



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ « ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ »**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Δομική και κινητική μελέτη συμπλόκων
λειτουργικών πρωτεϊνών (ΟΒΡ4 και φωσφορυλάση
του γλυκογόνου) με μικρά μόρια με σκοπό τον
σχεδιασμό βελτιωμένων προσδετών.**

**ΜΑΡΙΑ Β. ΚΕΡΑΜΙΩΤΗ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΑΘΗΝΑ
ΙΟΥΝΙΟΣ 2011**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Δομική και κινητική μελέτη συμπλόκων λειτουργικών πρωτεΐνων (OBR4 και φωσφορυλάση του γλυκογόνου) με μικρά μόρια με σκοπό τον σχεδιασμό βελτιωμένων προσδετών.

ΜΑΡΙΑ Β. ΚΕΡΑΜΙΩΤΗ

A.M.: 62910

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Μαίρη Μαυρή, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Μ. Μαυρή, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

Α. Σιαφάκα-Καπάδα, Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

Σ. Ζωγράφος, Ερευνητής Β', ΙΟΦΧ/ΕΙΕ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 27/06/2011

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η OBP4 εντάσσεται στην κατηγορία των πρωτεϊνών που μεταφέρουν οσμές από τον αέρα στους υποδοχείς που εκφράζονται στους οσφρητικούς νευρώνες του αισθητήριου οργάνου του κουνουπιού. Η δομική μελέτη τους, μπορεί να αποκαλύψει τον τρόπο πρόσδεσης μορίων με εντομοαπωθητικές ιδιότητες και να συντελέσει στην ανάπτυξη ενώσεων οδηγών με βελτιωμένη συγγένεια και εξειδίκευση. Τέτοιες ουσίες που παρεμβάλλονται στην φυσιολογική οσφρητική λειτουργία του κουνουπιού είναι δυνατόν να μειώσουν την ικανότητα του εντόμου στην αναγνώριση του ανθρώπινου στόχου του και έτσι να συμβάλλουν αποτελεσματικά στη μείωση της μετάδοσης της ελονοσίας. Στη παρούσα μεταπτυχιακή εργασία παρουσιάζονται οι δομές της OBP4 σε σύμπλοκο με τις ουσίες καρβακρόλη και γερανυλο-ακετόνη, οι οποίες έχει αποδειχθεί ότι παρουσιάζουν εντομοαπωθητική δράση. Η δομική μελέτη των συμπλόκων, πέρα από την ταυτοποίηση του κέντρου πρόσδεσης και των αμινοξέων τις πρωτεΐνης που συμβάλλουν στην αναγνώριση, παρέχει επιπλέον πληροφορίες για τη χημική φύση της συγγένειας των προσδετών με την πρωτεΐνη και εξηγεί την παρατηρούμενη διαφορά συγγένειας μεταξύ ουσιών με διαφορετικά δομικά χαρακτηριστικά. Συμπερασματικά, η δομική μελέτη των συμπλόκων μπορεί να συμβάλει σημαντικά στη βελτίωση ή /και στη σχεδίαση νέων εντομοαπωθητικών με βελτιωμένες ιδιότητες.

Επιπλέον πραγματοποιήθηκαν κινητικές μελέτες του ενζύμου της GP παρουσία των φλαβονοειδών χρυσίνη και φλαβοπιριδόλη προκειμένου να διευκρινιστεί η διαφορά στη συγγένεια σύνδεσης. Τα φλαβονοειδή αποτελούν κατηγορία ενώσεων οδηγών φυσικής προέλευσης που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στο σχεδιασμό εν δυνάμει υπογλυκαιμικών αναλόγων. Η κινητική μελέτη υπέδειξε ότι η συγκεκριμένη τάξη αναστολέων προσδένεται στο κέντρο αναστολής του ενζύμου, σε συμφωνία με προηγούμενες κρυσταλλογραφικές μελέτες, αλλά η φλαβοπιριδόλη παρουσιάζει υψηλότερη ισχύ σύνδεσης από τη χρυσίνη πιθανότατα λόγω της διαφορετικής της δομής.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ : πρωτεΐνες

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ : OBP4, εντομοαπωθητικό, ελονοσία, GP, φλαβονοειδή

ABSTRACT

OBP4 is included in the class of proteins which transport the odorants from the air to the receptors that are expressed in the odorant neurons of the chemosensory organ of insect. Their structural study may elucidate the way of binding of molecules with insect-repellent properties and thus help the development of lead compounds with improved affinity and specificity. Such substances, that are incorporated in the physiological odorant function of the mosquito, may probably decrease the insect's recognizing ability of the human target and consequently contribute effectively in the reduction of the malaria transmission. In the frame of this master thesis the structures of OBP4 are presented in complex with the substances carvacrol and geranyl-acetone whose repellent activity has been proved. The structural study of the complexes, apart from the identification of the binding center and the protein residues which participate in the recognition, provides additional information about the chemical nature of affinity between ligands and protein, thus explaining the observed difference of affinity among compounds with variable structural characteristics. In conclusion, the structural study of complexes may contribute to the development and/or the design of new repellents with improved properties.

Additionally, kinetic studies of the enzyme GP were conducted in the presence of flavonoids chrysin and flavopiridol, aiming at defining the difference in binding affinity. Flavonoids are a category of natural lead compounds which could be used in the design of potential hypoglycemic analogues. Kinetic studies showed that this class of compounds binds at the allosteric inhibitor site of the enzyme, in agreement with previous crystallographic studies, whereas flavopiridol presents higher binding affinity than chrysin, probably owing to its different structure.

SUBJECT AREA: proteins

KEYWORDS: OBP4, insect-repellent, malaria, GP, flavonoids

Στους γονείς μου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στην επιβλέπουσα μου, αναπληρώτρια καθηγήτρια κ. Μαίρη Μαυρή, η οποία εκτός από εξαιρετική καθηγήτρια είναι και υπέροχος άνθρωπος και έχω τη τιμή να γνωρίζω από τότε που ανέλαβε την επίβλεψη της πτυχιακής μου εργασίας, σε προπτυχιακό επίπεδο στη βιοχημεία. Την ευχαριστώ ιδιαίτερα, τόσο για την εμπιστοσύνη που μου έχει δείξει όλα τα χρόνια, τη στήριξή της σε όλα τα επίπεδα, όσο και για τις πολύτιμες συμβουλές της και την άριστη συνεργασία μας.

Επίσης, ευχαριστώ ιδιαίτερα τον υπεύθυνό μου στο εργαστήριο Δομικής Βιολογίας και Χημείας, Δρ. κ. Σπύρο Ζωγράφο (Ερευνητής Β' ΙΟΦΧ/ΕΙΕ) για την καθοδήγησή του και τις πολύτιμες συμβουλές του κατά τη διάρκεια εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου εργασίας.

Για τη διεκπεραίωση της παρούσας ερευνητικής εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Δρ. Κατερίνα Τσιτσάνου για τις σημαντικές συμβουλές της κατά τη διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων και την προθυμία της να μοιραστεί τις γνώσεις της μαζί μου.

Ευχαριστώ επίσης τη Χριστίνα Δράκου για την βοήθειά της κατά την εκπόνηση της εργασίας μου.

Επίσης, ευχαριστώ ιδιαίτερα την Δρ. Ευαγγελία Χρυσίνα (Ερευνήτρια ΙΟΦΧ/ΕΙΕ) για τη διάθεσή της να προσφέρει την βοήθειά της οποτεδήποτε τη χρειάστηκα.

Φυσικά δε θα μπορούσα να παραλείψω τις ευχαριστίες μου προς τις φίλες μου και συμφοιτήτριές μου, Βιβή Σκούρτη, Μάγδα Χεγκάζι και Κατερίνα Χατζησταματίου για τη διάθεσή τους για ανταλλαγή γνώσεων και απόψεων καθώς και τη δημιουργία ευχάριστου κλίματος στο εργαστήριο. Επίσης ευχαριστώ όλους τους φίλους μου για την υπομονή τους, την κατανόησή τους και τη στήριξή τους κατά τη διάρκεια των σπουδών μου.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου και ιδιαίτερα τους γονείς μου και την αδελφή μου, γιατί χωρίς τις δικές τους θυσίες και τη συμπαράστασή τους όλα αυτά τα χρόνια δε θα είχα πραγματοποιήσει τις σπουδές μου και τα όνειρά μου...

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	21
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1-ΕΛΟΝΟΣΙΑ.....	23
1.1 Εισαγωγή.....	23
1.2 Ελονοσία.....	24
1.3 Βιολογία της ασθένειας.....	25
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2- ΤΡΟΠΟΙ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ ΤΗΣ ΕΛΟΝΟΣΙΑΣ.....	28
2.1 Εισαγωγή.....	28
2.2 Ανθελνοσοσιακά φάρμακα.....	28
2.3 Εμβόλια.....	29
2.4 Διαγονιδιακά κουνούπια.....	31
2.5 Εντομοκτόνα.....	32
2.6 Εντομοαπωθητικά.....	32
2.6.1 DEET.....	33
2.6.2 Πικαριδίνη.....	34
2.6.3 Βότανα.....	34
2.6.3.1 Γενικά.....	34
2.6.3.2 Γερανυλο-ακετόνη και καρβακρόλη (geranyl acetone and carvacrol).....	36
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3-ΟΣΦΡΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΕΝΤΟΜΩΝ.....	38
3.1 Εισαγωγή.....	38
3.2 Το στέλεχος <i>Anopheles gambiae</i>	39
3.3 Οσφρητικό σύστημα και αναγνώριση οσμών.....	40
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4- ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ΟΣΦΡΗΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ.....	44
4.1 Ρόλος των OBPs.....	44
4.2 Δομή των OBPs.....	45
4.2.1 Δομή της AgamOBP1 του Ανωφελή.....	47
4.3 Σύνδεση προσδετών και δομικές μεταβολές.....	49
4.4 Αλληλεπιδράσεις των OBPs.....	50
4.5 Σύγκριση OBPs εντόμων- σπονδυλωτών.....	50

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5- ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΤΥΠΟΥ II ΚΑΙ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ.....	51
5.1 Εισαγωγή.....	51
5.2 Το ένζυμο φωσφορυλάση του γλυκογόνου.....	51
5.3 Ρύθμιση της μυϊκής φωσφορυλάσης από το ενδοκυτταρικό ενεργειακό φορτίο.....	52
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6- ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΑ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.....	53
6.1 Εισαγωγή.....	53
6.2 Κρυστάλλωση της πρωτεΐνης.....	53
6.2.1 Παράγοντες που επιδρούν στην κρυστάλλωση της πρωτεΐνης.....	54
6.2.2 Φυσικοχημεία της κρυστάλλωσης της πρωτεΐνης.....	57
6.3 Γεωμετρία πρωτεϊνικών κρυστάλλων.....	60
6.4 Περίθλαση ακτινών-Χ.....	61
6.5 Πηγές ακτινών-Χ.....	62
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7- ΚΑΤΕΥΘΥΝΟΜΕΝΟΣ ΑΠΟ ΤΗ ΔΟΜΗ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ.....	66
7.1 Σχεδιασμός βιοδραστικών μορίων με βάση τη δομή.....	66
7.2 Εκτίμηση μιας δομής για κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό βιοδραστικών μορίων.....	68
7.3 Προσδιορισμός της θέσης σύνδεσης.....	69
7.4 Μέθοδοι σχεδιασμού ουσιών.....	70
ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	72
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8- ΑΡΧΕΣ ΜΕΘΟΔΩΝ-ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ.....	74
8.1 Υλικά.....	74
8.2 Εργαστηριακός εξοπλισμός-Όργανα.....	77
8.3 Καλλιέργειες βακτηρίων.....	80
8.3.1 Αρχή μεθόδου.....	80
8.3.2 Κύτταρα Origami B (DE3).....	80
8.3.3 Φορέας έκφρασης PET-22b(+).	80
8.3.4 Μετασχηματισμός βακτηριδιακών στελεχών	82
8.3.5 Επιλογή.....	82
8.4 Πειραματική πορεία.....	82

8.5 Υπερέκφραση πρωτεΐνης με επαγωγή.....	83
8.5.1 Αρχή μεθόδου.....	83
8.5.2 Πειραματική πορεία.....	85
8.6 Λύση των κυττάρων.....	85
8.6.1 Αρχή μεθόδου.....	85
8.6.2 Πειραματική πορεία.....	86
8.7 Σώματα εγκλεισμού.....	86
8.7.1 Σχηματισμός σωμάτων εγκλεισμού.....	86
8.7.2 Απομόνωση σωμάτων εγκλεισμού.....	87
8.8 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή (SDS-Page Ηλεκτροφόρηση).....	88
8.8.1 Αρχή μεθόδου.....	88
8.8.2 Πειραματική πορεία.....	91
8.8.2.1 Προετοιμασία πηκτής.....	91
8.8.2.2 Ανάλυση SDS-Page.....	92
8.8.2.3 Τοποθέτηση δειγμάτων	92
8.8.2.4 Χρώση και αποχρωματισμός της πηκτής.....	92
8.9 Έκπλυση των σωμάτων εγκλεισμού.....	93
8.10 Αποδιάταξη των σωμάτων εγκλεισμού.....	93
8.11 Προσδιορισμός της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης με τη μέθοδο Bradford.....	94
8.11.1 Αρχή μεθόδου.....	94
8.11.2 Πειραματική πορεία.....	94
8.12 Αναδίπλωση της πρωτεΐνης.....	95
8.13 Συμπύκνωση της πρωτεΐνης.....	95
8.14 Διαπίδυση της πρωτεΐνης	95
8.14.1 Αρχή μεθόδου.....	95
8.14.2 Πειραματική πορεία.....	96
8.15 Καθαρισμός πρωτεΐνης με ταχεία υγρή χρωματογραφία πρωτεϊνών FPLC.....	96
8.15.1.1 Χρωματογραφία μοριακής διήθησης (Gel filtration Chromatography).....	97
8.15.1.2 Πειραματική πορεία.....	98
8.16 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης... ..	98

8.16.1 Αρχή μεθόδου.....	98
8.16.2 Πειραματική πορεία.....	99
8.17 Κρυστάλλωση πρωτεϊνών.....	99
8.17.1 Τεχνικές κρυστάλλωσης.....	99
8.17.2 Πειραματική πορεία.....	101
8.18 Συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων.....	103
8.18.1 Κρυστοπροστασία κρυστάλλων.....	103
8.18.3 Πειραματική πορεία.....	103
8.19 Κινητική μελέτη της GP παρουσία αναστολέων (χρυσίνης και φλαβοπιριδόλης) στην κατεύθυνση της σύνθεσης του γλυκογόνου.....	104
8.20 Κινητική μελέτη του ενζύμου GP (παρουσία αναστολέων χρυσίνης και φλαβοπιριδόλης) στην κατεύθυνση της αποικοδόμησης του γλυκογόνου.....	105
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9- ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ...	106
9.1 Αποτελέσματα έκφρασης και καθαρισμού της πρωτεΐνης OBP4.....	106
9.2 Επεξεργασία κρυσταλλογραφικών δεδομένων.....	108
9.3 Αποτελέσματα επεξεργασίας.....	109
9.3.1 Σύμπλοκο OBP4- καρβακρόλης.....	109
9.3.2 Σύμπλοκο OBP4 –γερανυλο-ακετόνης.....	114
9.4 Αποτελέσματα κινητικών μελετών της Φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (GP).....	117
9.4.1 Κινητικές μελέτες της GP στην κατεύθυνση σύνθεσης του γλυκογόνου.....	117
9.4.2 Κινητικές μελέτες της GP στην κατεύθυνση αποικοδόμησης του γλυκογόνου.....	119
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10- ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	124
ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ.....	129
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ.....	131
ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....	133

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1 : Σχηματική απεικόνιση των σταδίων αναζήτησης και εντοπισμού του στόχου του κουνουπιού.....	40
Σχήμα 2 : Βήματα κατευθυνόμενου από τη δομή σχεδιασμού φαρμάκων....	67
Σχήμα 3 : Αναστολή της GPb από τη χρυσίνη.....	118
Σχήμα 4 : Διάγραμμα των φαινόμενων K_m , a_{pp} συναρτήσει των συγκεντρώσεων αναστολέα.....	119
Σχήμα 5 : Διάγραμμα Dixon παρουσία χρυσίνης και καφεΐνης.....	119
Σχήμα 6 : Αναστολή της GPb από τη χρυσίνη στην κατεύθυνση αποικοδόμησης του γλυκογόνου	120
Σχήμα 7 : Αναστολή της GPb από τη φλαβοπιριδόλη στην κατεύθυνση αποικοδόμησης του γλυκογόνου.....	121
Σχήμα 8 : Αναστολή της GPb από τη φλαβοπιριδόλη στην κατεύθυνση αποικοδόμησης του γλυκογόνου.....	121
Σχήμα 9 : Διάγραμμα Dixon.....	122
Σχήμα 10 : Διάγραμμα Dixon	123

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Τα κρούσματα ελονοσίας και η αντίσταση στα φάρμακα.....	23
Εικόνα 2: Κύκλος μετάδοσης του παράσιτου της ελονοσίας <i>P. falciparum</i> ..	26
Εικόνα 3 : Φωτογραφία από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο ώριμων ωοκυττάρων και σπορόζων.....	26
Εικόνα 4 : Δομή του DEET.....	33
Εικόνα 5 : Δομή της πικαριδίνης.....	34
Εικόνα 6 : Γερανυλο-ακετόνη.....	36
Εικόνα 7 : Καρβακρόλη.....	36
Εικόνα 8 : Το στέλεχος <i>A. gambiae</i>	39
Εικόνα 9 : Το οσφρητικό σύστημα του κουνουπιού.....	40
Εικόνα 10 : Απεικόνιση των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην υποδοχή του οσφρητικού ερεθίσματος.....	42
Εικόνα 11 : Αλληλουχία OBPs διαφορετικών τάξεων εντόμων.....	46
Εικόνα 12 : Η τρισδιάστατη δομή της AgamOBP1.....	47
Εικόνα 13 : Υπέρθεση των δομών τριών OBPs.....	48
Εικόνα 14 : Στοιχειώδεις κυψελίδες σε κρυσταλλικό πλέγμα.....	54
Εικόνα 15 : Απεικόνιση των σταδίων της κρυστάλλωσης.....	59
Εικόνα 16 : Κρύσταλλοι πρωτεΐνης.....	60
Εικόνα 17 : Στοιχειώδεις κυψελίδες P, I, F.....	61
Εικόνα 18 : Σχηματική αναπαράσταση ακτινοβόλησης κρυστάλλου πρωτεΐνης με ακτίνες Χ.....	64
Εικόνα 19 : Αναπαράσταση του χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας ως αποτέλεσμα δεδομένων σε διαφορετική ευκρίνεια.....	64
Εικόνα 20 : Χάρτης του φορέα έκφρασης Pet-22b(+).	81
Εικόνα 21 : Το οπερόνιο <i>lac</i>	83
Εικόνα 22 : Συνδυαστικές επιδράσεις της γλυκόζης και λακτόζης στην έκφραση του <i>lac</i> οπερονίου	84
Εικόνα 23 : Δομές λακτόζης, D-γαλακτόζης, D-γλυκόζης και IPTG	84
Εικόνα 24 : Σχηματισμός σωμάτων εγκλεισμού.....	87
Εικόνα 25 : Σχηματική αναπαράσταση τη ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου	90
Εικόνα 26 : Σχηματική απεικόνιση της χρωματογραφίας μοριακής	

διήθησης.....	97
Εικόνα 27 : Τεχνικές κρυστάλλωσης πρωτεϊνών.....	101
Εικόνα 28 : Κρύσταλλοι πρωτεΐνης OBP4 στη συνθήκη κρυστάλλωσης C11.....	102
Εικόνα 29 : Πηκτή 15% ελέγχου έκφρασης.....	106
Εικόνα 30 : Πηκτή 15%.....	107
Εικόνα 31 : Καθαρισμός της OBP4 με χρωματογραφία μοριακής διήθησης.....	107
Εικόνα 32 : Πηκτή 15% δείγματος πρωτεΐνης	108
Εικόνα 33 : Ηλεκτρονιακή πυκνότητα των αμινοξέων του κέντρου σύνδεσης της OBP4.....	111
Εικόνα 34 : Αναπαράσταση της δομής του συμπλόκου OBP4- καρβακρόλης.....	112
Εικόνα 35 : Απεικόνιση της μοριακής επιφάνειας του συμπλόκου OBP4- καρβακρόλης.....	112
Εικόνα 36 : Ηλεκτρονιακή πυκνότητα των αμινοξέων του κέντρου σύνδεσης της OBP4.....	115
Εικόνα 37 : Αναπαράσταση της δομής του συμπλόκου OBP4- γερανυλο-ακετόνης.....	115
Εικόνα 38 : Απεικόνιση της μοριακής επιφάνειας του συμπλόκου OBP4-γερανυλο-ακετόνης.....	116
Εικόνα 39: Χρυσίνη	117
Εικόνα 40 : Φλαβοπιρυδόλη.....	117
Εικόνα 41 : Υπέρθεση των δομών των συμπλόκων OBP4-καρβακρόλης και OBP4-γερανυλο-ακετόνης.....	126

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1 : Ιδανικές ιδιότητες εντομοαπωθητικού.....	36
Πίνακας 2 : Παράγοντες που επιδρούν στην κρυστάλλωση μιας πρωτεΐνης.....	56
Πίνακας 3 : Τα επτά κρυσταλλικά συστήματα.....	62
Πίνακας 4 : Διαλύματα πηκτών επιστοίβασης και διαχωρισμού για SDS-Gel 15%.....	92
Πίνακας 5 : Διάλυμα αποδιάταξης 15 ml (pH 8.5).....	94
Πίνακας 6 : Διάλυμα αποδιάταξης.....	96
Πίνακας 7 : Συνθήκες κρυστάλλωσης της πρωτεΐνης OBP4.....	104
Πίνακας 8 : Συνθήκες Ακτινοβολήσης των κρυστάλλων.....	106
Πίνακας 9 : Περίληψη των δεδομένων περίθλασης και στατιστική ανάλυση της βελτιστοποίησης του συμπλόκου OBP4-καρβακρόλης και OBP4-γερανυλο-ακετόνης.....	111
Πίνακας 10 : Δεσμοί υδρογόνου στο σύμπλοκο OBP4-καρβακρόλη.....	114
Πίνακας 11 : Αλληλεπιδράσεις van der Waals στο σύμπλοκο OBP4-καρβακρόλη.....	114
Πίνακας 12 : Δεσμοί υδρογόνου στο σύμπλοκο OBP4-γερανυλο-ακετόνη.....	117
Πίνακας 13 : Αλληλεπιδράσεις van der Waals στο σύμπλοκο OBP4- γερανυλο-ακετόνη	117
Πίνακας 14 : Πίνακας αντιστοίχισης ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων....	130

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία εκπονήθηκε σε συνεργασία με το Εργαστήριο Δομικής Βιολογίας και Χημείας του Ινστιτούτου Οργανικής και Φαρμακευτικής Χημείας στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, υπό την επίβλεψη του Δρ. Σ. Ζωγράφου (Ερευνητής Β', ΙΟΦΧ/ΕΙΕ), στα πλαίσια του μεταπτυχιακού διπλώματος ειδίκευσης στη Βιοχημεία. Θα ήθελα λοιπόν να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στους καθηγητές μου στη Βιοχημεία : κ. Μαίρη Μαυρή, κ. Αθανασία Σιαφάκα-Καπάδα, κ. Ντία Γαλανοπούλου και κ. Κωνσταντίνο Δημόπουλο που μου έδωσαν την ευκαιρία να συμμετέχω στο μεταπτυχιακό δίπλωμα ειδίκευσης στη Βιοχημεία, καθώς και στον κ. Σπύρο Ζωγράφο που με δέχθηκε στην ερευνητική του ομάδα.

Η ερευνητική εργασία διενεργήθηκε στα πλαίσια του κατευθυνόμενου από τη δομή σχεδιασμού βιοδραστικών μορίων και περιλαμβάνει τη δομική και κινητική μελέτη λειτουργικών πρωτεϊνών (OBP4 και φωσφορυλάση του γλυκογόνου). Στο εργαστήριο Δομικής Βιολογίας και Χημείας του ΙΟΦΧ/ΕΙΕ πραγματοποιείται δομική μελέτη πρωτεϊνών χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ υψηλής ευκρίνειας.

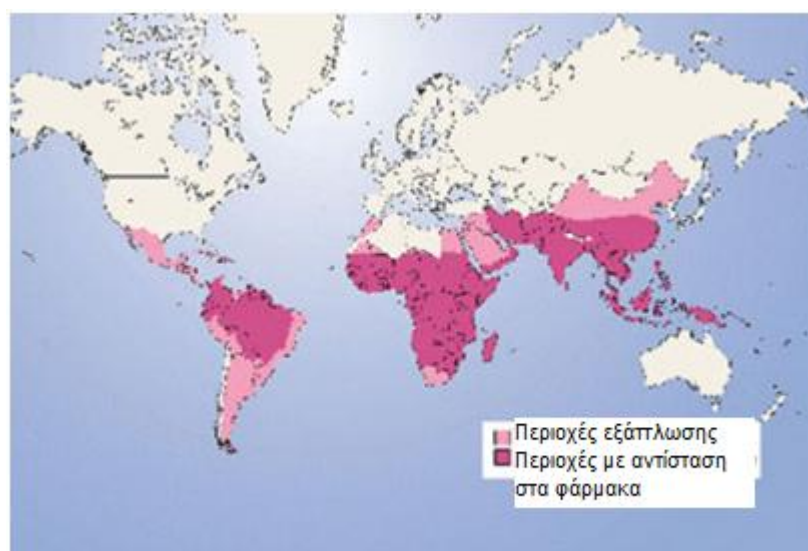
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΛΟΝΟΣΙΑ

1.1 Εισαγωγή

“No animal on earth has touched so directly and profoundly the lives of so many human beings. For all of our history, and all over the globe, she has been a nuisance, a pain, and an angel of death. The mosquito has killed great leaders, decimated armies, and decided the fates of nations. All this, and she is roughly the size and weight of a grape seed.”

A. Spielman and M. D'Antonio ²⁶

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται αύξηση των κρουσμάτων ασθενειών όπως η εγκεφαλίτιδα, ο κίτρινος πυρετός και η ελονοσία, που μέχρι πρόσφατα θεωρούνταν εξαλειμμένες ή υπό έλεγχο στα ανεπτυγμένα κράτη. Σημαντικό ρόλο στην εξάπλωση αυτών των σοβαρών ασθενειών διαδραματίζουν τα κουνούπια τα οποία τρέφονται με αίμα προκειμένου να αναπαραχθούν και τις μεταδίδουν μέσω τσιμπήματος.



Εικόνα 1: Τα κρούσματα ελονοσίας και η αντίσταση στα φάρμακα.²⁶

Η ελονοσία, που προκαλείται από τα πρωτόζωα του γένους Πλασμώδιο (*Plasmodium*) αποτελεί την πιο κοινή παρασιτική ασθένεια στους ανθρώπους

των τροπικών και υπο-τροπικών χωρών. Αν και κατά τον εικοστό αιώνα η ελονοσία παρουσίαζε ύφεση τόσο στις υπανάπτυκτες όσο και στις αναπτυσσόμενες χώρες λόγω εκτεταμένης χρήσης εντομοκτόνων και φαρμάκων, σήμερα η ασθένεια παρουσιάζει έξαρση ακόμη και σε περιοχές όπου είχε προηγουμένως τεθεί υπό έλεγχο.²⁶ Παρόλο που τα φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν για την καταπολέμηση της νόσου βοήθησαν σε σημαντικό βαθμό, προέκυψε το σημαντικό πρόβλημα της αντίστασης του παρασίτου σε αυτά (Εικόνα 1).

Έτσι, για την αποτελεσματική αντιμετώπιση της ασθένειας, η έρευνα κατευθύνθηκε στην κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στη μεταφορά των οσμογόνων στους οσφρητικούς υποδοχείς του φορέα (κουνουπιού) με στόχο την ανεύρεση νέων πιο δραστικών εντομοαπωθητικών και επομένως την προστασία της δημόσιας υγείας.²⁶

1.2 Ελονοσία

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) η ελονοσία προσβάλλει κατά μέσο όρο 247 εκ. ανθρώπους το χρόνο, ενώ αποβαίνει θανατηφόρα για το 1 εκ. από αυτούς.²⁰ Η πλειοψηφία των θανάτων παρατηρείται στις φτωχές τροπικές χώρες και πιο συγκεκριμένα στην υπο-σαχάριο Αφρική, Ασία και Αμερική. Τα περισσότερα θύματα της ελονοσίας είναι νεογέννητα και παιδιά κάτω των 5 ετών, ενώ η ασθένεια ευθύνεται για τον 1 στους 5 θανάτους παιδιών στην Αφρική.

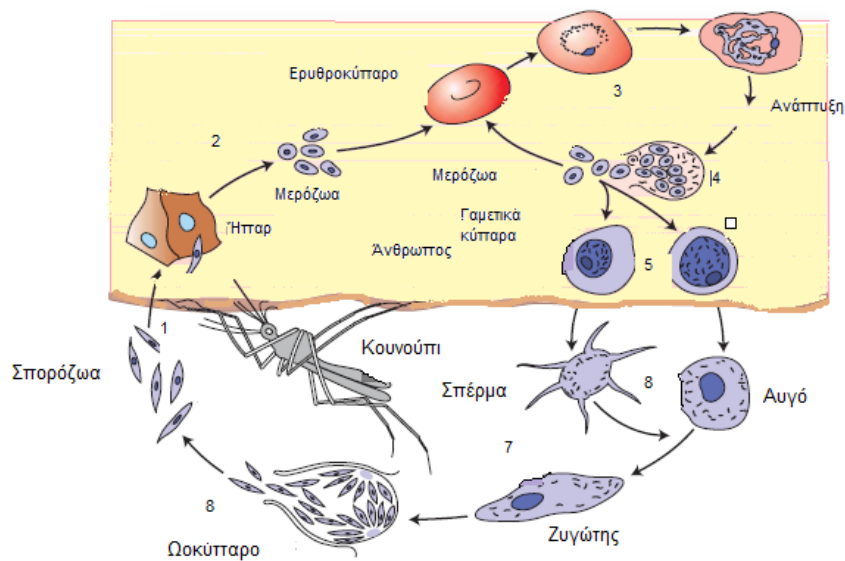
Η εξάπλωση του παράσιτου οφείλεται στην υψηλή μεταδοτικότητά του οδηγώντας σε εκατομμύρια μολύνσεις κάθε χρόνο, κυρίως μέσω του κουνουπιού.¹⁸ Πρόσφατα βρέθηκε ότι ίσως η παρουσία του παράσιτου σε συγκεκριμένη φάση της ανάπτυξής του να τροποποιεί τη συμπεριφορά του κουνουπιού έτσι ώστε να αυξάνεται ο ρυθμός μετάδοσής του. Μάλιστα σχετική μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε παιδιά έδειξε πως τα άτομα που είναι μολυσμένα με το παράσιτο *Plasmodium falciparum* στη φάση ανάπτυξης γαμετικών κυττάρων του παράσιτου, δηλαδή στη φάση που μεταδίδεται στα κουνούπια, έλκουν τα κουνούπια σε διπλάσιο ποσοστό συγκριτικά με τα άτομα που είναι μολυσμένα με το παράσιτο στη φάση που δεν μεταδίδεται,

γεγονός που ενισχύει την υπόθεση ότι τα γαμετοκύτταρα αυξάνουν την έλξη των κουνουπιών από τα παιδιά.¹⁸

1.3 Βιολογία της ασθένειας

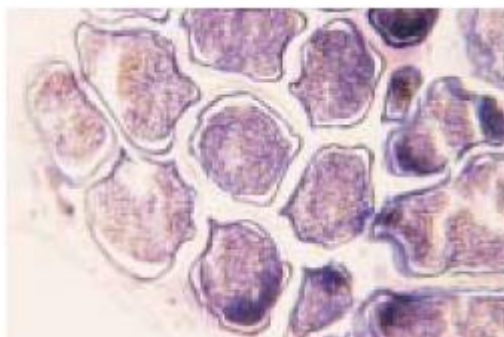
Η ασθένεια της ελονοσίας προκαλείται από πέντε είδη του παράσιτου *Plasmodium*: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* και *P. knowlesi* με το στέλεχος *P. falciparum* να είναι το πιο διαδεδομένο στην περιοχή της Σαχάρας της Αφρικής και το πλέον επικίνδυνο αφού αποτελεί το πιο θανατηφόρο είδος του παράσιτου.^{39,43} Η μετάδοσή τους στον άνθρωπο γίνεται από περίπου πενήντα είδη κουνουπιού, τα οποία ανήκουν στο γένος *Anopheles* (Ανωφελές).

Τα είδη του παράσιτου *Plasmodium* τα οποία προκαλούν ελονοσία στον άνθρωπο έχουν παρόμοιο κύκλο ζωής, μεταδίδονται από το κουνούπι και ζουν ένα μέρος της ζωής τους στον ξενιστή.¹ Ο κύκλος ζωής του παράσιτου είναι πολύπλοκος τόσο στον άνθρωπο όσο και στο κουνούπι. Όπως φαίνεται στην εικόνα 2, η ασθένεια μεταδίδεται στον άνθρωπο ύστερα από τσίμπημα μολυσμένου θηλυκού κουνουπιού, το οποίο με αυτό τον τρόπο εισάγει στον ξενιστή το παράσιτο σε μορφή σπορόζων (Εικόνα 3). Τα σπορόζωα μολύνουν κύτταρα του ήπατος, όπου πολλαπλασιάζονται και παράγουν ένα είδος αγενών κυττάρων, τα μερόζωα, τα οποία απελευθερώνονται στη κυκλοφορία του αίματος και μολύνουν τα αιμοσφαίρια. Η ρήξη των αιμοσφαιρίων προκαλεί την απελευθέρωση παρασίτων στην κυκλοφορία του αίματος και συνοδεύεται από νέο κύκλο μόλυνσης αιμοσφαιρίων και τα διάφορα συμπτώματα της νόσου όπως αναιμία, πυρετός κ.λπ.³⁹



Εικόνα 2: Κύκλος μετάδοσης του παράσιτου της ελονοσίας *P. falciparum*.⁶²

Ακολουθώντας έναν ελάχιστα κατανοητό μηχανισμό ορισμένα αγενή μερόζωα διαφοροποιούνται σε αρσενικά και θηλυκά γαμετοκύτταρα τα οποία παραμένουν στην κυκλοφορία του αίματος για εβδομάδες και μεταδίδονται στο επόμενο κουνούπι ύστερα από τσίμπημα του ξενιστή, μολύνοντάς το. Μέσα στο μολυσμένο πλέον κουνούπι τα γαμετοκύτταρα ωριμάζουν, αναπαράγονται, και οδηγούνται στους σιελογόνους αδένες του, οπότε και επαναλαμβάνεται ο κύκλος ζωής του παρασίτου.



Εικόνα 3: Φωτογραφία από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο ώριμων ωοκυττάρων και σποροζωων.⁶²

Σε κάποια είδη του *Plasmodium*, το παράσιτο μπορεί να ζει στο ήπαρ του ατόμου για μήνες ή χρόνια προκαλώντας περιοδικές εξάρσεις πυρετού και άλλων συμπτωμάτων της ασθένειας. Η σοβαρότητα της νόσου εξαρτάται από το είδος του παράσιτου, από την κατάσταση υγείας του ασθενούς καθώς και από το ανοσολογικό του προφίλ. Τυπικά συμπτώματα της νόσου είναι ο πυρετός, τα ρίγη, ο πονοκέφαλος, ο εμετός και η διάρροια. Επιπλέον, μπορεί να προκαλέσει μακροχρόνια αναιμία, δυσλειτουργία του ήπατος, σοβαρές βλάβες στο νευρικό σύστημα ακόμη και θάνατο, εάν η ασθένεια δεν θεραπευθεί. Το πιο επικίνδυνο στέλεχος που είναι το *Plasmodium falciparum* μπορεί να οδηγήσει σε εγκεφαλίτιδα, ιδιαίτερα επικίνδυνη κατάσταση με επιπλοκές στον εγκέφαλο και το νευρικό σύστημα, η οποία ευθύνεται για εγκεφαλική βλάβη ακόμη και μετά την ίαση της ασθένειας.¹

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΤΡΟΠΟΙ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ ΤΗΣ ΕΛΟΝΟΣΙΑΣ

2.1 Εισαγωγή

Η ελονοσία απειλεί τις ζωές εκατομμυρίων παιδιών στις τροπικές κυρίως χώρες αν και την τελευταία δεκαετία έχουν γίνει σημαντικά θετικά βήματα για την καταπολέμησή της. Η προσπάθεια επικεντρώνεται τόσο στη θεραπεία των ασθενών όσο και στην αποφυγή της μόλυνσης των υγιών ατόμων από το παράσιτο που την προκαλεί. Τα συμπτώματα της νόσου είναι μη ειδικά, γεγονός που κάποιες φορές προκαλεί είτε τη χορήγηση ανθελνοσοσιακών φαρμάκων σε άτομα που δεν πάσχουν από τη νόσο είτε στην καθυστέρηση χορήγησής τους λόγω μη έγκαιρης διάγνωσης.⁴⁰

Τα τελευταία χρόνια η αυξημένη χρήση των διχτυών με εντομοαπωθητικά, ο ψεκασμός των εσωτερικών χώρων και η συνδυαστική, βασισμένη στην αρτεμισινίνη, θεραπεία (ACT), μείωσαν τα κρούσματα ελονοσίας, που προκαλείται από το παράσιτο *P. falciparum*, και τη θνησιμότητα από τη νόσο στην Ασία και σε χώρες της Αφρικής. Ωστόσο το γεγονός ότι το παράσιτο αναπτύσσει αντίσταση στα φάρμακα κατά της ελονοσίας σε συνδυασμό με την αυξημένη ανθεκτικότητα των κουνουπιών στα εντομοκτόνα, αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα στην καταπολέμησή της.⁴⁰

Η προσπάθεια αντιμετώπισης της ελονοσίας συνίσταται στους εξής τρόπους: α) χορήγηση ανθελνοσοσιακών φαρμάκων β) ανάπτυξη εμβολίων, γ) ανάπτυξη διαγονιδιακών κουνουπιών δ) χρήση εντομοκτόνων ε) διχτυών εμποτισμένων με κάποιο εντομοαπωθητικό και στ) χρήση εντομοαπωθητικών.

