

# ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών  
του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ - ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ»

Κρυσταλλική δομή μεταλλαγμένων μορφών της λεκτίνης  
του μύκητα *Sclerotium rolfsii*

Βασιλική – Γεωργία Πέππα

2013



Κρυσταλλική δομή μεταλλαγμένων μορφών της λεκτίνης του μύκητα *Sclerotium rolfsii*

The crystal structure of *Sclerotium rolfsii* lectin variants

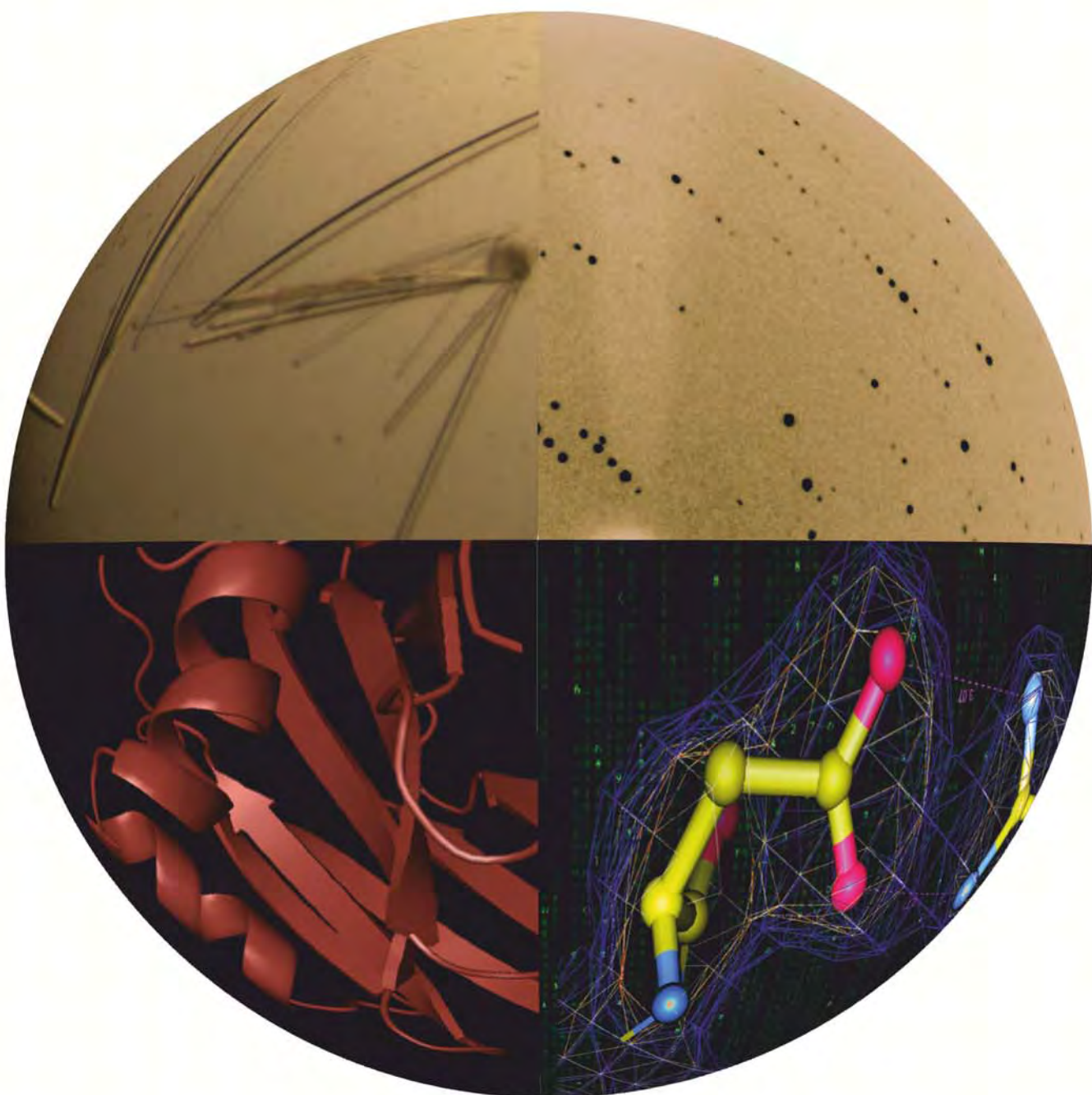
Μέλη τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής:

*Δ. Λεωνίδας*, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας,  
Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας  
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

*Μ. Κοντού*, Επίκουρος Καθηγήτρια Πρωτεϊνικής Χημείας,  
Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας  
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

*Γ. Παπαδόπουλος*, Λέκτορας Βιοφυσικής,  
Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας  
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Κρυσταλλική δομή μεταλλαγμένων μορφών της λεκτίνης του μύκητα *Sclerotium rolfsii*



2013



## Περιεχόμενα

I.	Abstract	xi
II.	Περίληψη	xiii
1.	Εισαγωγή	1
1.1.	Οι λεκτίνες	2
1.1.1.	Η SRL	2
1.1.2.	Οι SSR1 και SSR2	3
1.2.	Κρυστάλλωση πρωτεϊνών	5
1.2.1.	Βασικές αρχές της θεωρίας κρυστάλλωσης	5
1.2.2.	Στάδια της κρυστάλλωσης	5
1.2.2.1.	Πυρήνωση	5
1.2.2.2.	Ανάπτυξη πυρήνων	6
1.2.2.3.	Παύση της ανάπτυξης	7
1.2.3.	Διάγραμμα φάσης	7
1.2.4.	Παράγοντες που επηρεάζουν την κρυστάλλωση	8
1.2.4.1.	Ιοντική ισχύς	9
1.2.4.2.	pH	9
1.2.4.3.	Θερμοκρασία	9
1.2.4.4.	Κατακρημνιστικοί παράγοντες	9
1.2.4.4.1.	Άλατα	9
1.2.4.4.2.	Μεγάλου μοριακού Βάρους πολυμερή	10
1.2.4.4.3.	Οργανικοί διαλύτες	10
1.2.4.4.4.	MPD	10
1.2.5.	Τεχνικές Κρυστάλλωσης	10

1.2.5.1. Διάχυση ατμών	10
1.2.5.1.1. Μέθοδος κρεμάμενης σταγόνας	10
1.2.5.1.2. Μέθοδος sandwich	11
1.2.5.1.3. Μέθοδος καθήμενης σταγόνας	11
1.2.5.2. Η τεχνική micro – batch	12
1.2.5.3. Διαπίδυση	13
1.3. Κρυσταλλογραφία Ακτίνων Χ	14
1.3.1. Στοιχεία της δομής των κρυστάλλων	14
1.3.1.1. Ασύμμετρη μονάδα, Στοιχειώδης κυψελίδα	14
1.3.1.2. Πλέγματα Bravais και ομάδες χώρου	15
1.3.1.3. Αντίστροφο πλέγμα, Σφαίρα Ewald	16
1.3.1.4. Δείκτες Miller	17
1.3.2. Ακτινοβολία Χ και περιθλαση	17
1.3.2.1. Ο νόμος Bragg	18
1.3.2.2. Ατομικός και δομικός παράγοντας σκέδασης	19
1.3.2.3. Η συνάρτηση ηλεκτρονιακής πυκνότητας	20
1.3.2.4. Το πρόβλημα της φάσης- Μέθοδος μοριακής αντικατάστασης	20
1.4. Συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων	22
1.4.1. Πειραματική διάταξη	22
1.4.1.1. Πηγή ακτίνων Χ	22
1.4.1.2. Γωνιόμετρο	24
1.4.1.3. Ανιχνευτής	24
1.4.1.4. Ψυκτική συσκευή αζώτου	25
1.4.2. Ποιότητα κρυσταλλογραφικών δεδομένων	25



1.5.	Επεξεργασία Κρυσταλλογραφικών Δεδομένων	26
1.5.1.	Η μέθοδος της μοριακής αντικατάστασης (Molecular Replacement)	26
1.5.2.	Βελτιστοποίηση (Refinement)	28
1.5.2.1.	Προσομοιωμένη ανόπτηση	30
1.5.2.2.	Έλεγχος βελτιστοποίησης	30
1.5.2.3.	Έλεγχος δομικού μοντέλου	30
2.	Σκοπός της μελέτης	32
3.	Υλικά και μέθοδοι	33
3.1.	Κρυστάλλωση SSR1 και SSR2	33
3.2.	Προετοιμασία διαλύματος N-Acetyl-D-Glucosamine	33
3.3.	Συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων	34
3.3.1.	Σύμπλοκο SSR1 - N-Acetyl-D-Glucosamine	35
3.3.2.	Σύμπλοκο SSR2 - N-Acetyl-D-Glucosamine	35
3.4.	Επεξεργασία κρυσταλλογραφικών δεδομένων	35
3.4.1.	Υπολογισμός του αριθμού των μορίων στην ασύμμετρη μονάδα	36
3.4.2.	Η λύση της δομής των SSR1 και SSR2	36
3.4.3.	Βελτιστοποίηση	36
3.4.3.1.	Αξιολόγηση αποτελέσματος βελτιστοποίησης	37
3.4.4.	Μελέτη σύνδεσης N-Acetyl-D-Glucosamine και 2-Acetylamino-2-Deoxy-Alpha-D-Mannopyranose με τις SSR1 και SSR2	37
3.5.	Δημιουργία εικόνων	37
4.	Αποτελέσματα – Συζήτηση αποτελεσμάτων	39
4.1.	Η δομή της SSR1	39
4.1.1.	Διάγραμμα Ramachandran για τη δομή της SSR1	40

4.1.2.	Σύγκριση δομών SSR1 και SRL	41
4.2.	Η δομή της SSR2	42
4.2.1.	Διάγραμμα Ramachandran για τη δομή της SSR2	43
4.2.2.	Σύγκριση δομών SSR2 και SRL	44
4.3.	Ισομερίωση του N- Acetyl – D –Glucosamine σε 2-Acetylamino-2-Deoxy-Alpha-D-Mannopyranose	44
4.4.	Η δομή του συμπλόκου SSR1 με το N- Acetyl – D –Glucosamine	46
4.4.1.	Διάγραμμα Ramachandran για το σύμπλοκο SSR1 με το N- Acetyl – D –Glucosamine	47
4.4.2.	Σύνδεση N- Acetyl – D –Glucosamine με την SSR1	48
4.4.3.	Σύνδεση 2-Acetylamino-2-Deoxy-Alpha-D-Mannopyranose με την SSR1	50
4.5.	Η δομή του συμπλόκου SSR2 με το N- Acetyl – D –Glucosamine	53
4.5.1.	Διάγραμμα Ramachandran για το σύμπλοκο SSR2 με το N- Acetyl – D –Glucosamine	54
4.5.2.	Σύνδεση N- Acetyl – D –Glucosamine με την SSR2	55
4.5.3.	Σύνδεση 2-Acetylamino-2-Deoxy-Alpha-D-Mannopyranose με την SSR2	58
	Ευχαριστίες	61
	Βιβλιογραφία	63

## I. Abstract

Lectins are monovalent or multivalent carbohydrate-binding proteins that function as recognition molecules in cellular interactions. SRL is a protein secreted from *Sclerotium Rolfsii* (a soil-born pathogenic plant fungus) and a cell wall associated developmental-stage specific lectin. SSR1 (N14D, E113Q, E123Q) and SSR2 (T1V, N14D, T34S, E113Q, E123Q) are two different variants of SRL which differ in glycan specificity. While SSR1 binds to Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3GalNAc- $\alpha$ - (TF, Thomsen-Friedenreich antigen; a disaccharide over-expressed on cell-surface glycoproteins in a variety of human carcinomas) and GalNAc- $\alpha$ - (Tn antigen), SRL and SSR2 display specificity only for TF antigen. It has been shown that SRL strongly inhibits the growth of human colon (HT29 and PLD-1) and ovarian cancer cells (PA-1). As a result SRL and its variants have the potential to be developed as a therapeutic agent for cancer. In order to determine the crystal structure of the two variants, SSR1 and SSR2 protein crystals were grown using the hanging drop, vapor diffusion method while X-ray diffraction data were collected for SSR1 and SSR2 in their free form and in complex with N-Acetyl-D-Glucosamine. The structures of the two variants were solved using the molecular replacement function with SRL as a search model. The crystal structures of SSR1 and SSR2 lectins in their free form were determined at 1.7Å and 1.6 Å resolution respectively, while the crystal structures of SSR1 and SSR2, in complex with N-Acetyl-D-Glucosamine, were determined at 1.9 Å and 1.7Å respectively.



## II. Περίληψη

Οι λεκτίνες αποτελούν μια κατηγορία πρωτεϊνών με τη χαρακτηριστική ιδιότητα να προσδένουν υδατάνθρακες και κατάλοιπα σακχάρων. Η SRL είναι μια λεκτίνη που εκκρίνεται από το αναπτυσσόμενο στο έδαφος, παθογόνο μύκητα *Sclerotium Rolfsii* ενώ οι SSR1 (N14D, E113Q, E123Q) και SSR2 (T1V, N14D, T34S, E113Q, E123Q) είναι μεταλλαγμένες μορφές της SRL που διαφέρουν ως προς την εξειδίκευση στη πρόσδεση διαφορετικών σακχάρων. Συγκεκριμένα η SSR1 συνδέεται με το μόριο αντιγόνο TF (Thomsen-Friedenreich antigen, Galβ1→3GalNAc-α, δισακχαρίτης γλυκοπρωτεϊνών που εκφράζονται στη κυτταρική μεμβράνη ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων) και το αντιγόνο Tn (GalNAc-α) ενώ η SRL και η SSR2 προσδένουν μόνο το αντιγόνο TF. Καθώς έχει αποδειχθεί ότι η SRL αναστέλλει την ανάπτυξη των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων του εντέρου (τύποι HT29 και PTD-1) και των ωοθηκών (τύπος PA-1), θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σαν θεραπευτικοί παράγοντες η SRL και οι μεταλλαγμένες μορφές της, για την αντιμετώπιση ορισμένων μορφών καρκίνου. Προκειμένου να μελετηθεί η δομή των SSR1 και SSR2, αναπτύχθηκαν οι αντίστοιχοι πρωτεϊνικοί κρύσταλλοι με τη μέθοδο διάχυσης ατμών και τη τεχνική της κρεμάμενης σταγόνας, ενώ σε πείραμα περιθλάσης ακτίνων Χ συλλέχθηκαν κρυσταλλογραφικά δεδομένα για τις SSR1 και SSR2 στην ελεύθερη μορφή τους και σε σύμπλοκο με το σάκχαρο N-Ακέτυλο-D-Γλυκοζαμίνη με ευκρίνεια 1,7Å και 1,6Å για την ελεύθερη μορφή και 1,9Å και 1,7Å για το σύμπλοκο αντίστοιχα. Οι δομές των SSR1 και SSR2 προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο της μοριακής αντικατάστασης με χρήση της SRL σαν μόριο αναφοράς.



## 1. Εισαγωγή

Στα τέλη της δεκαετίας του '50 ο J. C. Kendrew (1917-1997) καθόρισε [1] την πρώτη πρωτεϊνική δομή με τη μέθοδο της κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ. Έκτοτε, δεκάδες χιλιάδες αντίστοιχες δομές<sup>1</sup> έχουν αποκρυπτογραφηθεί μέχρι σήμερα. Η ανάπτυξη εργαλείων βιοπληροφορικής σε συνδυασμό με τη γνώση της ατομικής δομής των βιολογικών μορίων επιτρέπουν τη περαιτέρω μελέτη και κατανόηση των ιδιοτήτων και της λειτουργίας τους, με κυριότερη εφαρμογή το σχεδιασμό φαρμάκων [2].

Οι λεκτίνες αποτελούν μία κατηγορία πρωτεϊνών, γνωστή ήδη από τα τέλη του 19<sup>ου</sup> αιώνα[3], οι οποίες έχουν την ιδιότητα να προσδένουν υδατάνθρακες και κατάλοιπα σακχάρων. Μέχρι σήμερα έχουν δημοσιευτεί στη Protein Data Bank πάνω από 1000 δομές λεκτινών<sup>1</sup>. Το αντικείμενο της παρούσας εργασίας είναι η κρυσταλλογραφική μελέτη της δομής των SSR1 και SSR2, λεκτίνες οι οποίες αποτελούν μεταλλαγμένες μορφές της SRL (Sclerotium Rolfsii Lectin). Οι δομές τους καθορίστηκαν με ανάλυση 1,7Å και 1,6Å αντίστοιχα και προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο της μοριακής αντικατάστασης (molecular replacement) χρησιμοποιώντας σαν μοντέλο την δομή της SRL[4]. Μελετήθηκαν επίσης τα σύμπλοκά τους με το σάκχαρο N-Acetyl-D-Glucosamine.

---

<sup>1</sup> Στατιστικά στοιχεία που παρέχονται από την PDB  
[http://www.rcsb.org/pdb/static.do?p=general\\_information/pdb\\_statistics/index.html](http://www.rcsb.org/pdb/static.do?p=general_information/pdb_statistics/index.html)

## 1.1.Οι λεκτίνες

Η ύπαρξη πρωτεϊνών που έχουν τη δυνατότητα να συγκολλούν ερυθροκύτταρα είναι γνωστή από τα τέλη του 19<sup>ου</sup> αιώνα [3]. Στη συνέχεια αποδείχθηκε ότι οι πρωτεΐνες αυτές προσδένουν σε πολλαπλά σημεία τα σάκχαρα της κυτταρικής μεμβράνης των ερυθροκυττάρων δημιουργώντας συσσωματώματα [3]. Οι πρωτεΐνες αυτές ονομάστηκαν το 1954 από τους Boyd και Sharpleigh λεκτίνες, από το λατινικό ρήμα "legare" που σημαίνει "διαλέγω", λόγω της ιδιότητας τους να προσδένονται σε διαφορετικούς τύπους των ερυθροκυττάρων του συστήματος ABO, διαχωρίζοντάς τους [3]. Ο όρος χρησιμοποιείται σήμερα για το χαρακτηρισμό μιας πολυπληθούς κατηγορίας πρωτεϊνών που παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια με υδατάνθρακες και κατάλοιπα σακχάρων τα οποία προσδένουν σε συγκεκριμένες θέσεις σύνδεσης χωρίς να τροποποιούν τις ιδιότητές τους [5]. Λεκτίνες έχουν απομονωθεί από φυτά, βακτήρια, ιούς, μύκητες, ασπόνδυλα και σπονδυλωτά [6][5] ενώ εμπλέκονται σε ποικίλες βιολογικές διεργασίες όπως στη διακυτταρική επικοινωνία, το κυτταρικό κύκλο και την ανοσοαπάντηση [7]. Διακρίνονται σε μερολεκτίνες (merolectins, παρουσιάζουν μοναδική θέση σύνδεσης), ολολεκτίνες (hololectins, παρουσιάζουν τουλάχιστον δύο θέσεις σύνδεσης) και χημολεκτίνες (chemolectins, παρουσιάζουν επιπρόσθετες καταλυτικές περιοχές χωρίς δράση λεκτίνης) [5][7].

### 1.1.1. Η SRL (Sclerotium Rolfsii Lectin)

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν οι δομές δύο μεταλλαγμένων μορφών της SRL, λεκτίνης που εκκρίνεται από τον οργανισμό *Sclerotium Rolfsii* (εικόνα 1), ενός μύκητα που αναπτύσσεται στο έδαφος και προσβάλλει διάφορους φυτικούς οργανισμούς[6]. Η λεκτίνη αυτή αποτελεί ενδιαφέρον αντικείμενο μελέτης καθώς αναγνωρίζει δομές σακχάρων και συγκεκριμένα το Thomsen – Friedenreich (TF) αντιγόνο (Galβ1-3GalNAcα1) [4], μια γλυκοπρωτεΐνη που εκφράζεται στην επιφάνεια ορισμένων καρκινικών κυττάρων[4]. Η εναλλαγή της γλυκοζυλίωσης των μεμβρανικών πρωτεϊνών καταδεικνύει την εξέλιξη μιας φυσιολογικής ή παθολογικής διεργασίας, από τη κυτταρική διαφοροποίηση έως τον καρκίνο[8][6]. Οι λεκτίνες αποτελούν ισχυρό εργαλείο για τη μελέτη και τον εντοπισμό των διαφορετικών σταδίων του καρκίνου, καθώς παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια με τις εκάστοτε υδατανθρακικές δομές [3]. Συγκεκριμένα η SRL έχει παρατηρηθεί ότι αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων των ωοθηκών της σειράς PA-1 in vitro, ενεργοποιώντας τους εκκινήτες των κασπασών -8 και -9 οδηγώντας τα κύτταρα στην απόπτωση [6]. Παρόμοια δράση αναπτύσσει και σε καρκινικά κύτταρα του ανθρώπινου παχέος εντέρου in vitro, ενώ in vivo καταστέλλει την ανάπτυξη του καρκινικού ιστού [8]. Τέλος η SRL προσδένεται ισχυρά με τους καρκινικούς και μεταστατικούς ιστούς ενώ ασθενής είναι η πρόσδεση με τους παρακείμενους υγιείς ιστούς [8].





Εικόνα 1 Καλλιέργεια (30 ημερών) του μύκητα *Sclerotium rolfsii* σε υλικό καλλιέργειας άμμου-καλαμποκιού.

#### 1.1.2. Οι SSR1 και SSR2

Οι SSR1 και SSR2 αποτελούν μεταλλαγμένες μορφές της SRL, που διαφέρουν όχι μόνο στην πρωτεϊνική αλληλουχία (πίνακας 1) αλλά και στην εξειδίκευση της πρόσδεσης με τα σάκχαρα όπως φαίνεται στο πίνακα 2. Η δομή των SSR1 και SSR2 αποτελεί το αντικείμενο της παρούσας εργασίας, καθώς και η πρόσδεση τους με το σάκχαρο N-Acetyl-D-Glucosamine.

Ac-	T-Y-K-I-T-V-R-V-Y-Q-T-N-P-N-A-F-F-H-P-V-E-K-T-V-W-K-Y-A-N-G-G-T-W-T-I-T-D-D-Q-H-V-L-T-M-	SRL
	T-Y-K-I-T-V-R-V-Y-Q-T-N-P-D-A-F-F-H-P-V-E-K-T-V-W-K-Y-A-N-G-G-T-W-T-I-T-D-D-Q-H-V-L-T-M-	SSR1
	V-Y-K-I-T-V-R-V-Y-Q-T-N-P-D-A-F-F-H-P-V-E-K-T-V-W-K-Y-A-N-G-G-T-W-S-I-T-D-D-Q-H-V-L-T-M-	SSR2
	G-G-S-G-T-S-G-T-L-R-F-H-A-D-N-G-E-S-F-T-A-T-F-G-V-H-N-Y-K-R-W-C-D-I-V-T-N-L-A-A-D-E-T-G-	SRL
	G-G-S-G-T-S-G-T-L-R-F-H-A-D-N-G-E-S-F-T-A-T-F-G-V-H-N-Y-K-R-W-C-D-I-V-T-N-L-A-A-D-E-T-G-	SSR1
	G-G-S-G-T-S-G-T-L-R-F-H-A-D-N-G-E-S-F-T-A-T-F-G-V-H-N-Y-K-R-W-C-D-I-V-T-N-L-A-A-D-E-T-G-	SSR2
	M-V-I-N-Q-Q-Y-Y-S-Q-K-N-R-E-E-A-R-E-R-Q-L-S-N-Y-E-V-K-N-A-K-G-R-N-F-E-I-V-Y-T-E-A-E-G-N-	SRL
	M-V-I-N-Q-Q-Y-Y-S-Q-K-N-R-E-E-A-R-E-R-Q-L-S-N-Y-Q-V-K-N-A-K-G-R-N-F-Q-I-V-Y-T-E-A-E-G-N-	SSR1
	M-V-I-N-Q-Q-Y-Y-S-Q-K-N-R-E-E-A-R-E-R-Q-L-S-N-Y-Q-V-K-N-A-K-G-R-N-F-Q-I-V-Y-T-E-A-E-G-N-	SSR2
	D-L-H-A-N-L-I-I-G	SRL
	D-L-H-A-N-L-I-I-G	SSR1
	D-L-H-A-N-L-I-I-G	SSR2

Πίνακας 1

G No	Glycan name	RFU		
		Native SRL	SSR1	SSR2
Simple Sugars				
17	GlcNAcβ-Sp8	172	24386	91
16	GlcNAcβ-Sp0	231	10458	19
Glycoproteins				
	AGP	31541	-	-
	AGP-A	6608	-	-
	Ceruloplasmine	42353	-	-
Tn Antigens				
4	GalNAcα-Sp8	-	25418	9
5	GalNAcα-Sp15	-	16691	16
Tn Antigen Derivatives				
95	GalNAcβ1-3GalNAcα-Sp8	-	40990	1289
193	GlcNAcβ1-6GalNAcα-Sp8	-	42247	-
180	GlcNAcβ1-3GalNAcα-Sp8	-	42113	-
194	GlcNAcβ1-6GalNAcα-Sp14	-	41801	-
92	GalNAcα1-3GalNAcβ-Sp8	-	38693	-
181	GlcNAcβ1-3GalNAcα-Sp14	-	36016	1180
TF Antigens and Anomers				
143	Galβ1-3GalNAcα-Sp8	1009	39767	155
140	Galβ1-3GalNAcβ-Sp8	38207	37094	38017
141	Galβ1-3GalNAcα-Sp14	-	35283	26087
142	Galβ1-3GalNAcα-Sp16	-	30774	20091
111	Gala1-3GalNAcα-Sp8	15097	17943	545
112	Gala1-3GalNAcα-Sp16	-	50	2
113	Gala1-3GalNAcβ-Sp8	496	55	30
TF Derivatives				
243	Neu5Aca2-3Galβ1-3(6S)GalNAcα-Sp8	52862	57171	59832
89	GlcNAcβ1-3Galβ1-3GalNAcα-Sp8	48442	56804	55053
29	(3S)Galβ1-3GalNAcα-Sp8	53789	54519	60407
224	Neu5Aca2-3Galβ1-3GalNAcα-Sp8	51164	47604	56636
134	GlcNAcβ1-6(Galβ1-3)GalNAcα-Sp8	23652	44485	37860
	Neu5Aca2-6(Galβ1-3)GalNAcα-Sp14	33000	44219	13550
244	Neu5Aca2-6(Neu5Aca2-3Galβ1-3)GalNAcα-Sp8	41598	42275	19265
167	Galβ1-4GlcNAcβ1-6(Galβ1-3)GalNAcα-Sp8	38990	41543	40694
136	Neu5Aca2-6(Galβ1-3)GalNAcα-Sp8	33000	41368	374
595	GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-6(Galβ1-3)GalNAcα-Sp14	-	41039	38968
562	GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-6(GlcNAcβ1-3Galβ1-3)GalNAcα-Sp14	-	40906	38043
289	Neu5Aca2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-6(Galβ1-3)GalNAcα-Sp14	-	40598	30392
138	Neu5Acβ2-6(Galβ1-3)GalNAcα-Sp8	33000	40198	3150
318	Neu5Aca2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-6(Neu5Aca2-3Galβ1-3)GalNAcα-Sp14	-	39966	9348
603	Neu5Aca2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-6(Galβ1-3)GalNAcα-Sp14	-	39770	28023
601	Neu5Aca2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-6(Galβ1-3)GalNAcα-Sp14	-	39035	21093
168	Galβ1-4GlcNAcβ1-6(Galβ1-3)GalNAcα-Sp14	-	38986	29704
600	Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-3GalNAcα-Sp14	-	38848	31899
605	GlcNAcβ1-6(Neu5Aca2-3Galβ1-3)GalNAcα-Sp14	-	38741	27706
245	Neu5Aca2-6(Neu5Aca2-3Galβ1-3)GalNAcα-Sp14	-	35485	3015
225	Neu5Aca2-3Galβ1-3GalNAcα-Sp14	-	33668	20448
602	Neu5Aca2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-6(Galβ1-3)GalNAcα-Sp14	-	22932	9887
567	GlcNAcβ1-3Galβ1-3GalNAcα-Sp14	48442	38950	32913
135	GlcNAcβ1-6(Galβ1-3)GalNAcα-Sp14	23652	36404	29926
568	Galβ1-3GlcNAcβ1-6(Galβ1-3)GalNAcα-Sp14	-	36538	29288
345	GlcNAcα1-4Galβ1-3GalNAcα-Sp14	-	36443	27443
360	KDNa2-3Galβ1-3GalNAcα-Sp14	-	34991	25053
591	Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-6(Galβ1-3)GalNAcα-Sp14	-	37214	19429
Fucosylated Glycans				
62	Fuca1-2Galβ1-3GalNAcα-Sp8	1603	215	7
63	Fuca1-2Galβ1-3GalNAcα-Sp14	-	4702	287
300	Neu5Aca2-3Galβ1-4(Fuca1-3)GlcNAcβ1-6(Galβ1-3)GalNAcα-Sp14	-	23333	180
381	Galβ1-3GalNAcα1-3(Fuca1-2)Galβ1-4Glc-Sp0	-	37627	33455
468	Gala1-3(Fuca1-2)Galβ1-3GalNAcα-Sp8	-	119	8
469	Gala1-3(Fuca1-2)Galβ1-3GalNAcβ-Sp8	-	40	6
490	Gala1-3Galβ1-3GlcNAcβ1-6GalNAcα-Sp14	-	25058	2
495	Fuca1-2Galβ1-4GlcNAcβ1-6GalNAcα-Sp14	-	26737	40
496	Gala1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-6GalNAcα-Sp14	-	24927	13

## Πίνακας 2

## 1.2. Κρυστάλλωση πρωτεϊνών

Προϋπόθεση για τη μελέτη της δομής των πρωτεϊνών αποτελεί η κρυστάλλωση τους, η παρασκευή δηλαδή αμιγών και καλά διατεταγμένων κρυστάλλων, ικανών να προσφέρουν μια ευκρινή εικόνα περίθλασης.

