



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μελέτη της συσχέτισης μεταλλάξεων και λειτουργίας της πρωτεΐνης
Odorant receptor coreceptor του οργανισμού *Anopheles gambiae*

Αναστασία Κ. Μακρή

Επιβλέπουσα καθηγήτρια:

Τριάς Θηραίου, Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ

**ΑΘΗΝΑ
2020**

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μελέτη της συσχέτισης μεταλλάξεων και λειτουργίας της πρωτεΐνης
Odorant receptor coreceptor του οργανισμού *Anopheles gambiae*

Correlation study between mutations and function of Odorant receptor
coreceptor of *Anopheles gambiae*

Αναστασία Κ. Μακρή

Εξεταστική επιτροπή:

Τριάς Θηραίου, Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ (επιβλέπουσα)

Ηλίας Ηλιόπουλος, Καθηγητής ΓΠΑ

Δημήτριος Βλαχάκης, Επίκουρος καθηγητής ΓΠΑ

Μελέτη της συσχέτισης μεταλλάξεων και λειτουργίας της πρωτεΐνης Odorant receptor coreceptor του οργανισμού *Anopheles gambiae*

ΠΜΣ Βιολογία Συστημάτων
Τμήμα Βιοτεχνολογίας
Εργαστήριο Γενετικής

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα πτυχιακή μελέτη έχει ως στόχο τη μελέτη της συσχέτισης μεταλλάξεων και λειτουργίας της πρωτεΐνης Odorant receptor coreceptor (ORCO) του οργανισμού *Anopheles gambiae*. Αρχικά έγινε προτυποποίηση με βάση την ομολογία (homology modeling) της πρωτεΐνης ORCO, η οποία στηρίχθηκε στην πειραματικά λυμένη δομή της πρωτεΐνης ORCO του είδους *Aprocyta bakeri*. Στην συνέχεια έγινε χρήση της τεχνικής του μοριακού ελλιμενισμού (molecular docking) για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης μικρών μορίων (ανταγωνιστών του ORCO) με το κέντρο πρόσδεσης της πρωτεΐνης. Παράλληλα έγινε πολλαπλή στοίχιση ομόλογων ακολουθιών ORCO διάφορων ειδών εντόμων για να μελετηθεί η συντήρηση και η συνεξέλιξη των καταλοίπων του κέντρου πρόσδεσης. Τέλος προσδιορίστηκαν συγκεκριμένα κατάλοιπα του κέντρου πρόσδεσης (W148, L177 και K180) ως σημαντικά για την αλληλεπίδραση με μικρά μόρια. Στα κατάλοιπα αυτά προτείνεται να γίνει μεταλλαξογένεση για να διερευνηθεί πειραματικά ο ρόλος τους στην αλληλεπίδραση με τους προσδέτες.

Επιστημονική περιοχή: Υπολογιστική Βιολογία

Λέξεις κλειδιά: Odorant receptor coreceptor, μοριακός ελλιμενισμός, μεταλλάξεις

Correlation study between mutations and function of Odorant receptor coreceptor of *Anopheles gambiae*

*MSc Systems Biology
Department of Biotechnology
Laboratory of Genetics*

ABSTRACT

In the present thesis, the correlation between mutations and function of Odorant receptor coreceptor (ORCO) of *Anopheles gambiae* was studied. The protein structure was computationally predicted using homology modeling, based on the experimentally solved structure of *Apocrypta bakeri* ORCO protein. Molecular docking was applied to study the interactions of small molecules (ORCO antagonists) within the protein binding site. A multiple sequence alignment of ORCO homologues was constructed in order to study the conservation and co-evolution of binding site amino acid residues. Finally, specific residues (W148, L177 and K180) were identified as important for the interaction with small molecules. Experimental mutation of these residues is required to verify the specific interactions.

Scientific area: Computational Biology

Keywords: Odorant receptor coreceptor, molecular docking, mutations

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Τριάδα Θηραίου για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα, για την επίβλεψη της παρούσας πτυχιακής εργασίας καθώς και για τη συνεχή βοήθεια και καθοδήγηση που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια της συγγραφής.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Ηλία Ηλιόπουλο και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Δημήτριο Βλαχάκη για τη συνεισφορά και τις πολύτιμες συμβουλές τους.

Επίσης, ευχαριστώ τον κ. Κώστα Ιατρού και την κ. Γεωργία Κυθραιώτη που μας παρείχαν τη λίστα με τις ενώσεις και που θα διεξάγουν τα πειράματα.

Table of Contents

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	3
1.1 Βιολογικό υπόβαθρο	3
1.1.1 Ελνοοσία	3
1.1.2 Όσφρηση	4
1.1.3 Οσφρητικό σύστημα εντόμων	4
1.1.4 Πρωτεΐνες OBPs	7
1.1.5 OR - ORCO	8
1.2 Υπολογιστικό υπόβαθρο	10
1.2.1 Προτυποποίηση με βάση την ομολογία (Homology modeling)	10
1.2.2 Μοριακός ελλιμενισμός (Molecular docking)	13
1.2.3 Συνεξέλιξη πρωτεϊνών	15
1.3 Σκοπός της εργασίας	16
2 ΜΕΘΟΔΟΙ	18
2.1 Ανάκτηση ομόλογων ακολουθιών	18
2.2 Πολλαπλή στοίχιση	20
2.3 Ανάκτηση πρωτεϊνικής δομής	20
2.4 Προτυποποίηση με βάση την ομολογία (Homology modelling)	20
2.5 Μοριακός ελλιμενισμός (Molecular docking)	21
2.6 Μικρά μόρια	21

2.7 MISTIC.....	22
2.8 HotSpot Wizard	22
3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	23
3.1 Βιβλιογραφική αναζήτηση	23
3.2 Πολλαπλή στοίχιση	29
3.3 Προτυποποίηση με βάση την ομολογία	38
3.4 Ελλιμενισμός	41
3.5 Συνεξέλιξη	45
3.5.1 HotSpot Wizard	45
3.5.2 MISTIC.....	47
4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	51
5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	57

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Βιολογικό υπόβαθρο

1.1.1 Ελονοσία

Η ελονοσία είναι μια ασθένεια που προκαλείται από το παράσιτο *Plasmodium falciparum*, το οποίο μεταφέρεται στους ανθρώπους μέσω του τσιμπήματος του θηλυκού κουνουπιού *Anopheles gambiae* (Phillips et al., 2017).

Περισσότεροι από 300 με 500 εκατομμύρια άτομα σε ολόκληρο τον κόσμο είναι μολυσμένοι με το παράσιτο *Plasmodium spp* και έως 2.7 εκατομμύρια άνθρωποι τον χρόνο πεθαίνουν από τη μόλυνση. Η ελονοσία είναι ενδημική σε σχεδόν 90 χώρες και αφορά περίπου το 40% του παγκόσμιου πληθυσμού. Σχεδόν το 90% των θανάτων από ελονοσία συμβαίνουν στην Αφρική. Η αντιμετώπιση της ελονοσίας είναι δύσκολη και κανένα φάρμακο δεν είναι ολοκληρωτικά αποδοτικό (Garcia, 2010).

Ένα εμβόλιο θα ήταν η ιδανική προσθήκη στα εργαλεία που έχουμε στη διάθεσή μας κατά της ελονοσίας. Όμως η ελονοσία προκαλείται από παράσιτα, τα οποία είναι πολύ πιο πολύπλοκα από τους ιούς και τα βακτήρια για τα οποία υπάρχουν διαθέσιμα εμβόλια, καθώς τα παράσιτα περνάνε από πολλαπλά στάδια ανάπτυξης στον ανθρώπινο ξενιστή και σε κάθε στάδιο εκφράζονται εκατοντάδες μοναδικά αντιγόνα. Αυτή η πολυπλοκότητα το κάνει πολύ πιο δύσκολο να αναπτυχθεί ένα εμβόλιο για παράσιτα σε σχέση με τα βακτήρια και τους ιούς, καθώς η ανοσολογική απόκριση που στοχεύει σε ένα στάδιο πιθανόν να μην προσφέρει προστασία ενάντια σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης του παρασίτου. (Hoffman, Vekemans, Richie, & Duffy, 2015)

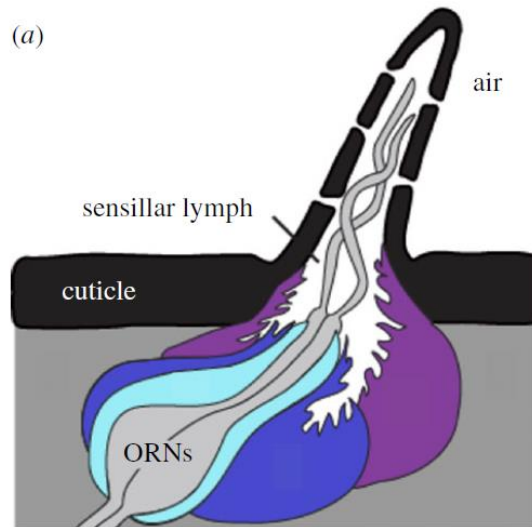
1.1.2 Όσφρηση

Το κουνούπι *Anopheles gambiae* είναι ο βασικός φορέας της ελονοσίας, ασθένειας με καταστροφικές επιδράσεις στην παγκόσμια υγεία. Η όσφρηση είναι η βασική αίσθηση γι'αυτό το κουνούπι και ως εκ τούτου παίζει κρίσιμο ρόλο στην επιλογή ξενιστή και σε άλλες συμπεριφορές των ενήλικων θηλυκών που επηρεάζουν ευθέως της ικανότητά τους να δρουν ως φορείς της ασθένειας (Wang, Carey, Carlson, & Zwiebel, 2010).

Η όσφρηση παίζει έναν σημαντικό ρόλο στην προσαρμοστικότητα του οργανισμού, παρέχοντας την αντίληψη των οσμών και φερομονών που είναι απαραίτητες για την επιβίωση και την αναπαραγωγή τους. Το οσφρητικό σύστημα των εντόμων έχει μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητα. Η ταυτοποίηση των οσμών είναι κρίσιμη για ένα εύρος δραστηριοτήτων, συμπεριλαμβανομένου του εντοπισμού πηγών τροφής, υποστρώματος για την εναπόθεση αυγών, συντρόφων και θηρευτών. (Vieira, Sanchez-Gracia, & Rozas, 2007)

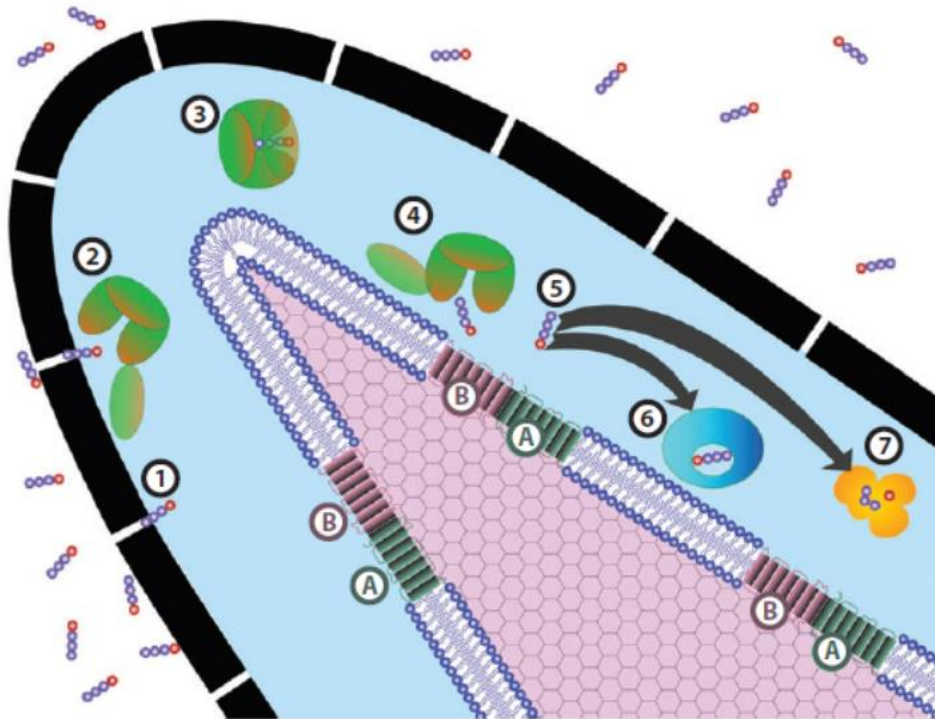
1.1.3 Οσφρητικό σύστημα εντόμων

Η βασική μονάδα του οσφρητικού συστήματος των εντόμων είναι το οσφρητικό αισθητήριο (olfactory sensillum). Τα οσφρητικά αισθητήρια τα οποία εντοπίζονται στις κεραίες και στις γναθικές κεραίες (maxillary palps), έχουν πόρους στο περίβλημα (cuticle) μέσω των οποίων πτητικά μόρια έχουν πρόσβαση στην λέμφο που περιβάλλει τους δενδρίτες των αισθητηρίων οσφρητικών νευρώνων.



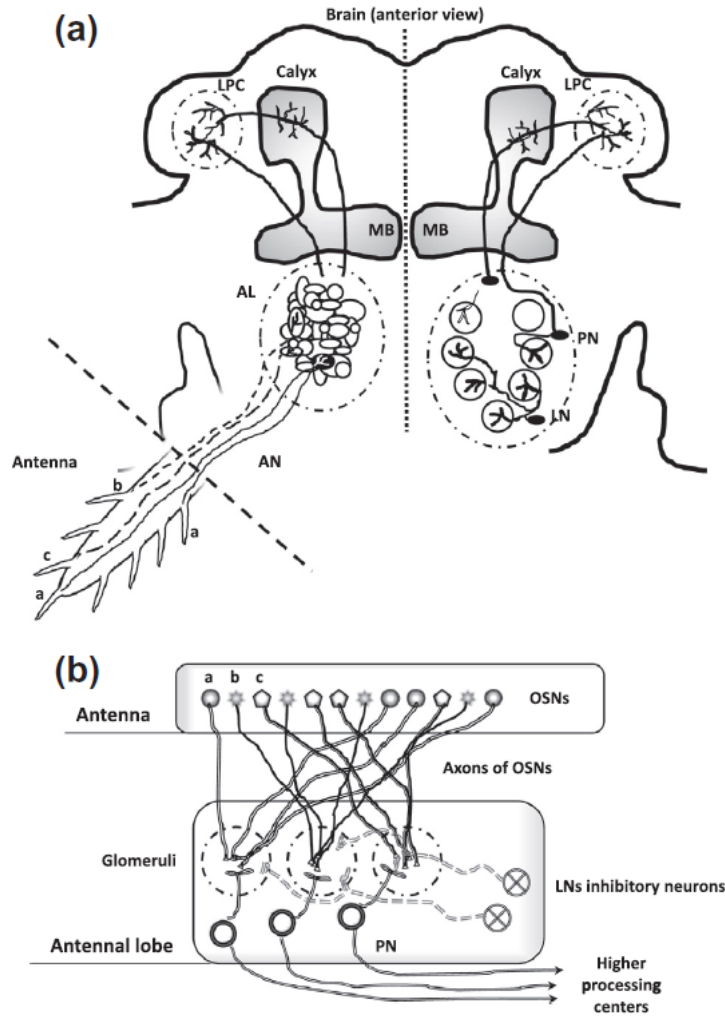
Εικόνα 1.1 Η δομή ενός οσφρητικού αισθητηρίου

Συνήθως ένα αισθητήριο περιλαμβάνει δύο ή περισσότερους οσφρητικούς νευρώνες που είναι εξειδικευμένοι για την αντίληψη συγκεκριμένων προσδετών. Τα συνήθως υδρόφοβα μόρια που εισέρχονται στην λεμφική κοιλότητα του οσφρητικού αισθητηρίου προσδένονται σε πρωτεΐνες OBPs (odourant binding proteins) που παράγονται από τα υποστηρικτικά κύτταρα που περιβάλλουν τον αισθητικό νευρώνα. Η πρόσδεση των οσμών από τις OBPs αυξάνει την διαλυτότητά τους και διευκολύνει την μεταφορά τους μέσω του υδρόφιλου περιβάλλοντος της λέμφου πριν την παράδοσή τους στους οσφρητικούς υποδοχείς (ORs) που βρίσκονται στην δενδριτική μεμβράνη των αισθητικών νευρώνων. (Leal, 2013).



Εικόνα 1.2 Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού της πρόσδεσης, απόδοσης και απενεργοποίησης οσφρητικών μορίων. 1) Οσφρητικές ουσίες φτάνουν στην λέμφο μέσω πόρων στο περίβλημα και 2) προσδέονται σε OBPs. 3) Το σύμπλοκο οσφρητικής ουσίας-OBP μεταφέρεται μέσω της λέμφου και 4) αποδίδει τον προσδέτη που ενεργοποιεί του οσφρητικούς υποδοχείς. 5) Οι οσφρητικοί υποδοχείς λειτουργούν ως ετεροτετραμερή με μία μονάδα πρόσδεσης (B) και έναν καλά συντηρημένο συνυποδοχέα Orco (A). 6) Έπειτα οι ελεύθερες οσφρητικές ουσίες απενεργοποιούνται από μια άγνωστη μέχρι στιγμής μοριακή "παγίδα" ή/και 7) από την γρήγορη δράση ενζύμων που τις διασπούν.

Οι άξονες των οσφρητικών αισθητηριακών νευρώνων των εντόμων προβάλλουν στον κεραϊκό λοβό (antennal lobe). Ο κεραϊκός λοβός είναι μια σφαιρική περιοχή στον εγκέφαλο που λαμβάνει αισθητήριες πληροφορίες από οσφρητικούς αισθητηριακούς νευρώνες που βρίσκονται στις κεραίες και σε στοματικά όργανα. Ο κεραϊκός λοβός αποτελείται από σφαιροειδείς δομές που ονομάζονται σπειράματα (glomeruli) που περιβάλλονται από γλοία. Συνήθως όλοι οι οσφρητικοί αισθητηριακοί νευρώνες που εκφράζουν τον ίδιο οσφρητικό υποδοχέα συγκλίνουν σε ένα από πολλαπλά σπειράματα (Guidobaldi, May-Concha, & Guerenstein, 2014).



