

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΚΗΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ «ΘΕΤΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ ΣΤΗ
ΓΕΩΠΟΝΙΑ»**

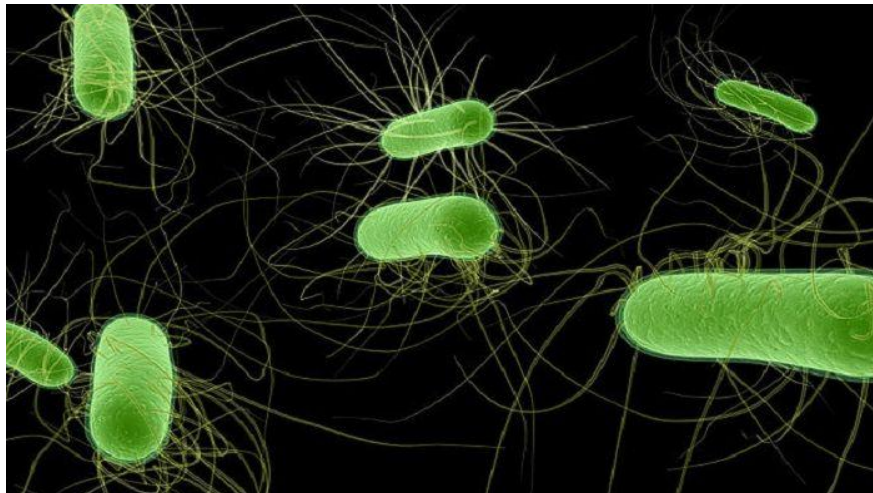
ΚΛΑΔΟΣ: ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«ΔΟΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΚΥΚΛΟΦΑΙΝΩΝ»

ΑΡΕΤΗ Δ. ΚΟΚΚΙΝΟΥ

ΑΘΗΝΑ 2014



ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΜΙΧΑΗΛ ΚΑΡΠΟΥΖΑΣ, ΑΝΑΠΛ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΓΠΑ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«ΔΟΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΚΥΚΛΟΦΛΙΝΩΝ»

ΤΗΣ ΑΡΕΤΗΣ Δ. ΚΟΚΚΙΝΟΥ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΜΙΧΑΗΛ ΚΑΡΠΟΥΖΑΣ

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:

- 1) ΜΙΧΑΗΛ ΚΑΡΠΟΥΖΑΣ, ΑΝΑΠΛ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ, ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ
ΦΥΣΙΚΗΣ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ, ΓΠΑ**
- 2) ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΜΠΕΘΑΝΗΣ ΕΠΙΚ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ, ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ
ΦΥΣΙΚΗΣ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ, ΓΠΑ**
- 3) ΜΑΡΙΑ ΔΗΜΟΥ, ΛΕΚΤΟΡΑΣ, ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΚΑΙ
ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ
ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΓΠΑ**

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι κυκλοφιλίνες, ένζυμα με μεγάλο ποσοστό συντήρησης σε όλους τους οργανισμούς, έχουν τη χαρακτηριστική ιδιότητα να καταλύουν την ισομερίωση της προλίνης μεταξύ της cis και της trans διαμόρφωσης. Οι αλληλομετατροπές των διαμορφώσεων της προλίνης είναι κρίσιμες για την επίτευξη της τριτοταγούς δομής των πρωτεϊνών-στόχων των κυκλοφιλινών. Οι κυκλοφιλίνες επίσης παρουσιάζουν δράση σαπερόνης και ενέχονται σε πολλές βιολογικές διαδικασίες με ενδιαφέρον και στην ιατρική, όπως η αναγνώριση της κυκλοσπορίνης A και της πρωτεΐνης του καψιδίου του HIV.

Στο πλαίσιο της εργασίας αυτής πραγματοποιήθηκε δομική ανάλυση μεταλλαγμάτων της κυκλοφιλίνης A (CypA) της προερχόμενης από το κυτόπλασμα του *E.coli* χρησιμοποιώντας μοριακά μοντέλα που δημιουργήθηκαν στον ιστότοπο SWISS MODEL. Σκοπός ήταν η ερμηνεία αποτελεσμάτων βιοδοκιμών όπου αξιολογήθηκε η ενζυμική δράση και η δράση σαπερόνης των μεταλλαγμάτων, καθώς και οι φαινοτυπικές αλλαγές των βακτηριακών καλλιέργειών σε σύγκριση με την πρωτεΐνη αγρίου τύπου. Επίσης σχεδιάστηκαν πειράματα κρυστάλλωσης για την αποσαφήνιση της κρυσταλλικής δομής, τα οποία βρίσκονται ακόμα σε εξέλιξη, και πραγματοποιήθηκε σειρά πειραμάτων ελέγχου θερμικής αποδιάταξης (Thermofluor) των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών.

Οι βιοδοκιμές σε συνδυασμό με τη δομική ανάλυση κατέδειξαν τη σημασία των αμινοξέων R43, F99, M49 που ανήκουν στο ενεργό κέντρο της CypA. Εκτός ενεργού κέντρου οι μεταλλάξεις G53V και Q61R επηρέασαν σημαντικά την ενζυμική δράση. Η δομική μελέτη κατέδειξε τα δομικά προβλήματα που η πρώτη μετάλλαξη δημιούργησε και διερεύνησε τις αιτίες για τη δεύτερη μετάλλαξη. Η θερμική αποδιάταξη φαίνεται να σχετίζεται με μεταλλάξεις που διαταράσσουν δομικά την πρωτεΐνη δημιουργώντας κενούς χώρους, όπως οι W118R και M85I. Σε αυτές τις περιπτώσεις η θερμική αποδιάταξη της πρωτεΐνης ήταν αισθητή και, ενώ δε φαίνεται να επηρεάζεται η ενζυμική δράση, επηρεάζεται ο φαινότυπος. Η δράση σαπερόνης διατηρήθηκε σε υψηλά επίπεδα με μικρές διακυμάνσεις σε όλα τα μεταλλάγματα που εξετάστηκαν

SUMMARY

Cyclophilins are highly conserved enzymes which catalyze the interconversion between cis- and trans- proline residues. This function is critical for assisting the folding process of protein substrates. Cyclophilins also act as chaperones and are involved in numerous biological processes of medical interest, like cyclosporin A and HIV capsid protein recognition.

In this work, structural analysis of cytoplasmic *E.coli* cyclophilin A (CypA) was performed, utilizing molecular models created by SWISS MODEL, aiming to explain experimental results on mutant enzyme activity, chaperone activity and phenotype alterations in relation to wild type proteins. In order to determine crystal structures, crystallization experiments have also been designed and performed and are in progress. A series of Thermofluor experiments were performed to assess thermal stability of the mutants.

Enzyme activity results combined with structural study confirmed the functional key role of R43, F99, M49 residues, which are part of the CypA active site. Besides, G53V and Q61R mutations severely affected enzyme activity. Structural studies provided explanations for these findings in the case of G53V and investigated possible causes for the Q61R loss in activity. There seems to be a clear pattern of thermal destabilization in mutants like W118R and M85I, which disturb protein hydrophobic packing. In these cases, not only mutations created empty spaces in protein structure but the phenotype is also altered. Chaperone activity was not severely affected in any of mutants studied.

Keywords: cyclophilin, mutants, molecular models, thermofluor

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εργασία αυτή εκπονήθηκε στα εργαστήρια Φυσικής και Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον επιβλέποντά μου κ. Μιχαήλ Καρπούζα , αναπληρωτή καθηγητή ΓΠΑ, τον κ. Ηλία Χριστοφορίδη, διδάκτορα, τον κ. Παναγιώτη Κατινάκη, καθηγητή ΓΠΑ, την κ. Μαρία Δήμου, λέκτορα ΓΠΑ και την κ. Αγγελική Σκάγια, υποψήφια διδάκτορα για την αμέριστη βοήθεια που μου προσέφεραν και την καθοδήγησή τους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	ΣΕΛΙΔΑ
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
A) ΚΥΚΛΟΦΙΛΙΝΕΣ- ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΚΑΙ ΚΑΤΑΤΑΞΗ	1
B) ΙΣΟΜΕΡΕΙΩΣΗ ΤΗΣ ΠΡΟΛΙΝΗΣ ΑΠΟ ΤΙΣ ΚΥΚΛΟΦΙΛΙΝΕΣ- ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΜΕ ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ	4
Γ) ΚΡΥΣΤΑΛΛΙΚΗ ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΚΥΚΛΟΦΙΛΙΝΩΝ Α	12
ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΚΥΚΛΟΦΙΛΙΝΗ	12
ΚΥΚΛΟΦΙΛΙΝΗ <i>ESCHERICHIA COLI</i>	15
ΚΥΚΛΟΦΙΛΙΝΗ <i>AZOTOBACTER VINELANDII</i>	18
2. ΔΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΗΣ ΚΥΚΛΟΦΙΛΙΝΗΣ του <i>E. Coli</i>: ΣΚΟΠΟΙ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	21
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ:	23
A) ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΓΡΙΟΥ ΤΥΠΟΥ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΗΣ <i>CyPA</i> του <i>E. Coli</i>	23
B) ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ, ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ ΚΑΙ ΔΡΑΣΗΣ ΣΑΠΕΡΟΝΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΗΣ <i>CyPA</i> του <i>E. Coli</i>	32
Γ) ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΚΥΚΛΟΦΙΛΙΝΗΣ ΤΟΥ <i>E.coli</i>	35
Δ) ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΘΕΡΜΙΚΗΣ ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗΣ ΤΗΣ ΚΥΚΛΟΦΙΛΙΝΗΣ ΤΟΥ <i>E.coli</i> ΜΕ THERMOFLUOR	41
Γενικά στοιχεία	39
Πειράματα θερμικής αποδιάταξης στο EMBL, Αμβούργο	44

Πειράματα θερμικής αποδιάταξης στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών	47
4. ΔΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ	57
A) ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ ΣΤΟΝ ΙΣΤΟΤΟΠΟ SWISS MODEL	57
B) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΔΟΜΙΚΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ - ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ, ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΩΝ ΕΚΔΗΛΩΣΕΩΝ ΚΑΙ ΘΕΡΜΙΚΗΣ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ	58
Μεταλλάγματα του ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης και γειτονικών αμινοξέων	59
Μεταλλάγματα εκτός του ενεργού κέντρου που επηρεάζουν την ενζυμική δράση της πρωτεΐνης	65
Μεταλλάγματα που επηρεάζουν το φαινότυπο της πρωτεΐνης	70
Μεταλλάγματα που δεν επηρεάζουν το φαινότυπο ή την ενζυμική δραστηριότητα της πρωτεΐνης	74
Μεταλλάγματα που παρουσίασαν αδυναμία έκφρασης ή διαλυτότητας	75
5. ΣΥΝΟΠΤΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	76
Βιβλιογραφία	79

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A) ΚΥΚΛΟΦΙΛΙΝΕΣ- ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΚΑΙ ΚΑΤΑΤΑΞΗ

Οι κυκλοφιλίνες είναι υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες σχετικά μικρού μοριακού βάρους (περίπου 18 kD). Ανήκουν στην ευρύτερη οικογένεια ενζύμων που είναι γνωστά ως ΡΡΐάσες (Peptidyl Proline Isomerases) ή Cyp (1,2,3,15).

Πρόκειται για ένζυμα που συναντώνται σε όλους τους οργανισμούς, προκαρυωτικούς και ευκαρυωτικούς, γεγονός που υποδηλώνει το σημαντικό τους ρόλο στις βιολογικές διεργασίες. Η κύρια λειτουργική τους ιδιότητα είναι η κατάλυση της trans/cis ισομερίωσης της πεπτιδικής προλίνης, διαδικασία απαραίτητη για την αναδίπλωση των πρωτεϊνών.

Ο ρόλος των κυκλοφιλινών στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών τις κατατάσσει στις σαπερόνες, πρωτεΐνες που βοηθούν την αναδίπλωση άλλων πρωτεϊνών που έχουν μετουσιωθεί από θερμικούς ή χημικούς παράγοντες χωρίς να υπεισέρχεται δημιουργία ομοιοπολικών δεσμών Με αυτή τους τη λειτουργία εξασφαλίζουν την διαμόρφωση της τριτοταγούς πρωτεϊνικής δομής μαζί με τις δισουλφυδο-ισομεράσες που αναδιατάσσουν τους πρωτεϊνικούς δισουλφιδικούς δεσμούς (65,66). Η διαδικασία δράσης σαπερόνης απεικονίζεται σχηματικά στην εικ. 1. 1

Η ενζυμική δράση των ΡΡΐάσών καταγράφηκε για πρώτη φορά το 1984 μελετώντας την πρωτεΐνη που προήλθε από ιστό νεφρών χοίρου (14).

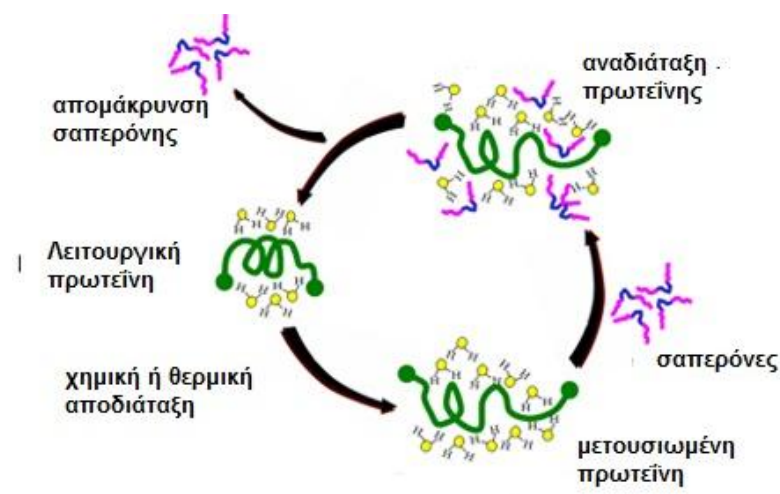
Οι κυκλοφιλίνες χαρακτηρίζονται ως τύπου Α, ο οποίος συναντάται στο κυτταρόπλασμα πολλών κυττάρων, τύπου Β στο ενδοπλασματικό δίκτυο, ενώ έχει εντοπιστεί και τρίτος τύπος κυκλοφιλίνης C στα μιτοχόνδρια. Η συγκεκριμένη εργασία επικεντρώνει στην κυκλοφιλίνη Α που συναντάται στο κυτταρόπλασμα του βακτηρίου *E. Coli*.

Επίσης, η οικογένεια των πεπτιδυλ-προλυλ cis-trans ισομερασών κατατάσσεται στην υπεροικογένεια των ανοσοφιλινών, εξαιτίας της επίδρασης τους στο ανοσοποιητικό σύστημα (11) . Στην οικογένεια αυτή ανήκουν επίσης οι πρωτεΐνες-υποδοχείς του ανοσοκατασταλτικού φαρμάκου FK506 (FKBPs) και οι παρβουλίνες. Το FK506 και

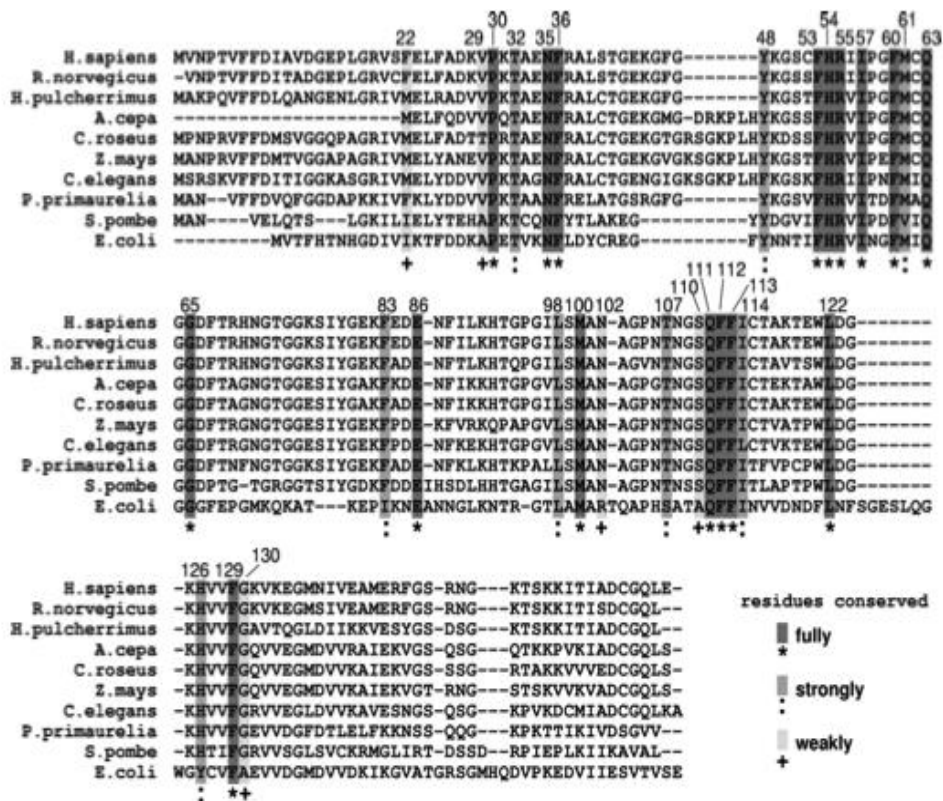
άλλες ανοσοκατασταλτικές ουσίες χρησιμοποιούνται για αποφυγή απόρριψης του μοσχεύματος κατά τις μεταμοσχεύσεις.

Παράλληλα με τη δράση της ισομεράσης, οι κυκλοφιλίνες ενέχονται σε ενδοκυτταρική μεταφορά πρωτεϊνών, και σε ορισμένες περιπτώσεις παρουσιάζουν δράση νουκλεάσης (17). Σχετίζονται επίσης με την μόλυνση με τον ιό HIV-1, καθώς η ανθρώπινη CypA αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη του καψιδίου του ιού. Έχει διαπιστωθεί ότι το σύμπλεγμα CypA-κυκλοσπορίνης A αναγνωρίζει χημικά την καλσινευρίνη, φωσφατάση εξαρτώμενη από την συγκέντρωση ιόντων ασβεστίου επίσης γνωστή ως πρωτεϊνική φωσφατάση 3 (32). Η λειτουργία των ομο-ολιγομερών νικοτινικών και σεροτονικών υποδοχέων των νευρώνων έχει βρεθεί ότι εξαρτάται από την δραστηριότητα της κυκλοφιλίνης .

Οι κυκλοφιλίνες (Cyp) όλων των οργανισμών χαρακτηρίζονται από κοινές, συντηρημένες περιοχές αμινοξικών ακολουθιών οι οποίες θεωρούνται σημαντικές για την δομική του υπόσταση και, κυρίως, την ενζυμική τους λειτουργία. Στην εικ 1.2 εμφανίζεται η ευθυγράμμιση των αμινοξικών ακολουθιών των CypA από διάφορους οργανισμούς. Η σημασία των συντηρημένων αυτών περιοχών θα συζητηθεί εκτενώς στη συνέχεια.



Εικ. 1.1 Σχηματική απεικόνιση της δράσης σαπερόνης (Maroon Biotech)



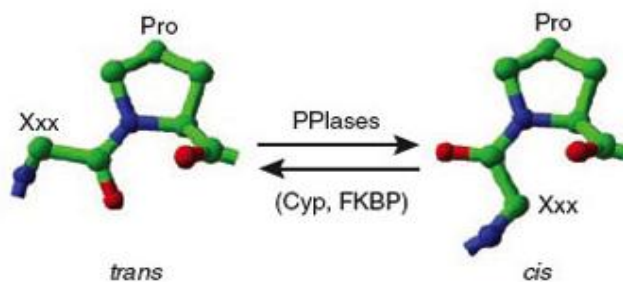
Εικ. 1.2 Ανάλυση ακολουθιών αμινοξέων CypA προερχόμενων από διάφορους οργανισμούς με υπέρθεση ομόλογων περιοχών. Με σκούρα σκίαση υποδηλώνονται οι περιοχές που έχουν πλήρως συντηρηθεί κατά την εξέλιξη (25)

Η μελέτη των κυκλοφιλινών παρουσιάζει ενδιαφέρον, καθώς αποτελούν πρότυπο μελέτης ενζυμικού μηχανισμού που έχει ερευνηθεί εκτενώς και σε βάθος. Επίσης, , υπάρχει προοπτική έρευνας και εφαρμογής σε ιατρικά θέματα όπως ο ρόλος των κυκλοφιλινών στην προσβολή από HIV και άλλες ιογενείς ασθένειες, στην ανοσοκαταστολή και στην ανάπτυξη καρκίνου (9, 67, 68).

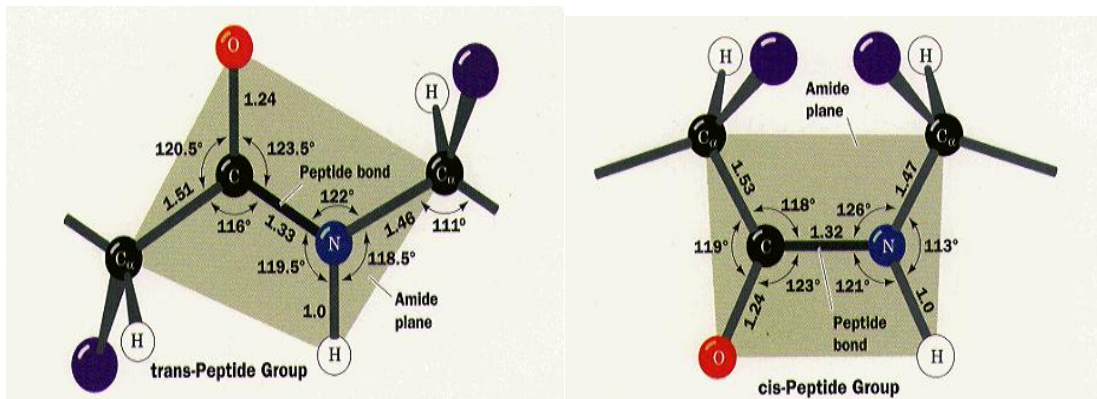
B) ΙΣΟΜΕΡΕΙΩΣΗ ΤΗΣ ΠΡΟΛΙΝΗΣ ΑΠΟ ΤΙΣ ΚΥΚΛΟΦΙΛΙΝΕΣ- ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΤΗΣ ΜΕ ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ

Τα αμινοξέα των πρωτεϊνών για λόγους στερεοχημικών παρεμποδίσεων υιοθετούν σχεδόν πάντα την *trans* διαμόρφωση, κατά την οποία οι ομάδες N-H και C=O διευθετούνται προς αντίθετες κατευθύνσεις ως προς το επίπεδο που ορίζει ο πεπτιδικός δεσμός (Εικ. 2.1B). Η *cis* μορφή (δίεδρη γωνία περιστροφής του δεσμού C-N= 0°) είναι κατά κανόνα περίπου 1000 φορές λιγότερο σταθερή από την *trans* μορφή (δίεδρη γωνία περιστροφής του δεσμού CN= 180°), γεγονός που κάνει την παρουσία της εξαιρετικά σπάνια. Εξαιρέση αποτελούν τα μόρια της προλίνης, όπου η ενεργειακή αναλογία είναι μόνο 1:4 υπέρ της *trans* μορφής, η οποία και ευνοείται και πάλι για λόγους ελαχιστοποίησης των στερεικών παρεμποδίσεων. Συναντώνται όμως και *cis* προλίνες κυρίως σε σημεία αναδίπλωσης της πεπτιδικής αλυσίδας, γεγονός που τις συνδέει με την σταθεροποίηση της τριτοταγούς δομής. (1,6,11)

Η αναλογικά μικρή διαφορά των ελεύθερων ενεργειών μεταξύ *cis* και *trans* ισομερών επιτρέπει συχνά στο τοπικό περιβάλλον της προλίνης μιας πρωτεϊνικής αλυσίδας να τις ισομεριώσει με αποτέλεσμα να προκύπτει ποικιλία στην παρατηρούμενη *cis:trans* αναλογία σε διαφορετικές πρωτεΐνες. Ωστόσο, η ενεργειακή διαφορά καθιστά την αυθόρμητη ισομερίωση της προλίνης πολύ αργή διαδικασία, την οποία επιταχύνουν εντυπωσιακά οι ισομεράσες (κατά 1.000.000 φορές).



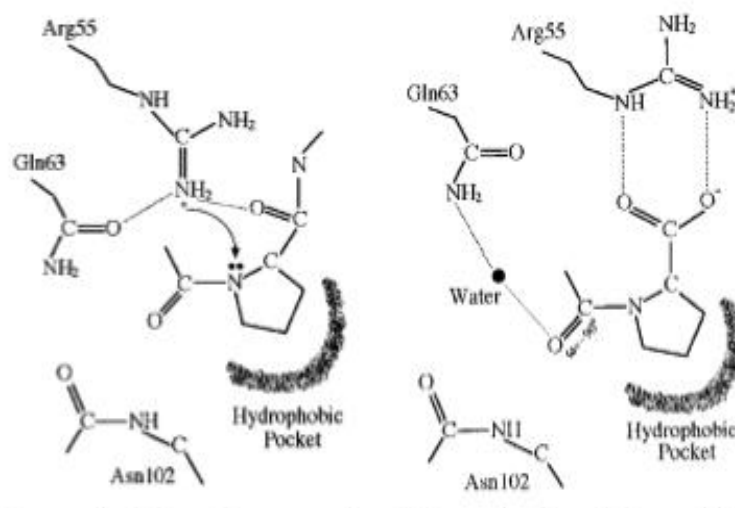
Εικ. 1.3 Ισομερείωση της προλίνης από PPIάσες (Lu *et al.* 2007, *Nature Chemical Biology* 3 619-629) Με Xxx αναπαριστάται οποιοδήποτε αμινοξύ πλην της σερίνης ή της θρεονίνης. Αυτές εμπλέκονται σε μηχανισμούς ισομερίωσης εξαρτώμενους από τη φωσφορυλίωση



Εικ. 1.4 Trans- και -Cis πεπτιδικές διαμορφώσεις. (Copyright John Wiley & Sons, Food biochemistry 1990)

Οι Zhao & Ke (19), βασισμένοι στα κρυσταλλογραφικά δεδομένα της δομής της ανθρώπινης κυκλοφιλίνης σε σύμπλεγμα με τετραπεπίδιο AAPF περιέγραψαν τον εξής μηχανισμό κατάλυσης: Η αργινίνη της θέσης 55, συντηρημένο αμινοξύ σε όλες τις κυκλοφιλίνες A που έχουν μελετηθεί, δημιουργεί δεσμό υδρογόνου με το αμιδικό άζωτο, που διαθέτει ζεύγος ελεύθερων ηλεκτρονίων. Με αυτό τον τρόπο αποδυναμώνει το συντονισμό του αμιδικού δεσμού και χαμηλώνει το ενεργειακό φράγμα της cis/trans μετατροπής (εικ. 1.5) Η σταθεροποίηση του μεταβατικού σταδίου επιτυγχάνεται περαιτέρω με το σχηματισμό δεσμού υδρογόνου μεταξύ του καρβονυλικού οξυγόνου του αμιδικού δεσμού της προλίνης και οξυγόνου νερού του διαλύτη.

Μπορούμε, με βάση την εξειδίκευση του υποστρώματος, να διακρίνουμε τις ισομεράσες προλίνης σε εξαρτώμενες και μη εξαρτώμενες από τη φωσφορυλίωση, η οποία μεταφράζεται σε κατανάλωση ATP. Οι κυκλοφιλίνες ανήκουν στην πρώτη ομάδα, όπως και τα FKBP. Τα trans- και -cis ισομερή πολλών πρωτεϊνών φαίνεται να έχουν διακριτές λειτουργίες, με αυτή την έννοια οι ισομεράσες προλίνης λειτουργούν σαν ρυθμιστές (μοριακοί “διακόπτες”) (6).



Εικ 1.5 Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού cis/trans μετατροπής (19) .

Η μελέτη των πρωτεϊνών με κρυσταλλογραφία, όπως στο προηγούμενο παράδειγμα, παρέχει ανεκτίμητη δομική πληροφορία μεγάλης ακρίβειας που βοηθά την κατανόηση των ενζυμικών λειτουργιών, καθώς είναι σαφές πως η δομή και η λειτουργικότητα των ενζύμων είναι παράγοντες αλληλοεξαρτώμενοι. Μέθοδοι όπως το NMR (πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός) και η φθορισμομετρία μπορούν να ρίξουν φως στη κινητική των ενζυμικών διεργασιών και να εντοπίσουν τους μεταβατικούς μηχανισμούς, καθώς και τη χρονική κλίμακα όπου αυτές παρατηρούνται. Σημαντικό πλεονέκτημα του NMR είναι η καταμέτρηση της χρονικής κλίμακας των ενζυμικών αντιδράσεων από την τάξη του pico-δευτερολέπτου έως την τάξη του δευτερολέπτου (22). Επίσης η αξιολόγηση μπορεί να γίνει με δεδομένα διαφόρων ειδών πυρήνων (^1H , ^2H , ^{13}C , ^{15}N) που μπορούν να δώσουν αλληλοσυμπληρούμενες πληροφορίες.

Πειράματα NMR (μέτρηση χρόνων αποδιέγερσης) στην ανθρώπινη CypA με ^{15}N - και ^{13}C - σήμανση κατέδειξαν ότι στην ισομερίωση υπαισέρχονται και άλλες περιοχές του ενζύμου πλην του ενεργού κέντρου (εικ 1.6) δημιουργώντας ευρύτερο δυναμικό σύστημα (20, 21). Επίσης υπάρχει δυναμική δραστηριότητα στις ίδιες περιοχές που υπαισέρχονται

στην κατάλυση ακόμα κι όταν το ένζυμο βρίσκεται σε ελεύθερη μορφή, χωρίς υπόστρωμα. Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε πεπτιδίο N-ηλεκτρηλο(suc)-Ala-Phe-Pro-Phe-p-νιτροανιλίνη.

Ο καταλυτικός μηχανισμός των κυκλοφιλινών A έχει επίσης διερευνηθεί υπολογιστικά με ενεργειακές προσομοιώσεις (molecular dynamics) χρησιμοποιώντας μοντέλα που έχουν προκύψει από κρυσταλλικές δομές ανθρώπινης κυκλοφιλίνης A (4,23,24,25). Σε όλες τις περιπτώσεις διαπιστώνεται η μείωση της ελεύθερης ενέργειας που απαιτείται για την ισομερίωση, η οποία πραγματοποιείται με περιστροφή του δεσμού μεταξύ της προλίνης και του άνθρακα του προηγούμενου από αυτήν αμινοξέος με φορά αντίστροφη από αυτήν του ρολογιού, κοιτάζοντας από την πλευρά του ατόμου N τη προλίνης (4,5,25). Θεωρείται πως το αμινοτελικό άκρο του πεπτιδίου είναι αυτό που περιστρέφεται, ενώ η ίδια η προλίνη παραμένει σταθερή στον ενζυμικό υδρόφοβο θύλακα του ενεργού κέντρου.

