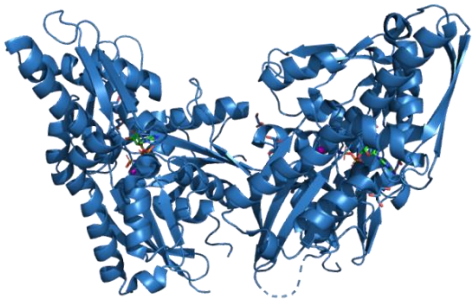
ΤΜΗΜΑ
Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Βιοχημικές και κρυσταλλογραφικές μελέτες ενζύμων του πλασμωδίου (Plasmodium falciparum) για ανάπτυξη ανθελονοσιακών φαρμάκων.



Μαρινίδης Σταύρος του Ζαφειρίου

Λάρισα 2024

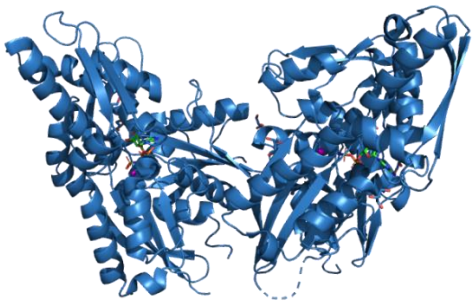
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

UNIVERSITY OF THESSALY

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY

DIPLOMA THESIS

Biochemical and crystallographic studies on plasmodial (Plasmodium falciparum) enzymes aiming to develop antimalarial drugs.



Stavros Zafirios Marinidis

Larissa 2024

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

Θέμα διπλωματικής εργασίας

«Βιοχημικές και κρυσταλλογραφικές μελέτες ενζύμων του πλασμωδίου (Plasmodium falciparum) για ανάπτυξη ανθελονοσιακών φαρμάκων.»

Diploma Thesis

“Biochemical and crystallographic studies on plasmodial (Plasmodium falciparum) enzymes aiming to develop antimalarial drugs.”

Ονοματεπώνυμο: Μαρινίδης Ζ. Σταύρος

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Καντσάδη Λ. Αναστασία

Εργαστήριο: Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Καντσάδη Αναστασία: Εντεταλμένη διδάσκουσα – Μεταδιδακτορική ερευνήτρια, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Λάρισα, Ελλάδα

Δημήτριος Λεωνίδας: Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Λάρισα, Ελλάδα

Νικόλαος Μπαλατσός: Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Λάρισα, Ελλάδα

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

Ευχαριστίες

Θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την Εντεταλμένη Διδάσκουσα Δρ. Αναστασία Καντσάδη, υπό την επίβλεψη της οποίας εκπονήθηκε η παρούσα διπλωματική εργασία από τον Νοέμβριο του 2023 μέχρι τον Ιούνιο του 2024. Η καθοδήγηση, η υποστήριξη και κυρίως, η εμπιστοσύνη της στις δυνατότητές μου, υπήρξε η πηγή ώθησης και συνέβαλε καίρια στην ολοκλήρωση της διπλωματικής. Πέρα από το πλαίσιο της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας, συνέβαλε με ενισχυτικό και ενεργητικό τρόπο, μέσω των γνώσεων που μου μετέδωσε, ώστε να αναπτύξω την επιστημονική μου σκέψη και να στραφώ σε ένα αντικείμενο που πραγματικά αγάπησα και θα ακολουθήσω στη μετέπειτα πορεία των σπουδών μου.

Στη συνέχεια, θέλω να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή Βιοχημείας του τμήματος, Δρ. Δημήτριο Δ. Λεωνίδα, ο οποίος με εμπιστεύθηκε αναθέτοντάς μου την εκπόνηση της πτυχιακής μου εργασίας στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας. Οι συμβουλές και η πολύπλευρη βοήθειά του κατά τη διάρκεια της παρούσας εργασίας ήταν πολύτιμες και θεωρώ πως χάρη σε αυτόν προσανατολίστηκα στον κλάδο της Δομικής Βιολογίας.

Επιπλέον, δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω, τον Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοχημείας Δρ. Νικόλαο Μπαλατσό, για τη συμβολή του στη διαμόρφωση των επιστημονικών ενδιαφερόντων μου, τόσο σε συμβουλευτικό επίπεδο όσο και μέσω των μεστών σε περιεχόμενο διαλέξεων του.

Η παρούσα διπλωματική εργασία θα είχε εξελιχθεί εντελώς διαφορετικά, χωρίς την απλόχερη βοήθεια που μου προσέφερε ο μεταδιδακτορικός ερευνητής Δρ. Γεώργιος Στραβοδήμος. Θα ήθελα λοιπόν να τον ευχαριστήσω από καρδιάς για την πρόθεσή του να απαντά σε κάθε μου ερώτηση και να με βοηθάει στις εργαστηριακές τεχνικές, μέσα από την πολυετή του εμπειρία.

Ένα τεράστιο ευχαριστώ οφείλω στους υποψήφιους διδάκτορες του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας και πολύ καλούς μου φίλους, Σεραφείμ Αλεξόπουλο και Αχιλλέα Γεωργαντόπουλο για την ανιδιοτελή τους ενθάρρυνση όλο αυτό το διάστημα. Η όρεξή και η διάθεσή τους να με συμβουλεύουν και να με βοηθούν με την εμπειρία τους κάθε στιγμή που τους είχα ανάγκη ήταν ιδιαίτερα σημαντική.

Ολοκληρώνοντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω βαθύτατα την οικογένεια μου για την ατελείωτη και αδιάκοπη στήριξη και εμπιστοσύνη απέναντι μου. Ειλικρινά τους οφείλω πολλά για ό,τι έχουν κάνει όλα αυτά τα χρόνια για εμένα.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη ..... **i**

Abstract ..... **ii**

Κεφάλαιο 1ο: Εισαγωγή **1**

1.1 Η ασθένεια της ελονοσίας (malaria) **1**

1.1.1 Ιστορικά στοιχεία για την ελονοσία 1

1.1.2 Επιδημιολογικά δεδομένα της ελονοσίας 2

1.1.3 Ο κύκλος ζωής του πλασμωδίου – η αιτία της νόσου 4

1.1.4 Επισκόπηση του *P. falciparum* σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο 6

1.2 Τρόποι – μέσα αντιμετώπισης της ασθένειας **8**

1.2.1 Θεραπευτικές προσεγγίσεις κατά της ελονοσίας μέχρι σήμερα 8

1.2.2 Κατευθυνόμενος από τη δομή σχεδιασμός φαρμάκων – Structure based drug design 13

1.2.3 Κατευθυνόμενος από τη δομή σχεδιασμός φαρμάκου κατά της ελονοσίας 17

1.3 Μοριακοί συνοδοί (molecular chaperones) **18**

1.3.1 Πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Heat shock proteins) 18

1.3.2 Αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών θερμικού σοκ 21

1.4 Μοριακοί συνοδοί (molecular chaperones) του *P. falciparum* και ανάπτυξη ανθελονοσιακών φαρμάκων **22**

1.5 Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων **26**

1.5.1 Αναστολή ενζυμικών αντιδράσεων 29

1.5.2 Η Τιμή IC_{50} 30

1.6 Κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ **31**

1.6.1 Πώς ορίζεται ο κρύσταλλος; 32

1.6.2 Ανάπτυξη κρυστάλλων 33

1.6.3 Ακτινοβολία Χ και περίθλαση κυμάτων 35

1.6.4 Ο νόμος του Bragg 36

1.6.5 Υπολογισμός του χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας 37

1.6.6 Βελτιστοποίηση του δομικού μοντέλου 38

1.6.7 Διάγραμμα Ramachandran 39

Κεφάλαιο 2ο: Σκοπός – Αντικείμενο μελέτης **40**

Κεφάλαιο 3ο: Υλικά και μέθοδοι **41**

3.1 Υλικά **41**

3.1.1 Αντιδραστήρια 41

3.1.2 Οργανολογία 42

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

3.1.3 Ένζυμα 42
3.1.4 Βακτηριακά στελέχη και πλασμίδια 42
3.1.5 Στήλες υγρής χρωματογραφίας 43
3.2 Μέθοδοι 43
3.2.1 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων 43
3.2.2 Παρασκευή υγρής καλλιέργειας και επαγωγή της έκφρασης με IPTG 45
3.2.3 Συλλογή των βακτηριακών κυττάρων και προετοιμασία για την απομόνωση της πρωτεΐνης 46
3.2.4 Χρωματογραφικός καθαρισμός της PfHsp70-x 47
3.2.4.1 Υγρή χρωματογραφία – Σύστημα FPLC 47
3.2.4.2 Χρωματογραφία συγγένειας 49
3.2.4.3 Διαπίδυση και πέψη της ετικέτας με την πρωτεάση 3C 50
3.2.4.4 Αντίστροφη στήλη αγχιστείας 51
3.2.4.5 Χρωματογραφία μοριακής διήθησης (Size exclusion chromatography - SEC) 51
3.2.5 Χρωματογραφικός καθαρισμός της περιοχής πρόσδεσης νουκλεοτιδίων (nucleotide binding domain–NBD) της PfHsp70-x 53
3.2.6 Χρωματογραφικός καθαρισμός της επικράτειας J της PFE0055c - PfHsp40 53
3.2.7 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών 53
3.2.8 Κινητικές μελέτες του ενζύμου PfHsp70-x 56
3.2.8.1 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός των παραγόμενων ορθοφωσφορικών ιόντων 57
3.2.8.2 Προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων (K_M και V_{max}) του ενζύμου PfHsp70-x 59
3.2.8.3 Κινητικές μελέτες εκτίμησης ικανότητας αναστολής προσδετών στο ένζυμο PfHsp70-x 61
3.2.8.4 Προσδιορισμός IC_{50} αναστολέων 64
3.2.9 Κρυσταλλογραφικές μελέτες 66
3.2.9.1 Κρυστάλλωση της επικράτειας πρόσδεσης νουκλεοτιδίων (nucleotide binding domain – NBD) της PfHsp70-x 66
3.2.9.2 Συν–κρυστάλλωση (co-crystallisation) της επικράτειας NBD της PfHsp70-x με αναστολείς 66
3.2.9.3 Εμβάπτιση (soaking) πρωτεϊνικών κρυστάλλων σε διάλυμα αναστολέα 67
3.3.10.4 Συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων 68
3.2.9.5 Επεξεργασία και βελτιστοποίηση του δομικού μοντέλου 68
Κεφάλαιο 4ο: Αποτελέσματα 70
4.1 Καθαρισμός και απομόνωση της PfHsp70-x 70
4.2 Καθαρισμός και απομόνωση της NBD (Nucleotide Binding Domain) 72
4.3 Καθαρισμός και απομόνωση της επικράτειας J (PFE0055c) 75

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

4.4 Αποτελέσματα κινητικών μελετών 79
4.4.1 Προσδιορισμός της σταθεράς K_M και V_{max} του ενζύμου PfHsp70-x 79
4.4.2 Υπολογισμός της ικανότητας αναστολής προσδετών έναντι της PfHsp70-x 80
4.4.3 Προσδιορισμός τιμών IC_{50} αναστολέων έναντι της PfHsp70-x 83
4.5 Αποτελέσματα δομικών μελετών 86
4.5.1 Ανάπτυξη κρυστάλλων της επικράτειας NBD της πρωτεΐνης PfHsp70-x 86
4.5.2 Συλλογή και ανάλυση κρυσταλλογραφικών δεδομένων 87
Κεφάλαιο 5ο: Συζήτηση 90
5.1 Συμπεράσματα 90
5.2 Μελλοντικές μελέτες 91
Βιβλιογραφία 92

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

Περίληψη

Η ελονοσία μέχρι και σήμερα, είναι μία από τις μεταδοτικότερες και πιο απειλητικές ασθένειες για τον άνθρωπο. Προσεγγιστικά ανά έτος, τα κρούσματα υπολογίζονται πάνω από 250 εκατομμύρια, ενώ σε θάνατο καταλήγουν περίπου 500.000 άτομα, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας. Η ελονοσία μεταδίδεται στον άνθρωπο από το δήγμα των κουνουπιών *Anopheles* και προκαλείται από το πρωτόζωο πλασμώδιο. Το είδος πλασμωδίου που μολύνει τον άνθρωπο σε μεγαλύτερη συχνότητα μεταξύ άλλων, είναι το *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*). Παρ' όλα αυτά και παρά τις διαρκείς προσπάθειες της επιστημονικής κοινότητας για ανάπτυξη ενός ασφαλούς και αποτελεσματικού πλάνου αντιμετώπισης, καμία αποδοτική θεραπευτική στρατηγική δεν έχει εφαρμοστεί μαζικά. Συνεπώς, η ανάγκη για ανάπτυξη θεραπείας με αυτά τα χαρακτηριστικά, κρίνεται αναγκαία.

Μέρος του ερευνητικού ενδιαφέροντος του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, στρέφεται γύρω από τον κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό φαρμάκων κατά της ελονοσίας. Ο μοριακός φαρμακευτικός στόχος αυτής της έρευνας είναι η πρωτεΐνη PfHsp70-x του *P. falciparum*, η οποία ως μοριακή συνοδός συμβάλλει κατά κύριο λόγο στη σωστή αναδίπλωση των πρωτεϊνών, στη σταθεροποίηση, την αποικοδόμηση και την μετατόπισή τους μέσω των κυτταρικών μεμβρανών. Η γενικότερη προοπτική αυτής της ερευνητικής πορείας αυξάνεται, καθώς η πρωτεΐνη PfHsp70-x, είναι η μόνη μοριακή συνοδός που χρησιμοποιεί το *P. Falciparum*, κατά την ερυθροκυτταρική σχιζογονία. Σημαντικό παράγοντα για τη λειτουργίας της συγκεκριμένης πρωτεΐνης, αποτελεί η συν-συνοδός της PfHsp70-x, η J-πρωτεΐνη PFE0055c. Μέσω της αλληλεπίδρασης των δύο πρωτεϊνών, ενισχύεται η υδρόλυση της ATP από την επικράτεια NBD της πρωτεΐνης συνοδού. Συνεπώς, ο βασικότερος στόχος αυτής της ερευνητικής πορείας, είναι να βρεθούν ενώσεις-αναστολείς που θα προσδεθούν στην καταλυτική επικράτεια της NBD και θα αναστείλουν την ενζυμική της δραστικότητα.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, μελετήθηκαν 19 διαφορετικοί και εξειδικευμένοι αναστολείς για την NBD επικράτεια της PfHsp70-x, αφού πρώτα προσδιορίστηκε η σταθερά K_M του ενζύμου. Ακολούθησαν, επιπλέον κινητικές μελέτες για τον προσδιορισμό της τιμής IC_{50} για κάθε αναστολέα που προκαλούσε υψηλά επίπεδα αναστολής. Ακόμη, εφαρμόστηκαν και δομικές μελέτες, ώστε να προσδιοριστεί κρυσταλλογραφικά η περιοχή πρόσδεσης του ισχυρότερου αναστολέα στην πρωτεΐνη. Τα αποτελέσματα αυτών των μελετών, έδωσαν στοιχεία για την περαιτέρω βελτιστοποίηση του αναστολέα με την υψηλότερη βιοδραστικότητα, ενώ προέκυψαν και δύο νέοι προσδέτες. Τέλος, υποβλήθηκαν σε κινητικές μελέτες προσδιορισμού της τιμής IC_{50} τους, ενώ το επόμενο βήμα θα είναι οι κρυσταλλογραφικές μελέτες αυτών των προσδετών.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

Abstract

Malaria is one of the most infectious and life-threatening diseases affecting humanity. In accordance with the World Health Organization, every year there are more than 250 million clinical cases and more than 500.000 deaths. Malaria in humans is caused by protozoan Plasmodium parasites which are transmitted to humans through female *Anopheles* mosquito's bite. As it is reported, *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) seems to be the most dangerous malaria parasite among others, which presents the highest transmission rate. Despite enormous efforts by the research community to develop a safe and effective treatment, appropriate therapeutic plans are not systematically applied. Therefore, the importance of developing a treatment with these characteristics to limit malaria's prevalence is vital.

One of the research interests of the Structural and Functional Biochemistry Laboratory is the structure-based drug design of anti-malarial drugs. The pharmaceutical target of this research approach is the *P. falciparum* protein PfHsp70-x. As a molecular chaperone, this protein is involved in protein folding, stabilization, degradation and translocation across membranes, thus playing a crucial role in parasite's survival and pathogenesis. PfHsp70-x is the one and only exported molecular chaperone during the phase of the erythrocyte schizogony of *P. falciparum* which gives great potential to this target. Another critical factor for the appropriate function of this protein seems to be the presence of the co-chaperone J-Domain Protein PFE0055c. Through their interaction, the ATPase domain (NBD) is stimulated, resulting in increasing the chaperone's activity. So, the primary objective of this research project is to find potential inhibitors which will be capable of binding at the catalytic domain.

This Thesis includes studies of 19 different ligands targeting subsites within the NBD domain of PfHsp70-x. To begin with, enzymatic studies were performed to determine the Michaelis – Menten constant (K_M). The kinetic studies were performed to assess the inhibitory potential of the ligands against PfHsp70-x and the complex PfHsp70-x – PFE0055c. Furthermore, the inhibitors with high inhibition rates, were further analyzed with enzymatic kinetic assays determined their IC_{50} values. The structure of the protein-ligand complex structure was studied by X-ray crystallography. Results of this study led to the synthesis of two additional chemical compounds based on the structural scaffold of an already existed ligand. Finally, their IC_{50} values were determined whereas further structural studies are in progress.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

Κεφάλαιο 1ο: Εισαγωγή

1.1 Η ασθένεια της ελονοσίας (malaria)

Ο όρος ελονοσία (mal-aria), κατά τη λατινική αποδίδεται ως «κακός αέρας» και συνδέθηκε με τους υδρατμούς των ελών και των βάλτων. Στην ελληνική γλώσσα ετυμολογικά προκύπτει από τις λέξεις έλος και νόσος, δηλαδή περιγράφεται μια ασθένεια που πηγάζει από περιοχές με μολυσμένα στάσιμα νερά. Πρόκειται για λοιμώδη νόσο με πολύ σοβαρές επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου, η οποία προκαλείται από πρωτόζωα του φύλου Apicomplexa, του γένους Plasmodium, όπως το *P. falciparum*, το *P. Vivax*, το *P. Ovale*, το *P. malariae* και το *P. knowlesi* (Sato, 2021). Η ελονοσία μεταδίδεται στον άνθρωπο μέσω του δήγματος θηλυκών κουνουπιών του γένους *Anopheles*, τα οποία αποτελούν τους φορείς του πλασμωδίου που τελικά προκαλεί την ασθένεια, μέσω προσβολής των ερυθρών αιμοσφαιρίων (Tuteja, 2007). Τα κουνούπια αυτά, πολλαπλασιάζονται στα έλη, μεταδίδοντας την ασθένεια με μεγάλη συχνότητα. Δευτερεύοντες τρόποι μετάδοσης της νόσου είναι η μετάγγιση αίματος, η χρήση μολυσμένης βελόνης και η μετάδοση από την εγκυμονούσα μητέρα στο έμβρυο (Rogerson et al., 2007).

1.1.1 Ιστορικά στοιχεία για την ελονοσία

Οι πρώτες καταγραφές σε ιστορικά κείμενα που παραπέμπουν στην ελονοσία, όπως τη γνωρίζουμε μέχρι σήμερα έγιναν στην αρχαία Κίνα, την αρχαία Αίγυπτο και την αρχαία Ελλάδα, όπου το 400 π.Χ., ο Ιπποκράτης και ο Γαληνός, κατέγραψαν τα συμπτώματα. Αναφέρεται μάλιστα ότι ο θάνατος του Μ. Αλεξάνδρου επήλθε από έντονο πυρετό λόγω ελονοσίας στην περιοχή του ποταμού Ευφράτη στη Μέση Ανατολή (Cox et al., 2010).

Ιστορικές πηγές επιπλέον, κάνουν λόγο για σοβαρή πλήξη της ρωμαϊκής αυτοκρατορίας από την ελονοσία. Η αυτοκρατορία επλήγη τόσο σε οικονομικό επίπεδο με την έλλειψη πρώτων υλών, όσο και σε κοινωνικό (Mer et al., 2020).

Η αρχική διαπίστωση για την ύπαρξη παρασίτων σε ανθρώπινο αίμα, έγινε στα τέλη του 19ου αιώνα από τον βρετανό ιατρό Ronald Ross, ο οποίος τιμήθηκε με βραβείο Nobel φυσιολογίας και ιατρικής το 1902 (The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1902. Nobelprize.org. Nobel Prize Outreach AB 2024).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

1.1.2 Επιδημιολογικά δεδομένα της ελονοσίας

Η ελονοσία είναι ένα παράδειγμα ασθένειας που απειλεί την παγκόσμια υγεία μέχρι και σήμερα. Στο δυτικό κόσμο μπορεί να ισχυριστεί κανείς με βεβαιότητα πως πρόκειται πλέον για ένα σπάνιο φαινόμενο. Στις χώρες της Αφρικής και της Νοτιοανατολικής Ασίας, ωστόσο, αποτελεί ένα ξεκάθαρο κοινωνικό πρόβλημα, αφού βρίσκεται σταθερά στις κύριες αιτίες θανάτου του αφρικανικού πληθυσμού. Οι κλιματολογικές συνθήκες που επικρατούν στην αφρικανική ήπειρο, ευνοούν τον πολλαπλασιασμό και τη διασπορά του πλασμωδίου μέσω των κουνουπιών στον ευρύτερο πληθυσμό. Επίσης, αν ληφθεί υπόψη, η οικονομική κατάσταση των χωρών της Αφρικής, το ελάχιστο κεφάλαιο που δαπανάται για ιατροφαρμακευτική περίθαλψη και το ιδιαίτερα χαμηλό βιοτικό επίπεδο με δεδομένο μάλιστα, τον υπερμεγέθη πληθυσμό, η άμεση επίλυση αυτού του κοινωνικού ζητήματος καθίσταται επιτακτική.

Τον 21ο αιώνα το επιδημιολογικό προφίλ της νόσου εμφάνισε διακυμάνσεις. Αναλυτικότερα, για της χώρες της Αφρικής, από το 2000 μέχρι το 2015 σημειώθηκε 34% μείωση στα ποσοστά μετάδοσης και παράλληλα 55% μείωση ως προς των αριθμό των θανάτων, σύμφωνα με την αναφορά του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας. Συμπερασματικά, η εφαρμογή ανθρωπιστικών και οικονομικών προγραμμάτων βοήθειας σε αυτά τα κράτη, μαζί με τη συνεισφορά της προόδου της επιστήμης, φαίνεται να αντιμετωπίζει το πρόβλημα (Health Organization, 2023).

Από το 2015 μέχρι το 2022, παρατηρείται εξίσου πτωτική πορεία για τα ποσοστά μετάδοσης, ωστόσο ο ρυθμός της ύφεσης είναι μειωμένος. Αυτό το γεγονός ενδέχεται να οφείλεται σε νέα έξαρση της διασποράς του πλασμωδίου, το οποίο πυροδοτείται από τα ακραία καιρικά φαινόμενα και την κλιματική αλλαγή που πλήττει τις περιοχές της Αφρικής. Από την άλλη, η ανάγκη εύρεσης νέας και αποτελεσματικότερης θεραπείας κατά της ελονοσίας μοιάζει απαραίτητη.

Ένα καλύτερο επιδημιολογικό προφίλ παρουσιάζουν οι χώρες της Νοτιοανατολικής Ασίας, καθώς από τις αρχές του αιώνα μέχρι το 2022 σημειώνουν μείωση μεγαλύτερη του 80% στον αριθμό των κρουσμάτων.

Αντίθετα, για τα κράτη της Ανατολικής Μεσογείου η ύφεση στον αριθμό των κρουσμάτων σταμάτησε 2015 και για την επόμενη πενταετία επικράτησε στασιμότητα. Το 2021, λόγω έντονων πλημμυρικών φαινομένων στην περιοχή του Πακιστάν, πυροδοτήθηκε η διασπορά του κουνουπιών του είδους *Aedes aegypti* (γνωστό ως κουνούπι τίγρης), το οποίο είναι φορέας του πλασμωδίου. Η απότομη έξαρση και η ελλιπώς εφοδιασμένη πρωτοβάθμια υγεία των χωρών αυτών δεν ανταποκρίθηκε στο αιφνίδιο κύμα ελονοσίας με αποτέλεσμα να προκύπτει αύξηση της τάξεως του 40% στα κρούσματα, κάτι που αποτυπώνεται και στους θανάτους (Health Organization, 2023).

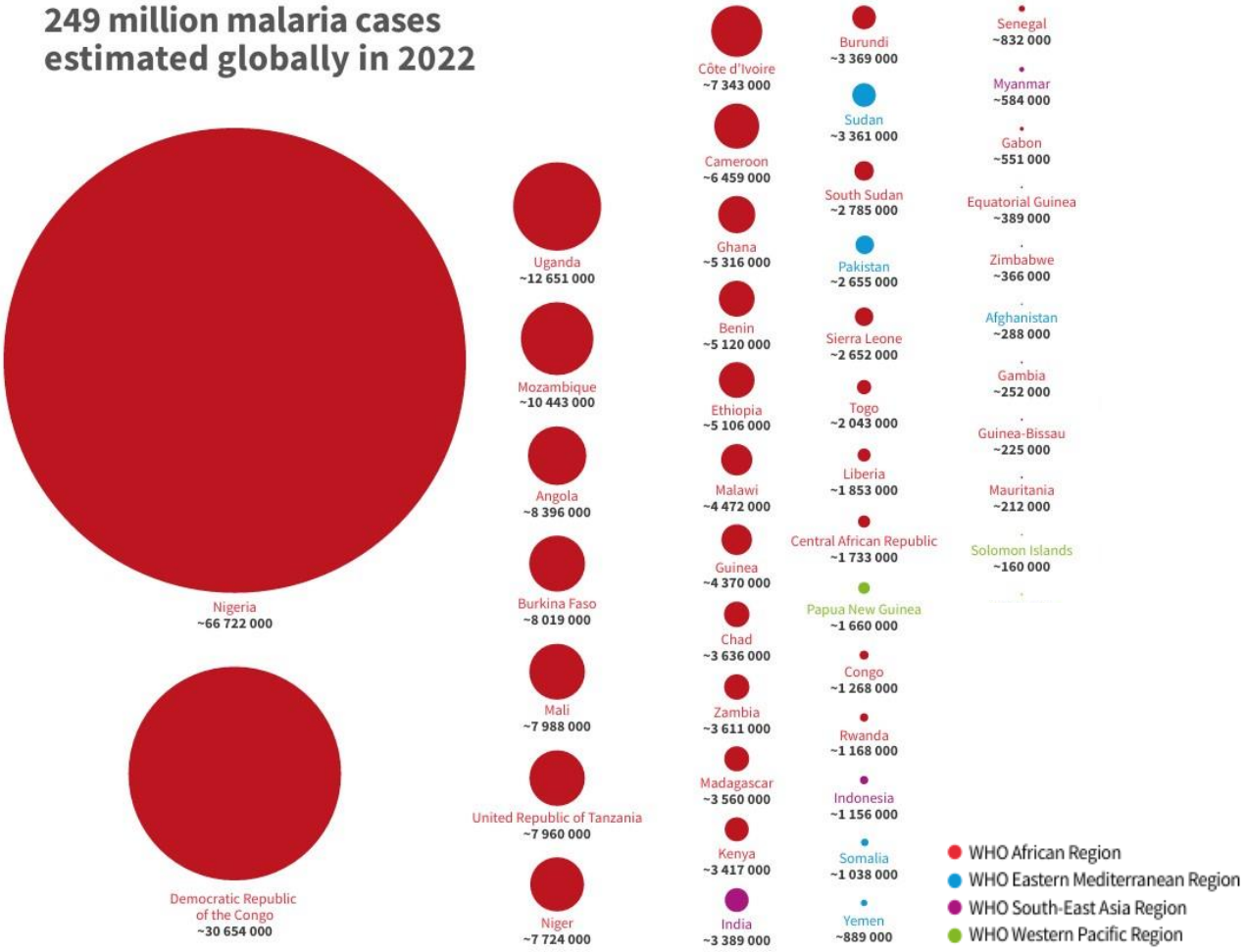
Όλα τα παραπάνω επιδημιολογικά στοιχεία συνοψίζονται στον ακόλουθο πίνακα:

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

Πίνακας 1: Επιδημιολογικά στοιχεία για την ελονοσία στις χώρες της Αφρικής, της Νοτιοανατολικής Ασίας και της Ανατολικής Μεσογείου το 2000, το 2015 και το 2022, σύμφωνα με την έκθεση του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας που δημοσιεύτηκε το 2023. Σημειώνεται ότι για τα αφρικανικά κράτη, επειδή ο πληθυσμός αυξάνεται με μεγάλους ρυθμούς, ο καθαρός αριθμός των κρουσμάτων ανά έτος, δεν αντικατοπτρίζει την πλήρη εικόνα και προτιμάται το ποσοστό των κρουσμάτων επί του συνολικού πληθυσμού ανά έτος, (Health Organization, 2023).

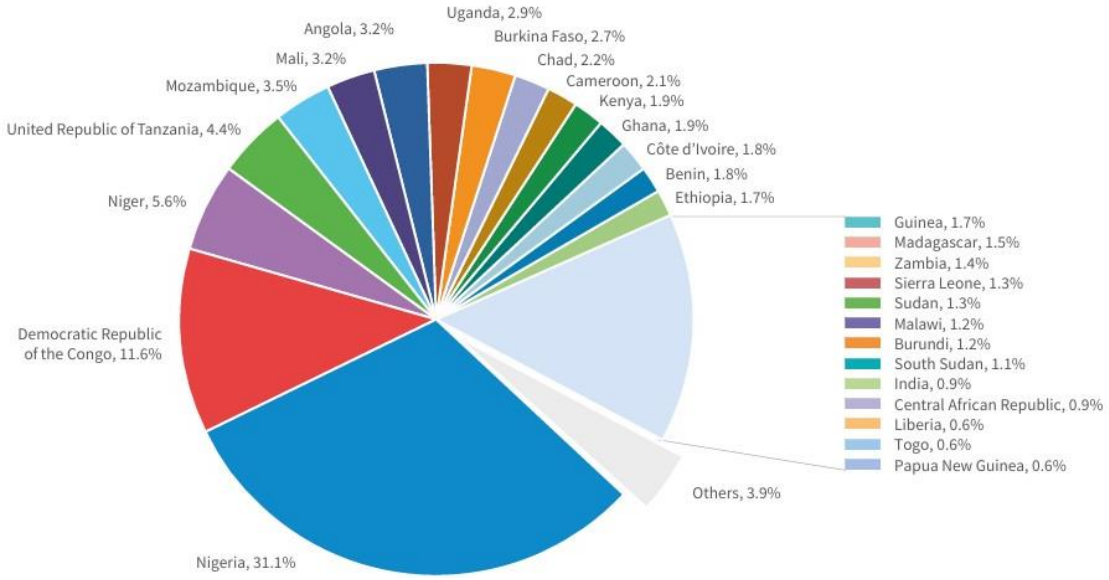
Περιοχή	2000	2015	2022	% Μεταβολή
ΑΦΡΙΚΗ	209 M	211 M	233 M	**+ 10%**
ΝΑ ΑΣΙΑ	22,8 M	13,3 M	5,2 M	**- 80%**
ΑΝΑΤΟΛΙΚΗ ΜΕΣΟΓΕΙΟΣ	6,9 M	4,3 M	8,3 M	**+ 17%**

Παρακάτω αποτυπώνεται ο εκτιμώμενος αριθμός κρουσμάτων (*Εικόνα 1*), καθώς και τα ποσοστά των θανάτων (*Εικόνα 2*) από ελονοσία ανά χώρα του κόσμου για το 2022:



Εικόνα 1: Εκτίμηση απόλυτου αριθμού κρουσμάτων ανά χώρα για το 2022, σύμφωνα με τον WHO, (Health Organization, 2023).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250



Εικόνα 2: Κατανομή του ποσοστού των θανάτων ανά χώρα παγκοσμίως για το 2022, σύμφωνα με τον WHO, (Health Organization, 2023).

Παρατηρώντας τις δύο εικόνες, διαπιστώνεται πως περίπου τα μισά από τα κρούσματα ελονοσίας παγκοσμίως, μοιράζονται σε πέντε χώρες: τη Νιγηρία, τη Λαϊκή Δημοκρατία του Κονγκό, την Ουγκάντα, τη Μοζαμβίκη και τον Νίγηρα. Αναφέρεται επίσης πως η ελονοσία είναι μάλλον η κυριότερη αιτία παιδικής θνησιμότητας για τις χώρες της Αφρικής, η οποία είναι ιδιαίτερα υψηλή. Σημειώνεται πως το είδος πλασμωδίου που είναι ιδιαίτερα μολυσματικό για τον άνθρωπο, εμφανίζει υψηλά επίπεδα διασποράς και προκαλεί τους περισσότερους θανάτους είναι το *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) (Health Organization, 2023).
Σύμφωνα με τα παραπάνω στατιστικά, γίνεται εύκολα αντιληπτό πως είναι επιτακτική ανάγκη για εύρεση μίας δραστικής λύσης για τον μετριασμό και την ολική καταπολέμηση της ελονοσίας με επίκεντρο την αφρικανική ήπειρο.

1.1.3 Ο κύκλος ζωής του πλασμωδίου – η αιτία της νόσου

Ι) Προ-ερυθροκυτταρική σχιζογονία

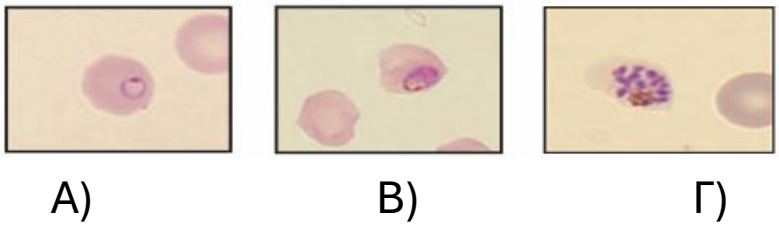
Ο κύκλος ζωής του πλασμωδίου είναι περίπλοκος και αποτελείται από πολλά στάδια. Αρχικά, ο άνθρωπος προσβάλλεται από το δήγμα του θηλυκού κουνουπιού του γένους *Anopheles*. Μέσω του σιέλου του κουνουπιού, μεταδίδονται στον άνθρωπο σποροζωίδια του πλασμωδίου. Μέσω της κυκλοφορίας του αίματος, τα σποροζωίδια φτάνουν στο ήπαρ περνώντας από τα κύτταρα Kupffer (Crompton et al., 2014). Εκεί, είτε θα παραμείνουν σε λανθάνουσα κατάσταση, είτε θα αντιγράψουν με μεγάλη

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

συχνότητα το γενετικό τους υλικό και θα πολλαπλασιαστούν (μέσω διχοτόμησης) με στόχο να διοχετευτούν στο αίμα.

ΙΙ) Ερυθροκυτταρική σχιζογονία

Η διαδικασία του πολλαπλασιασμού τους ονομάζεται σχιζογονία, από την οποία παράγονται τα σχιστά. Στη συνέχεια, τα σχιστά κατακερματίζονται και δημιουργούν μικρότερες δομές, τα μεροζωίδια, τα οποία αποτελούν τις μικρότερες δομές παρασίτων στον κύκλο ζωής του πλασμωδίου.
Με τον σχηματισμό των μεροζωιδίων, ακολουθεί η είσοδος στα ερυθρά αιμοσφαίρια. Η προσβολή των ερυθροκυττάρων από τα μεροζωίδια είναι μια σύνθετη διαδικασία που συμμετέχουν αρκετές πρωτεΐνες και πραγματοποιείται μέσω μεμβρανικής σύντηξης των μεμβρανών του μεροζωιδίου και του ερυθρού αιμοσφαιρίου. Η είσοδος των παρασίτων στα ερυθροκύτταρα, γίνεται με ενδομητρίωση (Cowman et al., 2012). Η είσοδος των μεροζωιδίων στα ερυθρά αιμοσφαίρια σηματοδοτεί τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό τους με τελικό αποτέλεσμα τη λύση των ερυθροκυττάρων. Η συνέπεια αυτού του γεγονότος είναι η εμφάνιση των πρώτων συμπτωμάτων της νόσου (έντονος πυρετός και μυαλγία). Μετά από σύντομο χρονικό διάστημα, ο αριθμός των ερυθρών αιμοσφαιρίων μειώνεται σημαντικά και προκαλείται σοβαρή αναιμία (Crompton et al., 2014), ενώ αν ο ασθενής δε λάβει άμεσα φαρμακευτική αγωγή, μπορεί να καταλήξει σε κωματώδη κατάσταση ή και σε θάνατο. Οι δομές του πλασμωδίου κατά την εισβολή του στα ερυθροκύτταρα απεικονίζονται στην *Εικόνα 3*. Τα μεροζωίδια, μετά τη λύση των ερυθροκυττάρων κυκλοφορούν στο αίμα το προσβεβλημένου ατόμου και δεν αποτελούν κίνδυνο. Μετά από κάποιες ημέρες ωστόσο (10-12 ημέρες στο *P. falciparum*), τα μεροζωίδια θα διαφοροποιηθούν σε γαμετοκύτταρα (αρσενικά και θηλυκά) (Tuteja, 2007).



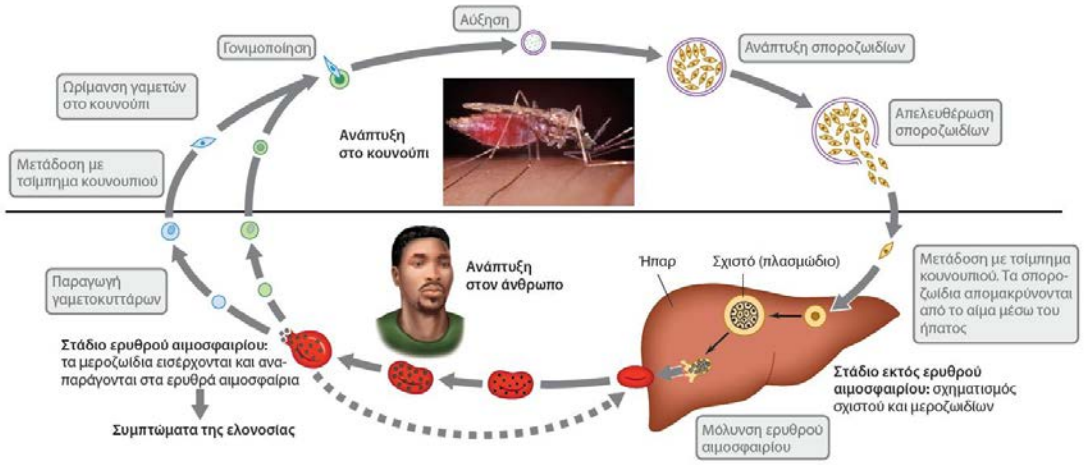
Εικόνα 3: Δομές του πλασμωδίου κατά την είσοδο του στα ερυθρά αιμοσφαίρια. Α) Δομή «δαχτυλιδιού»: αρχική δομή κατά την είσοδο στο κύτταρο, Β) Δομή τροφοζωιδίου: μορφή του διογκωμένου πλασμωδίου, Γ) Δομή σχιστών: δομή πριν τη λύση των ερυθροκυττάρων, κάθε σχιστό αποτελείται από περίπου 20 μεροζωίδια, (Tuteja, 2007).

ΙΙΙ) Σπορογονία

Τα πλέον διαφοροποιημένα γαμετοκύτταρα, κυκλοφορούν στο σώμα του ασθενούς, χωρίς να δημιουργούν κάποια επιπλοκή. Μπορούν ωστόσο να προσληφθούν από κάποιο θηλυκό κουνούπι στην απόπειρά του να τραφεί από το αίμα του ασθενούς (Sato, 2021). Τα γαμετοκύτταρα, στον στόμαχο του κουνουπιού *Anopheles*, μέσω γαμετογένεσης, θα μετατραπούν σε αρσενικούς και θηλυκούς γαμέτες. Με τη

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

σύντηξη των δύο απλοειδών γαμετών, προκύπτει το ζυγωτό, από το οποίο με διαδοχικές διαιρέσεις, αναπτύσσεται το σποροζωίδιο. Τα παραγόμενα σποροζωίδια περνούν στο σίελο του κουνουπιού και ο κύκλος ζωής του πλασμωδίου επαναλαμβάνεται. Με αυτόν τον τρόπο, η ασθένεια διασπείρεται τάχιστα, ειδικά αν ληφθεί υπόψη, ότι οι φορείς (κουνούπια *Anopheles*), αναπαράγονται με γρήγορους ρυθμούς στα έλη. Τα στάδια του κύκλου της ασθένειας που παρατέθηκαν, αποτυπώνονται σχηματικά στην *Εικόνα 4*:



Εικόνα 4: Σχηματική απεικόνιση των σταδίων του κύκλου ζωής της ασθένειας από τον φορέα (κουνούπι γένους Anopheles) στον ξενιστή (άνθρωπο), (Brock, *ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ*, ΠΕΚ 2018, www.cup.gr).

1.1.4 Επισκόπηση του *P. falciparum* σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο

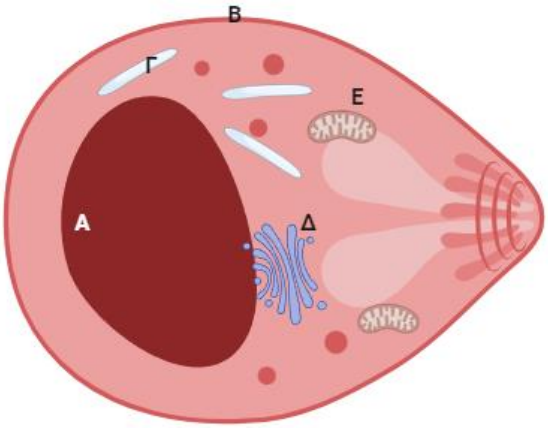
Το *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*), είναι το παράσιτο που ευθύνεται για τα περισσότερα κρούσματα ελονοσίας κυρίως στην αφρικανική ήπειρο (Health Organization, 2023). Μάλιστα, μέχρι στιγμής δεν υπάρχει κάποια ιδιαίτερα αποδοτική φαρμακευτική στρατηγική εναντίον του συγκριτικά με άλλα πλασμώδια, όπως π.χ. για το *P. vivax*. Πρόκειται για ευκαρυωτικό οργανισμό που ανήκει στο βασίλειο των πρωτίστων, του φύλου *Apicomplexa*, του γένους *Plasmodium* και είδους *Plasmodium falciparum* (NCBI Taxonomy).

Δομικά – μορφολογικά χαρακτηριστικά

Όπως αναφέρθηκε, το *P. falciparum* είναι ευκαρυωτικός μονοκύτταρος οργανισμός, που σημαίνει ότι περιβάλλεται από πλασματική μεμβράνη, διαθέτει οργανωμένο πυρήνα και μεμβρανώδη οργανίδια (*Εικόνα 5*). Πέρα από τα οργανίδια που συναντώνται στα ευκαρυωτικά κύτταρα, δηλαδή εκείνα των μιτοχονδρίων, του ενδοπλασματικού δικτύου (ΕΔ) και του συστήματος Golgi, στο *P. Falciparum* εντοπίζονται και οι απικοπλάστες – απικοπλαστίδια (Waller et al., 1998). Πρόκειται

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

για ημιαυτόνομα οργανίδια που παρουσιάζουν δομικές ομοιότητες με τους χλωροπλάστες, ωστόσο δε φωτοσυνθέτουν. Έχουν δικό τους γενετικό υλικό και συνιστούν δημιουργήματα δευτερεύουσας ενδοσυμβίωσης ενός φωτοσυνθετικού φύκους και ενός αυξοτροφικού ευκαρυώτη (Vaishnava & Striepen, 2006).



Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση του P. Falciparum. Α) Πυρήνας, Β) Πλασματική μεμβράνη, Γ) Απικοπλαστίδια, Δ) Σύμπλεγμα Golgi και Ε) Μιτοχόνδρια, (Created with BioRender.com).