Εικόνα 1.3 α) Πρόσθια όψη του εγκεφάλου ενός ενήλικου εντόμου όπου φαίνονται τα οσφρητικά μονοπάτια. Οι αισθητηριακοί οσφρητικοί νευρώνες προβάλλουν μέσω του κεραϊκού νεύρου σε σφαιρικά σπειράματα στον κεραϊκό λοβό. Οι αισθητηριακοί οσφρητικοί νευρώνες που εκφράζουν τον ίδιο οσφρητικό υποδοχέα προβάλλουν στο ίδιο σπείραμα. β) Σχηματική αναπαράσταση της οργάνωσης των σπειραμάτων του κεραϊκού λοβού. Οι άξονες των νευρώνων που εκφράζουν τον ίδιο τύπο οσφρητικού υποδοχέα συγκλίνουν στα σπειράματα του κεραϊκού λοβού.

1.1.4 Πρωτεΐνες OBPs

Πρωτεΐνες OBPs έχουν ταυτοποιηθεί και χαρακτηριστεί σε μια ποικιλία εντόμων, (Vieira & Rozas, 2011), συμπεριλαμβανομένης της *Drosophila melanogaster* (McKenna, Hekmat-Safe,

Gaines, & Carlson, 1994). Οι πρωτεΐνες OBPs διακρίνονται από κάποια χαρακτηριστικά: αριθμός, αφθονία, ποικιλότητα.

Οι OBPs πρωτεΐνες βρίσκονται σε μεγάλο αριθμό στα γονιδιώματα εντόμων που έχουν αλληλουχηθεί. Υπάρχουν 52 OBPs στην *Drosophila* (Hekmat-Scafe, Scafe, McKinney, & Tanouye, 2002), ενώ κάποια είδη περιλαμβάνουν ακόμα περισσότερα Obr γονίδια. Το κουνούπι *Anopheles gambiae* περιέχει 69 (Vieira & Rozas, 2011), και η γερμανική κατσαρίδα *Blattella germanica* περιέχει 109 (Robertson, Baits, Walden, Wada-Katsumata, & Schal, 2018) .

Κάποιες OBPs εκφράζονται σε πολύ υψηλά επίπεδα. Απο τα 10 πιο άφθονα εκφρασμένα γονίδια στο οσφρητικό τμήμα της κεραίας της *Drosophila*, 5 είναι OBPs, όπως φάνηκε από RNAseq ανάλυση (Menuz, Larter, Park, & Carlson, 2014).

Οι OBPs εμφανίζουν υψηλή ποικιλομορφία στην αλληλουχία. Για παράδειγμα, μέσα στην οικογένεια Obr της *Drosophila*, τα μέλη της οικογένειας μοιράζονται μόλις 20% αμινοξική ταύτιση κατά μέσο όρο (Graham & Davies, 2002).

Η δομή μιας Obr από το *Bombyx mori* καθορίστηκε το 2000 σε 2 μελέτες, μια χρησιμοποιώντας κρυσταλλογραφία ακτινών X και μια NMR. (Damberger et al., 2000; Sandler, Nikonova, Leal, & Clardy, 2000) Από τότε περισσότερες από 20 δομές Obr πρωτεϊνών έχουν λυθεί. Οι Obrs τυπικά περιλαμβάνουν έξι α-έλικες, τρεις δισουλφιδικές γέφυρες και μια εσωτερική κοιλότητα που μπορεί να προσδένει μικρά υδρόφοβα μόρια. (Sun, Xiao, & Carlson, 2018)

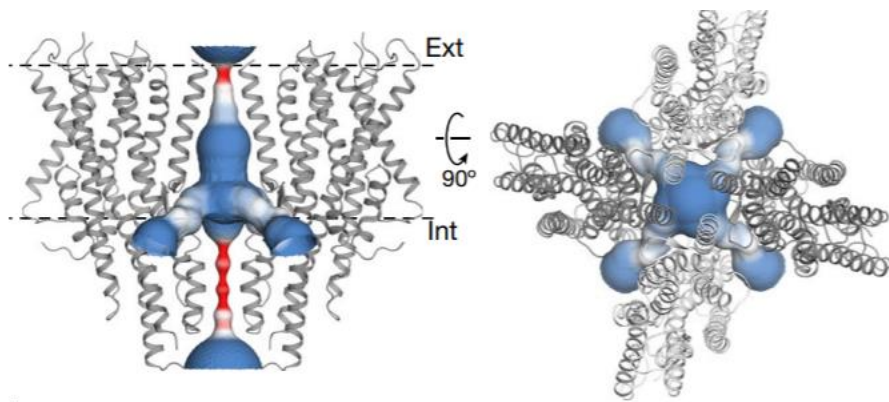
1.1.5 OR - ORCO

Τα γονίδια Or έχουν εξελιχθεί πολλές φορές και έχουν διαφορετική προέλευση στα έντομα και στα σπονδυλωτά. Παρόλο που οι ORs των εντόμων περιέχουν επτά διαμεμβρανικές έλικες, δεν είναι GPCRs (όπως είναι οι ORs των σπονδυλωτών) αλλά αντιθέτως λειτουργούν ως κανάλια

ιόντων. Έχουν μια ανεστραμμένη τοπολογία με ενδοκυττάρια αμινοτελικά άκρα και εξωκυττάρια καρβοξυτελικά άκρα. Οι ORs των εντόμων φαίνεται πως είναι ετεροτετραμερή που αποτελούνται από δύο αντίγραφα της απαραίτητης και κοινής μεταξύ όλων των ORs υπομονάδας ORCO και από δύο αντίγραφα ενός OR που αλληλεπιδρά με προσδέτες, και μαζί σχηματίζουν ιοντικά κανάλια που ελέγχονται από προσδέτες.

Συνήθως υπάρχει μόνο ένα γονίδιο *orco* σε κάθε γονιδίωμα εντόμου και οι ακολουθίες των *Orco* είναι υψηλά συντηρημένες μεταξύ των ειδών. Αντίθετα, ο αριθμός των γονιδίων *Or* ποικίλει από 3 έως 500.

Από τότε που το σύμπλοκο *Orco*-OR χαρακτηρίστηκε ως ετεροπολυμερές που λειτουργεί ως κανάλι ιόντων, οι επιστήμονες κατέβαλαν προσπάθειες να προσδιορίσουν τη δομή αυτού του συμπλόκου. Πρόσφατα, η δομή του *Orco* από το έντομο *Aroscrypta bakeri* λύθηκε πειραματικά μέσω cryo-EM ως ομοτετραμερές (Yan et al., 2020).



Εικόνα 1.4 Ο πόρος του καναλιού *Orco*. Οι υπομονάδες του *Orco* φαίνονται με γκρι χρώμα.

Έχουν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί για την διαμεσολαβούμενη από τους ORs μεταγωγή σήματος και είναι πιθανόν να υπάρχουν περισσότεροι από ένας μηχανισμοί. Σύμφωνα με μία υπόθεση το ετερομερές OR-ORCO σχηματίζει ένα μη εκλεκτικό κανάλι ιόντων που ενεργοποιείται από προσδέτες. Έτσι, μετά από ενεργοποίηση από οσμές, παρατηρείται ροή

ιόντων ασβεστίου και αύξηση στην μη εκλεκτική αγωγιμότητα κατιόντων. Έχει προταθεί ότι αυτή η ιοντοτροπική μεταγωγή σήματος είναι ανεξάρτητη από τα μονοπάτια όπου συμμετέχουν δευτερογενή μηνύματα (messengers) που σχετίζονται με G-πρωτεΐνες. Επίσης, έχει προταθεί ότι ο ίδιος ο ORCO είναι κανάλι κατιόντων και ότι αυτό το κανάλι ενεργοποιείται από δύο διαφορετικά μονοπάτια. Στο πρώτο (γρήγορο, ιοντοτροπικό) μονοπάτι οσφρητικοί προσδέτες ενεργοποιούν τον OR, ο οποίος στη συνέχεια ενεργοποιεί τον ORCO (κανάλι). Στο δεύτερο (αργό, μεταβοτροπικό) μονοπάτι η ενεργοποίηση του OR έχει σαν αποτέλεσμα έναν καταρράκτη που περιλαμβάνει G-πρωτεΐνες και αδενυλική κυκλάση που ενεργοποιεί κυκλικά νουκλεοτίδια που προκαλούν ιοντικό ρεύμα μόνο αφού πρώτα γίνει φωσφορυλίωση του ORCO από φωσφορική κινάση. Τέλος έχει επίσης προταθεί ότι η ενεργοποίηση μέσω οσφρητικών ουσιών ενεργοποιεί μια G-πρωτεΐνη που με τη σειρά της ενεργοποιεί μια φωσφολιπάση C, που οδηγεί σε μια αύξηση της τριφωσφορικής ινοσιτόλης (IP3). Η αύξηση της IP3 ενεργοποιεί ένα κανάλι ασβεστίου εξαρτημένο από IP3 και τα επίπεδα ενδοκυττάριου ασβεστίου αυξάνονται οδηγώντας σε διέλευση ρεύματος. Μακροχρόνια αύξηση ασβεστίου οδηγεί στην ενεργοποίηση περαιτέρω καναλιών κατιόντων καθώς επίσης και του καναλιού ORCO, αυξάνοντας έτσι την αγωγιμότητά τους και οδηγώντας σε επιπλέον μεταβοτροπικό ρεύμα. (Guidobaldi et al., 2014)

1.2 Υπολογιστικό υπόβαθρο

1.2.1 Προτυποποίηση με βάση την ομολογία (Homology modeling)

Η προτυποποίηση με βάση την ομολογία (homology modeling) είναι μία από τις υπολογιστικές μεθόδους πρόγνωσης δομής που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της τρισδιάστατης δομής πρωτεϊνών από την αμινοξική τους αλληλουχία. Αυτή η μέθοδος έχει πολλές εφαρμογές στην διαδικασία ανακάλυψης φαρμάκων.

Η βάση για την προτυποποίηση με βάση την ομολογία είναι κυρίως δύο παρατηρήσεις. Αφενός, η πρωτεϊνική τρισδιάστατη δομή καθορίζεται από την αμινοξική ακολουθία. Αφετέρου, η δομή των πρωτεϊνών είναι περισσότερο συντηρημένη σε σχέση με την αμινοξική αλληλουχία και η αλλαγή συμβαίνει σε πολύ αργότερο ρυθμό κατά τη διάρκεια της εξέλιξης. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα παρόμοιες ακολουθίες να διπλώνονται σε ταυτόσημες δομές και ακόμα και αλληλουχίες με μικρή ομοιότητα να διπλώνονται σε παρόμοιες δομές.

Η προτυποποίηση με βάση την ομολογία είναι μια μέθοδος πρόγνωσης δομής που αποτελείται από συγκεκριμένα στάδια.

α) Ταυτοποίηση και επιλογή προτύπου (template)

Σε αυτό το στάδιο της διαδικασίας η αλληλουχία-στόχος χρησιμοποιείται για την ανεύρεση δομών-προτύπων στην βάση δεδομένων PDB με χρήση του εργαλείου BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Αφού ταυτοποιηθούν τα υποψήφια πρότυπα, οι πιο κατάλληλες δομές πρέπει να επιλεγούν. Η υψηλή ομοιότητα αλληλουχίας-στόχου και αλληλουχίας-προτύπου είναι απαραίτητη για την κατασκευή μοντέλου υψηλής ακρίβειας.

β) Ευθυγράμμιση αλληλουχιών και διόρθωση ευθυγράμμισης

Σε αυτό το στάδιο γίνεται διόρθωση των ευθυγραμμίσεων των αλληλουχιών εφόσον αυτό είναι απαραίτητο.

γ) Κατασκευή μοντέλου

Διάφορες μέθοδοι χρησιμοποιούνται για την παραγωγή τρισδιάστατων μοντέλων των ακολουθιών-στόχων. Οι μέθοδοι αυτές περιλαμβάνουν τις μεθόδους συμπαγούς σώματος-συναρμολόγησης (rigid body-assembly methods), τις μεθόδους ταιριάσματος τμημάτων

(segment matching methods), τις μεθόδους χωρικού περιορισμού (spatial restraint methods) και τις μεθόδους τεχνητής εξέλιξης (artificial evolution methods).

δ) Μοντελοποίηση θηλιών

Οι δομές των θηλιών δεν συντηρούνται κατά τη διάρκεια της εξέλιξης. Τα κενά (gaps) και οι εισαγωγές (insertions) συχνά είναι καθοριστικής σημασίας για την λειτουργία μιας πρωτεΐνης. Η ακρίβεια στην μοντελοποίηση θηλιών είναι ένας σημαντικός παράγοντας που καθορίζει την αξία ενός μοντέλου. Υπάρχουν δύο βασικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την μοντελοποίηση θηλιών. Στη μία προσέγγιση γίνεται αναζήτηση σε βάσεις δεδομένων και στην άλλη γίνεται αναζήτηση διαμορφώσεων.

ε) Μοντελοποίηση πλευρικών αλυσίδων

Η μοντελοποίηση των πλευρικών αλυσίδων γίνεται συνήθως με την τοποθέτηση πλευρικών αλυσίδων στις συντεταγμένες της "ραχοκοκαλιάς" (backbone coordinates) που προέρχεται από μία γονεϊκή δομή (parent structure). Στην πράξη η μοντελοποίηση των πλευρικών αλυσίδων έχει επιτυχία για μεγάλη ομοιότητα των ακολουθιών πρότυπο και στόχος.

στ) Βελτιστοποίηση μοντέλου

Η βελτιστοποίηση του μοντέλου συνήθως γίνεται με μια ελαχιστοποίηση ενέργειας χρησιμοποιώντας πεδία δύναμης μοριακής μηχανικής (molecular mechanics force fields).

ζ) Επαλήθευση μοντέλου

Η ακρίβεια του κατασκευασμένου μοντέλου μπορεί να καθορίσει την χρησιμότητα του σε διάφορους τομείς. Τα παραγόμενα μοντέλα έχουν διαφορετική ακρίβεια ανάλογα με την ποιότητα των προτύπων που χρησιμοποιήθηκαν και την ομοιότητα των ακολουθιών πρότυπο

και στόχος. Για την εκτίμηση της ακρίβειας του μοντέλου είναι απαραίτητη η μελέτη της στεροχημείας του, ελέγχοντας παραμέτρους όπως το μήκος δεσμού και η γωνία περιστροφής. Το διάγραμμα Ramachandran είναι επίσης ένα ισχυρό εργαλείο για την εκτίμηση της ποιότητας του μοντέλου. Κατάλοιπα με πρόβλημα στεροχημείας θα πέσουν έξω από τις αποδεκτές περιοχές του διαγράμματος. (Muhammed & Aki-Yalcin, 2019)

1.2.2 Μοριακός ελλιμενισμός (Molecular docking)

Η τεχνική του μοριακού ελλιμενισμού (molecular docking) χρησιμοποιείται για τη μοντελοποίηση της αλληλεπίδρασης ανάμεσα σε ένα μικρό μόριο και μια πρωτεΐνη στο ατομικό επίπεδο, η οποία μας επιτρέπει να χαρακτηρίσουμε τη συμπεριφορά μικρών μορίων στο κέντρο πρόσδεσης πρωτεϊνών-στόχων καθώς επίσης και να διαλευκάνουμε θεμελιώδεις μεταβολικές διαδικασίες. Η διαδικασία του ελλιμενισμού περιλαμβάνει δύο βασικά βήματα: πρώτον, πρόγνωση της διαμόρφωσης, της θέσης και του προσανατολισμού του προσδέτη μέσα στο ενεργό κέντρο και δεύτερον, εκτίμηση της συγγένειας πρόσδεσης (binding affinity).

Η γνώση της θέσης του σημείου πρόσδεσης πριν από την διαδικασία του ελλιμενισμού αυξάνει σημαντικά την αποδοτικότητα του ελλιμενισμού. Σε πολλές περιπτώσεις η θέση πρόσδεσης είναι γνωστή πριν τον ελλιμενισμό. Επίσης, μπορεί κανείς να αποκτήσει πληροφορίες για το κέντρο πρόσδεσης μέσω της σύγκρισης των πρωτεϊνών-στόχων με μια οικογένεια πρωτεϊνών που έχουν παρόμοια λειτουργία ή με πρωτεΐνες που έχουν κρυσταλλωθεί με άλλους προσδέτες. Όταν δεν υπάρχουν πληροφορίες για το σημείο πρόσδεσης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν προγράμματα ανίχνευσης κοιλοτήτων για την αναγνώριση υποθετικών ενεργών κέντρων μέσα σε πρωτεΐνες. Ο ελλιμενισμός χωρίς καμία γνώση για τη σημείο πρόσδεσης λέγεται τυφλός ελλιμενισμός.

Το πρώτο μοντέλο για τον μηχανισμό πρόσδεσης προσδέτη-υποδοχέα είναι η θεωρία κλειδιού και κλειδαριάς (lock-and-key theory) που προτάθηκε από τον Fischer. Οι πρώιμες μέθοδοι ελλιμενισμού στηρίχτηκαν σε αυτή τη θεωρία και τόσο ο προσδέτης όσο και ο υποδοχέας αντιμετωπίστηκαν σαν συμπαγή σώματα. Έπειτα, η θεωρία του επαγόμενου ταιριάσματος (induced fit) που προτάθηκε από τον Koshland πήγε την θεωρία κλειδιού και κλειδαριάς ένα βήμα παραπέρα. Σύμφωνα με αυτή τη θεωρία το ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης αλλάζει σχήμα (is reshaped) συνεχώς από τις αλληλεπιδράσεις με τους προσδέτες. Αυτή η θεωρία υπονοεί ότι ο προσδέτης και ο υποδοχέας θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως εύκαμπτοι (flexible) κατά τη διάρκεια του ελλιμενισμού. Κατά συνέπεια μπορεί να περιγράψει τα γεγονότα πρόσδεσης με μεγαλύτερη ακρίβεια σε σχέση με την προσέγγιση των μορίων ως συμπαγών σωμάτων. Δεδομένων των περιορισμών των υπολογιστικών πόρων, ο ελλιμενισμός πραγματοποιείται συνήθως με εύκαμπτο προσδέτη και συμπαγή υποδοχέα.

