης με υψηλές ταχύτητες ροής και καλή διαχωριστική ικανότητα. Για την εξισορρόπηση της στήλης χρησιμοποιείται διάλυμα έκπλυσης (10mM Tris-HCl pH 8.0). Μόλις ολοκληρωθεί η διαδικασία εξισορρόπησης, τοποθετείται το πρωτεϊνικό δείγμα στη στήλη, η οποία εκπλένεται μέχρι $OD_{280nm}=0$. Επόμενο βήμα είναι η βαθμιδωτή έκλυση των προσδεμένων στη στήλη πρωτεϊνών με το διάλυμα έκπλυσης (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1M NaCl) με αυξανόμενη συγκέντρωση άλατος NaCl από 0-500mM. Συλλέγονται τα κλάσματα που περιέχουν πρωτεΐνη και βάση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης, επιλέγονται εκείνα που περιέχουν την AgamOBP1 και μετρείται η συγκέντρωσή τους με τη μέθοδο Bradford. Εν συνεχεία αραιώνονται με διάλυμα 10mM Tris-HCl pH 8.0, ώστε η τελική συγκέντρωση άλατος του δείγματος να είναι <40mM.

Κατά το δεύτερο στάδιο, χρησιμοποιείται η στήλη Resource Q 6ml της εταιρείας GE Healthcare Life Sciences, η οποία περιέχει ως σταθερή φάση πολυαιθεραιθερκετόνη (polyetheretherketone, PEEK), υλικό που προσφέρει υψηλές ταχύτητες ροής και υψηλή διαχωριστική ικανότητα με μικρή απώλεια δείγματος. Η διαδικασία είναι η ίδια με το πρώτο στάδιο απομόνωσης. Μόλις συλλεχθούν τα τελικά κλάσματα που περιέχουν την πρωτεΐνη, προσδιορίζεται η συγκέντρωση του δείγματος. Ακολουθεί συμπύκνωση σε όγκο 0.5ml με φίλτρα συμπύκνωσης Amicon Ultra 10MWCO της εταιρείας Millipore και φυλάσσεται στους 4°C μέχρι το επόμενο στάδιο.

Τελευταίο στάδιο είναι η εφαρμογή χρωματογραφίας μοριακής διήθησης με τη στήλη Superdex 75. Η διαδικασία περιεγράφηκε αναλυτικά κατά την απομόνωση της AgamOBP5. Τα τελικά κλάσματα συλλέγονται και το δείγμα συμπυκνώνεται σε τελική συγκέντρωση **15 mg/ml** με φίλτρα συμπύκνωσης Vivaspin 4 10MWCO, της εταιρείας Sartorius-Stedim, και φυλάσσεται στους 4°C. Η τελική συγκέντρωση της πρωτεΐνης προσδιορίζεται με φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 280 nm.

Κεφάλαιο 5^ο: Υπερέκφραση και απομόνωση της *AealOBP1*.

Το γονίδιο της πρωτεΐνης AealOBP1 (H9A9Y0) συντέθηκε και ενσωματώθηκε στον πλασμιδιακό φορέα κλωνοποίησης pUC57 (Εικόνα 45). Για την παραγωγή της πρωτεΐνης απαιτείται η απόσπαση του γονιδίου από τον αρχικό φορέα και η ενσωμάτωσή του στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης, με τη χρήση των κατάλληλων περιοριστικών ενδονουκλεασών.



Εικόνα 45: Χάρτης πλασμιδιακού φορέα κλωνοποίησης pUC57 (157)

5.1 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων *E. coli* DH5α

Για τον μετασχηματισμό, χρησιμοποιούνται 2 μ L pUC57- AealOBP1 και 20 μ L δεκτικά κύτταρα *E.coli* DH5α, σύμφωνα με τη διαδικασία που προαναφέρθηκε. Ακολουθεί επίστρωση 100 μ L μετασχηματισμένων βακτηρίων σε τρυβλίο LB-άγαρ, με 50 μ g/mL Kan, για την αποφυγή ανάπτυξης μη μετασχηματισμένων κυττάρων. Τέλος, το τρυβλίο επωάζεται για 18-20 ώρες στους 37°C και στη συνέχεια αποθηκεύεται στους 4°C.

5.2 Πολλαπλασιασμός και απομόνωση του πλασμιδίου pUC57- AealOBP1 από κύτταρα *E. coli* DH5α

Η απομόνωση γενετικού υλικού μέσω καθίζησης με αιθανόλη αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιούμενη και παλαιά μέθοδο, η οποία εφαρμόστηκε για πρώτη φορά ως μέθοδος απομόνωσης νουκλεϊκού οξέος από τον J. Lionel Alloway το 1930. Το DNA

είναι ένα εξαιρετικά πολικό μόριο λόγω των υδρόφιλων φωσφορικών ομάδων που εκτείνονται στο εξωτερικό της διπλής έλικας. Σε υδατικά διαλύματα, διασπώνται οι αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται ανάμεσα στο αρνητικά φορτισμένο DNA και στα κατιόντα του διαλύματος. Η αιθανόλη προάγει το σχηματισμό ιοντικών δεσμών μεταξύ των κατιόντων του διαλύτη και των φωσφορικών ομάδων του DNA. Σε συγκέντρωση αιθανόλης 70% και κατιόντων Na^+ 300 mM, οι απωθητικές δυνάμεις μεταξύ των πολυνουκλεοτιδικών αλυσίδων μειώνονται, με αποτέλεσμα την κατακρήμνιση του DNA. (158)

❖ Πειραματική διαδικασία

Για τον πολλαπλασιασμό του πλασμιδίου 2 καλλιέργειες των 500 mL με 75 $\mu\text{g/mL}$ Amp, εμβολιάζονται με 2 τυχαίες αποικίες από το αποθηκευμένο τρυβλίο. Για την απομόνωση του πλασμιδίου χρησιμοποιείται το NucleoBond Plasmid kit, της εταιρείας Macherey-Nagel. Συγκεκριμένα, 4 mL καλλιέργειας φυγοκεντρώνται σε 12.000 g για 4 λεπτά στους 4°C. Ακολουθεί διαλυτοποίηση του ιζήματος των κυττάρων σε 150 μL ρυθμιστικού διαλύματος επαναιώρησης, προσθήκη 150 μL ρυθμιστικού διαλύματος λύσης και ήπια ανάδευση. Το δείγμα επωάζεται για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, προστίθενται 150 μL του ρυθμιστικού διαλύματος εξουδετέρωσης και το δείγμα επωάζεται για 10 λεπτά στον πάγο. Επόμενο στάδιο, είναι η φυγοκέντρωση σε 12.000 g για 10 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο επωάζεται με 1 mL παγωμένης αιθανόλης στους -20 °C για τουλάχιστον 30 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρωση σε 20.000 g για 30 λεπτά στους 4°C. Το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται με 600 μL παγωμένης αιθανόλης και φυγοκεντρείται σε 20.000 g για 10 λεπτά στους 4°C. Το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε ρυθμιστικό διάλυμα (Tris/EDTA pH:7,5) και φυλάσσεται στους -20 °C.

5.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του πλασμιδίου με φωτομέτρηση στα 260 nm.

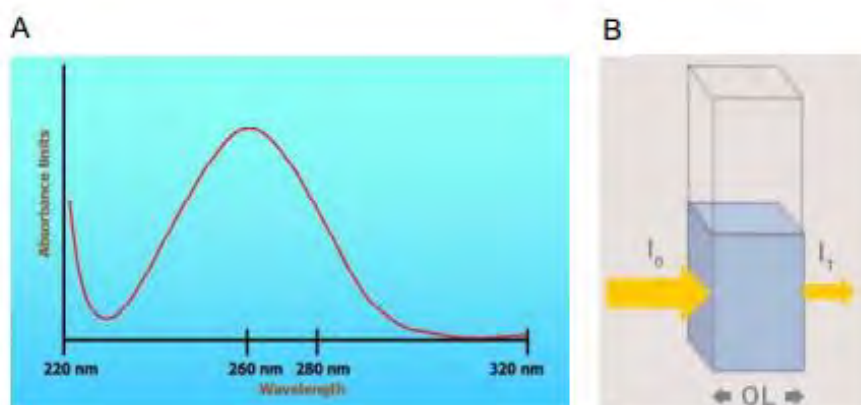
Η συγκέντρωση DNA (και RNA) πραγματοποιήθηκε με φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 260 nm (A_{260}) όπου το DNA παρουσιάζει τη μεγαλύτερη απορρόφηση. Για να είναι αποδεκτή η τιμή της απορρόφησης A_{260} , θα πρέπει να τοποθετείται εντός του γραμμικού εύρους του οργάνου (συνήθως 0,1-1,0 μα). Στο συγκεκριμένο μήκος κύματος, ο συντελεστής απόσβεσης για το δίκλωνο DNA είναι $0,020 (\mu\text{g/mL})^{-1}\text{cm}^{-1}$, για μονόκλωνο DNA είναι $0,027 (\mu\text{g/mL})^{-1}\text{cm}^{-1}$, για RNA είναι $0,025 (\mu\text{g/mL})^{-1}\text{cm}^{-1}$,

ενώ για μονόκλωνα ολιγονουκλεοτίδια εξαρτάται από το μέγεθος και την αναλογία των βάσεων τους.

Επομένως, για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του πλασμιδίου πολλαπλασιάζεται η τιμή της απορρόφησης A_{260} με το συντελεστή αραιώσης, και χρησιμοποιώντας τη σχέση ότι $A_{260}=1,0$ ισούται περίπου με 50 $\mu\text{g/mL}$ καθαρού δίκλωνου DNA (dsDNA):

$$C (\mu\text{g/mL}) = A_{260} \cdot 50\mu\text{g/ml} \cdot (1000\mu\text{L/mL})^{-1} \cdot \text{Αραιώση}$$

Χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή, καθώς προσμίξεις του δείγματος (RNA, πρωτεΐνες, ολιγονουκλεοτίδια, γουανιδίνη) μπορεί να προκαλέσουν αύξηση της τιμής της απορρόφησης, άρα και υπερεκτίμηση της συγκέντρωσης του δείγματος. Για αποφυγή των συγκεκριμένων σφαλμάτων, προσδιορίζεται παράλληλα η καθαρότητα του δείγματος, μέσω μέτρησης της απορρόφησης στο εύρος μήκους κύματος 230-320 nm για την ανίχνευση άλλων πιθανών προσμίξεων (Εικόνα 46). Η καθαρότητα του DNA ορίζεται ως ο λόγος των απορροφήσεων σε μήκη κύματος 260 nm και 280 nm (πρωτεΐνες). Για καλής ποιότητας δείγμα DNA θα πρέπει η αναλογία A_{260}/A_{280} να είναι 1,7-2,0. (146)



Εικόνα 46: Διάγραμμα απορρόφησης ενός καθαρού δείγματος μεταξύ των μηκών κύματος 220nm και 320nm. (159)

❖ Πειραματική διαδικασία

Για τη μέτρηση της απορρόφησης σε μήκος κύματος 260 nm, χρησιμοποιείται κυψελίδα χαλαζία όγκου 200 μL , κατάλληλη για μετρήσεις σε υπεριώδη ακτινοβολία. Αρχικά, η ένδειξη του φασματοφωτομέτρου μηδενίζεται με διάλυμα ελέγχου (ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος χωρίς το προς μέτρηση πλασμίδιο). Στη συνέχεια, λαμβάνεται μέτρηση από 1 μL πλασμιδιακού DNA αραιωμένο στο ίδιο ρυθμιστικό

διάλυμα σε τελικό όγκο 200 μL , σε μήκη κύματος 260 και 280 nm. Από την τιμή της απορρόφησης σε μήκος κύματος 260 nm υπολογίζεται η συγκέντρωση του πλασμιδιακού DNA που απομονώθηκε σύμφωνα με την παραπάνω εξίσωση και από το λόγο A_{260}/A_{280} υπολογίζεται η καθαρότητά του.

5.4 Πέψη του απομονωμένου πλασμιδίου με περιοριστικές ενδονουκλεάσες.

Μετά την απομόνωση του πλασμιδίου, ακολουθεί η υποκλωνοποίηση του γονιδίου της πρωτεΐνης στο φορέα έκφρασης. Για τον σκοπό αυτό απαιτείται προηγουμένως να αποσπαστεί το γονίδιο AealOBP1 από τον φορέα κλωνοποίησης pUC57, μέσω της επώασης με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού.

❖ Πειραματική διαδικασία

Για την απόσπαση του γονιδίου από τον φορέα χρησιμοποιούνται τα ένζυμα NdeI και XhoI, καθώς οι αλληλουχίες κοπής τους έχουν εισαχθεί στην αρχή (5') και στο τέλος (3') του γονιδίου. Τα συστατικά της αντίδρασης όπως περιγράφονται στον Πίνακα 9, αναμειγνύονται και επωάζονται για 2 ώρες υπό ήπια ανάδευση στους 37°C.

Πίνακας 9: Αντίδραση πέψης του πλασμιδίου pUC57-AealOBP1

<i>Αντιδραστήριο</i>	<i>Ποσότητα</i>	<i>Όγκος</i>
Πλασμίδιο pUC57-AealOBP1	1,6 μg	0,5 μl
Ρυθμιστικό διάλυμα H (10X)	1X	2 μl
NdeI (10U/ μl)	10U	1 μl
XhoI (10U/ μl)	10U	1 μl
Αποστειρωμένο H ₂ O		Μέχρι τελικού όγκου 20 μl

5.5 Απομόνωση των προϊόντων της πέψης με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης.

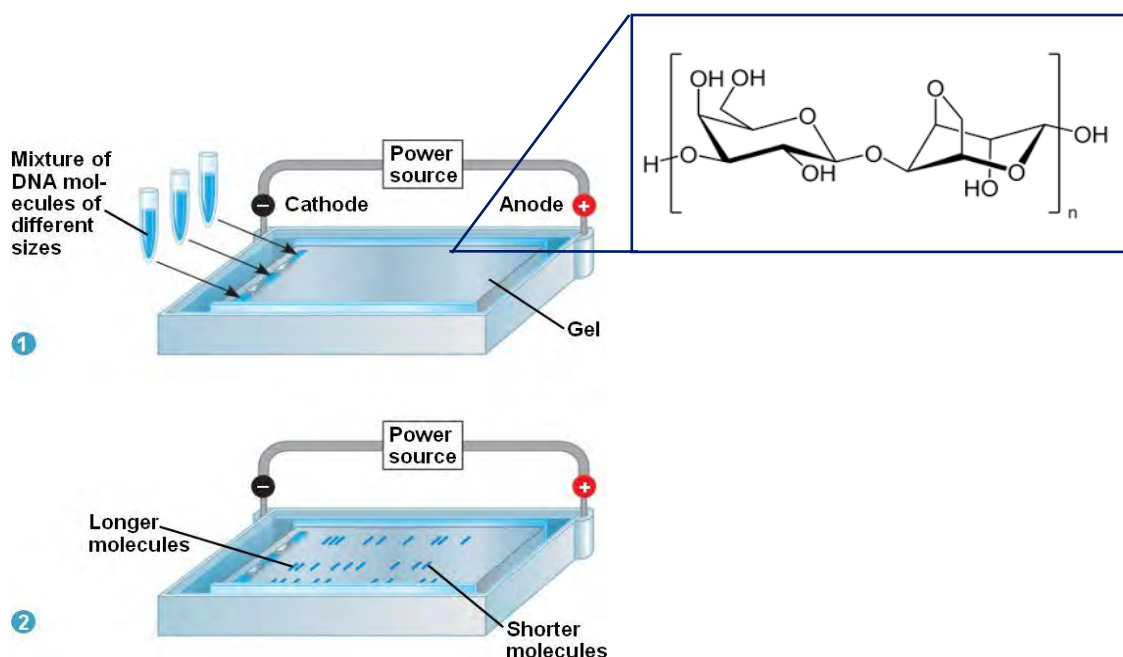
Για το διαχωρισμό νουκλεϊκών οξέων χρησιμοποιείται η ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης. Κατά τη συγκεκριμένη μέθοδο, ο διαχωρισμός των μορίων βασίζεται στο μέγεθός τους, καθώς τα μικρά μόρια (>50 ζεύγη βάσεων) κινούνται πιο γρήγορα κατά μήκος της πηκτής σε σύγκριση με τα μεγάλα μόρια (χιλιάδες ή εκατομμύρια βάσεις). Η κίνηση των αρνητικά φορτισμένων μορίων εντός της πηκτής οφείλεται στο σχηματισμό ηλεκτρικού πεδίου.

Η συγκέντρωση της αгарόζης ποικίλει ανάλογα με τη χρήση της πηκτής, καθώς για το διαχωρισμό μεγάλων μορίων παρόμοιου μοριακού βάρους, προτιμάται μικρή συγκέντρωση αгарόζης. Αντίστοιχα, για το διαχωρισμό θραυσμάτων DNA 5-10kb χρησιμοποιείται διάλυμα αгарόζης 0,7% (w/v), ενώ για θραύσματα 0,2-1kb διάλυμα 2% (w/v). Ως ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιείται Tris/Acetate/EDTA (TAE), Tris/Borate/EDTA (TBE) και βορικό λίθιο (lithium borate, LB), ενώ η πιο συνηθισμένη χρωστική για την εμφάνιση των ζωνών DNA ή RNA σε πηκτή αгарόζης είναι το βρωμιούχο αιθίδιο. Η χρωστική αυτή φθορίζει στο υπεριώδες κατά την αλληλεπίδρασή της με το DNA (ή RNA). (124)

❖ Πειραματική διαδικασία

Για το διαχωρισμό των συγκεκριμένων δειγμάτων χρησιμοποιείται πηκτή συγκέντρωσης 1%. Το διάλυμα αгарόζης (100 mL ρυθμιστικού διαλύματος TBE 1X και 1 g στερεή αгарόζη) θερμαίνεται μέχρι την πλήρη διαλυτοποίηση της αгарόζης. Το διάλυμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου, μέχρι να αποκτήσει θερμοκρασία 60°C και εν συνεχεία προστίθενται 5 μL βρωμιούχο αιθίδιο συγκέντρωσης 10 mg/mL. Ακολουθεί καλή ανάδευση και τοποθέτηση του διαλύματος στην ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης. Παράλληλα, τοποθετείται η ειδική κτένα (comb) για το σχηματισμό των ειδικών φρεατίων. Μόλις ολοκληρωθεί η πήξη της πηκτής, απομακρύνεται η κτένα, η πηκτή τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και καλύπτεται πλήρως με ρυθμιστικό διάλυμα TBE (Εικόνα 47).

Τα δείγματα (5 μL/ δείγμα) αναμειγνύονται με 1 μL ρυθμιστικού διαλύματος (loading buffer) 10X έκαστο, και τοποθετούνται στα ειδικά φρεάτια της πηκτής. Εφαρμόζεται τάση δυναμικού 100V. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης η πηκτή εκτίθεται σε υπεριώδες φως.



Εικόνα 47: Σχηματική αναπαράσταση της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης

5.6 Εκχύλιση των προϊόντων της πέψης από την πηκτή αгарόζης (Gel extraction)

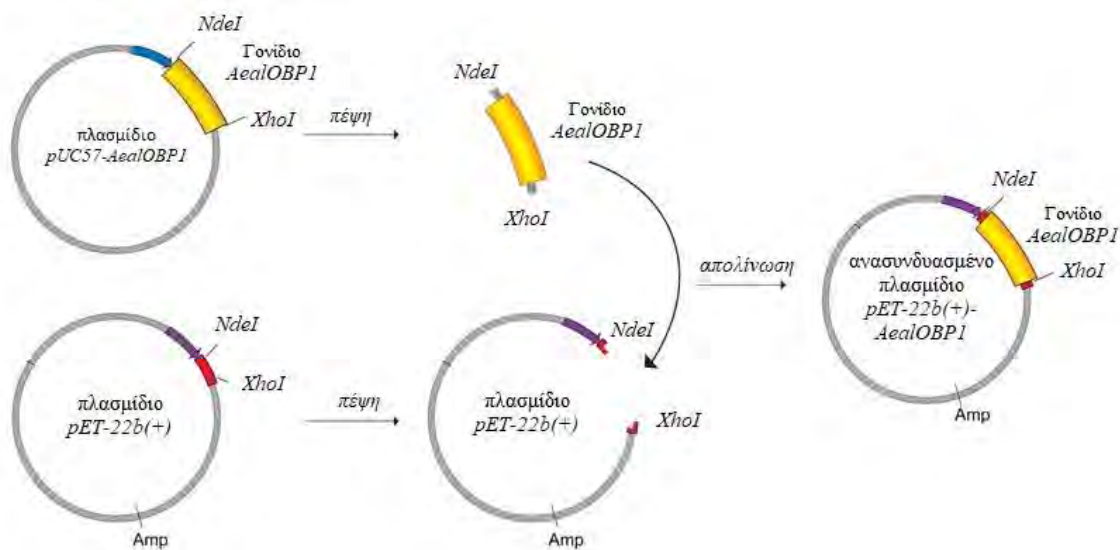
Με την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης πραγματοποιήθηκε ο διαχωρισμός των προϊόντων πέψης. Από την πηκτή επιλέγεται το δείγμα που αντιστοιχεί στο γονίδιο της πρωτεΐνης AealOBP1, και η ζώνη πηκτής που το περιέχει αποκόπτεται. Για την εκχύλιση του γονιδίου από την πηκτή εφαρμόζεται το πρωτόκολλο του κίτ NucleoSpin Extract II της εταιρείας Macherey-Nagel. Τέλος, τα απομονωμένα δείγματα DNA ελέγχονται εκ νέου μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης.

5.7 Υποκλωνοποίηση γονιδίου AealOBP1 στον πλασμιδιακό φορέα pET-22b(+)

Η υποκλωνοποίηση (subcloning) αποτελεί μια μέθοδο μεταφοράς του επιθυμητού γονιδίου από τον φορέα κλωνοποίησης στον φορέα έκφρασης. Κατά το προηγούμενο στάδιο, απομονώθηκε το επιθυμητό γονίδιο, το οποίο φέρει συγκεκριμένα συμπληρωματικά άκρα μετά την πέψη του με τα ένζυμα περιορισμού. Αντίστοιχα, ο επιθυμητός φορέας έκφρασης pET-22b(+) έπειτα πέψη με τα ίδια ένζυμα περιορισμού που ακολουθείτε από επεξεργασία με αλκαλική φωσφατάση, φέρει ομοίως με το απομονωμένο γονίδιο τα ίδια συμπληρωματικά άκρα τα οποία ωστόσο έχουν αποφωσφορυλιωθεί ώστε να αποφευχθεί πιθανή επανακυκλοποίηση.

Ακολουθεί ανάμειξη και επώαση του γονιδίου με τον επιθυμητό πλασμιδιακό φορέα, τα οποία μέσω της αντίδρασης απολίνωσης, συνδέονται καθώς και τα δυο φέρουν συμπληρωματικά άκρα. Η συγκεκριμένη αντίδραση καταλύεται από την DNA

λιγάση, το ένζυμο που ενώνει θραύσματα DNA σχηματίζοντας φωσφοδιεστερικούς δεσμούς(Εικόνα 48). (146) (124)



Εικόνα 48: Υποκλωνοποίηση του γονιδίου *AealOBP1* στον πλασμιδιακό φορέα *pET-22b(+)*. Εικόνα προσαρμοσμένη

❖ Πειραματική διαδικασία

Σε πηκτή αγαρόζης 1% (w/v) τοποθετούνται 1-3 μL γραμμικού φορέα *NdeI-pET-22b(+)-XhoI* και 1 μL από το συμπυκνωμένο γονίδιο *AealOBP1*, για τον υπολογισμό της ιδανικής αναλογίας φορέα- γονιδίου που πρέπει να χρησιμοποιηθεί για την απολίνωση. Η απολίνωση πραγματοποιείται με ανάμιξη των αντιδραστηρίων που φαίνονται στον Πίνακα 10 και επωάζεται για 16-20 ώρες στους 16°C .

Πίνακας 10: Αντίδραση απολίνωσης

Αντιδραστήριο	Όγκος
Ρυθμιστικό διάλυμα <i>T4 DNA</i> λιγάσης (10X)	1 μL
<i>T4 DNA</i> λιγάση	1 μL
Επεξεργασμένος γραμμικός φορέας <i>pET-22b(+)</i>	2 μL
Γονίδιο <i>NdeI-AealOBP1-XhoI</i>	4 μL
Αποστειρωμένο H_2O	Μέχρι τελικού όγκου 10 μL

5.8 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων *E. coli* DH5a

Ακολουθεί μετασχηματισμός 20μl δεκτικών κυττάρων *E.coli* DH5a με 4 μl δείγματος από την αντίδραση απολίνωσης. Η διαδικασία μετασχηματισμού είναι ακριβώς η ίδια, όπως αναλύθηκε εκτενώς.

5.9 Σάρωση επιλογής κλώνων μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR αποτελεί μια μέθοδο σταθμό στον τομέα της Μοριακής Βιολογίας. Ανακαλύφθηκε το 1983 από τον Dr K. Mullis, ενώ 1989 ανακηρύχθηκε ως το "μέγιστο επιστημονικό επίτευγμα" και η Taq DNA πολυμεράση ως το "μόριο της χρονιάς". Πρόκειται για μια *in vitro* τεχνική ενίσχυσης μιας αλληλουχίας DNA, με αποτέλεσμα την παραγωγή ενός μεγάλου αριθμού αντιγράφων μιας συγκεκριμένης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας.

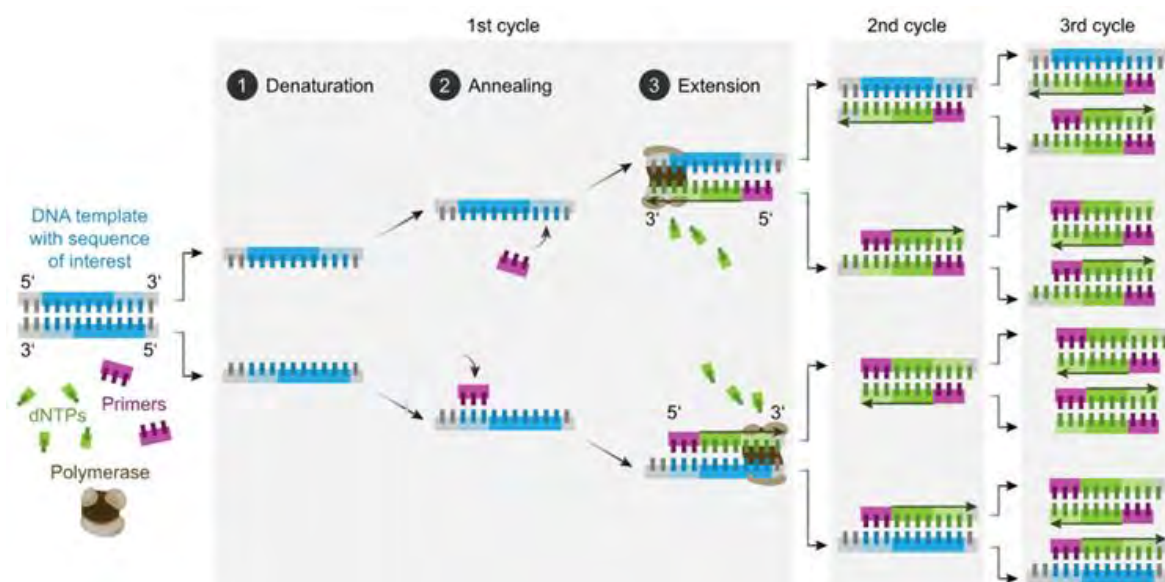
Αποτελεί μια *in vitro* αναπαράσταση της φυσικής *in vivo* διαδικασίας αντιγραφής του DNA. Ένα μονόκλωνο μόριο DNA χρησιμοποιείται ως μήτρα για τη σύνθεση ενός συμπληρωματικού μορίου, μια αντίδραση που καταλύεται από την DNA πολυμεράση. Εφαρμόζοντας υψηλές θερμοκρασίες, επιτυγχάνεται η αποδιάταξη του δίκλωνου αρχικού μορίου, με αποτέλεσμα το μόριο να είναι έτοιμο για την αντίδραση PCR. Παράλληλα, τοποθετούνται ολιγονουκλεοτίδια ως εναρκτήρια μόρια (εκκινητές) λειτουργώντας ως συμπληρωματικά αντίγραφα μικρών αρχικών τμημάτων της αντιγραφής.

Το σημαντικότερο χαρακτηριστικό της συγκεκριμένης μεθόδου είναι η κατευθυνόμενη ενίσχυση μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA μέσω του σχεδιασμού και της χρήσης των κατάλληλων εκκινητών. Κατά την αποδιάταξη ενός δίκλωνου μορίου σχηματίζονται δυο μονόκλωνα μόρια, τα οποία θα χρησιμοποιηθούν ως εκμαγείο για τη σύνθεση νέων πανομοιότυπων κλώνων. Επομένως, η αλληλουχία-στόχος πολλαπλασιάζεται εκθετικά.

Σύμφωνα με ένα κλασικό πρωτόκολλο, η μέθοδος περιλαμβάνει 4 βασικά στάδια, τα οποία χαρακτηρίζονται από εναλλαγές της θερμοκρασίας (Εικόνα 49):

1. Αποδιάταξη: Επώση για 5 λεπτά στους 95°C για αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων και σχηματισμός των μονόκλωνων εκμαγείων.
2. Υβριδισμός: Μείωση της θερμοκρασίας για υβριδοποίηση των εκκινητών με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες των μονόκλωνων μορίων.
3. Επέκταση: Αύξηση της θερμοκρασίας στους 72°C, θερμοκρασία για τη βέλτιστη δράση της Taq DNA πολυμεράσης.

4. Αύξηση της θερμοκρασίας στους 95°C για εκ νέου αποδιάταξη των νεοσυντιθέμενων δίκλωνων μορίων και σχηματισμός νέων μονόκλωνων εκμαγείων, ώστε να ξεκινήσει ένας νέος κύκλος. (125) (124)



Εικόνα 49: Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου PCR (160)

❖ Πειραματική διαδικασία

Το πρώτο σημείο ελέγχου για τον επιτυχή μετασχηματισμό είναι η ανάπτυξη των βακτηρίων παρουσία καρβενικιλίνης. Μόνο τα ανασυνδυασμένα βακτήρια παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό. Για το δεύτερο σημείο ελέγχου, εφαρμόζεται η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης. Επιλέγονται τυχαία αποικία από το τρυβλίο και λαμβάνεται δείγμα για την PCR. Με τους ειδικούς εκκινητές ελέγχεται αν θα επιτευχθεί ενίσχυση του γονιδίου *AeaIOBP1*, ένδειξη ότι πρόκειται για επιτυχώς μετασχηματισμένα βακτήρια. Επίσης, με τον συγκεκριμένο τρόπο, ελέγχεται ότι τα πλασμίδια που εισήχθησαν στα βακτήρια είναι ανασυνδυασμένα και φέρουν το επιθυμητό γονίδιο.

Για την αντίδραση της PCR χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων και η χρήση των κατάλληλων εκκινητών όπως φαίνεται στον Πίνακα 11. Τα δείγματα εφαρμόζονται σε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης.

Πίνακας 11: Υπολογισμός συγκεντρώσεων αντιδραστηρίων PCR

Αντιδραστήριο	Συγκέντρωση
Πλασμίδιο <i>AealOBP1</i>	1ng
Εκκινητής <i>promoter</i> (<i>TAATACGACTCACTATAGGG</i>)	0.4μM
Εκκινητής <i>terminator</i> (<i>GCTAGTTATTGCTCAGCGG</i>)	0.4μM
<i>dNTPS mix</i>	0.2mM
Ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης με Mg^{2+}	1X
<i>Kapa Taq polymerase</i>	1U

5.10 Απομόνωση του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pET-22b(+)-*AealOBP1* από κύτταρα *E. coli* DH5α

Εφόσον τα βακτήρια φέρουν το επιθυμητό πλασμίδιο, πραγματοποιείται απομόνωσή του σύμφωνα με το προαναφερθέν πρωτόκολλο του NucleoSpin Plasmid kit, της εταιρείας Macherey-Nagel.

5.11 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων *E. coli* Origami B (DE3) και Origami 2 (DE3)

Κατά το στάδιο του μετασχηματισμού, 2 μL από το πλασμίδιο pET-22b(+)-*AealOBP1* επωάζονται με 20μL δεκτικών κυττάρων *E.coli* Origami B (DE3). Παράλληλα, πραγματοποιείται μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E.coli* Origami 2 (DE3). Ακολουθεί επίστρωση 100 μL μετασχηματισμένων βακτηρίων σε τρυβλίο LB-άγαρ, με 50 μg/mL Crb και 12,5 μg/mL Tet. Τέλος, το τρυβλίο επωάζεται για 18-20 ώρες στους 37°C και στη συνέχεια αποθηκεύεται στους 4°C. Αποικίες παρατηρήθηκαν μόνο για τα κύτταρα Origami 2. Επομένως, η έκφραση της πρωτεΐνης πραγματοποιείται με τη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά.

5.12 Δοκιμή έκφρασης της πρωτεΐνης *AealOBP1*

Για τη διερεύνηση των συνθηκών και των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης *AealOBP1* αρχικά αναπτύχθηκαν προ-καλλιέργειες σε μικρή κλίμακα των 10 mL με 75 μg/mL Amp και 12,5 μg/mL Tet, οι οποίες εμβολιάστηκαν με αποικίες από το αντίστοιχο τρυβλίο. Οι καλλιέργειες επωάστηκαν υπό ανάδευση σε 200 rpm για 16-18h στους 37°C. Στη συνέχεια, εμβολιάστηκαν με 5 mL καθαρής καλλιέργειας

καλλιέργειες των 50 mL LB/αντιβιοτικά και επωάστηκαν υπό ανάδευση σε 220 rpm μέχρι η $OD_{600nm} \approx 0.5$ στους 37°C. Ακολούθησε προσθήκη IPTG σε τελική συγκέντρωση 1 mM και επώαση υπό ανάδευση σε 200 rpm για 4 ώρες στους 37°C. Συλλέχθηκε δείγμα 1 mL από όλα τα επιμέρους στάδια της διαδικασίας.

Μετά το πέρας των 4 ωρών, οι καλλιέργειες φυγοκεντρήθηκαν σε 5000 g για 20 min στους 4°C. Το ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης, εφαρμόστηκαν υπέρηχοι και ακολούθησε φυγοκέντρωση για 30 min σε 10.000 g στους 4°C. Συλλέχθηκε δείγμα από το υπερκείμενο, ενώ το ίζημα διαλυτοποιήθηκε εκ νέου με διάλυμα λύσης και συλλέχθηκε δείγμα.

Τα δείγματα που συλλέχθηκαν από τις καλλιέργειες φυγοκεντρήθηκαν σε 5000 g για 20 min στους 4°C, το ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε σε αποστειρωμένο νερό και εφαρμόστηκε λύση των κυττάρων. Σε όλα τα δείγματα προστέθηκαν 10 μ L 5X Sample loading buffer και επωάστηκαν για 15 λεπτά στους 100 °C. Τα δείγματα αξιολογήθηκαν μέσω ηλεκτροφόρησης υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Από την ανάλυση SDS-PAGE, αποδείχθηκε ότι η πρωτεΐνη εκφράζεται στο ίζημα, υπό τη μορφή έγκλειστων σωματίων.

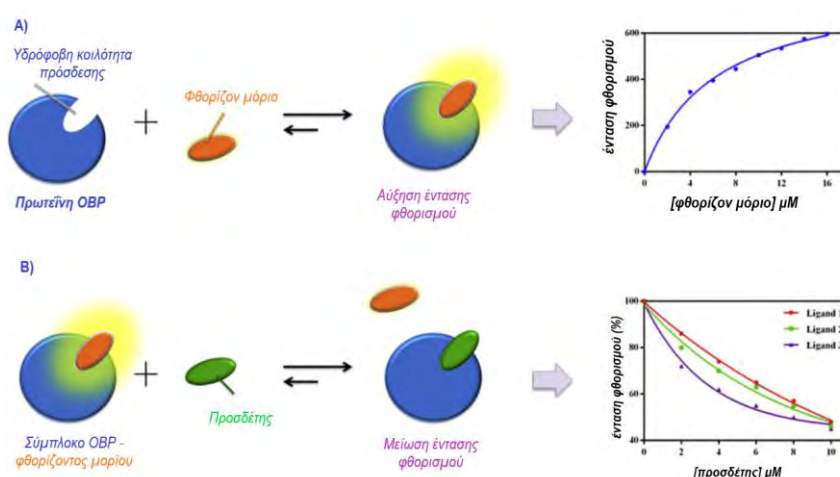
5.13 Υπερέκφραση και απομόνωση της πρωτεΐνης AealOBP1

Η πρωτεΐνη παρουσιάζει παρόμοιες φυσικοχημικές ιδιότητες με την πρωτεΐνη AgamOBP1. Παράλληλα, εκφράζεται στο αδιάλυτο μέρος των κυττάρων όπως οι πρωτεΐνες AgamOBP4 και AgamOBP5. Επομένως, για την διαδικασία απομόνωσης σχεδιάστηκε πρωτόκολλο με συνδυασμό αυτών που εφαρμόστηκαν για τις προαναφερθείσες πρωτεΐνες, ήτοι AgamOBP1, 4 και 5.

Συγκεκριμένα, μετά το στάδιο της λύσης των κυττάρων, ακολουθεί επεξεργασία των σωματίων εγκλεισμού, καθώς και η διαδικασία αποδιάταξης και αναδίπλωσης της πρωτεΐνης όμοια με αυτό που εφαρμόστηκε για τις AgamOBP4 και 5. Αντίστοιχα, το πρωτόκολλο καθαρισμού περιλαμβάνει δύο βήματα χρωματογραφίας ιονανταλλαγής και ένα χρωματογραφίας μοριακής διήθησης, όμοια με την πρωτεΐνη AgamOBP1.

Κεφάλαιο 6^ο: *in vitro* φθορισμομετρικές μελέτες

Οι *in vitro* φθορισμομετρικές μελέτες χρησιμοποιούνται ευρέως για τον προσδιορισμό συγγένειας πρωτεΐνης -προσδέτη. Συγκεκριμένα, η μέθοδος βασίζεται στην εκπομπή σήματος κατά την πρόσδεση ενός φθορίζοντος ιχνηθέτη στο υπό μελέτη πρωτεϊνικό μόριο. Για τις συγκεκριμένες πρωτεΐνες ως φθορίζων ιχνηθέτης χρησιμοποιείται το 1-NPN (N-phenyl-1-naphthylamine), το οποίο διαθέτει αρωματικούς δακτυλίους στους οποίους οφείλεται ο φθορισμός. Το μήκος κύματος διέγερσης του 1-NPN είναι 337nm, ενώ το μήκος κύματος εκπομπής του είναι 460 nm σε υδατικό περιβάλλον. Κατά την πρόσδεσή του στην πρωτεΐνη το μέγιστο εκπομπής μετατοπίζεται στα 406-410nm. Κατά την πρόσδεση του μορίου στην υδρόφοβη περιοχή της πρωτεΐνης παρατηρείται μια μετατόπιση στο κυανό (blue shift) του μέγιστου εκπομπής, η οποία συνοδεύεται από σημαντική αύξηση στην ένταση φθορισμού. Αντίστοιχα, όταν σε διάλυμα στο οποίο έχει ήδη σχηματιστεί το σύμπλοκο πρωτεΐνη – 1-NPN προστεθεί ένωση, η οποία έχει την ικανότητα να συναγωνίζεται και να εκτοπίζει το 1-NPN, παρατηρείται μείωση της έντασης φθορισμού. Επομένως, ο προσδιορισμός της συγγένειας του προσδέτη με την πρωτεΐνη βασίζεται στην εκτόπιση του 1-NPN. Ωστόσο, ελλοχεύει ο κίνδυνος ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων, καθώς η ένωση μπορεί να προσδένεται σε διαφορετικό κέντρο πρόσδεσης, άρα να μην πραγματοποιείται εκτόπιση του 1-NPN, με αποτέλεσμα στην πρωτεΐνη να προσδένονται ταυτόχρονα το φθορίζον μόριο και ο προσδέτης, αλλά σε διαφορετικό κέντρο (Εικόνα 50).



Εικόνα 50: Σχηματική αναπαράσταση της *in vitro* φθορισμομετρικής μεθόδου.

6.1 Μελέτη της πρόσδεσης ενώσεων με πιθανή βιοδραστική δράση στην πρωτεΐνη AgamOBP5

Για την εύρεση εν δυνάμει προσδετών της πρωτεΐνης, αξιολογήθηκε η συγγένεια γνωστών εντομοαπωθητικών ενώσεων για το πρωτεϊνικό μόριο μέσω *in vitro* φθορισμομετρικών μελετών. Συγκεκριμένα, προσδιορίζεται αρχικά η συγγένεια της AgamOBP5 με το φθορίζον μόριο 1-NPN. Στη συνέχεια, το σύμπλοκο πρωτεΐνη-ανιχνευτής επωάζεται παρουσία διάφορων συγκεντρώσεων του πιθανού προσδέτη και προσδιορίζεται η εκτόπιση του 1-NPN -από τον προσδέτη- μέσω της μείωσης της έντασης φθορισμού. (161)

6.1.1. Υπολογισμός της σταθεράς πρόσδεσης K_d του 1-NPN για την AgamOBP5

Αρχικά, προσδιορίζεται η σταθερά πρόσδεσης του φθορίζοντος μορίου με την πρωτεΐνη, επιβεβαιώνοντας την πρόσδεσή του. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα F (20 mM Tris-HCl, pH 8.0 και 100 mM NaCl) και 2 μ M AgamOBP5. Πραγματοποιείται τιτλοδότηση με διαφορετικές συγκεντρώσεις 1-NPN (0 μ M- 25 μ M). Το διάλυμα του ανιχνευτή παρασκευάζεται σε μεθανόλη. Η τελική περιεκτικότητα σε μεθανόλη δεν ξεπερνά το 2% (v/v). Ο τελικός όγκος του διαλύματος είναι 300 μ L σε όλες τις δοκιμές. Τα φάσματα εκπομπής καταγράφονται σε συσκευή ανάγνωσης πλακών φθορισμού Varioskan® Flash (Thermo Scientific) στους 25°C, χρησιμοποιώντας μαύρα δοκίμια (plates) 96 φρεατίων (Greiner, Bio-One). Ο ανιχνευτής διεγείρεται σε μήκος κύματος 337 nm και τα φάσματα εκπομπής καταγράφονται σε μήκη κύματος 360-500 nm. Οι μέγιστες εκπομπές φθορισμού, παρουσία AgamOBP5, παρατηρούνται μεταξύ 402 και 410 nm, ύστερα από αφαίρεση των φασμάτων υποβάθρου (1-NPN και προσδέτη σε ρυθμιστικό διάλυμα χωρίς πρωτεΐνη). Προσδιορίζεται ο μέσος όρος έντασης φθορισμού των τριών επαναλήψεων. Η σταθερά του 1-NPN (K_d) υπολογίζεται χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα ανάλυσης δεδομένων μη γραμμικής παλινδρόμησης GraphPad Prism 8 (www.graphpad.com).

6.1.2. Αξιολόγηση συγγένειας εν δυνάμει προσδετών της *AgamOBP5* σε μια σταθερή συγκέντρωση προσδέτη (one point screening)

Αρχικά, προσδιορίζεται η συγγένεια των πιθανών προσδετών της πρωτεΐνης σε μια σταθερή συγκέντρωση του προσδέτη (one point screening). Ειδικότερα, πραγματοποιήθηκε σάρωση (screening), παρουσία σταθερών συγκεντρώσεων 2 μM πρωτεΐνης, 5 μM 1-NPN και 10 μM του εκάστου προσδέτη σε ρυθμιστικό διάλυμα F και τελικό όγκο 300 μL . Ο προσδιορισμός της έντασης φθορισμού πραγματοποιείται όπως αναφέρθηκε παραπάνω (Υποενότητα 6.1.1). Σε κάθε περίπτωση υπολογίστηκε η ένταση φθορισμού σε δείγματα ελέγχου, απουσία πρωτεΐνης, ώστε να υπολογιστεί τυχόν φθορισμός που προέρχεται από την ελεύθερη ένωση.

6.1.3. Υπολογισμός της σταθεράς πρόσδεσης K_i των προσδετών για την *AgamOBP5*

Οι ενώσεις που στην παραπάνω διαδικασία σάρωσης παρουσίασαν ικανοποιητικό ποσοστό εκτόπισης του 1-NPN, ήτοι εκτόπιση μεγαλύτερη από 20% σε 10 μM προσδέτη, χρησιμοποιήθηκαν σε αναλυτική δοκιμή για τον υπολογισμό της σταθεράς πρόσδεσης K_i (Πίνακας 12). Για τον προσδιορισμό χρησιμοποιείται *AgamOBP5* σε τελική συγκέντρωση 2 μM και σταθερή συγκέντρωση 1-NPN (5 μM). Ο ανιχνευτής επωάζεται με την *AgamOBP5* και εν συνεχεία προστίθενται κατάλληλες ποσότητες από κάθε ένωση ώστε να επιτευχθεί ένα εύρος τελικής συγκέντρωσης από 0-25 μM . Στις περιπτώσεις της θυμόλης και της καρβακρόλης, το εύρος των τελικών συγκεντρώσεων των ενώσεων ήταν 0-100 μM .

Η σταθερά διάστασης του 1-NPN (K_d) και των ενώσεων (K_i) υπολογίζεται χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα ανάλυσης δεδομένων GraphPad Prism 8 (www.graphpad.com). Η K_d του 1-NPN για το *AgamOBP5* προσδιορίστηκε με προσαρμογή μη-γραμμικής παλινδρόμησης των δεδομένων φθορισμού σε καμπύλη κορεσμού για σύνδεση του προσδέτη σε ένα κέντρο σύνδεσης. Η εν λόγω καμπύλη κορεσμού περιγράφεται από την παρακάτω εξίσωση μετασχηματισμού της έντασης φθορισμού σε ποσοστό δεσμευμένης ένωσης:

$$[Bound] = 100 - \left[\frac{Ix - Imin}{Imax - Imin} \cdot 100 \right]$$

με ***I_x***: ένταση φθορισμού σε x μM προσδέτη

I_{min}: ένταση φθορισμού στη μέγιστη συγκέντρωση προσδέτη

I_{max}: ένταση φθορισμού σε μηδενική συγκέντρωση προσδέτη (Ένταση φθορισμού συμπλόκου OBP-1NPN)

Η σταθερά διάστασης K_i της καρβακρόλης και της θυμόλης προσδιορίζεται προσαρμόζοντας τα δεδομένα σε ένα μοντέλο συναγωνισμού για δέσμευση σε δύο κέντρα (two site) που περιγράφεται από τις παρακάτω εξισώσεις. Αρχικά, η συγκέντρωση προσδέτη όπου καταλαμβάνεται το 50% κάθε θέσης δέσμευσης προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας τις εξισώσεις που παρατίθενται παρακάτω.

$$\text{Site1} = B_{\max \text{Hi}} * X / (K_{d \text{Hi}} + X)$$

$$\text{Site2} = B_{\max \text{Lo}} * X / (K_{d \text{Lo}} + X)$$

$$Y = \text{Site1} + \text{Site2}$$

Όπου, τα $B_{\max \text{Hi}}$ και $B_{\max \text{Lo}}$ είναι οι μέγιστες ειδικές δεσμεύσεις στις δύο θέσεις και τα $K_{d \text{Hi}}$ και $K_{d \text{Lo}}$ είναι οι σταθερές διάστασης ισορροπίας, δηλαδή η συγκέντρωση του προσδέτη που απαιτείται για να επιτευχθεί το 50% της μέγιστης δέσμευσης.

Η τιμή της σταθεράς διάστασης (K_i) για κάθε θέση προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας τις εξισώσεις:

$$\log \text{EC50Lo} = \log(10^{\log K_{i \text{Lo}} * (1 + \text{HotNM} / \text{HotKdNMLo})})$$

$$\log \text{EC50Hi} = \log(10^{\log K_{i \text{Hi}} * (1 + \text{HotNM} / \text{HotKdNMHi})})$$

$$\text{Span} = \text{Top} - \text{Bottom}$$

$$\text{Part1} = \text{FractionHi} * \text{Span} / (1 + 10^{(X - \log \text{EC50Hi})})$$

$$\text{Part2} = (1 - \text{FractionHi}) * \text{Span} / (1 + 10^{(X - \log \text{EC50Lo})})$$

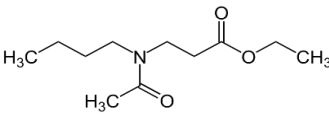
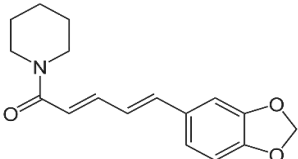
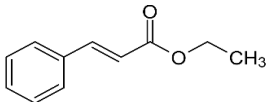
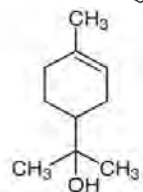
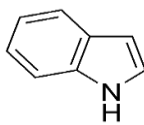
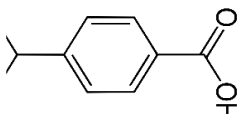
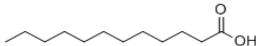
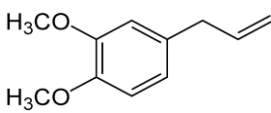
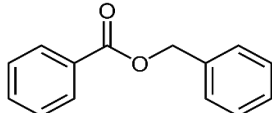
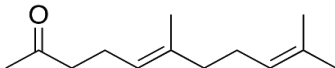
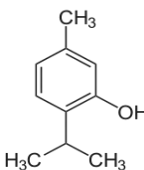
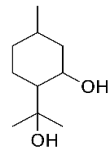
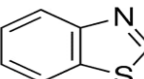
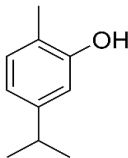
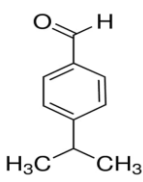
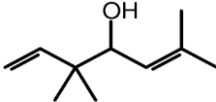
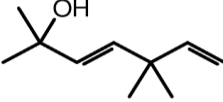
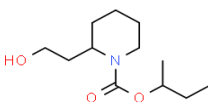
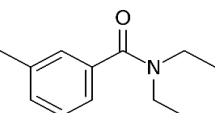
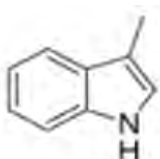
$$Y = \text{Bottom} + \text{Part1} + \text{Part2}$$

Όπου, $\text{Hot} \mu\text{M}$ η συγκέντρωση του 1-NPN στις δοκιμασίες ανταγωνισμού (5 μM) και $\text{HotKd} \mu\text{M}$ το K_d του 1-NPN ($2,8 \pm 0,5 \mu\text{M}$), υποθέτοντας ότι ένα μόριο 1-NPN καταλαμβάνει και τις δύο θέσεις δέσμευσης του προσδέτη. (144)

6.2 Μελέτη της πρόσδεσης ενώσεων με πιθανή βιοδραστική δράση στην πρωτεΐνη AgamOBP4

Καθώς η πρωτεΐνη AgamOBP4 παρουσιάζει μεγάλη ομολογία με την AgamOBP5, πρέπει να διευκρινιστεί αν προσδένονται οι ίδιες οικογένειες ενώσεων και στις δυο πρωτεΐνες. Επομένως, δοκιμάστηκαν οι ίδιοι πιθανοί προσδέτες ακολουθώντας την ίδια διαδικασία. Προσδιορίστηκε αρχικά η σταθερά πρόσδεσης του 1-NPN με την AgamOBP4 και στη συνέχεια η σταθερά K_i των ενώσεων. Παράλληλα, καθώς σύμφωνα με τη βιβλιογραφία παρατηρείται συγγένεια ανάμεσα στην πρωτεΐνη και το ινδόλιο, δοκιμάστηκε το skatole, η δομή του οποίου διαφέρει με τη δομή του ινδολίου, λόγω ενός επιπλέον μεθυλίου (Πίνακας 12).