2.2 Ανθελνοσοσιακά φάρμακα

Υπάρχουν πολλές τάξεις φαρμάκων που χρησιμοποιούνται στην καταπολέμηση της ελονοσίας μεταξύ των οποίων είναι οι κινολίνες (quinolines), οι αναστολείς της σύνθεσης του φολικού οξέος (antifolates) και οι συνδυαστικές θεραπείες με αρτεμισινίνη (ACTs). Όλα τα παραπάνω στοχεύουν στο ενδο-ερυθροκυτταρικό στάδιο του κύκλου του παράσιτου, το οποίο ευθύνεται για τα συμπτώματα της ασθένειας. Μεταξύ των κινολινών,

που αποτελούν την παλαιότερη τάξη ανθελονοσιακών φαρμάκων περιλαμβάνονται: η κινίνη (quinine), η χλωροκινίνη (chloroquinine), η μεφλοκίνη (mefloquine) και η αμοδιακίνη (amodiaquin). Παρόλα αυτά, λόγω μεταλλάξεων σε γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες απαραίτητες για τη μεταφορά του φαρμάκου στο *Plasmodium* έχει παρουσιαστεί ανθεκτικότητα στις κινολίνες. Η δεύτερη κατηγορία ενώσεων περιλαμβάνει τη σουλφαδοξίνη (sulfadoxine) και την προγουανίλη (proguanil) οι οποίες παρεμβαίνουν στην μεταβολική πορεία σύνθεσης του φολικού οξέος, το οποίο είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη του παρασίτου. Η αντίσταση στο συγκεκριμένο τύπο φαρμάκων οφείλεται σε μεταλλάξεις που προκαλούν μείωση της συγγένειας των φαρμάκων με τους στόχους τους (τα ένζυμα διϋδροφολική αναγωγή και διϋδροπτερική συνθετάση που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση του φολικού οξέος) και έτσι καθίσταται αδύνατο να διακοπεί η βιοσυνθετική πορεία. Τέλος, οι αρτεμισινίνες, οι οποίες προέρχονται από το κινέζικο βότανο *Artemisia annua*, βρίσκονται στην κορυφή της κατάταξης των ανθελονοσιακών φαρμάκων. Είναι λακτόνες των σεσκιτερπενίων και μπορούν να εξολοθρεύουν τα γαμετικά κύτταρα του *Plasmodium*, μειώνοντας έτσι το ρυθμό μετάδοσής του. Σημαντικό μειονέκτημα των ACTs είναι ο μικρός χρόνος ημιζωής τους και γι' αυτό το λόγο χορηγούνται σε συνδυασμό με κινολίνες ή αναστολείς της σύνθεσης του φολικού οξέος. Όπως και στις δυο πρώτες κατηγορίες φαρμάκων έτσι και σε αυτή την περίπτωση έχει προκύψει το σημαντικό πρόβλημα της αντίστασης του παράσιτου στις ACTs.²³

Η αποτελεσματική χρήση των φαρμάκων ενάντια στην ελονοσία αναστέλλεται και από άλλους παράγοντες όπως είναι η χαμηλή αποτελεσματικότητα τους, η αμφιλεγόμενη ασφάλεια τους για την υγεία του ασθενούς και τέλος το υψηλό τους κόστος ιδιαίτερα για τις φτωχότερες χώρες.³⁸

2.3 Εμβόλια

Τα εμβόλια παραμένουν ο κύριος τρόπος αντιμετώπισης των παθογόνων μικροοργανισμών. Σε αυτή την κατεύθυνση γίνεται προσπάθεια ανάπτυξης συγκεκριμένων εμβολίων όπως είναι:

Α) Εμβόλια με στόχο τα προ-ερυθροκύτταρα

Εξ' ορισμού τα παραπάνω εμβόλια στοχεύουν είτε τα σπορόζωα του παράσιτου είτε τα μολυσμένα ηπατοκύτταρα με σκοπό να αποτρέψουν την απελευθέρωση των μερόζων στο αίμα. Τα συγκεκριμένα εμβόλια είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικά σε ανθρώπους που δεν έχουν ακόμη μολυνθεί, αν και απαιτούν υψηλή ανοσολογική απόκριση διότι κάθε σπορόζωο πρέπει να εξουδετερωθεί σε μικρό χρονικό διάστημα.

Β) Εμβόλια που στοχεύουν στο στάδιο μόλυνσης του αίματος

Τα παραπάνω εμβόλια στοχεύουν το παράσιτο στο πιο καταστροφικό του στάδιο, δηλαδή στον ταχύ πολλαπλασιασμό του στα ανθρώπινα ερυθροκύτταρα. Στόχος τους είναι να μειώσουν τον αριθμό των παράσιτων στο αίμα και τελικά την επικινδυνότητα της ασθένειας. Σύμφωνα με έρευνα οι άνθρωποι που έχουν επιβιώσει από συστηματική έκθεση στην ελονοσία αναπτύσσουν φυσική ανοσία έναντι του παρασίτου.

Γ) Εμβόλια γαμετικής φάσης

Κύριος ρόλος των συγκεκριμένων εμβολίων είναι να διακόψουν τον κύκλο ζωής του παρασίτου αποτρέποντας την ωρίμανσή του στο κουνούπι που έχει τραφεί από ένα εμβολιασμένο άτομο. Αν και τα συγκεκριμένα εμβόλια είναι αδύνατο να προστατέψουν από τη μόλυνση μπορούν να περιορίσουν τη μετάδοση της ασθένειας. Συνεπώς, είναι εφικτή η μείωση της θνησιμότητας από τη νόσο και πιθανή η εξαφάνιση του παρασίτου από περιοχές που έχουν λίγα κρούσματα ή είναι γεωγραφικά απομονωμένες.³⁹

Ωστόσο η ανάπτυξη των εμβολίων ως τρόπου αντιμετώπισης της ελονοσίας παραμένει δύσκολη λόγω :

α) της πολυπλοκότητας του κύκλου ζωής του παρασίτου, β) της αβεβαιότητας που υπάρχει σχετικά με την ανοσολογική απόκριση που προκαλούν και επομένως την ανοσολογική μνήμη, καθιστώντας αβέβαιη τη μελλοντική προστασία του ατόμου από την ασθένεια, γ) της φυσικής ανοσολογικής απόκρισης ενάντια στην ελονοσία εξαιτίας της οποίας εκατομμύρια άτομα αν και μολυσμένα με το παράσιτο δεν εμφανίζουν συμπτώματα με αποτέλεσμα να μεταδίδεται συνεχώς από το κουνούπι στον άνθρωπο δ) δημιουργία μεταλλάξεων σε γονίδια στόχους, που μπορεί να οδηγήσουν σε ανοσία στο

πρωτότυπο(α) αντιγόνο. Παρόλη την πρόοδο στην ανάπτυξη εμβολίων σήμερα δεν έχει επιτευχθεί η δημιουργία αποτελεσματικών εμβολίων ενάντια στην ασθένεια.³

2.4 Διαγονιδιακά κουνούπια

Η αυξημένη αντίσταση στα εντομοκτόνα που χρησιμοποιούνται για να μειώσουν τη μετάδοση ασθενειών από τα έντομα επέβαλε την ανάγκη για ανάπτυξη νέων τεχνικών προκειμένου να ελεγχθούν γενετικά οι φορείς των ασθενειών. Η γενετική τροποποίηση αποτελεί καινοτόμο στρατηγική η οποία στοχεύει στη μείωση είτε της ικανότητας του εντόμου να αποτελεί ξενιστή για κάποιο παράσιτο είτε του ρυθμού μετάδοσης ενός παρασίτου.²⁷

Η δυνατότητα εισαγωγής ενός γονιδίου στο κουνούπι που να παρεμβαίνει στον κύκλο ζωής του παρασίτου θα μπορούσε να διακόψει τη μετάδοσή του στον άνθρωπο. Υπάρχουν τρεις βασικές απαιτήσεις ώστε να επιτευχθεί η γενετική τροποποίηση των κουνουπιών: α) η εισαγωγή του γονιδίου στη γαμετική σειρά (germ line –transformation) β) η εύρεση ενός κατάλληλου προαγωγέα ο οποίος να κατευθύνει την έκφραση των ξένων γονιδίων στον κατάλληλο ιστό και την κατάλληλη στιγμή και γ) η ταυτοποίηση κατάλληλων γονιδιακών προϊόντων που να επηρεάζουν την εξέλιξη του κύκλου του παρασίτου.

Παρόλο που έχει επιτευχθεί σημαντική πρόοδος στον συγκεκριμένο τομέα, απαιτούνται επιπλέον πειράματα ώστε να διαλευκανθούν σημαντικά ερωτήματα πριν ο συγκεκριμένος τρόπος αποτελέσει εργαλείο στην αντιμετώπιση της ελονοσίας.²⁷ Το μεγαλύτερο ερώτημα παραμένει πώς θα μπορούσαν να εισαχθούν τροποποιημένα γονίδια σε άγριους πληθυσμούς κουνουπιών. Επιπλέον δυσκολίες προκύπτουν από την ιδιαίτερα υψηλή μεταβλητότητα των γονιδίων των παρασίτων. Η βιολογία ενός τέτοιου συστήματος θα πρέπει να είναι πλήρως κατανοητή διότι ανεπιθύμητοι φαινότυποι μπορεί να οδηγήσουν σε μη αναστρέψιμες μεταβολές στη βιολογία του κουνουπιού με πιθανές καταστροφικές περιβαλλοντικές συνέπειες.⁵

2.5 Εντομοκτόνα

Μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τάξη εντομοκτόνων είναι τα πυρεθροειδή αν και παρατηρήθηκε ότι πολλά είδη του *Anopheles* είναι ανθεκτικά σε αυτά. Το γνωστότερο εντομοκτόνο είναι το διχλωρο-διφαινυλο-τριχλωροαιθάνιο, γνωστό ως DDT, το οποίο χρησιμοποιείται από το 1940. Εξαιτίας της βιοσυσσώρευσής του και της υψηλής τοξικότητάς του απαγορεύτηκε η χρήση του στην Αμερική το 1972 αλλά το 2006 εγκρίθηκε και πάλι η κυκλοφορία του από τον WHO για την αντιμετώπιση της ελονοσίας. Σύμφωνα με μελέτες, το DDT, αν και αποτελεί το πιο αποτελεσματικό εντομοκτόνο, επηρεάζει τη γονιμότητα, την ανάπτυξη του εγκεφάλου στα παιδιά ενώ αυξάνει τις πιθανότητες για προσβολή από καρκίνο και διαβήτη. Τέλος κατηγορείται ότι έχει προκαλέσει την εξαφάνιση πολλών ειδών πτηνών στην Αμερική.²³

2.6 Εντομοαπωθητικά

Είναι γνωστό πως οι χημικές ουσίες χρησιμοποιούνται ευρύτατα στο ζωικό βασίλειο για την επικοινωνία και είναι ιδιαίτερα σημαντικές για τα αρχαϊκά είδη από τα οποία συνήθως απουσιάζουν οι αισθήσεις της όρασης και της ακοής. Στα έντομα, οι χημικές ουσίες μπορεί να έχουν ποικίλους ρόλους. Για παράδειγμα, οι φερομόνες προκαλούν συγκεκριμένες αντιδράσεις ή μεταδίδουν μηνύματα μεταξύ ατόμων του ίδιου είδους, ενώ άλλες ουσίες όπως είναι οι καιρομόνες, συμμετέχουν στην επικοινωνία μεταξύ εντόμων διαφορετικών ειδών.¹⁴

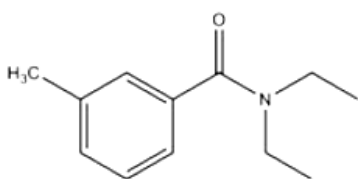
Τα συνθετικά εντομοαπωθητικά χρησιμοποιούνται ευρέως παρόλο που δεν είναι εξακριβωμένος ο μηχανισμός δράσης τους και έχουν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο αφού μπορούν να μειώνουν την αλληλεπίδραση μεταξύ κουνουπιού και ανθρώπου. Μεταξύ των αποτελεσματικότερων και πιο μελετημένων κατηγοριών ουσιών με εντομοαπωθητική δράση είναι οι πιπεριδίνες, οι διόλες, τα αμίδια, τα παράγωγα φθαλικού οξέος (phthalates), γλυκόλες, βενζοφουράνια, φαινόλες, υδροξυεστέρες και τέλος τα εκχυλίσματα βοτάνων.²⁴ Το DEET και η πικαριδίνη τα οποία ανήκουν στη τάξη των καρβοξαμιδίων και πιπεριδινών αντίστοιχα, αποτελούν τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα συστατικά στα προϊόντα του εμπορίου, σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται μεταξύ 10-20%. Πρόσφατα μάλιστα αποδείχθηκε ότι μπορεί

να έχουν και εντομοκτόνο δράση μιας και δρουν ως αναστολείς του ενζύμου ακετυλοχολινο -εστεράση. Για το συγκεκριμένο λόγο αμφισβητείται η ασφάλεια της χρήσης τους στους ανθρώπους και στα ζώα.¹⁹

Έχει βρεθεί ακόμη πως ένα πλήθος πτητικών χημικών ουσιών, όπως η σιτρονέλλα, η κιννανική αλδεΐδη και άλλα, παρουσιάζουν εντομοαπωθητικές ιδιότητες, όμως η δράση τους είναι αποτελεσματική μόνο σε υψηλές συγκεντρώσεις.¹⁹ Επιπλέον, μελετάται η σχέση μεταξύ μοριακής δομής και παρατηρούμενης εντομοαπωθητικότητας μέσω σύνθεσης καινούριων ουσιών όπως οι ακυλοπιπεριδίνες.⁴⁶

2.6.1 DEET

Μια πληθώρα καρβοξαμιδίων (κυρίως τα N,N-διαιθυλο αμίδια) με απλές δομές έχει αποδειχθεί ότι έχουν εντομοαπωθητική δράση. Ξεχωριστή θέση μεταξύ τους κατέχει το DEET (N,N-διαιθυλο-m-τολουαμίδιο) (Εικόνα 4) που χρησιμοποιείται ευρέως τα τελευταία εξήντα χρόνια, εξαιτίας της αποτελεσματικότητάς του και της εξαιρετικής προστασίας που παρέχει ενάντια σε μύγες, κουνούπια και άλλα αρθρόποδα.^{7,45} Το DEET, όπως και άλλα εντομοαπωθητικά δημιουργεί ένα πλέγμα οσμής το οποίο εμποδίζει το έντομο να έλθει σε επαφή με το δέρμα του ανθρώπου, μιας και προκαλεί στο πρώτο μια δυσάρεστη γεύση.⁷ Ωστόσο, ο μηχανισμός δράσης του συγκεκριμένου εντομοαπωθητικού δεν είναι ακόμη γνωστός.



Εικόνα 4: Δομή του DEET.

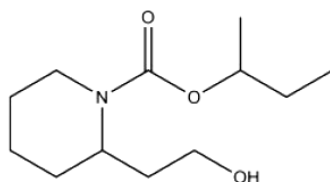
Πρόσφατες μελέτες έδειξαν πως τα έντομα έχουν την ικανότητα να μυρίζουν το DEET και να το αποφεύγουν.⁴¹ Ωστόσο, έχει βρεθεί ότι το DEET δεν είναι αποτελεσματικό σε κάποια ιδιαίτερα επικίνδυνα είδη κουνουπιού όπως το *A. albimanus*, το οποίο είναι ο κύριος ξενιστής της ελονοσίας στην κεντρική Αμερική και στην Καραϊβική, ενώ η δράση του είναι μειωμένη σε περιοχές με υψηλή θερμοκρασία και υγρασία. Άλλα μειονεκτήματα της χρήσης του είναι ότι

έχει μικρή διάρκεια δράσης, δυσάρεστη οσμή, και μπορεί να εισχωρεί στο αίμα, γεγονός που το συνδέει με νευρολογικές διαταραχές ύστερα από μακροχρόνια χρήση. Παράλληλα, μπορεί να αλληλεπιδράσει με άλλα φάρμακα, ενώ παρουσιάζει τοξικότητα και αντιδρά με πλαστικά ή συνθετικά υλικά. Τέλος, η ασφαλής χρήση του DEET από παιδιά είναι υπό έλεγχο, μιας και έχουν αναφερθεί ποικίλες αλλεργικές αντιδράσεις.

2.6.2 Πικαριδίνη

Η πικαριδίνη ή 1-μεθυλο-προπυλοεστέρας (Εικόνα 5) είναι μια τροποποιημένη πιπεριδίνη η οποία έχει χαμηλή τοξικότητα και δεν προκαλεί δερματικές αλλεργίες κατά την εφαρμογή της. Επιπλέον, δεν αντιδρά με πλαστικά, όπως το DEET, και είναι άχρωμο και άοσμο με ευχάριστη υφή. Επιπλέον, είναι πολύ αποτελεσματικό και έχει μεγαλύτερη διάρκεια δράσης από το DEET.⁷

Ωστόσο, όπως συμβαίνει με τα περισσότερα ήδη υπάρχοντα εντομοαπωθητικά, δοκιμές σε ζώα απέδειξαν ότι η πικαριδίνη προκαλεί ερεθισμό του δέρματος και επιπλέον μειώνεται η δράση της με την πάροδο μερικών ωρών από την εφαρμογή της.²⁸



Εικόνα 5: Δομή πικαριδίνης

Συνεπώς, καθίσταται αναγκαία η ανακάλυψη καινούργιων και ασφαλέστερων εντομοαπωθητικών για την αντιμετώπιση της ελονοσίας.

2.6.3 Βότανα

2.6.3.1 Γενικά

Η εύρεση καινούριων εντομοαπωθητικών με βελτιωμένες ιδιότητες είναι από τους πιο ασφαλείς και άμεσους τρόπους αντιμετώπισης της ελονοσίας, μιας και οι ουσίες αυτές προστατεύουν αποτελεσματικά τους ανθρώπους από τα τσιμπήματα μολυσμένων κουνουπιών, έχουν χαμηλό κόστος σε σχέση με τις

άλλες μεθόδους πρόληψης, και η εφαρμογή τους είναι απλή (επάλειψη στο δέρμα).

Σύμφωνα με μελέτες έχει βρεθεί ότι κάποια από τα συστατικά των φυτικών ελαίων παρουσιάζουν εντομοαπωθητική δράση, η οποία κάποιες φορές μπορεί να είναι συνεργιστική αυξάνοντας την αποτελεσματικότητά τους. Έτσι, τα τελευταία χρόνια παρατηρείται στροφή της έρευνας στη μελέτη των ιδιοτήτων των φυσικών προϊόντων και πιο συγκεκριμένα των εκχυλισμάτων από φυτά εξαιτίας των πλεονεκτημάτων τους. Τα φυτικά έλαια βρίσκονται σε αφθονία στη φύση, συνεπώς έχουν χαμηλότερο κόστος συγκριτικά με τις συνθετικές ουσίες και επιπλέον είναι βιοδιασπώμενα οπότε δεν προκαλούν περιβαλλοντική μόλυνση. Προκειμένου όμως να χρησιμοποιηθούν ως αποτελεσματικά εντομοαπωθητικά θα πρέπει να έχουν συγκεκριμένες ιδιότητες (Πίνακας 1) και να διερευνηθεί σε ποια συστατικά τους οφείλεται η εντομοαπωθητική τους δράση.²⁴

Πίνακας 1: Ιδανικές ιδιότητες εντομοαπωθητικού.⁶

1	Αυξημένος χρόνος δράσης ενάντια σε ποικιλία αρθροπόδων
2	Μη πρόκληση ερεθισμών κατά την εφαρμογή του
3	Άοσμο ή με ευχάριστη οσμή
4	Μη πρόκληση αλλοιώσεων σε ρούχα κατά την εφαρμογή του
5	Αδιάβροχο, μη λιπαρή υφή
6	Να μην αντιδρά με τα συνήθως χρησιμοποιούμενα πλαστικά
7	Χημική σταθερότητα
8	Χαμηλή τιμή για ευρεία χρήση
9	Μη τοξικό

Μεταξύ των συστατικών των βοτάνων που δρουν ως εντομοαπωθητικά, συγκαταλέγονται οι φαινόλες, οι κινόνες, οι λακτόνες, τα τερπένια, τα αλκαλοειδή, τα νιτρίλια και τα φουράνια, με πιο δραστικά τα τερπένια, τα

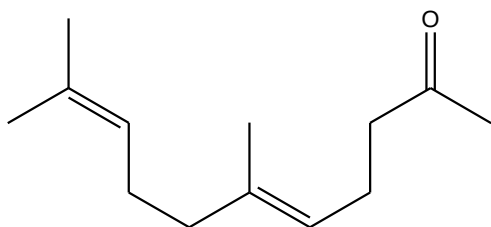
οποία κατηγοριοποιούνται ανάλογα με τις ομάδες ισοπρενίου (C_5H_8) που περιέχουν. Μάλιστα τα μονοτερπένια, τα σесκίτερπένια και τα διτερπένια βρίσκονται σε αφθονία στα έλαια φυτών όπως ο ευκάλυπτος, η πιπεριά, η μέντα, η λεμονιά και το φυτό *Cymborogon nardus*.²⁴

Στα μονοτερπένια ανήκουν το α -πινένιο, η σινεόλη, η ευγενόλη, το λιμονένιο, η σιτρονέλλα, η καμφορά, η θυμόλη και πολλά άλλα, τα οποία σύμφωνα με τη βιβλιογραφία παρουσιάζουν εντομοαπωθητική δράση. Από τα σесκίτερπένια, το β -καρυοφυλλένιο αποτελεί ισχυρό εντομοαπωθητικό ενάντια στο γένος *A. aegypti*.^{24,58} Επιπλέον τα υδροξυλιωμένα συστατικά φαινυλο-αιθυλο-αλκοόλη, β -σιτρονελλόλη, γερανιόλη, α -πινένιο και κινναμωνική αλκοόλη τα οποία έχουν απομονωθεί από το φυτό *Dianthus caryophyllum* παρουσιάζουν ισχυρή εντομοαπωθητική δράση ενάντια στα αρθρόποδα.⁵⁸

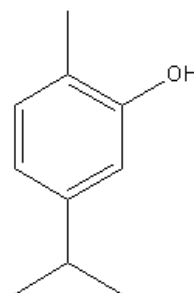
Για το λόγο αυτό οι έρευνες επικεντρώνονται στη διερεύνηση των ιδιοτήτων των τερπενίων και ιδιαίτερα των σесκίτερπενίων, με σκοπό να σχεδιαστούν νέες ενώσεις με βελτιωμένες εντομοαπωθητικές ιδιότητες και μεγαλύτερο εύρος δράσης.²⁴

2.6.3.2 Γερανυλο-ακετόνη και καρβακρόλη (geranyl acetone and carvacrol)

Η γερανυλο-ακετόνη (εικόνα 6) και η καρβακρόλη (εικόνα 7) ανήκουν στην κατηγορία των τερπενίων. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία και οι δύο ενώσεις παρουσιάζουν αξιοσημείωτες εντομοαπωθητικές ιδιότητες.^{66,67,68}



Εικόνα 6: Γερανυλο-ακετόνη



Εικόνα 7: Καρβακρόλη

Πιο αναλυτικά, η γερανυλο-ακετόνη (η οποία έχει βρεθεί στις τομάτες³²) είναι άχρωμο υγρό με ευχάριστη οσμή το οποίο χρησιμοποιείται τόσο στη βιομηχανία τροφίμων για τη βελτίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών

της γεύσης και της οσμής των τροφίμων, όσο και στην κοσμητολογία. Σύμφωνα με μελέτες παρουσιάζει απωθητική δράση ενάντια σε μύγες και κουνούπια συμπεριλαμβανομένων και εκείνων που ανήκουν στο γένος *Anopheles*.^{67,68,71}

Η καρβακρόλη ανήκει στην κατηγορία των φαινολών των μονοτερπενίων. Η συγκεκριμένη κατηγορία ενώσεων αποτελείται από δύο μονάδες ισοπρενίου, μια ομάδα υδροξυλίου και κάποια διακλάδωση χαρακτηριστική για κάθε ένωση. Η καρβακρόλη αποτελεί βασικό συστατικό των ελαίων του θυμαριού (*Thymus*) και της ρίγανης (*Origanum vulgare*) και έχει σημαντική αντιμικροβιακή δράση η οποία οφείλεται στην ικανότητά της να διαρρηγνύει την εξωτερική μεμβράνη των βακτηρίων και στη συνέχεια να τροποποιεί τις λειτουργίες τους, καθώς και εντομοαπωθητική και εντομοκτόνο δράση, λόγω της ικανότητάς της να δρα ως αναστολέας του ενζύμου της ακετυλοχολινεστεράσης.^{66,69,71,83}

Επιπλέον, η καρβακρόλη έχει ήπια δράση ως αναστολέας της συσώρευσης των αιμοπεταλίων, ενώ παρουσιάζει και αντικαρκινικές ιδιότητες.⁷⁰

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΟΣΦΡΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΩΝ ΕΝΤΟΜΩΝ

3.1 Εισαγωγή

Στο ζωικό βασίλειο η επικοινωνία μεταξύ των οργανισμών και του περιβάλλοντος ρυθμίζεται μέσω χημικών αλληλεπιδράσεων. Τα οσφρητικά συστήματα των εντόμων και των θηλαστικών χαρακτηρίζονται από υψηλή ευαισθησία και διακριτική ικανότητα, γεγονός που τους επιτρέπει να ανευρίσκουν τη τροφή τους, να ανακαλύπτουν το ταίρι τους ακόμη και να αποφεύγουν απειλές για την επιβίωσή τους. Έχει βρεθεί ότι ένα μόνο μόριο φερομόνης της θηλυκής πεταλούδας επαρκεί για την απόκριση/διέγερση του νευρώνα που βρίσκεται στην κεραία του αρσενικού. Επιπλέον, οι μέλισσες είναι ικανές να διακρίνουν μεταξύ πολλών ζευγών δομικά όμοιων οσμογόνων, ενώ τα ποντίκια μπορούν να ξεχωρίσουν με παρόμοιο τρόπο τα διαφορετικά εναντιομερή.²⁹

Το σύστημα επικοινωνίας των εντόμων είναι ιδιαίτερα περίπλοκο και έχει αποδειχθεί ότι στην όσφρησή τους συμμετέχουν μικρές πρωτεΐνες που βρίσκονται στις κεραίες τους, όπως είναι οι πρωτεΐνες πρόσδεσης οσμογόνων (OBPs) που βρίσκονται στις κεραίες τους. Οι πρωτεΐνες αυτές που περιλαμβάνουν και τις PBPs (πρωτεΐνες πρόσδεσης φερομονών), μεταφέρουν τα υδρόφοβα μόρια οσμών μέσω του υδατικού περιβάλλοντος της λέμφου στους οσφρητικούς υποδοχείς.²¹

Μέχρι πρόσφατα επικρατούσε η θεωρία ότι οι φερομόνες ή και άλλα οσμογόνα που εισέρχονταν στα υδατικά διαμερίσματα του χημειοαισθητήριου οργάνου (chemosensory) μεταφέρονταν από τις OBPs στους διαμεμβρανικούς υποδοχείς οσμογόνων και στη συνέχεια αποικοδομούνταν από ειδικά αποικοδομητικά ένζυμα (ODEs). Τα τελευταία χρόνια αποδείχθηκε ότι οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες διαδραματίζουν ενεργό ρόλο στην επικοινωνία των εντόμων με το εξωτερικό τους περιβάλλον. Μελέτες PBPs, OBPs και CSPs (χημειοαισθητήριες πρωτεΐνες) καταδεικνύουν το ρόλο τους στην πρόσδεση και μεταφορά ουσιών διαφόρων χημικών δομών.^{12,14,33}

Πρόσφατα ένας πιο ενεργός ρόλος των OBPs προτάθηκε με βάση τη μελέτη της πρωτεΐνης LUSH από τη Δροσόφιλα (*Drosophila melanogaster*) όπου παρατηρήθηκε ότι η αλλαγή στη διαμόρφωση ενός συμπλόκου LUSH-φερομόνης επάγει την σύνδεση της πρωτεΐνης σε ένα μεμβρανοσύνδετο υποδοχέα και την επακόλουθη ενεργοποίησή του.²¹

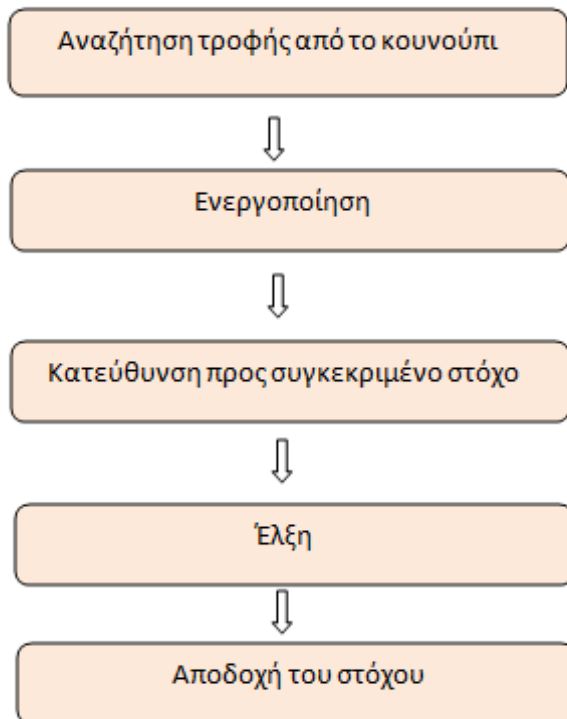
3.2 Το στέλεχος *Anopheles gambiae*



Εικόνα 8: Το στέλεχος *A. gambiae*.³⁰

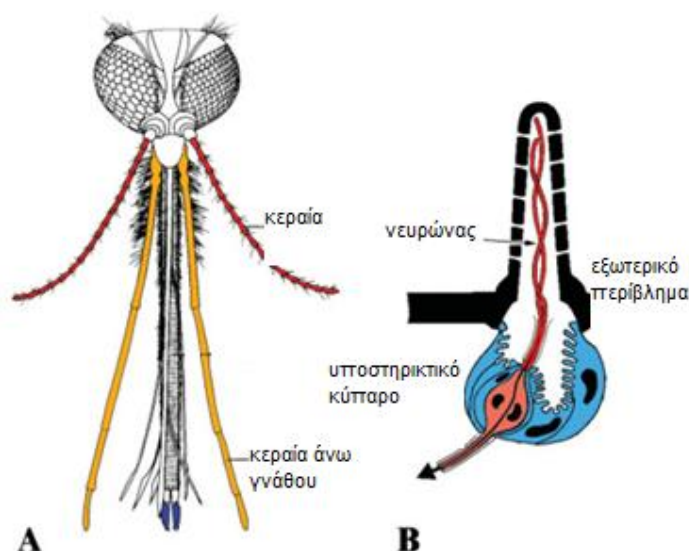
Το κουνούπι *Anopheles gambiae* αποτελεί τον κύριο ξενιστή για τη μετάδοση του παρασίτου *Plasmodium falciparum*, το οποίο προκαλεί την ελονοσία.

Όπως όλα τα έντομα, τα κουνούπια βασίζονται στην όσφρησή τους προκειμένου να εντοπίσουν την τροφή τους ή το ταίρι τους.²⁶ Τα θηλυκά κουνούπια έχουν αναπτύξει ειδικά οσφρητικά συστήματα, για να εντοπίζουν τους ξενιστές τους, οι οποίοι ανήκουν στα θηλαστικά, στην προσπάθεια αναζήτησης αίματος που απαιτείται για την ωρίμανση των αυγών τους. Η έλξη τους οφείλεται στις οσμές που αναδύονται από το ανθρώπινο σώμα και που οφείλονται στο CO₂, στο γαλακτικό οξύ και στην 1-οκτεν-3-όλη.⁴⁸ Ένα γενικό σχήμα που απεικονίζει τη σειρά γεγονότων που λαμβάνουν χώρα κατά την αναζήτηση της τροφής του κουνουπιού παρουσιάζεται παρακάτω (Σχήμα 1).



Σχήμα 1: Σχηματική απεικόνιση των σταδίων αναζήτησης και εντοπισμού του στόχου του κουνουπιού.²⁴

3.3 Οσφρητικό σύστημα και αναγνώριση οσμών.



Εικόνα 9: Το οσφρητικό σύστημα του κουνουπιού. Α) Το κεφάλι ενός κουνουπιού όπου φαίνεται η κεραία (το κύριο οσφρητικό όργανο) και τα χημειοαισθητήρια όργανα. Β) Ένα τυπικό οσφρητικό αισθητήριο όργανο της κεραίας σε μεγέθυνση.²⁶

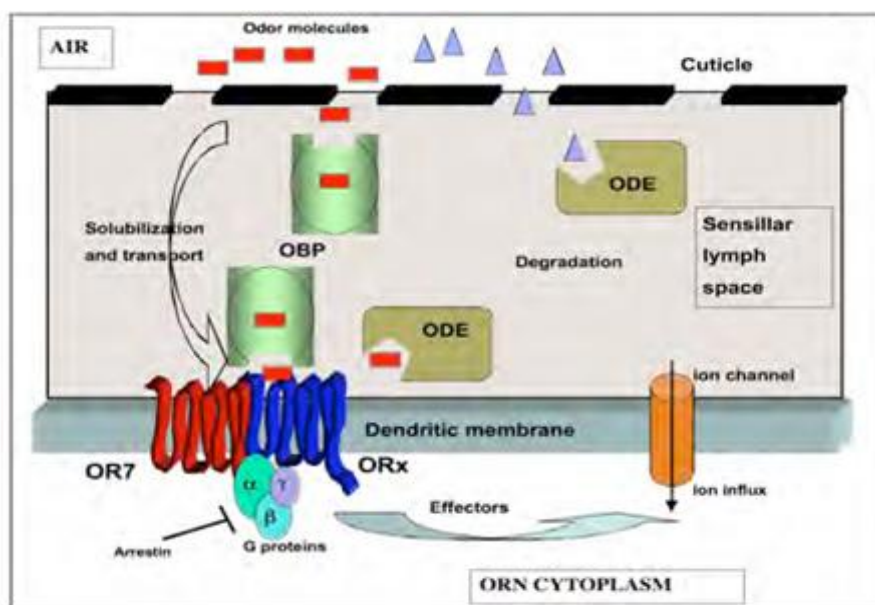
Οι οσφρητικοί νευρώνες σε όλα τα είδη των ζώων είναι εμβαπτισμένοι σε βλέννα (λέμφος) η οποία παρέχει το υδατικό περιβάλλον, απαραίτητο για τη λειτουργία όλων των βιοχημικών συστημάτων.

Τα έντομα υιοθέτησαν μια εναλλακτική στρατηγική για να διαφυλάξουν ένα υδατικό περιβάλλον γύρω από τις αισθητήριες δομές. Οι δένδριτες των οσφρητικών νευρώνων περικλείονται από σκληρού περιβλήματος τοιχώματα, τα οποία προεξέχουν από τις κεραίες με τη μορφή μακρών τριχιδίων (sensilla). Το διάστημα μεταξύ εξωτερικού τοιχώματος και εσωτερικής δένδριτικής μεμβράνης καταλαμβάνεται από την αισθητήρια λέμφο, διαφορετική σε σύσταση και φυσικά διαχωρισμένη από την αιμολέμφο των εντόμων. Η επικοινωνία με το εξωτερικό περιβάλλον επιτυγχάνεται με την παρουσία μικρών πόρων στο εξωτερικό περίβλημα (επιδερμίδα) μέσω των οποίων τα οσμογόνα μπορούν να εισέλθουν στο αισθητήριο όργανο (sensillum), ενώ εμποδίζει το νερό να διαφύγει στο εξωτερικό περιβάλλον.

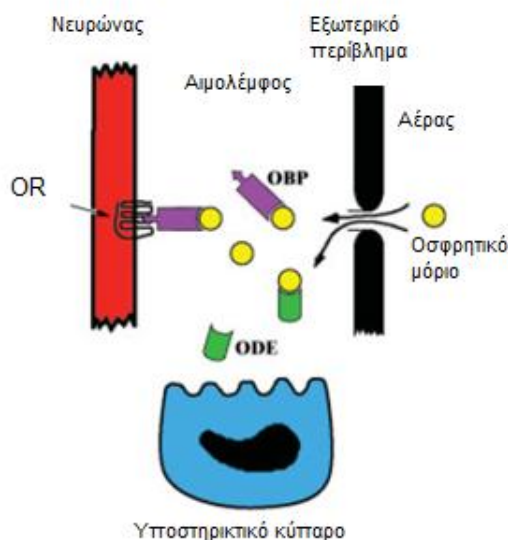
Η παρουσία ενός υδάτινου συνόρου μεταξύ οσφρητικού ερεθίσματος και των οσφρητικών νευρικών υποδοχέων δημιουργεί ερωτήματα στην προσπάθεια κατανόησης των φυσιολογικών και βιοχημικών μηχανισμών της μεταφοράς της οσμής. Τα συγκεκριμένα μόρια είναι υδρόφοβα και έτσι η διαλυτοποίησή τους είναι δύσκολη και αργή σε υδατικό περιβάλλον, συνεπώς η διέλευση τους μέσα από αυτό μειώνει την ευαισθησία και τη ταχύτητα απόκρισης.¹⁶

Οι μοριακοί μηχανισμοί της ανίχνευσης οσμής έχουν μελετηθεί τόσο στα κουνούπια όσο και σε μια ποικιλία άλλων ειδών εντόμων. Ρόλο κλειδί στις συγκεκριμένες διεργασίες διαδραματίζουν οι πρωτεΐνες πρόσδεσης οσμογόνων (OBPs), οι συζευγμένοι με G-πρωτεΐνη υποδοχείς οσμογόνων (ORs), και τα αποικοδομητικά ένζυμα οσμών (ODEs). Οι OBPs, παράγονται στα υποστηρικτικά κύτταρα του αισθητήριου οργάνου και εκκρίνονται στην αισθητήρια λέμφο όπου παγιδεύουν κυρίως υδρόφοβα μόρια που εισέρχονται από το εξωτερικό περιβάλλον. Στη συνέχεια τα μεταφέρουν μέσω της υδατικής λέμφου στους ORs της πλασματικής μεμβράνης των αισθητήριων οσφρητικών νευρώνων όπου α) είτε τα απελευθερώνουν στους οσφρητικούς υποδοχείς ενεργοποιώντας τους (Εικόνα 10 α) ή β) το σύμπλοκο πρωτεΐνης-οσμογόνου συνδέεται στον υποδοχέα και τον ενεργοποιεί²⁶ (Εικόνα 10β).

Περισσότερα στοιχεία σχετικά με τη συνεργατικότητα μεταξύ υποδοχέα και πρωτεΐνης προέκυψαν από πρόσφατα πειράματα στη Δροσόφιλα όπου μελετήθηκε η απόκριση στη φερομόνη 11-cis-vaccenyl acetate (cVA). Η cVA διεγείρει κύτταρα του υποδοχέα του T1 αισθητήριου οργάνου στην κεραία του αρσενικού κουνουπιού. Αυτό το αισθητήριο όργανο συν-εκφράζει τον υποδοχέα Or67d και την LUSH (OBP76a). Απώλεια της LUSH λόγω μεταλλάξεων του γονιδίου έχει ως αποτέλεσμα την απευαισθητοποίηση στο cVA, αν και φυσιολογικά η απώλεια μιας εξωκυτταρικής πρωτεΐνης μεταφοράς δεν θα έπρεπε να επιδρά στη δραστικότητα των νευρώνων. Έτσι, υποτέθηκε ότι η OBP μόνη της δρα ως ασθενής αγωνιστής ενώ σε σύμπλοκο με τη φερομόνη cVA αποτελεί εξειδικευμένο ενεργοποιητή των οσφρητικών νευρώνων. Επιπλέον, μεταλλάγματα από τα οποία απουσιάζει το T1 αισθητήριο όργανο δεν αποκρίνονται στη cVA, αλλά η ικανότητα απόκρισης στη φερομόνη μπορεί να επανακτηθεί εάν ο Or67d εκφρασθεί σε άλλο αισθητήριο όργανο εφόσον αυτό εκφράζει και την πρωτεΐνη LUSH.^{37,85}



Εικόνα 10: Απεικόνιση των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην μετάδοση του οσφρητικού ερεθίσματος. Αρχικά το μόριο εισέρχεται μέσω ενός πόρου του εξωτερικού δέρματος, προσδένεται σε κάποια OBP και μεταφέρεται μέσω της υδατικής λέμφου όπου α) Το οσμογόνο στη συνέχεια απελευθερώνεται στον υποδοχέα και τον ενεργοποιεί προκαλώντας ένα καταρράχτη μεταγωγής σήματος



β) Το σύμπλοκο πρωτεΐνης- προσδέτη συνδέεται στον υποδοχέα (OR) που βρίσκεται στην κυτταρική επιφάνεια του νευρώνα και προκαλεί απόκριση. Τελικά το οσφρητικό μόριο ελευθερώνεται και αποικοδομείται από κάποιο αποικοδομητικό ένζυμο (ODE) καθιστώντας το σύστημα ικανό να δεχθεί ένα καινούργιο ερέθισμα.²⁶

Τα ένζυμα αποικοδόμησης (ODEs) εντοπίζονται στην αισθητήρια λέμφο και χαρακτηρίζονται από υψηλή δραστικότητα.¹⁶ Η λειτουργία τους έγκειται στην ενζυμική μετατροπή ενός οσμογόνου σε κάποιο προϊόν το οποίο είναι ανίκανο να διεγείρει τον οσφρητικό μηχανισμό.²⁶ Το πρώτο ένζυμο αυτής της κατηγορίας που αναγνωρίστηκε ήταν μια εστεράση 55 kDa, παρούσα μόνο στις κεραίες του αρσενικού *A. polyphemus*, η οποία υδρολύει το κύριο συστατικό της φυλετικής φερομόνης E,Z-6,11-hexadecadienyl acetate. Από μετρήσεις της ειδικής ενζυμικής δραστικότητας διαφόρων φερομονών από διαφορετικά είδη λεπιδόπτερων προέκυψε ότι η λειτουργική ομάδα της φερομόνης κατά τη σύνδεσή της στην OBP μετατρέπεται σε περισσότερο υδρόφιλη, γεγονός που οδηγεί σε αύξηση της διαλυτότητας του συστατικού. Ωστόσο δεν έχει διευκρινιστεί εάν η συγκεκριμένη στρατηγική ακολουθείται προκειμένου να μειωθεί το ερέθισμα που προκαλείται από τη φερομόνη ή αν αποτελεί μέρος ενός μηχανισμού «αποτοξίνωσης».¹⁶

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Πρωτεΐνες πρόσδεσης οσμογόνων - *Odorant binding proteins (OBPs)*

4.1 Ρόλος των OBPs

Οι OBPs ξεχωρίζουν μεταξύ των άλλων πρωτεϊνών του οσφρητικού συστήματος, από την μοναδική τους ιδιότητα να προσδένουν με αντιστρεπτό τρόπο πτητικά συστατικά ή φερομόνες. Ο συγκεκριμένος ορισμός προϋποθέτει τα εξής χαρακτηριστικά για την πρωτεΐνη: α) την ικανότητα πρόσδεσης ενός οσμογόνου και β) τον εντοπισμό της στην περιοχή του κατάλληλου νευρώνα.¹⁰

Η υψηλή συγκέντρωσή των OBPs , ως διαλυτών πρωτεϊνών, γύρω από τους οσφρητικούς δένδριτες (σε συγκεντρώσεις mM) και ο μεγάλος αριθμός τους στο γονιδίωμα των εντόμων αποδεικνύουν πως έχουν σημαντικό ρόλο. Το υψηλό ποσό ενέργειας που απαιτείται για τη σύνθεση μεγάλου αριθμού OBPs (61 διαφορετικές για τον *A. gambiae*) δικαιολογείται αν οι OBPs επιτελούν κάποιο σημαντικό ρόλο στο έντομο. Οι παρατηρήσεις της εξέλιξης και της επέκτασης των OBPs δείχνουν την πιθανή εμπλοκή τους στη γρήγορη προσαρμογή του εντόμου όταν μεταβάλλεται το περιβάλλον του.¹⁵

Ο ιδιαίτερα σημαντικός ρόλος των OBPs υποδεικνύεται από διάφορες μελέτες των συγκεκριμένων πρωτεϊνών στη Δροσόφιλα (*LUSH*), στην κατσαρίδα (*LmaPBP*), στη μέλισσα (*Amel-ASP1*) και στην πεταλούδα του μεταξοσκώληκα (*ApolPBP1*). Έρευνα έδειξε πως δυο OBPs, οι OBP57d και OBP57e, συμμετέχουν στην ανίχνευση δυο λιπαρών οξέων τα οποία ασκούν ελκτική δράση στη *Drosophila sechellia*, ενώ τα ίδια λιπαρά οξέα δρουν ως απωθητικά στη Δροσόφιλα και σε άλλα είδη του εντόμου. Σε περαιτέρω πειράματα στα οποία τα γονίδια που κωδικοποιούν τις δύο OBPs ανταλλάχθηκαν μεταξύ των δυο ειδών της Δροσόφιλας παρατηρήθηκε αντιστροφή εν μέρει στην απόκριση ως προς τα δυο οξέα, δηλαδή απώθηση της *Drosophila sechellia* και έλξη του άλλου στελέχους δηλαδή της *Drosophila melanogaster*.¹⁹

Πρόσφατα αποδείχθηκε η σημασία της πρωτεΐνης OBP1 στα κουνούπια ως προς την απόκρισή τους στο ινδόλιο. Με αποσιώπηση του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη στον *A. gambiae* και στον *Culex quinquefasciatus* μειώθηκε η ηλεκτροφυσιολογική απόκριση του κουνουπιού στην ουσία.¹³

Από τα παραπάνω παραδείγματα φαίνεται ο εξαιρετικά σημαντικός ρόλος που διαδραματίζουν οι OBPs στην όσφρηση του κουνουπιού και των εντόμων γενικότερα.