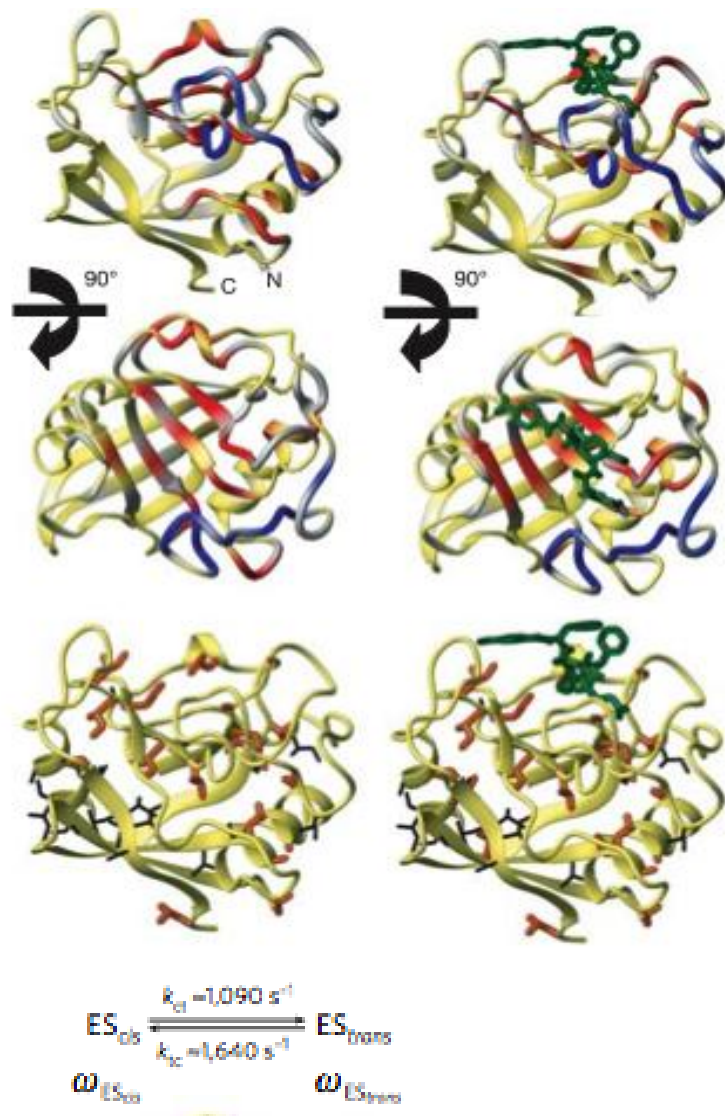
Επίσης επιβεβαιώνεται υπολογιστικά η σημασία των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων μεταξύ της προλίνης του υποστρώματος και συντηρημένων υδρόφοβων αμινοξέων του ενεργού κέντρου του ενζύμου (φαινυλαλανίνη 60, 113 και λευκίνη 122) καθώς και των δεσμών υδρογόνου μεταξύ του ενζύμου και του υποστρώματος. Αυτοί, όπως προκύπτει και από τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα με την προλίνη σε cis διαμόρφωση, σχηματίζονται κυρίως μεταξύ της ομάδας γουανιδίνης της αργινίνης 55 και του οξυγόνου του καρβονυλίου της προλίνης και μεταξύ του καρβονυλίου της Ασπαραγίνης 102 και του προηγούμενου της προλίνης αμινοξέος. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές είναι πιο έντονες κατά το μεταβατικό στάδιο και την cis διαμόρφωση της προλίνης (23, 25).

Δεδομένα που προέκυψαν από προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής όπου χρησιμοποιήθηκε η σουίτα προγραμμάτων AMBER (24) κατέδειξαν μεγάλη απώλεια βαθμών ελευθερίας όσον αφορά τη διαμόρφωση του ενζύμου κατά τη δέσμευση του υποστρώματος. Οι δεσμοί υδρογόνου όπως εκτιμήθηκαν υπολογιστικά μεταξύ πεπτιδίου σε μεταβατική κατάσταση ισομερίωσης και ενζύμου εμφανίζονται στην εικ. 1.7

Όπως και στην περίπτωση των αναλύσεων με NMR, οι προσομοιώσεις κατέληξαν σε δύο ακόμα σημαντικές διαπιστώσεις

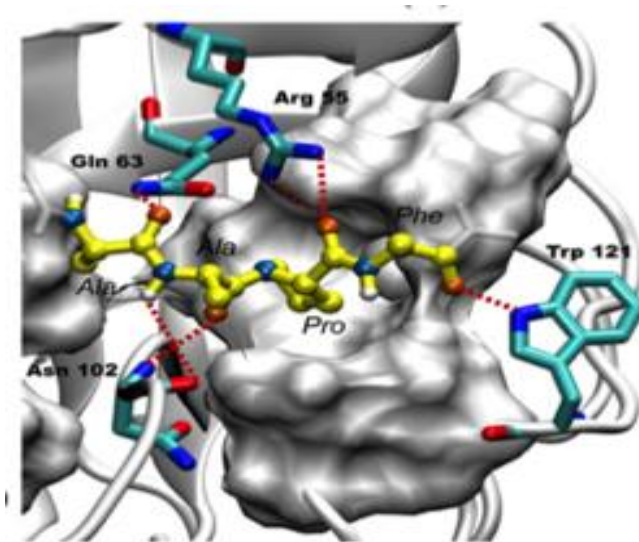
α) και άλλες περιοχές πλην του ενεργού κέντρου υφίστανται μεταβολές διαμορφώσεων κατά την κατάλυση (εικ. 1.8)

β) Η μεταβατική διαμόρφωση του υποστρώματος είναι ενεργειακά ευνοούμενη όσον αφορά την πρόσδεση στο ένζυμο σε σχέση με τις cis και trans διαμορφώσεις (24,26). Αυτό σημαίνει ότι ο σχεδιασμός του ενζύμου είναι τέτοιος ώστε να προσδένει και να σταθεροποιεί την μεταβατική διαμόρφωση του υποστρώματος.

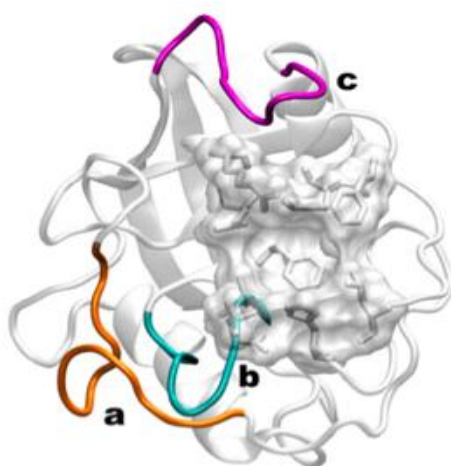


Εικ. 1.6 Απεικόνιση των περιοχών που απαρτίζουν το δυναμικό σύστημα της ανθρώπινης CypA με δεδομένα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού. Δεξιά απεικονίζεται το ένζυμο κατά τη διάρκεια της κατάλυσης και αριστερά το ένζυμο χωρίς να επιτελεί ενζυμική λειτουργία. Οι δύο πρώτες οριζόντιες σειρές (από πάνω προς τα κάτω) περιγράφουν τις ενεργές περιοχές (που υφίστανται χημική ανταλλαγή) κατά την ^{15}N -σήμανση που ταιριάζουν με το κινητικό προφίλ της trans/cis μετατροπής (κόκκινο χρώμα) και ένας βρόγχος που παρουσιάζει ταχύτερη χημική ανταλλαγή (μπλε χρώμα). Η τρίτη σειρά περιγράφει τις ενεργές μεθυλ-αλυσίδες που εντοπίστηκαν με ^{13}C -σήμανση (πορτοκαλί χρώμα) σε αντιδιαστολή με τις ανενεργές (μαύρο χρώμα). Με πράσινο χρώμα εμφανίζεται το πεπτίδιο N-ηλεκτρηλο(suc)-Ala-Phe-Pro-Phe-p-νιτροανιλίνη (20).

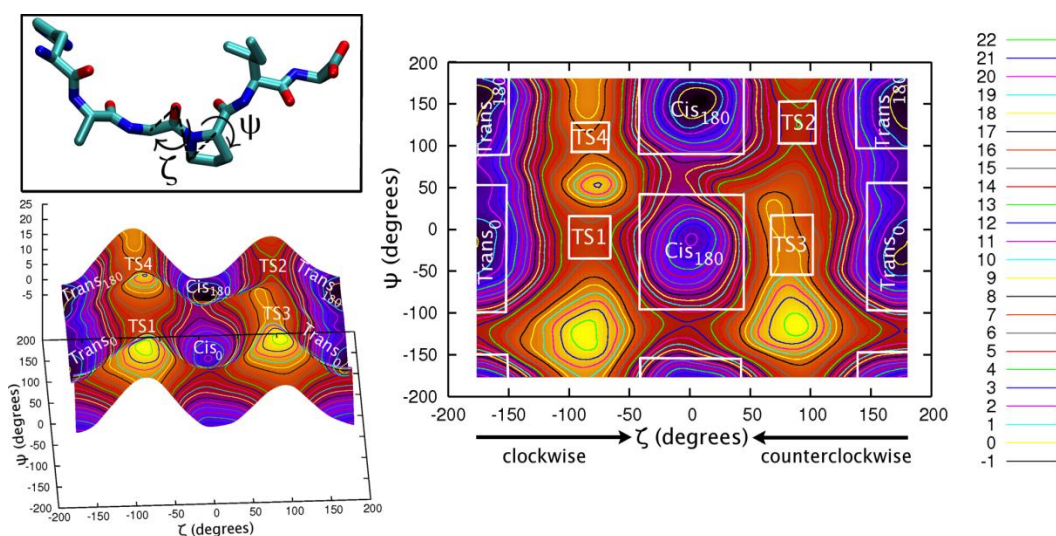
ES : Ένζυμο με προσδεμένο πεπτίδιο ω: Χημική μετατόπιση



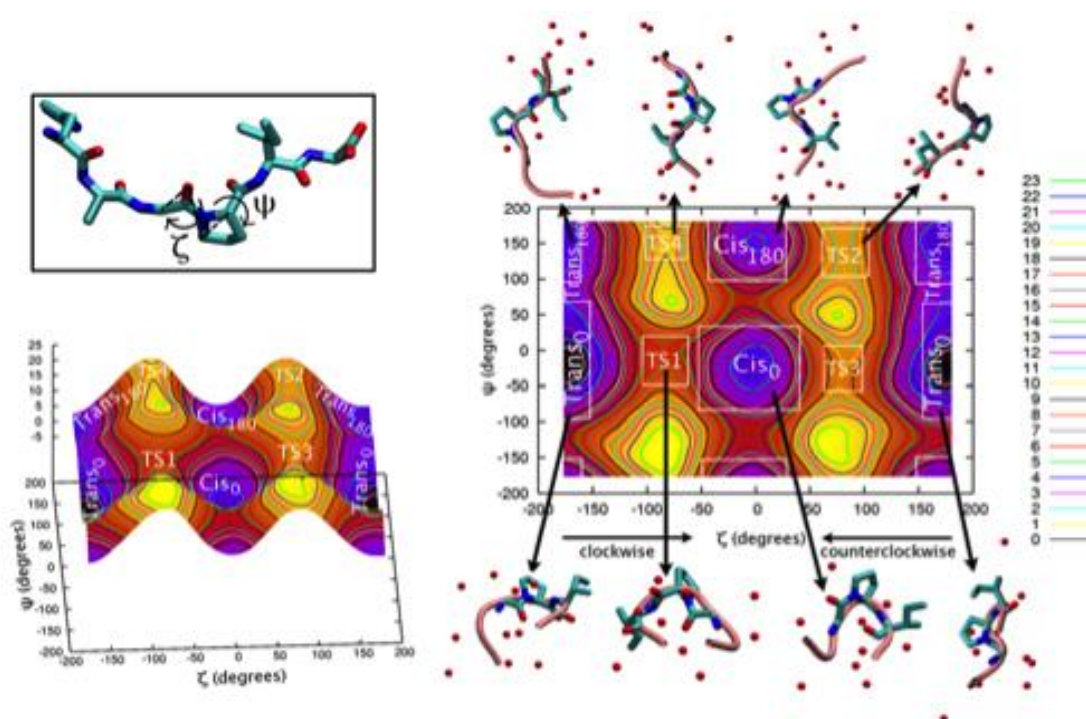
Εικ. 1.7 Δίκτυο δεσμών υδρογόνου μεταξύ ανθρώπινης CypA και υποστρώματος κατά τη μεταβατική διαμόρφωση του δεύτερου σύμφωνα με υπολογισμούς προγραμμάτων προσομοίωσης μοριακής δυναμικής(24)



Εικ. 1.8 Περιοχές της ανθρώπινης CypA εκτός του ενεργού κέντρου που παρουσιάζουν αλλαγές διαμόρφωσης κατά την κατάλυση σύμφωνα με υπολογισμούς προγραμμάτων προσομοίωσης μοριακής δυναμικής (24) a) αμινοξέα 75-85 b) αμινοξέα 101-110 c) αμινοξέα 147-155



α



β

Εικ. 1.9 Οι υπολογισμένη με μεθόδους προσομοίωσης ελεύθερη ενέργεια σε kcal/mol του πεπτιδίου HAGPIA (ακολουθία που μιμείται τη θέση πρόσδεσης του καμινιδίου του HIV-1) προσδεμένου στην CypA (α) και ελεύθερου στο υδατικό διάλυμα (β) σαν συνάρτηση των διέδρων γωνιών ψ και ζ . Απεικονίζονται μεταβατικές περιοχές TS και περιοχές χαμηλής ενέργειας. Το μαύρο χρώμα αντιστοιχεί σε διαμόρφωση χαμηλής ενέργειας. Είναι εμφανές ότι η διαμόρφωση cis180 εμφανίζεται ως χαμηλής ενέργειας μόνο στην περίπτωση πρόσδεσης στη CypA (6)

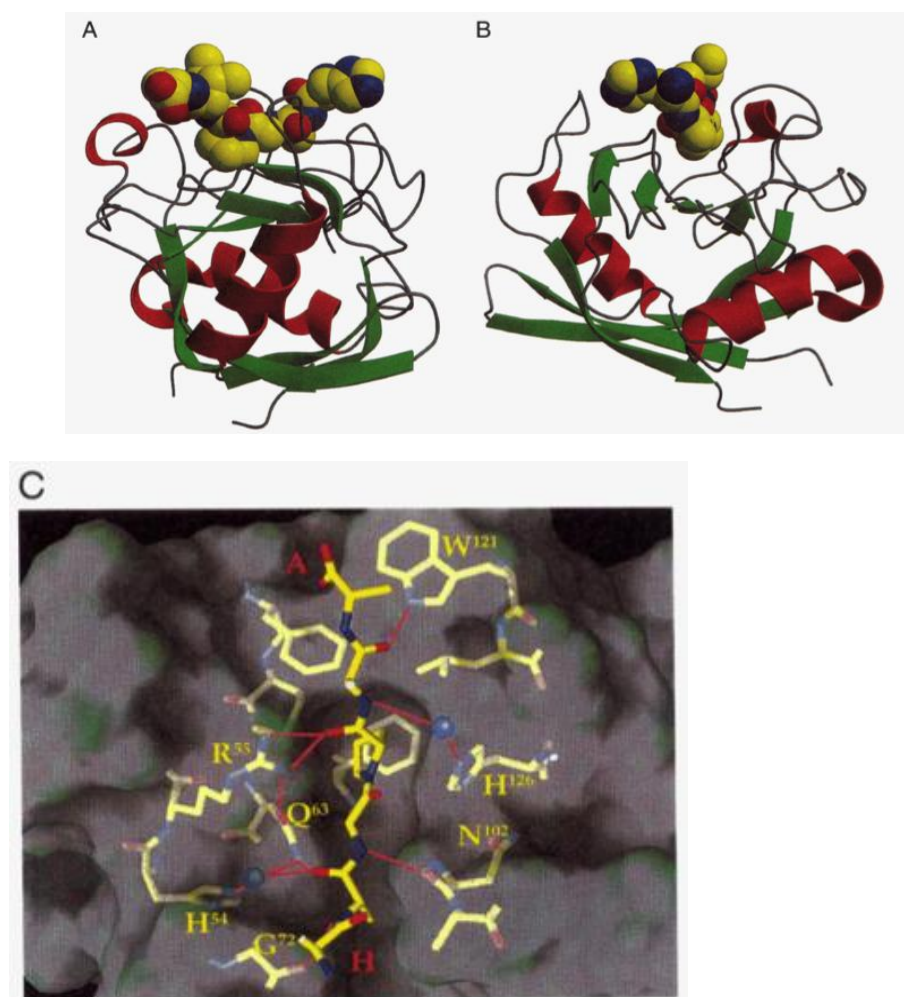
Γ) ΚΡΥΣΤΑΛΛΙΚΗ ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΚΥΚΛΟΦΙΛΙΝΩΝ Α

ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ CΥΡΑ:

Πρόκειται για την πιο μελετημένη CυρΑ. Η πρώτη κρυσταλλική δομή της που αναφέρθηκε ήταν εκείνη με προσδεμένο το τετραπεπτίδιο ac-Ala-Ala-Pro-Ala-amc (amc = αμινομεθυλκουμαρίνη, ac=οξική ομάδα) και παρουσιάστηκε στις αρχές της δεκαετίας του '90 (3). Η δομή που αναλύθηκε κρυσταλλώνει σε ομάδα χώρου P2₁2₁2₁. Το προσδεμένο πεπτίδιο όπως καταδείχθηκε από τη συγκεκριμένη μελέτη παρουσιάζει -cis διαμόρφωση.

Η δομή της κυκλοφιλίνης συνίσταται σε ένα βαρέλι που αποτελείται από οκτώ β-πτυχές και δύο α-έλικες στο εξωτερικό του μέρος. Το εσωτερικό του βαρελιού είναι πακεταρισμένο με υδρόφοβα κατάλοιπα. Η ανθρώπινη κυκλοφιλίνη σε σύμπλεγμα με το πεπτίδιο Hi-Ala-Gly-Pr-Ile-Ala απεικονίζεται στην εικ. 1.10 **A,B**.

Τα ενζυμικά κατάλοιπα που εντοπίστηκαν σε ατομικές αποστάσεις μικρότερες των 3.8 Å από τον περιστρεφόμενο κατά την κατάλυση (λαμβάνοντας υπόψη τα μη υδρογονικά άτομα) δεσμό προλίνης-αλανίνης είναι τα εξής: Arg 55, Ile 57, Phe 60, Gln63, Ala 101, Asn 102, Gln 111, Phe 134, Leu 122, His 126, Arg 148. Το ενζυμικό ενεργό κέντρο, όπως ορίζεται από το περιβάλλον αυτό είναι κανάλι που επικάθεται στην κορυφή δύο αντιπαράλληλων β-κλώνων. Το ενεργό κέντρο του ενζύμου είναι στην πραγματικότητα μία υδρόφοβη “θήκη” στην επιφάνεια του β-βαρελιού το οποίο συνδέεται με την προλίνη του τετραπεπτιδίου. Στην ανθρώπινη κυκλοφιλίνη Α εντοπίστηκαν δεσμοί υδρογόνου μεταξύ της ομάδας της γουανιδίνης της Arg55 και του καρβονυλικού οξυγόνου της προλίνης του πεπτιδίου Arg55-NH-OPro3. Επίσης σχηματίζεται δεσμός υδρογόνου μεταξύ Arg55 και Gln63, η οποία με τη σειρά της συνδέεται με δεσμό υδρογόνου με την Gln111. Η αμινομάδα της Ala 2 του πεπτιδίου συνδέεται επίσης με το καρβονυλικό οξυγόνο της Asn 102.



Εικ. 1.10 **A,B**: Δύο διαφορετικές απόψεις του συμπλέγματος CypA/ Hi-Ala-Gly-Pr-Ile-Ala. **C**: Δίκτυο δεσμών υδρογόνου μεταξύ πεπτιδίου (έντονο κίτρινο) και CypA που αναγνωρίστηκαν. Τα C- και N-τελικά άκρα του πεπτιδίου σημαίνονται με κόκκινο χρώμα.

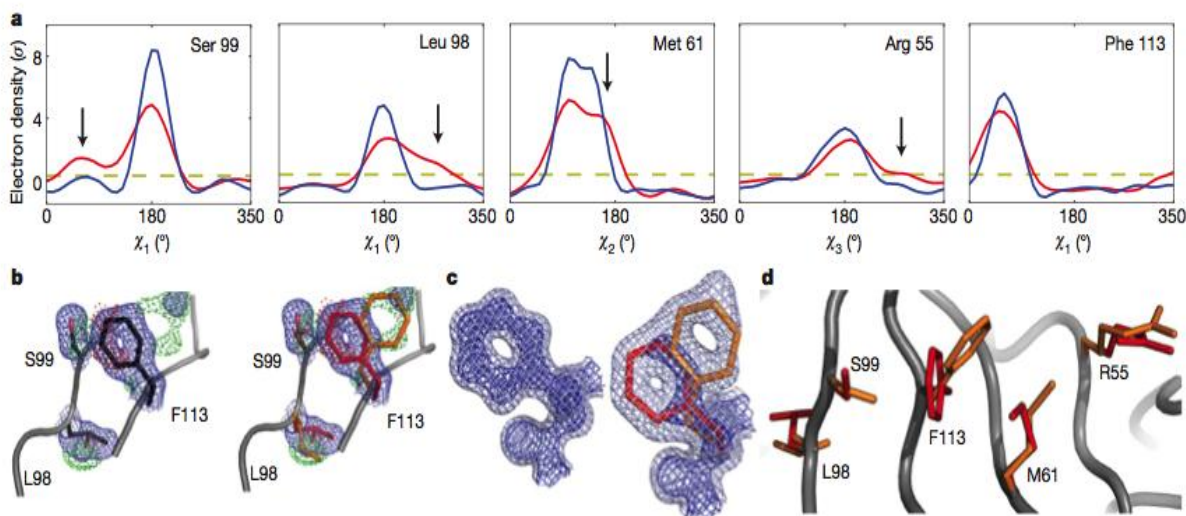
Παρατηρείται επίσης δίκτυο αλληλεπιδράσεων με μόρια νερού του διαλύτη που συμμετέχουν στην κρυσταλλική δομή. Τα παραπάνω ευρήματα βρίσκονται σε συμφωνία με τα υπολογιστικά μοντέλα μοριακής δυναμικής που προαναφέρθηκαν (20, 24).

Η ανθρώπινη CypA αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη του καψιδίου του HIV-1, η οποία είναι δομικό κομμάτι του ιού. Το ενεργό κέντρο της CypA αναγνωρίζει συγκεκριμένη αμινοξική ακολουθία, η οποία χαρακτηρίζεται από κατάλοιπο γλυκίνης (θέση 89 στην

ική πρωτεΐνη) που προηγείται της προλίνης-στόχου (θέση 90). Η γλυκίνη επιτρέπει την εφαρμογή της προλίνης 90 σε *trans* διαμόρφωση στο ενεργό κέντρο της CypA προκειμένου να ξεκινήσουν οι διεργασίες αξιοποίησης από τον ιό του ενζύμου του ξενιστή για εξυπηρέτηση των δικών του λειτουργιών (27). Ο τρόπος αυτός έρχεται σε αντιδιαστολή με τις υπόλοιπες κρυσταλλικές δομές που έχουν αναφερθεί, που χαρακτηρίζονται από *cis* διαμόρφωση του υποστρώματος.

Η κρυσταλλική δομή της CypA με ολιγοπεπτίδιο που μιμείται την ακολουθία πρόσδεσης της ικής πρωτεΐνης Hi-Ala-Gly-Pr-Ile-Ala έχει επιλυθεί (28). Η ομάδα χώρου των κρυστάλλων ήταν P4₁ με έξι σύμπλοκα ενζύμου/υποστρώματος ανά ασύμμετρη μονάδα. Η διαμόρφωση της CypA είναι ανάλογη με αυτή που παρατηρήθηκε σε άλλες κρυσταλλικές δομές που είχαν προαναφερθεί (3, 19). Η διαμόρφωση του συμπλέγματος ενζύμου-υποστρώματος και το δίκτυο δεσμών υδρογόνου που εμπλέκονται στην κατάλυση όπως αποτυπώθηκαν στην κρυσταλλική δομή εμφανίζονται στην εικ. 1.10 C.

Στο πλαίσιο της εις βάθος κατανόησης των μηχανισμών κατάλυσης διερευνήθηκε και αργότερα η διαμόρφωση του ενεργού κέντρου της ανθρώπινης CyPA με κρυσταλλογραφικές μεθόδους σε θερμοκρασία δωματίου (30). Χρησιμοποιήθηκε η υπολογιστική μέθοδος Ringier, η οποία ανιχνεύει ασθενή ηλεκτρονική πυκνότητα και εντοπίζει πολλαπλές συνυπάρχουσες διαμορφώσεις αμινοξικών καταλοίπων (31). Με τον τρόπο αυτό αποκαλύφθηκε η ύπαρξη αλληλοσχετιζόμενων διπλών διαμορφώσεων των καίριων για την κατάλυση αμινοξέων Ser 99, Leu 98, Met 61, Arg 55 και Phe 113 (εικ 1.11). Από τις δύο διαμορφώσεις η μία ήταν πάντα επικρατέστερη. Όπως αποκάλυψαν τα πειράματα NMR, η μετάλλαξη της Ser 99 σε Thr μετέθεσε την ισορροπία προς την δευτερεύουσα διαμόρφωση της πρωτεΐνης αγρίου τύπου, λόγω στερεοχημικών περιορισμών. Σαν συνέπεια, η ενζυμική δράση της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης ήταν 300 φορές μικρότερη. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει την ύπαρξη ευρύτερου καταλυτικού δυναμικού συστήματος που περιγράφηκε από προηγούμενα ευρήματα NMR και τα υπολογιστικά μοντέλα.



Εικ 1.11 Διαμορφώσεις αμινοξέων του ενεργού κέντρου CyPA όπως προέκυψαν από κρυσταλλογραφικά δεδομένα a) Διαγράμματα ηλεκτρονιακής πυκνότητας σε θερμοκρασία δωματίου (κόκκινο χρώμα) και σε χαμηλή θερμοκρασία (μπλε χρώμα) ως συνάρτησης της δίδερης γωνίας χ . Στα δεδομένα θερμοκρασίας δωματίου εμφανίζονται οι δευτερεύουσες διαμορφώσεις b) Χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας σε θερμ. δωματίου 2Fo-Fc (μπλε χρώμα), Fo-Fc (πράσινο χρώμα) c) Εμφάνιση διπλής διαμόρφωσης Phe 113 d) Σχηματική αναπαράσταση της επικρατούσας (κόκκινο χρώμα) και της δευτερεύουσας (κίτρινο χρώμα) των αμινοξέων (30)

ESCHERICHIA COLI CYPA.

Οι συγκεκριμένες κρυσταλλογραφικές μελέτες εστιάζουν το ενδιαφέρον στην κυκλοφιλίνη A την προερχόμενη από το κυτόπλασμα του *E. Coli*. Η κρυσταλλογραφική δομή της συγκεκριμένης πρωτεΐνης έχει μελετηθεί παρουσία και απουσία πεπτιδίου (33, 18).

Η δομή της κυκλοφιλίνης A του *Escherichia coli* παρουσιάζει πολλές ομοιότητες με αυτήν του ανθρώπου. Η επίλυση και βελτιστοποίηση της CyPA του *E. coli* συνδεδεμένης με τριπεπίδιο (ηλεκτρουλο-Ala-Pro-Ala-p-νιτροανιλίνη) απέδειξε ότι, όπως και στην περίπτωση της ανθρώπινης CyPA, το κέντρο πρόσδεσης του πεπτιδίου βρίσκεται στην επιφάνεια της ανώτατης πτυχωτής επιφάνειας δύο ορθογωνίων β-πτυχωτών επιφανειών.

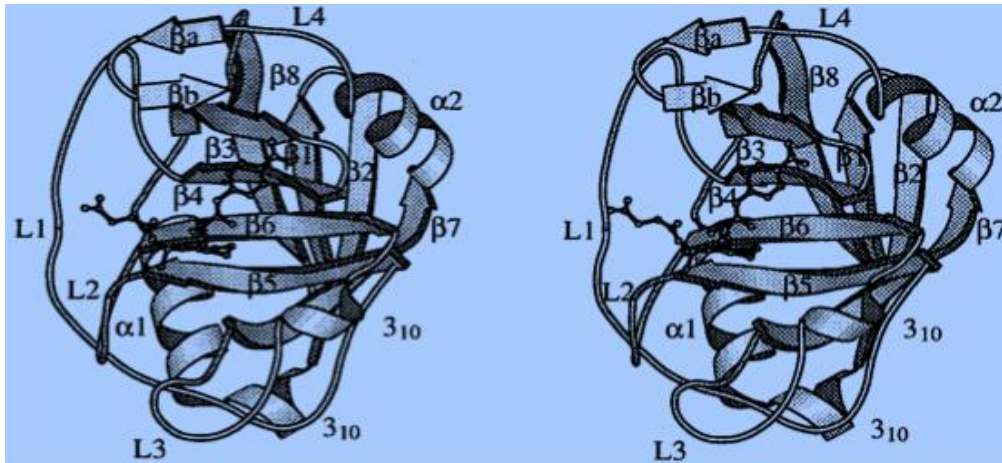
Τα τοιχώματα του υδρόφοβου θύλακα αυτού σχηματίζονται από τις πλαϊνές αλυσίδες πέντε μη πολικών καταλοίπων Phe48, Met49, Phe107, Leu108, και Tyr120.

Όπως κατέδειξαν τα δεδομένα περίθλασης ακτίνων X, το *cis* ισομερές της προλίνης του τριπεπτιδίου εισέρχεται στον υδρόφοβο θύλακα παράλληλα με τον δακτύλιο της Tyr120.

Αντίστοιχα με την Arg55 της ανθρώπινης κυκλοφιλίνης, η Arg43 είναι το ομόλογο αμινοξύ που συνδέεται με δεσμό υδρογόνου με την προλίνη του πεπτιδίου.

Οι συγγραφείς, βασιζόμενοι και σε προηγούμενα πειράματα αναδίπλωσης πρωτεϊνών παρουσία κυκλοφιλίνης A καταλήγουν στο συμπέρασμα πως το *cis* ισομερές της προλίνης του τριπεπτιδίου συνδέεται στον θύλακα και πως το ένζυμο καταλύει την *cis* → *trans* ισομερίωση. Παραμόρφωση του *trans* ισομερούς θα μπορούσε να βοηθήσει την πρόσδεσή του στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, με το ανάλογο όμως ενεργειακό κόστος. Μεταγενέστερη εργασία διερεύνησης της κρυσταλλικής δομής της κυκλοφιλίνης B του *E. Coli* διαπίστωσε την δυνατότητα πρόσδεσης της *trans* μορφής με μεγάλη παραμόρφωση. Αυτό καθίσταται δυνατό με την συνδρομή υδρογονικών δεσμών μεταξύ του ενζύμου και της αλανίνης που προηγείται της προλίνης του υποστρώματος (33)

Η κρυσταλλική δομή της Cyra του *E. Coli* χωρίς δεσμευμένο πεπτίδιο (18) επιτεύχθηκε με διαφορετικές συνθήκες κρυστάλλωσης και κατέδειξε διαφορετική ομάδα χώρου (C2221 αντί για P212121). Όσον αφορά την ίδια την πρωτεϊνική διαμόρφωση, η διαφοροποίηση δεν παρουσιάστηκε κε στο ενεργό κέντρο αλλά στους βρόγχους, ειδικά στον L1 (αμινοξική ακολουθία 57-64, 70-77), τον L3 (αμινοξική ακολουθία 114-117) και τον L4 (104-108). Η διαπίστωση αυτή συμφωνεί με μελέτες προσομοιώσεων με μοριακή δυναμική και με NMR, όπου εμφανίζονταν ενεργές κατά την κατάλυση και άλλες περιοχές πλην του ενεργού κέντρου. Τα αμινοξέα 74-76 σχηματίζουν έλικα στο αδέσμευτο ένζυμο, όπως και τα 104-108.



