

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Βελτιστοποίηση της έκφρασης και χρωματογραφικού
καθαρισμού της πρωτεΐνης OBP7 του κώνωπα
Anopheles stephensi

ΧΡΗΣΤΟΣ-ΝΕΚΤΑΡΙΟΣ ΠΕΤΡΟΥΛΙΑΣ



ΑΘΗΝΑ
2018

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Βελτιστοποίηση της έκφρασης και χρωματογραφικού καθαρισμού της πρωτεΐνης OBP7 του κώνωπα *Anopheles stephensi*

Optimization of expression and chromatographic purification of the OBP7 protein from the mosquito *Anopheles stephensi*

Χρήστος-Νεκτάριος Πετρούλιας

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ:

Σ. ΖΩΓΡΑΦΟΣ, Διευθυντής Ερευνών, ΙΧΒ/ΕΙΕ

ΣΥΝΕΠΙΒΛΕΠΩΝ:

Δ. ΛΕΩΝΙΔΑΣ, Καθηγητής Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΜΕΛΟΣ:

Β. ΣΚΑΜΝΑΚΗ, Επίκουρη Καθηγήτρια Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι πρωτεΐνες δέσμευσης οσμογόνων μορίων (OBPs) των κουνουπιών είναι μικρά, υδατοδιαλυτά μακρομόρια που μεταφέρουν υδρόφοβα μόρια-οσμές από τον αέρα στους υποδοχείς των οσφρητικών νευρώνων. Η μελέτη της δομής και της λειτουργίας των πρωτεϊνών αυτών είναι πρωταρχικής σημασίας για την κατανόηση των μηχανισμών αναγνώρισης των οσμών σε μοριακό επίπεδο και μπορεί να οδηγήσει στην ανακάλυψη ενώσεων που θα μπορούσαν να διαταράξουν τη φυσιολογική οσφρητική λειτουργία και κατά συνέπεια το δήγμα μολυσμένων κουνουπιών που είναι ικανό να μεταδώσει επικίνδυνους ιούς και παράσιτα στον άνθρωπο.

Ο σχεδιασμός διαταρακτών με βάση τη δομή των OBPs θα συμβάλλει στην ελάττωση μετάδοσης ασθενειών όπως η ελονοσία, ο δάγκειος πυρετός, η ασθένεια του ιού Ζίκα κ.α.

Στο πλαίσιο της παρούσας πτυχιακής εργασίας μελετήθηκε η πρωτεΐνη δέσμευσης οσμογόνων μορίων OBP7 του κώνωπα *Anopheles stephensi* (AsteOBP7). Το γονίδιο της πρωτεΐνης AsteOBP7 κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pET22b(+) με τον οποίο μετασχηματίστηκαν *E. coli* βακτήρια και πραγματοποιήθηκαν δοκιμές έκφρασης σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας και συγκέντρωσης επαγωγέα, προκειμένου να παραχθεί μεγάλη ποσότητα διαλυτής πρωτεΐνης. Επιπλέον, σχεδιάστηκε ένα πρωτόκολλο καθαρισμού της πρωτεΐνης, έτσι ώστε αυτή να ληφθεί σε υψηλή καθαρότητα και να χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια σε πειράματα κρυστάλλωσης.

ΛΕΞΕΙΣ-ΚΛΕΙΔΙΑ: OBP, ελονοσία, κουνούπι, μοριακή κλωνοποίηση, έκφραση, καθαρισμός, κρυστάλλωση

ABSTRACT

Mosquito odorant binding proteins (OBPs) are small, water-soluble molecules that carry hydrophobic odorant molecules from the air to the receptors of olfactory neurons. Studying the structure and function of these proteins is of paramount significance for understanding the molecular mechanisms of odor recognition and can lead to the discovery of compounds that can disrupt mosquitoes' physiological olfactory function as well as their ability to detect their human targets. Thus, they help to reduce the transmission of diseases such as malaria, dengue fever, Zika virus disease etc.

In the framework of this project we studied the odorant binding protein of the *Anopheles stephensi* mosquito, AsteOBP7. In particular, AsteOBP7 gene was cloned into the pET22b(+) expression vector which was used to transform *E. coli* bacteria.

Expression trials were then performed at different temperature and inducer conditions in order to obtain a high yield of soluble protein. In addition, we designed a purification protocol for the isolation of highly pure protein, suitable for use in crystallization experiments.

KEYWORDS: OBP, malaria, mosquito, molecular cloning, expression, purification, crystallization

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	8
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	9
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο: ΕΛΟΝΟΣΙΑ	10
1.1 Εισαγωγή.....	10
1.2 Η ελονοσία στην Ελλάδα.....	11
1.3 Τα παράσιτα και ο κύκλος ζωής τους.....	12
1.4 Πρόληψη και θεραπεία.....	13
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο: ΤΟ ΟΣΦΡΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΩΝ ΚΟΥΝΟΥΠΙΩΝ	16
2.1 Εισαγωγή.....	16
2.2 Το κουνούπι <i>Anopheles stephensi</i>	16
2.3 Μοριακή οργάνωση του οσφρητικού συστήματος	17
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο: ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΟΣΜΟΓΟΝΩΝ	
ΜΟΡΙΩΝ (OBPs)	20
3.1 Εισαγωγή.....	20
3.2 Δομή των OBPs.....	20
3.3 Λειτουργία των OBPs	23
3.4 AsteOBP7: τρέχουσα γνώση.....	24
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο: ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΑ ΑΚΤΙΝΩΝ Χ	27
4.1 Εισαγωγή.....	27
4.2 Ακτίνες Χ.....	27
4.3 Κρυστάλλωση πρωτεϊνών.....	28
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	31
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο: ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	32
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο: ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ-ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ	33
6.1 Αντιδραστήρια	33
6.2 Εργαστηριακός εξοπλισμός.....	34

6.3 Πλασμιδιακός φορέας έκφρασης pET22b(+)	35
6.4 Βακτηριακά στελέχη και καλλιέργεια <i>E. coli</i>	36
6.5 Αντιβιοτικά	37
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο: ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ, ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ AsteOBP7	39
7.1 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων <i>E. coli</i> DH5a	39
7.2 Πολλαπλασιασμός και απομόνωση του πλασμιδίου AsteOBP7-pUC57 από κύτταρα <i>E. coli</i> DH5a (miniprep)	39
7.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του πλασμιδίου AsteOBP7-pUC57 με φωτομέτρηση στα 260 nm	40
7.4 Διπλή πέψη των απομονωμένων πλασμιδίων AsteOBP7-pUC57 με περιοριστικές ενδονουκλεάσες	40
7.5 Ανακλωνοποίηση του γονιδίου της AsteOBP7 στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pET22b(+)	41
7.6 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων <i>E. coli</i> DH5a	42
7.7 Πολλαπλασιασμός και απομόνωση του πλασμιδίου AsteOBP7-pET22b(+)	42
7.8 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του πλασμιδίου AsteOBP7-pET22b(+)	42
7.9 Διπλή πέψη των απομονωμένων πλασμιδίων AsteOBP7-pET22b(+)	42
7.10 Δοκιμές έκφρασης της πρωτεΐνης AsteOBP7	43
7.11 Υπερέκφραση της πρωτεΐνης AsteOBP7	45
7.12 Καθαρισμός της πρωτεΐνης AsteOBP7 με ταχεία υγρή χρωματογραφία (FPLC)	46

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8^ο: ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗΣ.....	49
8.1 Κρυστάλλωση πρωτεϊνών-Διάχυση ατμών	49
8.2 Τεχνική της κρεμάμενης και της καθήμενης σταγόνας.....	49
8.3 Πειράματα κρυστάλλωσης της πρωτεΐνης AsteOBP7	49
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	50
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9^ο: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗΣ, ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗΣ, ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ AsteOBP7	51
9.1 Κλωνοποίηση του γονιδίου της AsteOBP7 και εισαγωγή του στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pET22b(+)	51
9.2 Δοκιμές έκφρασης-υπερέκφραση της πρωτεΐνης AsteOBP7 ...	52
9.3 Καθαρισμός της πρωτεΐνης AsteOBP7	53
9.4 Αποτελέσματα πειραμάτων κρυστάλλωσης	54
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	56
ΑΝΑΦΟΡΕΣ	58

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία με τίτλο «Βελτιστοποίηση της έκφρασης και χρωματογραφικού καθαρισμού της πρωτεΐνης OBP7 του κώνωπα *Anopheles stephensi*» πραγματοποιήθηκε στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών και συγκεκριμένα στο εργαστήριο Δομικής Βιολογίας και Χημείας του Ινστιτούτου Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας υπό την επίβλεψη του Δρ. Σπύρου Ζωγράφου (Διευθυντής Ερευνών, ΙΧΒ/ΕΙΕ) κατά το χρονικό διάστημα Φεβρουάριος 2018 - Νοέμβριος 2018.

Οφείλω τις θερμές μου ευχαριστίες στον Δρ. Σπύρο Ζωγράφο που με εμπιστεύθηκε, δέχθηκε να πραγματοποιήσω την πτυχιακή εργασία μου στο εργαστήριό του και με εισήγαγε σε θέματα μοριακής βιολογίας και πρωτεϊνικής κρυσταλλογραφίας. Η συνεχής του καθοδήγηση και οι πολύτιμες συμβουλές που μου παρείχε όλο αυτό το διάστημα υπήρξαν πολύτιμες για την επιτυχή ολοκλήρωση της εργασίας μου.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στη μεταδιδακτορική ερευνήτρια Δρ. Κατερίνα Τσιτσάνου για την πολύτιμη αρωγή και συμπαράστασή της κατά την εκτέλεση του πειραματικού μέρους της εργασίας.

Αδιαμφισβήτητα, απευθύνω ένα μεγάλο «ευχαριστώ» στην υποψήφια διδάκτορα κ. Παναγιώτα Λίγγρη για την συνεχή υποστήριξη, τις χρήσιμες συμβουλές και το αμείωτο ενδιαφέρον της από την πρώτη στιγμή έως και το τέλος της παρούσας εργασίας.

Πολλές ευχαριστίες εκφράζω επιπλέον στον Καθηγητή βιοχημείας του τμήματός μου, κ. Δημήτρη Λεωνίδα όπως επίσης και στην Επίκουρη Καθηγήτρια του τμήματός μου, κ. Βασιλική Σκαμνάκη για την πρόθυμη συμμετοχή τους στην κρίση της εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για τη συνολική βοήθεια και στηριξή της καθόλη τη διάρκεια της διπλωματικής εργασίας.

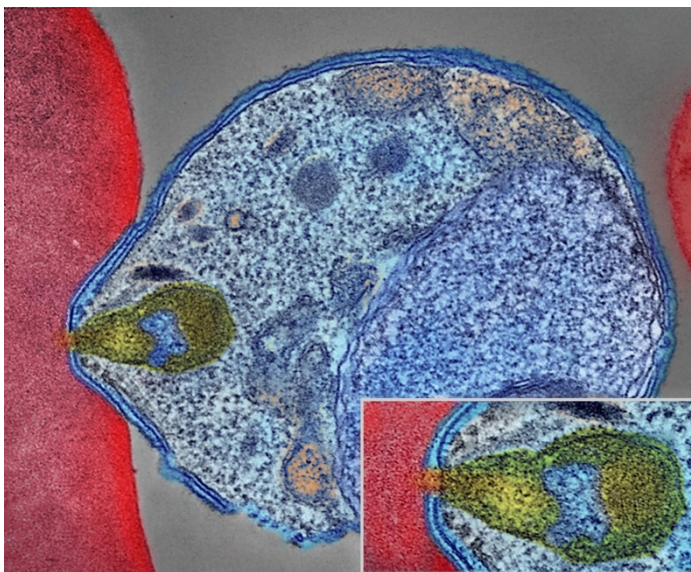
1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

ΕΛΟΝΟΣΙΑ

1.1 Εισαγωγή

Η ελονοσία είναι λοιμώδης ασθένεια που προκαλείται από παρασιτικά πρωτόζωα του γένους Πλασμώδιο (*Plasmodium*). Κατά κύριο λόγο, η ασθένεια μεταδίδεται στον άνθρωπο από το νύγμα (τσιμπημα) ενός θηλυκού κουνουπιού του γένους Ανωφελές (*Anopheles*). Το κουνούπι εισάγει τα παράσιτα μέσω του σάλιου του στο ανθρώπινο αίμα,^[1] όπου προσβάλλουν τα ερυθρά αιμοσφαίρια (**Εικόνα 1**). Τα συμπτώματα της ελονοσίας περιλαμβάνουν πυρετό, κούραση, εμετούς και πονοκεφάλους. Αν η μόλυνση δεν αντιμετωπιστεί μπορεί να προκαλέσει ίκτερο, επιληπτικές κρίσεις, κώμα ή θάνατο.^[2]



Εικόνα 1: Εικόνα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας που δείχνει παράσιτο της ελονοσίας (μπλε χρώμα) να προσβάλλει ανθρώπινο ερυθροκύτταρο. Το ένθετο δείχνει μια λεπτομέρεια του σημείου πρόσδεσης σε μεγέθυνση (Εικόνα από <https://www.flickr.com/photos/niaid/34034143483>).

Η διάγνωση της ελονοσίας γίνεται συνήθως με εξετάσεις αίματος χρησιμοποιώντας επιχρίσματα αίματος ή με γρήγορες διαγνωστικές δοκιμές βασισμένες σε αντιγόνα.^[2] Επίσης, έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι που χρησιμοποιούν την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για να ανιχνεύουν το DNA των παρασίτων, αλλά δεν είναι ευρέως χρησιμοποιούμενες σε περιοχές όπου εμφανίζεται η ελονοσία, λόγω του κόστους και της πολυπλοκότητάς τους.^[3]

Η ελονοσία είναι διαδεδομένη σε τροπικές και υποτροπικές περιοχές που βρίσκονται σε μία ευρεία ζώνη γύρω από τον ισημερινό^[2] και περιλαμβάνουν

μεγάλο μέρος της υποσαχάριας Αφρικής, της Ασίας και της Λατινικής Αμερικής. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας εκτιμά ότι το 2012 υπήρξαν στην Αφρική 207.000.000 κρούσματα ελονοσίας που οδήγησαν στο θάνατο 473.000-789.000 ανθρώπους, πολλοί από τους οποίους ήταν παιδιά κάτω από την ηλικία των πέντε ετών.^[1] Για το έτος 2017 υπολογίζεται ότι ο αριθμός των κρουσμάτων ξεπέρασε τα 210.000.000 και οδήγησε στο θάνατο 435.000 ανθρώπους.^[2]

1.2 Η ελονοσία στην Ελλάδα

Στην Ελλάδα η νόσος εκριζώθηκε το 1974, ύστερα από εντατικό και επίπονο πρόγραμμα καταπολέμησης (1946-1960). Έκτοτε και μέχρι και το 2016 καταγράφονταν πανελλαδικά ετησίως 20-110 εισαγόμενα κρούσματα, δηλαδή κρούσματα ατόμων που προσβλήθηκαν σε χώρα του εξωτερικού (επιστρέφοντες ταξιδιώτες ή μετανάστες από ενδημικές χώρες).

Συνολικά, το 2017 στην Ελλάδα δηλώθηκαν στο ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ. 107 κρούσματα ελονοσίας, εκ των οποίων τα 100 έχουν χαρακτηριστεί εισαγόμενα.^[4] Πρόσφατα επιδημιολογικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι παρά την εξάλειψη της ελονοσίας στη χώρα μας από το 1974, το ενδεχόμενο επανεγκατάστασης της νόσου είναι υπαρκτό κυρίως σε περιοχές όπου παρατηρείται η ύπαρξη ασθενών που προέρχονται από ενδημικές για την ελονοσία χώρες (**Εικόνα 3**).

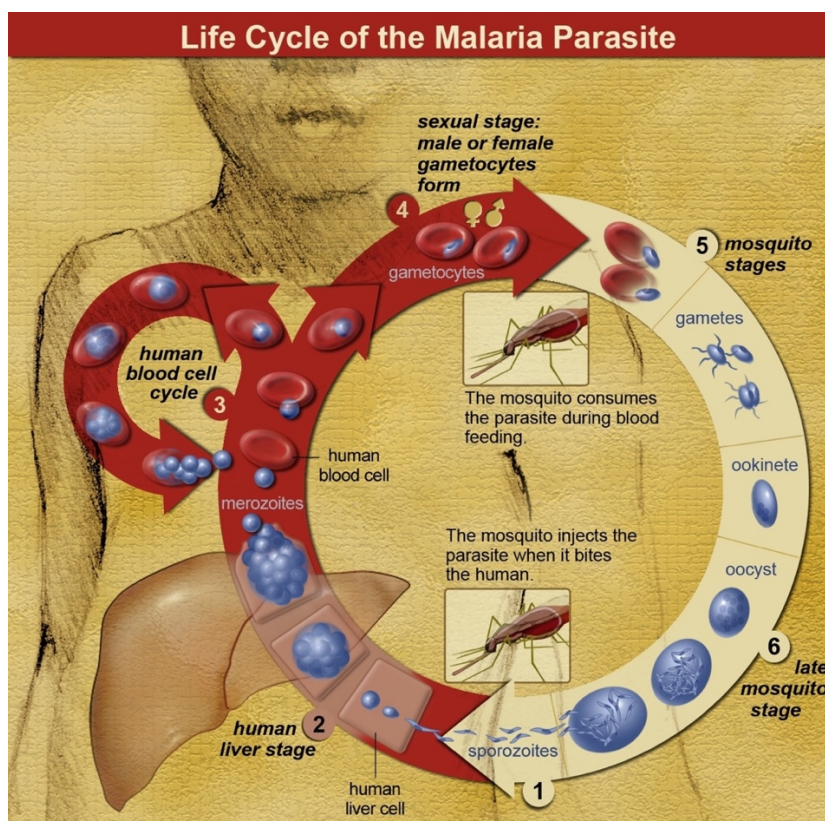


Εικόνα 2: Εκτιμώμενη Περιφερειακή Ενότητα έκθεσης κρουσμάτων ελονοσίας με ενδείξεις εγχώριας μετάδοσης, Ελλάδα, 2017 (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ).

1.3 Τα παράσιτα και ο κύκλος ζωής τους

Οι παρασιτικοί μικροοργανισμοί που προκαλούν την ελονοσία ανήκουν στο γένος *Plasmodium* και φύλο *Apicomplexa*. Στον άνθρωπο, η ελονοσία προκαλείται από τα είδη *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax* και *P. knowlesi*.^{[5][6]}

Στον κύκλο ζωής του πλασμοδίου (**Εικόνα 4**), ένα θηλυκό κουνούπι *Anopheles* (πρωτεύων ξενιστής) μεταδίδει μία κινητή μολυσματική μορφή, που ονομάζεται σποροζωΐτης, σε ένα σπονδυλωτό ξενιστή, όπως έναν άνθρωπο (δευτερεύων ξενιστής), μέσω τσιμπήματος, ενεργώντας έτσι ως φορέας μετάδοσης. Ο σποροζωΐτης ταξιδεύει μέσω των αιμοφόρων αγγείων στα κύτταρα του ήπατος, όπου αναπαράγεται ασεξουαλικά, παράγοντας χιλιάδες μεροζωΐτες. Αυτοί μολύνουν νέα ερυθρά αιμοσφαίρια και ξεκινούν μια σειρά από κύκλους ασεξουαλικής αναπαραγωγής που παράγουν 8-24 νέους μολυσματικούς μεροζωΐτες, σημείο στο οποίο τα κύτταρα υφίστανται ρήξη και ο μολυσματικός κύκλος αρχίζει εκ νέου.^[7]



Εικόνα 3: Ο κύκλος ζωής του παρασίτου της ελονοσίας
(Εικόνα από <http://www.niaid.nih.gov/topics/malaria/pages/lifecycle.aspx>).

Οι μεροζωΐτες που δε συμμετέχουν στο μολυσματικό κύκλο αναπτύσσονται σε ανώριμα γαμετοκύτταρα, τα οποία είναι οι πρόδρομοι των αρσενικών και θηλυκών γαμετών. Όταν ένα γονιμοποιημένο κουνούπι τσιμπήσει ένα

μολυσμένο άτομο, λαμβάνει με το αίμα γαμετοκύτταρα, τα οποία ωριμάζουν στο έντερο του κουνουπιού. Τα αρσενικά γαμετοκύτταρα τήκονται με τα θηλυκά και σχηματίζουν τον ωοκινέτη, δηλαδή το γονιμοποιημένο ζυγωτό. Οι ωοκινέτες αναπτύσσονται σε νέους σποροζωΐτες, οι οποίοι μεταναστεύουν στους σιελογόνους αδένες του κουνουπιού. Εκεί είναι έτοιμοι να μολύνουν ένα νέο ξενιστή, όταν το κουνούπι πάρει μεταγενέστερα ένα νέο γεύμα αίματος.^[8]

1.4 Πρόληψη και θεραπεία

I. Πρόληψη

Οι μέθοδοι πρόληψης της ελονοσίας που χρησιμοποιούνται σήμερα περιλαμβάνουν τη χημειοπροφύλαξη, την προσπάθεια περιορισμού του πληθυσμού των κουνουπιών και την αποφυγή των τσιμπημάτων.