Στην ουσία, ο στόχος του μοριακού ελλιμενισμού είναι να δώσει μια πρόγνωση του συμπλόκου προσδέτη-υποδοχέα χρησιμοποιώντας υπολογιστικές μεθόδους. Ο ελλιμενισμός μπορεί να επιτευχθεί μέσω δύο βημάτων: πρώτον μέσω δειγματοληψίας (sampling) των διαμορφώσεων του προσδέτη στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης και δεύτερον κατατάσσοντας (ranking) αυτές τις διαμορφώσεις μέσω μιας συνάρτησης βαθμολόγησης (scoring function). Θα ήταν πολύ κοστοβόρο να παραχθούν υπολογιστικά όλες οι δυνατές διαμορφώσεις προσδέτη και υποδοχέα, γι'αυτό έχουν αναπτυχθεί διάφοροι αλγόριθμοι δειγματοληψίας (sampling algorithms) που χρησιμοποιούνται ευρέως από προγράμματα ελλιμενισμού. Ο σκοπός της συνάρτησης βαθμολόγησης είναι να ξεχωρίσει τις σωστές διαμορφώσεις από τις λανθασμένες σε εύλογο υπολογιστικό χρόνο. Παρόλα αυτά οι συναρτήσεις βαθμολόγησης περιλαμβάνουν εκτίμηση παρά ακριβή υπολογισμό της συγγένειας πρόσδεσης (binding affinity) ανάμεσα στην πρωτεΐνη και στον προσδέτη. Οι συναρτήσεις βαθμολόγησης μπορούν να διαιρεθούν σε αυτές

που βασίζονται σε πεδίο δυνάμεων (force-field-based), σε εμπειρικές (empirical) και σε αυτές που βασίζονται στην γνώση (knowledge-based). (Meng, Zhang, Mezei, & Cui, 2011)

1.2.3 Συνεξέλιξη πρωτεϊνών

Ως τμήμα της εξελικτικής θεωρίας, η συνεξέλιξη είναι απαραίτητη για την κατανόηση των ζώντων συστημάτων. Στον απλούστερο ορισμό της, η συνεξέλιξη αναφέρεται σε συντονισμένες αλλαγές που συμβαίνουν σε ζευγάρια οργανισμών ή βιομορίων, κατά κανόνα για να συντηρηθούν ή να βελτιωθούν λειτουργικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών των ζευγαριών. Ο ίδιος ο Δαρβίνος ξεκίνησε την μελέτη της συνεξέλιξης. Οι μελέτες του Dobzhansky και άλλων συνεισέφεραν στην καθιέρωση αυτής της έννοιας σε όρους γενετικής. Τις τελευταίες δεκαετίες πολλή προσπάθεια έχει αφιερωθεί στην έρευνα της συνεξέλιξης στο μοριακό επίπεδο.

Μεγάλη πρόοδος έχει γίνει στην ανάπτυξη υπολογιστικών εργαλείων για την ανίχνευση της μοριακής συνεξέλιξης. Τα πιο πρόσφατα εργαλεία εστιάζουν στην συνεξέλιξη πρωτεϊνών. Τα εργαλεία αυτά μπορούν να διαιρεθούν σε αυτά που αναζητούν την συνεξέλιξη στο επίπεδο των αμινοξικών καταλοίπων και σε αυτά που την αναζητούν σε επίπεδο πρωτεΐνης. Όλα τα εργαλεία βασίζονται σε αρχές της μοριακής φυλογενετικής.

Τα εργαλεία στο επίπεδο των αμινοξικών καταλοίπων χρησιμοποιούν κατά κανόνα την πολλαπλή στοίχιση ακολουθιών (MSA) μιας πρωτεΐνης και των ομόλογων ακολουθιών για να γίνει αναζήτηση συσχετιζόμενων μεταλλάξεων. Τέτοιες συσχετιζόμενες μεταλλάξεις είναι ενδεικτικές εξισορροπιστικών αλλαγών που συμβαίνουν μεταξύ αμινοξικών καταλοίπων που βρίσκονται σε εγγύτητα, σε άμεση επαφή ή που δρουν μαζί σε καταλυτικά κέντρα ή κέντρα πρόσδεσης, για να διατηρηθεί η σταθερότητα της πρωτεΐνης, η λειτουργία της ή το δίπλωμά της.

Επιπλέον, η επέκταση αυτών των μεθόδων για την αναζήτηση συσχετιζόμενων μεταλλάξεων μεταξύ ζευγαριών αλληλεπιδρόντων πρωτεϊνών μπορεί να οδηγήσει στην ταυτοποίηση διαπρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Παράλληλα, έχουν αναπτυχθεί σχετικές μέθοδοι για την αναζήτηση μεγαλύτερων ομάδων αμινοξικών καταλοίπων που είναι συντηρημένα μέσα σε συγκεκριμένες πρωτεϊνικές υποοικογένειες. Αυτές οι μέθοδοι μπορούν να αναγνωρίσουν αμινοξικά κατάλοιπα που ορίζουν λειτουργικές ιδιότητες αυτής της υποοικογένειας, όπως η ειδικότητα πρόσδεσης ενός υποστρώματος κάποιου δεδομένου ενζύμου. (de Juan, Pazos, & Valencia, 2013)

1.3 Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της συσχέτισης μεταλλάξεων και λειτουργίας της πρωτεΐνης Odorant receptor coreceptor του οργανισμού *Anopheles gambiae*. Στο πλαίσιο αυτό δημιουργήθηκε ένα μοντέλο της τριτοταγούς δομής της πρωτεΐνης ORCO, με την μέθοδο της προτυποποίησης πρωτεϊνών με βάση την ομολογία (homology modeling). Στη συνέχεια έγινε μελέτη της σύνδεσης πειραματικά επιβεβαιωμένων προσδετών στο ενεργό κέντρο του μοντέλου, με τη χρήση της τεχνικής του μοριακού ελλιμενισμού. Παράλληλα προσδιορίστηκαν τα κατάλοιπα του κέντρου πρόσδεσης, τα οποία είναι συντηρημένα, καθώς και όσα συνεξελίσσονται με βάση την πολλαπλή στοίχιση ομόλογων ακολουθιών άλλων εντόμων. Οι πληροφορίες από τα επιμέρους βήματα συνδυάστηκαν, προκειμένου να προταθούν κατάλοιπα απαραίτητα για την λειτουργία της πρωτεΐνης, μέσω της αλληλεπίδρασής της με μικρά μόρια, καθώς και μεταλλάξεις των συγκεκριμένων αμινοξέων, για την πειραματική μελέτη του προτεινόμενου μηχανισμού.

2 ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Ανάκτηση ομόλογων ακολουθιών

Στην εργασία των Soffan et al. 2018 (Soffan, Subandiyah, Makino, Watanabe, & Horiike, 2018) αναφέρονται οι κωδικοί (accession number) 59 ομόλογων αμινοξικών αλληλουχιών της πρωτεΐνης Orco από διαφορετικά είδη εντόμων (πίνακας 2.1). Οι αλληλουχίες αυτές ανακτήθηκαν από την βάση δεδομένων του NCBI και αποθηκεύτηκαν σε αρχείο fasta.

(Order) Species	Accession No.		Topology (Memsat2)		
	Nucleotide	Protein	TM	N term.	C term.
Coleoptera					
<i>Ambrostoma quadriimpresum</i>	KM893996	AJF94638	7	in	out
<i>Anomala corpulenta</i>	KM251654	AKC58535	7	in	out
<i>Colaphellus bowringi</i>	KT381541	ALR72547	7	in	out
<i>Dendroctonus ponderosae</i>	XM_019912566	XP_019768125	7	in	out
<i>Holotrichia oblita</i>	JF718662	AEE69033	7	out	in
<i>H. parallela</i>	JF826514	AEG88961	7	out	in
<i>H. plumbea</i>	HQ110087	ADM35103	7	out	in
<i>Rhynchophorus ferrugineus</i>	KU845250	AOO35283	7	in	out
<i>R. vulneratus</i>	KU845251	AOO35284	7	in	out
<i>Tenebrio molitor</i>	KP296755	AJO62219	7	in	out
Diptera					
<i>Aedes albopictus</i>	KF663696	AHL20247	5	out	in
<i>Anopheles gambiae</i>	AY843205	AAX14774	6	out	out
<i>Bactrocera dorsalis</i>	KP743711	AKI29027	7	in	out
<i>Ceratitis capitata</i>	AY843206	JAC04018	7	in	out
<i>Chrysomya megacephala</i>	HQ315861	AEA30004	7	in	out
<i>C. rufifacies</i>	JQ365176	AFH96943	7	in	out
<i>Drosophila melanogaster</i>	AY567998	AAT71306	7	in	out
<i>D. pseudoobscura</i>	XM_001359327	XP_001359364	7	in	out
<i>D. suzukii</i>	LT555553	NP_00131553	7	in	out

		0		
<i>Haematobia irritans</i>	EU622915	ACF21678	7 in	out
<i>Lucilia sericata</i>	HQ315862	AEA30005	7 in	out
<i>Mayetiola destructor</i>	KX661034	AOT85634	6 out	out
<i>Musca domestica</i>	JQ365179	AFH96944	7 in	out
<i>Scaeva pyrastris</i>	KU291818	AOE48068	7 in	out
<i>Stomoxys calcitrans</i>	EU622914	NP_00129817 4	7 in	out
Hemiptera				
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	KX890154	AQS60741	7 in	out
<i>A. fasciaticollis</i>	KC881259	AHC72294	6 in	in
<i>A. lineolatus</i>	KC881258	AHC72293	7 in	out
<i>A. suturalis</i>	KC881257	AHC72292	6 in	in
<i>Apolygus lucorum</i>	KC881255	AHC72290	7 in	out
<i>Cimex lectularius</i>	KM275232	AIW42735	7 in	out
<i>Lygus hesperus</i>	JQ639213	AFX73447	7 in	out
<i>L. lineolaris</i>	JQ639214	AFX73448	7 in	out
<i>L. pratensis</i>	KC881256	AHC72291	7 in	out
Hymenoptera				
<i>Cephus cinctus</i>	KC778527	AGS43074	7 in	out
<i>Macrocentrus cingulum</i>	JX472452	AGI62937	7 in	out
Lepidoptera				
<i>Agrotis segetum</i>	KC526964	AGS41440	7 in	out
<i>Amyelois transitella</i>	JX173647	AFP54145	7 in	out
<i>Athetis dissimilis</i>	KR632987	ALJ33155	7 in	out
<i>A. lepigone</i>	KT588097	AOE48007	7 in	out
<i>Bombyx mori</i>	AB100454	BAD69585	7 in	out
<i>Cnaphalocrocis medinalis</i>	KP975160	ALT31679	7 in	out
<i>Conogethes punctiferalis</i>	JX101681	AGF29886	7 in	out
<i>Cydia fagiglandana</i>	KY283682	AST36341	7 in	out
<i>C. pomonella</i>	JN836672	AFC91712	6 in	in
<i>Diaphania indica</i>	AB263114	BAG71418	7 in	out
<i>Helicoverpa armigera</i>	HQ186284	ADQ13177	7 in	out
<i>H. assulta</i>	EU057178	ADQ13178	7 in	out
<i>H. zea</i>	AY843204	AAX14773	7 in	out
<i>Heliothis virescens</i>	AJ487477	CAD31851	7 in	out
<i>Manduca sexta</i>	LN885133	CUQ99422	7 in	out
<i>Mythimna separata</i>	AB263111	BAG71415	7 in	out
<i>Ostrinia nubilalis</i>	GQ844877	ADB89179	7 in	out
<i>O. scapularis</i>	AB467318	BAH57973	7 in	out
<i>Planotortrix octo</i>	KM892411	AJF23826	7 in	out
<i>Plutella xylostella</i>	AB263117	BAG71421	7 in	out
<i>Sitotroga cerealella</i>	KF513149	AI115784	7 in	out
<i>Spodoptera littoralis</i>	EF395366	ABQ82137	7 in	out

Psocodea

Pediculus humanus

KT369093

ALX17413

7 in

out

Πίνακας 2.1. Ομόλογες αλληλουχίες της πρωτεΐνης ORCO σε διαφορετικά είδη εντόμων.

2.2 Πολλαπλή στοίχιση

Η πολλαπλή στοίχιση των παραπάνω ακολουθιών έγινε με το πρόγραμμα MUSCLE (Edgar, 2004), διαθέσιμο στην ιστοσελίδα <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>. Το ακρωνύμιο MUSCLE σημαίνει **MU**ltiple **S**equence **C**omparison by **L**og-**E**xpectation. Η πολλαπλή στοίχιση πρωτεϊνικών αλληλουχιών είναι σημαντική για πολλές εφαρμογές, μεταξύ των οποίων η κατασκευή φυλογενετικών δέντρων, η πρόγνωση δευτεροταγούς δομής, και η ταυτοποίηση σημαντικών καταλοίπων για τη λειτουργία των πρωτεϊνών.

2.3 Ανάκτηση πρωτεϊνικής δομής

Η Protein Data Bank (PDB) (Berman et al., 2000), που είναι διαθέσιμη στην ιστοσελίδα <https://www.rcsb.org/>, είναι η πρώτη βάση δεδομένων "βιοπληροφορικής" που δημιουργήθηκε για την καταχώρηση πειραματικά προσδιορισμένων δομών πρωτεϊνών, νουκλεϊνικών οξέων, υδατανθράκων και συμπλόκων. Από τη βάση δεδομένων PDB, έγινε ανάκτηση της πρωτεϊνικής δομής του Orco που προέρχεται από τον οργανισμό *Arocrypta bakeri*, με κωδικό αριθμό 6C70.

2.4 Προτυποποίηση με βάση την ομολογία (Homology modelling)

Έγινε χρήση του server SWISS-MODEL (Waterhouse et al., 2018), διαθέσιμου στην ιστοσελίδα <https://swissmodel.expasy.org/interactive>, για την μοντελοποίηση της αλληλουχίας

AAX14774.1 (*Anopheles gambiae* (African malaria mosquito) odorant receptor Or83b). Ως πρότυπο (template) επιλέχθηκε η δομή 6C70 της βάσης δεδομένων PDB, η οποία είναι δομή του Orco του οργανισμού *Apocrypta bakeri* που προσδιορίστηκε μέσω Cryo-EM σε ανάλυση (resolution) 3.5 Å.

2.5 Μοριακός ελλιμενισμός (Molecular docking)

Για την μελέτη της πρόσδεσης μικρών μορίων στον ORCO, έγινε χρήση του προγράμματος μοριακού ελλιμενισμού AutoDock 4.2 (Morris et al., 2009). Το AutoDock είναι μια "σουίτα" αυτοματοποιημένων εργαλείων μοριακού ελλιμενισμού. Έχει σχεδιαστεί για να προβλέπει πώς μικρά μόρια, όπως υποστρώματα ή υποψήφια φάρμακα, προσδένονται σε έναν υποδοχέα με γνωστή τρισδιάστατη δομή. Το AutoDock 4.0 αποτελείται στην πραγματικότητα από δύο κύρια προγράμματα: το autodock πραγματοποιεί τον ελλιμενισμό του προσδέτη σε ένα σύνολο πλεγμάτων που περιγράφουν την πρωτεΐνη-στόχο, ενώ το autogrid προ-υπολογίζει αυτά τα πλέγματα. Εκτός από τη χρήση τους στον ελλιμενισμό, τα πλέγματα ατομικής συγγένειας μπορούν να οπτικοποιηθούν.

2.6 Μικρά μόρια

Σε πρόσφατη εργασία (Kythreoti et al., 2020) αναφέρεται η ταυτοποίηση και ο χαρακτηρισμός αρκετών ανταγωνιστών του ORCO του *Anopheles gambiae* μέσα από ένα σύνολο φυσικών πτητικών οργανικών μορίων. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήσαμε μια ομάδα από αυτούς για τον μοριακό ελλιμενισμό μικρών μορίων στο κέντρο πρόσδεσης του ORCO.

2.7 MISTIC

To MISTIC (mutual information server to infer coevolution) (Simonetti, Terpa, Chernomoretz, Nielsen, & Marino Buslje, 2013), διαθέσιμο στην ιστοσελίδα <http://mistic.leloir.org.ar/index.php>, είναι ένας server για την γραφική αναπαράσταση της πληροφορίας που περιέχεται σε μια πολλαπλή στοίχιση ακολουθιών και ένα ολοκληρωμένο εργαλείο ανάλυσης για τα δίκτυα αμοιβαίας πληροφορίας σε πρωτεϊνικές οικογένειες. Χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη της συνεξέλιξης των αμινοξικών καταλοίπων της ακολουθίας AAX14774.1 με βάση την πληροφορία που είναι διαθέσιμη από την πολλαπλή στοίχιση.

2.8 HotSpot Wizard

To HotSpot Wizard (Sumbalova, Stourac, Martinek, Bednar, & Damborsky, 2018), διαθέσιμο στην ιστοσελίδα <http://loschmidt.chemi.muni.cz/hotspotwizard3>, είναι ένας server για τον αυτοματοποιημένο σχεδιασμό μεταλλαγών. Ο εντοπισμός των hot spots μεταλλαξιγένεσης βασίζεται στην ολοκλήρωση δομικής, λειτουργικής και εξελικτικής πληροφορίας που λαμβάνεται από διάφορες βάσεις δεδομένων βιοπληροφορικής και υπολογιστικά εργαλεία. Οι χρήστες μπορούν να εξερευνήσουν hot spots που εντοπίζονται μέσω τεσσάρων στρατηγικών πρωτεϊνικής μηχανικής (protein engineering): i) λειτουργικά hot spots, ii) hot spots σταθερότητας (προσέγγιση δομικής ευελιξίας), iii) hot spots σταθερότητας (προσέγγιση συναίνεσης ακολουθίας), iv) συσχετιζόμενα hot spots.

