ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

Φαρμακοχημεία-Φυσικά Προϊόντα: Σχεδιασμός, Σύνθεση και Ανάλυση Βιοδραστικών Ενώσεων

Διατριβή Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης

«Υπερέκφραση, απομόνωση και χαρακτηρισμός της εξωκυττάριας περιοχής ενός ιοντικού καναλιού ενεργοποιούμενου από τη δέσμευση ενός προσδέτη του βακτηρίου *Gloeobacter violaceus* της υπεροικογένειας των υποδοχέων Cys-θηλιάς»

Αργυρίου Αικατερίνη
Φαρμακοποιός

Πάτρα 2011

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

1. Αναπληρωτής Καθηγητής **Γεώργιος Α. Σπυρούλιας** (επιβλέπων)

Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

2. Επίκουρη Καθηγήτρια **Φωτεινή Λάμαρη**

Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

3. Επίκουρος Καθηγητής **Κωνσταντίνος Πουλάς**

Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Ευχαριστίες

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Τμήμα Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Πατρών από το Νοέμβριο του 2009 έως το Νοέμβριο του 2011, στα πλαίσια της απόκτησης του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στην κατεύθυνση «Φαρμακοχημεία-Φυσικά Προϊόντα: Σχεδιασμός, Σύνθεση και Ανάλυση Βιοδραστικών Ενώσεων».

Θα ήθελα να εκφράσω τις πιο θερμές ευχαριστίες στον επιβλέποντά μου, τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Γεώργιο Σπυρούλια, για την επιστημονική συμβουλή και τη συνεχή καθοδήγηση που μου προσέφερε όλο αυτό το χρονικό διάστημα. Τον ευχαριστώ ιδιαίτερα για την ευκαιρία και την εμπιστοσύνη που μου έδωσε να ασχοληθώ με ενδιαφέροντα επιστημονικά θέματα και να εκπαιδευτώ σε πολλές διαφορετικές τεχνικές στο ερευνητικό πεδίο μου.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Φωτεινή Λάμαρη και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Πουλά για τις πολύτιμες συμβουλές τους και την πολύ καλή συνεργασία μας σε εκπαιδευτικά και ερευνητικά θέματα.

Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω θερμές ευχαριστίες στον Dr. Detlef Betrop από το Τμήμα Φυσιολογίας ΙΙ του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου του Freiburg της Γερμανίας, ο οποίος συνέβαλλε στη διεξαγωγή του συνόλου των NMR πειραμάτων και παράλληλα στην άριστη συνεργασία και καθοδήγηση σε ερευνητικά θέματα.

Δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω το Μεταδιδάκτορα Χρήστο Χασάπη για τις γνώσεις και συμβουλές που μου προσέφερε. Παράλληλα θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου, Νίκο Δημητρόπουλο, Ζηνοβία Σπυράντη, Αριάδνη Λουτσίδου, Πέτρο Γκαζώνη, Γεώργιο Δάλκα, Μαριτίμη Βλάχου και Διονύση Βούρτση για το φιλικό κλίμα και τη συμπαράσταση του καθενός με τον τρόπο του όλο αυτό το διάστημα.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά τους γονείς και τον αδερφό μου για την αμέτρητη συμπαράσταση και ενθάρρυνση που μου προσέφεραν όλα αυτά τα χρόνια.

Περιεχόμενα

Α. Θεωρητικό Μέρος 1

Α.1. Υπεροικογένεια ιοντικών καναλιών που ενεργοποιούνται μετά από δέσμευση προσδέτη (LGIC) 3

Α.2. Πενταμερείς ιοντικοί δίαυλοι που ενεργοποιούνται με δέσμευση προσδέτη (pLGICs) 4

Α.3. Επαγόμενες δομικές αλλαγές κατά την πρόσδεση υποκαταστατών στα pLGICs 6

Α.4. Κρυσταλλική δομή ELIC 9

Α.5. Κρυσταλλική δομή της GLIC 12

Α.6. Διαμορφώσεις της GLIC 14

Α.7. X-ray δομές της GLIC προσδεδεμένης με γενικά αναισθητικά 17

Α.8. Σύγκριση των διαμορφώσεων GLIC και ELIC 20

Α.Β. ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΒΙΟΜΟΡΙΑΚΟΥ NMR 22

Α.Β.1. Χρήση του NMR για τον προσδιορισμό τριτοταγών δομών βιομορίων 22

Α.Β.2. Χρήση του NMR για το χαρακτηρισμό της δυναμικής φύσης βιομορίων 23

Α.Β.3. Μοριακό μέγεθος και NMR 23

Α.Β.4. Έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών για δομική μελέτη NMR 23

Α.Β.5. Ισοτοπική επισήμανση πρωτεϊνών με ενεργούς πυρήνες στη φασματοσκοπία NMR 24

Α.Β.6. Επιλεκτική Επισήμανση 25

Α.Β.6.i). ^{15}N-επιλεκτικά επισημασμένα αμινοξέα σε μη-επισημασμένο (^{14}N) υπόβαθρο 26

Α.Β.6.i).α. ^{15}N-επισημασμενα αμινοξέα Lys, Arg, Met, Pro, Cys, His, Asn 28

Α.Β.6.i).β. ^{15}N-επισήμανση αμινοξέων που εμφανίζονται σε ενδιάμεσα στάδια του βιοσυνθετικού μονοπατιού στα βακτηριακά κύτταρα με την αποφυγή της μη-επιλεκτικής επισήμανσης 29

A.B.6.i).α.a). Έκφραση της πρωτεΐνης σε πρωτοτροφικά κύτταρα με προσθήκη του ^{15}N-επισημασμένου αμινοξέος 29
A.B.6.i).α.b). Έκφραση της πρωτεΐνης σε αυξοτροφικά βακτηριακά κύτταρα με προσθήκη περίσσειας μη-επισημασμένων αμινοξέων 30
A.B.6.ii). Επιλεκτική αντίστροφη επισήμανση αμινοξέων σε ^{15}N υπόβαθρο 30

Β. Σκοπός Εργασίας 33

Γ. Υλικά και Μέθοδοι 37

Γ.1. Υλικά 39
Γ.1.1. Εργαστηριακός Εξοπλισμός 39
Γ.1.2. Αναλώσιμα 40
Γ.1.3. Αντιδραστήρια 40
Γ.1.4. Επισημασμένα μέσα 41
Γ.1.5. Επισημασμένα αμινοξέα 42
Γ.1.6. Μη-επισημασμένα ^{14}N-αμινοξέα 42
Γ.1.7. Θρεπτικά Υλικά 43
Γ.1.8. Διαλύματα 43
Γ.1.9. Πλασμιδιακός φορέας κλωνοποίησης (cloning vector) και κυτταρικά στελέχη *Escherichia coli* που χρησιμοποιήθηκαν 45
Γ.2. Μέθοδοι 46
Γ.2.1. Υγρές και στερεές καλλιέργειες βακτηρίων 46
Γ.2.2. Εισαγωγή πλασμιδίου σε κύτταρα E.coli (μετασχηματισμός) 47
Γ.2.3. Πρωτεϊνική έκφραση 48
Γ.2.3.i). Διερεύνηση των συνθηκών έκφρασης μέσω μικρής κλίμακας καλλιέργειας 48
Γ.2.3.ii). Έκφραση της πρωτεΐνης μέσω των πρωτοτροφικών κυττάρων BL21(DE3) 49
Γ.2.3.iii). Έκφραση της πρωτεΐνης μέσω των αυξοτροφικών κυττάρων DL39(DE3) 50
Γ.2.3.iv). Το συστημα έκφρασης pET 51

Γ.2.4. Απομόνωση της πρωτεΐνης 53
Γ.2.4.i). Χρωματογραφία συγγένειας 53
Γ.2.4.ii). Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού 53
Γ.2.4.iii). Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής 54
Γ.2.5. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου σε αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE electrophoresis) 55

Δ. Πειραματικό Μέρος 59

Δ.1. Μετασχηματισμός των βακτηριακών κυττάρων E.coli BL21(DE3) και των κυττάρων DL39(DE3) με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pET20b(+) 61
Δ.2. Εύρεση των βέλτιστων συνθηκών έκφρασης της πρωτεΐνης $GLIC_{ΕΚΠ}$ 61
Δ.2.1. Ανάπτυξη προκαλλιέργειας 61
Δ.2.2. Δημιουργία stock γλυκερόλης 62
Δ.2.3. Ανάπτυξη υγρής καλλιέργειας ελαχίστων μέσων για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών έκφρασης της πρωτεΐνης 62
Δ.3. Υγρή καλλιέργεια για την έκφραση της $GLIC_{ΕΚΠ}$ 63
Δ.3.1. Προκαλλιέργεια 63
Δ.3.2. Υγρή καλλιέργεια σε θρεπτικό υλικό ελαχίστων μέσων (minimal media, M95X) 63
Δ.3.3. Συλλογή των κυττάρων 64
Δ.3.4. Λύση των βακτηριακών κυττάρων μέσω υπερήχων 64
Δ.4. Απομόνωση της πρωτεΐνης $GLIC_{ΕΚΠ}$ 64
Δ.4.1. Απομόνωση της πρωτεΐνης $GLIC_{ΕΚΠ}$ με χρωματογραφία συγγένειας 64
Δ.4.2. Απομόνωση της πρωτεΐνης $GLIC_{ΕΚΠ}$ με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού 66
Δ.4.3. Απομόνωση της πρωτεΐνης $GLIC_{ΕΚΠ}$ με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής 66
Δ.5. Ποσοτικός προσδιορισμός της $GLIC_{ΕΚΠ}$ – Προετοιμασία NMR – δείγματος 67

Δ.6. Έκφραση και απομόνωση της επισημασμένης ^{15}N ή/και ^{13}C ή/και ^{2}H πρωτεΐνης $GLIC_{ΕΚΠ}$ 68
Δ.7. Επιλεκτική αντίστροφη επισήμανση της αργινίνης (Arg) σε ^{15}N υπόβαθρο 69
Δ.8. Επιλεκτική αντίστροφη επισήμανση της λυσίνης (Lys) σε ^{15}N υπόβαθρο και επιλεκτική ^{15}N-επισήμανση λυσίνης 69
Δ.9. Επιλεκτική ^{15}N-επισήμανση ιστιδίνης (His) και ασπαραγίνης (Asn) 69
Δ.10. Εφαρμογή επιλεκτικής ^{15}N-επισήμανσης και αντίστροφης επισήμανσης της λευκίνης (Leu) 70
Δ.10.1. Επιλεκτική αντίστροφη επισήμανση της λευκίνης (Leu) σε ^{15}N υπόβαθρο 70
Δ.10.2. Επιλεκτική ^{15}N-επισήμανση της λευκίνης (^{15}N-Leu) 70
Δ.10.3. Έκφραση της πρωτεΐνης σε κύτταρα BL21(DE3) με προσθήκη ^{15}N-Leu και ^{14}N-Val, ^{14}N-Ile 70
Δ.10.4. Έκφραση της πρωτεΐνης-$GLIC_{ΕΚΠ}$ σε κύτταρα DL39(DE3) με προσθήκη ^{15}N-Leu 71
Δ.11. Εφαρμογή επιλεκτικής ^{15}N-επισήμανσης και αντίστροφης επισήμανσης της βαλίνης (Val) 72
Δ.11.1. Επιλεκτική αντίστροφη επισήμανση της βαλίνης (Val) σε ^{15}N υπόβαθρο 72
Δ.11.2. Έκφραση της πρωτεΐνης σε κύτταρα BL21(DE3) με προσθήκη ^{15}N-Val και ^{14}N-Leu, ^{14}N-Ile 72
Δ.12. Έκφραση της πρωτεΐνης σε κύτταρα BL21(DE3) με προσθήκη ^{15}N-Ile και ^{14}N-Leu, ^{14}N- Val 72
Δ.13. Εφαρμογή επιλεκτικής ^{15}N-επισήμανσης της φαινυλαλανίνης (Phe) / αλανίνης (Ala) 73
Δ.13.1 Επιλεκτική αντίστροφη επισήμανση της φαινυλαλανίνης (Phe)/αλανίνης (Ala) σε ^{15}N υπόβαθρο 73
Δ.13.2. Έκφραση της πρωτεΐνης-$GLIC_{ΕΚΠ}$ σε κύτταρα DL39(DE3) με προσθήκη ^{15}N-Phe 73
Δ.13.3. Έκφραση της πρωτεΐνης-$GLIC_{ΕΚΠ}$ σε κύτταρα DL39(DE3) με προσθήκη ^{15}N-Ala 73

Δ.14. Έκφραση της πρωτεΐνης-$GLIC_{ΕΚΠ}$ σε κύτταρα DL39(DE3) με προσθήκη ^{15}N-Tyr 74
Δ.15. Έκφραση της πρωτεΐνης-$GLIC_{ΕΚΠ}$ σε κύτταρα DL39(DE3) με προσθήκη ^{15}N-Glu 74
Δ.16. Έκφραση της πρωτεΐνης-$GLIC_{ΕΚΠ}$ σε κύτταρα DL39(DE3) με προσθήκη ^{15}N-Asp 74

Ε. Αποτελέσματα 77

Ε.1. Έκφραση και απομόνωση της πρωτεΐνης $GLIC_{ΕΚΠ}$ 79
Ε.2. Έκφραση της ^{15}N-πρωτεΐνης, της ^{15}N, ^{13}C-πρωτεΐνης και της ^{2}H, ^{15}N, ^{13}C-πρωτεΐνης 80
Ε.3. ^{15}N-επιλεκτική επισήμανση αμινοξέων 84
Ε.3.1. Επιλεκτική αντίστροφη επισήμανση της αργινίνης (Arg) σε ^{15}N υπόβαθρο 85
Ε.3.2. Επιλεκτική αντίστροφη επισήμανση της λυσίνης (Lys) σε ^{15}N υπόβαθρο και επιλεκτική ^{15}N-επισήμανση λυσίνης 85
Ε.3.3. Επιλεκτική αντίστροφη επισήμανση ιστιδίνης (His) και ασπαραγίνης (Asn) 87
Ε.3.4. Επιλεκτική ^{15}N-επισήμανση και επιλεκτική αντίστροφη επισήμανση της λευκίνης (Leu) 89
Ε.3.5. Επιλεκτική ^{15}N-επισήμανση και αντίστροφη επισήμανση της βαλίνης 91
Ε.3.6. Επιλεκτική ^{15}N-επισήμανση της $GLIC_{ΕΚΠ}$ με ^{15}N-Ile 92
Ε.3.7. Επιλεκτική αντίστροφη επισήμανση και επιλεκτική ^{15}N-επισήμανση της φαινυλαλανίνης (Phe)/ αλανίνης (Ala) 93
Ε.3.8. Επιλεκτική ^{15}N-επισήμανση της τυροσίνης 95
Ε.3.9. Επιλεκτική ^{15}N-επισήμανση του γλουταμινικού οξέος και του ασπαραγινικού οξέος 96
Ε.4. Λήψη NMR φασμάτων μετά την αύξηση της θερμοκρασίας του πρωτεϊνικού δείγματος 98
Ε.5. Ανάλυση κυκλικού διχρωισμού της $GLIC_{ΕΚΠ}$ 100

ΣΤ. Συζήτηση 101

Η. Βιβλιογραφία 117

Θ. Παράρτημα 125

Θ.1. Ταυτοποίηση των κορυφών του φάσματος ^{1}H-^{15}N HSQC στα 700MHz της $GLIC_{ΕΚΠ}$ 127

Θ.2. Συντμήσεις 143

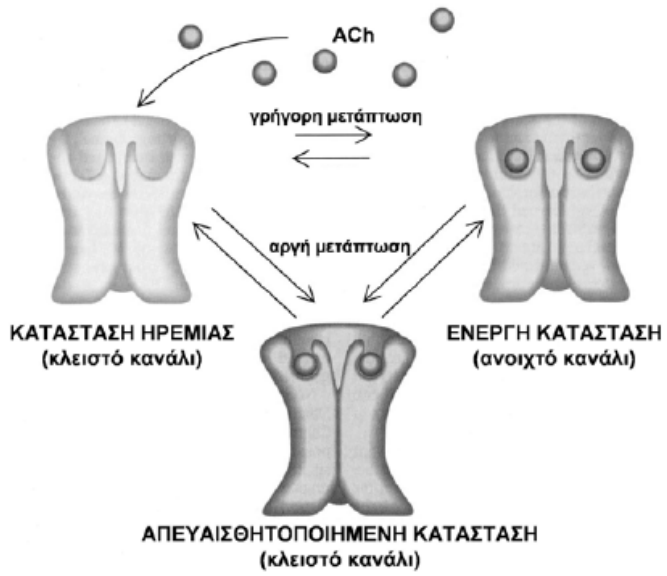
Θ.3. Δημοσίευση 145

Ενότητα Α

Θεωρητικό Μέρος

Α.1. Υπεροικογένεια ιοντικών καναλιών που ενεργοποιούνται μετά από δέσμευση προσδέτη (LGIC)

Τα ιοντικά κανάλια[1, 2] που ενεργοποιούνται μετά από δέσμευση ενός προσδέτη (ligand-gated ion channels – LGIC)[3] αποτελούν τη σημαντικότερη υπεροικογένεια υποδοχέων με λειτουργία διαύλων ιόντων. Πρόκειται για διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που ενεργοποιούνται από εξωκυττάριους ή ενδοκυττάριους προσδέτες, κυρίως νευροδιαβιβαστές και είναι υπεύθυνοι για τη γρήγορη διέγερση και αναστολή στη νευροδιαβίβαση. Χαρακτηριστικές ιδιότητες αυτής της κατηγορίας ιοντικών καναλιών είναι η ενεργοποίησή τους μετά από δέσμευση ειδικών προσδετών, η μεταφορά ιόντων διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης[4] καθώς επίσης και η εκλεκτικότητα ως προς τα ιόντα που μεταφέρουν (θετικά ή αρνητικά, μονοσθενή ή δισθενή). Αποτελούνται από ένα ενδοκυττάριο (C-τελικό) τμήμα, τις διαμεμβρανικές έλικες και μια εξωκυττάρια περιοχή (ΕΚΠ, N-τελικό άκρο). Εμφανίζονται με τη μορφή ολιγομερών ορισμένων υπομονάδων και υφίστανται σε τρεις λειτουργικές καταστάσεις[5]: Ο υποδοχέας μπορεί να βρίσκεται σε κατάσταση ηρεμίας απουσία προσδέτη (κλειστός δίαυλος), να είναι ενεργοποιημένος μετά από δέσμευση προσδέτη (ανοιχτός δίαυλος) ή να είναι απευαισθητοποιημένος μετά από συνεχή διέγερση από αγωνιστή[6].



Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση των αλλοστερικών καταστάσεων του nAChR.[6]

Με βάση τη δομή των υπομονάδων και τα σύμπλοκα που δημιουργούν, μπορούν να διαχωριστούν σε τρεις μεγάλες υπομονάδες:

Α. Υπομονάδες του τύπου Cys-θηλιάς (Cys-loop receptors)[7-10], οι οποίες είναι πενταμερή ιοντικά κανάλια (pentameric ligand-gated ion channel – pLGICs) που ενεργοποιούνται από δέσμευση ενός προσδέτη. Υπομονάδες των μελών της οικογένειας αυτής αποτελούνται από τέσσερις διαμεμβρανικές (ΔΜ) έλικες και μια χαρακτηριστική Cys-θηλιά στην Ν-τελική εξωκυττάρια περιοχή (ΕΚΠ).

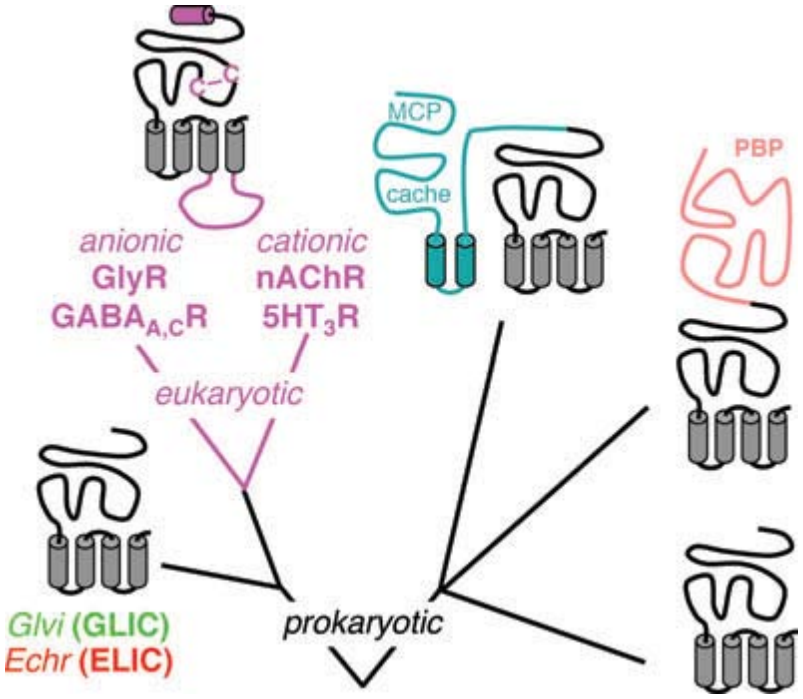
Β. Υπομονάδες των υποδοχέων NMDA (N-methyl-D-asparate)[11], AMPA (α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor)[12]. Πρόκειται για τύπους υποδοχέων, οι οποίοι περιλαμβάνουν τρεις διαμεμβρανικές (ΔΜ) έλικες και σχηματίζουν ένα κανάλι κατιόντων.

Γ. Υπομονάδες των υποδοχέων όπως οι υποδοχείς P2X (ATP-gated ion channels)[13], οι οποίες περιλαμβάνουν δύο διαμεμβρανικές περιοχές (ΔΜ).

Α.2. Πενταμερείς ιοντικοί δίαυλοι που ενεργοποιούνται με δέσμευση προσδέτη (pLGICs)

Οι πενταμερείς ιοντικοί δίαυλοι Cys-θηλιάς, οι οποίοι ενεργοποιούνται με δέσμευση προσδέτη (pentameric ligand-gated ion channels – pLGICs)[14-17] αποτελούν μια σημαντική κατηγορία υποδοχέων που μεσολαβούν στα αρχικά στάδια της κυτταρικής επικοινωνίας. Η οικογένεια αυτή των pLGICs περιλαμβάνει υποδοχείς των ευκαρυωτικών οργανισμών όπως οι νικοτινικοί υποδοχείς της ακετυλοχολίνης (nAChRs)[8, 16, 18, 19], υποδοχείς του γ-αμινοβουτυρικού οξέος τύπου Α και C ($GABA_A$ και $GABA_C$)[20], της γλυκίνης[21] και της σεροτονίνης (5HT-3)[22]. Παρόμοιοι τύποι υποδοχέων εμφανίζονται και σε προκαρυωτικούς οργανισμούς[23], όπως ο Erwinia ligand-gated ion channel[24] (ELIC), από το βακτήριο *Erwinia chrysanthemi* και ο Gloeobacter ligand-gated ion channel[25, 26] (GLIC) από το βακτήριο *Gloeobacter violaceus*[27]. Οι υποδοχείς Cys-θηλιάς αποτελούν κύριους θεραπευτικούς στόχους[28],

συμπεριλαμβανομένης της αναισθησίας και της μυοχαλάρωσης, καθώς επίσης και στόχος της δράσης των εντομοκτόνων. Ταυτόχρονα αποτελούν στόχους μιας σειράς φαρμάκων που θεραπεύουν νευρολογικές διαταραχές όπως Alzheimer[29], άγχος, επιληψία, μάθηση, έλλειψη προσοχής και τον εθισμό στα φάρμακα[30].



Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση του φυλογενετικού δέντρου της οικογένειας pLGICs.[23]

Οι υποδοχείς pLGICs είναι διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες που συγκροτούνται από πέντε όμοιες ή ομόλογες υπομονάδες[31, 32], οι οποίες διατάσσονται περιμετρικά ενός κεντρικού υδατο-πληρούμενου πόρου[10] στην κυτταρική μεμβράνη. Κάθε υπομονάδα αυτών των ιοντικών καναλιών αποτελείται από μια Ν-τελική εξωκυττάρια περιοχή, ΕΚΠ (μήκους περίπου 210 αμινοξικών καταλοίπων στην περίπτωση των υποδοχέων τύπου nAChRs), από τέσσερις διαμεμβρανικές (ΔΜ) α-έλικες (Μ1-Μ4) και από μια κυτταροπλασματική περιοχή (ΚΠ) μεταξύ της Μ3 και Μ4 έλικας με ποικιλία σε αλληλουχία και μέγεθος[33, 34]. Στην Ν-τελική εξωκυττάρια περιοχή (ΕΚΠ) κάθε υπομονάδας βρίσκεται η χαρακτηριστική θηλιά 13 αμινοξέων μεταξύ δύο συντηρημένων καταλοίπων κυστεΐνης (Cys) συνδεδεμένων με δισουλφιδικό δεσμό, σχηματίζοντας μια κλειστή θηλιά που

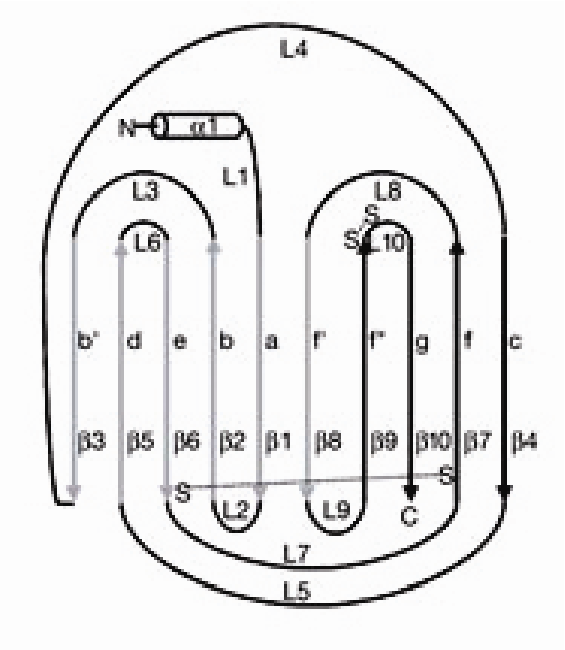
βρίσκεται μεταξύ περιοχών δέσμευσης προσδέτη και τμημάτων του καναλιού. Για το λόγο αυτό, οι συγκεκριμένοι ιοντικοί δίαυλοι ονομάζονται επίσης υποδοχείς Cys-θηλιάς (Cys-loop receptors).

Συνδυασμός διαφορετικών τύπων υπομονάδων με σκοπό το σχηματισμό ετερο-πενταμερών, παρέχει ένα πλούτο λειτουργικής ποικιλομορφίας που καλύπτει ένα μεγάλο εύρος αναγκών[35]. Επειδή οι διαφορετικοί υποδοχείς-μέλη της υπεροικογένειας εμφανίζουν κοινά δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά, υποστηρίζεται ότι τα γονίδια που κωδικοποιούν τις ομόλογες υπομονάδες προέρχονται εξελικτικά από το ίδιο αρχέγονο γονίδιο[14, 15]. Ανάλογα με την τοπολογία και τα φαρμακολογικά χαρακτηριστικά του κάθε υποδοχέα, οι υποδοχείς αυτοί χωρίζονται σε κατηγορίες. Κάθε οικογένεια των υποδοχέων είναι επιλεκτική είτε για κατιόντα είτε για ανιόντα και η ενεργοποίησή τους μπορεί να είναι διεγερτική ή ανασταλτική ανάλογα με τη κατανομή των ιόντων και στις δύο πλευρές της μεμβράνης και το δυναμικό της μεμβράνης των κυττάρων. Η μεταγωγή του σήματος στους υποδοχείς της οικογένειας Cys-θηλιάς πραγματοποιείται μέσω της δέσμευσης του νευροδιαβιβαστή και τη μεταφορά των ιόντων διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης, ενώ οι υποδοχείς αυτοί εμφανίζουν εκλεκτικότητα ως προς τα ιόντα που μεταφέρουν.

Α.3. Επαγόμενες δομικές αλλαγές κατά την πρόσδεση υποκαταστατών στα pLGICs

Τα πενταμερή ιοντικά κανάλια (pLGICs) αποτελούν μια οικογένεια μεμβρανικών πρωτεϊνών και εμφανίζουν μια «κλειστή» και μια «ανοιχτή» διαμόρφωση που σχετίζεται με την ιοντική αγωγιμότητα του καναλιού. Η μετατροπή αυτή προκαλείται ως απάντηση στην αύξηση ή τη μείωση της συγγένειας δέσμευσης για συγκεκριμένους προσδέτες. Αρκετά μέλη της οικογένειας, συμπεριλαμβανομένου του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη μεταγωγή σήματος στις συνάψεις των νευρώνων. Ο μηχανισμός με τον οποίο το

κανάλι μεταβαίνει από τη μία διαμόρφωση στην άλλη δεν είναι πλήρως κατανοητός παρά τις προσπάθειες που έχουν πραγματοποιηθεί. Ωστόσο, έχει πραγματοποιηθεί σύγκριση των κρυσταλλογραφικών δομών των συμπλόκων AChBPs-αγωνιστές με την απο-μορφή (απουσία προσδέτη) της πρωτεΐνης AChBP[2, 36, 37], η οποία ανέδειξε σημαντικές ανακατατάξεις στην AChBP κατά την πρόσδεση των αγωνιστών. Η AChBP είναι μια πενταμερής υδατοδιαλυτή πρωτεΐνη που απομονώθηκε για πρώτη φορά από κύτταρα γλοίας του γαστερόποδου μαλακίου Lymnaea stagnalis. Το ώριμο μόριο της AChBP έχει μήκος 210 αμινοξέα και παρουσιάζει ικανοποιητική ομολογία με τις Ν-τελικές ΕΚΠ των υπομονάδων (μεγαλύτερη με τις α υπομονάδες) των πενταμερών υποδοχέων της LGIC υπερ-οικογένειας. Οι αλλαγές, οι οποίες προέκυψαν στην AChBP κατά την πρόσδεση των αγωνιστών, πιθανόν να προκαλούν τη διάνοιξη του ιοντικού καναλιού στην περίπτωση της AChBP. Οι περιοχές πρόσδεσης βρίσκονται στις διεπιφάνειες των γειτονικών ΕΚΠ των υπομονάδων[38].

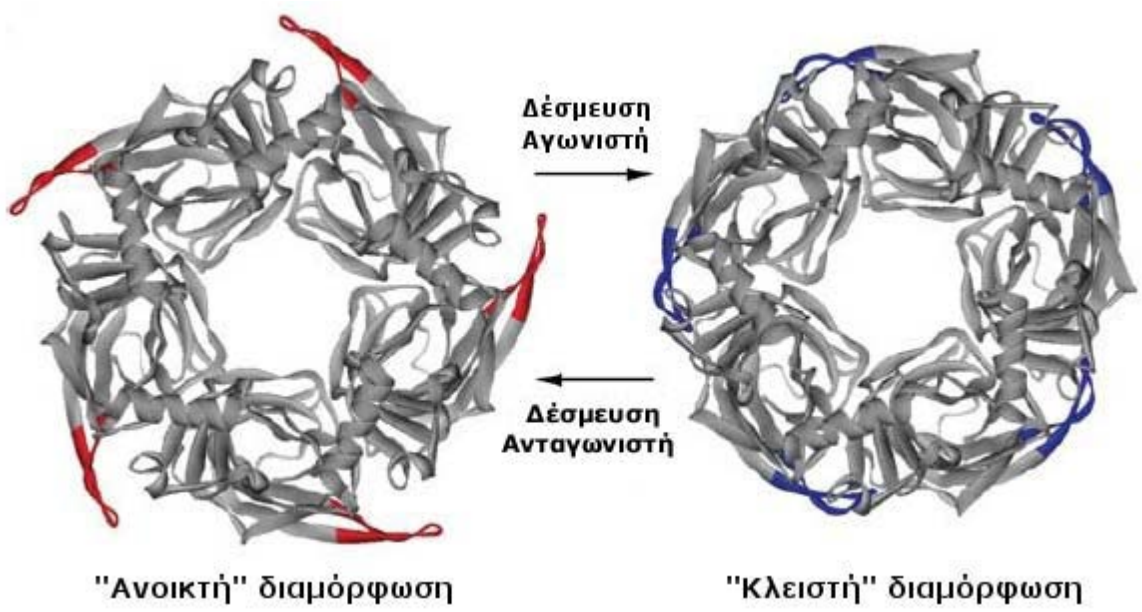


Εικόνα 3: Τοπολογικό διάγραμμα του μονομερούς μορίου AChBP. *Ν: αμινο-τελικό άκρο, α1: α-έλικα, β1-β10: πτυχωτά φύλλα, L1-10: θηλιές ακανόνιστης δομής, S-S: δισουλφιδικοί δεσμοί, C: καρβοξυ-τελικό άκρο.* [2]

Η πρόσδεση των αγωνιστών οδηγεί σε σημαντική μετακίνηση της θηλιάς C της κύριας πλευράς της θέσης πρόσδεσης, ώστε να «κλείνει» την είσοδο της υδρόφοβης κοιλότητας και να περιβάλλει τα μόρια των αγωνιστών.

Στην «ανοιχτή» διαμόρφωση, απουσία αγωνιστών, η συντηρημένη Tyr185 της θηλιάς C (αντιστοιχεί στην Tyr190 στην α1 υπομονάδα του μυϊκού τύπου nAChR) βρίσκεται σε απόσταση 8 Å από τη συντηρημένη Lys139 (Lys145 στην α1 υπομονάδα) του β7-πτυχωτού φύλλου, η οποία σχηματίζει μια γέφυρα άλατος με το συντηρημένο Asp194 (Asp200 στην α1 υπομονάδα) του β10-πτυχωτού φύλλου. Στα σύμπλοκα AChBP-αγωνιστές, η θηλιά C μετατοπίζεται με αποτέλεσμα η Tyr185 να βρίσκεται σε απόσταση 2-3 Å με τη Lys139, ενώ η γέφυρα άλατος με το Asp194 εξαφανίζεται. Έχει βρεθεί ότι μεταλλάξεις σε οποιοδήποτε από αυτά τα τρία αμινοξικά κατάλοιπα εμποδίζουν το άνοιγμα του καναλιού[39]. Συμπερασματικά, κατά την πρόσδεση αγωνιστών, η θηλιά C, η οποία βρίσκεται στη θέση πρόσδεσης, μετακινείται με τέτοιο τρόπο, ώστε να ευνοεί την ανάπτυξη ενός δεσμού υδρογόνου μεταξύ δύο συντηρημένων καταλοίπων Tyr και Lys, σταθεροποιώντας τη θηλιά C στη νέα διαμόρφωση.

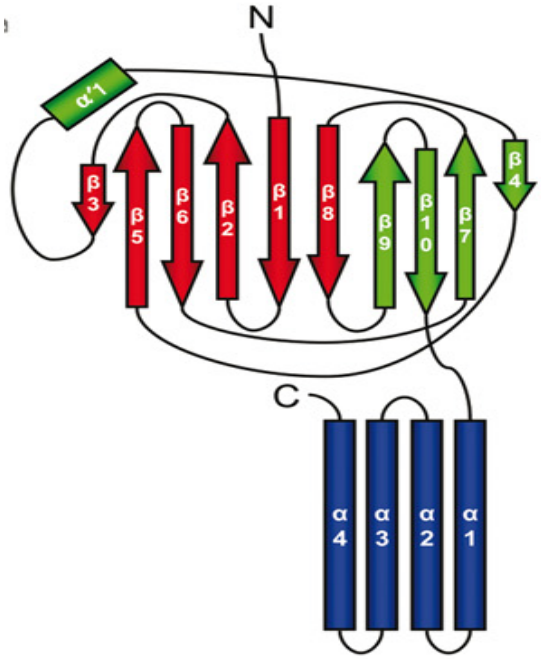
Όλες οι διαθέσιμες μέχρι στιγμής κρυσταλλογραφικές δομές διαφόρων AChBPs μπορούν να χωριστούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες, ανάλογα με τη διευθέτηση της θηλιάς C: «ανοιχτή» ή «κλειστή» (Εικόνα 3). Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει τις δομές της απο-μορφής της A-AChBP[2] (AChBP από *Aplysia californica*[40]) καθώς και τις δομές των συμπλόκων των AChBP με ανταγωνιστές[41] (α-Cbtx[42], α-Ctx-PnlA-διπλό μετάλλαγμα[43], α-Ctx ImI και MLA), αντιπροσωπεύοντας την κατάσταση ηρεμίας των nAChRs. Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει τις δομές των συμπλόκων της A-AChBP και της L-AChBP[44] (AChBP από *Lymnaea stagnalis*) με αγωνιστές (L-AChBP/νικοτίνη, L-AChBP/καρβαμυλοχολίνη[45], A-AChBP/λομπελίνη και A-AChBP/επιβατιδίνη) ή με μόρια που προσομοιάζουν κατιονικούς αγωνιστές (L-AChBP/HEPES, A-AChBP-HEPES) και αντιπροσωπεύει την ενεργή κατάσταση των nAChRs. Μεταξύ των δομών των δύο αυτών κατηγοριών, η θηλιά C μετατοπίζεται μέχρι και 11Å, όπως παρατηρήθηκε μετά από σύγκριση των δύο ακραίων καταστάσεων (σύμπλοκα A-AChBP/α-Ctx ImI και A-AChBP/επιβατιδίνη)[46]. Εκτός από τη μετατατόπιση της θηλιάς C, παρατηρούνται επίσης σημαντικές μετακινήσεις των θηλιών β1-β2, β8-β9 και της Cys-θηλιάς κατά την πρόσδεση αγωνιστών[47].



Εικόνα 4: «Ανοιχτή» και «κλειστή» διαμόρφωση της δομής της AChBP. Η θηλιά C σημειώνεται με κόκκινο ή μπλε χρώμα, αντίστοιχα.[2]

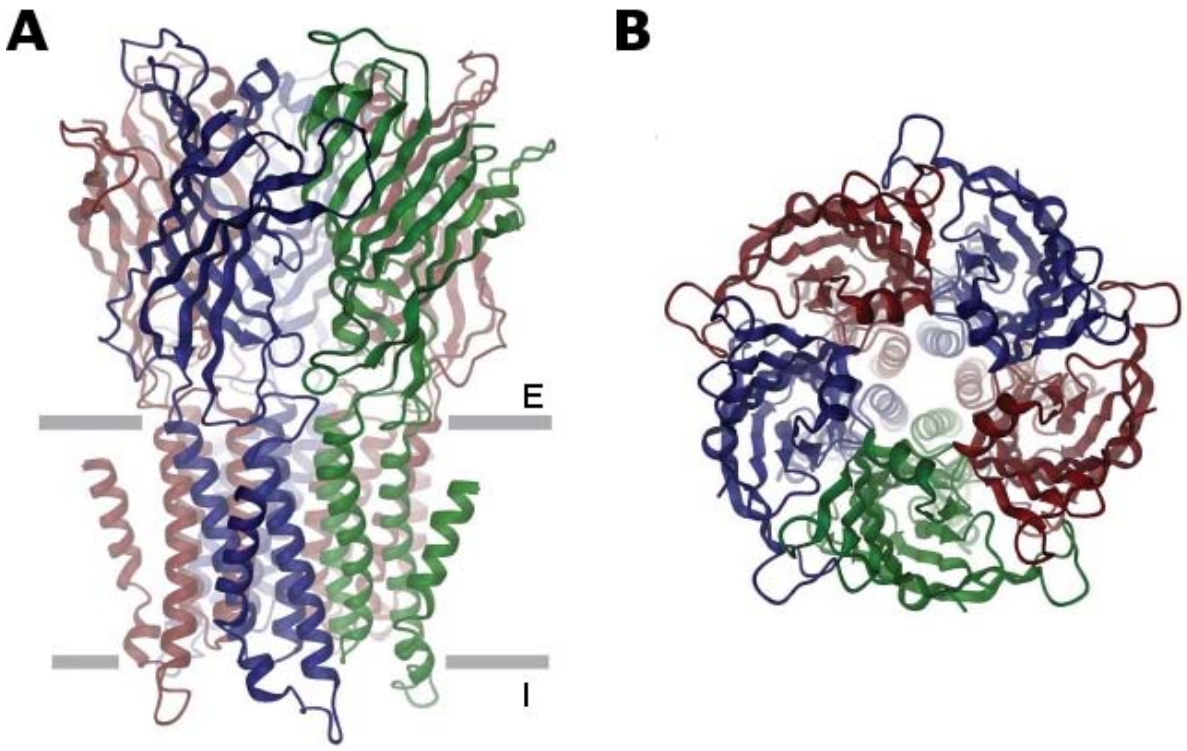
Α.4. Κρυσταλλική δομή ELIC

Έχει προσδιοριστεί η ύπαρξη νουκλεοτιδικών αλληλουχιών σε βακτηριακά γονιδιώματα, οι οποίες κωδικοποιούν 15 πιθανούς ομόλογους υποδοχείς της υπεροικογένειας των ευκαρυωτικών LGIC[48]. Η πρώτη δομή ενός pLGIC σε υψηλή ανάλυση που παρέχει ένα μοντέλο για τη μελέτη του μηχανισμού της μεταφοράς ιόντων μέσα από το δίαυλο των υποδοχέων αυτής της οικογένειας είναι η ELIC. Η επίλυση της δομής της ELIC, ενός προκαρυωτικού LGIC από το βακτήριο *Erwinia chrysanthemi,* με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ, σε ανάλυση 3,3 Å και με pH 6,5[26] πραγματοποιήθηκε πρόσφατα. Η δομή της ELIC (εικόνες 5 και 6), η οποία αντιπροσωπεύει την κλειστή διαμόρφωση του καναλιού, δηλαδή τη μη-αγώγιμη μορφή του καναλιού, επιβεβαίωσε το προτεινόμενο μοντέλο για τη δομή των προκαρυωτικών pLGICs.



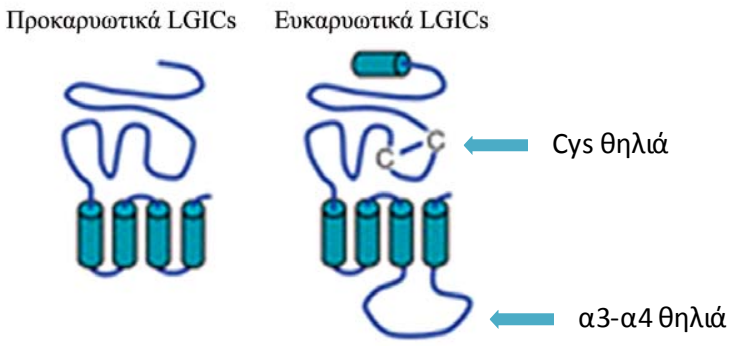
Εικόνα 5 : Τοπολογικό διάγραμμα της ELIC.[1]

Η πρωτεΐνη αυτή είναι ένα πενταμερές ιοντικό κανάλι που θεωρείται πρόγονος των nAChRs. Η επίλυση της δομής της αποκάλυψε τη μεγάλη ομοιότητα της δομής της εξωκυττάριας περιοχής της ($ELIC_{ΕΚΠ}$) με τη δομή της AChBP και με τις ΕΚΠ των υπομονάδων της *Torpedo* nAChR, με εξαίρεση την έλλειψη της N-τελικής α-έλικας και της Cys-θηλιάς[26]. Επίσης, η διαμεμβρανική περιοχή της πρωτεΐνης αυτής βρέθηκε ότι είναι παρόμοια με την αντίστοιχη των υπομονάδων του *Torpedo* nAChR, καθώς αποτελείται από τέσσερις α-έλικες (α1-α4) κατ' αντιστοιχία με τις M1-M4[49] διαμεμβρανικές περιοχές του nAChR. Οι α2-έλικες των διαμεμβρανικών περιοχών και των πέντε υπομονάδων της ELIC[50] σχηματίζουν έναν εσωτερικό κύκλο, που ορίζει την περίμετρο του καναλιού και ο οποίος περιβάλλεται και προστατεύεται από το υδρόφοβο περιβάλλον, ενώ ο εξωτερικός κύκλος σχηματίζεται από τις έλικες α1 και α3. Συγκρίνοντας τη δομή της ELIC με των ευκαρυωτικών LGICs, η ύπαρξη υδρόφοβου περιβάλλοντος στο κέντρο της μεμβράνης είναι συντηρημένη καθώς και η ύπαρξη αρνητικά φορτισμένων αμινοξικών καταλοίπων στην περιφέρεια του καναλιού, τα οποία προσδίδουν ιοντική επιλεκτικότητα[51]. Όμως η διάμετρος του ιοντικού πόρου της ELIC είναι μικρότερη από αυτή του nAChR, δημιουργώντας με αυτό τον τρόπο την κλειστή διαμόρφωση του καναλιού.



Εικόνα 6: Α Πλάγια όψη και **Β** κάτοψη της δομής της ELIC. E = εξωκυττάριος χώρος, I = ενδοκυττάριος χώρος.[24]

Ιδιαίτερα σημαντική είναι η έλλειψη της α3-α4 θηλιάς[1, 26] στα προκαρυωτικά LGICs, η οποία εμφανίστηκε κατά τη διάρκεια της εξέλιξης στα ευκαρυωτικά LGICs ώστε να εξυπηρετήσει συγκεκριμένες διεργασίες[52]. Για παράδειγμα στην περίπτωση των nAChR συνεισφέρει στη μεγαλύτερη επιλεκτικότητα σε διαπερατά ιόντα καθώς και στη σύνδεσή του υποδοχέα με την κυτταροπλασματική πρωτεΐνη Rapsyn, με την οποία επιτυγχάνεται η συνάθροιση του υποδοχέα σε διάφορα σημεία της κυτταρικής μεμβράνης[53, 54].

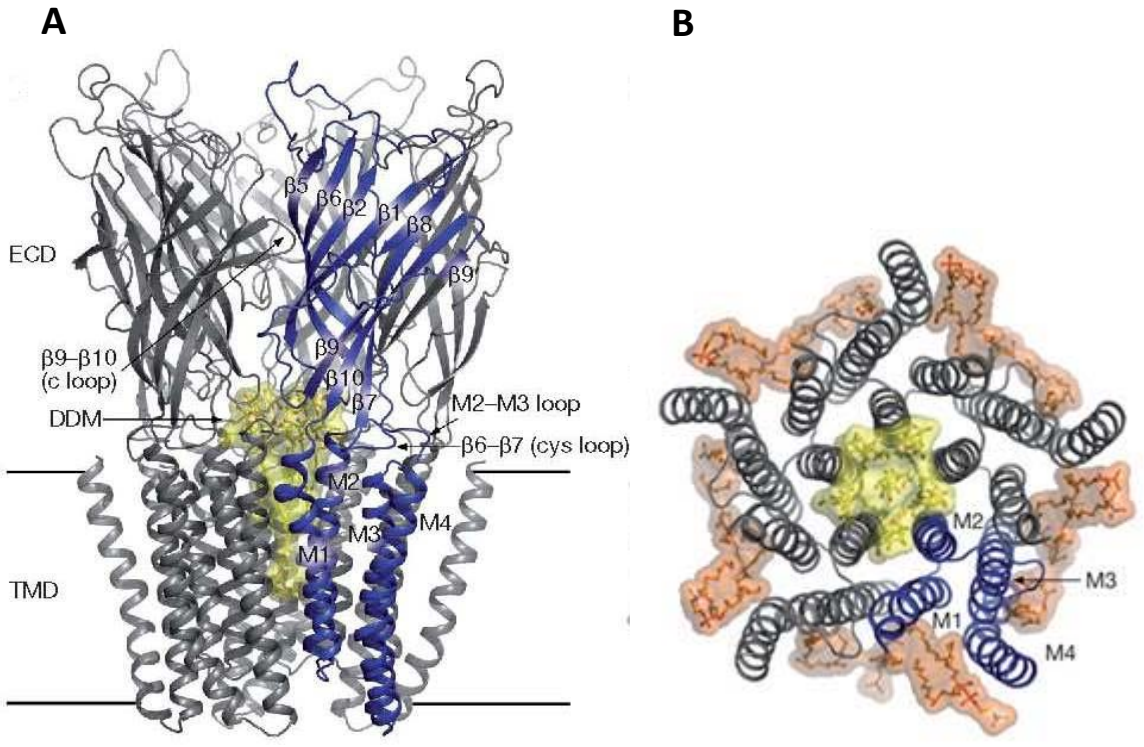


Εικόνα 7: Σύκριση απλουστευμένων απεικονίσεων των δομών των προκαρυωτικών με τα ευκαρυωτικά LGICs. Στα προκαρυωτικά LGICs απουσιάζει η χαρακτηριστική Cys θηλιά (C-C), η N-τελική α-έλικα και η κυτταροπλασματική θηλιά. [24]

Α.5. Κρυσταλλική δομή της GLIC

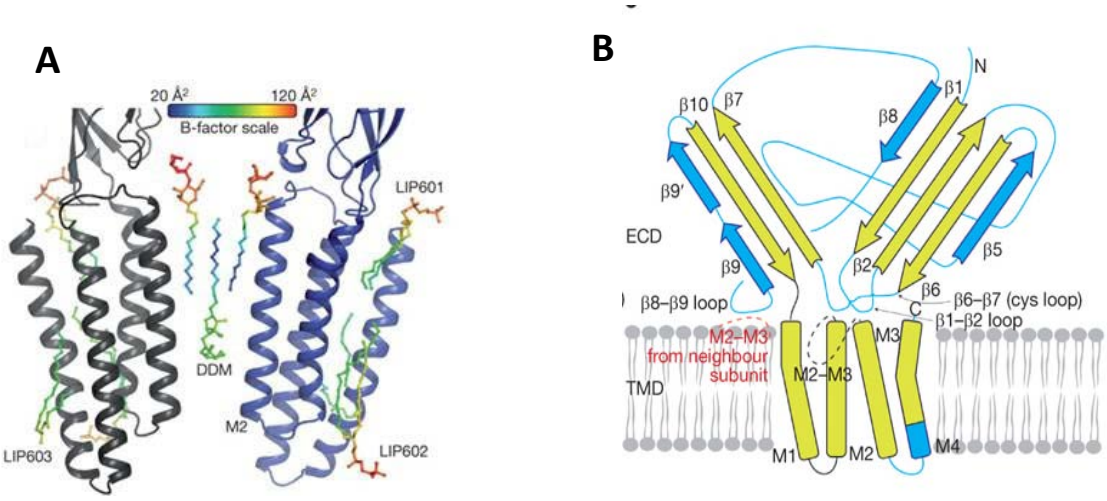
Η δομή της πρωτεΐνης GLIC, ενός προκαρυωτικού ομολόγου που εντοπίζεται στο κυανοβακτήριο *Gloeobacter violaceus*[55], έχει προσδιοριστεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ σε ανάλυση 2,9 Å[26] και 3.1 Å[25] σε pH 4,6. Ο ρόλος αυτού του υποδοχέα αν και παραμένει άγνωστος ακόμα και σήμερα, πιθανολογείται ότι είναι η προσαρμογή του βακτηρίου στις μεταβολές του pH στο περιβάλλον όπου αυτό βρίσκεται. Αποδείχθηκε ότι η GLIC σχηματίζει πενταμερή και λειτουργεί ως ένα κατιονικό κανάλι, το οποίο ενεργοποιείται από την πρόσδεση πρωτονίων σε αυτό. Επομένως, δεδομένης της σχετικά υψηλής ομολογίας της κυρίως με την α7 υπομονάδα του nAChR[56] (20% αμινοξική ταύτιση), θεωρείται ως ένας πρόγονος της υπεροικογένειας των ευκαρυωτικών LGICs.

Σύμφωνα με τη κρυσταλλική της δομή, η GLIC φαίνεται ότι σχηματίζει κατιονικά κανάλια που ενεργοποιούνται με μείωση του pH στην εξωκυττάρια περιοχή. Πρόκειται για μια φαινομενικά ανοιχτή διαμόρφωση. Οι πέντε υπομονάδες έχουν τη διευθέτηση βαρελιού γύρω από την οδό μεταφοράς των ιόντων (εικόνα 8).



Εικόνα 8 : Α Πλάγια όψη και **Β** κάτοψη της δομής της GLIC.[26]

Οι υπομονάδες αυτές αλληλεπιδρούν ισχυρά μέσω μιας διεπιφάνειας εμβαδού 2200Å^2, η οποία περιλαμβάνει φορτισμένα αμινοξικά κατάλοιπα και μόρια νερού. Κάθε υπομονάδα της ΕΚΠ αποτελείται από πέντε εσωτερικές και τρεις εξωτερικές β-πτυχωτές επιφάνειες που συνδέονται με θηλιές και σχηματίζει ένα υδρόφοβο πυρήνα β-πτυχώσεων. Η GLIC παρουσιάζει δομική ομοιότητα με την αντίστοιχη διεπιφάνεια των ΕΚΠ των ευκαρυωτικών pLGICs που καλύπτεται από μια κοιλότητα δέσμευσης νευροδιαβιβαστών. Αυτό ενισχύεται μετά τον καθορισμό της β9-β10 θηλιάς (θηλιά C). Η διαμεμβρανική περιοχή (ΔΜΠ) της κάθε υπομονάδας αποτελείται από τέσσερις έλικες (M1-M4). Οι M2 έλικες των πέντε υπομονάδων σχηματίζουν το τοίχωμα του πόρου (εικόνα 8A) και συνορεύουν με τους εξής πυρήνες αμινοξικών καταλοίπων: ένα αρνητικά φορτισμένο γλουταμινικό οξύ στη θέση 2 (Glu2), δύο πολικά αμινοξέα Thr2 και Ser6 και τα τέσσερα υδρόφοβα αμινοξέα Ile9, Ala13 και Ile16/Leu17. Οι M1 έλικες στρέφονται στο κατάλοιπο Pro205 και σχηματίζουν με τη M3 ένα δεύτερο κύκλο ελίκων που αλληλεπιδρούν με το M2[57], ενώ οι M4 έλικες βρίσκονται περιμετρικά.