Προφυλακτική φαρμακευτική αγωγή μπορεί να ληφθεί από άτομα που ταξιδεύουν σε ενδημικές χώρες για την πρόληψη της ασθένειας. Παρόλα αυτά, η χρήση ανθελονοσιακών φαρμάκων ως μέσο πρόληψης από άτομα που ζουν σε περιοχές όπου υπάρχει η ελονοσία, μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη μερικής αντίστασης σε αυτά.^[9]

Η προσπάθεια για την ανάπτυξη αποτελεσματικών εμβολίων έναντι της ελονοσίας αποτελεί τεράστια πρόκληση, εξαιτίας της πολυπλοκότητας που εμφανίζουν τα παράσιτα της ελονοσίας. Αλληλούχιση του γονιδιώματος του *P. falciparum* έδειξε ότι το παράσιτο εξελίχθηκε αναπτύσσοντας εξειδικευμένους μηχανισμούς που του επιτρέπουν να εκφράζει παραλλαγμένα αντιγόνα, όπως η μεμβρανική πρωτεΐνη των ερυθροκυττάρων PfEMP1. Η πρωτεΐνη αυτή δεσμεύεται στους ενδοθηλιακούς υποδοχείς και η αναγνώρισή της από τον ξενιστή οδηγεί στην απομάκρυνση των μολυσμένων ερυθροκυττάρων.^[10] Ως αποτέλεσμα, το παράσιτο μπορεί να αποφύγει την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή και τα μολυσμένα άτομα δεν αποκτούν ανοσία έναντι της νόσου.

Τα υπό ανάπτυξη εμβόλια κατηγοριοποιούνται ανάλογα με τα βιολογικά στάδια του πλασμοδίου στα οποία στοχεύουν:

1) **εμβόλια που στοχεύουν στον προ-ερυθροκυτταρικό κύκλο (Εικόνα 3: human liver stage)**, με σκοπό να αποτρέψουν τη μόλυνση από ελονοσία. Τα εμβόλια αυτά στοχεύουν είτε τους σποροζωΐτες είτε τα μολυσμένα ηπατοκύτταρα.

2) **εμβόλια που στοχεύουν στον ερυθροκυτταρικό κύκλο (Εικόνα 3: human blood cell cycle)**, με σκοπό να μειώσουν τα συμπτώματα και συνεπώς τη νοσηρότητα της ασθένειας, αποτρέποντας τους μεροζωΐτες από το να μολύνουν τα ερυθροκύτταρα.

3) **εμβόλια που στοχεύουν στο γαμετικό κύκλο (Εικόνα 3: sexual stage)**, με σκοπό την παρεμπόδιση μετάδοσης της ελονοσίας. Τα εμβόλια αυτά στοχεύουν στα γαμετοκύτταρα, τους ωοκινέτες και τα ζυγωτά προκειμένου να εμποδίσουν την ανάπτυξη σποροζωιτών.^[11]

Μέχρι στιγμής, τα εμβόλια που υποβάλλονται σε κλινικές δοκιμές δεν παρουσιάζουν την επιθυμητή αποτελεσματικότητα, εξαιτίας της πολυπλοκότητας της ελονοσίας. Η απαιτούμενη προστασία έναντι της νόσου περιλαμβάνει τη δημιουργία ενός εμβολίου το οποίο θα στοχεύει σε πολλαπλά βιολογικά στάδια του πλασμοδίου και θα περιέχει πολλαπλούς αντιγονικούς επιτόπους, έτσι ώστε να περιοριστεί το φαινόμενο αντιγονικής παραλλαγής που παρουσιάζει το παράσιτο.^[11]

Μεγάλη προσπάθεια πραγματοποιείται την τελευταία δεκαετία για την ανάπτυξη μεθόδων περιορισμού του πληθυσμού των κουνουπιών. Η προσπάθεια ελέγχου των κουνουπιών έχει στραφεί πλέον σε βιολογικές (χρήση παθογόνων μικροοργανισμών απέναντι στα κουνούπια) και χημικές (χρήση κουνουπιέρων επεξεργασμένων με εντομοκτόνα, χρήση εντομοκτόνων υλικών μακράς διάρκειας κ.α.) μεθόδους, στη διαχείριση του περιβάλλοντός τους (δηλαδή την τροποποίηση του περιβάλλοντος αναπαραγωγής τους) και στη γενετική τροποποίηση των ίδιων των κουνουπιών.^[12-15]

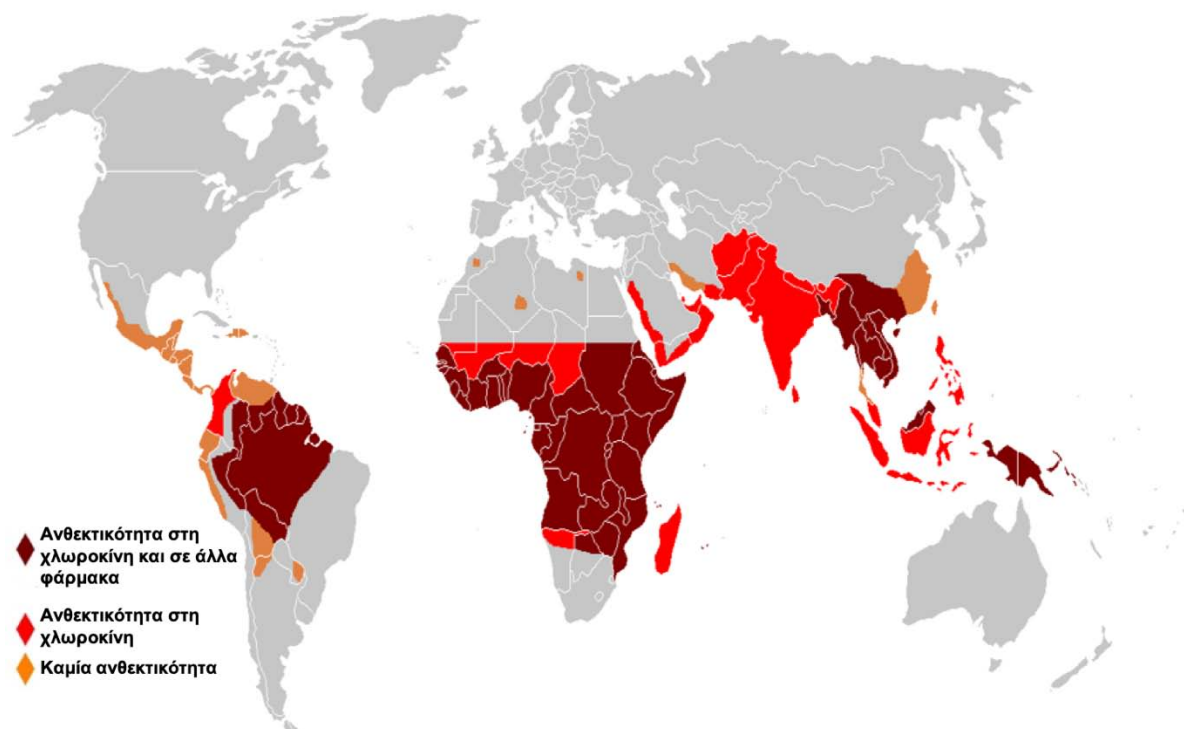
Έως σήμερα, τα ατομικά μέτρα προστασίας αποτελούν το σημαντικότερο μέτρο πρόληψης της ελονοσίας καθώς μειώνουν τη συχνότητα των επαφών μεταξύ των φορέων κουνουπιών και των ανθρώπινων στόχων τους. Η χρήση εντομοαπωθητικών και κατάλληλου ρουχισμού που δεν αφήνει μεγάλη έκταση δέρματος ακάλυπτη αλλά και η συμμετοχή σε δράσεις κοινωνικής ενημέρωσης και εκπαίδευσης, οι οποίες προωθούν την ευαισθητοποίηση για την ελονοσία και τη σπουδαιότητα των μέτρων ελέγχου, μπορούν να μειώσουν επιτυχώς τη διάδοση και τις επιπτώσεις της νόσου παγκοσμίως.^[4]

II. Θεραπεία

Η ελονοσία θεραπεύεται με ανθελονοσιακά φάρμακα, τα οποία ταξινομούνται σε τέσσερις κατηγορίες: τις κινολίνες, (κινίνη, χλωροκίνη, μελφοκίνη κ.α.) οι οποίες στοχεύουν στον ερυθροκυτταρικό, ηπατικό και γαμετικό στάδιο του παρασίτου, τους αναστολείς του φυλλικού οξέος (πυριμεθαμίνη, σουλφαδοξίνη κ.α.), την αρτεμισίνη και τα παράγωγά της, τα οποία στοχεύουν τα γαμετικά κύτταρα του πλασμοδίου και τις υδροξυναφθοκινόνες, οι οποίες διαταράσσουν τη λειτουργία των μιτοχονδρίων.^[10]

Με την πάροδο των ετών, τα παράσιτα της ελονοσίας απέκτησαν σταδιακά αντίσταση έναντι ανθελονοσιακών φαρμάκων (**Εικόνα 4**). Η αντίσταση αυτή αποτελεί ένα αυξανόμενο πρόβλημα στη θεραπεία της ελονοσίας του 21^{ου}

αιώνα.^[16] Η αντοχή είναι πλέον κοινή εναντίον όλων των τάξεων των ανθελονοσιακών φαρμάκων εκτός των αρτεμισινών, με αποτέλεσμα η καταπολέμηση των ανθεκτικών στελεχών να εξαρτάται όλο και περισσότερο από αυτήν την κατηγορία φαρμάκων. Το κόστος τους όμως περιορίζει τη χρήση τους στον αναπτυσσόμενο κόσμο.^[17] Είναι επομένως καθοριστικής σημασίας η ανάπτυξη νέων, αποτελεσματικότερων και ασφαλέστερων τόσο φαρμάκων για την αντιμετώπιση της ασθένειας, όσο και εντομοαπωθητικών για την πρόληψη τσιμπημάτων και εξάπλωσης της νόσου.



Εικόνα 4: Αντίσταση των παρασίτων της ελονοσίας έναντι ανθελονοσιακών φαρμάκων σε παγκόσμια κλίμακα ("Malaria", US Centers for Disease Control and Prevention April 15, 2010)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

ΤΟ ΟΣΦΡΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΩΝ ΚΟΥΝΟΥΠΙΩΝ

2.1 Εισαγωγή

Τα έντομα, συμπεριλαμβανομένων των κουνουπιών, στηρίζονται στο οσφρητικό τους σύστημα για να ανιχνεύουν και να αναλύουν οσφρητικά ερεθίσματα από το περιβάλλον. Η ερμηνεία των χημικών σημάτων είναι ένας βασικός μηχανισμός για τη διατήρηση της ζωής τους. Τα κουνούπια χρησιμοποιούν μια ποικιλία από σημειοχημικά (φερορμόνες, πτητικές ενώσεις φυτών και οσμογόνα μόρια που εκλύονται από ζώα) για μια πληθώρα λειτουργιών, όπως ο εντοπισμός πηγών τροφής και θέσεων ωοτοκίας, η εύρεση εταίρου και κατάλληλων ξενιστών, η αποφυγή θηρευτών και η επιλογή κατάλληλων ξενιστών. Εξειδικευμένα αισθητήρια όργανα που εμφανίζονται σε διαφορετικούς ιστούς των κουνουπιών, όπως στις κεραίες, τις σιαγόνες και την προβοσκίδα, είναι υπεύθυνα για την αναγνώριση των σημειοχημικών, γεγονός που τα καθιστά απολύτως απαραίτητα ως μέρη ενός μηχανισμού διατήρησης της ζωής των κουνουπιών.^[18]

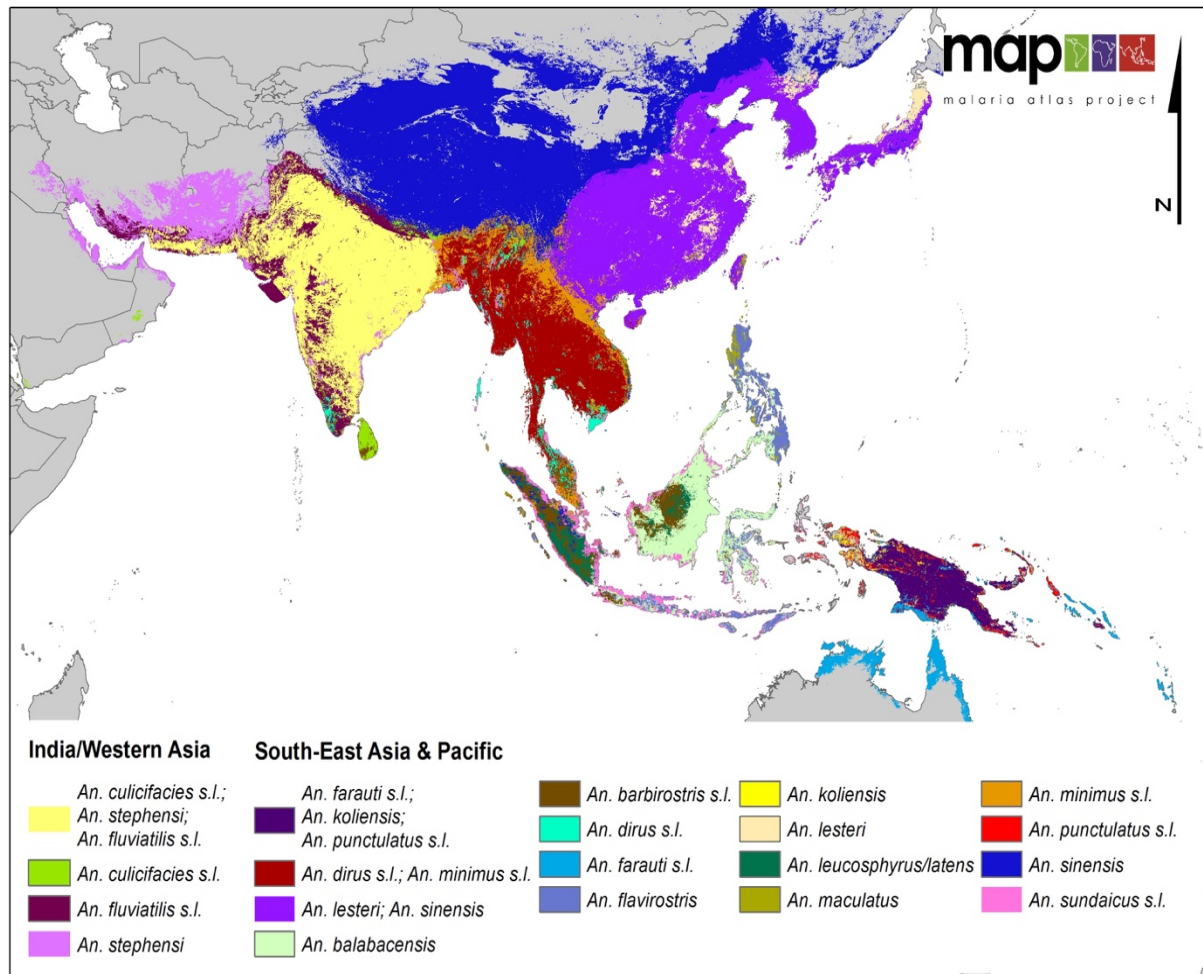
2.2 Το κουνούπι *Anopheles stephensi*

Τα κουνούπια του γένους *Anopheles* περιλαμβάνουν 465 αναγνωρισμένα είδη, εκ των οποίων τα 70 περίπου έχουν την ικανότητα να μεταδίδουν τα παράσιτα της ελονοσίας και 41 θεωρούνται ικανά να μεταδώσουν τη νόσο σε επίπεδα που προκαλούν μεγάλη ανησυχία για τη δημόσια υγεία.

Το *Anopheles stephensi* έχει κυρίαρχο ρόλο στη μετάδοση της ασθένειας σε μια γεωγραφική έκταση που εκτείνεται από τη Μέση Ανατολή έως και την Ινδία (**Εικόνα 5**) και αποτελεί σημαντικό φορέα τόσο για το παράσιτο *P. falciparum* όσο και για το *P. vivax*.

Το *A. stephensi* θεωρείται ενδογενές (κατοίκηση σε εσωτερικούς χώρους) και ενδοφαγικό (σίτιση σε εσωτερικούς χώρους) είδος, αν και μπορεί να τραφεί με αίμα σε εξωτερικούς χώρους κατά τη διάρκεια των θερινών μηνών όταν η θερμοκρασία είναι υψηλότερη και οι άνθρωποι είναι πιο πιθανό να κοιμηθούν στην ύπαιθρο.^[19] Παρόλο που οι εσωτερικές συνήθειες διατροφής του δεν έχουν δείξει καμία διαφορά μεταξύ των εποχών, τα ενήλικα θηλυκά τείνουν να τρέφονται πιο συχνά τη νύχτα κατά τους καλοκαιρινούς μήνες και όχι κατά τη

διάρκεια της ημέρας το χειμώνα. Αναλύσεις αίματος-γεύματος σε ενήλικα θηλυκά κουνούπια που συλλέχθηκαν σε αστικές περιοχές έδειξαν αυξημένη τάση αυτά να τρέφονται με αίμα ανθρώπων σε σχέση με ζώων.^[20]



Εικόνα 5: Χάρτης κατανομής 16 κυρίαρχων φορέων της ελονοσίας του γένους *Anopheles* στην περιοχή Ασίας-Ειρηνικού. Το κουνούπι *A. stephensi* εντοπίζεται στην Ινδία/Δυτική Ασία (Sinka et. al., 2012).

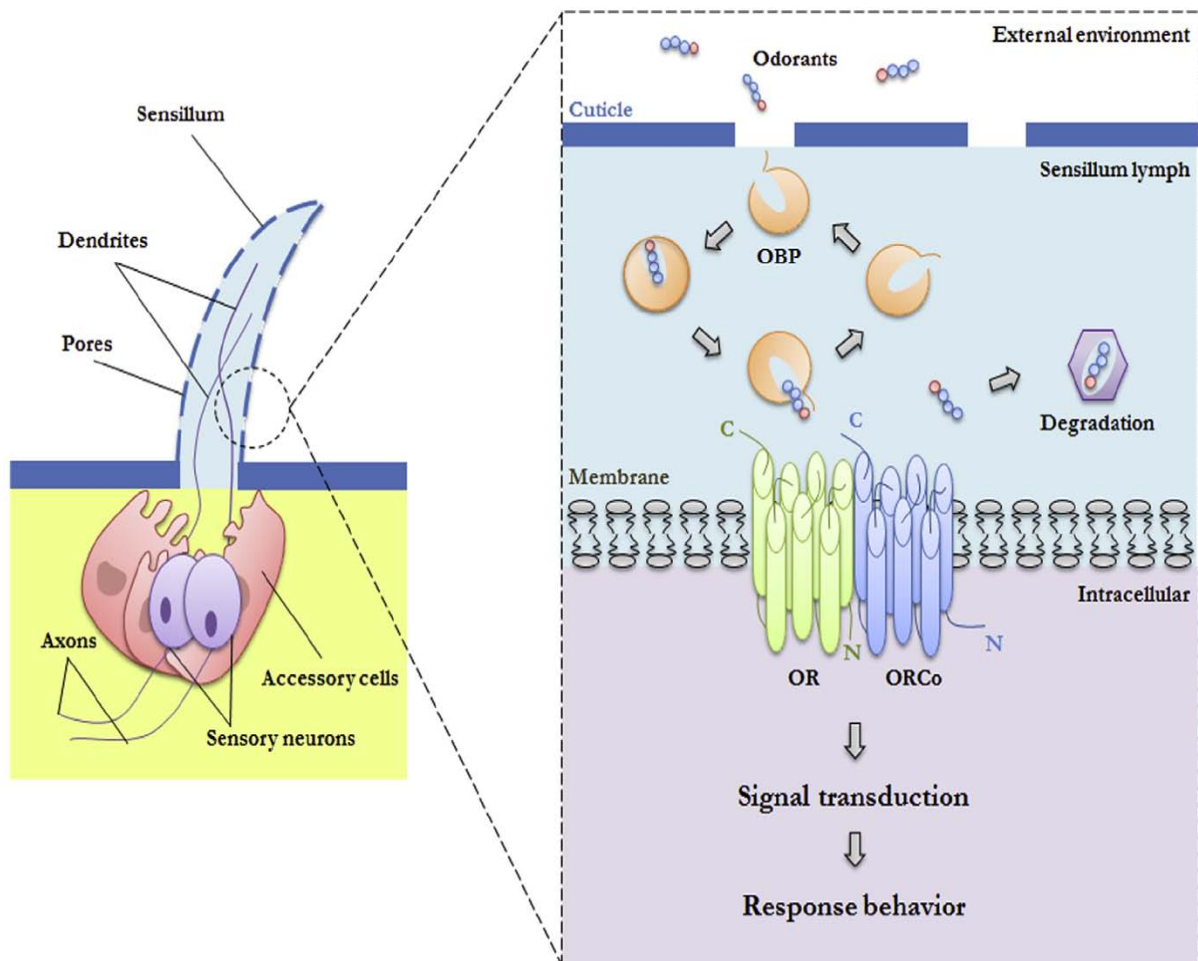
2.3 Οργάνωση του οσφρητικού συστήματος του κουνουπιού

Το κύριο οσφρητικό όργανο του κουνουπιού είναι οι κεραίες, οι οποίες καλύπτονται με τριχοειδείς προεκβολές που ονομάζονται αισθητήρια τριχοειδή (sensilla). Αυτά περιέχουν την αισθητήρια λέμφο και ένα μικρό αριθμό οσφρητικών νευρώνων (sensory neurons), ο ακριβής αριθμός των οποίων ποικίλλει ανάλογα με τον τύπο του αισθητήριου τριχοειδούς, καθώς και των διάφορων υποστηρικτικών κυττάρων (accessory cells).^[21]

Τα οσμογόνα μόρια που βρίσκονται ελεύθερα στον αέρα διεισδύουν μέσω πολλαπλών πόρων (pores) που υπάρχουν στο τοίχωμα της επιδερμίδας των κεραίων στο υδατικό περιβάλλον της αισθητήριας λέμφου, η οποία παρουσιάζει υψηλή συγκέντρωση σε υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες

δέσμευσης οσμογόνων μορίων (OBPs), οι υποδοχείς οσμογόνων μορίων (ORs) και τα ένζυμα αποικοδόμησης οσμογόνων μορίων (ODEs) είναι οι κύριες πρωτεΐνες του περιφερειακού οσφρητικού συστήματος που λαμβάνουν μέρος στην αναγνώριση των οσμών.^[22]

Οι OBPs είναι υπεύθυνες για τη σύνδεση μεταξύ του εξωτερικού περιβάλλοντος και των ORs. Μόλις τα οσμογόνα μόρια διεισδύσουν στην αισθητήρια λέμφο δεσμεύονται και διαλυτοποιούνται από τις OBPs και εν συνεχεία μεταφέρονται στους αισθητήριους δενδρίτες (dendrites), όπου ενεργοποιούν τους ORs που είναι αγκυροβολημένοι στη μεμβράνη (Εικόνα 6). Στην οικογένεια των OBPs περιλαμβάνονται επίσης πρωτεΐνες που δεσμεύουν ειδικά και μεταφέρουν φερομόνες σε υποδοχείς φερομονών (PRs), οι οποίες ονομάζονται πρωτεΐνες δέσμευσης φερομονών (PBPs).



Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση του μοριακού μηχανισμού λειτουργίας του οσφρητικού συστήματος των κουνουπιών (Sanchez-Gracia et. al., 2009).

Οι ORs των εντόμων αποτελούνται από επτά διαμεμβρανικές περιοχές με δομή α -έλικας. Ωστόσο, δεν είναι ομόλογες με τους GPCR υποδοχείς των σπονδυλωτών. Στην περίπτωση των ORs των εντόμων η τοπολογία των

πρωτεϊνών στη μεμβράνη είναι ανεστραμμένη σε σύγκριση με τους κλασικούς GPCRs, με το N-τελικό άκρο να βρίσκεται ενδοκυτταρικά.^{[23][24]} Οι ORs αποτελούν ετερομερή σύμπλοκα που περιλαμβάνουν τουλάχιστον δύο υπομονάδες: έναν εξειδικευμένο σε κάποιο προσδέτη ORx και ένα υψηλά συντηρημένο μεταξύ των εντόμων συν-υποδοχέα, ORco (Odorant Receptor coreceptor).^[25] Τα οσμογόνα μόρια δεσμεύονται ειδικά στην OR υπομονάδα. Ο ORco δεν εμπλέκεται άμεσα στην αναγνώριση των οσμών,^{[26][27]} ωστόσο η παρουσία του είναι απαραίτητη για την έκφραση λειτουργικών ORs σε όλους τους νευρώνες. Τα ετεροδιμερή σύμπλοκα σχηματίζουν διαύλους ιόντων που ενεργοποιούνται από την πρόσδεση οσμογόνων μορίων στην ORx υπομονάδα, οδηγώντας έτσι σε μεταγωγή σήματος^{[28][29]}.

Για τα έντομα των οποίων η «πλοήγηση» καθοδηγείται από οσμογόνα μόρια, η κινητική του οσφρητικού συστήματος απαιτεί την ταχεία απενεργοποίηση των σημάτων, πορκειμένου το έντομο να ανταποκρίνεται γρήγορα σε αλλαγές του περιβάλλοντός του.^[30] Υπάρχουν δύο υποθέσεις που προσπαθούν να εξηγήσουν τον τερματισμό του σήματος. Η πρώτη υποστηρίζει ότι τα ODEs είναι υπεύθυνα για τη γρήγορη αποικοδόμηση των οσμογόνων μορίων από την περιοχή των υποδοχέων ώστε να τερματιστεί το σήμα,^{[30][31]} ενώ η δεύτερη υπερασπίζεται την ύπαρξη, ακόμα άγνωστων, «παγιδευτών» που είναι υπεύθυνοι για τον τερματισμό του σήματος.^{[32][33]}

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΟΣΜΟΓΟΝΩΝ ΜΟΡΙΩΝ (OBPs)

3.1 Εισαγωγή

Στην πλειονότητά τους, τα οσμογόνα μόρια είναι υδρόφοβα και πρέπει να διασχίσουν την υδατική αισθητήρια λέμφο προκειμένου να φθάσουν και να προσδεθούν στους οσφρητικούς υποδοχείς. Οι OBPs είναι οι μεταφορικές πρωτεΐνες που επιτελούν τη μεταφορά των οσμογόνων μορίων διαμέσου του υδάτινου αυτού περιβάλλοντος. Οι OBPs ταυτοποιήθηκαν πρώτα στη νυχτοπεταλούδα *Antheraea Polyphemus* και σήμερα είναι γνωστό ότι υπάρχουν σε πολλά είδη εντόμων. Ωστόσο, μισό αιώνα σχεδόν μετά την ανακάλυψη της πρώτης φερομόνης φύλου στο μεταξοσκώληκα *Bombyx mori*, δεν είναι ακόμη σαφές πώς οι υδρόφοβες ενώσεις φθάνουν στους δενδριτικούς αισθητικούς νευρώνες, διασχίζοντας το υδατικό περιβάλλον της αισθητήριας λέμφου και πώς αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς.^[34] Τα τελευταία χρόνια οι μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην αποσαφήνιση της λειτουργίας και της τρισδιάστατης δομής των OBPs, προκειμένου αυτές να χρησιμοποιηθούν στο σχεδιασμό νέων και αποτελεσματικότερων ενώσεων για τη διατάραξη επικίνδυνων για τον άνθρωπο συμπεριφορών των εντόμων.

3.2 Δομή των OBPs

Οι OBPs είναι μικρές (13-17 kDa) υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες που εκκρίνονται από τα υποστηρικτικά κύτταρα σε υψηλές συγκεντρώσεις (~10mM) στην αισθητήρια λέμφο. Αυτές οι πρωτεΐνες εκφράζονται με ένα πεπτίδιο-σήμα το οποίο αφαιρείται κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας και δεν βρίσκεται πλέον στην ώριμη μορφή τους.^[35]

Σύμφωνα με τον αριθμό αμινοξικών καταλοίπων της πρωτοταγούς δομής τους, οι OBPs χαρακτηρίζονται ως OBPs μακράς αλυσίδας (~160 κατάλοιπα), OBPs μεσαίου μήκους αλυσίδας (~120 κατάλοιπα) και OBPs βραχείας αλυσίδας (~100 κατάλοιπα).^[35] Οι αμινοξικές αλληλουχίες αυτών των πρωτεϊνών είναι σε μεγάλο βαθμό αποκλίνουσες και η ομολογία των αμινοξέων μεταξύ OBPs από το ίδιο είδος μπορεί να είναι μικρότερη από 10%. Η σωστή ταξινόμηση μιας πρωτεΐνης στην οικογένεια OBP βασίζεται κυρίως σε ένα μοτίβο έξι κυστεϊνών,

των οποίων οι σχετικές θέσεις είναι καλά συντηρημένες σε όλες τις τάξεις των εντόμων (Εικόνα 7)^[36].

NvitOBP78	-----SPRFGRRGGGSMFSRESVKCKMAEMDIK-----R-EDIKT-----LKQNNDPKLSCLNACAMTKEEIMDE-AGNIDADKLIKATLEIVQKK---KPDINV-EE
AlinOBP13	-----LVSGRALDGLPQANQDECREESNFR---GELN-DDV-----GRNVTQELKCFRACSLMKLGMNEKGTVMTRLD---ELIASH---TPGKDAADV
BmorPBP1	-----SQEVMKQNLN---LNFQKALDECKEYVGMKMTLDAIN-EDFYN---FWKEGYEIKNRETCAIMCLSTKLNMLDP-EGNLHHGNAM---EFKAKH---GADEMTAQQ
BmorGOBP2	-----TAEVMSHVT---AHFGKTLKEECREESGL---SVDIL-DEFKH---FNSDDFDVVHRELGCRIICMSNKFSMLDD-DVRMHHVNMDD---EYIKSF---PNGQVLAEK
AlinOBP10	-----QELPPPGDVKQKIVVFKNSFLRSKAKYCSISYETS---I-LAIMA---L-LMSEKSDQNGKCFINCMQLQRYRLMSQ-DGSYKNDKFKPFLE-----YIPDSKFLQS
TcasOBP25	-----KVDIPFDLQAEIDGY-----YDIQYKQIGLI---K-DDLKA---YKIGD---RDPKIMCFMKCVFVEAKWMD-ENENLQDYIKNTI-----HHSI-RHI
LmigOBP1	-----MDVNMKLTGRIMDAAKEY-----DHTCRSSIGVF---R-DMLHR---YAEQGIVDDDDFKCYLKCIMVEFNLSLD-DGVFVLEEELENV-----PPEI-KEE
AaegOBP1	DVTPRRDAEYPPPEFLEAMKPL-----REICIKKTGVT---E-EAIE---FSDGKVEHEDENLKYNNCLFHEAKVVD-IGVHLEKLDHAL-----PDSM-HDI
CquiOBP1	-VTPRRDAEYPPPELLEALKPL-----HDIKAKKTGVT---D-EAIE---FSDGKVEHEDENLKYNNCLFHEAKVVD-IGVHLEKLDHAL-----PDSM-HDI
AgamOBP1	DTTPRRDAEYPPPELLEALKPL-----HDIKLGKTGVT---E-EAIE---FSDGKVEHEDENLKYNNCLFHEAKVVD-IGVHLEKLDHAL-----PDSM-HDI
RproOBP17	-----AVELSDDMKEMAKML---HQCLDESQVN---G-ALIEP---CAKGNFADDKLRKYFKCVFNGLVISD-EGELDAEAFGSIL-----PDSM-QEL
AlinOBP4	-----GELPEEMKEMAQGL-----HDSQVEETGVD---N-GLIAP---CAKGNFADDKLRKYFKCVFNGLVISD-EGELDAEAFGSIL-----PDSM-QEL
LlinLAP	-----GELPEEMKEMAQGL-----HDGQVEETGVD---N-GLIGP---CAKGNFADDKLRKYFKCVFNGLVISD-EGELDAEAFGSIL-----PDSM-QEL
AlinOBP6	-----KELTDEQKEQIFAEIKNKMESTKLI---D-EEFESI---MAKKELPTSEIGKCFKCLMEKMEYL-E-EGKINVIAVQAGM-----EENMEKESE-ITK
AlucOBP5	-----ITKEVHRAVAKADALKKHPSI---KESDVQ---EFLKQKHLPETDDGKCMIAQYMEEMNLM-A-DGKINVEAKKTNDSKYDGEPD---N-KEL
AlinOBP1	-----DEQINAMVAKAFNKCREEFPSI---D-DEIGGV---R-REKTIIPESHNAKCLMACMLREGKML-R-DGKYKKNALIMADVLM-K---DDPAS-ADK
ApisOBP1	-----ESDQVFINSSAAVESCLLETNMI---R-DEFEDMLTSFNARELTIILKSHAHKCMFGCVMRKNHIV-N-DGVVSKVLESKYVNLNFI-GRDPYKRLI-IKD
ApisOBP2	-----ENNQNGPSSDRSATIFQSCIAETKLS---G-DALKG---FRMSIPIKTAQKCMGCLMRKNVNI-N-KGKFSVEEATKVAQKYI-GTNE---AM-MKK
DmelLUSH	-----MTMEQFLTSLDMIRSGCAPKFKLK---T-EDLDRLR---VGFDFNFPSSQDLMTYKCVSLMAGTVNK-KGEFNAPKALQPLPHL-----VPFEM-MEM
AmelOBP5	-----MSMSADQVEKLAQNMRSKCLQKIAIT---E-ELVDGMR---RGE---FPDDHDLQCYTTCIMKLLRTF-K-KNGNFDPMIVKQLEIT-----MPFEE-VVI

NvitOBP78	L-ETAMLSCLIEKAK--EVEDKCMKAKTLLVCSHEYKGA-NVKGNPSSAGGEEE-----
AlinOBP13	FKTIVVPEQMKVEK--KSTDYCEYSVQLIACGMSKVP-----
BmorPBP1	L-IDIVHGCEKSTP--ANDDLIWTLGVATCFKAEIHKLNWAPSMDDVAVGEIL--AEV---
BmorGOBP2	M-VKLIHNCQEKQFD--TETDDIRVVKVAACFKEDSRKEGIAPEVAVVEAVIE--KY---
AlinOBP10	I-RGNLKNQISEKD---PDPCEKASKFKICFYTRARNKGEIGA-SKEVI PAD--GF---
TcasOBP25	T-LPELENGGKKAEE---GDKCEKSFSEFNKMAKAEPEDDWVLIQ-----
LmigOBP1	G-HRVVHSCKHINH---DEACEYAIQIHQCYKQSDPELYSLVVRAFDATTIGD---
AaegOBP1	A-LHMGKRCOLYPEG---ENLCEKAFWLHKCKWESDPKHYFLI-----
CquiOBP1	A-MHMGKRCOLYPEG---ENLCEKAFWLHKCKWQADPKHYFLV-----
AgamOBP1	A-MHMGKRCOLYPEG---ETLCKGAFWLHKCKWQADPKHYFLV-----
RproOBP17	L-SKMINSCKDAKG---ANACEVAFNFKCLYNADPEHFLVI-----
AlinOBP4	L--PTIRGCGGTTG---SDPCDLAMNFKKCLQKQVDFVNFVI-----
LlinLAP	L--PTIRGCGGTTG---ADPCDLAMNFKKCLQKQVDFVNFVI-----
AlinOBP6	A-KEVIQQCADSVPP---EDSCYVAYGISQCMYNNKMEKAGISGS-----
AlucOBP5	A-DKLIHNCSSQVSP-DGMSKCEYAYQFSKGLYGMKQNGLTPPKVVEEQRR-----
AlinOBP1	A-KQLVETCAGKVGTDAGSDECFAYKQAVCAEAERKQKLVRRPDPF-----
ApisOBP1	V-EHIVDVCARKVADESETDECELAATLVTQIVLEANKAGLVDDPARQI-----
ApisOBP2	A-KDLIDVCARKKAQ--SITEECALAGIVTQIVLEAQAQAGLGGGFSRSTRVSPKFRDAM
DmelLUSH	S-RKSVKQARDTHK--QFKESCERYVQIAKCFSENADGQFMNP-----
AmelOBP5	G-KEIVAVCRNEE---YTGDDCKTYQYVQCHYKQKPEKFFFP-----

Εικόνα 7: Στοιχισμός των αλληλουχιών OBP από διαφορετικά είδη εντόμων. Το μοτίβο των έξι κυστεϊνών είναι καλά συντηρημένο και επισημαίνεται με αστερίσκο.

Nasonia vitripennis (Nvit), *Adelphocoris lineolatus* (Alin), *Bombyx mori* (Bmor), *Apolygus lucorum* (Aluc), *Acyrtosiphon pisum* (Apis), *Drosophila melanogaster* (Dmel), *Tribolium castaneum* (Tcas), *Locusta migratoria* (Lmig), *Aedes aegypti* (Aaeg), *Culex quinquefasciatus* (Cqui), *Anopheles gambiae* (Agam), *Rhodnius prolixus* (Rpro), *Lygus lineolaris* (Llin), *Apis mellifera* (Amel) (Brito Nathalia F. et. al., 2016).

- Με βάση την αμινοξική τους αλληλουχία, οι OBPs ταξινομούνται σε:
- Κλασικές OBPs (Classical OBPs), που περιέχουν έξι συντηρημένα κατάλοιπα κυστεϊνης
 - Διμερείς OBPs (Dimer OBPs), που παρουσιάζουν δύο φορές το μοτίβο των έξι συντηρημένων κυστεϊνών
 - Plus-C OBPs, που έχουν δύο επιπρόσθετες συντηρημένες κυστεϊνες και μία προλίνη
 - Minus-C OBPs, που έχουν χάσει δύο συντηρημένες κυστεϊνες και
 - Μη Τυπικές OBPs (Atypical OBPs), που έχουν 9-10 κυστεϊνες και ένα μακρύ C-τελικό άκρο.^[34]

Επιπλέον, οι Κλασικές OBPs έχουν υπο-ομαδοποιηθεί σε long C-terminus OBPs, medium-length C-terminus OBPs και short C-terminus OBPs (Εικόνα 8), με βάση τις διαφορές που παρουσιάζουν στο μήκος του C-τελικού τους άκρου.^[37]

3.3 Λειτουργία των OBPs

Όπως έχει αναφερθεί, οι OBPs αναγνωρίζουν, διαλυτοποιούν και μεταφέρουν τα σημειοχημικά σε όλη την έκταση της αισθητήριας λέμφου έτσι ώστε αυτά να φτάσουν στους ORs προκειμένου να επιτευχθεί η αλληλεπίδραση προσδέτη-OR και η επακόλουθη μεταγωγή σήματος.^[39] Προτείνεται επίσης ότι οι OBPs προστατεύουν τα σημειοχημικά από αποικοδόμηση από τα ODEs κατά τη μεταφορά τους στους ORs.^[40]

Οι OBPs συμβάλλουν καθοριστικά στην εκλεκτικότητα του οσφρητικού συστήματος, καθώς σε αυτές δεσμεύεται ειδικά περιορισμένος αριθμός οσμογόνων μορίων. Δεδομένου του ότι ο αριθμός των σημειοχημικών που μπορούν να ανιχνεύσουν τα έντομα είναι πολύ μεγαλύτερος από τον αριθμό των OBPs, κάθε μία από αυτές μπορεί να αναγνωρίσει ειδικά μία τάξη δομικά παρόμοιων σημειοχημικών και να τα διακρίνει ανάλογα με τις διαφορές που παρουσιάζουν στη δομή τους.^[41]

Επιπλέον, μελέτες αποκάλυψαν ότι μερικοί ORs δεσμεύουν μόνο ένα ή ένα μικρό σύνολο σημειοχημικών, ενώ άλλοι παρουσιάζουν σημαντικά χαμηλότερη εξειδίκευση. Είναι πιθανό ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ OBPs και ORs αποτελεί ένα «φίλτρο» δύο σταδίων, με ένα μόνο ή πολύ λίγα κοινά σημειοχημικά, το οποίο συμβάλλει στην, τελικά, εξαιρετικά εκλεκτική αντίληψη των οσμών.^[41]

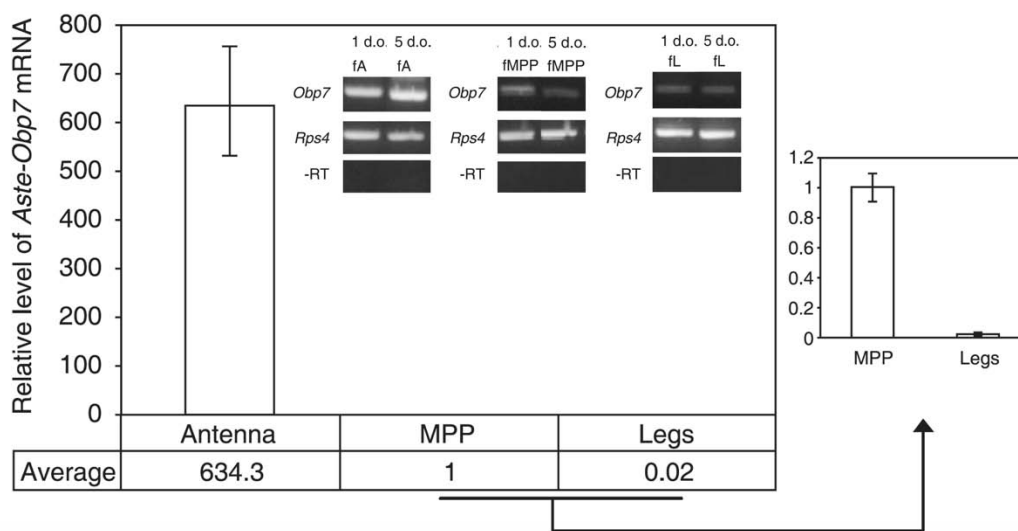
Μέχρι στιγμής, ο μηχανισμός ενεργοποίησης των ORs από τα σημειοχημικά δεν έχει αποσαφηνιστεί. Ωστόσο, έχουν προταθεί δύο μοντέλα προκειμένου να εξηγηθεί. Σύμφωνα με το πρώτο μοντέλο, οι ORs ενεργοποιούνται από το ίδιο το σύμπλοκο OBP-οσμογόνου μορίου. Το δεύτερο μοντέλο υποστηρίζει ότι η ενεργοποίηση του υποδοχέα γίνεται απευθείας από τα οσμογόνα μόρια. Όταν το σύμπλοκο OBP-οσμογόνου μορίου φτάσει στην περιοχή των δενδριτών, προκαλείται αλλαγή στη δομή των OBPs που έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση του προσδέτη, ο οποίος στη συνέχεια συνδέεται και ενεργοποιεί τον OR.^[42] Η αλλαγή στη δομή των OBPs αφορά:

- αλλαγές στη δομή του C-τελικού άκρου, το οποίο καταλαμβάνει το κέντρο πρόσδεσης και ωθεί την απελευθέρωση του οσμογόνου μορίου στον υποδοχέα,
 - επαναπροσανατολισμό των α-ελίκων που οδηγούν στο άνοιγμα του κέντρου πρόσδεσης και την απελευθέρωση του οσμογόνου μορίου στον υποδοχέα
- Αιτία των αλλαγών αυτών είναι η μείωση της τιμής του pH καθώς το σύμπλοκο OBP-οσμογόνο μόριο μετακινείται από το υδατικό περιβάλλον της αισθητήριας λέμφου (pH ~7) στην εγγύς περιοχή των δενδριτών (pH ~5).

