

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

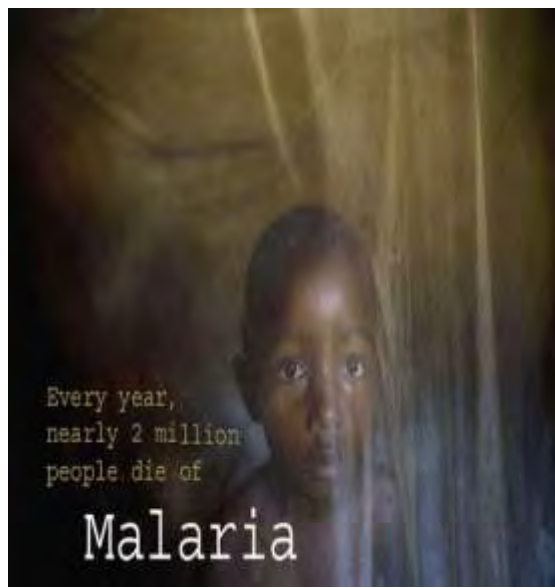
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΙΤΛΟΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ΟΣΜΟΓΟΝΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΡΩΤΕΙΝΗ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΟΣΜΟΓΟΝΩΝ ΜΟΡΙΩΝ 4 (OBP4) ΤΟΥ ΑΝΩΦΕΛΗ ΚΩΝΩΠΑ

FLUORESCENCE BINDING STUDY OF ODORANT MOLECULES BY ANOPHELES GAMBIAE ODORANT BINDING PROTEIN 4 (AgamOBP4)



ΜΠΑΜΠΑΛΙΟΥΤΑ ΑΝΤΩΝΙΑ

ΤΙΤΛΟΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ

ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ΟΣΜΟΓΟΝΩΝ
ΜΟΡΙΩΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΡΩΤΕΙΝΗ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΟΣΜΟΓΟΝΩΝ
ΜΟΡΙΩΝ 4 (OBP4) ΤΟΥ ΑΝΩΦΕΛΗ ΚΩΝΩΠΑ

FLUORESCENCE BINDING STUDY OF ODORANT
MOLECULES BY ANOPHELES GAMBIAE ODORANT
BINDING PROTEIN 4 (AgamOBP4)

ΤΡΙΜΕΛΕΙΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ:

Σ. ΖΩΓΡΑΦΟΣ, ερευνητής Β', ΙΟΦΧ/ΕΙΕ

ΣΥΝΕΠΙΒΛΕΠΩΝ:

Δ. ΛΕΩΝΙΔΑΣ, αναπληρωτής καθηγητής τμημ. βιοχ./βιοτεχ.

ΜΕΛΟΣ:

Α.Μ. ΨΑΡΡΑ, επίκουρη καθηγήτρια τμημ. Βιοχ./βιοτεχ.

ΜΠΑΜΠΑΛΙΟΥΤΑ ΑΝΤΩΝΙΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή μελέτη με θέμα «φθορισμομετρική μελέτη πρόσδεσης οσμογόνων μορίων από την πρωτεΐνη δέσμευσης οσμογόνων μορίων 4 (OBP4) του ανωφελή κώνωπα», πραγματοποιήθηκε στο εθνικό ίδρυμα ερευνών και συγκεκριμένα στο εργαστήριο Δομικής Βιολογίας και Χημείας υπό την επίβλεψη του Δρ. Σπύρου Ζωγράφου (ερευνητής Β΄, ΙΟΦΧ/ΕΙΕ).

Στον κ. Σπύρο Ζωγράφο οφείλω τις θερμές μου ευχαριστίες για την συνεχή του καθοδήγηση, την αμέριστη υποστήριξη και τις ουσιώδεις συμβουλές που μου παρείχε όλο αυτό το διάστημα.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στην υποψήφια διδάκτωρ κυρία Χριστίνα Δράκου για την πολύτιμη βοήθεια της, το αμείωτο ενδιαφέρον της και τη συμπαράστασή της κατά την εκτέλεση του πειραματικού μέρους της εργασίας.

Και τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τον αναπληρωτή καθηγητή βιοχημείας κ. Δημήτρη Λεωνίδα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και με σύστησε σε όλους αυτούς τους εξαιρετικούς επιστήμονες αλλά και ανθρώπους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΛΟΝΟΣΙΑ	
1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1.2 ΕΛΟΝΟΣΙΑ	9
1.2.1 ΤΡΟΠΟΙ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ	10
1.2.2 ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑ.....	11
1.2.3 ΜΕΤΡΑ ΠΡΟΛΗΨΗΣ.....	12
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΑΝΩΦΕΛΗΣ ΚΩΝΩΠΑΣ ΚΑΙ ΟΣΦΡΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	
2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	13
2.2 ΟΣΦΡΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	14
2.3 ΜΕΤΑΓΩΓΗ ΤΟΥ ΟΣΦΡΗΤΙΚΟΥ ΣΗΜΑΤΟΣ: «ΕΝΑΣ ΧΑΡΤΗΣ ΥΠΟ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ»	17
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ΟΣΜΟΓΟΝΩΝ (OBPs)	
3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	18
3.2 ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ OBPs	19
3.3 ΔΟΜΗ ΤΩΝ OBPs	21
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	
4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	22
4.2 ΕΠΙΛΟΓΗ ΠΡΟΣΔΕΤΩΝ ΚΑΙ OBPs.....	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	
5.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	26
5.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ	
5.2.1 ΣΤΕΡΕΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ	27
5.2.2 ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΜΕ ΕΠΑΓΩΓΗ	27
5.2.3 ΛΥΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	28
5.2.4 ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΣΩΜΑΤΙΩΝ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ	29

5.2.5	ΕΚΠΛΥΣΗ ΚΑΙ ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ ΤΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ.....	29
5.2.6	ΑΝΑΔΙΠΛΩΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΥΚΝΩΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ .	30
5.2.7	ΔΙΑΠΙΔΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ.....	30
5.2.8	ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ.....	31
5.3 ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ		
5.3.1	ΦΘΟΡΙΣΜΟΣ.....	32
5.3.2	ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	33
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ		34
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΣΥΖΗΤΗΣΗ		42
ΑΝΑΦΟΡΕΣ		45

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Πολλές φυσιολογικές μελέτες καθώς και μελέτες συμπεριφοράς προτείνουν τις OBPs των εντόμων ως απαραίτητες στην αναγνώριση των οσμών. Δεσμεύουν ελκυστικές και απωθητικές οσμές που προέρχονται από διάφορες πηγές. Διεκπεραιώνουν το πρώτο βήμα στη μεταγωγή του οσφρητικού σήματος. Ως εκ τούτου αποτελούν σημαντικούς στόχους για τον σχεδιασμό νέων εντομοαπωθητικών για τον έλεγχο μετάδοσης της ελονοσίας. Στην παρούσα εργασία η δέσμευση τριών προσδετών, του ινδολίου, της γερανύλ-ακετόνης και του βενζοϊκού βενζυλίου από την πρωτεΐνη δέσμευσης οσμογόνων μορίων του ανωφελή κώνωπα AgamOBP4 μελετήθηκε με φθορισμομετρικές δοκιμές.

ABSTRACT

Much physiological and behavioural evidence has been provided suggesting that insect Odorant Binding Proteins (OBPs) are indispensable for odorant recognition. OBPs bind attractant and repellent odors emanating from various sources and carry out the first step of olfactory transduction. Therefore OBPs constitute important molecular targets for the design of novel repellents for the control of malaria transmission. In the present study, the binding of three ligands, indole, geranyl acetone and benzyl benzoate to the AgamOBP4, have been studied by fluorescence binding assays.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΛΟΝΟΣΙΑ

1.1 Εισαγωγή

Η ελονοσία, ή μαλάρια, είναι μια ασθένεια, η οποία ευθύνεται για εκατομμύρια θανάτους, και σήμερα ενδημεί σε τροπικές και υποτροπικές περιοχές. Η ασθένεια προκαλείται από παράσιτα της ελονοσίας, τα οποία εισάγονται στο ανθρώπινο αίμα μέσω τσιμπήματος από μολυσμένο κουνούπι. Μετά από μία έως τέσσερις εβδομάδες από τη μόλυνση, εμφανίζονται τα πρώτα συμπτώματα, τα οποία είναι ρίγη, πονοκέφαλος και πυρετός. Μερικές φορές εμφανίζεται και ναυτία, πόνος στην κοιλιά, την πλάτη και τις αρθρώσεις. Η ελονοσία εξακολουθεί να παραμένει το πιο σημαντικό λοιμώδες νόσημα και η συχνότερη αιτία θανάτου για τον πληθυσμό των τροπικών και υποτροπικών χωρών ενώ αποτελεί σημαντικό κίνδυνο για τα άτομα που ταξιδεύουν σε αυτές τις περιοχές.

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας υπολογίζετε ότι το 50% περίπου του πληθυσμού της Γης απειλείται από τη νόσο, που σκοτώνει σχεδόν 1 εκατομμύριο ανθρώπους το χρόνο. Τα μικρά παιδιά είναι ιδιαίτερος εύάλωτα στη νόσο. Οι δε έγκυες γυναίκες είναι εξαιρετικά εύάλωτες στην ελονοσία που προκαλείται από το *P. falciparum*, γεγονός που οδηγεί σε μεγαλύτερα ποσοστά θνητότητας για τις γυναίκες αυτές και σε αύξηση των θνησιγενών και λιποβαρών παιδιών που γεννιούνται από αυτές.

Οι κλιματικές συνθήκες επηρεάζουν τη γεωγραφική και εποχική κατανομή της νόσου (εικόνα 1). Σε πολλές τροπικές περιοχές η νόσος μεταδίδεται όλο το έτος, ενώ στις εύκρατες περιοχές η μετάδοση σχεδόν διακόπτεται κατά τους ψυχρούς μήνες. Κατά τη διάρκεια της εποχικής έξαρσης της νόσου και κυρίως στις ενδημικές περιοχές και σε υψόμετρο μικρότερο των 1500 - 2000 μέτρων, ο κίνδυνος είναι υψηλός, ενώ

σε μεγαλύτερο υψόμετρο τα κουνούπια που μεταδίδουν τη νόσο δεν επιβιώνουν.

Ο χάρτης του τον Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ) που ακολουθεί, δείχνει τις περιοχές στον κόσμο όπου ενδημεί η ελονοσία.

[1],[2]



Εικόνα 1. Περιοχές όπου ενδημεί η ελονοσία παγκοσμίως

Έντονα χρωματισμένες περιοχές: ενδημικές για ελονοσία.

Ανοιχτόχρωμες περιοχές: περιορισμένος κίνδυνος μετάδοσης ελονοσίας

Λευκές περιοχές: δεν υπάρχει ελονοσία ή ο κίνδυνος μετάδοσης είναι αμελητέος

http://www.keelpno.gr/Portals/0/%CE%91%CF%81%CF%87%CE%B5%CE%AF%CE%B1/%CE%95%CE%BB%CE%BF%CE%BD%CE%BF%CF%83%CE%AF%CE%B1/malaria_faqs.pdf

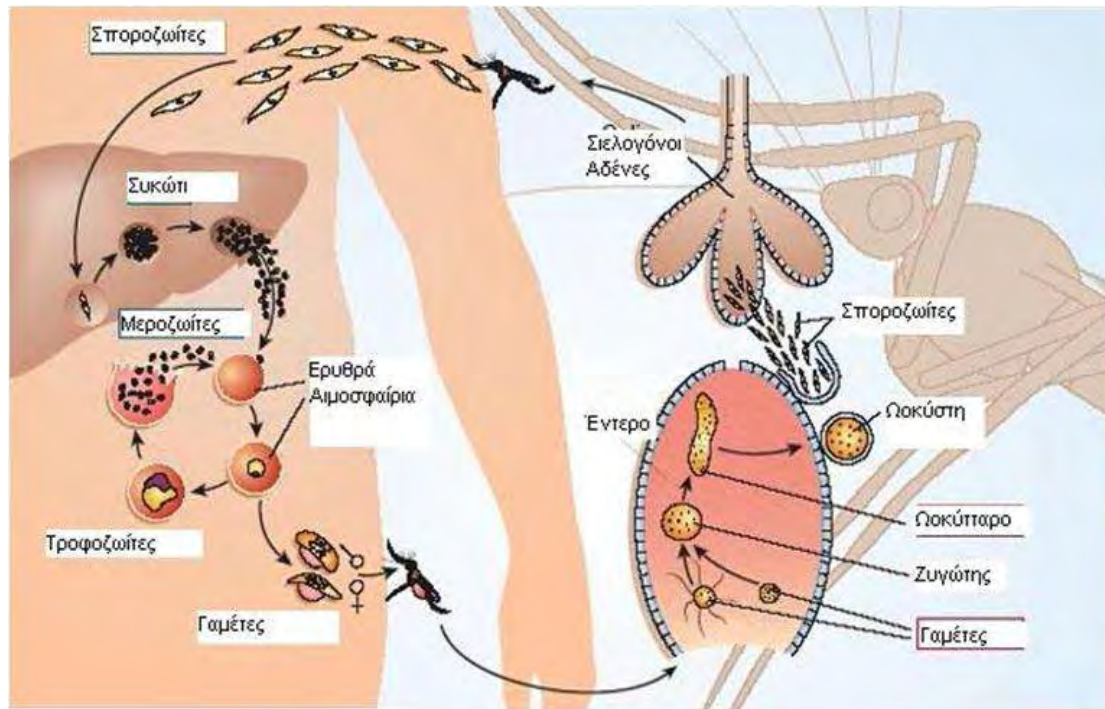
Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας έχει κηρύξει την Ελλάδα ελεύθερη από ελονοσία από το 1974. Όμως, το ενδεχόμενο επανεγκατάστασης της νόσου είναι υπαρκτό, λόγω των παρακάτω παραγόντων: (α) Η χώρα αποτελεί τόπο διαμονής και εργασίας μεταναστών από χώρες στις οποίες ενδημεί η νόσος. (β) Σε πολλές περιοχές κυκλοφορούν κουνούπια του γένους *Anopheles* (*Ανωφελής*) που αποτελεί κύριο διαβιβαστή της ελονοσίας. (γ) Σημειώνεται αλλαγή στις περιβαλλοντικές συνθήκες με συνακόλουθη αύξηση του πληθυσμού και της δραστηριότητας των κουνουπιών.

1.2 Ελονοσία

Η ελονοσία είναι εμπύρετη παρασιτική νόσος προκαλούμενη από πρωτόζωα του γένους «Πλασμώδιο» (*Plasmodium*) και συγκεκριμένα από ένα από τα παρακάτω τέσσερα είδη: *P.vivax*, *P.malariae*, *P.falciparum* και *P.ovale*. Το Πλασμώδιο της ελονοσίας προσβάλλει δύο είδη ξενιστών: τον άνθρωπο (ενδιάμεσος ξενιστής) και το θηλυκό κουνούπι του γένους *Anopheles* (κύριος ξενιστής).

