



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικό και Καποδιστριακό

Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

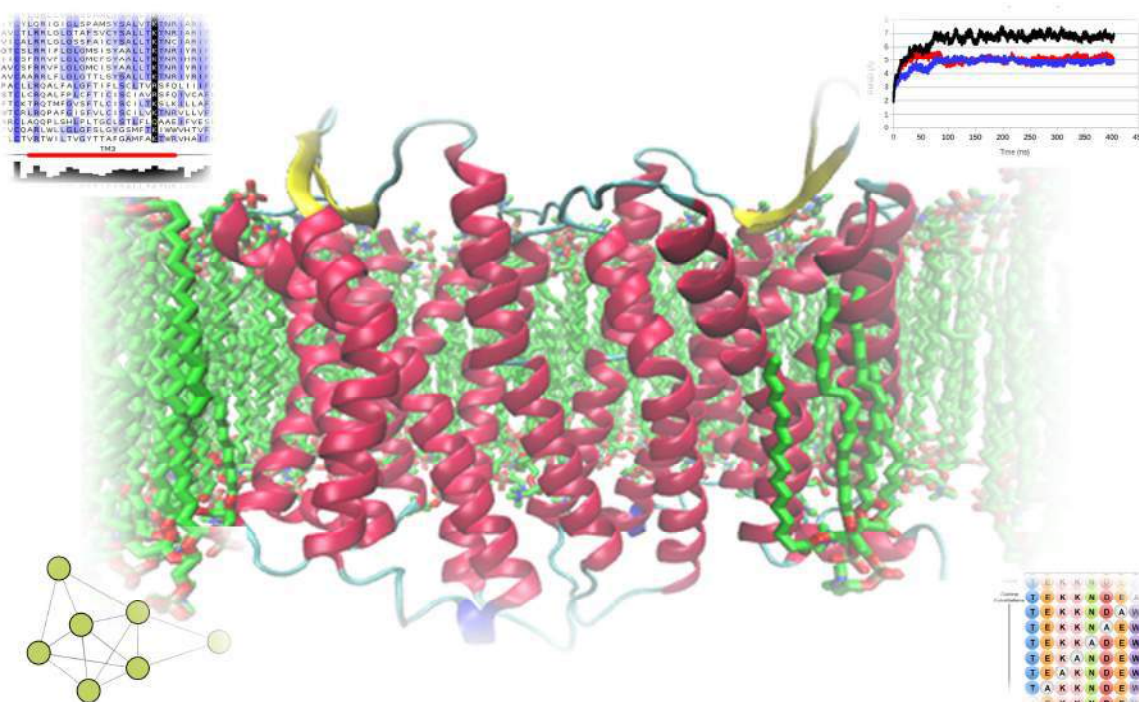
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ»

Δ Ι Π Λ Ω Μ Α Τ Ι Κ Η Ε Ρ Γ Α Σ Ι Α

«Υπολογιστικές Μελέτες Αλληλεπιδράσεων
Ολιγομερισμού σε Συζευγμένους με G-
πρωτεΐνες Υποδοχείς (GPCRs)»



Μπαλτούμας Φώτης

Πτυχιούχος Βιολογίας, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΑΘΗΝΑ 2015



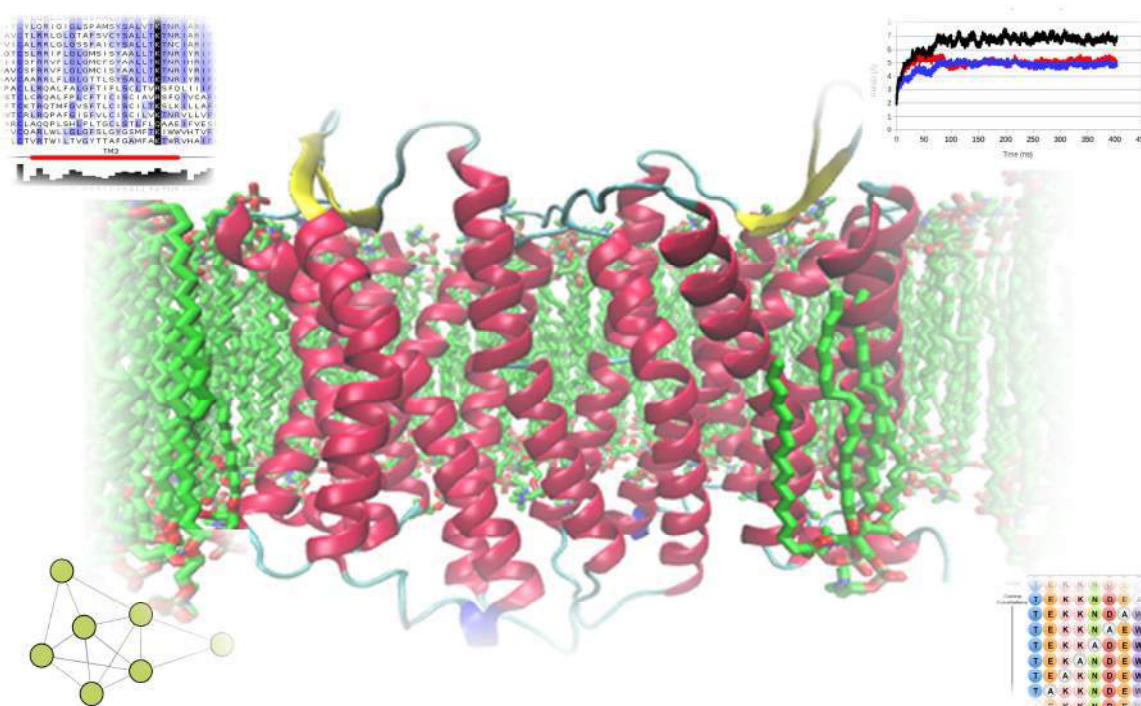
HELLENIC REPUBLIC
National and Kapodistrian
University of Athens

SCHOOL OF SCIENCE
FACULTY OF BIOLOGY

MASTER IN "BIOINFORMATICS"

Master Diploma Thesis

«Computational Studies of Oligomeric Interactions in G-protein Coupled Receptors (GPCRs)»



Fotis Baltoumas

Faculty of Biology, National & Kapodistrian University of
Athens

ATHENS 2015



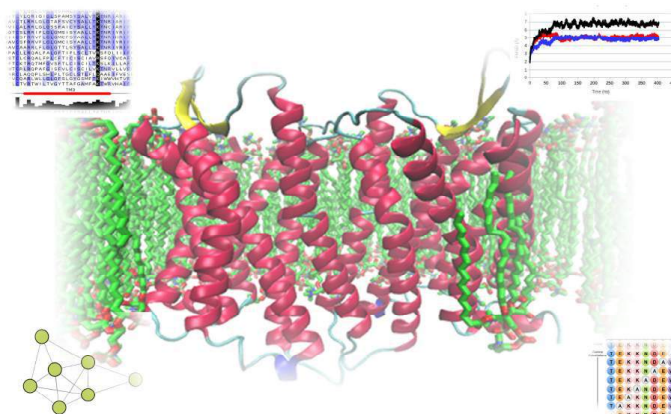
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ»

Δ Ι Π Λ Ω Μ Α Τ Ι Κ Η Ε Ρ Γ Α Σ Ι Α

«Υπολογιστικές Μελέτες Αλληλεπιδράσεων Ολιγομερισμού σε
Συζευγμένους με G-πρωτεΐνες Υποδοχείς (GPCRs)»



Τριμελής εξεταστική επιτροπή

Επικ. Καθ. Βασιλική Οικονομίδου

*Τομέας Βιολογίας Κυττάρου & Βιοφυσικής,
Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο
Αθηνών*

Αναπλ. Καθ. Παντελής Μπάγκος

*Τμήμα Πληροφορικής με Εφαρμογές στη Βιοϊατρική,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

Καθ. Κωνσταντίνος Βοργιάς

*Τομέας Βιοχημείας & Μοριακής Βιολογίας,
Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο
Αθηνών*

Αντί Προλόγου

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών στη Βιοπληροφορική, στον τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής του Τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Σε αυτό το σημείο νιώθω την ανάγκη και την ηθική να ευχαριστήσω όλους τους συνοδοιπόρους και συνεργάτες των οποίων η συμβολή ήταν αποφασιστική στην εκπόνηση και τη συγγραφή αυτής της διπλωματικής εργασίας.

Οφείλω, αρχικά, ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Καθηγητή κ. Σταύρο Χαμόδρακα, για τη μεγάλη εμπιστοσύνη που μου έδειξε, τόσο με το να με κάνει μέλος του Εργαστηρίου του αρχικά σαν προπτυχιακό και έπειτα σαν μεταπτυχιακό φοιτητή και υποψήφιο Διδάκτορα, όσο και με το να μου αναθέσει ένα τόσο ενδιαφέρον ερευνητικό αντικείμενο, επιτρέποντάς μου μάλιστα να εφαρμόσω τις προσωπικές ιδέες μου στη μελέτη του. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω επίσης γιατί τόσο μέσα από τη διδασκαλία του στα μαθήματα του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών όσο και μέσα από την προσωπική επαφή μαζί του με δίδαξε τον τρόπο με τον οποίο πρέπει να γίνεται η έρευνα και μου έδωσε σημαντικά εφόδια για να αντιλαμβάνομαι και να επεξεργάζομαι τα διάφορα ερωτήματα που εγείρονται κατά την διάρκεια μιας επιστημονικής μελέτης. Τον ευχαριστώ θερμά, τέλος, διότι με το να με συμπεριλάβει στην ομάδα του Εργαστηρίου του, μου έδωσε την ευκαιρία και την τιμή να γνωρίσω και να συνεργαστώ με αρκετούς αξιόλογους ανθρώπους.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω, επίσης, τα μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Βασιλική Οικονομίδου, τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Παντελή Μπάγκο και τον Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Βοργιά, τόσο για την τιμή που μου έκαναν να συμμετάσχουν σε αυτή όσο και για τις πολύτιμες υποδείξεις τους. Τους ευχαριστώ, επιπλέον, για τα πολύ σημαντικά και ενδιαφέροντα μαθήματά τους στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών, τα οποία συνέβαλαν αποφασιστικά στο να πραγματοποιηθεί η παρούσα διπλωματική εργασία.

Εξίσου θερμές ευχαριστίες οφείλω στην Δρ. Μαργαρίτα Θεοδωροπούλου για την άψογη συνεργασία μας πάνω σε ένα θέμα στο οποίο συνέβαλε αποφασιστικά, ευρισκόμενη συνεχώς στο πλευρό μου με υποδείξεις και συμβουλές και αφιερώνοντας

σημαντικό κομμάτι από τον προσωπικό της χρόνο. Όπως πάντα, η συμμετοχή της ήταν καθοριστική και οφείλω να ομολογήσω ότι η παρούσα διπλωματική εργασία σε σημαντικό βαθμό αποτελεί και δικό της έργο.

Ευχαριστώ τους Δρ. Νικόλαο Παπανδρέου και Δρ. Ζωή Λίτου, που αποτελούν τη ζωντανή ψυχή του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών, καθώς και τον Δρ. Γεώργιο Τσαούση, για την αμέριστη συμπαράσταση και βοήθειά τους τόσο ερευνητικά όσο και στην καθημερινότητά του εργαστηρίου. Ευχαριστώ επίσης τους συναδέλφους και φίλους, υποψήφιους διδάκτορες Κατερίνα Νάστου, Εβίτα Τσιολάκη και Νίκο Λούρο για την πολύτιμη συνεργασία τους σε ερευνητικά και όχι μόνο ζητήματα, αλλά και για τη συμβολή τους στην ευχάριστη εργασιακή ατμόσφαιρα μέσα στην οποία περνούσα και συνεχίζω να περνώ τις ώρες μου καθημερινά. Και, φυσικά, ευχαριστώ όλα τα μέλη του Εργαστηρίου, τόσο παρόντα όσο και παρελθόντα, για την βοήθεια, τη φιλική διάθεσή τους, αλλά και την ανεκτικότητα που επέδειξαν και συνεχίζουν να επιδεικνύουν απέναντι στις ιδιοτροπίες μου. Επιπρόσθετα, ευχαριστώ τον Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, του Τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, για τη φιλοξενία του κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας, όπως και τα υπόλοιπα μέλη του τομέα, για τη συνεργασία τους αλλά και για το ευχάριστο και φιλικό κλίμα.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω θερμά την Οικογένεια μου, τόσο για τη στήριξη και τα εφόδια που μου παρείχαν και συνεχίζουν να μου παρέχουν, όσο και για τις επιλογές εκείνες που διαμόρφωσαν τον σημερινό χαρακτήρα και την προσωπικότητά μου.

Περίληψη

Οι συζευγμένοι με G-πρωτεΐνες υποδοχείς (GPCRs) αποτελούν μια από τις μεγαλύτερες και πιο ποικιλόμορφες υπεροικογένειες υποδοχέων στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Είναι μεμβρανικές πρωτεΐνες, αποτελούμενοι από 7 α-ελικοειδή διαμεμβρανικά τμήματα, με αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο στον εξωκυτταρικό και τον κυτοπλασματικό χώρο, αντίστοιχα. Αν και παραδοσιακά οι GPCRs θεωρούνταν ότι δρουν αποκλειστικά σαν μονομερή, πλήθος στοιχείων πλέον προτείνουν ότι οι περισσότεροι υποδοχείς συμμετέχουν στο σχηματισμό διμερών ή ολιγομερών, πολλά από τα οποία έχουν συσχετιστεί με αλλαγές στη λειτουργικότητα των υποδοχέων και, σε κάποιες περιπτώσεις, με διάφορες ασθένειες. Ωστόσο, τα δομικά χαρακτηριστικά, η στοιχειομετρία και η λειτουργική σημασία των αλληλεπιδράσεων ολιγομερισμού των GPCRs παραμένουν αντικείμενο διαφωνιών.

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη των δομικών και λειτουργικών χαρακτηριστικών του ολιγομερισμού των GPCRs με υπολογιστικές μεθόδους. Για την επίτευξη αυτού του στόχου συγκεντρώθηκε αρχικά ένα σύνολο ομοδιμερών GPCRs με πειραματικά προσδιορισμένη τρισδιάστατη δομή, το οποίο συμπληρώθηκε από μοντέλα διμερών που προέκυψαν από δεδομένα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, και δοκιμές αγκυροβόλησης. Η δυναμική συμπεριφορά των διμερών των GPCRs και η συμβολή του μεμβρανικού περιβάλλοντος εξερευνήθηκαν μέσω προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής (MD), τα αποτελέσματα των οποίων χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση και αξιολόγηση των επαφών μεταξύ των υποδοχέων και συνδυάστηκαν με μεθόδους από τη θεωρία δικτύων, για την ανάλυση δυναμικών δικτύων βιομοριακών αλληλεπιδράσεων.

Μέσω των προσομοιώσεων MD διαπιστώθηκε η ύπαρξη συντηρημένων δομικών και δυναμικών χαρακτηριστικών ανάμεσα στα διαφορετικά διμερή των GPCRs. Η αξιολόγηση των διαμοριακών επαφών εντόπισε κεντρικά σημεία των επιφανειών αλληλεπίδρασης σε συγκεκριμένες περιοχές των υποδοχέων, ενώ κατάλοιπα που συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις αρωματικών δακτυλίων ή σε πολικές αλληλεπιδράσεις βρέθηκαν να βρίσκονται ανάμεσα στις πιο ισχυρές επαφές μεταξύ των υποδοχέων. Τέλος, η μελέτη των προσομοιώσεων MD μέσω ανάλυσης δικτύων αλληλεπιδράσεων αποκάλυψε την ύπαρξη συσχετίσεων ανάμεσα σε περιοχές που

συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις ολιγομερισμού και σε τμήματα που σχετίζονται με την πρόσδεση του υποκαταστάτη και την ενεργοποίηση των υποδοχέων, υποδεικνύοντας την ύπαρξη μηχανισμών μέσω των οποίων ο ολιγομερισμός ρυθμίζει τη λειτουργία των GPCRs. Τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας μπορούν να βρουν εφαρμογή στην περαιτέρω θεωρητική και πειραματική μελέτη του ολιγομερισμού των GPCRs και στη μελέτη των βιομοριακών αλληλεπιδράσεων στις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες γενικότερα.

Abstract

G-protein coupled Receptors (GPCRs) are one of the largest and most diverse superfamilies of cell – surface receptors in eukaryotic cells. They are membrane – bound proteins, composed by seven α -helical transmembrane segments, an extracellular N-terminus and an intracellular C-terminus. Even though GPCRs were traditionally thought to act as monomers, accumulating evidence suggests that their majority forms dimers or higher order oligomers, many of which have been found to influence receptor function and, in some cases, cause pathological conditions. However, the structural determinants, stoichiometry and functional relevance of GPCR oligomerization remain topics of intense debate.

The goal of this diploma thesis was the study of GPCR oligomeric interactions by means of Computational Biology. Towards this end, a dataset of crystallographic GPCR homodimers was compiled, complemented by additional dimer models based on electron microscopy results and macromolecular docking. These dimers were subjected to Molecular Dynamics (MD) simulations, the results of which were used for the evaluation of intermolecular contacts and were further combined with concepts from network theory, for the construction and analysis of dynamical networks.