### 1.2.1. Βασικές αρχές της θεωρίας κρυστάλλωσης

Η πολύπλοκη φύση ενός πρωτεϊνικού συστήματος δεν έχει επιτρέψει μέχρι σήμερα την ύπαρξη μιας θεωρίας που να χρησιμοποιείται ευρέως για την ανάπτυξη πρωτεϊνικών κρυστάλλων. Αντίθετα, η ανάπτυξη κρυστάλλων θεωρείται μια διαδικασία που βασίζεται κυρίως σε παρατηρήσεις και εμπειρικούς κανόνες από το παρελθόν και απαιτεί υπομονή, όσον αφορά το χρόνο, που χρειάζεται για να προκύψει πρωτεϊνικός κρύσταλλος, (συντά εβδομάδες ή ακόμη και μήνες) [9] και συνεχής έλεγχος, εφόσον οι αλλαγές σε κάποιες παραμέτρους ίσως επιφέρουν μεταβολές οπτικά παρατηρήσιμες [10]. Έτσι λέγεται, ότι η ανάπτυξη κρυστάλλων συνδυάζει την τέχνη με την επιστήμη [11].

Η κρυστάλλωση των μορίων σε ένα διάλυμα αποτελεί μια αντιστρεπτή αντίδραση που επάγεται από την ελαχιστοποίηση της ελεύθερης ενέργειας του συστήματος. Σε ένα διάλυμα του οποίου τα μόρια είναι πλήρως διαλυτοποιημένα στη κατάσταση ισορροπίας η ελεύθερη ενέργεια είναι η ελάχιστη. Εάν προστεθούν και άλλα μόρια στο διάλυμα, ώστε να μην υπάρχουν αρκετά μόρια διαλυτή για να διατηρήσουν την ενυδάτωση της διαλυμένης ουσίας, το σύστημα βρίσκεται σε υπερκορεσμό και οδηγείται σε μία νέα κατάσταση ισορροπίας. Συγκεκριμένα, μεμονωμένα μόρια χάνουν τους μεταφορικούς και περιστροφικούς βαθμούς ελευθερίας τους σχηματίζοντας μη ομοιοπολικούς δεσμούς με άλλα μόρια, ελαχιστοποιώντας έτσι την ελεύθερη ενέργεια του συστήματος. Η συσσωμάτωση των μορίων έχει σαν αποτέλεσμα τη μετάβαση τους από τη διαλυτή στη στερεή φάση, η οποία μπορεί να έχει τη μορφή κρυσταλλικών πυρηνίσκων ή άμορφου ιζήματος [12].

Η βασική στρατηγική της κρυστάλλωσης είναι η κατεύθυνση του συστήματος σε μια κατάσταση περιορισμένου βαθμού υπερκορεσμού, τροποποιώντας τις ιδιότητες του διαλύματος (θερμοκρασία, pH και συγκέντρωση) ή προσθέτοντας κατακρημνιστικούς παράγοντες, οι οποίοι θα αναπτυχθούν στη συνέχεια [12][13].

### 1.2.2. Στάδια της κρυστάλλωσης

Τα βασικά στάδια της κρυστάλλωσης είναι η πυρήνωση, η ανάπτυξη των πυρήνων και η παύση της ανάπτυξης τους [16][12].

#### 1.2.2.1. Πυρήνωση

Τα πρωτεϊνικά μόρια σε ένα υπερκορεσμένο διάλυμα είναι δυνατό να σχηματίσουν συσσωματώματα, δημιουργώντας δεσμούς γύρω από συγκεκριμένα κέντρα σύνδεσης [17]. Όταν το συσσωμάτωμα φτάσει σε ένα κρίσιμο μέγεθος, ονομάζεται πυρήνας και μπορεί να αναπτυχθεί σε κρύσταλλο [18]. Η ελεύθερη ενέργεια του συσσωματώματος αυτού ονομάζεται ελεύθερη ενέργεια πυρήνωσης, αποτελεί το ενεργειακό φράγμα για την ανάπτυξη πρωτεϊνικών κρυστάλλων και δίνεται από τη σχέση [16]:

$$\Delta G_g = \frac{-[kT(4r^3\pi)]}{V \ln \beta} + 4r^2\pi\gamma \quad (1)$$

Όπου:

k: η σταθερά του Boltzmann

T: η απόλυτη θερμοκρασία

r: η ακτίνα του πυρήνα

V: ο όγκος του μορίου μέσα στον κρύσταλλο

$\beta$ : ο βαθμός υπερκορεσμού ( $\beta = c/c_s$ , c η συγκέντρωση του διαλύματος και  $c_s$  η διαλυτότητά του)

$\gamma$ : η διεφασική ενέργεια διαλύματος κρυστάλλου

Προκειμένου να ξεπεραστεί το ενεργειακό φράγμα και να αναπτυχθεί ο κρύσταλλος, ο βαθμός υπερκορεσμού θα πρέπει να είναι τουλάχιστον ίσος με 3 [19]. Από τη στιγμή που θα δημιουργηθεί ένας πυρήνας η ανάπτυξη του κρυστάλλου ξεκινά αυθόρμητα ενώ τα μικρότερα συσσωματώματα τείνουν να διαλυτοποιηθούν εκ νέου [16].

#### 1.2.2.2. Ανάπτυξη πυρήνων

Αφού δημιουργηθούν οι πυρήνες, αρχίζει η ανάπτυξη του κρυστάλλου, κατά την οποία λαμβάνουν χώρα δύο διαδικασίες: η μεταφορά μορίων στην επιφάνεια του κρυστάλλου και η διευθέτησή τους στο κρυσταλλικό πλέγμα [18]. Η διάχυση των πρωτεϊνικών μορίων, που είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά τους στο κρύσταλλο, αποτελεί μια σχετικά αργή διαδικασία [18]. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης γειτονικά του ταχέως αναπτυσσόμενου κρυστάλλου και συνεπώς την αποτροπή της δημιουργίας νέων πυρήνων αλλά και τη σωστή τοποθέτηση των μορίων στο πλέγμα [12][18]. Έχει παρατηρηθεί ότι κρύσταλλοι που αναπτύσσονται με πολύ γρήγορο ρυθμό φτάνουν σε μικρότερο τελικό μέγεθος πιθανώς λόγω συσσωρευμένων ατελειών στο κρυσταλλικό πλέγμα [18].

Ο ρυθμός εναπόθεσης μορίων στην επιφάνεια του κρυστάλλου δίνεται από τον νόμο του Fick [17]:

$$\frac{dM}{dt} = D \frac{dC}{dx} \bigg|_o S \quad (2)$$

Όπου:

$\frac{dC}{dx} \bigg|_o$  : η βαθμίδα συγκέντρωσης στην επιφάνεια του κρυστάλλου

S: η επιφάνεια της κρυσταλλικής περιοχής

D: ο μέσος συντελεστής διάχυσης

Θεωρώντας ότι η ανάπτυξη του κρυστάλλου πραγματοποιείται μέσω σύνδεσης μονομερών, ορίζεται η σταθερά του ρυθμού ανάπτυξης  $k$  [17]:

$$\frac{dM}{dt} = k[C_1(0) - C_1^{sol}]S \quad (3)$$

Όπου:

$C_1(0)$  : η συγκέντρωση κορεσμού

$C_1^{sol}$ : η συγκέντρωση του διαλύματος

Από τις εξισώσεις (2) , (3) προκύπτει για τη σταθερά του ρυθμού ανάπτυξης:

$$k = \frac{D \frac{dC}{dx}|_o}{[C_1(0) - C_1^{sol}]} \quad (4)$$

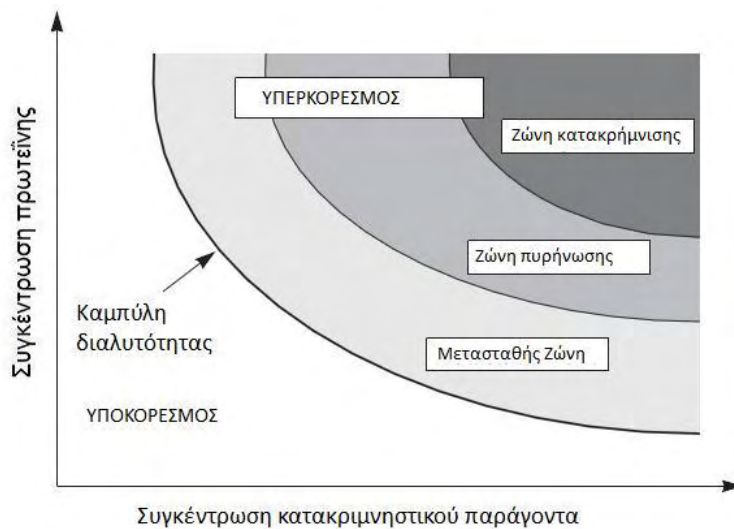
#### 1.2.2.3. Παύση της ανάπτυξης

Με βάση το νόμο του Fick, εάν ο μέσος συντελεστής διάχυσης  $D$  είναι μεγαλύτερος της σταθεράς ρυθμού ανάπτυξης  $k$  τότε η ταχύτητα ανάπτυξης καθορίζεται από τη μορφολογία του κρυστάλλου. Στην αντίθετη περίπτωση η ταχύτητα καθορίζεται από τη διάχυση των πρωτεϊνικών μορίων. Δεδομένου ότι τα συστήματα κρυστάλλωσης είναι συνήθως κλειστά, δεν προστίθεται δηλαδή πρωτεΐνη από εξωτερικούς παράγοντες, η ταχύτητα ανάπτυξης ελαπνώνεται με το χρόνο και τελικά μηδενίζεται [16]. Η αναστολή της ανάπτυξης δεν οφείλεται στην εξάντληση των αποθεμάτων πρωτεΐνης στο διάλυμα, αλλά στη μεταβολή των ιδιοτήτων της επιφάνειας του κρυστάλλου [18][17]. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται δηλητηρίαση των επιφανειακών κέντρων σύνδεσης και προκαλείται είτε λόγω εναπόθεσης προσμίξεων στα κέντρα αυτά είτε λόγω της αδρανοποίησης της επιφάνειας των κρυστάλλων [16][12]. Η ύπαρξη προσμίξεων στο πρωτεϊνικό διάλυμα έχει σαν αποτέλεσμα την επιτάχυνση της πυρήνωσης αλλά και την ταχύτερη ανάπτυξη των κρυστάλλων με τελικό μέγεθος μικρότερο από το επιθυμητό. Για αυτό το λόγο η πρωτεΐνη είναι απαραίτητο να έχει όσο το δυνατόν υψηλότερο βαθμό καθαρότητας [16].

#### 1.2.3. Διάγραμμα φάσης

Ανάλογα με τις συνθήκες, η πυρήνωση και η ανάπτυξη των κρυστάλλων λαμβάνουν χώρα σε διαφορετικές περιοχές του διαγράμματος φάσης (εικόνα 1). Το διάγραμμα φάσης παριστάνει τις καταστάσεις υποκορεσμού και υπερκορεσμού του διαλύματος σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης και του κατακρημνιστικού παράγοντα. Η καμπύλη διαλυτότητας διαχωρίζει τις δύο καταστάσεις στις οποίες η πρωτεΐνη απαντάται σε

διαφορετικές φάσεις: στη κατάσταση υποκορεσμού υπάρχει μόνο η διαλυτή φάση ενώ στη κατάσταση υπερκορεσμού συνυπάρχουν η διαλυτή και η στερεή φάση [19][13].



Εικόνα 2 Διάγραμμα φάσης

Στο διάγραμμα διακρίνονται οι εξής περιοχές:

*Ζώνη κατακρήμνισης:* στη περιοχή αυτή περιγράφεται η κατάσταση στην οποία τα μόρια της πρωτεΐνης που δεν είναι διαλυμένα δημιουργούν άμορφο ίζημα [12].

*Ζώνη πυρήνωσης (ασταθής ζώνη):* στη περιοχή αυτή τα μόρια της πρωτεΐνης συσσωματώνονται αυθόρμητα σε κρυσταλλικές δομές [16][12].

*Μετασταθής ζώνη:* στη κατάσταση αυτή τα μόρια της πρωτεΐνης δε σχηματίζουν εκ νέου κρυσταλλικούς πυρήνες αλλά οι ήδη υπάρχοντες πυρήνες αναπτύσσονται ταχύτατα [12][13]. Η ευνοϊκότερη συνθήκη για την ανάπτυξη μεγάλων κρυστάλλων είναι η εξής: η δημιουργία ενός πυρήνα σε συνθήκες πολύ κοντά στη μετασταθή ζώνη προκειμένου να μην σχηματιστούν περισσότεροι πυρήνες, το σύστημα να βρεθεί στη μετασταθή κατάσταση και να αναπτυχθεί μόνο ένας κρύσταλλος [12].

#### 1.2.4. Παράγοντες που επηρεάζουν την κρυστάλλωση

Πρωταρχικός παράγοντας για την επίτευξη μιας επιτυχημένης κρυστάλλωσης είναι η ίδια η πρωτεΐνη. Είναι απαραίτητο μια πρωτεΐνη προς κρυστάλλωση, η οποία απομονώνεται από κάποιο πολύπλοκο βιολογικό σύστημα να διαθέτει υψηλό βαθμό καθαρότητας τόσο ως προς την ύπαρξη άλλων βιολογικών ουσιών όσο και ως προς την ύπαρξη μικροετερογένειας, η οποία επιδρά αρνητικά στην ανάπτυξη κρυστάλλων, ιδιαίτερα όταν η ετερογένεια αφορά περιοχές που συμμετέχουν στη διαμόρφωση του κρυσταλλικού πλέγματος [14]. Επιπλέον, η διαλυτότητα μιας πρωτεΐνης είναι καθοριστικός παράγοντας για την κρυστάλλωση της, ενώ τις περισσότερες φορές καθορίζεται από το είδος αυτής. Για παράδειγμα, το μεγαλύτερο ποσοστό των μεμβρανικών πρωτεϊνών παρουσιάζει προβλήματα δυσδιαλυτότητας στους συμβατικούς οργανικούς διαλύτες. Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την διαλυτότητα των πρωτεϊνών είναι οι ακόλουθοι:

#### 1.2.4.1. Ιοντική ισχύς

Η διαλυτότητα των βιομορίων σε υδατικά ηλεκτρολυτικά διαλύματα, εξαρτάται από την συγκέντρωση των ηλεκτρολυτών στο διάλυμα. Οι όροι εναλάτωση (salting in) και εξαλάτωση (salting out) αναφέρονται σε δυο διαφορετικά φαινόμενα που χαρακτηρίζουν την εξάρτηση της διαλυτότητας από την ιοντική ισχύ.

Εναλάτωση: Σε πρωτεϊνικό διάλυμα με χαμηλή ιοντική ισχύ, οι πρωτεΐνες δημιουργούν συσσωματώματα αλληλεπιδρώντας ηλεκτροστατικά μεταξύ τους, ενώ σαν αποτέλεσμα μειώνεται η διαλυτότητα τους. Με τη πρόσθεση αλάτων στο διάλυμα, τα ιόντα που προκύπτουν αυξάνουν την ιοντική ισχύ του διαλύματος, αυξάνοντας ταυτόχρονα τη διαλυτότητα των πρωτεϊνικών μορίων αφού ικανοποιούν της ηλεκτροστατικές απαιτήσεις των επιφανειών τους.

Εξαλάτωση: Η αύξηση της συγκέντρωσης των ηλεκτρολυτών σε πρωτεϊνικό διάλυμα, έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση της διαλυτότητας του. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στον ανταγωνισμό των ιόντων των αλάτων με τα μόρια της πρωτεΐνης για τη δέσμευση μορίων νερού. Σαν αποτέλεσμα τα πρωτεϊνικά μόρια δεν συνδέονται με αρκετά μόρια διαλύτη προκειμένου να παραμείνουν διαλυτά και σχηματίζουν στερεή φάση [15].

#### 1.2.4.2. pH

Το συνολικό φορτίο που φέρει μια πρωτεΐνη επηρεάζει την διαλυτότητα της καθώς όσο περισσότερο συνολικό φορτίο φέρει, τόσο πιο διαλυτή είναι. Στο ισοηλεκτρικό σημείο, η διαλυτότητα της πρωτεΐνης είναι η ελάχιστη με αποτέλεσμα να ευνοείται ο σχηματισμός άμορφου ιζήματος. Η σωστή ρύθμιση του pH κατά την κρυστάλλωση καθιστά αναγκαία την χρήση κατάλληλων ρυθμιστικών διαλυμάτων.

#### 1.2.4.3. Θερμοκρασία

Αύξηση της θερμοκρασίας προκαλεί αύξηση της εντροπίας του συστήματος αλλά επιτρέπει επίσης μακρομοριακές διευθετήσεις υψηλότερης ελεύθερης ενέργειας.

#### 1.2.4.4. Κατακρημνιστικοί παράγοντες

Προκειμένου να κρυσταλλωθεί η πρωτεΐνη είναι απαραίτητη η προσθήκη στο διάλυμα κατακρημνιστικών παραγόντων, οι οποίοι διακρίνονται στις εξής κατηγορίες:

##### 1.2.4.4.1. Άλατα

Τα άλατα στο πρωτεϊνικό διάλυμα ανταγωνίζονται τη πρωτεΐνη για τη σύνδεση με τα μόρια του διαλύτη με αποτέλεσμα να μειώνεται η διαλυτότητα της πρωτεΐνης καθώς τα μόρια της δημιουργούν συσσωματώματα, προκειμένου να καλύψουν τις ηλεκτροστατικές τους ανάγκες (εξαλάτωση, salting out)[16][12]. Η χρήση αλάτων οδηγεί στην αύξηση της ιοντικής ισχύος του διαλύματος κρυστάλλωσης αλλά και του θορύβου στα κρυσταλλογραφικά δεδομένα[12].

#### 1.2.4.4.2. Μεγάλου μοριακού βάρους πολυμερή (πολυαιθυλενγλυκόλες PEG)

Η δράση των PEG είναι παρόμοια με των αλάτων καθώς ανταγωνίζονται την πρωτεΐνη για τη σύνδεση με τον διαλύτη ενώ δεν αυξάνουν την ιοντική ισχύ του διαλύματος καθώς η διηλεκτρική σταθερά των PEG είναι περίπου ίση με του νερού [12].

#### 1.2.4.4.3. Οργανικοί διαλύτες

Οι οργανικοί διαλύτες δεσμεύουν τα μόρια του νερού μειώνοντας τη διηλεκτρική σταθερά του μέσου με συνέπεια να αυξάνονται οι αλληλεπιδράσεις Coulomb ανάμεσα στα μόρια. Σαν αποτέλεσμα η ηλεκτροστατική θωράκιση των πρωτεϊνών μειώνεται ωθώντας τα πρωτεϊνικά μόρια να δημιουργήσουν συσσωματώματα [12]. Οι οργανικοί διαλύτες πρέπει να χρησιμοποιούνται σε χαμηλές συγκεντρώσεις καθώς είναι δυνατό να μετουσιώσουν τις πρωτεΐνες [16].

#### 1.2.4.4.4. MPD (2-μεθυλ-2,4-πεντανοδιόλη)

Το MPD είναι μια μικρή πολυαλκοόλη με ιδιότητες που την κατατάσσουν ανάμεσα στα μικρού μοριακού βάρους PEG και στους οργανικούς διαλύτες. Οι δράσεις του MPD ως κατακρημνιστικού παράγοντα είναι ο ανταγωνισμός για σύνδεση με μόρια νερού, ο υδροφοβικός αποκλεισμός της πρωτεΐνης και η μείωση της διηλεκτρικής σταθεράς του μέσου [12].

### 1.2.5. Τεχνικές Κρυστάλλωσης

#### 1.2.5.1. Διάχυση ατμών

Διάφορες μέθοδοι έχουν κατά καιρούς εφαρμοστεί σε πρωτεϊνικά διαλύματα προκειμένου να μεταβούν σε κατάσταση υπερκορεσμού. Η πλέον διαδεδομένη τεχνική κρυστάλλωσης πρωτεϊνών είναι σήμερα η τεχνική της διάχυσης ατμών που εκμεταλλεύεται την εξάτμιση και διάχυση των υδρατμών ανάμεσα σε υδατικά διαλύματα με διαφορετικές συγκεντρώσεις. Η τεχνική αυτή εφαρμόζεται με τρεις μεθόδους: τη μέθοδο της κρεμάμενης σταγόνας, τη μέθοδο sandwich και τη μέθοδο της καθήμενης σταγόνας, κατά τις οποίες λαμβάνουν χώρα οι ίδιες φυσικές διεργασίες και διαφέρουν μόνο στη χωροταξική διάταξη.

##### 1.2.5.1.1. Μέθοδος κρεμάμενης σταγόνας (hanging drop)

Το διάλυμα της πρωτεΐνης αναμιγνύεται σε αναλογία 1:1 ή 1:2 με το διάλυμα που περιέχει τον κατακρημνιστικό παράγοντα και με τη μορφή σταγόνας αιωρείται πάνω από το «μητρικό» διάλυμα (reservoir) που περιέχει τον κατακρημνιστικό παράγοντα (εικόνα 3). Το διάλυμα αυτό πρέπει να έχει συγκέντρωση ίση με την επιθυμητή τελική συγκέντρωση του κατακρημνιστικού παράγοντα στο διάλυμα κρυστάλλωσης αφού πάψει η διάχυση και επέλθει ισορροπία. Η διαφορά της συγκέντρωσης του κατακρημνιστικού παράγοντα ανάμεσα στη σταγόνα και το μητρικό διάλυμα είναι η κινητήρια δύναμη που



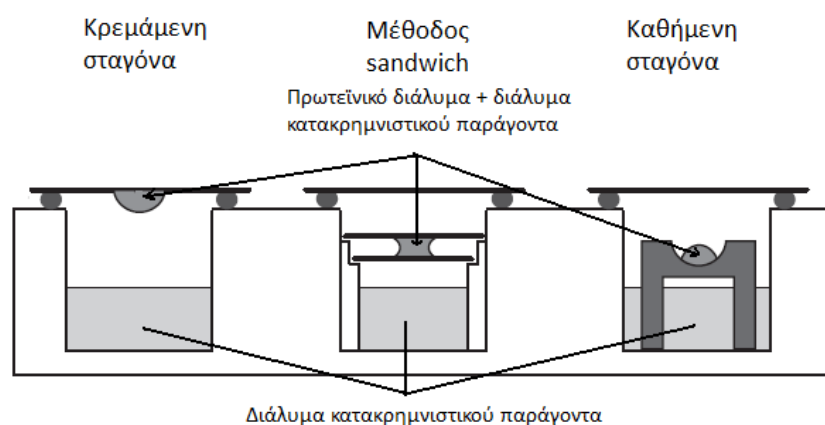
προκαλεί τη διάχυση των ατμών από τη σταγόνα στο φρεάτιο του μητρικού διαλύματος, μέχρι να εξισωθούν οι δύο συγκεντρώσεις. Δεδομένου ότι ο όγκος της σταγόνας (1-5μl) είναι πολύ μικρότερος του όγκου του διαλύματος στο φρεάτιο (100μl) το νερό που εξατμίζεται είναι ελάχιστο και δεν επηρεάζει τον όγκο της. Κατά τη διάρκεια της διάχυσης το διάλυμα της πρωτεΐνης πρέπει να μεταβεί από την ακόρεστη κατάσταση (Α) στη κατάσταση υπερκορεσμού (Β). Σε αυτή τη φάση θα δημιουργηθούν οι πρώτοι πυρήνες και έτσι η συγκέντρωση θα μειωθεί και το διάλυμα θα μεταβεί στη μετασταθή κατάσταση (Γ) όπου θα αναπτυχθεί ο κρύσταλλος (εικόνα 4)[12][13].

#### 1.2.5.1.2. Μέθοδος sandwich

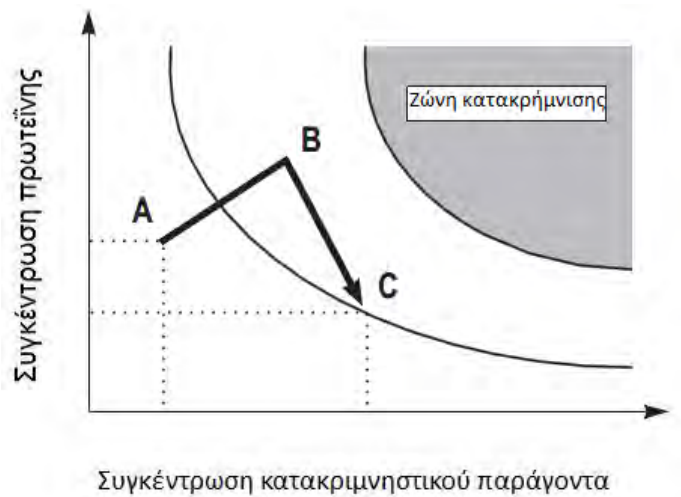
Στη μέθοδο αυτή, η σταγόνα έχει μέγιστο όγκο 10μl και τοποθετείται ανάμεσα από δύο cover slips (εικόνα 3) που αιωρούνται πάνω από το μητρικό διάλυμα.