Πίνακας 12: Ενώσεις με εντομοαπωθητική δράση, που δοκιμάστηκαν ως πιθανοί προσδέτες της AgamOBP5 (48)

Ενώσεις	Δομή	Ενώσεις	Δομή
IR3535		Piperine	
Ethyl Cinnamate		A- Terpineol	
Indole		Cuminic Acid	
Lauric Acid		Methyl Eugenol	
Benzyl Benzoate		Geranyl Acetone	
Thymol		PMD 75	
Benzothiazole		1-Octenole	
Carvacrol		Cuminaldehyde	
Artemisia Alcohol		Yomogi Alcohol	
Icaridin		DEET	
skatole			

6.3 Μελέτη της πρόσδεσης ενώσεων με πιθανή βιοδραστική δράση στην πρωτεΐνη AgamOBP1

Καθώς για την πρωτεΐνη AgamOBP1 έχει προσδιοριστεί η κρυσταλλική δομή του συμπλόκου της τόσο με το DEET όσο και με την ικαριδίνη, υπάρχουν πληροφορίες τόσο για την ομάδα των προσδετών της όσο και για τον τρόπο σύνδεσής τους. Χρησιμοποιώντας ως πρότυπο την ένωση DEET, έχουν σχεδιαστεί και συντεθεί ποικίλες ενώσεις που αποτελούν πιθανούς προσδέτες της AgamOBP1.

Η αξιολόγηση της συγγένειας των ενώσεων με το πρωτεϊνικό μόριο πραγματοποιείται, επίσης, με *in vitro* φθορισμομετρικές μελέτες. Χρησιμοποιήθηκε ως φθορίζον μόριο το 1-NPN -όπως και στις πειραματικές δοκιμές με την AgamOBP5- και η καταγραφή των φασμάτων εκπομπής πραγματοποιήθηκε σε φασματοφωτόμετρο FluoroLog (HORIBA Scientific) στους 25 °C, διαμόρφωσης πρόσπτωσης 90°, με χρήση κυψελίδας χαλαζία οπτικής διαδρομής 1 cm. Τα πλάτη των σχισμών ορίστηκαν σε 5 nm τόσο για διέγερση όσο και για εκπομπή.

Για τον προσδιορισμό της K_d του 1-NPN πραγματοποιείται τιτλοδότηση ρυθμιστικού διαλύματος (σε 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 και 100 mM NaCl) όγκου 1 mL, το οποίο περιέχει 2 μ M AgamOBP1. Για την τιτλοδότηση, λαμβάνεται ποσότητα από κατάλληλα διαλύματα παρακαταθήκης (stocks solution) X mM 1-NPN σε μεθανόλη, ώστε να επιτευχθεί ένα εύρος τελικής συγκέντρωσης από 0-50 μ M. Αντίστοιχα, ο προσδιορισμός της K_i των προσδετών πραγματοποιείται με τιτλοδότηση 1 mL διαλυμάτων με 2 μ M AgamOBP1 και 10 μ M 1-NPN. Οι ενώσεις διαλύονται σε μεθανόλη. Το εύρος των τελικών συγκεντρώσεων των προσδετών είναι από 0-50 μ M. Σε όλες τις δοκιμές, η τελική περιεκτικότητα των διαλυμάτων σε μεθανόλη περιορίζεται σε 1,5% (v/v).

Οι σταθερές διάστασης K_d και K_i του 1-NPN και των προσδετών, αντίστοιχα, υπολογίζονται με το πρόγραμμα ανάλυσης δεδομένων GraphPad Prism 8. Για τον προσδιορισμό της K_d τα φθορισμομετρικά δεδομένα προσαρμόστηκαν με μη-γραμμική παλινδρόμηση σε καμπύλη κορεσμού για μια θέση πρόσδεσης που περιγράφεται από την παρακάτω εξίσωση.

$$Y = Bmax X/(Kd + X) + NS * X + Backgr$$

υποθέτοντας ειδική δέσμευση (NS=0).

Για τον προσδιορισμό της K_i τα φθορισμομετρικά δεδομένα προσαρμόστηκαν με μη-γραμμική παλινδρόμηση σε ένα μοντέλο συναγωνισμού για πρόσδεση σε ένα κέντρο (one site) που περιγράφεται από τις παρακάτω εξισώσεις,

$$Y = Bottom + (Top - Bottom)/(1 + 10^{(X - LogEC50)})$$

και $logEC50 = \log(10^{(logKi * (1 + Hot\mu M / HotKd\mu M))})$.

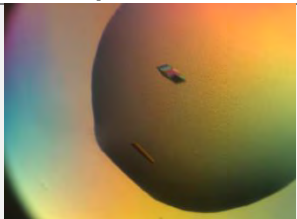
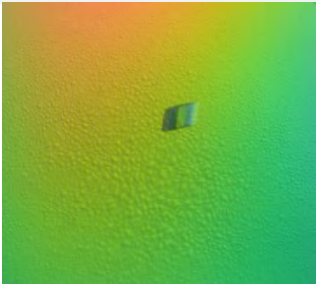
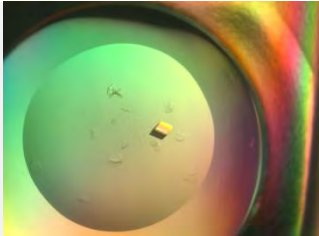
Όπου, Hot μ M ορίζεται η συγκέντρωση του 1-NPN στις δοκιμασίες ανταγωνισμού (10 μ M), HotKd μ M το K_d του 1-NPN (4,29 μ M), και logEC50 η συγκέντρωση του προσδέτη που οδηγεί σε 50% μείωση της έντασης φθορισμού. (162)

Κεφάλαιο 7^ο: Κρυσταλλογραφικές μελέτες

7.1 Προσδιορισμός της τρισδιάστατης κρυσταλλικής δομής της AgamOBP5

Απαραίτητο βήμα για την περαιτέρω μελέτη της πρωτεΐνης αποτέλεσε ο προσδιορισμός της τρισδιάστατης δομής της. Για την ανάπτυξη κρυστάλλων, εφαρμόζεται η τεχνική της διάχυσης ατμών καθήμενης σταγόνας, με το αυτοματοποιημένο σύστημα κρυστάλλωσης πρωτεϊνών Oryxnano (Douglas Instruments Ltd). Οι σταγόνες κρυστάλλωσης αποτελούνται από 0,5 μ L πρωτεΐνης (12 mg/mL) σε HPLC νερό, 0,5 μ L καταβυθιστικού διαλύματος που εξισορροπήθηκαν έναντι καταβυθιστικού διαλύματος όγκου 50 μ L στους 20°C. Για την ανάπτυξη των κρυστάλλων δοκιμάστηκαν 276 διαφορετικά καταβυθιστικά διαλύματα, τα οποία είναι διαθέσιμα σε εμπορικά κιτ κρυστάλλωσης πρωτεϊνών. Έπειτα από 15 μέρες εμφανίστηκαν κρύσταλλοι σε διαφορετικές συνθήκες όπως φαίνεται στον Πίνακα 13.

Πίνακας 13: Συνθήκες κρυστάλλωσης της πρωτεΐνης AgamOBP5

<i>Εμπορικό κιτ κρυστάλλωσης</i>	<i>Αριθμός Συνθήκης</i>	<i>Συνθήκη</i>	<i>Κρύσταλλοι</i>
<i>Morpheus</i>	E4	0.12M alcohols 0.1M Imidazole; MES(acid) pH: 6.5 37.5% MPD P1K P3350	
	E8	0.12M alcohols 0.1M Sodium HEPE; MOPS (acid) pH: 7.5 37.5% MPD P1K P3350	
	F4	0.12M Monosaccharides 0.1M Imidazole; MES(acid) pH 6.5 37.5% MPD; PEG1000; PEG3350	
	F12	0.12M Monosaccharides 0.1M Tris(base); Bicine pH 8.5 37.5% MPD; PEG1000; PEG3350	

Η συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων πραγματοποιήθηκε υπό κρυογονικές συνθήκες (100K) από απλούς μονοκλινικούς κρυστάλλους ($P2_1$), στην πηγή συγχροτρονικής ακτινοβολίας Diamond Light Source (Οξφόρδη, UK) σε μέγιστη ευκρίνεια 1,3 έως 1,35Å.

Η η επεξεργασία των περιθλασιγραμμάτων (integration) για την δημιουργία ενός ολοκληρωμένου συνόλου κρυσταλλογραφικών δεδομένων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα XDS. (163) Η κλιμάκωση (scaling) των περιθλάσεων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα SCALA (164) του πακέτου προγραμμάτων CCP4, (165) και το σύνολο των οπτικών εντάσεων I που προέκυψαν από την επεξεργασία των δεδομένων περίθλασης, μετασχηματίστηκαν σε δομικούς παράγοντες F με το πρόγραμμα TRUNCATE. Οι αρχικές φάσεις του συμπλόκου AgamOBP5-MPD προσδιορίστηκαν μέσω του προγράμματος MOLREP (166) χρησιμοποιώντας ως μοντέλο μοριακής αντικατάστασης τη δομή AgamOBP4-ινδόλης (PDB: 3Q8I). (165) (167)

Ακολούθησαν πολλαπλοί κύκλοι χειροκίνητης οικοδόμησης (manual model building) του μοντέλου με το πρόγραμμα COOT (168) και βελτιστοποίησης (refinement) με το πρόγραμμα REFMAC. (169) Παράλληλα προστέθηκαν στο μοντέλο μόρια του ύδατος εφόσον παρουσίαζαν αλληλεπιδράσεις με την πρωτεΐνη ή με άλλα μόρια ύδατος, και εντοπίζονταν στον ηλεκτρονικό χάρτη $F_o - F_c$ με $\sigma > 2.0$. Επιπλέον, προστέθηκαν ένα ιόν νατρίου και ένα μόριο PEG στην ηλεκτρονική πυκνότητα του μοντέλου. Ύστερα από έναν ακόμη κύκλο βελτιστοποίησης και χειροκίνητης οικοδόμησης, ενσωματώθηκε το μοντέλο του MPD, το οποίο ανακτήθηκε από τη βάση δεδομένων PDB και προσαρμόστηκε στην ηλεκτρονική πυκνότητα. (170)

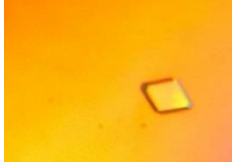
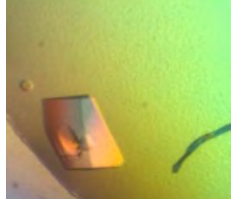
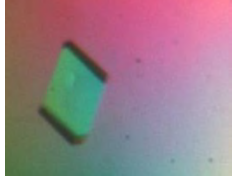
Ο έλεγχος της στερεοχημικής ορθότητας του τελικού μοντέλου αξιολογήθηκε μέσω των προγραμμάτων MolProbity (171) και PDB-REDO. (172) Οι υπερθέσεις των δομών πραγματοποιήθηκαν με το πρόγραμμα LSQKAB. ενώ ο όγκος της κοιλότητας πρόσδεσης προσδιορίστηκε με το πρόγραμμα CASTp. (173) Οι σχηματικές απεικονίσεις των δομών πραγματοποιήθηκαν με το πρόγραμμα PyMOL. Οι ατομικές συντεταγμένες και οι δομικοί παράγοντες του συμπλόκου έχουν κατατεθεί στην πρωτεϊνική βάση δεδομένων Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org>) με κωδικό 8BXU. (144)

7.2 Προσδιορισμός της τρισδιάστατης κρυσταλλικής δομής των συμπλόκων AgamOBP5- καρβακρόλη και AgamOBP5-θυμόλη

Για την ανάπτυξη κρυστάλλων των δυο συμπλόκων AgamOBP5- καρβακρόλη και AgamOBP5-θυμόλη, χρησιμοποιήθηκαν τα καταβυθιστικά διαλύματα τα οποία οδήγησαν σε κρυστάλλους της πρωτεΐνης (Πίνακας 14). Στο διάλυμα προστέθηκε καρβακρόλη και θυμόλη, αντίστοιχα, σε τελική συγκέντρωση 1mM, ενώ η τελική περιεκτικότητα του διαλύματος σε μεθανόλη (τον διαλύτη των ενώσεων) ήταν 2% v/v. Οι σταγόνες κρυστάλλωσης αποτελούνται από 0,5μl πρωτεΐνης (12mg/ml) σε HPLC νερό, 0,5μl καταβυθιστικού διαλύματος και εξισορροπούνται έναντι δεξαμενής καταβυθιστικού διαλύματος όγκου 50μl στους 20°C. Οι κρύσταλλοι των συμπλόκων εμφανίστηκαν έπειτα από 5 μέρες. Η συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων υπό κρυογονικές συνθήκες από απλούς μονοκλινείς κρυστάλλους ($P2_1$), πραγματοποιήθηκε στο σταθμό IO4-1 στο Diamond Light Source (Οξφόρδη, UK) σε μέγιστη ευκρίνεια 1,3 έως 1,35 Å.

Για την επεξεργασία των κρυσταλλογραφικών δεδομένων πραγματοποιήθηκε η ίδια διαδικασία με την πρωτεΐνη AgamOBP5. Στην περίπτωση του συμπλόκου AgamOBP5-καρβακρόλη/θυμόλη, ως μοντέλο μοριακής αντικατάστασης χρησιμοποιήθηκε το σύμπλοκο AgamOBP5-MPD. Επίσης, ύστερα από αρκετούς κύκλους βελτιστοποίησης και χειροκίνητης οικοδόμησης, προστέθηκε ένα ιόν νατρίου, ένα μόριο 1-βουτανόλης, ένα μόριο S-1,2-προπανοδιόλης και R-1,2-προπανοδιόλης στην AgamOBP5-καρβακρόλη, ενώ δύο ιόντα νατρίου, ένα S-1,2- προπανοδιόλη και ένα μόριο PEG προσαρμόστηκαν στο μοντέλο AgamOBP5-θυμόλης. Έπειτα από ένα επιπλέον κύκλο βελτιστοποίησης, προστέθηκαν και προσαρμόστηκαν τα μόρια της θυμόλης το οποία ανακτήθηκε από την PDB (code IPB) και της καρβακρόλης που δημιουργήθηκε από τον εξυπηρετητή PRODRG. (174) Οι ατομικές συντεταγμένες και οι δομικοί παράγοντες του συμπλόκου έχουν κατατεθεί στην πρωτεϊνική βάση δεδομένων Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org>) με κωδικό 8BXW (AgamOBP5-καρβακρόλη) και 8BXV (AgamOBP5-θυμόλη). (144)

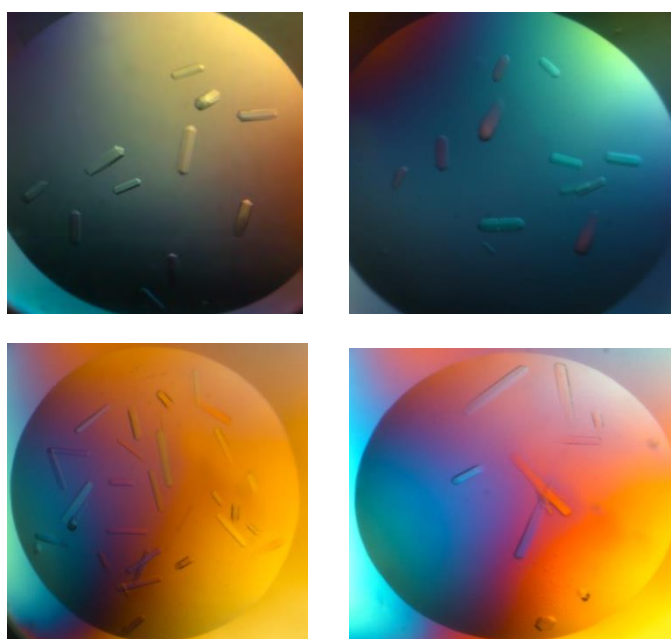
Πίνακας 14: Συνθήκες κρυστάλλωσης των συμπλόκων *AgamOBP5-carvacrol* και *AgamOBP5-thymol*

Εμπορικό κιτ κρυστάλλωσης	Αριθμός Συνθήκης	Συνθήκη	Κρύσταλλοι
<i>Morpheus</i>	B2	0.12M alcohols 0.1M Imidazole; MES(acid) pH: 6.5 37.5% MPD P1K P3350 +1mM Carvacrol	
	D2	0.12M Monosaccharides 0.1M Tris(base); Bicine pH 8.5 30% P550MME_P20K +1mM Carvacrol	
	D2	0.12M Monosaccharides 0.1M Tris(base); Bicine pH 8.5 30% P550MME_P20K + 1mM Carvacrol	
	E3	0.12M alcohols 0.1M Tris(base); Bicine pH 8.5 30% P550MME_P20K + 1mM Thymol	
	F3	0.12M alcohols 0.1M Imidazole; MES(acid) pH: 6.5 37.5% MPD P1K P3350 + 1mM Thymol	
	H2	0.12M Monosaccharides 0.1M Tris(base); Bicine pH 8.5 30% P550MME_P20K + 1mM Carvacrol	
	H2	0.12M Monosaccharides 0.1M Tris(base); Bicine pH 8.5 30% P550MME_P20K + 1mM Carvacrol	
	H3	0.12M Monosaccharides 0.1M Tris(base); Bicine pH 8.5 30% P550MME_P20K + 1mM Thymol	

7.3 Προσδιορισμός της τρισδιάστατης κρυσταλλικής δομής της πρωτεΐνης AealOBP1

Για την ανάπτυξη κρυστάλλων χρησιμοποιήθηκαν 276 συνθήκες διαθέσιμες από εμπορικά κιτ κρυστάλλωσης με την χρήση ρομπότ κρυστάλλωσης. Οι σταγόνες κρυστάλλωσης αποτελούνται από 0,5 μL πρωτεΐνης (12mg/mL) σε ρυθμιστικό διάλυμα (10mM Tris-HCl pH 8,0), 0,5 μL καταβυθιστικού διαλύματος που εξισορροπήθηκαν έναντι καταβυθιστικού διαλύματος όγκου 50 μL στους 20°C. Οι κρύσταλλοι εμφανίστηκαν έπειτα από 15 μέρες σε διάλυμα καταβύθισης 0.16 M tri-sodium citrate pH 6.5 (Εικόνα 51). Πριν τη συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων, ο κρύσταλλος μεταφέρθηκε σε φρέσκο διάλυμα κρυστάλλωσης που περιείχε 10% (v/v) γλυκερόλη ως κρυοπροστατευτικό. Η συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων υπό κρυογονικές συνθήκες από απλούς μονοκλινείς κρυστάλλους ($P2_1$), πραγματοποιήθηκε στο σταθμό IO4-1 στο Diamond Light Source (Οξφόρδη, UK) σε μέγιστη ανάλυση 1,8 έως 2,9 Å.

Η ανάλυση των κρυσταλλογραφικών δεδομένων πραγματοποιήθηκε όπως περιεγράφηκε στην Ενότητα 7.1. Ως μοντέλο μοριακής αντικατάστασης χρησιμοποιήθηκε η δομή της πρωτεΐνης AeagOBP22 (PDB: 6OG0) με την οποία παρουσιάζει μεγάλη ομολογία. Οι ατομικές συντεταγμένες και οι δομικοί παράγοντες του συμπλόκου έχουν κατατεθεί στην πρωτεϊνική βάση δεδομένων Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org>) με κωδικό 8BY4.



Εικόνα 51: Κρύσταλλοι της πρωτεΐνης AealOBP1 σε καταβυθιστικό διάλυμα 0.1.6M tri-sodium citrate

Κεφάλαιο 8^ο : Θερμοδυναμικές μελέτες

Η αναδίπλωση της πρωτεΐνης καθορίζεται εν πολλοίς από την πρωτοταγή δομή της, δηλαδή την αμινοξική αλληλουχία, και διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη λειτουργία του μορίου. Πρόκειται για μια πολύπλοκη διαδικασία, η οποία πραγματοποιείται μέσω διαδοχικών ενδιάμεσων καταστάσεων με ελαττώμενη ελεύθερη ενέργεια Gibbs. Καθώς οι ενδιάμεσες καταστάσεις είναι ιδιαίτερα ασταθείς, παρατηρείται ταχύτατος ρυθμός μετάπτωσης των καταστάσεων των μορίων.

Ένα θερμοδυναμικό σύστημα χαρακτηρίζεται από έντονες μεταβολές στην ενθαλπία, την εντροπία και σε λοιπές παραμέτρους, οι οποίες οφείλονται στη μετάβαση από μια θερμοδυναμική κατάσταση σε μια άλλη. Θεωρώντας ένα πρωτεϊνικό μόριο ως ένα θερμοδυναμικό σύστημα, είναι δυνατό να προσδιοριστεί η θερμοδυναμική του εικόνα (προφίλ) σε κάθε ενδιάμεση κατάσταση. Μια σωστά αναδιπλωμένη και λειτουργική πρωτεΐνη παρουσιάζει έντονες διαφορές στην ενθαλπία, την εντροπία και τον όγκο συγκριτικά με μια μετουσιωμένη και πλήρως αποδιαταγμένη πρωτεΐνη.

Οι πρωτεΐνες θεωρούνται κατάλληλα μόρια για θερμοδυναμικές μελέτες. Αφενός έχουν μέγεθος που καθιστά δυνατή τη μελέτη ενός μεγάλου αριθμού πρωτεϊνών για συγκριτικές μελέτες. Αφετέρου, είναι αρκετά μεγάλου μεγέθους ώστε να διαθέτουν αρκετές διακριτές θέσεις πρόσδεσης, οι οποίες ανιχνεύονται με τις κατάλληλες μεθόδους. Η κρυσταλλογραφία ακτίνων- Χ και η φασματοσκοπία NMR προσδιορίζουν την τρισδιάστατη δομή του πρωτεϊνικού μορίου. Ωστόσο, η κρυσταλλογραφία περιορίζεται σε μια σχετικά στατική εικόνα του μορίου, γεγονός ιδιαίτερα παραπλανητικό για τις ενεργειακές στάθμες της πρωτεΐνης. Ενώ και η φασματοσκοπία NMR δεν δίνει πληροφορίες για την ενέργεια των μορφών. Επίσης, σε αντίθεση με την κρυσταλλογραφία και όμοια με τη φασματοσκοπία NMR, στην θερμιδομετρία μελετώνται οι φυσικές ιδιότητες της πρωτεΐνης στο διάλυμα και όχι σε σχετικά περιορισμένη κατάσταση όπως στους πρωτεϊνικούς κρυστάλλους. (175)

8.1 Αδιαβατική θερμιδομετρία διαφορικής σάρωσης (DSC)

Η αδιαβατική θερμιδομετρία διαφορικής σάρωσης (DSC) αποτελεί μια μέθοδο για τη μελέτη της μεταβολής των θερμοδυναμικών παραμέτρων ενός συστήματος, η οποία προκαλείται από την αύξηση ή τη μείωση της θερμοκρασίας. Σε περιπτώσεις μορίων μικρού μοριακού βάρους, η μελέτη περιορίζεται σε συσσωματώματά τους, τα οποία εμφανίζουν διαμοριακή συνεργατικότητα. Υψηλής συνεργατικότητας δομές,

όπως οι πρωτεΐνες, οι οποίες σταθεροποιούνται μέσω ισχυρών ενδομοριακών ή/και διαμοριακών αλληλεπιδράσεων, υφίστανται μεταβάσεις σε ενδιάμεσες καταστάσεις, οι οποίες ανιχνεύονται μέσω της μεταβολής των θερμοδυναμικών παραμέτρων. Η ανάλυση DSC εφαρμόζεται για τον προσδιορισμό των θερμοδυναμικών παραμέτρων.

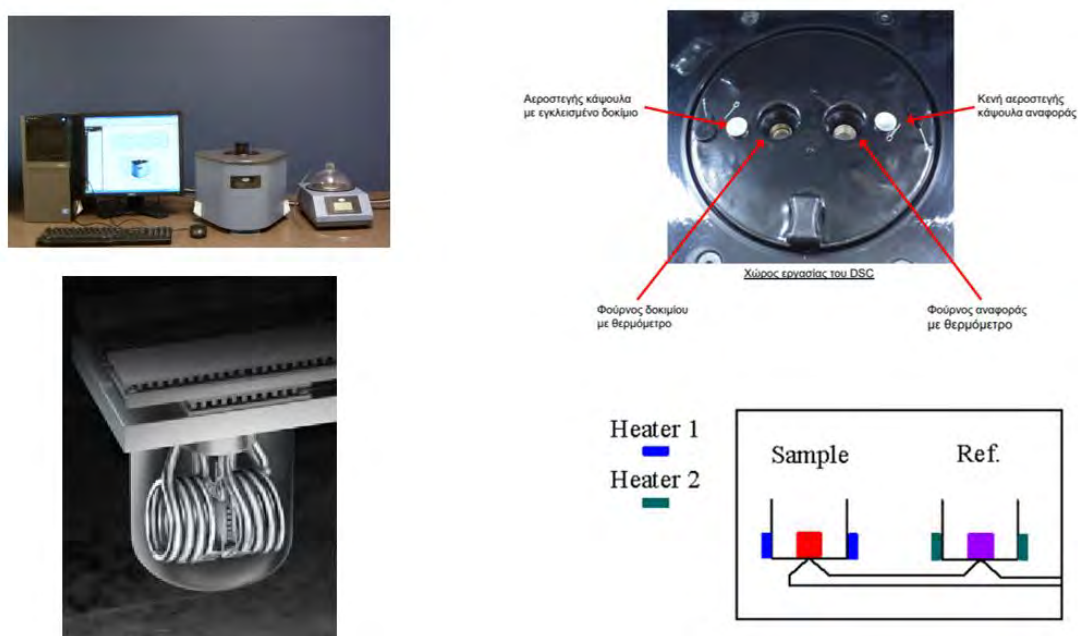
Για την μελέτη των πρωτεϊνών η θερμιδομετρική μελέτη παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς αποτελεί τη μοναδική μέθοδο άμεσου προσδιορισμού της ενθαλπίας του μορίου. Καθώς η ενθαλπία και η θερμοκρασία είναι εξαρτώμενες μεταβλητές, η μελέτη των θερμοδυναμικών παραμέτρων στις ενδιάμεσες μεταβατικές καταστάσεις της πρωτεΐνης είναι σημαντική. Όλες οι θερμικά επαγόμενες μεταβολές συνοδεύονται από παράλληλη μεταβολή στην ενθαλπία, δηλαδή πραγματοποιούνται με απορρόφηση ενέργειας (αύξηση θερμοκρασίας) ή έκλυση ενέργειας (ελάττωση θερμοκρασίας). Η σχέση ενθαλπίας- θερμοκρασίας παρέχει όλη τη θερμοδυναμική πληροφορία του συστήματος. (176)

❖ Πειραματική διαδικασία

Οι πρωτεΐνες AgamOBP5 και AgamOBP4 αξιολογήθηκαν ως προς τη σταθερότητά τους σε όξινο (pH: 4.5) και αλκαλικό περιβάλλον (pH:8.0). Επίσης, προσδιορίστηκε η συγγένεια ενώσεων με την AgamOBP5. Συγκεκριμένα, οι ενώσεις θυμόλη, καρβακρόλη, artemisia alcohol και cumin aldehyde, οι οποίες παρουσίασαν ικανοποιητικά αποτελέσματα σε φθορισμομετρικές ή/και *in vivo* μελέτες, αξιολογήθηκαν ως προς τη σύνδεσή τους στην AgamOBP5. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο του Καθ. Φέσσα (Department of Food, Environmental and Nutritional Sciences, University of Milan) στο πλαίσιο του προγράμματος Erasmus placement.

Οι θερμιδομετρικές μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα (TRIS-HCl 10 mM pH:8,0, NaCl 100 mM) με συγκέντρωση πρωτεΐνης 0,2 mM χρησιμοποιώντας το όργανο TA Instruments Nano-DSC (6300) (Εικόνα 52) με εύρος θερμοκρασίας από 20°C έως 110°C. Πριν την έναρξη της μέτρησης, προστέθηκε ποσότητα της προς μελέτη ένωσης μέχρι την επιθυμητή αναλογία προσδέτη/πρωτεΐνης ($[L]/[P] = 15$ ή $7,5$). Η τελική περιεκτικότητα της μεθανόλης στα διαλύματα πρωτεΐνης ήταν σταθερά 2% (v/v). Η αναλογία προσδέτη προς πρωτεΐνη ήταν η μέγιστη δυνατή, ώστε να είναι συμβατή με τις πειραματικές συνθήκες. Υψηλότερες συγκεντρώσεις προσδέτη οδηγούν σε καθίζηση, ενώ οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις πρωτεΐνης δεν θα ήταν επαρκείς για την λήψη θερμιδομετρικών μετρήσεων.

Τα δεδομένα αναλύθηκαν μέσω του λογισμικού THESEUS. (177)Εν συντομία, η φαινομενική μοριακή θερμοχωρητικότητα $CP(T)$ του δείγματος κλιμακώθηκε λαμβάνοντας ως γραμμής αναφοράς (baseline) τα πειραματικά δεδομένα στην περιοχή πριν το σημείο μετουσίωσης. Με τον τρόπο αυτό υπολογίστηκε η περίσσεια (σε σχέση με τη φυσική κατάσταση) μοριακή θερμοχωρητικότητα $CP_{exc}(T)$ σε όλο το εύρος θερμοκρασίας που σαρώθηκε. Η πτώση θερμικής ικανότητας, $\Delta_d CP$, σε όλο το σήμα συνοδευόταν από ένα σχετικά μεγάλο σφάλμα και επομένως δεν ελήφθη υπόψη στην παρούσα εργασία. Η περιοχή που βρίσκεται εκατέρωθεν των καταγεγραμμένων τιμών, αντιστοιχεί άμεσα στη σχετική ενθαλπία μετουσίωσης, $\Delta_d H^\circ$, σε μονάδες kJ/mol^{-1} . Τα σφάλματα αξιολογήθηκαν με βάση τουλάχιστον τρεις επαναλήψεις. Οι προσπάθειες προσαρμογής που βασίζονται στα θερμοδυναμικά μοντέλα μετουσίωσης πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τη μη γραμμική μέθοδο Levenberg-Marquardt. Τα σφάλματα κάθε παραμέτρου προσαρμογής υπολογίστηκαν με όριο εμπιστοσύνης 95,4% με τη μέθοδο προσομοίωσης Monte Carlo (178)και προέκυψαν αμελητέα σε σχέση με τα πειραματικά σφάλματα.



Εικόνα 52: Όργανο TA Instruments Nano-DSC (6300), το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τις θερμοδυναμικές αναλύσεις

Κεφάλαιο 9^ο : *in vivo* μελέτες συμπεριφοράς

Η εντομοαπωθητική δράση των προσδετών αξιολογείται με *in vivo* μελέτες συμπεριφοράς. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο εντομολογίας του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου, υπό την επίβλεψη και καθοδήγηση του Δρ. Α. Μιχαηλάκη.

9.1 Εκτροφή κουνουπιών *Aedes albopictus*

Τα ενήλικα κουνούπια λαμβάνονται από μια εργαστηριακή αποικία του *Ae. Albopictus*, η οποία διατηρείται στο Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο σε θερμοκρασία $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, σχετική υγρασία 80% και φωτοπερίοδο 16:8-h φωτός/σκότους (L/D). Στον κλωβό τοποθετούνται πλαστικά ποτήρια ζέσεως με 100 ml ύδατος, εντός των οποίων τοποθετείται διηθητικό χαρτί για ωτοκία των κουνουπιών. Τα αυγά συλλέγονται και μεταφέρονται σε ειδικά δοχεία για εκκόλαψη. Οι προνύμφες εκτρέφονται σε κυλινδρικά σκεύη με νερό βρύσης (περίπου 400/σκεύος) με επαρκή ποσότητα κατάλληλης ιχθυοτροφής (JBL Novo Tom 10% Artemia) μέχρι την εμφάνιση ενηλίκων. Τα ενήλικα κουνούπια συλλέγονται με αναρροφητήρα στόματος (Εικόνα 53) και μεταφέρονται στο κλωβό εκτροφής. Στα θηλυκά χορηγείται φρέσκο αίμα όρνιθας με ειδική συσκευή αίματος (blood feeder) της εταιρείας Hemotech. (179) (180)



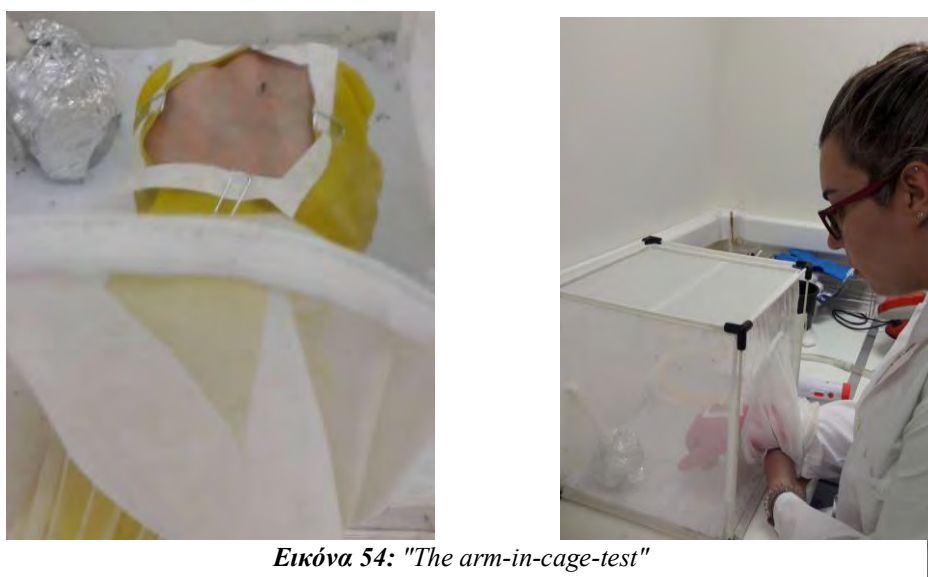
Εικόνα 53: Συλλογή κουνουπιών με αναρροφητήρα στόματος

9.2 *in vivo* αξιολόγηση εντομοαπωθητικής δράσης (*The arm-in-cage-test*)

Για την αξιολόγηση της απωθητικής ικανότητας των υπό μελέτη ενώσεων, υπολογίζεται ο αριθμός των προσγειώσεων των κουνουπιών στο ανθρώπινο χέρι. Η δοκιμή πραγματοποιείται σε κλωβό (33×33×33 cm) στους 25±2°C και σε 70-80% σχετική υγρασία. Σε κάθε κλωβό τοποθετούνται 100 ενήλικα κουνούπια *Ae. albopictus* (αναλογία φύλου, 1:1), ηλικίας 5 έως 10 ημερών. Τα κουνούπια δεν τρέφονται για 12 ώρες. Για όλες τις βιοδοκιμές χρησιμοποιείται πλαστικό γάντι με άνοιγμα διαστάσεων 5×5 cm.

Όλες οι υπό εξέταση ενώσεις εφαρμόζονται σε χαρτί χρωματογραφίας Whatman συνολικής επιφάνειας 24 cm² -το οποίο τοποθετείται γύρω από το άνοιγμα του γαντιού -και ελέγχονται σε διαφορετικές δόσεις. Τα προτεινόμενα πρωτόκολλα προτείνουν ως τη μέγιστη δόση δοκιμής ≈1 mg/cm², μια δοσολογία που χρησιμοποιείται συνήθως σε δοκιμές αποτελεσματικότητας απωθητικών (Εικόνα 55). Οι υπό μελέτη ενώσεις διαλυτοποιούνται σε διχλωρομεθάνιο (DCM) ή σε μεθανόλη ώστε να επιτευχθεί κατάλληλη αρχική συγκέντρωση δραστικής και εφαρμόζονται σε χαρτί χρωματογραφίας (50 μL / 24 cm² για κάθε επανάληψη). Η τελική συγκέντρωση ήταν 0.01–0.4 mg δραστικής /cm².

Το DEET χρησιμοποιείται ως θετικός μάρτυρας (ένωση αναφοράς). Επίσης, στις μελέτες απωθητικότητας πραγματοποιούνται δοκιμές ελέγχου απουσία ένωσης, μόνο με διαλύτη (DCM ή μεθανόλη αντίστοιχα). Ο συνολικός χρόνος έκθεσης ήταν 5 λεπτά, ενώ κάθε δοκιμή επαναλήφθηκε οκτώ φορές. (181) (182)



Εικόνα 54: "The arm-in-cage-test"

9.3 Προσδιορισμός δείκτη απωθητικότητας (RI) και στατιστική ανάλυση

Ο μετασχηματισμός του αριθμού προσγειώσεων σε δείκτη απωθητικότητας ($RI \pm SE$) υπολογίζεται από την ακόλουθη εξίσωση:

$$RI = 1 - (T / C) = (C - T) / C$$

όπου C είναι ο αριθμός των προσγειώσεων στο δείγμα ελέγχου και T ο αριθμός των προσγειώσεων στην υπό μελέτη ένωση.

Για την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων απώθησης θηλυκών κουνουπιών *Ae. albopictus* χρησιμοποιήθηκε μέθοδο Kruskal–Wallis test. Σε περίπτωση όπου παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές, εφαρμόζεται η μέθοδος Mann-Whitney U. (183) (184)

9.4 Πειράματα εντομοαπόθησης σε κουνούπια *Culex pipiens*.

Οι καλλιέργειες των κουνουπιών *Culex pipiens* αναπτύχθηκαν με το ίδιο πρωτόκολλο που ακολουθείται για τα κουνούπια *Ae. Albopictus*. Αντίθετα, το πρωτόκολλο των βιοδοκιμών παρουσιάζει σημαντικές διαφορές. Αρχικά, ετοιμάζονται κλωβοί σύμφωνα με την προηγούμενη διαδικασία. Παράλληλα, δυο πλαστικά δοχεία, τα οποία περιέχουν 10ml νερό με ζάχαρη σε περιεκτικότητα 10%w/v, καλύπτονται με λεπτή στρώση βαμβακιού, ώστε να επιτρέπεται η εναπόθεση των κουνουπιών και εισάγονται στον κλωβό σε απόσταση 10cm μεταξύ τους. Περιμετρικά του πρώτου δοχείου τοποθετείται διηθητικό χαρτί στο οποίο εφαρμόζεται το προς μελέτη δείγμα. Αντίστοιχα, στο δεύτερο δοχείο τοποθετείται διηθητικό χαρτί με το δείγμα ελέγχου. Η τροφή των κουνουπιών (νερό με 10%w/v ζάχαρη) απομακρύνεται από τους κλωβούς 6 ώρες πριν την έναρξη των δοκιμών. Κατά τη διάρκεια της δοκιμής, καταγράφονται οι προσγειώσεις ανά λεπτό που παρατηρούνται σε κάθε δοχείο (Εικόνα 55). Η συνολική διάρκεια της δοκιμής είναι τα 10 λεπτά, ενώ πραγματοποιούνται 8 επαναλήψεις. Το ίδιο πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκε και για τον προσδιορισμό της χρονικής διάρκειας της δράσης του δειγματος. (185)



Εικόνα 55: Εικόνα από το εσωτερικό του κλωβού κατά τα πειράματα σε καλλιέργειες *Culex pipiens*. Το επάνω δοχείο αποτελεί το προς μελέτη δείγμα, ενώ εκατέρωθεν τοποθετήθηκε το δείγμα ελέγχου.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Κεφάλαιο 1^ο: Υπερέκφραση και απομόνωση της *AgamOBP5* (144)

Το πλασμίδιο pET-22b(+)-AgamOBP5 μετασχηματίστηκε σε δεκτικά κύτταρα *E.coli* Origami B (DE3). Σύμφωνα με την ανάλυση σε πηκτή 15% SDS-PAGE η πρωτεΐνη εκφράζεται στο κυτταρικό ίζημα με τη μορφή σωματιδίων εγκλεισμού έπειτα από υπερέκφραση με 1mM IPTG (Εικόνα 56). Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στα βοθρία με την εξής σειρά:

0: Πρωτεϊνικοί δείκτες.

1: Ολικό κυτταρικό δείγμα πριν την επαγωγή

2: Ολικό κυτταρικό δείγμα μετά την επαγωγή με 0,5 mM IPTG

3: Κυτταρικό λύμα μετά την επαγωγή με 0,5 mM IPTG

4: Κυτταρικό ίζημα μετά την επαγωγή με 0,5 mM IPTG

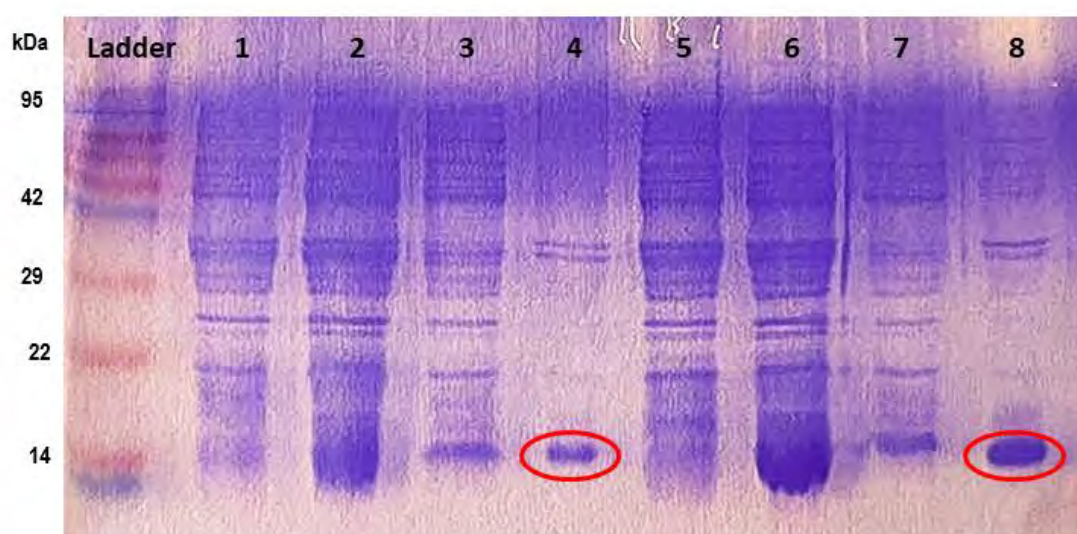
5: Ολικό κυτταρικό δείγμα πριν την επαγωγή

6: Ολικό κυτταρικό δείγμα μετά την επαγωγή με 1 mM IPTG

7: Κυτταρικό λύμα μετά την επαγωγή με 1 mM IPTG

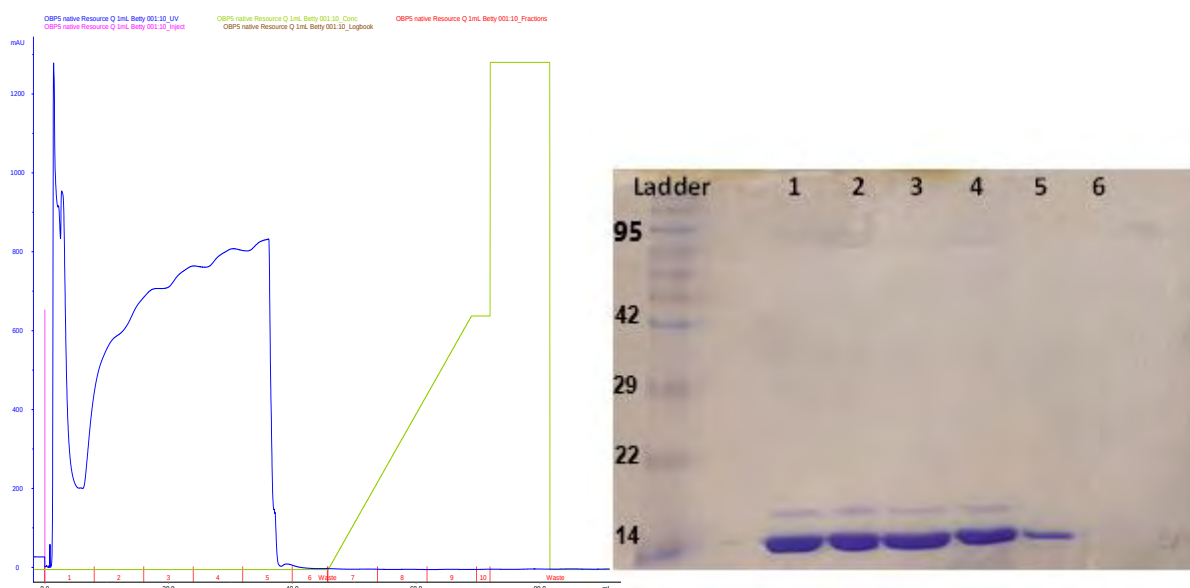
8: Κυτταρικό ίζημα μετά την επαγωγή με 1mM IPTG

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο απομόνωσης, ακολούθησε η λύση των κυττάρων, η επεξεργασία και πλύση των σωματίων εγκλεισμού, η αποδιάταξη και η αναδίπλωση της πρωτεΐνης.



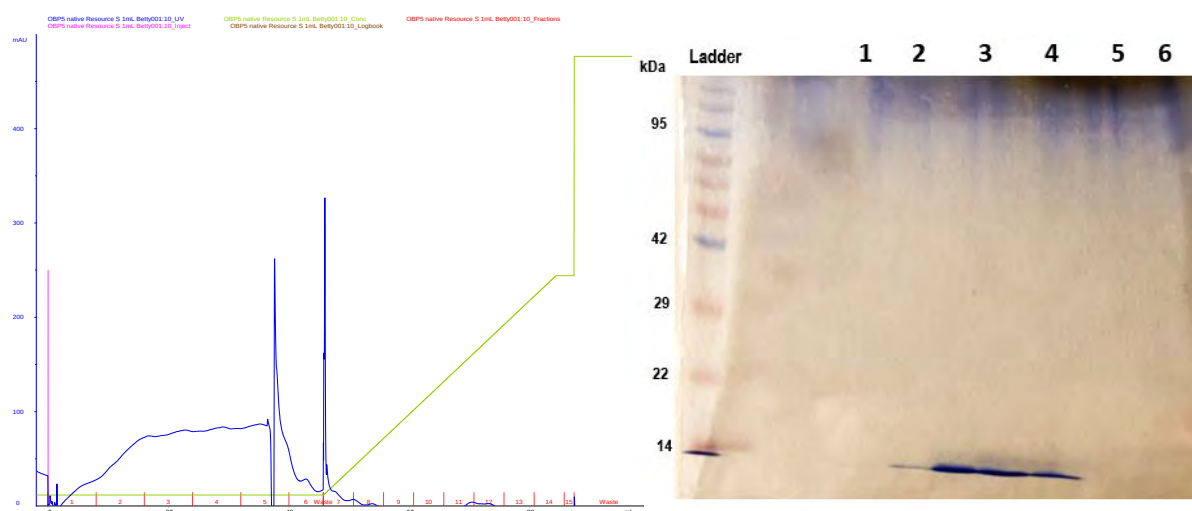
Εικόνα 56: Ανάλυση σε πηκτή 15% SDS-PAGE, ύστερα από 4 ώρες επαγωγή με IPTG στους 37°C.

Η πορεία απομόνωσης της πρωτεΐνης AgamOBP5 περιλαμβάνει τρία στάδια: δύο βήματα χρωματογραφίας ιονανταλλαγής και ένα χρωματογραφίας μοριακής διήθησης. Κατά το πρώτο στάδιο, η πρωτεΐνη τοποθετήθηκε σε ανιονανταλλακτική στήλη Resource Q 1mL. Ακολούθησε ανάλυση των κλασμάτων έκλουσης σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου 15%, για την επιλογή των κλασμάτων που περιέχουν την πρωτεΐνη (Εικόνα 57).



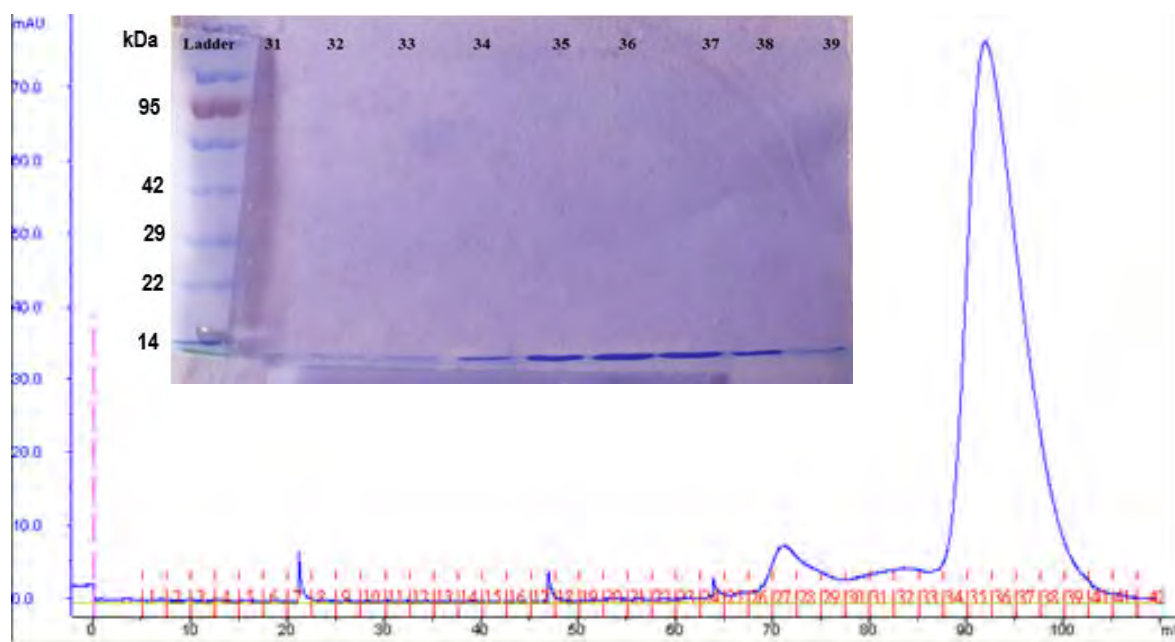
Εικόνα 57: Προφίλ της χρωματογραφίας ανιονανταλλαγής Resource Q και ανάλυση των κλασμάτων έκλουσης σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου 15%.