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Βιβλιογραφική αναζήτηση

Έγινε βιβλιογραφική αναζήτηση για να εντοπιστούν εργασίες στις οποίες αναφέρονται μεταλλαγές στην πρωτεΐνη Orco και τα αποτελέσματά τους. Στην εργασία (Carragher et al., 2015) συνοψίζονται μεταλλαγές της Orco στον οργανισμό *Drosophila melanogaster*, ενώ στην εργασία (Corcoran, Sonntag, Andersson, Johanson, & Lofstedt, 2018) αναφέρονται μεταλλάξεις στην πρωτεΐνη Orco τριών ειδών εντόμων (*Mayetiola destructor*, *Agrotis segetum*, *Drosophila melanogaster*).

Για κάθε μεταλλαγή έγινε αναδρομή στην πολλαπλή στοίχιση των ακολουθιών Orco (βλέπε υποκεφάλαιο 3.2 Πολλαπλή στοίχιση) και βρέθηκε το αντίστοιχο αμινοξύ στην ακολουθία του *Anopheles gambiae*. Οι παραπάνω πληροφορίες συνοψίζονται στον πίνακα 3.1.

Είδος	Κωδικός	Αμινοξύ/Μετάλλαξη	Αντίστοιχο κατάλοιπο στο <i>Anopheles gambiae</i>	Θέση	Επίδραση	Βιβλιογραφία
1 <i>Drosophila melanogaster</i>		A23S/M24A/F30A/M31A/H32A/N33A	L21/M22/F28/L29/F30/R31	N terminus	Συνέκφραση της DmOr47a ή της Dm85b με DmOrco ^{6mut} (και οι έξι μεταλλαγές μαζί) ή DmOrco ^{Δ23-33} (διαγραφή 11 καταλοίπων) σε ωοκύτταρα <i>Xenopus</i> μείωσε ή κατέργησε εντελώς τις αποκρίσεις σε οσφρητικές ουσίες ή στο VUAA1.	(Hopf et al., 2015)
2 <i>Drosophila melanogaster</i>		S159N/T250N/S289N	S157/T248/S288	ECL2/ICL2	Μεταλλαγή τριών εικαζόμενων θέσεων φωσφορυλίωσης ταυτόχρονα μείωσε το ρεύμα σε σχέση με αυτό του WT DmOrco σε πειράματα patch clamp.	(Sargsyan et al., 2011)
3 <i>Drosophila melanogaster</i>		T327N/T371N	T319/T363	ICL2/TMH5	Μεταλλαγή δύο εικαζόμενων θέσεων φωσφορυλίωσης ταυτόχρονα μείωσε το	(Sargsyan et al., 2011)

					ρεύμα σε σχέση με αυτό του WT DmOrco σε πειράματα patch clamp.	
4	<i>Drosophila melanogaster</i>	S336 - R344	S328 - R336	ICL2	Εικαζόμενη θέση πρόσδεσης καλμοδουλίνης - Οι αποκρίσεις στο VUAA1 μειώθηκαν και επιμηκύνθηκαν μέσω αναστολής της καλμοδουλίνης με τον ισχυρό ανταγωνιστή W7	(Mukunda, Miazzi, Kaltofen, Hansson, & Wicher, 2014)
5	<i>Drosophila melanogaster</i>	K339N	K331	ICL2	Μεταλλαγή στην προτεινόμενη θέση πρόσδεσης καλμοδουλίνης μείωσε την απόκριση σε Ca ⁺ σε σχέση με αυτή του WT DmOrco στον βαθμό που παρατηρείται στην παρουσία του ανταγωνιστή W7	(Mukunda et al., 2014)
6	<i>Drosophila melanogaster</i>	V394, L398	V386, L390	TMH6	Διαγραφή αυτών των δύο καταλοίπων μέσα στην εικαζόμενη ακολουθία καναλιού ιόντων με εκλεκτικότητα στο	(Wicher et al., 2008)

					κάλιο (³⁹³ TVVGYLG ³⁹⁹) επηρέασε την διαπερατότητα σε ιόντα	
7	<i>Drosophila melanogaster</i>	C429S	C421	ICL3	Μειωμένη ευαισθησία στο methyl hexanoate αλλά αυξημένη ευαισθησία στο VUAA1 για το σύμπλοκο DmOrco/DmOr22a.	(Turner et al., 2014)
8	<i>Drosophila melanogaster</i>	C449S	C441	ICL3	Μειωμένη ευαισθησία στο methyl hexanoate αλλά αυξημένη ευαισθησία στο VUAA1 για το σύμπλοκο DmOrco/DmOr22a.	(Turner et al., 2014)
9	<i>Drosophila melanogaster</i>	D466E	D458	TMH7	Αυξημένη ευαισθησία του Orco στο VUAA1 δύο φορές περισσότερο σε σύγκρισή με το WT, και αυξημένη ευαισθησία του συμπλόκου DmOrco/DmOr22a στο methyl hexanoate	(Kumar et al., 2013)

10 <i>Drosophila melanogaster</i>		Y478A	Y470	TMH7	Επηρέασε τα αυθόρμητα και τα προκαλούμενα από οσμές δυναμικά δράσης σε νευρόνες που περιέχουν DmOrco. Παρόλα αυτά η φύση αυτών ήταν ποικίλη και εξαρτώμενη από τα OrX	(Nakagawa, Pellegrino, Sato, Vosshall, & Touhara, 2012)
11 <i>Bombyx mori</i>		Y464A	Y470		Η μεταλλαγή μετέβαλε την εκλεκτικότητα ιόντων στο σύμπλοκο BmOR1/BmOrco	(Nakagawa et al., 2012)
12 <i>Mayetiola destructor</i>	KX661034	H81F/N133L/A350S	F81/L133/S362		Ο MdesOrco ^(H81F,N133L,A350S) αποκρίθηκε στο VUAA1, ενώ ο WT MdesOrco όχι	(Corcoran et al., 2018)
13 <i>Agrotis segetum</i>	KC526964.1	F83H/L135N/S356A	F81/L133/S362		Ο μεταλλαγμένος AsegOrco δεν αποκρίθηκε στο VUAA1	(Corcoran et al., 2018)
14 <i>Drosophila melanogaster</i>	NP524235.2	F83H/L135N/S370A	F81/L133/S362		Ο μεταλλαγμένος DmelOrco δεν αποκρίθηκε στο VUAA1	(Corcoran et al., 2018)

Πίνακας 3.1 Βιβλιογραφική αναζήτηση μεταλλάξεων ORCO



Εικόνα 3.2 Πολλαπλή στοίχιση ακολουθιών ORCO (2)



Εικόνα 3.3 Πολλαπλή στοίχιση ακολουθιών ORCO (3)



Εικόνα 3.4 Πολλαπλή στοίχιση ακολουθιών ORCO (4)

AAK14774.1	0000000000	240	250	260	270	280
AAK14774.1	GIMRSLMELASLDTYRPNSSQIFRAI	SAGSKSELIINEEKD	PDV	DFDL	SGIY	
CAD31851.1	AIMKPLMELASLDTYRPNNTAEIFRAS	STEKSEKI	PDTV	DMDIRGIY		
AAT71306.1	GIMKPLMELASLDTYRPNNSAALFRSL	SANSKSELIHNEEKD	P	GT	DMDMSGIY	
BAD69585.1	AIMKPLMELASALDLYRPNNTAEIFRVS	STDKSEKV	PDAV	DMDIRGIY		
AAK14773.1	AIMKPLMELASLDTYRPNNTAEIFRAS	STEKSEKI	PDTV	DMDIRGIY		
ABQ82137.1	AIMKPLMELASLDTYRPNNTAEIFRAS	STEKSEKI	PDTV	DMDIRGIY		
ACF21678.1	GIMKPLMELASLDTYRPNNSAALFRSL	SANSKSELIINEEKE	P	VN	DLDMSGIY	
BAG71415.1	AIMKPLMELASLDTYRPNNTAEIFRAS	STEKSEKI	PDAV	DMDIRGIY		
BAG71418.1	AIMKPLMELASLDTYRPNNTAEIFRAS	STEKSEKV	PDPV	DMDIRGIY		
BAG71421.2	AIMKPLMELASLDTYRPNNTAEIFRAN	SADK.EKV	PDPV	DMDIRGIY		
BAH57973.1	AIMKPLMELASLDTYRPNNTAEIFRAS	STEKSEKM	PDTV	DMDIRGIY		
ADB89179.1	AIMKPLMELASLDTYRPNNTAEIFRAS	STEKSEKM	PDTV	DMDIRGIY		
ADM35103.1	EIMKPLMELASALDLYRPNKSAIDFRAP	SASSQDKLTESDYN	ARNE	DAHMRAMY		
ADQ13177.1	AIMKPLMELASLDTYRPNNTAEIFRAS	STEKSEKI	PDTV	DMDIRGIY		
ADQ13178.1	AIMKPLMELASLDTYRPNNTAEIFRAS	STEKSEKI	PDTV	DMDIRGIY		
AEE69033.1	EIMKPLMELASALDLYRPNKSAIDFRAH	SASSQDKLTESDYN	ARNE	DAHMRAMY		
AEG88961.1	EIMKPLMELASALDLYRPNKSAIDFRAP	SASSQDRLMDSYN	ARNE	DVHMKTMY		
AFC91712.1	AIMKPLMELASALDLYRPNNTAEIFRAS	STEKSEKV	PEPT	DLDIRGIY		
AFH96943.1	GIMKPLMELASLDTYRPNNSAALFRSL	SANSKSELIINEEKE	P	PT	DLDMSGIY	
AFH96944.1	GIMKPLMELASLDTYRPNNSAALFRSL	SANSKSELIQNEEKE	P	VN	DLDMSGIY	
AFP54145.1	AIMKPLMELASLDTYRPNNTAEIFRVS	STEKSEKV	PDPV	DMDIRGIY		
AFX73447.1	EILQPLMELASALDSVVPNSGDIKAG	SAGSDVALIGNGEN	GNGN	DFVIRGIY		
AFX73448.1	EILQPLMELASALDSVVPNSGDIKAG	SAGSDVALIGNGEN	GNGN	DFVIRGIY		
AEA30004.2	GIMKPLMELASLDTYRPNNSAALFRSL	SANSKSELIINEEKE	P	PT	DLDMSGIY	
AEA30005.2	GIMKPLMELASLDTYRPNNSAALFRSL	SANSKSELIINEEKE	P	PS	DLDMTGIY	
AGF29886.1	AIMKPLMELASLDTYRPNNTAEIFRAS	STEKSEKV	PDPV	DMDIRGIY		
AGS41440.1	AIMKPLMELASLDTYRPNNTAEIFRAS	STEKSEKI	PDAV	DMDIRGIY		
AGS43074.1	QIMKPLMELASALDLYRPNHNEIFKAG	STDHLRDTQGTQPMAPPN	ENML	DMLRGIY		
AHC72290.1	EILQPLMELASALDSVVPNSGDIKAG	SAGSDIALIGNGE	NGN	DFVIRGIY		
AHC72291.1	EILQPLMELASALDSVVPNSGDIKSG	SAGSNIALISNGD	GNGN	DFVIRGIY		
AHC72292.1	EILQPLMELASALDSVVPNSGDIKSG	SAGSNIALISNGD	GNGN	DFVIRGIY		
AHC72293.1	EILQPLMELASALDSVVPNSGDIKSG	SAGSNIALISNGD	GNGN	DFVIRGIY		
AHC72294.1	EILQPLMELASALDSVVPNSGDIKSG	SAGSNVALISNGD	GNGN	DFVIRGIY		
JAC04018.1	GIMKPLMELASLDTYRPNNSAALFRSL	SANSKSELIINEEKE	P	T	DLVSGIY	
AHL20247.1	GIMRPLMELASLDTYRPNNSAALFRAA	SAGSKAELILNEEKD	PDTK	DFDLNGIY		
AII15784.1	AIMKPLMELASLDTYRPNNTAEIFRAS	STEKSEKV	PDPV	DMDIRGIY		
AIW42735.1	EILQPLMELASALDSVVPNSGDIKAG	STSSNIPIGN	DVNE	DFVIRGIY		
AGI62937.2	AIMKPLMELASALDLYRPNNSSEIFKAG	SADHLRDTAGSVPSATQPNGESML	DLDL	LRGIY		
AJF23826.1	AIMKPLMELASLDTYRPNNTSEIFRAS	STEKSEKV	PEPV	DMDIRGIY		
AJO62219.1	EIMKPLMELASLDTYRPNKSAIDFRAP	SATSQDNLIENDYN	TKNE	DLKGVY		
AJF94638.2	EIMKPLMELASLDTYRPNKSAIDFRAP	SANSQDNLIENEYN	EKNE	GLNLKGVY		
AKC58535.1	EIMKPLMELASALDLYRPNKSAIDFRAP	SASSQDNLVDSYN	QSNE	DANLRNLY		
AKI29027.1	GIMKPLMELASLDTYRPNNSAALFRSL	SANSKSELIINEEKE	P	T	DLDIRSGVY	
NP_001298174.1	GIMKPLMELASLDTYRPNNSAALFRSL	SANSKSELIINEEKE	P	VN	DLDMSGIY	
ALJ33155.1	AIMKPLMELASLDTYRPNNTAEIFRAS	STEKSEKI	PEAV	DVDIRGIY		
CUQ99422.1	AIMKPLMELASLDTYRPNNTAEIFRVS	STDKSEKV	PDPV	DMDIRGIY		
ALR72547.1	EIMKPLMELASLDTYRPNKSAIDFRAP	SANSQDNLIENDYN	AKNE	EINLKGIV		
ALT31679.1	AIMKPLMELASLDTYRPNNTAEIFRAS	STDKSEKV	PDPV	DMDIRGIY		
XP_001359364.3	GIMKPLMELASLDTYRPNNSAALFRSL	SAQSKSELIINEEKE	P	GN	DLDMSGVY	
ALX17413.1	EIMKPLIDLSSLDTFNPNNSADIFKMT	NTNNDSENLVDS	KNER	SMNIRGIY		
NP_001315530.1	GIMKPLMELASLDTCRPNNSAALFRSL	SANSKSELIINEEKE	P	AT	DMDMTGVY	
AOE48007.1	AIMKPLMELASLDTYRPNNTAEIFRAS	STEKSEKI	PEAV	DVDIRGIY		
AOE48068.1	GIMKPLMELASALDLYRPNNSAALFRSL	SANSKSELIINEEKE	P	VD	DLDMSGVY	
AOO35283.1	EIMKPLMELASLDTYRPNKSAIDFKAPN	SASSQDNLIENEYN	SKNE	ELNLKGVY		
AOO35284.1	EIMKPLMELASLDTYRPNKSAIDFKAPN	SASSQDNLIENEYN	SKNE	ELNLKGVY		
AOT85634.1	GILKPLMELASLDTYRPNNSAALFRSL	SANSKSELVNNDYD	QQDN	GSVF		
XP_019768125.1	EIMKPLMELASALDLYRPNKSAIDFKSPG	SATSQDHLIENDFN	AKND	DLKGVY		
AQS60741.1	EILNPLIELSALDSSVHNPAEIFRAN	SAKNQS	INGI	DHDYNGSY		
AST36341.1	AIMKPLMELASALDLYRPNNTAEIFRAS	STEKSEKV	PEPT	DMDIRGIY		
consensus>70	.ImkpLm#LSa.LDty.pn.aelFr...s				.d.d.gi%	