4.2 Δομή των OBPs

Οι OBPs των εντόμων είναι μέλη μιας οικογένειας που περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες πρόσδεσης φερομονών (PBPs), τις γενικές OBPs (GOBPs), και τις πρωτεΐνες πρόσδεσης που βρίσκονται στις κεραίες. Η πρώτη OBP εντόμου ανακαλύφθηκε στις αρχές της δεκαετίας του '80 στο γιγάντιο σκώρο *Antheraea polyphemus*, χρησιμοποιώντας τη σημασμένη με τρίτιο ειδική φερομόνη (E,Z)-6,11-hexadecadienyl acetate. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη ανήκει στις PBPs δηλαδή τις πρωτεΐνες πρόσδεσης φερομονών, και αποτελείται από 142 αμινοξέα. Στη συνέχεια απομονώθηκε μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών σε πολλά είδη λεπιδόπτερων όπως *Lymantria dispar*, *Manduca sexta*, *Bombyx mori* και άλλα, που παρουσιάζουν ομοιότητες με την παραπάνω PBP ως προς την αμινοξική τους αλληλουχία.¹¹

Τα τελευταία χρόνια, οι OBPs έχουν απομονωθεί και κλωνοποιηθεί από περισσότερα από 40 είδη εντόμων που ανήκουν σε οχτώ κατηγορίες. Κοινό δομικό μοτίβο τους είναι η παρουσία έξι κυστεϊνών, των οποίων οι σχετικές θέσεις συντηρούνται σε όλα τα είδη εντόμων. Οι έξι κυστεΐνες συμμετέχουν στο σχηματισμό τριών δισουλφιδικών δεσμών συνδέοντας τις έλικες με συγκεκριμένο τρόπο (1-3, 2-5 και 4-6), και σταθεροποιώντας την πρωτεΐνη.

Bmor-PBP	SQEV MKNLSL NFGKALDECKEMTLTDAINEDFYNFWKEGYE IKNR----	ETGCAIMCLSTKLNMLDP-EGNLHHGNA
Bmor-GOBP1	DVYVMKDVTLGFGQALEQCREESQLTEEKMEFFHFWNDDFKFEHR----	ELGCAIQCMSRHFNLITD-SSRMHHENT
Bmor-GOBP2	TAEVMSHVTAFHGKTL EE CREESGLSVDILDEFKHFWSDDFDVVHR----	ELGCAIICMSNKFSLMDD-DVRMHVNM
Bmor-ABPX	HGQLHDEIAELAAMVRENCAD ESSVDLNLVEKVN--AGTDLATITDG---	KLKCYIKCTMETAGMMS--DGVVDVEAV
Dmel-LUSH	MTMEQFLTSLDMIRSGCAPKFKLKTEDLDRLR---	VGDFNFPPSQ----DLMCYTKCVSLMAGTVNK-KGEFNAPKA
Agam-OBP	APFEIPDRYKPAKMLHEICIAESGASEEQRLTCL---	DGTVP TAPA-----AKCYIHCLFDKIDVVDEATGRILLDRL
Amel-ASP1	APDWVPPPEVFDLVAEDKARCMSEHGTTQAQIDDDV---	KGNLVNEPS-----ITCYMYCLLEAFSLVDD-EANVDEDIM
Pdom-OBP1	DSDI AVKKYLHAVPEPVLAKCLKESGLEADKDKLLS---	DESTVDQ GK-----FSLCIACTLKDNGALVN--GELKYDVL
Sinv-OBP	SRDSARKIGSQYDNYATCLAESHLTEDDIFSIGEVSSGQHKTNHEDTELHKNGCVMQCLLEKDGLMSG-	ADYDEEKM
Aosa-PBP	MSEEMEELAKQLHND CVAQTGVDEAHITTVK--DQKGFDPDE-----	KFKCYLKCIMTEMAIVGD-DGVVDIEAA
Pdiv-OBP2	ETLKEHGQKVL E QI I DYATSCADSLGVSPEDMKLLM---	EKKFPTSRE-----GQCMPSCVNKKFGLQKA-DGTLNKEYR
Pjap-PBP	MSEEMEELAKQLHDDCVSQTGVDEAHITTVK--DQKGFDPDE-----	KFKCYLKCIMTEMAIVGD-DGVVDVEAA
Llin-LAP	GELPEEMREMAQGLHDGCV EETGVNDGLIGPCA--KGN-FADDQ-----	KLKCYFKCVFGLNGLVSD-EGELDAEAF
Lmig-OBP	AAKEVDHTCRSSTGVPRDMLHRYA---EGQTVDDDD-----	FKCYLKCIMVEFNSLSD-DGVFVLEEE
Lmad-PBP	DSTQSYKDAMGPLVRECMGSVSATEDDFKTVLN--RNPLESRTA-----	QCLLACALDKVGLISPEGAIYTGDDL
	*	* *
Bmor-PBP	MEFAKKHGADETM AQQ LIDI-VHGE-KSTPANDDKCIWTLGVATCFKAEIHKLNWAP SMDVA VGEILAEV	142
Bmor-GOBP1	DKFIKSFNPGEILSQKMIDM-IHTCE-KTFDSEPDCWRILRVAECFKDACNKSG LAPSMELILAEFIMESEADK	146
Bmor-GOBP2	DEYIKGFNPQVLA EKMKVL-IHNCE-KQFDTETDCTRVVKVAACFKKDSRKEGIAP--EVAMIEAVIEKY	141
Bmor-ABPX	LSLLP-----DSLKTKNEAS-LKKCD-TQKGS--DDCDTAYLTQICWQAANKADYFLI	120
Dmel-LUSH	LAQLPHLVP-PEMMMSRKS-VEACR-DTHKQFKESCERVYQTAKCFSENADGQFMWP	124
Agam-OBP	LYIIP-----DDVKA AVDHL-TRECS-HIVTP--DKCETAYETVKCYFNARDEVIKFCHLLVLE	126
Amel-ASP1	LGLLP-----DQLQERAQSV-MGKCL-PTSGS--DNCNKIYNLAKCVQESAPDVWFVI	119
Pdom-OBP1	SELLSKLLTNKEDKLQERLELLKACIPEGANAK-NDCEYIGKIMQCKLSKAKEMGL	125
Sinv-OBP	REDYIKETG--AQPGDQRIEALNACM-QETKMDKCDKSLLLVACVLAEEAVLADLSNEGA	134
Aosa-PBP	VGVP-----DEYKAKAE PV-IRKCG-VIPGA--NPCDNVYQTHKCY YDTPQSYMIV	116
Pdiv-OBP2	YSEMENVKAIDEEIYNKMNSVWDKCVINGADG-TDECDTGKVVTCMKEESEKLGLSKDAIGF	133
Pjap-PBP	VGVL P-----DELKAKAEPI-MRKCG-FKPGA--NPCDNVYQTHKCY YETDAQSYMIV	116
Llin-LAP	GSILP-----DNMQ-ELLPT-IRGCA-GTTGA--DPCELAMNFNKCLQKVDPVNFMI	116
Lmig-OBP	LENVP-----PEIKEEGHRV-VHSCK-HINHD--EACETAYQIHQCYQSDPELYSLVVRAFDATIGD	118
Lmad-PBP	MPVMNRLYGFNDFKTVMKAKAVNDCANQVNGAYPDRCDL IKNFTDCVRNSY	119
	* * *	

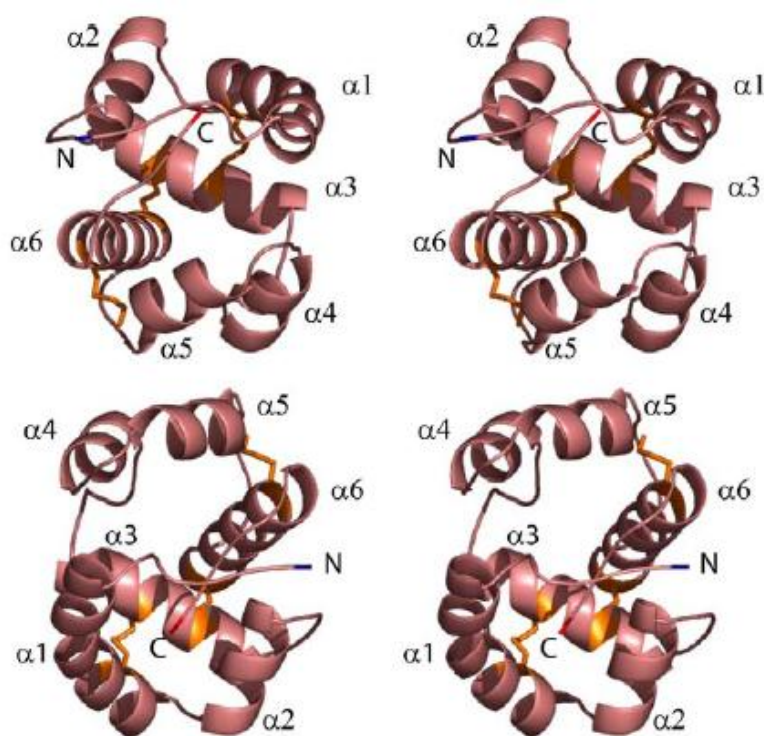
Εικόνα 11: Αλληλουχία OBPs διαφορετικών τάξεων εντόμων: *Lepidoptera: Bombyx mori* (Bmor); *Diptera: Drosophila melanogaster* (Dmel), *Anopheles gambiae* (Agam); *Hymenoptera: Apis mellifera* (Amel), *Polistes dominulus* (Pdom), *Solenopsis invicta* (Sinv); *Coleoptera: Anomala osakana* (Aosa), *Phylloperla diversa* (Pdiv), *Popilia japonica* (Pjap); *Hemiptera: Lygus lineolaris* (Llin); *Orthoptera: Locusta migratoria* (Lmig); *Dictyoptera: Leucophaea maderae* (Lmad). Αναφέρονται μόνο οι αλληλουχίες των ώριμων πρωτεϊνών. Οι έξι συντηρημένες κυστεΐνες επισημαίνονται με αστερίσκο.¹²

Οι OBPs των λεπιδόπτερων αντιπροσωπεύουν μια ομάδα στενά σχετιζόμενων πρωτεϊνών. Αντίθετα OBPs από διαφορετικές τάξεις εντόμων παρουσιάζουν διαφορές μεταξύ τους. Για παράδειγμα, οι OBPs της Δροσόφιλας παρουσιάζουν μόνο 15% ομολογία με εκείνες των Λεπιδόπτερων.

Στη Δροσόφιλα, υπάρχουν 51 γονίδια, εκ των οποίων τα 39 κωδικοποιούν τις κλασσικές OBPs που χαρακτηρίζονται από το κοινό δομικό μοτίβο των έξι κυστεϊνών. Οι 39 κλασσικές OBPs της Δροσόφιλας αντιπροσωπεύουν μια οικογένεια πρωτεϊνών, με ποσοστό ομοιότητας μόλις 10-15% ως προς την αμινοξική τους αλληλουχία, το οποίο σε ορισμένες περιπτώσεις μειώνεται στο

4% (ανταποκρινόμενο μόνο στο μοτίβο των έξι κυστεϊνών), ενώ σε μια μοναδική περίπτωση ανέρχεται στην ασυνήθιστα υψηλή τιμή του 60%. Στο γονιδίωμα του κουνουπιού *Anopheles gambiae* υπάρχουν 60 γονίδια που κωδικοποιούν τις OBPs. Οι OBPs από 1-29 ανήκουν στις κλασσικές OBPs, (έξι συντηρημένες κυστεΐνες), οι OBPs 30-45 ανήκουν στην κατηγορία των μη τυπικών, οι οποίες είναι μεγαλύτερου μοριακού βάρους (25-35 kDa) και τέλος οι OBPs 46-57 ανήκουν στην ομάδα των C+ και διακρίνονται από τις υπόλοιπες από την παρουσία 12 κυστεϊνών σε συντηρημένες θέσεις.

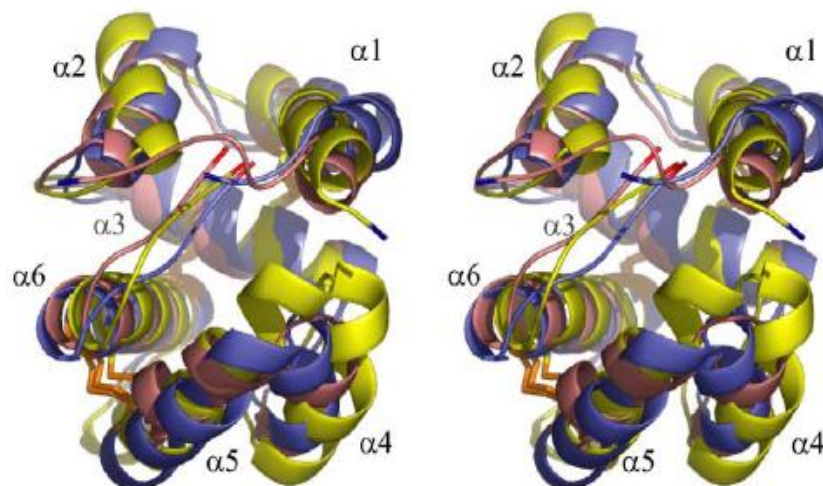
4.2.1 Δομή της AgamOBP1 (*Anopheles gambiae* OBP1)



Εικόνα 12: Η τρισδιάστατη δομή της AgamOBP1. Στερεοσκοπική απεικόνιση της πρωτεΐνης όπου φαίνονται οι έξι α-έλικες, τα N-(μπλε), C-τελικά άκρα (κόκκινα) και οι δισουλφιδικές γέφυρες με πορτοκαλί χρώμα.³³

Από δομικές μελέτες της πρωτεΐνης AgamOBP1 σε ευκρίνεια 1.5 Å προέκυψε ότι κρυσταλλώνεται σαν διμερές και διαθέτει ένα κανάλι πρόσδεσης το οποίο καταλαμβάνεται από ένα μόριο πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG). Η είσοδος του καναλιού εντοπίζεται μεταξύ των ελίκων 1, 3 & 4 και διασχίζει τις δύο

υπομονάδες διατρέχοντας τη μεσεπιφάνεια του διμερούς. Δεδομένου του μεγάλου ποσοστού των πολικών επαφών στη μεσεπιφάνεια είναι πιθανό ότι η πρωτεΐνη είναι μονομερές. Στην κεραία ωστόσο είναι δυνατόν ο διμερισμός της να επάγεται λόγω της μεγάλης συγκέντρωσης της στην λέμφο.³³



Εικόνα 13: Υπέρθεση των δομών τριών OBPs. Στερεοσκοπική απεικόνιση της αλληλεπικάλυψης της μιας υπομονάδας του διμερούς των AgamOBP1(ροζ), Amel-ASP1 (μπλε), LUSH (κίτρινο). Απεικονίζονται επιπλέον τα N- τελικά (μπλε), τα C-τελικά άκρα (κόκκινα) και οι δισουλφιδικοί δεσμοί (πορτοκαλί).³³.

Από την υπέρθεση των δομών των AgamOBP1, Amel-ASP1 και LUSH, που παρουσιάζουν δομική ομοιότητα, φαίνεται ότι στην Agam-OBP1 το C-τελικό άκρο αποτελεί τμήμα του τοιχώματος της θέσης πρόσδεσης (binding pocket) με το C-τελικό αμινοξύ να αλληλεπιδρά με την πρώτη έλικα μέσω δεσμών υδρογόνου των καρβοξυλικών του οξυγόνων με την υδροξυλομάδα της Tyr54 και του αζώτου της His123.

Διαφορά παρατηρείται στα αμινοξέα των N- τελικών άκρων μεταξύ των τριών δομών. Πιο συγκεκριμένα, στην περίπτωση της LUSH το αμινοξύ του N-τελικού άκρου είναι τμήμα της πρώτης έλικας. Στη δομή της Amel-ASP1, όπως και στην OBP1, υπάρχει ένας αμινο-τελικός βρόχος ο οποίος κατευθύνεται στην α1-έλικα. Και στις δυο περιπτώσεις, αυτός ο βρόχος με το καρβοξυτελικό άκρο αποτελεί τμήμα του τοιχώματος της θέσης πρόσδεσης.

Τέλος, το N-τελικό άκρο της AgamOBP1 έχει έξι επιπλέον αμινοξέα συγκριτικά με το αντίστοιχο άκρο της Amel-ASP1.³³

4.3 Σύνδεση προσδετών και δομικές μεταβολές.

Όλες οι OBPs των εντόμων, λόγω της δομής α-έλικας που έχουν, παρουσιάζουν αξιοσημείωτη ελαστικότητα που τους επιτρέπει να αλλάζουν διαμόρφωση μετά την πρόσδεση μιας ουσίας.¹⁰

Σε ορισμένες περιπτώσεις έχει αποδειχθεί πειραματικά ότι η πτώση του pH στην περιοχή γύρω από τους νευρώνες του οσφρητικού υποδοχέα προκαλεί αλλαγή στη διαμόρφωση της OBP οδηγώντας στην απελευθέρωσή του προσδέτη από το σύμπλοκο με την πρωτεΐνη με τελικό αποδέκτη τον υποδοχέα.

Η σχέση μεταξύ της τιμής του pH και του μηχανισμού απελευθέρωσης ενός οσμογόνου έχει μελετηθεί στην περίπτωση της PBP του *Bombyx mori*. Σε χαμηλό pH το καρβοξυ-τελικό άκρο της πρωτεΐνης λαμβάνει διαμόρφωση α-έλικας η οποία καταλαμβάνει τη θέση πρόσδεσης της φερομόνης cVA και την εκτοπίζει προκαλώντας την απελευθέρωση της.

Ωστόσο, στην περίπτωση άλλων OBPs συμπεριλαμβανομένων της AgamOBP1 απουσιάζει η μακριά C-τελική αλυσίδα που θα μπορούσε σε χαμηλό pH να σχηματίσει μια α-έλικα και να απελευθερώσει έτσι το οσμογόνο. Γι αυτές τις πρωτεΐνες προτείνεται αλλαγή στη συνολική διαμόρφωση επαγόμενη από το pH που έχει ως τελικό αποτέλεσμα την μείωση της ικανότητας πρόσδεσης της ουσίας από την πρωτεΐνη.³³

Για παράδειγμα στην περίπτωση της AgamOBP1, το C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης σχηματίζει τοίχωμα της θέσης πρόσδεσης, το οποίο συγκρατείται λόγω των υδρόφοβων και πολικών αλληλεπιδράσεων με το N-τελικό άκρο και τις γύρω έλικες. Η πλειοψηφία των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των N- και C-τελικών άκρων των πρωτεϊνών σχηματίζονται μεταξύ των καρβοξυλίων και των NH ομάδων τους. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές είναι ασταθείς σε όξινο περιβάλλον λόγω της πρωτονίωσης του καρβοξυλίου και συνεπώς σε χαμηλό pH το C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης είναι πιθανό να απομακρύνεται από το N-τελικό, λόγω απώλειας των παραπάνω αλληλεπιδράσεων, αφήνοντας το κέντρο σύνδεσης ανοιχτό και τον προσδέτη εκτεθειμένο στον διαλύτη.³³

4.4 Αλληλεπιδράσεις των OBPs

Οι OBPs των κουνουπιών μπορούν να σχηματίζουν ετεροδιμερή σύμπλοκα τα οποία έχουν διαφορετικά χαρακτηριστικά πρόσδεσης χημικών ουσιών συγκριτικά με τις επιμέρους πρωτεΐνες, γεγονός που αποδεικνύει την ικανότητα των OBPs να συμμετέχουν στο σχηματισμό μιας ποικιλίας συμπλόκων με καινούρια χαρακτηριστικά πρόσδεσης.¹⁹

Μελέτες έδειξαν ότι οι OBP1 και OBP4 του *A. gambiae* συν-εκφράζονται στα υποστηρικτικά κύτταρα και πιθανότατα εκκρίνονται ταυτόχρονα στην αισθητήρια λέμφο ενισχύοντας την άποψη περί σχηματισμού λειτουργικών διμερών OBP1/OBP4. Το φαινόμενο αυτό, που μπορεί να είναι διαδεδομένο στα έντομα, αυξάνει σημαντικά τον αριθμό των πρωτεϊνών πρόσδεσης οσμογόνων και φερομονών, διευρύνοντας με αυτό το τρόπο την χημική επικοινωνία.¹⁹

4.5 Σύγκριση OBPs εντόμων-σπονδυλωτών

Οι OBPs των σπονδυλωτών είναι μέλη της μεγάλης υπερ-οικογένειας των λιποκαλινών, οι οποίες μεταφέρουν υδρόφοβα μόρια σε υδατικά βιολογικά υγρά. Η τρισδιάστατη δομή τους περιλαμβάνει το μοτίβο του β-βαρελίου. Συνήθως αποτελούνται από αλυσίδες των 150 αμινοξέων.¹² Στη φυσική τους διαμόρφωση έχουν τη μορφή ομοδιμερούς. Σε κάθε υπομονάδα υπάρχει ένα κέντρο πρόσδεσης που εντοπίζεται μέσα στη δομή β-βαρελίου, στο οποίο συνδέονται προσδέτες μεσαίου μεγέθους (10-20 άτομα άνθρακα) και υδρόφοβης φύσεως.¹⁰

Όπως και οι OBPs των εντόμων έχουν γενικά χαμηλό ισοηλεκτρικό σημείο, εμφανίζουν συγγένεια για μικρούς προσδέτες και βρίσκονται σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις κοντά στους χημειοαισθητήριους υποδοχείς.¹⁰

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

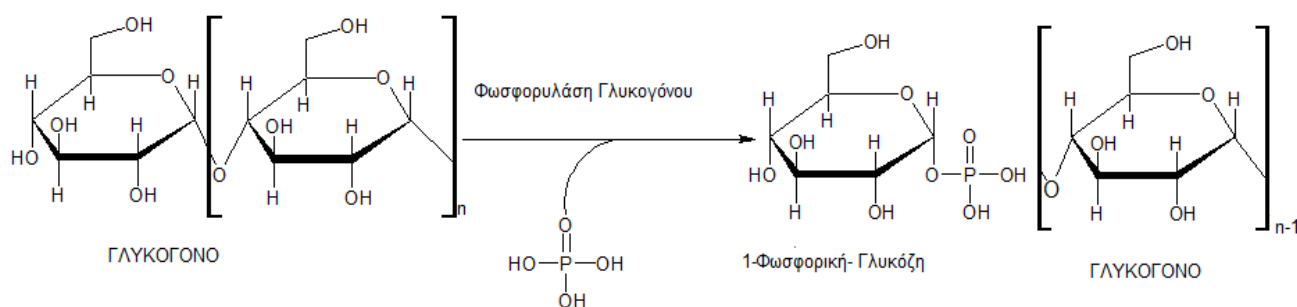
ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΤΥΠΟΥ II ΚΑΙ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ

5.1 Εισαγωγή

Ο διαβήτης τύπου 2 ή μη ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης είναι μια ασθένεια που χαρακτηρίζεται από υπεργλυκαιμία λόγω διαταραχής στο ρυθμό έκκρισης ινσουλίνης, αντίσταση στην ινσουλίνη των ιστών στόχων και ενεργοποίηση του μηχανισμού παραγωγής γλυκόζης στο ήπαρ. Η παραγωγή της γλυκόζης ύστερα από διάσπαση του γλυκογόνου και η γλυκονεογένεση από πρόδρομα μόρια με τρία άτομα άνθρακα συμβάλλουν στην αύξηση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα. Σύμφωνα με μελέτες, το μεγαλύτερο ποσοστό της γλυκόζης στο ήπαρ παράγεται από τη διάσπαση του γλυκογόνου, διαδικασία που αυξάνει τα επίπεδα γλυκόζης ιδιαίτερα όταν υπάρχει αδυναμία καταστολής της αποικοδόμησής του. Συνεπώς η αναστολή του ενζύμου που καταλύει την παραπάνω διεργασία αποτελεί στόχο θεραπευτικής αντιμετώπισης του διαβήτη τύπου II.⁸⁴

5.2 Το ένζυμο φωσφορυλάση του γλυκογόνου

Η αντίδραση που καταλύει το ένζυμο της φωσφορυλάσης προκειμένου να διασπάσει το γλυκογόνο είναι η εξής:



Η 1-φωσφορική-γλυκόζη που απελευθερώνεται από το γλυκογόνο μπορεί να μετατραπεί σε 6-φωσφορική-γλυκόζη, ένα σημαντικό μεταβολικό ενδιάμεσο, από το ένζυμο φωσφογλυκομουτάση.⁵¹

In vitro η αντίδραση που καταλύεται από τη φωσφορυλάση είναι αντιστρεπτή. Αντίθετα in vivo πραγματοποιείται μόνο προς την κατεύθυνση αποικοδόμησης διότι ο λόγος $[P_i]/[1\text{-φωσφορική-γλυκόζη}]$ είναι συνήθως μεγαλύτερος του 100 και ουσιαστικά ευνοείται η φωσφορόλυση.⁵¹

Η φωσφορυλάση ρυθμίζεται με διάφορους αλλοστερικούς τελεστές οι οποίοι σηματοδοτούν την ενεργειακή κατάσταση του κυττάρου όπως επίσης με αντιστρεπτή φωσφορυλίωση, ως απόκριση σε ορμονικά σήματα όπως της ινσουλίνης, της επινεφρίνης και της γλυκαγόνης.⁵¹

5.3 Ρύθμιση της μυϊκής φωσφορυλάσης από το ενδοκυτταρικό ενεργειακό φορτίο

Η διμερής φωσφορυλάση των σκελετικών μυών υπάρχει σε δυο αλληλομετατρέπόμενες μορφές : μια συνήθως ενεργό φωσφορυλάση a και μια συνήθως ανενεργό φωσφορυλάση b, κάθε μια εκ των οποίων βρίσκεται σε ισορροπία μεταξύ μιας ενεργού χαλαρής κατάστασης R και μιας πολύ λίγο ενεργού τεταμένης κατάστασης T. Η ισορροπία για τη φωσφορυλάση a ευνοεί την κατάσταση R ενώ για τη b την κατάσταση T. Η φωσφορυλάση b μετατρέπεται στην a με φωσφορυλίωση ενός καταλοίπου σερίνης (σερίνη 14) σε κάθε υπομονάδα της. Η μυϊκή φωσφορυλάση b είναι ενεργός παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων AMP, το οποίο δεσμεύεται σε μια θέση δέσμευσης νουκλεοτιδίου και σταθεροποιεί τη στερεοδιάταξη της φωσφορυλάσης b στην κατάσταση R. Το ATP δρα ως αρνητικός αλλοστερικός τελεστής που ανταγωνίζεται το AMP ευνοώντας έτσι την κατάσταση T. Συνεπώς, η μετάπτωση της φωσφορυλάσης b από την κατάσταση T στην R και αντιστρόφως ελέγχεται από το ενεργειακό φορτίο του μυϊκού κυττάρου. Τέλος, η 6-φωσφορική-γλυκόζη ευνοεί επίσης την κατάσταση T της φωσφορυλάσης b, που είναι ένα παράδειγμα αναστολής από επανατροφοδότηση.⁵¹

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΑ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

6.1 Εισαγωγή

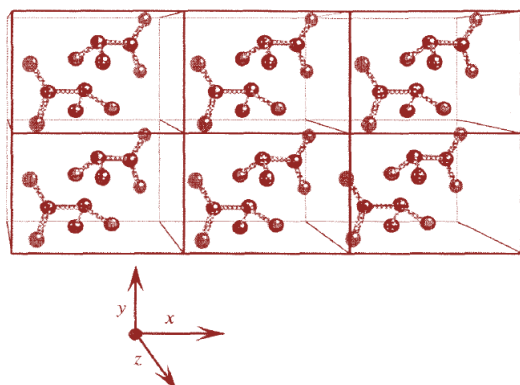
Μακρομοριακή κρυσταλλογραφία είναι η μέθοδος προσδιορισμού της τρισδιάστατης δομής βιολογικών μορίων βάσει της περίθλασης ακτινών Χ από κρυστάλλους τους. Η κρυσταλλογραφία με ακτίνες Χ, με στόχο την ανακάλυψη της τρισδιάστατης δομής των πρωτεϊνών, εφαρμόσθηκε για πρώτη φορά από τον Max Perutz και John Kendrew τη δεκαετία του 1950 για την ανακάλυψη της δομής της αιμοσφαιρίνης σε ευκρίνεια 6 Å και από τότε έχει σημειώσει σημαντική πρόοδο.^{31,62} Αποτελεί την πιο διαδεδομένη τεχνική για τον καθορισμό της τρισδιάστατης δομής βιολογικών μακρομορίων και η συμβολή της είναι ιδιαίτερα σημαντική σε πεδία όπως ο κατευθυνόμενος από τη δομή σχεδιασμός φαρμάκων, η διευκρίνιση ενζυμικών μηχανισμών, η κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση και άλλα.³¹

Ένα συχνό ερώτημα για την κρυσταλλική δομή είναι εάν αυτή είναι ίδια με τη δομή στο διάλυμα. Έχει αποδειχθεί πως τα δεδομένα της κρυσταλλογραφίας συμφωνούν με αποτελέσματα που προκύπτουν από NMR και βιοχημικές μεθόδους. Επιπλέον, στην περίπτωση των ενζύμων αποδείχθηκε ότι διατηρούν την ενεργότητά τους στην κρυσταλλική κατάσταση. Η κρυσταλλική δομή δεν πρέπει να θεωρείται στατική και αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα βιολογικά μόρια διατηρούν πολλαπλές σφαίρες ενυδάτωσης στον κρύσταλλο καθώς οι κρύσταλλοι περιέχουν υψηλά ποσοστά διαλύτη (30-70%), που αποτελεί αναγκαίο παράγοντα στη διατήρηση της τρισδιάστατης δομής τους και έχει ως αποτέλεσμα την διατήρηση της δυναμικής τους φύσης στον κρύσταλλο.

6.2 Κρυστάλλωση της πρωτεΐνης

Όπως είναι γνωστό πολλά μόρια, μεταξύ των οποίων και οι πρωτεΐνες μπορούν να κρυσταλλωθούν υπό ορισμένες συνθήκες. Κατά τη μετάβασή τους από την υγρή στη στερεή φάση τα μόρια της ουσίας υιοθετούν συγκεκριμένο προσανατολισμό, ώστε τελικά ο σχηματισμένος κρύσταλλος να

είναι μια τρισδιάστατη επαναλαμβανόμενη διάταξη μορίων τα οποία συγκρατούνται από μη ειδικές αλληλεπιδράσεις.⁶⁴



Εικόνα 14: Στοιχειώδεις κυψελίδες σε κρυσταλλικό πλέγμα. Στο παράδειγμα κάθε στοιχειώδης κυψελίδα περιέχει δυο μόρια αλανίνης σε διαφορετικούς προσανατολισμούς.⁶⁴

Η μέθοδος που εφαρμόζεται στην προσπάθεια ανάπτυξης κρυστάλλων πρωτεΐνης είναι της δοκιμής και απόρριψης (trial error method) μεγάλου αριθμού συνθηκών κρυστάλλωσης που έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικές σε άλλες περιπτώσεις. Η συνηθέστερη προσέγγιση για την κρυστάλλωση μιας πρωτεΐνης είναι η μεταβολή των χαρακτηριστικών του πρωτεϊνικού διαλύματος μέχρι να επιτευχθούν συνθήκες υπερκορεσμού. Οι δυσκολίες που προκύπτουν κατά την κρυστάλλωση οφείλονται στην πολυπλοκότητα, στην αστάθεια και στις δυναμικές ιδιότητες των βιολογικών μακρομορίων. Οι κρύσταλλοί τους έχουν κατά μέσο όρο περιεκτικότητα 50% σε διαλύτη, με την πρωτεΐνη να καταλαμβάνει τον υπόλοιπο χώρο.

Σήμερα, έχουν αναπτυχθεί αυτοματοποιημένα συστήματα (ρομπότ) με τα οποία μειώνεται ο πειραματικός χρόνος, βελτιστοποιούνται οι συνθήκες, ενώ παράλληλα ελαχιστοποιείται η ποσότητα της πρωτεΐνης που χρησιμοποιείται.

6.2.1 Παράγοντες που επιδρούν στην κρυστάλλωση της πρωτεΐνης.

Η επιτυχής κρυστάλλωση μιας πρωτεΐνης εξαρτάται από μια πληθώρα παραγόντων οι οποίοι διακρίνονται σε τρεις μεγάλες κατηγορίες, όπως φαίνεται στον πίνακα 2. Η δυσκολία να καθοριστεί με ακρίβεια ο βαθμός επίδρασης κάθε παράγοντα στην κρυστάλλωση των πρωτεϊνών έγκειται στις διαφορετικές τους ιδιότητες, ακόμη και στις πρωτεΐνες που διαφέρουν μόνο σε ένα ή δυο αμινοξέα ή σε ίδιες πρωτεΐνες που έχουν παρασκευαστεί με

διαφορετικό τρόπο. Επιπρόσθετα, οι παράγοντες που επιδρούν στην κρυστάλλωση δεν είναι ανεξάρτητοι μεταξύ τους και το αποτέλεσμα της συνδυαστικής δράσης τους μπορεί να είναι πολύπλοκο και δύσκολο να προβλεφθεί.

Πίνακας 2: Παράγοντες που επιδρούν στην κρυστάλλωση μιας πρωτεΐνης.

Φυσικοί παράγοντες	Χημικοί παράγοντες	Βιοχημικοί παράγοντες
Θερμοκρασία	Είδος παράγοντα καθίζησης	Στάδιο σχηματισμού συσσωματωμάτων
Μεθοδολογία/τρόπος προσέγγισης ισορροπίας	Συγκέντρωση παράγοντα καθίζησης	Επίδραση προσδέτη
Πίεση	pH	Μεταμεταγραφικές τροποποιήσεις
Χρόνος	Ειδικά ιόντα	Καθαρότητα
Βαρύτητα	Ιοντική ισχύς	Πρωτεόλυση/ υδρόλυση
Μηχανική διαταραχή	Αναγωγικό/ οξειδωτικό περιβάλλον	Πηγή πρωτεΐνης
Ηλεκτρικό/μαγνητικό πεδίο	Σταυροδεσμοί	Χημική τροποποίηση
Ιξώδες	Μεταλλικά ιόντα	Γενετικές τροποποιήσεις
Διηλεκτρικές ιδιότητες μέσου	Προσμίξεις	Συμμετρία
Κατάσταση ισορροπίας	Επιφανειοδραστικές ουσίες	Σταθερότητα
Ομοιογένεια/ετερογένεια πυρήνων κρυστάλλωσης		Ισοηλεκτρικό σημείο
Βαθμός υπερκορεσμού		Ιστορικό δείγματος
Συγκέντρωση πρωτεΐνης		

Πιο αναλυτικά σημαντικότερο ρόλο μεταξύ των παραπάνω παραγόντων φαίνεται πως παίζουν:

A) Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης και η καθαρότητά της (>95%) διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην κρυστάλλωσή της. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης πρέπει να είναι τέτοια ώστε να δημιουργείται κατάσταση υπερκορεσμού του διαλύματος αλλά μικρότερη από εκείνη στη τιμή της οποίας θα προκληθεί ανεπιθύμητη καταβύθιση. Επιπλέον, η πρωτεΐνη θα πρέπει να είναι καθαρή όχι μόνο από προσμίξεις αλλά και από άλλες διαμορφώσεις της, καθώς η ύπαρξη μετουσιωμένων πρωτεϊνών επιδρά αρνητικά στην ανάπτυξη των κρυστάλλων.

B) Η φύση και η συγκέντρωση του παράγοντα καταβύθισης (πολυαιθυλενογλυκόλες ή διάφορα άλατα). Διαλύτες όπως η 2-μεθυλο-3,4-πεντανοδιόλη (MPD) είναι αποτελεσματικοί παράγοντες καθίζησης και χρησιμοποιούνται ακόμη και στην περίπτωση ευαίσθητων πρωτεϊνικών μορίων. Ξεχωριστή θέση μεταξύ των παραγόντων καταβύθισης έχουν οι πολυαιθυλενογλυκόλες οι οποίες διαταράσσουν τη φυσική δομή του διαλύτη, δημιουργώντας έτσι ένα πιο περίπλοκο δίκτυο το οποίο περιλαμβάνει μόρια ύδατος και μόρια του παράγοντα καταβύθισης ως δομικά στοιχεία. Τα μόρια της πολυαιθυλενογλυκόλης επειδή είναι μακριά και εύκαμπτα μπορούν να συστρέφονται και να περιστρέφονται στο πρωτεϊνικό διάλυμα και επομένως να καταλαμβάνουν πολύ μεγαλύτερο όγκο διαλύματος από αυτόν που καθορίζει η μάζα τους, οδηγώντας τελικά στη «συμπύκνωση» των μακρομορίων πρωτεΐνης.