Στην **εικόνα 2** φαίνεται ο κύκλος αναπαραγωγής του παρασίτου όπου, το Πλασμώδιο εισάγεται αρχικά στον άνθρωπο με τη μορφή **σποροζωιτών** διαμέσου του νύγματος του μολυσμένου κουνουπιού και εγκαθίσταται στα ανθρώπινα ηπατοκύτταρα, όπου αναπτύσσεται και πολλαπλασιάζεται δημιουργώντας **μεροζώιτες (εξωερυθροκυτταρικός κύκλος ζωής)**. Οι τελευταίες μορφές απελευθερώνονται στη συστηματική κυκλοφορία και προσβάλλουν τα ερυθρά αιμοσφαίρια. Στην περίπτωση των *P.vivax* και *P.ovale*, οι μεροζώιτες μπορούν να παραμείνουν σε κατάσταση «ύπνωσης» μέσα στα ηπατοκύτταρα για αρκετό καιρό (**υπνοζώιτες**), προκαλώντας υποτροπές της νόσου κάθε φορά που απελευθερώνονται στη συστηματική κυκλοφορία του αίματος, ακόμα και πολλά χρόνια μετά την πρωτοπαθή λοίμωξη. Μετά την είσοδό τους στα ερυθροκύτταρα (**ερυθροκυτταρικός κύκλος ζωής**), οι μεροζώιτες συνεχίζουν την ωρίμανσή τους σε δακτυλιοειδείς μορφές και ώριμους τροφοζώιτες. Η λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων και η παρασιταίμια προκαλούν τη συμπτωματολογία της νόσου. Εντός των ερυθροκυττάρων, ορισμένα Πλασμώδια επίσης διαφοροποιούνται σε φυλετικές μορφές («γαμετοκύτταρα»). Όταν τα γαμετοκύτταρα προσλαμβάνονται από το θηλυκό ανωφελή κώνωπα, κατά τη διάρκεια ενός γεύματος αίματος, ξεκινά ένας καινούριος κύκλος ζωής για το παράσιτο μέσα στο πεπτικό σύστημα του εντόμου. Εκεί, δηλαδή,

ωριμάζουν οι σποροζωίτες, οπότε μεταναστεύοντας στους σιελογόνους αδένες του κουνουπιού μεταδίδονται σε άλλο άνθρωπο με το επόμενο τσίμπημα.



Εικόνα 2. Κύκλος ζωής Πλασμωδίου ελονοσίας

(<http://www.konstantopouleio.gr/images/files/enl/ekpraideutiko/ekp2/Elonosia/Enimerosi.pdf>)

Σε όλη αυτή τη διαδικασία, το έντομο μεταφέρει το παράσιτο από άνθρωπο σε άνθρωπο, λειτουργώντας ως διαβιβαστής, χωρίς το ίδιο να νοσεί. Ο αποτελεσματικός περιορισμός της επαφής των ανθρώπων με το διαβιβαστή (κουνούπι) είναι δυνατόν να μειώσει δραστικά τη μετάδοση της ελονοσίας μέσω αυτού του κύκλου. [1],[2]

1.2.1 ΤΡΟΠΟΙ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ

Ο κύριος τρόπος μετάδοσης της νόσου είναι μέσω του νύγματος θηλυκού κουνουπιού του γένους *Anopheles*. Τα έντομα αυτά μολύνονται από ασθενείς (συμπτωματικούς ή ασυμπτωματικούς) με παρασιταιμία. Τα κουνούπια αυτά εμφανίζουν μεγαλύτερη δραστηριότητα από το

σούρουπο μέχρι την αυγή και εναποθέτουν τα αυγά τους σε στάσιμο νερό.

Σπανιότεροι τρόποι μετάδοσης περιλαμβάνουν:

1. Μετάγγισης μολυσμένου αίματος
2. Μεταμόσχευσης οργάνων
3. Κοινή χρήση μολυσμένης σύριγγας ή βελόνας
4. μετάδοση από τη μητέρα στο έμβρυο κατά τη διάρκεια της κύησης (συνήθως σε λοιμώξεις από *P.vivax* και *P. falciparum*). [1],[2]

1.2.2 ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η κλινική εικόνα της νόσου ποικίλλει από ασυμπτωματική έως και σοβαρή νόσηση και θάνατο (κυρίως σε λοίμωξη από *P.falciparum*). Είναι ιάσιμη νόσος, εάν διαγνωστεί εγκαίρως και εάν ο ασθενής λάβει την κατάλληλη θεραπευτική αγωγή. Το *P.falciparum* προκαλεί τη σοβαρότερη μορφή της νόσου, ενώ η λοίμωξη από τα άλλα είδη Πλασμωδίου συνήθως δεν είναι απειλητική για τη ζωή του ασθενούς.

Τα κύρια και πιο συνηθισμένα συμπτώματα της ελονοσίας είναι: υψηλός πυρετός με ρίγη, εφίδρωση, και κεφαλαλγία, μυαλγία και γενική αδιαθεσία. Ο πυρετός εμφανίζεται κάθε δεύτερη ή κάθε τρίτη μέρα. Άλλα συμπτώματα που μπορούν επίσης να εμφανιστούν είναι: ναυτία, διάρροια, έμετος. Επιπλέον σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να εκδηλωθεί αναιμία και ίκτερος (κίτρινη χροιά των ματιών, του δέρματος και των βλεννογόνων) εξαιτίας της καταστροφής των ερυθρών αιμοσφαιρίων του αίματος (αιμόλυση). Αν δεν δοθεί η κατάλληλη θεραπεία και σε σοβαρές μορφές της νόσου μπορεί να παρουσιαστούν νευρολογικά συμπτώματα, νεφρική ή αναπνευστική ανεπάρκεια.

Στις περισσότερες περιπτώσεις τα συμπτώματα εμφανίζονται 10 ημέρες έως 4 εβδομάδες μετά το τσίμπημα. Η λοίμωξη από *Plasmodium*

ninax και *Plasmodium ovale* μπορεί να υποτροπιάσει με αποτέλεσμα ο ασθενής να νοσήσει ξανά μέσα σε διάστημα μηνών από το πρώτο επεισόδιο έως και 4-5 χρόνια μετά.

Υπάρχουν διάφορα αποτελεσματικά ανθελνοσσιακά φάρμακα. Η θεραπεία καλό είναι να ξεκινήσει έγκαιρα στα πρώτα στάδια της νόσου πριν αυτή γίνει χρόνια ή εξελιχθεί σε σοβαρή μορφή. Ωστόσο η θεραπεία της ελονοσίας εξαρτάται από το πλασμώδιο που προκαλεί τη λοίμωξη και την περιοχή στην οποία συνέβη η μόλυνση, λόγω της εμφάνισης αντοχής σε μερικά από τα ανθελνοσσιακά φάρμακα. Η θεραπεία εξαρτάται επίσης από την ηλικία του ασθενούς, από το πόσο σοβαρή είναι η κατάσταση του καθώς και από το αν βρίσκεται σε εξέλιξη ή αναμένεται εγκυμοσύνη. [1],[2]

1.2.3 ΜΕΤΡΑ ΠΡΟΛΗΨΗΣ

Τα πλέον ενδεδειγμένα μέτρα για τον έλεγχο των νοσημάτων της ελονοσίας είναι η ενισχυμένη επιδημιολογική επιτήρηση, η συστηματική καταπολέμηση των κουνουπιών π.χ. με την χρήση εντομοκτόνων, τα οποία περιέχουν πυρεθρινοειδή ουσίες που προσβάλλουν το νευρικό σύστημα των εντόμων.

Σημαντικό μέτρο πρόληψης αποτελεί η λήψη μέτρων ατομικής προστασίας. Σε αυτά περιλαμβάνονται η χρήση εντομοαπωθητικών τα οποία χρησιμοποιούν δραστικές ουσίες, μεταξύ των οποίων το DEET (N,N διεθυλο- μετα-τολουαμίδη) και η ικαριδίνη ή πικαριδίνη (2-(2-υδροξυαιθυλο) πιπεριδινό-1-καρβοξυλικό δευτ.βουτύλιο), η χρήση κατάλληλων ενδυμάτων όπως ρούχα που καλύπτουν όσο περισσότερο γίνεται το σώμα και συχνά λουτρά καθαριότητας για την απομάκρυνση του ιδρώτα. [1],[2]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΑΝΩΦΕΛΗΣ ΚΩΝΩΠΑΣ ΚΑΙ ΟΣΦΡΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα κουνούπια μεταφέρουν πολλές θανατηφόρες ασθένειες όπως η ελονοσία, η εγκεφαλίτιδα, ο δάγκειος πυρετός και ο κίτρινος πυρετός. Η ελονοσία μεταδίδεται μεταξύ των ανθρώπων από τα θηλυκά κουνούπια του γένους *anopheles* (ανωφελής). Τα θηλυκά κουνούπια λαμβάνουν γεύμα αίματος (εικόνα 3) με σκοπό την παραγωγή αυγών. Αυτά τα γεύματα είναι ουσιαστικά ο συνδετικός κρίκος μεταξύ του ανθρώπου και του κουνουπιού στον κύκλο ζωής του παρασίτου.



Εικόνα 3. Θηλυκό ανωφελές κουνούπι την ώρα που απολαμβάνει το γεύμα του από ανθρώπινο χέρι.

(<http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/mosquitoes/>)

Η επιτυχής ανάπτυξη του παρασίτου της ελονοσίας στο κουνούπι εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Οι πιο σημαντικοί είναι η θερμοκρασία περιβάλλοντος, η υγρασία (υψηλότερες θερμοκρασίες επιταχύνουν την ανάπτυξη του παρασίτου στο κουνούπι), καθώς επίσης και από την διάρκεια ζωής του κουνουπιού ώστε να ολοκληρωθεί ο κύκλος ζωής του παρασίτου (10-18 ημέρες). Διαφορετικά ανωφελή είδη μεταδίδουν την ελονοσία ανάλογα με την περιοχή και το περιβάλλον. Ο ανωφελής κώνωπας δεν βρίσκεται μόνο σε περιοχές που ενδημεί η

ελονοσία αλλά και σε περιοχές που η νόσος έχει εξαλειφθεί με αποτέλεσμα να υπάρχει ανησυχία επανεμφάνισης της νόσου.[3]

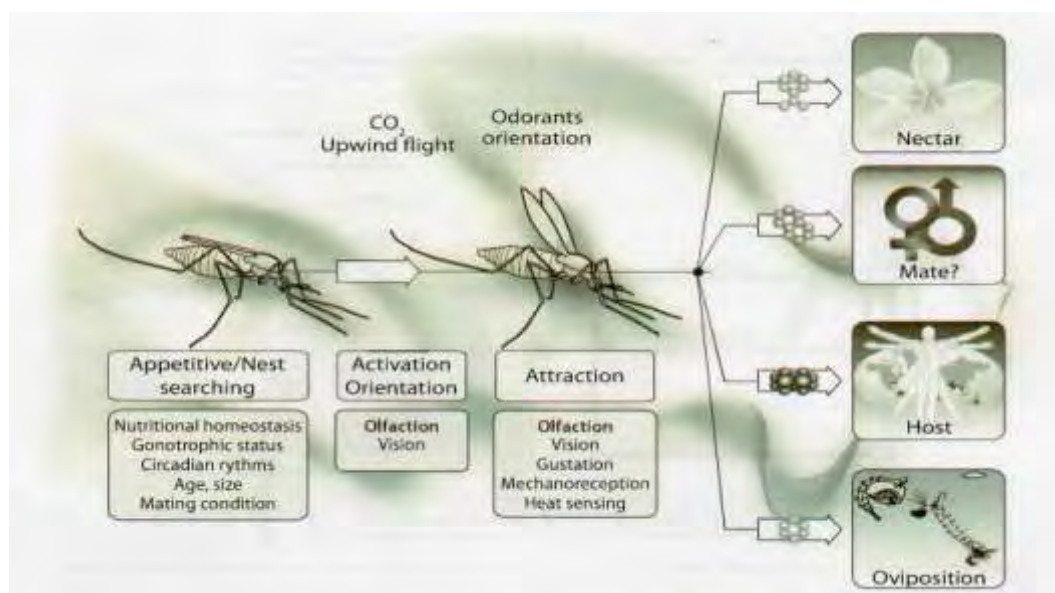
2.2 ΟΣΦΡΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Πρόσφατες έρευνες για την κατανόηση του μοριακού μηχανισμού της όσφρησης των κουνουπιών έδωσαν το έναυσμα να προσεγγιστούν οι στρατηγικές συμπεριφοράς του ξενιστή από μια νέα πλεονεκτική θέση. Η έρευνα της γονιδιακής αλληλουχίας του *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti* και της *Drosophila melanogaster* επέτρεψε την αναγνώριση ολόκληρων γονιδιακών οικογενειών, οι οποίες εμπλέκονται στην ανίχνευση της όσφρησης και στη ρύθμιση του σήματος. Ειδικά οι πρωτεΐνες των οσφρητικών υποδοχέων, εμπλέκονται άμεσα στην μεταγωγή σήματος. Η λειτουργία αυτών των υποδοχέων στις διάφορες αποφύσεις στο κεφάλι των προνυμφών και των ενήλικων κουνουπιών, έχει εγείρει νέα ερωτήματα σχετικά με την φύση του μηχανισμού της όσφρησης σε αυτά τα έντομα.[4]

Ο ενήλικας ανωφελής κώνωπας έλκεται από οσφρητικά ερεθίσματα, που μπορεί να είναι από απλές ενώσεις μέχρι και πιο πολύπλοκα μείγματα [5] (εικόνα 4) π.χ. ο *Anopheles gambiae* έλκεται από CO₂, γαλακτικό οξύ, ακετόνη και 1-οκτεν-3-ολη.[6],[7],[8],[9]

Το αισθητήριο όργανο της όσφρησης αποτελεί μια μορφή χημειουποδοχέων που ειδικεύεται στη λήψη ερεθισμάτων μέσω πτητικών μορίων και αποτελεί ουσιαστικά, το συνδετικό κρίκο μεταξύ του οργανισμού με το εξωτερικό περιβάλλον. Απαιτεί τη λειτουργία ενός εξαιρετικά πολύπλοκου καταρράκτη μεταγωγής σήματος ώστε να μετατρέψει τα αέρια χημικά σήματα σε συγκεκριμένα πρότυπα της νευρωνικής λειτουργίας. Στα έντομα, η διαδικασία αυτή διεκπεραιώνεται από μικρές διάτρητες, δερματικές δομές, που ονομάζονται αισθητήρες

