

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	4
SUMMARY	7
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	8
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
1.1 ΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΚΑΙ Η ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΕ ΑΥΤΑ	10
1.1.1 Κατάταξη των αντιβιοτικών	10
1.1.2 Η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά	11
1.1.3 Η προέλευση των γονιδίων της ανθεκτικότητας.....	13
1.1.4 Η δημιουργία γονιδίων ανθεκτικότητας σαν αποτέλεσμα αυθόρμητων μεταλλαγών.....	14
1.1.5 Η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά ως αποτέλεσμα της οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων	15
1.1.6 Άλλοι μηχανισμοί μεταφοράς γονιδίων ανθεκτικότητας	17
1.1.7 Συμπεράσματα	18
1.2 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΗ ΧΛΩΡΑΜΦΕΝΙΚΟΛΗ.....	19
1.2.1 Η χλωραμφενικόλη	19
1.2.2 Η ανθεκτικότητα στη χλωραμφενικόλη.....	20
1.2.3 Μη ενζυμική ανθεκτικότητα στη χλωραμφενικόλη.....	21
1.2.4 Ενζυμική ανθεκτικότητα στη χλωραμφενικόλη	22
1.2.5 Η φωσφοτρανσφεράση της χλωραμφενικόλης από το <i>S.venezuelae</i>	23
1.2.6 Οι ακετυλοτρανσφεράσες της χλωραμφενικόλης (CAT)	25
1.2.7 Γενικές ιδιότητες των ακέτυλο-τρανσφερασών της χλωραμφενικόλης.....	27
1.2.8 Γενικά για τις ακετυλοτρανσφεράσες της χλωραμφενικόλης από την <i>E.coli</i>	30
1.2.9 Δομή και οργάνωση της CAT _{III}	31
1.2.10 Ο καταλυτικός μηχανισμός της CAT _{III}	32
1.2.11 Η ακετυλοτρανσφεράση της χλωραμφενικόλης τύπου I	37
1.2.12 Η ανθεκτικότητα στο φουσιδικό οξύ.....	39
1.3 ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΚΑΙ ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	42
2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	44
2.1 ΥΛΙΚΑ.....	44
2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ	45
2.2.1 Μέτρηση συγκέντρωσης πρωτεϊνών, ηλεκτροφόρηση, ενζυμικές δοκιμασίες, διαπίδυση και διαλυτοδιαπίδυση.....	45
2.3 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ.....	45
2.3.1 Βιολογική πηγή του ενζύμου ακετυλοτρανσφεράσης της χλωραμφενικόλης τύπου I	45
2.3.2 Κυτταρικές σειρές	46
2.3.3 Παραγωγή της πρωτεΐνης	46
2.3.4 Μέθοδος απομόνωσης του πρωτεΐνης	46
2.3.5 Εκχύλιση της βακτηριακής πάστας και παρασκευή του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος	47

2.3.6	Χρωτογραφία συγγένειας σε προσροφητή <i>Chloramphenicol caproate agarose</i>	47
2.3.7	χρωματογραφία σε ανιοανταλλακτικό προσροφητή <i>Q sepharose fast flow</i>	48
2.3.8	Χρωματογραφία μοριακής διήθησης σε προσροφητή <i>Sephacryl S200HR</i>	48
2.4	ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗ ΤΗΣ ΑΚΕΤΥΛΟΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΧΛΩΡΑΜΦΕΝΙΚΟΛΗΣ ΤΥΠΟΥ I	49
2.5	ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	50
2.5.1	Η μέτρηση των κρυστάλλων της CAT_1	50
2.5.2	Συλλογή δεδομένων περίθλασης.....	51
2.5.3	Ολοκλήρωση των δεδομένων.....	52
2.5.4	Επίλυση του προβλήματος των φάσεων με μοριακή αντικατάσταση.....	52
2.5.5	Βελτιστοποίηση του μοντέλου.....	55
3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	57
3.1	ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΗΣ CAT_1	57
3.2	ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗ ΤΗΣ CAT_1	61
3.2.1	Σύστημα κρυστάλλωσης με <i>MPD</i> σε pH 5.4 – 6.2.....	62
3.2.2	Σύστημα κρυστάλλωσης με κατακρημνιστικό παράγοντα μεθανόλη.....	63
3.2.3	Σύστημα κρυστάλλωσης με αιθανόλη και ισοπροπανόλη.....	64
3.2.4	Σύστημα κρυστάλλωσης με κατακρημνιστικό παράγοντα πολυεθυλενογλυκόλη 200 (<i>PEG200</i>).....	64
3.2.5	Όταν όλα φαίνεται να οδηγούν σε αδιέξοδο τότε η θεωρία των μειωτών ιοντικής ισχύος φαίνεται να δίνει την λύση.....	65
3.2.6	Το <i>MPD</i> και τα άλατα.....	65
3.2.7	Η περίπτωση της μεθανόλης και του $(NH_4)_2SO_4$	65
3.2.8	Η περίπτωση της μεθανόλης και του $NaCl$	67
3.2.9	Η περίπτωση του $CaCl_2$. Μια απρόσμενη επιτυχία.....	67
3.2.10	Δημιουργία κρυστάλλων της CAT_1 σε σύμπλεγμα με τον συναγωνιστικό αναστολέα φουσιδικό οξύ.....	71
3.2.11	Κρυοπροστασία των κρυστάλλων της CAT_1	72
3.3	ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΠΕΡΙΘΛΑΣΗΣ ΑΠΟ ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΥΣ ΤΗΣ CAT_1	72
3.3.1	Γενικά.....	72
3.3.2	Συλλογή δεδομένων από κρυστάλλους του αποενζύμου CAT_1	72
3.3.3	Επεξεργασία των δεδομένων περίθλασης.....	74
3.3.4	Συλλογή δεδομένων από κρυστάλλους του συμπλόκου της CAT_1 με φουσιδικό οξύ.....	77
3.3.5	Περιεκτικότητα σε διαλύτη και τα περιεχόμενα της ασύμμετρης μονάδας.....	80
3.3.6	Η συνάρτηση αυτοπεριστροφής (<i>Self rotation function</i>).....	81
3.4	ΕΥΡΕΣΗ ΤΩΝ ΦΑΣΕΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΔΟΜΗ ΤΗΣ CAT_1	82
3.4.1	Προετοιμασία του αρχικού μοντέλου για την εφαρμογή της μοριακής αντικατάστασης.....	83
3.4.2	Η μοριακή αντικατάσταση.....	84
3.4.3	Η συνάρτηση περιστροφής του <i>AMORE</i> (<i>Cross rotation function</i>).....	85
3.4.4	Η συνάρτηση μετάθεσης (<i>Cross translation function</i>).....	86
3.4.5	Πρώτοι χάρτες ηλεκτρονικής πυκνότητας.....	88
3.4.6	Πορεία της διαδικασίας βελτιστοποίησης.....	90
3.4.7	Προσδιορισμός της δομής του συμπλόκου της CAT_1 με το φουσιδικό οξύ.....	92

3.5	ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΜΟΝΤΕΛΟΥ ΤΗΣ CAT _I	94
3.5.1	Αποένζυμο της CAT _I	94
3.5.2	Σύμπλοκο της CAT _I με τον αναστολέα.....	95
3.5.3	Ανάλυση των παραγόντων θερμοκρασίας B	96
3.6	ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΗΣ CAT _I	100
3.6.1	Πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής της CAT _I από την πρωτοταγή αλληλουχία της	100
3.6.2	Δομή του μονομερούς	101
3.6.3	Οι έλικες.....	104
3.6.4	β-κλώνοι και β-πτυχωτές επιφάνειες	107
3.6.5	Η τεταρτοταγής δομή ως αποτέλεσμα του σχηματισμού του τριμερούς	107
3.6.6	Το κρυσταλλικό πλέγμα.....	116
3.6.7	Η μη κρυσταλλογραφική συμμετρία	125
3.6.8	Τα κατιόντα ασβεστίου	129
3.6.9	Κατανομή ηλεκτροστατικού φορτίου.....	131
3.6.10	Το μόριο του αναστολέα	132
3.6.11	Το ενεργό κέντρο της CAT _I και ο τρόπος δέσμευσης του φουσιδικού οξέος 132	
3.6.12	Τα μόρια του διαλύτη.....	136
3.6.13	Αρχεία συντεταγμένων.....	136
4	ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	137
4.1	ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΗΣ CAT _I ΜΕ ΤΗΝ CAT _{III}	137
4.1.1	Σύγκριση της δομής της CAT _I με την δομή της αγρίου τύπου CAT _{III}	137
4.1.2	Σύγκριση της δομής του συμπλόκου της CAT _I με το φουσιδικό οξύ, με το τετραπλό μετάλλαγμα (Q92C / N146F / Y168F / I172V) της CAT _{III}	140
4.2	ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΗΣ CAT _I ΜΕ ΑΛΛΕΣ ΓΝΩΣΤΕΣ ΔΟΜΕΣ	143
4.2.1	Συγκριτική ανάλυση με την διυδρολιποϊκή τρανσακετυλάση(E2p).....	144
4.2.2	Συγκριτική ανάλυση της CAT _I με την μη ριβοσωμική αμιδική συνθετάση 146	
4.2.3	Σύγκριση της CAT _I με την ακετυλοτρανσφεράση της καρνιτίνης.....	148
4.2.4	Σύγκριση της CAT _I με την αποκαρβοξυλάση της ορνιθίνης.....	149
4.2.5	Συμπεράσματα από τις συγκρίσεις	151
4.3	ΑΝΑΚΕΦΑΛΑΙΩΣΗ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΗΣ CAT _I	154
4.3.1	Η αρχιτεκτονική του ενεργού κέντρου της CAT _I και η ικανότητα δέσμευσης στεροειδών παραγώγων.....	155
4.3.2	Προοπτικές της παρούσας εργασίας	157
5	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ	159

Πρόλογος

Μετά την ολοκλήρωση ενός δύσκολου έργου όπως είναι η συγγραφή μιας διδακτορικής διατριβής το τμήμα του προλόγου αποτελεί ένα βήμα μέσω του οποίου ο συγγραφέας μπορεί να εκφράσει κάποιες σκέψεις του.

Η ενασχόληση μου με την κρυσταλλογραφία πρωτεϊνών και με την δομική βιολογία γενικότερα ήταν ταυτόχρονα δύσκολη και ευχάριστη. Ο προσδιορισμός της δομής της CAT₁ αποτελεί το πνευματικό παιδί μιας προσπάθειας 6 ετών κατά την διάρκεια της οποίας αποκόμισα σημαντικότερες θεωρητικές και τεχνικές γνώσεις οι οποίες πιστεύω ότι με κατέστησαν εκτός από αυτόνομο ερευνητή και καλύτερο άτομο. Έμαθα ότι η μεγαλύτερη ίσως των αρετών είναι η υπομονή η οποία σε συνδυασμό με την επιμονή μπορεί να ξεπεράσει όλες τις δυσκολίες και τα εμπόδια.

Παρόλα αυτά συνηδειτοποίησα ότι η πολυπλοκότητα με την οποία λειτουργεί η φύση σε όλα τα επίπεδα από το ατομικό – μοριακό μέχρι το πληθυσμιακό είναι τεράστια και όλες μας οι προσπάθειες καταφέρνουν να φωτίσουν μόνο μικρές πτυχές του φαινομένου της ζωής. Χαίρομαι διότι κατάφερα να προσθέσω ένα μικρό λιθαράκι στο δέντρο της γνώσης το οποίο αιώνες τώρα μεγαλώνει σαν αποτέλεσμα της κοπιαστικής και επίπονης εργασίας εκατομμυρίων ανώνυμων ανθρώπων που αφιερώνουν την ζωή τους στον βωμό της επιστημονικής δημιουργίας. Ψαχνοντας να βρώ κάτι που να εκφράζει αυτά που σκέφτομαι ανακάλυψα ένα απόσπασμα από τον «Μύθο του Σίσυφου» του Albert Camus

“ Και την στιγμή εκείνη την άχραντη όταν ο άνθρωπος στρέφεται πίσω προς την ζωή του, ο Σίσυφος, ξαναπηγαίνοντας προς το βράχο του, ατενίζει την ασύνδετη αυτή ακολουθία των πράξεων που γίνεται πεπρωμένο του, πλασμένο απ’ τον ίδιο, ενιαίο κάτω από το βλέμμα της μνήμης του και σύντομα σφραγισμένο απ’ τον θάνατό του. Έτσι βεβαιωμένος για την ολότελα ανθρώπινη φύση των ανθρώπινων, τυφλός που διψάει να δει και που ξέρει πως η νύχτα είναι ατέλευτη, πορεύεται πάντα. Κι εγώ αφήνω το Σίσυφο στα ριζά του βουνού! Το φορτίο του ο καθένας πάντα το ξαναβρίσκει. Όμως ο Σίσυφος διδάσκει την ανώτερη πίστη που αρνιέται τους θεούς και ανασηκώνει τους βράχους. Κρίνει και αυτός ότι τα πάντα καλά. Το σύμπαν αυτό, στο εξής δίχως αφέντη, δεν του φαίνεται ούτε στείρο, ούτε μάταιο. Κάθε ψήγμα της πέτρας αυτής, κάθε ορυκτό θραύσμα του όρους αυτού του γεμάτου νύχτα, φτιάχνει

μόνο του κόσμον ολόκληρο. Και μόνη η πάλη προς τις κορφές αρκεί για να γεμίσει την καρδιά του ανθρώπου. Ο Σίσυφος πρέπει να λογίζεται ευτυχής.’’

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου σε κάποιους ανθρώπους και αυτό είναι το κατάλληλο σημείο.

Καταρχήν θα ήθελα να ευχαριστήσω το Καθηγητή του Βιολογικού Τμήματος Μιχάλη Κοκκινίδη ο οποίος αναθέτοντας μου αυτήν την εργασία έδειξε εμπιστοσύνη στις ικανότητες μου αλλά και γιατί όλα αυτά τα έτη με υποστήριξε επιστημονικά ηθικά και οικονομικά. Για το λόγο αυτό του εκφράζω την απεριόριστη ευγνωμοσύνη μου.

Ευχαριστώ θερμά τον Ερευνητή του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας Κυριάκο Πετράτο ο οποίος με ενθάρυνε και με βοήθησε με τον τεράστιο πλούτο των γνώσεων του στην κρυσταλλογραφία πρωτεϊνών. Οι συζητήσεις μας αποτέλεσαν για εμένα πηγή γνώσεων και ιδεών για την συνέχιση του έργου μου.

Ευχαριστώ τον Καθηγητή του Βιολογικού Τμήματος Βασίλη Μπουριώτη ο οποίος έδειξε εμπιστοσύνη στις ικανότητες μου να φέρω εις πέρας την παρούσα εργασία και για τις παρατηρήσεις του πάνω στο κείμενο.

Ευχαριστώ τα λοιπά μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, κ^ρ Ε. Αθανασάκη, κ^ρ Δ. Αλεξανδράκη, κ^ρ Β. Γαλανόπουλο και κ^ρ Ν. Πανόπουλο, για την συνεισφορά τους και τον χρόνο που διέθεσαν στην ανάγνωση και διόρθωση της διατριβής αυτής.

Ευχαριστώ τους φίλους και συναδέλφους μου όλα αυτά τα χρόνια, Ντίνα Κοτσιφάκη, Μαρία Παπαδοβασιλάκη, Ρενάτε Γκέσμαν, Κώστα Παλιακάση, Κώστα Μαυρομάτη, Δημήτρη Κουτσιούλη, Βασιλική Φαδούλογλου και φυσικά τον Γιάννη Παπανικολάου ο οποίος κατά την γνώμη μου αποτελεί κεφάλαιο για το Βιολογικό Τμήμα και το Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας.

Ευχαριστώ τις γραμματείες του τμήματος Βιολογίας και του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας για την βοήθεια τους στην διεκπεραίωση διοικητικών θεμάτων.

Τον Κώστα Πετρόπουλο ο οποίος πάντα δηλώνει παρών στις τεχνικές δυσκολίες.

Χρωστώ τεράστια ευγνωμοσύνη στους γονείς μου Κωνσταντίνο και Αμαλία οι οποίοι με υποστήριξαν ηθικά και οικονομικά όλα αυτά τα χρόνια και πάντοτε ήταν σύμφωνοι με τις επιλογές μου.

Ευχαριστώ την σύντροφο της ζωής μου Μαριάννα, η οποία με την αγάπη, την φροντίδα και την απεριόριστη υποστήριξη που μου έδωσε, ήταν και είναι η δύναμη που με παρακινεί να αντεπεξέλθω τις δυσκολίες και τα προβλήματα.

Ηράκλειο 2004

Summary

The phenomenon of antibiotic resistance in bacterial species is of major importance with clinical and ecological implications. Bacteria exhibit resistance to antibiotics via different pathways. Among these the enzymatic inactivation of antibiotics is of great interest.

Resistance to chloramphenicol, a widely used antibiotic, is achieved via enzymatic acetylation of the primary hydroxyl group of the antibiotic compound. The acetyl group donor is acetyl coenzyme A. Acetylation of chloramphenicol occurs in many bacterial species due to the action of a family of evolutionary related enzymes which are chloramphenicol acetyltransferases. In Enterobacteria enzymatic acetylation of chloramphenicol is performed by three distinct variants form of the enzyme namely CAT_I, CAT_{II} and CAT_{III}. Type I variant not only confers resistance to chloramphenicol but also to the widely used steroidal antibiotic fusidic acid, which acts as an inhibitor of the enzyme. Although CAT_I is inhibited by fusidic acid, by non reversible binding of the steroid to the active site, it confers resistance to the antibiotic by sequestering it from the cytoplasm. This extraordinary molecular selectivity of CAT_I is of great interest.

In order to explore the mechanism of antibiotic resistance to chloramphenicol and to fusidic acid we have determined the crystal structure of type I chloramphenicol acetyltransferase CAT_I in apoenzyme form and complex with inhibitor fusidic acid.

The three dimensional structure of CAT_I reveals a homotrimeric organization of the enzyme. The enzyme crystallizes in space group P2₁ and there are four trimers in the crystallographic asymmetric unit.

The enzyme has a mixed α/β structure. The central structural element is an extended beta pleated sheet which spans the entire trimer molecular core and is surrounded by alpha helices which support the above mentioned sheet and make contacts with the solvent.

The active sites of the enzyme are formed by amino acid residues belonging to adjacent subunits. Due to the homotrimeric structure of the enzyme there are three active sites, which can operate independently by random addition of the substrate and acetyl coenzyme A.

The binding of fusidic acid is achieved through specific hydrogen bonding of the steroid molecule with the side chains of polar amino acid residues that protrude into the active

site, as well as with ordered solvent molecules that occupy well defined space in the active site of the enzyme. The binding of the inhibitor is stabilized by non polar interactions with a number of hydrophobic amino acid residue mainly Phenylalanines which participate in π -stacking with the extended ring network of fusidic acid.

The structure of the enzyme reveals complex non crystallographic symmetry between the four trimers. There are three twofolds local axis which relate the trimers by 180° rotation. A calcium cation participates in the formation of one local axis. The chelating complex of the calcium cation consist of seven groups which adopt a pentagonal bipyramid geometry, which has been reported for other structures.

Finally comparative analysis of the three dimensional structure of CAT_I reveals that the folding pattern common to chloramphenicol acetyltransferases is conserved in other functionally unrelated proteins which exhibit low levels of primary sequence homology with the afformentioned enzymes. Such findings suggests that mechanisms of folding conservation operate evolutionary and must be taken into account in the classification of protein structures.

The structure of CAT_I complexed with fusidic acid not only explains the mechanism of resistance to this antibiotic but can also yield structural information for rational design of novel antibiotics based on fusidic acid that do not bind to CAT_I . Furthermore the mode of binding of fusidic yields novel insights in the architecture of steroid binding proteins.

Περίληψη

Το φαινόμενο της εμφάνισης βακτηριακών στελεχών ανθεκτικών στα αντιβιοτικά έχει μεγάλο ενδιαφέρον και τεράστιες κλινικές προεκτάσεις. Τα βακτήρια καθίστανται ανθεκτικά στα αντιβιοτικά με πολλούς τρόπους. Από αυτούς μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει η ενζυμική τροποποίηση των αντιβιοτικών.

Η ανθεκτικότητα στη χλωραμφενικόλη επιτυγχάνεται μέσω ενζυμικής ακετυλίωσης στο πρωτοταγές υδροξύλιο του αντιβιοτικού. Ο δότης της ακέτυλο ομάδας είναι το ακέτυλο συνένζυμο A. Η ακετυλίωση της χλωραμφενικόλης εμφανίζεται σε πολλά βακτηριακά είδη και οφείλεται στην δράση μιας οικογένειας εξελικτικά συντηρημένων ενζύμων τα οποία χαρακτηρίζονται σαν ακέτυλο τρανσφεράσες της χλωραμφενικόλης. Στα εντεροβακτήρια η ενζυμική ακετυλίωση της χλωραμφενικόλης καταλύεται από τρεις διακριτούς ενζυμικούς τύπους (CAT_I , CAT_{II} , CAT_{III}). Η ακέτυλο τρανσφεράση της χλωραμφενικόλης τύπου I προσδίδει ανθεκτικότητα όχι μόνο στη χλωραμφενικόλη αλλά

και στο ευρέως χρησιμοποιούμενο αντιβιοτικό φουσιδικό οξύ., το οποίο αναστέλει συναγωνιστικά το ένζυμο μέσω μη αντιστρεπτής σύνδεσης με το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Παρά το γεγονός ότι το φουσιδικό οξύ δεν τροποποιείται χημικά από το ένζυμο η απομάκρυνση του από το κυτταρόπλασμα προσδίδει ανθεκτικότητα. Εκτός από το φουσιδικό οξύ η ακέτυλο τρανσφεράση της χλωραμφενικόλης I δεσμεύει και χρωστικές όπως το crystal violet , οι οποίες ανήκουν στην κατηγορία των triphenyl methane χρωστικών.

Προκειμένου να διερευνήσουμε τον μηχανισμό ανθεκτικότητας στην χλωραμφενικόλη και στο φουσιδικό οξύ προσδιορίσαμε την κρυσταλλική δομή της ακέτυλο τρανσφεράσης της χλωραμφενικόλης τύπου I σε αποενζυμική μορφή και σε σύμπλοκο με το φουσιδικό οξύ.

Η βιολογικά ενεργή μονάδα του ενζύμου είναι ένα ομοτριμερές, το οποίο εμφανίζει μια μικτή α/β δομή. Το κύριο δομικό χαρακτηριστικό το τριμερούς είναι μια εκτεταμένη β πτυχωτή επιφάνεια η οποία διατρέχει το μοριακό πυρήνα του ενζύμου και περιβάλλεται από α-έλικες οι οποίες την υποστηρίζουν και έρχονται σε επαφή με τον διαλύτη. Το ενεργό κέντρο του ενζύμου σχηματίζεται στην μεσεπιφάνειες αλληλεπίδρασης των μονομερών με αποτέλεσμα να υπάρχουν τρία ενεργά κέντρα στο τριμερές τα οποία μπορούν να λειτουργούν ανεξάρτητα καταλύοντας την αντίδραση ακετυλίωσης μέσω τυχαίας σειράς δέσμευσης του υποστρώματος και του συνενζύμου A. Η δέσμευση του φουσιδικού οξέος στο ενεργό κέντρο του ενζύμου γίνεται μέσω ενός καλά καθορισμένου δικτύου υδρογονικών δεσμών οι οποίοι σχηματίζονται μεταξύ των πολικών ομάδων του μορίου του αναστολέα και πολικών καταλοίπων του ενεργού κέντρου. Η δέσμευση του αναστολέα σταθεροποιείται επιπλέον μέσω υδρογονικών δεσμών με μόρια νερού τα οποία καταλαμβάνουν καθορισμένες θέσεις μέσα στο ενεργό κέντρο.

Μέσα την κρυσταλλογραφική ασύμμετρη μονάδα εμφανίζονται σχέσεις μη κρυσταλλογραφικής συμμετρίας. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η ύπαρξη ενός κατιόντος ασβεστίου το οποίο συμμετέχει σε σχηματισμό χηλικού συμπλόκου και επτά υποκαταστάτες υιοθετώντας διαμόρφωση πενταγωνικής διπυραμίδας.

Τέλος συγκριτική ανάλυση της δομής της CAT₁ αποδεικνύει την συντήρηση το δομικού προτύπου των ακετυλοτρανσφερασών της χλωραμφενικόλης και σε άλλες λειτουργικά άσχετες πρωτεΐνες οι οποίες εμφανίζουν πολύ χαμηλό ποσοστό ομολογίας σε επίπεδο πρωτοταγούς δομής.

1 Εισαγωγή

1.1 Τα αντιβιοτικά και η ανθεκτικότητα σε αυτά

1.1.1 Κατάταξη των αντιβιοτικών

Τα αντιβιοτικά είναι βιοοργανικές ενώσεις που εκδηλώνουν βακτηριοκτόνο ή βακτηριοστατική δράση. Τα περισσότερα αντιβιοτικά παράγονται από γένη των ακτινομυκήτων. Η αντιμικροβιακή δράση των αντιβιοτικών έδωσε τη δυνατότητα μετά από την τυχαία ανακάλυψη τους από τον A.Flemming, να χρησιμοποιηθούν σε μια πλειάδα κλινικών εφαρμογών, έτσι ώστε πλέον περίπου μισό αιώνα μετά από την έναρξη της χρήσης τους να έχουμε καταφέρει να εξαλείψουμε ή να θέσουμε κάτω από έλεγχο τις περισσότερες βακτηριακής φύσεως επιδημικές ασθένειες, τουλάχιστον στις βιομηχανικά ανεπτυγμένες περιοχές του πλανήτη. Η αντιβακτηριακή δράση των αντιβιοτικών μπορεί να συνοψιστεί σε αυτό που αναφέρεται ως επιλεκτική τοξικότητα.

Δηλαδή:

- Είτε δρουν σε βακτηριακούς στόχους οι οποίοι δεν υπάρχουν στο ανθρώπινο σώμα
- Είτε παρουσιάζουν μεγαλύτερη συγγένεια για τα μόρια στόχους των βακτηρίων σε σχέση με τα ομόλογα μόρια από ευκαρυωτικά κύτταρα.

Η κατηγοριοποίηση των αντιβιοτικών γίνεται βάση του τρόπου δράσης τους. Συνοπτικά μπορούμε να διακρίνουμε τα εξής:

- Αντιβιοτικά που αναστέλλουν την σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων και ενεργοποιούν αυτολυτικά μονοπάτια. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι πενικιλίνες και τα παράγωγά τους (β-λακτάμες), οι κεφαλοσπορίνες και οι μονοβακτάμες καθώς και τα γλυκοπεπτίδια όπως η βανκομυκίνη και η τοιχοπλανίνη.
- Αντιβιοτικά τα οποία παρεμποδίζουν διάφορα στάδια της σύνθεσης των πρωτεϊνών, όπως η στρεπτομυκίνη, η ερυθρομικίνη, η τετρακυκλίνη, οι μακρολίδες αλλά και αντιβιοτικά όπως η χλωραμφενικόλη το φουσιδικό οξύ, η κλινταμυκίνη κ.α.

- Αντιβιοτικά που αναστέλλουν τις διαδικασίες της αντιγραφής και της μεταγραφής αλλά και σχετίζονται με υπερελίκωση του βακτηριακού χρωμοσώματος. Τέτοια είναι η ακτινομυκίνη, οι κινολόνες, το ναλιδιξικό οξύ και οι οξοφλαβόνες.
- Αντιβιοτικά που αναστέλλουν μεταβολικά μονοπάτια όπως τα σουλφοναμίδια (Wright 2003).

1.1.2 Η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά

Το ζήτημα της εμφάνισης βακτηριακών στελεχών ανθεκτικών σε αντιβιοτικά έχει ανακύψει μέσα στην τελευταία πενήνταετία, μια περίοδο που κατ' ουσίαν συμπίπτει και με την ευρύτερη χρήση των αντιβιοτικών ως θεραπευτικών παραγόντων στην κλινική πρακτική. Αυτή η χρονική περίοδος σηματοδοτήθηκε από αξιόλογες επιτυχίες στην αντιμετώπιση μικροβιακών ασθενειών αλλά και κινδύνους από την κλιμακούμενη εμφάνιση βακτηριακών στελεχών ανθεκτικών σε ένα ή και περισσότερα αντιβιοτικά.

Ο ρόλος που διαδραμάτισε η χρήση των αντιβιοτικών μέχρι σήμερα σε επίπεδο μικροβιακής οικολογίας δεν είναι ξεκαθαρισμένος. Με άλλα λόγια δεν είναι πλήρως γνωστό τι επιπτώσεις είχε και έχει η εξαπόλυση αντιβιοτικών στους φυσικούς πληθυσμούς των βακτηρίων. Θα μπορούσαμε να πούμε ότι κατά την περίοδο 1940 μέχρι σήμερα, στην διάρκεια της οποίας η χρήση των αντιβιοτικών πήρε μεγάλες διαστάσεις όχι μόνο σε ιατρικές εφαρμογές αλλά και σε άλλους είδους ανθρώπινες δραστηριότητες (πχ. Κτηνοτροφία), συντελέστηκε ένα πείραμα μεγάλης έκτασης κατά το οποίο 10^6 μετρικοί τόνοι αντιμικροβιακών ουσιών απελευθερώθηκαν ανεξέλεγκτα στο περιβάλλον και λίγα ή καθόλου στοιχεία υπάρχουν όσον αφορά τις επιπτώσεις στις φυσικές βακτηριακές κοινωνίες (Mazel 1999).

Ένα δεύτερο σημείο το οποίο πρέπει να αναφερθεί είναι ότι τουλάχιστον κατά την αρχή αυτής της περιόδου τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν φυσικά παράγωγα κάποιων μικροοργανισμών τα οποία είχαν ταυτοποιηθεί αρκετό καιρό πριν αλλά η εφαρμογή τους σαν θεραπευτικοί παράγοντες καθυστέρησε σε σχέση με την ανακάλυψή τους, ενώ σήμερα έχουμε πλέον περάσει στην κατασκευή ημισυνθετικών αντιβιοτικών τα οποία δεν έχουν υπάρξει ξανά στο φυσικό περιβάλλον. Αυτό έχει τεράστια σημασία για το πρόβλημα της εμφάνισης ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά.

Είναι γενικά αποδεκτό ότι η εμφάνιση της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά έλαβε χώρα πολύ σύντομα μετά την έναρξη της χρήσης των τελευταίων σε εκτεταμένη κλίμακα.

Από βιοχημικής άποψης η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά μπορεί να αποδοθεί στις ακόλουθες διαδικασίες

- Το μόριο του αντιβιοτικού τροποποιείται χημικά μέσω της δράσης ενός ενζύμου με αποτέλεσμα την απώλεια της αντιμικροβιακής δραστηριότητας. Χαρακτηριστικές τέτοιες περιπτώσεις είναι οι β-λακτάμες (πενικιλίνες και παράγωγα) οι οποίες απενεργοποιούνται μέσω της διάσπασης του λακταμικού δακτυλίου από ένζυμα που συλλήβδην χαρακτηρίζονται β-λακταμάσες αλλά κατηγοριοποιούνται σε διάφορες τάξεις.
- Αλλαγές σε μοριακό επίπεδο που μπορεί να συμβαίνουν στο μόριο στόχο του αντιβιοτικού και οι οποίες μπορεί να οφείλονται σε μεταλλαγές ή γενετικούς ανασυνδυασμούς όπως συμβαίνει στην περίπτωση των PBP (penicillin binding proteins) και έχουν ως αποτέλεσμα την μείωση ή και την εξάλειψη της χημικής συγγένειας του αντιβιοτικού προς το μόριο στόχο.
- Αύξηση της αδιαπερατότητας της κυτταροπλασματικής μεμβράνης των κυττάρων στόχων ή ακόμα και δράση συστημάτων ενεργητικής μεταφοράς έξω από τα κύτταρα.
- Μετατροπή των μεταβολικών μονοπατιών στα οποία επεμβαίνει το αντιβιοτικό, όπως συμβαίνει με την ανθεκτικότητα στα σουλφοναμίδια.

Πέρα από την εξακρίβωση των ακριβών μοριακών μηχανισμών που ευθύνονται για την εμφάνιση της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά μεγάλη σημασία και ενδιαφέρον παρουσιάζει και η γενετική βάση της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά.

Λαμβάνοντας υπόψη την ταχύτητα εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών τουλάχιστον στα πλαίσια κλινικών μελετών, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι δύο θα μπορούσαν να είναι οι γενετικές προελεύσεις της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά: οι μεταλλαγές και η οριζόντια μεταφορά γονιδίων. Η τελευταία φαίνεται από τα υπάρχοντα δεδομένα ότι είναι ο κυρίαρχος τρόπος μεταφοράς και εξάπλωσης της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά.

Ένα ακόμα σημείο που παρουσιάζει ενδιαφέρον είναι ο τρόπος με το οποίο συντελέστηκε το φαινόμενο αυτό. Δύο πιθανοί τρόποι προτείνονται:

- Η ανθεκτικότητα εμφανίστηκε σε ένα περιορισμένο αριθμό βακτηριακών ειδών και από εκεί εξαπλώθηκε σε άλλα είδη.

- Η ανθεκτικότητα εμφανίστηκε ταυτόχρονα σε πολλά βακτηριακά είδη

Από ότι θα αναφέρουμε παρακάτω, ο πιθανότερος τρόπος είναι ο πρώτος, χωρίς να σημαίνει ότι κατά περίπτωση δεν είναι δυνατό να εμφανίζεται ανθεκτικότητα ταυτόχρονα σε πολλά βακτηριακά είδη.

Από ενδείξεις που υπάρχουν σε βακτηριακούς πληθυσμούς, η ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά εμφανίστηκε σε σύντομο χρονικό διάστημα μετά την χρήση αντιβιοτικών και δεν προϋπήρχε σε αυτούς τους πληθυσμούς. Παρόμοια έλλειψη της επιλεκτικής πίεσης που επιβάλλουν τα αντιβιοτικά οδηγεί σε ελάττωση των ανθεκτικών στελεχών αλλά όχι σε εξάλειψη τους.

Σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί πολλές περιπτώσεις ανθεκτικότητας και έχει διευκρινιστεί η γενετική βάση και η προέλευση τους. Χωρίς να προκαλεί έκπληξη η πλειονότητα των γονιδίων που ευθύνονται για την ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά έχουν εξωχρωμοσωμική βάση και εδράζονται σε μεταθετά στοιχεία ή πλασμίδια ανθεκτικότητας (R plasmids). Πρόσφατα όμως έχει διαπιστωθεί και η ύπαρξη χρωμοσωμικών περιοχών στις οποίες δημιουργούνται συστοιχίες γονιδίων που κωδικοποιούν για χαμηλού επιπέδου ανθεκτικότητα σε διάφορα αντιβιοτικά (Multiple Antibiotic Resistance Locus, MAR), τόσο στην *E.coli* όσο και στην *Salmonella typhimurium*. Αν και οι ανθεκτικότητες που κωδικοποιούν τα MARs δεν είναι τόσο αποτελεσματικές σε σχέσεις με τις εξωχρωμοσωμικές εντούτοις αποτελούν προαπαιτούμενη κατάσταση για την ανάπτυξη πλήρους ανθεκτικότητας μέσω πρόσληψης εξωγενούς γενετικού υλικού (Randall 2002).

1.1.3 Η προέλευση των γονιδίων της ανθεκτικότητας

Συνηθέστερα τα γονίδια ανθεκτικότητας ομαδοποιούνται σε συστοιχίες οι οποίες κωδικοποιούν για πολλαπλές ανθεκτικότητες. Από την ανάλυση του ποσοστού G+C αλλά και της χρήσης κωδικονίων διαπιστώθηκε ότι η προέλευση αυτών των γονιδίων είναι διαφορετική, έτσι ώστε δύο συμπεράσματα να εξαγονται άμεσα:

- Τα γονίδια αυτά έχουν διαφορετική προέλευση
- Υπάρχει εξελικτικό και φυσιολογικό πλεονέκτημα στην ομαδοποίηση τους σε συστοιχίες

Η προέλευση αυτών των γονιδίων θα μπορούσαμε να πούμε ότι είναι:

- Γονίδια housekeeping τα οποία υπέστησαν σταδιακά μεταλλαγές και απέκτησαν διαφορετική μοριακή επιλεκτικότητα
- Γονίδια που φυσιολογικά υπάρχουν στους οργανισμούς που παράγουν τα αντιβιοτικά
- Φυσικά γονίδια ανθεκτικότητας τα οποία δημιουργήθηκαν και εντοπίζονται σε εδαφικές κοινότητες βακτηρίων, σαν αποτέλεσμα δια-ειδικού ανταγωνισμού

1.1.4 Η δημιουργία γονιδίων ανθεκτικότητας σαν αποτέλεσμα αυθόρμητων μεταλλαγών

Αν και οι περιπτώσεις εμφάνισης γονιδίων ανθεκτικότητας σαν αποτέλεσμα αυθόρμητων μεταλλαγών είναι λίγες δεν θα πρέπει να παραβλέπονται μια και σε ορισμένες περιπτώσεις ευθύνονται για την εμφάνιση πολύ επικίνδυνων παθογόνων στελεχών. Τέτοια χαρακτηριστική περίπτωση είναι η εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών του *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* και *Mycobacterium smegmatis*.

Τα μυκοβακτήρια είναι υπεύθυνα παγκοσμίως για υψηλά ποσοστά θνησιμότητας. Διάφορα παθογόνα είδη του γένους έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον την τελευταία δεκαετία λόγω της κλιμακούμενης εμφάνισης υποτροπιάζουσων λοιμώξεων από *M. tuberculosis* και *M. avium* σε ασθενείς με AIDS. Μόνο στις Η.Π.Α. το 25% ως 50% των ενηλίκων ασθενών με AIDS προσβάλλονται από τα παραπάνω παθογόνα ενώ το 10% των παιδιών με AIDS εμφανίζουν αντίστοιχα συμπτώματα. Η συνεχείς εμφανίσεις αυτών των κρουσμάτων έχει μειώσει κατά πολύ την μέση διάρκεια ζωής των ασθενών.

Περίπου στο 13% των περιπτώσεων απομονώθηκαν κλινικά στελέχη του μυκοβακτηρίου που εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε ένα τουλάχιστον από τα φάρμακα, isoniazid(INH), rifampicin(RIF), streptomycin(STR), ethambutol(EMB) και pyrazinamidie(PZA), τα οποία αποτελούν φάρμακα πρώτης γραμμής για την αντιμετώπιση τέτοιων λοιμώξεων. Σε ποσοστό 3.2% επί του συνόλου απομονώθηκαν κλινικά στελέχη με διπλές ανθεκτικότητες σε δύο φάρμακα.

Όπως αποδείχθηκε όλες οι περιπτώσεις ήταν αποτέλεσμα μεταλλαγών σε συγκεκριμένα γονίδια. Από τις πλέον χαρακτηριστικές περιπτώσεις είναι η ανθεκτικότητα στη ριμφαμπικίνη η οποία οφείλεται σε μεταλλαγές του γονιδίου *rpoB*(*Rna polymerase*), οι οποίες χαρτογραφούνται σε μια περιοχή 69 bp που κωδικοποιούν για 23 κατάλοιπα από τα οποία τα 8 είναι συντηρημένα σε διάφορα κλινικά στελέχη του μυκοβακτηρίου. Σε

στελέχη τα οποία δεν εμφάνιζαν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό καμιά από τις μεταλλάξεις δεν εντοπίστηκε (Musser 1995).

Μια ακόμα περίπτωση με τρομερό ενδιαφέρον από κλινική άποψη είναι η εμφάνιση ανθεκτικότητας στο isoniazid το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί εκτενέστατα από το 1940 σαν αντιφυματικό φάρμακο. Η δράση του φαρμάκου εκδηλώνεται σε δύο στάδια στα οποία το φάρμακο οξειδώνεται από το προϊόν του γονιδίου *KatG* το οποίο είναι μια υπεροξειδάση 80kd με ομολογία με την οξειδάση I από την *E.coli* (Heym, Zhang et al. 1993; Heym, Honore et al. 1994; Heym, Alzari et al. 1995). Το ενεργοποιημένο φάρμακο σε δεύτερο στάδιο αναστέλλει την δράση της ενόυλο-άκυλο- μεταφορικής πρωτεΐνης που πιθανότατα κωδικοποιείται από το γονίδιο *orf1*, αλλά και της αφυδρογονάσης *InhA*, παρεμποδίζοντας το μονοπάτι σύνθεσης των μουκολικών οξέων που φαίνεται να σχετίζεται και με την παθογονικότητα των στελεχών.

Πρωτογενής ανθεκτικότητα στο isoniazid φαίνεται να οφείλεται σε μεταλλαγές του *KatG* (Zhang, Heym et al. 1992; Zhang and Young 1993) οι οποίες χαρτογραφούνται σαν έλλειψη μικρού μέρους του γονιδίου. Μετασχηματισμός των ανθεκτικών στελεχών με πλασμίδια που φέρουν αντίγραφο του φυσιολογικού γονιδίου *KatG* έχει σαν αποτέλεσμα μερική αναστροφή του φαινοτύπου και επαναφορά της δράσης του φαρμάκου.

Παρόλα αυτά διαπιστώθηκε ότι σε στελέχη φυσιολογικά για το *KatG* εμφανίζονταν ανθεκτικότητα η οποία σχετιζόταν με δύο γενετικούς τόπους τον *orf1* και *inhA* (Banerjee, Dubnau et al. 1994). Στην περίπτωση αυτή το στάδιο ενεργοποίησης του φαρμάκου παρεμποδιζόταν. Τέλος πρόσφατα έχει προσδιοριστεί κρυσταλλογραφικά η δομή μια N-ακετυλοτρανσφεράσης από το *M. smegmatis* στα 1.8Å η οποία απενεργοποιεί μέσω ακετυλίωσης το isoniazid (Sandy 2002).

1.1.5 Η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά ως αποτέλεσμα της οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων

Μελετώντας την ταχύτητα εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών σε συνδυασμό με την χορήγηση αντιβιοτικών εύκολα καταλήγει κανείς στο συμπέρασμα ότι η γραμμική σχέση μεταξύ των δύο μεγεθών μπορεί να ερμηνευτεί μέσω οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων. Αυτό που έχει παρατηρηθεί είναι ότι σε αρκετές περιπτώσεις τα ανθεκτικά στελέχη είναι ανθεκτικά σε περισσότερα του ενός αντιβιοτικά. Αυτό σημαίνει ότι υπάρχουν σε

λειτουργία μηχανισμοί γενετικού ανασυνδυασμού οι οποίοι είναι ικανοί να συλλέγουν και να ανασυνδυάζουν γονίδια ανθεκτικότητας διαφορετικής προέλευσης σε συστοιχίες. Τέτοιοι μηχανισμοί κωδικοποιούνται από τα μεταθετά στοιχεία (mobile genetic elements) τα οποία έχουν τρία βασικά χαρακτηριστικά:

- Περιέχουν το γονίδιο της ιντεργκράσης η οποία είναι μια θέσο-ειδική (site-specific) ρεκομπινάση
- Μια κύρια θέση ανασυνδυασμού 59bp
- Έναν ισχυρό υποκινητή
- Και μπορούν να ανασυνδυάσουν διακριτά γενετικά τμήματα γνωστά και ως γονιδιακές κασέτες.

Φαίνεται λοιπόν ότι αυτά τα μεταθετά στοιχεία είναι ικανά για ανταλλαγή γενετικού υλικού με τέτοιο τρόπο ώστε μετακινούμενα μεταξύ διαφορετικών στελεχών αποσπούν γονίδια ανθεκτικότητας δημιουργώντας συστοιχίες γονιδίων.

Η ανάπτυξη πολλαπλών ανθεκτικότητων εμπλέκει διάφορα σενάρια τα οποία είναι:

- Ένα πλασμίδιο ή μεταθετό στοιχείο κωδικοποιεί για ανθεκτικότητες για πολλά αντιβιοτικά.
- Ένα γονίδιο που βρίσκεται πάνω σε πλασμίδιο ή μεταθετό στοιχείο κωδικοποιεί για ένα βιοχημικό μηχανισμό ο οποίος προσδίδει ανθεκτικότητα σε μια ομάδα συγγενών αντιβιοτικών. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι τα γονίδια *aac,aph,ant* τα οποία δίδουν ανθεκτικότητα στα αμινογλυκοσίδια και το γονίδιο *bla* το οποίο δίνει ανθεκτικότητα στις β-λακτάμες.
- Ένα γονίδιο δίνει ανθεκτικότητα σε μια ομάδα δομικά άσχετων αντιβιοτικών όπως το γονίδιο *aad* που δίνει ανθεκτικότητα σε στρεπτομυκίνη και σπεκτινομυκίνη
- Ένα χημικός παράγοντας, όπως ένα αντισηπτικό ή ακόμα και μία οργανομεταλλική ένωση (π.χ. όπως οι ενώσεις του υδραργύρου που χρησιμοποιήθηκαν εκτενέστατα σαν αντιμικροβιακές ενώσεις για την καταπολέμηση της σύφιλης) επιλέγει για την εγκατάσταση δομικά συνδεδεμένων γονιδίων ανθεκτικότητας.

Αν και υπάρχουν πολλά αδιευκρίνιστα ζητήματα σχετικά με τα παραπάνω εντούτοις πρόσφατες μελέτες στο *Vibrio cholerae* έχουν δείξει μια δομική σχέση των μεταθετών στοιχείων που κωδικοποιούν ανθεκτικότητες με τα VCR από το *Vibrio* (Mazel 1999).

Αξίζει εδώ να αναφερθεί ένα παράδειγμα οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων ανθεκτικότητας το οποίο είχε καταγραφεί από παλιά αλλά μόλις πρόσφατα προσέλκυσε πάλι το ενδιαφέρον. Είναι γνωστό ήδη από το 19^ο αιώνα το φαινόμενο των «μεγάλων σωμάτων» που εμφανίζονται σε καλλιέργειες κάποιων βακτηρίων. Ειδικά στην περίπτωση του *Streptobacillus moniliformis* είχε παρατηρηθεί ότι κατά την ανάπτυξη του σε στερεά μέσα οι χαρακτηριστικές αποικίες του είδους συχνά συνοδεύονταν από την εμφάνιση μικρότερων αποικιών, μελέτη των οποίων έδειξε ότι είναι βακτηριακές μορφές με ελαττωματικά τοιχώματα (Klieneberg 1935), οι οποίες όμως σε κατάλληλες συνθήκες μπορούν να ανακτήσουν την κανονική τους μορφή. Αυτές οι μορφές έχουν συσχετιστεί σε κάποιες περιπτώσεις με άτυπες λοιμώξεις που δίδουν αρνητικά αποτελέσματα σε τυπικές εργαστηριακές καλλιέργειες μετά από θεραπευτική χορήγηση β-λακταμών. Είναι προφανές ότι η αυξημένη μεμβρανική διαπερατότητα που εμφανίζεται σε αυτές τις βραχύβιες μορφές μπορεί να διευκολύνει την πρόσληψη γονιδίων ανθεκτικότητας μέσω πλασμιδίων ή μεταθετών στοιχείων από βακτηριακά στελέχη άλλου είδους μέσα στο σώμα του ασθενούς (Woo 2003). Αν και επί του θέματος δεν υπάρχουν αρκετά δεδομένα τουλάχιστον δύο περιπτώσεις αναφέρουν την *in vitro* προσομοίωση του φαινομένου.

Στην πρώτη περίπτωση πλασμίδια από *S.aureus* μπορούν να μετασχηματιστούν σε κύτταρα *B.subtilis* τα οποία έχουν υποστεί κατεργασία με πενικιλίνη ή λυσοσταφίνη (Feitelson 1980). Στην δεύτερη περίπτωση κατά την διάρκεια δοκιμής μιας νέας μεθοδολογίας εργαστηριακού μετασχηματισμού για την *E.coli* η οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί χωρίς θερμικό σοκ ή εφαρμογή ηλεκτρικού δυναμικού, δείχθηκε ότι κατεργασία των κυττάρων με μικρές συγκεντρώσεις αντιβιοτικού που αναστέλλουν την σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος, κάνει τα βακτηριακά κύτταρα δεκτικά σε εξωγενές πλασμιδιακό DNA φτάνοντας σε συχνότητα 5×10^5 μετασχηματισμένα βακτήρια ανά mg πλασμιδιακού DNA (Turkon, Belushkin et al. 1990).

1.1.6 Άλλοι μηχανισμοί μεταφοράς γονιδίων ανθεκτικότητας

Εκτός από τα παραπάνω πρόσφατα εμφανίστηκαν ενδείξεις ότι μεταφορά γονιδίων ανθεκτικότητας μπορεί να συντελεστεί και με ένα ιδιόμορφο αλλά και αρκετά επικίνδυνο τρόπο.

Οι ενδείξεις αυτές υποδεικνύουν ότι ενδέχεται κατά την διαδικασία βιομηχανικής παρασκευής των αντιβιοτικών, να παραμένουν θραύσματα DNA ή RNA στα σκευάσματα των φαρμάκων τα οποία μπορούν να ενισχυθούν εργαστηριακά από δείγματα αντιβιοτικών όπως τυλοσίνης, ερυθρομυκίνης, στρεπτομυκίνης, τομπραμυκίνης, βανκομυκίνης. Τέτοιου είδους σκευάσματα βρέθηκαν να περιέχουν αλληλουχίες του 16s ριβοσωμικού RNA, ενώ από παρασκευάσματα στρεπτομυκίνης και οξυτετρακυκλίνης απομονώθηκαν με PCR τα γονίδια *gaph* και *otrA* τα οποία είναι η 3-φωσφοτρανσφεράση της στρεπτομυκίνης και το γονίδιο της ανθεκτικότητας στην οξυτετρακυκλίνη, αντίστοιχα (Webb 1992).

1.1.7 Συμπεράσματα

Μέχρι αυτό το σημείο τα στοιχεία τα οποία παρατέθηκαν αφορούν τη γενετική βάση της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά. Συνοψίζοντας μπορούμε να πούμε ότι για το συγκεκριμένο θέμα υπάρχει τεράστια ποσότητα πληροφορίας καθώς αποτελεί ένα από τα μείζονα προβλήματα της σύγχρονης βιοϊατρικής έρευνας με σαφείς επιπτώσεις για την υγεία των ανθρώπινων πληθυσμών. Έτσι μπορούμε να πούμε ότι σε γενικές γραμμές το πρόβλημα της ανθεκτικότητας μπορεί να εστιαστεί στην προέλευση και την διάδοση των γονιδίων ανθεκτικότητας.

- Για την προέλευση θα μπορούσαμε να πούμε ότι οι πιθανές πηγές γονιδίων ανθεκτικότητας είναι καταρχήν οι ίδιοι οργανισμοί που παράγουν τα αντιβιοτικά αλλά και μεταλλαγές σε φυσιολογικά βακτηριακά γονίδια τα οποία έχουν σαν αποτέλεσμα την αλλαγή της ειδικότητας τους.
- Η διάδοση των γονιδίων ανθεκτικότητας κατά κύριο λόγο γίνεται μέσω φυσικών διαδικασιών μεταφοράς γενετικού υλικού (σύζευξη, μετασχηματισμός, μεταγωγή) μέσω πλασμιδίων, φάγων και μεταθετών στοιχείων, με τα τελευταία να παίζουν τεράστια σημασία στην εμφάνιση πολλαπλών ανθεκτικοτήτων. Εκτός από τους εγγενείς παράγοντες που επηρεάζουν την εξέλιξη του φαινομένου σήμερα μπορούμε να εντοπίσουμε και μερικούς άλλους παράγοντες που συνεισφέρουν στην εξάπλωση των γονιδίων ανθεκτικότητας. Αυτοί οι παράγοντες είναι:
- Η διακίνηση ανθεκτικών στελεχών που εμφανίζονται σαν κλινικά περιστατικά σε υπηρεσίες υγείας

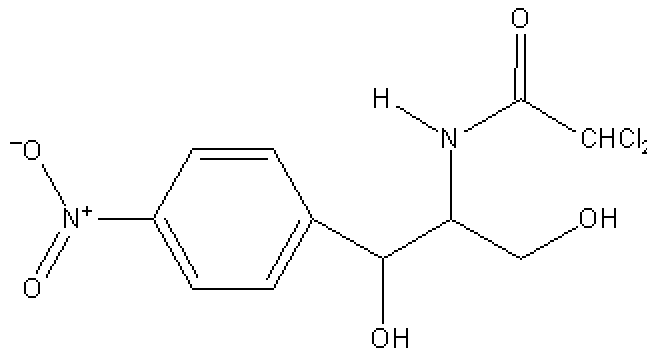
- Η διάδοση επικίνδυνων παθογόνων στελεχών μέσω των ανθρώπινων μετακινήσεων
- Η μεταφορά ανθεκτικότητας από βακτηριακά στελέχη εκτρεφόμενων ζώων στον άνθρωπο και συνεπώς
- Η εμφάνιση παθογόνων στελεχών που μπορούν να δράσουν και στα ζώα και στον άνθρωπο.

Στην συνέχεια θα παρουσιάσουμε συγκεκριμένα στοιχεία για την ανθεκτικότητα στη χλωραμφενικόλη και στο φουσιδικό οξύ τα οποία σχετίζονται με το αντικείμενο αυτής της διατριβής.

1.2 Ανθεκτικότητα στη χλωραμφενικόλη

1.2.1 Η χλωραμφενικόλη

Η χλωραμφενικόλη γνωστή και ως χλωρομυκετίνη είναι ένα αντιβιοτικό ευρέως φάσματος, το οποίο παράγεται από μια μεγάλη ποικιλία ειδών του γένους *Streptomyces*. Το αντιβιοτικό αυτό είναι ξεχωριστό ανάμεσα στις υπόλοιπες αντιμικροβιακές ενώσεις που συντίθενται από μικροοργανισμούς αφού περιέχει μια νιτροφαινύλο ομάδα συνδεδεμένη με μια ομάδα προπυλικής αλκοόλης καθώς και μια δίχλωρο ακεταμίδο ομάδα. Η σύνθετη δομή του αντιβιοτικού (εικ 1-1) δημιουργεί δύο ασύμμετρα κέντρα και μόνο το D(-)threo(1,R,2,S) στερεοϊσομερές είναι ενεργό σαν αναστολέας του κέντρου της πεπτιδύλο μεταφοράς των προκαρυωτικών 70s ριβοσωμάτων (Bartz 1948).



Εικ 1-1 Μοριακός τύπος της χλωραμφενικόλης

Αν και έχουν εμφανιστεί χημικά συνθετικά παράγωγα (Michelinaki 1997) κανένα δεν έχει την αντιμικροβιακή δραστηριότητα του αρχικού παραγώγου. Αυτή η δομή του

αντιβιοτικού είναι σχετικά απλή και γρήγορα αποτέλεσε ένα από τα πρώτα αντιβιοτικά που συντέθηκαν χημικά και εισήχθησαν στην καθημερινή πρακτική. Η χημική σύσταση του αντιβιοτικού το καθιστά μη πολικό μόριο, το οποίο είναι ικανό να διαχέεται μέσα από τις κυτταρικές μεμβράνες και τα κυτταρικά τοιχώματα (Stratton 2002). Η δράση της χλωραμφενικόλης εκδηλώνεται με αναστολή της ενεργότητας της πεπτιδύλο τρανσφεράσης των προκαρυωτικών ριβοσωμάτων μέσω αντιστρεπτής σύνδεσης με την 50s ριβοσωμική υπομονάδα (Pongs, Bald et al. 1973). Η αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης στα περισσότερα δεκτικά στελέχη εκδηλώνεται μέσω ενός βακτηριοστατικού αποτελέσματος, αν και ορισμένα είδη όπως το *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* και *Neisseria meningitidis* θανατώνονται άμεσα από το αντιβιοτικό (Rahal and Simberkoff 1979).

Επίσης έχει αναφερθεί ότι η χλωραμφενικόλη εμπλέκεται στην λειτουργία της βακτηριακής τρανσλοκάσης επειδή έχει βρεθεί ότι αναστέλει την σύνθεση του τειχοϊκού οξέος στο *Bacillus licheniformis* εμποδίζοντας την λειτουργία της undecaprenole-P. Η undecaprenole-P είναι μια αρκετά κοινή μεταφορική πρωτεΐνη που χρησιμοποιείται από τα βακτηριακά κύτταρα για την μεταφορά των δομικών στοιχείων του κυτταρικού τοιχώματος στον περιπλασμικό χώρο για την συναρμολόγηση τους (Stow, Starkey et al. 1971).

1.2.2 Η ανθεκτικότητα στη χλωραμφενικόλη

Η ποικιλία των μηχανισμών τους οποίους χρησιμοποιούν τα βακτήρια για να απενεργοποιήσουν βιολογικά ενεργά μόρια περιορίζεται από δύο παράγοντες, την σχέση δομής και λειτουργικότητας του χημικού παράγοντα, και τα μεταβολικά μονοπάτια που έχουν στη διάθεση τους. Στην περίπτωση της χλωραμφενικόλης, δεδομένου του μικρού μεγέθους της υπάρχουν αρκετές ομάδες πάνω στο μόριο της οι οποίες μπορούν να αποτελέσουν στόχους χημικής τροποποίησης. Έτσι αν λάβουμε υπόψη ότι σχεδόν όλες οι χημικές αυτές ομάδες ευθύνονται για την αντιβιοτική της δράσης δεν είναι παράξενο που έχουν αναφερθεί σχεδόν όλα τα είδη των χημικών μεταβολών για αυτό το μόριο αυτό, όπως αποκοπή των αλογόνων, αναγωγή νιτροομάδων, υδρόλυση του αμιδικού δεσμού, καθώς και ενζυμική ακετυλίωση ή φωσφορυλίωση του πρωτοταγούς και δευτεροταγούς υδροξυλίου (Shaw 1983).

Μετά από τέσσερις δεκαετίες ιατρικής χρήσης του αντιβιοτικού αυτού ο κυρίαρχος μηχανισμός ανθεκτικότητας που εμφανίζεται στα περισσότερα βακτηριακά στελέχη είναι η ενζυμική ακετυλίωση του αντιβιοτικού από ειδικευμένα ένζυμα που χαρακτηρίζονται σαν ακετυλ-τρανσφεράσες της χλωραμφενικόλης. Φυσικά ενδιαφέρον παρουσιάζουν και δύο άλλοι μηχανισμοί ανθεκτικότητας στον αντιβιοτικό αυτό. Ο ένας από τους μηχανισμούς αυτούς λειτουργεί μόνο στα είδη που παράγουν τη χλωραμφενικόλη και περιλαμβάνει φωσφορυλίωση του πρωτοταγούς υδροξυλίου, ενώ ο δεύτερος έχει πρόσφατα ταυτοποιηθεί και αποτελεί μη ενζυμική ανθεκτικότητα στη χλωραμφενικόλη. Έτσι έχουμε:

- Ενζυμική ακετυλίωση
- Ενζυμική φωσφορυλίωση
- Μη ενζυμική ανθεκτικότητα στη χλωραμφενικόλη

1.2.3 Μη ενζυμική ανθεκτικότητα στη χλωραμφενικόλη

Το φαινόμενο της μη ενζυμικής ανθεκτικότητας στη χλωραμφενικόλη εντάσσεται στους μηχανισμούς που περιγράφονται στην §1.1.2 οι οποίοι λειτουργούν μέσω περιορισμένης διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης ή και ενεργητικής μεταφοράς στον εξωκυττάριο χώρο.

Ο τύπος αυτός της ανθεκτικότητας παρουσιάζεται επαγόμενος από τα μη αναστέλοντα επίπεδα συγκέντρωσης του αντιβιοτικού (δηλαδή μικρότερη συγκέντρωση από την MIC, minimal inhibitory concentration) και οι γενετικοί καθοριστές του, εδράζονται στα πλασμίδια *IncP*, *P26* και στον τρανσπόζον *Tn1696* τα οποία απομονώνονται από ανθεκτικά στη χλωραμφενικόλη στελέχη του *Pseudomonas aeruginosa* (George 2002). Και τα τρία αυτά γενετικά στοιχεία είναι συγγενικά μεταξύ τους και βρέθηκε ότι κωδικοποιούν το γονίδιο *cmIA1* το οποίο ελέγχει την σύνθεση ενός πολυπεπτιδίου 419 καταλοίπων με μοριακό βάρος 44.2kDa (Gaffney, Cundliffe et al. 1981) (Nagai and Mitsuhashi 1972).

Το γονίδιο *cmIA1* είναι μέρος μια γενετικής κασέτας (gene cassette) και ο υποκινητής του αλλά και οι ρυθμιστικές αλληλουχίες του υποδεικνύουν ότι ελέγχεται στο μεταφραστικό επίπεδο (Burns, Rubens et al. 1986). Διαγράμματα υδροφοβικότητας της αναγόμενης αμινοξικής αλληλουχίας δείχνουν μεγάλη ομολογία του γονιδιακού προϊόντος με

τουλάχιστον 12 διαμεμβρανικές μεταφορικές πρωτεΐνες (Stokes and Hall 1991). Η ομοιότητα αυτή είναι ενδεικτική ότι το προϊόν του γονιδίου *cmIA1* είναι μια μεταφορική πρωτεΐνη που βασίζεται στο φαινόμενο pmf (proton motive force) για την μεταφορά της χλωραμφενικόλης.

Πρόσφατα, παρόμοια γονίδια έχουν εντοπιστεί τα οποία και έχουν κωδικοποιηθεί σαν *cmIA2*, *cmIA4* τα οποία έχουν ποσοστό ταυτότητας 90% και 98% αντίστοιχα και προφανώς ο μηχανισμός δράσης τους είναι κοινός. Εκτός από τα προαναφερθέντα γονίδια που προσδίδουν χαμηλού επιπέδου ανθεκτικότητα στη χλωραμφενόλη, έχουν ταυτοποιηθεί ανάλογα γονίδια που προσδίδουν ανθεκτικότητα στη φλωρφενικόλη ένα συγγενές μόριο με τη χλωραμφενικόλη και στην *S.typhimurium* DT104 η οποία χαρακτηρίζεται σαν *floR* και το οποίο φαίνεται να παράγει ένα πολυπεπτίδιο μήκους 404 αμινοξέων με φαινόμενο μοριακό βάρος 43kDa που έχει 88% ταυτότητα με την πρωτεΐνη Pp-flo από το *Pseudomonas piscida* και 48.5% με την πρωτεΐνη CmlA1 από το *P.aeruginosa*. Όλα τα συγκριθέντα μόρια παρουσιάζουν μια συντηρημένη διαμεμβρανική περιοχή με 12 τμήματα (Arcangioli 1999).

1.2.4 Ενζυμική ανθεκτικότητα στη χλωραμφενικόλη

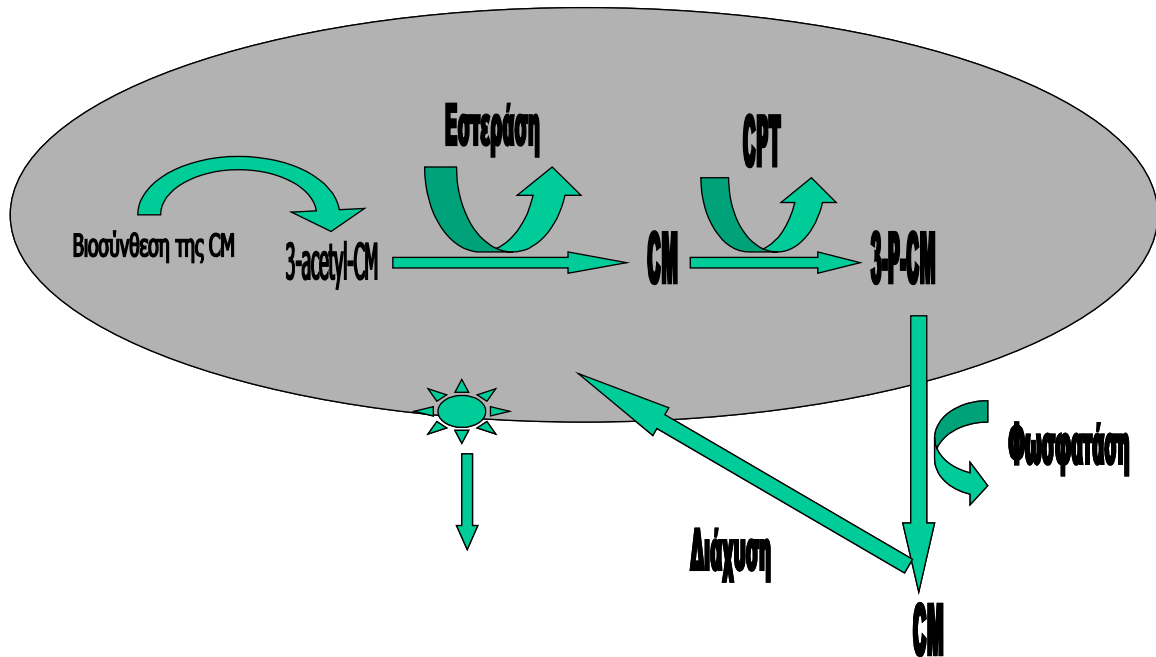
Η πλέον διαδεδομένη διαδικασία απενεργοποίησης της χλωραμφενικόλης μεταξύ των ανθεκτικών στελεχών που έχουν εξεταστεί μέχρι τώρα είναι η ενζυμική τροποποίηση του αντιβιοτικού και συγκεκριμένα η χημική προστασία του πρωτοταγούς υδροξυλίου της χλωραμφενικόλης (OH-3) είτε μέσω ακετυλίωσης, είτε μέσω φωσφορυλίωσης. Η ενζυμική ακετυλίωση πραγματοποιείται από τις ακετυλοτρανσφεράσες της χλωραμφενικόλης (CAT) (Shaw and Brodsky 1968; Shaw 1975; Shaw, Packman et al. 1979; Shaw, Brenner et al. 1985) οι οποίες αποτελούν μια οικογένεια από συγγενικά μόρια αρκετά διαδεδομένα στα βακτηριακά στελέχη, ενώ η ενζυμική φωσφορυλίωση μέχρι σήμερα έχει παρατηρηθεί μόνο στα είδη των αντινομικήτων που παράγουν τη χλωραμφενικόλη για να προστατευθούν από την τοξικότητα του ίδιου του προϊόντος τους (Shaw and Horwood 1976) και καταλύεται από τις φωσφοτρανσφεράσες της χλωραμφενικόλης (CPT)

1.2.5 Η φωσφοτρανσφεράση της χλωραμφενικόλης από το *S.venezuelae*

Το είδος *S.venezuelae* είναι από τα κυρίαρχα είδη ακτινομυκήτων που παράγουν τη χλωραμφενικόλη και προφανώς διαθέτει μια πληθώρα μηχανισμών για την προστασία του από τα τοξικά αποτελέσματα του αντιβιοτικού. Ο κυρίαρχος μηχανισμός προστασίας του από τη χλωραμφενικόλη περιλαμβάνει τη φωσφορυλίωση του πρωτοταγούς υδροξυλίου του αντιβιοτικού από ένα νέο ένζυμο την 3'-Ο-φωσφοτρανσφεράση της χλωραμφενικόλης (CPT). Αν και η φωσφορυλίωση έχει παρατηρηθεί και σε άλλες περιπτώσεις ως μηχανισμός απενεργοποίησης αντιβιοτικών όπως για παράδειγμα κατά την απενεργοποίηση της νεομυκίνης Β και της καναμυκίνης εντούτοις η ομολογία σε επίπεδο πρωτοταγούς δομής των ενζύμων που καταλύουν τις αντιδράσεις αυτές και την CPT είναι πολύ χαμηλή υποδεικνύοντας πως η CPT προέρχεται από ένα διαφορετικό εξελικτικό μονοπάτι. Σε αντίθεση με τα παραπάνω η CPT εμφανίζει αρκετά υψηλό ποσοστό ομολογίας με την κινάση του γαλλικού οξέος τύπου II (43%) (Krell, Coggins et al. 1998). Για την καταλυτική δραστηριότητα του ενζύμου είναι απαραίτητη η ύπαρξη εκτός του υποστρώματος, ATP και ιόντων Mg^{+2} .