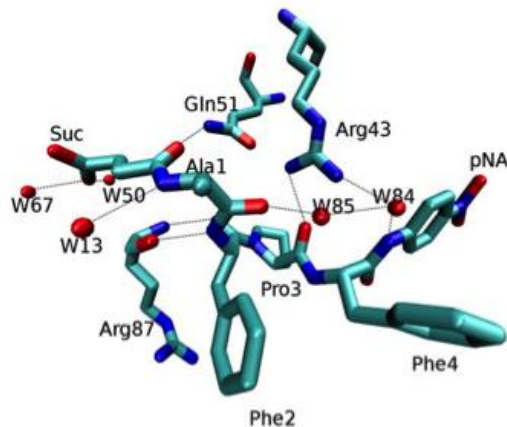
Εικ. 1.12 Στερεοχημική απεικόνιση της δομής της κυκλοφιλίνης Α του *E. Coli* όπου είναι εμφανής η δομή του β-βαρελίου με τις δύο α-έλικες και τους βρόγχους στο εξωτερικό. Διακρίνεται το τριπεπίδιο. Το ανώτερο τμήμα της δομής των β-κλώνων (β3-5) δημιουργεί το ενεργό κέντρο του ενζύμου επιφανειακά ενώ το κατώτερο τμήμα σταθεροποιεί το β-βαρέλι παρουσιάζοντας υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις με αυτό. Οι α-έλικες επίσης βοηθούν στη σταθεροποίηση της δομής μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων.

Όσον αφορά την κινητικότητα (παράγοντας Β), διαπιστώθηκε ότι στην δομή με το πεπτιδίιο ηλεκτρουλο-Ala-Pro-Ala-*p*-νιτροανιλίνη) (18) υπάρχει διαφοροποίηση μεταξύ των L2, L3 και των L1, L4 η οποία εξαλείφεται απουσία πεπτιδίου (εικ. 1.15). Οι L2 και ακόμα περισσότερο η L3 είναι αυτές που περιορίζονται κινητικά κατά την πρόσδεση του υποστρώματος. Ορισμένα αμινοξέα της L3 όπως η φαινυλαλανίνη 107, η λευκίνη 108, και η τυροσίνη 120 είναι ιδιαίτερα σημαντικά για την κατάλυση, όπως προαναφέρθηκε. Τα δεδομένα αυτά συμπίπτουν πλήρως με τον τρόπο διακύμανσης των μέσων τιμών του παράγοντα $B(A^2)$ σε όλο το μήκος της αμινοξικής ακολουθίας της CyPA του *A. vinelandii* (εικ. 1.15). Τα δεδομένα κρυσταλλικής δομής του που θα αναφερθούν στη συνέχεια.

Azotobacter vinelandii CYP_A

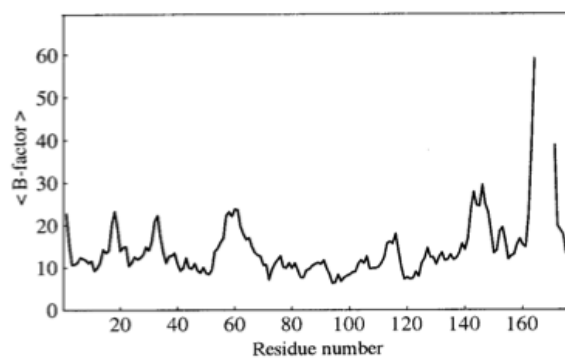
Η κρυσταλλική δομή της CypA ενός ακόμα βακτηρίου, του *Azotobacter vinelandii* με το πεπτίδιο suc-AFPF-pNA (π-νιτροανιλίνη) έχει επίσης επιλυθεί (2, 71).

Ο υδρόφοβος θύλακας πρόσδεσης είναι όμοιος με αυτόν της κυκλοφιλίνης του ανθρώπου και του *E. Coli* και σχηματίζεται από τις πλευρικές αλυσίδες των καταλοίπων Phe 48, Met49, Phe109, Leu108, Tyr 120, Phe 99. Η προλίνη του πεπτιδίου απαντάται στη cis διαμόρφωση, ενώ το καρβονυλικό οξυγόνο της σχηματίζει επίσης δεσμό υδρογόνου με το κατάλοιπο Arg43 ακριβώς όπως συμβαίνει με τις άλλες δύο περιπτώσεις που εξετάστηκαν. Σε όλες τις περιπτώσεις επίσης σχηματίζεται δεσμός υδρογόνου μεταξύ γουανιδινικής ομάδας Arg43 και μορίου νερού του διαλύτη που εμφανίζεται στην ίδια θέση και φαίνεται να λειτουργεί σαν γέφυρα μεταξύ πρωτεΐνης και πεπτιδίου. Υπάρχει δίκτυο αλληλεπιδράσεων ενζύμου-υποστρώματος το οποίο εκτεταμένα περιγράφεται από τους συγγραφείς όπου συμμετέχουν και μόρια του διαλύτη (εικ. 1.13)

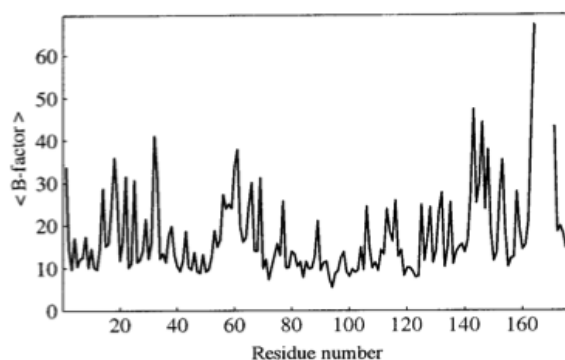


Εικ 1.13 Λεπτομερής αναπαράσταση της περιοχής πρόσδεσης του πεπτιδίου. Απεικονίζονται τα αμινοξέα του ενζύμου και τα μόρια νερού που εμπλέκονται σε πολικές αλληλεπιδράσεις με το πεπτίδιο, ενώ οι Η-δεσμοί απεικονίζονται με στικτές γραμμές (2).

Η δομή αυτή, παρουσιάζει εξαιρετικά μεγάλη ομοιότητα με τη Cyra του *E. coli*. Το γεγονός αυτό είναι αναμενόμενο καθώς έχουμε να κάνουμε με κοντινούς, εξελικτικά, οργανισμούς (βακτήρια). Και σε αυτή την περίπτωση το προσδεμένο υπόστρωμα έχει τη cis διαμόρφωση. Οι συγγραφείς του άρθρου (71), συγκρίνοντας τη διαμόρφωση του ίδιου προσδεμένου πεπτιδίου της Cyra του *Azotobacter vinelandii* με αυτό που χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα στις Cyra του *E. coli* και του ανθρώπου παρατήρησε διαφορετικές ροταμερείς διαμορφώσεις στο N-τελικό άκρο και παρόμοιες στο C- άκρο του. Η διαπίστωση αυτή συνάδει με τα όσα έχουν αναφερθεί προηγουμένως σχετικά με το μηχανισμό ισομερίωσης μέσω περιστροφής του N-τελικού άκρου του πεπτιδίου.

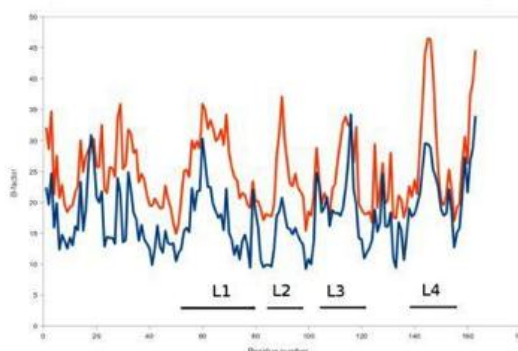


(a)



(b)

Εικ. 1.14 Η διακύμανση των μέσων τιμών του θερμικού παράγοντα $B(A^2)$ σε όλο το μήκος της αμινοξικής ακολουθίας της CyPA του *E. Coli* παρουσία πεπτιδίου (18) α) στα σκελετικά άτομα της πρωτεΐνης β) στα άτομα των πλαϊνών αλυσίδων.



Εικ. 1.15 Η διακύμανση των μέσων τιμών του παράγοντα $B(A^2)$ σε όλο το μήκος της αμινοξικής ακολουθίας της CyPA του *A. vinelandii* (2) σε ελεύθερη μορφή (πορτοκαλί χρώμα) και με δεσμευμένο το πεπτίδιο (μπλε χρώμα).

2. ΔΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΗΣ CyPA του *E. coli*: ΣΚΟΠΟΙ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η εργασία αυτή επικεντρώνεται στην μελέτη της σχέσης των πρωτεϊνικών δομικών στοιχείων με τα δεδομένα λειτουργικότητας και φαινοτυπικής έκφρασης της κυκλοφιλίνης A της προερχόμενης από το κυταρόπλασμα του *E. coli*.

Αφορμή για τη συγκεκριμένη διερεύνηση αποτέλεσε σειρά πειραματικών δοκιμών της ερευνητικής ομάδας του εργαστηρίου Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών πάνω σε τυχαία μεταλλάγματα της *E. coli* CyPA. Στα πειράματα αυτά αξιολογήθηκαν τα μεταλλάγματα ως προς την ενζυμική δράση ισομεράσης της προλίνης, την ικανότητα δράσης της ως σαπερόνη (πρωτεΐνη που προκαλεί αναδίπλωση) και το φαινότυπο.

Τα αποτελέσματα των δοκιμών προκάλεσαν ενδιαφέρον, καθώς παρατηρήθηκαν διαφορές ορισμένων μεταλλαγμάτων σε σχέση με τα στελέχη αγρίου τύπου όσον αφορά ένα ή περισσότερα από τα παραπάνω χαρακτηριστικά. Υπήρχαν, δηλαδή, μεταλλάγματα που παρουσίασαν διαφορές στο φαινότυπο αλλά όχι στην ενζυμική δράση και το αντίστροφο, καθώς και μεταλλάγματα που δεν επηρέασαν κανένα από τα δύο αυτά χαρακτηριστικά. Κάποια μεταλλάγματα δεν μπόρεσαν να αποδώσουν πρωτεϊνικό προϊόν, καθώς είτε δεν υπήρξε έκφραση είτε ήταν αδύνατη η διαλυτοποίηση.

Επιζητώντας την ερμηνεία των παραπάνω αποτελεσμάτων καταφύγαμε στην ανάλυση της δομικής πληροφορίας όπως προέκυψε από προγράμματα δημιουργίας μοριακών μοντέλων διαθέσιμα στον ιστότοπο Swiss Model. Επίσης διενεργήθηκαν πειράματα κρυστάλλωσης των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών για προσδιορισμό της δομής τους. Οι προσπάθειες κρυστάλλωσης συνεχίζονται ως στόχος της συγκεκριμένης έρευνας. Επιπρόσθετα, σχεδιάστηκαν και εκτελέστηκαν πειράματα μέτρησης θερμοκρασίας αποδιάταξης των πρωτεϊνών με τη μέθοδο τη διαφορικής σάρωσης φθορισμού για αξιολόγηση της πιθανής αποσταθεροποίησης που οι μεταλλάξεις προκαλούν.

Κάθε μετάλλαγμα μελετήθηκε ξεχωριστά με σκοπό να διερευνηθούν ερωτήματα που αφορούν τη σχέση δομής-λειτουργικότητας όπως τα ακόλουθα:

- Πώς επηρεάζεται η ικανότητα πρόσδεσης του υποστρώματος από μεταλλάξεις σε αμινοξέα του ενεργού κέντρου της του ενζύμου.
- Ο ρόλος των αμινοξικών καταλοίπων ή περιοχών του ενζύμου εκτός του ενεργού κέντρου που είναι σημαντικές για την ενζυμική δραστηριότητα.
- Αν και με ποιό τρόπο συνδέεται η θερμική σταθερότητα της πρωτεΐνης με την ενζυμική δράση και τις αλλαγές στο φαινότυπο.
- Ποιά είναι τα χαρακτηριστικά των μεταλλάξεων που διαταράσσουν την δομική υπόσταση της πρωτεΐνης και κατά πόσο αυτή επηρεάζει την ενζυμική λειτουργία.
- Αν, όπως αναμένεται, οι μεταλλάξεις σε συντηρημένα αμινοξέα προκαλούν πιο σημαντικές αλλαγές από τα μη συντηρημένα στην ενζυμική δράση και στο φαινότυπο
- Κατά πόσο συμφωνούν τα δομικά και πειραματικά δεδομένα με ανάλογα ευρήματα και συμπεράσματα που αναφέρονται στη βιβλιογραφία σχετικά με τη σχέση δομής-λειτουργίας των CypA.

Η συγκεκριμένη μελέτη εν κατακλείδι επιχειρεί να συνεισφέρει στη διερεύνηση των ενζυμικών μηχανισμών κατάλυσης της ισομερίωσης της προλίνης μέσα από την αξιολόγηση της υπολογιστικής δομικής πληροφορίας σε συνδυασμό με τα δεδομένα των διαθέσιμων βιοδοκιμών και των πειραμάτων θερμικής αποδιάταξης.

Η μελέτη αυτή μπορεί να βοηθήσει ακόμη στην απόδοση των παρατηρούμενων ανωμαλιών στο φαινότυπο στη μεταβολή της ενζυμικής δράσης ή της δράσης της σαπερόνης.

Η έκφραση και απομόνωση των πρωτεϊνών, καθώς και τα πειράματα θερμικής αποδιάταξης πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ:

A) ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΓΡΙΟΥ ΤΥΠΟΥ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΗΣ *CypA* του *E. coli*

Για την έκφραση πρωτεΐνης αγρίου τύπου και μεταλλαγμένων πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν στελέχη του *E. coli* που παραχωρήθηκαν από το εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Τα μεταλλαγμένα μικροβιακά στελέχη ήταν προϊόν τυχαίων μεταλλάξεων που προέκυψαν με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Εξαίρεση αποτελούν τα μεταλλάγματα R43A και F99A που προέκυψαν με κατευθυνόμενη μετάλλαξη (μέθοδος gene-SOEing, Horton 1995). Οι μεταλλαξιογόνοι εκκινητές (primers) που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι

Ec.b0525_{F99A}. F: 5'-GCAACTGCACAGTTCGCCATCAACGTGGTTGAT-3',
 Ec.b0525_{F99A}. R: 5'-ATCAACCACGTTGATGGCGAACTGTGCAGTTGC-3'
 Ec.b0525_{R43A}. F: 5'-AACACCATTTTCCACGCAGTTATCAACGGCTTT-3',
 Ec.b0525_{R43A}. R: 5'-AAAGCCGTTGATAACTGCGTGGAAAATGGTGT-3'

Εμφανίζονται με υπογράμμιση οι ακολουθίες που κωδικοποιούν τα μεταλλαγμένα αμινοξέα.

Από τα διαθέσιμα μικροβιακά στελέχη επελέγησαν εκείνα που έφεραν μετάλλαξη σε ένα μόνο αμινοξύ της *CypA* για να μπορεί να εξηγηθεί καλύτερα η σχέση λειτουργικότητας δομής. Τελικά επελέγησαν τα παρακάτω μεταλλάγματα για έκφραση και περαιτέρω μελέτη, σε σύγκριση με την *CypA* αγρίου τύπου:

K25Q, N46D, N46S, I68F, N73D, R80H, A90V, W118R, S144C, Q148R, S111P, F98L, M85I, A124V, M49L, F99A, G53V, Q61R και R43A .

Η καλλιέργεια των κυττάρων και η επαγωγή έκφρασης της πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε ως εξής:

- Τα κύτταρα παρελήφθησαν από τους -80 °C. Έγινε προκαλλιέργεια σε 20 ml υγρού θρεπτικού υλικού LB (10gr NaCl, 10 gr Βακτηριακή πεπτόνη, 5 gr

εκχύλισμα μαγιά ανά λίτρο υλικού) , τα οποία εμβολιάζονται με αποικία *E. coli* και επωάζονται στους 30° C για 18 ώρες περίπου, με ανακίνηση

- 15 ml της υγρής καλλιέργειας χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό 300 ml θρεπτικού υλικού LB. Για αποφυγή μολύνσεων, τόσο στο θρεπτικό υλικό της προκαλλιέργειας όσο και σε εκείνο της κυρίως καλλιέργειας προστίθεται 1ml αμπικιλίνης συγκέντρωσης 100 mg/ml. Τα χρησιμοποιούμενα στελέχη *E. Coli* φέρουν γονιδιακό παράγοντα ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη
- Η καλλιέργεια επωάζεται στους 30 ° C μέχρι ο πληθυσμός να φτάσει σε επαρκή επίπεδα. Κριτήριο αποτελεί η οπτική πυκνότητα (OD) στα 600 nm, η οποία πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 0,3 και 0,4. Η τιμή οπτικής πυκνότητας συνδέεται γραμμικά με τη συγκέντρωση της δίνεται από τη σχέση $OD = \epsilon \times C \times d$, όπου ϵ : συντελεστής απορρόφησης, C : η συγκέντρωση, d : το πλάτος της κυβέτας του φασματοφωτόμετρου.
- Στη συνέχεια προστίθενται 15ml διαλύματος 0,5 mg/ml του επαγωγέα έκφρασης πρωτεΐνης ισοπροπυλ β - D -1-θειογαλακτοπυρανοζίτη (IPTG) ανά 300 ml θρεπτικού υλικού. Ακολούθησε επώαση στους 30° C για 4 ώρες
- Για την παραλαβή των κυττάρων οι καλλιέργειες φυγοκεντρήθηκαν στις 5000 στροφές ανά λεπτό, για 10 λεπτά στους 4 ° C. Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο υγρό και τα κύτταρα παρελήφθησαν με πιπέτα ακριβείας αφού το υλικό τους επαναδιαλύθηκε με 1 ml LB. Ακολούθησε νέα φυγοκέντρωση (4000 στρ. ανά λεπτό, για 3 λεπτά) απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού που είχε απομείνει και φύλαξη στους -20 °C

Η πρωτεΐνη παρελήφθη ως εξής

- Αφού ξεπάγωσαν τα κύτταρα, προστέθηκε ποσότητα 5 ml διαλύματος λύσης (50 mM NaH_2PO_4 , 300mM NaCl, 10mM μιδαζόλιο) και 1mg/ml λυσοζύμης. Ακολούθησε επώαση για 30 λεπτά
- Ακολούθησε διάρρηξη των κυττάρων με υπερήχους σε πάγο (10 παλμοί 200-300 W με διαλείμματα των 10 δευτερολέπτων), όπου η πρωτεΐνη απελευθερώθηκε στο εκχύλισμα και

- φυγοκέντρωση του εκχυλίσματος στις 10.000 στροφές ανά λεπτό για 20 λεπτά, στους 4 ° C. Στο στάδιο αυτό, η πρωτεΐνη αναμένεται να έχει περάσει στο υπερκείμενο υγρό.

Ακολούθησε καθαρισμός των πρωτεϊνών με χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου και συγκεκριμένα νικελίου (Ni^{2+} , οξικό νιτρίλιο). Η χημική συγγένεια συνίσταται στο γεγονός ότι το δισθενές νικέλιο έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά με το αμινοξύ ιστοιδίνη και να προσδένεται σε αυτό. Για την αποτελεσματική πρόσδεση της πρωτεΐνης στη στήλη είναι απαραίτητη η προσθήκη σε αυτήν μιας μικρής αλυσίδας αμινοξέων που περιέχει ακολουθία διαδοχικών ιστοιδινών (έξι στην προκειμένη περίπτωση). Η ακολουθία αυτή ονομάζεται επίτοπο ιστοιδίνης (his-tag) και δημιουργήθηκε με την προσάρτηση κατάλληλου πλασμιδίου (pCA24N) στο γονίδιο που αποκωδικοποιεί την *E. Coli* CypA .

Η πρωτεϊνική ακολουθία της *E. Coli* CypA αγρίου τύπου μαζί με το επίτοπο ιστοιδίνης (έντονοι χαρακτήρες) είναι η ακόλουθη

**MSYYHHHHHHHDYDIPTTENLYFQGAMDPVTFHTNHGDIVIKTFDDKAPETVK
NFLDYCREGFYNNITIFHRVINGFMIQGGGFEPGMKQKATKEPIKNEANNGLKNTR
GTLAMARTQAPHSATAQFFINVDNDFLNFSGESLQGWGYCVFAEVVDGMDVV
DKIKGVATGRSGMHQDVPKEDVIIESVTVSE,**

Η διαδικασία παραλαβής λαμβάνει χώρα ως εξής:

- 4 ml από το εκχύλισμα προστίθεται στη στήλη που έχει ενεργοποιηθεί με 1 ml διαλύματος 50% Ni^{2+} - οξικού νιτρίλιου. Ήπια ανακίνηση για 1 ώρα
- Η στήλη εκπλένεται με 4ml κατάλληλου διαλύματος (50 mM NaH_2PO_4 , 300mM NaCl, 20mM ιμιδαζόλιο)
- Η πρωτεΐνη παραλαμβάνεται με σειρά διαδοχικών εκπλύσεων (στην περίπτωση αυτή έγιναν τέσσερις εκπλύσεις) με κατάλληλο διάλυμα (50 mM NaH_2PO_4 , 300mM NaCl, 250mM ιμιδαζόλιο). Το ιμιδαζόλιο του διαλύματος έκλουσης ανταγωνίζεται την ιστοιδίνη και οδηγεί σε σταδιακή απελευθέρωση της πρωτεΐνης

- και παραλαβής της στην κινητή φάση.
- Η στήλη χρωματογραφίας καθαρίζεται αμέσως για επόμενη χρήση με 20 ml απεσταγμένου νερού, 0.5 M NaOH για 30 λεπτά, 30 ml απεσταγμένου νερού και διάλυμα 30% αιθανόλης.

Η πρωτεΐνη μεταφέρεται με διαπίδυση σε διάλυμα 50 mM HEPES και 100mM NaCl σε pH 8.

Για την διαπίστωση του αποτελεσματικού καθαρισμού της κυκλοφιλίνης A έγινε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή (gel) ακρυλαμίδης. Για κάθε ηλεκτροφόρημα παρασκευάστηκαν δύο διαφορετικά μίγματα συστατικών που περιγράφονται στον πίνακα 1.3 Το ένα μίγμα αντιστοιχεί στο κυρίως σώμα της πηκτής, όπου έγινε η ανάπτυξη του ηλεκτροφορήματος. Το κυρίως σώμα της πηκτής εγχύθηκε ανάμεσα στις ειδικές διαφανείς πλάκες της συσκευής ηλεκτροφόρησης και προστέθηκε επιφανειακά μικρή ποσότητα νερού για δημιουργία οριζόντιας ελεύθερης επιφάνειας. Το δεύτερο μίγμα, η πηκτή επικάλυψης, τοποθετήθηκε στο ειδικό τμήμα της συσκευής όπου γίνεται η φόρτωση των πρωτεϊνικών μιγμάτων αφού έπηξε το πρώτο μίγμα. Στην όλη διάταξη προστέθηκε επίσης μικρή ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης (144 g/l 30.25 g/l Tris, 10 g/l SDS, pH 8) Κατόπιν τοποθετήθηκε το ειδικό εξάρτημα για την δημιουργία υποδοχών φόρτωσης των πρωτεϊνών.

Όταν έπηξε και το μίγμα επικάλυψης η συσκευή ηλεκτροφόρησης ήταν έτοιμη για την υποδοχή των δειγμάτων και την εφαρμογή ηλεκτρικής τάσης προκειμένου να αρχίσει η κίνηση των πρωτεϊνών. Η προετοιμασία των δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση (αποδιάταξη) πραγματοποιείται με βρασμό επί 5 λεπτά σε 100 μl ρυθμιστικού διαλύματος 4% SDS με βρωμοφαινόλη. Η εφαρμοζόμενη τάση ήταν 90 V αρχικά και 140 V αφού τα δείγματα πέρασαν στο κυρίως σώμα της πηκτής.

Για διαπίστωση της πορείας της έκφρασης και της διαλυτοποίησης των μεταλλαγμάτων σε σχέση με την πρωτεΐνη αγρίου τύπου φορτώθηκε για κάθε πρωτεΐνη α) δείγμα από το κυτταρικό υλικό που έχει υποστεί διάρρηξη με υπερήχους και έχει σχηματίσει ίζημα μετά

την φυγοκέντρηση. Εκεί αναμένεται να ανιχνευτεί μη διαλυτοποιημένη πρωτεΐνη β) δείγμα από την πρώτη έκπλυση γ) δείγμα από την δεύτερη και την τρίτη έκπλυση.

Συστατικά	Ποσότητες κυρίως σώματος πηκτής	Ποσότητες πηκτής επικάλυσης (ml)
Απεσταγμένο νερό	8 ml	6.24 ml
Διάλυμα ακρυλαμίδης 30%	15 ml	1.3 ml
Bis 1%	2.6 ml	1 ml
3M Tris pH 8.6	3.75 ml	-
1M Tris pH 6.8	-	1.25 ml
SDS 10%	0.3 ml	0.1 ml
TEMED	15 μ l	15 μ l
APS 10%	150 ml	150 ml

Πίνακας 1.3 Σύσταση πηκτής ακρυλαμίδης που χρησιμοποιήθηκε.

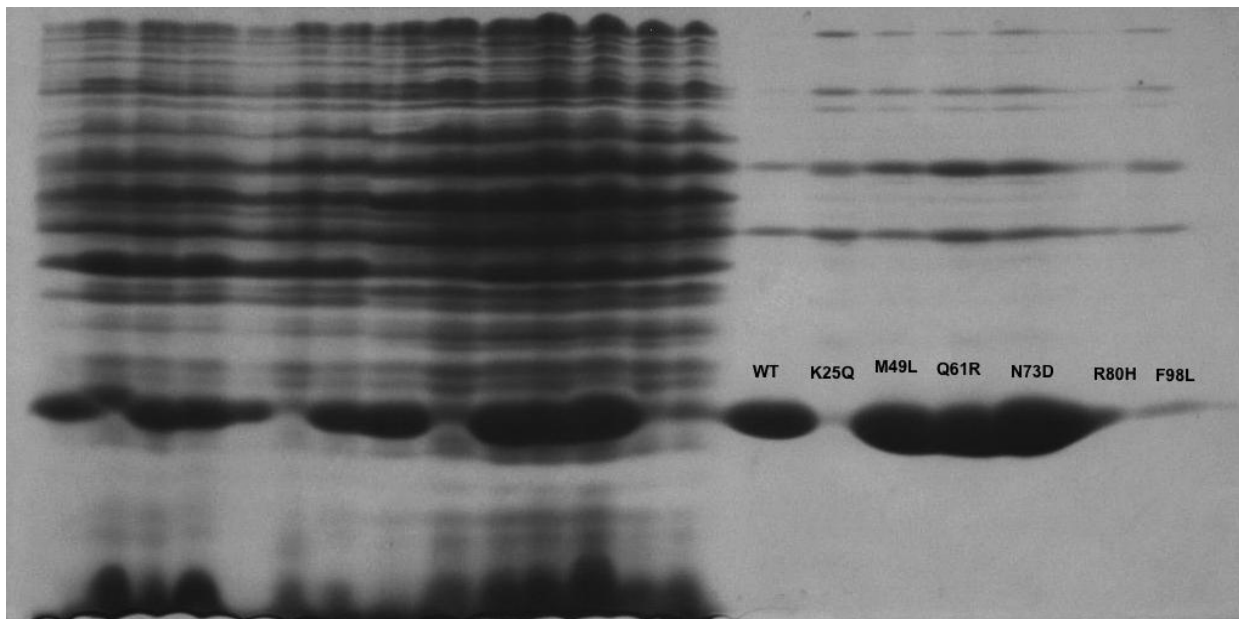
Για να μπορέσουμε να διακρίνουμε τα ίχνη των δειγμάτων το gel χρωματίζεται με Coomassie Brilliant Blue P250 (0.25g/l χρωστικής, 450 g/l μεθανόλης, 100 ml/l οξικού οξέος) στους 60 °C για 30 λεπτά.

Ακολουθεί αποχρωματισμός σε διάλυμα 30% μεθανόλης και 10% οξικού οξέος για αρκετές ώρες. Το διάλυμα αποχρωματισμού ανανεώνεται τακτικά ώσπου να καταστούν ευδιάκριτα τα αποτυπώματα των πρωτεϊνικών δειγμάτων.

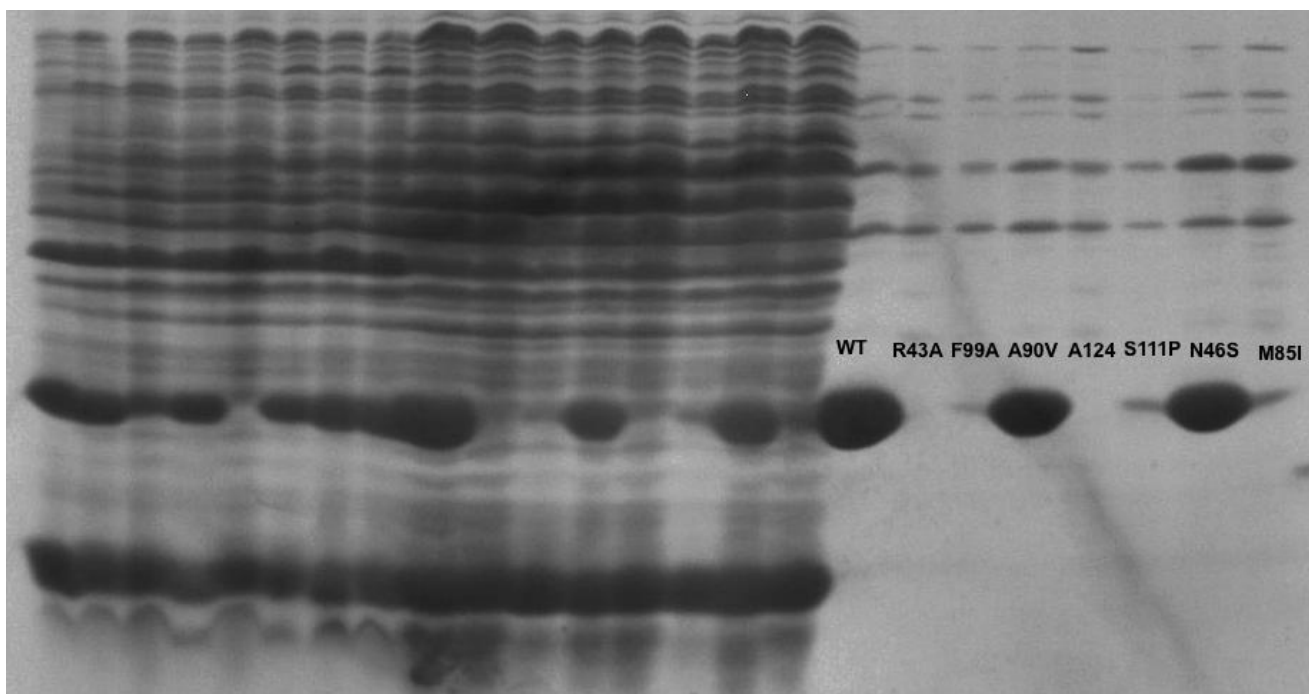
Η εικόνες των ηλεκτροφορημάτων (Εικ. 3.1 **A,B,G,Δ**) κατέδειξαν επιτυχή απομόνωση και ικανοποιητική καθαρότητα για τα στελέχη WT (πρωτεΐνη αγρίου τύπου), S144C, Q148R, W118R, I68F, S111P, M49I, Q61R, A90V. Η M85I παρουσίασε δυσκολία στην διαλυτοποίηση αλλά παρελήφθη σε μία από τις απομονώσεις σε ικανή ποσότητα για χρήση σε περαιτέρω πειράματα.