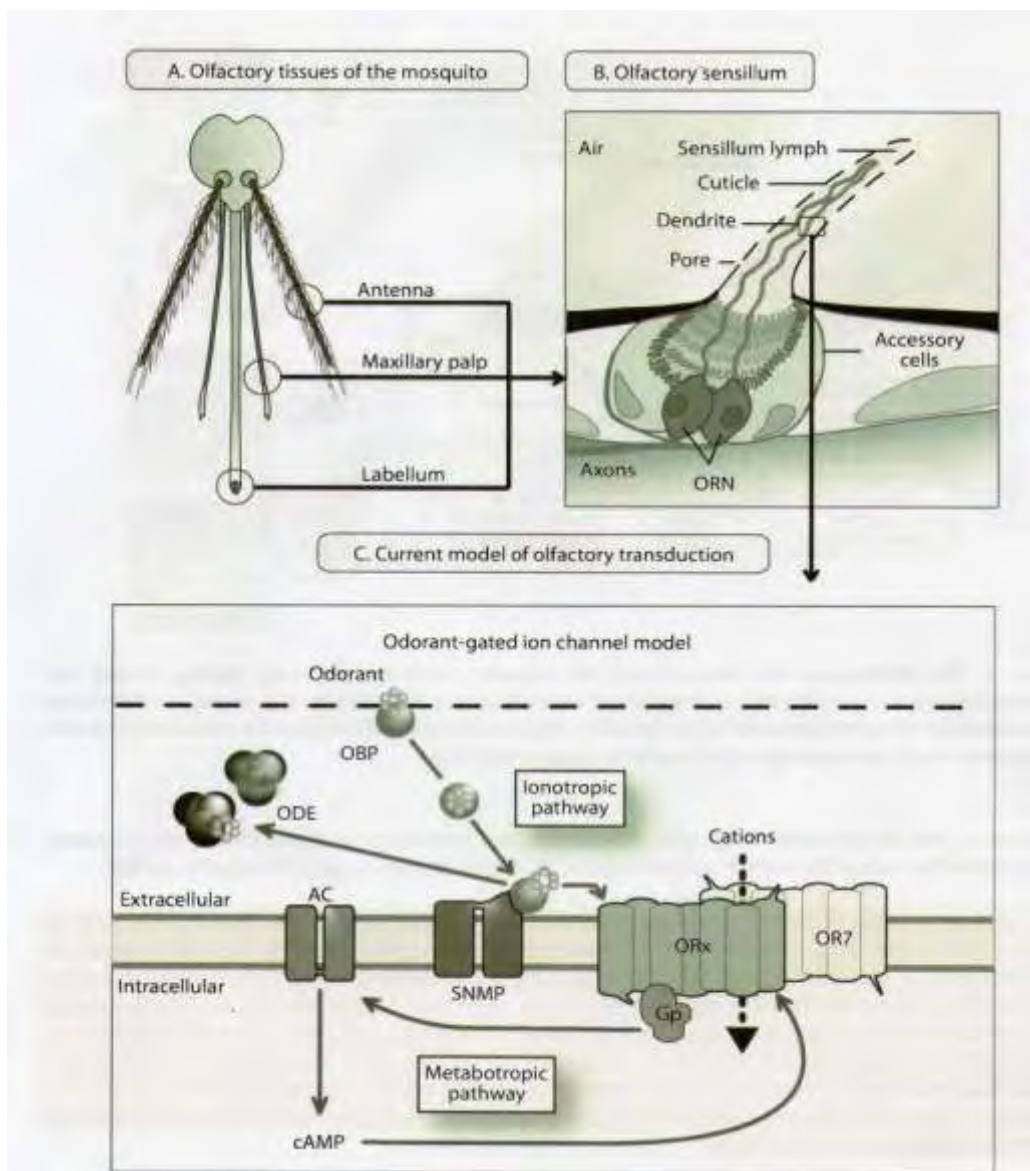
(sensilla). Οι αισθητήρες αυτοί κατανέμονται στην επιφάνεια των αποφύσεων του κεφαλιού και περιβάλλουν νευρώνες (εικόνα 5 A, B). Τα οσφρητικά γεγονότα της μεταγωγής σήματος λαμβάνουν χώρα στους δενδρίτες των νευρώνων, μέσω των οσφρητικών υποδοχέων, όμως ο βασικός μηχανισμός παραμένει άγνωστος παρά τις εκτεταμένες ερευνητικές προσπάθειες. [4]



Εικόνα 4. Οι βασικές φυσιολογικές και αισθητήριες συμπεριφορές του κουνουπιού.

Η αναζήτηση τροφής, συντρόφου, ξενιστή και η ωοτοκία, είναι συμπεριφορές που διαμορφώνονται από εσωτερικά και εξωτερικά σήματα. Τα αναπαραγωγικά, σεξουαλικά, διατροφικά και αναπτυξιακά επίπεδα, καθώς και οι χρονικοί παράγοντες συμπεριλαμβανομένου του κερκάδιου ρολογιού, επηρεάζουν τις αποκρίσεις των κουνουπιών σε εξωτερικά ερεθίσματα, τα οποία βασίζονται σε συνδυασμό των αισθήσεων. [4]

(Willem Takken and Bart G.J. Knols, Olfaction in vector-host interactions, Ecology and control of vector-borne diseases Volume 2, 2010, pp 18)



Εικόνα 5. Οσφρητική μεταγωγή:

Α) Η κεραία, η κεραία άνω γνάθου και το «χείλος» των κουνουπιών είναι τα τρία βασικά σημεία της οσφρητικής αίσθησης.[4]

Β) Οι αισθητήρες (sensilla) καλύπτουν αυτούς τους ιστούς και περιβάλλουν τους δενδρίτες των νευρώνων στους οποίους εντοπίζονται οι οσφρητικοί υποδοχείς των νευρώνων.[4]

Γ) Τα οσμογόνα μόρια έχουν πρόσβαση στην λέμφο του αισθητήρα μέσω των πόρων της επιδερμίδας και αλληλεπιδρούν με ένα μεμβρανικό σύμπλεγμα πρωτεϊνών, το οποίο αποτελείται από τις μεμβρανικές πρωτεΐνες των αισθητήριων νευρώνων και από τον ετερομερή υποδοχέα οσμογόνων (ORx/OR7). Σε αυτό το μοντέλο η ενεργοποίηση του υποδοχέα προκαλεί δύο αποκρίσεις: α) την γρήγορη απόκριση όπου εμπλέκει μια άμεση ενέργεια πάνω στους υποδοχείς, η οποία δρα ως ένα οσμοελεγχόμενο κανάλι ιόντων. β) και την πιο αργή απόκριση όπου προκαλείται μέσω μιας G πρωτεΐνης η οποία εξαρτάται από ένα σύστημα δευτέρου μηνύματος το οποίο συμπεριλαμβάνει την αδενυλική κυκλάση (AC) και το κυκλικό AMP (cAMP).[13],[14]

(Willem Takken and Bart G.J. Knols, Olfaction in vector-host interactions, Ecology and control of vector-borne diseases Volume 2, 2010, pp 19)

2.3 ΜΕΤΑΓΩΓΗ ΤΟΥ ΟΣΦΡΗΤΙΚΟΥ ΣΗΜΑΤΟΣ: «ΕΝΑΣ ΧΑΡΤΗΣ ΥΠΟ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ»

Πάνω από δυο δεκαετίες έρευνας για την όσφρηση των ασπόνδυλων, έχουν προσδιορίσει διάφορα μοριακά συστατικά που εμπλέκονται σε βιοχημικές διεργασίες που είναι υπεύθυνες για την ανίχνευση και την μεταγωγή των οσφρητικών ερεθισμάτων. Αυτές περιλαμβάνουν τις αρρεστίνες (arrestins, Arrs), τις G-πρωτεΐνες, τις πρωτεΐνες πρόσδεσης οσμογόνων (odorant binding proteins OBPs), τα αποικοδομητικά ένζυμα οσμογόνων (odorant degrading enzymes ODEs) τους υποδοχείς οσμογόνων (odorant receptors, ORs) και τις μεμβρανικές πρωτεΐνες των αισθητήριων νευρώνων (sensory neuron membrane proteins, SNMPs). [4]

Οι δομές των υποδοχέων (ORs) στα έντομα δεν έχουν προσδιοριστεί με ακρίβεια, γνωρίζουμε όμως ότι λειτουργούν ως ετερομερή σύμπλοκα,[10] παίζοντας κεντρικό ρόλο στην ανίχνευση και την ενεργοποίηση του μηχανισμού της μεταγωγής. Πειράματα σε ετερόλογα συστήματα έκφρασης, έδειξαν ότι στον ετεροδιμερή ORs της Δροσόφιλα, προκαλούνται κυτταρικές αποκρίσεις μετά από διέγερση των οσμογόνων,[11],[12] με αποτέλεσμα τον προσδιορισμό της λειτουργίας τους ως αυθεντικούς (bona fine) υποδοχείς οσμογόνων.

Εξωκυττάρια γεγονότα που σχετίζονται με την ανίχνευση οσμογόνων και περιλαμβάνουν διαλυτά OBPs, ODEs (εικόνα 10, Γ) και SNMPs, πιστεύεται ότι δημιουργούν μια μοριακή γέφυρα μεταξύ των ORs και του προσδέτη π.χ. μιας φερομόνης. Πρόσφατες έρευνες δείχνουν ότι, οι ORs εμφανίζουν είτε ιονοτροπικά είτε εναλλακτικά και ιονο- και μεταβοτροπικά χαρακτηριστικά.[4] Από την άλλη πλευρά, (εικόνα 5 Γ(α)), η ταχεία κινητική αντίδραση των οσφρητικών υποδοχέων που παρατηρήθηκε σε ετερόλογα συστήματα έκφρασης είναι σύμφωνη με το

μοντέλο των ελεγχόμενων από προσδέτη διαύλων ιόντων (ligand gated ion channels), που δρουν ανεξάρτητα από την σηματοδότηση των G-πρωτεϊνών [13]. Αντίθετα, μια άλλη έρευνα, (εικόνα 5, Γ(β)), υποδεικνύει μια διαφορετική μεταβοτροπική αντίδραση η οποία απαιτεί την πρόσληψη της G-πρωτεΐνης και τη μεσολάβηση ενός συστήματος δεύτερου μηνύματος το οποίο είναι πιο αργό από ότι η αρχική ιονοτροπική απόκριση.[14]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ΟΣΜΟΓΟΝΩΝ **(OBPs)**

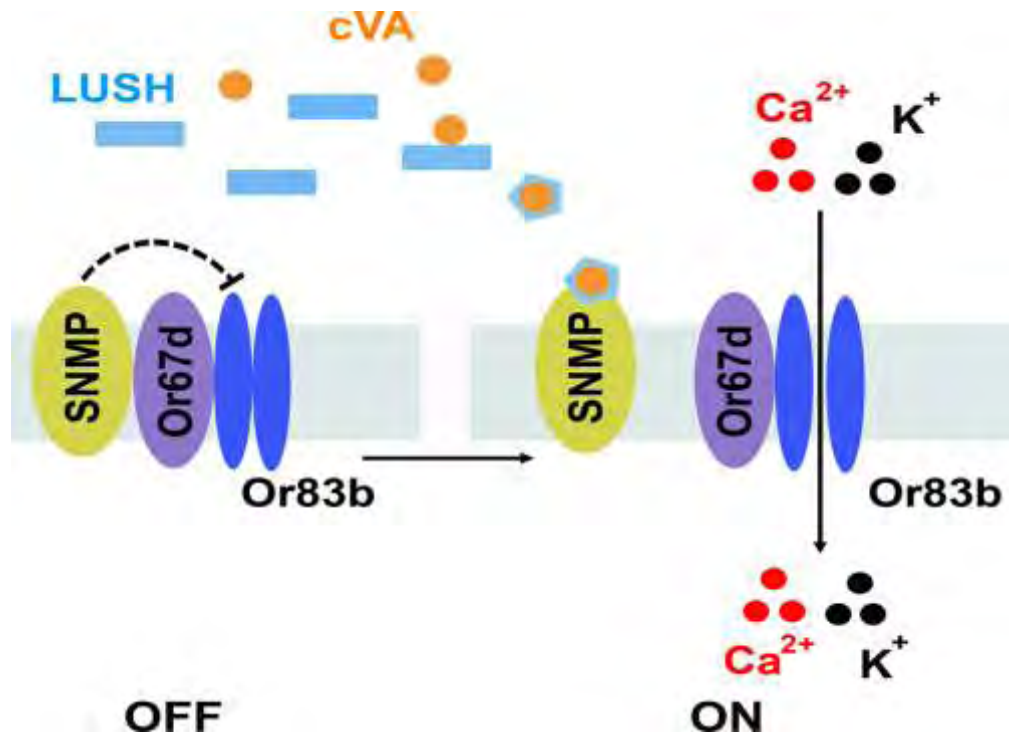
3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι OBPs είναι τα πρώτα στοιχεία του οσφρητικού συστήματος που έρχονται σε επαφή και δεσμεύουν ελκυστικές και απωθητικές οσμές που προέρχονται από διάφορες πηγές για την εν συνεχεία διέγερση των οσφρητικών υποδοχέων (ORs) που εντοπίζονται στους δενδρίτες των οσφρητικών νευρώνων (ORNs). Πολλές φυσιολογικές μελέτες και μελέτες συμπεριφοράς έχουν αποδείξει ότι οι OBPs των εντόμων είναι απαραίτητες στην αναγνώριση των οσμών. Επιπλέον, ο μοριακός χαρακτηρισμός των γονιδίων OBPs έχουν δείξει ότι σε μερικές περιπτώσεις αυτά υπερεκφράζονται ή υποεκφράζονται μετά από ένα γεύμα αίματος, υποδεικνύοντας ότι οι αντίστοιχες πρωτεΐνες εμπλέκονται στην αναγνώριση του ξενιστή. Οι OBPs των εντόμων εμφανίζουν δομική ποικιλομορφία στο μέγεθος, τη θέση και την κλίση των α -ελικών τους, το μήκος και τη κατεύθυνση των βρόχων τους, και στην διαμόρφωση του C-τελικού άκρου τους. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία πολύ διαφορετικών θυλάκων πρόσδεσης, οι οποίοι

διαφέρουν στο σχήμα, τη θέση, την προσπελασιμότητα από τον διαλύτη, και στη φύση των αμινοξέων που σχηματίζουν τα τοιχώματά τους. Το γεγονός αυτό καθιστά τις OBPs ικανές για αντιστρεπτή πρόσδεση ενός ευρέος φάσματος οργανικών μορίων και οσμών φυσικής προέλευσης.