Εικόνα 3.5 Πολλαπλή στοίχιση ακολουθιών ORCO (5)


```

AAK14774.1
290 300 310 320 330
AAK14774.1 SSK.ADWG.AQFR.APSTLQTFD.....ENGRNGNPNGLTRKQEMMVRSIAIKYW
CAD31851.1 STQ.QDFG.MTLRGAAGRLQNFQQ.....QN..PNPNGLTPKQEMLARSIAIKYW
AAT71306.1 SSK.ADWG.AQFR.APSTLQSFGGNGGGGN..GLVNG..ANPNGLTKKQEMMVRSIAIKYW
BAD69585.1 STQ.QDFG.MTLRGAAGRLQNFNA.....E..NNPNGLTAKQEMLARSIAIKYW
AAK14773.1 STQ.QDFG.MTLRGAAGRLQNFQQ.....QN..PNPNGLTPKQEMLARSIAIKYW
ABQ82137.1 STQ.QDFG.MTLRGAAGRLQTFQQ.....QN..NNPNGLTPKQEMLARSIAIKYW
ACF21678.1 NTK.ADWG.AQFR.APSTLQTFNG.....ING..ANPNGLTKKQEMLARSIAIKYW
BAG71415.1 STQ.QDFG.MTLRGAAGRLQNFQQ.....QN..ANPNGLTPKQEMLARSIAIKYW
BAG71418.1 STQ.QDFG.MTLRGAAGRLQNFSS.....NG..NNPNGLTQKQEMLARSIAIKYW
BAG71421.2 STQ.HDFG.MTLRGAAGRLQNFQQ.....QQV..NNPNGLTQKQEMLARSIAIKYW
BAH57973.1 STQ.QDFG.MTLRGAAGRLQNFQQ.....PNP..NNPNGLTQKQEMLARSIAIKYW
ADB89179.1 STQ.QDFG.MTLRGAAGRLQNFQQ.....PNP..NNPNGLTQKQEMLARSIAIKYW
ADM35103.1 STH.QEMG.VTYR..SQQLQDFS.....SGG..ICPNGLTKKQEMLARSIAIKYW
ADQ13177.1 STQ.QDFG.MTLRGAAGRLQNFQQ.....QN..PNPNGLTPKQEMLARSIAIKYW
ADQ13178.1 STQ.QDFG.MTLRGAAGRLQNFQQ.....QN..PNPNGLTPKQEMLARSIAIKYW
AEE69033.1 STH.QEMG.VTYR..SQQLQDFS.....SGG..ICPNGLTKKQEMLARSIAIKYW
AEG88961.1 STH.HEMG.VTYR..SQQLQDFS.....SGG..ICPNGLTKKQEMLARSIAIKYW
AFC91712.1 STQ.QDFG.MMLRGAAGRLQNFNS.....TN..PNPNGLTQKQEMLARSIAIKYW
AFH96943.1 STK.ADWG.AQFR.APSTLQTFNG.....NC..GNPNGLTKKQEMMVRSIAIKYW
AFH96944.1 STK.ADWG.AQFR.APSTLQTFNG.....ING..GNPNGLTKKQEMMVRSIAIKYW
AFP54145.1 ATQ.QDFG.MTLRGAAGRLQTFQQ.....QN..NNPNGLSQKQEMLARSIAIKYW
AFX73447.1 SSQ.RDFS..GFO..GCITN.....GGT..VCPNGLTKRQELLVRSIAIKYW
AFX73448.1 SSQ.RDFS..GFO..GCITN.....GGT..VCPNGLTKRQELLVRSIAIKYW
AEA30004.2 SSK.ADWG.AQFR.APSTLQTFNG.....VNG..GNPNGLTKKQEMMVRSIAIKYW
AEA30005.2 STK.ADWG.AQFR.APSTLQTFNG.....VNG..GNPNGLTKKQEMMVRSIAIKYW
AGF29886.1 STQ.QDFG.MTLRGAAGRLQNFQQ.....NPT..NNPNGLTQKHQEMLARSIAIKYW
AGS41440.1 STQ.QDFG.MTLRGAAGRLQNFQQ.....QN..SNPNGLTPKQEMLARSIAIKYW
AGS43074.1 SNR.QDFT.ATFRTAGM..NF.....NGG..VCPNGLTKKQEMLARSIAIKYW
AHC72290.1 SSQ.RDFS..GFO..GCVVN.....GGT..VCPNGLTKRQELLVRSIAIKYW
AHC72291.1 SSQ.RDFS..GFO..GCMTN.....GTT..VCPNGLTKRQELLVRSIAIKYW
AHC72292.1 SSQ.RDFS..GFO..GCMTN.....GTT..VCPNGLTKRQELLVRSIAIKYW
AHC72293.1 SSQ.RDFS..GFO..GCMTN.....GTT..VCPNGLTKRQELLVRSIAIKYW
AHC72294.1 SSQ.RDFS..GFO..GCMTN.....GTT..VCPNGLTKRQELLVRSIAIKYW
JAC04018.1 SSK.ADWG.AQFR.APSTLQTFNG.....MNG..TNPNGLTRKQEMMVRSIAIKYW
AHL20247.1 NSK.ADWG.AQFR.APSTLQTFND.....NNGMNGNPNGLTKKQEMLARSIAIKYW
AII15784.1 STQ.QDFG.VTLRGAAGRLQNFQQ.....NP..PNPNGLTQKQEMLARSIAIKYW
AIW42735.1 SNQ.RDFS..GFO..GCAIPT.....NGG..ICPNGLTKKQELLVRSIAIKYW
AGI62937.2 SNR.QDFT.ATFRPTAGT..QF.....TGG..VCPNGLTKKQEMLARSIAIKYW
AJF23826.1 STQ.QDFG.MLLRGAAGRLQNFNN.....PNP..NNPNGLTQKQEMLARSIAIKYW
AJO62219.1 STR.QELG.GHFR..CGALQNFQGV.....GGG..VCPNGLTKKQEMLARSIAIKYW
AJF94638.2 NTR.QEMG.ANFR..SCALQTFQGG.....GGG..VCPNGLSKKQEMLARSIAIKYW
AKC58535.1 TTH.QEMG.VTYR..SCNLQDFS.....SGG..ICPNGLSKKQEMLARSIAIKYW
AKI29027.1 SSK.ADWG.AQFR.APSTLQTFNG.....MNG..TNPNGLTRKQEMMVRSIAIKYW
NE_001298174.1 NTK.ADWG.AQFR.APSTLQTFNG.....ING..TNPNGLTKKQEMMVRSIAIKYW
ALJ33155.1 STQ.QDFG.MTLRGAAGRLQNFQQ.....QN..ANPNGLTPKQEMLARSIAIKYW
CUQ99422.1 STQ.QDFG.MTLRGTGKQLQNFVQ.....NT..VNPNGLTQKQEMLARSIAIKYW
ALR72547.1 NTR.QELG.INFR..SCALQTFQGG.....GGG..VCPNGLSKKQEMLARSIAIKYW
ALT31679.1 STQ.QDFG.MTLRGAAGRLQNFQT.....NG..SNPNGLTQKQEMLARSIAIKYW
XP_001359364.3 SSK.ADWG.AQFR.APSTLQSFQNGNGNGNGGGGAANG..ANPNGLTKKQEMMVRSIAIKYW
ALX17413.1 SNI.RELK..GNR..ISVVNPGVT.....MNG..ICPNGLTKKHQEMLARSIAIKYW
NP_001315530.1 SSK.ADWG.AQFR.APSTLQSFQNGNGGGGN..GLVNG..ANPNGLTKKQEMMVRSIAIKYW
AOE48007.1 STQ.QDFG.MTLRGAAGRLQNFQQ.....QN..ANPNGLTPKQEMLARSIAIKYW
AOE48068.1 STK.ADWG.AQFR.APSTLQTFNG.....TNGM.SNPNGLTKKQEMMVRSIAIKYW
AOO35283.1 STR.QELGNLTFR..SCALQTFQGG.....GGG..VCPNGLTKKQEMLARSIAIKYW
AOO35284.1 STR.QELGNLTFR..SCALQTFQGG.....GGG..VCPNGLTKKQEMLARSIAIKYW
AOT85634.1 VPK.AEWG.GTFK.VP.....PNM..GNPNGLSKKQEMLARSIAIKYW
XP_019768125.1 STR.QELGNLFR..SCALQTFQGG.....GGG..VCPNGLTKKQEMLARSIAIKYW
AQ560741.1 VNEITEYG.....TKCENE.....PNR..KCPNLTISNOEVLVRSIAIKYW
AST36341.1 STQ.QDFG.MMLRGAAGRLQNFNS.....PN..PNPNGLTQKQEMLARSIAIKYW
consensus>70 s...#.g...r...g.lq.f.....PNGLt.kqEm$.RSAIKYW

```

Εικόνα 3.6 Πολλαπλή στοίχιση ακολουθιών ORCO (6)

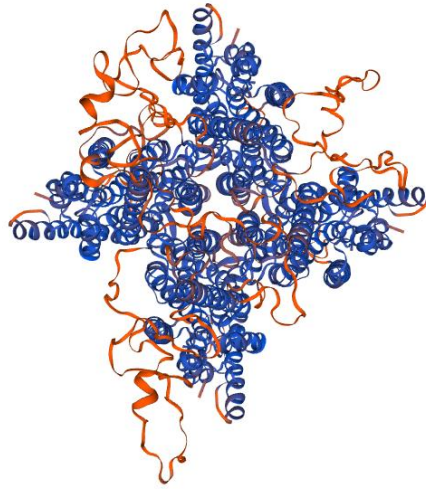
3.3 Προτυποποίηση με βάση την ομολογία

Η στοίχιση της ακολουθίας πρότυπο και της ακολουθίας στόχος είναι η εξής:

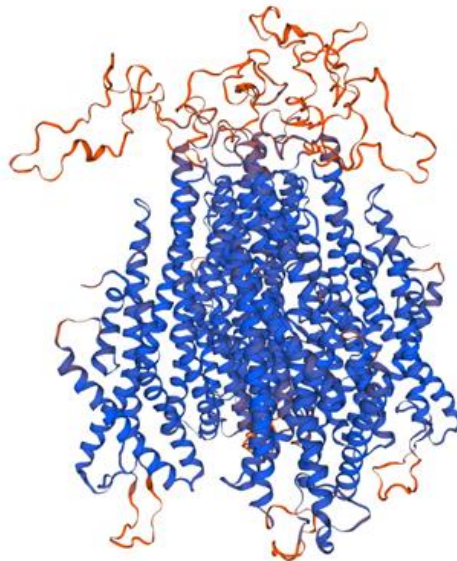
```
Model_01:A MQVQPTKYVGLVADLMPNIRLMOASGHFLFRYVT-GPILIRKVYSWWTLAMVLIQFFAILGNLATNADDVNELTA 74
Model_01:B MQVQPTKYVGLVADLMPNIRLMOASGHFLFRYVT-GPILIRKVYSWWTLAMVLIQFFAILGNLATNADDVNELTA 74
Model_01:C MQVQPTKYVGLVADLMPNIRLMOASGHFLFRYVT-GPILIRKVYSWWTLAMVLIQFFAILGNLATNADDVNELTA 74
Model_01:D MQVQPTKYVGLVADLMPNIRLMOASGHFLFRYVT-GPILIRKVYSWWTLAMVLIQFFAILGNLATNADDVNELTA 74
6c70.1.A -----KHQG(LVADL)MPNIR(VMQG)GHFMFNYS(GKKFPHRIYCI)VTLLLLLQYGMMAVN(LM)ESDD(VDDLTA) 76
Model_01:A NTITTLFFPETHSVTKFIYFAVNSGENFYRTLAIWNQNTNTHPLFAESDARYHSIALAKMRKLLVLMATTVLSVVAWV 149
Model_01:B NTITTLFFPETHSVTKFIYFAVNSGENFYRTLAIWNQNTNTHPLFAESDARYHSIALAKMRKLLVLMATTVLSVVAWV 149
Model_01:C NTITTLFFPETHSVTKFIYFAVNSGENFYRTLAIWNQNTNTHPLFAESDARYHSIALAKMRKLLVLMATTVLSVVAWV 149
Model_01:D NTITTLFFPETHSVTKFIYFAVNSGENFYRTLAIWNQNTNTHPLFAESDARYHSIALAKMRKLLVLMATTVLSVVAWV 149
6c70.1.A NTITTL(LF)FI(HPIV)KMIY(FPV)S(GTFY)HTDAIWNPNPSHPLFAESNAR(FHALA)TKMRLLFCVAGATIFSVISWT 151
Model_01:A TITTFEGESVKTVLDKATNETYTVDIPRLPIKSWYPWNAMSGPAYIFSPFIYQIYFLLFSMVQSNLADVMPCSWLLI 224
Model_01:B TITTFEGESVKTVLDKATNETYTVDIPRLPIKSWYPWNAMSGPAYIFSPFIYQIYFLLFSMVQSNLADVMPCSWLLI 224
Model_01:C TITTFEGESVKTVLDKATNETYTVDIPRLPIKSWYPWNAMSGPAYIFSPFIYQIYFLLFSMVQSNLADVMPCSWLLI 224
Model_01:D TITTFEGESVKTVLDKATNETYTVDIPRLPIKSWYPWNAMSGPAYIFSPFIYQIYFLLFSMVQSNLADVMPCSWLLI 224
6c70.1.A TITTFIEDSVKRIITDPEITNETIIPRLMIRTFYFPNAMS(GHVF)FBIYQFYVLVISMVSN(SI)DVLFCSWLLI 226
Model_01:A ACEQLQHLKGI(MRSLM)LSASLDTYRPNSSQLFRAISAG--SKSELIINEEKDPDVKDFDLSGIYSSK(AD)WGAQF 297
Model_01:B ACEQLQHLKGI(MRSLM)LSASLDTYRPNSSQLFRAISAG--SKSELIINEEKDPDVKDFDLSGIYSSK(AD)WGAQF 297
Model_01:C ACEQLQHLKGI(MRSLM)LSASLDTYRPNSSQLFRAISAG--SKSELIINEEKDPDVKDFDLSGIYSSK(AD)WGAQF 297
Model_01:D ACEQLQHLKGI(MRSLM)LSASLDTYRPNSSQLFRAISAG--SKSELIINEEKDPDVKDFDLSGIYSSK(AD)WGAQF 297
6c70.1.A ACEQLQHLK(I)KPL)ELSATLDTVVFNSSGELFKAGSADHLRESQGVQPSGNGDNVLDVDLRGIYSNRQDFTATF 301
Model_01:A RAPSTLQTFDENGRNGNPNGLTRKQEMMVRS(AIKYW)VERHKKHVRLVSAIGDYGPA(L)LLHMLTSTIKL(T)LLAYQ 372
Model_01:B RAPSTLQTFDENGRNGNPNGLTRKQEMMVRS(AIKYW)VERHKKHVRLVSAIGDYGPA(L)LLHMLTSTIKL(T)LLAYQ 372
Model_01:C RAPSTLQTFDENGRNGNPNGLTRKQEMMVRS(AIKYW)VERHKKHVRLVSAIGDYGPA(L)LLHMLTSTIKL(T)LLAYQ 372
Model_01:D RAPSTLQTFDENGRNGNPNGLTRKQEMMVRS(AIKYW)VERHKKHVRLVSAIGDYGPA(L)LLHMLTSTIKL(T)LLAYQ 372
6c70.1.A R-PTAGTTF--NGGVG-PNGLT(KQEM)LVRS(AIKYW)VERHKKHVRLV(AVGD)Y(GV)ALLHMLTITITL(T)LLAYQ 372
Model_01:A ATKIDGVNVYGLTVIGYLCYALAOVFLFCIFGNRLIESSSSVMEAA)SCHWYDGS(E)EAKTFVQIVCQ(C)QKAM(T) 447
Model_01:B ATKIDGVNVYGLTVIGYLCYALAOVFLFCIFGNRLIESSSSVMEAA)SCHWYDGS(E)EAKTFVQIVCQ(C)QKAM(T) 447
Model_01:C ATKIDGVNVYGLTVIGYLCYALAOVFLFCIFGNRLIESSSSVMEAA)SCHWYDGS(E)EAKTFVQIVCQ(C)QKAM(T) 447
Model_01:D ATKIDGVNVYGLTVIGYLCYALAOVFLFCIFGNRLIESSSSVMEAA)SCHWYDGS(E)EAKTFVQIVCQ(C)QKAM(T) 447
6c70.1.A ATKVNGVNVYGLTVIGY(L)Y(L)GQVFLFCIFGNRLIESSSSVMEAA)SCHWYDGS(E)EAKTFVQIVCQ(C)QKAM(S)I 447
Model_01:A SCAKFEETVSLDLFASV(L)GAVV(T)YFMV(L)VQLK 478
Model_01:B SCAKFEETVSLDLFASV(L)GAVV(T)YFMV(L)VQLK 478
Model_01:C SCAKFEETVSLDLFASV(L)GAVV(T)YFMV(L)VQLK 478
Model_01:D SCAKFEETVSLDLFASV(L)GAVV(T)YFMV(L)VQLK 478
6c70.1.A SCAKFEETVSLDLFASV(L)GAVV(T)YFMV(L)VQLK 478
```

Εικόνα 3.10 Στοίχιση ακολουθίας-πρότυπο και ακολουθίας στόχου

Η απεικόνιση της τετραμερούς πρωτεϊνικής δομής είναι η εξής:



Εικόνα 3.11 Δομή τετραμερούς πρωτεϊνικής δομής ORCO (1)



Εικόνα 3.12 Δομή τετραμερούς πρωτεϊνικής δομής ORCO (2)

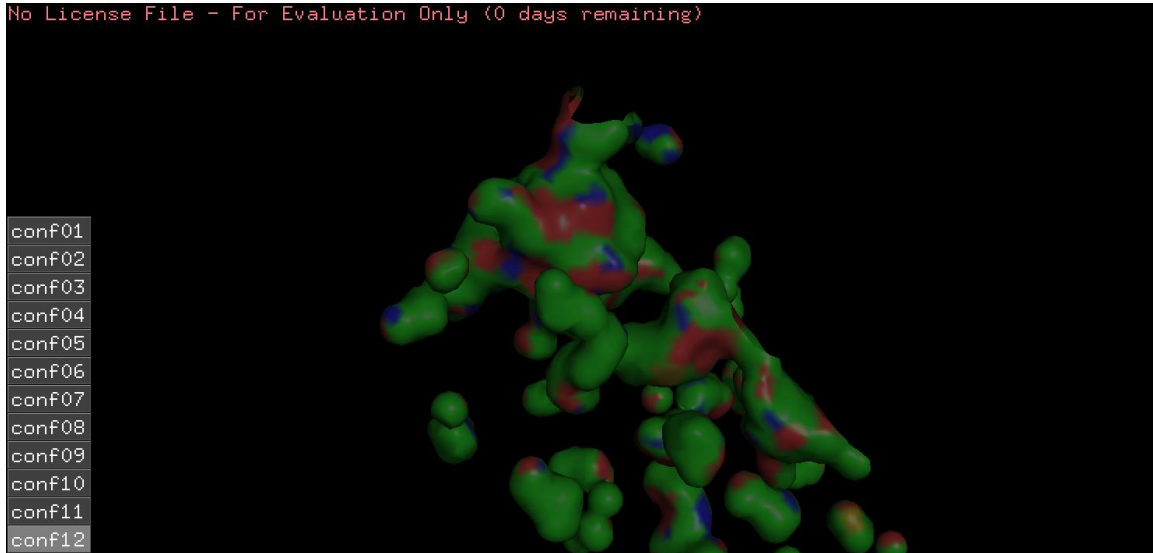
Η πρωτεϊνική δομή (της μίας από τις τέσσερις υπομονάδες του συμπλόκου) που προέκυψε από την προτυποποίηση με βάση την ομολογία του Orcο του *Anopheles gambiae* φαίνεται στην εικόνα 3.13.