3.4 AsteOBP7: τρέχουσα γνώση

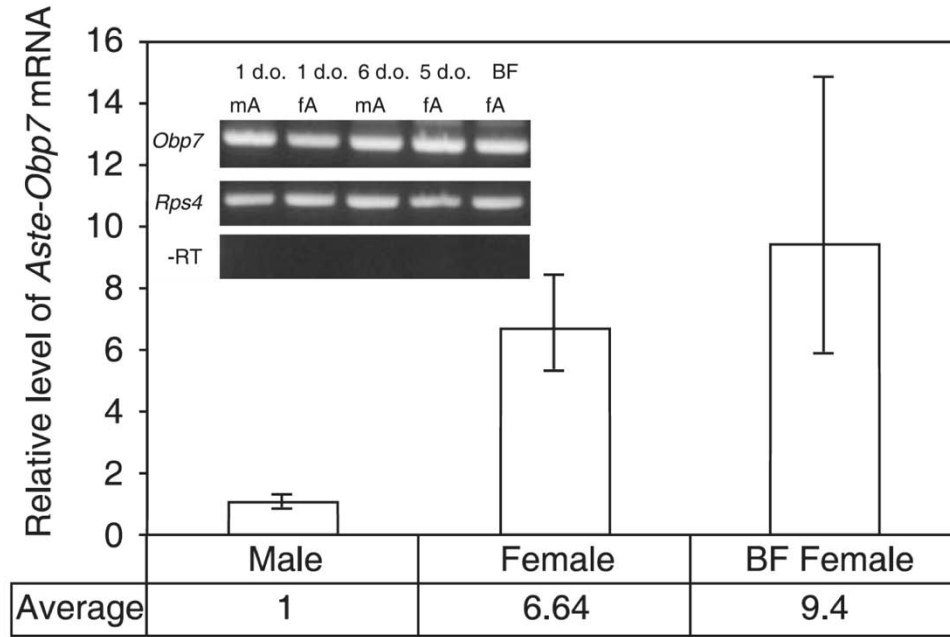
Η πρωτεΐνη OBP7 από το κουνούπι *A. stephensi* (AsteOBP7) μελετήθηκε από τους M. S. Sengul και Z. Tu το 2008. Πειράματα ανάλυσης του προφίλ έκφρασης του γονιδίου της AsteOBP7 αποκάλυψαν ενδιαφέροντα στοιχεία που αφορούν τη συμμετοχή της πρωτεΐνης στο οσφρητικό σύστημα των θηλυκών κουνουπιών.

Η αξιολόγηση του προφίλ έκφρασης της AsteOBP7 πραγματοποιήθηκε με μη ποσοτική PCR αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR) σε συνδυασμό με πειράματα ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (quantitative real time PCR). Το mRNA του γονιδίου της AsteOBP7 ανιχνεύθηκε σε όλους τους χημειοαισθητικούς ιστούς των ενήλικων θηλυκών κουνουπιών, με τα υψηλότερα επίπεδα να παρατηρούνται στις κεραίες (**Εικόνα 10**).^[46]



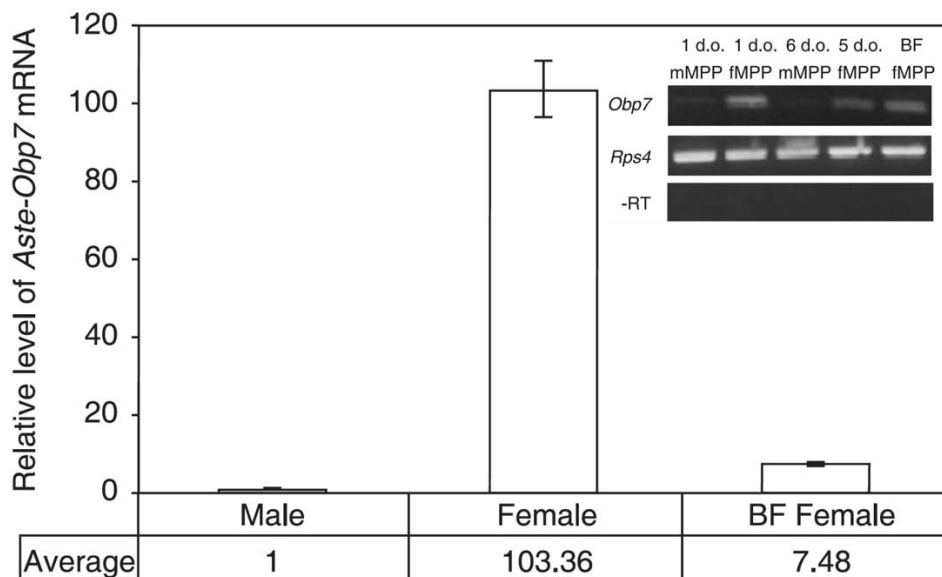
Εικόνα 10: Σχετικά επίπεδα του mRNA της AsteOBP7 στους χημειοαισθητικούς ιστούς ενήλικων θηλυκών κουνουπιών. Ένθετο: RT-PCR που δείχνει την έκφραση του γονιδίου της AsteOBP7 στους χημειοαισθητικούς ιστούς των ενήλικων θηλυκών κουνουπιών (Sengul et. al., 2008).

Συγκριτικά με ενήλικα αρσενικά κουνούπια, τα επίπεδα του mRNA της πρωτεΐνης ήταν υψηλότερα στις κεραίες των ενήλικων θηλυκών κουνουπιών και αυξήθηκαν στα θηλυκά ύστερα από γεύμα αίματος (**Εικόνα 11**).^[46]



Εικόνα 11: Σχετικά επίπεδα του mRNA της AsteOBP7 στις κεραίες ενήλικων θηλυκών και αρσενικών κουνουπιών. Ένθετο: RT-PCR που δείχνει την έκφραση του γονιδίου της AsteOBP7 στις κεραίες ενήλικων θηλυκών και αρσενικών κουνουπιών (BF: ύστερα από γεύμα αίματος) (Sengul et. al., 2008).

Στην προβοσκίδα και στη γνάθο δεν παρατηρήθηκε κάτι αντίστοιχο, αφού ύστερα από γεύμα αίματος τα επίπεδα του mRNA της AsteOBP7 παρουσίασαν σημαντική μείωση, εξακολουθώντας όμως να είναι υψηλότερα σε σχέση με των ενήλικων αρσενικών (Εικόνα 12).^[46]



Εικόνα 12: Σχετικά επίπεδα του mRNA της AsteOBP7 στην προβοσκίδα και τη γνάθο ενήλικων θηλυκών και αρσενικών κουνουπιών. Ένθετο: RT-PCR που δείχνει την έκφραση του γονιδίου της AsteOBP7 στην προβοσκίδα και τη γνάθο ενήλικων θηλυκών και αρσενικών κουνουπιών (BF: ύστερα από γεύμα αίματος) (Sengul et. al., 2008).

Επιπλέον, η στοίχιση της αμινοξικής αλληλουχίας της AsteOBP7 αποκάλυψε σημαντική ομοιότητα με την αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης OBP7 από το κουνούπι *A. gambiae* (AgamOBP7) (**Εικόνα 13**).^[46] Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η AgamOBP7 εκφράζεται σε όλους τους χημειοαισθητικούς ιστούς του κουνουπιού και τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης παρατηρούνται στις κεραίες,^[35] όπως συμβαίνει και με τα επίπεδα έκφρασης της AsteOBP7.

AsteOBP7	-----MSKAAIATFTALLTVYIVLSAAFEI PDRYKPKAKMLHEL	CV	AESGASEE	LLRQC	MDGTVHSDPAVKC	*			
AgamOBP7	MCEYSNTRNKMSNLVVVLVLLTMYIVLSAPFEI PDRYKPKAKMLHEI	CI	AESGASEE	QLRT	CLDGTVP	TAPAAKC			
AsteOBP7	YIHC	CLFDKIDV	IEEGTGRILLDRLLYI	IPDDVKDAVN	QLTRAC	SHIVTPDK	CDTAYETVK	CYFNAHDEVIKFC	HL
AgamOBP7	YIHC	CLFDKIDV	VDEATGRILLDRLLYI	IPDDVKA	AVDHL	TRECSHIVTPDK	CETAYETVK	CYFNARDEVIKFC	HL
AsteOBP7	LVIE								
AgamOBP7	LVLE								

Εικόνα 13: Στοίχιση των αμινοξικών αλληλουχιών μεταξύ AsteOBP7 και AgamOBP7. Τα συντηρημένα αμινοξέα μεταξύ των δύο πρωτεϊνών είναι ομαδοποιημένα σε κίτρινα πλαίσια. Το μοτίβο των κυστεϊνών είναι καλά συντηρημένο και επισημαίνεται με αστερίσκους. Τα πεπτίδια-σινιάλα είναι υπογραμμισμένα. (Sengul et. al., 2008).

Συνολικά, τα αποτελέσματα των παραπάνω αναλύσεων δημιουργούν ένα προφίλ έκφρασης που υποδηλώνει ότι η AsteOBP7 έχει πιθανώς σημαντικό ρόλο στο οσφρητικό σύστημα των θηλυκών κουνουπιών και κατ' επέκταση συμμετέχει στη συμπεριφορά του εντόμου που σχετίζεται με την αναγνώριση του ανθρώπινου στόχου και τη λήψη αίματος.^[46]

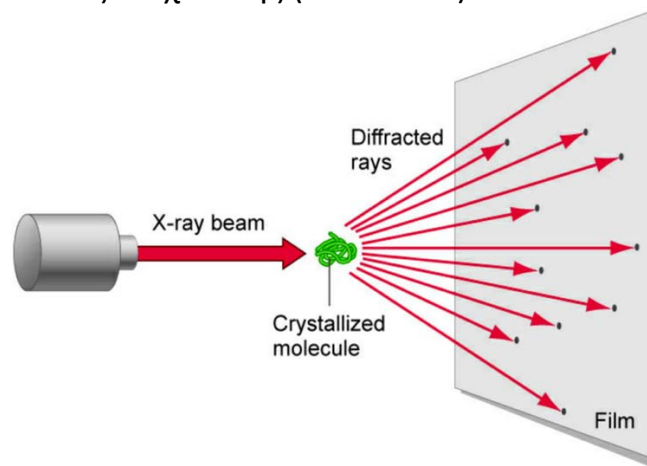
Η απουσία κατατεθμένης κρυσταλλικής δομής για την AsteOBP7, στρέφει το ενδιαφέρον σε δομικές μελέτες που θα βοηθήσουν στην εύρεση νέων και αποτελεσματικότερων ενώσεων με απωθητική ή ελκυστική δράση. Οι ενώσεις αυτές είναι δυνατόν να διαταράξουν την ικανότητα αναγνώρισης του ανθρώπινου στόχου και ως εκ τούτου θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μείωση της επαφής του κουνουπιού με τον άνθρωπο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΑ ΑΚΤΙΝΩΝ Χ

4.1 Εισαγωγή

Η πρωτεϊνική κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ ήταν η πρώτη τεχνική που αναπτύχθηκε για τον προσδιορισμό της πρωτεϊνικής δομής σε επίπεδο ατόμων. Με την τεχνική αυτή επιτυγχάνουμε τον επακριβή προσδιορισμό των θέσεων στον χώρο της πλειονότητας των ατόμων μιας πρωτεΐνης. Τα τρία βασικά συστατικά της ανάλυσης με ακτίνες Χ είναι ένας πρωτεϊνικός κρύσταλλος, μία πηγή ακτίνων Χ και ένας ανιχνευτής (**Εικόνα 14**).^[43]



Εικόνα 14: Διάταξη των βασικών χαρακτηριστικών σε ένα πείραμα κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ (Εικόνα από <http://260h.pbworks.com/w/page/30814223/X%20Ray%20Crystallography>).

4.2 Ακτίνες Χ

Η μελέτη των κρυσταλλικών δομών γίνεται με τη βοήθεια των ακτίνων Χ, οι οποίες αποτελούν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία μήκους κύματος 0,1-1000 Å. Η μέση απόσταση μεταξύ των ομοιοπολικά συνδεδεμένων ατόμων στα πρωτεϊνικά μόρια είναι περίπου 1,4 Å. Για να επιτευχθεί η μέγιστη ατομική ευκρίνεια, είναι απαραίτητη προϋπόθεση το μήκος κύματος των ακτίνων να βρίσκεται περίπου στο επίπεδο του μήκους του ομοιοπολικού δεσμού, το οποίο εμπεριέχεται στο εύρος του μήκους κύματος των ακτίνων Χ.^[44] Ως κύμα, οι ακτίνες Χ περιγράφονται πλήρως από τη φάση, το πλάτος, το μήκος κύματος και τη διεύθυνση διάδοσης.

4.3 Κρυστάλλωση των Πρωτεϊνών

I. Κρύσταλλοι

Το πρώτο βήμα σε κάθε πείραμα πρωτεϊνικής κρυσταλλογραφίας είναι η παρασκευή της πρωτεΐνης ή του συμπλόκου της με κάποιο προσδέτη σε κρυσταλλική μορφή. Ως κρύσταλλο ορίζουμε την τρισδιάστατη περιοδική διευθέτηση των μορίων σε στερεή φάση, τα οποία συγκρατούνται μεταξύ τους με μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις που ονομάζονται κρυσταλλικές επαφές.

Ένα μεμονωμένο μόριο περιθλά ασθενώς τις ακτίνες και επομένως η περίθλαση δεν μπορεί να μετρηθεί. Η χρήση των κρυστάλλων λύνει αυτό το πρόβλημα, διότι ενισχύεται το σήμα της περίθλασης. Αφού σχηματιστεί ο κρύσταλλος, μια δέσμη ακτίνων Χ προσκρούει σε αυτόν και ένα μέρος της τον διαπερνά, ενώ το υπόλοιπο σκεδάζεται προς διάφορες κατευθύνσεις. Οι ακτίνες Χ που περιθλώνται μπορούν να ανιχνευθούν σε ακτινογραφικό φιλμ ή από έναν ηλεκτρονικό ανιχνευτή στερεάς κατάστασης. Ο τρόπος σκέδασης προσφέρει πολλές πληροφορίες για τον προσδιορισμό της δομής της πρωτεΐνης.^[43]

II. Κρυστάλλωση Πρωτεϊνών

Ο όρος κρυστάλλωση περιγράφει τη μεταφορά των πρωτεϊνικών μορίων από την υγρή φάση σε μια οργανωμένη στερεή φάση. Σε υδατικό διάλυμα τα πρωτεϊνικά μόρια περιβάλλονται από μόρια ύδατος. Όταν το διάλυμα είναι κορεσμένο, τα μόρια της πρωτεΐνης βρίσκονται σε ισορροπία με τα μόρια του διαλύτη και το σύστημα είναι θερμοδυναμικά σταθερό. Για να επιτευχθεί η κρυστάλλωση θα πρέπει το διάλυμα να φθάσει στην κατάσταση υπερκορεσμού, δηλαδή στη θερμοδυναμικά ασταθή κατάσταση κατά την οποία στο διάλυμα περιέχεται μεγαλύτερη ποσότητα πρωτεϊνικών μορίων από αυτή που θα μπορούσε να διαλυθεί στη συγκεκριμένη ποσότητα διαλύτη υπό συγκεκριμένες συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας. Στην κατάσταση υπερκορεσμού δεν υπάρχει ικανός αριθμός μορίων ύδατος για να ενυδατώσει όλα τα πρωτεϊνικά μόρια, με αποτέλεσμα αυτά να συσσωματώνονται σχηματίζοντας είτε κρυστάλλους είτε άμορφα ιζήματα.

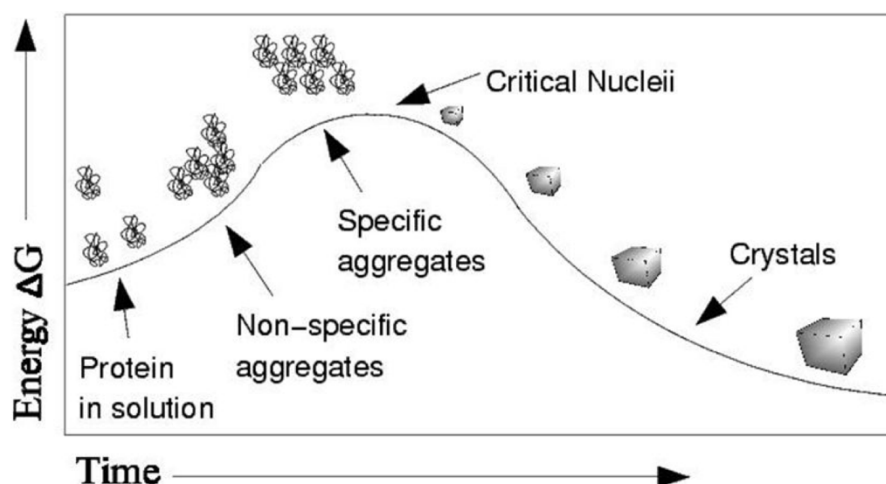
Επιπλέον απαιτήσεις για την ανάπτυξη κρυστάλλων είναι:

- 1) η υψηλού βαθμού καθαρότητα της πρωτεΐνης (>95%)
- 2) η ομοιογένεια του πρωτεϊνικού δείγματος (η πρωτεΐνη πρέπει να υπάρχει στο διάλυμα ως ένα ολιγομερικό είδος, π.χ. μονομερές)
- 3) η σωστή αναδίπλωση των πρωτεϊνικών μορίων (τυχαία αναδιπλωμένα ή μη αναδιπλωμένα πρωτεϊνικά μόρια δε μπορούν να διαταχθούν με τάξη έτσι ώστε να σχηματιστεί κρύσταλλος)

4) τα πειράματα κρυστάλλωσης να ξεκινούν σύντομα μετά την παραγωγή της πρωτεΐνης, προκειμένου να αποφευχθεί η ετερογένεια του πρωτεϊνικού δείγματος εξαιτίας φυσικής πρωτεόλυσης.

III. Στάδια Ανάπτυξης Κρυστάλλων: το Διάγραμμα Ενέργειας

Η κρυστάλλωση των πρωτεϊνών αποτελείται από τρία στάδια: την πυρήνωση, την ανάπτυξη των κρυστάλλων και την παύση της ανάπτυξης (**Εικόνα 15**).



Εικόνα 15: Γράφημα της ελεύθερης ενέργειας σε συνάρτηση με το χρόνο κατά την ανάπτυξη των κρυστάλλων (Εικόνα από www.chemie.uni-hamburg.de)

Προκειμένου να σχηματιστεί ένας κρύσταλλος από ένα πρωτεϊνικό διάλυμα σε κατάσταση υπερκορεσμού, πρέπει να ξεπεραστεί ένα ενεργειακό φράγμα που αντιπροσωπεύει την ελεύθερη ενέργεια (Energy ΔG) που απαιτείται για την έναρξη της πυρήνωσης. Κατά τη διάρκεια της πυρήνωσης, μια επαρκής ποσότητα μορίων συσχετίζεται σε τρεις διαστάσεις για να σχηματίσει ένα θερμοδυναμικά σταθερό συσσωμάτωμα που ονομάζεται κρίσιμος πυρήνας (critical nuclei). Κατά το στάδιο της ανάπτυξης των κρυστάλλων, τα πρωτεϊνικά μόρια προσελκύονται στους κρίσιμους πυρήνες και συναρμολογούνται ταξινομημένα στην επιφάνεια των κρίσιμων πυρήνων για το σχηματισμό των αναπτυσσόμενων κρυστάλλων. Η ανάπτυξη των κρυστάλλων σταματά όταν το διάλυμα είναι κορεσμένο και τα μόρια της πρωτεΐνης εξαντληθούν.^[45]

IV. Το Διάγραμμα Φάσεων

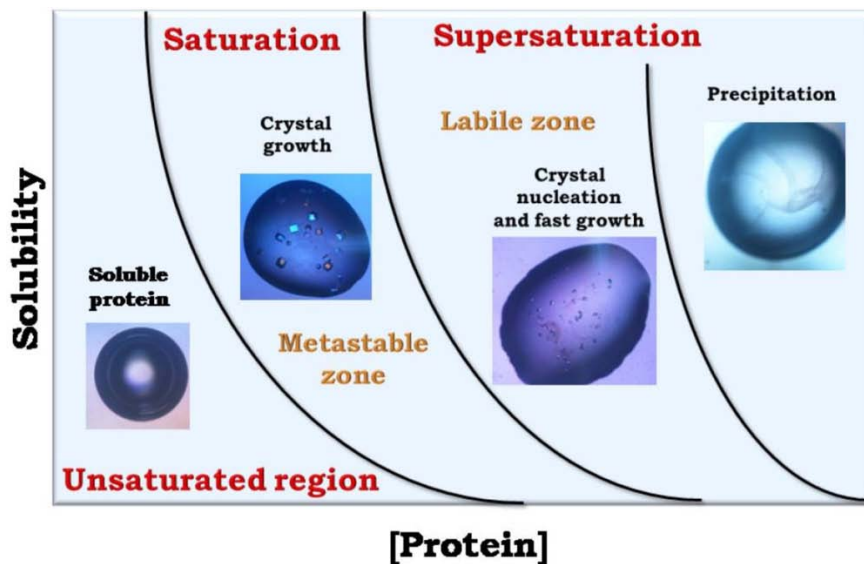
Η ανάπτυξη των κρυστάλλων μπορεί εύκολα να απεικονιστεί σε ένα διάγραμμα δύο διαστάσεων (**Εικόνα 16**), το οποίο αντιπροσωπεύει τις τρεις σταθερές καταστάσεις ενός πρωτεϊνικού διαλύματος (υγρό, κρύσταλλος, ίζημα) ως συνάρτηση δύο μεταβλητών: της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης και της διαλυτότητάς της. Το διάγραμμα αυτό ονομάζεται Διάγραμμα Φάσεων. Το

πρωτεϊνικό διάλυμα βρίσκεται σε κατάσταση υπερκορεσμού (supernaturation) όταν η συγκέντρωσή του υπερβαίνει το όριο διαλυτότητας. Σύμφωνα με το βαθμό υπερκορεσμού, το διάγραμμα μπορεί να χωριστεί στις εξής τρεις περιοχές:

1) μετασταθής περιοχή (metastable zone), στην οποία πραγματοποιείται αύξηση των κρυστάλλων από κρίσιμους πυρήνες που προϋπάρχουν στο διάλυμα

2) περιοχή πυρήνωσης (labile zone), στην οποία σχηματίζονται οι κρίσιμοι πυρήνες. Η εύρεση αυτής της περιοχής αποτελεί πρωταρχικό στόχο των πειραμάτων κρυστάλλωσης.