3.2 ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ OBPs [15]

Οι OBPs των εντόμων είναι μέλη μιας οικογένειας που περιλαμβάνει: τις πρωτεΐνες πρόσδεσης φερομονών (pheromone binding proteins, PBPs), της γενικές OBPs (general odorant binding proteins, GOBPs) και τις κεραϊκές πρωτεΐνες πρόσδεσης (antennal binding proteins X, ABPXs) [17]. Πρόκειται για μικρές διαλυτές πρωτεΐνες (10-20 kDa) που εντοπίζονται στην αισθητήρια λέμφο των κουνουπιών και μεσολαβούν στα αρχικά στάδια του καταρράκτη της μεταγωγής των οσφρητικών σημάτων. Συμμετέχουν σε αρκετά σημεία της οσφρητικής αντίληψης, συμπεριλαμβανομένων την διαλυτοποίηση των οσμογόνων, τη μεταφορά και την παράδοση τους στους οσφρητικούς υποδοχείς, καθώς και την προστασία έναντι της διάσπαση από αποικοδομητικά ένζυμα (ODEs) [18]. Ένας πιο ενεργός ρόλος των OBPs, όπου το σύμπλοκο OBP-οσμογόνο λειτουργεί ως προσδέτης έχει πρόσφατα αποδειχθεί για την πρωτεΐνη πρόσδεσης οσμογόνων της δροσόφιλα (LUSH) σε σύμπλοκο με τη φερομόνη, 11-cis vaccenyl acetate (cVA), (εικόνα 6) [19].



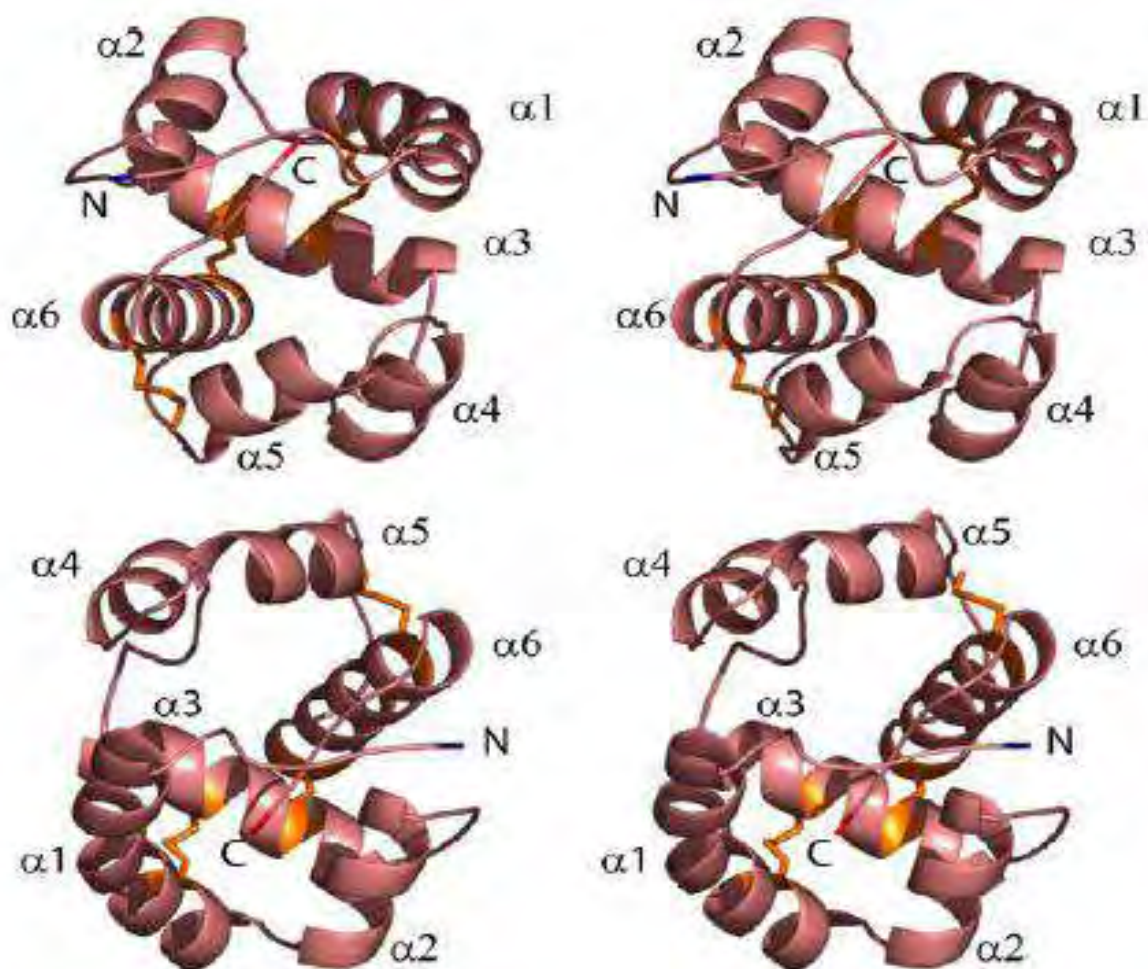
Εικόνα 6. Ανίχνευση της φερομόνης.

Η πρωτεΐνη LUSH δεσμεύει την φερομόνη cVA και λαμβάνει μια ενεργή διαμόρφωση. Η ενεργοποιημένη LUSH αλληλεπιδρά με την SNMP προκαλώντας τη διάσπαση του συμπλόκου SNMP-Or67d/Or83b και επιτρέποντας τη διέλευση των κατιόντων νευρώνες. ([Tal Soo Ha and Dean P. Smith](#) Odorant and pheromone receptors in insects, 2009)

Το πιο σημαντικό είναι ότι οι OBPs αναμένετε να συμβάλουν σημαντικά στην επιλεκτικότητα του οσφρητικού συστήματος. Έχει βρεθεί ότι ορισμένες OBPs δεσμεύουν συγκεκριμένα ένα μικρό αριθμό από προσδέτες [20]. Ωστόσο, δεδομένου ότι ο αριθμός των οσμών όπου τα έντομα μπορούν να ανιχνεύσουν, είναι πολύ μεγαλύτερος από τον αριθμό των OBPs, ορισμένες OBPs μπορούν να αναγνωρίσουν ειδικά, μια κατηγορία δομικά συγγενικών οσμών και επίσης να διακρίνουν σημειοχημικά τις διάφορες χημικές ομάδες. [21]

3.3 ΔΟΜΗ ΤΩΝ OBPs [15]

Οι πλειονότητα των OBPs έχουν το ίδιο δομικό μοτίβο και αποτελούνται από έξι α -έλικες οι οποίες δημιουργούν βρόγχους και συνδέονται με τρεις δισουλφιδικούς δεσμούς (εικόνα 7). Παρόλο την δομική ομολογία τους, έχει προβλεφθεί να φέρουν δεσμευτικές κοιλότητες από διαφορετικές μορφές και υδρόφοβα περιβάλλοντα τα οποία είναι ικανά να δεσμεύουν αντιστρεπτά ένα ευρύ φάσμα από οργανικά μόρια και φυσικές οσμές [22].



Εικόνα 7. Η τρισδιάστατη δομή της AgamOBP1.

Στερεοσκοπική απεικόνιση της πρωτεΐνης AgamOBP1, όπου φαίνονται οι έξι α -έλικες, τα N-, τα C- τελικά άκρα και οι δισουλφιδικές γέφυρες. (Κεραμιώτη Μαρία (2011), Δομική και κινητική μελέτη συμπλόκων λειτουργικών πρωτεϊνών (OBP4 και φωσφορυλάση του γλυκογόνου) με μικρά μόρια με σκοπό τον σχεδιασμό βελτιωμένων προσδετών, pp 47).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σήμερα υπάρχει παγκόσμια ανησυχία σχετικά με τον ξενιστή και των ασθενειών που μεταδίδονται από αυτόν, όπως ο πυρετός του δυτικού Νείλου, ο δάγκειος πυρετός, η ελονοσία κ.α. Παρά την προόδο στην ιατρική και τη δημόσια υγεία, τα κρούσματα ασθενειών από ελονοσία αλλά και από τις άλλες ασθένειες που μεταδίδονται από τα κουνούπια αυξάνονται σε παγκόσμιο επίπεδο. Υπάρχει η πιθανότητα ο ξενιστής που μεταδίδει τις ασθένειες να επανεμφανιστεί στις αναπτυγμένες χώρες όπως είναι η ΗΠΑ και η Ευρώπη. Το 2004, το ασιατικό κουνούπι τίγρης, που ενδημεί στην Ασία, την Αφρική και την Νότια Αμερική, εντοπίστηκε για πρώτη φορά στη Θεσπρωτία και την Κέρκυρα και έφερε στο προσκήνιο την απειλή των μολυσματικών ασθενειών στην Ελλάδα. Το 2011, καταγράφηκαν 101 επιβεβαιωμένα εργαστηριακά κρούσματα του ιού του δυτικού Νείλου καθώς και 8 θάνατοι. Επιπλέον, έχουν αναφερθεί 28 κρούσματα ελονοσίας, σε έλληνες που δεν έχουν επισκεφτεί περιοχές που ενδημεί η ελονοσία και διαμένουν στο δήμο Ευρώτα Λακωνίας, στην Εύβοια, στην ανατολική Αττική, στη Λάρισα και στη Βοιωτία. Το υπουργείο υγείας έχει δηλώσει ότι ο πιο αποτελεσματικός τρόπος για την καταπολέμηση των κουνουπιών είναι ο ψεκασμός. Ωστόσο, όπως είναι γνωστό η συνεχής χρήση συνθετικών εντομοκτόνων για τον έλεγχο των κουνουπιών έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη της ανθεκτικότητας καθώς και τις ανεπιθύμητες επιδράσεις σε οργανισμούς μη – στόχους. Επιπλέον, η χρήση των συμβατικών εντομοκτόνων στα ενδιαιτήματα των κουνουπιών (π.χ υδάτινες πηγές) δημιουργεί κινδύνους για τον άνθρωπο και το περιβάλλον. Ως εκ τούτου, υπάρχει μεγάλη ανάγκη για την ανακάλυψη αποτελεσματικών εντομοαπωθητικών. Τα τελευταία 15

χρόνια, η έρευνα για τα εντομοαπωθητικά έχει κινηθεί προς τα φυσικά προϊόντα που στοχεύουν όχι μόνο σε καθαρές βιοδραστικές ενώσεις αλλά και σε ενεργά εκχυλίσματα. Στον αναπτυσσόμενο κόσμο, εκτιμάται ότι 80% των ανθρώπων βασίζονται σε φυτικά φάρμακα λόγω τις διαθεσιμότητας τους και του χαμηλού κόστους. Σήμερα τα φυτικά απωθητικά είναι πιο αποδεκτά, ειδικά σε κοινωνίες με παράδοση στη χρήση φυτών, όπου τα συνθετικά προϊόντα μπορεί να θεωρούνται ανθυγιεινά. Εγχώρια προϊόντα μπορούν να παραχθούν σε τοπικό επίπεδο, γεγονός που μειώνει το κόστος τους και μπορεί να συμβάλει στην ενίσχυση της τοπικής και εθνικής οικονομίας. Στόχος είναι η κεφαλαιοποίηση της βιοποικιλότητας που υπάρχει στον φυτικό κόσμο, προκειμένου να αναπτυχθούν νέα μέσα για τον έλεγχο των φορέων των μεταδιδόμενων ασθενειών. Ελληνικά και άλλα μεσογειακά αρωματικά φυτά μπορούν να αξιοποιηθούν ως πρωτογενείς πηγές για την ταυτοποίηση βιοδραστικών εκχυλισμάτων και φυσικών συστατικών.

4.2 ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΩΝ ΠΡΟΣΔΕΤΩΝ ΚΑΙ OBPs

Από τις 60 OBPs που κωδικοποιούνται στο γονιδίωμα του ξενιστή της ελονοσίας του *Anopheles gambiae*, αρκετές βρέθηκαν να εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα στις κεραίες των θηλυκών[24]. Λόγω της σημαντικής συνεισφορά τους στη μεταγωγή του οσφρητικού σήματος, οι OBPs αποτελούν μοριακούς στόχους για τον σχεδιασμό νέων εντομοαπωθητικών. Πρόσφατα η μελέτη της κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου AgamOBP1 σε σύμπλοκο με το συνθετικό απωθητικό DEET πρότεινε για πρώτη φορά τις OBPs ως μοριακούς στόχους για το σχεδιασμό νέων εντομοαπωθητικών με βάση τη δομή [15]. Μεταξύ των OBPs πειράματα έχουν δείξει, ότι τα επίπεδα mRNA της AgamOBP4 στην κεραία του θηλυκού κουνουπιού αυξάνονται πριν το γεύμα και

μειώνονται μετά από αυτό, υποδεικνύοντας τη συμμετοχή της στην ανίχνευση του ανθρώπινου στόχου από το κουνούπι. Συνεπώς η AgamOBP4 αποτελεί εν δυνάμει στόχο για την εύρεση νέων βελτιωμένων εντομοαπωθητικών βάσει της δομής της [23].

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε με φθορισμομετρικές δοκιμές η ικανότητα δέσμευσης τριών προσδετών στην AgamOBP4. Αυτοί ήταν α) το ινδόλιο (indole) και η β) γερανυλο-ακετόνη (geranyl acetone) οι οποίες είναι φυσικές ουσίες, βρίσκονται στον ανθρώπινο ιδρώτα και διεγείρουν το οσφρητικό σύστημα του *An.gambiae*, καθώς επίσης και γ) το βενζοϊκό βενζύλιο (benzyl benzoate) το οποίο είναι συνθετικό εντομοαπωθητικό.

A) ΙΝΔΟΛΙΟ: [25]

Στον *An.gambiae* υπάρχουν περίπου 60 OBPs [26] και τα χαρακτηριστικά της έκφρασης μιας σειράς από αυτές σχετίζονται με τη συμπεριφορά του ξενιστή του κουνουπιού, [27],[28] γεγονός που υποδηλώνει ότι μπορεί να εμπλέκονται στη ρύθμιση των οσφρητικών αποκρίσεων έναντι συγκεκριμένων ανθρώπινων οσμών. Πρόσφατα αποδείχθηκε ότι η *An.gambiae* OBP1 απαιτείται για *in vivo* αποκρίσεις σε ινδόλιο και σε 3-μεθυλό ινδόλιο, [29] τα οποία είναι και τα δύο κύρια συστατικά του ανθρώπινου ιδρώτα που ελκύουν τα θηλυκά κουνούπια. Επιπλέον μελέτες προτείνουν ότι η απόκριση αυτή απαιτεί τον σχηματισμό ετεροδιμερών συμπλόκων μεταξύ της OBP1 και της OBP4 [30],[31]. Αυτό βασίστηκε στις εξής παρατηρήσεις: 1) η OBP4 έχει υψηλότερη συγγένεια για το ινδόλιο από την OBP1, 2) οι πρωτεΐνες συνεντοπίζονται στους αισθητήρες και 3) η OBP4 μπορεί να αυξήσει συνεργατικά την πρόσδεση μιας φθορίζουσας χρωστικής (1-NPN) με την OBP1 ή την OBP3 [31].