Γ) Η ιοντική ισχύς. Σύμφωνα με τη θεωρία των Debye-Huckel, η αύξηση της συγκέντρωσης των ιόντων που περιέχονται σε ένα υδατικό διάλυμα προκαλεί το σχηματισμό μιας σφαίρας από αντίθετα ιόντα γύρω από κάθε ιόν, γεγονός που μεταβάλλει την αλληλεπίδραση μεταξύ ιόντων και μορίων ύδατος και συνεπώς τροποποιεί τη διαλυτότητα. Στις χαμηλές συγκεντρώσεις ιόντων αυξάνεται η διαλυτότητα εξαιτίας της αύξησης των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ιόντων του άλατος και των φορτισμένων μορίων πρωτεΐνης, παρατηρείται δηλαδή το φαινόμενο της εναλάτωσης. Σε υψηλότερες η αύξηση της ιοντικής ισχύος οδηγεί σε μείωση της διαλυτότητας και λαμβάνει χώρα η εξαλάτωση.

Δ) Η θερμοκρασία κρυστάλλωσης. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων έχει παρατηρηθεί ότι η αύξηση της θερμοκρασίας προκαλεί αύξηση της διαλυτότητας της πρωτεΐνης, ενώ επιδρά και σε πολλούς από τους παράγοντες που επηρεάζουν τη διαλυτότητα. Επειδή οι περισσότερες πρωτεΐνες είναι σταθερές μεταξύ 0-40°C, η μεταβολή της θερμοκρασίας πρέπει να γίνεται εντός αυτού του εύρους.

Ε) Το pH. Όπως είναι γνωστό η διαλυτότητα μιας πρωτεΐνης αυξάνεται με την αύξηση του συνολικού της φορτίου. Η πρωτεΐνη παρουσιάζει τη μικρότερη διαλυτότητα στο ισοηλεκτρικό της σημείο, δηλαδή στο pH όπου το συνολικό της φορτίο είναι μηδέν, οπότε συρρικνώνεται, καθώς η ποσότητα του δεσμευμένου ύδατος μειώνεται στο ελάχιστο.

ΣΤ) Η παρουσία οργανικών διαλυτών. Λόγω της ικανότητας που έχουν τα οργανικά μόρια να προσελκύουν μόρια ύδατος και να συνδέονται με αυτά όπως και με μόρια άλατος και εξαιτίας της μείωσης της διηλεκτρικής σταθεράς του παρεμβάλλοντος διαλύτη, παρατηρείται μεταβολή της διαλυτότητας των πρωτεϊνών με την προσθήκη οργανικών διαλυτών στο μίγμα της κρυστάλλωσης. Η μείωση της διηλεκτρικής σταθεράς προκαλεί αύξηση των ηλεκτροστατικών έλξεων μεταξύ αντίθετα φορτισμένων ομάδων που βρίσκονται στην επιφάνεια των μορίων της πρωτεΐνης με αποτέλεσμα αυτά να έλκονται μεταξύ τους. Η παρουσία οργανικού διαλύτη και η μείωση της θερμοκρασίας στο πρωτεϊνικό διάλυμα δρουν συνδυαστικά με αποτέλεσμα τη μείωση της διαλυτότητας.

6.2.2 Φυσικοχημεία της κρυστάλλωσης πρωτεϊνών

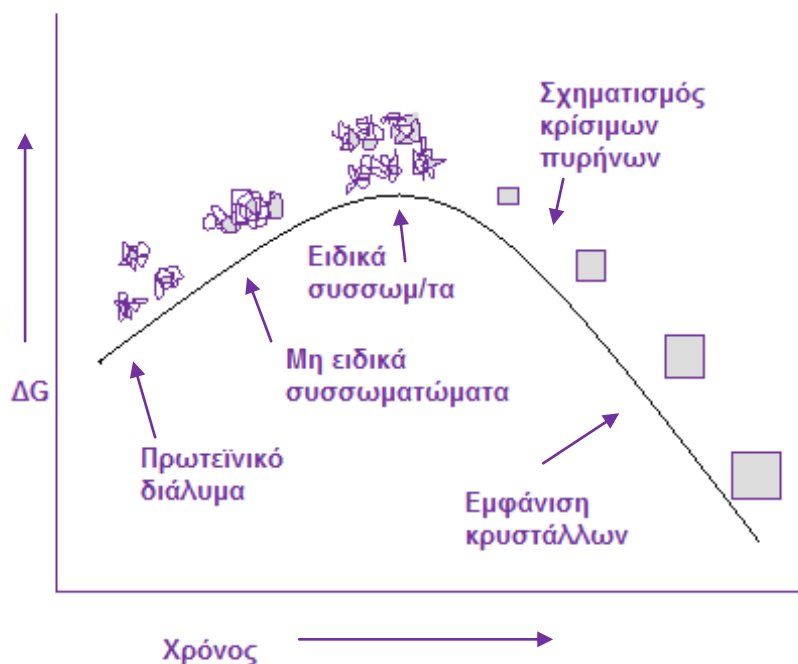
Όπως είναι γνωστό από τη θερμοδυναμική, σε κάθε σύστημα που τείνει να φθάσει στην κατάσταση ισορροπίας παρατηρείται μεγιστοποίηση της εντροπίας του συνοδευόμενη από ελαχιστοποίηση της ελεύθερης ενέργειάς του. Στον κρύσταλλο τα μόρια διευθετούνται περιοδικά σε ένα πλέγμα, γεγονός που μειώνει την εντροπία του συστήματος. Οι κρυσταλλικές επαφές, δηλαδή οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων στο κρυσταλλικό πλέγμα, είναι ίδιες σε κάθε οργανωμένη βασική μονάδα μορίων η οποία περιέχεται στη στοιχειώδη κυψελίδα του πλέγματος και επαναλαμβάνονται με τέτοιο τρόπο

ώστε τελικά να μειώνεται η ελεύθερη ενέργεια, γεγονός που αποτελεί την κινητήρια δύναμη της κρυστάλλωσης.

Αρχή της κρυστάλλωσης των μακρομορίων είναι η ύπαρξη ενός μίγματος κρυστάλλωσης σε κατάσταση υπερκορεσμού, έτσι ώστε τα μόρια να εξαναγκαστούν να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους και να δημιουργηθούν συσσωματώματα. Όταν το μέγεθος των συσσωματωμάτων αυξηθεί σε τέτοιο βαθμό που πλέον καθίσταται αδύνατο γι' αυτά να παραμένουν στην υδατική φάση, λαμβάνει χώρα αποχωρισμός από αυτή, ενώ συγχρόνως το διάλυμα επιστρέφει στην ισορροπία, δηλαδή σε κατάσταση κορεσμού. Η στερεή φάση δεν αναπτύσσεται αναγκαστικά μόλις ξεπεραστεί το όριο κορεσμού, διότι η ενέργεια που απαιτείται είναι ανάλογη της ενέργειας ενεργοποίησης για τη δημιουργία της στερεής φάσης δηλαδή ενός σταθερού πυρήνα κρυστάλλωσης ή ιζήματος.

Η πορεία της κρυστάλλωσης διακρίνεται στα εξής στάδια:

A) Την πυρήνωση (nucleation) κατά την οποία σχηματίζονται οι πυρήνες κρυστάλλωσης δηλαδή οι πρώτες τακτικά διευθετημένες συναθροίσεις μορίων και συμβαίνει μόνο σε υπέρκορα πρωτεϊνής διαλύματα. Ο υπερκορεσμός αποτελεί μια θερμοδυναμικά ασταθή κατάσταση και διακρίνεται σε τρεις περιοχές, τη ζώνη πυρήνωσης (δημιουργία πυρήνων κρυστάλλων), τη μετασταθερή ζώνη (δεν δημιουργούνται πυρήνες κρυστάλλων αλλά μπορεί να μεγαλώνουν οι προϋπάρχοντες) και τη ζώνη κατακρήμνισης (ο υπερκορεσμός είναι τόσο μεγάλος που τελικά η περίσσεια της πρωτεϊνής κατακρημνίζεται ως άμορφο ίζημα), όπως φαίνεται και στην εικόνα 15.



Εικόνα 15: Απεικόνιση των σταδίων της κρυστάλλωσης πρωτεϊνών.

Για να δημιουργηθεί μια νέα φάση στο υπέρκορο διάλυμα θα πρέπει το σύστημα να υπερπηδήσει το ενεργειακό φράγμα που ονομάζεται ελεύθερη ενέργεια πυρήνωσης και δίνεται από την παρακάτω σχέση:

$$\Delta G_g = [-k T(4\pi r^3) / V \ln \beta] + 4\pi \gamma r^2$$

όπου k η σταθερά Boltzman, T η απόλυτη θερμοκρασία, r η ακτίνα του πυρήνα του κρυστάλλου, V ο όγκος ενός μορίου μέσα στον κρύσταλλο, β ο βαθμός υπερκορεσμού και γ η διφαντική ελεύθερη ενέργεια μεταξύ του διαλύματος και του κρυστάλλου.

Β) Την αύξηση του μεγέθους του κρυστάλλου (crystal growth), η οποία συμβαίνει λόγω εναπόθεσης μορίων σε τρεις διαστάσεις στην επιφάνειά του και σταματάει όταν το σύστημα επανέλθει στην κατάσταση ισορροπίας. Ο ρυθμός που αναπτύσσεται ο κρύσταλλος είναι συνάρτηση της απόστασης του διαλύματος από την κατάσταση ισορροπίας (κατάσταση κορεσμού). Συνεπώς ένας πυρήνας που σχηματίζεται μακριά από την ισορροπία, στη ζώνη πυρήνωσης, αρχικά μεγαλώνει γρήγορα αλλά καθώς το διάλυμα αραιώνεται και μεταβαίνει στη μετασταθή περιοχή, μειώνεται και ο ρυθμός ανάπτυξής του.

Γ) Το τερματισμό της αύξησης (cessation of growth)

Για την ανάπτυξη κρυστάλλων κατάλληλου μεγέθους και μορφής, έτσι ώστε να είναι δυνατή η ανάλυσή τους με ακτίνες-Χ, θα πρέπει να πληρούνται κάποιες προϋποθέσεις. Σύμφωνα με το διάγραμμα φάσης, η ανάπτυξη του κρυστάλλου επιτυγχάνεται ύστερα από τη μετάβαση του πρωτεϊνικού διαλύματος από τη διαλυτή φάση στη ζώνη πυρήνωσης για τη δημιουργία πυρήνων κρυστάλλωσης, όπου και πρέπει να παραμείνει για σύντομο χρονικό διάστημα προς αποφυγή σχηματισμού μεγάλου αριθμού πυρήνων. Ακολουθεί η μετάπτωση του διαλύματος στη μετασταθή ζώνη, στην οποία οι πυρήνες θα συνεχίσουν να μεγαλώνουν έτσι ώστε να παραχθούν κρύσταλλοι ικανοποιητικού μεγέθους και με καλά καθορισμένες έδρες και πλευρές.



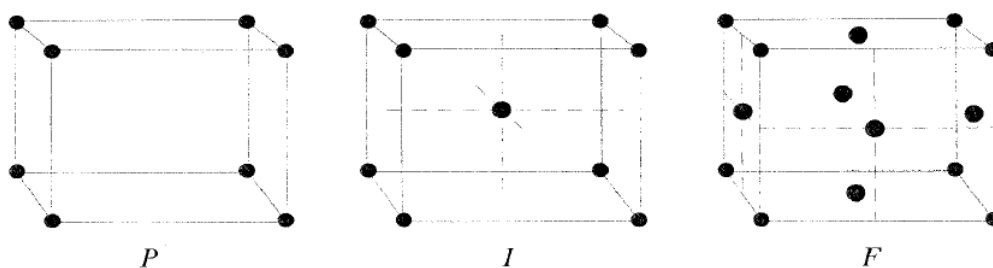
Εικόνα 16: Κρύσταλλοι πρωτεΐνης.⁶⁵

6.3 Γεωμετρία πρωτεϊνικών κρυστάλλων

Οι κρύσταλλοι αποτελούνται από μεγάλο αριθμό επαναλήψιμων μονάδων που είναι διευθετημένες σε ένα τρισδιάστατο πλέγμα, το κρυσταλλικό πλέγμα. Η μικρότερη επαναλαμβανόμενη μονάδα του κρυσταλλικού πλέγματος ονομάζεται στοιχειώδης κυψελίδα (Εικόνα 17), έχει σχήμα παραλληλεπιπέδου και η μορφή της περιγράφεται από τα ανύσματα a , b , c , τα οποία ονομάζονται κρυσταλλογραφικοί άξονες και τις γωνίες α , β και γ . Στις τρεις διαστάσεις τα παραπάνω στοιχεία συμμετρίας είναι δυνατόν να δημιουργήσουν διαφορετικούς συνδυασμούς που ονομάζονται ομάδες χώρου. Η στοιχειώδης κυψελίδα κάθε κρυστάλλου θα πρέπει να αντιστοιχεί σε μια από τις ομάδες χώρου που στην περίπτωση των πρωτεϊνών περιορίζονται σε 32. Οι ομάδες χώρου ταξινομούνται σε επτά κρυσταλλικά συστήματα (πίνακας 3).

Πίνακας 3: Τα επτά κρυσταλλικά συστήματα.⁶³

Σύστημα	Γεωμετρικά χαρακτηριστικά	Πλέγμα Bravais
Κυβικό	$a=b=c, \alpha=\beta=\gamma=90^\circ$	P, I, F
Τετραγωνικό	$a=b \neq c, \alpha=\beta=\gamma=90^\circ$	P, I
Ορθορομβικό	$a \neq b \neq c, \alpha=\beta=\gamma=90^\circ$	P, I, C, F
Μονοκλινές	$a \neq b \neq c, \alpha=\gamma=90^\circ, \beta \neq 90^\circ$	P, C
Τρικλινές	$a \neq b \neq c, \alpha \neq \beta \neq \gamma \neq 90^\circ$	P
Τριγωνικό ή Ρομβοεδρικό	$a=b=c, \alpha \neq \beta \neq \gamma \neq 90^\circ$	R
Εξαγωνικό	$a=b \neq c, \alpha=\beta=90^\circ, \gamma=120^\circ$	P



Εικόνα 17: Στοιχειώδεις κυψελίδες P, I, F.⁶⁴

6.4 Περίθλαση ακτίνων-Χ

Όπως είναι γνωστό από την οπτική, όταν φωτεινές ακτίνες προσπίπτουν σε λεπτή σχισμή περιθλώνται, δηλαδή σκεδάζονται σε διάφορες διευθύνσεις με τη σχισμή ως δευτερογενή πηγή ακτινοβολίας. Εάν αντί μιας, υπάρχουν πολλές σχισμές κανονικώς διατεταγμένες (φράγμα), οι περιθλώμενες ακτίνες συμβάλλουν και ενισχύονται σε ορισμένες διευθύνσεις ενώ αποσβένουν σε άλλες.

Ανάλογο φαινόμενο εμφανίζεται και κατά την πρόσπτωση ακτινών X επί κρυστάλλων. Το ρόλο κάθε σχισμής παίζουν τα ηλεκτρόνια των ατόμων του κρυστάλλου τα οποία υπό την επίδραση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας γίνονται πηγές δευτερογενούς ακτινοβολίας με αποτέλεσμα οι περιθλώμενες ακτίνες να συμβάλλουν και να ενισχύονται σε ορισμένες διευθύνσεις.

Η πειραματική διάταξη που χρησιμοποιείται για την περίθλαση ακτινών X από κρυστάλλους περιλαμβάνει την πηγή ακτινών X, τον πρωτεϊνικό κρύσταλλο και τον ανιχνευτή (Εικόνα 18). Ο κρύσταλλος τοποθετείται με κατάλληλο προσανατολισμό και με σταδιακή περιστροφή του γύρω από άξονα κάθετο στις ακτίνες X λαμβάνουμε ένα περιθλασίγραμμα ακτινών X.

Στη συνέχεια ακολουθεί κατάλληλη επεξεργασία των περιθλασιγραμμάτων ώστε να συλλεχθούν πληροφορίες σχετικά με τη συμμετρία του κρυστάλλου από τη γεωμετρική κατανομή των κηλίδων στο περιθλασίγραμμα. Οι εντάσεις των κηλίδων χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό των δομικών παραγόντων από τους οποίους υπολογίζεται στη συνέχεια ο χάρτης ηλεκτρονικής πυκνότητας. Για τη βελτίωση αυτού του χάρτη μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορες τεχνικές μέχρι να καταστεί δυνατή η κατασκευή ενός μοντέλου του μακρομορίου. Η δομή του μοντέλου στη συνέχεια βελτιστοποιείται (refinement) έτσι ώστε να ταιριάζει καλύτερα στο ηλεκτρονικό χάρτη και παράλληλα να έχει υιοθετήσει την ευνοϊκότερη θερμοδυναμική διαμόρφωση.³¹

6.5 Πηγές ακτινών-X

Οι ακτίνες X που είναι ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία μήκους κύματος 0.1-1000 Å που παράγονται όταν ηλεκτρόνια υψηλής ενέργειας, τα οποία έχουν επιταχυνθεί υπό κενό, προσπίπτουν πάνω σε ένα μεταλλικό στόχο. Οι πιο συνηθισμένες πηγές ακτινών X είναι οι επιταχυντές σωματιδίων που παράγουν συγχροτρονική ακτινοβολία (synchrotron radiation) στην περιοχή των ακτινών X και οι συμβατικές πηγές όπου τα ηλεκτρόνια προσπίπτουν σε άνοδο χαλκού. Οι επιταχυντές synchrotron είναι μεγάλοι δακτύλιοι διαμέτρου 10 έως μερικών εκατοντάδων μέτρων στους οποίους οι ταχύτητες των κινούμενων ηλεκτρονίων ή ποζιτρονίων πλησιάζουν τη ταχύτητα του φωτός, υποκινούμενα από ενέργεια που προέρχεται από πομπούς ραδιοσυχνότητας.

Έτσι, τα φορτισμένα αυτά σωματίδια εξαναγκάζονται σε κυκλική κίνηση με τη βοήθεια ισχυρών μαγνητικών πεδίων που έχει ως αποτέλεσμα την εκπομπή ακτινών Χ. Επιπλέον συστήματα, όπως κάτοπτρα εστίασης και μονοχρωμάτορες που εφάπτονται στο δακτύλιο αποθήκευσης, παράγουν μονοχρωματικές ακτίνες Χ διαφόρων μηκών κύματος. Τα πλεονεκτήματα που παρουσιάζει η χρήση τέτοιων πηγών είναι τα εξής:

Α) Η συλλογή των δεδομένων γίνεται σε δευτερόλεπτα ή λίγα λεπτά σε αντίθεση με τη συμβατική πηγή στην οποία απαιτούνται ώρες έκθεσης.

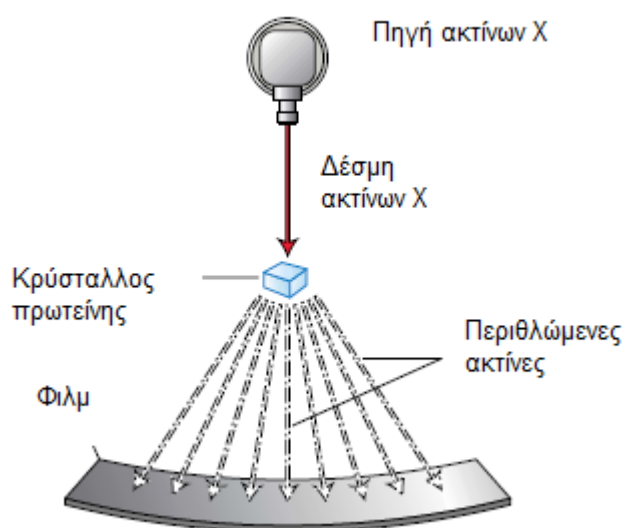
Β) Μπορούν να επιλεγούν διαφορετικά μήκη κύματος.

Γ) Είναι δυνατή η μελέτη κρυστάλλων μικρού μεγέθους λόγω μεγάλης έντασης της ακτινοβολίας.

Δ) Βελτιώνεται η σχέση σήματος-θορύβου.

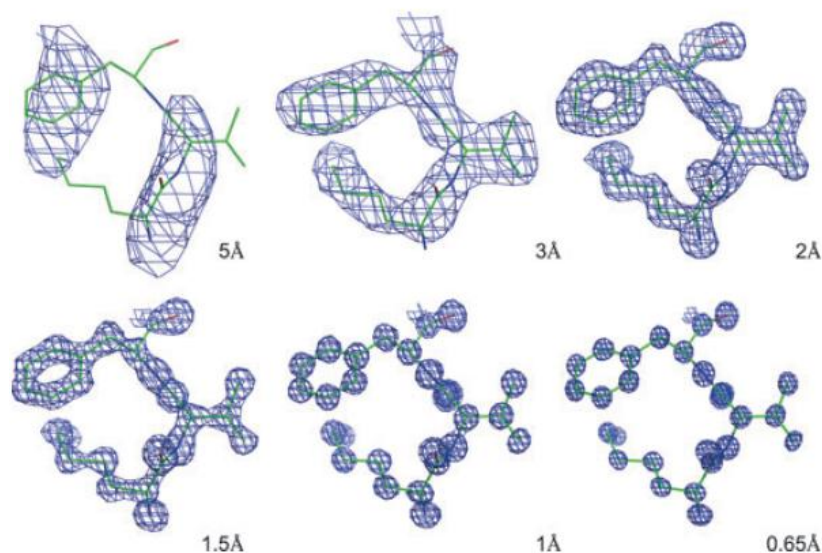
Ε) Λόγω δυνατότητας χρήσης μικρότερου μήκους κύματος η απρόσιτη περιοχή του πλέγματος (blind region) κατά την περιστροφή του κρυστάλλου γύρω από ένα μοναδικό άξονα είναι αναλογικά μικρότερη από αυτή σε μεγαλύτερο μήκος κύματος.

Η συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων περιλαμβάνει τη τοποθέτηση του κρυστάλλου στο γωνιόμετρο με τη βοήθεια θηλιάς ή τριχοειδούς σωλήνα και η περιστροφή του με τρόπο ώστε να παραμένει μέσα στη δέσμη των ακτινών Χ κατά την διάρκεια της ακτινοβολήσης.³¹ Στη περίπτωση συλλογής δεδομένων σε κρυογονικές συνθήκες ο κρύσταλλος αφού έχει εμβαπτιστεί στο κατάλληλο κρυοπροστατευτικό μέσο παγώνει ακαριαία σε ρεύμα αζώτου 100 Κ. Η λήψη δεδομένων στους 100 Κ έχει ως αποτέλεσμα την προστασία του κρυστάλλου από αλλοίωση λόγω της ακτινοβολίας (καταστροφή του κρυσταλλικού πλέγματος από την δημιουργία ελευθέρων ριζών) και κατά συνέπεια την αυξημένη διάρκεια ζωής του κατά την ακτινοβολήση.



Εικόνα 18: Σχηματική αναπαράσταση ακτινοβολήσης κρυστάλλου πρωτεΐνης με ακτίνες Χ.⁶²

Η συλλογή ενός καλού συνόλου περιθλαστικών δεδομένων προϋποθέτει την συλλογή ακριβών μετρήσεων τόσο σε χαμηλή ευκρίνεια (resolution) (οι οποίες χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό του μοριακού φακέλου κατά την μοριακή αντικατάσταση) όσο και σε υψηλή ευκρίνεια (πληροφορίες οι οποίες είναι απαραίτητες για τον προσδιορισμό της δομής της πρωτεΐνης σε ατομικό επίπεδο).³⁷



Εικόνα 19: Αναπαράσταση του χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας ως αποτέλεσμα συλλογής δεδομένων σε διαφορετική ευκρίνεια.⁵³

Όπως φαίνεται στην εικόνα 19 η τιμή της ευκρίνειας καθορίζει την ποιότητα του χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας και κατά συνέπεια την ακρίβεια των πληροφοριών που μπορούν να συλλεχθούν από το πείραμα. Για παράδειγμα, σε ευκρίνεια 6 Å μπορούμε να πάρουμε γενικές πληροφορίες σχετικά με τη δομή της πρωτεΐνης όπως είναι το σχήμα της ή η ύπαρξη α-ελίκων σε αυτή. Στα 2.7 Å είναι εφικτός ο προσδιορισμός μορίων ύδατος των οποίων οι αποστάσεις δεσμών υδρογόνου κυμαίνονται σε αυτό το μήκος. Στα 2 Å είναι δυνατό να προσδιοριστεί με ακρίβεια η μοριακή επιφάνεια των καταλοίπων και προσδετών ενώ στα 1.5 Å που αντιστοιχεί στις αποστάσεις των δεσμών C-C είναι δυνατόν να προσδιοριστεί με ακρίβεια η θέση όλων των βαρέων ατόμων. Η τοποθέτηση των ατόμων υδρογόνου στο χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας γίνεται σε ευκρίνεια μεγαλύτερη του 1 Å διότι οι αποστάσεις των δεσμών ενός βαρέως ατόμου με το άτομο υδρογόνου κυμαίνονται στα 0.9-1 Å.⁵³

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

Κατευθυνόμενος από τη δομή σχεδιασμός βιοδραστικών μορίων

7.1 Σχεδιασμός βιοδραστικών μορίων με βάση τη δομή

Το πεδίο του κατευθυνόμενου από τη δομή σχεδιασμού βιοδραστικών μορίων εξελίσσεται ταχύτατα εξαιτίας της ραγδαίας ανάπτυξης της γενωμικής, της πρωτεωμικής καθώς και της δυνατότητας γρήγορης συλλογής δομικών πληροφοριών. Εξαιτίας της ταχείας εξέλιξης της βιοπληροφορικής ταυτοποιούνται γονίδια που αποτελούν φαρμακευτικούς στόχους, τα οποία στη συνέχεια κλωνοποιούνται, η πρωτεΐνη-στόχος εκφράζεται, καθαρίζεται και τελικά προσδιορίζεται η δομή της κυρίως με την τεχνική της κρυσταλλογραφίας υψηλής ευκρίνειας.⁸

Ο ιδανικός μακρομοριακός στόχος στον κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό βιοδραστικών μορίων θα πρέπει να συνδέεται στενά με κάποια ανθρώπινη ασθένεια. Στην περίπτωση που η λειτουργία του μακρομοριακού στόχου ρυθμίζεται από ένα μικρό μόριο-τροποποιητή είναι δυνατόν να προσδιοριστεί η θέση σύνδεσης του (κέντρο σύνδεσης) βάσει της οποίας είναι δυνατός ο σχεδιασμός νέων συνθετικών μορίων ή η ανακάλυψη μορίων φυσικής προέλευσης, τα οποία ανταγωνίζονται, στον απαιτούμενο βαθμό, τους φυσικούς προσδέτες.⁸ Τέτοια μόρια είναι δυνατόν να τροποποιήσουν τη λειτουργία του στόχου προς την επιθυμητή κατεύθυνση (αναστολή/ ενεργοποίηση/ δομική μεταβολή) και αποτελούν ενώσεις οδηγούς για την ανάπτυξη εν δυνάμει βιοδραστικών μορίων. Η λειτουργία του επιλεγμένου μακρομοριακού στόχου πρέπει να είναι μοναδική και ιδανικό είναι να μην υπάρχει άλλο μονοπάτι μέσω του οποίου να υποστηρίζεται και με αυτό το τρόπο να παρακάμπτεται η επίδραση του προσδέτη. Τα βήματα της πορείας που ακολουθείται στον κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό βιοδραστικών μορίων συνοψίζονται στο σχήμα 2.

Σχήμα 2: Βήματα κατευθυνόμενου από τη δομή σχεδιασμού βιοδραστικών μορίων.⁸

7.2 Εκτίμηση μιας δομής για κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό βιοδραστικού μορίου.

Η συλλογή πληροφοριών για τη δομή του επιλεγμένου μακρομοριακού στόχου είναι δυνατό να πραγματοποιηθεί με τρεις μεθόδους: την κρυσταλλογραφία ακτινών- X, το NMR και τη μοντελοποίηση με βάση την ομολογία.⁸

Η πιο κοινή πηγή δομικών πληροφοριών για το σχεδιασμό βιοδραστικών μορίων είναι οι κρυσταλλικές δομές πρωτεϊνών επειδή είναι διαθέσιμες σε υψηλή ευκρίνεια, και περιλαμβάνουν πρωτεΐνες που το μοριακό τους βάρος ποικίλει από μερικά αμινοξέα μέχρι 1-2 MDa. Επιπλέον επειδή στην κρυσταλλογραφία ακτινών-Χ είναι δυνατή η απεικόνιση των μορίων ύδατος διευκολύνεται ο σχεδιασμός μορίων με πιθανή φαρμακευτική δράση λαμβάνοντας υπόψη τις θέσεις τους.⁸

Η ποιότητα μιας κρυσταλλικής δομής εκτιμάται από την ευκρίνεια στην οποία προσδιορίστηκε, τους παράγοντες R, το σχετικό σφάλμα, τους θερμικούς παράγοντες και την χημική ορθότητα. Τυπικά οι κρυσταλλικές δομές που προκύπτουν σε ευκρίνεια μεγαλύτερη των 2,5 Å είναι αποδεκτές για το σχεδιασμό βιοδραστικών μορίων επειδή η τοποθέτηση των καταλοίπων στο χάρτη ηλεκτρονικής πυκνότητας είναι σαφής. Οι τιμές των παραγόντων R και R_{free} αποτελούν μέτρο σύγκρισης μεταξύ του θεωρητικού μοντέλου και των πειραματικών δεδομένων και πρέπει να είναι μικρότερες από 25%, και 28% αντίστοιχα.⁸

Επιπλέον, οι τιμές των θερμικών παραγόντων (B-factors) των ατόμων στην περιοχή που μας ενδιαφέρει δε θα πρέπει να υπερβαίνουν το μέσο όρο του πρωτεϊνικού μορίου. Μεγάλες τιμές τους πιθανότατα οφείλονται στην κινητικότητα των αμινοξέων του κέντρου σύνδεσης ή του προσδέτη ή αποτελούν ένδειξη λάθους θέσης των ατόμων. Ακολουθεί η βελτιστοποίηση του μοντέλου έτσι ώστε να ικανοποιούνται όλες οι προϋποθέσεις της στερεοχημικής ορθότητας, οι οποίες είναι γνωστές από τις δομές μικρών μορίων. Πιο αναλυτικά, οι αποκλίσεις από τα ιδανικά μήκη και γωνίες δεσμών δεν πρέπει να υπερβαίνουν τα 0,015 Å και τις 3°, αντίστοιχα. Οι πλευρικές

ομάδες δεν πρέπει να βρίσκονται σε απόσταση μικρότερη των 0,015 Å από το επίπεδο του πεπτιδικού δεσμού και δεν πρέπει να υπάρχουν λάθος χειρόμορφα κέντρα. Τέλος, τουλάχιστον το 90% των γωνιών Φ και Ψ θα πρέπει να λαμβάνουν τιμές εντός των επιτρεπτών περιοχών του διαγράμματος Ramachandran. Τα στατιστικά αυτά στοιχεία αξιολογούνται και εκτιμώνται πριν συνεχίσει η προσπάθεια για το σχεδιασμό νέων φαρμάκων. Η δομή ελέγχεται και εκτιμάται για την αξιοπιστία της από προγράμματα όπως το PROCHECK.⁸

Εάν δεν υπάρχει κάποια πρωτεϊνική δομή που να έχει προκύψει πειραματικά, είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί στο σχεδιασμό βιοδραστικών μορίων ένα μοντέλο κατασκευασμένο βάσει μιας ομόλογης πρωτεΐνης γνωστής δομής.

Χρησιμοποιώντας όλες τις δομικές πληροφορίες που λαμβάνονται με εφαρμογή των παραπάνω τεχνικών, η δομή επεξεργάζεται με ειδικά προγράμματα σχεδιασμού βιοδραστικών μορίων. Αρχικά προστίθενται τα άτομα υδρογόνου τα οποία απουσιάζουν από της δομές που προσδιορίστηκαν σε ευκρίνεια μικρότερη του 1Å. Επιπρόσθετα, πρέπει να προσδιοριστούν η πρωτονίωση και οι ταυτομερείς καταστάσεις των αμινοξέων, όπως και η κατάσταση των καταλοίπων ιστιδίνης (ϵ , Δ ή και τα δυο άζωτα πρωτονιωμένα). Τέλος, μικρά μόρια, όπως ιόντα και μόρια νερού θα πρέπει να συμπεριληφθούν στη δομή και ειδικά σε περιπτώσεις που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση του μορίου στόχου. Διαφορετικά απομακρύνονται έτσι ώστε ο πιθανός προσδέτης να μπορεί να καταλάβει τη θέση τους.⁸

7.3 Προσδιορισμός της θέσης σύνδεσης

Αρχικά αναγνωρίζεται η ενεργή περιοχή σύνδεσης του μακρομορίου η οποία θα πρέπει είναι μια θήκη αποτελούμενη από αμινοξέα που μπορούν να αναπτύξουν ποικιλία δεσμών περιλαμβανομένων δεσμών υδρογόνου, ιοντικών ή με υδρόφοβα χαρακτηριστικά για την ανάπτυξη δεσμών van der Waals και το κυριότερο να διαθέτει επαρκή όγκο για να φιλοξενήσει την μοριακή επιφάνεια του προσδέτη. Η περιοχή πρόσδεσης του μορίου μπορεί να είναι α) το ενεργό κέντρο μιας πρωτεΐνης, β) μια περιοχή αλληλεπίδρασης

με άλλο μόριο ή γ) μια περιοχή αλληλεπίδρασης με άλλη πρωτεΐνη απαραίτητη στη λειτουργία του μορίου.⁸

7.4 Μέθοδοι σχεδιασμού ουσιών

Όταν πλέον έχει προσδιοριστεί η δομή και το ενεργό κέντρο του μορίου υπάρχουν διάφορες πορείες για να βελτιστοποιηθεί μια ένωση οδηγός με βάση τη δομή της πρωτεΐνης, οι οποίες διακρίνονται σε πειραματικούς και υπολογιστικούς. Παράδειγμα πειραματικής μεθόδου αποτελεί η υψηλής απόδοσης (high throughput) αξιολόγηση προσδετών που προκύπτουν μέσω συνδυαστικής χημείας (combinatorial chemistry) με την οποία είναι δυνατό να ελεγχθεί η βιοχημική δράση εκατοντάδων συστατικών.

Οι υπολογιστικές μέθοδοι διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες: την εξεταστική (inspection), την υπολογιστική αξιολόγηση (virtual screening) και την εκ νέου (de novo) δημιουργία. Στην πρώτη κατηγορία μελετώνται τα μόρια που προσδένονται στο κέντρο σύνδεσης των στόχων, όπως είναι τα φυσικά υποστρώματα ή συμπαράγοντες στην περίπτωση ενζύμων, πεπτιδία στην περίπτωση αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης ή πρωτεΐνης-νουκλεϊνικού οξέος, τα οποία και τροποποιούνται με σκοπό την μεγιστοποίηση συμπληρωματικών αλληλεπιδράσεων ώστε να καταστούν αναστολείς. Στην υπολογιστική αξιολόγηση οι διαθέσιμες βάσεις δεδομένων μικρών μορίων προσαρμόζονται (docked) στην περιοχή ενδιαφέροντος με την βοήθεια υπολογιστικών προγραμμάτων (*in silico*) και τα μόρια αξιολογούνται βάσει των προβλεπόμενων αλληλεπιδράσεων με το κέντρο αυτό. Τέλος στη *de novo* δημιουργία, μικρά τμήματα των μορίων (δραστικές ομάδες- fragments) όπως είναι βενζολικοί δακτύλιοι, καρβονυλικές ομάδες, αμινικές ομάδες κ.λπ., τοποθετούνται στο κέντρο σύνδεσης υπολογιστικά (*in silico*) και αξιολογούνται. Στη συνέχεια, τα μόρια που σχεδιάζονται από σύζευξη των δραστικών ομάδων συντίθενται εργαστηριακά.

Μετά την ταυτοποίηση ενός μορίου ως προσδέτη, ακολουθεί η υπολογιστική αξιολόγησή του πριν ακολουθήσουν τα επόμενα βήματα της διαδικασίας. Πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψη το γεγονός ότι τα αποτελέσματα της αξιολόγησης δεν είναι πάντα ενδεικτικά της αληθινής σταθεράς συγγένειας, μιας και το μοντέλο των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του μορίου στόχου και του

προσδότη είναι προσεγγιστικό. Συνήθως, οι ενώσεις οδηγοί εκτιμώνται οπτικά με υπολογιστικά γραφικά και σε αυτό το στάδιο βελτιστοποιούνται για μεγαλύτερη δραστικότητα. Η χημική και μεταβολική σταθερότητα και η ευκολία σύνθεσης του μορίου οδηγού αποτελούν σημαντικούς παράγοντες στην επεξεργασία του. Τελικά, οι ουσίες που προκύπτουν αποτιμούνται πειραματικά για την βιοδραστικότητα τους.

Έχουν αναφερθεί πολλά παραδείγματα σχεδιασμού μορίων τα οποία παρουσίαζαν σημαντικές διαφορές μεταξύ προβλεπόμενου και πραγματικού μοντέλου πρόσδεσης. Σε αρκετές όμως περιπτώσεις οι υπολογιστικές (docked) και οι πειραματικές διαμορφώσεις διαφέρουν κατά περίπου 2Å μέση απόκλιση.⁸

ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο κατευθυνόμενος από τη δομή σχεδιασμός βιοδραστικών μορίων αποτελεί ένα πολλά υποσχόμενο πεδίο στην προσπάθεια ανακάλυψης βελτιωμένων παραγώγων με επιθυμητές ιδιότητες. Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία μελετήθηκαν η πρωτεΐνη πρόσδεσης οσμογόνων OBP4 και η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) οι οποίες έχει αποδειχθεί ότι παίζουν ρόλο στη μετάδοση της ελonoσίας και στο διαβήτη τύπου 2, αντίστοιχα.

Έχει παρατηρηθεί πειραματικά ότι τα επίπεδα mRNA της OBP4 στην κεραία του θηλυκού κουνουπιού *A. gambiae* αυξάνονται πριν το γεύμα και μειώνονται σημαντικά μετά από αυτό. Επομένως, είναι πιθανή η συμμετοχή της πρωτεΐνης στην ανίχνευση του ανθρώπινου στόχου από το κουνούπι και συνεπώς αποτελεί στόχο για την εύρεση νέων βελτιωμένων εντομοαπωθητικών ουσιών βάσει της δομής της. Γι' αυτό το λόγο η πρωτεΐνη εκφράσθηκε σε βακτηριακά στελέχη, ακολούθησε η απομόνωση και ο καθαρισμός της με τη μέθοδο της ταχείας υγρής χρωματογραφίας ώστε να ληφθεί σε ποσότητα και καθαρότητα κατάλληλη για κρυσταλλογραφικές μελέτες. Τέλος, πραγματοποιήθηκε η συλλογή δεδομένων περίθλασης ακτινών X υψηλής ευκρίνειας και προσδιορίσθηκε η δομή του συμπλόκου της OBP4 με δυο ουσίες, τη γερανυλο-ακετόνη και την καρβακρόλη, οι οποίες έχει αποδειχθεί ότι έχουν εντομοαπωθητική δράση, με σκοπό να καταγραφούν οι αλληλεπιδράσεις και να κατανοηθεί η μοριακή βάση της συγγένειας τους για την πρωτεΐνη. Απώτερος στόχος είναι η εύρεση νέων παραγώγων με βελτιωμένη συγγένεια και εκλεκτικότητα για την πρωτεΐνη.

Στην περίπτωση του ενζύμου φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP), που καταλύει το πρώτο στάδιο της αποικοδόμησης του γλυκογόνου και αποτελεί στόχο για την αντιμετώπιση του διαβήτη τύπου 2, πραγματοποιήθηκε μια σειρά από κινητικές μελέτες με σκοπό τη διερεύνηση του μηχανισμού αναστολής του ενζύμου από το φλαβονοειδές χρυσίνη. Σκοπός της μελέτης είναι η κατανόηση του τρόπου δράσης υπογλυκαιμικών μέσων φυσικής προέλευσης.