The MD simulations revealed the existence of conserved structural and dynamic aspects appearing in GPCR dimers. Intermolecular contacts evaluation revealed the existence of interface hot spots, located at specific GPCR regions, while residues participating in aromatic stacking interactions or polar contacts were found to be among the strongest interface elements. Finally, network analysis of MD results revealed correlations of motion between segments participating in dimer interactions and regions responsible for ligand binding or receptor activation, suggesting the existence of mechanisms through which oligomerization may regulate GPCR function. The results of this diploma thesis may be used to drive further computational and experimental studies of GPCR oligomerization, as well as studies of transmembrane protein – protein interactions in general.

Περιεχόμενα

Ενότητα	Σελ.
Αντί Προλόγου	vii
Περίληψη	ix
Abstract	xi
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Βασικές Αρχές Μεταγωγής Σήματος	1
1.2 Οι συζευγμένοι με G-πρωτεΐνες Υποδοχείς	4
1.2.1 Ταξινόμηση των GPCRs	6
1.2.2 Η Δομή των GPCRs	7
1.2.3 Ο Μηχανισμός Ενεργοποίησης των GPCRs	14
1.3 Οι Ετεροτριμερείς G-πρωτεΐνες	17
1.3.1 Ταξινόμηση των G-πρωτεϊνών	19
1.3.2 Η Δομή των G-πρωτεϊνών	19
1.3.3 Αλληλεπιδράσεις των GPCRs με G-πρωτεΐνες	21
1.4 Το Φαινόμενο του ολιγομερισμού των GPCRs	24
1.4.1 Η λειτουργική σημασία του ολιγομερισμού στους GPCRs	26
1.4.2 Δομικά γνωρίσματα των αλληλεπιδράσεων ολιγομερισμού	31
1.5 Στόχος	35
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	37
2.1 Εισαγωγή στις Μοριακές Προσομοιώσεις	38
2.1.1 Μοριακή Μηχανική και Μοριακή Δυναμική	38
2.1.2 Η Διαδικασία της Ελαχιστοποίησης Ενέργειας	40
2.1.3 Βασικά Χαρακτηριστικά των Προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής	42
2.1.3.1 Προσομοιώσεις Περιβαλλοντικών Συνθηκών	43
2.1.3.2 Προσομοιώσεις Εκτός Ισορροπίας	46
2.1.4 Πεδία Δυνάμεων	47
2.1.5 Οι Προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής Coarse – Grained και το Πεδίο	54

Δυνάμεων MARTINI	
2.2 Συλλογή και Επεξεργασία Δεδομένων	60
2.2.1 Κατασκευή του Συνόλου Δεδομένων	60
2.2.2 Επεξεργασία και Ανάλυση Δομών και Αλληλουχιών	63
2.3 Προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής	64
2.3.1 Δημιουργία Μοντέλου για το Διμερές της Μεταροδοψίνης I από Δεδομένα Κρυο-Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας	65
2.3.2 Προτυποποίηση μέσω Ομολογίας	70
2.3.3 Δημιουργία Ετεροδιμερούς των Υποδοχέων μOR – δOR	71
2.3.4 Προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής τύπου Coarse – Grained σε Περιβάλλον Μεμβράνης	74
2.3.5 Ανακατασκευή Ατομικών Μοντέλων από Αποτελέσματα Προσομοιώσεων Coarse – Grained	76
2.4 Ανάλυση Δομών και Αποτελεσμάτων Μοριακής Δυναμικής	79
2.4.1 Γεωμετρική Ανάλυση Αποτελεσμάτων Προσομοιώσεων	79
2.4.2 Ανάλυση και Ταξινόμηση Βιομοριακών Αλληλεπιδράσεων	80
2.4.3 Υπολογιστική Μεταλλαξιγένεση Αλανίνης	84
2.4.4 Ανάλυση Δυναμικών Δικτύων	85
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ	91
3.1 Βασικά Χαρακτηριστικά των Κρυσταλλογραφικών Διμερών GPCRs	91
3.2 Η Μεταροδοψίνη I Σχηματίζει Διμερή Τύπου TM1-TM2-H8	98
3.3 Σταθερότητα και Συμπεριφορά των GPCRs κατά τη Διάρκεια των Προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής	100
3.4 Η Συμπεριφορά των διμερών CXCR4 και μOR απουσία της Λυσοζύμης T4L	106
3.5 Η Συνεισφορά της Χοληστερόλης στο Σχηματισμό Αλληλεπιδράσεων Ολιγομερισμού	111
3.6 Συντηρημένα Χαρακτηριστικά στη Δυναμική	116

των Διμερών GPCRs	
3.7 Η Συνεισφορά των Πολικών και Αρωματικών Επαφών στην Επιφάνεια Αλληλεπίδρασης	118
3.8 Ιδιότητες Δυναμικών Δικτύων στα Διμερή των GPCRs	136
3.9 Το ετεροδιμερές μ OR – δ OR Παρουσιάζει Κοινά Δομικά και Δυναμικά Χαρακτηριστικά με τα Ομοδιμερή των GPCRs	141
3.10 Η Πιθανή Βιολογική Σημασία των Αλληλεπιδράσεων Ολιγομερισμού	144
3.11 Μοντέλα για τις Αλληλεπιδράσεις Ολιγομερών GPCRs με G-πρωτεΐνες	150
3.12 Περιορισμοί της Μεθοδολογίας και των Προτεινόμενων Μοντέλων	152
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	155
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	157
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ	167
Παράρτημα I: Συμπληρωματικά Αποτελέσματα	168
Παράρτημα II: Προγράμματα	179
Παράρτημα III: Παράμετροι Προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής	193
Παράρτημα IV: Ανακοινώσεις σε Επιστημονικά Συνέδρια	201

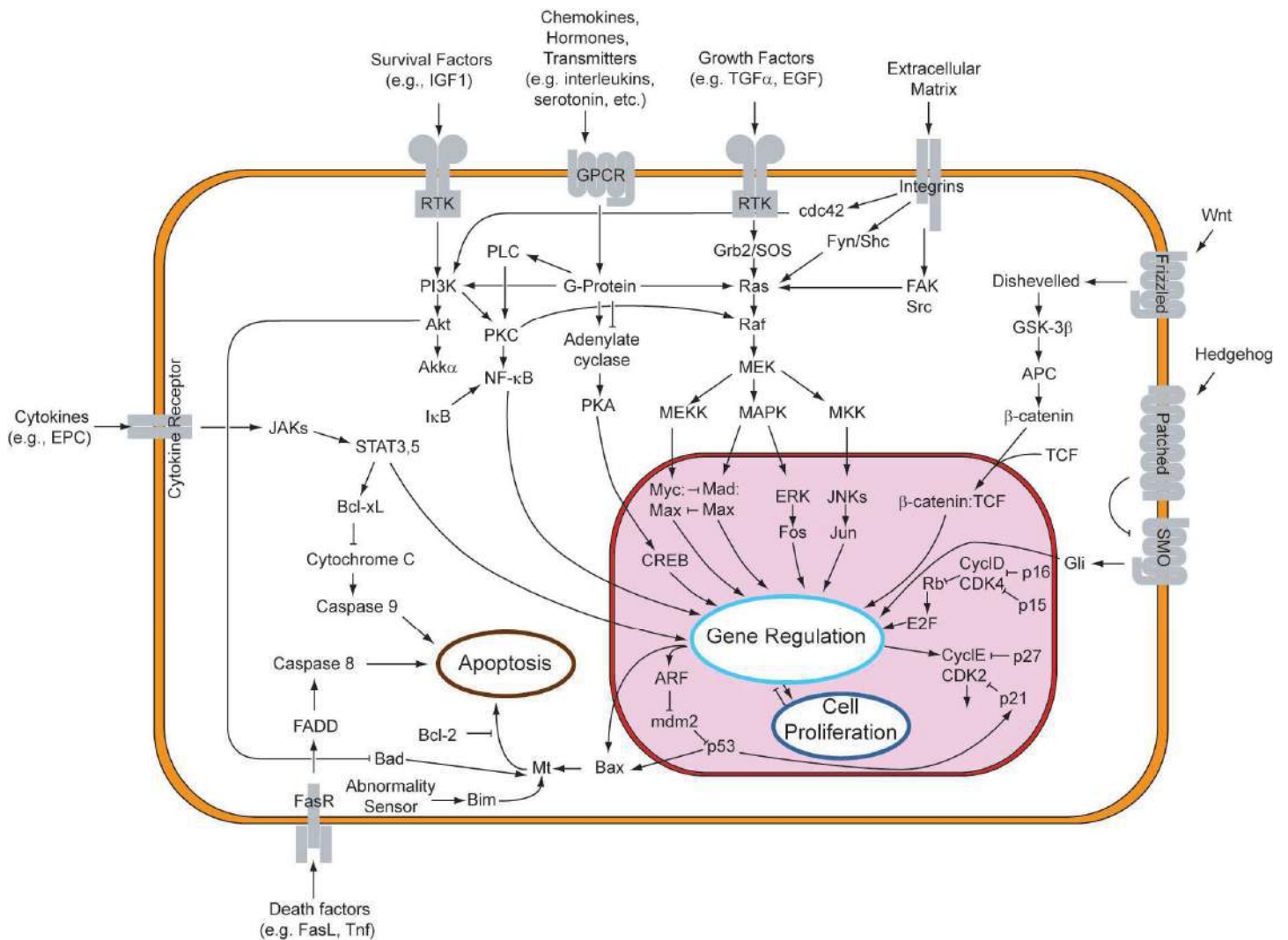
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Βασικές αρχές Μεταγωγής Σήματος

Η μεταγωγή σήματος είναι το σύνολο των κυτταρικών διεργασιών με τις οποίες σήματα φυσικής ή χημικής μορφής επάγουν εξειδικευμένες κυτταρικές αποκρίσεις, ενεργοποιώντας συγκεκριμένους μοριακούς μηχανισμούς. Οι περισσότερες πορείες μεταγωγής σήματος ακολουθούν μια ευρύτερη κοινή οδό, η οποία μπορεί να θεωρηθεί ως ένα μοριακό κύκλωμα. Ο μηχανισμός της οδού αποτελείται από διακριτά στάδια, που ρυθμίζουν συγκεκριμένες κυτταρικές λειτουργίες. Αλλοιώσεις στο μηχανισμό αυτό μπορούν να προκαλέσουν κυτταρικές δυσλειτουργίες και, σε πολλές περιπτώσεις, ανθρώπινες ασθένειες (Cooper, 2000).

Τα περισσότερα μονοπάτια μεταγωγής σήματος ακολουθούν τη διαδικασία πρόσδεσης μορίων σημάτων (υποκαταστάτες) σε κατάλληλους υποδοχείς, είτε στην κυτταρική μεμβράνη, είτε στο εσωτερικό του κυττάρου (Εικόνα 1.1). Οι υποκαταστάτες μπορούν να είναι πρωτεΐνες και πεπτίδια, αμινοξέα, λιπίδια, βιταμίνες, σάκχαρα, ακόμα και ανόργανα μόρια και ιόντα. Ανάλογα με τη λειτουργία τους και τον τρόπο μεταβίβασης στον οργανισμό ομαδοποιούνται σε ορμόνες (πρωτεϊνικές ή στεροειδείς), νευροδιαβιβαστές, παρακρινείς ή αυτοκρινείς παράγοντες, σε αυξητικούς παράγοντες, συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας, ελεύθερες ρίζες και νευροτροφίνες (Hanahan and Weinberg, 2000). Εκτός από τα μόρια – σήματα του ίδιου του οργανισμού, οι μηχανισμοί μεταγωγής μπορούν να ρυθμιστούν και από ερεθίσματα του εξωτερικού περιβάλλοντος, που μπορεί να είναι χημικής φύσεως, όπως τα μόρια που προαναφέρθηκαν, ή και φυσικά ερεθίσματα όπως ακτινοβολία, μηχανική καταπόνηση κλπ (Cooper, 2000).

Ένας υποκαταστάτης μπορεί να οδηγήσει σε ενεργοποίηση του υποδοχέα και εκκίνηση της λειτουργίας που αυτός ρυθμίζει, οπότε χαρακτηρίζεται ως αγωνιστής (agonist) ή να καταστείλει αυτή τη λειτουργία εμποδίζοντας την πρόσδεση ενός ενεργοποιητή στον υποδοχέα, οπότε χαρακτηρίζεται ως ανταγωνιστής (antagonist). Η απόκριση στο σήμα μπορεί να οδηγήσει σε μια σειρά από κυτταρικές αποκρίσεις, όπως έκφραση ή καταστολή συγκεκριμένων γονιδίων, αλλαγές στον μεταβολισμό του κυττάρου, επαγωγή της μίτωσης, ακόμα και κυτταρικό θάνατο.



Εικόνα 1.1 Επισκόπηση του δικτύου των σηματοδοτικών μονοπατιών σε ένα τυπικό ευκαρυωτικό κύτταρο. Προσαρμογή από (Hanahan and Weinberg, 2000).

Η απόκριση ενός κυττάρου σε ένα σήμα ή μια σειρά σημάτων εξαρτάται από τους υποδοχείς που διαθέτει. Οι υποδοχείς είναι πρωτεΐνες που εντοπίζονται στην πλασματική μεμβράνη, τον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα. Συνδέονται με μόρια υποκαταστάτες και ρυθμίζουν συγκεκριμένες κυτταρικές αποκρίσεις. Κάθε υποδοχέας είναι ειδικός για μερικούς – ή και έναν – υποκαταστάτες μόνο. Έτσι, ο βαθμός απόκρισης του κυττάρου σε ένα σήμα εξαρτάται τελικά από τον αριθμό των ειδικών για το σήμα υποδοχέων που εκφράζει. Με βάση τη θέση τους στο κύτταρο οι υποδοχείς μπορούν να διακριθούν σε επιφανειακούς και ενδοκυτταρικούς. Οι ενδοκυτταρικοί υποδοχείς είναι σφαιρικές υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες που εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα ή το εσωτερικό του πυρήνα. Αναγνωρίζουν ως σήματα τα ενδοκυτταρικά μηνύματα, καθώς και εκείνα τα εξωκυτταρικά μηνύματα που διαπερνούν τη μεμβράνη. Αντίθετα, οι επιφανειακοί υποδοχείς είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, οι οποίες

εντοπίζονται στην πλασματική μεμβράνη και αναγνωρίζουν την πλειονότητα των εξωκυτταρικών σημάτων.

Οι επιφανειακοί υποδοχείς διαπερνούν την πλασματική μεμβράνη, έχοντας ένα τμήμα τους στον εξωκυττάριο χώρο (εξωκυττάρια περιοχή), ένα στον ενδοκυττάριο χώρο (ενδοκυττάρια περιοχή) και το ενδιάμεσο τμήμα τους μέσα στη μεμβράνη (διαμεμβρανικό τμήμα). Η μεταγωγή σήματος μέσω επιφανειακών υποδοχέων ξεκινά με τη σύνδεση του υποκαταστάτη στην εξωκυττάρια περιοχή, καθώς το μόριο – σήμα δεν διαπερνά την πλασματική μεμβράνη. Μετά την πρόσδεση του υποκαταστάτη, ο υποδοχέας ξεκινά τη διαδικασία της μεταγωγής σήματος, προκαλώντας αλλαγές στη στερεοδιαμόρφωση του ενδοκυττάριου τμήματός του. Οι αλλαγές αυτές συχνά οδηγούν στην ενεργοποίηση κάποιας ενζυμικής λειτουργίας του ίδιου του υποδοχέα, ή εκθέτουν μια περιοχή αλληλεπίδρασης για άλλες σηματοδοτικές πρωτεΐνες στο εσωτερικό του κυττάρου. Με την πρόσδεσή τους στον υποδοχέα αυτές οι πρωτεΐνες ενεργοποιούνται και διαδίδουν το σήμα στο κυτταρόπλασμα (Cooper, 2000).