Το *P. falciparum*, δεν παρουσιάζει καθορισμένη μορφολογία, καθώς κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής του (εδάφιο 1.1.3) αλλάζει μέγεθος και σχήμα. Συνοπτικά αναφέρεται ότι ένα σποροζωίδιο έχει σχήμα ατράκτου και διάμετρο 10–15 μm (Garcia et al., 2006). Όταν το παράσιτο βρεθεί στο ήπαρ, λαμβάνει ωοειδές σχήμα, ενώ διογκώνεται με τελική διάμετρο 30-70 μm και χαρακτηρίζεται πλέον ως σχιστό. Έπειτα τα σχιστά διασπώνται σε πολύ μικρότερες δομές, τα μεροζωίδια με διάμετρο μόλις 1 μm. Έπειτα ακολουθεί η λύση των ερυθροκυττάρων που προκαλείται από την αύξηση του αριθμού των μεροζωιδίων.

Το γενετικό υλικό του P. Falciparum

Στο P. falciparum, υπάρχουν τρία οργανίδια που έχουν γενετικό υλικό. Ως κυριότερο, εκτιμάται το γενετικό υλικό του πυρήνα, που πρόκειται για γραμμικό και δίκλωνο DNA (dsDNA), οργανωμένο σε 14 χρωμοσώματα συνολικού μήκους περίπου 23 Mb, πλούσιο σε ποσοστό A-T. Στο γονιδίωμα αυτό, χαρτογραφούνται γύρω στα 5.300 γονίδια, ενώ περίπου το 70% της συνολικής αλληλουχίας αντιστοιχεί σε κωδικές περιοχές (Gardner et al., 2002), (www.plasmodb.org). Επόμενο οργανίδιο που είναι ημιαυτόνομο και στο *P. falciparum* και στους υπόλοιπους ευκαρυώτες, είναι τα μιτοχόνδρια. Το γενετικό υλικό των μιτοχονδρίων, αποτελείται από ένα κυκλικό χρωμόσωμα δίκλωνου DNA (dsDNA), με μήκος μόλις 6 kb (Feagin, 1992). Τα γονίδια του mtDNA κωδικοποιούν πρωτεΐνες απαραίτητες για τη μιτοχονδριακή λειτουργία όπως η κυτοχρωμική οξειδάση (cox1, cox3). Τέλος, τα ημιαυτόνομα πλαστίδια

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

(απικοπλάστες) που διαθέτει το *P. falciparum* διαθέτουν κι αυτά δίκλωνο κυκλικό DNA, σχεδόν έξι φορές μεγαλύτερο σε μήκος από αυτό των μιτοχονδρίων (35 kb). Το γενετικό υλικό των απικοπλαστιδίων διαθέτει γονίδια για τις βασικές του λειτουργίες, όπως γονίδια που κωδικοποιούν rRNA, tRNA και γονίδια πρωτεϊνών των ριβοσωμάτων, αλλά διαθέτει και γονίδια υπεύθυνα για τη σύνθεση λιπαρών οξέων και ισοπρενοειδών (acpP και IspD, IspE αντιστοίχως) (Wilson et al., 1996). Τέλος, ορισμένες πρωτεΐνες που δρουν στα απικοπλαστίδια, κωδικοποιούνται από γονίδια του DNA του πυρήνα.

Από γονίδια του πυρηνικού γονιδιώματος (περίπου 5.300), κωδικοποιούνται και πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην είσοδο του *P. falciparum* στα ερυθροκύτταρα. Συγκεκριμένα η μεμβρανική πρωτεΐνη PfEMP1 (*Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein* 1) και πρωτεΐνες της οικογένειας MSP, εντοπίζονται στην πλασματική μεμβράνη του πλασμωδίου και παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενδομητρίωση του παρασίτου στο ερυθροκύτταρο και κατ' επέκταση στη διάδοση της ασθένειας της ελονοσίας (Cowman et al., 2012). Μάλιστα τέτοιες πρωτεΐνες έχουν αποτελέσει και αποτελούν φαρμακευτικούς στόχους για την αντιμετώπιση της ασθένειας.

1.2 Τρόποι – μέσα αντιμετώπισης της ασθένειας

Η ελονοσία αποτελεί, όπως έχει ήδη αναφερθεί, ένα σοβαρό κοινωνικό και οικονομικό πρόβλημα, προκαλώντας πολλά εκατομμύρια κρούσματα ετησίως και εκατοντάδες χιλιάδες νεκρούς. Για το πλέον απειλητικό για την ανθρώπινη υγεία είδος πλασμωδίου (*P. falciparum*), δεν υπάρχει κάποιο αποδοτικό και ασφαλές μέσο αντιμετώπισης. Συνεπώς η ανάγκη για αυτού του είδους την έρευνα χαρακτηρίζεται παραπάνω από επιτακτική.

1.2.1 Θεραπευτικές προσεγγίσεις κατά της ελονοσίας μέχρι σήμερα

Ανάπτυξη φαρμάκων κατά της ελονοσίας

Όπως έχει αναφερθεί, η ελονοσία προκαλείται από παράσιτα του γένους Plasmodium (*P. falciparum*, *P. Vivax*, *P. Ovale*, *P. malariae* και *P. knowlesi*) και δευτερευόντως από τα κουνούπια του γένους Anopheles (φορείς) που μεταδίδουν το πλασμώδιο πολύ γρήγορα από άνθρωπο σε άνθρωπο.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

Η πρώτη ιστορικά καταγεγραμμένη απόπειρα για άμεση θεραπεία ενάντια στην ελονοσία, πραγματοποιήθηκε στην αρχαία Κίνα, όπου το φυτό Qinghai (*Artemisia annua*) χρησιμοποιήθηκε ως αντίδοτο στους ασθενείς με συμπτώματα ελονοσίας (Talapko et al., 2019).

Η πρώτη επιβεβαιωμένη και μαζικά χορηγούμενη ουσία κατά της ελονοσίας φαίνεται να είναι η χημική ουσία κινίνη, που απομονώθηκε το 1820 από τους Γάλλους χημικούς, Pierre Joseph Pelletie και Joseph Bienaime Caventou από το δέντρο Cinchona (*Cinchona succrirubra*) στη Ν. Αμερική. Πρόκειται για αλκαλοειδές που ανέστειλε τη σύνθεση DNA και RNA του πλασμωδίου. Η συγκεκριμένη ουσία χορηγούταν και για λόγους χημειοπροφύλαξης, δηλαδή ως μέσο πρόληψης κατά της ελονοσίας, εκτός από τον αμιγώς θεραπευτικό ρόλο της. Λόγω της αλόγιστης χορήγησης της σε ασθενείς ή μη, τα παράσιτα απέκτησαν ανθεκτικότητα απέναντι στην κινίνη και έτσι η θεραπεία δεν εμφάνιζε τα αναμενόμενα επίπεδα αποδοτικότητας. Επομένως η σύνθεση νέων ενώσεων θεραπευτικού χαρακτήρα ήταν αναγκαία (Talapko et al., 2019).

Μέχρι και τα τέλη του 20^{ου} αιώνα, συντέθηκαν διάφορες ουσίες με πρότυπο την κινίνη, όπως η χλωροκίνη, η πριμακίνη και η μεφλοκίνη και προέκυψαν αποδοτικά και οικονομικά φάρμακα, ώστε να χορηγηθούν μαζικά στους πληθυσμούς χωρών που πλήττονταν από την ελονοσία. Ωστόσο το πρόβλημα περί ανάπτυξης ανθεκτικότητας του πλασμωδίου απέναντι στα νέα φάρμακα δεν άργησε να εμφανιστεί, και έτσι η έρευνα στράφηκε στην ανάπτυξη νέου θεραπευτικού πλάνου (Sato, 2021).

Το σοβαρό ζήτημα της ανάπτυξης ανθεκτικότητας από το πλασμώδιο απέναντι σε μαζικά χορηγούμενες ουσίες, αποτελεί το κύριο εμπόδιο για την ανάπτυξη μιας αποδοτικής θεραπείας με διάρκεια και αντοχή στο χρόνο. Αυτό το φαινόμενο εξηγείται με τον ίδιο τρόπο που εξηγείται η ανάπτυξη ανθεκτικών βακτηριακών στελεχών, ύστερα από παρατεταμένη χρήση αντιβιοτικών ουσιών. Συγκεκριμένα, μία ουσία δύναται να εξουδετερώνει την πλειοψηφία των παρασίτων, ωστόσο σε έναν πλασμωδιακό πληθυσμό (που εμφανίζει μεγάλη γενετική ποικιλότητα), υπάρχουν και παράσιτα που λόγω τυχαίων μεταλλάξεων στο γενετικό τους υλικό, εμφανίζουν ανθεκτικότητα απέναντι στην εν λόγω ουσία. Έτσι λοιπόν, αποκτούν εξελικτικό πλεονέκτημα και λόγω της επιβίωσής τους, αναπαράγονται και μολύνουν περισσότερους ανθρώπους, χωρίς να επηρεάζονται από την υπάρχουσα φαρμακευτική θεραπεία (Escalante & Pacheco, 2019). Αποτέλεσμα αυτού, τα γονίδια που φέρουν την μετάλλαξη που προσδίδει ανθεκτικότητα, μεταβιβάζονται με μεγάλη συχνότητα.

Το φάρμακο που φαίνεται να μην οδηγεί σε δημιουργία ανθεκτικών πλασμωδιακών πληθυσμών (τουλάχιστον σε υπολογίσιμο βαθμό) και να αποτελεί ένα αποδοτικό μέσο αντιμετώπισης της ελονοσίας, κυρίως απέναντι στο *P. falciparum*, είναι η αρτεμισίνη (Artemisin - ACT). Η ουσία αυτή απομονώθηκε από τον κινέζο επιστήμονα Dr. Youyou Tu από το φυτό *Artemisia annua* το 1970. Μάλιστα το 2015, κέρδισε το βραβείο Nobel Φυσιολογίας και Ιατρικής (The Nobel Prize in Physiology or Medicine

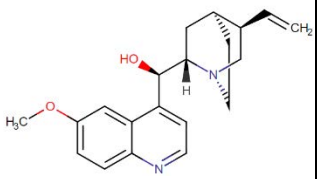
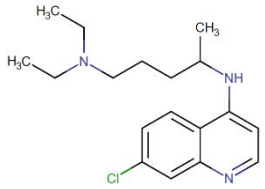
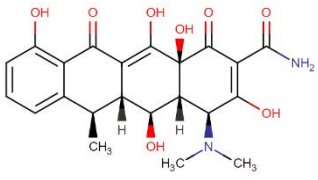
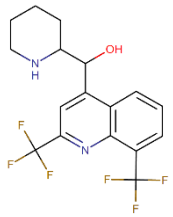
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

1902. Nobelprize.org. Nobel Prize Outreach AB 2024). Τα περισσότερα από τα φάρμακα – παράγωγα της αρτεμισίνης (πχ Artemether), χορηγούνται στους ασθενείς ως προφάρμακα και για να έρθουν στη δραστική τους μορφή χρειάζεται να υδρολυθούν (αντίδραση φάσης Ι του μεταβολισμού φαρμάκων). Η αρτεμισίνη και τα παράγωγά της, δρουν ως αναστολείς της πρωτεϊνικής αντλίας ασβεστίου (με δράση ATPάσης - αντίστοιχη της αντλίας SERCA) του πλασμωδίου (PfATP6). Με αυτόν τον τρόπο, όλο και περισσότερο ασβέστιο διοχετεύεται στο κυτταρόπλασμα του πλασμωδίου, ενώ υπερκαταναλώνεται ATP, με αποτέλεσμα το παράσιτο να πεθαίνει (Guo, 2016).

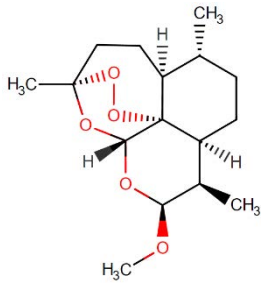
Παρά την υψηλή αποδοτικότητα της αρτεμισίνης, υπάρχει έντονη ανησυχία στην επιστημονική κοινότητα για την εμφάνιση ανθεκτικών πλασμωδιακών στελεχών, ενώ παράλληλα τα αποθέματα του φυτού *Artemisia annua* λιγοστεύουν. Επομένως, είναι απαραίτητη η ανάπτυξη νέων μεθόδων αντιμετώπισης της ελονοσίας.

Στον ακόλουθο πίνακα παρουσιάζονται οι φαρμακευτικές ενώσεις που έχουν χρησιμοποιηθεί, καθώς και οι χημικοί τους τύποι (*Πίνακας 2*):

Πίνακας 2: Υπάρχουσες φαρμακευτικές ενώσεις με το έτος κυκλοφορίας τους. Παρατίθεται ο μοριακός στόχος τους, καθώς και ορισμένα εκ των κυριότερων πλεονεκτημάτων και μειονεκτημάτων τους. Τέλος φαίνεται και ο χημικός τύπος αυτών των ενώσεων. (Talapko et al., 2019), (https://go.drugbank.com/).

Χημική ουσία	Έτος κυκλοφορίας	Μοριακός στόχος	Πλεονεκτήματα/ Μειονεκτήματα	DrugBank ID	Χημικός τύπος
Κινίνη	1600	Αναστολή σύνθεσης DNA και RNA	Τοξικότητα, μικρό θεραπευτικό παράθυρο, ανάπτυξη ανθεκτικών παρασίτων	DB00468	
Χλωροκίνη	1940	Αναστολή σύνθεσης DNA και RNA	Τοξικότητα, χαμηλή αποτελεσματικότητα, ανάπτυξη ανθεκτικών παρασίτων	DB00608	
Δοξικυκλίνη	1960	Αναστολή πρωτεϊνοσύνθεσης λόγω στόχευσης στην 30S ριβοσωμική υπομονάδα	Δρα ως χημειοπροστατευτικό. Φθηνό και αποδοτικό με ήπια τοξικότητα. Χρειάζεται	DB00254	
Μεφλοκίνη	1970	Καταστροφή της πλασμωδιακής κυτταρικής μεμβράνης	Τοξικότητα στο ΚΝΣ και σοβαρές παρενέργειες σε εγκύους, ανάπτυξη ανθεκτικών *P. falciparum*	DB00358	

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

Αρτεμισίνη (artemether)	1972	Αντλία ανσβεστίου PfATP6	Ιδιαίτερα αποδοτικό, μικρός χρόνος ημιζωής και χαμηλή τοξικότητα. Ανησυχία για ανάπτυξη ανθεκτικότητας και υψηλό κόστος παραγωγής.	DB06697	

Έμμεσες θεραπευτικές στρατηγικές

Εκτός από τις άμεσες θεραπείες που στοχεύουν στο πλασμώδιο, έχουν εφαρμοστεί στο παρελθόν και στρατηγικές με έμμεσο χαρακτήρα που να περιορίζουν τη διασπορά της νόσου μέσω στόχευσης στα κουνούπια *Anopheles* ως τους βασικούς φορείς της νόσου. Συγκεκριμένα έγινε μαζική χρήση εντομοκτόνων με προοπτική τη δραστική μείωση του πληθυσμού των κουνουπιών που μετέφεραν τη νόσο.
Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε σε εκτεταμένη κλίμακα το οργανοχλωριούχο εντομοκτόνο διχλωροδιφαινυλ – τριχλωροαιθάνιο (DDT), του οποίου η εντομοκτόνος ιδιότητα ανακαλύφθηκε το 1939 από τον Ελβετό χημικό Paul Hermann Muller, ο οποίος βραβεύτηκε με βραβείο Nobel φυσιολογίας και ιατρικής το 1948 (The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1902. Nobelprize.org. Nobel Prize Outreach AB 2024). Το DDT αποτέλεσε μια αρκετά επιτυχημένη στρατηγική αντιμετώπισης της ελονοσίας και σε συνδυασμό με το χαμηλό κόστος, σημειώθηκε σημαντική πρόοδος (Roberts et al., 1997). Παρά την αποτελεσματικότητά του ως προς τα κουνούπια και την ύφεση των ετήσιων περιστατικών ελονοσίας, οι συνέπειες ως προς το περιβάλλον και την υγεία των ανθρώπων ήταν ολέθριες, λόγω της μεγάλης υπολειματικότητας και τοξικότητας του ρύπου (Attaran & Maharaj, n.d.). Για το λόγο αυτό η χρήση του DDT έχει απαγορευτεί σε πολλά κράτη. Έτσι λοιπόν η στρατηγική χορήγησής του εγκαταλείφθηκε πρόωρα, αν και εξετάζεται να εφαρμοστεί ξανά σε περιοχές υψηλού κινδύνου με ελεγχόμενο τρόπο (Health Organization, 2016).

Ανάπτυξη εμβολίου

Λόγω της έντονης πολυμορφικότητας του πλασμωδίου και λόγω της ύπαρξης πέντε διαφορετικών ειδών πλασμωδίου η ανάπτυξη ενός αποτελεσματικού εμβολίου αποτελεί πρόκληση για την ερευνητική κοινότητα. Τα περισσότερα εν δυνάμει εμβόλια αποτυγχάνουν στις κλινικές δοκιμές, ενώ τα υπάρχοντα εμβόλια που χρησιμοποιούνται ως προς την αποδοτικότητα που προσφέρουν ποικίλουν ανάλογα την ηλικία, το φύλο και το ποσό της έκθεσης του ασθενούς στο παθογόνο (Tuteja, 2007).
Το διαθέσιμο σκεύασμα εμβολίου που χορηγείται στις χώρες υψηλού κινδύνου λόγω της διασποράς του *P. falciparum* είναι το εμβόλιο RTS,S/AS01, το οποίο κυκλοφορεί

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

με την εμπορική ονομασία Mosquirix. Το συγκεκριμένο εμβόλιο κατασκευάστηκε από τη βρετανική φαρμακοβιομηχανία GlaxoSmithKline (GSK) σε συνεργασία με ερευνητικά κέντρα της Αφρικής. Μεγάλο μέρος της χρηματοδότησης για την ανάπτυξη του εμβολίου προήλθε από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), από κρατικές χρηματοδοτήσεις και από μεγάλα φιλανθρωπικά ιδρύματα (Bill & Melinda Gates Foundation).

Συνιστά ένα εμβόλιο το οποίο αποτελείται από το αντιγόνο RTS,S. Πρόκειται για μια ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη στην οποία ενσωματώνονται τμήματα δύο διαφορετικών πρωτεϊνών: της καρβοξυτελικής περιοχής της CSP πρωτεΐνης του *P. falciparum* και του αντιγόνου επιφανείας της Ηπατίτιδας Β καθαρά για λόγους περεταίρω επαγωγής του ανοσοποιητικού συστήματος του ασθενούς. Η CSP πρωτεΐνη, παίζει σημαντικό ρόλο στην προ - ερυθροκυτταρική σχιζογονία, καθώς ως πρωτεΐνη της μεμβράνης των σποροζωιδίων συμβάλει στην είσοδό τους στο ήπαρ. Επιπλέον η κεντρική της επικράτεια εμφανίζει πλήθος επαναλήψεων της αμινοξικής αλληλουχίας NANP: (Asn-Ala-Asn-Pro), η οποία επάγει την ανοσολογική απόκριση.

Το εμβόλιο περιέχει και άλλους παράγοντες που επάγουν την χυμική και κυτταρική ανοσία όπως είναι το μονοφωσφολιπίδιο Α (MPL) και η σαπωνίνη QS-21 (“Efficacy and Safety of RTS,S/AS01 Malaria Vaccine with or without a Booster Dose in Infants and Children in Africa: Final Results of a Phase 3, Individually Randomised, Controlled Trial,” 2015).

Το συγκεκριμένο σκεύασμα είναι το μόνο που έχει εγκριθεί από τον FDA καθώς έχει επιτύχει σε κλινικές δοκιμές, ωστόσο η αποτελεσματικότητά του δεν είναι η αναμενόμενη, διότι ανέρχεται σε ένα ποσοστό της τάξεως του 40-50% (“A Phase 3 Trial of RTS,S/AS01 Malaria Vaccine in African Infants,” 2012).

Τα προγράμματα των εμβολιασμών κατά της ελονοσίας δεν έχουν υποχρεωτικό χαρακτήρα. Όλες οι οργανώσεις κατά της ελονοσίας και φυσικά ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας συστήνει και προτρέπει το μαζικό εμβολιασμό με το συγκεκριμένο σκεύασμα. Προτεραιότητα στους εμβολιασμός δίνεται στα ανήλικα άτομα, τα οποία είναι και πιο ευάλωτα στην ασθένεια.

Συμπέρασμα

Ως τελικό συμπέρασμα για τις μέχρι τώρα θεραπευτικές στρατηγικές κατά της ελονοσίας, είναι πως καμία δεν περιόρισε τη νόσο σε αποδεκτά επίπεδα. Η δυσκολία για κάτι τέτοιο είναι δεδομένη και αποτελεί πραγματική πρόκληση για την επιστημονική κοινότητα και τις κυβερνήσεις του κόσμου. Παρ’ όλα αυτά, μια θεραπευτική προσέγγιση που θα συνδυάζει ένα ασφαλές και αποδοτικό εμβόλιο μαζί με κάποιο αποδοτικό και χωρίς τοξικότητα χημειοπροστατευτικό φάρμακο δείχνει να είναι η ιδανικότερη λύση (Talapko et al., 2019). Επιπλέον, η ταυτόχρονη χρήση φιλικών προς το περιβάλλον εντομοκτόνων, παρά το υψηλό κόστος, για τον

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

περιορισμό των κουνουπιών – φορέων της ελονοσίας, πρόκειται να συμβάλλει ιδιαίτερα στην εξομάλυνση αυτού του κοινωνικού ζητήματος.

1.2.2 Κατευθυνόμενος από τη δομή σχεδιασμός φαρμάκων – Structure based drug design

Οι παραδοσιακές μέθοδοι ανακάλυψης φαρμάκων βασίζονταν στην τυχαία διαλογή φυσικών προϊόντων καθώς και παρατήρηση των αποτελεσμάτων σε γνωστές ασθένειες. Ενδέχεται να χρειαστούν πολλά χρόνια έρευνας για να μετατραπεί μια φαρμακευτική ουσία σε φάρμακο που θα είναι αποτελεσματικό και ανεκτό από τον ανθρώπινο οργανισμό. Το ποσοστό επιτυχίας είναι αρκετά χαμηλό καθώς πολλές ενώσεις δεν μπορούν να περάσουν τις κλινικές μελέτες ή μπορεί να εμφανίζουν αρκετές παρενέργειες. Στις αρχές της δεκαετίας του 1980, η δυνατότητα ορθολογικού σχεδιασμού φαρμάκων με τη χρήση πρωτεϊνικών δομών αποτελούσε έναν σύνθετο στόχο. Ωστόσο, η ολοκλήρωση της χαρτογράφησης του ανθρώπινου γονιδιώματος, η ταχύτατη εξέλιξη της πρωτεομικής και της δομικής γονιδιωματικής καθώς και η εξέλιξη των βιοπληροφορικών συστημάτων οδήγησαν σε ταχεία άνθηση της μεθόδου. Σήμερα, οι μέθοδοι δομικής και μοριακής βιολογίας συμβάλλουν στην ταχύτερη και πιο αποδοτική από πλευράς κόστους ανακάλυψη πρωτοπόρων ουσιών σε σχέση με τις παραδοσιακές μεθόδους ανακάλυψης φαρμάκων. Τεχνικές της δομικής βιολογίας και πιο συγκεκριμένα, η κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ καθώς και η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) χρησιμοποιούνται ευρέως ώστε να σχεδιαστούν ενώσεις με μεγάλη αγχιστεία ως προς τα μόρια στόχους. Πρώτο βήμα στη μέθοδο του κατευθυνόμενου από τη δομή σχεδιασμού φαρμάκων (SBDD, Structure Based Drug Design) αποτελεί η εύρεση του στόχου. Η επιλογή ενός φαρμακευτικού στόχου γίνεται σε βιολογική και βιοχημική βάση και μπορεί να είναι είτε πρωτεΐνη είτε νουκλεϊκά οξέα. Οι πρωτεΐνες και τα ένζυμα αποτελούν τους κύριους στόχους του SBDD καθώς εμπλέκονται σε αρκετές παθολογικές καταστάσεις, μέσω βλαβών στη ρύθμιση ή στη λειτουργία τους. Ο SBDD επικεντρώνεται στην τρισδιάστατη (3D) δομή των πρωτεϊνών - στόχων και των ασθενειών σε μοριακό επίπεδο. Πρόκειται για μια επαναληπτική διαδικασία με πολλαπλούς κύκλους που εκτελούνται για να οδηγηθεί το βελτιστοποιημένο υποψήφιο φάρμακο σε κλινική δοκιμή (Kuntz, 1992). Ο πρώτος κύκλος αποτελείται από την κλωνοποίηση του ανθρώπινου γονιδίου, την υψηλή έκφραση, τον καθαρισμό και το δομικό και βιοχημικό χαρακτηρισμό της πρωτεΐνης-στόχου. Η εύρεση της τρισδιάστατης δομής μπορεί να γίνει μέσω της κρυσταλλογραφίας ακτινών-Χ, φασματοσκοπίας NMR και κρυο-ηλεκτρονιακής μικροσκοπίας (Cryo-EM). Οι τεχνικές αυτές φέρουν αρκετά πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Η κρυσταλλογραφία

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

ακτίνων-Χ αποτελεί μία ευρύτατα χρησιμοποιούμενη τεχνική, η οποία μπορεί να παρέχει δεδομένα υψηλής ευκρίνειας, παρέχοντας ταυτόχρονα τη δυνατότητα παρατήρησης μορίων ύδατος ή μετάλλων τα οποία εμφανίζουν σημαντικό ρόλο στη σταθερότητα αλλά και στη δράση των πρωτεϊνών. Τα δεδομένα αυτά είναι απαραίτητα για τον SBDD. Ακολούθως, απαιτείται η εύρεση μιας ένωσης οδηγού η οποία θα χρησιμοποιηθεί ως βάση για τη δημιουργία άλλων ενώσεων. Ως ένωση οδηγός μπορεί να είναι το φυσικό υπόστρωμα της πρωτεΐνης στόχου ή κάποιοι συμπαράγοντες (Kuntz, 1992). Νέες ενώσεις οδηγοί μπορούν να βρεθούν μέσω υψηλής απόδοσης διαλογής συλλογών (HTS), κρυσταλλογραφίας συγγένειας, σχεδιασμού φαρμάκων μέσω θραυσμάτων (FBDD) και μέσω του σχεδιασμού φαρμάκων *in silico*.

Η διαλογή υψηλής απόδοσης αποτελεί μία μέθοδο για την εύρεση ενώσεων οδηγών που μπορούν περαιτέρω να τροποποιηθούν χημικά για το σχεδιασμό εν δυνάμει φαρμάκων. Η HTS είναι αρκετά αυτοματοποιημένη ώστε με χαμηλό κόστος και σε σύντομο χρονικό διάστημα να δοκιμάζονται πολλές ενώσεις έναντι ενός συγκεκριμένου στόχου. Το ποσοστό επιτυχίας προσδιορίζεται περίπου στο 50%. Ως εκ τούτου, μόνο τα αρχικά ευρήματα χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση του τρόπου πρόσδεσης τους στην πρωτεΐνη-στόχο με επακόλουθη βελτιστοποίηση (Doak et al., 2016).

Ο σχεδιασμός φαρμάκων με βάση τα θραύσματα ενώσεων (FBDD) χρησιμοποιείται για την εύρεση μικρών χημικών ενώσεων, από μικρές βιβλιοθήκες μικρών και απλών μορίων, που θα προσδένονται σε ένα μεγάλο εύρος θεραπευτικών στόχων. Η διαφορά μεταξύ της HTS και του FBDD εμφανίζεται στις βιβλιοθήκες διαλογής, με την πρώτη τεχνική να αποτελείται από μεγαλύτερες βιβλιοθήκες με μεγαλύτερα μόρια. Αρχικά, τα θραύσματα αξιολογούνται με βάση την πρόσδεσή τους στην πρωτεΐνη-στόχο με δομικές μελέτες και μέσω βιοφυσικών μελετών μπορεί να βρεθεί η σταθερά πρόσδεσής τους (K_D). Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι πολλά θραύσματα μπορούν να προσδεθούν σε κοντινές περιοχές της πρωτεΐνης-στόχου. Η ένωση αυτών για τη δημιουργία μιας μεγαλύτερης ένωσης μπορεί να οδηγήσει σε μια ένωση υψηλότερης συγγένειας και ειδικότητας. Σημαντικό βήμα σε αυτή τη μέθοδο όπως και στην HTS αποτελεί η χημική τροποποίηση των αρχικών ευρημάτων, ωστόσο, πολλές ενώσεις δεν μπορούν να συντεθούν στο εργαστήριο (Klebe, 2000).

Ο σχεδιασμός φαρμάκων *in silico* χρησιμοποιείται στη διαλογή πολλών ενώσεων, οι οποίες στη συνέχεια θα τροποποιηθούν ως προς τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη-στόχο. Για την κατασκευή κατάλληλων μοντέλων ελλιμενισμού (docking) χρησιμοποιούνται δεδομένα από κρυσταλλογραφία ακτινών Χ και μελετών φασματοσκοπίας NMR, ωστόσο αν δεν υπάρχουν δεδομένα, κατασκευάζονται μοντέλα ομόλογου συνδυασμού με χρήση υπολογιστών. Μέσω αλγορίθμων πολλές ενώσεις ελέγχονται εάν μπορούν να προσδεθούν στην πρωτεΐνη-στόχο και στη συνέχεια αξιολογούνται με βιοχημικές μεθόδους στο εργαστήριο. Οι πιο αποτελεσματικές ενώσεις βελτιστοποιούνται περαιτέρω και ακολουθεί νέα διαδικασία βελτιστοποίησης με

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

κύριο στόχο την εύρεση πιο ισχυρών ενώσεων. Η κρυσταλλογραφία συγγένειας αποτελεί μία μέθοδο κατά την οποία από ένα μίγμα φυσικών ουσιών μπορούν να βρεθούν νέες βιοδραστικές ουσίες. Η μεθοδολογία που ακολουθείται, αποτελείται από την εκχύλιση των δραστικών ουσιών από φυτά όπου πραγματοποιούνται δοκιμές δραστικότητας έναντι της πρωτεΐνης-στόχου και στη συνέχεια, διενεργείται περαιτέρω καθαρισμός του εκχυλίσματος και δοκιμές δραστικότητας. Η μεθοδολογία αυτή απαιτεί χρόνο και κόστος. Η κρυσταλλογραφία συγγένειας μειώνει το κόστος και τις εργατοώρες, καθώς μέσω εμβάπτισης των πρωτεϊνικών κρυστάλλων με τα εκχυλίσματα η/οι ένωση/εις με τη μεγαλύτερη συγγένεια θα προσδεθεί/ούν στην πρωτεΐνη στόχο. Ωστόσο, εμφανίζονται κάποιες δυσκολίες ως προς την εύρεση της ένωσης καθώς το εκχύλισμα περιέχει μια πληθώρα ενώσεων και μορίων. Ωστόσο, η μέθοδος αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη σάρωση εκχυλισμάτων με υψηλή απόδοση, με στόχο την εύρεση νέων βιοδραστικών φυσικών ενώσεων τόσο για τη χρήση τους ως εν δυνάμει φάρμακα όσο και για τον κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό φαρμάκων (Aguda et al., 2016). Στην ακόλουθη εικόνα, συνοψίζονται τα στάδια του κατευθυνόμενου από τη δομή σχεδιασμού φαρμάκων (*Εικόνα 6*):

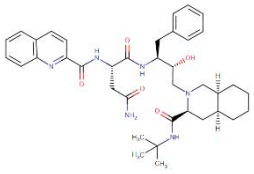
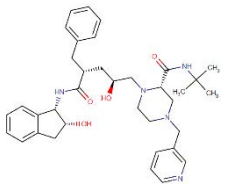
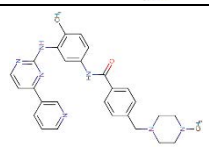
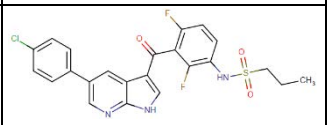
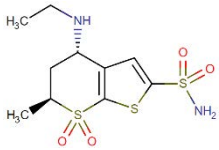
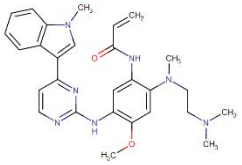
Εικόνα 6: Διαγραμματική απεικόνιση του δομικά κατευθυνόμενου σχεδιασμού φαρμάκων (Structure based drug design - SBDD).

Οι παραπάνω μέθοδοι μπορούν να οδηγήσουν στην εύρεση νέων βιοδραστικών ενώσεων που θα εμφανίζουν συγγένεια ως προς την πρωτεΐνη-στόχο. Οι ενώσεις που θα εμφανίζουν υψηλή συγγένεια, της τάξεως των μM, αξιολογούνται περαιτέρω σε δεύτερο κύκλο. Ο δεύτερος κύκλος αποτελείται από το δομικό χαρακτηρισμό και την αξιολόγηση του τρόπου πρόσδεσης των υποσχόμενων ενώσεων στην πρωτεΐνη-στόχο και με βάση αυτά τα δεδομένα οι ενώσεις βελτιστοποιούνται περαιτέρω με

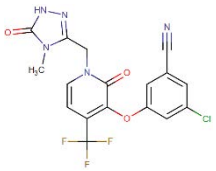
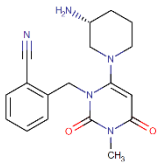
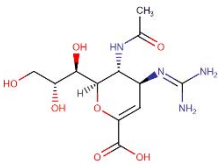
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

υπολογιστικές μεθόδους (Kuntz, 1992). Οι ενώσεις που επιλέγονται για βελτιστοποίηση θα πρέπει να είναι εφικτό να συντεθούν στο εργαστήριο και να αξιολογηθούν ως προς διάφορους περιοριστικούς παράγοντες. Οι παράγοντες αυτοί σχετίζονται με βάση τις ιδιότητες ADMET (absorption, distribution, metabolism, excrertion, toxicity), δηλαδή την απορρόφηση, κατανομή, μεταβολισμό, απέκκριση και τοξικότητα, έτσι ώστε να εμφανίσουν θετικό αποτέλεσμα στις κλινικές μελέτες. Αφού βρεθούν οι πρώτες υποψήφιες ενώσεις ακολουθούν και άλλοι κύκλοι βελτιστοποίησης ώστε να προκύψουν νέες ενώσεις που θα εμφανίζουν υψηλότερη συγγένεια και ειδικότητα ως προς την πρωτεΐνη-στόχο (Kuntz, 1992). Στον ακόλουθο πίνακα αναγράφονται μερικά φάρμακα που έχουν ανακαλυφθεί μέσω του SBDD και βρίσκονται διαθέσιμα στην αγορά μέχρι και σήμερα, (*Πίνακας 3*):

Πίνακας 3: Υπάρχοντα φαρμακευτικά σκευάσματα δομικά κατευθυνόμενα σχεδιασμένα με το έτος κυκλοφορίας τους. Παρατίθεται ο μοριακός στόχος τους, καθώς φαίνεται και ο χημικός τύπος αυτών των ουσιών, (https://go.drugbank.com/).

Φαρμακευτική ουσία	**Εμπορική ονομασία**	**Μοριακός στόχος**	**Εταιρία**	**Drug Bank ID**	**Χημικός τύπος**
Saquinavir (1995)	Invirase	HIV πρωτεάση	Genentech - Roche	DB01232	
Indinavir (1996)	Crixivan	HIV πρωτεάση	Merck & Co	DB00224	
Imatinib (2001)	Gleevec, Glivec	BCR-ABL	Novartis	DB00619	
Vemurafenib (2011)	Zelboraf	B-raf πρωτεϊνική κινάση	Genentech	DB08881	
Dorzolamide (2012)	Trusopt	Καρβονική ανυδράση	Merck	DB00869	
Osimertinib (2015)	Tagrisso	EGFR	AstraZeneca	DB09330	

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

Doravirine (2018)	Pifeltro	Αντίστροφη μεταγραφάση του ιού HIV	Merck & Co	DB12301	
Alogliptin (2013)	Nesina, Vipidia	Διπεπτιδυλ-πεπτιδάση 4	Takeda Pharma	DB06203	
Zanamivir (1999)	Relenza	Νευραμινιδάση του ιού της γρίπης A και B	Glaxosmithkline (GSK) LLC	DB00558	

1.2.3 Κατευθυνόμενος από τη δομή σχεδιασμός φαρμάκου κατά της ελονοσίας

Όπως έχει τονιστεί, η ανάγκη εύρεσης μιας ασφαλούς, αποδοτικής και οικονομικά βιώσιμης θεραπευτικής στρατηγικής κατά της ελονοσίας, είναι επιτακτική. Καθώς οι υπάρχουσες επιλογές για την αντιμετώπιση της ασθένειας έχουν χαρακτηριστεί ως μη επαρκώς αποτελεσματικές, η ερευνητική κοινότητα στρέφεται σε νέους φαρμακευτικούς στόχους και προσεγγίζει διαφορετικές μεθόδους φαρμακευτικού σχεδιασμού, οι οποίες αποδεδειγμένα έχουν επιτυχή αποτελέσματα σε άλλες περιπτώσεις ασθενειών.

Μία πολλά υποσχόμενη προσέγγιση που φέρει την προοπτική της ανάπτυξης ενός φαρμάκου με τα προσδοκόμενα αποτελέσματα, είναι η στόχευση πρωτεϊνών με γενικευμένο ρόλο στον κύκλο ζωής του *P. falciparum*. Τέτοιες πρωτεΐνες είναι οι μοριακές συνοδοί (molecular chaperones), οι οποίες διαδραματίζουν ζωτικής σημασίας ρόλο στην ομαλή λειτουργία των πρωτεϊνών ενός οργανισμού (Przyborski et al., 2015).

Προσεγγίσεις τέτοιου είδους και σύμφωνα με τον κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό φαρμάκων (SBDD), βασίζονται κυρίως στην εύρεση ενώσεων που εμφανίζουν υψηλή συγγένεια και εξειδίκευση ως προς την πρωτεΐνη συνοδό, λίγες παρενέργειες και καλό φαρμακοκινητικό και φαρμακοδυναμικό προφίλ.

Η αξιολόγηση και ο χαρακτηρισμός του τρόπου πρόσδεσης των ενώσεων στους μοριακούς συνοδούς, μπορεί να διεξαχθεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων X (Ali et al., 2022), (μέθοδος που αναλύεται εκτενώς παρακάτω), φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR και κρυο-ηλεκτρονιακή μικροσκοπία (Cryo-EM). Η αξιολόγηση της αγχιστείας μεταξύ της ένωσης και της πρωτεΐνης μπορεί να διεξαχθεί

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

με βιοχημικές κινητικές μελέτες και βιοφυσικές μεθόδους όπως η θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης (Isothermal Titration Calorimetry - ITC) (Pervushin et al., 1997), (Bai et al., 2015)

1.3 Μοριακοί συνοδοί (molecular chaperones)

Οι πρωτεΐνες, ως καίριοι δομικοί λίθοι των βιολογικών συστημάτων, για να καταστούν λειτουργικά ενεργές θα πρέπει να αναδιπλωθούν με τον κατάλληλο τρόπο. Η πρωτεϊνική αναδίπλωση είναι σε ορισμένες περιπτώσεις μια αυθόρμητη διαδικασία, κατά την οποία τα πολυπεπτίδια λαμβάνουν αμέσως την τελική τους διαμόρφωση στο χώρο. Σε άλλες περιπτώσεις ωστόσο, για να φτάσει μια πρωτεΐνη να αναδιπλωθεί ορθά και να επιτελέσει τον βιολογικό της ρόλο, χρειάζεται τη συνεισφορά μιας κατηγορίας πρωτεϊνών που ονομάζονται μοριακοί ακόλουθοι ή μοριακοί συνοδοί. Αυτές οι πρωτεΐνες λοιπόν, υποβοηθούν στη σωστή αναδίπλωση μη αναδιπλωμένων ή εσφαλμένα αναδιπλωμένων πολυπεπτιδίων, καθώς επίσης, αποτρέπουν το σχηματισμό πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων που μπορεί να επιφέρουν τοξικές συνέπειες στα κύτταρα (Sidawy et al., 1999).

1.3.1 Πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Heat shock proteins)

Οι μοριακοί συνοδοί δρουν αυτούσια, αναδιπλώνοντας σωστά πολυπεπτιδικές αλυσίδες που κατά τη σύνθεσή τους αποδεσμεύονται από τα ριβοσώματα, υδρολύοντας ένα μόριο ATP. Ωστόσο έχει παρατηρηθεί πως σε καταστάσεις στρες για το κύτταρο και ειδικότερα σε καταστάσεις θερμικού σοκ, επάγεται η έκφραση των γονιδίων των μοριακών συνοδών. Αυτό κυρίως συμβαίνει καθώς σε καταστάσεις στρεσογόνες για το κύτταρο, οι πρωτεΐνες αρχίζουν να ξεδιπλώνονται μερικώς με αποτέλεσμα να φθίνει η λειτουργικότητά τους. Έτσι λοιπόν η βασικότερη υποκατηγορία μοριακών συνοδών αποτελείται από τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ (heat shock proteins - HSPs) (Sidawy et al., 1999). Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ διακρίνονται σε κάποιες οικογένειες (Frydman, 2001):

- Hsp70s (πχ DnaK - προκαρυωτική)
- Hsp90s (πχ Grp94)
- Hsp40s (πχ DnaJ - προκαρυωτική) – δρουν επικουρικά ως συν - συνοδοί
- sHsps (Μικρές πρωτεΐνες θερμικού σοκ)
- AAA+ πρωτεΐνες
- Σαπερονίνες (chaperonins) (πχ GroES, GroEL - προκαρυωτικές, Hsp60s)

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

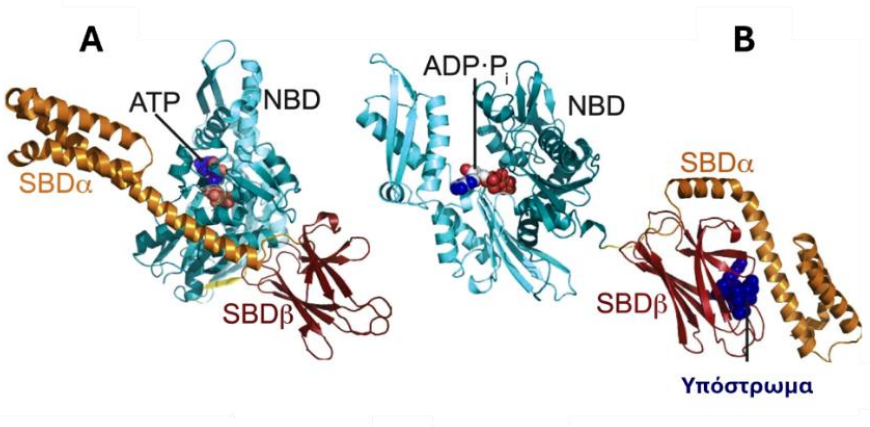
Σημειώνεται ότι ο αριθμός της κάθε πρωτεΐνης σηματοδοτεί το μοριακό της βάρος. Με άλλα λόγια, το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης Hsp90 ανέρχεται στα 90 kDa.
Πρόκειται για πολύ καλά μελετημένες πρωτεΐνες που εμφανίζουν ιδιαίτερα υψηλά ποσοστά συντήρησης των αλληλουχιών τους μεταξύ διαφορετικών οργανισμών, γεγονός που δημιουργεί πρόκληση για τη στόχευσή τους από πιθανές φαρμακευτικές ενώσεις.