3) περιοχή κατακρήμνισης (precipitation), στην οποία η πρωτεΐνη κατακρημνίζεται ως άμορφο ίζημα.^[45]



Εικόνα 16: Το Διάγραμμα των Φάσεων. Η διαλυτότητα μιας πρωτεΐνης παρουσιάζεται ως συνάρτηση της συγκέντρωσής της (Krauss et. al., 2013)

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Τα κουνούπια του γένους *Anopheles* καθώς και άλλα αιματοφάγα έντομα είναι υπεύθυνα για τη μετάδοση πολλών ασθενειών στον άνθρωπο, όπως η ελονοσία, με σοβαρές συνέπειες για τη δημόσια υγεία. Τα τελευταία χρόνια, η χρήση εντομοαπωθητικών αποτελεί έναν αποτελεσματικό τρόπο αποφυγής των τσιμπημάτων από μολυσμένα κουνούπια, καθώς δεν επιτρέπει την επαφή τους με τους ανθρώπινους-στόχους. Ωστόσο, αντίσταση των κουνουπιών έναντι των εντομοαπωθητικών και οι ενδείξεις τοξικότητας των υπαρχόντων εντομοαπωθητικών καθιστά επιτακτική την ανάγκη εύρεσης νέων, αποτελεσματικότερων ενώσεων.

Η ικανότητα προσδιορισμού της τρισδιάστατης δομής μιας πρωτεΐνης σε σύμπλοκο με ένα προσδέτη θέτει μια νέα βάση στο σχεδιασμό των εντομοαπωθητικών. Πληθώρα πειραμάτων και ερευνών έχουν δείξει ότι οι OBPs των κουνουπιών είναι αναντικατάστατα στοιχεία του οσφρητικού τους συστήματος και παίζουν σημαντικό ρόλο στην αναγνώριση των οσμών, γεγονός που τις καθιστά πρωταρχικούς στόχους για το σχεδιασμό εντομοαπωθητικών ενώσεων με βάση τη δομή.

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία μελετήθηκε η πρωτεΐνη δέσμευσης οσμογόνων μορίων OBP7 του ανωφελούς κώνωπα *Anopheles stephensi* (AsteOBP7). Έχει αποδειχθεί πειραματικά ότι τα επίπεδα του mRNA της συγκεκριμένης πρωτεΐνης είναι σημαντικά υψηλότερα στις κεραίες των θηλυκών κουνουπιών σε σχέση με των αρσενικών, όπως επίσης ότι τα επίπεδα του mRNA στη γνάθο και στην προβοσκίδα των θηλυκών κουνουπιών μειώνονται αισθητά ύστερα από γεύμα αίματος. Η πιθανή συμμετοχή της AsteOBP7 στο οσφρητικό σύστημα σε συμπεριφορά που σχετίζεται με τη λήψη γευμάτων αίματος αποτελεί ενδιαφέρον αντικείμενο μελέτης της δομής και της λειτουργίας της, στην προσπάθεια ελάττωσης της μετάδοσης της ελονοσίας.

Για το σκοπό αυτό, τέθηκαν οι επιμέρους στόχοι:

- 1) Κλωνοποίηση του γονιδίου της AsteOBP7 σε πλασμιδιακό φορέα έκφρασης.
- 2) Εύρεση των βέλτιστων συνθηκών έκφρασης της πρωτεΐνης σε βακτηριακά στελέχη με σκοπό την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων διαλυτής πρωτεΐνης.
- 3) Σχεδιασμός του πρωτοκόλλου καθαρισμού της AsteOBP7 με σκοπό τη λήψη πρωτεΐνης εξαιρετικά υψηλού βαθμού καθαρότητας.
- 4) Πειράματα κρυστάλλωσης της AsteOBP7 σε διάφορες συνθήκες με σκοπό την ανάπτυξη κρυστάλλων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ-ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

6.1 Αντιδραστήρια

- Κύτταρα *E. coli* DH5a, Takara
- Κύτταρα *E. coli* Origami 2 (DE3), Novagen
- Θρυπτόνη, Tryptone enzymatic digest from casein, Sigma
- Εκχύλισμα ζύμης, Yeast extract, Sigma
- Άγαρ, Agar bacteriological, Oxoid Ltd
- Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside, IPTG, Sigma
- Ανηγγμένη γλουταθειόνη, L-Glutathione reduced, GSH, Sigma
- Οξειδωμένη γλουταθειόνη, L-Glutathione oxidized, GSSG, Sigma
- Τετρακυκλίνη, Tetracycline, Tet, Sigma
- Αμπικιλλίνη, Ampicillin Sodium Salt, Amp, Sigma
- Καρβενικιλλίνη, Carbenicillin, Crb, Sigma
- Phenylmethylsulfonyl-fluoride, PMSF, Serva
- Αναστολείς πρωτεασών, Complete EDTA free protease inhibitor cocktail tablets, Roche
- Διάλυμα 30% w/v ακρυλαμιδίου/N,N'-μεθυλένο-δισ-ακρυλαμιδίου, 30% w/v Acrylamide/Bis Solution 29:1, BioRad
- Δωδεκυλο-θειικό νάτριο, Sodium Dodecyl Sulfate, SDS, Sigma
- Γλυκίνη, Glycine for electrophoresis, Sigma
- Βουτανόλη, Butanol, Sigma
- Χρωστική Brilliant Blue R, Sigma
- Χρωστική BioRad Protein Assay Dye Reagent
- Γλυκερόλη, Glycerol (plant), Serva
- Βενζονάση, Benzonase Nuclease, Sigma
- Tris(hydroxymethyl)-aminomethane, Tris, Sigma
- Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA, Serva
- Χλωριούχο νάτριο, Sodium Chloride, NaCl, Sigma
- Υδροχλωρική γουανιδίνη, Guanidine hydrochloride, GdnHCl, Serva
- L-Αργινίνη, L-Arginine, Sigma
- Triton X-100, Sigma
- Πρωτεϊνικοί δείκτες, Prestained Protein Markers, Abm
- Δείκτες DNA, 100bp DNA ladder, Invitrogen

- Οξικό νάτριο, Sodium Acetate, Serva
- Απόλυτη αιθανόλη, Ethanol Absolut, Sigma
- Οξικό οξύ, Acetic Acid, Sigma
- Υδροχλωρικό οξύ, Hydrochloric Acid, HCl, Sigma
- Υδροξείδιο του νατρίου, Sodium Hydroxide, NaOH, Sigma
- Πλασμιδιακός φορέας έκφρασης pET22b(+), Novagen
- Πλασμιδιακός φορέας pUC57, Novagen
- Λιγάση T4 DNA, T4 DNA ligase, New England Biosciences
- Περιοριστικά ένζυμα XhoI και NdeI, Takara
- GelRed 10000X in water, Biotium
- Μείγμα ολιγονουκλεοτιδίων, 100mM dNTPs set PCR grade, Invitrogen
- Nucleospin plasmid kit, Machery-Nagel
- Nucleospin Extract II, Machery-Nagel
- Morpheus, JSCG+, Structure Screen Crystallization Screens

6.2 Εργαστηριακός Εξοπλισμός

- Αποστειρωμένα erpendorf (1,5mL), Corning
- Αποστειρωμένα falcon (15mL, 50mL), Corning
- Αποστειρωμένα τριβλία, Corning
- Αποστειρωμένα σιφώνια (2mL, 5mL, 10mL, 25mL)
- Αποστειρωμένα ρύγχη για πιπέτες, Gilson
- Βρόγχοι εμβολιασμού καλλιιεργειών, Inoculation Loops, Gilson
- Δοκιμαστικοί σωλήνες (10mL)
- Κωνικές φιάλες για κυτταροκαλλιέργειες (250mL, 2L)
- Φίλτρα συμπύκνωσης Amicon Ultra 10MWCO, Millipore
- Μεμβράνες αποξήρασης πηκτών πολυακρυλαμιδίου, Gel drying frames extra cellophane sheets, Sigma
- Πιπέτες ακριβείας Gilson
- Πλαστικές κυψελίδες φωτομέτρου (1,6mL)
- Κυψελίδες χαλαζία τύπου 16.100, Starna Scientific Ltd.
- Επωαστήρας ανάδευσης ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας JFL 3033
- Επωαστήρας ανάδευσης ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας Labtech
- Φυγόκεντρος Kubota 7780
- Υπερφυγόκεντρος Optima LE-80K, Beckman-Coulter
- Συσκευή υπερήχων
- Συσκευή μέτρησης pH, MetrOhm
- Συσκευή PCR MiniCycler PTC-150, MJ Research
- Ξηρό λουτρό επώασης, Dry bath incubator, Kisker

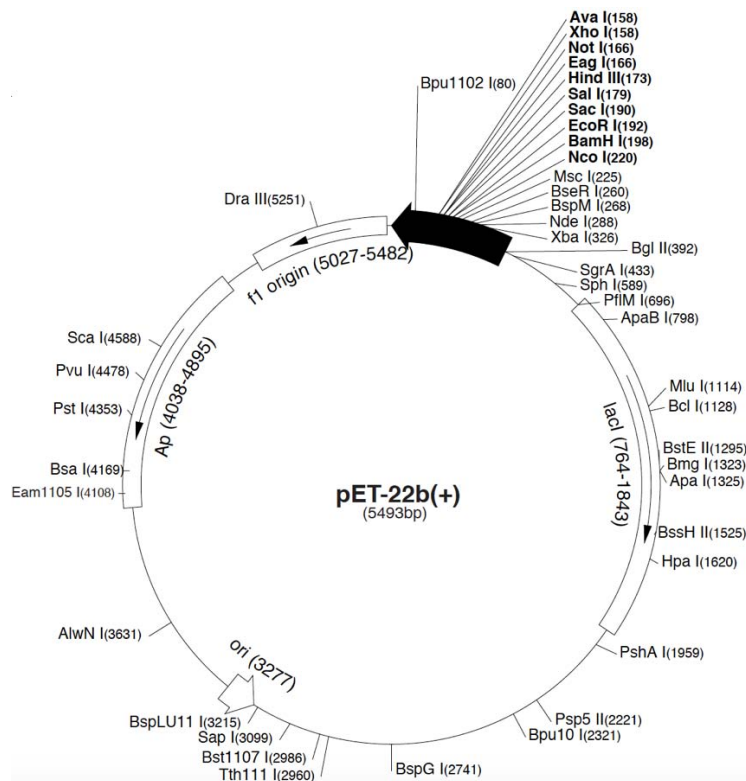
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης DNA Hoefer HE 33, Amersham Biosciences
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών Mini-Protean 3 cell, Bio-Rad
- Συσκευή ανάδευσης ZX3, VELP Scientifica
- Φασματοφωτόμετρο Novaspec II, Pharmacia Biotech
- Θερμοστατούμενο φασματοφωτόμετρο Cary 100 Conc UV/Vis, Varian
- Μικροπλάκες 96 θέσεων κρυστάλλωσης, MRC 2-well crystallization plates, Jena Biosciences
- Σύστημα χρωματογραφίας Akta purifier UPC-900 με συσκευή συλλογής κλασμάτων FRAC-900, GE Healthcare
- Στήλη χρωματογραφίας HiTrap Q FF 5mL, GE Healthcare
- Στήλη χρωματογραφίας Resource Q 6mL, GE Healthcare
- Στήλη χρωματογραφίας Superdex 75, GE Healthcare
- Σύστημα αυτοματοποιημένης κρυστάλλωσης πρωτεϊνών Oryx Nano, Douglas Instruments Ltd.

6.3 Πλασμιδιακός φορέας έκφρασης pET22b(+)

Τα πλασμίδια είναι κυκλικά μόρια δίκλωνου DNA που αντιγράφονται ανεξάρτητα από το χρωμόσωμα του κυττάρου ξενιστή. Χρησιμοποιούνται ως φορείς ανασυνδυασμένου DNA εξαιτίας ορισμένων ιδιοτήτων τους:

- 1) έχουν μικρό μέγεθος
- 2) έχουν σημείο έναρξης της αντιγραφής (ori)
- 3) έχουν γονίδια-δείκτες (selectable marker genes) που συνήθως είναι γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά και χρησιμοποιούνται στην επιλογή των κυττάρων που έχουν μετασχηματιστεί
- 4) έχουν μια περιοχή κατάλληλη για την εισαγωγή του ξένου DNA, η οποία περιέχει μοναδικές θέσεις αναγνώρισης από ένζυμα περιορισμού και ονομάζεται πολυσύνδεσμος (multiple cloning site, MCS).

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας έκφρασης pET22b(+) (**Εικόνα 17**) της εταιρείας Novagen για την κλωνοποίηση του γονιδίου της πρωτεΐνης AsteOBP7. Το πλασμίδιο έχει μήκος 5493 bp και ως γονίδιο-δείκτη περιέχει το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη, σε τελική συγκέντρωση 50-100 µg/mL.



Εικόνα 17: Ο πλασμιδιακός φορέας έκφρασης pET22b(+) (Novagen).

6.4 Βακτηριακά στελέχη και καλλιέργεια *E. coli*

I. *E. coli* DH5a δεκτικά κύτταρα (competent cells)

Τα στελέχη αυτά χρησιμοποιούνται κυρίως για κλωνοποίηση πλασμιδίων διότι δεν περιέχουν στο γονιδίωμά τους το γονίδιο *lacI^q* που απαιτείται για επαγόμενη έκφραση πρωτεϊνών. Το στέλεχος αυτό δεν παρουσιάζει αντίσταση σε κάποιο αντιβιοτικό.

II. *E. coli* Origami 2 (DE3) δεκτικά κύτταρα

Τα στελέχη αυτά προέρχονται από μία *lacZY* μετάλλαξη του βακτηριακού στελέχους BL21. Είναι παράγωγα K-12 που φέρουν μεταλλάξεις στα γονίδια αναγωγής της θειορεδοξίνης (*trxB*) και αναγωγής της γλουταθειόνης (*gor*), τα οποία αυξάνουν σημαντικά το βαθμό σχηματισμού δισουλφιδικών δεσμών στο κυτταρόπλασμα των βακτηρίων. Η μετάλλαξη *gor* προσφέρει αντίσταση στην τετρακυκλίνη. Για να μειωθεί η πιθανότητα σχηματισμού δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ των πρωτεϊνικών μορίων, τα στελέχη αυτά χρησιμοποιούνται μόνο για την έκφραση πρωτεϊνών που απαιτούν σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών, ως μέρος της σωστής αναδίπλωσης (όπως η υπό μελέτη AsteOBP7). Η ένδειξη «DE3» υποδεικνύει ότι ο ξενιστής είναι λυσογόνο του λDE3 και επομένως φέρει ένα χρωμοσωμικό αντίγραφο της T7 RNA πολυμεράσης υπό τον έλεγχο του υποκινητή *lacUV5*. Τέτοια στελέχη είναι

κατάλληλα για παραγωγή πρωτεΐνης από γονίδια κλωνοποιημένα σε φορείς pET μέσω επαγωγής με IPTG.

III. Καλλιέργεια βακτηρίων *E. coli*

Ο όρος αναφέρεται στην ανάπτυξη μεγάλων πληθυσμών βακτηρίων σε συγκεκριμένες συνθήκες. Η ανάπτυξη τέτοιων καλλιεργειών πραγματοποιείται υπό ασηπτικές συνθήκες διότι μας ενδιαφέρει η ανάπτυξη ενός μόνο στελέχους βακτηρίου (αποφυγή επιμολύνσεων).

Η έκφραση του γονιδίου-στόχου ξεκινά με την προσθήκη του επαγωγέα έκφρασης (IPTG) τη στιγμή που τα βακτήρια βρίσκονται στην εκθετική φάση ανάπτυξής τους και είναι μεταβολικώς ενεργά, προκειμένου να παράξουν τη μέγιστη ποσότητα πρωτεΐνης. Για τα βακτήρια *E. coli*, αυτή αντιστοιχεί σε οπτική πυκνότητα $OD_{600} = 0,5-0,6$. Μπορεί να γίνει ανά πάσα στιγμή ο προσδιορισμός της φάσης ανάπτυξης στην οποία βρίσκεται η καλλιέργεια με φωτομέτρηση στα 600nm, όπου μετράται σε κυψελίδα η οπτική πυκνότητα 1mL καλλιέργειας. Ο εμβολιασμός όλων των καλλιεργειών γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου και η επώαση στους 37 °C.

Οι καλλιέργειες αναπτύσσονται στους 37 °C σε αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό LB medium (Luria-Bertani broth) που περιέχει 25μL NaOH 10N, 2,5g NaCl, 1,25g tryptone και 2,5g yeast extract ανά 250mL διαλύματος και έχει pH 7.

Για την παρασκευή τριβλίων LB-agar παρασκευάζεται το ανωτέρω διάλυμα LB το οποίο περιέχει επίσης 15g agar/L. Ακολουθεί αποστείρωση και διάλυση του άγαρ. Έπειτα αφήνεται να κρυώσει σε θερμοκρασία < 60 °C, προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα αντιβιοτικών και το διάλυμα που προκύπτει προστίθεται σε αποστειρωμένα τριβλία. Τα τριβλία αφήνονται μέχρι στερεοποίησης του διαλύματος και αποθηκεύονται ανεστραμμένα, για ελαχιστοποίηση της εναπόθεσης υδρατμών, στους 4 °C.

6.5 Αντιβιοτικά

Για την αποφυγή επιμολύνσεων στις καλλιέργειες μετασηματισμένων βακτηρίων προστίθενται αντιβιοτικά, η ποσότητα και το είδος των οποίων εξαρτώνται από τα γονίδια-δείκτες που φέρει το πλασμίδιο και από την αντίσταση του βακτηριακού στελέχους σε συγκεκριμένα αντιβιοτικά.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντιβιοτικά:

I. Αμπικιλίνη (Ampicillin, Amp)

Η αμπικιλίνη (Εικόνα 18A) είναι αντιβιοτικό που ανήκει στην κατηγορία των β-λακταμών και δρα παρεμποδίζοντας τη βιοσύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων. Τα ανθεκτικά στην αμπικιλίνη στελέχη παράγουν

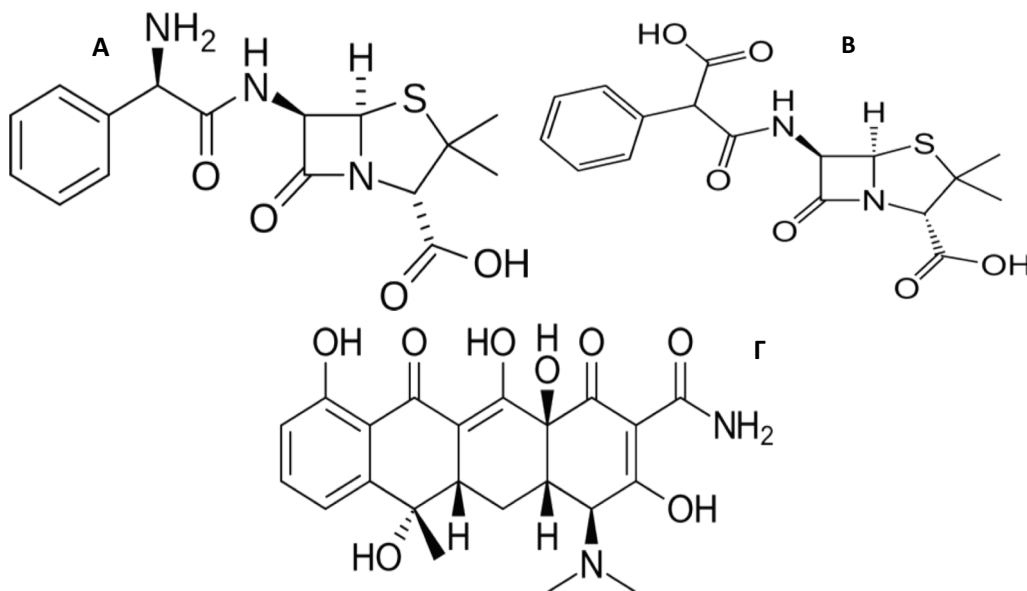
το ένζυμο β-λακταμάση, το οποίο υδρολύει το β-λακταμικό δακτύλιο του αντιβιοτικού. Το ένζυμο αυτό κωδικοποιείται από το γονίδιο *bla* που υπάρχει στο πλασμίδιο pET22b(+) και έτσι ύστερα από την προσθήκη αμπικιλλίνης, μόνο τα βακτήρια *E. coli* που περιέχουν τα πλασμίδια αυτά επιβιώνουν.

II. Καρβενικιλίνη (Carbencillin, Crb)

Η καρβενικιλίνη (Εικόνα 18B) είναι υποκατάστατο της αμπικιλλίνης (στην ίδια τελική συγκέντρωση) και παρουσιάζει τον ίδιο τρόπο δράσης. Σε τριβλία LB-agar προτιμάται έναντι της αμπικιλλίνης, διότι παρουσιάζει μεγαλύτερη σταθερότητα με αποτέλεσμα να μειώνεται η ανάπτυξη των δορυφορικών αποικιών.