Εικόνα 3.13 Δομή υπομονάδας ORCO

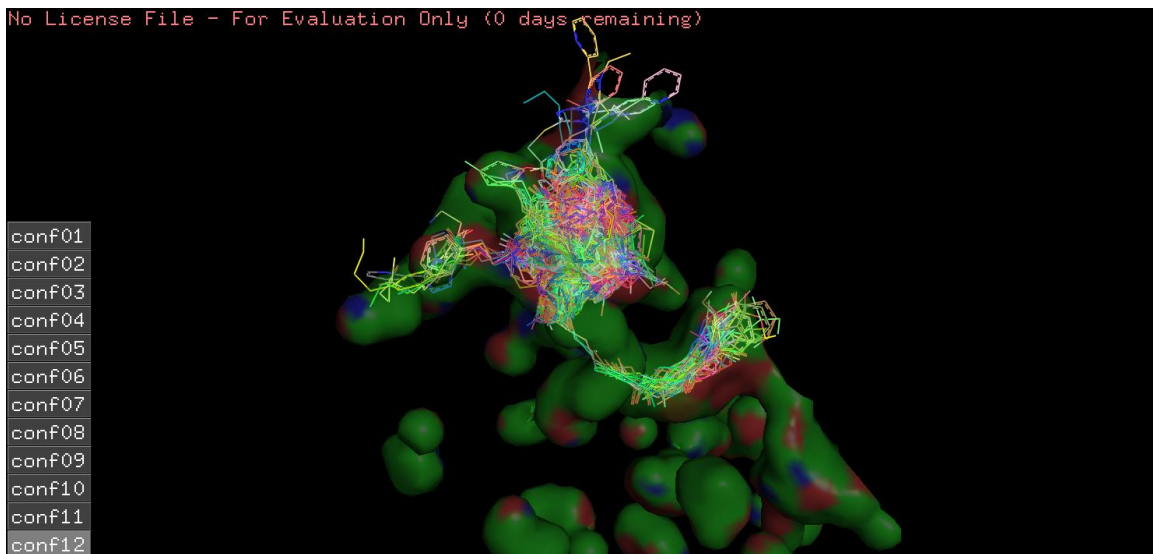
3.4 Ελλιμενισμός

Στην παρακάτω εικόνα απεικονίζονται οι κοιλότητες του ORCO που προσδιορίστηκαν στο πρόγραμμα PyMOL.



Εικόνα 3.14 Κοιλότητες ORCO

Παρακάτω απεικονίζονται τα αποτελέσματα του μοριακού ελλιμενισμού.



Εικόνα 3.15 Αποτελέσματα μοριακού ελλιμενισμού

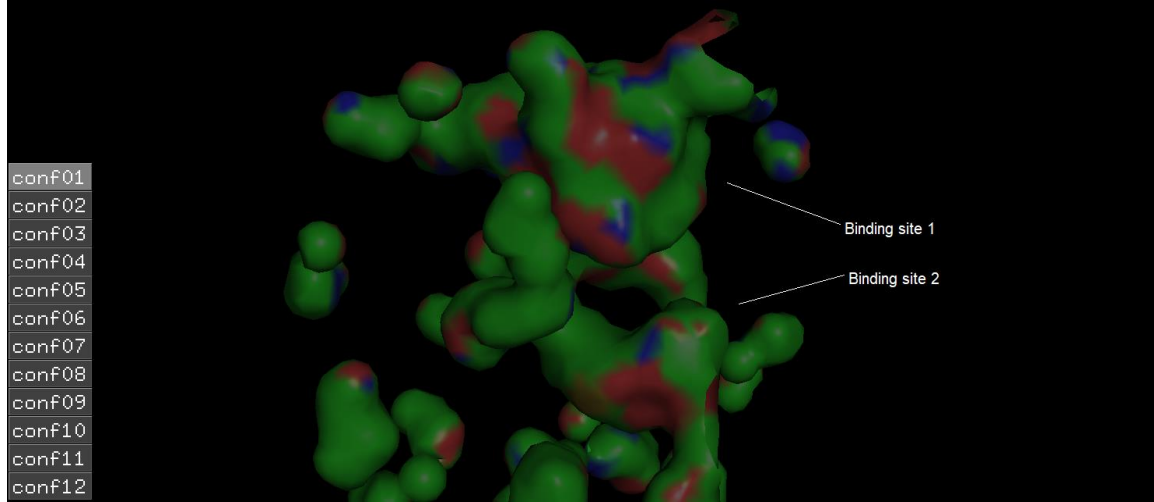
Πραγματοποιήθηκαν 11 διαφορετικές ομαδοποιήσεις των προσδετών όπως προέκυψαν από τα αποτελέσματα του μοριακού ελλιμενισμού. Για κάθε προσδέτη καταγράφηκαν οι δεσμοί υδρογόνου με αμινοξικά κατάλοιπα της πρωτεϊνικής δομής.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι υπάρχουν δύο πιθανά κέντρα πρόσδεσης των προσδετών (binding site 1 και binding site 2). Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται τα αμινοξικά κατάλοιπα που συμμετέχουν σε κάθε κέντρο πρόσδεσης. Με κίτρινο χρώμα έχουν σημειωθεί τα αμινοξικά κατάλοιπα, οι πλευρικές αλυσίδες των οποίων σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με κάποιον προσδέτη.

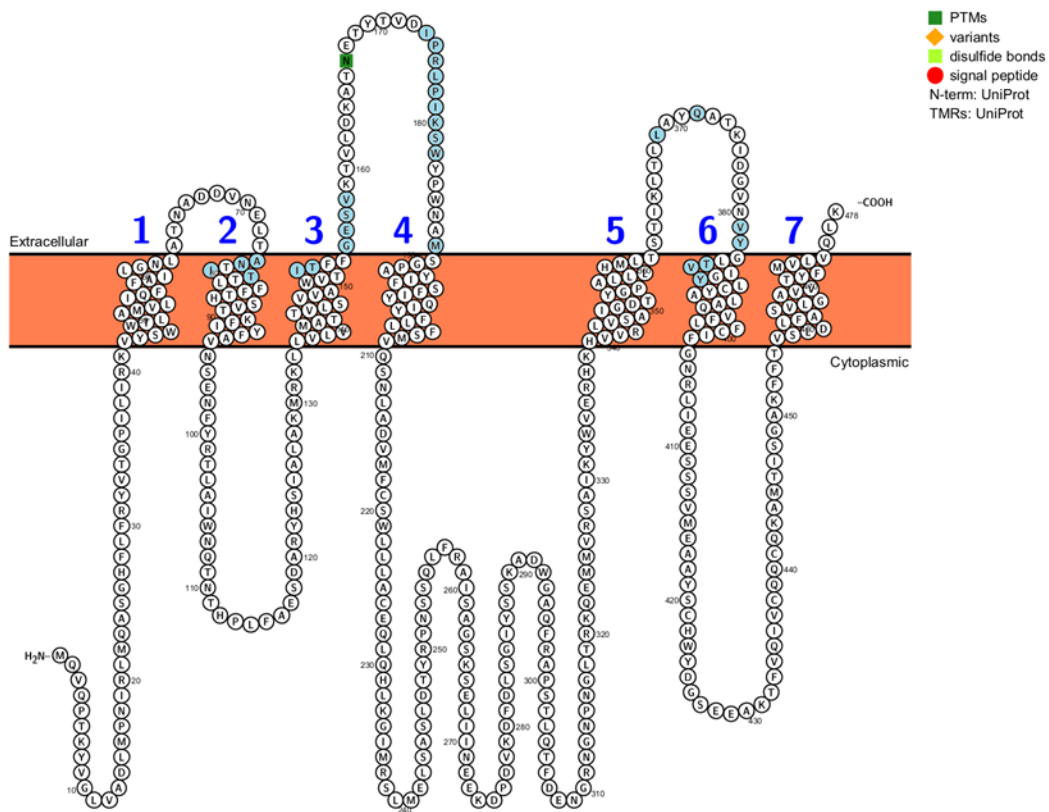
Binding site 1		Binding site 2
ALA74		PHE81
ASN75		SER144
ILE77		VAL145
THR78		ALA147
TRP148		TRP148
ILE151		ILE151
THR152		LEU204
GLY155		MET208
GLU156		GLY388
SER157		TYR389
VAL158		
ILE174		
PRO175		
ARG176		
LEU177		
PRO178		
ILE179		
LYS180		
SER181		
TRP182		
MET188		
LEU369		
GLN372		
VAL381		
TYR382		
THR385		
VAL386		
TYR389		

Πίνακας 3.1 Κέντρα πρόσδεσης ORCO

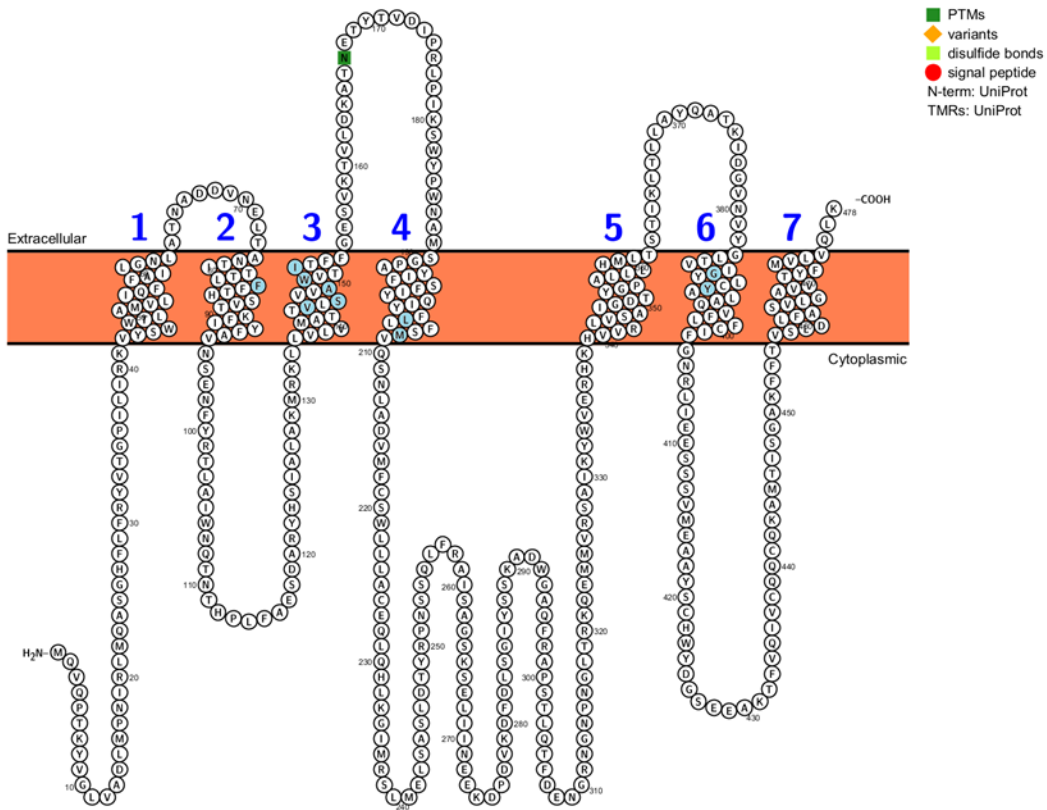
No License File - For Evaluation Only (0 days remaining)



Εικόνα 3.16 Πιθανά κέντρα πρόσδεσης ORCO



Εικόνα 3.17 Κέντρο πρόσδεσης 1 (Binding site 1)

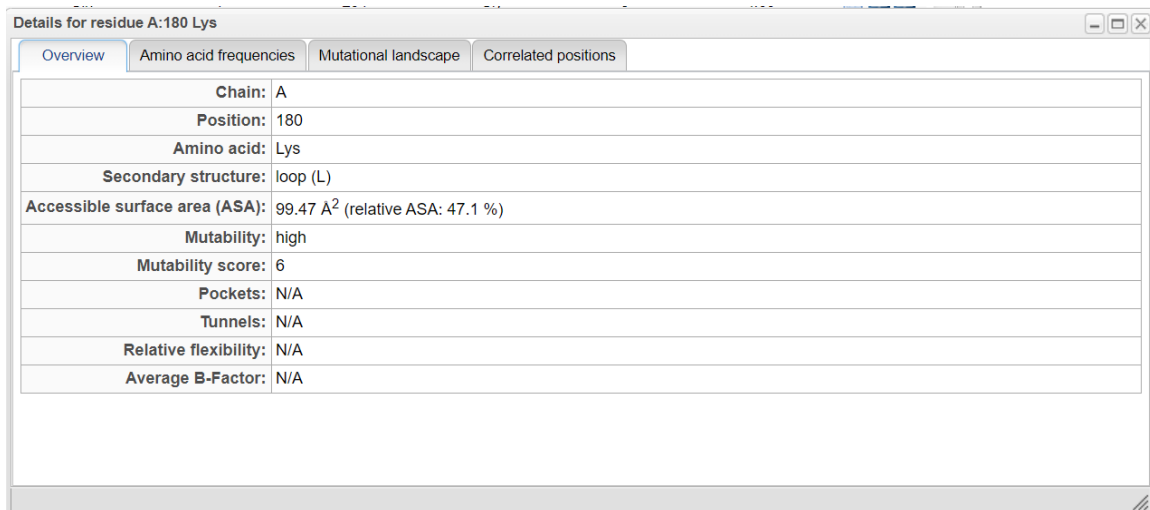


Εικόνα 3.18 Κέντρο πρόδεσης 2

3.5 Συνεξέλιξη

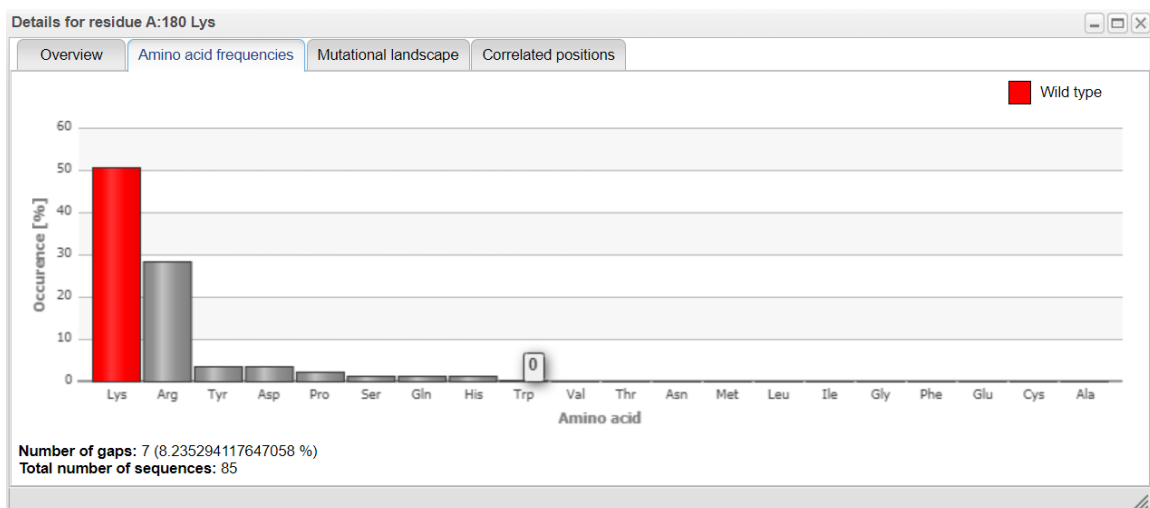
3.5.1 HotSpot Wizard

Το πρόγραμμα HotSpot Wizard εντόπισε κατάλοιπα με υψηλή συσχέτιση μεταξύ τους. Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για το κατάλοιπο 180 του ORCO, το οποίο ανήκει στο κέντρο πρόσδεσης που προσδιορίστηκε (binding site 1). Ανάλογα αποτελέσματα πήραμε και για τα υπόλοιπα κατάλοιπα.