#### 1.2.5.1.3. Μέθοδος καθήμενης σταγόνας (sitting drop)

Στη μέθοδο αυτή η σταγόνα τοποθετείται πάνω σε μία γέφυρα μέσα στο φρεάτιο που περιέχει το μητρικό διάλυμα (εικόνα 3)



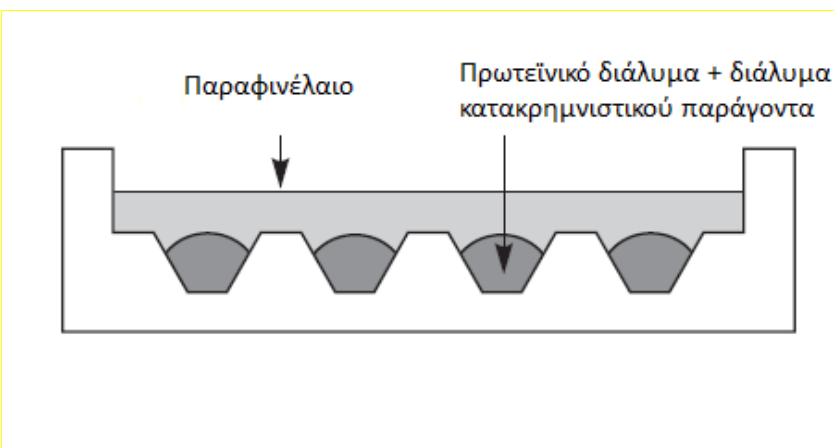
Εικόνα 3 Τεχνική διάχυσης ατμών



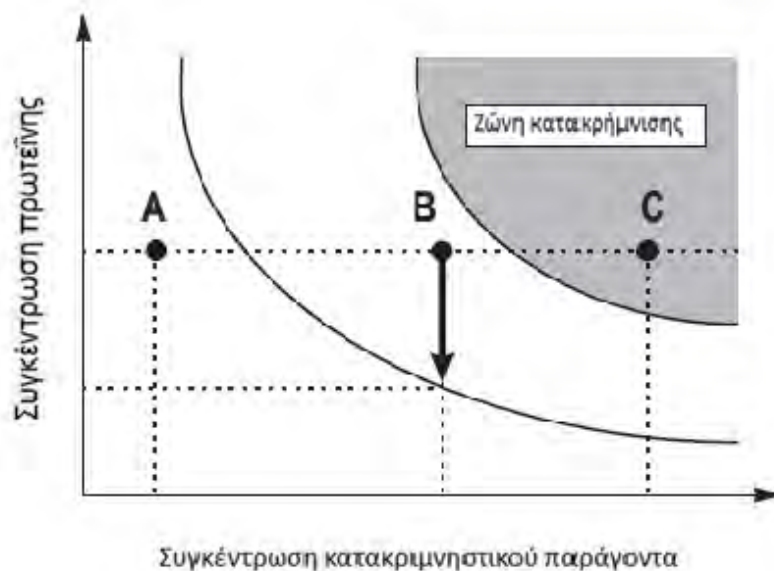
Εικόνα 4 Διάγραμμα φάσης για τη μέθοδο της κρεμάμενης σταγόνας

#### 1.2.5.2. Η τεχνική micro – batch

Στη τεχνική αυτή το πρωτεϊνικό διάλυμα και ο κατακρημνιστικός παράγοντας αναμιγνύονται και τοποθετούνται σε μικρά φρεάτια που στη συνέχεια σκεπάζονται με παραφινέλαιο που εμποδίζει την εξάτμιση (εικόνα 5)[12][20]. Το σημείο που αντιστοιχεί στην αρχική κατάσταση του διαλύματος θα πρέπει να βρίσκεται στη μετασταθή ζώνη προκειμένου να επιτευχθεί η κρυστάλλωση (εικόνα 6).



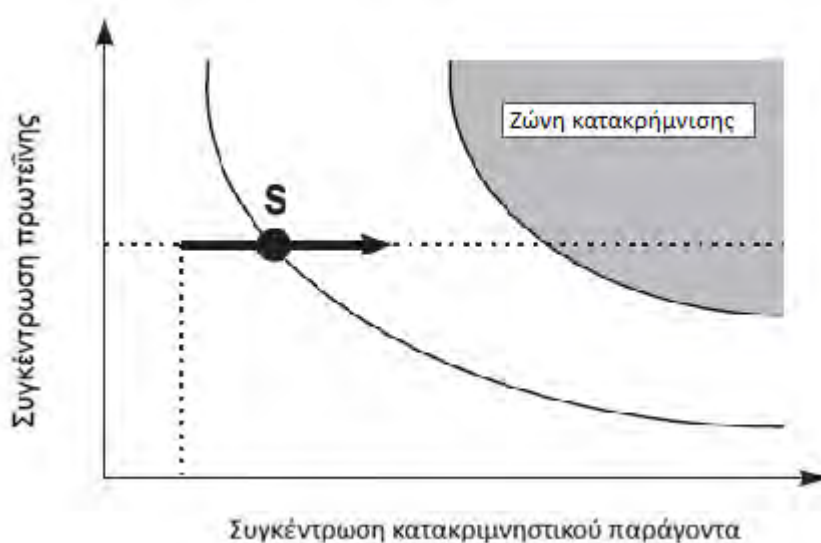
Εικόνα 5 Τεχνική micro – batch



Εικόνα 6 Διάγραμμα φάσης για τη μέθοδο micro – batch

#### 1.2.5.3. Διαπίδυση

Η μέθοδος αυτή εκμεταλλεύεται τη διάχυση του κατακρημνιστικού παράγοντα μέσω μιας ημιπερατής μεμβράνης από το μητρικό διάλυμα προς το πρωτεϊνικό. Αρχικά το πρωτεϊνικό διάλυμα χωρίζεται από το διάλυμα του κατακρημνιστικού παράγοντα μέσω της ημιπερατής μεμβράνης. Στη συνέχεια ο κατακρημνιστικός παράγοντας εισέρχεται στο πρωτεϊνικό διάλυμα μέσω διάχυσης προκαλώντας υπερκορεσμό και τελικά κρυστάλλωση[12]. Η πορεία της διαδικασίας στο διάγραμμα φάσης φαίνεται στην εικόνα 7.



Εικόνα 7 Διάγραμμα φάσης για τη μέθοδο της διαπίδυσης

### 1.3. Κρυσταλλογραφία Ακτίνων Χ

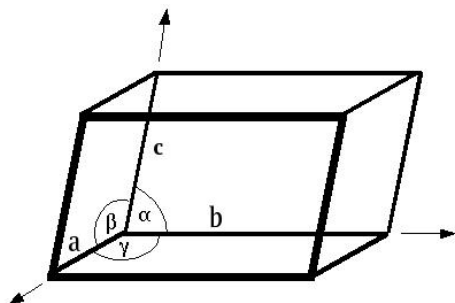
Η κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ αποτελεί μία μέθοδο προσδιορισμού των θέσεων των ατόμων και των μορίων που βρίσκονται σε περιοδικά διατεταγμένες θέσεις, δηλαδή σε ένα κρύσταλλο. Οι ακτίνες Χ είναι ιδανικές για τη μελέτη της ύλης σε ατομικό επίπεδο καθώς το μήκος κύματος τους είναι συγκρίσιμο με τις αποστάσεις των ατόμων σε ένα στερεό. Η δομή του κρυστάλλου και οι θέσεις των ατόμων προσδιορίζονται από την εικόνα της περίθλασης των ακτίνων Χ από τον κρύσταλλο, σύμφωνα με το νόμο του Bragg. Από το 1912 που ο Walter Friedrich και ο Paul Knipping, ακολουθώντας τη θεωρία του Laue (1879-1960) έλαβαν το πρώτο περίθλασίγραμμα από κρύσταλλο θειικού χαλκού μέχρι σήμερα, η τεχνική έχει εφαρμοστεί για την αποκρυπτογράφηση της δομής τόσο ανόργανων ενώσεων αλλά και του DNA και δεκάδων χιλιάδων πρωτεϊνών [21][22].

#### 1.3.1. Στοιχεία της δομής των κρυστάλλων

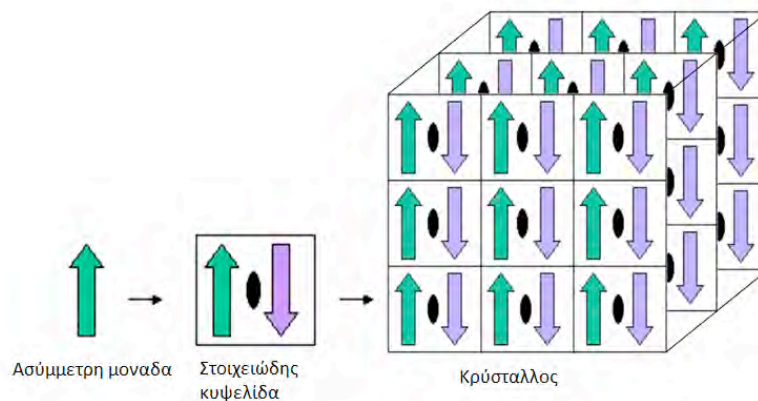
Κρύσταλλος είναι το στερεό σώμα το οποίο δομείται από άτομα και μόρια, διατεταγμένα σε ένα συμμετρικό μοτίβο που εκτείνεται επαναλαμβανόμενο στις τρεις διαστάσεις του χώρου [23].

##### 1.3.1.1. Ασύμμετρη μονάδα, Στοιχειώδης κυψελίδα

Προκειμένου να περιγραφεί η μορφολογία των κρυστάλλων χρησιμοποιούνται οι όροι της ασύμμετρης μονάδας (asymmetric unit) και της στοιχειώδους κυψελίδας (unit cell). Η στοιχειώδης κυψελίδα ορίζεται ως ο ελάχιστος όγκος που μετατοπιζόμενος και επαναλαμβανόμενος στις τρεις διαστάσεις κατασκευάζει το κρύσταλλο ενώ ασύμμετρη μονάδα θεωρείται η χωρίς εσωτερική συμμετρία μοριακή οντότητα η οποία με την εφαρμογή κατάλληλων τελεστών συμμετρίας δομεί τη στοιχειώδη κυψελίδα και κατά συνέπεια τον κρύσταλλο (εικόνα 9)[21][23]. Η στοιχειώδης κυψελίδα περιγράφεται πλήρως από τρία μη ομοεπίεδα διανύσματα, **a**, **b**, **c** και τις γωνίες  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  που σχηματίζονται μεταξύ τους (εικόνα 8).



Εικόνα 8 Η στοιχειώδης κυψελίδα



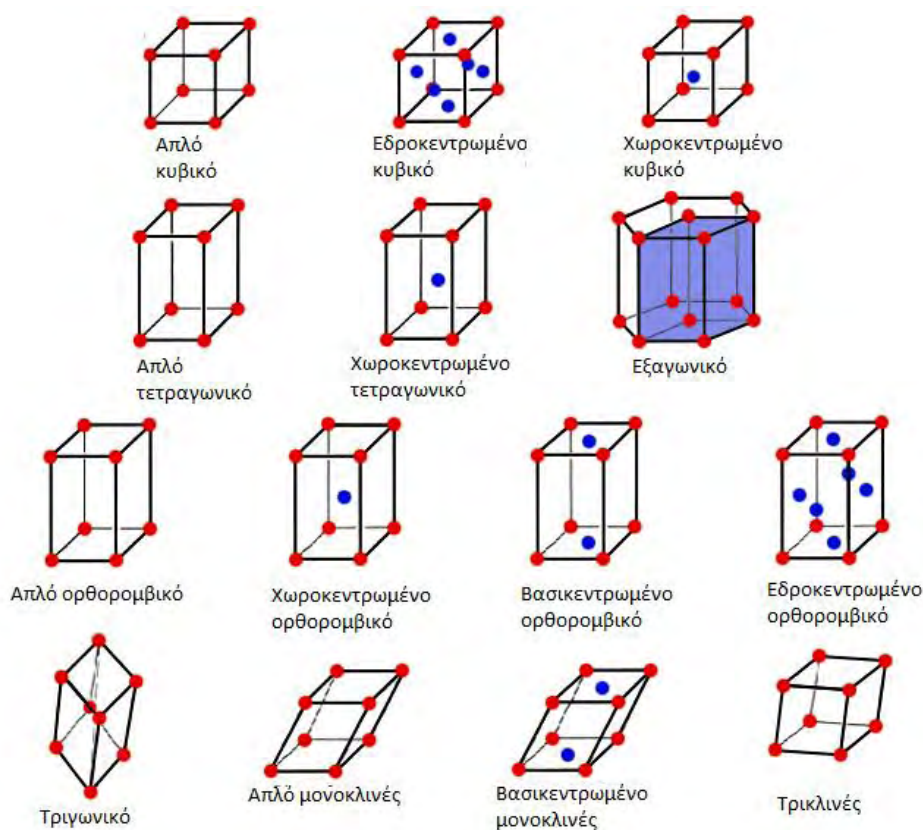
Εικόνα 9

### 1.3.1.2. Πλέγματα Bravais και ομάδες χώρου

Ο Γάλλος φυσικός Auguste Bravais (1811-1863) λαμβάνοντας υπόψιν τα επίπεδα και τους άξονες συμμετρίας κατέληξε σε 14 δυνατούς τύπους πλεγμάτων στο τρισδιάστατο χώρο, που κατατάσσονται σε 7 κρυσταλλικά συστήματα ανάλογα με τα είδη των συμβατικών στοιχειωδών κυψελίδων: κυβικό, τετραγωνικό, ορθορομβικό, μονοκλινές, τρικλινές, τριγωνικό και εξαγωνικό κρυσταλλικό σύστημα (πίνακας 3)(εικόνα 10) [22]. Ο συνδυασμός των 32 τύπων συμμετρίας που ορίζουν τη δομή των κρυστάλλων με τα 14 πλέγματα Bravais περιγράφουν όλες τις δυνατές μορφολογίες των κρυστάλλων που παράγουν τις μορφές και τη συμμετρία 230 διαφορετικών ομάδων χώρου (space group)[23].

Σύστημα	Συμβολισμός	Στοιχεία κυψελίδας
Τριγωνκλινές	P	$a \neq b \neq c$ $\alpha \neq \beta \neq \gamma$
Μονοκλινές	P, C	$a \neq b \neq c$ $\alpha = \gamma = 90^\circ \neq \beta$
Ορθορομβικό	P, C, I, F	$a \neq b \neq c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Τετραγωνικό	P, I	$a = b \neq c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Κυβικό	P, I, F	$a = b = c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Εξαγωνικό	P	$a = b \neq c$ $\alpha = \beta = 90^\circ$ $\gamma = 120^\circ$
Τριγωνικό	R	$a = b = c$ $\alpha = \beta = \gamma < 120^\circ$

Πίνακας 3



Εικόνα 10 Πλέγματα Bravais

### 1.3.1.3. Αντίστροφο πλέγμα, Σφαίρα Ewald

Το ανάστροφο πλέγμα ορίζεται από τα διανύσματα  $\mathbf{a}^*$ ,  $\mathbf{b}^*$ ,  $\mathbf{c}^*$  που σχετίζονται με τα διανύσματα  $\mathbf{a}$ ,  $\mathbf{b}$ ,  $\mathbf{c}$  της κυψελίδας του κρυσταλλικού πλέγματος με τις εξής σχέσεις [22]:

$$\mathbf{a}^* = \frac{2\pi}{V_c} (\mathbf{b} \times \mathbf{c}) \quad (5)$$

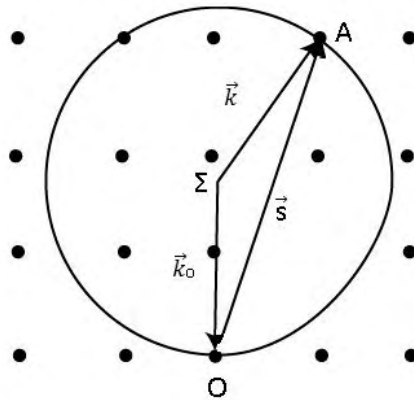
$$\mathbf{b}^* = \frac{2\pi}{V_c} (\mathbf{c} \times \mathbf{a}) \quad (6)$$

$$\mathbf{c}^* = \frac{2\pi}{V_c} (\mathbf{a} \times \mathbf{b}) \quad (7)$$

Όπου  $V_c = \mathbf{a} \cdot (\mathbf{b} \times \mathbf{c})$  ο όγκος της στοιχειώδους κυψελίδας του κρυσταλλικού πλέγματος.

Η σφαίρα Ewald είναι μια γεωμετρική παράσταση της συνθήκης που ικανοποιείται στην ενισχυτική συμβολή και κατασκευάζεται ως εξής: το σημείο  $O$  είναι η αρχή του κρυσταλλικού και του αντίστροφου πλέγματος ενώ το διάνυσμα  $\Sigma O$  είναι το κυματόνυσμα  $\mathbf{k}_o$  της προσπίπτουσας δέσμης (εικόνα 11). Η σφαίρα με κέντρο το σημείο  $\Sigma$  και ακτίνα το μέτρο του κυματόνυσματος  $\mathbf{k}_o$  ονομάζεται σφαίρα Ewald. Η διεύθυνση του διανύσματος  $\Sigma A$ , όπου  $A$  πλεγματοεικό σημείο στην επιφάνεια της σφαίρας, είναι η διεύθυνση της περιθλώμενης

δέσμης που θα δώσει ενισχυτική συμβολή. Το διάνυσμα  $\Sigma A$  ταυτίζεται με το κυματόνυσμα  $k$  της περιθλώμενης δέσμης ενώ ισχύει  $|k_o|=|k|$  αφού  $|k_o|=1/\lambda$  και η σκέδαση είναι σύμφωνη [16][22].



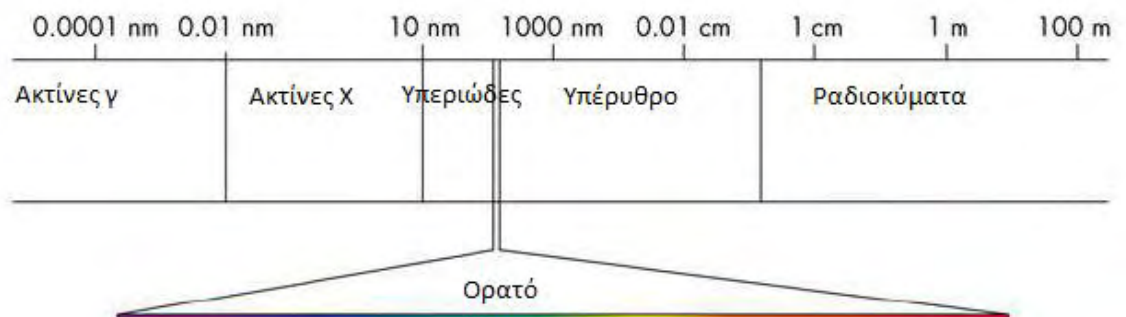
Εικόνα 11 Σφαίρα Ewald

#### 1.3.1.4. Δείκτες Miller

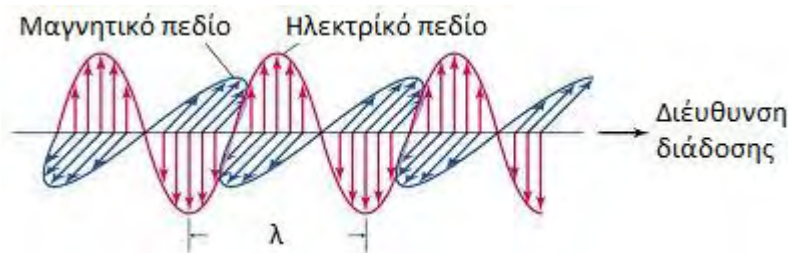
Μια οικογένεια παράλληλων πλεγματικών επιπέδων που δίνουν μια κορυφή έντασης προσδιορίζονται από τρεις ακέραιους αριθμούς  $h, k, l$ , τους δείκτες Miller. Το πλεγματικό επίπεδο με δείκτες Miller  $(h,k,l)$  είναι κάθετο στη διεύθυνση  $(h,k,l)$  του αντίστροφου πλέγματος [22].

#### 1.3.2. Ακτινοβολία X και περίθλαση

Η ακτινοβολία X είναι μια μορφή ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με μήκος κύματος από 0,01 έως 10 nm και καταλαμβάνει το τμήμα του φάσματος του φωτός ανάμεσα στην υπεριώδη και την γ ακτινοβολία (εικόνα 12). Το ηλεκτρομαγνητικό κύμα αποτελείται από ένα ηλεκτρικό και ένα μαγνητικό πεδίο που ταλαντώνονται με σταθερή συχνότητα και πλάτος, κάθετα μεταξύ τους και στη διεύθυνση διάδοσης του κύματος (εικόνα 13)[21][24].

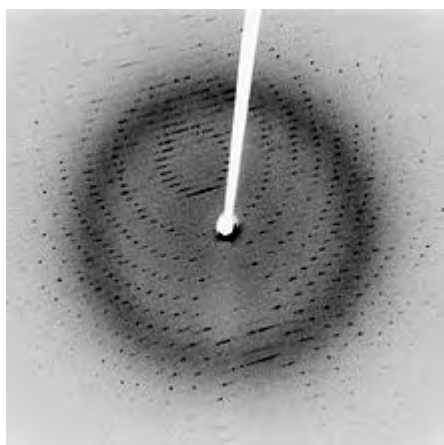


Εικόνα 12 Το φάσμα της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας



Εικόνα 13

Η περίθλαση των ακτίνων Χ από την ύλη, η αλλαγή δηλαδή της διεύθυνσης διάδοσης της, ερμηνεύεται με τον εξής τρόπο: κατά τη πρόσπτωση της ακτινοβολίας Χ στην ύλη, τα ηλεκτρόνια των ατόμων αλληλεπιδρούν με το ηλεκτρικό πεδίο του κύματος και ταλαντώνονται με την ίδια συχνότητα. Τα επιταχυνόμενα ηλεκτρόνια δρουν σαν δευτερεύουσες πηγές ακτινοβολίας εκπέμποντας κύματα με το ίδιο μήκος κύματος με τη προσπίπτουσα δέσμη. Η κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ βασίζεται στη περίθλαση αλλά και στο φαινόμενο της συμβολής του φωτός. Συγκεκριμένα, καθώς τα άτομα στον κρύσταλλο είναι περιοδικά διατεταγμένα, η περιθλώμενη ακτινοβολία που προέρχεται από αυτά θα συμβάλλει, δίνοντας μια χαρακτηριστική εικόνα μεγίστων έντασης στα σημεία που η συμβολή είναι ενισχυτική (εικόνα 7)[21].

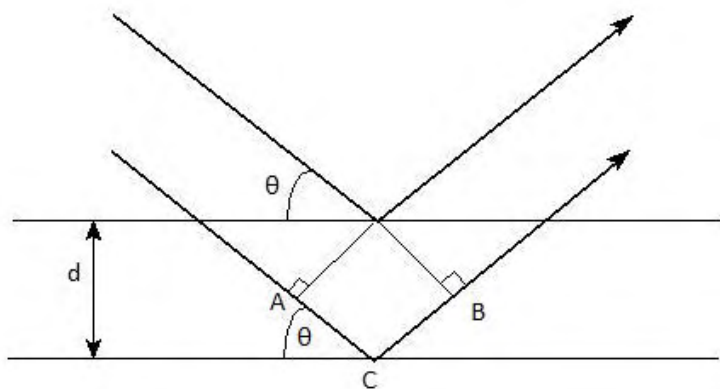


Εικόνα 14 Εικόνα περίθλασης από πρωτεϊνικό κρύσταλλο

#### 1.3.2.1. Ο νόμος Bragg

Για σύστημα δύο ατόμων οι περιθλώμενες δέσμες θα συμβάλλουν ενισχυτικά όταν είναι σε φάση, δηλαδή όταν η διαφορά δρόμων ( $AC + CB$ ) ισούται με ακέραιο πολλαπλάσιο του μήκους κύματος της ακτινοβολίας (εικόνα 15)[22].





Εικόνα 15

Η διεύθυνση της περιθλώμενης ακτινοβολίας για την οποία η συμβολή είναι ενισχυτική εξαρτάται από την απόσταση των δύο ατόμων και δίνεται από το νόμο Bragg:

$$n\lambda = 2d\sin\theta \quad (8)$$

Όπου:

n: ακέραιος αριθμός

λ: το μήκος κύματος της ακτινοβολίας

d: η απόσταση των δύο ατόμων

θ: ½ της γωνίας που σχηματίζει η περιθλώμενη με τη προσπίπτουσα δέσμη

#### 1.3.2.2. Ατομικός και δομικός παράγοντας σκέδασης

Το πλάτος του σκεδαζόμενου κύματος από ένα άτομο εξαρτάται από τη μορφή του ηλεκτρονικού νέφους και χαρακτηρίζεται από τον ατομικό παράγοντα σκέδασης (atomic scattering factor)[16]:

$$f_o = \int \rho(r)e^{2\pi i \mathbf{r} \cdot \mathbf{S}} \quad (9)$$

Όπου:

r: το διάνυσμα θέσης από το πυρήνα

ρ(r) : η συνάρτηση της ηλεκτρονικής πυκνότητας του ατόμου

Ο υπολογισμός αυτός του ατομικού παράγοντα σκέδασης προϋποθέτει τα άτομα σε ηρεμία. Στη πραγματικότητα όμως τα άτομα στη φύση εκτελούν ταλαντώσεις γύρω από μια

θέση ισορροπίας με πλάτος που εξαρτάται από τη θερμοκρασία. Η θερμική αυτή κίνηση των ατόμων μειώνει τον παράγοντα σκέδασης που υπολογίζεται από τη σχέση[24]:

$$f = f_0 e^{-\frac{B \sin^2 \theta}{\lambda}} \quad (10)$$

Όπου:

B: μια σταθερά που εξαρτάται από τη θερμοκρασία (B factor)(βλ. εξίσωση 25)

Ο παράγοντας σκέδασης από τη στοιχειώδη κυψελίδα ονομάζεται παράγοντας δομής (structure factor) και υπολογίζεται από τη σχέση[24]:

$$F = \sum_{j=1}^n f_j e^{2\pi i \mathbf{r}_j \cdot \mathbf{S}} \quad (11)$$

Όπου:

n: ο αριθμός των ατόμων στη στοιχειώδη κυψελίδα

$f_j$ : ο ατομικός παράγοντας σκέδασης για το άτομο j

#### 1.3.2.3. Η συνάρτηση ηλεκτρονιακής πυκνότητας

Η ηλεκτρονική πυκνότητα σαν τρισδιάστατη περιοδική συνάρτηση μπορεί να γραφεί σαν τρισδιάστατη σειρά Fourier [24]:

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V_c} \sum_h \sum_k \sum_l F e^{-2\pi i (hx + ky + lz)} \quad (12)$$

Όπου:

$V_c$ : όγκος της στοιχειώδους κυψελίδας

h, k, l: οι δείκτες Miller

$x, y, z$ : τα μοναδιαία διανύσματα στις τρεις διευθύνσεις

#### 1.3.2.4. Το πρόβλημα της φάσης - Μέθοδος μοριακής αντικατάστασης

Ο παράγοντας δομής είναι μιγαδικός αριθμός και μπορεί να γραφεί ως [24]:

$$F = A + iB \quad (13)$$

Όπου:

$$A = \sum_{j=1}^n f_j \cos(2\pi i \mathbf{r}_j \cdot \mathbf{S}) \quad (14)$$

$$B = \sum_{j=1}^n f_j \sin(2\pi i \mathbf{r}_j \cdot \mathbf{S}) \quad (15)$$

Το μέτρο του μιγαδικού αριθμού ισούται με:

$$|F| = \sqrt{A^2 + B^2} \quad (16)$$

Εναλλακτικά ο παράγοντας δομής γράφεται:

$$F = |F|e^{ia} \quad (17)$$

Όπου:

$$\alpha = \tan^{-1} \frac{B}{A} \quad (18)$$

η φάση της ανάκλασης.

Από τις πειραματικές μετρήσεις υπολογίζεται η ένταση της δέσμης  $I=c|F|$ , ενώ δεν υπάρχει πειραματικός τρόπος υπολογισμού της φάσης, που είναι απαραίτητη για τον υπολογισμό στη συνέχεια της ηλεκτρονιακής πυκνότητας από την εξίσωση (12)[24].

Μια μέθοδος προσδιορισμού της φάσης είναι η μοριακή αντικατάσταση (molecular replacement) σύμφωνα με την οποία εισάγεται ένα μοντέλο της δομής και συγκρίνονται οι παρατηρούμενες εντάσεις με τις φάσεις που υπολογίστηκαν από το μοντέλο [16][24]. Ο δείκτης αξιοπιστίας  $R$  ( $R$  factor) αποτελεί το μέτρο της ταύτισης του μοντέλου με τα πειραματικά αποτελέσματα και ορίζεται ως:

$$R = \frac{\sum_{hkl} (|F_o| - |F_c|)}{\sum_{hkl} |F_o|} \quad (19)$$

Όσο μικρότερος είναι ο δείκτης τόσο καλύτερη είναι η συμφωνία μεταξύ πειραματικών και υπολογιζόμενων από το μοντέλο εντάσεων για τις πρωτεΐνες οι τιμές του  $R$  κυμαίνονται από 0,3-0,15[24].

Συνοψίζοντας, για την εύρεση της δομής ενός κρυστάλλου, από το πείραμα τις περίθλασης ακτίνων  $X$  παρέχεται η πληροφορία για τις θέσεις των μεγίστων έντασης, από όπου υπολογίζονται μέσω του νόμου Bragg οι αποστάσεις των ατόμων και για τις τιμές της έντασης, από όπου υπολογίζεται το μέτρο του παράγοντα δομής. Στη συνέχεια με τη μέθοδο της μοριακής αντικατάστασης υπολογίζεται η φάση της ανάκλασης και ολοκληρώνεται η διαδικασία.