Ανάλογα με τον τρόπο λειτουργίας τους, οι επιφανειακοί υποδοχείς μπορούν να διακριθούν σε τρεις βασικές κατηγορίες:

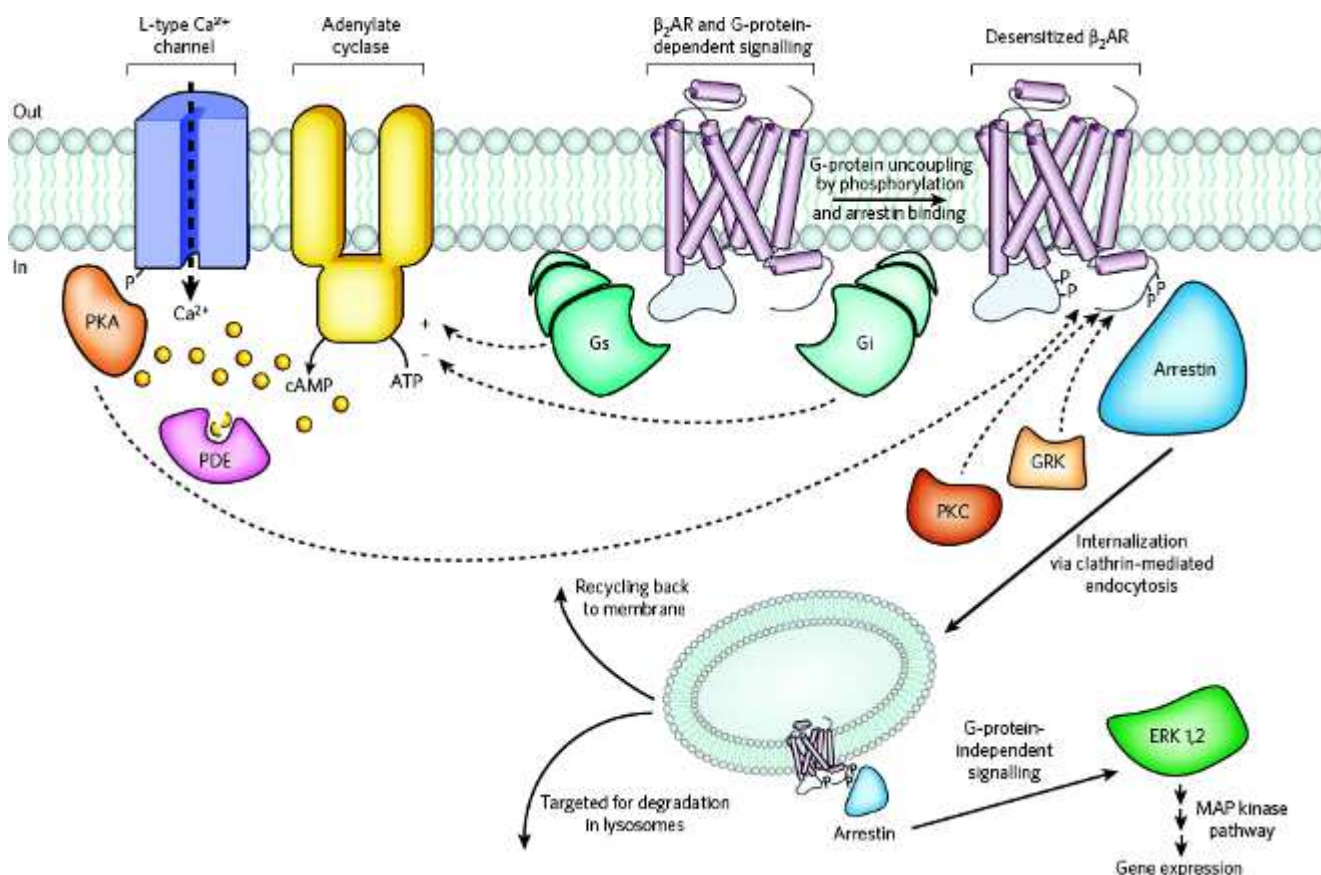
- Υποδοχείς με ενζυμική ενεργότητα. Πρόκειται για υποδοχείς οι οποίοι είτε διαθέτουν οι ίδιοι περιοχές με ενζυμική ενεργότητα (π.χ. οι υποδοχείς με ενεργότητα τυροσινικής κινάσης) είτε συζεύγνυνται άμεσα με κάποιο ένζυμο.
- Υποδοχείς με ενεργότητα ιοντικού καναλιού. Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν ιοντικά κανάλια τα οποία διαθέτουν επίσης θέση πρόσδεσης κάποιου υποκαταστάτη, έχοντας με αυτόν τον τρόπο ιδιότητες υποδοχέων. Η πρόσδεση ενός μορίου σε αυτή τη θέση ελέγχει το άνοιγμα ή το κλείσιμο του διαύλου του καναλιού.
- Συζευγμένοι με G-πρωτεΐνες υποδοχείς (GPCRs). Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν διαμεμβρανικοί υποδοχείς με συγκεκριμένη τοπολογία, οι περισσότερες λειτουργίες των οποίων επιτελούνται μέσω των ετεροτριμερών G-πρωτεϊνών.

Από τις διάφορες κατηγορίες των υποδοχέων, οι GPCRs είναι η μεγαλύτερη και πιο ποικιλόμορφη ομάδα στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Οι κύριοι μηχανισμοί των GPCRs εκτελούνται μέσω μιας ειδικής ομάδας πρωτεϊνών, τις ετεροτριμερείς G-πρωτεΐνες. Οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες, μέσω της αλληλεπίδρασής τους με τους GPCRs, καθορίζουν

ουσιαστικά την μεταγωγή σήματος. Μετά την ενεργοποίησή τους, αλληλεπιδρούν με ειδικά μόρια – εκτελεστές, οδηγώντας σε αλλαγές στη συγκέντρωση των ενδοκυττάρων μορίων σηματοδοτών, και πυροδοτώντας τελικά την κυτταρική απόκριση . Ο ρόλος τους στη ρύθμιση των μηχανισμών μεταγωγής καθιστά τους GPCRs μόρια σημαντικά στη μελέτη ασθενειών (συμπεριλαμβανομένων του καρκίνου, της κυστικής ίνωσης και του AIDS), αλλά και στην διαδικασία σχεδιασμού και παραγωγής φαρμάκων. Η δυνατότητα ρύθμισης των μονοπατιών μεταγωγής σήματος μέσω των GPCRs οδήγησε στην δυνατότητα παραγωγής φαρμάκων για τις ασθένειες που σχετίζονται με αυτά, κάνοντας τους GPCRs μια από τις σημαντικότερες ομάδες μορίων για τη φαρμακολογία, με αποτέλεσμα να αποτελούν στόχο για το 40% των φαρμάκων που υπάρχουν στην αγορά (Cherezon *et al.*, 2010; Rosenbaum *et al.*, 2009; Shonberg *et al.*, 2014).

1.2 Οι Συζευγμένοι με G-πρωτεΐνες Υποδοχείς

Το βασικό μοντέλο μεταγωγής σήματος που ακολουθούν οι GPCRs είναι η αλληλεπίδρασή τους με τις G-πρωτεΐνες, όπως υποδηλώνει και το όνομά τους. Ενεργοποιούμενοι από υποκαταστάτες με ιδιότητα αγωνιστή, οι υποδοχείς δρουν ως παράγοντες ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης (Guanine nucleotide Exchange Factors, GEFs) για τις G-πρωτεΐνες, που στη συνέχεια θα μεταδώσουν το σήμα ενδοκυτταρικά μέσω της ενεργοποίησης μορίων εκτελεστών, όπως ιοντικά κανάλια και ένζυμα. Πέρα από αυτό το μοντέλο όμως, έχει βρεθεί ότι οι GPCRs μπορούν να συμμετέχουν σε ποικίλες πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις με άλλα μόρια όπως οι κινάσες τύπου GRK (G-protein coupled Receptor Kinases) και οι β-αρρεστίνες, που παράγουν αποτελέσματα σε συνδυασμό με τη δράση των G-πρωτεϊνών ή ακόμα και ανεξάρτητα από αυτές (Εικόνα 1.2).



Εικόνα 1.2 Επισκόπηση των διάφορων σηματοδοτικών μονοπατιών των GPCRs. Στην εικόνα παρουσιάζεται διαγραμματικά ο αδρενεργικός υποδοχέας β_2 στο επίπεδο της μεμβράνης. Στο κύριο σηματοδοτικό μονοπάτι του ο υποδοχέας αλληλεπιδρά με ετεροτριμερείς G-πρωτεΐνες, ωθώντας την ενεργοποίησή τους και, μέσω αυτών, τη ρύθμιση διάφορων εκτελεστών όπως το ένζυμο αδενυλική κυκλάση και διάφορα ιοντικά κανάλια. Η φωσφορυλίωση του υποδοχέα από κινάσες GRK ή PKC οδηγεί στην αποδιαφοροποίησή του, επάγοντας την πρόσδεση των β -αρρεστίνων και την ενδοκύτωση του υποδοχέα σε κυστίδια κλαθρίνης. Ο ενδοκυτωμένος υποδοχέας στη συνέχεια μπορεί είτε να ανακυκλωθεί και να επιστρέψει στη μεμβράνη είτε να πρωτεολυθεί στα λυσοσώματα. Ωστόσο, μέσω της προσδεμένης β -αρρεστίνης, ο υποδοχέας μπορεί να ρυθμίσει σηματοδοτικά μονοπάτια ανεξάρτητα των G-πρωτεϊνών, όπως το μονοπάτι των κινασών ERK1,2 και, μέσω αυτών, την έκφραση διάφορων γονιδίων. Προσαρμογή από (Rosenbaum *et al.*, 2009).

Η αλληλούχηση και ανάλυση συνεχώς αυξανόμενου αριθμού ευκαρυωτικών γονιδιωμάτων αποκαλύπτει τον μεγάλο βαθμό ποικιλομορφίας στην εξέλιξη της υπερικογένειας των GPCRs. Έτσι, στον άνθρωπο έχουν προσδιοριστεί πάνω 800 γονίδια που κωδικοποιούν GPCRs, που αντιστοιχούν σε ποσοστό μεγαλύτερο του 1% του γονιδιώματος, ενώ σε άλλους οργανισμούς το ποσοστό αυτό μεγαλώνει. Οι GPCRs αναγνωρίζουν μια πολύ μεγάλη ποικιλία εξωκυττάρων σημάτων, ανάμεσα στα οποία περιλαμβάνονται ορμόνες, νευροδιαβιβαστές, ένα μεγάλο και ετερόκλητο σύνολο υποκαταστών όπως νουκλεοτίδια, αμίνες, αμινοξέα, πεπτίδια, λιπαρά οξέα και ιόντα ασβεστίου, καθώς και εξωγενείς υποκαταστάτες, όπως παράγοντες οσμής και γεύσης, ακόμα και φωτόνια. Συμμετέχουν σε διαδικασίες νευροδιαβίβασης, ενδοκρινούς ελέγχου, στην

ομοιόσταση και την αναπαραγωγή, στη ρύθμιση του μεταβολισμού και της αιμοδυναμικής, και στην επαγωγή και αναστολή της κυτταρικής αύξησης, του πολλαπλασιασμού και του κυτταρικού θανάτου (Rosenbaum *et al.*, 2009).

1.2.1 Ταξινόμηση των GPCRs

Στην προσπάθεια κατάταξης των GPCRs έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα συστήματα ταξινόμησης. Κάποια ταξινομούν τους υποδοχείς με βάση τη δομή τους, άλλα με βάση την εξελικτική τους καταγωγή και κάποια τους κατατάσσουν σε ομάδες ανάλογα με τους υποκαταστάτες με τους οποίους προσδένονται, κανένα όμως δεν έχει τύχει πλήρους αποδοχής από την επιστημονική κοινότητα. Το πιο δημοφιλές σύστημα κατατάσσει τους υποδοχείς στις κλάσεις A, B, C, D, E και F στο ανώτερο επίπεδο, βασιζόμενο κυρίως στην ομοιότητα των αμινοξικών ακολουθιών, και προχωρεί περαιτέρω σε κατάταξη σε υποοικογένειες (Kolakowski, 1994). Πιο αναλυτικά:

1. Κλάση A (ομοιάζοντες με Ροδοψίνη – Rhodopsin-like GPCRs). Σε αυτήν περιλαμβάνονται υποδοχείς με μεγάλη ετερογένεια υποκαταστών, όπως βιογενείς αμίνες, γλυκοπρωτεΐνες, πεπτίδια, νουκλεοτίδια κλπ. Η ομαδοποίηση των υποδοχέων γίνεται με βάση τη δομή τους, που μοιάζει με αυτή της Ροδοψίνης.
2. Κλάση B (ομοιάζοντες με σεκρετίνη – Secretin-like GPCRs). Υποδοχείς με πεπτιδικούς υποκαταστάτες.
3. Κλάση C (Μεταβοτροπικοί υποδοχείς του γλουταμικού - Metabotropic glutamate receptors). Υποδοχείς του γλουταμικού, του γ-αμινοβουτυρικού και κάποιοι γευστικοί υποδοχείς.
4. Κλάση D. Υποδοχείς για τις φερομόνες των μυκήτων.
5. Κλάση E. Υποδοχείς του κυκλικού AMP (μέχρι στιγμής μόνο στα είδη του πρωτόζωου *Dictyostellium*).
6. Κλάση F (Frizzled/Smoothed). Οι πρόσφατα ανακαλυφθέντες Frizzled/Smoothed υποδοχείς.

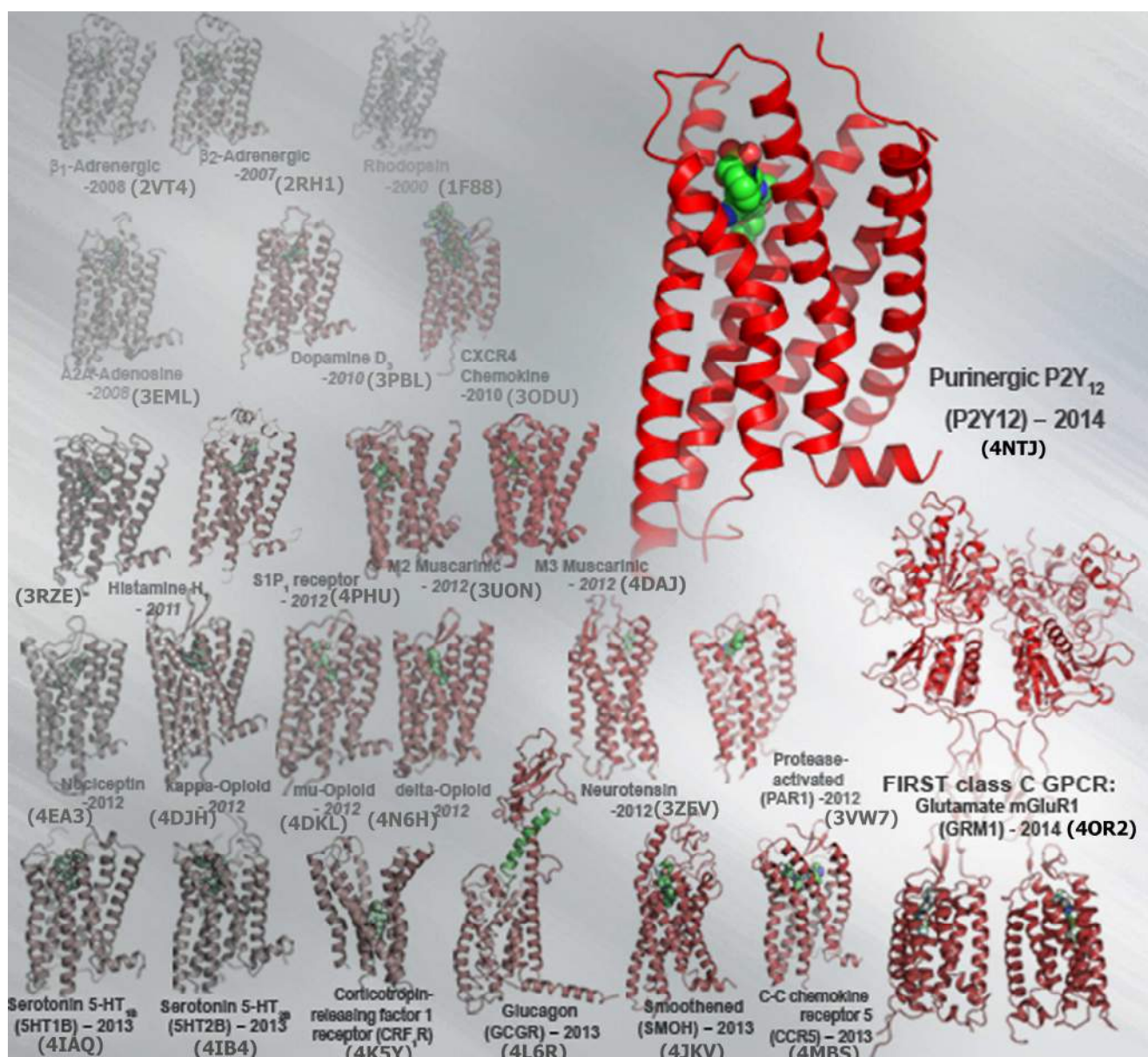
Το συγκεκριμένο σύστημα έχει σχεδιαστεί ώστε να καλύπτει ταξινομικά τους υποδοχείς τόσο των χορδωτών όσο και των μη χορδωτών.

Με τις αναλύσεις των γονιδιωμάτων έγιναν διαθέσιμα αρκετά δεδομένα ώστε να γίνει φυλετική μοντελοποίηση των GPCRs. Έτσι, προτάθηκε ένα εναλλακτικό σύστημα ταξινόμησης, το σύστημα GRAFS (Fredriksson *et al.*, 2003; Schioth and Fredriksson, 2005), το οποίο κατατάσσει τους GPCRs του ανθρώπινου γονιδιώματος σε πέντε οικογένειες, τις: Glutamate (G), Rhodopsin (R), Adhesion (A), Frizzled/Taste 2 (F) και Secretin (S). Το σύστημα αυτό προτείνει ότι οι GPCRs προήλθαν από έναν κοινό πρόγονο, και η διαφοροποίησή τους προέκυψε από την ανακατάταξη των εξωνίων. Η αρχική μορφή του συστήματος GRAFS περιοριζόταν στον άνθρωπο. Ωστόσο, πλέον χρησιμοποιείται συχνά για την περιγραφή των GPCRs όλων των σπονδυλοζώων, καθώς και αρκετών ασπονδύλων.