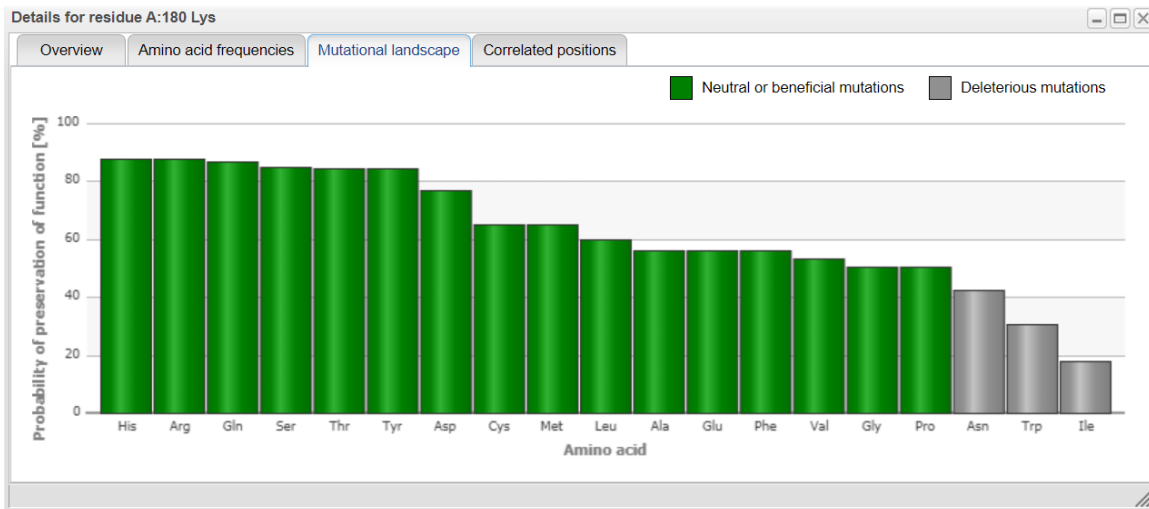


Details for residue A:180 Lys			
Overview	Amino acid frequencies	Mutational landscape	Correlated positions
Chain:	A		
Position:	180		
Amino acid:	Lys		
Secondary structure:	loop (L)		
Accessible surface area (ASA):	99.47 Å ² (relative ASA: 47.1 %)		
Mutability:	high		
Mutability score:	6		
Pockets:	N/A		
Tunnels:	N/A		
Relative flexibility:	N/A		
Average B-Factor:	N/A		

Εικόνα 3.19 Επισκόπηση καταλοίπου 180



Εικόνα 3.20 Αμινοξικές συχνότητες καταλοίπου 180



Εικόνα 3.21 Mutational landscape καταλοίπου 180

Details for residue A:180 Lys

Overview Amino acid frequencies Mutational landscape Correlated positions

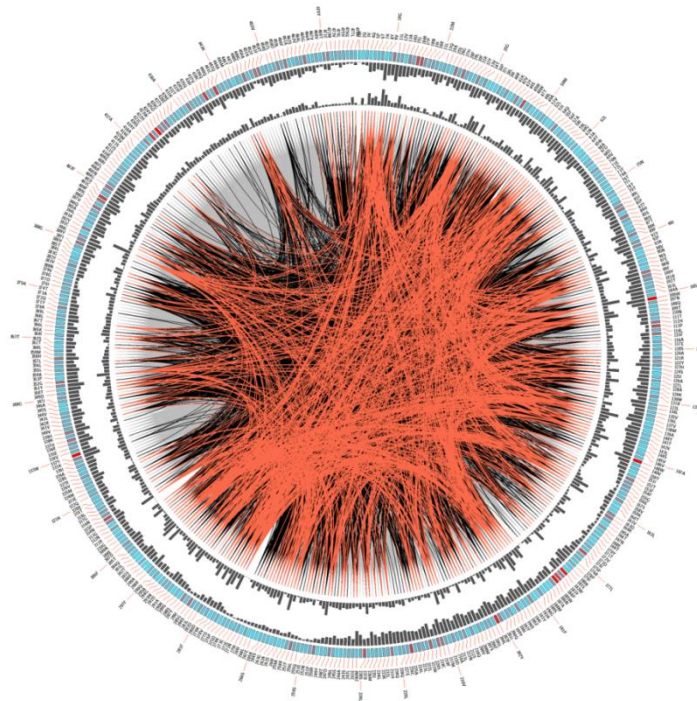
correlated position	residue	mutability	consensus Z-score
70	Asn	6	3.81
249	Tyr	6	5.35
250	Arg	5	3.50
264	Ser	7	3.63
289	Ser	6	4.64
294	Gly	6	4.73

Mutability of this position: 6

Εικόνα 3.22 Συσχετιζόμενες θέσεις καταλοίπου 180

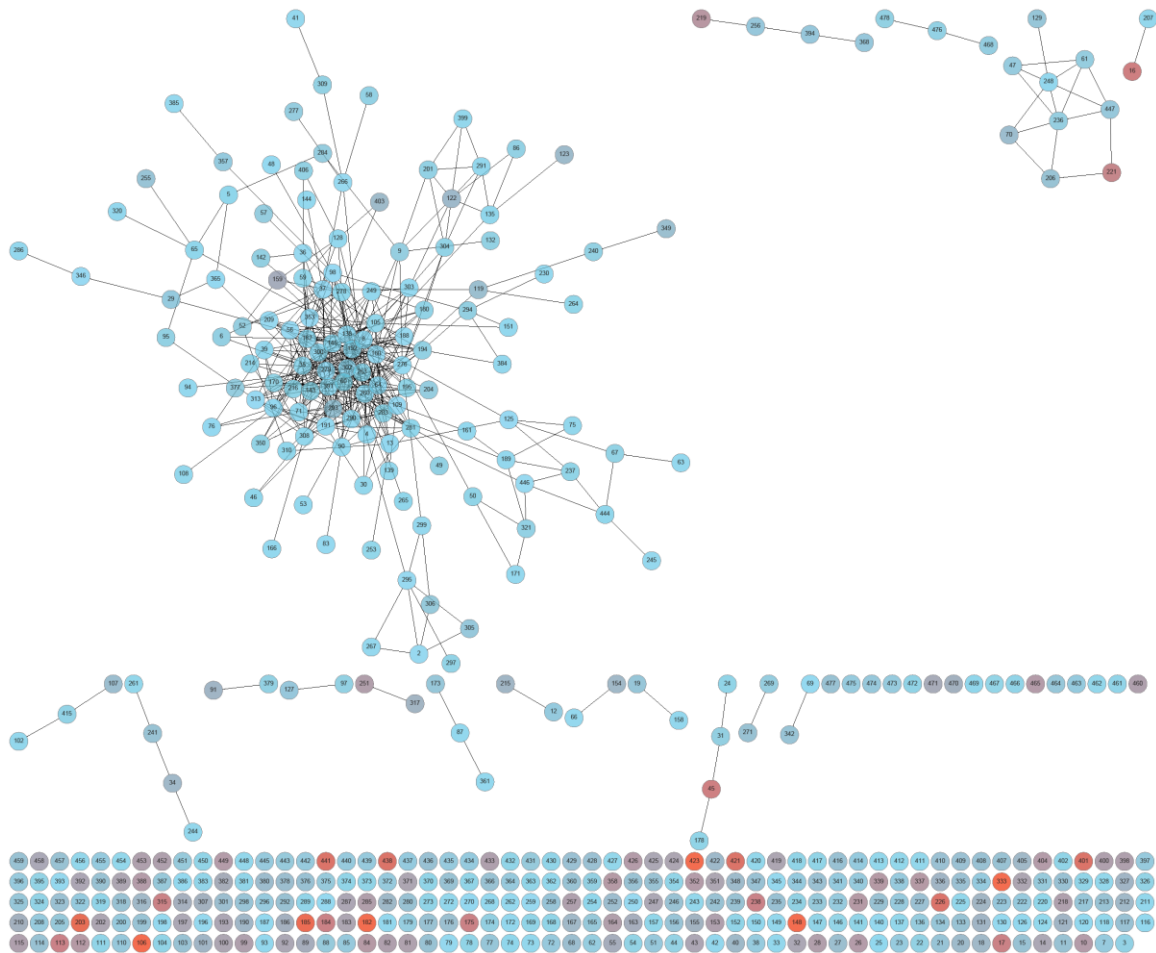
3.5.2 MISTIC

Το MI Circo είναι μια ακολουθιακή κυκλική αναπαράσταση της πολλαπλής στοίχισης και της πληροφορίας που περιέχει. Η πληροφορία του κάθε κύκλου από έξω προς τα μέσα είναι η ακόλουθη: στον πρώτο (εξωτερικό) κύκλο αναφέρονται η θέση στη στοίχιση και το αμινοξύ στην ακολουθία αναφοράς. Τα χρωματισμένα τετράγωνα του δεύτερου κύκλου υποδεικνύουν την συντήρηση αυτής της θέσης της ακολουθίας (υψηλά συντηρημένες θέσεις είναι χρωματισμένες με κόκκινο, ενώ λιγότερο συντηρημένες είναι μπλε). Ο τρίτος και ο τέταρτος κύκλος δείχνουν την αμοιβαία πληροφορία εγγύτητας (Proximity MI) και συσσωρευτική αμοιβαία πληροφορία (Cumulative MI) ως ιστογράμματα. Στο κέντρο του κύκλου φαίνονται γραμμές που συνδέουν ζευγάρια θέσεων με αμοιβαία πληροφορία μεγαλύτερη από 6.5.



Εικόνα 3.23 CIRCO πολλαπλής στοίχισης ORCO

Πέρα από την αναπαράσταση σε μορφή *Circo*, η ίδια πληροφορία παρουσιάζεται σε μορφή δικτύου. Κάθε κόμβος αναπαριστά μια θέση στην πολλαπλή στοίχιση ακολουθιών και οι γραμμές μεταξύ των κόμβων αναπαριστούν μια σημαντική τιμή αμοιβαίας πληροφορίας (>6.5). Το χρώμα των κόμβων αναπαριστά τη συντήρηση της θέσης (κόκκινο για υψηλή συντήρηση, μπλε για χαμηλή συντήρηση).



Εικόνα 3.24 Δίκτυο πολλαπλής στοίχισης ORCO

Στο δίκτυο της εικόνας 3.26 έγινε αναζήτηση των κόμβων που αντιστοιχούν στα αμινοξικά κατάλοιπα των κέντρων πρόσδεσης που προσδιορίστηκαν. Για καθένα από αυτά βρέθηκαν οι "πρώτοι γείτονες" (first neighbours).

Binding site 1	MISTIC first neighbours								
ALA74									
ASN75	125	189							
ILE77									
THR78									
TRP148									
ILE151	105	294							
THR152									
GLY155									
GLU156									
SER157									
VAL158	19								
ILE174									
PRO175									
ARG176									
LEU177									
PRO178	45								
ILE179									
LYS180	304	249	302	105	138	276	160		
SER181									
TRP182									
MET188	303	160	35	260	105	192	8	279	64
LEU369									
GLN372									
VAL381									
TYR382									
THR385	357								
VAL386									
TYR389									

Πίνακας 3.2 "Πρώτοι γείτονες" κέντρου πρόσδεσης 1

Binding site 2 MISTIC first neighbours													
PHE81													
SER144	37												
VAL145	29	303	35	260	391	109	64	145	276	138			
	8	290	300	192	96	302	143	105	216	71	293	353	204
ALA147													
TRP148													
ILE151	294												
LEU204	145	143	71										
MET208													
GLY388													
TYR389													

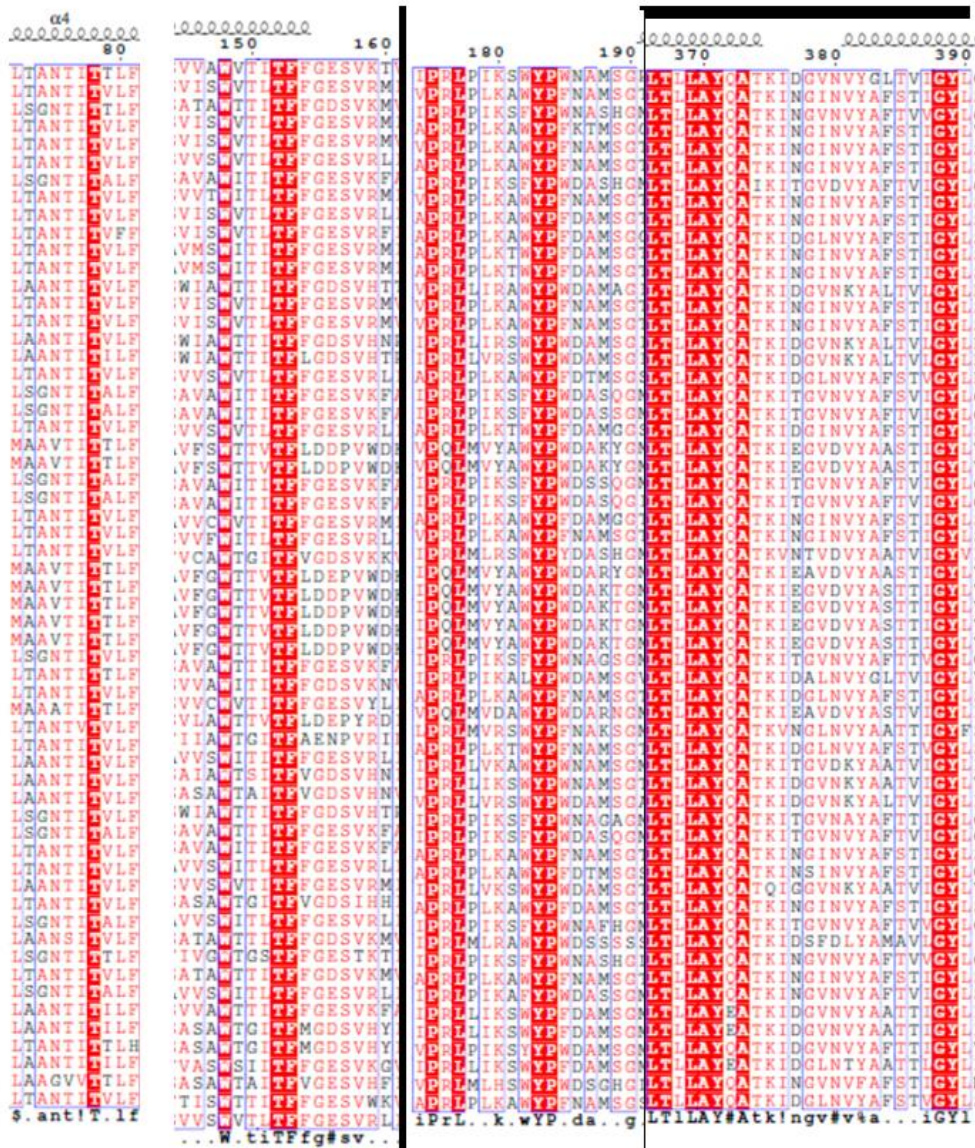
Πίνακας 3.3 "Πρώτοι γείτονες" κέντρου πρόσδεσης 2

4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε την πρωτεΐνη ORCO (Odorant Receptor Co-receptor) του εντόμου *Anopheles gambiae*. Καθώς δεν υπάρχει πειραματικά προσδιορισμένη δομή της πρωτεΐνης αυτής, στηριχθήκαμε στην πειραματικά προσδιορισμένη δομή του ORCO του *Aprocrypta bakeri* και δημιουργήσαμε μοντέλο της πρωτεΐνης ORCO του *Anopheles gambiae* μέσω της τεχνικής της προτυποποίησης πρωτεϊνών με βάση την ομολογία (homology modeling). Στη συνέχεια χρησιμοποιήσαμε την τεχνική του μοριακού ελλιμενισμού (molecular docking) για την μελέτη πρόσδεσης μικρών μορίων (κυρίως ανταγωνιστών του ORCO) στο κέντρο πρόσδεσης της πρωτεΐνης. Με χρήση μοριακών γραφικών έγινε η απεικόνιση των αποτελεσμάτων και προσδιορίστηκαν τα αμινοξικά κατάλοιπα που συμμετέχουν στο κέντρο πρόσδεσης του ORCO.

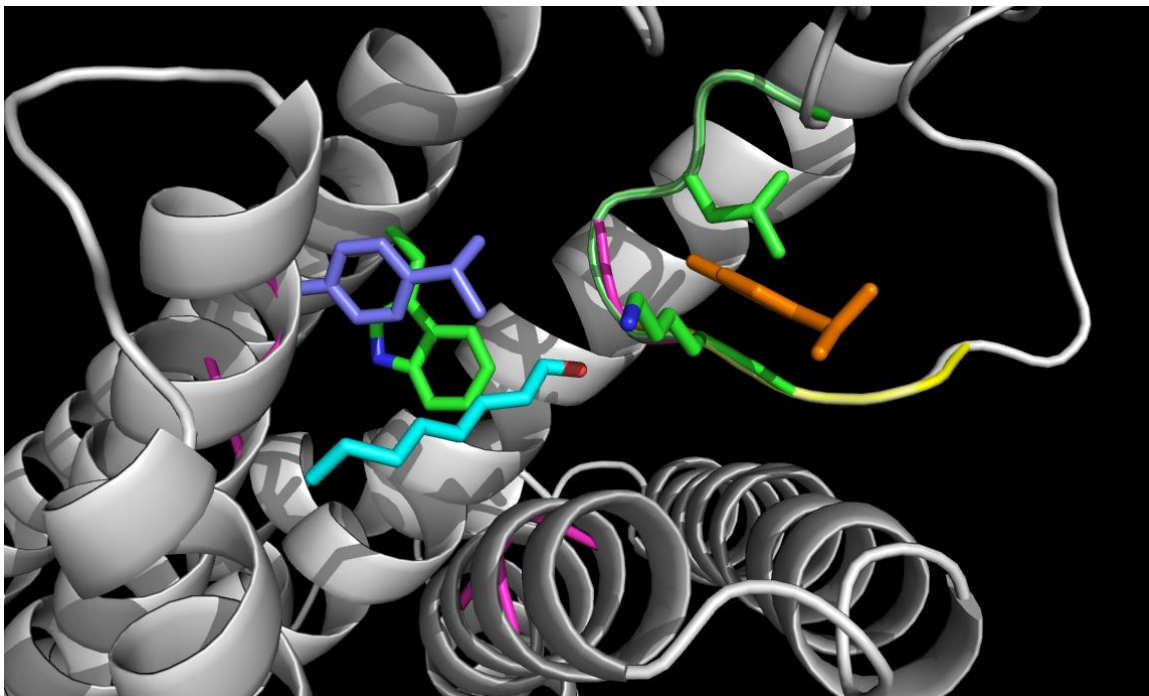
Παράλληλα, έγινε πολλαπλή στοίχιση ομόλογων ακολουθιών ORCO από διάφορα είδη εντόμων. Στην εικόνα 4.1 φαίνονται τα τμήματα της πολλαπλής στοίχισης που αντιστοιχούν στο κέντρο πρόσδεσης του ORCO.

Ακολούθως έγινε χρήση προγραμμάτων μελέτης της συνεξέλιξης αμινοξικών καταλοίπων με βάση την πολλαπλή στοίχιση. Σύμφωνα με το πρόγραμμα HotSpot Wizard το κατάλοιπο K180 παρουσιάζει συσχέτιση με τα κατάλοιπα 70, 249, 250, 264, 289, 294, ενώ σύμφωνα με το πρόγραμμα MISTIC παρουσιάζει συσχέτιση με τα κατάλοιπα 105,138, 160, 249, 276, 302, 304.