Η κρυσταλλική δομή του ενζύμου (Ellis 1999) έχει προσδιοριστεί στα 2.8 Å τόσο για την αποενζυμική μορφή, όσο και στο σύμπλεγμα με το υπόστρωμα και τον συμπάροντα ATP. Το ένζυμο είναι διμερές στο διάλυμα αλλά εμφανίζεται σαν τετραμερές στην κρυσταλλική δομή. Παρουσιάζει μια μικτή α/β δομή με μια κεντρική β-πτυχωτή επιφάνεια να περιβάλλεται από α-έλικες. Το ενεργό κέντρο είναι μια κοιλότητα μεταξύ των υπομονάδων του ενζύμου και περιγράφεται από αρκετά υδρόφοβα κατάλοιπα τα οποία και αλληλεπιδρούν με τη χλωραμφενικόλη. Ο καταλυτικός μηχανισμός της μεταφοράς της φωσφορικής ομάδας από το ATP στη χλωραμφενικόλη απαιτεί τον σχηματισμό ενός τεταρτοταγούς ενδιάμεσου συμπλόκου. Για την ακρίβεια η πλευρική ομάδα του Asp37 που είναι και το καταλυτικό κατάλοιπο βρίσκεται σε απόσταση υδρογονοδεσμού με το πρωτοταγές υδροξύλιο της χλωραμφενικόλης και συμμετέχει έτσι στην αποπρωτονίωση της αλκοολικής αυτής ομάδας. Μόλις συμβεί αυτό, το προκύπτον νουκλεόφιλο προσβάλλει (νουκλεόφιλη προσβολή) το γ-φώσφορο του ATP δημιουργώντας έτσι το ενδιάμεσο παράγωγο της αντίδρασης. Στην συνέχεια το ενδιάμεσο αυτό κατάλοιπο καταρρέει αφήνοντας το προϊόν της αντίδρασης.

Υπέρθεση της δομής του αποενζύμου της CPT και του συμπλόκου δείχνει μια κίνηση του πολυπεπτιδικού σκελετού κατά 3.7Å προς το ενεργό κέντρο, υποδεικνύοντας την πιθανότητα ενός μηχανισμού επαγόμενης προσαρμογής με την δέσμευση του υποστρώματος (Izard 2000). Πρέπει εδώ να τονίσουμε ότι η CPT είναι ο μηχανισμός προστασίας του συγκεκριμένου είδους έναντι του αντιβιοτικού που το ίδιο παράγει. Παρόλο που η φωσφορυλιωμένη χλωραμφενικόλη είναι ανενεργή ως αντιβιοτικό εντούτοις η φωσφορυλίωση είναι μια αντιστρεπτή μεταβολή σε αντίθεση με την ακετυλίωση και άρα υπάρχει μεγάλη πιθανότητα ότι η 3'-Ο-φωσφο-χλωραμφενικόλη να αποφωσφορυλιώνεται από μια ειδική φωσφατάση μετά την αποβολή της στον εξωκυττάριο χώρο έτσι ώστε να μπορέσει να εκτελέσει τον αμυντικό της ρόλο. Πάντως η συγκεκριμένη υπόθεση διατυπώνεται από τους ερευνητές που διερευνούν τον ρόλο της CPT και μέχρι στιγμής δεν υπάρχουν διαθέσιμες πληροφορίες σχετικά με το θέμα αυτό. Από την παραπάνω υπόθεση προκύπτει ένα ακόμα ερώτημα σχετικά με το αντιβιοτικό και αυτό είναι το πώς αναστέλλεται η διάχυση του ενεργοποιημένου αντιβιοτικού από τον εξωκυττάριο χώρο μέσω της κυτταρικής μεμβράνης και του κυτταρικού τοιχώματος. Πρέπει εδώ να υποθέσουμε την ύπαρξη κάποιας μεταφορικής πρωτεΐνης η οποία συμμετέχει στο όλο σύστημα εξασφαλίζοντας την συνεχή αποβολή της χλωραμφενικόλης από το εσωτερικό του κυτταρού. Πάντως τελευταία έχει διαπιστωθεί η ύπαρξη μιας ειδικής εστεράσης της 3'-Ο-ακετυλο-χλωραμφενικόλης η οποία συντίθεται σαν ενδιάμεσο προϊόν κατά την βιοσύνθεση της χλωραμφενικόλης και η οποία, διασπά το ακετυλιωμένο προϊόν για να δημιουργήσει την ενεργή χλωραμφενικόλη (Gross 2002). Από όλα όσα αναφέρθηκαν παραπάνω συμπεραίνει κανείς ότι το φαινόμενο της ανθεκτικότητας στη χλωραμφενικόλη είναι ιδιαίτερα πολύπλοκο και ενδιαφέρον αφού είναι πιθανό να λειτουργούν πολλά συστήματα ανθεκτικότητας έτσι ώστε να επιτευχθεί ο αντικειμενικός στόχος του μικροοργανισμού που είναι να συνθέσει και να παράγει το αντιβιοτικό στο περιβάλλον. Σχηματικά θα μπορούσαμε να αποδώσουμε την όλη διαδικασία με την εικ 1-2



Εικ 1-2 Υποθετικό σχήμα της συντονισμένης λειτουργίας του συστήματος ανθεκτικότητας στο *S.venezuelae*

1.2.6 Οι ακετυλοτρανσφεράσες της χλωραμφενικόλης (CAT)

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η ανθεκτικότητα στη χλωραμφενικόλη είναι αρκετά συχνή μεταξύ των βακτηριακών ειδών. Αν και σε ορισμένες περιπτώσεις η ανθεκτικότητα αυτή οφείλεται σε μηχανισμούς αδιαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης ή σε ενεργητική μεταφορά εκτός του κυττάρου με την μεσολάβηση ειδικών μεταφορικών πρωτεϊνών, εντούτοις ο φαινότυπος της ανθεκτικότητας υψηλού επιπέδου στη χλωραμφενικόλη οφείλεται στις περισσότερες περιπτώσεις στην ενζυμική ακετυλίωση της πρωτοταγούς υδροξυλομάδας της χλωραμφενικόλης από τα ένζυμα που είναι γνωστά σαν ακετυλοτρανσφεράσες της χλωραμφενικόλης (CAT) (Shaw 1967). Τα 3-Ο-ακετόξυ παράγωγα της χλωραμφενικόλης δεν εμφανίζουν αντιβιοτική δράση και δεν προσδένονται στα βακτηριακά ριβοσώματα και άρα αποτυγχάνουν να δράσουν ως αναστολείς της πρωτεϊνοσύνθεσης. Τα δομικά γονίδια για τα ένζυμα αυτά είναι εξωχρωμοσωμικής προέλευσης τουλάχιστον για τα γένη της οικογένειας των *Enterobacteriaceae*, όπου και εντοπίζονται σε R πλασμίδια (resistance plasmids) και μεταθετά στοιχεία. Αντίστοιχα, στα είδη των σταφυλόκοκκων η ανθεκτικότητα στη χλωραμφενικόλη εντοπίζεται και εκεί σε μεταθετά στοιχεία και R παράγοντες. Ανθεκτικότητα που οφείλεται στη δράση των CAT έχει αναφερθεί επίσης και στα *Streptococcus faecalis*, *Diplococcus*

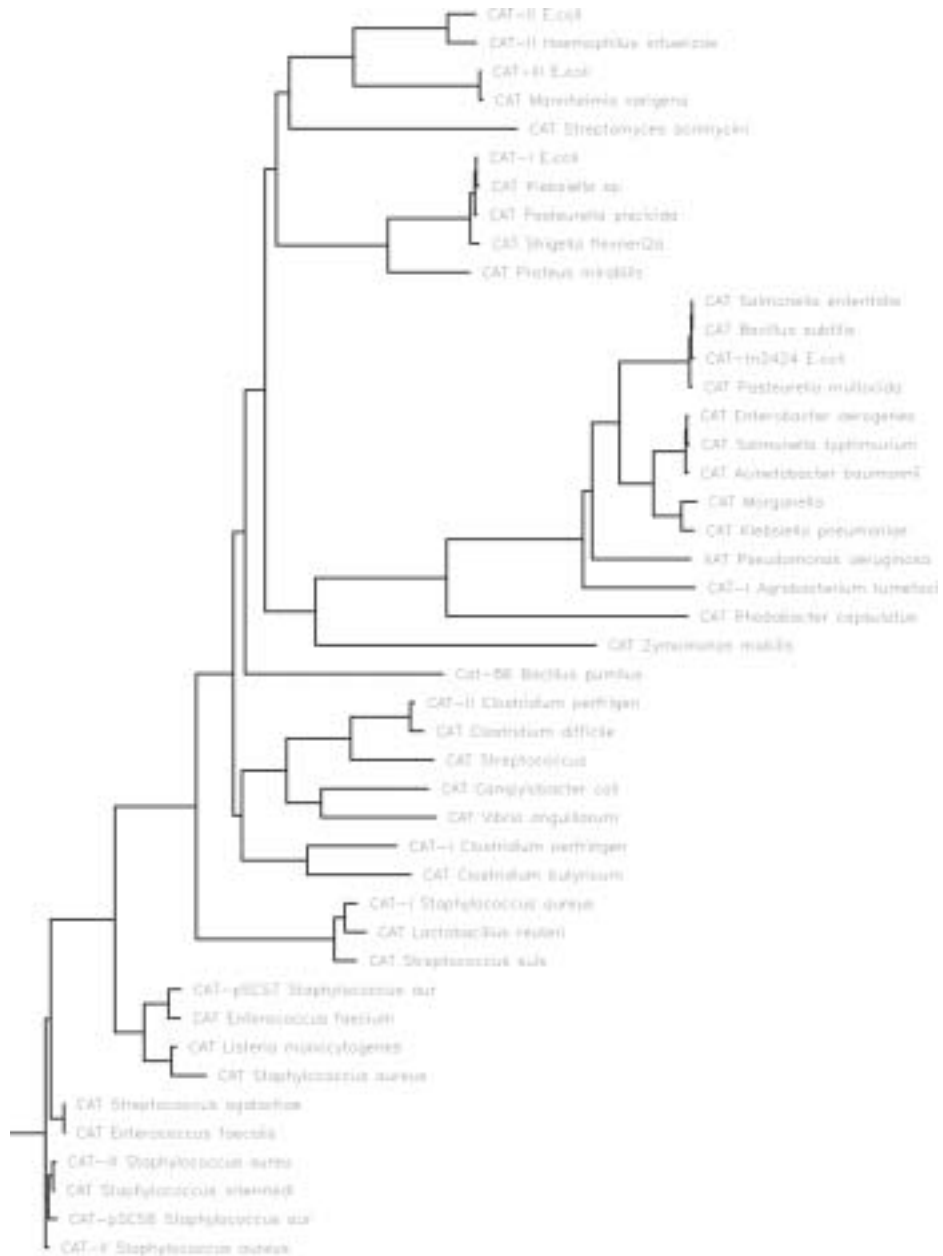
pneumoniae, Agrobacterium tumerifaciens και Pseudomonas aeruginosa (Rogers, Rahman et al. 2002) (Shaw, Brenner et al. 1985; White, Stokes et al. 1999).

Τα βακτηριακά στελέχη που συνθέτουν τα ένζυμα αυτά ξεκινούν την εκθετική φάση της ανάπτυξης τους μόνο αφού η συγκέντρωση του αντιβιοτικού πέσει κάτω από ένα επίπεδο στο οποίο δεν μπορεί να λειτουργήσει ανασταλτικά για την πρωτεϊνοσύνθεση (<**MIC, minimal inhibitory concentration**). Ο χρόνος που απαιτείται για να πραγματοποιηθεί κάτι τέτοιο είναι περίπου ανάλογος με την αρχική συγκέντρωση του αντιβιοτικού στο θρεπτικό μέσο. Το παραπάνω ισχύει για βακτήρια αρνητικά κατά Gram τα οποία μεταφέρουν R πλασμίδια ή μεταθετά στοιχεία τα οποία υπαγορεύουν συνεχή και μη επαγόμενη σύνθεση της CAT.

Σε άλλα βακτηριακά είδη όπως στους σταφυλόκοκκους, στρεπτόκοκκους και στο αγροβακτήριο το φαινόμενο είναι πιο πολύπλοκο αφού η σύνθεση της CAT είναι επαγομένη από χαμηλά επίπεδα συγκέντρωση της χλωραμφενικόλης.

Έχει παρατηρηθεί ότι είναι δυνατό στο ίδιο βακτηριακό κύτταρο να φιλοξενούνται δύο συμβατά πλασμίδια κάθε ένα από τα οποία μεταφέρει και ένα γονίδιο της CAT. Έτσι είναι προφανές ότι η ενζυμική ενεργότητα στην εντεροβακτήρια υπόκειται σε διακυμάνσεις που οφείλονται σε αυξημένες δόσεις του γονιδίου της CAT. (Shaw, Sands et al. 1972).

Η καταστολή της σύνθεσης της CAT στην *E.coli* γίνεται με ένα μηχανισμό στον οποίο συμμετέχει το c-AMP, πράγμα το οποίο είναι σε συμφωνία με την παρατήρηση ότι τα επίπεδα της CAT ελαττώνονται όταν τα ανθεκτικά στελέχη αναπτύσσονται σε θρεπτικά υλικά που περιέχουν γλυκόζη (Kuzj 1998). Εκτός από τις παραπάνω περιπτώσεις έχουν βρεθεί δύο τουλάχιστον φάγοι, ο P1CM και ο λ(CM), οι οποίοι προσδίδουν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό όταν βρίσκονται στην λυσιγονική φάση ανάπτυξης τους. Και στις δύο περιπτώσεις ο ανθεκτικός φαινότυπος οφείλεται στην σύνθεση της CAT (Kondo, Haarala et al. 1970; Garber, Carmielli et al. 1978). Από τις μέχρι τώρα μελετημένες ακετυλοτρανσφεράσες της χλωραμφενικόλης έχει διαπιστωθεί εκτεταμένη ομολογία σε επίπεδο πρωτοταγούς δομής, η οποία μπορεί να δώσει πληροφορίες σχετικά με την ομαδοποίηση των ενζύμων αυτών σε συγκεκριμένες υποομάδες οι οποίες παρουσιάζονται στην εικ 1-3



Εικ 1-3. Φαινόγραμμα το οποίο ομαδοποιεί τις αλληλουχίες διαφόρων CAT και μιας XAT από διάφορα βακτηριακά είδη. Η πολλαπλή στοιχισή έγινε με το CLUSTALW και το φαινόγραμμα κατασκευάστηκε με το λογισμικό πακέτο PHYLIP

1.2.7 Γενικές ιδιότητες των ακέτυλο-τρανσφερασών της χλωραμφενικόλης

Παρόλο που δεν υπάρχει ένα μόνο τύπος της CAT ο οποίος να μπορεί να επιλεγεί σαν βασικός αντιπρόσωπος της ομάδας αυτών των ενζύμων όλες οι ποικιλίες των ενζύμων

που έχουν μελετηθεί μέχρι τώρα διαθέτουν κοινά χαρακτηριστικά τα οποία εντοπίζονται σε βιοχημικές και δομικές ομοιότητες. Έτσι μπορούμε συνοπτικά να αναφέρουμε :

- Το άριστο pH για όλα τα ένζυμα του τύπου αυτού είναι στο 7.8
- Το φαινόμενο μοριακό βάρος τους κυμαίνεται από 75kDa ως 80kDa
- Όλες οι CAT οι οποίες έχουν απομονωθεί, είναι σταθερά ομοτριμερή πράγμα που σημαίνει ότι το μέσο μοριακό βάρος κάθε υπομονάδας είναι 25-30 KDa.
- Το φαινόμενο ισοηλεκτρικό σημείο είναι μεταξύ 5.4 και 4.0 , και άρα αναμένεται να συμπεριφέρονται σαν τυπικές όξινες σφαιρικές πρωτεΐνες.
- Όλοι οι τύποι CAT που έχουν μελετηθεί παρουσιάζουν αυστηρή μοριακή επιλεκτικότητα μόνο για το D-threo στερεοϊσομερές της χλωραμφενικόλης καθώς και μια εμφανή προτίμηση του ακέτυλο συνένζυμου A σαν δότη της ακετυλομάδας έναντι άλλων συναφών συνενζύμων.

Όσον αφορά την εξειδίκευση για το συνένζυμο, διαπιστώθηκε ότι παρόλο που το ακέτυλο-συνένζυμο A είναι το προτιμητέο, ανταλλαγή του με προπιόνυλο- ή βουτύρυλο-συνένζυμο A είναι δυνατή όμως τα τελευταία δύο είναι λιγότερο δραστικά. Άλλοι όξινοι άκυλο-θειο-εστέρες που ελέγχθηκαν για την ικανότητα τους να λειτουργούν σαν δότες άκυλο-ομάδας, όπως το ηλέκτρυλο-συνένζυμο A και το μαλόνυλο-συνένζυμο A δεν έχουν καμιά επίδραση ως συμπαραγόντες .Η εξειδίκευση για το υπόστρωμα είναι υψηλή και ένα αρκετά μεγάλος αριθμός ισομερών της χλωραμφενικόλης αλλά και χημικών αναλόγων της έχουν δοκιμαστεί για την ικανότητα τους να λειτουργούν σαν υποστρώματα του ενζύμου. Όλα τα παράγωγα τα οποία έχουν αλλαγές στο προπανοδιολικό σκελετό του αντιβιοτικού είναι ανενεργά σαν υποστρώματα του ενζύμου. Το ίδιο ισχύει και για τα στερεοϊσομερή του αντιβιοτικού. Μερική δράση ως υποστρώματα φαίνεται αν εμφανίζουν τα πάρα (p-) υποκατεστημένα παράγωγα του βενζολικού δακτυλίου του αντιβιοτικού (Winshell and Shaw 1969). Στον πίνακα παρουσιάζεται μια κατάταξη των σημαντικότερων αντιπρόσωπων της οικογένειας

	Τύπος	Έκφραση	K_m (μM) για την CM	Ευαισθησία στο DTNB	Θερμική σταθερότητα στους 75 °C
R πλασμίδια (Gramm) (<i>Enterobacteriaceae</i>)	I	Συνεχής	8-10	Δεν υπάρχει	Σταθερό
	II	Συνεχής	17-20	Ευαίσθητο	Άγνωστη
	III	Συνεχής	17-20	Δεν υπάρχει	Σταθερό
CM πλασμίδια των σταφυλοκόκκων	A	Επαγόμενη	3-4	Δεν υπάρχει	Ασταθές
	B	Επαγόμενη	3-4	Δεν υπάρχει	Σταθερό
	C	Επαγόμενη	3-4	Δεν υπάρχει	Σταθερό
	D	Επαγόμενη	3-4	Δεν υπάρχει	Σταθερό

Πίνακας 1-1 Κατηγοριοποίηση των CAT από την *E.coli* και το *Staphylococcus*(Shaw 1975)

1.2.8 Γενικά για τις ακετυλοτρανσφεράσες της χλωραμφενικόλης από την *E.coli*

Το βακτηριακό είδος *E.coli* εμφανίζει ανθεκτικότητα στη χλωραμφενικόλη που οφείλεται στην σύνθεση των CAT, οι οποίες διακρίνονται σε τρεις τύπους **CAT_I**, **CAT_{II}** και **CAT_{III}**. Οι τύποι αυτοί εμφανίζουν μεγάλη ομοιότητα στο πλαίσιο της πρωτοταγούς δομής αλλά έχουν και αρκετές διαφορές στην καταλυτική δραστηριότητα και στην μοριακή επιλεκτικότητα που παρουσιάζουν.

Η CAT_{III} είναι το πλέον μελετημένο από τα ένζυμα αυτά και το πρώτο για το οποίο αποκτήθηκε δομική πληροφορία μέσω κρυσταλλογραφικής ανάλυσης. Το συγκεκριμένο ένζυμο έχει την ικανότητα να καταλύει μόνο την ακετυλίωση της χλωραμφενικόλης.

Η CAT_I έχει μια ξεχωριστή θέση στην οικογένεια αυτών των ενζύμων μια και ήταν το πρώτο από τα τρία στα οποία προσδιορίστηκε η πρωτοταγής δομή, αλλά και για ένα ακόμα λόγο. Αντίθετα από την CAT_{III}, η CAT_I εκτός από την ενζυμική ακετυλίωση της χλωραμφενικόλης είναι σε θέση να δεσμεύει διάφορα στεροειδή παράγωγα με κυρίαρχο αντιπρόσωπο το φουσιδικό οξύ με συναγωνιστικό τρόπο ως προς το φυσικό υπόστρωμα χωρίς όμως να μπορεί να επιφέρει χημική τροποποίηση. Άρα το φουσιδικό οξύ από αυστηρή βιοχημική άποψη είναι ένας συναγωνιστικός αναστολέας του ενζύμου. Η δράση του όμως ως αντιβιοτικό μετατρέπει άμεσα την ενζυμική αναστολή της CAT_I σε μηχανισμό ανθεκτικότητας σε αυτό. Το συγκεκριμένο θέμα θα συζητηθεί αναλυτικότερα σε ειδική παράγραφο. Ανάλογη βιοχημική δραστηριότητα εμφανίζει μια ομάδα χρωστικών γνωστές σαν triphenyl-methane χρωστικές με τυπικό αντιπρόσωπο το κρυσταλλικό ιώδες (crystal violet) οι οποίες και αυτές δεσμεύονται συναγωνιστικά στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Η ταυτότητα σε επίπεδο πρωτοταγούς δομής μεταξύ της CAT_I και της CAT_{III} είναι 46% πράγμα που σημαίνει ότι η συνολική δομή του είναι αρκετά όμοια, αλλά όμως τα περισσότερα κατάλοιπα του ενεργού κέντρου δεν είναι τα ίδια πράγμα το οποίο και έχει σημασία για την ευρύτερη μοριακή επιλεκτικότητα της CAT_I (Shaw 1967).

Η CAT_{II} είναι ένα ιδιαίτερο ένζυμο από την άποψη ότι παρουσιάζει ιδιαίτερη ευαισθησία στον DTNB (5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid) το οποίο είναι ένα αντιδραστήριο που χρησιμοποιείται ευρέως στην ενζυμική δοκιμασία για τις ακετυλοτρανσφεράσες της χλωραμφενικόλης. Για δομικούς λόγους που ακόμα παραμένουν ασαφείς αφού μέχρι αυτή την στιγμή δεν υπάρχει καμιά δομική πληροφορία για την CAT_{II} το κατάλοιπο

Cys31 το οποίο είναι συντηρημένο και στους τρεις τύπους της CAT είναι ιδιαίτερα δραστικό στο DTNB και σε άλλες παρεμφερείς ενώσεις. Αν και το συγκεκριμένο κατάλοιπο δεν αποτελεί ενεργό κομμάτι του καταλυτικού κέντρου τόσο στην CAT_{III} όσο και στην CAT_I εντούτοις φαίνεται να προστατεύεται από το δεσμευμένο υπόστρωμα.

Οι πρωταρχικές δομικές μελέτες που έγιναν με σκοπό την ανάλυση των ενζύμων αυτών χρησιμοποίησαν ετερομερή υβρίδια μεταξύ της CAT_{III} και της CAT_I. Τα αποτελέσματα αυτά ερμηνεύθηκαν χωρίς να είναι πλήρως γνωστές το ακριβές μοριακό βάρος και η πλήρης αμινοξική αλληλουχία των ενζύμων. Έτσι αρχικά εκτιμήθηκε λανθασμένα ότι τα ένζυμα αυτά είναι τετραμερή με υπομονάδες 20kDa (Packman and Shaw 1981). Αυτό όμως όπως αποδείχθηκε από την κρυσταλλική δομή της CAT_{III} και την δομή της CAT_I που παρουσιάζεται στα πλαίσια αυτής της διατριβής είναι ότι τα ένζυμα αυτά είναι σταθερά ομοτριμερή με υπομονάδες μοριακού βάρους 24965 και 25688 dalton αντίστοιχα

Στην συνέχεια θα παρατεθούν τα υπάρχοντα δεδομένα για τις CAT_{III} και CAT_I. Ο πλήρης καταλυτικός μηχανισμός σε ατομική λεπτομέρεια είναι γνωστός μόνο για την CAT_{III}, αναμένουμε όμως να είναι κοινός από χημική άποψη, μεταξύ των δύο ενζύμων.

1.2.9 Δομή και οργάνωση της CAT_{III}

Η κρυσταλλική δομή της CAT_{III} προσδιορίστηκε στα 1.75 Å διακριτικότητα, τόσο στην απονεζυμική μορφή του όσο και σε σύμπλοκο με τη χλωραμφενικόλη και το ακέτυλο συνένζυμο A (Leslie, Moody et al. 1988; Leslie 1990). Το ένζυμο είναι τριμερές και αποτελείται από τρεις πανομοιότυπες υπομονάδες οι οποίες αλληλεπιδρούν μέσω ενός β-κλώνου ο οποίος σταθεροποιεί την αλληλεπίδραση των υπομονάδων στην επέκταση της κεντρικής β-πτυχωτής επιφάνειας.

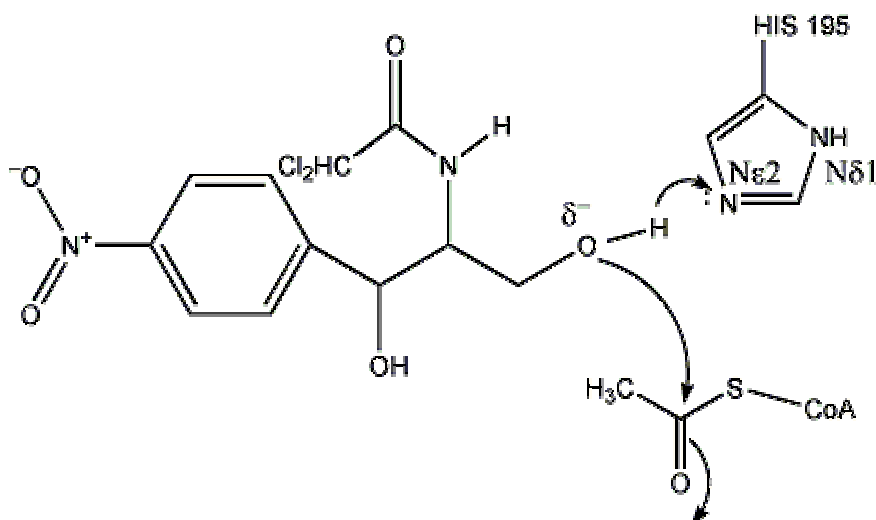
Το κυρίαρχο χαρακτηριστικό της δομής του μονομερούς είναι η κεντρική β-πτυχωτή επιφάνεια που αποτελείται από έξη β-κλώνους κατά κύριο λόγο αντιπαράλληλους, οι οποίοι παρουσιάζουν χαρακτηριστική αριστερόστροφη στρέβλωση. Πέντε α-έλικες βρίσκονται πακεταρισμένες στην μια πλευρά της β-πτυχωτής επιφάνειας. Αυτή η διεύθυνση των δομικών στοιχείων δημιουργεί μια δομή που έχει χαρακτηριστεί ανοικτό σαντουίτς (Richardson 1981). Τα μονομερή αλληλεπιδρούν για να δημιουργήσουν ένα δισκοειδές τριμερές το οποίο έχει 65 Å διάμετρο και 40 Å πάχος. Η δομές του αποενζύμου και των συμπλόκων της CAT_{III} είναι πανομοιότυπες με rms απόκλιση των ατομικών συντεταγμένων της τάξης των 0.3 Å. Οι υπομονάδες αλληλεπιδρούν για τη

δημιουργία του καταλυτικού κέντρου το οποίο είναι μια σήραγγα που σχηματίζεται από αμινοξικά κατάλοιπα που ανήκουν σε γειτονικά μονομερή. Τα αμινοξέα που συμμετέχουν στον σχηματισμό του ενεργού κέντρου είναι υδρόφοβα για να μπορούν να αλληλεπιδρούν με το μη πολικό υπόστρωμα. Η διαμόρφωση του υποστρώματος είναι συνεπής με τις πληροφορίες από μελέτες με NMR που έχουν γίνει σε διαλύματα χλωραμφενικόλης. Παρόλα αυτά υπάρχει μια σημαντική διαφορά η οποία εντοπίζεται στη διαμόρφωση του πρωτοταγούς υδροξυλίου της χλωραμφενικόλης του οποίο και υφίσταται την ακετυλίωση. Η ομάδα αυτή υιοθετεί μια ασταθή διαμόρφωση σε σχέση με αυτή που υπάρχει σε αμιγείς κρυστάλλους χλωραμφενικόλης. Αυτό φαίνεται να εξυπηρετεί τον σχηματισμό υδρογονοδεσμού μεταξύ της πρωτοταγούς αλκοόλης και του Ne2 ατόμου της His195 που είναι το καταλυτικά ενεργό κατάλοιπο. (Leslie, Moody et al. 1988; Leslie 1990). Υπάρχουν σοβαρές ενδείξεις ότι η διαμόρφωση του υποστρώματος ενδέχεται να είναι διαφορετική στην CAT_I από ότι στην CAT_{III}. Αυτό αναφέρεται αναλυτικά στο κεφάλαιο της συζήτησης των αποτελεσμάτων.

1.2.10 Ο καταλυτικός μηχανισμός της CAT_{III}

Για να εκδηλωθεί η ενζυμική ακετυλίωση της χλωραμφενικόλης είναι απαραίτητη η συνύπαρξη τριών συστατικών. Αυτά είναι το υπόστρωμα χλωραμφενικόλη το ακέτυλο συνένζυμο A καθώς και το ενεργό κέντρο του ενζύμου, το οποίο όχι μόνο φέρνει τα υποστρώματα σε θέση αντίδρασης αλλά και προσφέρει εκείνες τις χημικές ομάδες που είναι απαραίτητες για την ολοκλήρωση της αντίδρασης. Ο καταλυτικός μηχανισμός της ακετυλίωσης της χλωραμφενικόλης είναι αρκετά περίπλοκος για να παρουσιαστεί σε μεγάλη λεπτομέρεια και υπάρχει αρκετή πληροφορία πάνω στο θέμα με την οποία ο ενδιαφερόμενος αναγνώστης μπορεί να εντρυφήσει περισσότερο πάνω στην χημική και βιοχημική άποψη του θέματος.

Η ακετυλίωση της χλωραμφενικόλης πραγματοποιείται μέσω της απόσπασης του πρωτονίου του πρωτοταγούς υδροξυλίου της χλωραμφενικόλης από το μη δεσμικό ζεύγος ηλεκτρονίων του ατόμου Ne2 της His195. Αυτός ο συντονισμός οδηγεί στην δημιουργία παροδικού αρνητικού φορτίου στο οξυγόνο του πρωτοταγούς υδροξυλίου το οποίο προσβάλλει το ηλεκτρονιόφιλο κέντρο του καρβονυλικού άνθρακα του ακέτυλου συνένζυμου A. Σχηματικά ο μηχανισμός αντίδρασης φαίνεται στην εικ 1-4



Εικ 1-4 Ο μηχανισμός πυρηνόφιλης προσθήκης που γίνεται κατά την ενζυμική ακετυλίωση της χλωραμφενικόλης

Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τον σχηματισμό του ενδιάμεσου της αντίδρασης το οποίο όμως τελικά σε επόμενη φάση καταρρέει ελευθερώνοντας συνένζυμο Α και 3-ακέτυλο-χλωραμφενικόλη. Σε ένα δεύτερο στάδιο που δεν εξαρτάται από την δράση του ενζύμου μπορεί να συντελεστεί μια ταυτομερείωση η οποία περιλαμβάνει μεταφορά του ακετυλίου από το υδροξύλιο 3 στο υδροξύλιο 1, οπότε το μόριο που προκύπτει (1-ακέτυλο – χλωραμφενικόλη) μπορεί αν υποστεί και δεύτερη ακετυλίωση από το ένζυμο να σχηματιστεί 1,3 διακέτυλο-χλωραμφενικόλη. Αυτό το στάδιο δεν είναι απαραίτητο μια και το αρχικό προϊόν της αντίδρασης δεν έχει καμία αντιβιοτική δράση.

Διάφορες μελέτες χημικής τροποποίησης και κατευθυνόμενης μεταλλαξογέννησης (Kleanthous, Cullis et al. 1985) παρέχουν ενδείξεις ότι η His195 παίζει βασικό ρόλο στην κατάλυση αλλά εμπλέκεται και στη δέσμευση του υποστρώματος. Τα βασικά δεδομένα τα οποία στηρίζουν το ρόλο της His195 είναι:

- Βρίσκεται σε απόσταση υδρογονοδεσμού από το πρωτοταγές υδροξύλιο
- Αντικατάσταση της ιστοιδίνης με γλουταμίνη η αλανίνη έχει σαν αποτέλεσμα την μείωση του K_{cat} 9×10^5 και 3×10^5 φορές από ότι στο ένζυμο αγρίου τύπου.
- Αντικατάσταση της ιστοιδίνης με γλουταμικό οξύ δίδει ένα μετάλλαγμα το οποίο είναι λιγότερο δραστικό ενώ αντικατάσταση της ιστοιδίνης από ασπαρτικό οξύ δεν δίδει δραστικό ένζυμο. Αυτή η διαφορά πιθανά οφείλεται στο επιπλέον μεθυλένιο του γλουταμικού οξέος το οποίο φέρνει σε απόσταση υδρογονοδεσμού το καρβοξυλικό οξύ με το πρωτοταγές υδροξύλιο της χλωραμφενικόλης.

Τα παραπάνω συνηγορούν στο ότι η ιστιδίνη 195 έχει ρόλο γενική βάση (general base) στην αποπρωτονίωση του υποστρώματος (Lewendon, Murray et al. 1994). Εκτός από την ιστιδίνη 195 και άλλα κατάλοιπα του ενεργού κέντρου σχετίζονται με την ενζυμική ενεργότητα είτε άμεσα είτε παίζοντας ένα δομικό ρόλο σταθεροποιώντας τα υποστρώματα του ενζύμου. Τα κατάλοιπα τα οποία έχουν ταυτοποιηθεί είναι

- η σερίνη 148 η οποία είναι συντηρημένη σε όλες τις CAT που έχουν αναλυθεί ως σήμερα (το αντίστοιχο κατάλοιπο στην CAT_I είναι η σερίνη 146). Από τα υπάρχοντα δεδομένα (Lewendon, Murray et al. 1990) φαίνεται ότι η σερίνη αυτή συμμετέχει στην σταθεροποίηση του ενδιάμεσου οξυανιόντος της αντίδρασης. Αντικατάσταση της σερίνης με αλανίνη οδηγεί σε μια μείωση του K_{cat} κατά 53 φορές, ενώ αντικατάσταση της με γλυκίνη οδηγεί σε μείωση μόνο κατά 10 φορές πράγμα που μπορεί να οφείλεται στην αλληλεπίδραση ενός μορίου νερού το οποίο δρα σαν προγεφύρωμα μεταξύ του πεπτιδικού αζώτου της γλυκίνης και του καρβονυλικού οξυγόνου του ενδιάμεσου.
- Εκτός από την σερίνη 148 η οποία συμμετέχει στην σταθεροποίηση του ενδιάμεσου της αντίδρασης, αντίστοιχο ρόλο φαίνεται να διαδραματίζει και η θρεονίνη 174 μέσω της δράσης ενός μορίου νερού (μόριο 252) το οποίο ενδέχεται να είναι εκατέρωθεν συντονισμένο με το υδροξύλιο της θρεονίνης και με το υδροξύλιο-1 της χλωραμφενικόλης (Lewendon 1993).
- Η λευκίνη 160 είναι ένα ακόμα κατάλοιπο που από τα υπάρχοντα δεδομένα παίζει κάποιο σχετικά ασαφή ρόλο στην σταθεροποίηση του ενδιάμεσο σταδίου. Πιο συγκεκριμένα η λευκίνη 160 (η οποία είναι συντηρημένη και στην CAT_I) μαζί με την σερίνη 148, θρεονίνη 174 και την ισολευκίνη 172 σχηματίζουν μια αβαθή κοιλότητα. Λαμβάνοντας υπόψη (α) ότι η ακετυλίωση της χλωραμφενικόλης μπορεί να γίνει εις διπλούν καθώς παράγει το 1-3 διακετυλιωμένο προϊόν και (β) ότι απαραίτητη προϋπόθεση για να συμβεί αυτό είναι η ταυτομερίωση της 3-ακέτυλο χλωραμφενικόλης σε 1-ακέτυλο-χλωραμφενικόλη, το οποίο είναι αρκετά αργό σε χημικούς όρους στάδιο, αυτή η διαφορά στην ταχύτητα της αντίδρασης μπορεί να οφείλεται στο ότι η κοιλότητα που αναφέρθηκε παραπάνω είναι κατασκευασμένη να φιλοξενεί υπό κανονικές συνθήκες μόνο το δευτεροταγές υδροξύλιο του υποστρώματος. Αντικατάσταση της λευκίνης με φαινυλαλανίνη

έχει σαν αποτέλεσμα να μην αλλάζει η συγγένεια του ενεργού κέντρου για το υπόστρωμα αλλά αυτό αποκτά μια διαφορετική διαμόρφωση (Murray 1991).

- Η τυροσίνη 25 φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην δέσμευση του υποστρώματος και έμμεσο ρόλο στην καταλυτική δράση της ιστιδίνης 195. Αυτό γίνεται εφικτό μέσω υδροφοβική αλληλεπίδρασης των αρωματικών δακτυλίων της ιστιδίνης και της τυροσίνης. Στην δομή της CAT_{III} το φαινολικό υδροξύλιο της τυροσίνης είναι σε απόσταση υδρογονικού δεσμού με το υπόστρωμα, αν και αυτό δεν φαίνεται αρκετά σημαντικό αφού αντικατάσταση της τυροσίνης με φαινυλαλανίνη έχει σαν αποτέλεσμα αύξηση του K_m από 11.6μM σε 14.6μM με αντίστοιχη πτώση του K_{cat} από 599 s⁻¹ σε 298 s⁻¹. Άρα το ζητούμενο δομικό χαρακτηριστικό είναι η ύπαρξη ενός αρωματικού δακτυλίου στην άμεση γειτονία της καταλυτικής ιστιδίνης, πράγμα το οποίο επιβεβαιώνεται από το γεγονός ότι αντικατάσταση της τυροσίνης από αλανίνη οδηγεί σε χαμηλή ενεργότητα, αφού το K_m φτάνει την τιμή των 173μM και το K_{cat} την τιμή των 130 s⁻¹.

Επίσης ένα άλλο σημείο το οποίο πρέπει να τονιστεί είναι ότι και στην δομή της CAT_{III} αλλά και στην δομή της CAT_I που παρουσιάζεται στη διατριβή αυτή η διαμόρφωση της καταλυτικής ιστιδίνης είναι ίδια και αντιστοιχεί σε μια από τις δύο δυνατές. Πιο συγκεκριμένα η διαμόρφωση είναι τέτοια ώστε το Ne2 άτομο του πενταμελούς δακτυλίου της ιστιδίνης το οποίο και έχει διαθέσιμο το μη δεσμικό ζεύγος ηλεκτρονίων να είναι προσανατολισμένο προς τον δότη υδρογονοδεσμού ο οποίος ανήκει στο υπόστρωμα (στην περίπτωση της CAT_{III} είναι το πρωτοταγές υδροξύλιο της χλωραμφενικόλης, ενώ στην περίπτωση της CAT_I είναι το OH-6 του δακτυλίου A του φουσιδικού οξέος). Συμπερασματικά η διαμόρφωση της ιστιδίνης δεν οφείλεται στην αλληλεπίδραση των ηλεκτρονικών νεφών των αρωματικών δακτυλίων αλλά σχετίζεται με την διέδρη γωνία που υιοθετεί το αμινοξύ και τοποθετεί το Nδ1 άτομο του ιμιδαζολικού δακτυλίου σε απόσταση υδρογονοδεσμού με το καρβονυλικό οξυγόνο του ίδιου καταλοίπου κάτι το οποίο δεν είναι συνηθισμένο φαινόμενο σε δομές πρωτεϊνών (Gibbs, Moody et al. 1990; Murray 1991) (Murray 1991) (Lewendon 1988). Η δέσμευση του συμπαραγόντα της αντίδρασης, ακέτυλο-συνένζυμου A έχει μελετηθεί με κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση και με την χρήση χημικών αναλόγων και διαπιστώθηκε ότι για αυτήν ευθύνονται τόσο υδρόφοβες όσο και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Τα φωσφοανιόντα του συνενζύμου δεν συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις με τον

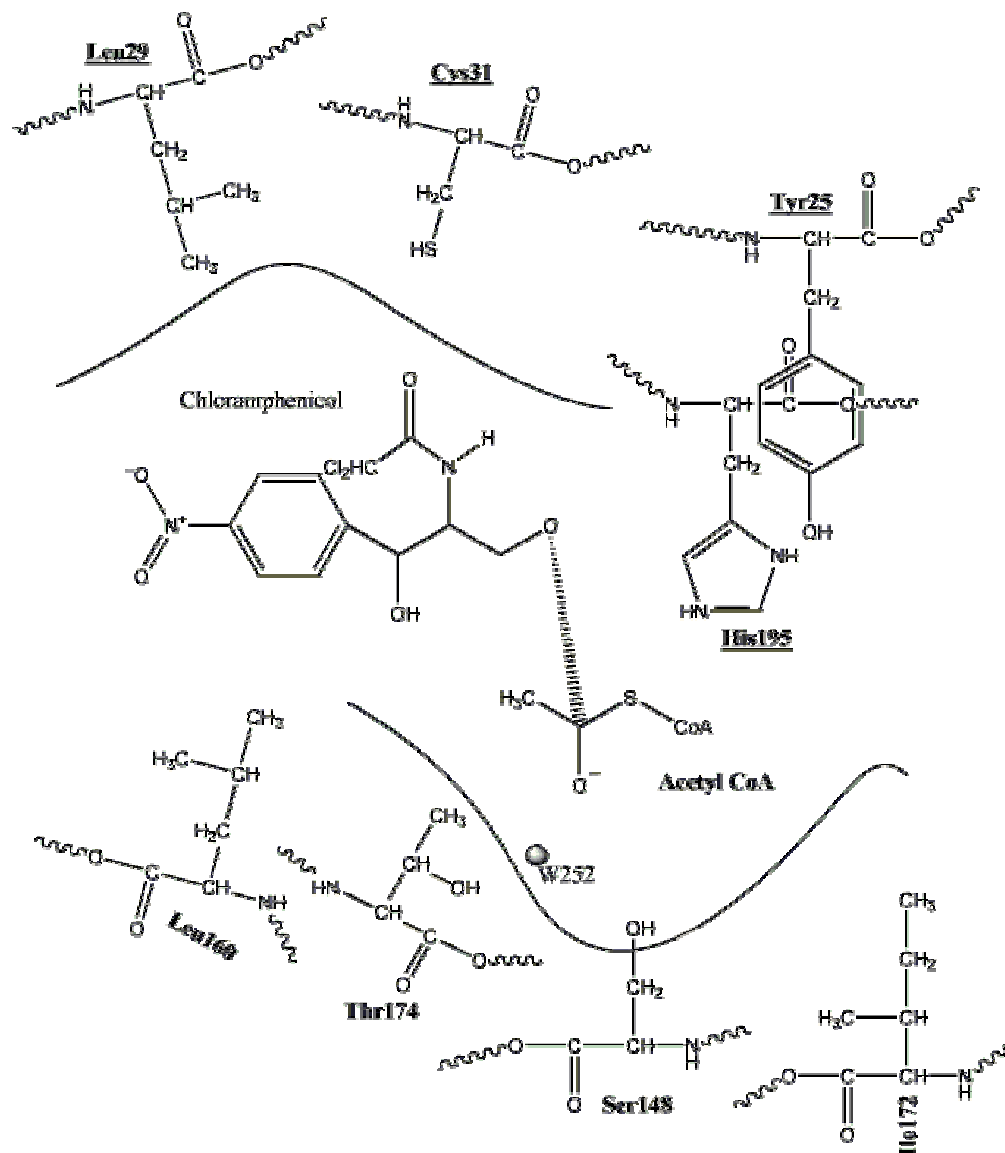
πολυπεπτιδικό σκελετό του ενζύμου. Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μακράς εμβέλειας (~12 Å) φαίνεται να συσχετίζουν την λυσίνη 177 και την λυσίνη 54 με την δέσμευση του συνένζυμου A.

Αντικατάσταση της τυροσίνης 56 και της τυροσίνης 178 σε αλανίνη υποδεικνύουν ότι αυτές εμπλέκονται σε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με την ομάδα της αδενίνης. Σημαντικότερη εκ των δύο φαίνεται να είναι για την CAT_{III} η τυροσίνη 178 (Day and Shaw 1992; Day, Shaw et al. 1992). Τα παραπάνω στοιχεία μπορούν να μας δώσουν έναν συγκεντρωτικό πίνακα

Τύπος μεταλλαγής	Km (μM)	Kcat (1/sec)	Kcat/Km
Άγριος τύπος	11,6	599	51,63793
ALA174	46,1	276	5,986985
VAL174	54,3	144	2,651934
ILE174	98,6	269	2,728195
GLN160	116	175	1,508621
PHE160	3,4	10,5	3,088235
PHE25	14,6	258	17,67123
ALA25	173	130	0,751445
ALA195	6,6	6,50E-04	9,85E-05
GLN195	11,4	1,80E-03	0,000158
TYR195	14	3,10E-03	0,000221
GLU195	32,6	1,20E-02	0,000368
ALA148	5,2	1,12E+01	2,153846
GLY148	17,6	5,93E+01	3,369318
CYS148	13,6	8,50E-01	0,0625
ASN148	20,9	2,80E+00	0,133971
PHE56	9,3	3,64E+02	39,13978
ILE56	7,8	2,64E+02	33,84615
VAL56	30,5	1,66E+02	5,442623
MET56	24,9	3,26E+02	13,09237
ALA56	17,4	2,21E+02	12,70115
THR56	25,6	2,43E+02	9,492188
LYS56	6,3	4,20E+00	0,666667

Πίνακας 1-2 Μεταβολή των κινητικών παραμέτρων της CAT_{III} για τις διάφορες μεταλλαγές της

Στον πίνακα 1-2 με έντονη σήμανση φαίνονται οι μεταλλαγές που είναι κοντά στο φυσιολογικό K_{cat}/K_m κριτήριο.



Εικ 1-5 Δισδιάστατη αναπαράσταση του ενεργού κέντρου με έμφαση στην ενεργές ομάδες που συμμετέχουν στην αντίδραση με βάση την πληροφορία που παρέχεται στο κείμενο για την CAT_{III}

1.2.11 Η ακετυλοτρανσφεράση της χλωραμφενικόλης τύπου I

Αν και η συσσωρευμένη πληροφορία για την CAT_{III} είναι τεράστια τόσο από δομικές μελέτες όσο και από βιοχημικές αναλύσεις και έρευνες κατευθυνόμενης μεταλλαξογένεσης, λίγα είναι γνωστά για την CAT_I παρόλο που το συγκεκριμένο μόριο έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς σαν γονίδιο σηματοδότης στην μοριακή βιολογία. Αυτή η

έλλειψη πληροφορίας είναι αξιοπρόσεκτη και αντιφατική σε σχέση με το γεγονός ότι η CAT_I ήταν η πρώτη από τις ακετύλο-τρανσφεράσες για την οποία έγινε πλήρης αλληλούχιση του γονιδίου της (Shaw, Packman et al. 1979) (Alton 1979; Marcoli 1980).

Τα κινητικά χαρακτηριστικά της CAT_I είναι παρόμοια με της CAT_{III}. Το K_m για τη χλωραμφενικόλη είναι 11 μ M ενώ το K_{cat} είναι 97 s⁻¹ περίπου 6 φορές μικρότερο από εκείνο της CAT_{III}. Αυτή η κινητική διαφορά της CAT_I αν και με την πρώτη ματιά παραπέμπει σε ένα λιγότερο τελειοποιημένο ένζυμο (δεδομένου ότι λόγος K_{cat}/K_m είναι το μέτρο της κινητικής τελειότητας στην οποία έχει φτάσει ένα ένζυμο), εντούτοις το γεγονός αυτό φαίνεται να αποζημιώνεται από την ικανότητα της CAT_I να προσδίδει ανθεκτικότητα όχι μόνο στη χλωραμφενικόλη αλλά και στο στεροειδές αντιβιοτικό φουσιδικό οξύ, με σταθερά δέσμευση $K_i=1.5\mu$ M (έναντι 279 μ M της τύπου III)

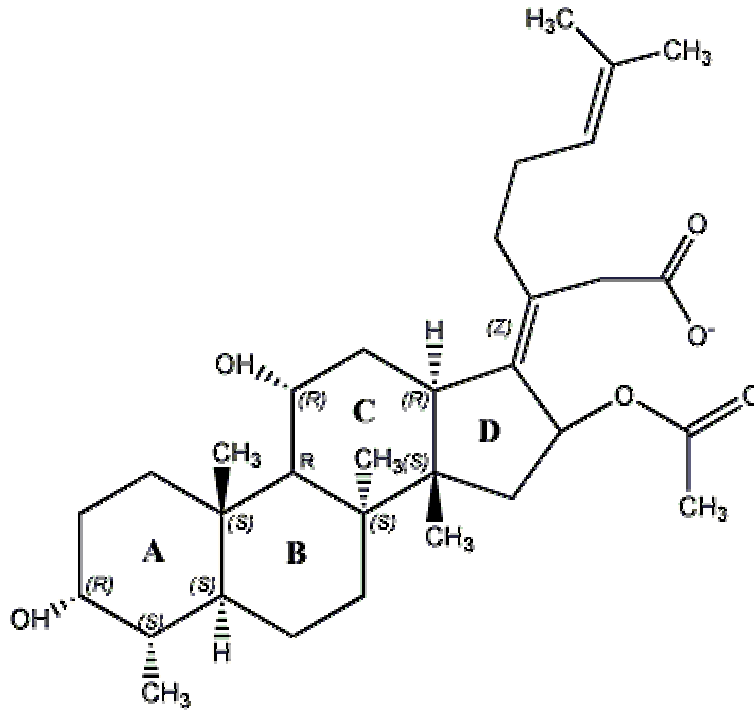
Εκτός από αυτό το συγκεκριμένο ένζυμο δεσμεύει με συναγωνιστικό τρόπο ως προς το φυσικό υπόστρωμα χρωστικές όπως το κρυσταλλικό ιώδες, το εθυλικό ιώδες και άλλες χαρακτηριστικές τριφαίνυλο-μεθενικές χρωστικές (Tanaka, Kudo et al. 1971; Tanaka, Izaki et al. 1974).

Αν και έγιναν προσπάθειες για την κρυστάλλωση και τον προσδιορισμό της δομής της CAT_I από την ερευνητική ομάδα η οποία είχε προσδιορίσει την δομή της CAT_{III} κάτι τέτοιο δεν έγινε δυνατό λόγω της δυσκολίας παραγωγής κρυστάλλων της CAT_I με κατάλληλες ιδιότητες περιθλάσης (Murray, Cann et al. 1995). Είναι προφανές ότι η ύπαρξη δομικής πληροφορίας αποτελεί την βάση για τον σχεδιασμό και την εκτέλεση οποιασδήποτε έρευνας σχετικά με τον προσδιορισμό των χαρακτηριστικών ενός ενζύμου που σχετίζονται με την καταλυτική του δράση. Από τις υπάρχουσες βιοχημικές αναλύσεις που έχουν πραγματοποιηθεί για την CAT_I φαίνεται ότι το γενικό σχήμα του καταλυτικού μηχανισμού που παρατέθηκε για την CAT_{III} ισχύει, πρέπει όμως να λάβουμε υπόψη ότι οι διαφορές που παρουσιάζουν τα δύο ένζυμα σε επίπεδο πρωτοταγούς δομής, μπορεί να επιβάλουν τοπικά διαφορετικές συνθήκες και άρα να σχετίζονται και με τη διαφορά στις κινητικές σταθερές μεταξύ τους. Όπως φαίνεται και στα αποτελέσματα και στην συζήτηση της διατριβής, διαφορές στο ενεργό κέντρο της CAT_I σε σχέση με αυτό της CAT_{III} προκαλούν ερωτήματα για το αν οι μοριακοί καθοριστές που έχουν ταυτοποιηθεί για την τελευταία είναι σε ισχύ για την CAT_I. Μερικές από τις πιο ενδιαφέρουσες δομικές μελέτες που έχουν γίνει στην CAT_I, πραγματοποιήθηκαν με φασματοσκοπία FT-IR με σκοπό να μελετηθεί η δευτεροταγής δομής του ενζύμου. Η συγκεκριμένη μελέτη

(Andreeva 2001), παρουσιάζει μια αύξηση στο ποσοστό της β-εκτεταμένης δομής η οποία επάγεται από λυοφιλοποίηση του ενζύμου και η οποία είναι αντιστρεπτή με ενυδάτωση. Τα δεδομένα αυτά αν και καταρχήν δεν φαίνεται να παρέχουν κάποια σημαντική δομική πληροφορία, αφού η συγκεκριμένη φασματοσκοπική μέθοδος δεν είναι σε θέση να συσχετίσει τη δευτεροταγή δομή με την αλληλουχία, παρόλα αυτά ιδωμένη υπό το πρίσμα παλαιότερων βιοφυσικών μελετών για τις ακετυλοτρανσφεράσες της χλωραμφενικόλης, παρέχουν μία ένδειξη για την σταθερότητα αυτών των ενζύμων. Τα ένζυμα αυτά έχουν κατασκευαστεί μέσα από μια εξελικτική διαδικασία με έναν και μοναδικό σκοπό, το να προστατεύουν το φέρον οργανισμό από τις τοξικές συνέπειες της χλωραμφενικόλης με υψηλή απόδοση. Η εξαιρετική σταθερότητα της CAT_I αποτέλεσε και το αντικείμενο και άλλων μελετών οι οποίες εστιάστηκαν στη συνεισφορά της τελικής α-έλικας, η οποία όμως προβλέπεται μέσω αλγορίθμων από την πρωτοταγή αλληλουχία του ενζύμου, στην σταθεροποίηση της τριτοταγούς δομής του μονομερούς της CAT_I και για την σωστή αναδίπλωση του βιομορίου (Van der Schueren, Robben et al. 1996; Van der Schueren, Robben et al. 1998). Τέλος άλλες βιοφυσικές μελέτες δείχνουν ότι η CAT_I αναστέλεται και από διάφορα απορυπαντικά τα οποία όμως έχουν βενζολικούς ή αρωματικούς δακτυλίους όπως το Triton X-100 (Junxuan and Jiang 1993).

1.2.12 Η ανθεκτικότητα στο φουσιδικό οξύ

Το φουσιδικό οξύ είναι ένα στεροειδές αντιβιοτικό το οποίο παράγεται κατά κύριο λόγο από τον μύκητα *Fusidium coccineum* (Godtfredsen, Roholt et al. 1962; Godtfredsen, Jahnssend et al. 1962) αλλά και από άλλα είδη μυκήτων τα οποία ανήκουν στις ομάδες των δευτερομυκήτων, ασκομυκήτων και βασιδιομυκήτων. Επίσης έχει ταυτοποιηθεί η σύνθεση φουσιδικού οξέος από τον μύκητα *Stibella aciculosa* που απομονώνεται από ιζήματα πυθμένος από θαλάσσια και υφάλμυρα περιβάλλοντα (Kuznetsova 2001). Το φουσιδικό οξύ είναι δομικά συγγενές με το χελβολικό οξύ το οποίο παράγεται από τον μύκητα *Aspergillus fumigatus* (Waksman, Horning et al. 1943) και με την κεφαλοσπορίνη P1 από είδη του *Cephalosporium* (Burton and Abraham 1951).



Εικ 1-6 Μοριακός τύπος του φουσιδικού οξέος. Σημειώνεται η σήμανση των δακτυλίων και τα ασύμμετρα κέντρα

Η υδρόφοβη δομή του μορίου του κατέστησε το φουσιδικό οξύ το αντιβιοτικό της επιλογής για θεραπεία δερματικών βακτηριακών λοιμώξεων, αλλά και για την μετεγχειρητική προστασία ασθενών λόγω της μεγάλης τοξικότητας που εμφανίζει για Gram⁺ βακτηριακά στελέχη όπως τα είδη του *Staphylococcus* (Turnidge 1999; Turnidge 1999). Η αντιβιοτική δράση του φουσιδικού οξέος εκδηλώνεται μέσω δέσμευσης του με τους παράγοντες επιμήκυνσης (elongation factors) EFG και EF2 προκαλώντας αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης λόγω μη αναστρεπτής σταθεροποίησης του συμπλόκου EFG-GTP και EF2-GTP αντίστοιχα (Johanson 1996)

Σε σχέση με άλλες τάξεις αντιβιοτικών, οι διαθέσιμες πληροφορίες για την γενετική και τους μηχανισμούς ανθεκτικότητας στο φουσιδικό οξύ είναι περιορισμένες. Μέχρι στιγμής έχουν περιγραφεί τέσσερις μηχανισμοί ανθεκτικότητας στο φουσιδικό οξύ, οι οποίοι είναι:

- Μεταλλαγή στους παράγοντες επιμήκυνσης. Έχει προσδιοριστεί κρυσταλλογραφικά η δομή ενός μεταλλάγματος του EFG (His573Ala) το οποίο εμφανίζει ανθεκτικότητα στο φουσιδικό οξύ (Laurberg 2000)
- Επιλεκτική διαπερατότητα για το αντιβιοτικό

- Απενεργοποίηση από ένζυμα
- Ενεργητική μεταφορά αντίθετη από την συγκέντρωση

Η πλέον ενδιαφέρουσα περίπτωση είναι η απενεργοποίηση του φαρμάκου από ένζυμα. Από τις περιπτώσεις που έχουν εξεταστεί μέχρι τώρα, διαπιστώθηκε ότι η ανθεκτικότητα στο φουσιδικό οξύ χαρτογραφείται στα ανθεκτικά στελέχη στον ίδιο γενετικό τόπο με την ανθεκτικότητα στη χλωραμφενικόλη (Proctor and Rownd 1982; Proctor, McKell et al. 1983). Μετά την αποτυχία να αποδειχθεί κάποιου είδους χημική τροποποίηση που υφίσταται το φουσιδικό οξύ σε ανθεκτικά στελέχη, διατυπώθηκε η άποψη ότι η ανθεκτικότητα στο φουσιδικό οξύ σε ανθεκτικά στελέχη τα οποία φέρουν R πλασμίδια ή το μεταθετό στοιχείο Tn9 οφείλεται στο ένζυμο της ακέτυλο – τρανσφεράσης της χλωραμφενικόλης τύπου I (CAT_I) η οποία δεν τροποποιεί χημικά το φάρμακο αλλά το αποτρέπει να εκδηλώσει την αντιβιοτική του δράση αποσύροντας το αντιβιοτικό από το κυτταρόπλασμα. Αυτή η απόσυρση είναι εφικτή δεδομένου ότι από κινητικές μελέτες είναι γνωστό ότι το φουσιδικό οξύ μπορεί να δρα σε συναγωνιστικός αναστολέας της CAT_I. Αυτό το φαινόμενο σημαίνει ότι τα μόρια της CAT_I τα οποία είναι συνδεδεμένα με φουσιδικό οξύ δεν μπορούν να εκδηλώσουν την δράση τους στη χλωραμφενικόλη. Κάτι τέτοιο θα ήταν καταστροφικό για το βακτηριακό κύτταρο, αλλά φαίνεται ότι το φαινόμενο αποζημιώνεται από την τεράστια ποσότητα της CAT_I η οποία συντίθεται σε ανθεκτικά στελέχη.

Εκτός από τα παραπάνω μια ακόμα ενδιαφέρουσα περίπτωση ανθεκτικότητας στο φουσιδικό οξύ εμφανίζεται στο *Streptomyces lividans 66* στο οποίο υπάρχει μια εκρινόμενη εστεράση που κωδικοποιείται από το γονίδιο *fusH* και η οποία είναι σε θέση να διασπάσει τον εστερικό δεσμό στην θέση 16β του δακτυλίου D, απενεργοποιώντας το φουσιδικό οξύ (Haar 1997). Η απώλεια του εστέρα έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός λακταμικού δακτυλίου.

Τέλος, αν και δεν έχει άμεση σχέση με την εμφάνιση ανθεκτικότητας, πρόσφατα έχει διαπιστωθεί δράση του φουσιδικού οξέος και στο ανθρώπινο ανοσοποιητικό σύστημα μέσω καταστολής της παραγωγής των ιντερλευκινών 1,2 και 6 (IL-1,IL-2,IL-6) και του TNF. Κάτι τέτοιο μπορεί να έχει άμεσες συνέπειες στην θεραπεία χρόνιων καταστάσεων που οφείλονται σε ανοσολογικές δυσλειτουργίες (Christiansen 1999).

1.3 Αντικείμενο και σκοπός της παρούσας διατριβής

Στην παρούσα διατριβή έχουμε προσδιορίσει την κρυσταλλική δομή της ακέτυλο-τρανσφεράσης της χλωραμφενικόλης τύπου I(CAT_I) σε αποενζυμική δομή αλλά και σε σύμπλοκο μορφή με τον αναστολέα φουσιδικό οξύ, σε διακριτικότητες 2.5Å και 2.1Å αντίστοιχα. Η έκταση της δομής είναι μεγάλη αφού περιέχει περίπου 22.000 άτομα, 600 μόρια διαλύτη, και 444 άτομα που ανήκουν στον αναστολέα. Αυτό καθιστά την δομή αυτή μια από τις μεγαλύτερες που έχουν προσδιοριστεί στο πανεπιστήμιο Κρήτης και στην Ελλάδα. Η μεγαλύτερη σημασία όμως της παρούσας διατριβής έγκειται στο γεγονός ότι καταφέρνει να εξηγήσει σε μοριακό επίπεδο την ανθεκτικότητα σε ένα από τα πιο δημοφιλή αντιβιοτικά στην κλινική πρακτική.

Αφού το φουσιδικό οξύ είναι ένα στεροειδές παράγωγο, η δομή της CAT_I σε σύμπλοκο με αυτό μας δίνει σημαντικές δομικές πληροφορίες σχετικά με τον τρόπο δέσμευσης των στεροειδών μορίων από τις πρωτεΐνες. Αυτό είναι αρκετά σημαντικό αφού από τις μέχρι τώρα γνωστές δομές πρωτεϊνών που εμφανίζουν χημική συγγένεια με στεροειδή μόρια, δεν φαίνεται να υπάρχει κάποιου είδους συντήρηση στο πρότυπο αναδίπλωσης των βιομορίων αυτών, γεγονός που μας ωθεί να συμπεράνουμε ότι η ικανότητα δέσμευσης ενός στεροειδούς μορίου είναι μια εγγενής ιδιότητα του ενεργού κέντρου η οποία μπορεί να επιτευχθεί με πολλούς δομικούς τρόπους. Άρα όσους περισσότερους τέτοιους τρόπους παρατηρούμε τόσο πλησιέστερα μπορούμε να φτάσουμε στην κατανόηση του φαινομένου με σαφείς βιοϊατρικές προεκτάσεις

Παρόλες τις προσπάθειες που κατεβλήθησαν σε πειραματικό επίπεδο δεν ήταν δυνατός ο προσδιορισμός της δομής του συμπλόκου της CAT_I με τη χλωραμφενικόλη, αν και μετρήθηκαν πολλά σετ δεδομένων από κρυστάλλους εμβαπτισμένους σε διαλύματα χλωραμφενικόλης ή κρυστάλλους που είχαν προκύψει παρουσία χλωραμφενικόλης. Το πρόβλημα αυτό δεν υπάρχει για το φουσιδικό οξύ το οποίο άμεσα συνδέεται με το ένζυμο και δίδει ικανοποιητικές μετρήσεις.

Αν και η δομική ομολογία της CAT_I με την γνωστή δομή του τύπου III είναι μεγάλη εντούτοις οι διαφορές τους σε ατομικό επίπεδο στο ενεργό κέντρο είναι τέτοιες ώστε να καθορίζουν την διαφορετική μοριακή επιλεκτικότητα που εμφανίζουν τα δύο ένζυμα. Αν και τελευταία υπάρχει μια μεγάλη τάση για ομαδοποίηση της δομικής πληροφορίας που είναι διαθέσιμη στην Protein Data Bank και για κατηγοριοποίηση των βιομορίων σε οικογένειες, πρότυπα αναδίπλωσης και άλλου είδους ομαδοποιήσεις, οι οποίες είναι

χρήσιμες για την εξαγωγή πολυτίμων συμπερασμάτων για την αναδίπλωση των πρωτεϊνών, εντούτοις ενέχουν τον κίνδυνο «να χάσουμε το δέντρο βλέποντας το δάσος».