Δομή και λειτουργία της πρωτεΐνης Hsp70

Η πρωτεΐνη Hsp70, ανήκει στην κατηγορία των μοριακών συνοδών και αλληλεπιδρά με τα υδρόφοβα αμινοξικά κατάλοιπα του αδίπλωτου πολυπεπτιδίου που πρόκειται να αναδιπλωθεί. Το συνολικό της μοριακό βάρος ανέρχεται στα 70 kDa και αποτελείται από τρεις κύριες επικράτειες (domains):

- Επικράτεια πρόσδεσης νουκλεοτιδίων (Nucleotide binding domain - NBD), μοριακού βάρους 45 kDa, η οποία βρίσκεται στο αμινοτελικό (N-τελικό) άκρο της πρωτεΐνης
- Επικράτεια πρόσδεσης υποστρώματος (Substrate binding domain - SBD), μοριακού βάρους περίπου 15 kDa
- Καρβοξυτελική (C-τελική) επικράτεια με δομή α-έλικας, μοριακού βάρους 10 kDa (Kityk et al., 2012).

Στην περιοχή NBD, εμπεριέχεται η περιοχή πρόσδεσης και υδρόλυσης της ATP, ενώ η επικράτεια SBD, αποτελεί την περιοχή αλληλεπίδρασης με το μη αναδιπλωμένο ή εσφαλμένα αναδιπλωμένο πολυπεπτίδιο. Οι δύο αυτές επικράτειες συνδέονται μεταξύ τους με έναν υδρόφοβο βρόχο και η τρισδιάστατη δομή παρουσιάζεται παρακάτω (*Εικόνα 7*):



Εικόνα 7: Τρισδιάστατες δομές της προκαρυωτικής Hsp70 (DnaK) πρωτεΐνης, σε δύο διαμορφώσεις της. Α) Δομή της «κλειστής» πρωτεΐνης λόγω της πρόσδεσης με την ATP στην επικράτεια NBD και άρα της μη κάμψης της C-τελικής α-έλικας (PDB ID: 4B9Q) και Β) δομή της «ανοιχτής» πρωτεΐνης λόγω της πρόσδεσης με την ADP στην επικράτεια NBD και άρα την αύξηση της συγγένειας της πρωτεΐνης με τα πρωτεϊνικά υποστρώματα που πρόκειται να αναδιπλώσει (PDB ID: 2KHO), (Kityk et al., 2012).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

Μηχανισμός δράσης

Η ικανότητα της πρωτεΐνης Hsp70 να υποβοηθά στην αναδίπλωση άλλων πρωτεϊνών είναι άμεσα εξαρτημένη από την υδρόλυση της ATP. Συγκεκριμένα, όσο η ATP είναι συνδεδεμένη σε μια συγκεκριμένη περιοχή της επικράτειας NBD, η καρβοξυτελική περιοχή α-έλικας, βρίσκεται σε κλειστή διαμόρφωση και η συγγένεια για μια αδίπλωτη πρωτεΐνη στην επικράτεια SBD, είναι μειωμένη. Με την υδρόλυση της ATP σε ADP και P_i, η στερεοδιάταξη της πρωτεΐνης Hsp70 επηρεάζεται, καθώς ανοίγει η καρβοξυτελική περιοχή α-έλικας και έτσι η συγγένεια της SDB για τα αδίπλωτα πολυπεπτίδια αυξάνεται σχεδόν κατά 10 φορές (Patury et al., 2009). Τέλος, με τη βοήθεια ενός παράγοντα ανταλλαγής νουκλεοτιδίων (Nucleotide exchange factor - NEF), η ADP ανταλλάσσεται με ATP και η πρωτεΐνη έρχεται στην αρχική της στερεοδιαμόρφωση (Fernández-Fernández & Valpuesta, 2018).
Ο μηχανισμός που περιεγράφηκε μελετήθηκε ιδιαίτερα στην προκαρυωτική ορθόλογη πρωτεΐνη DnaK (Assimon et al., 2013.) είναι ο ίδιος για την πλειοψηφία των ειδών αφού, οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ εμφανίζουν ασυνήθιστα ποσοστά συντήρησης μεταξύ διαφορετικών ειδών (Saibil, 2013).

Δομή και λειτουργία της πρωτεΐνης Hsp40

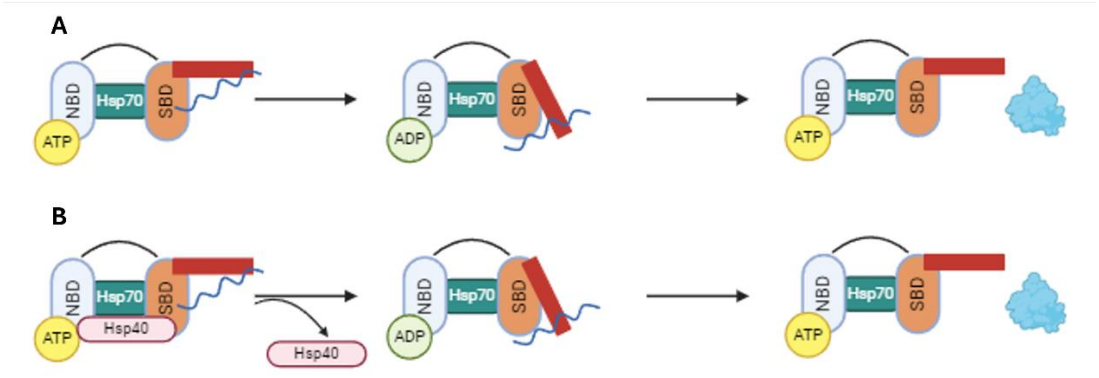
Οι πρωτεΐνες της οικογένειας Hsp40, ανήκουν στις J-πρωτεΐνες. Όπως όλες οι πρωτεΐνες αυτής της κατηγορίας, αποτελούνται από τη χαρακτηριστική επικράτεια J (J Domain), η οποία έχει δομή α-έλικας και βρίσκεται στο αμινοτελικό της άκρο (N-τελικό). Στην επικράτεια J εντοπίζεται το συντηρημένο μοτίβο των τριών αμινοξέων His-Pro-Asp (HPD), το οποίο είναι ιδιαίτερα σημαντικό, καθώς συμμετέχει στις αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες θερμικού σοκ. Επιπλέον στο αμινοτελικό άκρο συμπεριλαμβάνονται και περιοχές πλούσιες σε κυστεΐνη (Cys, C), zinc – binding domain. Η κατηγορία των πρωτεϊνών J χωρίζεται σε τρεις τάξεις (I, II και III), με ελάχιστες δομικές διαφορές, όπως την απουσία του zinc – binding domain στις τάξης II πρωτεΐνες J, αλλά και στην ύπαρξη της επικράτειας J σε διαφορετικό σημείο από το N-τελικό άκρο των τάξεως III με των I και II. Στην *Εικόνα 8*, παρατίθεται η τρισδιάστατη δομή της βακτηριακής Hsp40 (DnaJ) (PDB ID: 1XBL) (Pellecchia et al., 1996):

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

Εικόνα 8: Τρισδιάστατη δομή της προκαρυωτικής Hsp40 (J πρωτεΐνης) μέσω επίλυσης φάσματος NMR. Με κόκκινο σημειώνεται το μοτίβο HPD), το οποίο συμμετέχει στις αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες θερμικού σοκ, (PDB ID: 1XBL), (Pellecchia et al., 1996).

1.3.2 Αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών θερμικού σοκ

Αναπόσπαστο κομμάτι της λειτουργίας των πρωτεϊνών θερμικού σοκ, είναι η αλληλεπίδρασή τους με άλλες τέτοιες πρωτεΐνες. Συγκεκριμένα η πρωτεΐνη Hsp70 (μοριακή συνοδός), αλληλεπιδρά με επικράτειες πρωτεϊνών J, όπως η Hsp40 (μοριακή συν-συνοδός – molecular co-chaperone) (Barral et al., 2004) ή η προκαρυωτική πρωτεΐνη συν-συνοδός DnaJ (Liberek et al., 1991) σε βακτηριακά συστήματα. Μέσω αυτής της σχέσης η υδρόλυση της ATP γίνεται 5 με 10 φορές ταχύτερα (Patury et al., 2009), μια διαδικασία η οποία γίνεται με σχετικά αργό ρυθμό. Εφόσον λοιπόν η ικανότητα της Hsp70 εξαρτάται από την υδρόλυση της ATP, η αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών είναι ιδιαίτερα σημαντική. Η πρωτεΐνη συν-συνοδός, θα συνδεθεί μέσω της επικράτειας J της στην επικράτεια πρόσδεσης νουκλεοτιδίων της πρωτεΐνης Hsp70 και θα επιταχύνει την υδρόλυση της ATP σε ADP, με αποτέλεσμα την κάμψη της καρβοξυτελικής ελικοειδούς επικράτειας της. Η σύνδεση αυτή επιτυγχάνεται μέσω του πολύ καλά συντηρημένου μοτίβου His-Pro-Asp (HPD) που βρίσκεται μεταξύ της 2^{ης} και 3^{ης} α-έλικας της J πρωτεΐνης (Patury et al., 2009). Έτσι με πολύ πιο γρήγορο τρόπο, η Hsp70 αναδιπλώνει τις πρωτεΐνες – στόχους της. Στην ακόλουθη εικόνα (*Εικόνα 9*) παρουσιάζεται σχηματικά ο μηχανισμός δράσης πρωτεΐνης συνοδού – συν-συνοδού:



Εικόνα 9: Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού δράσης της πρωτεΐνης Hsp70. Α) Η πρωτεΐνη Hsp70 χωρίς τη συνεισφορά της Hsp40 J-πρωτεΐνης, υδρολύει με πολύ αργούς ρυθμούς την ATP σε ADP και με αυτό τον τρόπο προκαλεί την κάμψη της C-τελικής περιοχής της επικράτειας SBD (απεικονίζεται με κόκκινο χρώμα), ώστε να παραλάβει και να αναδιπλώσει το υπόστρωμα. Β) Ακολουθείται η ίδια διαδικασία, με τη διαφορά ότι συμμετέχει η συν-συνοδός Hsp40, η οποία μέσω της σύνδεσής της κυρίως στην επικράτεια NBD της Hsp70, επιταχύνει κατά πολύ την υδρόλυση της ATP και κατ' επέκταση αυξάνει τη δραστικότητα της, (Created with BioRender.com).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

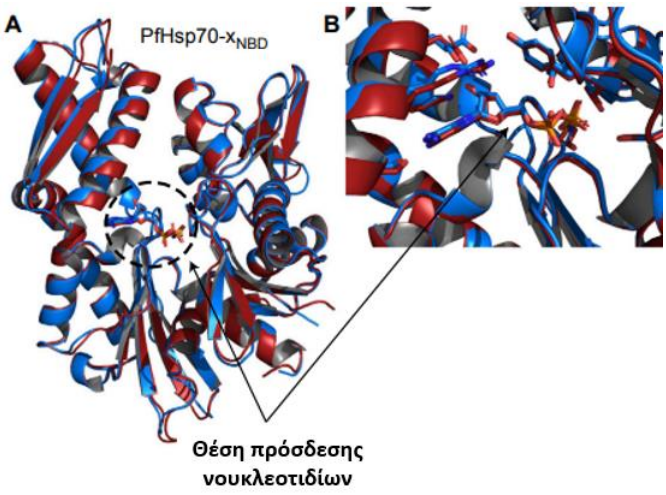
1.4 Μοριακοί συνοδοί (molecular chaperones) του *P. falciparum* και ανάπτυξη ανθελονοσιακών φαρμάκων

Οι μοριακοί συνοδοί, όπως και σε άλλους οργανισμούς, έτσι και στο *P. falciparum*, διαδραματίζουν κομβικό ρόλο στην πρωτεϊνική ομοιόσταση του συμβάλλοντας στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών του. Συγκεκριμένα κατά το στάδιο της μόλυνσης των ερυθροκυττάρων, το *P. falciparum*, εξάγει περίπου το 10% του πρωτεώματός του, δηλαδή λίγες περισσότερες από 450 πρωτεΐνες (το μεγαλύτερο ποσό συγκριτικά με τα υπόλοιπα είδη πλασμωδίου που προκαλούν ελονοσία). Ένα μέρος από αυτές, είναι απαραίτητο για τις ανάγκες της μόλυνσης ερυθροκυττάρων και το γεγονός ότι χρειάζονται αναδίπλωση από τις πλασμωδιακές μοριακές συνοδούς είναι επιβεβαιωμένο (Przyborski et al., 2015). Ένας ακόμη λόγος που καθιστά πολύ καίρια την παρουσία μοριακών συνοδών στο *P. falciparum*, είναι πως με σίγηση του υπεύθυνου γονιδίου που κωδικοποιεί τη μοναδική μοριακή συνοδό που εξάγει το *P. falciparum* (PfHsp70-x), το πλασμώδιο δεν επιβιώνει (Day et al., 2019). Συνεπώς οι μοριακοί συνοδοί, μπορούν να αποτελέσουν εν δυνάμει φαρμακευτικούς στόχους, καθώς με μια ενδεχόμενη αναστολή τους, η πιθανότητα επιβίωσης για το *P. falciparum* θα μειωθεί.

Σε ότι αφορά τη δομή οι διαφορές είναι ελάχιστες έως και αμελητέες σε σχέση με ό,τι αναφέρθηκε για τις μοριακές συνοδούς και τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ στο εδάφιο 1.3. Η παρούσα διπλωματική εργασία, στρέφεται γύρω από την πλασμωδιακή Hsp70 (Heat shock protein 70kDa – PfHsp70-x) και τη συν-συνοδό της, J – πρωτεΐνη PFE0055c, η οποία επιταχύνει την υδρόλυση της ATP και κατ’ επέκταση η PfHsp70-x επιτελεί ταχύτερα τη λειτουργία της (Dutta et al., 2020.)(Day et al., 2019). Αναφορικά με τη λειτουργία του συμπλόκου PfHsp70-x - PFE0055c, εντοπίζονται κάποιες σημαντικές διαφορές. Πέραν της αναδίπλωσης των πλασμωδιακών πρωτεϊνών σε συνδυασμό με την ταχύτερη υδρόλυση της ATP, το σύμπλοκο σχηματίζει δομές που ονομάζονται σφαιρίδια J (J-dots). Οι συγκεκριμένες δομές φαίνεται να μεταφέρουν πρωτεΐνες του πλασμωδίου στη μεμβράνη του ερυθροκυττάρου, καίριες για το στάδιο της ερυθροκυτταρικής σχιζογονίας, όπως η PfEMP1 (Dutta et al., 2020).

Η πρωτεΐνη PfHsp70-x, εμφανίζει μεγάλο βαθμό ταυτότητας της τάξεως του 70% στην αμινοξική της αλληλουχία με την αντίστοιχη ανθρώπινη πρωτεΐνη (hsHsp70) (ορθόλογα γονίδια), γεγονός που αποτυπώνεται στην *Εικόνα 10* (Day et al., 2019).

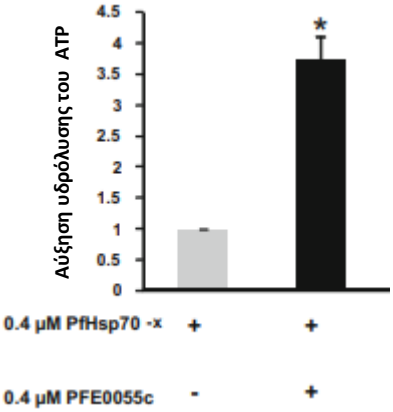
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250



Εικόνα 10: Α) Δομική υπέρθεση της πλασμωδιακής NBD (PfHsp70-x NBD, PDB ID: 6RZQ), με μπλε χρώμα και της ανθρώπινης NBD (hsHsp70 NBD, PDB ID: 4J8F), με κόκκινο χρώμα κατά την οποία φαίνεται η μεγάλη τους ομοιότητα. Β) Μεγέθυνση της θέσης σύνδεσης νουκλεοτιδίων (σε αυτή την περίπτωση AMP-PnP), (Day et al., 2019).

Παρ' όλο που η πρωτεΐνη PfHsp70-x έχει ενζυμική δραστικότητα, καθώς έχει την ικανότητα να υδρολύει την ATP, δεν θεωρείται ξεκάθαρα ένζυμο. Αυτό συμβαίνει, διότι η κύρια και τελική της λειτουργία να αναδιπλώνει άλλες πρωτεΐνες δεν μπορεί να την εντάξει σε κάποια ενζυμική κατηγορία. Ωστόσο, λόγω της δραστικότητας ATPάσης, μπορεί να ενταχθεί στην 3η κατηγορία ενζύμων (Enzyme commission number – EC Number), στην οποία ανήκουν οι υδρολάσες (https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iubmb/ - EC 3.6.1.3 - ATPase).

Σε ότι αφορά την συν-συνοδό της, την PFE0055c, αλληλεπιδρά με την περιοχή NBD της PfHsp70-x, μέσω του μοτίβου His-Pro-Asp (HPD) που βρίσκεται μεταξύ της 2ης και 3ης α-έλικας της πλασμωδιακής πρωτεΐνης J. Αυτή η αλληλεπίδραση αυξάνει την ταχύτητα της υδρόλυσης της ATP παραπάνω από τρεις φορές (Dutta et al., 2020.), (Day et al., 2019) όπως φαίνεται στην ακόλουθη εικόνα (*Εικόνα 11*):



Εικόνα 11: Κινητική μελέτη που εφαρμόστηκε με δύο διαφορετικές συνθήκες. 1η συνθήκη: 5 mM ATP + 0,4 μM PfHsp70-x και 2η συνθήκη: 5 mM ATP + 0,4 μM PfHsp70-x + 0,4 μM PFE0055c. Έπειτα έγινε φωτομετρικός προσδιορισμός των παραγόμενων φωσφορικών ιόντων από την υδρόλυση του ATP και με βάση την οπτική απορρόφηση κατασκευάστηκε το διάγραμμα, (Dutta et al., 2020).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

Έτσι λοιπόν, γίνεται κατανοητό πως υπάρχουν τουλάχιστον δύο πιθανοί φαρμακευτικοί στόχοι για την ανάπτυξη ανθελονοσιακών φαρμάκων: η περιοχή πρόσδεσης νουκλεοτιδίων (NBD) του *P. falciparum* και η περιοχή αλληλεπίδρασης της PfHsp70-x με την συν-συνοδό PFE0055c.

Σε αυτή την πτυχιακή εργασία, εξετάζεται ο πρώτος φαρμακευτικός στόχος, δηλαδή διερευνάται η πιθανή αναστολή της δραστικότητας ATPάσης της επικράτειας NBD της πρωτεΐνης PfHsp70-x, καθώς η υδρόλυση της ATP, αποτελεί τον κινητήριο μοχλό για την έναρξη του κύκλου λειτουργίας της πλασμωδιακής μοριακής συνοδού.

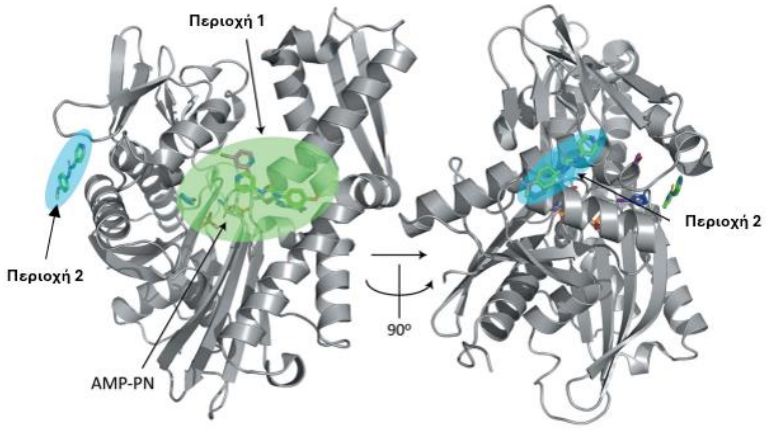
Είναι απαραίτητο να τονιστεί το γεγονός ότι η πλασμωδιακή Hsp70 (PfHsp70-x) είναι η μοναδική μοριακή συνοδός που εξάγει το *P. falciparum* κατά τη διαδικασία της εισόδου του στα ανθρώπινα ερυθροκύτταρα (Warncke et al., 2016). Γίνεται επομένως αντιληπτό πως η PfHsp70-x παίζει κυρίαρχο ρόλο στην μολυσματικότητα αλλά και την επιβίωση του*P. falciparum*, και ως εκ τούτου αποτελεί επικυρωμένο μοριακό στόχο και το αντικείμενο της παρούσας μελέτης για την ανάπτυξη ανθελονοσιακού φαρμάκου.

Με την επιλογή του συγκεκριμένου στόχου, θα πρέπει να ληφθεί υπόψη πως οι εν δυνάμει αναστολείς, θα πρέπει να συνδέονται σε σημείο το οποίο δεν είναι συντηρημένο και διαφέρει από τις ανθρώπινες hsHsp70s μοριακές συνοδούς. Με άλλα λόγια, ο προσδέτης θα πρέπει να προσδένεται εντός της επικράτειας NBD, ώστε να αναστέλλει την υδρόλυση της ATP. Παράλληλα όμως, θα πρέπει να προσδένεται σε μοναδική περιοχή, αποκλείοντας την περιοχή πρόσδεσης της ATP που είναι υψηλά συντηρημένη ώστε να μην αναστέλλει δυνητικά και τις ανθρώπινες HSPA1A, HSPA1B και HSPA8.

Σε πρόσφατες κρυσταλλογραφικές μελέτες κρύσταλλοι της επικράτειας NBD της PfHsp70-x, εμβαπτίστηκαν σε διαλύματα διαφορετικών προσδετών που είχαν σχεδιαστεί να προσδένονται στην επικράτεια NBD (crystallographic fragment screening). Ο σκοπός αυτών των μελετών, ήταν να αναγνωριστεί η ακριβής θέση της πρόσδεσης μικρών μορίων, η οποία να επηρεάζει την υδρόλυση της ATP και ταυτόχρονα να μην είναι αυστηρώς συντηρημένη με ανθρώπινες Hsp70s (Mohamad et al., 2021).

Οι περιοχές που ύστερα από κατάλληλη επεξεργασία των δεδομένων περίθλασης των κρυστάλλων, εμφάνισαν πρόσδεση ήταν οι περιοχές 1 και 2 που παρουσιάζονται στην *Εικόνα 12* ακολούθως:

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250



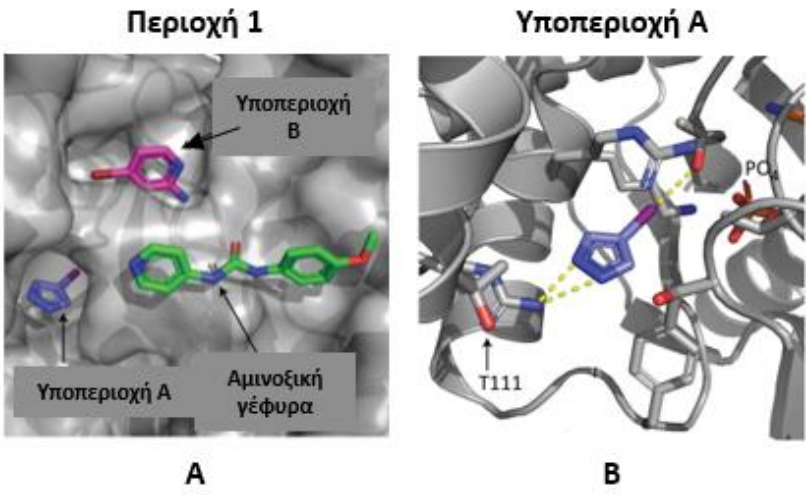
Εικόνα 12: Οι περιοχές που παρατηρείται σύνδεση των προσδετών στην επικράτεια NBD της PfHsp70-x, (Mohamad et al., 2021).

Αναλυτικότερα, η περιοχή 1 (Site 1) χωρίζεται σε 2 υποπεριοχές (υποπεριοχή A και B) που μεταξύ τους διακόπτονται από μια «πρωτεϊνική γέφυρα» αποτελούμενη από δυο ζεύγη αμινοξέων: Asp115-His257 και Arg101-Thr256. Με βάση αυτές τις μελέτες το ενδιαφέρον εστιάσθηκε στην υποπεριοχή A (Subsite A), καθώς αυτή βρίσκεται σε κοντινή απόσταση στην περιοχή πρόσδεσης της ATP (στις συνθήκες κρυστάλλωσης έχει προστεθεί AMP-PnP, το οποίο υδρολύεται σε AMP-Pn, ενώ η φωσφορική ομάδα εκτοπίζεται ελάχιστα πιο μακριά). Αυτό σημαίνει πως ο προσδέτης που θα συνδεθεί σε εκείνο το σημείο και λόγω απόστασης της συγκεκριμένης θέσης μπορεί να αναστείλει την υδρόλυση της ATP. Από την άλλη τα αμινοξικά κατάλοιπα που συμμετέχουν στην πρόσδεση είναι τα: Thr42, Lys100, Arg101, Arg105, Tyr179, Thr234 και Thr256. Τα συγκεκριμένα αμινοξέα είναι αυστηρά συντηρημένα με την ανθρώπινη hsHsp70, ωστόσο σε απόσταση 5 Å από το σημείο πρόσδεσης, βρίσκεται το κατάλοιπο Thr111 το οποίο στην ανθρώπινη πρωτεΐνη απαντάται σε Val111. Αυτή λοιπόν η μικρή και ευαίσθητη λεπτομέρεια, μπορεί να σηματοδοτεί μια μοναδική περιοχή πρόσδεσης, ιδανική για τον ευρύτερο στόχο (Mohamad et al., 2021).

Επιπλέον ,η υποπεριοχή B της περιοχής 1, από τη μία είναι μεγαλύτερη και επιτρέπει την πρόσδεση μεγαλύτερων μορίων, ωστόσο όλα τα αμινοξέα εντός 5 Å από το σημείο πρόσδεσης είναι αυστηρά συντηρημένα.

Τέλος στην περιοχή 2 (Site 2), παρατηρήθηκε μεν σύνδεση ενός προσδέτη, ωστόσο η ίδια η περιοχή θεωρείται απομακρυσμένη από την περιοχή σύνδεσης της ATP, επομένως μόνο προσδέτες με μεγάλη συγγένεια για την πρωτεΐνη, ίσως να μπορούσαν να φανούν αποδοτικοί. Ωστόσο και σε αυτή την περίπτωση τα αμινοξέα που συμμετέχουν στην πρόσδεση, είναι αυστηρά συντηρημένα. Στην παρακάτω εικόνα (*Εικόνα 13*), αποτυπώνονται οι περιοχές που σημειώθηκε πρόσδεση στην NBD της PfHsp70-x:

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250



Εικόνα 13: Α) Απεικόνιση της περιοχής 1 (Site 1). Β) Απεικόνιση του σημείου πρόσδεσης στην υποπεριοχή Α (Subsite A), καθώς και αλληλεπίδραση προσδέτη με το κατάλοιπο Thr111, (Mohamad et al., 2021).

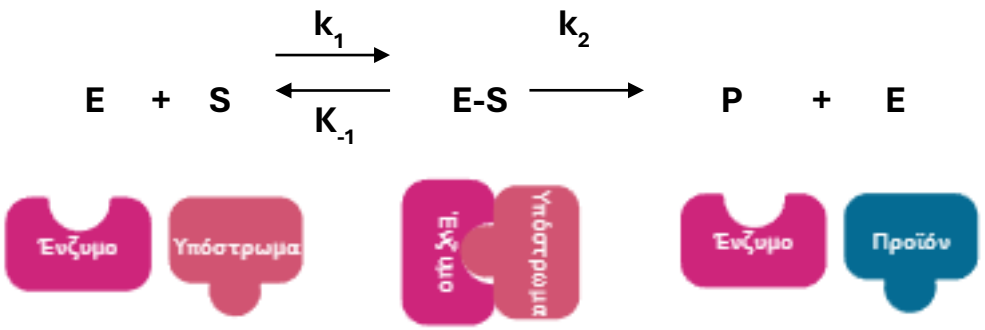
Ανακεφαλαιώνοντας, το σημείο που εμφανίζει τη μεγαλύτερη προοπτική για την ανάπτυξη νέων εν δυνάμει αναστολέων είναι η υποπεριοχή Α της περιοχής 1. Με βάση τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής, επικεντρωθήκαμε στην περιοχή αυτή που σχηματίζει μια βαθιά κοιλότητα (pocket) που συγκροτείται από τα κατάλοιπα Thr42, Lys100, Arg101, Arg105, Tyr179, Thr 111, Thr234 και Thr256 (Mohamad et al., 2021). Αυτή η κοιλότητα προσφέρει άμεση πρόσβαση στην ομάδα ορθοφωσφορικών ιόντων που αποχωρεί μετά την υδρόλυση της ATP. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει, ότι μικρά μόρια που συνδέονται σε αυτήν την περιοχή μπορεί να είναι ικανά να παρέμβουν στον καταλυτικό κύκλο της ATPάσης, για παράδειγμα σταθεροποιώντας την κατάσταση υδρόλυσης και εμποδίζοντας την ανταλλαγή ADP.

1.5 Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων

Ενζυμική κινητική ονομάζεται η μελέτη της ταχύτητας των ενζυμικά καταλυόμενων αντιδράσεων. Η ταχύτητα κατάλυσης μιας αντίδρασης μπορεί να υπολογιστεί μέσω της μέτρησης παραγωγής του προϊόντος (P) της σε συνάρτηση με τον χρόνο, με την χρήση διαφορετικών συγκεντρώσεων του υποστρώματος (S). Όσο περνάει ο χρόνος, η συγκέντρωση του P ([P]) αυξάνεται ενώ η συγκέντρωση του S ([S]) μειώνεται μέχρι που φτάνει μια χρονική στιγμή όπου το σύστημα επέρχεται σε μια κατάσταση ισορροπίας. Κατά την κατάσταση αυτή, το σύστημα μετατρέπει το υπόστρωμα σε προϊόν αλλά και το προϊόν σε υπόστρωμα με ίδιους ρυθμούς, και έτσι δεν παρατηρείται σημαντική μεταβολή στις συγκεντρώσεις αντιδρώντων και προϊόντων (Cornish-Bowden, 1996).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

Για πολλά ένζυμα η ταχύτητα της κατάλυσης V_0, η οποία ορίζεται ως ο αριθμός των μορίων του προϊόντος που σχηματίζονται ανά δευτερόλεπτο, μεταβάλλεται με τη συγκέντρωση του υποστρώματος, [S]. Πριν από περίπου 100 χρόνια οι Michaelis και Menten δημοσίευσαν την, πολύ διαδεδομένη πλέον, κλασσική δημοσίευση, μέσα από την οποία έδειξαν ότι ο ρυθμός μιας ενζυμικά καταλυόμενης αντίδρασης, είναι ανάλογος με τη συγκέντρωση του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος, όπως δείχνεται και από την εξίσωση Michaelis-Menten, χρησιμοποιώντας την ιμβερτάση ως ένζυμο για τις μελέτες τους (Bar-Even et al., 2011).
Το βασικό σχήμα της ενζυμικής αντίδρασης είναι το ακόλουθο (*Εικόνα 14*):



Εικόνα 14: Βασική μοντέλο ενζυμικών αντιδράσεων. E: Ένζυμο, S: Υπόστρωμα, P: Προϊόν και k_1, k_{-1}, k_2: Σταθερές ταχύτητας των αντίστοιχων αντιδράσεων, (Created with BioRender.com).

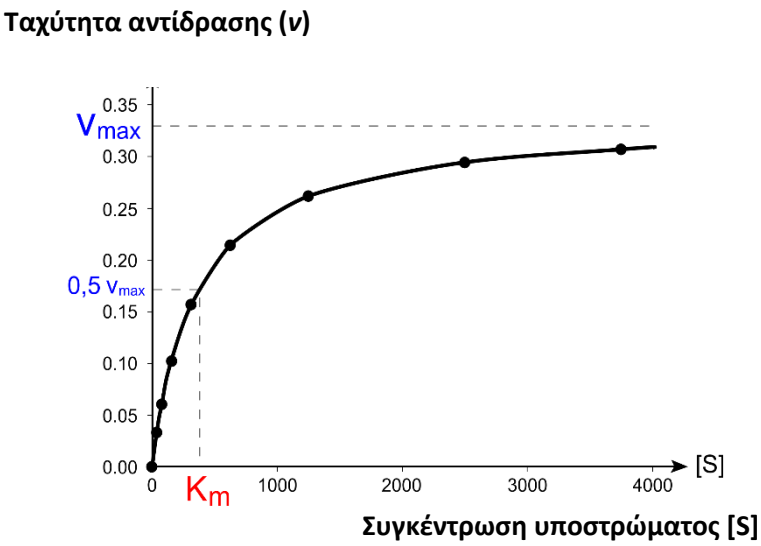
Για να απλουστευθούν τα πράγματα, χρησιμοποιείται η παραδοχή της σταθεροποιημένης κατάστασης (steady state). Στη σταθερή κατάσταση οι συγκεντρώσεις των ενδιάμεσων, στην περίπτωση αυτή το ES, παραμένουν σταθερές, ενώ οι συγκεντρώσεις των αρχικών ενώσεων και των προϊόντων αλλάζουν. Οι Michaelis και Menten κατέληξαν στη μαθηματική σχέση:

$$v = v0 = \frac{vmax\ [S]}{KM + [S]}$$

Όπου:
V_0: η ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης και
V_{max}: η μέγιστη ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης. Όπου V_0: η ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης V_{max} : η μέγιστη ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης. Η μέγιστη ταχύτητα V_{max} αποκαλύπτει τον ρυθμό μετατροπής ενός ενζύμου, ο οποίος είναι ο αριθμός των μορίων του υποστρώματος που μετατρέπονται σε προϊόν ανά μονάδα χρόνου από ένα μόριο ενζύμου όταν το ένζυμο είναι πλήρως κορεσμένο με υπόστρωμα. Η μέγιστη ταχύτητα, Vmax, ισούται με την κινητική σταθερά k_2, η οποία ονομάζεται και k_{cat}.
K_M: Σταθερά Michaelis - Menten που ορίζεται και ως $K_M = \frac{k-1+k2}{k1}$.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

Στην *Εικόνα 15*, παρατίθεται το διάγραμμα Michaelis – Menten (*v* = *f*([S]):



Εικόνα 15: Διάγραμμα Michaelis - Menten

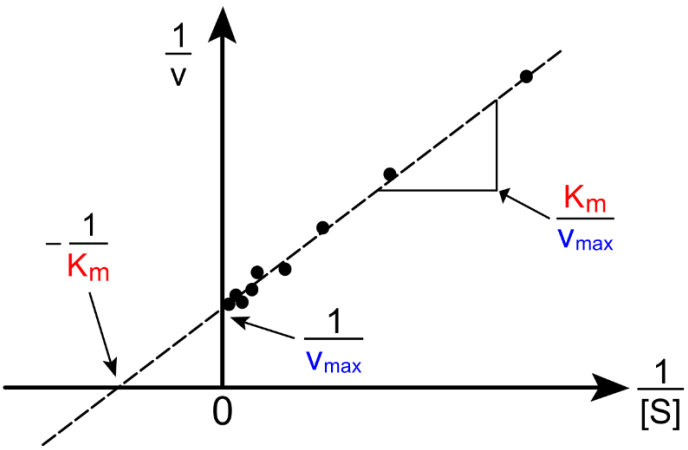
Επισημαίνεται πως η σταθερά Michaelis – Menten (K_M) έχει μονάδες συγκέντρωσης υποστρώματος. Επιπλέον αποτελεί μέτρο εκτίμησης της συγγένειας που εμφανίζει ένα ένζυμο για ένα υπόστρωμα. Όσο χαμηλότερη είναι η σταθερά K_M, τόσο μεγαλύτερη η συγγένεια ενζύμου – υποστρώματος. Σημαντικό χαρακτηριστικό των αλληλεπιδράσεων ενζύμου-υποστρώματος, ενώ δεν εξαρτάται από τις συγκεντρώσεις του ενζύμου και του υποστρώματος. Όταν [S]=K_M, τότε $v = \frac{vmax}{2}$. Έτσι η K_M είναι ίση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος, όταν η ταχύτητα της αντίδρασης είναι ίση με το μισό της μέγιστης τιμής της.

Αν η εξίσωση που δίνει τη σταθερά Michaelis – Menten ($v = v0 = \frac{vmax\,[S]}{KM+[S]}$), γραφεί με τη μέθοδο του διπλού αντιστόφου, τότε θα προκύψει η εξίσωση Lineweaver–Burk:

$$\frac{1}{v0} = \frac{KM}{vmax[S]} + \frac{1}{vmax}$$

Συνήθως, η σταθερά K_M προσδιορίζεται μέσω αυτής της εξίσωσης, της οποίας η γραφική παράσταση είναι ευθεία (y = ax + b) με τεταγμένη τις τιμές $1/v_0$ και τετμημένη τις τιμές 1/[S]. Μέσω του διαγράμματος Lineweaver-Burk (διπλού αντιστρόφου), μπορεί να υπολογιστεί από την κλίση της ευθείας ο λόγος K_M/v_{max}, ενώ το σημείο τομής με τον άξονα y'y, αντιστοιχεί στην τιμή $1/v_{max}$. Τέλος το σημείο τομής της ευθείας με τον άξονα x'x αντιστοιχεί στην τιμή $-1/K_M$ (Berg, J. M., 2019) (*Εικόνα 16*).

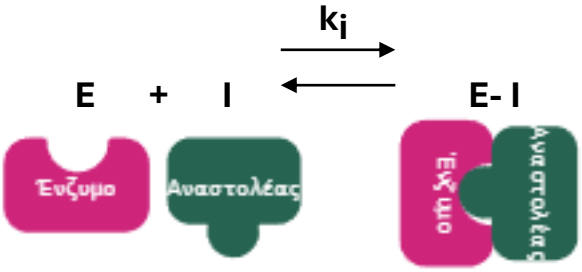
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250



Εικόνα 16: Διάγραμμα Lineweaver-Burk (Διπλού αντιστρόφου).

1.5.1 Αναστολή ενζυμικών αντιδράσεων

Η κατάλυση ενζυμικών αντιδράσεων μπορεί να ανασταλεί από κάποια μόρια-αναστολείς (Inhibitors - I). Πολλά φάρμακα και τοξικοί παράγοντες εκφράζουν τις ιδιότητές τους μέσω της αναστολής των ενζύμων-στόχων τους. Η ενζυμική αναστολή διακρίνεται σε αντιστρεπτή και σε μη αντιστρεπτή (Sharma, 2012). Οι μη αντιστρεπτοί αναστολείς συνδέονται πολύ ισχυρά στο ένζυμο, μέσω ομοιοπολικών και μη αλληλεπιδράσεων, και έτσι γίνεται πολύ δύσκολη και αργή η διαδικασία διαχωρισμού ενζύμου και αναστολέα. Οι αντιστρεπτοί αναστολείς, όπως προδίδει και η ονομασία τους, δεσμεύονται αμφίδρομα και πιο χαλαρά στο ένζυμο και έτσι οι διαχωρισμός του συμπλόκου ενζύμου - αναστολέα μπορεί να γίνει αρκετά γρήγορα. Η σχέση μεταξύ αντιστρεπτού αναστολέα και ενζύμου μπορεί να περιγραφή από την σχέση της *Εικόνας* 17:



Εικόνα 17: Σχέση αναστολέα – ενζύμου (Συναγωνιστική αναστολή), όπου Ε το ένζυμο, Ι ο αναστολέας και ΕΙ το σύμπλοκο ενζύμου-αναστολέα και ki η σταθερά αναστολής, (Created with BioRender.com).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

Η σταθερά Ki, αποτελεί τη σταθερά διάστασης του αναστολέα και περιγράφει πόσο εύκολα ή δύσκολα μπορεί να αποχωριστεί ο αναστολέας από το ένζυμο, δηλαδή να διασπαστεί το σύμπλοκο EI. Όσο μικρότερη είναι η K_i τόσο πιο ισχυρή η σύνδεση και η αναστολή που προκαλεί ο αναστολέας.

Είδη αναστολέων ανάλογα με το είδος κατάλυσης που προκαλούν:

- Συναγωνιστικοί αναστολείς (competitive inhibitors)
- Μη συναγωνιστικοί αναστολείς (non - competitive inhibitors)
- Ασυναγώνιστοι αναστολείς (uncompetitive inhibitors).

Οι συναγωνιστικοί αναστολείς έχουν αρκετά παρόμοια δομή με το υπόστρωμα του ενζύμου, και έτσι το ανταγωνίζονται για την πρόσδεσή τους. Το ένζυμο θα συνδέσει στο ενεργό του κέντρο ή τον αναστολέα ή το υπόστρωμά του, όχι όμως και τα δύο. Αν προσδεθεί ο αναστολέας, η ταχύτητα της αντίδρασης που καταλύει το ένζυμο μειώνεται, διότι τα μόρια του ενζύμου που έχουν προσδέσει υπόστρωμα είναι λιγότερα.

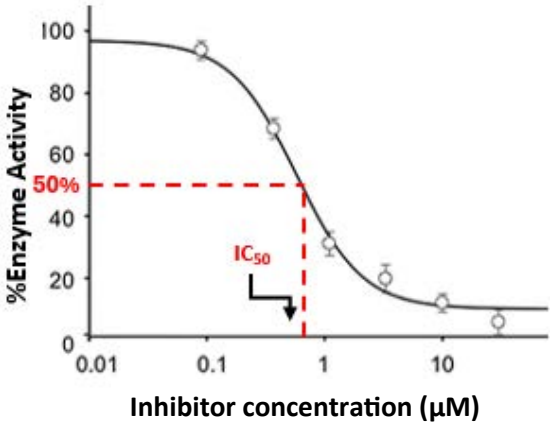
Στην μη συναγωνιστική αναστολή, ο αναστολέας και το υπόστρωμα προσδένονται σε διαφορετικές περιοχές του ενζύμου, με αποτέλεσμα να είναι εφικτή η ταυτόχρονη σύνδεσή τους στο ένζυμο, με την δημιουργία ενός συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος-αναστολέα (ESI), δηλαδή μέσω του φαινομένου του αλλοστερισμού, κατά το οποίο προσδέτες συνδέονται σε κέντρα του ενζύμου, διάφορα του ενεργού κέντρου. Με αυτόν τον τρόπο, συνήθως προκαλείται αλλαγή στη στερεοδιαμόρφωση του ενζύμου και ως αποτέλεσμα υπάρχει αναστολή, αφού τα μόρια υποστρώματος δεν μπορούν να συνδεθούν στο ενεργό κέντρο.

Ο ασυναγώνιστος αναστολέας τέλος, μπορεί να προσδεθεί μόνο στο σύμπλοκο ενζύμου υποστρώματος.

1.5.2 Η Τιμή IC_{50}

Ένας άλλος τρόπος έκφρασης ικανότητας αναστολής ενός αναστολέα, είναι ο πειραματικός προσδιορισμός της τιμής IC_{50} (inhibitory concentration 50%). Πρόκειται για την τιμή συγκέντρωσης ενός αναστολέα που προκαλεί 50% αναστολή στο ένζυμο που προσδένεται ή αντίστοιχα 50% μείωση της δραστικότητας του (*Εικόνα 18*).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250



Εικόνα 18: Διάγραμμα προσδιορισμού τιμής IC_{50}, η οποία προσδιορίζεται γραφικά με τη βοήθεια λογισμικού από το διάγραμμα ενζυμικής δραστικότητας σε συνάρτηση με διάφορες συγκεντρώσεις ενός αναστολέα.

1.6 Κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ

Η ανακάλυψη της περίθλασης ακτίνων Χ από κρυστάλλους σημείωση τη δημιουργία της κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ, η οποία χρησιμοποιεί τα διαγράμματα περίθλασης για τον υπολογισμό των θέσεων των ατόμων μέσα στον κρύσταλλο. Η ανακάλυψη της δομής της μυοσφαιρίνης από τον John Kendrew και της λυσοζύμης από τον David Phillips το 1965, οδήγησε στην ανάπτυξη της τεχνικής και στην επίλυση πάνω από 200.000 δομών πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων μέχρι σήμερα (PDB statistics). Τα τελευταία χρόνια οι μέθοδοι ανάπτυξης αλλά και βελτιστοποίησης των τεχνικών κρυστάλλωσης είχαν ως αποτέλεσμα την παραγωγή μιας πληθώρας πρωτεϊνικών δομών που παρείχαν σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τη κατανόηση της λειτουργίας των πρωτεϊνών. Μέχρι σήμερα, το 84% της Πρωτεϊνικής Βάσης Δεδομένων (RCSB-PDB) είναι δομές μακρομορίων που προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ (PDB statistics).