Κοτταρικό ίζημα Υπερκαίμενο μετά τη φυγοκέντρωση Δείγμα 2^{ης} και 3^{ης} έκλουσης
μετά τη φυγοκέντρωση

A

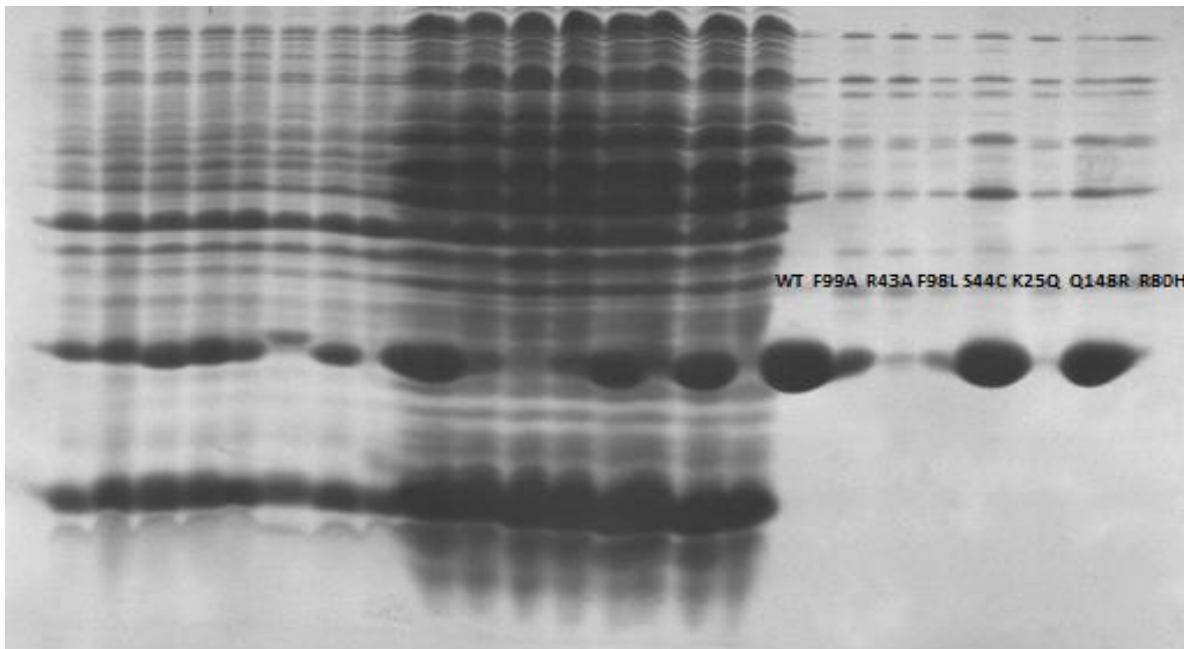


B

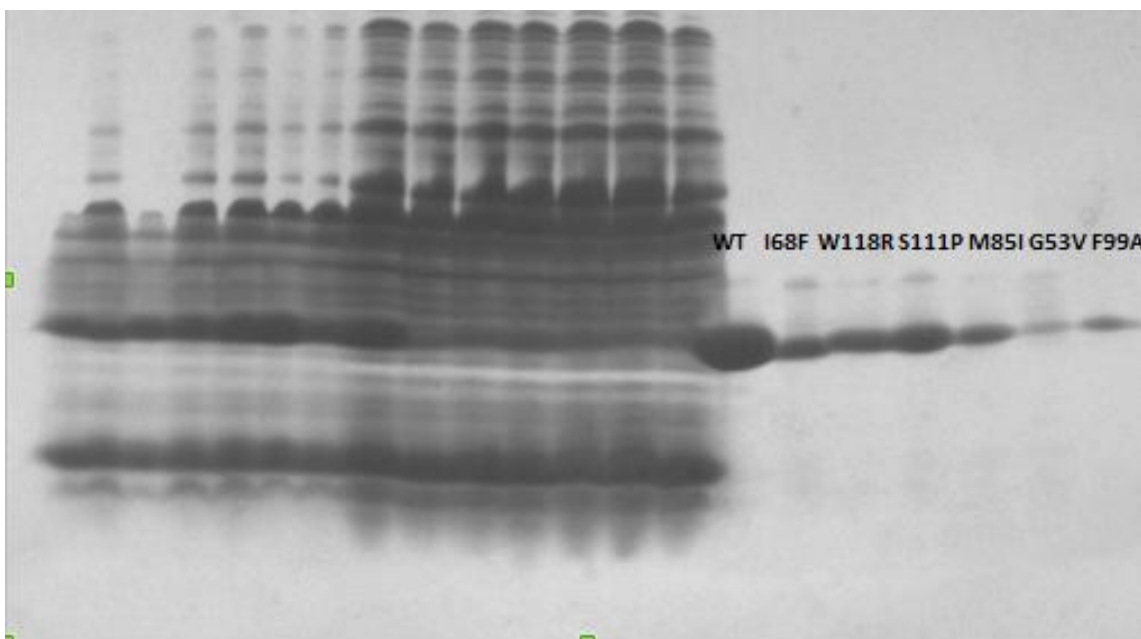


Κοτταρικό ίζημα Υπερκείμενο μετά τη φυγοκέντρωση Δείγμα 2^{ης} και 3^{ης} έκλουσης
μετά τη φυγοκέντρωση

Γ



Δ



Εικ 3.1 Α,Β,Γ,Δ Ηλεκτροφορήματα ελέγχου καθαρότητας μεταλλαγμένων στελεχών της *E. coli* CypA από απομονώσεις πρωτεϊνών από διαφορετικές παρτίδες βακτηριακών καλλιεργειών WT: πρωτεΐνη αγρίου τύπου) Η θέση του αποτυπώματος αντιστοιχεί σε MB 18 kD περίπου.

Η πρωτεΐνη F99A δεν διαλυτοποιήθηκε καλά σε σχέση με την αγρίου τύπου αλλά μπόρεσε επίσης σε μία από τις απομονώσεις να παραληφθεί σε ικανή ποσότητα για τις περαιτέρω δοκιμές. Η G53V παρουσίασε προβλήματα κατά την διαλυτοποίηση και χρειάστηκε έντονη συμπύκνωση. Η F98L επέδειξε αναιμική διαλυτότητα, όπως και η R43A. Η K25Q εκφράστηκε ελάχιστα και δεν διαλυτοποιήθηκε, ενώ οι R80H και A124V δεν εκφράστηκαν καθόλου, τουλάχιστον με βάση την εικόνα που ελήφθη από τα gel ηλεκτροφόρησης. Επομένως οι τρεις αυτές πρωτεΐνες δεν παρελήφθησαν καθόλου και δεν μπόρεσαν να πραγματοποιηθούν περαιτέρω πειραματικές δοκιμές.

Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης υπολογίστηκε φασματοφωτομετρικά με τη μέθοδο Bradford (59, 60), η οποία βασίζεται στην μετατόπιση της απορρόφησης της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 (διάλυμα ενός μέρους χρωστικής σε τέσσερα μέρη νερού) όταν προσδένεται σε πρωτεΐνη από την περιοχή του κόκκινου στην περιοχή του μπλε. Το μήκος κύματος του φάσματος μέγιστης απορρόφησης της προσδεδεμένης μορφής είναι 595 nm. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης, η οποία είναι ανάλογη της έντασης της απορρόφησης, πραγματοποιείται με τη βοήθεια ευθείας ελάχιστων τετραγώνων που έχει προκύψει από μετρήσεις απορρόφησης γνωστών συγκεντρώσεων πρωτεΐνης.

Για να αποκτήσουν τα διαλύματα ενδεδειγμένες συγκεντρώσεις για δοκιμές κρυστάλλωσης, πραγματοποιήθηκε συμπύκνωση με ειδικά φίλτρα, φυγοκέντρηση και έκπλυση με SDS όπου ήταν απαραίτητο. Οι τελικές συγκεντρώσεις παρουσιάζονται στον πίνακα 3.2.

Στέλεχος <i>E.coli</i>	Συγκέντρωση (mg/ml)
WT	7,9
M49L	8,6
Q61R	8,1
A90V	8,6
S111P	7,3
F99A	14
S144C	20
Q148R	25
W118R	11,5
G53V	7
I68F	2,2
M85I	17,24
N73D	8
N46S	8,6
F98L	5,9

Πίνακας 3.2: Τελικές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης.

B) ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ, ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ ΚΑΙ ΔΡΑΣΗΣ ΣΑΠΕΡΟΝΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΗΣ *CypA* του *E. coli*

Τα πειράματα ενζυμικής ενεργότητας και αξιολόγησης φαινοτυπικών στοιχείων των εξεταζόμενων μεταλλαγμάτων πραγματοποιήθηκαν από την ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Στα πειράματα που αφορούσαν το φαινότυπο οι αποικίες μεταλλαγμάτων *E. coli* ελέγχθηκαν ως προς την ικανότητά τους να δημιουργούν μορφή κίνησης της αποικίας, που στη βιβλιογραφία αναφέρεται με τον όρο swarming (κίνηση συρροής). Η κίνηση αυτή, που γίνεται εμφανής σε στερεό κυρίως υπόστρωμα, δημιουργεί χαρακτηριστικούς φαινοτυπικούς σχηματισμούς καθώς μεγάλες ομάδες μικροβίων μετακινούνται προς διάφορες κατευθύνσεις από την αρχική τους τοποθεσία. Η κίνηση swarming ορίζεται σαν ραγδαία επιφανειακή κίνηση του βακτηριακού πληθυσμού που προκαλείται από την περιστροφή του κυτταρικού μαστιγίου (57,58). Τα μεταλλαγμένα στελέχη αξιολογήθηκαν επίσης ως προς την ικανότητα δημιουργίας βιομεμβράνης ή βιοφίλμ (biofilm). Το βιοφίλμ είναι λεπτό στρώμα μικροοργανισμών που σχηματίζεται επιφανειακά σε μια καλλιέργεια μαζί με πολυμερείς ουσίες που οι μικροοργανισμοί εκκρίνουν (69).

Αδημοσίευτα ευρήματα της ερευνητικής ομάδας καταδεικνύουν ότι η αγρίου τύπου *CypA* εμποδίζει το swarming και τη δημιουργία βιομεμβράνης.

Για τον έλεγχο της ενζυμικής δράσης της *E. coli CypA* η ερευνητική ομάδα χρησιμοποίησε μέθοδο βασισμένη στην ικανότητα της χυμοθρυψίνης να υδρολύει εκλεκτικά τον πεπτιδικό δεσμό μεταξύ trans προλίνης και συνδεδεμένου σε αυτή αμινοξέος (Xaa) στο πεπτιδίο ηλεκτρυλο-A-Xaa-P-F-pNA (34, 35). Στο πεπτιδίο που χρησιμοποιήθηκε το Xaa ήταν αλανίνη. Σε ειδική κυβέτα προστίθεται διάλυμα ενζύμου και πεπτιδίου (με cis διαμόρφωση προλίνης) στις κατάλληλες ποσότητες, μαζί με χυμοθρυψίνη. Με το δεδομένο ότι η *E. coli CypA* καταλύει την cis->trans μεταβολή, η χυμοθρυψίνη βρίσκει κατάλληλο υπόστρωμα καταλήγοντας στη λύση του πεπτιδίου και στο σχηματισμό ελεύθερης pNA που προσμετράται φασματοφωτομετρικά. Η καμπύλη

αύξησης της οπτικής πυκνότητας ελεύθερης pNA δίνει κατ'αυτό τον τρόπο ποσοτικό κριτήριο της ενζυμικής δράσης της *E. coli* CypA .

Η ικανότητα δράσης σαπερόνης των μεταλλαγμάτων προσμετρήθηκε με κριτήριο την αναδίπλωση της συνθάσης του κιτρικού οξέος μετά από αποδιάταξη που προκλήθηκε από επώαση σε θερμοκρασία 45° C (Buchner et al, 1998). Το ποσοστό της συσσωματωμένης συνθάσης του κιτρικού με και χωρίς την παρουσία CypA αξιολογήθηκε με φασματοφωτομετρικές μεθόδους.

Τα αριθμητικά και ποιοτικά αποτελέσματα όσον αφορά το φαινότυπο, την ενζυμική δράση και τη δράση σαπερόνης απεικονίζονται στον πίνακα 3.3 Σε κάθε δοκιμή πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις.

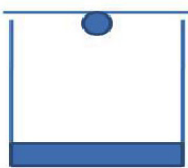
<i>Στέλεχος E.coli</i>	Swarming	Δημιουργία βιομεμβράνης	Ενζυμική δράση (% σε σχέση με την WT)	Δράση σαπερόνης (% σε σχέση με την WT)
WT	-	-	100 ± 6	100
R43A	++	+++	2	
M49L	-	-	49 ± 10	99
F99A	-	-	53	100
F98L	++	++	81 ± 7	83
Q61R	-	-	30 ± 10	99
G53V	+++	+++	2	81
A90V	-	-	120 ± 7	98
S111P			88 ± 10	99
S144C	-	-	81 ± 9	99
Q148R	-	-	95 ± 10	100
N73D	-	-	114 ± 3	99
W118R	++	+	118 ± 9	88
I68F	+++	-	100 ± 9	99
N46S	-	-	99 ± 20	99
M85I	+++	++	105 ± 3	99

Πίνακας 3.3: Πειραματικά δεδομένα δοκιμών φαινοτύπου, ενζυμικής δράσης και δράσης σαπερόνης από πειράματα της ερευνητικής ομάδας του εργαστηρίου Γεν & Γεωργ. Μικροβιολογίας του ΓΠΑ. Στις ενδείξεις που αφορούν το φαινότυπο (swarming και δημιουργία βιομεμβράνης) τα σύμβολα +, ++ και +++ υποδηλώνουν κλιμάκωση έντασης του φαινομένου και το - απουσία του φαινομένου.

Γ) ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΑΤΩΝ ΤΗΣ *E.coli* CypA

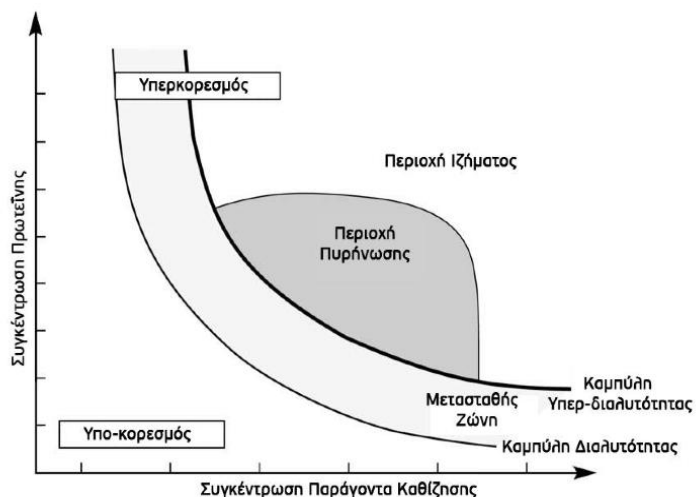
Με τις πρωτεΐνες που απομονώθηκαν επιτυχώς πραγματοποιήθηκαν πειράματα κρυστάλλωσης με τη μέθοδο της κρεμάμενης σταγόνας (1, 61) με απώτερο σκοπό τον προσδιορισμό της δομής των πρωτεϊνών με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ.

Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, σταγόνα διαλύματος που περιέχει την πρωτεΐνη και διάλυμα κρυστάλλωσης τοποθετείται επικρεμάμενη σε καλυπτρίδα που λειτουργεί ως κάλυμμα ερμητικά κλειστής μικρής δεξαμενής που φέρει μικρή ποσότητα (1 ml) διαλύματος κρυστάλλωσης (Εικ 3.3). Το διάλυμα κρυστάλλωσης περιέχει κατακρημνιστή και κατάλληλο άλας. Σταδιακά πραγματοποιείται διάχυση των ατμών από την κρεμάμενη σταγόνα στο υποκείμενο διάλυμα, με αποτέλεσμα οι συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης και του κατακρημνιστή στη σταγόνα να φθάσουν σε επίπεδα επιτρεπτά για να αρχίσουν να δημιουργούνται πυρήνες κρυστάλλωσης.



Εικ. 3.3 .Αριστερά: Σχηματική αναπαράσταση του συστήματος κρεμάμενης σταγόνας. Δεξιά: Συστοιχίες δεξαμενών κρυστάλλωσης που χρησιμοποιήθηκαν.

Η αρχική συγκέντρωση της πρωτεΐνης και του κατακρημνιστή πρέπει να είναι τέτοια ώστε το σύστημα να βρίσκεται κοντά στην περιοχή πυρήνωσης που περιγράφεται από το διάγραμμα φάσεων κρυστάλλωσης (εικ 3.4) Η συγκέντρωση, επομένως, θα πρέπει να είναι κοντά στο όριο κορεσμού. Αν η συγκέντρωση είναι πολύ χαμηλή, το διάλυμα της σταγόνας θα βρίσκεται στην περιοχή υποκορεσμού και θα είναι δύσκολη η μετάβαση στην περιοχή πυρήνωσης. Αν η συγκέντρωση είναι πολύ υψηλή, θα οδηγηθούμε σε υπερκορεσμό και κατακρήμνιση της πρωτεΐνης χωρίς να επιτευχθεί κρυστάλλωση.



Εικ 3.4 Διάγραμμα φάσεων κρυστάλλωσης (Αθανασίου 2004, διπλωματική εργασία, από Chayen 2005)

Τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής, σύμφωνα με τις δημοσιευμένες εργασίες κρυσταλλικής δομής *E.coli* CypA .

Πρωτόκολλο κρυστάλλωσης δομής με pdb καταχώρηση 1LOP (7): Παρουσία πεπτιδίου (Suc_Ala_Pro_Ala-pNA) . Κατακρημιστής : Ένυδρο Θειϊκό αμμώνιο (SAS δημοσ. Συγκ 46% β/ο) παρουσία 10 mM Tris-HCl pH 8 (ρυθμιστικό διάλυμα).

Πρωτόκολλο κρυστάλλωσης δομής με pdb καταχώρηση 2NUL (18) : Απουσία πεπτιδίου. Κατακρημιστής : Πολυαιθυλενογλυκόλη 3500 (δημοσ. Συγκ 30% β/ο) παρουσία 100 mM Tris-HCl pH 8.5 (ρυθμιστικό διάλυμα).

Επιχειρήθηκαν διάφορες αναλογίες πρωτεΐνης-κατακρημιστή και αλάτων κοντά στις παραπάνω δημοσιευμένες συνθήκες. Συγκεκριμένα, δοκιμάστηκαν συγκεντρώσεις πολυαιθυλενογλυκόλης 3500 από 20 έως 30% και SAS 30-50% Τα αποτελέσματα των πειραμάτων κρυστάλλωσης ανά δοκιμή εμφανίζονται στον πίνακα 3.4. Σε ορισμένες περιπτώσεις εμφανίστηκε πιθανό μικροκρυσταλλικό ίζημα αλλά όχι επαρκούς μεγέθους για λήψη δεδομένων.

Επίσης πραγματοποιήθηκαν πειράματα σάρωσης συνθηκών κρυστάλλωσης με διάφορους κατακρημιστές pH(4.6-9.0) και άλατα στις εγκαταστάσεις ρομπότ του EMBL στο Αμβούργο. Στις δοκιμές χρησιμοποιήθηκε πρωτεΐνη αγρίου τύπου και μεταλλαγμένη πρωτεΐνη G53V. Η εξέλιξη των κρυσταλλώσεων παρακολουθούνταν με περιοδική φωτογράφιση των σταγόνων και έλεγχο μέσω διαδικτύου. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν ήταν παρόμοια με αυτά των πειραμάτων του εργαστηρίου Φυσικής για την πρωτεΐνη αγρίου τύπου ενώ η G53V δεν απέδωσε κρυστάλλους ούτε κρυσταλλική ουσία. Σε ορισμένα δείγματα πρωτεΐνης αγρίου τύπου σε συνθήκες παρόμοιες με αυτές των δημοσιευμένων δομών εμφανίστηκαν μικροκρυσταλλικά ιζήματα. Σε γενικές γραμμές το pH παρατηρήθηκε ότι ήταν καθοριστικός παράγοντας για την συμπεριφορά της πρωτεΐνης. Οι συνθήκες όξινου pH προκάλεσαν σχεδόν άμεσα κατακρήμιση της πρωτεΐνης προφανώς λόγω μετουσίωσης (εικ. 3.5)

Το γεγονός ότι δεν μπόρεσε, στην πρωτεΐνη αγρίου τύπου τουλάχιστον, να επαναληφθεί η κρυστάλλωση στις συνθήκες της βιβλιογραφίας προκάλεσε προβληματισμό. Η αδυναμία επίτευξης κρυστάλλωσης αποδίδεται

α) στην μη απομάκρυνση του επίτοπου ιστιδίνης. Παρόλο που υπάρχουν αναφορές κρυσταλλικών δομών όπου το επίτοπο δεν έχει απομακρυνθεί, έχει αναφερθεί ότι κατά τη βελτιστοποίηση τέτοιων δομών το επίτοπο ιστιδίνης εμφανίζεται στην ηλεκτρονιακή πυκνότητα σε λιγότερο από το 10% των περιπτώσεων. Το επίτοπο ιστιδίνης δεν φαίνεται να επηρεάζει τον παράγοντα αξιοπιστίας R της δομής και την όλη διαμόρφωση της πρωτεΐνης, αυξάνει όμως στατιστικά τους παράγοντες θερμικής κίνησης B (36). Σε κάποιες περιπτώσεις έχει διαπιστωθεί ότι το επίτοπο ιστιδίνης επενεργεί απαγορευτικά στην κρυστάλλωση πιθανόν εμποδίζοντας το σχηματισμό κρυσταλλικών επαφών (37).

β) Στη μη ικανοποιητική καθαρότητα των πρωτεϊνών. Η κρυστάλλωση απαιτεί δείγματα μεγαλύτερης καθαρότητας σε απ' ότι οι βιοδοκιμές.

Μεταλλαγμένο στελεχος	Πρωτόκολλο κρυστάλλωσης 1LOP στους 18°	Πρωτόκολλο κρυστάλλωσης NUL 2 στους 18°	Πρωτόκολλο κρυστάλλωσης 1LOP στους 4°	Πρωτόκολλο κρυστάλλωσης NUL 2 στους 4°
WT (8 mg/ml)	Διαυγείς σταγόνες	Διαυγείς σταγόνες		
WT (15 mg/ml)	Κατακρήμιση	Κατακρήμιση	Μικροκρύσταλλοι 0,45ml SAS	Μικροκρύσταλλοι
W118	Κατακρήμιση	Μικροκρύσταλλοι PEG 3500 25%	Μικροκρύσταλλοι 0,3 mlSAS	Μικροκρύσταλλοι
S144C	Κατακρήμιση	Κατακρήμιση	Έντονη κατακρήμιση 0,3 ml SAS	Ελαφριά κατακρήμιση 0,3 mlSAS Έντονη κατακρήμιση 0,5 mlSAS
S148C	Κατακρήμιση	Κατακρήμιση		
S111P (11/3)	Κατακρήμιση, Μικροκρύσταλλοι SAS 40%	Κατακρήμιση	Μικροκρύσταλλοι	Διαυγείς σταγόνες
M49L		Κατακρήμιση	Μικροκρύσταλλοι	Μικροκρύσταλλοι
Q61R		Κατακρήμιση	Ελαφριά κατακρήμιση	Κατακρήμιση 0,4 mlSAS
N73S	Μικροκρύσταλλοι			
M85I	Έντονη κατακρήμιση	Κατακρήμιση		
A90V			Clear Drops Ελαφριά κατακρήμιση 0,5 mlSAS	Ελαφριά κατακρήμιση
F98L	Clear Drops	Clear Drops		
F99A	Κατακρήμιση	Κατακρήμιση		
I68F	Κατακρήμιση	Κατακρήμιση		

Πίν. 3.4 Συνοπτικά αποτελέσματα δοκιμών κρυστάλλωσης *E.coli* CyrA αγρίου τύπου και μεταλλαγμάτων στο εργαστήριο Φυσικής.



Inspection 9 - 02/05/2014 - 34 days -

<< Prev Next >>

Sample : PPIB_wt Concentration : 1 (mg/ml) Setup Date : 28/03/2014

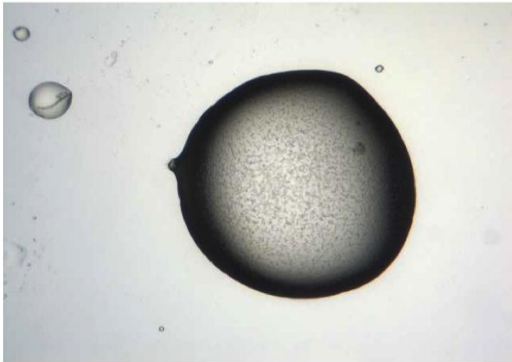
Well	Salt	Buffer	pH	Main Precipitant	Component 2	Component 3	Component 4	final pH	Cryoprotectant	Reagent number	Supplier
A11		0.2 M Potassium acetate		20 %(w/v) PEG 3350						11	Qiagen/Nextal

α

Plate : TTP3000585 Inspection : 12 (Vis + UV) 84 day(s) Inspection Date : 21/06/2014 Setup Date : 28/03/2014 16:02

Well : E11 Position : 1

View in HD Popup HD Drop History Summary



Set Score :

 (You can use these buttons to score your drop)

Sample : PPIB_wt 1 (mg/ml) - Screen : HH_QIAGEN_JCSG-Core-I

Well	Salt	Buffer	pH	Main Precipitant	Component 2	Component 3	Component 4	final pH	Cryoprotectant	Reagent number	Supplier
E11		0.1 M MES	5	20 %(w/v) HPD				6		59	Qiagen/Nextal

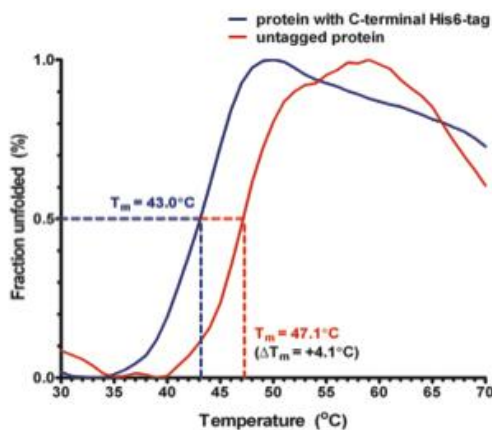
β

Εικ 3.5 Δύο διαφορετικές δοκιμές στα πειράματα σάρωσης του EMBL, Αμβούργο. α) Με μικροκρυστάλλους β) Με μη παραγωγική κατακρήμνιση. Στο κάτω μέρος των α, β εμφανίζονται οι συνθήκες κρυστάλλωσης.

Η επιτυχία της πρωτεϊνικής κρυστάλλωσης έχει συσχετισθεί με την ομοιογένεια, τη σταθερότητα και τη διαλυτότητα (39). Ενδεχομένως το επίτοπο ιστιδίνης σε κάποιες περιπτώσεις επηρεάζει αρνητικά τη σταθερότητα ή την δομική ομοιογένεια της πρωτεΐνης.

Η υψηλή θερμοκρασία αποδιάταξης είναι κριτήριο σταθερότητας και συσχετίζεται θετικά με την πιθανότητα μιας πρωτεΐνης να αποδώσει κρυστάλλους (40). Το επίτοπο ιστιδίνης φέρεται να επηρεάζει την θερμική σταθερότητα των πρωτεϊνών. Η καρβοξυλ-εστεράση του *G. thermodenitrificans* με επίτοπο ιστιδίνης χάνει τη δραστηριότητά της στους 25 °C όταν αναδιπλωθεί μετά από θερμική αποδιάταξη, σε αντίθεση με το ελεύθερο ένζυμο (38). Στην εικόνα 3.6 περιγράφεται παράδειγμα αξιοσημείωτης αποσταθεροποίησης πρωτεΐνης από την παρουσία του επίτοπου ιστιδίνης σε πρωτεΐνη ικής προέλευσης.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, η παρουσία του επίτοπου ιστιδίνης στα δείγματά μας είναι πιθανόν να επηρεάζει τη σταθερότητα ή την ομοιογένεια των κυκλοφιλινών Α που μελετήθηκαν, με αποτέλεσμα την δυσκολία στην κρυστάλλωση που παρατηρήθηκε. Επανάληψη των πειραμάτων μετά από απομάκρυνση του θα βοηθούσε τη διευκρίνιση του ρόλου του στην κρυστάλλωση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης.



Εικ. 3.6 Επίδραση επίτοπου ιστιδίνης στην θερμική σταθερότητα ικής πρωτεΐνης. Παρατηρούμε ότι προκαλείται αποσταθεροποίηση κατά 4.1 °C

Δ) ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΘΕΡΜΙΚΗΣ ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ THERMOFLUOR

Γενικά στοιχεία

Η θερμική σταθερότητα επιλεγμένων μεταλλαγμάτων *E. coli* Cyra μελετήθηκε με τη μέθοδο διαφορικής σάρωσης φθορισμού Thermofluor.

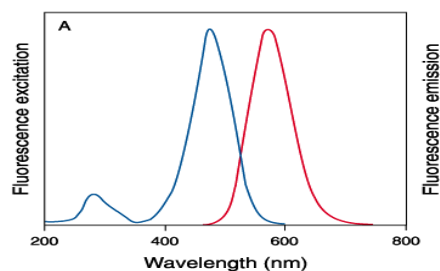
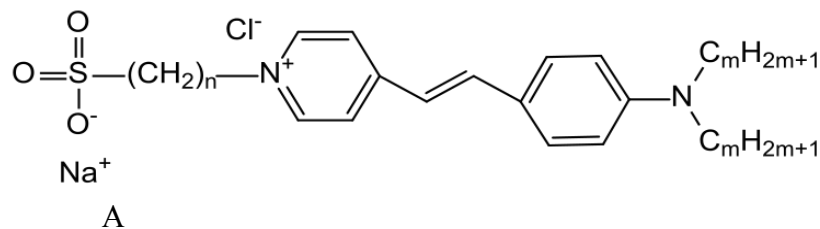
Όπως είναι γνωστό, κάθε πρωτεΐνη διατηρεί την τριτοταγή δομή της σε ορισμένο εύρος θερμοκρασιών. Η θέρμανση προκαλεί αύξηση της εντροπίας του συστήματος έως μια κρίσιμη θερμοκρασία (θερμοκρασία τήξης ή θερμικής αποδιάταξης) όπου ο ενθαλπικός όρος ΔH εξισώνεται με τον εντροπικό όρο $-T\Delta S$ ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$), η ΔG μηδενίζεται και η αποδιάταξη της πρωτεΐνης γίνεται θερμοδυναμικά ευνοϊκή (62). Η αποδιάταξη (μετουσίωση) εμφανίζεται ως “ξεδίπλωμα” της πρωτεΐνης και καταστροφή της τριτοταγούς της δομής. (εικ. 9.3) Μέχρι ενός ορισμένου ορίου, η αποδιάταξη αυτή είναι αντιστρεπτή και η πρωτεΐνη επανέρχεται με ψύξη στην αρχική της διαμόρφωση. Η τιμή της θερμοκρασίας τήξης και η δυνατότητα επαναφοράς της πρωτεΐνης αποτελούν κριτήρια για τη σταθερότητά της.

