

# ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΜΗΜΑ ΦΥΣΙΚΗΣ

# ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

# Physical and statistical analysis tools to unravel allosteric pathways by monitoring protein dynamics

Εργαλεία φυσικής και στατιστικής ανάλυσης για την αποκάλυψη αλλοστερικών μονοπατιών παρακολουθώντας τη δυναμική των πρωτεϊνών

# TPIANTOY EIPHNH

Υπεύθυνος καθηγητής : Δημήτρης Χαραλαμπίδης

Επόπτης καθηγητής : Γιώργος Γκουρίδης

Εργαστήριο Δυναμικής Δομικής Βιολογίας

Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Ηράκλειο

### ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περιεχομενα	
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	
ABSTRACT	
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
1. Στατιετική Αναλύει	
1.1 Η σημασία της συνεξέλιξης αμινοξέων	
1.2 Το φυλογενετικό δέντρο και ο κύκλος των μεταλλάξε	ων6
1.3 Η πρωτεΐνη MBP (Maltose Binding Protein)	
1.4 Η πρωτεΐνη SBD2 (Substrate Binding Domain 2)	
2. ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ FÖRSTER (FRET)	
2.1 Γιατί επιλέγουμε FRET;	
2.2 Η τεχνική FRET μονού-μορίου (smFRET)	
2.3 Το διάγραμμα Jablonski	
2.4 Οι παράμετροι που επηρεάζουν τη τεχνική	
2.5 Ταξινόμηση των μετρήσεων	
2.6 Τα φθοροφόρα	
2.7 Η σημασία τους στη μικροσκοπία φθορισμού	
2.8 Τα χαρακτηριστικά επιλογής τους	
2.9 Η επιλογή των φθοροφόρων Alexa Dyes	
2.10 Η συνεστιακή μικροσκοπία (confocal microscopy)	
2.11 Τα όργανα μέτρησης	
2.12 Διέγερση βιομορίων με εναλλασσόμενο laser (ALEX	)
2.13 Η διάταξη του smFRET	
γλικά και μεθοδοι	
1. Στατιστική Αναλύση	
1.1 Η επιλογή των ομόλογων ακολουθιών	
1.2 Τα φυλογενετικά δέντρα των MBP & SBD2	
1.3 Επεξεργασία των αρχείων με Python	
1.4 Ευθυγράμμιση των αλληλουχιών	
1.5 Statistical Coupling Analysis (SCA)	
1.6 Εντοπισμός συσχετίσεων μεταξύ των ακολουθιών	
2. Η τεχνική Μεταφοράς Ενεργείας Συντονισμού Förster (FR	<b>ET)</b>
2.1 Η πειραματική διάταξη του smFRET	
2.2 Πειραματική διαδικασία και συνθήκες	
2.3 Πειραματικές μετρήσεις σύμφωνα με τη σταθερά δια	άστασης Kd (Association Constant)32
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
1. Το ΔΙΚΤΥΟ ΣΥΝΕΞΕΛΙΞΗΣ ΣΤΗΝ SBD2 (CLASS B)	
2. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΔΟΜΙΚΗΣ ΔΥΝΑΜΙΚΗΣ ΤΗΣ SBD2 ΜΕ SMFRET.	
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	

# Περίληψη

Τα εργαλεία των φυσικών και στατιστικών επιστημών κατέστησαν τη βιολογική έρευνα ποσοτική. Στην παρούσα διατριβή, ένα μακροχρόνιο θεμελιώδες βιολογικό ερώτημα αντιμετωπίστηκε με την υιοθέτηση τέτοιων εργαλείων. Η αλλοστερία αντιπροσωπεύει τα μέσα με τα οποία η βιολογική πληροφορία διαδίδεται σε αποστάσεις. Αυτή η διάδοση σήματος είναι απαραίτητη για όλες τις διαδικασίες της ζωής, και για το λόγο αυτό η αλλοστερία έχει οριστεί με την πάροδο των ετών ως "το δεύτερο μυστικό της ζωής". Εδώ, προσπάθησα να αποκρυπτογραφήσω τα μέσα με τα οποία το σήμα από ένα γεγονός πρόσδεσης σε μια πρωτεϊνική περιοχή μεταδίδεται σε μια γειτονική περιοχή που είναι αποκομμένη από την πρώτη. Μετά τη σύνδεση, οι δύο περιοχές πλησιάζουν η μία την άλλη, με τέτοιο τρόπο ώστε να δημιουργείται ένα πρότυπο σύστημα δύο καταστάσεων: μια ανοικτή ελεύθερη στερεοδιαμόρφωση και μια κλειστή συνδεδεμένη. Η ανοικτή στερεοδιαμόρφωση είναι η ανενεργή, ενώ η κλειστή ενεργοποιεί βιολογικές διεργασίες, όπως η μεταφορά και η χημειοαντίληψη.

Για να προσδιορίσω το αλλοστερικό δίκτυο που συνδέει το ligand (ή τον effector) με τον προσδέτη και την απομακρυσμένη περιοχή, χρησιμοποίησα τη στατιστική ανάλυση σύζευξης (SCA). Ένα τέτοιο εργαλείο επιτρέπει τον εντοπισμό ομάδων αμινοξέων που αλλάζουν ακολουθώντας κοινά μοτίβα, ή με άλλα λόγια συν-εξελίσσονται. Τα συν-εξελισσόμενα αμινοξέα είναι πιθανότατα μέρος ενός μοναδικού δικτύου, ενός αλλοστερικού δικτύου που διαδίδει το αλλοστερικό γεγονός. Για να παρακολουθήσω την κίνηση του ενός τομέα σε σχέση με τον άλλο, χρησιμοποίησα τη μεταφορά ενέργειας συντονισμού Förster σε ένα μόριο (smFRET). Αυτή η τεχνική είναι ένας "φασματοσκοπικός χάρακας" που βασίζεται στη μέτρηση της μεταφοράς ενέργειας μεταξύ ενός φθοροφόρου που δίνει ενέργεια και ενός φθοροφόρου που δέχεται ενέργεια. Το δυναμικό της εύρος είναι συγκρίσιμο με το μέγεθος και τις αλλαγές στις πρωτεϊνικές δομές (Angstrom), καθορίζοντας την απόσταση μεταξύ των φθοροφόρων. Οι δομικές αλλαγές (δομική δυναμική) μεταξύ των δύο περιοχών που δημιουργούν το πρότυπο σύστημα δύο καταστάσεων προσδιορίστηκαν με τη σήμανση των δύο πρωτεϊνικών περιοχών με ειδική σήμανση. Η FRET έχει προσδιοριστεί με μια προσαρμοσμένη κατά παραγγελία συνοπτική διάταξη στην οποία συνέβαλα στη δημιουργία της. Προσάρμοσα επιπλέον τα διαθέσιμα εργαλεία ανάλυσης για τη μετατροπή των ρυθμών μέτρησης φωτονίων σε αποδόσεις FRET και τελικά σε αποστάσεις μεταξύ των περιοχών.

Ανακτήθηκε το αλλοστερικό δίκτυο που συνδέει τις δύο επικράτειες με το ligand και προσδιορίστηκε η δομική δυναμική της πρωτεΐνης άγριου τύπου. Επιπλέον, παρατήρησα ότι όταν το δίκτυο διαταράχθηκε, η διάδοση του αλλοστερικού σήματος καταργήθηκε. Σε μια τέτοια περίπτωση η πρωτεΐνη δεν ήταν σε θέση να υιοθετήσει τη δομή κλειστού συνδέσμου, παραμένοντας έτσι στην ανοικτή ανενεργή κατάσταση, παρά τη δέσμευση του συνδέσμου.

### Abstract

The tools from the physical and statistical sciences rendered biological research quantitative. In this thesis, a long-standing fundamental biological question has been addressed by adopting such tools. Allostery represents the means by which biological information is propagatted over distances. This signal propagation is essential to all life processes, and for that reason allostery has been defined over the years as "the second secret of life". Here, I tried to decipher the means by which the signal from a binding event to one protein domain is transmitter to an adjacent domain that is detached from the first one. After binding, the two domains approach each other. I such a way a two-state model system is generated: an open free state and a closed liganded one. The open state is the inactive one, whereas the closed one activates biological processes, alike transport and chemoreception.

To identify the allosteric network connecting the ligand (or effector) to the docking and the distant domain, I employed Statistical Coupling Analysis (SCA). Such a tool allows to identify groups of amino acids that change following common patterns, or in others words co-evolve. Co-evolving amino acids are likely part of a unique network, an allosteric network propagating the allosteric event. To monitor the movement of one domain relative to the other, I used single-molecule Förster Resonance Energy Transfer (smFRET). This technique is a "spectroscopic ruler" based on measuring the energy transfer between an energy donating fluorophore and an energy accepting one. Its dynamic range is comparable to the size and changes in protein structures (Angstrom), determining the distance between fluorophores. The structural changes (Structural dynamics) between the two domains generating the two-state model system have been determined by labeling site-specifically the two protein domains. FRET has been determined by a custommade confocal arrangement that I contributed in setting it up. I additionally adapted available analysis tools to convert photon counts rates to FRET efficiencies and ultimately to interdomain distances.

The allosteric network connecting the two domains with the ligand has been retrieved and structural dynamics of the wild-type protein were determined. Moreover, I observed that when the network was disrupted, allosteric signal propagation was abolished. In such a case the protein was unable to adopt the closed-liganded structure, thus remaining in the open inactive state, despite ligand binding.

# Εισαγωγή

# 1. Στατιστική Ανάλυση

## 1.1 Η σημασία της συνεξέλιξης αμινοξέων

Οι βασικές βιολογικές ιδιότητες των πρωτεϊνών (αναδίπλωση, βιοχημικές δραστηριότητες και ικανότητα προσαρμογής) προκύπτουν από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αμινοξέων. Η στατιστική ανάλυση σύζευξης (Statistical Coupling Analysis) [8] είναι μια προσέγγιση που παρουσιάστηκε πρώτη φορά από τους Ernesto Freire και Rama Ranganathan σε ένα σύνολο ομόλογων αλληλουχιών, για την αποκάλυψη αλλοστερικών μονοπατιών μέσω της ανάλυσης της συνεξέλιξης αμινοξέων σε μια οικογένεια πρωτεϊνών. Προσδιορίζει μοτίβα συσχετιζόμενων μεταλλάξεων και τα χρησιμοποιεί για να βρει ομάδες συνεξελισσόμενων αμινοξέων. Αυτές οι ομάδες, που ονομάζονται πρωτεϊνικοί τομείς (sectors), σχετίζονται με διάφορες λειτουργικές πτυχές, όπως η ενζυμική δραστικότητα, η σταθερότητα των πρωτεϊνών ή η αλλοστερία.

Η αλλοστερία είναι η διαδικασία με την οποία βιολογικά μακρομόρια (κυρίως πρωτεΐνες) μεταδίδουν το αποτέλεσμα της δέσμευσης (binding) από μια θέση σε μια άλλη λειτουργική θέση, συχνά απομακρυσμένη, επιτρέποντας τη ρύθμιση της δραστικότητας. Η αλλοστερία είναι ένα θερμοδυναμικό γεγονός και έχει άμεση επίδραση στη δυναμική των πρωτεϊνών, η οποία εν συνεχεία υπαγορεύει τη λειτουργία.

Η επικράτηση πρωτεϊνών με "αρχιτεκτονική" πολλαπλών επικρατειών (domains) και η επαναλαμβανόμενη εμφάνιση του ίδιου domain σε μη ομόλογες πρωτεΐνες υποδηλώνει ότι οι λειτουργικές περιοχές επαναχρησιμοποιούνται κατά την δημιουργία νέων πρωτεϊνών και των λειτουργιών τους. Πρόσφατες μελέτες και αναλύσεις σε επιλεγμένες ομάδες επικρατειών, έδειξαν ότι μοιράζονται σε ποσοστό 40 με 50% έναν κοινό δυναμικό πυρήνα που είναι εξαιρετικά διατηρημένος ακόμα και σε προγόνους που τους χωρίζουν δισεκατομμύρια χρόνια.

Επομένως όταν μια περιοχή μιας πρωτεΐνης είναι σημαντική για τη λειτουργία της, είναι συνήθως καλά διατηρημένη μεταξύ ομόλογων και μη πρωτεϊνών. Αυτά τα αμινοξέα εντοπίζονται πραγματοποιώντας μια ευθυγράμμιση αλληλουχίας πρωτεϊνών και στη συνέχεια αναγνωρίζοντας εκείνα που παρέμειναν ίδια. Η μέθοδος της SCA είναι εξαιρετικά σημαντική και βασίζεται στην ευθυγράμμιση ακολουθιών για την εύρεση διατηρημένων residues, αλλά αντί να ψάχνει για διατηρημένα residues, σαρώνει τις ακολουθίες για residues που μεταβάλλονται ταυτόχρονα, επομένως συνεξελίσσονται.

Για παράδειγμα, όταν το αμινοξύ αλλάζει στη θέση 9 μιας πρωτεΐνης, τα αμινοξέα 30, 81 και 136 αλλάζουν επίσης. Αυτό το αποτέλεσμα είναι πολύ σημαντικό για τη μελέτη μας καθώς προσδιορίζει δίκτυα αμινοξέων

που επικοινωνούν με κάποιο τρόπο. Σύμφωνα με την SCA, αυτά τα δίκτυα συνεξελίσσονται και μερικά από αυτά είναι ξεκάθαρα μονοπάτια που χρησιμοποιούν τα αλλοστερικά σήματα για να διαδοθούν στην πρωτεΐνη. Το βασικό αποτέλεσμα είναι η αποσύνθεση των πρωτεϊνικών δομών σε ομάδες (groups) γειτονικών αμινοξέων οι οποίες ονομάζονται sectors (τομείς) που έχουν συνδεθεί με διατηρημένες λειτουργικές ιδιότητες.