Εικόνα 9: A Πλάγια όψη της διαμεμβρανικής περιοχής. Μόνο δύο υπομονάδες παρουσιάζονται.και **B** τοπολογικό διάγραμμα της GLIC.[26]

Η κεντρική οδός μεταφοράς ιόντων αποτελείται από έναν εξωκυττάριο υδρόφιλο προθάλαμο, του οποίου το εύρος ξεπερνά τα 12Å και από έναν διαμεμβρανικό πόρο σε σχήμα χωνιού (εικόνα 9A). Οι M2 άξονες των ελίκων είναι κεκλιμένοι σε σχέση με τον άξονα του πόρου, με εξωτερικές υδρόφοβες πλευρικές

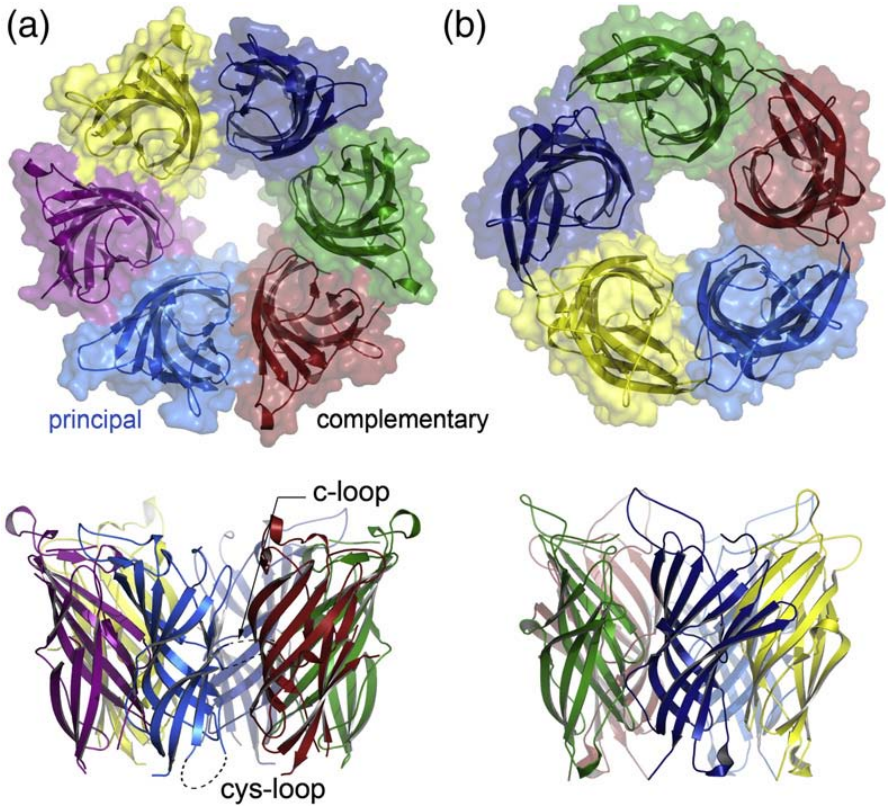
αλυσίδες προσανατολισμένες προς τις έλικες της κοινής επιφάνειας ενώ το εσωτερικό καλύπτεται από πολικές πλευρικές αλυσίδες προσανατολισμένες προς τον πόρο. Ο πόρος της GLIC σχηματίζει κώνο διαμέτρου 12Å στο άνω μέρος (εξωτερικά) και 5Å στο κάτω μέρος (εσωτερικά). Αυτό το μεγάλο άνοιγμα του πόρου υποδηλώνει μια «ανοιχτή δομή» του ιοντικού καναλιού. Όσον αφορά στη στενή περιοχή του πόρου, αυτή καθορίζεται από ισχυρές αλληλεπιδράσεις μεταξύ πέντε πλευρικών αλυσίδων γλουταμίνης. Αυτή η στενή περιοχή είναι πιθανό να αποτελεί εμπόδιο στην ελεύθερη διάχυση των ιόντων, λειτουργώντας ως φίλτρο επιλεκτικότητας των ιόντων. Επειδή το ενδοκυττάριο τμήμα του ανοιχτού καναλιού αντιμετωπίζει το φυσιολογικό pH του κυτταρικού περιβάλλοντος, είναι πιθανό η πρωτονιωμένη κατάσταση αυτών των αμινοξικών καταλοίπων να αλλάζει σε χαμηλό pH, ως αποτέλεσμα των συνθηκών κρυστάλλωσης (pH 4,6). Οι μικρές αλλαγές στη διαμόρφωση των πλευρικών αλυσίδων είναι επαρκείς για την αύξηση της ακτίνας του πόρου των μερικώς πρωτονιωμένων καταλοίπων σε χαμηλό pH, ενώ η συνολική διαμόρφωση των ελίκων που μορφοποιούν τον πόρο δε διαταράσσονται. Η δομή του κωνικού υδατικού πόρου και η ικανότητα πρόσδεσης ιόντων στο στενό ενδοκυττάριο τμήμα του αποδεικνύουν ότι η δομή της GLIC απεικονίζει είτε μια αγώγιμη κατάσταση ενός pLGIC είτε μια διαμόρφωση η οποία πλησιάζει αρκετά στη διαμόρφωση η οποία υιοθετείται σε μια αγώγιμη κατάσταση.

Α.6. Διαμορφώσεις της GLIC

Ανάλογα με το τμήμα του γονιδίου της GLIC το οποίο εκφράζεται αλλά και την κατάσταση στην οποία βρίσκεται η πρωτεΐνη, η GLIC εμφανίζεται σε διαφορετικές διαμορφώσεις. Η $GLIC_{ΕΚΠ}$ είναι μονομερές σε διάλυμα[58] παρά την ικανότητά της να σχηματίζει πενταμερή[26] όταν συνδέεται με τη διαμεμβρανική περιοχή, ενώ όταν η $GLIC_{ΕΚΠ}$ κρυσταλλώνεται χωρίς τη διαμεμβρανική περιοχή σχηματίζει εξαμερή[58].

Η δομή του μονομερούς, με την οποία εμφανίζεται η $GLIC_{ΕΚΠ}$ σε διάλυμα, πλησιάζει αρκετά την αναδίπλωση του αντίστοιχου τμήματος του πενταμερούς της

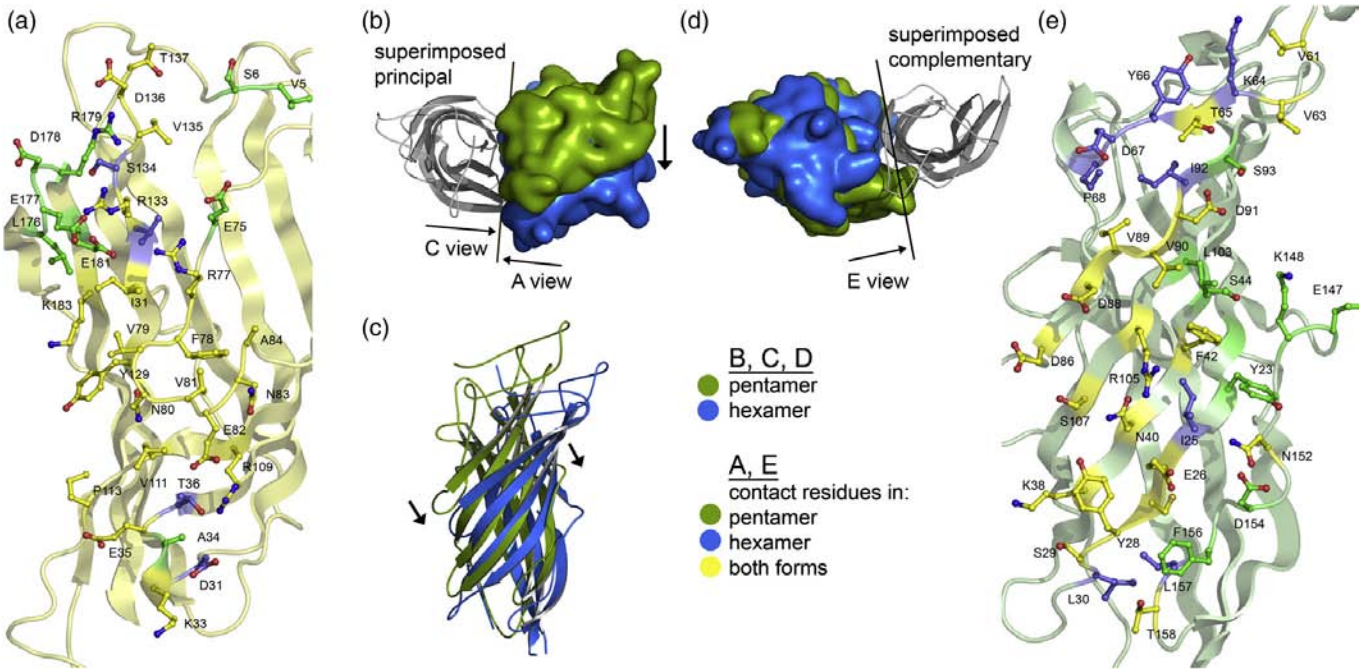
GLIC χωρίς όμως να επηρεάζεται η διαμόρφωση του υδρόφοβου πυρήνα, ο οποίος παραμένει ανεξάρτητος από τις δραστικές αλλαγές στο περιβάλλον όπου βρίσκεται η $GLIC_{ΕΚΠ}$. Σε κατάσταση κρυστάλλου και απουσία της διαμεμβρανικής περιοχής, η οποία φαίνεται να σχετίζεται με τη σωστή συγκρότηση του πενταμερούς, παρουσιάζεται μετάβαση από το πενταμερές στο εξαμερές (εικόνα 10) καθώς οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υπομονάδων τροποποιούνται, οι αλληλεπιδράσεις με τη διαμεμβρανική περιοχή χάνονται και οι συνθήκες κρυστάλλωσης της πρωτεΐνης μεταβάλλονται. Συγκεκριμένα η GLIC κρυσταλλώθηκε σε pH 4,6, ενώ η $GLIC_{ΕΚΠ}$ κρυσταλλώθηκε σε pH 7.



Εικόνα 10: Κάτοψη και πλάγια όψη (a)του εξαμερούς και (b)του πενταμερούς της $GLIC_{ΕΚΠ}$.[58]

Οι επιφάνειες αλληλεπίδρασης μεταξύ γειτονικών υπομονάδων είναι μεγαλύτερες στο εξαμερές σε σύγκριση με αυτές που σχηματίζονται στο πενταμερές (10.3% και 8.5% της συνολικής επιφάνειας αντίστοιχα). Οι διεπιφάνειες αλληλεπίδρασης μελετηθήκαν αναλυτικά χρησιμοποιώντας σαν σύστημα αναφοράς δύο υπομονάδες: την κεντρική και την γειτονική/συπμληρωματική της σε κατάσταση ολιγομερισμού. Ο πιο εύκολος τρόπος για την περιγραφή της αναδιοργάνωσης των υποομάδων που επέρχεται κατά την μετάβαση από την μορφή του πενταμερούς σε αυτή του

εξαμερούς, είναι η εξέταση της γειτονικής υπομονάδας (και στις δύο μορφές ολιγομερισμού) αφού γίνει η υπέρθεση της κεντρικής υπομονάδας (Εικόνα 11). Στην εξαμερή μορφή του υποδοχέα παρατηρείται μια κλίση της γειτονικής υπομονάδας που οδηγεί σε μια κίνηση προς τα έξω και μακριά από τον άξονα συμμετρίας της. Επιπλέον, το τμήμα του εσωτερικού β κλώνου της συμπληρωματικής υπομονάδας που αλληλεπιδρά με την κύρια υπομονάδα υποβάλλεται σε μια καθοδική μετακίνηση της τάξης των 5Å.



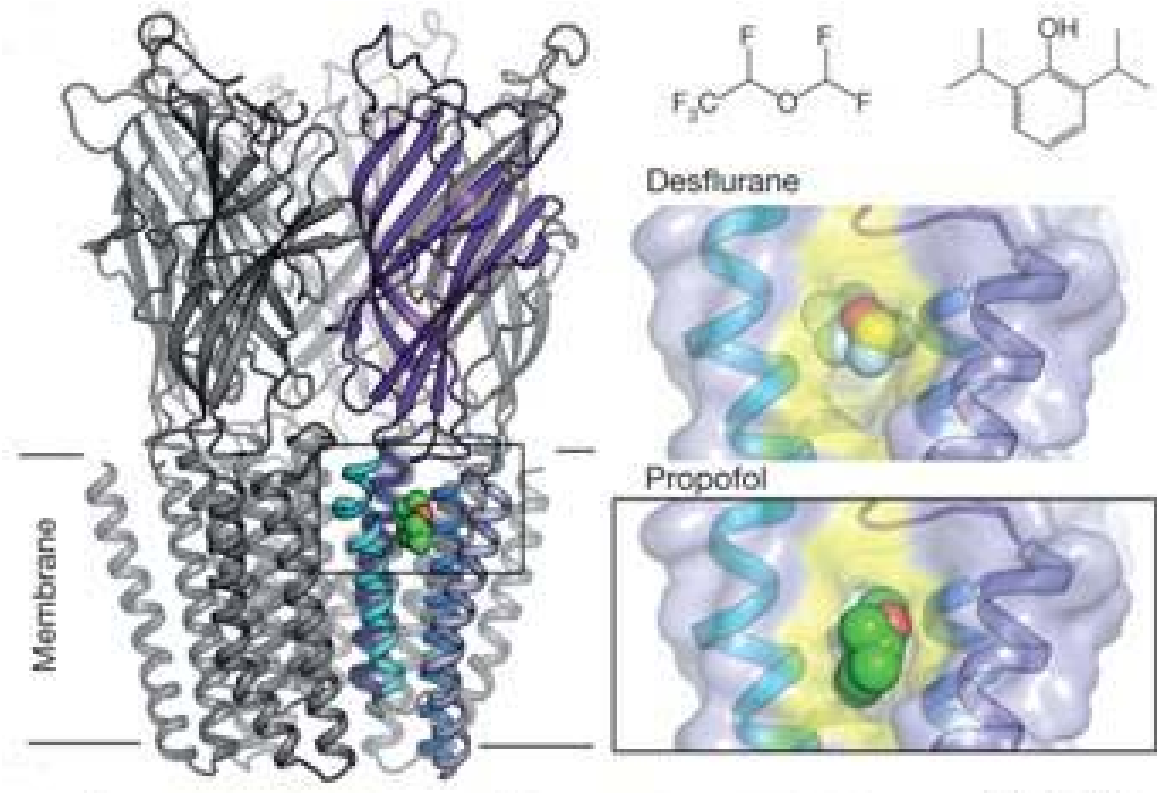
Εικόνα 11: Ατομικές επαφές που συμμετέχουν στη τεταρτοταγή δομή της $GLIC_{EKΠ}$ (a) κεντρική υπομονάδα (e) συμπληρωματική υπομονάδα : με βέργες κίτρινου χρώματος για τα αμινοξέα που συμμετέχουν στις αλληλεπιδράσεις της διεπιφάνειας στο πενταμερές και στο εξαμερές, πράσινο για τα αμινοξικά κατάλοιπα που αλληλεπιδρούν μόνο στο πενταμερές, μπλε για τα αμινοξικά κατάλοιπα που αλληλεπιδρούν μόνο στο εξαμερές. (b, d) κάτοψη των δύο γειτονικών υπομονάδων όπου γίνεται υπέρθεση των κεντρικών (b) και των συμπληρωματικών (d) υπομονάδων. Η άλλη υπομονάδα είναι πράσινη για το πενταμερές και μπλε για το εξαμερές. (c) πλάγια όψη των συμπληρωματικών υπομονάδων, όπου εμφανίζονται οι σχετικές κινήσεις κατά την αλλαγή στον ολιγομερισμό.[58]

Αμινοξικά κατάλοιπα τα οποία συμβάλουν στις διεπειφάνειες αλληλεπίδρασης των γειτονικών υπομονάδων τόσο στον πενταμερή όσο και εξαμερή τύπο ανήκουν στους κλώνους β1, β2, β6 και β5. Κατάλοιπα της συμπληρωματικής υπομονάδας που συμμετέχουν στην διεπιφάνεια αλληλεπίδρασης στο πενταμερές βρίσκονται στην δεξιά πλευρά της και αλληλεπιδρούν με την C–θηλιά της κύριας υπομονάδας η οποία παρατηρήθηκε ότι είναι ευκίνητη και μη σωστά δομημένη στον εξαμερή τύπο. Γι αυτό

η κλίση της συμπληρωματικής υπομονάδας στο εξαμερές συνδυάζεται με αποκλεισμό της C–θηλιάς από την επιφάνεια ολιγομερισμού. Τέλος τα κατάλοιπα τα οποία συμμετέχουν στην επιφάνεια εξαμερισμού βρίσκονται στη πάνω πλευρά της συμπληρωματικής υπομοναδας.

Α.7. X-ray δομές της GLIC προσδεδεμένης με γενικά αναισθητικά

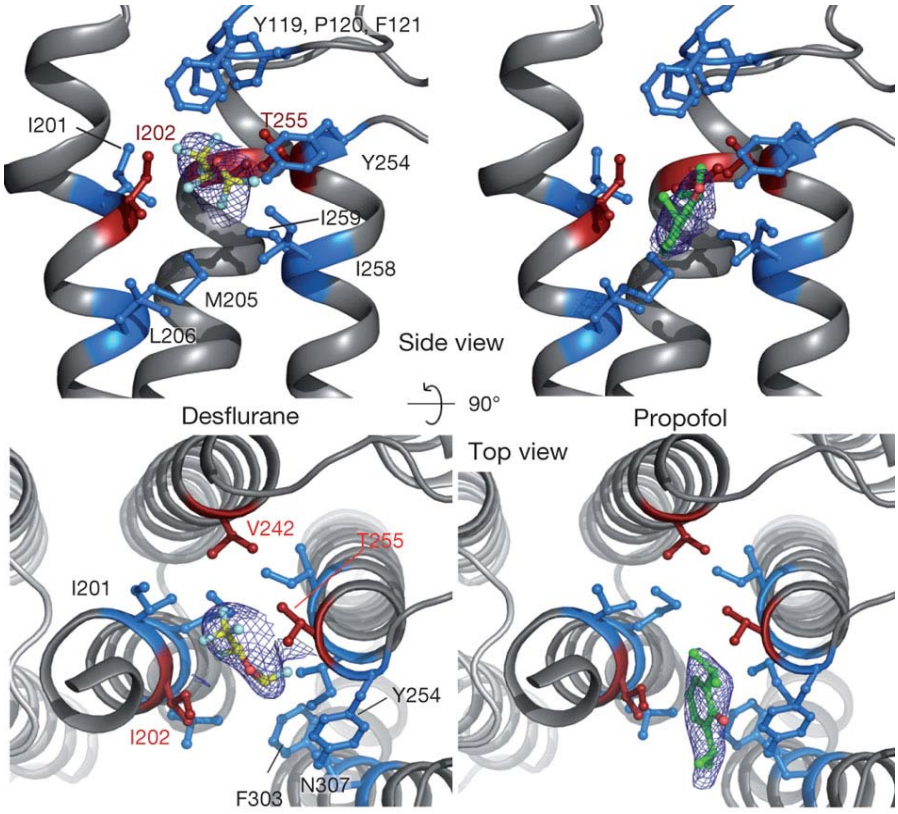
Τα γενικά αναισθητικά[59] χρησιμοποιούνται ευρέως, αλλά ο μοριακός μηχανισμός δράσης τους παραμένει ελάχιστα κατανοητός. Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι κύριοι στόχοι τους αποτελούν οι πενταμερείς ιοντικοί δίαυλοι που ενεργοποιούνται ή αναστέλλονται από αυτά[60]. Το βακτηριακό ομόλογο του υποδοχέα από το *Gleobacter violaceus* (GLIC) είναι ευαίσθητο σε κλινικές συγκεντρώσεις των γενικών αναισθητικών[61]. Με σκοπό τη μελέτη των αλλαγών στη δομή της GLIC μετά από πρόσδεση σε αυτήν των αναισθητικών, έγινε κρυστάλλωση των συμπλόκων της GLIC με την προποφόλη[62, 63] και το ντεσφλουράνιο[64] και ακολούθησε προσδιορισμός της δομής των συμπλόκων αυτών σε κρυσταλλική κατάσταση μέσω κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ σε ανάλυση 3,3 Å και 3,2 Å αντίστοιχα[65]. Αυτές οι κρυσταλλικές δομές αποκαλύπτουν μια κοινή θέση δέσμευσης των γενικών αναισθητικών, η οποία προϋπάρχει στη δομή. Η περιοχή πρόσδεσης βρίσκεται στο πάνω μισό της διαμεμβρανικής περιοχής (εικόνα 12) στην κοιλότητα που υπάρχει μέσα σε κάθε υπομονάδα. Και τα δύο μόρια αναισθητικών συνδέονται με την πρωτεΐνη μέσω αλληλεπιδράσεων Van der Waals. Συγκεκριμένα, η προποφόλη συνδέεται στην είσοδο της κοιλότητας, ενώ το μικρότερο και πιο ευέλικτο ντεσφλουράνιο δεσμεύεται στο εσωτερικό της.



Εικόνα 12: Περιοχές πρόσδεσης προποφόλης και ντεσφλουράνιο.[65]

Η κοιλότητα των γενικών αναισθητικών είναι προσβάσιμη από τη διπλοστοιβάδα λιπιδίων και σταδιακά στενεύει προς τα κάτω, προς το εσωτερικό της υπομονάδας. Μια άλλη κοιλότητα συγκρίσιμου όγκου βρίσκεται στην κοινή επιφάνεια των υπομονάδων, από την άλλη πλευρά της Μ1. Δεν είναι προσβάσιμη από το εξωτερικό, ενώ ένας στενός δίαυλος (διαμέτρου μικρότερης των 3 Å) συνδέει τις δύο κοιλότητες. Το ντεσφλουράνιο που είναι θαμμένο στην κοιλότητα συνδέεται με υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με τη Μ1 (Ile201, Ile202), τη Μ3 (Thr255, Ile258) και τη Μ2 (Val242). Η προποφόλη που βρίσκεται κοντά στην είσοδο των κοιλοτήτων των γενικών αναισθητικών, κατά την πρόσδεσή της θα οδηγήσει σε σύγκρουση με τα λιπίδια, τα οποία βρίσκονται φυσιολογικά στην περιοχή. Κατά συνέπεια η παρουσία της προποφόλης σχετίζεται με την αναδιοργάνωση των τοπικών αλκυλομάδων. Η προποφόλη προσδένεται ανάμεσα στις Μ1 και Μ3 και αλληλεπιδρά κυρίως με τα αμινοξικά κατάλοιπα Thr255 και Tyr255 μέσω αλληλεπιδράσεων Van der Waals (εικόνα 13). Η διαταραχή των αλληλεπιδράσεων της πρωτεΐνης με τα λιπίδια, η οποία προκαλείται από τη δέσμευση των γενικών αναισθητικών συμβάλλει στην αναστολή της λειτουργίας της πρωτεΐνης, γεγονός το οποίο υποδηλώνει ότι τα γενικά

αναισθητικά μπορούν να ανταγωνίζονται με ενδογενείς, αλλοστερικούς υποκαταστάτες, τα λιπίδια στην περίπτωση αυτή αλλά και ενδεχομένως λιπαρά οξέα και χοληστερόλη στην περίπτωση των ευκαρυωτικών pLGICs.



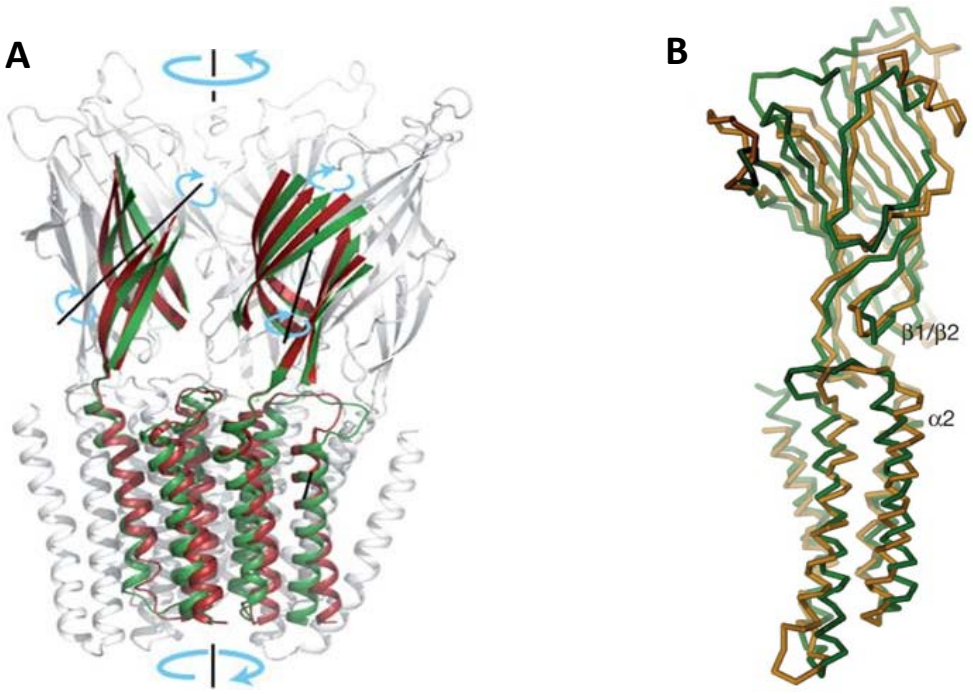
Εικόνα 13: Αμινοξικά κατάλοιπα της GLIC που συμμετέχουν στην πρόσδεση του ντεσφλουράνιο και της προποφόλης.[65]

Μεταλλάξεις συγκεκριμένων αμινοξέων της περιοχής πρόσδεσης μεταβάλλουν την ιοντική ευαισθησία της GLIC απέναντι στα πρωτόνια και επηρεάζουν τα αποτελέσματα της γενικής αναισθησίας. Επίσης, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις αναστολής των γενικών αναισθητικών σε διαφορετικό pH και τα αποτελέσματα των μετρήσεων αυτών ήταν ότι και για τα δύο αναισθητικά είναι περισσότερο αποτελεσματικά σε υψηλότερο pH. Αυτό αποδεικνύεται από πειράματα ηλεκτροφυσιολογίας.

Η κρυσταλλική δομή της GLIC εμφανίζεται να έχει ανοιχτή διαμόρφωση. Τα γενικά αναισθητικά συμπεριφέρονται ως αναστολείς της ιοντικής ανταπόκρισης και ως εκ τούτου αναμένεται να σταθεροποιούν μια κλειστή διαμόρφωση.

Α.8. Σύγκριση των διαμορφώσεων GLIC και ELIC

Η ELIC[24] εμφανίζει σχετικά χαμηλή ταύτιση αμινοξέων με την GLIC,[26] η οποία φτάνει περίπου το 18%, γεγονός που αντανακλάται στη φυλογενετική απόσταση των κυανοβακτηρίων και των πρωτεοβακτηρίων[23]. Μετά από υπέρθεση της X-ray δομής της ELIC με την αντίστοιχη της GLIC παρατηρούνται σημαντικές ομοιότητες μεταξύ των δύο δομών[25] (εικόνα 14). Η εντυπωσιακή διατήρηση τόσο της δευτεροταγούς όσο και στοιχείων της τριτοταγούς δομής επιτρέπει την οριοθέτηση μιας κύριας δομής που διατηρείται στην οικογένεια των pLGICs. Αυτή περιλαμβάνει το εσωτερικό του υδρόφοβου πυρήνα και τις τέσσερις διαμεμβρανικές α-έλικες. Επίσης, και οι δύο προκαρυωτικές πρωτεΐνες σχηματίζουν ιοντικά κανάλια που είναι εκλεκτικά για κατιόντα. Οι διαφορές που διακρίνονται ανάμεσα στις περιοχές της GLIC και της ELIC αφορούν στη διαμόρφωσή της περιοχής πρόσδεσης και της διαμεμβρανικής περιοχής και υποδηλώνουν ότι οι δύο πρωτεΐνες υιοθετούν δύο ευδιάκριτες διαμορφώσεις στον πόρο, τον οποίο διαπερνούν ιόντα. Επομένως, οι διαφορές στις διαμορφώσεις μεταξύ των δύο ιοντικών καναλιών εντοπίζονται στη γεωμετρία των πόρων τους.



Εικόνα 14: A Υπέρθεση της ανοιχτής διαμόρφωσης δύο γειτονικών υπομονάδων της GLIC με τις αντίστοιχες της κλειστής διαμόρφωσης της ELIC, με πράσινο για την GLIC και με κόκκινο την ELIC, ενώ με γκρι οι υπόλοιπες υπομονάδες. **B** Υπέρθεση της υπομονάδας της GLIC (πράσινο) και της ELIC (κίτρινο).[25,26]

Συγκεκριμένα, αν και ο διαμεμβρανικός πόρος της ELIC συμπιέζεται στην εξωκυττάρια περιοχή, η αντίστοιχη περιοχή της GLIC δείχνει μια ανοιχτή διαμόρφωση χωνιού με μια γραμμική μείωση της διαμέτρου προς την ενδοκυττάρια είσοδο του καναλιού. Σε αυτό το στενό τμήμα της GLIC, ο πόρος της ELIC διευρύνεται λόγω της ύπαρξης μιας κοιλότητας γεμάτη με νερό διαμέτρου περίπου 6Å. Αυτή η διαφορά στη διαμόρφωση του πόρου είναι αποτέλεσμα της διαφοράς στον προσανατολισμό των α2 και α3 ελίκων, ενώ η θέση της α1 έλικας που συνδέει το διαμεμβρανικό πόρο με το εξωκυττάριο τμήμα παραμένει ουσιαστικά αμετάβλητη. Επομένως, η δομή της GLIC και της ELIC προσομοιώνει την ανοιχτή και την κλειστή κατάσταση του ιοντικού καναλιού, αντίστοιχα. Ο συνδυασμός των δύο αυτών δομών προτείνει ένα νέο μηχανισμό ελέγχου εισόδου των ιόντων για τα πενταμερή ιοντικά κανάλια, που το άνοιγμά τους προέρχεται από την αλλαγή στην κλίση των ελίκων οι οποίες διαμορφώνουν ανάλογα, τον πόρο.

Α.Β. ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΒΙΟΜΟΡΙΑΚΟΥ NMR

Α.Β.1. Χρήση του NMR για τον προσδιορισμό τριτοταγών δομών βιομορίων

Η πιο γνωστή χρήση της φασματοσκοπίας NMR[66] σε βιολογικά συστήματα είναι η επίλυση τριτοταγών δομών βιομορίων σε ατομική λεπτομέρεια στο διάλυμα. Γεγονός είναι πάντως ότι η μεγάλη πλειοψηφία των γνωστών σήμερα δομών έχει επιλυθεί χρησιμοποιώντας την τεχνική της κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ[67]. Η κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ είναι προγενέστερη τεχνική και σχεδόν πλήρως αυτοματοποιημένη άλλα απαιτεί την, αβέβαιης έκβασης, διαδικασία της κρυστάλλωσης μιας πρωτεΐνης[68]. Τυπικά, για την επιτυχή έκβαση της διαδικασίας επίλυσης τριτοταγούς δομής με NMR[69, 70] απαιτείται η καταγραφή ποικίλων ετεροπυρηνικών και πολυδιάστατων φασμάτων βιομοριακών δειγμάτων υψηλών απαιτήσεων σε συγκέντρωση και καθαρότητα. Η σύνθεση των πληροφοριών που προκύπτουν από τον κάθε τύπο φάσματος οδηγεί στην κατάρτιση μίας λίστας περιορισμών διατομικών αποστάσεων και γωνιών, η ικανοποίηση των οποίων οδηγεί στην επίλυση της δομής.

Η διαφοροποίηση των χημικών μετατοπίσεων λόγω τριτοταγούς δομής μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να πιστοποιηθεί η σωστή αναδίπλωση ενός πολυπεπτιδίου. Η ευρεία διασπορά των σημάτων NMR στους άξονες του φάσματος ^{1}H-^{15}N HSQC (Heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy)[71], το οποίο συσχετίζει το άτομο του αζώτου (N) μιας ομάδας NHχ με το άμεσα συνδεδεμένο πρωτόνιο, οφείλεται στην ύπαρξη ποικίλων χημικών μικροπεριβαλλόντων που επάγουν μαγνητικές διαφοροποιήσεις σε χημικά όμοιους πυρήνες και συνεπώς αποτελεί στοιχείο ενδεικτικό της ύπαρξης δομής και το αντίστροφο.

Α.Β.2. Χρήση του NMR για το χαρακτηρισμό της δυναμικής φύσης βιομορίων

Η φασματοσκοπία NMR είναι πολύτιμο και αναντικατάστατο εργαλείο για το χαρακτηρισμό της ευκινησίας σε μοριακό, ακόμα και σε υπομοριακό επίπεδο. Είναι δηλαδή δυνατό να μελετηθεί ο δυναμικός χαρακτήρας,[72] η κινητικότητα επιμέρους τμημάτων ενός βιομορίου σε επίπεδο ατόμων και να εξαχθούν συμπεράσματα για τη σημασία της ευελιξίας δραστικών ομάδων στη συνολική βιολογική δραστικότητα του μορίου. Στις περιπτώσεις πολυπεπτιδίων, τα πειράματα χαρακτηρισμού της δυναμικής συμπεριφοράς αποσκοπούν στον υπολογισμό παραμέτρων όπως οι χρονικές σταθερές αποδιέγερσης T1 και T2 για κάθε πυρήνα ^{1}H αμιδικής ομάδας του πολυπεπτιδικού σκελετού, και συνεπώς σε έμμεση εκτίμηση της ευελιξίας τους.

Α.Β.3. Μοριακό μέγεθος και NMR

Το μοριακό μέγεθος αποτελεί σημαντική παράμετρο στη βιομοριακή φασματοσκοπία NMR. Φάσματα NMR υψηλού μοριακού βάρους πρωτεϊνών, περιέχουν ευρείες και μικρότερης έντασης κορυφές και αυτό καθιστά δύσκολο τον δομικό χαρακτηρισμό τους, δικαιολογώντας την υπεραντιπροσώπευση μικρών πρωτεϊνών στην κατανομή μοριακών βαρών των επιλυμένων με NMR δομών. Με τα διαθέσιμα σήμερα μαγνητικά πεδία, το όριο μοριακού βάρους κάτω από το οποίο η επίλυση της δομής μιας πρωτεΐνης είναι εφικτή χρησιμοποιώντας πολύπλοκα σχήματα ισοτοπικής επισήμανσης (π.χ. ειδική επισήμανση αμινοξέων) και πρωτόκολλα πολυδιάστατης φασματοσκοπίας NMR είναι 30kDa.

Α.Β.4. Έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών για δομική μελέτη NMR

Με NMR δομική μελέτη είναι δυνατόν να χαρακτηριστούν μικρά οργανικά μόρια, πεπτίδια και πρωτεΐνες[73], μεγέθους από μερικά Da έως και 30kDa. Ωστόσο, απαιτείται επισήμανση των μορίων αυτών με τους ενεργούς NMR πυρήνες (^{15}N ή/και

^{13}C) και αυξημένη συγκέντρωσή τους στο διάλυμα[74]. Η επισήμανση των ενεργών μορίων και των πεπτιδίων με ενεργούς πυρήνες αποτελεί μια αρκετά ακριβή και πολύπλοκη τεχνική. Η επισήμανση των πρωτεϊνών, οι οποίες εκφράζονται με βιοτεχνολογικές μεθόδους, με ενεργούς NMR πυρήνες αποτελεί μια εύχρηστη και σχετικά προσιτή τεχνική. Αυτό πραγματοποιείται καθώς τα κύτταρα που εκφράζουν την πρωτεΐνη-στόχο, αναπτύσσονται σε βακτηριακές καλλιέργειες, των οποίων το θρεπτικό μέσο φέρει τις απαραίτητες πηγές άνθρακα και αζώτου επισημασμένες (σε ^{13}C και ^{15}N, αντίστοιχα). Επίσης, τα κύτταρα, τα οποία επιλέγονται για την έκφραση των πρωτεϊνών είναι απαραίτητο να εξασφαλίζουν ελεγχόμενη και υψηλής απόδοσης έκφραση. Επομένως, οι πρωτεΐνες, οι οποίες εκφράζονται με τον τρόπο αυτό είναι επισημασμένες στο άζωτο (^{15}N) ή/και στον άνθρακα (^{13}C) και στις απαραίτητες συγκεντρώσεις. Ακολουθεί η απομόνωση των πρωτεϊνών, η λήψη και επεξεργασία των NMR φασμάτων και ο δομικός χαρακτηρισμός των μορίων.

Α.Β.5. Ισοτοπική επισήμανση πρωτεϊνών με ενεργούς πυρήνες στη φασματοσκοπία NMR

Οι ενεργοί πυρήνες στη φασματοσκοπία NMR είναι οι ^{15}N και ^{13}C και αξιοποιούνται για τη συσχέτισή τους με τους πυρήνες του πρωτονίου (^{1}H)[75, 76]. Τα συστήματα συντονισμού σε ένα ομο- (^{1}H-^{1}H) ή ετερο- (^{1}H-^{13}C/^{15}N) πυρηνικό φάσμα NMR δύο, τριών[77, 78] ή τεσσάρων διαστάσεων[79] παρέχουν τη δυνατότητα αναγνώρισης των δομικών μονάδων του βιοπολυμερούς καθώς και την εξακρίβωση της θέσης των δομικών αυτών μονάδων στην αλυσίδα του βιοπολυμερούς. Ο συνδυασμός της ισοτοπικής επισήμανσης εξαρτάται εκτός από τον τύπο των πειραμάτων του NMR που πρόκειται να πραγματοποιηθούν και από το μέγεθος της προς μελέτη πρωτεΐνης[80]. Επομένως, για πρωτεΐνες μεγέθους μέχρι 20kDa η διπλή επισήμανση είναι επαρκής. Για μελέτη της δομής μεγάλων μακρομορίων, που το μέγεθός του ξεπερνά τα 20kDa δεν επαρκεί. Το γεγονός αυτό οφείλεται στη διεύρυνση των κορυφών που προκαλούνται από τη γρήγορη αποδιέγερση των πυρήνων, καθώς επίσης και στην επικάλυψη των κορυφών εξαιτίας του πλήθους

τους. Στις περιπτώσεις αυτές χρησιμοποιείται ευρέως η μέθοδος της δευτερίωσης[81], δηλαδή η χρήση υγρών θρεπτικών μέσων όπου οι πυρήνες των ^{1}H (πρωτονίων) έχουν αντικατασταθεί από ^{2}H (δευτέριο) και συνεπώς η παραγόμενη πρωτεΐνη φέρει ^{2}H αντί των ^{1}H. Με τη δευτερίωση μειώνεται ο ρυθμός αποδιέγερσης των NMR-ενεργών πυρήνων, ιδιαίτερα του ^{13}C, καθώς ο γυρομαγνητικός λόγος του ^{2}H είναι 6,5 φορές μικρότερος από αυτόν του ^{1}H. Επιπλέον, με τη χρήση της δευτερίωσης[82, 83] απλοποιούνται τα φάσματα, καθώς τα σήματα των πρωτονίων δεν εμφανίζονται εξαιτίας της ανταλλαγής τους με το δευτέριο[84]. Τέλος, βελτιώνεται η ανάλυση και η ευαισθησία των πειραμάτων NMR. Όσον αφορά στη δομική μελέτη μακρομορίων που το μέγεθός τους ξεπερνά τα 30kDa, τα φάσματα γίνονται όλο και περισσότερο πολύπλοκα εξαιτίας της επικάλυψης των κορυφών, καθιστώντας την επεξεργασία των φασμάτων αυτών εξαιρετικά δύσκολη. Ως μέσον απλοποίησής τους χρησιμοποιείται η επιλεκτική επισήμανση. Πολλές φορές μάλιστα η μέθοδος αυτή συνδυάζεται με αυτή της δευτερίωσης με σκοπό την απλοποίηση των NMR φασμάτων.

Α.Β.6. Επιλεκτική Επισήμανση

Η στρατηγική της επιλεκτικής επισήμανσης[85] βασίζεται σε επιλεκτικά επισημασμένα ή μη αμινοξικά κατάλοιπα σε ^{13}C / ^{15}N επισημασμένες πρωτεΐνες. Με τον τρόπο αυτό απλοποιούνται τα πολυδιάστατα ετεροπυρηνικά NMR φάσματα και αυτό συντελεί στην ταυτοποίηση των πυρήνων της συγκεκριμένης αλληλουχίας για την κύρια αλυσίδα[86, 87] και για τους πυρήνες των πλευρικών ομάδων[88, 89]. Χρησιμοποιείται κυρίως για την ταυτοποίηση πυρήνων πρωτεϊνών μεγάλου μοριακού βάρους[90], τα φάσματα των οποίων είναι αρκετά πολύπλοκα. Η επιλεκτική επισήμανση αποτελεί μια σημαντική μεθοδολογία για να μειωθεί η αλληλοεπικάλυψη των σημάτων συντονισμού στο φάσμα και συντελεί στη διαδικασία ταυτοποίησης των κορυφών αλλά και στο χαρακτηρισμό της δυναμικής τμημάτων ή ολόκληρης της πρωτεΐνης. Ως μειονέκτημα της επιλεκτικής επισήμανσης μπορεί να αναφερθεί το υψηλό κόστος αρκετών επισημασμένων αμινοξέων. Επιπλέον, η παρεμβολή κορυφών στο φάσμα ^{1}H-^{15}N HSQC που αντιστοιχούν σε αμινοξέα τα οποία δεν έχουν επιλεχθεί

να είναι επισημασμένα, αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα της επιλεκτικής επισήμανσης. Αυτό συμβαίνει διότι τα βακτηριακά κύτταρα που εκφράζουν τις προς μελέτη πρωτεΐνες μεταβολίζουν το επισημασμένο αμινοξύ παράγοντας και άλλα επισημασμένα αμινοξέα. Επομένως, στο ^{1}H-^{15}N HSQC φάσμα εμφανίζονται όχι μόνο κορυφές οι οποίες αντιστοιχούν στο συγκεκριμένο/επιθυμητό (αρχικά επισημασμένο) αμινοξύ αλλά εμφανίζονται σήματα/κορυφές αμινοξέων που έχουν προέλθει βιοσυνθετικά από αυτό. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται μη ειδική επισήμανση αμινοξέων (scrambling/cross- labeling) και γίνονται προσπάθειες εξάλειψής του.

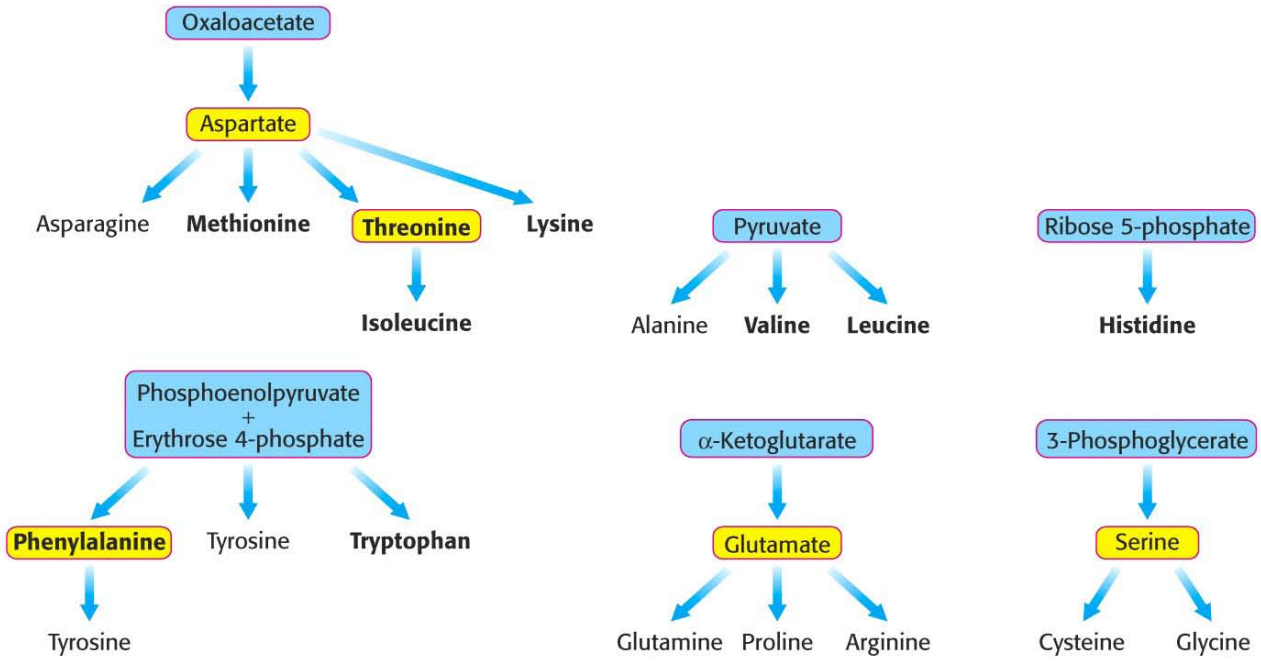
Ανάλογα με το είδος της επισήμανσης (^{13}C ή/και ^{15}N ή/και ^{2}H) του αμινοξέος που επιλέγεται αλλά και της επισήμανσης του μέσου έκφρασης της προς μελέτη πρωτεΐνης, προκύπτουν διάφορες κατηγορίες επιλεκτικής επισήμανσης. Έτσι, διακρίνουμε τις κατηγορίες:

- ^{15}N-επιλεκτικά επισημασμένα αμινοξέα σε μη-επισημασμένο (^{14}N) υπόβαθρο,[91]
- Επιλεκτική αντίστροφη επισήμανση αμινοξέων σε ^{15}N-υπόβαθρο,[92]
- ^{13}C-επιλεκτική επισήμανση αμινοξέων σε μη-επισημασμένο (^{12}C) υπόβαθρο,[90]
- Επιλεκτική πρωτονίωση μεθυλομάδων σε ^{2}H υπόβαθρο.[93, 94]

Α.Β.6.i). ^{15}N-επιλεκτικά επισημασμένα αμινοξέα σε μη-επισημασμένο (^{14}N) υπόβαθρο

Η μέθοδος αυτή της επιλεκτικής επισήμανσης στηρίζεται στην ενσωμάτωση ^{15}N-επιλεκτικά επισημασμένων αμινοξέων σε μη-επισημασμένο (^{14}N) υπόβαθρο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα στο φάσμα ^{1}H- ^{15}N HSQC, το οποίο λαμβάνεται, να εμφανίζονται μόνο οι κορυφές που αντιστοιχούν στα αμινοξικά κατάλοιπα του ^{15}N-επισημασμένου αμινοξέος. Σε πολλούς τύπους αμινοξέων, οι οποίοι επισημάνθηκαν επιλεκτικά εμφανίζεται το φαινόμενο της μη-ειδικής επισήμανσης αμινοξέων[95]. Περαιτέρω μελέτη αυτού του προβλήματος οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η μη-ειδική

επισήμανση οφείλεται στη βιοσύνθεση των αμινοξέων[96, 97] αυτών από το αρχικά επισημασμένο αμινοξύ (Εικόνα 15).



Εικόνα 15: Απεικόνιση της βιοσύνθεσης των αμινοξέων σε βακτηριακά κύτταρα.

Η βιοσύνθεση των αμινοξέων στα βακτήρια[98] είναι γνωστή εξαιτίας της μελέτης της ρύθμισης σε επίπεδο ενζυματικής δραστηριότητας και σε επίπεδο έκφρασης γονιδίων. Οι πορείες για τη βιοσύνθεση των αμινοξέων είναι ποικίλες. Ωστόσο, εμφανίζουν ένα σημαντικό κοινό χαρακτηριστικό: ο ανθρακικός σκελετός τους προέρχεται από ενδιάμεσα της γλυκόλυσης,[99] της πορείας των φωσφορικών πεντοζών ή του κύκλου του κιτρικού οξέος.[100] Με βάση τις πρώτες ύλες τα αμινοξέα μπορούν να ταξινομηθούν σε έξι βιοσυνθετικές οικογένειες. Η τρανσαμινάση[101] καταλύει την ανταλλαγή του αζώτου που οδηγεί στην ενσωμάτωση της επισήμανσης σε μη επιθυμητά παράγωγα. Επομένως, αυτή η μη-ειδική επισήμανση αμινοξέων μπορεί να αποφευχθεί με αναστολή του μεταβολισμού του επισημασμένου αμινοξέος σε παράγωγά του, δηλαδή άλλα αμινοξέα. Ασφαλώς, είναι ευκολότερη η επιλεκτική επισήμανση αμινοξέων που εμφανίζονται στα τελικά στάδια των μονοπατιών βιοσύνθεσης των αμινοξέων σε βακτηριακά κύτταρα. Έτσι, διακρίνουμε δυο κατηγορίες αμινοξέων για την ^{15}N-επιλεκτική επισήμανση αμινοξέων:

- Αμινοξέα που βρίσκονται στο τελικό στάδιο βιοσύνθεσης στα βακτηριακά κύτταρα *E.coli,*
- Αμινοξέα που βρίσκονται στα ενδιάμεσα στάδια των βιοσυνθετικών μονοπατιών των αμινοξέων σε βακτηριακά κύτταρα *E.coli.*

Α.Β.6.i).α. ^{15}N-επισημασμενα αμινοξέα Lys, Arg, Met, Pro, Cys, His, Asn

Τα επιλεκτικά ^{15}N-επισημασμένα αμινοξέα[91] Lys, Arg, Met, Pro, Cys, His, Asn εμφανίζονται ως τελικά προϊόντα στα βιοσυνθετικά μονοπάτια των αμινοξέων στα βακτηριακά κύτταρα. Επομένως, μπορούν να χρησιμοποιηθούν κυτταρικές σειρές του βακτηρίου *E.coli* , τα οποία είναι πρωτοτροφικά κύτταρα[102]. Τα κύτταρα αυτά έχουν τη δυνατότητα σύνθεσης όλων των αμινοξέων που χρειάζονται, τόσο για να καλύψουν τις βιολογικές τους ανάγκες όσο και για τη έκφραση των προς μελέτη πρωτεϊνών, από μόνα τους χρησιμοποιώντας μια πηγή άνθρακα και μια πηγή αζώτου, η οποία τους δίνεται εξωγενώς. Έτσι, η έκφραση της προς μελέτη πρωτεΐνης γίνεται στις συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές με την προσθήκη του ^{15}N-επισημασμένου αμινοξέος. Με τον τρόπο αυτό το κύτταρο λαμβάνει το ^{15}N-επισημασμένο αμινοξύ έτοιμο από την, κατά τα άλλα, μη επισημασμένη βακτηριακή καλλιέργεια και δε χρειάζεται να το βιοσυνθέσει από μόνο του. Αυτό συμβαίνει καθώς το τελικό προϊόν της βιοσυνθετικής πορείας, που στην περίπτωση αυτή είναι το επιθυμητά ^{15}N-επισημασμένο αμινοξύ, αναστέλλει το ένζυμο το οποίο καταλύει την αντίδραση σύνθεσής του από κάποιο άλλο πρόδρομο αμινοξύ.

Μετά την έκφραση και την απομόνωση της πρωτεΐνης ακολουθεί η λήψη φασμάτων NMR και συγκεκριμένα του φάσματος ^{1}H-^{15}N HSQC. Το ^{1}H-^{15}N HSQC φάσμα, το οποίο λαμβάνεται περιλαμβάνει τις κορυφές που αντιστοιχούν στο ^{15}N-επισημασμένο αμινοξύ. Με υπέρθεση του φάσματος αυτού με το φάσμα που περιλαμβάνει την πλήρως ^{15}N-επισημασμένη πρωτεΐνη, επιτρέπει τη ταυτοποίηση των σημάτων συντονισμού, τα οποία αντιστοιχούν στα αμινοξικά κατάλοιπα του επιλεκτικά ^{15}N-επισημασμένου αμινοξέος. Συνδυασμός των φασμάτων αυτών με τα τρισδιάστατα ετεροπυρηνικά φάσματα τα οποία συνδυάζουν το κάθε αμινοξύ με το προηγούμενό του έχει ως αποτέλεσμα τον προσδιορισμό της θέσης του κάθε αμινοξικού καταλοίπου στην αλληλουχία της πρωτεΐνης. Με τον τρόπο αυτό είναι

δυνατή η ταυτοποίηση όλων των αμινοξικών καταλοίπων μιας πρωτεΐνης που αντιστοιχούν στα αμινοξέα Lys, Arg, Met, Pro, Cys, His, Asn.