Εκτός από αυτό ο τομέας της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά είναι πολύ ενδιαφέρον, αφού σήμερα περισσότερο από ποτέ, είναι επιτακτική η ανάγκη σχεδιασμού νέων φαρμάκων. Αυτός ο σχεδιασμός μπορεί να επιτευχθεί μόνο μέσα από την χρήση δομικής πληροφορίας που παρέχεται από την κρυσταλλογραφία. Η δομή της CAT_I με την εκπληκτική της ικανότητα να δεσμεύει και άλλα μόρια εκτός του υποστρώματος θα αποτελέσει σίγουρα την βάση για την κατασκευή αντιμικροβιακών φαρμάκων που βασίζονται στην δομή του φουσιδικού οξέος.

Εκτός από τις δομές των ακετυλοτρανσφερασών της χλωραμφενικόλης εκτεταμένη κρυσταλλογραφική ανάλυση έχει γίνει και για μια πλειάδα ενζύμων που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά. Από αυτές σημειώνουμε, τον προσδιορισμό της δομής της β-λακταμάσης TEM1 από την *E.coli* (Jelsch 1992) και την συνεχή ερευνητική δουλειά που γίνεται στα ένζυμα που ανήκουν στην κατηγορία των N-ακετυλοτρανσφερασών (NATs) τα οποία εμφανίζουν δομική ομολογία με τις ακετυλοτρανσφεράσες των ιστονών (HATs) και την οικογένεια των GCN5 (Sinclair 2000; Wolf 2002; Hongzhen 2003) και σχετίζονται με την ανθεκτικότητα στα αμινογλυκοσίδια.

2 Υλικά και μέθοδοι

2.1 Υλικά

Τα υλικά χρωματογραφίας Q sepharose fast flow και Sephacryl S200HR, αγοράστηκαν από την Amersham-Pharmacia Biotech, εκτός από τον προσροφητή συγγένειας Chloramphenicol agarose caproate ο οποίος αγοράστηκε από την Sigma (cat. no.C-8899).

Τα χημικά τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στις πειραματικές διαδικασίες ήταν:

- Tris-(hydroxymethylamino)-ethane (Tris, for analysis) από την Merck
- NaCl (for analysis), Merck
- NaOH(for analysis), Merck
- Titriplex(for analysis), Merck
- Mes(2-(N-Morpholino)-ethane-sulfonic acid), Sigma
- CaCl₂ · 2H₂O 99%, Sigma
- Chloramphenicol:(D-(-)-threo-2-Dichloroacetamido-1-(p-nitrophenyl)-1,3-propanediol), Sigma
- β-mercaptoethanol 99% (for analysis), Merck
- Methanol 100%, Ethanol 100%, Isopropanol 100%, Glycerol 97%, HCl 37% (for analysis), PEG200, PEG400, Merck
- MPD 100% , Hampton Research, Kodak
- Dimethyldichlorosilane σε 2% 1,1,1,1trichloroethane, BDH
- Acrylamide, methylene-bis-acrylamide (for analysis), Merck
- Το νερό το οποίο χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις πειραματικές διαδικασίες ήταν βαθμού καθαρότητας nanopure.

Όλα τα χρωματογραφικά στάδια πραγματοποιήθηκαν με το ολοκληρωμένο σύστημα υψηλής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης Acta purifier.

Όλες οι χρωματογραφικές στήλες που χρησιμοποιήθηκαν αγοράστηκαν από την Amersham-Pharmacia Biotech και ήταν του τύπου XK.

2.2 Μέθοδοι

2.2.1 Μέτρηση συγκέντρωσης πρωτεϊνών, ηλεκτροφόρηση, ενζυμικές δοκιμασίες, διαπίδυση και διαλυτοδιαπίδυση

Για την μέτρηση της συγκέντρωσης πρωτεϊνών στα δείγματα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Bradford με χρήση βαθμονομημένης καμπύλης αλβουμίνης ορού βοδιού (Bradford 1976). Η αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση έγινε σε πηκτώματα 12%(w/v) ακρυλαμίδης-μεθυλένο-μπις-ακρυλαμίδης (Laemmli 1970). Η εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών στα πηκτώματα έγινε με Commasie Brilliant Blue R-250. Η συμπύκνωση των πρωτεϊνικών διαλυμάτων έγινε με συσκευές υπερδιήθησης Amicon (250ml,50ml) καθώς και με φυγοκεντρούμενες μονάδες υπερδιήθησης Centriprep-centricon εφοδιασμένες με μεμβράνες μοριακού αποκλεισμού (10.000 cutoff). Η αλλαγή του διαλύματος γίνεται με σύστημα διαπίδυσης. Το πρωτεϊνικό διάλυμα, φέρεται εντός ημιπερατής μεμβράνης και τοποθετείται μέσα στο επιθυμητό ρυθμιστικό διάλυμα προς εξισορρόπηση για 12-18 ώρες. Ενδιάμεσως γίνονται αλλαγές του διαλύματος. Εναλλακτικά με την μέθοδο της διαλυτοδιαπίδυσης κατά την οποία η αλλαγή του διαλύματος εκτελείται με ταυτόχρονη συμπύκνωση εντός συσκευής υπερδιήθησης Amicon. Η μέθοδος αυτή είναι ταχύτερη της πρώτης.

Η μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας της ακετυλοτρανσφεράσης της χλωραμφενικόλης έγινε με την φασματοφωτομετρική μέθοδο σε φασματοφωτόμετρο ορατού/υπεριώδους Hitachi U-1100. Το ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης είναι 0.1M Tris-HCl pH 7.8, 0.1mM acetyl-CoA, 0.1mM Chloramphenicol, 0.4mg/ml 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB). Ως μονάδα ενζυμικής ενεργότητας της ακετυλοτρανσφεράσης της χλωραμφενικόλης θεωρείται η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για να ακετυλιώσει 1μmol χλωραμφενικόλης ανά λεπτό κάτω από συνήθεις συνθήκες αντίδρασης (θερμοκρασία 25 °C)(Shaw 1991).

2.3 Παραγωγή και απομόνωση της πρωτεΐνης

2.3.1 Βιολογική πηγή του ενζύμου ακετυλοτρανσφεράσης της χλωραμφενικόλης τύπου I

Το γονίδιο της ακετυλοτρανσφεράσης της χλωραμφενικόλης τύπου I το οποίο εν συντομία μπορούμε να το αναφέρουμε ως CAT_I προέρχεται από το μεταθετό στοιχείο Tn9 και έχει τροποποιηθεί μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) έτσι ώστε

να εισαχθεί σε αυτό η θέση κλωνοποίησης *HindIII* προκειμένου να κλωνοποιηθεί στο φορέα pBR322. Βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή P1. Αυτό καθιστά την έκφραση του γονιδίου συνεχή και μη επαγόμενη.

2.3.2 Κυτταρικές σειρές

Για τις ανάγκες του καθαρισμού της ακετυλοτρανσφεράσης της χλωραμφενικόλης τύπου I χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα *E.coli LE392*, τα οποία ήταν μετασχηματισμένα με το πλασμίδιο *pBRcatI*. Ο μετασχηματισμός των κυττάρων έγινε με τις συνήθεις διαδικασίες που περιγράφονται στην βιβλιογραφία (Samrock 1989)

2.3.3 Παραγωγή της πρωτεΐνης

Για την καλλιέργεια κυττάρων *E. Coli LE392*, τα οποία ήταν μετασχηματισμένα με το πλασμίδιο *pBR322-catI*, χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό LB (Luria – Bertrani broth) το οποίο έχει τροποποιηθεί για να συμβάλει στην μεγαλύτερη απόδοση της καλλιέργειας. Η σύσταση του θρεπτικού υλικού είναι: yeast extract 10g/l, peptone 10g/l, sodium chloride 10g/l, 0.2% (w/v) β-D-glucose, 50 μg/ml chloramphenicol.

Από κατεψυγμένη στους -80°C καλλιέργεια *E.coli LE392*, *pBR322-catI* η οποία είναι αναμεμιγμένη με γλυκερόλη, εμβολιάζεται υγρή καλλιέργεια 200ml LB+50μg/ml chloramphenicol, και αφήνεται υπό ανάδευση στους 37 °C για 12 ώρες.

Αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό όγκου 5 λίτρων εμβολιάζεται σε αναλογία 1/100 από από την παραπάνω καλλιέργεια και επωάζεται για 7 ώρες υπό έντονη ανάδευση (280 rpm) στους 37 °C. Η κυτταρική καλλιέργεια συλλέγεται με φυγοκέντρηση στις 6.000 rpm, στους 10 °C και η βακτηριακή πάστα εκπλένεται με ρυθμιστικό διάλυμα 25mM Tris-HCl pH 7.8, 0.5mM EDTA. Η έκπλυση της βακτηριακής μάζας κρίθηκε αναγκαία για την απομάκρυνση ιχνών του αντιβιοτικού χλωραμφενικόλης η οποία χρησιμοποιήθηκε κατά την καλλιέργεια και πιθανό να παρεμβαίνει σε μετέπειτα χρωματογραφικά στάδια.

2.3.4 Μέθοδος απομόνωσης του πρωτεΐνης

Στο τμήμα αυτό περιγράφονται οι διαδικασίες οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του ενζύμου, αφού αυτές έχουν αναθεωρηθεί από τις ήδη δημοσιευμένες (Andreeva, Borissova et al. 2000), προκειμένου να επιλυθούν προβλήματα που εμφανίστηκαν κατά τις δοκιμασίες κρυστάλλωσης και σχετίζονται με την ομοιογένεια του πρωτεϊνικού παρασκευάσματος.

Ρυθμιστικά διαλύματα

A: 50mM Tris-HCl pH 7.8, 0.2M NaCl, 5% glycerol(v/v), 2mM β-mercaptoethanol

B: 50mM Tris-HCl pH 7.8 , 2mM β-mercaptoethanol

C: 50mM Tris-HCl pH 7.8, 1.0M NaCl, 2mM β-mercaptoethanol

D: 50mM Tris-HCl pH 7.8, 1.5M NaCl, 5% chloramphenicol, 2mM β-mercaptoethanol

E: 50mM Tris-HCl pH 7.8 , 0.01M NaCl, 2mM β-mercaptoethanol

F: 50mM Tris-HCl pH 7.8 , 1 M NaCl, 2mM β-mercaptoethanol

G: 25mM Tris-HCl pH 7.8, 0.2M NaCl, 2mM β-mercaptoethanol

H: 5mM Tris-HCl pH 7.4, 2mM β-mercaptoethanol

Πίνακας 2-1 Ρυθμιστικά διαλύματα

2.3.5 Εκχύλιση της βακτηριακής πάστας και παρασκευή του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος

Η βακτηριακή πάστα μετά από έκπλυση, επαναιωρείται σε ρυθμιστικό διάλυμα A και στερεά λυσοζύμη προστίθεται σε συγκέντρωση 0.3mg/ml. Το κυτταρικό εναιώρημα αφήνεται σε ήπια ανάδευση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και προστίθενται αναστολείς πρωτεασών. Στην συνέχεια το εναιώρημα υπερηχοβολείται με διαστήματα δύο λεπτών για να αποφευχθεί υπερθέρμανση του δείγματος. Το εναιώρημα φυγοκέντρείνεται στις 10.000 rpm , 10 °C και το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης τίθεται σε σύστημα διαπίδυσης προς αλλαγή του διαλύτη έναντι ρυθμιστικού διαλύματος B

2.3.6 Χρωτογραφία συγγένειας σε προσροφητή Chloramphenicol caproate agarose

Για την πραγματοποίηση αυτής της μεθόδου επιλέχθηκε η αγορά του προσροφητή συγγένειας (Chloramphenicol caproate agarose) από την Sigma αφού η κατασκευή αντίστοιχου προσροφητή στο εργαστήριο αν και ήταν δυνατή εντούτοις δεν θα εξασφάλιζε τις τεχνικές προδιαγραφές ενός εμπορικού προσροφητή ούτε και την σταθερή επαναληψιμότητα της μεθόδου. Στον εμπορικό προσροφητή που αναφέρθηκε παραπάνω η χλωραμφενικόλη είναι συνδεδεμένη μέσω χημικής διασύνδεσης σε αγαρόζη ενεργοποιημένη με κυανιούχο βρωμίδιο.

Στήλη όγκου 10ml (ΧΚ16/20) παρασκευάζεται σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρίας και εξισορροπείται με 10 όγκους στήλης ρυθμιστικού διαλύματος Β. Το πρωτεϊνικό παρασκεύασμα εφαρμόζεται κατευθείαν στην στήλη μέσω περισταλτικής αντλίας και στην συνέχεια η στήλη εκπλένεται με 10 όγκους ρυθμιστικού διαλύματος C. Το έκπλυμα της στήλης ελέγχεται για τυχόν ενζυμική ενεργότητα και απομακρύνεται. Κατόπιν τούτου η στήλη εκλούεται με 10 όγκους ρυθμιστικού διαλύματος D και κλάσματα όγκου 10ml συλλέγονται και ελέγχονται για ενζυμική ενεργότητα και καθαρότητα με SDS-PAGE. Τα επιθυμητά κλάσματα ενώνονται και τίθενται σε σύστημα διαπίδυσης προς αλλαγή διαλύματος έναντι ρυθμιστικού διαλύματος E.

2.3.7 χρωματογραφία σε ανιοανταλλακτικό προσροφητή Q sepharose fast flow

Στήλη όγκου 30ml (ΧΚ26/30) εξισορροπείται με 20 όγκους διαλύματος E. Το δείγμα εφαρμόζεται στην στήλη μέσω εφαρμογέα δείγματος (Super loop 150ml) και η στήλη εκπλένεται με 20 όγκους του ίδιου διαλύματος. Μετά το πέρας της εκπλύσεως, η στήλη αναπτύσσεται με γραμμική βαθμίδωση συγκέντρωσης NaCl από 0.01M (E) έως 1M (F) διάρκειας 10 όγκων στήλης. Κλάσματα όγκου 5ml συλλέγονται και αναλύονται με SDS-PAGE προκειμένου να διαπιστωθεί η καθαρότητα τους. Τα επιλεγμένα κλάσματα ενώνονται και συμπυκνώνονται μέχρι όγκου 4ml για να χρησιμοποιηθούν στο επόμενο στάδιο.

2.3.8 Χρωματογραφία μοριακής διήθησης σε προσροφητή Sephacryl S200HR

Στήλη όγκου 370ml (ΧΚ26/70) εξισορροπείται με 1 όγκο στήλης ρυθμιστικού διαλύματος G. Το δείγμα εφαρμόζεται στην στήλη και ακολουθεί ισοκρατική έκλουση με το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα. Κλάσματα όγκου 5ml συλλέγονται και συμπυκνώνονται με την μέθοδο της διαλυτοδιαπίδυσης με ταυτόχρονη αλλαγή του ρυθμιστικού διαλύματος έναντι διαλύματος H σε μονάδες υπερδιήθησης Amicon 250 και Amicon 50 εφοδιασμένες με μεμβράνες μοριακού αποκλεισμού (10.000 cutoff). Μετά το πέρας της συμπύκνωσης και της αλλαγής του διαλύτη το ομογενές πρωτεϊνικό παρασκεύασμα χωρίζεται σε κλάσματα όγκου 0.3ml, καταψύχεται άμεσα σε υγρό άζωτο και στην συνέχεια φυλάσσεται σε θερμοκρασία -80°C .

2.4 Κρυστάλλωση της ακετυλοτρανσφεράσης της χλωραμφενικόλης τύπου I

Για την πραγματοποίηση των κρυσταλλώσεων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της κρεμάμενης σταγόνας (McPherson 1999) .

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στο φαινόμενο της διάχυσης ατμών. Μία σταγόνα πρωτεϊνικού διαλύματος φέρεται πάνω σε υάλινη καλυπτρίδα μικροσκοπίου η οποία είναι κατεργασμένη με Dimethyldichlorosilane και αναμιγνύεται με ρυθμιστικό διάλυμα δεδομένης συγκέντρωσης του κατακρημνιστικού παράγοντα. Το σύστημα τοποθετείται σε κλειστό σύστημα με δεξαμενή που περιέχει διάλυμα μεγαλύτερης συγκέντρωσης του κατακρημνιστή και αφήνεται να εξισορροπηθεί. Λόγω της επακόλουθης διάχυσης ατμών από την σταγόνα του πρωτεϊνικού διαλύματος προς το μεγαλύτερης συγκέντρωσης διάλυμα που βρίσκεται στην δεξαμενή, η συγκέντρωση του κατακρημνιστή αυξάνεται με ελεγχόμενο τρόπο και οδηγεί στην κρυστάλλωση της πρωτεΐνης .Προηγούμενες προσπάθειες κρυστάλλωσης της CAT_I (Andreeva, Borissova et al. 2000) έχουν χρησιμοποιήσει το MPD σαν πρωταρχικό κατακρημνιστή. Αρχικές μελέτες όμως που έγιναν στα πλαίσια αυτής της διατριβής απέδειξαν ότι οι συνθήκες αυτές είναι μη επαναλήψιμες και ότι οι ποιότητα των παραγομένων κρυστάλλων δεν ήταν κατάλληλη για μετρήσεις με ακτίνες X σε υψηλή διακριτικότητα. Για το λόγο αυτό σχεδιάστηκαν εκ νέου δοκιμασίες κρυστάλλωσης σε μια προσπάθεια εύρεσης καταλληλότερων συνθηκών οι οποίες θα παρήγαγαν κρυστάλλους συστηματικά και με σταθερή ποιότητα.

Έτσι αρχικά μελετήθηκε η επίδραση διαφόρων κατακρημνιστικών παραγόντων σε μονά συστήματα με μεταβολή του pH και της συγκέντρωσης του κατακρημνιστή. Από την μελέτη αυτών των συστημάτων σχεδιάστηκαν δοκιμασίες κρυστάλλωσης με την χρήση μικτών ηλεκτρολυτικών διαλυμάτων σε μεγάλο εύρος για τον εντοπισμό της περιοχής κρυστάλλωσης της CAT_I και την βελτιστοποίηση των κρυστάλλων. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι διαφορετικές δοκιμασίες σε γενικές γραμμές. Με το σύμβολο (+) σημειώνονται οι δοκιμασίες που έδωσαν κρυστάλλους ή άμορφους κρυσταλλικούς σχηματισμούς. Με (-) σημειώνονται οι δοκιμασίες που ήταν ανεπιτυχείς και με (*) οι δοκιμασίες που δεν έχουν ελεγχθεί

	Μεθανόλη	Αιθανόλη	Προπανόλη 2	MPD	PEG200
	+	+	+	+	+
NaCl	+	*	*	-	+
CaCl ₂	+	*	*	*	+
Ca(NO ₃) ₂	+	*	*	*	+
BaCl ₂	+	*	*	*	*
LiCl	+	*	*	*	+
MgCl ₂	+	+	+	-	*
(NH ₄) ₂ SO ₄	+	+	+	+	-

Πίνακας 2-2 Περιοχή δοκιμασιών κρυστάλλωσης

Όπως φαίνεται και από τον παραπάνω πίνακα το εύρος συνθηκών κρυστάλλωσης της CAT_I είναι πολύ μεγάλο και αυτό οφείλεται στην εξαιρετικά υψηλή ομοιογένεια του πρωτεϊνικού παρασκευάσματος από την τροποποίηση της διαδικασίας απομόνωσης. Τελικά οι συνθήκες που επιλέχθηκαν για την κρυστάλλωση της CAT_I ήταν ,20-30% (v/v) Μεθανόλης, 100-150 mM CaCl₂, 0.5 M MES pH 5.8-6.0, με συγκέντρωση πρωτεΐνης 20mg/ml, οι οποίες και έδωσαν τους καλύτερους κρυστάλλους από την άποψη της επαναληψιμότητας και του διακριτικού ορίου. Για την παρασκευή κρυστάλλων του συμπλόκου της CAT_I με τον αναστολέα φουσιδικό οξύ στις συνθήκες κρυστάλλωσης προστίθεται φουσιδικό νάτριο σε τελική συγκέντρωση 1mM.

2.5 Κρυσταλλογραφικές μέθοδοι

2.5.1 Η μέτρηση των κρυστάλλων της CAT_I

Οι προκαταρκτικές μετρήσεις για τον προσδιορισμό της χώρο-ομάδας των κρυστάλλων της CAT_I και εύρεσης των κατάλληλων συνθηκών κρύο-προστασίας έγιναν σε γεννήτρια ακτίνων Χ περιστρεφόμενης ανόδου τύπου Rigaku RU200 με ανιχνευτή τύπου δίσκου ειδώλου MAR300 (MarResearch). Ολοκληρωμένες μετρήσεις πλήρων δεδομένων από κρυστάλλους της CAT_I έγιναν στην πηγή X11 η οποία εδράζεται στον αποθηκευτικό δακτύλιο (storage-ring) DorisIII (EMBL/DESY Hamburg), σε μήκος κύματος 0.811 Å και με ανιχνευτή CCD (Marresearch).

Όλες οι υπολογιστικές διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν σε επιτραπέζιο προσωπικό υπολογιστή dual Pentium II, 512MB RAM, 40 GB HDD, GeForce440MX64MB, ο οποίος είναι εφοδιασμένος με το λειτουργικό σύστημα Linux 8.0.

Τα προγράμματα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν είναι τα ακόλουθα:

- Για την ολοκλήρωση των δεδομένων της περίθλασης χρησιμοποιήθηκαν τα υπολογιστικά πακέτα Denzo – Scalepack (Otwinowski 1997), καθώς και το πακέτο MOSFLM και SCALA από το πακέτο προγραμμάτων CCP4 (Leslie 1999).
- Για την πραγματοποίηση της μοριακής αντικατάστασης (molecular replacement) χρησιμοποιήθηκε ως αρχικό μοντέλο η δομή της ακετυλοτρανσφεράσης της χλωραμφενικόλης τύπου III (κωδικός PDB: 3CLA) και το πρόγραμμα AMORE (Navaza, Panerucci et al. 1998; Navaza 2001; Navaza 2002; Navaza, Lepault et al. 2002) του πακέτου CCP4.
- Για την κατασκευή παρατήρηση και διόρθωση του μοριακού μοντέλου της πρωτεΐνης σε συνδυασμό με τους χάρτες ηλεκτρονικής πυκνότητας χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα O (Jones 1991) .Για την βελτιστοποίηση του μοντέλου χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα REFMAC5 του CCP4 (Murshudov, Vagin et al. 1999)
- Η ποιότητα της δομής ελέγχθηκε με το πρόγραμμα Procheck από το πακέτο CCP4 (Laskowski 1993).
- Για την ανάλυση της δομής σε επίπεδο αμινοξικής αλληλουχίας και την κατασκευή των πολλαπλών στοιχίσεων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό CLUSTAL (Higgins 1988) και PHYLIP (Felsenstein 1993)
- Για απεικόνιση του μοντέλου και την κατασκευή των εικόνων που υπάρχουν στην διατριβή αυτή χρησιμοποιήθηκαν τα πακέτα, Pymol (www.pymol.org) , ribbons(Carson 1997), grasp (Nicholls, Sharp et al. 1991), xtalview (McRee 1999)
- Για την ταυτοποίηση της μη κρυσταλλογραφικής συμμετρίας χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα LSQKAB του πακέτου CCP4 .

2.5.2 Συλλογή δεδομένων περίθλασης

Η συλλογή των δεδομένων περίθλασης έγινε σύμφωνα με τις συνήθειες διαδικασίες (Dauter 1999) με την μέθοδο της περιστροφής του κρυστάλλου. Συλλέχθηκαν δύο σετ δεδομένων:

- Δεδομένα από κρυστάλλους του μορίου CATI στην αποενζυμική μορφή του. Χρησιμοποιήθηκε ακτινοβολία μήκους κύματος 0.811 \AA . Ο κρύσταλλος από το πάγωμα με την προσθήκη 30% MPD (v/v) στο μητρικό υγρό κρυστάλλωσης. Η μέτρηση έγινε με τον ανιχνευτή σε απόσταση 200mm από τον κρύσταλλο. Ο κρύσταλλος περιστράφηκε κατά 180° ώστε να συλλεχθούν πλήρη δεδομένα σύμφωνα με τη χωρομάδα στην οποία ανήκει. Η γωνία περιστροφής ήταν 0.5° ανά εικόνα.
- Δεδομένα από κρυστάλλους του συμπλόκου της CATI με φουσιδικό νάτριο. Χρησιμοποιήθηκε ακτινοβολία μήκους κύματος 0.811 \AA . Ο κρύσταλλος προστατεύεται από το πάγωμα με την προσθήκη 30% MPD (v/v) στο μητρικό υγρό κρυστάλλωσης. Η μέτρηση έγινε με τον ανιχνευτή σε απόσταση 200mm από τον κρύσταλλο. Ο κρύσταλλος περιστράφηκε κατά 180° ώστε να συλλεχθούν πλήρη δεδομένα σύμφωνα με την χώρο-ομάδα στην οποία ανήκει. Η γωνία περιστροφής ήταν 0.5° ανά εικόνα.

2.5.3 Ολοκλήρωση των δεδομένων

Η ολοκλήρωση των δεδομένων και η μετατροπή των μετρηθέντων εντάσεων των ανακλάσεων σε παράγοντες δομής (structure factors) έγιναν με την χρήση των προγραμμάτων DENZO SCALEPACK (καθώς και scale pack2mtz, truncate, uniquefy του πακέτου CCP4) για τα δεδομένα του αποενζύμου, και με τα προγράμματα MOSFLM , SCALA για τα δεδομένα του συμπλόκου. Η χρήση διαφορετικών πακέτων επιβλήθηκε, διότι στα δεδομένα του συμπλόκου με το φουσιδικό νάτριο, η μωσαϊκότητα του κρυστάλλου σε συνδυασμό με την γωνία περιστροφής , συντέλεσαν σε μεγάλο ποσοστό μερικώς καταγεγραμμένων ανακλάσεων τις οποίες μόνο το πακέτο MOSFLM μπορεί να δεικτοδοτήσει και να ολοκληρώσει χωρίς προβλήματα.

2.5.4 Επίλυση του προβλήματος των φάσεων με μοριακή αντικατάσταση

Για την επίλυση του προβλήματος των φάσεων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της μοριακής αντικατάστασης (molecular replacement) όπως αυτή έχει αναπτυχθεί στο πρόγραμμα AMORE. Στην μέθοδο της μοριακής αντικατάστασης μία "ομόλογη" δομή-ανιχνευτής τοποθετείται μέσα στην στοιχειώδη κυψελίδα της άγνωστης δομής της οποίας ζητάμε την επίλυση και οι φάσεις από το αρχικό μοντέλο χρησιμεύουν σαν μια αρχική εκτίμηση των φάσεων της άγνωστης δομής. Για την εύρεση του καλύτερου ταιριάσματος

των δύο δομών απαιτείται μια αναζήτηση σε έξι διαστάσεις που αντιστοιχούν σε τρεις γωνίες περιστροφής κατά Euler και τρεις μετατοπίσεις στο ορθοκανονικό σύστημα αξόνων. Προς χάριν της ταχύτητας των υπολογισμών είναι δυνατό να χωρίσουμε την εξαδιάστατη αναζήτηση σε ένα άθροισμα δυο τρισδιάστατων αναζητήσεων οι οποίες είναι μία περιστροφή κατά τις τρεις γωνίες που αναφέρθηκαν παραπάνω και ακολούθως σε τρεις μετατοπίσεις κατά τους άξονες του ορθοκανονικού συστήματος. Αυτό το υπολογιστικό τέχνασμα είναι χρήσιμο διότι ο χρόνος που απαιτείται για να πραγματοποιηθούν υπολογιστικά τα δύο στάδια είναι ίσος με το άθροισμα των χρόνων του κάθε ενός από αυτά, ενώ στην αντίθετη περίπτωση ο απαιτούμενος χρόνος θα ήταν ανάλογος του τετραγώνου του κάθε σταδίου. Έτσι αν η περιστροφική αναζήτηση απαιτεί 10^3 sec και η αναζήτηση μετάθεσης 10^3 sec τότε ο συνολικός χρόνος θα είναι $10^3+10^3=2000$ sec ενώ αν η αναζήτηση γίνει συνδυασμένα τότε θα απαιτούνταν χρόνος 10^6 sec (McRee 1999). Το επόμενο ζήτημα που είναι σχετικό με την εφαρμογή της μεθόδου της μοριακής αντικατάστασης είναι η ομοιότητα της δομής ανιχνευτή με την άγνωστη πρωτεΐνη. Από την στιγμή που δεν υπάρχει μια αρχική εκτίμηση της δομικής ομοιότητας των δύο δομών το μόνο χρήσιμο στοιχείο είναι η ομοιότητα σε επίπεδο πρωτοταγούς δομής. Σαν γενικό κανόνα μπορούμε να θεωρήσουμε ότι μια ταυτότητα αλληλουχίας επιπέδου 50% είναι ικανή να οδηγήσει σε ακριβή λύση μια και η πιθανότητα είναι αυτές οι δύο δομές να είναι και δομικά όμοιες (Chothia and Lesk 1986). Το μεγαλύτερο πρόβλημα της μεθόδου είναι ότι οι προκύπτουσες φάσεις είναι καταρχήν μια χονδρική εκτίμηση των φάσεων της άγνωστης δομής και στατιστικά είναι πολύ επηρεασμένες από το αρχικό μοντέλο. Έτσι είναι φανερό ότι προσεκτική παρατήρηση του μοντέλου και σταδιακή αλλαγή με ταυτόχρονη παρατήρηση των στατιστικών μεγεθών μπορεί να αποτρέψει μια ενδεχόμενη παγίδευση της διαδικασίας βελτιστοποίησης σε κάποιο τοπικό ελάχιστο ή σε λάθος γεωμετρία. Παρόλα αυτά η μέθοδος της μοριακής αντικατάστασης παραμένει μία δυνατή και συμπαγής διαδικασία η οποία μπορεί να βοηθήσει στην επίλυση της άγνωστης δομής όταν δεν είναι δυνατή η εφαρμογή άλλων μεθόδων. Ο επηρεασμός των φάσεων μπορεί να υπερπηδηθεί εάν υπάρχουν και πειραματικά μετρημένες φάσεις οπότε ο συνδυασμός φάσεων δίδει και τα καλύτερα αποτελέσματα.

Η περίπτωση της CAT_I δεν ήταν αυτό το οποίο θα αναφέρονταν σαν χαρακτηριστικό παράδειγμα για την μέθοδο της μοριακής αντικατάστασης. Και αυτό διότι σύμφωνα με τα

κρυσταλλογραφικά δεδομένα τα οποία είχαν μετρηθεί είχε διαπιστωθεί ότι μέσα στην ασύμμετρη μονάδα ενδεχομένως να υπήρχαν 3-4 τριμερή, γεγονός το οποίο καθιστά την επιτυχή ολοκλήρωση της μεθόδου δύσκολη. Τα στάδια τα οποία έγιναν προκειμένου να υπολογιστούν οι σωστές λύσεις για το παραπάνω πρόβλημα ήταν:

- Κατασκευή του αρχικού μοντέλου. Το αρχικό μοντέλο το οποίο χρησιμοποιήθηκε ήταν η γνωστή δομή της CATIII η οποία υπάρχει κατατεθειμένη στην βάση δεδομένων πρωτεϊνών (3CLA). Εξαιτίας της χώρο-ομάδας στην οποία επιλύθηκε η δομή της CATIII (R32) μόνο η μία εκ των τριών αλυσίδων του ομοτριμερούς ήταν διαθέσιμη με την μορφή καρτεσιανών συντεταγμένων. Για τη δημιουργία ολοκλήρου του ομοτριμερούς εφαρμόστηκαν πίνακες περιστροφής οι οποίοι συνοδεύουν το μοντέλο. Επειδή η ομολογία μεταξύ των δύο τύπων της CAT είναι υψηλή δεν έγινε καμία περαιτέρω αλλαγή στο μοντέλο, δηλαδή δεν επιχειρήθηκε μετατροπή σε αλυσίδα πολυαλανίνης αφού εκτιμήθηκε ότι η δομική πληροφορία των συντηρημένων καταλοίπων είναι σημαντική και μπορεί να συνεισφέρει στον υπολογισμό σωστών φάσεων, σε σχέση με τον θόρυβο που μπορούν να εισάγουν οι μη συντηρημένες περιοχές.
- Υπολογισμός των παραγόντων δομής (structure factors) από το μοντέλο και ταξινόμηση τους για περαιτέρω χρήση. Αυτό το στάδιο είναι προαπαιτούμενο από το πρόγραμμα AMORE.
- Υπολογισμός της συνάρτησης περιστροφής (rotation function). Κατά την διαδικασία αυτή υπολογίζονται οι συναρτήσεις Patterson για το μοντέλο και για τα πειραματικά μετρημένα δεδομένα και στην συνέχεια οι δύο συναρτήσεις περιστρέφονται στο χώρο κατά τις γωνίες του Euler (α, β, γ) και υπολογίζεται η επικάλυψη των δύο συναρτήσεων. Οι τιμές των γωνιών (α, β, γ) στις οποίες οι συναρτήσεις εμφανίζουν μέγιστο επικάλυψης θεωρούνται ως αποδεκτές λύσεις της συνάρτησης περιστροφής όταν ξεπερνούν ένα προκαθορισμένο ύψος (cutoff)
- Υπολογισμός της συνάρτησης μετάθεσης (Translation function). Κατά την διαδικασία αυτή οι αποδεκτές λύσεις από την παραπάνω διαδικασία εφαρμόζονται και η προκύπτουσα συνάρτηση του μοντέλου μετατίθεται κατά μήκος ανύσματος (T_x, T_y, T_z) μέσα στην κυψελίδα σε σχέση με τα πειραματικά δεδομένα και τα μέγιστα επικάλυψης των συναρτήσεων υπολογίζονται εκ νέου. Τα μέγιστα

- ταξινομούνται σύμφωνα με τον συντελεστή συσχέτισης (colleration factor) και τον συντελεστή αξιοπιστίας (R factor)
- Οι αποδεκτές λύσεις από την παραπάνω διαδικασία βελτιστοποιούνται και αξιολογούνται.
 - Στην περίπτωση που κάποιος ζητά ένα μόριο η παραπάνω διαδικασία είναι ικανή να βρει λύση. Στην προκείμενη περίπτωση η εύρεση μιας σωστής λύσης από τα παραπάνω θα αποτελούσε την θέση του ενός μόνο εκ των τεσσάρων τριμερών που αναμένονται. Έτσι η λύση που έχει γίνει αποδεκτή στο προηγούμενο στάδιο κλειδώνεται (δεν υπολογίζεται ξανά) και η διαδικασία επαναλαμβάνεται $n-1$ φορές για όσα μόρια ζητάμε να βρούμε.

2.5.5 Βελτιστοποίηση του μοντέλου

Η βελτιστοποίηση του αρχικού μοντέλου έγινε με το πρόγραμμα **REFMAC5** το οποίο χρησιμοποιεί μια μέθοδο ελαχιστοποίησης των σφαλμάτων του μοντέλου λαμβάνοντας υπόψη τους γεωμετρικούς περιορισμούς που επιβάλλονται σε ένα πρωτεϊνικό μόριο, καθώς και τα πειραματικά δεδομένα (maximum likelihood) έτσι ώστε λειτουργώντας σε ένα πολυπαραμετρικό χώρο να μπορέσει να επιφέρει μεταβολές στο μοντέλο που να συμφωνούν με τις πειραματικές μετρήσεις. Το πρόγραμμα έχει την δυνατότητα να παράγει χάρτες διαφορών ηλεκτρονικής πυκνότητας του τύπου $2m|F_o|-D|F_c|$ και $|F_o|-|F_c|$ ζυγισμένους ως προς την τυπική απόκλιση των υπολογισμένων φάσεων (sigma a weighted). Οπτική επίβλεψη του μοντέλου και αλλαγές στην αμινοξική αλληλουχία σε σχέση με τους χάρτες ηλεκτρονικής πυκνότητας έγιναν με το πρόγραμμα O. Τα στάδια που ακολουθήθηκαν κατά την διαδικασία της βελτιστοποίησης είναι:

1. Αρχικά όλες οι υπομονάδες όλων των τριμερών θεωρούνται περιορισμένες και όποιες αλλαγές εφαρμόζονται σε μία αλυσίδα εφαρμόζονται σε όλες. Για να γίνει αυτό, μία αλυσίδα φορτώνεται στο πρόγραμμα γραφικών μαζί με το χάρτη ηλεκτρονικής πυκνότητας και όπου απαιτείται γίνονται αλλαγές. Στην συνέχεια με βάση τους πίνακες περιστροφής οι οποίοι κωδικοποιούν τις στροφικές και μεταθετικές σχέσεις των αλυσίδων στην ασύμμετρη μονάδα παράγονται και οι υπόλοιπες αλυσίδες. Οι συντεταγμένες τοποθετούνται σε αρχείο και ακολουθούν κύκλοι βελτιστοποίησης και η διαδικασία επαναλαμβάνεται.
2. Σε δεύτερο στάδιο και εφόσον η παραπάνω διαδικασία έχει οδηγήσει σε μοντέλο με ικανοποιητική γεωμετρία και με συντελεστή αξιοπιστίας ο οποίος δεν

- μεταβάλεται παραπέρα, τα κριτήρια περιορισμού των αλυσίδων χαλαρώνονται σε επίπεδο τριμερούς, έτσι ώστε κάθε τριμερές να θεωρείται ανεξάρτητα μεταβαλλόμενο σε σχέση με τα υπόλοιπα τριμερή. Οι συντεταγμένες τοποθετούνται σε αρχείο και ακολουθούν κύκλοι βελτιστοποίησης και η διαδικασία επαναλαμβάνεται.
3. Όταν και το στάδιο 2 έχει οδηγήσει σε σταθερό μοντέλο όλες οι αλυσίδες θεωρούνται ανεξάρτητες και βελτιστοποιούνται ανάλογα
 4. Σε ένα επόμενο στάδιο ακολουθεί ιστροπική βελτιστοποίηση των παραγόντων θερμοκρασίας των ατόμων του μοντέλου (B factor), πράγμα το οποίο σημαίνει ότι τα άτομα του μοντέλου θεωρούνται ότι εκτελούν ισοπίθανη ταλάντωση σε όλες τις διαστάσεις (x,y,z) η οποία και τελικά εκφράζεται σαν ιστροπικός παράγων θερμοκρασίας και αντιστοιχεί στην επιφάνεια πιθανωτικής σφαίρας εντός της οποίας ταλαντώνεται το άτομο.
 5. Αφού και η παραπάνω διαδικασία έχει ολοκληρωθεί άτομα νερού προστίθενται για να εξηγήσουν ηλεκτρονική πυκνότητα με βάση γεωμετρικά κριτήρια (απόσταση από άτομα της πρωτεΐνης και ικανότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου με αποδεκτή γεωμετρία).
 6. Επιπλέον στην περίπτωση της δομής του συμπλόκου της CAT_I με το φουσιδικό οξύ το μοντέλο του αναστολέα τοποθετήθηκε στα ενεργά κέντρα των μορίων

3 Αποτελέσματα

3.1 Απομόνωση της CAT_I

Στόχος του τμήματος αυτού ήταν η παραγωγή μεγάλης ποσότητας του ενζύμου και η όσο το δυνατό μεγαλύτερη ομοιογένεια του τελικού πρωτεϊνικού παρασκευάσματος που θα χρησιμοποιηθεί στις δοκιμασίες κρυστάλλωσης.

Σαν πηγή για την παραγωγή του ενζύμου χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *E. coli* LE392 το οποίο είναι μετασχηματισμένο με το πλασμίδιο **pBR322catI** και στο οποίο η έκφραση του γονιδίου **catI** βρίσκεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή **P1**.

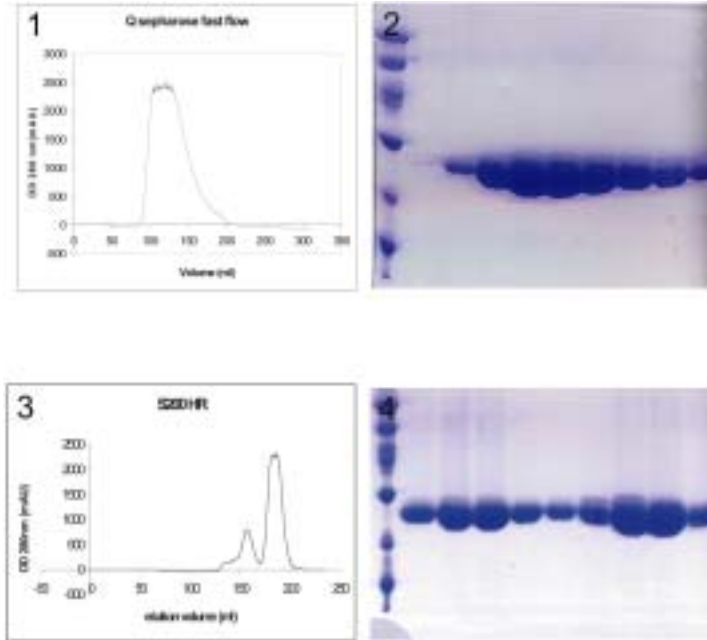
Αρχικά έγινε προσπάθεια βελτιστοποίησης των συνθηκών καλλιέργειας του οργανισμού έτσι ώστε να υπάρχει μέγιστη παραγωγή πρωτεΐνης σε άριστη ποιότητα. Από διάφορες δοκιμασίες που πραγματοποιήθηκαν (δεδομένα δεν παραθέτονται) διαπιστώθηκε ότι η αύξηση της συγκέντρωσης του NaCl σε διπλάσια τιμή από την συνήθη που βρίσκεται στο θρεπτικό υλικό LB είχε σημαντική επίδραση στην ποσότητα της παραγόμενης πρωτεΐνης. Επίσης προσθήκη β-D-γλυκόζης σε συγκέντρωση 0.2% (w/v) είχε σημαντικότερη επίδραση στην ομοιογένεια του πρωτεϊνικού δείγματος. Είναι γνωστό ότι η παραγωγή της CAT_I στην *E. coli* παρόλο που δεν είναι επαγομένη εντούτοις βρίσκεται κάτω από έλεγχο και επηρεάζει την ανάπτυξη των βακτηρίων με τέτοιο τρόπο ώστε η εκθετική φάση της βακτηριακής καλλιέργειας ξεκινά αφού έχει ήδη απενεργοποιηθεί όλη η ποσότητα της χλωραμφενικόλης που έχει προστεθεί στο μέσο της καλλιέργειας. Αυτό σημαίνει ότι η παραγωγή της CAT_I έχει ολοκληρωθεί ήδη από τη λανθάνουσα φάση ανάπτυξης και στην συνέχεια η ποσότητα της πρωτεΐνης δεν αυξάνεται μόλις τα βακτήρια εισέλθουν στην εκθετική φάση ανάπτυξης τους αλλά όπως παρατηρήθηκε μειώνεται ή και χειροτερεύει από ποιοτική άποψη. Για το λόγο αυτό η ποσότητα της χλωραμφενικόλης που προστίθεται στο μέσο καλλιέργειας αυξήθηκε στα 50 μg/ml και ο συνολικός χρόνος καλλιέργειας δεν αφέθηκε σε καμία περίπτωση να υπερβεί τις έξι με επτά ώρες. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα να βελτιωθεί πολύ η παραγωγή και η ποιότητα του πρωτεϊνικού παρασκευάσματος.

Για την παρασκευή του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες συνολικού όγκου 5lt με παραγωγή συνολικής βακτηριακής πάστας 10-15gr.

Το επόμενο σημαντικό στοιχείο πάνω στην απομόνωση του ενζύμου ήταν η άμεση χρησιμοποίηση της βακτηριακής πάστας. Κατάψυξη της βακτηριακής πάστας οδηγεί σε μειωμένη συγκέντρωση της τελικής πρωτεΐνης καθώς και χειρότερη ποιότητα. Για το λόγο αυτό η βακτηριακή πάστα χρησιμοποιήθηκε άμεσα μετά την παραγωγή της.

Για την διάρρηξη των κυττάρων και την παρασκευή του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος επιλέχθηκε συνδυασμός των μεθόδων της ενζυμικής λύσης των κυτταρικών τοιχωμάτων με λυσοζύμη και διάσπαση των κυττάρων με υπερηχοβόλιση. Αυτός ο συνδυασμός αποδείχθηκε ο καλύτερος από την απόψη της εκχύλισης των κυττάρων μια και η CAT₁ έχει αυξημένη θερμική σταθερότητα και δεν επηρεάζεται από την χρήση των υπερήχων. Λεπτομερής περιγραφή αναφέρεται στο κεφάλαιο των Υλικών και Μεθόδων.

Το επόμενο στάδιο το οποίο έχρηζε ιδιαίτερης προσοχής ήταν η καθαυτή διαδικασία απομόνωσης του ενζύμου. Παλαιότερες προσπάθειες (Andreeva, Borissova et al. 2000) είχαν επικεντρωθεί μόνο στην χρήση στήλης συγγένειας Chloramphenicol caproate agarose για το καθαρισμό. Κάτι τέτοιο απεδείχθη όμως ανεπαρκές όπως φαίνεται στην παράγραφο για την κρυστάλλωση του μορίου μία και η φαινόμενη ηλεκτροφορητική ομοιογένεια που παρουσιάζει το δείγμα μετά από την στήλη συγγένειας είναι ψευδής αφού η πρωτεΐνη συνοδεύεται από συμπλέγματα μεγαλύτερου μοριακού βάρους τα οποία όμως δεν είναι ορατά σε αποδιατακτικά πηκτώματα ακρυλαμίδης. Η εμφάνιση των ανώτερου μοριακού βάρους συμπλεγμάτων γίνεται εμφανής μόνο αν χρησιμοποιηθεί στήλη μοριακής διήθησης η οποία είναι σε θέση να τα διαχωρίσει. Το επόμενο βήμα ήταν η χρησιμοποίηση μια στήλης ανιοανταλλαγής μια και αυτού του είδους οι προσροφητές έχουν μεγάλη χωρητικότητα και μεγάλη διακριτική ικανότητα. Τέλος χρησιμοποιήθηκε μια στήλη μοριακής διήθησης για να απομακρύνει τα μεγαλομοριακά συμπλέγματα από το πρωτεϊνικό παρασκεύασμα. Στις εικόνες 3-1 (1) και (3) παρουσιάζονται οι καταγραφές της οπτικής απορρόφησης στα χρωματογραφικά στάδια και η ηλεκτροφορητική εικόνα των δειγμάτων στα στάδια αυτά



Εικόνα 3- 1 (1) και (2) Καταγραφή της οπτικής απορρόφησης από ανιοανταλλακτική στήλη Q sepharose και SDS-PAGE ανάλυση των κλασμάτων της στήλης. (3) και (4) Καταγραφή της οπτικής πυκνότητας από στήλη μοριακής διήθησης Sepharose S200HR και SDS-PAGE ανάλυση των κλασμάτων της στήλης

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω διαγράμματα η καταγραφή από την στήλη ανιοανταλλαγής υποδηλώνει ένα σχεδόν ομογενές παρασκεύασμα, το οποίο επιβεβαιώνεται και από το ηλεκτροφορητικό πρότυπο του δείγματος. Όμως αν το δείγμα αυτό αναλυθεί σε παρασκευαστική στήλη μοριακής διήθησης γίνεται εμφανής η έκλυση δύο διακριτών μοριακών οντοτήτων τα οποία αντιστοιχούν σε διαφορετικά μοριακά βάρη. Παρόλα αυτά η ηλεκτροφορητική εικόνα δείχνει και στις δύο κορυφές πολυπεπίδια του ίδιου μοριακού βάρους. Παρόλο που η τελευταία στήλη διαχωρίζει τις δύο κορυφές αρκετά καλά εντούτοις για την αποφυγή ανάμιξης των πληθυσμών επιλέγεται το μέσο της δεύτερης κορυφής η οποία αντιστοιχεί σε 4 έως 5 κλάσματα των 5 ml. Στο πίνακα 3-1 παρατίθενται τα στάδια που ακολουθούνται σε ένα τυπικό καθαρισμό.

Πίνακας 3-1 Το σχήμα απομόνωσης της ακετυλοτρανσφεράσης της χλωραμφενικόλης τύπου I

1	Ενζυμική λύση των κυττάρων με λυσοζύμη
2	Υπερηχοβόλιση
3	Φυγοκέντρωση 20000 rpm 8 ^o C (Beckman JA20)
4	Χρωματογραφία συγγένειας σε προσροφητή Chloramphenicol caproate agarose(10ml)
5	Χρωματογραφία σε ανιοανταλλακτικό προσροφητή Q sepharose fast flow(30ml)
6	Χρωματογραφία σε προσροφητή μοριακής διήθησης Sephacryl S200HR(370ml)

Όπως είναι φανερό η συνεχής επιλογή των κλασμάτων με την μεγαλύτερη καθαρότητα είναι απαραίτητη προκειμένου να εξασφαλίσουμε την τελική ομοιογένεια του πρωτεϊνικού δείγματος το οποίο θα χρησιμοποιηθεί για δοκιμασίες κρυστάλλωσης. Εξαιτίας της τεράστιας παραγωγής του ενζύμου (η CAT_I αντιπροσωπεύει το 30-40% της συνολικής βακτηριακής πρωτεΐνης στα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν) η αυστηρή επιλογή των κλασμάτων δεν αποτέλεσε πρόβλημα και επέτρεψε ώστε να μην συμβιβαστεί η ποιότητα σε βάρος της ποσότητας. Στον πίνακα 3-2 φαίνονται τα στάδια καθαρισμού και οι ποσότητες της πρωτεΐνης

Πίνακας 3-2 Πίνακας καθαρισμού του ενζύμου

1.	Χρωματογραφία συγγένειας σε προσροφητή Chloramphenicol caproate agarose	430 mg
2.	Χρωματογραφία σε ανιοανταλλακτικό προσροφητή Q sepharose fast flow	400 mg
3.	Χρωματογραφία σε προσροφητή μοριακής διήθησης Sephacryl S200HR	150-200 mg

Είναι εμφανές ότι η τελική ποσότητα της πρωτεΐνης είναι ικανοποιητική για κρυστάλλωση. Τελικά το πρωτεϊνικό παρασκεύασμα υφίσταται αλλαγή του διαλύτη και της ιοντικής ισχύος του διαλύματος ώστε να μην επηρεάζονται τα αποτελέσματα των δοκιμασιών κρυστάλλωσης. Το δείγμα συγκεντρώνεται μέχρι συγκέντρωσης 10-15mg/ml και χωρίζεται σε κλάσματα μικρού όγκου. Ακολουθεί κατάψυξη πρώτα σε υγρό άζωτο και κατόπιν σε θερμοκρασία -80^o C αφού διαπιστώθηκε ότι η κατάψυξη δεν επηρεάζει την δυνατότητα της πρωτεΐνης να κρυσταλλώνει αλλά και επιμηκύνει το χρόνο ζωής του πρωτεϊνικού παρασκευάσματος.

3.2 Κρυστάλλωση της CAT_I

Όπως αναφέρθηκε και στο τμήμα Υλικών και μεθόδων αρχικές προσπάθειες κρυστάλλωσης της CAT_I είχαν αποδώσει κρυστάλλους. Για την παραγωγή των κρυστάλλων αυτών χρησιμοποιήθηκε ένας συνδυασμός των τεχνικών της κρεμάμενης σταγόνας για την παραγωγή αρχικών πυρήνων (seeds) και της μικροδιαπίδωσης για το μέγεθος των κρυστάλλων. Οι κρύσταλλοι εμφανίζονται σε σταγόνες που περιέχουν ίσο όγκο πρωτεΐνης και διαλύματος δεξαμενής το οποίο αποτελείται από 0.1M MES pH 5.4-6.2 44%-48% MPD. Στην συνέχεια, οι κρύσταλλοι συνθλίβονταν και οι προκύπτοντες μικροπυρήνες φέρονταν σε συσκευή μικροδιαπίδωσης (Παπανικολάου 1995) η οποία περιέχει 30% MPD 50mM MES pH 6.0, 75mM NaCl. Στην συνέχεια η σταδιακή μείωση του χλωριούχου νατρίου οδηγεί την πρωτεΐνη προς την αδιαλυτότητα και πιθανά σε κρυστάλλωση. Από τα παραπάνω είναι προφανές ότι η διαδικασία παραγωγής κρυστάλλων με αυτό τον τρόπο είναι χρονοβόρα και επιδέχεται λαθών σε διάφορα από τα στάδια της, πράγμα το οποίο και επηρεάζει όχι την ποιότητα των παραγόμενων κρυστάλλων, αλλά και το αν και κατά πόσο θα προκύψουν κρύσταλλοι τελικά. Αρχικές προσπάθειες βελτιστοποίησης της παραπάνω μεθοδολογίας δεν ήταν ικανοποιητικές μια και η επαναληψιμότητα δεν ήταν σταθερή αλλά εξαρτάται από τον εκάστοτε καθαρισμό που έχει προηγηθεί. Επιπλέον προσπάθεια για μέτρηση των κρυστάλλων ήταν άκαρπη αφού οι κρύσταλλοι αυτοί παρουσιάζουν μεγάλη μωσαικότητα και άλλα προβλήματα που θα συζητηθούν παρακάτω. Εδώ πρέπει να σημειωθεί ότι το πρωτεϊνικό δείγμα το οποίο χρησιμοποιούνταν στις παραπάνω κρυσταλλώσεις προέρχονταν από καθαρισμό ενός μόνο σταδίου δηλαδή έχει μόνο χρησιμοποιηθεί η στήλη συγγένειας.

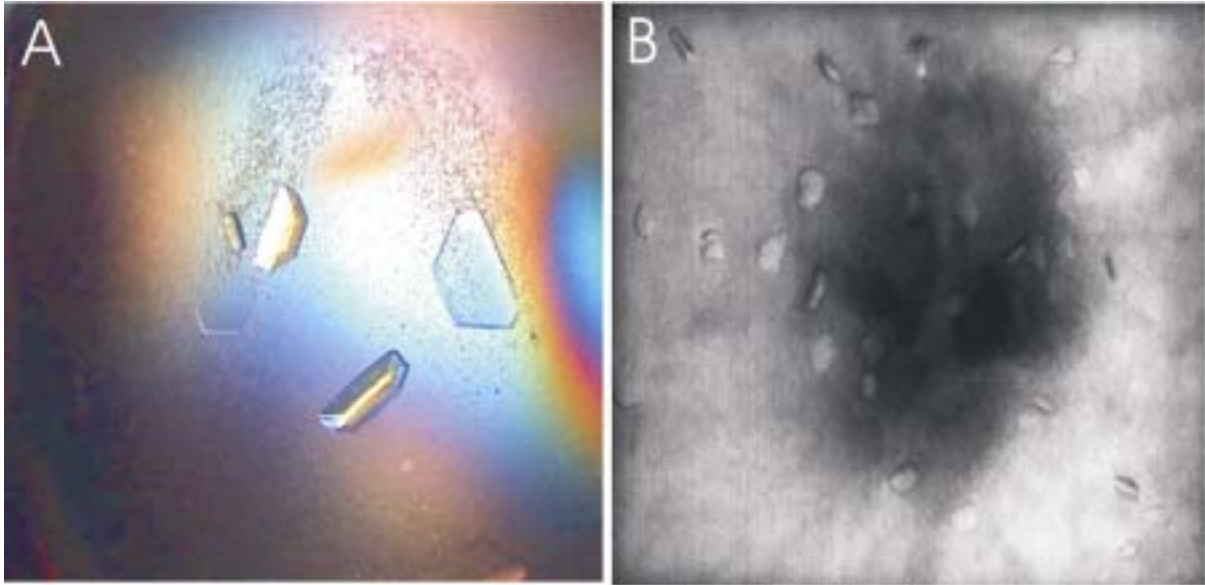
Έτσι καταστρώθηκε ένα σχέδιο το οποίο περιελάμβανε αλλαγή του σχήματος καθαρισμού και παρατήρηση των αλλαγών που επιφέρει στις κρυσταλλώσεις με αποτέλεσμα να προστεθούν δύο ακόμα στάδια καθαρισμού. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν ήταν

- Αρχικά έγινε έλεγχος σε ποια γενικευμένη περιοχή κρυσταλλώνει η CAT_I. Διαπιστώθηκε ότι η CAT_I κρυσταλλώνει στην salting in περιοχή (εναλάτωση).
- Παράλληλα επαναπροσδιορίστηκε η περιοχή του pH στην οποία πρέπει να κινηθεί κάποιος για να πάρει κρυστάλλους. Αυτή η περιοχή είναι αρκετά ευρεία κυμαινόμενη από 5.4 – 6.2 με άριστο pH στο 5.8 με ρυθμιστικό διάλυμα MES-NaOH. Έτσι αυτή η τιμή του pH επιλέχθηκε για να πραγματοποιηθούν όλα οι επακόλουθες δοκιμασίες.

- Δοκιμάστηκαν σαν κατακρημνιστικοί παράγοντες διάφοροι οργανικοί διαλύτες όπως MPD, αιθανόλη, μεθανόλη, προπανόλη-2, PEG200 και PEG400.

3.2.1 Σύστημα κρυστάλλωσης με MPD σε pH 5.4 – 6.2

Σε αυτές τις δοκιμασίες χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος κρεμάμενης σταγόνας. Δοκιμάστηκαν συγκεντρώσεις MPD από 10-40% σε pH 5.4 – 6.2. Παρατηρήθηκε ότι σε όλες τις συνθήκες που δοκιμάστηκαν εμφανίζεται έντονη ιζηματοποίηση η οποία είναι άμεσο αποτέλεσμα της ανάμιξης του πρωτεϊνικού διαλύματος με το διάλυμα της δεξαμενής και η οποία είναι ανεξάρτητη από την συγκέντρωση του πρωτεϊνικού διαλύματος. Η δημιουργία του ιζήματος αυτού είναι καθοριστική αφού κρύσταλλοι προκύπτουν εντός δύο ημερών μέσα από το ίζημα. Οι κρύσταλλοι αυτοί παρουσιάζουν μια μορφολογία πλακιδίων με χαρακτηριστικές ατέλειες που δημιουργούν την εντύπωση ότι η ανάπτυξη των κρυσταλλικών επιφανειών γίνεται ανομοιόμορφα έτσι ώστε οι κρύσταλλοι να παίρνουν την μορφή τραπεζίων σχημάτων. Επιπλέον ο χειρισμός αυτών των κρυστάλλων είναι δύσκολος αφού η παρουσία του ιζήματος δυσχεραίνει την προσπάθεια ανάκτησης τους και απαιτεί πολλαπλές εκπλύσεις με μητρικό υγρό κρυστάλλωσης που έχει σαν αποτέλεσμα την σταδιακή αποκόλληση τμημάτων τους. Από τις παραπάνω συνθήκες οι βέλτιστες ήταν 50 mM MES-NaOH pH 5.8, 24-28% MPD (v/v) με συγκέντρωση πρωτεΐνης 10mg/ml. Οι κρύσταλλοι που προκύπτουν από αυτές τις συνθήκες σκεδάζουν σε διακριτικό όριο 3.5-4.0 Å αλλά εμφανίζουν πολλά προβλήματα. Στην εικόνα 3-2 παρουσιάζονται μερικές χαρακτηριστικές μορφές κρυστάλλων.



Εικόνα 3- 2 Κρύσταλλοι που προκύπτουν με κατακρημνιστή MPD σε σύστημα κρεμαστής σταγόνας. **A)** κρύσταλλοι με στιβαδωτή δομή των κρυστάλλων. **B)** ατελώς σχηματισμένοι κρύσταλλοι μέσα σε πυκνό ίζημα

Είναι φανερή η στιβαδωτή κατασκευή αυτών των κρυστάλλων η οποία υποδηλώνει και την χαμηλή τους ποιότητα.

3.2.2 Σύστημα κρυστάλλωσης με κατακρημνιστικό παράγοντα μεθανόλη

Μετά από την περιορισμένη επιτυχία των προαναφερθέντων, επιχειρήθηκε η χρήση μεθανόλης ως κατακρημνιστικού παράγοντα. Αρχικά δοκιμάστηκαν συγκεντρώσεις μεθανόλης από 5 -30 %(v/v). Τα πρώτα αποτελέσματα ήταν απογοητευτικά και ο ρυθμός εξάτμισης της μεθανόλης μέσα στο κλειστό σύστημα της κρυστάλλωσης ήταν τεράστιος σε σχέση με την διάχυση ατμών του νερού με αποτέλεσμα ταχύτατα μεθανόλη από την δεξαμενή να μεταφέρεται στην σταγόνα με επακόλουθη ιζηματοποίηση. Προσεκτικότερη παρατήρηση των σταγόνων και ανάδευση τους αποκάλυψε την παρουσία μικροσκοπικών βελόνων η οποίες χάνονται μέσα στο ίζημα. Οι βελόνες αυτές εμφανίζονται σε συγκέντρωση μεθανόλης 10-15%. Αυτό σημαίνει ότι η μεθανόλη μπορεί να λειτουργήσει ως κατακρημνιστής της CAT_I πράγμα που δημιούργησε νέες προοπτικές. Ήταν φανερό ότι έπρεπε να ελεγχθεί ο ρυθμός με τον οποίον η πρωτεΐνη περνά από την φάση πυρήνωσης στην μετασταθή ζώνη, Προσθήκη 250λ παραφινέλαιου στην επιφάνεια του διαλύματος της δεξαμενής μείωσε δραστικά τον ρυθμό αυτό με αποτέλεσμα να προκύψουν κρύσταλλοι παρόμοιοι με αυτούς που

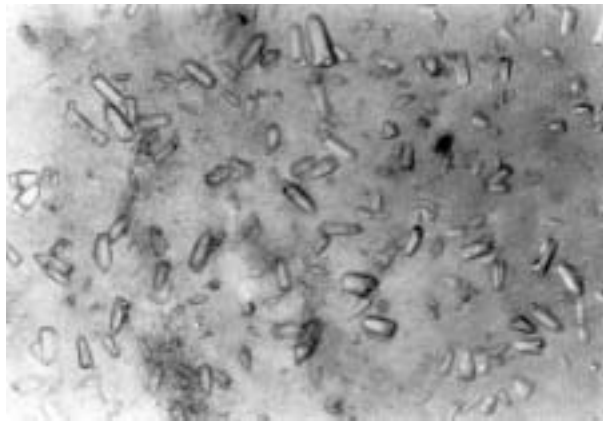
λαμβάνονται από το MPD. Ο δρόμος για εύρεση νέων συνθηκών κρυστάλλωσης είχε πια ανοίξει.

3.2.3 Σύστημα κρυστάλλωσης με αιθανόλη και ισοπροπανόλη

Αφού η μεθανόλη μπορεί να επάγει την κρυστάλλωση της CAT₁ τότε η πιθανότητα να κρυσταλλώνει το ένζυμο παρουσία αιθανόλης και ισοπροπανόλης είναι ιδιαίτερα αυξημένη. Πράγματι αρχικός έλεγχος απέδειξε ότι και η αιθανόλη μπορεί να επιφέρει κρυστάλλωση σε ένα εύρος συγκεντρώσεων από 10-35 %, ενώ το ίδιο ισχύει και για την ισοπροπανόλη σε πιο περιορισμένο εύρος από 20-25%. Παρόλες τις προσπάθειες που καταβλήθηκαν δεν ήταν δυνατή η βελτίωση ούτε της μορφολογίας αλλά ούτε και του μεγέθους των κρυστάλλων αυτών. Έτσι αυτή η οδός εγκαταλείφθηκε.

3.2.4 Σύστημα κρυστάλλωσης με κατακρημνιστικό παράγοντα πολυεθυλενογλυκόλη 200 (PEG200)

Η δοκιμασία του PEG200 ήταν ένα βήμα χωρίς σχεδιασμό μια και ο τρόπος δράσης των αλκοολών είναι διάφορος ως προς τον τρόπο δράσης των πολυεθυλενογλυκολών. Παρόλα αυτά το PEG200 (αλλά και το PEG400) κατάφεραν να δώσουν κρυστάλλους σε συγκεντρώσεις 25 %- 30 %(v/v). Οι κρύσταλλοι αυτοί έχουν χαρακτηριστικό σχήμα βολίδας (σφαίρας όπλου) και πολύ μικρές διαστάσεις. Χαρακτηριστικοί τέτοιοι κρύσταλλοι φαίνονται στην εικόνα 3-3. Έντονη είναι και η ιζηματοποίηση που παρατηρείται στην σταγόνα



Εικόνα 3- 3 Κρύσταλλοι που προκύπτουν με κατακρημνιστή PEG200 σε σύστημα κρεμαστής σταγόνας

3.2.5 Όταν όλα φαίνεται να οδηγούν σε αδιέξοδο τότε η θεωρία των μειωτών ιοντικής ισχύος φαίνεται να δίνει την λύση

Από τα παραπάνω γίνεται εμφανές ότι το ένζυμο κρυσταλλώνει στην περιοχή της γενικευμένης εναλάτωσης και η κρυστάλλωση του επάγεται από την σταδιακή μείωση της διηλεκτρικής σταθεράς του διαλύματος που επιφέρουν οι προαναφερθέντες οργανικοί διαλύτες. Όμως υπάρχει ένα σημαντικό πρόβλημα. Ο ρυθμός με τον οποίον η πρωτεΐνη διέρχεται από τη φάση πυρήνωσης στην μετασταθή είναι μεγάλος με αποτέλεσμα να παρατηρείται έντονη ιζηματοποίηση. Επιπλέον η δημιουργία πολλών μικρών κρυστάλλων σήμαινε ότι ο αριθμός των σχηματιζόμενων πυρήνων είναι μεγάλος και έπρεπε να ελεγχθεί. Υπάρχει πάντοτε η λύση της μάκρο ή μικρο ενπυρήνωσης (macro /microseeding) χρήση της οποίας θα σήμαινε αποτυχία του σχεδίου για εύρεση καλύτερων συνθηκών. Αρα έπρεπε κάτι να μπορεί να γίνει για να βελτιωθεί η εικόνα. Και φυσικά η θεωρία των μειωτών ιοντικής ισχύος προτείνει την χρήση μικτών ηλεκτρολυτικών διαλυμάτων και οργανικών διαλυτών (Paranikolau,Υ. 1997). Έτσι σχεδιάστηκε ένα δεύτερο κύμα δοκιμασιών κρυστάλλωσης όπου οι παραπάνω οργανικοί διαλύτες συνδυάστηκαν με διάφορα άλατα με ενθαρρυντικά αποτελέσματα.