Η αρχή της μεθόδου διαφορικής σάρωσης φθορισμού βασίζεται στην σταδιακή θέρμανση της πρωτεΐνης με ταυτόχρονη παρακολούθηση της με φθορισμομετρία. Η ίδια η πρωτεΐνη μπορεί να φθορίζει λόγω των αμινοξέων τρυπτοφάνη, φαινυλαλανίνη και τυροσίνη (φάσματα απορρόφησης 280, 274, 257 nm και εκπομπής 348, 303 και 282 nm, αντίστοιχα) (43, 44). Όμως, με δεδομένο το ότι η ένταση φθορισμού μπορεί να μην είναι ικανοποιητική σε όλες τις πρωτεΐνες, λόγω μικρής αναλογίας τέτοιων αμινοξέων, συνήθως επιλέγεται η παρακολούθηση του φθορισμού με την εφαρμογή ειδικής χρωστικής, η οποία έχει την ιδιότητα να προσδέεται στις υδρόφοβες ομάδες της πρωτεΐνης. Οι ομάδες αυτές, όσο η πρωτεΐνη διατηρεί την τριτοταγή δομή της συντάσσονται στο εσωτερικό της, ενώ οι υδρόφιλες ομάδες διατάσσονται στην επιφάνεια. Όταν όμως, η πρωτεΐνη θερμανθεί έως τη θερμοκρασία τήξης και ξεδιπλωθεί η αμινοξική αλυσίδα, οι υδρόφοβες ομάδες εκτίθενται στο διάλυμα και δεσμεύουν τη χρωστική. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να παρατηρείται απότομη αύξηση του σήματος

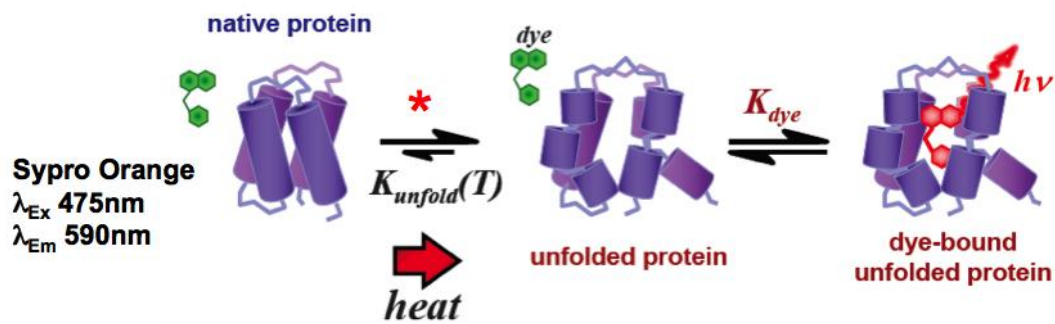
φθορισμού στη συγκεκριμένη θερμοκρασία. (40,41,42). Η γραφική απεικόνιση του φαινομένου αποδίδει σιγμοειδή καμπύλη όπως εκείνη της εικ. 3.9.

Η χρησιμοποιούμενη χρωστική πρέπει να παρουσιάζει διαφοροποίηση όσον αφορά το φθορισμό μεταξύ του πολικού περιβάλλοντος του διαλύτη και του υδρόφοβου περιβάλλοντος της αποδιεταγμένης πρωτεΐνης και να προσδένεται όσο το δυνατόν λιγότερο εκλεκτικά στις υδρόφοβες ομάδες της. Το εύρος της περιοχής διέγερσης και εκπομπής ακτινοβολίας επίσης δεν πρέπει να επικαλύπτεται από το αντίστοιχο της ίδιας της πρωτεΐνης. Η πιο συνήθης χρωστική στα πειράματα ThermoFluor είναι η Sypro orange (55,56)(Εικ 3.7) που διεγείρεται στα 475 nm και αποδίδει μέγιστη ένταση εκπομπής στα 590 nm (Εικ 3.8). Προτιμάται επίσης για την ικανότητά της να καθιστά ανιχνεύσιμες ακόμα και πολύ μικρές ποσότητες πρωτεΐνης και τις υψηλές τιμές σήματος/θόρυβο.

Στα πλεονεκτήματα της μεθόδου ThermoFluor συγκαταλέγεται η ευκολία, ακρίβεια, η επαναληψιμότητα και η επάρκεια ακόμα και μικρών ποσοτήτων πρωτεΐνης. Επίσης η μέθοδος επιτρέπει την ταυτόχρονη πειραματική δοκιμή σε πολλαπλά δείγματα.

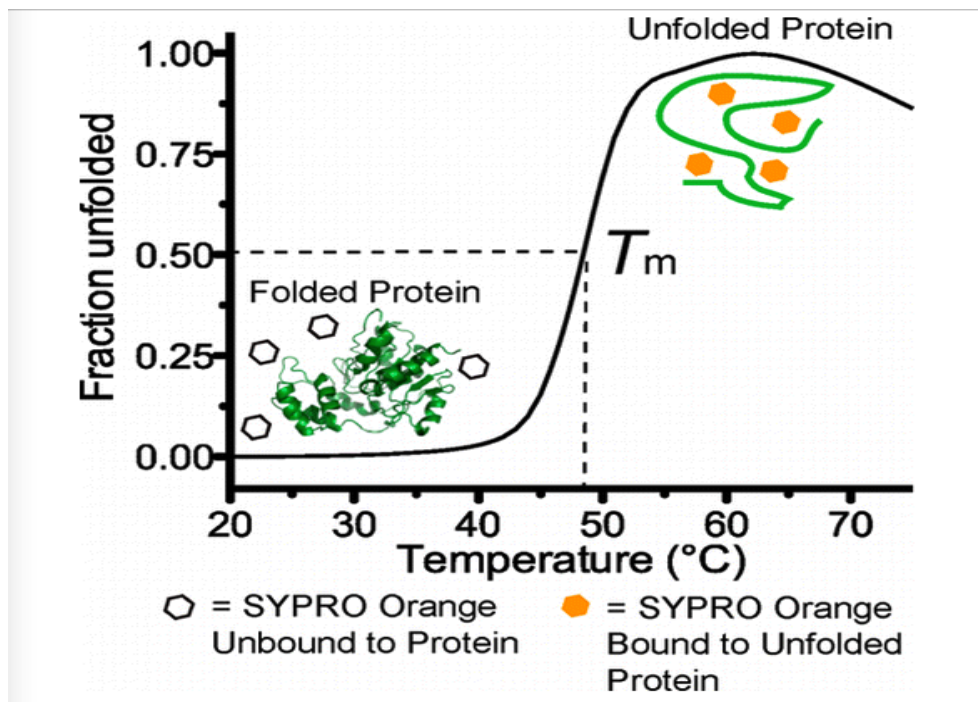


Εικ. 3.7 Sypro orange **A**: Χημική δομή **B**: Φάσμα διέγερσης-εκπομπής



J. Kranz
 Johnson & Johnson Pharmaceutical Research & Development

Εικ. 3.8 Πορεία πρόσδεσης της χρωστικής στην πρωτεΐνη καθώς αποδιατάσσεται η τριτοταγής δομή της .



Εικ 3.9 Γραφική αναπαράσταση της αναλογίας μετουσιωμένης (ξεδιπλωμένης) πρωτεΐνης σαν συνάρτηση της θερμοκρασίας, όπως παρακολουθείται μέσω της ανίχνευσης σήματος φθορισμού της χρωστικής Sypro Orange . T_m : θερμοκρασία τήξης

Πειράματα θερμικής σταθερότητας στο EMBL, Αμβούργο

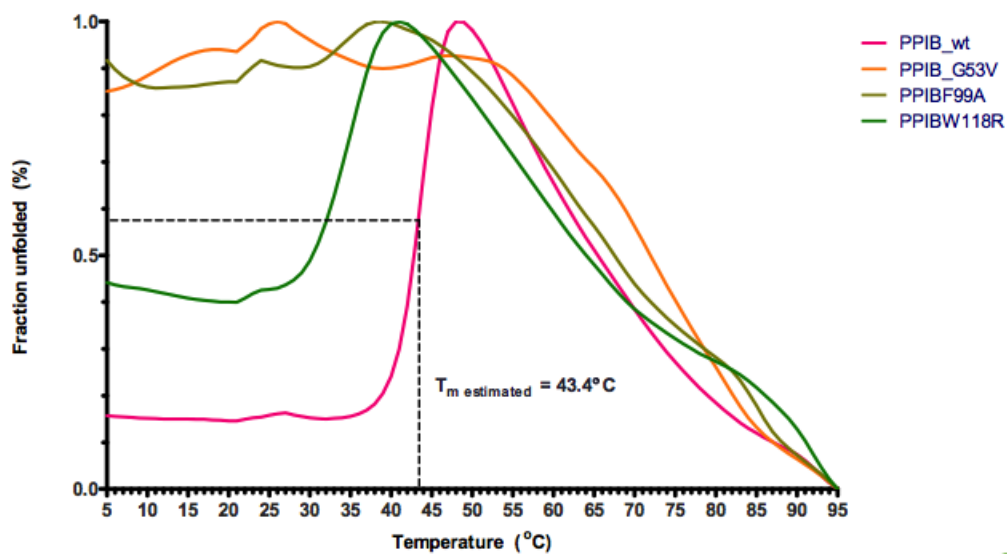
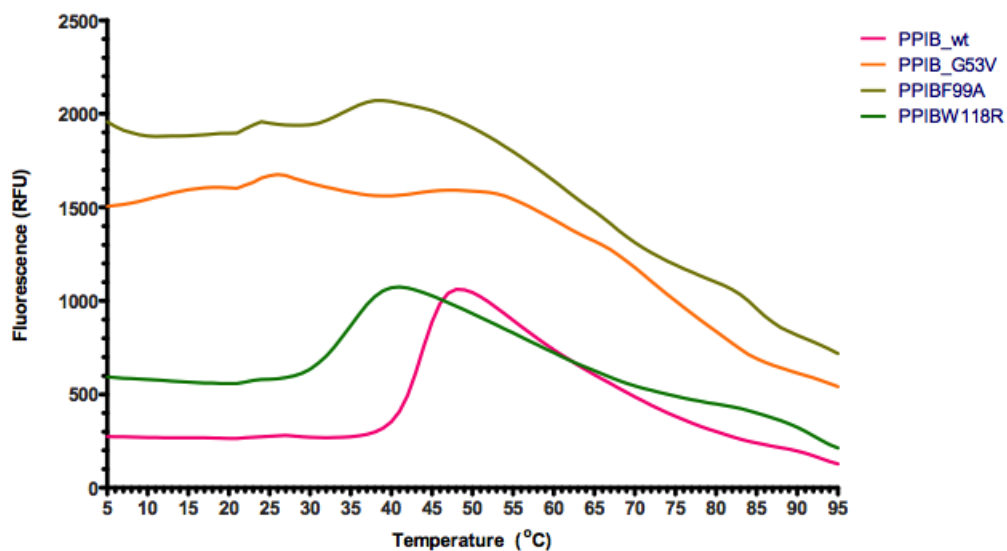
Τα πρώτα πειράματα thermofluor μεταλλαγμένων στελεχών *E. coli* CypA πραγματοποιήθηκαν στο EMBL, όπου στάλθηκαν δείγματα από WT, F99A, G53V και W118R CypA. Τα μεταλλάγματα αυτά θεωρήθηκαν ενδιαφέροντα σε σχέση με τα αποτελέσματα δοκιμών ενζυμικής ενεργότητας ή/και παρατήρησης φαινοτύπου. Το πείραμα διεξήχθη σύμφωνα με το δημοσιευμένο πρωτόκολλο των Boivin et al. , 2013 (45). Χρησιμοποιήθηκαν φίλτρα Sypro Orange.

Τα αποτελέσματα αποδίδονται γραφικά στην εικ. 3.10. Η θερμοκρασία τήξης της *E. coli* CypA αγρίου τύπου εκτιμάται να είναι 43° C, τιμή ιδιαίτερα χαμηλή που αποτελεί ένδειξη ασταθούς πρωτεΐνης, όπως φαίνεται στο διάγραμμα. Το μετάλλαγμα W118R εμφανίζεται ακόμα πιο ασταθές (κατά 7 °C περίπου).

Τα μεταλλάγματα G53V και F99A έδωσαν καμπύλες που παραπέμπουν σε εξ αρχής μετουσιωμένη και συσσωματωμένη πρωτεΐνη, καθώς τα σήματα φθορισμού παρέμειναν σταθερά υψηλά από τους 5 °C. Τα δείγματα πιθανόν να έφτασαν στον προορισμό τους κατεστραμμένα ή η μετάλλαξη να οδήγησε σε αποτυχία σχηματισμού της τριτοταγούς δομής. Τα αίτια δομής-αποτελέσματος θα αναπτυχθούν διεξοδικά στο επόμενο κεφάλαιο.

Σημειώνεται ότι όλα τα δείγματα έφεραν επίτοπο ιστιδίνης.

Report : Thermal stability assay



Εικ. 10.3 Τα αποτελέσματα δοκιμών θερμικής σταθερότητας που πραγματοποιήθηκαν στο EMBL. *Επάνω:* Ένταση φθορισμού ως συνάρτηση της θερμοκρασίας *Κάτω:* Κλάσμα μετουσιωμένης πρωτεΐνης ως συνάρτηση της θερμοκρασίας (ως προς το ανερχόμενο τμήμα της καμπύλης).

Πειράματα θερμικής σταθερότητας στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Με αφορμή τα παραπάνω ευρήματα, πραγματοποιήθηκαν μια σειρά από διευρυμένα πειράματα σε σύστημα QPCR Mx3005P. (Εικ 3.11)

Με βάση τα πειραματικά δεδομένα δημοσιευμένων εργασιών (39, 45.47) καταρτίστηκε το εξής πειραματικό πρωτόκολλο:

Υλικά:

- 16,4 μl από δ/μα HEPES pH 7.5 24,4 mM και NaCl 24,4 mM (για 50 ml stock 0.29 mg HEPES, 0.07 mg NaCl)
- 1,6 μl από SYPRO orange 62X (1 μl σε 79 μl απεσταγμένου νερού)
- 2 μl πρωτεΐνης 50μM (για τη λυσοζύμη περίπου 0,8 mg/ml, για τη CYPB 0,9 mg/ml)

Τελικός όγκος περίπου 20 μl

- ✓ Η ανάμιξη γίνεται **στον πάγο με την εξής σειρά:** Buffer, αλάτι, νερό, πρωτεΐνη, χρωστική
- ✓ Φυγοκέντρηση 1 λεπτό (1000 rpm στους 4°C)
- ✓ Ακολουθούν 5´ ηρεμίας για επώαση
- ✓ Το πρόγραμμα του πειράματος θερμικής σταθερότητας πραγματοποιείται με αύξηση της θερμοκρασίας σε βήματα του 0,5 °C από τους 20 ως τους 95 °C.

Σε κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ίσος όγκος του παραπάνω διαλύματος με τη ανάλογη ποσότητα χρωστικής χωρίς πρωτεΐνη για να διαπιστωθεί ότι πράγματι δεν υπάρχουν σήματα φθορισμού από άλλες πηγές εκτός του δείγματος πρωτεΐνης.

Μετά την ανάμιξη και την επώαση τα δείγματα τοποθετήθηκαν στις ειδικές θέσεις του QPCR. Χρησιμοποιήθηκαν τα διαθέσιμα φίλτρα Sypro Green (διέγερση στα 492 nm και εκπομπή στα 516 nm, τα οποία απέδωσαν ικανοποιητικές εντάσεις φθορισμού.



Εικ. 3.11 Σύστημα QPCR Mx3005 κλειστό (αριστερά) και με χώρο υποδοχής των δειγμάτων.

Τα πρώτα πειράματα έγιναν με πρωτεΐνη αγρίου τύπου έτσι ώστε να συγκριθούν τα δεδομένα με αυτά του Αμβούργου. Για πιθανή βελτίωση του πρωτοκόλλου εφαρμόστηκαν τρεις διαφορετικές ποσότητες πρωτεΐνης (1, 2 και 3 μl διαλύματος πρωτεΐνης 50 μM σε 20 μl ρυθμιστικού διαλύματος) Τα αποτελέσματα διαγραμματικά απεικονίζονται στην εικ. 3.12.

Παρατηρήσαμε ότι η όσον αφορά την πρωτεΐνη αγρίου τύπου υπήρχε επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων του πειράματος θερμικής αποδιάταξης σε σχέση με αυτά στο Αμβούργο. Όπως ακριβώς αναμενόταν, οι τρεις διαφορετικές μεταχειρίσεις επηρέασαν την ένταση του φθορισμού και όχι την θερμοκρασία τήξης. Ως προς την μέτρηση της θερμοκρασίας τήξης, επομένως, μπορούν να θεωρηθούν χονδρικά ως πειραματικές επαναλήψεις. Κατέδειξαν θερμοκρασίες τήξης 44,02, 44,02 και 44,4 $^{\circ}\text{C}$, δηλαδή $44 \pm 0,1$ $^{\circ}\text{C}$, τιμή με πολύ μικρό σφάλμα και πολύ κοντινή στην εκτίμηση των 43, 4 $^{\circ}\text{C}$ που υπολογίστηκαν στο EMBL. Το γεγονός αυτό αποτελεί ισχυρή ένδειξη της επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων και την αξιοπιστίας της μεθόδου, λαμβάνοντας μάλιστα υπόψη το γεγονός ότι οι πρωτεΐνες των πειραμάτων του EMBL και του ΓΠΑ προήλθαν από απομονώσεις σε διαφορετικές χρονικές στιγμές και διαφορετικές παρτίδες

κυτταρικών καλλιιεργειών.

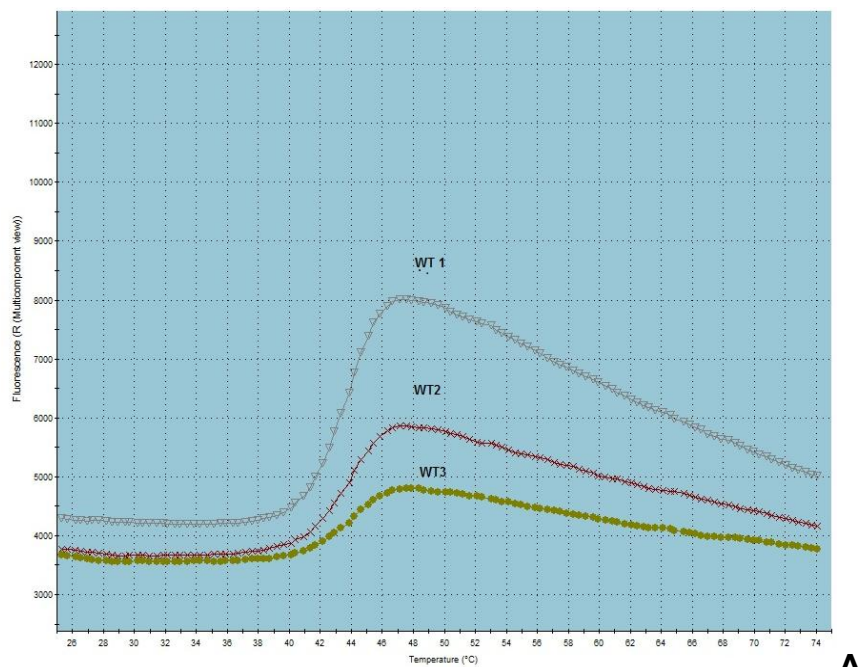
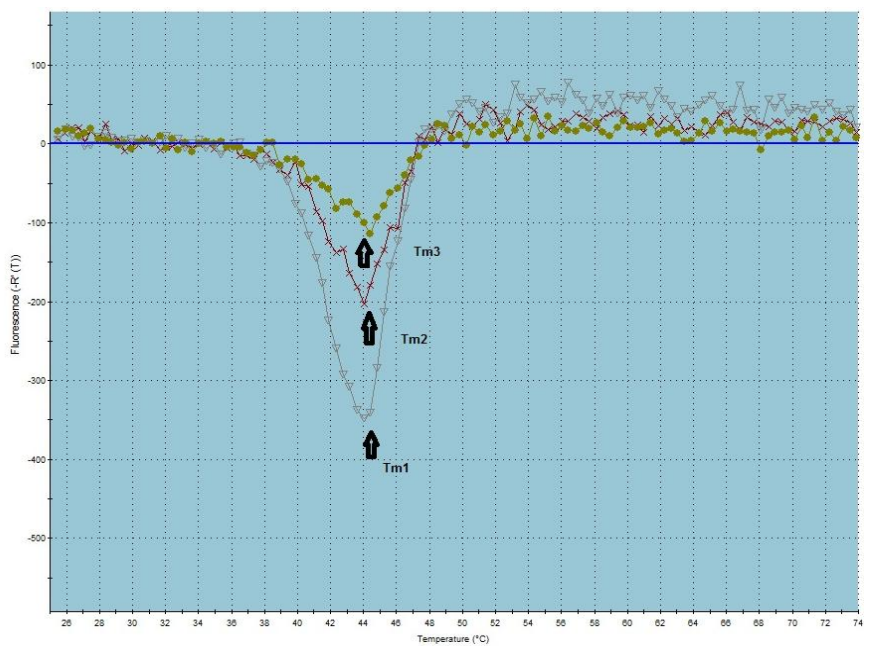
Μετά το προαναφερθέν διερευνητικό πείραμα, ακολούθησαν πειράματα με πρωτεΐνη αγρίου τύπου και με ορισμένες μεταλλαγμένες πρωτεΐνες που απομονώθηκαν, χρησιμοποιώντας τις ποσότητες πρωτεΐνης που αναφέρονται στο πρωτόκολλο (2 μl διαλύματος πρωτεΐνης 50μM σε 20 μl ρυθμιστικού διαλύματος). Στην εικ. 3.13 και 3.14 απεικονίζονται οι καμπύλες της έντασης φθορισμού ως συνάρτηση της θερμοκρασίας. Οι θερμοκρασίες τήξης όπως προέκυψαν από την ελάχιστη τιμή στα διαγράμματα της πρώτης παραγώγου τη έντασης φθορισμού (εικ. 3.15, 3.16, 3.17, 3.18) είναι οι ακόλουθες:

ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΑ	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΤΗΞΗΣ T_m (° C)	ΔT_m
WT	44,0±0,2	0
Q148R	43,0±0,1	-1
N46S	42,77 (μία μοναδική μέτρηση)	-1,23
M85I	37,4±0,1	-6,6
M49L	46,80±0,03	+2,8
Q61R	42,2± 0,2	-2
A90V	44 (μέσος όρος δύο μετρήσεων)	0

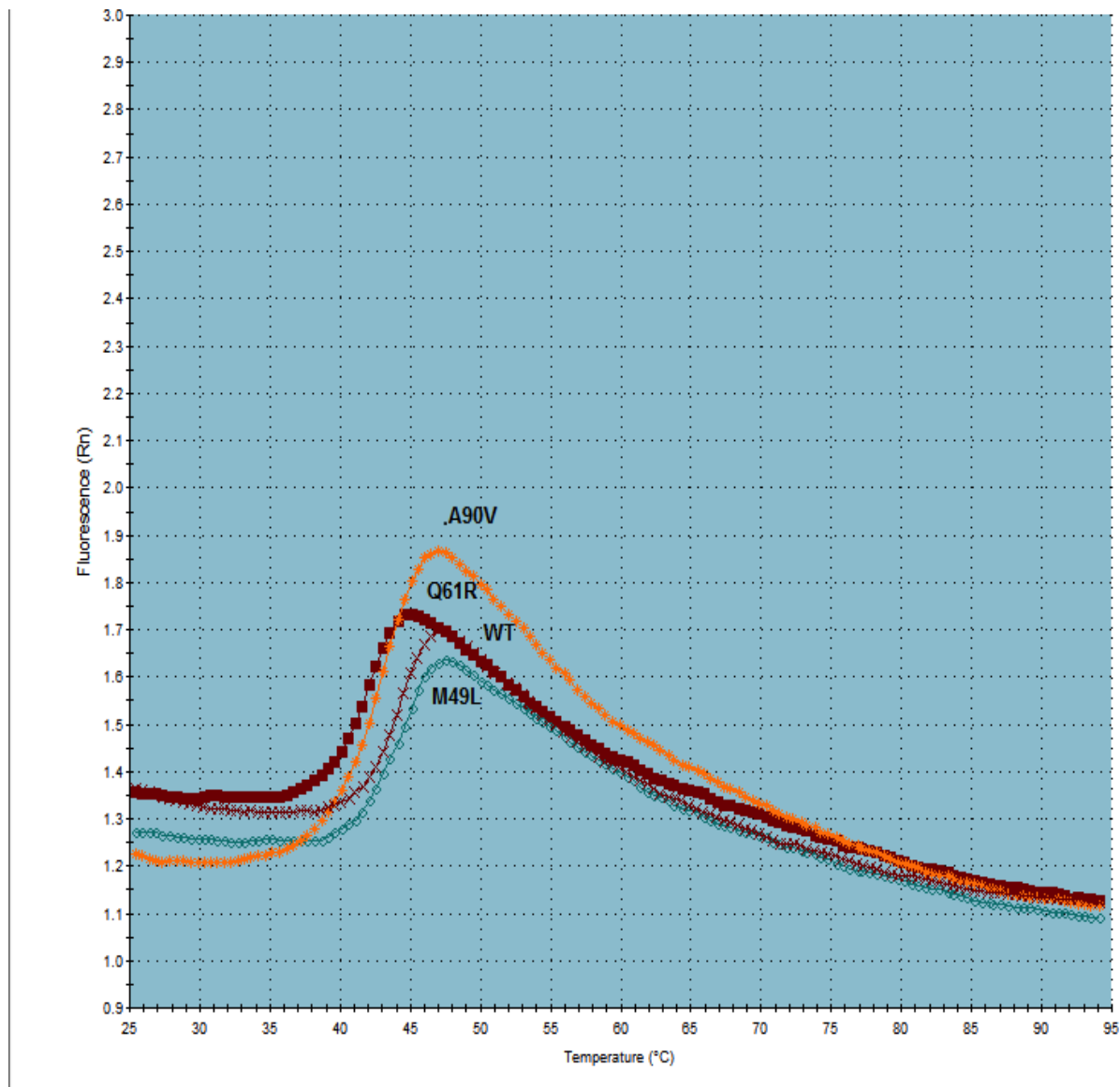
Η τυπική απόκλιση υπολογίστηκε σε όσες περιπτώσεις μεταλλαγμάτων μπορούσαν να ληφθούν τρεις τουλάχιστον επαρκείς καμπύλες φθορισμού.

Με το κριτήριο της ελάχιστης τιμής της πρώτης παραγώγου της έντασης φθορισμού, το μεταλλάγμα M85I ήταν εκείνο που παρουσίασε τη μεγαλύτερη αποσταθεροποίηση. Η αρχική ένταση φθορισμού του M85I είναι αρκετά υψηλή, γεγονός που να υποδηλώνει υψηλό ποσοστό αποδιάταξης εξ' αρχής.

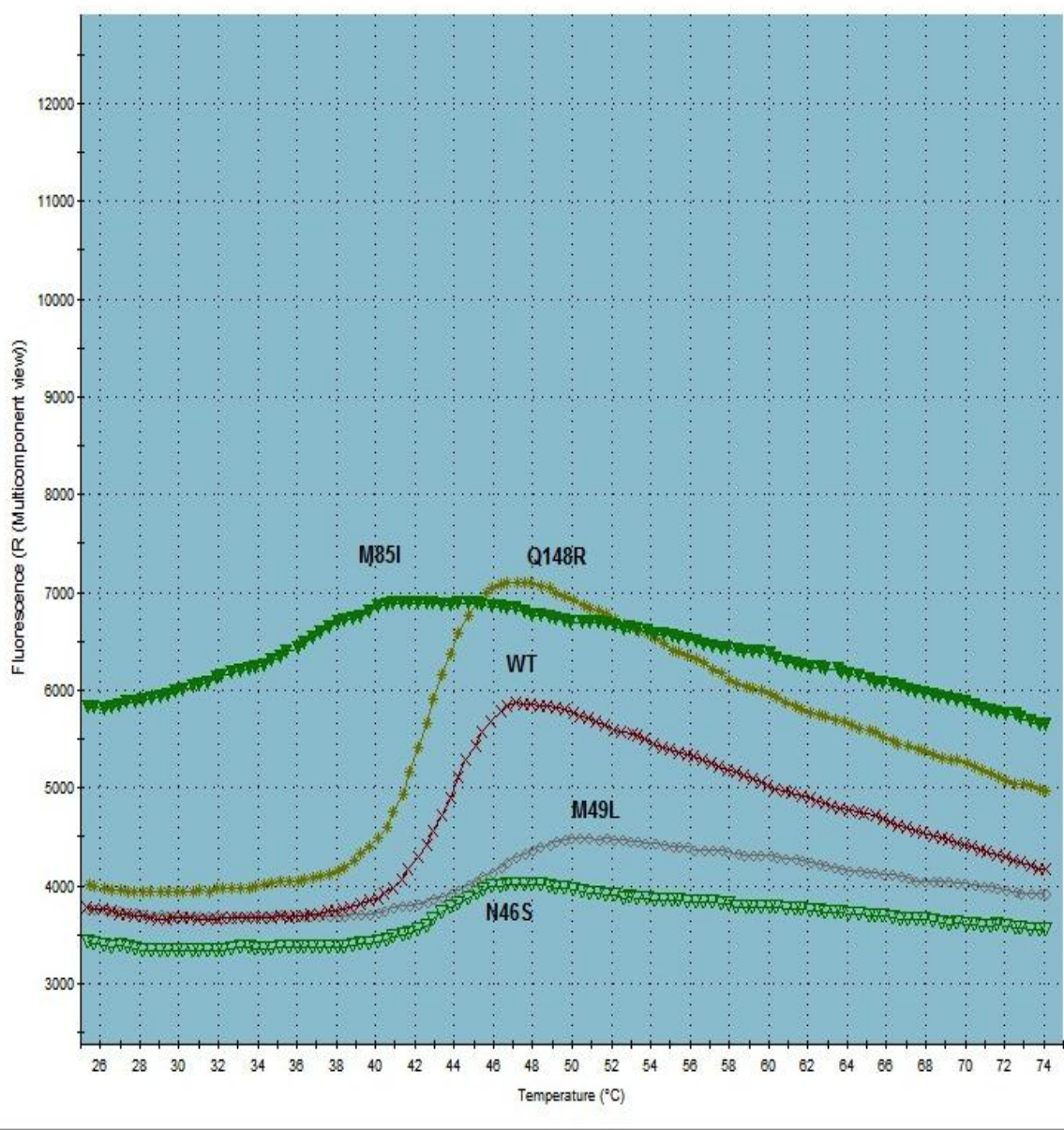
Οι πρωτεΐνες Q148R, A90V και N46S επέδειξαν θερμοκρασίες τήξης σε επίπεδα παραπλήσια με εκείνα της πρωτεΐνης αγρίου τύπου, ενώ η μετάλλαξη M49L φαίνεται να σταθεροποιεί ελαφρά την πρωτεΐνη κατά 2 °C περίπου. Αντίστοιχα, η πρωτεΐνη Q61R στατιστικά εμφανίζει μικρή μείωση της σταθερότητας κατά 2 °C σε σχέση με την πρωτεΐνη αγρίου τύπου.