Α.Β.6.i).β. ^{15}N-επισήμανση αμινοξέων που εμφανίζονται σε ενδιάμεσα στάδια του βιοσυνθετικού μονοπατιού στα βακτηριακά κύτταρα με την αποφυγή της μη-επιλεκτικής επισήμανσης

Σε μια προσπάθεια να εξαλειφθεί η μη-ειδική επισήμανση και να αυξηθεί ο αριθμός των αμινοξέων τα οποία μπορούν να επισημανθούν επιλεκτικά με επιτυχία, αναπτύχθηκαν διάφορες μέθοδοι επιλεκτικής επισήμανσης για τα αμινοξέα τα οποία εμφανίζονται σε ενδιάμεσα στάδια των βιοσυνθετικών μονοπατιών στα βακτηριακά κύτταρα *E.coli*. Σε αυτές τις μεθόδους χρησιμοποιούνται διαφορετικές *E.coli* κυτταρικές σειρές, οι οποίες χρησιμοποιούνται για την έκφραση της πρωτεΐνης, ή προστίθενται άλλα μη-επισημασμένα ^{14}N-αμινοξέα για να μειωθεί η μη-ειδική επισήμανση. Επομένως, διακρίνονται δύο μέθοδοι επιλεκτικής επισήμανσης των αμινοξέων αυτών:

- Έκφραση της πρωτεΐνης σε πρωτοτροφικά κύτταρα[103] με προσθήκη του ^{15}N-επισημασμένου αμινοξέος και περίσσειας μη-επισημασμένων ^{14}N-αμινοξέων, για να αποφευχθεί το φαινόμενο της μη-ειδικής επισήμανσης,[104]
- Έκφραση της πρωτεΐνης σε αυξοτροφικά βακτηριακά κύτταρα με προσθήκη του επιλεκτικά ^{15}N-επισημασμένου αμινοξέος μαζί με τα μη-επισημασμένα ^{14}N-αμινοξέα που δεν μπορούν να συνθέσουν από μόνα τους τα κύτταρα.[105]

Α.Β.6.i).α.a). Έκφραση της πρωτεΐνης σε πρωτοτροφικά κύτταρα με προσθήκη του ^{15}N-επισημασμένου αμινοξέος

Ένα κοινό πρόβλημα, το οποίο εμφανίζεται κατά την έκφραση της πρωτεΐνης σε πρωτοτροφικά κύτταρα, στα ελάχιστα θρεπτικά μέσα[106], με ένα επιλεκτικά ^{15}N-επισημασμένο αμινοξύ είναι η μη-ειδική επισήμανση αμινοξέων που εντοπίζεται στο ^{1}H-^{15}N HSQC φάσμα που λαμβάνεται. Αυτή η μη-ειδική επισήμανση μπορεί να αποφευχθεί με αναστολή της σύνθεσης άλλων ^{15}N-αμινοξέων από το επιλεκτικά επισημασμένο αμινοξύ. Επομένως, η μη-ειδική επισήμανση αμινοξέων μπορεί να αποφευχθεί με προσθήκη περίσσειας μη-επισημασμένων αμινοξέων,[104] τα οποία

προέρχονται βιοσυνθετικά από το επιθυμητά επισημασμένο αμινοξύ ή και όλων των υπολοίπων αμινοξέων με σκοπό να αποκλειστεί η μη-ειδική επισήμανση και άλλων αμινοξέων. Ωστόσο, η απαιτούμενη ποσότητα των μη επισημασμένων αμινοξέων, τα οποία πρέπει να προστεθούν ποικίλει και είναι δύσκολο να καθοριστεί με ακρίβεια αν η εσφαλμένη επισήμανση αμινοξέων έχει επαλειφθεί ή όχι, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις όπου η ταυτοποίηση των κορυφών δεν είναι γνωστή. Γίνονται, επομένως, προσπάθειες για τον προσδιορισμό των ποσοτήτων των μη-επισημασμένων αμινοξέων που απαιτούνται για την αποτελεσματική διαδικασία της επιλεκτικής επισήμανσης της πρωτεΐνης με το επιθυμητό αμινοξύ.

Α.Β.6.i).α.b). Έκφραση της πρωτεΐνης σε αυξοτροφικά βακτηριακά κύτταρα με προσθήκη περίσσειας μη-επισημασμένων αμινοξέων

Ένας εναλλακτικός τρόπος εξάλειψης του φαινομένου της μη-ειδικής επισήμανσης αμινοξέων στην επιλεκτική επισήμανση είναι η χρήση αυξοτροφικών βακτηριακών κυττάρων[95]. Τα βακτήρια που ανήκουν σε τέτοιου είδους κυτταρικές σειρές δε μπορούν να συνθέσουν όλα τα είδη των αμινοξέων. Αυτό συμβαίνει λόγω έλλειψης των ειδικών ενζύμων, των τρανσαμινασών[101] που μετατρέπουν κάποιο αμινοξύ σε αμινοξύ διαφορετικού τύπου, καταλύοντας την αντίδραση ανάμεσα στο αμινοξύ και στο πρόδρομο μόριο, α-κετο οξύ. Επομένως, σε αυτές τις βακτηριακές κυτταρικές σειρές τα αμινοξέα που δε μπορούν να συνθέσουν τα βακτήρια προστίθενται εξωγενώς. Αυτά τα κύτταρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην επιλεκτική επισήμανση των αμινοξέων που προστίθενται στο μέσο έκφρασής τους. Ένα μειονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι η μειωμένη απόδοση στην έκφραση της πρωτεΐνης. Το ^{1}H-^{15}N-HSQC φάσμα που λαμβάνεται σε μια τέτοια περίπτωση περιλαμβάνει τις κορυφές του επισημασμένου αμινοξέος.

Α.Β.6.ii). Επιλεκτική αντίστροφη επισήμανση αμινοξέων σε ^{15}N υπόβαθρο

Μια παρόμοια μέθοδος με αυτή της επιλεκτικής ^{15}N-επισήμανσης, η οποία στηρίζεται στις ίδιες αρχές και προορίζεται για τον εντοπισμό των παραπάνω σημάτων συντονισμού αμινοξέων αλλά ταυτόχρονα με χαμηλότερο κόστος, είναι αυτή της αντίστροφης επιλεκτικής επισήμανσης[92]. Όπως αναφέρθηκε στην ενότητα Β.6.i).α. ανάμεσα στα αμινοξέα, τα οποία μπορούν να επισημανθούν επιλεκτικά είναι η αργινίνη και η ασπαραγίνη. Ωστόσο, εξαιτίας του υψηλού κόστους αυτών των ^{15}N-επισημασμένων αμινοξέων, χρησιμοποιείται η τεχνική της αντίστροφης επισήμανσης. Η στρατηγική αυτή στηρίζεται στην επιλεκτική αντίστροφη επισήμανση αμινοξικών καταλοίπων σε μια πλήρως ^{15}N- επισημασμένη πρωτεΐνη και απλοποιεί το ετεροπυρηνικό φάσμα ^{1}H-^{15}N-HSQC. Στα φάσματα ^{1}H-^{15}N-HSQC που λαμβάνονται εμφανίζονται όλες οι κορυφές που αντιστοιχούν σε όλα τα αμινοξέα της πρωτεΐνης εκτός από αυτά του μη-επισημασμένου αμινοξέος. Με υπέρθεση των φασμάτων αυτών με το αντίστοιχο της πλήρους ^{15}N-επισημασμένης πρωτεΐνης καθώς και με την ανάλυση και άλλων ομο/ετερο-πυρηνικών NMR φασμάτων αναγνωρίζονται τα σήματα συντονισμού των αμινοξέων και τα αμινοξέα ταυτοποιούνται.

Ενότητα Β

Σκοπός Εργασίας

Β. Σκοπός Εργασίας

Η GLIC (Gloeobacter ligand-gated ion channel) είναι ένας ομοπενταμερής διαμεμβρανικός υποδοχέας του κυανοβακτηρίου *Gloeobacter violaceus*. Ο πιθανός ρόλος αυτού του υποδοχέα είναι η προσαρμογή του βακτηρίου στις αλλαγές του pH στο περιβάλλον, στο οποίο βρίσκεται. Ο υποδοχέας αυτός ανήκει στην υπεροικογένεια των pLGICs και εμφανίζει σχετικά υψηλή ομολογία κυρίως με την α7 υπομονάδα του nAChR (20% αμινοξική ταύτιση). Τα τελευταία χρόνια οι γνώσεις γύρω από τη τριτοταγή δομή των pLGICs έχουν αυξηθεί, καθώς αρκετά μέλη της οικογένειας αυτής έχουν κρυσταλλωθεί και μελετηθεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ. Πρόκειται είτε για ολόκληρα μόρια, με περίπου 500-600 αμινοξικά κατάλοιπα ανά υπομονάδα και τρεις διακριτές περιοχές, είτε για τα μόρια αυτά προσδεδεμένα με διάφορους προσδέτες, είτε ακόμα και για μεμονωμένες τις ΕΚΠ τους. Αυτό συμβαίνει για την εξαγωγή όσο το δυνατόν περισσοτέρων πληροφοριών σχετικών με τη δομή των υποδοχέων αυτών αλλά και των περιοχών δέσμευσής τους. Η οικογένεια αυτών των υποδοχέων παρουσιάζει μεγάλο φαρμακολογικό ενδιαφέρον, καθώς διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε νευρολογικές ασθένειες, αλλά αποτελούν ταυτόχρονα σημαντικούς στόχους διαφόρων φαρμάκων. Οι γνώσεις μας γύρω από τη δομή των pLGICs προέρχεται κυρίως από τη χρήση καρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ.

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας είναι η NMR μελέτη της ΕΚΠ της GLIC σε υδατικό διάλυμα. Έχοντας ως στόχο τη μέγιστη δυνατή απόδοση της παραγόμενης πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκαν πειράματα έκφρασης της πρωτεΐνης σε διαφόρους τύπους θρεπτικών μέσων, έτσι ώστε να επιλεχθεί αυτό με τη μεγαλύτερη δυνατή απόδοση και το χαμηλότερο κόστος. Εξίσου σημαντική ήταν η διαδικασία επιτυχούς απομόνωσης της πρωτεΐνης $GLIC_{ΕΚΠ}$ από τις βακτηριακές πρωτεΐνες, έτσι ώστε να επιτευχθεί η δομική μελέτη μέσω της φασματοσκοπίας NMR. Ένας ακόμη στόχος είναι η επιτυχής, ολοκληρωτική ισοτοπική επισήμανση της πρωτεΐνης με ενεργούς πυρήνες ^{15}N, ^{13}C και ^{2}H με σκοπό την καταγραφή NMR φασμάτων. Η πολυπλοκότητα των φασμάτων αυτών, η οποία οφείλεται στα φαινομένα αλληλεπικάλυψης των κορυφών, στο γρήγορο ρυθμό αποδιέγερσης των

πυρήνων, καθώς και στο μέγεθος της πρωτεΐνης που μελετάται, το οποίο είναι αρκετά μεγάλο (201 αμινοξέα), αποτυπώνεται στα φάσματα της πρωτεΐνης. Σημαντική είναι η αναζήτηση μεθόδων για την αποτελεσματικότερη επεξεργασία των φασμάτων και την εξαγωγή ασφαλέστερων συμπερασμάτων. Τέτοιες μέθοδοι είναι η αντικατάσταση των ατόμων/πυρήνων πρωτονίου με δευτέρια, ^{2}H και η επιλεκτική επισήμανση συγκεκριμένων αμινοξέων για την απλοποίηση των φασμάτων και τη μείωση του ρυθμού αποδιέγερσης, αντίστοιχα. Επόμενος στόχος της παρούσας εργασίας, εκτός από τη δομική μελέτη της $GLIC_{ΕΚΠ}$ σε διάλυμα μέσω της φασματοσκοπίας NMR, αποτέλεσε ο χαρακτηρισμός της δυναμικής της $GLIC_{ΕΚΠ}$ στο διάλυμα. Σημαντική είναι, επίσης, η ταυτοποίηση περιοχών που παρουσιάζουν σημαντική κινητικότητα και σύγκριση των NMR δεδομένων με τα δομικά δεδομένα που προέρχονται από τις διαθέσιμες κρυσταλλικές δομές της $GLIC_{ΕΚΠ}$.

Ενότητα Γ

Υλικά και Μέθοδοι

Γ.1. Υλικά

Γ.1.1. Εργαστηριακός Εξοπλισμός

- Επωαστήρας για καλλιέργειες βακτηρίων υπό ανάδευση, INFORS HT (Minitron)
- Ψυχόμενη φυγόκεντρος Beckman Coulter
- Επιτραπέζια ψυχόμενη φυγόκεντρος Heraeus Fresco 21 (Thermo Electron Corporation)
- Φυγόκεντρος KUBOTA
- Ηλεκτρονικός ζυγός Mettler Toledo
- Ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας Mettler Toledo
- Αυτόκαυστο της Raypa (για την αποστείρωση των θρεπτικών υλικών)
- Μηχάνημα υπερήχων για τη λύση των μεμβρανών των κυττάρων Misonix Sonicator Ultrasonic Processor-QSONICA, LLC
- Συσκευή παραγωγής ddH_2O (διπλά αποσταγμένου νερού) Direct Q (Millipore)
- Συσκευή μέτρησης pH Sartorius
- Φασματοφωτόμετρο ορατού/υπεριώδους JENWAY 6305 UV/Vis Spectrophotometer
- Φασματοφωτόμετρο μονοχρωματικό για τη μέτρηση οπτικής πυκνότητα στα 600nm, Ultrospec 10, cell density meter, Amersham Biosciences
- Αναδευτήρας Vortex της Biorad
- Experion Automated Electrophorisis Station, Biorad
- Μαγνητικός αναδευτήρας Heidolph Mr Hei-Standard
- Περισταλτική αντλία Pharmacia Fine Chemicals
- Συσκευή αναρρόφησης Kif Lab Laboport
- Υδατόλουτρο
- Συσκευή υγρής χρωματογραφίας για την απομόνωση των πρωτεϊνών (FPLC-Fast Protein Liquid Chromatography) από την Amersham Biosciences
- Στήλη μοριακού αποκλεισμού Superose 12_10/300
- Στήλη χρωματογραφίας συγγένειας His-Tag
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών της Biorad
- Πιπέτες Gilsson για τη μετάγγιση υγρών από 1μl έως 1ml

Γ.1.2. Αναλώσιμα

- Τρυβλία petri για στερεές καλλιέργειες
- Πλαστικά ακρορύγχια (tips) από Greiner bio-one
- Πλαστικοί σωλήνες προπυλενίου μιας χρήσης 15 και 50ml από Greiner bio-one
- Πλαστικοί σωλήνες φυγοκέντρησης 250ml
- Κωνικές φιάλες 250ml και 2L
- Πλαστικά σωληνάρια 1,5ml (eppendorf) από Greiner bio-one
- Πλαστικές κυψελίδες μιας χρήσης
- Κυψελίδα χαλαζία οπτικής διαδρομής για μέτρηση απορρόφησης διαλύματος 1cm
- NMR σωλήνες
- Φίλτρα με διάμετρο πόρου 0,2μm Whatman
- Φίλτρα συμπύκνωσης 10.000MWCO (Molecular Weight Cut-Off) από Amicon
- Πλαστικοί σωλήνες πολυπροπυλενίου μιας χρήσης 14ml από Greiner bio-one
- Φίλτρα διήθησης διαμέτρου πόρου 0,2μm από Millipore
- Σύριγγες μιας χρήσης
- Πλαστικά σιφώνια των 2, 5 και 10ml από Greiner bio-one

Όλα τα γυάλινα και πλαστικά είδη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αποστειρωμένα ή αποστειρώνονταν με υγρή αποστείρωση στο αυτόκαυστο Raypa με το πρωτόκολλο: 20 λεπτά στους 121°C.

Γ.1.3. Αντιδραστήρια

Χρησιμοποιήθηκαν χημικά αντιδραστήρια καθαρότητας αναλυτικού βαθμού από Sigma, Applichem Biochemica, Fluca και Reidel de Hae.

- Bacto-tryptone, Bacto yeast extract και άγαρ από την Applichem Biochemica
- Αμπικιλλίνη, από Applichem Biochemica
- Βιοτίνη, θιαμίνη, IPTG (Isopropylo-1-thio-b-D-galactopyranozite), θειικό μαγνήσιο, από Applichem Biochemica
- Γλυκόζη, θειικό αμμώνιο, από Applichem Biochemica

- Ιμιδαζόλιο από Applichem Biochemica
- Μίγμα αναστολέων προτεασών για χρήση τους κατά την πορεία της απομόνωσης πρωτεϊνών με His-Tag (Protease Inhibitor Coctail for use in purification of Histidine-tagged proteins) από Sigma
- Θειϊκός ψευδάργυρος και γλυκερόλη από Fluka
- Τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη (temed) ακρυλαμίδιο 40%, SDS από Biorad, περοξυδιθειικό αμμώνιο (APS) από Applichem Biochemica και Trizma Base από Sigma
- Έγχρωμοι μάρτυρες διαφόρων μοριακών μεγεθών από Nippon Genetics Europe GmbH
- Αιθανόλη, μεθανόλη, οξικό οξύ από Applichem Biochemica
- Γουανιδίνη και DTT από Applichem Biochemica και υδροξείδιο του νατρίου από Reidel-de Haën

Γ.1.4. Επισημασμένα μέσα

Τα επισημασμένα μέσα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από την CortecNet (FR) και από την Cambridge Isotope Laboratories (CIL, USA).

- ^{15}N-χλωριούχο αμμώνιο
- ^{15}N-isogro®
- ^{13}C-γλυκόζη
- ^{15}N, ^{13}C- isogro
- ^{13}C-D7-γλυκόζη
- D_2O (δευτεριωμένο νερό)

Γ.1.5. Επισημασμένα αμινοξέα

Τα επισημασμένα αμινοξέα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από την CortecNet (FR) και CIL (USA).

- ^{15}N-λυσίνη
- ^{15}N-λευκίνη
- ^{15}N-βαλίνη
- ^{15}N-ισολευκίνη
- ^{15}N-φαινυλαλανίνη
- ^{15}N-αλανίνη
- ^{15}N-τυροσίνη
- ^{15}N-ιστιδίνη
- ^{15}N-ασπαραγίνη
- ^{15}N-ασπαραγινικό οξύ
- ^{15}N-γλουταμινικό οξύ

Γ.1.6. Μη-επισημασμένα ^{14}N-αμινοξέα

Τα μη-επισημασμένα ^{14}N-αμινοξέα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από την εταιρία CortecNet (FR).

- ^{14}N-λευκίνη
- ^{14}N-αργινίνη
- ^{14}N-βαλίνη
- ^{14}N-φαινυλαλανίνη
- ^{14}N-λυσίνη
- ^{14}N-αλανίνη
- ^{14}N-ισολευκίνη
- ^{14}N-τυροσίνη
- ^{14}N-ασπαραγινικό οξύ
- ^{14}N-ασπαραγίνη

- ^{14}N-γλυκίνη
- ^{14}N-μεθειονίνη

Γ.1.7. Θρεπτικά Υλικά

Τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τις καλλιέργειες κυττάρων *E.coli* ύστερα από υγρή αποστείρωση (20 min, 121°C, 2Atm) ήταν της ακόλουθης σύστασης:

LB (rich media) : 1% κ.β. Bacto-tryptone, 0,5% κ.β. Bacto-yeast extract, 1% κ.β. NaCl

5XM9 (minimal media) : 1,5% κ.β. KH_2PO_4, 6,4% κ.β. $Na_2HPO_4.7H_2O$, 0,25% κ.β. NaCl

LB-άγαρ-αμπικιλλίνη : LB που περιέχει 1,5% κ.β. άγαρ, 1mg/ml αμπικιλλίνη

Γ.1.8. Διαλύματα

- **Διαλύματα τα οποία χρησιμοποιούνται στην έκφραση της πρωτεΐνης με καλλιέργεια σε M9**

Θιαμίνης : 0,5 mg/ml θιαμίνης σε ddH_2O

Βιοτίνης : 0,5 mg/ml βιοτίνης σε ddH_2O

I.P.T.G. : 1M I.P.T.G. (αποθήκευση στους -20°C)

Αμπικιλλίνης : 0,1 g/ml σε 50% v/v αιθανόλης (αποθήκευση στους -20°C)

Solution Q : για την παρασκευή 1l απαιτούνται: 8ml HCl (5M), 5g $FeCl_2.4H_2O$, 184mg $CaCl_2.2H_2O$, 64mg H_3BO_3, 18mg $CoCl_2.6H_2O$, 4mg $CuCl_2.2H_2O$, 340mg $ZnCl_2$, 605mg $Na_2MoO_4.2H_2O$, 40mg $MnCl_2.4H_2O$

Τα διαλύματα αυτά αποστειρώνονται (20 min, 121°C, 2Atm) πριν από τη χρήση τους.

- **Διαλύματα τα οποία χρησιμοποιούνται στη χρωματογραφία συγγένειας**

$ZnSO_4$: 1M $ZnSO_4$

Ιμιδαζολίου 10mM : 20mM Na_2HPO_4, 0,5mM NaCl, 10mM ιμιδαζολίου

Ιμιδαζολίου 20mM : 20mM Na_2HPO_4, 0,5mM NaCl, 20mM ιμιδαζολίου

Ιμιδαζολίου 40mM : 20mM Na_2HPO_4, 0,5mM NaCl, 40mM ιμιδαζολίου

Ιμιδαζολίου 100mM : 20mM Na_2HPO_4, 0,5mM NaCl, 100mM ιμιδαζολίου

Ιμιδαζολίου 400mM : 20mM Na_2HPO_4, 0,5mM NaCl, 400mM ιμιδαζολίου

EDTA : 0,1M EDTA

Τα παραπάνω διαλύματα φιλτράρονται με φίλτρο της Millipore μεγέθους πόρων 0,2μm πριν από τη χρήση τους.

- **Διαλύματα τα οποία χρησιμοποιούνται στη χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού**

Φωσφορικών : 50mM K_2HPO_4, 50mM KH_2PO_4

Γουανιδίνης : 6M γουανιδίνη

Υδροξειδίου του νατρίου : 0,5M NaOH

Τα παραπάνω διαλύματα φιλτράρονται με φίλτρο της Millipore μεγέθους πόρων 0,2μm πριν από τη χρήση τους.

- **Διαλύματα τα οποία χρησιμοποιούνται στην ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμιδίου**

Πήκτωμα διαχωρισμού 17% : 2,9ml ddH_2O, 3,4ml ακρυλαμιδίου 40%, 2,2ml Tris-base 1,5M pH8,8, 10% w/v SDS, 50μl APS (ammonium per sulfate) 10%, 5μl TEMED (N,N,N΄,N΄,-τετραμεθυλεθυλενδιαμίνη)

Πήκτωμα φόρτωσης : 3ml ddH_2O, 0,5ml ακρυλαμιδίου 40%, 1,25ml Tris-base 0,5M pH 6,8, 10% w/v SDS, 25μl APS 10%, 5μl TEMED

Διάλυμα φόρτωσης δειγμάτων 3x πυκνό : 30% γλυκερόλης, 3%SDS, 60mM Tris-HCl pH 6,8-7, 0,09% μπλε της βρωμοφαινόλης, 150mM DTT

Διάλυμα ηλεκτροφόρησης : 3 g/1l Tris-base, 14,4 g/1l γλυκίνη, 1gr SDS, ddH2O μέχρι το 1L

Διάλυμα χρωματισμού της πηκτής πολυακρυλαμιδίου : 0,1%κ.β. Coomassie Blue R-250, 40%v/v μεθανόλη,10% CH_3COOH

Διάλυμα χρωματισμού της πηκτής πολυακρυλαμιδίου : 5%v/v μεθανόλη, 7,5% CH_3COOH

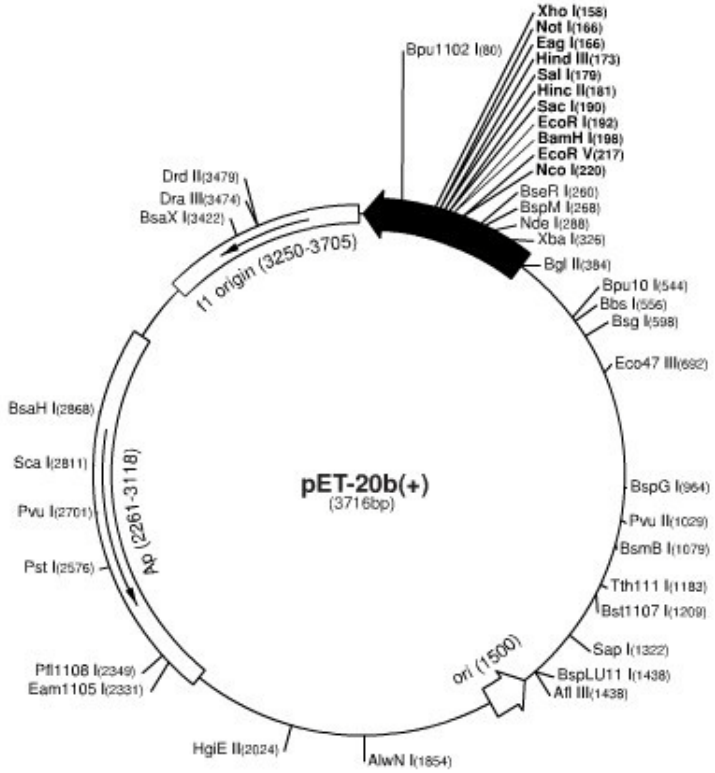
Γ.1.9. Πλασμιδιακός φορέας κλωνοποίησης (cloning vector) και κυτταρικά στελέχη *Escherichia coli* που χρησιμοποιήθηκαν

Τα στελέχη *Escherichia coli* που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα πρωτοτροφικά BL21(DE3) και τα αυξοτροφικά DL39(DE3). Τα κύτταρα BL21(DE3) είναι επιδεκτικά και παρέχουν την έκφραση των πρωτεϊνών σε υψηλά επίπεδα μετά από επαγωγή της έκφρασης με IPTG. Μετασχηματίζονται με πλασμίδια που φέρουν T7 προαγωγέα. Επίσης, όπως ήδη αναφέρθηκε, πρόκειται για πρωτοτροφικά κύτταρα δηλαδή συνθέτουν όλα τα αμινοξέα χρησιμοποιώντας μια πηγή άνθρακα και μια πηγή αζώτου που προστίθεται εξωγενώς. Όσον αφορά στα κύτταρα DL39(DE3) έχουν τη δυνατότητα έκφρασης των πρωτεϊνών μετά από επαγωγή της έκφρασης με IPTG και μετασχηματίζονται με πλασμίδια που φέρουν T7 προαγωγέα. Τα αυξοτροφικά κύτταρα DL39(DE3) δεν έχουν τη δυνατότητα σύνθεσης όλων των αμινοξέων, με αποτέλεσμα κάποια από αυτά να προστίθενται εξωγενώς. Επίσης, απαιτείται η προσθήκη πηγής αζώτου και άνθρακα για τη σύνθεση των υπολοίπων αμινοξέων.

Ο πλασμιδιακός φορέας που χρησιμοποιείται είναι ο pET.20b(+). Το πλασμίδιο pET είναι βακτηριακό και έχει σχεδιαστεί για να επιτρέπει τη γρήγορη παραγωγή μεγάλης ποσότητας της πρωτεΐνης στόχου, όταν ενεργοποιείται. Το πλασμίδιο αυτό φέρει κάποιες σημαντικές περιοχές: ένα γονίδιο lacI (λακτόζης I) που κωδικοποιεί την

πρωτεΐνη καταστολέα της λακτόζης (lac repressor), έναν T7-προαγωγέα, ειδικό μόνο για την T7 RNA-πολυμεράση, ένα χειριστή λακτόζης που μπορεί να εμποδίζει τη μεταγραφή, μια περιοχή πολλαπλής σύνδεσης, ένα γονίδιο αντίστασης στην αμπικιλλίνη. Επίσης, φέρει θέσεις αναγνώρισης για την πέψη περιοριστικών ενζύμων.

pET-20b(+) sequence landmarks	
T7 promoter	353-369
T7 transcription start	352
pelB coding sequence	224-289
Multiple cloning sites	
(*Nco* I - *Xho* I)	158-225
His•Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
pBR322 origin	1500
bla coding sequence	2261-3118
f1 origin	3250-3705



Εικόνα 16: Χάρτης του φορέα κλωνοποίησης pET.20b(+)

Γ.2. Μέθοδοι

Γ.2.1. Υγρές και στερεές καλλιέργειες βακτηρίων

Για την ανάπτυξη βακτηρίων χρησιμοποιούνται θρεπτικά υλικά, τα οποία πρέπει να περιέχουν πηγή άνθρακα, πηγή αζώτου, άλατα και ιόντα. Τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιούνται είναι υγρά ή στερεά. Τα υγρά θρεπτικά υλικά περιέχουν όλα τα θρεπτικά συστατικά διαλυμένα σε νερό. Όσον αφορά στους τύπους της υγρής καλλιέργειας ως μέσο ανάπτυξης βακτηρίων που χρησιμοποιήθηκαν είναι η

καλλιέργεια ελαχίστων θρεπτικών μέσων (M9, minimal media) και η καλλιέργεια πλούσιων θρεπτικών μέσων (LB, rich media). Τα στερεά θρεπτικά υλικά παρασκευάζονται με ανάμιξη του υγρού θρεπτικού υλικού με έναν πολυσακχαρίτη που προέρχεται από φύκη, το άγαρ. Το άγαρ είναι ρευστό σε θερμοκρασίες πάνω από 45°C και στερεοποιείται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες.

Μια καλλιέργεια ξεκινά με προσθήκη μικρής ποσότητας κυττάρων στο θρεπτικό υλικό, μια διαδικασία η οποία ονομάζεται εμβολιασμός. Στη συνέχεια, η κωνική φιάλη που περιέχει την υγρή καλλιέργεια ή το τρυβλίο petri με τη στερεή καλλιέργεια τοποθετείται σε επωαστικό κλίβανο, όπου η θερμοκρασία της καλλιέργειας παραμένει σταθερή στους 37°C. Όσον αφορά στις υγρές καλλιέργειες απαιτείται ανάδευση έτσι ώστε η καλλιέργεια να εμπλουτίζεται με οξυγόνο. Με τον τρόπο αυτό ευνοείται ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων. Στις καλλιέργειες αυτού του τύπου οι φάσεις ανάπτυξης των βακτηριακών κυττάρων είναι: η λανθάνουσα, η εκθετική, η στατική και η φάση θανάτου. Κατά τη λανθάνουσα φάση τον πληθυσμό των κυττάρων αποτελούν τα κύτταρα του εμβολιασμού και ο πληθυσμός παραμένει σχεδόν σταθερός καθώς τα κύτταρα πρέπει να προσαρμοστούν στις καινούριες συνθήκες για να αρχίσουν να αναπτύσσονται. Ακολουθεί η εκθετική φάση ανάπτυξης κατά την οποία ο αριθμός των κυττάρων αυξάνεται εκθετικά, καθώς οι συνθήκες ανάπτυξης είναι οι βέλτιστες. Στη συνέχεια, τα κύτταρα περνούν στη στατική φάση, στην οποία ο πληθυσμός των βακτηρίων παραμένει περίπου σταθερός, λόγω εξάντλησης μεγάλου μέρους του θρεπτικού υλικού και της συσσώρευσης τοξικών προϊόντων του μεταβολισμού τους. Τέλος, κατά τη φάση θανάτου ο αριθμός των κυττάρων μειώνεται.

Γ.2.2. Εισαγωγή πλασμιδίου σε κύτταρα E.coli (μετασχηματισμός)

Τα επιδεκτικά κύτταρα, τα οποία περιγράφηκαν παραπάνω, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εισαγωγή σε αυτά πλασμιδιακού DNA που φέρει το γονίδιο της $GLIC_{ΕΚΠ}$. Αυτές οι κυτταρικές σειρές του βακτηρίου *E.coli* επιδεκτικών κυττάρων χρησιμοποιούνται για την έκφραση την $GLIC_{ΕΚΠ}$ και είναι τα κύτταρα BL21(DE3) και τα

κύτταρα DL39(DE3). Και στις δύο περιπτώσεις κυττάρων χρησιμοποιείται το ίδιο πλασμίδιο και ακολουθούνται τα ίδια βήματα για το μετασχηματισμό τους.

Σε 100μl εναιωρήματος επιδεκτικών κυττάρων, που φυλάσσονται στους -80°C, γίνεται ανάμιξη με 2μl πλασμιδιακού DNA (70ng/μl). Ακολουθεί τοποθέτηση του μίγματος σε πάγο (0°C) για 30min και στη συνέχεια θερμικό σοκ με επώαση στους 42°C (μέσα σε υδατόλουτρο) για 45sec. Το μίγμα τοποθετείται άμεσα σε πάγο και επωάζεται για 2min. Στη συνέχεια, γίνεται προσθήκη 500μl LB και επωάζεται υπό ανάδευση στους 37°C, για 1h, σε 200rpm. Κατόπιν, τα κύτταρα με το υγρό θρεπτικό υλικό επιστρώνονται σε στερεό θρεπτικό μέσο (LB με άγαρ) μέσα σε τρυβλίο petri, παρουσία του κατάλληλου αντιβιωτικού, δηλαδή παρουσία 100μl/ml αμπικιλλίνης. Το προϊόν/μίγμα επωάζεται για περίπου 12-16h στους 37°C. Τα πλασμίδια αυτού του τύπου φέρουν γονίδιο ανθεκτικότητας σε αμπικιλλίνη, με αποτέλεσμα οι αποικίες που εμφανίζονται στο τρυβλίο να αποτελούνται αποκλειστικά από κύτταρα που φέρουν τον πλασμιδιακό φορέα, δηλαδή έχουν μετασχηματιστεί επιτυχώς. Η διαδικασία αυτή διεξάγεται κάτω από στείρες συνθήκες και τα αναλώσιμα και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται είναι αποστηρωμένα.

Γ.2.3. Πρωτεϊνική έκφραση

Γ.2.3.i). Διερεύνηση των συνθηκών έκφρασης μέσω μικρής κλίμακας καλλιέργειας

Σε κάθε πρωτεΐνη που μπορεί να εκφραστεί οι συνθήκες έκφρασής της ποικίλουν ως προς το θρεπτικό υλικό, τη θερμοκρασία, το χρόνο επαγωγής και τη συγκέντρωση IPTG που προστίθεται. Για τη διερεύνηση των βέλτιστων συνθηκών έκφρασης της πρωτεΐνης, πραγματοποιούνται δοκιμές έκφρασης σε υγρή καλλιέργεια ελαχίστων μέσων (minimal media, M9), χρησιμοποιώντας θρεπτικά μέσα τα οποία όμως περιέχουν μη-επισημασμένα συστατικά. Η επαγωγή της έκφρασης για τα βακτηριακά κύτταρα επιλέγεται να γίνει κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης, δηλαδή της απότομης αύξησης των κυττάρων. Αυτό ελέγχεται με τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (optical density, OD) στα 600nm και θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 0,6 και 0,9. Η επαγωγή της έκφρασης γίνεται με προσθήκη του IPTG. Οι

παράγοντες που επηρεάζουν την έκφραση της πρωτεΐνης και που επιδέχονται βελτιστοποίηση είναι:

- Η συγκέντρωση του IPTG: Γενικά η αποτελεσματικότερη απελευθέρωση του υποκινητή και η επαγόμενη έκφραση παρατηρούνται για συγκεντρώσεις IPTG 1mM. Σε περιπτώσεις που η ραγδαία αύξηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης αποτελεί αιτία κατακρήμνισης της πρωτεΐνης ή εμφάνισης τοξικότητας για τα βακτηριακά κύτταρα, επιλέγονται συγκεντρώσεις 0,1-0,8mM.
- Η θερμοκρασία: Οι υψηλές θερμοκρασίες επαγωγής (>32°C) ευνοούν τα ποσοστά έκφρασης της πρωτεΐνης. Σε περιπτώσεις εμφάνισης τοξικότητας στα κύτταρα ή κατακρήμνισης της πρωτεΐνης, η μείωση της θερμοκρασίας ευνοεί την επαγωγή της έκφρασης σε ορισμένες περιπτώσεις.
- Ο χρόνος επαγωγής κατά τον οποίο υπερεκφράζεται η πρωτεΐνη-στόχος: Η υπερέκφραση των πρωτεϊνών συμβαίνει συνήθως κατά τις πρώτες ώρες της επαγωγής της έκφρασης και στη συνέχεια μειώνεται εκθετικά, καθώς τα κύτταρα περνούν στη φάση θανάτου. Ο βέλτιστος χρόνος επαγωγής της έκφρασης εξετάζεται μετά από λήψη δειγμάτων κυττάρων από την καλλιέργεια (1,5ml δείγματος, φυγοκέντρηση και απόρριψη του υπερκείμενου) και μετά από έλεγχο με SDS-page, για 0, 2, 4, 6, 8h και μετά από περίπου 16h.

Γ.2.3.ii). Έκφραση της πρωτεΐνης μέσω των πρωτοτροφικών κυττάρων BL21(DE3)

Μετά το μετασχηματισμό των κυττάρων με το φορέα κλωνοποίησης και την ανάπτυξη των αποικιών τους στο τρυβλίο petri παρουσία στερεού θρεπτικού υλικού (LB με άγαρ) και αμπικιλλίνης (100μg/ml), ακολουθεί η παρασκευή προκαλλιέργειας και στοκ γλυκερόλης. Κατά τη δημιουργία προκαλλιέργειας γίνεται εμβολιασμός του υγρού θρεπτικού υλικού LB με μια αποικία ή μέρους του στοκ γλυκερόλης παρουσία αμπικιλλίνης. Η προκαλλιέργεια αναπτύσσεται υπό ισχυρή ανάδευση στους 37°C, στους 180rpm, για περίπου 16h. Μέρος της προκαλλιέργειας αυτής χρησιμοποιείται για τον εμβολιασμό της καλλιέργειας των κυττάρων με σκοπό την έκφραση της πρωτεΐνης. Για την ανάπτυξη υγρής καλλιέργειας ελάχιστων θρεπτικών μέσων (M9) πρωτοτροφικών κυττάρων χωρίς επισήμανση απαιτούνται εκτός από τα

φωσφορικά άλατα, μια μη-επισημασμένη πηγή αζώτου, μια μη-επισημασμένη πηγή άνθρακα, βιταμίνες, ανιόντα, διάφορα μέταλλα και ιχνοστοιχεία, αντιβιοτικό και μέρος της προκαλλιέργειας. Η ανάπτυξη των κυττάρων γίνεται με επώαση στους 37^{o}C, υπό ανάδευση στους 200rpm και ελέγχεται με τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD ~0,6-0,9). Στη συνέχεια, γίνεται επαγωγή της έκφρασης με προσθήκη του IPTG και ακολουθούνται οι βέλτιστες συνθήκες θερμοκρασίας και χρόνου επαγωγής της έκφρασης που προσδιορίστηκαν μέσω δοκιμών έκφρασης που πραγματοποιήθηκαν. Κατόπιν, τα κύτταρα συλλέγονται και επεξεργάζονται για την απομόνωση της πρωτεΐνης.

Όσον αφορά στην έκφραση επισημασμένης ^{15}N /^{13}C πρωτεΐνης ακολουθείται η ίδια διαδικασία με τη διαφορά ότι οι πηγές αζώτου ή/και άνθρακα που χρησιμοποιούνται αντίστοιχα, είναι επισημασμένες, ενώ για την έκφραση της τριπλά επισημασμένης πρωτεΐνης ακολουθείται ένα ελαφρώς διαφοροποιημένο πρωτόκολλο. Συγκεκριμένα, επειδή η έκφραση της πρωτεΐνης παρουσία δευτεριωμένου νερού (D_2O) δεν είναι ικανοποιητική, για να αυξηθεί η απόδοσή της, τα κύτταρα αναπτύσσονται σε υγρό, πλούσιο θρεπτικό μέσο, LB, παρουσία αντιβιοτικού, χωρίς να πραγματοποηθεί επαγωγή της έκφρασης. Ακολουθεί η συλλογή των κυττάρων αυτών. Η έκφραση της τριπλά επισημασμένης πρωτεΐνης σε υγρό θρεπτικό υλικό ελάχιστων μέσων (M9) απαιτεί τη χρήση δευτεριωμένου νερού (D_2O) αντί του ddH_2O. Σε αυτό το θρεπτικό μέσο προστίθεται η ^{15}N-επισημασμένη πηγή αζώτου, η ^{13}C-επισημασμένη πηγή άνθρακα, βιταμίνες, ιόντα, μέταλλα, ιχνοστοιχεία, το αντιβιοτικό (αμπικιλλίνη στη συγκεκριμένη περίπτωση) και κύτταρα που αναπτύχθηκαν σε υγρό θρεπτικό υλικό LB μέχρι το OD να αποκτήσει τιμή ~0,3. Η ανάπτυξη των κυττάρων αυτών γίνεται μέχρι το OD να αποκτήσει περίπου τις τιμές 0,6-0,9. Στη συνέχεια, ακολουθεί η επαγωγή της έκφρασης και η συλλογή των κυττάρων χωρίς αλλαγές στις συνθήκες έκφρασης της πρωτεΐνης.

Γ.2.3.iii). Έκφραση της πρωτεΐνης μέσω των αυξοτροφικών κυττάρων DL39(DE3)

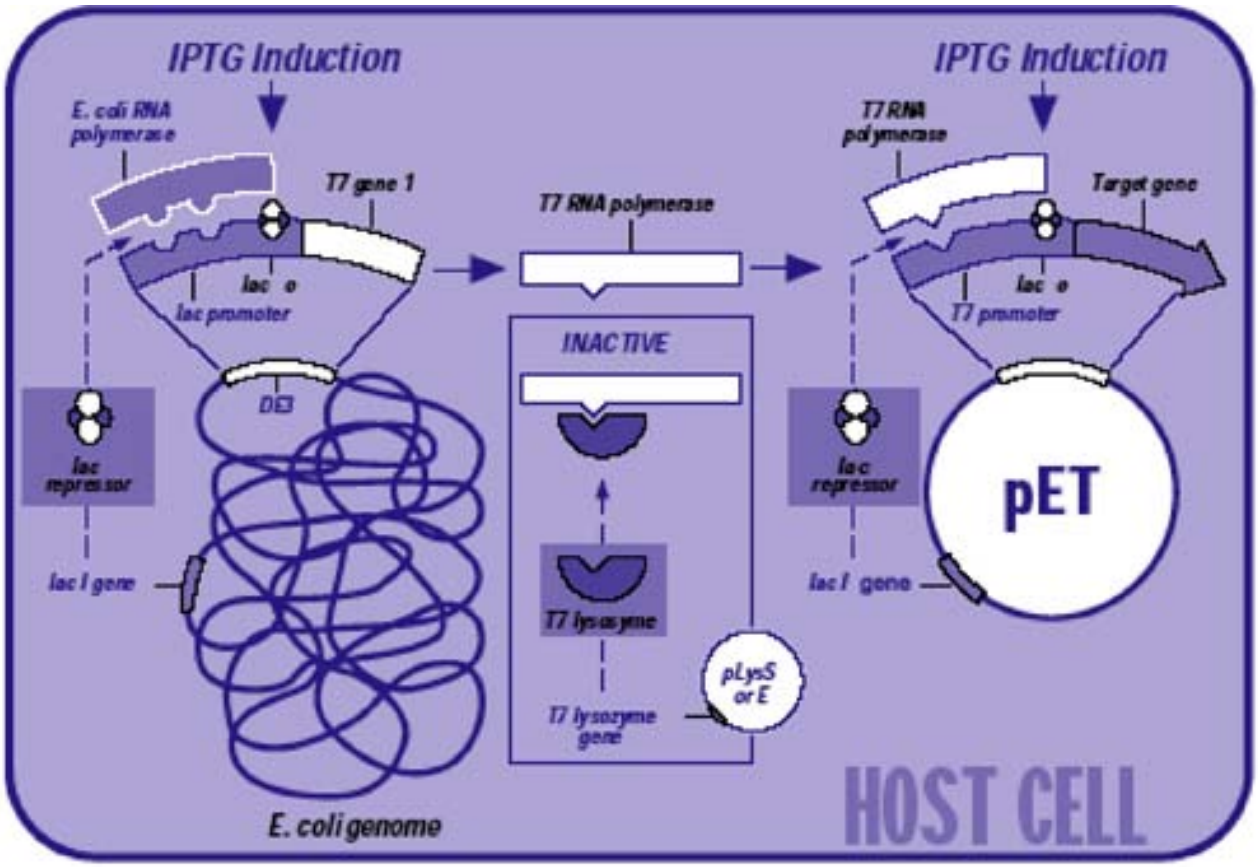
Η χρήση αυξοτροφικών κυττάρων DL39(DE3) για την έκφραση της πρωτεΐνης σε θρεπτικό υλικό ελαχίστων μέσων διαφοροποιείται από τα παραπάνω. Ως

μειονεκτήματα των κυττάρων αυτών αναφέρονται η μειωμένη έκφραση της πρωτεΐνης και το γεγονός ότι τα αυξοτροφικά κύτταρα δεν έχουν τη δυνατότητα σύνθεσης όλων των αμινοξέων. Επομένως, τα αμινοξέα που δεν συντίθενται ή συντίθενται σε ποσότητες που δεν είναι ικανές να καλύψουν τις ανάγκες των κυττάρων, πρέπει να προστεθούν εξωγενώς. Στην περίπτωση αυτή τα κύτταρα αναπτύσσονται σε υγρό θρεπτικό υλικό LB, παρουσία αντιβιοτικού σε μεγάλη κλίμακα και συλλέγονται χωρίς να πραγματοποιηθεί επαγωγή της έκφρασης. Μέρος των κυττάρων αυτών χρησιμοποιείται για εμβολιασμό του θρεπτικού υλικού ελαχίστων μέσων (M9) σε ποσότητα τέτοια ώστε το OD να φτάσει περίπου στο 0,3. Στο θρεπτικό μέσο προστίθεται πηγή αζώτου, πηγή άνθρακα σε μεγαλύτερη ποσότητα από την αντίστοιχη στα πρωκαρυωτικά και τα αμινοξέα που δεν συντίθενται από τα κύτταρα. Επίσης, προστίθενται βιταμίνες, ιόντα, μέταλλα και ιχνοστοιχεία σε διπλάσιες ποσότητες από τις αντίστοιχες στα πρωτοτροφικά κύτταρα, ενώ είναι απαραίτητη η προσθήκη αντιβιοτικού. Οι συνθήκες έκφρασης της πρωτεΐνης παραμένουν ίδιες με τις βέλτιστες, όπως αυτές διαπιστώθηκαν κατά τις δοκιμές έκφρασης. Ακολουθεί η συλλογή των κυττάρων και οι διαδικασίες για την απομόνωση της πρωτεΐνης.

Γ.2.3.iv). Το συστημα έκφρασης pET

Ο T7-προαγωγός και ο χειριστής της λακτόζης, τα οποία διαθέτει το πλασμίδιο pET και διαδραματίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην έκφραση του γονιδίου-στόχου, βρίσκονται στο 5΄ άκρο του γονιδίου στόχου. Επειδή ο T7-προαγωγός είναι ιογενής φορέας, μεταγράφει γρήγορα το γονίδιο και για όσο χρονικό διάστημα η T7-RNA-πολυμεράση είναι παρούσα. Η έκφραση της πρωτεΐνης αυξάνεται ραγδαία ανάλογα με το ποσό του mRNA που μεταγράφεται από το γονίδιο. Ο έλεγχος έκφρασης της πρωτεΐνης επιτυγχάνεται μέσω του εκκινητή λακτόζης και του χειριστή. Για να μπορέσει να μεταγραφεί το γονίδιο της πρωτεΐνης-στόχου θα πρέπει να είναι παρούσα η T7-πολυμεράση. Το γονίδιο στο χρωμόσωμα του κυττάρου ξενιστή φέρει έναν επαγώγιμο εκκινητή που ενεργοποιείται από IPTG. Το IPTG εκτοπίζει τον καταστολέα από το χειριστή της λακτόζης, καθώς αποτελεί ανάλογο

της λακτόζης. Δεδομένου ότι υπάρχουν χειριστές λακτόζης και για τα δύο γονίδια που κωδικοποιούν την T7-πολυμεράση και το γονίδιο στόχο, αντίστοιχα, το IPTG ενεργοποιεί και τα δύο γονίδια. Επομένως, όταν προστίθεται στο κύτταρο, εκφράζεται η T7-πολυμεράση και γρήγορα αρχίζει να μεταγράφει το γονίδιο-στόχο, το οποίο στη συνέχεια μεταφράζεται σε πρωτεΐνη-στόχο.



Εικόνα 17: Σύστημα έκφρασης του πλασμιδίου pET.20b(+)

Ένα επιπλέον πλεονέκτημα των φορέων έκφρασης pET αποτελεί το γεγονός ότι περιλαμβάνουν διάφορες ακολουθίες που βρίσκονται δίπλα στις θέσεις κλωνοποίησης και κωδικοποιούνται ως πεπτίδια-επίτοποι, τα οποία συντελούν στην απομόνωση της πρωτεΐνης αυτής. Στην περίπτωση του pET.20b(+) πρόκειται μια ακολουθία 6 ιστιδίνων (6xHis-tag).

Γ.2.4. Απομόνωση της πρωτεΐνης

Γ.2.4.i). Χρωματογραφία συγγένειας

Η χρωματογραφία συγγένειας αποτελεί μια αποτελεσματική χρωματογραφική τεχνική διαχωρισμού και απομόνωσης πρωτεϊνών[107-109]. Η αρχή της λειτουργίας της τεχνικής στηρίζεται στη χημική συγγένεια δέσμευσης. Συγκεκριμένα, η τεχνική αυτή εκμεταλλεύεται την υψηλή συγγένεια που εμφανίζουν πολλές πρωτεΐνες για ειδικές χημικές ομάδες. Στην περίπτωση αυτή η πρωτεΐνη $GLIC_{ΕΚΠ}$ εκφράστηκε συντηρημένη με επίτοπο 6 καταλοίπων ιστιδίνης (6His-tag). Ο επίτοπος των αμινοξέων αυτών έχει την ιδιότητα να προσδένεται ισχυρά σε ρητίνη που φέρει δισθενή ιόντα Zn^{2+}, τα οποία είναι ακινητοποιημένα επάνω στα σφαιρίδια νιτροτριακετικού οξέος (NTA) της ρητίνης. Τα ιόντα ψευδαργύρου ακινητοποιούνται πάνω στα σφαιρίδια ριτίνης γιατί το NTA των σφαιριδίων είναι ένας χηλικός παράγοντας με ικανότητα να δεσμεύει ιόντα Zn^{2+} στις τέσσερις χηλικές περιοχές αλληλεπίδρασης που διαθέτει. Η έκλουση της 6His-πρωτεΐνης από τη στήλη επιτυγχάνεται με προσθήκη στη στήλη διαλυμάτων αυξημένης συγκέντρωσης ενός χηλικού παράγοντα, του ιμιδαζολίου. Η δομή του ιμιδαζολίου προσομοιάζει αυτή της ιστιδίνης (που διαθέτει ιμιδαζολικό δακτύλιο). Το ιμιδαζόλιο ανταγωνίζεται την ιστιδίνη ως προς τη δέσμευση των ιόντων Zn^{2+} και τελικά αντικαθιστά την πρωτεΐνη στο δεσμό υψηλής συγγένειας με τα χηλικά σύμπλοκα των σφαιριδίων της ρητίνης της χρωματογραφικής στήλης, απελευθερώνοντάς την στο έκλουσμα. Με τον τρόπο αυτό γίνεται ο πρώτος διαχωρισμός της πρωτεΐνης $GLIC_{ΕΚΠ}$ από το μίγμα των βακτηριακών πρωτεϊνών που λαμβάνονται μετά τη λύση των μεμβρανών των κυττάρων.

Γ.2.4.ii). Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού

Το δεύτερο στάδιο καθαρισμού και απομόνωσης της πρωτεΐνης $GLIC_{ΕΚΠ}$ περιλαμβάνει τη χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού[110] σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (FPLC, Fast Perfomance Liquid Chromatography). Η χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (size exclusion chromatography), η οποία ονομάζεται και χρωματογραφία διήθησης με πηκτή (gel filtration chromatography,)

αποτελεί μια τεχνική ιδιαίτερα εφαρμόσιμη σε ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους . Η τεχνική αυτή δίνει τη δυνατότητα διαχωρισμού μορίων με διαφορετικά μοριακά βάρη, χρησιμοποιώντας μια στήλη μοριακού αποκλεισμού. Η αρχή λειτουργίας της στηρίζεται στο γεγονός ότι το υλικό πλήρωσης της στήλης αποτελείται από πορώδη ομοιόμορφα σφαιρίδια, μέσα από τους σπόρους των οποίων μπορούν να διαχέονται τα μόρια του διαλύτη και των διαλυμένων σωματιδίων. Όσο τα μόρια βρίσκονται μέσα στους πόρους παγιδεύονται σε αυτούς και απομακρύνονται με το ρεύμα ροής της κινητής φάσης. Ο μέσος χρόνος παραμονής στους πόρους εξαρτάται από το πραγματικό μέγεθος των μορίων. Μόρια μεγαλύτερα από το μέσο μέγεθος των πόρων αποβάλλονται χωρίς καμία κατακράτηση. Τα μόρια αυτά εκλούονται πρώτα από τη στήλη. Μόρια διαμέτρου σημαντικά μικρότερης από αυτή των πόρων μπορούν να διεισδύσουν και να διαπεράσουν μέσα από τους πόρους με αποτέλεσμα να παγιδεύονται για μεγαλύτερο χρόνο. Τα μόρια αυτά εκλούονται τελευταία από τη στήλη. Όσον αφορά στα μόρια ενδιάμεσου μεγέθους, ο μέσος όρος διείσδυσης στους πόρους του υλικού πλήρωσης της στήλης εξαρτάται από τη διάμετρό τους. Η ομάδα των μορίων αυτών υφίσταται διαχωρισμό, ο οποίος σχετίζεται άμεσα με το μέγεθος των μορίων και εν μέρει με το σχήμα τους. Με τον τρόπο αυτό γίνεται διαχωρισμός των μορίων με βάση το μοριακό τους βάρος.