1.2.2 Η Δομή των GPCRs

Όλα τα μέλη της υπεροικογένειας των GPCRs μοιράζονται μια κοινή τοπολογία και διαθέτουν 7 διαμεμβρανικές έλικες, τρεις ενδο- και τρεις εξωκυτταρικούς βρόχους, μια εξωκυτταρική περιοχή – αμινοτελικό άκρο και μια ενδοκυτταρική περιοχή – καρβοξυτελικό άκρο (Rosenbaum *et al.*, 2009). Η κοινή τοπολογία επιβεβαιώνεται από τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα που έχουν κατατεθεί στην Protein Data Bank (PDB), και είναι πλέον ευρύτερα αποδεκτή (Εικόνα 1.3). Η πρώτη δομή GPCR που προσδιορίστηκε κρυσταλλογραφικά ήταν αυτή της Ροδοψίνης του βοδιού (Palczewski *et al.*, 2000). Ακολούθησαν οι δομές των αδρενεργικών υποδοχέων β1 και β2 (Cherezon *et al.*, 2007; Warne *et al.*, 2008) και του αδενοσινικού υποδοχέα A2α, ενώ τα τελευταία χρόνια έχουν προσδιοριστεί οι τρισδιάστατες δομές για πάνω από 20 υποδοχείς της Κλάσης A, ανάμεσα στους οποίους περιλαμβάνονται σημαντικοί στόχοι φαρμάκων όπως οι χημειοκινικοί υποδοχείς CXCR1 και CXCR4 (Park *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2010) και η πλήρης υποοικογένεια των οπιοειδών υποδοχέων (Cherezon *et al.*, 2007; Granier *et al.*, 2012; Manglik *et al.*, 2012; Thompson *et al.*, 2012; Warne *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2012). Επιπλέον, πρόσφατες δομικές μελέτες οδήγησαν στον προσδιορισμό κρυσταλλικών δομών για τον υποδοχέα Smoothed της Κλάσης F (Wang *et al.*, 2013), τον υποδοχέα της γλυκαγόνης (Κλάσης B) (Siu *et al.*, 2013) και τους μεταβοτροπικούς υποδοχείς του γλουταμικού mGluR1 και mGluR5

(Κλάση C) (Dore *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2014), επιβεβαιώνοντας την ύπαρξη της κοινής τοπολογίας και για υποδοχείς εκτός της Κλάσης A. Οι δομές των περισσότερων από τους παραπάνω υποδοχείς έχουν λυθεί επανειλημμένα, σε διαφορετική διακριτικότητα και σε σύμπλοκα με διάφορα μόρια. Το σύνολο των κρυσταλλικών δομών GPCRs που έχουν κατατεθεί στην PDB μέχρι σήμερα παρουσιάζεται στον Πίνακα 1.1.



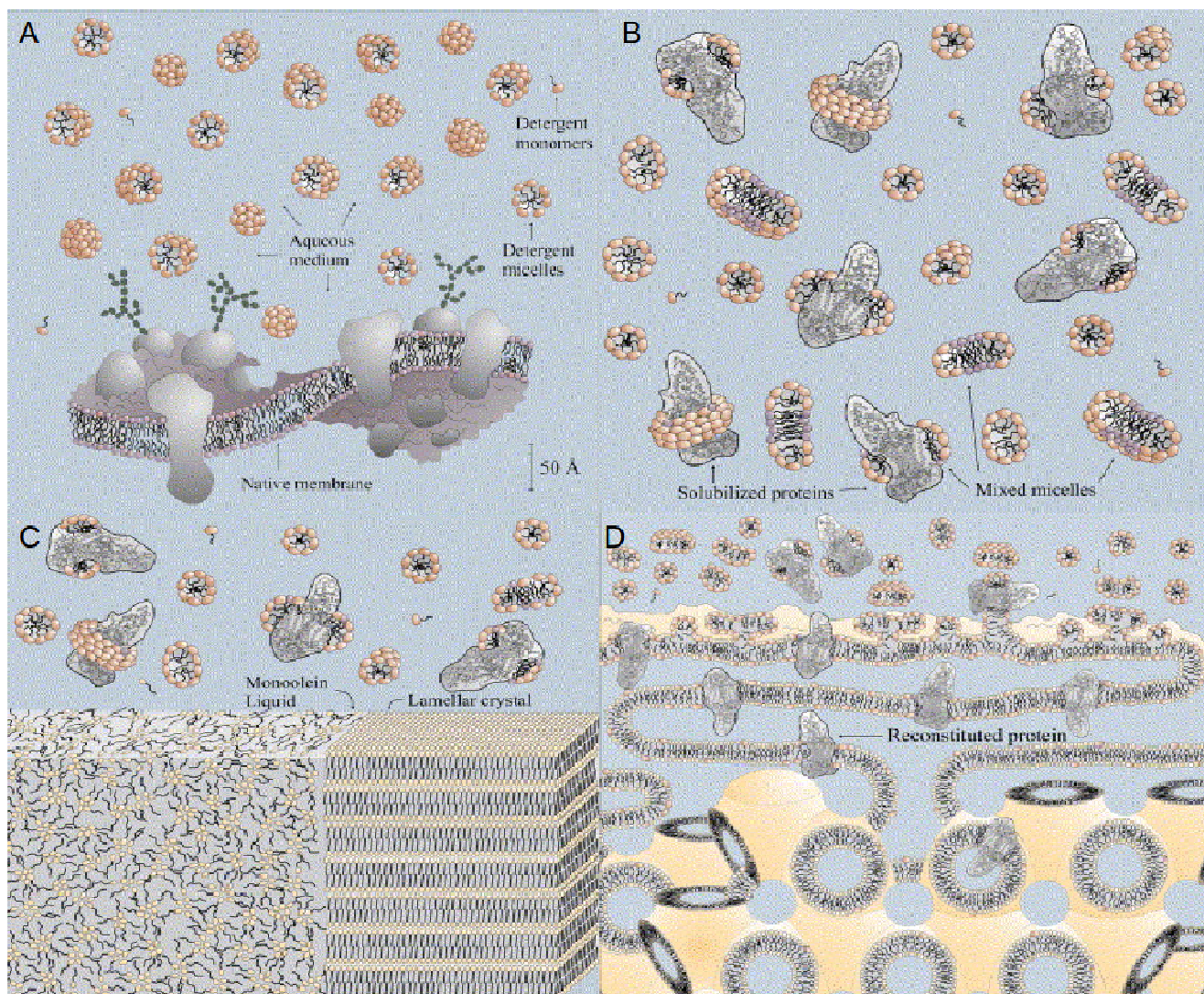
Εικόνα 1.3 Οι διαθέσιμες κρυσταλλικές δομές των GPCRs. Προσαρμογή από The Stevens Lab (<http://stevens.scripps.edu/>).

Οι GPCRs, όπως και οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες γενικότερα, παρουσιάζουν ιδιαίτερες δυσκολίες στην επίλυση της τρισδιάστατης δομής τους. Είναι αδύνατο να χρησιμοποιηθεί η

τυπική διαδικασία που ακολουθείται στην κρυστάλλωση σφαιρικών υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών καθώς, λόγω των υδρόφοβων τμημάτων τους, οι υπό φυσιολογικές συνθήκες θαμμένοι στη μεμβράνη υποδοχείς δημιουργούν ίζημα κατά την απομόνωσή τους. Επιπλέον, στην διαδικασία κρυστάλλωσης των GPCRs υπάρχουν δύο σημαντικά εμπόδια: Οι περισσότεροι GPCRs εκφράζονται σε χαμηλά επίπεδα στους ζωντανούς ιστούς. Κατά συνέπεια, πρέπει να σχεδιαστούν ειδικά συστήματα έκφρασης, που θα παράγουν σε μεγάλες συγκεντρώσεις μεμβρανικές πρωτεΐνες που διπλώνουν στο χώρο ακριβώς όπως και σε *in vivo* συνθήκες. Μέχρι στιγμής μόνο τα Sf-9 και Hi-5 κύτταρα εντόμων, και τα COS-1 κύτταρα των θηλαστικών παράγουν ικανοποιητικά επίπεδα GPCRs που να μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε κρυσταλλογραφικές μελέτες. Το δεύτερο εμπόδιο που πρέπει να ξεπεραστεί είναι τα προβλήματα στη θερμοδυναμική και πρωτεολυτική σταθερότητα των υποδοχέων. Με εξαίρεση τη Ροδοψίνη, όλοι οι υπόλοιποι GPCRs έχουν κακή θερμοδυναμική σταθερότητα και είναι ευάλωτοι σε πρωτεολυτικά ένζυμα λόγω των μη προστατευμένων εξωμεμβρανικών περιοχών τους (Cherezov *et al.*, 2010; Rosenbaum *et al.*, 2009).

Πίνακας 1.1. Οι GPCRs με διαθέσιμη τρισδιάστατη δομή.

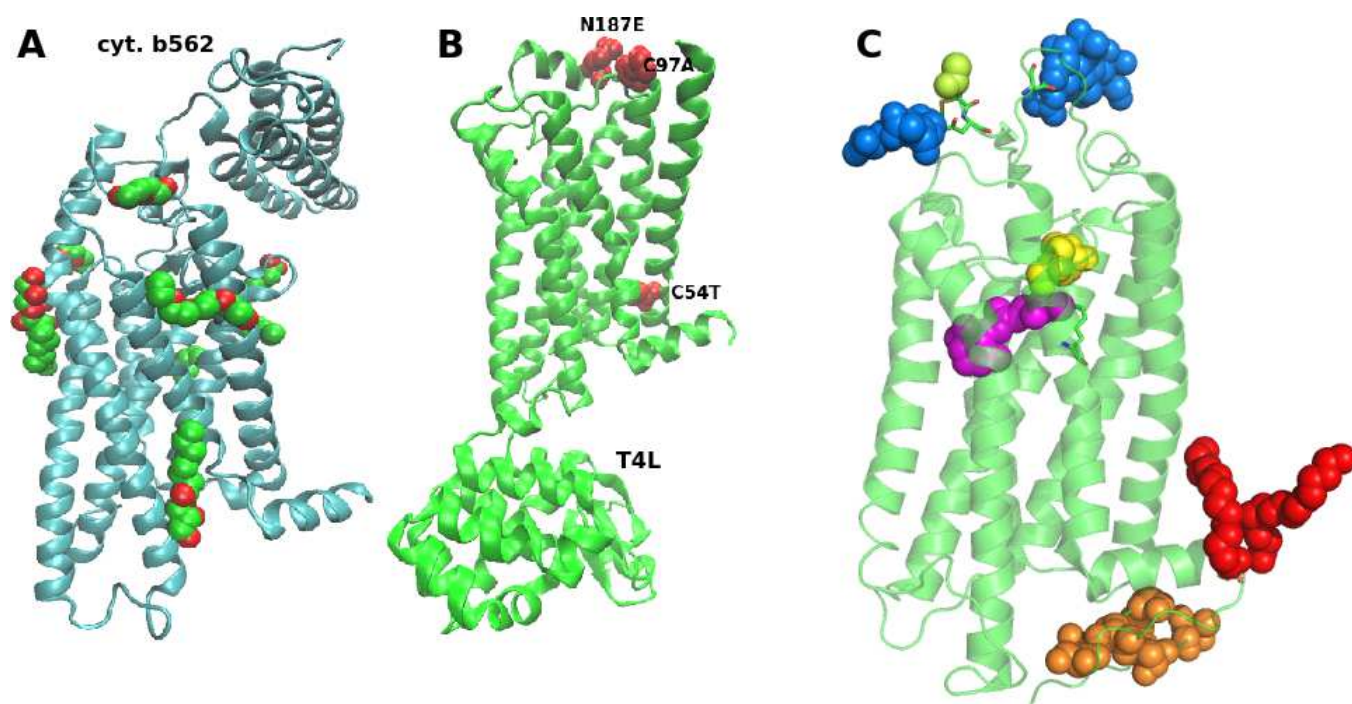
GPCR	Κλάση	Διαθέσιμες δομές στην PDB
Ροδοψίνη Βοδιού	A	1F88, 1GZM, 1HZX, 1JFP, 1L9H, 1LN6, 1U19, 2G82HPY, 2I35, 2I36, 2I37, 2J4Y, 2PED, 2X72, 3C9L, 33CAP, 3DQB, 3OAX, 3PQR, 3PXO, 4A4M, 4BEY, 44J4Q, 4PXF
Ροδοψίνη Καλαμαριού	A	2Z73, 2ZIY, 3AYM, 3AYN
β2AR αδρενεργικός	A	2R4R, 2R4S, 2RH1, 3D4S, 3KJ6, 3NY8, 3NY9, 3NY3P0G, 3PDS, 3SN6, 4GBR, 4LDE, 4LDL, 4LDO, 4QI
β1AR αδρενεργικός	A	2VT4, 2Y00, 2Y01, 2Y02, 2Y03, 2Y04, 2YCW, 2YCY, 2YCY, 2YCY, 3ZPQ, 3ZPR, 4AMI, 4AMJ, 4BVN, 4G
A2aR αδενосινικός	A	2YDO, 2YDV, 3EML, 3PWH, 3QAK, 3REY, 3RFM, 33UZY, 3VGA, 4EYI, 4UG2, 4UHR
CXCR1 χημειοκινικός	A	2LNL
CXCR4 χημειοκινικός	A	3ODU, 3OE0, 3OE6, 3OE8, 3OE9, 4RWS
CCR5 χημειοκινικός	A	4MBS
D3 ντοπαμινικός	A	3PBL
5-HT1B σεροτονινικός	A	4IAQ, 4IAR
5-HT2B σεροτονινικός	A	4IB4, 4NC3
H1R	A	3RZE
Υποδοχέας λιπαρών οξέων 1	A	4PHU
M2R μουςκαρινικός	A	3UON, 4MQS, 4MQT
M3R μουςκαρινικός	A	4DAJ, 4U14, 4U15, 4U16
NTS1R νευροτενσινικός	A	3ZEV, 4BUO, 4BV0, 4BWB, 4GRV
δ οπιοειδής	A	4EJ4, 4N6H, 4RWA
μ οπιοειδής	A	4DKL
κ οπιοειδής	A	4DJH
N/OFQ οπιοειδής	A	4EA3
OX2R ορεξινικός	A	4S0V
P2Y1 πουρινεργικός	A	4XNV, 4XNW
P2Y12 πουρινεργικός	A	4NTJ, 4PXZ, 4PY0
PAR1 υποδοχ.θρομβίνης	A	3VW7
AT1R αγγειοτενσινικός	A	4YAY
CRF1 κορτικοτροπινικός	B	4K5Y
Υποδοχέας γλυκαγόννης	B	4L6R
mGluR1 υποδοχ. γλουταμικού	C	4OR2
mGluR5 υποδοχ. γλουταμικού	C	4O09
Smoothened	F	4JKV, 4N4W, 4O9R, 4QIM, 4QIN
Ικός GPCR US28	A	4XT1, 4XT3



Εικόνα 1.4 Τα βασικά στάδια της μεθοδολογίας της λιπιδικής κυβικής μεσόφασης για την κρυστάλλωση διαμεμβρανικών πρωτεϊνών. Α. Οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες απομονώνονται από το δείγμα με αποδιάταξη του κυττάρου, εισάγοντας μικύλλια απορρυπαντικού με υδρόφοβα τμήματα, Β. Τα μόρια απορρυπαντικού προσδένονται στα διαμεμβρανικά τμήματα των πρωτεϊνών, προστατεύοντας τα από το νερό και εμποδίζοντας την καθίζηση των πρωτεϊνών, C. Τα σύμπλοκα πρωτεΐνης – απορρυπαντικού εισάγονται σε διάλυμα τεχνητών λιπιδίων μονοολεΐνης. Η εισαγωγή του υδατικού διαλύματος στο λιπιδικό διάλυμα ωθεί την αυτοοργάνωση των λιπιδίων σε δομές, η πρώτη φάση των οποίων είναι ένας ελασματοειδής κρύσταλλος αποτελούμενος από λιπιδικές διπλοστιβάδες, D. Κατά τη μετάβαση των λιπιδίων από την υγρή στην οργανωμένη κατάσταση τους οι μεμβρανικές πρωτεΐνες ενσωματώνονται στις λιπιδικές διπλοστιβάδες. Τελικό αποτέλεσμα είναι ο σχηματισμός μιας κυβικής λιπιδικής φάσης, αποτελούμενης από λιπίδια και πρωτεΐνες. Αυτή η φάση υπόκειται σε επεξεργασία με ιοντικά διαλύματα για την παραγωγή κρυστάλλων. Προσαρμογή από (Caffrey, 2003).