Συλλέχθηκαν τα κλάσματα 1-5 που περιείχαν την πρωτεΐνη AgamOBP5 και ενοποιήθηκαν σε ένα δείγμα. Το ενοποιημένο δείγμα αρχικά τέθηκε σε διαπίδυση έναντι 1L ρυθμιστικού διαλύματος 150 mM Sodium acetate pH 5.0 στους 4°C για 18-20 ώρες. Ακολούθησε διαύγαση με φυγοκέντρηση και εφαρμογή του σε στήλη κατιονανταλλαγής Resource S. Τέλος, μέσω ανάλυσης των κλασμάτων έκλουσης σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου 15% (w/v), επιλέχθηκαν τα κλάσματα για το τελευταίο στάδιο απομόνωσης (Εικόνα 58).



Εικόνα 58: Προφίλ της χρωματογραφίας κατιονανταλλαγής *Resource S* και ανάλυση των κλασμάτων έκλουσης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 15%.

Τα κλάσματα 2-5 συλλέχθηκαν, ενοποιήθηκαν και συμπυκνώθηκαν σε τελικό όγκο 500 μL , για να εφαρμοστούν στην τελική στήλη μοριακής διήθησης Superdex 75. Σύμφωνα με την ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 15% (w/v) των κλασμάτων που εκλούστηκαν επιλέχθηκαν τα κλάσματα 34-38, ενοποιήθηκαν και τέθηκαν σε διαπίδυση έναντι 1L ύδατος HPLC (Εικόνα 59). Μετά το πέρας της διαπίδυσης, το δείγμα συμπυκνώθηκε σε τελική συγκέντρωση 12 mg/mL. Το στάδιο της διαπίδυσης σε νερό πραγματοποιήθηκε μόνο για δείγμα πρωτεΐνης, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την αρχική σάρωση των κρυσταλλογραφικών μελετών ώστε να μην επηρεαστούν οι συνθήκες κρυστάλλωσης από το ρυθμιστικό διάλυμα του πρωτεϊνικού διαλύματος. Σε περίπτωση που θα χρησιμοποιηθεί σε άλλες μελέτες, η πρωτεΐνη φυλάσσεται σε ρυθμιστικό διάλυμα 10mM Tris-HCl pH 8.0. Η απόδοση του καθαρισμού της πρωτεΐνης AgamOBP5 είναι 10-12 mg/mL καλλιέργειας.



Εικόνα 59: Προφίλ της χρωματογραφίας μοριακής διήθησης Superdex75 και ανάλυση των κλασμάτων έκλουσης σε πηκτή πολυακρυλαμίδιον 15% (w/v).

Κεφάλαιο 2^ο: Υπερέκφραση και απομόνωση της *AgamOBP4*

Για την υπερέκφραση της πρωτεΐνης AgamOBP4 το πλασμίδιο pET-22b(+)-AgamOBP4 μετασχηματίστηκε σε δεκτικά κύτταρα *E.coli* Origami B, ενώ η πρωτεΐνη εκφράστηκε στο κυτταρικό ίζημα με τη μορφή σωματιδίων εγκλεισμού έπειτα από υπερέκφραση με 1mM IPTG (Εικόνα 60). Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στα βοθρία της πηκτής πολυακρυλαμίδιου 15% (w/v) με την εξής σειρά:

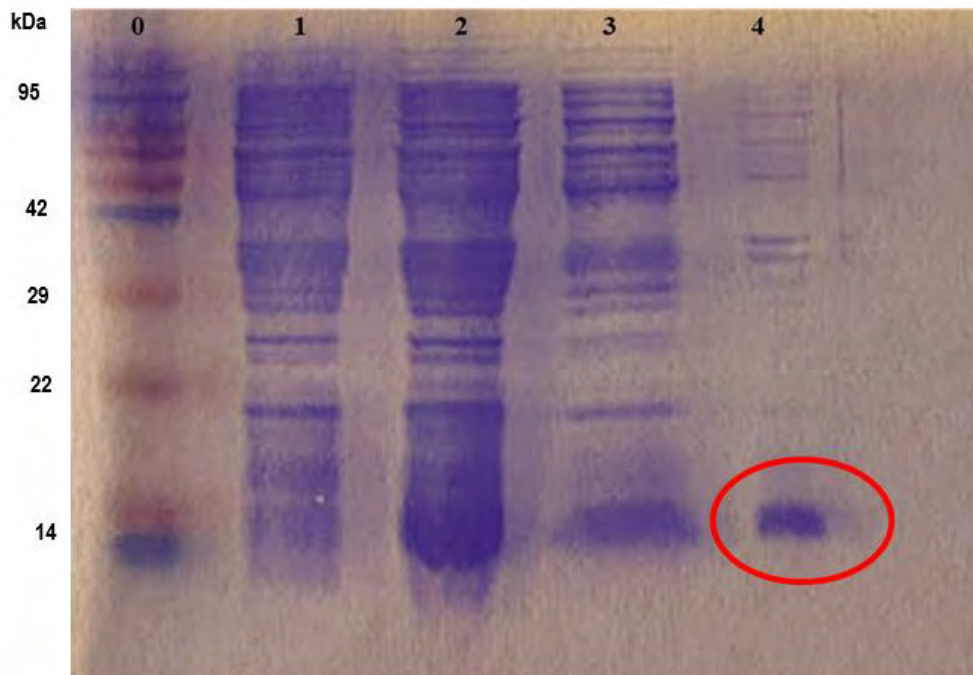
0: Πρωτεϊνικοί δείκτες.

1: Ολικό κυτταρικό δείγμα πριν την επαγωγή

2: Ολικό κυτταρικό δείγμα μετά την επαγωγή με 1 mM IPTG

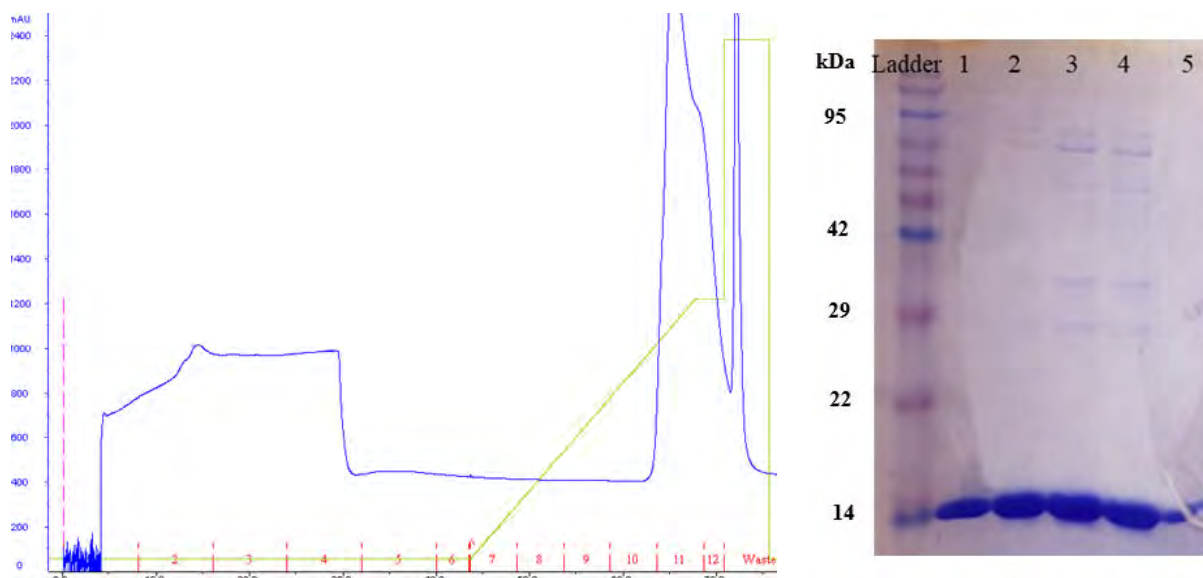
3: Κυτταρικό λύμα μετά την επαγωγή με 1 mM IPTG

4: Κυτταρικό ίζημα μετά την επαγωγή με 1 mM IPTG



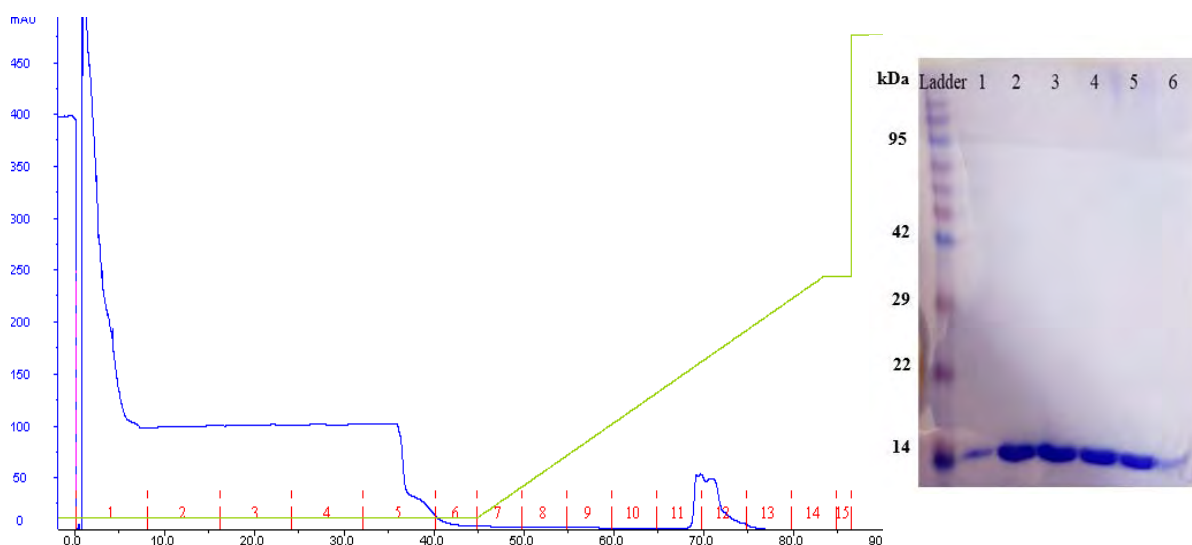
Εικόνα 60:Ανάλυση σε πηκτή 15% SDS-PAGE, ύστερα από 4 ώρες επαγωγή με IPTG στους 37°C.

Μετά την λύση των κυττάρων, ακολούθησε περαιτέρω επεξεργασία και πλύση των εγκλειστων σωματίων. Το πρωτεϊνικό δείγμα αποδιατάχθηκε και στη συνέχεια αναδιπλώθηκε εκ νέου. Ακολούθησε το πρώτο στάδιο απομόνωσης της πρωτεΐνης, κατά το οποίο το δείγμα τοποθετήθηκε σε ανιονανταλλακτική στήλη Resource Q 1 mL. Ακολούθησε ανάλυση των κλασμάτων έκλουσης σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου 15% (w/v), για την επιλογή των κλασμάτων που περιέχουν την πρωτεΐνη (Εικόνα 61).



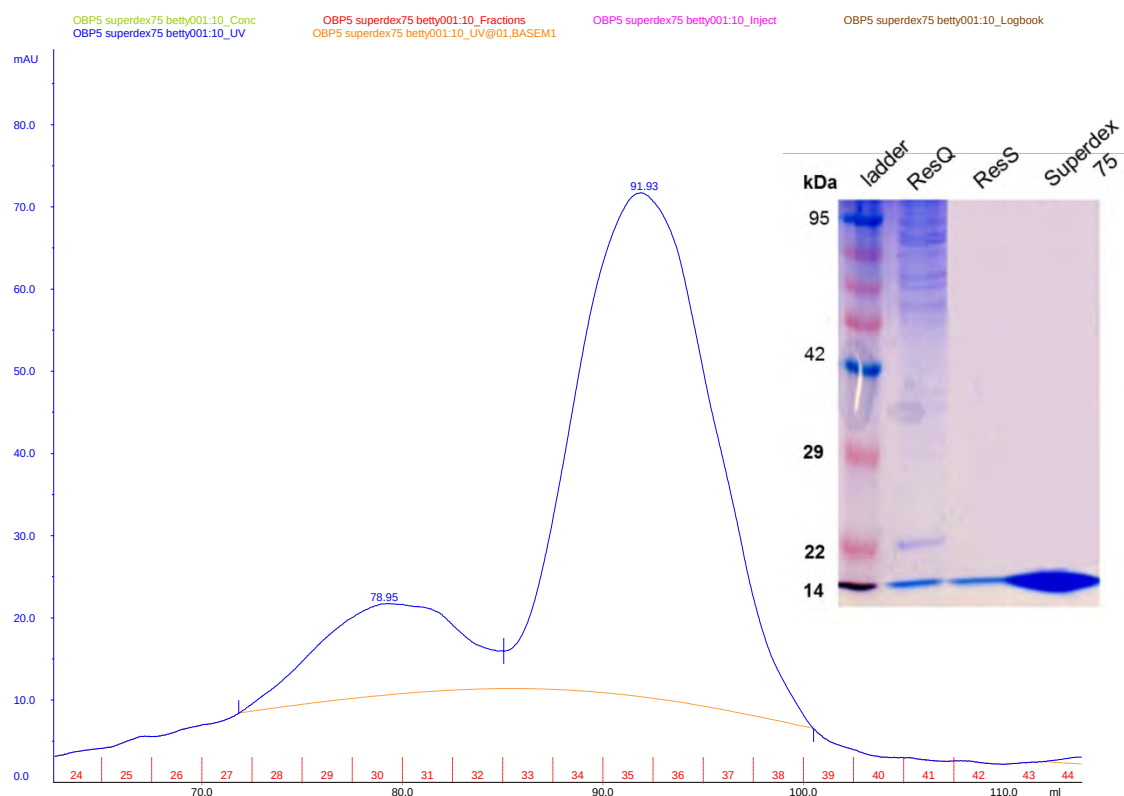
Εικόνα 61: Προφίλ της χρωματογραφίας ανιοανταλλαγής Resource Q και ανάλυση των κλασμάτων έκλουσης σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου 15% (w/v).

Συλλέχθηκαν τα κλάσματα 1-5 που περιείχαν την πρωτεΐνη και ενοποιήθηκαν σε ένα δείγμα. Το ενοποιημένο δείγμα τέθηκε σε διαπίδυση σε 1L ρυθμιστικού διαλύματος 150 mM Sodium acetate pH 5.0 στους 4°C για 18-20 ώρες. Ακολούθησε διαύγαση με φυγοκέντρηση και τοποθέτησή του σε στήλη κατιονανταλλαγής Resource S. Τέλος, μέσω ανάλυσης των κλασμάτων έκλουσης σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου 15% (w/v), επιλέχθηκαν τα κλάσματα για το τελευταίο στάδιο απομόνωσης (Εικόνα 62).



Εικόνα 62: Προφίλ της χρωματογραφίας κατιονανταλλαγής Resource S και ανάλυση των κλασμάτων έκλουσης σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου 15%.

Τα κλάσματα 1-5 συλλέχθηκαν και συμπυκνώθηκαν σε τελικό όγκο 500μl, για να τοποθετηθούν στην τελική στήλη μοριακής διήθησης Superdex 75. Τα κλάσματα 34-38 συμπυκνώθηκαν σε τελική συγκέντρωση 12mg/ml. Η απόδοση του καθαρισμού της πρωτεΐνης AgamOBP4 είναι 10-15 mg/l καλλιέργειας (Εικόνα 63).



Εικόνα 63: Προφίλ της χρωματογραφίας μοριακής διήθησης Superdex75 και ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου 15%, δειγμάτων από τη συνολική πορεία απομόνωσης της πρωτεΐνης.

Κεφάλαιο 3^ο: Υπερέκφραση και απομόνωση της *AgamOBP1*

Το πλασμίδιο pET-22b(+)-AgamOBP1 μετασχηματίζεται σε κύτταρα *E.coli* Origami B (DE3) και η πρωτεΐνη υπερεκφράζεται στο κυτταρικό λύμα παρουσία 1mM IPTG. Δείγματα από τις καλλιέργειες παρουσία και απουσία IPTG τοποθετήθηκαν στα βοηθία της πηκτής πολυακρυλαμίδιου 15% με την εξής σειρά (Εικόνα 64).:

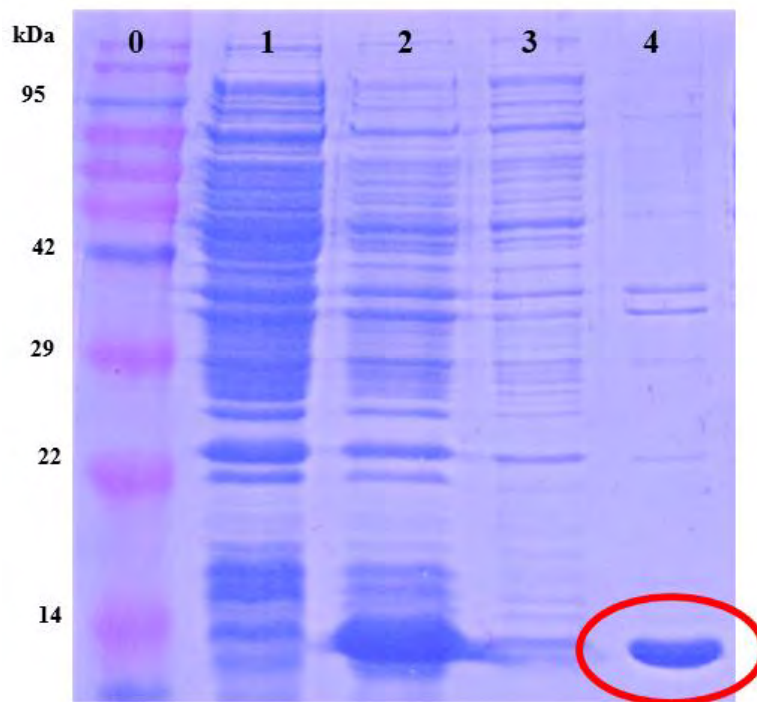
0: Πρωτεϊνικοί δείκτες.

1: Ολικό κυτταρικό δείγμα πριν την επαγωγή

2: Ολικό κυτταρικό δείγμα μετά την επαγωγή με 1 mM IPTG

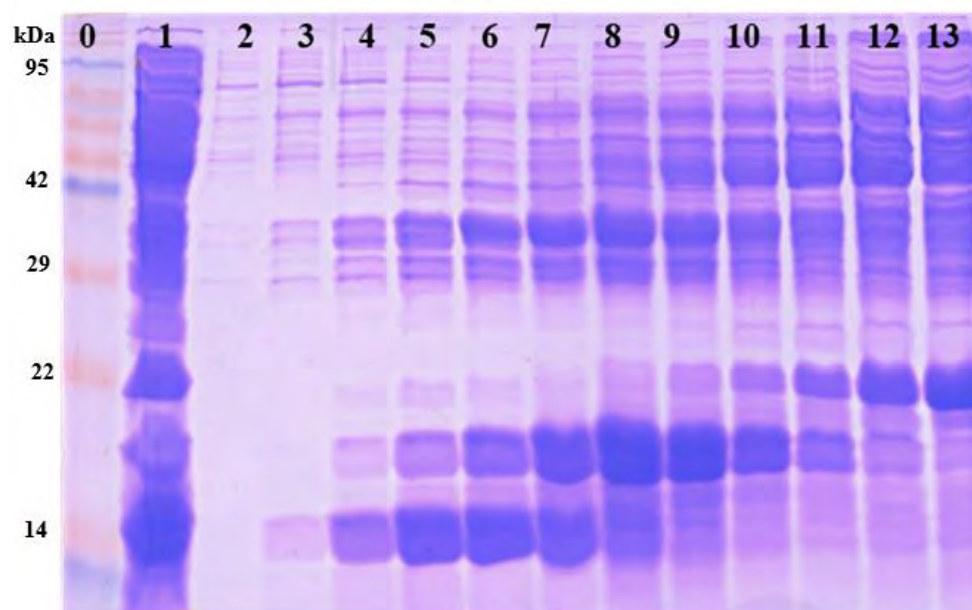
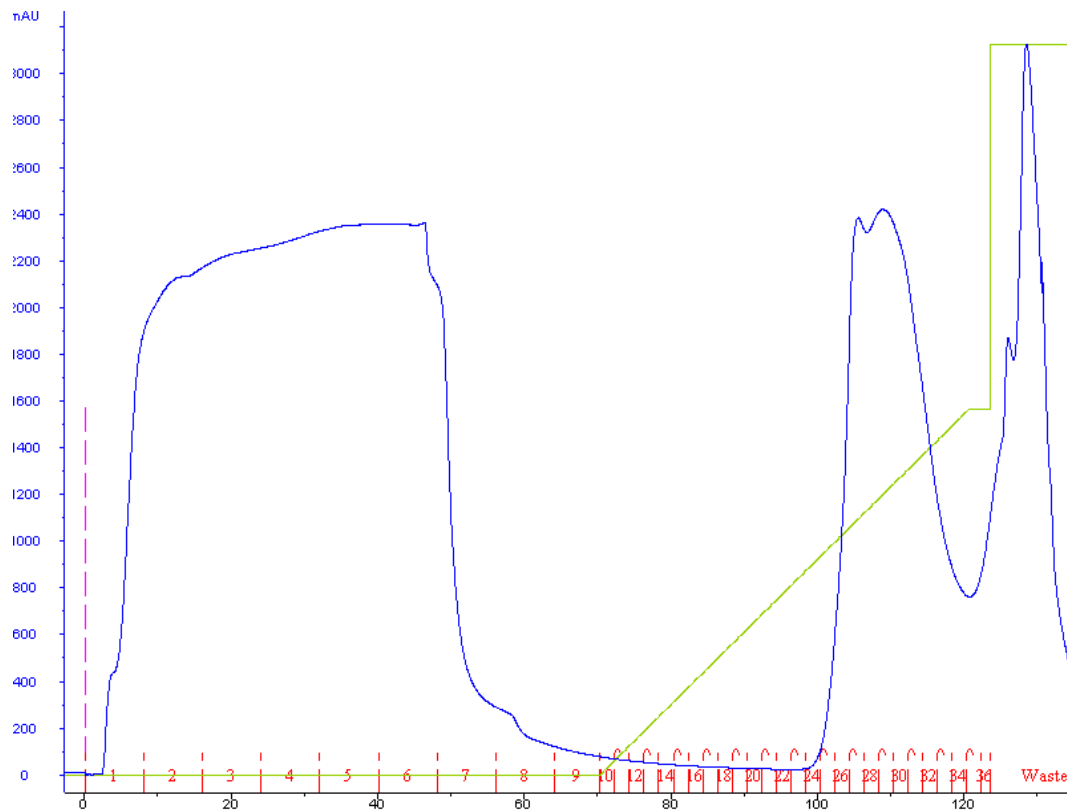
3: Κυτταρικό ίζημα μετά την επαγωγή με 1 mM IPTG

4: Κυτταρικό λύμα μετά την επαγωγή με 1 mM IPTG



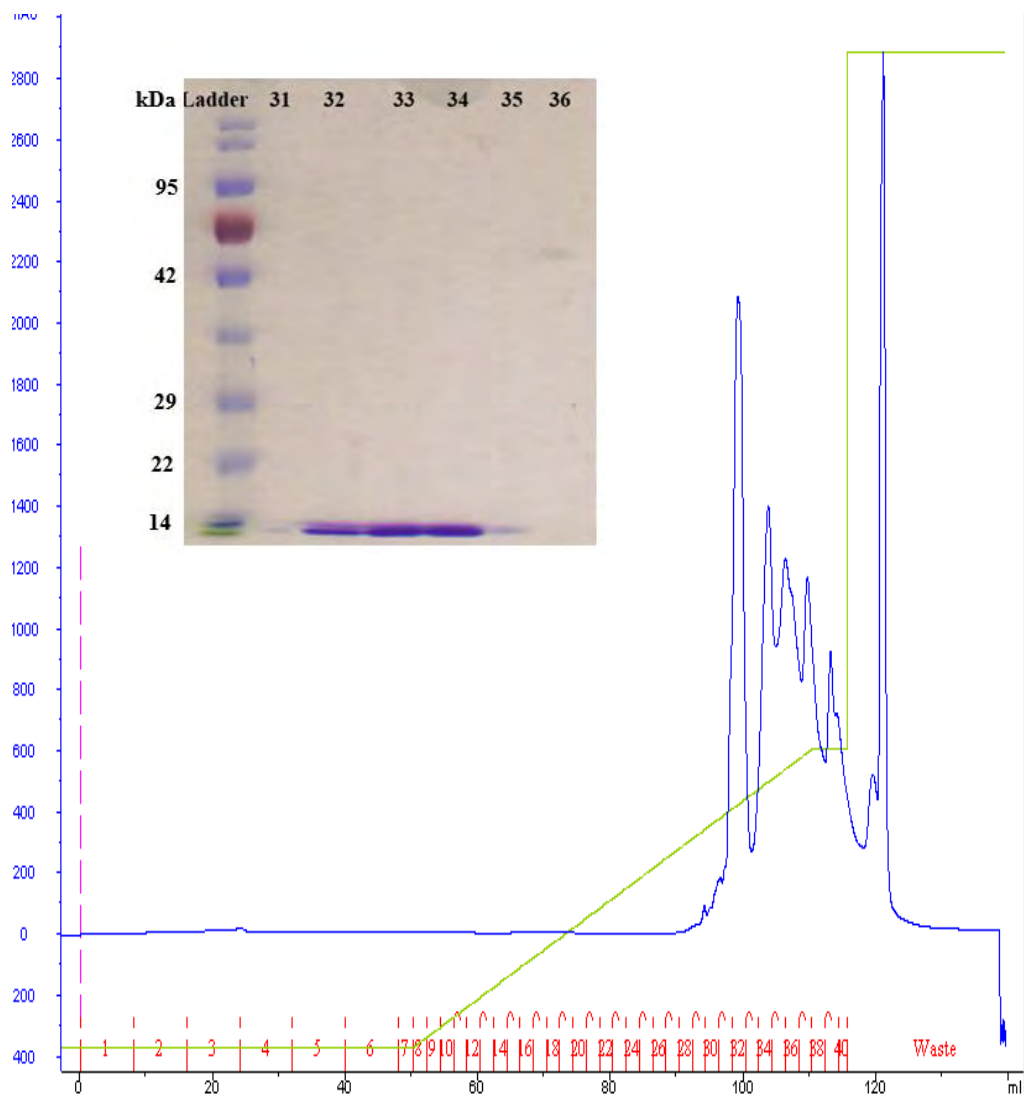
Εικόνα 64: Ανάλυση σε πηκτή 15% SDS-PAGE, ύστερα από 4 ώρες επαγωγή με IPTG στους 37°C.

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο απομόνωσης της πρωτεΐνης εφαρμόζονται δύο στάδια χρωματογραφίας ιονανταλλαγής και ένα χρωματογραφίας μοριακής διήθησης. Συγκεκριμένα, κατά το πρώτο στάδιο, χρησιμοποιείται στήλη HiTrap Q FF 5ml, ενώ ακολουθεί ανάλυση των κλασμάτων έκλουσης σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου 15%, για την επιλογή των κλασμάτων που περιέχουν την πρωτεΐνη (Εικόνα 65).



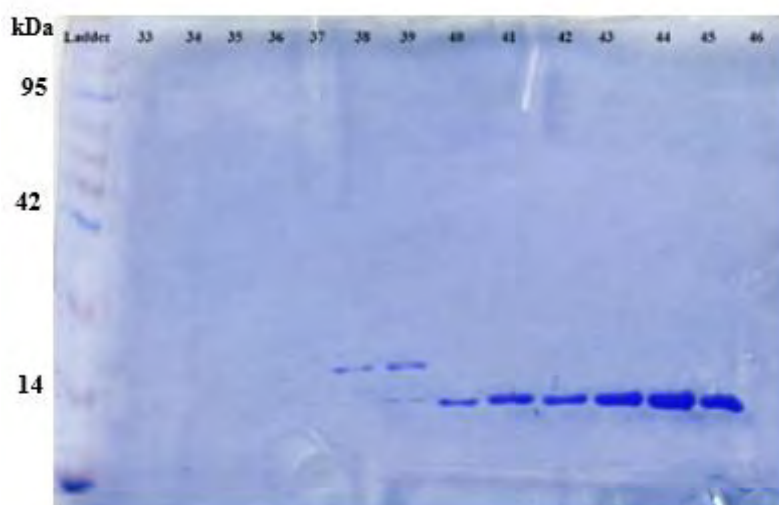
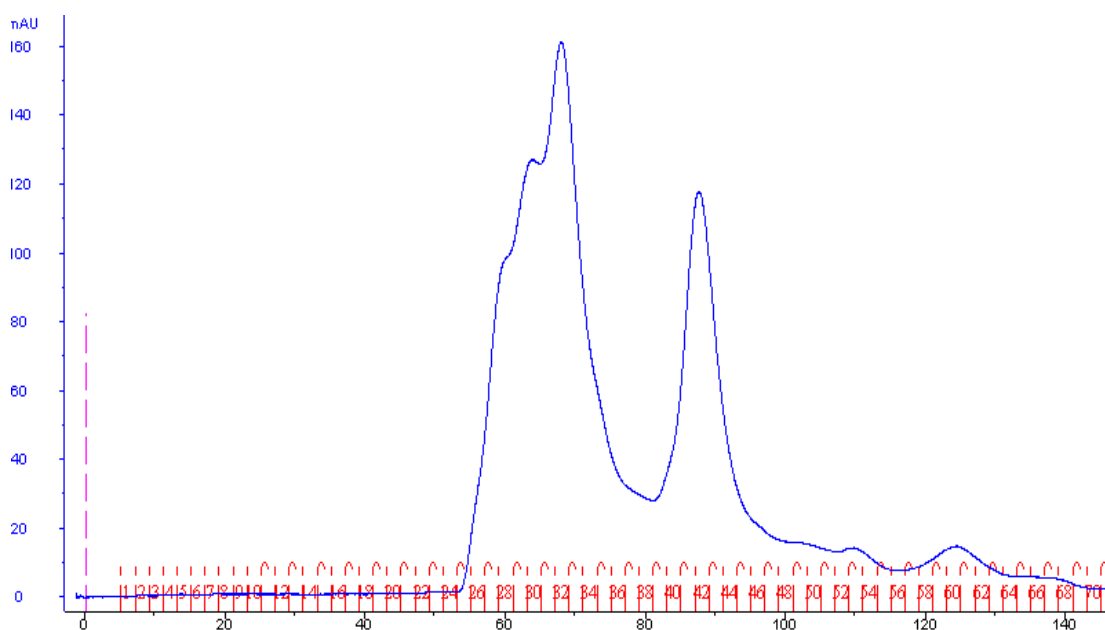
Εικόνα 65: Προφίλ της χρωματογραφίας ιονανταλλαγής HiTrap QFF και ανάλυση των κλασμάτων έκλυσης σε πηκτή πολυακρυλαμίδιον 15%. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στα βοθρία της πηκτής πολυακρυλαμίδιον 15% με την εξής σειρά: 0: Πρωτεϊνικοί δείκτες. 1: Ολικό πρωτεϊνικό δείγμα πριν τον καθαρισμό 2-13: Κλάσματα έκλυσης 22-33 αντίστοιχα

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης, επιλέχθηκαν τα κλάσματα 24-32 που περιέχουν την πρωτεΐνη, αραιώθηκαν στα 100 mL και τοποθετήθηκαν σε στήλη χρωματογραφία ανιοανταλλαγής Resource Q 6 mL. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου 15% (w/v) των κλασμάτων έκλουσης (Εικόνα 66).



Εικόνα 66: Προφίλ της χρωματογραφίας ανιοανταλλαγής Resource Q και ανάλυση των κλασμάτων έκλουσης σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου 15% (w/v).

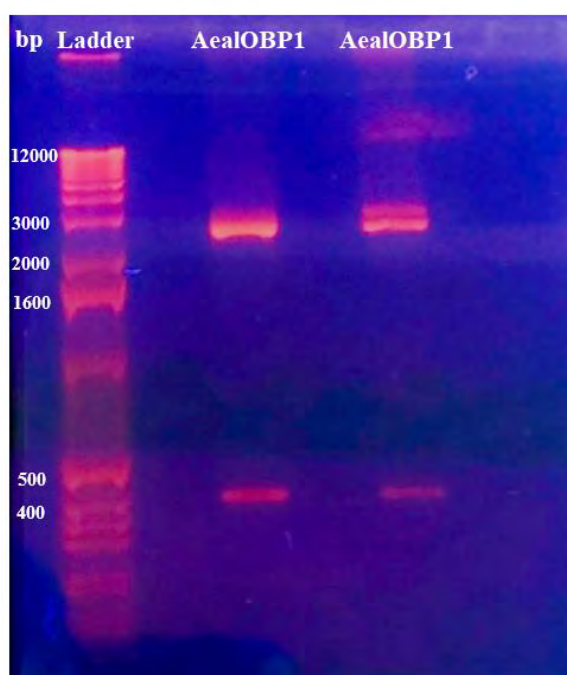
Τα κλάσματα 31-36 συλλέχθηκαν και συμπυκνώθηκαν σε τελικό όγκο 500μl, για να τοποθετηθούν στην τελική στήλη μοριακής διήθησης Superdex 75. Ακολούθησε αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτική πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) 15%, σύμφωνα με την οποία συλλέχθηκαν τα κλάσματα 40-45, τα οποία τέθηκαν για διαπίδυση σε 1L 10mM Tris-HCl pH 8,0 για 16-18 ώρες και συμπυκνώθηκαν σε τελική συγκέντρωση 14mg/ml. Η απόδοση του καθαρισμού της πρωτεΐνης AgamOBP1 είναι 2-4 mg/l καλλιέργειας (Εικόνα 67).



Εικόνα 67: Προφίλ της χρωματογραφίας μοριακής διήθησης Superdex75 και ανάλυση σε πηκτική πολυακρυλαμιδίου 15%, δειγμάτων από τη συνολική πορεία απομόνωσης της πρωτεΐνης

Κεφάλαιο 4^ο: Υπερέκφραση και απομόνωση της *AealOBP1*

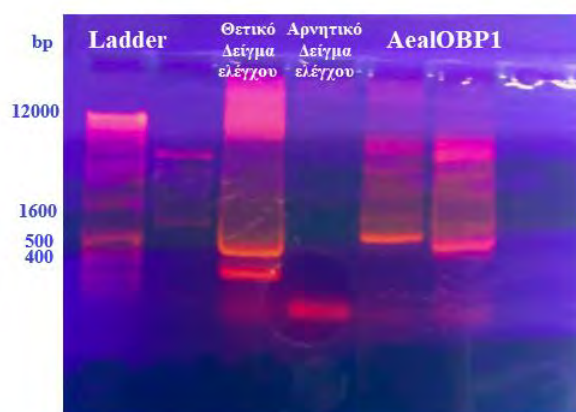
Για την υποκλωνοποίηση του γονιδίου της πρωτεΐνης *AealOBP1* χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pUC57-*AealOBP1*. Για την απόσπαση του γονιδίου από τον φορέα χρησιμοποιήθηκαν τα ένζυμα *NdeI* και *XhoI*, καθώς οι αλληλουχίες κοπής τους είχαν εισαχθεί στην αρχή και στο τέλος του γονιδίου. Για το διαχωρισμό των συγκεκριμένων δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε πηκτή συγκέντρωσης 1%. Με την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης πραγματοποιήθηκε ο διαχωρισμός των προϊόντων πέψης με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες (Εικόνα 68). Από την πηκτή επιλέχθηκε το δείγμα που αντιστοιχεί στο γονίδιο της πρωτεΐνης *AealOBP1*, και απομονώθηκε. Για την εκχύλιση του γονιδίου από την πηκτή εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο NucleoSpin Extract II της εταιρείας Macherey-Nagel. Τα τελικά δείγματα ελέγχθηκαν εκ νέου μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης για το σωστό τους μέγεθος και την ακεραιότητά τους.



Εικόνα 68: Ανάλυση σε πηκτή αгарόζης 1% του πλασμιδίου pUC57-*AealOBP1*.

Στη συνέχεια, το γονίδιο εισήχθη στον πλασμιδιακό φορέα pET-22b(+) και μετασχηματίστηκε σε κύτταρα *E.coli* DH5a. Πραγματοποιήθηκαν δοκιμές ελέγχου με αλυσιδωτή αντίδραση PCR ώστε να επιβεβαιωθεί η εισαγωγή του γονιδίου της *AealOBP1* στον πλασμιδιακό φορέα pET-22b(+). Τα προϊόντα της αντίδρασης PCR με

δείγματα αποικιών που επιλέχθηκαν τυχαία, αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης, ώστε να επαληθευτεί η ύπαρξη του επιθυμητού γονιδίου στα βακτήρια. Ακολούθησε απομόνωση του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pET-22b(+)-AealOBP1 από κύτταρα *E. coli* DH5a. Τα προϊόντα της απομόνωσης ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση, στην οποία χρησιμοποιήθηκαν αρνητικά και θετικά δείγματα ελέγχου (Εικόνα 69).



Εικόνα 69: Απομονωμένο πλασμίδιο pET-22b(+)- AealOBP1

Στη συνέχεια, το πλασμίδιο pET-22b(+)-AgamOBP5 μετασχηματίστηκε σε δεκτικά κύτταρα *E.coli* Origami B (DE3). Σύμφωνα με την ανάλυση σε πηκτή 15% SDS-PAGE η πρωτεΐνη εκφράζεται στο κυτταρικό ίζημα με τη μορφή σωματιδίων εγκλεισμού (Εικόνα 70). Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στα βοθρία με την εξής σειρά:

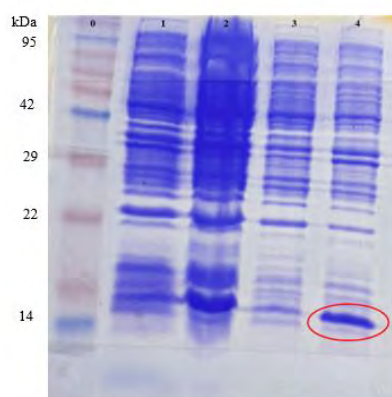
0: Πρωτεϊνικοί δείκτες.

1: Ολικό κυτταρικό δείγμα πριν την επαγωγή

2: Ολικό κυτταρικό δείγμα μετά την επαγωγή με 1 mM IPTG

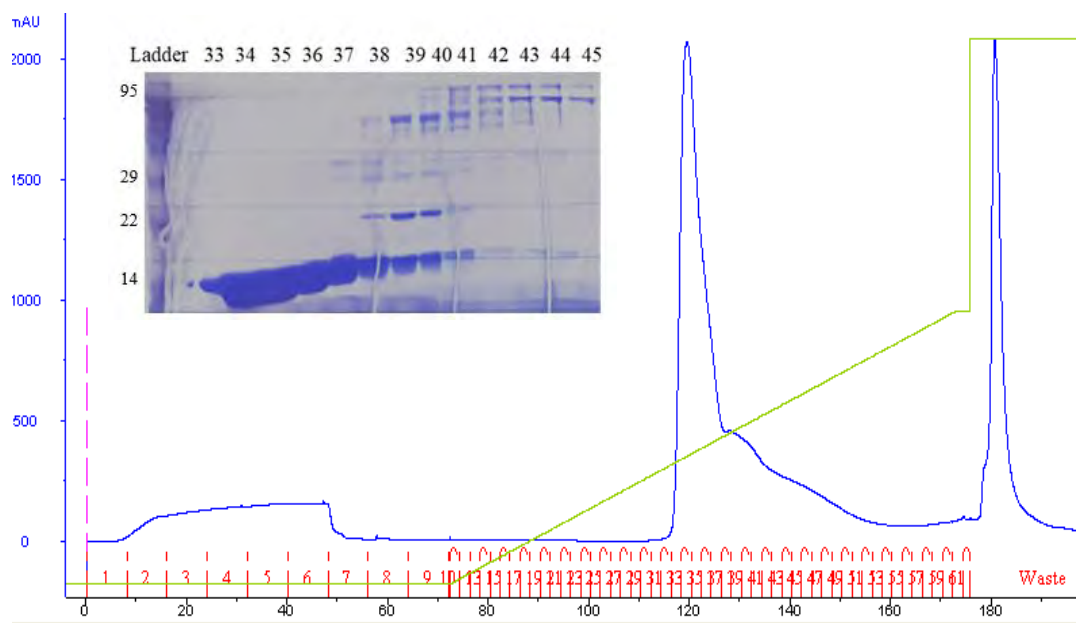
3: Κυτταρικό λύμα μετά την επαγωγή με 1 mM IPTG

4: Κυτταρικό ίζημα μετά την επαγωγή με 1 mM IPTG



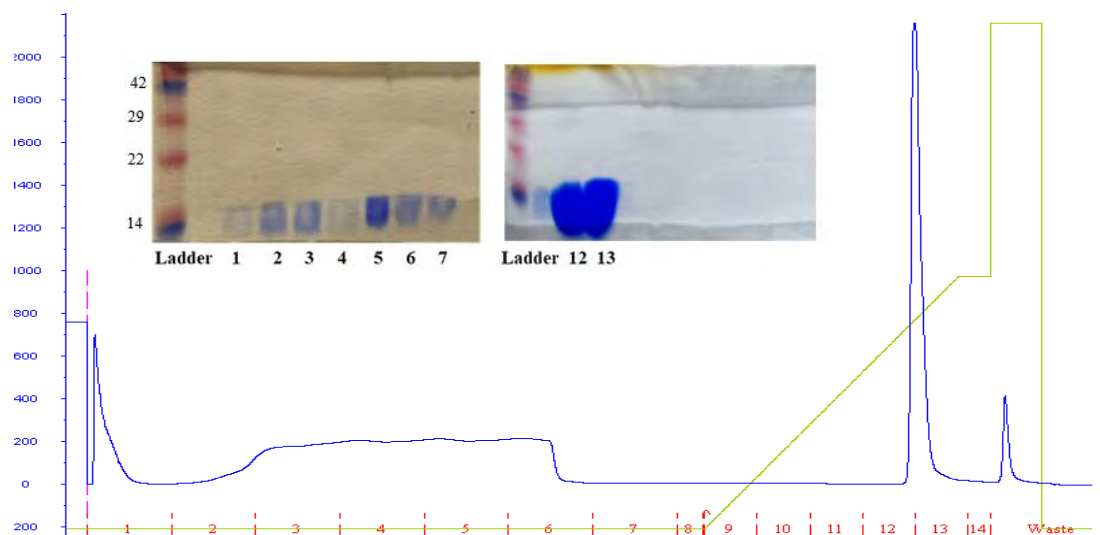
Εικόνα 70: Ανάλυση σε πηκτή 15% SDS-PAGE, ύστερα από 4 ώρες επαγωγή με IPTG στους 37°C.

Μετά την λύση των κυττάρων, ακολούθησε περαιτέρω επεξεργασία και πλύση των έγκλειστων σωματιών. Το πρωτεϊνικό δείγμα αποδιατάχθηκε και στη συνέχεια αναδιπλώθηκε εκ νέου. Ακολούθησε το πρώτο στάδιο απομόνωσης της πρωτεΐνης, κατά το οποίο το δείγμα τοποθετήθηκε σε στήλη HiTrap Q FF 5ml, ενώ ακολουθεί ανάλυση των κλασμάτων έκλουσης σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου 15%, για την επιλογή των κλασμάτων που περιέχουν την πρωτεΐνη (Εικόνα 71).



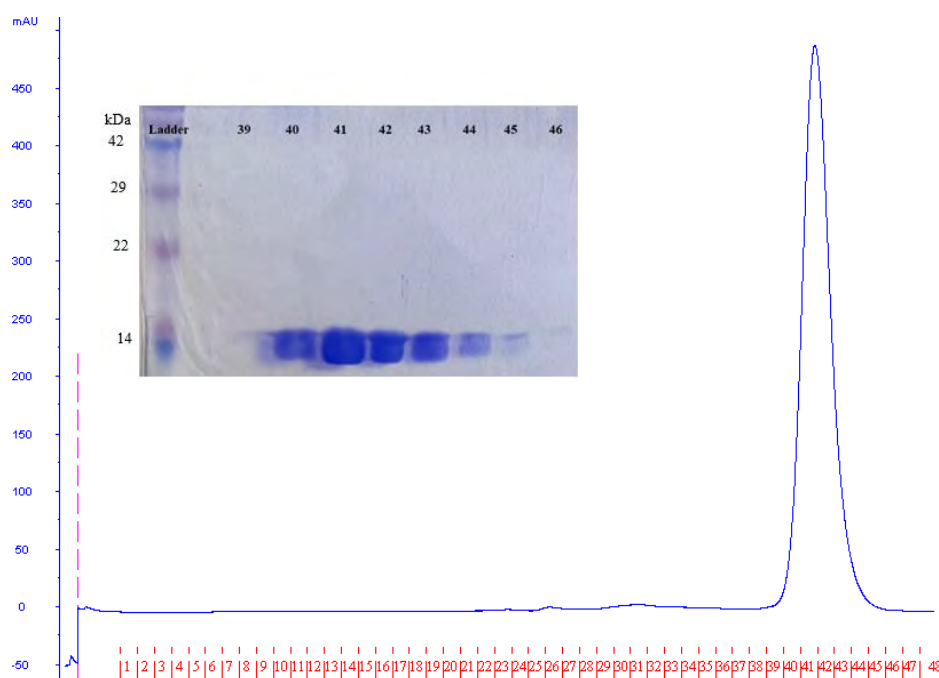
Εικόνα 71: Προφίλ της χρωματογραφίας ιονανταλλαγής HiTrap QFF και ανάλυση των κλασμάτων έκλουσης σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου 15%.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης, επιλέχθηκαν τα κλάσματα 33-37 που περιέχουν την πρωτεΐνη, τέθηκαν σε διαπίδυση σε 1L 10mM Tris-HCl pH 8,0 για 16-18 ώρες και τοποθετήθηκαν σε στήλη χρωματογραφία ανιοανταλλαγής Resource Q 6ml. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου 15% των κλασμάτων έκλουσης (Εικόνα 72).



Εικόνα 72: Προφίλ της χρωματογραφίας ανιονανταλλαγής Resource Q και ανάλυση των κλασμάτων έκλουσης σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου 15%.

Τα κλάσματα έκλουσης 12 και 13 συλλέχθηκαν και συμπυκνώθηκαν σε τελικό όγκο 500μl, για να εφαρμοστούν στην τελική στήλη μοριακής διήθησης Superdex 75. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου (SDS-PAGE) 15%, σύμφωνα με την οποία συλλέχθηκαν τα κλάσματα 40-45, τα οποία τέθηκαν για διαπίδυση σε 1L 10mM Tris-HCl pH 8,0 και συμπυκνώθηκαν σε τελική συγκέντρωση 12mg/ml. Η απόδοση του καθαρισμού της πρωτεΐνης AgamOBP1 είναι 10-15 mg/l καλλιέργειας (Εικόνα 73).



Εικόνα 73: Προφίλ της χρωματογραφίας μοριακής διήθησης Superdex75 και ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου 15%, δειγμάτων από τη συνολική πορεία απομόνωσης της πρωτεΐνης

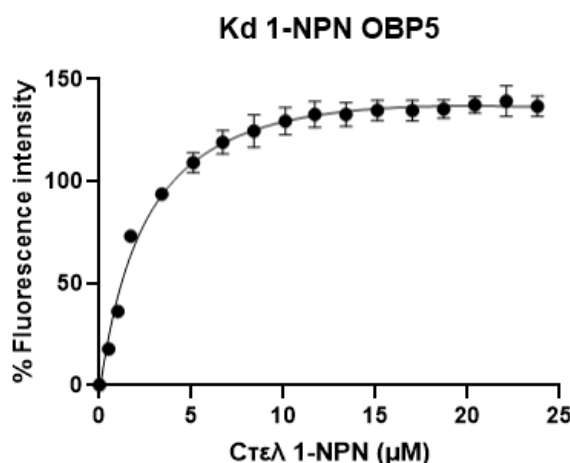
Κεφάλαιο 5^ο: *in vitro* φθορισμομετρικές μελέτες

5.1 Μελέτη πρόσδεσης επιλεγμένων ενώσεων στην πρωτεΐνη AgamOBP5 (144)

Επόμενο βήμα ήταν η εύρεση νέων πιθανών προσδετών της πρωτεΐνης AgamOBP5, περιλαμβανομένων γνωστών εντομοαπωθητικών ενώσεων. Συγκεκριμένα, οι ενώσεις IR3535, Ethyl Cinnamate, Indole, Lauric Acid, Benzyl Benzoate, Thymol, Benzothiazole, Yomogi, Piperine, α -Terpineol, Cuminic Acid, Methyl Eugenol, Geranyl Acetone, 1-Octenol, Deet, Carvacrol και Artemisia Alcohol αξιολογήθηκαν ως προς τη συγγένειά τους με το πρωτεϊνικό μόριο σε *in vitro* φθορισμομετρικές μελέτες..

5.1.1. Υπολογισμός της σταθεράς πρόσδεσης K_d του 1-NPN για την AgamOBP5

Για τον προσδιορισμό της σταθεράς πρόσδεσης του φθορίζοντος μορίου με την πρωτεΐνη, πραγματοποιήθηκε τιτλοδότηση με διαφορετικές συγκεντρώσεις 1-NPN (0 μ M- 25 μ M) σε ρυθμιστικό διάλυμα (20 mM Tris-HCl, pH 8.0 και 100 mM NaCl), το οποίο περιείχε 2 μ M AgamOBP5. Για τον υπολογισμό της K_d προσδιορίστηκε πειραματικά το ποσοστό του προσδεμένου και ελεύθερου φθορίζοντος ανιχνευτή, συγκρίνοντας την ένταση του φθορισμού σε διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων ιχνηθέτη, απουσία και παρουσία πρωτεΐνης. Τα δεδομένα επεξεργάστηκαν όπως περιγράφεται στην ενότητα 6.1.3 και η K_d του 1-NPN προσδιορίστηκε στα $2,8 \pm 0,5$ μ M (Εικόνα 74).