Η αλληλουχία αμινοξέων μιας πρωτεΐνης αντανακλά τους περιορισμούς που κρύβονται πίσω από την καταλληλόλητά της και γενικότερα, την εξελικτική ιστορία που οδήγησε στον σχηματισμό της. Ένα κεντρικό πρόβλημα είναι η αποκωδικοποίηση αυτών των πληροφοριών από την αλληλουχία, και έπειτα η κατανόηση της "αρχιτεκτονικής" των φυσικών πρωτεϊνών και της διαδικασίας με την οποία εξελίσσονται. Υποθέτοντας ότι οι κύριοι περιορισμοί που διέπουν την αναδίπλωση, τη λειτουργία και άλλες πτυχές της φυσικής κατάστασης διατηρούνται κατά τη διάρκεια της εξέλιξης, η ιδέα είναι να ξεκινήσουμε με ένα σύνολο ομόλογων ακολουθιών, να προχωρήσουμε στη στοίχιση πολλαπλών ακολουθιών και να υπολογίσουμε έναν πίνακα συσχετίσεων μεταξύ θέσεων ακολουθιών, την αναμενόμενη στατιστική υπογραφή των συζεύξεων μεταξύ αμινοξέων. [8]

### 1.2 Το φυλογενετικό δέντρο και ο κύκλος των μεταλλάξεων

Από τη στατιστική ανάλυση σύζευξης προκύπτει ένα φυλογενετικό δέντρο, ένα διάγραμμα διακλάδωσης, που αποκαλύπτει τις εξελικτικές σχέσεις μεταξύ ομόλογων πρωτεϊνών με βάση τη δομή και την αλληλουχία των αμινοξέων τους. Η ανάλυση αυτή έδειξε ότι οι πρωτεΐνες εξελίχθηκαν από έναν κοινό πρόγονο που διαφοροποιήθηκε σε 7 διαφορετικές δομικές κατηγορίες από Α έως G. [20]

Οι ομόλογες πρωτεΐνες μπορούν να έχουν διαφορετικές λειτουργίες παρόλο που είναι παρόμοιες δομικά. Στην εργασία αυτή εξετάζουμε τη μακροπρόθεσμη εξέλιξη, όπου οι πρωτεΐνικές λειτουργίες αλλάζουν δραστικά. Οι δραστικές αλλαγές στη λειτουργία χρειάζονται επίσης δραστικές αλλαγές στην πρωτεΐνική αλληλουχία ή δομή, και η εξέλιξη το κάνει αυτό με τη μορφή προσθήκης ή διαγραφής δομικών στοιχείων. Η κατευθυνόμενη εξέλιξη είναι μια δημοφιλής τεχνική που χρησιμοποιείται για την αποσαφήνιση ερωτήσεων που σχετίζονται με την αλλοστερία. Είναι μια μέθοδος που μιμείται τη διαδικασία της φυσικής επιλογής για να κατευθύνει τις πρωτεΐνες προς έναν στόχο που έχει ορίσει ο χρήστης, εφαρμόζοντας μια συγκεκριμένη πίεση.

Για παράδειγμα, μια πρωτεΐνη με τη λειτουργία Α υποβάλλεται σε πολλαπλές μεταλλάξεις ενώ πιέζεται σε ένα περιβάλλον που απαιτείται η λειτουργία Β. Στο τέλος της διαδικασίας, καταλήγει σε μια πρωτεΐνη που εξελίχθηκε για να έχει τη λειτουργία Β. Εν συνεχεία παρατηρούμε ποιες μεταλλάξεις είναι υπεύθυνες για αυτήν την αλλαγή. Οι μεταλλάξεις στο ενεργό κέντρο είναι ευκολότερο να κατανοηθούν και να εξηγηθούν, ενώ για μεταλλάξεις σε άλλα μέρη της πρωτεΐνης γίνονται προσπάθειες κατανόησης αυτών των αλλαγών με αποτέλεσμα συχνά την ταυτοποίηση αλλοστερικών συστατικών ή ακολουθώντας την εξελικτική τροχιά κατά τον κύκλο των μεταλλάξεων. Ωστόσο, ένα μειονέκτημα είναι ότι δε μπορεί κάποιος να γνωρίζει αν όντως ευθύνεται αυτή η μετάλλαξη για την εξέλιξη. Επιπλέον, σε πολλές περιπτώσεις για τη μέθοδο αυτή έχει αναφερθεί ότι υπάρχει ένα σημείο όπου οι περαιτέρω κύκλοι μεταλλάξεων δεν μπορούν να αποδώσουν καλύτερο αποτέλεσμα, υποψιαζόμενοι ότι πρέπει να υπάρχει ένα κατώφλι ενέργειας το οποίο μια πρωτεΐνη δεν μπορεί να ξεπεράσει μόνο με λίγες παραπάνω μεταλλάξεις, αλλά με κάποια πιο δραστική αλλαγή.

### 1.3 Η πρωτεΐνη MBP (Maltose Binding Protein)

Η πρωτεΐνη MBP ( Class G) έχει κατά προσέγγιση μάζα 42,5 kilodaltons και δεσμεύει τη μαλτόζη. Είναι

μέρος του συστήματος μαλτόζης / μαλτοδεξτρίνης του βακτηρίου *Escherichia coli* (*E. coli*), το οποίο είναι υπεύθυνο για την πρόσληψη και τον αποτελεσματικό καταβολισμό των μαλτοδεξτρινών. Είναι ένα πολύπλοκο σύστημα ρύθμισης και μεταφοράς που περιλαμβάνει πολλές πρωτεΐνες και πρωτεΐνικά σύμπλοκα.



Εικόνα 1. Η πρωτεΐνη MBP(PDB: 10MP). [13]

Η MBP κωδικοποιείται από το γονίδιο malE του Escherichia coli. Το γονίδιο malE κωδικοποιεί ένα πρόδρομο πολυπεπτίδιο (396 residues αμινοξέων) το οποίο αποδίδει την ώριμη MBP (370 residues) κατά τη

διάσπαση του αμινοτελικού άκρου NH<sub>2</sub>. Η πρόδρομη και η ώριμη μορφή της MBP δεν περιέχουν αμινοξέα κυστεΐνης.

Η MBP είναι μια μονομερής πρωτεΐνη. Οι κρυσταλλικές δομές έχουν δείξει ότι η MBP διαιρείται σε δύο διακριτές σφαιρικές περιοχές που συνδέονται με μία γέφυρα-άρθρωση, β-πτυχωτής επιφάνειας. Οι δύο περιοχές διαχωρίζονται από μια βαθιά εσοχή που περιέχει τη θέση δέσμευσης μαλτόζης/μαλτοδεξτρίνης και περικλείεται από μια περιστροφή μεταξύ των domains. Η σύγκριση των δομών των διάφορων μορφών της MBP με υπόστρωμα (ligand) και χωρίς, έχει δείξει ότι η δέσμευση μαλτόζης προκαλεί μια σημαντική διαμορφωτική αλλαγή που κλείνει την εσοχή με μια άκαμπτη κίνηση των δύο περιοχών γύρω από τη συνδετική άρθρωση του πολυπεπτιδίου. [9]

## 1.4 Η πρωτεΐνη SBD2 (Substrate Binding Domain 2)

Η πρωτεΐνη SBD2 (Substrate Binding Domain 2) είναι σημαντικά δομικά στοιχεία των ABC (ATP-Binding Cassette) μεταφορέων υποστρώματος που μεσολαβούν στη μεταφορά βασικών μορίων μέσω της κυτταρικής μεμβράνης.

Οι τρισδιάστατες (3D) δομές πολλών SBDs από διάφορους μεταφορείς έχουν προσδιοριστεί σε μη δεσμευμένες (apo) καθώς και σε δεσμευμένες (holo) καταστάσεις. Τα SBDs αποτελούνται συνήθως από δύο

τομείς (D1 και D2) με μια κοιλότητα δέσμευσης στο διάστημα μεταξύ των περιοχών. Χωρίς υπόστρωμα συνήθως υιοθετείται μια στερεοδιαμόρφωση ανοιχτού τομέα και μελέτες υποδεικνύουν ότι η μετάβαση σε κλειστή στερεοδιαμόρφωση διευκολύνεται από τη δέσμευση του.

STORE OF CONTRACT

Εικόνα 2. Η πρωτεΐνη SBD2 (PDB: 4KR5). [13]

Η περιοχή SBD2 (ανήκει στην Class B κατηγορία) του μεταφορέα γλουταμίνης (GLN) από βακτήρια αποτελείται από δύο τομείς D1 και D2 που δεσμεύουν τη γλουταμίνη στο διάστημα μεταξύ των περιοχών σε μια κλειστή στερεοδιαμόρφωση. Απουσία υποστρώματος, η SBD2 υιοθετεί μια ανοιχτή στερεοδιαμόρφωση με αυξημένη απόσταση περιοχής.

Μετά τη δέσμευση του υποστρώματος, το σύμπλεγμα SBD συνδέεται με τον ABC μεταφορέα και παρέχει το δεσμευμένο υπόστρωμα για να ξεκινήσει η μετατόπιση στην κυτταροπλασματική πλευρά της μεμβράνης. Ένας από τους πιο εκτενώς διερευνημένους μεταφορείς ABC είναι ο μεταφορέας GlnPQ από βακτήρια που χρησιμοποιεί δύο SBDs (SBD1 και SBD2) για την εισαγωγή ασπαραγίνης, γλουταμίνης και γλουταμικού. Το SBD2 συνδέεται ειδικά με την L-γλουταμίνη (GLN) και είναι απαραίτητο για τη μετέπειτα μεταφορά. Για SBD2 είναι διαθέσιμες κρυσταλλικές δομές υψηλής ανάλυσης τόσο της αρο όσο και της μορφής holo με δεσμευμένο GLN. [10]

# 2. Μεταφορά Ενέργειας Συντονισμού Förster (FRET)

## 2.1 Γιατί επιλέγουμε FRET;

Οι δυναμικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών πιστεύεται ότι διαδραματίζουν βασικό ρόλο στη ρύθμιση των περισσότερων οδών μεταγωγής σήματος των κυττάρων. Αν και οι βιοχημικές προσεγγίσεις για τον προσδιορισμό τέτοιων αλληλεπιδράσεων είναι κοινές, αδύναμες ή παροδικές αλληλεπιδράσεις μπορεί να συμβούν μόνο εντός του φυσικού κυτταρικού περιβάλλοντος των πρωτεϊνών. Ιστορικά, ο εντοπισμός με μικροσκοπία ανοσοφθορισμού σε σταθερά κύτταρα ήταν μια δημοφιλής μέθοδος για την εξέταση των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων *in situ*. Ενώ οι περισσότερες πρωτεϊνες έχουν πλάτος μερικά νανόμετρα, η ανάλυση της μικροσκοπίας φθορισμού είναι αρκετές εκατοντάδες νανόμετρα. Κατ' αναλογία, ένα τυπικό πείραμα απεικόνισης φθορισμού αποδίδει πληροφορίες ισοδύναμες για παράδειγμα με το να γνωρίζουμε ότι δύο μαθητές είναι παρόντες σε μια μεγάλη αίθουσα διαλέξεων: ο απλός εντοπισμός των δύο μαθητών στην ίδια τάξη δεν δίνει πληροφορίες για το αν οι μαθητές γνωρίζονται ή όχι.

Επειδή πολλά μονοπάτια σηματοδότησης χρησιμοποιούν τις ίδιες κυτταρικές δομές, μια τέτοια ακατέργαστη μέτρηση είναι ενδεικτική στην καλύτερη περίπτωση και παραπλανητική στη χειρότερη. Η γνώση ότι δύο μόρια είναι στην πραγματικότητα γειτονικά, και όχι μόνο στην ίδια γειτονιά, παρέχει ένα πολύ πιο αξιόπιστο μέτρο της αλληλεπίδρασής τους. Η ηλεκτρονική μικροσκοπία παρέχει την απαιτούμενη ανάλυση, αλλά περιορίζεται από την έλλειψη ακριβών στρατηγικών σήμανσης. Επιπλέον, αυτές οι τεχνικές γενικά περιορίζονται στη χρήση εντός σταθερών κυττάρων, γεγονός που αποκλείει δυναμικές μετρήσεις ζωντανών κυττάρων.

Μια τεχνική που βασίζεται στη μεταφορά ενέργειας συντονισμού Förster (FRET) μπορεί να ξεπεράσει αυτούς τους περιορισμούς. Το FRET εμφανίζεται μεταξύ δύο κατάλληλα επιλεγμένων φθοροφόρων μόνο όταν η απόσταση που τα χωρίζει είναι μικρότερη από 10 nm. Έτσι, το FRET είναι κατάλληλο για τη μελέτη των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων, οι οποίες συμβαίνουν σε παρόμοια χωρική κλίμακα. Τα τελευταία δέκα χρόνια, οι προσεγγίσεις FRET έχουν κερδίσει δημοτικότητα λόγω της ευκολίας της στόχευσης της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (GFP). [6]

### 2.2 Η τεχνική FRET μονού-μορίου (smFRET)

Το smFRET συστήθηκε πρώτη φορά το 1996 (Ha et al. 1996) και έχει ευρέως υιοθετηθεί από πολλά εργαστήρια ανά τον κόσμο για τη μελέτη διαφόρων βιολογικών συστημάτων, συμπεριλαμβανομένων των DNA, RNA (Zhuang 2005), πρωτεϊνών και μεγάλων μακρομοριακών συμπλόκων (Ha 2001a, 2004; Myong et al. 2006).

Υπάρχουν δύο στοιχειώδεις μέθοδοι ανάλυσης μονού μορίου (single-molecule) FRET (smFRET): παράλληλη ανίχνευση εκατοντάδων μορίων μέσω μικροσκοπίας ολικής εσωτερικής ανάκλασης φθορισμού/Total Internal

Reflection Fluorescence Microscopy (TIRFM) και συνεστιακή ανίχνευση μορίων διάχυσης /confocal detection of diffusing molecules. Το FRET είναι μία φασματοσκοπική τεχνική για τη μέτρηση αποστάσεων της κλίμακας 30-80Å. Η ενέργεια διέγερσης ενός μορίου δότη (donor) μεταφέρεται στον δέκτη (acceptor) μέσω αλληλεπίδρασης μεταξύ δύο επαγόμενων διπόλων.



την οποία μετράμε την αναλογία μεταξύ δύο διαφορετικών χρωμάτων και αναφέρεται στις εσωτερικές κινήσεις των μορίων στο πλαίσιο του κέντρου μάζας τους. Έτσι, παραλλαγές στην αποδοτικότητα της διέγερσης και ανίχνευσης είναι ως επί το πλείστων ανεκτές. Επιπροσθέτως, σχετική μετατόπιση του μορίου





σε εργαστηριακό πλαίσιο δεν αποτελεί τόσο μεγάλο πρόβλημα, όσο τεχνικές που βασίζονται στον προσδιορισμό απόλυτων θέσεων. [1]

Για να πραγματοποιηθεί το smFRET ένας δότης και ένας δέκτης πρέπει να τοποθετηθούν σε συγκεκριμένες στρατηγικές θέσεις στις πρωτεΐνες. Αν ο δότης λείπει δε θα παρατηρηθεί το μόριο και αν λείπει ο δέκτης το είδος που είναι μόνο δότης εμφανίζεται σαν πληθυσμός μηδενικού FRET. Είναι εξαιρετικά ευαίσθητο όταν ο δότης βρίσκεται σε απόσταση  $R_0$  από το δέκτη. Είναι σύνηθες να τοποθετούνται σε θέσεις στο μόριο με τέτοιο τρόπο ώστε η απόσταση μεταξύ των δύο βαφών (dyes) να εναλλάσσεται γύρω από αυτή την τιμή κατά τη διαμορφωτική αλλαγή.