## 1.4. Συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων

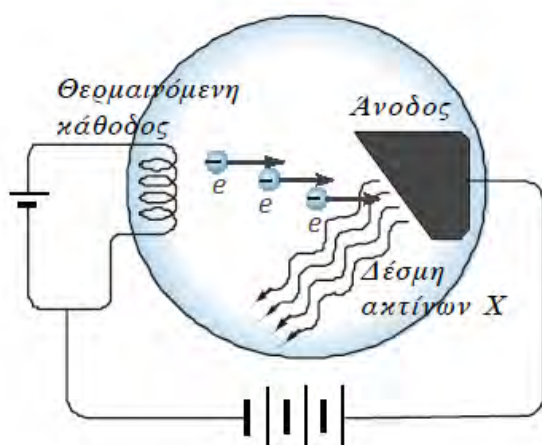
Η συλλογή δεδομένων αποτελεί το πειραματικό μέρος της κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ, και περιλαμβάνει την ακτινοβόληση του κρυστάλλου και την καταγραφή της περιθλώμενης ακτινοβολίας.

### 1.4.1. Πειραματική διάταξη

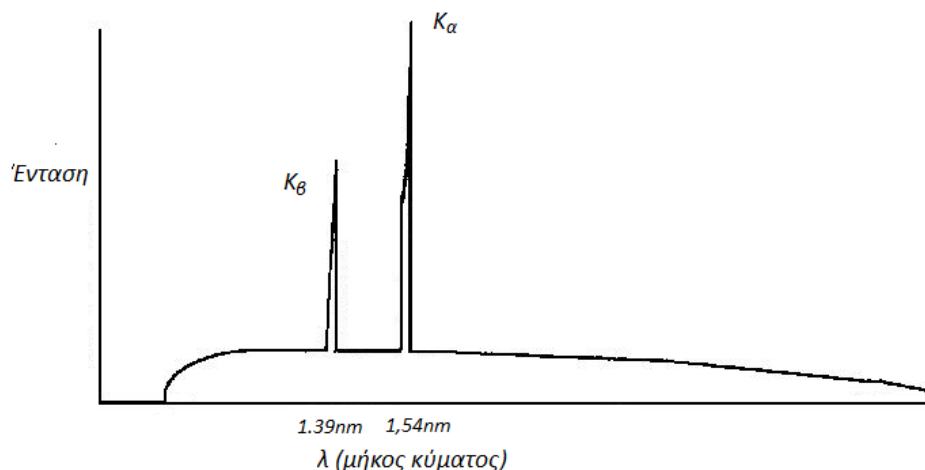
Τα βασικά μέρη της πειραματικής διάταξης είναι:

#### 1.4.1.1. Πηγή ακτίνων Χ

Η ακτινοβολία Χ που χρησιμοποιείται για τη κρυσταλλογραφική μελέτη των βιομορίων προέρχεται είτε από λυχνίες ακτίνων Χ, είτε από συγχροτρονικές πηγές. Η λυχνία ακτίνων Χ (εικόνα 16) είναι ένα ηλεκτρικό κύκλωμα που αποτελείται από μία θερμαινόμενη κάθοδο, απ' όπου εκπέμπονται ηλεκτρόνια, και μία μεταλλική άνοδο. Καθώς τα ηλεκτρόνια επιταχύνονται υπό την επίδραση της διαφοράς δυναμικού προσπίπτουν πάνω στην άνοδο, εκπέμποντας ένα συνεχές φάσμα ακτίνων Χ καθώς επιβραδύνονται αλλά και διεγείροντας τα άτομα της ανόδου, τα οποία στη συνέχεια αποδιεγείρονται προσφέροντας ένα, χαρακτηριστικό για το υλικό της ανόδου, γραμμικό φάσμα (εικόνα 17). Αυτή η σχεδόν μονοχρωματική ακτινοβολία χρησιμοποιείται για τα πειράματα της κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ [24].



Εικόνα 16 Σχηματική παράσταση της διάταξης της λυχνίας ακτίνων Χ



Εικόνα 17 Χαρακτηριστικό φάσμα εκπομπής ακτίνων Χ για το χαλκό.

Το Synchrotron είναι ένας τύπος κυκλικού επιταχυντή σωματιδίων, όπου χρησιμοποιούνται μαγνητικά πεδία για να στρέψουν και να επιταχύνουν τα φορτισμένα σωματίδια (ηλεκτρόνια ή ποζιτρόνια). Η συγχροτρονική ακτινοβολία εκπέμπεται λόγω επιτάχυνσης των φορτισμένων σωματιδίων και αποτελεί μια, σε μεγάλο βαθμό, εστιασμένη και μονοχρωματική δέσμη [21]. Οι πηγές συγχροτρονικής ακτινοβολίας αποτελούν μεγάλες εγκαταστάσεις με δακτυλίους επιτάχυνσης σωματιδίων από 10 έως μερικές εκατοντάδες μέτρα. Τα ηλεκτρόνια (ποζιτρόνια) διατηρούνται σε μία κυκλική τροχιά με τη βοήθεια ισχυρών μαγνητών. Υπάρχουν τέσσερις τύποι μαγνητικών πεδίων στους δακτυλίους αποθήκευσης σωματιδίων: οι μαγνήτες κλίσης, που αναγκάζουν τα σωματίδια να κινούνται σε κυκλική τροχιά και άλλες τρεις συσκευές, που επεκτείνουν και ενισχύουν το φάσμα σε μικρότερα μήκη κύματος χωρίς να προκαλούν καθαρή μετατόπιση από την κυκλική τροχιά π.χ. σύστημα μετατόπισης μήκους κύματος. Το κύριο πλεονέκτημα της συγχροτρονικής ακτινοβολίας είναι η έντασή της που είναι περίπου δύο τάξεις μεγέθους μεγαλύτερη από τις συμβατικές πηγές. Η ισχυρή ακτινοβολία χρησιμοποιείται για κρυσταλλικά δείγματα που περιθλούν ασθενώς, όπως μικροί κρύσταλλοι ή κρύσταλλοι με μεγάλη μοναδιαία κυψελίδα. Επίσης, λόγω της χαμηλής απόκλισης (divergence) της ακτίνας οι κηλίδες είναι πιο διακριτές (sharp). Μια άλλη διαφορά της συγχροτρονικής ακτινοβολίας από τις συμβατικές πηγές είναι η ρύθμιση του μήκους κύματος (tunability). Οποιοδήποτε μήκος κύματος από την περιοχή του υπέρυθρου μέχρι αυτή των ακτίνων Χ μπορεί να επιλεγεί. Αυτή η ιδιότητα χρησιμοποιείται σε πειράματα ανώμαλης σκέδασης από ακτίνες πολλαπλών μηκών κύματος. Συνήθως επιλέγονται ακτίνες Χ μήκους κύματος 1 Å ή ακόμα και μικρότερου μήκους κύματος με αποτέλεσμα τον περιορισμό της απορρόφησης κατά την πορεία της ακτίνας αλλά και εντός του κρυστάλλου, περιορίζοντας και την καταστροφή του κρυσταλλικού πλέγματος του κρυστάλλου [[25]]. Ο χρόνος ζωής των σωματιδίων στο δακτύλιο αποθήκευσης είναι περιορισμένος και εξαρτάται από πολλούς παράγοντες (τη χρήση, το είδος των σωματιδίων κ.α.). Όταν η ένταση της ακτινοβολίας φτάσει σε κάποιο ελάχιστο όριο γίνεται καινούργια ελευθέρωση σωματιδίων. Η πρόσβαση στις συγχροτρονικές ακτίνες Χ είναι πολύ σημαντική. Το μήκος κύματος των ακτίνων Χ είναι συγκρίσιμο με τις διατομικές αποστάσεις. Έτσι είναι δυνατή η περίθλαση ακτίνων Χ από δείγματα κρυστάλλων και οι δομές τους μπορούν να αναλυθούν σε ατομική κλίμακα. Αυτό φυσικά έχει σαν αποτέλεσμα η συμβολή της συγχροτρονικής ακτινοβολίας στην πρωτεύουσα κρυσταλλογραφία να είναι κεφαλαιώδης. Η συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων με περιστρεφόμενη ανοδική πηγή παλαιότερα,

απαιτούσε την έκθεση του κρυστάλλου στην ακτινοβολία για αρκετές ώρες ενώ σήμερα αρκούν λίγα μόλις λεπτά. Η δυνατότητα επιλογής του μήκους κύματος της ακτινοβολίας, συμβάλλει πολύ σημαντικά στην επίλυση του προβλήματος φάσης. Τα μικρά μήκη κύματος μειώνουν τόσο την απορρόφηση του κρυστάλλου, όσο και του αέρα, με αποτέλεσμα τη βελτιωμένη σχέση σήματος-θορύβου.

Ο προσδιορισμός της δομής μίας πρωτεΐνης (ή ενός μακρομορίου) με περίθλαση ακτίνων Χ απαιτεί την καταγραφή όλων (ή ένα μεγάλο ποσοστό) των σκεδαζόμενων ακτίνων. Για να επιτευχθεί αυτό πρέπει όλα τα κρυσταλλικά σημεία του ανάστροφου πλέγματος να βρεθούν σε κατάσταση περίθλασης, δηλαδή εντός σφαίρας ακτίνας  $1/\lambda$  (σφαίρα του Ewald, βλέπε 1.3.1.3), με περιστροφή του κρυστάλλου. Έτσι, ένα κρυσταλλογραφικό πείραμα απαιτεί τις ακόλουθες συσκευές:

#### 1.4.1.2. Γωνιόμετρο

Ο κρύσταλλος κατά τη διάρκεια της ακτινοβολήσης περιστρέφεται προκειμένου να καταγραφούν εικόνες περίθλασης από όλα τα κρυσταλλικά πλέγματα. Η συσκευή που περιστρέφει το κρύσταλλο ονομάζεται γωνιόμετρο.

#### 1.4.1.3. Ανιχνευτής

Ο ανιχνευτής είναι η συσκευή που καταγράφει την ένταση και τη θέση των περιθλώμενων ακτίνων και μετατρέπει τη πληροφορία αυτή σε ψηφιακή μορφή. Τις τελευταίες δεκαετίες η συλλογή των δεδομένων έχει βελτιωθεί σημαντικά. Αρχικά η καταγραφή γινόταν σε φωτογραφικό φιλμ, ενώ σήμερα γίνεται με συστήματα που μπορούν αυτόματα να μετατρέπουν το σήμα σε ψηφιακή μορφή, αμέσως μετά την έκθεση του κρυστάλλου.

Οι ανιχνευτές τύπου image plates είναι κατασκευασμένοι από ένα στρώμα φθορίζοντος υλικού. Τα φωτόνια των περιθλώμενων ακτίνων Χ προκαλούν μετάπτωση των ηλεκτρονίων του υλικού σε υψηλότερες ενεργειακές στοιβάδες. Μέρος της ενέργειας αυτής χάνεται ως φθορισμός, ενώ μία ποσότητα ενέργειας παγιδεύεται για να ελευθερωθεί μετά από έκθεση σε laser. Συνήθως κόκκινο laser ανιχνεύει την επιφάνεια και ελευθερώνεται μπλε laser, το οποίο και μετράται με φωτοπολλαπλασιαστή. Η ένταση αυτή είναι ανάλογη των φωτονίων που αρχικά πρόσβαλλαν το υλικό. Η καταγραφή αυτή διαρκεί μερικά λεπτά ενώ η ευαισθησία είναι περίπου 10 φορές μεγαλύτερη από αυτή των φωτογραφικών φιλμ.

Οι ανιχνευτές πεδιάς (area detectors) (παρόλο που το φωτογραφικό φιλμ και οι τύπου image plate ανιχνευτές ανιχνεύουν περιοχή, ο όρος χρησιμοποιείται για ηλεκτρονικές συσκευές) αποτελούν ηλεκτρονικές συσκευές που ανιχνεύουν φωτόνια σε μία επιφάνεια και η επεξεργασία του σήματος γίνεται αμέσως μετά την ανίχνευση φωτονίων. Η βασική διαφορά είναι ότι οι ανιχνευτές πεδιάς μπορούν να καταγράφουν ταλάντωση  $0.1^\circ$  δίνοντας την τρισδιάστατη εικόνα της κηλίδας, αντίθετα από το φιλμ και τους image plate ανιχνευτές που καταγράφουν πολύ μεγαλύτερη ταλάντωση. Οι ανιχνευτές αυτοί στηρίζονται στην τεχνολογία του θαλάμου ιονισμού αερίων, πολλαπλασιαστή εικόνας (image intensifier) συνδεδεμένο με σύστημα video ή CCD (charge coupled device).

#### 1.4.1.4. Ψυκτική συσκευή αζώτου

Κατά την ακτινοβόληση με ακτίνες Χ ο κρύσταλλος υφίσταται φθορές καθώς δημιουργούνται ελεύθερες ρίζες οι οποίες διαχέονται μέσα στο κρυσταλλικό πλέγμα καταστρέφοντας τους δεσμούς μεταξύ των ατόμων [26]. Προκειμένου να περιοριστούν οι φθορές στο κρύσταλλο λόγω ακτινοβολίας, η συλλογή δεδομένων πραγματοποιείται σε χαμηλή θερμοκρασία (100K) η οποία διατηρείται με συνεχή ροή αέριου αζώτου. Η χρήση κρυοπροστατευτικού μέσου (MPD, Ethylene Glycol, Glucose, Glycerol, PEG400/600 κ.α.) είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της πλεγματικής διάταξης του κρυστάλλου και για να αποτραπεί ο σχηματισμός πάγου, ο οποίος επιφέρει φθορά στο κρύσταλλο και προκαλεί επιπλέον θόρυβο στα κρυσταλλογραφικά δεδομένα (ice rings) [27].

#### 1.4.2. Ποιότητα κρυσταλλογραφικών δεδομένων

Η ποιότητα της εικόνας περίθλασης εξαρτάται τόσο από την ποιότητα του κρυστάλλου όσο και από τη διαδικασία της συλλογής των κρυσταλλογραφικών δεδομένων. Οι γεωμετρικοί παράγοντες που υπεισέρχονται στη διαδικασία αυτή προκύπτουν από τη συμμετρία του κρυστάλλου και περιλαμβάνουν την απόσταση του κρυστάλλου από τον ανιχνευτή, τη μέθοδο και το εύρος περιστροφής του κατά τη διάρκεια του πειράματος και την απόκλιση της δέσμης. Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν τη ποιότητα των δεδομένων είναι το εύρος ανίχνευσης του ανιχνευτή και ο χρόνος έκθεσης του κρυστάλλου στην ακτινοβολία: όσο μεγαλύτερος ο χρόνος έκθεσης, τόσο αυξάνεται ο λόγος του σήματος προς το θόρυβο και βελτιώνεται η ποιότητα των δεδομένων.

## 1.5. Επεξεργασία Κρυσταλλογραφικών Δεδομένων

Αφού πραγματοποιηθεί η συλλογή του πακέτου δεδομένων, η κάθε εικόνα περίθλαση μετατρέπεται με χρήση κατάλληλου λογισμικού (Mosfilm) σε μία λίστα από δείκτες Miller (h,k,l) με τις αντίστοιχες εντάσεις και τα σφάλματα των εντάσεων. Το επόμενο βήμα είναι ο συνδυασμός των εικόνων και η συγχώνευση των ισοδύναμων ανακλάσεων (scaling)[29]. Το αποτέλεσμα αυτής της επεξεργασίας είναι ένα αρχείο τύπου .mtz που αποτελεί τον χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας.

### 1.5.1. Η μέθοδος της μοριακής αντικατάστασης (Molecular Replacement)

Η Μοριακή Αντικατάσταση είναι μια μέθοδος προσδιορισμού της δομής μιας πρωτεΐνης σε αναφορά με ένα παρόμοιο μόριο του οποίου η δομή είναι ήδη γνωστή. Η περίπτωση αυτή είναι αρκετά διαδεδομένη καθώς πολλές φορές μελετώνται διαφορετικές ή μεταλλαγμένες μορφές μιας πρωτεΐνης με γνωστή δομή ή σύμπλοκά της με άλλα μόρια. Το πρόβλημα που πρέπει να αντιμετωπιστεί είναι το λεγόμενο πρόβλημα φάσης, ο προσδιορισμός δηλαδή της διάταξης των πρωτεϊνικών μορίων μέσα στη θεμελιώδη κυψελίδα. Για το λόγο αυτό αναζητάται η βέλτιστη θέση και προσανατολισμός του μορίου αναφοράς στη θεμελιώδη κυψελίδα του υπό μελέτη μορίου[21].

#### *Αναζήτηση προσανατολισμού*

Προκειμένου να βρεθεί ο βέλτιστος προσανατολισμός του πρωτεϊνικού μορίου αναφοράς χρησιμοποιείται η συνάρτηση συσχέτισης περιστροφής R[21]:

$$R(\theta_1, \theta_2, \theta_3) = \int_{all\ space} P_r(\mathbf{M}(\theta_1, \theta_2, \theta_3) \cdot \mathbf{u}) P_t(\mathbf{u}) dV \quad (20)$$

Όπου:

$\theta_1, \theta_2, \theta_3$  : τρεις γωνίες περιστροφής

M: είναι ένας τελεστής στροφής που στρέφει το διάνυσμα  $\mathbf{u}$  υπό γωνίες  $\theta_1, \theta_2, \theta_3$

$P_r, P_t$  : οι συναρτήσεις Patterson για το μόριο αναφοράς (reference) και το υπό μελέτη μόριο (target) αντίστοιχα, που γενικά ορίζονται ως:

$$P(\mathbf{u}) = \frac{1}{V} \sum_{\mathbf{h}} F^2(\mathbf{h}) e^{-2\pi i \mathbf{h} \cdot \mathbf{u}} \quad (21)$$

Όπου:

F: ο παράγοντας δομής του μορίου



**h**: το διάνυσμα με συντεταγμένες τους δείκτες Miller  $h$ ,  $k$ ,  $l$

**u**: το διάνυσμα θέσης (χρησιμοποιείται το γράμμα  $u$  για να μη συγχέεται η συνάρτηση Patterson με τη συνάρτηση ηλεκτρονιακής πυκνότητας όπου χρησιμοποιείται το γράμμα  $x$ )

Η συνάρτηση συσχέτισης περιστροφής  $R$  υπολογίζεται για όλες τις δυνατές διευθύνσεις που χαρακτηρίζονται από τις γωνίες  $\theta_1$ ,  $\theta_2$ ,  $\theta_3$ . Η μέγιστη τιμή της  $R$  αντιστοιχεί στο προσανατολισμό εκείνο του μορίου αναφοράς που συμφωνεί με τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα. Συγκεκριμένα για αυτόν το προσανατολισμό, οι κορυφές της συνάρτησης Patterson του μορίου αναφοράς, συμπίπτουν με τις αντίστοιχες του υπό μελέτη μορίου.

### *Αναζήτηση θέσης*

Για τον υπολογισμό της βέλτιστης θέσης του μορίου αναφοράς χρησιμοποιείται η συνάρτηση συσχέτισης θέσης  $T$ . Εάν υποθέσουμε ότι στη θεμελιώδη κυψελίδα υπάρχουν μόνο δύο μόρια της πρωτεΐνης τότε ο παράγοντας δομής του κρυστάλλου ισούται με το άθροισμα των παραγόντων δομής των δύο μορίων:

$$F(\mathbf{h}) = F_1(\mathbf{h}) + F_2(\mathbf{h}) \quad (22)$$

Και η συνάρτηση συσχέτισης θέσης θα ισούται με [21]:

$$T(\mathbf{x}_1, \mathbf{x}_2) = \sum |F_{obs}(\mathbf{h})|^2 F_1(\mathbf{h}) F_2^*(\mathbf{h}) e^{2\pi i \mathbf{h} \cdot (\mathbf{x}_1 - \mathbf{x}_2)} \quad (23)$$

Όπου:

$F_{obs}$  : ο παράγοντας δομής του υπό μελέτη μορίου

$F_1$  : ο παράγοντας δομής του ενός μορίου της θεμελιώδους κυψελίδας του μορίου αναφοράς

$F_2^*$  : ο συζυγής του παράγοντας δομής του δεύτερου μορίου της θεμελιώδους κυψελίδας του μορίου αναφοράς

$\mathbf{x}_1, \mathbf{x}_2$  : τα διανύσματα θέσης των δύο μορίων της θεμελιώδους κυψελίδας του υπό μελέτη μορίου

Συμπερασματικά, το μοντέλο στρέφεται και μεταφέρεται στον χώρο έτσι ώστε τα μέτρα των δομικών παραγόντων  $|F_c(hkl)|$ , να πλησιάζουν αυτά των πειραματικών  $|F_o(hkl)|$ . Η μέθοδος αυτή καλείται μοριακή αντικατάσταση. Μέτρο σύγκρισης της ταύτισης του μοντέλου με τα πειραματικά αποτελέσματα αποτελεί ο κρυσταλλογραφικός δείκτης αξιοπιστίας που ορίζεται ως:

$$R = \frac{\sum_{hkl} (|F_o(hkl)| - |F_c(hkl)|)}{\sum_{hkl} (|F_o(hkl)|)} \quad (24)$$

όπου ειδικά για την κρυσταλλογραφία μακρομορίων ένα μοντέλο με δείκτη αξιοπιστίας  $R=0.2-0.3$  είναι αξιόπιστο. Επίσης, ένας άλλος δείκτης της ποιότητας του μοντέλου (πιο αξιόπιστος σε σύγκριση με τον πιο πάνω) αποτελεί ο  $R_{\text{free}}$  που αντιστοιχεί στον κρυσταλλογραφικό δείκτη αξιοπιστίας  $R$  για ένα 5% ανακλάσεων που δεν έχουν συμπεριληφθεί στη βελτιστοποίηση.

### 1.5.2. Βελτιστοποίηση (Refinement)

Η μέθοδος της μοριακής αντικατάστασης προσφέρει ένα δομικό μοντέλο της υπό μελέτη πρωτεΐνης. Αυτό το μοντέλο περιέχει σφάλματα που οφείλονται στις δομικές διαφορές ανάμεσα στο υπό μελέτη και στο μόριο αναφοράς αλλά και στο πειραματικό θόρυβο του χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας [21]. Το αρχικό αυτό δομικό μοντέλο μπορεί να βελτιωθεί με τη διαδικασία που ονομάζεται βελτιστοποίηση (refinement), σύμφωνα με την οποία το αρχικό μοντέλο μεταβάλλεται συστηματικά ούτως ώστε να επιτευχθεί η καλύτερη συμφωνία του με τα πειραματικά δεδομένα. Ο παράγοντας που χρησιμοποιείται συχνότερα για την παρακολούθηση και την αξιολόγηση της διαδικασίας βελτιστοποίησης είναι ο δείκτης αξιοπιστίας  $R$  της εξίσωσης 24.

Καθώς η εξελίσσεται η διαδικασία βελτιστοποίησης το μοντέλο βελτιώνεται και δείκτης  $R$  μειώνεται. Συγκεκριμένα σε κάθε κύκλο βελτιστοποίησης η διαδικασία που ακολουθείται για μια παράμετρο  $p_i$  και τη διαφορά  $\Delta p_i = p_{\text{icad}} - p_{\text{icobs}}$  είναι η εξής:

- Υπολογισμός της νέας τιμής της παραμέτρου  $p_{i,\text{new}} = p_i + \Delta p_i$
- Ελαχιστοποίηση της τιμής  $\Delta p_{i,\text{new}}$  χρησιμοποιώντας τις τιμές  $p_{i,\text{new}}$
- Επιστροφή στο πρώτο βήμα

Βελτιστοποίηση μοριακού μοντέλου είναι λοιπόν, η διαδικασία προσαρμογής του μοντέλου (δηλ. των συντεταγμένων  $x, y, z$  για κάθε άτομο της ασύμμετρης μονάδας) έτσι ώστε οι πειραματικοί και οι υπολογιζόμενοι (χρησιμοποιώντας το μοντέλο) δομικοί παράγοντες να βρίσκονται σε όσο καλύτερη συμφωνία γίνεται. Οι παράμετροι που συνήθως βελτιστοποιούνται είναι οι συντεταγμένες των ατόμων του μορίου ( $x, y, z$ ), αλλά και οι παράγοντες θερμικής κίνησης του κάθε ατόμου ( $B$  factor). Εδώ να αναφερθεί ότι θερμικός παράγοντας ( $B$ , temperature factor ή παράγοντας Debye-Waller) αποτελεί μέτρο της ταλάντωσης των ατόμων και επηρεάζει το μέγεθος του νέφους ηλεκτρονιακής πυκνότητας γύρω από κάθε πυρήνα ατόμου λόγω της επίδρασης του στον ατομικό παράγοντα σκέδασης. Ορίζεται ως:

$$B = 8\pi^2 \langle u^2 \rangle \quad (25)$$

όπου  $\langle u^2 \rangle$  αντιστοιχεί στο τετράγωνο της μέσης τιμής του εύρους ταλάντωσης, όταν υποθέσουμε ότι έχουμε ισότροπη και αρμονική δόνηση ατόμων (π.χ. για  $B=30\text{\AA}^2$ ,  $\langle u^2 \rangle = \sqrt{30/8\pi^2} = 0.62\text{\AA}$ , δίνει μια αίσθηση της ταλάντωσης των ατόμων). Στην περίπτωση προσδιορισμού της δομής των πρωτεϊνών είναι σύνηθες να δουλεύουμε με ισότροπους θερμικούς παράγοντες για το κάθε άτομο λόγω της μικρής ευκρίνειας των αποτελεσμάτων. Υπάρχουν τέσσερις παράμετροι που πρέπει να προσδιορισθούν για κάθε άτομο:  $x, y, z$  και

B. Μια πρωτεΐνη με 2000 άτομα στην ασύμμετρη μονάδα έχει 8000 άγνωστες παραμέτρους που πρέπει να προσδιοριστούν. Σ' αυτή την περίπτωση για την απόδοση μια αξιόπιστης δομής πρέπει τα δεδομένα (εντάσεις ανακλάσεων) να είναι περίπου ίσα με τον αριθμό των παραμέτρων. Επίσης μια μέση τιμή B που κυμαίνεται από μερικά  $\text{\AA}^2$  μέχρι  $30\text{\AA}^2$  αντιστοιχεί σε μια καλά οργανωμένη πρωτεϊνική δομή.

Η μέθοδος βελτιστοποίησης του μοντέλου με ελάχιστα τετράγωνα αποτελεί μια βελτιστοποίηση στον ανάστροφο χώρο (reciprocal-space refinement), αφού οι υπολογισμοί γίνονται μεταξύ πειραματικών και θεωρητικών πλατών δομικών παραγόντων (δηλ. στοιχεία του ανάστροφου χώρου) και όχι με την εξέταση του χάρτη πυκνότητας και του μοντέλου (πραγματικός χώρος) [28].

Σε μια απλή μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων σε δυο διαστάσεις, στόχος είναι να βρεθεί μια συνάρτηση  $\psi=f(x)$  που να περιγράφει μια σειρά πειραματικών δεδομένων  $(x_1, \psi_1), (x_2, \psi_2), (x_3, \psi_3), \dots (x_i, \psi_i)$ . Η λύση στο πρόβλημα είναι μια συνάρτηση  $\psi=f(x)$  για την οποία το άθροισμα των τετράγωνων των αποστάσεων των δεδομένων και της ίδιας της συνάρτησης να είναι η ελάχιστη δυνατή. Με άλλα λόγια η  $\psi=f(x)$  είναι η συνάρτηση που ελαχιστοποιεί το D, που αποτελεί το άθροισμα των διαφορών των πειραματικών και θεωρητικών τιμών.

Στην περίπτωση της κρυσταλλογραφικής βελτιστοποίησης προσπαθούμε να ελαχιστοποιήσουμε την συνάρτηση Φ που ισούται με,

$$\Phi = \sum_{hkl} (|F_o| - |F_c|)^2 \quad (26)$$

η οποία αποτελεί άθροισμα των τετραγώνων των διαφορών των πειραματικών και θεωρητικών πλατών δομικών παραγόντων (όπου w ένας παράγοντας που εμπεριέχει την αξιοπιστία της κάθε μέτρησης έτσι ώστε να λαμβάνονται υπόψη σε μεγαλύτερο βαθμό τα πιο αξιόπιστα δεδομένα).