Η έκφραση και ο καθαρισμός των πρωτεϊνών σε ποσότητες που απαιτούνται για την κρυστάλλωση και κατ' επέκταση και την ανάλυση μέσω κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ, είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που απασχολεί τους ερευνητές Δομικής Βιολογίας. Επίσης, βασικός παράγοντας για την απόκτηση κρυστάλλων, είναι η ομοιογένεια του δείγματος (Ali et al., 2022). Παρά τη σημαντική προσπάθεια που αφιερώνεται στη θεωρία της κρυστάλλωσης μακρομορίων, η κατανόηση του φαινομένου είναι ακόμη σχετικά περιορισμένη (Krauss et al., 2013). Προκειμένου να ληφθούν οι κατάλληλοι κρύσταλλοι, η πρωτεΐνη πρέπει να βρίσκεται σε ποσοστό καθαρότητας >95%, ενώ όλα τα μακρομόρια του δείγματος να έχουν τον ίδιο μοριακό τύπο.

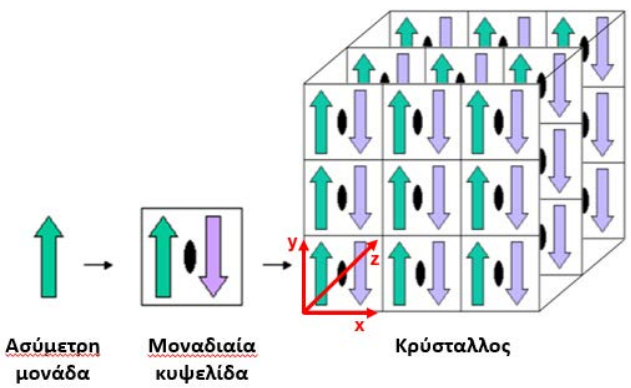
Άλλα εργαλεία του κλάδου της δομικής βιολογίας είναι η επίλυση της τρισδιάστατης δομής ενός πρωτεϊνικού μορίου με τη μέθοδο της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (nuclear magnetic resonance, NMR), με βασικό μειονέκτημα

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

την αδυναμία επίλυσης πρωτεϊνικών δομών μεγαλύτερων των 30 - 40 kDa (Pervushin et al., 1997) και της κρυο – ηλεκτρονιακής μικροσκοπίας (Cryo – Electron microscopy, Cryo - EM) με αδυναμία εφαρμογής σε μικρότερα μόρια. Από την άλλη, αυτές οι μέθοδοι δεν απαιτούν τη διαδικασία της κρυστάλλωσης του μορίου που πρόκειται να επιλυθεί η δομή του, καθώς πρόκειται πράγματι για μια ιδιαίτερα περίπλοκη διεργασία.

1.6.1 Πώς ορίζεται ο κρύσταλλος;

Οι κρύσταλλοι είναι στερεά σώματα που αποτελούνται από ακριβείς επαναλήψεις ενός συμμετρικού μοτίβου. Παράγονται από ένα μόριο το οποίο επαναλαμβάνεται με αυστηρά καθορισμένη συμμετρία. Η μονάδα που περιγράφει έναν κρύσταλλο είναι η μοναδιαία κυψελίδα (unit cell). Για να περιγραφεί ένας κρύσταλλος χρειάζεται η λιγότερο συμμετρική μονάδα καθώς και η συμμετρία που δημιουργεί τον κρύσταλλο (Blundell, T. L., 1976). Η μοναδιαία κυψελίδα μπορεί να χωριστεί σε μια οντότητα η οποία δεν εμφανίζει καμία συμμετρία και ονομάζεται ασύμμετρη μονάδα. Επομένως, αφού κάθε επίπεδο του κρυστάλλου μπορεί να παραχθεί με εφαρμογή τελεστών συμμετρίας στην ασύμμετρη μονάδα, μπορεί να επιτευχθεί ο προσδιορισμός της δομής μιας πρωτεΐνης με τον προσδιορισμό των θέσεων των ατόμων της πρωτεΐνης της ασύμμετρης μονάδας σε τρία επίπεδα στο χώρο x,y,z (Blundell, T. L., 1976). Το συμμετρικό πλέγμα μετατοπίζεται ως προς τις τρεις διαστάσεις δημιουργώντας το κρυσταλλικό πλέγμα. Τα γειτονικά σημεία του κρυσταλλικού πλέγματος συνδέονται μεταξύ τους δημιουργώντας τις μοναδιαίες κυψελίδες, οι οποίες αποτελούνται από όλα τα άτομα των μοτίβων του κρυσταλλικού πλέγματος και κατ' επέκταση της ασύμμετρης μονάδας. Στην *Εικόνα 19* φαίνεται μια τέτοια συστοιχία μορίων και οι γραμμές χωρίζουν τον κρύσταλλο σε μοναδιαίες κυψελίδες. Για να προσδιοριστεί η θέση ενός ατόμου στο χώρο χρησιμοποιείται ένα σύνολο συντεταγμένων x,y,z, όπου μία από τις κορυφές της μοναδιαίας κυψελίδας χρησιμοποιείται ως αρχή του συστήματος των συντεταγμένων [x,y,z=0 ή (0,0,0)].

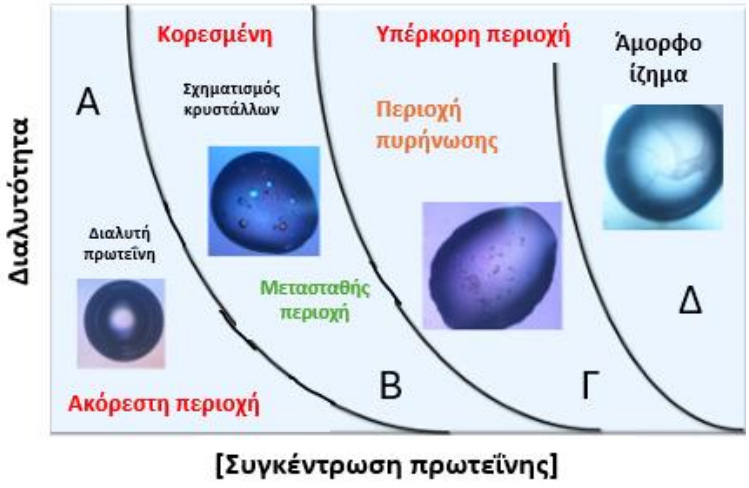


Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

Εικόνα 19: Απεικονίζεται η ασύμμετρη μονάδα, η οποία έστω ότι η αποτελείται από ένα μόριο πρωτεΐνης. Ακολούθως, απεικονίζεται η μοναδιαία κυψελίδα η οποία αποτελείται από δύο μόρια πρωτεΐνης, το καθένα με το δικό του προσανατολισμό. Τέλος, πολλές όμοιες μοναδιαίες κυψελίδες δομούν έναν πρωτεϊνικό κρύσταλλο με καθορισμένο προσανατολισμό ως προς τα επίπεδα x,y,z, (Blundell, T. L., 1976).

1.6.2 Ανάπτυξη κρυστάλλων

Ένας κρύσταλλος είναι ένα στερεό σώμα, αλλά τα μακρομόρια υπάρχουν συνήθως σε μορφή υδατικών διαλυμάτων. Κατά συνέπεια για την δημιουργία ενός κρυστάλλου πρέπει τα διαλυμένα μόρια να οδηγηθούν εκτός διαλύματος ή να κατακρημνιστούν με έναν ελεγχόμενο τρόπο που να ευνοεί την τάξη. Ένα μόριο εγκαταλείπει το διάλυμα, όταν η συγκέντρωση του υπερβεί την εγγενή του διαλυτότητα S_0 (η S_0 δεν είναι πραγματικά μια εγγενής ιδιότητα, αλλά εξαρτάται από εξωγενείς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης της θερμοκρασίας, της πίεσης και του διαλύτη). Η ανάπτυξη ενός κρυστάλλου απαιτεί την αύξηση της συγκέντρωσης του υλικού στην υπέρκορη κατάσταση. Η συγκέντρωση του μορίου μπορεί να αυξηθεί με την αφαίρεση μέρος του διαλύτη, προκειμένου να μειωθεί ο συνολικός όγκος του διαλύματος.
Τα στάδια της κρυστάλλωσης είναι καθορισμένα από το διάγραμμα φάσεων (*Εικόνα 20*) και διακρίνονται σε: α) Περιοχή υποκορεσμού, β) Μετασταθή περιοχή, γ) Περιοχή πυρήνωσης και δ) Περιοχή κατακρήμνισης. Το στάδιο κατά το οποίο έχουμε σχηματισμό πυρήνων είναι εκείνο της περιοχής πυρήνωσης, ενώ το ιδανικό στάδιο για το σχηματισμό μεγαλύτερων και πιο καλοσχηματισμένων κρυστάλλων είναι εκείνο της μετασταθής περιοχής. Στην περιοχή υποκορεσμού, δεν παρατηρείται κάποια μεταβολή, ενώ στο στάδιο της κατακρήμνισης, η πρωτεΐνη καταβυθίζεται υπό τη μορφή άμορφου ιζήματος.



Εικόνα 20: Διάγραμμα φάσης. Α)Ακόρεστη περιοχή, Β) Μετασταθής περιοχή και σχηματισμός κρυστάλλων, Γ) Περιοχή πυρήνωσης, Δ) Φάση κατακρήμνισης και σχηματισμού κρυσταλλικού ιζήματος.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

Για να επιτευχθεί η κρυστάλλωση ενός μακρομορίου απαιτείται η εύρεση των συνθηκών που ισορροπούν τη διαλυτότητα με τη δομική ομοιογένεια. Οι συνθήκες που μπορούν να οδηγήσουν σχηματισμό κρυστάλλων μιας πρωτεΐνης είναι το pH, η θερμοκρασία, η ιοντική ισχύς του ρυθμιστικού διαλύματος, η συγκέντρωση της πρωτεΐνης, η μέθοδος κρυστάλλωσης καθώς και η επιλογή του καταβυθιστικού παράγοντα και της συγκέντρωσής του. Σε περίπτωση που για μια πρωτεΐνη οι συνθήκες κρυστάλλωσης είναι άγνωστες, πραγματοποιείται δοκιμασία σάρωσης διαφόρων συνθηκών κρυστάλλωσης (screening). Πρόκειται για μια διαδικασία που απαιτούνται μεγάλες ποσότητες της πρωτεΐνης (>95% σε καθαρότητα) και επιπλέον αποτελεί μια αρκετά χρονοβόρα διεργασία.

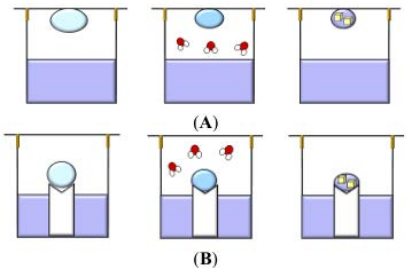
Μέθοδοι κρυστάλλωσης πρωτεϊνών:

Α) Διάχυση ατμών (vapor diffusion): Μέσω καθήμενης ή κρεμάμενης σταγόνας (*Εικόνα 21*)

Β) Μικροσπορά (microseeding): πρόκειται για χρήση σχηματισμένων κρυσταλλικών πυρήνων σε νέα δοκιμασία κρυστάλλωσης με στόχο το σχηματισμό μεγαλύτερων κρυσταλλικών δομών, ικανών να δεχτούν ακτινοβολία Χ.

Γ) Διαπίδυση (Dialysis)

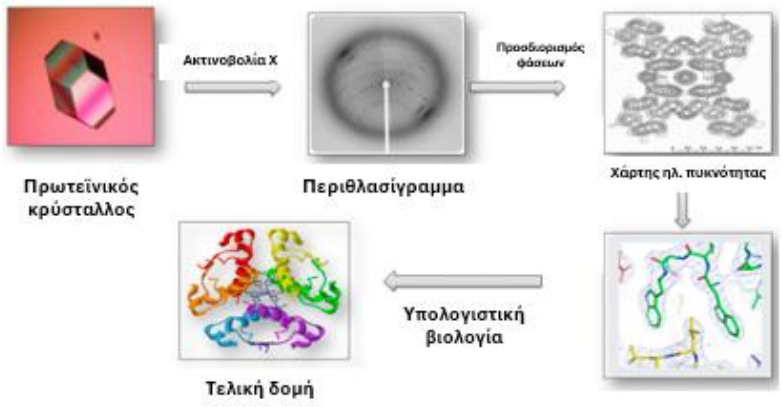
Δ) Στατική μέθοδος (Batch): επέρχεται άμεσος υπερκορεσμός, σε αντίθεση με τις υπόλοιπες που είναι πιο αργές (Benvenuti & Mangani, 2007).



Εικόνα 21: Δοκιμασία κρυστάλλωσης μέσω διάχυσης ατμών. Α) Κρεμάμενη σταγόνα στην οποία βρίσκεται η πρωτεΐνη μαζί με διάλυμα κρυστάλλωσης. Στην πορεία της διαδικασίας, μόρια νερού διαχέονται από τη σταγόνα προς το διάλυμα κρυστάλλωσης του βοθρίου με αποτέλεσμα η πρωτεΐνη να φτάνει σε κατάσταση ελάχιστης διαλυτότητας (υπερκορεσμό) και να σχηματίζονται κρύσταλλοι. Β) Καθήμενη σταγόνα στην οποία ακολουθείται παρόμοιο σκεπτικό. Σε περιπτώσεις όπου χρησιμοποιείται ρομποτικό σύστημα, εφαρμόζεται η μέθοδος της καθήμενης σταγόνας.

Η διαγραμματική πορεία που ακολουθείται για την επίλυση της τρισδιάστατης δομής μιας πρωτεΐνης είναι η ακόλουθη (*Εικόνα 22*) και τα στάδια που διαδέχονται την κρυστάλλωση αναλύονται λεπτομερώς:

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250



Εικόνα 22: Διαγραμματική πορεία της επίλυσης μιας πρωτεϊνικής δομής με χρήση κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ.

1.6.3 Ακτινοβολία Χ και περίθλαση κυμάτων

Η κάθε μορφή ακτινοβολίας χαρακτηρίζεται από τη σωματιδιακή και την κυματική της φύση. Κάθε κύμα ορίζεται από κάποια βασικά χαρακτηριστικά όπως: το μήκος κύματος (λ), η συχνότητα (*ν* ή *f*), το πλάτος, η διεύθυνση διάδοσης και η φάση. Οι παράμετροι αυτοί, μετρούνται πειραματικά για κάθε κύμα που σκεδάζει ο κρύσταλλος, ώστε να προσδιοριστεί το μεγεθυμένο είδωλο του κρυστάλλου. Αυτοί οι υπολογισμοί γίνονται με τη χρήση περίπλοκων μαθηματικών εξισώσεων, γνωστοί ως μετασχηματισμοί Fourier. Η ακτινοβολία Χ είναι κύμα με χαμηλό μήκος κύματος και με υψηλή συχνότητα ($C = \lambda \cdot \nu$), με $\lambda = 10^{-11}$ - 10^{-9} m = 0,1 – 10 Å (Angstrom), που σημαίνει πως ικανοποιεί την ατομική ευκρίνεια αν θεωρηθεί ως δεδομένο ότι η μέση απόσταση ενός ομοιοπολικού δεσμού μεταξύ δύο ατόμου σε μια πρωτεΐνη είναι περίπου 1,4 Å. Για αυτό το λόγο έχει καθιερωθεί η χρήση της ακτινοβολίας Χ για την ανάλυση της δομής μιας πρωτεΐνης.

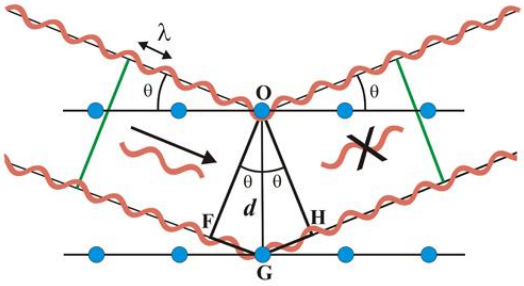
Κάθε κύμα ακτινοβολίας Χ που προσπίπτει με μία αρχική συχνότητα και ένα δεδομένο μήκος κύματος σε κάθε άτομο του πρωτεϊνικού κρυστάλλου, προκαλεί εξαναγκασμένη ταλάντωση στα ηλεκτρόνια του συγκεκριμένου ατόμου με το ίδιο μήκος κύματος και την ίδια συχνότητα, ενώ οι προσπίπτουσες δέσμες ακτίνων Χ περιθλώνται προς μια συγκεκριμένη κατεύθυνση. Οι περιθλάσεις (reflections), είναι το αποτέλεσμα της ενισχυτικής συμβολής, όλων των κυμάτων από κάθε ηλεκτρόνιο του κρυστάλλου. Από την αλληλεπίδραση των ακτίνων Χ με το κρυσταλλικό δείγμα, προκύπτει το διάγραμμα περίθλασης ή περιθλασίγραμμα, το οποίο λειτουργεί σαν δακτυλικό αποτύπωμα ενός δείγματος (Νικόλαος Μ. Γλυκός, 2015). Η θέση της κάθε αμαύρωσης μπορεί με σύνθετη επεξεργασία να δώσει πληροφορία για τη θέση του κάθε ατόμου, ενώ η ένταση της αμαύρωσης (spot) δίνει πληροφορία για το πλάτος του περιθλώμενου κύματος (με τη βοήθεια ανιχνευτή), το οποίο προέκυψε μέσω ενισχυτικής συμβολής με άλλο κύμα. Η συλλογή δεδομένων γίνεται μέσω

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

περιστροφής του κρυστάλλου, ενώ επιδρά ακτινοβολία Χ, ώστε να υπάρχει πληροφορία σε τρεις διαστάσεις. Εκτός από το πλάτος των κυμάτων, μπορούν να υπολογιστούν και οι διευθύνσεις των κυμάτων, οι οποίες καθορίζονται από τις διαστάσεις της στοιχειώδους κυψελίδας και χαρακτηρίζονται με τρεις ακέραιους αριθμούς τους δείκτες hkl ή δείκτεςMiller: h $= \frac{a}{x}$, k $= \frac{b}{y}$, l = $= \frac{c}{z}$, με x, y, z τις συντεταγμένες του επιπέδου και a, b, c, οι άξονες του κρυστάλλου. Η κυματική παράμετρος που δεν μπορεί να προσδιοριστεί άμεσα στην κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ είναι η φάση του κύματος, γνωστό και ως *πρόβλημα της φάσης*.

1.6.4 Ο νόμος του Bragg

Το 1912 οι βρετανοί φυσικού Willian Henry Bragg και William Lawrence Bragg, μελέτησαν την κρυσταλλική δομή και να διατυπώσουν τον νόμο τους για τη συμβολή δύο περιθλώμενων κυμάτων. Συγκεκριμένα, ο νόμος αυτός συνέδεσε το μήκος κύματος λ και τη γωνία πρόσπτωσης θ πάνω στα διαδοχικά επίπεδα ενός κρυστάλλου καθώς και τη μεταξύ τους απόσταση d (*Εικόνα 23*). Ο νόμος διατυπώνεται σύμφωνα με την εξίσωση: $n * \lambda = 2 * d \sin\theta$, όπου n ένας ακέραιος αριθμός (n = 0, 1, 2, 3, …).



Εικόνα 23: Περίθλαση κύματος, μήκους λ από δύο διαδοχικά επίπεδα που απέχουν μεταξύ τους απόσταση d.

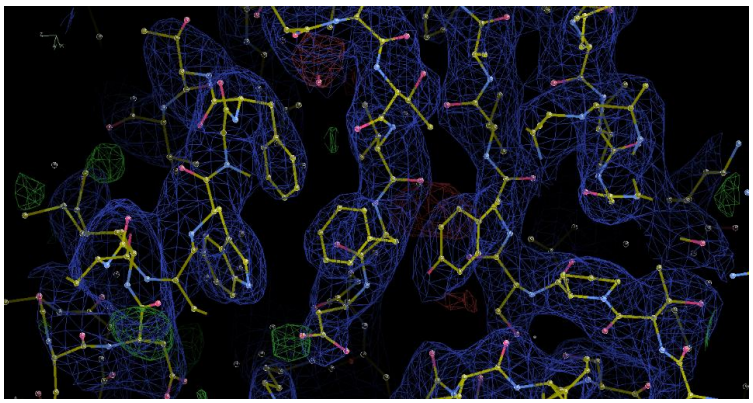
Για να παρατηρηθεί το φαινόμενο της περίθλασης, πρέπει τα δύο περιθλώμενα κύματα να συμβάλουν ενισχυτικά (δηλαδή να είναι σε φάση). Αυτό το φαινόμενο εμφανίζεται όταν η διαφορά διαδρομής των διαδοχικών κρυσταλλικών επιπέδων είναι μηδενική ή ίση με το ακέραιο πολλαπλάσιο του μήκους κύματος, συνεπώς πρέπει να ικανοποιείται η παραπάνω εξίσωση.
Η συγκεκριμένη εξίσωση περιγράφει τις πιθανές διευθύνσεις που θα παρατηρηθεί περίθλαση κάτι που εξαρτάται από τις διαστάσεις a, b,c της στοιχειώδους κυψελίδας. Παράλληλα, δεν δίνονται πληροφορίες για το πλάτος και τις φάσεις των κυμάτων.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

1.6.5 Υπολογισμός του χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας

Ως αποτέλεσμα της περίθλασης των ακτίνων Χ σε κρύσταλλο προκύπτει ένα σετ εικόνων στον ηλεκτρονικό υπολογιστή που απεικονίζουν δισδιάστατα πλέγματα κουκκίδων και περιλαμβάνουν τις εντάσεις μεμονωμένων ανακλάσεων. Η ανάπτυξη κατάλληλων υπολογιστικών προγραμμάτων, βοήθησε στην επεξεργασία των εικόνων περίθλασης και στη μετατροπή αυτών σε μια λίστα δεικτών hkl, με τις αντίστοιχες εντάσεις. Στη συνέχεια πραγματοποιείται η διαδικασία συνδυασμού μεταξύ των εικόνων και της συγχώνευσης των ισοδύναμων ανακλάσεων (scaling), με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός αρχείου (.mtz file) που εμπεριέχει το σύνολο των μοναδικών ανακλάσεων του κρυστάλλου.

Η κατασκευή του χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας πραγματοποιείται μέσω του 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 εν πολλοίς 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 μέσω των διαφορών μεταξύ των πειραματικών (παρατηρούμενων) παραγόντων δομής και των παραγόντων 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 (πράσινο χρώμα), τα οποία απουσιάζουν από το μοντέλο και αντίστοιχα αρνητικής πυκνότητας για τα τμήματα τα οποία απουσιάζουν από την δομή και υπάρχουν στο μοντέλο (κόκκινο χρώμα). Στην πρωτεϊνική κρυσταλλογραφία χρησιμοποιούνται οι χάρτες ($2F_{obs}$ - F_{calc}, ϕ_{calc}) οι οποίοι είναι το αποτέλεσμα υπέρθεσης των δύο προηγούμενων χαρτών. Απεικονίζουν τον χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας του μοντέλου καθώς και 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 (*Εικόνα 24*).



Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

Εικόνα 24: Χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας $2F_{obs}$ - F_{calc} της υπομονάδας πρόσδεσης νουκλεοτιδίων (NBD) της PfHsp70-x σε ευκρίνεια 2,7 Å . Με πράσινο χρώμα αποτυπώνονται περιοχές θετικής πυκνότητας, ενώ με κόκκινο περιοχές αρνητικής πυκνότητας, οι οποίες απουσιάζουν στο μοντέλο.

1.6.6 Βελτιστοποίηση του δομικού μοντέλου

Για τη βελτίωση της δομής χρησιμοποιούνται υπολογιστικά προγράμματα που δύνανται να υπολογίσουν το πόσο αξιόπιστη είναι μια δομή με βάση τον χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας $2F_{obs}$ - F_{calc}, ϕ_{calc}. Αυτό επιτυγχάνεται κατά τη διαδικασία βελτιστοποίησης της δομής μέσω του restrained refinement, όπου αξιολογούνται κάποιοι δείκτες. Συγκεκριμένα ο παράγοντας R, χρησιμοποιείται προκειμένου να αξιολογηθεί η ποιότητα ενός μοντέλου και η ανάγκη του για βελτίωση. Ο παράγοντας αυτός αποτελεί μέτρο για σφάλματα ανάμεσα στις παρατηρούμενες εντάσεις που προκύπτουν από την περίθλαση με ακτίνες Χ και τις προβλεπόμενες εντάσεις που θα υπολογιστούν από το μοντέλο. Τιμές R μικρότερες ή ίσες με 0,25 υποδεικνύουν την αξιοπιστία του μοντέλου, ενώ τιμές από 0,4 έως και 0,6 δείχνουν πως το μοντέλο είναι αναξιόπιστο (Νικόλαος Μ. Γλυκός, 2015).

$$R = \frac{\sum ||Fobs| - |Fcalc||}{\sum |Fobs|}$$

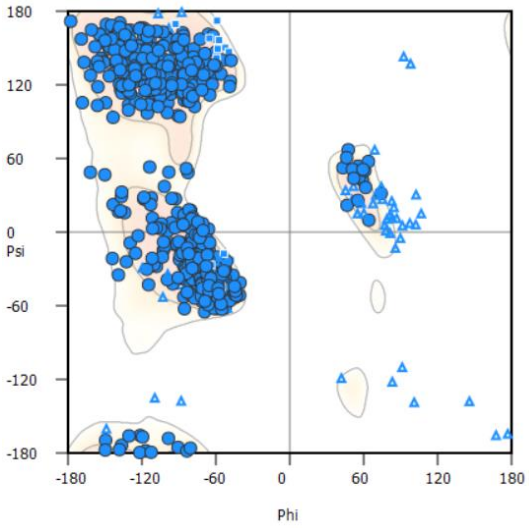
Όταν ο χάρτης της ηλεκτρονιακής πυκνότητας είναι ποιοτικός σε επαρκή βαθμό με αποτέλεσμα να δείχνει με αξιοπιστία την θέση των αμινοξέων, τότε μπορεί να αρχίσει να κατασκευάζεται το μοντέλο. Για την κατασκευή αυτή χρησιμοποιείται ένα πρόγραμμα στο οποίο εμφανίζεται ο χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας και η αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης. Η δομή που θα δημιουργηθεί εξάγεται με τη μορφή αρχείου της πρωτεϊνικής τράπεζας δεδομένων (Protein Data Bank - .pdb file), το οποίο μέσω κάποιων επιπλέον προγραμμάτων επιδέχεται και άλλους κύκλους βελτίωσης ώσπου να επιτευχθεί η μέγιστη δυνατή συμφωνία (Νικόλαος Μ. Γλυκός, 2015).

Εκτός από τον δείκτη αξιοπιστίας R, στην κρυσταλλογραφία εισήλθε και ο παράγοντας R_{free}, ο οποίος υπολογίζεται όπως ο παράγοντας R, ωστόσο αντιπροσωπεύει ένα μικρό σύνολο τυχαία επιλεγμένων περιθλάσεων. Καθώς η διαδικασία της βελτιστοποίησης προχωρά, ο δείκτης R αντιστοιχεί στο 90-95% των δεδομένων και μειώνεται, ωστόσο αν πρόκειται για πραγματική βελτιστοποίηση του μοντέλου, πρέπει να μειώνεται και ο δείκτης R_{free}. Η τιμή R_{free} πρέπει να είναι μικρότερη του 0,28, ενώ η διαφορά θα πρέπει R - R_{free} < 0,1. Αν η συνθήκες αυτές δεν ικανοποιούνται, τότε το μοντέλο υποδεικνύει σοβαρά δομικά προβλήματα.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

1.6.7 Διάγραμμα Ramachandran

Μετά την βελτιστοποίηση του δομικού μοντέλου, απαιτείται έλεγχος του έτσι ώστε να αποφευχθούν λάθη στην ερμηνεία της ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Ο Ramachandran, διαπίστωσε ότι πολλοί συνδυασμοί φ (phi) και ψ (psi) γωνιών δεν είναι δυνατοί λόγω των στερεοχημικών συγκρούσεων μεταξύ των ατόμων. Οι τιμές που επιτρέπονται μπορούν να τοποθετηθούν σε ένα δισδιάστατο σχήμα που ονομάζεται διάγραμμα Ramachandran (*Εικόνα 25*) (Hollingsworth & Karplus, 2010).



Εικόνα 25: Διάγραμμα Ramachandran. Στον άξονα χ΄χ βρίσκονται οι τιμές για τη φωνία φ, ενώ στον y'y, οι τιμές της γωνίας ψ.

Σημειώνεται πως η γωνία φ αφορά τη γωνία περιστροφής μεταξύ C_α και NH_2, ενώ η γωνία ψ τη γωνία περιστροφής C_α και COOH. Επομένως για να ολοκληρωθεί η κατασκευή του δομικού μοντέλου, πρέπει να γίνει έλεγχος με το διάγραμμα Ramachandran, ώστε όλες οι γωνίες των αμινοξέων της δομής, να συμφωνούν με αυτό.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

Κεφάλαιο 2ο: Σκοπός – Αντικείμενο μελέτης

Η ασθένεια της ελονοσίας είναι μέχρι και σήμερα μία από τις απειλητικότερες μολυσματικές ασθένειες για την υγεία του ανθρώπου, καθώς ανά έτος τα συνολικά κρούσματα ξεπερνούν τα 240 εκατομμύρια παγκοσμίως, ενώ οι νεκροί ξεπερνούν τους 500.000. Γίνεται αντιληπτό λοιπόν, πως η ασθένεια αποτελεί ένα κοινωνικό ζήτημα, ιδιαίτερα για την αφρικανική ήπειρο, για το οποίο μέχρι στιγμής δεν έχει αναπτυχθεί ένα αποδοτικό και ασφαλές θεραπευτικό πλάνο που να παρεμβάλει στον κύκλο της μόλυνσης του πλασμωδίου *P. falciparum*, του πιο απειλητικού είδους πλασμωδίου.

Η παρούσα διπλωματική εργασία αποτελεί μέρος της γενικότερης έρευνας του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Ο απώτερος σκοπός αυτού του εγχειρήματος, είναι η εύρεση πρόδρομων και ικανών ενώσεων – αναστολέων για το σχεδιασμό και την ανάπτυξη πιθανών φαρμάκων κατά της ελονοσίας, μέσω κατευθυνόμενου από τη δομή σχεδιασμού φαρμάκων. Ο φαρμακευτικός στόχος που επιλέχθηκε για αυτή την έρευνα, ήταν οι πρωτεϊνικές μοριακές συνοδοί του *P. falciparum,* PfHsp70-x και η συν-συνοδός της, J-πρωτεΐνη PFE0055c, οι οποίες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην επιβίωση και την παθογένεση του *P.falciparum.*

Σκοπός της διπλωματικής εργασίας ήταν η βιοχημική μελέτη ενζύμων του *P. falciparum,* PfHsp70-x και της πρωτεΐνης J PFE0055c με αναστολείς που προέκυψαν από τη σάρωση βιβλιοθηκών θραυσμάτων (*in silico screening)* σε συνεργασία με τον Καθηγητή Rainer Riedl (Institute of Chemistry and Biotechnology, Zhaw Zurich University of Applied Sciences). Με κινητικές μελέτες διερευνήθηκε η ανασταλτική δράση 19 διαφορετικών εν δυνάμει αναστολέων στην ενδογενή δραστικότητα του ενζύμου PfHsp70-x αλλά και την επαγόμενη δραστικότητα μετά από ενεργοποίηση από την συν-συνοδό PFE0055c και προσδιορίστηκαν οι τιμές IC_{50} για τις πιο δραστικές από αυτές. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν κρυσταλλογραφικές μελέτες με τον πιο ισχυρό αναστολέα που βρέθηκε από τις κινητικές μελέτες, έτσι ώστε να δοθεί μια δομική εξήγηση της αναστολής του αλλά και για την κατανόηση των αλληλεπιδράσεων με κατάλοιπα της περιοχής πρόσδεσης, οι οποίες είναι σημαντικές για την αναγνώριση και την πρόσδεση του αναστολέα στο κέντρο σύνδεσης.

Τα αποτελέσματα των μελετών αυτής της εργασίας θα βοηθήσουν στον ορθολογικό σχεδιασμό νέων ενώσεων καθώς οι αναστολείς με ισχυρή ανασταλτική δράση που μελετήθηκαν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ικρίωμα για την περαιτέρω βελτιστοποίησή τους, με απώτερο σκοπό, την ανάπτυξη ενός αποτελεσματικού και εξειδικευμένου φαρμάκου κατά της ασθένειας της ελονοσίας, κάτι το οποίο η επιστημονική κοινότητα έχει ανάγκη.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

Κεφάλαιο 3ο: Υλικά και μέθοδοι

3.1 Υλικά

3.1.1 Αντιδραστήρια

Αντιδραστήριο	Εταιρία - Κατασκευαστής
Acetic acid – CH_3COOH	Sds
Acrylamide	Serva
Adenosine Triphosphate (ATP)	Sigma - Aldrich
Ammonium persulfate – $(NH_4)_2S_2O_8$ (APS)	Serva
Bis-Acrylamide	Serva
Coomasie Brilliant Blue R-250	Fluka
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Panreac Applichem
Disodium phosphate – Na_2HPO_4	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Panreac Applichem
Ethanol Absolute	Sigma - Aldrich
Glycerol	Panreac Applichem
HEPES	Serva
Hydrochloric acid – HCl	Panreac Applichem
Imidazole	Sigma
Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)	Serva
Kanamycin	Panreac Applichem
LB Agar	Fisher BioReagents
LB Broth	Merck
Magnesium chloride – $MgCl_2$	Alfa Aesar
Malachite Green Phosphate Assay Kit	Sigma - Aldrich
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Invitrogen
Polyethylene glycol 1500 (PEG1500)	Alfa Aesar
Potassium chloride – KCl	Merck
Potassium dihydrogen phosphate – KH_2PO_4	Merck
SOC Medium	New England Biolabs
Sodium chloride - NaCl	Sigma - Aldrich
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Serva
Sodium hydroxide - NaOH	Merck
Tris	Serva
TRITON	Sigma - Aldrich
Tryptone	Sigma - Aldrich
Yeast extract	Melford Biolaboratories

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

3.1.2 Οργανολογία

Όργανα	Εταιρία - Κατασκευαστής
Αυτόματες πιπέτες	Gilson, Eppendorf
Επωαστήρας	Labtech
Εργαστηριακός – Αναλυτικός ζυγός	KERN
Ηλεκτρονικό πεχάμετρο	Metrohm
Μεμβράνες διαπίδυσης	Sigma
Ομογενοποιητής υπερήχων	Hielscher – UP400S
Στερεοσκόπιο	Olympus - TL2
Συσκευή διήθησης υπό κενό	Fisher scientific
Υδατόλουτρο Wisebath	Wisd
Φασματοφωτόμετρο UV-Vis	Perkin Elmer – Lambda bio +
Φασματοφωτόμετρο Microplate reader	Perkin Elmer – EnSpire 2300
Φασματοφωτόμετρο Nanodrop	Thermo Fisher – ND1000
Φίλτρο συμπύκνωσης με κατώφλι 10 kDa	Vivaspin 15 - Sartorius
Φίλτρο συμπύκνωσης με κατώφλι 5 kDa	Vivaspin 20 - Sartorius
Φυγόκεντροι	HERMLE Z 36 HK, Hitatchi CR22N
ÄKTA Purifier (FPLC system)	GE Healthcare Life Sciences
Robot OryxNano	Douglas Instruments
Sonic bath	VWR
Vortex	Kisker Biotech

3.1.3 Ένζυμα

Ένζυμο	**Εταιρία - Κατασκευαστής**
3C Protease	Παρασκευάστηκε στο εργαστήριο
Benzonase	Merck

3.1.4 Βακτηριακά στελέχη και πλασμίδια

Βακτήρια	**Εταιρία – Κατασκευαστής**
E. Coli strain BL-21 Gold	Agilent Technologies
E. coli strain Rosetta2 (DE3)	Agilent Technologies
Φορείς έκφρασης (πλασμίδια)	**Εταιρία – Κατασκευαστής**
pFloat	Χορηγία Παν. Οξφόρδης

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

3.1.5 Στήλες υγρής χρωματογραφίας

Στήλη συγγένειας	**Εταιρία - Κατασκευαστής**
HiTrap TALON crude Co^{2+}	Cytiva
Στήλη μοριακής διήθησης (SEC)	**Εταιρία - Κατασκευαστής**
Superdex 75	Cytiva
Superdex 200	Cytiva

3.2 Μέθοδοι

3.2.1 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων

Η διαδικασία κατά την οποία ένα εξωγενές μόριο DNA εισάγεται τεχνητά σε βακτηριακά κύτταρα ονομάζεται μετασχηματισμός. Στον τομέα της έρευνας εφαρμόζονται διάφορες μέθοδοι μετασχηματισμού όπως ο χημικός μετασχηματισμός, η ηλεκτροδιάτρηση και η βιολιστική μέθοδος (Gene gun).
Στην ηλεκτροδιάτρηση (electroporation), γίνεται εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται πόρο στη μεμβράνη των κυττάρων και να εισέρχεται το πλασμίδιο (Ren et al., 2019).
Κατά τον χημικό μετασχηματισμό από την άλλη, πραγματοποιείται επεξεργασία των κυτταρικών μεμβρανών των βακτηρίων με χρήση χημικών ουσιών (συνηθέστερα με $CaCl_2$), κατά τον οποίο τα θετικά ιόντα Ca^{2+} προσδένονται στις αρνητικά φορτισμένες ομάδες των φωσφολιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης και έλκουν το αρνητικά φορτισμένο πλασμιδιακό DNA. Έπειτα εφαρμόζεται απότομη αλλαγή της θερμοκρασίας (θερμικό σοκ – Heat shock) για μικρό χρονικό διάστημα, κατά την οποία προσδίδεται λιπιδιακή κινητικότητα στην κυτταρική μεμβράνη και το πλασμίδιο εισέρχεται ευκολότερα (Chen & Dubnau, 2004).

Πειραματική πορεία

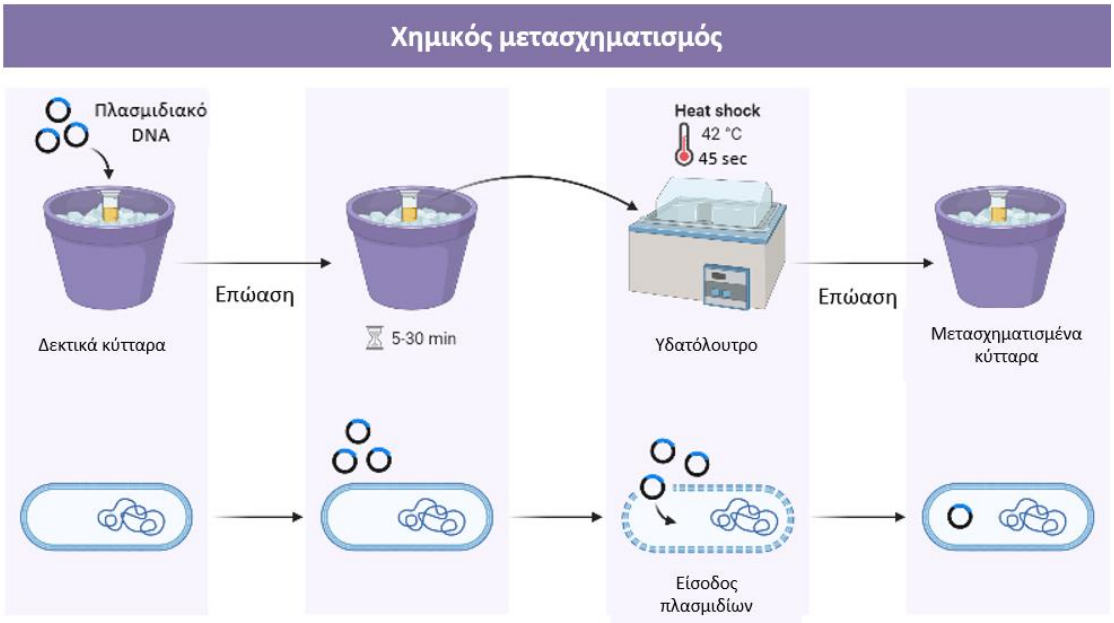
Υλικά

- Δεκτικά βακτηριακά στελέχη BL21Gold (DE3) μετά από κατεργασία με $CaCl_2$
- Πλασμίδιο (pFloat) με ένθεμα το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη PfHsp70-x που φέρει ετικέτα 6 ιστιδινών (6xHis-tag) και γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη (Kan^R)
- LB Agar 200 ml, pH: 7 (2g Nacl, 2,4g Agar, 2g Tryptone, 1g Yeast)
- Αντιβιοτικό καναμυκίνη 50 mg/ml

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

- SOC Medium
- Τρυβλία petri

Αρχικά παρασκευάστηκε και αποστειρώθηκε το LB Agar (10g/L Nacl, 10g/L Tryptone, 5g/L Yeast και 15g/L Agar). Έπειτα και αφού το LB agar φθάσει σε κατάλληλη θερμοκρασία ώστε να μην απενεργοποιεί το αντιβιοτικό, τοποθετήθηκαν σε δοχείο τύπου Falcon 50 ml LB Agar και καναμυκίνη σε συγκέντρωση 20 μg/mL. Στη συνέχεια το περιεχόμενο του falcon μοιράζεται σε δύο τρυβλία, τα οποία μένουν σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να στερεοποιηθεί το LB Agar. Παράλληλα, τοποθετήθηκε 1 μL από το πλασμίδιο στα δεκτικά βακτηριακά στελέχη BL-21, τα οποία φυλάσσονται σε δοχείο με πάγο για 30 min, ώστε τα κατιόντα Ca^{2+} της μεμβράνης των κυττάρων να έλξουν το αρνητικά φορτισμένο πλασμίδιο. Ακολουθεί το θερμικό σοκ, κατά το οποίο τα κύτταρα μεταφέρονται σε υδατόλουτρο με θερμοκρασία 42°C για 45sec, ενώ αμέσως μετά επιστρέφουν ξανά σε πάγο για 2min (*Εικόνα 26*).



Εικόνα 26: Χημικός μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων με χρήση $CaCl_2$ και είσοδος πλασμιδίων με θερμικό σοκ, καθώς τα θετικά κατιόντα Ca^{2+} έλκουν το αρνητικά φορτισμένο DNA, (Created with BioRender.com).

Στη συνέχεια προστέθηκαν 900 μL από τον θρεπτικό παράγοντα SOC, ενώ είχε προηγηθεί προθέρμανσή του στους 37°C, και τα κύτταρα επωάστηκαν για 1 h σε επωαστήρα υπό ανάδευση στα 210 rpm στους 37°C. Τέλος, έγινε η επίστρωση των κυττάρων (100 μL) σε κάθε τριβλίο και ακολούθησε ολονύχτια επώαση στους 37 °C.
Την επόμενη ημέρα, οι σχηματισμένες βακτηριακές αποικίες είναι αυτές που θα έχουν λάβει το πλασμίδιο και συνεπώς και το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

Στα ετερόλογα συστήματα παραγωγής ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών αντιμετωπίζεται συχνά το ζήτημα της έκφρασης της επιθυμητής πρωτεΐνης στα σωμάτια εγκλεισμού (inclusion bodies - IB), γεγονός που δυσκολεύει σε μεγάλο βαθμό την παραλαβή της πρωτεΐνης που επιθυμούμε να απομονώσουμε. Έτσι λοιπόν για να γίνει η παραλαβή της στο διαλυτό μέρος, γίνονται πολλές δοκιμές ως προς τις συνθήκες έκφρασης (expression tests). Η κυτταρική σειρά E.Coli BL21Gold (DE3), λοιπόν αναδείχθηκε αποδοτική για την υπερέκφραση της πρωτεΐνης PfHsp70-x μετά από συγκεκριμένες δοκιμές έκφρασης.
Όλη η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε υπό ασηπτικές συνθήκες.