Στην απόσταση  $R_0$ , η οποία κυμαίνεται μεταξύ των 20 έως 100Å μεταξύ του δότη και του δέκτη, βασίζεται και ο χαρακτηρισμός του FRET, που διακρίνεται σε High, Mid και Low FRET. Όταν η απόσταση είναι μικρή μεταξύ δότη και δέκτη τότε έχουμε High FRET, ενώ όταν είναι μεγάλη έχουμε Low FRET και σε μία ενδιάμεση τιμή πρόκειται για Mid FRET. Έτσι γίνεται αντιληπτή η διαμόρφωση του μορίου, καθώς η περίπτωση του Low FRET υποδεικνύει ότι η πρωτεΐνη βρίσκεται στην ανοιχτή στερεοδιαμόρφωση, ενώ εκείνη του High FRET στην κλειστή. [11]

### 2.3 Το διάγραμμα Jablonski

Oι διαδικασίες που συμβαίνουν μεταξύ της απορρόφησης και της εκπομπής φωτός συνήθως απεικονίζονται από το διάγραμμα Jablonski, το οποίο χρησιμοποιείται για την απεικόνιση διαφόρων μοριακών διαδικασιών που μπορεί να συμβαίνουν σε διεγερμένες στάθμες. Σε ένα τυπικό διάγραμμα η θεμελιώδης στάθμη, η 1<sup>η</sup> και 2<sup>η</sup> διεγερμένη συμβολίζονται ως  $S_0$ ,  $S_1$  και  $S_2$  αντίστοιχα. Σε κάθε μία από αυτές τις ηλεκτρονιακές ενεργειακές στάθμες τα φθοροφόρα υπάρχουν στις δονητικές καταστάσεις. Οı μεταβάσεις μεταξύ καταστάσεων των



Εικόνα 4. Διάγραμμα Jablonski με σύγκρουση απόσβεσης και μεταφορά ενέργειας φθορισμού (FRET). Ο όρος Σ k<sub>i</sub> χρησιμοποιείται για τα μονοπάτια χωρίς ακτινοβολία προς τη θεμελιώδη κατάσταση.

απεικονίζονται ως κάθετες γραμμές για να φανεί η ακαριαία φύση της απορρόφησης φωτός. Η απορρόφηση συμβαίνει σε περίπου  $10^{-15}s = 1$  femtosecond (χρόνος που χρειάζεται ένα φωτόνιο για να ταξιδέψει το μήκος του), πολύ μικρό χρόνο ώστε να γίνει σημαντική μετατόπιση πυρήνων, σύμφωνα και με την αρχή *Franck-Condon*. Δεν αλλάζει η διαπυρηνική απόσταση, καθώς γίνεται αναδιάταξη των ηλεκτρονίων στα μοριακά τροχιακά, δηλαδή οι πυρήνες μένουν ουσιαστικά ακίνητοι.

Η απορρόφηση και η εκπομπή προκύπτουν κυρίως από μόρια με τη χαμηλότερη δονητική ενέργεια. Η ενεργειακή διαφορά μεταξύ των  $S_0$  και  $S_1$  είναι πολύ μεγάλη για τον θερμικό πληθυσμό της  $S_1$  και αυτός είναι ο λόγος που χρησιμοποιούμε φως και όχι θερμότητα για να παράγουμε φθορισμό. Κατά την απορρόφηση, ένα φθοροφόρο διεγείρεται σε μια υψηλότερη δονητική στάθμη, την  $S_1$  ή  $S_2$ .

Με κάποιες ελάχιστες εξαιρέσεις, τα μόρια σε συμπυκνωμένες φάσεις "χαλαρώνουν" γρήγορα (solvent relaxation) στη χαμηλότερη δονητική κατάσταση της διεγερμένης κατάστασης  $S_1$ . Γίνεται δηλαδή μια εσωτερική μετατροπή (internal conversion), η οποία συνήθως είναι της τάξης των  $10^{-12}s$ , ίσως και λιγότερο, και είναι το αποτέλεσμα μιας ισχυρής αλληλοεπικάλυψης μεταξύ πολλών καταστάσεων με την ίδια σχεδόν ενέργεια. Εξαιτίας αυτής της γρήγορης "χαλάρωσης" τα φάσματα εκπομπής παρατηρούνται γενικά και δεν εξαρτώνται συνήθως από το μήκος κύματος της διέγερσης, γνωστό και ως κανόνας του Kasha. Κατά τη διέγερση αυτή η περίσσεια ενέργεια διαχέεται, αφήνοντας το φθοροφόρο στη χαμηλότερη στάθμη της  $S_1$ . Δεδομένου ότι οι χρόνοι ζωής του φθορισμού είναι κοντά στα  $10^{-8}s$ , αυτή η εσωτερική μετατροπή έχει προηγηθεί της εκπομπής. Ως εκ τούτου, η εκπομπή φθορισμού είναι αποτέλεσμα μιας θερμικά ισορροπημένης διεγερμένης κατάστασης, στη χαμηλότερη δονητική ενεργειακή στάθμη της  $S_1$ .

Υπάρχουν και εξαιρέσεις, όπως τα φθοροφόρα που βρίσκονται σε δύο ιονισμένες καταστάσεις καθένα από τα οποία εμφανίζουν διακριτά φάσματα απορρόφησης και εκπομπής. Επίσης, κάποια μόρια είναι γνωστό ότι εκπέμπουν από τη στάθμη S<sub>2</sub>, αλλά μια τέτοιου είδους εκπομπή είναι σπάνια και γενικά δεν παρατηρείται σε βιολογικά μόρια.

Μια άλλη διαδικασία που λαμβάνει χώρα στη διεγερμένη κατάσταση είναι η μεταφορά ενέργειας συντονισμού (RET), όταν το φάσμα εκπομπής του φθοροφόρου, που λέγεται δότης, επικαλύπτει το φάσμα απορρόφησης του άλλου μορίου, που λέγεται δέκτης. Ο δέκτης δε χρειάζεται να υποστεί φθορισμό. Είναι σημαντικό να διευκρινιστεί ότι το RET δεν περιλαμβάνει εκπομπή φωτός από τον δότη, καθώς δεν είναι το αποτέλεσμα εκπομπής από το δότη που απορροφάται από το δέκτη.

Μια τέτοιου είδους διαδικασία απορρόφησης εξαρτάται από τη συνολική συγκέντρωση του δέκτη και από μη-μοριακούς παράγοντες όπως το μέγεθος του δείγματος. Δεν υπάρχει ενδιάμεσο φωτόνιο στο RET. Ο δότης και ο δέκτης συνδέονται μέσω αλληλεπίδρασης διπόλου-διπόλου. Το μέγεθος της μεταφερόμενης ενέργειας καθορίζεται από την απόσταση μεταξύ δότη-δέκτη και από την φασματική επικάλυψη. Για ευκολία η φασματική επικάλυψη περιγράφεται βάση της απόστασης Förster ( $R_0$ ). Ο ρυθμός μεταφοράς ενέργειας  $k_T(r)$  δίνεται από τον τύπο:  $k_T(r) = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r}\right)^6$ , όπου r η απόσταση μεταξύ του δότη (D) και του δέκτη (A) και  $\tau_D$  ο χρόνος ζωής του δότη απουσία μεταφοράς ενέργειας.

Οι αποστάσεις Förster είναι της κλίμακας των 15 έως 60 Å, που είναι συγκρίσιμες σε μέγεθος με τα βιολογικά μακρομόρια, τις πρωτεΐνες και το πάχος των μεμβρανών. Γι' αυτό το λόγο η μεταφορά ενέργειας χρησιμοποιείται σαν ένας "φασματοσκοπικός χάρακας" για μετρήσεις απόστασης μεταξύ τμημάτων των πρωτεϊνών. [3]

Η επιστροφή στη θεμελιώδη στάθμη τυπικά γίνεται σε μια υψηλότερη διεγερμένη κατάσταση της θεμελιώδους, που γρήγορα  $(10^{-12}s = 1ps)$  φτάνει σε θερμική ισορροπία. Αυτό εξηγεί τη δονητική δομή του φθοροφόρου στο φάσμα εκπομπής, το οποίο είναι ουσιαστικά μια εικόνα καθρέφτης του φάσματος απορρόφησης για τη μετάβαση  $S_0 \rightarrow S_1$ . Η ομοιότητα αυτή υπάρχει, επειδή η ηλεκτρονιακή διέγερση δεν τροποποιεί ιδιαίτερα τη γεωμετρία του πυρήνα. Επομένως το κενό των δονητικών ενεργειακών σταθμών στις διεγερμένες καταστάσεις είναι παρόμοιο με αυτό της θεμελιώδους κατάστασης.

Εξετάζοντας το διάγραμμα Jablonski φαίνεται ότι η ενέργεια εκπομπής είναι μικρότερη από αυτή της απορρόφησης. Ο φθορισμός συμβαίνει τυπικά σε χαμηλότερες ενέργειες ή μεγαλύτερα μήκη κύματος. Αυτό το φαινόμενο παρατηρήθηκε πρώτη φορά από τον Sir. G. G. Stokes το 1852 στο Πανεπιστήμιο του Κέιμπριτζ. Έτσι εφευρέθηκε ο όρος Stokes shift (μετατόπιση Stokes) που χρησιμοποιείται για να περιγράψει τη διαφορά στο μήκος κύματος στο οποίο διεγέρθηκε το μόριο. [3]



### 2.4 Οι παράμετροι που επηρεάζουν τη τεχνική

Σημαντική αλλαγή στην αποδοτικότητα Ε παρατηρείται όταν η απόσταση μεταξύ των μορίων δότη και δέκτη αλλάζει κατά αρκετά angstroms και nanometers. Επιπλέον, μία διαρθρωτική αλλαγή ενός βιολογικού μορίου ή σχετικής κίνησης μεταξύ δύο αλληλεπιδρώντων μορίων μπορεί να διακριθεί μέσω αλλαγής στο FRET.

Υπολογίζουμε την φαινόμενη (apparent) αποδοτικότητα του FRET από:  $E_{app} = \frac{I_A}{(I_D + I_A)}$ , όπου  $I_D$  και  $I_A$  είναι η ένταση εκπομπής του δότη και του δέκτη αντίστοιχα. Αυτό που ουσιαστικά μετράμε είναι οι ακατέργαστες εντάσεις των καναλιών του δότη  $I_D^0$  και του δέκτη  $I_A^0$ . Έπειτα πρέπει να διορθώσουμε τη διαρροή του σήματος του δότη στο κανάλι του δέκτη, που είναι τυπικά μεταξύ του 10% και 15% και μπορεί να προσδιοριστεί από το μόριο του δότη. Αφαιρούμε ένα σταθερό κλάσμα α του  $I_D^0$  από το  $I_A^0$ , έτσι ώστε το διορθωμένο σήμα του δέκτη να μηδενιστεί (και  $E_{app} = 0$ ). Οπότε η φαινόμενη αποδοτικότητα γίνεται:  $E_{app} = \frac{(I_A^0 - a \times I_D^0)}{(I_D^0 + I_A^0 - a \times I_D^0)}$ .

Μια επιπλέον διόρθωση μπορεί ακόμη να επέλθει, καθώς ίσως να υπάρχει μια πεπερασμένη ποσότητα διαρροής του σήματος του δέκτη στο κανάλι του δότη, βάση της οπτικής διαμόρφωσης. Η απόλυτη τιμή του FRET δύναται να εκτιμηθεί από την παραπάνω διορθωμένη σχέση χρησιμοποιώντας το διορθωτικό παράγοντα (Ha et al. 1999). Επομένως η αποδοτικότητα του FRET δίνεται από:  $E = \frac{I_A}{(I_D + \gamma \times I_A)}$ , όπου γ η παράμετρος που αντιπροσωπεύει σχετικές αποδόσεις ανίχνευσης και κβαντικές αποδόσεις των δύο βαφών, προσδιορίσιμα από συμβάντα φωτολεύκανσης. Η φωτολεύκανση είναι η μη αναστρέψιμη καταστροφή ενός διεγερμένου φθοροφόρου λόγω φωτοχημικών μεταβολών των μορίων έπειτα από παρατεταμένη έκθεση στην ακτινοβολία.

Επομένως,  $E = \frac{I_A}{(I_A + I_D)}$  είναι μία άριστη προσέγγιση για την αποδοτικότητα του FRET. [1]

Η αποδοτικότητα (efficiency) της μεταφοράς ενέργειας δίνεται επίσης από τον τύπο:

 $E = \frac{R_0}{R_0^6 + r^6}$ , όπου r η απόσταση μεταξύ δότη και αποδέκτη και  $R_0$  η χαρακτηριστική απόσταση κατά την οποία μεταφέρεται το 50% της ενέργειας. Η απόσταση μεταξύ του δότη και του δέκτη υπολογίζεται από αυτή την αποδοτικότητα. [1]

To  $R_0$  υπολογίζεται ως εξής:  $R_0^6 = \frac{9000(ln10)\Phi_D \kappa^2 J(v)}{128\pi^5 N_A n^4}$ , όπου  $\Phi_D$  η κβαντική απόδοση του δότη,  $N_A$  ο αριθμός Avogadro και n ο δείκτης διάθλασης του μέσου,  $\kappa^2$  είναι ένας παράγοντας προσανατολισμού με μέση τιμή 2/3. Το J(v) είναι η κανονικοποιημένη φασματική επικάλυψη της εκπομπής του δότη  $f_D(\lambda)$  και της απορρόφησης του δέκτη  $\varepsilon_A(\lambda)$  όπως δίνεται:  $J(v) = \frac{\int \varepsilon_A(\lambda) f_D(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int f_D(\lambda) d\lambda}$ , όπου το  $\varepsilon_A(\lambda)$  είναι σε μονάδες  $M^{-1}cm^{-1}$  και το  $M^{-1}$  ισούται με 1000 $cm^3/mole$ .

#### 2.5 Ταξινόμηση των μετρήσεων

Οι μετρήσεις φθορισμού μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο τύπους: σταθερής κατάστασης (steady-state) και χρονικής ανάλυσης (time-resolved). Οι μετρήσεις σταθερής κατάστασης, ο πιο συνηθισμένος τύπος, είναι αυτές που πραγματοποιούνται με συνεχή ακτινοβολία και παρατήρηση. Το δείγμα ακτινοβολείται με μια συνεχή δέσμη και καταγράφεται η ένταση ή το φάσμα εκπομπής. Εξαιτίας της χρονικής κλίμακας του νανοδευτερολέπτου του φθορισμού, οι περισσότερες μετρήσεις είναι σταθερής κατάστασης. Αμέσως μόλις το δείγμα εκτεθεί στο φως επιτυγχάνεται η σταθερή κατάσταση.