Η πολυπλοκότητα όμως των πρωτεϊνικών μορίων, και περιορισμένη ευκρίνεια (resolution) των κρυσταλλογραφικών δεδομένων καθιστούν απαραίτητη την ύπαρξη ορισμένων περιορισμών προκειμένου να πραγματοποιηθούν οι υπολογισμοί για τις χιλιάδες παραμέτρους που εμπλέκονται στη διαδικασία της βελτιστοποίησης. Οι περιορισμοί αυτοί αφορούν στις χημικές δομές των πρωτεϊνικών μορίων (μήκη και γωνίες δεσμών) είναι διαθέσιμοι στη βιβλιογραφία και προκύπτουν από υψηλής ευκρίνειας κρυσταλλογραφικά δεδομένα αμινοξέων και πεπτιδίων αλλά και από φασματοσκοπικές και θεωρητικές μελέτες [21]. Έτσι εκτός από το δείκτη αξιοπιστίας R που αφορά στο παράγοντα δομής, και άλλοι δείκτες μπορούν να ελαχιστοποιηθούν στη διάρκεια της βελτιστοποίησης όπως για παράδειγμα ο δείκτης  $R_{bonds}$  που αφορά στο μήκος των δεσμών:

$$R_{bonds} = \sum_{i=1}^{\# bonds} \left( \frac{b_{i,obs} - b_{i,std}}{\sigma_{bond,i}} \right)^2 \quad (27)$$

Όπου:

$b_{i,obs}$  : το μήκος του δεσμού i στο μοντέλο

$b_{i,std}$  : το μήκος του δεσμού i που αναφέρεται στη βιβλιογραφία

$\sigma_{bond,i}$  : το στατιστικό βάρος που πόσο σημαντικός είναι ο συγκεκριμένος περιορισμός για τη διαδικασία βελτιστοποίησης

#### 1.5.2.1. Προσομοιωμένη ανόπτηση

Η μέθοδος της προσομοιωμένης ανόπτησης (simulated annealing) χρησιμοποιείται στις κρυσταλλογραφικές μελέτες, όταν το αρχικό μοντέλο είναι πολύ διαφορετικό από το βέλτιστο. Στη περίπτωση αυτή η διαδικασία της βελτιστοποίησης, ελαχιστοποιώντας τις προαναφερθείσες παραμέτρους, καταλήγει σε τοπικά ελάχιστα αντί των ορθών ολικών ελαχίστων. Με τη προσέγγιση της προσομοιωμένης ανόπτησης, επιτρέπονται στα άτομα θερμικές κινήσεις μεγάλου πλάτους ταλάντωσης, ενώ ταυτόχρονα ελέγχονται οι γεωμετρικοί περιορισμοί κάθε διαμόρφωσης. Με τον τρόπο αυτό ο δείκτης  $R$  αυξάνεται προσωρινά, ξεπερνά όμως στη συνέχεια τα τοπικά ελάχιστα καταλήγοντας στο ολικό ελάχιστο, το οποίο αντιστοιχεί στη βέλτιστη μορφή του μορίου[21].

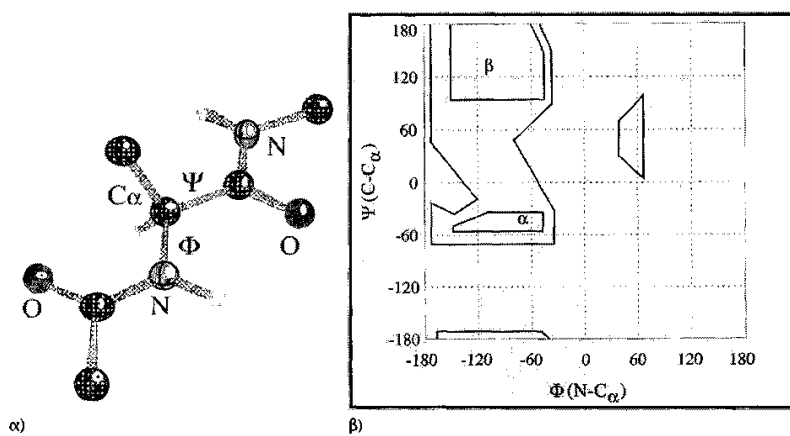
#### 1.5.2.2. Έλεγχος βελτιστοποίησης

Οι ισχυρές μέθοδοι βελτιστοποίησης όπως η προσομοιωμένη ανόπτηση είναι δυνατό να οδηγήσουν σε εξωπραγματικά χαμηλές τιμές του δείκτη αξιοπιστίας  $R$  καταστρέφοντας το μοντέλο. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται το δείκτης  $R_{free}$ , ο οποίος αντιστοιχεί σε ένα μικρό τμήμα (5%) των κρυσταλλογραφικών δεδομένων[21], το οποίο διαχωρίζεται ήδη από την αρχική επεξεργασία τους (scaling)[29]. Καθώς η διαδικασία της βελτιστοποίησης προχωρά, ο δείκτης αξιοπιστίας  $R$ , που αντιστοιχεί στο 95% των δεδομένων, μειώνεται, αλλά στη περίπτωση που το μοντέλο πραγματικά βελτιώνεται θα πρέπει ταυτόχρονα να μειώνεται και δείκτης  $R_{free}$ , ενώ η διαφορά  $R - R_{free}$  θα πρέπει να είναι μικρότερη από 0,1[21].

#### 1.5.2.3. Έλεγχος δομικού μοντέλου

Μετά την βελτιστοποίηση του δομικού μοντέλου, είναι απαραίτητος ο έλεγχος αυτού έτσι ώστε να αποφευχθούν λάθη στην ερμηνεία της ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Η εκτίμηση μπορεί να γίνει με προσεκτικό έλεγχο του μοντέλου και της ηλεκτρονιακής πυκνότητάς του αλλά και την εξαγωγή διαφόρων στατιστικών παραμέτρων και διαγραμμάτων που βοηθούν στην αξιολόγηση του μοντέλου. Εκτός από την ορθότητα της ερμηνείας της ηλεκτρονιακής πυκνότητας πρέπει τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά του μοντέλου (γωνίες, μήκη δεσμών) να μην αποκλίνουν από αυτές των μικρών μορίων αλλά και αυτές των βάσεων δεδομένων, όπως επίσης και τα στερεοχημικά χαρακτηριστικά του να είναι ελεγμένα (πεπτιδικοί δεσμοί, διέδρες γωνίες πλευρικών ομάδων και στερεοχημική παρεμπόδιση). Η στερεοχημεία της κύριας αλυσίδας πρωτεϊνικού μορίου μπορεί να διερευνηθεί με το διάγραμμα Ramachandran, στο οποίο οι διέδρες γωνίες  $\phi$  και  $\psi$  για κάθε κατάλοιπο καταχωρούνται σε διάγραμμα όπως αυτό που φαίνεται στην εικόνα 18. Ο G.N. Ramachandran παρατήρησε ότι τα αμινοξέα στην πολυπεπτιδική αλυσίδα δεν μπορούν να έχουν οποιοδήποτε ζεύγος  $\phi$  και  $\psi$ . Μερικοί συνδυασμοί δεν είναι δυνατοί λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης. Στην περίπτωση που εξαχθεί το διάγραμμα για κάποιο μοντέλο πρέπει όλα τα κατάλοιπα να βρίσκονται σε περιοχές που είναι επιτρεπτές,

διαφορετικά το μοντέλο πρέπει να επανεξεταστεί για τα κατάλοιπα που παρουσιάζουν λάθος στερεοχημεία.



Εικόνα 18 Διάγραμμα Ramachandran α) Ορισμός των  $\Phi$  (C $\alpha$ -N) και  $\Psi$  (C $\alpha$ -C) διεδρων γωνιών και β) το διάγραμμα Ramachandran για κατάλοιπα εκτός γλυκίνης (περιοχή χωρίς γράμμα) ενώ η περιοχή α: δεξιόστροφη α-έλικα και η περιοχή β: αντιπαράλληλη-παράλληλη πτυχωτή επιφάνεια.

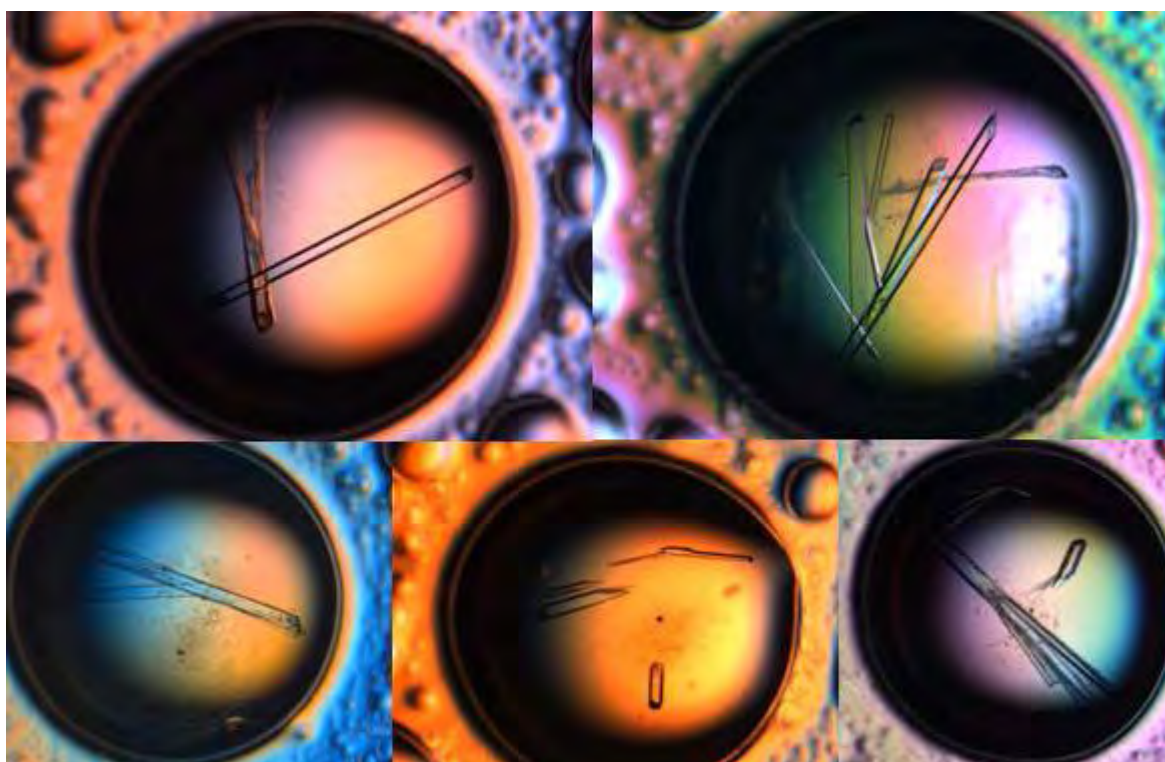
## 2. Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της δομής των λεκτινών SSR1 και SSR2, οι οποίες αποτελούν μεταλλαγμένες μορφές της Sclerotium Rolfsii Lectin (SRL) και της σύνδεσής του με το σάκχαρο N-Acetyl-D-Glucosamine. Συγκεκριμένα εκτός από τον προσδιορισμό της δομής των SSR1 και SSR2, μελετήθηκε η επίδραση των μεταλλάξεών τους στην αρχική δομή της SRL και στην αναγνώριση του σακχάρου N-Acetyl-D-Glucosamine.

### 3. Υλικά και μέθοδοι

#### 3.1.Κρυστάλλωση SSR1 και SSR2

Οι δύο πρωτεΐνες κρυσταλλώθηκαν στις ίδιες ακριβώς συνθήκες που περιγράφονται παρακάτω: Οι πρωτεΐνες σε λυοφιλιωμένη μορφή διαλύθηκαν σε διάλυμα TRIS 5mM (pH 8.5) για τελική συγκέντρωση 16mg/ml. Οι SSR1 και SSR2 κρυσταλλώθηκαν με τη τεχνική της κρεμάμενης σταγόνας. Στο φρεάτιο τοποθετήθηκαν 700μl διαλύματος 20%MPD ενώ η σταγόνα αποτελούνταν από 2μl πρωτεϊνικού διαλύματος και 1μl μητρικού διαλύματος. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε αποστειρωμένο χώρο σε θερμοκρασία 16°C. Η τελική συγκέντρωση της πρωτεΐνης στη σταγόνα ήταν 10,6mg/ml. Οι κρύσταλλοι αναπτύχθηκαν στους 16°C μετά από 3 έως 4 μέρες (εικόνα 19).



Εικόνα 19 Κρύσταλλοι μέσα στη σταγόνα των SSR1 και SSR2

#### 3.2.Προετοιμασία διαλύματος N-Acetyl-D-Glucosamine

Το σάκχαρο N-Acetyl-D-Glucosamine βρισκόταν σε διάλυμα 100mM, 10%PEG 4000, 20% isopropanol. Αραιώθηκε στα 30mM με διάλυμα 20% MPD. Στη συνέχεια ρυθμίστηκε το pH του διαλύματος με NaOH στο 7.0, ογκομετρήθηκε με πιπέτα και συμπληρώθηκε διάλυμα 20%MPD για τελική συγκέντρωση του σακχάρου 20mM.

### 3.3. Συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων

Για τη συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το περιθλασίμετρο Oxford Diffraction Super Nova (εικόνα 20) του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών. Το περιθλασίμετρο αποτελείται από τα εξής μέρη[30]:

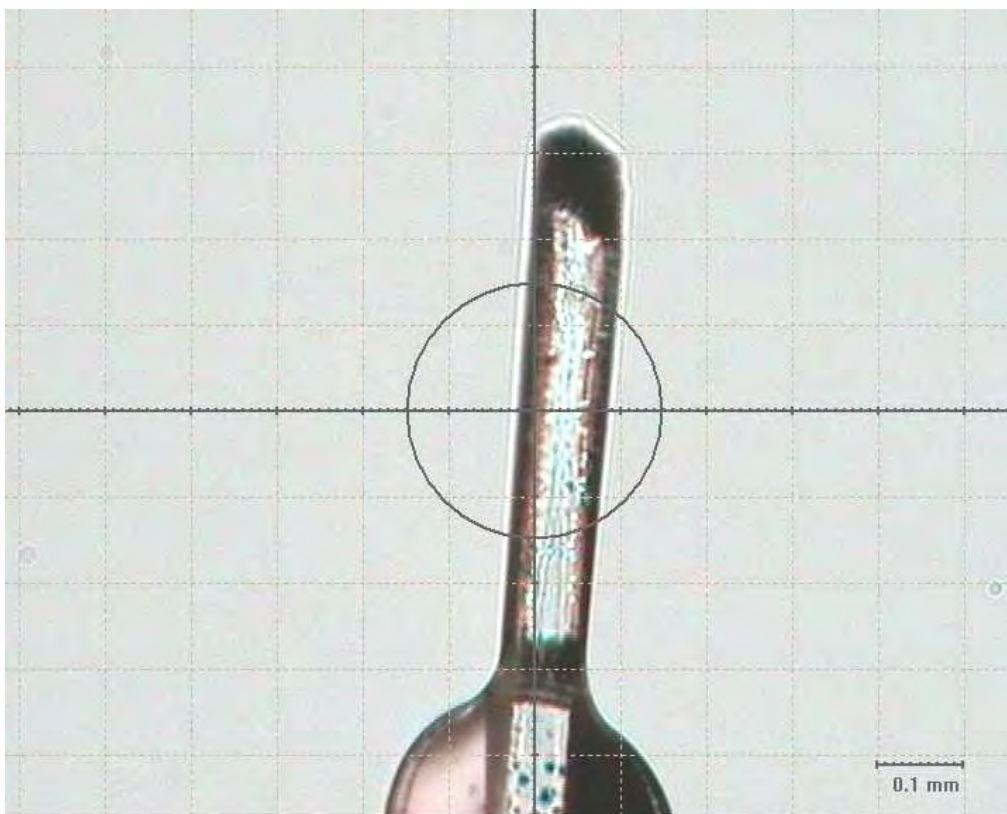
- Τη πηγή ακτίνων Χ, με εξερχόμενη δέσμη τη χαρακτηριστική κορυφή Κα ( $\lambda=1,54178\text{\AA}$ ) του χαλκού
- Τον ανιχνευτή CCD Atlas με εύρος ανίχνευσης 135mm
- Το γωνιόμετρο (4-circle kappa goniometer)
- Τη ψυκτική συσκευή υγρού αζώτου
- Το λογισμικό CrisAlis<sup>Pro</sup>, ορισμένες από τις εφαρμογές του οποίου είναι η αξιολόγηση του κρυστάλλου σε προπείραματικό στάδιο, ο υπολογισμός της στοιχειώδους κυψελίδας και της ομάδας χώρου, η πρόταση στρατηγικών για τη συλλογή δεδομένων, καθώς και η μετατροπή και επεξεργασία τους για τη δημιουργία ενός τελικού αρχείου τύπου .mtz .



Εικόνα 20 Oxford Diffraction Super Nova diffractionmeter

Συνολικά συλλέχθηκαν τέσσερα πακέτα κρυσταλλογραφικών δεδομένων, τα οποία αφορούν τις δομές των SSR1 και SSR2 καθώς και των συμπλόκων τους με το σάκχαρο N-Acetyl-D-Glucosamine. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 100K με χρήση κρυοπροστατευτικού διαλύματος 25%MPD. Οι κρύσταλλοι στερεώθηκαν σε ένα βρόγχο (loop) και, αφού εμβαπτίστηκαν για 1s σε σταγόνα του κρυοπροστατευτικού διαλύματος, τοποθετήθηκαν στο γωνιόμετρο (εικόνα 21).





Εικόνα 21 Κρύσταλλος της SSR1 τοποθετημένος στο γωνιόμετρο πριν την ακτινοβολήσή του

### 3.3.1. Σύμπλοκο SSR1 - N-Acetyl-D-Glucosamine

Προκειμένου να εμβαπτιστεί ο κρύσταλλος στο διάλυμα του N-Acetyl-D-Glucosamine, προστέθηκε στη σταγόνα 1 μl του διαλύματος του σακχάρου με πιπέτα και στη συνέχεια αναδεύτηκε αντλώντας και εκχέοντας το διάλυμα με τη πιπέτα 3 έως 4 φορές. Μετά από 2h απομακρύνθηκε ο κρύσταλλος, τοποθετήθηκε στη θυλιά για τη συλλογή δεδομένων.

### 3.3.2. Σύμπλοκο SSR2 - N-Acetyl-D-Glucosamine

Η διαδικασία εμβάπτισης του κρυστάλλου της SSR2 στο διάλυμα του σακχάρου είναι πανομοιότυπη με αυτή που περιγράφηκε παραπάνω για την SSR1 και διήρκεσε 4h και 15min.

## 3.4. Επεξεργασία κρυσταλλογραφικών δεδομένων

Η επεξεργασία των κρυσταλλογραφικών δεδομένων έγινε με το λογισμικό ChrisAlis<sup>Pro</sup> ενώ το scaling έγινε με το πρόγραμμα SCALA του CCP4i.

### 3.4.1. Υπολογισμός του αριθμού των μορίων στην ασύμμετρη μονάδα

Σύμφωνα με τον B. W. Matthews [31] ο αριθμός των πρωτεϊνικών μορίων στην ασύμμετρη μονάδα υπολογίζεται σε σχέση με τη περιεκτικότητα του κρυστάλλου σε διαλύτη, η οποία θα πρέπει να αντιστοιχεί περίπου σε 50%. Το πρόγραμμα Matthews-Cell content analysis του CCP4i, με δεδομένο το αρχείο scala.mtz που προέκυψε από το scaling και τον αριθμό των αμινοξέων της πρωτεϊνικής αλληλουχίας, υπολογίζει τη περιεκτικότητα του κρυστάλλου σε διαλύτη, για ακέραιες τιμές του αριθμού των μορίων στην ασύμμετρη μονάδα, παραθέτοντας παράλληλα την πιθανότητα η κάθε τιμή να είναι αληθής. Για την SSR1 και SSR2 υπολογίστηκε ότι η ασύμμετρη μονάδα περιέχει δύο πρωτεϊνικά μόρια με πιθανότητα 98%.

### 3.4.2. Η λύση της δομής των SSR1 και SSR2

Η δομές των SSR1 και SSR2 προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο της Μοριακής Αντικατάστασης με μόριο αναφοράς την SRL. Το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε για αυτό το σκοπό ήταν το Phaser-MR-simpleGUI του προγράμματος phenix. Προκειμένου να εκτελεστεί ο αλγόριθμος της μοριακής αντικατάστασης απαιτούνται ένα αρχείο κρυσταλλογραφικών δεδομένων για το υπό μελέτη μόριο και συγκεκριμένα το scala.mtz και ένα αρχείο δομής (.pdb) του μορίου αναφοράς χωρίς συνδέτες και μόρια νερού. Πρέπει επίσης να καθοριστεί η ποσοστιαία τιμή της ταύτισης των αλληλουχιών των δύο μορίων. Καθώς η αλληλουχία των SRL, SSR1, και SSR2 είναι γνωστή (πίνακας 1) για την SSR1 η παράμετρος αυτή αντιστοιχεί σε 98% και για την SSR2 σε 96%. Τέλος προστέθηκε το συνολικό μοριακό βάρος της ασύμμετρης μονάδας, που όπως αποδείχθηκε (βλ. 3.4.1) περιέχει δύο πρωτεϊνικά μόρια, με 141 αμινοξέα το κάθε ένα. Έτσι το συνολικό μοριακό βάρος αντιστοιχεί σε 31kDa με 110Da το μέσο μοριακό βάρος του κάθε αμινοξέος. Προκειμένου να αξιολογηθεί το αποτέλεσμα της μοριακής αντικατάστασης, υπολογίζονται δύο δείκτες, το Z score και το LLG(Log Likelihood Gain). Για να κριθεί αξιόπιστο το αποτέλεσμα, θα πρέπει η τιμή του z score να είναι μεγαλύτερη από 8 και του LLG μεγαλύτερη του 0 [32], κριτήρια τα οποία ικανοποιήθηκαν και για την SSR1 και για την SSR2.

### 3.4.3. Βελτιστοποίηση

Η διαδικασία βελτιστοποίησης ήταν η ακόλουθη και για τις 4 δομές: Με χρήση του λογισμικού WinCoot ορίστηκε η ηλεκτρονιακή πυκνότητα του χάρτη να αντιστοιχεί στη μέση τετραγωνική απόκλιση (1 r.m.s.d) και τροποποιήθηκε η αλληλουχία της SRL, ανάλογα για την SSR1 και SSR2, με αντικατάσταση των μεταλλαγμένων αμινοξέων. Στη συνέχεια προσαρμόστηκε η πρωτεϊνική δομή στο χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας κατά το βέλτιστο τρόπο, χωρίς να τοποθετηθούν μόρια νερού ή συνδετών. Έπειτα το μοντέλο βελτιστοποιήθηκε με το πρόγραμμα phenix.refine του λογισμικού PHENIX. Τα αρχεία που εισήχθησαν ήταν εκείνο της δομής (.pdb) που προέκυψε από το WinCoot, και το αρχείο scala.mtz, του χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας που προέκυψε από το πρόγραμμα SCALA του CCP4i. Οι παράμετροι που επιλέχθηκαν να βελτιστοποιηθούν είναι οι συντεταγμένες (x, y, z) και ο παράγοντας B του κάθε ατόμου, όπως και το πηλίκo X-ray/stereochemistry. Επίσης, δόθηκε εντολή να προστεθούν τα μόρια του νερού στο χάρτη ηλεκτρονιακής

πυκνότητας. Το προϊόν της διαδικασίας αυτής είναι ένα καινούριο αρχείο δομής(.pdb) και ένας καινούριος χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας (.mtz). Το επόμενο βήμα ήταν η επεξεργασία του αρχείου της δομής (.pdb) που προέκυψε από τη βελτιστοποίηση με το λογισμικό WinCoot σε σχέση με τον αρχικό χάρτη, αλλά και τον εξερχόμενο από τη διαδικασία βελτιστοποίησης, αφού προστέθηκαν τα μόρια των συνδετών (μόρια TRIS, MPD, N-Acetyl-D-Glucosamine) και διαγράφηκαν τα μόρια νερού που απείχαν λιγότερο από 2,2Å και περισσότερο από 3,3Å από το μόριο της πρωτεΐνης. Η καινούρια δομή βελτιστοποιήθηκε υπό τις ίδιες συνθήκες, χωρίς την επιλογή της πρόσθεσης μορίων νερού. Η εναλλαγή της προσαρμογής της δομής στο χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας με την επακόλουθη βελτιστοποίηση με το phenix.refine συνεχίστηκε έως ότου οι δείκτες αξιοπιστίας R έπαψαν να μειώνονται, και η εικόνα της δομής σε σχέση με την ηλεκτρονική πυκνότητα ήταν ικανοποιητική. Κατά τη διαδικασία προσαρμογής της δομής του συμπλόκου των SSR1 και SSR2 με το σάκχαρο N-Acetyl-D-Glucosamine στο χάρτη, παρατηρήθηκε ηλεκτρονική πυκνότητα στην ίδια θέση πρόσδεσης του N-Acetyl-D-Glucosamine η οποία αντιστοιχούσε στο σάκχαρο 2-Acetyl-amino-2-Deoxy-Alpha-D-Mannopyranose. Έτσι προστέθηκε και αυτός ο συνδέτης και ορίστηκε η κατοχή (occupancy) της θέσης πρόσδεσης να ισούται με 50% και για τα δύο σάκχαρα.

#### 3.4.3.1. Αξιολόγηση αποτελέσματος βελτιστοποίησης

Προκειμένου να αξιολογηθεί το τελικό αποτέλεσμα της βελτιστοποίησης, εκτός από τους δείκτες αξιοπιστίας R, χρησιμοποιείται και το διάγραμμα Ramachandran που σχεδιάζεται από τα λογισμικά WinCoot και PHENIX. Για να είναι στερεοχημικά η δομή αξιόπιστη, θα πρέπει το ποσοστό των αμινοξέων που βρίσκονται έξω από τις επιτρεπτές περιοχές να μην υπερβαίνει το 2%.

#### 3.4.4. Μελέτη σύνδεσης N-Acetyl-D-Glucosamine και 2-Acetyl-amino-2-Deoxy-Alpha-D-Mannopyranose με τις SSR1 και SSR2

Προκειμένου να μελετηθούν οι δεσμοί των λεκτινών SSR1 και SSR2 με τα σάκχαρα N-Acetyl-D-Glucosamine και 2-Acetyl-amino-2-Deoxy-Alpha-D-Mannopyranose, υπολογίστηκαν οι αποστάσεις των ατόμων των σακχάρων με τα άτομα της πρωτεΐνης με το πρόγραμμα Analyse Molecular Contacts του CCP4i. Οι δεσμοί μεταξύ ατόμων οξυγόνου ή αζώτου, με μήκος μικρότερο από 3,3Å θεωρήθηκαν δεσμοί υδρογόνου, ενώ με μήκος από 3,3Å έως 4,0Å θεωρήθηκαν δεσμοί Van der Waals, όπως όλοι οι δεσμοί των ατόμων του άνθρακα από 0Å έως 4Å.

#### 3.5. Δημιουργία εικόνων

Οι εικόνες της δομής της πρωτεΐνης και του συμπλόκου με τα σάκχαρα δημιουργήθηκαν με το λογισμικό PyMol. Με το ίδιο λογισμικό δημιουργήθηκαν και οι εικόνες των θέσεων των μεταλλάξεων και της αλληλεπικάλυψης και σύγκρισης των δομών της SRL με τις SSR1 και SSR2.



#### 4. Αποτελέσματα – Συζήτηση αποτελεσμάτων

##### 4.1. Η δομή της SSR1

Η δομή της SSR1 καθορίστηκε με ευκρίνεια  $1,7\text{\AA}$  ενώ τα στοιχεία του πειράματος περιθλάσης ακτίνων Χ και της βελτιστοποίησης παρουσιάζονται στον πίνακα 4. Η συμμετρία του κρυστάλλου χαρακτηρίζεται από την ομάδα χώρου  $P4_22_12$  ενώ τα στοιχεία της στοιχειώδους κυψελίδας παρουσιάζονται στον πίνακα 5.