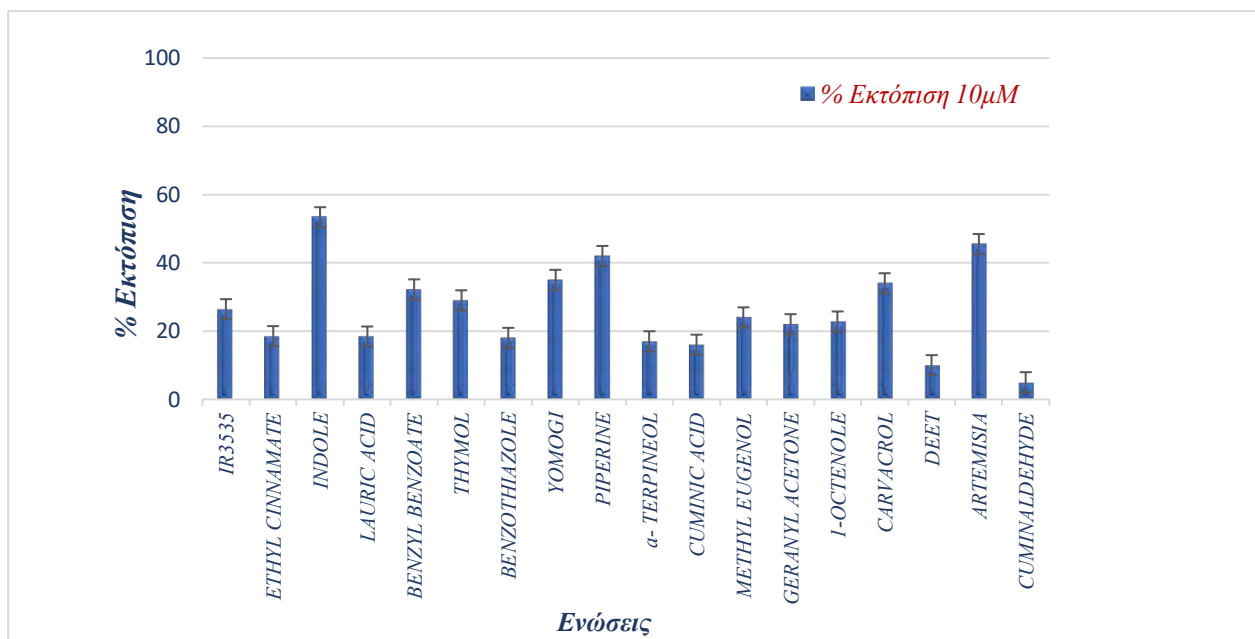
Εικόνα 74: Καμπύλη προσδιορισμού της σταθεράς πρόσδεσης του 1-NPN με την AgamOBP5.

5.1.2. Αξιολόγηση συγγένειας πιθανών προσδετών με την AgamOBP5 σε μια σταθερή συγκέντρωση (Δοκιμασίες διαλογής ενός σημείου; one point screening assays)

Αρχικά, για την αξιολόγηση της συγγένειας των ενώσεων με την πρωτεΐνη, πραγματοποιήθηκαν φθορισμομετρικές μελέτες σε σταθερή συγκέντρωση προσδέτη 5μM 1-NPN και σταθερή συγκέντρωση 10μM του εκάστου προσδέτη (Πίνακας 15). Στη συνέχεια προσδιορίστηκε το ποσοστό «εκτόπισης» του 1-NPN ώστε να αξιολογηθεί η πρόσδεση των ενώσεων με την πρωτεΐνη (Εικόνα 75). Οι ενώσεις που παρουσίασαν ικανοποιητικά αποτελέσματα τέθηκαν σε περαιτέρω μελέτες.

Πίνακας 15: Ποσοστό εκτόπισης 1-NPN από τις υπό μελέτη ενώσεις

COMPOUNDS	% Εκτόπιση παρουσία 10μM προσδέτη
IR3535	26.4
ETHYL CINNAMATE	18.5
INDOLE	53.35
LAURIC ACID	18.4
BENZYL BENZOATE	32.2
THYMOL	29
BENZOTHAZOLE	18
YOMOGI	35
PIPERINE	42
α - TERPINEOL	17
CUMINIC ACID	16
METHYL EUGENOL	24
GERANYL ACETONE	22
1-OCTENOLE	22.8
CARVACROL	34
DEET	10
ARTEMISIA	45.5
CUMINALDEHYDE	5



Εικόνα 75: Διάγραμμα της εκτόπισης του 1-NPN από τους πιθανούς προσδέτες της AgamOBP5

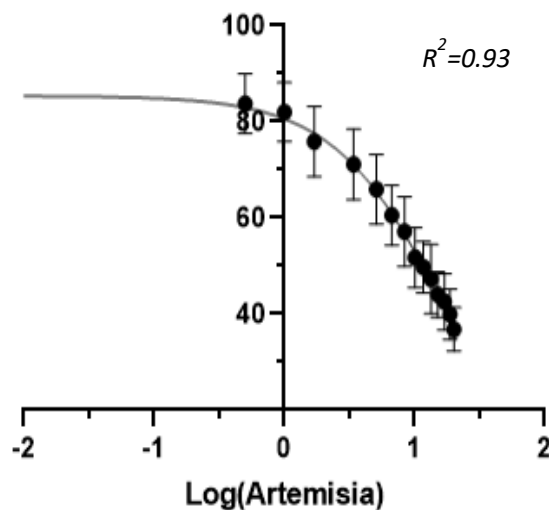
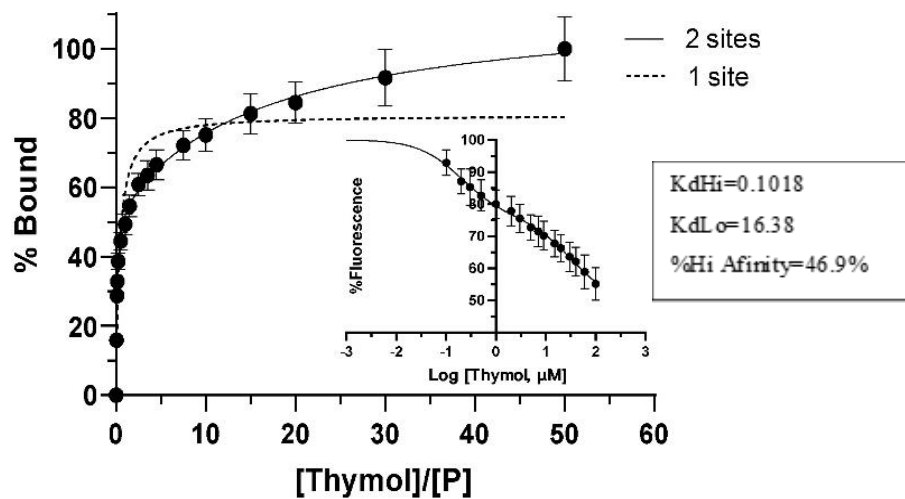
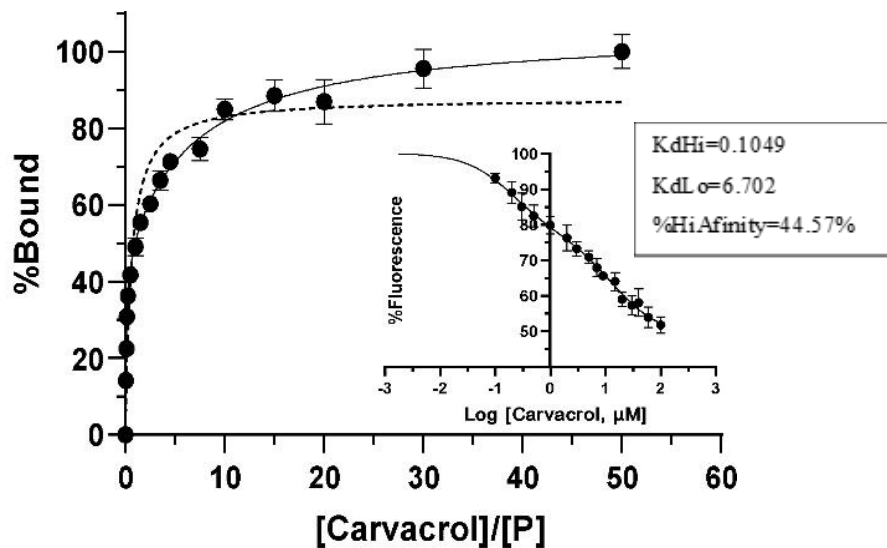
5.1.3. Υπολογισμός της σταθεράς πρόσδεσης K_i των προσδετών για την AgamOBP5

Μετά από μια αρχική διαλογή για ταυτοποίηση πιθανών προσδετών της AgamOBP5, προσδιορίστηκαν λεπτομερώς τα χαρακτηριστικά δέσμευσης των ενώσεων που παρουσίασαν ποσοστό εκτόπισης του 1-NPN μεγαλύτερο από 20%. Συγκεκριμένα, η συγγένεια (K_i) των προς μελέτη προσδετών για την AgamOBP5 αξιολογήθηκε έμμεσα με μέτρηση του ανταγωνισμού τους με το 1-NPN. Το ρυθμιστικό διάλυμα (20 mM Tris-HCl, pH 8.0 και 100 mM NaCl) περιείχε 2 μ M AgamOBP5 και σταθερή συγκέντρωση 1-NPN (5 μ M). Ο ανιχνευτής επώαστηκε με την πρωτεΐνη και στη συνέχεια προστέθηκε ποσότητα από την εκάστοτε ένωση για να επιτευχθεί ένα εύρος τελικής συγκέντρωσης από 0 έως 25 μ M (με εξαίρεση την θυμόλη και την καρβακρόλη, όπου το εύρος τελικής συγκέντρωσης ήταν 0-100 μ M).

Οι ενώσεις που παρουσίασαν αξιοσημείωτα αποτελέσματα ήταν η θυμόλη, η καρβακρόλη και η αρτεμισία. Οι σταθερές πρόσδεσης των ενώσεων (K_i) υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα ανάλυσης δεδομένων μη γραμμικής παλινδρόμησης GraphPad Prism 8 (www.graphpad.com). Η K_d της αρτεμισίας για την AgamOBP5 υπολογίστηκε 6,25 μ M προσαρμόζοντας τα δεδομένα σε ένα μοντέλο ανταγωνισμού για δέσμευση συνδέτη σε ένα κέντρο, χρησιμοποιώντας ως Hot μ M τη συγκέντρωση του 1-NPN στις δοκιμασίες ανταγωνισμού (5 μ M) και ως Hot K_d μ M το K_d του 1-NPN (2,8 μ M) (Εικόνα 76).

Αντίστοιχα, για τον υπολογισμό της K_i της καρβακρόλης και της θυμόλης τα δεδομένα προσαρμόστηκαν σε ένα μοντέλο ανταγωνισμού για δέσμευση προσδότη σε δύο κέντρα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η πρωτεΐνη παρουσιάζει δυο θέσεις πρόσδεσης τόσο για την καρβακρόλη όσο και για τη θυμόλη. Αναλυτικότερα, η πρώτη θέση δέσμευσης (site 1) παρουσιάζει μεγάλη συγγένεια και με τις δυο ενώσεις ($K_d=0,11 \mu\text{M}$), ενώ η δεύτερη (site 2) παρουσιάζει σημαντικά χαμηλότερη συγγένεια με σταθερά διάστασης $7,26 \pm 1,62 \mu\text{M}$ και $17,73 \pm 4,49 \mu\text{M}$ για την Carvacrol και την Thymol, αντίστοιχα. Η ύπαρξη δύο θέσεων δέσμευσης στην AgamOBP5 δεν προκαλεί έκπληξη δεδομένου ότι οι OBPs φέρουν μεγάλες υδρόφοβες κοιλότητες και σήραγγες που παρέχουν αρκετό διαθέσιμο χώρο και επομένως έχουν τη δυνατότητα να φιλοξενήσουν περισσότερα από ένα μόρια προσδέτη.

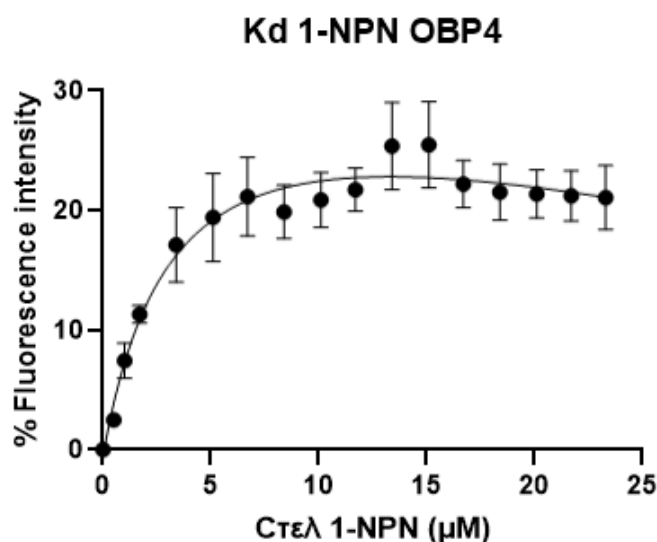
Σύμφωνα με την ανάλυση των δεδομένων, στην πρωτεΐνη παρατηρείται μια θέση υψηλής συγγένειας (Site-1) και μια θέση χαμηλής (Site-2), σε σχεδόν ίσες αναλογίες (45:55). Υπολογίζεται, λοιπόν, ότι το Site-1 είναι σχεδόν πλήρως κατειλημμένο ($PL/P=99\%$) σε συγκέντρωση προσδέτη $15 \mu\text{M}$ ($L/P=7,5$), ενώ για την ίδια αναλογία L/P , υπολογίζεται ότι το Site-2 καταλαμβάνεται κατά 65% και 44% από καρβακρόλη και θυμόλη αντίστοιχα. Ομοίως, για αναλογία $L/P=15$, οι αντίστοιχες καταλήψεις υπολογίστηκαν σε 81% και 61% για την καρβακρόλη και τη θυμόλη αντίστοιχα, ενώ η πληρότητα αυξήθηκε σε 93% και 85% στη μέγιστη συγκέντρωση που δοκιμάστηκε ($100 \mu\text{M}$ πρόσδεμα $L/P=50$). (144)



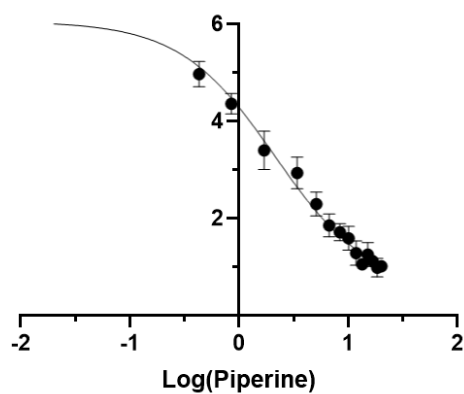
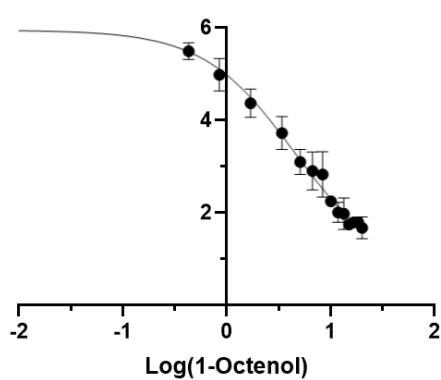
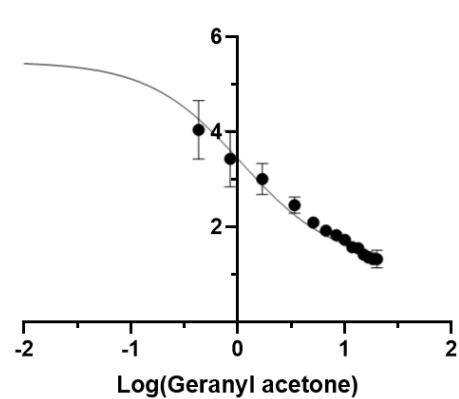
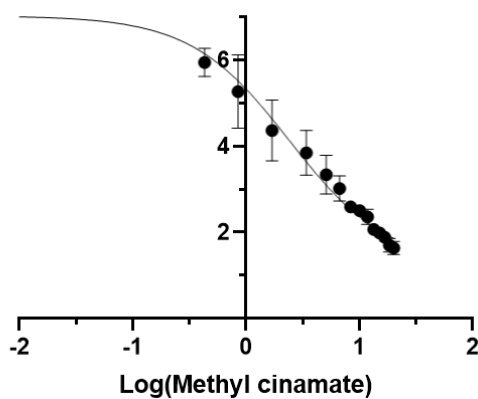
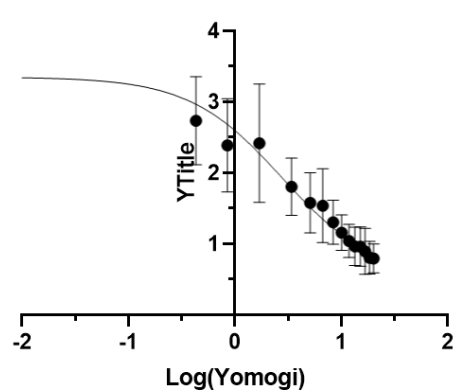
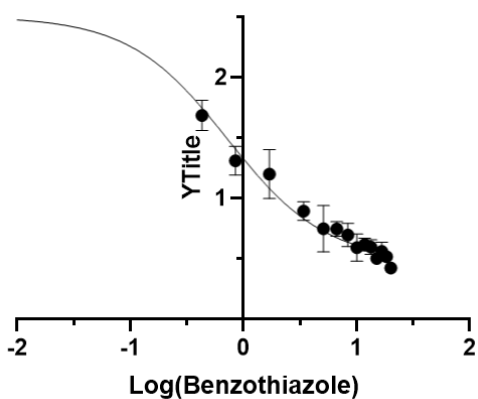
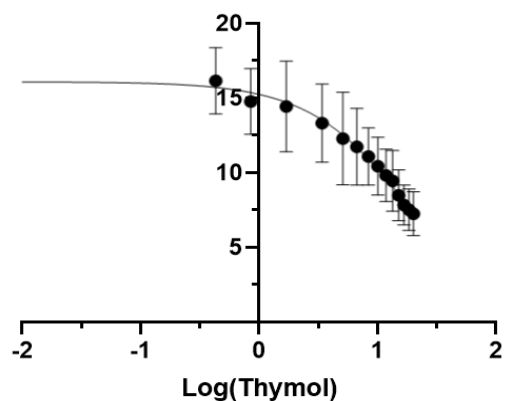
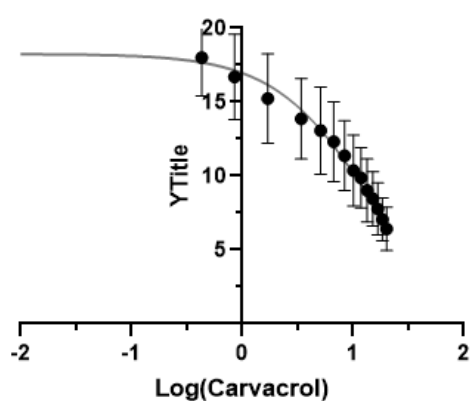
Εικόνα 76: Διαγράμματα Κι των τριών προσδετών της AgamOBP5

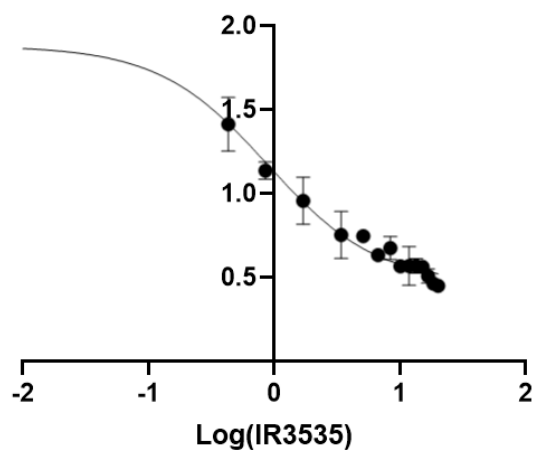
5.2 Μελέτη της πρόσδεσης επιλεγμένων ενώσεων στην πρωτεΐνη AgamOBP4

Καθώς η πρωτεΐνη AgamOBP4 παρουσιάζει μεγάλη ομολογία με την AgamOBP5, οι ίδιες ενώσεις αξιολογήθηκαν ως προς τη συγγένειά τους με την AgamOBP4. Εφαρμόστηκε η ίδια ακριβώς διαδικασία και τα αποτελέσματα ήταν ενδιαφέροντα. Συγκεκριμένα, η K_d του 1-NPN προσδιορίστηκε σε $3,48 \pm 0,3 \mu\text{M}$ (Εικόνα 77). Η καρβακρόλη και η θυμόλη παρουσιάζουν δυο θέσεις πρόσδεσης στην AgamOBP5, ενώ στην AgamOBP4 μια σχετικά χαμηλής συγγένειας. Επίσης, σύμφωνα με τα αποτελέσματα δεν υποδεικνύεται πρόσδεση της *Artemisia alcohol* στην AgamOBP4, σε αντίθεση με τις υπόλοιπες ενώσεις, οι οποίες φαίνεται να παρουσιάζουν αξιοσημείωτη συγγένεια με την AgamOBP4 αλλά όχι με την AgamOBP5 (Εικόνα 78, Πίνακας 16). Καθώς οι *in vitro* φθορισμομετρικές μελέτες αποτελούν μια έμμεση μέθοδο προσδιορισμού της συγγένειας των ενώσεων με την πρωτεΐνη, απαιτείται περαιτέρω μελέτη με διαφορετικές τεχνικές



Εικόνα 77: Καμπύλη προσδιορισμού της σταθεράς πρόσδεσης του 1-NPN με την AgamOBP4.





Εικόνα 78: Διαγράμματα K_i των προσδετών της AgamOBP4

Πίνακας 16: Τιμές της σταθεράς πρόσδεσης K_i της εκάστοτε ένωσης με την πρωτεΐνη AgamOBP4

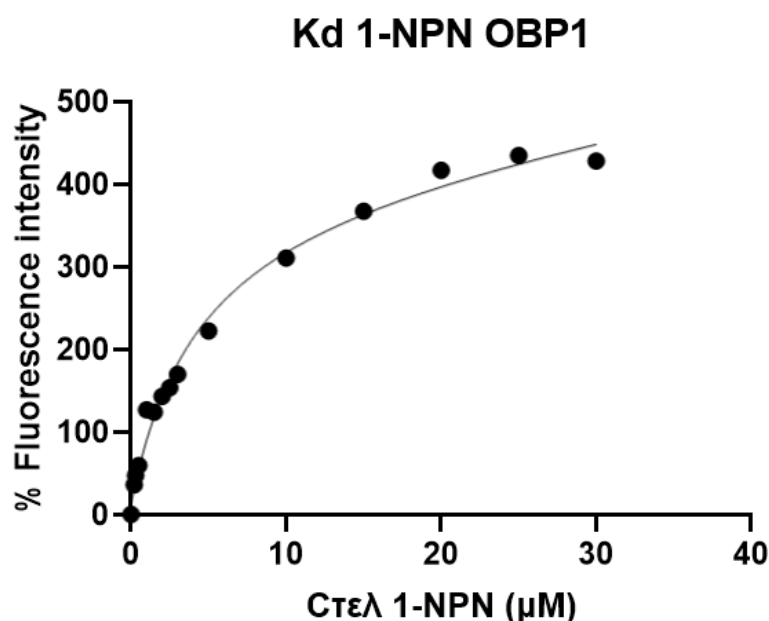
Compounds	K_i (μM)	R^2
<i>carvacrol</i>	5,7	0,79
<i>Thymol</i>	8,2	0,77
<i>Benzothiazole</i>	0,3	0,96
<i>Yomogi</i>	1,13	0,77
<i>Methyl cinamate</i>	0,99	0,96
<i>Geranyl acetone</i>	0,45	0,96
<i>l- Octenol</i>	1,8	0,97
<i>Piperine</i>	0,87	0,98
<i>IR3535</i>	0,36	0,97

5.3 Μελέτη της πρόσδεσης επιλεγμένων ενώσεων στην πρωτεΐνη AgamOBP1

Πολλές *in silico* μελέτες στηρίζονται στην τριτοταγή δομή του συμπλόκου της AgamOBP1 τόσο με το DEET όσο και με την ικαριδίνη για την εύρεση νέων προσδετών της πρωτεΐνης με εντομοαπωθητικές ιδιότητες. Ενώσεις που αναδεικνύονται από τις *in silico* προσεγγίσεις προβλέφθηκαν να έχουν συγγένειά με την πρωτεΐνη αξιολογήθηκαν μέσω *in vitro* φθορισμομετρικών μελετών.

5.3.1. Υπολογισμός της σταθεράς πρόσδεσης K_d του 1-NPN για την AgamOBP1

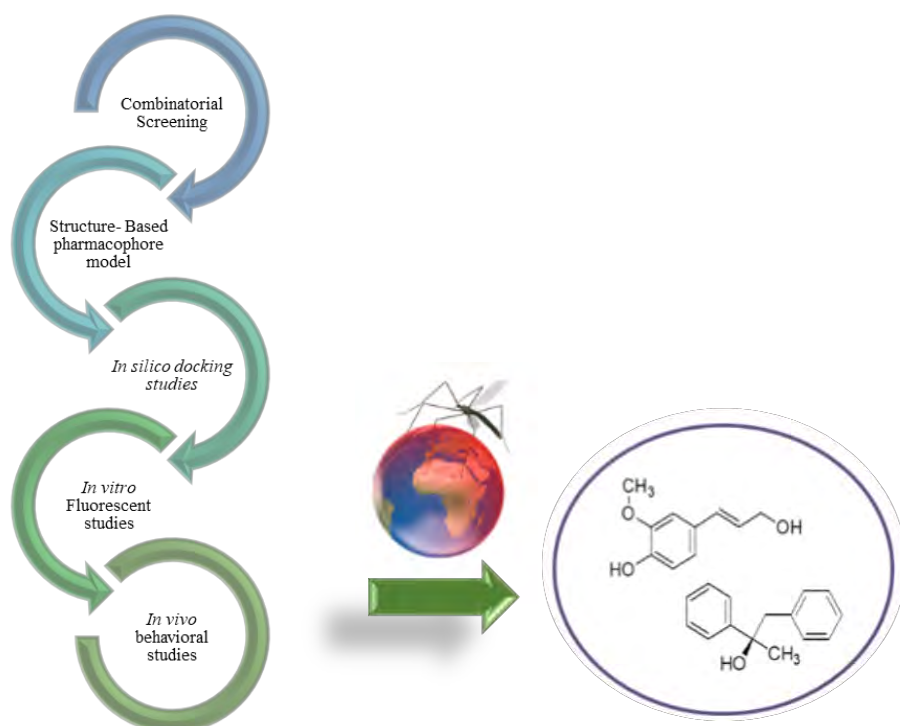
Η συγγένεια του φθορίζοντος ανιχνευτή 1-NPN για την AgamOBP1 προσδιορίστηκε με τιτλοδότηση 1-NPN (τελικές συγκεντρώσεις 0-24 μM), σε ρυθμιστικό διάλυμα (20 mM Tris-HCl, pH 8.0 και 100 mM NaCl), το οποίο περιείχε 2 μM AgamOBP5. Η K_d του 1-NPN για την AgamOBP1 υπολογίστηκε σε $4,29 \mu\text{M} \pm 0,94$ μέσω του προγράμματος ανάλυσης δεδομένων μη γραμμικής παλινδρόμησης GraphPad Prism 8 (Εικόνα 79).



Εικόνα 79: Καμπύλη προσδιορισμού της σταθεράς πρόσδεσης του 1-NPN με την AgamOBP1.

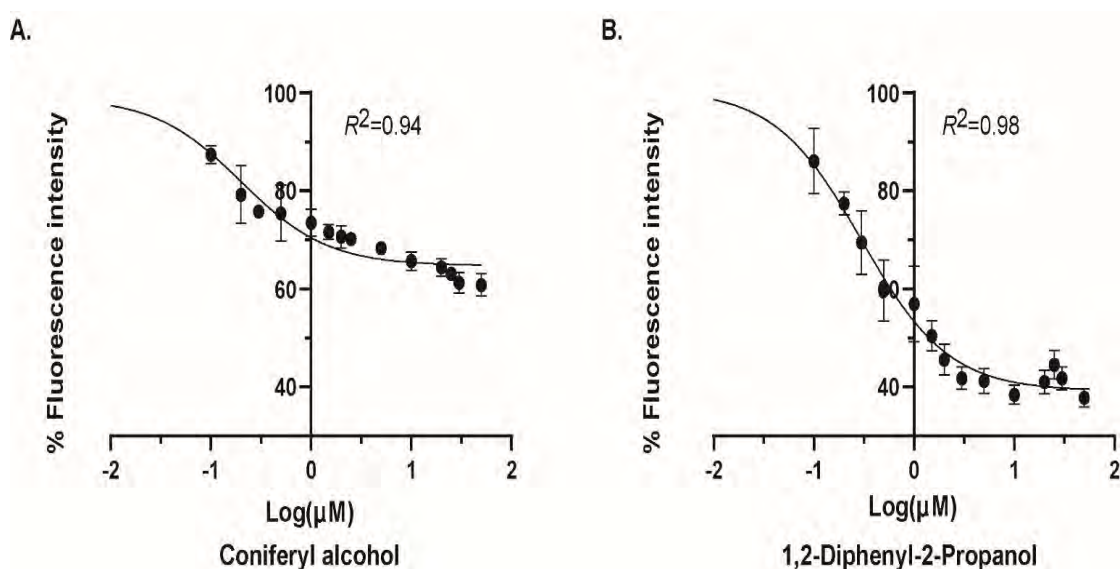
5.3.2. Προσδιορισμός νέων εντομοαπωθητικών ενώσεων με εικονική επιλογή βάσει φαρμακοφόρου (Pharmacophore based virtual screening) και υπολογιστικές μελέτες μοριακής πρόσδεσης στην AgamOBP1

Η κρυστάλλωση του Anopheles gambiae OBP1 (AgamOBP1) σε σύμπλοκο με το DEET και την Icaridin ανέδειξε τον τρόπο σύνδεσης των πιο ευρέως χρησιμοποιούμενων εντομοαπωθητικών σε ένα οσφρητικό μακρομόριο, καθιστώντας δυνατή τη διερεύνηση και τη σύνθεση νέων εντομοαπωθητικών ενώσεων με βάση τη δομή. Προς αυτή την κατεύθυνση, υπολογιστικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε συνεργασία με την ερευνητική ομάδα του Δρ. Ζουμπουλάκη, Ινστιτούτο Βιολογικής Χημείας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, επιχείρησαν την ανακάλυψη νέων ενώσεων, οι οποίες είναι δυνατόν να εξελιχθούν ως εντομοαπωθητικά χρησιμοποιώντας μια συνδυασμένη μεθοδολογία υπολογιστικών τεχνικών. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε εικονική διαλογή βιβλιοθηκών συνθετικών και φυσικών ενώσεων βασισμένη σε ένα φαρμακοφόρο μοντέλο, ακολουθούμενη από μελέτες μοριακής σύνδεσης για τον εντοπισμό ενώσεων με πιθανή απωθητική δράση και συγγένεια δέσμευσης με την πρωτεΐνη AgamOBP1 (Εικόνα 80). Οι λεπτομέρειες της *in silico* μελέτη περιγράφεται στην δημοσίευση Liggri et al. 2022. (162) Τα αποτελέσματα ανέδειξαν δύο ενώσεις, οι οποίες στο πλαίσιο της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής αξιολογήθηκαν τόσο με *in vitro* φθορισμομετρικές δοκιμές, όσο και με *in vivo* δοκιμές συμπεριφοράς έναντι του κουνουπιού *Aedes albopictus*. (162)



Εικόνα 80: Σχηματική αναπαράσταση της μεθοδολογίας που ακολουθήθηκε για την εύρεση νέων εν δυνάμει προσδετών της AgamOBP1

Συγκεκριμένα, η K_i των ενώσεων προσδιορίστηκε με τιτλοδότηση ρυθμιστικού διαλύματος όγκου 1 mL, το οποίο περιείχε 2 μM AgamOBP1 και 10 μM 1-NPN. Ακολούθησε επώαση του ανιχνευτή με το πρωτεϊνικό διάλυμα και στη συνέχεια προστέθηκε ποσότητα από την εκάστοτε ένωση για να επιτευχθεί ένα εύρος τελικής συγκέντρωσης από 0 έως 25 μM . Ο προσδιορισμός της K_i των ενώσεων πραγματοποιήθηκε μέσω του προγράμματος GraphPad Prism 8, εφαρμόζοντας τις εξισώσεις που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Ειδικότερα, η K_d του Coniferyl alcohol και του 1,2-Diphenyl-2-Propanol για την AgamOBP1 υπολογίστηκε σε $69,4 \pm 4,6$ nM και $84,7 \pm 3,4$ nM αντίστοιχα (Εικόνα 81), προσαρμόζοντας τα δεδομένα σε ένα μοντέλο ανταγωνισμού για δέσμευση σε ένα κέντρο, χρησιμοποιώντας ως Hot μM τη συγκέντρωση του 1-NPN στις δοκιμασίες ανταγωνισμού (10 μM) και ως Hot K_d μM την K_d του 1-NPN (4,29 μM). (162)



Εικόνα 81: Διαγράμματα K_i των προσδετών της AgamOBP1

Τα παραπάνω αποτελέσματα παρουσιάζονται στην δημοσίευση Kritsi E, Liggri P.G.V (equal contribution) et al. 2022 (162)

5.3.3. Προσδιορισμός νέων εντομοαπωθητικών ενώσεων με εικονική επιλογή βάσει χημικής δομής (2D-fingerprint based virtual screening) και υπολογιστικές μελέτες μοριακής πρόσδεσης στην AgamOBP1.

Στόχος αυτής της εργασίας ήταν η εφαρμογή συνδυαστικών υπολογιστικών τεχνικών για την υπόδειξη υποψήφιων ενώσεων που θα αξιολογηθούν πειραματικά ως προς την ικανότητα πρόσδεσής τους στον πρωτεϊνικό στόχο και την απωθητική τους δράση σε πειράματα εντομοαπώθησης

Για τον σκοπό αυτό, στο πλαίσιο της παρούσας διδακτορικής διατριβής πραγματοποιήθηκε υπολογιστική διαλογή εκατό είκοσι ενώσεων από την βιβλιοθήκη μικρών μορίων της Sigma-Aldrich. Η διαλογή έγινε με βάση την χημική και δομική τους ομοιότητα με 6 βιοδραστικές ενώσεις (186) και 4 προσδέτες της AgamOBP1 που έχουν αξιολογηθεί στο πλαίσιο της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής σε *in vivo* δοκιμές εντομοαπώθησης (βλ. Ενότητα 9.5 παρακάτω).

Τα παραπάνω, συνολικά δέκα, μόρια που χρησιμοποιήθηκαν ως μόρια αλίευσης (queries) για την αναζήτηση στη βάση δεδομένων χημικών δομών Aldrich Market Select μέσω του συστήματος iResearch™ <https://www.chemnavigator.com/cnc/products/iResearchSys.asp>. Από την διαλογή προέκυψαν 152 ενώσεις οι οποίες πληρούσαν τα εξής κριτήρια α) δομική ομοιότητα $\geq 70\%$ με τα μόρια αλίευσης, β) εμπορική διαθεσιμότητα και γ) κόστος των ενώσεων $\leq 10\text{€}/\text{mg}$. (187)

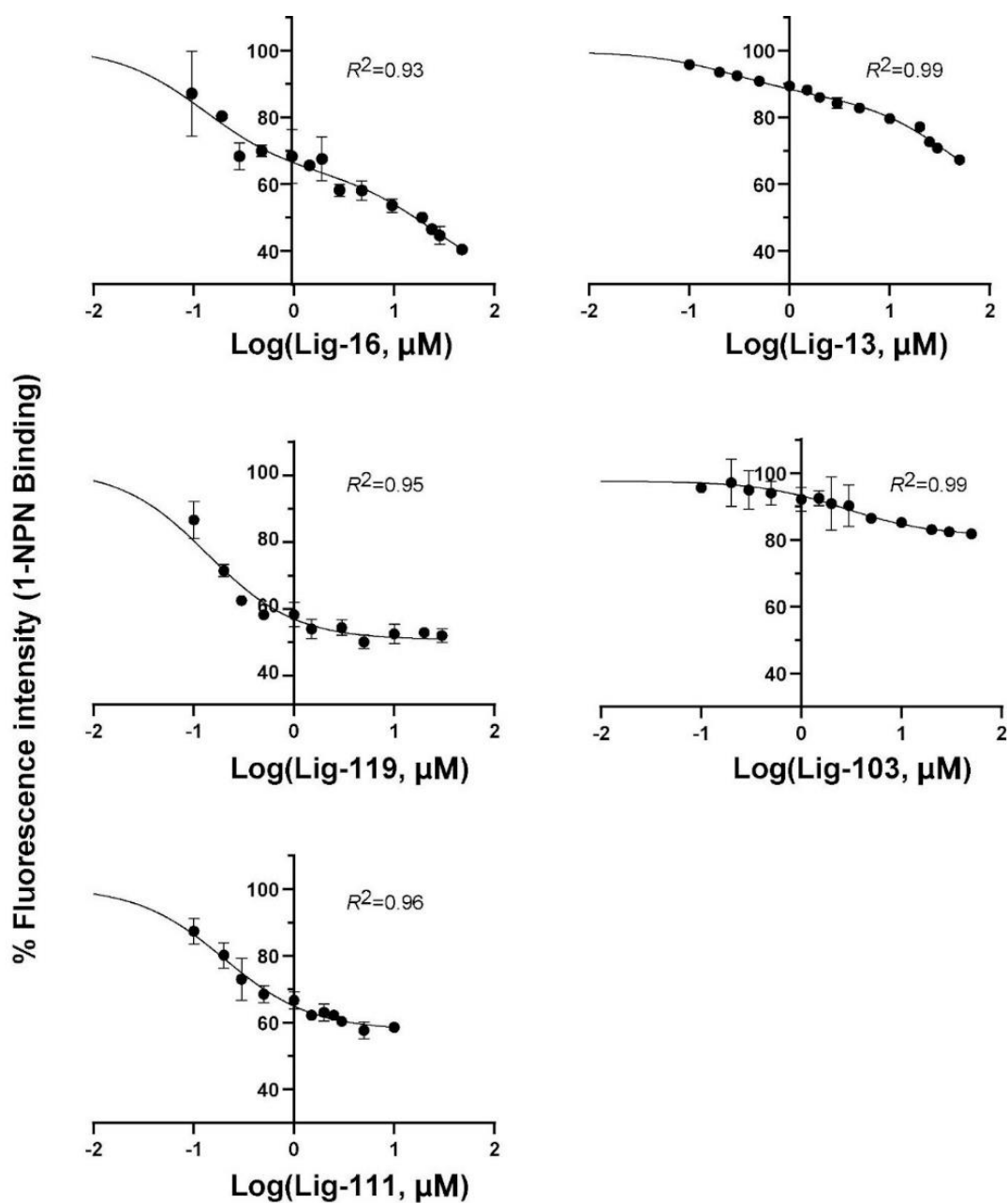
Εν συνεχεία μέσω του προγράμματος FILTER 2.1.1 (OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM, USA. OE <http://www.eyesopen.com>) απομακρύνθηκαν μόρια με λειτουργικές ομάδες που συνδέονται με τοξική δράση, όπως για παράδειγμα αλκυλιωτικοί παράγοντες, ή ομάδες που παρουσιάζουν υψηλή χημική αντιδραστικότητα με αμινοξέα, όπως οι υδραζίνες, ή ενώσεις που μπορούν να παρέμβουν στις *in vitro* δοκιμασίες όπως για παράδειγμα επαγωγείς συσσωμάτωσης πρωτεϊνών (aggregators). Μετά την εφαρμογή της παραπάνω διαδικασίας επιλέχθηκαν 120 μόρια για τα επόμενα βήματα επιλογής. Ως επόμενο κριτήριο επιλογής χρησιμοποιήθηκε η τάση ατμών, με κατώτερο όριο τα 7.5×10^{-7} mmHg (ελάχιστη τιμή για , οδηγώντας στην τελική επιλογή 104 ενώσεων).

Οι ενώσεις αυτές αξιολογήθηκαν περαιτέρω για την ικανότητα πρόσδεσης τους στην AgamOBP1 με *in silico* μελέτες μοριακού ελλιμενισμού (molecular docking) και μοριακής δυναμικής (Molecular dynamics; MD) στο πλαίσιο της συνεργασίας με τον

καθηγητή Horacio Pérez-Sánchez του Καθολικού πανεπιστημίου της Μούρθια, στην Ισπανία. Συγκεκριμένα, οι κρυσταλλικές δομές των συμπλόκου AgamOBP1-DEET (3N7H) και AgamOPB1-Icaridin (5EL2) χρησιμοποιήθηκαν ως μοριακά φίλτρα για σε μελέτες μοριακού ελλιμενισμού με σκοπό την επιλογή των μορίων που παρουσιάζουν ομοότητα τρόπου σύνδεσης (binding mode) με το DEET ή και την Ικαριδίνη στο κέντρο σύνδεσης του DEET. Από τις μελέτες αυτές προτάθηκαν 17 ενώσεις που παρουσίασαν καλή προσαρμογή στην AgamOBP1 και υψηλές ενέργειες πρόσδεσης σε μελέτες μοριακής δυναμικής. Οι λεπτομέρειες των μελετών ελλιμενισμού παρουσιάζονται στο Liggri P.G.V et al 2022 (187)

Στο πλαίσιο της διατριβής επτά από τις ενώσεις που παρουσίαζαν τις υψηλότερες βαθμολογίες προσαρμογής (docking score) και ενέργειας σύνδεσης (MM-GBSA values) δοκιμάστηκαν σε *in vitro* πειράματα και σε *in vivo* βιοδοκιμές σε κουνούπια. (187)

Οι τιμές K_i των ενώσεων υπολογίστηκαν προσαρμόζοντας τα δεδομένα σε μια καμπύλη συναγωνισμού για τη δέσμευση του μορίου σε ένα ή δύο κέντρα. Για το μοντέλο πρόσδεσης σε ένα κέντρο, χρησιμοποιήθηκε ως HotμM η συγκέντρωση του 1-NPN (10 μM) και ως HotKdμM η K_d του 1-NPN (4,29 μM). Αντίστοιχα, για το μοντέλο πρόσδεσης σε δύο κέντρα τα δεδομένα προσαρμόστηκαν σε μια τροποποιημένη εξίσωση (Two sites - Fit K_i), από την οποία προσδιορίστηκε η τιμή K_i για κάθε κέντρο (Εικόνα 82, Πίνακας 17). (187)



Εικόνα 82: Διαγράμματα Κι των προσδετών της AgamOBP1

Πίνακας 17: Οι 7 τελικές ενώσεις που αξιολογήθηκαν ως προς τη συγγένειά τους με την ¹AgamOBP1 και οι τιμές *K_i*

Compound number	CHEM_NAME	<i>K_i</i> , μM		STRUCTURE
		Hi	Lo	
Lig-16	ethyl (2Z)-3-(5-bromofuran-2-yl)-2-methylprop-2-enoate	0.040	7.71	
Lig-119	(4,6,9-trimethyl-3-oxabicyclo [3.3.1] non-6-en-1-yl) methyl acetate	0.042		
Lig-103	(4-isopropyl-6-methyl-3-oxabicyclo [3.3.1] non-6-en-1-yl) methyl acetate	1.246		
Lig-13	diethyl 2-(2-furylmethylene)malonate	0.082	12.84	
Lig-86	2-Methylcinnamic acid, predominantly trans	No binding ¹		
Lig-111	Terpinyl Isobutyrate	0.060		
Lig-118	Terpinyl Butyrate	No binding ¹		

¹ Μείωση φθορισμού 2% σε τελική συγκέντρωση προσδέτη 50 μM

Οι *in vitro* προσδιορισμός της δεσμευτικής τους συγγένειας με το AgamOBP1 με φθορισμομετρικές μελέτες απέδειξε ότι τα τέσσερα από τα οκτώ μόρια παρουσίαζαν βελτιωμένες απωθητικές ιδιότητες. Συγκεκριμένα, το Lig-119 χαρακτηρίζεται ως ένα νέο απωθητικό που μοιάζει με το DEET, ενώ το Lig-13 και το Lig-111 θεωρούνται εξαιρετικά δραστικά απωθητικά μόρια. Ιδιαίτερα ενδιαφέρον παρουσιάζει η ένωση Lig-16, καθώς σε δόσεις υψηλής συγκέντρωσης παρουσιάζει ελκυστική συμπεριφορά σε αντίθεση με τα υπόλοιπα μόρια. Αντίθετα, οι ενώσεις Lig-118, Lig-103 και Lig-86 δεν παρουσιάζουν συγγένεια με την πρωτεΐνη AgamOBP1.