Λύσεις στα παραπάνω προβλήματα έχουν αποτελέσει η χρήση ειδικών απορρυπαντικών για την απομόνωση των υποδοχέων, η εφαρμογή μεθόδων όπως η κρυστάλλωση μέσω λιπιδικής μεσόφασης (Εικόνα 1.4) και η εισαγωγή ειδικών μεταλλαγών που αυξάνουν την ανθεκτικότητα των υποδοχέων στην πρωτεόλυση, καθώς και η συγκρυστάλλωσή τους με μόρια όπως οι Fab

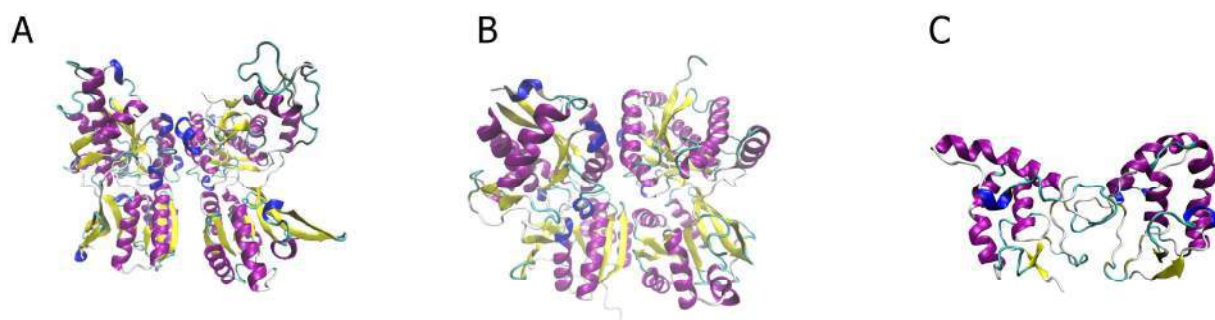
περιοχές των ανοσοσφαιρινών και τα νανοαντισώματα των καμηλοειδών, ή η έκφράσή τους σαν χίμαιρες με συνοδευτικές πρωτεΐνες όπως η λυσοζύμη του φάγου T4 και η σφαιρική υπομονάδα b562 του κυτοχρώματος (Εικόνα 1.5). Ωστόσο, οι παραπάνω μέθοδοι επηρεάζουν σημαντικά τη διαδικασία της κρυστάλλωσης, με αποτέλεσμα να απουσιάζουν συχνά από τις δομές των GPCRs σημαντικές περιοχές όπως ο 3ος ενδοκυτταρικός βρόχος ICL3, το καρβοξυτελικό άκρο ή οι εξωκυτταρικές περιοχές.



Εικόνα 1.5 Απεικόνιση χαρακτηριστικών των διαθέσιμων δομών GPCRs. Όλοι οι υποδοχείς παρουσιάζονται σε απεικόνιση “cartoon”. Α. Η κρυσταλλική δομή του υποδοχέα Smoothed (PDB: 4JKV). Ο υποδοχέας έχει λυθεί ως χίμαιρα με την υπομονάδα του κυτοχρώματος b562 στο εξωκυτταρικό του τμήμα. Μόρια απορρυπαντικού και λιπιδίων που συγκρυστάλλωθηκαν με τον υποδοχέα απεικονίζονται μέσω σφαιρών van der Waals, Β. Η κρυσταλλική δομή του αδρενεργικού υποδοχέα β2 (PDB: 2RH1). Ο υποδοχέας έχει λυθεί σαν χίμαιρα με τη λυσοζύμη του φάγου T4 (T4L). Τα σημεία των θερμοανθεκτικών μεταλλαγών που εφαρμόστηκαν για τη σταθεροποίηση του β2 σημαίνονται με κόκκινες σφαίρες van der Waals, C. Η κρυσταλλική δομή της Ροδοψίνης (PDB: 1U19). Ο υποδοχέας έχει λυθεί στη φυσική κατάστασή του, χωρίς τη χρήση χιμαιρών ή σταθεροποιητικών τεχνικών. Με σφαίρες van der Waals αντιπροσωπεύονται οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των GPCRs: φωσφορυλίωση (πορτοκαλί), παλμιτοϋλίωση (κόκκινο), ακετυλίωση (πράσινο) και γλυκοζυλίωση (μπλε). Με μωβ και κίτρινες σφαίρες, τέλος, σημαίνονται η θέση του υποκαταστάτη 11-cis-ρετινάλη και του συντηρημένου δισουλφιδικού δεσμού, αντίστοιχα.

Τα διαμεμβρανικά τμήματα των διάφορων υποδοχέων μοιράζονται μεγαλύτερο βαθμό συντήρησης της αμινοξικής τους ακολουθίας, ενώ τα εξωκυττάρια και ενδοκυττάρια τμήματα εμφανίζουν εκτενή μεταβλητότητα σε μέγεθος και πολυπλοκότητα. Οι εξωκυττάρια και διαμεμβρανικές περιοχές του υποδοχέα εμπλέκονται στην πρόσδεση του υποκαταστάτη, ενώ τα

ενδοκυττάρια τμήματα είναι σημαντικά για τη μεταγωγή σήματος και την ανατροφοδοτούμενη διαφοροποίηση της λειτουργίας του υποδοχέα. Πρέπει να σημειωθεί ότι, με ελάχιστες εξαιρέσεις, οι GPCRs της Κλάσης A διαθέτουν σχετικά μικρό αμινοτελικό άκρο, συνήθως με ακανόνιστη δομή. Αντίθετα, οι υποδοχείς των Κλάσεων B, C και F διαθέτουν μεγάλες σε μέγεθος (>200 κατάλοιπα) εξωκυτταρικές περιοχές, οι οποίες σχηματίζουν σφαιρικές δομικές αυτοτελείς περιοχές (domains). Οι συγκεκριμένες περιοχές συμμετέχουν ενεργά στην αναγνώριση του φυσικού υποκαταστάτη των υποδοχέων, ενώ ενδέχεται να επιτελούν και επιπλέον λειτουργίες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν οι υποδοχείς Adhesion, οι οποίοι συμμετέχουν στο σχηματισμό απ'ευθείας επαφών ανάμεσα σε κύτταρα. Δεδομένα για τη δομική φύση κάποιων από αυτές τις εξωκυτταρικές περιοχές προέρχονται από τις διαθέσιμες κρυσταλλικές δομές εξωκυτταρικών τμημάτων για GPCRs (Εικόνα 1.6), όπως οι μεταβοτροπικοί υποδοχείς του γλουταμικού mGluR1, mGluR3 και mGluR5, οι υποδοχείς του γ-αμινοβουτυρικού οξέος GABAB1 και GABAB2 και κάποιοι υποδοχείς Frizzled (Niswender and Conn, 2010). Ωστόσο, μέχρι στιγμής δεν έχει προσδιοριστεί πειραματικά η πλήρης δομή κάποιου από τους παραπάνω υποδοχείς, η οποία θα μπορούσε να παρουσιάζει τα δομικά χαρακτηριστικά των αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στις εξωκυτταρικές περιοχές και το τμήμα των 7 διαμεμβρανικών α-ελίκων (Dann *et al.*, 2001; Geng *et al.*, 2012; Kunishima *et al.*, 2000).



Εικόνα 1.6 Διαθέσιμες κρυσταλλικές δομές εξωκυτταρικών περιοχών των υποδοχέων mGluR1 (PDB: 1EWK) (A), GABAB1/GABAB2 (PDB: 4MS3) (B) και Frizzled-8 (1JIY) (C). Οι δομές αναπαρίστανται σε απεικόνιση cartoon και χρωματίζονται με βάση τη δευτεροταγή δομή, με μωβ για τις α-έλικες, μπλε για τις 3_{10} -έλικες και κίτρινο για τους β-κλώνους. Στις δομές των mGluR1 και GABAB οι υποδοχείς απαντούν ως ομο- και ετεροδιμερή, αντίστοιχα, με τις εξωκυτταρικές περιοχές του mGluR1 να συνδέονται μέσω δισουλφιδικών δεσμών.

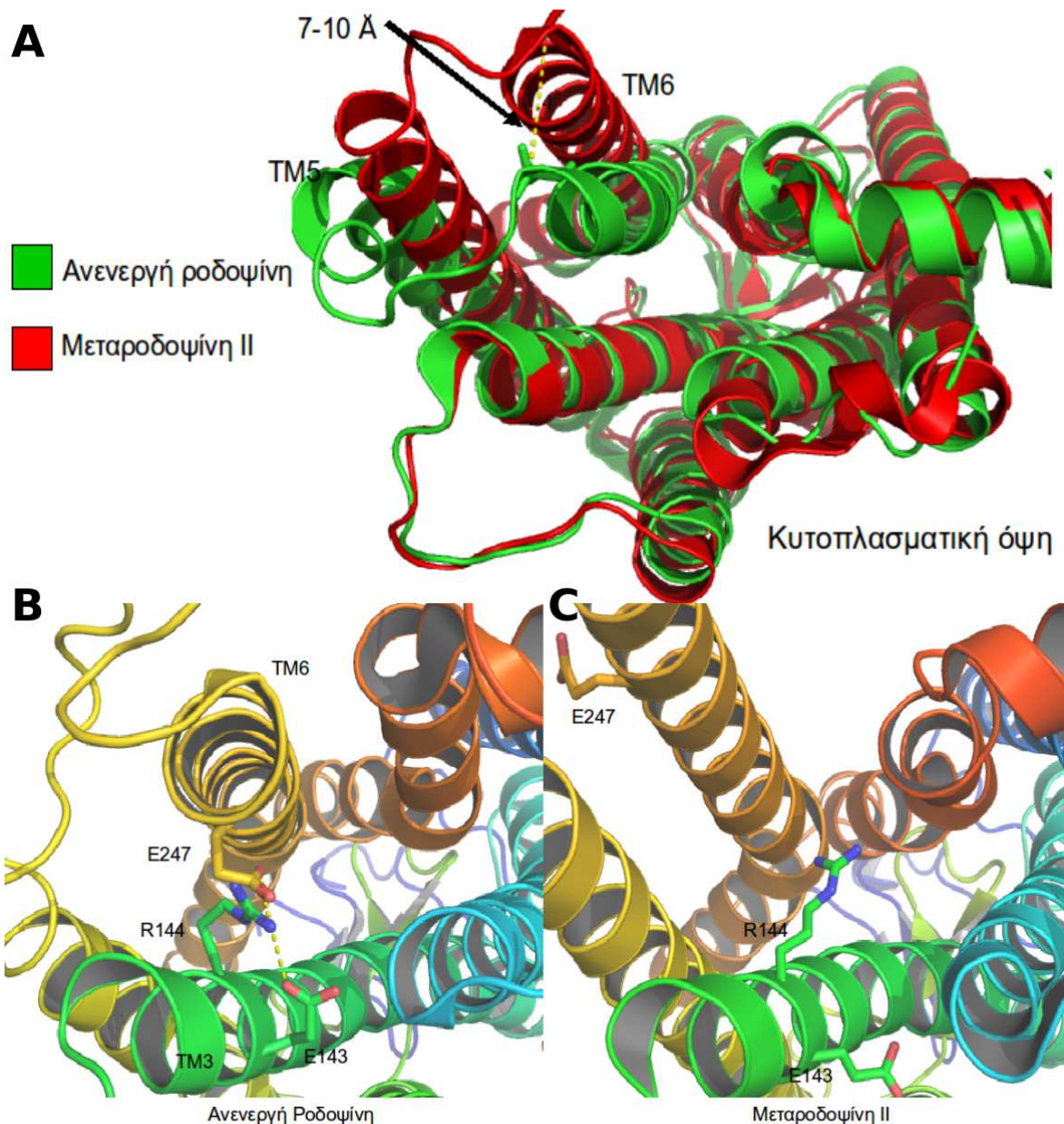
Οι GPCRs, όπως και πολλές διαμεμβρανικές πρωτεΐνες γενικότερα, αποτελούν συχνά στόχο διάφορων μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων (Εικόνα 1.5). Μία ή περισσότερες περιοχές για N-γλυκοζυλίωση υπάρχουν στο αμινοτελικό άκρο ή, λιγότερο συχνά, στις εξωκυττάρειες λούπες.

Οι περισσότεροι υποδοχείς έχουν 2 συντηρημένες κυστεΐνες, που φτιάχνουν έναν δισουλφιδικό δεσμό, ο οποίος συνδέει την τρίτη διαμεμβρανική α-έλικα με την δεύτερη εξωκυττάρια λούπα και είναι κρίσιμος για το φυσιολογικό δίπλωμα της πρωτεΐνης, καθώς και άλλα κατάλοιπα κυστεΐνης στο καρβοξυτελικό άκρο, που εξυπηρετούν ως θέσεις παλμιτοϋλίωσης. Με εξαίρεση τη φωσφορυλίωση, η οποία οδηγεί στην αποδιαφοροποίηση των υποδοχέων και την ενδοκύτωσή τους, ο ρόλος των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως, ωστόσο πιστεύεται ότι συμβάλλουν σε μεγάλο βαθμό στην ορθή λειτουργικότητα των υποδοχέων. Τα παραπάνω χαρακτηριστικά έχουν βρεθεί συντηρημένα σε όλες σχεδόν τις διαθέσιμες δομές των GPCRs της Κλάσης A, ενώ πειραματικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι και οι υποδοχείς των άλλων Κλάσεων υφίστανται αντίστοιχες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις.

1.2.3 Ο Μηχανισμός Ενεργοποίησης των GPCRs

Οι υποκαταστάτες προσδένονται στην εξωκυτταρική πλευρά ενός υποδοχέα GPCR προκαλώντας μεταβολές στη στερεοδιάταξη που οδηγούν στην ενεργοποίηση των G-πρωτεϊνών. Οι υποδοχείς συνδέονται με τους υποκαταστάτες με διάφορους τρόπους. Η θέση πρόσδεσης του υποκαταστάτη εξαρτάται από το είδος αυτού. Όταν ο υποκαταστάτης είναι πρωτεϊνικής φύσεως, αυτός αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα κυρίως μέσω των μεγάλων περιοχών στον εξωκυττάριο χώρο. Διαφορετικές τέτοιες περιοχές είναι δυνατόν να εμπλέκονται στην αναγνώριση ακόμα και σχετικά όμοιων υποκαταστατών. Αντίθετα, υπάρχουν ενδείξεις ότι στην δέσμευση και αναγνώριση υποκαταστατών μικρών μοριακών βαρών, λειτουργικά απαραίτητες περιοχές εμφανίζονται κυρίως στα εξωτερικά όρια των διαμεμβρανικών α-ελίκων, και συγκεκριμένα στην άνω εσωτερική κοιλότητα του δεματίου, στην περιοχή αλληλεπίδρασης των ελίκων. Τα αμινοξέα που πλαισιώνουν αυτόν τον θύλακα διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των υποδοχέων, παρέχοντας έτσι την εξειδίκευση σε κάθε υποδοχέα για τη σύνδεσή του με ένα συγκεκριμένο υποκαταστάτη. Πρέπει, τέλος, να σημειωθεί ότι είναι δυνατό να υπάρχουν περισσότερες του ενός θέσεις πρόσδεσης υποκαταστατών στον ίδιο υποδοχέα, οι οποίες μπορούν να δέχονται τον ίδιο ή διαφορετικούς υποκαταστάτες και να αλληλοεπηρεάζονται. Επιπρόσθετα, ένας υποδοχέας μπορεί να αναγνωρίσει περισσότερους του ενός υποκαταστάτες, οι οποίοι μπορούν να επάγουν ή να αναστέλλουν τη λειτουργία του, ή να οδηγούν σε διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια (Shonberg *et al.*, 2014).