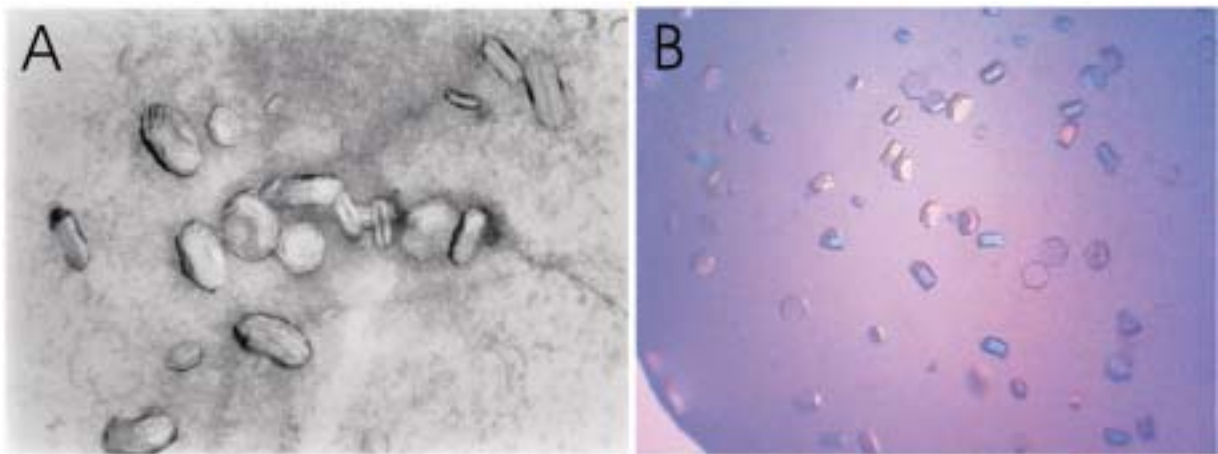
3.2.6 Το MPD και τα άλατα

Αρχικά έγινε προσπάθεια να χρησιμοποιηθούν διάφορα μικτά ηλεκτρολυτικά διαλύματα σε συνδυασμό με το MPD. Όπως απεδείχθη υπάρχει μεγάλη ασυμβατότητα μεταξύ του MPD και διαφόρων αλάτων όπως NaCl και $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ στην κρυστάλλωση του ενζύμου. Το αποτέλεσμα της παρουσίας των αλάτων σε μικτά ηλεκτρολυτικά διαλύματα της CAT_I με MPD είναι πλήρης αναστολή της ιζηματοποίησης και κρυστάλλωσης. Έστω και σε συγκεντρώσεις 5-10mM NaCl η CAT_I δεν κατακρημνίζεται. Το $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ είναι διαφορετικό μια και σε συγκεντρώσεις μέχρι 0.5 M δεν προκαλεί καμία αλλαγή ενώ σε συγκεντρώσεις πάνω από αυτή δημιουργεί διαχωρισμό φάσεων με τον οργανικό διαλύτη. Έτσι τελικά το MPD εγκαταλείφθηκε οριστικά.

3.2.7 Η περίπτωση της μεθανόλης και του $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

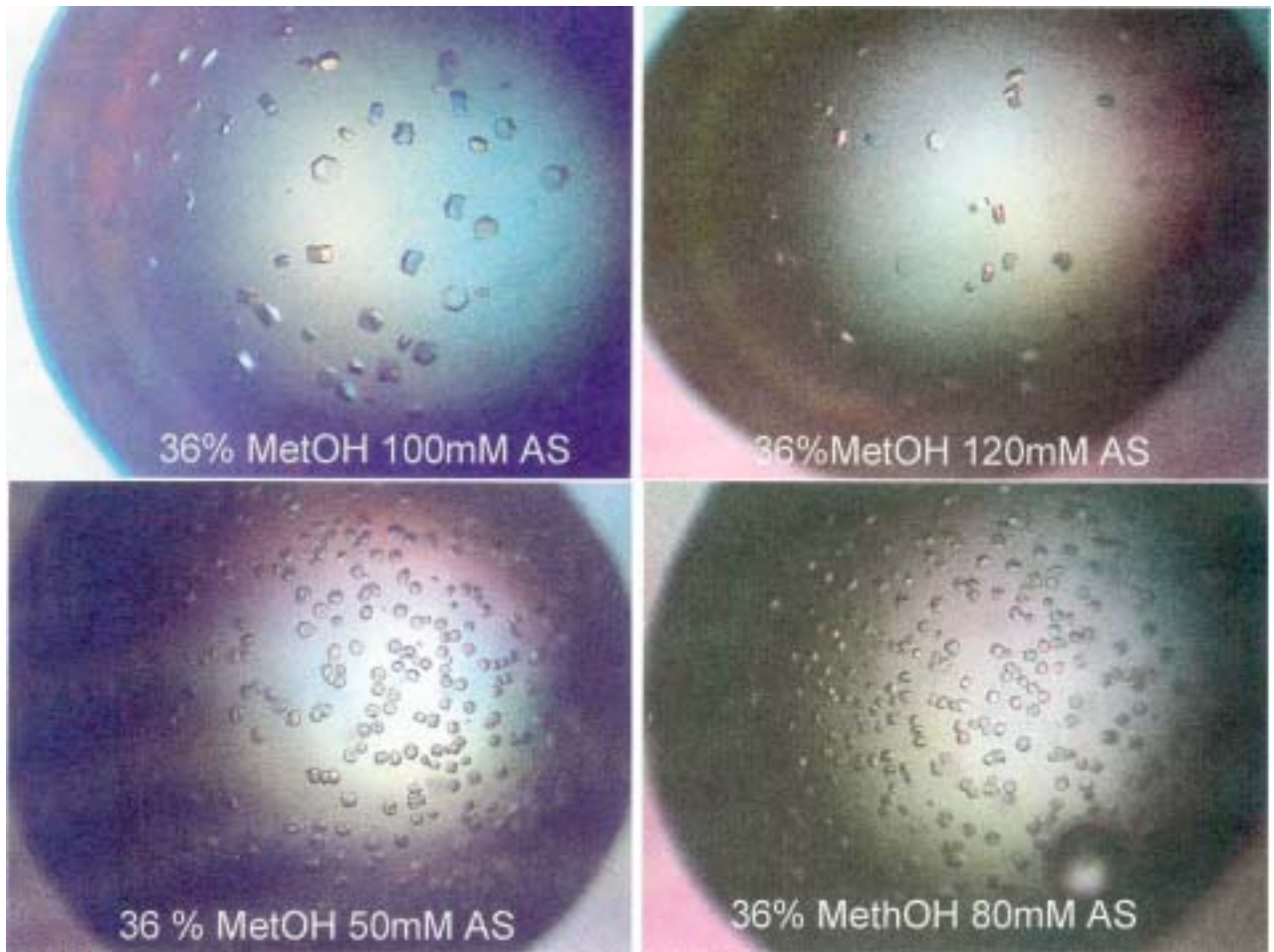
Το επόμενο βήμα ήταν να χρησιμοποιήσουμε το αμέσως καλύτερο κατακρημνιστή που ήταν η μεθανόλη με το πλέον χρησιμοποιημένο άλας στην κρυστάλλωση που είναι το $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Οι συνθήκες που δοκιμάστηκαν περιελάμβαναν μεταβολή των συγκεντρώσεων της μεθανόλης από 20-40%(v/v) και του $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 80-150mM. Τα αποτελέσματα ήταν ενθαρρυντικά. Εξαγωνικοί κρύσταλλοι παρουσιάζονται χωρίς ίζημα

μέσα σε ένα βράδυ σχετικά μεγάλοι (0.3mmx0.1mm) με άριστο από 30-34% μεθανόλη και από 90-120mM (NH₄)₂SO₄. Τελικά είχα επιτύχει το σκοπό μου; Όχι ακόμα. Και αυτό διότι διαπιστώθηκε ότι η προσπάθεια να τοποθετηθούν αυτοί οι κρύσταλλοι σε τριχοειδή για προκαταρκτική κρυσταλλογραφική ανάλυση οδηγούσε σε ταχεία καταστροφή τους η οποία εκδηλώνεται με χαρακτηριστικά ραγίσματα που επεκτείνονται σε όλο το κρύσταλλο σε σύντομο χρονικό διάστημα. Ένα πολύ ενδιαφέρον χαρακτηριστικό αυτών των κρυστάλλων ήταν ότι έξω από τις άριστες συνθήκες που αναφέρθηκαν παραπάνω όπου εμφανίζονται φέρουν χαρακτηριστικές ατέλειες στις οποίες διακρίνονται τα κρυσταλλικά στρώματα (layers). Αυτοί οι κρύσταλλοι φαίνονται στην εικ. 3-4



Εικόνα 3- 4 Κρύσταλλοι που προκύπτουν από διπλό σύστημα μεθανόλης και θειικού αμμωνίου. Στην εικόνα A φαίνονται κρύσταλλοι εκτός της άριστης περιοχής συγκέντρωσης στους οποίους είναι εμφανείς μακροσκοπικές ατέλειες

Από τις εικόνες γίνεται προφανές και ο τρόπος με τον οποίο οι κρύσταλλοι αναπτύσσονται (με εναπόθεση στρωμάτων με φορά από το κέντρο προς την περιφέρεια). Αν και οι κρύσταλλοι οι οποίοι προέκυψαν από την παραπάνω διαδικασία δεν έγινε δυνατό να μετρηθούν εντούτοις αποτελούν ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα για το πώς η μεταβολή της συγκέντρωσης του άλατος μπορεί να διαμορφώσει κρύσταλλους. Αυτό φαίνεται στην σειρά εικόνων 3-5 στις οποίες για σταθερή συγκέντρωση μεθανόλης μεταβάλεται μόνο η συγκέντρωση του άλατος.



Εικόνα 3- 5 Επίδραση της συγκέντρωσης του άλατος στην πυρήνωση και ανάπτυξη των κρυστάλλων σε διπλό σύστημα μεθανόλης και θειικού αμμωνίου

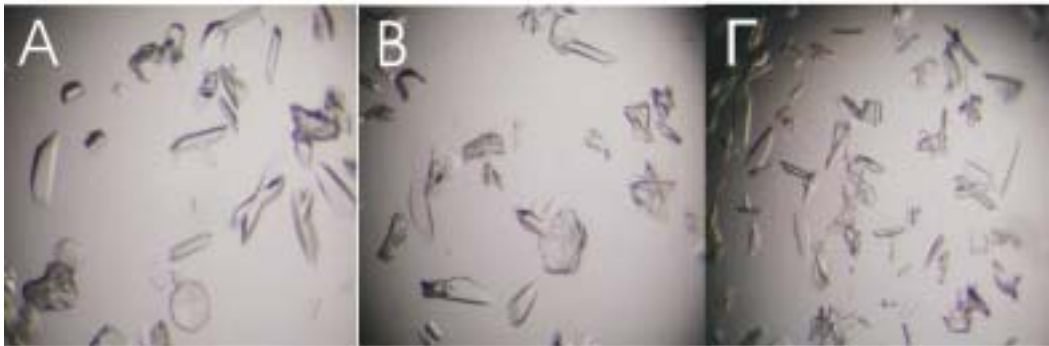
3.2.8 Η περίπτωση της μεθανόλης και του NaCl

Η αντικατάσταση του AS με το NaCl δεν έδωσε τα επιθυμητά αποτελέσματα. Αν και είναι δυνατή η παραγωγή κρυστάλλων με αυτό το συνδυασμό το εύρος της περιοχής κρυστάλλωσης είναι πολύ περιορισμένο.

3.2.9 Η περίπτωση του CaCl₂. Μια απρόσμενη επιτυχία

Μετά από όλα αυτά έγινε φανερό ότι η τυχαία δοκιμή ηλεκτρολυτών δεν θα έφερνε τα επιθυμητά αποτελέσματα. Έτσι μια ματιά στην γνωστή σειρά Hofmeister έδωσε την απάντηση. Το κλειδί για την παραγωγή κρυστάλλων ήταν στη χαοτροπικότητα των ηλεκτρολυτικών διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν. Ποια είναι η σχέση που διέπει την υδροφοβικότητα του οργανικού διαλύτη και το βαθμό χαοτροπικότητας του ηλεκτρολύτη; Το παράδειγμα του (NH₄)₂SO₄ με το MPD είναι χαρακτηριστικό. Από την μια μεριά ένα σχετικά υδροφοβος διαλύτης και από την άλλη ένα χαοτροπικό άλας είναι

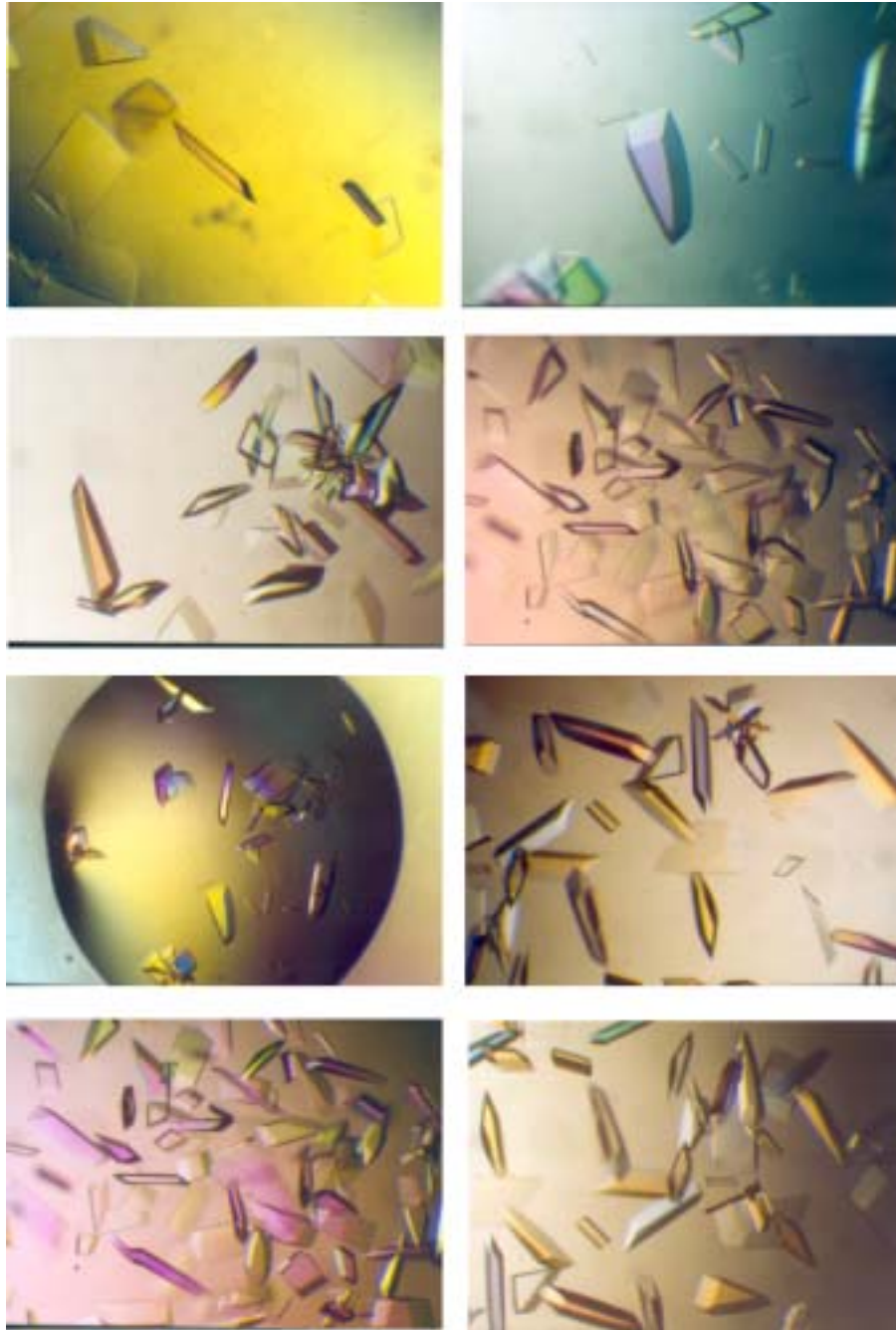
ο πλέον ακατάλληλος συνδυασμός. Η CAT_1 δεν επρόκειτο ποτέ να κρυσταλλώσει έτσι όπως έπρεπε αν δεν γινόταν ο κατάλληλος συνδυασμός του άριστου κατακρημνιστή ο οποίος είναι η μεθανόλη με ένα ηλεκτρολύτη ισχυρά ενυδατωμένου. Έτσι αρχικά δοκιμάστηκαν διάφορες συγκεντρώσεις $CaCl_2$. Τα αποτελέσματα ήταν θεαματικά. Το $CaCl_2$ έχει την ικανότητα να ελέγξει την πέρασμα των πυρήνων κρυστάλλωσης στην μετασταθή ζώνη και να δημιουργήσει μετρήσιμους κρύσταλλους. Τέτοιοι κρύσταλλοι φαίνονται στην εικ 3-6.



Εικόνα 3- 6 Κρύσταλλοι που προκύπτουν με χρήση χλωριούχου ασβεστίου

Οι κρύσταλλοι που προκύπτουν από τις παραπάνω συνθήκες είναι μετρήσιμοι, περιθλούν στα 2.7 \AA , αλλά έχουν μικρό μέγεθος (**$0.1\text{mm} \times 0.2 \text{ mm} \times 0.1\text{mm}$**) και εμφανίζονται σε μεγάλους αριθμούς μέσα στις σταγόνες. Ο ένας αντικειμενικός στόχος του αρχικού σχεδίου είχε πετύχει. Είχα βρει επαναλήψιμες συνθήκες κρυστάλλωσης οι οποίες παρήγαγαν μετρήσιμους κρυστάλλους. Όμως υπήρχε έναν ακόμα πρόβλημα άλυτο. Ο σχηματισμός μεγάλου αριθμού πυρήνων εξακολουθεί να αποτελεί ένα ανασταλτικό παράγοντα στην αύξηση του μεγέθους των κρυστάλλων. Αυτό συμβαίνει διότι οι πολλοί πυρήνες μεγαλώνουν σε κρυστάλλους μικρού μεγέθους αφού η πρωτεΐνη καταναλίσκεται νωρίς. Η αιτία αυτού του προβλήματος βρίσκεται στην ανομοιογένεια του πρωτεϊνικού παρασκευάσματος. Ακόμα και μετά τον βελτιωμένο καθαρισμό έπρεπε κάτι να γίνει ώστε το τελικό δείγμα να είναι απαλλαγμένο από οποιοδήποτε παράγοντα που θα μπορούσε να επηρεάσει τις κρυσταλλώσεις. Το αποφασιστικό βήμα ήταν να εφαρμοστεί μια αυστηρή επιλογή στα κλάσματα που λαμβάνονται από το τελευταίο στάδιο του καθαρισμού. Όπως φαίνεται στην εικόνα 3-1(3) που παρουσιάζει την καταγραφή της οπτικής πυκνότητας στο έκλουσμα της στήλης μοριακής διήθησης το φαινομενικά ομοιογενές δείγμα αναλύεται σε δύο κορυφές. Η δεύτερη και μεγαλύτερη σε ύψος είναι

αυτή που περιέχει την CAT_I στην μορφή του τριμερούς. Επιλέγοντας μόνο τα κεντρικά κλάσματα της κορυφής και απορίπτοντας τα δύο άκρα χάσαμε κάποια ποσότητα πρωτεΐνης αλλά κερδίσαμε σε ομοιογένεια μια και όπως αποδείχθηκε αυτό το πρωτεϊνικό δείγμα όταν χρησιμοποιήθηκε σε δοκιμασίες κρυστάλλωσης με κατακρημνιστή μεθανόλη και CaCl₂ τα αποτελέσματα ήταν θεαματικά (εικ.3-7).



Εικόνα 3- 7 Βελτιστοποιημένοι κρύσταλλοι

Το αποτέλεσμα της αυστηρής επιλογής κλασμάτων στον καθαρισμό που είχε προηγηθεί οδήγησε σε παραγωγή κρυστάλλων με διαστάσεις (1.0mm x 0.7mm x 0.5mm) ορατούς ακόμα και με γυμνό μάτι από την σταγόνα. Οι κρύσταλλοι αυτοί προκύπτουν σε μικρούς αριθμούς μέσα στις σταγόνες και εμφανίζονται ταχύτατα αφού ήδη σε έξη ώρες μετά από την τοποθέτηση των σταγόνων είναι δυνατό να παρατηρηθούν κρύσταλλοι οι οποίοι και συνεχίζουν να αναπτύσσονται μέσα σε ένα βράδυ φτάνοντας το τελικό τους μέγεθος σε μια ως δύο ημέρες. Ο αντικειμενικός στόχος είχε επιτευχθεί. Είχα καταφέρει να αποδείξω ότι:

- Η ποιότητα του καθαρισμού που προηγείται της κρυστάλλωσης είναι ίσως το πλέον βασικό στάδιο της όλης διαδικασίας.
- Η CAT_I μπορεί να δώσει μετρήσιμους κρυστάλλους σε συστήμα κρεμαστής σταγόνας ταχύτατα και με επαναληψιμότητα καθιστώντας την προηγούμενα προτεινόμενη μεθοδολογία παρωχημένη και επιρρεπή σε λάθη και εξωτερικούς παράγοντες.
- Οτι η CAT_I όχι μόνο κρυσταλλώνει με επαναλήψιμο τρόπο αλλά η μεγάλη ποσότητα της παραγόμενης πρωτεΐνης σε συνδυασμό με το μεγάλο εύρος των συνθηκών κρυστάλλωσης την καθιστά ένα άριστο σύστημα – μοντέλο ίσως αντίστοιχης χρησιμότητας με την λυσοζύμη, ως αναφορά για την φυσικοχημική μελέτη των παραγόντων που επιδρούν στην κρυστάλλωση των βιομορίων.

Παρόλη την επιτυχία της παραπάνω διαδικασίας οι δοκιμασίες κρυστάλλωσης δεν περιορίστηκαν σε αυτά αλλά επεκτάθηκαν με σκοπό να αποδειχθεί ότι η γνώση της συμπεριφοράς ενός βιομορίου στην κρυστάλλωση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να προβλεφθεί ποιοι άλλοι παράγοντες μπορεί να έχουν αποτελέσματα παρόμοια με τα παρατηρηθέντα. Έτσι με απλή παρατήρηση του περιοδικού συστήματος διαπιστώθηκε ότι δύο ακόμα στοιχεία όπως το Ba και το Sr τα οποία καταλαμβάνουν τις δύο επόμενες θέσεις στο περιοδικό σύστημα των στοιχείων μετά το ασβέστιο θα πρέπει να μπορούν να επάγουν την κρυστάλλωση της CAT_I . Πράγματι το $BaCl_2$ έχει ακριβώς το ίδιο αποτέλεσμα όταν χρησιμοποιηθεί στις κρυσταλλώσεις με το $CaCl_2$. Ο πίνακας 3-3 συνοψίζει τις δοκιμασίες που πραγματοποιήθηκαν.

Πίνακας 3-3 Πίνακας που συνοψίζει τις δοκιμασίες κρυστάλλωσης που πραγματοποιήθηκαν.

	Μεθανόλη	Αιθανόλη	Ισοπροπανόλη	MPD	PEG200
Χωρίς άλας	25-30% βελόνες	10-35% βελόνες	20-25% κακοί εξαγωνικοί	24-28% ακανόνιστες πλάκες	Βολίδες 25-30%
NaCl	Άμορφοι κρυσταλλικοί σχηματισμοί	Δεν δοκιμάστηκε	Δεν δοκιμάστηκε	Δεν εμφανίζονται κρύσταλλοι	Βολίδες 25-30%, 5-15mM
CaCl ₂	Ραβδόμορφοι κρύσταλλοι 19-24%, 60-90mM	Δεν δοκιμάστηκε	Δεν δοκιμάστηκε	Δεν δοκιμάστηκε	Άμορφοι κρυσταλλικοί σχηματισμοί
Ca(NO ₃) ₂	Ραβδόμορφοι κρύσταλλοι 19-24%, 60-90mM	Δεν δοκιμάστηκε	Δεν δοκιμάστηκε	Δεν δοκιμάστηκε	Αστεροειδής κρύσταλλοι
BaCl ₂	Ραβδόμορφοι κρύσταλλοι 19-24%, 60-90mM	Δεν δοκιμάστηκε	Δεν δοκιμάστηκε	Δεν δοκιμάστηκε	Δεν εμφανίζονται κρύσταλλοι
LiCl	Άμορφοι κρυσταλλικοί σχηματισμοί	Δεν δοκιμάστηκε	Δεν δοκιμάστηκε	Δεν δοκιμάστηκε	Βολιδόμορφοι 25-30%, 10-60mM
MgCl ₂	Άμορφοι κρυσταλλικοί σχηματισμοί	Εξαγωνικοί κρύσταλλοι	Εξαγωνικοί κρύσταλλοι	Δεν εμφανίζονται κρύσταλλοι	Δεν δοκιμάστηκε
(NH ₄) ₂ SO ₄	Εξαγωνικοί κρύσταλλοι 34-39%, 80-140mM	Εξαγωνικοί κρύσταλλοι	Εξαγωνικοί κρύσταλλοι	Κακοί εξαγωνικοί κρύσταλλοι	Δεν εμφανίζονται κρύσταλλοι

3.2.10 Δημιουργία κρυστάλλων της CAT₁ σε σύμπλεγμα με τον συναγωνιστικό αναστολέα φουσιδικό οξύ

Για την παρασκευή αυτών των κρυστάλλων στις συνθήκες κρυστάλλωσης που αναφέρθηκαν παραπάνω προστέθηκε διάλυμα φουσιδικού νάτριου σε τελική συγκέντρωση 1mM. Οι κρύσταλλοι που προκύπτουν είναι πανομοιότυποι με αυτούς του αποενζύμου.

3.2.11 Κρυοπροστασία των κρυστάλλων της CAT_I

Προκειμένου να συλλεχθούν δεδομένα περίθλασης από τους κρύσταλλους της CAT_I έπρεπε να ταυτοποιηθούν οι συνθήκες εκείνες στις οποίες ο κρύσταλλος μπορεί να ψυχθεί σε θερμοκρασία υγρού αζώτου, για να προστατευτεί ο κρύσταλλος από την καταστροφή από ακτινοβολία, χωρίς να δημιουργηθεί κρυσταλλικός πάγος. Για να γίνει αυτό δοκιμάστηκαν διάφοροι παράγοντες γνωστοί για την αντιπηκτική τους δράση όπως το MPD, PEG200, PEG400, PEG600, glycerol, glucose. Τελικά διαπιστώθηκε ότι προσθήκη 30% MPD (v/v) στο μητρικό υγρό κρυστάλλωσης με μείωση της συγκέντρωσης του άλατος 5-15 mM έδινε την καλύτερη κρυοπροστασία οπότε και επιλέχθηκε σαν ο κρυοπροστατευτικός παράγοντας που θα χρησιμοποιούσαμε.

3.3 Συλλογή δεδομένων περίθλασης από κρυστάλλους της CAT

3.3.1 Γενικά

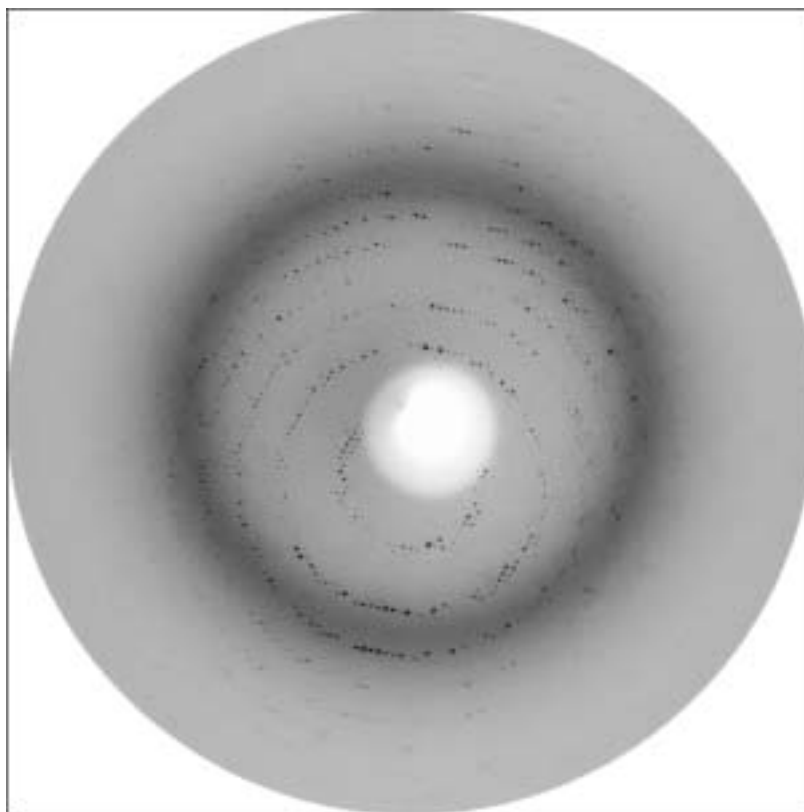
Προκαταρκτικές κρυσταλλογραφικές αναλύσεις των κρυστάλλων της CAT_I οι οποίες πραγματοποιήθηκαν σε γεννήτρια ακτίνων Χ περιστρεφόμενης ανόδου RU300 εξοπλισμένη με δίσκο ειδώλου για την συλλογή των δεδομένων, έδειξαν ότι η CAT_I κρυσταλλώνει στο μονοκλινές σύστημα (P2₁) και η στοιχειώδης κυψελίδα της είναι αρκετά μεγάλη. Αυτό σε συνδυασμό με μια σχετικά αυξημένη μωσαικότητα των κρυστάλλων η οποία υπαγορεύει μικρή γωνία περιστροφής κατά την διάρκεια της συλλογής δεδομένων δημιούργησαν πρόβλημα μια και το οικείο σύστημα της γεννήτριας λόγω της κατασκευής του (γωνιοστάτης και οπτικά) δεν είναι σε θέση να διαχωρίσει επαρκώς τις ανακλάσεις και απαιτείται η χρήση ακτινοβολίας σύγχροτρου για την συλλογή δεδομένων. Προς τούτο χρησιμοποιήθηκε το EMBL/DESY (Deutch Electron Sychrotron) για την μέτρηση των κρυστάλλων της CAT_I.

3.3.2 Συλλογή δεδομένων από κρυστάλλους του αποενζύμου CAT_I

Για την συλλογή δεδομένων περίθλασης χρησιμοποιήθηκε κρύσταλλος του αποενζύμου διαστάσεων 1.5mm x 0.8 mm x 0.4 mm. Ο κρύσταλλος παραλείφθηκε από το μητρικό υγρό κρυστάλλωσης με ειδικό βρόγχο (cryoloop) διαμέτρου 2mm. Η επιλογή του μεγέθους του βρόγχου έγινε με βάση το μέγεθος του κρύσταλλου αφού δεν πρέπει ο κρύσταλλος να έρθει σε επαφή με το νήμα του βρόγχου διότι κατά το επικείμενο πάγωμα ενδέχεται να ραγίσει λόγω αλλαγής του όγκου του διαλύματος. Στην συνέχεια ο

κρύσταλλος φέρεται εντός σταγόνας μητρικού υγρού κρυστάλλωσης για έκπλυση και στην συνέχεια εμβαπίζεται σε διάλυμα κρυσταλλοπροστασίας. Αμέσως ο κρύσταλλος τοποθετείται στην γωνιομετρική κεφαλή όπου και προσκολλάται μέσω μαγνητικής βάσης ενώ για το διάστημα που απαιτείται για την ευθυγράμμιση του κρυστάλλου το ρεύμα του αζώτου εκτρέπεται. Μόλις η διαδικασία ευθυγράμμισης ολοκληρωθεί το ρεύμα αζώτου αφήνεται να ψύξει τον κρύσταλλο.

Ο ανιχνευτής (MAR CCD 165 mm) τοποθετείται σε απόσταση 200mm από τον κρύσταλλο. Το σύστημα συλλογής δεδομένων ρυθμίστηκε να συλλέγει εικόνες με γωνιακή ταχύτητα 0.5° /εικόνα με χρόνο έκθεσης 30 sec. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται ενώ ο κρύσταλλος βρίσκεται σε ρεύμα αζώτου 100°K . Ο κρύσταλλος περιστράφηκε κατά 180° (η περιστροφή αυτή υπαγορεύεται από την ομάδα συμμετρίας του κρυστάλλου για την συλλογή πλήρων δεδομένων) και συνολικά συλλέχθηκαν 360 εικόνες. Μια εικόνα περιθλασης ακολουθεί παρακάτω. Από την δεικτοδότηση (indexing) των δεδομένων προκύπτει ότι ο κρύσταλλος ανήκει στην ομάδα συμμετρίας $P2_1$ με παραμέτρους στοιχειώδους κυψελίδας $a=115.73 \text{ \AA}$, $b=129.70 \text{ \AA}$, $c=117.98 \text{ \AA}$, $\alpha=90.00^\circ$, $\beta=108.38^\circ$, $\gamma=90.00^\circ$.



Εικόνα 3- 8 Διάγραμμα περίθλασης από κρυστάλλους του άποενζυμου της **CAT₁**. Το διακριτικό όριο είναι **2.5 Å**. Η περιφέρεια του ανιχνευτή αντιστοιχεί σε διακριτικότητα **2.1 Å**

3.3.3 Επεξεργασία των δεδομένων περίθλασης

Η επεξεργασία των δεδομένων περίθλασης και η ολοκλήρωση των εντάσεων έγινε με το πακέτο DENZO/SCALEPACK. Τα στατιστικά στοιχεία που προκύπτουν από τα δεδομένα περίθλασης και αφορούν την ποιότητα τους συνοψίζονται στους πίνακες 3-4, 3-5 και 3-6

Πίνακας 3-4 Πολλαπλότητα δεδομένων ανάκλασης ανά φλοιό διακριτικότητας

Φλοιός		Πολλαπλότητα παρατηρήσεων ανά φλοιό ανάκλασης										Σύνολο
Χαμηλό όριο	Υψηλό όριο	0	1	2	3	4	5-6	7-8	9-12	13-19	>19	
8,00	4,97	13	107	450	662	8732	0	0	0	0	0	9951
4,97	4,11	18	18	429	669	8773	0	0	0	0	0	9889
4,11	3,65	29	27	378	629	8800	0	0	0	0	0	9834
3,34	3,12	43	31	340	548	8863	0	0	0	0	0	9782
3,12	2,94	43	25	347	599	8828	0	0	0	0	0	9799
2,94	2,80	55	32	335	670	8752	0	0	0	0	0	9789
2,80	2,69	60	25	347	863	8556	0	0	0	0	0	9791
2,69	2,59	66	39	422	1227	8069	0	0	0	0	0	9757

Φλοιός		Πολλαπλότητα παρατηρήσεων ανά φλοιό ανάκλασης										Σύνολο
Χαμηλό όριο	Υψηλό όριο	0	1	2	3	4	5-6	7-8	9-12	13-19	>19	
2,59	2,50	75	51	522	1507	7594	0	0	0	0	0	9674
Σύνολο		433	387	3934	7994	85770	0	0	0	0	0	98085

Ο πίνακας 3-4 παρουσιάζει την πολλαπλότητα των δεδομένων δηλαδή πόσες φορές είναι μετρημένα οι ανακλάσεις ανά φλοιό ανάκλασης. Από τον πίνακα είναι φανερό ότι το 87.4 % των παρατηρήσεων είναι μετρημένων 4 φορές γεγονός που ανεβάζει την αξιοπιστία των δεδομένων.

Πίνακας 3-5 Ποσοστιαία πληρότητα δεδομένων ανά φλοιό διακριτικότητας

Φλοιός		Πληρότητα δεδομένων % με I/sigma λιγότερο από ανά φλοιό ανάκλασης								Σύνολο
Χαμηλό όριο	Υψηλό όριο	0	1	2	3	5	10	20	>20	
8,00	4,97	1,4	2,2	3,0	4,1	6,2	11,8	25,5	74,4	99,9
4,97	4,11	2,0	2,8	3,5	4,5	6,4	11,7	26,1	73,7	99,8
4,11	3,65	2,3	3,7	5,0	6,5	9,6	17,6	36,0	63,7	99,7
3,65	3,34	1,6	3,1	5,2	7,5	12,4	24,3	46,1	53,5	99,7
3,34	3,12	3,8	6,8	10,4	14,3	22,0	37,5	61,5	38,1	99,6
3,12	2,94	7,5	12,5	17,7	22,5	31,6	49,7	72,8	26,8	99,6
2,94	2,80	9,7	16,9	24,2	30,7	41,5	61,3	82,9	16,6	99,4
2,80	2,69	11,5	20,6	29,7	36,9	49,7	70,4	89,2	10,2	99,4
2,69	2,59	13,0	24,7	35,4	44,5	58,0	77,3	91,9	7,5	99,3
2,59	2,50	14,5	27,9	4,06	50,7	64,5	82,9	94,8	4,5	99,2
Σύνολο		6,7	12,1	17,4	22,2	30,1	44,3	62,6	37,0	99,6

Η πληρότητα των δεδομένων (πίνακας 3-5) είναι παραπάνω από ικανοποιητική αφού σε όλους τους φλοιούς ανάκλασης η πληρότητα είναι πάνω από 99%.

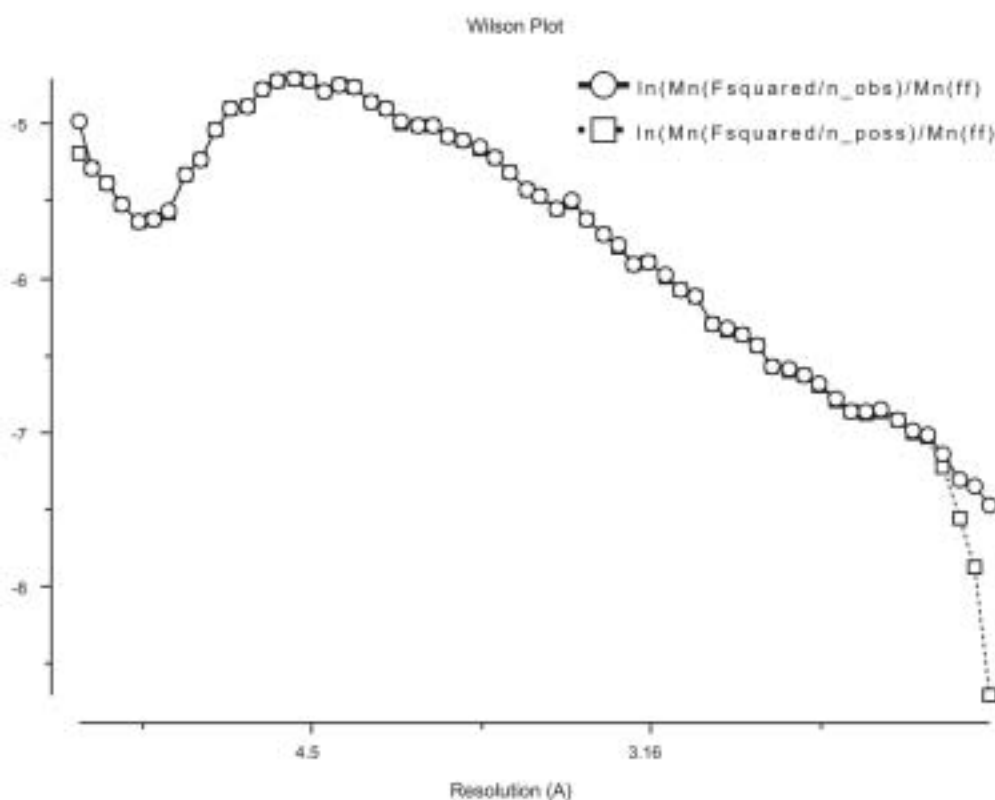
Πίνακας 3-6 Πίνακας στατιστικών για την ορθότητα του πλέγματος που επιλέχθηκε

Φλοιός		Μέση	Μέσο	Κανον	Γραμμικό	Τετράγωνο	
Χαμηλό όριο	Υψηλό όριο	I (ένταση)	Σφάλμα stat.	χ^2	R-fac	R-fac	
8.00	4.97	7008.7	224.5	110.9	1.041	0.037	0.043
4.97	4.11	10815.3	386.0	155.8	1.030	0.039	0.050
4.11	3.65	8554.7	314.1	162.2	1.097	0.048	0.065
3.65	3.34	5825.8	219.4	162.9	1.172	0.057	0.056
3.34	3.12	3750.5	187.5	156.2	1.079	0.078	0.093
3.12	2.94	2450.6	163.8	146.2	1.022	0.104	0.102
2.94	2.80	1579.0	147.2	137.9	0.963	0.144	0.124
2.80	2.69	1103.0	138.8	133.3	0.916	0.190	0.165

Φλοιός		Μέση	Μέσο	Κανον	Γραμμικό	Τετράγωνο
Χαμηλό όριο	Υψηλό όριο	I (ένταση)	Σφάλμα	stat.	χ^2	R-fac
2.69	2.59	821.3	134.4	132.3	0.891	0.241
2.59	2.50	644.4	134.0	132.6	0.838	0.291
Σύνολο		4274.2	205.3	143.0	1.006	0.065

Στον πίνακα 3-6 παρουσιάζονται τα συγκεντρωτικά στατιστικά στοιχεία για το σύνολο των δεδομένων. Ιδιαίτερη σημασία πρέπει να δοθεί στην στήλη χ^2 η της οποίας οι τιμές πρέπει να πλησιάζουν το 1.00 καθώς και στις δύο τελευταίες στήλες που παρουσιάζουν την μεταβολή του συντελεστή αξιοπιστίας ως συνάρτηση του φλοιού ανάκλασης. Η τελική τιμή του R είναι 0.065 ή 6.5%.

Η μετατροπή των μετρηθέντων εντάσεων σε παράγοντες δομής έγινε με την μέθοδο Wilson. Παρακάτω φαίνεται το διάγραμμα Wilson για τα δεδομένα του αποενζύμου της CAT_I.



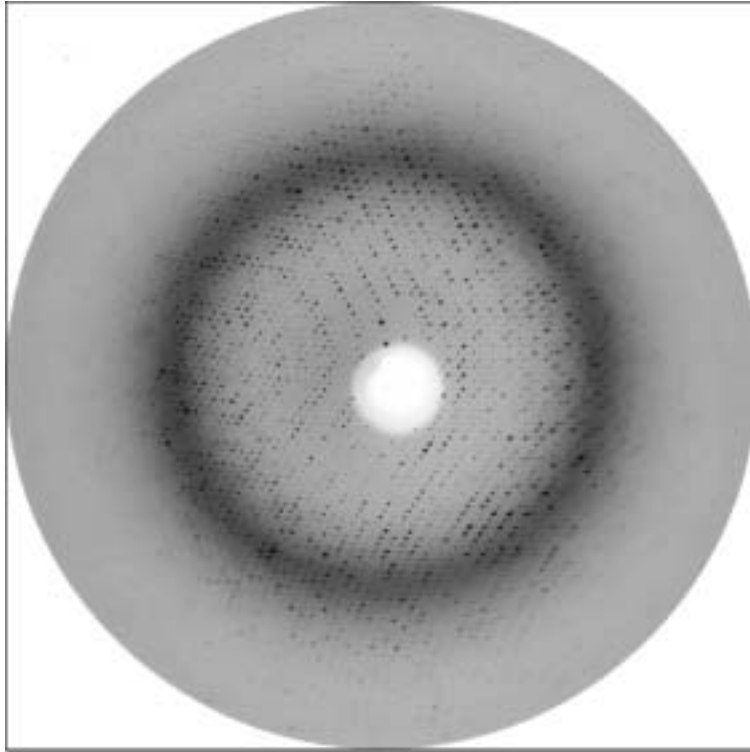
Εικόνα 3- 9 Διάγραμμα Wilson για τα δεδομένα του αποενζύμου

Η τιμή του συνολικού συντελεστή κλιμάκωσης (scale factor) είναι 20.92 και η τιμή του μέσου παράγοντα θερμοκρασίας είναι 58.086. Συνολικά τα δεδομένα που μετρήθηκαν έχουν 114785 ανακλάσεις με διακριτικό όριο από 8.44 -2.5 Å.

3.3.4 Συλλογή δεδομένων από κρυστάλλους του συμπλόκου της CAT₁ με φουσιδικό οξύ.

Η διαδικασία συλλογής δεδομένων από κρυστάλλους του συμπλόκου με το φουσιδικό οξύ ουσιαστικά είναι ίδια με την προαναφερθείσα. Ο κρύσταλλος που χρησιμοποιήθηκε είχε προκύψει από τις ίδιες συνθήκες κρυστάλλωσης με την προσθήκη 1mM διαλύματος φουσιδικού νατρίου. Η απόσταση του ανιχνευτή από τον κρύσταλλο είναι 200mm. Ο κρύσταλλος περιστράφηκε κατά 180⁰ και εικόνες συλλέχθηκαν στρέφοντας 0.5⁰ κάθε φορά.

Στην εικόνα 3-10 φαίνεται το πρότυπο περίθλασης του κρυστάλλου της CAT₁ με το φουσιδικό οξύ. Η δεικτοδότηση των δεδομένων έγινε με το πακέτο MOSFLM διότι το 95% των μετρημένων ανακλάσεων είναι μερικώς καταγεγραμμένες (partial reflections) και υπό αυτές τις συνθήκες το παραπάνω λογισμικό δίδει καλύτερα δεδομένα για την ολοκλήρωση των εντάσεων. Από την δεικτοδότηση των ανακλάσεων προκύπτει ότι ο κρύσταλλος ανήκει στην ομάδα συμμετρίας P2₁ με παραμέτρους στοιχειώδους κυψελίδας a=115.35 Å, b=129.19 Å, c=118.07 Å, α=90.00⁰, β=108.29⁰, γ=90.00⁰ δηλαδή είναι ισόμορφος με τον κρύσταλλο του άποενζύμου. Η επεξεργασία των δεδομένων και ο υπολογισμός των παραγόντων δομής έγινε με το πρόγραμμα SCALA.



Εικόνα 3- 10 Διάγραμμα περίθλασης από κρυστάλλους του συμπλόκου της **CAT_I** με το φουσιδικό νάτριο. Η περιφέρεια του ανιχνευτή αντιστοιχεί σε διακριτικότητα **2.1 Å**

Στους πίνακες 3-7 και 3-8 παρουσιάζονται κάποια στατιστικά στοιχεία για τα δεδομένα του κρυστάλλου.

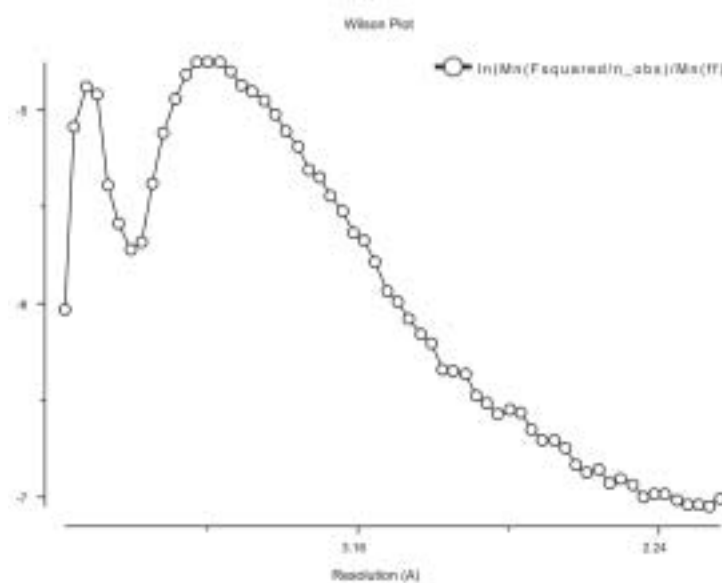
Πίνακας 3-7 Στατιστικοί παράγοντες ανά φλοιό διακριτικότητας

	Φλοιός	Rfrac	Rcum	Av_I	Sigma	I/sigma	Αριθμός ανακλάσεων
1	6,7	0,032	0,032	8595	740,3	11,6	5851
2	4,74	0,029	0,03	7596	386,1	19,7	10826
3	3,87	0,034	0,032	9980	545,9	18,3	13962
4	3,35	0,047	0,036	6238	450,6	13,8	16494
5	3	0,064	0,04	3332	319,6	10,4	18661
6	2,74	0,092	0,044	1752	228,8	7,7	20607
7	5,53	0,122	0,048	1154	193	6	22335
8	2,37	0,161	0,052	839	201,3	4,2	23654
9	2,23	0,204	0,056	655	183,7	3,6	24339
10	2,12	0,234	0,059	566	182,2	3,1	16896
Σύνολο		0,059	0,059	3228	329,5	9,8	173625

Πίνακας 3-8 Πληρότητα και πολλαπλότητα δεδομένων ανά φλοιό διακριτικότητας

N	Φλοιός	Αριθμός ανακλάσεων	%πληρότητα	Αθροιστική %πληρότητα	Πολλαπλότητα	Rsym
1	6,7	6006	99,5	99,5	3,4	0,032
2	4,74	10885	100	99,8	3,7	0,029
3	3,87	13995	100	99,9	3,7	0,034
4	3,35	16527	100	99,9	3,7	0,047
5	3	18697	100	100	3,7	0,064
6	2,74	20644	100	100	3,7	0,092
7	5,53	22459	100	100	3,6	0,122
8	2,37	24074	99,9	100	3,5	0,161
9	2,23	25486	99,4	99,9	3,3	0,204
10	2,12	23372	86,5	97,9	2,5	0,234
Σύνολο		182115	97,9	97,9	3,5	0,059

Από τους πίνακες είναι εμφανής η ποιότητα των δεδομένων αφού αυτά μπορούν να συνδυαστούν ικανοποιητικά σε όλους τους φλοιούς ανάκλασης . Ο συνολικός αριθμός ανακλάσεων μετά την μετατροπή των εντάσεων σε παράγοντες δομής είναι 185890. Ο συνολικός θερμοκρασιακός παράγοντας είναι $B = 28.587$ και ο συντελεστής κλιμάκωσης 69.64368. Στην εικ. 3-11 φαίνεται το διάγραμμα Wilson για τα δεδομένα.



Εικόνα 3- 11 Διάγραμμα Wilson για τα δεδομένα του συμπλόκου της CAT_I με το φυσικό νάτριο

3.3.5 Περιεκτικότητα σε διαλύτη και τα περιεχόμενα της ασύμμετρης μονάδας

Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται οι αναλύσεις των δεδομένων για το αποένζυμο της CAT_I και για το σύμπλοκο με το φουσιδικό οξύ σε σχέση με την περιεκτικότητα των κρυστάλλων σε διαλύτη και των αριθμό των μορίων στην ασύμμετρη μονάδα (Matthews 1968). Για την περίπτωση της CAT_I χρησιμοποιήθηκε μοριακό βάρος 80Kd αφού η πρωτεΐνη αυτή είναι πάντα στην μορφή του τριμερούς.

Πίνακας 3-9 Ανάλυση του ποσοστού διαλύτη και των περιεχομένων της ασύμμετρης μονάδας για τους κρυστάλλους του αποενζύμου

Αποένζυμο		
Ογκος στοιχειώδους κυψελίδας: 1670717 Å³		
N μόρια /ασύμμετρη μονάδα	Συντελεστής Mawthews V_M(Å³/Dalton)	% περιεκτικότητα σε διαλύτη
1	10,4	88,1
2	5,2	76,3
3	3,5	64,4
<u>4</u>	<u>2,6</u>	<u>52,5</u>
5	2,1	40,6
6	1,7	28,8
7	1,5	16,9
8	1,3	5,0

Πίνακας 3-10 Ανάλυση του ποσοστού του διαλύτη και των περιεχομένων της ασύμμετρης μονάδας για τους κρυστάλλους του συμπλόκου

Σύμπλοκο		
Ογκος στοιχειώδους κυψελίδας: 1680683 Å³		
N μόρια /ασύμμετρη μονάδα	Συντελεστής Mawthews V_M(Å³/Dalton)	% περιεκτικότητα σε διαλύτη
1	10.5	88.2
2	5.3	76.4
3	3.5	64.6
<u>4</u>	<u>2.6</u>	<u>52.8</u>
5	2.1	41.0
6	1.8	29.2
7	1.5	17.4
8	1.3	5.6

Από τους πίνακες 3-9 και 3-10 είναι σαφές ότι οι δύο κρύσταλλοι είναι ισόμορφοι αφού η διαφορά τους είναι λιγότερο από 1% και έχουν 4 τριμερή της CAT_I στην ασύμμετρη

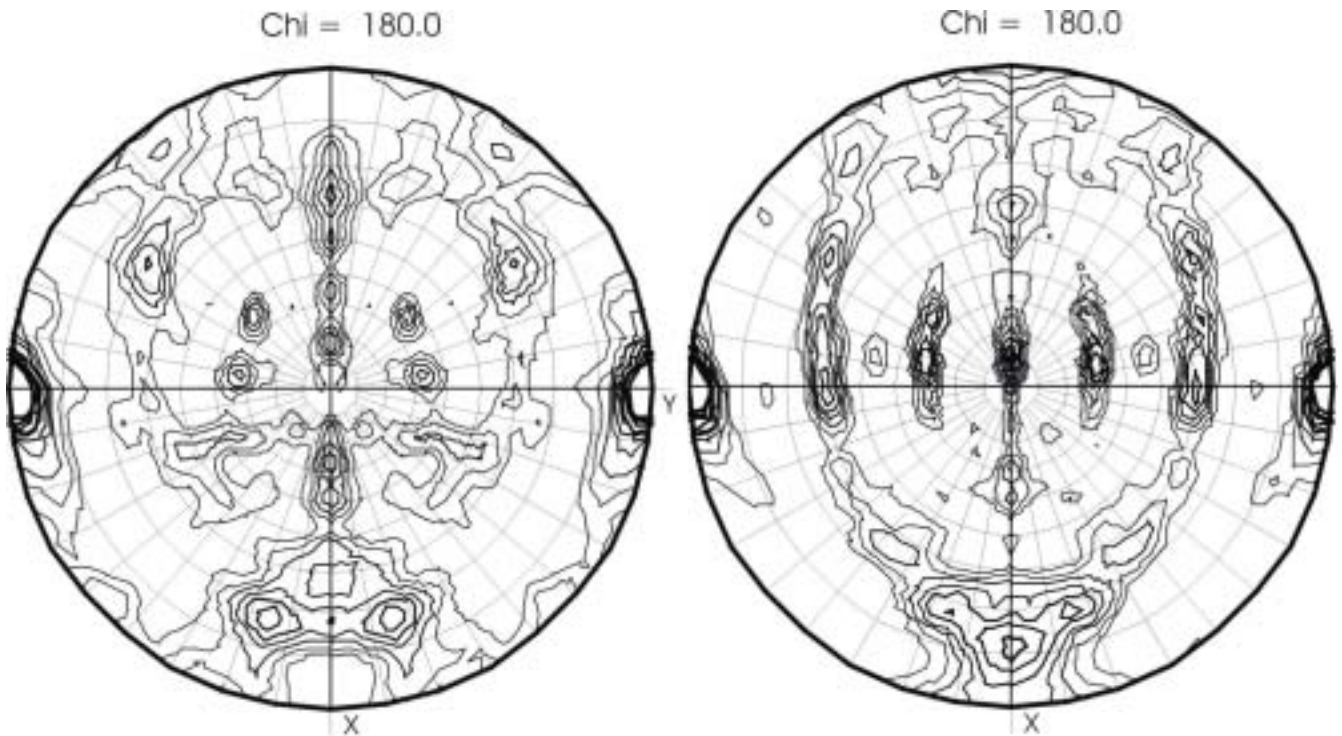
μονάδα. Από αυτό το στάδιο φάνηκε ότι η επίλυση της δομής της CAT_I δεν θα ήταν μια απλή υπόθεση. Τα συγκεντρωτικά στοιχεία για τα δύο σετ δεδομένων παρουσιάζονται στον πίνακα 3-11.

Πίνακας 3-11 Συγκεντρωτικός πίνακας για την συλλογή δεδομένων

	Αποένζυμο CAT_I	Σύμπλοκο CAT_I – φουσιδικό οξύ
Ομάδα συμμετρίας	P2 ₁	P2 ₁
	a(A)	115.73
	b(A)	129.70
	c(A)	117.98
Παράμετροι στοιχειώδους κυψελίδας	α(°)	90.00
	β(°)	108.38
	γ(°)	90.00
Περιεχόμενο σε διαλύτη	~55.7 % (V _m = 2.8 Å ³ /dalton) 4 τριμερή /ασύμμετρη μονάδα	~52.5 % (V _m = 2.6 Å ³ /dalton) 4 τριμερή /ασύμμετρη μονάδα
Τρόπος συλλογής δεδομένων	Σταθερό μήκος κύματος	Σταθερό μήκος κύματος
Πηγή	X11 EMBL / DESY	X11 EMBL / DESY
Μήκος κύματος (Å)	0.81	0.81
Διακριτικό όριο (Å)	10 – 2.5	7 – 2.12
Σύνολο ανακλάσεων	375317	1833386
Μοναδικές ανακλάσεις	114785	182115
Ολοκλήρωση των εντάσεων	DENZO	MOSFLM
Αναγωγή των δεδομένων σε κοινή κλίμακα	SCALEPACK	SCALA
Πληρότητα δεδομένων (%)	99.60%	97.9%
R_{sym} (Σύνολο/υψηλότερος φλοιός ανάκλασης)	0.061/0.246	0.059/0.234

3.3.6 Η συνάρτηση αυτοπεριστροφής (Self rotation function)

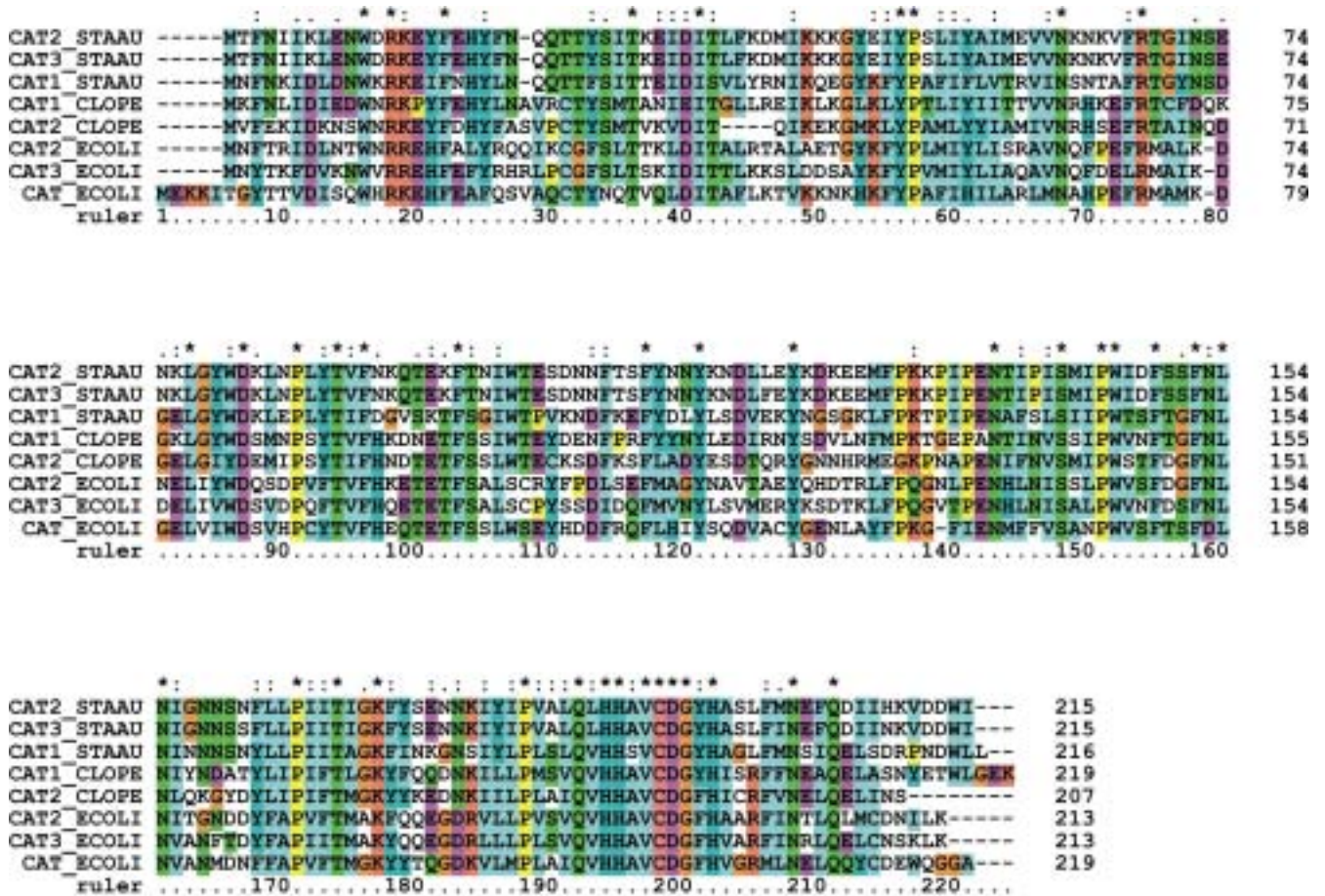
Είναι γνωστό ότι η συνάρτηση αυτοπεριστροφής Patterson (self rotation) μπορεί να αποκαλύψει τις υπάρχουσες σχέσεις συμμετρίας μεταξύ των μορίων που βρίσκονται στην ασύμμετρη μονάδα ακόμα και αν δεν υπάρχει διαθέσιμη πληροφορία για τις φάσεις. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η συνάρτηση Patterson είναι μια εσωτερική ιδιότητα των δεδομένων και αναλύει ουσιαστικά την σχετική απόσταση μεταξύ των ατόμων χωρίς να ενδιαφέρεται για τις απόλυτες τιμές των συντεταγμένων του που είναι άγνωστες. Στην εικόνα 3-12 παρουσιάζονται η γραφικές αναπαραστάσεις της συνάρτησης για τα δύο σετ δεδομένων. Η ακτίνα ολοκλήρωσης είναι 20Å και το εύρος διακριτικότητας από 8.0-5.0Å



Εικόνα 3- 12 Γραφική αναπαράσταση του χάρτη Patterson για την συνάρτηση αυτοπεριστροφής των δεδομένων. Η έντονες κορυφές στην τομή των 180° που παρουσιάζεται εδώ είναι ενδεικτικές για την ύπαρξη μη κρυσταλλογραφικής συμμετρίας

3.4 Εύρεση των φάσεων για την δομή της CAT_I

Αν και έγιναν εκτεταμένες προσπάθειες παρασκευής ισόμορφων κρυστάλλων με βαρέα μέταλλα εντούτοις τα αποτελέσματα ήταν ατυχή είτε διότι οι κρύσταλλοι δεν ήταν ισόμορφοι, είτε διότι η προσθήκη του μετάλλου είχε σαν αποτέλεσμα την χειροτέρευση της περίθλασης από τον κρύσταλλο. Από όλα τα παράγωγα που δοκιμάστηκαν μόνο εκείνο που παρασκευάζεται με προσθήκη 0.5mM HgCl₂ είναι ισόμορφο αλλά ο βαθμός υποκατάστασης του ήταν πολύ χαμηλός με αποτέλεσμα να μην μπορεί να συνεισφέρει στο υπολογισμό φάσεων για την πρωτεΐνη. Έτσι εφόσον υπήρχε ήδη γνωστή η δομή της CAT_{III} χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της μοριακής αντικατάστασης για τον υπολογισμό φάσεων της CAT_I από το ήδη γνωστό μοντέλο της CAT_{III}. Κάτι τέτοιο είναι εφικτό αφού όλη η ομάδα των προκαρυωτικών ακετυλοτρανσφερασών της χλωραμφενικόλης έχει εκτεταμένη ομολογία σε επίπεδο πρωτοταγούς δομής. Στην εικόνα 3-13 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα πολλαπλής στοιχίσης μεταξύ διαφόρων ακετυλοτρανσφερασών.

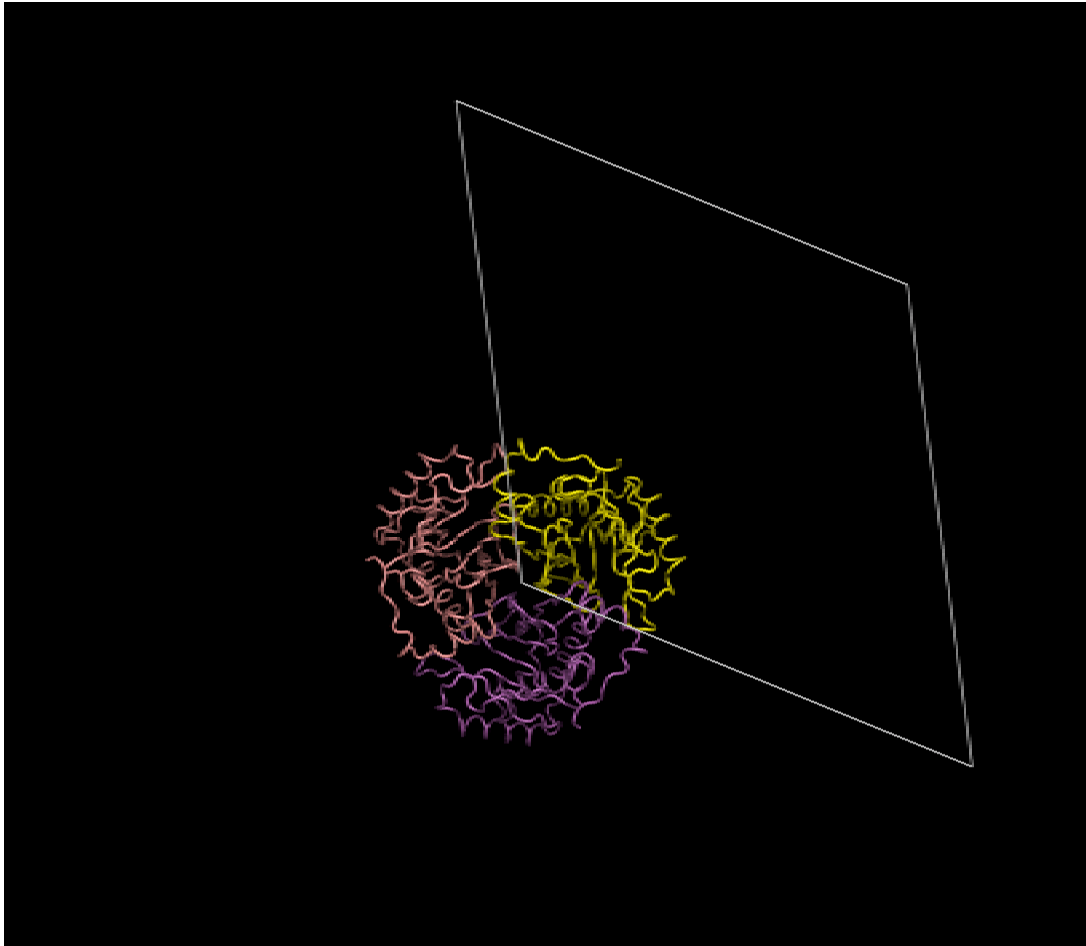


Εικόνα 3- 13 Στοιχίση των πρωτοπαγών δομών των ακετυλοτρανσφερασών από *S. aureus*, *E. coli* και *Clesbiella*

Οι αλληλουχίες προέρχονται από την *E. coli* (cat₁_ecoli:CAT_I, cat₂_ecoli:CAT_{II}, cat₃_ecoli:CAT_{III}) και από το *S. aureus*. Είναι φανερή η εκτεταμένη ομολογία μεταξύ των διαφόρων τύπων της CAT και η συντήρηση των καταλοίπων που συμμετέχουν στο σχηματισμό του ενεργού κέντρου.