Για τις μετρήσεις χρονικής ανάλυσης το δείγμα εκτίθεται σε παλμικό φως, όπου το πλάτος του παλμού είναι τυπικά μικρότερο από το χρόνο αποσύνθεσης του παλμού. Αυτή η μείωση της έντασης καταγράφεται από

ένα σύστημα ανίχνευσης υψηλής ταχύτητας που επιτρέπει η ένταση ή η ανισοτροπία να μετρούνται σε χρονική κλίμακα του ns. [3]

### 2.6 Τα φθοροφόρα

Τί είναι τα φθοροφόρα;

Το φθοροφόρο είναι μια χημική ένωση φθορισμού που μπορεί να εκπέμψει εκ νέου φως μετά από διέγερση φωτός. Τα φθοροφόρα περιέχουν συνήθως πολλές συνδυασμένες αρωματικές ομάδες ή επίπεδα ή κυκλικά μόρια με αρκετούς δεσμούς π. Τα φθοροφόρα ανιχνεύθηκαν πρώτη φορά σε θερμοκρασία υγρού ηλίου μέσω απορρόφησης (Moerner και Kador 1989) και φθορισμού (Orrit και Bernard 1990) και αργότερα επεκτάθηκε σε συνθήκες δωματίου (Betzig και Chichester 1993) διευρύνοντας τις δυνατότητες για βιολογικές εφαρμογές.

### 2.7 Η σημασία τους στη μικροσκοπία φθορισμού

Η προσάρτηση ενός φθοροφόρου στη βέλτιστη θέση είναι ζωτικής σημασίας για να είναι επιτυχημένα τα πειράματα smFRET. Η παρουσία της βαφής και ο φυσικός περιορισμός από την ακινητοποίηση μπορεί να επηρεάσει τη δραστηριότητα της πρωτεΐνης. Τι μας αποκαλύπτει ο φθορισμός μονού μορίου για το βιομόριο ξενιστή;

Πρώτον, μας λέει ότι υπάρχει και πού βρίσκεται. Ο εντοπισμός ενός φθοροφόρου μπορεί να έχει ακρίβεια 1nm=10Å κατά την εφαρμογή της εικόνας ενός (ή δύο φθοροφόρων διαφορετικών χρωμάτων) χρησιμοποιώντας δισδιάστατη Γκαουσιανή εφαρμογή.



Εικόνα 5. Κύτταρα νευροβλαστώματος: οι πυρήνες είναι βαμμένοι με κόκκινο-μωβ, τα μικρονημάτια σε πράσινο & μπλε. [14]

Δεύτερον, η απόκριση της πόλωσης ενός φθοροφόρου μπορεί να χρησιμοποιηθεί ώστε να συμπεράνουμε τον προσανατολισμό του μορίου ξενιστή ή της επικράτειας του (domain). Τρίτον, η απόσταση μεταξύ δύο φθοροφόρων, ενός δότη και ενός αποδέκτη, μπορεί να υπολογιστεί από τη μέτρηση της μεταφοράς ενέργειας συντονισμού φθορισμού/ Fluorescence/Förster Resonance Energy Transfer (FRET) μεταξύ τους.

#### 2.8 Τα χαρακτηριστικά επιλογής τους

Η ιδανική βαφή για τη μελέτη του φθορισμού του μορίου πρέπει να έχει όσα περισσότερα χαρακτηριστικά από τα παρακάτω. Πρέπει 1) να είναι φωτοσταθερά, ώστε να εκπέμπουν εκατομμύρια φωτόνια πριν τη φωτολεύκανση, 2) να είναι λαμπερά, δηλαδή να έχουν υψηλό συντελεστή απόσβεσης και κβαντική απόδοση, 3) να παρουσιάζουν μικρή διακύμανση της έντασης, 4) να διεγείρονται και να εκπέμπονται στα μήκη κύματος

του ορατού φάσματος, 5) να είναι σχετικά μικρά ώστε να παρουσιάζουν ελάχιστες διαταραχές στο μόριο ξενιστή και 6) να είναι εμπορικά διαθέσιμα σε μορφή που να μπορούν να συζευχθούν με βιομόρια. Οι βαφές που προτιμώνται συνήθως για μελέτες smFRET είναι οι Cy3,Cy5 και tetramethyl rhodamine (TMR).

Το καταλληλότερο ζεύγος βαφών θα είχε 1) αισθητή επικάλυψη μεταξύ της εκπομπής του δότη και της απορρόφησης του δέκτη, 2) μεγάλο φασματικό διαχωρισμό στην εκπομπή τους ώστε να ελαχιστοποιηθεί η διαρροή εκπομπής του δότη στη φασματική περιοχή της απορρόφησης του δέκτη και να περιορίσει την ποσότητα της άμεσης διέγερσης του δέκτη από το laser και 3) μία συγκρίσιμη κβαντική απόδοση εκπομπής για το δότη και το δέκτη. [1]

### 2.9 Η επιλογή των φθοροφόρων Alexa Dyes

Ο φθορισμός προκύπτει από αρωματικά μόρια όπως για παράδειγμα τα Fluorescein, rhodamines, Texas-Red, Alexa Fluor κ.α. Ένα πρόβλημα με κάποια φθοροφόρα είναι ότι τείνουν να σβήνουν (self-quenching). Για

παράδειγμα είναι γνωστό ότι η λαμπρότητα των σημασμένων πρωτεϊνών με Fluorescein δεν αυξάνεται γραμμικά καθώς προχωρά η σήμανση (labeling), αντίθετα η ένταση μειώνεται.

Τα Alexa Fluor dyes από την άλλη φαίνεται να παρουσιάζουν πολύ λιγότερο self-quenching, που επιτρέπουν στα μεμονωμένα σημασμένα αντισώματα να φθορίζουν περισσότερο. Δεν είναι ξεκάθαρο γιατί



Εικόνα 6. Φάσματα εκπομπής φθορισμού των Alexa Fluor συναρτήσει του μήκους κύματος, από την Cambridge Research Biochemicals.

συμβαίνει αυτό με τα Alexa dyes, καθώς παρουσιάζουν παρόμοιες μετατοπίσεις Stokes με τα φθοροφόρα fluorescein και rhodamine.

Μία από τις πιο σημαντικές ιδιότητες είναι η φωτοσταθερότητα των φθοροφόρων. Περίπου όλα τα φθοροφόρα φωτολευκαίνουν (photobleached) κατά τη συνεχή ακτινοβόληση, κυρίως στη μικροσκοπία φθορισμού όπου οι εντάσεις φωτός είναι υψηλές. Τα Alexa dyes είναι περισσότερο φωτοσταθερά και αυτός είναι ο λόγος που έχουν αναπτυχθεί. Η χημική δομή τους δεν είναι διαθέσιμη, ενώ η μέγιστη εκπομπή τους κυμαίνεται από 442 έως 775 nm. Βέβαια η φωτοσταθερότητα μιας βαφής επηρεάζεται και από το περιβάλλον, καθώς σε κάποιες περιπτώσεις αυξάνεται απουσία οξυγόνου, ενώ σε άλλες το οξυγόνο δεν επηρεάζει. [4]

### 2.10 Η συνεστιακή μικροσκοπία (confocal microscopy)

Από τί ορίζεται το συνεστιακό μικροσκόπιο;

Στα τέλη της δεκαετίας του 1950, ο Marvin Minsky ανέπτυξε τη συνεστιακή μικροσκοπία (confocal microscopy) με σκοπό την εκτέλεση απεικόνισης σε πυκνό ιστό όπως ο εγκέφαλος. Το κόλπο της συνεστιακής μικροσκοπίας είναι η χρήση οπών (pinholes) ώστε να περιοριστούν οι δέσμες διέγερσης και ανίχνευσης και ως εκ τούτου να κατασταλεί η ανίχνευση φωτός εκτός της εστίασης. Οι οπές είναι τοποθετημένες στα επίπεδα εικόνας του μικροσκοπίου και κατά συνέπεια είναι "συν-εστιασμένες".

Τυπικά, μία συνεκτική δέσμη laser έχει επιλεγεί ως πηγή διέγερσης και στην περίπτωση αυτή μία οπή διέγερσης δεν είναι απαραίτητη. Η διεγερμένη δέσμη, που κατευθύνεται από ένα σετ φακών, ανακλάται ακολούθως από ένα διχρωμικό (dichroic) καθρέφτη που διαχωρίζει το φως διέγερσης από το σήμα φθορισμού βασισμένο στα διαφορετικά μήκη κύματος. Το φως φθορισμού συλλέγεται με τον αντικειμενικό φακό και

μεταδίδεται μέσω του διχρωμικού καθρέφτη. Για να διασφαλιστεί ότι μόνο φως από μια μικρή περιοχή του δείγματος φτάνει στον ανιχνευτή, τοποθετείται μία οπή (pinhole) στο επίπεδο εικόνας του δείγματος. Η συνεστιακή οπή ανίχνευσης καθορίζει τι φως φτάνει στον ανιχνευτή: φθορίζοντα φωτόνια που προέρχονται από την εστία της δέσμης διέγερσης περνούν μέσα από την οπή και ανιχνεύονται. Η μικροσκοπική οπή (pinhole) είναι το βασικό στοιχείο που παρέχει τη βελτιωμένη ανάλυση και δυνατότητες τομής του οργάνου.



Το μέγεθος της οπής (pinhole) μπορεί να ποικίλει ώστε να τροποποιηθεί η ανάλυση ή να αυξηθεί η απόδοση του φωτός.

Εικόνα 4. Απεικόνιση της διαδρομής των δεσμών ενός μοντέρνου συνεστιακού μικροσκοπίου. [11]

[2]

Το εκτός εστίασης φως (δηλαδή το φως που δεν είναι συνεστιασμένο με την οπή) μπλοκάρεται από την οπή. Η συντριπτική πλειοψηφία του φωτός θα μπλοκαριστεί, όπως επίσης και το φως υποβάθρου που προέρχεται από το επίπεδο εστίασης (focal plane) αλλά εκτοπίζεται πλευρικά από τη θέση της οπής στο επίπεδο του δείγματος που επίσης θα μπλοκαριστεί. Παρ' όλο που φτάνει λιγότερο φως στον ανιχνευτή, η συνεστιακή οπή οδηγεί σε σημαντική βελτίωση της αναλογίας του σήματος προς θόρυβο, της συλλεγόμενης απεικόνισης συγκριτικά με τις μεθόδους φωτεινού πεδίου. Μετά την οπή, η εναπομείνασα δέσμη φωτός μπορεί να κατευθυνθεί απευθείας στον ανιχνευτή, που μπορεί να είναι ένας σωλήνας φωτοπολλαπλασιαστή (PMT), μία φωτοδίοδος χιονοστιβάδας (Avalanche Photodiode-APD), ή σε κάποιες περιπτώσεις μία κάμερα συζευγμένης συσκευής φόρτισης (Charge-Coupled Device-CCD) όπως είναι για έναν περιστρεφόμενο δίσκο συνεστιακού μικροσκοπίου (Spinning Disk Confocal Microscope-SDCM). [2]

### 2.11 Τα όργανα μέτρησης

Γενικά σε μία συνεστιακή διάταξη μπορούν να χρησιμοποιηθούν και συνεχούς κύματος (CW) laser και παλμικό. Τα συνεχούς κύματος lasers χρησιμοποιούνται στα περισσότερα συμβατικά συνεστιακά μικροσκόπια. Ωστόσο, η χρήση sub-nanosecond παλμικών lasers εισάγει μία άλλη διάσταση και κάνει εφικτό τον προσδιορισμό της διάρκειας ζωής του φθορισμού και την εκτέλεση απεικόνισης φθορισμού εφ' όρου ζωής (FLIM). Το μειονέκτημα των παλμικών lasers είναι ότι μπορεί να οδηγήσουν σε ενισχυμένη φωτοφυσική σε φθορίζουσες βαφές (dyes), καθώς η ροή των φωτονίων και η πυκνότητα ενέργειας κατά τη διάρκεια του παλμού laser είναι μεγαλύτερη απ' ότι στα συνεχούς κύματος. Αντίθετα, τα συνεχούς κύματος lasers είναι πιο κατάλληλα για εφαρμογές όπου χρειάζεται μια εξαιρετικά σταθερή ροή φωτονίων σε ένα ευρύ φάσμα χρονικών κλιμάκων.

Οι ανιχνευτές πρέπει να επιλέγονται βάσει των λεπτομερειών των μετρήσεων, ανάλογα αν χρειάζεται ένας ανιχνευτής ευρέος πεδίου ή ανιχνευτής σημείου. Οι ευρέος πεδίου ανιχνευτές όπως ο επιστημονικός συμπληρωματικός ημιαγωγός οξειδίου του μετάλλου (sCMOS) ή CCD κάμερες πολλαπλασιασμού ηλεκτρονίων (EMCCD) προσφέρουν υψηλή ευαισθησία και είναι ιδανικά για εφαρμογές συνεστιακής μικροσκοπίας περιστρεφόμενου δίσκου.

Για εφαρμογές σάρωσης με laser, ένας ανιχνευτής μονού σημείου όπως οι PMTs ή APDs είναι τυπικά η καλύτερη επιλογή. Οι ανιχνευτές APDs, που χρησιμοποιούμε και στη διάταξή του πειράματός μας, δίνουν τη δυνατότητα μέτρησης πολύ μικρού ρυθμού σκότους (λιγότερα από <10 Hz) και υψηλή ευαισθησία, αλλά συνήθως έχουν ευρύτερη λειτουργία απόκρισης του οργάνου (Instrument Response Function-IRF) και η μέγιστη τιμή του ρυθμού φτάνει έως ~10MHz. Ως εκ τούτου είναι κατάλληλοι για χαμηλού επιπέδου φωτισμού πειράματα, όπου είναι επιθυμητή υψηλή ευαισθησία.