Η στήλη μοριακού αποκλεισμού προσαρμόζεται σε ένα σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, FPLC (Fast Perfomance Liquid Chromatography). Ένα τυπικό FPLC αποτελείται από τη στήλη, ένα σύστημα αντλιών, ένα σύστημα ανίχνευσης UV, ένα συλλέκτη κλασμάτων και μία μονάδα ελέγχου. Ο έλεγχος του συστήματος γίνεται μέσω λογισμικού σε ηλεκτρονικό υπολογιστή. Το δείγμα εφαρμόζεται μέσω ενός βρόγχου και φορτώνεται χειροκίνητα με ένεση στη βαλβίδα εισαγωγής δείγματος.

Γ.2.4.iii). Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής

Η απομόνωση των πρωτεϊνών με τη χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής[111] στηρίζεται στην αντιστρεπτή προσρόφηση φορτισμένων μορίων στις καθηλωμένες ομάδες του ιοντικού ανταλλάκτη οι οποίες φέρουν αντίθετο φορτίο. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται λόγω του ότι τα διαφορετικά μόρια έχουν διαφορετικούς βαθμούς

αλληλεπίδρασης με τον ιοντικό ανταλλάκτη εξαιτίας των διαφορών στα φορτία, στις πυκνότητες του φορτίου και το διαχωρισμό των φορτίων στις επιφάνειές τους. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές μπορούν να ελεγχθούν με μεταβολή διαφόρων συνθηκών, όπως η ιοντική ισχύς και το pH.

Υπάρχουν δύο είδη ιοντικών ανταλλακτών, οι θετικά και οι αρνητικά φορτισμένοι. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ο ανιοντικός ανταλλάκτης της στήλης Mono Q 5/50 GL που φέρει σαν λειτουργική ομάδα $–CH_2-N^+(CH_3)_3$. Το πρώτο βήμα για τη χρήση της στήλης είναι η εξισορρόπηση της στατικής φάσης της στήλης στις επιθυμητές συνθήκες με τη χρήση του διαλύματος στο οποίο είναι διαλυμένες οι πρωτεΐνες. Ακολουθεί η χορήγηση του διαλύματος στο οποίο είναι διαλυμένες οι πρωτεΐνες μέσα στη στήλη. Με αυτή τη διαδικασία επιτυγχάνεται η προσρόφηση των πρωτεϊνών στις φορτισμένες ομάδες της στήλης με διαφορετικό βαθμό αλληλεπίδρασης και η απομάκρυνση των μη δεσμευμένων μορίων. Ακολουθεί η έκλουση, κατά την οποία τα βιομόρια απελευθερώνονται από τον ιοντοανταλλάκτη με τη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος διαφορετικής σύστασης. Μόρια με μεγαλύτερη αλληλεπίδραση καθυστερούν περισσότερο από μόρια με μικρότερη τάση για αλληλεπίδραση. Η έκλουση των μορίων από τη στήλη πραγματοποιείται εκλούοντας διαλύματα με διαβαθμισμένη συγκέντρωση άλατος (συνήθως NaCl σε συγκεντρώσεις από 0,05M μέχρι και 2M).

Γ.2.5. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου σε αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE electrophoresis)

Ο διαχωρισμός και η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος γίνεται με ηλεκτροφόρηση σε κάθετη πηκτή πολυακρυλαμιδίου, παρουσία δινατριούχου θειϊκού δωδεκαλικού νατρίου (SDS)[112, 113]. Η τεχνική αυτή στηρίζεται στο γεγονός ότι όταν ένα φορτισμένο μόριο βρεθεί σε ηλεκτροστατικό πεδίο, κινείται προς τον αντίθετα φορτισμένο πόλο. Διαφορετικά μόρια, με διαφορετική ένταση φορτίου, όταν βρεθούν σε ηλεκτρικό πεδίο κινούνται με ταχύτητα που εξαρτάται

από την ένταση του φορτίου που φέρουν και από το μέγεθος και το σχήμα τους. Συγκεκριμένα, οι πρωτεΐνες κατά την έκθεσή τους στο αρνητικά φορτισμένο απορρυπαντικό SDS αποκτούν αρνητικό φορτίο ανάλογο με τον αριθμό των αμινοξέων που διαθέτουν, οι πρωτεΐνες διατηρούνται αποδιαταγμένες και μετακινούνται προς το θετικό πόλο με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη προς το μέγεθός τους. Με αυτό τον τρόπο η συμπεριφορά των πρωτεϊνών κατά την ηλεκτροφόρηση εξαρτάται μόνο από το μοριακό τους βάρος. Κατά τη μέθοδο της κάθετης ηλεκτροφόρησης, οι πρωτεΐνες τοποθετούνται αρχικά σε πηκτή χαμηλής περιεκτικότητας σε ακρυλαμίδιο (πηκτή φόρτωσης), η οποία χρησιμεύει στην προετοιμασία των πρωτεϊνών, ενώ ο διαχωρισμός πραγματοποιείται, αφού οι πρωτεΐνες περάσουν σε πηκτή υψηλής περιεκτικότητας σε ακρυλαμίδιο (πηκτή διαχωρισμού). Ανάλογα με το μέγεθος των πρωτεϊνών που αναμένονται να βρίσκονται στο δείγμα που ηλεκτροφορείται, κυμαίνεται και η πυκνότητα της πηκτής διαχωρισμού. Για το διαχωρισμό πρωτεϊνών μεγάλου μοριακού βάρους χρησιμοποιείται πηκτή μικρής πυκνότητας, ενώ για το διαχωρισμό πρωτεϊνών μικρού μοριακού βάρους χρησιμοποιείται πηκτή μεγάλης πυκνότητας.

Α. Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμιδίου

Η πηκτή φόρτωσης (stacking gel) περιέχει 3ml ddH_2O, 0,5ml ακρυλαμιδίου 40%, 1,25ml Tris-base 0,5M pH 6,8, 10% w/v SDS, 25μl APS 10%, 5μl TEMED. Η πηκτή διαχωρισμού (running gel ή separating gel) 17% (σε ακρυλαμίδιο) περιέχει 2,9ml ddH_2O, 3,4ml ακρυλαμιδίου 40%, 2,2ml Tris-base 1,5M pH8,8, 10% w/v SDS, 50μl APS 10%, 5μl TEMED. Το APS (Ammonium Per Sulfate) και το TEMED (N,N,N′,N′,-τετραμεθυλεθυλενδιαμίνη) χρησιμοποιούνται ως καταλύτες πολυμερισμού του ακρυλαμιδίου.

Β. Προετοιμασία δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση

Τα δείγματα που προορίζονται για ηλεκτροφόρηση αναμειγνύονται με διάλυμα «φόρτωσης» πρωτεϊνών, το οποίο περιέχει SDS και β-μερκαπτοαιθανόλη και επωάζονται για 5min σε θερμοκρασία βρασμού (100°C). Οι συνθήκες αυτές είναι αποδιατακτικές για τις πρωτεΐνες, καθώς ο βρασμός παρουσία SDS έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση δεσμών (υδρογόνου, ιοντικών, υδρόφοβων και Van der

Waals αλληλεπιδράσεων), ενώ η β-μερκαπτοαιθανόλη προκαλεί διάσπαση των δισουλφιδικών δεσμών. Παράλληλα με τα προς εξέταση δείγματα, γίνεται ανάλυση μείγματος πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους, που χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες μοριακών μεγεθών.

Γ. Ηλεκτροφόρηση και ανίχνευση των πρωτεϊνικών ζωνών

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται υπό σταθερή τάση 120V, σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών. Οι ζώνες των πρωτεϊνών εμφανίζονται μετά από χρώση του πηκτώματος με ήπια ανάδευση σε διάλυμα χρωματισμού για 30 min στους 37^{o}C και μετέπειτα αποχρωματισμό με συνεχείς πλύσεις σε διάλυμα αποχρωματισμού και σε θερμοκρασία δωματίου, μέχρι να απομακρυνθεί η περίσσεια χρωστικής. Οι πρωτεΐνες συνδέονται ισχυρά με τα μόρια των χρωστικών με αποτέλεσμα οι ζώνες οι οποίες αντιστοιχούν στις πρωτεΐνες να παραμένουν χρωματισμένες κατά την απομάκρυνση της χρωστικής. Η μελέτη του πρωτεϊνικού δείγματος γίνεται μετά από σύγκρισή του με τους μάρτυρες μοριακών μεγεθών.

Ενότητα Δ

Πειραματικό Μέρος

Δ.1. Μετασχηματισμός των βακτηριακών κυττάρων E.coli BL21(DE3) και των κυττάρων DL39(DE3) με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pET20b(+)

Ο μετασχηματισμός των επιδεκτικών κυττάρων *E.coli BL21(DE3)* με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο *pET20b(+)* πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την τεχνική που περιγράφηκε στην παράγραφο Γ.2.2. Μια θετική αποικία μετασχηματισμένων κυττάρων, η οποία αναπτύχθηκε στο τρυβλίο επιλέγεται για τον εμβολιασμό υγρού θρεπτικού υλικού, τη δημιουργία stock γλυκερόλης και την έκφραση της προς μελέτη πρωτεΐνης. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται για το μετασχηματισμό των «επιδεκτικών», αυξοτροφικών κυττάρων *DL39(DE3)* από το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο *pET20b(+).*

Δ.2. Εύρεση των βέλτιστων συνθηκών έκφρασης της πρωτεΐνης $GLIC_{EKΠ}$

Δ.2.1. Ανάπτυξη προκαλλιέργειας

Μετά το μετασχηματισμό, αναπτύσσεται υγρή καλλιέργεια LB, η οποία εμβολιάζεται με μία αποικία από το στερεό θρεπτικό υλικό. Συγκεκριμένα, σε πλαστικό σωλήνα των 50ml που περιέχει 10ml υγρού θρεπτικού υλικού LB και 10μl αμπικιλλίνης πραγματοποιείται εμβολιασμός του θρεπτικού υλικού με τα κύτταρα. Η προκαλλιέργεια αυτή επωάζεται σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C, υπό ισχυρή ανάδευση στους 180rpm (rounds per minute) για περίπου 12-16 ώρες. Με αυτή τη διαδικασία προκύπτει η ανάπτυξη προκαλλιέργειας, η οποία χρησιμοποιείται τόσο για τη δημιουργία stock γλυκερόλης, όσο και για την ανάπτυξη καλλιέργειας βακτηρίων σε μεγάλη κλίμακα.

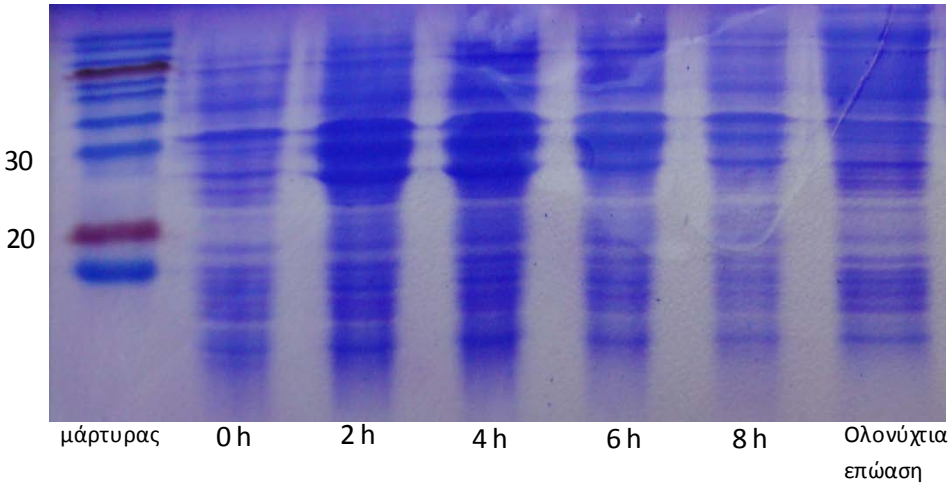
Δ.2.2. Δημιουργία stock γλυκερόλης

Σε αποστειρωμένο πλαστικό σωληνάριο (eppendorf) προστίθενται 500μl από την προκαλλιέργεια και 500μl γλυκερόλη, η οποία έχει αποστειρωθεί. Ακολουθεί η ομογενοποίηση του μείγματος με ανακίνηση του σωληναρίου και αποθήκευση του stock γλυκερόλης στους -80°C. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται για τη μακροχρόνια διατήρηση και αποθήκευση των μετασχηματισμένων κυττάρων.

Δ.2.3. Ανάπτυξη υγρής καλλιέργειας ελαχίστων μέσων για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών έκφρασης της πρωτεΐνης

Χρησιμοποιείται κωνική φιάλη των 250ml, που περιέχει 80ml ddH_2O (double distilled water) και 20ml M9X5, τα οποία έχουν υποστεί αποστείρωση. Σε αυτά προστίθενται 1ml από την προκαλλιέργεια, η οποία αναπτύχθηκε τις προηγούμενες 12-16 ώρες, 200μl διαλύματος Q, 100μl διαλύματος $MgSO_4$ 1M, 100μl βιοτίνης (0,5mg/ml), 100μl θειαμίνης (0,5mg/ml), 0,4g γλυκόζης, 0,1g $(NH_4)_2SO_4$ και 100μl αμπικιλλίνης. Τα κύτταρα επωάζονται μέχρι η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας (Optical Density, OD) στα 600nm να φτάσει περίπου στις τιμές 0,6-0,9. Τότε γίνεται προσθήκη 100μl διαλύματος IPTG 1M. Μετά την προσθήκη του IPTG συλλέγονται δείγματα σε φιαλίδια από την καλλιέργεια κατά την προσθήκη του IPTG και ανά δύο ώρες. Τα δείγματα που συλλέγονται φυγοκεντρούνται στις 15.000 rpm για 2 λεπτά και απορρίπτεται το υπερκείμενο. Τα κυτταρικά δείγματα προετοιμάστηκαν για ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου SDS με προσθήκη σε αυτά 100μl διαλύματος φόρτωσης δειγμάτων 1X πυκνό με 50mM DTT (Γ.1.8). Στη συνέχεια, τα κυτταρικά δείγματα επωάζονται σε νερό που βρίσκεται σε κατάσταση βρασμού (100°C) για 4 λεπτά, στη συνέχεια τοποθετούνται στους -80°C για 30 λεπτά και ξανά σε νερό που βρίσκεται σε κατάσταση βρασμού για 2 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 15 λεπτά και ηλεκτροφόρησή τους σε πηκτή περιεκτικότητας 17% σε ακρυλαμίδιο. Από την πηκτή ηλεκτροφόρησης σημειώθηκε ο χρόνος που απαιτείται για την εμφάνιση της μέγιστα υπερεκφρασμένης ζώνης (σε σύγκριση με αυτές που αντιστοιχούν στις λιγότερες ή περισσότερες ώρες έκφρασης), η οποία αντιστοιχεί στο μοριακό βάρος της πρωτεΐνης-στόχου μετά την προσθήκη IPTG. Από

την πηκτή (Εικόνα 18) διαπιστώνεται ότι η $GLIC_{ΕΚΠ}$ φτάνει στη μέγιστη έκφραση 4 ώρες μετά την προσθήκη IPTG στην καλλιέργεια.



Εικόνα 18: SDS-PAGE που απεικονίζει τη δοκιμή έκφρασης για 0, 2, 4, 6, 8 ώρες και μετά από ολονύχτια επώαση μετά την προσθήκη IPTG.

Δ.3. Υγρή καλλιέργεια για την έκφραση της $GLIC_{ΕΚΠ}$

Δ.3.1. Προκαλλιέργεια

Σε πλαστικό σωλήνα των 50ml προστίθενται 20ml αποστειρωμένου LB, 20μl αμπικιλλίνης και μικρή ποσότητα από το stock γλυκερόλης. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται επώαση υπό ανάδευση στους 37°C, σε 180rpm για 12-16 ώρες.

Δ.3.2. Υγρή καλλιέργεια σε θρεπτικό υλικό ελαχίστων μέσων (minimal media, M95X)

Σε δύο κωνικές φιάλες των 2L, προστίθενται 800ml ddH_2O και 200ml M95X, τα οποία έχουν υποστεί αποστείρωση. Σε αυτά προστίθενται 10ml προκαλλιέργειας, 2ml διαλύματος Q, 1ml διαλύματος $MgSO_4$ 1M, 1ml βιοτίνης (0,5 mg/ml βιοτίνης σε ddH_2O), 1ml θειαμίνης (0,5 mg/ml θειαμίνης σε ddH_2O, 4g γλυκόζης, 1g $(NH_4)_2SO_4$ και 1ml αμπικιλλίνης (0,1 g/ml). Τα κύτταρα επωάζονται σε 180rpm μέχρι η οπτική πυκνότητα (OD) να φτάσει περίπου στις τιμές 0,6-0,9. Τότε προστίθεται στην υγρή καλλιέργεια 1ml/L διαλύματος IPTG 1M και τα κύτταρα επωάζονται στις ίδιες συνθήκες για 4 ώρες.

Δ.3.3. Συλλογή των κυττάρων

Μετά την έκφραση της πρωτεΐνης, ακολουθεί η συλλογή των κυττάρων από την υγρή καλλιέργεια. Η καλλιέργεια μοιράζεται σε ειδικούς πλαστικούς σωλήνες των 250ml και φυγοκεντρείται για 20 λεπτά, σε 8000rpm (4°C). Στη συνέχεια, απορρίπτεται το υπερκείμενο, τα κύτταρα εκπλένονται με διάλυμα ιμιδαζολίου 10mM, συλλέγονται σε πλαστικό σωλήνα των 50ml και αποθηκεύονται στους -20°C.

Δ.3.4. Λύση των βακτηριακών κυττάρων μέσω υπερήχων

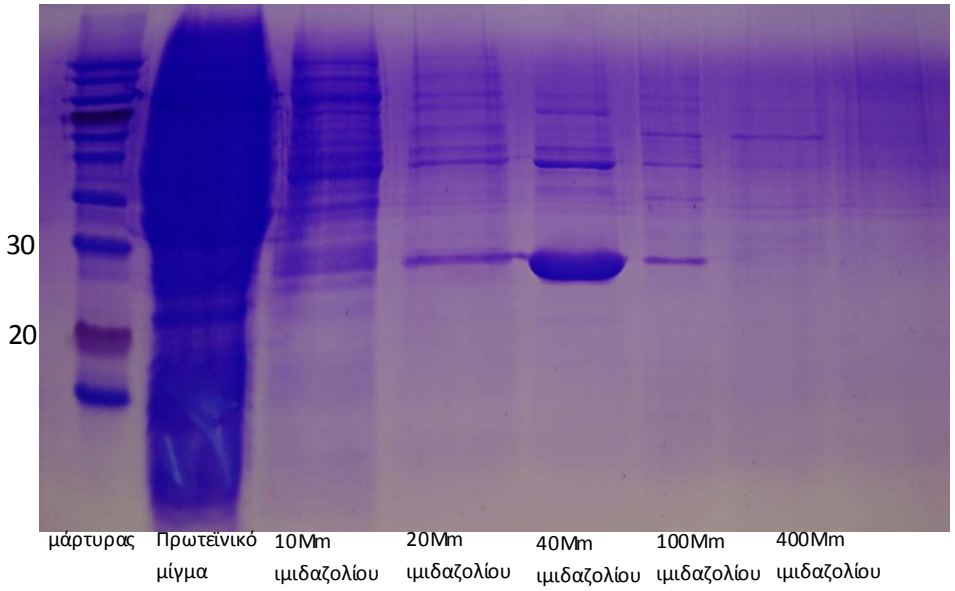
Η λύση των βακτηριακών κυττάρων πραγματοποιείται με τη χρήση υπερήχων σε ειδικό μηχάνημα (μηχάνημα υπερήχων για τη λύση των μεμβρανών των κυττάρων Sonicator Ultrasonic Processor-QSONICA, LLC). Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας αυτής ο πλαστικός σωλήνας που περιέχει τα κύτταρα βρίσκεται σε πάγο. Η εφαρμογή των υπερήχων διαρκεί 10 δευτερόλεπτα και ενδιάμεσα υπάρχει μια παύση της διαδικασίας για 5 λεπτά, έτσι ώστε να αποφεύγεται η αύξηση της θερμοκρασίας στο διάλυμα των κυττάρων. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται 10 φορές. Πριν τη λύση τους τα κύτταρα ζυγίζονται και μετά προστίθεται σε αυτά μείγμα αναστολέων πρωτεολυτικών ενζύμων (πρωτεασών) σε αναλογία 1ml για κάθε 20g κυττάρων. Αμέσως μετά τα κύτταρα φυγοκεντρούνται στις 10.000rpm για 1 ώρα (4°C). Δείγματα από το υπερκείμενο και από το ίζημα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου SDS, με σκοπό να διαπιστωθεί εάν η πρωτεΐνη βρίσκεται στο διαλυτό μέρος των κυττάρων (υπερκείμενο) ή στο μη-διαλυτό μέρος τους (ίζημα). Παρατηρείται ότι η $GLIC_{ΕΚΠ}$ βρίσκεται στο διαλυτό μέρος, το οποίο υφίσταται και περαιτέρω επεξεργασία για την απομόνωσή της πρωτεΐνης.

Δ.4. Απομόνωση της πρωτεΐνης $GLIC_{ΕΚΠ}$

Δ.4.1. Απομόνωση της πρωτεΐνης $GLIC_{ΕΚΠ}$ με χρωματογραφία συγγένειας

Η πρωτεΐνη $GLIC_{ΕΚΠ}$ εκφράστηκε με επίτοπο 6 καταλοίπων ιστιδίνης (6His-tag) στο C-τελικό της άκρο. Επομένως, η πρώτη απομόνωση της πρωτεΐνης

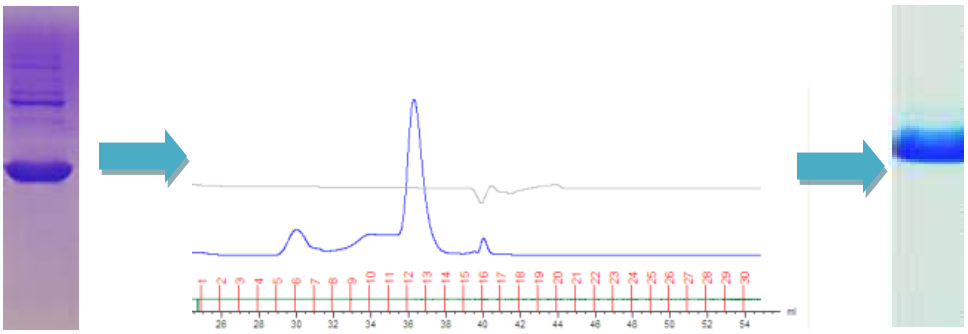
πραγματοποιείται με τη χρήση της στήλης His-tag. Αρχικά, στη ρητίνη της στήλης ακινητοποιούνται δισθενή ιόντα ψευδαργύρου (Zn^{2+}) και στη συνέχεια εκπλένεται με ddH_2O, ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια ψευδαργύρου που δεν προσδέθηκε στη ρητίνη. Ακολουθεί η βαθμονόμηση της στήλης (calibration) με διάλυμα ιμιδαζολίου 10mM και εισαγωγή του δείγματος στη στήλη χρησιμοποιώντας χαμηλή ταχύτητα ροής. Κατόπιν, εισάγεται στη στήλη μια σειρά από διαλύματα σταδιακά αυξανόμενης συγκέντρωσης ιμιδαζολίου και συγκεκριμένα διαλύματα συγκεντρώσεων 10mM, 20mM, 40mM, 100mM και 400mM ιμιδαζολίου. Η έκλουση της $GLIC_{ΕΚΠ}$-6His πραγματοποιείται κατά την εισαγωγή του διαλύματος 40mM ιμιδαζολίου στη στήλη. Το ιμιδαζόλιο αντικαθιστά την $GLIC_{ΕΚΠ}$-6His στο δεσμό υψηλής συγγένειας με το μεταλλικό ιόν και έτσι απελευθερώνεται από τη ρητίνη. Τέλος, η στήλη εκπλένεται με EDTA για την απομάκρυνση του ψευδαργύρου και του ιμιδαζολίου και στη συνέχεια εκπλένεται με άφθονο ddH_2O. Η στήλη αποθηκεύεται στους 4°C και είναι έτοιμη για επόμενη χρήση. Το κλάσμα που περιέχει την $GLIC_{ΕΚΠ}$ συγκεντρώνεται στα 2ml με τη χρήση ειδικών φίλτρων συγκέντρωσης (amicon) των 10.000 MWCO (Molecular Weight Cut-Off). Το δείγμα φυγοκετρείται στις 4500 rpm μέχρι να φτάσει στην επιθυμητή ποσότητα (2ml).



Εικόνα 19: SDS-PAGE που απεικονίζει την ποιότητα των κλασμάτων μετά τη χρωματογραφία συγγένειας.

Δ.4.2. Απομόνωση της πρωτεΐνης $GLIC_{ΕΚΠ}$ με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού

Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη μετά την απομόνωσή της μέσω χρωματογραφίας συγγένειας, σε δεύτερο στάδιο εμπλουτίζεται μέσω χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού. Για την απομόνωσή της επιλέχθηκε η στήλη μοριακής διήθησης Superose 12_10/300 και η συσκευή FPLC της Amersham Biosciences. Αρχικά, η στήλη βαθμονομείται με διάλυμα φωσφορικών (K_2HPO_4 και KH_2PO_4) 50Mm, pH 7 και στη συνέχεια εισάγεται το δείγμα στη στήλη και ακολουθεί η έκλουση των πρωτεϊνών ανάλογα με το μοριακό βάρος τους. Η περιοχή στην οποία εντοπίζεται η πρωτεΐνη-$GLIC_{ΕΚΠ}$ εμφανίζεται στην εικόνα του χρωματογραφήματος (Εικόνα 20).



Εικόνα 20: Απομόνωση της πρωτεΐνης με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού

Η περιοχή αυτή εντοπίζεται μετά από ηλεκτροφόρηση δειγμάτων από τα κλάσματα που προέκυψαν σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (Εικόνα 20). Ακολουθεί συμπύκνωση του δείγματος με τον ίδιο τρόπο που πραγματοποιήθηκε μετά τη χρωματογραφία συγγένειας. Επίσης, πραγματοποιείται αλλαγή του διαλύματος στο οποίο βρίσκεται η πρωτεΐνη με τη χρήση του amicon από διάλυμα φωσφορικών (K_2HPO_4 και KH_2PO_4)σε Tris-HCl 20mM.

Δ.4.3. Απομόνωση της πρωτεΐνης $GLIC_{ΕΚΠ}$ με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής

Για να επιτευχθεί η πλήρης απομόνωση της πρωτεΐνης $GLIC_{ΕΚΠ}$ ακολούθησε η χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής. Η στήλη ιοντοανταλλαγής που χρησιμοποιείται είναι η "Mono Q" της Amersham Biosciences. Ως διάλυμα εκκίνησης χρησιμοποιείται το διάλυμα 20mM Tris-HCl, pH 8 και ως διάλυμα έκλουσης το 20mM

Tris-HCl και 1M NaCl, pH 8. Μετά από τη βαθμονόμηση της στήλης με το διάλυμα εκκίνησης, ακολουθεί η εισαγωγή του δείγματος στη στήλη και η αποδέσμευση των πρωτεϊνών από τη στήλη με τη χρήση διαλύματος έκλουσης, το οποίο εισάγεται στη στήλη με αυξανόμενη συγκέντρωση. Με αυτό τον τρόπο πραγματοποιείται η πλήρης απομόνωση της πρωτεΐνης και αυτό αποτυπώνεται στην πηκτή ηλεκτροφόρησης πολυακρυλαμιδίου. Τέλος, τα κλάσματα στα οποία η πρωτεΐνη είναι πλήρως απομονωμένη συμπυκνώνονται στα 450μl.

Δ.5. Ποσοτικός προσδιορισμός της $GLIC_{ΕΚΠ}$ – Προετοιμασία NMR - δείγματος

Ο ποσοτικός προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε μετά από μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 280nm με τη χρήση του φασματοφωτόμετρου ορατού/υπεριώδους JENWAY 6305. Μετά τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας ακολουθεί ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης με το νόμο Lambert-Beer που ορίζει ότι η οπτική πυκνότητα της πρωτεΐνης είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης, (c), το μήκος της διαδρομής που διανύεται στο διάλυμα (δηλαδή το μήκος της κυψελίδας, α) και το συντελεστή απορροφητικότητας της πρωτεΐνης (ε). Δηλαδή:

$$\text{οπτική πυκνότητα} = (\alpha) \times (\varepsilon) \times (c)$$

Μετά τον ποσοτικό προσδιορισμό της πρωτεΐνης, ακολουθεί η εισαγωγή του δείγματος σε σωλήνες NMR και η λήψη των NMR φασμάτων.

Δ.6. Έκφραση και απομόνωση της επισημασμένης ^{15}N ή/και ^{13}C ή/και ^{2}H πρωτεΐνης $GLIC_{ΕΚΠ}$

Η έκφραση της ^{15}N-επισημασμένης και της $^{15}N,^{13}C$- επισημασμένης πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ^{15}N και $^{15}N,^{13}C$-επισημασμένων αντιδραστηρίων ($^{15}NH_4Cl$ ή/και ^{13}C-D-γλυκόζη) κατά την ανάπτυξη υγρής καλλιέργειας, αντίστοιχα. Οι συνθήκες έκφρασης και η πειραματική πορεία απομόνωσης της πρωτεΐνης είναι ίδιες με αυτές που εφαρμόζονται κατά την παραγωγή των μη-επισημασμένων πρωτεϊνών, με τη διαφορά ότι το $^{15}NH_4Cl$ ή/και η ^{13}C-γλυκόζη αντικαθιστούν το $(NH_4)_2SO_4$ και τη γλυκόζη, αντίστοιχα. Σε κάποια δείγματα ^{15}N-επισημασμένης και της $^{15}N,^{13}C$-επισημασμένης πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε το ενισχυτικό μέσο ^{15}N-isogro και το $^{15}N,^{13}C$-isogro, αντίστοιχα. Πρόκειται για εκχύλισμα από φύκια, το οποίο περιέχει μίγμα αμινοξέων και επιταχύνει την ανάπτυξη των κυττάρων, ενώ ενισχύει την έκφραση της πρωτεΐνης.

Όσον αφορά στην έκφραση της $^{15}N,^{13}C,^{2}H$-επισημασμένης πρωτεΐνης, ως πηγή αζώτου και άνθρακα χρησιμοποιούνται τα $^{15}NH_4Cl$ και η ^{13}C-D-γλυκόζη, ενώ το ddH_2O αντικαθιστάται από D_2O. Επίσης, τα κύτταρα, αρχικά, αναπτύσσονται σε υγρή καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας. Επομένως, 10ml προκαλλιέργειας μεταφέρονται σε 1L αποστειρωμένου LB στο οποίο προστίθεται 1ml αμπικιλλίνης. Τα κύτταρα αναπτύσσονται χωρίς να πραγματοποιηθεί επαγωγή της έκφρασης μέχρι η οπτική πυκνότητα στα 600nm να φτάσει περίπου 0,8-0,9. Στη συνέχεια, τα κύτταρα συλλέγονται και με αυτά πραγματοποιείται ο εμβολιασμός του θρεπτικού υλικού M9. Οι συνθήκες έκφρασης και η πειραματική πορεία απομόνωσης της πρωτεΐνης παραμένουν ίδιες.

Δ.7. Επιλεκτική αντίστροφη επισήμανση της αργινίνης (Arg) σε ^{15}N υπόβαθρο

Η ανάπτυξη της προκαλλιέργειας πραγματοποιείται χωρίς καμία αλλαγή, όπως περιγράφεται παραπάνω. Το ίδιο ισχύει και για την ανάπτυξη της καλλιέργειας της ^{15}N-επισημασμένης πρωτεΐνης, με τη διαφορά ότι όταν η οπτική πυκνότητα φτάσει περίπου 0,3-0,4 προστίθενται 0,15g/L ^{14}N-Arg (περίπου μία ώρα πριν την επαγωγή της έκφρασης). Στη συνέχεια, πραγματοποιείται επαγωγή της έκφρασης (OD 0,6-0,9) και συλλογή των κυττάρων, διατηρώντας τις ίδιες συνθήκες. Η πειραματική πορεία απομόνωσης της πρωτεΐνης παραμένει ίδια.

Δ.8. Επιλεκτική αντίστροφη επισήμανση της λυσίνης (Lys) σε ^{15}N υπόβαθρο και επιλεκτική ^{15}N-επισήμανση λυσίνης

Η διαδικασία της αντίστροφης επισήμανσης της λυσίνης είναι ίδια με την αντίστοιχη της αργινίνης με τη διαφορά ότι αντί της προσθήκης Arg γίνεται προσθήκη 0,15g/L ^{14}N-Lys.

Όσον αφορά στην επιλεκτική ^{15}N-επισήμανση Lys ακολουθείται η διαδικασία έκφρασης της μη-επισημασμένης πρωτεΐνης σε ελάχιστα μέσα. Κατά την ανάπτυξη των κυττάρων στην υγρή καλλιέργεια ελαχίστων μέσων παρεμβάλλεται ένα επιπλέον στάδιο πριν τη προσθήκη IPTG. Όταν το OD φτάσει 0,3-0,4 (δηλαδή περίπου 1 ώρα πριν την επαγωγή της έκφρασης) προστίθενται στην καλλιέργεια 0,15g/L ^{15}N-Lys. Οι συνθήκες έκφρασης και η πειραματική πορεία απομόνωσης της πρωτεΐνης παραμένουν ίδιες.

Δ.9. Επιλεκτική ^{15}N-επισήμανση ιστιδίνης (His) και ασπαραγίνης (Asn)

Για την επιλεκτική ^{15}N-επισήμανση των καταλοίπων ιστιδίνης (^{15}N-His) απαιτείται η έκφραση της πρωτεΐνης με μη-επισημασμένες πηγές αζώτου και άνθρακα και την προσθήκη του ^{15}N-επισημασμένου αμινοξέος. Συγκεκριμένα, οι

διαδικασίες έκφρασης και απομόνωσης της πρωτεΐνης που χρησιμοποιούνται είναι αυτές που απαιτούνται για την έκφραση της μη-επισημασμένης πρωτεΐνης με τη διαφορά ότι κατά την ανάπτυξη των κυττάρων και περίπου όταν το OD φτάσει περίπου 0,3-0,4 (μια ώρα πριν την προσθήκη του IPTG), προστίθενται 0,15g/L ^{15}N-His. Με αυτό τον τρόπο πραγματοποιείται η επιλεκτική ^{15}N-επισήμανση των ιστιδίνων, ενώ όλα τα υπόλοιπα αμινοξικά κατάλοιπα παραμένουν μη-επισημασμένα. Με τον ίδιο τρόπο πραγματοποιείται και η επιλεκτική ^{15}N-επισήμανση των καταλοίπων ασπαραγίνης (Asn).

Δ.10. Εφαρμογή επιλεκτικής ^{15}N-επισήμανσης και αντίστροφης επισήμανσης της λευκίνης (Leu)

Δ.10.1. Επιλεκτική αντίστροφη επισήμανση της λευκίνης (Leu) σε ^{15}N υπόβαθρο

Η διαδικασία που ακολουθείται για την αντίστροφη επισήμανση της λευκίνης είναι ίδια με την αντίστοιχη διαδικασία, η οποία περιγράφεται παραπάνω, για την αντίστροφη επισήμανση της αργινίνης, με τη διαφορά ότι αντί για αργινίνη προστίθενται 0,15g/L ^{14}N-Leu.

Δ.10.2. Επιλεκτική ^{15}N-επισήμανση της λευκίνης (^{15}N-Leu)

Για την επιλεκτική ^{15}N-επισήμανση της Leu δοκιμάστηκαν διαφορετικές διαδικασίες επιλεκτικής επισήμανσης, έτσι ώστε να επιτευχθεί το καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα επιλεκτικής επισήμανσης. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε η ίδια διαδικασία με την επιλεκτική ^{15}N-επισήμανση της λυσίνης, με τη διαφορά ότι προστίθενται 0,15g/L ^{15}N-Leu αντί για ^{15}N-Lys.

Δ.10.3. Έκφραση της πρωτεΐνης σε κύτταρα BL21(DE3) με προσθήκη ^{15}N-Leu και ^{14}N-Val, ^{14}N-Ile

Εξαιτίας της εμφάνισης του φαινομένου της μη-ειδικής επισήμανσης έγιναν προσπάθειες για την εξάλειψη του φαινομένου αυτού. Επομένως, η μη-ειδική επισήμανση της βαλίνης και της ισολευκίνης, που εμφανίζεται κατά την επιλεκτική ^{15}N-επισήμανση της λευκίνης έγιναν προσπάθειες να εξαληφθεί με την προσθήκη ^{14}N-

Val και ^{14}N-Ile. Συγκεκριμένα, ακολουθείται η ίδια διαδικασία έκφρασης της μη-επισημασμένης πρωτεΐνης σε ελάχιστα μέσα και η απομόνωσή της. Σε αυτή την περίπτωση όμως κατά την επαγωγή της έκφρασης, εκτός από την προσθήκη IPTG προστίθενται 0,085g/L ^{15}N-Leu, 0,51g/L ^{14}N-Val και 0,51g/L ^{14}N-Ile (δηλαδή οι ποσότητες των μη-επισημασμένων αμινοξέων που προστίθενται είναι εξαπλάσιες από την ποσότητα της ^{15}N-Leu). Οι διαδικασίες έκφρασης και απομόνωσης της πρωτεΐνης παραμένουν ίδιες.

Δ.10.4. Έκφραση της πρωτεΐνης-$GLIC_{ΕΚΠ}$ σε κύτταρα DL39(DE3) με προσθήκη ^{15}N-Leu

Για την έκφραση της πρωτεΐνης $GLIC_{ΕΚΠ}$ σε κύτταρα DL39(DE3) απαιτείται η δημιουργία προκαλλιέργειας, όπως περιγράφεται παραπάνω. Στην περίπτωση αυτή όμως τα μετασχηματισμένα κύτταρα με τα οποία γίνεται εμβολιασμός είναι τα DL39(DE3). Την επόμενη μέρα 10ml προκαλλιέργειας μεταφέρονται σε 1L αποστειρωμένου LB, στο οποίο προστίθεται 1ml αμπικιλλίνης. Τα κύτταρα αναπτύσσονται χωρίς να πραγματοποιηθεί η επαγωγή της έκφρασης, μέχρι η οπτική πυκνότητα στα 600nm να φτάσει περίπου 0,8-0,9. Στη συνέχεια, τα κύτταρα συλλέγονται. Σε δύο κωνικές φιάλες των 2L, οι οποίες περιέχουν 800ml ddH_2O και 200ml M95X, (τα οποία έχουν υποστεί αποστείρωση) πραγματοποιείται εμβολιασμός με τα παραπάνω κύτταρα μέχρι το OD να φτάσει περίπου στο 0,3. Σε καθεμιά από τις δύο κωνικές φιάλες προστίθενται επίσης 5g γλυκόζης, 1g $(NH_4)_2SO_4$, 4ml διαλύματος Q, 2ml βιοτίνης, 2ml θειαμίνης, 1ml διαλύματος $MgSO_4$, 1ml αμπικιλλίνης και οι παρακάτω ποσότητες των αμινοξέων: 0,2g/L ^{15}N-Leu, 0,15g/L ^{14}N-Phe, 0,09g/L ^{14}N-Tyr, 0,4g/L^{14}N-Asp, 0,2g/L ^{14}N-Ile, 0,2g/l ^{14}N-Val, 0,4g/L ^{14}N-Ala, 0,2g/L ^{14}N-Asn, 0,5g/L ^{14}N-Gly, 0,1g/L ^{14}N-Met, 0,21g/L ^{14}N-Lys και 0,1g/L ^{14}N-Met. Τα κύτταρα επωάζονται στους 37^{o}C υπό ισχυρή ανάδευση στους 180rpm, μέχρι το OD να φτάσει 0,6-0,7. Τότε στην υγρή καλλιέργεια προστίθεται 1ml/L διαλύματος IPTG 1M και τα κύτταρα επωάζονται στις ίδιες συνθήκες για 4 ώρες. Η πειραματική πορεία απομόνωσης της πρωτεΐνης παραμένει ίδια.

Δ.11. Εφαρμογή επιλεκτικής ^{15}N-επισήμανσης και αντίστροφης επισήμανσης της βαλίνης (Val)

Δ.11.1. Επιλεκτική αντίστροφη επισήμανση της βαλίνης (Val) σε ^{15}N υπόβαθρο

Η διαδικασία της επιλεκτικής αντίστροφης επισήμανσης της βαλίνης είναι ίδια με αυτή που ακολουθείται για την αντίστροφη επισήμανση της λυσίνης. Ασφαλώς, στη θέση της ^{14}N-Lys προστίθενται 0,15g/L ^{14}N-Val.

Δ.11.2. Έκφραση της πρωτεΐνης σε κύτταρα BL21(DE3) με προσθήκη ^{15}N-Val και ^{14}N-Leu, ^{14}N-Ile

Οι συνθήκες έκφρασης και απομόνωσης της πρωτεΐνης είναι ίδιες με αυτές που απαιτούνται κατά την έκφραση της μη-επισημασμένης πρωτεΐνης με τη διαφορά ότι κατά την επαγωγή της έκφρασης προστίθενται 0,17g/L ^{15}N-Val, 1,02g/L ^{14}N-Leu και 1,02g/L ^{14}N-Ile (δηλαδή οι ποσότητες ^{14}N-Leu και ^{14}N-Ile είναι εξαπλάσιες από αυτή της ^{15}N-Val).

Δ.12. Έκφραση της πρωτεΐνης σε κύτταρα BL21(DE3) με προσθήκη ^{15}N- Ile και ^{14}N-Leu, ^{14}N- Val

Οι συνθήκες έκφρασης και απομόνωσης της πρωτεΐνης είναι ίδιες με αυτές που απαιτούνται κατά την έκφραση της μη-επισημασμένης πρωτεΐνης. Η διαφορά είναι ότι κατά την επαγωγή της έκφρασης προστίθενται 0,09g/L ^{15}N- Ile, 0,54g/L ^{14}N-Leu και 0,54g/L ^{14}N- Val (δηλαδή οι ποσότητες των ^{14}N-Leu και ^{14}N- Val είναι εξαπλάσιες από αυτή της ^{15}N- Ile).

Δ.13. Εφαρμογή επιλεκτικής ^{15}N-επισήμανσης της φαινυλαλανίνης (Phe) / αλανίνης (Ala)

Δ.13.1 Επιλεκτική αντίστροφη επισήμανση της φαινυλαλανίνης (Phe)/αλανίνης (Ala) σε ^{15}N υπόβαθρο

Η διαδικασία της επιλεκτικής αντίστροφης επισήμανσης τόσο για τη φαινυλαλανίνη όσο και για την αλανίνη είναι ίδια με αυτή που ακολουθείται για την αντίστροφη επισήμανση της λυσίνης. Στη θέση της ^{14}N-Lys προστίθεται 0,15g/L ^{14}N-Phe ή 0,15g/L ^{14}N-Ala ανάλογα με το αμινοξύ που επιλέγεται να μην είναι ^{15}N-επισημασμένο.

Δ.13.2. Έκφραση της πρωτεΐνης-GLIC$_{ΕΚΠ}$ σε κύτταρα DL39(DE3) με προσθήκη ^{15}N-Phe

Η έκφραση της πρωτεΐνης GLIC$_{ΕΚΠ}$ με ^{15}N-επισημασμένη τη Phe σε αυξοτροφικά κύτταρα DL39(DE3) πραγματοποιείται με τον ίδιο τρόπο που περιγράφεται στο κεφάλαιο Δ.10.4. Τα αμινοξέα και οι ποσότητες οι οποίες προστίθενται είναι: 0,15g/L ^{15}N-Phe, 0,09g/L ^{14}N-Tyr, 0,4g/L^{14}N-Asp, 0,2g/L ^{14}N-Leu, 0,2g/L ^{14}N-Ile, 0,2g/l ^{14}N-Val, 0,4g/L ^{14}N-Ala, 0,2g/L ^{14}N-Asn, 0,5g/L ^{14}N-Gly, 0,1g/L ^{14}N-Met, 0,21g/L ^{14}N-Lys.

Δ.13.3. Έκφραση της πρωτεΐνης-GLIC$_{ΕΚΠ}$ σε κύτταρα DL39(DE3) με προσθήκη ^{15}N-Ala

Η έκφραση της πρωτεΐνης GLIC$_{ΕΚΠ}$ με ^{15}N-επισημασμένη τη Ala σε αυξοτροφικά κύτταρα DL39(DE3) πραγματοποιείται με τον ίδιο τρόπο που περιγράφεται στο κεφάλαιο Δ.10.4. Τα αμινοξέα και οι ποσότητες οι οποίες προστίθενται είναι: 0,3g/L ^{15}N-Ala, 0,15g/L ^{14}N-Phe, 0,09g/L ^{14}N-Tyr, 0,4g/L^{14}N-Asp, 0,2g/L ^{14}N-Leu, 0,2g/L ^{14}N-Ile, 0,2g/l ^{14}N-Val, 0,2g/L ^{14}N-Asn, 0,5g/L ^{14}N-Gly, 0,1g/L ^{14}N-Met, 0,21g/L ^{14}N-Lys.

Δ.14. Έκφραση της πρωτεΐνης-GLIC$_{ΕΚΠ}$ σε κύτταρα DL39(DE3) με προσθήκη ^{15}N-Tyr

Η έκφραση της πρωτεΐνης GLIC$_{ΕΚΠ}$ με ^{15}N-επισημασμένη τη Tyr σε αυξοτροφικά κύτταρα DL39(DE3) πραγματοποιείται με τον ίδιο τρόπο που περιγράφεται στο κεφάλαιο Δ.10.4. Τα αμινοξέα και οι ποσότητες οι οποίες προστίθενται είναι: 0,07g/L ^{15}N-Tyr, 0,15g/L ^{14}N-Phe, 0,4g/L^{14}N-Asp, 0,2g/L ^{14}N-Leu, 0,2g/L ^{14}N-Ile, 0,2g/l ^{14}N-Val, 0,4g/L ^{14}N-Ala, 0,2g/L ^{14}N-Asn, 0,5g/L ^{14}N-Gly, 0,1g/L ^{14}N-Met, 0,21g/L ^{14}N-Lys.

Δ.15. Έκφραση της πρωτεΐνης-GLIC$_{ΕΚΠ}$ σε κύτταρα DL39(DE3) με προσθήκη ^{15}N-Glu

Η έκφραση της πρωτεΐνης GLIC$_{ΕΚΠ}$ με ^{15}N-επισημασμένη το Glu σε αυξοτροφικά κύτταρα DL39(DE3) πραγματοποιείται με τον ίδιο τρόπο που περιγράφεται στο κεφάλαιο Δ.10.4. Τα αμινοξέα και οι ποσότητες οι οποίες προστίθενται είναι: 0,18g/L ^{15}N-Glu, 0,15g/L ^{14}N-Phe, 0,09g/L ^{14}N-Tyr, 0,4g/L^{14}N-Asp, 0,2g/L ^{14}N-Leu, 0,2g/L ^{14}N-Ile, 0,2g/l ^{14}N-Val, 0,4g/L ^{14}N-Ala, 0,2g/L ^{14}N-Asn, 0,5g/L ^{14}N-Gly, 0,1g/L ^{14}N-Met, 0,21g/L ^{14}N-Lys.

Δ.16. Έκφραση της πρωτεΐνης-GLIC$_{ΕΚΠ}$ σε κύτταρα DL39(DE3) με προσθήκη ^{15}N-Asp

Η έκφραση της πρωτεΐνης GLIC$_{ΕΚΠ}$ με ^{15}N-επισημασμένη το Asp σε αυξοτροφικά κύτταρα DL39(DE3) πραγματοποιείται με τον ίδιο τρόπο που περιγράφεται στο κεφάλαιο Δ.10.4. Τα αμινοξέα και οι ποσότητες οι οποίες προστίθενται είναι: 0,31g/L ^{15}N-Asp, 0,15g/L ^{14}N-Phe, 0,09g/L ^{14}N-Tyr, 0,2g/L ^{14}N-Leu,

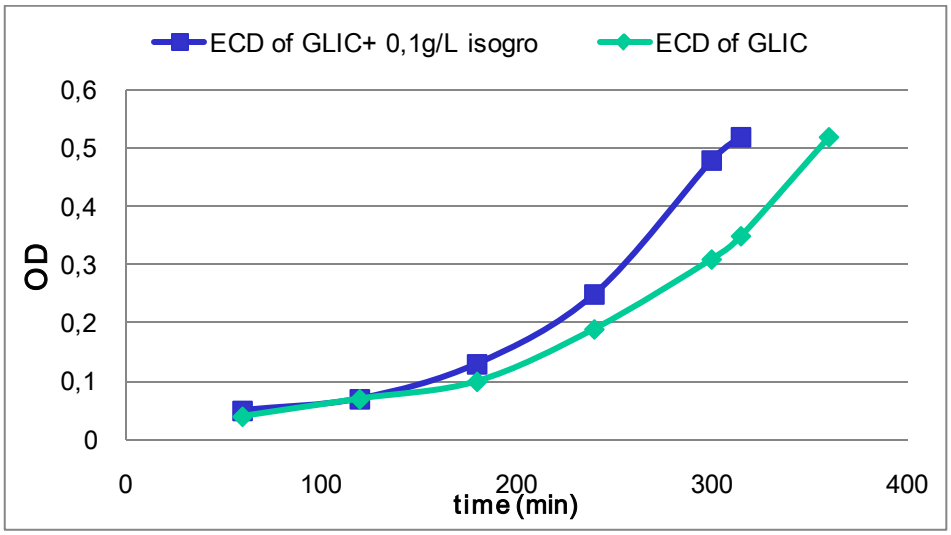
0,2g/L ^{14}N-Ile, 0,2g/l ^{14}N-Val, 0,4g/L ^{14}N-Ala, 0,2g/L ^{14}N-Asn, 0,5g/L ^{14}N-Gly, 0,1g/L ^{14}N-Met, 0,21g/L ^{14}N-Lys.

Ενότητα Ε

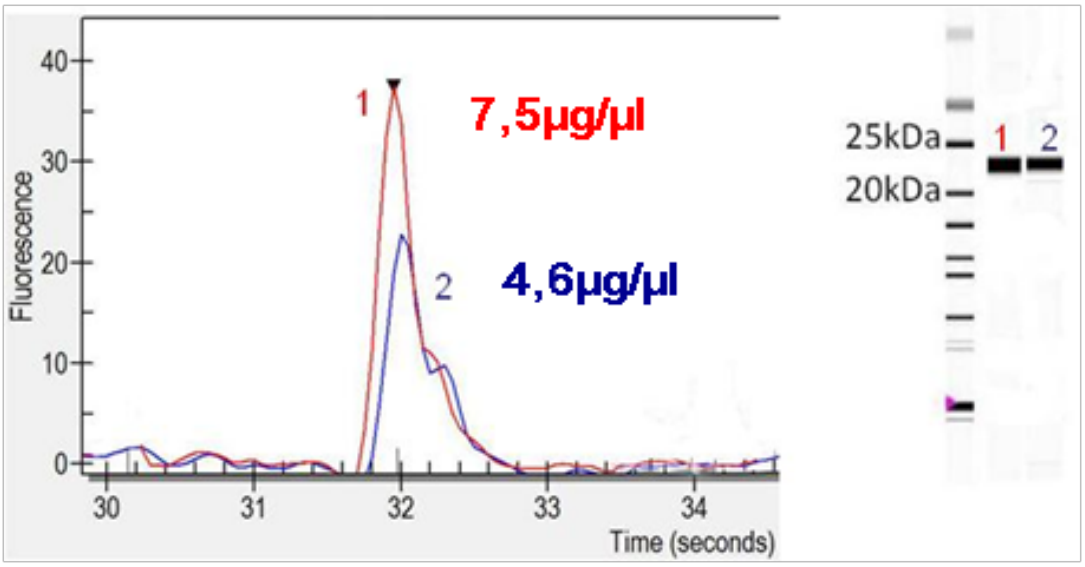
Αποτελέσματα

Ε.1. Έκφραση και απομόνωση της πρωτεΐνης $GLIC_{ΕΚΠ}$

Το isogro είναι ένα μίγμα ουσιών, το οποίο προέρχεται από εκχύλισμα φυκιών και αποτελείται από μίγμα αμινοξέων και άλλων χημικών συστατικών. Χρησιμοποιείται με σκοπό τη γρηγορότερη ανάπτυξη των κυττάρων και την ενίσχυση της απόδοσης της εκφραζόμενης πρωτεΐνης. Διατίθεται επισημασμένο σε ^{15}N, $^{15}N,^{13}C$ και $^{2}H,^{15}N,^{13}C$ και προστίθεται στο θρεπτικό υλικό M9 μαζί με την πηγή αζώτου και άνθρακα. Πραγματοποιήθηκαν δοκιμές σε μικρής κλίμακας καλλιέργειες με σκοπό τον προσδιορισμό της ποσότητας του isogro, το οποίο πρέπει να προστεθεί για τα βέλτιστα αποτελέσματα όσον αφορά στη γρήγορη ανάπτυξη των κυττάρων και στη μεγαλύτερη απόδοση της έκφρασης της πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν δύο καλλιέργειες ελαχίστων μέσων των 100ml (όπως περιγράφονται στο πειραματικό μέρος). Στην πρώτη δεν προστίθεται καθόλου isogro και στη δεύτερη προστίθεται 0,01g isogro. Στο διάγραμμα που παρατίθεται (Εικόνα 21) παρουσιάζεται η ανάπτυξη των βακτηριακών κυττάρων (η οποία αποτυπώνεται μέσω της αύξησης του OD) σε σχέση με το χρόνο και για τις δύο περιπτώσεις. Προκύπτει ότι η καλλιέργεια, στην οποία προστέθηκε isogro αναπτύσσεται γρηγορότερα από την άλλη. Το ίδιο συμβαίνει και με την απόδοση της κάθε καλλιέργειας σε πρωτεΐνη, όπως παρουσιάζεται στο διάγραμμα απεικόνισης της ποσότητας της πρωτεΐνης μέσω του αυτοματοποιημένου συστήματος ηλεκτροφόρησης του Experion TM της Biorad (Εικόνα 22).