ΜΕΡΟΣ 2^ο : ΑΡΧΕΣ ΜΕΘΟΔΩΝ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ

.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

ΑΡΧΕΣ ΜΕΘΟΔΩΝ - ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ

8.1 ΥΛΙΚΑ

Άγαρ, Agar bacteriological, Oxoid Ltd

Αιθανόλη, Ethanol, Sigma

Αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ, EDTA

N, N, N',N'-τετραμεθυλο-αιθυλενοδιαμίνη, TEMED, Sigma

Αμπικιλλίνη, Ampicillin Sodium Salt, Sigma

Αναστολείς πρωτεασών, Complete EDTA free protease inhibitor cocktail tablets, Roche

ANSA (1-Amino-2-hydroxynaphthalene-4-sulfonic acid, NaHSO₃, Na₂SO₃)

L-Αργινίνη, L-Arginine, Sigma

Ακρυλαμίδιο, (Διάλυμα 30%)

Αφυδρογονάση της 6-Φωσφορικής Γλυκόζης, Glucose-6-P dehydrogenase, Sigma

Βενζονάση, Benzonase Nuclease, Sigma

Βουτανόλη, Butanol, Sigma

Bio –Rad Protein Assay Dye Reagent

β-GP, β-glycerol-phosphate, Sigma

Γλυκερόλη, Glycerol plant, Serva

Γλυκογόνο, Glycogen, Sigma

Υδροχλωρική Γουανιδίνη, Guanidine hydrochloride,

Ανηγμένη Γλουταθειόνη, Glutathione reduced,

Οξειδωμένη Γλουταθειόνη, Glutathione oxidized, Sigma

1,6-Διφωσφορική γλυκόζη, Glucose- 1,6- diphosphate potassium salt, Sigma

Δεκτικά κύτταρα Origami B (DE3), Novagen

Διθειοθειτρόλη, DL-Dithiothreitol, DTT, Sigma

Διμέθυλοσουλφοξείδιο, DMSO, Sigma

Δισόξινο Φωσφορικό κάλιο, KH_2PO_4

Δισόξινο Φωσφορικό Νάτριο, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Δωδεκάκυλο-θειικό Νάτριο, Sodium Dodecyl Sulfate, SDS, Sigma

Εκχύλισμα ζύμης (Yeast extract), Fluka

Θειικό οξύ, H_2SO_4 , Sigma

Θρυπτόνη, Tryptone enzymatic digest from casein, Fluka

Ιμιδαζόλιο, Imidazole

Ισοπρόπυλο-1-θειογαλακτοπυρανοζίτης, Isopropyl-β-D1-thiogalactopyranoside, IPTG, Sigma

Καρβενικιλίνη, Carbenisiline, Sigma

Καναμυκίνη, Kanamycine, Sigma

Καφεΐνη, Caffeine, Sigma

Μερκαπτο-αιθανόλη

Μολυβδαινικό Αμμώνιο, Merck

5-μονοφωσφορική αδενοσίνη, Adenosine-5- Monophosphate disodium salt, AMP, Sigma

β- Nicotinamide Adenine dinucleotide phosphate, Sigma

Οξικό νάτριο, Sodium Acetate, CH_3COONa , Sigma

Όξινο Φωσφορικό Δινάτριο, Na_2HPO_4 ,

Οξικό Μαγνήσιο, $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

Πρωτεϊνικοί μάρτυρες, Prestained Protein Ladder, Fermentas

2-άμινο-2-υδροξυμέθυλο-1,3-προπανοδιόλη, Tris (hydroxymethyl)-aminomethane, Sigma

Phenylmethylsulfonyl-fluoride, PMSF, Serva

Τετρακυκλίνη, Tetracycline, Sigma

Triton 100%, Sigma

Υπερθειικό Αμμώνιο, Ammonium Persulfate for electrophoresis, Biorad

Φλαβοπιριδόλη, Flavopiridol, Sigma

Φωσφογλυκομουτάση, Phosphoglycomutase, Sigma

Φωσφορυλάση του γλυκογόνου, Glycogen Phosphorylase

1-Φωσφορική γλυκόζη, Glucose-1-Phosphate, G-1-P, Sigma

Χρωστική Coomasie Brilliant Blue, Sigma

Χλωριούχο Κάλιο, KCl, Sigma

Χλωριούχο Νάτριο, Sodium Chloride, NaCl, Sigma

Χρυσίνη, Chrysin

8.2 Εργαστηριακός εξοπλισμός- Όργανα

Αναδευόμενος επωαστήρας ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας, JFL

Αποστειρωμένα σιφώνια (1 ml, 5 ml, 10 ml)

Αποστειρωμένα τρυβλία, falcons (15,50 ml), eppendorf, tips, inoculation loops

Γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες των 15ml

Δοκιμαστικοί σωλήνες των 10 ml

Θερμοστατούμενο Φασματοφωτόμετρο Cary 100 Conc UV-Vis, Varian

Κασέτα συμπύκνωσης, Pellicon XL Filter, Millipore

Κωνικές φιάλες για καλλιέργειες βακτηρίων (250 ml, 2Lt)

Κυψελίδες χαλαζία τύπου 105.201-QS, Hellma

Κυψελίδες χαλαζία τύπου 16.100 Starna Scientific Ltd

Ομογενοποιητής

Πεχάμετρο, Metrohm

Πιπνέτες ακριβείας Gilson

Πλαστικές κυψελίδες (1,6 ml)

Συσκευή απαέρωσης διαλυμάτων

Συσκευή ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών Mini- Protean 3 cell, Bio-Rad

Συσκευή ήπιας ανάδευσης Super Roller K.L.-600S, Kisker

Συσκευή υπέρηχων

Σύστημα αυτοματοποιημένης κρυστάλλωσης πρωτεϊνών, Oryx, Douglas Instruments, UK

Σύστημα Χρωματογραφίας Äkta Purifier UPC-900 με συσκευή συλλογής κλασμάτων FRAC-900, GE Healthcare

Υπερφυγόκεντρος Optima LE-80K, Beckman-Coulter

Φασματοφωτόμετρο Novaspec II, Pharmacia Biotech

Φίλτρα διήθησης Express Plus Membrane 47 mm, Millipore

Φίλτρα διήθησης Millex-GV Syringe Driven Filter Unit 0,22 μm , Millipore

Φίλτρα συμπύκνωσης Amicon Ultra 10 MWCO, Millipore

Φυγόκεντρος

8.3 Καλλιέργειες βακτηρίων

8.3.1 Αρχή Μεθόδου

Ως καλλιέργεια βακτηρίων χαρακτηρίζεται η ανάπτυξη μεγάλου αριθμού βακτηρίων σε ελεγχόμενες συνθήκες. Εργαστηριακά είναι επιθυμητή η ανάπτυξη ομοιογενών καλλιεργειών, δηλαδή καλλιεργειών που περιέχουν μόνο τα κύτταρα ενδιαφέροντος, γεγονός που καθίσταται δυνατό υπό ασηπτικές συνθήκες με χρήση αποστειρωμένων υλικών και σκευών καθώς και αντιβιοτικών. Ο προσδιορισμός της φάσης ανάπτυξης της καλλιέργειας γίνεται φωτομετρικά στα 600 nm. Η επαγωγή της έκφρασης λαμβάνει χώρα σε οπτική απορρόφηση $\sim 0,6$ δηλαδή στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης των βακτηρίων.

8.3.2 Κύτταρα Origami B (DE3)

Το βακτηριακό στέλεχος Origami B (DE3) διαθέτει μεταλλάξεις στα γονίδια της αναγωγάσης της θειορεδοξίνης (thioredoxin reductase, *trxB*) και της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (glutathione reductase, *gor*) τα οποία παρέχουν οξειδωτικό περιβάλλον που διευκολύνει το σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών αυξάνοντας έτσι και την ποσότητα της σωστά αναδιπλωμένης πρωτεΐνης. Το στέλεχος προέρχεται από μετάλλαξη του *lacZY* γονιδίου του βακτηριακού στελέχους *E. coli* BL21 που επιτρέπει τον έλεγχο των επιπέδων της έκφρασης με καθορισμό της συγκέντρωσης του επαγωγέα IPTG. Ο χαρακτηρισμός του βακτηριακού στελέχους ως DE3 δηλώνει την ύπαρξη του γονιδίου της T7 RNA πολυμεράσης στο γονιδίωμά του, η έκφραση της οποίας βρίσκεται υπό τον έλεγχο του οπερονίου της λακτόζης *lacUV5*. Τα Origami B (DE3) παρουσιάζουν εκλεκτική αντίσταση στα αντιβιοτικά καναμυκίνη και τετρακυκλίνη τα οποία χρησιμοποιούνται ως μέσα επιλογής.

8.3.3 Φορέας έκφρασης pET-22b(+)

Τα πλασμίδια είναι κυκλικά μόρια DNA τα οποία μπορούν να αντιγράφονται ανεξάρτητα από το χρωμόσωμα του κυττάρου ξενιστή. Τα πλασμίδια για να χρησιμοποιηθούν ως φορείς ανασυνδυασμένου DNA πρέπει να έχουν τις εξής ιδιότητες:

A) Μικρό μέγεθος

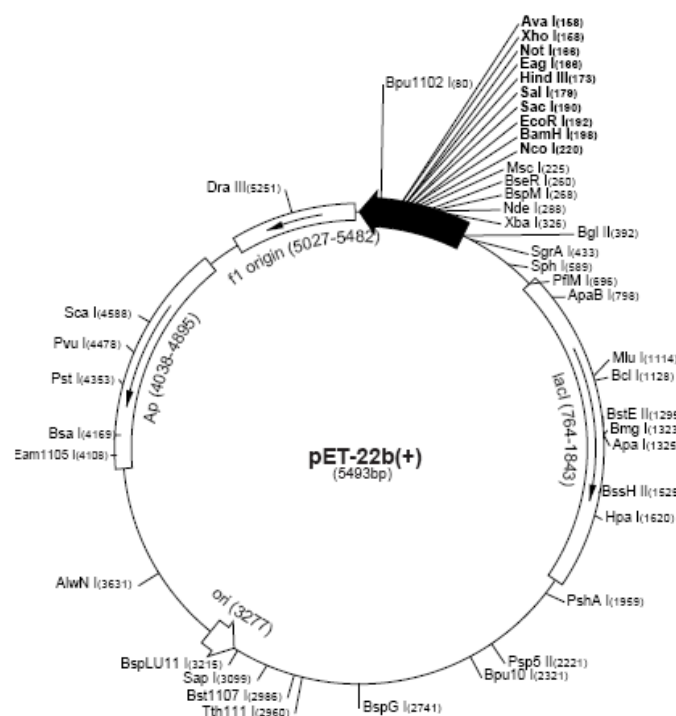
B) Σημείο έναρξης της αντιγραφής (ori C)

Γ) Γονίδια δείκτες (selectable genetic markers) τα οποία είναι συνήθως γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά και έτσι επιτυγχάνεται η επιλογή των κυττάρων που περιέχουν το ανασυνδυασμένο DNA.

Δ) Περιοχή κατάλληλη για την εισαγωγή ξένου DNA, η οποία συνήθως αποτελείται από μια αλληλουχία DNA που περιέχει μοναδικές θέσεις αναγνώρισης από περιοριστικές ενδονουκλεάσες και ονομάζεται πολυσύνδεσμος (polylinker / multiple cloning site).

Ε) Στην περίπτωση που ο φορέας θα χρησιμοποιηθεί και για την έκφραση γονιδίου τότε το πλασμίδιο περιέχει επιπρόσθετα τρεις περιοχές που κωδικοποιούν τον υποκινητή (P), το χειριστή (O) και τον καταστολέα του υποκινητή (I) ο οποίος συνδέεται στο χειριστή και ρυθμίζει τον υποκινητή.

Στην παρούσα εργασία για την κλωνοποίηση του γονιδίου της OBP4 (375 bp) χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pET-22b(+), (5493 bp). Το cDNA της OBP4 εισήχθη στο κατάλληλο πλαίσιο ανάγνωσης με χρήση των περιοριστικών ενδονουκλεασών NdeI και XhoI.



Εικόνα 20 : Χάρτης του φορέα έκφρασης pET-22b(+).

8.3.4 Μετασχηματισμός βακτηριδιακών στελεχών

Το cDNA ενός γονιδίου κλωνοποιημένου σε ένα φορέα έκφρασης μπορεί να εισαχθεί στα βακτήρια με τη τεχνική του μετασχηματισμού βακτηριδιακών στελεχών. Έτσι, τα ανασυνδυασμένα μόρια DNA πολλαπλασιάζονται εντός των βακτηρίων δημιουργώντας ένα σημαντικό αριθμό από αντίγραφα τα οποία φέρουν το τμήμα DNA που κλωνοποιήθηκε. Όταν τα κύτταρα ξενιστές *E.coli* διπλασιάζονται, τα αντίγραφα του ανασυνδυασμένου DNA περνούν και στην επόμενη γενεά.

Στην παρούσα εργασία, τα βακτήρια μετασχηματίστηκαν με τη μέθοδο του θερμικού σοκ που θεωρείται ότι βοηθά να κλείσουν οι ασυνέχειες της κυτταρικής μεμβράνης.

8.3.5 Επιλογή

Επειδή οι φορείς έκφρασης είναι φορείς γενετικών δεικτών που προσδίδουν στα κύτταρα ανθεκτικότητα παρουσία αντιβιοτικών όπως είναι οι καναμυκίνες, η αμπικιλίνη, η καρβενικιλίνη και οι τετρακυκλίνες, είναι δυνατή η επιλογή των επιτυχώς μετασχηματισμένων βακτηρίων. Έτσι, παρουσία κατάλληλων αντιβιοτικών αναπτύσσονται μόνο τα κύτταρα στα οποία έχει εισαχθεί το DNA του πλασμιδίου.⁴⁹ Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν ως μέσα επιλογής τα αντιβιοτικά καναμυκίνη, τετρακυκλίνη, αμπικιλίνη και καρβενικιλίνη. Το πλασμίδιο PET προσδίδει αντίσταση στην αμπικιλίνη.

8.4 Πειραματική πορεία

Αρχικά παρασκευάζεται αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό Luria-Broth medium-agar (LB-Άγαρ) με περιεκτικότητα σε άγαρ 15% (Σύσταση LB: 10 g tryptone, 5 g yeast extract, 10 g NaCl και 15 gr άγαρ ανά λίτρο διαλύματος, pH 7.0). Σε 30 ml LB-άγαρ, προστίθενται αντιβιοτικά επιλογής σε τελική συγκέντρωση 50 µg/ml καρβενικιλίνη, 12.5 µg/ml τετρακυκλίνη και 15 µg/ml καναμυκίνη και επιστρώνεται τρυβλίο petri υπό ασηπτικές συνθήκες. Μετά τη στερεοποίηση του θρεπτικού υλικού το τρυβλίο LB-άγαρ τοποθετείται ανεστραμμένο στους 37°C για μια νύχτα πριν χρησιμοποιηθεί ή αποθηκευθεί στους 4°C για μελλοντική χρήση.

Ακολουθεί επιμόλυνση του τρυβλίου με κύτταρα Origami B (DE3) μετασχηματισμένα με το πλασμίδιο pET22b(+)-OBP4 (φυλαγμένα στους -80°C παρουσία γλυκερόλης 40%) και στη συνέχεια το τρυβλίο επωάζεται στους 37°C για 48 ώρες.

8.5 Υπερέκφραση πρωτεΐνης με επαγωγή

8.5.1 Αρχή μεθόδου

Με τον όρο επαγωγή περιγράφεται η ικανότητα μιας ουσίας να επάγει την έκφραση μιας πρωτεΐνης. Το οπερόνιο *lac* (εικόνα 21) είναι απαραίτητο για τη μεταφορά και το μεταβολισμό της λακτόζης σε βακτήρια *E. coli* και αποτελείται από τρία γονίδια: *lacZ*, *lacY* και *lacA*.

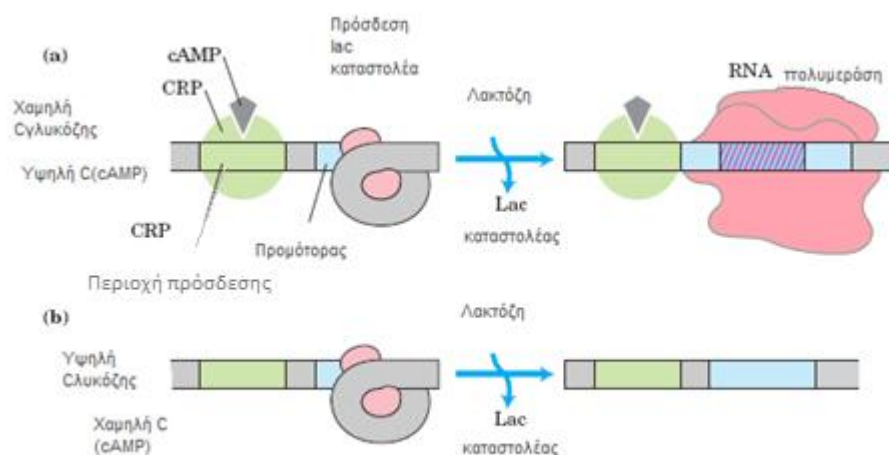


Εικόνα 21: Το οπερόνιο *lac*.

Η είσοδος της λακτόζης στα κύτταρα γίνεται από την περμεάση των β-γαλακτοσιδίων που κωδικοποιείται από το γονίδιο *Lac Y*, ενώ το *Lac A* κωδικοποιεί την τρנסακετυλάση των β-γαλακτοσιδίων. Ο μεταβολισμός της λακτόζης σε γλυκόζη και γαλακτόζη γίνεται από το ένζυμο β-γαλακτοσιδάση το οποίο κωδικοποιείται από το γονίδιο *Lac Z*.

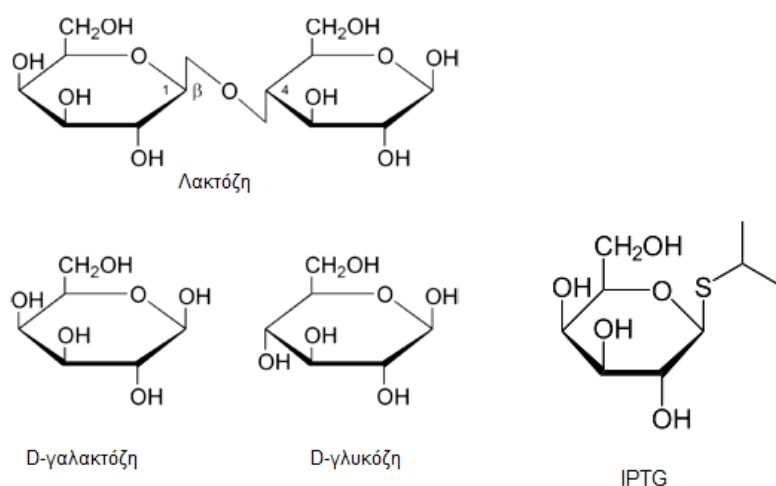
Απουσία λακτόζης ο καταστολέας προσδένεται στον *lac* χειριστή και δεν επιτρέπει την έναρξη της μεταγραφής από την RNA πολυμεράση. Αντίθετα, παρουσία λακτόζης προκαλείται αλλαγή στη διαμόρφωση του καταστολέα και δε μπορεί να προσδεθεί στο χειριστή με αποτέλεσμα την έναρξη της μεταγραφής από την RNA πολυμεράση. Η έκφραση του οπερόνιου *lac* ρυθμίζεται από διάφορους παράγοντες συμπεριλαμβανομένης και της διαθεσιμότητας σε γλυκόζη. Η μεταγραφή συμβαίνει όταν η συγκέντρωση γλυκόζης είναι χαμηλή (οπότε τα επίπεδα του cAMP είναι αυξημένα και προσδένεται το CRP-cAMP) ενώ της λακτόζης είναι υψηλή (οπότε δεν προσδένεται ο *lac* καταστολέας). Αντίθετα χωρίς πρόσδεση του ενεργοποιητή

CRP-cAMP ο προαγωγέας *lac* μεταγράφεται με αργό ρυθμό ακόμη και αν η συγκέντρωση της λακτόζης είναι υψηλή και δεν έχει προσδεθεί ο *lac* καταστολέας⁵² (Εικόνα 22).



Εικόνα 22: Συνδυαστικές επιδράσεις της γλυκόζης και λακτόζης στην έκφραση του *lac* οπερονίου.⁵²

Στην παρούσα εργασία σαν επαγωγέας του *lac* οπερονίου χρησιμοποιήθηκε το IPTG αφού μπορεί να προσδένεται στον *lac* καταστολέα λόγω της δομικής του ομοιότητας με την λακτόζη (Εικόνα 23). Βασικό πλεονέκτημα της χρήσης του IPTG αποτελεί το γεγονός ότι δεν μεταβολίζεται από τα βακτήρια *E. coli* και συνεπώς η συγκέντρωσή του παραμένει σταθερή.



Εικόνα 23: Δομές λακτόζης, D- γαλακτόζης, D-γλυκόζης και IPTG.

8.5.2 Πειραματική πορεία

Μετά από 48 ώρες, 40 ml θρεπτικού μέσου LB που περιέχει τα κατάλληλα αντιβιοτικά (75 µg/ml αμπικιλίνη, 12,5 µg/ml τετρακυκλίνη και 15 µg/ml καναμυκίνη) εμβολιάζονται από μια μεμονωμένη αποικία βακτηρίων και επωάζονται τους 37°C υπό συνεχή ανάδευση (220 rpm) για ~18 ώρες περίπου.

Την επόμενη μέρα 1 Lt θρεπτικού υλικού LB που περιέχει τα παραπάνω αντιβιοτικά προθερμαίνεται στους 37°C και εμβολιάζεται με την μικρή καλλιέργεια σε αναλογία 1:30. Η καλλιέργεια επωάζεται στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση (220 rpm) έως ότου η απορρόφηση στα 600 nm λάβει τιμή 0,6 ($O.D._{600} = 0,6$). Λαμβάνεται 1ml δείγμα καλλιέργειας για ανάλυση με SDS-PAGE. Ακολουθεί επαγωγή της έκφρασης με την προσθήκη IPTG σε τελική συγκέντρωση 1 mM. Η έκφραση πραγματοποιείται υπό συνεχή ανάδευση στους 37°C για 4 ώρες. Λαμβάνεται 1ml δείγμα καλλιέργειας για ανάλυση με SDS-PAGE. Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στα 4000xg για 30 min, στους 4°C και το ίζημα φυλάσσεται στον πάγο (ή στους -20°C για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα).

8.6 Λύση των κυττάρων

8.6.1 Αρχή μεθόδου

Η λύση των κυττάρων είναι μία μέθοδος που περιλαμβάνει τη διάρρηξη της εξωτερικής μεμβράνης τους με αποτέλεσμα την απελευθέρωση των ενδοκυτταρικών τους σωματιδίων. Η λύση των κυττάρων μπορεί να επέλθει α) με χρήση ενός διαλύματος λύσης που προκαλεί τη διάσπαση του κυτταρικού τοιχώματος λόγω διαφοράς της ωσμωτικής πίεσης, β) με χρήση κατάλληλου ενζύμου (λυσοζύμη) το οποίο έχει την ικανότητα να διαρρηγνύει την κυτταρική μεμβράνη γ) με εφαρμογή υπέρηχων στο κυτταρικό διάλυμα όπου η συχνότητα της υπερήχησης μετατρέπεται σε μηχανική ενέργεια που μεταφέρεται ως πίεση στο κυτταρικό τοίχωμα και προκαλεί την διάρρηξη του δ) Προσθήκη αποδιατακτικών μέσων, τα οποία αλληλεπιδρούν με την εξωτερική μεμβράνη των κυττάρων και τη διαρρηγνύουν.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος λύσης παρουσία διαλύματος λυσοζύμης που προκαλεί τη διάσπαση του κυτταρικού τοιχώματος σε συνδυασμό με την εφαρμογή υπερήχων στο κυτταρικό διάλυμα.

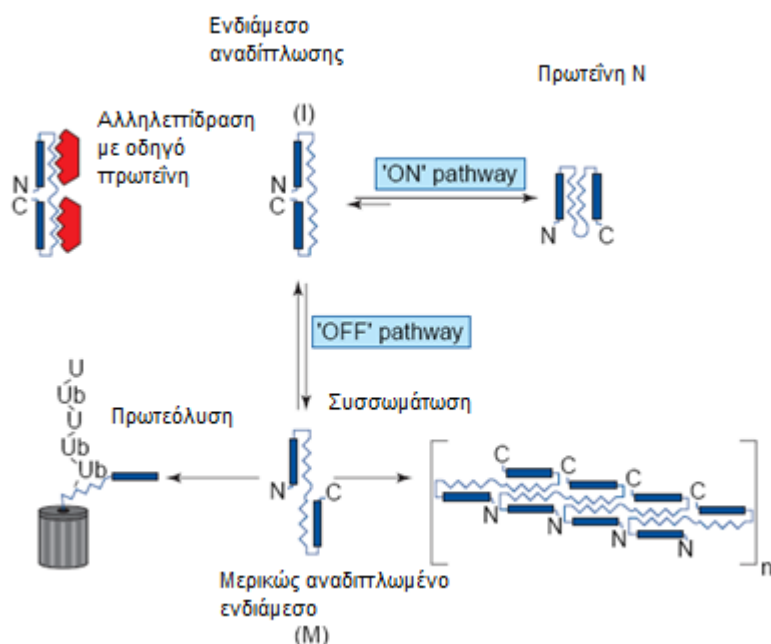
8.6.2 Πειραματική πορεία

Το βακτηριακό ίζημα διαλυτοποιείται σε ~20 ml ρυθμιστικού διαλύματος λύσης (5 ml/gr κυτταρικού ιζήματος) με συνεχή ανάδευση στον πάγο για να αποφευχθεί η πρωτεόλυση. Η σύσταση του διαλύματος λύσης που χρησιμοποιήθηκε είναι 10 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 0.1% Triton, 1mM PMSF και Roche complete (1x). Τα διαλύματα Roche complete και PMSF δρουν ως αναστολείς του συνόλου των πρωτεασών και των πρωτεασών σερίνης αντίστοιχα και συνεπώς εμποδίζουν την πρωτεόλυση. Στη συνέχεια προστίθεται 1μl ένζυμο βενζονάση και το διάλυμα αναδεύεται ήπια για 15 min στους 4°C. Η βενζονάση είναι μια ενδονουκλεάση η οποία αποικοδομεί DNA ή RNA υδρολύοντας τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς μεταξύ των νουκλεοτιδίων και χρησιμοποιείται για την μείωση του ιξώδους του κυτταρικού λύματος. Ακολουθεί λύση των κυττάρων (στον πάγο) με υπέρηχους (6 x 15 sec στα 300 Watt με ενδιάμεση παύση 15 sec).

8.7 Σώματα εγκλεισμού.

8.7.1 Σχηματισμός σωμάτων εγκλεισμού

Τα κύτταρα αποτρέπουν τη συσσώρευση πιθανόν τοξικών συσσωματωμάτων με κατασταλτικούς μηχανισμούς που αναστέλλουν το σχηματισμό τους είτε με τις συνοδούς πρωτεΐνες (chaperones) ή με το πρωτεάσωμα που αποικοδομεί τις λάθος αναδιπλωμένες πρωτεΐνες (Εικόνα 24). Σε περίπτωση όμως που τα συσσωματώματα τελικά σχηματιστούν είναι ανθεκτικά στην πρωτεόλυση και σχηματίζουν τα σώματα εγκλεισμού.³⁵



Εικόνα 24: Σχηματισμός σωμάτων εγκλεισμού.³⁵

Ο σχηματισμός σωμάτων εγκλεισμού συμβαίνει κατά την υπερέκφραση των πρωτεϊνών, γεγονός που διευκολύνει τον καθαρισμό τους διότι τα συγκεκριμένα σωματίδια είναι ομοιογενή.²

Στην παρούσα εργασία η υπερέκφραση της OBP4 οδηγεί στο σχηματισμό σωμάτων εγκλεισμού, στα οποία η πρωτεΐνη είναι βιολογικά ανενεργή και για αυτό απαιτήθηκε η επαναδίπλωσή της με την χρήση του κατάλληλου πρωτόκολλου. Η διαδικασία είναι ιδιαίτερα περίπλοκη καθώς κατά το στάδιο της αναδίπλωσης η συσσωμάτωση ανταγωνίζεται την αναδίπλωση της πρωτεΐνης, με αποτέλεσμα τον περιορισμό της απόδοσης βιολογικά ενεργής πρωτεΐνης.²

8.7.2 Απομόνωση σωμάτων εγκλεισμού

Τα σώματα εγκλεισμού παραλαμβάνονται με φυγοκέντρηση στα 15000xg για 30 min στους 4°C. Λαμβάνεται μικρό δείγμα του ιζήματος για ανάλυση με SDS-PAGE και το υπόλοιπο φυλάσσεται στους -20°C.

8.8 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή (SDS-Page Ηλεκτροφόρηση)

8.8.1 Αρχή μεθόδου

Η μετακίνηση σε ηλεκτρικό πεδίο ενός φορτισμένου μορίου καλείται ηλεκτροφόρηση και προσφέρει έναν αναλυτικό τρόπο διαχωρισμού πρωτεϊνών και άλλων μακρομορίων, όπως DNA και RNA. Η ταχύτητα μετακίνησης (u) της πρωτεΐνης (ή κάθε μορίου) σε ένα ηλεκτρικό πεδίο εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου (E), το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης (z) και τον συντελεστή τριβής (f).

$$u = Ez / f$$

Η ηλεκτροστατική δύναμη Ez που κατευθύνει το φορτισμένο μόριο προς το αντίθετα φορτισμένο ηλεκτρόδιο είναι αντίθετη της τριβής f που εμφανίζεται μεταξύ του μορίου που μετακινείται και του μέσου. Ο συντελεστής τριβής f εξαρτάται από τη μάζα και το σχήμα του μορίου που μετακινείται, καθώς και από το ιξώδες (η) του μέσου. Έτσι, για μια σφαίρα με ακτίνα r

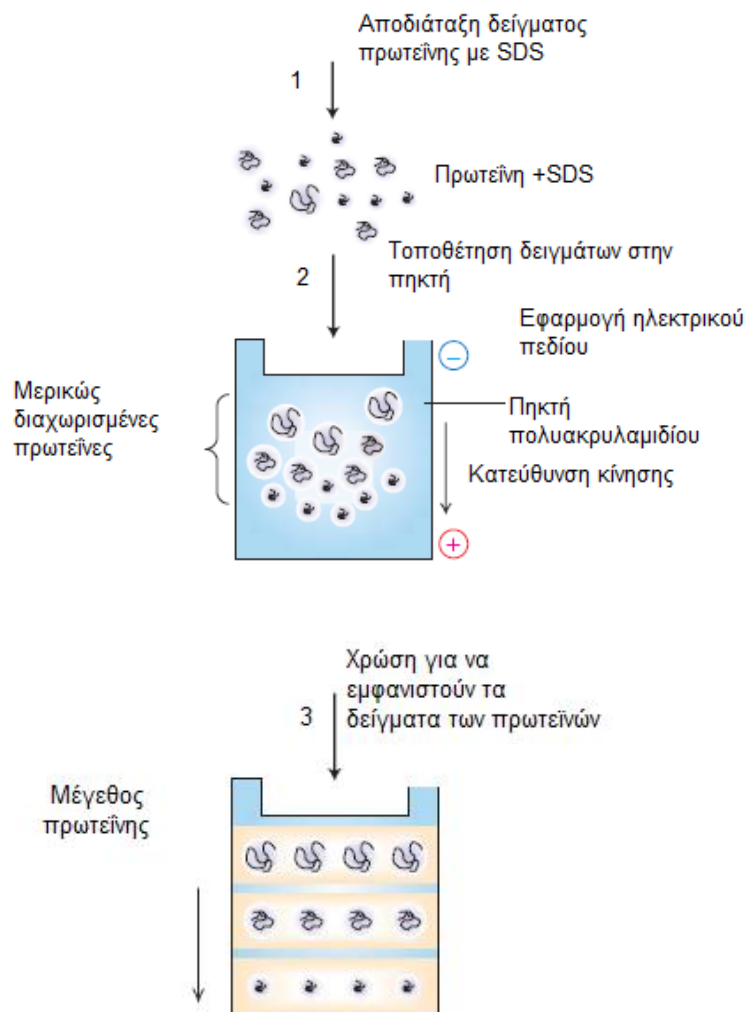
$$f = 6\pi\eta r$$

Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σχεδόν πάντοτε σε πηκτή (πολυακρυλαμιδίου ή άλλου πολυμερούς) διότι η πηκτή λειτουργεί ως μοριακός ηθμός που ενισχύει τον διαχωρισμό. Τα μόρια που είναι μικρά σε σχέση με τους πόρους της πηκτής μετακινούνται εύκολα δια μέσου της πηκτής, ενώ τα μεγάλα μόρια παραμένουν σχεδόν αμετακίνητα. Μόρια ενδιάμεσου μεγέθους μετακινούνται μέσα από την πηκτή με διαφορετικές ταχύτητες. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε μια λεπτή κατακόρυφη πλάκα πολυακρυλαμιδίου και η κατεύθυνση ροής είναι από πάνω προς τα κάτω. Η ηλεκτροφόρηση στη συγκεκριμένη πηκτή προτιμάται διότι το υλικό είναι χημικά ουδέτερο και η παρασκευή της πηκτής εύκολη. Το ακρυλαμίδιο πολυμερίζεται με διασύνδεση μεθυλενο-δισακρυλαμιδίου.

Σε μια ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου κάτω από συνθήκες αποδιάταξης, οι πρωτεΐνες είναι δυνατό να διαχωριστούν κυρίως βάσει της μάζας τους. Το μείγμα των πρωτεϊνών διαλύεται πρώτα σε διάλυμα δωδεκακυλο-θειικού νατρίου (SDS), ενός ανιοντικού απορρυπαντικού που καταστρέφει σχεδόν όλες τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μιας φυσικής πρωτεΐνης. Προστίθεται επίσης μερκαπτοαιθανόλη (2-θειοαιθανόλη) ή διθειοθειτρώλη

(DTT), που ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς. Τα ανιόντα του SDS δεσμεύονται στις κύριες αλυσίδες σε αναλογία ενός μορίου SDS ανά δύο αμινοξέα. Αυτό δίνει στο σύμπλοκο SDS-αποδιατεταγμένη πρωτεΐνη ένα μεγάλο φορτίο, περίπου ανάλογο με τη μάζα της πρωτεΐνης. Το αρνητικό φορτίο που αποκτάται με τη δέσμευση του SDS είναι συνήθως πολύ μεγαλύτερο από το αρχικό φορτίο της φυσικής πρωτεΐνης, επομένως το αρχικό φορτίο καθίσταται αμελητέο. Η αποδιάταξη των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται πλήρως με τη θέρμανση των πρωτεϊνικών δειγμάτων για 5 λεπτά στους 100°C, παρουσία όλων των παραπάνω αποδιατακτικών παραγόντων. Τα σύμπλοκα SDS-αποδιατεταγμένης πρωτεΐνης ηλεκτροφορούνται στη συνέχεια σε πολυακρυλαμίδιο. Τέλος, οι πρωτεΐνες στην πηκτή εμφανίζονται με χρώση αργύρου ή κυανού του Coomassie, που αποκαλύπτει μια σειρά από ζώνες (Εικόνα 25).

Οι μικρές πρωτεΐνες μετακινούνται εύκολα διαμέσου της πηκτής, ενώ οι μεγάλες μένουν στην κορυφή κοντά στο σημείο τοποθέτησης του δείγματος. Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS- πολυακρυλαμιδίου είναι γρήγορη, ευαίσθητη και έχει μεγάλη διαχωριστική ικανότητα. Οι ποσότητες των πρωτεϊνών που απαιτούνται για ανίχνευση είναι εξαιρετικά μικρές, περίπου 0,1 μg (~2pmol) για χρώση με κυανού του Coomassie ή λιγότερο (0,02 μg) όταν χρησιμοποιείται χρώση αργύρου. Με τη συγκεκριμένη μέθοδο είναι δυνατόν να διαχωριστούν εύκολα πρωτεΐνες που διαφέρουν στη μάζα τους κατά 2%.



Εικόνα 25: Σχηματική αναπαράσταση της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου.⁶²

Η αποτελεσματικότητα ενός πρωτεϊνικού καθαρισμού μπορεί να εξεταστεί αναλύοντας ένα μικρό δείγμα κάθε σταδίου με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου. Στα αρχικά στάδια συνήθως εμφανίζεται μεγάλος αριθμός ζωνών που αντιστοιχούν σε πολύπλοκα πρωτεϊνικά μίγματα αλλά καθώς η διαδικασία καθαρισμού εξελίσσεται, ο αριθμός των προσμίξεων ελαττώνεται και στην ιδανική περίπτωση εμφανίζεται μια μοναδική ζώνη που αντιπροσωπεύει την προς καθαρισμό πρωτεΐνη.

8.8.2 Πειραματική πορεία

8.8.2.1 Προετοιμασία πηκτής

Οι πηκτές επιστοίβασης (stacking gel) και διαχωρισμού (running gel) παρασκευάζονται συνήθως σε επίπεδη κατακόρυφη μορφή, πάχους 0,8-2 mm και ποικίλων διαστάσεων σύμφωνα με το πρωτόκολλο Laemmli με χρήση δύο γυάλινων πλακών και ειδικών διαχωριστικών ταινιών (spacers) σε κατάλληλη διάταξη. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων είναι ανάλογες με τον αριθμό των πηκτών που πρόκειται να παρασκευαστούν, ενώ η συγκέντρωση του ακρυλαμίδιου που χρησιμοποιείται εξαρτάται από το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών που θα διαχωριστούν.

Τα αντιδραστήρια APS (Ammonium Persulfate) και TEMED (Tetramethylethylenediamine) προστίθενται στο τέλος, λίγο πριν τη μεταφορά των διαλυμάτων εντός των πλακών προς αποφυγή έναρξης του πολυμερισμού. Η πηκτή διαχωρισμού παρασκευάζεται πρώτη και μεταφέρεται στο χώρο μεταξύ των πλακών σε ποσοστό περίπου 75% και στη συνέχεια προστίθεται ισοβουτανόλη για προστασία της στοιβάδας από την οξείδωση. Μετά την ολοκλήρωση του πολυμερισμού απομακρύνεται η ισοβουτανόλη, παρασκευάζεται η πηκτή επιστοίβασης και διαβιβάζεται στο χώρο μεταξύ των πλακών σχηματίζοντας μια στοιβάδα πάνω στην πηκτή διαχωρισμού. Αμέσως τοποθετείται κατάλληλο πλαστικό διαχωριστικό (χτενάκι) για το σχηματισμό καθορισμένης χωρητικότητας και αριθμού φρεατίων. Η πηκτή παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι τον πλήρη πολυμερισμό της.

Πίνακας 4: Διαλύματα πηκτών επιστοίβασης και διαχωρισμού για SDS-Gel 15%.

Αντιδραστήριο (ml)	Διάλυμα πηκτής επιστοίβασης (5 ml)	Διάλυμα πηκτής διαχωρισμού (5 ml)
Διάλυμα ακρυλαμίδιου (30%)	0.83	2.5
1.0 M Tris (pH 6.8)	0.63	-
1.5 Tris (pH 8.8)	-	1.3
10% SDS	0.05	0.05
10% APS	0.05	0.05
TEMED	0.005	0.002
H ₂ O	Έως 5 ml	Έως 5 ml

8.8.2.2 Ανάλυση SDS-PAGE

Τα δείγματα που ελήφθησαν στα παραπάνω στάδια αναλύονται με SDS-PAGE ως εξής:

1 mL δείγματος καλλιέργειας φυγοκεντρείται στα 4000xg για 30 min στους 4°C. Το ίζημα διασπείρεται σε 50-100 µl ρυθμιστικού διαλύματος 1x (Loading buffer, 50 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% (w/v) SDS, 0,1% μπλε της βρωμοφαινόλης, 100 mM μερκαπτοαιθανόλη, 10% (v/v) γλυκερόλη).

Η γλυκερόλη χρησιμοποιείται διότι αυξάνει το ειδικό βάρος του δείγματος έτσι ώστε να παραμείνει μέσα στο πηγαδάκι, ενώ η χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης περιέχει αρνητικά φορτισμένα μόρια και χρησιμοποιείται ως ένδειξη για την πορεία της ηλεκτροφόρησης. Τα δείγματα θερμαίνονται στους 95°C ώστε να επιτευχθεί η πλήρης αποδιάταξη των πρωτεϊνών και φυγοκεντρούνται στα 11000xg για 10min για να ομογενοποιηθούν.