B) ΓΕΡΑΝΥΛΟ –ΑΚΕΤΟΝΗ:

Η γερανυλο-ακετόνη εκτός από τον ανθρώπινο ιδρώτα βρίσκεται και στα φύλλα του δένδρου *Suregada zanzibariensis*. Παραδοσιακές αφρικανικές κοινότητες χρησιμοποιούν ως αποθητικά πτητικές ουσίες από ορισμένα φυτά οι οποίες παράγονται από άμεση καύση ή με θερμική αποβολή και παίζουν σημαντικό ρόλο στην προστασία των νοικοκυριών από τους ξενιστές της ελονοσίας και των άλλων ασθενειών. Έρευνα σχετικά με τα πτητικά συστατικά των φυτών, έδειξε ότι μερικά είναι καλές πηγές για τη δημιουργία ισχυρών αποθητικών για τα κουνούπια. Σε αυτήν την πρωτοβουλία βιοαναδίφησης, το αιθέριο έλαιο που βρίσκεται στα φύλλα του δένδρου *Suregada zanzibariensis* ελέγχθηκε έναντι του κουνουπιού *An.gambiae* και βρέθηκε να είναι αποθητικό. Με τη χρήση διάφορων τεχνικών ταυτοποιήθηκαν οι ενώσεις στο αιθέριο έλαιο με κύρια συστατικά τις κετόνες τερπενοειδών, τη φαινυλακεταλδεΰδη, την αρτεμισία κετόνη, την βερβενόνη και τέλος την γερανυλ-ακετόνη. Μίγματα των κύριων συστατικών σε αναλογία με αυτές που βρέθηκαν στο αιθέριο έλαιο ήταν περισσότερο αποθητικά στον *An.gambiae* από ότι ήταν το αρχικό έλαιο, η παρουσία της αρτεμισίας ακετόνης στο μίγμα προκάλεσε σημαντική αύξηση στην αποθητικότητα του συγκεκριμένου μίγματος. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι μίγματα ορισμένων τερπενοειδών κετόνων μπορούν να χρησιμεύσουν ως αποτελεσματικό αποθητικό για το κουνούπι *An.gambiae* [32]

Γ) ΒΕΝΖΟΪΚΟ ΒΕΝΖΥΛΙΟ:

Στον Β' παγκόσμιο πόλεμο το βενζοϊκό βενζύλιο χρησιμοποιήθηκε ως ακαρεοκτόνο και αποτέλεσε πρότυπο για την ανάπτυξη απωθητικών για τα υφάσματα. Οι επιστήμονες ανακάλυψαν μια σειρά από ουσίες που ήταν πιο ισχυρές από το χρησιμοποιούμενο μέχρι τότε διμεθυλφαιλικό, για τον εμποτισμό των ενδυμάτων για την προστασία από τις προνύμφες των ακάρεων. Το βενζοϊκό βενζύλιο επιλέχθηκε λόγω της ταχείας δράσης του ενάντια στα ακάρεα και του εντοπισμού του στα ρούχα ακόμη και μετά το πλύσιμο. Χρησιμοποιήθηκε σε διάφορα μίγματα για τον εμποτισμό των ρούχων για την προστασία από κουνούπια, σκνίπες κ.α [33].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

5.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Αρκετές τεχνικές έχουν χρησιμοποιηθεί για την μελέτη σύνδεσης του προσδέτη με συγκεκριμένες OBPs καθώς και με τις δομικά συναφείς PBPs για αρκετά είδη λεπιδόπτερων εντόμων [34-39]. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της προσαρμοστικότητας της έχει η ανάλυση με φθορισμό η οποία αναπτύχθηκε πρώτα για την μελέτη των OBPs στα σπονδυλωτά (λιποκαλίνες) και αργότερα εφαρμόστηκε στις OBPs και PBPs των εντόμων [40-42]. Αυτή η τεχνική χρησιμοποιεί φθορίζουσες ενώσεις, που μεταβάλλουν το φάσμα εκπομπής τους κατά τη συνδεσή τους στο υδρόφοβο θύλακα της OBP, με κύρια χαρακτηριστικά μια κυανή μετατόπιση(μικρότερα μήκη κύματος) του φάσματος εκπομπής και μια σημαντική αύξηση της έντασης. Μέσω τέτοιων τεχνικών, έχει αποδειχθεί ότι συγκεκριμένοι προσδέτες συνδέονται με τις OBPs και τις

PBPs των λεπιδόπτερων με σταθερές διάστασης της τάξεως των μM [41].

Για να χρησιμοποιήσουμε όμως την τεχνική του φθορισμού πρέπει πρώτα να έχει γίνει καθαρισμός και απομόνωση της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει, στη συγκεκριμένη περίπτωση της AgamOBP4.

5.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ

5.2.1 ΣΤΕΡΕΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ [23]

Ως καλλιέργεια βακτηρίων χαρακτηρίζεται η ανάπτυξη μεγάλου αριθμού βακτηρίων σε ελεγχόμενες συνθήκες. Για την απομόνωση ενός κλώνου του γονιδίου της OBP4 αρχικά παρασκευάζεται στερεή καλλιέργεια αποτελούμενη από αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό Luria-Broth medium-agar (LB: 10g tryptone, 5g yeast extract, 10g NaCl, και 15gr άγαρ ανά λίτρο διαλύματος, pH 7.0). Σε 30ml LB-άγαρ, προστίθενται αντιβιοτικά σε τελική συγκέντρωση 50 $\mu\text{g/ml}$ καρβενικιλίνη, 12.5 $\mu\text{g/ml}$ τετρακυκλίνη και 15 $\mu\text{g/ml}$ καναμυκίνη. Τέλος πραγματοποιείται διασπορά με κύτταρα Origami B μετασχηματισμένα με το πλασμίδιο PET-22b(+)-OBP4 και επώαση στους 37°C για 48 ώρες.

5.2.2 ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΜΕ ΕΠΑΓΩΓΗ [23]

Με τον όρο επαγωγή περιγράφεται η ικανότητα μιας ουσίας να επάγει την έκφραση μιας πρωτεΐνης. Το οπερόνιο της λακτόζης είναι απαραίτητο για τη μεταφορά και το μεταβολισμό της λακτόζης σε βακτήρια *E.coli*. Στην συγκεκριμένη εργασία σαν επαγωγέας του lac οπερονίου χρησιμοποιήθηκε το IPTG αφού μπορεί να προσδένεται στο

Iac καταστολέα λόγω της δομικής ομοιότητας με τη λακτόζη καθώς επίσης και λόγω που δεν μεταβολίζεται από τα βακτήρια E.coli με αποτέλεσμα να παραμένει σταθερή η συγκέντρωση του.

Για την υπερέκφραση της AgamOBP4 40 ml θρεπτικού μέσου LB με τα κατάλληλα αντιβιοτικά εμβολιάστηκαν με μια μεμονωμένη αποικία βακτηρίων και επωάστηκαν στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση για 18h. Στη συνέχεια καλλιέργεια αυτή χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό 1 Lt θρεπτικού υλικού LB με τα κατάλληλα αντιβιοτικά σε αναλογία 1:30. Η καλλιέργεια επωάστηκε στους 37°C υπό ανάδευση έως ότου η απορρόφηση στα 600nm λάβει τιμή 0.6. Λαμβάνεται 1 ml δείγμα καλλιέργειας για ανάλυση με SDS-PAGE. Ακολουθεί επαγωγή της έκφρασης με την προσθήκη IPTG σε τελική συγκέντρωση 1mM. Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στα 4000xg για 30min, στους 4°C και το κυτταρικό ίζημα φυλάσσεται στον πάγο.

5.2.3 ΛΥΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ [23]

Η λύση των κυττάρων είναι μια μέθοδος που περιλαμβάνει τη διάρρηξη της εξωτερικής μεμβράνης τους με αποτέλεσμα την απελευθέρωση των ενδοκυτταρικών τους σωματιδίων. Μια μέθοδος για να γίνει λύση των κυττάρων είναι η επεξεργασία λυσοζύμης που προκαλεί τη διάσπαση του κυτταρικού τοιχώματος σε συνδυασμό με την εφαρμογή υπερήχων στο κυτταρικό διάλυμα.

Το βακτηριακό ίζημα επαναδιασπείρεται σε 20ml ρυθμιστικού διαλύματος λύσης (10mM Tris-HCL, 2mM EDTA, 0.1% Triton, 1mM PMSF και μίγμα αναστολέων Roche complete (1x)). Ακολουθεί λύση των κυττάρων με υπερήχους. Στη συνέχεια προστίθεται 1μl βενζονάση, η οποία είναι μια ενδονουκλεάση και χρησιμοποιείται για την μείωση του

ιζώδους του κυτταρικού λύματος και το διάλυμα αναδύεται ήπια για 30min στους 4⁰C.

5.2.4 ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΣΩΜΑΤΙΩΝ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ [23]

Τα κύτταρα αποτρέπουν τη συσσώρευση πιθανόν τοξικών συσσωματωμάτων με κατασταλτικούς μηχανισμούς που αναστέλλουν στο σχηματισμό τους είτε με τις συνοδούς πρωτεΐνες ή με το πρωτεάσωμα που αποικοδομεί τις λάθος αναδιπλωμένες πρωτεΐνες. Σε περίπτωση που τα συσσωματώματα σχηματιστούν είναι ανθεκτικά στην πρωτεόλυση, σχηματίζουν σωματία εγκλεισμού. Η υπερέκφραση της OBP4 οδηγεί στον σχηματισμό σωματίων εγκλεισμού και γι' αυτό απαιτείται η αναδιπλωσή της.

Τα σωματία εγκλεισμού παραλαμβάνονται με φυγοκέντρηση στα 15000x g για 30min στους 4⁰C. Λαμβάνεται μικρό δείγμα του ιζήματος για ανάλυση με SDS-PAGE.

5.2.5 ΕΚΠΛΥΣΗ ΚΑΙ ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ ΤΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ [23]

Η έκπλυση των σωματίων εγκλεισμού γίνεται με τη χρησιμοποίηση του ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης (Wash Buffer, 50mM Tris-HCl, 2mM EDTA, 300mM NaCl, 1mM PMSF, pH 8.0). Το διάλυμα έκπλυσης χωρίζεται σε δύο μέρη στο ένα εκ των οποίων προστίθενται Triton-X σε τελική συγκέντρωση 0.1%. Ακολουθεί έκπλυση δυο φορές των σωματίων εγκλεισμού με το διάλυμα έκπλυσης και το Triton-X και δυο φορές χωρίς το Triton-X. Η διασπορά των σωματίων εγκλεισμού γίνεται με τη βοήθεια ομογενοποιητή. Μετά από

κάθε έκπλυση ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 17000 x g για 1 ώρα στους 4°C.

Για την αποδιάταξη των σωμάτων εγκλεισμού παρασκευάζεται διάλυμα αποδιάταξης το οποίο αποτελείται από: 0.1M Tris, 6M υδροχλωρική γουανιδίνη, 2mM EDTA και 80mM ανηγμένη γλουταθειόνη GSH. Στη συνέχεια τα σωμάτια εγκλεισμού τοποθετούνται στο πάγο και προστίθενται 13,5ml διαλύματος αποδιάταξης, το μίγμα ομογενοποιείται και αναδύεται ήπια. Η αποδιατεταγμένη πρωτεΐνη διαυγάζεται με φυγοκέντρωση στα 17000 x g για 30min στους 4°C και προστίθεται στάγδην με προχοΐδα στο παγωμένο διάλυμα αναδίπλωσης υπό ήπια ανάδευση.

5.2.6 ΑΝΑΔΙΠΛΩΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΥΚΝΩΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ [23]

Για να αναδιπλωθεί σωστά η πρωτεΐνη θα πρέπει το τελικό διάλυμα της αναδίπλωσης η πρωτεϊνική συγκέντρωση να κυμαίνεται στα 30-150μg/ml και η αναλογία ανηγμένης/ οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSH/GSSG) να είναι 4/1.

Το διάλυμα της πρωτεΐνης διαυγάζεται μέσω φίλτρου 0.22μm (Millipore) και συμπυκνώνεται σε μικρό όγκο (εώς 35 ml περίπου) με χρήση της κασέτας συμπύκνωσης Pellicon XL Filter (Millipore) στους 4°C.

5.2.7 ΔΙΑΠΙΔΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ [23]

Η διαπίδυση είναι μια διαδικασία που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών από μικρά μη επιθυμητά μόρια. Το διάλυμα πρωτεΐνης τοποθετείται σε μια μεμβράνη (συνήθως κυτταρίνη) και στη συνέχεια εμβαπτίζεται σε μεγάλο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος

κατάλληλης ιονικής ισχύος. Η μεμβράνη επιτρέπει την ανταλλαγή των μορίων του διαλύματος αλλά αποκλείει τη διαφυγή της πρωτεΐνης που είναι εγκλωβισμένη σε αυτή λόγω του μεγάλου μοριακού της βάρους.

Η αναδιπλωμένη πρωτεΐνη τοποθετείται εντός της μεμβράνης διαπίδυσης και τίθεται δύο φορές για διαπίδυση σε 1lt διαλύματος 10mM Tris(HCl), pH8.0 στους 4°C. Στη συνέχεια παραλαμβάνεται η πρωτεΐνη και διαυγάζεται με φυγοκέντρηση 15000xg για 15min στους 4°C.

5.2.8 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ [23]

Ο διαχωρισμός βάσει μεγέθους των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται με την τεχνική της χρωματογραφίας μοριακής διήθησης σε πηκτή. Το δείγμα τοποθετείται στην κορυφή της στήλης που αποτελείται από πορώδεις κόκκους από αδιάλυτο πολυμερές. Μικρά μόρια περνούν διαμέσου αυτών των κόκκων αλλά τα μεγαλύτερα δεν μπορούν να περάσουν, με αποτέλεσμα τα μικρά μόρια να κατανέμονται στο υδάτινο περιβάλλον μέσα στους κόκκους και ανάμεσά τους, ενώ τα μεγάλα μόρια βρίσκονται μόνο μεταξύ των κόκκων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα μόρια μεγάλου μοριακού βάρους να εκλούνται σε μικρότερους όγκους (γρηγορότερα) σε σχέση με τα μικρότερα και έτσι να επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός βάσει του μοριακού βάρους.

Ο καθαρισμός της πρωτεΐνης με χρωματογραφία πραγματοποιήθηκε σε σύστημα FPLC το οποίο περιλαμβάνει ρυθμιστή της ταχύτητας ροής των διαλυμάτων και του δείγματος στη στήλη, συσκευή συλλογής κλασμάτων και φωτόμετρο υπεριώδους.