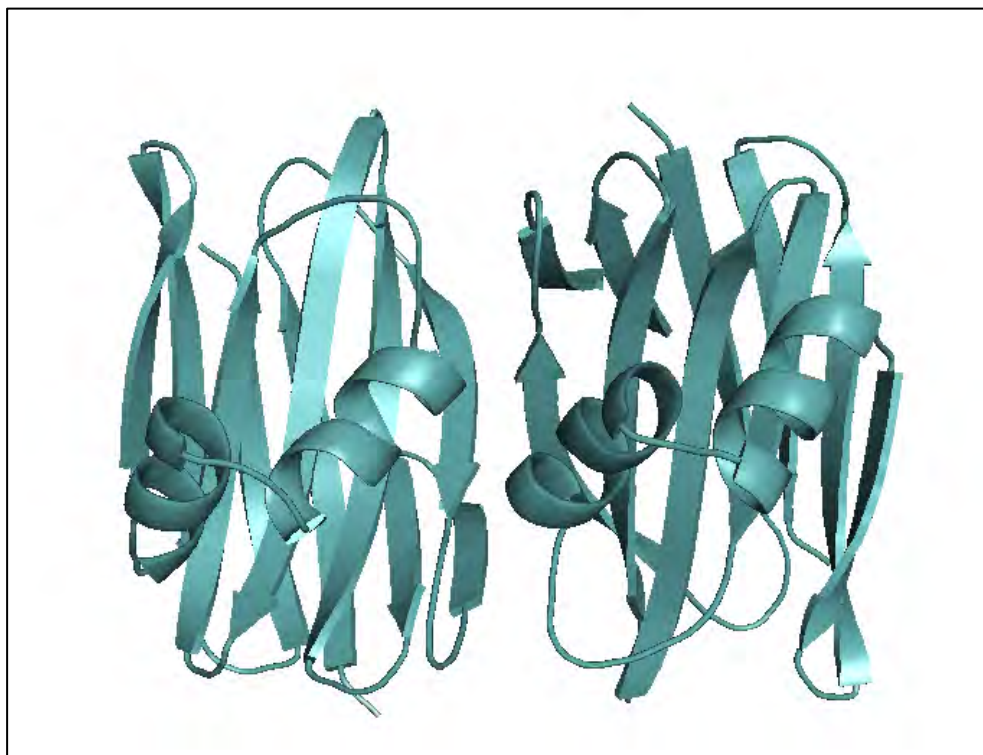
Ευκρίνεια ( $\text{\AA}$ )	13.84 – 1.70
Εξωτερική στοιβάδα	1.79 – 1.70
Συνολικός αριθμός περιθλάσεων	193530
Αριθμός ανεξάρτητων περιθλάσεων	36020 (5160)
Πολλαπλότητα	5.4 (3.3)
$R_{\text{sym}}^a$	0.044 (0.204)
Πληρότητα (%)	99.7 (99.6)
$\langle I/\sigma \rangle$	24.5 (5.5)
$R_{\text{cryst}}^b$	0.147 (0.161)
$R_{\text{free}}^c$	0.179 (0.191)
Αριθμός μορίων διαλύτη	398
Απόκλιση από τις πρότυπες τιμές	
Μήκη δεσμών ( $\text{\AA}$ )	0.014
Γωνίες δεσμών ( $^\circ$ )	1.45
Μέση τιμή του συντελεστή θερμοκρασίας B	
Άτομα πρωτεΐνης (chain A/B)	8.4/6.3
Μόρια διαλύτη	19.4
Άτομα MPD	25.1

Πίνακας 4 Στοιχεία πειράματος περιθλάσης, και βελτιστοποίησης

a ( $\text{\AA}$ )	b ( $\text{\AA}$ )	c ( $\text{\AA}$ )	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$
100.285	100.285	63.643	$90^\circ$	$90^\circ$	$90^\circ$

Πίνακας 5 Στοιχεία στοιχειώδους κυψελίδας SSR1

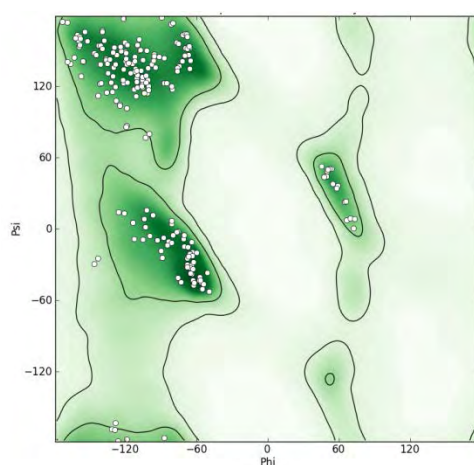
Όπως φαίνεται από την εικόνα 22 η SSR1 είναι μία διμερής πρωτεΐνη και η δομή της κάθε υπομονάδας συντίθεται από 2 α-έλικες και 2 β-πτυχωτές επιφάνειες που αποτελούνται από 10 β-κλώνους.. Από τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα αναγνωρίστηκαν 398 μόρια νερού και 1 μόριο MPD συνδεδεμένο με τη πρωτεΐνη.



Εικόνα 22 Η διμερής μορφή της SSR1

#### 4.1.1. Διάγραμμα Ramachandran για τη δομή της SSR1

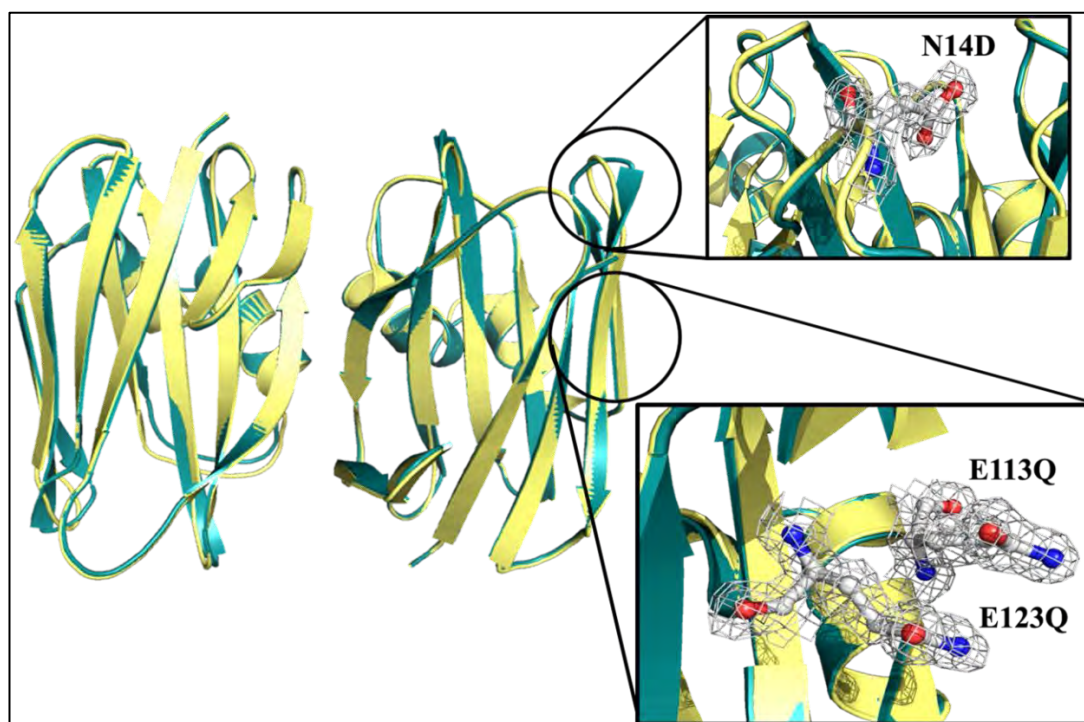
Στην εικόνα 23 φαίνεται το διάγραμμα Ramachandran τη δομή της SSR1, όπως προέκυψε από τη τελευταία βελτιστοποίηση, με όλα τα αμινοξέα εντός των επιτρεπόμενων περιοχών.



Εικόνα 23 Διάγραμμα Ramachandran για τη δομή της SSR1

#### 4.1.2. Σύγκριση δομών SSR1 και SRL

Οι κρυσταλλικές δομές των SSR1 και SRL χαρακτηρίζονται από την ίδια ομάδα χώρου  $P4_22_12$  ενώ οι μεταλλάξεις της SSR1 δεν προκάλεσαν σημαντική αλλαγή στη διαμόρφωση της δομής της SRL όπως φαίνεται από την εικόνα 24 όπου παρουσιάζεται η υπέρθεση των δύο δομών. Η μέση τετραγωνική απόκλιση των θέσεων των Ca ατόμων των δύο πρωτεϊνών, υπολογίστηκε έπειτα από υπέρθεση των δύο δομών και ισούται με  $0,208\text{\AA}$ .



Εικόνα 24 Υπέρθεση των SSR1 (μπλε) και SRL (κίτρινο). Στην εικόνα φαίνονται οι θέσεις των μεταλλάξεων στο ένα μόριο του διμερούς.

## 4.2. Η δομή της SSR2

Η δομή της SSR2 καθορίστηκε με ευκρίνεια 1,6 Å ενώ τα στοιχεία του πειράματος περίθλασης ακτίνων Χ και της βελτιστοποίησης παρουσιάζονται στον πίνακα 6. Η συμμετρία του κρυστάλλου χαρακτηρίζεται από την ομάδα χώρου  $P4_22_12$  ενώ τα στοιχεία της στοιχειώδους κυψελίδας παρουσιάζονται στον πίνακα 7.

Ευκρίνεια (Å)	13.56 – 1.60
Εξωτερική στοιβάδα	1.69 – 1.60
Συνολικός αριθμός περιθλάσεων	244821(22780)
Αριθμός ανεξάρτητων περιθλάσεων	43553 (4289)
Πολλαπλότητα	5.6 (3.6)
$R_{\text{symm}}^a$	0.080 (0.513)
Πληρότητα (%)	100.00 (100.00)
$\langle I/\sigma I \rangle$	16.27 (2.21)
$R_{\text{cryst}}^b$	0.1567 (0.2173)
$R_{\text{free}}^c$	0.1876 (0.2715)
Αριθμός μορίων διαλύτη	435
Απόκλιση από τις πρότυπες τιμές	
Μήκη δεσμών (Å)	0.014
Γωνίες δεσμών (°)	1.43
Μέση τιμή του συντελεστή θερμοκρασίας B	
Ατομα πρωτεΐνης (chain A/B)	11.9/9.3
Μόρια διαλύτη	24.3
Ατομα MPD	16.9

Πίνακας 6 Στοιχεία πειράματος περίθλασης, και βελτιστοποίησης

a (Å)	b (Å)	c (Å)	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$
100.501	100.501	63.839	90°	90°	90°

Πίνακας 7 Στοιχεία στοιχειώδους κυψελίδας SSR2



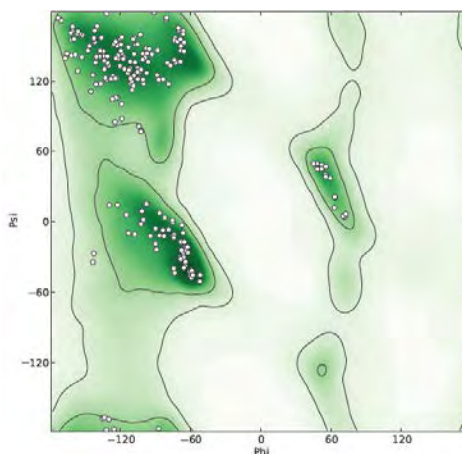
Όπως φαίνεται από την εικόνα 25 η SSR2, όπως η SSR1 και η SRL, είναι μία διμερής πρωτεΐνη και η δομή της κάθε υπομονάδας συντίθεται από 2  $\alpha$ -έλικες και 2  $\beta$ -πτυχωτές επιφάνειες που αποτελούνται από 10  $\beta$ -κλώνους. Από τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα αναγνωρίστηκαν 435 μόρια νερού, 2 μόρια MPD και 1 μόριο TRIS συνδεδεμένο με τη πρωτεΐνη.



Εικόνα 25 Η διμερής μορφή της SSR2

#### 4.2.1. Διάγραμμα Ramachandran για τη δομή της SSR2

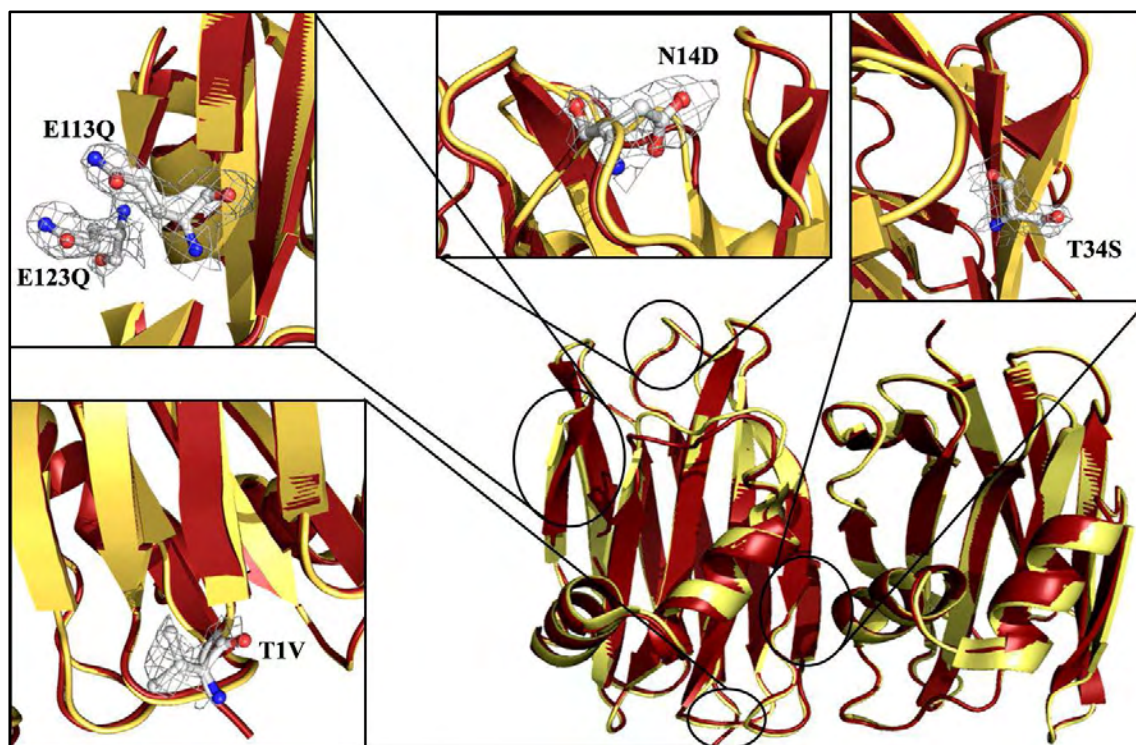
Στην εικόνα 26 φαίνεται το διάγραμμα Ramachandran τη δομή της SSR2, όπως προέκυψε από τη τελευταία βελτιστοποίηση, με όλα τα αμινοξέα εντός των επιτρεπόμενων περιοχών.



Εικόνα 26 Διάγραμμα Ramachandran για τη δομή της SSR2

#### 4.2.2. Σύγκριση δομών SSR2 και SRL

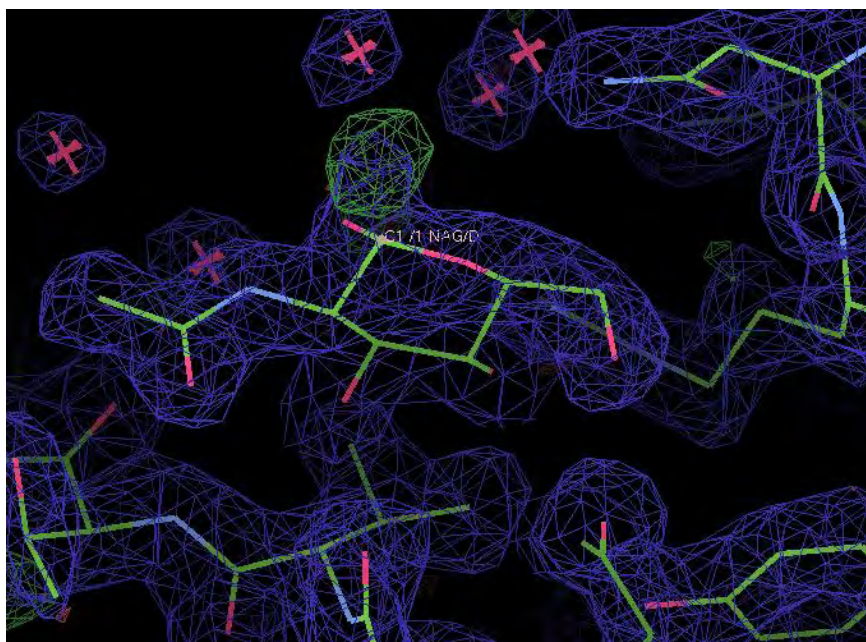
Οι κρυσταλλικές δομές των SSR2 και SRL χαρακτηρίζονται από την ίδια ομάδα χώρου  $P4_22_12$  ενώ οι μεταλλάξεις της SSR2 δεν προκάλεσαν σημαντική αλλαγή στη διαμόρφωση της δομής της SRL όπως φαίνεται από την εικόνα 27 όπου παρουσιάζεται η υπέρθεση των δύο δομών. Η μέση τετραγωνική απόκλιση των θέσεων των Ca ατόμων των δύο πρωτεϊνών, υπολογίστηκε έπειτα από υπέρθεση των δύο δομών και ισούται με 0,24Å.



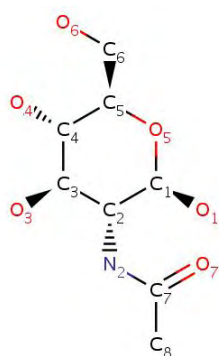
Εικόνα 27 Υπέρθεση των SSR2 (κόκκινο) και SRL (κίτρινο). Στην εικόνα φαίνονται οι θέσεις των μεταλλάξεων στο ένα μόριο του διμερούς.

#### 4.3. Ισομερίωση του N- Acetyl – D –Glucosamine σε 2-Acetylamino-2-Deoxy-Alpha-D-Mannopyranose

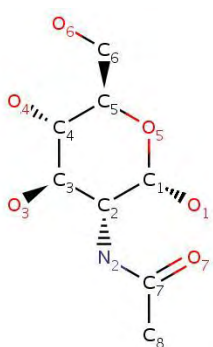
Κατά την επεξεργασία με το WinCoot των δομών των συμπλόκων της SSR1 και SSR2 με το σάκχαρο N- Acetyl – D –Glucosamine, παρατηρήθηκε ότι η ηλεκτρονιακή πυκνότητα στις θέσεις σύνδεσης, υποδείκνυε (εικόνα 28) και τη πρόσδεση ενός στερεοϊσομερούς του N-Acetyl – D –Glucosamine(εικόνα 29). Συγκεκριμένα φάνηκε ότι την ίδια θέση σύνδεσης μοιράζονταν και το σάκχαρο 2-Acetylamino-2-Deoxy-Alpha-D-Mannopyranose(εικόνα 30), με κατοχή (occupancy) 50% στον κρύσταλλο.



Εικόνα 28



Εικόνα 29 N- Acetyl – D –Glucosamine



Εικόνα 30 2-Acetyl-amino-2-Deoxy-Alpha-D-Mannopyranose

#### 4.4. Η δομή του συμπλόκου SSR1 με το N- Acetyl – D –Glucosamine

Η δομή του συμπλόκου της SSR1 με το N- Acetyl – D –Glucosamine καθορίστηκε με ευκρίνεια 1,9Å ενώ τα στοιχεία του πειράματος περίθλασης ακτίνων Χ και της βελτιστοποίησης παρουσιάζονται στον πίνακα 8. Η συμμετρία του κρυστάλλου χαρακτηρίζεται από την ομάδα χώρου  $P4_22_12$  ενώ τα στοιχεία της στοιχειώδους κυψελίδας παρουσιάζονται στον πίνακα 9.

Ευκρίνεια (Å)	13.83 – 1.90
Εξωτερική στοιβάδα	2.00 – 1.90
Συνολικός αριθμός περιθλάσεων	195920 (17118)
Αριθμός ανεξάρτητων περιθλάσεων	25956 (2553)
Πολλαπλότητα	7.5 (4.6)
$R_{\text{sym}}^a$	0.089 (0.279)
Πληρότητα (%)	99.99(99.92)
$\langle I/\sigma \rangle$	15.74 (5.21)
$R_{\text{cryst}}^b$	0.1457 (0.1854)
$R_{\text{free}}^c$	0.1869 (0.2255)
Αριθμός μορίων διαλύτη	405
Απόκλιση από τις πρότυπες τιμές	
Μήκη δεσμών (Å)	0.011
Γωνίες δεσμών (°)	1.42
Μέση τιμή του συντελεστή θερμοκρασίας B	
Άτομα πρωτεΐνης (chain A/B)	8.0/6.0
Μόρια διαλύτη	19.9
Άτομα MPD	12.0

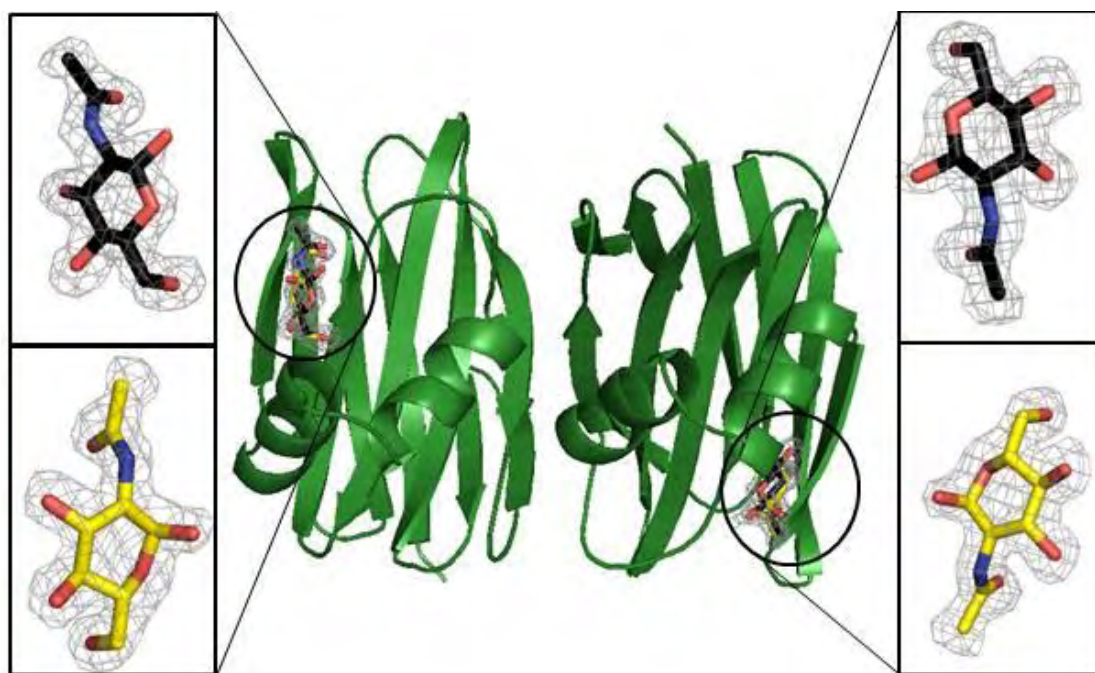
Πίνακας 8 Στοιχεία πειράματος περίθλασης, και βελτιστοποίησης

a (Å)	b (Å)	c (Å)	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$
99.919	99.919	63.81	90°	90°	90°

Πίνακας 9 Στοιχεία στοιχειώδους κυψελίδας συμπλόκου SSR1 - N-Acetyl-D-Glucosamine



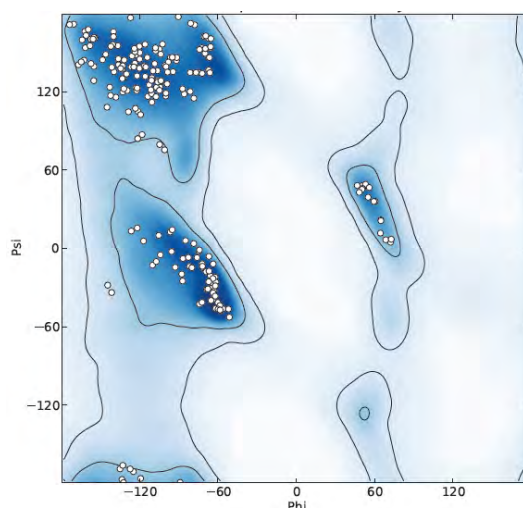
Όπως φαίνεται από την εικόνα 31 η δομή του συμπλόκου της SSR1 με το N- Acetyl – D –Glucosamine, είναι πανομοιότυπη με αυτή της SSR1 και συγκεκριμένα οι θέσεις των Ca ατόμων των δύο δομών ταυτίζονται με μέση τετραγωνική απόκλιση 0,212Å. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η ηλεκτρονική πυκνότητα στις θέσεις σύνδεσης, υποδεικνύει ότι εκτός από το N- Acetyl – D –Glucosamine, είχε συνδεθεί και το 2-Acetylamino-2-Deoxy-Alpha-D-Mannopyranose. Στην εικόνα 31 παρουσιάζονται οι δύο θέσεις σύνδεσης των σακχάρων αυτών καθώς και η ηλεκτρονική πυκνότητα που αντιστοιχεί σε κάθε σάκχαρο. Από τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα αναγνωρίστηκαν 405 μόρια νερού, 2 μόρια MPD και 1 μόριο TRIS συνδεδεμένο με τη πρωτεΐνη.



Εικόνα 31 Η δομή του συμπλόκου SSR1 - N-Acetyl-D-Glucosamine (μαύρο) και 2-Acetylamino-2-Deoxy-Alpha-D-Mannopyranose (κίτρινο). Σε μεγέθυνση παρουσιάζονται τα σάκχαρα με την ηλεκτρονική πυκνότητα που τα περιβάλλει.

#### 4.4.1. Διάγραμμα Ramachandran για το σύμπλοκο SSR1 με το N- Acetyl – D – Glucosamine

Το διάγραμμα Ramachandran για το σύμπλοκο όπως προέκυψε μετά τη τελευταία βελτιστοποίηση παρουσιάζεται στην εικόνα 32 ενώ όπως φαίνεται όλα τα αμινοξέα βρίσκονται εντός των επιτρεπόμενων περιοχών.