Οι ανιχνευτές μπορούν να "τρέξουν" σε αναλογική ή ψηφιακή λειτουργία. Η τεχνική διαφορά εμφανίζεται μετά τα φωτοευαίσθητα ηλεκτρονικά. Οι ηλεκτρονικοί παλμοί είτε ενσωματώνονται για ορισμένο χρόνο από έναν ενσωματωτή σε αναλογική λειτουργία ή ψηφιοποιούνται από ένα διαχωριστή (discriminator). Στην πρώτη περίπτωση, η τάση εξόδου είναι ανάλογη με τον αριθμό των εισερχόμενων φωτονίων. Στη δεύτερη

περίπτωση, κάθε ανιχνευμένο φωτόνιο μετατρέπεται σε TTL παλμό, που μπορεί να καταγραφεί από κάρτα μέτρησης ή μία κάρτα μέτρησης ενός φωτονίου σε συσχέτιση με το χρόνο (Time-Correlated Single Photon Counting-TCSPC). Η αναλογική ανίχνευση είναι συμφέρουσα για φωτεινά δείγματα, ενώ η ψηφιακή ανίχνευση, που εφαρμόζεται στη διάταξή μας είναι καλύτερη όταν χρειάζονται περισσότερες πληροφορίες από ένα περιορισμένο αριθμό φωτονίων. [2]

### 2.12 Διέγερση βιομορίων με εναλλασσόμενο laser (ALEX)

Το smFRET είναι μία από τις πιο δημοφιλείς μονομοριακές μεθόδους (Ha et al. 1996) για την παρακολούθηση αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών και διαμορφωτικών αλλαγών. Σε ένα τυπικό smFRET πείραμα ένα μόριο ή σύμπλοκο σημασμένο με ένα ζεύγος δότη-δέκτη εκτίθεται στο φως που διεγείρει το δότη. Το FRET έχει επεκταθεί πρόσφατα μέσω της χρήσης διέγερσης εναλλασσόμενου laser (Kapanidis et al. 2004, 2005a; Laurence et al. 2005; Lee et al. 2005; Nir et al. 2006), που παρέχει επιπρόσθετες και άμεσες πληροφορίες για την παρουσία και την κατάσταση των φθοροφόρων του δότη και του δέκτη. Αρχικές εφαρμογές του ALEX εστιάζονται σε μελέτες αντιγραφής γονιδίων (Kapanidis et al.2005b, 2006; Margeat et al. 2006) και αναδίπλωσης πρωτεϊνών (Laurence et al.2005). Σε συμβατικό smFRET, η μέθοδος ALEX είναι συμβατή με μελέτες διάχυσης και ακινητοποίησης μορίων. Η διάχυση μορίων μπορεί να μελετηθεί σε διαλύματα, gels ή ακόμα σε πορώδη υλικά. Ακινητοποιημένα μόρια μπορούν να μελετηθούν κάνοντας χρήση συνεστιακής (confocal) μικροσκοπίας και σάρωσης, η οποία είναι και η μέθοδος που χρησιμοποιούμε στο πείραμά μας.

Το ALEX (Alternating-Laser Excitation) είναι μία σύγχρονη μέθοδος φθορισμού που χρησιμοποιεί εναλλασσόμενο laser για τη διέγερση βιομορίων ώστε να μελετήσουμε τη δομή, τις αλληλεπιδράσεις και τις δυναμικές τους. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση αναλογιών της έντασης φθορισμού που αναφέρονται στην απόσταση μεταξύ τους και στη σχετική στοιχειομετρία των φθοροφόρων που είναι συνδεδεμένα στα μόρια που μας ενδιαφέρουν. Η αρχή της εναλλασσόμενης διέγερσης είναι συμβατή με διάφορα χρονοδιαγράμματα, επιτρέποντας την παρακολούθηση γρήγορων δυναμικών ή ταυτόχρονης παρακολούθησης ενός μεγάλου αριθμού μεμονωμένων μορίων. [5]

Η φύση και το χρονοδιάγραμμα των βιολογικών ερωτήσεων που πρέπει να αντιμετωπιστούν, μαζί με την απαιτούμενη ευαισθησία μέτρησης, καθορίζει το χρονοδιάγραμμα της εναλλαγής για το ALEX. Βασικά πειράματα σχετικά με την ισορροπία ενός βιολογικού συστήματος (όπως εμφανίζονται στο χρονοδιάγραμμα μερικών λεπτών) μπορεί να επιτευχθεί χρησιμοποιώντας διαμορφωτή laser σε κλίμακα μικροδευτερολέπτου με τη μέθοδο του μs-ALEX, που παρέχει στιγμιότυπα διάχυσης μορίων. Από την άλλη, σε πειράματα μη ισορροπίας και δυναμικές κινήσεις κλίμακας λεπτών σε πολλά μόρια ταυτόχρονα, το ένα πρέπει να χρησιμοποιεί απεικόνιση σε συνδυασμό με διαμορφωτή laser σε κλίμακα millisecond (ms-ALEX). Στα

smFRET πειράματα, οι μέθοδοι που βασίζονται σε ένα τυπικό ALEX απαιτούν χρήση υπονανομοριακών συγκεντρώσεων σημασμένων μορίων για να εξασφαλιστεί ότι μονά μόρια μπορούν να εντοπιστούν και να αναλυθούν. Επιπλέον, φθορίζοντες ανιχνευτές πρέπει να εισαχθούν στο μόριο ενδιαφέροντος και αναλύσεις πρέπει να αποδείξουν ότι τα φθοροφόρα δε διαταράσσουν σημαντικά τη λειτουργία τους. Τέλος, η φωτολεύκανση των φθοροφόρων θέτει ένα όριο στην παρατήρηση ακινητοποιημένων μορίων, ειδικά κατά την απουσία απορροφητών οξυγόνου και χημικών προσθέσεων. [5]

### 2.13 Η διάταξη του smFRET

Για να κατασκευαστεί ένα βασικό όργανο με δύο lasers και δύο ανιχνευτές, μπορεί κανείς να χωρίσει τη διάταξη σε τρεις βασικές ενότητες (όπως σε κάθε μέτρηση φθορισμού) : (1) τη μονάδα διέγερσης (excitation module), η οποία δημιουργεί το φως εναλλασσόμενου laser και το κατευθύνει στο δείγμα του μικροσκοπίου, (2) τη θήκη του δείγματος και το αντικειμενικό εξάρτημα (συχνά ένα πλαίσιο ανεστραμμένου μικροσκοπίου), το οποίο στηρίζει το δείγμα και επιτρέπει την αποτελεσματική διέγερση του δείγματος και την αρχική συλλογή της εκπομπής φθορισμού και (3) τη μονάδα εκπομπής (emission module), που συλλέγει, μετρά και "χρονομετρά" τα εκπεμπόμενα φωτόνια.

### Το επίπεδο διέγερσης (Excitation module)

Τα βασικά στοιχεία της διαδρομής διέγερσης μιας διάταξης ALEX είναι οι πηγές laser, οι διαμορφωτές, και οι συσκευές συνδυασμού laser. Είναι κρίσιμο να διαλέξουμε τα μήκη κύματος διέγερσης, τα φίλτρα και τους διχρωμικούς διαχωριστές δέσμης με τρόπο που μεγιστοποιεί τα μεμονωμένα παράθυρα ανίχνευσης για φθοροφόρα και ελαχιστοποιεί το σήμα υποβάθρου που προκαλείται από τη σκέδαση. Οι δύο βασικές μέθοδοι σκέδασης είναι η σκέδαση Rayleigh ("ελαστική" σκέδαση, δεδομένου ότι οδηγεί στην ανίχνευση φωτονίων ίδιου μήκους κύματος με αυτό της διέγερσης) και η σκέδαση Raman ("ανελαστική" σκέδαση, δεδομένου ότι οδηγεί στην ανίχνευση φωτονίων μήκους κύματος μεγαλύτερου από αυτού της διέγερσης). [5]

### **T**α Lasers

Το ευρύ φάσμα των εμπορικά διαθέσιμων lasers μπορούν να ταξινομηθούν με πολλούς τρόπους. Αρχικά, τα lasers διαχωρίζονται σε συνεχές-κύμα (CW) και παλμικό laser. Επιπλέον, τα lasers μπορούν να ταξινομηθούν βάσει των φυσικών αρχών και του εκπεμπόμενου υλικού στην παραγωγή δέσμης laser. Laser-αερίου (π.χ. ιόν αργού, νέον-ηλίου), laser στερεάς κατάστασης (π.χ. Nd:YAG) και διοδικά lasers είναι ανάμεσα στα πιο δημοφιλή. Η δύναμη διέγερσης laser των 5 mW πρέπει να είναι επαρκής για τα πειράματα με διάχυση μορίων. Οποιοδήποτε από αυτά τα laser πληρεί τις προϋποθέσεις μπορούν να επιλεγούν, αλλά προτιμώνται συμπαγή,

άμεσα διαθέσιμα laser στερεάς κατάστασης. Ως μία εναλλακτική, άμεσα διαμορφωμένα διοδικά lasers, τα οποία προτιμήσαμε για τα πειράματά μας, προσφέρουν μία ελκυστική επιλογή για να απλοποιηθεί η οπτική διαδρομή της διάταξης, όπως και η ευθυγράμμιση και ο έλεγχος των οργάνων.

### Άμεση διαμόρφωση (Direct modulation)

Μια έξοδος συστοιχίας n-SPAD (Single Photon Avalanche Diode) αποτελείται από n ανεξάρτητες ροές «παλμών», κάθε παλμός αντιστοιχεί σε μια χιονοστιβάδα λόγω ενός από τα διάφορα είδη γεγονότων: ανίχνευση φωτονίων, μεταπαλμικό παλμό, παλμό διασταύρωσης ή μέτρηση σκοταδισμού. Αυτοί οι ηλεκτρικοί παλμοί διαμορφώνονται γενικά από ηλεκτρονικά μέσα όπως το transistor-transistor logic (TTL). [7]

Χρειάζεται να προσθέσουμε ένα δεύτερο "κόκκινο laser" που διεγείρει το δέκτη. Έπειτα, κάθε εικόνα είτε λόγω του πράσινου είτε λόγω του κόκκινου laser καταγράφεται στην κάμερα, ένα TTL σήμα στέλνεται σε μια κάρτα PC (NI card), που αμέσως ενεργοποιεί το διαμορφωτή, που με τη σειρά του αλλάζει από το ένα laser στο άλλο. Για να ελέγξουμε με ακρίβεια τη σχετική θέση και την επικάλυψη των δύο lasers, χρειάζεται κάποιος να κατευθύνει τα lasers χρησιμοποιώντας τουλάχιστον δύο καθρέφτες πριν μεταβούν στην οπτική ίνα. Για το κόκκινο laser, αποτελείται από δύο ανακλαστικούς καθρέφτες, ενώ για το πράσινο, από έναν ανακλαστικό καθρέφτη, και ένας DM (Dichroic mirror) τοποθετείται σε μια κινούμενη βάση, που επίσης χρησιμοποιείται για να επικαλύψει τα δύο lasers (ανακλώντας το πράσινο φως του laser και μεταδίδοντας το κόκκινο φως του). [5]

Direct modulation είναι η ηλεκτρονική διαμόρφωση μέσω TTL σημάτων (transistor-transistor logic), που αναφέρεται σε ένα τυποποιημένο ψηφιακό σήμα) που μπορεί να επιτύχει υψηλές συχνότητες μέχρι και 100 MHz (για διοδικά) και σύντομους χρόνους ανόδου (2ns). Άμεσα διαμορφωμένα διοδικά laser αντιπροσωπεύουν την καταλληλότερη επιλογή, καθώς δε χρειάζονται επιπρόσθετα οπτικά εξαρτήματα, αλλά αυτά επί του παρόντος είναι μόνο διαθέσιμα για μήκη κύματος μεταξύ 475nm και 635nm. Είναι αναμενόμενο ότι laser στερεάς κατάστασης με άντληση διοδικού laser και διαμόρφωση συχνοτήτων μέχρι και 100 kHz σύντομα θα γίνουν διαθέσιμα και θα συμπληρώσουν το κενό των άμεσα διαμορφωμένων διοδικών lasers (Kong et al. 2007). [5]

### Σύζευξη των lasers

Για να εξασφαλίσουμε την καλύτερη δυνατή επικάλυψη, οι δέσμες laser πρέπει να συζευχθούν σε μία λειτουργική οπτική ίνα. Το πλεονέκτημα της λειτουργικής οπτικής ίνας βρίσκεται στην αποκλειστική διάδοση της μικρότερης Εγκάρσιας Ηλεκτρικής/Μαγνητικής (Transverse Electric/Magnetic) λειτουργίας laser  $[TE_{00}/TM_{00}]$ , που εγγυάται ένα συμμετρικό, κοντά σε Γκαουσιανό-σχήμα προφίλ διέγερσης. Προτιμάται μία οπτική ίνα που υποστηρίζει Εγκάρσια Ηλεκτρομαγνητική λειτουργία ( $TEM_{00}$ ) για μήκη κύματος στο ορατό φάσμα. Οι δέσμες laser συνήθως συνδυάζονται χρησιμοποιώντας ένα διχρωμικό διαχωριστή δέσμης και επιτυγχάνεται να συζευχθούν στη μονάδα σύζευξης ινών. Αυτή η μέθοδος είναι ευέλικτη και φθηνή αλλά μπορεί να οδηγήσει σε χαμηλότερη αποδοτικότητα σύζευξης ινών, καθώς απαιτεί παράλληλη αντιστοίχιση και των δύο lasers ώστε να εξασφαλιστεί ότι και οι δύο εστίες είναι στην ίδια θέση στο συζευκτήρα ινών. Ένας πολυπλέκτης (μία συσκευή που περιέχει ξεχωριστές μονάδες σύζευξης για κάθε laser, σε συνδυασμό με ένα σταθερό διχρωμικό διαχωριστή δέσμης και κατευθύνεται σε μία ίνα εξόδου) συνδεδεμένος με οπτική ίνα, προσφέρει μία ενδιαφέρουσα αλλά λιγότερο ευέλικτη εναλλακτική, καθώς τα επιθυμητά μήκη κύματος πρέπει να καθοριστούν πριν την επιλογή του. Και οι δύο μέθοδοι συνδυάζουν τα lasers σε μία λειτουργική οπτική ίνα, προσφέροντας έτσι την καλύτερη δυνατή επικάλυψη των δεσμών τους. Η ίνα εξόδου συνδέεται με μία μονάδα αποσύνδεσης ινών, ή με ένα 10-20χ αντικειμενικό φακό τοποθετημένο σε ένα χιζευξης για και το πίσω διάφραγμα του αντικειμενικού φακού εστίασης. [5]

### Αντικειμενικός φακός

Αντικειμενικοί φακοί με υψηλό αριθμητικό άνοιγμα (ΝΑ) χρησιμοποιούνται ευρέως σε εφαρμογές ανίχνευσης μονού μορίου, καθώς μία μεγάλη γωνία συλλογής επιτρέπει την αποτελεσματική ανίχνευση των φωτονίων που εκπέμπονται από τυχαία προσανατολισμένα φθοροφόρα. Αντικειμενικοί φακοί υψηλού-ΝΑ (NA=1.2) εμβαπτισμένων σε νερό, προσφέρουν μεγάλη απόσταση εργασίας (μέχρι ~150 μm στο διάλυμα) και μειωμένες εκτροπές (κοντά σε μια ιδανική συνάρτηση διασποράς σημείου). Οι αντικειμενικοί φακοί ανήκουν στο σώμα του μικροσκοπίου.