3.4.1 Προετοιμασία του αρχικού μοντέλου για την εφαρμογή της μοριακής αντικατάστασης

Η ήδη γνωστή δομή της CAT_{III} είναι λυμένη στην ομάδα συμμετρίας R32 που αντιστοιχεί στο ρομβοεδρικό σύστημα. Αυτό σημαίνει ότι υπάρχει ένα μονομερές στην ασύμμετρη μονάδα και άλλωστε το μονομερές αυτό είναι και όλη η δομική πληροφορία που υπάρχει στην βάση δεδομένων (PDB). Έτσι σε ένα πρώτο στάδιο έπρεπε να μετατρέψουμε το κατατεθειμένο μονομερές σε πλήρες τριμερές. Αυτό γίνεται με την εφαρμογή πινάκων περιστροφής.



Εικόνα 3- 14 Το μοντέλο της CAT_{III} που χρησιμοποιήθηκε στην μοριακή αντικατάσταση μέσα στη στοιχειώδη κυψελίδα

Εξαιτίας του μεγάλου βαθμού ομολογίας μεταξύ της CAT_I και της CAT_{III} αποφασίστηκε να χρησιμοποιήσουμε το μοντέλο χωρίς καμία αλλαγή, δηλαδή αποκοπή των πλευρικών ομάδων που δεν είναι ίδιες και μετατροπή τους σε αλανίνες το οποίο είναι συνήθης πρακτική, διατηρώντας πάντα την δυνατότητα να επαναλάβουμε τα στάδια αυτά αν η επακόλουθη διαδικασία δεν ήταν επιτυχής.

3.4.2 Η μοριακή αντικατάσταση

Η μεθοδολογία για την εκτέλεση αυτού του βήματος έχει περιγραφεί και δεν θα αναφερθεί εδώ. Σε αυτό το τμήμα θα αναφέρουμε τα αποτελέσματα της μεθόδου στα διάφορα στάδια. Όπως έχει ήδη αναφερθεί παραπάνω από την ανάλυση των κρυσταλλογραφικών δεδομένων έγινε εξ αρχής φανερό ότι αναμέναμε την ύπαρξη 4 τριμερών στην ασύμμετρη μονάδα της CAT_I. Αυτό σήμαινε ότι μέσα στην ασύμμετρη

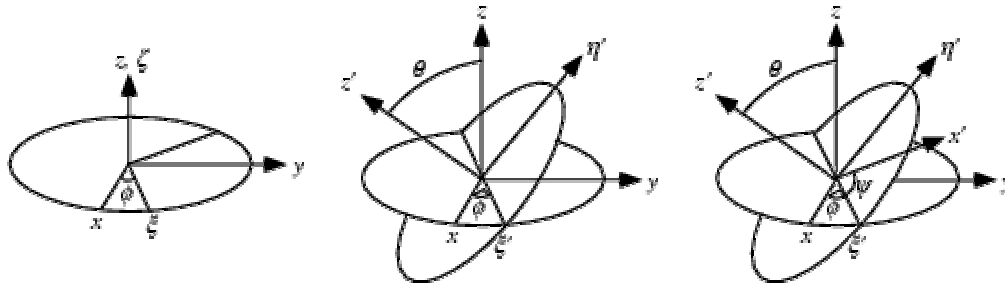
μονάδα υπάρχουν 2628 αμινοξικά κατάλοιπα κατανεμημένα σε 12 αλυσίδες τα οποία έπρεπε να τοποθετηθούν στους χάρτες ηλεκτρονικής πυκνότητας. Ακόμα και αν η μέθοδος της μοριακής αντικατάστασης αποδεικνύονταν επιτυχής ο όγκος της εργασίας που έπρεπε να γίνει ήταν τεράστιος. Το κύριο όμως πρόβλημα δεν ήταν αυτό. Η ύπαρξη τόσων πολλών αντιγράφων στην ασύμμετρη μονάδα ενδεχομένως να δημιουργούσε πρόβλημα στα λογισμικά πακέτα που θα χρησιμοποιούσαμε. Έπρεπε να προχωρήσουμε με σύνεση.

3.4.3 Η συνάρτηση περιστροφής του AMORE (Cross rotation function)

Η εφαρμογή της συνάρτησης περιστροφής έδωσε μία σειρά από λύσεις οι οποίες φαίνονται στο πίνακα που ακολουθεί. Παρατίθενται οι γωνίες του Euler (α, β, γ) και ο συντελεστής συσχέτισης (cc_f)

Πίνακας 3-12 Οι λύσεις της συνάρτησης περιστροφής

$\alpha(^{\circ})$	$\beta(^{\circ})$	$\gamma(^{\circ})$	CC_F
353.60	82.81	320.32	25.1
353.52	82.78	200.33	24.9
353.57	82.85	80.30	24.9
41.56	63.79	4.87	14.4
41.41	63.71	244.78	14.1
41.36	63.62	124.89	14.0
183.50	90.00	138.50	11.7
183.50	90.00	258.50	11.6
183.50	90.00	18.50	11.4
53.50	67.86	121.06	8.5
34.72	57.98	306.01	8.2
34.63	57.93	66.05	8.1
125.16	72.47	208.35	8.1
34.70	58.09	186.09	8.0



Εικόνα 3- 15 Η σύμβαση που ακολουθείται για τις γωνίες του Euler. Στο σχήμα οι γωνίες συμβολίζονται με ϕ, θ και ψ . Η γωνία ϕ περιστρέφει γύρω από τον άξονα Z, η θ γύρω από τον νέο Y και η ψ γύρω από τον νέο Z.

Πρέπει εδώ να τονιστεί ότι οποιαδήποτε από αυτές τις λύσεις μπορεί να οδηγήσει σε σωστή τοποθέτηση του μοντέλου, όπως επίσης και ότι μερικές από αυτές τις λύσεις να είναι ισοδύναμες μεταξύ του όσον αφορά τις τρεις γωνίες περιστροφής. Το σύνολο αυτών των λύσεων τροφοδοτήθηκε στην συνάρτηση μετάθεσης.

3.4.4 Η συνάρτηση μετάθεσης (Cross translation function)

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω ήταν αναμενόμενα 4 τριμερή στην ασύμμετρη μονάδα. Άρα έπρεπε να βρεθούν 4 συνδυασμοί των παραπάνω λύσεων μαζί με 4 διανύσματα $T(x,y,z)$ που οι οποίοι θα αντιστοιχούσαν ουσιαστικά στο πόσο πρέπει να στραφεί το αρχικό μοντέλο και μετά πόσο πρέπει να μετακινηθεί μέσα στην κυψελίδα για να πάρει την πραγματική θέση που υπαγορεύεται από τα πειραματικά δεδομένο. Αυτό έπρεπε να επαναληφθεί 4 φορές και με τέτοιο τρόπο ώστε θέσεις (δηλαδή συνδυασμοί γωνιών και ανυσμάτων μετάθεσης) οι οποίες έχουν ήδη οδηγήσει σε μία σωστή λύση να μην επανεξετάζονται. Αυτό τουλάχιστον στο παρόν επίπεδο κατασκευής του λογισμικού δεν είναι εφικτό σε αυτόματη βάση. Έτσι αναγκαστικά η διαδικασία χωρίστηκε σε βήματα εύρεσης κάθε μιας λύσης ξεχωριστά. Η επιλογή των σωστών λύσεων βασίζεται σε δύο κριτήρια:

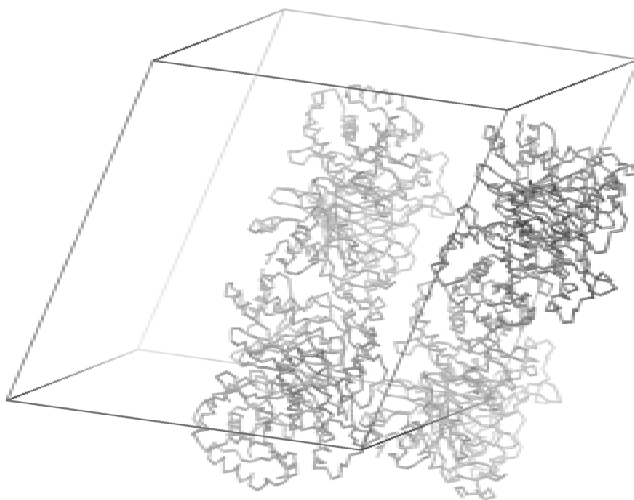
- Η αξιοπιστία της δεύτερης λύσης που υπολογίζεται πρέπει να αυξάνεται
- ο συντελεστής συσχέτισης των λύσεων πρέπει να αυξάνεται.

Αυτό εξηγείται από το ότι όταν δύο λύσεις είναι σωστές πρέπει να είναι σε θέση να εξηγήσουν καλύτερα την ηλεκτρονική πυκνότητα μέσα στην στοιχειώδη κυψελίδα από ότι η κάθε μία χωριστά. Ο πίνακας που ακολουθεί περιέχει τις τελικές λύσεις μετά από βελτιστοποίηση.

Πίνακας 3-13 Οι τελικές λύσεις της μοριακής αντικατάστασης

	$\alpha(^{\circ})$	$\beta(^{\circ})$	$\gamma(^{\circ})$	Tx	Ty	Tz	CC_F	R
1	354.88	83.25	319.30	0.0792	-0.0003	0.0095	46.1	46.4
2	351.75	83.91	321.64	0.5753	0.0349	0.5041	46.1	46.4
3	41.85	63.68	4.16	0.0082	0.2166	0.5414	46.1	46.4
4	55.59	70.14	120.17	0.4789	0.2514	0.0237	46.1	46.4

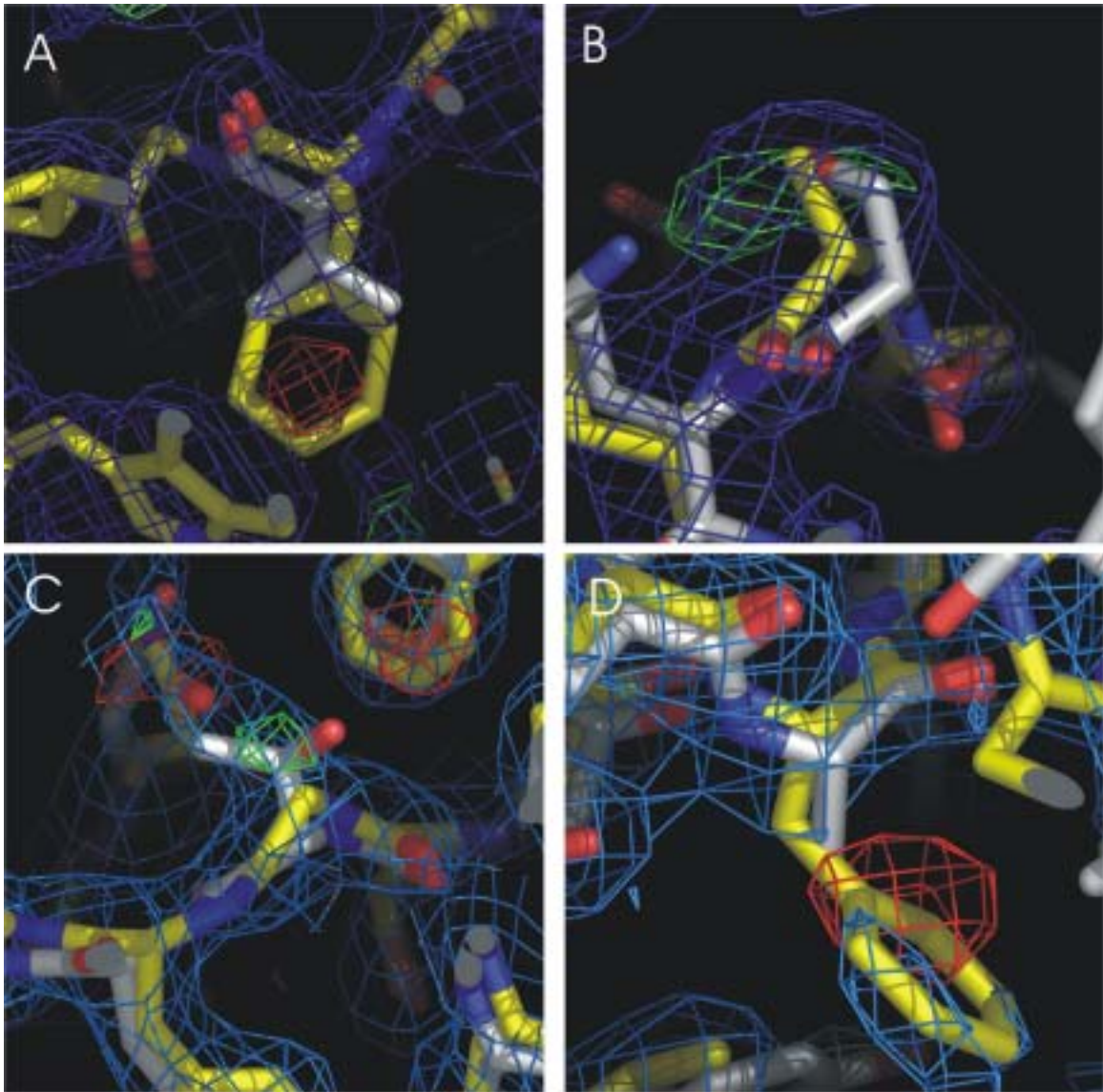
Στον πίνακα 3-13 τα διανύσματα Tx Ty Tz αντιπροσωπεύουν κλασματικές μεταθέσεις . Το επόμενο βήμα είναι να στρέψουμε το αρχικό μοντέλο 4 φορές και να το μεταθέσουμε σύμφωνα με το πίνακα και να συνδυάσουμε τα 4 μοντέλα σε ένα αρχείο συντεταγμένων για να συνεχίσουμε στο επόμενο στάδιο. Στο επόμενο σχήμα φαίνονται όλα τα μόρια μέσα στην στοιχειώδη κυψελίδα όπως προκύπτουν από την εφαρμογή των λύσεων της μοριακής αντικατάστασης.



Εικόνα 3- 16 Το μοντέλο που προκύπτει από την εφαρμογή των λύσεων και η τοποθέτηση του μέσα στην μονοκλινή κυψελίδα

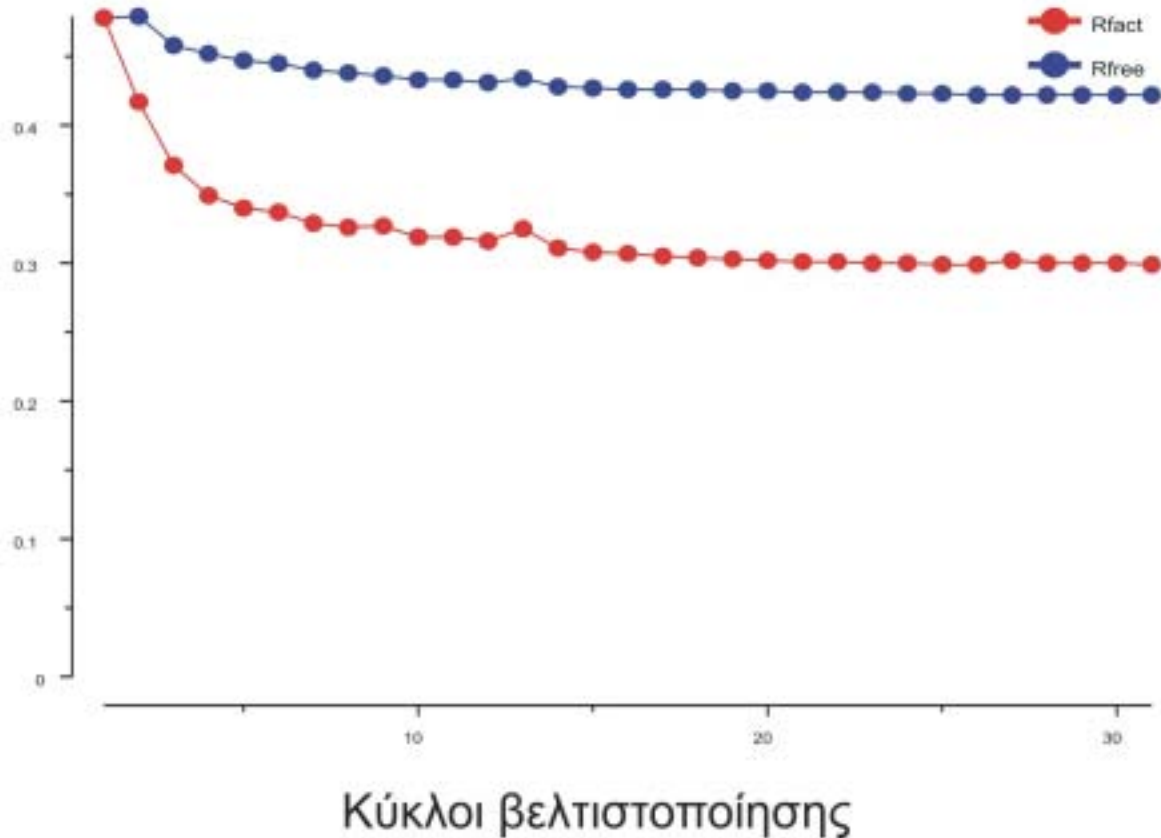
3.4.5 Πρώτοι χάρτες ηλεκτρονικής πυκνότητας

Επειδή οι τελικές λύσεις της μοριακής αντικατάστασης υφίστανται βελτιστοποίηση από το AMORE με την μέθοδο rigid body, το αρχικό μοντέλο χρησιμοποιήθηκε κατευθείαν για βελτιστοποίηση με το πρόγραμμα REFMAC5 αφού δόθηκε μια αρχική τιμή στους παράγοντες θερμοκρασίας ($B=20 \text{ \AA}^2$). Μετά από 30 κύκλους βελτιστοποίησης προέκυψαν χάρτες ηλεκτρονικής πυκνότητας $2m|F_0|-D|Fc|$ και $|F_0|-|Fc|$, από τους οποίους έγινε αμέσως φανερό ότι οι λύσεις που είχαν βρεθεί ήταν σωστές και οι χάρτες μπορούσαν να υποδείξουν τις λανθασμένες περιοχές του μοντέλου και να βοηθήσουν στην αλλαγή των αμινοξέων για την κατασκευή του μοριακού μοντέλου της CAT₁. Μετά από τους πρώτους κύκλους βελτιστοποίησης ο συντελεστής αξιοπιστίας του μοντέλου είχε την τιμή 30.8% ενώ ο ελεύθερος συντελεστής αξιοπιστίας είχε την τιμή 40.1%. Στην εικόνα 3-17 φαίνονται τέσσερα παραδείγματα περιοχών οι οποίες είναι άμεσα ερμηνεύσιμες βάση του χάρτη.



Εικόνα 3- 17 Υπέρθωση του αρχικού (κίτρινο χρώμα) και του τελικού μοντέλου (λευκό χρώμα) της CAT₁. Ο χάρτης $2m|F_o|-D|F_c| \sigma(a)$ φαίνεται μπλέ σε ισουψείς των 1.0σ πάνω από τον μέσο όρο. Ο χάρτης $|F_o|-|F_c|$ είναι σε ισουψείς των +3.0σ (πράσινο) και των -3.0σ (κόκκινο). **A)** Η πλευρική ομάδα της φαινυλαλανίνης στο αρχικό μοντέλο καλύπτεται από αρνητική πυκνότητα. Η βαλίνη στο τελικό μοντέλο ταιριάζει απόλυτα στο χάρτη. **B)** Η αλανίνη στο αρχικό μοντέλο δεν μπορεί να εξηγήσει τη θετική πυκνότητα στο χάρτη. **Γ)** Η θρεονίνη στο τελικό μοντέλο ταιριάζει καλύτερα στο χάρτη από ότι η γλυκίνη. **Δ)** Η πλευρική ομάδα της φαινυλαλανίνης είναι έξω από την πυκνότητα την οποία ερμηνεύει καλύτερα η αλανίνη

Το πρώτο αυτό στάδιο βελτιστοποίησης είναι πολύ σημαντικό αφού σε αυτό έχουμε δραματική πτώση του συντελεστή αξιοπιστίας πράγμα που επιβεβαιώνει την ορθότητα των λύσεων. Στο ακόλουθο διάγραμμα φαίνεται η μεταβολή του R και του R_{free} σαν συνάρτηση του κύκλου βελτιστοποίησης.



Εικόνα 3- 18 Οι πρώτοι 30 κύκλοι βελτιστοποίησης του μοντέλου

3.4.6 Πορεία της διαδικασίας βελτιστοποίησης.

Κατά την διαδικασία βελτιστοποιήσεως ακολουθήθηκαν συγκεκριμένα βήματα:

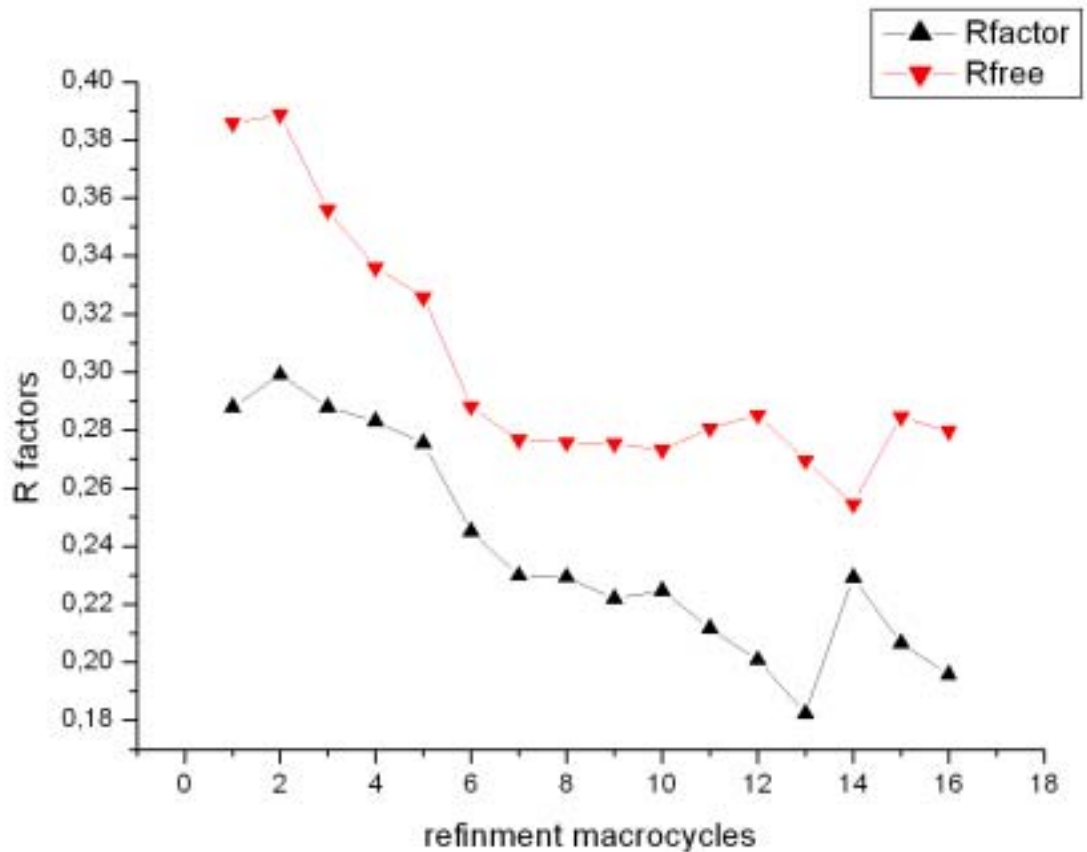
Αρχικά όλες οι υπομονάδες όλων των τριμερών θεωρούνται περιορισμένες και όποιες αλλαγές εφαρμόζονται σε μία αλυσίδα εφαρμόζονται σε όλες. Για να γίνει αυτό μία αλυσίδα φορτώνεται στο πρόγραμμα γραφικών μαζί με το χάρτη ηλεκτρονικής πυκνότητας και όπου απαιτείται γίνονται αλλαγές. Στην συνέχεια με βάση τους πίνακες περιστροφής οι οποίοι κωδικοποιούν τις στροφικές και μεταθετικές σχέσεις των αλυσίδων στην ασύμμετρη μονάδα, παράγονται και οι υπόλοιπες αλυσίδες. Οι συντεταγμένες τοποθετούνται σε αρχείο και ακολουθούν κύκλοι βελτιστοποίησης και η διαδικασία επαναλαμβάνεται. Σε δεύτερο στάδιο και εφόσον η παραπάνω διαδικασία έχει οδηγήσει σε μοντέλο με ικανοποιητική γεωμετρία και με συντελεστή αξιοπιστίας ο οποίος δεν μεταβάλλεται παραπέρα, τα κριτήρια περιορισμού των αλυσίδων χαλαρώνονται σε επίπεδο τριμερούς, έτσι ώστε κάθε τριμερές να θεωρείται ανεξάρτητα μεταβαλλόμενο σε

σχέση με τα υπόλοιπα τριμερή. Οι συντεταγμένες τοποθετούνται σε αρχείο και ακολουθούν κύκλοι βελτιστοποίησης και η διαδικασία επαναλαμβάνεται.

Όταν και το προηγούμενο στάδιο έχει οδηγήσει σε σταθερό μοντέλο όλες οι αλυσίδες θεωρούνται ανεξάρτητες και βελτιστοποιούνται ανάλογα.

Σε ένα επόμενο στάδιο ακολουθεί ιστροπική βελτιστοποίηση των παραγόντων θερμοκρασίας των ατόμων του μοντέλου (B factor), πράγμα το οποίο σημαίνει ότι τα άτομα του μοντέλου θεωρούνται ότι εκτελούν ισοπίθανη ταλάντωση σε όλες τις διαστάσεις (x,y,z) η οποία και τελικά εκφράζεται σαν ιστροπικός παράγων θερμοκρασία. Αφού και η παραπάνω διαδικασία έχει ολοκληρωθεί άτομα νερού προστίθενται για να εξηγήσουν ηλεκτρονική πυκνότητα με βάση γεωμετρικά κριτήρια (απόσταση από άτομα της πρωτεΐνης και ικανότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου με αποδεκτή γεωμετρία).

Επιπλέον στην περίπτωση της δομής του συμπλόκου της CAT_I με το φουσιδικό οξύ το μοντέλο του αναστολέα τοποθετήθηκε στο ενεργό κέντρο του μορίου.



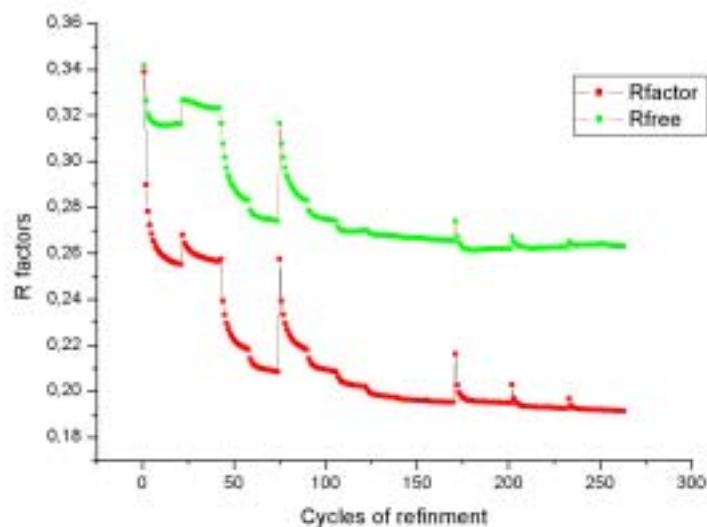
Εικόνα 3- 19 Συνολική πορεία των συντελεστών αξιοπιστίας R και R_{free} σε μακρόκυκλους βελτιστοποίησης. Κάθε μακρόκυκλος περιέχει 30 κύκλους βελτιστοποίησης και επιθεώρηση του μοντέλου

Στην εικόνα 3-19 απεικονίζεται η μεταβολή του συντελεστής αξιοπιστίας ως συνάρτηση των μακρόκυκλων βελτιστοποίησης. Κάθε μακρόκυκλος περιλαμβάνει χειροποίητη μεταβολή του μοντέλου με βάση τους χάρτες ηλεκτρονικής πυκνότητας και ακολουθεί βελτιστοποίηση μέσω του Refmac5. Το αποτέλεσμα αυτού του σταδίου χρησιμεύει σαν είσοδος στο επόμενο στάδιο.

3.4.7 Προσδιορισμός της δομής του συμπλόκου της CAT_I με το φουσιδικό οξύ

Για την εύρεση των φάσεων του συμπλόκου της CAT_I με το αναστολέα φουσιδικό οξύ χρησιμοποιήθηκε ως αρχικό μοντέλο η ήδη γνωστή δομή της CAT_I στην αποενζυμική μορφή της αφού πρώτα αφαιρέθηκαν από το μοντέλο τα μόρια νερού. Το μοντέλο αυτό χρησιμοποιήθηκε για να κατασκευαστούν συνθέσεις διαφορών $2m|F_o|-d|F_c|$ και $m|F_o|-$

$d|F_c|$ οι οποίες έδειξαν ηλεκτρονική πυκνότητα στο ενεργό κέντρο του μορίου και μας οδήγησαν στην τοποθέτηση του μοντέλου του αναστολέα. Στην συνέχεια η πορεία που ακολουθήθηκε ήταν ίδια με παραπάνω. Στο τελευταίο στάδιο και λόγω του υψηλότερου διακριτικού ορίου των δεδομένων του σύμπλοκου έγινε προσθήκη μορίων νερού με το λογισμικό ARP. Στο διάγραμμα 3-20 απεικονίζεται η μεταβολή των συντελεστών αξιοπιστίας στην πορεία της βελτιστοποίησης.



Εικόνα 3- 20. Πορεία των δεικτών αξιοπιστίας του μοντέλου του συμπλόκου με το φυσικό οξύ

Ο πίνακας 3-14 συνοψίζει τα στατιστικά στοιχεία για το μοντέλο του συμπλόκου.

Πίνακας 3-14 Συνοπτικός πίνακας των στοιχείων βελτιστοποίησης του μοντέλου

Περιορισμός	Παράμετροι	Απόκλιση σε τιμές (σ)	Μέσο (σ)
Μήκη δεσμών	22441	0.036	0.021
Γωνίες δεσμών	30570	2.964	1.920
Διέδρες γωνίες	2551	8.016	5.000
Ασύμμετρα κέντρα	3179	0.364	0.200
Επίπεδες ομάδες	17664	0.010	0.020
Απωστικές δυνάμεις Van der Walls	10513	0.254	0.200
Γωνίες Van der Walls	15040	0.334	0.200
Υδρογονοδεσμοί	1107	0.185	0.200
Μεταλλικά ιόντα	2	0.154	0.200
Εύρος διακριτικότητας		8.703-2.180	
Αριθμός ανακλάσεων		161964	

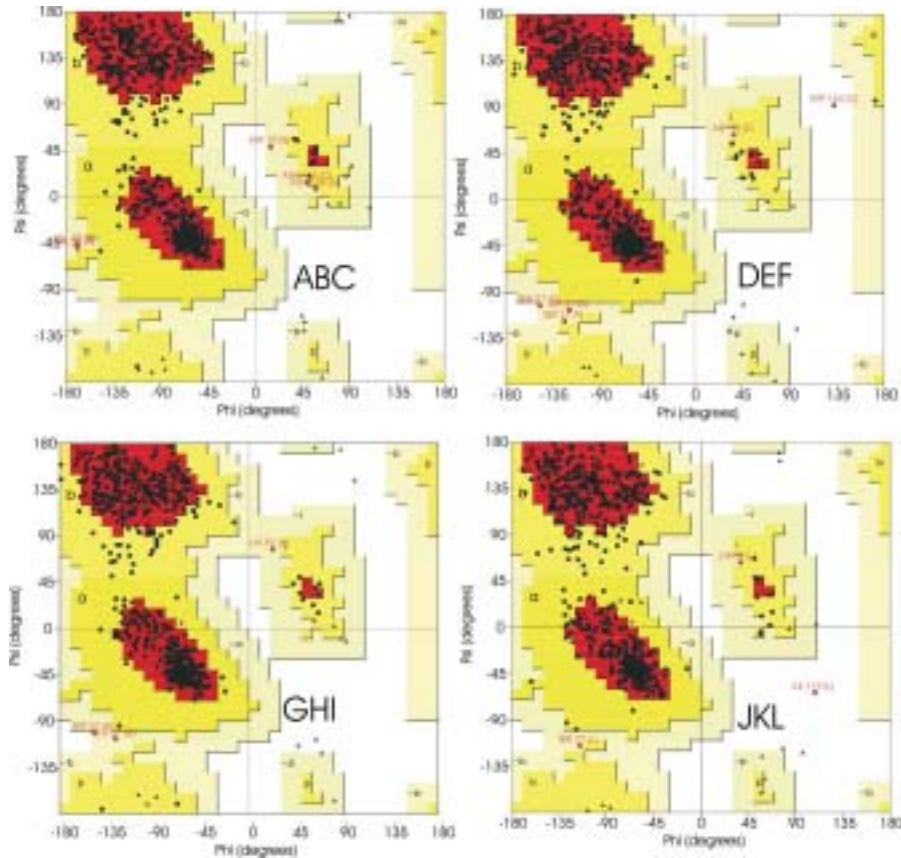
% παρατηρηθείσες ανακλάσεις	99.7363
% ελεύθερων ανακλάσεων	5.0438
Κρυσταλλογραφικός R	0.1915
Ελεύθερος R	0.2633
Συνολικός συντελεστής συσχέτισης	0.9480
Ελεύθερος συντελεστής συσχέτισης	0.9043
Εκτίμηση λάθους συντεταγμένων (κατά Cruickshank)	0.2352
FOM	0.8163

3.5 Ανάλυση της ποιότητας του μοντέλου της CAT_I

Προκειμένου να εκτιμηθεί η ποιότητα και η ορθότητα της δομής ενός πρωτεϊνικού μοντέλου το οποίο έχει προσδιορισθεί μέσω κρυσταλλογραφικής ανάλυσης είναι απαραίτητη η παρακολούθηση κάποιων παραμέτρων οι οποίες εκφράζουν την πιστότητα της δομής και την διαδικασία προς την σωστή κατεύθυνση. Εκτός από την χρήση των συντελεστών αξιοπιστίας δηλαδή του κρυσταλλογραφικού R και του ελεύθερου R_{free} (Brunger 1992), μερικοί ακόμα παράγοντες οι οποίοι δίδουν λεπτομέρειες για την ποιότητα της δομής είναι οι διεδρες γωνίες στροφής (ϕ, ψ) της κύριας αλυσίδας, οι αποστάσεις των ατόμων που συμμετέχουν στο σχηματισμό ομοιοπολικών και μη ομοιοπολικών δεσμών καθώς και οι θερμοκρασιακοί παράγοντες οι οποίοι δίδουν την πληροφορία για την κινητικότητα του μορίου γενικά αλλά και για την κινητικότητα συγκεκριμένων περιοχών. Οι παράγοντες θερμοκρασίας πέρα από την ποιότητα του μοντέλου δίνουν πληροφορίες και για εγγενείς ιδιότητες του μορίου οι οποίες και σχετίζονται με την λειτουργία του. Παρακάτω παρατίθενται στοιχεία που αφορούν την ποιότητα του μοντέλου της CAT_I τόσο στην αποενζυμική μορφή της όσο και σε σύμπλοκο με τον αναστολέα φουσιδικό οξύ.

3.5.1 Αποένζυμο της CAT_I

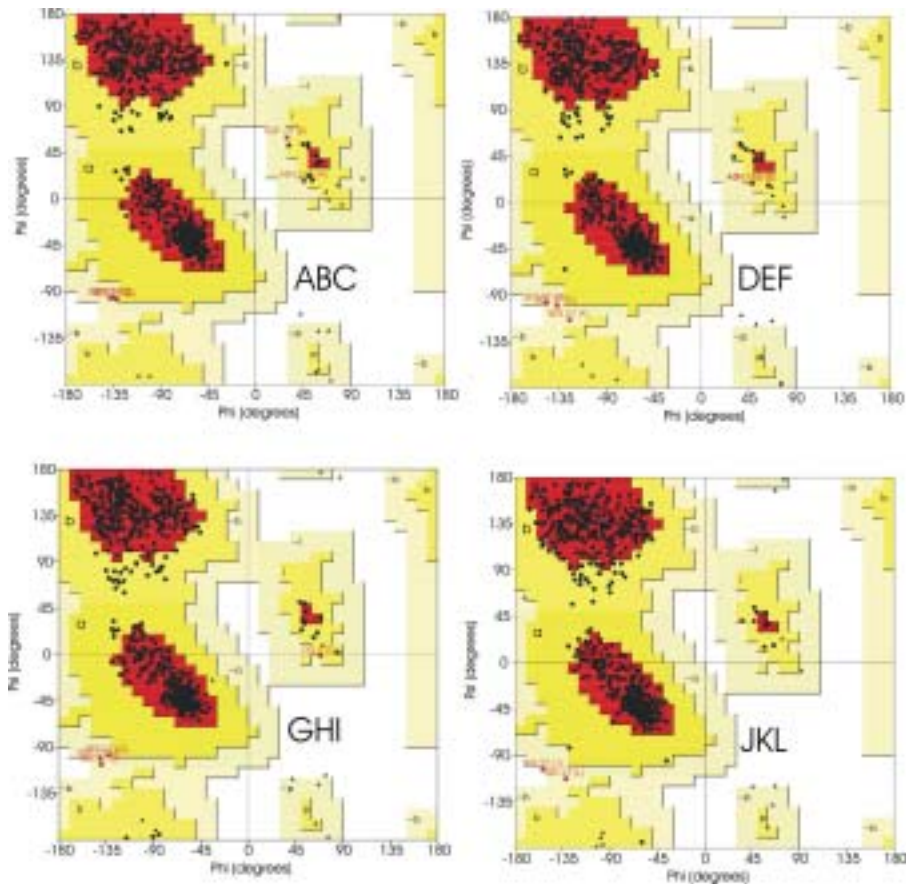
Στο σχήμα 3-21 παρουσιάζονται τα διαγράμματα ϕ - ψ γωνιών (Ramachadran plots) για τα τέσσερα τριμερή που υπάρχουν στην ασύμμετρη μονάδα, του τελικού μοντέλου της CAT_I.



Εικόνα 3- 21 Διαγράμματα Ramachadran για τα τέσσερα τριμερή μέσα στην ασύμμετρη μονάδα
 Από τα παραπάνω διαγράμματα είναι εμφανές ότι παρόλο τον μεγάλο αριθμό ατόμων που υπάρχουν στο μοντέλο κανένα κατάλοιπο δεν εμφανίζεται σε μη επιτρεπτές περιοχές του διαγράμματος Ramachadran. Τα κατάλοιπα που συμβολίζονται με κόκκινο στα παραπάνω διαγράμματα βρίσκονται σε τιμές φ-ψ γωνιών οι οποίες θεωρούνται αποδεκτές αν και έξω από τις προβλεπόμενες (γενναιόδωρη περιοχή του διαγράμματος).

3.5.2 Σύμπλοκο της CAT_I με τον αναστολέα

Το μοντέλο της CAT_I με το φουσιδικό οξύ είναι υπολογισμένο σε υψηλότερη διακριτικότητα με αποτέλεσμα όλα τα στατιστικά να έχουν ελαφρώς καλύτερες τιμές. Στο σχήμα 3-22 παρατίθενται τα διαγράμματα φ-ψ για τα τριμερή



Εικόνα 3- 22 Διάγραμμα Ramachandran για τα τέσσερα τριμερή της συμπλόκου δομής

3.5.3 Ανάλυση των παραγόντων θερμοκρασίας B

Μια πρώτη ματιά στην κατανομή των παραγόντων θερμοκρασίας φανερώνει ότι η CAT_I είναι ένα σχετικά σταθερό μόριο χωρίς ακραίες τιμές στους παράγοντες θερμοκρασίας εκτός από ελάχιστες εξαιρέσεις. Από την μελέτη της κατανομής των θερμοκρασιακών παραγόντων συμπεραίνονται τα ακόλουθα:

- Τα τέσσερα τριμερή μέσα στην ασύμμετρη μονάδα δεν παρουσιάζουν τον ίδιο βαθμό θερμοκρασιακής σταθερότητας, γεγονός το οποίο προκαλείται από το κρυσταλλικό περιβάλλον του κάθε τριμερούς.
- Τα τριμερή εμφανίζουν μια αυστηρή κατανομή των θερμοκρασιακών παραγόντων έτσι ώστε ο εσωτερικός πυρήνας κάθε μορίου να είναι «ψυχρός» δηλαδή σταθερός με περιορισμένη κινητικότητα των ατόμων ενώ μεγαλύτερη ευκαμψία παρατηρείται στην επιφάνεια των τριμερών.

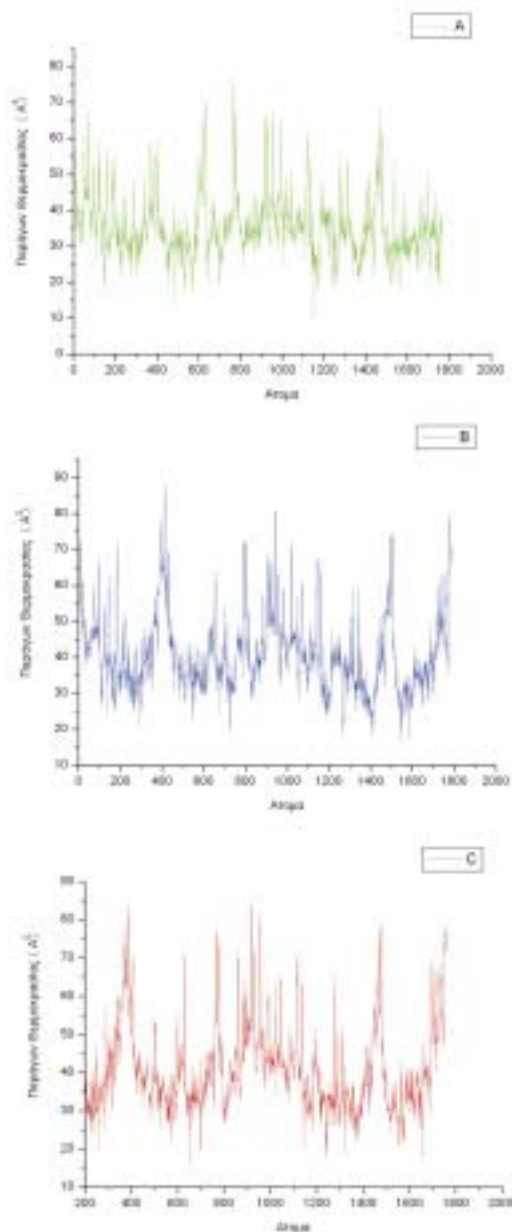
Ο πίνακας 3-15 συνοψίζει στατιστικά δεδομένα για τα τριμερή αλλά και για τα μη πρωτεϊνικά άτομα, τόσο της δομής του αποενζύμου όσο και του συμπλόκου.

Πίνακας 3-15 Ανάλυση των θερμοκρασιακών παραγόντων ανά τριμερές για το αποένζυμο και για το σύμπλοκο με τον αναστολέα

Τριμερές		Μέσος Β (\AA^2)	σ (B) (\AA^2)	Μέσος Β κύρια αλυσίδα (\AA^2)	Μέσος Β πλευρικές αλυσίδες (\AA^2)
ABC	ΑΠΟΕΝΖΥΜΟ	38,8	0,5	38,0	39,6
DEF		45,7	0,6	44,8	46,5
GHI		42,7	0,5	41,8	43,5
JKL		58,4	0,8	57,7	59,0
ABC	ΣΥΜΠΛΟΚΟ	28,7	0,3	27,4	29,9
DEF		30,9	0,4	29,6	32,0
GHI		31,6	0,4	30,4	32,7
JKL		41,4	0,5	40,3	42,3

Όπως φαίνεται και στον παραπάνω πίνακα καταρχήν η δομή του συμπλόκου εμφανίζει συνολικά χαμηλότερους θερμοκρασιακούς παράγοντες. Αυτό οφείλεται στην υψηλότερη διακριτικότητα στην οποία έχει προσδιοριστεί η δομή και πιθανά στην πρόσδεση του αναστολέα αν και δεν έχει παρατηρηθεί καμία μεταβολή στην συνολική δομή σε σχέση με το αποένζυμο. Ωστόσο και στις δύο δομές το τριμερές JKL παρουσιάζει σταθερά ψηλότερους Β σε σχέση με τα υπόλοιπα τριμερή πράγμα το οποίο ενδεχομένως οφείλεται στην θέση του μέσα στην ασύμμετρη μονάδα.

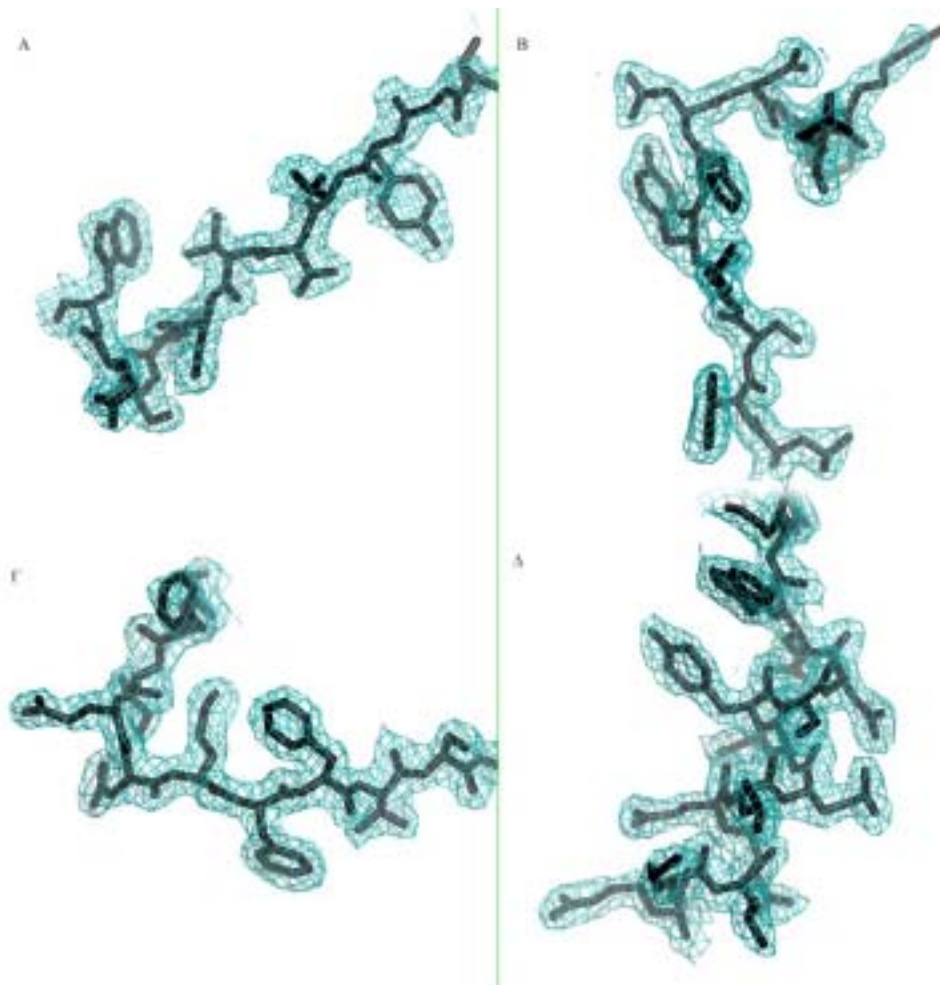
Στο σχήμα 3-23 φαίνεται η κατανομή των παραγόντων θερμοκρασίας για το τριμερές ABC



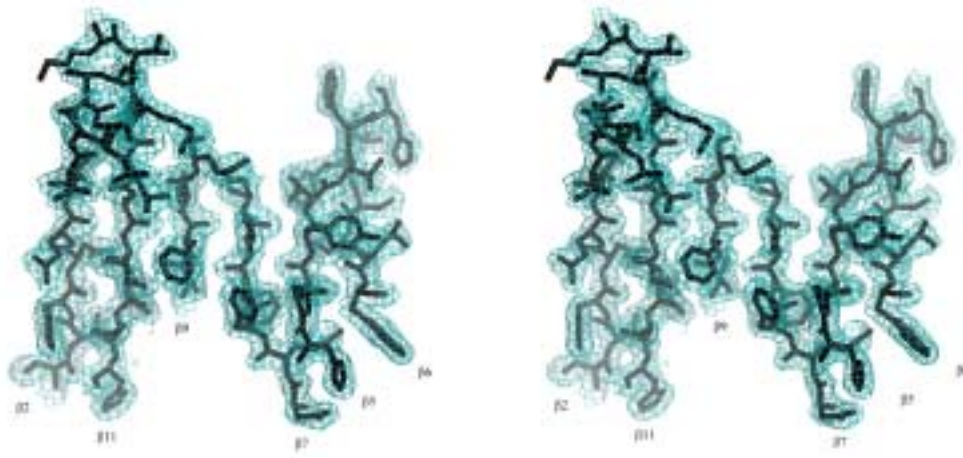
Εικόνα 3- 23 Η κατανομή των θερμοκρασιακών παραγόντων σαν συνάρτηση του αριθμού των ατόμων

Από τα παραπάνω γίνεται φανερό άμεσα ότι οι αμινοτελικές και καρβοξυτελικές περιοχές του μορίου συγκεντρώνουν τις υψηλότερες τιμές του B αφού στις περισσότερες δομές είναι εύκαμπτες και δεν μπορούν να τοποθετηθούν σωστά στους χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Ωστόσο στην συγκεκριμένη δομή εμφανείς εξαιρέσεις αποτελούν οι

αλυσίδες Β και Ι (δεδομένα δεν παρατίθενται) στις οποίες λόγω της μη κρυσταλλογραφικής συμμετρίας η οποία θα συζητηθεί σε επόμενο κεφάλαιο, είναι σταθεροποιημένες και ορατές στους χάρτες ηλεκτρονικής πυκνότητας. Ωστόσο τα υπόλοιπα τμήματα της δομής εμφανίζονται με εξαιρετική ευκρίνεια στους χάρτες ηλεκτρονικής πυκνότητας. Ακόμα και σε επίπεδο σημαντικότητας 1.2σ οι χάρτες καλύπτουν όλο το μόριο και οι πλευρικές ομάδες βρίσκονται μέσα στην ηλεκτρονική πυκνότητα. Αυτό οφείλεται ποιότητα του αρχικού μοντέλου που χρησιμοποιήθηκε αλλά κυρίως στην ενίσχυση του σήματος της περίθλασης από τα πολλά αντίγραφα που υπάρχουν μέσα στην ασύμμετρη μονάδα. Τυπική εικόνα των χαρτών ηλεκτρονικής πυκνότητας φαίνεται στο σχήμα 3-24.



Εικ 3-24 Τυπική εικόνα ηλεκτρονικής πυκνότητας. Με κυανό χρώμα συμβολίζεται ο χάρτης ηλεκτρονικής πυκνότητας $2m|Fo|-D|Fc|$ που παρουσιάζεται σε ισουψείς των 1.2σ πάνω από τον μέσο όρο. Α) τα κατάλοιπα 6-16 του μονομερούς β) μια μικρή στροφή που περιλαμβάνει τα κατάλοιπα 105-115 Γ) η επιφανειακή στροφή 137-147 η οποία χρειάστηκε ολοκληρωτική ανακατασκευή Δ) τμήμα της τελευταίας α -ελίκας $\alpha 7$

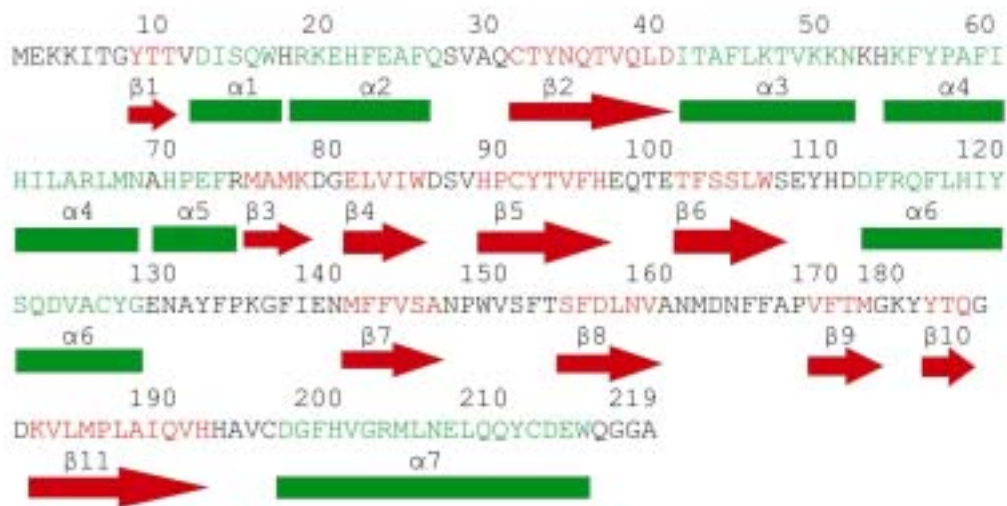
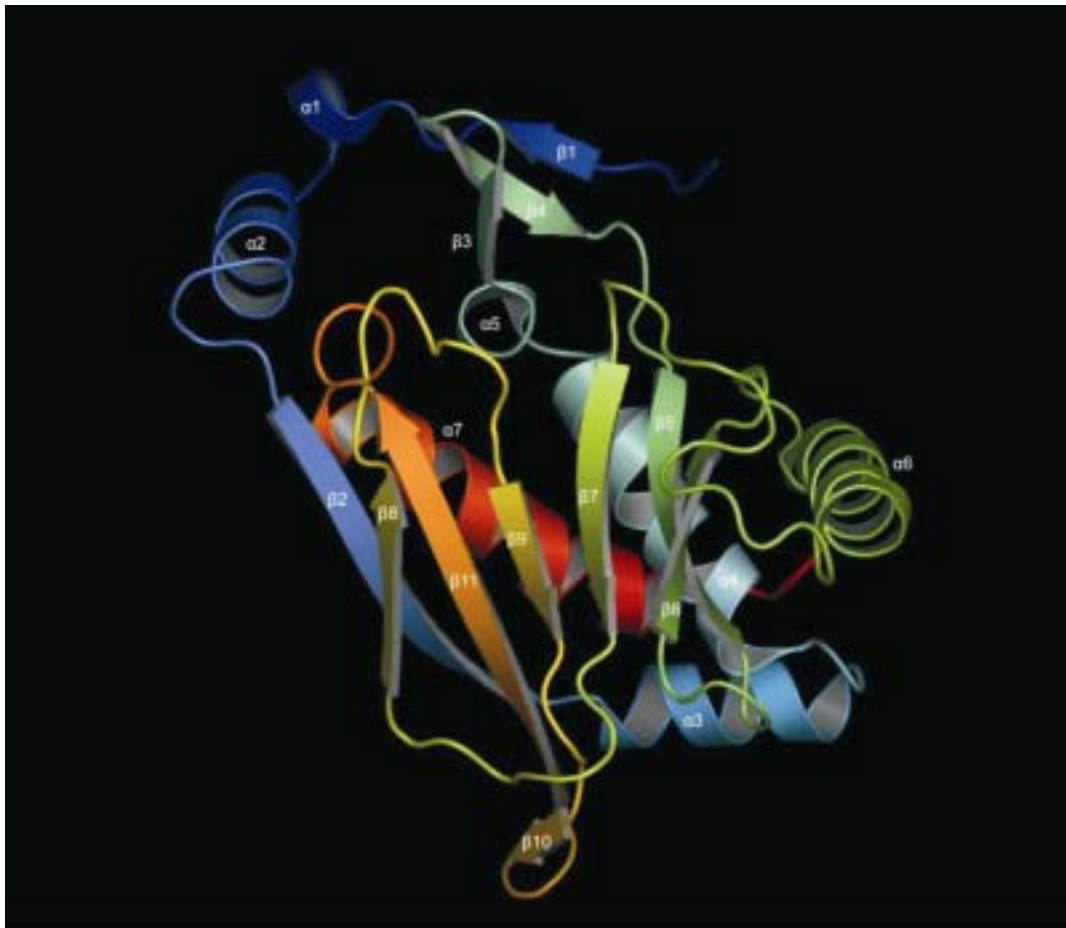


Εικ 3-25 Στερεοδιάγραμμα της κεντρική β-πτυχωτής επιφάνειας. Σημειώνονται οι συμμετέχοντες β-κλώνοι.

3.6 Ανάλυση της δομής της CATI

3.6.1 Πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής της CAT₁ από την πρωτοταγή αλληλουχία της

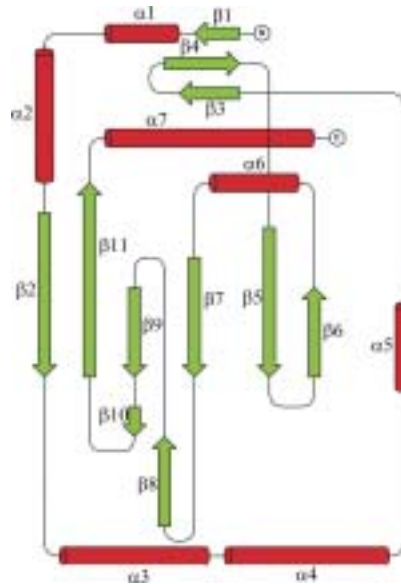
Η πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής έγινε με την βοήθεια του αλγορίθμου SOPM (www.expasy.org). Η πρόβλεψη δίδει μια αναμενόμενη α/β δομή η οποία φαίνεται στο σχήμα 3-24.



Εικόνα 3- 25 Διάγραμμα κορδέλλας του μονομερούς της CAT₁. Τα στοιχεία της δευτεροταγούς είναι εντοπισμένα με ελληνικούς χαρακτήρες. (β) για β-κλώνους και (α) για άλφα έλικες. Ο αριθμός υποδηλώνει την θέση στην αλληλουχία και την σειρά εμφάνιση στην δομή

Όπως γίνεται αντιληπτό από την εικόνα 3-25 η διεύθετηση στο χώρο των β-κλώνων και

των α-ελίκων είναι διαφοροποιημένη έτσι ώστε οι β-κλώνοι β5, β6, β7, β9, β11 και β2 να δημιουργούν μια εκτεταμένη β-πτυχωτή επιφάνεια η οποία αποτελείται από παράλληλους και αντιπαράλληλους β-κλώνους. Πιο συγκεκριμένα οι κλώνοι β5, β7 και β9 είναι παράλληλοι. Ολόκληρη η β-πτυχωτή επιφάνεια που σχηματίζεται από τους παραπάνω κλώνους υποστηρίζεται από τις α-έλικες α3, α4, και α7. Ενώ οι υπόλοιπες ελικοειδείς δομές παίρνουν θέση γύρω από την κεντρική κατασκευή μαζί με του β-κλώνους β1, β3 και β4 ερχόμενες σε επαφή με τον διαλύτη. Μείζονα σημασία, όσον αφορά την διασύνδεση των μονομερών για τον σχηματισμό των βιολογικά ενεργών μονάδων του ενζύμου που είναι τα τριμερή, κατέχει ο κλώνος β8 ο οποίος εκτείνεται από τα κατάλοιπα 155-160 και συμπεριλαμβάνει τρία κατάλοιπα Ser155, Asp157 και Asn159, τα οποία συμμετέχουν μέσω μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων στον τριμερισμό των μονομερών της CAT_I. Σύμφωνα με τα παραπάνω το μονομερές της CAT_I υιοθετεί μια δομή στην οποία από την μια πλευρά υπάρχει μια εκτεθειμένη β-πτυχωτή επιφάνεια ενώ από την άλλη υπάρχει μια συσώρευση ελίκων. Η εκτεταμένη β-πτυχωτή επιφάνεια του μονομερούς συμμετέχει στην ανάπτυξη του υδρόφοβου πυρήνα του τριμερούς όπως θα αναπτυχθεί παρακάτω. Η σχέση των στοιχείων δευτεροταγούς δομής φαίνεται και στο τοπολογικό διάγραμμα 3-26.



Εικόνα 3- 26 Τοπολογικό διάγραμμα του μονομερούς της CAT₁. Τα πράσινα βέλη συμβολίζουν τους β-κλώνους και οι κόκκινοι κύλινδροι τις α-έλικες

3.6.3 Οι έλικες

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω το μονομερές της CAT₁ διαθέτει επτά α-έλικες. Ανάλογα με την θέση που καταλαμβάνουν στην τρισδιάστατη δομή αυτές οι έλικες εμφανίζουν διαφορετικές ιδιότητες ως προς την κατανομή και τον τύπο των αμινοξικών καταλοίπων τα οποία τις απαρτίζουν. Στον πίνακα 3-17 παρουσιάζονται τα τμήματα της αλληλουχίας των ελίκων και ο αριθμός των υδρόφοβων καταλοίπων τους.

Πίνακας 3-17 Ο πίνακας παρουσιάζει την αλληλουχία ,το μήκος και την περιεκτικότητα σε υδρόφοβα κατάλοιπα των α-ελίκων

	Αλληλουχία	Μήκος	Υδρόφοβα κατάλοιπα
α-1	12-16 DISQW	5	2
α-2	18-26 RKEHFEAFQ	9	3
α-3	41-51 ITAFLKTVKKN	11	5
α-4	54-68 KFYPAFIHILARLMN	15	10
α-5	70-73 HPEF	4	3
α-6	112-128 DFRQFLHIYSQDVACYG	17	8
α-7	197-215 DGFHVGRMLNELQQYCDEW	19	6

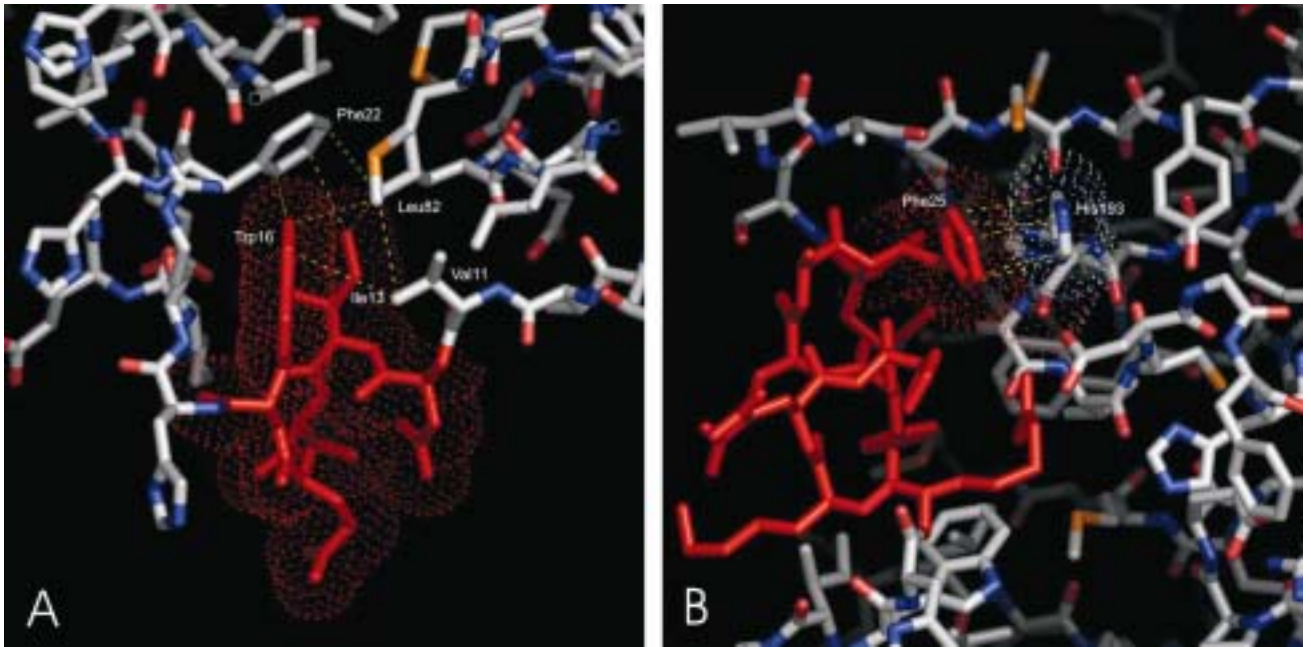
Στην έλικα α1 η τοποθέτηση των καταλοίπων 13 και 16 είναι απαραίτητη για την σταθεροποίηση της έλικας. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της ανάπτυξης υδρόφοβων

αλληλεπιδράσεων των δύο καταλοίπων με τα κατάλοιπα Val11, Leu82 και Phe22 η οποία συμμετέχει στην επόμενη α-έλικα (α_2), τα οποία δημιουργούν μικρή τοπική υδρόφοβη ομάδα.