3.2.2 Παρασκευή υγρής καλλιέργειας και επαγωγή της έκφρασης με IPTG

Προκειμένου να γίνει παραγωγή της πρωτεΐνης σε μεγάλη ποσότητα είναι αναγκαίο να γίνει μεταφορά αποικιών από το τριβλίο σε φιάλες που θα περιέχουν υγρό θρεπτικό LB. Στη συνέχεια θα ακολουθήσει η προσθήκη του μονοσακχαρίτη IPTG (ισοπρόπυλο–β–D-θειογαλακτοζίτη), ο οποίος απενεργοποιεί μέσω αλλοστερικής πρόσδεσης στον καταστολέα του οπερονίου της λακτόζης και κατ' επέκταση, επάγει την έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί την εκάστοτε πρωτεΐνη που υπάρχει ως ένθεμα. Ο συγκεκριμένος μονοσακχαρίτης παρουσιάζει σημαντική ομοιότητα με την αλλολακτόζη, η οποία είναι μεταβολίτης της λακτόζης, δηλαδή τον βασικό επαγωγέα του οπερονίου. Η βασική διαφορά και το πλεονέκτημα της προσθήκης του IPTG σε σχέση με τη λακτόζη, είναι το γεγονός ότι το IPTG δε μεταβολίζεται από το κύτταρο ή από τα ένζυμα που παράγονται κατά την επαγωγή του οπερονίου. Συνεπώς η ποσότητα του IPTG παραμένει σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια και έτσι τα επίπεδα έκφρασης του ενθέματος παραμένουν υψηλά (Gomes et al., 2020).

Πειραματική πορεία

Υλικά

- LB broth σε σκόνη
- IPTG

Αρχικά για να γίνει παραγωγή της πρωτεΐνης PfHsp70-x σε υψηλή απόδοση, είναι απαραίτητο η υγρή καλλιέργεια να είναι εκτεταμένη. Συνεπώς παρασκευάστηκαν 6L LB broth σε σκόνη με αναλογία 25g σκόνης LB ανά L καλλιέργειας, τα οποία μοιράστηκαν σε μεγάλες κωνικές φιάλες χωρητικότητας 2L (φλάσκες Όλες οι φιάλες αποστειρώθηκαν και επωάστηκαν κλειστές σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, από

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

τα τρυβλία που επιστρώθηκαν με τα μετασχηματισμένα κύτταρα την προηγούμενη ημέρα, επιλέχθηκε από μία απομονωμένη αποικία και εμβολιάστηκαν 50 ml υγρού θρεπτικού LB που περιείχε αντιβιοτικό καναμυκίνη 20 μg/ml ως μέτρο πρόληψης επιμολύνσεων. Τέλος, οι φιάλες αυτές επωάστηκαν ολονύκτια στους 37^{o}C, υπό ήπια ανάδευση 210 rpm.

Την επόμενη ημέρα, πραγματοποιήθηκε ανακαλλιέργεια των βακτηριακών κυττάρων, καθώς έγινε μεταφορά 10 mL υγρής καλλιέργειας από τις μικρές φιάλες, στις μεγάλες. Αμέσως μετά οι φλάσκες επωάστηκαν μέχρις ότου η απορρόφηση (OD) της υγρής βακτηριακής καλλιέργειας να έχει τιμή 0,5-0,7 σε μήκος κύματος λ=600nm. Τέτοιες τιμές οπτικής απορρόφησης είναι επιθυμητές καθώς τότε τα βακτηριακά κύτταρα βρίσκονται στην εκθετική φάση της ανάπτυξής τους. Η εκθετική φάση αποτελεί το ιδανικό σημείο για να προκληθεί η επαγωγή της έκφρασης των επιθυμητών με την προσθήκη του μεταβολίτη IPTG, σύμφωνα με τον τρόπο που περιεγράφηκε παραπάνω. Σημειώνεται πως για τις ανάγκες της φωτομέτρησης, είχε συλλεχθεί κατάλληλο δείγμα ως τυφλό το οποίο αποτελούνταν από υγρό LB και αντιβιοτικό το οποίο προστέθηκε σε όλες τις φλάσκες μόλις έφτασαν σε θερμοκρασία δωματίου μετά την αποστείρωσή τους. Όταν λοιπόν η υγρή καλλιέργεια προσέγγισε την εκθετική της φάση (OD_{600nm} = 0,5-0,7), οι φλάσκες τοποθετήθηκαν σε δοχείο με πάγο, ώστε να σταματήσει η βακτηριακή ανάπτυξη και κατόπιν έγινε η προσθήκη 0,3 mM IPTG, με στόχο να επαχθεί η έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί την PfHsp70-x. Τέλος οι φλάσκες επωάστηκαν στους 17 ^{o}C υπό ανάδευση 210 rpm για 17-20 h.

3.2.3 Συλλογή των βακτηριακών κυττάρων και προετοιμασία για την απομόνωση της πρωτεΐνης

Μετά το πέρας της επώασης των κυττάρων σε υγρό θρεπτικό μέσο LB, ακολούθησαν φυγοκεντρήσεις όλης της ποσότητας της υγρής καλλιέργειας σε 5000 rmp, 4^{o}C για 10 λεπτά.

Στο βακτηριακό ίζημα εντοπίζονται όλες οι ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες των βακτηριακών κυττάρων, καθώς και η πρωτεΐνη που παράχθηκε από το γονίδιο του ενθέματος. Αντίθετα στο υπερκείμενο, εντοπίζονται όλες οι εξωκυττάριες πρωτεΐνες. Επισημαίνεται πως η τυχόν αποθήκευση του βακτηριακού ιζήματος για μελλοντικούς σκοπούς γίνεται στην κατάψυξη (-20 ^{O}C).

Προκειμένου να προχωρήσουμε στα στάδια καθαρισμού και απομόνωσης της πρωτεΐνης, είναι αναγκαία η λύση (ρήξη κυτταρικών μεμβρανών) των βακτηριακών κυττάρων που περιέχουν την πρωτεΐνη στο διαλυτό τους μέρος (soluble). Κυτταρική λύση μπορεί να επιτευχθεί με διάφορες μεθόδους ή και με συνδυασμό αυτών. Στην παρούσα συνθήκη επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί ένα κατάλληλο διάλυμα λύσης

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

(lysis buffer), ένζυμα όπως βενζονάση (νουκλεάση) για να γίνει διάσπαση του DNA και τέλος εφαρμογή υπερήχων.

Πειραματική πορεία

Παρασκευάστηκαν 50 mL διαλύματος λύσης (lysis buffer) pH 7,4, το οποίο περιείχε:10 mM Na_2HPO_4, 2 mM KH_2PO_4, 2,7 mM KCl, 500 mM NaCl, 0,01% TRITON, 5 mM ATP και 2 mM $MgCl_2$.
20 mL από το διάλυμα λύσης, προστέθηκαν στο βακτηριακό ίζημα και με ειδική σπάτουλα διαλυτοποιήθηκε το ίζημα, ενώ προστέθηκαν αναστολείς πρωτεασών, ώστε να ανασταλεί η δράση τους. . Τέλος προστίθεται και 1 μL βενζονάσης για τη διάσπαση του DNA.
Αμέσως μετά, στο ομογενοποίημα έγινε εφαρμογή υπερήχων ανά 30 sec με 30 sec παύση για 6 φορές σε ένταση 70 % και 1 κύκλο μέχρι να προκύψει ένα ανοιχτόχρωμο και ρευστό ομογενοποίημα. Η διαδικασία της εφαρμογής υπερήχων πραγματοποιήθηκε σε δοχείο με πάγο και είναι ιδιαίτερα κρίσιμη ώστε να μην καταστραφούν οι πρωτεΐνες.
Στη συνέχεια, το ομογενοποίημα μεταφέρθηκε σε σωλήνες φυγοκέντρησης, και ακολούθησε φυγοκέντρηση σε 19.000 rpm για 1 h στους $4^{O}C$.

3.2.4 Χρωματογραφικός καθαρισμός της PfHsp70-x

3.2.4.1 Υγρή χρωματογραφία – Σύστημα FPLC

Με δεδομένη την ποικιλομορφία των βιομορίων ως προς το μέγεθος, το φορτίο, την υδροφοβικότητα και την αγχιστεία τους με άλλα με μόρια, έχουν αναπτυχθεί ποικίλες τεχνικές διαχωρισμού. Οι χρωματογραφικές τεχνικές που εντάσσονται στην υγρή χρωματογραφία (LC – Liquid Chromatography), περιγράφουν σύνθετα μίγματα, τα οποία διοχετεύονται σε πορώδες υλικό, με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται διαχωρισμός με βάση τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους.
Κατά την πραγματοποίηση της υγρής χρωματογραφίας εκτελούνται τα παρακάτω στάδια:

Ι) ΕΞΙΣΟΡΡΟΠΗΣΗ (EQUILIBRATION)
Σε αυτό το στάδιο, περνά στη στήλη και στο σύστημα χρωματογραφίας διάλυμα παρόμοιο με αυτό που χρησιμοποιήθηκε για τη λύση των κυττάρων (Διάλυμα Α), με στόχο να απομακρυνθεί το υλικό φύλαξης του συστήματος (συνήθως αιθανόλη). Ο σκοπός αυτού του σταδίου, είναι να γίνει η κατάλληλη προετοιμασία, ώστε η

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

πρωτεΐνη να μη βρεθεί σε ανεπιθύμητο χημικό περιβάλλον από αυτό που είναι διαλυμένη. Παράλληλα το υλικό της στήλης μένει αναλλοίωτο και έτοιμο για χρήση.

II) ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ (INJECTION)

Μετά το πέρας της εξισορρόπησης της στήλης, γίνεται εισαγωγή του δείγματος που επιθυμούμε να διαχωριστεί. Ανάλογα με την υποκατηγορία υγρής χρωματογραφίας που εκτελείται, οι αντίστοιχες ουσίες συνδέονται με τη στήλη που χρησιμοποιείται. Αντίθετα ουσίες μη σχετιζόμενες με τη στήλη ή ουσίες διαφορετικής φύσης δε συνδέονται με τη στήλη και απομακρύνονται. Το κλάσμα αυτών των ουσιών ονομάζεται υπερδιήθημα (Flow through-FT).

III) ΠΛΥΣΗ (WASH)

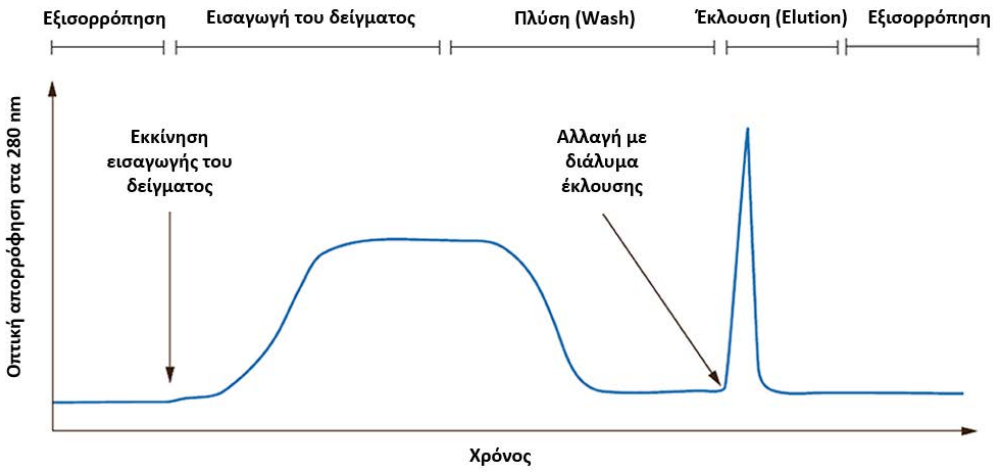
Αφού περάσει το δείγμα από τη στήλη και έχει γίνει συλλογή του κλάσματος υπερδιηθήματος (FT), ακολουθεί το στάδιο της πλύσης της στήλης. Σε αυτό το σημείο, η στήλη εκπλένεται με διάλυμα πλύσης (Διάλυμα Α), με στόχο να απομακρυνθούν από τη στήλη οι ουσίες που συγκρατήθηκαν στη στήλη μη ειδικά και έτσι να μείνουν στα σφαιρίδια της στήλης μόνο οι πρωτεΐνες που συνδέονται ισχυρά με αυτά. Στο στάδιο της πλύσης πραγματοποιείται συνήθως με χρήση διαλύματος πλύσης όγκου ίσο με 5-10 όγκους στήλης. Τα κλάσματα που θα συλλεχθούν ονομάζονται Wash (W), και περιέχουν πρωτεΐνες μη ειδικές ως προς τη στήλη.

IV) ΈΚΛΟΥΣΗ (ELUTION)

Στο συγκεκριμένο στάδιο και μετά την ολοκλήρωση της πλύσης, γίνεται χρήση διαλύματος (Elution buffer - Διάλυμα Β) ουσίας, η οποία ανταγωνίζεται τις πρωτεΐνες που συνδέθηκαν στη στήλη, με σκοπό να εκλούονται από τη στήλη και να παραλαμβάνονται στα κλάσματα Elution (Ε). Η έκλουση σε κάποιες περιπτώσεις μπορεί να γίνει και με βαθμιδωτή συγκέντρωση της ουσίας έκλουσης. Σημειώνεται ότι σε ορισμένα είδη υγρής χρωματογραφίας, το στάδιο αυτό δεν πραγματοποιείται.

V) ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗ

Η στήλη εξισορροπείται ξανά όπως στο στάδιο Ι), ενώ αποθηκεύεται για μελλοντική χρήση. Παρακάτω ακολουθεί ένα ενδεικτικό διάγραμμα χρωματογραφίας που φαίνονται τα στάδια της χρωματογραφίας, (*Εικόνα 27*):



Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

Εικόνα 27: Τυπικό διάγραμμα υγρής χρωματογραφίας (LC) – χρωματογράφημα. Στον άξονα x βρίσκεται ο χρόνος, ενώ στον άξονα y, μετριέται η ποσότητα της πρωτεΐνης που εξέρχεται από το σύστημα της υγρής χρωματογραφίας μέσω της οπτικής απορρόφησης που απορροφούν τα αρωματικά αμινοξέα στο UV (280 nm).

Οι συνηθέστερες υποκατηγορίες της υγρής χρωματογραφίας που εφαρμόζονται ευρύτερα είναι η χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής (ion – exchange chromatography), η χρωματογραφία μοριακής διήθησης (size exclusion chromatography - SEC) και η χρωματογραφία συγγένειας (affinity chromatography) (Coskun, 2016).
Στην παρούσα πτυχιακή εργασία, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα FPLC ÄKTA Purifier (GE Healthcare Life Sciences).

3.2.4.2 Χρωματογραφία συγγένειας

Η συγκεκριμένη μέθοδος καθαρισμού αποτελεί μια αποδοτική μέθοδο καθαρισμού ενζύμων. Η τεχνική αυτή βασίζεται στη βιολογική αγχιστεία δύο μορίων όπως αντιγόνο – αντίσωμα, ένζυμο – υπόστρωμα, πρωτεΐνη – προσδέτης ή και μέταλλο - πρωτεΐνη. Με άλλα λόγια, χρησιμοποιούνται στήλες κατασκευασμένες από κάποιο πολυμερές υλικό (πχ ρητίνη), οι οποίες είναι εμπλουτισμένες με κάποια ουσία που θα συγκρατήσει λόγω βιολογικής συγγένειας το επιθυμητό μόριο (Urh et al., 2009).
Το πρώτο στάδιο καθαρισμού της PfHsp70-x είναι η χρωματογραφία συγγένειας. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω (§3.2.1), η πρωτεΐνη είναι ανασυνδυασμένη με (6xHis-tag). Μέσω αυτής της ετικέτας, η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη έχει την ικανότητα να προσδένεται σε στήλη από ρητίνη, εμπλουτισμένη με ιόντα νικελίου (Ni^{2+}) ή κοβαλτίου (Co^{2+}). Στην παρούσα πτυχιακή εργασία, γίνεται χρήση στήλης από ρητίνη εμπλουτισμένη με ιόντα κοβαλτίου (Co^{2+}) όγκου 5mL (HiTrap TALON crude Co^{2+} - Cytiva). Με αυτόν τον τρόπο, τα κατιόντα Co^{2+} αλληλεπιδρούν με τους δακτυλίους ιμιδαζολίου των 6 ιστιδινών και η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη συγκρατείται στη στήλη.
Αξίζει να αναφερθεί πως κατά το στάδιο της έκλουσης έγινε χρήση ιμιδαζολίου, το οποίο ανταγωνίζεται χημικά την ετικέτα των 6 ιστιδινών.

Πειραματική πορεία

Για την εξισορρόπηση, την πλύση και την αναγέννηση της στήλης, γίνεται χρήση του διαλύματος Α, το οποίο είναι σχεδόν όμοιο με το διάλυμα λύσης των κυττάρων.
Παρασκευάστηκαν 300 mL, pH: 7,4 από το Διάλυμα Α: 10 mM Na_2HPO_4, 2 mM KH_2PO_4, 2,7 mM KCl, 500 mM NaCl και 0,01% (v/v) TRITON.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

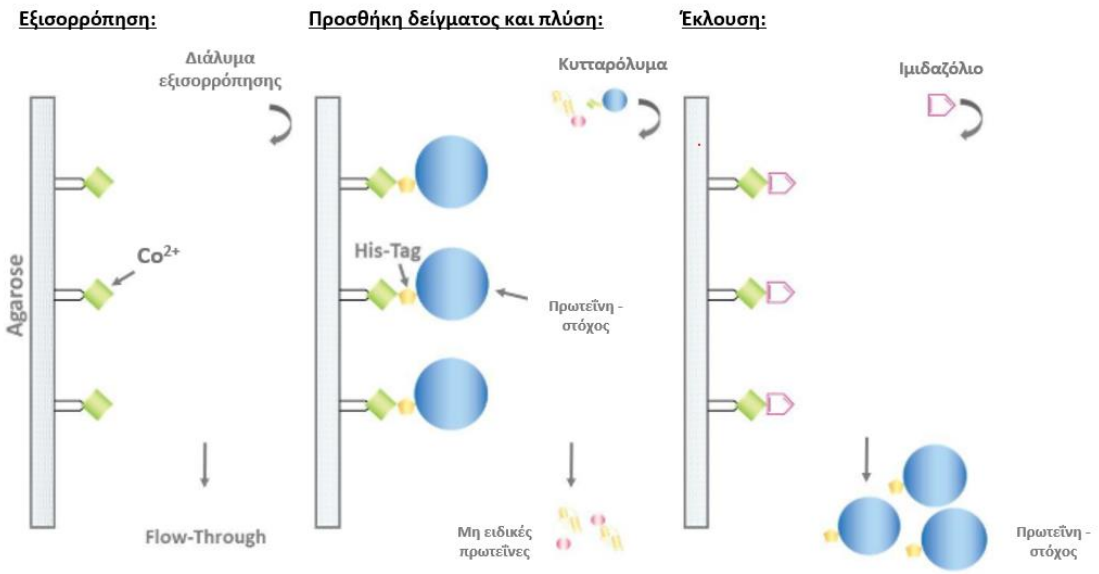
Κατόπιν παρασκευάστηκε και το διάλυμα έκλουσης (Διάλυμα Β), το οποίο διέφερε μόνο ως προς τον παράγοντα έκλουσης (ιμιδαζόλιο) Παρασκευάστηκαν επομένως 300 mL, pH: 7,4 από το Διάλυμα Β: 10 mM Na_2HPO_4, 2 mM KH_2PO_4, 2,7 mM KCl, 500 mM NaCl, 0,01% (v/v) TRITON και 500 mM Imidazole.

Τα δύο διαλύματα διηθήθηκαν υπό κενό και απαερώθηκαν σε υδατόλουτρο υπερήχων.

Μετά την εξισορρόπηση της στήλης με διάλυμα Α, ακολούθησε η εισαγωγή του δείγματος, δηλαδή η τοποθέτηση του κυτταρολύματος, στη στήλη. Στο σημείο αυτό, οι ουσίες που υπήρχαν στο δείγμα και δεν εμφάνιζαν συγγένεια με τη στήλη, όπως αναμενόταν, δεν προσδέθηκαν στη στήλη και κατέληξαν στο κλάσμα υπερδιηθήματος (flow through) 50 mL.

Στη συνέχεια, κατά την πλύση της στήλης, χρησιμοποιήθηκε ξανά διάλυμα Α, με σκοπό να αποσυνδεθούν τα μόρια τα οποία είχαν συνδεθεί μη ειδικά στη στήλη, χωρίς να έχουν βιολογική συγγένεια με αυτή. Η πλύση της στήλης έγινε με 7 όγκους στήλης και συλλέχθηκε το κλάσμα wash 40 mL.

Μετά την ολοκλήρωση της πλύσης της στήλης, ακολουθήσε το στάδιο της έκλουσης, το οποίο έγινε με το διάλυμα Β που περιείχε υψηλή συγκέντρωση ιμιδαζολίου, όπου εκλούσθηκε η μετασχηματισμένη με 6xHis-tag PfHsp70-x πρωτεΐνη και συλλέχθηκαν κλάσματα όγκου 3 ml. Ο συνολικός όγκος της έκλουσης ήταν 7cv (όγκοι στήλης), 35ml. (όγκος έκλουσης = 7 όγκους στήλης) (*Εικόνα 28*).



Εικόνα 28: Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής πορείας κατά τη χρωματογραφία συγγένειας και της έκλουσης με ιμιδαζόλιο.

3.2.4.3 Διαπίδυση και πέψη της ετικέτας με την πρωτεάση 3C

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

Οι ετικέτες αγχιστείας είναι ιδιαίτερα χρήσιμες για την απομόνωση των πρωτεϊνών, ωστόσο στη μετέπειτα αξιοποίηση τους όπως σε κινητικές, βιοφυσικές ή κρυσταλλογραφικές μελέτες μπορεί να επέμβουν στη βιολογική δράση της πρωτεΐνης. Επομένως είναι αναγκαία η πέψη της ετικέτας.

Στην παρούσα εργασία, η πέψη έγινε εφικτή με τη χρήση της πρωτεάσης 3C. Η πρωτεάση αυτή έχει αυστηρή εξειδίκευση ως προς την αλληλουχία που αναγνωρίζει δηλαδή την αλληλουχία Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln/Gly-Pro. Η ανασυνδυασμένη PfHsp70-x εκφράζεται από τον φορέα έκφρασης pFloat ως πρωτεΐνη συγχωνευμένη στο αμινοτελικό της άκρο με επίτοπο έξι καταλοίπων ιστιδίνης, ακολουθούμενο από τον επίτοπο αναγνώρισης της 3C πρωτεάσης LEVLFQ/GP. Συνεπώς μετά την πρωτεολυτική διάσπαση από την 3C πρωτεάση, η ετικέτα 6xHis απομακρύνεται από την πρωτεΐνη PfHsp70-x (Waugh, 2011).

Ταυτόχρονα με την πρωτεολυτική διάσπαση πραγματοποιήθηκε και αλλαγή του διαλύματος της πρωτεΐνης με διαπίδυση σε μεμβράνες διαπίδυσης με ανώτατο όριο μοριακού βάρους 10kDa ώστε να μην διαφύγει η απομονωμένη πρωτεΐνη από τους πόρους της μεμβράνης. Η διαπίδυση έγινε σε διάλυμα 20 mM Na_2HPO_4, 150 mM NaCl, 1 mM DTT και όγκου 2 L, pH: 7,4 για διάρκεια 16h στους 4^oC. Με το στάδιο της διαπίδυσης, τα μικρότερα μόρια τα οποία βρίσκονταν στο κλάσμα της έκλουσης εξήλθαν από τη μεμβράνη λόγω ώσμωσης, ενώ τα μεγαλύτερα, συμπεριλαμβανομένου και της πρωτεΐνης παρέμειναν στη μεμβράνη.

3.2.4.4 Αντίστροφη στήλη αγχιστείας

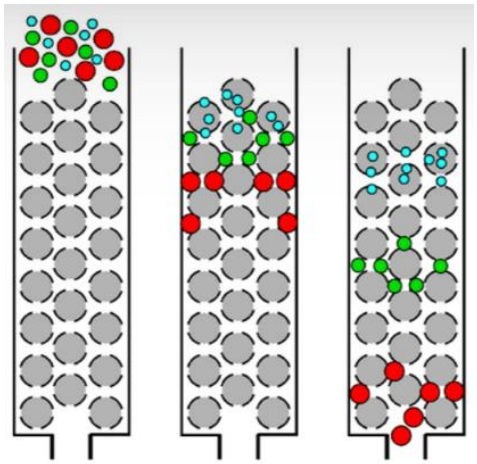
Το πρωτεϊνικό διάλυμα καθαρίστηκε περαιτέρω με αντίστροφη χρωματογραφία συγγένειας με στήλη κοβαλτίου (HiTrap TALON crude Co^{2+}- Cytiva). Η διαδικασία καθαρισμού διαφέρει από το πρώτο βήμα, καθώς η PfHsp70-x δεν θα δεσμευτεί στη στήλη, εφόσον πλέον δεν φέρει τον επίτοπο έξι ιστιδινών και δεν έχει συγγένεια με τη ρητίνη της στήλης. Στη στήλη συνδέεται ο επίτοπος 6xHis καθώς και η πρωτεάση 3C, ενώ η PfHsp70-x εκλούεται στο κλάσμα του υπερδιηθήματος όπου και συλλέγεται.

3.2.4.5 Χρωματογραφία μοριακής διήθησης (Size exclusion chromatography - SEC)

Το επόμενο και τελικό χρωματογραφικό στάδιο καθαρισμού του ενζύμου PfHsp70-x είναι αυτό της χρωματογραφίας μοριακής διήθησης (Gel filtration chromatography – Size exclusion chromatography SEC). Αυτή η μέθοδος διαχωρίζει τα μόρια ενός

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

πρωτεϊνικού δείγματος λαμβάνοντας υπόψη το μέγεθός τους. Με άλλα λόγια, τα μόρια του δείγματος περνούν από τα σφαιρίδια μιας στήλης, κατασκευασμένα από δεξτράνη, αγαρόζη ή πολυακρυλαμίδιο με σκοπό να διαχωριστούν με βάση το μοριακό τους βάρος (MW). Όπως γίνεται αντιληπτό, ο χρόνος και η ταχύτητα έκλουσης της κάθε πρωτεΐνης είναι διαφορετικός, καθώς σε ένα δείγμα υπάρχουν πρωτεΐνες με διαφορετικά χαρακτηριστικά. Τέλος, σε ένα πρωτεϊνικό δείγμα, οι μικρότερες πρωτεΐνες καθυστερούν να εκλουστούν, διότι διέρχονται δυσκολότερα μέσα από τους πόρους της στήλης. Οι μεγαλύτερες πρωτεΐνες από την άλλη, θα εκλουστούν ταχύτερα (Duong-Ly & Gabelli, 2014), (*Εικόνα 29*).



Εικόνα 29: Αναπαράσταση της χρωματογραφίας μοριακής διήθησης, όπου η μεγαλύτερες πρωτεΐνες εκλούονται πρώτες και οι μικρότερες τελευταίες, καθώς περνούν δυσκολότερα τα σφαιρίδια της στήλης (στατική φάση).

Πειραματική πορεία

Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Superdex 200 HiLoad 26/600 (Cytiva) με διαχωριστική ικανότητα 10-600kDa σφαιρικών πρωτεϊνών. Ο όγκος του δείγματος που δέχεται η στήλη είναι 13mL, οπότε η πρωτεΐνη συμπυκνώθηκε ώστε να έχει όγκο λιγότερο από 13 mL. Η συμπύκνωση του κλάσματος flow through πραγματοποιήθηκε με διαδοχικές φυγοκεντρήσεις χρησιμοποιώντας φίλτρο συμπύκνωσης με μεμβράνη κατώτατου μοριακού βάρους 10 kDa (Vivaspin Turbo15, Sartorius).

Παράλληλα η στήλη εξισορροπήθηκε για 320 mL με κατάλληλο διάλυμα (Buffer SEC), όγκου 1 L και pH: 7,4: 20 mM HEPES, 50 mM NaCl και 1mM DTT.

Μετά την εξισορρόπηση της στήλης, γίνεται εισαγωγή του δείγματος (injection). Σύμφωνα με το εγχειρίδιο χρήσης ο όγκος έκλουσης της η πρωτεΐνης είναι περίπου στα 150 mL. Συνεπώς από τα 140 mL μέχρι και τα 240 mL και με ταχύτητα ροής 2 mL/min συλλέγουμε κλάσματα των 4 mL, ώστε να βεβαιωθούμε ότι συλλέγουμε όλη την πρωτεΐνη.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

3.2.5 Χρωματογραφικός καθαρισμός της περιοχής πρόσδεσης νουκλεοτιδίων (nucleotide binding domain–NBD) της PfHsp70-x

Η απομόνωση της καταλυτικής επικράτειας (NDB) του ενζύμου PfHsp70-x πραγματοποιήθηκε κατά τον ίδιο τρόπο που εφαρμόστηκε για την απομόνωση του ολοενζύμου PfHsp70-x, με τα ίδια διαλύματα. Η διαφορά έγκειται στο γεγονός ότι επειδή η καταλυτική επικράτεια (NDB) έχει μικρότερο μοριακό βάρος (40 kDa), θα εκλουστεί πιο αργά κατά τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης.

3.2.6 Χρωματογραφικός καθαρισμός της επικράτειας J της PFE0055c - PfHsp40

Σε ότι αφορά την απομόνωση της επικράτειας J της PfHsp40, PFE0055c (co-chaperone) πραγματοποιήθηκε κατά τον ίδιο τρόπο που εφαρμόστηκε για την απομόνωση του ολοενζύμου PfHsp70-x, με τα ίδια διαλύματα. Η διαφορά έγκειται στο γεγονός ότι επειδή η επικράτεια J, PFE0055c, έχει μικρότερο μοριακό βάρος (8 kDa), θα εκλουστεί πιο αργά κατά τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης. Τέλος, για την παραγωγή της PFE0055c σε μεγάλες ποσότητες, χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά BL-21 και το πλασμίδιο που προστέθηκε κατά τον μετασχηματισμό, ήταν το pFloat και έφερε το ανασυνδυασμένο γονίδιο που κωδικοποιεί την PFE0055c με ετικέτα 6 – ιστιδινών και γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη.

3.2.7 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

Η τεχνική της ηλεκτροφόρησης επιτρέπει την παρακολούθηση της κίνησης των βιομορίων σε μία πηκτή υπό την επίδρασης ενός ηλεκτρικού πεδίου. Η θεωρία της ηλεκτροφόρησης βασίζεται στην παρακάτω σχέση:

$$v = \frac{\mathrm{E}q}{\mathrm{f}}$$

Όπου:
v: η ταχύτητα του μορίου,
E: η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου,
q: το φορτίου του μορίου και

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

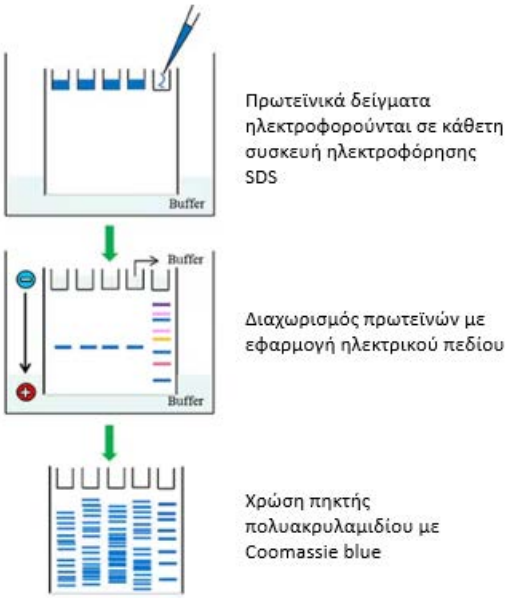
f: ο συντελεστής τριβής που εξαρτάται από τη μάζα και το σχήμα του μορίου.

Γίνεται αντιληπτό λοιπόν πως σε μια ηλεκτροφόρηση με δεδομένη ένταση ηλεκτρικού πεδίου, η ταχύτητα μετακίνησης των μορίων εξαρτάται από το φορτίο, το σχήμα και το μοριακό τους βάρος (Matsumoto et al., 2019).

Όταν πρόκειται για ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών γίνεται λόγος για πηκτές πολυακρυλαμιδίου (PAGE – Polyacrylamide Gel Electrophoresis), η οποίες αποτελούνται από 1) μονομερές ακρυλαμίδιο, 2) Bis ακρυλαμίδιο, 3)Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl, 4) Υπερθειϊκό αμμώνιο (APS) και 4) N, N, - τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη (TEMED).
Συγκεκριμένα, το μονομερές ακρυλαμίδιο πολυμερίζεται μαζί με το Bis ακρυλαμίδιο (αντιδραστήριο διασταύρωσης), με τη βοήθεια του APS, το οποίο εκκινεί τον πολυμερισμό και της TEMED η οποία τον επιταχύνει.
Όσο μεγαλύτερη είναι η περιεκτικότητα μιας πηκτής σε ακρυλαμίδιο, τόσο μικρότερη θα είναι η διάμετρος των πόρων της με αποτέλεσμα να διαχωρίζονται μικρότερα μόρια μεταξύ τους. Με άλλα λόγια, για διαχωρισμό ενός δείγματος με πρωτεΐνες χαμηλού μοριακού βάρους, θα γίνει κατασκευή πηκτής υψηλής περιεκτικότητας σε ακρυλαμίδιο, ενώ για διαχωρισμό πρωτεϊνών υψηλού μοριακού βάρους θα επιλεγεί πηκτή με χαμηλή περιεκτικότητα σε ακρυλαμίδιο.
Επειδή σε ένα πρωτεϊνικό δείγμα υπάρχει ποικιλομορφία μεταξύ των χαρακτηριστικών των πρωτεϊνών, όπως διαφορετικό φορτίο, διαφορετικό μοριακό βάρος και διαφορετικό σχήμα, ο διαχωρισμός πρωτεϊνών γίνεται περίπλοκος. Για τον λόγο αυτό, επιλέγεται να πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικές συνθήκες. Κάτι τέτοιο μπορεί να πραγματοποιηθεί με την προσθήκη απορρυπαντικού όπως το δωδεκανοθειϊκό νάτριο – SDS. Το SDS, καταστρέφει την δευτεροταγή και την τριτοταγή διαμόρφωση των πρωτεϊνών και ταυτόχρονα προσδίδει σε όλες τις πρωτεΐνες αρνητικό φορτίο, με αποτέλεσμα να αποδιατάσσονται και εν τέλει να διαχωρίζονται αποκλειστικά βάσει του μοριακού τους βάρους (MW). Έτσι λοιπόν, για μια πηκτή με δεδομένη περιεκτικότητα σε ακρυλαμίδιο, τα βαρύτερα μόρια κινούνται πιο αργά προς το θετικό ηλεκτρόδιο της συσκευής ηλεκτροφόρησης σε σχέση με τα ελαφρύτερα μόρια που κινούνται γρηγορότερα. Σημειώνεται πως για περαιτέρω αποδιάταξη των πρωτεϊνών, τα δείγματα που πρόκειται να αναλυθούν με SDS PAGE, τίθενται για 5 min σε υψηλή θερμοκρασία (95 ^{o}C), προς εξάλειψη όλων των ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων.
Για λόγους αυξημένης αναλυτικής ικανότητας, υπάρχουν δύο στοιβάδες πηκτής, η πηκτή ανάλυσης (resolving gel) και η πηκτή επιστοίβαξης (stacking gel) από πάνω. Η πηκτή επιστοίβαξης είναι πηκτή χαμηλότερης περιεκτικότητας σε ακρυλαμίδιο και έχει τιμή pH χαμηλότερη από αυτή της πηκτής ανάλυσης. Αυτοί οι παράγοντες συντελούν στη συσσώρευση του προς ανάλυση δείγματος και της δημιουργία μιας ευρείας ζώνης (Matsumoto et al., 2019).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

Το αποτέλεσμα μιας SDS PAGE οπτικοποιείται μέσω χρώσης της πηκτής με κατάλληλη χρωστική (Coomassie blue) και κατόπιν αποχρωματισμό με οξικό οξύ (Garca-Descalzo et al., 2012) (*Εικόνα 30*).



Εικόνα 30: Στάδια ηλεκτροφόρησης πηκτής πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS PAGE).

Πειραματική πορεία

Μετά από τον χρωματογραφικό καθαρισμό των πρωτεϊνών PfHsp70-x, PfHsp70-x-NBD επικράτεια και της επικράτειας J (PFE005c), πραγματοποιήθηκε κατασκευή πηκτών 10%-15% σε ακρυλαμίδιο, ώστε να οπτικοποιηθεί και να αποτιμηθεί η καθαρότητα των πρωτεϊνών που απομονώθηκαν ύστερα από κατάλληλη χρώση με χρωστική Coomasie Brilliant Blue R-250.

Αναλυτικότερα πριν και μετά από κάθε στάδιο καθαρισμού της πρωτεΐνης, συλλέχθηκε περίπου 100 μL από το δείγμα, ώστε να γίνει η εκτίμηση της καθαρότητας των πρωτεϊνών και η απόδοση της απομόνωσής τους.

Κατασκευάστηκαν 15 mL 10% ακρυλαμιδίου και 15 mL 15% ακρυλαμιδίου πηκτές ανάλυσης, καθώς και 5 mL 5% ακρυλαμιδίου πηκτής επιστοίβαξης με τις ποσότητες των συστατικών να φαίνονται στον ακόλουθο πίνακα (*Πίνακας 4*):

Πίνακας 4: Συστατικά και ποσότητες για κατασκευή πηκτών ανάλυσης 10% και 15% ακρυλαμιδίου, καθώς και για κατασκευή 5% ακρυλαμιδίου πηκτής επιστοίβαξης.

	Πηκτή διαχωρισμού (15 mL)	Πηκτή διαχωρισμού (15 mL)	Πηκτή επιστοίβαξης (5 mL)
	10%	15%	5%
dH_2O	5,9 mL	3,4 mL	3,4 mL

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

30% Μείγμα ακρυλαμιδίου – Bis ακρυλαμιδίου	5 mL	7,5 mL	830 μL
1,5 M Tris – HCl (pH 8,8)	3,8 mL	3,8 mL	-
10% SDS	150 μL	150 μL	50 μL
1 M Tris – HCl (pH 6,8)	-	-	630 μL
10% APS	150 μL	150 μL	50 μL
TEMED	6 μL	6 μL	5 μL

Δείγμα 20 μL αναμείχθηκε με 5 μL loading buffer, ενώ τελικά ηλεκτροφορήθηκαν 17 μL από το κάθε δείγμα, τα οποία υπέστησαν θερμική επεξεργασία στους 95 ^{o}C για 5 min, ώστε να αποδιαταχθούν ολικά. Επιπλέον σε κάθε πήκτωμα, ηλεκτροφορήθηκε και 1 μL από κατάλληλο πρωτεϊνικός μάρτυρας για τον προσδιορισμό των μοριακών βαρών.

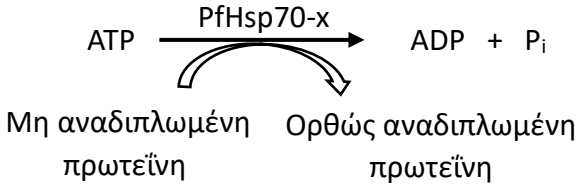
Μέσω αυτής της τεχνικής επιλέχθηκαν τα κλάσματα τα οποία επρόκειτο να συμπυκνωθούν ώστε να παραληφθεί ένα δείγμα επαρκούς συγκέντρωσης, όγκου και καθαρότητας όλων των πρωτεϊνών που απομονώθηκαν

Η συμπύκνωση των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας φίλτρο συμπύκνωσης με μεμβράνη κατώτατου μοριακού βάρους 10 kDa (Vivaspin Turbo15, Sartorius) για το ολοενζύμου Hsp70-x και την επικράτεια NBD και φίλτρο συμπύκνωσης με μεμβράνη κατώτατου μοριακού βάρους 5 kDa (Vivaspin 20, Sartorius) για την J - επικράτεια της πρωτεΐνης PFE0055c.

Η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων έγινε φασματοφωτομετρικά με τη χρήση φασματοφωτομέτρου Nanodrop (ND 1000, Thermo Fischer) σε μήκος ακτινοβολίας 280 nm, εφόσον οι πρωτεΐνες απορροφούν στο υπεριώδες λόγω των δακτυλίων των αρωματικών αμινοξέων.

3.2.8 Κινητικές μελέτες του ενζύμου PfHsp70-x

Το ένζυμο PfHsp70-x, ως μοριακός συνοδός (molecular chaperone), συμβάλλει στη σωστή αναδίπλωση των πρωτεϊνών (§1.4) καταναλώνοντας ένα μόριο ATP και απελευθερώνοντας ADP και P_i. Η αντίδραση που μελετήθηκε συνεπώς είναι η ικανότητα υδρόλυσης της ATP από το ένζυμο:



Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

Εικόνα 31: Σχηματική απεικόνιση της καταλυόμενης από το ένζυμο PfHsp70-x αντίδρασης. Η μη αναδιπλωμένη πρωτεΐνη αναδιπλώνεται μέσω υδρόλυσης υποστρώματος ATP, ενώ απελευθερώνεται ADP και ορθοφωσφορικά ανιόντα (Pi).

3.2.8.1 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός των παραγόμενων ορθοφωσφορικών ιόντων

Η ποσοτικοποίηση του παραγόμενου προϊόντος βασίστηκε στον φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό ορθοφωσφορικών, τα οποία παράγονται από την υδρόλυση του υποστρώματος ATP από το ένζυμο. Αυτή η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του αντιδραστηρίου malachite (Malachite green Phosphate Assay Kit - Sigma - Aldrich). Το συγκεκριμένο kit προσδιορισμού φωσφορικών περιέχει το αντίδραστήριο A (malachite) και το αντιδραστήριο B (Μολυβδενικό), τα οποία αναμιγνύονται σε αναλογία 100:1 (διάλυμα εργασίας), με αποτέλεσμα όταν αντιδρούν με τα ελεύθερα φωσφορικά (Pi) να παράγουν μία έγχρωμη ένωση (χρωμοφόρο), το οποίο παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στην περιοχή του ορατού (Vis) σε μήκος κύματος λ = 620nm. Το δείγμα και το διάλυμα εργασίας πριν τη φωτομέτρηση πρέπει να βρίσκονται σε αναλογία 4:1 (πχ 40 μL δείγματος και 10 μL διάλυμα εργασίας). Η συγκεκριμένη μέθοδος είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη και είναι ικανή τα εντοπίσει παραγωγή ελευθέρων φωσφορικών ακόμη και σε συγκέντρωση 1,6 pmoles και ενδείκνυται για ενζυμικές δοκιμασίες που έχουν ως υπόστρωμα τριφωσφορικά νουκλεοτίδια.
Για τον ακριβή υπολογισμό των παραγόμενων ορθοφωσφορικών, κατασκευάστηκε μια πρότυπη καμπύλη με διαλύματα φωσφορικών γνωστών συγκεντρώσεων που δημιουργήθηκαν από αραιώσεις ενός αρχικού διαλύματος 1 mM φωσφορικών (standard)
Όλες οι κινητικές μελέτες πραγματοποιήθηκαν σε πιάτο 96 θέσεων (96 well plate) και η φωτομέτρηση έλαβε χώρα σε φασματοφωτόμετρο plate reader (Perkin Elmer)στα 620nm.