Η στήλη εξισορροπείται με διάλυμα έκπλυσης (150mM οξικό νάτριο, pH 5.0) και έκλυση των πρωτεϊνών με το διάλυμα έκπλυσης (150mM οξικό νάτριο, 200mM χλωριούχο νάτριο, pH5.0). Ακολούθως

παραλαμβάνονται τα κλάσματα που αντιστοιχούν στην κορυφή της καμπύλης έκλυσης και γίνεται ηλεκτροφόρηση τους σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου 15%. Στη συνέχεια βάσει της ηλεκτροφόρησης συλλέγονται τα κλάσματα που περιέχουν πρωτεΐνη και τίθενται για διαπίδυση έναντι διαλύματος 150mM οξικού νατρίου, pH 5.0 στους 4°C. Στο επόμενο στάδιο η πρωτεΐνη διαυγάζεται με φυγοκέντρηση 17000 xg για 30min, στους 4°C και το υπερκείμενο φυλάσσεται. Η πρωτεΐνη συμπυκνώνεται με φίλτρο 10KD MWCO (15ml) με υπερδιήθηση στα 3500xg, 4°C. Το τελικό δείγμα πρωτεΐνης διαυγάζεται με φυγοκέντρηση στα 11000xg για 10 λεπτά στους 4°C.

5.3 ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ

5.3.1 ΦΘΟΡΙΣΜΟΣ [43]

Η συγγένεια της OBPs με τους προσδέτες (ινδόλιο, γερανυλακετόνη και βενζοϊκό βενζύλιο), αξιολογήθηκε εμμέσως με προσδιορισμό της εκτόπισης του φθορίζοντα ιχνηθέτη N-φαινυλό-1-ναφθυλαμίνη (N- phenyl-1-naphthylamine, 1-NPN) από τους προσδέτες [44]. Τα φάσματα εκπομπής καταγράφηκαν σε φθορισμόμετρο μικροπλακών, στους 30°C χρησιμοποιώντας μαύρα δοκίμια (plate) των 96 βοθρίων.

Το μέγιστο εκπομπής του ελεύθερου 1-NPN μετά από διέγερση στα 337nm είναι 460 nm, ενώ παρουσία της AgamOBP4 είναι μεταξύ 408 και 410nm, οπότε και καταγράφηκαν τα φάσματα εκπομπής από 380 nm έως 476 nm. Επίσης ελήφθησαν τα φάσματα των προσδετών και του 1-NPN στο ρυθμιστικό διάλυμα απουσία πρωτεΐνης και αφαιρέθηκαν από τα φάσματα του προσδέτη με την πρωτεΐνη.

Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 200μl. Το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για όλες τις μετρήσεις ήταν το PBS σε pH 7.0. Οι διάφορες αραιώσεις του 1-NPN και των προσδετών που μελετήθηκαν παρασκευάστηκαν κατάλληλα σε 100% DMSO ώστε η τελική συγκέντρωση DMSO σε κάθε δείγμα να είναι 2%.

Η σταθερά διάστασης του ιχνηθέτη (K_d^{1-NPN}) προσδιορίστηκε σε πρωτεϊνικά διαλύματα τα οποία περιείχαν 2μM AgamOBP4 και διάφορες συγκεντρώσεις 1-NPN (0-50μM), ο υπολογισμός της K_d^{1-NPN} πραγματοποιήθηκε από γραφική παράσταση της έντασης φθορισμού σε συνάρτηση της συγκέντρωσης του 1-NPN. Ο προσδιορισμός της K_d των προσδετών πραγματοποιήθηκε παρουσία 2μM AgamOBP4, σταθερή συγκέντρωση 1-NPN (20 μM) και διάφορες συγκεντρώσεις του υπό μελέτη προσδέτη (π.χ. 0-500μM). Τα δεδομένα αναλύθηκαν με τη χρήση του προγράμματος μη γραμμικής παλινδρόμησης Grafit [45].

5.3.2 ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ [43]

Τα δεδομένα φθορισμού (F) που προέκυψαν από την τιτλοδότηση της πρωτεΐνης με 1-NPN προσαρμόστηκαν στην εξίσωση κορεσμού για ένα κέντρο σύνδεσης: $F = \frac{F_{max} \cdot [L]}{K_d + [L]}$ (εξίσωση 1). Όπου, F η ένταση φθορισμού σε κάθε συγκέντρωση προσδέτη (ανάλογη της συγκέντρωσης του συμπλοκοποιημένου προσδέτη), F_{max} η ένταση του φθορισμού σε κορεσμό προσδέτη (ανάλογη με τη μέγιστη ικανότητα πρόσδεσης του προσδέτη), [L] η εκάστοτε συγκέντρωση του προσδέτη και K_d η σταθερά διάστασης του 1-NPN. Για τον προσδιορισμό της σταθεράς διάστασης του βενζοϊκού βενζυλίου αρχικά υπολογίστηκε το κλάσμα του 1-NPN (Y) μέσω της εξίσωσης $Y = 1 - ((F_L - F_{min}) / (F_{max} - F_{min}))$ (εξίσωση 2) όπου: η F_{max} είναι η ένταση φθορισμού της AgamOBP4 που δημιουργεί

σύμπλοκο με το 1-NPN απουσία του βενζοϊκού βενζολίου, η F_{\min} είναι η ένταση φθορισμού του βενζοϊκού βενζολίου σε συγκέντρωση κορεσμού και το F_L είναι η ένταση φθορισμού στην εκάστοτε συγκέντρωση του προσδέτη.

Το κλάσμα του 1-NPN ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του βενζοϊκού βενζολίου προσαρμόστηκε στην εξίσωση κορεσμού για ένα κέντρο σύνδεσης $Y = Y_{\max} * [L] / (K_{d, app} + [L])$ (εξίσωση 3) όπου: το Y_{\max} ισούται με το κλάσμα του 1-NPN που εκτοπίζεται σε άπειρη συγκέντρωση προσδέτη, το $[L]$ είναι η εκάστοτε συγκέντρωση του προσδέτη και το $K_{d, app}$ είναι η συγκέντρωση του προσδέτη που απαιτείται για να εκτοπίσει το ήμισυ του δεσμευμένου 1-NPN, η οποία θεωρείται ως η φαινομενική σταθερά διαστάσεως του αντίστοιχου προσδέτη.

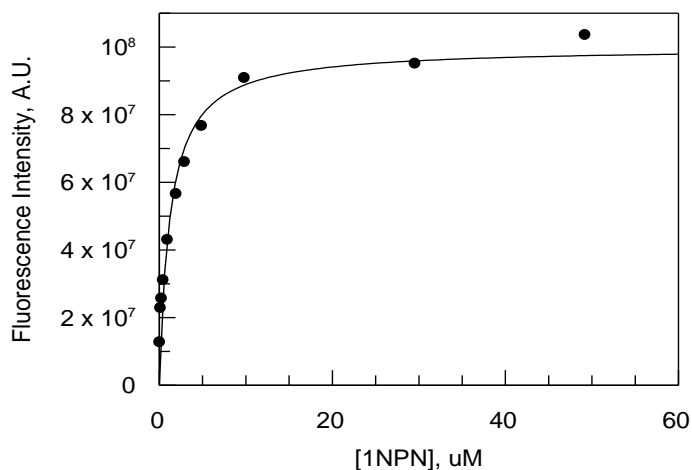
Από την φαινόμενη σταθερά διάστασης, η σταθερά διάστασης του βενζοϊκού βενζολίου $K_d^{benzyl\ benzoate}$ υπολογίστηκε βάσει της εξίσωσης $K_d^{benzyl\ benzoate} = K_{d, app} / (1 + [1-NPN] / K_d^{1-NPN})$ (εξίσωση 4), όπου: το 1-NPN είναι η συγκέντρωση του ιχνηθέτη (20 μM) και η K_d^{1-NPN} είναι η σταθερά διάστασης του συμπλόκου AgamOBP4/1-NPN.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

A) 1-NPN

Η K_d του 1-NPN για την AgamOBP4 προσδιορίστηκε να είναι 1.23 μM . Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

1-NPN	0,0.1,0.2,0.3,0.5, 1,2,3,5, 10,20,30, και 50 μM
AgamOBP4	2 μM

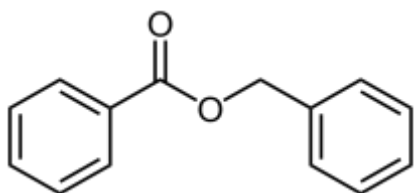


Γραφική παράσταση 1: Καμπύλη φθορισμού της AgamOBP4 συναρτήσει της συγκέντρωσης 1-NPN

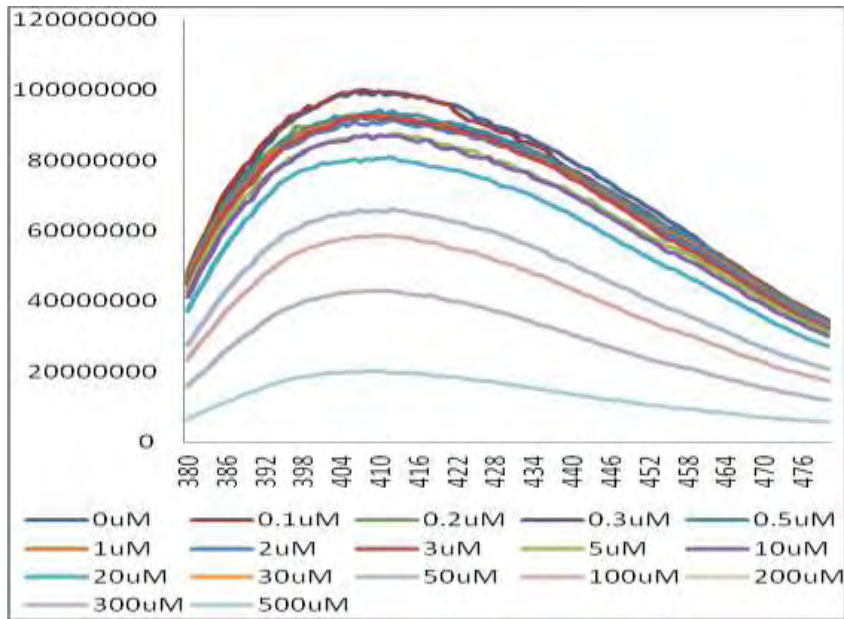
B) Βενζοϊκό Βενζόλιο

Η K_d του βενζοϊκού βενζολίου για την AgamOBP4 προσδιορίστηκε να είναι 2.44 μ M. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

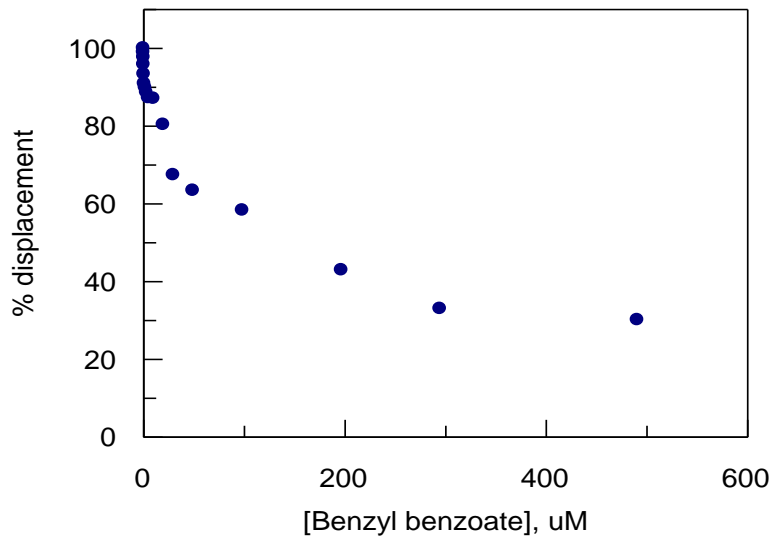
Βενζοϊκό βενζόλιο	0,0.1,0.2,0.3,0.5,2,3,5, 10,20,30,50,100,200,300, και 500 μ M
1-NPN	20 μ M
AgamOBP4	2 μ M



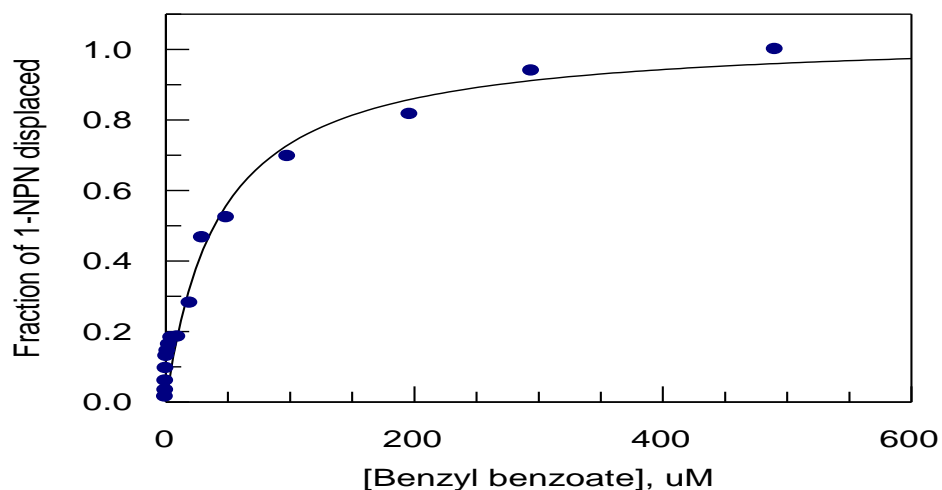
Σχήμα 1: χημική δομή του βενζοϊκού βενζολίου



Διάγραμμα (Α)



Διάγραμμα (Β)



Διάγραμμα (Γ)

Γραφική παράσταση 2: (Α) Φάσματα φθορισμού της AgamOBP4 σε διάφορες συγκεντρώσεις του βενζοϊκού βενζολίου, (Β) % εκτόπιση του 1-NPN συναρτήση της συγκέντωσης του βενζοϊκού βενζολίου,

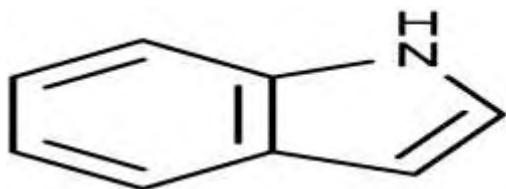
Γ) Καμπύλη του κλάσματος του εκτοπισμένου 1-NPN συναρτήση διαφόρων συγκεντρώσεων βενζοϊκού βενζολίου από το οποίο υπολογίζεται η $K_{d, app}$ του βενζοϊκού βενζολίου να είναι $42.19\mu\text{M}$. Μέσω της εξίσωσης (4) η K_d του βενζοϊκού βενζολίου υπολογίστηκε να είναι $2.44\mu\text{M}$.