**A****B**

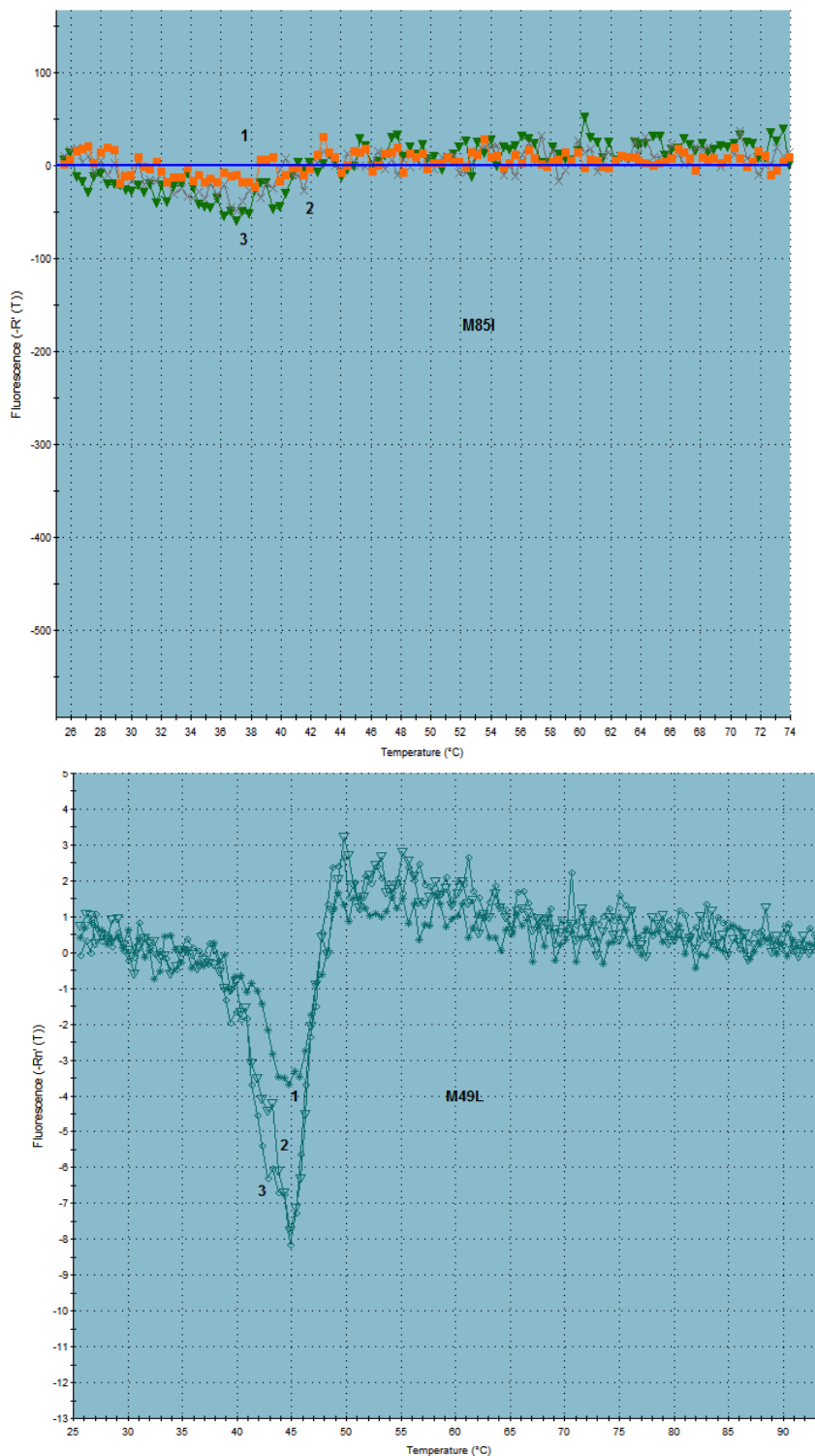
Εικ. 3.12 Α: Καμπύλες φορισμού πρωτεΐνης αγρίου τύπου (WT) σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία Β: Οι θερμοκρασίες τήξης (T_m) όπως προκύπτουν από το διάγραμμα της πρώτης παραγώγου της συνάρτησης φορισμού, σύμφωνα με τα αναγραφόμενα στις οδηγίες του προγράμματος MXPRO



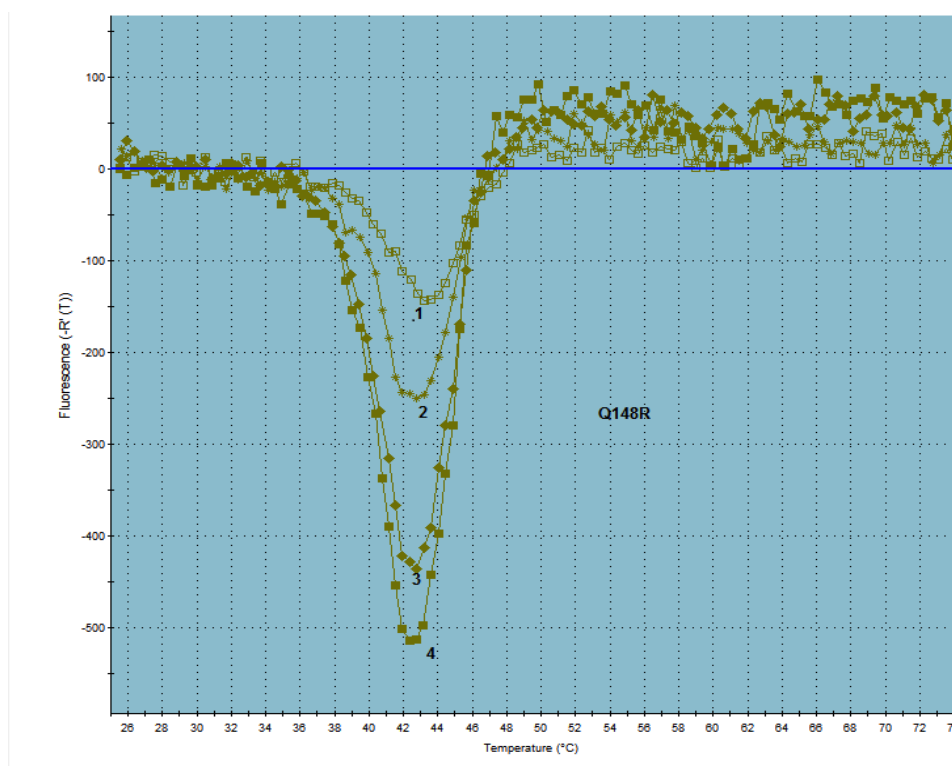
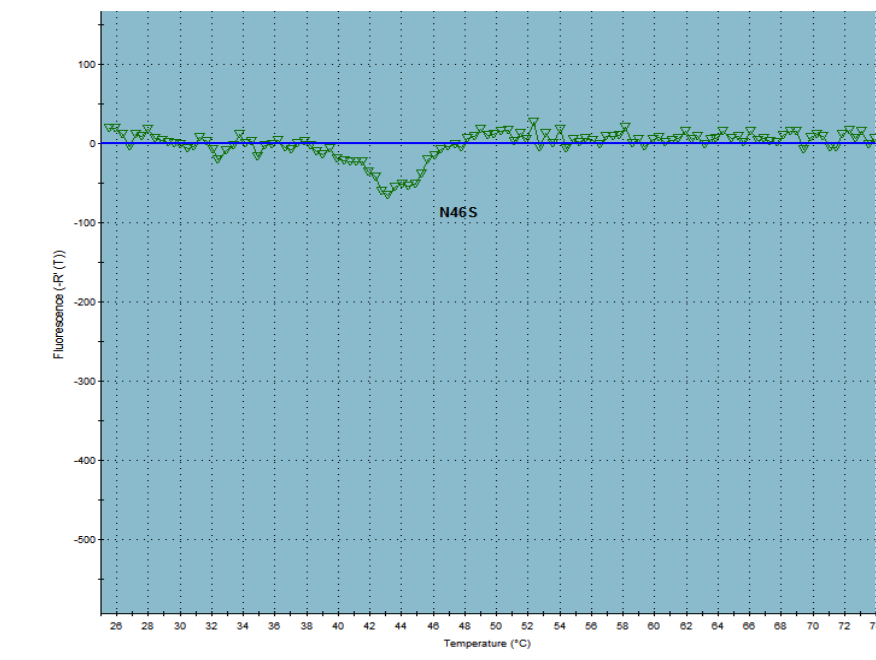
Εικ. 3.13 : Καμπύλες φθορισμού μεταλλαγμάτων πρωτεΐνης *E.coli*. Συρα M49L, Q61R, A90V σε σχέση με την πρωτεΐνη αγρίου τύπου (WT)



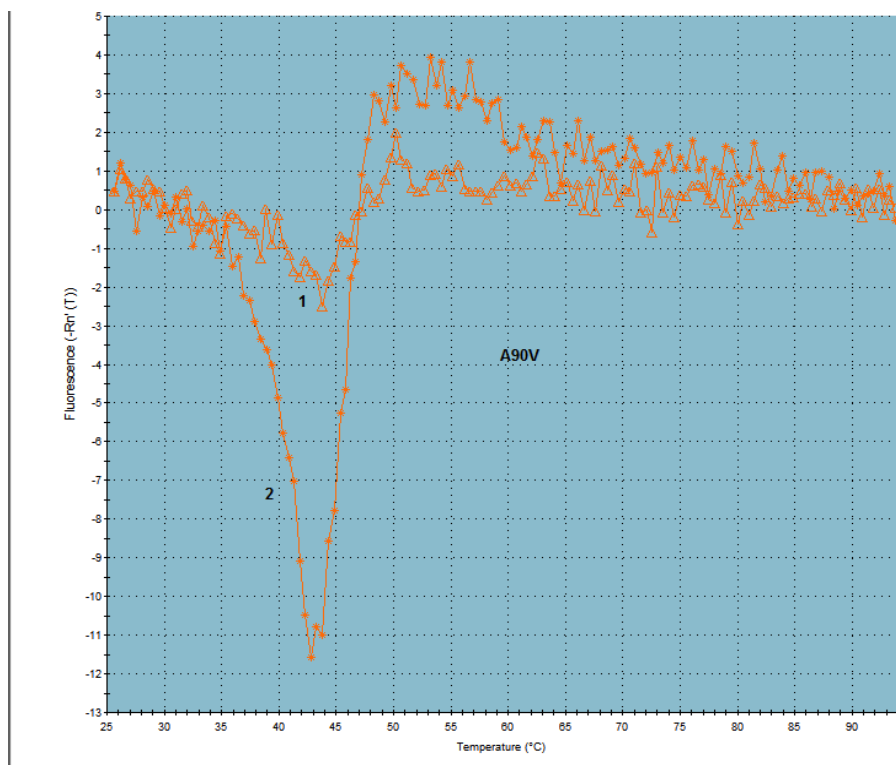
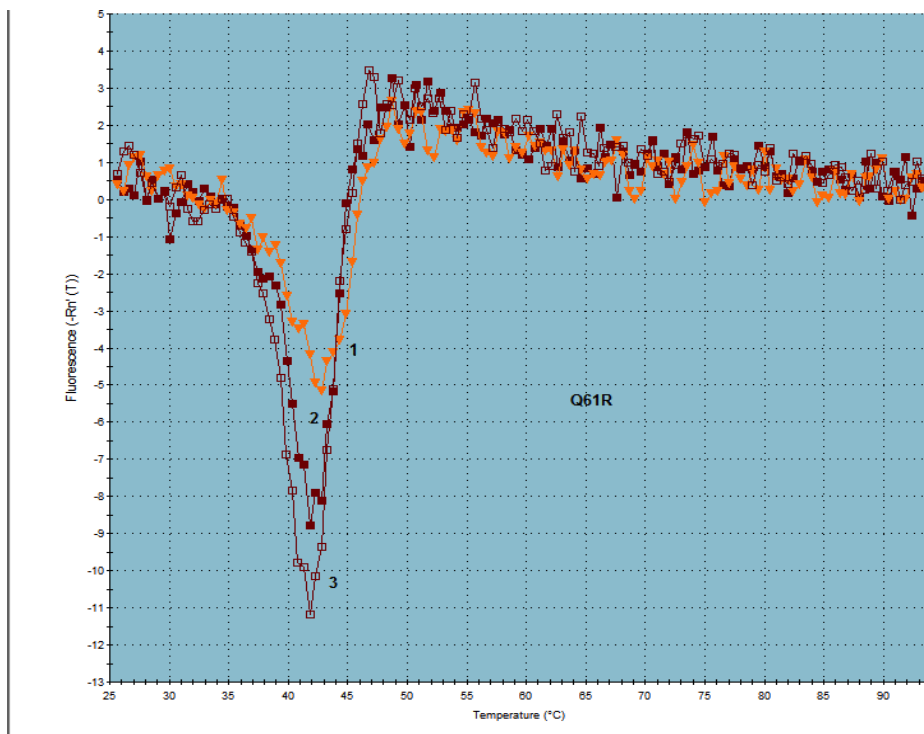
Εικ. 3.14 : Δεδομένα φθορισμού μεταλλαγμάτων πρωτεΐνης *E.coli*. Συρα Q148R, M85I, M49L, N46S σε σχέση με την πρωτεΐνη αγρίου τύπου (WT)



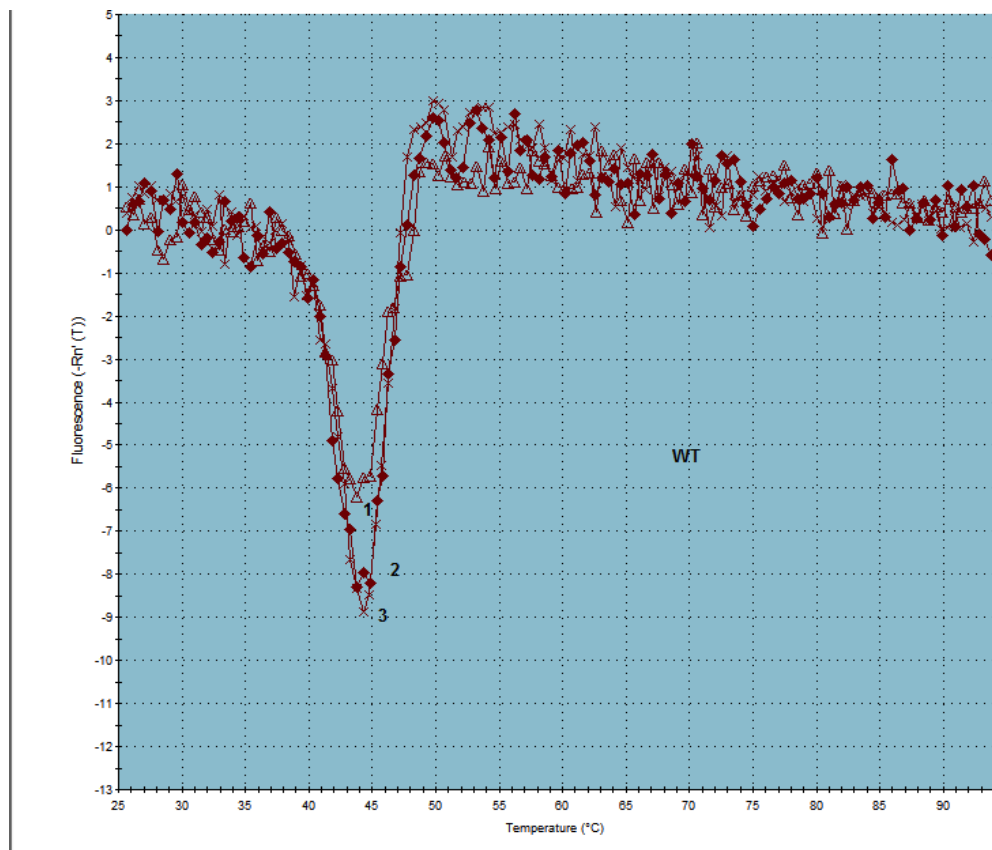
Εικ. 3.15 Διάγραμμα της πρώτης παραγώγου της έντασης φθορισμού των μεταλλαγμάτων M85I, M49L σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία, απ' όπου υπολογίστηκε η θερμοκρασία τήξης (T_m)



Εικ. 3.16 Διάγραμμα της πρώτης παραγώγου της έντασης φθορισμού των μεταλλαγμάτων Q148R και N46S σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία, απ' όπου υπολογίστηκε η θερμοκρασία τήξης (T_m)



Εικ. 3.17 Διάγραμμα της πρώτης παραγώγου της έντασης φθορισμού των μεταλλαγμάτων Q61R και A90V σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία, απ' όπου υπολογίστηκε η θερμοκρασία τήξης (T_m)



Εικ. 3.18 Διάγραμμα της πρώτης παραγώγου της έντασης φθορισμού της πρωτεΐνης αγρίου τύπου σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία, απ' όπου υπολογίστηκε η θερμοκρασία τήξης (T_m)

4. ΔΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΟΝΤΕΛΩΝ

A) ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ ΣΤΟΝ ΙΣΤΟΤΟΠΟ SWISS MODEL

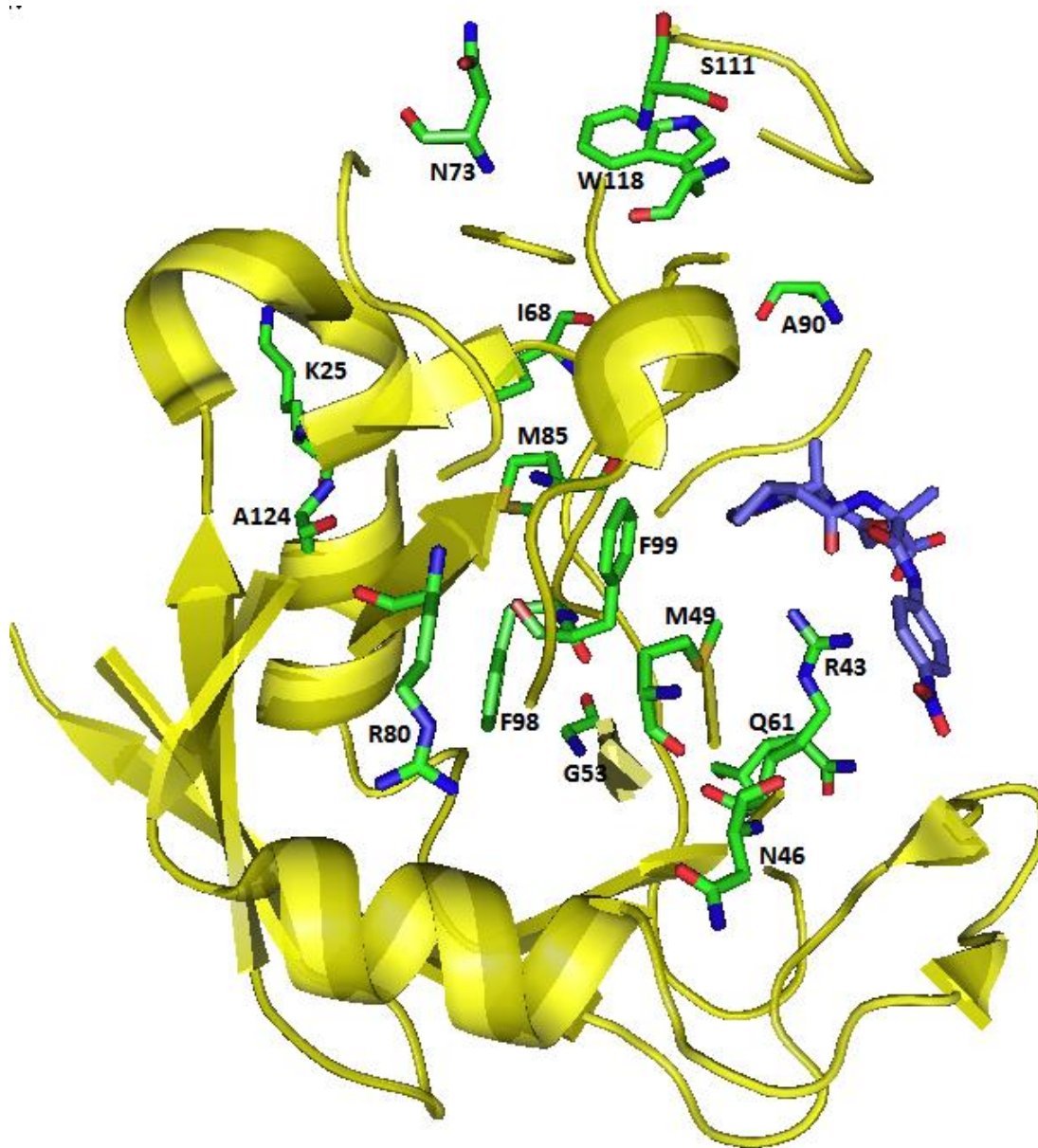
Τα μοντέλα των μεταλλαγμάτων της *E. coli* CypA ανακτήθηκαν από τον ιστότοπο του Swiss model (*Protein Structure Bioinformatics Group, Swiss Institute of Bioinformatics* αναφ. 48-51), δημόσια προσβάσιμο εξυπηρετητή όπου γίνεται η επεξεργασία μοντέλων πρωτεϊνικών δομών. Πρόκειται για μέθοδο δημιουργίας αξιόπιστων τρισδιάστατων μοντέλων δομής των πρωτεϊνών και χρησιμοποιείται κατά κόρον σε πολλές πρακτικές εφαρμογές. Η κατασκευή του μοντέλου γίνεται χρησιμοποιώντας ως πρότυπο μία ή περισσότερες επιλυμένες και δημοσιευμένες δομές που έχουν τη μέγιστη ομοιότητα με την κατατεθειμένη από τη χρήστη αμινοξική ακολουθία. Τα πρότυπα αυτά εντοπίζονται αυτόματα από το σύστημα.

Το SWISS-MODEL αποτελείται από τα εξής στοιχεία: (1) Μια σειρά από εργαλεία λογισμικού και βάσεων δεδομένων για την αυτοματοποιημένη μοντελοποίηση δομής της πρωτεΐνης (2) Την περιοχή εργασίας του χρήστη (workspace) (3) Το αποθετήριο (Repository), βάση δεδομένων που ενημερώνεται διαρκώς, απ' όπου αντλούνται οι πρότυπες δομές.

Στην περιοχή εργασίας του SWISS-MODEL εισήχθησαν μία προς μία οι ακολουθίες αμινοξέων των μεταλλαγμάτων της *E. coli* CypA και μετά από επεξεργασία από το λογισμικό προέκυψαν τρία μοντέλα για κάθε περίπτωση, βασισμένα στα εξής πρότυπα:

1. Την κρυσταλλική δομή της *E. coli* CypA παρουσία πεπτιδίου με κωδικό όνομα RCBS Protein Data Bank “1LOP” (7) η οποία περιγράφηκε στο κεφάλαιο 1Γ
2. Την κρυσταλλική δομή της *E. coli* CypA απουσία πεπτιδίου με κωδικό όνομα RCBS Protein Data Bank “2 NUL” (18)
3. Την δομή της *E. coli* CypA με δεδομένα NMR με κωδικό όνομα “2rs4” (52)

Β) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΔΟΜΙΚΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ - ΕΡΜΗΝΕΙΑΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ, ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΩΝ ΕΚΔΗΛΩΣΕΩΝ ΚΑΙ ΘΕΡΜΙΚΗΣ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ



Εικόνα 4.1 Οι θέσεις όλων των αμινοξέων που μεταλλάχθηκαν και μελετήθηκαν στο πλαίσιο της εργασίας αυτής. Απεικονίζεται η πρωτεΐνη αγρίου τύπου σύμφωνα με το μοντέλο 1LOP. Διακρίνεται το ολιγοπεπτίδιο με μωβ χρώμα.

Μεταλλάγματα του ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης και γειτονικών αμινοξέων

Τα μεταλλάγματα σε θέσεις του ενεργού κέντρου είναι τα εξής:

R43A Συντηρημένο αμινοξύ σε όλες τις CypA, είναι το πλέον σημαντικό για την κατάλυση της ισομερείωσης της προλίνης. Όπως έχει γίνει εμφανές από τα ήδη αναφερθέντα στο εισαγωγικό κεφάλαιο, η αλληλεπίδραση της αργινίνης 43 με το υπόστρωμα μέσω δεσμών υδρογόνου είναι σημαντικό και απαραίτητο στάδιο της ενζυμικής δράσης.

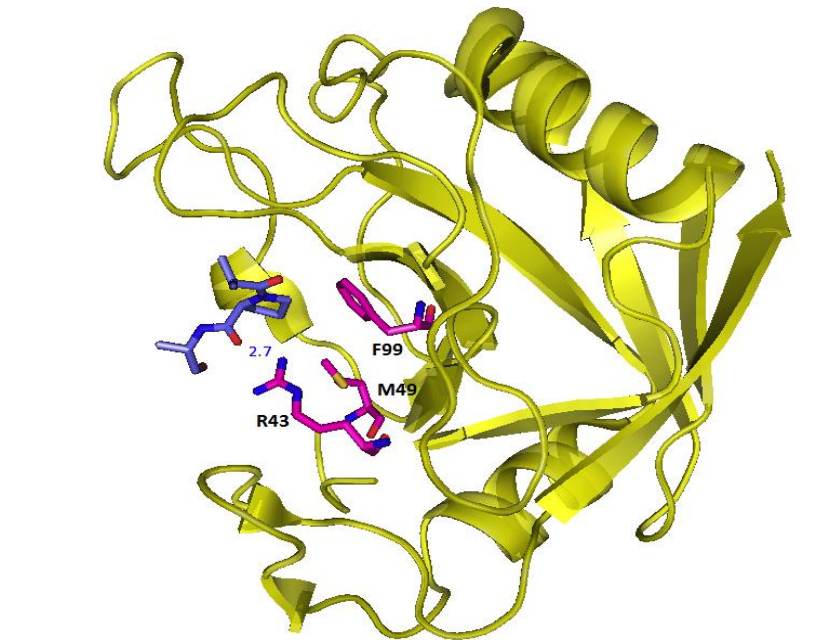
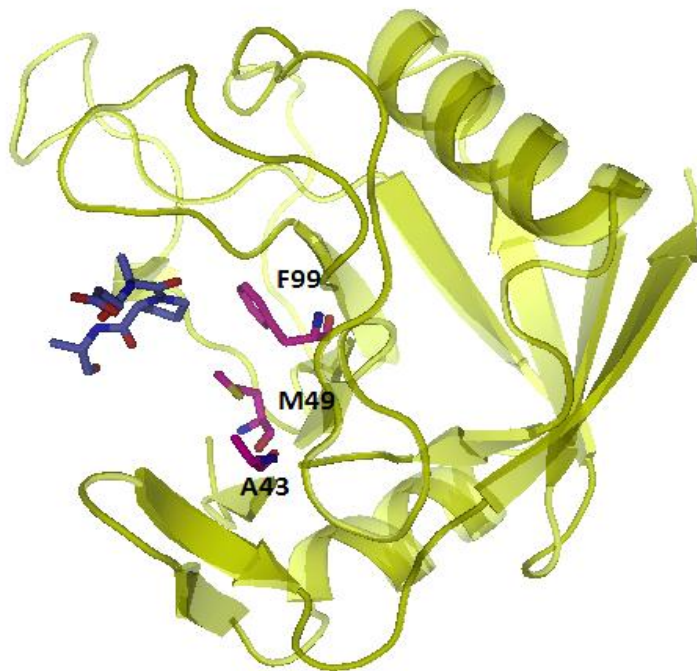
Επομένως δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι η μετάλλαξη της αργινίνης σε αλανίνη καθιστά το ένζυμο εντελώς ανενεργό όσον αφορά την ισομερίωση της προλίνης και την δράση του ως σαπερόνη (πίνακας 3.3). Εκτός από τη λειτουργικότητα του ενζύμου, επηρεάζεται έντονα και ο φαινότυπος, τόσο στη μορφή της μικροβιακής αποικίας (swarming) όσο και στη δημιουργία βιομεμβράνης. Επομένως η θέση 43 είναι πολύ σημαντική συνολικά για την υπόσταση της κυκλοφιλίνης.

Στην εικ 4.2 περιγράφεται η αδυναμία σχηματισμού δεσμού υδρογόνου με το καρβονύλιο της προλίνης που είναι απαραίτητο για την κατάλυση.

M49L Επίσης συντηρημένο αμινοξύ σε όλες τις CypA (*A. vinelandii*, *S. cerevisiae*, *L. donovii*, *H. sapiens*). Η ακριβής θέση του είναι μέσα στον υδρόφοβο θύλακα του ενεργού κέντρου στην επιφάνεια β4.

Η μετάλλαξη επηρεάζει έντονα την ενζυμική δράση, η οποία μειώνεται περίπου στο μισό αλλά αφήνει αναλλοίωτη την δράση σαπερόνης. Ο φαινότυπος επίσης δεν επηρεάζεται.

Η μετάλλαξη δεν μεταβάλλει τον υδρόφοβο χαρακτήρα της περιοχής του θύλακα και δε φαίνεται να υπάρχουν ατομικές αλληλεπιδράσεις εκτός των δεσμών υδρογόνου που σχηματίζουν τις β- επιφάνειες.

**A****B**

Εικ 4.2 Α: Άποψη του ενεργού κέντρου της CypA αγρίου τύπου παρουσία πεπτιδίου (μοντέλο 1LOP) β) Άποψη του ενεργού κέντρου της μεταλλαγμένης κυκλοφιλίνης R43A. Είναι εμφανής η αδυναμία αλληλεπίδρασης με το υπόστρωμα.

F99A: Άλλο ένα καθολικά συντηρημένο αμινοξύ του ενεργού κέντρου μέσα στον υδρόφοβο θύλακα (επιφ. β4).

Η μετάλλαξη αυτή έχει παρόμοιες επιδράσεις στο ένζυμο με αυτές που προκαλούνται από τη μετάλλαξη της θέσης 49, δηλαδή η ενζυμική δράση μειώνεται περίπου στο μισό ενώ η δράση σαπερόνης και ο φαινότυπος δεν επηρεάζονται, παρότι η αλανίνη ακαταλαμβάνει πολύ λιγότερο χώρο σε σχέση με τη φαινυλαλανίνη.

Η αλληλοεξάρτηση των αμινοξέων F99 και M49 και ο από κοινού ρόλος τους στην καταλυτική δράση του ενζύμου ενισχύεται από τα εξής γεγονότα: α) τα δύο αμινοξέα είναι κοινά σε όλες τις CypA που έχουν μελετηθεί β) και οι δύο μεταλλάξεις μειώνουν την ενζυμική δράση κατά το ίδιο ποσοστό (περίπου κατά 50%).

F98L Μαζί με την γειτονική θέση 99 συνιστούν συντηρημένη αμινοξική ακολουθία σε όλες τις CypA. Η φαινυλαλανίνη της θέσης 98 συντελεί στο σχηματισμό του υδρόφοβου θύλακα του ενεργού κέντρου.

Η διαλυτότητα του συγκεκριμένου μεταλλάγματος ήταν πενιχρή όπως έδειξαν τα gel ακρυλαμίδης. Σύμφωνα με τις δοκιμές ενζυμικής ενεργότητας με συμπυκνωμένη την ποσότητα που παρελήφθη, η φαινυλαλανίνη 98 δεν φαίνεται να εμπλέκεται στην δράση ισομεράσης, παρόλη τη γειτνίασή της με το ενεργό κέντρο. Επηρεάζει, όμως, σαφώς το φαινότυπο (swarming , δημιουργία βιομεμβράνης) και σε μικρό βαθμό τη δράση σαπερόνης.

Η μετάλλαξη σε λευκίνη αφήνει κενό χώρο σε αυτή τη σημαντική θέση, που προηγουμένως καταλάμβανε η φαινυλαλανίνη. Οι ανωμαλίες στο φαινότυπο και στην αντίδραση σαπερόνης μάλλον συνδέονται στη διαταραχή της στερεοχημικής διαμόρφωσης της πρωτεΐνης. Η απώλεια φαινυλαλανίνης αφήνει άδεια υδροφοβική κοιλότητα (εικ. 4.6) με αναμενόμενη αποσταθεροποίηση της πρωτεΐνης κατά 3-4 Kcal/mole (53)

Τα παραπάνω οδηγούν στο συμπέρασμα ότι ο ρόλος της θέσης 98 είναι σημαντικός για την υπόσταση της πρωτεΐνης σε δομικό αλλά όχι σε άμεσα λειτουργικό επίπεδο.

Συνοπτικά συμπεράσματα δομικής μελέτης των αμινοξέων του ενεργού κέντρου

Η συμμετοχή των θέσεων 49 και 99 στο δυναμικό σύστημα που εμπλέκεται στην ισομερίωση της προλίνης έχει ήδη διαπιστωθεί στην περίπτωση της ανθρώπινης CypA. (Fraser et al 2009, βλ. Κεφ 2Α). Στην κρυσταλλική δομή της ανθρώπινη CypA εντοπίστηκαν δύο συνυπάρχοντα ροταμερή για κάθε μία από τις θέσεις F113, S99, M61, ομόλογες των θέσεων F99, A84 και M49 του *E. Coli*. Η συγχρονισμένη αλληλομετατροπή των ροταμερών φαίνεται να αποτελεί κινητήριο μοχλό για την *cis-trans* ισομερίωση της προλίνης.