III. Τετρακυκλίνη (Tetracycline, Tet)

Η τετρακυκλίνη (Εικόνα 18Γ) ανήκει στην κατηγορία των πολυκετιδίων και δρα αναστέλλοντας την σύνθεση των πρωτεϊνών, μέσω της δέσμευσής της στην υπομονάδα 30S του ριβοσώματος που δεν επιτρέπει την πρόσδεση των φορτισμένων αμινοακυλο-tRNAs στην περιοχή A του ριβοσώματος. Μόνο τα κύτταρα που φέρουν το γονίδιο *tet^R* (ή μετάλλαξη στο γονίδιο *gor*, όπως τα χρησιμοποιούμενα *E. coli* Origami 2 (DE3) δεκτικά κύτταρα) επιβιώνουν, αφού αυτό το γονίδιο κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη που εξάγει την τετρακυκλίνη από το κύτταρο.



Εικόνα 18: Χημικός τύπος της (Α) αμπικιλλίνης, (Β) καρβενικιλίνης και (Γ) τετρακυκλίνης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο

ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ, ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ AsteOBP7

7.1 Μετασηματισμός βακτηριακών κυττάρων *E. coli* DH5a

Ο μετασηματισμός βακτηριακών κυττάρων *E. coli* DH5a με το πλασμίδιο AsteOBP7-pUC57 πραγματοποιείται με σκοπό τον πολλαπλασιασμό του πλασμιδίου και του εισαχθέντος γονιδίου της AsteOBP7. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιείται η μέθοδος του χημικού μετασηματισμού. Πιο συγκεκριμένα:

- 1) 2μL πλασμιδίου (~200ng) AsteOBP7-pUC57 προστίθενται σε 20μL δεκτικών κυττάρων *E. coli* DH5a.
- 2) τα κύτταρα επωάζονται στον πάγο για 30min.
- 3) τα κύτταρα υπόκεινται σε θερμικό σοκ στους 42 °C για 45sec.
- 4) τα κύτταρα μεταφέρονται στον πάγο για 2min.
- 5) προστίθενται 250μL θρεπτικού υλικού SOC medium (2% tryptone, 0.5% yeast extract, 10mM NaCl, 2.5mM KCl, 10mM MgCl₂, 10mM MgSO₄, 20mM glucose), το οποίο δεν περιέχει αντιβιοτικά προκειμένου να συντεθούν παράγοντες ανθεκτικότητας (π.χ. το ένζυμο β-λακταμάση)
- 6) τα κύτταρα επωάζονται στους 37 °C για 1h υπό έντονη ανάδευση (220 rounds per minute, rpm)
- 7) επίστρωση 100μL υγρής καλλιέργειας κυττάρων σε προθερμασμένο στους 37 °C τριβλίο petri που περιέχει LB με το αντιβιοτικό Crb σε τελική συγκέντρωση 50 μg/mL (τα στελέχη αυτά δεν παρουσιάζουν αντίσταση σε κάποιο αντιβιοτικό)
- 8) τα κύτταρα επωάζονται, με το τριβλίο ανεστραμμένο, για 24h στους 37 °C.

7.2 Πολλαπλασιασμός και απομόνωση του πλασμιδίου AsteOBP7-pUC57 από κύτταρα *E. coli* DH5a (miniprep)

Επιλέγονται 2 αποικίες, οι οποίες χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη μικρών, υγρών καλλιεργείων:

- 1) 5mL θρεπτικού μέσου LB που περιέχει το αντιβιοτικό Amp σε τελική συγκέντρωση 75 μg/mL εμβολιάζονται με μία αποικία από τη στερεή καλλιέργεια (1 αποικία/ 5mL συνολικού όγκου καλλιέργειας)

2) τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται για 16-18h στους 37 °C υπό ανάδευση (220rpm).

Η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA από τα κύτταρα πραγματοποιείται με το NucleoSpin Plasmid kit της εταιρείας Macherey-Nagel.

7.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του πλασμιδίου AsteOBP7-pUC57 με φωτομέτρηση στα 260nm

I. Αρχή της μεθόδου

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του απομονωμένου πλασμιδιακού DNA γίνεται μέτρηση της οπτικής του απορρόφησης. Το DNA απορροφά έντονα το φως σε μήκος κύματος 260nm. Απαραίτητη προϋπόθεση είναι να διασφαλιστεί ότι η τιμή της απορρόφησης A_{260} θα είναι μέσα στο γραμμικό εύρος του οργάνου, που συνήθως είναι 0,1-1,0. Σε αυτό το μήκος κύματος, ο μέσος συντελεστής απόσβεσης για το δίκλωνο DNA είναι $0,02 (\mu\text{g}/\text{mL})^{-1}\text{cm}^{-1}$. Έτσι, χρησιμοποιώντας ότι $A_{260}=1,0$ ισούται με $\sim 50 \mu\text{g}/\text{mL}$ καθαρού δίκλωνου DNA (dsDNA) μπορούμε να υπολογίσουμε τη συγκέντρωση του DNA με χρήση του τύπου:

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

II. Πειραματική διαδικασία

Για να προσδιοριστεί η συγκέντρωση του απομονωμένου πλασμιδίου, ακολουθούνται τα εξής βήματα:

- 1) σε κυψελίδα χαλαζία όγκου 200μL τοποθετείται ως τυφλό 200μL ddH₂O και μηδενίζεται το φασματοφωτόμετρο
- 2) σε δεύτερη κυψελίδα προστίθεται 1μL δείγματος σε ddH₂O, σε τελικό όγκο 200μL
- 3) λαμβάνεται η τιμή απορρόφησης και υπολογίζεται η συγκέντρωση του δείγματος.

7.4 Διπλή πέψη των απομονωμένων πλασμιδίων AsteOBP7-pUC57 με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Η διπλή πέψη των πλασμιδίων που απομονώνονται έχει ως σκοπό την επιτυχή εξαγωγή του γονιδίου της AsteOBP7 από το πλασμίδιο AsteOBP7-pUC57 και την εν συνεχεία απομόνωσή του, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί σε πειράματα κλωνοποίησης με τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pET22b(+).

Πραγματοποιείται μία διπλή πέψη του πλασμιδιακού DNA με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες XhoI και NdeI στην ίδια θερμοκρασία. Οι

αλληλουχίες αναγνώρισης των δύο ενζύμων περιορισμού βρίσκονται εκατέρωθεν του γονιδίου.

Στον **Πίνακα 1** παρουσιάζεται η αντίδραση διπλής πέψης όπως αυτή πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 37 °C για 2h. Μετά το πέρας αυτού του χρόνου, ακολουθεί απενεργοποίηση των ενζύμων στους 65 °C για 20min. Η ανάλυση της αντίδρασης διπλής πέψης γίνεται σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v. Η πηκτή αγαρόζης παρασκευάζεται με την διαλυτοποίηση 1g αγαρόζης σε 100mL νερού. Στη συνέχεια, σε 30mL διαλύματος αγαρόζης 1% w/v προστίθεται η χρωστική GelRed σε τελική συγκέντρωση 1X.

Πίνακας 1: Αντίδραση διπλής πέψης του πλασμιδίου AsteOBP7-pUC57.

Αντιδραστήριο	Όγκος	Τελική Συγκέντρωση	Ποσότητα
Πλασμιδιακό DNA (7 µg/µL)	2µL	0,7 µg/µL	14 µg
Ρυθμιστικό διάλυμα H (10X)	2µL	1X	
XhoI (10 units/µL)	1 µL	0,5 units/µL	10 units
NdeI (10 units/µL)	1 µL	0,5 units/µL	10 units
ddH ₂ O	έως 20 µL		

7.5 Κλωνοποίηση του γονιδίου της AsteOBP7 στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pET22b(+)

Για την κλωνοποίηση του γονιδίου της AsteOBP7 στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pET22b(+) απαιτείται η απομόνωση και ο καθαρισμός του από την πηκτή αγαρόζης, μετά την αντίδραση διπλής πέψης. Το κομμάτι της μπάντας του DNA που αντιστοιχεί στο γονίδιο της AsteOBP7 κόβεται και αφαιρείται από την πηκτή αγαρόζης. Εν συνεχεία εκχυλίζεται από την πηκτή με το NucleoSpin Extract II kit της εταιρείας Macherey-Nagel. Ακολουθεί ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v ώστε να επιβεβαιωθεί η επιτυχής απομόνωση και η καθαρότητα του γονιδίου.

Σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v, φορτώνονται 2µL του απομονωμένου γονιδίου της AsteOBP7, και 1-3 µL κομμένου πλασμιδίου pET22b(+), που έχει υποστεί διπλή πέψη με τα ένζυμα περιορισμού NdeI και XhoI (κομμένο πλασμίδιο), προκειμένου να προσδιοριστεί η βέλτιστη αναλογία γονιδίου/κομμένου πλασμιδίου που πρέπει να χρησιμοποιηθεί στην αντίδραση απολίνωσης.

Για την εισαγωγή του γονιδίου της AsteOBP7 στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pET22b(+) πραγματοποιείται η αντίδραση απολίνωσης που παρουσιάζονται στον **Πίνακα 2** στους 16 °C για 16-18h. Μετά το πέρας αυτού του χρόνου, ακολουθεί απενεργοποίηση των ενζύμων στους 65 °C για 10min.

Πίνακας 2: Αντίδραση απολίνωσης του γονιδίου *AsteOBP7* στον πλασμιδιακό φορέα *pET22b(+)*.

Αντιδραστήριο	Όγκος
Ρυθμιστικό διάλυμα T4 DNA λιγάσης (10X)	1 μ L
T4 DNA λιγάση	1 μ L
Κομμένος <i>pET22b(+)</i>	2 μ L
Γονίδιο <i>AsteOBP7</i>	4 μ L
ddH ₂ O	έως 10 μ L

7.6 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων *E. coli* DH5a

Μετά το πέρας της αντίδρασης απολίνωσης, μετασχηματίζονται 20 μ L δεκτικών κυττάρων *E. coli* DH5a με 4 μ L από την αντίδραση απολίνωσης με τον τρόπο που περιγράφηκε στο Κεφάλαιο 7.1 (σελίδα 39).

7.7 Πολλαπλασιασμός και απομόνωση του πλασμιδίου *AsteOBP7-pET22b(+)* από κύτταρα *E. coli* DH5a (mini-prep)

Ο πολλαπλασιασμός του πλασμιδίου *AsteOBP7-pET22b(+)* πραγματοποιείται όπως περιγράφηκε στο Κεφάλαιο 7.2 (σελίδα 39) και η απομόνωσή του γίνεται με το πρωτόκολλο του NucleoSpin Plasmid kit της εταιρείας Macherey-Nagel.

7.8 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του πλασμιδίου *AsteOBP7-pET22b(+)* με φωτομέτρηση στα 260nm

Μετά την απομόνωση του πλασμιδίου, πραγματοποιείται ο προσδιορισμός της συγκέντρωσής του όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 7.3 (σελίδα 40).

7.9 Διπλή πέψη των απομονωμένων πλασμιδίων *AsteOBP7-pET22b(+)* με περιοριστικές ενδονουκλέασες

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η επιτυχής ένθεση του γονιδίου της *AsteOBP7* στον πλασμιδιακό φορέα *pET22b(+)*, το απομονωμένο πλασμιδίο *AsteOBP7-pET22b(+)* υποβάλλεται σε μία ακόμα αντίδραση διπλής πέψης με τα ένζυμα *XhoI* και *NdeI*. Στον **Πίνακα 3** παρουσιάζεται η αντίδραση πέψης που πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 37 °C για 2h. Ακολουθεί απενεργοποίηση των ενζύμων στους 65 °C για 20min.

Πίνακας 3: Αντίδραση διπλής πέψης του πλασμιδίου *AsteOBP7-pET22b(+)*.

Αντιδραστήριο	Όγκος	Τελική Συγκέντρωση	Ποσότητα
Πλασμιδιακό DNA (10,4 µg/µL)	2µL	1,04 µg/µL	20,8 µg
Ρυθμιστικό διάλυμα H (10X)	2µL	1X	
XhoI (10 units/µL)	1 µL	0,5 units/µL	10 units
NdeI (10 units/µL)	1 µL	0,5 units/µL	10 units
ddH ₂ O	έως 20 µL		

Η ανάλυση της αντίδρασης πέψης γίνεται σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v, όπου ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιείται το προϊόν της αντίδρασης διπλής πέψης του πλασμιδίου *AsteOBP1-pET22b(+)* με τα ένζυμα περιορισμού NdeI και XhoI. Το γονίδιο της *AsteOBP1* έχει τις αλληλουχίες αναγνώρισης των δύο ενζύμων περιορισμού εκατερωθέν του και έχει παρόμοιο μήκος με το γονίδιο της *AsteOBP7*.

7.10 Δοκιμές έκφρασης της πρωτεΐνης *AsteOBP7*

Οι OBPs εκφράζονται σε μεγάλες ποσότητες σε βακτηριακά συστήματα *E. coli*, αλλά συνήθως με τη μορφή των σωματίων εγκλεισμού (inclusion bodies, δηλαδή συσσωματώματα μη σωστά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών). Στην παρούσα εργασία, οι δοκιμές έκφρασης της πρωτεΐνης *AsteOBP7* σε βακτήρια *E. coli* Origami 2 (DE3) πραγματοποιούνται με σκοπό τον προσδιορισμό των βέλτιστων συνθηκών συγκέντρωσης επαγωγέα στην υγρή καλλιέργεια και θερμοκρασίας της επαγωγής, έτσι ώστε να παραχθεί μεγάλη ποσότητα διαλυτής πρωτεΐνης.

I. Μετασηματισμός βακτηριακών κυττάρων *E. coli* Origami 2 (DE3)

Μετασηματίζονται 20µL δεκτικά κύτταρα *E. coli* Origami 2 (DE3) με 3µL από το πλασμίδιο *AsteOBP7-pET22b(+)* με τον τρόπο που περιγράφηκε στο Κεφάλαιο 7.1 (σελίδα 39). Η στερεή καλλιέργεια στο τριβλίο περιέχει εκτός από Amp και το αντιβιοτικό Tet σε τελική συγκέντρωση 12,5 µg/mL.

II. Ανάπτυξη υγρών καλλιεργειών (10mL)

Επιλέγονται 2 αποικίες, με τις οποίες εμβολιάζεται θρεπτικό υλικό LB για την ανάπτυξη μικρών, υγρών καλλιεργειών, όπως περιγράφηκε στο Κεφάλαιο 7.2 (σελίδα 39). Το θρεπτικό μέσο LB περιέχει και το αντιβιοτικό Tet σε τελική συγκέντρωση 12,5 µg/mL.

III. Ανάπτυξη υγρών καλλιιεργειών (50mL) και έκφραση της AsteOBP7

Η έκφραση AsteOBP7 από υγρές καλλιέργειες *E. coli* όγκου 50mL πραγματοποιείται σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας και συγκέντρωσης επαγωγέα με σκοπό την εύρεση του βέλτιστου συνδυασμού:

- 1) σε 4 κωνικές φιάλες με 50mL αποστειρωμένου και προθερμασμένου στους 37 °C θρεπτικού μέσου LB προστίθενται Amp και Tet σε τελική συγκέντρωση 75 µg/mL και 12,5 µg/mL αντίστοιχα
- 2) το θρεπτικό μέσο εμβολιάζεται με 2,5mL από την υγρή καλλιέργεια των 10mL (2,5mL καλλιέργειας/50mL θρεπτικού μέσου) και τα κύτταρα επωάζονται στους 37 °C υπό ανάδευση (220rpm), μέχρι η OD₆₀₀ να έχει τιμή 0,5-06 (περίπου 4h)
- 3) λαμβάνεται δείγμα 1mL που φυγοκεντρείται (4000g, 4°C, 10min). Τα καταβυθισμένα κύτταρα επαναδιαλυτοποιούνται σε 50µL διαλύματος 1xSDS-PAGE (0.1M DTT, 0.8M 2X Loading SDS-PAGE Buffer) (μη επαγμένο δείγμα/non induced control sample)
- 4) προστίθεται ο επαγωγέας έκφρασης IPTG. Στο σημείο αυτό μπορούν να ελεγχθούν οι διαφορετικές συνθήκες έκφρασης. Το IPTG μπορεί να προστεθεί σε τρεις διαφορετικές τελικές συγκεντρώσεις (0,5mM και 1mM). Η έκφραση πραγματοποιείται έπειτα σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες, στους 37 °C για 4h και στους 16 °C 16-18h.
- 5) μετά το πέρας του χρόνου έκφρασης λαμβάνεται 1mL καλλιέργειας και φυγοκεντρείται (4000g, 4 °C, 10min). Το ίζημα κυττάρων επαναδιασπείρεται με 100µL διαλύματος 1xSDS-PAGE (επαγμένο δείγμα/induced control sample).
- 6) τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση (4000g, 4 °C, 20min) και φυλλάσσονται στον πάγο.

IV. Λύση των κυττάρων

Η λύση των κυττάρων είναι μια μέθοδος που περιλαμβάνει τη διάρρηξη της κυτταρικής μεμβράνης και απελευθέρωση των ενδοκυτταρικών συστατικών. Αποτελεί καθοριστικό βήμα στην πορεία απομόνωσης της πρωτεΐνης, αφού μπορεί να επηρεάσει τη βιολογική της ενεργότητα και τη συνολική της ποσότητα. Στην παρούσα εργασία, η λύση των κυττάρων πραγματοποιείται με τη χρήση αποδιατακτικών μέσων και την εφαρμογή υπερήχων.

Το πρωτόκολλο περιλαμβάνει:

- 1) επαναδιασπορά των κυττάρων σε 5mL ρυθμιστικού διαλύματος λύσης, σύστασης 10mM Tris-HCl pH 8, 2mM EDTA pH 8, 1mM PMSF, 0,1% v/v Triton X-100 και αναστολείς πρωτεασών (1X Complete EDTA free protease inhibitor cocktail, 20mL ρυθμιστικό διάλυμα λύσης / 1L καλλιέργειας)

- 2) προσθήκη 1μL του ενζύμου βενζονάση και ανάδευση για 15min στους 4 °C. Η βενζονάση είναι μία ενδονουκλεάση η οποία αποικοδομεί όλες τις μορφές του DNA και του RNA, χωρίς να παρουσιάζει πρωτεολυτική δράση.
- 3) λύση των κυττάρων με χρήση υπερήχων 8 x 15sec με ενδιάμεσες παύσεις των 15sec σε πάγο.
- 4) φυγοκέντρηση (13000g, 4 °C, 30min) και διαχωρισμός του διαλυτού (διαλυτές πρωτεΐνες/soluble fraction) από το αδιάλυτο κλάσμα (αδιάλυτες πρωτεΐνες/insoluble fraction) των κυττάρων.
- 5) επαναδιασπορά του αδιάλυτου κλάσματος των κυττάρων σε 5mL ρυθμιστικού διαλύματος λύσης και φύλλαξη στους 4 °C.

V. Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Για ανάλυση του προφίλ έκφρασης της AsteOBP7 στις επιλεγμένες συνθήκες έκφρασης πραγματοποιείται αποδιατακτική SDS ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου, όπου οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση τη μάζα τους. Το μίγμα των πρωτεϊνών πρώτα διαλύεται σε διάλυμα δωδεκακυλοθειικού νατρίου (SDS), ενός ανιονικού απορρυπαντικού που αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και τις φορτίζει αρνητικά. Προστίθεται επίσης διθειοθρεϊτόλη (DTT), η οποία ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς που αναπτύσσονται ανάμεσα σε δύο ομάδες -SH κυστεϊνών της ίδιας ή δύο διαφορετικών πολυπεπτιδικών αλυσίδων και η αποδιάταξη ολοκληρώνεται με θέρμανση.

Για το σκοπό αυτό παρασκευάζεται πηκτή 15% w/v SDS-πολυακρυλαμιδίου και ακολουθούνται τα εξής βήματα:

- 1) 25μL διαλύματος 2xSDS-PAGE (1.6X Loading SDS-PAGE Buffer, 0.2M DTT) προστίθενται σε 25μL δείγματος διαλυτού και αδιάλυτου κλάσματος και αποδιάταξή τους μαζί με το επαγμένο και μη επαγμένο δείγμα με θέρμανση στους 95-100 °C για 10min
- 2) σύντομη φυγοκέντρηση (11.000g, 1min, θερμοκρασία δωματίου)
- 3) φόρτωση των δειγμάτων στην πηκτή και έναρξη της ανάλυσης. Χρησιμοποιούνται 5μL Prestained Protein Marker (Tris-Glycine 15%) της εταιρίας Abm, ως πρωτεϊνικοί μάρτυρες μοριακών μαζών.

7.11 Υπερέκφραση της πρωτεΐνης AsteOBP7

Μετά τον προσδιορισμό των βέλτιστων συνθηκών έκφρασης της πρωτεΐνης AsteOBP7 σε διαλυτή μορφή πραγματοποιείται υπερέκφραση της πρωτεΐνης σε μεγάλη ποσότητα από μεγάλο όγκο βακτηριακής καλλιέργειας. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιούνται τα εξής βήματα:

I. Ανάπτυξη στερεής καλλιέργειας *E. coli* Origami 2 (DE3)

Ένα τριβλίο που περιέχει τα αντιβιοτικά Car και Tet σε τελική συγκέντρωση 50 µg/mL 12,5 µg/mL αντίστοιχα εμβολιάζεται υπό ασηπτικές συνθήκες με μετασχηματισμένα *E. coli* Origami 2 (DE3) βακτήρια με το πλασμίδιο AsteOBP7-rET22b(+), τα οποία φυλλάσσονται σε γλυκερόλη σε θερμοκρασία -80 °C. Τα κύτταρα επωάζονται, με το τριβλίο ανεστραμμένο, για 2d στους 37 °C.

II. Ανάπτυξη υγρών καλλιιεργειών (10mL και 50mL)

Η ανάπτυξη των υγρών καλλιιεργειών πραγματοποιείται όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 7.10 (σελίδα).