8.8.2.3 Τοποθέτηση δειγμάτων

Πριν την ηλεκτροφόρηση αφαιρείται το χτενάκι και συναρμολογείται η συσκευή ηλεκτροφόρησης (οι πλάκες τοποθετούνται κατακόρυφα). Στη συνέχεια προστίθεται στη συσκευή ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (SDS running buffer: 25 mM Tris, 250 mM γλυκίνη, 0,1% SDS, pH 8.3), έτσι ώστε να διαβρέχονται οι ελεύθερες επιφάνειες της πηκτής μεταξύ των πλακών και με την τοποθέτηση των ηλεκτροδίων να σχηματιστεί κλειστό κύκλωμα. Στη συνέχεια φορτώνονται τα δείγματα στα φρεάτια, συνδέονται τα ηλεκτρόδια και εφαρμόζεται διαφορά δυναμικού 120V αρχικά και μετά την συσσώρευση των δειγμάτων 160V. Η ηλεκτροφόρηση τερματίζεται όταν το μέτωπο της χρωστικής διατρέξει όλο το μήκος της πηκτής.

8.8.2.4 Χρώση και αποχρωματισμός της πηκτής

Η πηκτή τοποθετείται σε διάλυμα χρώσης (0,1% (w/v) Coomassie Blue R-250, 50% (v/v) μεθανόλη και 5% (v/v) οξικό οξύ) υπό ανάδευση για 10 min. Στη συνέχεια μεταφέρεται σε διάλυμα αποχρωματισμού (50% (v/v) μεθανόλη, 10% (v/v) οξικό οξύ) υπό ανάδευση, μέχρι να απομακρυνθεί η μη ειδικά συνδεδεμένη με την πηκτή χρωστική.

8.9 Έκπλυση των σωμάτων εγκλεισμού

Η έκπλυση των σωμάτων εγκλεισμού γίνεται με χρησιμοποίηση του ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης (Wash Buffer, 50 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 300 mM NaCl, 1mM PMSF, pH 8.0). Το διάλυμα έκπλυσης χωρίζεται σε δυο μέρη στο ένα εκ των οποίων προστίθενται Triton-X σε τελική συγκέντρωση 0.1%. Ακολουθεί έκπλυση δυο φορές των σωμάτων εγκλεισμού με το διάλυμα έκπλυσης παρουσία Triton-X και 2 επιπλέον εκπλύσεις με το διάλυμα χωρίς Triton-X. Η διασπορά των σωμάτων εγκλεισμού γίνεται με τη βοήθεια ομογενοποιητή. Μετά από κάθε έκπλυση ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 17000xg για 1 h στους 4°C. Στο τέλος τα σώματα εγκλεισμού φυλάσσονται στους -20°C.

8.10 Αποδιάταξη των σωμάτων εγκλεισμού.

Αρχικά παρασκευάζεται πρόσφατο διάλυμα αποδιάταξης (Denaturation Buffer)

Πίνακας 5: Διάλυμα αποδιάταξης (pH 8.5)

Αντιδραστήριο	C _{ΤΕΛΙΚΗ}
Tris (acetate)	0,1 M
Υδροχλωρική Γουανιδίνη	6 M
EDTA	2 mM
Ανηγμένη Γλουταθειόνη (GSH)	80 mM

Τα σώματα εγκλεισμού τοποθετούνται στον πάγο και προστίθενται περίπου 13,5 mL του διαλύματος αποδιάταξης, το μίγμα ομογενοποιείται και αναδεύεται ήπια για 2h στους 4°C.

Η αποδιατεταγμένη πρωτεΐνη διαυγάζεται με φυγοκέντρηση στα 17000xg, 30 min, 4°C (1 ή 2 φορές) και προστίθεται στάγδην με προχοΐδα στο παγωμένο διάλυμα αναδίπλωσης υπό ήπια ανάδευση έτσι ώστε να βελτιστοποιηθεί η διαδικασία της αναδίπλωσης της πρωτεΐνης και παραμένει στο διάλυμα για 48-72h στους 4°C.

8.11 Προσδιορισμός της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης με τη μέθοδο Bradford

8.11.1 Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος Bradford αποτελεί γρήγορη και ακριβή μέθοδο προσδιορισμού της συγκέντρωσης μιας πρωτεΐνης. Η τεχνική βασίζεται στην ικανότητα της χρωστικής κυανού του Coomassie G-250 να αλλάζει χρώμα όταν αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες σε όξινο περιβάλλον.

Οι κατιοντικές μορφές της χρωστικής έχουν κόκκινο και πράσινο χρώμα και απορροφούν στα 470 και 650 nm αντίστοιχα, σε αντίθεση με την πιο ανιοντική μορφή της χρωστικής που έχει μπλε χρώμα και παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στα 595 nm. Έτσι, η ποσότητα της πρωτεΐνης προσδιορίζεται από τη μέτρηση της απορρόφησης του διαλύματος στα 595 nm. Η χρωστική δεσμεύεται στα κατάλοιπα αργινίνης, λυσίνης, ιστιδίνης και στα αρωματικά αμινοξέα της πρωτεΐνης.⁵⁰

Με το συγκεκριμένο πρωτόκολλο είναι δυνατός ο προσδιορισμός 10-100 µg πρωτεΐνης.

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης γίνεται από το τύπο

$$C(\text{mg/ml}) = A \times 15.38 / V_{\text{δείγματος}}$$

όπου A= απορρόφηση του δείγματος στα 595 nm

15.38= ο συντελεστής που προέκυψε από τη βαθμονόμηση του διαλύματος Bradford

V= ο όγκος του δείγματος φωτομέτρησης σε µl.

8.11.2 Πειραματική πορεία

Για τον υπολογισμό της συνολικής πρωτεΐνης χρησιμοποιείται η μέθοδος Bradford. Στο τυφλό περιέχεται ποσότητα διαλύματος αποδιάταξης ίση με του δείγματος. Η απορρόφηση 2 µl δείγματος προσδιορίστηκε να είναι $A_{595} = 1,264$ που αντιστοιχεί σε 81 mg συνολικής πρωτεΐνης.

8.12 Αναδίπλωση της πρωτεΐνης

Βάσει της ποσότητας της συνολικής πρωτεΐνης που υπάρχει στο διάλυμα αποδιάταξης παρασκευάζεται διάλυμα αναδίπλωσης (Refolding Buffer pH 8.5) το οποίο διατηρείται παγωμένο.

Για να αναδιπλωθεί σωστά η πρωτεΐνη θα πρέπει στο τελικό διάλυμα αναδίπλωσης η πρωτεϊνική συγκέντρωση να κυμαίνεται από 30-150 $\mu\text{g/ml}$ και η αναλογία ανηγμένης/οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSH/GSSG) θα πρέπει να είναι 4/1.

Πίνακας 6: Διάλυμα αναδίπλωσης, pH 8.5

Αντιδραστήριο	C _{τελική}
Tris (acetate)	0,1 M
L-Αργινίνη	0,5 M
Οξειδωμένη Γλουταθειόνη (GSSG)	0,3075 mM

8.13 Συμπύκνωση της πρωτεΐνης

Το διάλυμα της πρωτεΐνης διαυγάζεται μέσω φίλτρου 0.22 μm (Millipore) και συμπυκνώνεται σε μικρό όγκο (έως 35 ml περίπου) με χρήση της κασέτας συμπύκνωσης Pellicon XL Filter (Millipore) στους 4°C. Η συγκεκριμένη συσκευή περιέχει ένα σύστημα μεμβρανών μέσω του οποίου διέρχεται το προς συμπύκνωση δείγμα της πρωτεΐνης με τη βοήθεια περισταλτικής αντλίας και έτσι επιτυγχάνεται η απομάκρυνση του ύδατος και τελικά η συμπύκνωση της πρωτεΐνης.

8.14 Διαπίδυση πρωτεΐνης

8.14.1 Αρχή μεθόδου

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

εμβαπτίζεται σε μεγάλο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος κατάλληλης ιονικής ισχύος. Η μεμβράνη επιτρέπει την ανταλλαγή των μορίων του διαλύματος, αλλά αποκλείει τη διαφυγή της πρωτεΐνης που είναι εγκλωβισμένη σε αυτή λόγω του μεγάλου μοριακού της βάρους. Έτσι, η συγκέντρωση των διαλυτών συστατικών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρασκευή της πρωτεΐνης μεταβάλλεται μέχρι να επέλθει ισορροπία με το διάλυμα εξωτερικά της μεμβράνης. Με αυτό τον τρόπο είναι δυνατό να αλλάξει η σύσταση του διαλύματος που περιέχει την πρωτεΐνη στόχο πριν ακολουθήσουν τα επόμενα βήματα καθαρισμού της.⁵³

8.14.2 Πειραματική πορεία

Η αναδιπλωμένη πρωτεΐνη τοποθετείται εντός μεμβράνης διαπίδυσης και τίθεται δύο φορές για διαπίδυση σε 1t διαλύματος 10 mM Tris (HCl), pH 8.0 στους 4°C για 6 ώρες και κατά τη διάρκεια της νύχτας, αντίστοιχα.

Την επόμενη μέρα παραλαμβάνεται η πρωτεΐνη και διαυγάζεται με φυγοκέντρηση στα 15000xg για 15 min στους 4°C.

Η συγκέντρωσή της προσδιορίζεται με τη μέθοδο Bradford όπως παραπάνω. Η τιμή της απορρόφησης που λαμβάνεται στα 595nm είναι: $A_{595} = 0,777$ από την οποία υπολογίζεται ότι το δείγμα περιέχει 86 mg συνολικής πρωτεΐνης που υποδεικνύει ότι η πρωτεΐνη από το προηγούμενο στάδιο παραλήφθηκε ποσοτικά χωρίς απώλειες.

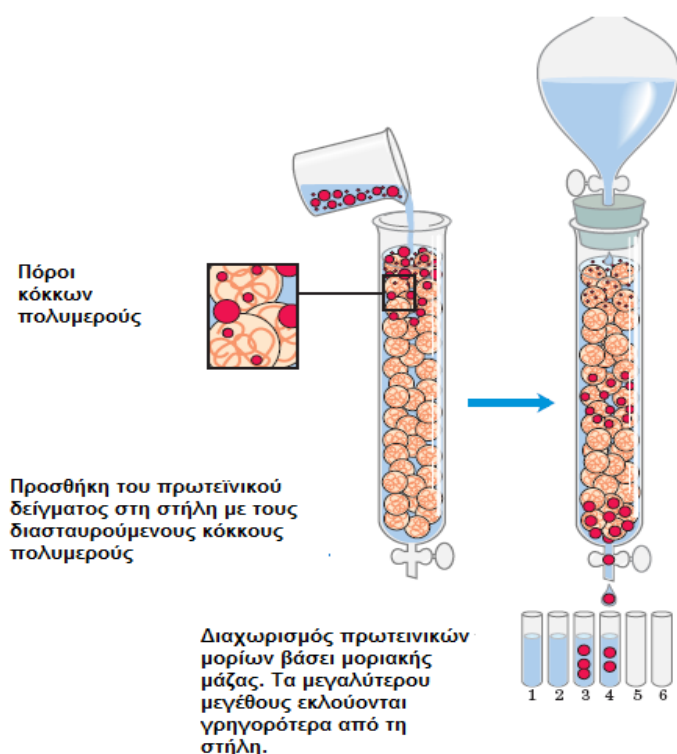
8.15 Καθαρισμός πρωτεΐνης με ταχεία υγρή χρωματογραφία πρωτεϊνών FPLC

8.15.1 Αρχή μεθόδου

Στην υγρή χρωματογραφία πρωτεϊνών χρησιμοποιείται ως πληρωτικό υλικό της χρωματογραφικής στήλης κάποιο πολυμερές όπως είναι η αгарόζη. Οι στήλες του συστήματος της FPLC μπορεί να είναι από πλαστικό ή από γυαλί. Η κινητή φάση είναι υγρή ενώ η σταθερή μπορεί να είναι υγρή ή στερεή.⁵⁰ Η ταχύτητα του διαλύτη στο συγκεκριμένο είδος χρωματογραφίας ρυθμίζεται με σύστημα αντλιών, οι οποίες ελέγχουν συνεχώς τη ροή των διαλυτών.

8.15.1.1 Χρωματογραφία μοριακής διήθησης (Gel filtration chromatography)

Ο καλύτερος διαχωρισμός βάσει του μεγέθους των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται με τη τεχνική της χρωματογραφίας διήθησης σε πηκτή (εικόνα 26). Το δείγμα τοποθετείται στην κορυφή μιας στήλης που αποτελείται από πορώδεις κόκκους από αδιάλυτο πολυμερές, που μπορεί όμως να συγκρατήσει πολύ νερό, όπως για παράδειγμα η δεξτράνη, η αγαρόζη (υδατάνθρακες) ή το πολυακρυλαμίδιο. Τα ονόματα Sephadex, Sepharose ή Biogel είναι κλασσικές εμπορικές ονομασίες αυτών των υλικών που έχουν τυπική διάμετρο 100 μm . Μικρά μόρια περνούν διαμέσου αυτών των κόκκων αλλά τα μεγαλύτερα δε μπορούν να περάσουν, με αποτέλεσμα τα μικρά μόρια να κατανέμονται στο υδατινό περιβάλλον μέσα στους κόκκους και ανάμεσά τους, ενώ τα μεγάλα μόρια βρίσκονται μόνο μεταξύ των κόκκων. Τα μεγάλα μόρια περνούν πιο εύκολα διαμέσου της στήλης και εμφανίζονται πρώτα διότι βρίσκονται σε μικρότερο όγκο υγρού. Τα μόρια με μέγεθος που τους επιτρέπει να περνούν περιστασιακά στους κόκκους θα εκλουσθούν σε ενδιάμεσο χρόνο, ενώ τα μικρά θα εκλουσθούν τελευταία διότι ακολουθούν μια δαιδαλώδη διαδρομή μέσα από τους κόκκους.⁵¹



Εικόνα 26 : Σχηματική απεικόνιση της χρωματογραφίας μοριακής διήθησης.⁵²

8.15.1. 2 Πειραματική πορεία

Ο καθαρισμός της πρωτεΐνης με χρωματογραφία πραγματοποιήθηκε σε σύστημα FPLC (Åkta Purifier UPC-900, GE Healthcare) το οποίο περιλαμβάνει ρυθμιστή της ταχύτητας ροής των διαλυμάτων και του δείγματος στη στήλη, συσκευή συλλογής κλασμάτων και φωτόμετρο υπεριώδους το οποίο ελέγχει συνεχώς την περιεκτικότητα των κλασμάτων σε πρωτεΐνη, με μέτρηση και καταγραφή της απορρόφησης στα 280nm. Ο καθαρισμός της πρωτεΐνης έγινε σε ψυκτικό θάλαμο στους 4°C.

Η στήλη εξισορροπείται με το Διάλυμα έκπλυσης (150 mM Οξικό Νάτριο, pH 5.0) και η έκλουση των πρωτεϊνών γίνεται με το Διάλυμα έκλουσης (150 mM Οξικό Νάτριο, 200 mM Χλωριούχο νάτριο, pH 5.0) (Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται στο χρωματογραφικό καθαρισμό είναι φιλτραρισμένα (0.22 μM) και απαερωμένα, ενώ το νερό που χρησιμοποιείται για την παρασκευή τους είναι υψηλής καθαρότητας 18.2 MΩ/cm (Mili-Q). Παραλαμβάνονται τα κλάσματα που αντιστοιχούν στην κορυφή της καμπύλης έκλουσης και γίνεται ηλεκτροφόρησή τους σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 15%. Στη συνέχεια βάσει της ηλεκτροφόρησης συλλέγονται τα κλάσματα που περιέχουν πρωτεΐνη και τίθενται για διαπίδυση έναντι διαλύματος 150 mM Οξικού Νατρίου, pH 5.0 για μια νύχτα στους 4 °C. Την επόμενη μέρα, η πρωτεΐνη διαυγάζεται με φυγοκέντρηση στα 17000xg, 30 min, 4°C και το υπερκείμενο φυλάσσεται στους 4°C. Ακολούθως, η πρωτεΐνη συμπυκνώνεται με φίλτρο 10KD MWCO (15 ml) με υπερδιήθηση στα 3500xg, 4°C.

Το τελικό δείγμα της πρωτεΐνης διαυγάζεται με φυγοκέντρηση στα 11000xg για 10 λεπτά, στους 4°C και φυλάσσεται στο ψυγείο.

8.16 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης.

8.16.1 Αρχή μεθόδου

Οι πρωτεΐνες απορροφούν στα 280 nm (περιοχή UV) λόγω της ύπαρξης των αρωματικών αμινοξέων τυροσίνης και θρυπτοφάνης ή προσθετικών ομάδων αν υπάρχουν στην πρωτεΐνη.

Σύμφωνα με το νόμο του Beer η απορρόφηση ενός δείγματος δίνεται από τη σχέση:

$$A = E \cdot b \cdot c$$

όπου E (mol cm/lit), ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης

b (cm), το μήκος της οπτικής διαδρομής (της κυψελίδας στην οποία γίνεται η φωτομέτρηση του δείγματος)

και c (mol/lit), η συγκέντρωση του συστατικού του δείγματος που μας ενδιαφέρει.

Επειδή ο αριθμός των συγκεκριμένων αμινοξέων ποικίλει μεταξύ των πρωτεϊνών, ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης, ο οποίος εκφράζεται συνήθως σαν E_{280} , διαφέρει για κάθε ένζυμο.⁵¹ Ο αντίστοιχος συντελεστής της OBP4 είναι 0,342 και για τη GP ο αντίστοιχος συντελεστής είναι 1,32.

Ο λόγος A_{260}/A_{280} αποτελεί ένδειξη της παρουσίας ή μη νουκλεοτιδίων (απορροφούν στα 260 nm) στο πρωτεϊνικό δείγμα. Τιμή του λόγου 0.6-0.7 υποδεικνύει ότι το δείγμα είναι απαλλαγμένο από την παρουσία νουκλεϊνικών οξέων. Στην παρούσα εργασία ο προσδιορισμός του λόγου A_{260}/A_{280} χρησιμοποιήθηκε στον φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό της συγκέντρωσης του ενζύμου φωσφορυλάση του γλυκογόνου, με στόχο την εκτίμηση της παρουσίας νουκλεοτιδίων.

8.16.2 Πειραματική πορεία

Η τελική συγκέντρωση της πρωτεΐνης προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Bradford ($A=0.968$) σε 29.8 mg/ml και φωτομετρικά στα 280 nm ($A_{280}=0.078$, $E_{OBP4}=0.342$) σε 22.8 mg/ml. Ως συγκέντρωση της πρωτεΐνης λαμβάνεται ο μέσος όρος των δύο μεθόδων, δηλαδή 26 mg/ml καθαρής OBP4.

8.17 Κρυστάλλωση πρωτεϊνών

8.17.1 Τεχνικές κρυστάλλωσης

Ο απλούστερος τρόπος για να παραχθούν κρύσταλλοι είναι η ανάμειξη της πρωτεΐνης με το μίγμα κρυστάλλωσης ώστε να δημιουργηθεί ένα υπέρκορο διάλυμα. Το μίγμα κρυστάλλωσης αποτελείται από τα εξής συστατικά: το καταβυθιστικό (precipitant), το ρυθμιστικό διάλυμα (buffer), το οποίο καθορίζει το pH του μίγματος και πρόσθετα (additives). Οι μέθοδοι κρυστάλλωσης που χρησιμοποιούνται είναι :

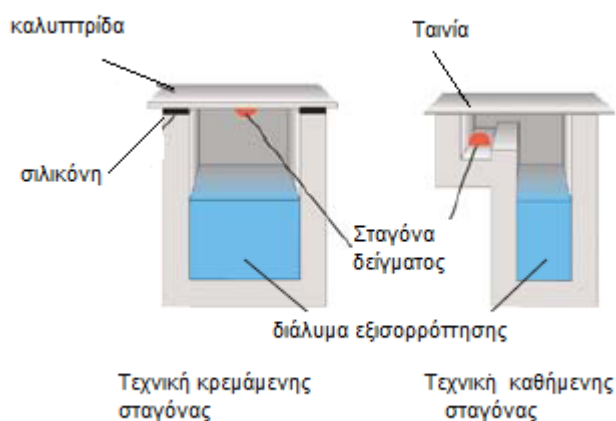
1)Τεχνική άμεσης προσθήκης του παράγοντα κατακρήμνισης (Batch).

Η πρωτεΐνη διαλύεται σε χαμηλής ιοντικής ισχύος διάλυμα για να δώσει διάλυμα υψηλής συγκέντρωσης. Ο παράγοντας κατακρήμνισης (αλάτι ή οργανικός διαλύτης) προστίθεται στη συνέχεια έτσι ώστε να φέρει το διάλυμα σε κατάσταση υπερκορεσμού οπότε μετά την πάροδο ωρών ή ημερών εμφανίζονται οι κρύσταλλοι πρωτεΐνης. Μειονέκτημα της μεθόδου είναι η μικρή δυνατότητα ελέγχου της ανάπτυξης των κρυστάλλων.⁷⁸

2) Τεχνική διάχυσης ατμών

Η μέθοδος είναι ευρέως διαδεδομένη και ιδιαίτερα αποτελεσματική στην παραγωγή κρυστάλλων.⁷⁸ Η τεχνική διάχυσης ατμών (Vapor diffusion) μπορεί να διακριθεί περαιτέρω στις τεχνικές καθήμενης (sitting drop) και κρεμάμενης σταγόνας (hanging drop). Η τεχνική αυτή στηρίζεται στην ελεγχόμενη εξάτμιση του πρωτεϊνικού διαλύματος με εξισορρόπηση με ένα διάλυμα καταβυθιστικού μεγαλύτερης συγκέντρωσης (συνήθως άλατος). Έτσι, ένα διάλυμα πρωτεΐνης με συγκέντρωση άλατος 10% μικρότερη από αυτή που απαιτείται για την κατακρήμνιση της εξισορροπείται με διάχυση ατμών από ένα μεγάλο όγκο διαλύματος άλατος μεγαλύτερης συγκέντρωσης. Τα δυο διαλύματα τοποθετούνται ξεχωριστά εντός καλά κλεισμένου δοχείου που ιδανικά εμποδίζει την ανταλλαγή μάζας και ενέργειας με το περιβάλλον. Μόρια ύδατος μεταφέρονται σταδιακά μέσω της φάσης των ατμών από το πρωτεϊνικό διάλυμα στο πιο συγκεντρωμένο διάλυμα άλατος έως ότου επέλθει ισορροπία και οι κρύσταλλοι σχηματίζονται καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του πρωτεϊνικού διαλύματος. Πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι οι μικρές ποσότητες πρωτεΐνης που χρησιμοποιούνται, η εύκολη παρακολούθηση της πορείας κρυστάλλωσης, η απλότητα και το χαμηλό κόστος.

Στις κρυσταλλώσεις με την τεχνική κρεμάμενης σταγόνας, η σταγόνα του πρωτεϊνικού διαλύματος τοποθετείται σε καλυπτρίδα και αναμιγνύεται με κατάλληλο όγκο διαλύματος καταβυθιστικού από το φρεάτιο. Στη συνέχεια η καλυπτρίδα τοποθετείται στο στόμιο του φρεατίου και κλείνει αεροστεγώς⁹ (Εικόνα 27).



Εικόνα 27: Τεχνικές κρυστάλλωσης πρωτεϊνών. ³¹

Στη τεχνική καθήμενης σταγόνας, η σταγόνα του πρωτεϊνικού διαλύματος τοποθετείται σε ένα ξεχωριστό διαμέρισμα, ενώ για την κάλυψη των φρεατίων χρησιμοποιείται διαφανής κολλητική ταινία ⁹ (Εικόνα 27).

3) Διαπίδυση (Dialysis)

Στη συγκεκριμένη μέθοδο η ιοντική ισχύς και το pH του πρωτεϊνικού διαλύματος που περιέχεται στη μεμβράνη διαπίδυσης ρυθμίζεται με εξισορρόπηση. Όταν ο όγκος της διαθέσιμης πρωτεΐνης είναι μεγάλος (πχ. 1 ml) μπορεί να τοποθετηθεί σε μεμβράνη διαπίδυσης και να εμβαπτιστεί σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα. Η κατάσταση υπερκορεσμού προσεγγίζεται βαθμιαία μέσω διάχυσης του εξωτερικού ρυθμιστικού διαλύματος κατάλληλης σύστασης έτσι ώστε να επιτευχθεί ο σχηματισμός πυρήνων και η ανάπτυξη κρυστάλλων. Άμορφα ιζήματα ή μικροκρύσταλλοι μπορούν να επαναδιαλυτοποιηθούν με αλλαγή των εξωτερικών συνθηκών και να επαναληφθεί η δοκιμασία.⁷⁸

8.17.2 Πειραματική πορεία

Η κρυστάλλωση της πρωτεΐνης (σε συγκέντρωση 15mg/ml) έγινε με χρήση της συσκευής αυτοματοποιημένης (ρομπότ) κρυστάλλωσης πρωτεϊνών, (Oryx, Douglas Instruments, UK) εφαρμόζοντας τη τεχνική καθήμενης σταγόνας και τα εμπορικά διαθέσιμα σύνολα συνθηκών (screening kits) JCSG⁺ και PEG. Οι συνθήκες στις οποίες σχηματίστηκαν κρύσταλλοι

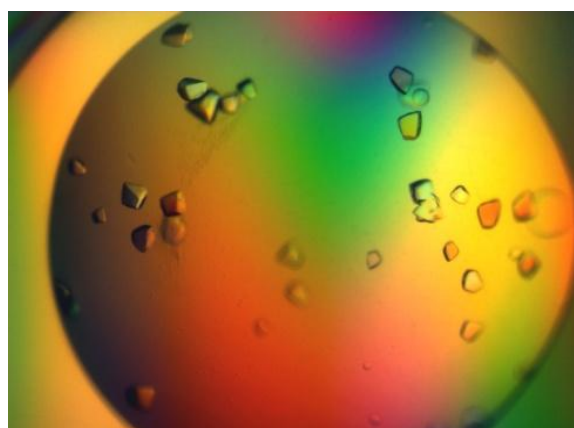
φαίνονται στον πίνακα 7. Οι καλύτερα σχηματισμένοι κρύσταλλοι αναπτύχθηκαν στη συνθήκη C11 (Εικόνα 28).

Για την δομική μελέτη της πρωτεΐνης σε σύμπλοκο με τους προσδέτες, προσχηματισμένοι κρύσταλλοι που αναπτύχθηκαν στη συνθήκη C11 εμβαπτίστηκαν σε διαλύματα των προσδετών καρβακρόλη και γερανυλο-ακετόνη για 3 και 13 ώρες αντίστοιχα.

Επιπλέον έγινε προσπάθεια συγκρυστάλλωσης της πρωτεΐνης με τους προσδέτες σε τρεις συνθήκες (A1, A7, B1) στις οποίες είχαν σχηματιστεί κρύσταλλοι πρωτεΐνης. Στη σταγόνα η αναλογία πρωτεΐνης: προσδέτη ήταν 1:1,5. (1mM πρωτεΐνη:1,5 mM προσδέτη). Η συγκρυστάλλωση δεν απέδωσε κρυστάλλους πιθανότατα λόγω της παρεμπόδισης σχηματισμού τους από τους προσδέτες.

Πίνακας 7: Συνθήκες κρυστάλλωσης της πρωτεΐνης OBP4

JCSG ⁺	C11	0.1M Οξικό Νάτριο 2.0 M Θειικό Αμμώνιο	pH4.6
PEG	A1	0.1M Οξικό Νάτριο 40% v/v PEG 200	pH 4.6
PEG	A7	0.1M MES 40% v/v PEG 200	pH 6.5
PEG	B1	0.1M Hepes 40% v/v PEG 200	pH 7.5



Εικόνα 28: Κρύσταλλοι πρωτεΐνης OBP4 στη συνθήκη κρυστάλλωσης C11.

8.18 Συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων

8.18.1 Κρυοπροστασία των κρυστάλλων

Στις περιπτώσεις που γίνεται συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων σε κρυογονικές θερμοκρασίες (κρυοκρυσταλλογραφία) για να ελαχιστοποιηθεί η καταστροφή του κρυστάλλου πρωτεΐνης από την ακτινοβολία, απαιτείται η κρυοπροστασία των κρυστάλλων. Με τον όρο κρυοπροστασία εννοείται η παρεμπόδιση δημιουργίας πάγου στο μητρικό διάλυμα που περιβάλλει τον κρύσταλλο και περιέχεται σε αυτόν, γεγονός που θα επέφερε την καταστροφή του κρυσταλλικού πλέγματος.⁹

Οι ουσίες που εμποδίζουν την δημιουργία πάγου κατά την ταχεία ψύξη των κρυστάλλων σε ρεύμα αζώτου, ονομάζονται κρυοπροστατευτικά και σε αυτές ανήκουν διάφορες τάξεις ουσιών όπως το PEG 400, η γλυκερόλη, η αιθυλενογλυκόλη και το MPD. Μάλιστα έχει βρεθεί ότι ο συνδυασμός κρυοπροστατευτικών με κάποια έλαια βελτιώνει την ευκρίνεια.^{9,32} Η κρυοπροστασία των πρωτεϊνικών κρυστάλλων αποτελεί πολύ σημαντικό βήμα στην παραλαβή καλών δεδομένων περίθλασης και γίνεται με τους εξής τρόπους: α) με κρυοπροστατευτικά που υπάρχουν ήδη στο μητρικό διάλυμα, β) με εμβάπτισμό του κρυστάλλου σε αυτά.

8.18.2 Συλλογή δεδομένων στους 100K.

Η συλλογή δεδομένων σε κρυογονικές συνθήκες πραγματοποιείται με την εξής τεχνική: Αφού παραληφθεί ο κρύσταλλος της πρωτεΐνης από το μητρικό διάλυμα με τη βοήθεια μιας μικρής θηλιάς, η οποία είναι φτιαγμένη από λεπτό νήμα, εμβαπτίζεται στο κρυοπροστατευτικό διάλυμα. Το υγρό σχηματίζει λεπτό φιλμ στο οποίο συγκρατείται ο κρύσταλλος λόγω της επιφανειακής τάσης που αναπτύσσεται. Ακολουθεί η ταχεία τοποθέτηση του κρυστάλλου σε ρεύμα ψυχρού αζώτου (100K), που συνοδεύεται από την δημιουργία ενός λεπτού υαλώδους φιλμ.

8.18.3 Πειραματική πορεία

Οι κρύσταλλοι διαβρέχτηκαν με διάλυμα που περιείχε 0.1 M Οξικού νατρίου, 2.0 M Θειικό αμμώνιο (pH 4.6) και γλυκερόλη ως κρυοπροστατευτικό (σε τελική συγκέντρωση 20%), προτού τοποθετηθούν σε θηλιά και ψυχθούν

ακαριαία σε ρεύμα ψυχρού αζώτου (100K) που δημιουργείται με τη βοήθεια ψυκτικής συσκευής. Ακολούθησε η συλλογή των περιθλαστικών δεδομένων στο σταθμό X13 SRS EMBL Hamburg (πίνακας 8).

Πίνακας 8: Συνθήκες Ακτινοβολήσης των κρυστάλλων.

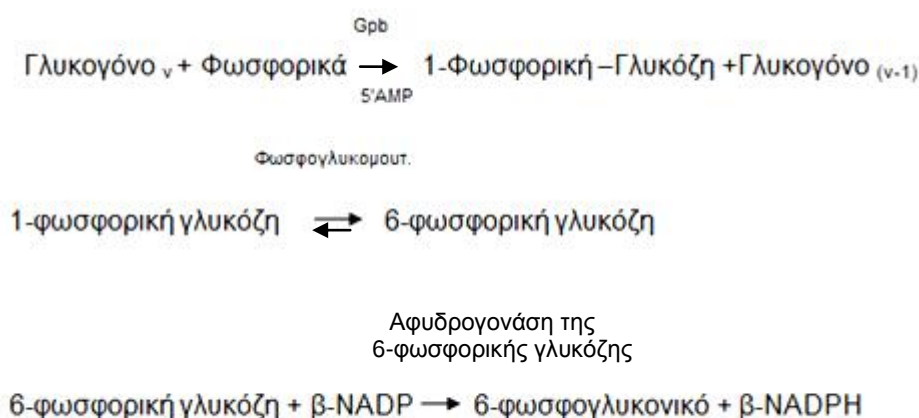
Ουσία	T(K)	Ευκρίνεια (Å)	Χρόνος έκθεσης του κρυστάλλου στη ακτίνα (s)	ΧΤFD (mm)	ΔΦ°	No περιθλασμάτων
Καρβακρόλη	100	2	30	185,6	0,5	200
Γερανυλο- ακετόνη	100	2	20	185,6	0,5	150

8.19 Κινητική μελέτη της GP παρουσία αναστολέων (χρυσίνης, φλαβοπιριδόλης) στην κατεύθυνση της σύνθεσης του γλυκογόνου.

Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στην κατεύθυνση της σύνθεσης του γλυκογόνου η δραστηριότητα της GPb (5μg/ml) προσδιορίστηκε παρουσία σταθερής ή μεταβλητής συγκέντρωσης AMP, σταθερής συγκέντρωσης γλυκογόνου (1%), Glc-1-P (1-20 mM) και αναστολέα χρυσίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις σε ρυθμιστικό διάλυμα (0.5 β-GP: 0.5 μερκαπτοαιθανόλη: 0.01 EDTA) mM, pH 6.8. Ο αναστολέας διαλυτοποιήθηκε σε DMSO 100%, ενώ η τελική συγκέντρωση του διαλύτη στην αντίδραση ήταν 1%. Το μίγμα της αντίδρασης που περιείχε τη φωσφορυλάση με το γλυκογόνο προεπωάστηκε για 15 λεπτά στους 30°C, πριν την έναρξη της αντίδρασης με την προσθήκη της Glc-1-P. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 900 μl και ο τερματισμός της έγινε με SDS σε τελική συγκέντρωση 0,2%. Ακολούθησε προσθήκη αντιδραστήριου AMOR-ANSA και φωτομέτρηση των δειγμάτων στα 660nm, όπου μετρήθηκε φωτομετρικά το χρώμα που αναπτύσσεται από την συμπλοκοποίηση των φωσφορικών ιόντων (Pi) που προκύπτουν από την

αντίδραση με το μολυβδαινικό αμμώνιο. Επίσης μετρήθηκαν και τυφλά δείγματα γλυκογόνου και Glc-1-P η απορρόφηση των οποίων αφαιρέθηκε από εκείνη των δειγμάτων. Τέλος, οι δραστηκότητες υπολογίστηκαν με κατάλληλη επεξεργασία στο πρόγραμμα μη γραμμικής παλινδρόμησης Grafit.⁸⁹

8.20 Κινητική μελέτη του ενζύμου GP παρουσία αναστολέων (χρυσίνης, φλαβοπιριδόλης) στην κατεύθυνση της διάσπασης του γλυκογόνου.



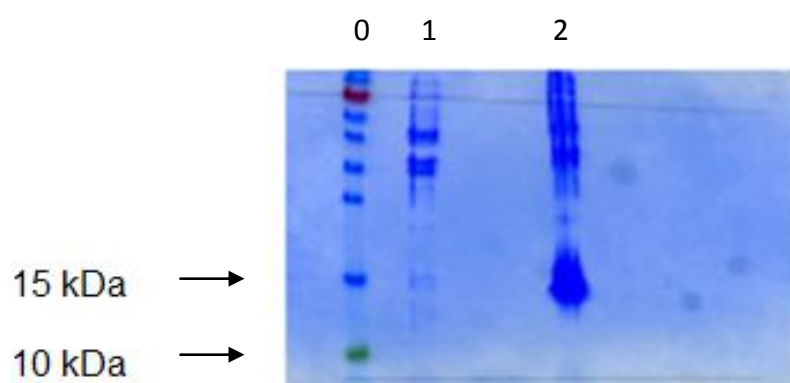
Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στην κατεύθυνση της αποικοδόμησης του γλυκογόνου, η δραστηκότητα της GPb προσδιορίστηκε σε αντίδραση όγκου 300μl η οποία περιείχε 1,2 μg ενζύμου, 0,1% γλυκογόνο, 10 μg φωσφογλυκομουτάση, 4 μg αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης, 1mM NADP, 1μM 1,6-διφωσφορική γλυκόζη και 10 mM οξικό μαγνήσιο σε ρυθμιστικό διάλυμα (20 ιμιδαζόλιο:10 β-μερκαπτοαιθανόλη: 0.15 EDTA) mM, pH 6.8. Οι μελέτες έγιναν είτε με σταθερή συγκέντρωση AMP (0,2 mM) σε διάφορες συγκεντρώσεις Pi (1-16 mM) ή με σταθερή συγκέντρωση Pi (4 mM) και διαφορετικές συγκεντρώσεις AMP (0,010-0,5 mM) παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων αναστολέα (χρυσίνης ή φλαβοπιριδόλης) σε τελική συγκέντρωση DMSO 1%. Η θερμοκρασία κατά τη διάρκεια του πειράματος ήταν 30°C και η αντίδραση διακόπηκε με SDS σε τελική συγκέντρωση 0,1% σε χρόνους εντός της γραμμικής περιοχής της αντίδρασης. Η απελευθέρωση του NADPH που σχηματίστηκε στην αντίδραση προσδιορίστηκε με φωτομέτρηση των δειγμάτων στα 340 nm.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

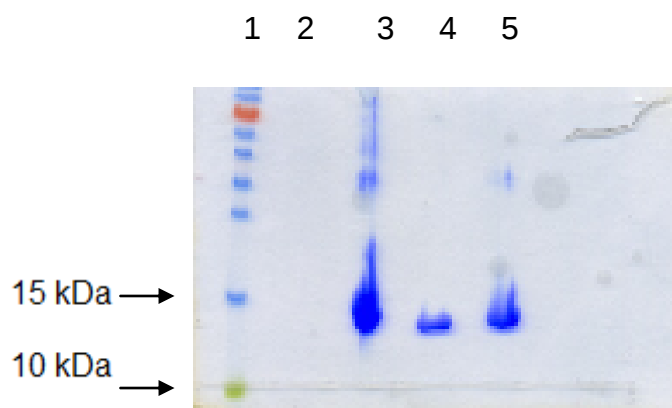
9.1 Αποτελέσματα έκφρασης και καθαρισμού της πρωτεΐνης OBP4.

Η έκφραση και ο καθαρισμός της πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 8. Αρχικά έγινε έλεγχος της έκφρασης της πρωτεΐνης με SDS-PAGE σε δείγματα που συλλέχθηκαν πριν και μετά την επαγωγή με το IPTG. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στην παρακάτω πηκτή πολυακρυλαμίδιου 15% (εικόνα 29), όπου φαίνεται πως η πρωτεΐνη εκφράζεται μετά την επαγωγή με IPTG σε τελική συγκέντρωση 1 mM.