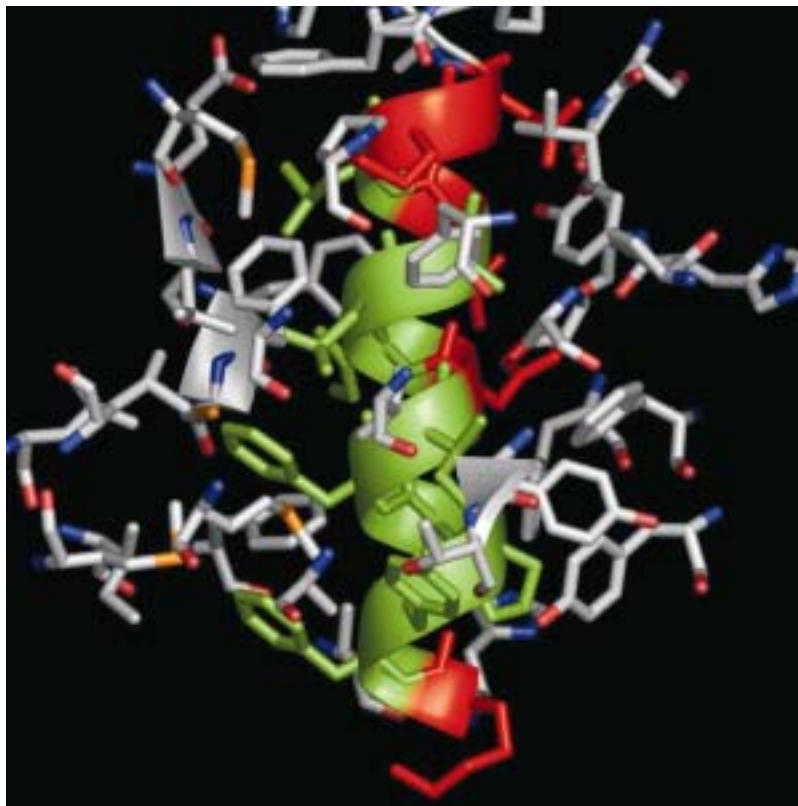
Η έλικα α_2 έχει πολύ σημαντικό ρόλο στην διαμόρφωση της δομής και την καταλυτική ενεργότητα της CAT_I αφού περιέχει ένα μεγάλο αριθμό καταλοίπων τα οποία συμμετέχουν στον σχηματισμό του ενεργού κέντρου του ενζύμου και είτε λειτουργούν αλληλεπιδρώντας με το υπόστρωμα είτε σταθεροποιούν τις πλευρικές ομάδες άλλων καταλοίπων του ενεργού κέντρου όπως στην περίπτωση της Phe25 η οποία έρχεται σε ευνοϊκή διευθέτηση για π-αλληλεπίδραση (π -stacking) με το δακτύλιο της His193 η οποία είναι το καταλυτικά ενεργό κατάλοιπο.

Η έλικα α_4 είναι ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα «θαμμένης» έλικας μια και το μεγαλύτερο τμήμα της αποτελείται από υδρόφοβα κατάλοιπα και βρίσκεται μέσα στον υδρόφοβο πυρήνα του μονομερούς. Για την ακρίβεια η έλικα α_4 είναι η καρδιά του υδρόφοβου πυρήνα του μονομερούς αφού κατά κάποιο τρόπο μπορεί να θεωρηθεί ως η στηρικτική δοκός πάνω στην οποία βασίζονται όλες οι υπόλοιπες α-έλικες και η εκτεταμένη β-πτυχωτή επιφάνεια που συμμετέχει στην διασύνδεση των υπομονάδων. Δύο ομάδες καταλοίπων είναι σημαντικές για την αγκυροβόληση της έλικας αυτής. Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει τα κατάλοιπα Val48, Phe55, Phe59 και Phe44 και η δεύτερη τα κατάλοιπα Pro57, Tyr56, Phe116, Tyr120.

Οι έλικες α_6 και α_7 βρίσκονται σε επαφή με το διαλύτη και η σύστασή τους είναι περισσότερο υδρόφιλη και αν εξαιρεθεί το μεγάλο μήκος τους δεν έχουν κανένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό το οποίο να χρήζει ιδιαίτερης μνείας.



Εικόνα 3- 27 Α .Ελικά 1, Β Ελικά 2



Εικόνα 3- 28 Η έλικα α3. Χρωματικός κώδικας : Πράσινο=υδρόφοβο Κόκκινο=Πολικό . Το μεγαλύτερο τμήμα της έλικας είναι υδρόφοβο και περιβάλεται από υδρόφοβα κατάλοιπα. Αξιοσημείωτη είναι η τοποθέτηση δύο φαινυλαλανινών στην αρχή της έλικας

3.6.4 β-κλώνοι και β-πτυχωτές επιφάνειες

Η σημασία των β-πτυχωτών επιφανειών για την δομή της CAT_I είναι μεγάλη μια και αυτές συμμετέχουν όχι μόνο στην σταθεροποίηση της δομής αλλά και στον τριμερισμό και κατ' επέκταση και στην καταλυτική ενεργότητα.

Πίνακας 3-18 Αλληλουχία και μήκος των β-κλώνων

	Αλληλουχία	Μήκος	Υδροφοβα κατάλοιπα
β1	8-10 YTT	3	1
β2	31-40 CTYNQTVQLD	10	3
β3	74-78 MAMK	4	1
β4	81-85 ELVIW	5	3
β5	89-96 HPCYTVFH	8	3
β6	101-106 TFSSLW	6	3
β7	141-146 MFFVSA	6	4
β8	155-160 SFDLNV	6	4
β9	170-173 VFTM	4	2
β10	177-179 YTQ	3	1
β11	182-192 KVLMPLAIQVH	11	7

Από την αλληλεπίδραση των β-κλώνων β2, β5, β6, β7, β9, β11 σχηματίζεται μια β-πτυχωτή επιφάνεια η οποία είναι εκτεθειμένη κατά το ήμισυ και έχει συνολική επιφάνεια 5658 Å² και στηρίζεται δομικά από τις υποκείμενες α-έλικες α7,α3,α4 και α6. Αυτή η β-πτυχωτή επιφάνεια ολοκληρώνει την συνολική δομή του μονομερούς της CAT_I. Αν και φαίνεται ότι η επιφάνεια αυτή βρίσκεται εκτεθειμένη στο διαλύτη εντούτοις καλύπτεται κατά την διάρκεια του τριμερισμού για το σχηματισμό της βιολογικά ενεργής μονάδας με τέτοιο τρόπο ώστε να δημιουργείται μια εκτεταμένη β-πτυχωτή επιφάνεια από την αλληλεπίδραση των αντίστοιχων επιφανειών από τα άλλα μονομερή.

3.6.5 Η τεταρτοταγής δομή ως αποτέλεσμα του σχηματισμού του τριμερούς

Στον σχηματισμό του τριμερούς το οποίο είναι η βιολογικά ενεργή μονάδα συμμετέχει ένας μεγάλος αριθμός μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων που κυριαρχούνται από υδρογονοδεσμούς μεταξύ πολικών καταλοίπων. Η συνεισφορά όμως των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων είναι μεγάλη αφού σε κατάλληλες θέσεις υπάρχουν υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις που σταθεροποιούν την δομή. Εξαιτίας του μεγάλου όγκου πληροφορίας που οφείλεται στην ύπαρξη πολλών υπομονάδων στην ασύμμετρη μονάδα

είναι αδύνατη η περιγραφή όλων των ατομικών αλληλεπιδράσεων σε όλα τα τριμερή. Για το λόγο αυτό η πληροφορία που παρατίθεται αφορά ένα τριμερές αφού κατ' ουσία η διαφορές μεταξύ των διαφόρων τριμερών είναι ελάχιστες. Το σύνολο των πολικών αλληλεπιδράσεων για το τριμερές 1 (δηλαδή για τις αλυσίδες A B C οι οποίες έχουν κατατεθεί στην Protein Data Bank) είναι 87. Στον πίνακα 3-19 παρατίθενται τα συμμετέχοντα άτομα καθώς και οι μεταξύ τους αποστάσεις. Η σειρά των αλληλεπιδράσεων έχει γίνει κατά την πιθανότητα ανάπτυξης υδρογονοδεσμών η οποία συμβολίζεται με τον αστερίσκο.

Πίνακας 3-19 Πολικές διαμοριακές επαφές που συμμετέχουν στον σχηματισμό του τριμερούς της CAT_I

Αμινοξύ 1	Θέση	Άτομο	Αμινοξύ 2	Θέση	Άτομο	Απόσταση	Υδρογονοδεσμός
Thr	36A	O	Ser	155C	N	3.53	*
Ser	155A	OG	Asp	157B	OD2	3.47	*
Asn	159A	OD1	Val	160B	O	3.51	*
Ser	155B	N	Thr	36C	O	3.49	*
Asp	157B	OD2	Ser	155A	OG	3.47	*
Asp	157B	O	Asn	34C	O	3.5	*
Val	160B	O	Asn	159A	OD1	3.51	*
Asn	162B	OD1	Ser	27C	O	3.43	*
Asn	162B	OD1	Val	28C	O	3.51	*
Ser	27C	O	Asn	162B	OD1	3.43	*
Val	28C	O	Asn	162B	OD1	3.51	*
Thr	36C	O	Ser	155B	N	3.49	*
Thr	36C	O	Thr	154B	OG1	3.55	*
Ser	155C	N	Thr	36A	O	3.53	*
Glu	20A	OE2	Tyr	133C	N	2.67	***
His	21A	NE2	Phe	102C	O	2.68	***
Gln	30A	O	Ala	161C	N	2.85	***
Thr	32A	N	Asn	159C	O	2.72	***
Thr	32A	O	Asn	159C	N	2.98	***
Asn	34A	N	Asp	157C	O	2.79	***
Asn	34A	O	Asp	157C	N	2.83	***
Gln	35A	OE1	Asn	148C	ND2	3.2	***
Thr	36A	N	Ser	155C	O	2.95	***
Thr	36A	O	Thr	154C	N	2.79	***
Gln	38A	OE1	Thr	154C	OG1	3.04	***
Phe	102A	O	His	21B	NE2	2.82	***
Tyr	133A	N	Glu	20B	OE1	2.82	***
Asn	148A	OD1	Gln	35B	OE1	3.23	***
Trp	150A	O	Asn	206B	OD1	3.02	***
Thr	154A	N	Thr	36B	O	2.94	***
Ser	155A	O	Thr	36B	N	2.97	***
Asp	157A	N	Asn	34B	O	2.84	***
Asp	157A	OD1	Asn	34B	OD1	3	***
Asp	157A	O	Asn	34B	N	2.91	***
Asn	159A	N	Thr	32B	O	2.73	***
Asn	159A	O	Thr	32B	N	2.88	***
Ala	161A	N	Gln	30B	O	2.93	***
Asn	206A	OD1	Trp	150C	O	3.12	***
Glu	20B	OE1	Tyr	133A	N	2.82	***

Αμινοξύ 1	Θέση	Άτομο	Αμινοξύ 2	Θέση	Άτομο	Απόσταση	Υδρογονοδεσμός
His	21B	NE2	Phe	102A	O	2.82	***
Gln	30B	O	Ala	161A	N	2.93	***
Thr	32B	N	Asn	159A	O	2.88	***
Thr	32B	O	Asn	159A	N	2.73	***
Asn	34B	N	Asp	157A	O	2.91	***
Asn	34B	OD1	Asp	157A	OD1	3	***
Asn	34B	O	Asp	157A	N	2.84	***
Gln	35B	OE1	Asn	148A	OD1	3.23	***
Thr	36B	N	Ser	155A	O	2.97	***
Thr	36B	O	Thr	154A	N	2.94	***
Phe	102B	O	His	21C	NE2	2.79	***
Tyr	133B	N	Glu	20C	OE2	2.65	***
Asn	148B	ND2	Gln	35C	OE1	3.03	***
Trp	150B	O	Asn	206C	OD1	3.17	***
Thr	154B	N	Thr	36C	O	2.99	***
Thr	154B	OG1	Gln	38C	OE1	3.16	***
Ser	155B	OG	Asp	157C	OD1	3.11	***
Ser	155B	O	Thr	36C	N	3.16	***
Asp	157B	N	Asn	34C	O	2.73	***
Asp	157B	O	Asn	34C	N	2.84	***
Asn	159B	N	Thr	32C	O	2.59	***
Asn	159B	O	Thr	32C	N	2.91	***
Ala	161B	N	Gln	30C	O	3.01	***
Asn	206B	OD1	Trp	150A	O	3.02	***
Glu	20C	OE2	Tyr	133B	N	2.65	***
His	21C	NE2	Phe	102B	O	2.79	***
Thr	32C	N	Asn	159B	O	2.91	***
Thr	32C	O	Asn	159B	N	2.59	***
Asn	34C	N	Asp	157B	O	2.84	***
Asn	34C	O	Asp	157B	N	2.73	***
Gln	35C	OE1	Asn	148B	ND2	3.03	***
Thr	36C	N	Ser	155B	O	3.16	***
Thr	36C	O	Thr	154B	N	2.99	***
Gln	38C	OE1	Thr	154B	OG1	3.16	***
Phe	102C	O	His	21A	NE2	2.68	***
Tyr	133C	N	Glu	20A	OE2	2.67	***
Asn	148C	ND2	Gln	35A	OE1	3.2	***
Trp	150C	O	Asn	206A	OD1	3.12	***
Thr	154C	N	Thr	36A	O	2.79	***
Thr	154C	OG1	Gln	38A	OE1	3.04	***
Ser	155C	O	Thr	36A	N	2.95	***
Asp	157C	N	Asn	34A	O	2.83	***
Asp	157C	OD1	Ser	155B	OG	3.11	***
Asp	157C	O	Asn	34A	N	2.79	***
Asn	159C	N	Thr	32A	O	2.98	***
Asn	159C	O	Thr	32A	N	2.72	***
Ala	161C	N	Gln	30A	O	2.85	***
Asn	206C	OD1	Trp	150B	O	3.17	***

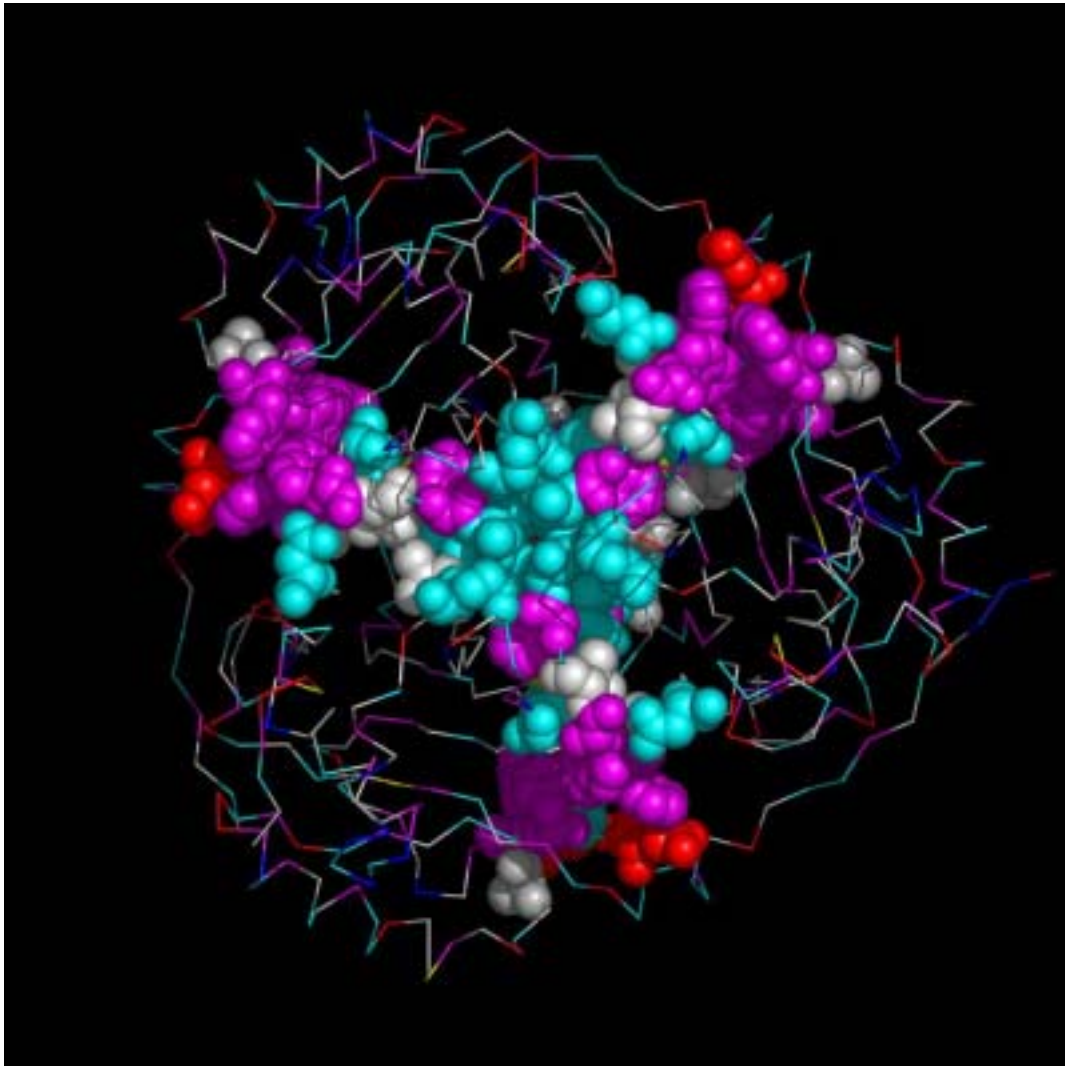
Οι μη πολικές αλληλεπιδράσεις περιλαμβάνουν τόσο αλληλεπιδράσεις μεταξύ αλειφατικών πλευρικών ομάδων αμινοξέων όσο και αρωματικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ αρωματικών καταλοίπων. Το σύνολο των μη πολικών αλληλεπιδράσεων είναι 32.

Πίνακας 3-20 Υδροφobes επαφές που συμμετέχουν στον σχηματισμό του τριμερούς

Αμινοξύ 1	Θέση	Άτομο	Αμινοξύ 2	Θέση	Άτομο	Απόσταση
His	21A	CD2	Tyr	133C	CD1	3.54
Tyr	33A	CD1	Phe	156C	CZ	3.57
Val	37A	CG2	Val	151C	CG1	3.19
Glu	100A	CG	Phe	199B	CE1	3.38
Glu	100A	CD	Phe	199B	CE1	3.46
Glu	100A	CD	Phe	199B	CZ	3.53
Tyr	133A	CB	Glu	20B	CD	3.54
Trp	150A	CB	Gly	202B	CA	3.56
Trp	150A	CZ3	Gly	198B	C	3.52
Val	151A	CG2	Gly	202B	CA	3.53
Thr	154A	CG2	Thr	36B	CB	3.57
Thr	154A	CG2	Thr	36B	CG2	3.44
Asn	159A	CB	Thr	32B	CG2	3.49
Phe	199A	CB	Phe	95C	CE1	3.56
Phe	199A	CE1	Glu	100C	CD	3.52
Phe	199A	CD2	Phe	95C	CZ	3.54
Gly	202A	CA	Trp	150C	CB	3.54
Gly	202A	CA	Val	151C	CG2	3.48
Glu	20B	CD	Tyr	133A	CB	3.54
Glu	20B	OE1	Ala	132A	CA	3.52
Thr	32B	CG2	Asn	159A	CB	3.49
Gln	35B	OE1	Val	151A	CG1	3.47
Thr	36B	CB	Thr	154A	CG2	3.57
Thr	36B	CG2	Thr	154A	CG2	3.44
Phe	95B	CZ	Phe	199C	CG	3.56
Phe	95B	CZ	Phe	199C	CD2	3.39
Glu	100B	CG	Phe	199C	CE1	3.44
Glu	100B	CD	Phe	199C	CE1	3.59
Phe	102B	CE2	Asp	197C	CG	3.5
Trp	150B	CB	Gly	202C	CA	3.46
Ala	161B	CB	Met	163C	SD	3.59
Gly	198B	C	Trp	150A	CZ3	3.52
Phe	199B	CE1	Glu	100A	CG	3.38
Phe	199B	CE1	Glu	100A	CD	3.46
Phe	199B	CZ	Glu	100A	CD	3.53
Gly	202B	CA	Trp	150A	CB	3.56
Gly	202B	CA	Val	151A	CG2	3.53
Phe	95C	CE1	Phe	199A	CB	3.56
Phe	95C	CZ	Phe	199A	CD2	3.54
Glu	100C	CD	Phe	199A	CE1	3.52
Tyr	133C	CD1	His	21A	CD2	3.54
Trp	150C	CB	Gly	202A	CA	3.54
Trp	150C	CZ3	Gly	198A	C	3.5
Val	151C	CG1	Val	37A	CG2	3.19
Val	151C	CG2	Gly	202A	CA	3.48
Phe	156C	CZ	Tyr	33A	CD1	3.57
Met	163C	SD	Ala	161B	CB	3.59
Asp	197C	CG	Phe	102B	CE2	3.5

Αμινοξύ 1	Θέση	Άτομο	Αμινοξύ 2	Θέση	Άτομο	Απόσταση
Phe	199C	CG	Phe	95B	CZ	3.56
Phe	199C	CE1	Glu	100B	CG	3.44
Phe	199C	CE1	Glu	100B	CD	3.59
Phe	199C	CD2	Phe	95B	CZ	3.39
Gly	202C	CA	Trp	150B	CB	3.46

Στην εικόνα 3-29 φαίνεται η μεσεπιφάνεια αλληλεπίδρασης των μονομερών της CAT₁.



Εικόνα 3- 29 Η επιφάνεια αλληλεπίδρασης Van der Walls στην οποία έχουν χαρτογραφηθεί τα αμινοξέα που παρουσιάζονται στους πίνακες 3-19 και 3-20. Ο χρωματικός κώδικας είναι: ιώδες=αρωματικά κατάλοιπα, λευκό=αλειφατικά κατάλοιπα,κυανό=πολικά κατάλοιπα, κόκκινο=φορτισμένα κατάλοιπα. Είναι εμφανής η κυριαρχία των πολικών και ιοντικών αλληλεπιδράσεων

Ιδιαίτερη σημασία στην αλληλεπίδραση των μονομερών για τον σχηματισμό της βιολογικά ενεργής μονάδας έχουν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κλώνων β8 γειτονικών μονομερών, οι οποίοι και σχηματίζουν μια πολύ στενά συνδεδεμένη περιοχή η οποία συνεισφέρει στην

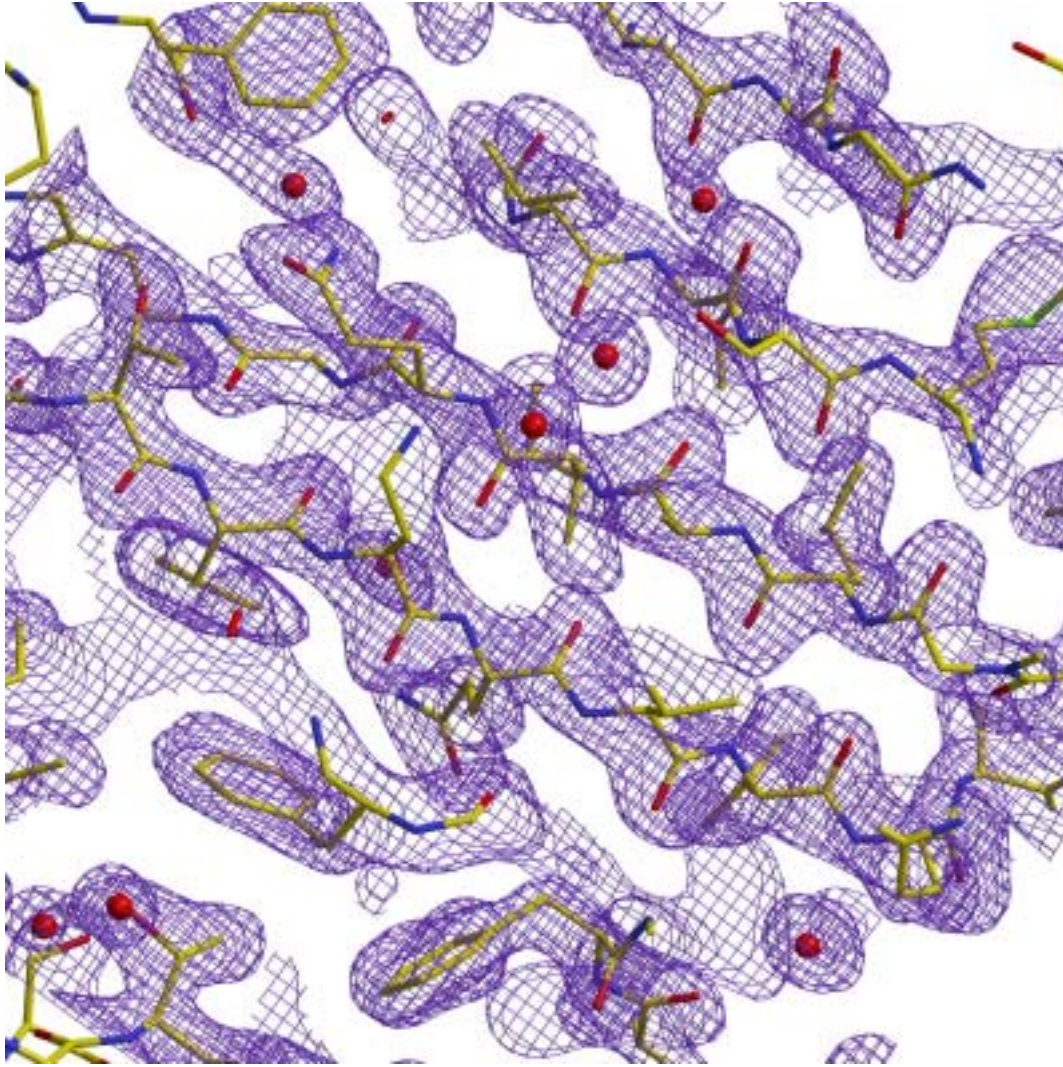
συνολική σταθερότητα. Επιπλέον οι κεντρικοί β8 κλώνοι αλληλεπιδρούν μέσω των ατόμων της κύριας αλυσίδας με αντί-παράλληλους β2 κλώνους της γειτονικής αλυσίδας του τριμερούς, με υδρογονοδεσμούς. Αυτή η ανάπτυξη των υδρογονοδεσμών είναι το σημείο κλειδί μια και εξασφαλίζει την συνέχεια της β-πτυχωτής επιφάνειας κάθε μονομερούς στο επόμενο γειτονικό του. Υπό αυτό το πρίσμα καθίσταται σαφές ότι η παρατήρηση των μεμονωμένων μονομερών μπορεί να δώσει μόνο περιορισμένη πληροφορία για την συνολική δομή και τη λειτουργικότητα του μορίου. Μόνο στα πλαίσια του ολοκληρωμένου τριμερούς μπορεί κανείς με σιγουριά να διακρίνει τις σημαντικές αλληλεπιδράσεις οι οποίες όχι μόνο εξασφαλίζουν τον τριμερισμό αλλά και την ενζυμική ενεργότητα. Ανακεφαλαιώνοντας έτσι μπορούμε να ορίσουμε τους κανόνες οι οποίοι υπαγορεύουν τον σχηματισμό των τριμερών.

- Τα μονομερή της CAT_I έχουν μια μικτή α/β δομή με τους κεντρικούς β-κλώνους (β5,β6,β7,β9,β11,β2) να δημιουργούν μια β-πτυχωτή επιφάνεια η οποία από την μία μεριά υποστηρίζεται από τις υποκείμενες α-έλικες (α3,α4,α7) και από την άλλη είναι διαθέσιμη. Τα λοιπά στοιχεία της δευτεροταγούς δομής πλαισιώνουν τον βασικό αυτό σχηματισμό και έρχονται σε επαφή με το διαλύτη.
- Από τους β-κλώνους οι οποίοι βρίσκονται σε τοπολογική γειτνίαση ο κλώνος β8 φαίνεται να τοποθετείται εκτός της συστραμμένης β-πτυχωτής επιφάνειας που αναφέρθηκε παραπάνω.
- Από την οπτική παρατήρηση των τριμερών φαίνεται άμεσα ότι το τριμερές της CAT_I σχηματίζεται με στροφή 120⁰ γύρω από τον άξονα ο οποίος διέρχεται από το κέντρο της μάζας του τριμερούς. Αυτό έχει σαν άμεση συνέπεια να διατηρείται μεν η φορά κατεύθυνσης των στοιχείων της δευτεροταγούς δομής, αλλά διαφορετικά στοιχεία αυτής να έρχονται σε γειτνίαση στα τριμερή. Μοναδική εξαίρεση σε αυτό αποτελούν Οι κλώνοι β8 από γειτονικά μονομερή οι οποίοι αλληλεπιδρούν μέσω πολικών αλληλεπιδράσεων (κυρίως ανάπτυξη υδρογονοδεσμών).
- Το παραπάνω σύστημα των τριών β-κλώνων πλαισιώνεται από αντίροπους β2 κλώνους που ανήκουν σε γειτονικά μονομερή, μέσω αλληλεπιδράσεων κύριας αλυσίδας. Αποτέλεσμα αυτού είναι η δημιουργία ενός κεντρικού περισφιγμένου σωληνοειδούς σχηματισμού του οποίου τα τοιχώματα έχουν την δομή **((β8)₁(β2)₃-(β8)₂(β2)₁-(β8)₃(β2)₂)**.
- Προχωρώντας σε ανώτερο επίπεδο οργάνωσης εξαιτίας της συμμετοχής των κλώνων β2 στις συστραμμένες β-πτυχωτές επιφάνειες κάθε μονομερούς, έχουμε ως

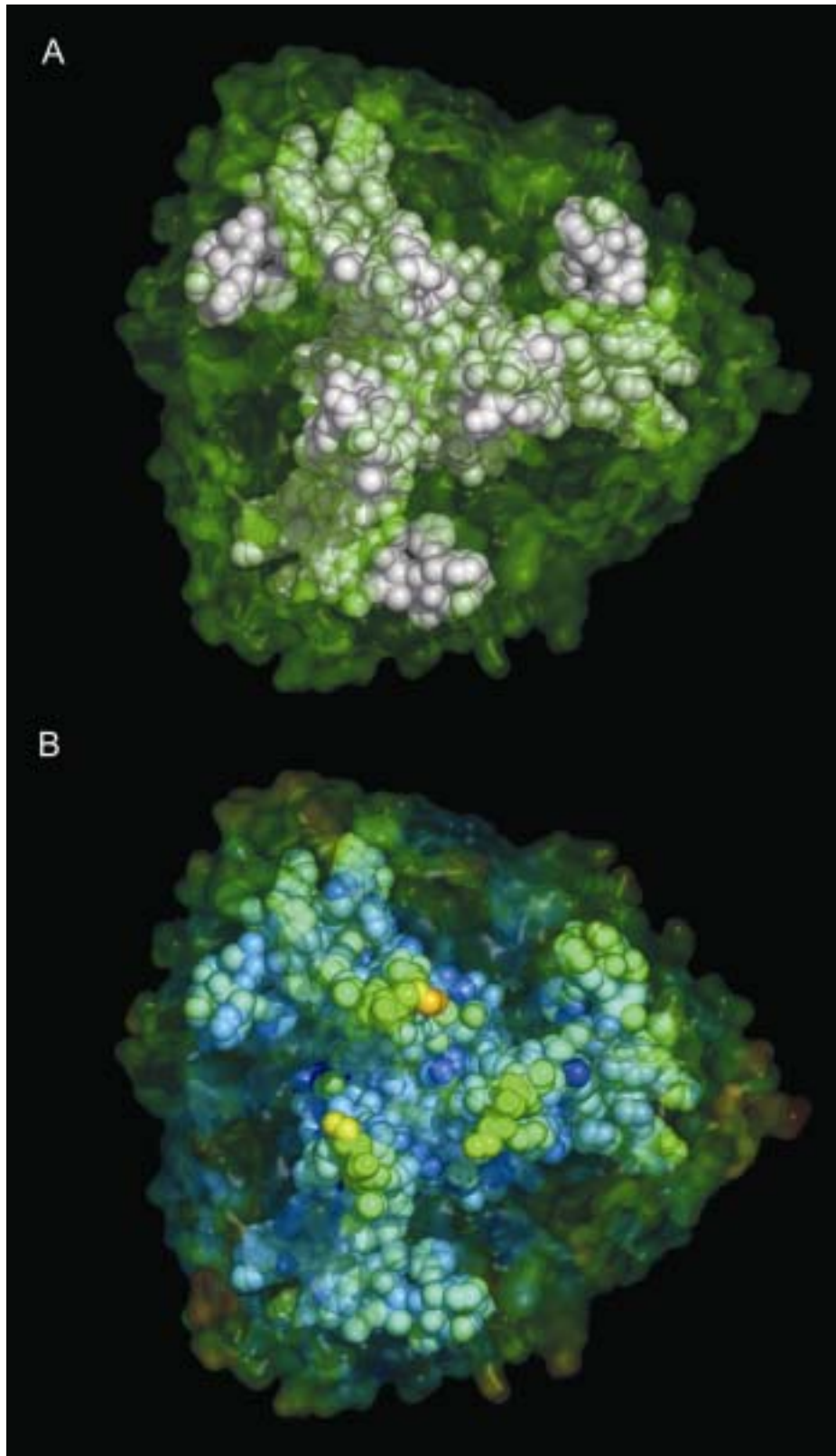
αποτέλεσμα την επέκταση των επιφανειών αυτών και τη δημιουργία του πραγματικού κεντρικού πυρήνα ο οποίος όμως μπορεί να ορισθεί σε επίπεδο πλήρους τριμερούς. Ο πυρήνας αυτός τελικά αποκτά μια χαρακτηριστική αρχιτεκτονική η οποία μπορεί να παρομοιασθεί με προπέλα της οποίας ο κεντρικός άξονας αποτελείται από την δομή **((β8)₁(β2)₃-(β8)₂(β2)₁-(β8)₃(β2)₂)** και οι πτέρυγες από τα υπόλοιπα προαναφερθέντα στοιχεία.

- Οι παραπάνω αλληλεπιδράσεις μπορούν να ταυτοποιηθούν σε ατομικό επίπεδο και παρατίθενται συγκεντρωμένες στους παραπάνω πίνακες. Από το σύνολο των αλληλεπιδράσεων αυτών είναι εμφανές ότι το μεγαλύτερο ποσοστό τους (73.1%) είναι πολικές και μόλις το 26.8 % είναι αλειφατικές ή αρωματικές, πράγμα το οποίο είναι αναμενόμενο αφού το ζητούμενο είναι η θερμοκρασιακή σταθερότητα του τριμερούς. Χρήση υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων για τον τριμερισμό θα είχε σαν αποτέλεσμα την αποσταθεροποίηση του βιολογικά ενεργού μορίου σε υψηλές θερμοκρασίες, κάτι το οποίο όμως δεν συμβαίνει.

Στην εικόνα 3-30 φαίνεται μια άποψη του τελικού 2m|Fo|-D|Fc| sigma(a) χάρτη ηλεκτρονικής πυκνότητας πάνω στη κεντρική β-πτυχωτή επιφάνεια.



Εικόνα 3- 30 Υπέρθηση του $2m|F_o|-D|F_c|sigma(a)$ χάρτη ηλεκτρονικής πυκνότητας πάνω στην κεντρική β-πτυχωτή επιφάνεια. Ο χάρτης είναι σε ισοψείς των 1.3σ πάνω από τον μέσο όρο. (Κίτρινο=άνθρακας, κόκκινο=οξυγόνο, μπλε=άζωτο). Μόρια νερού φαίνονται σαν κόκκινες σφαίρες



Εικόνα 3- 31 Η κεντρική β-πτυχωτή επιφάνεια παρουσιάζεται με σφαίρες. Το υπόλοιπο μόριο παρουσιάζεται με εκτεθειμένη μοριακή επιφάνεια(διαφανές πράσινο). Β Χαρτογράφηση των

παραγόντων θερμοκρασία Β μέσα στην κεντρική β επιφάνεια. (Κλίμακα: μπλέ=ψυχρό,κόκκινο=θερμό)

Η εικόνα 3-31 συνοψίζει όσα αναφέρθηκαν. Όπως είναι εύκολα αντιληπτό υπάρχει μια ταύτιση της κεντρικής επιφάνειας με την περιοχή με χαμηλούς θερμοκρασιακούς συντελεστές κάτι το οποίο είναι αναμενόμενο για ένα ένζυμο αυτής της τάξης.

3.6.6 Το κρυσταλλικό πλέγμα

Κατά την διάρκεια της κρυσταλλογραφικής ανάλυσης πολλές φορές χάνουμε την ευκαιρία να δούμε με ποιο τρόπο τα μόρια αλληλεπιδρούν μεταξύ τους για να σχηματίσουν αυτή την

Πίνακας 3-21 Οι επιτρεπτές πράξεις συμμετρίας για την ομάδα χώρου P2₁. Το A παίρνει ακέραιες θετικές τιμές. Τα x,y,z είναι κλασματικές μεταθέσεις

Πράξεις συμμετρίας για την ομάδα P2 ₁		
X	Y	Z
X	Y + 1/2	Z
X+A	Y	Z
X-A	Y	Z
X	Y+A	Z
X	Y-A	Z
X	Y	Z+A
X	Y	Z-A
X+A	Y+A	Z
X-A	Y+A	Z
X+A	Y-A	Z
X-A	Y-A	Z
X+A	Y	Z+A
X+A	Y	Z-A
X-A	Y	Z+A
X-A	Y	Z-A
X	Y+A	Z+A
X	Y+A	Z-A
X	Y-A	Z+A
X	Y-A	Z-A
X+A	Y+A	Z+A
X-A	Y+A	Z+A
X+A	Y-A	Z+A
X-A	Y-A	Z+A

Πράξεις συμμετρίας για την ομάδα $P2_1$		
X+A	Y+A	Z-A
X+A	Y+A	Z-A
X-A	Y+A	Z-A
X-A	Y+A	Z-A
X-A	Y-A	Z-A

τριδιάστατη επαναλαμβανόμενη δομή που είναι ο κρύσταλλος. Αν και αυτό δεν είναι τρομερά σημαντικό από βιολογικής απόψεως, εντούτοις έχει κάποιο ενδιαφέρον από την μεριά της φυσικοχημείας μια και οι αλληλεπιδράσεις που συγκρατούν τα μόρια στο κρυσταλλικό πλέγμα είναι πιθανό να εμφανίζονται και μέσα στο διάλυμα επηρεάζοντας τόσο τις διαδικασίες κρυστάλλωσης όσο και την ίδια την βιολογική ενεργότητα του μορίου. Από την αρχική εκτίμηση των δεδομένων περίθλασης που συλλέχθηκαν από τους κρυστάλλους της ακετυλοτρανσφεράσης της χλωραμφενικόλης τύπου I έγινε φανερό ότι η ύπαρξη πολλών μορίων μέσα στην ασύμμετρη μονάδα θα είχε σαν αποτέλεσμα πολύπλοκες επαφές πακεταρίσματος ή και την εμφάνιση τοπικής συμμετρίας. Κατά την διάρκεια της ανάλυσης της δομής έγινε φανερό ότι το πακετάρισμα στο κρυσταλλικό πλέγμα και η μη κρυσταλλογραφική συμμετρία μεταξύ των τριμερών είναι αλληλένδετα και δεν μπορούν να αντιμετωπιστούν ξεχωριστά αφού η δημιουργία του κρυσταλλικού πλέγματος εμφανίζεται από αλληλεπιδράσεις μορίων που σχετίζονται μέσω πράξεων συμμετρίας αλλά και αφού αυτή η συμμετρία γίνεται ορατή κοιτώντας το πλέγμα σε μεγάλη έκταση. Για λόγους κατανόησης οι διαμοριακές αλληλεπιδράσεις έχουν κατηγοριοποιηθεί σε πολικές και υδρόφοβες καθώς και σε πρωτογενείς και δευτερογενείς. Με το όρο πρωτογενείς θα χαρακτηρίσω εκείνες τις αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα μεταξύ των μορίων που βρίσκονται μέσα στην ασύμμετρη μονάδα και αποτελούν ουσιαστικά την βασική μονάδα επανάληψης. Ως δευτερογενείς θα χαρακτηρίσω εκείνες τις αλληλεπιδράσεις οι οποίες σχηματίζονται μεταξύ μορίων που δημιουργούνται από όλες τις επιτρεπτές πράξεις κρυσταλλογραφικής συμμετρίας. Οι επιτρεπτές πράξεις κρυσταλλογραφικής συμμετρίας φαίνονται στον πίνακα 3-21.

Για τις χωροομάδες συμμετρίας στις οποίες οι τρεις άξονες τις στοιχειώδους κυψελίδας κείνται κατά μήκος των αξόνων του καρτεσιανού συστήματος συντεταγμένων όπως τα ορθορομβικά συστήματα (απλά ή έδρο-κεντρωμένα π.χ. $P222$, $P212121$ $P2221$, $C222$,

C212121,C2221) ο πίνακας εφαρμόζεται κατευθείαν για κάθε X, Y, Z. Αντίθετα για συστήματα όπως τα μονοκλινή (P2,P2₁,C2 ,C2₁) στα οποία ισχύει η ορθοκανονικοποίηση 1 σύμφωνα με τις προδιαγραφές της I.U.C.R. (δηλαδή A//X, B//Y C*//Z) η εφαρμογή του παραπάνω πίνακα γίνεται πιο περίπλοκη αφού η μετάθεση κατά τον άξονα C διασπάται σε δύο μέρη (ένα άνυσμα κατά μήκος του X και ένα κατά μήκος του Y στα οποία συμμετέχει η γωνία β που είναι διάφορη των 90 °). Το πρόβλημα αυτό πάντως είναι επουσιώδες μια και η μετατροπή των συντεταγμένων σε κλασματικές (fractional coordinates) μετατρέπει το πρόβλημα στην απλούστερη πρώτη περίπτωση.

Στους πίνακες 3-22 και 3-23 παρουσιάζονται οι κρυσταλλικές επαφές στις οποίες συμμετέχουν πολικές ομάδες. Ο πίνακας δείχνει τις επαφές μέσα στην ασύμμετρη μονάδα. Με έντονα γράμματα δείχνονται οι επαφές που σχετίζονται με την μη κρυσταλλογραφική συμμετρία. Από τον πίνακα 3-22 είναι φανερή η ύπαρξη τεσσάρων παλίνδρομων ομάδων επαφών που αντιστοιχούν στα ζεύγη της μη κρυσταλλογραφικής συμμετρίας που θα αναφέρουμε αναλυτικά πιο κάτω.

Πίνακας 3-22 Οι πολικές κρυσταλλικές επαφές μέσα στην ασύμμετρη μονάδα. Με έντονα γράμματα παρουσιάζονται οι επαφές που σχετίζονται με την μη κρυσταλλογραφική συμμετρία

Αριθμός καταλοίπου	Αλυσίδα	Κατάλοιπο	Ατομο	Αριθμός καταλοίπου	Αλυσίδα	Κατάλοιπο	Ατομο	Απόσταση
50	A	LYS	O	165	L	ASN	ND2	3.44
50	A	LYS	NZ	164	L	ASP	OD2	3.59
114	A	ARG	NE	80	L	GLY	O	3.54
114	A	ARG	NH2	80	L	GLY	O	2.38
118	A	HIS	NE2	81	L	GLU	OE1	3.14
121	A	SER	OG	79	L	ASP	OD1	3.49
3	B	LYS	O	10	I	THR	N	2.92
5	B	ILE	N	8	I	TYR	O	2.89
5	B	ILE	O	8	I	TYR	N	3.05
5	B	ILE	O	8	I	TYR	O	3.18
8	B	TYR	N	5	I	ILE	O	3.04
8	B	TYR	O	5	I	ILE	N	2.83
8	B	TYR	O	5	I	ILE	O	3.49
10	B	THR	N	3	I	LYS	O	3.23
10	D	THR	O	12	J	ASP	N	2.8
12	D	ASP	N	10	J	THR	O	3.02
65	D	ARG	NH1	111	J	ASP	OD1	2.59
65	D	ARG	NH1	111	J	ASP	OD2	3.54
111	D	ASP	OD2	211	J	TYR	OH	3.22
211	D	TYR	OH	111	J	ASP	OD1	3.56
111	D	ASP	OD2	65	J	ARG	NE	3.58
111	D	ASP	OD2	65	J	ARG	NH1	3.33
214	D	GLU	OE2	110	J	HIS	NE2	3.19

Αριθμός καταλοίπου	Αλυσίδα	Κατάλοιπο	Ατομο	Αριθμός καταλοίπου	Αλυσίδα	Κατάλοιπο	Ατομο	Απόσταση
216	D	GLN	OE1	114	J	ARG	NE	3.59
99	F	THR	O	6	J	THR	OG1	3.59
3	I	LYS	O	10	B	THR	N	3.23
5	I	ILE	N	8	B	TYR	O	2.83
5	I	ILE	O	8	B	TYR	N	3.04
5	I	ILE	O	8	B	TYR	O	3.49
8	I	TYR	N	5	B	ILE	O	3.05
8	I	TYR	O	5	B	ILE	N	2.89
8	I	TYR	O	5	B	ILE	O	3.18
10	I	THR	N	3	B	LYS	O	2.92
6	J	THR	OG1	99	F	THR	O	3.59
10	J	THR	O	12	D	ASP	N	3.02
12	J	ASP	N	10	D	THR	O	2.8
65	J	ARG	NE	111	D	ASP	OD2	3.58
65	J	ARG	NH1	111	D	ASP	OD2	3.33
110	J	HIS	NE2	214	D	GLU	OE2	3.19
111	J	ASP	OD1	211	D	TYR	OH	3.56
111	J	ASP	OD1	65	D	ARG	NH1	2.59
111	J	ASP	OD2	65	D	ARG	NH1	3.54
114	J	ARG	NE	216	D	GLN	OE1	3.59
211	J	TYR	OH	111	D	ASP	OD2	3.22
79	L	ASP	OD1	121	A	SER	OG	3.49
80	L	GLY	O	114	A	ARG	NE	3.54
80	L	GLY	O	114	A	ARG	NH2	2.38
81	L	GLU	OE1	118	A	HIS	NE2	3.14
164	L	ASP	OD2	50	A	LYS	NZ	3.59
165	L	ASN	ND2	50	A	LYS	O	3.44

Ο ακόλουθος πίνακας δείχνει τις πολικές κρυσταλλικές επαφές λαμβάνοντας υπόψη και την κρυσταλλογραφική συμμετρία

Πίνακας 3-23 Οι πολικές επαφές λαμβάνοντας υπόψη και την κρυσταλλογραφική συμμετρία

Αρ.	Αλυσίδα	Τύπος	Ατομο	Αρ.	Αλυσίδα	Τύπος	Ατομο	X	Y	Z	απόσταση
8	A	TYR	OH	12	H	ASP	OD1	0	0	-1	2.74
9	A	THR	OG1	9	H	THR	OG1	0	0	-1	2.65
10	A	THR	N	10	H	THR	O	0	0	-1	2.78
10	A	THR	O	10	H	THR	N	0	0	-1	3.01
12	A	ASP	OD1	46	E	LYS	NZ	-1	0	-1	3.16
51	A	ASN	OD1	216	H	GLN	OE1	0	0	-1	3
65	A	ARG	NH1	65	H	ARG	NH1	0	0	-1	3.5
65	A	ARG	NH1	211	H	TYR	OH	0	0	-1	3.08
81	A	GLU	OE1	50	E	LYS	NZ	-1	0	-1	3.41
112	A	ASP	OD1	214	H	GLU	OE1	0	0	-1	3.06
112	A	ASP	OD2	214	H	GLU	OE1	0	0	-1	2.39
114	A	ARG	NH1	216	H	GLN	NE2	0	0	-1	3.14
114	A	ARG	NH2	216	H	GLN	NE2	0	0	-1	3.55
115	A	GLN	OE1	214	H	GLU	OE1	0	0	-1	3.44
210	A	GLN	NE2	115	H	GLN	OE1	0	0	-1	2.88

Αποτελέσματα

Αρ.	Αλυσίδα	Τύπος	Ατομο	Αρ.	Αλυσίδα	Τύπος	Ατομο	X	Y	Z	απόσταση
211	A	TYR	OH	65	H	ARG	NH1	0	0	-1	3.14
214	A	GLU	OE1	112	H	ASP	OD1	0	0	-1	3.05
214	A	GLU	OE1	112	H	ASP	OD2	0	0	-1	2.64
216	A	GLN	N	218	H	GLY	O	0	0	-1	3.13
216	A	GLN	O	216	H	GLN	OE1	0	0	-1	2.88
216	A	GLN	OE1	217	H	GLY	O	0	0	-1	3.52
216	A	GLN	OE1	218	H	GLY	N	0	0	-1	3.45
216	A	GLN	OE1	216	H	GLN	O	0	0	-1	2.56
216	A	GLN	OE1	51	H	ASN	OD1	0	0	-1	3.05
216	A	GLN	NE2	217	H	GLY	O	0	0	-1	3.43
216	A	GLN	NE2	51	H	ASN	OD1	0	0	-1	3.59
216	A	GLN	NE2	114	H	ARG	NH2	0	0	-1	2.56
217	A	GLY	O	216	H	GLN	OE1	0	0	-1	3.55
122	B	GLN	NE2	114	G	ARG	NH2	0	-1	1	3.14
127	B	TYR	OH	52	G	LYS	O	0	-1	1	2.92
137	B	GLY	N	52	G	LYS	NZ	0	-1	1	3.5
100	C	GLU	OE2	4	H	LYS	NZ	0	0	-1	3.21
125	C	ALA	O	125	I	ALA	O	0	-1	0	2.87
181	C	ASP	OD2	181	K	ASP	O	1	-1	0	3.58
50	D	LYS	O	165	G	ASN	OD1	1	0	0	3.51
50	D	LYS	O	165	G	ASN	ND2	1	0	0	2.33
51	D	ASN	O	79	G	ASP	N	1	0	0	3.43
51	D	ASN	O	80	G	GLY	N	1	0	0	2.82
52	D	LYS	O	79	G	ASP	N	1	0	0	2.99
114	D	ARG	NH1	79	G	ASP	O	1	0	0	3.24
114	D	ARG	NH2	79	G	ASP	O	1	0	0	3.51
218	D	GLY	O	80	G	GLY	O	1	0	0	2.93
3	E	LYS	O	10	K	THR	N	0	0	1	3.38
5	E	ILE	N	8	K	TYR	O	0	0	1	3.04
5	E	ILE	O	8	K	TYR	N	0	0	1	3.38
5	E	ILE	O	8	K	TYR	O	0	0	1	3.49
7	E	GLY	N	7	K	GLY	N	0	0	1	3.56
8	E	TYR	N	5	K	ILE	O	0	0	1	3.18
8	E	TYR	O	5	K	ILE	N	0	0	1	3.14
8	E	TYR	O	5	K	ILE	O	0	0	1	3.22
8	E	TYR	O	4	K	LYS	NZ	0	0	1	3.27
10	E	THR	N	3	K	LYS	O	0	0	1	2.73
46	E	LYS	NZ	12	A	ASP	OD1	1	0	1	3.16
50	E	LYS	NZ	81	A	GLU	OE1	1	0	1	3.41
86	E	ASP	OD1	4	K	LYS	NZ	0	0	1	3
86	E	ASP	OD2	4	K	LYS	NZ	0	0	1	3.15
123	E	ASP	OD1	52	L	LYS	NZ	1	-1	1	2.52
181	E	ASP	OD2	80	H	GLY	N	1	0	0	3.6
118	F	HIS	O	122	K	GLN	OE1	1	-1	0	3.49
118	F	HIS	ND1	122	K	GLN	NE2	1	-1	0	3.12
122	F	GLN	OE1	122	K	GLN	OE1	1	-1	0	3.11
122	F	GLN	NE2	118	K	HIS	ND1	1	-1	0	2.84
52	G	LYS	O	127	B	TYR	OH	0	0	1	2.92
52	G	LYS	NZ	137	B	GLY	N	0	0	1	3.5

Αποτελέσματα

Αρ.	Αλυσίδα	Τύπος	Ατομο	Αρ.	Αλυσίδα	Τύπος	Ατομο	X	Y	Z	απόσταση
79	G	ASP	N	51	D	ASN	O	-1	0	0	3.43
79	G	ASP	N	52	D	LYS	O	-1	0	0	2.99
79	G	ASP	O	114	D	ARG	NH1	-1	0	0	3.24
79	G	ASP	O	114	D	ARG	NH2	-1	0	0	3.51
80	G	GLY	N	51	D	ASN	O	-1	0	0	2.82
80	G	GLY	O	218	D	GLY	O	-1	0	0	2.93
81	G	GLU	OE1	216	J	GLN	NE2	-1	0	0	3.55
114	G	ARG	NH2	122	B	GLN	NE2	0	0	1	3.14
165	G	ASN	OD1	50	D	LYS	O	-1	0	0	3.51
165	G	ASN	ND2	50	D	LYS	O	-1	0	0	2.33
4	H	LYS	NZ	100	C	GLU	OE2	0	0	1	3.21
9	H	THR	OG1	9	A	THR	OG1	0	0	1	2.65
10	H	THR	N	10	A	THR	O	0	0	1	3.01
10	H	THR	O	10	A	THR	N	0	0	1	2.78
12	H	ASP	OD1	8	A	TYR	OH	0	0	1	2.74
51	H	ASN	OD1	216	A	GLN	OE1	0	0	1	3.05
51	H	ASN	OD1	216	A	GLN	NE2	0	0	1	3.59
65	H	ARG	NH1	65	A	ARG	NH1	0	0	1	3.5
65	H	ARG	NH1	211	A	TYR	OH	0	0	1	3.14
80	H	GLY	N	181	E	ASP	OD2	-1	0	0	3.6
112	H	ASP	OD1	214	A	GLU	OE1	0	0	1	3.05
112	H	ASP	OD2	214	A	GLU	OE1	0	0	1	2.64
114	H	ARG	NH2	216	A	GLN	NE2	0	0	1	2.56
115	H	GLN	OE1	210	A	GLN	NE2	0	0	1	2.88
211	H	TYR	OH	65	A	ARG	NH1	0	0	1	3.08
214	H	GLU	OE1	112	A	ASP	OD1	0	0	1	3.06
214	H	GLU	OE1	112	A	ASP	OD2	0	0	1	2.39
214	H	GLU	OE1	115	A	GLN	OE1	0	0	1	3.44
216	H	GLN	O	216	A	GLN	OE1	0	0	1	2.56
216	H	GLN	OE1	217	A	GLY	O	0	0	1	3.55
216	H	GLN	OE1	216	A	GLN	O	0	0	1	2.88
216	H	GLN	OE1	51	A	ASN	OD1	0	0	1	3
216	H	GLN	NE2	114	A	ARG	NH1	0	0	1	3.14
216	H	GLN	NE2	114	A	ARG	NH2	0	0	1	3.55
217	H	GLY	O	216	A	GLN	OE1	0	0	1	3.52
217	H	GLY	O	216	A	GLN	NE2	0	0	1	3.43
218	H	GLY	N	216	A	GLN	OE1	0	0	1	3.45
218	H	GLY	O	216	A	GLN	N	0	0	1	3.13
125	I	ALA	O	125	C	ALA	O	0	0	0	2.87
216	J	GLN	NE2	81	G	GLU	OE1	1	0	0	3.55
3	K	LYS	O	10	E	THR	N	0	0	-1	2.73
4	K	LYS	NZ	8	E	TYR	O	0	0	-1	3.27
4	K	LYS	NZ	86	E	ASP	OD2	0	0	-1	3.15
4	K	LYS	NZ	86	E	ASP	OD1	0	0	-1	3
5	K	ILE	N	8	E	TYR	O	0	0	-1	3.14
5	K	ILE	O	8	E	TYR	N	0	0	-1	3.18
5	K	ILE	O	8	E	TYR	O	0	0	-1	3.22
7	K	GLY	N	7	E	GLY	N	0	0	-1	3.56
8	K	TYR	N	5	E	ILE	O	0	0	-1	3.38

Αποτελέσματα

Αρ.	Αλυσίδα	Τύπος	Ατομο	Αρ.	Αλυσίδα	Τύπος	Ατομο	X	Y	Z	απόσταση
8	K	TYR	O	5	E	ILE	N	0	0	-1	3.04
8	K	TYR	O	5	E	ILE	O	0	0	-1	3.49
10	K	THR	N	3	E	LYS	O	0	0	-1	3.38
118	K	HIS	ND1	122	F	GLN	NE2	1	0	0	2.84
122	K	GLN	OE1	118	F	HIS	O	1	0	0	3.49
122	K	GLN	OE1	122	F	GLN	OE1	1	0	0	3.11
122	K	GLN	NE2	118	F	HIS	ND1	1	0	0	3.12
181	K	ASP	O	181	C	ASP	OD2	1	0	0	3.58
52	L	LYS	NZ	123	E	ASP	OD1	1	0	1	2.52

Στους πίνακες 3-24 και 3-25 παρουσιάζονται οι υδρόφοβες κρυσταλλικές επαφές μέσα στην ασύμμετρη μονάδα και μαζί με τις πράξεις συμμετρίας.

Πίνακας 3-24 Υδρόφοβες επαφές μέσα στην ασύμμετρη μονάδα

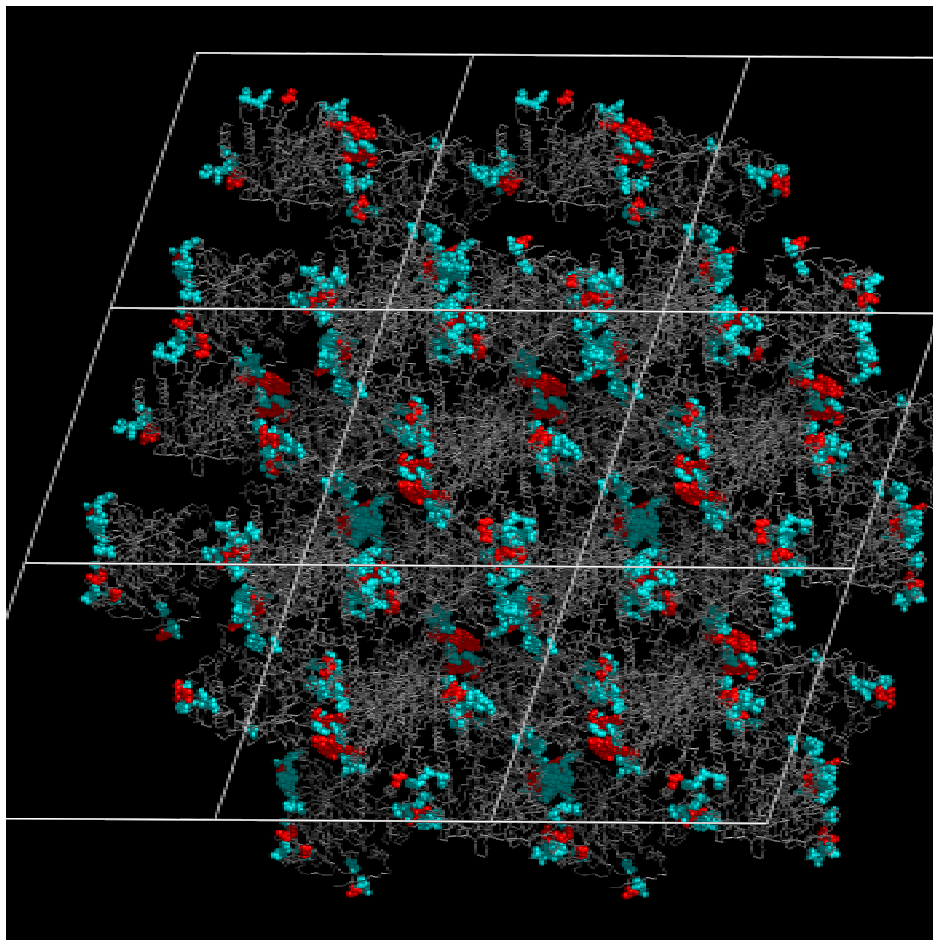
Αριθμός καταλοίπου	Αλυσίδα	Κατάλοιπο	Ατομο	Αριθμός καταλοίπου	Αλυσίδα	Κατάλοιπο	Ατομο	Απόσταση
117	A	LEU	CD1	79	L	ASP	CA	3.38
117	A	LEU	CD1	79	L	ASP	CB	3.19
117	A	LEU	CD1	79	L	ASP	CG	3.37
5	B	ILE	CB	8	I	TYR	CZ	3.57
5	B	ILE	CG2	8	I	TYR	CE2	3.4
7	B	GLY	CA	7	I	GLY	CA	3.57
12	D	ASP	C	10	J	THR	CG2	3.53
65	D	ARG	CD	111	J	ASP	CG	3.5
111	D	ASP	CG	65	J	ARG	CD	3.59
214	D	GLU	CG	115	J	GLN	CG	3.47
214	D	GLU	CG	115	J	GLN	CD	3.45
214	D	GLU	CD	115	J	GLN	CG	3.42
216	D	GLN	CB	114	J	ARG	CZ	3.4
7	I	GLY	CA	7	B	GLY	CA	3.57
8	I	TYR	CE2	5	B	ILE	CG2	3.4
8	I	TYR	CZ	5	B	ILE	CB	3.57
10	J	THR	CG2	12	D	ASP	C	3.53
65	J	ARG	CD	111	D	ASP	CG	3.59
111	J	ASP	CG	65	D	ARG	CD	3.5
114	J	ARG	CZ	216	D	GLN	CB	3.4
115	J	GLN	CG	214	D	GLU	CG	3.47
115	J	GLN	CG	214	D	GLU	CD	3.42
115	J	GLN	CD	214	D	GLU	CG	3.45
79	L	ASP	CA	117	A	LEU	CD1	3.38
79	L	ASP	CB	117	A	LEU	CD1	3.19
79	L	ASP	CG	117	A	LEU	CD1	3.37

Πίνακας 3-25 Υδρόφοβες επαφές μέσα στο κρυσταλλικό πλέγμα

Αρ. καταλοίπου	Αλυσίδα	Κατάλοιπο	Ατομο	Αρ. Καταλοίπου	Αλυσίδα	Κατάλοιπο	Ατομο	X	Y	Z	απόσταση
9	A	THR	CG2	84	H	ILE	CD1	0	0	-1	3.42
84	A	ILE	CD1	9	H	THR	CG2	0	0	-1	3.36
216	A	GLN	CG	218	H	GLY	CA	0	0	-1	3.59
216	A	GLN	CD	217	H	GLY	C	0	0	-1	3.42
53	D	HIS	CE1	79	G	ASP	C	1	0	0	3.24
8	E	TYR	CE1	5	K	ILE	CG1	0	0	1	3.6
10	E	THR	CB	3	K	LYS	CB	0	0	1	3.25
10	E	THR	CG2	3	K	LYS	CB	0	0	1	3.19
181	E	ASP	CG	79	H	ASP	C	1	0	0	3.45
79	G	ASP	C	53	D	HIS	CE1	-1	0	0	3.24
9	H	THR	CG2	84	A	ILE	CD1	0	0	1	3.36

Αρ. καταλοίπου	Αλυσίδα	Κατάλοιπο	Ατομ ο	Αρ. Καταλοίπου	Αλυσίδα	Κατάλοιπο	Ατομ ο	X	Y	Z	απόσταση
79	H	ASP	C	181	E	ASP	CG	-1	0	0	3.45
84	H	ILE	CD1	9	A	THR	CG2	0	0	1	3.42
217	H	GLY	C	216	A	GLN	CD	0	0	1	3.42
218	H	GLY	CA	216	A	GLN	CG	0	0	1	3.59
3	K	LYS	CB	10	E	THR	CB	0	0	-1	3.25
3	K	LYS	CB	10	E	THR	CG2	0	0	-1	3.19
5	K	ILE	CG1	8	E	TYR	CE1	0	0	-1	3.6

Όπως είναι φανερό από τους πίνακες το μεγαλύτερο ποσοστό των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων που συμμετέχουν στο σχηματισμό του κρυσταλλικού πλέγματος είναι πολικές δηλαδή δεσμοί υδρογόνου και ιοντικές γέφυρες πράγμα το οποίο εν μέρει εξηγεί και τον τρόπο κρυστάλλωσης του ενζύμου στην περιοχή της γενικευμένης εναλάτωσης. Στην εικόνα 3-32 φαίνεται μια άποψη του κρυσταλλικού πλέγματος



Εικόνα 3- 32 Άποψη του κρυσταλλικού πλέγματος. Κόκκινο υδρόβοφες αλληλεπιδράσεις. Κυανό πολικές αλληλεπιδράσεις

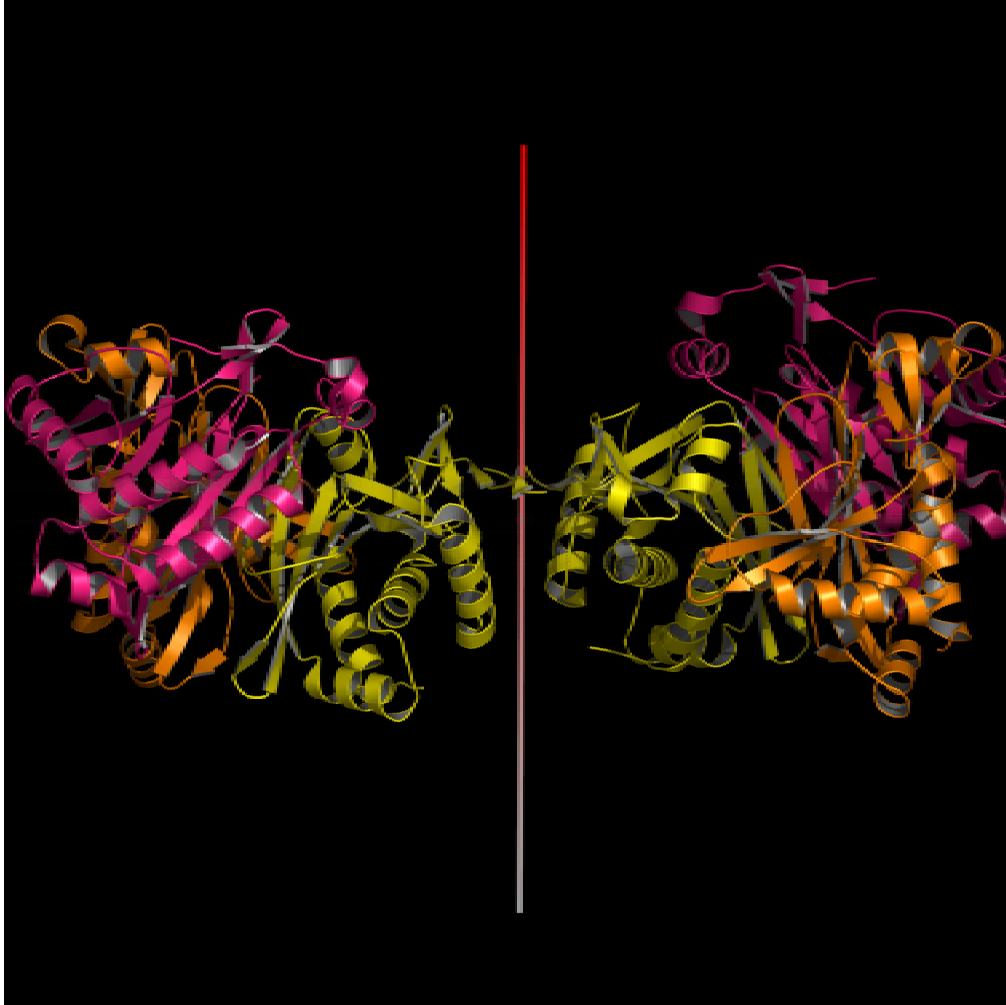
3.6.7 Η μη κρυσταλλογραφική συμμετρία

Όπως έχει αναφερθεί παραπάνω από την αρχική ανάλυση των δεδομένων περίθλασης, είναι εμφανές ότι τα βιολογικά ενεργά τριμερή σχετίζονται μεταξύ τους με πράξεις μη κρυσταλλογραφικής συμμετρίας οι οποίες εμπλέκουν όχι μόνο μόρια τα οποία ανήκουν στην αυτή ασύμμετρη μονάδα αλλά και μόρια τα οποία έρχονται σε γειτονία μέσω πράξεων κρυσταλλογραφικής συμμετρίας. Ήδη από την παρατήρηση της συνάρτησης αυτοπεριστροφής (Εικ.3-12) των δεδομένων περίθλασης τόσο για την αποενζυμική μορφή όσο και για το σύμπλοκο με το φουσιδικό οξύ γίνεται φανερό ότι υπάρχουν τρεις διπλοί άξονες μη κρυσταλλογραφικής συμμετρίας.