Εικόνα 21: Διάγραμμα απεικόνισης της ανάπτυξης των βακτηριακών κυττάρων σε σχέση με το χρόνο ανάπτυξης.

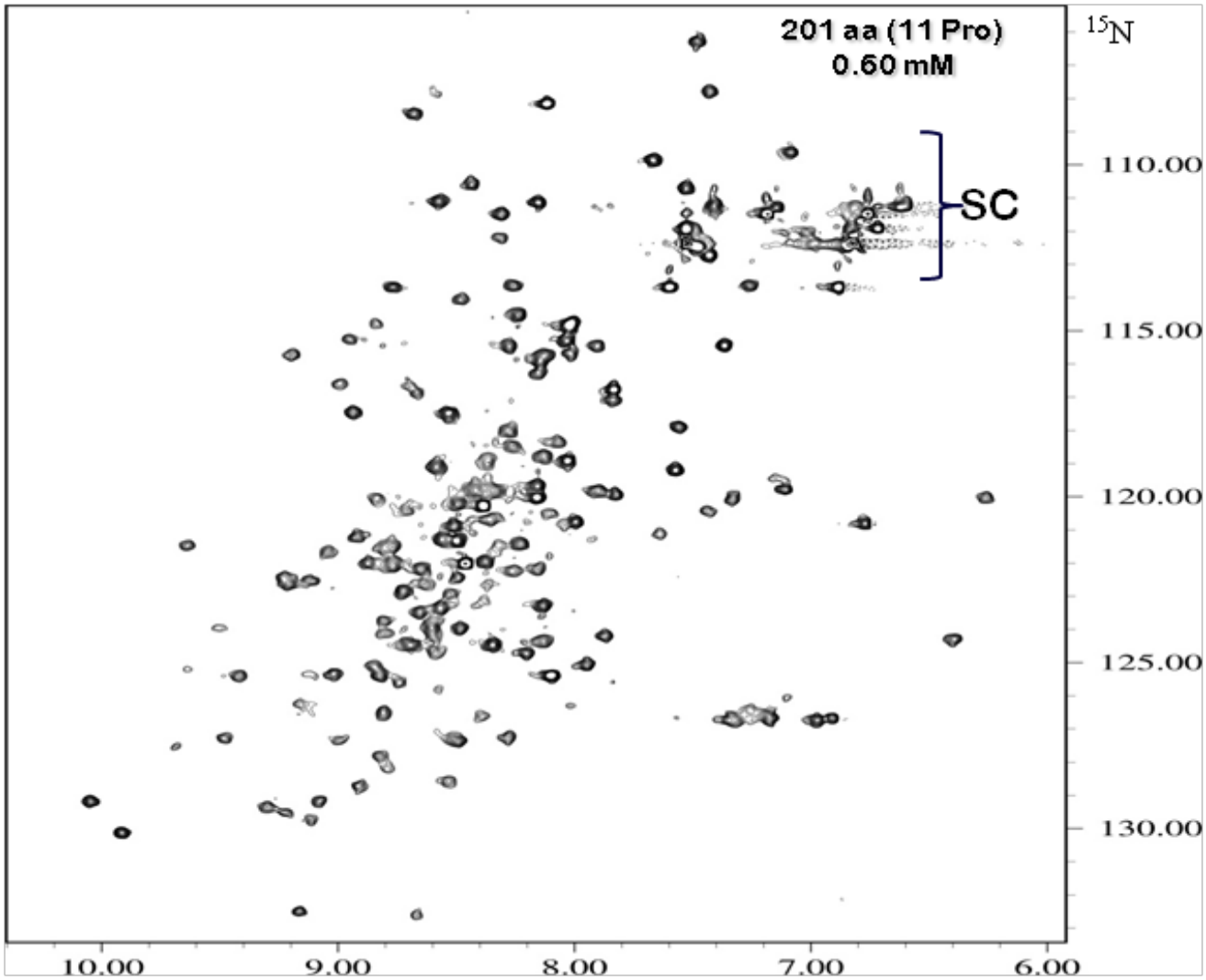


Εικόνα 22: Απεικόνιση της απόδοσης της πρωτεΐνης $GLIC_{ΕΚΠ}$ χωρίς την προσθήκη isogro (4,6μg/μl) και μετά την προσθήκη 0,1g/l isogro (7,5μg/μl), με τη χρήση του Experion της Biorad.

Ε.2. Έκφραση της ^{15}N-πρωτεΐνης, της ^{15}N, ^{13}C-πρωτεΐνης και της ^{2}H, ^{15}N, ^{13}C-πρωτεΐνης

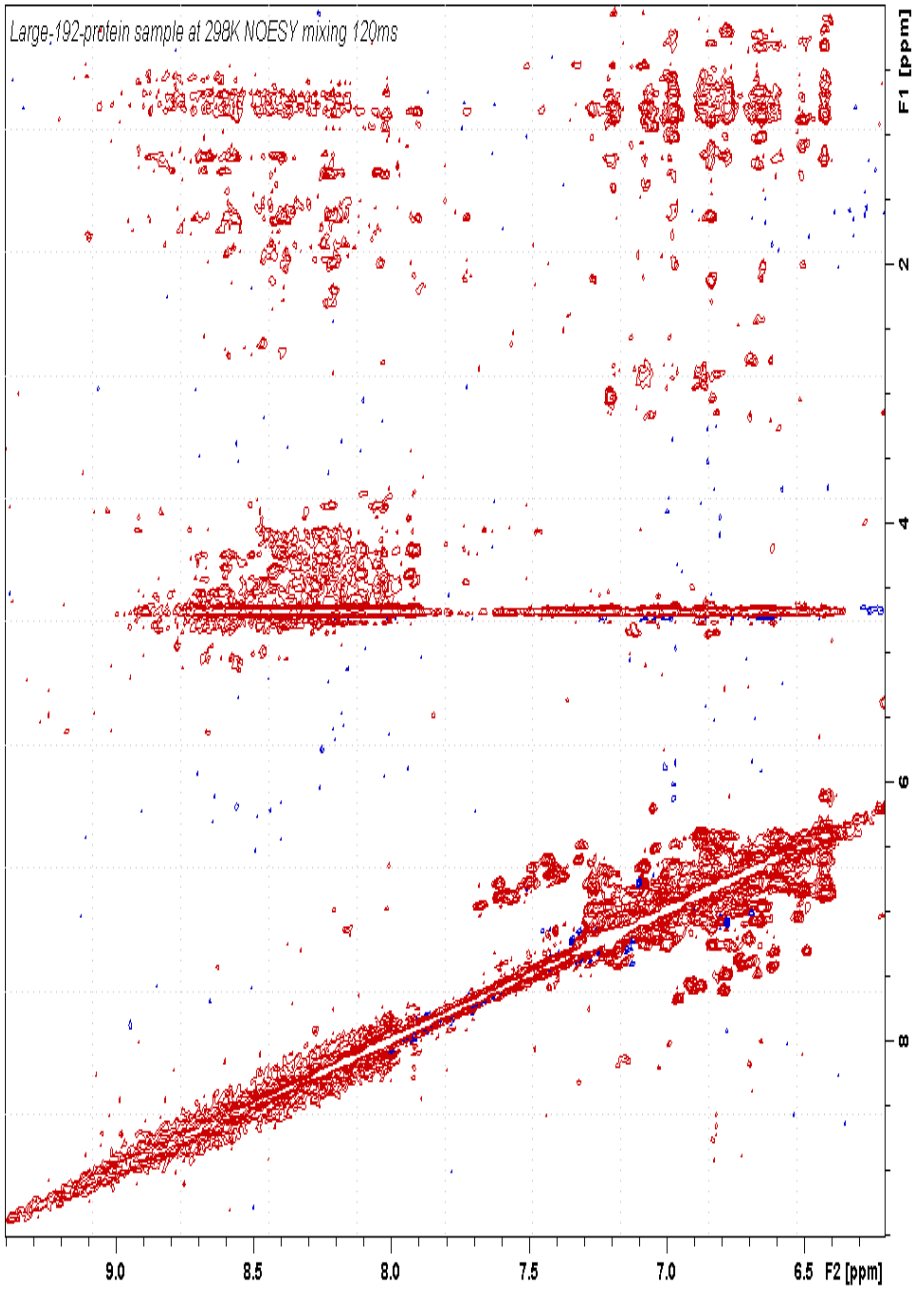
Από την ^{15}N-επισημασμένη πρωτεΐνη προέκυψε το παρακάτω ^{1}H-^{15}N-HSQC φάσμα της $GLIC_{ΕΚΠ}$ σε pH 6,95, θερμοκρασία T=298 K, σε NMR μαγνήτη 700 MHz (Εικόνα 23)

Στο παρακάτω ^{1}H-^{15}N-HSQC φάσμα διακρίνονται περίπου 140-145 HN σήματα συντονισμού της κύριας αλυσίδας (αντί για περίπου 190, όπως αναμένονται από τα αμινοξικά κατάλοιπα της $GLIC_{ΕΚΠ}$, χωρίς να υπολογίζονται οι 11 προλίνες τις οποίες διαθέτει και οι οποίες στερούνται αμιδικού NH). Υπολείπονται περίπου 50 σήματα HN, τα οποία δεν υπάρχουν ή επικαλύπτονται με άλλα. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο μεγάλο μοριακό βάρος της πρωτεΐνης και στην ευκινησία του μορίου.



Εικόνα 23: ^{1}H-^{15}N-HSQC φάσμα της $GLIC_{ΕΚΠ}$, σε pH 6,95, θερμοκρασία T=298 K, σε NMR μαγνήτη 700MHz.

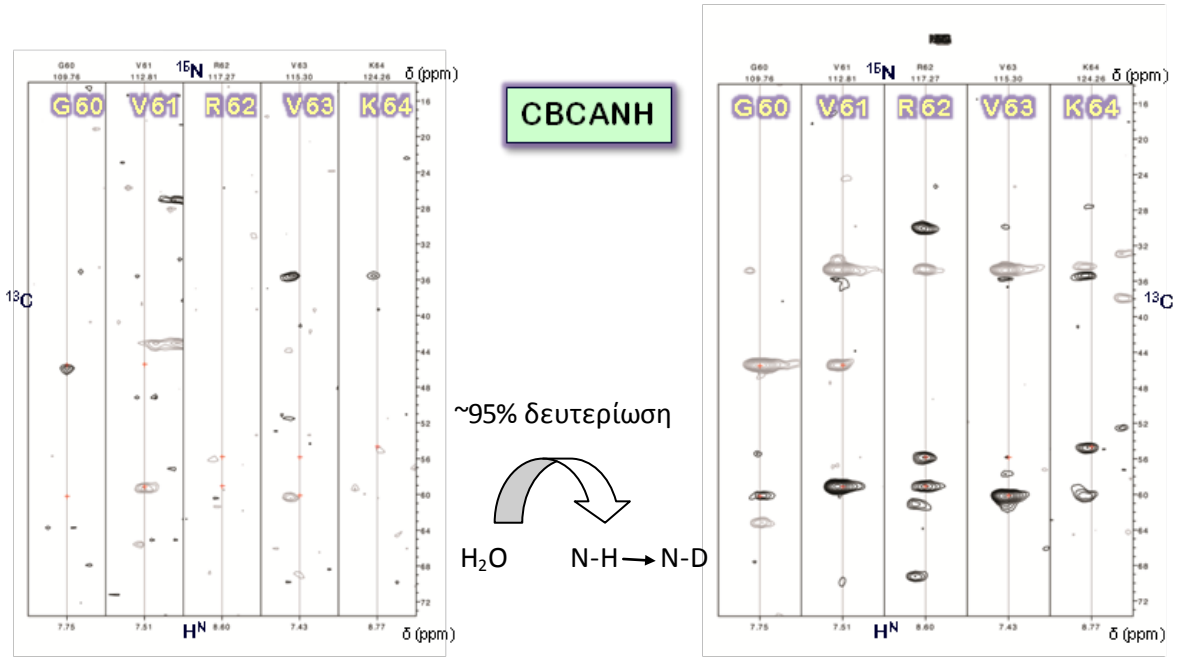
Επιπλέον, ο αριθμός των σημάτων NOEs στα ^{1}H- ^{1}H- NOESY φάσματα, όπως φαίνεται και στο παρακάτω φάσμα (Εικόνα 24), είναι αρκετά μικρότερος από τον αναμενόμενο. Αυτό οφείλεται στο μεγάλο μοριακό βάρος της πρωτεΐνης και στο μεγάλο ρυθμό αποδιέγερσης των NMR-ενεργών πυρήνων, λόγω της αλληλεπίδρασης των πυρηνικών spin (T_2 μηχανισμός αποδιέγερσης).



Εικόνα 24: ^{1}H-^{1}H-NOESY φάσμα της GLIC$_{ΕΚΠ}$.

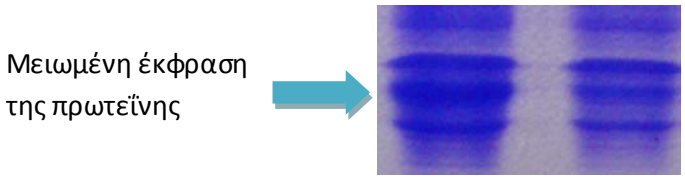
Το ίδιο πρόβλημα υπάρχει και στα φάσματα που λαμβάνονται με ^{13}C-επισήμανση της πρωτεΐνης (CACBNH). Η ένταση του προβλήματος αυτού μειώνεται με τη χρήση δευτεριωμένου νερού, D_2O. Έτσι, η πρωτεΐνη που εκφράζεται στα δευτεριωμένα μέσα φέρει δευτέριο αντί για πρωτόνιο, ενώ όταν η δευτεριωμένη πρωτεΐνη βρεθεί σε υδατικό διαλύτη μόνο τα ανταλλάξιμα ^{2}H (δηλαδή τα -NH, -OH και -SH) και όχι τα –CH ανταλλάσσονται με τα πρωτόνια και έτσι εμφανίζονται τα σήματα συντονισμού HN. Η αντικατάσταση του ^{1}H με ^{2}H (δευτέριο) έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του ρυθμού αποδιέγερσης των ενεργών NMR-πυρήνων (αποδιέγερση spin-spin, T_2).

Συγκεκριμένα, η διακριτικότητα και η ευαισθησία των NMR πειραμάτων βελτιώνεται. Επομένως, πραγματοποιείται ο εμπλουτισμός των M9 ελαχίστων μέσων με $^{15}NH_4Cl$ (^{15}N-χλωριούχο αμμώνιο) και ^{13}C-D_7-γλυκόζη σε D_2O. Με αυτό τον τρόπο το υδρογόνο αντικαθίσταται από δευτέριο και ο ρυθμός αποδιέγερσης του μορίου μειώνεται. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση σημάτων στα φάσματα, τα οποία δεν εμφανίζονταν προηγουμένως.



Εικόνα 25: Διαφοροποίηση του φάσματος CBCANH μετά την ολική (~95%) δευτερίωση της πρωτεΐνης και την ανταλλαγή των αμιδικών ND σε NH μέσω διάλυσης της δευτεριωμένης πρωτεΐνης σε υδατικό (H_2O) ρυθμιστικό διάλυμα.

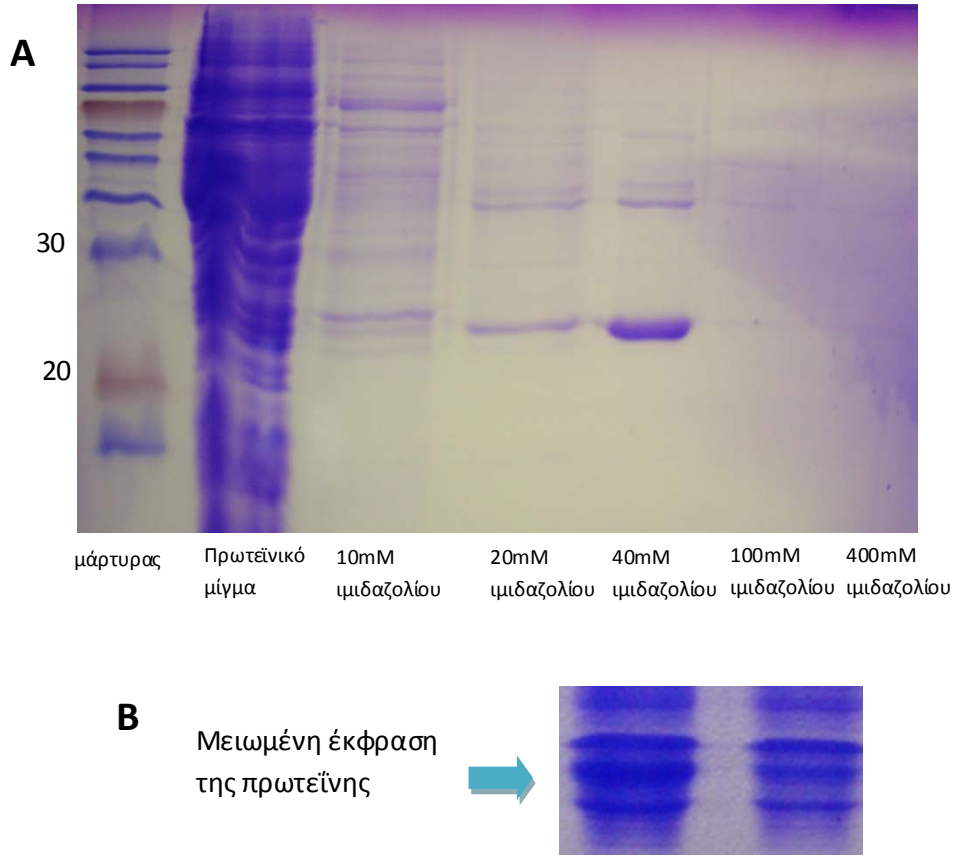
Κατά τη φάση ανάπτυξης των κυττάρων σε δευτεριωμένα μέσα ο χρόνος, ο οποίος απαιτείται για την ανάπτυξή τους στα επιθυμητά επίπεδα είναι διπλάσιος από αυτόν στα μη-δευτεριωμένα μέσα. Αυτό οφείλεται στο διαφορετικό (δευτεριωμένο) περιβάλλον, στο οποίο αναπτύσσονται τα βακτηριακά κύτταρα. Για τον ίδιο λόγο η έκφραση της πρωτεΐνης είναι μειωμένη (Εικόνα 26). Ωστόσο, η συγκέντρωση της πρωτεΐνης επαρκεί για τη λήψη φασμάτων.



Εικόνα 26: SDS-PAGE που απεικονίζει τη μειωμένη έκφραση της πρωτεΐνης σε δευτεριωμένα μέσα σε σύγκριση με αυτή σε πρωτονιωμένα μέσα.

Ε.3. ^{15}N-επιλεκτική επισήμανση αμινοξέων

Για την ^{15}N-επιλεκτική επισήμανση αμινοξέων χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά πρωτόκολλα και διαφορετικές κυτταρικές σειρές του βακτηρίου *E.coli*, ανάλογα με το αμινοξύ που επισημαίνεται. Παρατηρείται ότι η έκφραση της πρωτεΐνης με τα αυξοτροφικά κύτταρα DL39(DE3) είναι χαμηλότερη σε σχέση με την αντίστοιχη στα πρωτοτοτροφικά BL21(DE3), όπως αναμενόταν (Εικόνα 27Β). Ωστόσο, η απομόνωση της πρωτεΐνης πραγματοποιείται με τον ίδιο τρόπο που περιγράφεται στο κεφάλαιο Δ.4 (Εικόνα 27Α) .



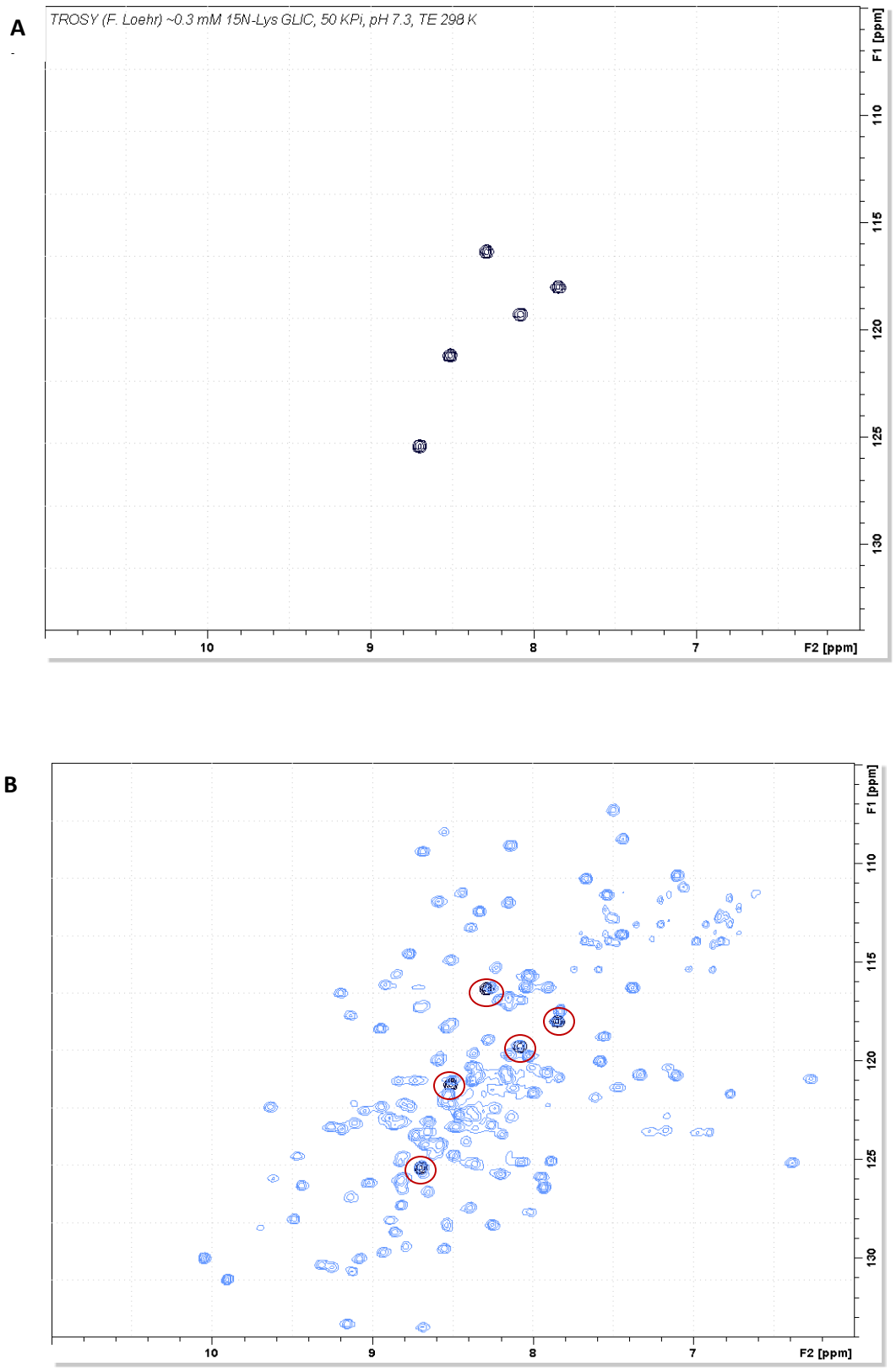
Εικόνα 27: Α SDS-PAGE που απεικονίζει την ποιότητα των κλασμάτων μετά τη χρωματογραφία συγγένειας μετά από έκφραση με επιλεκτική επισήμανση σε αυξοτροφικά κύτταρα DL39(DE3) **Β** SDS-PAGE που απεικονίζει τη μειωμένη έκφραση της πρωτεΐνης σε κύτταρα BL21(DE3) σε σύγκριση με αυτή σε κύτταρα DL39(DE3).

Ε.3.1. Επιλεκτική αντίστροφη επισήμανση της αργινίνης (Arg) σε ^{15}N υπόβαθρο

Μετά την έκφραση της $GLIC_{ΕΚΠ}$ σε ^{15}N υπόβαθρο με επιλεκτική αντίστροφη επισήμανση της αργινίνης, πραγματοποιήθηκε η λήψη του αντίστοιχου ^{1}H-^{15}N-HSQC φάσματος. Σε αυτό παρατηρείται (μετά από υπέρθεση του φάσματος αυτού με το ^{1}H-^{15}N-HSQC της $GLIC_{ΕΚΠ}$) ότι τα σήματα συντονισμού, τα οποία αντιστοιχούν στην αργινίνη εξαφανίζονται. Με αυτό τον τρόπο ταυτοποιούνται και τα αμινοξικά κατάλοιπα αργινίνης. Η θέση της καθεμιάς από αυτές στην αλληλουχία της πρωτεΐνης εντοπίζεται με τα τρισδιάστατα ετεροπυρηνικά φάσματα, τα οποία συνδυάζουν το κάθε αμινοξύ με το προηγούμενό του. Με τον τρόπο αυτό ταυτοποιήθηκαν και επιβεβαιώθηκαν δεκαπέντε αμινοξικά κατάλοιπα αργινίνης. Επομένως, η διαδικασία της αντίστροφης επιλεκτικής επισήμανσης της αργινίνης στην $GLIC_{ΕΚΠ}$ είναι επιτυχημένη.

Ε.3.2. Επιλεκτική αντίστροφη επισήμανση της λυσίνης (Lys) σε ^{15}N υπόβαθρο και επιλεκτική ^{15}N-επισήμανση λυσίνης

Η διαδικασία έκφρασης της $GLIC_{ΕΚΠ}$ με επιλεκτική αντίστροφη επισήμανση της λυσίνης καθώς και αυτή της $GLIC_{ΕΚΠ}$ με επιλεκτική ^{15}N-Lys πραγματοποιείται όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Δ.8. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η λήψη των αντίστοιχων ^{1}H-^{15}N-HSQC φασμάτων. Παρατηρείται ότι στο φάσμα ^{1}H-^{15}N-HSQC για την ^{14}N-Lys δεν εμφανίζονται οι κορυφές συντονισμού που αντιστοιχούν στη λυσίνη.

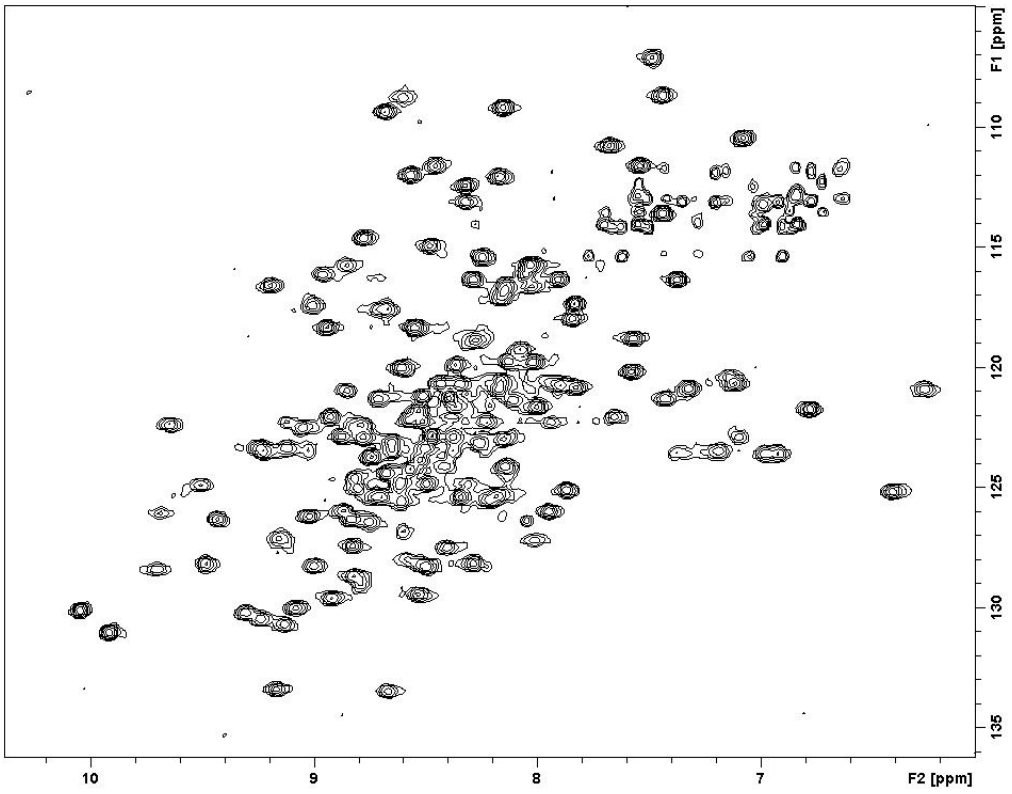


Εικόνα 28: A ^{1}H-^{15}N-HSQC φάσμα για την επιλεκτική ^{15}N-επισήμανση της λυσίνης. **B** Υπέρθεση του φάσματος ^{1}H-^{15}N-HSQC για την ^{15}N-Lys και του ^{1}H-^{15}N-HSQC φάσματος της $GLIC_{ΕΚΠ}$. (Σε κύκλο εμφανίζονται τα αμινοξικά κατάλοιπα λυσίνης.)

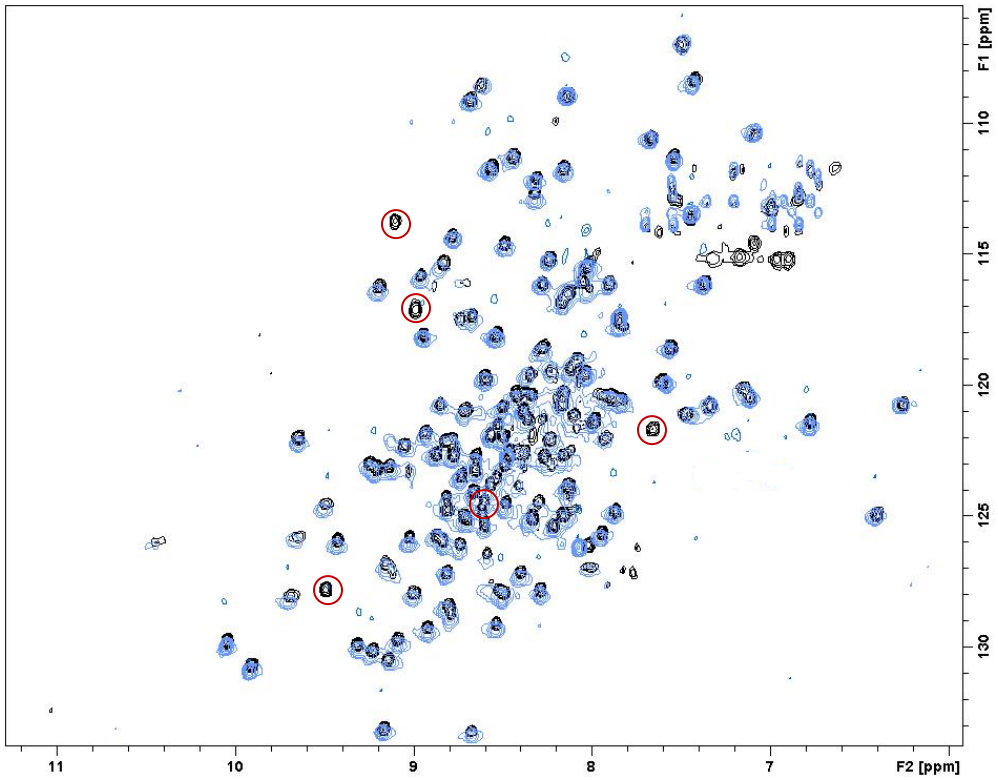
Αντίστοιχα, στο φάσμα παρατηρείται εμφάνιση των σημάτων συντονισμού που αντιστοιχούν μόνο στη λυσίνη (Εικόνα 28Α). Τα σήματα συντονισμού που εμφανίζονται στο ^{1}H-^{15}N-HSQC για την ^{15}N-Lys είναι τα ίδια με αυτά που εξαφανίζονται στο ^{1}H-^{15}N-HSQC για την ^{14}N-Lys. Μετά από υπέρθεση των φασμάτων αυτών με το φάσμα ^{1}H-^{15}N-HSQC της ^{15}N-GLIC$_{ΕΚΠ}$ (Εικόνα 28Β) εντοπίζονται τα σήματα συντονισμού που αντιστοιχούν στα αμινοξικά κατάλοιπα λυσίνης. Η θέση της κάθε λυσίνης στην αλληλουχία της πρωτεΐνης εντοπίζεται σε συνδυασμό με τα τρισδιάστατα ετεροπυρηνικά φάσματα που συνδυάζουν το κάθε αμινοξύ με το προηγούμενό του. Με τη διαδικασία αυτή εντοπίζονται πέντε από τις οκτώ λυσίνες οι οποίες υπάρχουν στην αλληλουχία της GLIC$_{ΕΚΠ}$ και ταυτοποιείται η μία από αυτές (η οποία δεν είχε ταυτοποιηθεί ούτε μετά τη λήψη του φάσματος της δευτεριωμένης πρωτεΐνης) και επιβεβαιώνονται οι υπόλοιπες. Επομένως, η διαδικασία ^{15}N-επιλεκτικής επισήμανσης για την λυσίνη ήταν επιτυχημένη.

Ε.3.3. Επιλεκτική αντίστροφη επισήμανση ιστιδίνης (His) και ασπαραγίνης (Asn)

Το ^{1}H-^{15}N-HSQC της GLIC$_{ΕΚΠ}$ με επιλεκτικά αντίστροφη επισήμανση της ιστιδίνης περιλαμβάνει τα σήματα συντονισμού που αντιστοιχούν σε όλα τα αμινοξέα εκτός από τις ιστιδίνες. Επομένως, η μέθοδος της επιλεκτικής αντίστροφης επισήμανσης η οποία χρησιμοποιήθηκε για την ιστιδίνη ήταν επιτυχημένη. Μετά από υπέρθεση του φάσματος αυτού με το ^{1}H-^{15}N-HSQC φάσμα της GLIC$_{ΕΚΠ}$ εντοπίζονται τα HN σήματα των ιστιδινών. Η θέση της κάθε ιστιδίνης στην αλληλουχία της πρωτεΐνης εντοπίζεται σε συνδυασμό με τα τρισδιάστατα ετεροπυρηνικά φάσματα, τα οποία συσχετίζουν το κάθε αμινοξύ με το προηγούμενό του. Με αυτό τον τρόπο προσδιορίζονται και επιβεβαιώνονται οι ιστιδίνες (Εικόνα 29). Η ίδια διαδικασία πραγματοποιείται για τον προσδιορισμό των αμινοξικών καταλοίπων ασπαραγίνης (Εικόνα 30) στην αλληλουχία της GLIC$_{ΕΚΠ}$. Έτσι, προσδιορίζονται και επιβεβαιώνονται τα αμινοξικά κατάλοιπα ασπαραγίνης.



Εικόνα 29: ^{1}H-^{15}N-HSQC φάσμα για την επιλεκτικά αντίστροφη επισήμανση της ιστιδίνης

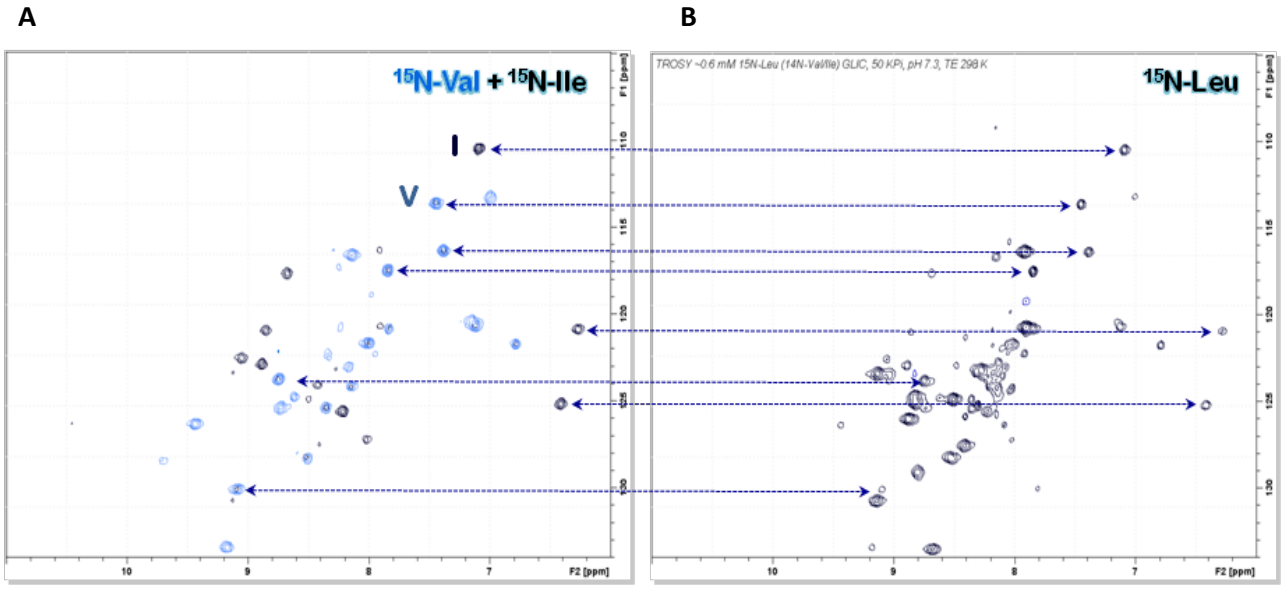


Εικόνα 30: Υπέρθεση του ^{1}H-^{15}N-HSQC φάσματος για την επιλεκτικά αντίστροφη επισήμανση της ασπαραγίνης (με μπλε χρώμα) και του ^{1}H-^{15}N-HSQC φάσματος της $GLIC_{ΕΚΠ}$ (με μαύρο χρώμα).

Ε.3.4. Επιλεκτική ^{15}N-επισήμανση και επιλεκτική αντίστροφη επισήμανση της λευκίνης (Leu)

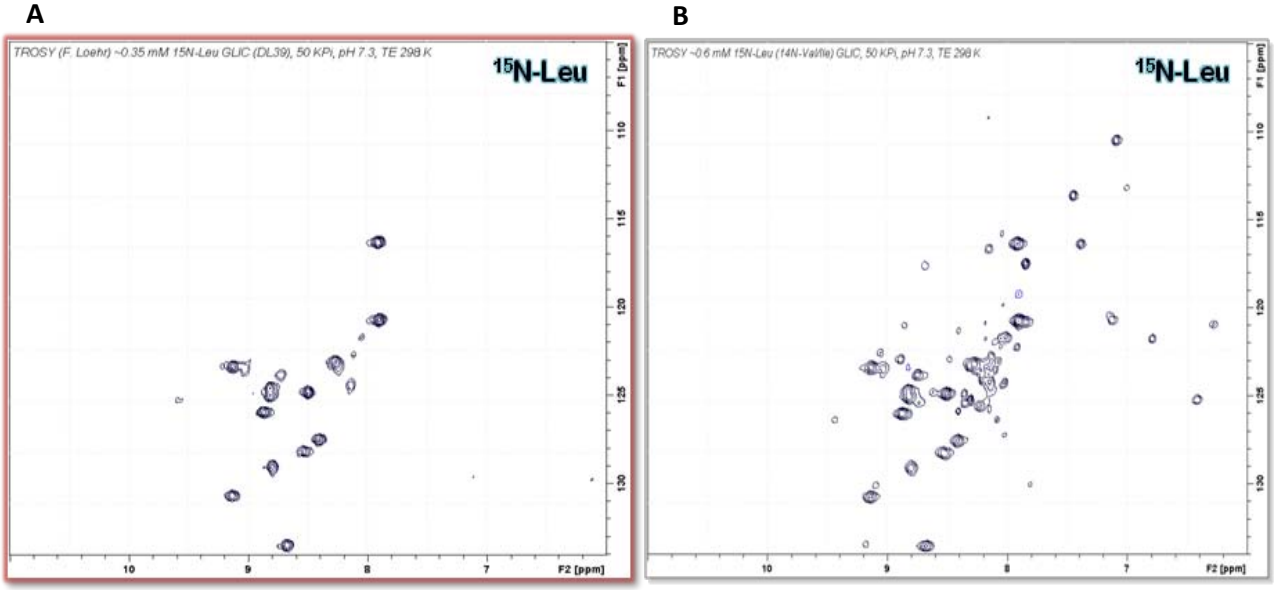
Στο ^{1}H-^{15}N-HSQC φάσμα της ^{14}N-Leu της $GLIC_{ΕΚΠ}$, το οποίο λαμβάνεται σε ^{15}N υπόβαθρο παρατηρείται ότι μετά από υπέρθεση του φάσματος αυτού οι κορυφές που εξαφανίζονται αντιστοιχούν σε σήματα συντονισμού των αμινοξικών καταλοίπων λευκίνης και άλλων αμινοξέων. Επομένως, η διαδικασία επιλεκτικής αντίστροφης επισήμανσης για την λευκίνη δεν ήταν επιτυχής.

Στο ^{1}H-^{15}N-HSQC φάσμα της $GLIC_{ΕΚΠ}$ που προέκυψε μετά από προσθήκη ^{15}N-Leu στην καλλιέργεια (Εικόνα 31) παρατηρούνται σήματα συντονισμού, τα οποία αντιστοιχούν σε περισσότερα και διαφορετικά αμινοξικά κατάλοιπα από τις λευκίνες. Επομένως, δεν ήταν δυνατή η αντιστοίχιση των κορυφών συντονισμού που ανήκουν στα αμινοξικά κατάλοιπα λευκίνης και κατά συνέπεια η αξιοποίηση του φάσματος αυτού. Η εμφάνιση σημάτων συντονισμού που αντιστοιχούν σε διαφορετικού τύπου αμινοξέα οφείλεται στην εμφάνιση της μη-ειδικής επισήμανσης, η οποία είναι αρκετά εκτεταμένη. Το γεγονός αυτό οδήγησε στην τροποποίηση της μεθόδου παρασκευής της επιλεκτικά επισημασμένης $GLIC_{ΕΚΠ}$ με ^{15}N-Leu. Μετά από υπέρθεση του προηγούμενου φάσματος με το ^{1}H-^{15}N-HSQC φάσμα της $GLIC_{ΕΚΠ}$, αλλά και μετά από περαιτέρω μελέτη της βιοσύνθεσης των αμινοξέων στα βακτηριακά κύτταρα, διαπιστώθηκε ότι αρκετές κορυφές του φάσματος αντιστοιχούν σε βαλίνη και ισολευκίνη. Με στόχο τη μείωση της μη-ειδικής επισήμανσης για τη βαλίνη και ισολευκίνη γίνεται προσθήκη αυτών των αμινοξέων μαζί με την ^{15}N-Leu. Με τον τρόπο αυτό μειώνεται το φαινόμενο της μη-ειδικής επισήμανσης για τα αμινοξέα αυτά και προκύπτει το παρακάτω ^{1}H-^{15}N-HSQC φάσμα (Εικόνα 31Β). Ωστόσο, μετά από υπέρθεση του φάσματος αυτού με το ^{1}H-^{15}N-HSQC φάσμα της $GLIC_{ΕΚΠ}$ παρατηρείται ότι και σε αυτή την περίπτωση εμφανίζεται το φαινόμενο της μη-ειδικής επισήμανσης αλλά σε χαμηλότερη έκταση. Σε αυτό το φάσμα υπάρχουν σήματα συντονισμού, τα οποία αντιστοιχούν και σε άλλα αμινοξικά κατάλοιπα εκτός της λευκίνης.



Εικόνα 31: A Υπέρθεση των φασμάτων ^{1}H-^{15}N-HSQC φάσμα της ^{15}N-Val και της ^{15}N-Ile της $GLIC_{ΕΚΠ}$. **B** ^{1}H-^{15}N-HSQC φάσμα για την ^{15}N-Leu

Επομένως, ούτε και στην περίπτωση αυτή υπήρχε εξάλειψη του φαινόμενου της μη-ειδικής επισήμανσης. Έτσι, χρησιμοποιήθηκε διαφορετικός τύπος κυττάρων για την έκφραση της ειδικά επισημασμένης σε ^{15}N-Leu πρωτεΐνης, τα αυξοτροφικά κύτταρα και η διαδικασία περιγράφεται στο Δ.10.4. Στο ^{1}H-^{15}N-HSQC φάσμα, το οποίο προέκυψε από τη διαδικασία αυτή και παρουσιάζεται παρακάτω (Εικόνα 32), φαίνεται να επιτυγχάνεται η επιλεκτική ^{15}N-επισήμανση για τη λευκίνη.



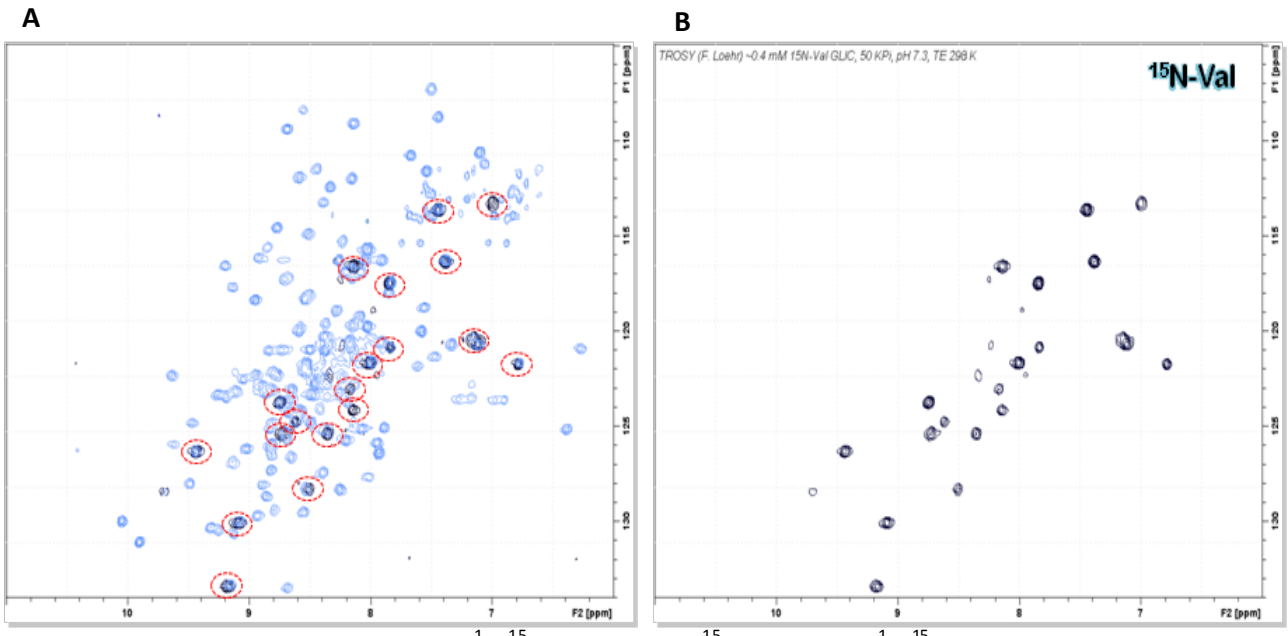
Εικόνα 32: A ^{1}H-^{15}N-HSQC φάσμα για την ^{15}N-Leu σε αυξοτροφικά κύτταρα. **B** ^{1}H-^{15}N-HSQC φάσμα για την ^{15}N-Leu σε πρωτοτροφικά κύτταρα.

Μετά από υπέρθεση του παραπάνω φάσματος με το ^{1}H-^{15}N-HSQC φάσμα της $GLIC_{ΕΚΠ}$ εντοπίζονται τα σήματα συντονισμού για τα αμινοξικά κατάλοιπα λευκίνης και σε συνδυασμό με τα τρισδιάστατα ετεροπυρηνικά φάσματα, τα οποία συνδυάζουν το κάθε αμινοξύ με το προηγούμενό του εντοπίζεται η θέση της κάθε λευκίνης στην αλληλουχία της πρωτεΐνης. Επομένως, με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται η σωστή ταυτοποίηση και επιβεβαίωση των αμινοξικών καταλοίπων λευκίνης.

Ε.3.5. Επιλεκτική ^{15}N-επισήμανση και αντίστροφη επισήμανση της βαλίνης

Στο φάσμα ^{1}H-^{15}N-HSQC της $GLIC_{ΕΚΠ}$ με επιλεκτική αντίστροφη επισήμανση της βαλίνης φαίνεται να λείπουν κάποια σήματα συντονισμού, τα οποία αντιστοιχούν όχι μόνο στα αμινοξικά κατάλοιπα βαλίνης αλλά και σε άλλα αμινοξέα. Αυτό διαπιστώνεται μετά από υπέρθεση του φάσματος αυτού με το ^{1}H-^{15}N-HSQC φάσμα της $GLIC_{ΕΚΠ}$. Επομένως, από το φάσμα αυτό δεν ήταν δυνατόν να ληφθούν σαφή και ασφαλή συμπεράσματα και καθιστά τη συγκεκριμένη μέθοδο επιλεκτικής επισήμανσης της βαλίνης ανεπιτυχή. Τα περισσότερα από τα επιπλέον σήματα συντονισμού, τα οποία εξαφανίζονται, εκτός από αυτά που αντιστοιχούν στη βαλίνη, ανήκουν κυρίως σε αμινοξικά κατάλοιπα λευκίνης και ισολευκίνης.

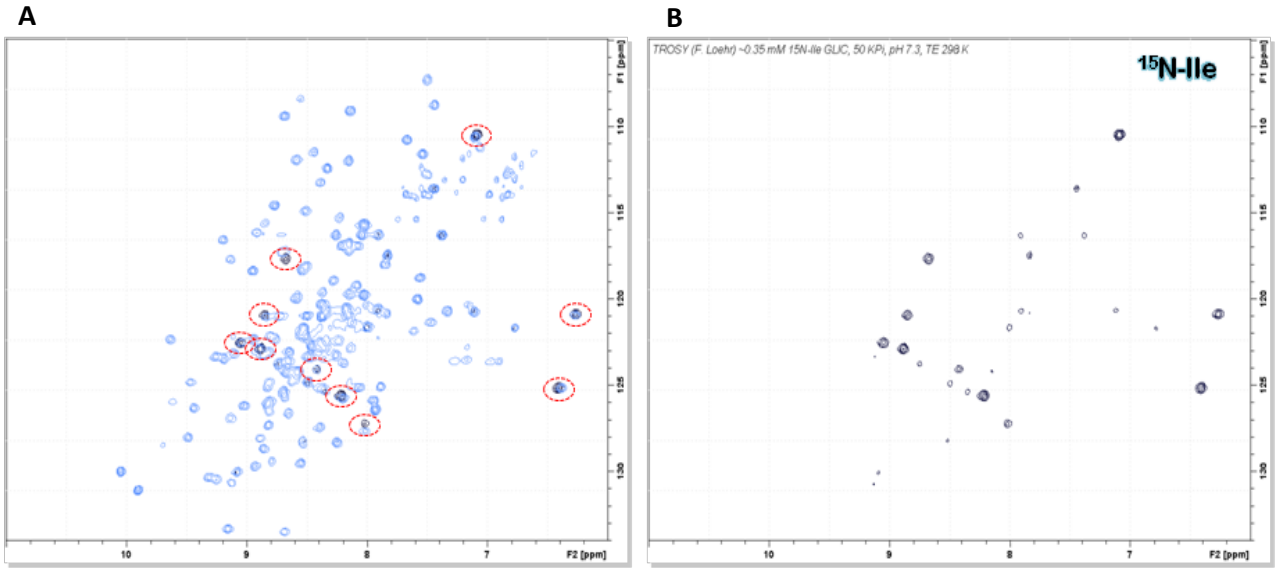
Τα ίδια σήματα, τα οποία εξαφανίζονται στο παραπάνω φάσμα, θα εμφανίζονταν αν πραγματοποιούνταν επιλεκτική ^{15}N-επισήμανση σε πρωτοτροφικά κύτταρα με προσθήκη ^{15}N-Val. Για να αποφευχθεί η μη-ειδική επισήμανση της λευκίνης και της ισολευκίνης, εκτός από την προσθήκη ^{15}N-Val στην καλλιέργεια προστίθεται ^{14}N-Leu και ^{14}N-Ile. Με αυτό τον τρόπο τα βακτήρια λαμβάνουν έτοιμα τα αμινοξέα λευκίνη και ισολευκίνη και δε χρειάζεται να τα βιοσυνθέσουν από την ^{15}N-Val. Επομένως, η μη-ειδική επισήμανση μειώνεται και το φάσμα ^{1}H-^{15}N-HSQC της $GLIC_{ΕΚΠ}$ με επιλεκτική ^{15}N-επισήμανση της βαλίνης (Εικόνα 33) μπορεί να αξιοποιηθεί για την ταυτοποίηση και επιβεβαίωση των αμινοξικών καταλοίπων βαλίνης (μετά από υπέρθεση του φάσματος αυτού με το ^{1}H-^{15}N-HSQC φάσμα της $GLIC_{ΕΚΠ}$). Η θέση της κάθε βαλίνης εντοπίζεται με τη χρήση των τρισδιάστατων ετεροπυρηνικών φασμάτων, τα οποία συσχετίζουν το κάθε αμινοξύ με το προηγούμενό του.



Εικόνα 33: A Υπέρθεση του φάσματος ^{1}H-^{15}N-HSQC για την ^{15}N- Val και του ^{1}H-^{15}N-HSQC φάσματος της $GLIC_{ΕΚΠ}$. (Σε κύκλο εμφανίζονται τα αμινοξικά κατάλοιπα βαλίνης.) **B** ^{1}H-^{15}N-HSQC φάσμα για την επιλεκτική ^{15}N- Val με προσθήκη ^{14}N- Leu και ^{14}N- Ile.