Οι υποδοχείς βρίσκονται σε μια ισορροπία μεταξύ δύο στερεοδιατάξεων: μια ανενεργό κατάσταση και μια ενεργό κατάσταση, κατά την οποία ο υποδοχέας έχει την ικανότητα να καταλύει την ανταλλαγή νουκλεοτιδίων στις G-πρωτεΐνες. Η σύνδεση του υποκαταστάτη με τον υποδοχέα προκαλεί την έναρξη της μεταγωγής σήματος, μετατοπίζοντας την ισορροπία προς την ενεργό στερεοδιάταξη. Νεότερα κρυσταλλογραφικά δεδομένα, ανάμεσα στα οποία περιλαμβάνονται οι λυμένες δομές των ενεργοποιημένων ενδιαμέσων της Ροδοψίνης, της Οψίνης και της Μεταροδοψίνης II (Park *et al.*, 2008), καθώς και οι δομές των ενεργών στερεοδιατάξεων του β_2 αδρενεργικού υποδοχέα (Rasmussen *et al.*, 2011) και του $A_{2\alpha}$ αδενοσινικού υποδοχέα (Xu *et al.*, 2011) δείχνουν πως οι GPCRs της Κλάσης A ακολουθούν ένα κοινό πρότυπο ενεργοποίησης (Park *et al.*, 2008; Rasmussen *et al.*, 2011). Στην ανενεργή τους κατάσταση οι υποδοχείς σταθεροποιούνται μέσω μιας ιοντικής γέφυρας που σχηματίζεται ανάμεσα στα κυτοπλασματικά μέρη της 3ης και της 6ης διαμεμβρανικής έλικας. Συγκεκριμένα, στην τρίτη διαμεμβρανική έλικα παρατηρείται η ύπαρξη ενός μοτίβου D(E)RY, τα φορτισμένα κατάλοιπα του οποίου συμμετέχουν στο σχηματισμό γεφύρων άλατος με αντίστοιχα φορτισμένα κατάλοιπα της 6ης έλικας. Ο σχηματισμός αυτών των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων σταθεροποιεί τη θέση των διαμεμβρανικών τμημάτων. Κατά την ενεργοποίηση του υποδοχέα, ωστόσο, αυτή η ιοντική γέφυρα σπάει, οδηγώντας στη μετατόπιση της 6ης διαμεμβρανικής έλικας κατά 6-15 Å, με μικρότερες μετακινήσεις να παρατηρούνται επίσης για την 5η διαμεμβρανική έλικα (Εικόνα 1.7). Οι μετατοπίσεις οδηγούν στο σχηματισμό μιας κοιλότητας στην κυτοπλασματική όψη του υποδοχέα, στην οποία εισέρχονται οι G-πρωτεΐνες, οι κινάσες GRK και οι β-αρρεστίνες. Ένα δεύτερο μοτίβο που φαίνεται να σχετίζεται άμεσα με τη διαδικασία της ενεργοποίησης είναι το NPxxYx(5,6)F, το οποίο εντοπίζεται στο κυτοπλασμικό άκρο της έλικας TM7. Σε αντίθεση με το D(E)RY, το συγκεκριμένο μοτίβο φαίνεται να συμβάλλει στη σταθεροποίηση των ενεργοποιημένων υποδοχέων, χρησιμοποιώντας τα κατάλοιπα τυροσίνης και φαινυλαλανίνης για να σταθεροποιήσει τη θέση της έλικας TM6 μέσω αλληλεπιδράσεων π-ηλεκτρονίων με αντίστοιχης φύσης κατάλοιπα στην TM6 (Park *et al.*, 2008; Rasmussen *et al.*, 2011).

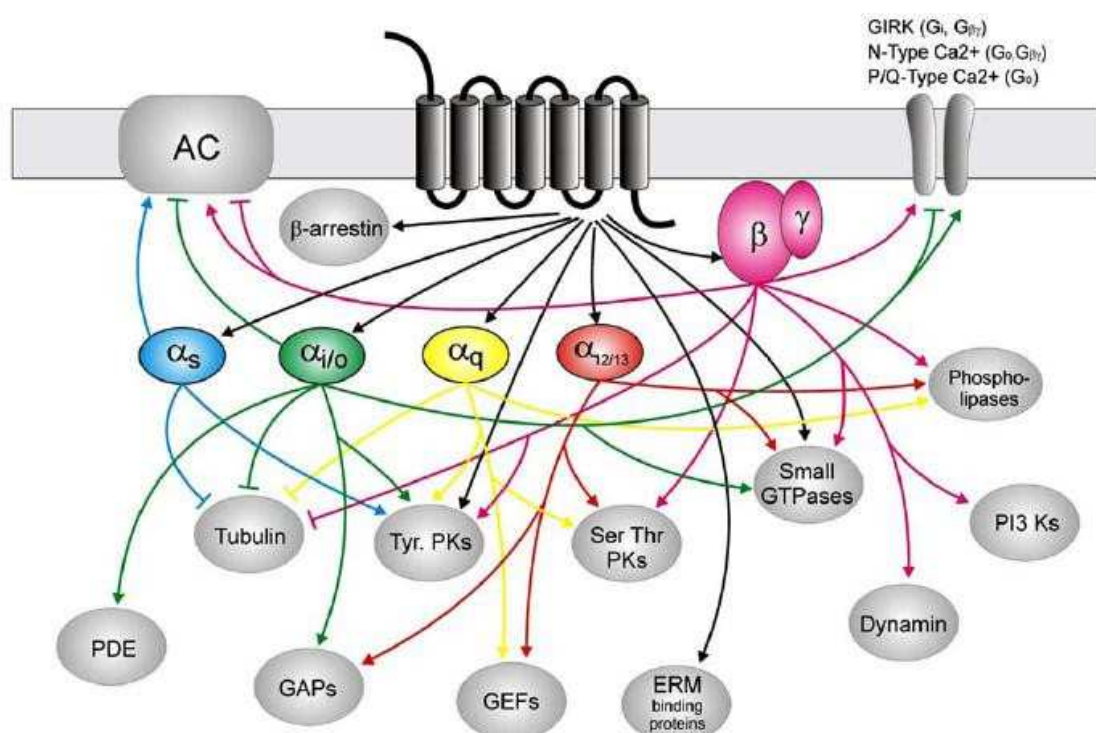


Εικόνα 1.7 Απεικόνιση των βασικών χαρακτηριστικών του μηχανισμού ενεργοποίησης των GPCRs στις δομές της ανενεργής Ροδοψίνης (PDB: 1U19) και της Μεταροδοψίνης II (PDB: 3PXO). Α. Κατά την ενεργοποίηση των GPCRs παρατηρείται μετατόπιση της έλικας TM6 κατά 7-10 Å, Β. Στην ανενεργή κατάσταση, τα φορτισμένα κατάλοιπα του μοτίβου D(E)RY της έλικας TM3 σχηματίζουν γέφυρες άλατος με κατάλοιπα στην έλικα TM6, C. Κατά την ενεργοποίηση η ιοντική γέφυρα TM3-TM6 σπάει, επιτρέποντας τη μετακίνηση της TM6.

Τα μοτίβα D(E)RY και NPxxYx(5,6)F παρατηρήθηκαν αρχικά στη δομή της Ροδοψίνης και η συντηρημένη παρουσία τους επιβεβαιώθηκε σε όλες τις υπόλοιπες δομές υποδοχέων της Κλάσης A, γεγονός που, σε συνδυασμό με τη σημαντική ομοιότητα των δομών των ενεργοποιημένων GPCRs, αποδεικνύει πως η διαδικασία ενεργοποίησης είναι κοινή για τα μέλη της Κλάσης A. Επιπρόσθετα, παρ'ότι μέχρι στιγμής δεν υπάρχει διαθέσιμη δομή για ενεργοποιημένους GPCRs άλλων οικογενειών, οι διαθέσιμες δομές των υποδοχέων των

Κλάσεων B, C και F παρουσιάζουν είτε ιοντικές γέφυρες παρόμοιου χαρακτήρα με αυτές του μοτίβου D(E)RY ανάμεσα στην 3η και την 6η έλικα είτε μοτίβα παρόμοια με το NPxxYx(5,6)F στην έλικα TM7, γεγονός που υποδεικνύει ότι και οι υπόλοιπες κλάσεις των GPCRs πιθανώς ακολουθούν παρόμοιο πρότυπο ενεργοποίησης (Dore *et al.*, 2014; Siu *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2014).

1.3 Οι ετεροτριμερείς G-πρωτεΐνες



Εικόνα 1.8 Τα βασικά σηματοδοτικά μονοπάτια των G-πρωτεϊνών. Προσαρμογή (Woehler and Ponimaskin, 2009).

Ο συνδετικός κρίκος ανάμεσα στους υποδοχείς GPCRs της μεμβράνης και στα μόρια εκτελεστές είναι οι ετεροτριμερείς G-πρωτεΐνες. Λειτουργούν σαν μοριακοί «διακόπτες» που ενεργοποιούν ενδοκυτταρικούς σηματοδοτικούς «καταρράκτες» ως απόκριση στα εξωκυττάρια σήματα που ενεργοποιούν τους GPCRs και κατά συνέπεια, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της ειδικότητας και των προσωρινών χαρακτηριστικών της κυτταρικής απόκρισης. Οι G-πρωτεΐνες είναι μια ομάδα GTPασών με κοινή δομή. Είναι ετεροτριμερείς, αποτελούμενες από α, β και γ υπομονάδες με μοριακά βάρη 39-45, 35-39 και 6-8 kDa αντίστοιχα (Woehler and Ponimaskin, 2009).

Κατά την παρουσία του ετεροδιμερούς Gβγ και μέσω αλληλεπιδράσεων με τα μεμβρανικά λιπίδια, η Gα υπομονάδα παραμένει προσκολλημένη στην πλασματική μεμβράνη όπου, στο εσωτερικό τμήμα της, βρίσκεται κοντά στα μόρια με τα οποία αλληλεπιδρά, τους GPCRs, τους ρυθμιστές και εκτελεστές της (Oldham and Hamm, 2008). Στην ενεργή της διαμόρφωση μπορεί να έρθει σε επαφή με μόρια εκτελεστές, και να διαφοροποιήσει τη λειτουργία τους. Το Gβγ είναι υπεύθυνο για τη συσχέτιση και την ειδική αναγνώριση του ετεροτριμερούς Gαβγ με τον υποδοχέα, ενώ μπορεί συμπληρωματικά να αλληλεπιδράσει τόσο με εκτελεστές όσο και με ρυθμιστικούς παράγοντες (Εικόνα 1.8).

Οι εκτελεστές είναι μια ετερογενής ομάδα πρωτεϊνών που, μέσω των αλληλεπιδράσεών τους με τις G-πρωτεΐνες, δρουν σαν φορείς δεύτερου μηνύματος ή οδηγούν απ'ευθείας σε κάποια κυτταρική και φυσιολογική απόκριση. Το πρώτο μόριο εκτελεστής που μελετήθηκε εκτενώς είναι η αδενυλική κυκλάση, ένα ένζυμο που παράγει κυκλικό AMP. Η αποσαφήνιση της δράσης του συγκεκριμένου ενζύμου ήταν που οδήγησε τελικά στην μελέτη των διαμεμβρανικών μηχανισμών μεταγωγής σήματος, και στην ανακάλυψη των G-πρωτεϊνών. Σε αντίθεση με τις G-πρωτεΐνες που είναι συγκεκριμένες σε αριθμό, και τους GPCRs που ακολουθούν συγκεκριμένο πρότυπο δομής και λειτουργίας, οι εκτελεστές είναι μια μεγάλη ομάδα πρωτεϊνών με μεγάλη ποικιλία στις δομές και τις λειτουργίες τους, από κινάσες και στοιχεία του κυτταροσκελετού ως και ιοντικά κανάλια. Κατά συνέπεια, γίνεται δύσκολη η διαδικασία ταξινόμησής τους.

Η κλασική οπτική των σηματοδοτικών μονοπατιών των GPCRs πρότεινε πως ένας υποδοχέας αλληλεπιδρά με ένα ετεροτριμερές G-πρωτεϊνών, οδηγώντας στην ενεργοποίηση ενός εκτελεστή και σε μια συγκεκριμένη κυτταρική απόκριση. Ωστόσο, έχει γίνει πλέον αποδεκτό πως ένας GPCR μπορεί να αλληλεπιδράσει με περισσότερες από μία διαφορετικές υπομονάδες Gα, και αντίστοιχα, ετεροδιμερή Gβγ, ενώ διάφορες μελέτες τα τελευταία χρόνια έχουν δείξει πως μια οικογένεια Gα ή ετεροδιμερές Gβγ μπορεί να αλληλεπιδράσει με περισσότερους από έναν διαφορετικούς εκτελεστές, και αντίστροφα ένας εκτελεστής μπορεί να ρυθμιστεί από περισσότερες της μίας διαφορετικές G-πρωτεΐνες (Oldham and Hamm, 2008; Woehler and Ponimaskin, 2009).

1.3.1 Ταξινόμηση των G-πρωτεϊνών

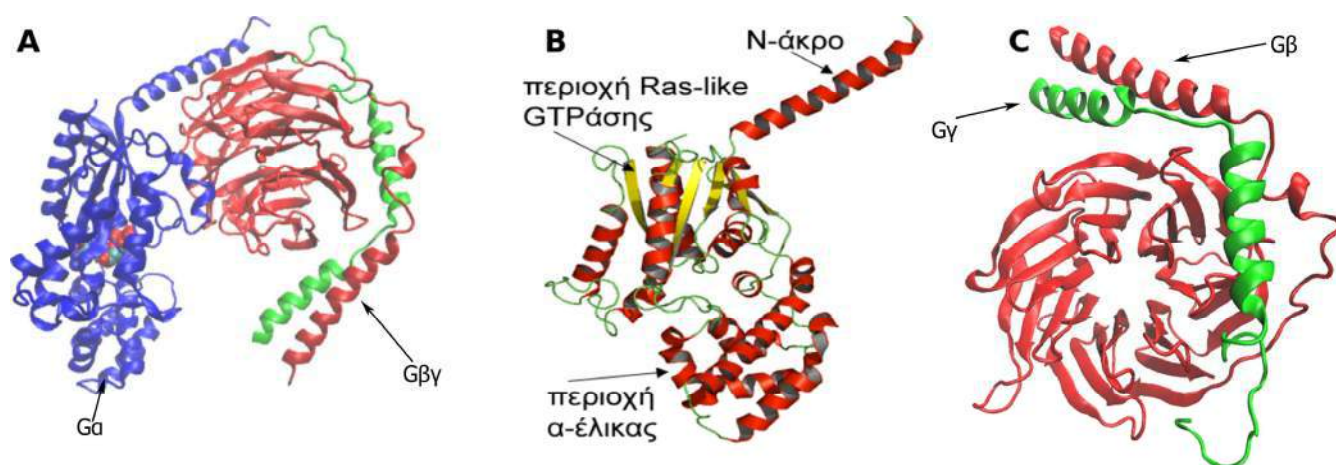
Σε αντίθεση με τη μεγάλη ποικιλομορφία των GPCRs, τα γονίδια που κωδικοποιούν τις G-πρωτεΐνες είναι σχετικά λίγα. Στα θηλαστικά υπάρχουν 21 Gα υπομονάδες που κωδικοποιούνται από 16 γονίδια, 6 Gβ υπομονάδες που κωδικοποιούνται από 5 γονίδια και 12 Gγ υπομονάδες. Οι Gα υπομονάδες κατατάσσονται σε τέσσερις μεγάλες οικογένειες, τις Gα_s, Gα_{i/o}, Gα_{q/11} και Gα_{12/13}, με βάση κυρίως την ομοιότητα της αμινοξικής ακολουθίας τους, ενώ με τη σειρά τους, αυτές οι οικογένειες διαχωρίζονται σε υποοικογένειες. Αντίστοιχα, γονιδιακές μελέτες προτείνουν το διαχωρισμό των Gβ σε δυο μεγάλες οικογένειες, τις ομοιάζοντες Gβ₁ που περιλαμβάνουν τις υπομονάδες Gβ₁ ως Gβ₄ και τις ομοιάζοντες με Gβ₅, που περιλαμβάνουν τις διαφορετικές ισομορφές της Gβ₅, καθώς και τις υπομονάδες Gβ κάποιων εντόμων. Τέλος, οι 12 Gγ υπομονάδες ομαδοποιούνται σε τέσσερις οικογένειες, τις Group I – γ₁ (Gγ₁, Gγ_c και Gγ₁₁), Group II – γ₂ (Gγ₂, Gγ₃, Gγ₄), Group III – γ₇ (Gγ₇, Gγ₁₂) και Group IV – γ₅ (Gγ₅, Gγ₈, Gγ₁₀) (Cabrera-Vera *et al.*, 2003; Downes and Gautam, 1999).

Αν και οι περισσότερες Gβ υπομονάδες μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τις περισσότερες Gγ υπομονάδες, δεν παρατηρούνται όλοι οι πιθανοί συνδυασμοί τους. Επιπλέον, πολλά διμερή Gβγ έχουν βρεθεί να αλληλεπιδρούν με την ίδια ισομορφή Gα, κάτι που σημαίνει ότι η διαφορική έκφραση ή η υποκυτταρική κατανομή είναι σημαντική στην ρύθμιση των οδών σηματοδότησης. Επιπρόσθετα, τα δεδομένα δείχνουν πως ενώ η Gγ δεν φαίνεται να συμμετέχει σε αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες πέρα από την Gβ, επηρεάζει την επιλεκτικότητα του ετεροδιμερούς απέναντι τόσο στους εκτελεστές όσο και στους υποδοχείς που προσδένει (Oldham and Hamm, 2008).