Κεφάλαιο 6^ο: Κρυσταλλογραφικές μελέτες

6.1 Προσδιορισμός της τριτοταγούς δομής της AgamOBP5

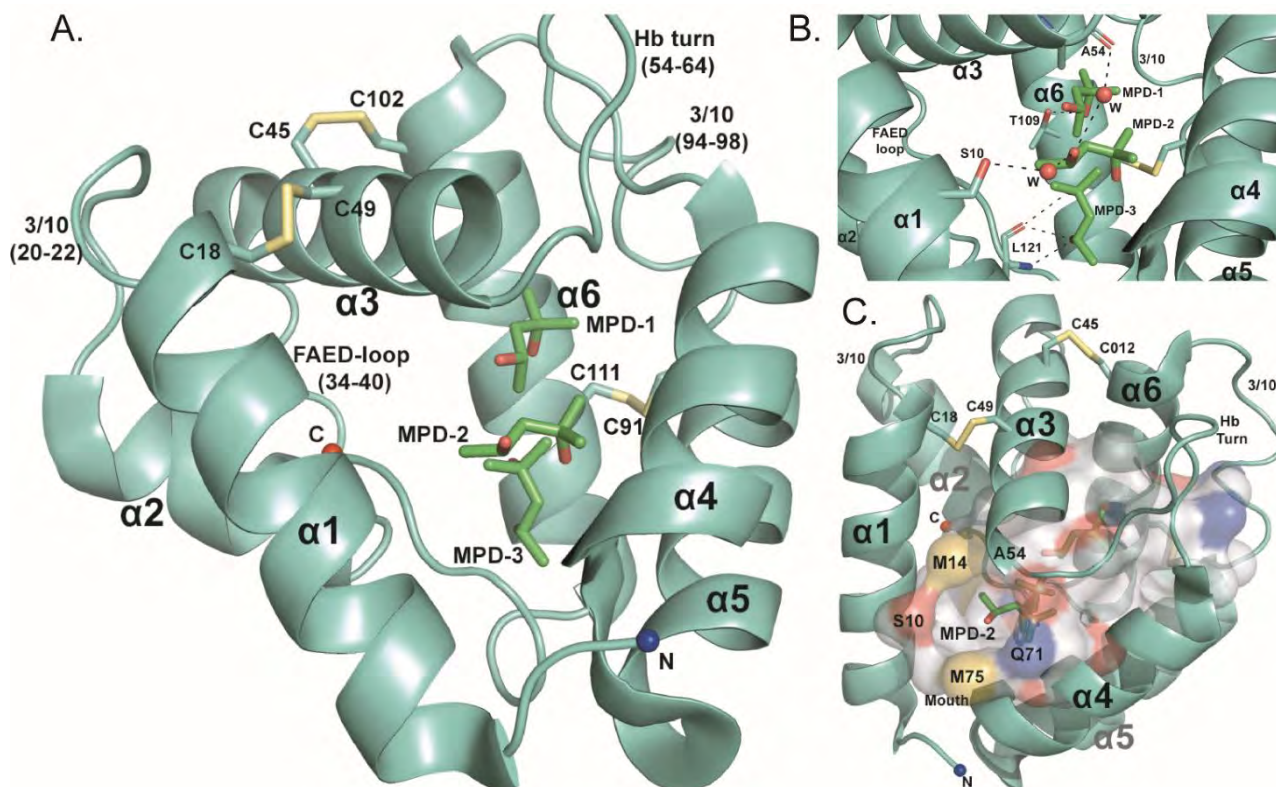
Η τριτοταγής δομή της πρωτεΐνης AgamOBP5 προσδιορίστηκε σε ευκρίνεια 1,35Å. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη αποτελεί μέλος της οικογένειας των κλασικών OBPs, οι οποίες χαρακτηρίζονται από ένα μοτίβο έξι διατηρημένων κυστεϊνών. Η σφαιρική δομή της απαρτίζεται από έξι α έλικες (α1-α6), οι οποίες συνδέονται με εύκαμπτους βρόχους σχηματίζοντας μια μεγάλη κεντρική υδρόφοβη κοιλότητα. Το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης στρέφεται προς το εσωτερικό του μορίου, με αποτέλεσμα να αποτελεί μέρος του τοιχώματος της κοιλότητας. (144)

Τρεις διατηρημένοι δισουλφιδικοί δεσμοί -οι οποίοι σταθεροποιούν την πρωτεϊνική δομή- δημιουργούνται μεταξύ των κυστεϊνών που εντοπίζονται στις έλικες α1 και α3 (Cys18–Cys49), α3 και στην αρχή της έλικας α6 (Cys45–Cys102) και στο τέλος της α6 και την α5 έλικα (Cys111–Cys91). Επίσης, παρατηρούνται δύο προεκτάσεις 3_{10} των ελίκων α1 και α5 που ακολουθούνται από συνδετικούς βρόχους μεταξύ των ελίκων α2 και α6, αντίστοιχα. Επιπλέον, η τριτοταγής δομή περιέχει μια στροφή δεσμών υδρογόνων (hydrogen bonded turn) που συνδέει τις έλικες α3-α4. Τέλος, χαρακτηρίζεται από έναν βρόχο που συνδέει έλικες α2-α3, ο οποίος φέρει μια ακολουθία FAED. (144)

Η κεντρική υδρόφοβη κοιλότητα του μορίου καταλαμβάνεται από τρία μόρια MPD, τα οποία προέρχονται από το διάλυμα κρυστάλλωσης. Το μόριο MPD-1 προσδένεται λόγω του πολικού δεσμού που σχηματίζεται ανάμεσα στο υδροξύλιο του μορίου και του ατόμου OG1 του Thr109 της έλικας α6. Αντίστοιχα, η υδροξυλομάδα του MPD-2, η οποία βρίσκεται μεταξύ των ελίκων α1 και α4, στην είσοδο της κοιλότητας. Η 2-υδροξυλομάδα του MPD-2 συμμετέχει μέσω των γεφυρών ύδατος σε ένα δίκτυο δH που εκτείνεται μεταξύ της Ser10 και της Ala54. Το τρίτο μόριο MPD (MPD-3) αλληλοεπιδρά με τα άτομα οξυγόνου και αζώτου της κύριας αλυσίδας της Leu121 που εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης (Εικόνα 83). (144)

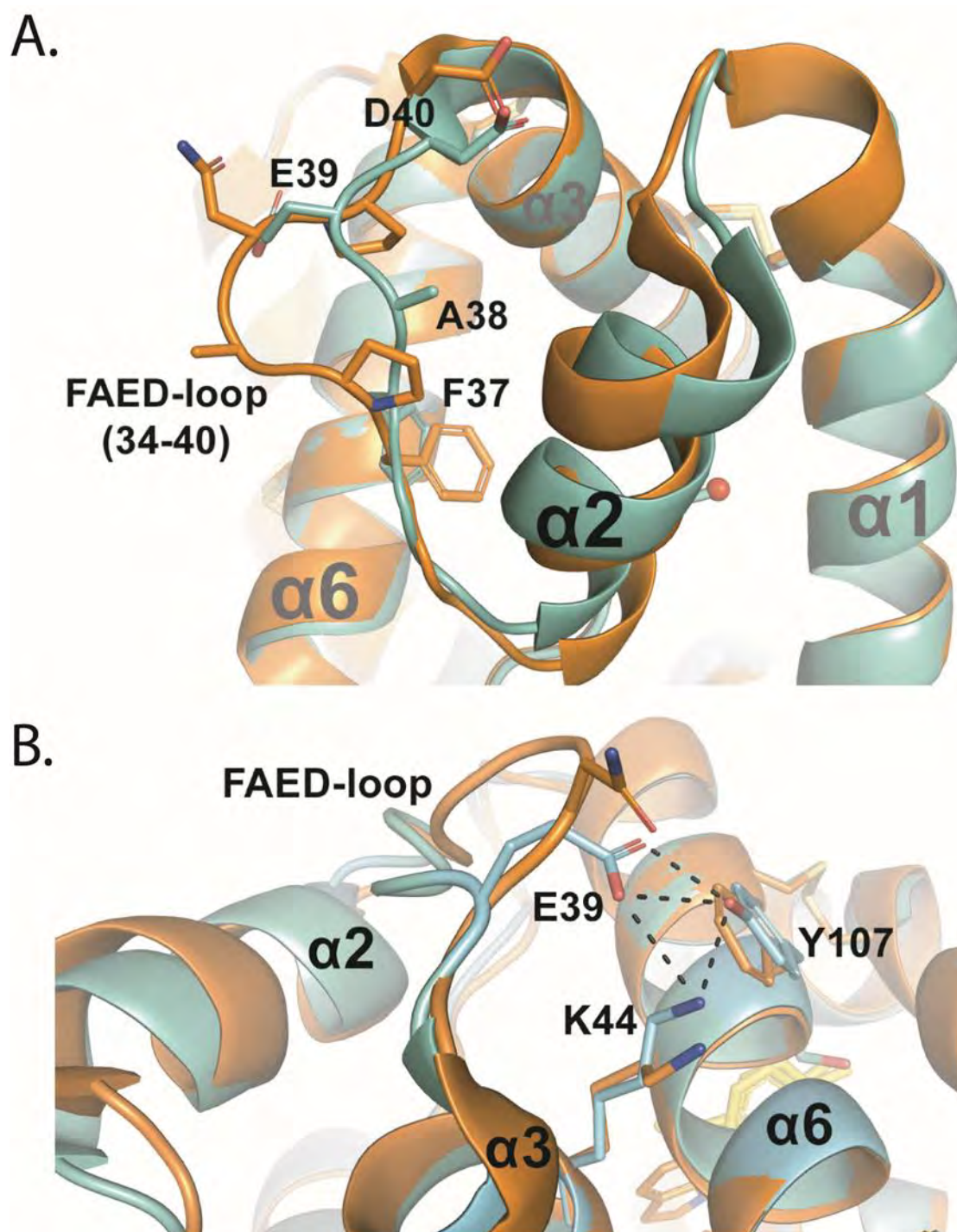
Πίνακας 18. Στατιστικά στοιχεία συλλογής, επεξεργασίας και βελτιστοποίησης της δομής OBP5

Δομή AgamOBP5 (PDB ID)	MPD (8BXU)
Στατιστικά στοιχεία συλλογής δεδομένων	
MX Diamond Light Source	I03; $\lambda=0.9762 \text{ \AA}$
Ομάδες χώρου P2₁ , Διαστάσεις κυψελίδας, a,b,c ($\text{\AA}$)	33.94 35.51 55.06
α, β, γ ($^\circ$)	90.00 100.49 90.00
Διακριτικότητα ($\text{\AA}$)	54.14 - 1.35
Outermost shell ($\text{\AA}$)	1.42-1.35
Αντανakλάσεις που μετρήθηκαν	77102 (11354)
Μοναδικές αντανakάσεις	27461 (3964)
Πληρότητα %	96.5 (95.9)
Πολλαπλότητα	2.8 (2.9)
$\langle I/\sigma I \rangle$	12.7 (2.0)
Wilson Plot B-factor ($\text{\AA}^2$)	17.42
R _{symm}	0.036 (0.523)
R _{meas}	0.045 (0.641)
CC ^{1/2}	0.999 (0.749)
Στατιστικά βελτιστοποίησης	
Final R _{cryst} / R _{free} %	16.57 / 19.41
Αριθμός πρωτεϊνικών καταλοίπων	123
Αριθμός μορίων νερού	126
r.m. απόκλιση στα μήκη κύματος ($\text{\AA}$)	0.013
r.m.s. απόκλιση στις γωνίες των δεσμών ($^\circ$)	1.89
Μέσος όρος B factor ($\text{\AA}^2$)	
Ατομα πρωτεΐνης	21.70
Μόρια νερού	35.11
Μόρια προσδέτη	34.14 ^{All Ligands} , 24.06 ^{MPD1} , 35.12 ^{MPD2} , 35.64 ^{MPD3} , 44.02 ^{PEU}
Ramachandran (u-w) plot.	
Κατάλοιπα σε ευνοϊκές περιοχές (%)	99.17
Κατάλοιπα σε επιτρεπόμενες περιοχές (%)	0.83



Εικόνα 83. (A) Αναπαράσταση της πρωτεΐνης *AgamOBP5* με τρία μόρια MPD συνδεδεμένα στην κεντρική υδρόφοβη κοιλότητα. Οι τρεις δισουλφιδικοί δεσμοί υποδεικνύονται με κίτρινο χρώμα. (B) Τα μόρια MPD-1 και MPD-3 που βρίσκονται στον πυθμένα και στο κέντρο της κοιλότητας δέσμευσης, αντίστοιχα, σχηματίζουν άμεσους δεσμούς υδρογόνου με υπολείμματα πρωτεΐνης. Το μόριο MPD-2 που βρίσκεται στην είσοδο της κοιλότητας σχηματίζει «δίκτυο δεσμών υδρογόνου» μέσω δύο μορίων ύδατος. Οι δεσμοί υδρογόνου εμφανίζονται ως διακεκομμένες γραμμές. (C) Η μοριακή επιφάνεια Connolly της κοιλότητας δέσμευσης *AgamOBP5* που δείχνει το άνοιγμα του στομίου μεταξύ των ελίκων α1, α3 και α4, το οποίο καταλαμβάνεται από το μόριο MPD-2.

Η αλληλουχία *AgamOBP5* παρουσιάζει 62% ταυτότητα και 73% ομοιότητα με την πρωτεΐνη *AgamOBP4*, όπως έχει προαναφερθεί. Μελέτες υπέρθεσης επισημαίνουν τις διαφορές αλλά και τις ομοιότητες που εντοπίζονται ανάμεσα στις δυο τριτοταγείς δομές. Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη *AgamOBP4* φέρει δύο επιπλέον υπολείμματα προλίνης του βρόγχου που συνδέει τις έλικες α2 και α3. Συγκεκριμένα, το τμήμα FPANPD (κατάλοιπα αα 37-42) του βρόγχου της *AgamOBP4*, αντικαθίσταται από το μικρότερο τμήμα ακολουθίας FAED (κατάλοιπα αα 37-40) στην *AgamOBP5*. Ως αποτέλεσμα οι δύο βρόχοι λαμβάνουν αντίθετο προσανατολισμό στις δύο πρωτεΐνες με την Ala38 της *AgamOBP5* να προσανατολίζεται προς την έλικα α2 σε αντίθεση με το αντίστοιχο κατάλοιπο υπόλειμμα αλανίνης στη δομή *AgamOBP4* το οποίο εκτίθεται στο διαλύτη (Εικόνα 86A). Σε αυτόν το προσανατολισμό το γλουταμικό Glu39 της *AgamOBP5* συμμετέχει σε ένα δίκτυο δH με την Tyr107 (α6) και την Lys44 (α3) (Εικόνα 84B).

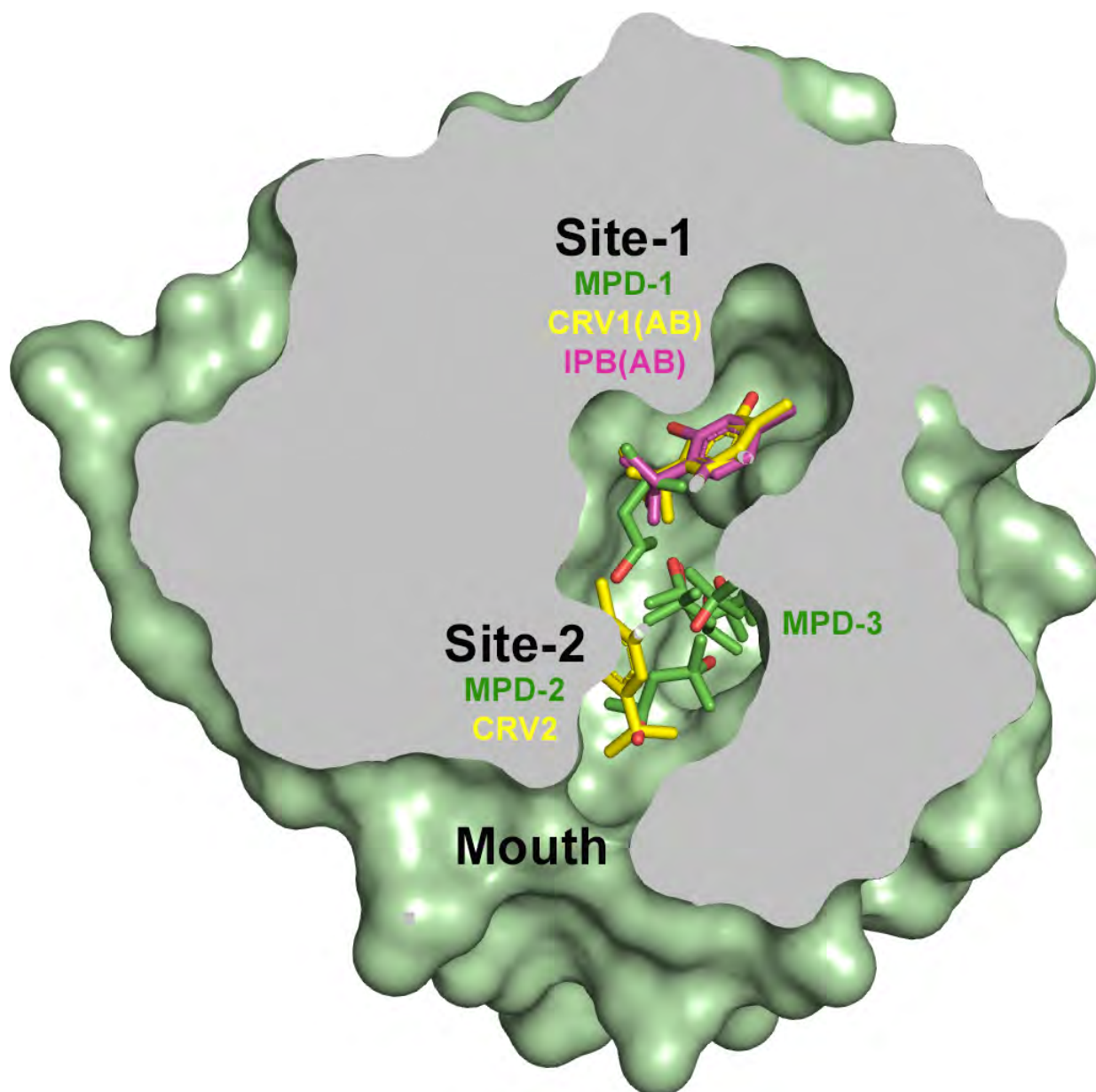


Εικόνα 84. Δομική σύγκριση μεταξύ *AgamOBP5* και *AgamOBP4* στην περιοχή του βρόχου FAED. Υπέρθεση δομής του *AgamOBP5* (πράσινο) στο *AgamOBP4* (πορτοκαλί) που δείχνει τις κύριες διαμορφωτικές διαφορές που παρατηρήθηκαν στον βρόχο FAED και στην έλικα $\alpha 2$

6.2 Προσδιορισμός της τρισδιάστατης δομής των συμπλόκων AgamOBP5-καρβακρόλη και AgamOBP5-θυμόλη

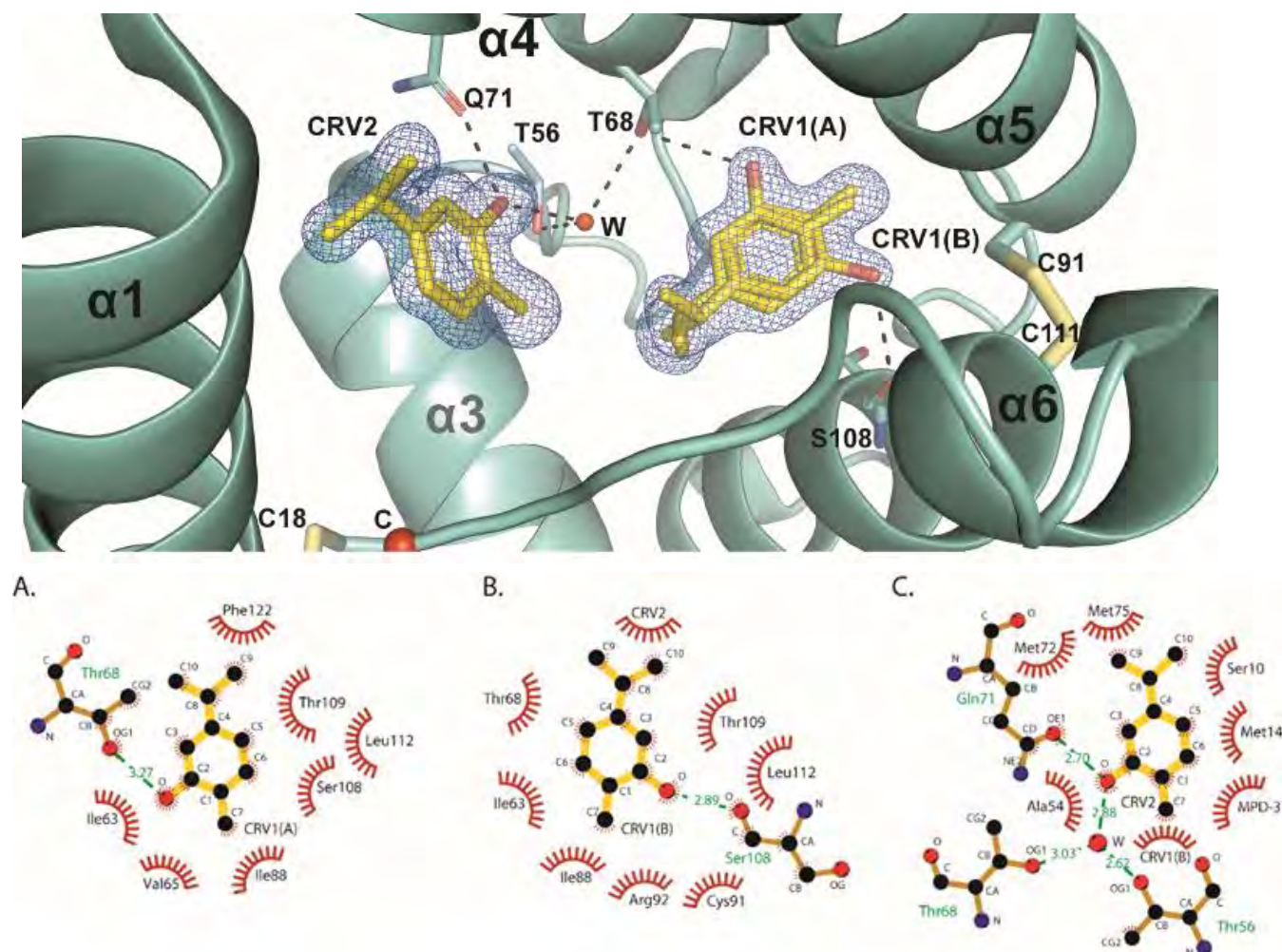
Η ανάλυση των κρυσταλλογραφικών δομών για τα σύμπλοκα AgamOBP5-καρβακρόλη και AgamOBP5-θυμόλη, έδειξε ότι η κεντρική υδρόφοβη κοιλότητα της πρωτεΐνης, καταλαμβάνεται από τους εν λόγω προσδέτες. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση της καρβακρόλης, δύο μόρια της ένωσης προσδένονται στην πρωτεΐνη. Η πρώτη θέση δέσμευσης (site-1) βρίσκεται στον πυθμένα της κοιλότητας που οριοθετείται από τις έλικες α5 (πυθμένας της κοιλότητας), α4 και την α6. Η θέση της φαινολικής υδροξυλομάδας της καρβακρόλης φάνηκε ότι δεν ήταν μοναδική, υποδηλώνοντας την παρουσία δύο εναλλακτικών διαμορφώσεων της ένωσης. Πράγματι, περαιτέρω δοκιμές βελτιστοποίησης αποκάλυψαν δύο διακριτές διαμορφώσεις καρβακρόλης (CRV1A και CRV1B), οι οποίες διαφέρουν μεταξύ τους κατά 180°. (144)

Υπέρθεση των δομών AgamOBP5-καρβακρόλη και AgamOBP5-MPD, έδειξε ότι η θέση πρόσδεσης του πρώτου μορίου της καρβακρόλης επικαλύπτεται μερικώς με αυτή του MPD-1 (Εικόνα 85). Αντίστοιχα, το δεύτερο μόριο καρβακρόλης (CRV2) προσδένεται κοντά στο άνοιγμα της κεντρικής κοιλότητας, σε μια θέση όπου επικαλύπτεται μερικώς με το μόριο MPD-2. Σε αντίθεση με την καρβακρόλη στο site-1, η πυκνότητα που παρατηρείται στο site-2, είναι καλά καθορισμένη, υποδεικνύοντας τη δέσμευση της καρβακρόλης ως ένα μοναδικό διαμορφωτή. Τέλος, παρατηρήθηκε μια επιπλέον πυκνότητα, η οποία αποδόθηκε σε ένα μόριο MPD προερχόμενο από το διάλυμα κρυστάλλωσης. Το συγκεκριμένο μόριο MPD εντοπίζεται στη συγκεκριμένη θέση (MPD-3) και στη δομή του συμπλόκου AgamOBP5-MPD (Εικόνα 85). (144)



Εικόνα 85. Οι θέσεις δέσμευσης της καρβακρόλης (κίτρινο χρώμα), της θυμόλης (μωβ χρώμα) και του MPD (πράσινο χρώμα). Ένα μόριο καρβακρόλης (σε δύο εναλλακτικές διαμορφώσεις) προσδένεται στο site-1 και ένα μόριο στο site-2. Αντίστοιχα, το μόριο θυμόλης επικαλύπτεται τέλεια με αυτό της καρβακρόλης στο site-1. Στην ίδια θέση προσδένεται το MPD-1 (στη δομή AgamOBP5-MPD), ενώ το μόριο MPD-3 καταλαμβάνει την ίδια θέση σε όλες τις δομές.

Η πρόσδεση της καρβακρόλης στο site-1 επιτυγχάνεται μέσω του σχηματισμού δεσμών υδρογόνου ανάμεσα στην υδροξυλομάδα της ένωσης και της Thr68 της α4 έλικας (CRV1A) ή ανάμεσα στην υδροξυλομάδα της ένωσης και το οξυγόνο της κύριας αλυσίδας του Ser108 της α6 έλικας (CRV1B) (Εικόνα 86). Επίσης, η καρβακρόλη σχηματίζει διαμοριακές αλληλεπιδράσεις van der Waals με τα αμινοξέα της πρωτεΐνης, 34 στη διαμόρφωση A και 37 στη διαμόρφωση B (Πίνακας 19). Αντίστοιχα, στο site-2, η υδροξυλομάδα της καρβακρόλης αναπτύσσει δεσμό υδρογόνου με το Gln71 της α4 έλικας. Επίσης, συμμετέχει σε δίκτυο δH, μέσω σχηματισμό γεφυρών ύδατος, με τις πλευρικές αλυσίδες της Thr56 (βρόχος α3-α4) και της Thr68 της έλικας α4. Στη συγκεκριμένη θέση η καρβακρόλη αναπτύσσει επιπλέον 31 αλληλεπιδράσεις van der Waals, περιλαμβανομένων μιας αλληλεπίδρασης με το μόριο καρβακρόλης CRV1 στο κέντρο-1 (Site-1) και τρεις με το μόριο MPD-3 (Εικόνα 86, Πίνακας 20).



Εικόνα 86. (πάνω) Το δίκτυο των πολικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των προσδετών, των υπολειμμάτων πρωτεΐνης και ενός μορίου ύδατος στην κοιλότητα δέσμευσης της AgmatOBP5 (αναπαρίστανται ως μαύρες διακεκομμένες γραμμές. (A, B) αλληλεπιδράσεων της καρβακρόλης προσδεμένης στο site-1, σε δύο εναλλακτικές επικαλυπτόμενες διαμορφώσεις, και (C) στο site-2 ως μεμονωμένη διαμόρφωση. Οι πιθανοί δεσμοί υδρογόνου αναπαρίστανται ως πράσινες διακεκομμένες γραμμές και επαφές van der Waals ως ακτίνες

Πίνακας 19. Αλληλεπιδράσεις του μορίου της καρβακρόλης με την πρωτεΐνη στο site 1.

A. Καρβακρόλη στο Site 1.

I. Πιθανοί Δεσμοί Υδρογόνου				
Καρβακρόλη άτομο	AgamOBP5 άτομο		Distance (Å)	
	Διαμόρφωση A	Διαμόρφωση B	Διαμ. A	Διαμ. B
O	Thr68 OG1	Ser108 O	3.27	2.89
II. Van der Waals αλληλεπιδράσεις				
Καρβακρόλη άτομο	AgamOBP5 άτομο		Αριθμός αλληλεπιδράσεων	
	Διαμόρφωση A	Διαμόρφωση B	Διαμ. A	Διαμ. B
O	Ile63 CG2; Val65 CA, CG2; Thr68 CG2, CB; Ile88 CG2	Cys91 O, CB; Ser108 CA, CB, C; Leu112 CG, CD2	6	7
C ₂	Ile63 CG2; Thr68 CG2, OG1	Ser108 CB, C, O; Leu112 CD2, CD1, CG	3	6
C ₃	Ile63 CG2; Thr68 CG2, OG1; Wat71	Ser108 CB, C, O; Thr109 N; Leu112 CD1, CG	4	6
C ₄	—	Leu112 CD1	—	1
C ₅	Ser108 CB, C, O; Thr109 N, OG1; Leu112 CD1	Ile63 CG2; Thr68 CG2, OG1; Wat71	6	4
C ₆	Ser108 CB, C, O; Leu112 CD1, CG, CD2	Ile63 CG2	6	1
C ₇	Ile88 CG2, O	Wat5; Ile88 CG2, O; Cys91 O; Arg92 CA	2	5
C ₈	Wat71; Thr109 OG1	Thr109 OG1; Leu112 CD1	2	2
C ₉	Thr109 OG1; Leu112 CD1; Phe122 CE1	Wat71; Thr109 OG1	3	2
C ₁₀	Thr105 O; Thr109 OG1	CRV2 C7; Wat71; Leu112 CD1	2	3
Συνολικός αριθμός αλληλεπιδράσεων			34	37

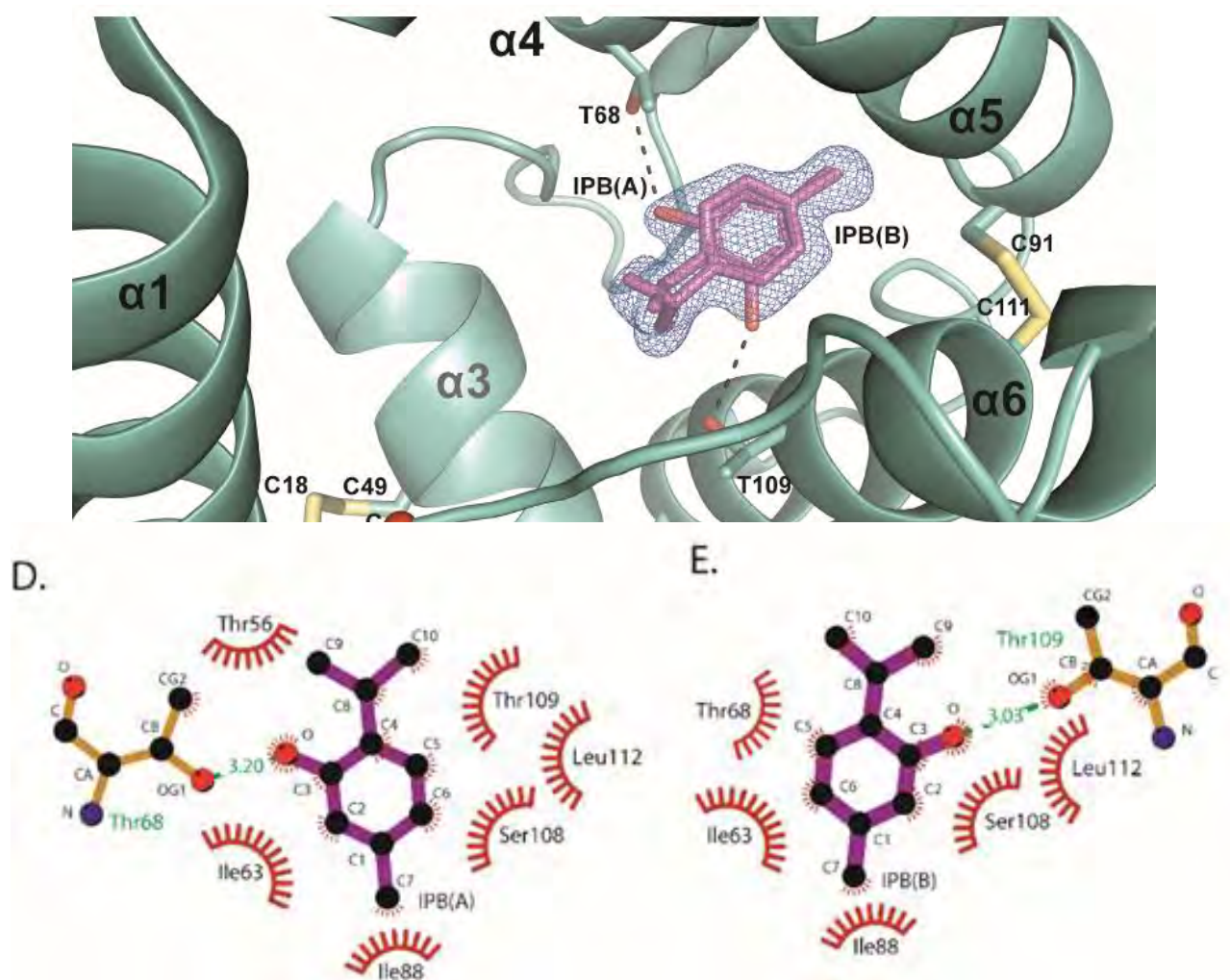
Πίνακας 20. Αλληλεπιδράσεις του μορίου της καρβακρόλης με την πρωτεΐνη στο site 2.

B. Καρβακρόλη στο Site 2

I. Πιθανοί Δεσμοί Υδρογόνου		
Καρβακρόλη άτομο	AgamOBP5 άτομο	Distance (Å)
O	*Wat71; Gln71 OE1	2.88, 2.70
II. Van der Waals αλληλεπιδράσεις		
Καρβακρόλη άτομο	AgamOBP5 άτομο	Αριθμός αλληλεπιδράσεων
O	Ala54 CB; Thr56 CG2; Gln71 CD; Met72 CE	4
C ₁	Ala54 CB; MPD301 C5	2
C ₂	Wat71; Ala54 CB; Gln71 OE1; Met72 CE	4
C ₃	Ala54 CB; Gln71 OE1; Met72 CE; PGO901 C3	4
C ₅	Met14 SD; MPD301 C5	2
C ₆	Pro123 CD, CG; MPD301 C5	3
C ₇	CRV1B C10 ; Wat71; Ile50 CG2; Ala54 CB	4
C ₈	Met75 SD; PGO901 C3	2
C ₉	Leu7 CD1; Met72 SD; Met75 SD	3
C ₁₀	Leu7 CD1; Ser10 OG; Met14 SD	3
Συνολικός αριθμός αλληλεπιδράσεων		31

*Wat71 is in turn capable to donate an additional hydrogen to make a hydrogen bond either to Thr56 OG1 (2.62 Å) or Thr68 OG1 (3.03 Å).

Η ανάλυση της κρυσταλλογραφικής δομής του συμπλόκου AgamOBP5-θυμόλης, αποκάλυψε ότι ένα μόριο θυμόλης προσδένεται στο site-1, και επικαλύπτεται πλήρως με το μόριο της καρβακρόλης στο αντίστοιχο σύμπλοκο. Όμοια με την καρβακρόλη, η θυμόλη υιοθετεί δύο εναλλακτικές διαμορφώσεις, με κατάληψη (occupancy) 0,6 και 0,4. Σε αυτή τη θέση το μόριο της θυμόλης αναπτύσσει δεσμό υδρογόνου μέσω της υδροξυλομάδας του με την πλευρική ομάδα της Thr68 της έλικας $\alpha 4$ (IPB-A) ή της Thr109 της $\alpha 6$ (IPB-B). Επιπλέον, αναπτύσσει 28 αλληλεπιδράσεις van der Waals με τα αμινοξέα του κέντρου στη διαμόρφωση A και 29 στη διαμόρφωση B (Εικόνα 87, Πίνακας 21).



Εικόνα 87. (Επάνω) Το δίκτυο των πολικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ του προσδέτη και των αμινοξικών υπολειμμάτων της πρωτεΐνης στην κοιλότητα δέσμευσης του AgamOBP5 (υποδεικνύονται ως μαύρες διακεκομμένες γραμμές). (D, E) Το αντίστοιχο διάγραμμα αλληλεπιδράσεων της θυμόλης προσδεμένης στο site-1, σε δυο εναλλακτικές διαμορφώσεις. Οι πιθανοί δεσμοί υδρογόνου αναπαρίστανται ως πράσινες διακεκομμένες γραμμές και επαφές van der Waals ως ακτίνες

Πίνακας 21. Αλληλεπιδράσεις του μορίου της θυμόλης με την πρωτεΐνη

I. Πιθανοί Δεσμοί Υδρογόνου				
Θυμόλη άτομο	AgamOBP5 άτομο		Distance (Å)	
	Διαμόρφωση A	Διαμόρφωση B	Διαμ. A	Διαμ. B
O	Thr68 OG1	Thr109 OG1	3.20	3.03
II. Van der Waals αλληλεπιδράσεις				
Θυμόλη άτομο	AgamOBP5 άτομο		Αριθμός αλληλεπιδράσεων	
	Διαμόρφωση A	Διαμόρφωση B	Διαμ. A	Διαμ. B
O	Thr56 CB, OG1, CG2; Ile63 CG2; Thr68 CB, CG2	Thr 105 O; Ser108 CA, CB, C, O; Thr109, N, CA, CB; Leu112 CD1	6	9
C ₂	Ile63 CG2; Thr68 CG2	Ser108 CB, C, O; Leu112 CD1	2	4
C ₃	Ile63 CG2; Thr68 CG2	Ser108 CB, C; Leu112 CD1	2	3
C ₄	Leu112 CD1	—	1	—
C ₅	Ser108 CB, C, O; Thr109 N; Leu112 CD1, CG	Ile63 CG2; Thr68 CG2, OG1	6	3
C ₆	Ser108 CB, C, O; Leu112 CD2, CD1, CG	Ile63 CG2; Thr68 CG2	6	2
C ₇	Ile88 CG2, O	Ile88 CA, CG2, C, O	2	4
C ₈	Thr109 OG1	—	1	—
C ₉	—	Ile63 CD1; Thr109 OG1	—	2
C ₁₀	Ala51 CB; Thr109 OG1	Thr109 OG1; Leu112 CD1	2	2
Συνολικός αριθμός αλληλεπιδράσεων			28	29

Πίνακας 22. Στατιστικά στοιχεία συλλογής, επεξεργασίας και βελτιστοποίησης των δομών
OBP5 με προσδέτες

Δομή AgamOBP5 (PDB ID)	Καρβακρόλη (8BXW)	Θυμόλη (8BXV)
Στατιστικά στοιχεία συλλογής δεδομένων		
MX Diamond Light Source	I04-1; $\lambda=0.91587$	I04-1; $\lambda=0.91587$
Ομάδες χώρου P2₁ , Διαστάσεις κυψελίδας, a,b,c (Å)	34.36 36.71 54.66	34.24 36.57 54.96
α, β, γ (°)	90.00 101.77 90.00	90.00 100.38 90.00
Διακριτικότητα (Å)	53.51 - 1.30	54.06 - 1.30
Outermost shell (Å)	1.37-1.30	1.37-1.30
Αντανακλάσεις που μετρήθηκαν	206265 (26351)	200594 (31980)
Μοναδικές αντανακλάσεις	32113 (4584)	31153 (4715)
Πληρότητα %	97.5 (96.3)	94.3 (97.8)
Πολυαπλότητα	6.4 (5.7)	6.4 (6.8)
$\langle I/\sigma I \rangle$	23.5 (7.5)	22.5 (6.7)
Wilson Plot B-factor (Å ²)	15.3	16.86
R _{sym}	0.036 (0.171)	0.037 (0.233)
R _{meas}	0.040 (0.188)	0.040 (0.253)
CC ^{1/2}	0.999 (0.985)	0.999 (0.980)
Στατιστικά βελτιστοποίησης		
Final R _{cryst} / R _{free} %	17.18 / 20.09	18.51 / 22.02
Αριθμός πρωτεϊνικών καταλοίπων	123	123
Αριθμός μορίων νερού	124	126
r.m. απόκλιση στα μήκη κύματος (Å)	0.015	0.015
r.m.s. απόκλιση στις γωνίες των δεσμών (°)	1.83	1.96
Μέσος όρος B factor (Å²)		
Άτομα πρωτεΐνης	21.76	23.12
Μόρια νερού	32.76	33.69
Μόρια προσδέτη	32.20 ^{All Ligands} , 45.30 ^{MPD} 21.93 Carvacrol ^{Site 1} 23.63 Carvacrol ^{Site 2}	39.56 ^{All Ligands} , 57.05 ^{MPD} , 44.21 ^{PEU} 29.03 Thymol ^{Site 1}
Ramachandran (u-w) plot.		
Κατάλοιπα σε ευνοϊκές περιοχές (%)	100	100
Κατάλοιπα σε επιτρεπόμενες περιοχές (%)	-	-

❖ Δομική σύγκριση τρισδιάστατων κρυσταλλικών δομών της *AgamOBP5*

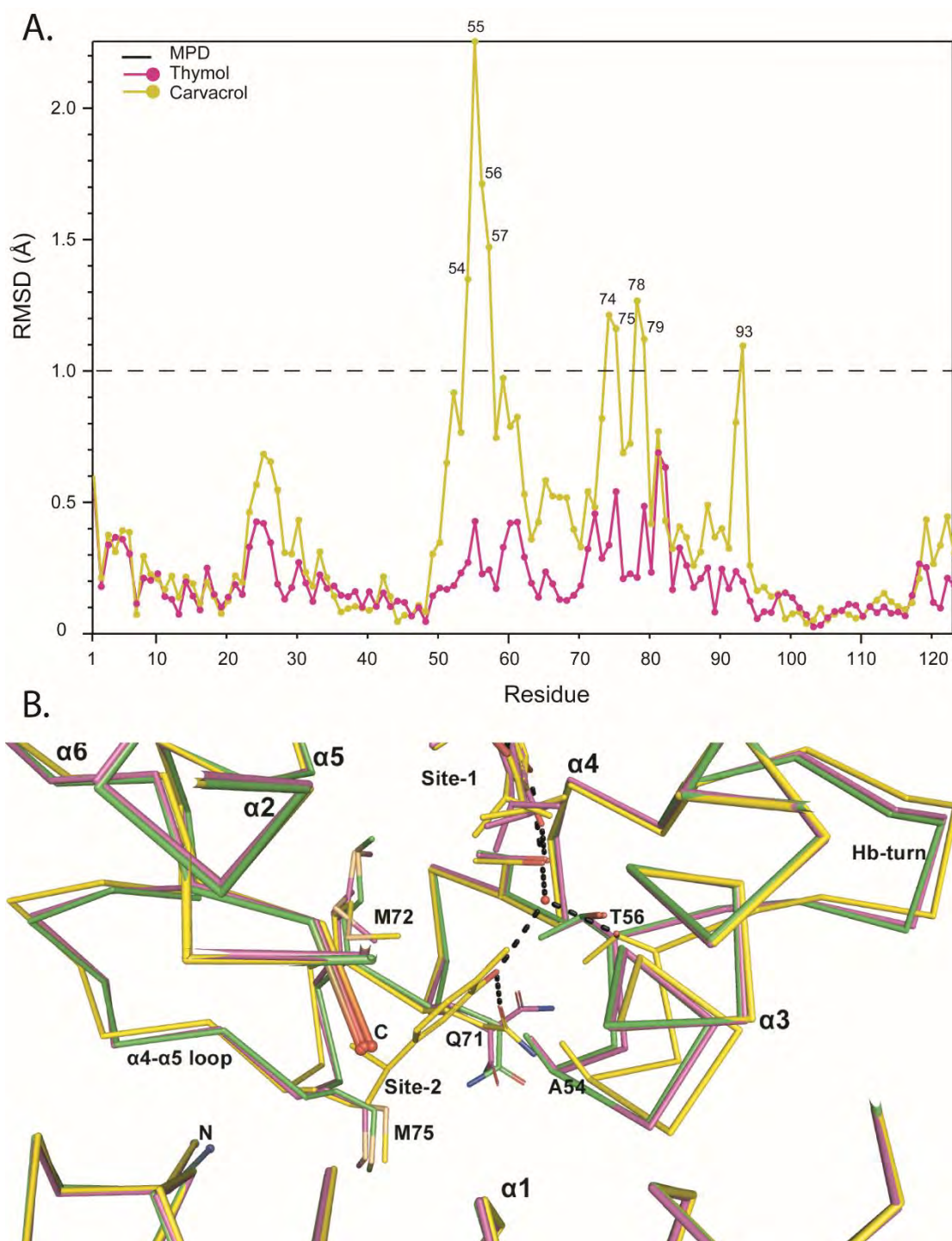
Για τη διερεύνηση πιθανών αλλαγών στη διαμόρφωση της πρωτεΐνης κατά την πρόσδεση των ενώσεων, πραγματοποιήθηκε συγκριτική ανάλυση των τριτοταγών δομών. Καθώς δεν διατίθεται κρυσταλλική δομή της πρωτεΐνης απουσία MPD, το σύμπλοκο AgamOBP5-MPD χρησιμοποιείται δομή αναφοράς. (144)

Η πρόσδεση τερπενίου (καρβακρόλης ή θυμόλης) δεν προκαλεί σημαντικές μεταβολές στη ολική τριτοταγή διαμόρφωση της πρωτεΐνης. Η ανάλυση των αποκλίσεων RMSD μεταξύ των ατόμων της κύριας αλυσίδας του πρωτεϊνικού μορίου, υπέδειξε ότι οι βασικότερες αλλαγές εντοπίζονται στα κατάλοιπα 54-57 -που ανήκουν στην περιοχή βρόχου στροφής δH, μεταξύ των ελίκων α3 και α4, στα κατάλοιπα 74-79 του βρόχου σύνδεσης α4-α5 και στο Asp93 που βρίσκεται στην επέκταση 3₁₀ της έλικας α5 (Εικόνα 88). (144)

Η σύγκριση των δομών καρβακρόλης και της θυμόλης με τη δομή MPD αποκάλυψε ότι το site-1 υφίσταται πολύ μικρή αλλαγή. Η μόνη εξαίρεση είναι η κύρια αλυσίδα του Asp93 στο σύμπλεγμα καρβακρόλης. Ωστόσο, η πλευρική αλυσίδα του Asp93 δεν είναι μέρος του εσωτερικού της κοιλότητας αλλά εκτίθεται στο διαλύτη σε όλα τα σύμπλοκα. Σύμφωνα με αυτά τα αποτελέσματα, προτείνεται ότι το site-1 διαθέτει μια προσχηματισμένη θέση πρόσδεσης, τόσο για την καρβακρόλη όσο και για τη θυμόλη που χαρακτηρίζεται από υψηλή συγγένεια. Με άλλα λόγια προτείνεται ότι η πρόσδεση των ενώσεων σε αυτό το κέντρο μπορεί να σταθεροποιεί τις έλικες α4, α5 και α6 χωρίς κατανάλωση ενέργειας για δομική αναδιάταξη. (144)

Αντίθετα, το site-2 προτείνεται να είναι το κέντρο χαμηλότερης συγγένειας και η σύνδεση προσδέτη φαίνεται να απαιτεί αρκετές αλλαγές στη διαμόρφωση τόσο της κύριας αλυσίδας όσο και των πλευρικών ομάδων, προκειμένου να επιτευχθεί η πρόσδεση των ενώσεων. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε σημαντική μετατόπιση των ατόμων της κύριας αλυσίδας του Ala54, η οποία ευνοεί την ανάπτυξη αλληλεπιδράσεων με τον αρωματικό δακτύλιο της καρβακρόλης. Παράλληλα, η πλευρική αλυσίδα του Gln71 μετατοπίζεται προς τη μεριά του προσδέτη, προκειμένου να δημιουργηθεί ένας δεσμός υδρογόνου με το υδροξύλιο της καρβακρόλης. Αντίθετα, στο σύμπλοκο AgamOBP5-θυμόλη, όπου το site-2 δεν είναι κατειλημμένο, η Gln71 στρέφεται προς το διαλύτη. Ομοίως, η πλευρική αλυσίδα της Met72 στρέφεται προς το site-2 προκαλώντας πολυάριθμες αλληλεπιδράσεις με τις ομάδες ισοπροπυλίου,

υδροξυλίου και τον αρωματικό δακτύλιο της καρβακρόλης. Τόσο η Ala54, η Met75 όσο και η Gln71 συμβάλλουν στο σχηματισμό του ανοίγματος του στόμιου (mouth) το οποίο καθίσταται περισσότερο υδρόφοβο κατά τη μετάβαση από το σύμπλοκο του MPD στο σύμπλεγμα θυμόλης και της καρβακρόλης. (144)

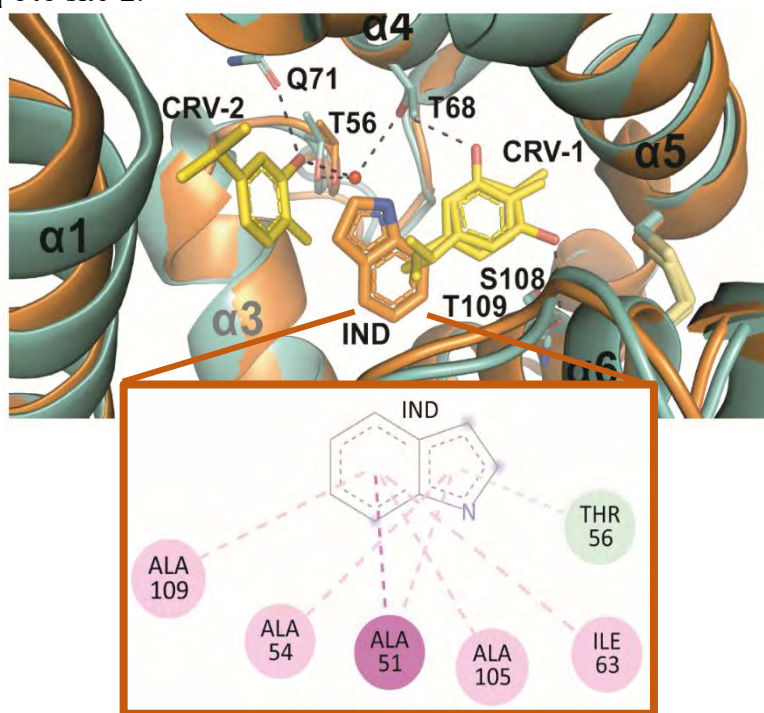


Εικόνα 88. (πάνω) Συγκριτικό διάγραμμα RMSD των συμπλόκων καρβακρόλης και θυμόλης αναφορικά με το σύμπλοκο MPD. Αμινοξέα με $RMSD \geq 1$ υποδεικνύονται με αριθμό. (κάτω). Υπέρθηση των τριών κρυσταλλικών δομών της AgamOBP5

❖ *Δομική σύγκριση τρισδιάστατων κρυσταλλικών δομών AgamOBP5-καρβακρόλη, AgamOBP5- θυμόλη και AgamOBP4- ινδόλιο.* (144)

Η υπέρθεση των δομών της AgamOBP5-καρβακρόλης με το σύμπλοκο AgamOBP4-ινδόλιο (PDB id: 3Q8I) έδειξε ότι το μόριο του ινδολίου προσδένεται σε μια περιοχή μεταξύ του site-1 και site-2, όπου επικαλύπτεται με την θέση του μορίου MPD-3. Το ινδόλιο στην θέση αυτή αναπτύσσει 31 αλληλεπιδράσεις Van der Waals, με την AgamOBP4, αριθμό παρόμοιο με την κάθε μεμονωμένη διαμόρφωση καρβακρόλης ή θυμόλης στο site-1. Ωστόσο, σχηματίζει μόνο δύο μακρινές πολικές αλληλεπιδράσεις με την Thr56 και Thr68, σε αντίθεση με τα δύο τερπένια τα οποία σχηματίζουν ισχυρούς δεσμούς υδρογόνου (Εικόνα 89).

Αξίζει να σημειωθεί ότι το Thr109 που εντοπίζεται στο site-1, στην AgamOBP4 αντικαθίσταται από μια αλανίνη. Πρόκειται για μια σημαντική διαφορά, καθώς το Thr109 δημιουργεί μέσω της πλευρικής του αλυσίδας δεσμό υδρογόνου με τη θυμόλη αλλά και αλληλεπιδράσεις Van der Waals τόσο με τη θυμόλη όσο και με την καρβακρόλη. Αντίστοιχα, στην AgamOBP4 η Ala σχηματίζει μόνο μια μακρινή αλληλεπίδραση Van der Waals με το ινδόλιο. Επίσης, στην AgamOBP5 η Leu112 (έναντι της Ala112 της AgamOBP4), αποτελεί σημαντική πηγή αλληλεπιδράσεων τόσο με τα μόρια της καρβακρόλης όσο και με τα μόρια θυμόλης. Τέλος, η Ile73 της AgamOBP4 έχει αντικατασταθεί στο AgamOBP5 από τη Met72, η οποία αλληλεπιδρά με την καρβακρόλη στο site-2.



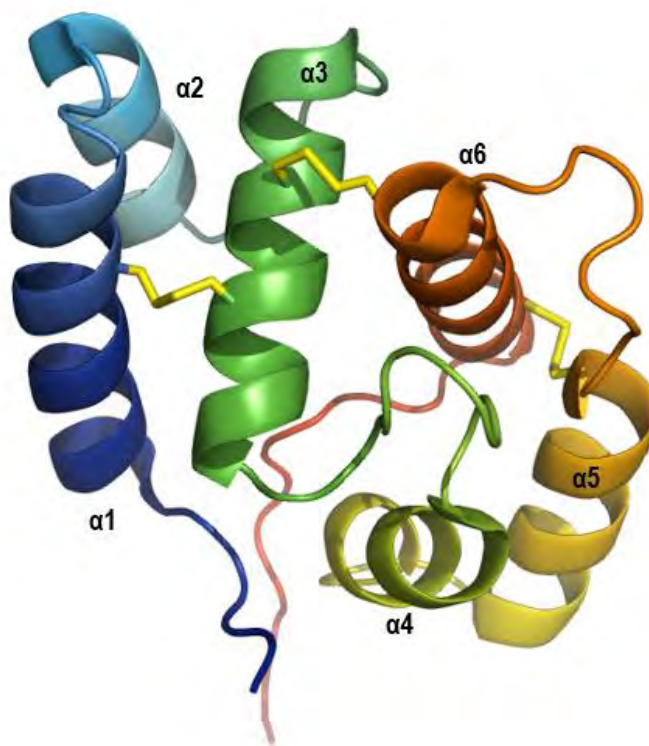
Εικόνα 89. Υπέρθεση του συμπλόκου AgamOBP5-καρβακρόλη με το σύμπλοκο AgamOBP4- ινδόλιο. Οι αλληλεπιδράσεις που σχηματίζει ο εκάστοτε προσδέτης αναπαριστούνται ως διακεκομμένες γραμμές. .

6.3 Προσδιορισμός της τριτοταγούς δομής της *AealOBP1*

Η κρυσταλλική τρισδιάστατη δομή της πρωτεΐνης *AealOBP1* προσδιορίστηκε σε ευκρίνεια 2.00Å. (Πίνακας 23). Πρόκειται για ένα μέλος της οικογένειας των κλασικών OBPs, που συγκροτείται από έξι α- έλικες (α1-α6), οι οποίες σταθεροποιούνται μεταξύ τους από τρεις δισουλφιδικούς δεσμούς. Οι δεσμοί αναπτύσσονται μεταξύ των κυστεϊνών που εντοπίζονται στις έλικες α1 και α3 (Cys17–Cys48), α3 και στην αρχή της έλικας α6 (Cys44–Cys97) και, στο τέλος της α6 και της α5 έλικας (Cys106–Cys87). Χαρακτηριστικό είναι το μακρύ καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης, το οποίο προσανατολίζεται προς το εξωτερικό του μορίου (Εικόνα 90).