Πειραματική πορεία

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης, δημιουργήθηκαν 8 πρότυπα διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης προκειμένου να δημιουργηθεί μια εξίσωση της μορφής y = ax + b με σκοπό να μπορεί να υπολογιστεί η συγκέντρωση των φωσφορικών σε δείγματα άγνωστης συγκέντρωσης.
Αρχικά και για μεγαλύτερη αξιοπιστία, κάθε πρότυπο διάλυμα μετρήθηκε σε 2 επαναλήψεις. και σε κάθε μία τοποθετήθηκαν από 20 μL από το διάλυμα εργασίας. Συνεπώς για τη συγκεκριμένη διεργασία, χρειάστηκαν τουλάχιστον 320 μL διαλύματος εργασίας. Επομένως για τελικό όγκο 400 μL έγινε ανάμειξη 400 μL και 4

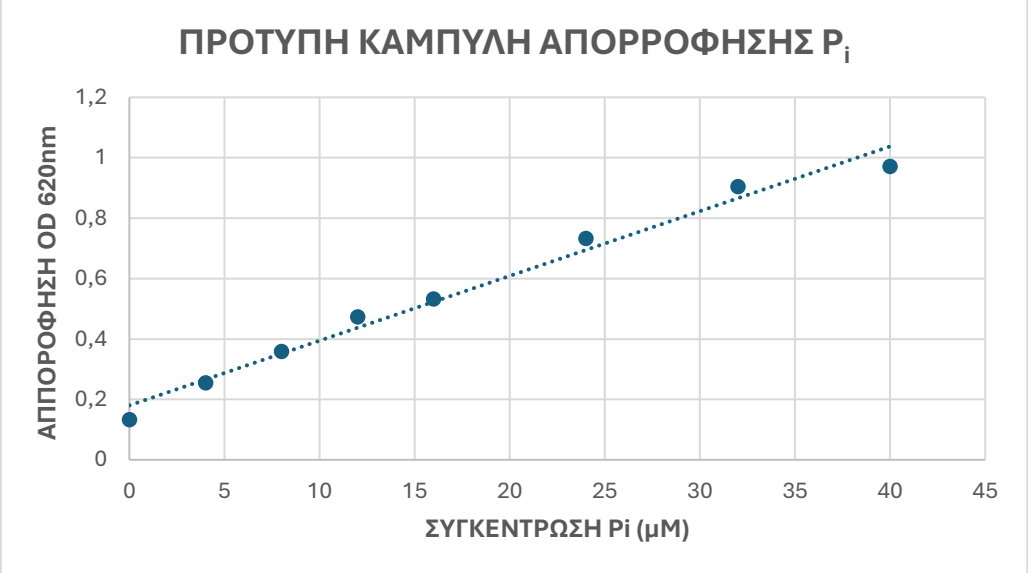
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

μL από τα αντιδραστήρια A και B του kit αντίστοιχα. Στη συνέχεια δημιουργήθηκε ένα αρχικό πρότυπο διάλυμα αρχικής συγκέντρωσης 40 μM, όγκου 1 mL, το οποίο προέκυψε από αραίωση 40 μL από το standard διάλυμα (1 mM) με 960 μL $_{dd}H_2O$. Τονίζεται πως το H_2O που χρησιμοποιείται πρέπει να είναι διπλά απεσταγμένο, ώστε να εμπεριέχεται η ελάχιστη δυνατή ποσότητα φωσφορικών (OD < 0,1). Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν ως πρότυπα περιγράφονται στον παρακάτω πίνακα (*Πίνακας 5*):

Πίνακας 5: Συστατικά και τελική συγκέντρωση των πρότυπων διαλυμάτων για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης.

	Αρχικό πρότυπο	ddH_20	Τελικός όγκος	$[P_i]$ (μM)
1	200 μL	-	200 μL	40
2	160 μL	40 μL		32
3	120 μL	80 μL		24
4	80 μL	120 μL		16
5	60 μL	140 μL		12
6	40 μL	160 μL		8
7	20 μL	180 μL		4
8	-	200 μL		0

Για τη φωτομέτρηση των ορθοφωσφορικών λοιπόν, μεταφέρθηκαν σε κάθε θέση 80 μL από κάθε πρότυπο διάλυμα και ύστερα από 30 minεπώασης για ανάπτυξη του χρώματος του χρωμοφόρου , πραγματοποιήθηκε η φωτομέτρηση στα 620 nm.
Η πρότυπη καμπύλη απορρόφησης των ορθοφωσφορικών (P_i) και η αντίστοιχη εξίσωση της μορφής y = ax + b αποτυπώνονται παρακάτω (*Εικόνα 32*):



Εικόνα 32: Πρότυπη καμπύλη απορρόφησης ορθοφωσφορικών ανιόντων (Pi).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

y = 0,0214x + 0,1801 (R^2 = 0,9827), όπου y: Οπτική απορρόφηση (OD_{620}) και x: Συγκέντρωση ορθοφωσφορικών (P_i)

3.2.8.2 Προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων (K_M και V_{max}) του ενζύμου PfHsp70-x

Οι παράμετροι K_M και V_{max}, προσδιορίστηκαν ύστερα από δοκιμές με διάφορες συγκεντρώσεις υποστρώματος (ATP), χρησιμοποιώντας ενζυμικό διάλυμα με όμοια συγκέντρωση ενζύμου κάθε φορά. Επιπλέον οι χρονικές στιγμές που λαμβάνονταν δείγμα ήταν καθορισμένες και σταθερές για όλες τις δοκιμές. Τέλος η συγκεκριμένη ενζυμική δοκιμασία, και όλες οι κινητικές μελέτες πραγματοποιήθηκαν σε υδατόλουτρο στους 37 ^oC, ως τη βέλτιστη θερμοκρασία για τη δραστικότητα του ενζύμου PfHsp70-x. Με άλλα λόγια, ο μόνος μεταβλητός παράγοντας για αυτές τις κινητικές μελέτες, ήταν η διαφορετική συγκέντρωση της ATP στο κάθε ενζυμικό διάλυμα. Τέλος, για κάθε διάλυμα υποστρώματος, δημιουργήθηκε και από ένας μάρτυρας με όμοια συγκέντρωση ATP, λόγω της έντονης υδρόλυσης που υφίσταται η ATP κατά τη διάρκεια του χρόνου και σε θερμοκρασία 37 ^oC.

Πειραματική πορεία

Το ενζυμικό διάλυμα σε αυτές τις κινητικές μελέτες, ήταν το ίδιο και είχε σύσταση 50 mM Tris – HCl pH 8, 2 mM $MgCl_2$, 200mM KCl και 2 μM από το ένζυμο PfHsp70-x.
Το μεταβλητό κομμάτι σε αυτές τις μελέτες ήταν το διάλυμα υποστρώματος, το οποίο κάθε φορά είχε διαφορετική συγκέντρωση ως προς το υπόστρωμα (ATP) και περιείχε επίσης 50 mM Tris – HCl pH 8 και 2 mM $MgCl_2$ και μεταβλητές συγκεντρώσεις ATP με τελικό όγκο 120 μL.
Στην αντίδραση, ο τελικός όγκος ήταν πάντοτε 240 μL, έπειτα από ανάμειξη 120 μL από το ενζυμικό διάλυμα με τα 120 μL του κάθε διαλύματος υποστρώματος.
Επομένως κατά την αντίδραση και σε τελικό όγκο 240 μL, υπήρχαν 50 mM Tris – HCl pH 8, 2 mM $MgCl_2$, 100mM KCl και 1 μM από το ένζυμο PfHsp70-x.
Οι διαφορετικές τιμές υποστρώματος ATP που επιλέχθηκαν για τον υπολογισμό της σταθεράς K_M και της V_{max} είναι οι εξής: 0,05 mM, 0,075 mM, 0,1 mM, 0,5 mM, 0,7 mM, 0,8 mM, 1,5 mM.
Επιπλέον δημιουργήθηκαν και διαλύματα μάρτυρες (τυφλά) για κάθε διαφορετική συγκέντρωση υποστρώματος, ώστε να συνυπολογίζεται η φυσική υδρόλυση της ATP και να αφαιρείται από τις τιμές απορρόφησης της αντίδρασης
Η διάρκεια της συνολικής αντίδρασης ήταν τα 75 min, ενώ οι χρονικές στιγμές που μετρήθηκε το προϊόν και κατ' επέκταση η πορεία της αντίδρασης ήταν: t_1 = 30 min,

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

t_2 = 40 min, t_3 = 50 min, t_4 = 65 min, t_5 = 75 min. Σε κάθε μία από αυτές τις χρονικές στιγμές, 40 μL από το περιεχόμενο της αντίδρασης, αναμειγνύονταν με 10 μL από το διάλυμα της μέτρησης (μείγμα αντιδραστηρίου A και B από το malachite green kit assay) και μετά από 30 min (χρόνος αντίδρασης του αντιδραστηρίου της μέτρησης με το προϊόν της αντίδρασης - §3.2.6.1), πραγματοποιήθηκε η φωτομέτρηση στα 620 nm. Ο παρακάτω πίνακας (*Πίνακας 6*), συνοψίζει τις ποσότητες των αντιδραστηρίων κατά την αντίδραση:

Πίνακας 6: Ποσότητα κάθε αντιδραστηρίου, για την κατασκευή ενζυμικού διαλύματος και διαφορετικών διαλυμάτων υποστρώματος ATP.

	Ενζυμικό διάλυμα	**Διάλυμα υποστρώματος ATP (π.χ. 0,1mM ATP)**	**Μάρτυρας ενζυμικού διαλύματος**	**Μάρτυρας διαλύματος υποστρώματος (π.χ. 0,1 mM ATP)**
Tris – HCl 0,5 M pH 8	12 μL	12 μL	50 μL	-
$MgCl_2$ 0,1 M	2,4 μL	2,4 μL	10 μL	-
KCl 1M	24 μL	-	50 μL	-
PfHsp70-x 124,5 μM (9mg/ml)	1,94 μL	-	-	-
Υπόστρωμα ATP 10mM	-	2,4 μL	-	5 μL
ddH_20	79,6 μL	103,2 μL	390 μL	495 μL
Τελικός όγκος	120 μL		500 μL	
Όγκος αντίδρασης	240 μL		-	-

Επεξεργασία δεδομένων

Η ανάλυση των κινητικών δεδομένων και η κατασκευή των απαραίτητων διαγραμμάτων έγιναν μέσω του προγράμματος GraFit (Erithacus software). Το πρώτο βήμα της επεξεργασίας των δεδομένων ήταν ο υπολογισμός της ειδικής ενζυμικής δραστικότητας (Enzyme specific activity) για κάθε συγκέντρωση υποστρώματος την κάθε χρονική στιγμή που επιλέχθηκε να γίνει μέτρηση, η οποία ορίζεται ως τα μmol υποστρώματος που καταναλώνονται ή προϊόντος (P_i) που παράγονται ανά μονάδα χρόνου για κάθε mg πρωτεΐνης, δηλαδή μmol/min/mg.
Η συγκέντρωση του παραγόμενου προϊόντος (P_i), υπολογίστηκε από τη διαφορά των απορροφήσεων (Δabs) του δείγματος με το άθροισμα της απορρόφησης των δύο μαρτύρων (τυφλά διαλύματος ενζύμου και υποστρώματος) και με τη βοήθεια της εξίσωσης της πρότυπης καμπύλης των ορθοφωσφορικών – P_i (§3.2.8.1):

$$Abs\ (Pi) = \Delta abs\ = Abs\ (\Delta είγματος) - Abs\ (Τυφλών)$$

$$y = 0{,}0214x + 0{,}1801 \Rightarrow Abs\ (Pi) = [P_i]*0{,}0214 + 0{,}1801 \Rightarrow [P_i] = \frac{Abs\ (Pi) - 0{,}1801}{0{,}0214}.$$

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

Κατόπιν, υπολογίστηκε η ειδική ενζυμική δραστικότητα μέσω μη γραμμικής εξίσωσης. Τέλος, από την εξίσωση Michaelis – Menten: $v = \frac{vmax\,[S]}{KM+[S]}$, κατασκευάστηκε το σχετικό διάγραμμα Michaelis - Menten $v = f([S])$, αλλά και το διάγραμμα Lineweaver – Burk (διπλού αντιστρόφου) $1/v = f([1/S])$ και προσδιορίστηκαν οι τιμές των σταθερών K_M και V_{max}.

3.2.8.3 Κινητικές μελέτες εκτίμησης ικανότητας αναστολής προσδετών στο ένζυμο PfHsp70-x

Όπως έχει ήδη αναλυθεί παραπάνω (§1.2.2), ένα από τα βήματα για τον κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό φαρμάκων (Structure based drug design) είναι να διερευνηθεί η βιολογική δράση μικρών μορίων. Σε συνεργασία με τον Καθηγητή Rainer Riedl (Institute of Chemistry and Biotechnology, Zhaw Zurich University of Applied Sciences) πραγματοποιήσαμε μια αρχική *in silico* σάρωση βιβλιοθήκης θραυσμάτων με σκοπό την εύρεση χημικών μορίων με μεγάλη πιθανότητα πρόσδεσης στην PfHsp70-x. Κύριος στόχος της διαλογής ήταν τα θραύσματα να προσδένονται σε επιμέρους κοιλότητες εντός της καταλυτικής περιοχής (NBD κέντρο σύνδεσης) αποκλείοντας ωστόσο την περιοχή δέσμευσης της ATP. Η βιβλιοθήκη που χρησιμοποιήθηκε περιείχε >25 χιλιάδες χαμηλού μοριακού βάρους χημικές ενώσεις-θραύσματα και/ή εμπορικά διαθέσιμες χημικές ενώσεις. Από την αρχική σάρωση προέκυψε μια ομάδα 100 ενώσεων με τα επιθυμητά χαρακτηριστικά έναντι του βιολογικού στόχου.

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία, έγιναν κινητικές μελέτες εκτίμησης αναστολής σε 19 διαφορετικές πρόδρομες ενώσεις, οι οποίες συντέθηκαν από το εργαστήριο του καθηγητή Rainer Riedl

Σημειώνεται ότι οι συγκεκριμένες πρόδρομες ενώσεις (προσδέτες - ligands) ήταν διαλυμένες σε 100% v/v DMSO (διμεθυλικό σουλφοξείδιο). Μετά από μελέτες δραστικότητας της PfHsp70-x παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων DMSO επιλέχθηκε η τελική συγκέντρωση του στην αντίδραση να είναι 1% v/v ώστε να μην παρατηρείται μείωση της δραστικότητας του ενζύμου εξαιτίας της παρουσίας του DMSO και να μην επηρεάζεται η διαλυτότητα του προσδέτη.

Ο ακόλουθος πίνακας (*Πίνακας 7*) συνοψίζει τις αρχικές και τελικές συγκεντρώσεις των ενώσεων που διερευνήθηκε η ικανότητα αναστολής τους, καθώς και τα μοριακά τους βάρη:

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

Πίνακας 7: Παράθεση μοριακού βάρους (MW) για τον κάθε προσδέτη, καθώς και της αρχικής του και τελικής του συγκέντρωσης στην αντίδραση.

Προσδέτης	Μοριακό βάρος (MW)	Αρχική συγκέντρωση (mM)	Τελική συγκέντρωση (mM)
98	204,23	100	1
680	212,68	200	2
1007	215,04	500	5
1095	236,09	200	2
1359	156,2	500	5
3771	139,15	500	5
3776	175,21	500	5
3924	156,2	200	2
3988	175,18	500	5
5331	139,15	500	5
5460	241,25	200	2
21001	201,06	200	2
22206	447,55	200	2
22658	114,17	200	2
23516	146,98	200	2
23517	273,5	200	2
23543	136,08	200	2
23545	205,01	200	2
23551	205,05	200	2

Πειραματική πορεία

Στις κινητικές μελέτες, όπου διερευνήθηκε η πιθανή δυνατότητα αναστολής ενός προσδέτη υπήρξαν τέσσερις διαφορετικές συνθήκες: 1) ένζυμο PfHsp70-x + 1% v/v DMSO, 2) ένζυμο PfHsp70-x + PFE0055c + 1% v/v DMSO, 3) ένζυμο PfHsp70-x + προσδέτης και 4) ένζυμο PfHsp70-x + PFE0055c + προσδέτης.

Κάθε μία από αυτές τις διαφορετικές συνθήκες είχε παρόμοια σύσταση δηλαδή: 50 mM Tris – HCl pH 8, 2 mM $MgCl_2$, 200mM KCl, 2% v/v DMSO, 2 μM PfHsp70-x, ενώ στις συνθήκες όπου συμμετείχε και η J – επικράτεια (domain) του ενζύμου co – chaperone PFE0055c, βρισκόταν σε συγκέντρωση 20 μM. Ο τελικός όγκος της κάθε συνθήκης ήταν τα 120 μL.

Κατά την έναρξη της αντίδραση, (t_0=0) προστίθενται στην κάθε συνθήκη 120 μL, από το διάλυμα υποστρώματος ATP με αποτέλεσμα ο συνολικός όγκος της αντίδρασης να ήταν τα 240 μL. Το διάλυμα υποστρώματος είχε την ίδια σύσταση με αυτό που χρησιμοποιήθηκε στις κινητικές μελέτες προσδιορισμού της K_M και V_{max}. Περιείχε δηλαδή 50 mM Tris – HCl pH 8, 2 mM $MgCl_2$ και 0,4 mM υποστρώματος ATP με τελικό όγκο 1200 μL, για ένα πείραμα με 10 διαφορετικές συνθήκες, δηλαδή για μια κινητική μελέτη που διερευνά 4 διαφορετικούς αναστολείς, τον καθένα υπό τη συμμετοχή ή μη της J – επικράτειας (PFE0055c). Η τελική συγκέντρωση του υποστρώματος στην αντίδραση είναι καλό να είναι περίπου η ίδια με την σταθερά K_M, η οποία υποδηλώνει

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

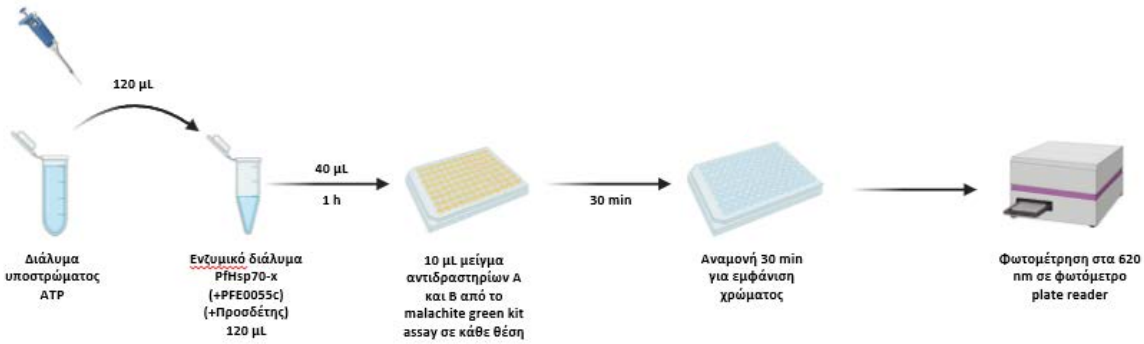
την τιμή συγκέντρωσης υποστρώματος, όπου υπάρχει η μεγαλύτερη συγγένεια του υποστρώματος με το ενεργό κέντρο του ενζύμου ($[ATP]_{assay}$ = 0,2 mM).
Η αντίδραση, όπως και όλες οι ενζυμικές δοκιμασίες του συγκεκριμένου ενζύμου πραγματοποιήθηκε σε υδατόλουτρο με θερμοκρασία 37 ^{o}C. Ο συνολικός χρόνος της αντίδρασης ορίστηκε στα 60 min και η φωτομέτρηση (λ = 620nm) έγινε για μία φορά στη λήξη της αντίδρασης, σε πιάτο 96 θέσεων (96-well plate), με 10 μL από το μείγμα των αντιδραστηρίων A και B του malachite green assay kit και 40 μL από την κάθε διαφορετική πειραματική συνθήκη. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων της κάθε συνθήκης αποτυπώνονται στον παρακάτω πίνακα, (*Πίνακας 8*):

Πίνακας 8: Ποσότητες για το κάθε συστατικό της ενζυμικής αντίδρασης ανά πειραματική συνθήκη.

	Tris - HCl 0,5 M pH 8	**KCl 1M**	**MgCl 0,1 M**	**DMSO 100% v/v**	**PfHsp70-x 124,5 μM**	**PFE0055c**	**Ligand**	**ddH_2O**
Συνθήκη 1: PfHsp70-x + DMSO	12 μL	24 μL	2,4 μL	2,4 μL	1,94 μL	-		77,2 μL
Συνθήκη 2: PfHsp70-x + PFE0055c + DMSO	12 μL	24 μL	2,4 μL	2,4 μL	1,94 μL	2 μL		75,2 μL
Συνθήκη 3: PfHsp70-x + Προσδέτης	12 μL	24 μL	2,4 μL	-	1,94 μL	-	2,4 μL	77,2 μL
Συνθήκη 4: PfHsp70-x + PFE0055c + Προσδέτης	12 μL	24 μL	2,4 μL	-	1,94 μL	2 μL	2,4 μL	75,2 μL

Σημειώνεται πως στις συνθήκες που συμμετείχε η J – επικράτεια (PFE0055c), η προσθήκη της γινόταν μετά από 10 min, καθώς η πρόσδεσή της στην PfHsp70-x, αλλάζει τη στερεοδιάταξη της και υπήρχε το ενδεχόμενο της μη πρόσδεσης του προσδέτη με την NBD (nucleotide binding domain) του ενζύμου. Επομένως, δόθηκε ένας χρόνος προ-επώασης, ώστε ο προσδέτης να συνδεθεί με την NBD.
Τέλος στην ενζυμική δοκιμασία κατασκευάστηκαν και μάρτυρες (τυφλά) για το ένζυμο και για το υπόστρωμα αντίστοιχα, όμοια με αυτά που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της σταθεράς K_M και V_{max}, με τη διαφορά ότι στο τυφλό του ενζυμικού προστέθηκε και DMSO με τελική σύσταση 1% v/v και στο τυφλό του υποστρώματος, η ATP είχε συγκέντρωση 0,2 mM, δηλαδή όση και στην τελική αντίδραση. Στην παρακάτω εικόνα (*Εικόνα 33*), συνοψίζεται η πειραματική πορεία που εφαρμόστηκε.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250



Εικόνα 33: Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής διαδικασία για την κινητική μελέτη της εκτίμησης αναστολής από ορισμένους προσδέτες, (Created with BioRender.com).

Επεξεργασία δεδομένων

Σε αυτή την κινητική μελέτη που το αρχικό ζητούμενο ήταν να διερευνηθεί η πιθανή ανασταλτική ικανότητα 19 διαφορετικών προσδετών, η επεξεργασία των δεδομένων ήταν πιο απλή. Αυτό που υπολογίστηκε τελικά, ήταν η ποσοστιαία αναστολή ως προς την παραγωγή προϊόντος που προκαλούσε ο κάθε αναστολέας στα ένζυμα. Αρχικά έγινε αφαίρεση της συνολικής απορρόφησης των μαρτύρων (τυφλών) από όλες τις συνθήκες και έπειτα έγινε ποσοστιαία σύγκριση της δραστικότητας της PfHsp70-x παρουσία και απουσία προσδέτη.

$$\Delta abs = Abs\ (Συνθήκη\ 1) - Abs\ (Τυφλών)$$

$$\%\ \text{Αναστολή (χωρίς PF0055c)} = \frac{\Delta abs\ (Συνθήκη\ 1) - \Delta abs\ (Συνθήκη\ 3)}{\Delta abs\ (Συνθήκη\ 1)} * 100\%$$

$$\%\ \text{Αναστολή (παρουσία PF0055c)} = \frac{\Delta abs\ (Συνθήκη\ 2) - \Delta abs\ (Συνθήκη\ 4)}{\Delta abs\ (Συνθήκη\ 2)} * 100\%$$

Με αυτόν τον τρόπο, αποκτήθηκε μια πρώτη εκτίμηση για το ποιοι προσδέτες μπορεί να προκαλούν υπολογίσιμη αναστολή ακόμη σε συγκεντρώσεις της τάξεως των μM.

3.2.8.4 Προσδιορισμός IC_{50} αναστολέων

Ο προσδιορισμός της τιμής IC_{50} (inhibitory concentration 50)αναστολέων, είναι μία από τις μελέτες που τεκμηριώνουν και ποσοτικοποιούν την ανασταλτική ικανότητα ενός προσδέτη. Με άλλα λόγια η τιμή IC_{50} αντιπροσωπεύει την τιμή συγκέντρωσης του αναστολέα, στην οποία προκαλεί 50% αναστολή στο ένζυμο. Συνεπώς κατά τη διαδικασία εύρεσης ικανών αναστολέων, το επιθυμητό είναι η τιμή IC_{50} να είναι όσο το δυνατόν χαμηλότερη. Μέσω μιας χαμηλής τιμής IC_{50}, μπορεί δυνητικά μια χημική ουσία να χορηγηθεί στην ελάχιστη συγκέντρωση, πετυχαίνοντας το μέγιστο φαρμακευτικό αποτέλεσμα, χωρίς πρόκληση τοξικότητας στον ασθενή. Για τον

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

προσδιορισμό της τιμής IC_{50}, χρησιμοποιήθηκαν ως βάση τα αποτελέσματα της κινητικής μελέτης εκτίμησης ικανότητας αναστολής για 19 διαφορετικούς προσδέτες. Συγκεκριμένα, αναστολείς που σε συγκέντρωση έως 5 mM στην αντίδραση, προκαλούσαν αναστολή μεγαλύτερη από 90% στο ένζυμο PfHsp70-x, κρίθηκε αναγκαίος ο προσδιορισμός της τιμής IC_{50} τους.

Πειραματική πορεία

Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε ήταν όμοια με αυτή της εκτίμησης ικανότητας αναστολέων, με τη διαφορά ότι στον προσδιορισμό της IC_{50}, δε χρησιμοποιήθηκαν συνθήκες που να συμπεριλαμβάνουν τη συμμετοχή της επικράτειας J (PFE0055c) στην αντίδραση. Επίσης σε αυτές τις μελέτες, δημιουργήθηκαν νέα αραιωμένα διαλύματα για τον κάθε αναστολέα σε DMSO, ώστε να μελετηθεί η ικανότητα αναστολής τους σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Για έναν ολοκληρωμένο και χωρίς σημαντικά σφάλματα προσδιορισμό τιμής IC_{50}, χρειάζονται τουλάχιστον 4-5 διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέα, ώστε να καλύπτεται το φάσμα της επί τοις εκατό αναστολής του ενζύμου.

Επεξεργασία δεδομένων

Η επί τοις εκατό αναστολή που προκαλούσε ο κάθε αναστολέας σε μία δεδομένη συγκέντρωση, υπολογίστηκε με τον ίδιο τρόπο που αναλύθηκε προηγουμένως (§3.2.8.3):

$$\Delta abs = Abs\ (Δείγματος) - Abs\ (Τυφλών)$$

$$\%\ \text{Αναστολή} = \frac{\Delta abs\ (PfHsp70x) - \Delta abs\ (PfHsp70x + αναστολέας)}{\Delta abs\ (PfHsp70x)} * 100\%$$

$$\%\ \text{Δραστικότητα} = 100\% - \%\ \text{Αναστολή}$$

Έπειτα, με το πρόγραμμα GraFit έγινε εισαγωγή των τιμών συγκέντρωσης σε αύξουσα σειρά μαζί με την επί τοις εκατό Δραστικότητα (%Activity) που προκαλούσαν στο ένζυμο και προέκυψε μία σιγμοειδής καμπύλη επί τοις εκατό Activity = $f([αναστολέα])$. Τέλος, σύμφωνα με την εξίσωση, $y = \frac{100\%}{1+(\frac{x}{IC50})^S}$, όπου S: η κλίση του διαγράμματος, υπολογίστηκε η τιμή IC_{50} του κάθε αναστολέα.

Σημειώνεται τέλος, πως σε όλες τις κινητικές μελέτες, επιτυχημένα και ασφαλή αποτελέσματα εξασφαλίζονται από τιμές τυπικού σφάλματος (St. Error), χαμηλότερες του 10% της τιμής του αποτελέσματος.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

3.2.9 Κρυσταλλογραφικές μελέτες

3.2.9.1 Κρυστάλλωση της επικράτειας πρόσδεσης νουκλεοτιδίων (nucleotide binding domain – NBD) της PfHsp70-x

Η κρυστάλλωση για ένα βιολογικό μόριο είναι μια διαδικασία ο ιδιαίτερα περίπλοκη και σύνθετη που εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Κάθε πρωτεΐνη οδηγείται σε σχηματισμό κρυστάλλων υπό διαφορετικές συνθήκες, η οποίες γίνονται γνωστές έπειτα από πολλές δοκιμές συνδυασμών συνθηκών. Οι συνθήκες που επηρεάζουν την εμφάνιση κρυστάλλων, είναι η συγκέντρωση της πρωτεΐνης, η θερμοκρασία, το pH, η ιοντική ισχύς και η παρουσία παραγόντων κατακρήμνισης (πχ πολυμερή ευθείας αλυσίδας).
Κρύσταλλοι της PfHsp70-x NBD επικράτειας που είναι εύκολα αναπαραγώγιμοι έχουν αναπτυχθεί στο Εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας (ΕΔΛΒ) με περίθλαση σε υψηλή ευκρίνεια (1,8-2,5 Å).

Πειραματική πορεία

Για την κρυστάλλωση της επικράτειας NBD του ενζύμου PfHsp70-x χρησιμοποιήθηκαν οι εξής συνθήκες κρυστάλλωσης: 24% v/v PEG 1500 και 20% v/v γλυκερόλη).
Το πρωτεϊνικό μείγμα, που χρησιμοποιήθηκε για κρυστάλλωση είχε τελική συγκέντρωση 10 mg/mL και περιείχε το μη-υδρολυόμενο ανάλογο ATP, AMP-PnP σε τελική συγκέντρωση 3,5 mM.
Η διαδικασία της κρυστάλλωσης, δηλαδή της ανάμειξης του πρωτεϊνικού μείγματος με το διάλυμα κρυστάλλωσης έγινε σε αναλογία 2:1 (πρωτεΐνη: διάλυμα κρυστάλλωσης) πραγματοποιήθηκε σε ρομποτικό σύστημα OryxNano (Douglas instruments). Το πιάτο 96 θέσεων κρυσταλλώσεων σφραγίστηκε με ειδική ταινία και διατηρήθηκε στους 16 ^{o}C για 48 h που εμφανίστηκαν οι κρύσταλλοι. Οι κρύσταλλοι συνέχισαν να αναπτύσσονται για περίοδο μιας εβδομάδας.

3.2.9.2 Συν–κρυστάλλωση (co-crystallisation) της επικράτειας NBD της PfHsp70-x με αναστολείς

Μία από τις μεθόδους που μπορεί να εφαρμοστεί ώστε να γίνει δομική μελέτη μιας πρωτεΐνης μαζί με κάποιο μόριο που συνδέεται στην πρωτεΐνη είναι η τεχνική της συν-κρυστάλλωσης (co-crystallisation). Με άλλα λόγια, ακολουθήθηκε η ίδια λογική

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

και οι ίδιες συνθήκες σε ότι αφορά το διάλυμα κρυστάλλωσης με την κρυστάλλωση της NBD (§3.2.9.1) με τη διαφορά ότι στο πρωτεϊνικό μείγμα υπήρχε και αναστολέας σε συγκέντρωση 1 mM και 10 mM στη δεύτερη συνθήκη συν-κρυστάλλωσης του ίδιου αναστολέα. Με αυτή τη διαδικασία έγινε δοκιμή συν-κρυστάλλωσης 5 διαφορετικών αναστολέων: (98, 3776, 3924, 3988 και 22658). Οι αναστολείς επωάστηκαν με το διάλυμα της πρωτεΐνης για 30min πριν ξεκινήσει η διαδικασία της κρυστάλλωσης.
Επειδή οι αναστολείς βρίσκονταν διαλυμένοι σε DMSO, θεωρήθηκε απαραίτητο η επί τοις εκατό v/v περιεκτικότητα σε DMSO, να μην ξεπερνάει το 10%, καθώς κάτι τέτοιο θα επηρέαζε το σχηματισμό των κρυστάλλων.
Η διαδικασία της συν-κρυστάλλωσης, δηλαδή της ανάμειξης του πρωτεϊνικού μείγματος - αναστολέα με το διάλυμα κρυστάλλωσης έγινε σε αναλογία 2:1 και πραγματοποιήθηκε σε ρομποτικό σύστημα OryxNano (Douglas instruments). Το πιάτο 96 θέσεων κρυσταλλώσεων σφραγίστηκε με ειδική ταινία και διατηρήθηκε στους 16 ^{o}C. Οι κρύσταλλοι αναπτύχθηκαν μετά από περίπου 48h.

3.2.9.3 Εμβάπτιση (soaking) πρωτεϊνικών κρυστάλλων σε διάλυμα αναστολέα

Μία ακόμη τεχνική που επιτρέπει τη δομική μελέτη μιας πρωτεΐνης με έναν προσδέτη της, είναι η μέθοδος της εμβάπτισης (soaking) προσχηματισμένων πρωτεϊνικών κρυστάλλων σε διαλύματα αναστολέων. Αναλυτικότερα χρησιμοποιούνται κρύσταλλοι μιας πρωτεΐνης, οι οποίοι συλλέγονται με προσοχή με τη χρήση κατάλληλου βρόχου και έπειτα εμβαπτίζονται στο διάλυμα ενός προσδέτη.

Πειραματική πορεία

Για αυτή την τεχνική, χρησιμοποιήθηκαν οι σχηματισμένοι κρύσταλλοι της NBD και κατασκευάστηκαν και κατάλληλα διαλύματα του κάθε αναστολέα. Τα διαλύματα περιείχαν τον καθένα από τους 5 διαφορετικούς αναστολείς (98, 3776, 3924, 3988 και 22658) που χρησιμοποιήθηκαν σε συγκέντρωση 10 mM και 10 %v/v περιεκτικότητα σε DMSO. Για να επιτευχθεί αυτό, η αραίωση των πυκνών διαλυμάτων των αναστολέων έγινε με διάλυμα κρυστάλλωσης (24% v/v PEG 1500 και 20% v/v γλυκερόλη). Μετά την προσθήκη του διαλύματος του κάθε αναστολέα στον σχηματισμένο κρύσταλλο της NBD, το πιάτο 96 θέσεων κρυσταλλώσεων σφραγίστηκε με ειδική ταινία και διατηρήθηκε στους 16 ^{o}C.
Σημειώνεται ότι οι δοκιμές κρυστάλλωσης παρουσία αναστολέων έγινε με δύο διαφορετικές μεθοδολογίες (συν-κρυστάλλωση και εμβάπτιση κρυστάλλων σε διάλυμα αναστολέα), για να αυξηθούν οι πιθανότητες σχηματισμού επαρκών κρυστάλλων, τόσο σε ποιότητα, όσο και σε ποσότητα.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

3.3.10.4 Συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων

Η συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων, πραγματοποιήθηκε στις εγκαταστάσεις συγχροτρονιακής ακτινοβολίας EMBL-Hamburg στο σταθμό P13. Οι κρύσταλλοι που δημιουργήθηκαν είτε από τη διαδικασία της συν-κρυστάλλωσης, είτε από την εμβάπτιση τους στο διάλυμα αναστολέα. Ως κρυοπροστατευτικό διάλυμα χρησιμοποιήθηκε 20% v/v γλυκερόλη, η οποία βρισκόταν στο διάλυμα κρυστάλλωσης.

3.2.9.5 Επεξεργασία και βελτιστοποίηση του δομικού μοντέλου

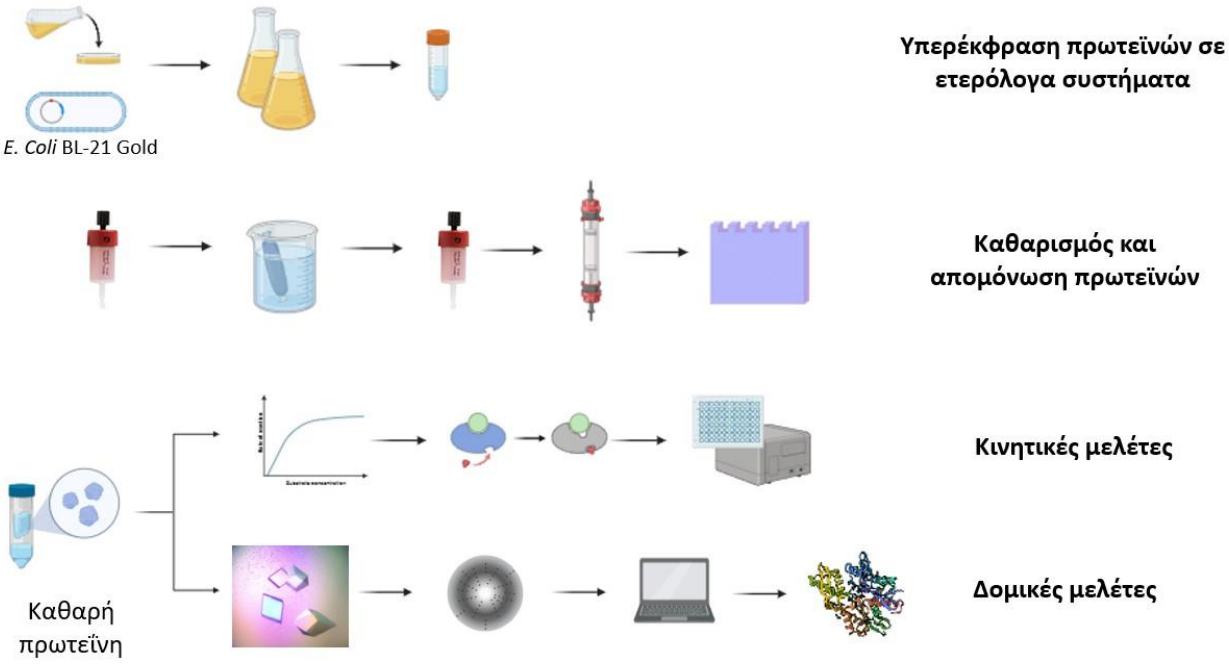
Η επεξεργασία των κρυσταλλογραφικών δεδομένων, έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος XDS, ενώ η συγχώνευση των εντάσεων περίθλασης με το πρόγραμμα Aimless. Η βελτίωση της ευκρίνειας έγινε με μετασχηματισμούς Fourier που χρησιμοποιεί ο αλγόριθμος REFMAC του προγράμματος CCP4i2 (Collaborative Computational Project, 1994). Ο προσδιορισμός των φάσεων των συμπλόκων πρωτεΐνης – προσδέτη έγινε με τη μέθοδο της μοριακής αντικατάστασης (molecular replacement) και η γνωστή δομή που χρησιμοποιήθηκε ήταν αυτή της ελεύθερης NBD (PDB ID: 6RZQ). Στη συνέχεια, μέσω του αλγορίθμου REFMAC, με 10 κύκλους βελτιστοποίησης, ακολούθησε η βελτιστοποίηση των συντεταγμένων των ατόμων του μορίου στο χώρο (xyz) αλλά και των τελεστών θερμικής κίνησης (B-factor). Ακολούθως, έγινε η μελέτη των χαρτών $2F_{obs}$-F_{calc}, με απώτερο στόχο την εύρεση των θετικών ηλεκτρονιακών πυκνοτήτων, οι οποίες υποδηλώνουν τη θέση πρόσδεσης της ένωσης – αναστολέα στην πρωτεΐνη.

Για την κατασκευή της δομής του κάθε αναστολέα χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος AceDRG του CCP4i2 (Collaborative Computational Project, 1994). Μέσω του προγράμματος WinCoot (Emsley & Cowtan, 2004) έγινε η προσθήκη των ενώσεων στους χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας, η γενική αναπροσαρμογή του μοντέλου δηλαδή, η μετακίνηση των πλευρικών αλυσίδων κάποιων καταλοίπων, η προσθήκη εναλλακτικών διαμορφώσεων των πλευρικών αλυσίδων ορισμένων καταλοίπων καθώς και η προσθήκη ή η διαγραφή μορίων ύδατος. Έπειτα, ακολούθησε περαιτέρω βελτιστοποίηση του μοντέλου μέσω του αλγορίθμου REFMAC (restrained refinement) και οι αλλαγές αξιολογήθηκαν από το ταίριασμά τους στους νέους χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας, από τη γεωμετρία και από το διάγραμμα Ramachandran. Η ανάλυση των δεσμών υδρογόνου και των αλληλεπιδράσεων Van der Waals πραγματοποιήθηκε μέσω του αλγορίθμου CONTACT που υπάρχει στο πρόγραμμα CCP4i (Collaborative Computational Project, 1994). Για τους δεσμούς υδρογόνου

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

εφαρμόστηκαν ως μέγιστες αποστάσεις τα 3,35 Å, ενώ για τις αλληλεπιδράσεις Van der Waals τα 4 Å. Η κατασκευή των εικόνων για την αναπαράσταση των τρισδιάστατων δομών έγινε με το πρόγραμμα Pymol (Schrödinger L. & DeLano W., 2020).

Ανακεφαλαιώνοντας, παρατίθεται σχηματικά όλη η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία (*Εικόνα 34*):



Εικόνα 34: Διαγραμματική απεικόνιση της πειραματικής πορείας που εφαρμόστηκε.

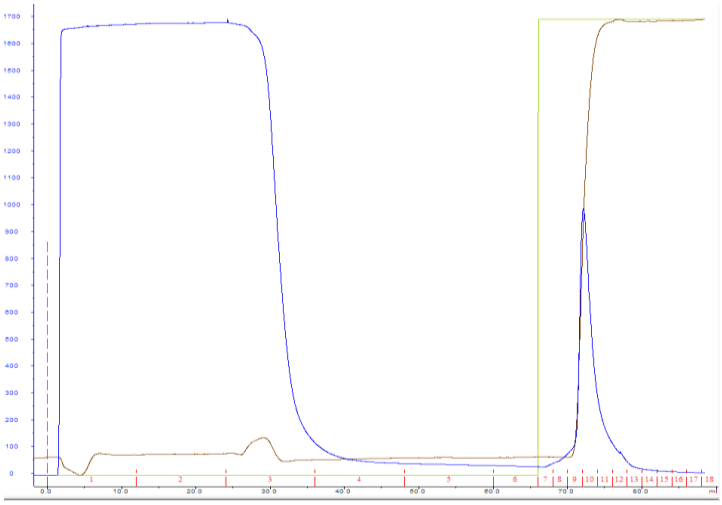
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

Κεφάλαιο 4ο: Αποτελέσματα

4.1 Καθαρισμός και απομόνωση της PfHsp70-x

Η διαδικασία αναλύεται λεπτομερώς στο εδάφιο 3.2.4. Παρακάτω παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα καθώς και οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες SDS-PAGE, κατά την πορεία του καθαρισμού. Το μοριακό βάρος της PfHsp70-x ανέρχεται στα 72 kDa.

1ο βήμα καθαρισμού: Στήλη χρωματογραφίας συγγένειας (HiTrap TALON crude Co^{2+})



Εικόνα 35: Χρωματογράφημα κατά την χρωματογραφία συγγένειας της PfHsp70-x.

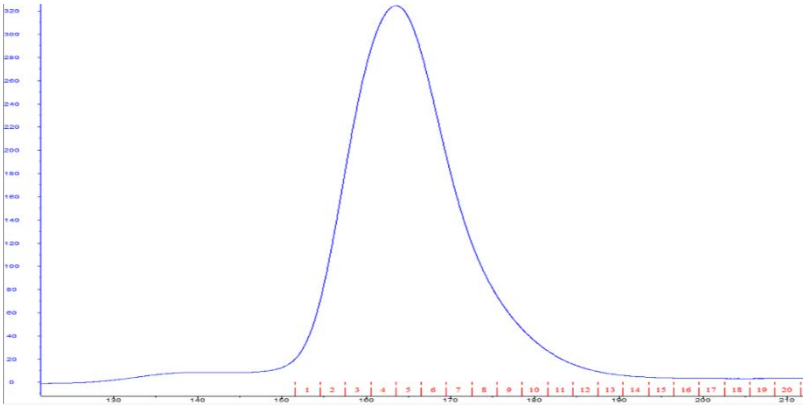
Η μπλε καμπύλη του διαγράμματος αντιπροσωπεύει την απορρόφηση (OD) στα 280 nm, ενώ με κίτρινο υποδηλώνεται η προσθήκη του διαλύματος Β με τον παράγοντα έκλουσης (ιμιδαζόλιο). Με καφέ χρώμα, φαίνεται η αγωγιμότητα του ρυθμιστικού διαλύματος.
Τα κλάσματα της έκλουσης που περιείχαν την PfHsp70-x συλλέχθηκαν και υποβλήθηκαν για εκτεταμένη διαπίδυση έναντι διαλύματος 20 mM Na_2HPO_4, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, pH: 7,4.