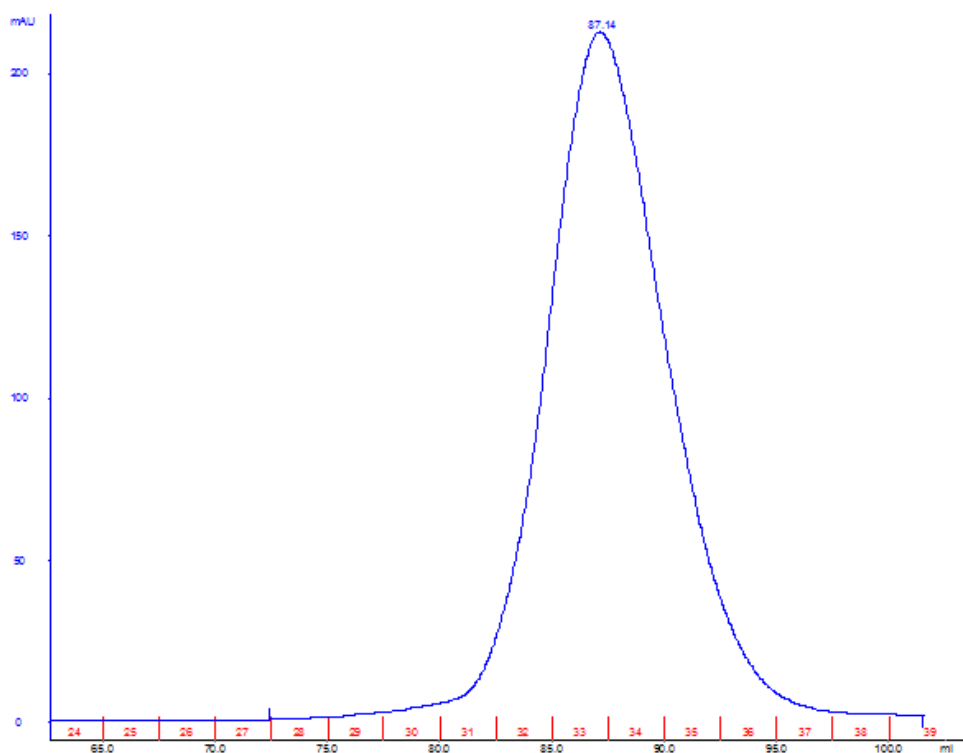
Εικόνα 29: Πηκτή 15% ελέγχου έκφρασης. Φαίνονται τα δείγματα [0] πρωτεϊνικοί μάρτυρες, 5 μl [1] δείγμα συνολικού κυτταρολύματος προ της επαγωγής, 10 μl [2] δείγμα συνολικού κυτταρολύματος μετά την επαγωγή, 10 μl.

Ακολουθεί έλεγχος της έκφρασης της πρωτεΐνης όπου φαίνεται η έκφραση στο κυτταρικό ίζημα (Εικόνα 30).



- (1) Μάρτυρας 5 μ l
- (2) Δείγμα υπερκείμενου 10 μ l
- (3) Δείγμα ιζήματος 10 μ l
- (4) Δείγμα ομογενοποιημάτος (Wash+ inclusion bodies) 10 μ l
- (5) Δείγμα μετά την έκπλυση των σωμάτων εγκλεισμού 10 μ l

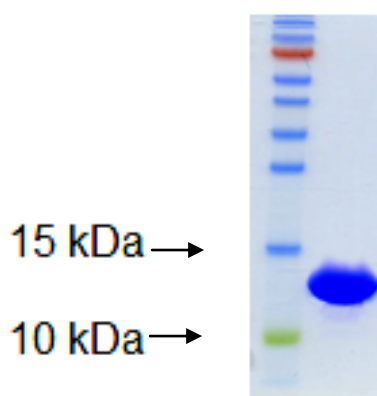
Εικόνα 30: Πηκτή 15%.



Εικόνα 31 : Καθαρισμός της OBP4 με χρωματογραφία μοριακής διήθησης.

Ακολουθώς συλλέγονται δείγματα των κλασμάτων της στήλης που αντιστοιχούν στην κορυφή του χρωματογραφήματος (εικόνα 35) και

αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση. Η τελική πρωτεΐνη ήταν πολύ υψηλής καθαρότητας όπως φαίνεται από την ανάλυση SDS-PAGE (εικόνα 36).



Εικόνα 32: Πηκτή 15% δείγματος πρωτεΐνης OBP4 μετά από χρωματογραφικό καθαρισμό. Στην εικόνα φαίνεται το δείγμα πρωτεϊνικού μάρτυρα και το δείγμα πρωτεΐνης που προέκυψε από την συνένωση των κλασμάτων που αντιστοιχούν στη κορυφή του χρωματογραφήματος.

9.2 Επεξεργασία κρυσταλλογραφικών δεδομένων

Η επεξεργασία των κρυσταλλογραφικών δεδομένων έγινε με τη βοήθεια των προγραμμάτων MOSFLM και SCALA του CCP4.^{86,87} Από την επεξεργασία προήλθε ένα σύνολο οπτικών εντάσεων I οι οποίες μετατράπηκαν σε δομικούς παράγοντες F με το πρόγραμμα TRUNCATE⁷⁴. Ακολούθησαν πολλαπλοί κύκλοι διόρθωσης του μοντέλου με το πρόγραμμα COOT⁷⁵ και βελτιστοποίησης με το πρόγραμμα REFMAC⁷⁶. Σε αυτό το στάδιο προστέθηκαν μόρια ύδατος σε κενές κορυφές ηλεκτρονιακής πυκνότητας του χάρτη 2Fo-Fc (σ 1.0) εφόσον ανέπτυσαν αλληλεπιδράσεις με την πρωτεΐνη ή με άλλα μόρια ύδατος και διέθεταν τιμές θερμικών παραγόντων $B < 60 \text{ \AA}^2$. Τα μόρια των ενώσεων καρβακρόλη και γερανυλο-ακετόνη συμπεριλήφθηκαν κατά τα τελικά στάδια της διαδικασίας της βελτιστοποίησης (refinement), ενώ τα αρχικά τους μοντέλα προήλθαν από την σχεδίαση στο Dundee Server PRODRG. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε διόρθωση των αρχικών μοντέλων μέσω του προγράμματος COOT και βελτιστοποίηση με το πρόγραμμα REFMAC του CCP4. Ανάλυση του διαγράμματος Ramachandran (ϕ - ψ) έδειξε πως όλα τα αμινοξέα βρίσκονταν στις επιτρεπόμενες περιοχές. Ο σχεδιασμός των δομών έγινε με το πρόγραμμα PyMOL.⁷⁷

Για να εκτιμηθεί η ποιότητα των στερεοχημικών μοντέλων που προέκυψαν χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα PROCHECK του CCP4 και η ανάλυση των δομών έγινε με τα προγράμματα CONTACTS και ANGLES του CCP4.⁸⁸ Οι δεσμοί υδρογόνου αποδίδονται μεταξύ ηλεκτραρνητικών ατόμων με απόσταση μικρότερη των 3.3 Å και εάν η γωνία μεταξύ αυτών των ατόμων και των προηγούμενων τους είναι μεγαλύτερη από 90°. Οι αλληλεπιδράσεις van der Waals αποδίδονται μεταξύ ατόμων (εκτός υδρογόνου) όταν η απόσταση τους είναι μικρότερη από 4 Å.

9.3 Αποτελέσματα επεξεργασίας κρυσταλλογραφικών δεδομένων

9.3.1 Σύμπλοκο OBP4- καρβακρόλη

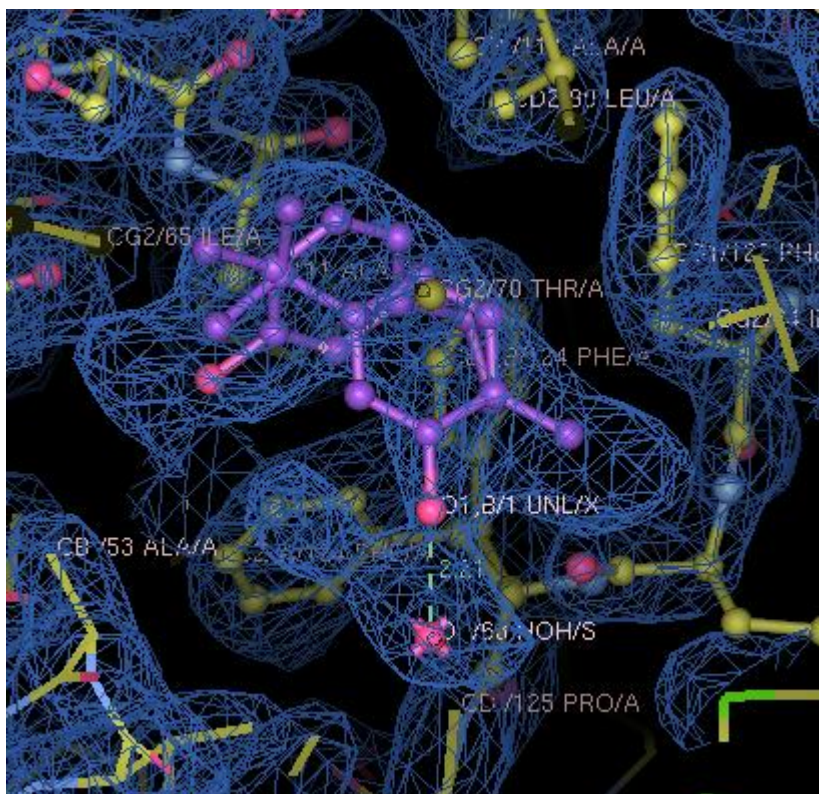
Οι κρύσταλλοι του συμπλόκου OBP4-καρβακρόλη ανήκουν στην ομάδα συμμετρίας χώρου $P 3_121$. Στον πίνακα 9 που ακολουθεί καταγράφονται τα στατιστικά της συλλογής των κρυσταλλογραφικών δεδομένων και της βελτιστοποίησης της δομής των συμπλόκων OBP4-καρβακρόλη και OBP4-γερανυλο-ακετόνη.

Πίνακας 9. Περίληψη των δεδομένων περίθλασης και στατιστική ανάλυση της βελτιστοποίησης του συμπλόκου OBP4-καρβακρόλης και OBP4-γερανυλο-ακετόνη.

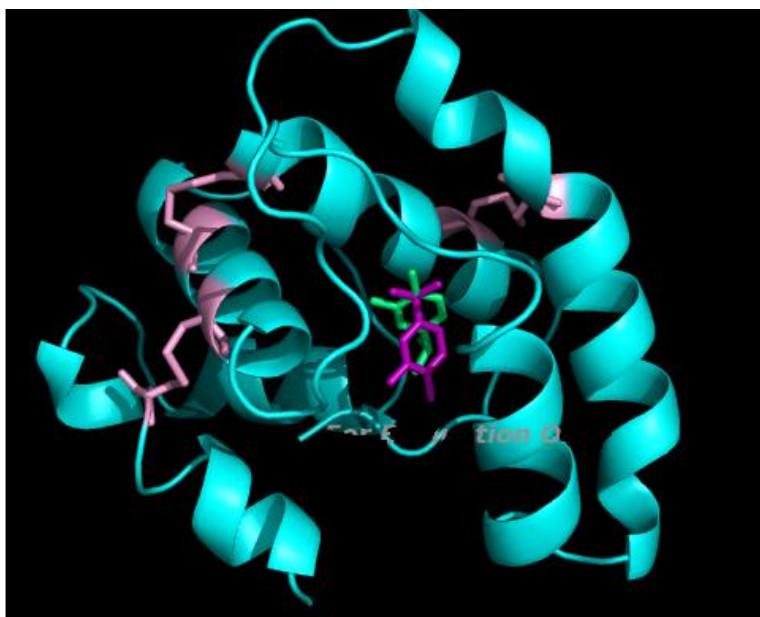
Σύμπλοκο	OBP4-καρβακρόλη	OBP4-γερανυλο-ακετόνη
Ομάδα χώρου	P 3 ₁ 21	P 3 ₁ 21
Διαστάσεις κυψελίδας (Å, °)	51.93 51.93 87.34 90.00 90.00 120.00	52.21 52.21 87.68 90.00 90.00 120.00
Εξωτερική στοιβάδα (Å)	2.21-2.1	2.32-2.2
Περιθλάσεις	170434	182926
Μοναδικές περιθλάσεις	8404	7443
<I/σI>	27.5 (3.1)	10.7 (2.8)
Πληρότητα (%)	100 (98.7)	100 (98.3)
Πολλαπλότητα	6.0 (4.6)	4.3 (3.3)
R _m	0.487	0.472
Εύρος Ευκρίνειας	29.113-2.1	29.227-2.2
Περιθλάσεις που χρησιμοποιήθηκαν	12.250	7044
Αριθμός αμινοξέων	116 (9-125)	118 (7-125)
Αριθμός μορίων ύδατος	80	70
Αριθμός μορίων προσδέτη	2	1
R	0.217	0.2233
R _{free}	0.282	0.2618
R _{msd} απόκλιση από τις ιδανικές τιμές στα μήκη δεσμών	0.0129	0.0154
R _{msd} απόκλιση από τις ιδανικές τιμές στα μήκη γωνιών	1.3754	1.5701
Μέσος όρος B (Å ²)		
Στα πρωτεϊνικά άτομα	27.687	32.207
Στα μόρια ύδατος	35.776	36.731
Στα μόρια προσδέτη	36.239	59.974

Οι τιμές στις παρενθέσεις είναι για την εξωτερική στιβάδα. $R_{\text{symm}} = \sum_h \sum_i |I(h) - I_i(h)| / \sum_h \sum_i I_i(h)$ όπου $I_i(h)$ και $I(h)$ είναι η i th και η μέση μέτρηση της οπτικής πυκνότητας της περίθλασης h . $R_{\text{cryst}} = \sum_h |F_o - F_c| / \sum_h F_o$, όπου F_o και F_c είναι τα πλάτη των πειραματικών και θεωρητικών δομικών παραγόντων της περίθλασης h , αντίστοιχα. R_{free} υπολογίζεται όπως και ο R_{cryst} από ένα τυχαίο υποσύνολο (5% του συνόλου) των περιθλάσεων το οποίο δεν χρησιμοποιείται στη διαδικασία της βελτιστοποίησης.

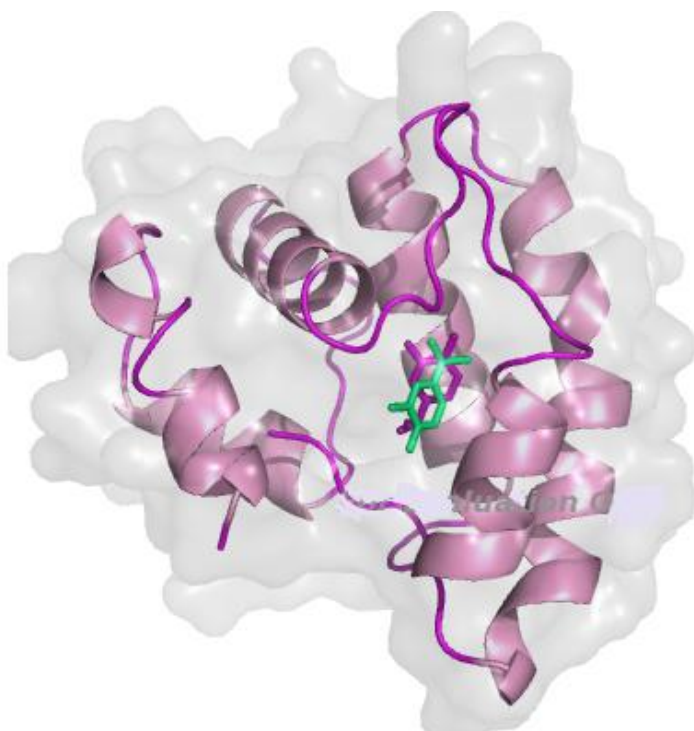
Από την δομική μελέτη του συμπλόκου σε ευκρίνεια 2.1Å προέκυψε ότι αυτό κρυσταλλώνεται σαν μονομέρες στην ασύμμετρη μονάδα και αποτελείται από έξι α-έλικες όπως οι κλασσικές OBPs, οι οποίες σχηματίζουν μια υδρόφοβη περιοχή πρόσδεσης (Εικόνα 34). Η υδρόφοβη περιοχή πρόσδεσης οριοθετείται από τα μη πολικά αμινοξέα Phe122, Phe124, Ile65, τα ασθενώς πολικά Thr58, Thr70, Gln73 και τα Ala111 και Ala107. Η ανάλυση των χαρτών ηλεκτρονιακής πυκνότητας υπέδειξε την δυνατότητα σύνδεσης της καρβακρόλης στο κέντρο σύνδεσης με 2 διαφορετικές διαμορφώσεις (Εικόνες 33, 34). Τα μόρια καρβακρόλης κατά τη σύνδεσή τους στην OBP4 σχηματίζουν 1 δεσμό υδρογόνου και 60 αλληλεπιδράσεις van der Waals (53 μεταξύ μη πολικών-μη πολικών ομάδων, 3 μεταξύ πολικών-πολικών και 4 μεταξύ πολικών-μη πολικών ομάδων) (Πίνακες 10, 11).



Εικόνα 33: Ηλεκτρονιακή πυκνότητα των αμινοξέων του κέντρου σύνδεσης της OBP4. Η ηλεκτρονιακή πυκνότητα που αντιστοιχεί στον προσδέτη αποδίδεται στη σύνδεση 2 διαμορφώσεων της καρβακρόλης.



Εικόνα 34: Αναπαράσταση της δομής του συμπλόκου OBP4-καρβακρόλης. Οι α-έλικες απεικονίζονται με κυανό χρώμα, οι δισουλφιδικές γέφυρες με ροζ και το μόριο καρβακρόλης σε δύο διαφορετικές διαμορφώσεις με μωβ και πράσινο.



Εικόνα 35: Απεικόνιση της μοριακής επιφάνειας του συμπλόκου OBP4-καρβακρόλης. Διακρίνονται οι 6 α-έλικες με ροζ χρώμα και τα μόρια καρβακρόλης με μοβ και πράσινο χρώμα.

Πίνακας 10 . Δεσμοί Υδρογόνου στο σύμπλοκο OBP4-καρβακρόλη

Ατομο καρβακρόλης B	Πρωτεϊνικό άτομο	Απόσταση (Å)
OH	Wat 63	2.21

Πίνακας 11. Αλληλεπιδράσεις van der Waals στο σύμπλοκο OBP4-καρβακρόλη

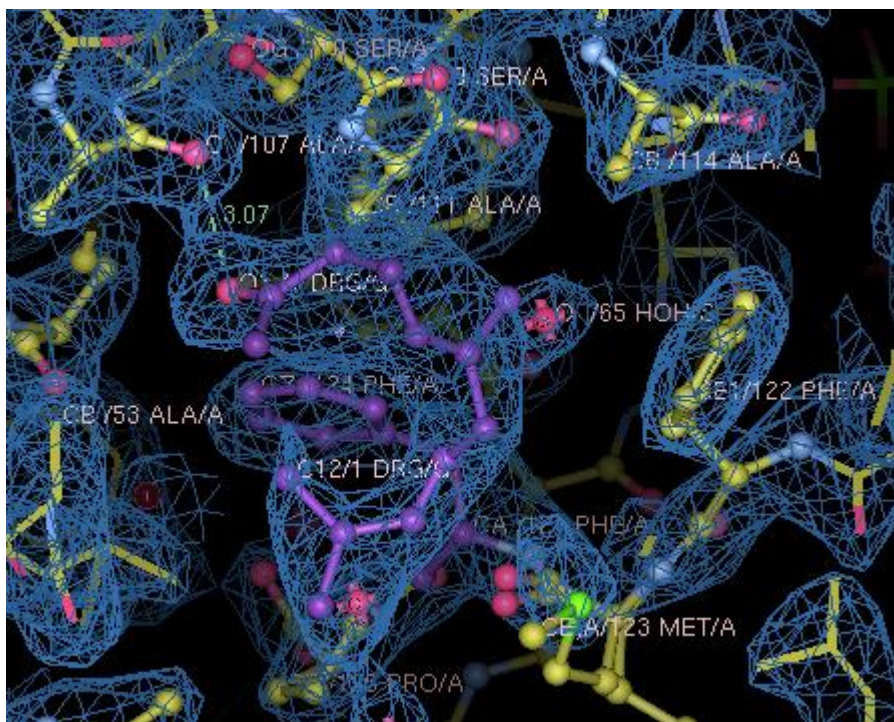
A άτομο καρβακρόλης	Πρωτεϊνικό μόριο	Αριθμός δεσμών
C7	Leu90CD; Ala114CB	2
C10	Leu90CD2; Thr70CG2	2
C6	Ala111CA; Ala111CB; Phe124(B)CE1	3
C3	Ala111CA; Ala111CB; Phe124(B)CZ; Phe123(B)CE1	4
C9	Ala111CA; Ala111CB	2
C11	Ile65CG2; Ser110CB	2
C4	Phe122CG; Ala111CB; Ala111 O; Phe124(b)CD2; Phe122CB; Phe124(B)CG;Phe124(B)CE1; Phe124(B)CZ; Phe124(B)CE2; Phe124(B)CD1	10
C5	Phe122CD1; Phe124CD1; Phe122CB; Met123 O; Phe124(B)CG; Phe124(B)CE1; Phe124(B)CZ; Phe124(B)CD1	8
C2	Phe122CD1; Phe122CG; Phe(B)124CE2; Phe122CB; Phe124(B)CE1; Phe124(B)CZ; Phe124(B)CD1	7
O1	Ala107 O; Ala111CB	2
<u>Σύνολο</u>		<u>42</u>

B Άτομο καρβακρόλης	Πρωτεϊνικό άτομο	Αριθμός δεσμών
C10	Phe122CE1; Phe122CG; Phe(B)124CE1; Phe122CD1	4
C7	Leu90CD2; Thr70CG2; Phe124(B)CE1	3
C3	Thr70CG2	1
C8	Phe124(B)CE1; Phe122CD1	2
C9	Wat 63	1
C11	Phe122CD1; Phe122CB; Met123O	3
C4	Thr70CG2; Wat 45	2
O1	Wat 63	1

9.3.2 Σύμπλοκο OBP4-γερανυλο-ακετόνη

Συνολικά η τριτοταγής δομή του συμπλόκου της OBP4-γερανυλικής ακετόνης είναι όμοια με αυτή που περιγράφηκε στην προηγούμενη ενότητα. Η δομική ανάλυση έδειξε την πρόσδεση ενός μορίου γερανυλο-ακετόνης (Εικόνες 36, 37).

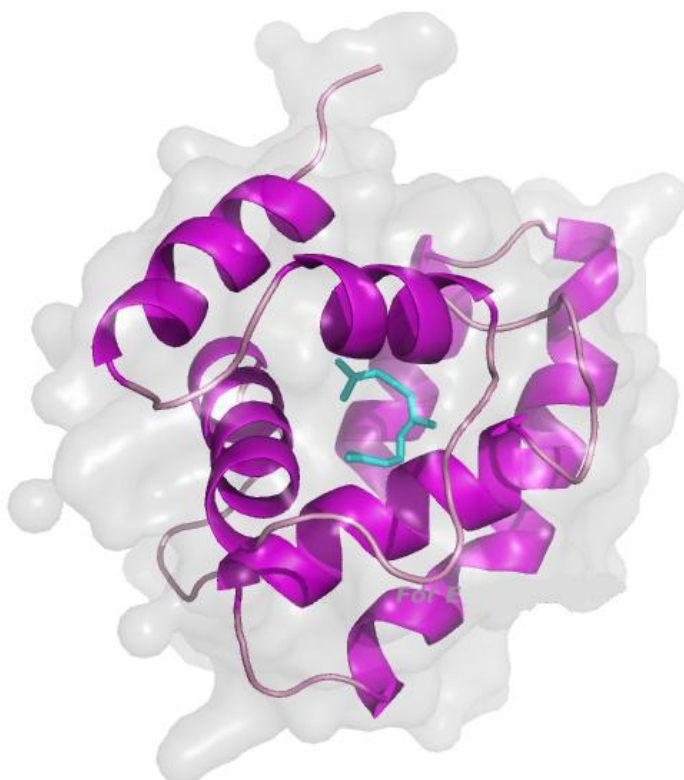
Πιο αναλυτικά, κατά τη σύνδεση του προσδέτη στην πρωτεΐνη δημιουργούνται 40 αλληλεπιδράσεις, στις οποίες περιλαμβάνονται 1 δεσμός υδρογόνου ($3.07\text{\AA}$) μεταξύ του καρβονυλικού οξυγόνου της Ala107(O) με το O1 της γερανυλο-ακετόνης καθώς και 39 αλληλεπιδράσεις van der Waals (18 μεταξύ πολικών–μη πολικών ομάδων, 20 μεταξύ μη πολικών-μη πολικών ομάδων και 2 μεταξύ πολικών-πολικών ομάδων). Παρατηρείται δηλαδή ότι ο αριθμός μεταξύ των πολικών-μη πολικών αλληλεπιδράσεων είναι παρόμοιος με τον αριθμό μη πολικών-μη πολικών αλληλεπιδράσεων. Τα αμινοξέα που συμμετέχουν στις παρατηρούμενες αλληλεπιδράσεις είναι η Met123, Ala107 και Thr70 (μέσω των πολικών τους ομάδων), ενώ τα αμινοξέα Phe122 και Phe124 αναπτύσσουν μεγάλο αριθμό μη πολικών van der Waals αλληλεπιδράσεων με τον προσδέτη (Πίνακες 12, 13).



Εικόνα 36: Ηλεκτρονιακή πυκνότητα των αμινοξέων του κέντρου σύνδεσης της OBP4. Η ηλεκτρονιακή πυκνότητα που αντιστοιχεί στον προσδέτη αποδίδεται στη σύνδεση μιας διαμόρφωσης της γερανυλο-ακετόνης.



Εικόνα 37: Αναπαράσταση της δομής του συμπλόκου OBP4-γερανυλο-ακετόνης. Διακρίνονται οι έξι α-έλικες της πρωτεΐνης με ροζ, οι δισουλφιδικές γέφυρες με κόκκινο και το μόριο της ουσίας με κυανό χρώμα.



Εικόνα 38: Απεικόνιση της μοριακής επιφάνειας του συμπλόκου OBP4-γερανυλο-ακετόνης. Διακρίνονται οι έξι α-έλικες με μωβ χρώμα και το μόριο της γερανυλο-ακετόνης με κυανό.

Πίνακας 12. Δεσμοί Υδρογόνου στο σύμπλοκο OBP4-γερανυλο-ακετόνη.

Άτομο γερανυλο-ακετόνης	Πρωτεϊνικά άτομα	Απόσταση (Å)
O1	Ala107(O)	3.07

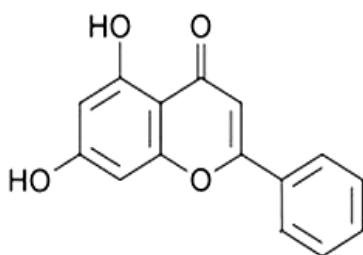
Πίνακας 13 . Αλληλεπιδράσεις van der Waals στο σύμπλοκο OBP4- γερανυλο-ακετόνη

Άτομο γερανυλο-ακετόνης	Πρωτεϊνικά άτομα	Αριθμός δεσμών
O1	Ala111(CB); Ala107(C); Ala107(CA); Ala107(O)	4
C1	Thr70(OG1); Ile65(CG2); Ile65(CD1); Thr58(OG1)	4
C2	Ala107(O)	1
C3	Ala111(CB); Ala111(CA); Ser110(O); Ser110(C); Ser110(CB); Ala111(N)	6
C5	Leu90(CD2); Thr70(CG2)	2
C6	Thr70(CG2); Leu90(CD2)	2
C7	Phe122(CE1); Phe122(CD1); Thr70(CG2); Phe122(CZ); Leu90(CD2)	5
C8	Met123(CE); Met123(SD); Wat69	3

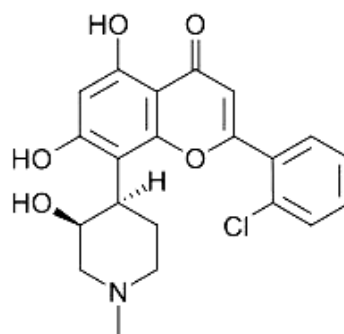
C9	Met123(SD);Met123(CE); Wat69	3
C10	Wat69	1
C11	Ala56(CB); Gln73(OE1); Wat68; Wat69	4
C12	Wat69	1
C13	Ala111(CA); Ala114(CB); Wat65	3
ΣΥΝΟΛΟ		39

9.4 Αποτελέσματα κινητικών μελετών της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (GP).

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε συγκριτική κινητική μελέτη της χρυσίνης και της φλαβοπιριδόλης που είναι γνωστό από κρυσταλλογραφικές μελέτες ότι συνδέονται στο κέντρο αναστολής ή κέντρο της καφεΐνης.^{79,84}



Εικόνα 39 . Χρυσίνη

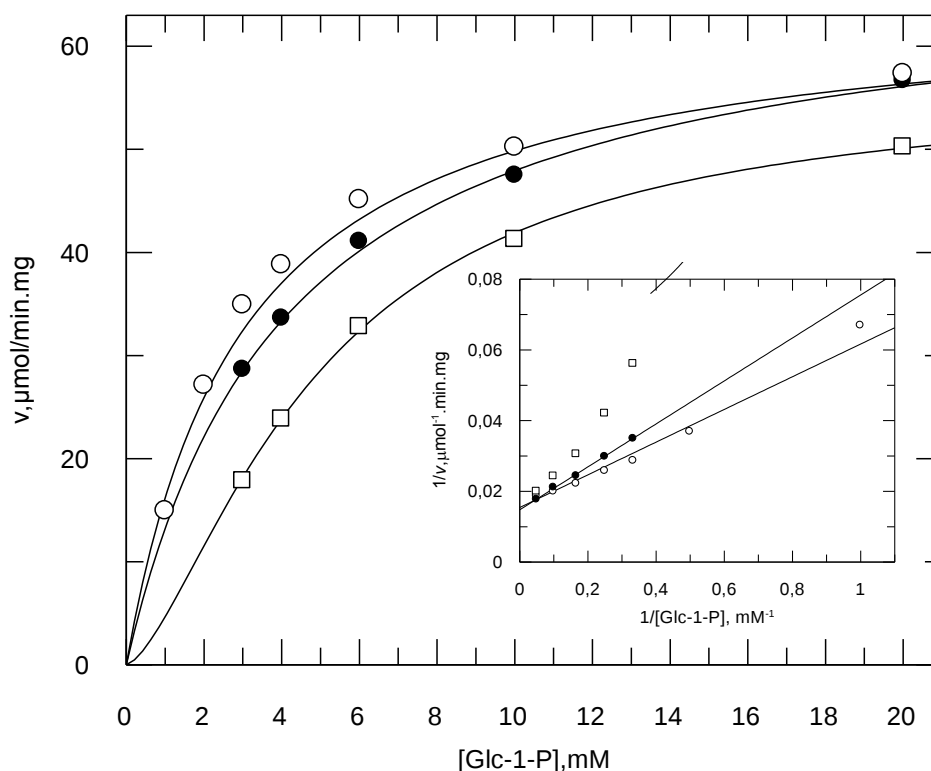


Εικόνα 40 . Φλαβοπιριδόλη

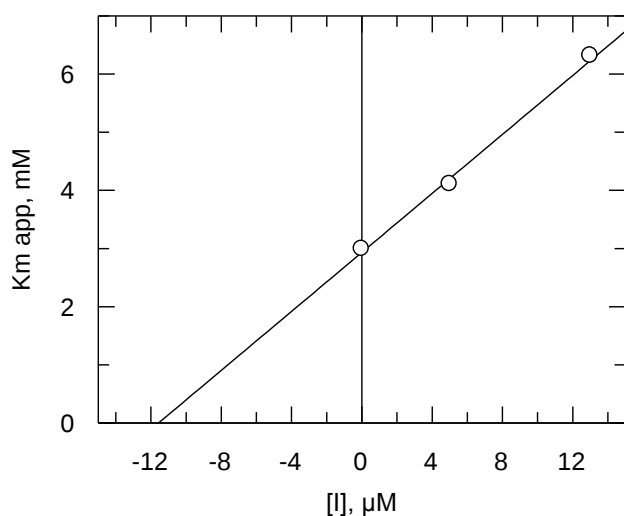
9.4.1 Κινητικές μελέτες της GPb στην κατεύθυνση σύνθεσης του γλυκογόνου.

Η κινητική μελέτη της GP παρουσία σταθερής συγκέντρωσης AMP (1mM) και γλυκογόνου (1%) στην κατεύθυνση σύνθεσης του γλυκογόνου και διαφόρων συγκεντρώσεων Glc-1-P και αναστολέα, έδειξε ότι η χρυσίνη δρα ως ανταγωνιστικός αναστολέας (competitive) του ενζύμου ως προς την Glc-1-P (Σχήμα 3) με σταθερά αναστολής $K_i = 11.56 \pm 0.94 \mu\text{M}$ (Σχήμα 4). Επιπλέον, τα πειράματα που έγιναν στην ίδια κατεύθυνση στις ίδιες συγκεντρώσεις

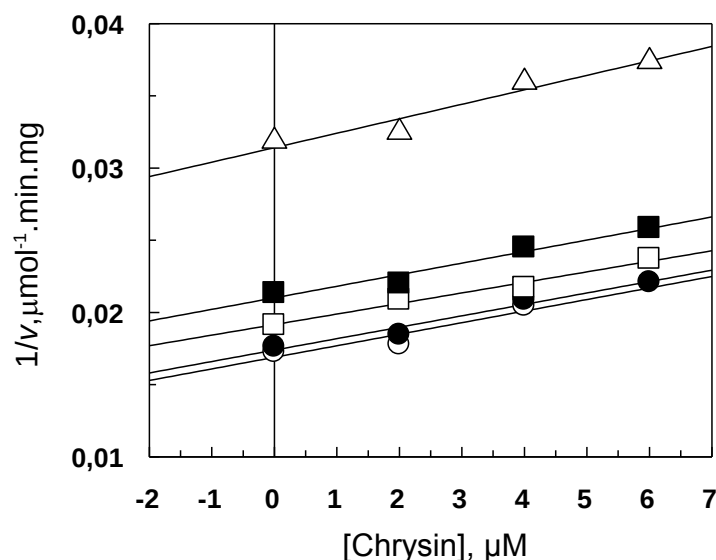
γλυκογόνου και AMP, παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων αναστολέα και καφεΐνης υποδεικνύουν ότι η χρυσίνη ανταγωνίζεται την καφεΐνη (σχήμα 5).



Σχήμα 3: Αναστολή της GPb από τη χρυσίνη. Αναστολή του ενζύμου από τη χρυσίνη, στην κατεύθυνση σύνθεσης του γλυκογόνου, συναρτήσει της συγκέντρωσης της Glc-1-P (3, 4, 6, 10, 20 mM) στην κατεύθυνση σύνθεσης του γλυκογόνου. Οι συγκεντρώσεις του αναστολέα ήταν 0 (○), 5 (●) και 13 (□) μM. Στο ένθετο παρουσιάζεται το διάγραμμα Lineweaver-Burk, δηλαδή το διπλά αντίστροφο διάγραμμα της δραστηριότητας της GPb σε σταθερές συγκεντρώσεις AMP (1 mM) και γλυκογόνου (1%) και συγκεντρώσεις χρυσίνης 0 (○), 5 (●) και 13 (□) μM. Οι κινητικές σταθερές του ενζύμου ως προς την Glc-1-P σε σταθερή συγκέντρωση γλυκογόνου (1%) είναι $K_m = 2.99 \pm 0.26$ mM και $V_{max} = 64.78 \pm 2.35$ μmol/min/mg.



Σχήμα 4: Διάγραμμα των φαινόμενων $K_{m,app}$ συναρτήσει των συγκεντρώσεων αναστολέα. Οι τιμές των K_m είναι οι εξής: $K_m = 2.99 \pm 0.27$ (0 μM χρυσίνης), $K_m = 4.11 \pm 0.26$ (5 μM), $K_{m,app} = 6.32 \pm 0.41$ mM (13 μM). Από το διάγραμμα υπολογίζεται η σταθερά αναστολής $K_i = 11.56 \pm 0.94$ μM .

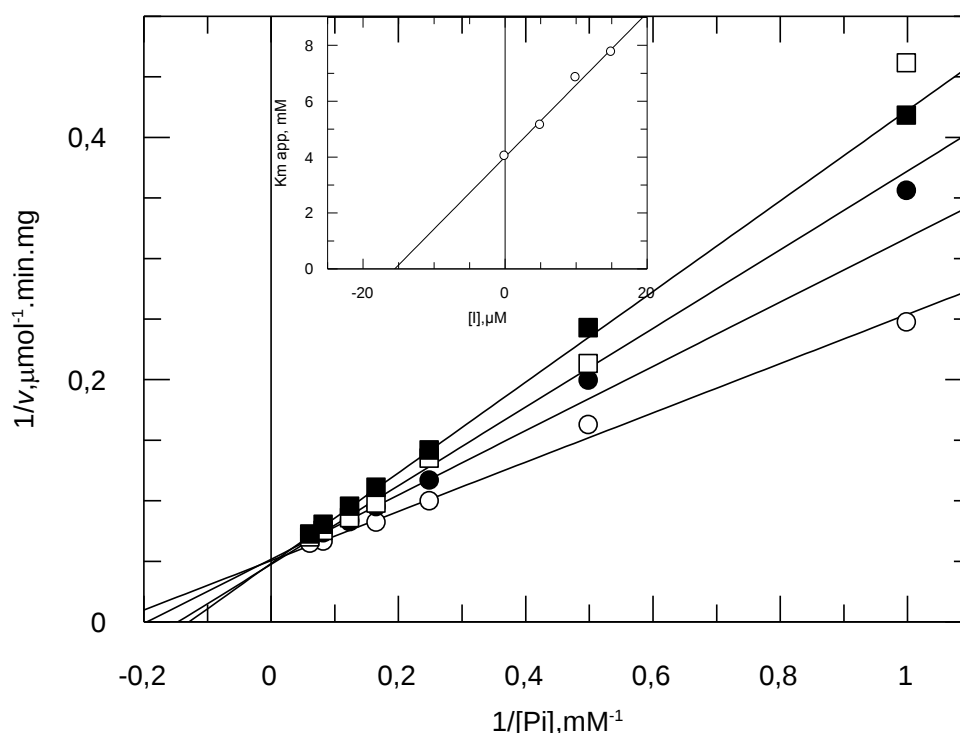


Σχήμα 5: Διάγραμμα Dixon παρουσία χρυσίνης και καφεΐνης. Αντίστροφο διάγραμμα της δραστηριότητας της GPb στην κατεύθυνση της σύνθεσης του γλυκογόνου, σε σταθερή συγκέντρωση AMP (1 mM) και γλυκογόνου (1%) και διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέα χρυσίνης (0, 2, 4, 6 μM) και καφεΐνης 0 ($\circ$), 0.1 ($\bullet$), 0.2 ($\square$), 0.4 ($\blacksquare$), 1 ($\triangle$) mM.

9.4.2 Κινητικές μελέτες της GPb στην κατεύθυνση αποικοδόμησης του γλυκογόνου.

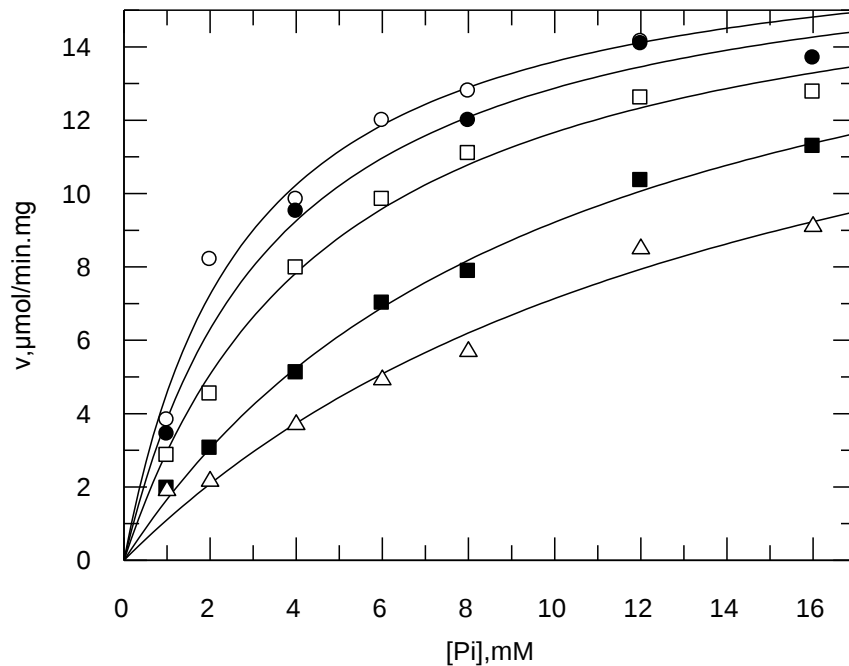
Η κινητική μελέτη της GPb στην κατεύθυνση της αποικοδόμησης του γλυκογόνου παρουσία σταθερής συγκέντρωσης γλυκογόνου (0.1%), AMP (0.2 mM) και διαφορετικές συγκεντρώσεις Pi και αναστολέα έδειξε ότι η

χρυσίνη δρα ως ανταγωνιστικός (competitive) αναστολέας του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα με σταθερά αναστολής $K_i = 15.53 \pm 1.46 \mu\text{M}$ (Σχήμα 6).