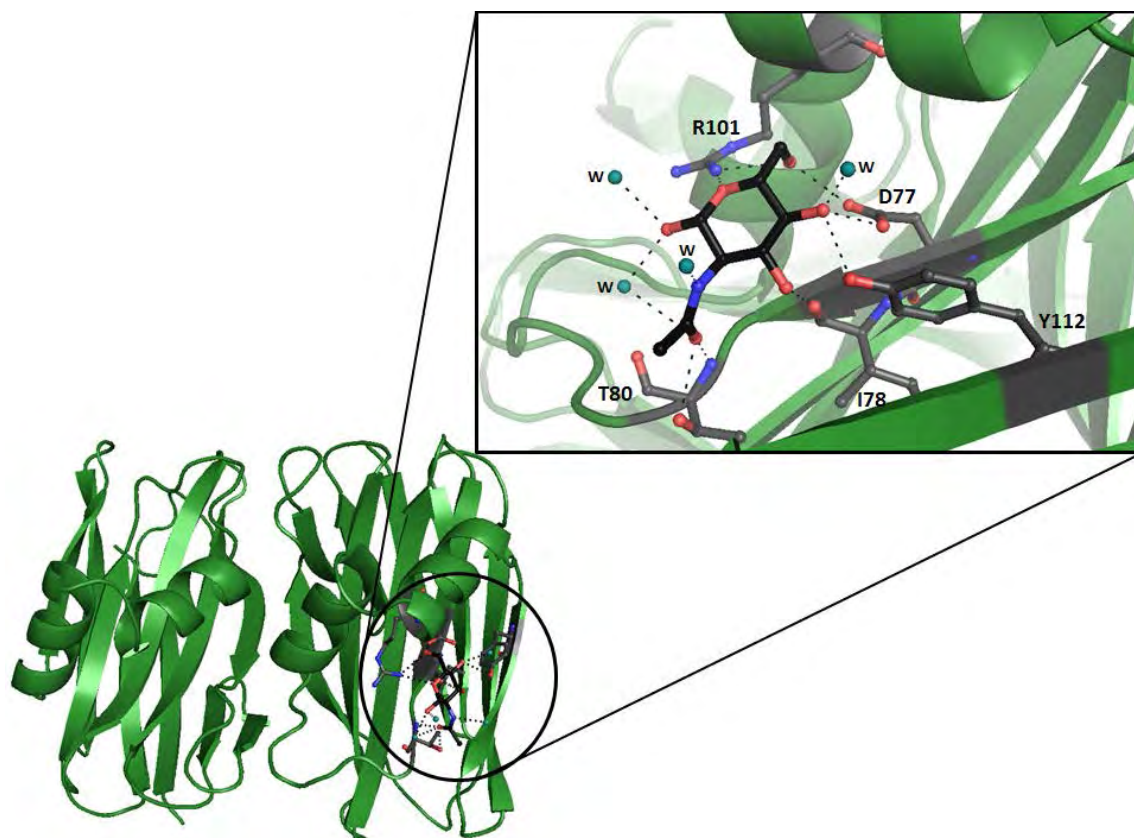
Εικόνα 32 Διάγραμμα Ramachandran για το σύμπλοκο SSR1 με το N-Acetyl – D –Glucosamine

#### 4.4.2. Σύνδεση N- Acetyl – D –Glucosamine με την SSR1

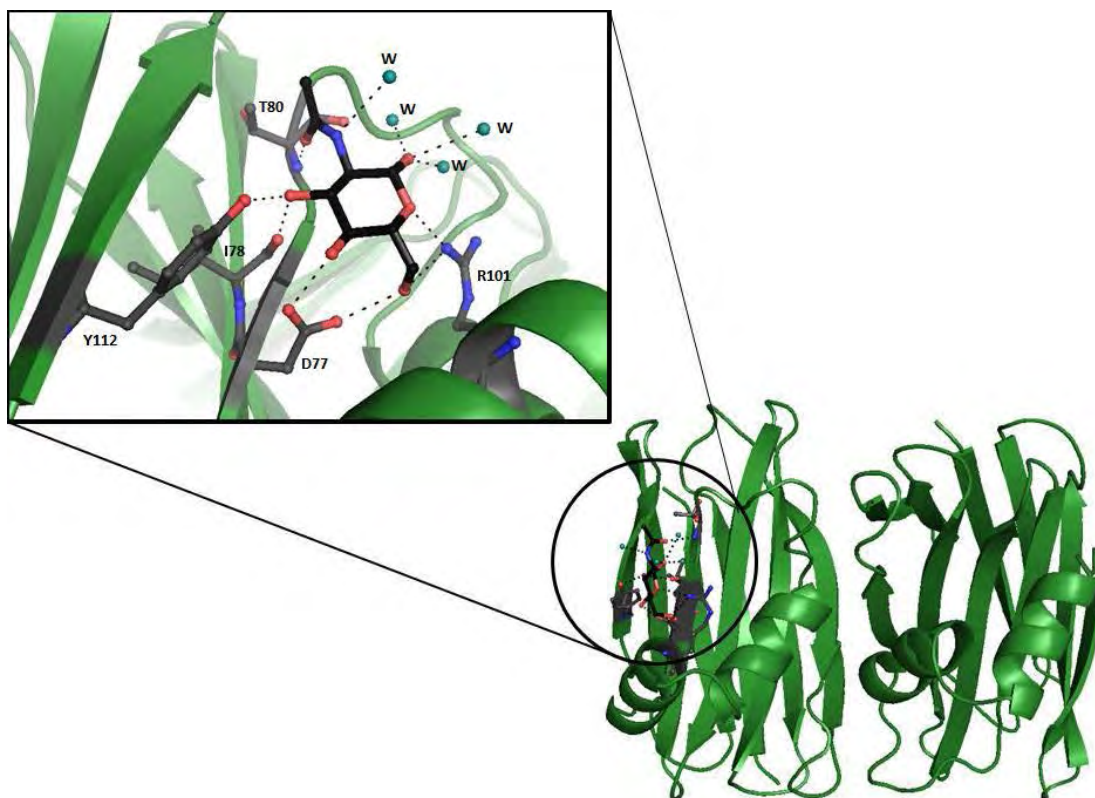
Όπως φαίνεται στο πίνακα 10, το μόριο του N- Acetyl–D –Glucosamine που προσδένεται στη μία υπομονάδα της διμερούς πρωτεΐνης SSR1 σχηματίζει 9 δεσμούς υδρογόνου με άτομα της πρωτεΐνης και 5 με μόρια νερού (εικόνα 33), ενώ το μόριο του σακχάρου που συνδέεται στη δεύτερη υπομονάδα της SSR1 σχηματίζει 7 δεσμούς υδρογόνου με τη πρωτεΐνη και 4 με μόρια νερού (εικόνα 34). Και στις δύο θέσεις σύνδεσης το σάκχαρο συνδέεται με άτομα των αμινοξέων Ισολευκίνη 78, Ασπαρτικό Οξύ 77, Θρεονίνη 80, Αργινίνη 101 και Τυροσίνη 112. Στον πίνακα 11 καταγράφονται οι δεσμοί Van der Waals του σακχάρου με τα αμινοξικά κατάλοιπα της κάθε θέσης σύνδεσης. Όπως φαίνεται, το N- Acetyl–D –Glucosamine σχηματίζει 44 δεσμούς Van der Waals με 10 αμινοξικά κατάλοιπα του πρώτου μορίου και 42 δεσμούς με 10 αμινοξικά κατάλοιπα του δεύτερου μορίου της SSR1.

Άτομο GluNAc	Απόσταση (Å)		
	Άτομο SSR1	Διμερές SSR1	
		Μόριο Α	Μόριο Β
O3	Tyr112 O <sup>1</sup>	2.78	2.69
	Ile78 O	2.71	2.76
O4	Asp77 O <sup>δ1</sup>	2.66	2.64
	Tyr112 O <sup>1</sup>	3.15	-
	Μόριο νερού	2.66	-
O5	Arg101 N <sup>η1</sup>	2.98	3.01
O6	Asp77 O <sup>δ2</sup>	2.67	2.70
	Arg101 N <sup>η1</sup>	3.03	3.06
O7	Thr80 O <sup>γ1</sup>	2.82	-
	Thr80 N	2.66	2.76
	Μόριο νερού	3.28	-
O1	Μόριο νερού	2.77	2.95
	Μόριο νερού	2.65	2.01
	Μόριο νερού	-	2.74
N2	Μόριο νερού	3.06	3.19

Πίνακας 10 Δεσμοί υδρογόνου του N-Acetyl–D-Glucosamine με την SSR1 και τα μόρια νερού που το περιβάλλουν



Εικόνα 33 Η θέση σύνδεσης του N-Acetyl-D-Glucosamine στη μία υπομονάδα της SSR1, και οι δεσμοί υδρογόνου που σχηματίζει με μόρια νερού και αμινοξικά κατάλοιπα στη θέση αυτή.



Εικόνα 34 Η θέση σύνδεσης του N-Acetyl-D-Glucosamine στη δεύτερη υπομονάδα της SSR1, και οι δεσμοί υδρογόνου που σχηματίζει με μόρια νερού και αμινοξικά κατάλοιπα στη θέση αυτή.

Ατομο GluNAc	SSR1	
	Αμινοξικό κατάλοιπο (Μόριο A)	Αμινοξικό κατάλοιπο (Μόριο B)
C1	Arg101, N <sup>η1</sup>	Arg101, N <sup>η1</sup>
O1	Arg101, N <sup>η1</sup> ; Val79, C <sup>γ1</sup>	Arg101, N <sup>η1</sup> ; Val79, C <sup>γ1</sup>
C2	Ile78, O	Ile78, O
C7	Thr80, N, O <sup>γ1</sup>	Thr80, N
O7	Val79, C <sup>α</sup> , C; Thr80, C <sup>α</sup> , C, O, C <sup>β</sup> , C <sup>γ2</sup>	Val79, C <sup>α</sup> , C; Thr80, C <sup>α</sup> , C, O, C <sup>γ2</sup> ; Ile78, O
C8	Thr80, O <sup>γ1</sup> ; Lys115, O; Asn81, N <sup>δ2</sup>	Thr80, C <sup>γ2</sup> ; Lys115, O; Asn81, N <sup>δ2</sup> ; Val79, C <sup>γ2</sup>
C3	Ile78, O; Tyr112, O <sup>η</sup>	Ile78, O; Tyr112, O <sup>η</sup>
O3	Tyr112, C <sup>ζ</sup> , C <sup>ε2</sup> ; Val114, C <sup>β</sup> , C <sup>γ2</sup>	Tyr112, C <sup>ζ</sup> , C <sup>ε2</sup> ; Val114, C <sup>β</sup> , C <sup>γ2</sup> , C <sup>γ1</sup> ; Ile78, C
C4	Asp77, C <sup>γ</sup> , O <sup>δ1</sup> , O <sup>δ2</sup> ; Ile78, O; Tyr112, O <sup>η</sup>	Asp77, C <sup>γ</sup> , O <sup>δ1</sup> , O <sup>δ2</sup> ; Ile78, O
O4	Asp77, C <sup>γ</sup> , O <sup>δ2</sup> ; Ile78, O; Tyr112, C <sup>ζ</sup>	Asp77, C <sup>γ</sup> , O <sup>δ2</sup> ; Tyr112, O <sup>η</sup>
C5	Asn100, N <sup>η1</sup> ; Arg101, N <sup>η1</sup>	Arg101, N <sup>η1</sup>
C6	Asn100, O, N <sup>δ2</sup> ; Asp77, O <sup>δ2</sup> , Arg101, N <sup>η1</sup>	Asn100, O, N <sup>δ2</sup> ; Asp77, O <sup>δ2</sup> , Arg101, N <sup>η1</sup>
O6	Arg101, C <sup>α</sup> , C <sup>γ</sup> , C <sup>δ</sup> ; Asp77, O <sup>δ2</sup> , C <sup>γ</sup> ; Val79, C <sup>γ2</sup>	Arg101, C <sup>α</sup> , C <sup>γ</sup> , C <sup>δ</sup> ; Asp77, C <sup>γ</sup> ; Val79, C <sup>γ2</sup>
O5	Asn100, N <sup>δ2</sup>	Asn100, N <sup>δ2</sup>
Σύνολο	10 Αμινοξέα (44 Δεσμοί)	10 Αμινοξέα (42 Δεσμοί)

Πίνακας 11 Δεσμοί Van der Waals του N-Acetyl-D-Glucosamine με τα αμινοξέα της SSR1

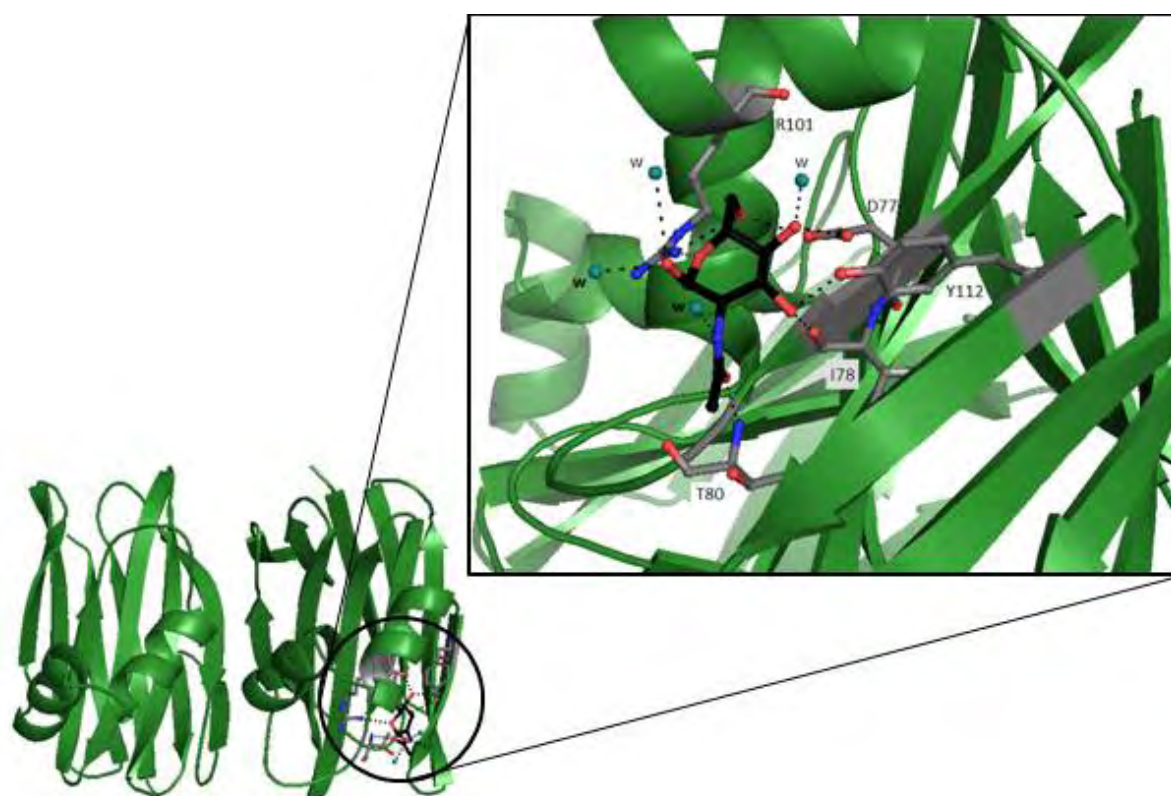
#### 4.4.3. Σύνδεση 2-Acetyl-amino-2-Deoxy-Alpha-D-Mannopyranose με την SSR1

Το σάκχαρο 2-Acetyl-amino-2-Deoxy-Alpha-D-Mannopyranose συνδέεται με την SSR1 στις ίδιες θέσεις σύνδεσης με το N-Acetyl-D-Glucosamine. Οι δεσμοί υδρογόνου που σχηματίζει το μόριο στη κάθε θέση σύνδεσης καταγράφονται στο πίνακα 12 και όπως φαίνεται το μόριο του σακχάρου που προσδένεται στη μία υπομονάδα της διμερούς πρωτεΐνης SSR1 σχηματίζει 7 δεσμούς υδρογόνου με άτομα της πρωτεΐνης και 4 με μόρια νερού (εικόνα 35), ενώ αυτό που συνδέεται στη δεύτερη υπομονάδα της SSR1 σχηματίζει 8 δεσμούς υδρογόνου με τη πρωτεΐνη και 4 με μόρια νερού (εικόνα 36). Και στις δύο θέσεις σύνδεσης το σάκχαρο συνδέεται με άτομα των αμινοξέων Ισολευκίνη 78, Ασπαρτικό Οξύ 77, Θρεονίνη 80, Αργινίνη 101 και Τυροσίνη 112. Στον πίνακα 13 καταγράφονται οι δεσμοί Van der Waals του σακχάρου με τα αμινοξικά κατάλοιπα της κάθε θέσης σύνδεσης. Όπως φαίνεται, το 2-Acetyl-amino-2-Deoxy-Alpha-D-Mannopyranose σχηματίζει 44 δεσμούς Van der Waals με 10 αμινοξικά κατάλοιπα της πρώτης υπομονάδας και 42 δεσμούς με 10 αμινοξικά κατάλοιπα της δεύτερης υπομονάδας της SSR1.

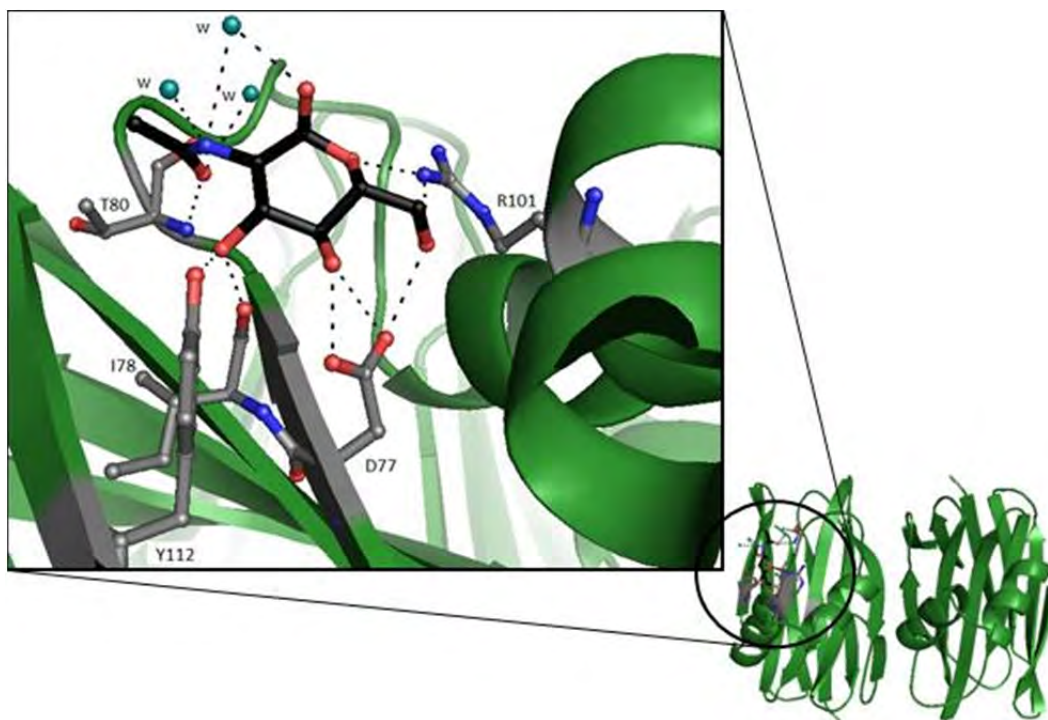


Άτομο ManNAc	Απόσταση (Å)		
	Άτομο SSR1	Διμερής SSR1	
		Μόριο A	Μόριο B
O3	Tyr112 O <sup>n</sup>	2.71	3.25
	Ile78 O	2.53	2.55
O4	Asp77 O <sup>δ1</sup>	3.28	2.55
	Asp77 O <sup>δ2</sup>	-	3.26
	Μόριο νερού	2.60	-
O5	Arg101 N <sup>n</sup>	3.06	3.06
O6	Asp77 O <sup>δ2</sup>	2.69	2.69
	Arg101 N <sup>n</sup>	2.96	3.05
O7	Thr80 O <sup>n</sup>	-	-
	Thr80 N	2.74	2.74
	Μόριο νερού	-	2.96
O1	Μόριο νερού	2.54	2.47
	Μόριο νερού	3.18	-
	Μόριο νερού	-	-
N2	Μόριο νερού	2.80	3.18
	Μόριο νερού	-	3.26

Πίνακας 12 Δεσμοί υδρογόνου του 2-Acetylamino-2-Deoxy-Αlpha-D-Mannopyranose με την SSR1 και τα μόρια νερού που το περιβάλλουν



Εικόνα35 Η θέση σύνδεσης του 2-Acetylamino-2-Deoxy-Αlpha-D-Mannopyranose στη μία υπομονάδα της SSR1 και οι δεσμοί υδρογόνου που σχηματίζει με μόρια νερού (w) και αμινοξικά κατάλοιπα στη θέση αυτή.



Εικόνα 36 Η θέση σύνδεσης του 2-Acetylamin-2-Deoxy-Alpha-D-Mannopyranose στη δεύτερη υπομονάδα της SSR1, και οι δεσμοί υδρογόνου που σχηματίζει με μόρια νερού(ν) και αμινοξικά κατάλοιπα στη θέση αυτή.

Άτομο ManNAc	SSR1	
	Αμινοξικό κατάλοιπο (Μόριο Α)	Αμινοξικό κατάλοιπο (Μόριο Β)
C7	Thr80, N, O <sup>γ1</sup> ; Val114, C <sup>γ2</sup>	Thr80, N
O7	Val79, C <sup>α</sup> , C, C <sup>γ1</sup> ; Thr80, C <sup>α</sup> , O, C <sup>β</sup> , O <sup>γ1</sup> ; Ile78, O	Val79, C <sup>α</sup> , C, C <sup>γ1</sup> ; Thr80, C <sup>α</sup> , C, O, C <sup>γ2</sup> ;
C8	Thr80, O <sup>γ1</sup> ; Lys115, O; Asn81, N <sup>δ2</sup> ; Val114, C <sup>γ2</sup>	Thr80, C <sup>γ2</sup> ; Lys115, O; Asn81, N <sup>δ2</sup> ;
C3	Ile78, O; Tyr112, O <sup>η</sup>	Ile78, O; Tyr112, O <sup>η</sup>
O3	Tyr112, C <sup>ζ</sup> , C <sup>ε2</sup> ; Val114, C <sup>β</sup> , C <sup>γ1</sup> , C <sup>γ1</sup> ; Ile78, C	Tyr112, C <sup>ζ</sup> , C <sup>ε2</sup> ; Val114, C <sup>β</sup> , C <sup>γ2</sup> , C <sup>γ1</sup> ; Ile78, C
C4	Asp77, C <sup>γ</sup> , O <sup>δ1</sup> , O <sup>δ2</sup> ; Ile78, O; Tyr112, O <sup>η</sup>	Asp77, C <sup>γ</sup> , O <sup>δ1</sup> , O <sup>δ2</sup> ; Ile78, O
O4	Asp77, C <sup>γ</sup> , O <sup>δ2</sup> ; Tyr112, C <sup>ζ</sup> , O <sup>η</sup>	Asp77, C <sup>γ</sup> ; Tyr112, O <sup>η</sup>
C5	Arg101, N <sup>η1</sup>	Arg101, N <sup>η1</sup>
C6	Asn100, O, N <sup>δ2</sup> ; Asp77, O <sup>δ2</sup> , Arg101, N <sup>η1</sup>	Asn100, O; Asp77, O <sup>δ2</sup> , Arg101, N <sup>η1</sup>
O6	Arg101, C <sup>α</sup> , C <sup>γ</sup> , C <sup>δ</sup> , C <sup>ζ</sup> ; Asp77, C <sup>γ</sup> ; Val79, C <sup>γ2</sup>	Arg101, C <sup>α</sup> , C <sup>γ</sup> , C <sup>δ</sup> ; Asp77, C <sup>γ</sup> ; Val79, C <sup>γ2</sup>
O5	Asn100, N <sup>δ2</sup>	-
N2	Val114, C <sup>γ2</sup>	Val114, C <sup>γ2</sup>
Σύνολο	10 Αμινοξέα (44 Δεσμοί)	10 Αμινοξέα (42 Δεσμοί)

Πίνακας 13 Δεσμοί Van der Waals του 2-Acetylamin-2-Deoxy-Alpha-D-Mannopyranose με τα αμινοξέα της SSR1

#### 4.5. Η δομή του συμπλόκου SSR2 με το N- Acetyl – D –Glucosamine

Η δομή του συμπλόκου της SSR2 με το N- Acetyl – D –Glucosamine καθορίστηκε με ευκρίνεια 1,7Å ενώ τα στοιχεία του πειράματος περίθλασης ακτίνων Χ και της βελτιστοποίησης παρουσιάζονται στον πίνακα 14. Η συμμετρία του κρυστάλλου χαρακτηρίζεται από την ομάδα χώρου P4<sub>2</sub>2<sub>1</sub>2 ενώ τα στοιχεία της στοιχειώδους κυψελίδας παρουσιάζονται στον πίνακα 15.

Ευκρίνεια (Å)	13.95 – 1.70
Εξωτερική στοιβάδα	1.79 – 1.70
Συνολικός αριθμός περιθλάσεων	242590 (21336)
Αριθμός ανεξάρτητων περιθλάσεων	36058 (3539)
Πολλαπλότητα	6.7 (4.1)
R <sub>sym</sub> <sup>a</sup>	0.097 (0.507)
Πληρότητα (%)	99.99(99.97)
<I/σI >	13.12 (2.34)
R <sub>cryst</sub> <sup>b</sup>	0.1668 (0.2332)
R <sub>free</sub> <sup>c</sup>	0.2034 (0.2282)
Αριθμός μορίων διαλύτη	412
Απόκλιση από τις πρότυπες τιμές	
Μήκη δεσμών (Å)	0.011
Γωνίες δεσμών (°)	1.45
Μέση τιμή του συντελεστή θερμοκρασίας B	
Άτομα πρωτεΐνης (chain A/B)	11.4/9.5
Μόρια διαλύτη	24.1
Άτομα MPD	14.5

Πίνακας 14 Στοιχεία πειράματος περίθλασης, και βελτιστοποίησης

a (Å)	b (Å)	c (Å)	α	β	γ
100.025	100.025	63.783	90°	90°	90°

Πίνακας 15 Στοιχεία στοιχειώδους κυψελίδας συμπλόκου SSR2 - N-Acetyl-D-Glucosamine

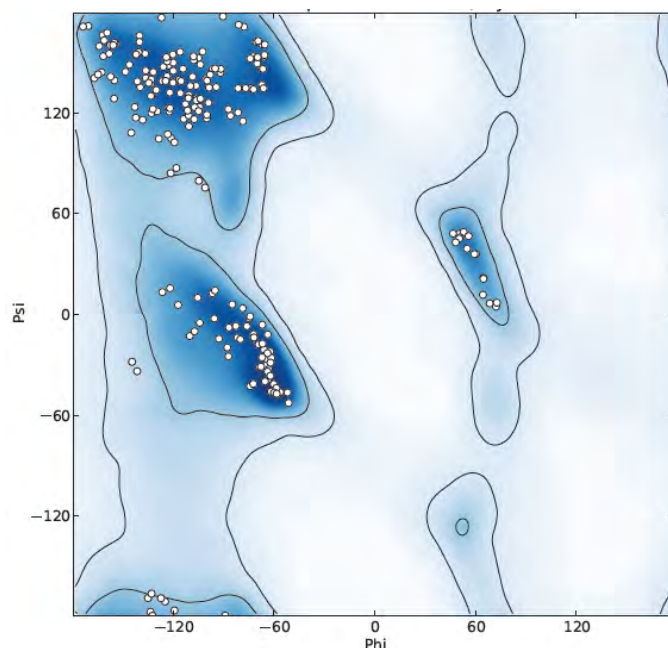
Όπως φαίνεται από την εικόνα 37 η δομή του συμπλόκου της SSR2 με το N- Acetyl – D –Glucosamine, είναι πανομοιότυπη με αυτή της SSR2 και συγκεκριμένα οι θέσεις των Ca ατόμων των δύο δομών ταυτίζονται με μέση τετραγωνική απόκλιση 0,918Å. Στην εικόνα 37 επίσης παρουσιάζονται οι δύο θέσεις σύνδεσης των σακχάρων N-Acetyl–D –Glucosamine και 2-Acetylamino-2-Deoxy-Alpha-D-Mannopyranose καθώς και η ηλεκτρονική πυκνότητα που αντιστοιχεί σε κάθε σάκχαρο. Από τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα αναγνωρίστηκαν 412 μόρια νερού, 2 μόρια MPD και 1 μόριο TRIS συνδεδεμένο με τη πρωτεΐνη.



Εικόνα 37 Η δομή του συμπλόκου SSR2 - N-Acetyl–D–Glucosamine . Σε μεγέθυνση παρουσιάζονται τα σάκχαρα με την ηλεκτρονική πυκνότητα που τα περιβάλλει.

#### 4.5.1. Διάγραμμα Ramachandran για το σύμπλοκο SSR2 με το N- Acetyl – D – Glucosamine

Το διάγραμμα Ramachandran για το σύμπλοκο όπως προέκυψε μετά τη τελευταία βελτιστοποίηση παρουσιάζεται στην εικόνα 38 ενώ όπως φαίνεται, όλα τα αμινοξέα βρίσκονται εντός των επιτρεπόμενων περιοχών.