Ε.3.6. Επιλεκτική ^{15}N-επισήμανση της $GLIC_{ΕΚΠ}$ με ^{15}N-Ile

Τα αμινοξέα λευκίνη, βαλίνη και ισολευκίνη συνδέονται μέσω βιοσυνθετικών μονοπατιών, καθώς από το ένα αμινοξύ βιοσυντίθενται τα άλλα δύο. Για να είναι επιτυχής η επιλεκτική επισήμανση για την ισολευκίνη, μαζί με την ^{15}N-Ile προστίθεται ^{14}N-Leu και ^{14}N- Val. Στο ^{1}H-^{15}N-HSQC φάσμα παρατηρούνται τα σήματα συντονισμού, τα οποία αντιστοιχούν στα αμινοξικά κατάλοιπα ισολευκίνης (Εικόνα 34). Μετά από υπέρθεση του φάσματος αυτού με το ^{1}H-^{15}N-HSQC φάσμα της $GLIC_{ΕΚΠ}$ εντοπίζονται τα σήματα συντονισμού που αντιστοιχούν στα αμινοξικά κατάλοιπα ισολευκίνης. Στη συνέχεια, με τη βοήθεια τρισδιάστατων ετεροπυρηνικών φασμάτων, τα οποία συσχετίζουν το κάθε αμινοξύ με το προηγούμενό του. Έτσι, εντοπίζεται η θέση της κάθε ισολευκίνης στην αλληλουχία της $GLIC_{ΕΚΠ}$.

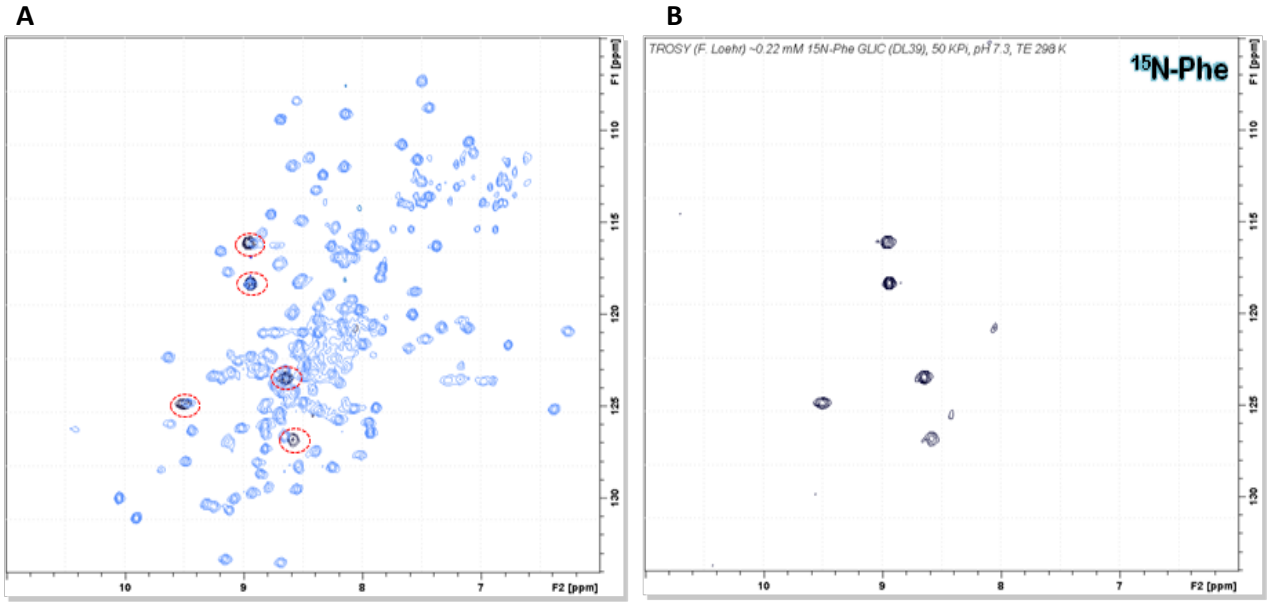


Εικόνα 34: A Υπέρθεση του φάσματος ^{1}H-^{15}N-HSQC για την ^{15}N-Ile και του ^{1}H-^{15}N-HSQC φάσματος της GLIC$_{ΕΚΠ}$. (Σε κύκλο εμφανίζονται τα αμινοξικά κατάλοιπα ισολευκίνης.) **B** ^{1}H-^{15}N-HSQC φάσμα για την επιλεκτική ^{15}N-Ile με προσθήκη ^{14}N- Leu και ^{14}N- Val.

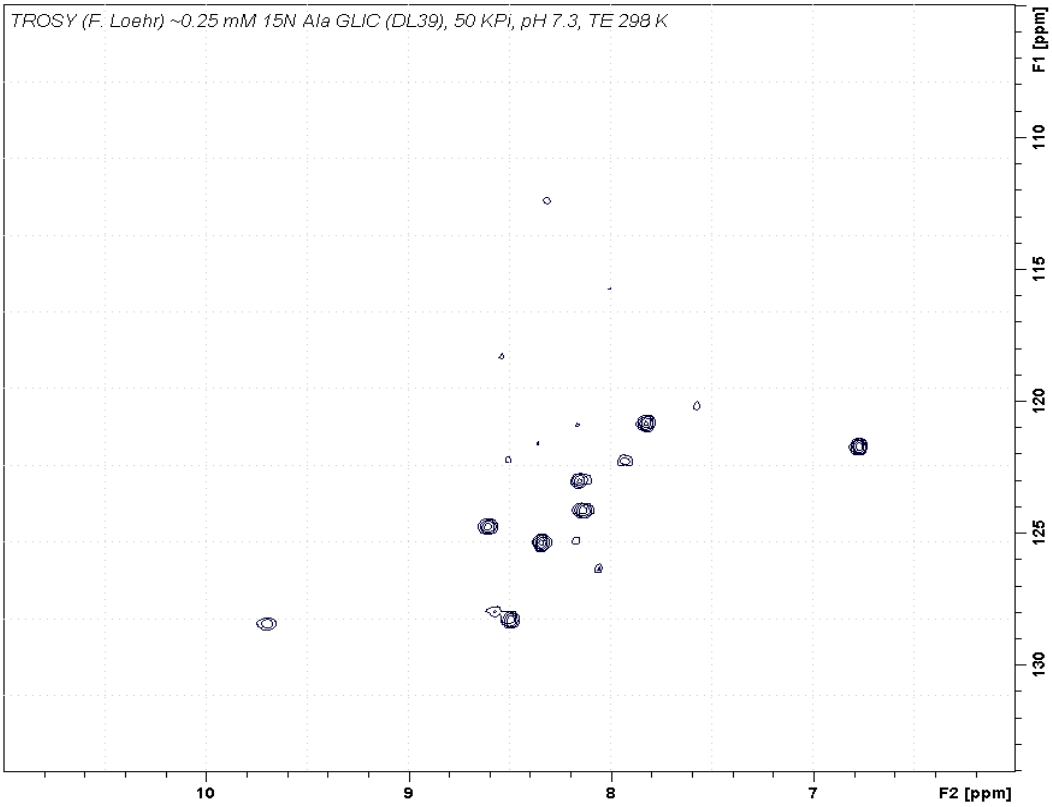
Ε.3.7. Επιλεκτική αντίστροφη επισήμανση και επιλεκτική ^{15}N-επισήμανση της φαινυλαλανίνης (Phe)/ αλανίνης (Ala)

Αρχικά, τόσο για τη φαινυλαλανίνη (Phe) όσο και για την αλανίνη (Ala), πραγματοποιήθηκε επιλεκτική αντίστροφη επισήμανση και λήφθησαν τα αντίστοιχα φάσματα. Σε αυτά τα ^{1}H-^{15}N-HSQC φάσματα παρατηρείται το φαινόμενο της μη-ειδικής επισήμανσης εκτεταμένο σε αρκετούς τύπους αμινοξέων. Επομένως, πραγματοποιήθηκε προσπάθεια επιλεκτικής επισήμανσης με τη χρήση αυξοτροφικών κυττάρων, DL39(DE3), όπως περιγράφεται στο Δ.13.2 και Δ.13.3. Στα ^{1}H-^{15}N-HSQC φάσματα των δύο επιλεκτικά επισημασμένων αμινοξέων (Phe και Ala, Εικόνες 35 και 36, αντίστοιχα) παρατηρείται ότι το φαινόμενο της μη-ειδικής επισήμανσης εκλείπει και αυτή η μέθοδος επισήμανσης είναι επιτυχημένη. Μετά από υπέρθεση του κάθε φάσματος με το ^{1}H-^{15}N-HSQC φάσμα της GLIC$_{ΕΚΠ}$ εντοπίζονται τα αμινοξικά κατάλοιπα φαινυλαλανίνης και αλανίνης. Η θέση του κάθε αμινοξέος στην αλληλουχία της πρωτεΐνης εντοπίζεται μέσω των τρισδιάστατων ετεροπυρηνικών φασμάτων, τα οποία συσχετίζουν το κάθε αμινοξύ με το προηγούμενό του. Με τη διαδικασία αυτή ταυτοποιήθηκαν τρία αμινοξικά κατάλοιπα φαινυλαλανίνης και

επιβεβαιώθηκαν άλλα τρία. Αντίστοιχα, με τη διαδικασία αυτή ταυτοποιήθηκαν και επιβεβαιώθηκαν κάποια αμινοξικά κατάλοιπα αλανίνης.



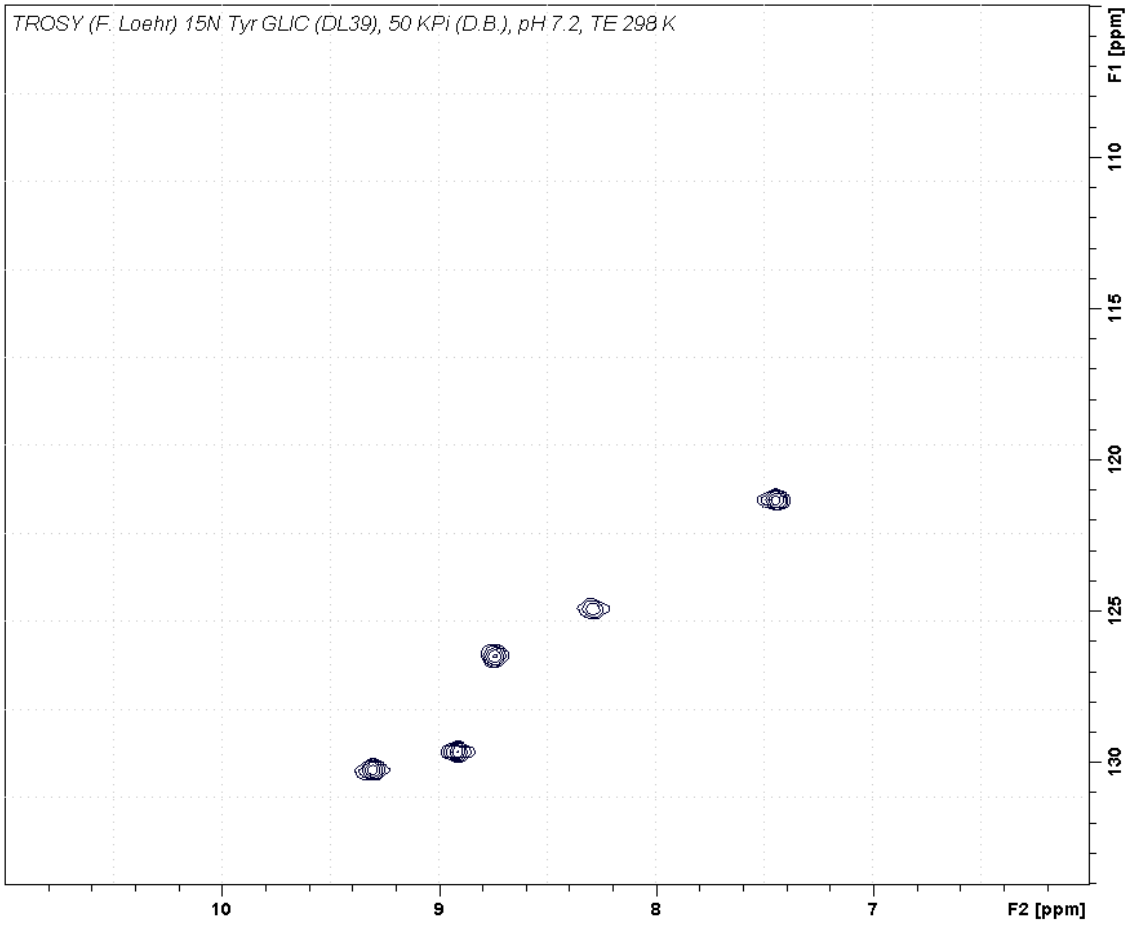
Εικόνα 35: A Υπέρθεση του φάσματος ^{1}H-^{15}N-HSQC για την ^{15}N-Phe και του ^{1}H-^{15}N-HSQC φάσματος της $GLIC_{ΕΚΠ}$. (Σε κύκλο εμφανίζονται τα αμινοξικά κατάλοιπα φαινυλαλανίνης.) **B** ^{1}H-^{15}N-HSQC φάσμα για την επιλεκτικά επισημασμένη $GLIC_{ΕΚΠ}$ σε ^{15}N- Phe.



Εικόνα 36: ^{1}H-^{15}N-HSQC φάσμα για την ^{15}N-Ala.

Ε.3.8. Επιλεκτική ^{15}N-επισήμανση της τυροσίνης

Η διαδικασία επιλεκτικής ^{15}N-επισήμανσης των αμινοξικών καταλοίπων τυροσίνης που επιλέχθηκε περιγράφεται στο Δ.15 και για την επιλογή της σημαντικό στοιχείο αποτέλεσε η θέση της τυροσίνης στο χάρτη βιοσύνθεσης των αμινοξέων. Το ^{1}H-^{15}N-HSQC φάσμα, το οποίο προέκυψε (Εικόνα 37) περιελάμβανε μόνο τις κορυφές που αντιστοιχούν στα αμινοξικά κατάλοιπα τυροσίνης. Αυτά εντοπίζονται στο ^{1}H-^{15}N-HSQC φάσμα της $GLIC_{ΕΚΠ}$ μετά από υπέρθεση των δύο φασμάτων.

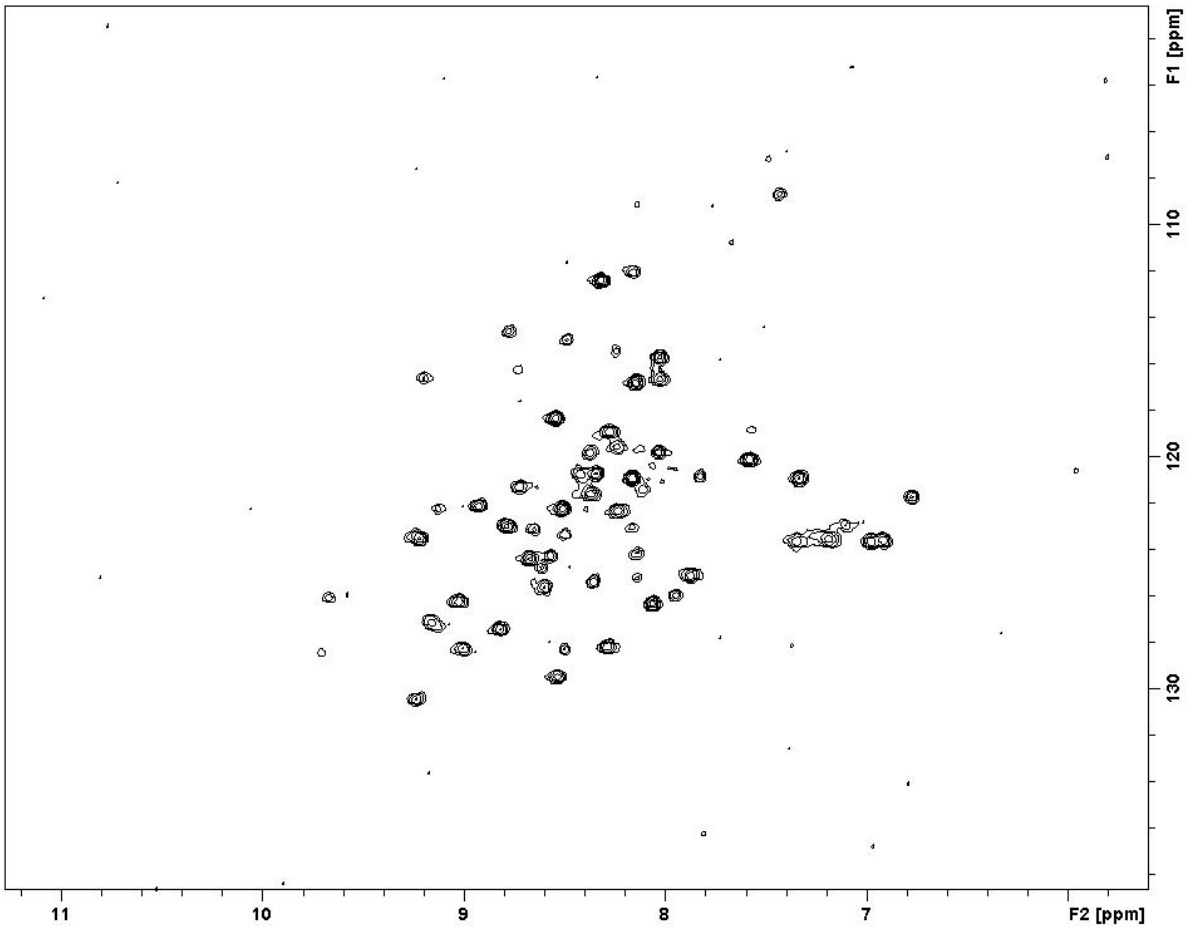


Εικόνα 37: ^{1}H-^{15}N-HSQC φάσμα για την ^{15}N-Tyr της $GLIC_{ΕΚΠ}$.

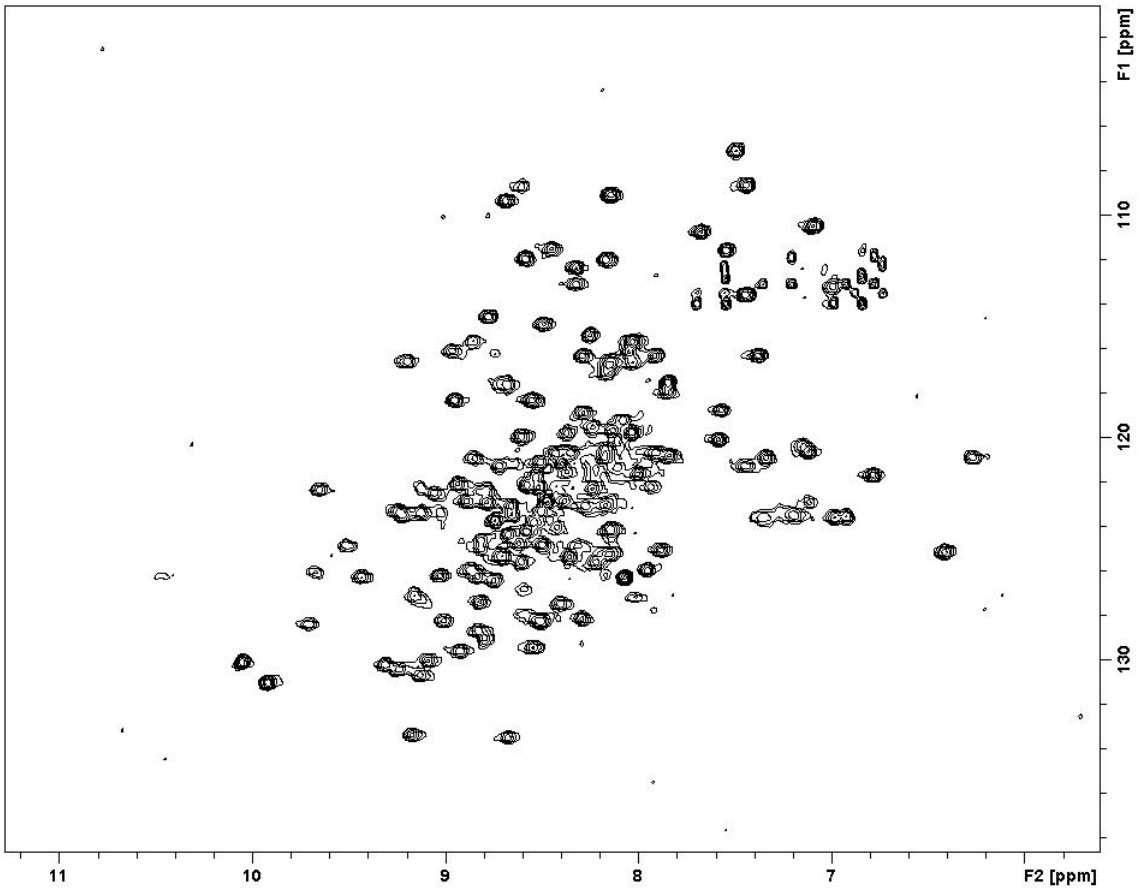
Η θέση του κάθε αμινοξικού καταλοίπου στην αλληλουχία βρέθηκε με τη βοήθεια των τρισδιάστατων ετεροπυρηνικών φασμάτων. Με αυτό τον τρόπο ταυτοποιούνται και επιβεβαιώνονται ορισμένα αμινοξικά κατάλοιπα τυροσίνης.

Ε.3.9. Επιλεκτική ^{15}N-επισήμανση του γλουταμινικού οξέος και του ασπαραγινικού οξέος

Επειδή, τόσο από το γλουταμινικό οξύ (Glu) όσο και από το ασπαραγινικό οξύ (Asp) συντίθενται αρκετά αμινοξέα, η επιλεκτική ^{15}N-επισήμανση τους είναι αρκετά δύσκολο να επιτευχθεί, εξαιτίας της μεγάλης έκτασης του φαινομένου της μη-ειδικής επισήμανσης. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε επιλεκτική ^{15}N-επισήμανση για αυτά τα αμινοξέα με τη χρήση των αυξοτροφικών κυττάρων, DL39(DE3) (όπως περιγράφεται στα Δ.15, Δ.16). Στα ^{1}H-^{15}N-HSQC φάσματα που αντιστοιχούν στην επιλεκτική επισήμανση του καθενός αμινοξέος (Εικόνες 38, 39) παρατηρείται το φαινόμενο της μη-ειδικής επισήμανσης εκτεταμένο σε ένα πλήθος διαφορετικών τύπων αμινοξέων.



Εικόνα 38: ^{1}H-^{15}N-HSQC φάσμα για την ^{15}N-Glu της $GLIC_{ΕΚΠ}$.

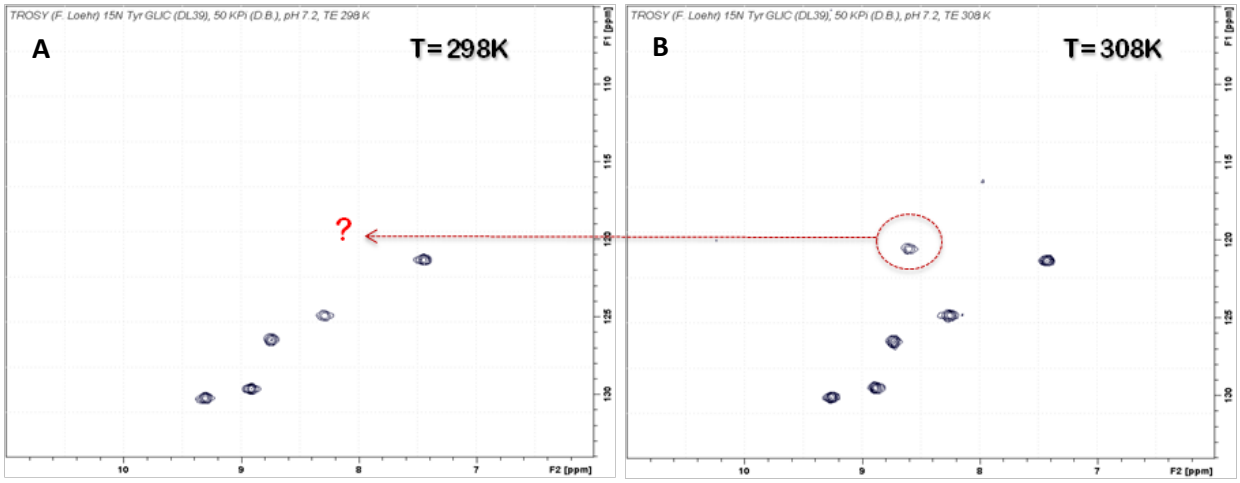


Εικόνα 39: ^{1}H-^{15}N-HSQC φάσμα για την ^{15}N-Asp της $GLIC_{ΕΚΠ}$.

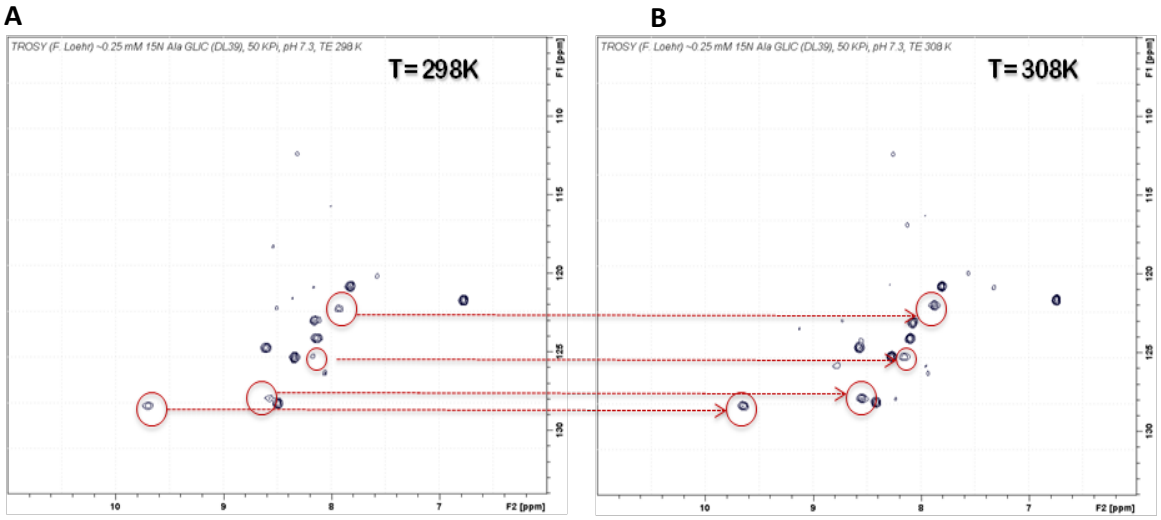
Επομένως, από τα φάσματα αυτά δεν ήταν δυνατό να εξαχθούν σαφή συμπεράσματα, καθώς η μέθοδος επιλεκτικής ^{15}N-επισήμανσης δεν ήταν επιτυχημένη.

Ε.4. Λήψη NMR φασμάτων μετά την αύξηση της θερμοκρασίας του πρωτεϊνικού δείγματος

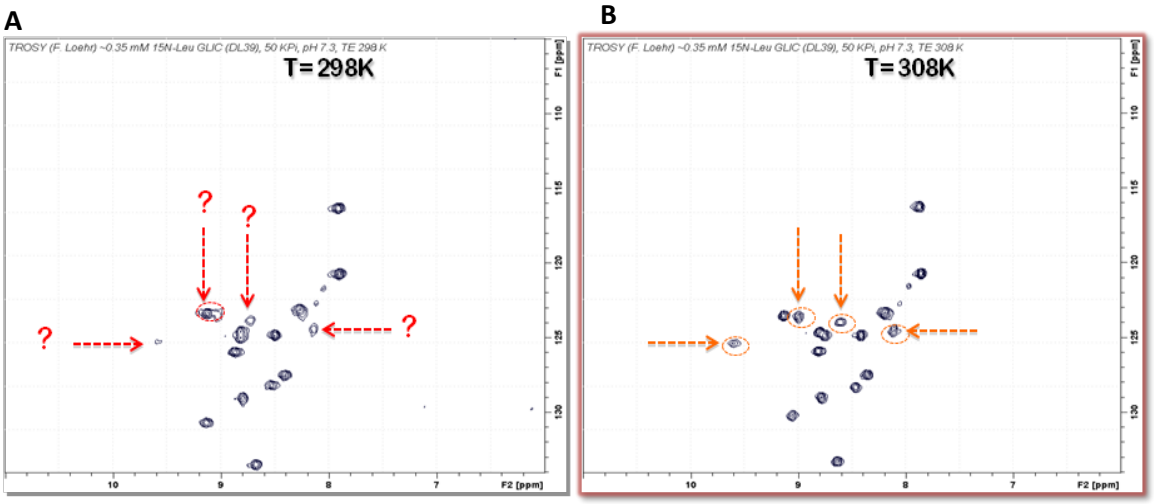
Η λήψη των παραπάνω NMR φασμάτων της πρωτεΐνης $GLIC_{ΕΚΠ}$ πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος T=298 K (δηλαδή 25°C). Σε αυτή τη θερμοκρασία η πρωτεΐνη βρίσκεται ανάμεσα σε δύο διαφορετικές διαμορφωτικές καταστάσεις. Η διαμορφωτική ανταλλαγή μεταξύ των δύο καταστάσεων στη θερμοκρασία αυτή πραγματοποιείται σε μια ενδιάμεση συχνότητα στη χρονική κλίμακα του NMR. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση αδύναμων σημάτων συντονισμού στα NMR φάσματα, τα οποία οφείλονται στη διεύρυνση των κορυφών συντονισμού, ενώ κάποια HN σήματα δεν εμφανίζονται. Με την αύξηση της θερμοκρασίας η ανταλλαγή μεταξύ των δύο διαμορφώσεων πραγματοποιείται γρήγορα στη χρονική κλίμακα του NMR. Έτσι, πραγματοποιείται γρήγορη ανταλλαγή των πυρήνων μεταξύ δύο διαμορφωτικών καταστάσεων και κάποια από τα σήματα, τα οποία δεν εμφανιζόταν προηγουμένως εξαιτίας της μεγάλης διεύρυνσης των κορυφών, με αυτό τον τρόπο εμφανίζονται. Πραγματοποιήθηκε λήψη NMR φασμάτων, στα οποία είχαν επισημανθεί επιλεκτικά αμινοξέα, σε θερμοκρασίες T=298 K και T=308 K. Συγκρίνοντας τα φάσματα για το ίδιο επιλεκτικά επισημασμένο ^{15}N-αμινοξύ σε διαφορετικές θερμοκρασίες (Εικόνες 40-42) παρατηρείται ότι εμφανίζονται νέες κορυφές συντονισμού οι οποίες αντιστοιχούν στο αμινοξύ και οι οποίες δεν εμφανιζόταν στα φάσματα τα οποία λήφθησαν σε T=298 K.



Εικόνα 40: ^{1}H-^{15}N-HSQC φάσμα για την ^{15}N-Tyr σε θερμοκρασίες **A** T=298 K και **B** T=308 K.



Εικόνα 41: ^{1}H-^{15}N-HSQC φάσμα για την ^{15}N-Ala σε θερμοκρασίες **A** T=298 K και **B** T=308 K Σε κύκλο παρουσιάζονται οι κορυφές, οι οποίες αυξάνουν την έντασή τους σημαντικά με την αύξηση της θερμοκρασίας.



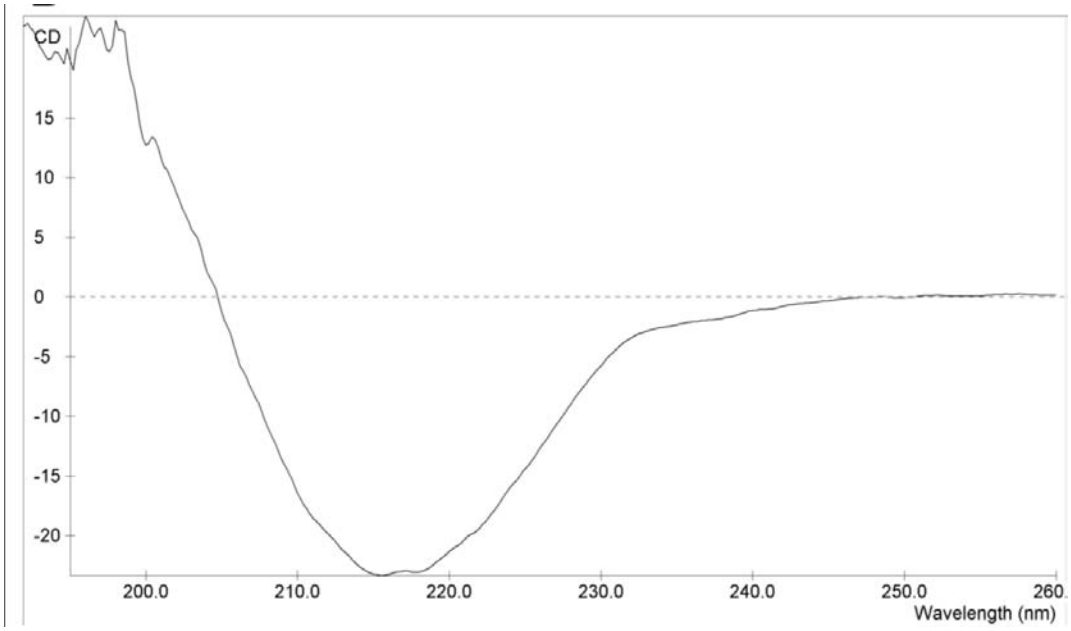
Εικόνα 42: ^{1}H-^{15}N-HSQC φάσμα για την ^{15}N-Leu σε θερμοκρασίες **A** T=298 K και **B** T=308 K. Σε κύκλο παρουσιάζονται οι κορυφές, οι οποίες αυξάνουν την έντασή τους σημαντικά με την αύξηση της θερμοκρασίας.

Με αυτό τον τρόπο, ταυτοποιούνται και επιβεβαιώνονται επιπλέον συχνότητες συντονισμού αμιδικών HN των αμινοξέων αυτών. Το πρόβλημα, το οποίο παρουσιάζεται στην περίπτωση αυτή είναι ότι η πρωτεΐνη καταβυθίζεται και πρωτεολύεται γρηγορότερα όταν αυξάνεται η θερμοκρασία. Αυτό αναμένεται να επιλυθεί με τη χρήση του αντιδραστηρίου «choline o-sulphate», το οποίο χρησιμοποιείται για την αύξηση της ανθεκτικότητας σε υψηλές θερμοκρασίες και δείχνει να σταθεροποιεί την πρωτεΐνη. Επομένως, μελλοντικά θα πραγματοποιηθούν προσπάθειες να ληφθούν φάσματα σε θερμοκρασία T=308 K, στα οποία να

εμφανίζονται περισσότερα σήματα συντονισμού και να εντοπίζονται περισσότερα αμινοξέα.

Ε.5. Ανάλυση κυκλικού διχρωισμού της $GLIC_{ΕΚΠ}$

Η φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού εκμεταλλεύεται τη διαφορά στην απορρόφηση μεταξύ των δύο φορών κυκλικά πολωμένου φωτός από μόρια που περιέχουν ασύμμετρα κέντρα. Η μεταβολή της διαφοράς απορρόφησης του αριστερόστροφα κυκλικά πολωμένου φωτός από το δεξιόστροφα (ΔΑ=AL-AR) σε σχέση με το μήκος κύματος είναι πλούσια σε πληροφορία σχετικά με τη δευτεροταγή δομή πρωτεϊνών στην περιοχή του απώτερου υπεριώδους (far-UV). Από φάσματα CD μπορεί να πιστοποιηθεί η αναδίπλωση μιας πρωτεΐνης, αλλά και να εκτιμηθεί το ποσοστό συμμετοχής κάθε επιμέρους τύπου δευτεροταγούς δομής στη συνολική δομή. Δείγματα πρωτεΐνης συγκέντρωσης 20-50μM χρησιμοποιήθηκαν για τη λήψη φασμάτων κυκλικού διχρωισμού (ΔΑ vs. λ) και θερμικής αποδιάταξης (ΔΑλ vs. Τ). Η περιοχή του φάσματος που σαρώθηκε αντιστοιχούσε στα 190-250nm. Χρησιμοποιήθηκαν κυψελίδες quartz-suprasil (HELLMA) οπτικών διαδρομών 0.2-0.5cm. Τα φάσματα καταγράφηκαν σε φασματοπολωσίμετρα Jasco J-810 (ΕΚΕΦΕ "ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ) συνδεδεμένα με συσκευή ελέγχου θερμοκρασίας τύπου Peltier. Η προτυποποίηση (standardization) και η συντήρηση των οργάνων έγινε με χρήση διαλυμάτων καμφοροσουλφονικού οξέος. Έτσι, χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού τεκμηριώθηκε η αναδίπλωση του μορίου σε επίπεδο δευτεροταγούς δομής, με συνεισφορά σε αυτή 48% της β- πτυχωτής επιφάνειας.



Εικόνα 43: Φάσμα κυκλικού διχρωισμού της $GLIC_{ΕΚΠ}$ σε pH 7, 298 K (20 mM TrisHCl).

Ενότητα ΣΤ

Συζήτηση

ΣΤ. Συζήτηση

Τα πενταμερή ιοντικά κανάλια, τα οποία ενεργοποιούνται μετά από δέσμευση προσδέτη (pLGICs) της οικογένειας Cys-θηλιάς είναι διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες, οι οποίες εμπλέκονται σε μεγάλη ποικιλία βιολογικών λειτουργιών. Οι νικοτινικοί υποδοχείς ακετυλοχολίνης (nAChR) αποτελούν το κύριο μέλος των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών αυτής της οικογένειας. Πολλά μέλη της οικογένειας αυτής χαρακτηρίζονται από μια συντηρημένη αλληλουχία 13 αμινοξικών καταλοίπων, τα οποία σχηματίζουν μια θηλιά και μεταξύ των δύο αμινοξικών καταλοίπων κυστεΐνης στο Ν-τελικό άκρο της κάθε υπομονάδας σχηματίζεται ένας δισουλφιδικός δεσμός. Οι εξωκυττάριες περιοχές (ΕΚΠ, ~210 αμινοξικά κατάλοιπα) περιλαμβάνουν περιοχές πρόσδεσης για αγωνιστές, συναγωνιστικούς αγωνιστές και ανταγωνιστές. Πρόσδεση ενός αγωνιστή προκαλεί γρήγορο άνοιγμα του διαμεμβρανικού ιοντικού καναλιού και οδηγεί σε μια αλλαγή στο δυναμικό της μεμβράνης. Πρόσφατα, έχουν προσδιοριστεί οι κρυσταλλικές δομές των εξωκυττάριων περιοχών σε χαμηλή και υψηλή διακριτικότητα παρέχοντας μια άποψη για τις δομές σε ατομικό επίπεδο και συγκεκριμένα για την αρχιτεκτονική αυτών των πενταμερών συστημάτων. Μέχρι πρόσφατα δεν υπήρχε αναφορά για τη δομή των συστημάτων αυτών σε διάλυμα καθώς και για τη δυναμική της πρωτεΐνης εξαιτίας της τάσης τους να σχηματίζουν ολιγομερή. Αυτός είναι ο κύριος λόγος για τον οποίο εμποδίζεται η μελέτη των pLGICs με φασματοσκοπία NMR, μέχρι σήμερα. Η εξωκυττάρια περιοχή του βακτηριακού ομολόγου του νικοτινικού υποδοχέα ακετυλοχολίνης (nAChR) από το *Gloeobacter violaceus* (GLIC) έχει πρόσφατα κρυσταλλωθεί και εμφανίζει μια απροσδόκητη τεταρτοταγή δομή εξαμερούς, ενώ στο διάλυμα συμπεριφέρεται ως μονομερές.

Στη μελέτη αυτή παρουσιάζεται η NMR διαμόρφωση σε διάλυμα καθώς και οι ιδιότητες δυναμικής του μορίου της $GLIC_{ΕΚΠ}$ (193 αμινοξικά κατάλοιπα με μια C-τελική Gly_2His_6 επίτοπο) βασισμένη στην ταυτοποίηση των πυρήνων σε ποσοστό 80% της κύριας αλυσίδας (με εξαίρεση 11 αμινοξικά κατάλοιπα προλίνης, Εικόνα 51). Οι μη επιθυμητές ιδιότητες αποδιέγερσης εμποδίζουν μια ολοκληρωμένη ταυτοποίηση των σημάτων συντονισμού της $GLIC_{ΕΚΠ}$. Ακόμη και σε μαγνητικό πεδίο 900MHz, το ^{1}H-^{15}N ετεροπυρηνικό φάσμα δύο διαστάσεων, HSQC/TROSY φάσμα της $GLIC_{ΕΚΠ}$

περιλαμβάνει μόνο 145 από τα 190 σήματα συντονισμού των αμιδίων τα οποία αναμένονται στο φάσμα. Βασικά NMR πειράματα τριών διαστάσεων με ^{2}H, ^{13}C, ^{15}N-επίσημανση των δειγμάτων της $GLIC_{ΕΚΠ}$ επιτρέπει την ταυτοποίηση των πυρήνων του σκελετού 110 αμινοξικών καταλοίπων. Για να επιβεβαιωθεί και να επεκταθεί αυτή η ταυτοποίηση των πυρήνων, πραγματοποιήθηκαν πειράματα επιλεκτικής ^{15}N-επισήμανσης και / ή αντίστροφης επισήμανσης για 12 αμινοξέα (Ala, Leu, Ile, Val, Phe, Tyr, Asn, His, Lys, Arg, Asp και Glu) σύμφωνα με γνωστές στρατηγικές ή στρατηγικές οι οποίες έχουν τροποποιηθεί και περιγράφονται στα Δ.7-Δ.16 (Πίνακας 1 και 2).

Πίνακας 1: Συνοπτική απεικόνιση της προσπάθειας για επιλεκτική επισήμανση της $GLIC_{ΕΚΠ}$. σε πρωτοτροφικά κύτταρα BL21(DE3)

^{15}N επιλεκτική επισήμανση με τη χρήση πρωτοτροφικών βακτηριακών κυττάρων E. coli BL21(DE3):			
Αμινοξύ	^{14}N (αντίστροφη επισήμανση)	^{15}N επισήμανση	Μη-ειδική επισήμανση
Leu	✓		+
Arg	✓		-
Val	✓		+
Phe	✓		+
Lys	✓		-
Ala	✓		+
Lys		✓	-
Leu		✓	+
^{15}N Leu+ ^{14}N (Val+Ile)		✓	+
^{15}N Val + ^{14}N (Leu+Val)		✓	-
^{15}N Ile + ^{14}N (Leu+Val)		✓	-
His	✓		-
Asn	✓		-

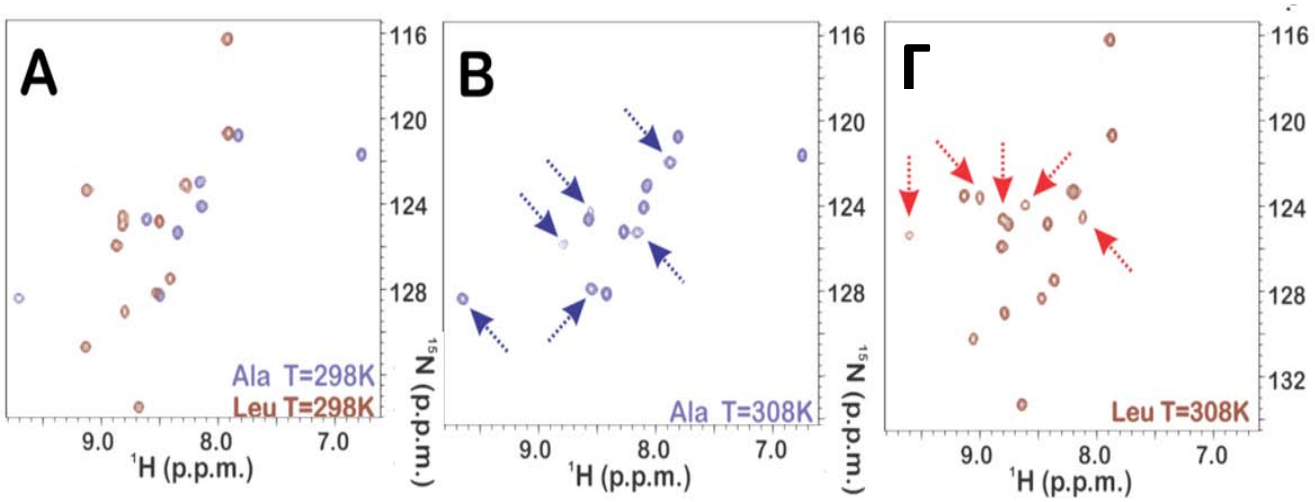
Πίνακας 2: Συνοπτική απεικόνιση της προσπάθειας για επιλεκτική επισήμανση της $GLIC_{ΕΚΠ}$. σε αυξοτροφικά κύτταρα DL39(DE3)

^{15}N επιλεκτική επισήμανση με τη χρήση αυξοτροφικών βακτηριακών κυττάρων E. coli DL39(DE3):		
Αμινοξύ	^{15}N επισήμανση	Μη-ειδική επισήμανση
Leu	✓	-
Phe	✓	-
Ala	✓	-
Tyr	✓	-
Asp	✓	+
Glu	✓	+

Αποτελεσματική αντίστροφη επισήμανση της ^{15}N-$GLIC_{ΕΚΠ}$ πραγματοποιήθηκε για τα αμινοξέα Arg, Lys, His και Asn στα βακτηριακά κύτταρα *Escherichia coli*, στην κυτταρική σειρά BL21(DE3). Επιτυχής επιλεκτική ^{15}N-επισήμανση στα κύτταρα *Escherichia coli*, στην κυτταρική σειρά πρωτοτροφικών κυττάρων BL21(DE3) επιτεύχθηκε για τα αμινοξέα Lys, Val και Ile (παρουσία ^{14}N-επισημασμένων αμινοξέων για να αποφευχθεί το φαινόμενο της μη-ειδικής επισήμανσης). Επιτυχής επιλεκτική ^{15}N-επισήμανση της $GLIC_{ΕΚΠ}$ για τα αμινοξέα Leu, Ala, Phe, Tyr, Asp και Glu επιτεύχθηκε στα αυξοτροφικά κύτταρα *Escherichia coli*, DL39(DE3). Συνολικά, η επιλεκτική επισήμανση παρείχε την ταυτοποίηση 34 νέων σημάτων συντονισμού των αμιδίων του σκελετού της $GLIC_{ΕΚΠ}$.

Τα ^{1}H-^{15}N-HSQC / TROSY φάσματα της επιλεκτικής ^{15}N-επισήμανσης των δειγμάτων της $GLIC_{ΕΚΠ}$ σε 298 και 308 K απέδειξε ότι η διαδικασία διαμορφωτικής ανταλλαγής σε αρκετά τμήματα της πρωτεΐνης αποτελεί μαζί με το χρόνο T_2 το λόγο της γρήγορης αποδιέγερσης. Με τον τρόπο αυτό, εμποδίζεται η ολοκληρωμένη ταυτοποίηση των πυρήνων, καθώς 36 HN σήματα συντονισμού δεν διακρίνονταν στα 298 K. Στα 308 K αρκετά ασθενή σήματα συντονισμού ενισχύονται σε ένταση και

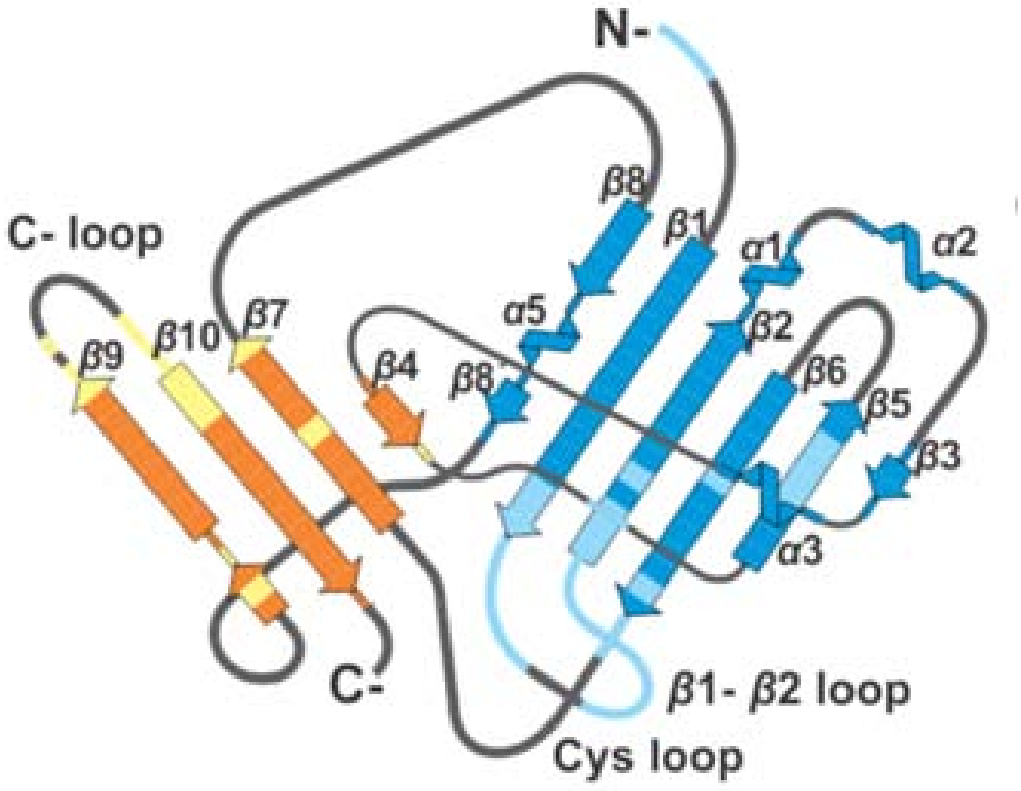
νέα σήματα συντονισμού, τα οποία δεν εμφανίζονταν καθόλου στους 298 K εμφανίστηκαν (Εικόνα 44).



Εικόνα 44: Α Υπέρθεση των ^{1}H-^{15}N-HSQC φάσματα της $GLIC_{ΕΚΠ}$ με επιλεκτική ^{15}N-Ala και ^{15}N-Leu στους 298 K. **Β** ^{1}H-^{15}N-HSQC φάσμα της $GLIC_{ΕΚΠ}$ με επιλεκτική ^{15}N-Ala στους 308 K. **Γ** ^{1}H-^{15}N-HSQC φάσμα της $GLIC_{ΕΚΠ}$ με επιλεκτική ^{15}N-Leu στους 308 K.

Το γεγονός αυτό ήταν αρκετά βοηθητικό για τη ταυτοποίηση των πυρήνων σε ορισμένες περιπτώσεις (π.χ. στην ταυτοποίηση της Tyr29).

Παρά τις προσπάθειες επισήμανσης υπάρχουν 39 μη-ταυτοποιημένα σήματα συντονισμού αμινοξικών καταλοίπων εξαιρουμένων των προλινών, οι οποίες δε διαθέτουν αμιδικό HN (Εικόνα 45). Τα περισσότερα μη-ταυτοποιημένα αμινοξικά κατάλοιπα εντοπίζονται στην N-τελική περιοχή και κυρίως στη β1-β2 θηλιά, στο πρώτο μισό της β2-πτύχωσης, στον πυρήνα της β5-πτύχωσης, δύο αμινοξικά κατάλοιπα σε καθένα από τις β6 και β7-πτυχώσεις, ορισμένα τμήματα της β9-πτύχωσης, καθώς επίσης και της β9-β10 θηλιάς (θηλιά C) και το πρώτο τμήμα της β10 πτύχωσης.