III. Ανάπτυξη υγρών καλλιιεργειών (4 x 500mL)

Η ανάπτυξη υγρών καλλιιεργειών συνολικού όγκου 2L πραγματοποιείται όταν οι βέλτιστες συνθήκες έκφρασης της πρωτεΐνης είναι γνωστές, με τον ίδιο τρόπο που αναπτύσσονται οι υγρές καλλιιεργειες όγκου 50mL. Κάθε μία από τις 4 φλάσκες εμβολιάζεται με 20mL από τις υγρές καλλιιεργειες των 50mL.

IV. Λύση των κυττάρων

Τα κύτταρα επαναδιασπείρονται στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα λύσης και υφίστανται την ίδια λύση με χρήση υπερήχων όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Κεφάλαιο 7.10 σελίδα 43). Στη συνέχεια ακολουθεί υπερφυγοκέντρωση του κυτταρικού λύματος (130.000g, 4 °C, 30min) και απομόνωση του υπερκειμένου διαλυτού κλάσματος που περιέχει την πρωτεΐνη AsteOBP7. Παράλληλα φυλάσσεται δείγμα (Lysate, L) για την μετέπειτα SDS-PAGE ανάλυση των κλασμάτων του 1^{ου} σταδίου του χρωματογραφικού καθαρισμού.

7.12 Καθαρισμός της πρωτεΐνης AsteOBP7 με ταχεία υγρή χρωματογραφία (FPLC)

Ο χρωματογραφικός καθαρισμός της AsteOBP7 πραγματοποιείται σε ψυκτικό θάλαμο στους 4 °C. Το πρωτόκολλο καθαρισμού που σχεδιάσαμε αποτελείται από τρία στάδια καθαρισμού:

1) **χρωματογραφία ανιοντοανταλλαγής**. Ο διαχωρισμός των μορίων με τη χρωματογραφία ανιοντοανταλλαγής βασίζεται στην αντιστρεπτή προσρόφηση αρνητικά φορτισμένων μορίων στις καθηλωμένες ομάδες του ιοντικού ανταλλάκτη, οι οποίες είναι θετικά φορτισμένες. Η έκλυση των μορίων του δείγματος από τον ιοντικό ανταλλάκτη γίνεται με την προσθήκη ενός ανταγωνιστικού ιόντος που εξουδετερώνει τα φορτία στον ιοντικό ανταλλάκτη.

Χρησιμοποιείται η στήλη HiTrap Q FF 5mL της εταιρείας GE Healthcare, η οποία επιτρέπει υψηλές ταχύτητες ροής και καλή διαχωριστική ικανότητα. Στη στήλη φορτώνεται το σύνολο του διαλυτού κλάσματος του κυτταρικού λύματος (~45mL). Η εξισορρόπηση της στήλης πραγματοποιείται με το διάλυμα εξισορρόπησης Wash Buffer A (**Πίνακας 4**) ενώ η έκλυση των πρωτεϊνών με το διάλυμα έκλυσης Elution Buffer B (**Πίνακας 5**) με γραμμικά αυξανόμενη συγκέντρωση άλατος NaCl (0-500 mM NaCl).

Πίνακας 4: Διάλυμα εξισορρόπησης Wash Buffer A, pH 8.

	Όγκος	Τελική Συγκέντρωση
1M Tris-HCl pH 8	10mL	10mM
ddH ₂ O (HPLC water)	έως 1L	

Πίνακας 5: Διάλυμα έκλυσης Elution Buffer B, pH 8.

	Όγκος / Μάζα	Τελική Συγκέντρωση
1M Tris-HCl pH 8	10mL	10mM
NaCl (MW = 58,44 g/mol)	58,44g	1M
ddH ₂ O (HPLC water)	έως 1L	

Τα λαμβανόμενα κλάσματα που αντιστοιχούν στις κορυφές της καμπύλης απορρόφησης UV του χρωματογραφήματος ηλεκτροφορούνται σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 15% w/v υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Βάσει του αποτελέσματος επιλέγονται τα επιμέρους κλάσματα που περιέχουν την AsteOBP7 και αφού ενωθούν μετράται η συγκέντρωση με τη μέθοδο Bradford. Η μέθοδος βασίζεται στη δημιουργία συμπλόκου-πρωτεΐνης και αλλαγής χρώματος του αντιδραστηρίου. Συγκεκριμένα, η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 αλλάζει χρώμα όταν δημιουργήσει σύμπλοκο σε αραιό όξινο διάλυμα με μέγιστο απορρόφησης στα 595nm. Η μέθοδος αυτή είναι γρήγορη, απλή και ευαίσθητη, καθώς μπορεί να προσδιορίσει μέχρι και 5μg πρωτεϊνών. Έπειτα, το ενοποιημένο δείγμα αραιώνεται με διάλυμα εξισορρόπησης έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση του NaCl να είναι < 25mM. Η χαμηλή συγκέντρωση άλατος είναι απαραίτητη προϋπόθεση για το δεύτερο στάδιο καθαρισμού, προκειμένου να αποφευχθεί η προσρόφηση των αρνητικά φορτισμένων ιόντων Cl⁻ στον ανιοντικό ανταλλάκτη.

2) **χρωματογραφία ανιοντοανταλλαγής** με χρήση της στήλης Resource Q 6mL της εταιρείας GE Healthcare. Η στήλη επιτρέπει υψηλές ταχύτητες ροής και καλή διαχωριστική ικανότητα, με μικρή απώλεια δείγματος. Στη στήλη φορτώνεται το σύνολο του δείγματος (~40mL). Η εξισορρόπηση της στήλης πραγματοποιείται με το διάλυμα εξισορρόπησης Wash Buffer A (**Πίνακας 4**) ενώ η έκλυση με το διάλυμα έκλυσης Elution Buffer B (**Πίνακας 5**) με

γραμμικά αυξανόμενη συγκέντρωση άλατος NaCl (0-300 mM NaCl). Τα λαμβανόμενα κλάσματα που αντιστοιχούν στις κορυφές της καμπύλης χρωματογραφήματος ηλεκτροφορούνται σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 15% w/v υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Βάσει του αποτελέσματος επιλέγονται τα κλάσματα που περιέχουν την AsteOBP7, ενώνονται και μετράται η συγκέντρωση με τη μέθοδο Bradford. Το ενοποιημένο δείγμα συμπυκνώνεται με χρήση φίλτρων συμπύκνωσης Amicon Ultra 10MWCO της εταιρείας Millipore σε τελικό όγκο ~0,5mL.

3) το τρίτο στάδιο καθαρισμού περιλαμβάνει **χρωματογραφία μοριακής διήθησης**. Με τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης επιτυγχάνεται διαχωρισμός βάσει του μεγέθους των μορίων. Το δείγμα τοποθετείται σε στήλη με πορώδεις κόκκους από αδιάλυτο πολυμερές και τα μικρά μόρια κατανέμονται μεταξύ του υδατικού διαλύτη και των πόρων, ενώ τα μεγάλα μόρια δεν διέρχονται των πόρων και βρίσκονται μόνο στον υδατικό διαλύτη μεταξύ των κόκκων. Τα μεγάλα μόρια διέρχονται της στήλης και εκλούνται πρώτα, ενώ τα μικρά ακολουθούν μια δαιδαλώδη διαδρομή μέσα από τους πόρους και εκλούνται τελευταία. Μόρια ενδιάμεσου μεγέθους κατανέμονται μεταξύ των πόρων και του διαλύτη κατά τάξεις μεγέθους. Χρησιμοποιείται η στήλη Superdex 75, η οποία μπορεί να διαχωρίσει πρωτεΐνες με μοριακό βάρος 3.000-70.000 Da. Στη στήλη φορτώνεται το σύνολο του δείγματος (~0,5mL). Η στήλη εξισορροπείται με 2 όγκους αυτής με το φιλτραρισμένο και απαερωμένο διάλυμα μοριακής διήθησης Buffer C (**Πίνακας 6**).

Πίνακας 5: Διάλυμα μοριακής διήθησης Buffer C, pH 8.

	Όγκος / Μάζα	Τελική Συγκέντρωση
1M Tris-HCl pH 8	5mL	10mM
NaCl (MW 58,44 g/mol)	5,85g	200mM
ddH ₂ O (HPLC water)	έως 0,5L	

Τα λαμβανόμενα κλάσματα που αντιστοιχούν στις κορυφές της καμπύλης χρωματογραφήματος ηλεκτροφορούνται σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 15% w/v υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Βάσει του αποτελέσματος επιλέγονται τα κλάσματα που περιέχουν την AsteOBP7, ενώνονται και μετράται η συγκέντρωση με τη μέθοδο Bradford. Το ενοποιημένο δείγμα αρχικά αραιώνεται με διάλυμα εξισορρόπησης έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση του NaCl να είναι $\leq 1.5\text{mM}$ (προκειμένου να χρησιμοποιηθεί σε πειράματα κρυσταλλογραφίας) και έπειτα συμπυκνώνεται με χρήση φίλτρων συμπύκνωσης Amicon Ultra 10MWCO της εταιρείας Millipore σε τελικό όγκο ~ 250μL τελικής συγκέντρωσης 12 mg/mL.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8^ο

ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ AsteOBP7

8.1 Κρυστάλλωση πρωτεϊνών-Διάχυση ατμών

Η μέθοδος της διάχυσης ατμών είναι η πλέον χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την κρυστάλλωση των πρωτεϊνών. Το μίγμα της πρωτεΐνης και του μέσου κρυστάλλωσης τοποθετείται σε βοθρίο, το οποίο περιέχει τον παράγοντα κατακρήμνισης και άλλων προσθέτων σε υψηλότερη συγκέντρωση σε σχέση με τη συγκέντρωσή τους στη σταγόνα κρυστάλλωσης. Δεδομένου ότι το σύστημα είναι ερμητικά κλειστό, το νερό διαχέεται μέσω εξάτμισης από τη σταγόνα προς το διάλυμα του πηγαδιού, έτσι ώστε να εξισωθούν οι συγκεντρώσεις των δύο διαλυμάτων. Αυτό προκαλεί την αργή αύξηση των συγκεντρώσεων της πρωτεΐνης και του παράγοντα κατακρήμνισης στη σταγόνα και οδηγεί σε κατάσταση υπερκορεσμού.

8.2 Τεχνική της καθήμενης σταγόνας

Η μέθοδος της διάχυσης ατμών για την ανάπτυξη των κρυστάλλων εφαρμόζεται με τις τεχνικές της κρεμάμενης και της καθήμενης σταγόνας.

Στην τεχνική της καθήμενης σταγόνας, το διάλυμα της πρωτεΐνης τοποθετείται σε ένα μικρό βοθρίο στο εσωτερικό του πηγαδιού και αναμιγνύεται με το διάλυμα κρυστάλλωσης που υπάρχει στο πηγάδι. Η τεχνική αυτή είναι η καταλληλότερη μέθοδος για τη σάρωση πολλών διαφορετικών συνθηκών κρυστάλλωσης.

8.3 Πειράματα κρυστάλλωσης της πρωτεΐνης AsteOBP7

Πραγματοποιήθηκε σάρωση 288 συνθηκών κρυστάλλωσης με την τεχνική της διάχυσης ατμών καθήμενης σταγόνας. Το δείγμα AsteOBP7 που χρησιμοποιήθηκε είχε όγκο 212μL και συγκέντρωση **12 mg/mL**. Τοποθετήθηκαν δύο σταγόνες κρυστάλλωσης ανά πηγάδι που περιέχουν αναλογίες πρωτεΐνης-καταβυθιστικού 1:1 και 2:1 με χρήση του αυτοματοποιημένου συστήματος κρυστάλλωσης Oryxnano (Douglas Instruments Ltd.). Η σταγόνα κρυστάλλωσης είχε όγκο 1μL και το καταβυθιστικό στο πηγάδι 50μL. Η ανάπτυξη των κρυστάλλων έγινε σε θερμοκρασία 20 °C.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

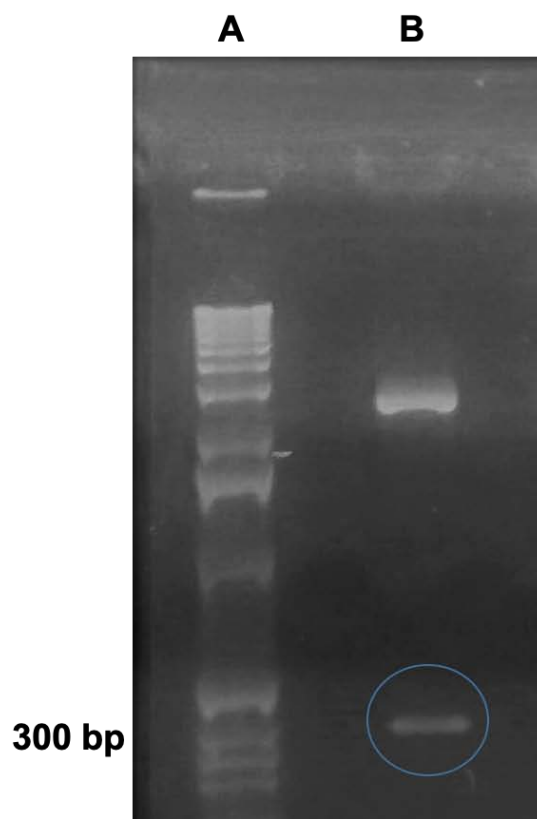
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9^ο

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗΣ, ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ AsteOBP7

9.1 Κλωνοποίηση του γονιδίου AsteOBP7 στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pET22b(+)

Ύστερα από επιτυχή μετασηματισμό των δεκτικών *E. coli* DH5a κυττάρων με το πλασμίδιο AsteOBP7-pUC57 και τον πολλαπλασιασμό και την απομόνωση του πλασμιδίου, η συγκέντρωσή του υπολογίστηκε με τον τρόπο που περιγράφεται στο Κεφάλαιο 7.3 (σελίδα 40) στα **7 µg/µL**.

Η ανάλυση της αντίδρασης διπλής πέψης του πλασμιδίου σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v έδειξε ότι ο πολλαπλασιασμός του γονιδίου της AsteOBP7 ως μέρος του πλασμιδίου AsteOBP7-pUC57 ήταν επιτυχής (**Εικόνα 19**).

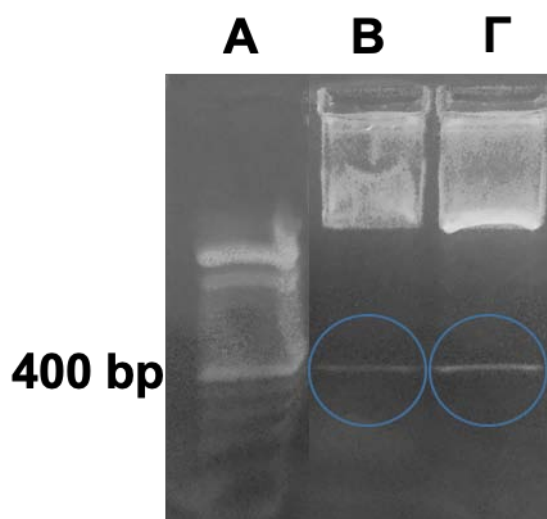


Εικόνα 19: Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v της διπλής πέψης του πλασμιδίου AsteOBP7-pUC57 με τα ένζυμα περιορισμού *XhoI* και *NdeI*. Το γονίδιο της AsteOBP7 (375bp) επισημαίνεται σε κυκλικό πλαίσιο.
A. Δείκτες DNA 1kb, B. Πέψη του πλασμιδίου AsteOBP7-pUC57 με τα *XhoI*-*NdeI*

Στη συνέχεια, το γονίδιο εκχυλίστηκε επιτυχώς από την πηκτή, με την εφαρμογή του πρωτοκόλλου NucleoSpin Extract II της εταιρείας Macherey-Nagel.

Με το πέρας της αντίδρασης απολίνωσης, του επιτυχούς μετασχηματισμού δεκτικών *E. coli* DH5a κυττάρων με το πλασμίδιο AsteOBP7-pET22b(+) και πολλαπλασιασμού και απομόνωσής του, η συγκέντρωσή του υπολογίστηκε με τον τρόπο που περιγράφεται στο Κεφάλαιο 7.3 (σελίδα 40) στα **10,4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$** .

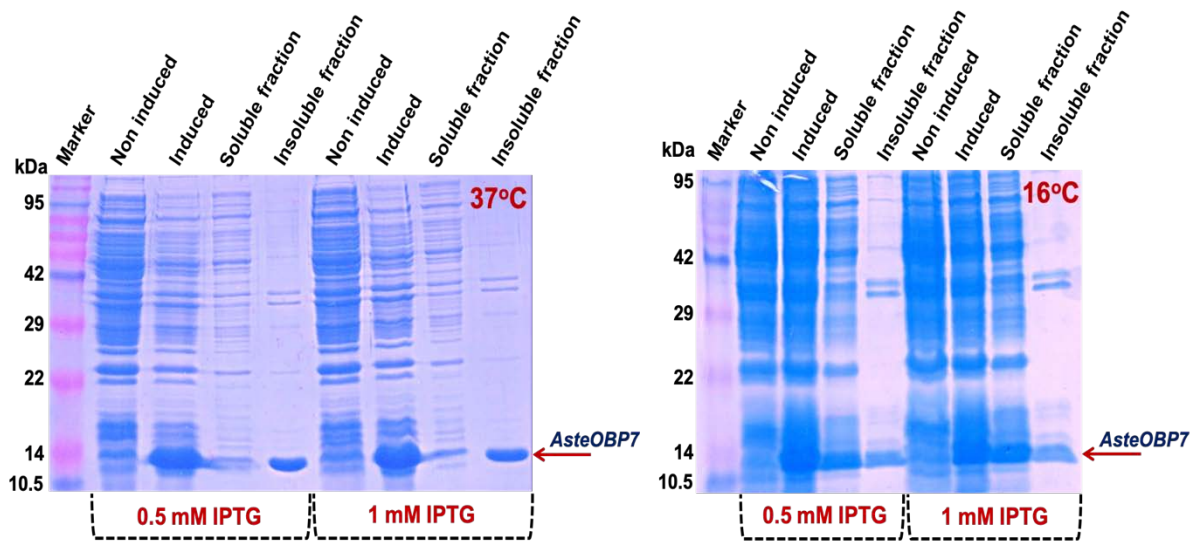
Η ανάλυση της αντίδρασης διπλής πέψης του πλασμιδίου σε σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v έδειξε ότι είχε γίνει επιτυχής κλωνοποίηση του γονιδίου της AsteOBP7 στον πλασμιδιακό φορέα pET22b(+) (**Εικόνα 21**).



Εικόνα 21: Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v της διπλής πέψης των πλασμιδίων AsteOBP1-pET22b(+) και AsteOBP7-pET22b(+) με τα ένζυμα περιορισμού *Xho*I και *Nde*I. Τα γονίδια των AsteOBP1 (380bp) και AsteOBP7 (375bp) επισημαίνονται σε κυκλικό πλαίσιο.
Α. Δείκτες DNA 1kb, Β. Πέψη του πλασμιδίου AsteOBP1-pET22b(+) με τα *Xho*I-*Nde*I, Γ. Πέψη του πλασμιδίου AsteOBP7-pET22b(+) με τα *Xho*I-*Nde*I.

9.2 Δοκιμές έκφρασης - υπερέκφραση της πρωτεΐνης AsteOBP7

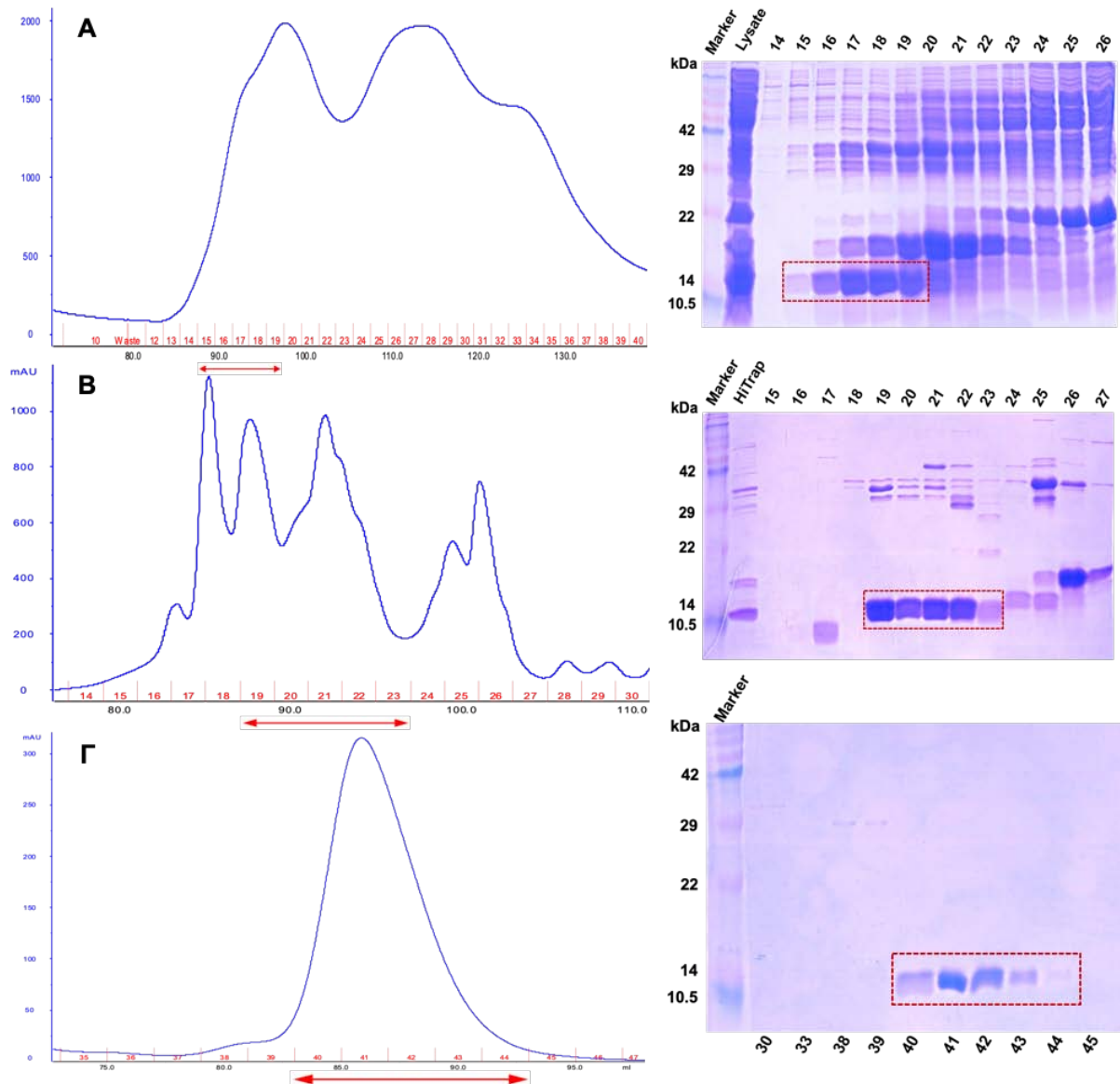
Δοκιμές έκφρασης της πρωτεΐνης AsteOBP7 πραγματοποιήθηκαν αρχικά στους 37 °C για 4h και έπειτα στους 16 °C για ~18h, ύστερα από επαγωγή με IPTG σε τελική συγκέντρωση 0,5mM και 1mM. Η μείωση της θερμοκρασίας είχε ως αποτέλεσμα την έκφραση του μεγαλύτερου μέρους της πρωτεΐνης από το αδιάλυτο στο διαλυτό κλάσμα των κυττάρων (**Εικόνα 22**). Εν συνεχεία η πρωτεΐνη υπερεκφράστηκε από μεγάλο όγκο υγρών καλλιιεργειών *E. coli* Origami 2 (DE3) 2L ύστερα από επαγωγή με 1mM IPTG στους 16 °C για ~18h.