### Διχρωμικός διαχωριστής δέσμης

Ο σκοπός του διχρωμικού διαχωριστή δέσμης είναι να κατευθύνει το διεγερμένο φως μέσα από το πίσω άνοιγμα του αντικειμενικού φακού στο δείγμα και να μεταδίδει τον εκπεμπόμενο φθορισμό προς τη διαδρομή ανίχνευσης. Για τις εφαρμογές ALEX, εμπορικά διαθέσιμοι πολυχρωμικοί διαχωριστές δέσμης χρησιμοποιούνται για να διασφαλιστεί η ταυτόχρονη ανάκλαση των γραμμών laser και η διάδοση του φθορίζοντος φωτός σε πολλαπλές περιοχές μηκών κύματος.

### Το επίπεδο εκπομπής (emission module)

Το φθορίζον φως που περνά από το μικροσκόπιο μέσα από τη θύρα βάσης κατευθύνεται προς τη μονάδα ανίχνευσης. Μετά από τη θύρα βάσης του μικροσκοπίου, τοποθετείται μία μικροσκοπική οπή στο εστιακό σημείο του φακού του μικροσκοπίου. Αυτό είναι ο σωληνωτός φακός/ "tube lens". Μετά την οπή, το φως συγκεντρώνεται με ένα άλλο φακό και είναι φασματικά διαχωρισμένο με ένα διχρωμικό διαχωριστή δέσμης μονής-ζώνης. Σε συνδυασμό με φίλτρα εκπομπής μπροστά από τους ανιχνευτές, αυτά τα στοιχεία θα πρέπει να ταιριάζουν με τα φασματικά χαρακτηριστικά της διάταξης και των φθοροφόρων (δηλαδή εξάλειψη του μήκους κύματος διέγερσης και συνεισφορές στο σήμα υποβάθρου από τη σκέδαση Raman), διασφαλίζοντας έτσι αποτελεσματική διέγερση των επιλεγμένων φθοροφόρων. [5]

## Η επιλογή του μs-ALEX

Ο χρόνος άφιξης κάθε φωτονίου μετράται χρησιμοποιώντας μια πλακέτα καταμέτρησης που ανιχνεύει την άφιξη των παλμών TTL από κάθε ανιχνευτή με ανάλυση χρόνου nanosecond. Η ανάθεση των φωτονίων σε μια περίοδο διέγερσης λέιζερ πραγματοποιείται εκ των υστέρων, με βάση τον ακριβή χρόνο άφιξης των φωτονίων και το εσωτερικό ρολόι της πλακέτας PCI. Αυτό προϋποθέτει ότι τόσο η καταμέτρηση όσο και η διαμόρφωση του λέιζερ είναι συγχρονισμένες (π.χ. οι τιμές του μετρητή ξεκινούν από το μηδέν όταν η τετραγωνική κυματομορφή αποστέλλεται στους διαμορφωτές). Αυτό μπορεί να γίνει εύκολα αν η πλακέτα συλλογής δεδομένων ενεργοποιείται από έναν σύντομο παλμό TTL, η μία πλακέτα στέλνει πρώτα έναν παλμό TTL στην πλακέτα καταμέτρησης και στον εαυτό της, ενώ και οι δύο πλακέτες είναι προγραμματισμένες να αρχίσουν να αποκτούν ή να εκπέμπουν το αντίστοιχο σήμα τους κατά τη λήψη του παλμού. [5]

# Υλικά και μέθοδοι

# 1. Στατιστική Ανάλυση

### 1.1 Η επιλογή των ομόλογων ακολουθιών

Η μέθοδος αυτής της στατιστικής ανάλυσης βασίζεται κατά κύριο λόγο στην όσο το δυνατό καλύτερη ευθυγράμμιση (alignment) των ομόλογων αλληλουχιών της πρότυπης πρωτεΐνης από διάφορους οργανισμούς και διαφορετικές πρωτεΐνες που είναι κοντά εξελικτικά με την πρότυπη που επιλέξαμε προς ανάλυση. Με τη βοήθεια βάσεων δεδομένων και της γλώσσας προγραμματισμού Python, κατασκευάσαμε ένα εγχειρίδιο συλλογής και επεξεργασίας δεδομένων, ώστε να βρούμε το "μονοπάτι" διάδοσης του σήματος στην πρωτεΐνη.

Το πρώτο βήμα είναι η συλλογή ομόλογων ακολουθιών της πρωτεΐνης αναφοράς από διάφορους οργανισμούς και πρωτεΐνες που είναι όμοιες εξελικτικά με την πρωτεΐνη αναφοράς. Σε αυτό συνεισφέρει ο ιστότοπος DALI (protein structure comparison server) [15], όπου εισαγάγαμε τη δομή της επιθυμητής πρωτεΐνης, της SBD2 (4kr5) και έπειτα της MBP (10mp) συνοδευόμενη από την αλυσίδα που επιλέξαμε. Ως αποτέλεσμα ο server έδωσε περίπου ~2000 αλληλουχίες πρωτεΐνως, τις οποίες στη συνέχεια επεξεργαστήκαμε και επιλέξαμε ανάμεσα σε αυτές, τις πρωτεΐνες που φαίνεται να έχουν κοινό πρόγονο.

Σε αυτό το εγχείρημα βοηθά ο ιστόπτοπος ECOD (Evolutionary Classification of Protein Domains) [16], ταξινομώντας τις πρωτεΐνες βάσει των domains στα οποία ανήκουν. Η 4kr5 ανήκει στα SBP\_bac\_3\_1<sup>st</sup>, SBP\_bac\_3\_2<sup>nd</sup>, ενώ η 10mp ανήκει στα SBP\_bac\_1\_N\_1, SBP\_bac\_1\_C. Βασιζόμενοι σε αυτό, εξετάσαμε ποιές πρωτεΐνες που προέκυψαν από τα αποτελέσματα του DALI server ανήκουν στα ίδια domains με τις 4kr5 και 10mp.

Εν συνεχεία καταγράψαμε μέσω της PDB (Protein Data Bank) [13], επιπρόσθετες πληροφορίες για τις επίλεκτες πρωτεΐνες, για τον οργανισμό στον οποίο εκφράζονται, για τη δομή τους, τα στοιχεία που προσδένουν και την πιθανή ύπαρξη μεταλλαγμάτων (mutations) στις δομές τους. Αποκλείσαμε εκείνες που εκφράζονται στους ίδιους οργανισμούς, έχουν την ίδια δομή ή έχουν mutations σε κάποια αμινοξέα, καθώς στόχος είναι να έχουμε ομόλογες ακολουθίες αμινοξέων -όχι ίδιες- από αμιγείς πρωτεΐνες. Αυτή η επιθυμητή ποικιλομορφία είναι μείζονος σημασίας, αποκαλύπτοντάς μας την εξέλιξη των δομών μέσα στο χρόνο.

### 1.2 Τα φυλογενετικά δέντρα των MBP & SBD2

Πίσω στον DALI server εισαγάγαμε τις δομές των πρωτεϊνών, όπως ονομάζονται από την PDB, που πληρούν τα παραπάνω κριτήρια και σαν αποτέλεσμα αυτή τη φορά είχαμε το φυλογενετικό δέντρο των δύο πρωτεϊνών που μας αφορούν, τα λεγόμενα δενδρογράμματα (dendrograms). Παρακάτω παρουσιάζονται τα dendrograms της 4kr5 και της 10mp, που μας φανερώνουν κατά πόσο είναι κοινές οι δομές μεταξύ των διαφόρων αλληλουχιών. Είναι φανερό ότι οι αλληλουχίες που προέκυψαν για την 4kr5 είναι πολύ περισσότερες από αυτές της 10mp, γεγονός που αποδίδεται στο ligand που δεσμεύει η 4kr5, τη γλουταμίνη.



#### 1.3 Επεξεργασία των αρχείων με Python

Για την επίτευξη της ευθυγράμμισης, χρειαζόμαστε ένα σύνολο πολυάριθμων ομόλογων ακολουθιών για κάθε μία από τις πρωτεΐνες που προέκυψαν από το φυλογενετικό δέντρο. Το BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) είναι το εργαλείο που χρησιμοποιήσαμε για αυτό το σκοπό και για κάθε μία αλληλουχία αμινοξέων που εισήχθη σε μορφή pdb είχαμε ως αποτέλεσμα στην έξοδό του περίπου ~5000 αλληλουχίες πρωτεϊνών. Τις αποθηκεύσαμε σε fasta μορφή αρχείου και χρησιμοποιώντας τη γλώσσα προγραμματισμού της python επεξεργαζόμαστε αρχικά το μήκος των αλληλουχιών, καθώς είναι αναγκαία η ομοιομορφία ώστε να επιτύχουμε την καλύτερη δυνατή ευθυγράμμιση.

Η εντολή *seqkit seq* περιορίζει το μήκος της αλληλουχίας ανάμεσα σε μία ελάχιστη και μία μέγιστη τιμή, όπως φαίνεται στο Παράδειγμα 1 που ακολουθεί, όπου m η ελάχιστη τιμή έως M τη μέγιστη τιμή της θέσης των αμινοξέων, σύμφωνα με το συνολικό μήκος της αλληλουχίας, 232 για την 4kr5 πρωτεΐνη.

Παράδειγμα 1: >seqkit seq -m 227-M 237 4kr5\_seqdump.txt -o 4kr5\_output.fa,

Το επόμενο βήμα της ανάλυσής μας ήταν να συρράψουμε τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την επεξεργασία του μήκους της αλληλουχίας των αντιπροσωπευτικών πρωτεϊνών. Το φυλογενετικό δέντρο ήταν ο οδηγός μας ώστε να "συρράψουμε" -(combine)- κάθε ομάδα του ή και όλα συγχρόνως σε ένα αρχείο text, σε συνδυασμό με τις δομικές αλληλουχίες των πρότυπων πρωτεϊνών που επιλέχθηκαν αρχικά. Στη συνέχεια, είναι απαραίτητο πριν προχωρήσουμε στην ευθυγράμμιση να αφαιρέσουμε τις αλληλουχίες εκείνες που είναι διπλότυπες από το προκύπτον αρχείο, καθώς όπως έχουμε αναφέρει βασιζόμαστε στην ποικιλομορφία των αποτελεσμάτων. Αυτό επετεύχθη, κάνοντας χρήση της εντολής *seqkit rmdup* -(remove duplicates)- και ως output είχαμε το τελικό αρχείο .txt, όπως φαίνεται στο Παράδειγμα 2.

Παράδειγμα 2: >seqkit rmdup -n 4kr5\_combined.txt -o 4kr5\_combined\_rmdup.txt

### 1.4 Ευθυγράμμιση των αλληλουχιών

Έχοντας επεξεργαστεί τα δεδομένα μας με τη βοήθεια της Python, στη συνέχεια χρησιμοποιήσαμε το πρόγραμμα ClustalX [17] ακολουθώντας τον αλγόριθμο ευθυγράμμισης με τις προκαθορισμένες παραμέτρους. Εισάγουμε τα αρχεία .txts των αλληλουχιών, ώστε να γίνουν τα alignments για κάθε ομάδα του φ.δ. Στις εικόνες που ακολουθούν παραθέτουμε τα αποτελέσματά μας για τις πρωτεΐνες MBP και SBD2 αντίστοιχα.

# Alignment MBP (10mp)

Στην Εικόνα 9 παρατίθεται ένα μέρος του alignment της 10mp συμπεριλαμβανομένων των αλληλουχιών του φ.δ., της πρωτεΐνης αναφοράς και των 2gha, 6l0z, 3jyr, 6dts, 2fnc, 6dtu. Έχει εξαιρεθεί από την ευθυγράμμιση η 6lcf, καθώς όπως διακρίνεται στο φ.δ. της MBP έχει ιδιαίτερα μικρή συγγένεια σε σχέση με τις άλλες δομές του.



## Alignment SBD2 (4kr5)

Από το φυλογενετικό δέντρο της πρωτεΐνης 4kr5 επιλέξαμε να αναλύσουμε την 1<sup>η</sup> ομάδα του, στην οποία συμπεριλαμβάνεται η πρωτεΐνη αναφοράς, καθώς και οι 2hv1, 4la9, 1ggg, 40en, 2zsf, όπως φαίνονται στην Εικόνα 10 της ευθυγράμμισης.



Εικόνα 8. Το alignment της πρωτεΐνης 4kr5 (SBD2) σύμφωνα με το πρόγραμμα ClustalX.

### Η δράση των εντολών scaProcessMSA, scaCore, scaSectorID

Τα αρχεία που προέκυψαν από τα alignments των πρωτεϊνών υπόκεινται σε περαιτέρω επεξεργασία με τη βοήθεια ενός script python ανάλυσης της SCA, με στόχο κυρίως τον εντοπισμό στατιστικά σημαντικών συσχετίσεων μεταξύ των ακολουθιών.

### I. <u>scaProcessMSA</u>

Με τη χρήση της scaProcessMSA επιτυγχάνεται:

- η διαμόρφωση του alignment είτε με περικοπή στην αλληλουχία αναφοράς που προσδιορίζεται με το
  *t* (truncate), είτε με αφαίρεση των υπερβολικά κενών θέσεων σε ποσοστό μεγαλύτερο του 40%
- ο καθορισμός της αλληλουχίας αναφοράς του alignment και η δημιουργία μιας αντιστοιχίας της αρίθμησης της ευθυγράμμισης σε αρίθμηση των θέσεων της αλληλουχίας αναφοράς
- το φιλτράρισμα των αλληλουχιών ώστε να αφαιρεθούν εκείνες με μεγάλα κενά και εκείνες που είναι ταυτόσημες κατά μία ελάχιστη και μέγιστη τιμή με την αλληλουχία αναφοράς
- το φιλτράρισμα θέσεων ώστε να αφαιρεθούν εκείνες με μεγάλα κενά (προεπιλογή 20%), ορίζοντας επιπλέον παραμέτρους με το -p (parameters)
- ο υπολογισμός του βάρους των αλληλουχιών και ο προσδιορισμός των τελικών παραμέτρων του alignment.