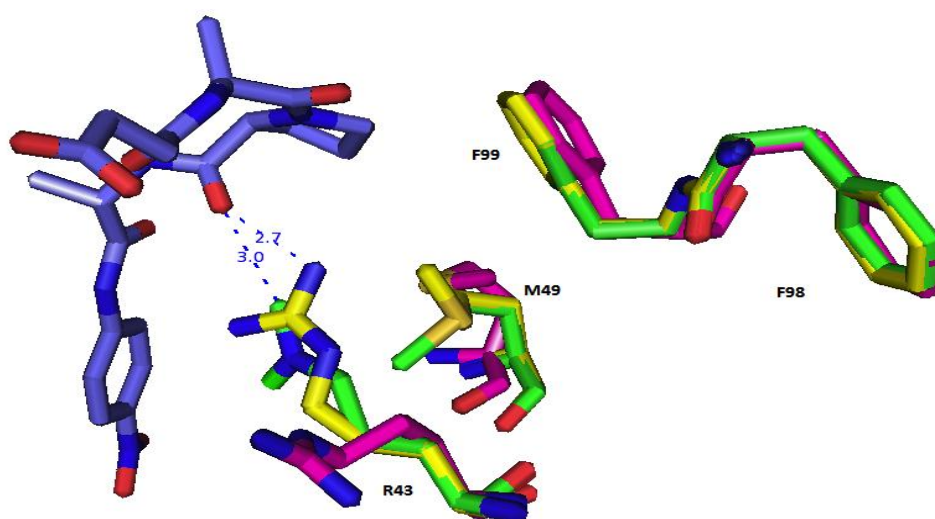
Η μείωση, επομένως, της ενζυμικής δράσης που παρατηρείται στα μεταλλάγματα M49I, F99A πιθανότατα να οφείλεται στην διατάραξη του αντίστοιχου με την ανθρώπινη rriB δυναμικού συστήματος που δημιουργεί τις συνθήκες κατάλυσης.

Για περαιτέρω διερεύνηση των μετατροπών που προκαλεί στο παραπάνω δυναμικό σύστημα η παρουσία υποστρώματος *cis* προλίνης έγινε σύγκριση των διαμορφώσεων των θέσεων 43, 99 και 49 μεταξύ των τριών διαθέσιμων δομικών προτύπων 1LOP, 2NUL, 2rs4. Τα δύο τελευταία πρότυπα περιγράφουν ένζυμο σε ελεύθερη μορφή, χωρίς υπόστρωμα.

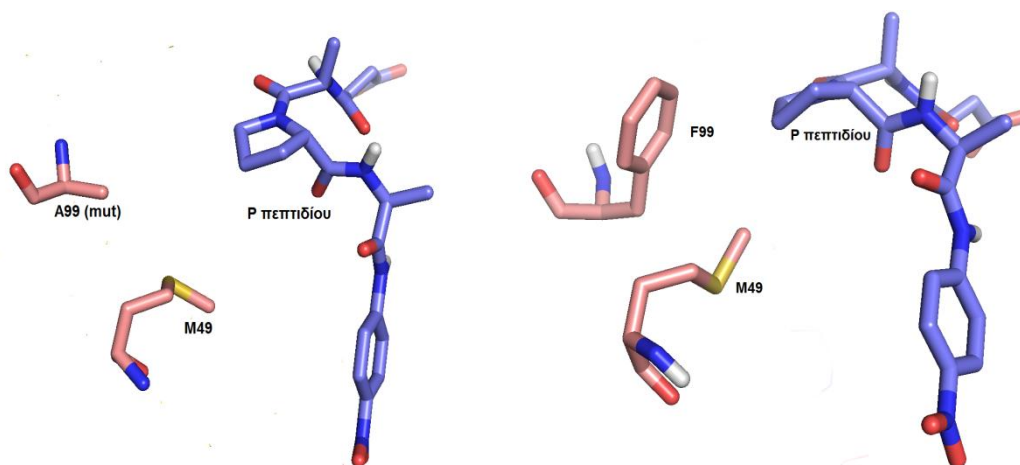
Στην εικόνα 4.3 περιγράφονται οι διαμορφώσεις των αμινοξέων στις πρότυπες δομές 1LOP, 2NUL και μία από τις πολλαπλές (είκοσι συνολικά) διαμορφώσεις που έχουν προκύψει από την 2rs4. Είναι εμφανής η ποικιλία διαμορφώσεων των αμινοξέων του ενεργού κέντρου, ιδίως όσον αφορά τη θέση 43. Η κρυσταλλική δομή στην περίπτωση του προτύπου 2NUL αποτύπωσε, απουσία πεπτιδίου, θέση παρόμοιου προσανατολισμού λίγο πιο απομακρυσμένη από το πιθανό υπόστρωμα αλλά σε θέση ετοιμότητας για δημιουργία δεσμού υδρογόνου. Η Arg43, κατά κύριο λόγο αλλά και άλλα αμινοξέα φαίνεται να έχουν μεγαλύτερη ελευθερία κίνησης και διάφορες πιθανές θέσεις απουσία υποστρώματος.

Οι στεreoχημικοί περιορισμοί της φαινυλαλανίνης της θέσης 98 δεν φαίνεται να δίνουν τη δυνατότητα πολλαπλών διαμορφώσεων. Η θέση της είναι εντελώς παρόμοια στις προτεινόμενες διαμορφώσεις και των τριών πρότητων δομών, γεγονός που πιθανόν να συνδέεται και με την μη εμπλοκή της στο δυναμικό σύστημα κατάλυσης.

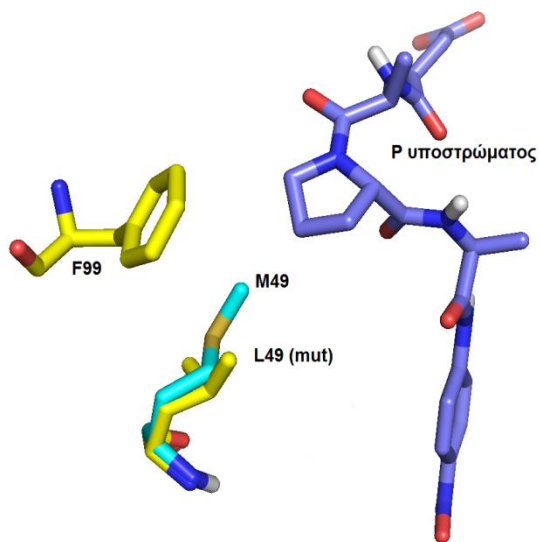
Σε αντίθεση με την δράση ισομεράσης, η δράση σαπερόνης της πρωτεΐνης δεν φαίνεται να επηρεάζεται από τις αλλαγές στην περιοχή του υδρόφοβου θύλακα του ενεργού κέντρου.



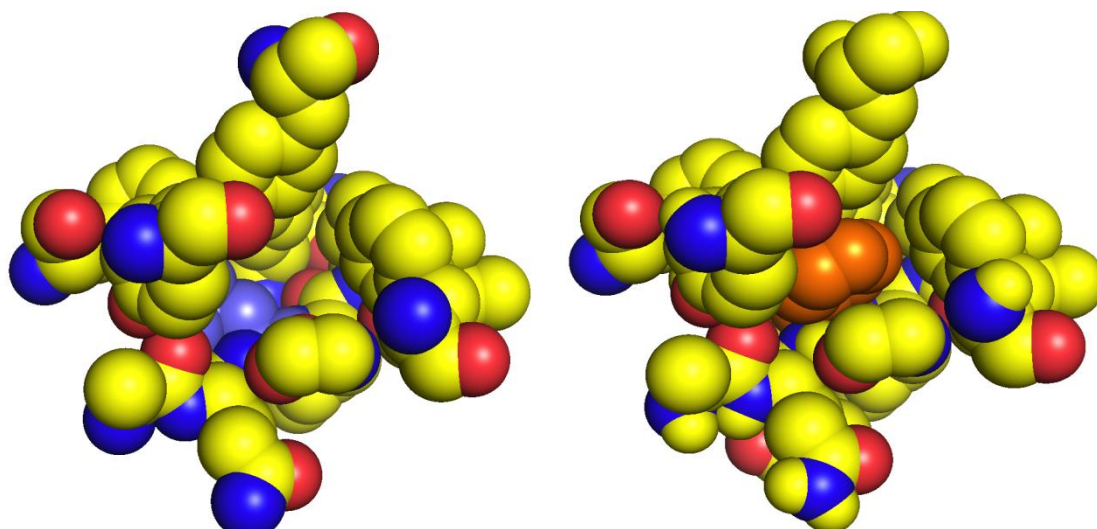
Εικ. 4.3 Διαμορφώσεις αμινοξέων ενεργού κέντρου στις δομές 1LOP (κίτρινο χρώμα), 2NUL (πράσινο χρώμα) και, 2rs4 (ροζ χρώμα).



Εικ. 4.4 F99A(αριστερά) και αγρίου τύπου πρωτεΐνη (δεξιά)



Εικ. 4.5 Μετάλλαξη M49L (κίτρινο χρώμα) σε υπέρθεση με την μεθειονίνη της πρωτεΐνης αγρίου τύπου (γαλάζιο χρώμα). Διακρίνεται η εγγύτητα με το υπόστρωμα (πεπτίδιο που περιέχει προλίνη). Μοντέλο 1LOP



Εικ. 4.6 Στερεοχημική απεικόνιση της θέσης 98 A) με τη μετάλλαξη σε λευκίνη (μωβ χρώμα) B) αγρίου τύπου με φαινυλαλανίνη (πορτοκαλί χρώμα). Είναι εμφανής η διαφορά στην κατάληψη χώρου που προκαλείται από τη μετάλλαξη.

Μεταλλάγματα εκτός του ενεργού κέντρου που επηρεάζουν την ενζυμική δράση της πρωτεΐνης

G53V : Συντηρημένο αμινοξύ σε υδρόφοβη περιοχή στο εσωτερικό του μορίου, (επιφ. β7)

Το αμινοξύ αυτό φαίνεται είναι νευραλγικής σημασίας για τη διαμόρφωση και σταθεροποίηση της πρωτεΐνης. Στο σημείο αυτό, θαμμένο στον πυρήνα του ενζύμου, υπάρχει χαρακτηριστική διαδοχή από τρεις γλυκίνες στις θέσεις 52, 53 και 54.

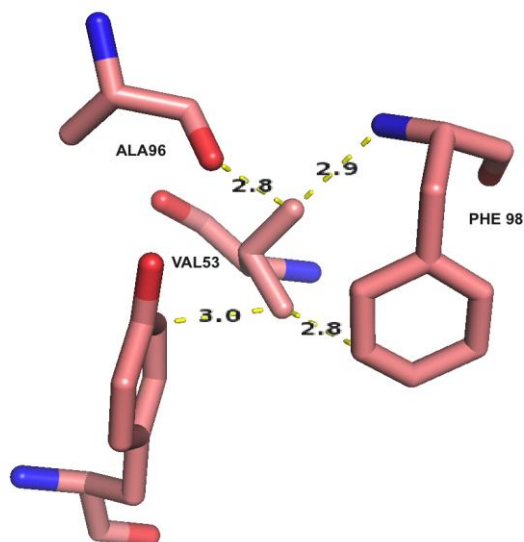
Η φαινομενικά μικρή μετάλλαξη της γλυκίνης σε βαλίνη επιφέρει ολική παρεμπόδιση της δράσης ισομεράσης και έντονες αλλαγές στο μικροβιακό φαινότυπο. Η δυσκολία στη διαλυτότητα που καταδεικνύουν τα ηλεκτροφορήματα ακρυλαμίδης και οι υψηλές

εντάσεις φθορισμού από την αρχή του πειράματος συντείνουν στην αδυναμία σχηματισμού της τριτοταγούς δομής.

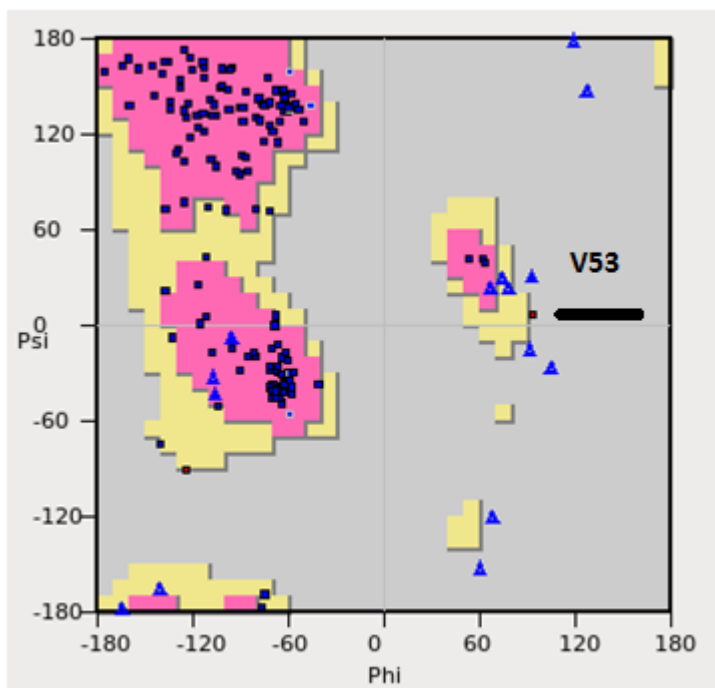
Κατά τη δομική μελέτη-μοντελοποίηση διαπιστώθηκε ότι η μετάλλαξη της γλυκίνης 53 προς την ογκωδέστερη βαλίνη προκαλεί ανακατατάξεις στα γειτνιάζοντα αμινοξέα. Ο φαινολικός δακτύλιος της φαινυλαλανίνης 98 εμφανίζεται κατά 0.68 Å μετατοπισμένος σε σχέση με τον WT, το καρβονύλιο της αλανίνης 96 έχει μετατοπιστεί κατά 0.85 Å και το καρβονύλιο της ίδιας της θέσης 53 κατά 0.77 Å (μοντέλο 2NUL). Η δομική μελέτη της μετάλλαξης φανερώνει μη αποδεκτές ατομικές αποστάσεις μεταξύ του άνθρακα CG2 της βαλίνης και του φαινολικού δακτυλίου της φαινυλαλανίνης 98, όπως και μεταξύ του άνθρακα CG1 και του καρβονυλίου της αλανίνης 96. (εικ 4.6). Απόπειρες χειροκίνητης επέμβασης στο μοντέλο με αλλαγή ροταμερών της γλυκίνης 53 και των γειτονικών αμινοξέων προκειμένου να επιτευχθούν επιτρεπτές ατομικές αποστάσεις δεν απέφεραν θετικό αποτέλεσμα.

Η αλληλουχία γλυκίνης-γλυκίνης στις θέσεις 52, 53, η οποία απαντάται σε όλες τις CypA εξυπηρετεί την αναγκαιότητα της ύπαρξης πιο ευέλικτων στερεοχημικά δομικών μονάδων στη σημείο εκείνο, πιθανόν για τη διευκόλυνση της στροφής της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Η παρουσία της βαλίνης εξουδετερώνει το χαρακτηριστικό αυτό που ίσως είναι απαραίτητο για την αναδίπλωση της πρωτεΐνης. Πράγματι, το διάγραμμα Ramachandran (54) αποκαλύπτει μη επιτρεπτές χ , ψ διέδρες γωνίες για τη γλυκίνη 53 (εικ. 7.4)

Για τους παραπάνω λόγους θεωρούμε ότι το ένζυμο καθίσταται μη λειτουργικό και επηρεάζεται και δράση της σαπερόνης (μείωση κατά 30%).



Εικ. 4.6 Δομικό μοντέλο του μεταλλάγματος G53V και επαφές με γειτονικά αμινοξέα



Εικ. 4.7 Διάγραμμα Ramachandran της μετάλλαξης G53V όπου διακρίνονται με κόκκινο χρώμα τα αμινοξέα με μη επιτρεπτές χ, ψ γωνίες (μοντέλο ILOP.)

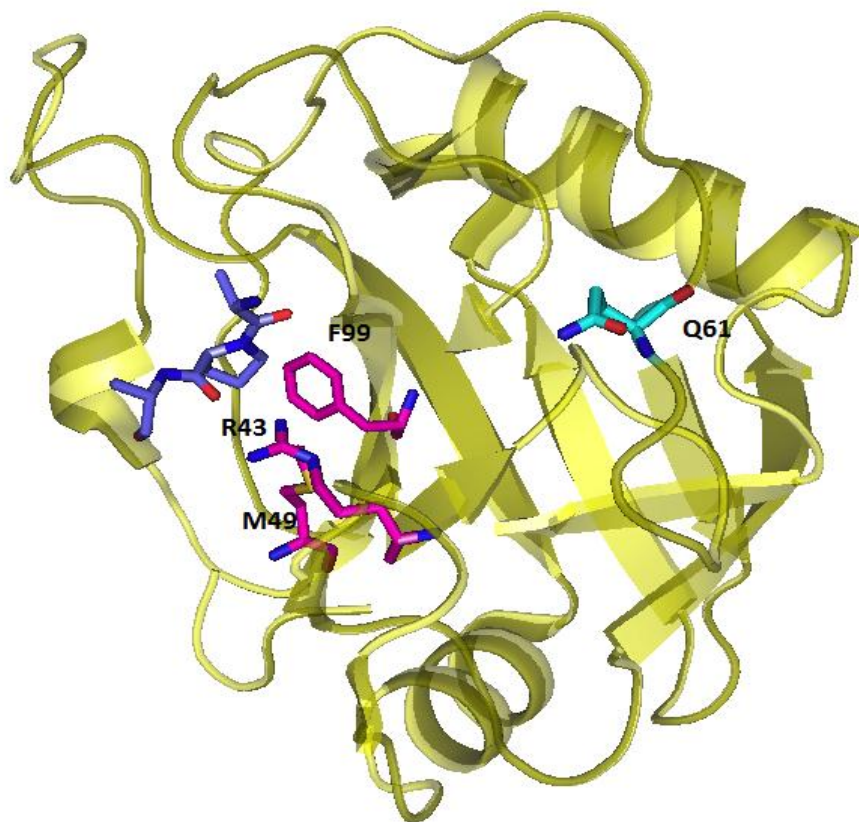
Q61R

Πρόκειται για το μοναδικό αμινοξύ σε εξωτερικό βρόγχο (L1) που επηρεάζει την ενζυμική δράση (μείωση κατά 60%). Η θέση δεν είναι συντηρημένη και δεν συνδέεται με το δυναμικό σύστημα της κατάλυσης. Όμως, όπως αναφέρθηκε στο εισαγωγικό κεφάλαιο, δεν είναι μόνο το ενεργό κέντρο του ενζύμου εκείνο που υφίσταται μεταβολές προκειμένου να γίνει πρόσδεση με το υπόστρωμα. Στην εικόνα 4.8 απεικονίζεται η θέση το αμινοξικού καταλοίπου 61 σε σχέση με το ενεργό κέντρο του ενζύμου με βάση τα δεδομένα της πρότυπης δομής 1LOP.

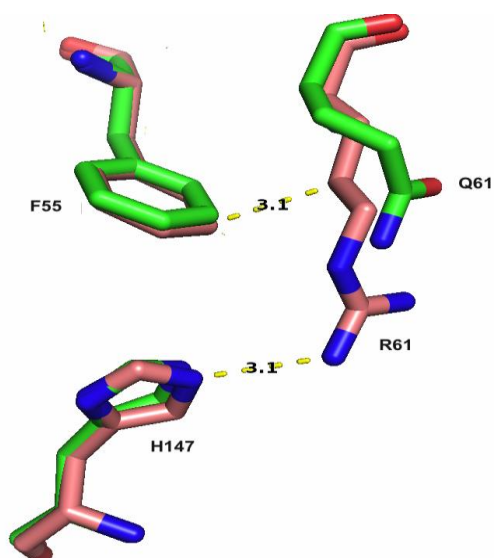
Η κινητικότητα του βρόγχου L1 έχει διαπιστωθεί ότι δεν επηρεάζεται από την πρόσδεση του πεπτιδίου (18). Με το μικρό πεπτίδιο του μοντέλου 1LOP δε φαίνεται να υπάρχουν αλληλεπιδράσεις. Ωστόσο, ο βρόγχος L1 βρίσκεται σχετικά κοντά στο ενεργό κέντρο και ενδέχεται σε πραγματικές συνθήκες η θέση αυτή να προσεγγίζει περισσότερο το υπόστρωμα και να κατέχει σημαντικότερο λειτουργικό ρόλο. Η πιθανότητα αυτή ενισχύεται λόγω της περιστροφής του αμινοτελικού άκρου του πεπτιδίου κατά την κατάλυση, της οποίας οι αλληλεπιδράσεις με την γλουταμίνη 61 μπορεί να είναι σημαντικές. Στην ανθρώπινη CypA που αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη του καψιδίου HIV το ομόλογο αμινοξύ 73 βρίσκεται αρκετά κοντά σε πεπτιδικές αλυσίδες του υποστρώματος (Howard *et al*, 2003).

Σε επίπεδο ατομικών επαφών, η γλουταμίνη 61 του στις πρότυπες δομές του WT αλληλεπιδρά μόνο με μόρια του διαλύτη. Η αργινίνη της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης έχει δυνατότητα ασθενών επαφών με τα κατάλοιπα φαινυλαλανίνη 55 και ιστιδίνη 147 (εικ.4.9)

Η αργινίνη διαθέτει μεγαλύτερη πλευρική αλυσίδα με βασική αντίδραση σε σχέση με την ουδέτερης αντίδρασης γλουταμίνη. Αυτό δεν φαίνεται να επηρεάζει τη διαλυτότητα (οπτική εκτίμηση από τα ηλεκτροφορήματα ακρυλαμίδης). Η δράση σαπερόνης δεν επηρεάζεται από τη συγκεκριμένη μετάλλαξη.



Εικ. 4.8 Θέση Q61 αγρίου τύπου σε σχέση με το ενεργό κέντρο του ενζύμου (μοντέλο ILOP)



Εικ. 4.9 Τοπική επισκόπηση θέσης 61: Πρωτεΐνη αγρίου τύπου(πράσινο χρώμα) σε υπέρθεση με το μοντέλο μεταλλαγμένου στελεχούς (ροζ χρώμα) και η θέση σε σχέση με τα γειτονικά αμινοξέα.

Μεταλλάγματα που επηρεάζουν το φαινότυπο της πρωτεΐνης

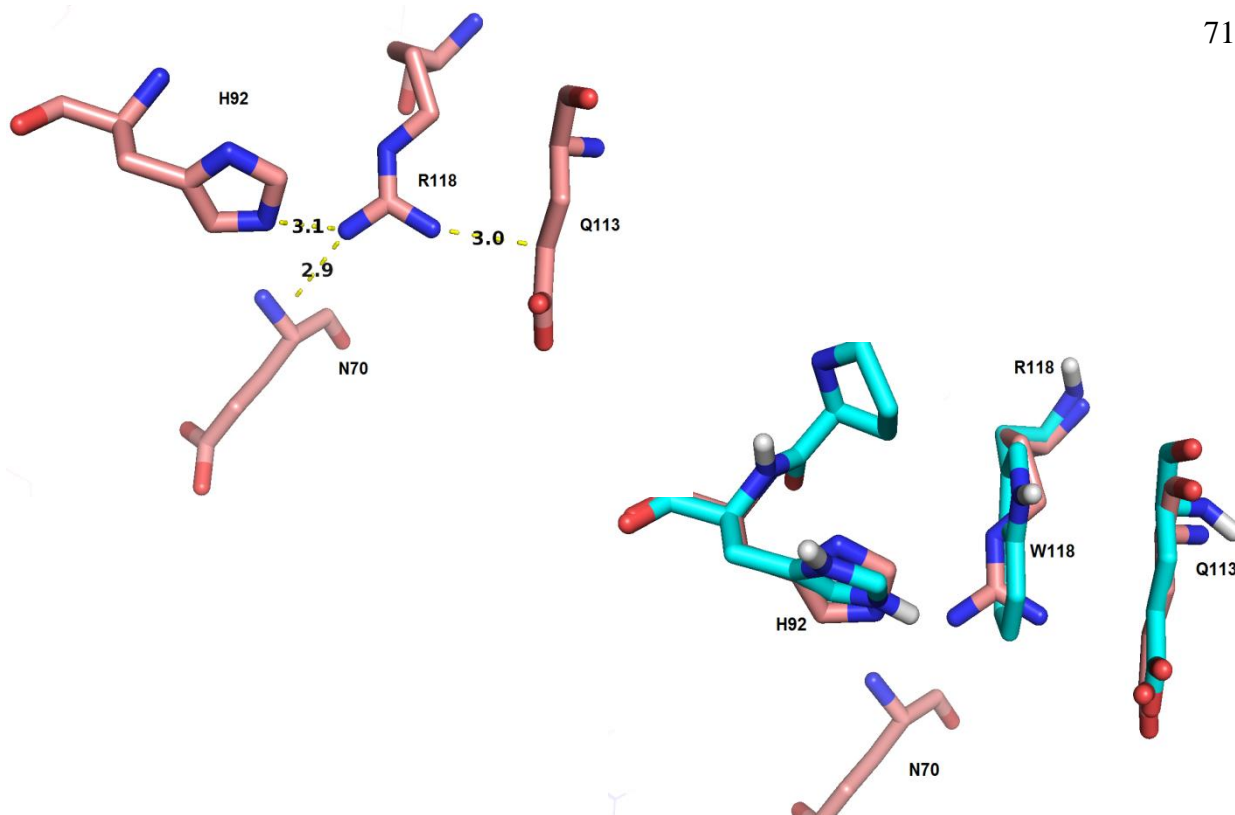
W118R: Μη συντηρημένο αμινοξύ. Υπάρχει αντίστοιχη θέση στο *A. vinelandii*. Η τρυπτοφάνη βρίσκεται σε βρόγχο στο εξωτερικό του μορίου αλλά εμφανίζεται τοποθετημένη σε μικρό θύλακα του βρόγχου με επαφές Van Der Waals με γειτονικά αμινοξέα. Η αργινίνη της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης έχει δυνατότητα δημιουργίας δεσμών υδρογόνου με γειτονικά αμινοξέα (εικ. 4.10).

Η μετάλλαξη W118R οδηγεί σε μικρή μείωση της δράσης σαπερόνης και επηρεάζει έντονα το φαινότυπο. Επίσης αποσταθεροποιεί την πρωτεΐνη σημαντικά, κατεβάζοντας τη θερμοκρασία της κατά 10 ° C.

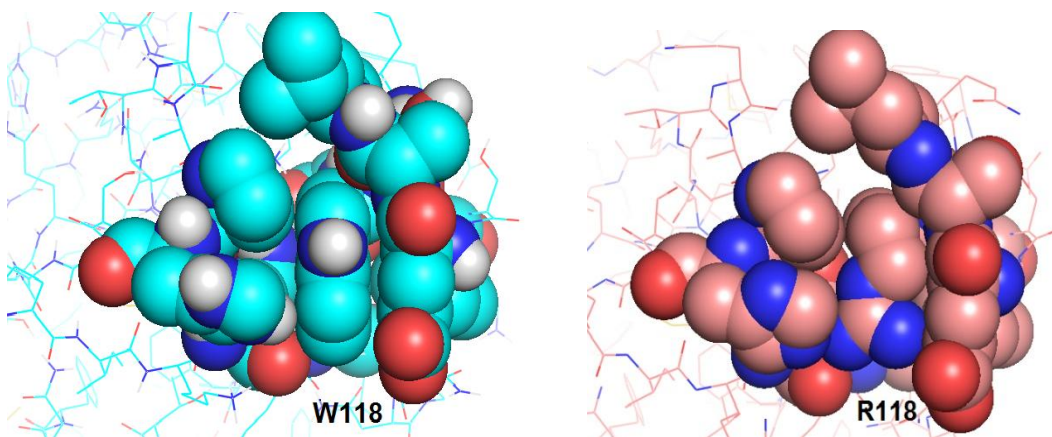
Οι παρατηρήσεις αυτές αποδίδονται στις εξής αιτίες:

- Η αργινίνη έχει τελείως διαφορετική συμπεριφορά από την υδρόφοβη και ογκωδέστερη τρυπτοφάνη. Ως πολικό αμινοξύ αλληλεπιδρά με γειτονικά αμινοξέα και ο χώρος που καταλαμβάνει είναι μικρότερος.
- Ο όγκος και ο υδρόφοβος χαρακτήρας της τρυπτοφάνης φαίνονται απαραίτητες για την σωστή διαμόρφωση της πρωτεΐνης στο σημείο εκείνο. Η τρυπτοφάνη ταιριάζει απόλυτα από άποψη όγκου στη μικρό θύλακα του βρόγχου πράγμα που δε συμβαίνει με την αργινίνη. Πιθανότατα η αντικατάσταση της τρυπτοφάνης διαταράσσει τοπικά την δομική ακεραιότητα του βρόγχου και δυσκολεύει τη σύνδεση με πρωτεϊνικά υποστρώματα. Έτσι εξηγείται η σημαντικά μικρότερη θερμική σταθερότητα και οι ανωμαλίες στο φαινότυπο.

Τέλος παρατηρούμε ότι, ενώ σύμφωνα με δεδομένα κρυσταλλικής δομής (7,18) η κινητικότητα του βρόγχου L3 μειώνεται παρουσία υποστρώματος, η δράση ισομεράσης δεν επηρεάζεται. Αυτό σημαίνει είτε ότι η μετάλλαξη δεν επηρεάζει την κινητικότητα του βρόγχου είτε ότι η κινητικότητα αυτή δεν είναι τελικά καθοριστική για την ενζυμική δράση.



Εικ. 4.10 Πάνω αριστερά: Μετάλλαξη W118R και επαφές με γειτονικά αμινοξέα Κάτω δεξιά: Πρωτεΐνη αγρίου τύπου (γαλάζιο χρώμα) σε υπέρθεση με το μεταλλαγμένο στέλεχος (ροζ χρώμα) Μοντέλο 1LOP



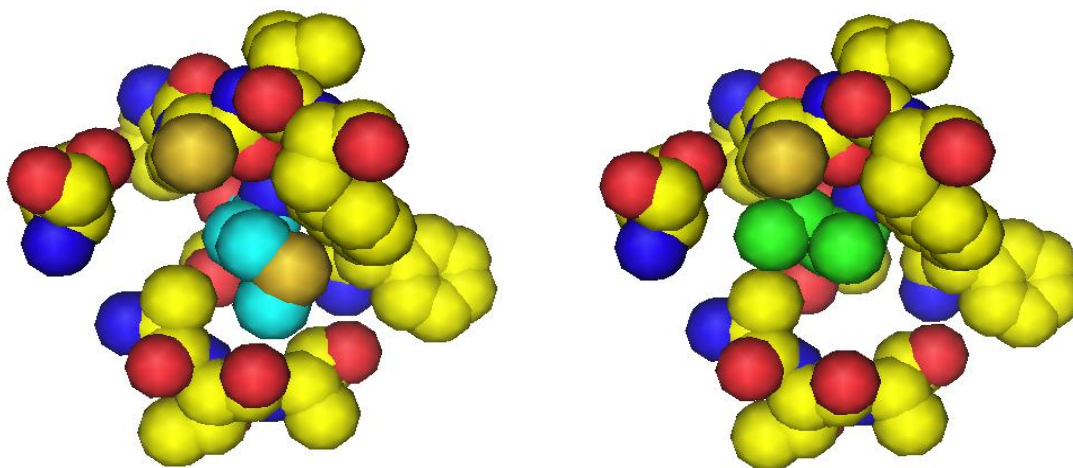
Εικ. 4.11 Χωροπληρωματικό μοντέλο του επιφανειακού θύλακα όπου υπεισέρχεται η θέση 118. Στο μεταλλαγμένο στέλεχος η χωρική διεύθυνση της αργινίνης στην κοιλότητα (δεξιά) δεν είναι τόσο καλή όπως αυτό της τρυπτοφάνης του αγρίου τύπου (αριστερά) Μοντέλο 1LOP

M85I: Μη συντηρημένο αμινοξύ στην ανθρώπινη CypA. Υπάρχει αντίστοιχη θέση στο *A. vinelandii*. Στις Cypa των *S. cerevisiae*, *L. donovii*, *H. sapiens*, έχει αντικατασταθεί με σερίνη.