Γ) Ινδόλιο

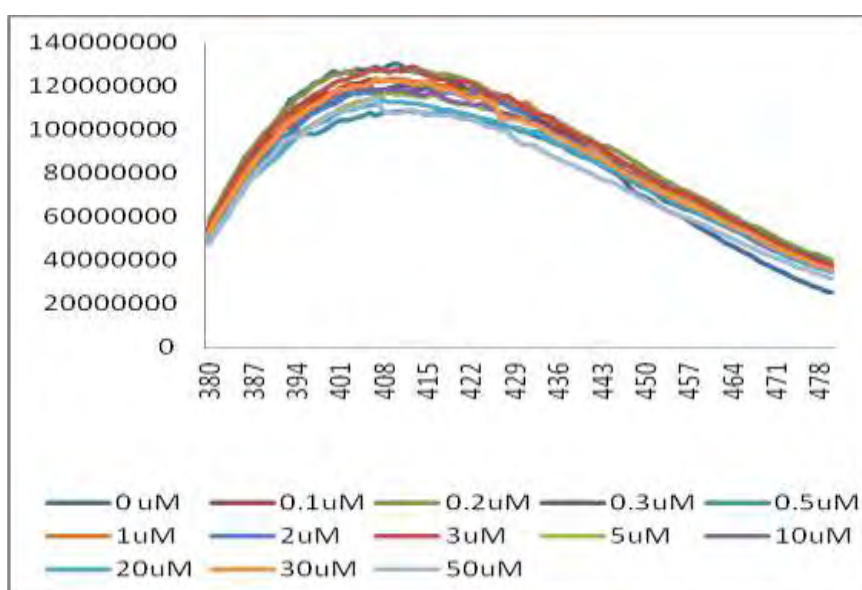
Η μέγιστη εκτόπιση του 1-NPN που επιτυγχάνεται ανέρχεται σε 18% σε συγκέντρωση ινδολίου $50\mu\text{M}$. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στο παρακάτω πίνακα.

Στη περίπτωση αυτή δε είναι δυνατός ο προσδιορισμός της $K_{d, app}$ και ως εκ τούτου της K_d , καθώς δεν επιτυγχάνεται εκτόπιση του 1-NPN κατά 50% όπως απαιτείται για την εφαρμογή της εξίσωσης (4).

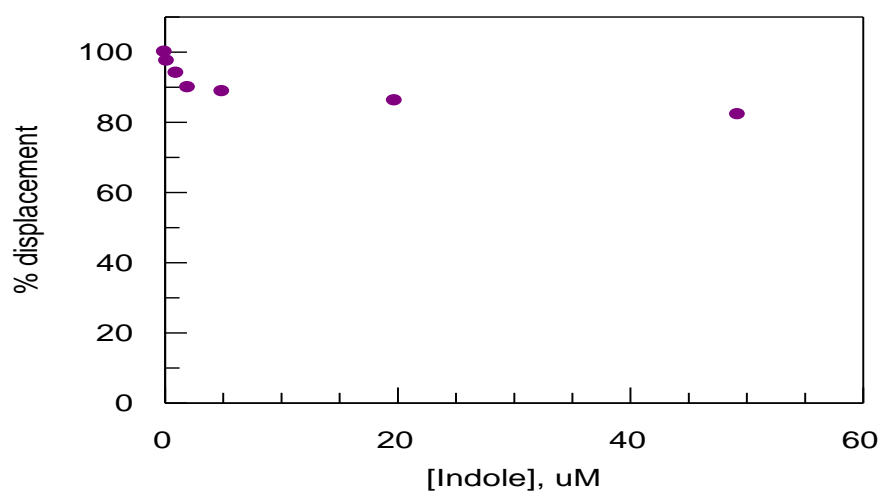
Ινδόλιο	0,0.1,0.2,0.3,0,5, 1,2,3,5, 10,20,30, και 50µM
1-NPN	20µM
AgamOBP4	2µM



Σχήμα 2: χημική δομή του ινδολίου



Διάγραμμα (Α)



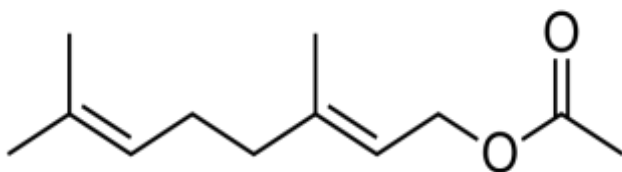
Διάγραμμα (Β)

Γραφική παράσταση 3: (Α) Φάσματα φθορισμού της AgamOBP4 σε διάφορες συγκεντρώσεις του ινδολίου, (Β) % εκτόπιση του 1-NPN, συναρτήσει της συγκέντρωσης του ινδολίου

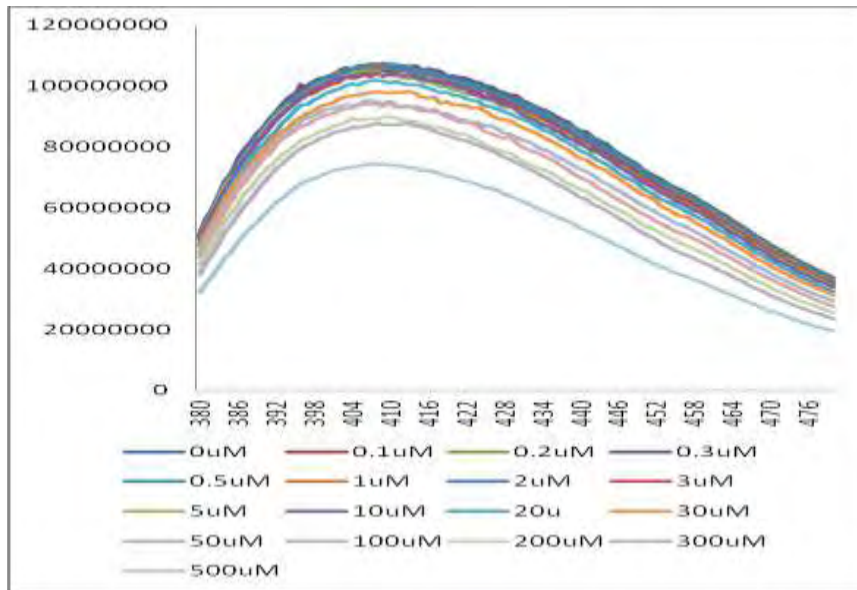
Δ) Γερανύλ-ακετόνη

Παρόμοια με το ινδόλιο ο προσδιορισμός της K_d δεν κατέσται δυνατός. Η μέγιστη εκτόπιση του 1-NPN που επιτυγχάνεται ανέρχεται σε 24% σε συγκέντρωση γερανύλ-ακετόνης 500 μ M. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στο παρακάτω πίνακα:

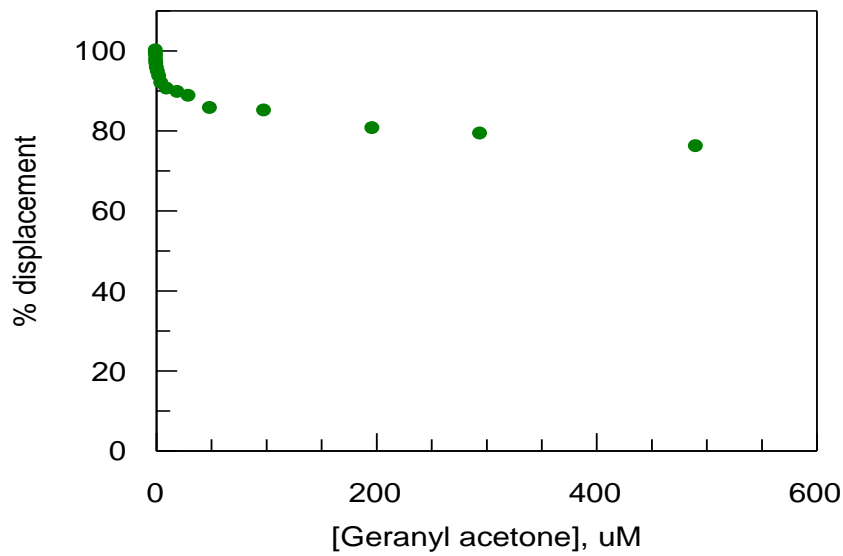
Γεραούλ-ακετόνη	0,0.1,0.2,0.3,0.5,2,3,5, 10,20,30,50,100,200,300, και 500 μ M
1-NPN	20 μ M
AgamOBP4	2 μ M



Σχήμα 3 : Χημική δομή της γερανύλ-ακετόνης



Διάγραμμα (A)

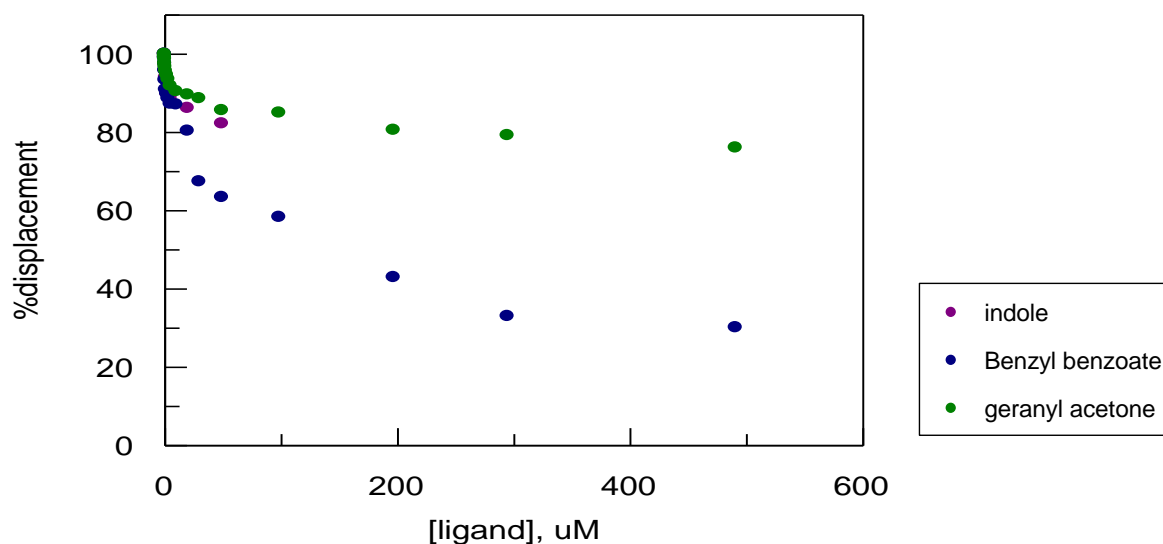


Διάγραμμα (B)

Γραφική παράσταση 4: (A) Φάσματα φθορισμού της AgamOBP4 σε διάφορες συγκεντρώσεις γερανύλ-ακετόνη. (B) % εκτόπιση του 1-NPN, συναρτήσεως της συγκέντρωσης της γερανύλ-ακετόνης.

E) Συγκριτική γραφική παράσταση

Η σύγκριση των τριών προσδετών υπέδειξε ότι το βενζοϊκό βενζόλιο είναι ισχυρός προσδέτης ενώ το ινδόλιο και η γερανύλ-ακετόνη αποτελούν ασθενείς προσδέτες για την AgamOBP4. Ως εκ τούτου το βενζοϊκό βενζόλιο αποτελεί ένα μόριο οδηγό για περαιτέρω βελτιστοποίηση με την προσέγγιση του σχεδιασμού με βάση τη δομή της OBP4.



Γραφική παράσταση 5: Καμπύλες % εκτόπιση του 1-NPN, συναρτήσει των συγκεντρώσεων και των τριών προσδετών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η προσέγγιση που εστιάζει στη δομή των OBPs θα αποφέρει αποτελέσματα που θα ενισχύσουν σημαντικά την κατανόηση των μηχανισμών που ελέγχουν την αντίληψη των οσμών από τις OBPs σε μοριακό επίπεδο. Πιο σημαντικό, ο σχεδιασμός βελτιωμένων εντομοαπωθητικών με βάση τη δομή των OBPs, θα παρέχει πολλαπλούς, νέους και αποτελεσματικούς διαταράκτες της συμπεριφοράς αναζήτησης του ξενιστή, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην προσπάθεια να μειωθεί η εξάπλωση μολυσματικών ασθενειών που μεταδίδονται από έντομα.

Στη προσπάθεια αυτή θα πρέπει να μελετηθεί ένας μεγάλος αριθμός προσδετών με γνωστή εντομοαπωθητική δράση, ώστε να ανακαλυφθούν μόρια οδηγού (lead compounds) που στη συνέχεια θα χρησιμοποιηθούν στο σχεδιασμό νέων εντομοαπωθητικών με αυξημένη αποτελεσματικότητα και εξειδίκευση. Ένα σημαντικό στάδιο σε αυτή τη διαδικασία είναι μελέτη σύνδεσης στο διάλυμα των υποψήφιων ενώσεων με τις OBPs στόχους όπως έγινε στα πλαίσια της παρούσας εργασίας. Το επόμενο βήμα είναι η δομική μελέτη των ισχυρών προσδετών με τη μέθοδο τις πρωτεϊνικής κρυσταλλογραφίας X που μπορεί να αποκαλύψει τον τρόπο σύνδεσης και την πηγή της συγγένειας σε μοριακό επίπεδο. Η τρισδιάστατη δομή των συμπλόκων OBP-προσδετών αποτελεί το πρώτο βήμα στη διαδικασία ορθολογικού σχεδιασμού με βάση τη δομή.