Οι τρεις αυτοί άξονες σχηματίζονται διότι τα τριμερή μέσα στην ασύμμετρη μονάδα δεν είναι σε ασύνδετες μεταξύ τους θέσεις αλλά κατά ζεύγη συνδέονται με μεταθετική σχέση. Έτσι αν χαρακτηρίσουμε τις τέσσερις βιολογικές μονάδες με ABC, DEF, GHI και JKL τότε οι μονάδες ABC και DEF έχουν την ίδια διεύθυνση αλλά είναι μετακινημένες η μία σε σχέση με την άλλη κατά διάνυσμα $T(XYZ)$ (65.6 Å). Το ίδιο ισχύει και για τις μονάδες GHI και JKL (91.6 Å). Ανά ζεύγη οι μονάδες αυτές σχετίζονται με περιστροφική σχέση που ορίζεται από δύο μη κρυσταλλογραφικούς διπλούς άξονες έτσι ώστε το τριμερές ABC να σχετίζεται με περιστροφή 179.01° με το GHI σύμφωνα με το ακόλουθο πίνακα περιστροφής:

$$R = \begin{pmatrix} 0.661 & 0.480 & 0.576 \\ 0.491 & -0.858 & 0.151 \\ 0.567 & 0.183 & -0.803 \end{pmatrix}$$

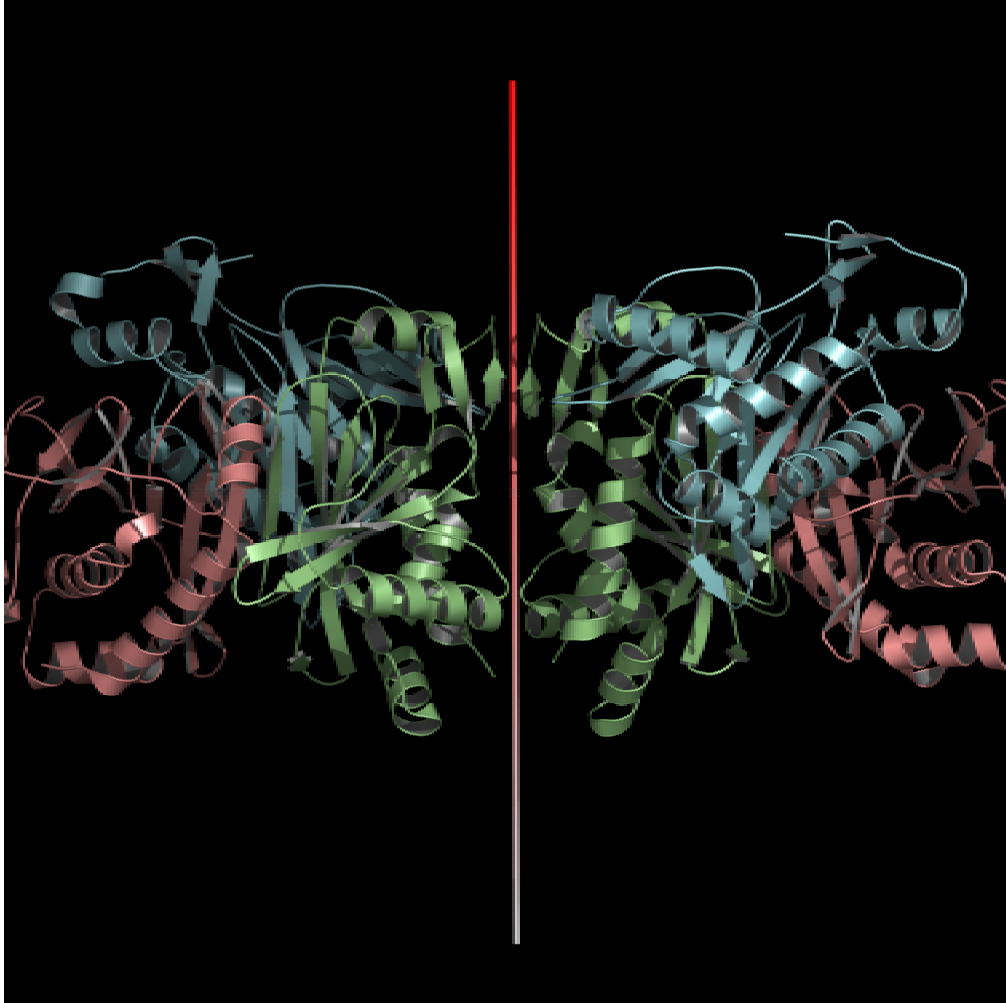
ο οποίος εφαρμοζόμενος μπορεί να μετατρέψει το ένα τριμερές στο άλλο. Στην εικόνα 3-33 φαίνονται τα δύο παραπάνω τριμερή καθώς και ο εν λόγω άξονας συμμετρίας σχεδιασμένος για καλύτερη κατανόηση.



Εικόνα 3- 33 Η τοπική δυάδα ABC και GHI. Στην εικόνα παρουσιάζεται ο διπλός τοπικός άξονας συμμετρίας. Οι ισοδύναμες υπομονάδες φέρουν τον ίδιο χρωματισμό.

Αντίστοιχα για την δεύτερη τοπική δυάδα τα τριμερή DEF και JKL σχετίζονται με περιστροφή 176.29° και ο αντίστοιχος πίνακας περιστροφής είναι Η εικόνα που περιγράφει τα παραπάνω είναι η 3-34.

$$R = \begin{pmatrix} 0.586 & 0.607 & 0.537 \\ 0.644 & -0.751 & 0.146 \\ 0.492 & 0.261 & -0.831 \end{pmatrix}$$

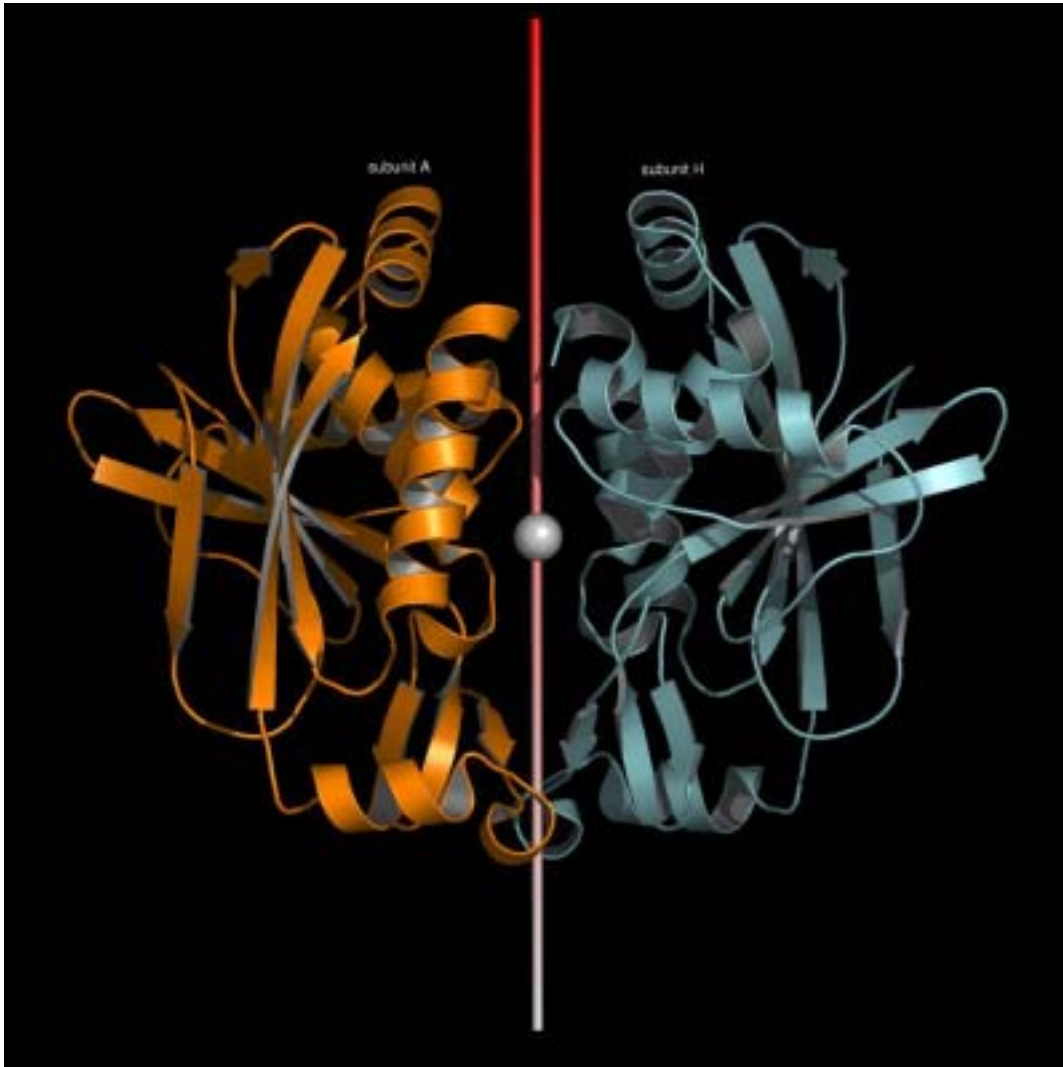


Εικόνα 3- 34 Η τοπική δυάδα DEF και JKL. Οι ισοδύναμες υπομονάδες φέρουν τον ίδιο χρωματισμό.

Εκτός από τους δύο παραπάνω αναφερθέντες άξονες υπάρχει και ένας τρίτος ο οποίος σχηματίζεται μεταξύ της υπομονάδος A του τριμερούς ABC και της υπομονάδος H του τριμερούς GHI το οποίο δημιουργείται από την επιτρεπτή πράξη μετάθεσης 0,0,-1. Η ιδιαιτερότητα με την περίπτωση αυτή είναι ότι ο άξονας αυτός διέρχεται από την θέση δέσμευσης ενός κατιόντος ασβεστίου το οποίο συγκρατείται μέσω χηλικού συμπλόκου μεταξύ των δύο πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Ο πίνακας περιστροφής που ορίζει αυτόν τον άξονα είναι

$$R = \begin{pmatrix} 0.662 & 6.491 & 6.567 \\ 0.487 & -0.856 & 0.173 \\ 0.570 & 0.161 & -0.806 \end{pmatrix}$$

ο οποίος αντιστοιχεί σε μία γωνία 179.62° . Στην εικόνα 3-35 φαίνεται ο άξονας καθώς και το ιόν ασβεστίου για καλύτερη εποπτεία.



Εικόνα 3- 35 Η τοπική δυάδα A και H (0,0,-1) . Το ιόν ασβεστίου παριστάνεται με λευκή σφαίρα

3.6.8 Τα κατιόντα ασβεστίου

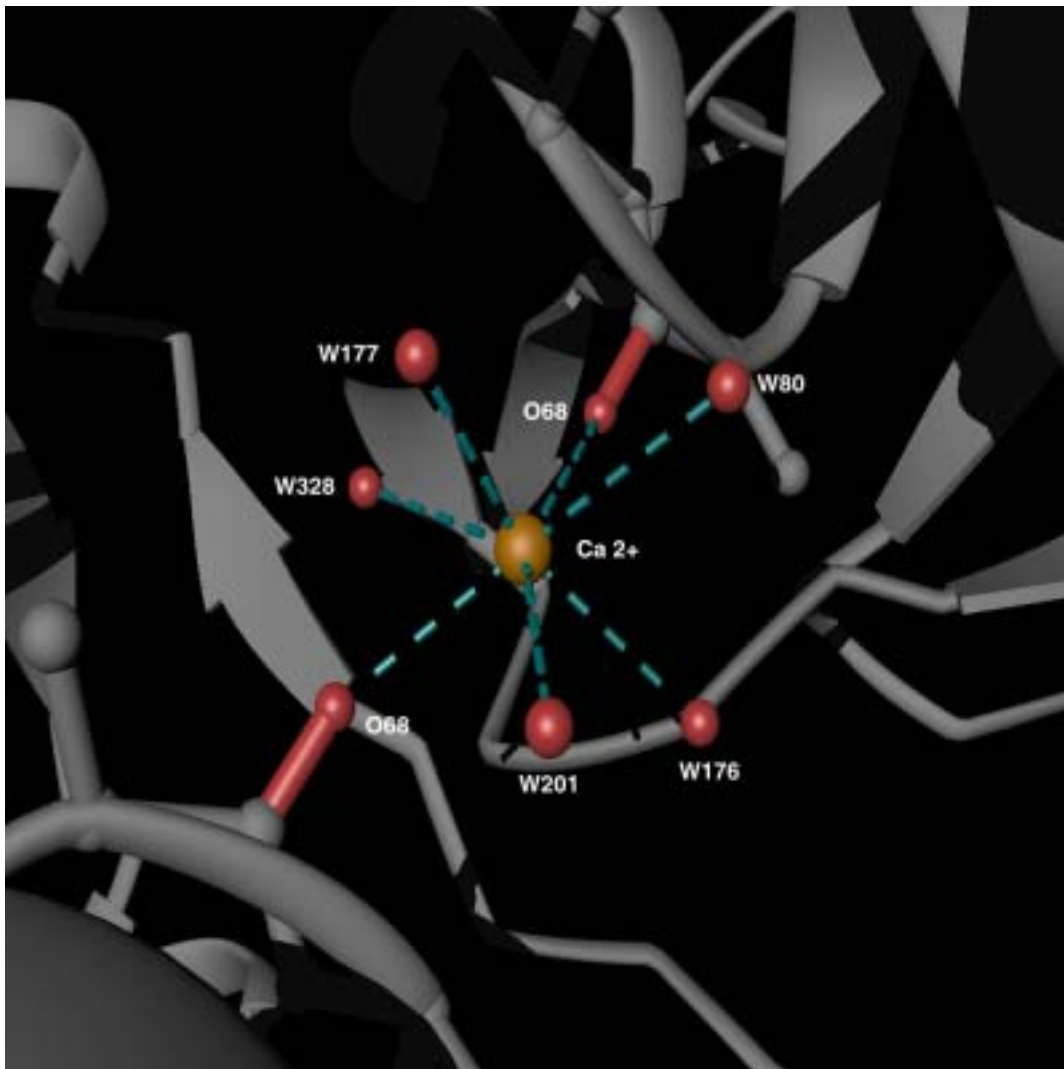
Όπως έχει αναφερθεί στο τμήμα των υλικών και μεθόδων για την επιτυχή κρυστάλλωση της CaT_I είναι απαραίτητη η ύπαρξη στο μητρικό υγρό κρυστάλλωσης κατιόντων Ca^{+2} σε τελική συγκέντρωση από 80-150mM. Από την ήδη γνωστή δομή της CaT_{III} είναι ήδη γνωστό ότι για την κρυστάλλωση της χρησιμοποιήθηκε χλωριούχο εξαμινικό κοβάλτιο το οποίο δεσμεύεται σε μια πρωτεύουσα και δύο δευτερεύουσες θέσεις στο κρυσταλλικό πλέγμα. Αντίστοιχα στην περίπτωση της CaT_I το κατιόν του Ca^{+2} δεσμεύεται σε συγκεκριμένη θέση στο κρυσταλλικό πλέγμα. Αν και συνήθως η γεωμετρία των συμπλόκων του ασβεστίου είναι τετραγωνική δι-πυραμίδα με 6 υποκατάστατες (τέσσερις στο ίδιο επίπεδο και δύο αξονικούς) εντούτοις εμφανίζεται και με αριθμό υποκατάστασης 7 υιοθετώντας μορφή περίπου πενταγωνικής δι-πυραμίδας. Στην προκειμένη περίπτωση η γεωμετρία είναι η δεύτερη και οι υποκαταστάτες του ασβεστίου είναι άτομα της κύριας αλυσίδας της A υπομονάδας καθώς και της υπομονάδας H που δημιουργείται με μετάθεση (0,0,-1C) και μόρια νερού τα οποία έχουν μοντελοποιηθεί επιτόπου στην ηλεκτρονική πυκνότητα καθώς και μόρια νερού που δημιουργούνται μέσω της αυτής πράξεως συμμετρίας. Ο πίνακας 2-26 περιγράφει του υποκαταστάτες και τις αποστάσεις τους από το κατιόν ασβεστίου. Οι γωνίες μεταξύ των υποκαταστατών είναι μεταξύ των προβλεπομένων ορίων δηλαδή περίπου 72^0 (πίνακας 3-27). Πληροφορίες για τις γωνίες δίδονται στον ακόλουθο πίνακα. Η εικόνα 3-36 παριστά την θέση δέσμευσης του κατιόντος ασβεστίου.

Πίνακας 3-26 Οι επτά υποκαταστάτες του ιόντος ασβεστίου με τις αποστάσεις του από το ιόν.Μ ε αστερίσκο σημειώνονται άτομα που δημιουργούνται από την πράξη συμμετρίας 0,0,-C

Κατιόν	Υποκαταστάτες	Απόσταση
Ca^{2+}	Asn68A O	2.37
	Asn68H O*	2.53
	Wat800	2.6
	Wat3280	2.69
	Wat1770	2.21
	Wat1760*	2.43
	Wat2010*	2.61

Πίνακας 3-27 Οι γωνίες που σχηματίζουν οι υποκαταστάτες με το ιόν

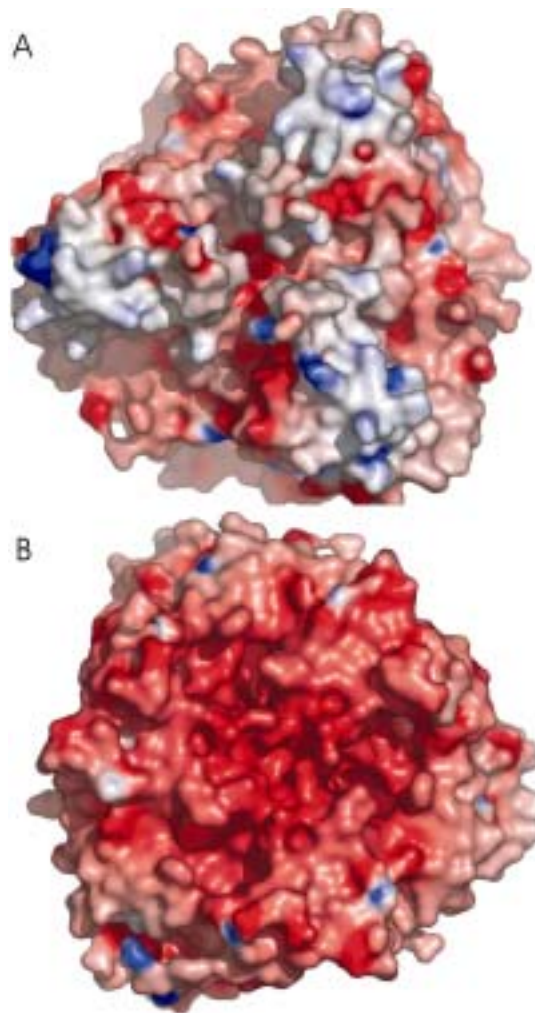
Υποκαταστάτης 1	Ιόν Ca^{2+}	Υποκαταστάτης 2	Γωνία ($^{\circ}$)
O201	Ca	O177	79.11
O276	Ca	O201	72.43
O80	Ca	O176	73.76
O177	Ca	O80	77.00
O328	Ca	O177	85.00
O201	Ca	CO68	72.70
O328	Ca	CO68	67.18



Εικόνα 3- 36 Το ιόν ασβεστίου συνδεδεμένο με τους υποκαταστάτες. Η κύρια αλυσίδα αναπαριστάται σαν μοντέλο κορδέλας. Οι κόκκινες σφαίρες αναπαριστούν μόρια νερού.(W177,W328,W201,W176,W80). Τα άτομα O68 είναι τα καρβονυλικά οξυγόνα των καταλοίπων Asn68A και Asn68H. Με διακεκομμένες γραμμές οι δεσμοί στο σύμπλοκο.Η εικόνα είναι δοσμένη με προοπτική για καλύτερη εποπτεία

3.6.9 Κατανομή ηλεκτροστατικού φορτίου.

Αν και οι υπολογισμοί του καθαρού ηλεκτροστατικού πεδίου ενός πολυπεπτιδίου δεν έχουν ιδιαίτερη αξία αφού γίνονται *in silico* και ουσιαστικά αποτελούν προσομοίωση στην οποία δεν λαμβάνεται υπόψη του πραγματικό περιβάλλον της πρωτεΐνης εντούτοις για την πληρότητα του θέματός μια τέτοια ανάλυση δεν μπορεί να απουσιάζει από μια κρυσταλλογραφική ανάλυση. Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται η χαρτογράφηση του ηλεκτρικού φορτίου πάνω στην μοριακή επιφάνεια για ένα τριμερές. Ο υπολογισμός του φορτίου γίνεται με επίλυση ενός συστήματος Poisson-Boltzman. Από το υπολογισμό προκύπτει μια ανισοκατανομή του φορτίου στις δύο πλευρές του μορίου.



Εικόνα 3- 37. Η κατανομή του ηλεκτροστατικού φορτίου. Ο υπολογισμός του φορτίου έγινε με το πρόγραμμα GRASP. Α)Κορυφαία όψη του τριμερούς Β) Εδρική όψη του τριμερούς

Η βασική πλευρά του μορίου κυριαρχείται από αρνητικά φορτία σε αντίθεση με την κορυφαία η οποία έχει έντονα διακριτές νησίδες μη φορτισμένων καταλοίπων και τοπική συσσώρευση θετικών φορτίων.

3.6.10 Το μόριο του αναστολέα

Μετά το πέρας της βελτιστοποίησης του μοριακού μοντέλου, κρίθηκε αναγκαία η εκτέλεση ενός ακόμα ελέγχου. Στην φάση αυτή αφαιρέθηκε κάθε πληροφορία για το μοντέλο του αναστολέα και το εναπομείναν μοντέλο χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό ενός χάρτη παράλειψης (omit map). Αν τα δεδομένα πράγματι περιέχουν δομική πληροφορία για τον αναστολέα τότε περιμένουμε ο χάρτης να δείξει μη ερμηνευμένη ηλεκτρονική πυκνότητα στο ενεργό κέντρο. Πράγματι ηλεκτρονική πυκνότητα στα 3.0σ πάνω από το μέσο όρο εμφανίζεται να διαγράφει την θέση του αναστολέα.

3.6.11 Το ενεργό κέντρο της CAT_I και ο τρόπος δέσμευσης του φουσιδικού οξέος

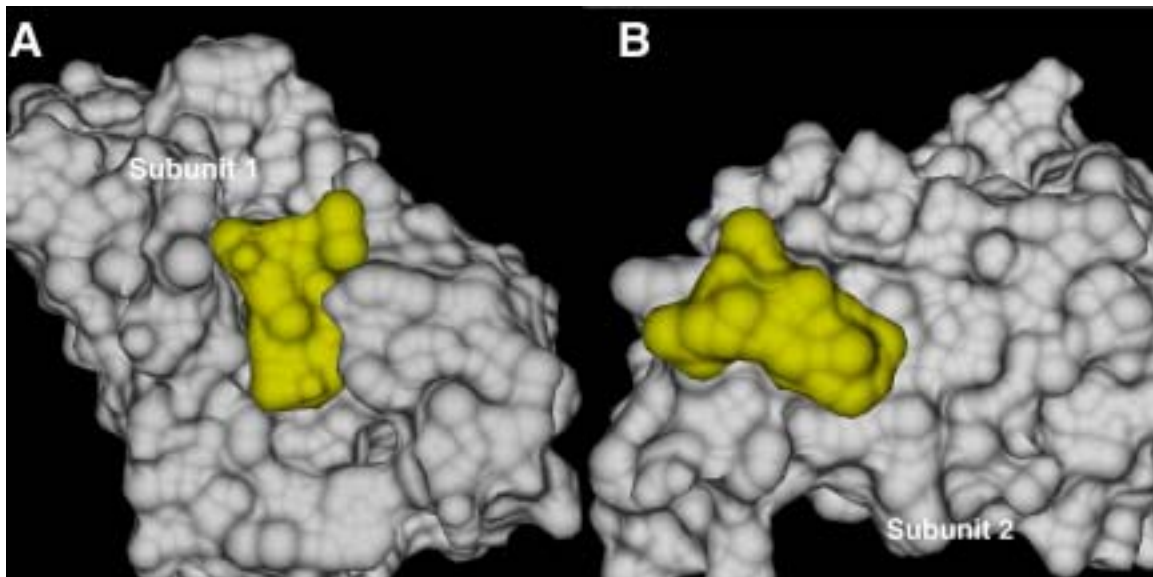
Το ενεργό κέντρο της CAT_I έχει την μορφή μιας μακριάς σήραγγας η είσοδος βρίσκεται στην βασική πλευρά του μορίου και η οποία σχηματίζεται από την αλληλεπίδραση αμινοξικών καταλοίπων τα οποία ανήκουν σε γειτονικές πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Για τον σχηματισμό ενός ενεργού κέντρου απαιτείται η αλληλεπίδραση δύο αλυσίδων και αφού το βιολογικά ενεργό μόριο της CAT_I είναι ένα τριμερές συνεπάγεται ότι υπάρχουν τρία διαφορετικά ενεργά κέντρα σε κάθε τριμερές τα οποία είναι διακριτά και στο χώρο με την έννοια ότι δεν σχετίζονται το ένα με το άλλο (απόσταση ενεργών κέντρων 18 Å) αλλά και ως προς την καταλυτική δραστηριότητα αφού μπορούν το κάθε ένα να δρά ανεξάρτητα από το άλλο. Τα κατάλοιπα που συμμετέχουν στον σχηματισμό του ενεργού κέντρου φαίνονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 3-28 Τα αμινοξικά κατάλοιπα που συμμετέχουν στο σχηματισμό του ενεργού κέντρου

Υπομονάδα I	Υπομονάδα II
Ala 24	Phe 102
Phe 25	Tyr 133
Ser 26	Phe 144
Ala 29	Phe 156
Cys 31	Phe 158
Tyr 33	Val 160
His 193	Phe 166

Υπομονάδα I	Υπομονάδα II
	Val 170

Από τις δύο γειτονικές αλυσίδες που απαιτούνται για το σχηματισμό ενός ενεργού κέντρου φαίνεται ότι ο ρόλος της κάθε μίας από αυτές είναι διακριτός και έτσι η μία αλυσίδα προσφέρει ουσιαστικά τις απαραίτητες επιφάνειες για την αλληλεπίδραση του υποστρώματος με το ένζυμο ενώ η άλλη συνεισφέρει το καταλυτικά ενεργό αμινοξύ που είναι η His193. Όπως φαίνεται και στο ακόλουθο σχήμα στο οποίο το πρωτεϊνικό μόριο απεικονίζεται ως μοριακή επιφάνεια η μία αλυσίδα δημιουργεί στο ενεργό κέντρο μια κοίλη επιφάνεια στην οποία η μοριακή συμπληρωματικότητα είναι εμφανής ενώ η άλλη απλά εφαρμόζει σαν σκέπασμα για να φέρει δύο πολικά κατάλοιπα για τα οποία θα αναφερθούμε αναλυτικά παρακάτω σε κατάλληλη θέση.

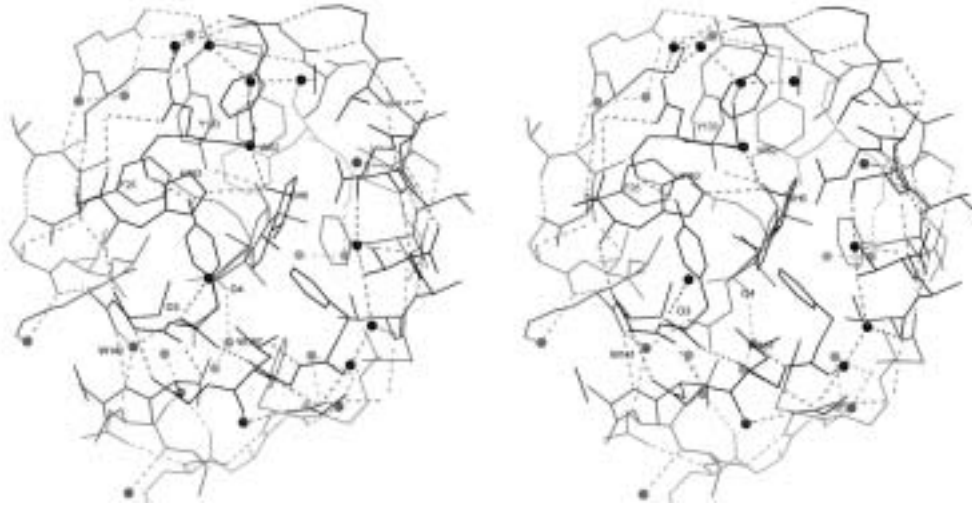


Εικόνα 3- 38 Μοριακή επιφάνεια του ενεργού κέντρου. Με κίτρινο φαίνεται το μόριο του αναστολέα. Με γκρι φαίνεται η πολυπεπτιδική αλυσίδα. Η μία αλυσίδα δημιουργεί στο ενεργό κέντρο μια κοίλη επιφάνεια στην οποία η μοριακή συμπληρωματικότητα είναι εμφανής ενώ η άλλη απλά εφαρμόζει σαν σκέπασμα . Η μοριακή επιφάνεια έχει υπολογιστεί με το λογισμικό MSMS

Η πλειονότητα των αμινοξέων τα οποία απαρτίζουν το ενεργό κέντρο είναι μη πολικά αρωματικά ή αλειφατικά δημιουργώντας έτσι ένα αρκετά υδρόφοβο περιβάλλον για την δέσμευση του υποστρώματος. Από το σύνολο των αμινοξέων που συμμετέχουν μόνο 3 αμινοξέα που συμμετέχουν στην δέσμευση του υποστρώματος είναι πολικά. Αυτά είναι η His193 η Tyr133 και η Cys31. Εκτός από τις πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων στον σχηματισμό του ενεργού κέντρου συμμετέχουν και διατεταγμένα μόρια νερού τα οποία

μπορούν να εντοπιστούν σε χάρτες διαφορών τόσο στην σύμπλοκο μορφή του ενζύμου με το φουσιδικό οξύ όσο και στην αποενζυμική μορφή. Η δέσμευση του φουσιδικού οξέος διευκολύνεται μέσω μη πολικών αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ της εκτεταμένης υδρόφοβης επιφάνειας των δακτυλίων του και των πλευρικών ομάδων που προβάλλουν μέσα στο ενεργό κέντρο. Οι υδρογονοδεσμοί που σχηματίζονται μεταξύ του αναστολέα φουσιδικού οξέος και του ενζύμου είναι:

- Ο υδρογονικός δεσμός που σχηματίζεται μεταξύ της OH6 ομάδας του φουσιδικού με το NE2 άτομο της His193.
- Ο υδρογονικός δεσμός που σχηματίζεται μεταξύ του μορίου νερού W62 με την OH6 ομάδα του φουσιδικού οξέος.
- Ο υδρογονικός δεσμός μεταξύ της OH ομάδας της Tyr133 και της OH1 ομάδας του φουσιδικού οξέος.
- Ο υδρογονικός δεσμός που σχηματίζεται με το καρβοξυλικό οξυγόνο O4 του φουσιδικού οξέος και του μορίου νερού W157.
- Ο υδρογονικός δεσμός που σχηματίζεται μεταξύ του εστερικού καρβονυλικού οξυγόνου O3 του φουσιδικού οξέος και το μορίου νερού W141. Το σύστημα των δύο ατόμων σταθεροποιείται μέσω δευτερευόντων υδρογονικών δεσμών που σχηματίζονται με το W141 και τα άτομα N162 (άζωτο κύριας αλυσίδας), N161 (άζωτο κύριας αλυσίδας) και O160 (οξυγόνο κύριας αλυσίδας).
- Υδρογονικός δεσμός σχηματίζεται μεταξύ του N ατόμου της H193 με το C=O άτομο της C31.



Εικ 3-39 Στερεοδιάγραμμα του ενεργού κέντρου. Με στικτές γραμμές συμβολίζονται οι υδρογονικοί δεσμοί. Σημειώνονται τα κατάλοιπα που συμμετέχουν στις πολικές αλληλεπιδράσεις

Από την ανάλυση των συντεταγμένων του μορίου βρέθηκε ότι το καταλυτικό κατάλοιπο H193 έχει συγκεκριμένη διαμόρφωση με διεδρες γωνίες $\phi = -60.6^\circ$, $\psi = -23.7^\circ$ και η πλευρική ομάδα του καταλοίπου είναι σε τέτοια ταυτομερική διαμόρφωση έτσι ώστε το Ne2 άτομο της ιστιδίνης να έρχεται σε αλληλεπίδραση με το OH6 άτομο του φουσιδικού οξέος. Ο ιμιδαζολικός δακτύλιος της ιστιδίνης συμμετέχει σε π-αλληλεπίδραση με το βενζολικό δακτύλιο της φαινυλαλανίνης 25 πράγμα το οποίο συμβάλει στην σταθεροποίηση της δέσμευσης του φουσιδικού οξέος. Από προσεκτικότερη ανάλυση όμως γίνεται φανερό ότι αυτή η αλληλεπίδραση δεν είναι υπεύθυνη για την συγκεκριμένη ταυτομερική μορφή της ιστιδίνης. Αυτή οφείλεται στην δημιουργία ενός ενδοαμινοξικού υδρογονοδεσμού μεταξύ του Nδ1 ατόμου του ιμιδαζολικού δακτυλίου και του πεπτιδικού αζώτου του ίδιου αμινοξέος (απόσταση 2.99Å).

Υπέρθωση της συμπλόκου και αποενζυμικής μορφής του ενζύμου δεν επιδεικνύει σημαντικές αποκλίσεις μεταξύ των δύο μορφών. Η rms απόκλιση για όλα τα άτομα είναι 0.258 Å η οποία είναι στην ίδια τάξης μεγέθους με το αναμενόμενο σφάλμα των ατομικών συντεταγμένων. Έτσι δεν μπορούμε να μιλήσουμε για μηχανισμό αλλοστερικής δέσμευσης ή επαγόμενης προσαρμογής του υποστρώματος γεγονός το οποίο συμφωνεί με την υπάρχουσα βιβλιογραφία.

3.6.12 Τα μόρια του διαλύτη

Μέχρι εδώ δεν έχουμε μιλήσει για τα μόρια του νερού τα οποία συμμετέχουν στην δομή της CAT_I. Ο διαλύτης δεν είναι κάτι το στατικό αλλά μεταβάλεται επηρεάζοντας τις ιδιότητες του κρυστάλλου. Όμως κάθε πρωτεΐνη διαθέτει ένα αριθμό μορίων νερού τα οποία είναι διατεταγμένα και συγκρατούνται με υδρογονικούς δεσμούς τα οποία αποτελούν συστατικό της δομής. Κατά την διάρκεια του προσδιορισμού της δομής της CAT_I προσπαθήσαμε να είμαστε φειδωλοί με την προσθήκη μορίων διαλύτη και αυτό γιατί σε διακριτικότητες που δεν πλησιάζουν την ατομική λεπτομέρεια (<1.8Å) η ηλεκτρονική πυκνότητα έχει περιοχές οι οποίες μπορούν να ερμηνευτούν ως μόρια νερού, αλλά υπερερμηνεία του οδηγεί σε ένα μοντέλο το οποίο δεν ανταποκρίνεται στην πραγματικότητα. Αυτό παλαιότερα ήταν συνηθισμένη πρακτική αφού προσθήκη μορίων νερού έχει την τάση να χαμηλώνει τον κρυσταλλογραφικό R παράγοντα. Αυτό όμως όταν δεν συμβαδίζει με την πολλαπλότητα και την πληρότητα των δεδομένων έχει σαν αποτέλεσμα ο ελεύθερος R_{free} να αυξάνει. Μετά την εισαγωγή του ελεύθερου συντελεστή αξιοπιστίας σαν μέτρο της πιστότητας των πρωτεϊνικών μοντέλων (Brunger 1992) πολλές από τις δομές που είχαν κατατεθεί στην PDB βρέθηκαν να είναι υπερερμηνευμένες σε σχέση με τα πειραματικά δεδομένο.

Αυτό δεν συμβαίνει στην CAT_I. Επιλέξαμε να συμπεριλάβουμε σχετικά μικρό αριθμό μορίων διαλύτη (236 μόρια νερού στην αποενζυμική δομή και 619 στην σύμπλοκο δομή) κρατώντας των R και των R_{free} σε χαμηλά αποδεκτά επίπεδα (19.9% και 28.1% για το αποένζυμο και 19.5% και 26.3% για το σύμπλοκο αντίστοιχα), τα οποία για δομή αυτού του μεγέθους είναι ικανοποιητικά.

3.6.13 Αρχεία συντεταγμένων

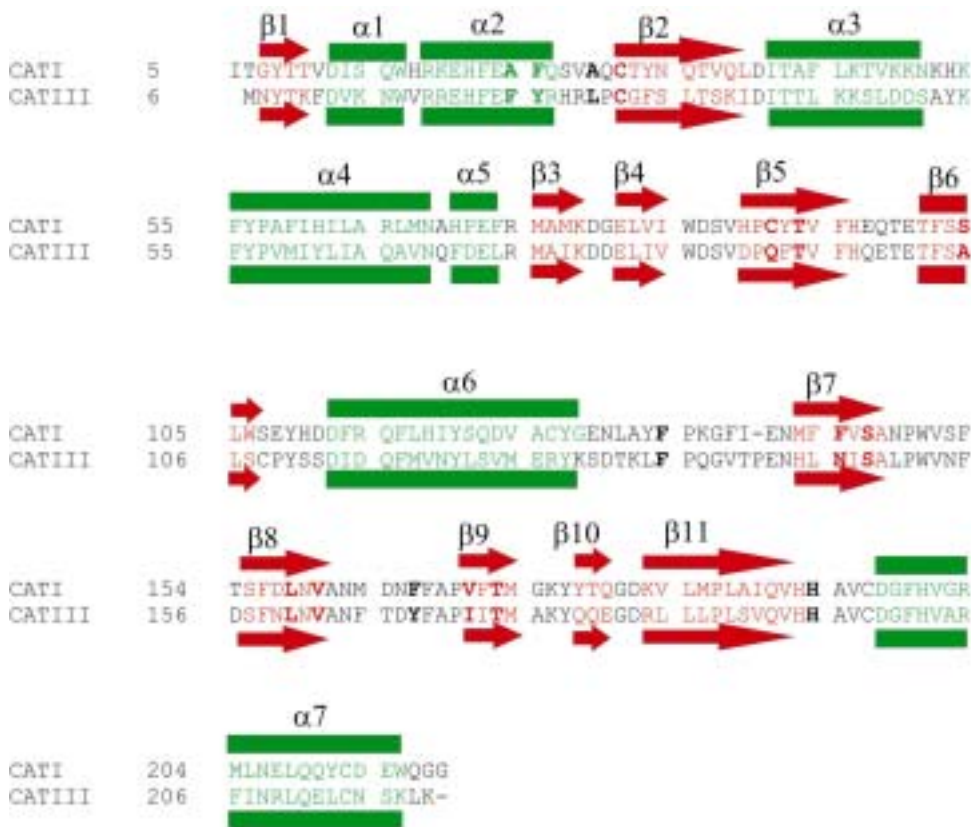
Τα αρχεία συντεταγμένων έχουν κατατεθεί στην *Protein Data Bank* (www.rcsb.org/pdb) και έχουν τους κωδικούς **1PD5** (αποένζυμο) και **1Q23** (σύμπλοκο) αφού ελέγχθησαν και έγιναν αποδεκτά από την βάση δεδομένων. Οι συντεταγμένες θα είναι διαθέσιμες για το κοινό μετά την έκδοση της σχετικής δημοσίευσης (σε προετοιμασία).

4 Συζήτηση - Συμπεράσματα

4.1 Συγκριτική ανάλυση της δομής της CAT_I με την CAT_{III}

4.1.1 Σύγκριση της δομής της CAT_I με την δομή της αγρίου τύπου CAT_{III}

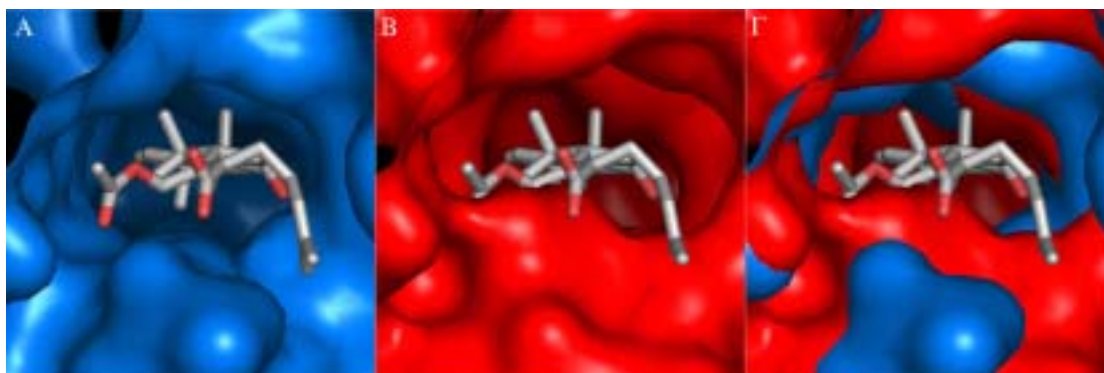
Όπως έχει ήδη αναφερθεί αρκετές φορές η CAT_I και η CAT_{III} εμφανίζουν μεγάλο βαθμό ταυτότητας σε επίπεδο πρωτοταγούς δομής (46%) και υψηλό βαθμό ομολογίας. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα η συνολική διαμόρφωση των δύο ενζύμων και σε επίπεδο μονομερούς αλλά και σε επίπεδο τριμερούς να είναι όμοια. Ετσι μια λεπτομερής σύγκριση των δομικών στοιχείων των δύο μορίων δεν είναι απαραίτητη.



Εικ 4-1 Δομική στοιχίση μεταξύ CAT_I και CAT_{III}. Με πράσινο χρώμα σημειώνονται οι α έλικες και με κόκκινο οι β κλώνοι. Η ονομασία των στοιχείων της δευτεροταγούς δομής ανήκει στην CAT_I.

Το ενδιαφέρον σημείο στην σύγκριση μεταξύ των δύο μορίων δεν είναι οι συνολική τους ομοιότητα αλλά εκείνες οι διαφορές που εντοπίζονται σε ατομικό επίπεδο και είναι

υπεύθυνες για την διαφορά που παρουσιάζουν τα δύο ένζυμα τόσο στην συγγένεια για το φυσικό υπόστρωμα που είναι η χλωραμφενικόλη, όσο και για την ευρύτερη μοριακή επιλεκτικότητα που παρουσιάζει η CAT_I σε αντίθεση με την CAT_{III}. Πρέπει εδώ να ξαναθυμίσουμε ότι η CAT_I εκτός από τη χλωραμφενικόλη είναι σε θέση να δεσμεύει και το φουσιδικό οξύ, ενώ επίσης δεσμεύει και χρωστικές. Και στα δύο μόρια το κατάλοιπο που είναι υπεύθυνο για την κατάλυση είναι συντηρημένο (His193/His195) και κατέχει την ίδια σχετική θέση μέσα στο ενεργό κέντρο. Παρόλα αυτά αλλαγές που λαμβάνουν χώρα σε άλλα κατάλοιπα που συμμετέχουν στο σχηματισμό του ενεργού κέντρου δημιουργούν ένα σχετικά διαφορετικό μοριακό περιβάλλον για την δέσμευση του υποστρώματος. Συνολικά οι αλλαγές που παρουσιάζονται στα κατάλοιπα του ενεργού κέντρου έχουν σαν αποτέλεσμα το ενεργό κέντρο της CAT_I να εμφανίζεται μεγαλύτερο σε όγκο από εκείνο της CAT_{III}. Αυτό φαίνεται και στην εικόνα 4-2.

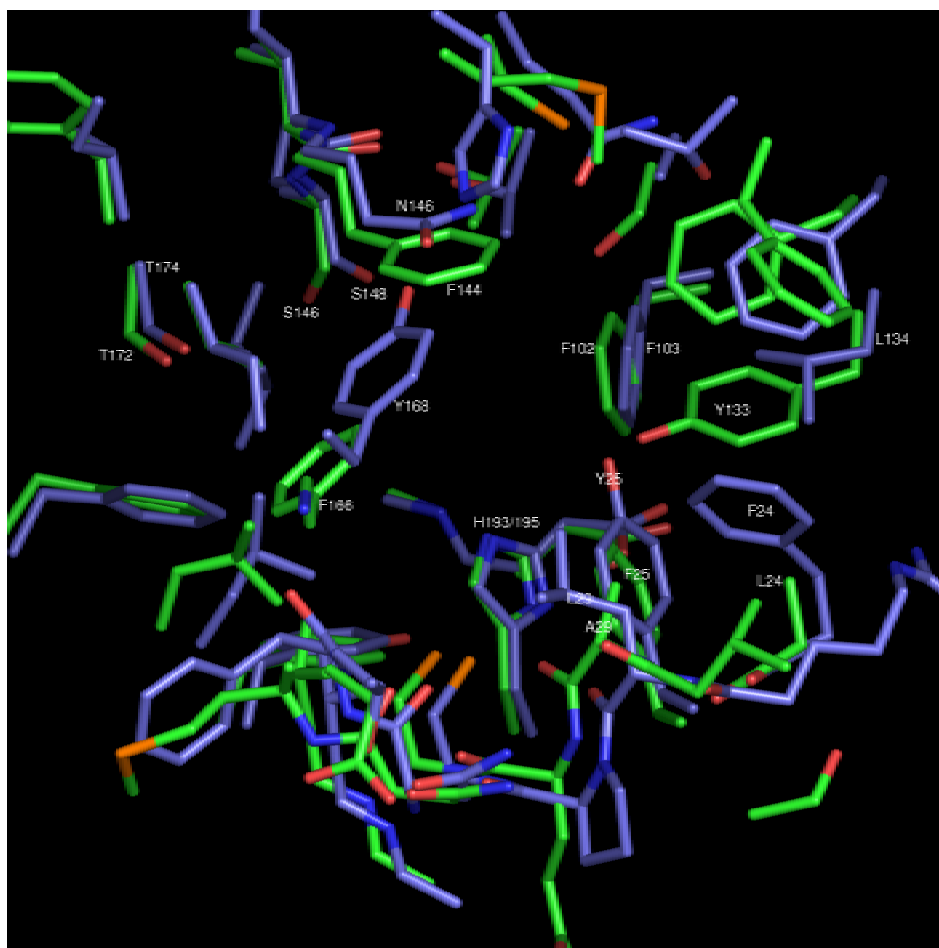


Εικ 4-2 Απεικόνιση της κοιλότητας του ενεργού κέντρου (άποψη από την είσοδο) με μορφή μοριακής επιφάνειας με το μόριο του αναστολέα με μορφή δεσμών. **A)** Ενεργό κέντρο της CAT_I **B)** Ενεργό κέντρο της CAT_{III} **Γ)** Υπερθεση των δύο ενεργών κέντρων. Εύκολα γίνεται κατανοητό ότι η διαφορά σε επίπεδο αμινοξέων μεταφράζεται σε διαφορά στην εκτεθειμένη μοριακή επιφάνεια. Το ενεργό κέντρο της CAT_{III} είναι μικρότερο και δεν επιτρέπει την είσοδο του φουσιδικού οξέος το οποίο συναντά στερεοχημική παρεμπόδιση

Παρόλα αυτά μια λεπτομερέστερη περιγραφή των αλλαγών είναι απαραίτητη για την πληρότητα του θέματος. Έτσι ενώ το καταλυτικό κατάλοιπο His 193 (His195 CAT_{III}) είναι συντηρημένο, παρατηρούμε μια σειρά από αλλαγές οι οποίες είναι:

- Το κατάλοιπο Phe 24 στην CAT_{III} έχει μετατραπεί σε Ala 24. Αυτό αν και εκ πρώτης όψεως είναι μια συντηρητική αλλαγή έχει σαν αποτέλεσμα ,την μείωση της εκτεθειμένης επιφάνειας του καταλοίπου από 161.930 Å² σε 89.413Å² δηλαδή μείωση κατά 72.517 Å².
- Το κατάλοιπο Tyr25 έχει μετατραπεί στην CAT_I σε Phe25, με αποτέλεσμα την μείωση της επιφάνειας από 169.758 Å² σε 157.698 Å².Μείωση κατά 12.06 Å².

- Η αλλαγή της Leu29 σε Ala29 έχει σαν αποτέλεσμα την μείωση της εκτεθειμένης επιφάνειας του καταλοίπου από 135.525 Å² σε 89.659 Å². Αυτή η αλλαγή είναι ιδιαίτερης σημασίας μια και η αλανίνη 29 βρίσκεται στην είσοδο του ενεργού κέντρου της CAT_I και συγκεκριμένα βρίσκεται σχεδόν παράλληλα με το σύστημα των δακτυλίων του αναστολέα και καταλαμβάνει μικρότερο χώρο έτσι ώστε να διευκολύνεται η είσοδος του φουσιδικού οξέος. Αντίθετα η λευκίνη 29 της CAT_{III} είναι μεγαλύτερη και εμποδίζει την είσοδο του ενεργού κέντρου.
- Η αλλαγή της Leu 134 σε Tyr133 στην CAT_I έχει σαν αποτέλεσμα αύξηση της εκτεθειμένης επιφάνειας από 147.044 Å² σε 169.386 Å². Αυτή η αύξηση της επιφάνειας φαίνεται ότι εξυπηρετεί την συνεύρεση της OH ομάδος της Tyr133 και της OH3 ομάδας του φουσιδικού οξέος σε απόστασης υδρογονοδεσμού και η οποία λειτουργεί ως αντιστάθμιση της αλλαγής που περιγράφεται στο 2.

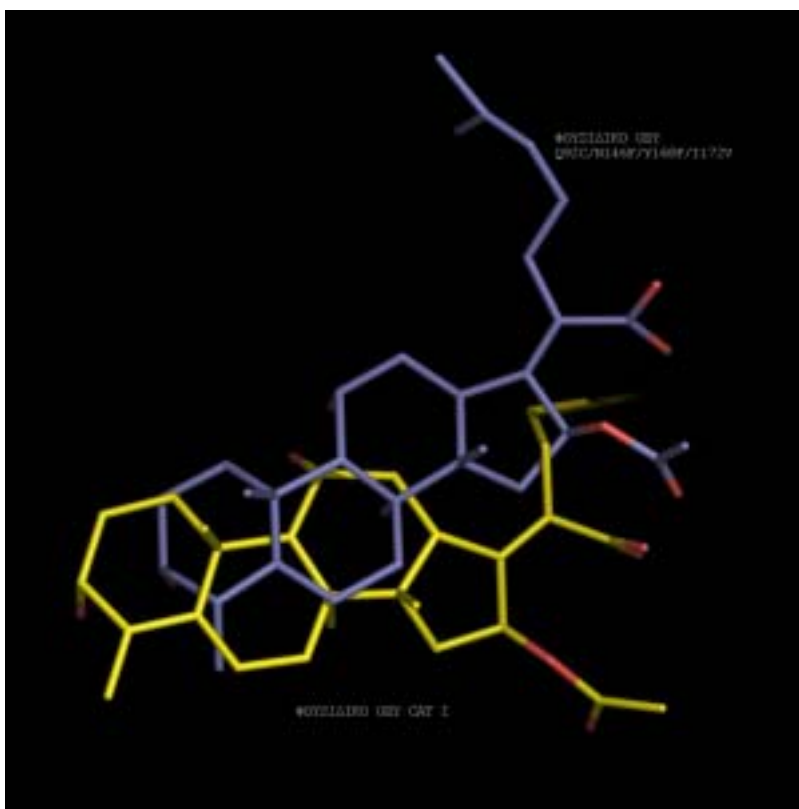


Εικ 4-3 Υπέρθυση των καταλοίπων του ενεργού κέντρου στα δύο ένζυμα. Σημειώνονται τα κατάλοιπα που έχουν υποστεί αλλαγές και η καταλυτική ιστιδίνη (193-195)

4.1.2 Σύγκριση της δομής του συμπλόκου της CAT_I με το φουσιδικό οξύ, με το τετραπλό μετάλλαγμα (Q92C / N146F / Y168F / I172V) της CAT_{III}

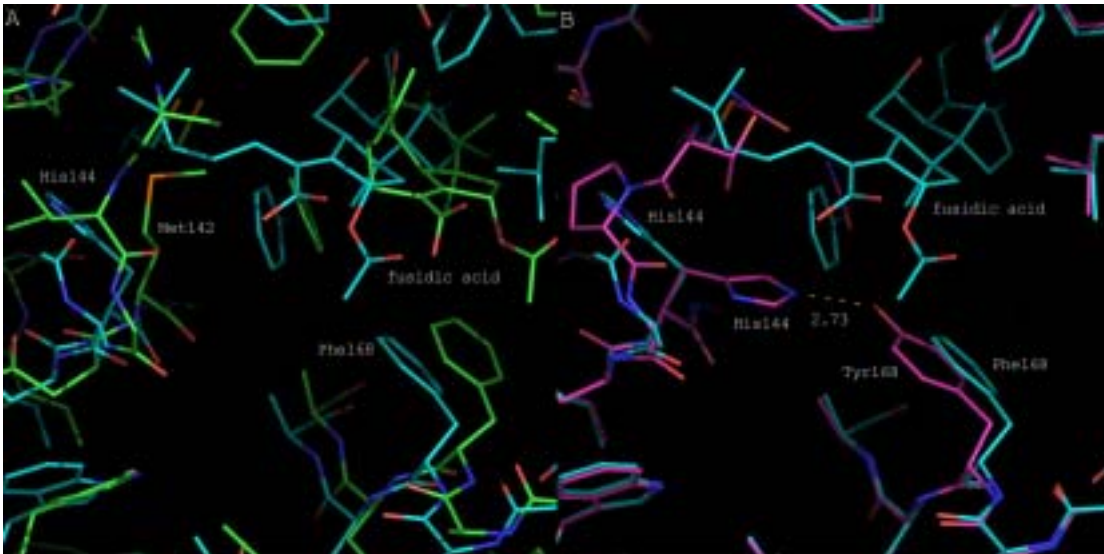
Μετά από αποτυχημένες προσπάθειες για κρυστάλλωση της CAT_I η ομάδα που είχε προσδιορίσει την κρυσταλλική δομή της CAT_{III} αποφάσισε να προχωρήσει σε κατασκευή ενός μεταλλάγματος της CAT_{III} το οποίο θα είχε την ικανότητα να δεσμεύει φουσιδικό οξύ. Το συγκεκριμένο χιμαιρικό μόριο έφερε τέσσερις μεταλλαγές στα κατάλοιπα Glu92, Asn146, Tyr168, Ile172, οι οποίες και αντικαθιστούσαν τα αμινοξέα αυτά με τα αντίστοιχα της CAT_I. Η rms απόκλιση μεταξύ των δύο μορίων είναι 0.94Å. Από την σύγκριση των δύο δομών σε ατομικό επίπεδο μπορούν να εξαχθούν τα ακόλουθα συμπεράσματα:

- Από μια πρώτη παρατήρηση του μοντέλου του μεταλλάγματος φαίνεται ότι ο αναστολέας έχει υποστεί μετάθεση σε σχέση με την θέση του αναστολέα στην τελική δομή του μοντέλου της CAT_I.



Εικ 4-4 Το μόριο του αναστολέα σε υπέρθεση όπως έχει προσδιοριστεί κρυσταλλογραφικά στις δύο δομές. Με κίτρινο χρώμα αναπαρίσταται το μόριο του αναστολέα στην δομή της CAT_I. Με μώβ στην δομή του τετραπλού μεταλλάγματος της CAT_{III}.

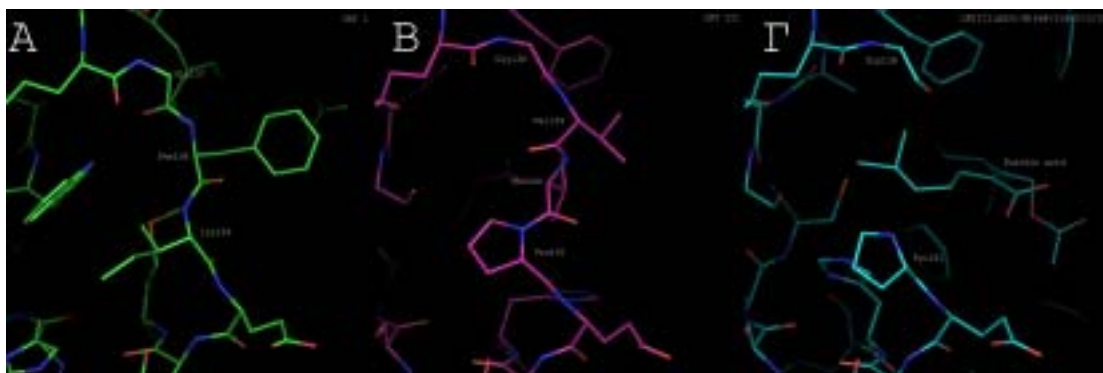
- Αυτή η μετάθεση αντιστοιχεί σε μετακίνηση κατά 1.93 Å στον επιμήκη άξονα του μορίου του αναστολέα και σε μια πλευρική μετακίνηση κατά 3.92 Å, έτσι ώστε το μόριο του αναστολέα να είναι περιστραμμένο σε σχέση με το πραγματικό(εικόνα 4-4).
- Η μεταλλαγή της Gln92 σε Cys δεν φαίνεται να έχει τόσο μεγάλη σημασία στην δέσμευση του αναστολέα αφού βρίσκεται αρκετά μακριά από αυτόν.
- Η μεταλλαγή της Tyr146 έχει σαν αποτέλεσμα η θέση της Phe144 που είναι το δομικό αντίστοιχο της CAT_I να βρίσκεται κοντύτερα στο φουσιδικό οξύ (3.89Å) από ότι η Phe146 (4.11Å).
- Η αλλαγή της Tyr168 σε Phe δεν είναι αρκετά μελετημένη. Αυτό διότι στην δομή της αγρίου τύπου CAT_{III} η Tyr168 έρχεται σε απόσταση υδρογονοδεσμού με την His144(2.73Å) η οποία και σταθεροποιείται. Αλλαγή της τυροσίνης σε φαινυλαλανίνη έχει σαν αποτέλεσμα να αποσταθεροποιηθεί η πλευρική ομάδα της His144 και να κινείται δίδοντας διπλή διαμόρφωση όπως αναφέρεται και στην σχετική βιβλιογραφία (Murray, Cann et al. 1995). Σε αντιδιαστολή με τα παραπάνω στην δομικά αντίστοιχη θέση της CAT_I υπάρχει η Met142 η οποία πιθανά σταθεροποιείται μέσω αλληλεπίδραση με το άζωτο της κύριας αλυσίδας στην θέση 139 (Ile139).



Εικ 4-5 A) υπέρθεση του ενεργού κέντρου των CAT_I (πράσινο) και του μεταλλάγματος της CAT_{III} (κυανό) . B) υπέρθεση του ενεργού κέντρου του μεταλλάγματος της CAT_{III} (κυανό) και της αγρίου τύπου CAT_{III} (ιώδες) . Είναι εμφανής η απώλεια του υδρογονοδεσμού μεταξύ της Tyr168 και της His144 που οδηγεί σε αποσταθεροποίηση της πλευρικής ομάδας της τελευταίας

- Η αλλαγή της Ile172 σε Val απλά φαίνεται να συνεισφέρει στο υδρόφοβο περιβάλλον του ενεργού κέντρου.

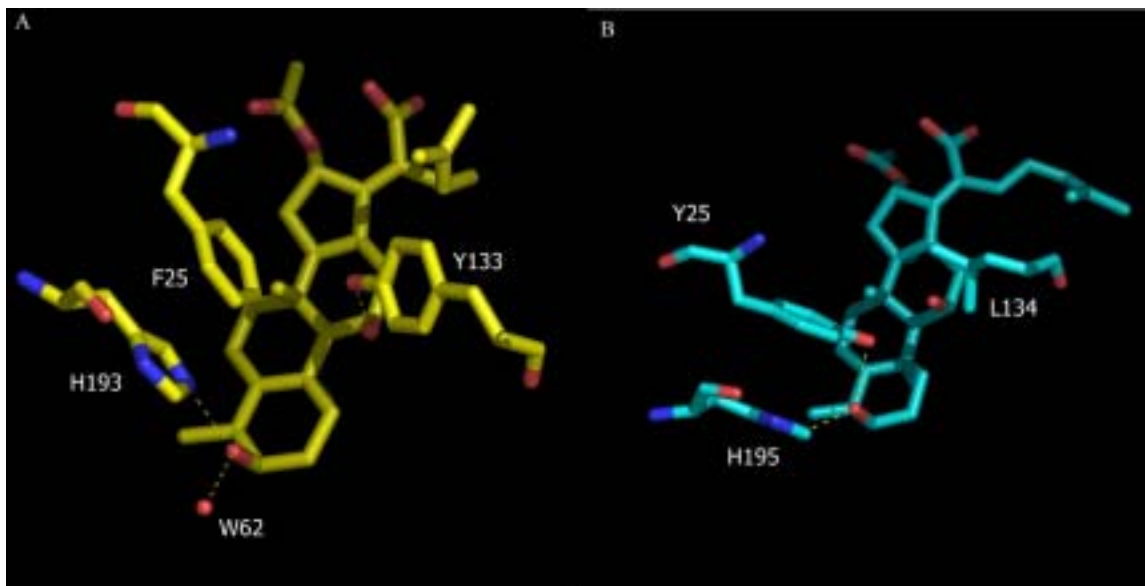
Επιπλέον είναι αξιοσημείωτη μια ακόμα δομική παραμόρφωση που παρουσιάζεται στο μοντέλο του μεταλλάγματος. Στην δομή του αγρίου τύπου της CAT_{III} στις θέσεις 139, 140 και 141 βρίσκονται τα κατάλοιπα Val, Thr και Pro αντίστοιχα. Η ύπαρξη της προλίνης 141 που έχει περιορισμένη τιμή διεδρων γωνιών ουσιαστικά κλειδώνει το ίχνος(trace) της κύριας αλυσίδας. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 4-6 από την στοίχιση των πρωτοταγών δομών της CAT_I και της CAT_{III} δεν υπάρχει αντίστοιχο κατάλοιπο στην CAT I. Αυτή η περιοχή, που ουσιαστικά είναι μια εκτεταμένη λούπα, καλύπτεται στην CAT I από τα κατάλοιπα Gly137 και Phe 138 τα οποία βρίσκονται σε εκτεταμένη διαμόρφωση με διεδρες γωνίες φ-ψ 71.4⁰, -176.4⁰ και -125.6⁰ και 153.6⁰ αντίστοιχα και είναι μια από τις περιοχές που χρειάστηκαν πλήρη μοντελοποίηση κατά τα αρχικά στάδια του προσδιορισμού της δομής. Μετά την ανακατασκευή της περιοχής τα κατάλοιπα αυτά ήταν καλά καθορισμένα και βρίσκονται σχετικά απομακρυσμένα από το μόριο του αναστολέα με μόνη την Phe138 να έρχεται σε χαλαρή αλληλεπίδραση με τον αλειφατικό βραχίονα του φουσιδικού. Στην δομή του μεταλλάγματος τα κατάλοιπα 139 και 140 είναι αποδιαταγμένα και δεν φαίνονται στους χάρτες ηλεκτρονικής πυκνότητας διότι κάνουν στενή επαφή με το μόριο του αναστολέα το οποίο βρίσκεται πιο μπροστά από την κανονική θέση δέσμευσης.



Εικ 4-6 Η επιφανειακή λούπα 138 141. Α) CAT_I Β) αγρίου τύπου CAT_{III} Γ) τετραπλό μετάλλαγμα της CAT_{III}.

Αυτή η παραμόρφωση μπορεί να αποδοθεί στον αριθμό των πολικών αλληλεπιδράσεων που σχηματίζει το μόριο του αναστολέα μέσα στο ενεργό κέντρο. Όπως φαίνεται στην εικόνα 4-7 στο ενεργό κέντρο της CAT_I το μόριο του αναστολέα συγκρατείται με υδρογονικούς δεσμούς μεταξύ του OH6 και του Ne2 ατόμου της ιστιδίνης 193 και του

HOH62 ενώ το OH1 συγκρατείται με υδρογονοκό δεσμό με το OH της Tyr133. Αυτοί οι δεσμοί σε δύο διαφορετικές ομάδες δεν επιτρέπουν πλευρική μετακίνηση του μορίου του αναστολέα. Αντίθετα στην περίπτωση του μεταλλάγματος υπάρχουν δύο υδρογονικοί δεσμοί με το ίδιο άτομο και συγκεκριμένα τα άτομα Ne2 της ιστιδίνης 195 και OH της Tyr25 αλληλεπιδρούν με το OH6 του αναστολέα. Η συγκεκριμένη διάταξη δεσμών επιτρέπει την πλευρική κίνηση του μορίου του αναστολέα που παρατηρείται.