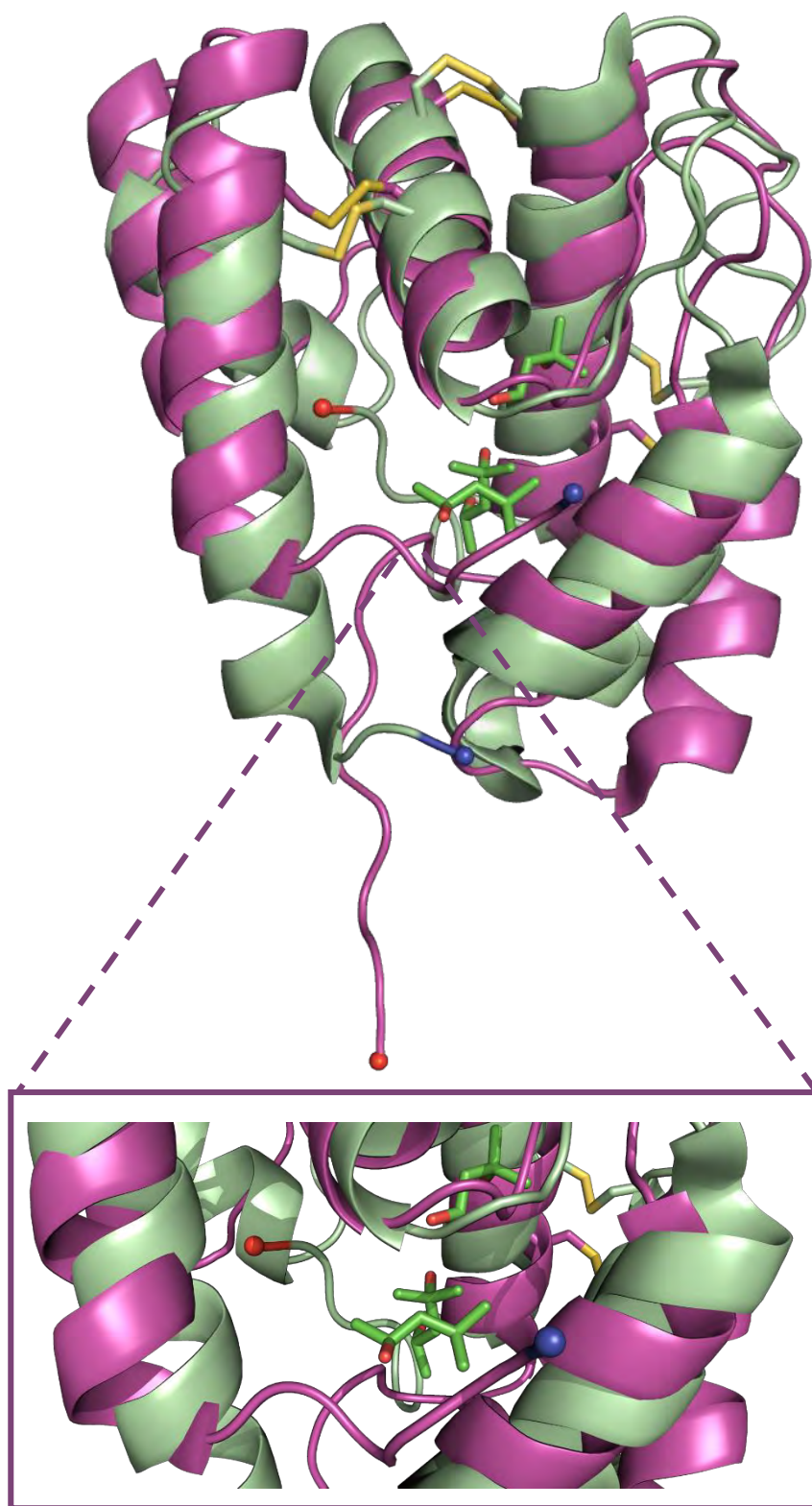
Πίνακας 23. Στατιστικά στοιχεία συλλογής, επεξεργασίας και βελτιστοποίησης της δομής *OBP1*

AealOBP1 Structure (PDB ID)	
Στατιστικά στοιχεία συλλογής δεδομένων	
MX Diamond Light Source	I04; λ=0.9762 Å
Ομάδες χώρου P2₁ , Διαστάσεις κυψελίδας, a,b,c (Å)	81.3367 81.3367
α, β, γ (°)	63.8438 90 90 120
Διακριτικότητα (Å)	47.3 - 2.0
Outermost shell (Å)	2.072 - 2.0
Αντανεκλάσεις που μετρήθηκαν	33668 (3327)
Μοναδικές αντανεκλάσεις	16836 (1662)
Πληρότητα %	99.96 (99.82)
Πολλαπλότητα	2.0 (2.0)
<I/σI>	15.60 (3.65)
Wilson Plot B-factor (Å ²)	32.66
Rsymm	0.01833 (0.143)
Rmeas	0.02592 (0.2022)
CC ^{1/2}	0.999 (0.94)
Στατιστικά βελτιστοποίησης	
Final R _{cryst} / R _{free} %	0.1736 (0.2132)
Αριθμός πρωτεϊνικών καταλοίπων	0.1989 (0.2412)
Αριθμός μορίων νερού	121
r.m. απόκλιση στα μήκη κύματος (Å)	0.018
r.m.s. απόκλιση στις γωνίες των δεσμών (°)	1.92
Μέσος όρος B factor (Å²)	
Άτομα πρωτεΐνης	37.84
Μόρια νερού	35.11
Ramachandran (u–w) plot.	
Κατάλοιπα σε ευνοϊκές περιοχές (%)	100.00
Κατάλοιπα σε επιτρεπόμενες περιοχές (%)	0.00



Εικόνα 90. Η τριτοταγής δομή της πρωτεΐνης *AealOBP1*, η οποία αποτελείται από έξι α έλικες, σταθεροποιημένες με τρεις δισουλφιδικούς δεσμούς.

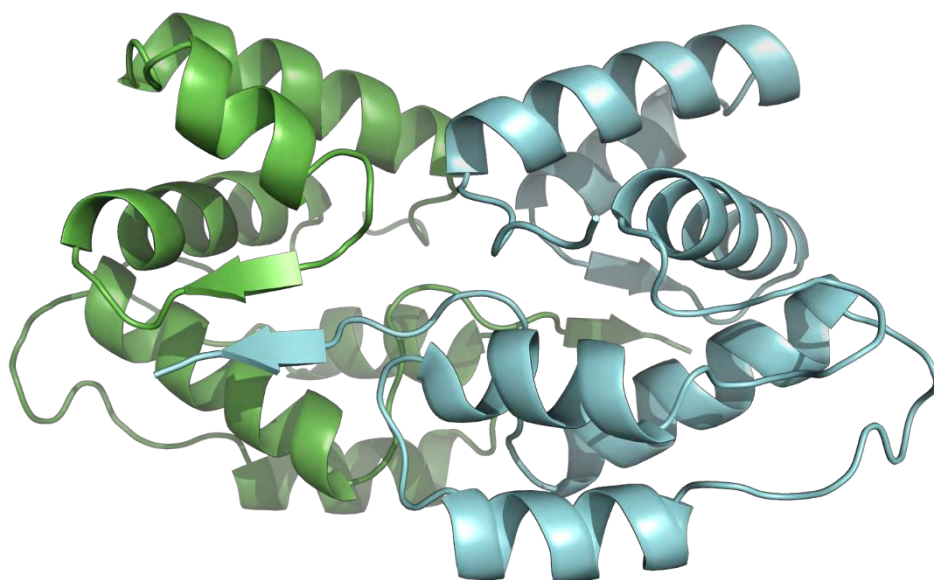
Η *AealOBP1* παρουσιάζει συνολικά δομική ομοιότητα με την *AgamOBP5* ως προς την αναδίπλωση της τριτοταγούς δομής (Εικόνα 91). Η σημαντικότερη διαφορά εντοπίζεται στο καρβοξυλικό άκρο το οποίο στην *AealOBP1* εκτείνεται προς τον διαλύτη σε αντίθεση με το αντίστοιχο της *AgamOBP5* το οποίο στρέφεται προς το εσωτερικό της πρωτεΐνης και αποτελεί μέρος του τοιχώματος της κοιλότητας δέσμευσης. Οι διαφορές αυτές έχουν ως αποτέλεσμα μια κοιλότητα σύνδεσης με διαφορετικό σχήμα και όγκο. Επιπλέον οι διαφορές στην αμινοξική αλληλουχία συμβάλουν σε ένα διαφορετικό περιβάλλον. Έτσι είναι αναμενόμενο οι δύο πρωτεΐνες να διαθέτουν διαφορετική εξειδίκευση στην αναγνώριση προσδετών. Πράγματι, στην παρούσα εργασία βρέθηκε ότι η *AgamOBP5* έχει εξειδίκευση για μονοτερπένια. Αντίθετα, μελέτες της ομόλογη της *AeagOBP22* του *Aedes aegypti* έδειξαν ότι είναι ικανή να δεσμεύσει λιπαρά οξέα, ήτοι μόρια γραμμικά και επιμήκη . (188)



Εικόνα 91 Υπέρθυση των πρωτεϊνών *AgamOBP5* (πράσινο) και *AealOBP1* (μωβ). Οι θέσεις των δισουλφιδικών δεσμών είναι τοπολογικά συντηρημένες. Το επιμήκες καρβοξυλικό άκρο της *AealOBP1* εκτίθεται στο διαλύτη. Αντίθετα, το αντίστοιχο της *AgamOBP5* συνεισφέρει στο σχηματισμό του κέντρου σύνδεσης (κάτω).

Ένα επιπλέον εύρημα είναι ο πιθανός διμερισμός της *AealOBP1* ο οποίος προτείνεται υπολογιστικά από την ανάλυση της κρυσταλλικής δομής με το πρόγραμμα PISA.

Συγκεκριμένα η ανάλυση PISA έδειξε ότι ο σχηματισμός διμερούς που προκύπτει από κρυσταλλογραφική συμμετρία είναι ενεργειακά ευνοϊκός (-99.2 kcal/mol) και ότι οδηγεί σε αποκλεισμό από τον διαλύτη επιφάνειας συνολικής έκτασης 7100.8 Å², κυρίως υδρόφοβου χαρακτήρα. Συγκεκριμένα στο προτεινόμενο μοντέλο του διμερούς, μια περιοχή β-κλώνου που εντοπίζεται στον βρόχο που συνδέει τις έλικες α2 και α3 της μιας υπομονάδας, σχηματίζει παράλληλη β-πτυχωτή επιφάνεια με την περιοχή β-κλώνου του καρβοξυτελικού άκρου της δεύτερης υπομονάδας (Εικόνα 92).

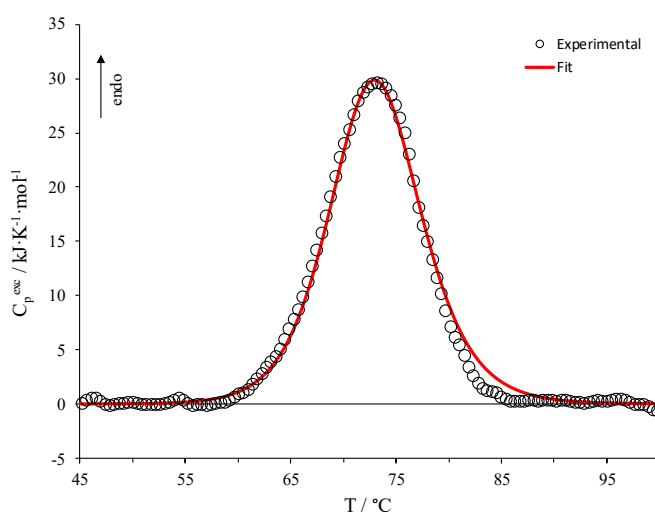


Εικόνα 92. Η δομή του διμερούς της AealOBP1. Φαίνονται οι δύο παράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες που ο καθένας σχηματίζονται από β-κλώνους των μονομερών υπομονάδων A (πράσινο) και B (κυανό).

Κεφάλαιο 7^ο: Θερμοδυναμικές μελέτες

Η διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης εφαρμόστηκε για την αξιολόγηση της θερμοδυναμικής σταθερότητας της AgamOBP5 στο διάλυμα, απουσία και παρουσία των προσδετών. Αρχικά, εξετάστηκε η επίδραση του διαλύτη των προσδετών σε περιεκτικότητα 2% v/v. Η προσθήκη μεθανόλης είχε ως αποτέλεσμα μια ελαφρά αποσταθεροποίηση της πρωτεΐνης όσον αφορά τόσο την ενθαλπία μετουσίωσης ($\Delta_d H^\circ$) και την θερμοκρασία μετουσίωσης (T_d), χωρίς όμως να επηρεάζει το μηχανισμό μετουσίωσης (Εικόνα 93 και Πίνακας 24). Το σύστημα AgamOBP5- μεθανόλη χρησιμοποιήθηκε ως σύστημα αναφοράς για τη σύγκριση της αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης με τους προσδέτες.-(144)

Στη συνέχεια, αξιολογήθηκε η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης με την καρβακρόλη και τη θυμόλη, σε μέγιστη αναλογία προσδέτη/ πρωτεΐνη ($[L]/[P]=7,5-15$), ώστε να επιτευχθεί κορεσμός. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η προσθήκη καρβακρόλης και θυμόλης στο πρωτεϊνικό διάλυμα σε αναλογία ($[L]/[P]=7,5$ προκάλεσε μια σημαντική πρωτεϊνική σταθεροποίηση, γεγονός που αποτελεί ισχυρή απόδειξη πρόσδεσης των ενώσεων στην πρωτεΐνη. Παράλληλα, δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές στο μηχανισμό αποδιάταξης της πρωτεΐνης, καθώς διατηρήθηκε το μοντέλο μετουσίωσης ενός σταδίου. Επομένως, ενώ η συνολική τριτοταγής δομή της πρωτεΐνης δεν επηρεάζεται από την πρόσδεση των ενώσεων, σε συμφωνία με τις κρυσταλλογραφικές μελέτες, οι ενώσεις έχουν σημαντική σταθεροποιητική επίδραση. (144)

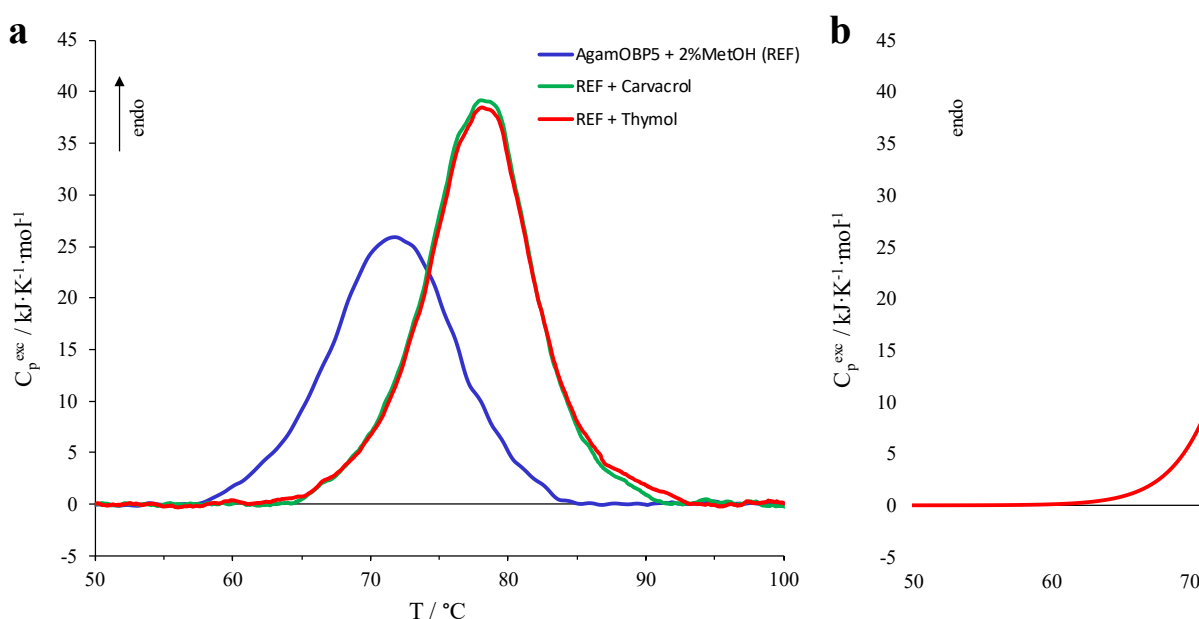


Εικόνα 93: Θερμογράφημα Nano-DSC για AgamOBP5 (μαύροι κύκλοι) και αντίστοιχη θεωρητική καμπύλη που υπολογίζεται σύμφωνα με ένα μοντέλο μετουσίωσης ενός σταδίου (κόκκινη καμπύλη).

Πίνακας 24: Ενthalπία μετουσίωσης, $\Delta_d H^\circ$ και θερμοκρασία, T_d , για δείγματα AgamOBP5 (χωρίς και με 2% μεθανόλη) και παρουσία καρβακρόλης και θυμόλης ως προσδέτες. Οι παράμετροι προσαρμογής υπολογίστηκαν σύμφωνα με ένα μοντέλο μετουσίωσης ενός σταδίου.

System	Experimental		One-step denaturation model	
	$\Delta_d H^\circ / \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	$T_d / ^\circ\text{C}$	Best-Fit parameters	
	$\Delta_d H^\circ / \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	$T_d / ^\circ\text{C}$	$\Delta_d H^\circ / \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	$T_d / ^\circ\text{C}$
AgamOBP5	330 ± 20	73.2 ± 0.5	345	73.0
AgamOBP5 + 2% MetOH (REF)	300 ± 20	71.8 ± 0.5	320	71.7
REF + Carvacrol (L/P = 7.5)	360 ± 20	75.9 ± 0.5	365	75.7
REF + Carvacrol (L/P = 15)	385 ± 20	78.1 ± 0.5	400	77.9
REF + Thymol (L/P = 15)	390 ± 20	78.1 ± 0.5	395	78.0

Παράλληλα, οι υψηλές τιμές του Kb_1 και για τις δύο ενώσεις υποδεικνύουν κορεσμό στην 1^η θέση πρόσδεσης σε αναλογία $[L]/[P] = 6$. Επίσης, καθώς η πρωτεΐνη διαθέτει δύο κέντρα πρόσδεσης, πραγματοποιήθηκαν περαιτέρω μελέτες για να διερευνηθεί το ενδεχόμενο να αυξάνεται η θερμική σταθερότητα λόγω της δέσμευσης στο 2^ο κέντρο (Εικόνα 94). Οι δοκιμές πραγματοποιήθηκαν σε αναλογία $[L]/[P] = 15$. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η πρόσδεση του μορίου στο 2^ο κέντρο προκαλεί περαιτέρω σταθεροποίηση της πρωτεΐνης. (144)

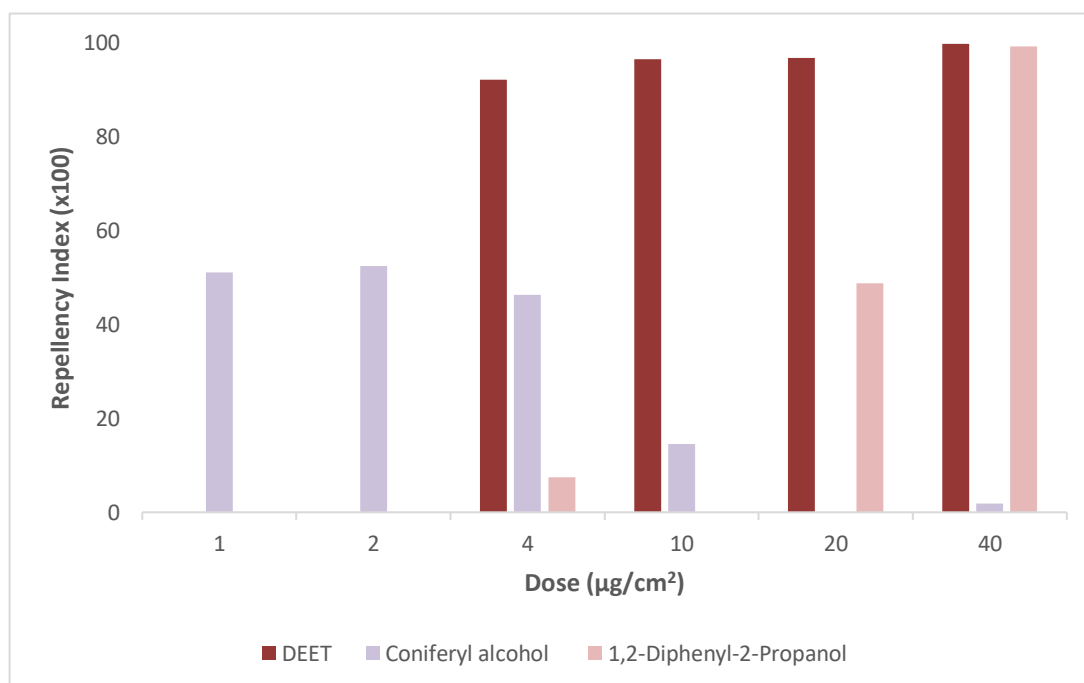


Εικόνα 94: Προφίλ μετουσίωσης που ελήφθησαν για το διάλυμα AgamOBP5 (2% v/v μεθανόλη) (μπλε ίχνος) και για την πρωτεΐνη παρουσία καρβακρόλης (πράσινο ίχνος) και θυμόλης (κόκκινο ίχνος) στην ίδια αναλογία προσδέτη προς πρωτεΐνη ($[L]/[P] = 15$).

Κεφάλαιο 8^ο: *in vivo* μελέτες συμπεριφοράς

8.1 Αξιολόγηση απωθητικής δράσης των νέων προσδετών της AgamOBP1

Οι ενώσεις που αναδείχθηκαν ως νέοι προσδέτες της AgamOBP1 μελετήθηκαν ως προς τη συγγένεια που παρουσιάζουν με την πρωτεΐνη μέσω φθορισμομετρικών μελετών, αλλά παράλληλα αξιολογήθηκε η απωθητική ικανότητά τους με *in vivo* μελέτες συμπεριφοράς. Συγκεκριμένα, οι ενώσεις Coniferyl alcohol και 1,2-Diphenyl-2-Propanol που προέκυψαν από την διαλογή βάσει φαρμακοφόρου (βλέπε Ενότητα 5.3.2) ελέγχθηκαν σε δόσεις 1, 2,4, 10, 20 και 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Εικόνα 95, Πίνακας 25). (162). Αντίστοιχα, οι ενώσεις Lig-13, Lig-16, Lig-86, Lig-103, Lig-111, Lig-118 και Lig-119 που προέκυψαν από την διαλογή βάση χημικής ομοιότητας και μοριακού ελλιμενισμού (βλέπε Ενότητα 5.3.3) δοκιμάστηκαν σε δόσεις 1, 2,4, 10, 20 και 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Εικόνα 96, Πίνακας 26). Οι ενώσεις Lig-86 και Lig-111 δεν ήταν εφικτό να δοκιμαστούν καθώς ήταν διαλυτές μόνο σε DMSO, το οποίο παρουσιάζει έντονη απωθητική ικανότητα και ως εκ τούτου δεν είναι κατάλληλος διαλύτης για την διεξαγωγή πειραμάτων εντομοαπώθησης. (187)



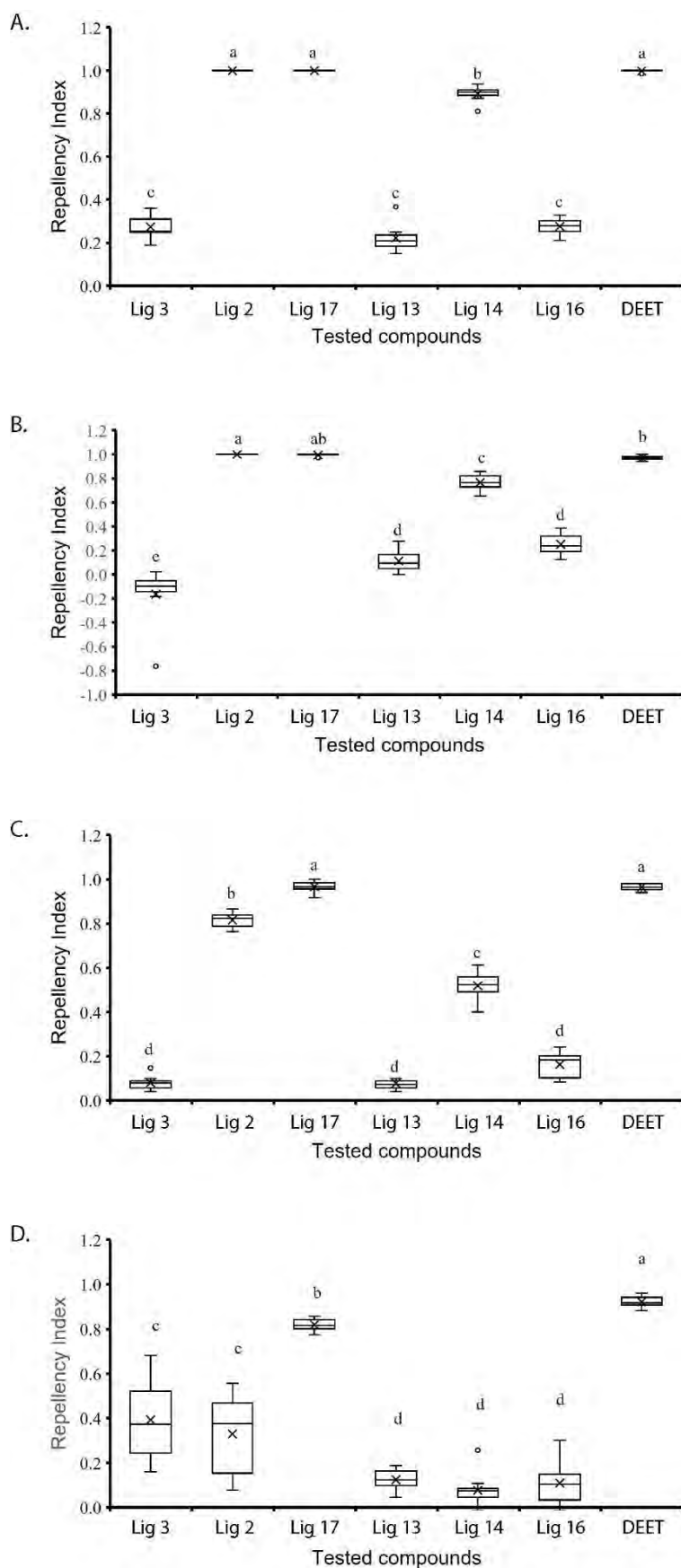
Εικόνα 95: Δείκτης απωθητικότητας των ενώσεων σε διάφορες συγκεντρώσεις, έναντι θηλυκών *Ae. albopictus*. Η ένωση DEET χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα ελέγχου (162)

Πίνακας 25: Δείκτες Αποθητικότητας (RI) των εξεταζόμενων ενώσεων (162)

Compound	Dose $\mu\text{g}/\text{cm}^2$					
	1	2	4	10	20	40
	Repellency Index (x100)					
DEET	-	-	92.2	96.5	96.8	99.8
Coniferyl alcohol	51.1	52.5	46.25	14.5	0	1.89
1,2-Diphenyl-2-Propanol	-	-	7.4	-	48.8	99.2

Πίνακας 26: Δείκτες Αποθητικότητας (RI) των εξεταζόμενων ενώσεων (187)

<i>Ligand</i>	<i>Repellency Index (x100)</i>			
	4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$
DEET	92.2	96.5	96.8	99.8
<i>Lig-16</i>	39.3	8.1	0.2	11.0
<i>Lig-13</i>	33.0	81.5	100	100
<i>Lig-119</i>	81.8	96.6	99.3	100
<i>Lig-103</i>	12.4	8.0	11.4	22.2
<i>Lig-111</i>	8.3	51.8	76.8	89.1
<i>Lig-118</i>	11.1	16.1	25.2	27.6

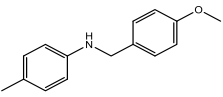
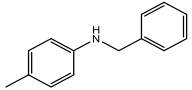
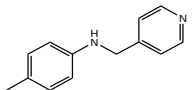
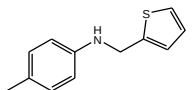


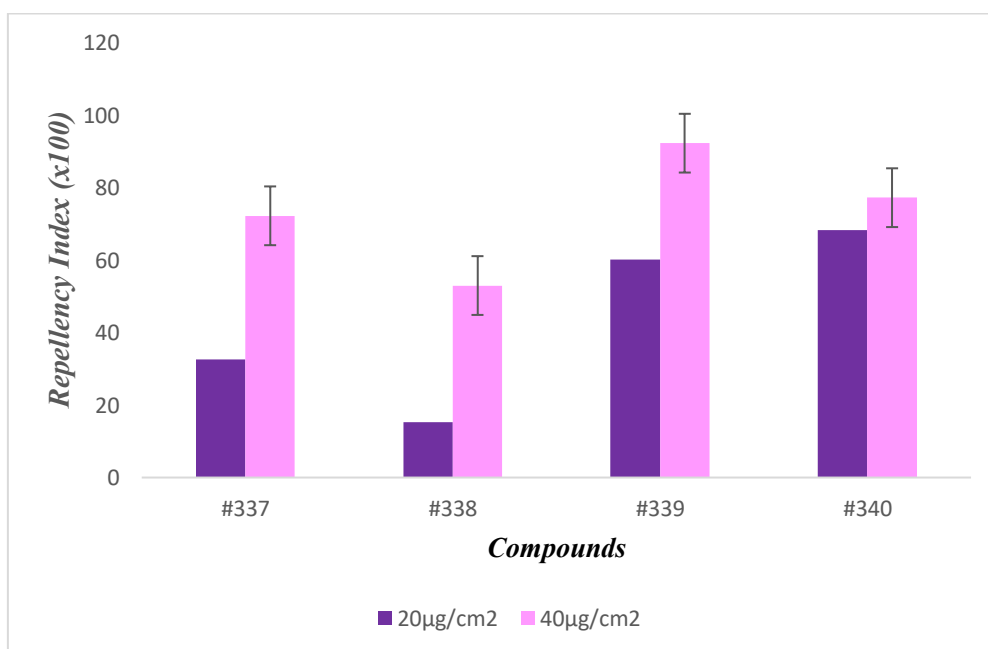
Εικόνα 96: Δείκτης απωθητικότητας των ενώσεων σε θηλυκά *Ae. albopictus* ύστερα από έκθεση σε Α) 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, Β) 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, Γ) 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ και Δ) 4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ της κάθε ένωσης. (187)

8.1.1. Προσδιορισμός νέων πιθανών προσδετών της *AgamOBP1*, με βάση τη δομή του συμπλόκου *AgamOBP1-DEET* εφαρμόζοντας τη δυναμική συνδυαστική χημεία

Αξιοποιώντας τις πληροφορίες που αντλούνται από τον προσδιορισμό της κρυσταλλικής δομής της *AgamOBP1* σε σύμπλοκο με το DEET και την ικαριδίνη αντίστοιχα, πραγματοποιήθηκε ο σχεδιασμός μιας εστιασμένης βιβλιοθήκης τα συστατικά της οποίας μπορούν να συνδεθούν με την πρωτεΐνη- στόχο και ενδεχομένως να επηρεάσουν τη δράση του. Στο πλαίσιο της συνεργασίας με τις ερευνητικές ομάδες των Δρ. Καλογεροπούλου και Δρ. Ζερβού, Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, σχεδιάστηκε και μελετήθηκε *in silico* μια βιβλιοθήκη που περιέχει αμίνες για δέσμευση έναντι της *AgamOBP1*. Τα αποτελέσματα διερευνήθηκαν για δύο διαφορετικά ικρίωματα αμίνης που διαθέτουν δακτύλιο π-τολουιδίνης (1A-7A) ή τμήμα 4- (2-αμινοαιθυλ) βενζολοσουλφοναμιδίου (1B-7B) σε συνδυασμό με ένα σύνολο αρωματικών υποκαταστάσεων. Η σύνθεσή τους βασίστηκε σε σχηματισμό βάσης Schiff από αμίνες και αρωματικές αλδεΐδες χρησιμοποιώντας μια προσέγγιση δυναμικής συνδυαστικής βιβλιοθήκης (DCL). Παράλληλα, οι τελικές αμίνες διερευνήθηκαν απευθείας για την αλληλεπίδρασή τους με το *AgamOBP1* με τη χρήση ^1H STD NMR. Οι τελικές ενώσεις αξιολογήθηκαν με *in vivo* δοκιμές συμπεριφοράς έναντι του κουνουπιού *Aedes albopictus* (Εικόνα 97, Πίνακας 27).

Πίνακας 27: Ο δείκτης απωθητικότητας των 4 ενώσεων που μελετήθηκαν

Compounds number	Molecular Formula	STRUCTURE	Repellency Index (x100)	
			20 µg/cm ²	40 µg/cm ²
TC_337 (1)	C ₁₅ H ₁₇ NO		32.6	72.25
TC_338 (2)	C ₁₄ H ₁₅ N		15.25	53
TC_339 (3)	C ₁₂ H ₁₃ NS		60.1	92.3
TC_340 (4)	C ₁₂ H ₁₃ NS		68.3	77.25



Εικόνα 97: Δείκτης απωθητικότητας των ενώσεων σε διάφορες συγκεντρώσεις έναντι θηλυκών *Ae. albopictus*

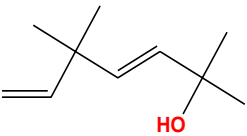
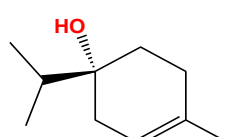
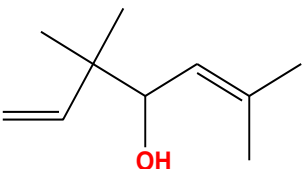
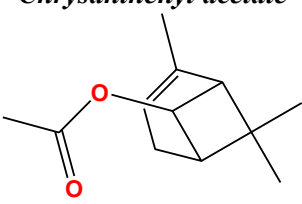
8.2 Αξιολόγηση αποθητικής δράσης μεταβολιτών απομονωμένων από αλόφυτα

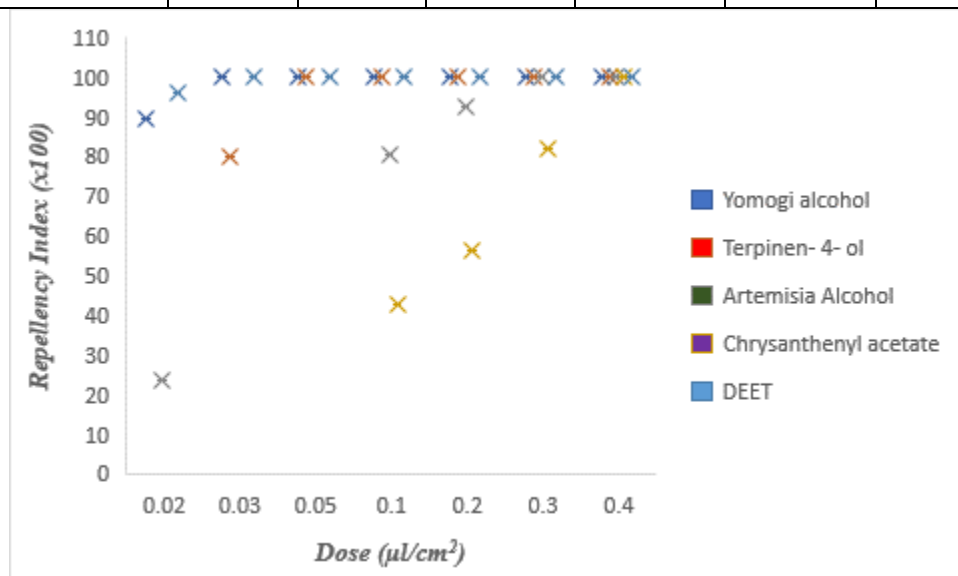
Στο πλαίσιο της συνεργασίας με τον Καθ. Β. Ρούσση, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών και την Δρ. Μ. Ζερβού, πραγματοποιήθηκε μελέτη για την ανακάλυψη φυσικών προϊόντων με εντομοαπωθητική ή εντομοκτόνο δράση. Η έρευνα επικεντρώθηκε, βάσει προηγούμενων μελετών, στα μεσογειακά αλόφυτα *Crithmum maritimum* και *Otanthus maritimus*, καθώς και το ενδημικό στην Ελλάδα και τη Νότια Αλβανία φυτό *Nepeta parnassica*, από τα οποία απομονώθηκαν και αξιολογήθηκαν 14 μεταβολίτες (Εικόνα 98). Οι ενώσεις που αναδείχθηκαν από φθορισμομετρικές μελέτες και ^1H STD NMR πειράματα ως προσδέτες της AgamOBP1, μελετήθηκαν περαιτέρω δομικά με πειράματα HSQC-NMR ως προς την εντομοαπωθητική τους δράση μέσω βιοδοκιμών συμπεριφοράς στα κουνούπια *Ae. Albopictus*. (Εικόνα 99, Πίνακας 28).



Εικόνα 98: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας που πραγματοποιήθηκε για την επιλογή και την αξιολόγηση της δράσης των ενώσεων

Πίνακας 28: Δείκτης απωθητικότητας και αριθμός προσγειώσεων των 4 μεταβολιτών που μελετήθηκαν

Compounds	% Repellency Index $\pm$ SE / Mean Number of Landing $\pm$ SE						
	0.02 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$	0.03 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$	0.05 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$	0.1 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$	0.2 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$	0.3 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$	0.4 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$
Yomogi alcohol 	89.25 $\pm$ 0.7/ 5.75 $\pm$ 0.48	100 $\pm$ 0.0/ 0	100 $\pm$ 0.0/ 0	100 $\pm$ 0.0/ 0	100 $\pm$ 0.0/ 0	100 $\pm$ 0.0/ 0	100 $\pm$ 0.0/ 0
Terpinen- 4- ol 	-	79.75 $\pm$ 2.14/ 10 $\pm$ 0.91	100 $\pm$ 0.0/ 0	100 $\pm$ 0.0/ 0	100 $\pm$ 0.0/ 0	100 $\pm$ 0.0/ 0	100 $\pm$ 0.0/ 0
Artemisia Alcohol 	23.5 $\pm$ 3.59/ 48.5 $\pm$ 1.32	-	-	80.5 $\pm$ 0.8/ 12.25 $\pm$ 1.03	92.5 $\pm$ 1.76/ 5.25 $\pm$ 1.11	100 $\pm$ 0.0/ 0	100 $\pm$ 0.0/ 0
Chrysanthenyl acetate 	-	-	-	42.5 $\pm$ 1.32/ 38.5 $\pm$ 1.5	56.0 $\pm$ 1.0/ 26.75 $\pm$ 0.95	81.75 $\pm$ 2.1/ 10.75 $\pm$ 0.95	100 $\pm$ 0.0/ 0



Εικόνα 99: Δείκτης απωθητικότητας των ενώσεων σε διάφορες συγκεντρώσεις έναντι θηλυκών *Ae. albopictus*

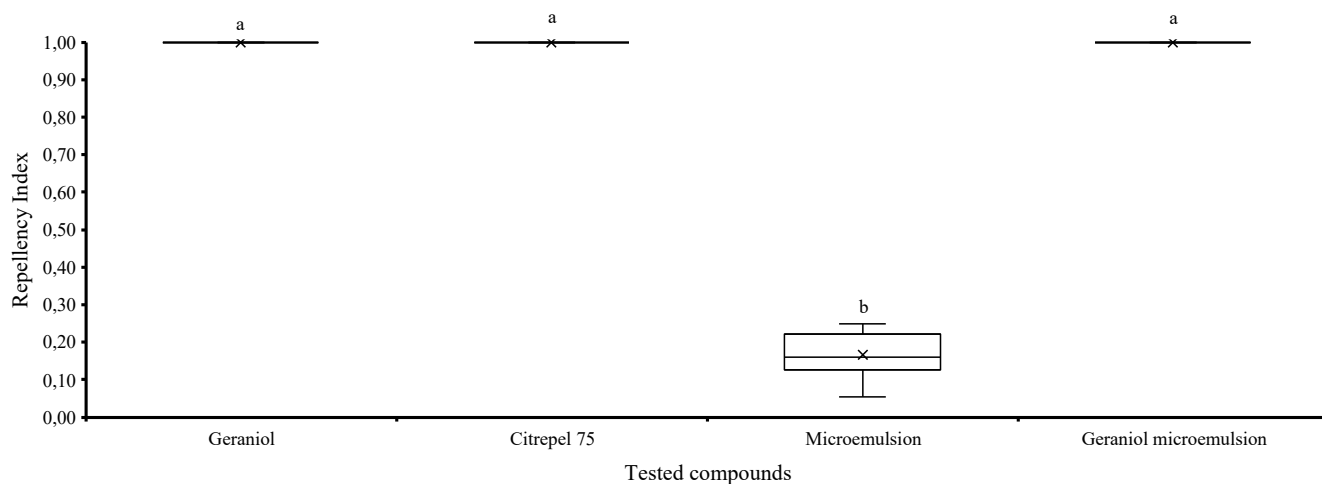
8.3 Αξιολόγηση αποθητικής δράσης ελεύθερων και ενθυλακωμένων αιθέριων ελαίων

Στο πλαίσιο της διατριβής μελετήθηκε η εντομοαποθητική δράση αιθέριων ελαίων τα οποία περιείχαν σε ικανοποιητική περιεκτικότητα ενώσεις που παρουσιάζουν συγγένεια με OBPs κουνουπιών. Αυτά τα αιθέρια έλαια μελετήθηκαν τόσο σε ελεύθερη μορφή όσο ενθυλακωμένα ως εν δυνάμει τελικά εντομοαποθητικά προϊόντα. Η ενθυλάκωση είχε ως σκοπό την βελτιστοποίηση των καλλυντικών ιδιοτήτων των νέων προϊόντων αλλά και για ενίσχυση της χρονικής διάρκειάς προστασίας. Η ενθυλάκωση των ελαίων σε συστήματα εγκλεισμού, πραγματοποιήθηκε από την ερευνητική ομάδα της Δρ. Παπαδημητρίου, Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών.

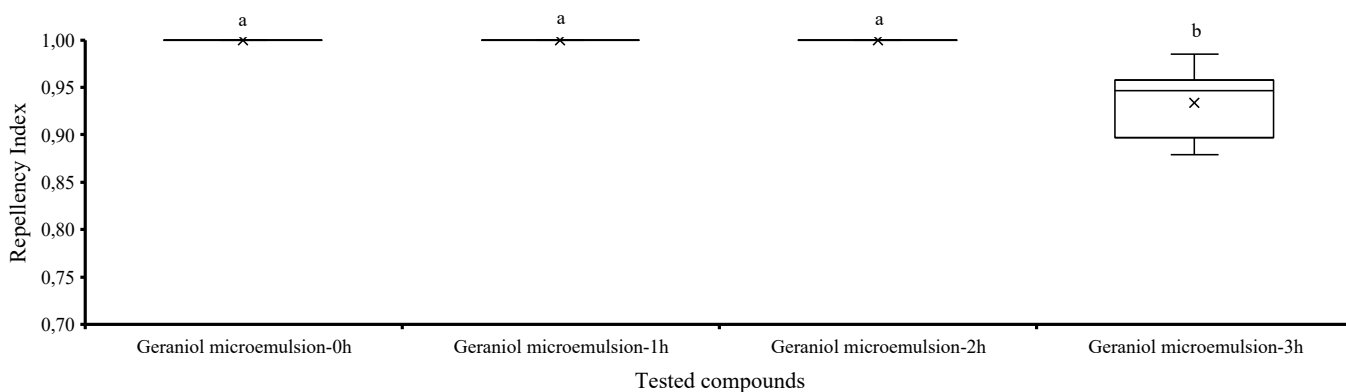
Για την αξιολόγηση των αιθέριων ελαίων, μειγμάτων τους αλλά και ενθυλακωμάτων τους, πραγματοποιήθηκαν *in vivo* μελέτες συμπεριφοράς σε κουνούπια *Ae. Albopictus*. Ως ενώσεις αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν δύο γνωστά εντομοαποθητικά φυτικής προέλευσης το CitrepeI (εγκεκριμένη εντομοαποθητική δραστική για δερματική χρήση) και η Geraniol (βιοκτόνο μη εγκεκριμένο για δερματική χρήση). Όλα τα υπό εξέταση αιθέρια έλαια και δραστικές αξιολογήθηκαν σε διάφορες δόσεις από 0.02 έως και 0.4 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$. Παράλληλα, ελέγχθηκαν και τα επιμέρους συστατικά των συστημάτων εγκλωβισμού για πιθανή εντομοαποθητική δράση.

Καθώς πρόκειται για έλαια με γνωστή εντομοαποθητική δράση, πραγματοποιήθηκαν βιοδοκιμές χρονικής διάρκειας. Συγκεκριμένα, αξιολογήθηκε η δράση των ελεύθερων αλλά και των εγκλωβισμένων ελαίων σε διάστημα 1, 3 και 7 ωρών, εφαρμόζοντας την ίδια διαδικασία (βλέπε Ενότητα 9.2). Τέλος, τα δείγματα με τα βέλτιστα χαρακτηριστικά αξιολογήθηκαν και ως προς την ικανότητα απόθησης κουνουπιών *Culex pipiens*.

Αρχικά, η γερανιόλη και το μικρογαλάκτωμα της αξιολογήθηκαν με *in vivo* δοκιμές απόθησης. Το μικρογαλάκτωμα αποτελείται από 93% H₂O, 2% T80, 1% Labrasol, 1% S85, 1% Transcutol® (DEGEE). Αρχικά, το κενό μικρογαλάκτωμα εξετάστηκε για να επαληθευτεί η απουσία αποθητικής δράσης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η ενθυλακωμένη γερανιόλη παρουσιάζει συγκρίσιμη αποθητική δράση με την ελεύθερη γερανιόλη και το CitrepeI (Εικόνα 100) και η δράση της διαρκεί έως και 3 ώρες σε δόση 0,2 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ (Εικόνα 101). (189)



Εικόνα 100. Μελέτες συμπεριφοράς για τη γερανιόλη, το Citrepiel καθώς και την ενθυλακωμένη γερανιόλη σε δόση 0,2 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$

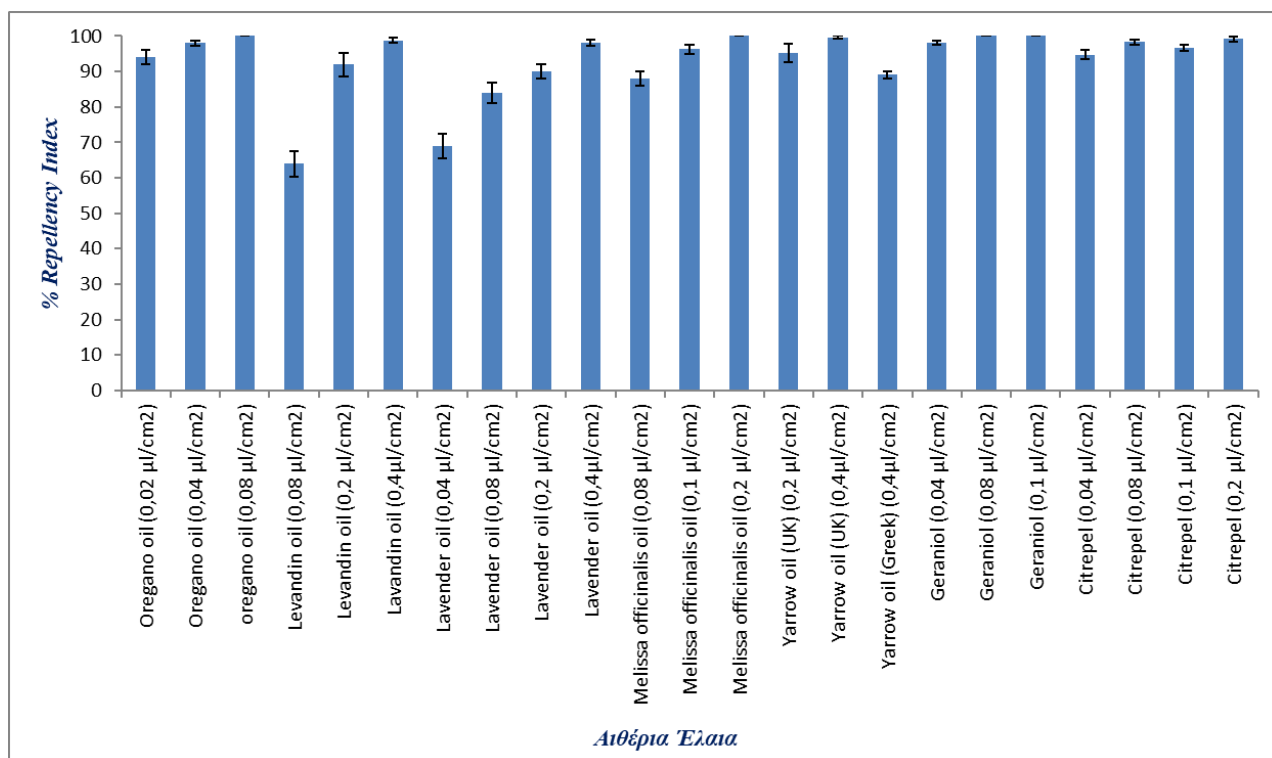


Εικόνα 101. Μελέτες συμπεριφοράς για τον προσδιορισμό της χρονικής διάρκειας της δράσης του μικρογαλακτώματος γερανιόλης.

Στη συνέχεια, εξετάστηκαν τα αιθέρια έλαια τα οποία επιλέχθηκαν ύστερα από βιβλιογραφική μελέτη. Πιο συγκεκριμένα, τα έλαια αξιολογήθηκαν ως προς την εντομοαπωθητική τους δράση σε διαφορετικές δόσεις (0,02 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ - 0,4 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$) (Πίνακας 29, Εικόνα 102). Τα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν με βάση τη δράση δύο γνωστών εντομοαπωθητικών φυτικής προέλευσης, Citrepiel και Geraniol.