<u>Παράδειγμα 3.</u> >scaProcessMSA -a 4kr5\_clustal\_aligned.fa -b ../data/ -s 4kr5 -c A -t -n -p 0.2 0.2 0.1 0.99 Η εντολή scaProcessMSA στο τερματικό, όπου:

-a : alignment , -s : pdb identifier , -b : pdb directory , -c : chain ID , -n : number of effective sequences

## II. scaCore

Η εντολή scaCore υπολογίζει:

ο τον πίνακα ομοιοτήτων του συνόλου των αλληλουχιών για τη στοίχιση

- τα ιδιοδιανύσματα και τα independent components για τους ακόλουθους πίνακες συσχέτισης
  αλληλουχιών
- ο το βάρος μιας ενιαίας θέσης και την τιμή διατήρησής της
- ο τον πίνακα συσχέτισης  $C_{ij}$  μειωμένης διάστασης και την προβολή (projection) του alignment
- ο τον αριθμό των τυχαίων πινάκων, τα ιδιοδιανύσματα και τις ιδιοτιμές για κάθε ένα από αυτούς

<u>Παράδειγμα 4.</u> >scaCore -i output/4kr5\_clustal\_aligned.db , όπου -i : input ,η βάση δεδομένων που παράγεται από την εκτέλεση της scaProcessMSA)

# III. scaSectorID

Η εντολή scaCoreID:

- $\circ$  επιλέγει τον αριθμό των σημαντικών ιδιοκαταστάσεων  $k_{max}$ , συγκρίνοντας το ιδιοφάσμα (eigenspectrum)  $C_{ij}$  με εκείνο των τυχαίων πινάκων
- ο περιστρέφει την κορυφή  $k_{max}$  των ιδιοδιανυσμάτων αναλύοντας τα independent components
- καθορίζει τις θέσεις αμινοξέων που συμβάλλουν σημαντικά σε κάθε ένα από τα independent components (ICs) προσαρμόζοντας εμπειρικά κάθε IC στην κατανομή και επιλέγοντας θέσεις με τιμές μεγαλύτερες από ένα καθορισμένο όριο (προεπιλογή: p=0,95)
- ο καταχωρεί τις θέσεις σε ομάδες με βάση τα ICs με τα οποία έχει το μεγαλύτερο βαθμό συν-εξέλιξης

<u>Παράδειγμα 5.</u> >scaCoreID -i output/4kr5\_clustal\_aligned.db , όπου -i : input

## 1.6 Εντοπισμός συσχετίσεων μεταξύ των ακολουθιών

Εν συνεχεία τα outputs που προκύπτουν από την εκτέλεση των παραπάνω εντολών της SCA, με τη βοήθεια ενός script του Jupyter Notebook [18] (1), φανερώνουν τα correlations μεταξύ των ακολουθιών. Παρατηρώντας τα ICs ομαδοποιούμε εκείνα με τη μεγαλύτερη συσχέτιση μεταξύ τους σε sectors. Κάθε sector περιλαμβάνει τους αριθμούς των ICs που έχουμε υποδείξει εμπειρικά, ή τον αριθμό ενός μόνο independent component σε περίπτωση που δεν διακρίνεται συσχετισμός με κανένα άλλο.

Ακολουθούν τα ιστογράμματα για τις MBP και SBD2 πρωτεΐνες, που προέκυψαν από το Jupyter Notebook.



Ιστόγραμμα Ι. Παρατηρώντας το ιστόγραμμα της *MBP* πρωτεΐνης και βάσει των correlations μεταξύ των ICs όπως αριθμούνται παραπάνω, διακρίναμε 3 sectors οι οποίοι είναι :



Ιστόγραμμα ΙΙ. Το ιστόγραμμα της SBD2 πρωτεΐνης με τη σειρά του, αναδεικνύει 5 sectors βάσει των συσχετισμών που υπάρχουν μεταξύ των ICs, οι οποίοι είναι :

Sector A: (1, 6, 7) Sector B: (2, 3, 4, 5, 8, 10) Sector C: (9)

Ακολούθως, έχοντας καταχωρήσει τους sectors που ανακαλύψαμε μέσω των ιστογραμμάτων στο script του Jupyter Notebook, δημιουργήσαμε ένα αρχείο .pml το οποίο στη συνέχεια χρησιμοποιήσαμε στο λογισμικό της Pymol [19], όπου με 3D απεικόνιση αποκαλύπτεται το αλλοστερικό δίκτυο συνεξέλιξης των residues των αμινοξέων.

# 2. Η τεχνική Μεταφοράς Ενέργειας Συντονισμού Förster (FRET)

## 2.1 Η πειραματική διάταξη του smFRET



## Excitation pathway

Τόσο η κόκκινη δέσμη μήκους κύματος 637 nm, όσο και η πράσινη μήκους κύματος 532 nm αρχικά διέρχονται από δύο ND περιστρεφόμενα κυκλικά φίλτρα που παρέχουν εξασθένηση της ισχύς των lasers. Μεσολαβούν δύο καθρέφτες M για την κόκκινη δέσμη και ένας για την πράσινη, ώσπου να φτάσουν στον διχρωϊκό καθρέφτη DC1, που κατευθύνει το 90% της δέσμης προς το μικροσκόπιο ενώ το υπόλοιπο 10% ανήκει σε απώλειες.

### Sample stage

Έχοντας πλέον γίνει σύζευξη, η δέσμη κατευθύνεται μέσω μίας οπτικής ίνας προς τον διχρωϊκό καθρέφτη **DC2**, που βρίσκεται στο σώμα του μικροσκοπίου και οδηγεί τη δέσμη στο δείγμα μέσω του αντικειμενικού φακού **O** (objective) με NA=1.2 . Η εκπομπή φθορισμού του δείγματος διέρχεται από τον DC2 και κατά την έξοδό του από τον σωληνωτό φακό-**Tube Lens** εστιάζει σε μία οπή **P** (pinhole) διαμέτρου 50μm, ώστε να αφαιρεθεί το εκτός εστίασης φως.

### Emission pathway

Έπειτα μεσολαβεί ένας φακός L για την επανεστίαση της δέσμης καθώς φτάνει στο διχρωϊκό καθρέφτη DC3 υπό γωνία 45° ο οποίος ανακλά φωτόνια μήκους κύματος έως 644 nm. Τα ανακλώμενα φωτόνια του donor οδηγούνται προς τον φωτοανιχνευτή APD1 αφού περάσουν από ένα band-pass φίλτρο F1 που επιτρέπει τη διέλευση φωτονίων μήκους κύματος ~532 nm, το οποίο αποτρέπει τα σκεδαζόμενα φωτόνια, ενώ τα φωτόνια του acceptor διέρχονται από το φίλτρο F2 που επιτρέπει τη διέλευση φωτονίων μήκους κύματος ~637 nm και καταλήγουν στον APD2. Κάθε φωτόνιο που φτάνει στους φωτοανιχνευτές APDs ερμηνεύεται ως ένας παλμός που μετατρέπεται σε TTL σήμα μέσω της NI card.

## 2.2 Πειραματική διαδικασία και συνθήκες

Έχοντας αρχικά το Labview software (National Instruments) ανοιχτό και τα lasers σε λειτουργία, ορίσαμε την ισχύ των lasers στο συγκεκριμένο πείραμα που πραγματοποιήσαμε στα 260 μW για το πράσινο και στα 120 μW για το κόκκινο. Η περίοδος της εναλλαγής των lasers είναι 100 μs, εκ των οποίων αρχικά το πράσινο είναι ON για 45 μs και 55 μs OFF, ενώ το κόκκινο είναι OFF για 50 μs, έπειτα 45 μs ON και τέλος 5 μs και πάλι OFF, ώσπου να αρχίσει ο νέος κύκλος εναλλαγής.

Σε θερμοκρασία δωματίου, τοποθετούμε ~100 μl νερού, διπλά απιονισμένου και αποστειρωμένου, στην επιφάνεια του objective και στην αντικειμενοφόρο πλάκα του μικροσκοπίου προσθέτουμε 100μl πρωτεΐνης BSA για περίπου 1 λεπτό και στη συνέχεια 200 μl του δείγματος SBD2. Η BSA καλύπτει τις οποιεσδήποτε εσοχές της αντικειμενοφόρου πλάκας περιορίζοντας έτσι τυχούσες σκεδάσεις κατά την ακτινοβόληση του δείγματος. Αφού εστιάσουμε, σε συνθήκες σκότους θέτουμε σε λειτουργία τους ανιχνευτές και αρχίζει η καταμέτρηση. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται για κάθε δείγμα πρωτεΐνης, εφόσον έχει τοποθετηθεί κάθε φορά νέα αντικειμενοφόρος πλάκα.

Εφόσον έχει απομονωθεί και είναι σημασμένη με τα φθοροφόρα Alexa 555 και Alexa 647 μέσω κυστεϊνών, η πρωτεΐνη SBD2 εκλούεται σε όγκο 0.5 ml με συγκέντρωση ~0.2 mg/ml. Κατά τη μέτρηση η συγκέντρωση θα πρέπει να είναι της τάξεως των picomolar και γι' αυτό έγιναν διαδοχικές αραιώσεις, ώστε να επιτύχουμε single molecule resolution.

Buffer Αραίωσης	
50 mM	Tris-HCl pH=8
50 mM	NaCl
1 µM	$Trolox((\pm)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid)$

# 2.3 Πειραματικές μετρήσεις σύμφωνα με τη σταθερά διάστασης $K_d$ (Association Constant)

Η σταθερά διάστασης K<sub>d</sub> περιγράφει τη συγκέντρωση του ligand κατά την οποία είναι προσδεδεμένο στην πρωτεΐνη κατά το ήμισυ. Στην περίπτωση της SBD2 προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου έδειξαν ότι η σταθερά διάστασης κυμαίνεται στο 1.5 μM, κατά την οποία η πρωτεΐνη βρίσκεται 50% σε κλειστή στερεοδιαμόρφωση και 50% σε ανοικτή. Επομένως τα πειράματα που πραγματοποιήσαμε αφορούσαν συγκεντρώσεις μικρότερες και μεγαλύτερες από 1.5 μM.

Πραγματοποιήσαμε μετρήσεις αρχικά απουσία του προσδέτη γλουταμίνη (apo) και στη συνέχεια παρουσία του για συγκεντρώσεις 0.5 μM, 1.5 μM, 2.5 μM και 50 μM (holo).

# Αποτελέσματα

# 1. Το δίκτυο συνεξέλιξης στην SBD2 (Class B)

Η έρευνα στις μέρες μας αγνοεί το γεγονός ότι η αλλοστερία επιδρά σημαντικά στη δυναμική των πρωτεϊνών και υπαγορεύει τη λειτουργία τους και αυτός είναι ο λόγος που ακόμη και όταν η αλλοστερία αναγνωρίζεται ως ένας τόσο σημαντικός παράγοντας για τη μηχανική πρωτεϊνών και φυσικά τις βιοϊατρικές εφαρμογές στην πράξη, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ακόμη επειδή δεν είναι καλά κατανοητή.

Ένα βήμα πιο κοντά στην κατανόησή της έγινε με τη βοήθεια των στατιστικών εργαλείων που χρησιμοποιήσαμε, από τα ιστογράμματα της SCA όπου παρατηρήσαμε τους συσχετισμούς μεταξύ των ακολουθιών και ομαδοποιήσαμε σε sectors τα independent components. Με τη βοήθεια του λογισμικού της Pymol [19] απεικονίζονται παρακάτω τα αποτελέσματά μας για κάθε independent component (IC) της SBD2 (4kr5) στην ανοιχτή στερεοδιαμόρφωση, απουσία ligand.

Οι διακριτές δομικές καταστάσεις μπορεί να προέρχονται από τοπική ευελιξία, όπως οι δονήσεις δεσμών και οι περιστροφές πλευρικών αλυσίδων, από αλλαγές στη δευτεροταγή δομή (δυναμική Tier-1) και κινήσεις μεγάλης κλίμακας των domains (δυναμική Tier-0).





### Sector A (IC1)

Προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου που αφορούν όλα τα Classes των πρωτεϊνών από A έως και G συνέβαλαν στην περαιτέρω κατανόηση και ερμηνεία του δικτύου συνεξέλιξης της Class B πρωτεΐνης SBD2.[20]

Όπως προέκυψε από τη μελέτη των αποτελεσμάτων της Pymol, το IC1 περιλαμβάνει residues που βρίσκονται στην περιοχή του της σχισμής δέσμευσης υποστρώματος (binding cleft), καθώς και τα αμινοξέα F270 και F308 τα οποία είναι υπεύθυνα για την πρόσδεση της GLN. Σε αυτό το IC επίσης ανήκει το αμινοξύ K373 που δρα ως Lock residue και συμβάλλει δραστικά στην επίτευξη της κλειστής στερεοδιαμόρφωσης. Από την άλλη περιλαμβάνει όπως παρατηρείται και αλληλεπιδράσεις μεταξύ των residues, I425-Y479, τα οποία σταθεροποιούν την ανοικτή στερεοδιαμόρφωση της πρωτεΐνης. Ως ένας μοναδικός sector το IC1 συμπεραίνουμε ότι έχει εξαιρετική σημασία για τη δυναμική λειτουργικότητα της SBD2 τόσο στην ανοικτή όσο και στην κλειστή στερεοδιαμόρφωση.

### Sector B (IC2 & IC3)

Το IC2 όπως αποκαλύφθηκε περιλαμβάνει residues της έλικας 6 (H6), τα οποία επικοινωνούν με την καρβοξυ-τελική (C-terminal) προέκταση ή αλλιώς C-tail, τα 418-427 residues. Οι C-τελικές προεκτάσεις τροποποιούν τη δυναμική Tier-0 στο δομικό πυρήνα, επιδρώντας έτσι στον τρισδιάστατο προσανατολισμό

τους. Η περιοχή του C-tail αλληλεπιδρά με το D1 ή D2 (domain), ώστε να σταθεροποιεί την ανοικτή δομική κατάσταση.

Το **IC3** περιλαμβάνει residues, τα R333 και A377, που βρίσκονται στην περιοχή του cleft και επικοινωνούν με τον προσδέτη γλουταμίνη. Ακόμη, και αυτό το IC περιλαμβάνει residues που ανήκουν στο C-tail και αλληλεπιδρούν με την H6. Συμπεραίνουμε πως τα IC2 και IC3 που ανήκουν στον ίδιο sector B, φροντίζουν για τη σταθεροποίηση του ανοικτού state μέσω της επικοινωνίας της H6 με το C-τελικό άκρο, ενώ παράλληλα το IC3 συμβάλλει και στην πρόσδεση του ligand.

## Sector C (IC5 & IC6)

Το **IC5** περιλαμβάνει το "finger" residue D417, το οποίο υποδεικνύει τη θέση πρόσδεσης της γλουταμίνης στην κατάσταση της ανοικτής στερεοδιαμόρφωσης. Επίσης αποκαλύπτεται ένα δίκτυο επικοινωνίας μεταξύ του finger residue και του C-tail, μέσω του μονοπατιού από residues από το finger προς το C-τελικό άκρο ή και το αντίθετο.

Το **IC6** περικλείει residues που βρίσκονται στην περιοχή γύρω από το cleft, χωρίς ωστόσο σε αυτό να ανήκουν residues που προσδένουν το ligand. Επιπλέον σε αυτό περιλαμβάνονται και πάλι residues της H6. Επομένως ο sector C φανερώνει ακόμη μία φορά πως το C-tail έχει καθοριστικό ρόλο στην πρόσδεση του ligand μέσω της αλληλεπίδρασης με το finger residue, αλλά και την πιθανή επικοινωνία της H6 με τα residues που βρίσκονται γύρω από το cleft.