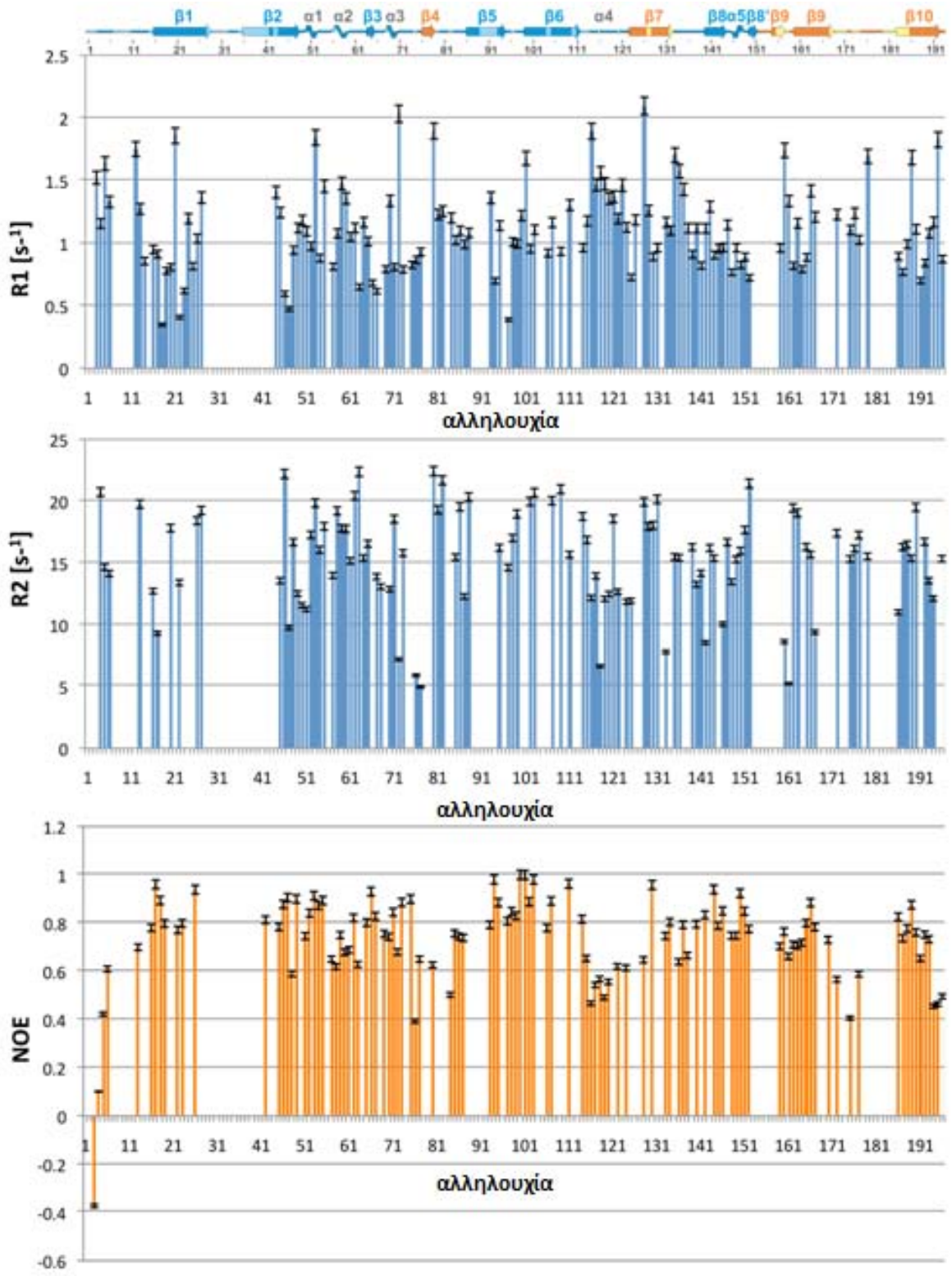
Εικόνα 45: Τοπολογικό διάγραμμα της $GLIC_{ΕΚΠ}$ στο οποίο περιγράφονται σχηματικά τα ταυτοποιημένα τμήματα της $GLIC_{ΕΚΠ}$. Με γκρι χρώμα εμφανίζονται οι περιοχές οι οποίες συνδέουν μεταξύ τους τις β-πτυχώσεις, με μπλε χρώμα εμφανίζεται το εσωτερικό β-φύλλο, με πορτοκαλί το εξωτερικό β-φύλλο και με ανοιχτό μπλε ή κίτρινο οι περιοχές οι οποίες δεν έχουν ταυτοποιυθεί.

Στο κρυσταλλικό μοντέλο της GLIC, η β1-β2 θηλιά και η β5-β6 θηλιά ανήκουν στο εσωτερικό β-φύλλο (Εικόνα 45), το οποίο αλληλεπιδρά με τη διαμεμβρανική περιοχή, ενώ το C-τελικό άκρο καταλήγει στις β7 και β9 πτυχώσεις και στο πρώτο τμήμα της β10-πτύχωσης, τα οποία σχηματίζουν το άνω τμήμα του εξωτερικού β-φύλλου. Επιπλέον, μη-ταυτοποιημένα αμινοξικά κατάλοιπα βρίσκονται στη β4-β5 θηλιά και στο αρχικό τμήμα της Cys-θηλιάς (β6-β7 θηλιά).

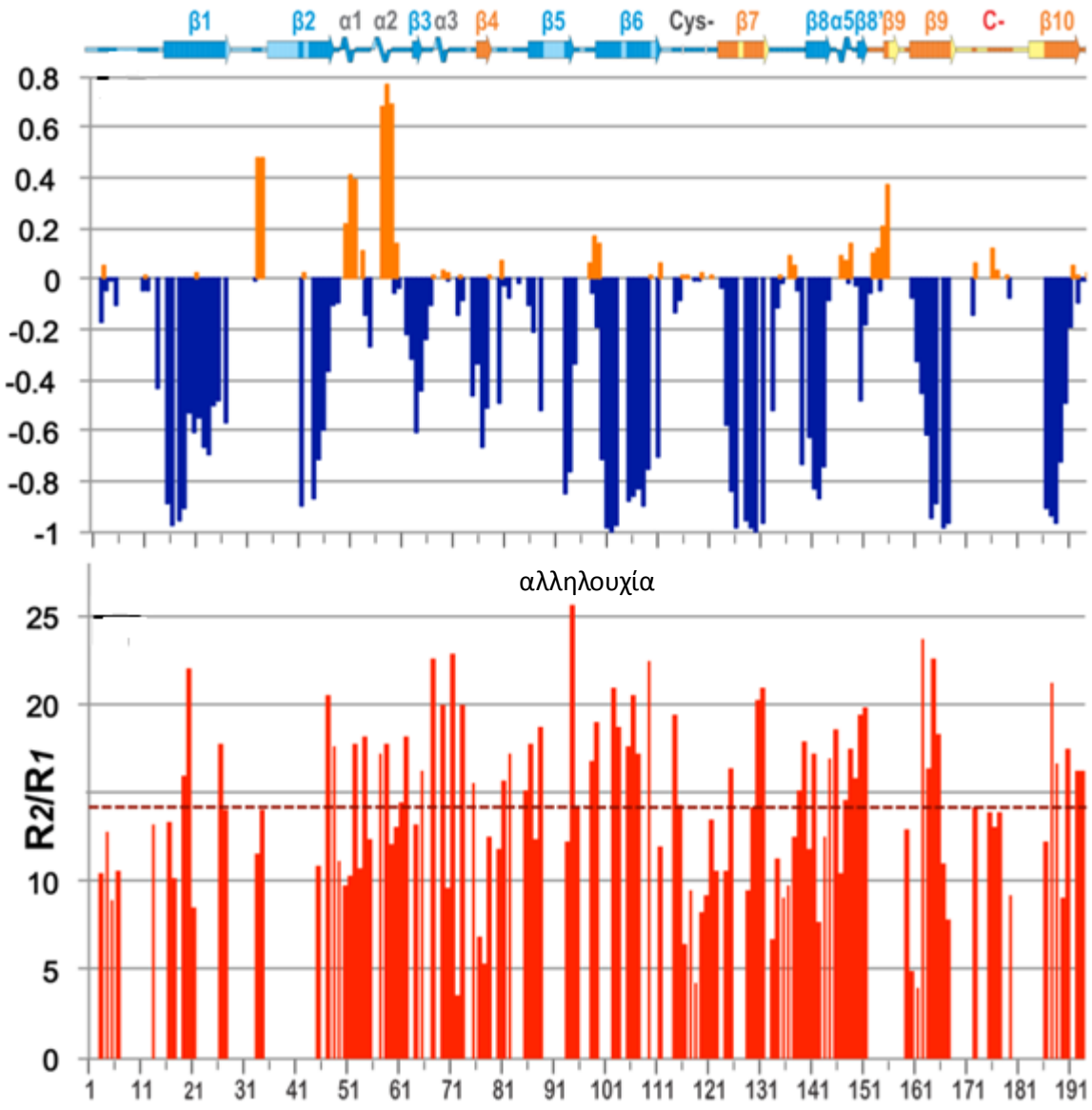
Η πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής της μονομερούς $GLIC_{ΕΚΠ}$ (η οποία πραγματοποιήθηκε μέσω του υπολογιστικού προγράμματος PECAN, Εικόνα 46) στηρίζεται στην ανάλυση των χημικών μετατοπίσεων και έρχεται σε συμφωνία με τα στοιχεία δευτεροταγούς δομής, τα οποία παρατηρούνται στην κρυσταλλική δομή του πενταμερούς της GLIC και του εξαμερούς της $GLIC_{ΕΚΠ}$. Επομένως, η κυρίαρχη β-

δομή είναι ανεξάρτητη από την κατάσταση ολιγομερισμού. Αυτό επιβεβαιώνεται, επίσης, από τις μετρήσεις κυκλικού διχρωισμού σε pH 7,0 (εικόνα 43), οι οποίες τεκμηριώνουν την αναδίπλωμένη μορφή του μορίου σε επίπεδο δευτεροταγούς δομής με ποσοστό της β-πτυχωτής επιφάνειας 48%. Το ποσοστό είναι σχεδόν ταυτόσημο με το β-φύλλο το οποίο περιέχεται στην $GLIC_{ΕΚΠ}$ και στις δύο κρυσταλλικές δομές (48-50%).

Η δυναμική του σκελετού της $GLIC_{ΕΚΠ}$ σε κλίμακα χρόνου από pico- σε nanosecond μελετήθηκε μέσω της ανάλυσης της αποδιέγερσης των πυρήνων και των σταθερών αποδιέγερσης R_1 ($1/T_1$, όπου T_1 ο χρόνος αποδιέγερσης μέσω του spin-πλέγματος), R_2 ($1/T_2$, όπου T_2 ο χρόνος αποδιέγερσης μέσω του spin-spin) και του ετεροπυρηνικού $^1H^N$ – ^{15}N NOEs (αλληλεπίδραση μεταξύ δύο πυρήνων HN). Ο λόγος των σταθερών αποδιέγερσης R_2/R_1 για το μόριο της $GLIC_{ΕΚΠ}$ υπολογίστηκε 11,1±0,3ns και αποδεικνύει ότι η $GLIC_{ΕΚΠ}$ είναι σε κατάσταση μονομερούς. Αν και τα R_2/R_1 δεδομένα (Εικόνα 46) δείχνουν υπολογίσιμη αστάθεια, ορισμένα ευκίνητα τμήματα (χαμηλότερες τιμές R_2/R_1) ή σταθερά τμήματα (υψηλότερες τιμές R_2/R_1) ήταν εφικτό να ταυτοποιηθούν. Για παράδειγμα, το N-τελικό τμήμα της $GLIC_{ΕΚΠ}$ είναι περισσότερο ευέλικτο από το C-τελικό. Χαμηλή ευκινησία (υψηλές R_2/R_1 τιμές) μπορεί να αποδοθεί στις πτυχώσεις β1, β6, β7 και β9. Αντίθετα, τμήματα τα οποία συνδέουν τις β2-β3 πτυχώσεις, τμήματα του φύλου β4, της Cys-θηλιάς (β6-β7 θηλιά), της β7-β8 θηλιάς και τα γειτονικά τμήματα της C-θηλιάς (β9-β10 θηλιά) φαίνεται να είναι ευκίνητα.



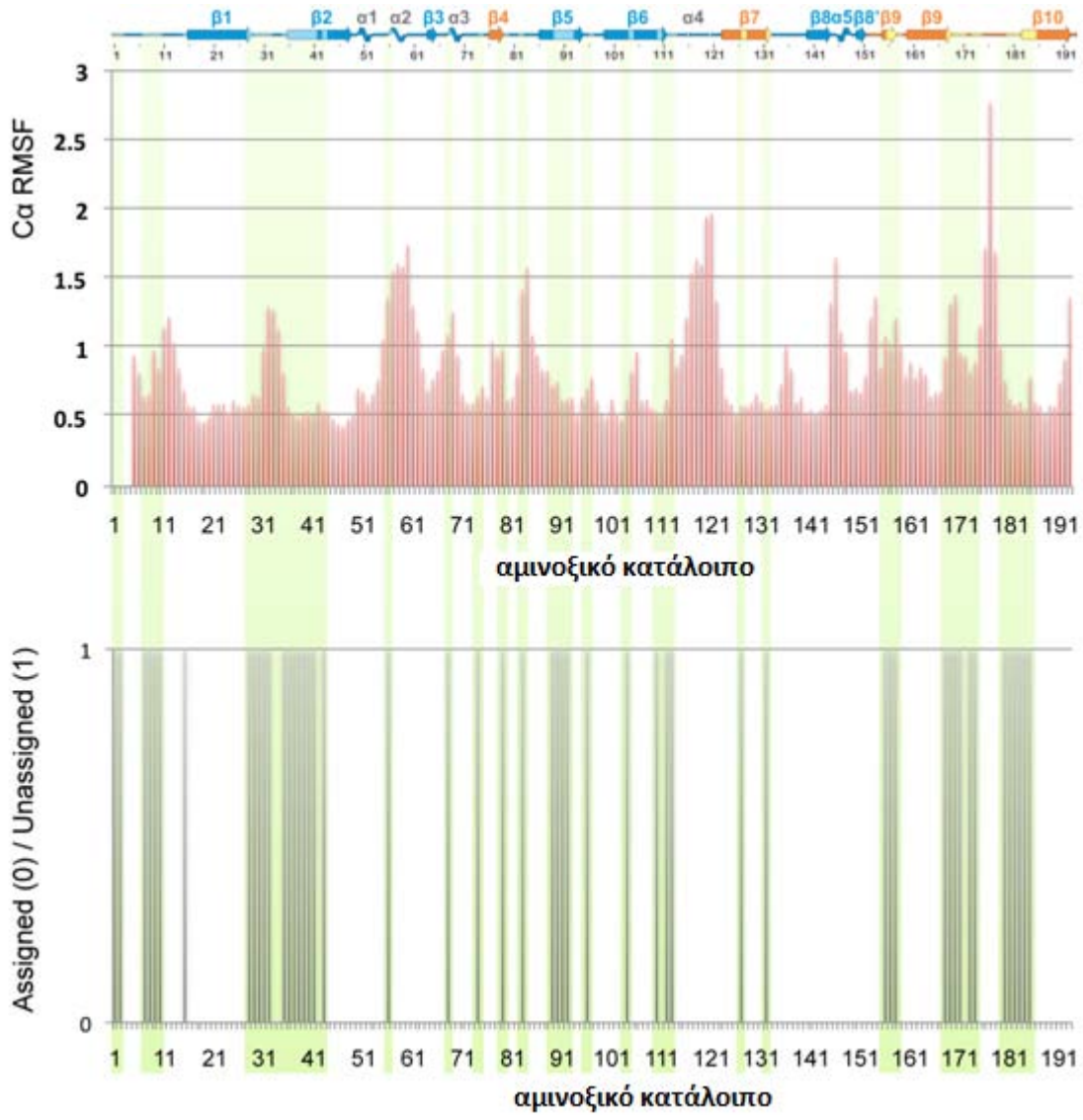
Εικόνα 46: Τιμές ^{15}N R_1, R_2 και ετεροπυρηνικού $^{1}H^{N}$–^{15}N NOE



Εικόνα 47: A Δευτεροταγής δομή μέσω του PECAN σε σύγκριση με τη δευτεροταγή δομή του εξαμερούς της $GLIC_{ΕΚΠ}$ **B** Τιμές R_2/R_1 (η διακεκομμένη γραμμή αντιπροσωπεύει το μέσο όρο του R_2/R_1)

Αξιοσημείωτο είναι ότι σύμφωνα με τις ^{15}N σταθερές αποδιέγερσης, τα ευκίνητα τμήματα της $GLIC_{ΕΚΠ}$ συνορεύουν με τις περισσότερες μη-ταυτοποιημένες περιοχές, οι οποίες υφίστανται διαμορφωτική ανταλλαγή σε ενδιάμεση κλίμακα χρόνου NMR. Η δομή της μονομερούς $GLIC_{ΕΚΠ}$ (Εικόνα 48), η οποία είναι εκτεθειμένη σε νερό όπως παρατηρήθηκε σε πειράματα προσομοίωσης μοριακής δυναμικής 10ns (MD) έρχονται σε πλήρη συμφωνία με τις ^{15}N σταθερές αποδιέγερσης. Ο συντελεστής απόκλισης RMSD (Root-Mean Square Deviation) κυμαίνεται σε τιμές, οι οποίες εμπλέκουν υψηλή κινητικότητα του N-τελικού άκρου της $GLIC_{ΕΚΠ}$, την άκρη της β1-β2

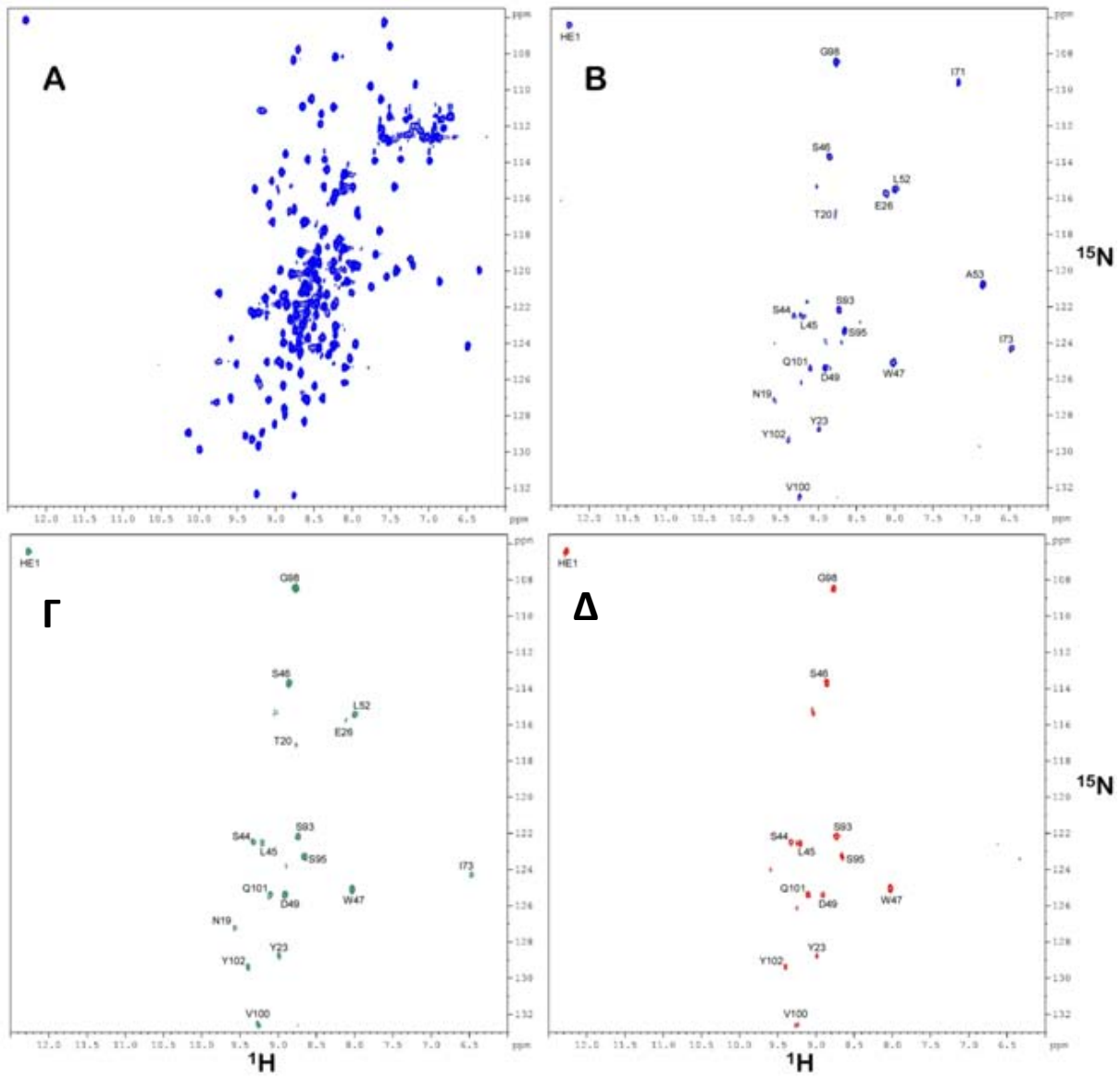
θηλιάς και τη β3-β4 θηλιά, τη Cys-θηλιά, το πρώτο τμήμα της β9-πτύχωσης και τη C-θηλιά (Εικόνα 48).



Εικόνα 48: Τιμές ατομικής RMS (Root Mean Square) διακύμανσης το οποίο προέρχεται από υπολογισμούς προσομοίωσης μοριακής δυναμικής (MD) σε 10ns της $GLIC_{εκπ}$ σε νερό. Μη ταυτοποιημένα τμήματα της $GLIC_{ΕΚΠ}$ παρατίθεται για σύγκριση.

Πληροφορίες για την κινητικότητα της $GLIC_{ΕΚΠ}$ σε κλίμακα χρόνου από λεπτά μέχρι μέρες προέρχονται από ένα πείραμα H-D ανταλλαγής, στο οποίο το ^{1}H-^{15}N-HSQC φάσμα σε 298 K καταγράφηκε από λυοφιλοποιημένο δείγμα πρωτεΐνης, το οποίο είχε διαλυθεί σε 100% D_2O. Το πρώτο φάσμα μετά από ανταλλαγή πυρήνων για 90 λεπτά περιελάμβανε μόνο 19 HN σήματα συντονισμού του σκελετού, τα περισσότερα από τα οποία ανήκουν σε αμινοξικά κατάλοιπα στο άνω τμήμα του

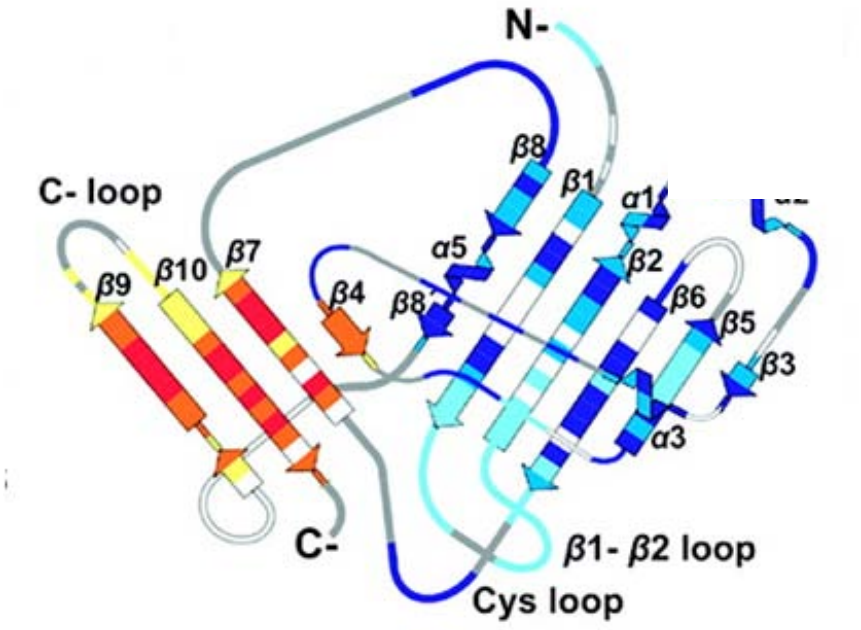
εσωτερικού β-φύλλου και των συμπεριλαμβανομένων θηλιών (Εικόνα 49). Επομένως, μόνο οι ομάδες HN αυτού του τμήματος του σκελετού της $GLIC_{ΕΚΠ}$ εμπλέκονται στην κινητική σταθερότητα των δεσμών υδρογόνου. Το υπόλοιπο τμήμα της πρωτεΐνης είναι ευκίνητο σε κλίμακα χρόνου ωρών.



Εικόνα 49: Ανταλλαγή H-D της $GLIC_{ΕΚΠ}$ η οποία παρακολουθείται μέσω ^{1}H-^{15}N HSQC φάσματος **Α** ^{1}H-^{15}N HSQC φάσμα της δευτεριωμένης $GLIC_{ΕΚΠ}$ (600 MHz; 50 mM KP_i, pH 7.0, 298 K), **Β** ^{1}H-^{15}N HSQC φάσμα της $GLIC_{ΕΚΠ}$ μετά από 90min μετά από HD ανταλλαγή **Γ** ^{1}H-^{15}N HSQC φάσμα της $GLIC_{ΕΚΠ}$ μετά από 23h μετά από HD ανταλλαγή **Δ** ^{1}H-^{15}N HSQC φάσμα της $GLIC_{ΕΚΠ}$ μετά από 6d 20h μετά από HD ανταλλαγή.

Η δομή του μονομερούς της $GLIC_{ΕΚΠ}$ παρουσιάζεται να είναι καλά αναδιπλωμένη στο διάλυμα, αν και τα πειράματα ανταλλαγής H-D και τα φάσματα της επιλεκτικής επισήμανσης των δειγμάτων στους 308 K αποδεικνύουν ότι ορισμένα

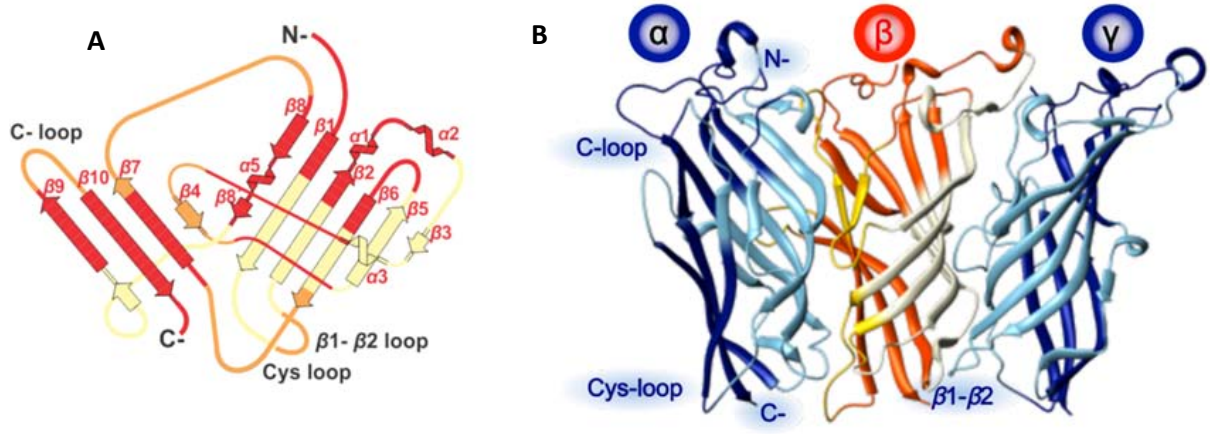
τμήματα της πρωτεΐνης υπόκεινται σε εγγενή κινητικότητα σε διαφορετικές κλίμακες χρόνου NMR. Σύμφωνα με τα NMR δεδομένα, η $GLIC_{ΕΚΠ}$ παρουσιάζει μια δομή β-σάντουιτς, στην οποία το πάνω μέρος του εσωτερικού πυρήνα του β-φύλλου (β1, β2, β5 και β6-πτυχώσεις) και το κεντρικό τμήμα του εξωτερικού β-φύλλου (β4, β7, β9 και β10-πτυχώσεις) ανήκουν στο άκαμπτο τμήμα του μορίου (Εικόνα 50).



Εικόνα 50: NMR δυναμική του σκελετού σύμφωνα με τις ^{15}N σταθερές αποδιέγερσης. Με μπλε σκούρο και κόκκινο εμπλέκονται οι τιμές R_2/R_1 πάνω από το μέσο όρο στο εσωτερικό και εξωτερικό β-φύλλο, αντίστοιχα. Με άσπρο παρουσιάζονται τα ταυτοποιημένα τμήματα για τα οποία το R2/R1 δεν έχει προσδιοριστεί.

Αντίθετα, τα ακόλουθα τμήματα παρουσιάζουν υψηλότερη ευκινησία κυρίως σε κλίμακα χρόνου από pico- σε nanosecond: το κατώτερο τμήμα του εσωτερικού β-φύλλου, η β1-β2 θηλιά και τα γειτονικά τμήματα των β-πτυχώσεων β1 και β2, η Cys-θηλιά και τμήμα του συνδέτη β8-β9 και η C-θηλιά με τα γειτονικά τμήματα των πτυχώσεων β9 και β10. Τα περισσότερα από αυτά τα τμήματα βρέθηκαν να είναι ευέλικτα ή διαταραγμένα στα κρυσταλλωμένα ολιγομερή. Αυτά βρίσκονται είτε στην περίμετρο της δομής β-σάντουιτς είτε στα τμήματα, τα οποία βρίσκονται σε επαφή με τη διαμεμβρανική μεμβράνη στο πενταμερές της GLIC. Επιπλέον, η β1-β2 θηλιά, τμήματα των πτυχώσεων β5, β6 καθώς και η C-θηλιά υφίστανται διαμορφωτική ανταλλαγή σε κλίμακα χρόνου από microsecond σε millisecond, όπως αποδεικνύεται από την εμφάνιση των NMR σημάτων συγκεκριμένων αμινοξικών καταλοίπων μόνο

στους 308 K. Στα κρυσταλλικά μοντέλα, σημαντικά τμήματα των τελευταίων περιοχών ανήκουν στη διεπιφάνεια μεταξύ των υπομονάδων (Εικόνα 51A, 51B).



Εικόνα 51: Τμήματα τα οποία συμμετέχουν στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υπομονάδων στο εξαμερές (πορτοκαλί και κίτρινο για τη διεπιφάνεια μεταξύ της προηγούμενης και της επόμενης υπομονάδας, αντίστοιχα για το β και με μπλε ανοιχτό για τη διεπιφάνεια με την επόμενη ή την προηγούμενη υπομονάδα για τα α και γ, αντίστοιχα)

Τα δεδομένα NMR σχετικά με την κινητικότητα του μονομερούς της $GLIC_{ΕΚΠ}$ στο διάλυμα και τα αντίστοιχα συμπεράσματα σχετικά με την ευελιξία των υπομονάδων του εξαμερούς της $GLIC_{ΕΚΠ}$ και του πενταμερούς της GLIC σε κατάσταση κρυστάλλωσης παρέχουν νέες γνώσεις σχετικά με την υπομονάδα και την οργάνωση του ολιγομερούς. Αρκετές ένδο- και διαμεμβρανικές αλληλεπιδράσεις οι οποίες υφίστανται στο πενταμερές αλλά όχι στο εξαμερές εντοπίζονται στα τμήματα τα οποία εμφανίζουν αργές ή γρήγορες κινήσεις. Για παράδειγμα η β1-β2 θηλιά έρχεται σε επαφή με τη διαμεμβρανική μεμβράνη στο πενταμερές αλλά εμφανίζει ευκινησία στο εξαμερές της $GLIC_{ΕΚΠ}$, απουσία της διαμεμβρανικής περιοχής. Αυτό πιθανόν σχετίζεται με την απώλεια της γέφυρας άλατος μεταξύ Asp32-Arg192, η οποία υφίσταται στο πενταμερές αλλά στο εξαμερές έχει διασπαστεί. Στο διάλυμα, η β1-β2 θηλιά φαίνεται να υιοθετεί διαφορετική διαμορφωτική κατάσταση και η εξισορρόπηση μεταξύ των δύο καταστάσεων επιτεύχθηκε μετά την αύξηση της θερμοκρασίας. Η β1-β2 θηλιά εμφάνισε υψηλή κινητικότητα, η οποία μπορεί να επηρεάσει, επίσης, τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υπομονάδων. Αυτό συμβαίνει καθώς το τμήμα των καταλοίπων Tyr28-Ala41 εμπλέκεται στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υπομονάδων στο πενταμερές και στο εξαμερές (Εικόνα 50B), ενώ στο μονομερές σε διάλυμα αποκτά ιδιαίτερη ευκινησία. Επιπλέον, τα NMR σήματα συντονισμού των αμινοξικών καταλοίπων Val89-Ile92 της β5-πτυχώσης, τα οποία

συμμετέχουν στη διεπιφάνεια των δύο υπομονάδων και των δύο ολιγομερών δεν ανιχνεύονται στους 298 K, γεγονός το οποίο υποδηλώνει έντονα μια διαδικασία ανάμεσα σε δύο καταστάσεις διαμορφωτικής ανταλλαγής στο μονομερές της $GLIC_{ΕΚΠ}$ στο διάλυμα. Επιπροσθέτως, τα σήματα συντονισμού, τα οποία αντιστοιχούν στο άκρο της β6-β7 θηλιάς (Ser112 και His127) παραμένουν μη ανιχνεύσιμα. Αυτά τα αμινοξέα έχει βρεθεί ότι συνδέονται με δεσμούς υδρογόνου στην κρυσταλλική δομή, σταθεροποιώντας έτσι την β6-β7 θηλιά στα βακτηριακά pLGICs, στα οποία απουσιάζει ο δισουλφιδικός (S-S) δεσμός της Cys-θηλιάς. Σύμφωνα με τις ^{15}N σταθερές αποδιέγερσης, η Cys-θηλιά παρουσιάζει σημαντική ευκινησία σε κλίμακα χρόνου από pico- σε nanosecond. Τελικά, το άκρο της β9-β10 C-θηλιάς (Ala175-Arg179), το οποίο παραμένει μη ταυτοποιημένο σε αρκετές υπομονάδες του εξαμερούς της $GLIC_{ΕΚΠ}$, έχει ανιχνευθεί και ταυτοποιηθεί στο διάλυμα μέσων στο NMR και δείχνει αξιοσημείωτη κινητικότητα. Τα τμήματα, τα οποία συνδέουν τις πτυχώσεις β9 και β10 δεν είναι ορατά, γεγονός το οποίο υποδηλώνει και πάλι μια διαμορφωτική ανταλλαγή ανάμεσα σε δύο καταστάσεις σε κλίμακα χρόνου micro- σε millisecond. Τα αμινοξικά κατάλοιπα Ala175-Arg179 εμπλέκονται σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ δύο υπομονάδων μόνο στο πενταμερές, αλλά εμφανίζονται αρκετά ευκίνητα στο εξαμερές. Το γεγονός αυτό ερμηνεύεται ως μια σημαντική κίνηση προς τα πάνω (όταν το πενταμερές συγκρίνεται με το εξαμερές) ή προς τα κάτω (όταν το εξαμερές συγκρίνεται με το πενταμερές), σύμφωνα με το διαφορετικό τρόπο ολιγομερισμού της $GLIC_{ΕΚΠ}$. Από τα NMR δεδομένα συμπεραίνεται ότι το άκρο της C-θηλιάς, αν και είναι ευκίνητο, δεν είναι σημαντικό για αυτή τη μετατροπή, η οποία εμφανίζεται να είναι ζωτικής σημασίας για την κατάσταση ολιγομερισμού της $GLIC_{ΕΚΠ}$. Τα δύο μη-ταυτοποιημένα τμήματα (Val168-Phe174 και Leu180-Asp185), τα οποία αποτελούν το πάνω μέρος του β9-β10 τμήματος με διαμόρφωση φουρκέτας, φέρει μια εγγενή πλαστικότητα, η οποία μπορεί να επηρεάσει την αλληλεπίδραση υπομονάδας-υπομονάδας (Εικόνα 51B) και του ολιγομερισμού. Στα δεδομένα της κρυσταλλογραφίας ακτίνων X φαίνεται ότι η σύνδεση των γειτονικών υπομονάδων εξαρτάται από τον αποκλεισμό της C-θηλιάς από τη διεπιφάνεια. Μια υψηλή κινητικότητα της θηλιάς και μια κίνηση κάμψης έχει προβλεφθεί από την προσομοίωση μοριακής κινητικής και τη ab initio ανάλυση των κινήσεων/δονήσεων του μορίου (normal-mode analysis).

Συνοπτικά, έχουν εξεταστεί οι δομικές ιδιότητες και η δυναμική του μονομερούς της $GLIC_{ΕΚΠ}$, στο διάλυμα, με μέγεθος 23kDa. Παρόλο που οι ιδιότητες αποδιέγερσης δεν είναι ευνοϊκές για μια ολοκληρωμένη NMR ανάλυση, τα NMR δεδομένα παρέχουν τη δυνατότητα μελέτης των κινήσεων του μορίου, τα οποία λαμβάνουν χώρα σε ευρύ φάσμα κλίμακας χρόνου, το οποίο κυμαίνεται από pico- σε millisecond. Η συγκεκριμένη μελέτη αποτελεί την πρώτη ταυτοποίηση μιας ΕΚΠ ενός μέλους της οικογένειας των Cys-θηλιάς υποδοχέων σε διάλυμα και την πρώτη λεπτομερή μελέτη της δυναμικής συμπεριφοράς μιας ΕΚΠ. Τα δεδομένα αυτά σε διάλυμα θεωρείται ότι σχετίζονται άμεσα με τη συναρμολόγηση των υπομονάδων της ΕΚΠ των LGIC και τις κινήσεις, οι οποίες είναι σχετικές με τη λειτουργία των υποδοχέων της οικογένειας Cys-θηλιάς.

Ενότητα Η

Βιβλιογραφία

Η. Βιβλιογραφία

1. Bocquet, N., et al., *A prokaryotic proton-gated ion channel from the nicotinic acetylcholine receptor family.* Nature, 2007. **445**(7123): p. 116-9.
2. Hansen, S.B., et al., *Structures of Aplysia AChBP complexes with nicotinic agonists and antagonists reveal distinctive binding interfaces and conformations.* EMBO J, 2005. **24**(20): p. 3635-46.
3. Connolly, C.N. and K.A. Wafford, *The Cys-loop superfamily of ligand-gated ion channels: the impact of receptor structure on function.* Biochem Soc Trans, 2004. **32**(Pt3): p. 529-34.
4. Sine, S.M., et al., *On the origin of ion selectivity in the Cys-loop receptor family.* J Mol Neurosci, 2010. **40**(1-2): p. 70-6.
5. Hibbs, R.E. and E. Gouaux, *Principles of activation and permeation in an anion-selective Cys-loop receptor.* Nature, 2011. **474**(7349): p. 54-60.
6. Changeux, J.P., *Allosteric proteins: from regulatory enzymes to receptors--personal recollections.* Bioessays, 1993. **15**(9): p. 625-34.
7. Changeux, J.P. and S.J. Edelstein, *Allosteric mechanisms of signal transduction.* Science, 2005. **308**(5727): p. 1424-8.
8. Karlin, A. and M.H. Akabas, *Toward a structural basis for the function of nicotinic acetylcholine receptors and their cousins.* Neuron, 1995. **15**(6): p. 1231-44.
9. Arias, H.R., P. Bhumireddy, and C. Bouzat, *Molecular mechanisms and binding site locations for noncompetitive antagonists of nicotinic acetylcholine receptors.* Int J Biochem Cell Biol, 2006. **38**(8): p. 1254-76.
10. Paas, Y., et al., *Pore conformations and gating mechanism of a Cys-loop receptor.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(44): p. 15877-82.
11. Salussolia, C.L., et al., *Arrangement of Subunits in Functional NMDA Receptors.* J Neurosci, 2011. **31**(31): p. 11295-304.
12. Rossmann, M., et al., *Subunit-selective N-terminal domain associations organize the formation of AMPA receptor heteromers.* EMBO J, 2011. **30**(5): p. 959-71.
13. Kawate, T., et al., *Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state.* Nature, 2009. **460**(7255): p. 592-8.
14. Betz, H., *Ligand-gated ion channels in the brain: the amino acid receptor superfamily.* Neuron, 1990. **5**(4): p. 383-92.
15. Ortells, M.O. and G.G. Lunt, *Evolutionary history of the ligand-gated ion-channel superfamily of receptors.* Trends Neurosci, 1995. **18**(3): p. 121-7.
16. Tsetlin, V., D. Kuzmin, and I. Kasheverov, *Assembly of nicotinic and other Cys-loop receptors.* J Neurochem, 2011. **116**(5): p. 734-41.
17. Maksay, G., *Ligand-gated pentameric ion channels, from binding to gating.* Curr Mol Pharmacol, 2009. **2**(3): p. 253-62.
18. Le Novere, N., T. Grutter, and J.P. Changeux, *Models of the extracellular domain of the nicotinic receptors and of agonist- and Ca2+-binding sites.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(5): p. 3210-5.
19. Unwin, N., et al., *Nicotinic acetylcholine receptor at 4.6 angstrom resolution: Transverse tunnels in the channel wall.* Journal of Molecular Biology, 1999. **288**(4): p. 765-786.
20. Schofield, P.R., et al., *Sequence and Functional Expression of the Gaba-a Receptor Shows a Ligand-Gated Receptor Super-Family.* Nature, 1987. **328**(6127): p. 221-227.
21. Grenningloh, G., et al., *Glycine vs GABA receptors.* Nature, 1987. **330**(6143): p. 25-6.
22. Maricq, A.V., et al., *Primary structure and functional expression of the 5HT3 receptor, a serotonin-gated ion channel.* Science, 1991. **254**(5030): p. 432-7.
23. Corringer, P.J., et al., *Atomic structure and dynamics of pentameric ligand-gated ion channels: new insight from bacterial homologues.* J Physiol, 2010. **588**(Pt 4): p. 565-72.

24. Hilf, R.J. and R. Dutzler, *X-ray structure of a prokaryotic pentameric ligand-gated ion channel.* Nature, 2008. **452**(7185): p. 375-9.
25. Hilf, R.J. and R. Dutzler, *Structure of a potentially open state of a proton-activated pentameric ligand-gated ion channel.* Nature, 2009. **457**(7225): p. 115-8.
26. Bocquet, N., et al., *X-ray structure of a pentameric ligand-gated ion channel in an apparently open conformation.* Nature, 2009. **457**(7225): p. 111-4.
27. Nakamura, Y., et al., *Complete genome structure of Gloeobacter violaceus PCC 7421, a cyanobacterium that lacks thylakoids.* DNA Res, 2003. **10**(4): p. 137-45.
28. Gotti, C., D. Fornasari, and F. Clementi, *Human neuronal nicotinic receptors.* Prog Neurobiol, 1997. **53**(2): p. 199-237.
29. Pollard, H.B., N. Arispe, and E. Rojas, *Ion channel hypothesis for Alzheimer amyloid peptide neurotoxicity.* Cell Mol Neurobiol, 1995. **15**(5): p. 513-26.
30. Kalamida, D., et al., *Muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors. Structure, function and pathogenicity.* FEBS J, 2007. **274**(15): p. 3799-845.
31. McGehee, D.S. and L.W. Role, *Physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by vertebrate neurons.* Annu Rev Physiol, 1995. **57**: p. 521-46.
32. Role, L.W., *Diversity in primary structure and function of neuronal nicotinic acetylcholine receptor channels.* Curr Opin Neurobiol, 1992. **2**(3): p. 254-62.
33. Le Novere, N. and J.P. Changeux, *The Ligand Gated Ion Channel Database.* Nucleic Acids Res, 1999. **27**(1): p. 340-2.
34. Lo, W.Y., et al., *A conserved Cys-loop receptor aspartate residue in the M3-M4 cytoplasmic loop is required for GABAA receptor assembly.* J Biol Chem, 2008. **283**(44): p. 29740-52.
35. Sine, S.M. and A.G. Engel, *Recent advances in Cys-loop receptor structure and function.* Nature, 2006. **440**(7083): p. 448-55.
36. Brejc, K., et al., *The 2.7 A structure of AChBP, homologue of the ligand-binding domain of the nicotinic acetylcholine receptor.* Novartis Found Symp, 2002. **245**: p. 22-9; discussion 29-32, 165-8.
37. Sixma, T.K. and A.B. Smit, *Acetylcholine binding protein (AChBP): a secreted glial protein that provides a high-resolution model for the extracellular domain of pentameric ligand-gated ion channels.* Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2003. **32**: p. 311-34.
38. Taly, A., et al., *Discrimination of agonists versus antagonists of nicotinic ligands based on docking onto AChBP structures.* J Mol Graph Model, 2011. **30**: p. 100-9.
39. Mukhtasimova, N., C. Free, and S.M. Sine, *Initial coupling of binding to gating mediated by conserved residues in the muscle nicotinic receptor.* J Gen Physiol, 2005. **126**(1): p. 23-39.
40. Church, P.J., *Functional analyses of cotransmission in Aplysia californica*. 1993, University of Chicago. p. viii, 93 leaves.
41. Bourne, Y., et al., *Structural determinants in phycotoxins and AChBP conferring high affinity binding and nicotinic AChR antagonism.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(13): p. 6076-81.
42. Bourne, Y., et al., *Crystal structure of a Cbtx-AChBP complex reveals essential interactions between snake alpha-neurotoxins and nicotinic receptors.* EMBO J, 2005. **24**(8): p. 1512-22.
43. Celie, P.H., et al., *Crystal structure of nicotinic acetylcholine receptor homolog AChBP in complex with an alpha-conotoxin PnIA variant.* Nat Struct Mol Biol, 2005. **12**(7): p. 582-8.
44. Ihara, M., et al., *Crystal structures of Lymnaea stagnalis AChBP in complex with neonicotinoid insecticides imidacloprid and clothianidin.* Invert Neurosci, 2008. **8**(2): p. 71-81.
45. Celie, P.H., et al., *Nicotine and carbamylcholine binding to nicotinic acetylcholine receptors as studied in AChBP crystal structures.* Neuron, 2004. **41**(6): p. 907-14.
46. Lewis, R.J. and S. Dutertre, *Toxin insights into nicotinic acetylcholine receptors.* Biochemical Pharmacology, 2006. **72**(6): p. 661-670.
47. Ulens, C., et al., *Structural determinants of selective alpha-conotoxin binding to a nicotinic acetylcholine receptor homolog AChBP.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(10): p. 3615-20.

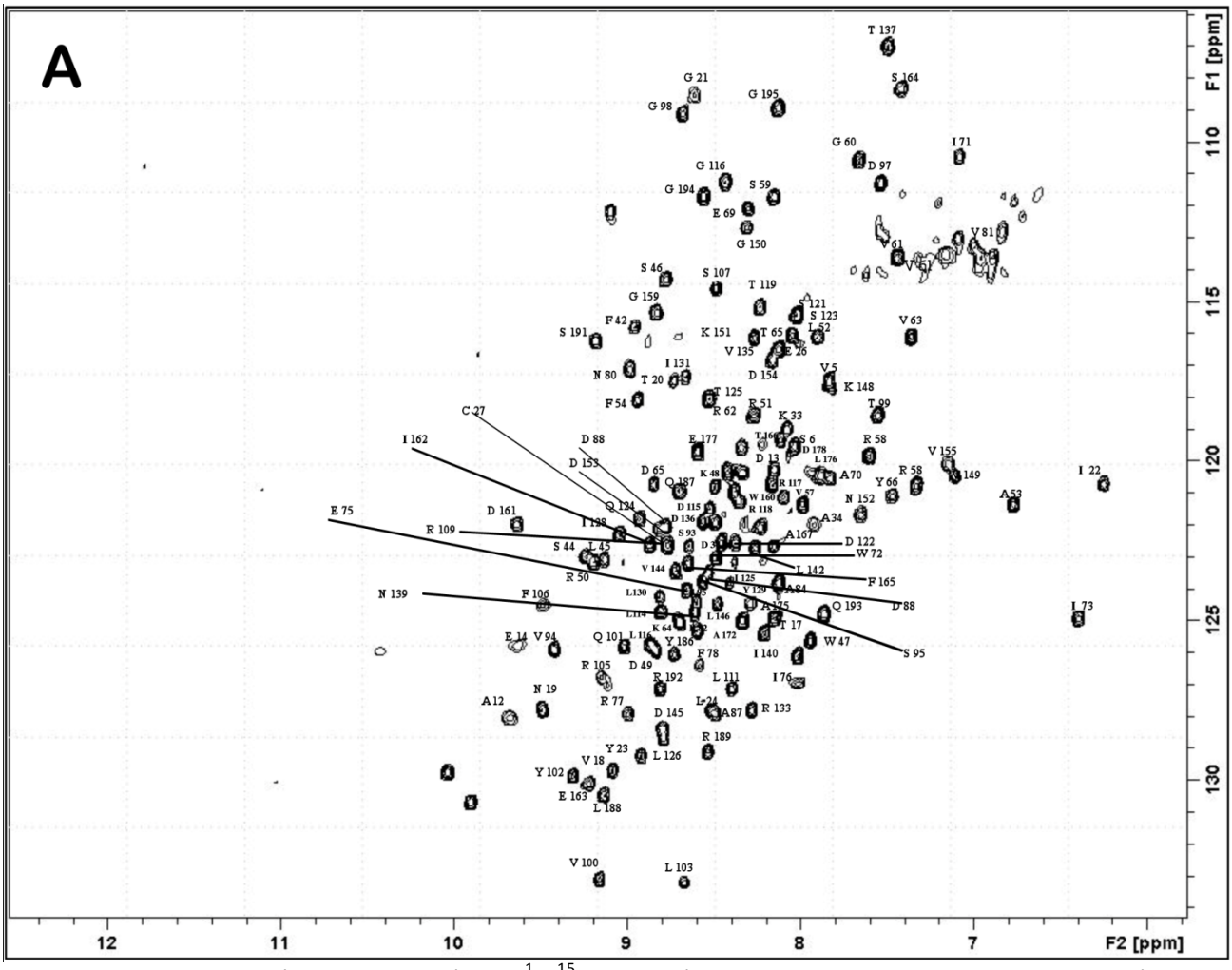
48. Tasneem, A., et al., *Identification of the prokaryotic ligand-gated ion channels and their implications for the mechanisms and origins of animal Cys-loop ion channels.* Genome Biol, 2005. **6**(1): p. R4.
49. Jha, A., et al., *Acetylcholine receptor gating at extracellular transmembrane domain interface: the cys-loop and M2-M3 linker.* J Gen Physiol, 2007. **130**(6): p. 547-58.
50. Cheng, X., et al., *Molecular-dynamics simulations of ELIC-a prokaryotic homologue of the nicotinic acetylcholine receptor.* Biophys J, 2009. **96**(11): p. 4502-13.
51. Zimmermann, I. and R. Dutzler, *Ligand activation of the prokaryotic pentameric ligand-gated ion channel ELIC.* PLoS Biol, 2011. **9**(6): p. e1001101.
52. Rendon, G., et al., *Identifying bacterial and archaeal homologs of pentameric ligand-gated ion channel (pLGIC) family using domain-based and alignment-based approaches.* Channels (Austin), 2011. **5**(4): p. 325-43.
53. Feng, G., J.H. Steinbach, and J.R. Sanes, *Rapsyn clusters neuronal acetylcholine receptors but is inessential for formation of an interneuronal cholinergic synapse.* J Neurosci, 1998. **18**(11): p. 4166-76.
54. Bruneau, E. and M. Akaaboune, *The dynamics of the rapsyn scaffolding protein at individual acetylcholine receptor clusters.* J Biol Chem, 2007. **282**(13): p. 9932-40.
55. Rexroth, S., et al., *The Plasma Membrane of the Cyanobacterium Gloeobacter violaceus Contains Segregated Bioenergetic Domains.* Plant Cell, 2011. **23**(6): p. 2379-90.
56. Dey, R. and L. Chen, *In search of allosteric modulators of a7-nAChR by solvent density guided virtual screening.* J Biomol Struct Dyn, 2011. **28**(5): p. 695-715.
57. Parikh, R.B., M. Bali, and M.H. Akabas, *Structure of the M2 transmembrane segment of GLIC, a prokaryotic Cys loop receptor homologue from Gloeobacter violaceus, probed by substituted cysteine accessibility.* J Biol Chem, 2011. **286**(16): p. 14098-109.
58. Nury, H., et al., *Crystal structure of the extracellular domain of a bacterial ligand-gated ion channel.* J Mol Biol, 2010. **395**(5): p. 1114-27.
59. Franks, N.P., *General anaesthesia: from molecular targets to neuronal pathways of sleep and arousal.* Nat Rev Neurosci, 2008. **9**(5): p. 370-86.
60. Li, G.D., et al., *Numerous classes of general anesthetics inhibit etomidate binding to gamma-aminobutyric acid type A (GABAA) receptors.* J Biol Chem, 2010. **285**(12): p. 8615-20.
61. Weng, Y., et al., *Anesthetic sensitivity of the Gloeobacter violaceus proton-gated ion channel.* Anesth Analg, 2010. **110**(1): p. 59-63.
62. Kotani, Y., et al., *The experimental and clinical pharmacology of propofol, an anesthetic agent with neuroprotective properties.* CNS Neurosci Ther, 2008. **14**(2): p. 95-106.
63. Bhattacharya, A.A., S. Curry, and N.P. Franks, *Binding of the general anesthetics propofol and halothane to human serum albumin. High resolution crystal structures.* J Biol Chem, 2000. **275**(49): p. 38731-8.
64. Terrell, R.C., *The invention and development of enflurane, isoflurane, sevoflurane, and desflurane.* Anesthesiology, 2008. **108**(3): p. 531-3.
65. Nury, H., et al., *X-ray structures of general anaesthetics bound to a pentameric ligand-gated ion channel.* Nature, 2011. **469**(7330): p. 428-31.
66. Ernst, R.R., G. Bodenhausen, and A. Wokaun, *Principles of nuclear magnetic resonance in one and two dimensions*. The International series of monographs on chemistry. 1987, Oxford OxfordshireNew York: Clarendon Press ;Oxford University Press. xxiv, 610 p.
67. Drenth, J. and J. Mesters, *Principles of protein x-ray crystallography*. 3rd ed. 2007, New York: Springer. xiv, 332 p.
68. George, A. and W.W. Wilson, *Predicting protein crystallization from a dilute solution property.* Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 1994. **50**(Pt 4): p. 361-5.
69. Leopold, M.F., J.L. Urbauer, and A.J. Wand, *Resonance assignment strategies for the analysis of NMR spectra of proteins.* Mol Biotechnol, 1994. **2**(1): p. 61-93.