Πίνακας 29: Δείκτης αποθηκικότητας των αιθέριων ελαίων που μελετήθηκαν

<i>samples</i>	<i>RI(%)</i>	<i>SE</i>
<i>oregano oil 0,02 μl/cm²</i>	94	2
<i>oregano oil 0,04 μl/cm²</i>	98	0,78
<i>oregano oil 0,08 μl/cm²</i>	100	0
<i>levandin oil 0,08 μl/cm²</i>	64	3,58
<i>levandin oil 0,2 μl/cm²</i>	92	3,3
<i>levandin oil 0,4 μl/cm²</i>	98,8	0,6
<i>lavender oil 0,04 μl/cm²</i>	69	3,43
<i>lavender oil 0,08 μl/cm²</i>	84	2,8
<i>lavender oil 0,2 μl/cm²</i>	90	1,96
<i>lavender oil 0,4 μl/cm²</i>	98	0,88
<i>Melissa officinalis oil 0,08 μl/cm²</i>	88	1,93
<i>Melissa officinalis oil 0,1 μl/cm²</i>	96,25	1,37
<i>Melissa officinalis oil 0,2 μl/cm²</i>	100	0
<i>Yarrow oil 0,2μl/cm²</i>	95,2	2,61
<i>Yarrow oil 0,4μl/cm²</i>	99,6	0,4
<i>Yarrow oil (Greek) 0,4 μl/cm²</i>	89	0,88
<i>Geraniol 0,04 μl/cm²</i>	98	0,56
<i>Geraniol 0,08 μl/cm²</i>	100	0
<i>Geraniol 0,1 μl/cm²</i>	100	0
<i>Citrepel 0,04 μl/cm²</i>	94,75	1,29
<i>Citrepel 0,08 μl/cm²</i>	98,25	0,7
<i>Citrepel 0,1 μl/cm²</i>	96,63	0,89
<i>Citrepel 0,2 μl/cm²</i>	99,13	0,64



Εικόνα 102. Αξιολόγηση της απωθητικής δράσης των αιθέριων ελαίων σε διαφορετικές δόσεις (0,02 μl/cm² - 0,4 μl/cm²)

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν πειράματα για το σύστημα εγκλωβισμού Νο 1, το οποίο περιείχε 40% LABRASOL/ 30% DEMGEE. Αρχικά, εξετάστηκαν τα συστατικά του συστήματος ώστε να επαληθευτεί η απουσία απωθητικής δράσης, ενώ ακολούθησε αξιολόγηση των ενθυλακωμένων ελαίων στο συγκεκριμένο σύστημα σε διαφορετικές αναλογίες. Το κάθε σύστημα δοκιμάστηκε σε ποικίλες δόσεις, αλλά και ως προς τη χρονική διάρκεια της δράσης του. Τα αποτελέσματα ήταν εντυπωσιακά καθώς τα ενθυλακωμένα αιθέρια έλαια παρουσίασαν 100% απωθητική δράση σε ιδιαίτερα χαμηλές δόσεις (0,02-0,08 μl/cm²) για διάστημα περίπου 3 ωρών. Αύξηση της δόσης στα 0,2 μl/cm² οδήγησε σε αυξημένη χρονική διάρκεια της απωθητικής δράσης στις 7 ώρες. Ιδιαίτερη περίπτωση αποτελεί το έλαιο *Melissa officinalis oil*, καθώς τα επιτρεπόμενα όρια ασφαλούς δερματικής χρήσης, και ως εκ τούτου οι συγκεντρώσεις που εγκλωβίστηκαν ήταν πολύ χαμηλές (0,46% και 0,67%). Έτσι παρά το γεγονός ότι η απωθητική δράση του παρουσιάζεται σε ιδιαίτερα χαμηλή δόση (0,001 μl/cm²), η διάρκεια του σε αυτή την δόση περιορίζεται στις 3 ώρες.

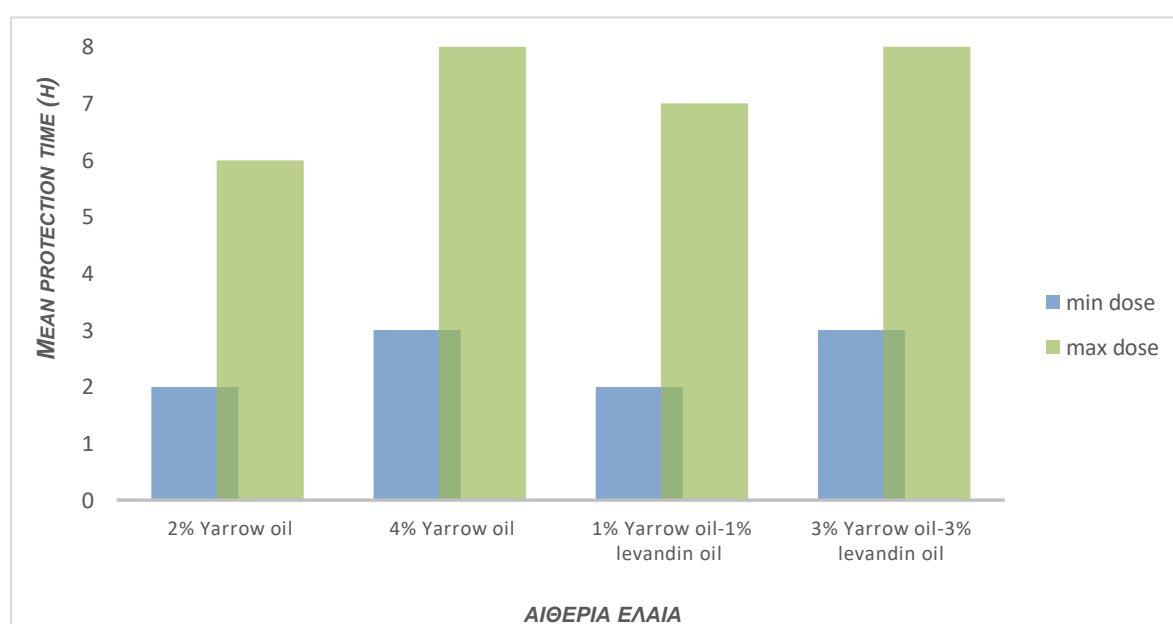
Παρόλο που το σύστημα Νο 1 παρουσιάζει εντυπωσιακά αποτελέσματα, η περιεκτικότητα του συστήματος σε δυο βασικά συστατικά ξεπερνά κατά πολύ τα επιτρεπόμενα όρια ασφαλούς δερματικής χρήσης, καθιστώντας τις συγκεντρώσεις των

συστατικών απαγορευτικές. Επομένως, δημιουργήθηκε η ανάγκη για ένα νέο σύστημα, το οποίο θα βρίσκεται εντός επιτρεπόμενων ορίων.

Οι μελέτες για το σύστημα Νο 2 επικεντρώθηκαν κυρίως στην ενθυλάκωση των δειγμάτων *levandin oil* και *Yarrow oil* (ελληνικής προέλευσης), καθώς και σε μείγμα των δυο ελαίων με διαφορετικές αναλογίες (Πίνακας 30). Η επιλογή των ελαίων στηρίχθηκε στην υψηλή περιεκτικότητά τους σε ενώσεις με εντομαπωθητική δράση και στη ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες AgamOBP1 και AgamOBP5 (Evgenia CV Stamati, MSc Thesis, 2020) (190)

Περαιτέρω τα έλαια αυτά διαθέτουν καλλυντικές ιδιότητες ενώ το *Yarrow oil* (*Achillea Millefolium*) κοινώς αγραψιθιά είναι χρησιμοποιείται παραδοσιακά για την επούλωση πληγών και για την αντιφλεγμονώδη δράση της. Σημαντικότερα τα δύο επιλεγμένα έλαια και τα μίγματα τους μπορούν να ενθυλακωθούν σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις. Τα αποτελέσματα ήταν επίσης ενθαρρυντικά, καθώς σε μικρές δόσεις παρατηρήθηκε διάρκεια δράσης έως 7-8 ώρες περίπου.

Τέλος, τα τελικά προϊόντα (δείγματα 97 και 98) αξιολογήθηκαν και ως προς την απωθητική τους ικανότητα έναντι θηλυκών κουνουπιών *Culex pipiens*, το κοινό αστικό είδος κουνουπιού το οποίο εντοπίζεται στην περιοχή της Μεσογείου. Τα αποτελέσματα ήταν τα αντίστοιχα, με το είδους *Ae. albopictus* με την διάρκεια δράσης τους να αυξάνεται περίπου κατά μια ώρα (Εικόνα 103).



Εικόνα 103: Διάγραμμα διάρκειας της απωθητικής δράσης των ενθυλακωμένων αιθέριων ελαίων

Πίνακας 30. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα των ενθυλακωμένων αιθέριων ελαίων

Sample No.	% EXCIPIENTS	% OIL (GR)	Minimum Effective Dose – Duration	Standard Usage Dose – Duration
NANOΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΑ				
97	93% H ₂ O, 2% T80, 1% Labrasol, 1% S85, 1% Transcutol® ^b	2% YARROW	60 µg/cm ² - 2h	200 µg/cm ² - 6h
98	93% H ₂ O, 2% T80, 1% Labrasol, 1% S85, 1% Transcutol®	1% YARROW 1% LAVANDIN	50 µg/cm ² – 2h	200 µg/cm ² - 7h
99	89% H ₂ O, 2% T80, 1% Labrasol, 1% S85, 1% Transcutol®	3% YARROW 3% LAVANDIN	50 µg/cm ² – 3h	200 µg/cm ² - 8h
100	91% H ₂ O, 2% Tween 80, 1% Span 85, 2% Labrasol, 2% Transcutol®	2% YARROW	60 µg/cm ² - 2h	200 µg/cm ² - 6h
101	91% H ₂ O, 2% Tween 80, 1% Span 85, 1% Labrasol, 1% Transcutol®	4% YARROW	50 µg/cm ² – 3h	200 µg/cm ² - 8h
102	92% H ₂ O, 2% Tween 80, 1% Span 85, 1% Labrasol, 2% Transcutol®	2% YARROW	60 µg/cm ² - 2h	200 µg/cm ² - 6h

Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζονται σε δύο διπλώματα ευρεσιτεχνίας:

- Mosquito repellent composition comprising yarrow essential Oil. (2022) European Patent Office (EPO), Application Number EP22193561.2/01.09.2022
- Σύνθεση απωθητικού κουνουπιών που περιλαμβάνει αιθέριο έλαιο Αχιλλέας (Yarrow). (2022). Οργανισμός Βιομηχανικής Ιδιοκτησίας (OBI), Αρ. αίτησης: 20220100673/10.08.2022

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα κουνούπια, οι κύριοι φορείς πολλαπλών παρασίτων και ιών, αποτελούν ένα από τα πιο επικίνδυνα ζώα στον πλανήτη καθώς προκαλούν πάνω από ένα εκατομμύριο θανάτους ετησίως, μέσω της μετάδοσης σοβαρών ασθενειών όπως η ελονοσία, ο δάγκειος πυρετός, και ο πυρετός του Δυτικού Νείλου. Ο μεγάλος αριθμός θανάτων από τις συγκεκριμένες ασθένειες και η (επαν)εμφάνιση τους σε νέες περιοχές, καθιστά επιτακτική την ανάγκη ελέγχου των εντόμων διαβιβαστών. Η αδήριτη αυτή ανάγκη αναγνωρίζεται τόσο από τον Π.Ο.Υ., όσο και από τα επιμέρους εθνικά κέντρα ελέγχου ασθενειών.

Η χρήση των εντομοαπωθητικών αποτελεί έναν από τους πιο αποτελεσματικούς τρόπους περιορισμού της μετάδοσης των ασθενειών. Ως εκ τούτου, υπάρχει αυξημένο ενδιαφέρον για την ανακάλυψη νέων εντομοαπωθητικών μέσων με προηγμένα χαρακτηριστικά αποτελεσματικότητας, ασφάλειας, κόστους και περιβαλλοντικής βιωσιμότητας.

Οι οσφρητικές πρωτεΐνες δέσμευσης οσμογόνων μορίων (OBPs) συμμετέχουν στο εναρκτήριο στάδιο του οσφρητικού μεταγωγικού μονοπατιού. Πρόκειται για πρωτεΐνες μεταφορείς σημειοχημικών, περιλαμβανομένων φυτικών και ζωικών οσμογόνων μορίων και φερομονών. Οι OBPs αποτελούν ο πρώτο μοριακό φίλτρο διαλογής των μορίων, γεγονός που τις καθιστά ιδανικούς μοριακούς στόχους για την ανακάλυψη και το σχεδιασμό νέων εντομοαπωθητικών χημικών ενώσεων και μιγμάτων τους.

Ο προσδιορισμός της τριτοταγούς δομής των OBPs αλλά και των συμπλόκων τους με προσδέτες, παρέχει λεπτομερείς πληροφορίες τόσο για τη συνολική δομή όσο και για τις επιμέρους αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης - πρωτεΐνης και πρωτεΐνης – προσδετών, στοιχεία που αποτελούν τα γενεσιουργά αίτια της ικανότητας εξειδικευμένης αναγνώρισης ποικιλίας χημικών σημάτων (σημειοχημικά).

Περαιτέρω ο προσδιορισμός της συγγένειας και η αξιολόγηση της βιολογικής δράσης γνωστών και νεοανακαλυφθέντων μορίων παρέχει πολύτιμες πληροφορίες για την σχέση δομής – λειτουργίας.

Η αξιοποίηση αυτών των πληροφοριών, διευκολύνει την κατανόηση των βιολογικών μονοπατιών όσφρησης των κουνουπιών, καθοδηγώντας την ανακάλυψη και τον σχεδιασμό με βάση την πρωτεϊνική δομή νέων, πιο αποτελεσματικών, ασφαλέστερων και φιλικών προς το περιβάλλον χημικών μέσων ελέγχου των

κουνουπιών. (191) . Η προσέγγιση αυτή -η οποία για τους φαρμακευτικούς στόχους είναι ευρέως γνωστή ως ανακάλυψη ή σχεδιασμός βάσει δομής (structure-based) - αναφέρεται ως Αντίστροφη Χημική Οικολογία (AXO). Προς αυτή την κατεύθυνση, η παρούσα εργασία επικεντρώνεται στην δομική και βιοχημική μελέτη OBP-στόχων με σκοπό την ανακάλυψη νέων εν δυνάμει εντομοαπωθητικών ή ελκυστικών ενώσεων με σκοπό την χημική παρέμβαση στην ικανότητα του κουνουπιού για επαφή με τον ανθρώπινο ξενιστή (host-seeking disruption).

Στο πλαίσιο της διατριβής μελετήθηκαν οι πρωτεΐνες του ανωφελή κώνωπα AgamOBP1, AgamOBP4 και AgamOBP5, καθώς και η πρωτεΐνη AealOBP1 του κουνουπιού *Aedes albopictus*. Οι πρωτεΐνες AgamOBP1 και AgamOBP4 ήταν στόχοι γνωστής δομής από προηγούμενες μελέτες και στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή οι μελέτες τους επικεντρώθηκαν στην ανακάλυψη νέων προσδετών με την μέθοδο AXO. Όσον αφορά τις AgamOBP5 και AealOBP1 η μελέτη καταρχήν επικεντρώθηκε στον προσδιορισμό των αγνώστων δομών τους με σκοπό την περαιτέρω διευκρίνιση της εξειδίκευσης τους και την ανάδειξη/ένταξή τους ως νέων μοριακών στόχων σε προσεγγίσεις AXO.

Για τον σκοπό αυτό επιλύθηκε η κρυσταλλική δομή της AgamOBP5 και των συμπλόκων της με τα φυτικά εντομοαπωθητικά καρβακρόλη και θυμόλη και προσδιορίστηκε η συγγένεια της με προσδέτες στο διάλυμα.

Η AgamOBP5 αποτελεί μια κλασική OBP, που αποτελείται από έξι α έλικες (α1-α6), οι οποίες συγκρατούνται με τρεις δισουλφιδικούς δεσμούς και συνδέονται μεταξύ τους μέσω εύκαμπτων βρόχων. Η διευθέτηση των ελίκων, βρόγχων και του καρβοξυτελικού άκρου, το οποίο στρέφεται προς το εσωτερικό του της πρωτεΐνης, οδηγεί στο σχηματισμό μιας κεντρικής υδρόφοβης κοιλότητας η οποία είναι προσβάσιμη από τον διαλύτη μέσω ενός στομίου μεταξύ των ελίκων X, Ψ, Z. Η κοιλότητα αυτή βρέθηκε να καταλαμβάνεται από τρία μόρια MPD προερχόμενα από το διάλυμα κρυστάλλωσης υποδεικνύοντας την ύπαρξη τουλάχιστον τριών υποκέντρων πρόσδεσης μικρών μορίων. Τα κέντρα αυτά χαρακτηρίστηκαν ως site-1, στον πυθμένα της κοιλότητας, site-2, στο στόμιο της κοιλότητας, και site-3 ένας θύλακας που εμφανίζεται ως κάθετη επέκταση στο μέσο της κοιλότητας μεταξύ των sites 1 και 2.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν φθορισμομετρικές μελέτες διαλογής *in vitro* για την εύρεση εν δυνάμει προσδετών με σκοπό τον χαρακτηρισμό της εξειδίκευσης (specificity) της νέας πρωτεΐνης. Η μελέτη αυτή υπέδειξε ότι η AgamOBP5 είναι

στόχος για μονοτερπένια όπως τα φυτικά εντομοαπωθητικά καρβακρόλη και θυμόλη. Αυτό αποτελεί ένα σημαντικό εύρημα καθώς εξ όσων γνωρίζουμε η AgamOBP5 είναι ο πρώτος μοριακός στόχος μεταξύ των OBPs με εξειδίκευση για μονοτερπένια. Ως εκ τούτου, τα χαρακτηριστικά πρόσδεσης της καρβακρόλης και της θυμόλης μελετήθηκαν διεξοδικά μέσω φθορισμομετρικών μελετών.

Η εν λόγω μελέτη έδειξε ότι υπάρχουν δυο κέντρα δέσμησης τόσο για την καρβακρόλη όσο και για τη θυμόλη. Η πρώτη θέση (κέντρο-1) χαρακτηρίστηκε ως υψηλής συγγένειας και για τις δυο ενώσεις ($K_d=0,11 \mu\text{M}$), ενώ η δεύτερη θέση (κέντρο-2) παρουσιάζει σημαντικά χαμηλότερη συγγένεια με σταθερά διάστασης $7.26\pm 1.62 \mu\text{M}$ και $17.73\pm 4.49 \mu\text{M}$ για την καρβακρόλη και την θυμόλη αντίστοιχα.

Η ύπαρξη δύο κέντρων δέσμησης στην AgamOBP5 ενισχύει περαιτέρω την προτεινόμενη από την κρυσταλλική δομή AgamOBP5-MPD ύπαρξη πολλαπλών κέντρων πρόσδεσης. Το εύρημα αυτό δεν προκαλεί έκπληξη δεδομένου ότι πολλές OBPs διαθέτουν μεγάλες υδρόφοβες κοιλότητες και κανάλια, που παρέχουν αρκετό διαθέσιμο χώρο ώστε να προσδεθούν περισσότερα από ένα μόρια. Για παράδειγμα, προηγούμενες κρυσταλλογραφικές, HSQC-NMR και θερμοδομετρικές μελέτες απέδειξαν ότι η AgamOBP1 μπορεί να δεσμεύσει ταυτόχρονα δύο μόρια ικαριδίνης, τα οποία εντοπίζονται σε δύο διακριτές περιοχές ενός επιμήκους υδρόφοβου καναλιού. (192).

Αξιοσημείωτη ωστόσο είναι η διαφορά της συγγένειας του κέντρου-2 για την καρβακρόλη και την θυμόλη, δύο ισομερών με μεγάλη χημική και δομική ομοιότητα. Με βάση τις σταθερές συγγένειας που προσδιορίστηκαν για τα δύο κέντρα και για τις δύο ενώσεις, μπορεί να υπολογιστεί ότι σε αναλογία προσδέτη/πρωτεΐνης $L/P=7,5$ (πλησίον της K_i της καρβακρόλης) το κέντρο-1 της AgamOBP5 είναι πλήρως κατειλημμένο ($PL/P=99\%$) αδιακρίτως από καρβακρόλη ή θυμόλη. Ωστόσο, στην ίδια αναλογία το κέντρο-2 καταλαμβάνεται κατά 65% και 44% από καρβακρόλη και θυμόλη αντίστοιχα. Περαιτέρω μπορεί να υπολογιστεί ότι με διπλασιασμό της συγκέντρωσης των προσδετών ($L/P=15$) η διαφορά ανέρχεται σε 81% και 61%, ενώ πλησίον της περιοχής κορεσμού της καρβακρόλης ($L/P=50$) τα ποσοστά κατάληψης υπολογίζονται σε 93% και 85% για την καρβακρόλη και την θυμόλη, αντίστοιχα.

Με βάση αυτά τα ευρήματα προτείνεται ότι κέντρο-2 πιθανόν να λειτουργεί ως μια δεξαμενή αποθήκευσης της περίσσειας του διαθέσιμου προσδέτη αλλά και ως ένα κέντρο επιλεκτικότητας μεταξύ των δύο ενώσεων. Σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις καρβακρόλης ή θυμόλης, η AgamOBP5 μπορεί να ανιχνεύσει και τις δυο ενώσεις με

την ίδια ευαισθησία, ενώ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις προσδέτη, πιθανόν να ευνοείται η μεταφορά «περισσότερης» καρβακρόλης αντί θυμόλης, στους συγγενείς οσφρητικούς υποδοχείς (ORs). Πράγματι, προηγούμενες μελέτες *in vivo* έδειξαν ότι η καρβακρόλη και η θυμόλη εμφανίζουν παρόμοιους δείκτες απωθητικότητας, όπως θα ήταν αναμενόμενο για δύο ισομερείς ενώσεις. Ωστόσο, η καρβακρόλη είναι εξίσου αποτελεσματική με την θυμόλη (ή ακόμα και ελαφρώς πιο αποτελεσματική), σε χαμηλότερη δόση (25 nmol/cm^2) έναντι της θυμόλης (31 nmol/cm^2). Επομένως, τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν περαιτέρω την ιδέα ότι οι OBPs συμβάλλουν στην εξαιρετική επιλεκτικότητα και ευαισθησία του οσφρητικού συστήματος των εντόμων. (193). Φαίνεται λοιπόν, ότι οι OBPs, όπως σε αυτή την περίπτωση η AgamOBP5, παρόλο που δεν χαρακτηρίζονται από την απόλυτη εξειδίκευση των ενζύμων, έχουν την ικανότητα να διακρίνουν όχι μόνο μεταξύ διαφορετικών κλάσεων χημικών ενώσεων, αλλά και μεταξύ ενώσεων με πολύ παρόμοια χαρακτηριστικά. Προηγούμενο παράδειγμα, αποτελεί και σε αυτή την περίπτωση η AgamOBP1 η οποία προσδένει επιλεκτικά καρβαμίδια και πιπεριδίνες, αλλά και εκλεκτικά μόνο ένα από τα τέσσερα στερεοϊσομερή της ικαριδίνης. (155)

Οι μελέτες θερμιδομετρίας που ακολούθησαν, έδειξαν ότι η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης τόσο με την καρβακρόλη όσο και με τη θυμόλη προκάλεσε σημαντική πρωτεϊνική σταθεροποίηση έναντι της διαδικασίας μετουσίωσης όσον αφορά την ενθαλπία μετουσίωσης ($\Delta_d H^\circ$) και τη θερμοκρασία μετουσίωσης (T_d), σαφής ένδειξη δέσμευσης ειδικού προσδέτη. Οι δυο ενώσεις επηρέασαν τη σταθερότητα της πρωτεΐνης σε εξαιρετικά συγκρίσιμο βαθμό. Επιπλέον, ο μηχανισμός αποδιάταξης της πρωτεΐνης παρέμεινε ανεπηρέαστος, υποδηλώνοντας ότι στο σύνολο της η τριτοταγής δομή της πρωτεΐνης δεν μεταβάλλεται μετά από την πρόσδεση των δυο ενώσεων.

Για την κατανόηση του τρόπου σύνδεσης σε μοριακό επίπεδο, πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός της τρισδιάστατης κρυσταλλικής δομής των συμπλόκων της πρωτεΐνης με τα δύο μονοτερπένια. Σε συμφωνία με τις φθορισμομετρικές και θερμιδομετρικές μελέτες, η κρυσταλλική δομή AgamOBP5-καρβακρόλης επιβεβαίωσε την ύπαρξη τουλάχιστον δύο θέσεων δέσμευσης μονοτερπενίων (κέντρο-1 και κέντρο-2) και μιας πιθανής τρίτης (κέντρο-3) που καταλαμβάνεται από MPD. Το γεγονός ότι η θυμόλη εντοπίστηκε μόνο στο κέντρο-1 της κρυσταλλικής δομής AgamOBP5-θυμόλης, δεν αποκλείει την πρόσδεσή της στο διάλυμα και στο κέντρο-2 -όπως δηλαδή υπό της συνθήκες των πειράματα φθορισμού και DSC- όπου απουσιάζουν ανταγωνιστές όπως το MPD. Επιπλέον, καθώς η θυμόλη

παρουσιάζει χαμηλότερη συγγένεια συγκριτικά με την καρβακρόλη για το κέντρο-2, πιθανόν υπό της πειραματικές συνθήκες της συγκρυστάλλωσης δεν επιτεύχθηκε ικανοποιητικός κορεσμός για την κατάληψη του κέντρου-2 από την θυμόλη.

Ελλείπει μιας δομής της AgamOBP5 απουσία MPD, δεν μπορεί να εξαχθεί ένα ασφαλές συμπέρασμα σχετικά με τη σταθεροποίηση της πρωτεΐνης απουσία και παρουσία προσδετών. Ωστόσο, η δομή AgamOBP5-MPD αποτελεί το πιο κοντινό διαθέσιμο ανάλογο της apo-AgamOBP5 και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δομή αναφοράς για την σύγκριση με/μεταξύ των δομών καρβακρόλης και θυμόλης. Από την ανάλυση των κρυσταλλικών δομών των μονοτερπενίων γίνεται σαφές ότι τόσο η καρβακρόλη όσο και η θυμόλη στο κέντρο-1 γεφυρώνουν τις έλικες α4 και α6 (γεγονός που δεν επιτυγχάνεται με την πρόσδεση του MPD) και επίσης αναπτύσσουν αλληλεπιδράσεις Van der Waals με την έλικα α5. Συγκρίνοντας τις τρεις διαθέσιμες κρυσταλλικές δομές φαίνεται ότι η δέσμευση των μονοτερπενίων σε αυτό το κέντρο δεν συνοδεύεται από διαμορφωτικές αλλαγές. Προτείνεται λοιπόν ότι το κέντρο αυτό είναι προ-σχηματισμένο και η δέσμευση των μονοτερπενίων σταθεροποιεί περαιτέρω την πρωτεΐνη μέσω σταθεροποίησης των σχετικών θέσεων των ελίκων που οριοθετούν το κέντρο. Αντίθετα, η σύνδεση της καρβακρόλης στο κέντρο-2 απαιτεί μια σειρά τοπικών διαμορφωτικών αλλαγών με σκοπό την βελτιστοποίηση των αλληλεπιδράσεων με τον προσδέτη. Επιπλέον, η καρβακρόλη στο κέντρο-2 επεκτείνει το δίκτυο αλληλεπιδράσεων των α4 και α6 στο τέλος της έλικας α3 περαιτέρω σταθεροποιεί την πρωτεΐνη σε συμφωνία με τα ευρήματα της DSC. Παρόλο που η κρυσταλλική δομή του συμπλόκου AgamOBP5-θυμόλη δεν αποκάλυψε τον τρόπο δέσμευσης της θυμόλης σε αυτό το κέντρο, θα μπορούσε να προταθεί ότι σε διάλυμα όπου η θυμόλη βρέθηκε να προσδένεται στο κέντρο-2, ο τρόπος σύνδεσης θα μοιάζει με τον αντίστοιχο της καρβακρόλης, συμμετέχοντας σε ένα εκτεταμένο δίκτυο με τις έλικες α4, α5, α6 και α3. Αυτό το συμπέρασμα υποστηρίζεται από το γεγονός ότι στα πειράματα DSC και οι δύο προσδέτες σταθεροποιούν την πρωτεΐνη στον ίδιο βαθμό.

Οι νέες δομές μπορούν να έχουν σημαντική συνεισφορά σε προσεγγίσεις AXO καθώς εμπλουτίζουν το ρεπερτόριο των διαθέσιμων κέντρων για μελέτες διαλογής *in silico* και *in vitro*. Σημαντικότερα, είναι δυνατόν να βοηθήσουν στην ανακάλυψη νέων φυσικών προσδετών διαφορετικής χημικής και δομικής κλάσης από τα καρβαμίδια (DEET) και τις πιπεριδίνες (ικαριδίνη). Περαιτέρω είναι δυνατόν να κατευθύνουν τον σχεδιασμό νέων βιο-εμπνευσμένων παραγώγων. Για παράδειγμα παράγωγα μονοτερπενίων με λειτουργικές ομάδες στις θέσεις όρθο- και μέτα- συνδυάζοντας τις

εναλλακτικές διαμορφώσεις των δύο μονοτερπενίων σε ένα μοναδικό μόριο. Τέλος, η δυνατότητα για συζευγμένες ενώσεις που θα καταλαμβάνουν συγχρόνως και τα δύο κέντρα.

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι η ενδεδειγμένη δομική σύγκριση της AgamOBP5 με την ομόλογη AgamOBP4, τόσο σε επίπεδο συνολικής τριτοταγούς δομής, όσο και επίπεδο αμινοξέων, παρέχει μια απάντηση στο εύλογο ερώτημα περί πιθανής επικάλυψης των φυσιολογικών δράσεων ή αλλιώς, εάν η ύπαρξη τους αντίκειται στον κανόνα της οικονομίας της φύσης: Οι παρατηρούμενες δομικές διαφορές μεταξύ των δύο ομολόγων, υποδεικνύουν διαφορές στην σταθερότητα, την εξειδίκευση και των πιθανών αλληλεπιδράσεων με πρωτεϊνικούς εταίρους και ως εκ τούτου, διαφορετική φυσιολογική δράση, γεγονός που υποστηρίζεται και από τις φθορισμομετρικές μελέτες.

Στη συνέχεια προσδιορίστηκε η τριτοταγής δομή της πρωτεΐνης AealOBP1, ενός μέλους της οικογένειας των κλασικών OBPs, που συγκροτείται από έξι α -έλικες ($\alpha 1$ - $\alpha 6$) και σταθεροποιείται από τρεις δισουλφιδικούς δεσμούς. Πρόκειται για μια πρωτεΐνη που παρουσιάζει δομική ομοιότητα με την AgamOBP5. Η διαφορετική τοποθέτηση των άκρων τους, όμως, έχει ως αποτέλεσμα να σχηματίζονται κοιλότητες σύνδεσης με διαφορετικό σχήμα και όγκο. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με το διαφορετικό περιβάλλον που προκύπτει, λόγω των διαφορετικών αμινοξικών αλληλουχιών, έχει ως αποτέλεσμα οι δυο πρωτεΐνες να αναγνωρίζουν και να προσδένουν διαφορετικές ομάδες ενώσεων.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκαλεί ο πιθανός διμερισμός της AealOBP1, μια κατάσταση κατά την οποία μια περιοχή β -κλώνου που εντοπίζεται στον βρόχο που συνδέει τις έλικες $\alpha 2$ και $\alpha 3$ της μιας υπομονάδας, σχηματίζει παράλληλη β -πτυχωτή επιφάνεια με την περιοχή β -κλώνου του καρβοξυτελικού άκρου της δεύτερης υπομονάδας. Ο σχηματισμός ομοδιμερών στις OBPs είναι δυνατόν να οδηγήσει στην δημιουργία νέων συνδυαστικών κέντρων και ως εκ τούτου σε διαφορετική εξειδίκευση. Τέτοιες πληροφορίες είναι σημαντικές και απαιτείται να λαμβάνονται υπόψη στις προσεγγίσεις AXO με βάση την δομή. Παράδειγμα σχηματισμού συνδυαστικού κέντρου είναι η C-plus AgamOBP48 (74) που όπως η AealOBP1 εκλούεται ως μονομερές από την στήλη μοριακής διήθησης και ο σχηματισμός του διμερούς λαμβάνει χώρα με την πάροδο του χρόνου, όποτε και αποκαθίσταται ισορροπία μεταξύ μονομερών και διμερών μορφών.

Ωστόσο, πρέπει να τονιστεί ιδιαίτερος, ότι ενδείξεις διμερισμού που προέρχονται από την ανάλυση κρυσταλλικών δομών θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη

με μεγάλη επιφύλαξη καθώς είναι δυνατόν ο διμερισμός να αποτελεί τεχνητό δημιούργημα (artifact) λόγω των κρυσταλλικών επαφών και συμμετρίας και εν τέλει να μην έχουν φυσιολογική σημασία. Η επιβεβαίωση με τεχνικές στο διάλυμα συναρτήσει του χρόνου όπως προφίλ μοριακής διήθησης, μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση, αναλυτική υπερφυγοκέντρωση, μελέτες NMR, θερμοδομετρικές μελέτες κ.λπ., είναι δυνατόν να αποκαλύψουν την φυσιολογική (ή μη) σημασία της κρυσταλλογραφικής παρατήρησης. Τέτοιες μελέτες παραμένει να διενεργηθούν σε μελλοντικές εργασίες.

Η εκμετάλλευση των δομικών και βιοχημικών μελετών για την ανακάλυψη νέων προσδετών μέσω τις προσέγγισης AXO, όπως συζητήθηκε παραπάνω, αποτέλεσε επιπλέον μέρος του αντικείμενου της παρούσας διατριβής. Οι μελέτες επικεντρώθηκαν σε δύο πρωτεΐνες στόχους την AgamOBP1 και AgamOBP4. Όσον αφορά την AgamOBP1 αξιοποιήθηκαν οι γνωστές, και οι μοναδικές έως σήμερα, δομές της AgamOBP1 με τα συνθετικά εντομοαπωθητικά DEET και Ικαριδίνη με την εφαρμογή δύο διαφορετικών υπολογιστικών προσεγγίσεων.

Η πρώτη από αυτές τις μελέτες στηρίχθηκε στην ανεύρεση νέων προσδετών της AgamOBP1 με δομική και χημική ομοιότητα α) με γνωστούς από την βιβλιογραφία βιοδραστικούς συνθετικούς προσδέτες της AgamOBP1 (186) και β) με ενώσεις φυτικής παράκτιας προέλευσης προσδετών της AgamOBP1 των οποίων η βιολογική τους δράση αξιολογήθηκε στο πλαίσιο της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής. Αυτές οι δέκα ενώσεις μητρικές ενώσεις χρησιμοποιήθηκαν για *in silico* διαλογή σε χημική βιβλιοθήκη 96 εκατομμυρίων χημικών δειγμάτων και περιορίστηκαν περαιτέρω με κριτήρια έλλειψης τοξικότητας, επαρκούς πηκτικότητας αλλά και εμπορικής διαθεσιμότητας και κόστους με αποτέλεσμα να επιλεγθούν 120 μοναδικά μόρια. Σε αυτό το σημείο, αξίζει να σημειωθεί ότι η πτητικότητα πρέπει να αποτελεί ένα σημαντικό κριτήριο επιλογής στα πρωτόκολλα AXO. Αφενός, η ανεύρεση ισχυρών προσδετών των OBPs που δεν διαθέτουν ικανοποιητική πτητικότητα και ως εκ τούτου δεν είναι δυνατόν να γίνουν αντιληπτά από τα κουνούπια, είναι συνυφασμένη με απουσία βιολογικής δράσης. Αφετέρου, ισχυροί προσδέτες με σχετικά μειωμένη πτητικότητα μπορούν να έχουν μεγαλύτερη διάρκεια δράσης. Επιπλέον είναι αυτονόητη η ανάγκη για έναν προ-αποκλεισμό ενώσεων με προβλεπόμενη τοξική δράση. Τέλος, τα κριτήρια της εμπορικής διαθεσιμότητας και του χαμηλού κόστους, αν και επιστημονικά αδιάφορα, έχουν μεγάλη πρακτική σημασία τόσο για την

δυνατότητα διεξαγωγής των μελετών αυτών καθ'αυτών, όσο και του τελικού κόστους ενός εντομοαπωθητικού προϊόντος.

Οι περαιτέρω μελέτες προσομοίωσης μοριακής πρόσδεσης και μοριακής δυναμικής έναντι της AgamOBP1, οδήγησαν στην επιλογή οκτώ μορίων που παρουσιάζουν την υψηλότερη ομοιότητα με τις μητρικές ενώσεις και υψηλές τιμές ενέργειας πρόσδεσης.

Ο προσδιορισμός *in vitro* της δεσμευτικής τους συγγένειας με το AgamOBP1 με φθορισμομετρικές μελέτες καθώς και η αξιολόγηση της απωθητικής τους δράσης *in vivo* έναντι των θηλυκών κουνουπιών *Ae. Albopictus*, απέδειξαν ότι τα τρία από τα οκτώ μόρια παρουσίαζαν σημαντική απωθητική δράση. Συγκεκριμένα, το μόριο Lig-119 χαρακτηρίζεται ως ένα νέο απωθητικό που μοιάζει με το DEET, ενώ το Lig-13 και το Lig-111 αποδείχθηκαν εξαιρετικά δραστικά μόρια.

Αναλυτικότερα, το Lig-119, που αντιπροσωπεύει ένα νέο μοριακό ικρίωμα, παρουσιάζει υψηλή συγγένεια για την πρωτεΐνη στόχο OBP1 ενώ διαθέτει χαμηλότερη πτητικότητα ($8,55 \times 10^{-4}$ mmHg) από το DEET ($1,35 \times 10^{-3}$ mmHg). Επομένως, το Lig-119 θα μπορούσε να παρέχει μεγαλύτερους χρόνους προστασίας και υψηλότερη χωρική κάλυψη από το DEET σε σύγκριση με ισομοριακές συγκεντρώσεις.

Επίσης, το μόριο Lig-13 συνδέεται με την AgamOBP1 σε δυο θέσεις πρόσδεσης, παρουσιάζοντας παρόμοια συμπεριφορά με την ικαριδίνη.

Ιδιαίτερα ενδιαφέρον παρουσιάζει η ένωση Lig-16, καθώς σε δόσεις υψηλής συγκέντρωσης παρουσιάζει ελκυστική συμπεριφορά σε αντίθεση με τα υπόλοιπα μόρια. Το γεγονός αυτό είναι αξιοσημείωτο αλλά όχι περίεργο, εφόσον οι OBPs είναι πρωτεΐνες μεταφοράς, οι οποίες δεν μπορούν να διακρίνουν μεταξύ απωθητικών και ελκυστικών μορίων. Η φυσιολογική δραστηριότητα των ενώσεων, είτε η απώθηση είτε η έλξη των κουνουπιών, καθορίζεται τελικά από τους Οσφρητικούς Υποδοχείς (ORs), επομένως ο τύπος της δράσης μπορεί να αξιολογηθεί μόνο εκ των υστέρων σε βιολογικές δοκιμές συμπεριφοράς.

Παράλληλα, οι ενώσεις Lig-118 και Lig-111 παρόλο που έχουν μεγάλη ομοιότητα στη δομή, παρουσιάζουν εντυπωσιακή διαφορά στην απωθητική τους δράση. Ειδικότερα, η Lig-111 είναι η τρίτη πιο δραστική ένωση από τα δείγματα που μελετήθηκαν, ενώ η Lig-118 δεν παρουσιάζει εντομοαπωθητική δραστικότητα. Παρομοίως, οι ενώσεις Lig-103 και Lig-119 εμφανίζουν μεγάλη δομική ομοιότητα, αλλά σημαντική διαφορά στη δράση τους. Οι διαφορές που παρατηρούνται, πιθανόν

να οφείλονται στην αδυναμία των ενώσεων Lig-118 και Lig-103 να προσδεθούν στην πρωτεΐνη AgamOBP1.

Συμπερασματικά, από αυτή τη μελέτη προέκυψαν τρία νέα πολλά υποσχόμενα απωθητικά μόρια. Η ένωση Lig-119 με δράση συγκρίσιμη με εκείνη του DEET, αλλά με χαμηλότερη πτητικότητα και υψηλότερη συγγένεια δέσμευσης για την AgamOBP1. Επίσης, η ένωση Lig-13 προσδένεται σε δυο θέσεις στην πρωτεΐνη, αντιπροσωπεύοντας ένα νέο ικρίωμα που πρέπει να αξιοποιηθεί για την ανακάλυψη προσδετών με πολλαπλές θέσεις σύνδεσης. Τέλος, η Lig-111 παρουσιάζει υψηλό βαθμό πτητικότητας και αποτελεί ισχυρό προσδέτη της OBP1, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε σκευάσματα βραδείας αποδέσμευσης.

Στη δεύτερη προσέγγιση AXO, πραγματοποιήθηκε διαλογή βιβλιοθηκών συνθετικών και φυσικών ενώσεων *in silico* βασισμένη σε ένα φαρμακοφόρο μοντέλο βασισμένο στον τρόπο δέσμευσης την DEET και ικαριδίνης. Η πρωτοτυπία αυτού του φαρμακοφόρου μοντέλου ήταν ότι στηρίχθηκε στην δημιουργία ενός ψευδομορίου με σκοπό την επέκταση της αναζήτησης για θέσεις πρόσδεσης σε όλο το μήκος του πρώτου ημίσεος του καναλιού της OBP1. Όπως και στην προηγούμενη μελέτη AXO οι προσομοιώσεις μοριακής πρόσδεσης με την πρωτεΐνη AgamOBP1 πρότειναν δυο νέες ενώσεις— το Coniferyl alcohol και το 1,2-Diphenyl-2-Propanol— που αξιολογήθηκαν σε φθορισμομετρικές μελέτες για την ικανότητα πρόσδεσης στην AgamOBP1, και *in vivo* για την απωθητική τους δράση. Οι ενώσεις Coniferyl alcohol και το 1,2-Diphenyl-2-Propanol έδειξαν υψηλή συγγένεια με την πρωτεΐνη με σταθερά διάστασης 69,4 nM και 84,7 ηM,, αντίστοιχα αποδεικνύοντας την επιτυχία του υπολογιστικού πρωτοκόλλου. Ωστόσο, οι δυο ενώσεις σημείωσαν σημαντική διαφορά στην απωθητική τους δράση. Συγκεκριμένα, το Coniferyl alcohol παρουσίασε μια ιδιόμορφη συμπεριφορά, όπως η ένωση Lig-16, από την μελέτη AXO. Παρόλο που, σε χαμηλές δόσεις 1 και 2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ παρατηρείται σημαντική απωθητική δράση (51,1 και 52,5 %, αντίστοιχα), όταν η δόση αυξήθηκε στα 4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ η απωθητική δράση της μειώθηκε και τελικά ελαχιστοποιήθηκε σε υψηλότερες δόσεις μεταξύ 10 και 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Είναι πιθανόν η ένωση μετά από μια κρίσιμη συγκέντρωση να δρα ως ελκυστικό και όχι ως απωθητικό. Αξίζει να σημειωθεί ότι το Coniferyl alcohol έχει ταυτοποιηθεί ως αρσενική σεξουαλική φερομόνη της μύγας *Bactrocera papayae*. (194). Η πιθανή ελκυστική δράση του μορίου στα κουνούπια έχει επιστημονικό ενδιαφέρον και χρήζει περαιτέρω μελέτης.

Σημαντικός απότοκος της μελέτης ήταν η ένωση 1,2-Diphenyl-2-Propanol που χαρακτηρίστηκε ως ισχυρό απωθητικό. Η ένωση σε δόση 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ εμφάνισε απωθητική δράση (%RI = 99,2) συγκρίσιμη με εκείνη του DEET (%RI = 99,8), ενώ διατήρησε μια αξιολογη δραστηριότητα (%RI=48,8) σε δόση 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Μια άλλη προσέγγιση AXO που έγινε αντικείμενο μελέτης στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή έχει ως σημείο εκκίνησης ομάδα ενώσεων που προέκυψαν από μελέτες δυναμικής συνδυαστικής χημείας, (*dynamic combinatorial chemistry*) και ανήκαν στην κατηγορία των αμινών. Οι ενώσεις αυτές που σε προηγούμενες εργασίες αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητα πρόσδεσης στην AgamOBP1 με *in silico* προσομοιώσεις μοριακής πρόσδεσης και *in vitro* σε STD-NMR και φθορισμομετρικές δοκιμασίες πρόσδεσης. (155) Οι ενώσεις αυτές αξιολογήθηκαν στο πλαίσιο της διατριβής ως προς την απωθητική τους δράση με πειράματα απώθησης *in vivo* έναντι θηλυκών κουνουπιών *Ae. Albopictus*. Πρόκειται για ενώσεις με αξιολογη απωθητική ικανότητα αλλά σε υψηλές δόσεις 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ και 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Έτσι αυτή η προσέγγιση AXO που στηρίζονται στην δυναμική συνδυαστική χημεία αποτελούν μια υποσχόμενη μέθοδο και ανοίγουν το δρόμο για παρόμοιες μελέτες με την χρήση της τεχνικής παρουσία της πρωτεΐνης για την παραγωγή νέων προσδετών *in situ* που θα καθορίζονται από τους χωροταξικούς περιορισμούς του φυσικού κέντρου πρόσδεσης.

Μια τέταρτη προσέγγιση AXO στηρίχθηκε σε μεταβολίτες που σε προηγούμενες εργασίες απομονώθηκαν από αλόφυτα και υποβλήθηκαν σε *in vitro* διαλογή βάσει φθορισμομετρικών δοκιμασιών έναντι τριών OBP-στόχων ήτοι, AgamOBP1, AgamOBP4 και AgamOBP48. Οι ενώσεις αξιολογήθηκαν περαιτέρω με STD-NMR καθώς και δομική μελέτη έναντι της AgamOBP1 με πειράματα HSQC-NMR. Αυτή η προσέγγιση απέφερε εντυπωσιακά αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, οι επιλεγμένες ενώσεις αξιολογήθηκαν για την εντομοαπωθητική τους δράση σε βιοδοκιμές έναντι του κώνωπα *Ae. albopictus*. Αυτές οι μελέτες ανέδειξαν το Yomogi alcohol ένα εξαιρετικά ισχυρό απωθητικό, συγκρίσιμο με το DEET και μάλιστα σε πολύ χαμηλές δόσεις 0.02 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ (%RI = 89,2) και 0.03 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ (%RI = 100). Το Terpinen- 4- ol παρουσίασε επίσης σημαντική απώθηση σε δόσεις 0.03 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ (%RI = 79,8) και 0.05 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ (%RI = 100), ενώ ακολούθησε το Artemisia Alcohol και cis-Chrysanthenyl acetate, με ικανοποιητικό δείκτη απώθησής αλλά σε υψηλότερες δόσεις.

Τέλος, αντικείμενο της διατριβής αποτέλεσε η αξιολόγηση τελικών εντομοαπωθητικών προϊόντων με βάση αιθέριων ελαίων ενθυλακωμένων σε νανοδιασπορές *in vivo*. Αρχικά, αξιολογήθηκε η απωθητική ικανότητα αιθέριων

ελαίων τα οποία σε προηγούμενες εργασίες είχαν επιλεγεί με την μέθοδο AXO, και συγκεκριμένα την ικανότητα τους να αλληλεπιδρούν με δύο πρωτεΐνες στόχους (AgamOBP1 και AgamOBP5). Ιδιαίτερα ενθαρρυντική ήταν τα αποτελέσματα για τα *lavandin oil* και *Yarrow oil* (ελληνικής προέλευσης), τα οποία παρουσίασαν απωθητική δράση συγκρίσιμη με του DEET, αλλά περιορισμένη διάρκεια δράσης όπως αναμένονταν για τα εξαιρετικά πτητικά αιθέρια έλαια. Ωστόσο, τα αντίστοιχα ενθυλακωμένα έλαια παρουσίασαν αξιόλογη απωθητική ικανότητα, και ιδιαίτερα αυξημένη διάρκεια δράσης έως και οκτώ ώρες. Αξίζει να σημειωθεί ότι ένα ενθυλακωμένο μίγμα *Lavandin oil* και *Yarrow oil* επιλέχθηκε για διάθεση ως τελικό εμπορικό προϊόν, ενώ η δράση του *Yarrow oil* ως εντομοαπωθητικού κατοχυρώθηκε μέσω εθνικού και ευρωπαϊκού διπλώματος ευρεσιτεχνίας.

Συμπερασματικά, απότοκο της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής αποτελεί ο προσδιορισμός της τρισδιάστατης κρυσταλλικής δομής της AgamOBP5 και της AealOBP1 και η ταυτοποίηση νέων βιοδραστικών προσδετών των AgamOBP1, AgamOBP4 και AgamOBP5. Η ανάδειξη νέων στόχων συνδυαστικά με τις δομικές και βιοχημικές πληροφορίες που προέκυψαν από αυτή την εργασία συμβάλουν στην προσπάθεια κατανόησης των κανόνων που διέπουν την εξιδεικευμένη ανίχνευση οσμών από τις OBPs του κουνουπιού. Εν κατακλείδι, τα ερευνητικά αποτελέσματα της παρούσας Διατριβής συμβάλουν στη διεύρυνση του ρεπερτορίου των διαθέσιμων μοριακών στόχων και κατ' επέκταση τον αριθμό των απωθητικών ενώσεων που ανακαλύφθηκαν. Τέλος, ανοίγουν το δρόμο για την ανακάλυψη νέων ενώσεων σε μελλοντικές εργασίες, ενισχύοντας έτσι το χημικό μας οπλοστάσιο για τον περιορισμό των ασθενειών που μεταδίδονται από κουνούπια-διαβιβαστές.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα κουνούπια, οι κύριοι φορείς πολλαπλών παρασίτων και ιών, αποτελούν ένα από τα πιο επικίνδυνα ζώα στον πλανήτη προκαλώντας πάνω από ένα εκατομμύριο θανάτους ετησίως. Ο μεγάλος αριθμός θανάτων που οφείλονται σε αυτά καθιστά επιτακτική την ανάγκη ελέγχου των εντόμων διαβιβαστών. Ο πιο κοινός και αποτελεσματικός τρόπος περιορισμού τους είναι η χρήση εντομοαπωθητικών.

Οι οσφρητικές πρωτεΐνες δέσμευσης οσμογόνων μορίων (OBPs) συμμετέχουν στο εναρκτήριο στάδιο του οσφρητικού μεταγωγικού μονοπατιού, γεγονός που τις καθιστά ιδανικούς μοριακούς στόχους για την ανακάλυψη και το σχεδιασμό νέων εντομοαπωθητικών χημικών ενώσεων και μιγμάτων τους.