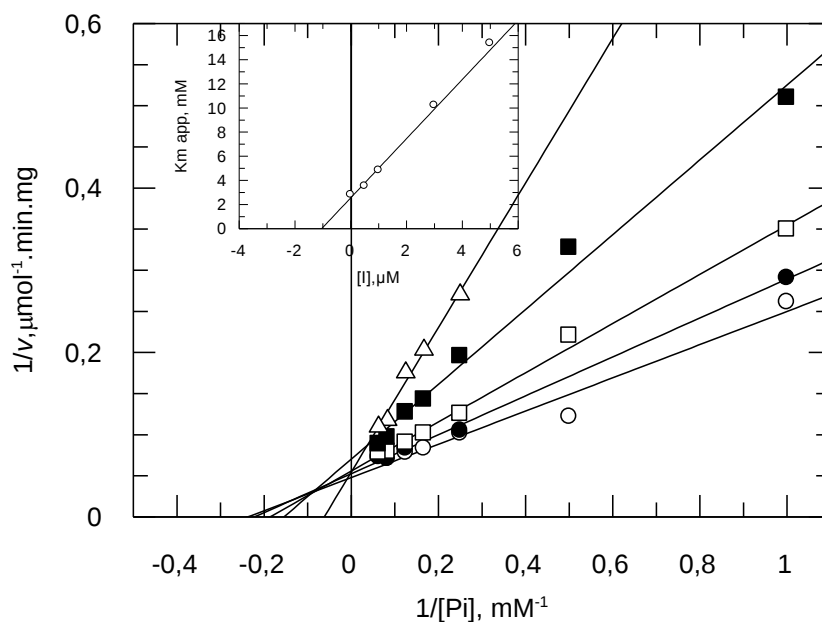


Σχήμα 6: Αναστολή της GPb από τη χρυσίνη στην κατεύθυνση αποικοδόμησης του γλυκογόνου. Διπλά αντίστροφο διάγραμμα της δραστηριότητας της GPb σε σταθερή συγκέντρωση AMP (0.2 mM), γλυκογόνου (0.1%), P_i (1, 2, 4, 6, 8, 12, 16 mM) και διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέα χρυσίνης 0 (○), 5 (●), 10 (□) και 15 (■) μM . Οι κινητικές σταθερές του ενζύμου είναι $K_m = 4.03 \pm 0.48 \text{ mM}$ και $V_{\max} = 19.8 \pm 0.85 \mu\text{mol/min/mg}$. Στο ένθετο παρουσιάζεται το διάγραμμα των $K_{m,app}$ συναρτήσει των συγκεντρώσεων αναστολέα. Οι τιμές των K_m είναι οι εξής: $K_m = 5.13 \pm 0.55$, $K_m = 6.84 \pm 0.81$, $K_m = 7.75 \pm 0.17 \text{ mM}$. Από το διάγραμμα υπολογίζεται η σταθερά αναστολής $K_i = 15.53 \pm 1.46 \mu\text{M}$.

Η συγκριτική κινητική μελέτη του ενζύμου στην κατεύθυνση αποικοδόμησης του γλυκογόνου σε σταθερές συγκεντρώσεις γλυκογόνου (0.1%) και AMP (0.2 mM) και μεταβλητές συγκεντρώσεις P_i και φλαβοπιριδόλης υπέδειξε ότι η φλαβοπιριδόλη είναι μικτού τύπου αναστολέας (mixed type inhibition) με σταθερά αναστολής $K_i = 1.05 \pm 0.1 \mu\text{M}$ (Σχήματα 7 και 8).



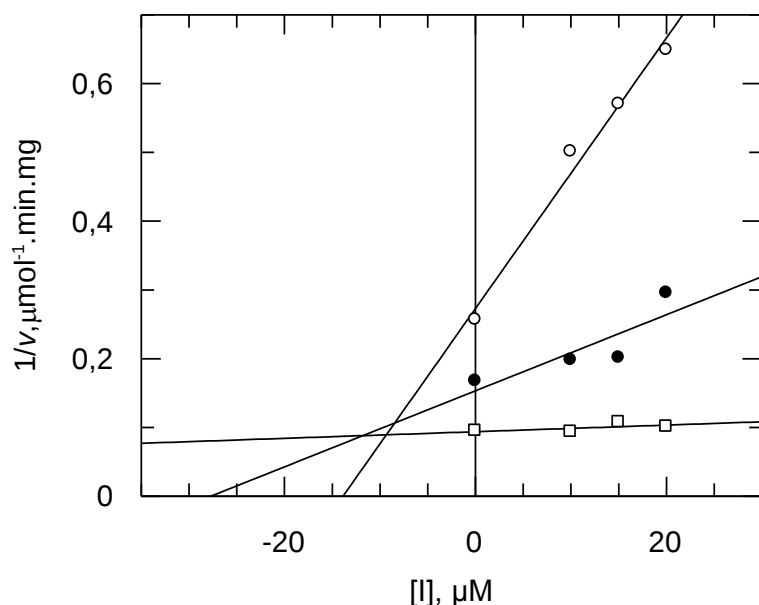
Σχήμα 7: Αναστολή της GPb από τη φλαβοπιριδόλη στην κατεύθυνση της αποικοδόμησης του γλυκογόνου. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε σταθερή συγκέντρωση γλυκογόνου (0.1%) και AMP (0.2 mM), διαφορετικές συγκεντρώσεις Pi (1, 2, 4, 6, 8, 12, 16 mM) και διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέα φλαβοπιριδόλης 0 (○), 0.5 (●), 1 (□), 3 (■) και 5 (△). Οι κινητικές σταθερές του ενζύμου ως προς τα Pi είναι $K_m = 2.80 \pm 0.5$ mM και $V_{max} = 17.41 \pm 1.07$ μmol/min.mg.



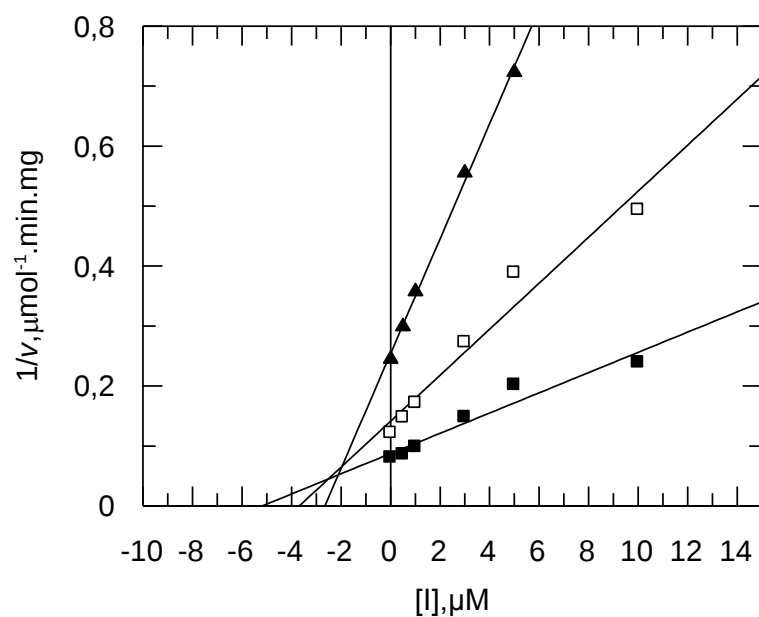
Σχήμα 8: Αναστολή της GPb από τη φλαβοπιριδόλη στην κατεύθυνση αποικοδόμησης του γλυκογόνου. Παράτιθεται το διάγραμμα Lineweaver-Burk σε σταθερές συγκεντρώσεις

γλυκογόνου (0.1%) και AMP (0.2 mM), διαφορετικές συγκεντρώσεις P_i (1, 2, 4, 6, 8, 12, 16 mM) και διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέα φλαβοπιριδόλης 0 (○), 0.5 (●), 1 (□), 3 (■) και 5 (△) μM . Στο ένθετο παρατίθεται το διάγραμμα των K_m συναρτήσει των συγκεντρώσεων αναστολέα. Οι τιμές των K_m app είναι οι εξής: $K_m = 2.8 \pm 0.5$, $K_m = 3.5 \pm 0.65$, $K_m = 4.82 \pm 0.56$, $K_m = 10.21 \pm 1.06$, $K_m = 15.35 \pm 4.51$ μM . Από το διάγραμμα υπολογίζεται η σταθερά αναστολής $K_i = 1.05 \pm 0.1$ μM .

Η κινητική μελέτη της GPb στην κατεύθυνση της αποικοδόμησης του γλυκογόνου παρουσία σταθερής συγκέντρωσης γλυκογόνου (0.1%) και P_i (16 mM) και μεταβαλλόμενες συγκεντρώσεις AMP και αναστολέων έδειξε ότι τόσο η χρυσίνη (Σχήμα 9) όσο και η φλαβοπιριδόλη δεν ανταγωνίζονται με το AMP (Σχήμα 10).



Σχήμα 9: Διάγραμμα Dixon. Αναστολή της GPb από τη χρυσίνη στην κατεύθυνση αποικοδόμησης του γλυκογόνου, σε σταθερή συγκέντρωση γλυκογόνου (0.1%), P_i (16 mM) και μεταβλητές συγκεντρώσεις AMP: 20 (○), 40 (●) και 80 (□) μM .



Σχήμα 10: Διάγραμμα Dixon. Αναστολή της GPb από την φλαβοπιριδόλη στην κατεύθυνση αποικοδόμησης του γλυκογόνου, σε σταθερή συγκέντρωση γλυκογόνου (0.1%), Pi (16 mM) και μεταβλητές συγκεντρώσεις AMP 20 (▲), 40 (□), 80 (■) μM.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η υψηλή εξειδίκευση του οσφρητικού συστήματος των εντόμων οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στις OBPs. Δεδομένου ότι οι οσμές που αντιλαμβάνονται τα έντομα είναι πολύ περισσότερες από τον αριθμό των OBPs (60 το σύνολο για το *A. gambiae*) προτείνεται ότι κάθε μια από αυτές τις πρωτεΐνες μπορεί να αναγνωρίζει μια τάξη δομικά σχετιζόμενων οσμογόνων παρά ένα και μόνο οσμογόνο. Ωστόσο, σύμφωνα με μελέτες, οι OBPs διαθέτουν την ικανότητα να διακρίνουν μεταξύ δομικά μη-σχετιζόμενων ενώσεων.²⁸

Στην περίπτωση των OBPs οι οποίες «βομβαρδίζονται» από χημικά σήματα ο ανταγωνισμός μεταξύ μορίων διαφορετικής συγγένειας για την ίδια OBP είναι δυνατόν να αποτελεί έναν ακόμα μηχανισμό εκλεκτικότητας που τελικά συμβάλλει, συνεργατικά με την εκλεκτικότητα των οσφρητικών υποδοχέων, στην αξιοθαύμαστη εξειδίκευση του οσφρητικού συστήματος των εντόμων.

Η δομική μελέτη της καρβακρόλης και της γερανυλο-ακετόνης, οι οποίες ανήκουν στη τάξη των τερπενίων, έδειξε ότι και οι δύο προσδένονται στην ίδια υδρόφοβη περιοχή (θήκη) που σχηματίζεται από τμήματα των έξι α-ελίκων στο κέντρο της πρωτεΐνης. Οι ενώσεις συνδέονται χωρίς να επάγουν αλλαγές στη συνολική τριτοταγή δομή της πρωτεΐνης (Εικόνα 41).

Η καρβακρόλη συνδέεται λαμβάνοντας δύο διαφορετικές διαμορφώσεις γεγονός που υποδεικνύει την ευκινησία του μορίου στο κέντρο σύνδεσης και κατά συνέπεια τη μικρή εξειδίκευση της OBP4 για την καρβακρόλη. Η OBP4, σε αντίθεση με την OBP1 λόγω μεγάλου μεγέθους του κέντρου σύνδεσης είναι πιθανόν να ανήκει στην κατηγορία των OBPs που λειτουργούν ως γενικά «φίλτρα».²⁸ Ωστόσο η ύπαρξη ενός εξειδικευμένου, μη-ταυτοποιημένου ακόμα προσδέτη μεγαλύτερου μεγέθους που να δεσμεύεται ειδικά δεν μπορεί να αποκλειστεί.

Το μόριο της γερανυλο-ακετόνης φαίνεται πως προσδένεται πιο ειδικά συγκριτικά με το μόριο της καρβακρόλης. Η μελέτη της δομής του συμπλόκου OBP4-γερανυλο-ακετόνης έδειξε ότι το μόριο του προσδέτη σταθεροποιείται

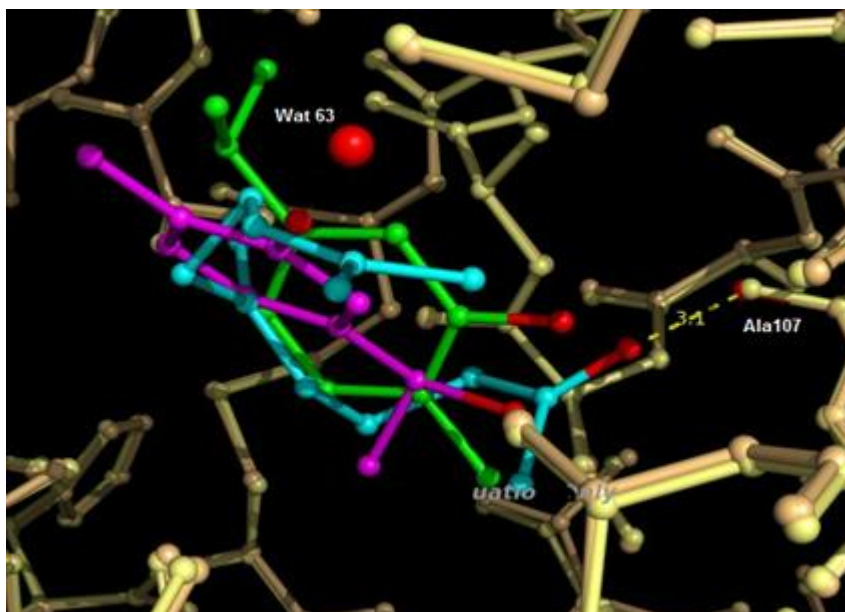
κυρίως μέσω των αλληλεπιδράσεων van der Waals που σχηματίζονται μεταξύ πολικών-μη πολικών ομάδων και μη πολικών-μη πολικών ομάδων. Επιπλέον, το άτομο Ο της κετονικής ομάδας του προσδέτη συμμετέχει σε τέσσερις αλληλεπιδράσεις van der Waals με μόρια της πρωτεΐνης και ένα δεσμό υδρογόνου με το καρβονυλικό οξυγόνο της Ala107 (στα 3.07Å).

Είναι πιθανόν η δημιουργία ενός δεσμού υδρογόνου απευθείας με ένα άτομο της πεπτιδικής αλυσίδας να συμβάλλει στην αυξημένη συγγένεια για το μόριο της γερανυλο-ακετόνης, σε σύγκριση με την καρβακρόλη όπου ο μοναδικός δεσμός υδρογόνου είναι αυτός μεταξύ του προσδέτη και ενός μορίου ύδατος. Πράγματι ανεξάρτητες μελέτες φθορισμού (Tsitsanou et al. *in preparation*) έδειξαν ότι η γερανυλο-ακετόνη συνδέεται ισχυρότερα (% εκτοπισμός του 1-NPN=~80) σε σύγκριση με την καρβακρόλη (% εκτοπισμός του 1-NPN=~30).

Η παρούσα μελέτη έδειξε ότι μόρια όπως η καρβακρόλη και η γερανυλο-ακετόνη μπορούν να δεσμευθούν στην OBP4 μέσω πολυάριθμων αλληλεπιδράσεων van der Waals αλλά με διαφορετική συγγένεια. Η σύγκριση των δύο μορίων υποδεικνύει ότι μόρια με δομή παρόμοια της γερανυλο-ακετόνης αποτελούν καλύτερες ενώσεις οδηγούς για το σχεδιασμό νέων βελτιωμένων προσδετών. Ακόμα και στην περίπτωση μη εξειδικευμένων προσδετών όπως η καρβακρόλη, η ικανότητα τους να συνδέονται στην OBP4 τους καθιστά κατάλληλες ενώσεις-οδηγούς (Lead compounds) για το σχεδιασμό νέων προσδετών με μεγαλύτερη εξειδίκευση και συγγένεια.

Συνοψίζοντας η δομική ανάλυση μπορεί να αποκαλύψει το κέντρο σύνδεσης ενός μακρομοριακού στόχου καθώς και τα αμινοξέα που το συνιστούν και να εξηγήσει την συγγένεια ενός προσδέτη με μοριακούς όρους.

Επιπλέον τέτοιες μελέτες είναι δυνατό, αφενός να οδηγήσουν στην ανακάλυψη νέων ενώσεων οδηγών και αφετέρου να μειώσουν σημαντικά τον αριθμό των ενώσεων που θα ελεγχθούν *in vivo* επιταχύνοντας έτσι την ανακάλυψη νέων εν δυνάμει εντομοαπωθητικών μέσων.



Εικόνα 41: Υπέρθεση των δομών των συμπλόκων OBP4-καρβακρόλης και OBP4-γερανυλο-ακετόνης. Απεικονίζονται τα μόρια της καρβακρόλης με μοβ και πράσινο χρώμα και της γερανυλο-ακετόνης με κυανό, στο κέντρο της υδρόφοβης περιοχής της πρωτεΐνης που σχηματίζεται από τις 6 α-έλικες.

Η κινητική μελέτη της GP παρουσία των αναστολέων χρυσίνη και φλαβοπιριδόλη έδειξε πως τόσο η χρυσίνη όσο και η φλαβοπιριδόλη αναστέλλουν τη φωσφορυλάση αλλά παρουσιάζουν σημαντικά διαφορετική ισχύ (15 φορές). Η χρυσίνη εμφανίζει ανταγωνιστική δράση με το υπόστρωμα και την καφεΐνη. Παρόμοια, η φλαβοπιριδόλη εμφανίζεται να ανταγωνίζεται το υπόστρωμα και να δρα ως μικτού τύπου αναστολέας. Τέλος και οι δύο αναστολείς βρέθηκε να μην ανταγωνίζονται με το AMP (τουλάχιστον στις συγκεντρώσεις AMP που δοκιμάστηκαν στην παρούσα κινητική μελέτη). Δεδομένου ότι το καταλυτικό κέντρο και το κέντρο αναστολής είναι διακριτά, η φαινόμενη ανταγωνιστική δράση των φλαβονοειδών με το υπόστρωμα, πιθανό να οφείλεται στις δομικές μεταβολές που επάγει η σύνδεση τους στο αλλοστερικό κέντρο αναστολής (κέντρο καφεΐνης). Οι μεταβολές αυτές έχουν ως αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση της τεταμένης T (πολύ λίγο ενεργής) διαμόρφωσης που παρουσιάζει μικρή συγγένεια για το υπόστρωμα, μέσω σταθεροποίησης του βρόχου 280s.

Δεδομένου ότι και οι δύο ενώσεις έχουν βρεθεί κρυσταλλογραφικά να συνδέονται στο κέντρο αναστολής (καφεΐνης) με παρόμοιο τρόπο, η διαφορά

στην ισχύ σύνδεσής τους πιθανόν πηγάζει από την διαφορά στη χημική τους δομή.^{79,84} Πιο συγκεκριμένα, η κρυσταλλογραφική μελέτη υπέδειξε ότι η θετικά φορτισμένη ομάδα (υδροξυπιπεριδίν-1-υλο υποκαταστάτης) που υπάρχει στη φλαβοπιριδόλη (η οποία απουσιάζει από τη χρυσίνη) ευθύνεται για τη δημιουργία ευνοϊκών αλληλεπιδράσεων μεταξύ της ουσίας και των αμινοξέων της πολυπεπτιδικής αλυσίδας του ενζύμου και συνεπώς μεγαλύτερη συγγένεια σύνδεσης της ουσίας με το ένζυμο (Εικόνες 39, 40). Αντίθετα, ο υποκαταστάτης Cl του B φαινολικού δακτυλίου της φλαβοπιριδόλης φαίνεται να μη δημιουργεί επιπλέον σταθεροποιητικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ ενζύμου και προσδέτη (Εικόνες 39, 40).⁸⁴

Η κρυσταλλογραφική μελέτη των φυσικών προϊόντων σε συνδυασμό με την κινητική και υπολογιστική μελέτη τους είναι δυνατό να βοηθήσει στην κατανόηση του τρόπου δράσης τους και παρέχει χρήσιμες πληροφορίες για τον σχεδιασμό παραγώγων με βελτιωμένη συγγένεια.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Πίνακας 14: Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων.

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός Όρος
Additive	Πρόσθετο
Artemisinin	Αρτεμισινίνη
Cessation of growth	Τερματισμός ανάπτυξης
Chaperones	Πρωτεΐνες οδηγοί
Chemosensory protein	Χημειοαισθητήρια Πρωτεΐνη
Crystal growth	Ανάπτυξη κρυστάλλου
Glutathione reductase	Αναγωγάση της γλουταθειόνης
Hanging drop technique	Τεχνική κρεμάμενης σταγόνας
Hemolymph	Αιμολέμφος
Ligand	Προσδέτης
Nucleation	Πυρήνωση
Odorant Binding Protein	Πρωτεΐνη Πρόσδεσης Οσμογόνου
Odorant Degradating Enzyme	Ένζυμο Αποικοδόμησης Οσμογόνου
Odorant Receptor	Οσφρητικός υποδοχέας
Paratransgenesis	Γενετική Παρατροποποίηση
PEG	Πολυαιθυλενογλυκόλες
Pheromone Binding Protein	Πρωτεΐνη Πρόσδεσης Φερομόνης
Plasmodium	Πλασμώδιο

Precipitant	Παράγοντας καταβύθισης
X-Ray Chrystallography	Κρυσταλλογραφία ακτινών-Χ
Resolution	Ευκρίνεια
Sensillum	Αισθητήριο όργανο
Sitting drop technique	Τεχνική καθήμενης σταγόνας
Synchrotron	Συγχροτρονική ακτινοβολία
Thioredoxine reductase	Αναγωγάση θειορεδοξίνης
Transgenesis	Γενετική τροποποίηση
Vapor diffusion	Διάχυση ατμών

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

ACT	Artemisinin Combination Therapy
AgamOBP1	Anopheles <i>gambiae</i> Odorant Binding Protein 1
OBP4	Odorant Binding Protein 4
APS	Ammonium Persulfate
AMP	Adenosine- Monophosphate
cVA	11- cis Vaccenyl-acetate
CSP	Chemosensory Protein
DDT	Dichlordiphenyldichloroethane
DEET	N,N-diethyl-m-toluamide
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
GP	Glycogen Phosphorylase
Hepes	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
IPTG	Isopropyl- thiogalacto-pyranoside
MES	2-(N-morpholino)-ethanesulfonic acid
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
PBP	Pheromone Binding Protein
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
OBP	Odorant Binding Protein

OR	Odorant receptor
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
TEMED	Tetramethylethylenediamine
XRC	X-Ray Chrystallography
WHO	Worldwide Health Organization

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Gollin, Zimmermann, Malaria : Disease Impacts and long-run Income differences, Discussion paper, *Disease Biology and Ecology*, 2007
2. A. Fink, Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid, Review, *Folding and Design*, Vol 3, 1998
3. S. Ahuza, Development of a recombinant protein vaccine against Plasmodium falciparum, *Malaria*, 2006
4. M. J. Lorena, Interrupting malaria transmission by genetic manipulation of anophelines mosquitoes, *J. Vect. Borne Dis.*, Vol. 40, 2003, pp. 73-77
5. Spenanca, Capurro, Perspectives in the control of infectious diseases by transgenic mosquitoes in the post genomic era, Review
6. T. M. Katz, J. H. Miller, A. A. Hebert, Insect repellents: Historical perspectives and new developments, Review, *J. AM. ACAD. DERMATOL.* Vol. 58, No 5, 2008, pp. 865-871
7. M. Debbooun, S. P. Frances, D. Strickman, *Insect Repellents, Principles, Methods and Uses*, CRC Press, 2007
8. Anderson, The process of Structure-Based Drug Design, Review, *Chemistry and Biology*, Vol 10, 2003, pp. 787-797
9. B. Rupp, *Biomolecular crystallography, Principles, Practice and Application to Structural Biology*, Garland Science, 2010
10. Pelosi, Odorant- Binding Proteins: Structural aspects, *Annals New York Academy of Sciences*, 1998, pp. 281-293
11. E. Andronopoulou, V. Labropoulou, V. Douris, D. F. Woods, H. Biessmann, K. Iatrou, Specific Interactions among odorant- binding proteins of the African malaria vector Anopheles gambiae, *Insect Molecular Biology* 15 (6), 2006, pp. 797-811
12. Pelosi, Zhou, Ban, Calvello, Soluble proteins in insect chemical communication, Review, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63, 2006, pp. 1658-1676
13. H. Biessmann, E. Andronopoulou, M. R. Biessmann, V. Douris, S. P. Dimitratos, E. Eliopoulos, P. M. Guerin, K. Iatrou, R. W. Justice, T. Krober, O. Marinotti, P. Tsitoura, D. Woods, M. F. Walter, The Anopheles gambiae

- odorant binding protein (AgamOBP1) mediates indole recognition in the antennae of female mosquitoes, *PLOS one*, Vol.5, Issue 3, 2010
14. M. Tegoni, V. Campanacci, C. Cambillau, Structural aspects of sexual attraction and chemical communication in insects, Review, *Elsevier*, Vol.29 No. 5, 2004
 15. Zhou, Odorant-Binding Proteins in insects, *Vitamins and Hormones*, Vol. 83, Elsevier, 2010
 16. Pelosi, Perireceptor Events in Olfaction, *Journal of Neurobiology*, Vol. 30, 1996, 3-19
 17. C. Liu, R.J. Pitts, J. D. Bohbot, P. L. Jones, G. Wang, L. J. Zwiebel, Distinct Olfactory Signaling Mechanisms in the Malaria Vector Mosquito *Anopheles gambiae*, *Plos Biology*, 2010
 18. R. Lacroix, W.R. Mucabana, L. C. Gouagna, J.C. Koella, Malaria Infection Increases Attractiveness of Humans to Mosquitoes, *Plos Biology*, 2005
 19. H. Qiao, X. He, D. Schumura, L. Ban, L. Field, F. R. Dani, E. Michelucci, B. Caputo, A. Torre, K. Iatrou, J-J. Zhou, J. Krieger, P. Pelosi, Cooperative interactions between odorant- binding proteins of *Anopheles gambiae*, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2010
 20. <http://www.who.int>
 21. Y.-L. Xu, P. He, L. Zhang, S.-Q. Fang, S.-L. Dong, Y.-J. Zhang, F. Li, Large scale identification of odorant-binding proteins from expressed sequence tags in insects, *BMC Genomics*, 10:632, 2009
 22. G. Walsh, *Proteins: Biochemistry and biotechnology*, pp. 147-149
 23. S. Sadanand, Malaria: An Evaluation of the Current State of Research on Pathogenesis and Antimalarial Drugs, Review, *Yale Journal of Biology and Medicine*, 83, 2010, pp.185-191
 24. G. Paluch, L. Bartholomay, J. Coats, Mosquito repellents: a review of chemical structure diversity and olfaction, *Pest Manag. Sci.* 66, 2010, pp. 925-935
 25. T. Cellmer, D. Bratko, J. M. Prausnitz, H. W. Blanch, Protein aggregation in silico, *Trends Biotechnol.*, 25 (6), 2007, pp. 254-261
 26. R. W. Justice, H. Biessmann, M. F. Walter, S. D. Dimitratos, D. F. Woods, Genomics spawns novel approaches to mosquito control, *BioEssays* 25, 2003, pp. 1011-1020

27. I. V. C. Abreu, K.-Y. Zhu, M. R. Ortigao, Transgenesis and paratransgenesis to control insect- borne diseases: Current status and future challenges, *Parasitology International*, Elsevier, 2009
28. K. E. Tsitsanou, T. Thireou, C. E. Drakou, K. Koussis, M. V. Keramioti, D. D. Leonidas, E. Eliopoulos, K. Iatrou, S. E Zographos, Anopheles gambiae odorant binding protein crystal complex with the synthetic repellent DEET : implications for structure-based design of novel mosquito repellents, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2011
29. G. Wang, A. F. Carrey, J. R. Carlson, L. J. Zwiebel, Molecular basis of odor coding in the malaria vector Anopheles gambiae, *PNAS*, Vol. 107, No 9, 2010, pp. 4418-4423
30. M. S. Smyth, J. H. J. Martin, x Ray crystallography, Review, *J. Clin. Pathol: Mol. Pathol*, 53, 2000, pp. 8-14
31. T. Ochi, V. M. Bolanos – Garcia, V. Stojanoff, A. Moreno, Perspectives on protein crystallization, *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, Elsevier, 2009
32. R. G. Berger, *Flavors and Fragrances: chemistry, bioprocessing and sustainability*, Springer, pp. 143-145
33. Mark Wogulis, Tania Morgan, Yuko Ishida, Walter S. Leal, David K. Wilson, The crystal structure of an odorant binding protein from Anopheles gambiae: Evidence for a common ligand release mechanism, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Elsevier, 339, 2006, pp. 157-164
34. Paul Cutler, *Protein Purification Protocols, Methods in Molecular Biology*, Vol. 244, 2nd Edition, Humana Press, 2004
35. Ron R. Kopito, Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation, Review, *Trends in Cell Biology*, Elsevier, Vol. 10, 2000
36. G. Evans, D. Axford, R. L. Owen, The design of macromolecular crystallography diffraction experiments, *Acta Crystallographica D67*, 2011, pp. 261-270
37. J. D. Laughlin, T. S. Ha, D. N. M. Jones, D. P. Smith, Activation of Pheromone –Sensitive Neurons is mediated by Conformational Activation of Pheromone- Binding Protein, *Cell*, 133, 2008, pp. 1255-1265

38. Santwana Kar, Santosh Kar, Control of Malaria, *Nature Reviews*, Vol. 9, 2010, pp. 511-512
39. J. Crawley, C. Chu, G. Mtove, F. Nosten, Malaria in children, *Seminar, Lancet*, 375, 2010, pp. 1468-81
40. E. Hajjar, D. Perahia, H. Debat, C. Nespoulous, C. H. Robert, Odorant Binding and Conformational Dynamics in the Odorant-binding Protein, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol, 281, No 40, 2006, pp. 29929-29937
41. Z. Syed, W. S. Leal, Mosquitoes smell and avoid the insect repellent DEET, *PNAS*, Vol. 105, No 36, 2008, pp. 13598-13603
42. H. Wojtasek, W. S. Leal, Conformational change in the Pheromone-binding Protein from *Bombyx mori* induced by pH and by Interaction with Membranes, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 274, No 43, 1999, pp. 30950-30956,
43. The malERA Consultative Group on Diagnoses and Diagnostics, A Research Agenda for Malaria Eradication: Diagnoses and Diagnostics, Review, *PLoS Medicine*, Vol. 8, Issue 1, 2011
44. J.- M. Gaudin, T. Lander, O. Nikolaenko, Carboxamides Combining Favorable Olfactory Properties with Insect Repellency, *Chemistry and Biodiversity*, Vol. 5, 2008, pp. 617-635
45. A. R. Katritzky, Z. Wang, S. Slavov, M. Tsikolia, D. Dobchev, N. A. Akhmedov, C. D. Hall, U. R. Bernier, G.G. Clark, K. J. Linthicum, Synthesis and bioassay of improved mosquito repellents predicted from chemical structure, *PNAS*, Vol. 105, no 21, 7359-7364, 2008
46. A. Lartigue, A. Gruez, S. Spinelli, S. Riviere, R. Brossut, M. Tegoni, C. Cambillau, The Crystal Structure of a Cockroach Pheromone-binding Protein Suggests a New Ligand Binding and Release Mechanism, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 278, No 32, 2003, pp. 30213-30218
47. M. Ditzen, M. Pellegrino, L. B. Vosshall, Insect Odorant Receptors Are Molecular Targets of the Insect Repellent DEET, *Science*, Vol. 319, 2008, pp. 1838-1842
48. J. Sambrook, D. W. Russell, *Molecular Cloning- A laboratory manual*, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Vol. 1, 2001, pp. 34-35, 168-173
49. *The Protein protocols handbook*, 2nd edition, 2002, part 1 ,15-21, 2002

50. Robert Scopes, *Protein purification –Principles& Practice*, 3d Edition
51. L. Stryer, J. M. Berg, J. L. Tymoczko, *Βιοχημεία*, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, 5^η έκδοση, τόμος Α, 2001
52. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4th edition
53. A. Wlodawer, V. Minor, Z. Dauter, M. Jaskolski, Protein crystallography for non-crystallographers, or how to get the best (but no more) from published macromolecular structures, Review Article, *FEBS Journal*, 275, 2008
54. S. C. Basak, R. Natarajan, W. Nowak, P. Misztal, J. A. Klun, Three dimensional structure- activity relationships (3D-QSAR) for insect repellency of diastereoisomeric compounds : a hierarchical molecular overlay approach, *SAR and QSAR in environmental research*, Vol 18, Nos 3-4, pp. 237-250, 2007
55. S. W. Kruse, R. Zhao, D. P. Smith, D. N. M. Jones, Structure of a specific alcohol binding site defined by the odorant –binding protein LUSH from *Drosophila Melanogaster*, *Nature Structural Biology*, Vol. 10, No 9, 2003
56. S. A. White, L. Briand, D.J. Scott, A. J. Borysik, Structure of odorant-binding protein, OBP1 at 1,6 Å resolution, *Acta cryst.* D65, 2009, pp. 403-410
57. G. Murshudov, P. Skubak, A. A. Lebedev, N. S. Pannu, R. A. Steiner, R. A. Nicholls, M. D. Winn, F. Long, A. A. Vagin, REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures, *Acta Cryst.* D67, 2011, pp. 355-367
58. L. S. Nerio, J. Olivero-Verbel, E. Stashenko, Repellent activity of essential oils: a review, *Bioresourse Technology*, 101, 2010, pp. 372-378
59. P. Wang, R. F. Lyman, T. F. C. Mackay, R. R. H Anholt, Natural Variation in Odorant Recognition Among Odorant Binding Proteins in *Drosophila Melanogaster*, *Genetics*, 2010, pp. 759-767
60. R. K. Scopes, *Protein Purification, Principles and Practice*, 3d edition, Springer, 1993
61. D. Ma, A. K . Bhattacharjee, R. K. Gupta, J. M. Karle, Predicting mosquito repellent potency of N,N-diethyl-m- toluamide (DEET) analogs from molecular electronic properties, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 60(1), 1999, pp. 1-16

62. Iodich, Berg, Zipursky, Matsudaira, Baltimore, Darnell, *Molecular Cell Biology*, 5th edition, Freeman
63. Ι. Παπαϊωάννου, *Σημειώσεις χημείας στερεάς κατάστασης*, Εργαστήριο φυσικοχημείας, Τμήμα Χημείας Πανεπιστημίου Αθηνών, 2004
64. G. Rhodes, *Crystal Clear: A Guide For Users of Macromolecular Models*, 2nd Edition, Academic Press
65. A. Battacharya, *Structures of Desire*, Nature, Vol.459, 2009
66. M. C. Dolan, R. A. Jordan, T. L. Schulze, C. J. Schulze, M. C. Manning, D. Ruffolo, J. P. Schmidt, J. Piesman, J. J. Karchesy, Ability of Two Natural Products, Nootkatone and Carvacrol to Suppress *Ixodes scapularis* and *Amblyomma americanum* in a Lyme Disease Endemic Area of New Jersey, *Medical Entomology*, 102(6), 2009, pp. 2316-2324
67. R. S. Mann, P. E. Kaufman, J. F. Butler, Evaluation of semiochemical toxicity to houseflies and stable flies (Diptera: Muscidae), *Pest Manag. Science*, Vol 66, 2010, pp. 816-824
68. E. Innocent, C.C. Joseph, N. K. Gikonyo, M. H. H. Nkunya, A. Hassanali, Constituents of the essential oil of *Suregada zanzibariensis* leaves are repellent to the mosquito *Anopheles gambiae*, *Journal of Insect Science*, Vol. 10, Article 57
69. M.Jukic, O. Politeo, M. Maksimovic, M. Milos, In Vitro Achetylcholinesterase Inhibitory Properties of Thymol, Carvacrol and their Derivatives Thymoquinone and Thymohydroquinone, *Phytotherapy Research* Vol.21, 2007, pp. 259-261
70. S. Karkabounas, O. K. Kostoula, T. Daskalou, P. Veltsistas, M. Karamouzis, Z. Zelovitis, A. Metsios, P. Lekkas, A. M. Evangelou, N. Kotsis, I. Skoufos, Anticarcinogenic and antiplatelet effects of carvacrol, *Experimental Oncology*
71. http://www.suite101.com/content/antimicrobial-properties-of_thymol_and_carvacrol
72. G. N. Murshudov, P. Skubak, A. A. Lebedev, N. S. Pannu, R. A. Steiner, R. A. Nicholls, M. D. Winn, F. Long, A. A. Vagin, REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures, *Acta Cryst. D* 67, 2011, pp. 355- 367,
73. P.H. Bessette et al, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1999

74. S. French, K. Wilson, On the treatment of negative intensity observations. *Acta Cryst. A*, 34, 1978, pp. 517-525
75. P. Emsley, K. Cowtan, Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Cryst. D-Biological Crystallography*, 60, 2004, pp. 2126-2132
76. G. N. Murshudov, A. A. Vagin, E.J. Dodson, Refinement of Macromolecular Structures by the Maximum-Likelihood Method. *Acta Cryst. Section D-Biol. Cryst.*, 53, 1997, pp. 240-255
77. W.L. DeLano, The PyMOL Molecular Graphics System, *DeLano Scientific, Palo Alto, CA, USA*, 2004
78. N. B. Madsen, S. Shechosky, R. J. Fletterick, Site-Site Interactions in Glycogen Phosphorylase b Probed by Ligands Specific for Each Site, *Biochemistry* 22, 1983, pp. 4460-4465
79. N. G. Oikonomakos, J. B. Schnier, S. E. Zographos, V. T. Skamnaki, K. E. Tsitsanou, L. N. Johnson, Flavopiridol Inhibits Glycogen Phosphorylase by Binding at the Inhibitor Site, *JBC*, Vol. 275, No 44, 2000, pp. 34566-34573
80. N. G. Oikonomakos, S. E. Zographos, L. N. Johnson, A. C. Papageorgiou, K. R. Acharya, The Binding of 2-Deoxy-D-glucose 6-Phosphate to Glycogen Phosphorylase b: Kinetic and Crystallographic Studies, *JMB*, Vol. 254, 1995, pp. 900-917
81. M. van Lieshout, R. S. Kovats, M. T. J. Livermore, P. Martens, Climate change and malaria: analysis of the SRES climate and socio-economic scenarios, *Global environmental change, Elsevier*, 14, 2004, pp. 87-99
82. J. L. Komisar, Malaria vaccines, *Frontiers in Bioscience*, 12, 2007, pp. 3928-3955
83. M. Carson, C. Bugg, L. Delucas, S. Narayana, Comparison of homology model to the experimental structure of a novel serine protease, *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, 50, 1994, pp. 889-894
84. J. M. Hayes, M. Keramioti, K. E. Tsitsanou, C. Tiraidis, K-M. Alexacou, D. D. Leonidas, N. G. Oikonomakos, A. Kato, S.E. Zographos, Sourcing the affinity of flavonoids for the glycogen phosphorylase inhibitor site via crystallography, kinetics and QM/MM-PBSA binding studies: comparison of chrysin and flavopiridol., *paper in preparation*
85. L. Stowers, D. W. Logan, LUSH Shapes Up for a Starring Role in Olfaction, *Cell* 133, 2008, pp. 1137-1139

86. A. G. W. Leslie, Jnt CCP4/ESF- EACBM *Newsl. Protein Crystallogr.*, 26, 1992
87. COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT, *N. Acta, Cryst. D. Biol. Cryst.*, 50, 1994, pp. 760-763
88. R. A. Laskowski, M. W. Macarthur, D. S. Moss, J. M. Thornton, PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures, *J. App Cryst.*, 26, 1993, pp. 283-291
89. R. J. Leatherbarrow, Grafit version 3.0, *Erithakus Software, Staines, UK*, 1992