Εικόνα 22 : Ανάλυση σε πηκτή 15% w/v SDS-πολυακρυλαμιδίου των δοκιμών έκφρασης της πρωτεΐνης AsteOBP7.

9.3 Καθαρισμός της πρωτεΐνης AsteOBP7

Ο χρωματογραφικός καθαρισμός της AsteOBP7 πραγματοποιήθηκε με το συνδυασμό τριών σταδίων καθαρισμού, όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 7.11 (σελίδα 45) και είχε ως αποτέλεσμα τη λήψη πρωτεΐνης υψηλής καθαρότητας (>98%). Στην **Εικόνα 23** απεικονίζεται η διαδικασία του χρωματογραφικού καθαρισμού και οι αναλύσεις σε πηκτή 15% w/v SDS-πολυακρυλαμιδίου των κλασμάτων που συλλέχθηκαν σε κάθε βήμα του καθαρισμού.

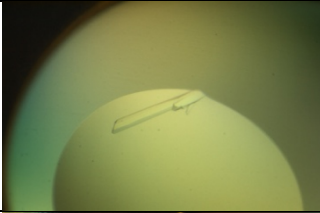
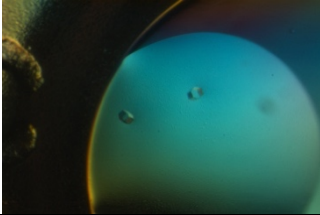
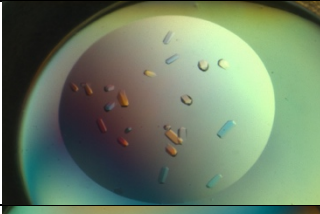
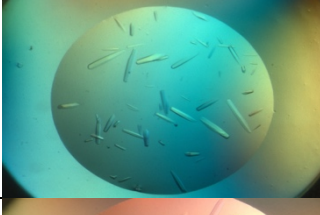

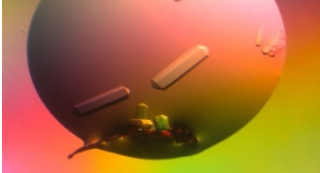


Εικόνα 23 : Προφίλ χρωματογραφίας: Α. ανιοντοανταλλαγής HiTrap Q FF, Β. ανιοντοανταλλαγής Resource Q, Γ. μοριακής διήθησης Superdex 75 και ανάλυσης σε πηκτή 15% w/v SDS-πολυακρυλαμιδίου των κλασμάτων έκλυσης σε κάθε στάδιο καθαρισμού. Τα κόκκινα βέλη αντιστοιχούν στα κλάσματα που επιλέχθηκαν για περαιτέρω χρωματογραφική ανάλυση και τα κόκκινα τετράγωνα στην πρωτεΐνη AsteOBP7 .

9.4 Αποτελέσματα πειραμάτων κρυστάλλωσης της πρωτεΐνης AsteOBP7

Αναπτύχθηκαν κρύσταλλοι της πρωτεΐνης AsteOBP7 στους 20 °C με την πάροδο τριών ημερών σε 33 διαφορετικές συνθήκες κρυστάλλωσης. Στον **Πίνακα 6** παρουσιάζονται ενδεικτικά ορισμένες συνθήκες που οδήγησαν στο σχηματισμό κρυστάλλων, καθώς και οι φωτογραφίες των αντίστοιχων κρυστάλλων.

Πίνακας 6: Ενδεικτικές συνθήκες κρυστάλλωσης της πρωτεΐνης AsteOBP7 σε θερμοκρασία 20 °C.

Αναλογία πρωτεΐνη:καταβυθιστικό στη σταγόνα κρυστάλλωσης	Συνθήκη Κρυστάλλωσης	Φωτογραφία
2:1	0.1M citrate, pH 5, 20% w/v PEG 6K	
1:1	0.1M sodium acetate, pH 4.6, 2M ammonium sulfate	
2:1	0.1M amino acids, pH 6.5	
2:1	0.2M ammonium acetate, 0.1M sodium acetate trihydrate, pH 4.6, 30% w/v PEG 4K	
2:1	0.1M Na HEPES, pH 7.5, 1.4M tri-Sodium citrate dihydrate	
2:1	0.01M cobalt chloride hexahydrate, 0.1M MES, pH 6.5, 1.8M ammonium sulfate	

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην προσπάθεια να αντιμετωπιστεί η μετάδοση της ελονοσίας είναι καθοριστική η ανάπτυξη νέων, αποτελεσματικότερων και ασφαλέστερων για τον άνθρωπο εντομοαπωθητικών ενώσεων, καθώς υπερβολική ποσότητα προκαλεί ερεθισμούς στο δέρμα και η χρήση τους αντενδείκνυται σε βρέφη και μικρά παιδιά. Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον έχει στραφεί στην κατανόηση του οσφρητικού συστήματος των κουνουπιών, το οποίο αποτελεί το κύριο αισθητήριο όργανο για την ανίχνευση των ξενιστών και τη λήψη γευμάτων αίματος. Αρκετές μελέτες έχουν καταφέρει να αποκαλύψουν σημαντικές πληροφορίες για την οργάνωση του οσφρητικού συστήματος, παρόλο που ο μοριακός μηχανισμός αναγνώρισης των οσμών δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί.

Η εις βάθος κατανόηση του οσφρητικού συστήματος των κουνουπιών και η ανάπτυξη εντομοαπωθητικών ενώσεων απαιτεί τον προσδιορισμό της τρισδιάστατης δομής των κύριων τελεστών της όσφρησης σε μοριακό επίπεδο: των υποδοχέων οσμογόνων μορίων (ORs) και των πρωτεϊνών δέσμευσης οσμογόνων μορίων (OBPs). Ενώ οι δομές των υποδοχέων δεν έχουν ακόμη προσδιοριστεί με ακρίβεια, είναι γνωστές περισσότερες από 60 κρυσταλλικές δομές OBPs από διάφορα είδη εντόμων (συμπεριλαμβανομένων των κουνουπιών) είτε σε ελεύθερη μορφή είτε σε σύμπλοκα που προσδιορίστηκαν με επιλεγμένα μόρια με πειράματα πρωτεϊνικής κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ. Η λεπτομερής γνώση των τρισδιάστατων δομών και της λειτουργικότητάς τους είναι ζωτικής σημασίας για τον προσδιορισμό με βάση τη δομή νέων εντομοαπωθητικών και ελκυστικών μορίων που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε ασφαλείς και αποτελεσματικές στρατηγικές ελέγχου των κουνουπιών. Ο σχεδιασμός προσδετών με βάση τις OBPs μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία πολλά υποσχόμενων μορίων με βελτιωμένα χαρακτηριστικά δέσμευσης και ειδικότητα. Αυτά μπορούν να αξιολογηθούν περαιτέρω τόσο για την ενεργοποίηση των ORs όσο και σε δοκιμές συμπεριφοράς, μειώνοντας έτσι σημαντικά τον αριθμό των προσδετών που θα εξεταστούν σε αυτές τις μελέτες.

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία επιλέχθηκε να μελετηθεί η πρωτεΐνη δέσμευσης οσμογόνων μορίων του ανωφελούς κώνωπα AsteOBP7, καθώς προηγούμενη μελέτη έδειξε ότι η πρωτεΐνη αυτή υπερεκφράζεται στις κεραίες και στη γνάθο και στην προβοσκίδα των θηλυκών κουνουπιών, ενώ τα επίπεδά της μειώνονται αισθητά στη γνάθο και στην προβοσκίδα ύστερα από τη λήψη γευμάτων αίματος. Παρόλα αυτά, τα επίπεδά της είναι συνεχώς υψηλότερα στα θηλυκά σε σχέση με τα αρσενικά κουνούπια. Οι παρατηρήσεις αυτές την

καθιστούν υποσχόμενο στόχο για τη διευκρίνιση του ρόλου των OBPs στο οσφρητικό σύστημα, καθώς και την ανάπτυξη βιοδραστικών ενώσεων που θα μπορούσαν να διαταράξουν τη φυσιολογική συμπεριφορά του κουνουπιού που σχετίζεται με τη λήψη αίματος.

Έχει αποδειχθεί από προηγούμενα πειράματα ότι οι OBPs εκφράζονται σε βακτηριακά συστήματα *E. coli* σε μεγάλες ποσότητες αλλά με τη μορφή των σωμάτων εγκλεισμού. Στην παρούσα εργασία, η βελτιστοποίηση των συνθηκών έκφρασης της πρωτεΐνης σε βακτηριακά στελέχη *E. coli* Origami 2 (DE3) έτσι ώστε αυτή να λαμβάνεται σε μεγάλες ποσότητες στο διαλυτό κλάσμα των κυττάρων, αποτελεί σημαντική πρόοδο στη μελέτη αυτών των πρωτεϊνών με ταυτόχρονη διατήρηση της φυσιολογικής τους δομής.

Επιπλέον, ο σχεδιασμός του πρωτοκόλλου χρωματογραφικού καθαρισμού της αποτελούμενου από δύο στάδια χρωματογραφίας ανιοντοανταλλαγής και ενός τελικού σταδίου χρωματογραφίας μοριακής διήθησης οδήγησε στην απομόνωση πρωτεΐνης εξαιρετικά υψηλής καθαρότητας, κατάλληλης για την ανάπτυξη κρυστάλλων, με μικρό ποσοστό απωλειών.

Επιπρόσθετα, η σάρωση περίπου 300 συνθηκών κρυστάλλωσης οδήγησε στη λήψη πολλών κρυσταλλικών μορφών της πρωτεΐνης AsteOBP7 σε 30 διαφορετικές συνθήκες, παρέχοντας το απαραίτητο υλικό για μελέτες κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ.

Συνολικά, η παρούσα πτυχιακή εργασία αποτελεί ένα πρώτο βήμα στη μελέτη της δομής και της λειτουργίας της πρωτεΐνης AsteOBP7. Η παραγωγή της σε μεγάλη ποσότητα και ο επιτυχής καθαρισμός της είναι απαραίτητες προϋποθέσεις για πειράματα κρυστάλλωσης και εύρεσης μορίων-προσδετών, που θα αποκαλύψουν το ρόλο της στο οσφρητικό σύστημα του *A. stephensi*.

Συμπερασματικά, η μελέτη των OBPs του *A. stephensi* και ο προσδιορισμός της τριασδιάστατης δομής τους θα μπορούσε να βοηθήσει σημαντικά στην κατανόηση της διαδικασίας ανίχνευσης των οσμών σε μοριακό επίπεδο με σκοπό την ανάπτυξη μιας νέας γενιάς διαταρακτών της συμπεριφοράς του.

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Caraballo H (2014). "Emergency department management of mosquito-borne illness: Malaria, dengue, and west nile virus". *Emergency Medicine Practice*. **16** (5). Archived from the original on 2016-08-01.
2. *World Malaria Report 2017*. WHO. 2017. ISBN 978-92-4-156552-3.
3. Nadjm B, Behrens RH (2012). "Malaria: An update for physicians". *Infectious Disease Clinics of North America* 26 (2): 243–59 [1].
4. *Hellenic Centre for Disease Control and Prevention. Annual epidemiological reports 2017. KEELPNO website [online]*. KEELPNO, 2018 [cited; Available from: <http://www.keelpno.gr/en-us/epidemiologicalstatisticaldata.aspx>].
5. Mueller I, Zimmerman PA, Reeder JC (2007). «*Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale*--the "bashful" malaria parasites». *Trends Parasitol*. 23 (6): 278–83. doi:10.1016/j.pt.2007.04.009.
6. Singh B, Kim Sung L, Matusop A, et al. (2004). «A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings». *Lancet* 363 (9414): 1017–24. doi:10.1016/S0140-6736(04)15836-4.
7. Schlagenhauf-Lawlor, Patricia (2008). *Travelers' Malaria*, σελ. 70-1. ISBN 978-1-55009-336-0.
8. Cowman AF, 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): 961–71.. doi:10.1083/jcb.201206112.
9. Turschner S, Efferth T (2009). "Drug resistance in Plasmodium: Natural products in the fight against malaria". *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 9 (2): 206–14. doi:10.2174/138955709787316074. PMID 19200025.
10. Saifi M.A., B.T., Harrath A.H., Hamad-Altayalan F.S., Al-Quraishy S., Antimalarial drugs: Mode of action and status of resistance. *Afr J Phar and Pharmacol.*, 2013. 7(5): p. 148-156.
11. Lyke, K. E. (2017). Steady progress toward a malaria vaccine. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 30(5), 463-470. doi:10.1097/qco.0000000000000393

12. Ramirez, J.L., L.S. Garver, and G. Dimopoulos, Challenges and approaches for mosquito targeted malaria control. *Curr Mol Med*, 2009. 9(2): p. 116-30.
13. Kamareddine, L., The biological control of the malaria vector. *Toxins (Basel)*, 2012. 4(9): p. 748-67.
14. McGraw, E.A. and S.L. O'Neill, Beyond insecticides: new thinking on an ancient problem. *Nat Rev Microbiol*, 2013. 11(3): p. 181-93.
15. Raghavendra, K., et al., Malaria vector control: from past to future. *Parasitol Res*, 2011. 108(4): p. 757-79.
16. Sinha, Shweta; Medhi, Bikash; Sehgal, Rakesh (2014). "Challenges of drug-resistant malaria". *Parasite* 21: 61. doi:10.1051/parasite/2014059. ISSN 1776-1042.PMID 25402734.
17. White NJ (2008). "Qinghaosu (artemisinin): The price of success". *Science* 320 (5874): 330–4. doi:10.1126/science.1155165. PMID 18420924.
18. Brito N.F., Moreira M.F., Melo Ana C.A., A look inside odorant-binding proteins in insect chemoreception. *Journal of Insect Physiology* 95 (2016) 51-56.
19. Maouchehri, A.V., Javadian, E., Eshghy, N., & Motabar, M. (1976). Ecology of *Anopheles stephensi* Liston in southern Iran. *Tropical and Geographical Medicine*, 28, 228-232.
20. Sinka, M.E., Bangs, M.J., Manguin, S., Chareonviriyaphap, T., Patil, A.P., Temperley, W.H., Gething, P. W., Elyazar, I.R.F., Kabaria, C.W., Harbach, R.E., & Hay, S.I. (2011). The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in the Asia-Pacific region: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. *Parasites and Vectors*, 4, 1-46.
21. Clark, J. T., & Ray, A. (2016). Olfactory Mechanisms for Discovery of Odorants to Reduce Insect-Host Contact. *Journal of Chemical Ecology*, 42(9), 919–930. doi:10.1007/s10886-016-0770-3.
22. Leal, W.S., 2005. Pheromone reception. In: Schulz, S. (Ed.), *The Chemistry of Pheromones and Other Semiochemicals II*. Springer, Berlin Heidelberg, pp. 1–36

23. Benton, R., Sachse, S., Michnick, S.W., Vosshall, L.B., 2006. Atypical membrane topology and heteromeric function of *Drosophila* odorant receptors in vivo. *PLoS Biol.* 4, e20.
24. Buck L and Axel R (1991). A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* 65: 175-187.
25. Vosshall, L.B., Hansson, B.S., 2011. A unified nomenclature system for the insect olfactory coreceptor. *Chem. Senses* 36, 497–498.
26. Guidobaldi, F., May-Concha, I.J., Guerenstein, P.G., 2014. Morphology and physiology of the olfactory system of blood-feeding insects. *J. Physiol. Paris* 108, 96–111.
27. Larsson, M.C., Domingos, A.I., Jones, W.D., Chiappe, M.E., Amrein, H., Vosshall, L.B., 2004. Or83b encodes a broadly expressed odorant receptor essential for *Drosophila* olfaction. *Neuron* 43, 703–714.
28. Sato, K., Pellegrino, M., Nakagawa, T., Vosshall, L.B., Touhara, K., 2008. Insect olfactory receptors are heteromeric ligand-gated ion channels. *Nature* 452, 1002–1006.
29. Wicher, D., Schafer, R., Bauernfeind, R., Stensmyr, M.C., Heller, R., Heinemann, S.H., Hansson, B.S., 2009. DOr83b—receptor or ion channel? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1170, 164–167.
30. Ishida, Y., Leal, W.S., 2005. Rapid inactivation of a moth pheromone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 14075–14079.
31. Ishida, Y., Leal, W.S., 2008. Chiral discrimination of the Japanese beetle sex pheromone and a behavioral antagonist by a pheromone-degrading enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 9076–9080.
32. Kaissling, K.E., 2009. Olfactory perireceptor and receptor events in moths: a kinetic model revised. *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sens. Neural Behav. Physiol.* 195, 895–922.
33. Leal, W.S., Kaissling, K.-E., 2004. Biologische Nanokapseln für Duftstoffe. *Naturwiss. Rundschau* 668, 66–71.

34. Zhou, J.J., 2010. Odorant-binding proteins in insects. *Vitam. Horm.* 83, 241–272.
35. Briand, L., Nespoulous, C., Huet, J.C., Pernollet, J.C., 2001a. Disulfide pairing and secondary structure of ASP1, an olfactory-binding protein from honeybee (*Apis mellifera* L). *J. Pept. Res.* 58, 540–545.
36. Leal, W.S., Nikonova, L., Peng, G., 1999. Disulfide structure of the pheromone binding protein from the silkworm moth, *Bombyx mori*. *FEBS Lett.* 464, 85–90.
37. Lagarde, A., Spinelli, S., Tegoni, M., He, X., Field, L., Zhou, J.J., Cambillau, C., 2011b. The crystal structure of odorant binding protein 7 from *Anopheles gambiae* exhibits an outstanding adaptability of its binding site. *J. Mol. Biol.* 414, 401–412.
38. Fan, J., Francis, F., Liu, Y., Chen, J. L., & Cheng, D. F. (2011). Review An overview of odorant-binding protein functions in insect peripheral olfactory reception. *Genetics and Molecular Research*, 10(4), 3056–3069. doi:10.4238/2011.december.8.2.
39. Kaissling, K.-E. (2013) Kinetics of olfactory responses might largely depend on the odorant-receptor interaction and the odorant deactivation postulated for flux detectors. *Journal of Comparative Physiology A*, 199, 879–896.
40. Leal, W.S., 2013. Odorant reception in insects: roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes. *Annu. Rev. Entomol.* 58, 373–391.
41. Tsitsanou, K. E., Thireou, T., Drakou, C. E., Koussis, K., Keramioti, M. V., Leonidas, D. D., ... Zographos, S. E. (2011). *Anopheles gambiae* odorant binding protein crystal complex with the synthetic repellent DEET: implications for structure-based design of novel mosquito repellents. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(2), 283–297. doi:10.1007/s00018-011-0745-z.
42. Nakagawa, T., Sakurai, T., Nishioka, T., Touhara, K., 2005. Insect sex-pheromone signals mediated by specific combinations of olfactory receptors. *Science* 307, 1638–1642.
43. *Biochemistry Sixth Edition*, Stryer L., 2007, W.H. Freeman and Company.

44. Rhodes, G., Crystallography made crystal clear. Third ed. 2006: Academic press, New York.
45. Russo Krauss, I., Merlino, A., Vergara, A., & Sica, F. (2013). An Overview of Biological Macromolecule Crystallization. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(6), 11643–11691. doi:10.3390/ijms140611643.
46. M.S. Sengul and Z. Tu. Characterization and expression of the odorant-binding protein 7 gene in *Anopheles stephensi* and comparative analysis among five mosquito species. *Insect Molecular Biology* (2008) **17**(6), 631-645.
47. Marianne E. Sinka, Michael J. Bangs, Sylvie Manguin, Yasmin Rubio-Palis, Theeraphap Chareonviriyaphap, Maureen Coetzee, Charles M. Mbogo, Janet Hemingway, Anand P. Patil, William H. Temperley, Peter W. Gething, Caroline W. Kabaria, Thomas R. Burkot, Ralph E. Harbach and Simon I. Hay. A global map of dominant malaria vectors. *Parasites and vectors*, 2012, **5**:69.