70. Marion, D. and K. Wuthrich, *Application of phase sensitive two-dimensional correlated spectroscopy (COSY) for measurements of 1H-1H spin-spin coupling constants in proteins.* Biochem Biophys Res Commun, 1983. **113**(3): p. 967-74.
71. Muller, L., *Sensitivity Enhanced Detection of Weak Nuclei Using Heteronuclear Multiple Quantum Coherence.* Journal of the American Chemical Society, 1979. **101**(16): p. 4481-4484.
72. Kay, L.E., *NMR studies of protein structure and dynamics.* J Magn Reson, 2005. **173**(2): p. 193-207.
73. Huth, J.R., et al., *Design of an expression system for detecting folded protein domains and mapping macromolecular interactions by NMR.* Protein Sci, 1997. **6**(11): p. 2359-64.
74. Ross, A., et al., *Optimised fermentation strategy for 13C/15N recombinant protein labelling in Escherichia coli for NMR-structure analysis.* J Biotechnol, 2004. **108**(1): p. 31-9.
75. Wüthrich, K., *NMR of proteins and nucleic acids*. The George Fisher Baker non-resident lectureship in chemistry at Cornell University. 1986, New York: Wiley. xv, 292.
76. Clubb, R.T. and G. Wagner, *A triple-resonance pulse scheme for selectively correlating amide 1HN and 15N nuclei with the 1H alpha proton of the preceding residue.* J Biomol NMR, 1992. **2**(4): p. 389-94.
77. Otting, G., et al., *Protein hydration studied with homonuclear 3D 1H NMR experiments.* J Biomol NMR, 1991. **1**(2): p. 209-15.
78. Logan, T.M., et al., *Side chain and backbone assignments in isotopically labeled proteins from two heteronuclear triple resonance experiments.* FEBS Lett, 1992. **314**(3): p. 413-8.
79. Snyder, D.A., et al., *Resolution-enhanced 4D 15N/13C NOESY protein NMR spectroscopy by application of the covariance transform.* J Am Chem Soc, 2007. **129**(46): p. 14126-7.
80. Ikura, M., L.E. Kay, and A. Bax, *A novel approach for sequential assignment of 1H, 13C, and 15N spectra of proteins: heteronuclear triple-resonance three-dimensional NMR spectroscopy. Application to calmodulin.* Biochemistry, 1990. **29**(19): p. 4659-67.
81. Eletsky, A., et al., *A novel strategy for the assignment of side-chain resonances in completely deuterated large proteins using 13C spectroscopy.* J Biomol NMR, 2003. **26**(2): p. 167-79.
82. Lohr, F., et al., *A strategy to obtain backbone resonance assignments of deuterated proteins in the presence of incomplete amide 2H/1H back-exchange.* J Biomol NMR, 2003. **25**(4): p. 291-311.
83. Leiting, B., F. Marsilio, and J.F. O'Connell, *Predictable deuteration of recombinant proteins expressed in Escherichia coli.* Anal Biochem, 1998. **265**(2): p. 351-5.
84. Hu, K., B. Vogeli, and K. Pervushin, *Side-chain H and C resonance assignment in protonated/partially deuterated proteins using an improved 3D(13)C-detected HCC-TOCSY.* J Magn Reson, 2005. **174**(2): p. 200-8.
85. Goto, N.K. and L.E. Kay, *New developments in isotope labeling strategies for protein solution NMR spectroscopy.* Curr Opin Struct Biol, 2000. **10**(5): p. 585-92.
86. Ono, A., et al., *Selective multiple labeling strategy to obtain accurate NMR parameters for nucleic acids. Conformational analysis around the glycosidic bond.* Nucleic Acids Symp Ser, 1997(37): p. 75-6.
87. Parker, M.J., et al., *A combinatorial selective labeling method for the assignment of backbone amide NMR resonances.* J Am Chem Soc, 2004. **126**(16): p. 5020-1.
88. Simplaceanu, V., et al., *Chain-selective isotopic labeling for NMR studies of large multimeric proteins: application to hemoglobin.* Biophys J, 2000. **79**(2): p. 1146-54.
89. Weigelt, J., et al., *Site-selective labeling strategies for screening by NMR.* Comb Chem High Throughput Screen, 2002. **5**(8): p. 623-30.
90. Takeuchi, K., et al., *1-13C amino acid selective labeling in a 2H15N background for NMR studies of large proteins.* J Biomol NMR, 2007. **38**(1): p. 89-98.
91. Fiaux, J., et al., *Uniform and residue-specific 15N-labeling of proteins on a highly deuterated background.* J Biomol NMR, 2004. **29**(3): p. 289-97.

92. Chary, K.V.R. and H.S. Atreya, *Amino acid selective 'unlabelling' for residue-specific NMR assignments in proteins.* Current Science, 2000. **79**(4): p. 504-507.
93. Goto, N.K., et al., *A robust and cost-effective method for the production of Val, Leu, Ile (delta 1) methyl-protonated 15N-, 13C-, 2H-labeled proteins.* J Biomol NMR, 1999. **13**(4): p. 369-74.
94. Ayala, I., et al., *An efficient protocol for the complete incorporation of methyl-protonated alanine in perdeuterated protein.* J Biomol NMR, 2009. **43**(2): p. 111-9.
95. Ou, H.D., et al., *Efficient identification of amino acid types for fast protein backbone assignments.* J Biomol NMR, 2001. **21**(3): p. 269-73.
96. Kramer, R., *Secretion of Amino-Acids by Bacteria - Physiology and Mechanism.* Fems Microbiology Reviews, 1994. **13**(1): p. 75-93.
97. Kleerebezem, M. and J. Hugenholtz, *Metabolic pathway engineering in lactic acid bacteria.* Curr Opin Biotechnol, 2003. **14**(2): p. 232-7.
98. Epelbaum, S., D.M. Chipman, and Z. Barak, *Analysis of intracellular metabolites as tool for studying branched-chain amino acid biosynthesis and its inhibition in bacteria.* Methods Enzymol, 2000. **324**: p. 10-23.
99. Eanes, W.F., *Molecular population genetics and selection in the glycolytic pathway.* J Exp Biol, 2011. **214**(Pt 2): p. 165-71.
100. Barnes, S.J. and P.D. Weitzman, *Organization of citric acid cycle enzymes into a multienzyme cluster.* FEBS Lett, 1986. **201**(2): p. 267-70.
101. Feldman, L.I. and I.C. Gunsalus, *The occurrence of a wide variety of transaminases in bacteria.* J Biol Chem, 1950. **187**(2): p. 821-30.
102. Tatum, E.L. and J. Lederberg, *Gene Recombination in the Bacterium Escherichia coli.* J Bacteriol, 1947. **53**(6): p. 673-84.
103. Mehta, B.M., D.V. Rege, and A. Sreenivasan, *Transformation to prototrophic condition in Escherichia coli induced by deoxyribonucleic acid.* Nature, 1962. **193**: p. 296-7.
104. Truhlar, S.M., et al., *Rapid mass spectrometric analysis of 15N-Leu incorporation fidelity during preparation of specifically labeled NMR samples.* Protein Sci, 2008. **17**(9): p. 1636-9.
105. Varshaver, N.B., et al., *Detection of auxotrophic mutations in mammalian cell culture.* Sov Genet, 1973. **7**(3): p. 338-42.
106. Pryor, K.D. and B. Leiting, *High-level expression of soluble protein in Escherichia coli using a His(6)-tag and maltose-binding-protein double-affinity fusion system.* Protein Expression and Purification, 1997. **10**(3): p. 309-319.
107. Muller, K.M., et al., *Tandem immobilized metal-ion affinity chromatography/immunoaffinity purification of His-tagged proteins--evaluation of two anti-His-tag monoclonal antibodies.* Anal Biochem, 1998. **259**(1): p. 54-61.
108. Grundy, J.E., L.Y. Wirtanen, and M. Beauregard, *Addition of a poly-(6X) His tag to Milk Bundle-1 and purification using immobilized metal-affinity chromatography.* Protein Expr Purif, 1998. **13**(1): p. 61-6.
109. Hochuli, E., H. Dobeli, and A. Schacher, *New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues.* J Chromatogr, 1987. **411**: p. 177-84.
110. Hagnauer, G.L., *Size Exclusion Chromatography.* Analytical Chemistry, 1982. **54**(5): p. R265-R276.
111. Kopaciewicz, W., et al., *Retention Model for High-Performance Ion-Exchange Chromatography.* Journal of Chromatography, 1983. **266**(Aug): p. 3-21.
112. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
113. Webb, K.S., et al., *Correlation of apparent molecular weight and antigenicity of viral proteins: an SDS-page separation followed by acrylamide-agarose electrophoresis and immunoprecipitation.* J Immunol Methods, 1977. **14**(3-4): p. 343-53.

Ενότητα Θ
Παράρτημα

Θ.1. Ταυτοποίηση των κορυφών του φάσματος ^{1}H-^{15}N HSQC στα 700MHz της $GLIC_{ΕΚΠ}$



Εικόνα Π1: Ταυτοποίηση των κορυφών του ^{1}H-^{15}N-HSQC φάσματος της $GLIC_{ΕΚΠ}$, σε pH 6,95, θερμοκρασία T=298 K, σε NMR μαγνήτη 700MHz.

Πίνακας Π1: Πίνακας χημικών μετατοπίσεων των πυρήνων όπως κατατέθηκε στη βάση δεδομένων BMPB.

α/α	αμινοξικό κατάλοιπο	τύπος αμινοξέος	τύπος πυρήνα	χημική μετατόπιση
1	3	ASP	C	176.431
2	3	ASP	H	8.457
3	3	ASP	N	122.512
4	3	ASP	CA	54.259
5	3	ASP	CB	40.267
6	4	MET	C	176.146
7	4	MET	H	8.376
8	4	MET	N	120.923
9	4	MET	CA	55.126
10	4	MET	CB	31.529
11	5	VAL	CA	61.717
12	5	VAL	C	176.063
13	5	VAL	CB	30.756
14	5	VAL	H	7.840
15	5	VAL	N	117.564
16	6	SER	C	170.789
17	6	SER	H	8.036
18	6	SER	N	119.491
19	6	SER	CA	56.114
20	6	SER	CB	62.190
21	11	ILE	CA	62.778
22	11	ILE	H	10.436
23	11	ILE	N	125.951
24	12	ALA	C	175.232
25	12	ALA	H	9.680
26	12	ALA	N	128.022
27	12	ALA	CA	51.947
28	12	ALA	CB	17.225
29	13	ASP	C	175.308
30	13	ASP	H	8.153
31	13	ASP	N	120.237
32	13	ASP	CA	52.805
33	13	ASP	CB	40.038
34	14	GLU	H	9.654
35	14	GLU	N	125.746
36	14	GLU	CA	54.490
37	16	LEU	C	175.107
38	16	LEU	H	8.864
39	16	LEU	N	125.740
40	16	LEU	CA	53.982
41	16	LEU	CB	41.805

42	17	THR	C	174.302
43	17	THR	H	8.150
44	17	THR	N	124.903
45	17	THR	CA	62.633
46	17	THR	CB	68.514
47	18	VAL	C	174.943
48	18	VAL	H	9.086
49	18	VAL	N	129.676
50	18	VAL	CA	60.327
51	18	VAL	CB	31.838
52	19	ASN	C	176.625
53	19	ASN	H	9.494
54	19	ASN	N	127.765
55	19	ASN	CA	52.778
56	19	ASN	CB	39.431
57	20	THR	H	8.734
58	20	THR	N	117.474
59	20	THR	CA	60.618
60	21	GLY	H	8.613
61	21	GLY	N	108.502
62	21	GLY	CA	45.624
63	22	ILE	H	6.248
64	22	ILE	N	120.702
65	22	ILE	CA	59.938
66	23	TYR	CB	40.177
67	23	TYR	H	8.918
68	23	TYR	N	129.211
69	23	TYR	CA	55.019
70	24	LEU	CB	41.163
71	24	LEU	H	8.521
72	24	LEU	N	127.820
73	24	LEU	CA	55.334
74	25	ILE	CA	61.877
75	25	ILE	H	8.404
76	25	ILE	N	123.789
77	26	GLU	CB	33.601
78	26	GLU	H	8.011
79	26	GLU	N	116.287
80	26	GLU	CA	55.503
81	27	CYS	H	8.772
82	27	CYS	N	122.590
83	27	CYS	CA	57.062
84	27	CYS	CB	30.714
85	33	LYS	C	175.655

86	33	LYS	H	8.075
87	33	LYS	N	118.966
88	33	LYS	CA	55.905
89	33	LYS	CB	31.642
90	34	ALA	CB	16.390
91	34	ALA	H	7.917
92	34	ALA	N	121.962
93	34	ALA	CA	52.263
94	42	PHE	CB	40.670
95	42	PHE	H	8.959
96	42	PHE	N	115.767
97	42	PHE	CA	56.432
98	44	SER	C	174.195
99	44	SER	H	9.241
100	44	SER	N	122.966
101	44	SER	CA	55.731
102	44	SER	CB	64.515
103	45	LEU	CA	52.786
104	45	LEU	H	9.131
105	45	LEU	N	123.059
106	45	LEU	CB	46.479
107	46	SER	C	173.263
108	46	SER	H	8.781
109	46	SER	N	114.281
110	46	SER	CA	56.373
111	46	SER	CB	64.784
112	47	TRP	C	171.801
113	47	TRP	H	7.939
114	47	TRP	N	125.631
115	47	TRP	CA	56.979
116	47	TRP	CB	31.043
117	48	LYS	C	175.677
118	48	LYS	H	8.494
119	48	LYS	N	120.779
120	48	LYS	CA	54.760
121	48	LYS	CB	32.930
122	49	ASP	C	176.648
123	49	ASP	H	8.833
124	49	ASP	N	125.901
125	49	ASP	CA	52.196
126	49	ASP	CB	40.868
127	50	ARG	C	178.385
128	50	ARG	H	9.199
129	50	ARG	N	123.143

130	50	ARG	CA	58.485
131	50	ARG	CB	28.390
132	51	ARG	C	177.905
133	51	ARG	H	8.271
134	51	ARG	N	118.554
135	51	ARG	CA	57.399
136	51	ARG	CB	28.880
137	52	LEU	C	176.321
138	52	LEU	H	7.902
139	52	LEU	N	116.097
140	52	LEU	CA	52.809
141	52	LEU	CB	41.329
142	53	ALA	C	176.842
143	53	ALA	H	6.765
144	53	ALA	N	121.328
145	53	ALA	CA	52.770
146	53	ALA	CB	18.330
147	54	PHE	C	172.004
148	54	PHE	H	8.938
149	54	PHE	N	118.053
150	54	PHE	CA	55.572
151	54	PHE	CB	39.890
152	55	ASP	C	176.600
153	55	ASP	H	8.597
154	55	ASP	N	119.688
155	55	ASP	CA	49.846
156	55	ASP	CB	41.686
157	57	VAL	C	178.855
158	57	VAL	H	7.984
159	57	VAL	N	121.330
160	57	VAL	CA	65.139
161	57	VAL	CB	30.285
162	58	ARG	C	178.679
163	58	ARG	H	7.600
164	58	ARG	N	119.831
165	58	ARG	CA	57.687
166	58	ARG	CB	29.367
167	59	SER	H	8.154
168	59	SER	N	111.693
169	59	SER	CA	60.058
170	59	SER	CB	63.172
171	59	SER	C	175.185
172	60	GLY	H	7.659
173	60	GLY	N	110.549

174	60	GLY	CA	45.499
175	60	GLY	C	173.155
176	61	VAL	C	173.860
177	61	VAL	CB	34.674
178	61	VAL	H	7.442
179	61	VAL	N	113.603
180	61	VAL	CA	59.158
181	62	ARG	C	175.531
182	62	ARG	H	8.519
183	62	ARG	N	118.101
184	62	ARG	CA	55.784
185	62	ARG	CB	30.058
186	63	VAL	C	173.974
187	63	VAL	CB	34.751
188	63	VAL	H	7.361
189	63	VAL	N	116.085
190	63	VAL	CA	60.131
191	64	LYS	C	175.293
192	64	LYS	H	8.696
193	64	LYS	N	125.052
194	64	LYS	CA	54.725
195	64	LYS	CB	35.326
196	65	THR	C	173.640
197	65	THR	CB	70.007
198	65	THR	H	8.045
199	65	THR	N	116.033
200	65	THR	CA	60.111
201	66	TYR	H	7.464
202	66	TYR	N	121.066
203	66	TYR	CA	56.866
204	66	TYR	CB	42.814
205	67	GLU	C	176.063
206	67	GLU	H	8.334
207	67	GLU	N	120.332
208	67	GLU	CA	53.620
209	67	GLU	CB	27.892
210	69	GLU	H	8.304
211	69	GLU	N	112.063
212	69	GLU	CA	57.363
213	69	GLU	CB	27.739
214	69	GLU	C	176.982
215	70	ALA	C	176.807
216	70	ALA	H	7.826
217	70	ALA	N	120.541

218	70	ALA	CA	52.422
219	70	ALA	CB	20.657
220	71	ILE	CA	58.219
221	71	ILE	CB	41.983
222	71	ILE	H	7.082
223	71	ILE	N	110.442
224	72	TRP	C	174.846
225	72	TRP	H	8.482
226	72	TRP	N	123.013
227	72	TRP	CA	59.380
228	72	TRP	CB	27.718
229	73	ILE	H	6.397
230	73	ILE	N	124.915
231	73	ILE	CA	56.123
232	73	ILE	CB	40.613
233	75	GLU	C	174.486
234	75	GLU	H	8.656
235	75	GLU	N	124.033
236	75	GLU	CA	54.560
237	75	GLU	CB	28.112
238	76	ILE	C	176.052
239	76	ILE	H	8.016
240	76	ILE	N	126.937
241	76	ILE	CA	57.853
242	76	ILE	CB	35.935
243	77	ARG	H	8.995
244	77	ARG	N	127.909
245	77	ARG	CA	54.091
246	78	PHE	H	8.586
247	78	PHE	N	126.370
248	80	ASN	CA	52.442
249	80	ASN	H	8.983
250	80	ASN	N	117.111
251	81	VAL	H	6.984
252	81	VAL	N	113.258
253	81	VAL	CA	59.152
254	82	GLU	C	175.968
255	82	GLU	CB	29.984
256	82	GLU	H	8.597
257	82	GLU	N	125.297
258	82	GLU	CA	56.972
259	84	ALA	C	177.273
260	84	ALA	H	8.129
261	84	ALA	N	123.794

262	84	ALA	CA	51.681
263	84	ALA	CB	18.805
264	85	ARG	C	174.153
265	85	ARG	H	8.353
266	85	ARG	N	121.269
267	85	ARG	CA	54.494
268	85	ARG	CB	28.881
269	86	ASP	H	8.531
270	86	ASP	N	123.484
271	86	ASP	CA	53.360
272	86	ASP	CB	40.805
273	87	ALA	C	176.346
274	87	ALA	CB	21.983
275	87	ALA	H	8.493
276	87	ALA	N	127.867
277	87	ALA	CA	51.188
278	88	ASP	CA	52.672
279	88	ASP	H	8.781
280	88	ASP	N	122.028
281	93	SER	C	173.185
282	93	SER	H	8.646
283	93	SER	N	122.638
284	93	SER	CA	57.177
285	93	SER	CB	65.711
286	94	VAL	C	175.606
287	94	VAL	H	9.420
288	94	VAL	N	125.877
289	94	VAL	CA	60.659
290	94	VAL	CB	33.943
291	95	SER	C	173.119
292	95	SER	H	8.565
293	95	SER	N	123.771
294	95	SER	CA	57.406
295	95	SER	CB	62.184
296	97	ASP	H	7.537
297	97	ASP	N	111.265
298	97	ASP	CA	52.919
299	97	ASP	CB	39.189
300	97	ASP	C	177.148
301	98	GLY	H	8.679
302	98	GLY	N	109.104
303	98	GLY	CA	44.009
304	98	GLY	C	173.663
305	99	THR	CB	67.016

306	99	THR	H	7.553
307	99	THR	N	118.530
308	99	THR	CA	64.877
309	100	VAL	C	175.321
310	100	VAL	H	9.163
311	100	VAL	N	133.099
312	100	VAL	CA	61.290
313	100	VAL	CB	31.390
314	101	GLN	C	173.420
315	101	GLN	H	9.017
316	101	GLN	N	125.794
317	101	GLN	CA	54.720
318	101	GLN	CB	29.294
319	102	TYR	H	9.313
320	102	TYR	N	129.862
321	102	TYR	CA	56.176
322	102	TYR	CB	40.959
323	103	LEU	H	8.675
324	103	LEU	N	133.189
325	103	LEU	CA	53.487
326	105	ARG	H	9.111
327	105	ARG	N	126.966
328	106	PHE	H	9.488
329	106	PHE	N	124.494
330	106	PHE	CA	55.005
331	106	PHE	CB	42.252
332	107	SER	C	174.332
333	107	SER	H	8.487
334	107	SER	N	114.568
335	107	SER	CA	55.772
336	107	SER	CB	65.314
337	108	ALA	H	8.566
338	108	ALA	N	127.483
339	109	ARG	C	174.447
340	109	ARG	H	8.771
341	109	ARG	N	122.727
342	109	ARG	CA	54.778
343	109	ARG	CB	29.677
344	111	LEU	CB	40.835
345	111	LEU	H	8.391
346	111	LEU	N	127.098
347	111	LEU	CA	53.516
348	114	LEU	H	8.809
349	114	LEU	N	124.713

350	114	LEU	CA	54.885
351	114	LEU	CB	41.014
352	115	ASP	C	177.154
353	115	ASP	H	8.522
354	115	ASP	N	121.485
355	115	ASP	CA	53.676
356	115	ASP	CB	40.374
357	116	GLY	H	8.432
358	116	GLY	N	111.246
359	116	GLY	CA	45.248
360	116	GLY	C	174.564
361	117	ARG	C	176.806
362	117	ARG	H	8.161
363	117	ARG	N	120.720
364	117	ARG	CA	55.856
365	117	ARG	CB	29.544
366	118	ARG	C	176.778
367	118	ARG	H	8.236
368	118	ARG	N	122.052
369	118	ARG	CA	55.800
370	118	ARG	CB	29.353
371	119	THR	C	175.056
372	119	THR	CB	69.091
373	119	THR	H	8.236
374	119	THR	N	115.157
375	119	THR	CA	61.786
376	120	GLU	C	176.382
377	120	GLU	H	8.494
378	120	GLU	N	121.920
379	120	GLU	CA	56.560
380	120	GLU	CB	28.642
381	121	SER	C	174.536
382	121	SER	CB	63.253
383	121	SER	H	8.025
384	121	SER	N	115.431
385	121	SER	CA	57.859
386	122	ASP	H	8.373
387	122	ASP	N	122.530
388	122	ASP	CA	54.640
389	122	ASP	CB	40.439
390	123	SER	C	173.541
391	123	SER	CB	63.809
392	123	SER	H	8.019
393	123	SER	N	115.479

394	123	SER	CA	57.603
395	124	GLN	C	173.911
396	124	GLN	CB	31.518
397	124	GLN	H	8.930
398	124	GLN	N	121.789
399	124	GLN	CA	54.100
400	125	THR	C	172.802
401	125	THR	H	8.536
402	125	THR	N	118.083
403	125	THR	CA	61.135
404	125	THR	CB	69.218
405	126	LEU	C	172.656
406	126	LEU	H	8.792
407	126	LEU	N	128.638
408	126	LEU	CA	53.161
409	128	ILE	CB	39.401
410	128	ILE	H	9.044
411	128	ILE	N	122.272
412	128	ILE	CA	61.241
413	129	TYR	CA	55.940
414	129	TYR	H	8.297
415	129	TYR	N	124.438
416	130	LEU	C	175.692
417	130	LEU	CB	45.292
418	130	LEU	H	8.814
419	130	LEU	N	124.236
420	130	LEU	CA	53.530
421	131	ILE	H	8.666
422	131	ILE	N	117.331
423	131	ILE	CA	59.205
424	133	ARG	C	175.950
425	133	ARG	H	8.282
426	133	ARG	N	127.796
427	133	ARG	CA	55.011
428	133	ARG	CB	30.205
429	134	SER	C	173.707
430	134	SER	H	8.418
431	134	SER	N	120.314
432	134	SER	CA	59.349
433	134	SER	CB	63.150
434	135	VAL	C	176.367
435	135	VAL	H	8.124
436	135	VAL	N	116.466
437	135	VAL	CA	59.472

438	135	VAL	CB	32.878
439	136	ASP	H	8.562
440	136	ASP	N	121.861
441	136	ASP	CA	56.318
442	136	ASP	CB	39.917
443	137	THR	H	7.492
444	137	THR	N	106.982
445	137	THR	CA	61.651
446	137	THR	CB	68.862
447	137	THR	C	174.413
448	138	ARG	C	173.899
449	138	ARG	H	7.336
450	138	ARG	N	120.762
451	138	ARG	CA	54.180
452	138	ARG	CB	31.469
453	139	ASN	C	173.984
454	139	ASN	H	8.612
455	139	ASN	N	124.712
456	139	ASN	CA	52.547
457	139	ASN	CB	38.022
458	140	ILE	C	174.466
459	140	ILE	H	8.206
460	140	ILE	N	125.356
461	140	ILE	CA	60.179
462	140	ILE	CB	38.349
463	141	VAL	C	174.250
464	141	VAL	H	8.713
465	141	VAL	N	124.968
466	141	VAL	CA	59.426
467	141	VAL	CB	34.835
468	142	LEU	C	175.883
469	142	LEU	H	8.265
470	142	LEU	N	122.697
471	142	LEU	CA	53.043
472	142	LEU	CB	42.288
473	143	ALA	C	176.499
474	143	ALA	H	8.600
475	143	ALA	N	124.372
476	143	ALA	CA	49.618
477	143	ALA	CB	21.858
478	144	VAL	C	174.966
479	144	VAL	H	8.725
480	144	VAL	N	123.416
481	144	VAL	CB	33.030

482	144	VAL	CA	61.392
483	145	ASP	H	8.799
484	145	ASP	N	128.340
485	145	ASP	CA	51.340
486	145	ASP	CB	39.574
487	146	LEU	H	8.478
488	146	LEU	N	124.450
489	146	LEU	CA	57.456
490	146	LEU	CB	40.595
491	147	GLU	C	177.782
492	147	GLU	H	8.140
493	147	GLU	N	116.550
494	147	GLU	CA	57.673
495	147	GLU	CB	28.594
496	148	LYS	C	174.744
497	148	LYS	H	7.828
498	148	LYS	N	117.722
499	148	LYS	CA	53.605
500	148	LYS	CB	32.007
501	149	VAL	C	176.324
502	149	VAL	H	7.111
503	149	VAL	N	120.428
504	149	VAL	CA	60.362
505	149	VAL	CB	32.425
506	150	GLY	C	169.988
507	150	GLY	H	8.313
508	150	GLY	N	112.642
509	150	GLY	CA	44.840
510	151	LYS	C	174.171
511	151	LYS	H	8.266
512	151	LYS	N	116.108
513	151	LYS	CA	52.989
514	151	LYS	CB	34.165
515	152	ASN	H	7.652
516	152	ASN	N	121.652
517	152	ASN	CA	52.293
518	152	ASN	CB	38.683
519	153	ASP	H	8.826
520	153	ASP	N	122.129
521	153	ASP	CA	56.402
522	154	ASP	H	8.161
523	154	ASP	N	116.818
524	154	ASP	CA	52.883
525	154	ASP	CB	39.647

526	155	VAL	H	7.145
527	155	VAL	N	120.081
528	155	VAL	CA	62.742
529	159	GLY	C	173.883
530	159	GLY	H	8.829
531	159	GLY	N	115.307
532	159	GLY	CA	45.029
533	160	TRP	C	174.310
534	160	TRP	H	8.101
535	160	TRP	N	121.103
536	160	TRP	CA	55.948
537	160	TRP	CB	31.883
538	161	ASP	C	176.097
539	161	ASP	H	9.641
540	161	ASP	N	121.962
541	161	ASP	CA	53.169
542	161	ASP	CB	41.819
543	162	ILE	C	175.948
544	162	ILE	H	8.868
545	162	ILE	N	122.594
546	162	ILE	CA	61.159
547	162	ILE	CB	36.641
548	163	GLU	CB	29.862
549	163	GLU	H	9.223
550	163	GLU	N	130.082
551	163	GLU	CA	57.480
552	164	SER	H	7.418
553	164	SER	N	108.307
554	164	SER	CB	63.829
555	164	SER	CA	57.205
556	164	SER	C	172.045
557	165	PHE	C	173.302
558	165	PHE	H	8.648
559	165	PHE	N	123.180
560	165	PHE	CA	55.385
561	165	PHE	CB	40.236
562	166	THR	C	170.846
563	166	THR	H	8.115
564	166	THR	N	119.318
565	166	THR	CA	59.275
566	166	THR	CB	71.082
567	167	ALA	C	176.012
568	167	ALA	H	8.157
569	167	ALA	N	122.643

570	167	ALA	CA	50.056
571	167	ALA	CB	20.676
572	172	ALA	C	177.094
573	172	ALA	H	8.333
574	172	ALA	N	124.974
575	172	ALA	CA	51.695
576	172	ALA	CB	18.558
577	175	ALA	H	8.149
578	175	ALA	N	124.816
579	175	ALA	CA	52.236
580	176	LEU	C	177.619
581	176	LEU	H	7.887
582	176	LEU	N	120.428
583	176	LEU	CA	55.250
584	176	LEU	CB	41.287
585	177	GLU	C	176.112
586	177	GLU	H	8.341
587	177	GLU	N	119.545
588	177	GLU	CA	56.685
589	177	GLU	CB	28.821
590	178	ASP	H	8.052
591	178	ASP	N	119.703
592	178	ASP	CA	53.997
593	179	ARG	CA	55.406
594	179	ARG	H	7.945
595	179	ARG	N	120.320
596	179	ARG	CB	29.383
597	186	TYR	C	174.182
598	186	TYR	H	8.734
599	186	TYR	N	126.030
600	186	TYR	CA	58.347
601	186	TYR	CB	37.382
602	187	GLN	C	175.136
603	187	GLN	CB	28.942
604	187	GLN	H	8.707
605	187	GLN	N	120.911
606	187	GLN	CA	53.752
607	188	LEU	CA	53.081
608	188	LEU	C	174.129
609	188	LEU	H	9.134
610	188	LEU	N	130.434
611	189	ARG	C	175.421
612	189	ARG	H	8.535
613	189	ARG	N	129.085

614	189	ARG	CA	55.522
615	189	ARG	CB	29.457
616	190	ILE	H	8.843
617	190	ILE	N	120.702
618	190	ILE	CA	58.712
619	190	ILE	CB	40.999
620	191	SER	C	174.074
621	191	SER	H	9.185
622	191	SER	N	116.210
623	191	SER	CA	56.347
624	191	SER	CB	65.078
625	192	ARG	C	176.969
626	192	ARG	H	8.810
627	192	ARG	N	127.086
628	192	ARG	CA	56.552
629	192	ARG	CB	29.512
630	193	GLN	C	176.811
631	193	GLN	H	7.866
632	193	GLN	N	124.760
633	193	GLN	CA	55.749
634	193	GLN	CB	27.782
635	194	GLY	C	174.605
636	194	GLY	H	8.555
637	194	GLY	N	111.681
638	194	GLY	CA	44.797
639	195	GLY	H	8.131
640	195	GLY	N	108.908
641	195	GLY	CA	44.657
642	195	GLY	C	173.884

Θ.2. Συντμήσεις

Αμινοξέα

Ala A Αλανίνη
Arg R Αργινίνη
Asn N Ασπαραγίνη
Asp D Ασπαραγινικό οξύ
Cys C Κυστεΐνη
Gln Q Γλουταμίνη
Glu E Γλουταμινικό οξύ
Gly G Γλυκίνη
His H Ιστιδίνη
Ile I Ισολευκίνη
Leu L Λευκίνη
Lys K Λυσίνη
Met M Μεθειονίνη
Phe F Φαινυλαλανίνη
Pro P Προλίνη
Ser S Σερίνη
Thr T Θρεονίνη
Trp W Τρυπτοφάνη
Tyr Y Τυροσίνη
Val V Βαλίνη

ACh: ακετυλοχολίνη
nAChR: νικοτινικός υποδοχέας της ακετυλοχολίνης
LGICs: ιοντικά κανάλια που ενεργοποιούνται από την δέσμευση κάποιου προσδέτη
ΕΚΠ: εξωκυττάρια περιοχή
ΚΠ: κυτταροπλασματική περιοχή
ΔΜ: διαμεμβρανική περιοχή
AChBP: πρωτεΐνης δέσμευσης της ακετυλοχολίνης
ELIC: προκαρυωτικό LGIC από *Erwinia chrysanthemi*
GLIC: προκαρυωτικό LGIC από *Gleobacter violaceus*
A-AChBP: AChBP από *Aplysia californica*
L-AChBP: AChBP από *Lymnaea stagnalis*
α-Btx: α-μπουγκαροτοξίνη
α-Cbtx: α-κομπρατοξίνη
α-Ctx: α-κωνοτοξίνη
NMR: πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός
HSQC: Heteronuclear **S**ingle **Q**uantum **C**orrelation
NOE: Nuclear **O**verhauser **E**nhancement or **N**uclear **O**verhauser **E**ffect
NOESY: 2D **N**uclear **O**verhauser **E**nhancement **S**pectroscop**Y**
HEPES: 4-(2-υδροξυαιθυλ)-1-πιπεραζινο-αιθυλ-σουλφονικό οξύ
CD: κυκλικός διχρωϊσμός

PDB: βάση δεδομένων Protein Data Bank
RMSD: μέση απόκλιση της θέσης ενός ατόμου από ένα άτομο αναφοράς (root mean square deviation)
Å: μονάδα μέτρησης (Amstrong) = 10^{-10} m

Θ.3. Δημοσίευση

Από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας συγγράφηκε η παρακάτω επιστημονική δημοσίευση, η οποία επισυνάπτεται αυτούσια στις επόμενες σελίδες.

Christos T. Chasapis, Aikaterini I. Argyriou, Pierre-Jean Corringer, Detlef Bentrop, and Georgios A. Spyroulias. Unravelling the Conformational Plasticity of the Extracellular Domain of a Prokaryotic nAChR Homologue in Solution by NMR. Biochemistry (2011). Nov 15;50(45):9681-3.

Abstract:

Pentameric ligand-gated ion channels (pLGICs) of the Cys loop family are transmembrane glycoproteins implicated in a variety of biological functions. Here, we present a solution NMR study of the extracellular domain of a prokaryotic pLGIC homologue from the bacterium Gloeobacter violaceus that is found to be a monomer in solution.

BIOCHEMISTRY
including biophysical chemistry & molecular biology

Rapid Report

pubs.acs.org/biochemistry

Unravelling the Conformational Plasticity of the Extracellular Domain of a Prokaryotic nAChR Homologue in Solution by NMR

Christos T. Chasapis,[†] Aikaterini I. Argyriou,[†] Pierre-Jean Corringer,[‡] Detlef Bentrop,[§] and Georgios A. Spyroulias*[,†]

[†]Department of Pharmacy, University of Patras, GR-26504 Patras, Greece

[‡]Institut Pasteur, Groupe Récepteurs-Canaux, F-75015 Paris, France

[§]Institute of Physiology II, University of Freiburg, D-79104 Freiburg, Germany

Supporting Information

ABSTRACT: Pentameric ligand-gated ion channels (pLGICs) of the Cys loop family are transmembrane glycoproteins implicated in a variety of biological functions. Here, we present a solution NMR study of the extracellular domain of a prokaryotic pLGIC homologue from the bacterium *Gloeobacter violaceus* that is found to be a monomer in solution.

nAChR is the prototype of an important class of transmembrane proteins that form pentameric ion channels activated upon ligand binding (pLGICs).[1] Most members of this family are characterized by a conserved sequence of 13 residues flanked by disulfide-bridged cysteines in the N-terminal domain of each subunit.[1] The extracellular domains (ECDs; ~210 residues) contain binding sites for agonists and competitive antagonists. Binding of an agonist induces rapid opening of the transmembrane ion channel, leading to a change in membrane potential.[2] Recently, both low- and high-resolution ECD crystal structures[3,4] have been determined, providing new atomic-level insights into the structure and the pentameric architecture of these systems. However, there is not yet a report about their structure and dynamics in solution because their tendency to form oligomers has prevented the study of pLGICs by NMR spectroscopy until now.[5] The ECD of a bacterial nAChR homologue from *Gloeobacter violaceus* (GLIC) was recently crystallized in two crystal forms and showed an unexpected hexameric quaternary structure while behaving as a monomer in solution.[6,7]

Here, we present the solution NMR conformational and dynamical properties of the $GLIC_{ECD}$ monomer (193 residues with a C-terminal Gly_2His_6 tag), based on the assignment of ~80% of the backbone nuclei (excluding 11 Pro residues) (Figure S1 of the Supporting Information; BMRB accession number 17695). Unfavorable relaxation properties prevent a complete resonance assignment of $GLIC_{ECD}$. Even at 900 MHz, the $^{1}H-^{15}N$ heteronuclear single-quantum coherence or transverse relaxation optimized spectroscopy (HSQC/TROSY) spectra of $GLIC_{ECD}$ show only 145 of 182 expected backbone amide resonances. Standard triple-resonance NMR experiments with uniformly ^{2}H-, ^{13}C-, and ^{15}N-labeled GLIC samples allowed the backbone assignment of 110 residues. To corroborate and extend this assignment, we applied amino acid selective ^{15}N labeling and/or reverse labeling ("unlabeling" of a ^{15}N protein) for 12 amino acids (Ala, Leu, Ile, Val, Phe, Tyr, Asn, His, Lys, Arg, Asp, and Glu) according to known or modified strategies (Supporting Information). Efficient unlabeling of $[^{15}N]GLIC_{ECD}$ was performed for Arg, Lys, His, and Asn in *Escherichia coli* BL21(DE3). Successful selective ^{15}N labeling in *E. coli* BL21(DE3) was achieved for Lys, Val, and Ile [in the presence of ^{14}N-labeled amino acids to prevent cross-labeling (Table S1 of the Supporting Information)]. Efficient selective ^{15}N labeling of $GLIC_{ECD}$ with Leu, Ala, Phe, Tyr, Asp, and Glu was achieved in the auxotrophic strain *E. coli* DL39 (Table S1). In total, the selective labeling efforts provided 34 new unambiguous assignments of backbone amides.

$^{1}H-^{15}N$ HSQC/TROSY spectra of selectively ^{15}N-labeled $GLIC_{ECD}$ samples at 298 and 308 K clearly proved that conformational exchange processes in various regions of the protein are the reason for fast relaxation precluding a complete assignment (36 backbone HN resonances not detectable at 298 K). At 308 K, many weak HN resonances gain in intensity, and new resonances that do not appear at all at 298 K become observable. This is illustrated in Figure 1A–C by the $[^{15}N]$Ala and $[^{15}N]$Leu $GLIC_{ECD}$ spectra at 298 and 308 K and was helpful for the assignment in some cases, e.g., for the detection of Tyr29. However, triple-resonance experiments at 308 K were not feasible because of the precipitation of $GLIC_{ECD}$ within a few hours. Figure 1D shows the assigned residues on the $GLIC_{ECD}$ topology diagram of the crystallized hexamer [Protein Data Bank (PDB) entry 3IGQ].[7]

Despite all labeling efforts, there are 39 unassigned non-proline residues (Figure 1D and Figure S2 of the Supporting Information) comprising the very N-terminus, most of the $\beta1-\beta2$ loop, the first half of strand $\beta2$, the core of strand $\beta5$, two residues each of strands $\beta6$ and $\beta7$, certain portions of strand $\beta9$ and of the $\beta9-\beta10$ loop (C-loop), and the first part of strand $\beta10$. In the GLIC crystal model, the $\beta1-\beta2$ and $\beta5-\beta6$ loops belong to the inner β-sheet (Figure 1D) interacting with the transmembrane domain (TMD), while the C-terminal ends of strands $\beta7$ and $\beta9$ and the first part of strand $\beta10$ form the upper region of the outer β-sheet (Figure

Received: August 5, 2011
Revised: October 11, 2011

ACS Publications © XXXX American Chemical Society

dx.doi.org/10.1021/bi201223u | *Biochemistry* XXXX, XXX, XXX–XXX

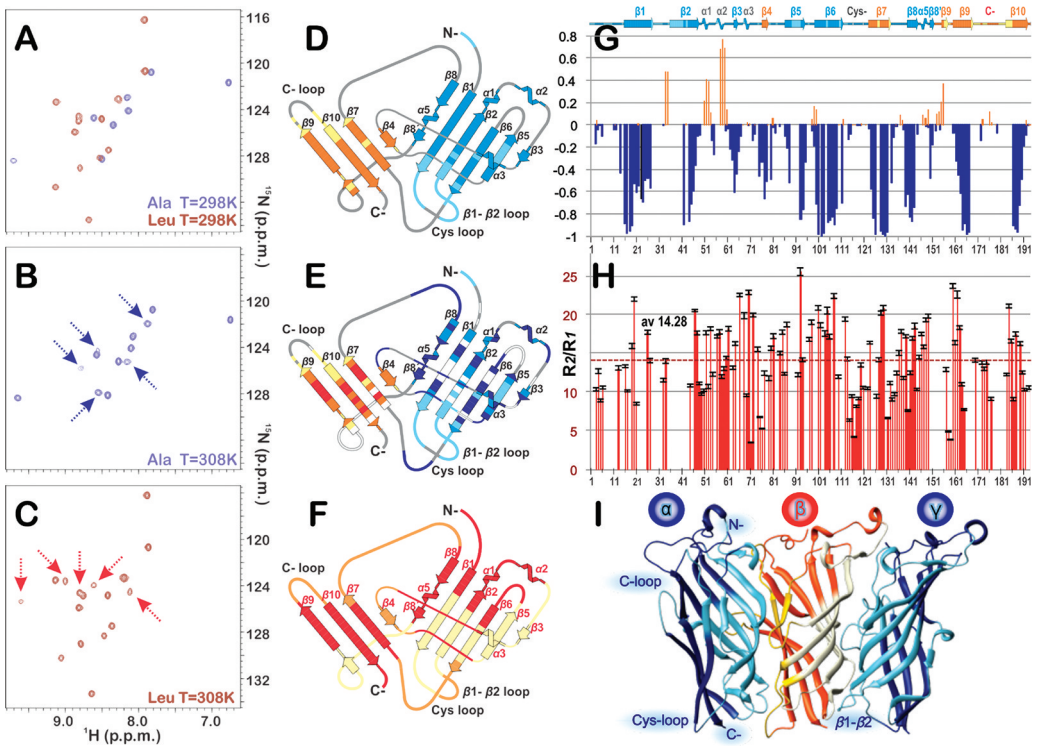


Figure 1. (A) Overlay of the ^{1}H−^{15}N HSQC spectra (298 K) of GLIC$_{ECD}$ selectively labeled with [^{15}N]Ala and [^{15}N]Leu. (B and C) ^{1}H−^{15}N HSQC spectra of [^{15}N]Ala and [^{15}N]Leu GLIC$_{ECD}$ at 308 K indicating new HN resonances (arrows). (D−F) Topology diagrams of GLIC$_{ECD}$ (PDB entry 3IGQ). (D) Assigned GLIC$_{ECD}$ regions gray for linkers, blue for the inner β-sheet, and orange for the outer β-sheet; unassigned residues light blue or yellow. (E) NMR backbone dynamics according to ^{15}N relaxation data shown on top of the assignment status in panel D. Dark blue and red indicate R_2/R_1 values above average (14.28) in the inner and outer β-sheet, respectively. White illustrates assigned regions for which R_2/R_1 could not be determined (27 backbone HN resonances). (F) Regions participating in 6mer (PDB entry 3IGQ) subunit−subunit interactions (light orange and yellow denote the interface with the preceding and following subunits, respectively). (G) Secondary structure through PECAN[8] compared to the secondary structure of the GLIC$_{ECD}$ 6mer (cartoon at the top of the diagram; light colors for unassigned residues). (H) R_2/R_1 values (the dotted line denotes the R_2/R_1 average). (I) Subunit−subunit interactions in the GLIC$_{ECD}$ 3mer (PDB entry 3IGQ) are colored light blue for subunits α and γ and gold and light yellow for subunit β in the $\alpha-\beta$ and $\beta-\gamma$ interfaces, respectively. Panel I was generated with MOLMOL.[9]

1D). Additional unassigned residues are in the $\beta4-\beta5$ loop and at the beginning of the Cys loop ($\beta6-\beta7$ loop).

Chemical shift-based prediction of the secondary structure of monomeric GLIC$_{ECD}$ through PECAN[8] (Figure 1G) is fully consistent with the secondary structure elements observed in the crystal structures of pentameric GLIC and hexameric GLIC$_{ECD}$ (PDB entries 3EAM and 3IGQ, respectively);[6,7] i.e., the predominant β-structure is independent of the oligomerization state. This is also confirmed by circular dichroism measurements at pH 7.0 (Figure S1) showing a β-sheet content of 48% that is almost identical to the β-sheet content of GLIC$_{ECD}$ in the two crystal structures (48−50%).

The backbone dynamics of GLIC$_{ECD}$ on the pico- to nanosecond time scale was studied through the analysis of ^{15}N R_1 and R_2 relaxation rates and heteronuclear {^{1}H^{N}}−^{15}N NOEs (Figure S2). The correlation time for isotropic tumbling in solution as calculated from the R_2/R_1 ratio is 11.1 ± 0.3 ns, clearly indicating that GLIC$_{ECD}$ is in the monomeric state. Although the R_2/R_1 data (Figure 1E,H) show considerable variability, some flexible (lower R_2/R_1 values) or rigid (higher R_2/R_1 values) regions may be identified. For example, the N-terminus of GLIC$_{ECD}$ is clearly more flexible than the C-terminus. Low flexibility (high R_2/R_1 values) may be attributed to strands $\beta1$, $\beta6$, $\beta7$, and $\beta9$. In contrast, parts of the $\beta2-\beta3$ linker, strand $\beta4$, the Cys loop ($\beta6-\beta7$ loop), the $\beta7-\beta8$ loop, and the flanking portions of the C-loop ($\beta9-\beta10$) seem to be mobile. It is important to note that according to ^{15}N relaxation data, mobile GLIC$_{ECD}$ regions are neighboring most of the unassigned segments undergoing conformational exchange on an intermediate time scale. The dynamics of monomeric GLIC$_{ECD}$ [PDB entry 3EAM, chain A (Figure S3 of the Supporting Information)] in explicit water as observed in a 10 ns molecular dynamics (MD) simulation is in good agreement with the ^{15}N relaxation data. The root-mean-square fluctuation values indicate a high flexibility of the N-terminus of GLIC$_{ECD}$, the tip of the $\beta1-\beta2$ loop and the $\beta2-\beta3$ loop, the Cys-loop, the first part of strand $\beta9$, and the C-loop (Figure S3).

Information about the mobility of GLIC$_{ECD}$ on a time scale of minutes to days came from an H−D exchange experiment in which ^{1}H−^{15}N HSQC spectra at 298 K were recorded after a lyophilized sample had been dissolved in 100% D_2O. Surprisingly, the first spectrum after exchange for 90 min contained only 19 backbone HN resonances, most of which belong to residues in the upper part of the inner β-sheet and its connecting loops (Figure S4 of the Supporting Information). Thus, only the backbone HN groups of this part of GLIC$_{ECD}$ are involved in kinetically stable hydrogen bonds. The rest of the protein is apparently mobile on the time scale of hours.

Overall, the GLIC$_{ECD}$ monomer exhibits a well-folded structure in solution. However, the ^{15}N relaxation data, the H−D exchange experiment, and the spectra of selectively labeled samples at 308 K clearly show that some parts of the protein are subject to intrinsic mobility on different NMR time scales. According to the NMR data, GLIC$_{ECD}$ exhibits a β-

dx.doi.org/10.1021/bi201223u | Biochemistry XXXX, XXX, XXX−XXX

sandwich structure in which the upper part of the inner β-sheet core (β1, β2, β5, and β6) and the central part of the outer β-sheet (β4, β7, β9, and β10) are rather rigid (Figure 1E). On the other hand, the following regions exhibit higher flexibility mainly on the pico- to nanosecond time scale: (i) the lower part of the inner β-sheet, (ii) the β1−β2 loop and the neighboring parts of strands β1 and β2, (iii) the Cys loop and a part of the β8−β9 linker, and (iv) the C-loop along with flanking parts of strands β9 and β10. Most of these regions were also found to be flexible or disordered in the crystallized oligomers.[6,7] They are either at the perimeter of the β-sandwich or in contact with the TMD in the GLIC pentamer. Furthermore, the β1−β2 loop, some parts of strands β5 and β6, and the C-loop seem to undergo conformational exchange on a micro- to millisecond time scale, as evidenced by the observation of NMR signals of specific residues only at ≥308 K. In the crystal models, significant portions of the latter regions belong to the subunit−subunit interface (Figure 1F,I).

The mobility data of monomeric $GLIC_{ECD}$ in solution and the corresponding flexibility data of the $GLIC_{ECD}$ hexamer in the crystallized state provide new insights into the subunit assembly and organization of the oligomer. Many intra- or intersubunit interactions that are present in the pentamer but not in the hexamer[7] are found in regions showing slow or fast motions. For example, the β1−β2 loop is in contact with the TMD in the pentamer but flexible in hexameric $GLIC_{ECD}$ in the absence of the TMD. This correlates with the loss of the Asp32−Arg192 salt bridge that exists in the pentamer but is broken in the hexamer. In solution, the β1−β2 loop seems to adopt different conformational states whose equilibration is accelerated when the temperature is increased. High β1−β2 loop flexibility may also influence the interactions between neighboring subunits because residues of the Tyr28−Ala41 segment are implicated in subunit−subunit interactions in the pentamer and hexamer[6,7] (Figure 1I). Moreover, the NMR resonances of strand β5 residues Val89−Ile92 that participate in the interface of two subunits in both oligomers are not detected at 298 K, strongly suggesting intermediate conformational exchange processes in the $GLIC_{ECD}$ monomer in solution. Furthermore, the resonances of two residues of the tip of the β6−β7 loop (Ser112 and His127) remain undetectable. These residues are hydrogen-bonded in the crystal structures, stabilizing thus the β6−β7 loop in bacterial LGICs that lack the Cys loop S−S linkage. According to ^{15}N relaxation data, the Cys loop exhibits significant flexibility on the pico- to nanosecond time scale. Finally, the tip of the β9−β10 C-loop (Ala175−Arg179) that remains undefined in many subunits of the $GLIC_{ECD}$ hexamer is detected by NMR and shows notable flexibility. In contrast, the flanking segments of strands β9 and β10 are not observable, suggesting again a conformational averaging on the micro- to millisecond time scale. Residues Ala175−Arg179 are implicated in intersubunit interactions only in the pentamer[6,7] but found to be very mobile in the hexamer, which is interpreted as a significant upward (when pentamer compared to hexamer) or downward (when hexamer compared to pentamer) movement due to the different oligomerization mode of $GLIC_{ECD}$. It can be concluded from our NMR data that the tip of the C-loop, although mobile, is not crucial for this translation that seems to be vital for the oligomeric state of $GLIC_{ECD}$.[7] Instead, the two unassigned regions (Val168−Phe174 and Leu180−Asp185) that comprise the upper part of the β9−β10 hairpinlike segment bear an intrinsic plasticity that may influence the subunit−subunit interaction (Figure 1I) and the oligomerization. Indeed, the X-ray data suggest that the association of the neighboring subunits depends on the exclusion of the C-loop from their interface. A high flexibility of this loop and a bending and stretching movement are also predicted by the MDs and the ab initio normal-mode analysis, respectively (Figures S3 and S5 of the Supporting Information).

In conclusion, we have investigated the structural properties and the dynamics of $GLIC_{ECD}$, a 23 kDa monomer, in solution. Although its unfavorable relaxation properties preclude a complete NMR analysis, the NMR data provide valuable insight into molecular motions that occur over a wide range of time scales, ranging from pico- to milliseconds. These NMR data are novel and strongly related to the subunit assembly of LGIC ECDs and to motions that are relevant for the function of Cys loop receptors.

■ ASSOCIATED CONTENT

Ⓢ Supporting Information

Detailed experimental procedures, NMR and CD spectra, ^{15}N relaxation and H−D exchange data, root-mean-square fluctuations, and normal-mode analysis R^2 parameters. This material is available free of charge via the Internet at http://pubs.acs.org.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Phone/fax: (+30) 2610-969950. E-mail: g.a.spyroulias@upatras.gr.

Funding

This work has been supported by EU FP7 project "Neurocypres" (202088).

■ ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. A. Papakyriakou and P. V. Gkazonis for assistance in MDs and CD data analysis, respectively, Dr. V. Dötsch (University of Frankfurt, Frankfurt, Germany) for *E. coli* strain DL39, and Dr. B. Fakler (University of Freiburg) for continued support.

■ REFERENCES

(1) Lester, H. A., Dibas, M. I., Dahan, D. S., Leite, J. F., and Dougherty, D. A. (2004) *Trends Neurosci. 27*, 329−336.
(2) Changeux, J. P., and Edelstein, S. J. (1998) *Neuron 21*, 959−980.
(3) Unwin, N. (2005) *J. Mol. Biol. 346*, 967−989.
(4) Dellisanti, C. D., Yao, Y., Stroud, J. C., Wang, Z. Z., and Chen, L. (2007) *Nat. Neurosci. 10*, 953−962.
(5) Yao, Y., Wang, J., Viroonchatapan, N., Samson, A., Chill, J., Rothe, E., Anglister, J., and Wang, Z. Z. (2002) *J. Biol. Chem. 272*, 12613−12621.
(6) Bocquet, N., Nury, H., Baaden, M., Le Poupon, C., Changeux, J. P., Delarue, M., and Corringer, P. J. (2009) *Nature 457*, 111−114.
(7) Nury, H., Bocquet, N., Le Poupon, C., Raynal, B., Haouz, A., Corringer, P. J., and Delarue, M. (2010) *J. Mol. Biol. 395*, 1114−1127.
(8) Eghbalnia, H. R., Wang, L., Bahrami, A., Assadi, A., and Markley, J. L. (2005) *J. Biomol. NMR 32*, 71−81.
(9) Koradi, R., Billeter, M., and Wüthrich, K. (1996) *J. Mol. Graphics 14*, 51−55.