Εικόνα 4.1 Πολλαπλή στοίχιση αμινοξικών καταλοίπων του ενεργού κέντρου του ORCO

Ακολούθως παρουσιάζονται εικόνες από το κέντρο πρόσδεσης (εικόνα 4.2), όπου διακρίνονται τόσο οι περιοχές που αλληλεπιδρούν οι αγωνιστές (VUAA1) (εικόνα 4.3) και οι ορθοστερικοί ανταγωνιστές (2,4-ocatadienial), όσο και οι περιοχές που αλληλεπιδρούν οι αλλοστερικοί ανταγωνιστές (carvacrol, cumin alcohol) (εικόνα 4.4).



Εικόνα 4.4 Διαμόρφωση των ανταγωνιστών 2,4-octadienal (γαλάζιο), cumyl alcohol (μπλε) και carvacrol (πορτοκαλί) στο κέντρο πρόσδεσης της πρωτεΐνης ORCO του *Anopheles gambiae*. Διακρίνονται επίσης με πράσινο τα κατάλοιπα W148, L177 και K180.

Από τα παραπάνω συνάγεται ότι τα κατάλοιπα W148, L177 και K180 είναι σημαντικά για την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης ORCO με μικρά μόρια (ανταγωνιστές και αγωνιστές). Για να διερευνηθεί πειραματικά προτείνεται να γίνει μεταλλαξογένεση σε αυτά τα κατάλοιπα.

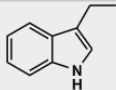




Στην εικόνα 4.4 φαίνεται η νουκλεοτιδική ακολουθία του ORCO του *Anopheles gambiae*. Για κάθε τριπλέτα νουκλεοτιδίων αναφέρεται το κατάλοιπο στο οποίο αντιστοιχεί. Σημειώνονται με τετράγωνο τα κατάλοιπα W148, L177 και K180.

5'3' Frame 1	
atg	caa gtc cag ccg acc aag tac gtc ggc ctc gtt gcc gac ctg atg ccg aac att cgg
M	Q V Q P T K Y V G L V A D L M P N I R
ctg	atg cag gcc agc ggt cac ttt ctg ttc cgc tac gtc acc gcc ccg ata ctg atc cgc
L	M Q A S G H F L F R Y V T G G P I L I R
aag	gtg tac tcc tgg tgg acg ctc gcc atg gtg ctg atc cag ttc ttc gcc atc ctc ggc
K	V Y S W W T L A M V L I Q F F A I L G
aac	ctg gcg acg aac gcg gac gac gtg aac gag ctg acc gcc aac acg atc acg acc ctg
N	L A T N A D D V N E L T A N T I T T L
ttc	ttc acg cac tcg gtc acc aag ttc atc tac ttt gcg gtc aac tcg gag aac ttc tac
F	F T H S V T K F I Y F A V N S E N F Y
ccg	acg ctc gcc atc tgg aac cag acc aac acg cac ccg ctg ttt gcc gaa tcg gac gcc
R	T L A I W N Q T N T H P L F A E S D A
cgg	tac cat tcg att gcg ctc gcc aag atg ccg aag ctg ctg gtg ctg gtg atg gcc acc
R	Y H S I A L A K M R K L L V L V M A T
acc	gtc ctg tcg gtt gtc gcc tgg gtt acg ata aca ttt ttc gcc gag agc gtc aag act
T	V L S V V A W V T I T F F G E S V K T
gtg	ctc gat aag gca acc aac gag acg tac acg gtg gat ata ccc ccg ctg ccc atc aag
V	L D K A T N E T Y T V D I P R L P I K
tcc	tgg tat ccg tgg aat gca atg agc gga ccg gcg tac att ttc tct ttc atc tac cag
S	W Y P W N A M S G P A Y I F S F I Y Q
att	tac ttc ctg ctg ttt tcg atg gtc cag agc aac ctc gcg gat gtc atg ttc tgc tcc
I	Y F L L F S M V Q S N L A D V M F C S
tgg	ttg ctg cta gcc tgc gag cag ctg caa cac ttg aag ggt att atg cga tcg ttg atg
W	L L L A C E Q L Q H L K G I M R S L M
gag	ctt tcg gcc tcg ctg gac acc tac ccg ccc aac tct tcg caa ctg ttc cga gca att
E	L S A S L D T Y R P N S S Q L F R A I
tca	gcc ggt tcc aaa tcg gag ctg atc atc aac gaa gaa aag gat ccg gac gtt aag gac
S	A G S K S E L I I N E E K D P D V K D
ttt	gat ctg agc ggc atc tac agc tcg aag gcg gac tgg gcc gcc cag ttc cgt gcg ccg
F	D L S G I Y S S K A D W G A Q F R A P
tcg	acg ctg caa acg ttc gac gag aat gcc agg aac gga aat ccg aac ggg ctt acc ccg
S	T L Q T F D E N G R N G N P N G L T R
aag	cag gaa atg atg gtg cgc agc gcc atc aag tac tgg gtc gag ccg cac aag cag gtt
K	Q E M M V R S A I K Y W V E R H K H V
gta	cgt ctc gtt tca gca atc gga gat acg tac ggt cct gcc ctg ctg cta cac atg ctg
V	R L V S A I G D T Y G P A L L L H M L
acc	tcc acc atc aag ctg acg ctg ctc gcc tac cag gca acg aaa atc gac ggt gtc aac
T	S T I K L T L L A Y Q A T K I D G V N
gtg	tac gga ttg acc gta atc gga tat ttg tgc tac gcg ttg gct cag gtt ttc ctg ttt
V	Y G L T V I G Y L C Y A L A Q V F L F
tgc	atc ttt ggc aat ccg ctc atc gag gag agc tca tcc gtg atg gag gcg gcc tat tcc
C	I F G N R L I E E S S S V M E A A Y S
tgc	cac tgg tac gac ggg tcc gag gag gca aaa acc ttc gtc cag atc gtt tgt cag cag
C	H W Y D G S E E A K T F V Q I V C Q Q
tgc	cag aag gcg atg act att tcc gga gcc aag ttt ttc acc gtt tcg ctc gat ctg ttt
C	Q K A M T I S G A K F F T V S L D L F
gct	tcg gtt ctt gga gcc gtt gtc acc tac ttc atg gtg ctg cag ctg aag taa
A	S V L G A V V T Y F M V L V Q L K -

Εικόνα 4.4 Νουκλεοτιδική ακολουθία του γονιδίου ORCO του *Anopheles gambiae* με τα αντίστοιχα αμινοξικά κατάλοιπα για κάθε τριπλέτα. Έχουν σημειωθεί με τετράγωνα τα κατάλοιπα W148, L177 και K180.

Στον πίνακα 4.5 φαίνονται οι αλλαγές που πρέπει να γίνουν στις τριπλέτες που αντιστοιχούν στα κατάλοιπα W148, L177 και K180.

ORco mutations

Target aa	Codon seq. in ORco ORF	Structure	Possible mutations	Codon seq.	Structure	Rest. site generated	Expected fragments in pEIA ORco-mutX
W148: Trp	TGG		1. W148A Trp → Ala	GCG	H ₃ C—	Sac II	Parent: linear Mut: 2.5 + 9.5 kb
L177: Leu	CTG		1. L177A Leu → Ala	GCG	H ₃ C—	-	
			2. L177V Leu → Val	GTG		-	
K180: Lys	AAG		1. K180A Lys → Ala	GCG	H ₃ C—	-	
			2. K180T Lys → Thr	ACG		-	

Εικόνα 4.5 Μεταλλάξεις στα επιλεγμένες τριπλέτες της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας ORCO.

Για κάθε κατάλοιπο επιλέχθηκαν τελικά οι μεταλλάξεις W148A, L177A, L177V, K180A, K180T.

Οι μεταλλάξεις θα υλοποιηθούν στο εργαστήριο του κ. Ιατρού, Ερευνητικού Διευθυντή στην Ομάδα Μοριακής Γενετικής και Βιοτεχνολογίας Εντόμων, του Ινστιτούτου Βιοεπιστημών και Εφαρμογών του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών Επιστημών "Δημόκριτος", προκειμένου να διαπιστώσουμε αν τα μικρά μόρια αλληλεπιδρούν στο συγκεκριμένο κέντρο πρόσδεσης και αν υπάρχουν διαφορές μεταξύ ανταγωνιστών.

Αυτό θα είναι ένα βήμα προς την εύρεση ανταγωνιστών με βελτιωμένα χαρακτηριστικά για την αντιμετώπιση της ελονοσίας. Η γνώση της δομής του κέντρου πρόσδεσης μικρών μορίων του ORCO και του τρόπου αλληλεπίδρασης των μικρών μορίων με τα κατάλοιπα της πρωτεΐνης ORCO θα συμβάλει στην εύρεση ανταγωνιστών μέσω μεθόδων σχεδιασμού φαρμάκων που στηρίζονται στην δομή (structure-based drug design).

5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., . . . Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res*, *28*(1), 235-242. doi:10.1093/nar/28.1.235

Carraher, C., Dalziel, J., Jordan, M. D., Christie, D. L., Newcomb, R. D., & Kralicek, A. V. (2015). Towards an understanding of the structural basis for insect olfaction by odorant receptors. *Insect Biochem Mol Biol*, *66*, 31-41. doi:10.1016/j.ibmb.2015.09.010

Corcoran, J. A., Sonntag, Y., Andersson, M. N., Johanson, U., & Lofstedt, C. (2018). Endogenous insensitivity to the Orco agonist VUAA1 reveals novel olfactory receptor complex properties in the specialist fly *Mayetiola destructor*. *Sci Rep*, *8*(1), 3489. doi:10.1038/s41598-018-21631-3

Damberger, F., Nikonova, L., Horst, R., Peng, G., Leal, W. S., & Wuthrich, K. (2000). NMR characterization of a pH-dependent equilibrium between two folded solution conformations of the pheromone-binding protein from *Bombyx mori*. *Protein Sci*, *9*(5), 1038-1041. doi:10.1110/ps.9.5.1038

de Juan, D., Pazos, F., & Valencia, A. (2013). Emerging methods in protein co-evolution. *Nat Rev Genet*, *14*(4), 249-261. doi:10.1038/nrg3414

Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*, *32*(5), 1792-1797. doi:10.1093/nar/gkh340

Garcia, L. S. (2010). Malaria. *Clin Lab Med*, *30*(1), 93-129. doi:10.1016/j.cll.2009.10.001

Graham, L. A., & Davies, P. L. (2002). The odorant-binding proteins of *Drosophila melanogaster*: annotation and characterization of a divergent gene family. *Gene*, 292(1-2), 43-55. doi:10.1016/s0378-1119(02)00672-8

Guidobaldi, F., May-Concha, I. J., & Guerenstein, P. G. (2014). Morphology and physiology of the olfactory system of blood-feeding insects. *J Physiol Paris*, 108(2-3), 96-111. doi:10.1016/j.jphysparis.2014.04.006

Hekmat-Safe, D. S., Safe, C. R., McKinney, A. J., & Tanouye, M. A. (2002). Genome-wide analysis of the odorant-binding protein gene family in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res*, 12(9), 1357-1369. doi:10.1101/gr.239402

Hoffman, S. L., Vekemans, J., Richie, T. L., & Duffy, P. E. (2015). The march toward malaria vaccines. *Vaccine*, 33 Suppl 4, D13-23. doi:10.1016/j.vaccine.2015.07.091

Hopf, T. A., Morinaga, S., Ihara, S., Touhara, K., Marks, D. S., & Benton, R. (2015). Amino acid coevolution reveals three-dimensional structure and functional domains of insect odorant receptors. *Nat Commun*, 6, 6077. doi:10.1038/ncomms7077

Kumar, B. N., Taylor, R. W., Pask, G. M., Zwiebel, L. J., Newcomb, R. D., & Christie, D. L. (2013). A conserved aspartic acid is important for agonist (VUAA1) and odorant/tuning receptor-dependent activation of the insect odorant co-receptor (Orco). *PLoS One*, 8(7), e70218. doi:10.1371/journal.pone.0070218

Kythreoti, G., Sdralia, N., Tsitoura, P., Papachristos, D. P., Michaelakis, A., Karras, V., . . . Iatrou, K. (2020). Volatile allosteric antagonists of mosquito odorant receptors inhibit human-host attraction. *J Biol Chem*. doi:10.1074/jbc.RA120.016557

Leal, W. S. (2013). Odorant reception in insects: roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes. *Annu Rev Entomol*, *58*, 373-391. doi:10.1146/annurev-ento-120811-153635

McKenna, M. P., Hekmat-Scafe, D. S., Gaines, P., & Carlson, J. R. (1994). Putative *Drosophila* pheromone-binding proteins expressed in a subregion of the olfactory system. *J Biol Chem*, *269*(23), 16340-16347.

Meng, X. Y., Zhang, H. X., Mezei, M., & Cui, M. (2011). Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Curr Comput Aided Drug Des*, *7*(2), 146-157. doi:10.2174/157340911795677602

Menuz, K., Larter, N. K., Park, J., & Carlson, J. R. (2014). An RNA-seq screen of the *Drosophila* antenna identifies a transporter necessary for ammonia detection. *PLoS Genet*, *10*(11), e1004810. doi:10.1371/journal.pgen.1004810

Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem*, *30*(16), 2785-2791. doi:10.1002/jcc.21256

Muhammed, M. T., & Aki-Yalcin, E. (2019). Homology modeling in drug discovery: Overview, current applications, and future perspectives. *Chem Biol Drug Des*, *93*(1), 12-20. doi:10.1111/cbdd.13388

Mukunda, L., Miazzi, F., Kaltofen, S., Hansson, B. S., & Wicher, D. (2014). Calmodulin modulates insect odorant receptor function. *Cell Calcium*, *55*(4), 191-199. doi:10.1016/j.ceca.2014.02.013

Nakagawa, T., Pellegrino, M., Sato, K., Vosshall, L. B., & Touhara, K. (2012). Amino acid residues contributing to function of the heteromeric insect olfactory receptor complex. *PLoS One*, *7*(3), e32372. doi:10.1371/journal.pone.0032372

Phillips, M. A., Burrows, J. N., Manyando, C., van Huijsduijnen, R. H., Van Voorhis, W. C., & Wells, T. N. C. (2017). Malaria. *Nat Rev Dis Primers*, 3, 17050. doi:10.1038/nrdp.2017.50

Robertson, H. M., Baits, R. L., Walden, K. K. O., Wada-Katsumata, A., & Schal, C. (2018). Enormous expansion of the chemosensory gene repertoire in the omnivorous German cockroach *Blattella germanica*. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*, 330(5), 265-278. doi:10.1002/jez.b.22797

Sandler, B. H., Nikonova, L., Leal, W. S., & Clardy, J. (2000). Sexual attraction in the silkworm moth: structure of the pheromone-binding-protein-bombykol complex. *Chem Biol*, 7(2), 143-151. doi:10.1016/s1074-5521(00)00078-8

Sargsyan, V., Getahun, M. N., Llanos, S. L., Olsson, S. B., Hansson, B. S., & Wicher, D. (2011). Phosphorylation via PKC Regulates the Function of the *Drosophila* Odorant Co-Receptor. *Front Cell Neurosci*, 5, 5. doi:10.3389/fncel.2011.00005

Simonetti, F. L., Teppa, E., Chernomoretz, A., Nielsen, M., & Marino Buslje, C. (2013). MISTIC: Mutual information server to infer coevolution. *Nucleic Acids Res*, 41(Web Server issue), W8-14. doi:10.1093/nar/gkt427

Soffan, A., Subandiyah, S., Makino, H., Watanabe, T., & Horiike, T. (2018). Evolutionary Analysis of the Highly Conserved Insect Odorant Coreceptor (Orco) Revealed a Positive Selection Mode, Implying Functional Flexibility. *J Insect Sci*, 18(6). doi:10.1093/jisesa/iey120

Sumbalova, L., Stourac, J., Martinek, T., Bednar, D., & Damborsky, J. (2018). HotSpot Wizard 3.0: web server for automated design of mutations and smart libraries based on sequence input information. *Nucleic Acids Res*, 46(W1), W356-W362. doi:10.1093/nar/gky417

Sun, J. S., Xiao, S., & Carlson, J. R. (2018). The diverse small proteins called odorant-binding proteins. *Open Biol*, 8(12), 180208. doi:10.1098/rsob.180208

Turner, R. M., Derryberry, S. L., Kumar, B. N., Brittain, T., Zwiebel, L. J., Newcomb, R. D., & Christie, D. L. (2014). Mutational analysis of cysteine residues of the insect odorant co-receptor (Orco) from *Drosophila melanogaster* reveals differential effects on agonist- and odorant-tuning receptor-dependent activation. *J Biol Chem*, 289(46), 31837-31845. doi:10.1074/jbc.M114.603993

Vieira, F. G., & Rozas, J. (2011). Comparative genomics of the odorant-binding and chemosensory protein gene families across the Arthropoda: origin and evolutionary history of the chemosensory system. *Genome Biol Evol*, 3, 476-490. doi:10.1093/gbe/evr033

Vieira, F. G., Sanchez-Gracia, A., & Rozas, J. (2007). Comparative genomic analysis of the odorant-binding protein family in 12 *Drosophila* genomes: purifying selection and birth-and-death evolution. *Genome Biol*, 8(11), R235. doi:10.1186/gb-2007-8-11-r235

Wang, G., Carey, A. F., Carlson, J. R., & Zwiebel, L. J. (2010). Molecular basis of odor coding in the malaria vector mosquito *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(9), 4418-4423. doi:10.1073/pnas.0913392107

Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., . . . Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res*, 46(W1), W296-W303. doi:10.1093/nar/gky427

Wicher, D., Schafer, R., Bauernfeind, R., Stensmyr, M. C., Heller, R., Heinemann, S. H., & Hansson, B. S. (2008). *Drosophila* odorant receptors are both ligand-gated and cyclic-nucleotide-activated cation channels. *Nature*, 452(7190), 1007-1011. doi:10.1038/nature06861

Yan, H., Jafari, S., Pask, G., Zhou, X., Reinberg, D., & Desplan, C. (2020). Evolution, developmental expression and function of odorant receptors in insects. *J Exp Biol*, 223(Pt Suppl 1). doi:10.1242/jeb.208215