1.3.2 Η Δομή των G-πρωτεϊνών

Μια σειρά από κρυσταλλικές δομές τόσο για τις υπομονάδες Gα όσο και για τα ετεροδιμερή Gβγ υπάρχουν διαθέσιμες στην PDB, προσφέροντας αρκετές πληροφορίες τόσο για τα δομικά χαρακτηριστικά των G-πρωτεϊνών όσο και για την φύση διάφορων αλληλεπιδράσεών τους (Nishimura *et al.*, 2010; Wall *et al.*, 1995). Η Gα υπομονάδα αποτελείται από τρεις αυτοτελείς δομικές περιοχές (domains): μια αμινοτελική περιοχή με δομή α-έλικας, μια περιοχή Ras-like

GTPάσης, και μια περιοχή α-έλικας που αλληλεπιδρά με την περιοχή της GTPάσης. Οι δυο τελευταίες περιοχές δομούν μια βαθιά σχισμή, στην οποία συνδέεται το νουκλεοτίδιο GTP ή GDP . Η περιοχή της Ras-like GTPάσης αποτελείται από έξι α-έλικες που περικλείουν μία β-πτυχωτή επιφάνεια η οποία αποτελείται από έξι κλώνους. Η περιοχή της α-έλικας αποτελείται από πέντε α-έλικες που περιβάλλουν μια μεγαλύτερη α-έλικα. Το ετεροδιμερές Gβγ ακολουθεί ένα πρότυπο διάταξης γνωστό σαν «έλικα επτά λεπίδων» (seven bladed propeller), το οποίο αποτελείται από επτά επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες WD40 . Η επανάληψη WD40 είναι ένα μικρό δομικό μοτίβο περίπου 40 καταλοίπων, που συνήθως τερματίζεται με ένα διπεπτίδιο τρυπτοφάνης-ασπαρτικού . Από την άλλη, η Gγ είναι μια μικρή υπομονάδα, αποτελούμενη από μια αμινοτελική και μια καρβοξυτελική α-έλικα, που ενώνονται μέσω μιας εκτεταμένης λούπας. Το αμινοτελικό άκρο της Gβ υιοθετεί δομή α-έλικας που σχηματίζει δομή υπερέλικας α-ελίκων με το αμινοτελικό άκρο της Gγ, ενώ το καρβοξυτελικό άκρο της Gγ προσδένεται «λεπίδες» WD 5 και 6. Οι υπομονάδες Gβ και Gγ βρίσκονται σχεδόν πάντα ενωμένες ως ετεροδιμερή, σχηματίζοντας μια λειτουργική μονάδα, η οποία μπορεί να διαχωριστεί μόνο κάτω από συνθήκες αποδιάταξης (Εικόνα 1.9).



Εικόνα 1.9 Η δομή των ετεροτριμερών G-πρωτεϊνών. Α. Το ετεροτριμερές Gαi-Gβγ (PDB: 1GP2), Β. Η δομή της Gα υπομονάδας, χρωματισμένη με βάση τη δευτεροταγή δομή, με τις α-έλικες να σημαίνονται με κόκκινο και τους β-κλώνους με κίτρινο χρώμα. C. Το ετεροδιμερές των υπομονάδων Gβ (κόκκινο) και Gγ (πράσινο).

Οι Gα υπομονάδες εμφανίζουν ομολογία σε επίπεδο ακολουθίας σε ποσοστό της τάξης του 40%, το οποίο αντιστοιχεί, κατά κύριο λόγο, στις περιοχές της πρωτεΐνης που σχηματίζουν τη σχισμή πρόσδεσης του νουκλεοτιδίου. Η περιοχή της Ras-like GTPάσης είναι συντηρημένη σε όλα τα μέλη της υπεροικογένειας των G-πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων των μονομερών G-πρωτεϊνών και των παραγόντων επιμήκυνσης. Αυτή η περιοχή υδρολύει το GTP και παρέχει τις

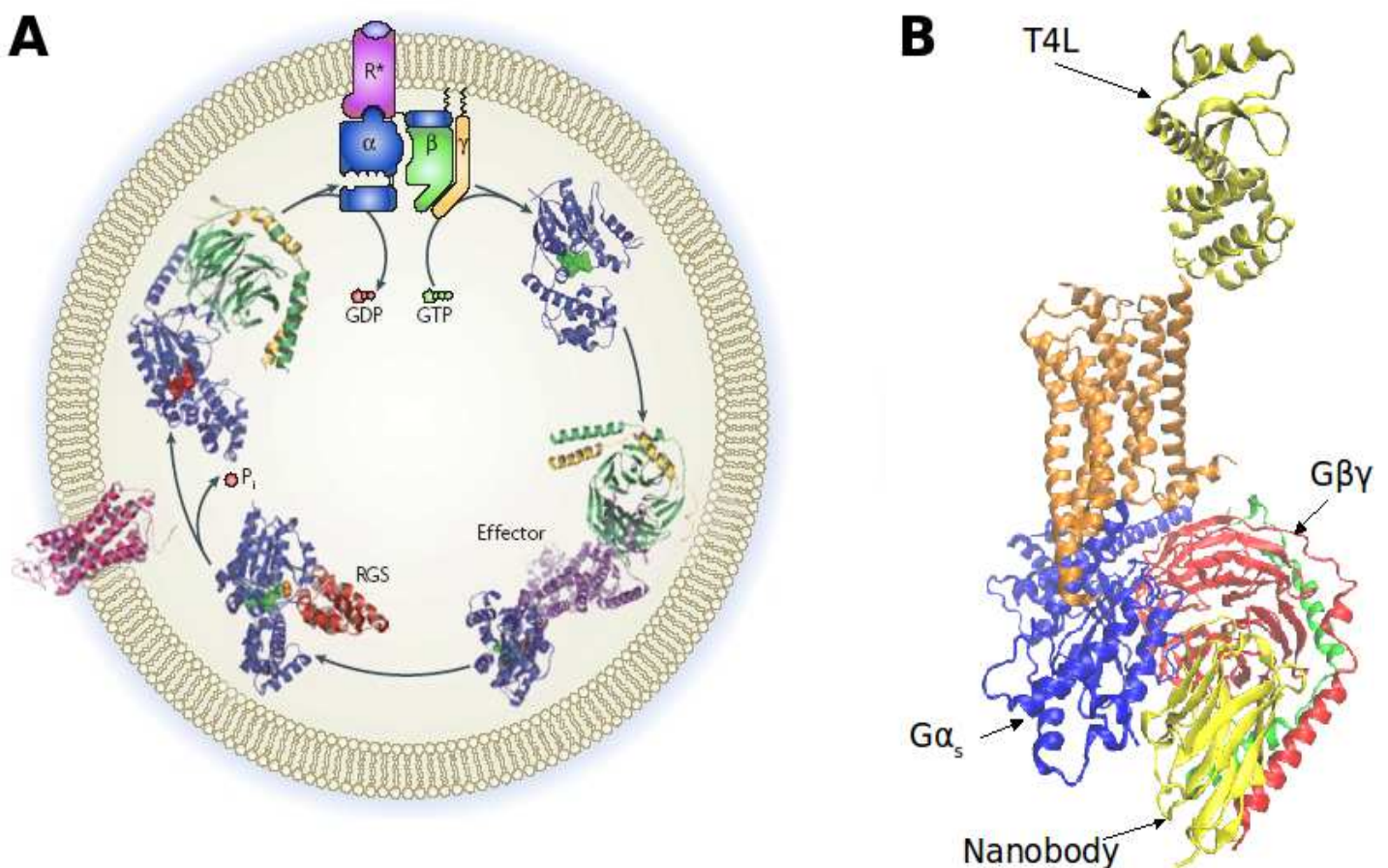
επιφάνειες πρόσδεσης για το Gβγ ετεροδιμερές, τους GPCRs και τους εκτελεστές. Η συγκεκριμένη περιοχή περιλαμβάνει επίσης τρία τμήματα (Switch I, II, και III) στα οποία έχουν παρατηρηθεί σημαντικές διαφορές ανάμεσα στη δομή της Gα κατά το σχηματισμό του δεσμού GDP και στη δομή της κατά το σχηματισμό του δεσμού GTP_γS. Αντίθετα, παρατηρείται μεγάλη απόκλιση στα δυο άκρα της αλυσίδας, που φαίνεται να σχετίζεται με την επιλεκτικότητα στις αλληλεπιδράσεις τους. Η περιοχή α-έλικας είναι μοναδική για της Gα υπομονάδες και σχηματίζει ένα κάλυμμα πάνω από την σχισμή πρόσδεσης του νουκλεοτιδίου, «θάβοντας» τα συνδεδεμένα νουκλεοτίδια στον πυρήνα της πρωτεΐνης (Oldham and Hamm, 2008).

Οι δομές ετεροτριμερών Gαβγ που έχουν λυθεί κρυσταλλογραφικά δείχνουν δύο περιοχές αλληλεπίδρασης ανάμεσα στην Gα υπομονάδα και το ετεροδιμερές Gβγ. Η πρωταρχική επιφάνεια αλληλεπίδρασης στην GDP-συνδεδεμένη Gα υπομονάδα είναι μια υδρόφοβη σχισμή σχηματιζόμενη από τις περιοχές Switch I και II, με μικρότερη συνεισφορά της αμινοτελικής έλικας, ενώ από το Gβγ συμμετέχουν οι κορυφές των λεπίδων WD40. Τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα δεν υποδεικνύουν κάποια άμεση αλληλεπίδραση της Gα υπομονάδας με την Gγ, αν και τα ακυλιωμένα αμινοτελικά και καρβοξυτελικά άκρα της Gα και της Gγ αντίστοιχα βρίσκονται αρκετά κοντά και πιθανόν να εισχωρούν συνεργατικά στην πλασματική μεμβράνη. Οι συγκεκριμένες μετατροπές αυξάνουν επίσης τη συγγένεια της Gα με το διμερές Gβγ, κάτι που μπορεί να είναι ανεξάρτητο από τη μεμβράνη (Nishimura *et al.*, 2010; Oldham and Hamm, 2008; Wall *et al.*, 1995).

1.3.3 Αλληλεπιδράσεις των GPCRs με G-πρωτεΐνες

Όλες οι ετεροτριμερείς G-πρωτεΐνες ακολουθούν τον ίδιο κύκλο ενεργοποίησης – απενεργοποίησης (Εικόνα 1.10). Όταν το GDP συνδέεται με την Gα υπομονάδα επιτρέπει τη σύνδεση της με το βγ ετεροδιμερές και την απενεργοποίηση της ετεροτριμερούς πρωτεΐνης. Η πρόσδεση του ετεροδιμερούς Gβγ στην Gα υπομονάδα ενισχύει αυξάνει τη συγγένειά της για τον ενεργοποιημένο υποδοχέα. Με τη σύνδεση του αγωνιστή, ο υποδοχέας ενεργοποιείται μέσω των στερεοδιαταξικών αλλαγών που περιγράφηκαν στην Ενότητα 1.2.3, αυξάνοντας τη συγγένεια του για το ετεροτριμερές GαGβγ. Η πρόσδεση του ετεροτριμερούς στον υποδοχέα οδηγεί στην απομάκρυνση του GDP από την Gα υπομονάδα και την αντικατάσταση του από

GTP. Η αντικατάσταση αυτή ελαττώνει τη συγγένεια της $G\alpha$ υπομονάδας για το $G\beta\gamma$ και την αποδιάταξη του ετεροτριμερούς. Η $G\alpha$ υπομονάδα και το $G\beta\gamma$ στη συνέχεια ενεργοποιούν αντίστοιχα μόρια εκτελεστές. Η δράση της $G\alpha$ υπομονάδας ως GTPάσης έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση του GTP σε GDP και την επανασύνδεση και απενεργοποίηση του ετεροτριμερούς. Συχνά σε αυτό το μηχανισμό συμμετέχουν συμπληρωματικά ειδικές πρωτεΐνες με την ιδιότητα να επιταχύνουν την υδρόλυση του GTP. Πρόκειται για τις πρωτεΐνες RGS (Regulators of G-protein Signaling), οι οποίες επάγουν την δραστικότητα GTPάσης, επιταχύνοντας την υδρόλυση του GTP και την απενεργοποίηση της $G\alpha$ (Oldham and Hamm, 2008).



Εικόνα 1.10 Ο κύκλος λειτουργίας των G-πρωτεϊνών. Προσαρμογή από (Oldham and Hamm, 2008), B. Η κρυσταλλική δομή του συμπλόκου $\beta 2 - G\alpha_s G\beta\gamma$ (PDB: 3SN6).

Έχουν προταθεί δύο μοντέλα που εξηγούν το πώς οι G-πρωτεΐνες έρχονται σε επαφή με ενεργοποιημένους υποδοχείς. Στο μοντέλο «ζευγαρώματος μέσω σύγκρουσης» (collision coupling) αυτές οι αλληλεπιδράσεις προκύπτουν ως αποτέλεσμα ελεύθερης πλευρικής διάχυσης μέσα στην πλασματική μεμβράνη, όπου οι G-πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν μόνο με ενεργοποιημένους υποδοχείς. Το εναλλακτικό μοντέλο προτείνει ότι οι G-πρωτεΐνες μπορούν να

αλληλεπιδράσουν με υποδοχείς πριν την πρόσδεση του υποκαταστάτη, δηλαδή είναι «ήδη ζευγαρωμένοι» (precoupled). Το δεύτερο μοντέλο υποστηρίζεται από πολλά *in vitro* και *in situ* πειραματικά δεδομένα, και γενικά είναι αρκετά ελκυστικό, εφόσον εξηγεί εν μέρει την ειδικότητα στις αλληλεπιδράσεις υποδοχέων – G-πρωτεϊνών, ωστόσο δεν μπορεί να εξηγήσει ικανοποιητικά το φαινόμενο ενίσχυσης του σήματος (Oldham and Hamm, 2008).

Μέχρι πρόσφατα, ελάχιστα ήταν γνωστά για τη φύση των αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στις G-πρωτεΐνες και τους υποδοχείς τους. Μελέτες μεταλλαξιγένεσης και δοκιμές με χιμαιρικές πρωτεΐνες υποδείκνυαν πως οι Gα υπομονάδες χρησιμοποιούν κυρίως το καρβοξυτελικό άκρο και το βρόχο α4-β6 για να αλληλεπιδράσουν με την κυτοπλασματική κοιλότητα που δημιουργείται κατά την ενεργοποίηση του υποδοχέα, ενώ καθιστούσαν τον τρίτο ενδοκυτταρικό βρόχο των GPCRs σημαντικό στοιχείο στο σχηματισμό του συμπλόκου. Οι κρυσταλλικές δομές συμπλόκων ανάμεσα στα ενεργοποιημένα ενδιάμεσα της Ροδοψίνης, Μεταροδοψίνη II και Οψίνη, και σε πεπτίδια από το καρβοξυτελικό άκρο της Gαt υποστήριξαν αυτήν την υπόθεση, παρουσιάζοντας το καρβοξυτελικό άκρο των Gα να αλληλεπιδρά με τις τρεις ενδοκυτταρικές λούπες και το καρβοξυτελικό άκρο της 7ης έλικας του υποδοχέα. Επιπλέον προτεινόμενες θέσης αλληλεπίδρασης πάνω στην επιφάνεια των Gα περιελάμβαναν κατάλοιπα στο αμινοτελικό άκρο καθώς και σε άλλες επιφάνειες στην περιοχή GTPάσης. Μελέτες με χιμαιρικές υπομονάδες από την οικογένεια των Gαs υπέδειξαν πως συγκεκριμένες μεταλλαγές στον βρόχο α3-β5 της Gα επηρεάζουν την συγγένειά της στην αλληλεπίδραση με αδρενεργικούς υποδοχείς. Μεταγενέστερες βιοχημικές και υπολογιστικές μελέτες επίσης υποστήριξαν πως ο συγκεκριμένος βρόχος μπορεί να λειτουργήσει σαν θέση αλληλεπίδρασης των GPCRs. Τέλος, μια πρόσφατη υπολογιστική μελέτη πρότεινε αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στον ακετυλοχολινικό υποδοχέα M3R και κατάλοιπα στο αμινοτελικό, το καρβοξυτελικό άκρο και τον βρόχο β2-β3 της ανενεργής Gα_q (Oldham and Hamm, 2008; Park *et al.*, 2008).

Το πρώτο μεγάλο βήμα προς την αποσαφήνιση της δομικής βάσης των αλληλεπιδράσεων μεταξύ GPCRs και G-πρωτεϊνών ήταν η κρυσταλλική δομή του συμπλόκου ανάμεσα στον β2 αδρενεργικό υποδοχέα και το ετεροτριμερές GasGβγ (Εικόνα 1.10). Στη δομή ο β2 υποδοχέας κρυσταλλώθηκε στην ενεργοποιημένη στερεοδιάταξή του, ενώ η Gas παρουσιάζεται σε μια ενδιάμεση κατάσταση ανάμεσα στην ενεργή και την ανενεργή μορφή της, μη προσδένοντας κάποιο νουκλεοτίδιο GTP. Το πιο χαρακτηριστικό γνώρισμα αυτής της κατάστασης είναι η

εκτεταμένη μετακίνηση (περίπου 50 Å) της περιοχής α-έλικας, η οποία απομακρύνεται από την περιοχή GTPάσης, οδηγώντας στο άνοιγμα της κοιλότητας του νουκλεοτιδίου. Το σύμπλοκο σταθεροποιείται μέσω της εισαγωγής ενός νανοαντισώματος (Nb35) ανάμεσα στην ανοιχτή Gα και το Gβγ, και της Λυσοζύμης του φάγου T4, που προσδένεται στην εξωκυτταρική πλευρά του υποδοχέα (Rasmussen *et al.*, 2011).