Εικ 4-7 Σύγκριση του τρόπου σχηματισμού υδρογονικών δεσμών μεταξύ της CAT_I και του μεταλλάγματος της CAT_{III}

Αν και το μετάλλαγμα αυτό έχει την ικανότητα να δεσμεύει συναγωνιστικά φουσιδικό οξύ εντούτοις είναι φανερό ότι αυτό γίνεται εφικτό λόγω τυχαίας μετατροπής του ενεργού κέντρου, παρά μέσω εκλογικευμένου ανασχεδιασμού του ενεργού κέντρου, πράγμα το οποίο δεν ήταν δυνατό αφού η τρισδιάστατη δομή της CAT_I παρουσιάζεται στα πλαίσια αυτής της διατριβής. Επιπλέον γίνεται σαφές ότι η μοντελοποίηση με βάση δεδομένα μεταλλαξογένεσης και η εφαρμογή τους σε μια νέα πρωτεΐνη δεν οδηγεί πάντα σε σωστά συμπεράσματα σχετικά με την αναμενόμενη δομή.

4.2 Σύγκριση της CAT I με άλλες γνωστές δομές

Από την σύγκριση της τρισδιάστατης δομής της CAT_I με ολόκληρη την βάση δεδομένων πρωτεϊνικών δομών μέσω του συστήματος **DALI** (Holm 1996) διαπιστώθηκε ότι το δομικό πρότυπο της CAT_I εμφανίζεται και σε άλλες πρωτεΐνες εκτός από την CAT_{III}. Αυτές συνοψίζονται στον πίνακα 4-1

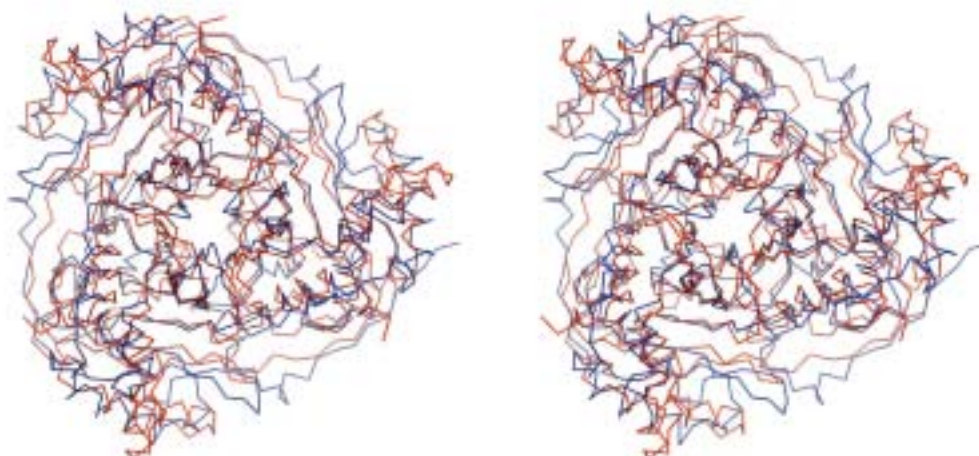
Κωδικός PDB	Z score	RMSD(Å)	Μήκος στοίχισης	Μήκος στόχου	%ταυτότητα	Όνομα και ακρωνύμιο
1eaf	15.5	2.6	172	243	16	Διυδρολιποϊκή τρανσακετυλάση (E2pCD)
1l5a	8.2	3.3	126	424	13	Αμιδική συνθάση (VibH)
1ndb	7.6	3.6	156	576	9	Ακετυλοτρανσφεράση της καρνιτίνης (CRAT)
1ord	4.0	3.6	93	730	5	Αποκαρβοξυλάση της ορνιθίνης

Πίνακας 4-1 Αρχικά αποτελέσμα της στοίχισης που πραγματοποιήθηκε μέσω του συστήματος DALI

Έτσι προχωρήσαμε σε μια λεπτομερέστερη σύγκριση της CAT_I με κάθε μια από αυτές τις πρωτεΐνες.

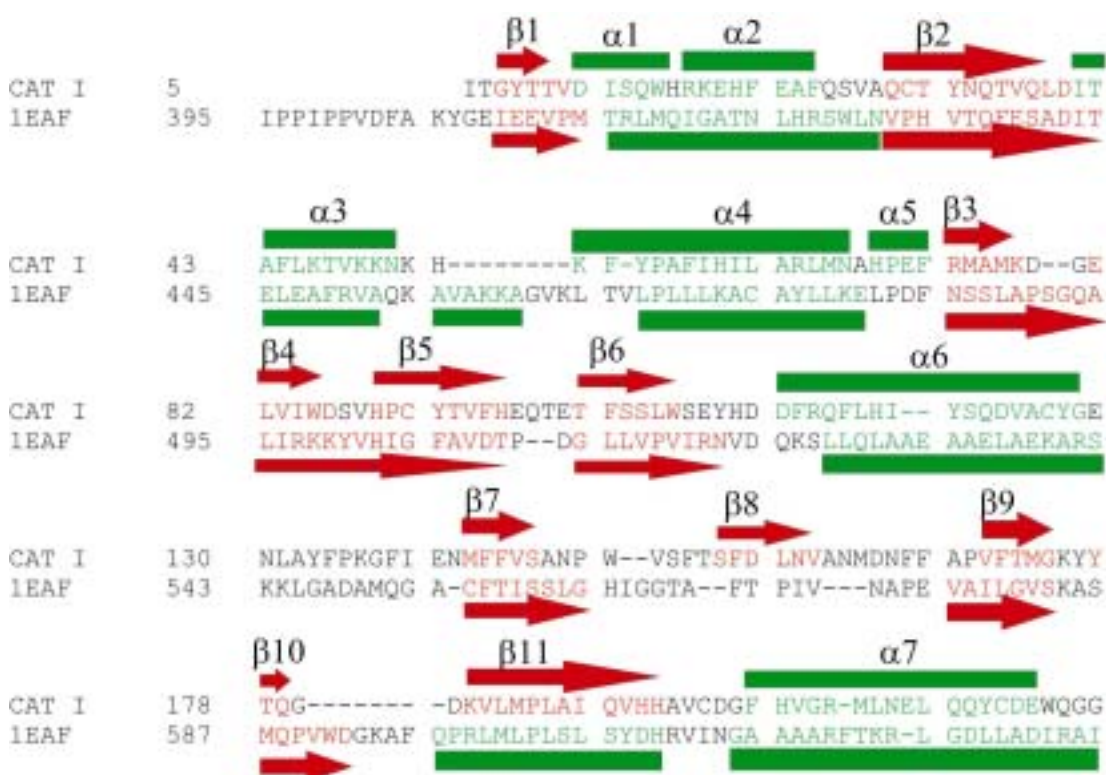
4.2.1 Συγκριτική ανάλυση με την διυδρολιποϊκή τρανσακετυλάση(E2p)

Η διυδρολιποϊκή τρανσακετυλάση είναι το κεντρικό ένζυμο τόσο από βιοχημικής όσο και από δομικής άποψης στο πολυενζυμικό σύμπλεγμα της αφυδρογονάσης του πυροσταφιλικού οξέος. Το ένζυμο καταλύει την αντίδραση παραγωγής ακέτυλο-συνένζυμου Α μεταφέροντας την ενεργοποιημένη ακετυλομάδα από το λιπόϊλο ακέτυλο συνένζυμο στο συνένζυμο Α (CoA). Η κρυσταλλική δομή του καταλυτικού τμήματος του ενζύμου αποτελείται από 2182 άτομα και παρουσιάζει εκτεταμένη δομική ομολογία με την ακετυλοτρανσφεράση της χλωραμφενικόλης τύπου III και I. Το θέμα της δομικής ομοιότητας με την CAT_{III} έχει επανεξεταστεί από τον Mattevi (Mattevi 1992; Mattevi 1993). Στην παρούσα παράγραφο παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της σύγκρισης του ενζύμου αυτού με την CAT_I. Η δομική ομολογία μεταξύ των δύο ενζύμων διαφαίνεται ήδη από το γεγονός ότι και τα δύο είναι τριμερή ένζυμα των οποίων τα μονομερή είναι στενά συνδεδεμένα για να σχηματίσουν το ενεργό κέντρο στην επιφάνεια διεπαφής μεταξύ τους. Όπως φαίνεται από τον πίνακα 4-1 η τιμή του Z για την δομική στοίχιση των δύο ενζύμων είναι αρκετά υψηλή και παρόλο το % ποσοστό των ταυτώσεων αμινοξέων είναι μόλις 16% εντούτοις η υπέρθεση των δύο δομών αποκαλύπτει μια εκπληκτική ομοιότητα (Εικ4-7).



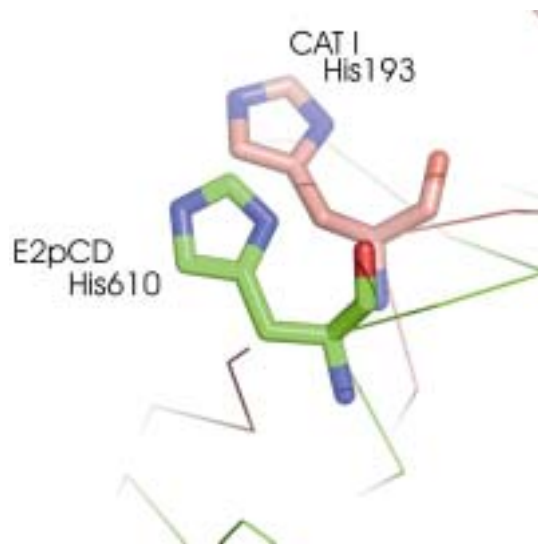
Εικ 4-8 Στερεοδιάγραμμα των δομών της CAT₁ (μπλέ) και της E2pCD (κόκκινο) , σε υπέρθεση.

Στην εικόνα 4-8 παρουσιάζεται μια στοίχιση των πρωτοταγών δομών των δύο πρωτεϊνών η οποία έχει γίνει με βάση τα ισοδύναμα δομικά στοιχεία



Εικ 4-9 Δομική στοίχιση μεταξύ CAT₁ και E2pCD. Με πράσινο χρώμα σημειώνονται οι α-έλικες και με κόκκινο οι β-κλώνοι. Η ονομασία των στοιχείων της δευτεροταγούς δομής ανήκει στην CAT₁.

Από την στοίχιση είναι εμφανές τα δομικά στοιχεία της CAT_I έχουν ισοδύναμα τμήματα στην E2pCD με μοναδική εξαίρεση τον β-κλώνο β11 ο οποίος φαίνεται δομικά να στοιχίζεται με μια α-έλικα. Η r.m.s απόκλιση για την υπέρθεση των δύο μορίων είναι 1.59Å για 490 άτομα της κύριας αλυσίδας. Ιδιαίτερη αναφορά πρέπει να γίνει και στην σχετική ομοιότητα που παρουσιάζουν οι δύο δομές στο ενεργό κέντρο τουλάχιστον όσον αφορά την καταλυτική ιστοδίνη η οποία είναι η His610 στην E2pCD και η His193 στην CAT I. Οι πλευρικές αλυσίδες των δύο αυτών καταλοίπων έρχονται πολύ κοντά στον χώρο κατά την υπέρθεση των δύο δομών και υιοθετούν παρόμοια διαμόρφωση αφού οι γωνίες φ-ψ των δύο καταλοίπων είναι αρκετά κοντά. (His610 φ=-71.2°, ψ=-10.3°, His193 φ=-60.6°, ψ=-23.7°). Η εικόνα 4-9 συνοψίζει τα παραπάνω.



Εικ 4-10 Υπέρθωση των καταλυτικών καταλοίπων στην CAT_I και στην E2pCD

4.2.2 Συγκριτική ανάλυση της CAT I με την μη ριβοσωμική αμιδική συνθετάση

Οι μη ριβοσωμικές αμιδικές συνθετάσες είναι συνήθως μεγάλα πολυενζυμικά συμπλέγματα που συνθέτουν προϊόντα μεγάλης βιολογικής σημασίας τόσο από φαρμακευτική άποψη όσο για τα ίδια τα παραγωγά στελέχη. Η αμιδική συνθάση από το *Vibrio cholerae* είναι μια ελεύθερη αμιδική συνθετάση η οποία καταλύει την σύνθεση της βιμπριοβακτίνης που είναι ένα ιονοφόρο του βακτηρίου (Keating 2002). Παρόλη τη χαμηλή ομολογία σε επίπεδο πρωτοταγούς δομής η αμιδική συνθάση (VibH) παρουσιάζει μια αξιοσημείωτη δομική ομοιότητα με την CAT_I. Αν και η αμιδική συνθάση είναι μονομερές, έχει μια διαμόρφωση ψευδο-διμερούς η οποία και συνεισφέρει στην συνολική δομική ομοιότητα.

Η rms απόκλιση είναι 1.72Å για 372 άτομα της κύριας αλυσίδας. Πάλι όπως και στην περίπτωση της διϋδρολιποϊκής αφυδρογονάσης υπάρχει ένα συντηρημένο κατάλοιπο His που είναι υπεύθυνο για την καταλυτική δραστικότητα.



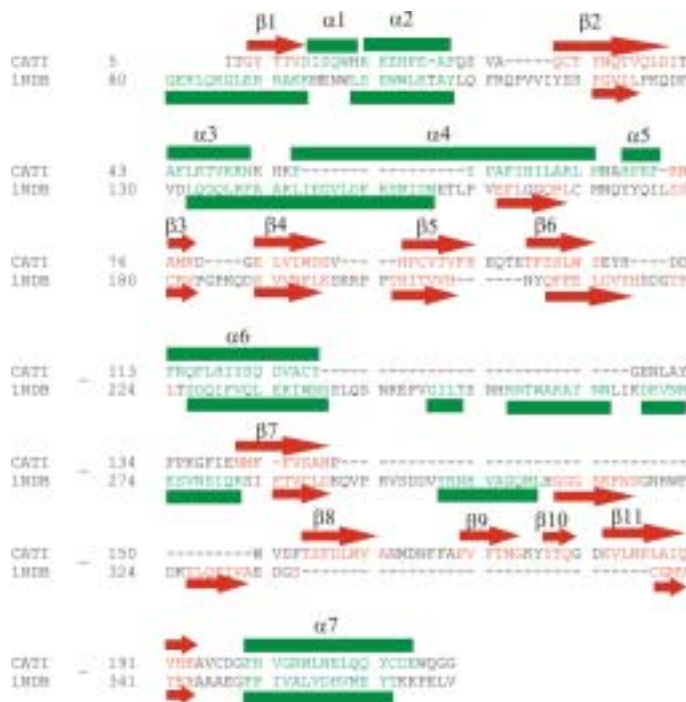
Εικ 4-11 Στοιχισή των στοιχείων δευτεροταγούς δομής σε επίπεδο πρωτοταγούς αλληλουχίας της CAT₁ και της αμιδικής συνθάσης VibH



Εικ 4-12 Στερεοδιάγραμμα των δομών της CAT₁ (μπλέ) και της VibH (κόκκινο) , σε υπέρθεση

4.2.3 Σύγκριση της CAT I με την ακετυλοτρανσφεράση της καρνιτίνης

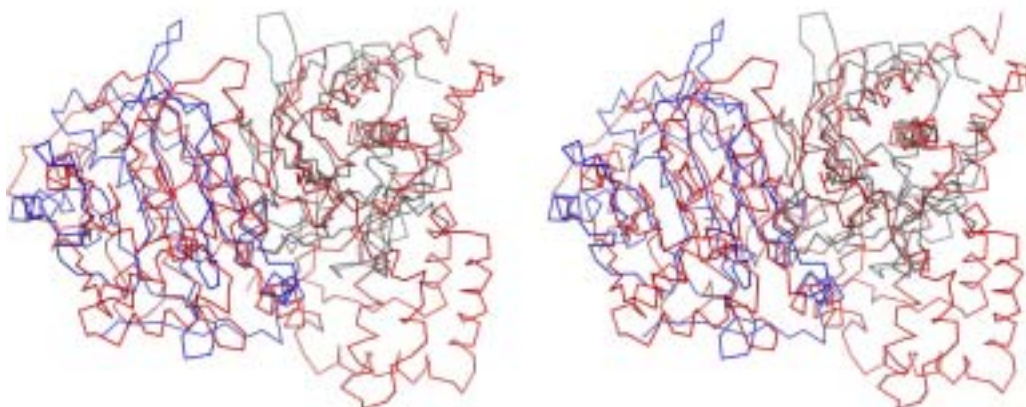
Η ακετυλοτρανσφεράση της καρνιτίνης είναι ένα σημαντικό ένζυμο που συμμετέχει στο μεταβολισμό των λιπαρών οξέων. Συγκεκριμένα συμμετέχει στον σχηματισμό του ενδιάμεσου άκυλο – καρνιτίνιο παράγωγου το οποίο μπορεί να εισέλθει μέσω της μιτοχονδριακής μεμβράνης στο εσωτερικό του μιτοχονδρίου για να υποστεί β-οξειδωση (Jogl 2003). Η τρισδιάστατη δομή της ακετυλοτρανσφεράσης της καρνιτίνης από το *Mus musculus* έχει προσδιοριστεί σε διακριτικότητα 1.80Å με την τεχνική MAD. Η δομή του ενζύμου αποκαλύπτει ένα μόριο με δύο λειτουργικές περιοχές (domains C,N). Αν και η ταυτότητα μεταξύ του ενζύμου αυτού και της CAT I σε επίπεδο πρωτοταγούς δομής είναι μόλις 9% εντούτοις παρουσιάζουν μια αξιόλογη δομική ομοιότητα η οποία μεταφράζεται σε μια rms απόκλιση των ατομικών συντεταγμένων κατά 1.69Å για 579 άτομα της κύριας αλυσίδας.



Εικ 4-13 Στοιχισή των στοιχείων δευτεροταγούς δομής σε επίπεδο πρωτοταγούς αλληλουχίας της CAT I και της ακετυλοτρανσφεράσης της καρνιτίνης

Η δομική ομοιότητα εκτείνεται πέρα από την ομοιότητα σε επίπεδο πολυπεπτιδικού σκελετού. Ποιο συγκεκριμένα όπως και στην περίπτωση της αμιδικής συνθετάσης έτσι και εδώ η οργάνωση του δύο δομικών περιοχών της ακετυλοτρανσφεράσης της καρνιτίνης είναι παρόμοια με δύο γειτονικές υπομονάδες της CAT I οι οποίες στοιχίζονται δομικά στο χώρο με την μία από τις δύο υπομονάδες της ακετυλοτρανσφεράσης της

καρνιτίνης πράγμα το οποίο σημαίνει ότι και εδώ έχουμε την μορφή ενός ψευδο-διμερούς. Όπως γίνεται αντιληπτό υπάρχει μια μεγάλη αντιστοιχία των στοιχείων της δευτεροταγούς δομής μεταξύ των δύο ενζύμων η οποία φαίνεται και στο στερεοδιάγραμμα παρακάτω.



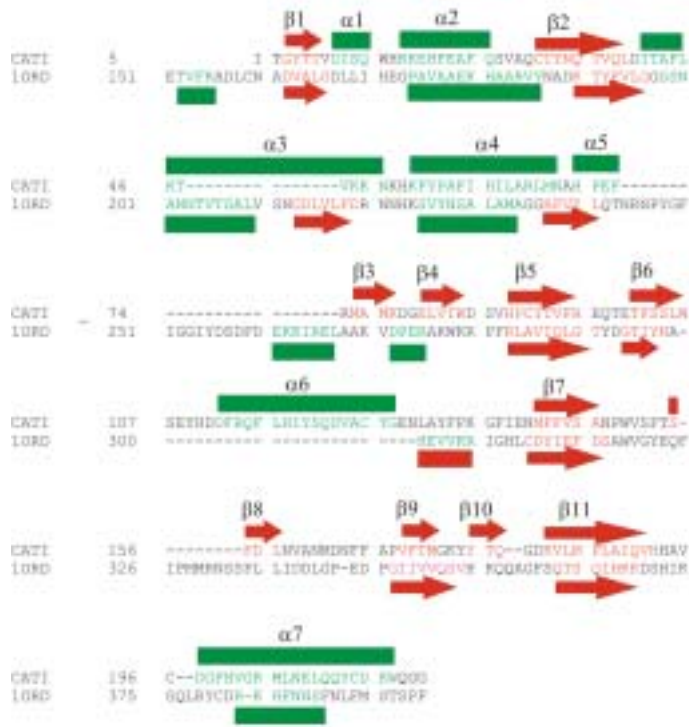
Εικ 4-14 Στερεοδιάγραμμα της υπέρθεσης του πολυπεπτιδικού σκελετού της CAT_I(μπλέ και γκριζο) και της CRAT (κόκκινο)

Η αμινοξική αλληλουχία της CRAT έχει αποκλίσει αρκετά από αυτή της CAT_I πιθανώς μέσω διπλασιασμού ενός προγονικού γονιδίου με μία λειτουργική περιοχή προς ένα ψευδο-διμερές που έχει παρόμοια οργάνωση με τα τριμερή της CAT_I και της E2pCD .

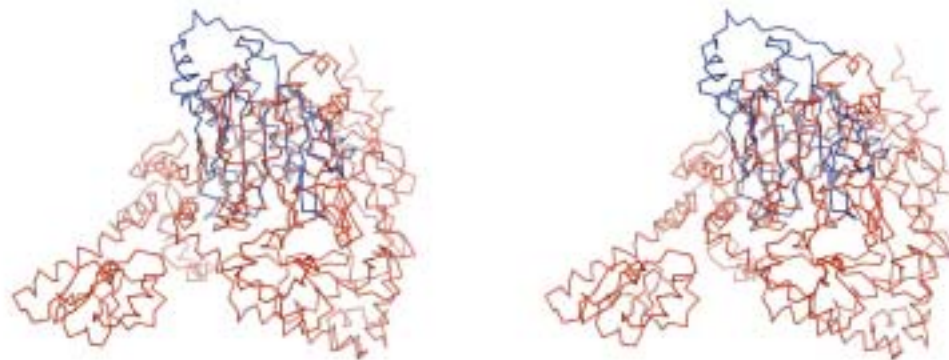
4.2.4 Σύγκριση της CAT I με την αποκαρβοξυλάση της ορνιθίνης

Η αποκαρβοξυλάση της ορνιθίνης είναι ένα ένζυμο κλειδί στον μεταβολισμό των αμινοξέων σε πολλούς οργανισμούς. Το προϊόν της αποκαρβοξυλίωσης της ορνιθίνης είναι η πουτρεσκίνη η οποία αποτελεί πρόδρομο στην βιοσύνθεση διαφόρων πολυαμινών όπως η σπερμιδίνη και η σπερμίνη. Η ίδια η ορνιθίνη προέρχεται από τον μεταβολισμό της αργινίνης μέσω απαμίνωσης οπότε παράγεται κιτροουλίνη η οποία στην συνέχεια διασπάται σε καρβαμόυλο-φωσφορικό και ορνιθίνη.

Η αποκαρβοξυλάση της ορνιθίνης παρουσιάζει εκπληκτικά μικρή ταυτότητα σε επίπεδο πρωτοταγούς δομής με την CAT I. Ωστόσο και πάλι έχουμε ένα σχετικά συντηρημένο δομικό πρότυπο μεταξύ των δύο ενζύμων.



Εικ 4-15 Στοίχιση των στοιχείων δευτεροταγούς δομής σε επίπεδο πρωτοταγούς αλληλουχίας της CAT_I και της ακετυλοτρανσφεράσης της ορνιθίνης



Εικ 4-16 Στερεοδιάγραμμα της υπέρθεσης του πολυπεπτιδικού σκελετού της CAT_I (μπλέ) και της ακετυλοτρανσφεράσης της ορνιθίνης (κόκκινο)

Περισσότερη πληροφορία για την βιολογική δραστικότητα του ενζύμου και δομικές λεπτομέρειες δεν είναι άμεσα διαθέσιμες αφού η σχετική δημοσίευση δεν είναι προς το παρόν διαθέσιμη.

4.2.5 Συμπεράσματα από τις συγκρίσεις

Αυτό που προκαλεί μεγάλη έκπληξη είναι το γεγονός ότι έξη διαφορετικά ένζυμα τα οποία επιτελούν διαφορετικές λειτουργίες παρουσιάζουν τόσο μεγάλη ομοιότητα σε δομικό επίπεδο η οποία δεν είναι αναμενόμενη από την πληροφορία σε επίπεδο πρωτοταγούς δομής. Είναι εμφανές ότι η στοιχισή αλληλουχιών σε επίπεδο πρωτοταγούς δομής αν και έχει συνεισφέρει τα μέγιστα στην κατηγοριοποίηση των πρωτεϊνικών αλληλουχιών εντούτοις δεν είναι σε θέση να προβλέψει ομοιότητες σε επίπεδο τρισδιάστατης δομής πράγμα το οποίο σημαίνει ότι η παράμετρος της δομικής ομοιότητας δεν εξαρτάται μόνο από το ποσοστό ομολογίας ή ταυτότητας μεταξύ δύο μορίων αλλά και από άλλους παράγοντες. Οι συγκρίσεις που παρατέθηκαν παραπάνω παίρνουν μια ακόμα σημαντικότερη διάσταση διότι όπως έχει ήδη αναφερθεί η rms απόκλιση των ατομικών συντεταγμένων είναι συνάρτηση του ποσοστού ομολογίας μεταξύ δύο συγκρινόμενων δομών. Στις περιπτώσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω το ποσοστό ταυτότητας με εξαίρεση την περίπτωση της CATIII (46%) είναι πολύ χαμηλό, ίσως τόσο χαμηλό που μόνο με τυχαίες αλληλουχίες αναμένεται ποσοστό της τάξης του 5-10% όπως στην περίπτωση της αποκαρβοξυλάσης της ορνιθίνης. Κάτι τέτοιο έχει παρατηρηθεί και σε άλλες περιπτώσεις. Τέτοιου είδους αποτελέσματα μόνο νέα ερωτήματα δημιουργούν αφού μας καλούν να εξηγήσουμε φαινόμενα τα οποία έχουν δημιουργηθεί μέσα από εκατομμύρια χρόνια εξέλιξης. Ποιος οι ποιοι είναι οι λόγοι για τους οποίους τόσο διαφορετικές αλληλουχίες επιμένουν να υιοθετούν ένα τόσο κοινό μεταξύ τους δομικό πρότυπο; Σίγουρα αυτό το ερώτημα δεν είναι εύκολο να απαντηθεί όχι από έλλειψη επιστημονικού ενδιαφέροντος αλλά από άγνοια των μηχανισμών που λειτουργούν σε εξελικτικό αλλά και σε κυτταρικό επίπεδο και σχετίζονται με την εξέλιξη των δομικών προτύπων και την δυναμική της αναδίπλωσης των βιομορίων. Αυτό που συμπερασματικά μπορούμε να κάνουμε είναι να θέσουμε κάποια ερωτήματα για μελλοντική εξέταση και αυτά είναι:

- Η εμφάνιση ενός κοινού δομικού προτύπου σε ένζυμα τα οποία προέρχονται από διαφορετικούς οργανισμούς είναι αποτέλεσμα συγκλίνουσας εξέλιξης ή είναι μήπως οικονομία της φύσης που επαναλαμβάνει την χρήση ενός πετυχημένου μοντέλου ξανά και ξανά (Lupas 2001);

- Μήπως εκτός από τις εξελικτικές διαδικασίες και άλλοι μηχανισμοί ευθύνονται για τέτοιου είδους φαινόμενα;

Δεν θα πρέπει να ξεχνάμε ότι παρόλη την πρόοδο μας στο προσδιορισμό της δομής των βιομορίων, δεν είμαστε ακόμα σε θέση να εξομοιώσουμε ούτε και τις απλούστερες των συνθηκών που επηρεάζουν φαινόμενα αναδίπλωσης βιομορίων. Με αυτό εννοείται ότι μπορεί ένα δομικό πρότυπο να χτίζεται από αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα κατά τα αρχικά στάδια της αναδίπλωσης ενός βιομορίου.

Αυτό που μπορούμε να παρατηρήσουμε από την δομική στοίχιση που παρατίθεται παραπάνω είναι ότι πράγματι υπάρχει μια μεγάλου βαθμού συντήρηση στα στοιχεία της δευτεροταγούς δομής και συγκεκριμένα στις έλικες οι οποίες αποτελούν την στηρικτική βάση του προτύπου και στον κεντρικό πυρήνα των β-κλώνων που σχηματίζουν τα καταλυτικά κέντρα. Αυτό βέβαια που πρέπει να γίνει κατανοητό είναι ότι εμφανίζεται και ένας σχετικός εκφυλισμός του δομικού προτύπου ο οποίος και εκδηλώνεται μέσω της παρεμβολής μη στοιχιζόμενων τμημάτων τα οποία όμως δεν επηρεάζουν τον σχηματισμό διότι καταλαμβάνουν διαφορετικές θέσεις στον χώρο. Επίσης σημαντικό είναι να τονίσουμε ότι τουλάχιστον ένας από τους β-κλώνους και συγκεκριμένα ο β8 (SFDLNV) εμφανίζεται μόνο στην CAT_I στην CAT_{III} και στην E2pCD οι οποίες είναι τριμερές και άρα σχετίζεται με την διαδικασία του τριμερισμού.

4.3 Ανακεφαλαίωση της δομής της CAT_I

Από όλα αυτά που έχουμε αναφέρει μέχρι τώρα αξίζει να συνοψίσουμε τα βασικά σημεία της δομής. Αυτά είναι:

- Το βιολογικά ενεργό μόριο της CAT_I είναι ένα τριμερές το οποίο δημιουργείται με απλή περιστροφή 120⁰ ενός μονομερούς γύρω από ένα τριπλό τοπικό άξονα.
- Τα μονομερή που σχηματίζουν το τριμερές έχουν μια μικτή α/β δομή, η οποία αποτελείται από 6 β-κλώνους που σχηματίζουν μια κεντρική β-πτυχωτή επιφάνεια.
- Οι 6 β-κλώνοι εμφανίζουν χαρακτηριστική αριστερόστροφη συστροφή όπως έχει παρατηρηθεί και σε άλλες δομές.
- Η κεντρική επιφάνεια υποβαστάζεται από 4 α-έλικες που αποτελούν και τον εξωτερικό σκελετό της δομής.
- Ένας β-κλώνος ο οποίος βρίσκεται εκτός του επιπέδου των υπολοίπων αλληλεπιδρά με άλλους δύο ίδιους κλώνους από τα γειτονικά μονομερή και σχηματίζει το βασικό πυρήνα του τριμερισμού.
- Ο σχηματισμός του τριμερούς γίνεται μέσω πολικών αλληλεπιδράσεων αλλά και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις σε κείρια σημεία συμβάλλουν στην διατήρηση της δομής.

- Ο σχηματισμός του τριμερούς επεκτείνει την β-πτυχωτή επιφάνεια κάθε μονομερούς με αποτέλεσμα να δημιουργείται μια εκτεταμένη β-επιφάνεια που διατρέχει όλο το τριμερές.
- Από την αλληλεπίδραση μεταξύ καταλοίπων που ανήκουν σε γειτονικά μονομερή, σχηματίζεται το ενεργό κέντρο το οποίο είναι μια μακριά σήραγγα με πλάτος 14Å. Τα αμινοξέα που απαρτίζουν το ενεργό κέντρο είναι κατά κύριο λόγο υδρόφοβα αλλά και πολικά κατάλοιπα που βρίσκονται σε καίριες θέσεις είναι υπεύθυνα για τον σχηματισμό υδρογονοδεσμών με το μόριο του αναστολέα. Οι παράγοντες θερμοκρασίας στο ενεργό κέντρο είναι αρκετά χαμηλοί όσον αφορά τα αμινοξικά κατάλοιπα, και ειδικά σε εκείνα τα άτομα εκείνα που έρχονται σε άμεση αλληλεπίδραση με το μόριο του αναστολέα.
- Μόρια διαλύτη συμμετέχουν στην σταθεροποίηση του μορίου του συναγωνιστικού αναστολέα μέσα στο ενεργό κέντρο.
- Τα τριμερή μέσα στην ασύμμετρη μονάδα εμφανίζουν σχέσεις τοπικής συμμετρίας.
- Υπάρχουν κατιόντα ασβεστίου τα οποία συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις στο κρυσταλλικό πλέγμα.

4.3.1 Η αρχιτεκτονική του ενεργού κέντρου της CAT_I και η ικανότητα δέσμευσης στεροειδών παραγώγων.

Κατά την επεξεργασία των δεδομένων και του μοριακού μοντέλου της CAT_I έγινε εμφανές ότι πέρα από την συνολική ομοιότητα σε επίπεδο τεταρτοταγούς δομής με την CAT_{III} οι διαφορές που εμφανίζονται στον ενεργό κέντρο των δύο ενζύμων είναι αρκετές για να μεταβάλουν τα κινητικά χαρακτηριστικά τους και να αλλάξουν την ικανότητα τους να δεσμεύουν χημικά μόρια. Αν και για τον ανθρώπινο τρόπο σκέψης είναι ευκολότερο να προσπαθήσουμε να αποδώσουμε την διαφορετική συμπεριφορά αυτή σε μεμονωμένες αλλαγές, κάτι το οποίο επιβάλλεται και από την αφαιρετική ικανότητα μας εντούτοις όπως συζητήθηκε παραπάνω η μελέτη μεμονωμένων αλλαγών δεν είναι σε θέση να εξηγήσει το ζητούμενο. Άρα είναι κατανοητό ότι όλες οι διαφορές που εντοπίζονται στο ενεργό κέντρο των δύο ενζύμων είναι συνολικά υπεύθυνες για την εγγενή ικανότητα της CAT_I να δεσμεύει στεροειδή παράγωγα. Το σίγουρο είναι ότι η

αυξημένη υδροφοβικότητα του ενεργού κέντρου είναι βασική προϋπόθεση για αυτό τον σκοπό. Από την υπάρχουσα βιβλιογραφία είναι πλέον γνωστό ότι αρκετές προκαρυωτικές πρωτεΐνες έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν στεροειδή, παρουσιάζοντας μια εκπληκτική ανομοιομορφία στον τρόπο δέσμευσης και στα αμινοξέα στα οποία συμμετέχουν στον σχηματισμό των θέσεων δέσμευσης. Αυτό το γεγονός, υποδηλώνει ότι υπάρχουν πολλές εναλλακτικές οδοί οι οποίες οδηγούν στο ίδιο αποτέλεσμα. Βασισμένοι στην αρχιτεκτονική του ενεργού κέντρου της CAT_I μπορούμε να διατυπώσουμε κάποιους βασικούς κανόνες που πρέπει να ισχύουν για να είναι σε θέση μια πρωτεΐνη να δεσμεύει στεροειδή. Το πρώτο απαιτούμενο στοιχείο είναι το συνολικό σχήμα του ενεργού κέντρου, το οποίο θα πρέπει να είναι τέτοιο ώστε να ευνοεί την δέσμευση ενός υδρόφοβου παραγώγου. Αναμένουμε ένα τέτοιο ενεργό κέντρο να είναι προστατευμένο κοντά στον υδρόφοβο πυρήνα του μορίου και να έχει σχήμα σήραγγας ή βαθιάς τσέπης. Αυτό έχει διπλό ρόλο. Καταρχήν εξασφαλίζει την δέσμευση του υποστρώματος μέσω διάχυσης στο ενεργό κέντρο (diffusion control) μια και αλληλεπιδράσεις μακράς εμβέλειας δεν είναι το ιδανικότερο μέσο για αυτό το σκοπό και δεύτερον εξασφαλίζει ότι τα υδρόφοβα κατάλοιπα του ενεργού κέντρου δεν έρχονται σε επαφή με τον διαλύτη.

Σε ένα δεύτερο στάδιο θα πρέπει να εξετάσουμε το είδος των καταλοίπων που αποτελούν το ενεργό κέντρο. Μια καλή επιλογή καταλοίπων θα είναι αρωματικά κατάλοιπα όπως θρυπτοφάνη, φαινυλαλανίνη και τυροσίνη τα οποία μπορούν να συμμετάσχουν σε π-αλληλεπιδράσεις με το σύστημα των δακτυλίων του στεροειδούς. Μικρές πλευρικές ομάδες σαν αυτές τις αλανίνης και της βαλίνης πρέπει να είναι παρούσες για την πλευρική προστασία του μορίου. Τέλος αν είναι απαραίτητη η χημική μετατροπή του μορίου, κατάλοιπα σαν την ιστιδίνη ή ακόμα και τα ιονισμένα κατάλοιπα γλουταμικό ή ασπαρτικό οξύ μπορούν να δράσουν ως γενικές βάσεις για να αποσπάσουν πρωτόνια από το υπόστρωμα.

Ένα ακόμα σημείο που αξίζει να σημειωθεί, είναι ότι λόγω της φύσης τους τα υδρόφοβα κατάλοιπα δεν είναι ενεργειακά ευνοϊκά να έρχονται σε επαφή με το διαλύτη, όταν το ενεργό κέντρο δεν είναι κατειλημένο από το υπόστρωμα. Αυτό σε διάφορες περιπτώσεις οδηγεί σε μια αστάθεια στις πλευρικές αλυσίδες όπως έχει αναφερθεί για την περίπτωση της ανθρώπινης σφαιρίνης που δεσμεύει φυλετικές ορμόνες (Grishkovskaya 2002).

Δέσμευση του υποστρώματος έχει σαν αποτέλεσμα σταθεροποίηση αυτών των καταλοίπων.

Σε άλλες περιπτώσεις (Heredia 2003) τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου παρουσιάζουν ελαφρά μετακίνηση για την δέσμευση του υποστρώματος.

Στην περίπτωση της CAT_I δεν συμβαίνει κανένα από τα δύο παραπάνω αφού τα κατάλοιπα του ενεργού κέντρου έχουν σταθερή θέση και καλά καθορισμένη πυκνότητα. Άρα θα πρέπει να υποθέσουμε ότι η CAT_I είναι σε θέση να ανεχτεί τις αποσταθεροποιητικές επιδράσεις του διαλύτη.

Τέλος, από προκαταρκτικά δεδομένα μοντελοποίησης που έχουμε φαίνεται ότι η διαμόρφωση του υποστρώματος χλωραμφενικόλης δεν είναι η ίδια με την διαμόρφωση που αποκτά το μόριο στο ενεργό κέντρο της CAT_{III}. Δεδομένου ότι η χλωραμφενικόλη έχει δίεδρες γωνίες που επιτρέπουν την περιστροφή θα μπορούσε να υιοθετεί μια εκτεταμένη διαμόρφωση. Αυτή η διαφορά ίσως μπορεί να εξηγήσει τις διαφορές στις κινητικές παραμέτρους των δύο ενζύμων.

Θα πρέπει εδώ να τονίσουμε ότι η χαμηλότερη τιμή του K_{cat} της CAT_I οφείλεται στο μεγαλύτερο ποσοστό υδροφόβων καταλοίπων στο ενεργό κέντρο. Με απλά λόγια ενώ το ένζυμο είναι σε θέση να καταλύσει με την ίδια ταχύτητα την ακετυλίωση της χλωραμφενικόλης δεν μπορεί να απαλλαγεί το ίδιο εύκολα από τα προϊόντα της αντίδρασης. Στην ακραία του μορφή το φαινόμενο εκδηλώνεται με την δέσμευση του φουσιδικού οξέος, η οποία είναι ουσιαστικά μη αναστρέπτη. Παρόλα αυτά η CAT_I μπορεί να θεωρηθεί ένα εξελικτικά πετυχημένο μόριο αφού έχοντας διατηρήσει το συνολικό πρότυπο αναδίπλωσης που έχουν όλα τα ένζυμα αυτής της ομάδας έχει προσαρμοστεί να δεσμεύει και άλλα μόρια. Είναι εκπληκτικό το ότι η φυσική επιλογή δεν λειτουργεί με τα αυστηρά κριτήρια της συναγωνιστικής αναστολής ούτε και ξεχωρίζει αν ένα μόριο είναι υπόστρωμα ή αναστολέας. Καταφέρνει έτσι στο τέλος να μετατρέψει μια κατάσταση αποτυχημένη όπως είναι η αναστολή της ενζυμικής δράσης της CAT_I από το φουσιδικό οξύ σε πετυχημένη αφού και αυτό είναι αντιβιοτικό και αποσύρεται από το κυτταρόπλασμα.

4.3.2 Προοπτικές της παρούσας εργασίας

Ο προσδιορισμός της δομής της ακετυλοτρανσφεράσης της χλωραμφενικόλης τύπου III είναι ένα μεγάλο επίτευγμα του Βιολογικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Κρήτης και του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας. Η σπουδαιότητα της δομής αυτής

είναι μεγάλη όχι μόνο λόγω των τεχνικών δυσκολιών που επεβλήθησαν από το μεγάλο μέγεθος της αλλά κυρίως λόγω του ότι η CAT_I είναι ένα ένζυμο το οποίο προσδίδει ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικό γεγονός το οποίο έχει άμεσες βιοιατρικές προεκτάσεις. Η δομική πληροφορία που περιέχεται στην δομή της CAT_I είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για την μελέτη του προτύπου αναδίπλωσης προκαρυωτικών πρωτεϊνών και για την σχέση δομής και λειτουργίας των.

Εκτός αυτού αποτελεί το εφαλτήριο για μια σειρά μελετών με τεράστια σπουδαιότητα που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα στη χλωραμφενικόλη και στο φουσιδικό οξύ. Οι μελέτες αυτές θα εστιαστούν στα ακόλουθα:

- Κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση για την ταυτοποίηση των καταλοίπων που σχετίζονται με την διαδικασία του τριμερισμού
- Κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση των καταλοίπων του ενεργού κέντρου
- Προσδιορισμός της δομής των δυαδικών συμπλόκων του ενζύμου με τη χλωραμφενικόλη και το ακέτυλο – συνένζυμο A
- Μελέτης της αντίδρασης ακετυλίωσης μέσω περιθλασης Laue
- Προσδιορισμός της δομής του συμπλόκου του ενζύμου με triphenyl-methene χρωστικών όπως των crystal violet
- Σχεδιασμός φαρμάκων με βάση το φουσιδικό οξύ τα οποία να διατηρούν την αντιβιοτική δράση τους αλλά να μην δεσμεύονται από το ένζυμο.
- Λεπτομερέστερη προσέγγιση του φαινομένου της συντήρησης του προτύπου αναδίπλωσης των ακετυλοτρανσφερασών της χλωραμφενικόλης και εξακρίβωση των μοριακών καθοριστών αυτού του προτύπου
- Μελέτη της δομής της εστεράσης του φουσιδικού οξέος από το *Streptomyces lividans* 66.

5 Βιβλιογραφικές αναφορές

1. Παπανικολάου, Ι. (1995). Ο ρόλος των μειωτών ιοντικής ισχύος στην διαλυτότητα των βιομορίων σε μικτά υδατικά ηλεκτρολυτικά διαλύματα και εφαρμογές στην χρωματογραφία και την κρυστάλλωση. Διδακτορική διατριβή, Πανεπιστήμιο Κρήτης.
2. Alton, N. K., Vapnek, D., (1979). Nucleotide sequence analysis of the chloramphenicol resistance transposon Tn9. *Nature* 282, 864-869.
3. Andreeva, A. E., Karamancheva, I.R. (2001). Insight into secondary structure of chloramphenicol acetyltransferase type I- computer analysis and FT-IR spectroscopic characterization of the protein structure. *Journal of Molecular Structure* 565-566, 177-182.
4. Andreeva, A. E., Borissova, B. E., Mironova, R., Glykos, N. M., Kotsifaki, D., Ivanov, I., Krysteva, M. & Kokkinidis, M. (2000). Crystallization of type I chloramphenicol acetyltransferase: an approach based on the concept of ionic strength reducers. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56 (Pt 1), 101-3.
5. Arcangioli, M. A., Leroy-Setrin, S., Martel, J. L., Dancla-Chalsus, E. (1999). A new chloramphenicol and florphenicol resistance gene flanked by two integron structures in *Salmonella typhimurium* DT104. *FEMS Microbiology letters* 174, 327-332.
6. Banerjee, A., Dubnau, E., Quemard, A., Balasubramanian, V., Um, K. S., Wilson, T., Collins, D., Lisle de, G. & Jacobs, W. R. J. (1994). inhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethonamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 263, 227-230.
7. Bartz, Q. R. (1948). Isolation and characterization of chloromycetin. *Journal of Biological Chemistry* 172, 445-450.
8. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* 72, 248-254.
9. Brunger, A. T. (1992). Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature* 355, 472-475.

10. Burns, J. L., Rubens, C. E., Mendelman, P. M. & Smith, A. L. (1986). Cloning and expression in *Escherichia coli* of a gene encoding non-enzymatic chloramphenicol resistance from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 29, 445-450.
11. Burton, H. S. & Abraham, E. P. (1951). Isolation of antibiotics from a species of *Cephalosporium*. Cephalosporin P1,P2,P3,P4 and P5. *Biochem J* 50, 168-174.
12. Carson, M. (1997). Ribbons. *Methods Enzymol* 277.
13. Chothia, C. & Lesk, A. M. (1986). The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *Embo J* 5, 823-6.
14. Christiansen, K. (1999). Fusidic acid non-antibacterial activity. *International Journal of Antimicrobial Agents* 12, 73-78.
15. Dauter, Z. (1999). Data-collection strategies. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* 55, 1703-1717.
16. Day, P. J. & Shaw, W. V. (1992). Acetyl coenzyme A binding by chloramphenicol acetyltransferase. Hydrophobic determinants of recognition and catalysis. *J Biol Chem* 267, 5122-7.
17. Day, P. J., Shaw, W. V., Gibbs, M. R. & Leslie, A. G. (1992). Acetyl coenzyme A binding by chloramphenicol acetyltransferase: long-range electrostatic determinants of coenzyme A recognition. *Biochemistry* 31, 4198-205.
18. Ellis, J., Campopiano, D.J., Izard, T. (1999). Cubic crystals of chloramphenicol phosphotransferase from *Streptomyces venezuelae* in complex with chloramphenicol. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* 55, 1086-1088.
19. Feitelson, J. S., Ledeborg, J. (1980). Grade lysates of *Staphylococcus aureus* can transform *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* 116, 545-547.
20. Felsenstein, J. (1993). PHYLIP: a phylogeny inference package. *Cladistics* 5, 164-166.
21. Gaffney, D. F., Cundliffe, E. & Foster, T. J. (1981). Chloramphenicol resistance that does not involve chloramphenicol acetyltransferase encoded by plasmids from gram-negative bacteria. *J Gen Microbiol* 125, 113-21.
22. Garber, N., Carmielli, T. & Gilboa-Garber, N. (1978). Synthesis of chloramphenicol acetyltransferase coded by bacterial gene carried on P1CM bacteriophage in extracts of human blood platelets. *Can J Biochem* 56, 143-9.

23. George, A. M., Hall, R. M. (2002). Efflux of chloramphenicol by the Cm1A1 protein. *FEMS Microbiology letters* 209, 209-213.
24. Gibbs, M. R., Moody, P. C. & Leslie, A. G. (1990). Crystal structure of the aspartic acid-199----asparagine mutant of chloramphenicol acetyltransferase to 2.35-Å resolution: structural consequences of disruption of a buried salt bridge. *Biochemistry* 29, 11261-5.
25. Godtfredsen, W., Roholt, K. & Tybring, L. (1962). Fusidin: a new orally active antibiotic. *Lancet* 1, 928-931.
26. Godtfredsen, W. O., Jahnsen, S., Lorck, H., Roholt, K. & Tybring, L. (1962). Fusidic acid: a new antibiotic. *Nature* 193, 897.
27. Grishkovskaya, I., Avvakumov, G.V., Hammond, G.L., Muller, Y.A. (2002). Resolution of a disorder region at the entrance of the human sex hormone-binding globulin steroid-binding site. *Journal of Molecular Biology* 318, 621-626.
28. Gross, F., Lewis, E. A., Pirae, M., Pee, K-A., Vining, L.C., White, R.L. (2002). Isolation of 3'-O-acetylchloramphenicol: a possible intermediate in chloramphenicol biosynthesis. *Bioorganic and medicinal chemistry letters* 12, 283-286.
29. Haar, B., Walter, S., Schwapenheuer, S., Schrempf, H. (1997). A novel fusidic acid resistance gene from *Streptomyces lividans* 66 encodes a highly specific esterase. *Microbiology* 143, 867-874.
30. Heredia, V. V., Kruger, R.G., Penning, T.M. (2003). Steroid binding site residues dictate optimal substrate positioning in rat 3α-hydroxysteroid dehydrogenase (3α-HSD or AKR1C9). *Chemico-biological interactions* 143-144, 393-400.
31. Heym, B., Alzari, P. M., Honore, N. & Cole, S. T. (1995). Missense mutations in the catalase-peroxidase gene, KatG, are associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol* 15, 235-245.
32. Heym, B., Honore, N., Truffot-Pernot, C., Banerjee, A., Schurra, C., Jacobs, W. R., Embden van, D. A. J., Grosset, H. J. & Cole, S. T. (1994). Implications of multidrug resistance for the future of short-course chemotherapy of tuberculosis: a molecular study. *Lancet* 344, 293-298.
33. Heym, B., Zhang, Y., Poulet, S., Young, D. & Cole, S. T. (1993). Characterization of the KatG gene encoding a catalase-peroxidase required for isoniazid susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Bacteriology* 175, 4255-4259.

34. Higgins, D. G. a. S., P.M. (1988). CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignments on a microcomputer. *Gene* 73, 237-244.
35. Holm, L., Sander, C. (1996). Mapping the protein universe. *Science* 273, 595-602.
36. Hongzhen, H., Ding, H., Bartlam, M., Sun, F., Le, Y., Qin, X., Tang, H., Zhang, R., Joachimiak, A., Liu, J., Zhao, N., Rao, Z. (2003). Crystal structure of Tabtoxin resistance protein complexed with acetyl coenzyme A reveals the mechanism for b-lactam acetylation. *Journal of Molecular Biology* 325, 1019-1030.
37. Izard, T., Ellis, J. (2000). The crystal structures of chloramphenicol phosphotransferase reveal a novel inactivation mechanism. *The EMBO Journal* 19, 2690-2700.
38. Jelsch, C., Lenfant, F., Masson, J.M., Samama, J. P. (1992). beta lactamase TEM1 of E. coli . Crystal structure at 2.5 A resolution. *FEBS letters* 299, 135-142.
39. Jogl, G., Tong, L. (2003). Crystal structure of carnitine acetyltransferase and implications for the catalytic mechanism and fatty acid transport. *Cell* 112, 113-122.
40. Johanson, U., Evarsson, A., Liljas, A., Hughes, D. (1996). The dynamic structure of EF-G studied by fusidic acid resistance and internal revertants. *Journal of Molecular Biology* 258, 420-432.
41. Jones, T. A., Zou, J. Y., Cowan, S.W. & Kjeldgaard, M. (1991). Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in the theses models. *Acta Crystallographica section A* 47, 110-119.
42. Junxuan, L., Jiang, C. (1993). Inhibition kinetics of chloramphenicol acetyltransferase by selected detergents. *Biochemical and biophysical research communications* 196, 12-17.
43. Keating, T. A., Marshall, C.G., Walsh, C.T., Keating, A.E. (2002). The structure of VibH represents nonribosomal peptide synthetase condensation and epimerization domains. *Nature Structural Biology* 9, 522-526.
44. Kleanthous, C., Cullis, P. M. & Shaw, W. V. (1985). 3-(Bromoacetyl)chloramphenicol, an active site directed inhibitor for chloramphenicol acetyltransferase. *Biochemistry* 24, 5307-13.

45. Klieneberg, E. (1935). The natural occurrence of pleuropneumonia like microorganisms in apparent symbiosis with *Streptobacillus moniliformis* and other bacteria. *Journal of Pathol. Bacteriol.* 40, 93-105.
46. Kondo, E., Haapala, D. K. & Falkow, S. (1970). The production of chloramphenicol acetyltransferase by bacteriophage P1CM. *Virology* 40, 431-40.
47. Krell, T., Coggins, J. R. & Laphorn, A. J. (1998). The three dimensional structure of shikimate kinase. *Journal of Molecular Biology* 278, 983-997.
48. Kuzj, A. S. E., Medberry, P.S., Schottel, J. (1998). Stationary phase, amino acid limitation and recovery from stationary phase modulate the stability and translation of chloramphenicol acetyltransferase mRNA and total mRNA in *Escherichia coli*. *Microbiology* 144, 739-750.
49. Kuznetsova, T. A., Smetanina, O.F., Afiyatullo, S.S., Pivkin, M., Denisenko, V.A., Elyakov, G.B. (2001). The identification of fusidic acid, a steroidal antibiotic from marine isolate of the fungus *Stibella aciculosa*. *Biochemical Systematics and Ecology* 29, 873-874.
50. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of the structural proteins during the assembly head of bacteriophage T4. *Nature* 227.
51. Laskowski, R. A., McArthur, M. W., Moss, D., Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr* 26, 283-291.
52. Laurberg, M., Kristensen, O., Martemyanov, K., Gudkov, A. T., Nagaev, I., Hughes, D., Liljas, A. (2000). Structure of a mutant EF-G reveals domain III and possibly the fusidic acid binding site. *Journal of Molecular Biology* 303, 593-603.
53. Leslie, A. G. (1990). Refined crystal structure of type III chloramphenicol acetyltransferase at 1.75 Å resolution. *J Mol Biol* 213, 167-86.
54. Leslie, A. G. (1999). Integration of macromolecular diffraction data. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 55 (Pt 10), 1696-702.
55. Leslie, A. G., Moody, P. C. & Shaw, W. V. (1988). Structure of chloramphenicol acetyltransferase at 1.75-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 4133-7.
56. Lewendon, A., Murray, I.A., Shaw, W.V., Gibbs, M.R., Leslie, A.G.W. (1990). Evidence for transition-state stabilization by serine 148 in the catalytic mechanism of chloramphenicol acetyltransferase. *Biochemistry* 29.

57. Lewendon, A., Murray, I. A., Kleanthous, C., Cullis, P. M. & Shaw, W. V. (1988). Substitutions in the active site of chloramphenicol acetyltransferase: role of a conserved aspartate. *Biochemistry* 27, 7385-90.
58. Lewendon, A., Murray, I. A., Shaw, W. V., Gibbs, M. R. & Leslie, A. G. (1994). Replacement of catalytic histidine-195 of chloramphenicol acetyltransferase: evidence for a general base role for glutamate. *Biochemistry* 33, 1944-50.
59. Lewendon, A. & Shaw, W. V. (1993). Transition state stabilization by chloramphenicol acetyltransferase. Role of a water molecule bound to threonine 174. *J Biol Chem* 268, 20997-1001.
60. Lupas, A. N., Ponting, C. P., Russell, R.B. (2001). On the evolution of protein folds: Are similar motifs in different proteins the result of convergence, insertion or relics or an ancient peptide world? *Journal of structural biology* 134, 191-203.
61. Marcoli, R., Iida, S., Bickle, T.A. (1980). The DNA sequence of an IS/-flanked transposon coding for resistance to chloramphenicol and fusidic acid. *FEBS Letters* 110, 11-14.
62. Mattevi, A., Obmolova, G., Kalk, K. H., Westphal, A. H., Kok, A., Hof, W.G.J. (1992). Atomic structure of the cubic core of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex. *Science* 255, 1544-1550.
63. Mattevi, A., Obmolova, G., Kalk, K. H., Westphal, A. H., Kok, A., Hof, W.G.J. (1993). Refined crystal structure of the catalytic domain of dihydrolipoyl transacetylase (E2p) from *Azotobacter vinelandii* at 2.6 Å resolution. *Journal of Molecular Biology* 230, 1183-1199.
64. Matthews, B. W. (1968). Solvent content of protein crystals. *Journal of Molecular Biology* 33, 491-497.
65. Mazel, D., Davies, J. (1999). Antibiotic resistance in microbes. *Cellular and Molecular life sciences* 56, 742-754.
66. McPherson, A. *Preparation and analysis of protein crystals*, Willey Publications, NY.
67. McRee, D. (1999). *Practical Protein Crystallography*, Academic Press.
68. McRee, D. E. (1999). XtalView/Xfit--A versatile program for manipulating atomic coordinates and electron density. *J Struct Biol* 125, 156-65.

69. Michelinaki, M., Mamos, P., Coutsogeorgopoulos, C., Kalpaxis, D. (1997). Aminoacyl and peptidyl analogs of chloramphenicol as slow binding inhibitors of ribosomal peptidyltransferase: a new approach for evaluating their potency. *Molecular Pharmacology* 51, 139-146.
70. Murray, I. A., Lewendon, A., Shaw, W. V. (1991). Stabilization of the imidazole ring of His195 at the active site of chloramphenicol acetyltransferase. *The Journal of Biological Chemistry* 266, 11695-11698.
71. Murray, I. A., Lewendon, A., Williams, J. A., Cullis, P. M., Shaw, W. V. (1991). Alternative binding modes for chloramphenicol and 1-substituted chloramphenicol analogues revealed by site directed mutagenesis and x-ray crystallography of chloramphenicol acetyltransferase. *Biochemistry* 30.
72. Murray, I. A., Cann, P. A., Day, P. J., Derrick, J. P., Sutcliffe, M. J., Shaw, W. V. & Leslie, A. G. (1995). Steroid recognition by chloramphenicol acetyltransferase: engineering and structural analysis of a high affinity fusidic acid binding site. *J Mol Biol* 254, 993-1005.
73. Murshudov, G. N., Vagin, A. A., Lebedev, A., Wilson, K. S. & Dodson, E. J. (1999). Efficient anisotropic refinement of macromolecular structures using FFT. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 55 (Pt 1), 247-55.
74. Musser, J. M. (1995). Antimicrobial Agent resistance in Mycobacteria: Molecular Genetics Insights. *Clinical Microbiology Reviews* 8, 496-514.
75. Nagai, Y. & Mitsuhashi, S. (1972). New type of R factors incapable of inactivating chloramphenicol. *Journal of Bacteriology* 109, 1-7.
76. Navaza, J. (2001). Implementation of molecular replacement in AMoRe. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 57, 1367-72.
77. Navaza, J. (2002). On the computation of structure factors by FFT techniques. *Acta Crystallogr A* 58, 568-73.
78. Navaza, J., Lepault, J., Rey, F. A., Alvarez-Rua, C. & Borge, J. (2002). On the fitting of model electron densities into EM reconstructions: a reciprocal-space formulation. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 58, 1820-5.
79. Navaza, J., Panepucci, E. H. & Martin, C. (1998). On the use of strong Patterson function signals in many-body molecular replacement. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 54 (Pt 5), 817-21.

80. Nicholls, A., Sharp, K. A. & Honig, B. (1991). Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons. *Proteins* 11, 281-96.
81. Otwinowski, Z. M., W. (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Macromolecular Crystallography, Part A* 276, 307-326.
82. Packman, L. C. & Shaw, W. V. (1981). The use of naturally occurring hybrid variants of chloramphenicol acetyltransferase to investigate subunit contacts. *Biochem J* 193, 541-52.
83. Pongs, O., Bald, R. & Erdmann, V. A. (1973). Identification of chloramphenicol binding protein in Escherichia coli ribosome by affinity labelling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70, 2229-2233.
84. Proctor, G. N., McKell, J. & Rownd, R. H. (1983). Chloramphenicol acetyltransferase may confer resistance to fusidic acid by sequestering the drug. *J Bacteriol* 155, 937-9.
85. Proctor, G. N. & Rownd, R. H. (1982). Rosanilins: indicator dyes for chloramphenicol-resistant enterobacteria containing chloramphenicol acetyltransferase. *J Bacteriol* 150, 1375-82.
86. Rahal, J. J. & Simberkoff, M. S. (1979). Bactericidal and bacteristatic action of chloramphenicol against menigeal pathogens. *Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 16, 13-18.
87. Randall, L. P., Woodward, M. J. (2002). The multiple antibiotic resistance locus (mar) and its significance. *Research in veterinary science* 72, 87-93.
88. Richardson, J. S. (1981). The anatomy and taxonomy of protein structure. *Adv Protein Chem* 34, 167-339.
89. Rogers, E. J., Rahman, M. S., Hill, R. T. & Lovett, P. S. (2002). The chloramphenicol-inducible catB gene in Agrobacterium tumefaciens is regulated by translation attenuation. *J Bacteriol* 184, 4296-300.
90. Samrock, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A Laboratory manual*, Cold Spring Harbor laboratory press,, Cold Spring Harbor, NY.
91. Sandy, J., Mushtaq, A., Kawamura, A., Sinclair, J., Sim, E., Noble, M. (2002). The structure of arylamide N-acetyltransferase from Mucobacterium smegmatis- An enzyme which inactivates the anti-tubercular drug, Isoniazid. *Journal of Molecular Biology* 318, 1071-1083.

92. Shaw, W. V. (1967). The enzymatic acetylation of chloramphenicol by extracts of R factor resistant *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* 242, 687-693.
93. Shaw, W. V. (1975). Chloramphenicol acetyltransferase from chloramphenicol-resistant bacteria. *Methods Enzymol* 43, 737-55.
94. Shaw, W. V. (1983). Chloramphenicol acetyltransferase: enzymology and molecular biology. *CRC Crit Rev Biochem* 14, 1-46.
95. Shaw, W. V., Brenner, D. G., LeGrice, S. F., Skinner, S. E. & Hawkins, A. R. (1985). Chloramphenicol acetyltransferase gene of staphylococcal plasmid pC221. Nucleotide sequence analysis and expression studies. *FEBS Lett* 179, 101-6.
96. Shaw, W. V., Brenner, D. G. & Murray, I. A. (1985). Regulation of antibiotic resistance in bacteria: the chloramphenicol acetyltransferase system. *Curr Top Cell Regul* 26, 455-68.
97. Shaw, W. V. & Brodsky, R. F. (1968). Characterization of chloramphenicol acetyltransferase from chloramphenicol-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 95, 28-36.
98. Shaw, W. V. & Hopwood, D. A. (1976). Chloramphenicol acetylation in *Streptomyces*. *J. Gen. Microbiol.* 94, 159-166.
99. Shaw, W. V. & Leslie, A. G. (1991). Chloramphenicol acetyltransferase. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* 20, 363-86.
100. Shaw, W. V., Packman, L. C., Burleigh, B. D., Dell, A., Morris, H. R. & Hartley, B. S. (1979). Primary structure of a chloramphenicol acetyltransferase specified by R plasmids. *Nature* 282, 870-2.
101. Shaw, W. V., Sands, L. C. & Datta, N. (1972). Hybridization of variants of chloramphenicol acetyltransferase specified by f_i^+ and f_i^- R factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69, 3049-53.
102. Sinclair, J. C., Sandy, J., Delgoda, R., Sim, E., Noble, M. E. M. (2000). Structure of arylamide N-acetyltransferase reveals a catalytic triad. *Nature structural biology* 7, 560-564.
103. Stokes, H. W. & Hall, R. M. (1991). Sequence analysis of the inducible chloramphenicol resistance determinant in the Tn1696 integron suggests regulation by translation attenuation. *Plasmid* 26, 10-19.

104. Stow, M., Starkey, B. J., Hancock, I. C. & Baddiley, J. (1971). Inhibition by chloramphenicol of glucose transfer in teichoic acid biosynthesis. *Nature* 229, 26-57.
105. Stratton, C. W. (2002). Chloramphenicol. *Antimicrobics and infectious diseases newsletter* 18, 89-91.
106. Tanaka, H., Izaki, K. & Takahashi, H. (1974). Some properties of chloramphenicol acetyltransferase, with particular reference to the mechanism of inhibition by basic triphenylmethane dyes. *J Biochem (Tokyo)* 76, 1009-19.
107. Tanaka, H., Kudo, O., Sato, K., Izaki, K. & Takahashi, H. (1971). Inhibition of chloramphenicol O-acetyltransferase of *Escherichia coli* by basic triphenylmethane dyes. *J Antibiot (Tokyo)* 24, 324-5.
108. Turkov, M. I., Belushkin, V. V., Zhitomirskii, D. L., Gordeev, V. K. & Chernomordik, L. V. (1990). The effect of small concentrations of antibiotics blocking the synthesis of bacterial cell wall on the permeability of *Escherichia coli* cell wall for plasmid DNA. *Genetika* 26, 443-447.
109. Turnidge, J. (1999). Fusidic acid pharmacology, pharmacokinetics and pharmacodynamics. *International Journal of Antimicrobial Agents* 12, 23-34.
110. Turnidge, J., Collignon, P. (1999). Resistance to fusidic acid. *International Journal of Antimicrobial Agents* 12, 35-44.
111. Van der Schueren, J., Robben, J., Goossens, K., Heremans, K. & Volckaert, G. (1996). Identification of local carboxy-terminal hydrophobic interactions essential for folding or stability of chloramphenicol acetyltransferase. *J Mol Biol* 256, 878-88.
112. Van der Schueren, J., Robben, J. & Volckaert, G. (1998). Misfolding of chloramphenicol acetyltransferase due to carboxy-terminal truncation can be corrected by second-site mutations. *Protein Eng* 11, 1211-7.
113. Waksman, S. A., Horning, E. S. & Spencer, E. L. (1943). Two antagonistic fungi, *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus clavatus* and their antibiotic substances. *Journal of Bacteriology* 45, 233-248.
114. Webb, V., Davies, J. (1992). Antibiotic preparations contain DNA: a source of antibiotic resistance genes? *Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 37, 2379-2384.
115. White, P. A., Stokes, H. W., Bunny, K. L. & Hall, R. M. (1999). Characterisation of a chloramphenicol acetyltransferase determinant found in the chromosome of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* 175, 27-35.

116. Winshell, E. & Shaw, W. V. (1969). Kinetics of induction and purification of chloramphenicol acetyltransferase from chloramphenicol-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 98, 1248-57.
117. Wolf, E., De Angelis, J., Khalil, E.M., Cole, P.A., Burley, S.K. (2002). X-ray crystallographic studies of serotonin N-acetyltransferase catalysis and inhibition. *Journal of Molecular Biology* 317, 215-224.
118. Woo, P. C. Y., To, A.P.C., Lau, S.K.P., Yuen, K.Y. (2003). Facilitation of horizontal transfer of antimicrobial resistance by transformation of antibiotic induced cell-wall-deficient bacteria. *Medical Hypotheses* 61, 503-508.
119. Wright, G. D. (2003). Mechanisms of resistance to antibiotics. *Current opinion in chemical biology* 7, 1-7.
120. Zhang, Y., Heym, B., Allen, B., Young, D. & Cole, S. (1992). The catalase peroxidase gene and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature(London)* 358, 591-593.
121. Zhang, Y. & Young, D. B. (1993). Molecular mechanisms of isoniazid: a drug at the front line of tuberculosis control. *Trends Microbiol.* 1, 109-115