Ο προσδιορισμός της τριτοταγούς δομής των OBPs αλλά και των συμπλόκων τους με προσδέτες, παρέχει λεπτομερείς πληροφορίες τόσο για τη συνολική δομή όσο και για τις επιμέρους αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης - πρωτεΐνης και πρωτεΐνης - προσδετών, στοιχεία που δύνανται να οδηγήσουν στην εύρεση αποτελεσματικότερων, ασφαλέστερων και φιλικών προς το περιβάλλον χημικών μέσων ελέγχου των κουνουπιών.

Στο πλαίσιο της παρούσας Διδακτορικής διατριβής μελετήθηκαν οι πρωτεΐνες του ανωφελή κώνωπα AgamOBP1, AgamOBP4 και AgamOBP5, καθώς και η πρωτεΐνη AealOBP1 του κουνουπιού *Aedes albopictus*. Όσον αφορά τις πρωτεΐνες AgamOBP1, AgamOBP4 ανακαλύφθηκαν έξι νέοι προσδέτες με την προσέγγιση της Αντίστροφης Χημικής Οικολογίας (AXO). Προσδιορίστηκαν επίσης οι τρισδιάστατες δομές των AgamOBP5 και AealOBP1. Ταυτοποιήθηκαν δύο κέντρα σύνδεσης στην AgamOBP5 που προσδέονται μονοτερπένια (καρβακρόλη, θυμόλη), αναδεικνύοντάς την ως τον πρώτο μοριακό στόχο μεταξύ των OBPs με εξειδίκευση για μονοτερπένια. Ενώ παράλληλα ο προσδιορισμός της τρισδιάστατης δομής της AealOBP1 καθιστά δυνατή την ανάδειξη ενός επιπλέον μοριακού στόχου για την εφαρμογή της προσέγγισης AXO με βάση τις OBP.

Τα ερευνητικά αποτελέσματα αυτής της διατριβής συμβάλλουν στην κατανόηση της μοριακής βάσης της αναγνώρισης οσμών από τις OBPs. Είναι σημαντικό ότι διευρύνει τον αριθμό των διαθέσιμων μοριακών στόχων και απωθητικών ενώσεων, ανοίγοντας το δρόμο για την ανακάλυψη νέων. Ως εκ τούτου, συμβάλλει στην ενίσχυση του χημικού μας οπλοστασίου για τον έλεγχο των ασθενειών που μεταδίδονται από τα κουνούπια.

ABSTRACT

Mosquitoes, the main vectors of multiple parasites and viruses, are one of the most dangerous animals on the planet, causing over a million deaths annually. The large number of deaths attributed to them makes the need to control insect vectors imperative. The most common and effective way of limiting mosquitoes is the use of insect repellents.

Odorant binding proteins (OBPs) participate in the initial step of the olfactory transduction pathway making them valuable targets for the discovery and design of new insect repellent chemical compounds and mixtures.

The determination of the tertiary structure of OBPs as well as their complexes with ligands provides detailed information both on the overall structure and on the individual protein-protein and protein-ligand interactions, information that may lead to finding of more effective, safer, and friendly to the environment chemicals as mosquito control agents.

In the context of this thesis, the proteins of the mosquito *Anopheles gambiae* AgamOBP1, AgamOBP4 and AgamOBP5, as well as the AealOBP1 protein of the mosquito *Aedes albopictus* were studied. Regarding the proteins AgamOBP1, AgamOBP4, a total of six new ligands were discovered by the RCE approach (Reverse Chemical Ecology). The crystal structures of AgamOBP5 and AealOBP1 were also determined. Two binding sites in AgamOBP5 that bind monoterpenes (carvacrol, thymol) were identified, thus making AgamOBP5 the first monoterpene specific target among OBPs. At the same time, the determination of the three-dimensional structure of AealOBP1 provides a novel molecular target for application of OBP-based RCE approaches.

The research results of this thesis contribute to the understanding of the molecular basis of odorants recognition by OBPs. Significantly, it expands the number of available molecular targets and repellent compounds, paving the way for the discovery of new ones. Therefore, contributes to the strengthening of our chemical arsenal for the control of mosquito-borne diseases.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Ιδανικά χαρακτηριστικά ενός εντομοαπωθητικού προϊόντος ⁽²²⁾	19
Πίνακας 2. Παράμετροι για την επιλογή του κατάλληλου εντομοαπωθητικού. ⁽²²⁾	19
Πίνακας 3 Τα πιο διαδεδομένα αιθέρια έλαια, το φυτό προέλευσής τους και τα δραστικά συστατικά τους.	33
Πίνακας 4: Κατάλογος αντιδραστηρίων.....	81
Πίνακας 5: Κατάλογος εργαστηριακού εξοπλισμού	82
Πίνακας 6: Κατάλογος οργάνων	83
Πίνακας 7: Κατάλογος βακτηριακών στελεχών, πλασμιδιακών φορέων, ενζύμων και στηλών χρωματογραφίας.....	84
Πίνακας 8: Αντιδραστήρια για την παρασκευή της πηκτής ηλεκτροφόρησης.	110
Πίνακας 9: Αντίδραση πέψης του πλασμιδίου pUC57-AealOBP1	120
Πίνακας 10: Αντίδραση απολίνωσης	123
Πίνακας 11: Υπολογισμός συγκεντρώσεων αντιδραστηρίων PCR	126
Πίνακας 12: Ενώσεις με εντομοαπωθητική δράση, που δοκιμάστηκαν ως πιθανοί προσδέτες της AgamOBP5 ⁽⁴⁸⁾	133
Πίνακας 13: Συνθήκες κρυστάλλωσης της πρωτεΐνης AgamOBP5.....	136
Πίνακας 14: Συνθήκες κρυστάλλωσης των συμπλόκων AgamOBP5- carvacrol και AgamOBP5-thymol	139
Πίνακας 15: Ποσοστό εκτόπισης 1-NPN από τις υπό μελέτη ενώσεις.....	165
Πίνακας 16: Τιμές της σταθεράς πρόσδεσης K_i της εκάστοτε ένωσης με την πρωτεΐνη AgamOBP4	171
Πίνακας 17: Οι 7 τελικές ενώσεις που αξιολογήθηκαν ως προς τη συγγενειά τους με την AgamOBP1 και οι τιμές K_i	178
Πίνακας 18. Στατιστικά στοιχεία συλλογής, επεξεργασίας και βελτιστοποίησης της δομής OBP5	181
Πίνακας 19. Αλληλεπιδράσεις του μορίου της καρβακρόλης με την πρωτεΐνη στο site 1.	187
Πίνακας 20. Αλληλεπιδράσεις του μορίου της καρβακρόλης με την πρωτεΐνη στο site 2.	188
Πίνακας 21. Αλληλεπιδράσεις του μορίου της θυμόλης με την πρωτεΐνη	190

Πίνακας 22. Στατιστικά στοιχεία συλλογής, επεξεργασίας και βελτιστοποίησης των δομών OBP5 με προσδέτες	191
Πίνακας 23. Στατιστικά στοιχεία συλλογής, επεξεργασίας και βελτιστοποίησης της δομής OBP1	196
Πίνακας 24: Ενθαλπία μετουσίωσης, ΔH° και θερμοκρασία, Td, για δείγματα AgamOBP5 (χωρίς και με 2% μεθανόλη) και παρουσία καρβακρόλης και θυμόλης ως προσδέτες. Οι παράμετροι προσαρμογής υπολογίστηκαν σύμφωνα με ένα μοντέλο μετουσίωσης ενός σταδίου.....	201
Πίνακας 25: <i>Δείκτες Αποθητικότητας (RI) των εξεταζόμενων ενώσεων</i> ⁽¹⁶²⁾	203
Πίνακας 26: <i>Δείκτες Αποθητικότητας (RI) των εξεταζόμενων ενώσεων</i> ⁽¹⁷⁵⁾	203
Πίνακας 27: Ο δείκτης αποθητικότητας των 4 ενώσεων που μελετήθηκαν	206
Πίνακας 28: Δείκτης αποθητικότητας και αριθμός προσγειώσεων των 4 μεταβολιτών που μελετήθηκαν	208
Πίνακας 29: Δείκτης αποθητικότητας των αιθέριων ελαίων που μελετήθηκαν	211
Πίνακας 30. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα των ενθυλακωμένων αιθέριων ελαίων	214

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Βιβλιογραφία

1. WHO. World malaria report 2018. (2018). .
2. The malERA Consultative Group on Vector Control. A research agenda for malaria eradication: vector control. 2011, PLoS Med 8, e1000401 (2011).
3. Catteruccia*, W. Robert Shaw* and Flaminia. Vector biology meets disease control: using basic research to fight vector-borne diseases. 2019, Nat Microbiol. 2019 Jan; 4(1): 20–34.
4. DP, Kwiatkowski. How malaria has affected the human genome and what human genetics can teach us about malaria. . (2005), pp. Am. J. Hum. Genet 77, 171–192 .
5. D, Kwiatkowski. Malaria genomics: tracking a diverse and evolving parasite population. . 2015, Int. Health 7, 82–84 (2015).
6. Snow RW, Guerra CA, Noor AM, Myint HY, Hay SI. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. . *Nature*. 2005, Nature 434:214–21710.1038/nature03342.
7. DE, Neafsey. Highly evolvable malaria vectors: the genomes of 16 *Anopheles* mosquitoes. *Science*. 2015, Science 347, 1258522 (2015).
8. Zeldenryk LM, Gray M, Speare R, Gordon S & Melrose W. The emerging story of disability associated with lymphatic filariasis: a critical review. . 2011, Τόμ. PLoS Negl. Trop. Dis 5, e1366.
9. Bern C, Maguire JH & Alvar J. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. 2008, PLoS Negl. Trop. Dis 2, e313 (2008).
10. M, Garza. Projected future distributions of vectors of *Trypanosoma cruzi* in North America under climate change scenarios. 2014, PLoS Negl. Trop. Dis 8, e2818.
11. Gascon J, Bern C & Pinazo MJ. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. 2010, Acta Trop 115, 22–27.
12. D, Reiter P & Sprenger. The used tire trade: a mechanism for the worldwide dispersal of container breeding mosquitoes. 1987, J. Am. Mosq. Control Assoc 3, 494–501.
13. G, Rezza. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. . 2007, Lancet 370, 1840–1846 (2007).
14. Sadie J. Ryan, Colin J. Carlson ,Erin A. Mordecai, Leah R. Johnson. Global expansion and redistribution of Aedes-borne virus transmission risk with climate change. *PLOS*. 2019.
15. S, Bhatt. The effect of malaria control on *Plasmodium falciparum* in Africa between 2000 and 2015. *Nature*. 2015, Nature 526, 207–211 (2015).
16. JR, Franco. Monitoring the elimination of human African trypanosomiasis: update to 2014. 2017, PLoS Negl. Trop. Dis 11, e0005585 .
17. WHO. Investing to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases—Third WHO Report on Neglected Tropical Diseases 191 . 2015.

18. Morrison AC, Zielinski-Gutierrez E, Scott TW & Rosenberg R. Defining challenges and proposing solutions for control of the virus vector *Aedes aegypti*. 2008, PLoS Med 5, e68.
19. GF, Killeen. Characterizing, controlling and eliminating residual malaria transmission. . 2014, Malar. J 13, 330.
20. ΕΟΔΥ. <https://eody.gov.gr/disease/koynoyypia/>. [Ηλεκτρονικό] 2021.
21. Diaz, J.H.,. Chemical and Plant-Based Insect Repellents: Efficacy, Safety, and Toxicity. . 2016, Wilderness Environ Med, 2016. 27(1): p. 153-63.
22. Melanie Tavaresa, Márcio Robert Mattos da Silvaa, Luciana Betzler de Oliveira de Siqueiraa,. Trends in insect repellent formulations: A review. *International Journal of Pharmaceutics*. 2018.
23. Consulting, Nielsen. Epidemia de dengue e surgimento dos vírus Zika e Chikungunya impulsiona venda de repelentes. . 2016.
24. M, DeGennaro. The mysterious multi-modal repellency of DEET. 2015, Fly (Austin) 9, 45–51.
25. Costantini C, Badolo A, Ilboudo-Sanogo E. Field evaluation of the efficacy and persistence of insect repellents DEET, IR3535, and KBR 3023 against *Anopheles gambiae* complex and other Afrotropical vector mosquitoes. 2004, Trans. R Soc. Trop. Med. Hyg. 98, 644–652. (10.1016/j.trstmh.2003.12.015).
26. The Chemistry of Insect Repellents.
<https://www.compoundchem.com/2014/07/14/insectrepellents/>. [Ηλεκτρονικό]
27. McCabe ET, Barthel WF, Gertler SI, and Hall SA. Insect Repellents. III. N, N-diethylamides. 1954, J. Org. Chem 19, 493–498.
28. Tawatsin A, Thavara U, Chansang U, Chavalittumrong P, Boonruad T, Wongsinkongman P, Bansidhi J, and Mulla MS. Field evaluation of deet, Repel Care, and three plant based essential oil repellents against mosquitoes, black flies (Diptera: Simuliidae) and land leeches (Arhynchobdellida: Haemadipsidae) in Thailand. 2006, J Am Mosq Control Assoc 22, 306–313.
29. Evans SR, Korch GW Jr., and Lawson MA. Comparative field evaluation of permethrin and deet-treated military uniforms for personal protection against ticks (Acari). 1990, J Med Entomol 27, 829–834.
30. Bernier UR, Furman KD, Kline DL, Allan SA, and Barnard DR. Comparison of contact and spatial repellency of catnip oil and N,N-diethyl-3-methylbenzamide (deet) against mosquitoes. . 2005, J Med Entomol 42, 306–311.
31. Thavara U, Tawatsin A, Chompoosri J, Suwonkerd W, Chansang UR, and Asavadachanukorn P. Laboratory and field evaluations of the insect repellent 3535 (ethyl butylacetylaminopropionate) and deet against mosquito vectors in Thailand. 2001, J Am Mosq Control Assoc 17, 190–195.
32. Emily J. Dennis, 1,5 Olivia V. Goldman,1 and Leslie B. Vosshall. *Aedes aegypti* mosquitoes use their legs to sense DEET on contact. 2019, Curr Biol. 2019 May 6; 29(9): 1551–1556.e5.

33. Bloomquist, Daniel R Swale Jeffrey R. Is DEET a dangerous neurotoxicant? 2019, Volume75, Issue8 p. 2068-02070.
34. Corbel V, Stankiewicz M, Pennetier C, Fournier D, Stojan J, Girard E. Evidence for inhibition of cholinesterases in insect and mammalian nervous systems by the insect repellent deet. 2009, BMC Biol 7: 47 (2009).
35. Wille T, Thiermann H and Worek F. In vitro kinetic interactions of DEET, pyridostigmine and organophosphorus pesticides with human cholinesterases. 2011, Chem Biol Interact 190: 79– 83 (2011).
36. Swale DR, Sun B, Tong F and Bloomquist JR. Neurotoxicity and mode of action of N,N-diethyl-meta-toluamide (DEET). . 2014, PLoS One 9:e103713 (2014).
37. Siler W. Is DEET safe? Outside. . 2018.
38. Heid M. DEET is the most effective bug spray. But is it safe? . *Time*. 2018.
39. Berenson AB, Trinh HN, Hirth JM, Guo F, Fuchs EL and Weaver SC. Knowledge and prevention practices among U.S. pregnant immigrants from Zika virus outbreak areas. 2017, Am J Trop Med Hyg 97: 155– 162.
40. McGready R, Hamilton KA, Simpson JA, Cho T, Luxemburger C, Edwards. Safety of the insect repellent N,N-diethyl-m-toluamide (DEET) in pregnancy. . 2001, Am J Trop Med Hyg 65: 285– 289.
41. Mutebi J-P, Hawley WA, and Brogdon WG. Protection against Mosquitoes, Ticks, and other Arthropods. Traveler's Health. The Pretravel Consultation. 2019.
42. *Agency for Toxic Substances and Disease Registry, DEET, 3. Health Effects,*.
43. B, Tice R and Brevard. N,N-Diethyl-m-toluamide (DEET) [134-62-3] Review of Toxicological Literature. 1999.
44. Nina M. Stanczyk, John F. Y. Brookfield, Linda M. Field, James G. Logan. Aedes aegypti Mosquitoes Exhibit Decreased Repellency by DEET following Previous Exposure. *Plos One*. 2013.
45. Quoc-Bao D. Nguyen, M.D., Mai-Anh N. Vu, Adelaide A. Hebert, M.D. Insect Repellents: An Updated Review for the Clinician. *Journal of the American Academy of Dermatology*. doi: <https://doi.org/10.1016/>, 2018.
46. Merck, R3535, Technical Material. Interim Specification Who/Is/Tc/667/2001, P. 1-15, 2001.
47. <https://mosquitmed.com/deeper-look-into-icaridin/>.
<https://mosquitmed.com/deeper-look-into-icaridin/>. [Ηλεκτρονικό]
48. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/N_N-Diethyl-2-phenylacetamide.
[Ηλεκτρονικό]
49. Moore, Marta Ferreira Maia & Sarah J. Plant-based insect repellents: a review of their efficacy, development and testing. *Malaria Journal*. 2011.

50. António B. Mapossa^{1, 2*}, Walter W. Focke^{1,2}, Robert K. Tewo³. Mosquito-repellent controlled-release formulations for fighting infectious diseases. *Mapossa et al. Malar J* (2021) 20:165 .
51. Hsieh, W.C., Chang, C.P., Gao, Y.L.,. Controlled release properties of Chitosan encapsulated volatile Citronella Oil microcapsules by thermal treatments. *Colloids*. 2006. .
52. Solomon, B., Sahle, F.F., Gebre-Mariam, T., Asres, K., Neubert, R.H.H.,. Microencapsulation of citronella oil for mosquito-repellent application: Formulation and in vitro permeation studies. . *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 80, 61–66. 2012.
53. Becky Fankhauser, corresponding author Pascal Dumont, James S Hunter, III, John W McCall, Christian Kaufmann, Alexander Mathis, David R Young, Scott P Carroll, Scott McCall, S Theodore Chester, and Mark D Soll. Repellent and insecticidal efficacy of a new combination of fipronil and permethrin against three mosquito species (*Aedes albopictus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*) on dogs. *Parasit Vectors*. . 10.1186/s13071-015-0691-y, 2015.
54. Meigen, J. W. (1818). *Systematische Beschreibung der Bekannten Europäischen Zweiflügeligen Insekten Vol. 1. Forstmann, Aachen, 332 pp.*
55. A. Domingos, R. Pinheiro-Silva, J. Couto, V. do Rosário, J. de la Fuente. The *Anopheles gambiae* transcriptome – a turning point for malaria control. *Insect Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1111/imb.12289>, 2017.
56. Margaret A. Phillips, Jeremy N. Burrows, Christine Manyando, Rob Hooft van Huijsduijnen, Wesley C. Van Voorhis & Timothy N. C. Wells. Malaria. *nature*. 2017, Τόμ. 17050 (2017) .
57. Ralph E. Harbach, Department of Life Sciences, Natural History Museum, London, UK.
58. Ε.Ο.Δ.Υ., Ετήσια Έκθεση 2021. Ετήσια έκθεση επιδημιολογικής επιτήρησης ελονοσίας, Ελλάδα, έτος 2021. *Ε.Ο.Δ.Υ., Ετήσια Έκθεση 2021*.
59. <https://gr.dreamstime.com/%CE%BA%CF%8D%CE%BA%CE%BB%CE%BF%CF%82-%CE%B6%CF%89%CE%AE%CF%82-%CE%B5%CE%BD%CF%8C%CF%82-%CF%80%CE%B1%CF%81%CE%B1%CF%83%CE%AF%CF%84%CE%BF%CF%85-%CE%B5%CE%BB%CE%BF%CE%BD%CE%BF%CF%83%CE%AF%CE%B1%CF%82-image122308107>. [Ηλεκτρονικό]
60. Ferdinand Nanfack Minkeu, Kenneth D Vernick. A Systematic Review of the Natural Virome of *Anopheles* Mosquitoes. *PMC*. 2018 Apr 25;10(5):222. doi: 10.3390/v10050222., 2018.
61. Joanna M. Reinhold, 1 Claudio R. Lazzari, 2 and Chloé Lahondère^{1,*}. Effects of the Environmental Temperature on *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* Mosquitoes: A Review. *Insects*. 2018 Nov 6. doi: 10.3390/insects9040158, 2018.
62. Giovanni Benelli 1, André B B Wilke 2, John C Beier 2. *Aedes albopictus* (Asian Tiger Mosquito). *Trends Parasitol.* 10.1016/j.pt.2020.01.001, 2020.
63. F. Guidobaldi, , I.J. May-Concha, P.G. Guerenstein. Morphology and physiology of the olfactory system of blood-feeding insects. *Journal of Physiology*. 2014.

64. McMeniman, Conor J. *Genetic Control of Malaria and Dengue*.
65. Madelien Wooding¹, Yvette Naudé¹, Egmont Rohwer¹ and Marc Bouwer^{2*}. Controlling mosquitoes with semiochemicals: a review. *Wooding et al. Parasites Vectors*. 2020, Τόμ. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-3960->.
66. Joel A. Butterwick¹, Josefina del Mármol^{1,3}, Kelly H. Kim^{2,3}, Martha A. Kahlson¹, Jackson A. Rogow¹, Thomas Walz² & Vanessa Ruta^{1*}. Cryo-EM structure of the insect olfactory receptor Orco. *Nature*. 2018, <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0420-8>.
67. Briand, Marine BruléMargot GlazChristine BelloirNicolas PoirierLucie MoitrierFabrice NeiersLoïc. Odorant Binding and Chemosensory Proteins. *Methods in Enzymology*, 2020. 2020.
68. Thomas Kröbera, Konstantinos Koussis, Martine Bourquin, Panagiota Tsitoura, Maria Konstantopoulou, Taiwo Sam Awolola, Francesca R.Danie, Huili Qiao, Paolo Pelosi, Kostas Iatrou, Patrick M.Guerin. Odorant-binding protein-based identification of natural spatial repellents for the African malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. Τόμ. Volume 96, May 2018, Pages 36-50.
69. C.Dickens, Jackson T.SparksJonathan D.BohbotJoseph. *Chapter Four - Olfactory Disruption: Toward Controlling Important Insect Vectors of Disease*. Volume 130, 2015, Pages 81-108.
70. Brito, N.F., M.F. Moreira, and A.C. Melo,. A look inside odorant-binding proteins in insect chemoreception. . *J Insect Physiol*, 2016. 95: p. 51-65.
71. Mastrobuoni, G., et al.,. A proteomic investigation of soluble olfactory proteins in *Anopheles gambiae*. . *PLoS One*, 2013. 8(11): p. e75162.
72. Mark Wogulis, Tania Morgan, Yuko Ishida, Walter S. Leal, David K. Wilson. The crystal structure of an odorant binding protein from *Anopheles gambiae*: Evidence for a common ligand release mechanism. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 339 (2006) 157–164.
73. Silvia Spinelli a, Amandine Lagarde a , Immacolata Iovinella b , Pierre Legrand c , Mariella Tegoni a , Paolo Pelosi b , Christian Camb. Crystal structure of *Apis mellifera* OBP14, a C-minus odorant-binding protein, and its complexes with odorant molecules . *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. Τόμ. Volume 42, Issue 1, January 2012, Pages 41-50.
74. Katerina E. Tsitsanou, ‡ Christina E. Drakou,‡ Trias Thireou,§ Anna Vitlin Gruber,¶ Georgia Kythreoti,|| Abdussalam Azem,¶ Dimitrios Fessas,** Elias Eliopoulos,§ Kostas Iatrou,|| and Spyros E. Zographos‡,1. Crystal and Solution Studies of the “Plus-C” Odorant-binding Protein 48 from *Anopheles gambiae*. Τόμ. *J Biol Chem*. 2013 Nov 15; 288(46): 33427–33438.
75. Nathália F. Brito¹ & Daniele S. Oliveira¹ & Thaisa C. Santos¹ & Monica F. Moreira^{1, 2} & Ana Claudia A. Melo^{1,2}. Current and potential biotechnological applications of odorant-binding proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 26 August 2020.
76. Biessmann, H., et al.,. Microarray-based survey of a subset of putative olfactory genes in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Insect Molecular Biology*, 2005. 14(6): p. 575-589.

77. Biessmann H, Andronopoulou E, Biessmann MR, Douris V, Dimitratos SD, Eliopoulos E, Guerin PM, Iatrou K, Justice RW, Krober T, Marinotti O, Tsitoura P, Woods DF, Walter MF. The *Anopheles gambiae* odorant binding protein 1 (AgamOBP1) mediates indole recognition in the antennae of female mosquitoes. 2010, Τόμ. PLoS ONE 5(3):e9471. doi:10.1371/Journal.Pone.0009471.
78. K. E. Tsitsanou, T. Thireou, C. E. Drakou, K. Koussis, M. V. Keramioti, D. D. Leonidas, E. Eliopoulos, K. Iatrou & S. E. Zographos. *Anopheles gambiae* odorant binding protein crystal complex with the synthetic repellent DEET: implications for structure-based design of novel mosquito repellents. 2012, Τόμ. Cellular and Molecular Life Sciences volume 69, pages283–297 (2012).
79. Zographos, Christina E. Drakou¹ • Katerina E. Tsitsanou¹ • Constantinos Potamitis Dimitrios Fessas² • Maria Zervou¹ • Spyros E. The crystal structure of the AgamOBP1•Icaridin complex reveals alternative binding modes and stereo-selective repellent recognition. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2016, DOI 10.1007/s00018-016-2335-6.
80. E Andronopoulou ¹, V Labropoulou, V Douris, D F Woods, H Biessmann, K Iatrou. Specific interactions among odorant-binding proteins of the African malaria vector *Anopheles gambiae*. Τόμ. *Insect Mol Biol* 2006.
81. Foteini Davrazou, ‡,1 Emily Dong,‡,1 Emma J. Murphy,‡ Hannah T. Johnson,‡ and David N. M. Jones‡§,2. New Insights into the Mechanism of Odorant Detection by the Malaria-transmitting Mosquito *Anopheles gambiae**An external file that holds a picture, illustration, etc. *J Biol Chem.* 2011 Sep 30; 286(39): 34175–34183.
82. Huili Qiao ¹, Xiaoli He, Danuta Schymura, Liping Ban, Linda Field, Francesca Romana Dani, Elena Michelucci, Beniamino Caputo, Alessandra della Torre, Kostas Iatrou, Jing-Jiang Zhou, Jürgen Krieger, Paolo Pelosi. Cooperative interactions between odorant-binding proteins of *Anopheles gambiae*. *Cell Mol Life Sci.* 2011, Τόμ. 10.1007/s00018-010-0539-8.
83. Carla Gentile, ¹ Gustavo Bueno da S Rivas, ¹ José BP Lima, ² , ³ , ⁴ Rafaela Vieira Bruno, ¹ , ² , + and Alexandre Afranio Peixoto. Circadian clock of *Aedes aegypti*: effects of blood-feeding, insemination and RNA interference. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013 Dec; 108(Suppl 1): 80–87.
84. Samuel SC Rund, James E Gentile & Giles E Duffield. Extensive circadian and light regulation of the transcriptome in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *BMC Genomics* volume 14, Article number: 218 (2013).
85. Chunxiao Li, Ting Yan, Yande Dong, Tongyan Zhao. Identification and Quantitative Analysis of Genes Encoding Odorant Binding Proteins in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) . *Journal of Medical Entomology*, Volume 49, Issue 3, 1 May 2012, Pages 573–580, <https://doi.org/10.1603/ME11239>.
86. ΝΜ., ΓΛΥΚΟΣ. ΜΙΑ ΜΗ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΑ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ.
87. J., Lima-de-Faria. *Historic atlas of Crystallography.* Kluwer Academic. 1990.
88. Blundell TLJ, L. N. και . *Protein Crystallography.* Academic Press. 1976.
89. McPherson A, Gavira JA. Introduction to protein crystallization. . *Acta crystallographica Section F, Structural biology communications.* 2014;70(Pt 1):2-20.

90. Irene Russo Krauss, ORCID logo ab Giarita Ferraro, ORCID logo a Andrea Pica, ORCID logo c José A. Márquez, ORCID logo c John R. Helliwell ORCID logo d and Antonello Merlino. Principles and methods used to grow and optimize crystals of protein–metallo drug adducts, to determine metal binding sites and to assign metal ligands. *Metallomics*. Τόμ. Issue 11, 2017.
91. Chayen NE, Saridakis E. Protein crystallization: from purified protein to diffraction-quality crystal. . *Nature methods*. 2008;5(2):147-53.
92. Russo Krauss I, Merlino A, Vergara A, Sica F. An overview of biological macromolecule crystallization. *International journal of molecular sciences*. 2013;14(6):11643-91.
93. J., McMurry. *Οργανική Χημεία Τόμοι I & II*. . s.l. : Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης. 2001.
94. Rosenberger FH, S. B., και συν. Temperature dependence of protein solubility — determination and application to crystallization in X-ray capillaries. . *Journal of Crystal Growth*. 1993;129(1-2):1-12.
95. Chernov AAK, H. και . Principles of crystal growth in protein crystallization, in Science and Technology of Crystal Growth (van der Eerden, J. P. and Bruinsma, O. S. L., eds.). . *Kluwer Academic*. 1995:329–53.
96. Dumetz AC, Chockla AM, Kaler EW, Lenhoff AM. Effects of pH on protein-protein interactions and implications for protein phase behavior. . *Biochimica et biophysica acta*. 2008;1784(4):600-10.
97. Kantardjieff KA, Rupp B. Protein isoelectric point as a predictor for increased crystallization screening efficiency. *Bioinformatics*. 2004;20(14):2162-8.
98. In:; McPherson A. Methods in Enzymology. Wyckoff H W, Hirs C H W, Timasheff S N, editors. Orlando, FL : Academic. 1985;114:120-5.
99. A., McPherson. Preparation and analysis of protein crystals. . *Krieger Publishing*. 1982:1-51.
100. Zhang YC, P. S. και . Interactions between macromolecules and ions: The Hofmeister series. . *Current Opinion in Chemical Biology*. 2006;10(6):658-63.
101. Gros PG, H., και συν. Experiments in membrane protein crystallization. *Journal of Crystal Growth*. 1988;90(1-3):193-200.
102. Watson AA, O'Callaghan CA. Crystallization and X-ray diffraction analysis of human CLEC-2. *Acta crystallographica Section F, Structural biology and crystallization communications*. 2005;61(Pt 12):1094-6.
103. A., McPherson. Crystallization of Biological Macromolecules. . *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. 1999.
104. TE., Bergfors. Protein Crystallization. . *International University Line*, 2009. 2009.
105. Benvenuti M, Mangani S. Crystallization of soluble proteins in vapor diffusion for x-ray crystallography. . *Nature protocols*. 2007;2(7):1633-51.

106. Whon TWL, Y. H., και συν. A simple technique to convert sitting-drop vapor diffusion into hanging-drop vapor diffusion by solidifying the reservoir solution with agarose. *Journal of Applied Crystallography*. 2009;42:975-6.
107. Korczynska J, Hu TC, Smith DK, Jenkins J, Lewis R, Edwards T, et al. Microscale vapour diffusion for protein crystallization. . *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography*. 2007;63(Pt 9):1009-15.
108. <https://thebumblingbiochemist.com/365-days-of-science/vapor-diffusion-crystallization-theory-practice/>. [Ηλεκτρονικό]
109. Chayen NESS, P. D., και συν. An automated system for micro-batch protein crystallization and screening. . *Journal of Applied Crystallography*. 1990;23(4):297-302.
110. Brumshtein BG, H. M., και συν. Control of the rate of evaporation in protein crystallization by the 'microbatch under oil' method. *J Appl Crystallogr*. 2008;41(5):969-71.
111. D'Arcy AMS, A., και συν. The advantages of using a modified microbatch method for rapid screening of protein crystallization conditions. . *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2003;59(2):369-99.
112. Irene Russo Krauss 1ORCID, Antonello Merlino 1,2ORCID,Alessandro Vergara 1,2 andFilomena Sica 1,2,* . An Overview of Biological Macromolecule Crystallization. *Int. J. Mol. Sci*. 2013, 14(6), 11643-11691; <https://doi.org/10.3390/ijms140611643>.
113. Rosenberger FM, E. J. και . Control of nucleation and growth in protein crystal growth. *Journal of Crystal Growth*. 1988;90(1-3):74-8.
114. T., Bergfors. Seeds to crystals. . *Journal of structural biology*. 2003;142(1):66-76.
115. M.IslamabYutakaKurodaa, Mohammad. A hetero-micro-seeding strategy for readily crystallizing closely related protein variants. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.08.161>. 2017.
116. Buttner FM, Renner-Schneck M, Stehle T. X-ray crystallography and its impact on understanding bacterial cell wall remodeling processes. . *International journal of medical microbiology : IJMM*. 2015;305(2):209-16.
117. Lattman EEL, P. J. Protein Crystallography. . *The John Hopkins Univesity Press*. 2008.
118. B., Rupp. Biomolecular Crystallography. . *Garland Science Taylor & Frncis Group, LLC* 2010.
119. Dazzling, Sumner T. history. . *Science*. 2014;343(6175):1092-3.
120. G., Rhodes. Crystallography Made Crystal Clear. (*Academic Press*). 1999.
121. Helliwell JR, Helliwell M, Jones RH. Abinitio structure determination using dispersive differences from multiple-wavelength synchrotron-radiation powder diffraction data. *Acta crystallographica Section A, Foundations of crystallography*. 2005;61(Pt 6):568-.
122. Wlodawer A, Minor W, Dauter Z, Jaskolski M. Protein crystallography for non-crystallographers, or how to get the best (but not more) from published macromolecular structures. . *The FEBS journal*. 2008;275(1):1-21.

123. A., McPherson. Introduction to MACROMOLECULAR CRYSTALLOGRAPHY. . Wiley-Blackwell: USA. 2009;2nd Edition.
124. Lubert, Berg Jeremy / Tymoczko John / Stryer. *Βιοχημεία*. s.l. : Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης. 9605241900.
125. Michael T. Madigan. *Βιολογία των μικροοργανισμών*. s.l. : Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης. ISBN-13: 9789605242008.
126. <https://www.addgene.org/12651/>. [Ηλεκτρονικό]
127. Mehrnoosh Fathi-Roudsari, 1,* Asal Akhavian-Tehrani,1 and Nader Maghsoudi2,* . *Comparison of Three Escherichia coli Strains in Recombinant Production of Reteplase*. s.l. : Avicenna J Med Biotechnol. 2016 Jan-Mar; 8(1): 16–22.
128. Maxim Kostylev, # 1 , * Anne E. Otwell, # 2 Ruth E. Richardson, 3 and Yo Suzuki 1 , * . *Cloning Should Be Simple: Escherichia coli DH5α-Mediated Assembly of Multiple DNA Fragments with Short End Homologies*. s.l. : PLoS One. 2015; 10(9): e0137466.
129. Pedro Jacquez, 1 Ningjing Lei,1 David Weigt,1 Chuan Xiao,2 and Jianjun Sun1,* . *Expression and purification of the functional ectodomain of human anthrax toxin receptor 2 in E. coli Origami B cells with assistance of bacterial Trigger Factor*. *Protein Expr Purif*. 2014 Mar; 95: 149–155.
130. Novagen. Overview, Competent Cells. <http://wolfson.huji.ac.il/expression/procedures/bacterial/novagen-CompCells.pdf>. [Ηλεκτρονικό] 2002-2003.
131. Arber, Werner. *Host-Controlled Modification of Bacteriophage*. s.l. : Vol. 19:365-378 (Volume publication date October 1965).
132. Richard J. Roberts, a Marlene Belfort,1 Timothy Bestor,2 Ashok S. Bhagwat,3 Thomas A. Bickle,4 Jurate Bitinaite, Robert M. Blumenthal,5 Sergey Kh. Degtyarev,6 David T. F. Dryden,7 Kevin Dybvig,8 Keith Firman,9 Elizaveta S. Gromova,10 Richard I. Gumpert,11. *SURVEY AND SUMMARY: A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes*. Τόμ. Nucleic Acids Res. 2003 Apr 1; 31(7): 1805–1812.
133. Robert J. Watson, Ira Schildkraut+, B.-Q. Qiang+, Stan M. Martin* and Louis P. Visentin*. *NdeI: a restriction endonuclease from Neisseria denitrificans which cleaves DNA at 5 ‘-CATATG-3 ‘ sequences* . *FEBS LETTERS* . 1982.
134. <https://www.nzytech.com/products-services/molecular-biology/restriction-enzymes/conventional/mb074/>. [Ηλεκτρονικό]
135. Tipper, D J. Mode of action of beta-lactam antibiotics. *Pharmacol Ther*. 1985.
136. UPTON, JOSEPH P. STANKEWICH AND RONALD P. Turbidimetric Bioassay for Carbenicillin. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, Mar. 1973, p. 364-368 .
137. MORTON NELSON, MD, MPH. Carbenicillin in the Treatment of Gonorrhea in Males. October 1972, Vol. 87, No. 8 763.

138. Sumantha Salian, a Tanja Matt, b Rashid Akbergenov, b Shinde Harish, a Martin Meyer, b Stefan Duscha, b Dmitri Shcherbakov, b Bruno B. Bernet, a Andrea Vasella, a Eric Westhof, c and Erik C. Böttger corresponding author b. Structure-Activity Relationships among the Kanamycin Aminoglycosides: Role of Ring I Hydroxyl and Amino Groups. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Dec; 56(12): 6104–6108.
139. Ian Chopra¹ and Marilyn Roberts², *. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2001 Jun; 65(2): 232–260.
140. Griffith, Fred. The Significance of Pneumococcal Types. *J Hyg (Lond).* 1928 Jan; 27(2): 113–159.
141. Maral Rahimzadeh, ¹ Majid Sadeghizadeh, ², * Farhood Najafi, ³ Seyed Arab, ⁴ and Hamid Mobasheri⁵. Impact of heat shock step on bacterial transformation efficiency. *Mol Biol Res Commun.* 2016 Dec; 5(4): 257–261.
142. Hall, Alexandrine Froger and James E. Transformation of Plasmid DNA into E. coli Using the Heat Shock Method. *J Vis Exp.* 2007; (6): 253.
143. <https://www.thermofisher.com/gr/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/molecular-cloning/transformation/competent-cell-basics.html>. [Ηλεκτρονικό]
144. Panagiota G.V. Liggri¹, ², Katerina E. Tsitsanou¹, Evgenia C.V. Stamati^{1,2}, Francesca Saitta³, Christina E. Drakou¹, Demetres D. Leonidas², Dimitrios Fessas³ and Spyros E. Zographos*,. The structure of AgamOBP5 in complex with the natural insect repellents Carvacrol and Thymol: Crystallographic, fluorescence and thermodynamic binding studies. *υποβληθείσα Cellular and Molecular Life Sciences.* 2022.
145. Lewis, Charles E. Bell & Mitchell. A closer view of the conformation of the Lac repressor bound to operator. *Nature Structural Biology* volume 7, pages 209–214 (2000).
146. Lewin, Benjamin. *GENES*. ISBN: 960-88412-0-8.
147. Singhal, Jayaranjan R. Kar and Rekha S. Investigations on ideal mode of cell disruption in extremely halophilic *Actinopolyspora halophila* (MTCC 263) for efficient release of glycine betaine and trehalose. *Biotechnol Rep (Amst).* 2015 Mar; 5: 89–97.
148. Ludmil Benov ¹, Jameela Al-Ibraheem. Disrupting *Escherichia coli*: a comparison of methods. *J Biochem Mol Biol.*
149. D.Kumar. *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)*. Volume 2, 2011, Pages 765-784.
150. Tangboriboon, Nuchnapa. Removal of water extractable proteins from concentrated natural rubber latex by eggshells. *May 2013 Journal of Elastomers and Plastics* 45(3):253-269.
151. <https://www.marshallscientific.com/GE-AKTA-Purifier-10-FPLC-System-p/ak-p10.htm>. [Ηλεκτρονικό]

152. Neil J. Oldham, Jürgen Krieger, Heinz Breer, Aleš Svatoš. Detection and Removal of an Artefact Fatty Acid from the Binding Site of Recombinant *Bombyx mori* Pheromone-binding Protein. *Chemical Senses*, Volume 26, Issue 5, June 2001, Pages 529–531,.
153. He, Fanglian. Laemmli-SDS-PAGE. *Vol 1, Iss 11, Jun 5, 2011*.
154. BRADFORD, MARION M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding . *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY* 72, 248-254 (1976).
155. Χριστίνα, Δράκου Ε. Δομική και Βιοχημική Μελέτη των Πρωτεϊνών Δέσμευσης Οσφρητικών Μορίων (Odorant Binding Protein, OBP) του Ανωφελή Κώνωπα (*Anopheles gambiae*). Διδακτορική διατριβή. 2017.
156. Bacteria Expression Systems. <https://theory.labster.com/bacteria-expression-systems/>. [Ηλεκτρονικό]
157. Vikalo, Haris. Limits of Performance of Quantitative Polymerase Chain Reaction Systems. *March 2010IEEE Transactions on Information Theory* 56(2).
158. Sambrook, Michael R. Green and Joseph. Precipitation of DNA with Ethanol. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. 2016.
159. <https://agctsequencing.wordpress.com/tag/sanger-sequencing/page/2/>. [Ηλεκτρονικό]
160. https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%91%CE%BB%CF%85%CF%83%CE%B9%CE%B4%CF%89%CF%84%CE%AE_%CE%B1%CE%BD%CF%84%CE%AF%CE%B4%CF%81%CE%B1%CF%83%CE%B7_%CF%80%CE%BF%CE%BB%CF%85%CE%BC%CE%B5%CF%81%CE%AC%CF%83%CE%B7%CF%82. [Ηλεκτρονικό]
161. V Campanacci 1, J Krieger, S Bette, J N Sturgis, A Lartigue, C Cambillau, H Breer, M Tegoni. Revisiting the specificity of *Mamestra brassicae* and *Antheraea polyphemus* pheromone-binding proteins with a fluorescence binding assay. *J Biol Chem*.
162. Eftichia Kritsi, Panagiota G.V. Liggri, Evgenia C.V. Stamati, Katerina E. Tsitsanou, Spyros E. Zographos, Antonios Michaelakis, Dimitrios Papachristos, and Panagiotis Zoumpoulakis. A Combined Computational Methodology for the Discovery of Hit Compounds with Putative Insect Repellency Properties. *ChemMedChem* 2022, e202200271.
163. W., Kabsch. XDS. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2010 Feb;66(Pt 2):125-32. doi: 10.1107/S0907444909047337. Epub 2010 Jan 22.
164. P, Evans. Scaling and assessment of data quality. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography*. 2006;62(Pt 1):72-82.
165. COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT, N., The CCP4 suite: programs for protein crystallography. . *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 1994. 50(Pt 5): p. 760-3.
166. Vagin A, Teplyakov A. Molecular replacement with MOLREP. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2010 Jan;66(Pt 1):22-5. doi: 10.1107/S0907444909042589. Epub 2009 Dec 21.

167. French, S. and K. Wilson,. Treatment of Negative Intensity Observations. . *Acta Crystallographica Section A*, 1978. 34(Jul): p. 517-525.
168. Emsley P, Cowtan K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2004 Dec;60(Pt 12 Pt 1):2126-32. doi: 10.1107/S0907444904019158. Epub 2004 Nov 26.
169. Lebedev AA, Young P, Isupov MN, Moroz OV, Vagin AA, Murshudov GN. Jligand: a graphical tool for the CCP4 template-restraint library. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2012 Apr;68(Pt 4):431-40. doi: 10.1107/S090744491200251X. Epub 2012 Mar 17.
170. Emsley, P. and K. Cowtan,. Coot: model-building tools for molecular graphics. . *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, 2004. 60: p. 2126-2132.
171. Williams CJ, Headd JJ, Moriarty NW, Prisant MG, Videau LL, Deis LN, Verma V, Keedy DA, Hintze BJ, Chen VB, Jain S, Lewis SM, Arendall WB 3rd, Snoeyink J, Adams PD, Lovell SC, Richardson JS, Richardson D. MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation. *Protein Sci*. 2018 Jan;27(1):293-315. doi: 10.1002/pro.3330. Epub 2017 Nov 27.
172. Joosten RP, Joosten K, Murshudov GN, Perrakis A. PDB_REDO: constructive validation, more than just looking for errors. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2012 Apr;68(Pt 4):484-96. doi: 10.1107/S0907444911054515. Epub 2012 Mar 16.
173. Tian W, Chen C, Lei X, Zhao J, Liang J. CASTp 3.0: computed atlas of surface topography of proteins. *Nucleic Acids Res*. 2018 Jul 2;46(W1):W363-W367. doi: 10.1093/nar/gky473.
174. Schüttelkopf AW, van Aalten DM. PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2004 Aug;60(Pt 8):1355-63. doi: 10.1107/S0907444904011679. Epub 2004 Jul 21.
175. Privalov, P L. Intermediate states in protein folding. *J Mol Biol*. 1996.
176. P L Privalov, S A Potekhin. Scanning microcalorimetry in studying temperature-induced changes in proteins. *Methods Enzymol*. 1986.
177. Bates J, Stanton H, Cannings-John R, Thomas KS, Leighton P, Howells LM, Rodrigues J, Howes R, Collier F, Harris C, Gibbons A, Thomas-Jones E, Hood K, Ingram JR. Treatment of Hidradenitis Suppurativa Evaluation Study (THESEUS): protocol for a prospective cohort study. *BMJ Open*. 2022 Apr 21;12(4):e060815. doi: 10.1136/bmjopen-2022-060815.
178. Ana Lourenço 1, Russell Thomas 2, Hugo Bouchard 2, Andrzej Kacperek 3, Vladimir Vondracek 4, Gary Royle 5, Hugo Palmans 6. Experimental and Monte Carlo studies of fluence corrections for graphite calorimetry in low- and high-energy clinical proton beams. *Med Phys*.
179. Evergetis, E., Bellini, R., Balatsos, G., Michaelakis, A., Carrieri, M., Veronesi, R., Papachristos, D. P., Puggioli, A., Kapsaski-Kanelli, V.-N., and Haroutounian, S. A. From bio-prospecting to field assessment: the case of carvacrol rich essential oil as a potent mosquito larvicidal and repellent agent. *Front. Ecol. Evol*. 6, 204. 2018.
180. Gunathilaka, N., Ranathunge, T., Udayanga, L., and Abeyewickreme, W. Efficacy of blood sources and artificial blood feeding methods in rearing of *Aedes aegypti* (Diptera:

Culicidae) for sterile insect technique and incompatible insect technique approaches in Sri Lanka. . *Biomed. Res.Int.* 2017, 3196924. 2017.

181. Giatropoulos A, Papachristos DP, Kimbaris A, Koliopoulos G, Polissiou MG, Emmanouel N, Michaelakis A. Evaluation of bioefficacy of three Citrus essential oils against the dengue vector *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in correlation to their components enantiomeric distribution. . *Parasitol Res* 111:2253–2263. 2012.

182. Mustapha Debboun, Stephen P. Frances, Daniel Strickman. *Insect Repellents. Principles, Methods, and Uses.* Book ISBN9780429123382.

183. Kruskal WH, Wallis WA. Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. *J Am Stat Assoc.* 1952;47:583-621.

184. Mann HB, Whitney DR. On a Test of Whether One of 2 Random Variables Is Stochastically Larger Than the Other. *Ann Math Stat.* 1947;18:50-60.

185. Leal, Zainulabeuddin Syed and Walter S. Mosquitoes smell and avoid the insect repellent DEET. 2008.

186. Trias Thireou 1, Georgia Kythreoti 2, Katerina E Tsitsanou 3, Konstantinos Koussis 2, Christina E Drakou 3, Julie Kinnersley 4, Thomas Kröber 5, Patrick M Guerin 5, Jing-Jiang Zhou 4, Kostas Iatrou 2, Elias Eliopoulos 1, Spyros E Zographos 6. Identification of novel bioinspired synthetic mosquito repellents by combined ligand-based screening and OBP-structure-based molecular docking. *Insect Biochem Mol Biol.* 2018, Τόμ. DOI: 10.1016/j.ibmb.2018.05.001.

187. Panagiota G.V. Liggri^{1, 5}, Alfonso Pérez-Garrido², Katerina E. Tsitsanou¹, K.V. Dileep³ Antonios Michaelakis⁴, Dimitrios P. Papachristos⁴, Horacio Pérez-Sánchez^{2*}, Spyros E. Zographos^{1*}. 2D finger-printing and molecular docking studies identified potent mosquito repellents targeting Odorant Binding Protein 1. *υποβληθείσα Insect Biochemistry and Molecular Biology.*

188. Jing Wang, 1 Emma J. Murphy,^{1,4} Jay C. Nix,³ and David N. M. Jones^{corresponding author}^{1,2}. *Aedes aegypti* Odorant Binding Protein 22 selectively binds fatty acids through a conformational change in its C-terminal tail. *Scientific Reports* . 2020, Τόμ. 10.1038/s41598-020-60242-9.

189. Maria D.Chatzidaki, Sotiria Demisli, Eleni Zingkou, Panagiota G.V.Liggri, Dimitrios P.Papachristos, George Balatsos, Vasilios Karras, Frédéric Nallette, Antonios Michaelakis, Georgia Sotiropoulou, Spyros E.Zographos, VassilikiPapadimitriou. Essential oil-in-water microemulsions for topical application: structural study, cytotoxic effect and insect repelling activity. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.* 2022, Τόμ. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2022.130159>.

190. Evgenia C.V. Stamati. Development of plant based insect repellents based on the essential oils of the plant's families Asteraceae and Lamiaceae: selection of plant species based on the chemotype and biochemical binding studies of essential oils on selected. *MSc. Thesis, University of Thessaly, 2020.* <http://dx.doi.org/10.26253/heal.uth.9595>.

191. Rund, S. S., Gentile, J. E. & Duffield, G. E. (2013). BMC Genomics 14, 218.

192. Drakou, C. E., Tsitsanou, K. E., Potamitis, C., Fessas, D., Zervou, M. & Zographos, S. E. (2017). *Cell Mol Life Sci* 74, 319-338.
193. Kröber, T., Koussis, K., Bourquina, M., Tsitoura, P., Konstantopoulou, M., Awolola, T. S., Danie, F. R., Qiao, H., Pelosi, P., Iatrou, K. & Guerin, P. M. (2018). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 96, 36-50.
194. Tan, Alvin Kah-Wei Hee & Keng-Hong. Male Sex Pheromonal Components Derived from Methyl Eugenol in the Hemolymph of the Fruit Fly *Bactrocera papayae*. *Journal of Chemical Ecology*, 2004.