Εικόνα 38 Διάγραμμα Ramachandran για το σύμπλοκο SSR2 με το N- Acetyl – D –Glucosamine

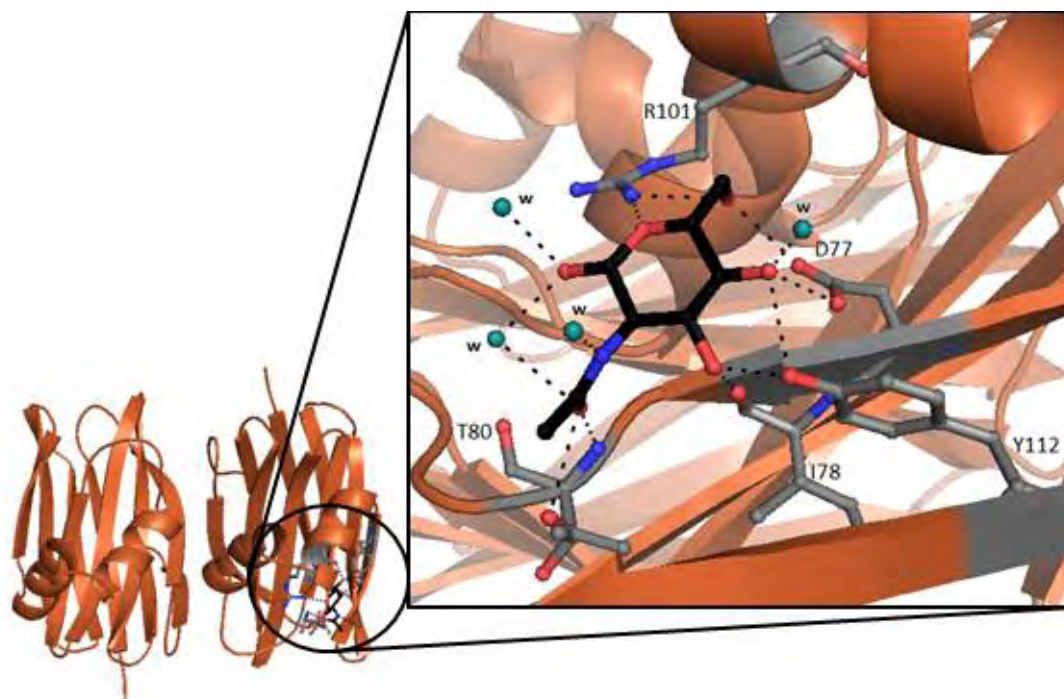
#### 4.5.2. Σύνδεση N- Acetyl – D –Glucosamine με την SSR2

Όπως φαίνεται στο πίνακα 16, το μόριο του N- Acetyl–D –Glucosamine που προσδένεται στη μία υπομονάδα της διμερούς πρωτεΐνης SSR2 σχηματίζει 9 δεσμούς υδρογόνου με άτομα της πρωτεΐνης και 5 με μόρια νερού (εικόνα 39), ενώ το μόριο του σακχάρου που συνδέεται στη δεύτερη υπομονάδα της SSR2 σχηματίζει 7 δεσμούς υδρογόνου με τη πρωτεΐνη και 6 με μόρια νερού (εικόνα 40). Και στις δύο θέσεις σύνδεσης το σάκχαρο συνδέεται με άτομα των αμινοξέων Ισολευκίνη 78, Ασπαρτικό Οξύ 77, Θρεονίνη 80, Αργινίνη 101 και Τυροσίνη 112. Στον πίνακα 17 καταγράφονται οι δεσμοί Van der Waals του σακχάρου με τα αμινοξικά κατάλοιπα της κάθε θέσης σύνδεσης. Όπως φαίνεται, το N- Acetyl–D –Glucosamine σχηματίζει 44 δεσμούς Van der Waals με 10 αμινοξικά κατάλοιπα της πρώτης υπομονάδας και 42 δεσμούς με 10 αμινοξικά κατάλοιπα της δεύτερης υπομονάδας της SSR1.

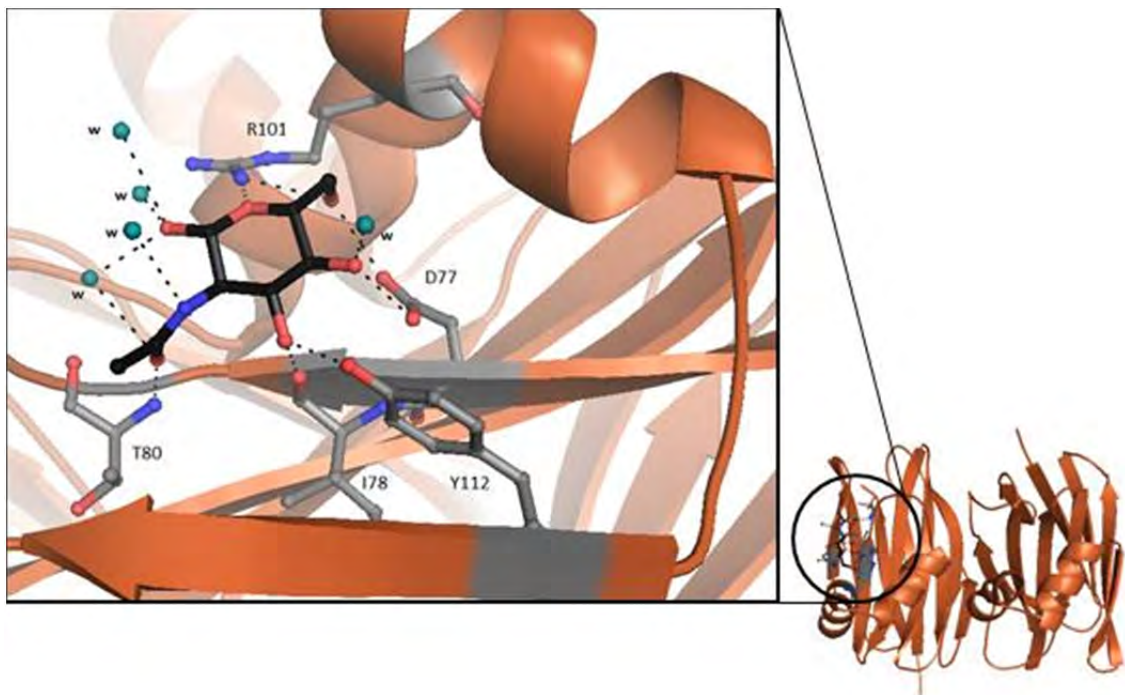


Άτομο GluNAc	Απόσταση (Å)		
	Άτομο SSR2	Διμερής SSR2	
		Μόριο A	Μόριο B
O3	Tyr112 O <sup>n</sup>	2.67	2.63
	Ile78 O	2.69	2.72
O4	Asp77 O <sup>δ1</sup>	2.64	2.69
	Tyr112 O <sup>n</sup>	3.26	-
	Μόριο νερού	2.50	2.65
O5	Arg101 N <sup>n1</sup>	3.01	2.81
O6	Asp77 O <sup>δ2</sup>	2.74	2.73
	Arg101 N <sup>n1</sup>	2.95	2.93
O7	Thr80 O <sup>γ1</sup>	3.03	-
	Thr80 N	2.75	2.72
	Μόριο νερού	3.04	2.76
O1	Μόριο νερού	2.72	2.76
	Μόριο νερού	2.80	2.99
	Μόριο νερού	-	2.07
N2	Μόριο νερού	2.90	3.21

Πίνακας 16 Δεσμοί υδρογόνου του N-Acetyl-D-Glucosamine με την SSR2 και τα μόρια νερού που το περιβάλλουν



Εικόνα 39 Η θέση σύνδεσης του N-Acetyl-D-Glucosamine στη μία υπομονάδα της SSR2, και οι δεσμοί υδρογόνου που σχηματίζει με μόρια νερού και αμινοξικά κατάλοιπα στη θέση αυτή.



Εικόνα 40 Η θέση σύνδεσης του N-Acetyl-D-Glucosamine στη δεύτερη υπομονάδα της SSR2, και οι δεσμοί υδρογόνου που σχηματίζει με μόρια νερού και αμινοξικά κατάλοιπα στη θέση αυτή.

Ατομο GluNAc	SSR2	
	Αμινοξικό κατάλοιπο (Μόριο Α)	Αμινοξικό κατάλοιπο (Μόριο Β)
C1	Arg101, N <sup>η1</sup>	Arg101, N <sup>η1</sup>
O1	Arg101, N <sup>η1</sup> ; Val79, C <sup>γ1</sup>	Arg101, N <sup>η1</sup> ; Val79, C <sup>γ1</sup>
C2	Ile78, O	Ile78, O
C7	Thr80, N, O <sup>γ1*</sup>	Thr80, N
O7	Val79, C <sup>α</sup> , C; Thr80, C <sup>α</sup> , C, O, C <sup>β</sup> , C <sup>γ2</sup>	Val79, C <sup>α</sup> , C, C <sup>γ1</sup> ; Thr80, C <sup>α</sup> , C, O, C <sup>γ2</sup> ;
C8	Thr80, C <sup>γ2</sup> :B, O <sup>γ1</sup> :A; Lys115, O; Asn81, N <sup>δ2</sup>	Thr80, C <sup>γ2</sup> ; Lys115, O; Asn81, N <sup>δ2</sup> ; Val114, C <sup>γ2</sup>
C3	Ile78, O; Tyr112, O <sup>η</sup>	Ile78, O; Tyr112, O <sup>η</sup>
O3	Tyr112, C <sup>ζ</sup> , C <sup>ε2</sup> ; Val114, C <sup>β</sup> , C <sup>γ2</sup> , C <sup>γ1</sup> ; Ile78, C	Tyr112, C <sup>ζ</sup> , C <sup>ε2</sup> ; Val114, C <sup>γ2</sup> , C <sup>γ1</sup> ; Ile78, C
C4	Asp77, C <sup>γ</sup> , O <sup>δ1</sup> , O <sup>δ2</sup> ; Ile78, O	Asp77, C <sup>γ</sup> , O <sup>δ1</sup> , O <sup>δ2</sup> ; Ile78, O
O4	Asp77, C <sup>γ</sup> , O <sup>δ2</sup> ; Tyr112, C <sup>ζ</sup>	Asp77, C <sup>γ</sup> , O <sup>δ2</sup> ; Tyr112, C <sup>ζ</sup>
C5	Asp77, N <sup>δ2</sup> ; Arg101, N <sup>η1</sup>	Asp77, O <sup>δ2</sup> ; Arg101, N <sup>η1</sup>
C6	Asn100, C, O, N <sup>δ2</sup> ; Asp77, O <sup>δ2</sup> , Arg101, N <sup>η1</sup>	Asn100, O, N <sup>δ2</sup> ; Asp77, O <sup>δ2</sup> ; Arg101, N <sup>η1</sup>
O6	Arg101, C <sup>α</sup> , C <sup>γ</sup> , C <sup>δ</sup> , C <sup>ζ</sup> , N <sup>ε</sup> ; Asp77, C <sup>γ</sup> ; Val79, C <sup>γ2</sup>	Arg101, C <sup>α</sup> , C <sup>γ</sup> , C <sup>δ</sup> , C <sup>ζ</sup> , N <sup>ε</sup> ; Asp77, C <sup>γ</sup> ; Val79, C <sup>γ2</sup>
O5	Asn100, N <sup>δ2</sup>	Asn100, N <sup>δ2</sup>
Σύνολο	10 Αμινοξέα (47 Δεσμοί)	10 Αμινοξέα (44 Δεσμοί)

Πίνακας 17 Δεσμοί Van der Waals του N-Acetyl-D-Glucosamine με τα αμινοξέα της SSR2

\*αμινοξύ με διπλή διαμόρφωση

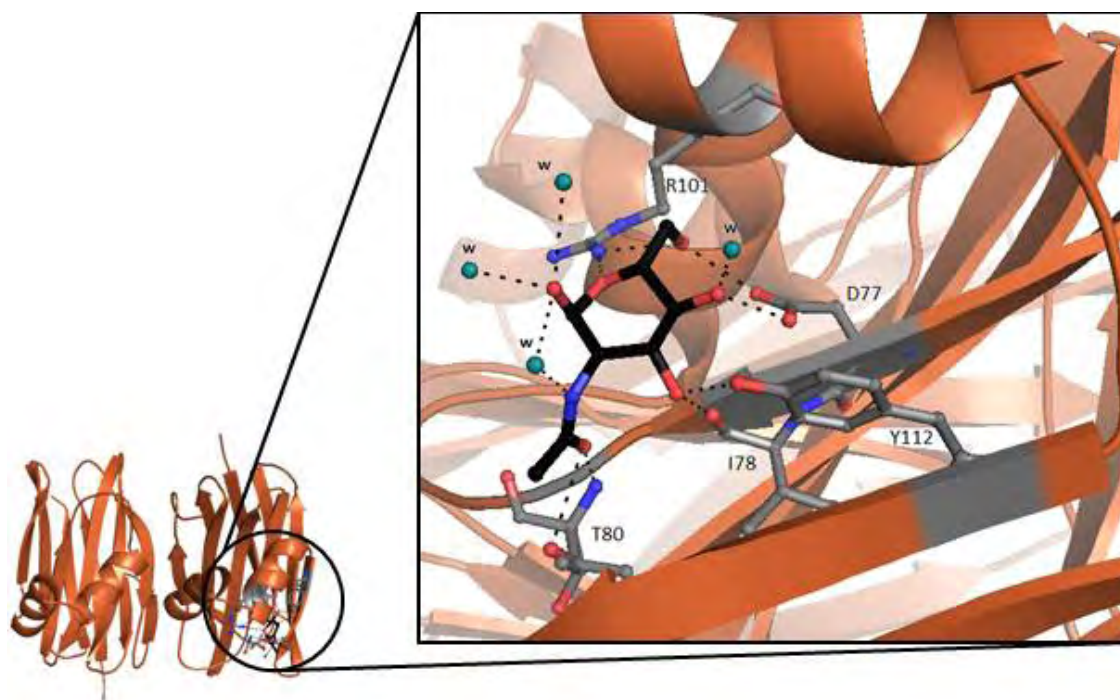
#### 4.5.3. Σύνδεση 2-Acetylamino-2-Deoxy-Alpha-D-Mannopyranose με την SSR2

Το σάκχαρο 2-Acetylamino-2-Deoxy-Alpha-D-Mannopyranose συνδέεται με την SSR2 στις ίδιες θέσεις σύνδεσης με το N-Acetyl-D-Glucosamine. Οι δεσμοί υδρογόνου που σχηματίζει το μόριο στη κάθε θέση σύνδεσης καταγράφονται στο πίνακα 18 και όπως φαίνεται, το μόριο του σακχάρου που προσδένεται στη μία υπομονάδα της SSR2 σχηματίζει 8 δεσμούς υδρογόνου με άτομα της πρωτεΐνης και 5 με μόρια νερού (εικόνα 41), ενώ αυτό που συνδέεται στη δεύτερη υπομονάδα της SSR2 σχηματίζει 7 δεσμούς υδρογόνου με τη πρωτεΐνη και 5 με μόρια νερού (εικόνα 42). Και στις δύο θέσεις σύνδεσης το σάκχαρο συνδέεται με άτομα των αμινοξέων Ισολευκίνη 78, Ασπαρτικό Οξύ 77, Θρεονίνη 80, Αργινίνη 101 και Τυροσίνη 112. Στον πίνακα 19 καταγράφονται οι δεσμοί Van der Waals του σακχάρου με τα αμινοξικά κατάλοιπα της κάθε θέσης σύνδεσης. Όπως φαίνεται, το 2-Acetylamino-2-Deoxy-Alpha-D-Mannopyranose σχηματίζει 44 δεσμούς Van der Waals με 10 αμινοξικά κατάλοιπα της πρώτης υπομονάδας και 42 δεσμούς με 10 αμινοξικά κατάλοιπα της δεύτερης υπομονάδας της SSR1.

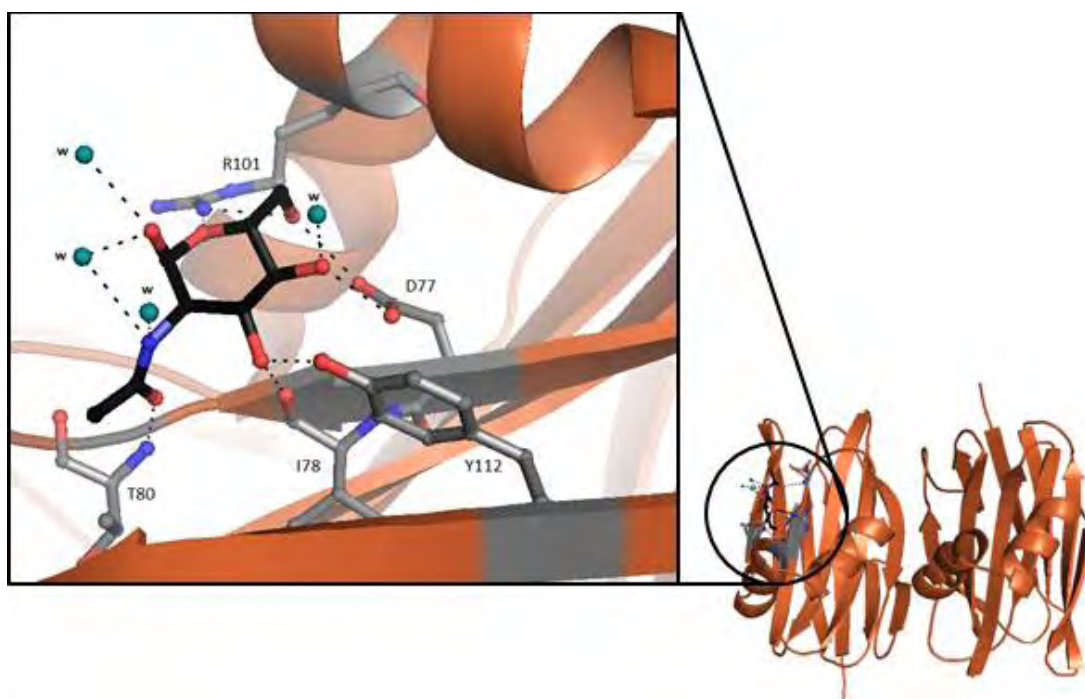
'Ατομο ManNAc	Απόσταση Å		
	'Ατομο SSR2	Διμερής SSR2	
		Μόριο Α	Μόριο Β
O3	Tyr112 O <sup>n</sup>	2,77	2,65
	Ile78 O	2,56	2,55
O4	Asp77 O <sup>δ1</sup>	2,57	2,60
	Tyr112 O <sup>n</sup>	-	-
	Μόριο νερού	2,55	2,70
O5	Arg101 N <sup>n1</sup>	3,03	3,08
O6	Asp77 O <sup>δ2</sup>	2,70	2,68
	Arg101 N <sup>n1</sup>	2,92	2,95
O7	Thr80 O <sup>γ1</sup>	3,10	-
	Thr80 N	2,70	2,74
	Μόριο νερού	-	-
O1	Μόριο νερού	2,63	2,37
	Μόριο νερού	3,16	2,66
	Μόριο νερού	3,14	-
N2	Μόριο νερού	2,74	3,16
	Μόριο νερού	-	3,18

Πίνακας 18 Δεσμοί υδρογόνου του 2-Acetylamino-2-Deoxy-Alpha-D-Mannopyranose με την SSR1 και τα μόρια νερού που το περιβάλλουν





Εικόνα 41 Η θέση σύνδεσης του 2-Acetylamino-2-Deoxy-Alpha-D-Mannopyranose στη μία υπομονάδα της SSR2 και οι δεσμοί υδρογόνου που σχηματίζει με μόρια νερού και αμινοξικά κατάλοιπα στη θέση αυτή.



Εικόνα 42 Η θέση σύνδεσης του 2-Acetylamino-2-Deoxy-Alpha-D-Mannopyranose στη δεύτερη υπομονάδα της SSR2, και οι δεσμοί υδρογόνου που σχηματίζει με μόρια νερού και αμινοξικά κατάλοιπα στη θέση αυτή.

'Ατομο ManNAc	SSR2	
	Αμινοξικό κατάλοιπο (Μόριο A)	Αμινοξικό κατάλοιπο (Μόριο B)
C7	Thr80, N, O <sup>γ1</sup> ; Val114, C <sup>γ2</sup>	Thr80, N; Val114, C <sup>γ2</sup>
O7	Val79, C <sup>α</sup> , C, C <sup>γ1</sup> ; Thr80, C <sup>α</sup> , O, C <sup>β</sup> , O <sup>γ2</sup> Ile78, O	Val79, C <sup>α</sup> , C, C <sup>γ1</sup> ; Thr80, C <sup>α</sup> , O, O <sup>γ2</sup> Ile78, O
C8	Thr80, C <sup>γ2</sup> ; Lys115, O; Asn81, N <sup>δ2</sup> ; Val114, C <sup>γ2</sup>	Thr80, C <sup>γ2</sup> ; Lys115, O; Asn81, N <sup>δ2</sup> ; Val114, C <sup>γ2</sup>
C3	Ile78, O; Tyr112, O <sup>η</sup>	Ile78, O
O3	Tyr112, C <sup>ζ</sup> , C <sup>ε2</sup> ; Val114, C <sup>β</sup> , C <sup>γ2</sup> , C <sup>γ1</sup> ; Ile78, C	Tyr112, C <sup>ζ</sup> , C <sup>ε2</sup> ; Val114, C <sup>β</sup> , C <sup>γ2</sup> , C <sup>γ1</sup> ; Ile78, C
C4	Asp77, C <sup>γ</sup> , O <sup>δ1</sup> , O <sup>δ2</sup> ; Ile78, O; Tyr112, O <sup>η</sup>	Asp77, C <sup>γ</sup> , O <sup>δ1</sup> , O <sup>δ2</sup> ; Ile78, O
O4	Asp77, C <sup>γ</sup> , O <sup>δ2</sup> ; Tyr112, C <sup>ζ</sup> , O <sup>η</sup>	Asp77, C <sup>γ</sup> , O <sup>δ2</sup> ; Tyr112, C <sup>ζ</sup> , O <sup>η</sup>
C5	Asn100, N <sup>δ2</sup> ; Arg101, N <sup>η1</sup>	Arg101, N <sup>η1</sup>
C6	Asn100, O, N <sup>δ2</sup> ; Asp77, O <sup>δ2</sup> , Arg101, N <sup>η1</sup>	Asn100, N <sup>δ2</sup> ; Asp77, O <sup>δ2</sup> ; Arg101, N <sup>η1</sup>
O6	Arg101, C <sup>α</sup> , C <sup>γ</sup> , C <sup>δ</sup> , C <sup>ζ</sup> ; Asp77, C <sup>γ</sup> ; Val79, C <sup>γ2</sup>	Arg101, C <sup>γ</sup> , C <sup>δ</sup> , C <sup>ζ</sup> ; Asp77, C <sup>γ</sup> ; Val79, C <sup>γ2</sup>
O5	Asn100, N <sup>δ2</sup>	Asn100, N <sup>δ1</sup>
N2	Val114, C <sup>γ2</sup>	-
Σύνολο	10 Αμινοξέα (45 Δεσμοί)	10 Αμινοξέα (38 Δεσμοί)

Πίνακας 19 Δεσμοί Van der Waals του 2-Acetylamino-2-Deoxy-Alpha-D-Mannopyranose με τα αμινοξέα της SSR2

## Ευχαριστίες

Η εκπόνηση της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ενώ η συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων διεξήχθη στο εργαστήριο Δομικής Βιολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας κ. Δημήτρη Λεωνίδα που μου εμπιστεύτηκε το θέμα πάνω στο οποίο εργάστηκα καθώς και για την πολύτιμη βοήθεια και υποστήριξη που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια τη εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας. Επίσης, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην υποψήφια διδάκτορα Νατάσα Καντσάδη για την ιδιαίτερη βοήθεια και το χρόνο που μου διέθεσε καθώς και για την άριστη συνεργασία της. Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στον ερευνητή του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών κ. Σπύρο Ζωγράφο και στην υποψήφια διδάκτορα Χριστίνα Δράκου για την απαραίτητη και σημαντικότερη συμμετοχή τους στη συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου, χωρίς την ηθική, πνευματική και οικονομική υποστήριξη των οποίων, δεν θα ήμουν σε θέση να φέρω εις πέρας την εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας.



## Βιβλιογραφία:

1. K.C. Holmes, (2001), Sir John Cowdery Kendrew. 24 March 1917 - 23 August 1997, *Biographical Memoirs of the Fellows of the Royal Society*
2. Arthur Gruber, Alan M Durham, Chuong Huynh, and Hernando A del Portillo, (2008), *Bioinformatics in Tropical Disease Research*, Bethesda, National Center for Biotechnology Information
3. Nathan Sharon , Halina Lis (2004), History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules, *Glycobiology*, 14, 11, 53R–62R
4. D. D. Leonidas, B. M. Swamy, G. N. Hatzopoulos, S. J. Gonchigar, V. B. Chachadi, S.R. Inamdar, S. E. Zographos and N. G. Oikonomakos, (2007), Structural Basis for the Carbohydrate Recognition of the *Sclerotium rolfsii* Lectin, *J. Mol. Biol.*, 368, 1145–1161
5. Rizwan Ahmad, (2012), *Protein Purification*, InTech
6. S.M. Eligar, R. Pujari, B.M. Swamy, P. Shastri and S.R. Inamar, (2012), *Sclerotium Rolfsii* lectin inhibits proliferation and induces apoptosis in human ovarian cancer cell line PA-1, *Cell Proliferation*,
7. Sameh Magdeldin, (2012), *Affinity Chromatography*, InTech,
8. S.R. Inamdar, M. A. Savanur, S. M. Eligar, V. B. Chachadi, N. N. Nagre, C. Chen, M. Barclays, A. Ingle, P. Mahajan, A. Borges, P. Shastri, R.D. Kalraiya, B.M. Swamy, J.M. Rhodes and L.C.Yu,(2012) The TF – antigen binding lectin from *Sclerotium Rolfsii* inhibits growth of human colon cancer cells by inducing apoptosis in vitro and suppress tumor growth in vivo, *Glycobiology*, 0, 0, 1-9

9. B. K. Shiochet and D. E. Bussiere, (2000), The role of macromolecular crystallography and structure for drug discovery: advances and caveats, *Current Opinion in Drug Discovery & Development*, 3(4):408-422
- 10.R. Acharya and A. R. Rees (1997), *Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine*, Vol. 6, Weinheim, VCH Verlagsgesellschaft mbH,
- 11.The Structures of Life, (2000), U.S. Department of Health and Human Services
- 12.D. Chirgadze, (2001), *Protein Crystallization in Action*
- 13.JBS Crystallization Freshman Kit, (2009), Get a head start crystallizing your protein, Jena, Jena Biosciences
- 14.Geige et al., 1986
- 15.A. McPherson, (1997), *Crystallization of Biological Macromolecules*, New York, Cold Spring Laboratory Press
- 16.Δασκαλακη Μαρια, Σχεδιασμός αναλόγων γλυκόζης, αναστολέων της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, ως εν δυνάμει υπογλυκαιμικά φάρμακα. Κινητικές και κρυσταλλογραφικές μελέτες.
17. Z. Kam, H. B. Shores And G. Feher, (1977), On the Crystallization of Proteins, *J.Mol. Biol.* 123, 539-555
- 18.Z. Kam And G. Feher, (1986), Nucleation Growth of Protein Crystals, *General Principles and Assays, Methods of Enzymology*, 114
- 19.N. Asherie, (2004), *Protein Crystallization and Phase Diagrams*, Elsevier, Methods, 34, 266-272
- 20.I. Rayment, (2002), Small – Scale Batch Crystallization of Proteins RevisitedQ An Underutilized Way to Grow Large Protein Crystals, *Structure*, 10, 147-151
- 21.E. E. Lattman, P. J. Loll, (2008), Baltimore, The John Hopkins University Press

22. Π. Α. Βαρώτσος, Κ. Δ. Αλεξόπουλος, (1995), Αθήνα, Σαββάλας
23. Κ. Ε. Van Holde, W.C. Johnson, P. S. Ho., Βιοφυσική - Αρχές Φυσικής Βιοχημείας
24. Σ. Ι. Χαμόδρακας, (1993), Θέματα Μοριακής Βιοφυσικής, Αθήνα, Συμμετρία
25. G. Rhodes, (1993), Crystallography made crystal clear, London, Academic Press Inc
26. E.F. Garman and M. Weik (2012), Radiation Damage To Biological Macromolecules: Some Answers And More Questions, Journal of Synchrotron Radiation
27. H. C. Tai (2004), X-Ray Crystallographic Studies Of Bovine Serum Albumin And Helicobacter Pylori Thioredoxin-2
28. J. Drenth, (2002) Principles of Protein X-Ray Crystallography, New York, Springer
29. The CCP4 Suite — Computer Programs For Protein Crystallography - Overview And Manual, (2004) CCLRC Daresbury Laboratory
30. Oxford Diffraction , Super Nova™ Manual, Varian Inc.
31. B.W. Matthews, (1968), Solvent Content of Protein Crystals, J. Mol. Biol. 33, 491-497
32. A. J. McCoy, R. W. Grosse-Kunstleve, P. D. Adams, M. D. Winn, L. C. Storoni and R. J. Read, (2007), Phaser Crystallographic Software, Journal of Applied Crystallography.