Η θέση 85 στο εσωτερικό της πρωτεΐνης (Επιφ. β5) είναι απομακρυσμένη από το ενεργό κέντρο. Τόσο στην αγρίου τύπου πρωτεΐνη όσο και στο μοντέλο του μεταλλάγματος M85I παρατηρούνται επαφές Van Der Waals με γειτονικά αμινοξέα.

Υπάρχει όμως σαφής διαφορά στον τρόπο κατάληψης του χώρου από την μεθειονίνη σε σχέση με την ισολευκίνη (εικ. 4.12). Η μετάλλαξη δημιουργεί κενό χώρου όπου αποδίδεται η έντονη παρατηρούμενη μεταβολή του φαινότυπου και η θερμική αποσταθεροποίηση.

Η δράση ισομεράσης και σαπερόνης δεν επηρεάζονται από τη μετάλλαξη.

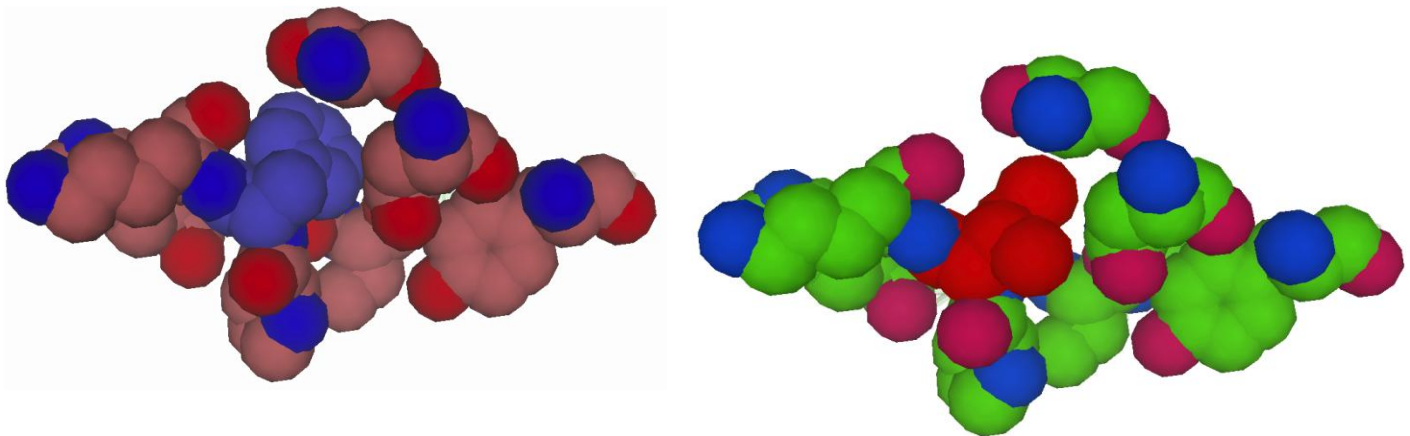


Εικ. 4.12 Χωροπληρωματικό μοντέλο του περιβάλλοντος της θέσης 85 αγρίου τύπου (επάνω αριστερά) και του μεταλλάγματος M85I (κάτω δεξιά) Μοντέλο 1LOP

I68F: Μη συντηρημένο αμινοξύ στην ανθρώπινη CypA . Υπάρχει αντίστοιχη θέση στο *A. vnaelandii*. Στις Cypa των *S. verevisiae*, *L. donovii*, *H. sapiens*, έχει αντικατασταθεί με λυσίνη.

Και η θέση 68 βρίσκεται στον βρόγχο L1. Η μετάλλαξη δεν προκαλεί επίδραση στην ενζυμική δράση αλλά επηρεάζει το φαινότυπο δημιουργώντας swarming.

Δεν παρατηρούνται ατομικές αποστάσεις που να υποδηλώνουν ατομική αλληλεπίδραση. Η θέση 68 είναι μεν επιφανειακή αλλά η ισολευκίνη αντικαθίσταται με αμινοξύ πολύ ογκωδέστερο που πιθανόν να δυσκολεύει τοπικά την χωροταξική διεύθετηση λόγω ανεπάρκειας χώρου και προκαλεί μορφολογικές αλλαγές (Εικ. 4.13).



Εικ. 4.13 Στερεοχημική απεικόνιση της θέσης 68 (επάνω αριστερά) με τη μετάλλαξη σε φαινυλαλανίνη(μωβ χρώμα) Κάτω δεξιά, η αντίστοιχη απεικόνιση της πρωτεΐνης αγρίου τύπου με ισολευκίνη (πορτοκαλί χρώμα).

Μεταλλάγματα που δεν επηρεάζουν το φαινότυπο ή την ενζυμική δραστηριότητα της πρωτεΐνης

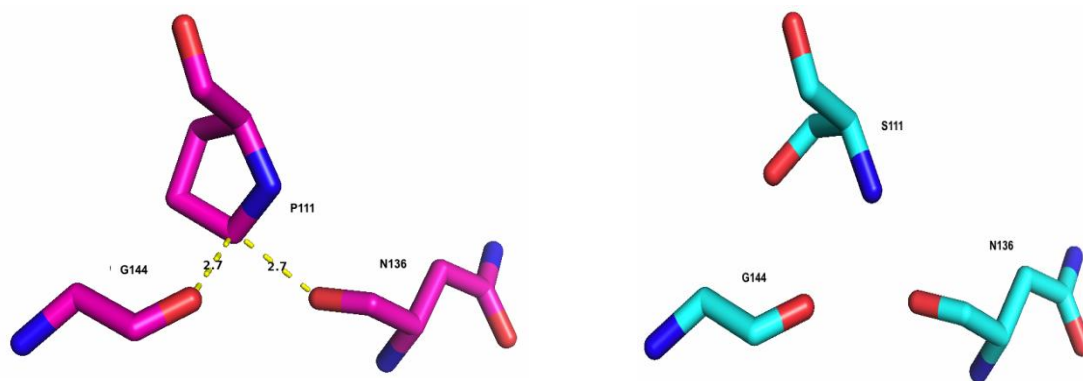
Τα μεταλλάγματα που δεν επιφέρουν αλλαγές στην συμπεριφορά του ενζύμου συνήθως βρίσκονται σε επιφανειακές, μη συντηρημένες θέσεις μακριά από το ενεργό κέντρο. Οι μεταλλάξεις που δεν προκάλεσαν διαφοροποιήσεις ήταν οι εξής:

N46S, N73D, A90V, S111P, S144C, Q148R

Από τις παραπάνω ενδιαφέρον παρουσιάζει μόνο η μετάλλαξη S111P, η οποία δεν έχει καν ομόλογη θέση στις CypA πιο εξελιγμένων οργανισμών.

Η μετάλλαξη σε προλίνη γενικά αναμένεται να προκαλέσει δυσκολίες διαμόρφωσης. Στην προκειμένη όμως περίπτωση ίσως λόγω επιφανειακής θέσης (βρόγχος L3) η δυσκολία αυτή εύκολα παρακάμφθηκε. Το διάγραμμα Ramachandran, επίσης, δεν έδειξε μη επιτρεπτές τιμές χ, ψ γωνιών εκατέρωθεν της προλίνης στη θέση 111 του μεταλλάγματος.

Στην πρωτεΐνη αγρίου τύπου σχηματίζεται δεσμός υδρογόνου μεταξύ του αζώτου της σερίνης 111 και της γλυκίνης 117. Στη μεταλλαγμένη πρωτεΐνη πιθανώς σχηματίζονται δύο ακόμα δεσμοί υδρογόνου (εικ. 4.14). Δεν παρατηρούνται αλληλεπιδράσεις με το διαλύτη.



Εικ. 14.4 Τοπική επισκόπηση της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης P111 (αριστερά) σε αντιπαράθεση με την πρωτεΐνη αγρίου τύπου S111 (δεξιά).

Μεταλλάγματα που παρουσίασαν αδυναμία έκφρασης ή διαλυτότητας

Το γεγονός ότι οι μεταλλάξεις στα καίρια κατάλοιπα R43, F98 και G53 επηρέασαν σημαντικά την ενζυμική δραστηριότητα δεν δημιούργησε προβληματισμό. Όμως τα μεταλλάγματα που επέδειξαν μηδαμινή διαλυτότητα, με αποτέλεσμα να μην μπορέσει να είναι ανέφικτη η παραλαβή της πρωτεΐνης, αφορούσαν φαινομενικά πολύ λιγότερο σημαντικές θέσεις στην αμινοξική ακολουθία. Παντελή αδυναμία διαλυτότητας παρουσίασαν οι A124V, R80H ενώ η K25Q δεν εκφράστηκε καθόλου.

Ενδεχομένως το γεγονός να οφείλεται σε γονιδιακές διαταραχές που προκλήθηκαν κατά τη διαδικασία της μετάλλαξης εκτός του γονιδίου έκφρασης της πρωτεΐνης, παράμετρος της οποίας η διερεύνηση βρίσκεται εκτός του πλαισίου της συγκεκριμένης εργασίας.

5. ΣΥΝΟΠΤΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο συνδυασμός των δεδομένων των δομικών μοντέλων και των βιοδοκιμών επιβεβαιώνει το ρόλο των συντηρημένων αμινοξέων του ενεργού κέντρου R43, F99 και M49 στην κατάλυση της προλυλ-ισομερίωσης. Πέρα από τον ξεκάθαρο και διαπιστωμένο ρόλο της αργινίνης της θέσης 43, επιβεβαιώνεται ο αλληλοεξαρτώμενος ρόλος των παραπάνω αμινοξέων στην κατάλυση όπως έχει περιγραφεί στην περίπτωση της ανθρώπινης CypA (30). Η μετάλλαξη μείωσε δραστικά την ενζυμική δράση στην περίπτωση των F99A και M49L. Η δυνατότητα ελευθερίας διαμόρφωσης των αμινοξέων του ενεργού κέντρου φαίνεται να είναι σημαντική για την δυνατότητα του ενζύμου να παλινδρομεί μεταξύ δύο διαμορφώσεων που αντιστοιχούν στην cis και την trans διαμόρφωση του υποστρώματος.

Στον μηχανισμό της κατάλυσης της ανθρώπινης CypA εμπλέκεται και η ομόλογη στην *E. Coli* λευκίνη της θέσης 98 (76 η ομόλογη θέση του *E. Coli*), όπως και η μη συντηρημένη στο *E. Coli* λυσίνη της θέσης 99 (84 η ομόλογη θέση του *E. Coli*). Περαιτέρω μελέτη με επιπλέον μεταλλάξεις στις θέσεις αυτές ενδεχομένως να διαλευκάνει το λειτουργικό ρόλο του συνόλου των αμινοξέων του ενεργού κέντρου του *E. Coli* και τις ομοιότητες και διαφορές με άλλους οργανισμούς.

Η σταθερότητα της πρωτεΐνης ενδεχομένως σχετίζεται με την μείωση της ενζυμικής δράσης στην περίπτωση της μετάλλαξης F99A. Τα πειράματα θερμικής σταθερότητας κατέδειξαν μεγάλο ποσοστό αποδιεταγμένης πρωτεΐνης. Το γεγονός αυτό έχει δομικό έρεισμα όπως αναλύθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο. Αντίθετα, στην περίπτωση του M49L, η μετάλλαξη οδήγησε σε ελαφρά αύξηση της θερμοκρασίας τήξης.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο εντοπισμός θέσεων αμινοξέων εκτός ενεργού κέντρου που επηρεάζουν την ενζυμική ενεργότητα. Τέτοιες είναι οι περιπτώσεις των μεταλλάξεων G53V και Q61R. Στην περίπτωση της G53V η δομική μελέτη δικαιολόγησε πλήρως την αδυναμία επίτευξης της ενζυμικής λειτουργίας και τις έντονες αλλαγές στο φαινότυπο. Στην περίπτωση της μετάλλαξης Q61R, που επηρεάζει μάλιστα την ενζυμική ενεργότητα σε μεγαλύτερο βαθμό απ' ό,τι οι μεταλλάξεις του ενεργού κέντρου, απαιτείται ευρύτερη διερεύνηση. Είναι η μοναδική μη συντηρημένη θέση

αμινοξέος που σχετίζεται με την ενζυμική ενεργότητα απ' όσες εξετάστηκαν. Όσον αφορά τη θερμική σταθερότητα, η μετάλλαξη Q61R επέφερε μικρή αποσταθεροποίηση της τάξης των 2°C .

Σχολιάζοντας τα αποτελέσματα των πειραμάτων θερμικής αποδιάταξης σε συνδυασμό με την ενζυμική δραστηριότητα, δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταβολής θερμικής σταθερότητας και ενζυμικής ενεργότητας στα μεταλλάγματα που εξετάσαμε. Στην βιβλιογραφία αναφέρονται περιπτώσεις όπου παρατηρείται θετική σταθεροποίηση πρωτεϊνικών δομών μέσω μεταλλάξεων εις βάρος της ενζυμικής ενεργότητας, όπως και περιπτώσεις θετικής συσχέτισης σταθερότητας-ενεργότητας (63, 64, 70). Και τα δικά μας δεδομένα δείχνουν ότι η σχέση σταθερότητας- ενεργότητας, πρέπει να εξετάζεται κατά περίπτωση.

Με τις μεταβολές της ενζυμικής δραστηριότητας δε φαίνεται να σχετίζονται ούτε οι παρατηρούμενες ανωμαλίες φαινότυπου στις μεταλλάξεις που μελετήθηκαν. Μείωση ενζυμικής δραστηριότητας και φαινοτυπικές ανωμαλίες παρατηρήθηκαν ταυτόχρονα μόνο στην περίπτωση των κομβικών μεταλλάξεων G53V και R43A. Εκτός των δύο αυτών περιπτώσεων, αλλαγές στο φαινότυπο εμφάνισαν οι μεταλλάξεις I68F, W118R, M85I. Κοινό τους στοιχείο, οι χωροπληρωματικές μεταβολές που κατέδειξε η δομική μελέτη σε συνδυασμό με την έντονη μεταβολή στην παρατηρούμενη θερμική σταθερότητα για τις πρωτεΐνες W118R, M85I. Όπως ήταν αναμενόμενο, οι παραπάνω μεταλλάξεις, απομακρυσμένες από το ενεργό κέντρο, δεν επηρέασαν την ενζυμική δράση, επηρέασαν όμως τη δομική υπόσταση και ακεραιότητα της πρωτεΐνης, προκαλώντας και σημαντική μείωση της θερμικής σταθερότητας.

Στις τρεις περιπτώσεις μη σημαντικών μεταλλάξεων που εξετάστηκαν (N46S, Q148R, A90V), οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες επέδειξαν την ίδια συμπεριφορά με την πρωτεΐνη αγρίου τύπου όσον αφορά τη θερμοκρασία αποδιάταξης.

Όσον αφορά τη δράση της σαπερόνης, στις περισσότερες περιπτώσεις έμεινε αναλλοίωτη ή μειώθηκε σε μικρό βαθμό. Παρατηρήθηκε ότι μεταλλάγματα που χάνουν κατά ένα μέρος ή ολοκληρωτικά την ενζυμική τους δραστηριότητα (M49L, F99A, Q61R, G53V) διατηρούν σε μεγάλο βαθμό ή αναλλοίωτη τη δραστηριότητα σαπερόνης. Τη μεγαλύτερη

μείωση δράσης σαπερόνης (20% περίπου) παρουσίασε η μετάλλαξη G53V. Η δράση σαπερόνης ενδεχομένως να οφείλεται στην ικανότητα της CypA να συνδέεται μη επιλεκτικά με μεγάλο πλήθος πρωτεϊνών κατά τη διαδικασία αναδίπλωσης και να υποβοηθά τη μετάβαση στην λειτουργική τους δομή, πιθανόν εξαρτώμενη από τα επιφανειακά κυρίως αμινοξέα που βρίσκονται στους βρόγχους που περιβάλλουν το ενεργό κέντρο.

Τέλος, η διαλυτότητα και η δυνατότητα έκφρασης της πρωτεΐνης δεν φαίνεται να είναι συνδεδεμένη με τα κρίσιμα για την κατάλυση αμινοξέα. Από τις μεταλλαγμένες πρωτεΐνες που μπόρεσαν να απομονωθούν, εκείνες που εμφάνισαν μεγάλη αποδιάταξη ή μειωμένη θερμική σταθερότητα παρουσίασαν κατά κανόνα πολύ μειωμένη διαλυτότητα και δυσκολία στην απομόνωση, με εξαίρεση το W118R.

Βιβλιογραφία

1. Branden, C., Tooze, J., (2006) “Εισαγωγή στη δομή των πρωτεϊνών”, Ελληνική έκδοση σελ. 132-135
2. Χριστοφορίδης, Η. (2013) Crystallographic analysis of structure and function of cyclophilin enzymes and study of inclusion compounds of natural products in cyclodextrins
3. Kallen., J., Walkinshaw, M., (1992) *The X-Ray structure of a tetrapeptide bound to the active site of human cyclophilin A*, FEBS, Vol. 300, 3, 286-290
4. Howard, B., Vajdos, F, Li, S., Sundquist, W., Hill, C., (2003) *Structural insights into the catalytic mechanism of cyclophilin A* , Nature Structural Biology, Vol. 10, 6, 475-481
5. Leone, V., Lattanzi., G., Molteni., C., Carloni. P., PLOS (2009) *Mechanism of Action of Cyclophilin A Explored by Metadynamics Simulations*. PLoS Comput Biol 5(3):
6. Lu. K.P, Finn G., Lee, T.H. & Nicholson L., (2007) *Prolyl cis-trans isomerization as a molecular switch*, Nature Chemical Biology 3, 619 - 629
7. Konno., M. , Ito, M. Hayano, T, Takahashi, N. (1996) *The Substrate-binding Site in Escherichia coli Cyclophilin A Preferably Recognizes a cis-proline Isomer or a Highly Distorted Form of the trans Isomer* J. Mol. Biol.256, 897–908
8. Eisenmesser, M., Bosco, D., Akke, M, Kern, D. (2002) *Enzyme Dynamics During Catalysis* Science 22, Vol. 295 no. 5559 pp. 1520-1523
9. Vajdos, F, Sangee Y.S., Housewear M., T. , Sundquist, W., Hill, C. (1997) *Crystal structure of cyclophilin A complexed with a binding site peptide from the HIV-1 capsid protein* Protein Science, 6:2297-2307.
10. Harding MW, Galat A, Uehling DE, Schreiber SL. (1989) *A receptor for the*

immunosuppressant FK506 is a cis-trans peptidyl-prolyl isomerase. Nature. 341:758–60

11. Kumari S., Suchismita Roy S., Singh P., Singla-Pareek S. L., Pareek A. (2013) *Cyclophilins Proteins in search of function* Plant Signaling & Behavior 8,1, e22734

12. Schreiber S. L. and Crabtree G. R. (1992) *The mechanism of action of cyclosporin A and FK506*. Immunol. Today 13 :136–142

13. Galat A., *Peptidylproline cis-trans-isomerases: immunophilins* (1993) European Journal of Biochemistry 216,689-707

14. Fischer, G., Bang, H. & Mech, C. (1984) *Detection of enzyme catalysis for cis-trans isomerization of peptide bonds using proline containing peptides as substrates*, Biomed. Biochim. Acta 43, 1101-1112.

15. Αλεξίου Σ. (2011) *Βιοχημικός χαρακτηρισμός των prolyl cis-trans ισομερασών στο Sinorhizobium meliloti* Μεταπτυχιακή διατριβή

16. Takahashi N, Hayano T, Suzuki M. (1989) *Peptidyl-Prolyl Cis-Trans Isomerase Is the Cyclosporin-a-Binding Protein Cyclophilin*. Nature. 337:473–475

17. Montague JW, Gaido ML, Frye C, Cidlowski JA. (1994) *A calcium-dependent nuclease from apoptotic rat thymocytes is homologous with cyclophilin. Recombinant cyclophilins A, B, and C have nuclease activity*. J Biol Chem 269:18877-80

18. Edwards K. J., David L. Ollis D. L., and Nicholas E. Dixon N.E., (1997) *Crystal Structure of Cytoplasmic Escherichia coli Peptidyl-prolyl Isomerase: Evidence for Decreased Mobility of Loops upon Complexation* Journal of Molecular Biology 271, 2: 258–265

19. Zhao Y., Ke H. (1996) *Mechanistic Implication of Crystal Structures of the Cyclophilin-Dipeptide Complexes* Biochemistry, Vol. 35, No. 23

20. Eisenmesser, M., Millet, O., Labeikovski, W., Korzhnev D. M., Wolf-Waltz M.,

Bosco, D., Skalicky J. J., Kay L., Kern, D. (2005) *Intrinsic dynamics of an enzyme underlies catalysis* Nature Letters Vol 438 117-121

21. Zhao Y., Ke H. (1996) *Crystal Structure Implies That Cyclophilin Predominantly Catalyzes the Trans to Cis Isomerization* Biochemistry 1996, 35, 7356-7361

22. Henzler-Wildman K., Kern D. (2007) *Dynamic personalities of proteins* Nature 450 964-972

23. Trzesniak D., Van Gunsteren W., (2006) *Catalytic mechanism of cyclophilin as observed in molecular dynamics simulations: Pathway prediction and reconciliation of X-ray crystallographic and NMR solution data* Protein Science, 15:2544–2551.

24. McGowan L.C., Hamelberg D. (2013) *Conformational Plasticity of an Enzyme during Catalysis: Intricate Coupling between Cyclophilin A Dynamics and Substrate Turnover* Biophysical Journal 104, 216-226

25. Agarwal P.K., Geist A., Gorin A (2004) *Protein Dynamics and Enzymatic Catalysis: Investigating the Peptidyl-Prolyl Cis-Trans Isomerization Activity of Cyclophilin A* Biochemistry 43, 33 10605-10618

26. Doshi U., McGowan L. C., Ladani S. T., Hamelberg D. (2012) *Resolving the complex role of enzyme conformational dynamics in catalytic function* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 109:5699–5704.

27. Yoo, S., Myszka D. G., Yeh C., McMurray M., Hill C., Sundquist W. (1997) *Molecular Recognition in the HIV-1 Capsid/Cyclophilin A Complex* J. Mol. Biol. 269, 780-795

28. Yoo, S., Vadjos, F., Houseweart M., Sundquist W, Hill C. (1997) *Crystal structure of cyclophilin A complexed with a binding site peptide from the HIV-1 capsid protein* Protein Science 6 2297-2307

29. Helekar S., Patrick J. (1997) *Peptidyl prolyl cis-trans isomerase activity of cyclophilin A in functional homo-oligomeric receptor expression* Proc. Natl. Acad. Sci.

USA 94Q 5432–5437

30. Fraser J., Clarkson M., Degnan S., Erion R., Kern D., Alber T. (2009) *Hidden alternative structures of proline isomerase essential for catalysis* Nature Letters 462, 669-674
31. Lang T., Ng H-L., Alber T. (2010, updated 2013) *Ringer Users Manual* Regents of the University of California
32. Huai Q., Kim H.Y., Liu Y., Zhao Y., Mondragon A., Liu, J. O., Ke H. (2002) *Crystal structure of calcineurin–cyclophilin–cyclosporin shows common but distinct recognition of immunophilin–drug complexes* Biochemistry, 33, 2761-2772
33. Konno. M. , Sano Y, Okudaira K., Kawaguchi Y., Yamagishi-Phmori Y., Fushinobu S., Matsuzawa H. (2004) *Escherichia coli cyclophilin B binds a highly distorted form of trans-prolyl peptide isomer* Eur. J. Biochem. 271, 3794–3803
34. Dimou M., Venieraki A., Liakopoulos G., Kouri E., D., Tampakaki A., Katinakis P. (2011) *Gene expression and biochemical characterization of Azotobacter vinelandii cyclophilins and protein interaction studies of the cytoplasmic isoform with dnaK and lpxH* Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology 20(3) 176-190
35. Kofron JL, Kuzmic P, Kishore V, Colon-Bonilla E, Rich DH. (1991) *Determination of kinetic constants for peptidyl prolyl cis-trans isomerases by an improved spectrophotometric assay.* Biochemistry 30 6127-6134
36. Carson, M., Johnoson, D.H., McDonald H., Bruillette C. Delucas L.J.(2007) *His-tag impact on structure* Acta Cryst.. D63, 295-301
37. Kim M., Yi E. C., Baker D., Zhang K.Y. J. (2001) *Post-translational modification of the N-terminal His tag interferes with the crystallization of the wild-type and mutant SH3 domains from chicken src tyrosine kinase* Acta Cryst. D 57, 759-762
38. Charbonneaul M., Meddeb-Mouelhit F., Beauregardl M. (2012) *N-terminal Purification Tag Alters Thermal Stability of the Carboxyl- esterase EstGtA2 from G.*

thermodenitrificans by Impairing Reversibility of Thermal Unfolding Protein & Peptide Letters 19, 264-269

39. Ericsson U.B. , Hallberg M. B., DeTitta G.T., Dekker N., Nordlund P., (2006) *Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies* Analytical Biochemistry 357 289–298

40. Dupeux F., Rower M., Seroul G., Blot D., Marquez J. A. (2011) *A thermal stability assay can help to estimate the crystallization likelihood of biological samples* Acta Cryst. . D67, 915–919

41. Lavinder J., Hari S.B., Sullivan J., Magliery J.Th. (2009) *High-throughput thermal scanning: a general, rapid dye-binding thermal shift screen for protein engineering* J Am Chem Soc. 131(11): 3794–3795

42. Johnson J. R., Savas J.C., Kartje Z., Hoops, G.C. (2014) *Rapid and Adaptable Measurement of Protein Thermal Stability by Differential Scanning Fluorimetry: Updating a Common Biochemical Laboratory Experiment* . Chem. Educ., 91 (7), pp 1077–1080

43. Teale F.W.J., Weber G. (1957) *Ultraviolet Fluorescence of the Aromatic Amino Acids* Biochemical Journal 65.3 : 476.

44. Held, P. (2003) *Peptide and Amino Acid Quantification Using UV Fluorescence in Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader* Biotek application notes

45. Boivin S, Kozak S, Meijers R. (2013) *Optimization of protein purification and characterization using Thermofluor screens*. Protein Expr Purif. 2013

46. Invitrogen Life Science, *Molecular Probes : The Handbook Detection of the Total-Protein Profile in Gels, on Blots, on Microarrays and in Capillary Electrophoresis* – Chapter 9, Section 9.3

47. Vedadi, M, Niesen F.H. Allali-Hassani A., Fedorov OY., Finerty P.J. Jr, Wasney G.A., Yeung R., Arrowsmith C., Ball L.J., Berglund H., Hui R., Marsden B.D.,

Nordlund P., Sundstorm M., Weigely L., Edwards A.M. (2006). *Chemical screening methods to identify ligands that promote protein stability, protein crystallization, and structure determination*. Proc Natl Acad Sci U S A 103, 15835-40

48. Marco Biasini, Stefan Bienert, Andrew Waterhouse, Konstantin Arnold, Gabriel Studer, Tobias Schmidt, Florian Kiefer, Tiziano Gallo Cassarino, Martino Bertoni, Lorenza Bordoli, Torsten Schwede. (2014). SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Research*;

49. Arnold K., Bordoli L., Kopp J., and Schwede T. (2006). *The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling*. Bioinformatics, 22,195-201.

50. Kiefer F, Arnold K, Künzli M, Bordoli L, Schwede T (2009). *The SWISS-MODEL Repository and associated resources*. *Nucleic Acids Research*. 37, D387-D392.

51. Guex, N., Peitsch, M.C., Schwede, T. (2009). *Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective*. Electrophoresis, 30(S1), S162-S173

52. Takeda, M.,Jee, J.,Ono, A.M.,Terauchi, T.,Kainosho, M. (2011) *Hydrogen exchange study on the hydroxyl groups of serine and threonine residues in proteins and structure refinement using NOE restraints with polar side-chain groups*. J AmChem Soc133(43):17420-7

53. Pace CN, Shirley BA, McNutt M, Gajiwala K. 1996. *Forces contributing to the conformational stability of proteins*. *FASEB J* 10:75–83.

54. Ramachandran, G.N., Ramakrishnan, C., Sasisekharan, V. (1963). *Stereochemistry of polypeptide chain configurations*. *Journal of Molecular Biology* 7: 95–9

55. T.H. Steinberg, H.M. White, V.L. Singer, (1997) *Optimal filter combinations for photographing SYPRO orange or SYPRO red dye-stained gels* Anal. Biochem., 248),

pp. 168–172

56. T.H. Steinberg, R.P. Haugland, V.L. Singer Anal. Biochem. (1996), *Applications of SYPRO orange and SYPRO red protein gel stains* Anal. Biochem., 239, 238–245
57. Henrichsen, J (1972). *Bacterial surface translocation: a survey and a classification* Bacteriological reviews 36 (4): 478–503.
58. Kearns D. B. (2010) *A field guide to bacterial swarming motility* Nat Rev Microbiol.8(9): 634–644.
59. Kruger N. J. (1994) *The Bradford Method for Protein Qualification Methods in Molecular Biology* 32 Basic Protein and Peptide Protocols
60. Bradford, M. (1976) *A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding* Analytical Biochemistry 72, 248-254
61. Rupp, B., J. Wang (2004). *Predictive models for protein crystallization*. Methods 34: 390–407
62. Scharnagl C., Reif M., Friedrich J.(2005) *Stability of proteins: Temperature, pressure and the role of the solvent* Biochimica et Biophysica Acta 1749, 187–213
63. Shoichet B. K., Baase W. A.,Kuroki R.,Mathhews B. (1994) *A relationship between protein stability and protein function* Biochemistry Vol.92 , 452-456
64. Teilum K., Olsen J. G., Kragelund B.B.(2011) *Protein stability, flexibility and function* Biochimica et Biophysica Acta 1814 969-976
65. Wang Chih-Chen, Tsou Chen-Lu (1998) *Enzymes as chaperones and chaperones as enzymes*, FEBS Letters, 425, 3, 382–384
66. Gilbert H. *Protein chaperones and protein folding* (1993) Current Opinion in Biotechnology 5:534-539

67. Yao., Q., Li M., Yang, H., Chai., H., Fisher, W., Chen, Ch. (2005) *Roles of Cyclophilins in Cancers and Other Organ Systems* World Journal of Surgery 29,3, 276-280
68. Nigro P., Pompilio G., Capogrossi M.C. (2013) *Cyclophilin A: a key player for human disease* Cell Death and Disease 4, e888; doi:10.1038/cddis.2013.410
69. O' Toole G., Kaplan H.B. Kol ter R. (2000) *Biofilm formation as microbial development* Annual Review of Microbiology 54,49-79
70. Bukhtiyarova M., Karpusas M., Northrop K., Namboodiri H. V. M., and Springman E. B (2007) *Mutagenesis of p38R MAP Kinase Establishes Key Roles of Phe169 in Function and Structural Dynamics and Reveals a Novel DFG-OUT State* Biochemistry 15, 46 (19):5687-96
71. Christoforides E. Dimou M., Katinakis P., Bethanis K., Karpusas M. (2012) *Structure of a bacterial cytoplasmic cyclophilin A in complex with a tetrapeptide* Acta Crystallographica Section F 68, 3, 259–264