2ο βήμα καθαρισμού: Αφαιρετική στήλη συγγένειας για την απομάκρυνση του 6xHis-tag και της πρωτεάσης 3C.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

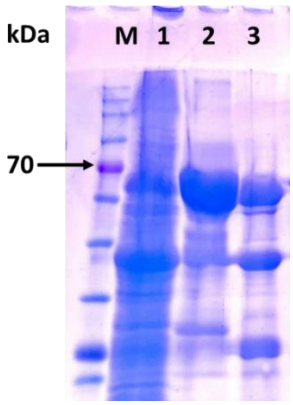
Στη συνέχεια ακολούθησε η αφαιρετική στήλη συγγένειας με στόχο να απομακρυνθεί η ετικέτα 6xHis-tag, καθώς και η πρωτεάση 3C. Η πρωτεΐνη δε συγκρατήθηκε στη στήλη, όπως αναμενόταν, και συλλέχθηκε στο κλάσμα flow through, το οποίο συμπυκνώθηκε με φίλτρο συμπύκνωσης 10 kDa cut off.

3ο βήμα καθαρισμού: Στήλη χρωματογραφίας μοριακής διήθησης (Superdex 200)



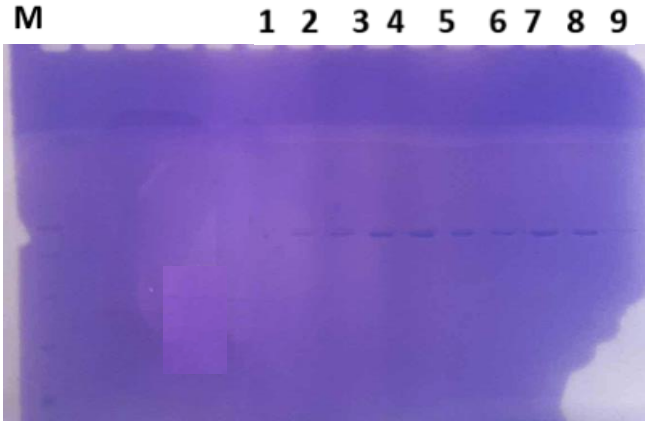
Εικόνα 36: Χρωματογράφημα κατά την χρωματογραφία μοριακής διήθησης (SEC) της PfHsp70-x.

Στο παραπάνω χρωματογράφημα φαίνεται η αύξηση της οπτικής απορρόφησης στα 280 nm, περίπου στα 150 mL. Συνεπώς τα κλάσματα από εκείνο το σημείο μέχρι και την ελάττωση της μπλε καμπύλης, περιείχαν την πρωτεΐνη.
Παρακάτω απεικονίζονται οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου 10% υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS PAGE) (*Εικόνες 37 και 38*), όπου ηλεκτροφορήθηκαν δείγματα από τα στάδια του καθαρισμού της πρωτεΐνης PfHsp70-x:



Εικόνα 37: Πρώτο και δεύτερο στάδιο καθαρισμού της PfHsp70-x. Στα αριστερά εντοπίζεται ο μάρτυρας (M) γνωστών μοριακών βαρών. Στην πρώτη διαδρομή φαίνεται η συνολική ποσότητα πρωτεΐνης μετά τη λύση των κυττάρων (total protein). Στη συνέχεια ακολουθεί το κλάσμα της έκλουσης (κλάσματα 7-18 του χρωματογραφήματος - Elution). Στην Τρίτη διαδρομή φαίνεται το αποτέλεσμα μετά την πέψη της πρωτεάσης 3C (reverse talon).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250



Εικόνα 38: Τρίτο στάδιο καθαρισμού της PfHsp70-x. 10% SDS-PAGE μετά από τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης με τη στήλη Superdex 200. Στις διαδρομές 1-9, έχει πραγματοποιηθεί ηλεκτροφόρηση των κλασμάτων 1-9 του χρωματογραφήματος.

Τα κλάσματα που περιείχαν την PfHsp70-x, συμπυκνώθηκαν με κατάλληλο φίλτρο συμπύκνωσης με κατώφλι 10 kDa, σε τελικό όγκο 1,5 mL με συγκέντρωση 9 mg/mL. Η ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης έγινε σε φασματοφωτόμετρο Nanodrop σε μήκος κύματος 280 nm. Συνεπώς από τα αρχικά 4 L της υγρής καλλιέργειας, καταλήξαμε σε 1,5 mL πρωτεΐνης PfHsp70-x 9 mg/ mL καθαρότητας >95%. Η απόδοση της έκφρασης ήταν 3,4 mg πρωτεΐνης/ L βακτηριακής καλλιέργειας.

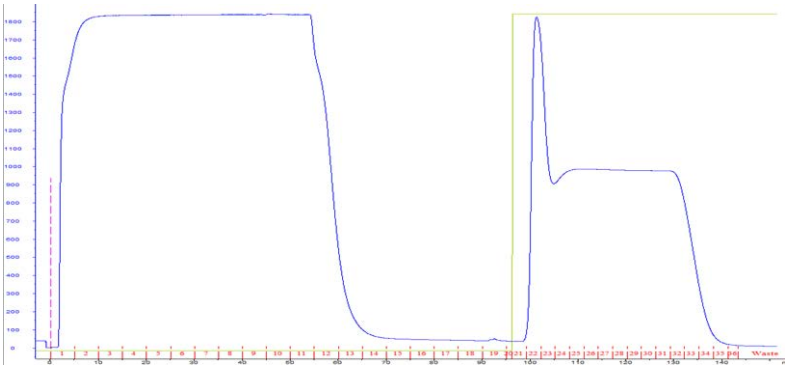
4.2 Καθαρισμός και απομόνωση της NBD (Nucleotide Binding Domain)

Η διαδικασία αναλύεται λεπτομερώς στο εδάφιο 3.2.5. Παρακάτω παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα καθώς και οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες SDS-PAGE, κατά την πορεία του καθαρισμού. Το μοριακό βάρος της NBD, ανέρχεται σε 42 kDa.

1ο βήμα καθαρισμού: Στήλη χρωματογραφίας συγγένειας (HiTrap TALON crude Co^{2+})

Όπως και στην απομόνωση της PfHsp70-x, έτσι και στο 1ο βήμα καθαρισμού της NBD, μετά την εισαγωγή του δείγματος ακολουθεί η συλλογή του flow through, όπου συνοδεύεται με αύξηση της απορρόφησης UV. Ακολουθεί η πλύση για τη συλλογή του κλάσματος wash, ενώ με την εισαγωγή του διαλύματος Β, συλλέχθηκε το κλάσμα elution, στο οποίο βρισκόταν και η πρωτεΐνη NBD (*Εικόνα 39*).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

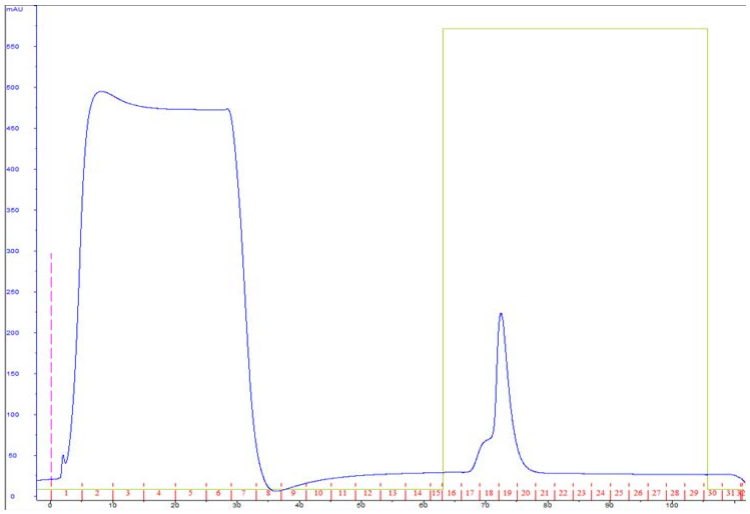


Εικόνα 39: Χρωματογράφημα κατά την χρωματογραφία συγγένειας της επικράτειας NBD της PfHsp70-x.

Ακολούθησε και πάλι το ενδιάμεσο στάδιο της διαπίδυσης και πέψης της πρωτεΐνης με την πρωτεάση 3C, έναντι διαλύματος 20 mM Na_2HPO_4, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, pH: 7,4.

2ο βήμα καθαρισμού: Αφαιρετική στήλη συγγένειας για την απομάκρυνση του 6xHis-tag και της πρωτεάσης 3C.

Στη συνέχεια ακολούθησε η αφαιρετική στήλη συγγένειας με στόχο να απομακρυνθεί η ετικέτα 6xHis-tag, καθώς και η πρωτεάση 3C. Η πρωτεΐνη NBD, δε συγκρατήθηκε στη στήλη, όπως αναμενόταν, και συλλέχθηκε στο κλάσμα flow through (υπερδιήθημα), όπως φαίνεται και στο παρακάτω χρωματογράφημα (*Εικόνα 40*).

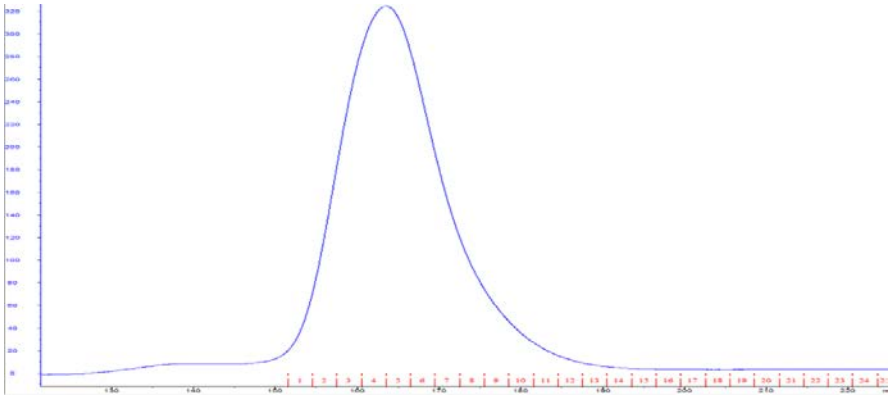


Εικόνα 40: Χρωματογράφημα που προέκυψε από το 2ο στάδιο καθαρισμού της NBD επικράτειας. Η αύξηση στο UV από την αρχή, υποδηλώνει πως πράγματι η πρωτεΐνη εξέρχεται στο υπερδιήθημα (flowthrough), καθώς λόγω της απουσίας του επιτόπου ιστιδινών, δεν συγκρατείται από τη στήλη.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

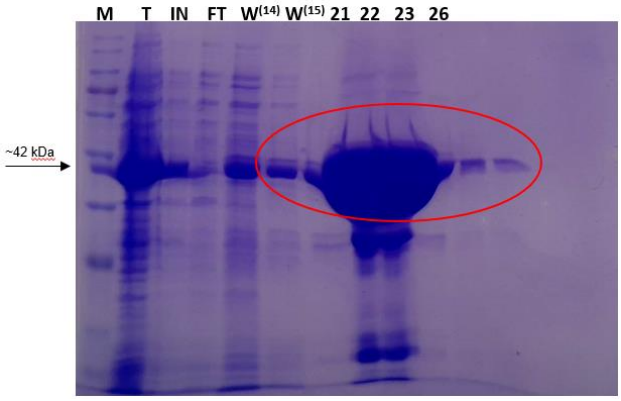
Έπειτα, το δείγμα του υπερδιηθήματος, συμπυκνώθηκε με φίλτρο συμπύκνωσης 10 kDa cut off και ακολούθησε το επόμενο στάδιο καθαρισμού.

3ο βήμα καθαρισμού: Στήλη χρωματογραφίας μοριακής διήθησης (Superdex 200).



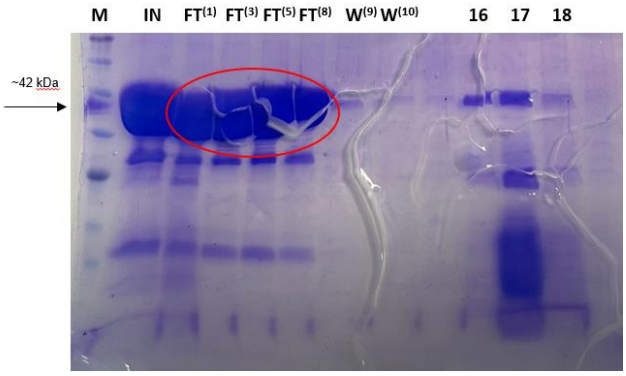
Εικόνα 41: Χρωματογράφημα κατά την χρωματογραφία μοριακής διήθησης (SEC) της επικράτειας NBD της PfHsp70-x.

Στο παραπάνω χρωματογράφημα φαίνεται η αύξηση της οπτικής απορρόφησης στα 280 nm, περίπου στα 150 mL. Συνεπώς τα κλάσματα από εκείνο το σημείο μέχρι και την ελάττωση της μπλε καμπύλης, περιείχαν την πρωτεΐνη.
Παρακάτω απεικονίζονται οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου 10% υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS PAGE), όπου ηλεκτροφορήθηκαν δείγματα από τα στάδια του καθαρισμού της πρωτεΐνης NBD, στις *Εικόνες 42,43* και *44*:

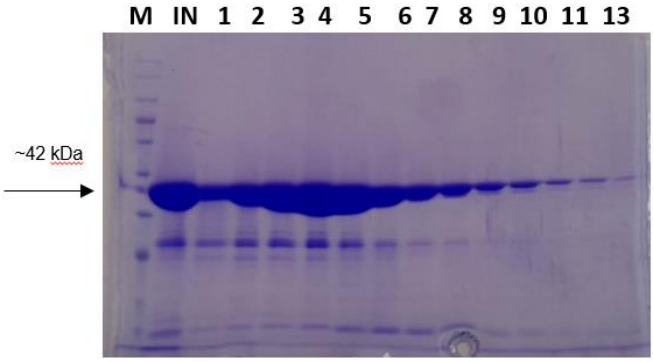


Εικόνα 42: Πρώτο βήμα καθαρισμού του pfHsp70-x - NBD. Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου (10%) υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Ως M συμβολίζεται ο μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους. Στην πρώτη διαδρομή (T) είναι δείγμα από το σύνολο των πρωτεϊνών μετά τη λύση των βακτηριακών κυττάρων. Στη δεύτερη διαδρομή (IN) δείγμα από το σύνολο των πρωτεϊνών μετά από φυγοκέντρηση σε υψηλές στροφές (lysate). Στην τρίτη διαδρομή δείγμα από την ενοποίηση των κλασμάτων 1 έως 12 (FT). Στη τέταρτη και πέμπτη διαδρομή δείγμα από τα κλάσματα 14-15 (W). Στις υπόλοιπες διαδρομές εμφανίζεται δείγματα από τα κλάσματα 21, 22, 23 και 26, τα οποία αφορούσαν το στάδιο της έκλουσης.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250



Εικόνα 43**:** Δεύτερο βήμα καθαρισμού του PfHsp70-x - NBD. Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου (10%) υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Στην πρώτη διαδρομή εμφανίζεται ο μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους. Στη δεύτερη διαδρομή (IN) είναι το δείγμα που φορτώθηκε στη στήλη. Στη τρίτη έως έκτη διαδρομή εμφανίζεται το flowthrough (FT), όπου υπάρχει PfHsp70-x - NBD, κλάσματα 1-8 του χρωματογραφήματος. Στην έκτη και έβδομη διαδρομή εμφανίζεται η έκπλυση (W) της στήλης (κλάσμα 8 και 10 του χρωματογραφήματος). Στις διαδρομές 9, 10, και 11 παρουσιάζεται η έκλουση του άτμητου του PfHsp70-x - NBD (κλάσματα 16-18 του χρωματογραφήματος).



Εικόνα 44: Τρίτο βήμα καθαρισμού του PfHsp70-x - NBD. Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου (12 %) υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Ως Μ συμβολίζεται ο μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους. Στη δεύτερη διαδρομή (IN) είναι το δείγμα που φορτώθηκε στη στήλη. Οι διαδρομές 5-19 αντιστοιχούν στα αντίστοιχα κλάσματα του παρακάτω χρωματογραφήματος.

Τα κλάσματα 1-13 της στήλης χρωματογραφίας μοριακής διήθησης συμπυκνώθηκαν με κατάλληλο φίλτρο συμπύκνωσης με κατώφλι 10 kDa , σε τελικό όγκο 800 μL με συγκέντρωση 22 mg/mL. Η ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης έγινε σε φασματοφωτόμετρο Nanodrop σε μήκος κύματος 280 nm. Συνεπώς από τα αρχικά 4 L της υγρής καλλιέργειας, καταλήξαμε σε 800 μL πρωτεΐνης NBD 22 mg/mL καθαρότητας >95%, ιδανικό για να χρησιμοποιηθεί σε κρυσταλλογραφικές μελέτες. Η απόδοση της έκφρασης ήταν 4,4 mg πρωτεΐνης/L βακτηριακής καλλιέργειας.

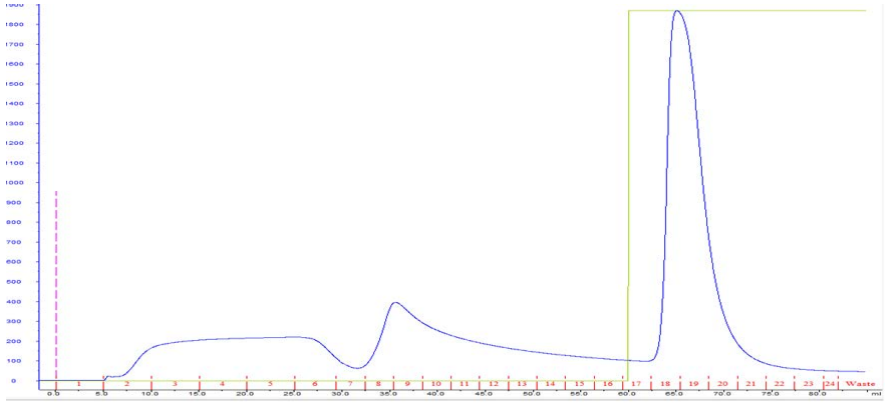
4.3 Καθαρισμός και απομόνωση της επικράτειας J (PFE0055c)

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

Η διαδικασία του καθαρισμού της επικράτειας J της PFE0055c είναι η ίδια που ακολουθήθηκε για να απομονωθούν και οι πρωτεΐνες PfHsp70-x και NBD. Το μοριακό της βάρος, ανέρχεται σε 8,2 kDa.

1ο βήμα καθαρισμού: Στήλη χρωματογραφίας συγγένειας (HiTrap TALON crude Co^{2+})

Σε αυτή την περίπτωση παρατηρείται μικρότερη αύξηση του UV κατά τη συλλογή των κλασμάτων flow through. Στη συνέχεια και για τα κλάσματα 7-16, έγινε η πλύση της στήλης (wash), ενώ τέλος για στα κλάσματα 17-23 συλλέχθηκε η συνδεδεμένη στη στήλη πρωτεΐνη μέσω της έκλουσής της με τον παράγοντα έκλουσης (ιμιδαζόλιο) κάτι που αποτυπώνεται πράγματι στην παρακάτω εικόνα (*Εικόνα 45*):



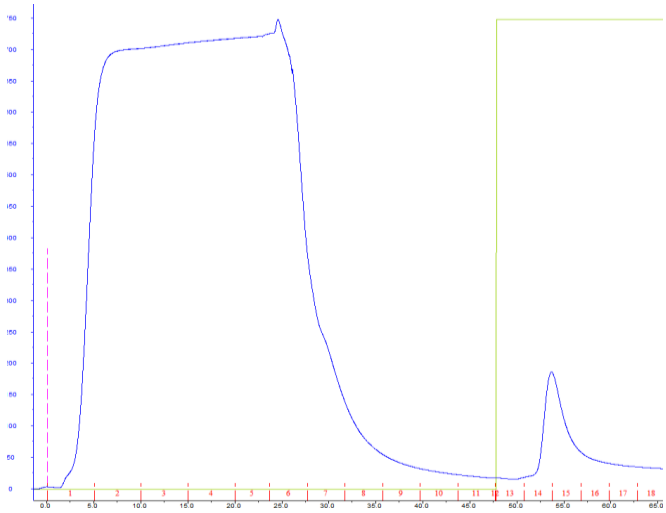
Εικόνα 45: Χρωματογράφημα κατά την χρωματογραφία συγγένειας της PFE0055c επικράτειας J.

Ακολούθησε και εδώ το ενδιάμεσο στάδιο της διαπίδυσης και πέψης της πρωτεΐνης με την πρωτεάση 3C, έναντι διαλύματος 20 mM Na_2HPO_4, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, pH: 7,4.

2ο βήμα καθαρισμού: Αφαιρετική στήλη συγγένειας για την απομάκρυνση του 6xHis-tag και της πρωτεάσης 3C.

Στη συνέχεια ακολούθησε η αφαιρετική στήλη συγγένειας με στόχο να απομακρυνθεί η ετικέτα 6xHis-tag, καθώς και η πρωτεάση 3C. Η επικράτεια J (PFE0055c), δε συγκρατήθηκε στη στήλη, όπως αναμενόταν, και συλλέχθηκε στο κλάσμα flow through (*Εικόνα 46*):

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

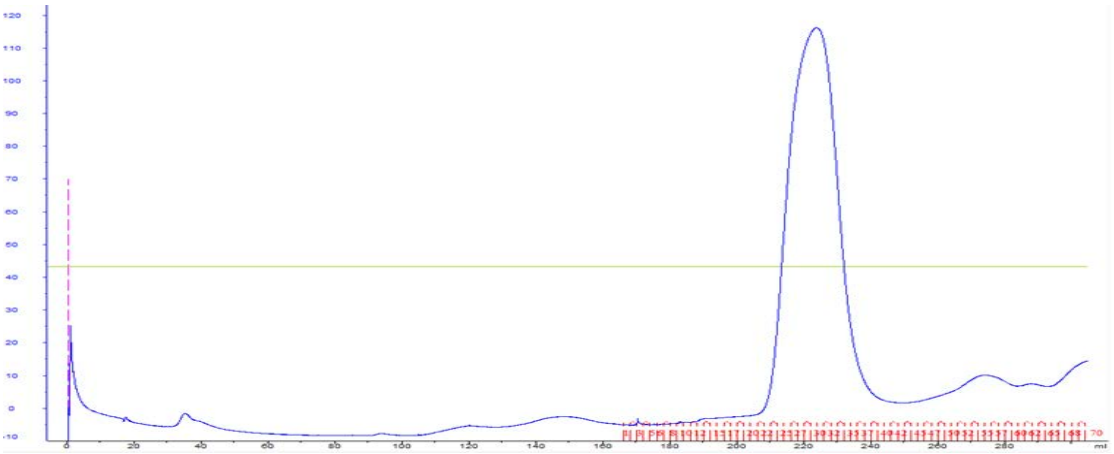


Εικόνα 46: Χρωματογράφημα που προέκυψε από το 2ο στάδιο καθαρισμού της PFE0055c. Η αύξηση στο UV από την αρχή, υποδηλώνει πως πράγματι η πρωτεΐνη εξέρχεται στο υπερδιήθημα (flowthrough), καθώς λόγω της απουσίας του επιτόπου ιστιδινών, δεν συγκρατείται από τη στήλη.

Το κλάσμα του υπερδιηθήματος (flowthrough), συμπυκνώθηκε τέλος, με φίλτρο συμπύκνωσης 10kDa cut off.

3ο βήμα καθαρισμού: Στήλη χρωματογραφίας μοριακής διήθησης (Superdex 75).

Μετά το ενδιάμεσο στάδιο της διαπίδυσης, της αφαιρετικής στήλης αγχιστείας και της συμπύκνωσης του δείγματος, ακολούθησε χρωματογραφία μοριακής διήθησης στη στήλη Superdex 75 και το σχετικό χρωματογράφημα παρατίθεται παρακάτω (*Εικόνα 47*):

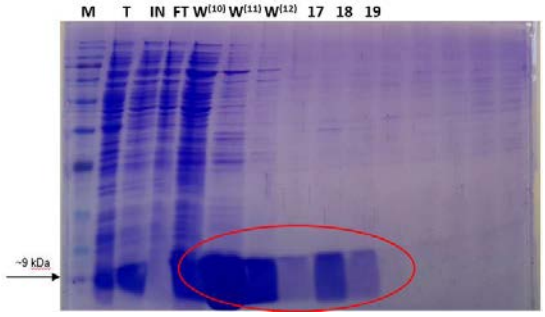


Εικόνα 47: Χρωματογράφημα κατά την χρωματογραφία μοριακής διήθησης (SEC) της επικράτειας J (PFE0055c).

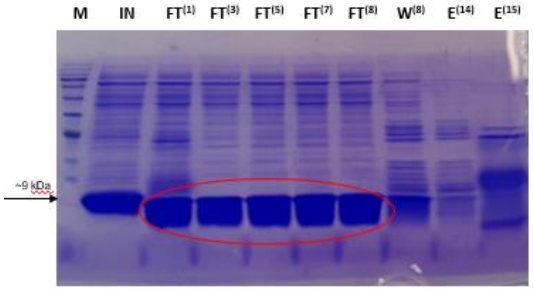
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

Στο παραπάνω χρωματογράφημα φαίνεται η αύξηση της οπτικής απορρόφησης σε μήκος κύματος 280 nm, περίπου σε 200 mL. Συνεπώς τα κλάσματα από εκείνο το σημείο μέχρι και την ελάττωση της μπλε καμπύλης, περιείχαν την πρωτεΐνη.

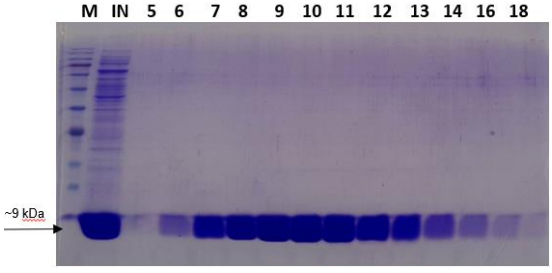
Παρακάτω απεικονίζονται οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου 15% υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS PAGE), όπου ηλεκτροφορήθηκαν δείγματα από τα στάδια του καθαρισμού της πρωτεΐνης PFE0055c στις *Εικόνες 48,49 και 50*:



Εικόνα 48: Πρώτο βήμα καθαρισμού του PFE0055c. Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου (15%) υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Ως Μ συμβολίζεται ο μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους. Στην πρώτη διαδρομή (Τ) είναι δείγμα από το σύνολο των πρωτεϊνών μετά τη λύση των βακτηριακών κυττάρων. Στη δεύτερη διαδρομή (IN) δείγμα από το σύνολο των πρωτεϊνών μετά από φυγοκέντρηση σε υψηλές στροφές (lysate). Στην τρίτη διαδρομή δείγμα από την ενοποίηση των κλασμάτων 1 έως 6 (FT). Στη τέταρτη, πέμπτη και έκτη διαδρομή δείγμα από τα κλάσματα 10-11-12 (W). Στις υπόλοιπες διαδρομές εμφανίζεται δείγματα από τα κλάσματα 17, 18 και 19.



Εικόνα 49: Δεύτερο βήμα καθαρισμού του PFE0055c. Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου (15%) υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Στην πρώτη διαδρομή εμφανίζεται ο μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους. Στη δεύτερη διαδρομή (IN) είναι το δείγμα πριν την πέψη με την πρωτεάση 3c. Στη τρίτη έως έβδομη διαδρομή εμφανίζεται το flowthrough (FT), όπου υπάρχει PFE0055c, κλάσματα 1-8 του χρωματογραφήματος. Στην όγδοη διαδρομή εμφανίζεται η έκπλυση (W) της στήλης (κλάσμα 8). Στις διαδρομές 8 και 9 παρουσιάζεται η έκλουση της 3c πρωτεάσης (κλάσματα 14-15 του χρωματογραφήματος).



Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

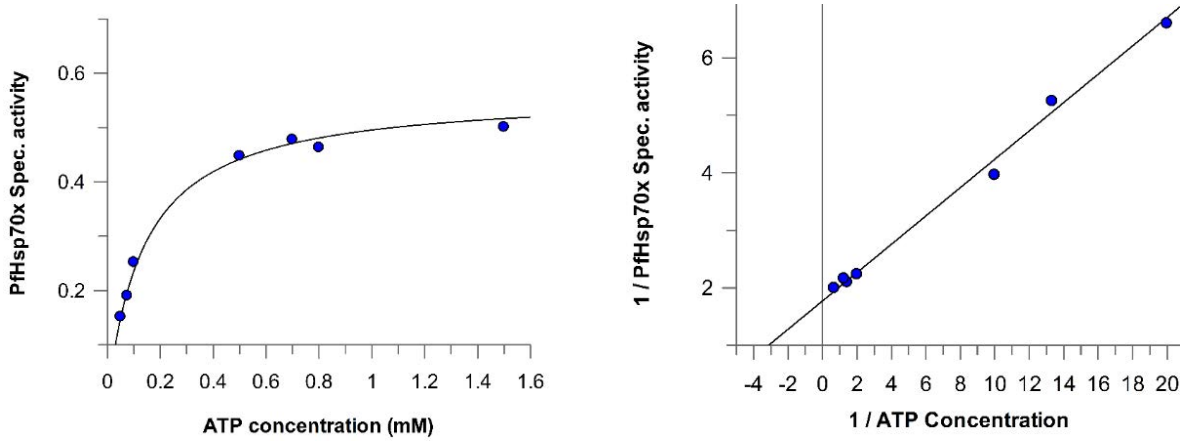
Εικόνα 50: Τρίτο βήμα καθαρισμού του PFE0055c.. Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου (15 %) υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Ως Μ συμβολίζεται ο μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους. Στη δεύτερη διαδρομή (IN) είναι το δείγμα που φορτώθηκε στη στήλη. Οι διαδρομές 5-19 αντιστοιχούν στα αντίστοιχα κλάσματα του παρακάτω χρωματογραφήματος.

Τα κλάσματα 17-42 της στήλης χρωματογραφίας μοριακής διήθησης συμπυκνώθηκαν με κατάλληλο φίλτρο συμπύκνωσης με κατώφλι 10 kDa, σε τελικό όγκο 1 mL με συγκέντρωση 5,3 mg/mL. Η ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης έγινε σε φασματοφωτόμετρο Nanodrop σε μήκος κύματος 280 nm. Συνεπώς από τα αρχικά 4 L της υγρής καλλιέργειας, καταλήξαμε σε 1 mL πρωτεΐνης NBD 6,3 mg/ mL καθαρότητας >95%. Η απόδοση της έκφρασης ήταν 3 mg πρωτεΐνης/L βακτηριακής καλλιέργειας. Η ποσότητα αυτή αξιοποιήθηκε σε κινητικές μελέτες για τον προσδιορισμό της ικανότητας αναστολής ορισμένων προσδετών.
Σημειώνεται ότι όλη η ποσότητα των πρωτεϊνών που απομονώθηκε, χωρίστηκε σε ισόποσα σε κλάσματα των 40 μL και αποθηκεύτηκαν στους -80^{o}C.

4.4 Αποτελέσματα κινητικών μελετών

4.4.1 Προσδιορισμός της σταθεράς K_M και V_{max} του ενζύμου PfHsp70-x

Ο προσδιορισμός των κινητικών παραμέτρων (K_M και V_{max}) πραγματοποιήθηκε με τη μεθοδολογία που περιεγράφηκε στο εδάφιο 3.2.8.2. Η επεξεργασία των δεδομένων έγινε με το πρόγραμμα GraFit (Erithacus software). Οι κινητικές παράμετροι της PfHsp70-x υπολογίστηκαν σε **K_M= 0,14 ± 0,01 mM** και **V_{max}= 0,56 ± 0,02 mmol/min/mg.** Στην παρακάτω εικόνα (*Εικόνα 51*), παρατίθενται τα διαγράμματα Michaelis – Menten και Lineweaver – Burk αντιστοίχως:



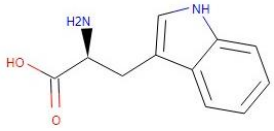
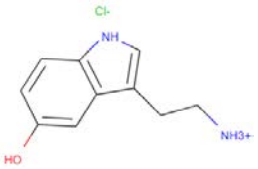
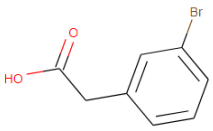
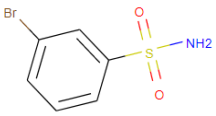
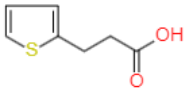
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

Εικόνα 51: Διαγράμματα Michaelis – Menten και Lineweaver – Burk για τον προσδιορισμό των κινητικών παραμέτρων

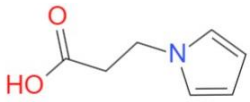
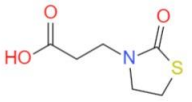
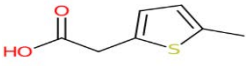
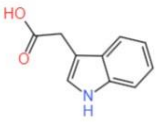
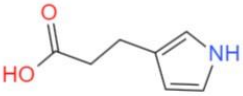
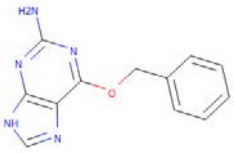
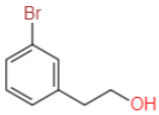
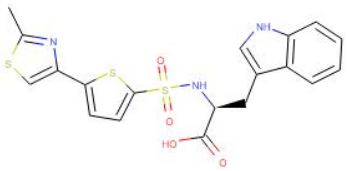
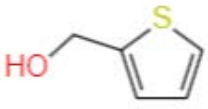
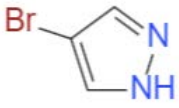
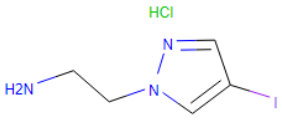
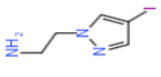
4.4.2 Υπολογισμός της ικανότητας αναστολής προσδετών έναντι της PfHsp70-x

Σύμφωνα με την ανάλυση της μεθοδολογίας που περιεγράφηκε παραπάνω (§3.2.8.3), υπολογίστηκε η %αναστολή (%inhibition) που προκαλούσε ο κάθε ένας από τους 19 προσδέτες έναντι του ενζύμου PfHsp70-x. Επιπλέον η ίδια μελέτη εφαρμόστηκε και παρουσία της επικράτειας J (PFE0055c) της πρωτεΐνης συν – συνοδού ώστε να προσδιοριστεί η ενεργότητα της PfHsp70-x μετά από την ενεργοποίηση από την συν-συνοδή πρωτεΐνη PFE0055c. Αυτή η μελέτη αποτέλεσε μια πρώτη ένδειξη της δραστικότητας των προσδετών ως προς την ικανότητα να αναστείλουν το ένζυμο. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης, συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα, (*Πίνακας 9*):

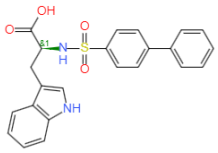
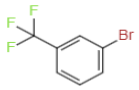
Πίνακας 9: Σε αυτόν τον πίνακα, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της %αναστολής που προκάλεσαν οι 19 διαφορετικοί προσδέτες που μελετήθηκαν στην PfHsp70-x και στο σύμπλοκο PfHsp70-x – PFE0055c. Στη δεύτερη στήλη σημειώνεται η τελική συγκέντρωση του καθενός στην αντίδραση, Στην τρίτη στήλη παρατίθεται ο χημικός συντακτικός τύπος της κάθε ένωσης, ενώ τέλος φαίνονται τα ποσοστά της αναστολής που προκάλεσε ο κάθε ένας από αυτούς.

Προσδέτης	Τελική συγκέντρωση (mM)	Χημικός συντακτικός τύπος	% Αναστολή έναντι PfHsp70-x	% Αναστολή έναντι PfHsp70-x + PF0055c
98	**1**		**100**	**100**
680	2		6,12	29,54
1007	5		0	0
1095	2		2,45	0
1359	5		11,83	1,38

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

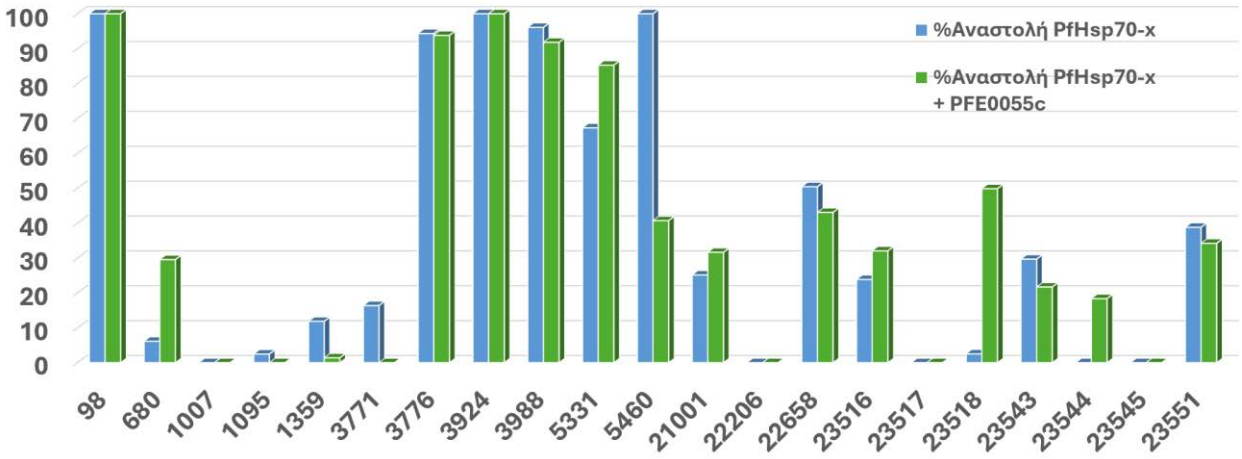
3771	5		16,36	0
3776	**5**		**94,34**	**93,79**
3924	**2**		**100**	**100**
3988	**5**		**96,08**	**91,81**
5331	5		67,3	85,26
5460	2		100	40,7
21001	2		25,11	31,61
22206	2		0	0
22658	2		50,42	43,06
23516	2		23,83	32,04
23517	2		0	0
23543	2		29,66	21,68

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

23545	2		0	0
23551	5		38,79	34,21

Από αυτές τις μελέτες, εξάγονται κάποια συμπεράσματα σχετικά με τη δυναμική των προσδετών που ήταν διαθέσιμοι. Αρχικά όπως έχει περιγραφεί στο εδάφιο 1.3.2, η επικράτεια J (PFE0055c) ενισχύει τη δραστικότητα της PfHsp70-x, καθώς η υδρόλυση της ATP γίνεται 5 με 10 φορές ταχύτερα (Patury et al., 2009). Με εξαίρεση τους προσδέτες, 1007, 22206, 23517 και 23545, οι οποίοι δεν προκάλεσαν καμία αναστολή στην πρωτεΐνη-στόχο, PfHsp70-x, οι υπόλοιποι εμφάνισαν διαφορετικά ποσοστά αναστολής, όπως φαίνεται και στον *Πίνακα 9*. Η πλειοψηφία των ενώσεων που χρησιμοποιήθηκαν σε συγκεντρώσεις από 2-5 mM, δεν έδειξαν υψηλή βιοδραστικότητα καθώς η %αναστολή του ενζύμου ήταν χαμηλή (<70%). Ωστόσο, οι προσδέτες που επιλέχθηκαν να αξιολογηθούν περαιτέρω είναι οι 98, 3776, 3924 και 3988, καθώς προκάλεσαν 100% αναστολή της δράσης του ενζύμου PfHsp70-x και του συμπλόκου με την πρωτεΐνη J PFE0055c σε συγκεντρώσεις 1-5 mM.

Ακολούθως, απεικονίζονται και υπό μορφή γραφήματος τα αποτελέσματα του *Πίνακα 9*:



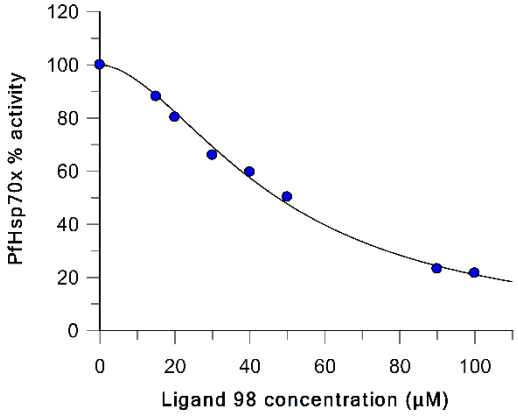
Εικόνα 52: Διάγραμμα για την επί τοις εκατό αναστολή που προκάλεσε ο κάθε ένας εκ των 19 προσδετών που δοκιμάστηκε, έναντι του ενζύμου PfHsp70-x (γαλάζιο χρώμα) και του συμπλόκου PfHsp70-x – PFE0055c (πράσινο χρώμα).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

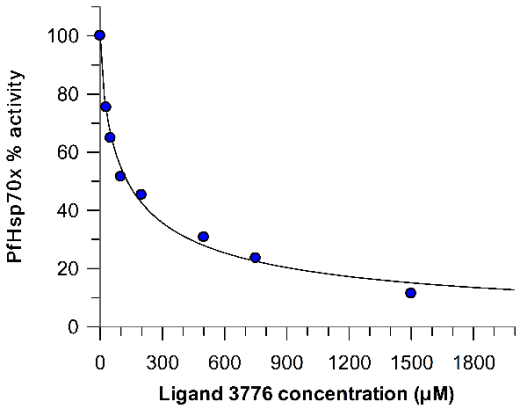
4.4.3 Προσδιορισμός τιμών IC_{50} αναστολέων έναντι της PfHsp70-x

Αξιοποιώντας τα αποτελέσματα των παραπάνω μελετών, θεωρήθηκε αναγκαίος ο προσδιορισμός της τιμής IC_{50} των προσδετών που προκάλεσαν 100% αναστολή στο ένζυμο PfHsp70-x σε τιμές συγκέντρωσης από 1-5 mM. Η τιμή IC_{50}, όπως αναλύθηκε στο εδάφιο 3.2.8.4, αντιπροσωπεύει την τιμή συγκέντρωσης ενός αναστολέα, που προκαλεί 50% αναστολή στο ένζυμο που συνδέεται. Προσδιορίστηκαν συνεπώς οι τιμές IC_{50} για τους αναστολείς 98, 3776, 3924, 3988, των οποίων τα αποτελέσματα και τα διαγράμματα παρατίθενται παρακάτω (*Εικόνα 53*):

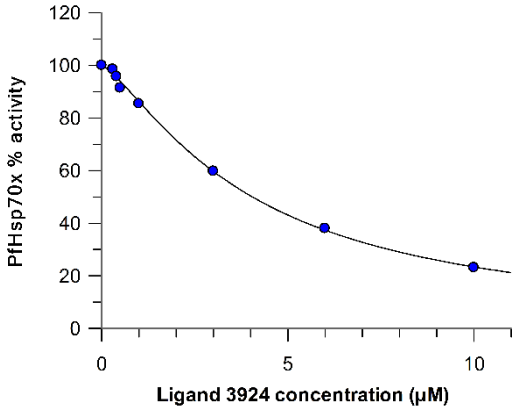
1) 98: IC_{50} = 47,41 μM ± 1,14 μM



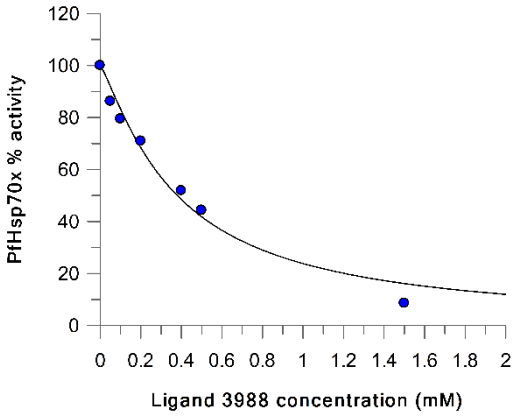
2) 3776: IC_{50} = 130,91 μM ± 8,94 μM



3) 3924: IC_{50} = 4,04 μM ± 0,07 μM



4) 3988: IC_{50} = 379,72 μM ± 31,92 μM



Εικόνα 53: Διαγράμματα προσδιορισμού τιμής IC_{50} για τους αναστολείς 1) 98, 2)3776, 3) 3924 και 4) 3988.