## Sector D (IC4)

To IC4 είναι ένα ανεξάρτητο component και ένας μοναδικός sector, το οποίο περιλαμβάνει residues που πιθανόν επικοινωνούν με τον ABC μεταφορέα.

## Sector E (IC7)

To IC7 είναι επίσης ένα ανεξάρτητο component που αποτελεί έναν μοναδικό sector και αποτελείται από residues που βρίσκονται στην περιοχή μπροστά και πίσω από το cleft. Παρ' όλο που δεν είναι άρρηκτα συνδεδεμένα μαζί του, διαφαίνεται η πιθανότητα να επιδρά και αυτό με κάποιο τρόπο στην πρόσδεση ή μη του ligand.

Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι στην Class B κατηγορία τα πλησιέστερα ICs του cleft συνδέονται με τα απομακρυσμένα ICs που σταθεροποιούν την apo ανοικτή στερεοδιαμόρφωση. Ωστόσο ο τρόπος με τον οποίο μεταδίδεται το σήμα μεταξύ των residues παραμένει ασύλληπτος.

## 2. Διερεύνηση της δομικής δυναμικής της SBD2 με smFRET

Έχοντας αναλύσει το δίκτυο επικοινωνίας μεταξύ των residues που καθορίζουν τη δομική δυναμική της SBD2, η τεχνική του single molecule FRET που χρησιμοποιήσαμε στην παρούσα εργασία θα ανιχνεύσει σε αυτό το σημείο τη δυναμική μεγάλης κλίμακας Tier-0 μεταξύ των domains.

Τα φωτόνια χαρακτηρίστηκαν ως DD, DA, AD, AA με βάση το κανάλι ανίχνευσης και την περίοδο διέγερσής τους. Μόνο οι τρεις σχετικές ροές φωτονίων αναλύθηκαν (DA, εκπομπή του acceptor με διέγερση του donor-DD, εκπομπή donor με διέγερση του donor, AA, εκπομπή acceptor με διέγερση του acceptor). Οι εκρήξεις (bursts) φθορισμού εντοπίστηκαν με τον αλγόριθμο All Photon Burst Search. [21] Εν συντομία, ένα φωτόνιο ανήκει σε ένα burst εάν έχει *m* γειτονικά φωτόνια εντός ενός χρονικού παραθύρου Τ. Εάν αυτό το κριτήριο ισχύει για L γειτονικά φωτόνια με κατώφλι υποβάθρου F, αυτά τα φωτόνια αποτελούν ένα burst. Χρησιμοποιήσαμε m = 15, L = 50 και F=6. Κάθε burst χαρακτηρίζεται από μια φαινομενική απόδοση FRET *E*<sup>\*</sup> και μια φαινομενική στοιχειομετρία *S* αθροίζοντας όλες τις μετρήσεις στην αντίστοιχη ροή φωτονίων εντός του burst.



Εικόνα 9. Ιστογράμματα Ε-S για συγκεντρώσεις GLN, με την τεχνική smFRET.

$$E^* = \frac{\sum DA}{\sum DA + \sum DD}$$
 &  $S = \frac{\sum DA + \sum AA}{\sum DA + \sum DD + \sum AA}$ 

Στα παραπάνω δισδιάστατα ιστογράμματα E-S παρουσιάζονται οι μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν σε διάστημα 30 λεπτών για διαλύματα απουσία γλουταμίνης (apo) και παρουσία της για συγκεντρώσεις 0.5 μM, 1.5 μM, 2.5 μM και μεγάλης συγκέντρωσης (holo) αντίστοιχα. Στο ανώτερο σημείο των ιστογραμμάτων απεικονίζεται ο πληθυσμός των DD φωτονίων, στο κατώτερο ο πληθυσμός των AA φωτονίων ενώ για τιμές του S μεταξύ 0.2 και 0.6 αναπαρίσταται η κατανομή FRET. Τα bursts που ανήκουν στην περιοχή αυτής της κατανομής E-S χρησιμοποιούνται για το μονοδιάστατο ιστόγραμμα FRET.

Με τα κριτήρια αναζήτησης bursts που χρησιμοποιήθηκαν m, L, F και τις παρατηρούμενες φαινομενικές τιμές (apparent) FRET μεταξύ 0,4 και 1, η κατανομή FRET μπορεί να προσεγγιστεί από μια κατανομή Gauss για την εκάστοτε συγκέντρωση του ligand, όπου η τιμή PDF (Probability Density Function) στον κάθετο άξονα αντιπροσωπεύει τον αριθμό φωτονίων.



Εικόνα 10. Πειραματική προσέγγιση για τη διερεύνηση των καταστάσεων διαμόρφωσης των SBDs με τη χρήση FRET.



Εικόνα 11. Κατανομές Gauss για συγκεντρώσεις GLN συναρτήσει του αριθμού φωτονίων και της αποδοτικότητας FRET (Ε).

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της Γκαουσιανής κατανομής για την περίπτωση της *apo* SBD2 έδειξε ότι το αποδοτικότητα FRET (FRET Efficiency) έχει τιμή  $\approx 0.64$  (low FRET\_ που αντιπροσωπεύει την ανοικτή στερεοδιαμόρφωση (open state). Με την προσθήκη συγκέντρωσης 0.5 μM GLN παρατηρούνται δύο κατανομές Gauss, με τιμή 0.65 που αντιπροσωπεύει την ανοιχτή στερεοδιαμόρφωση και 0.79 για την κλειστή. Έπειτα για συγκέντρωση 1.5 μM, όπως θα ήταν αναμενόμενο για την τιμή  $K_d$ , παρουσιάζονται δύο πανομοιότυπες Γκαουσιανές κατανομές με τιμή 0.65 για το open state και 0.83 για το closed state. Με περαιτέρω προσθήκη γλουταμίνης συγκέντρωσης 2.5 μM οι κατανομές διαμορφώθηκαν αντίστροφα όσον αφορά τα counts των φωτονίων με τιμή 0.65 για το open state και 0.83 για το closed state, όπως και προηγουμένως. Τέλος, για μεγάλη συγκέντρωση GLN για την περίπτωση της holo SBD2 διαμορφώθηκε μία κατανομή Gauss με τιμή high FRET 0.85, η οποία αντιστοιχεί αποκλειστικά στην κλειστή στερεοδιαμόρφωση της πρωτεΐνης.

# Συζήτηση

Συνοψίζοντας, στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήσαμε την SCA μέθοδο επιδιώκοντας να εξερευνήσουμε τα αλλοστερικά μονοπάτια συνεξέλιξης μεταξύ των αμινοξέων της πρωτεΐνης SBD2. Συνδυάζοντας μηχανισμούς ανάλυσης και ευθυγράμμισης των αλληλουχιών όπως το πρόγραμμα Clustal X και βάσεις δεδομένων όπως ο DALI server, το ECOD και η PDB, ανακαλύψαμε ότι το αλλοστερικό δίκτυο απαρτίζεται από 7 διακριτές και ανεξάρτητες αλλοστερικές περιοχές (IC1-7). Οι IC περιοχές του βρίσκονται στην πρωτεϊνική σχισμή δέσμευσης υποστρώματος συνδέονται με τις απομακρυσμένες του C-τελικού άκρου που σταθεροποιούν την ανοιχτή στερεοδιαμόρφωση της SBD2.

Το κύριο πλεονέκτημά του smFRET σε σχέση με τις συμβατικές βιοχημικές και βιοφυσικές μεθόδους είναι η δυνατότητα αποφυγής μέσω όρων. Με τις συμβατικές μεθόδους, τα παρατηρήσιμα στοιχεία αποτελούν ένα μέσο όρο μεγάλου αριθμού μορίων, ενώ με τις μεθόδους μονού μορίου, τα μόρια μπορούν να μελετηθούν σε ατομική βάση. Το δυναμικό εύρος του smFRET είναι 2-10 nanometers και ανάλογες μελέτες χρησιμοποιώντας την τεχνική του smFRET έχουν επιτύχει ανάλυση της κλίμακας μεταξύ 35 – 80 Å, που αντιστοιχεί στην απόσταση μεταξύ των φθοροφόρων. [22] Όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 11 στο Open state η απόσταση μεταξύ των φθοροφόρων της SBD2 ισούται με 47.0 Å, ενώ στο Closed state απέχουν απόσταση 40.0 Å. Με μετρήσεις smFRET, διαπιστώθηκε ότι απουσία υποστρώματος, η SBD2 βρίσκεται στην ανοιχτή διαμόρφωση (open state), όπως προκύπτει από τις κατανομές Gauss. Αυξανόμενες συγκεντρώσεις του υποστρώματος γλουταμίνης αυξάνουν σταδιακά το ποσοστό των πρωτεϊνών που αποκτούν την κλειστή ενεργή στερεοδιαμόρφωση. Σε συγκεντρώσεις που αντιστοιχούν στη σταθερά διάστασης  $K_d$  (1.5 μM GLN), οι επιφάνειες των κατανομών που αντιστοιχούν στην ενεργή και ανενεργή στερεοδιαμόρφωση.

Σε αντίθεση με την αγρίου τύπου SBD2, το μετάλλαγμα D417N της IC5 περιοχής απαγορεύει την SBD2 να αποκτήσει την κλειστή ενεργή στερεοδιαμόρφωση ακόμα και με την προσθήκη 500 mM GLN. Καθώς η σταθερά πρόσδεσης GLN για το παράγωγο SBD2 (D417N) είναι ~ 1mM, διαπιστώνεται ότι το αλλοστερικό σήμα έχει διακοπεί πλήρως. Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι με την προσέγγιση του περιγράφεται στην παρούσα πτυχιακή εργασία, μπορούν να εντοπισθούν τα αλλοστερικά μονοπάτια. Μπορεί επίσης να διαπιστωθεί το αν και με ποιο τρόπο τα μονοπάτια αυτά ρυθμίζουν την μετάδοση του αλλοστερικού σήματος.

# Βιβλιογραφία

[1] Joo, C. & Ha, T. Single-molecule FRET with total internal reflection microscopy. [book auth.] Paul R. Selvin & Taekjip Ha. *Single Molecule Techniques: A Laboratory Manual*. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2008.

[2] Dobrucki, Ulrich Kubitscheck & Jurek W. *Fluorescence Microscopy: From Principles to Biological Applications, Second Edition.* s.l. : Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2017.

[3] Introduction to Fluorescence. [συγγρ. βιβλίου] Joseph R. Lakowicz. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Boston : Springer, 2006.

[4] Fluorophores. [συγγρ. βιβλίου] Joseph R. Lakowicz. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Boston : Springer, 2006.

[5] Achillefs N. Kapanidis, Mike Heilemann, Emmanuel Margeat, Xiangxu Kong, Eyal Nir, and Shimon Weiss. Alternating-Laser Excitation of Single Molecules. [συγγρ. βιβλίου] P. Selvin & T. Ha. *Single Molecule Techniques: A Laboratory Manual.* New York : Cold Spring Harbor , 2008.

[6] *Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly.* David W Piston, Gert-Jan Kremers. 9, s.l. : Trends Biochemical Sciences, September 2007, Τόμ. 32.

[7] *High-throughput smFRET analysis of freely diffusing nucleic acid molecules and associated proteins.* Segal M, Ingargiola A, Lerner E, Chung S, White JA, Streets A, Weiss S, Michalet X. Methods, s.l. : Elsevier, 2019, Tóμ. 169.

[8] *Evolution-Based Functional Decomposition of Proteins*. Rivoire O, Reynolds KA, Ranganathan R. s.l. : PLOS Computational Biology, 2016.

[9] *Crystal structures of the maltodextrin/maltose-binding protein complexed with reduced oligosaccharides: flexibility of tertiary structure and ligand binding*. Xiaoqun Duan, Jason A Hall, Hiroshi Nikaido, Florante A Quiocho. 5, s.l. : Journal of Molecular Biology, 2001, Τόμ. 306.

[10] Ligand binding and global adaptation of the GlnPQ substrate binding domain 2 revealed by molecular dynamics simulations. Maximilian Kienlein, Martin Zacharias. 12, s.l. : Protein Science, 2020, Tóµ. 29.

[11] *The smfBox is an open-source platform for single-molecule FRET*. Ambrose, B., Baxter, J.M., Cully, J. et al. s.l. : nature communications, 2020. 5641.

[12] Crystal Structures of the Solute Receptor GacH of Streptomyces glaucescens in Complex with Acarbose and an Acarbose Homolog: Comparison with the Acarbose-Loaded Maltose-Binding Protein of Salmonella typhimurium. Vahedi-Faridi A, Licht A, Bulut H, Scheffel F, Keller S, Wehmeier UF, Saenger W, Schneider E. 3, s.l. : Journal of Molecular Biology, 2010, Τόμ. 397.

[13] *The Protein Data Bank*. H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne. 1, s.l. : Nucleic Acids Research, 2000, Τόμ. 28.

[14] Vshivkova. iStock. [Ηλεκτρονικό] 28 August 2016. <u>https://www.istockphoto.com/photo/real-fluorescence-microscopic-view-of-mice-neuroblastoma-cell-line-gm586707580-100705021</u>.

[15] *Dali server: structural unification of protein families*. Holm, Liisa. W1, s.l. : Nucleic Acids Research, 2022, Τόμ. 50.

[16] *ECOD: An Evolutionary Classification of protein Domains*. H. Cheng, R. D. Schaeffer, Y. Liao, L. N. Kinch, J. Pei, S. Shi, B. H. Kim, N. V. Grishin. s.l. : PLOS Computational Biology, 2014.

[17] *Clustal W and Clustal X version 2.0.* M.A. Larkin, G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna, P.A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I.M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J.D. Thompson, T.J. Gibson, D.G. Higgins. 21, s.l. : Bioinformatics, 2007, Tóµ. 23.

[18] Schmidt, F. Loizides and B. Jupyter Notebooks – a publishing format for reproducible computational workflows. [συγγρ. βιβλίου] Ragan-Kelley B, Fernando Perez, Granger B, Bussonnier M, Frederic J, et al. Kluyver T. *Positioning and Power in Academic Publishing: Players, Agents and Agendas.* s.l. : IOS Press, 2016, σσ. 87-90.

[19] The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC.

[20] *Structural dynamics in the evolution of a bilobed protein scaffold*. al., Gouridis et. 29 November 2021, PNAS.

[21] *FRETBursts: An Open Source Toolkit for Analysis of Freely-Diffusing Single-Molecule FRET.* Ingargiola A, Lerner E, Chung S, Weiss S, Michalet X. 17 August 2016, PLOS ONE.

[22] Precision and accuracy of single-molecule FRET measurements—a multi-laboratory benchmark study. Hellenkamp, B., Schmid, S., Doroshenko, O. et al. 31 August 2018, Nat Methods.