Οι μέθοδοι πρόσδεσης στο διάλυμα μπορούν είτε να παρέχουν ενώσεις που συνδέονται σε πολλαπλούς στόχους OBPs ή μίγματα διαφορετικών ενώσεων, τα οποία μπορεί να συνδέονται σε μεμονωμένες OBPs. Απωθητικά / ελκυστικά με αυξημένη συγγένεια για τις OBPs μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις και να ανιχνευθούν σε μεγάλες αποστάσεις, επομένως, θα μπορούσαν να

ενσωματωθούν σε συστήματα χρόνο-ελεγχόμενης αποδέσμευσης των ενεργών συστατικών στον αέρα (εντομοαπωθητικά χώρου). Ως εκ τούτου, θα προστατεύουν το σύνολο του χώρου, αποφεύγοντας την ανάγκη για την άμεση εφαρμογή των απωθητικών στο σώμα. Αυτό είναι σημαντικό για τα κουνούπια που προτιμούν εσωτερικούς χώρους και ανθρώπους κατά τη διάρκεια του ύπνου τους π.χ. *A. gambiae*. Τέτοια προϊόντα, έχουν τη δυνατότητα να παρέχουν πληρέστερη, ασφαλέστερη και μεγαλύτερης διάρκειας προστασία από τα συμβατικά απωθητικά και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μέρος μιας ευρύτερης στρατηγικής για τον έλεγχο των κουνουπιών. Επιπλέον, η εφαρμογή αυτής της προσέγγισης σε άλλα είδη κουνουπιών θα μας επιτρέψει την τελειοποίηση απωθητικών μιγμάτων για συγκεκριμένες γεωγραφικές περιοχές, όπου οι πληθυσμοί των κουνουπιών και οσφρητική μηχανισμοί μπορεί να διαφέρουν. Η προσέγγισή αυτή είναι σε θέση να προσφέρει προενεργή πρόληψη των απειλών για τον άνθρωπο ή τα ζώα και είναι επίσης φιλική προς το περιβάλλον, δεδομένου ότι στοχεύουν σε συγκεκριμένες OBPs που εμπλέκονται στην ανίχνευση του ανθρώπων ξενιστών από θηλυκά κουνούπια. Κατά πάσα πιθανότητα αυτές οι OBPs θα παίζουν ένα εντελώς διαφορετικό ρόλο σε ωφέλιμα έντομα. Επίσης τα αποτελέσματα των μεθόδων θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν για την ταυτοποίηση γονιδίων OBPs βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος π.χ. για τη δημιουργία αισθητήρων οσμών με βάση OBPs.

Παρά την προσπάθεια ανάπτυξης ανθελονοσιακών εμβολίων και φαρμάκων, γενετικά τροποποιημένων κουνουπιών, ασφαλέστερων και αποτελεσματικότερων εντομοκτόνων, τα εντομοαπωθητικά είναι συνήθως η πρώτη γραμμή άμυνας κατά των νοσημάτων που μεταδίδονται από έντομα επειδή δεν απαιτούν (i) μεγάλο εξοπλισμό, (ii) οργανωμένη προσπάθεια από τις υπηρεσίες ελέγχου των φορέων, και (iii) διανέμουν την ευθύνη της προστασίας στα άτομα.

Επί του παρόντος, τα πιο δραστικά αποθητικά συστατικά είναι το DEET (N,N-δισαιθυλο-μ-τολουαμίδιο), picaridin (2-(2-υδροξυαιθυλο)πιπεριδινό-1-καρβοξυλικό δευτ.βουτύλιο), PMD (π-μινθανοδιόλη-3,8), DEPA (N, N-δισαιθυλ-2-φαινυλ-αιθαναμίδιο) και IR3535 (αιθυλ-βουτυλ-ακετυλ-αμινοπροπιονικό). Ενώ έχει αποδειχθεί ότι τα DEET, picaridin και IR3535 έχουν στόχο τη λειτουργία των οσφρητικών υποδοχέων, ο τρόπος δράσης τους είναι σε μεγάλο βαθμό άγνωστος. Σήμερα, το DEET είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο εντομοαποθητικό. Πρόσφατα, έχει προταθεί ότι αναστέλλει τα κανάλια κατιόντων ασβεστίου και αναστέλλει τη δράση της χολινεστεράσης στα θηλαστικά. Αυτά τα ευρήματα εγείρουν κάποια ανησυχία ως προς την ασφάλεια του προϊόντος αυτού για ανθρώπους και ζώα. Επίσης, η χρήση του DEET, λόγω του υψηλού κόστους της και της ανάγκης για επαναλαμβανόμενη εφαρμογή στο δέρμα σε υψηλές συγκεντρώσεις (10-70%), δεν προτιμάται σε τροπικές χώρες. Επιπρόσθετα, όλα τα επί του παρόντος χρησιμοποιούμενα αποθητικά, συμπεριλαμβανομένων του DEET, καθίστανται αναποτελεσματικά λίγες ώρες μετά την εφαρμογή τους. Με την αύξηση των προβλημάτων της ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα και την αυξανόμενη ανησυχία του κοινού σχετικά με την ασφάλεια, νέες, ασφαλέστερες δραστικές ενώσεις απαιτούνται για να αντικαταστήσουν τα υπάρχοντα αποθητικά στην αγορά.

Η ελονοσία καθώς και οι άλλες μεταδιδόμενες ασθένειες από τα κουνούπια χρήζουν άμεσης αντιμετώπισης ακόμα και από τις αναπτυσσόμενες χώρες όπως οι Ελλάδα, γι' αυτό και η έρευνα πλέον στρέφεται προς την κατασκευή ασφαλέστερων αποθητικών, με τη χρήση φυτικών ουσιών και συνθετικών ενώσεων, τα οποία θα είναι φιλικότερα προς τον άνθρωπο και το περιβάλλον αλλά και πιο ισχυρά για την καταπολέμηση των κουνουπιών και την μετάδοση των ασθενειών από αυτά.

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. <http://www.konstantopouleio.gr/images/files/enl/ekpaideutiko/ekp2/Elonosia/Enimerosi.pdf>
2. http://www.keelpno.gr/Portals/0/%CE%91%CF%81%CF%87%CE%B5%CE%AF%CE%B1/%CE%95%CE%BB%CE%BF%CE%BD%CE%BF%CF%83%CE%AF%CE%B1/malaria_faqs.pdf
3. <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/mosquitoes/>
4. Willem Takken and Bart G.J. Knols, Olfaction in vector-host interactions, Ecology and control of vector-borne diseases Volume 2, 2010, pp 18-20
5. Knols BGJ (1996) Odour-mediated host seeking behavior of the Afro-tropical malaria vector *Anopheles gambiae* Giles. Thesis, Wageningen Agricultural University, Wageningen, the Netherlands.
6. Dekker T, Steib B, Carde RT and Geier M (2002) L-lactic acid: a human-signifying host cue for the anthropophilic mosquito *Anopheles gambiae*. Med Vet Entomol 16: 91-98.
7. Healy TP and Copland MJ (1995) Activation of *Anopheles gambiae* mosquitoes by carbon dioxide and human breath. Med Vet Entomol 9: 331-336.
8. Smallegange RC, Qiu YT, van Loon JJ and Takken W (2005) Synergism between ammonia, lactic acid and carboxylic acids as kairomones in the host-seeking behaviour of the malaria mosquito *Anopheles gambiae sensu stricto* (Diptera: Culicidae). Chem Senses 30: 145-152.

9. Takken W, Dekker T and Wijnholds YG (1997) Odor-mediated flight behavior of *Anopheles gambiae* Giles *sensu stricto* and *A-stephensi* Liston in response to CO₂, acetone, and 1-octen-3-ol (Diptera: Culicidae). *Journal of Insect Behavior* 10: 395-407.
10. Benton R, Sachse S, Michnick SW and Vosshall LB (2006) Atypical membrane topology and heteromeric function of *Drosophila* odorant receptors *in vivo*. *PLoS Biol* 4: e20.
11. Neuhaus EM, Gisselmann G, Zhang W, Dooley R, Stortkuhl K and Hatt H (2005) Odorant receptor heterodimerization in the olfactory system of *Drosophila melanogaster*. *Nat Neurosci* 8: 15-17.
12. Wetzel CH, Behrendt HJ, Gisselmann G, Stortkuhl KF, Hovemann B and Hatt H (2001) Functional expression and characterization of a *Drosophila* odorant receptor in a heterologous cell system. *PNAS* 98: 9377-9380.
13. Sato K, Pellegrino M, Nakagawa T, Nakagawa T, Vosshall LB and Touhara K (2008) Insect olfactory receptors are heteromeric ligand-gated ion channels. *Nature* 452 (7190): 1002-1006.
14. Wicher D, Schafer R, Bauernfeind R, Stensmyr MC, Heller R, Heinemann SH and Hansson BS. (2008) *Drosophila* odorant receptors are both ligand-gated and cyclic-nucleotide-activated cation channels. *Nature* 452 (7190): 1007-1011.
15. K. E. Tsitsanou, T. Thireou, C. E. Drakou, K. Koussis, M. V. Keramioti, D. D. Leonidas, E. Eliopoulos, K. Iatrou, S.E.Zographos, (2012) “*Anopheles gambiae* odorant binding protein crystal complex with the synthetic repellent DEET: implications for structure-based design of novel mosquito repellents” *Cellular Molecular Life Sci.* **69**, 283-297.

16. [Tal Soo Ha](#) and [Dean P. Smith](#) Odorant and pheromone receptors in insects, 2009
17. Zhou JJ (2010) Odorant-binding proteins in insects. *Vitam Horm Pheromones* 83:241–272. doi:[10.1016/S0083-6729\(10\)83010-9](#).
18. Pelosi P (1996) Perireceptor events in olfaction. *J Neurobiol* 30(1):3–19.
19. Laughlin JD, Ha TS, Jones DN, Smith DP (2008) Activation of pheromone-sensitive neurons is mediated by conformational activation of pheromone-binding protein. *Cell* 133(7):1255–1265. doi:[10.1016/j.cell.2008.04.046](#).
20. Du GH, Prestwich GD (1995) Protein-structure encodes the ligand-binding specificity in pheromone binding-proteins. *Biochemistry* 34(27):8726–8732.
21. Leal WS, Chen AM, Erickson ML (2005) Selective and pH dependent binding of a moth pheromone to a pheromone-binding protein. *J Chem Ecol* 31(10):2493–2499. doi:[10.1007/s10886-005-7458-4](#).
22. Tegoni M, Campanacci V, Cambillau C (2004) Structural aspects of sexual attraction and chemical communication in insects. *Trends Biochem Sci* 29(5):257–264. doi:[10.1016/j.tibs.2004.03.003](#)
23. Κεραμιώτη Μαρία (2011), Δομική και κινητική μελέτη συμπλόκων λειτουργικών πρωτεϊνών (OBP4 και φωσφορυλάση του γλυκογόνου) με μικρά μόρια με σκοπό τον σχεδιασμό βελτιωμένων προσδετών, pp 47, 80-99.
24. Biessmann H, Nguyen QK, Le D, Walter MF (2005) Microarraybased survey of a subset of putative olfactory genes in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Insect Mol Biol* 14(6):575–589. doi: [10.1111/j.1365-2583.2005.00590.x](#).

25. Foteini Davrazou, Emily Dong, Emma J. Murphy, Hannah T. Johnson, and David N. M. Jones, (2011), New Insights into the Mechanism of Odorant Detection by the Malaria-transmitting Mosquito *Anopheles gambiae*, p.p 2.
26. Xu, P. X., Zwiebel, L. J., and Smith, D. P. (2003) *Insect Mol. Biol.* 12, p.p549–560
27. Biessmann, H., Nguyen, Q. K., Le, D., and Walter, M. F. (2005) *Insect Mol. Biol.* 14, 575–589
28. Justice, R. W., Dimitratos, S., Walter, M. F., Woods, D. F., and Biessmann, H. (2003) *Insect Mol. Biol.* 12, 581–594
29. Biessmann, H., Andronopoulou, E., Biessmann, M. R., Douris, V., Dimitratos, S. D., Eliopoulos, E., Guerin, P. M., Iatrou, K., Justice, R. W., Krober, T., Marinotti, O., Tsitoura, P., Woods, D. F., and Walter, M. F. (2010) *PLoS ONE* 5, e9471
30. Andronopoulou, E., Labropoulou, V., Douris, V., Woods, D. F., Biessmann, H., and Iatrou, K. (2006) *Insect Mol. Biol.* 15, 797–811
31. Qiao, H., He, X., Schymura, D., Ban, L., Field, L., Dani, F. R., Michelucci, E., Caputo, B., della Torre, A., Iatrou, K., Zhou, J. J., Krieger, J., and Pelosi, P. (2011) *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 1799–1813
32. Ester Innocent¹, Cosam C. Joseph, Nicholas K. Gikonyo, Mayunga H. H. Nkunya, and Ahmed Hassanali, Constituents of the essential oil of *Suregada zanzibariensis* leaves are repellent to the mosquito, *Anopheles gambiae* s.s., p.p 1
33. Mustapha Debboun, Stephen P. Frances, Daniel Strickman, (2006), *Insect Repellents (principles, method and uses)*, p.p 277.
34. Feng, L., and Prestwich, G. D. (1997). Expression and characterization of Lepidopteran general odorant binding protein. *Ins.*

35. Honson, N., Johnson, M. A., Oliver, J. E., Prestwich, G. D., and Plettner, E. (2003). Structure-activity studies with pheromonebinding proteins of the gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Chem. Senses* 28, 479-489.
36. Leal, W. S., Chen, A. M., Ishida, Y., Chiang, V. P., Erickson, M. L., Morgan, T. I., and M., T. J. (2005). Kinetics and molecular properties of pheromone binding and release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 5386-5391.
37. Maida R, Mameli M, Muller B, Krieger J, Steinbrecht RA. (2005). The expression pattern of four odorant-binding proteins in male and female silk moths, *Bombyx mori*. *J Neurocytol.* 34, 149-63.
38. Plettner, E., Lazar, J., Prestwich, E. G., and Prestwich, G. D. (2000). Discrimination of pheromone enantiomers by two pheromone binding proteins from the gypsy moth *Lymantria dispar*. *Biochem.* 39, 8953-8962
39. Vogt, R. G., and Riddiford, L. M. (1981). Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature* 293, 161-163.
40. Campanacci, V., Krieger, J., Bette, S., Sturgis, J. N., Lartigue, A., Cambillau, C., Breer, H., and Tegoni, M. (2001). Revisiting the specificity of *Mamestra brassicae* and *Antheraea polyphemus* pheromone-binding proteins with a fluorescence binding assay. *J.*
41. Pelosi, P., Zhou, J.-J., Ban, L. P., and Calvello, M. (2006). Soluble proteins in insect chemical communication. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 1658- 1676.
42. Ban, L., Zhang, L., Yan, Y., and Pelosi, P. (2002). Binding properties of a locust's chemosensory protein. *Biochem. Biophys. Res*

43. Katerina E. Tsitsanou, Christina E. Drakou, Trias Thireou, Anna Vitlin Gruber, Georgia Kythreoti, Abdussalam Azem, Dimitrios Fessas, Elias Eliopoulos, Kostas Iatrou, and Spyros E. Zographos, (2013), Crystal and Solution Studies of the “Plus-C” Odorant-binding Protein 48 from *Anopheles gambiae*.
44. Campanacci, V., Krieger, J., Bette, S., Sturgis, J. N., Lartigue, A., Cambillau, C., Breer, H., and Tegoni, M. (2001) Revisiting the specificity of *Mamestra brassicae* and *Antheraea polyphemus* pheromone-binding proteins with a fluorescence binding assay. *J. Biol. Chem.* 276, 20078–20084
45. Leatherbarrow, R. J. (2007) *GraFit*, Version 6.0, Erithakus Software, Staines, UK