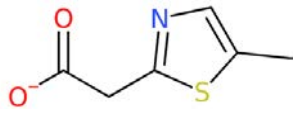
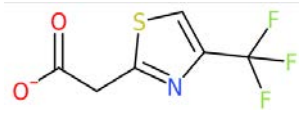
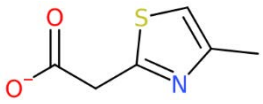
Στον κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό φαρμάκων, υπάρχει μια συνεχής προσπάθεια βελτιστοποίησης μικρών μορίων, με στόχο την αύξηση της ικανότητας της αναστολής που μπορεί να προκαλέσουν σε ένα βιολογικό στόχο.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

Συγκεκριμένα, διαπιστώνεται πως ο αναστολέας 3924 με τιμή IC_{50} = 4,04 μM ± 0,07 μM, εμφάνισε ισχυρή ανασταλτική δραστικότητα, τουλάχιστον ως προς τις κινητικές μελέτες που συμμετείχε. Σε συνεργασία με την ομάδα του καθηγητή Rainer Riedl (Institute of Organic and Medicinal Chemistry, ZHAW Zurich University of Applied Sciences, Switzerland) προχωρήσαμε σε μελέτες νέων εν δυνάμει αναστολέων οι οποίοι έφεραν ως ικρίωμα παραπλήσια χημική δομή με τον ισχυρότερο αναστολέα που δοκιμάστηκε, (3924), και είχαν αλλαγές στους υποκαταστάτες με στόχο να αυξηθούν οι αλληλεπιδράσεις με το κέντρο σύνδεσης και να αυξηθεί η αγχιστεία πρόσδεσης.

Οι τρεις νέοι προσδέτες ήταν οι 3926, 3927 και 3931, των οποίων οι χημικοί συντακτικοί τύποι και τα μοριακά βάρη (MW) συμπεριλαμβάνονται στον παρακάτω πίνακα (*Πίνακας 10*). Οι συγκεκριμένοι προσδέτες παραλήφθηκαν υπό μορφή σκόνης και παρασκευάστηκαν διαλύματα αρχικής συγκέντρωσης 100 mM σε DMSO.

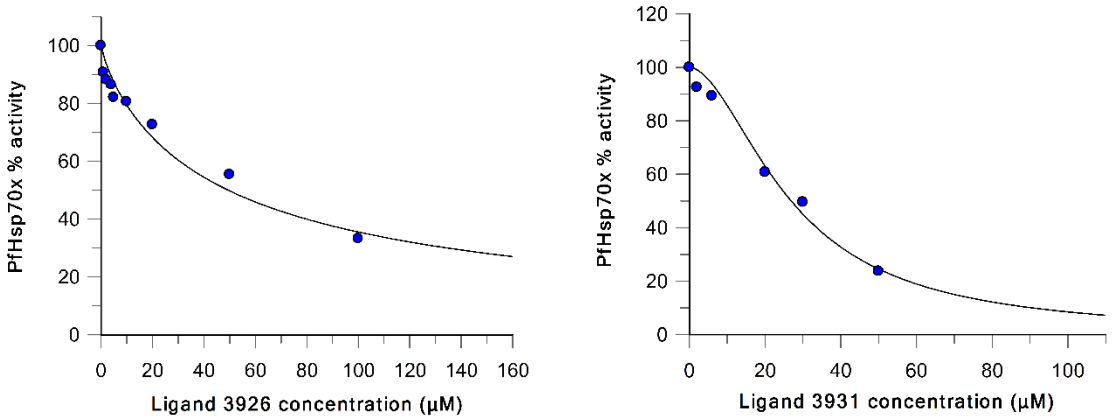
Πίνακας 10: Νέοι προσδέτες με παρόμοια χημική δομή με τον αναστολέα 3924, όπου παρατίθενται τα μοριακά τους βάρη και ο χημικός συντακτικός τους τύπος.

Προσδέτης	Μοριακό βάρος	Χημικός συντακτικός τύπος
3926	179,17	
3927	233.14	
3931	179,17	

Υποβλήθηκαν αρχικά σε κινητικές μελέτες προσδιορισμού τιμής IC_{50}, εφαρμόζοντας τη σχετική μεθοδολογία για κάθε έναν από τους νέους προσδέτες. Παρακάτω, συνοψίζονται τα αποτελέσματα των τιμών IC_{50} των νέων προσδετών, καθώς και τα σχετικά διαγράμματα (*Εικόνα 54*):

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

1) 3926: IC_{50} = 49,43 μM ± 4,37 μM **2) 3931: IC_{50} = 26,88 μM ± 1,41 μM**

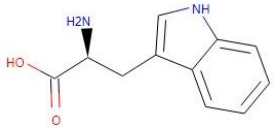
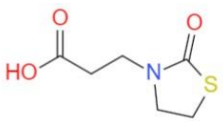
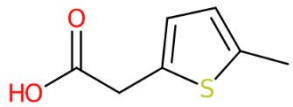
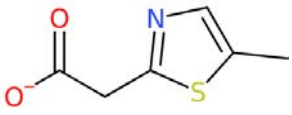


Εικόνα 54: Διαγράμματα προσδιορισμού τιμής IC_{50} για τους αναστολείς 1) 3926 και 2) 3931.

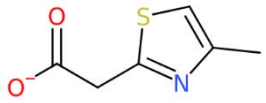
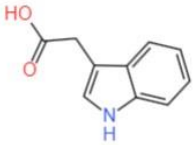
Σχετικά με τον προσδέτη 3927, το συμπέρασμα που προέκυψε από τις κινητικές μελέτες είναι πως εμφανίζει πολύ χαμηλή συγγένεια πρόσδεσης για το ένζυμο και έτσι να μην προκαλεί αναστολή παρά την παραπλήσια δομή του. Αυτή η υπόθεση μένει να επιβεβαιωθεί και κρυσταλλογραφικά ή ακόμη και με χρήση βιοφυσικής μεθόδου, όπως με θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης (ITC).

Τα τελικά κινητικά αποτελέσματα ανακεφαλαιώνονται στον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας 11: Τελικά αποτελέσματα τιμών IC_{50} των αναστολέων με έντονη ικανότητα αναστολής. Στην Τρίτη και τέταρτη στήλη του πίνακα, αναγράφεται το μοριακό βάρος της κάθε ένωσης και ο χημικός συντακτικός τύπος αντίστοιχα.

Αναστολέας	IC_{50}	Μοριακό βάρος	Χημικός συντακτικός τύπος
98	47,41 μM	204,23	
3776	130,91 μM	175,21	
3924	4,04 μM	156,2	
3926	49,43 μM	179,17	

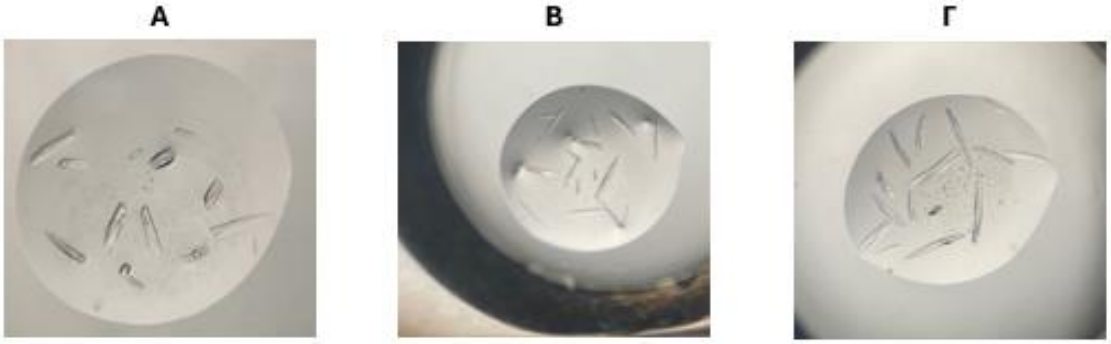
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

3931	26,88 μM	179,17	
3988	379,72 μM	175,18	

4.5 Αποτελέσματα δομικών μελετών

4.5.1 Ανάπτυξη κρυστάλλων της επικράτειας NBD της πρωτεΐνης PfHsp70-x

Όπως αναφέρθηκε και στο εδάφιο 3.2.9.1, οι κρύσταλλοι της PfHsp70-x NBD επικράτειας, είναι αναπαραγώγιμοι και έχουν αναπτυχθεί στο Εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας (ΕΔΛΒ) με περίθλαση σε υψηλή ευκρίνεια (1,8-2,5 Å).
Για την κρυστάλλωση της επικράτειας NBD του ενζύμου PfHsp70-x, χρησιμοποιήθηκαν οι εξής συνθήκες κρυστάλλωσης: 24% PEG 1500 και 20% v/v γλυκερόλη).
Το πρωτεϊνικό μείγμα, που χρησιμοποιήθηκε για κρυστάλλωση είχε τελική συγκέντρωση 10 mg/mL και περιείχε το μη-υδρολυόμενο ανάλογο ATP, AMP-PnP σε τελική συγκέντρωση 3,5 mM.
Μετά από περίπου 48-72h, και σε θερμοκρασία 16 ^{o}C, παρατηρήθηκε ανάπτυξη κρυστάλλων της επικράτειας NBD, (*Εικόνα 55*):



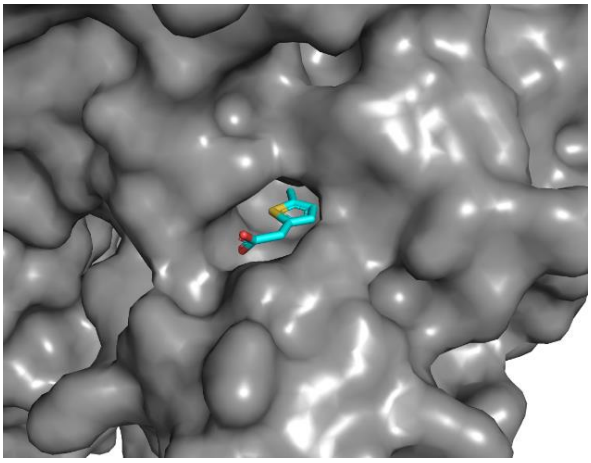
Εικόνα 55: Α) Πρωτεϊνικοί κρύσταλλοι της επικράτειας NBD της πρωτεΐνης PfHsp70-x. Β) Κρύσταλλοι της NBD που προέκυψαν από συν-κρυστάλλωση μαζί με τον αναστολέα 3924 (10mM 3924και 10% DMSO) και Γ) Κρύσταλλοι της NBD, ύστερα από εμβάπτιση σχηματισμένων κρυστάλλων σε διάλυμα του αναστολέα 98 (10mM και 10% DMSO).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

4.5.2 Συλλογή και ανάλυση κρυσταλλογραφικών δεδομένων

Οι κρυσταλλογραφικές μελέτες πραγματοποιήθηκαν μέσω διάχυσης του διαλύματος του αναστολέα σε προσχηματισμένους κρυστάλλους της NBD επικράτειας της PfHsp70-x. Ο εμποτισμός των κρυστάλλων έγινε με 10mM διαλύματος του αναστολέα 3924 (24% v/v PEG 1500 και 20% v/v γλυκερόλη, 10% v/v DMSO) για 48h πριν την συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων. Η συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 100K στις εγκαταστάσεις συγχροτρονικής ακτινοβολίας EMBL-Hamburg, Γερμανίας, στο σταθμό P13 με ανιχνευτή EIGER 16M.

Οι χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας έδειξαν την πρόσδεση του αναστολέα στο υποκέντρο πρόσδεσης εντός της καταλυτικής επικράτειας NBD (Περιοχή 1, υποπεριοχή A). Στην *Εικόνα 56,* παρουσιάζεται η πρόσδεση του αναστολέα 3924 στην μοριακή επιφάνεια της NBD επικράτειας στο υποκέντρο σύνδεσης κοντά στο κέντρο πρόσδεσης της ATP. Όπως φαίνεται στην *Εικόνα 56*, το κέντρο πρόσδεσης σχηματίζει μια βαθιά κοιλότητα και η χημική ένωση μετά την πρόσδεσή της καταλαμβάνει την μεγαλύτερη επιφάνεια της κοιλότητας.



Εικόνα 56: Η μοριακή επιφάνεια της NBD επικράτειας όπου παρουσιάζεται η σύνδεση του μορίου 3924 στο υποκέντρο πρόσδεσης.

Ανάλυση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης 3924 με τα αμινοξικά κατάλοιπα του κέντρου πρόσδεσης έδειξε τον τρόπο πρόσδεσης του αναστολέα, καθώς και το δίκτυο των αλληλεπιδράσεων που σταθεροποιούν την πρόσδεση του. Όπως φαίνεται και στην *Εικόνα 57* και στους *Πίνακες 12* και *13*, ο αναστολέας 3924 μετά την πρόσδεση του σχηματίζει 3 δεσμούς υδρογόνου με τα κατάλοιπα του κέντρου πρόσδεσης και 35 αλληλεπιδράσεις Van der Waals. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι περισσότερες αλληλεπιδράσεις οι οποίες σταθεροποιούν την πρόσδεση του αναστολέα είναι με κατάλοιπα τα οποία είναι συντηρημένα μεταξύ της PfHsp70-x και της ανθρώπινης

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

ορθόλογης hsHsp70 ωστόσο οι δομικές μελέτες έδειξαν ότι συμμετέχει σε αλληλεπιδράσεις Van der Waals με το κατάλοιπο Thr111 (κίτρινες διακεκομμένες γραμμές), η οποία όπως έχει αναφερθεί, δεν είναι συντηρημένη στην ανθρώπινη ορθόλογη και στην οποία αντικαθίσταται με Val. Αρκετές μελέτες υποστηρίζουν πως ακόμα και μικρές διαφοροποιήσεις στην αλληλουχία των μοριακών συνοδών Hsp του παρασίτου μπορούν να παρέχουν επαρκείς δομικές διαφορές ώστε να επιτευχθεί η επιλεκτική αναστολή τους με ελάχιστες επιπτώσεις στις αντίστοιχες ανθρώπινες Hsp (Cockburn et al., 2014), (Ahmad et al., 2024). Αν και ο αριθμός των δεσμών υδρογόνου δεν είναι μεγάλος, ωστόσο όπως φαίνεται από τις δομικές μελέτες οι αλληλεπιδράσεις Van der Waals είναι αυτές που συνεισφέρουν στην σταθεροποίηση της σύνδεσης στο κέντρο πρόσδεσης. Η ενέργεια που σχετίζεται με την αλληλεπίδραση Van der Waals είναι πολύ μικρή. Οι συνήθεις αλληλεπιδράσεις συνεισφέρουν 0,5-1 kcal/ mol ανά ζεύγος ατόμων. Ωστόσο, όταν οι επιφάνειες δύο μορίων πλησιάζουν, τότε ένας μεγάλος αριθμός ατόμων είναι σε επαφή Van der Waals μεταξύ τους, οπότε η ενέργεια που προκύπτει, αθροιζόμενη για πολλά ζεύγη ατόμων, μπορεί να είναι σημαντική. Οι αλληλεπιδράσεις Van der Waals μεταξύ των ατόμων των καταλοίπων του κέντρου πρόσδεσης με τα άτομα της 3924 οδηγούν σε σημαντική αύξηση της ολικής ενέργειας, με αποτέλεσμα να σταθεροποιείται ακόμη περισσότερο η πρόσδεση του αναστολέα στο κέντρο πρόσδεσης και η τιμή της IC_{50} να μειώνεται αισθητά. Οι δομικές μελέτες των υπόλοιπων αναστολέων που είναι σε εξέλιξη, θα αναδείξουν τις διαφορές στον τρόπο πρόσδεσης των αναστολέων και το δίκτυο των αλληλεπιδράσεων και θα δώσουν μια δομική εξήγηση της ανασταλτικής τους ισχύς, ενώ θα εξηγήσουν και την διαφοροποίηση στην βιοδραστικότητά τους σε σύγκριση με τον αναστολέα 3924.

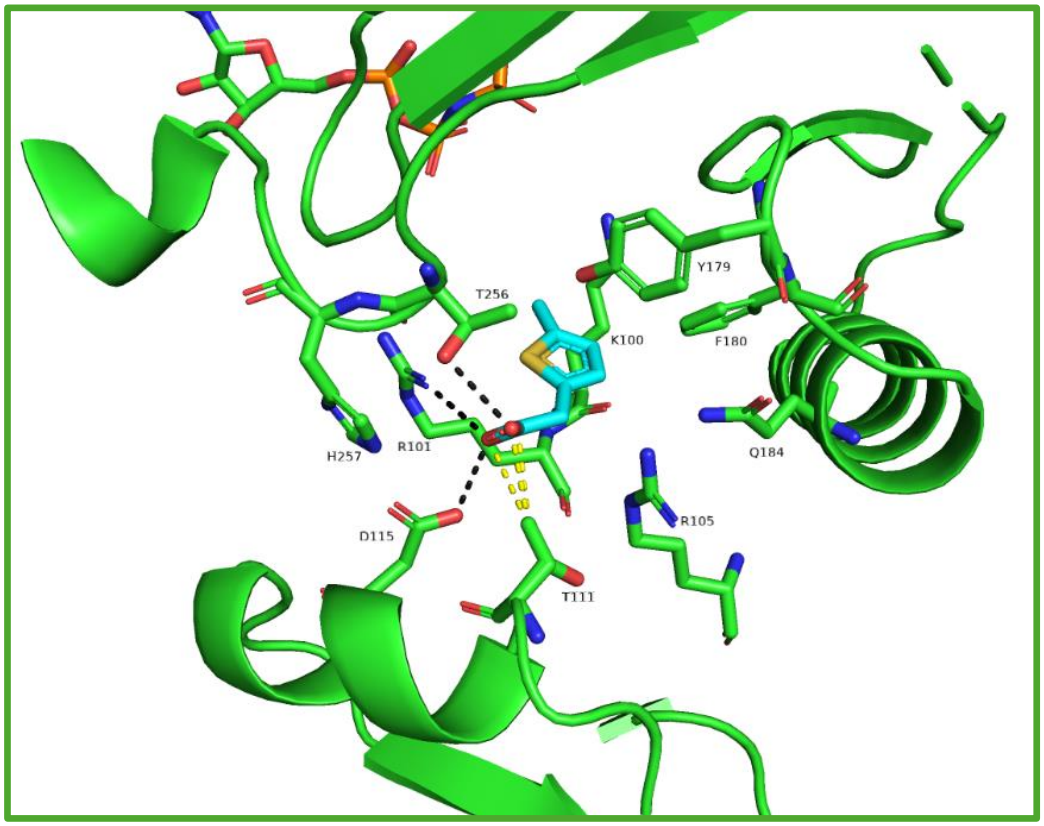
Πίνακας 12: Δεσμοί Υδρογόνου μεταξύ της ένωσης 3924 και καταλοίπων του κέντρου σύνδεσης.

Άτομο αναστολέα	**Άτομο πρωτεΐνης**	**Απόσταση (Å)**
O08	Thr256 OG1 (O)	3.16
O09	Asp115 OD2 (O)	3.14
O09	Arg101 NH1 (N)	3.30

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

Πίνακας 13: Αλληλεπιδράσεις Van der Waals μεταξύ της ένωσης 3924 και αμινοξέων του κέντρου πρόσδεσης της NBD επικράτειας

Άτομο αναστολέα	Άτομο πρωτεΐνης	Αριθμός αλληλεπιδράσεων
C01	Tyr179 OH, Thr42 OG1, Lys100 CG, Lys100 CD	4
C02	Tyr179 OH	1
C03	Tyr179 CE1, Tyr179 OH, Phe180 CE1, Phe180 CZ, Lys100 O	5
C04	Arg105 NH2, Tyr179 CE1, Tyr179 OH, Phe180 CE1, Gln184 NE2	6
C05	Arg105 NH2, Tyr179 OH,	2
C06	Arg105 CZ, Arg105 NH2, Thr111 CG2, Arg105 NE	4
C07	Thr256 OG1, Thr111 CG2, Thr256 CB	3
O08	Thr256 CG2, Thr111 CG2, Thr256 CB	3
O09	Thr111 CG2, Asp115 CG, Asp115 OD1, His257 NE2	4
S10	Tyr179 OH, Arg101 CG, Arg101 NH1	3



Εικόνα 57: Σύνδεση του αναστολέα 3924 και δίκτυο αλληλεπιδράσεων με τα κατάλοιπα του κέντρου πρόσδεσης (με μαύρες διακεκομμένες γραμμές παρουσιάζονται οι δεσμοί υδρογόνου ενώ με κίτρινες διακεκομμένες οι αλληλεπιδράσεις Van der Waals με το κατάλοιπο Thr 111).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

Κεφάλαιο 5ο: Συζήτηση

5.1 Συμπεράσματα

Το πρωτόζωο *Plasmodium falciparum* αποτελεί ένα από τα πιο επικίνδυνα μολυσματικά παράσιτα για τη δημόσια υγεία τις τελευταίες δεκαετίες, καθώς είναι υπεύθυνο για την πιο σοβαρή και θανατηφόρα μορφή ελονοσίας στον άνθρωπο. Παρά τις πολύχρονες προσπάθειες για την καταπολέμηση της νόσου μέσω της εφαρμογής διαφόρων μέτρων προστασίας και ελέγχου και παρά την μείωση των κρουσμάτων και θανάτων παγκοσμίως, υπάρχει επιτακτική ανάγκη για την ανακάλυψη νέων θεραπευτικών παραγόντων και μοριακών στόχων για την επίτευξη μιας αποτελεσματικής θεραπείας, καθώς το παράσιτο έχει πλέον αναπτύξει ανθεκτικότητα στα υπάρχοντα φάρμακα.

Η παρούσα διπλωματική εργασία αποτελεί μέρος της έρευνας που διεξάγεται στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας για τον ορθολογικό σχεδιασμό φαρμάκων κατά της ελονοσίας που στοχεύει στο σύστημα των μοριακών συνοδών του παρασίτου *P. falciparum.* Πολλές μελέτες έχουν επιβεβαιώσει το σημαντικό ρόλο της πρωτεΐνης Hsp70-x και των συν-συνοδών Hsp40s στην επιβίωση και την μολυσματικότητα του πλασμωδίου και έχουν αναδείξει το σύστημα αυτό ως ένα επικυρωμένο στόχο για την ανάπτυξη μιας βιώσιμης θεραπείας για την ελονοσία.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, αρχικά υπολογίστηκαν οι κινητικές παράμετροι K_M και V_{max} για την πρωτεΐνη PfHsp70-x, στο πλαίσιο του ενζυμικού χαρακτηρισμού της. Έπειτα πραγματοποιήθηκαν κινητικές μελέτες με 19 διαφορετικούς προσδέτες, οι οποίοι προέκυψαν από *in silico* σάρωση βιβλιοθήκης θραυσμάτων σε συνεργασία με την ομάδα του καθηγητή Rainer Riedl (Institute of Chemistry and Biotechnology, Zhaw Zurich University of Applied Sciences). Αρχικά υπολογίστηκε η επί τοις εκατό αναστολή που προκαλούσαν στο ένζυμο και στο ενζυμικό σύμπλοκο PfHsp70-x – PFE0055c και μέσω αυτής της κινητικής μελέτης, προέκυψαν 6 προσδέτες (98, 3776, 3924, 3988, 3931, 3926) που προκαλούσαν 100% αναστολή στην πρωτεΐνη-στόχο σε τελικές συγκεντρώσεις από 1-5 mM. Έπειτα, οι συγκεκριμένοι αναστολείς υποβλήθηκαν σε περαιτέρω κινητικές μελέτες, ώστε να προσδιοριστεί η τιμή IC_{50} του καθενός από αυτούς. Στη συνέχεια προχωρήσαμε σε κρυσταλλογραφικές μελέτες με τον προσδέτη που εμφάνισε την υψηλότερη ανασταλτική βιοδραστικότητα, τον 3924 (IC_{50} = 4,04 μM ± 0,07 μM), ώστε να δοθεί μια δομική εξήγηση της αναστολής που προκαλεί. Τα αποτελέσματα των κρυσταλλογραφικών μελετών επιβεβαίωσαν το κέντρο πρόσδεσης του αναστολέα και ανέδειξαν το δίκτυο το αλληλεπιδράσεων με τα κατάλοιπα του κέντρου σύνδεσης που σταθεροποιούν την πρόσδεσή του.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποκάλυψαν 6 ενώσεις –οδηγούς με ισχυρή ανασταλτική ισχύ της τάξης των μM, ενώ

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

οι δομικές μελέτες που ακολούθησαν με τον ισχυρότερο αναστολέα προσέφεραν πληροφορίες για το κέντρο πρόσδεσης και τις αλληλεπιδράσεις που σταθεροποιούν την σύνδεση του αναστολέα. Επιπλέον φανέρωσαν τις αλληλεπιδράσεις με κατάλοιπο το οποίο δεν είναι συντηρημένο στην ανθρώπινη ορθόλογη πρωτεΐνη, γεγονός που καθιστά την πληροφορία αυτή σημαντική για την κατευθυνόμενη από τη δομή βελτιστοποίηση των ενώσεων- οδηγών με σκοπό το σχεδιασμό νέων ενώσεων με υψηλή εκλεκτικότητα για την Hsp70-x του πλασμωδίου. Οι πληροφορίες αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν περαιτέρω για τον κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό αναστολέων και την βελτιστοποίηση της συγγένειας πρόσδεσης με στόχο την ανάπτυξη ενός φαρμάκου για την αντιμετώπιση της ελονοσίας.

5.2 Μελλοντικές μελέτες

Στο πλαίσιο του κατευθυνόμενου από τη δομή σχεδιασμού φαρμάκων, γίνεται διαρκής προσπάθεια για βελτιστοποίηση χημικών ενώσεων με σκοπό τη δημιουργία νέων αναστολέων με βελτιωμένες ιδιότητες. Συνεπώς αναστολείς όπως οι 98, 3924 και 3931, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως ικρίωμα για την περαιτέρω βελτιστοποίηση τους ώστε να προκύψουν νέες ενώσεις που θα εμφανίζουν υψηλότερη βιοδραστικότητα έναντι του βιολογικού στόχου. Η βελτιστοποίηση των ενώσεων-οδηγών θα καθοδηγηθεί από τα αποτελέσματα των δομικών μελετών και των υπόλοιπων αναστολέων που βρίσκονται σε εξέλιξη για την επέκταση και τροποποίηση των υποκαταστατών ώστε να διερευνηθεί ο τρόπος που οι λειτουργικές ομάδες που εισάγονται στις νέες προτεινόμενες ενώσεις ενισχύουν τη συγγένεια πρόσδεσης. Επιπλέον, βρίσκονται σε εξέλιξη μελέτες θερμιδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης (ITC) των αναστολέων 98, 3924, 3926 και 3931 με την για τον χαρακτηρισμό των θερμοδυναμικών παραμέτρων της μοριακής αλληλεπίδρασης PfHsp70-x – αναστολέων. Τελευταία προέκταση αυτής της εργασίας για το κοντινό μέλλον, θα ήταν οι κινητικές και κρυσταλλογραφικές μελέτες των συγκεκριμένων αναστολέων στην ανθρώπινη hsHsp70 έτσι ώστε να διερευνηθεί η εκλεκτικότητα των συγκεκριμένων αναστολέων για την PfHsp70-x του πλασμωδίου.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

Βιβλιογραφία

1. A Phase 3 Trial of RTS,S/AS01 Malaria Vaccine in African Infants. (2012). *New England Journal of Medicine*, *367*(24), 2284–2295. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1208394
2. Aguda, A. H., Lavallee, V., Cheng, P., Bott, T. M., Meimetis, L. G., Law, S., Nguyen, N. T., Williams, D. E., Kaleta, J., Villanueva, I., Davies, J., Andersen, R. J., Brayer, G. D., & Brömme, D. (2016). Affinity Crystallography: A New Approach to Extracting High-Affinity Enzyme Inhibitors from Natural Extracts. *Journal of Natural Products*, *79*(8), 1962–1970. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b00215
3. Ahmad, T., Alhammadi, B. A., Almaazmi, S. Y., Arafa, S., Blatch, G. L., Dutta, T., Gestwicki, J. E., Keyzers, R. A., Shonhai, A., & Singh, H. (2024). Plasmodium falciparum heat shock proteins as antimalarial drug targets: An update. *Cell Stress and Chaperones*, *29*(2), 326–337. https://doi.org/10.1016/j.cstres.2024.03.007
4. Ali, A., Chiang, Y. W., & Santos, R. M. (2022). X-Ray Diffraction Techniques for Mineral Characterization: A Review for Engineers of the Fundamentals, Applications, and Research Directions. *Minerals*, *12*(2). https://doi.org/10.3390/min12020205
5. Assimon, V. A., Gillies, A. T., Rauch, J. N., & Gestwicki, J. E. (n.d.). *Hsp70 Protein Complexes as Drug Targets*.
6. Attaran, A., & Maharaj, R. (n.d.). *Ethical debate Doctoring malaria, badly: the global campaign to ban DDT DDT for malaria control should not be banned*. www.ipen.org/pops_platform.htm
7. Bai, X., McMullan, G., & Scheres, S. H. W. (2015). How cryo-EM is revolutionizing structural biology. *Trends in Biochemical Sciences*, *40*(1), 49–57. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.10.005
8. Bar-Even, A., Noor, E., Savir, Y., Liebermeister, W., Davidi, D., Tawfik, D. S., & Milo, R. (2011). The Moderately Efficient Enzyme: Evolutionary and Physicochemical Trends Shaping Enzyme Parameters. *Biochemistry*, *50*(21), 4402–4410. https://doi.org/10.1021/bi2002289
9. Barral, J. M., Broadley, S. A., Schaffar, G., & Hartl, F. U. (2004). Roles of molecular chaperones in protein misfolding diseases. In *Seminars in Cell and Developmental Biology* (Vol. 15, Issue 1, pp. 17–29). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2003.12.010
10. Benvenuti, M., & Mangani, S. (2007). Crystallization of soluble proteins in vapor diffusion for x-ray crystallography. *Nature Protocols*, *2*(7), 1633–1651. https://doi.org/10.1038/nprot.2007.198
11. Chen, I., & Dubnau, D. (2004). DNA uptake during bacterial transformation. *Nature Reviews Microbiology*, *2*(3), 241–249. https://doi.org/10.1038/nrmicro844
12. Cockburn, I. L., Boshoff, A., Pesce, E.-R., & Blatch, G. L. (2014). Selective modulation of plasmodial Hsp70s by small molecules with antimalarial activity. *Biological Chemistry*, *395*(11), 1353–1362. https://doi.org/10.1515/hsz-2014-0138
13. Collaborative Computational Project, N. 4. (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, *50*(5), 760–763. https://doi.org/10.1107/S0907444994003112

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

14. Cornish-Bowden, A. (1996). Fundamentals of enzyme kinetics. *Choice Reviews Online*, *33*(08), 33-4507-33–4507. https://doi.org/10.5860/CHOICE.33-4507
15. Coskun, O. (2016). Separation Tecniques: CHROMATOGRAPHY. *Northern Clinics of Istanbul*. https://doi.org/10.14744/nci.2016.32757
16. Cowman, A. F., Berry, D., & Baum, J. (2012). The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell. *Journal of Cell Biology*, *198*(6), 961–971. https://doi.org/10.1083/jcb.201206112
17. Cox, F. E., Grassi, G. B., Bignami, A., Bastianelli, G., Celli, A., Golgi, C., & Marchiafava, E. (2010). *Ronald Ross in 1897*. http://www.parasitesandvectors.com/content/3/1/5
18. Crompton, P. D., Moebius, J., Portugal, S., Waisberg, M., Hart, G., Garver, L. S., Miller, L. H., Barillas, C., & Pierce, S. K. (2014). Malaria immunity in man and mosquito: Insights into unsolved mysteries of a deadly infectious disease. In *Annual Review of Immunology* (Vol. 32, pp. 157–187). Annual Reviews Inc. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120220
19. Day, J., Passecker, A., Beck, H. P., & Vakonakis, I. (2019). The Plasmodium falciparum Hsp70-x chaperone assists the heat stress response of the malaria parasite. *FASEB Journal*, *33*(12), 14611–14624. https://doi.org/10.1096/fj.201901741R
20. Doak, B. C., Norton, R. S., & Scanlon, M. J. (2016). The ways and means of fragment-based drug design. *Pharmacology and Therapeutics*, *167*, 28–37. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.07.003
21. Duong-Ly, K. C., & Gabelli, S. B. (2014). *Gel Filtration Chromatography (Size Exclusion Chromatography) of Proteins* (pp. 105–114). https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.00009-4
22. Dutta, T., Singh, H., Gestwicki, J. E., & Blatch, G. L. (n.d.). *Exported plasmodial J domain protein, PFE0055c, and PfHsp70-x form a specific co-chaperone-chaperone partnership*. https://doi.org/10.1007/s12192-020-01181-2/Published
23. Efficacy and safety of RTS,S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: Final results of a phase 3, individually randomised, controlled trial. (2015). *The Lancet*, *386*(9988), 31–45. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60721-8
24. Emsley, P., & Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, *60*(12), 2126–2132. https://doi.org/10.1107/S0907444904019158
25. Escalante, A. A., & Pacheco, M. A. (2019). *CURATED COLLECTION Advances in Molecular Epidemiology of Infectious Diseases Malaria Molecular Epidemiology: An Evolutionary Genetics Perspective**. https://doi.org/10.1128/microbiolspec
26. Feagin, J. E. (1992). The 6-kb element of Plasmodium falciparum encodes mitochondrial cytochrome genes. In *Molecular and Biochemical Parasitology* (Vol. 52).
27. Fernández-Fernández, M. R., & Valpuesta, J. M. (2018). Hsp70 chaperone: A master player in protein homeostasis. In *F1000Research* (Vol. 7). F1000 Research Ltd. https://doi.org/10.12688/F1000RESEARCH.15528.1
28. Frydman, J. (2001). Folding of Newly Translated Proteins In Vivo: The Role of Molecular Chaperones. *Annual Review of Biochemistry*, *70*(1), 603–647. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.70.1.603

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

29. Garca-Descalzo, L., Garca-Lpez, E., Alczar, A., Baquero, F., & Ci, C. (2012). Gel Electrophoresis of Proteins. In *Gel Electrophoresis - Principles and Basics*. InTech. https://doi.org/10.5772/37514
30. Garcia, J. E., Puentes, A., & Patarroyo, M. E. (2006). Developmental biology of sporozoite-host interactions in Plasmodium falciparum malaria: Implications for vaccine design. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 19, Issue 4, pp. 686–707). https://doi.org/10.1128/CMR.00063-05
31. Gardner, M. J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R. W., Carlton, J. M., Pain, A., Nelson, K. E., Bowman, S., Paulsen, I. T., James, K., Eisen, J. A., Rutherford, K., Salzberg, S. L., Craig, A., Kyes, S., Chan, M.-S., Nene, V., … Barrell, B. (2002). *Genome sequence of the human malaria parasite Plasmodium falciparum*. www.nature.com/nature
32. Gomes, L., Monteiro, G., & Mergulhão, F. (2020). The impact of IPTG induction on plasmid stability and heterologous protein expression by escherichia coli biofilms. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(2). https://doi.org/10.3390/ijms21020576
33. Guo, Z. (2016). Artemisinin anti-malarial drugs in China. In *Acta Pharmaceutica Sinica B* (Vol. 6, Issue 2, pp. 115–124). Chinese Academy of Medical Sciences. https://doi.org/10.1016/j.apsb.2016.01.008
34. Health Organization. (2016). *Global vector control response*.
35. Health Organization, W. (2023). *World malaria report 2022*. https://www.wipo.int/amc/en/mediation/
36. Hollingsworth, S. A., & Karplus, P. A. (2010). A fresh look at the Ramachandran plot and the occurrence of standard structures in proteins. In *Biomolecular Concepts* (Vol. 1, Issues 3–4, pp. 271–283). De Gruyter Mouton. https://doi.org/10.1515/bmc.2010.022
37. Kityk, R., Kopp, J., Sinning, I., & Mayer, M. P. (2012). Structure and Dynamics of the ATP-Bound Open Conformation of Hsp70 Chaperones. *Molecular Cell*, *48*(6), 863–874. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.09.023
38. Klebe, G. (2000). Recent developments in structure-based drug design. *Journal of Molecular Medicine*, *78*(5), 269–281. https://doi.org/10.1007/s001090000084
39. Krauss, I. R., Merlino, A., Vergara, A., & Sica, F. (2013). An overview of biological macromolecule crystallization. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 14, Issue 6, pp. 11643–11691). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/ijms140611643
40. Kuntz, I. D. (1992). Structure-Based Strategies for Drug Design and Discovery. *Science*, *257*(5073), 1078–1082. https://doi.org/10.1126/science.257.5073.1078
41. Liberek, K., Marszalek, J., Angt, D., Georgopoulostt, C., & Zylicz, M. (1991). Escherichia coli DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK. In *Proc. NatI. Acad. Sci. USA* (Vol. 88). https://www.pnas.org
42. Matsumoto, H., Haniu, H., & Komori, N. (2019). *Determination of Protein Molecular Weights on SDS-PAGE* (pp. 101–105). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8793-1_10
43. Mer, M., Dünser, M. W., Giera, R., & Dondorp, A. M. (2020). Severe malaria. Current concepts and practical overview: What every intensivist should know. *Intensive Care Medicine*, *46*(5), 907–918. https://doi.org/10.1007/s00134-020-06019-0
44. Mohamad, N., O Donoghue, A., Kantsadi, A. L., & Vakonakis, I. (2021). Structures of the Plasmodium falciparum heat-shock protein 70-x ATPase domain in complex with chemical fragments identify conserved and unique binding sites. *Acta*

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

Crystallographica Section F: Structural Biology Communications, *77*, 262–268. https://doi.org/10.1107/S2053230X21007378
45. Patury, S., Miyata, Y., & Gestwicki, J. E. (n.d.). *Pharmacological Targeting of the Hsp70 Chaperone*.
46. Pellecchia, M., Szyperski, T., Wall, D., Georgopoulos, C., & Wü Thrich, K. (1996). NMR Structure of the J-domain and the Gly/Phe-rich Region of the Escherichia coli DnaJ Chaperone. In *J. Mol. Biol* (Vol. 260).
47. Pervushin, K., Riek, R., Wider, G., & Wu¨thrich, K. W. (1997). Attenuated T 2 relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution. In *Biophysics* (Vol. 94). www.pnas.org.
48. Przyborski, J. M., Diehl, M., & Blatch, G. L. (2015). Plasmodial HSP70s are functionally adapted to the malaria parasite life cycle. In *Frontiers in Molecular Biosciences* (Vol. 2, Issue JUN). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fmolb.2015.00034
49. Ren, J., Karna, S., Lee, H.-M., Yoo, S. M., & Na, D. (2019). Artificial transformation methodologies for improving the efficiency of plasmid DNA transformation and simplifying its use. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *103*(23–24), 9205–9215. https://doi.org/10.1007/s00253-019-10173-x
50. Roberts, D. R., Laughlin, L. L., Hsheih, P., & Legters, L. J. (1997). DDT, Global Strategies, and a Malaria Control Crisis in South America. *Emerging Infectious Diseases*, *3*(3), 295–302. https://doi.org/10.3201/eid0303.970305
51. Rogerson, S. J., Hviid, L., Duffy, P. E., Leke, R. F., & Taylor, D. W. (2007). Malaria in pregnancy: pathogenesis and immunity. *The Lancet Infectious Diseases*, *7*(2), 105–117. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70022-1
52. Saibil, H. (2013). Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *14*(10), 630–642. https://doi.org/10.1038/nrm3658
53. Sato, S. (2021a). Plasmodium—a brief introduction to the parasites causing human malaria and their basic biology. In *Journal of Physiological Anthropology* (Vol. 40, Issue 1). BioMed Central Ltd. https://doi.org/10.1186/s40101-020-00251-9
54. Sato, S. (2021b). Plasmodium—a brief introduction to the parasites causing human malaria and their basic biology. In *Journal of Physiological Anthropology* (Vol. 40, Issue 1). BioMed Central Ltd. https://doi.org/10.1186/s40101-020-00251-9
55. Schrödinger L., & DeLano W. (2020). *PyMOL*.
56. Sharma, R. (2012). Enzyme Inhibition: Mechanisms and Scope. In *Enzyme Inhibition and Bioapplications*. InTech. https://doi.org/10.5772/39273
57. Sidawy, A., Johnston, K. W., & Rutherford, R. B. (1999). *REVIEW OF BASIC SCIENCE*.
58. Talapko, J., Škrlec, I., Alebić, T., Jukić, M., & Včev, A. (2019). Malaria: The past and the present. In *Microorganisms* (Vol. 7, Issue 6). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/microorganisms7060179
59. Tuteja, R. (2007a). Malaria - An overview. In *FEBS Journal* (Vol. 274, Issue 18, pp. 4670–4679). https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05997.x
60. Tuteja, R. (2007b). Malaria - An overview. In *FEBS Journal* (Vol. 274, Issue 18, pp. 4670–4679). https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05997.x
61. Urh, M., Simpson, D., & Zhao, K. (2009). *Chapter 26 Affinity Chromatography* (pp. 417–438). https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63026-3

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250

62. Vaishnava, S., & Striepen, B. (2006). The cell biology of secondary endosymbiosis - How parasites build, divide and segregate the apicoplast. In *Molecular Microbiology* (Vol. 61, Issue 6, pp. 1380–1387). https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05343.x
63. Waller, R. F., Keeling, P. J., Donald, R. G. K., Striepen, B., Handman, E., Lang-Unnasch, N., Cowman, A. F., Besra ¶, G. S., Roos, D. S., & Mcfadden, G. I. (1998). Nuclear-encoded proteins target to the plastid in Toxoplasma gondii and Plasmodium falciparum (apicomplexan parasitesorganellar targetingfatty acid biosynthesismalaria). In *Cell Biology* (Vol. 95). www.ebi.ac.ukparasitestoxotoxpage.html
64. Warncke, J. D., Vakonakis, I., & Beck, H.-P. (2016). Plasmodium Helical Interspersed Subtelomeric (PHIST) Proteins, at the Center of Host Cell Remodeling. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *80*(4), 905–927. https://doi.org/10.1128/mmbr.00014-16
65. Waugh, D. S. (2011). An overview of enzymatic reagents for the removal of affinity tags. In *Protein Expression and Purification* (Vol. 80, Issue 2, pp. 283–293). https://doi.org/10.1016/j.pep.2011.08.005
66. Wilson, (Iain) R.J.M., Denny, P. W., Preiser, P. R., Rangachari, K., Roberts, K., Roy, A., Whyte, A., Strath, M., Moore, D. J., Moore, P. W., & Williamson, D. H. (1996). Complete Gene Map of the Plastid-like DNA of the Malaria ParasitePlasmodium falciparum. *Journal of Molecular Biology*, *261*(2), 155–172. https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0449
67. Νικόλαος Μ. Γλυκός. (2015). *Μία μη μαθηματική εισαγωγή στην κρυσταλλογραφία πρωτεϊνών*. www.kallipos.gr

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
04/09/2026 10:05:03 EEST - 216.73.216.250