Οι αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στον β2 υποδοχέα και την Gas περιλαμβάνουν κυρίως τον δεύτερο ενδοκυτταρικό βρόχο ECL2 και τα κυτοπλασματικά μέρη των διαμεμβρανικών ελίκων TM5 και TM6 από τον υποδοχέα, και το καρβοξυτελικό άκρο, τον βρόχο α4-β6 και το αμινοτελικό άκρο της Gα. Επιπλέον αλληλεπιδράσεις περιλαμβάνουν το καρβοξυτελικό άκρο της 7ης έλικας του υποδοχέα και μερικά κατάλοιπα στον βρόχο β2-β3, τον βρόχο αG – α4 (που είναι πιο εκτεταμένη στην Gas σε σύγκριση με άλλες Gα υπομονάδες) και την περιοχή α-έλικας της Gas. Οι κρυσταλλικές δομές των συμπλόκων της Οψίνης και της Μεταροδοψίνης II με το καρβοξυτελικό άκρο της Gατ υποδεικνύουν παρόμοιες αλληλεπιδράσεις, όσον αφορά τον υποδοχέα. Ωστόσο, δεν παρατηρούνται αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στον υποδοχέα β2 και το Gβγ, παρ'ότι είναι γνωστό πειραματικά ότι τα ετεροδιμερή Gβγ συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις με GPCRs. Ωστόσο, η έλλειψη συντεταγμένων για τη δομή του βρόχου ICL3 για τον υποδοχέα β2, μιας περιοχής που θεωρείται ως καθοριστικής σημασίας για το σχηματισμό του συμπλόκου GPCR – G-πρωτεϊνών, θα μπορούσε να σημαίνει την ύπαρξη επιπλέον, μη παρατηρηθείσων αλληλεπιδράσεων, ίσως μάλιστα με περιοχές όπως ο βρόχος α3-β5 της Gα. Επιπλέον, η – μέχρι στιγμής μοναδική – διαθέσιμη δομή του συμπλόκου περιγράφει τις αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στον υποδοχέα και την ενδιάμεση, κενή από νουκλεοτίδιο κατάσταση της Gas, αλλά δεν παρέχει πληροφορίες σχετικά με τις αρχικές αλληλεπιδράσεις του υποδοχέα με την ανενεργή, GDP-προσδένουσα υπομονάδα (Rasmussen *et al.*, 2011).

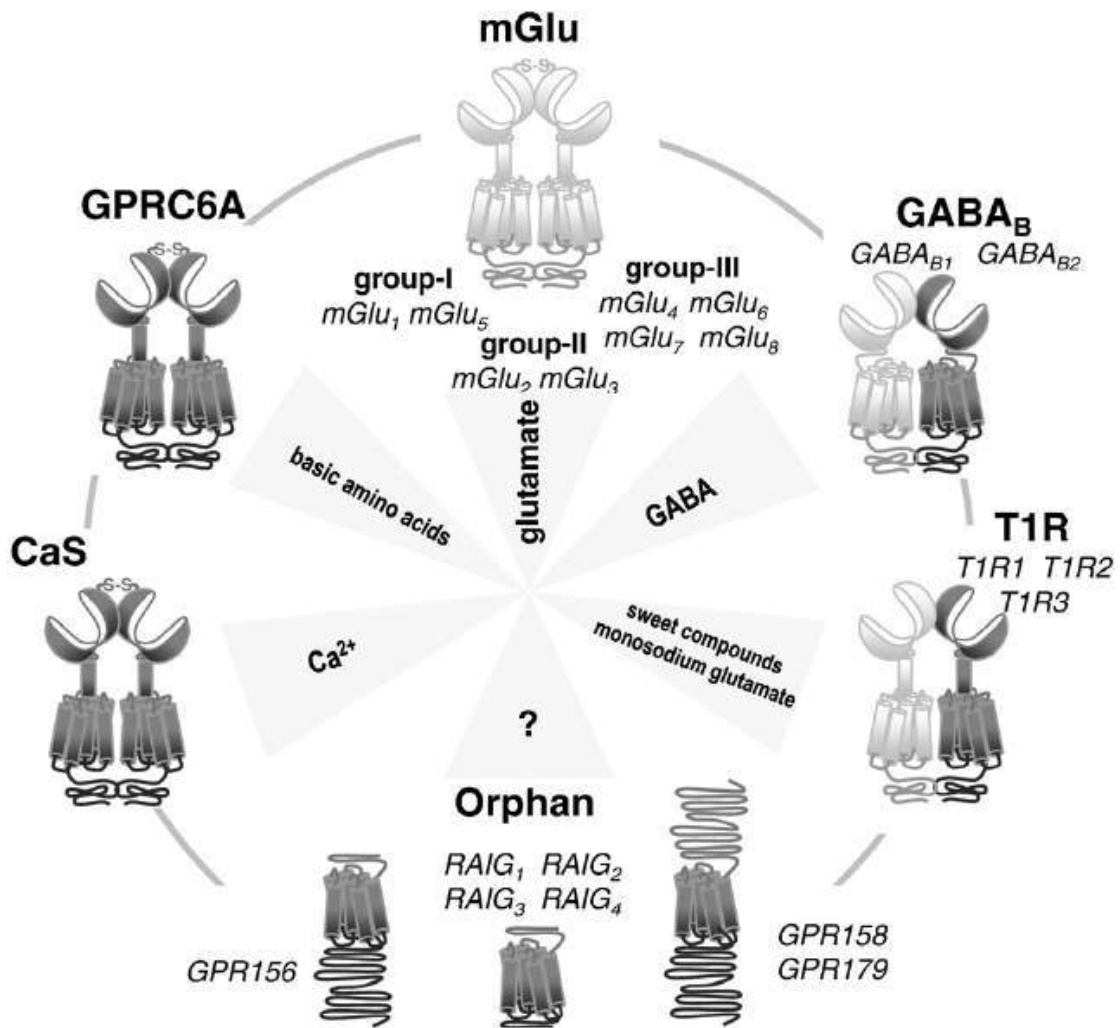
1.4 Το φαινόμενο του ολιγομερισμού των GPCRs

Η παραδοσιακή οπτική του σηματοδοτικού μηχανισμού των GPCRs παρουσίαζε τους υποδοχείς να λειτουργούν κυρίως ως μονομερή. Σύμφωνα με αυτήν την οπτική, ένας υποκαταστάτης οδηγεί στην ενεργοποίησή του υποδοχέα, οδηγώντας στην ενεργοποίηση επιλεγμένων G-πρωτεϊνών και τη ρύθμιση συγκεκριμένων κυτταρικών αποκρίσεων. Ωστόσο,

συνεχώς αυξανόμενος όγκος πειραματικών στοιχείων προτείνουν ότι οι GPCRs μπορούν επίσης να οργανωθούν σε διμερή ή ανώτερης τάξης ολιγομερή και να δράσουν συνεργατικά (Milligan, 2013). Αυτές οι τεταρτοταγείς δομές, σχηματιζόμενες είτε από πολλαπλά αντίγραφα του ίδιου υποδοχέα (ομομερή) είτε από διαφορετικούς GPCRs (ετερομερή) συχνά έχουν σαν αποτέλεσμα την περίπλοκη και ετερογενή αλλοστερική ρύθμιση σηματοδοτικών μηχανισμών. Επιπρόσθετα, μια σειρά από διμερή GPCRs συνδέονται με συνεχώς αυξανόμενο αριθμό σοβαρών παθολογικών καταστάσεων, ανάμεσα στις οποίες συμπεριλαμβάνονται η ασθένεια του Parkinson's, η σχιζοφρένεια, η κλινική κατάθλιψη, το άσθμα, η ανοσολογική απόκριση σε διάφορα φάρμακα και ο εθισμός στα ναρκωτικά και τη νικοτίνη (Πίνακας 1.2) (Kamal and Jockers, 2011; Moreno *et al.*, 2013; Niswender and Conn, 2010; Pasternak and Pan, 2011). Κατά συνέπεια, το ενδιαφέρον για την περαιτέρω μελέτη των χαρακτηριστικών και της σημασίας του ολιγομερισμού των GPCRs, καθώς και τον πιθανό σχεδιασμό φαρμάκων με στόχους τα ολιγομερή υποδοχέων αυξάνεται συνεχώς (Dalrymple *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009; Pasternak and Pan, 2011).

1.4.1 Η λειτουργική σημασία του ολιγομερισμού στους GPCRs

Ανάμεσα στα μέλη της μεγάλης υπερικογένειας των GPCRs, οι υποδοχείς της Κλάσης C είναι αυτοί που έχουν μελετηθεί περισσότερο ως προς τα χαρακτηριστικά του ολιγομερισμού. Αυτό συμβαίνει γιατί, όπως έχει αποδειχθεί, ο σχηματισμός τεταρτοταγών δομών είναι απαραίτητος για τη φυσιολογική λειτουργία αυτών των υποδοχέων (Kniazeff *et al.*, 2011). Τα μέλη της Κλάσης C περιλαμβάνουν τους μεταβοτροπικούς υποδοχείς του γλουταμικού (mGluR), τους υποδοχείς B του γ-αμινοβουτυρικού οξέως (GABAB), υποδοχείς φορτισμένων αμινοξέων και ιόντων Ca^{2+} , τους γευστικούς υποδοχείς τάξης 1 (TAS1) που συμμετέχουν στη γεύση του γλυκού καθώς και την συμπληρωματική γεύση του «umami» και μερικούς υποδοχείς για τους οποίους η λειτουργικότητα δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως («orphan GPCRs»). Με εξαίρεση τους τελευταίους, όλες οι υπόλοιπες υποικογένειες της Κλάσης C έχουν επανειλημμένα αποδειχθεί πειραματικά ότι σχηματίζουν υποχρεωτικά ομο- και ετεροδιμερή και, σε κάποιες περιπτώσεις, ολιγομερή ανώτερης τάξης (Εικόνα 1.11). Η ανακάλυψη μέσω πειραματικών μελετών ότι ο υποδοχέας GABAB για το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) είναι, στην πραγματικότητα, ένα υποχρεωτικό ετεροδιμερές των πρωτομερών GABAB1 και GABAB2, καθώς και ότι τα δυο πρωτομερή δεν λειτουργούν φυσιολογικά παρά μόνο όταν οργανώνονται στο διμερές, παρείχε την πρώτη *in situ* απόδειξη της ύπαρξης ενός βιολογικά σημαντικού διμερούς GPCR (Kaupmann *et al.*, 1998). Παρόμοια με τους υποδοχείς GABAB, η αναγνώριση των διαφορετικών γεύσεων από τους γευστικούς υποδοχείς επιτυγχάνεται μέσω του λειτουργικού ετεροδιμερισμού του υποδοχέα TAS1R3 με τους υποδοχείς TAS1R1 και TAS1R2 (Nelson *et al.*, 2001; Nelson *et al.*, 2002).



Εικόνα 1.11 Διαγραμματική απεικόνιση των GPCRs της Κλάσης C. Με εξαίρεση τους “orphan” GPCRs, όλα τα υπόλοιπα μέλη της Κλάσης έχουν βρεθεί πειραματικά να σχηματίζουν ομοδιμερή ή ετεροδιμερή. Προσαρμογή από Kniazeff (Kniazeff *et al.*, 2011).

Από την άλλη, οι μεταβοτροπικοί υποδοχείς του γλουταμικού, οι υποδοχείς ασβεστίου και οι υποδοχείς φορτισμένων αμινοξέων σχηματίζουν ομοδιμερή, στα οποία τα δυο πρωτομερή αλληλεπιδρούν μεταξύ τους όχι μόνο με ασθενείς αλληλεπιδράσεις αλλά και ομοιοπολικά, συνδεόμενα με δισουλφιδικούς δεσμούς ανάμεσα στις εξωκυτταρικές περιοχές τους (Niswender and Conn, 2010). Η λειτουργική ικανότητα τόσο των διμερών όσο και των απομονομένων πρωτομερών έχει μελετηθεί επανειλημμένα μέσω μεγάλου εύρους βιοχημικών και βιοφυσικών μελετών, ενώ μέρος των διμερικών αλληλεπιδράσεων των υποδοχέων του γλουταμικού και του GABA έχουν παρατηρηθεί και κρυσταλλογραφικά (Εικόνα 1.6), με την επίλυση δομών των εξωκυτταρικών τμημάτων των υποδοχέων (Geng *et al.*, 2012; Kunishima *et al.*, 2000). Τα παραπάνω έχουν οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι ο διμερισμός και, πιθανώς ο ολιγομερισμός, είναι απαραίτητο στοιχείο στη φυσιολογική λειτουργία των υποδοχέων της Κλάσης C.

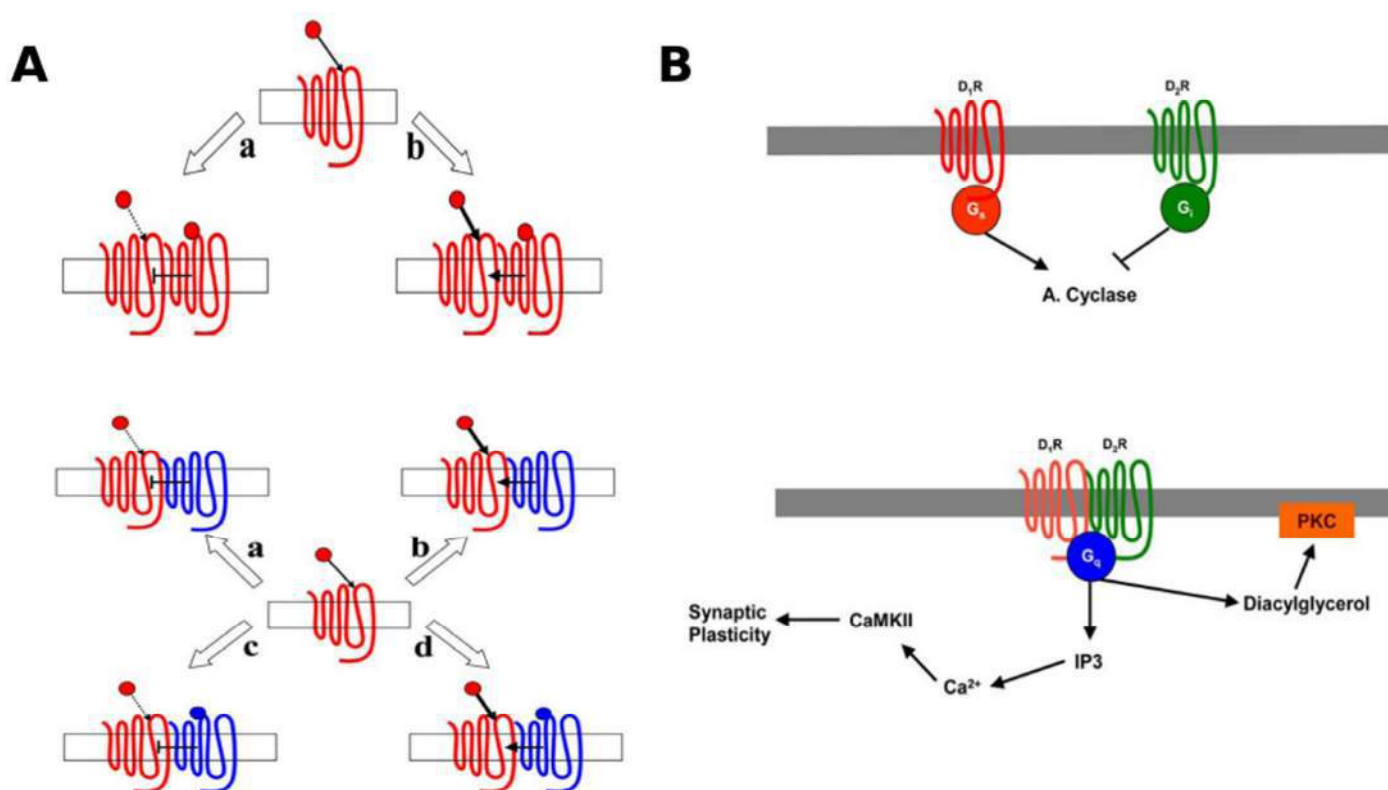
Σε αντίθεση με τους παραπάνω υποδοχείς, η ιδέα του ολιγομερισμού παραμένει αμφιλεγόμενη για τις υπόλοιπες κλάσεις των GPCRs (Milligan, 2013). Την πιο περίπλοκη περίπτωση αποτελεί η Κλάση A των υποδοχέων με ομοιότητα προς τη Ροδοψίνη, η οποία περιλαμβάνει την πλειονότητα των GPCRs. Σημαντικός αριθμός υποδοχέων της Κλάσης A έχουν βρεθεί να σχηματίζουν λειτουργικά διμερή ή ολιγομερή. Χαρακτηριστικά παραδείγματα περιλαμβάνουν την ίδια τη Ροδοψίνη, η οποία έχει βρεθεί να οργανώνεται σε λειτουργικά συσσωματώματα στους δίσκους ROS των ραβδίων (Fotiadis *et al.*, 2003; Liang *et al.*, 2003), καθώς και χαρακτηριστικούς στόχους φαρμάκων όπως οι αδρενεργικοί υποδοχείς β1 και β2, για τους οποίους στοιχεία προτείνουν την ύπαρξη σχετικά σταθερών ομοδιμερών και ομοτετραμερών (Dorsch *et al.*, 2009; Fung *et al.*, 2009), και οι οπιοειδείς υποδοχείς, οι οποίοι έχουν βρεθεί να σχηματίζουν βιολογικά σημαντικά διμερή, κάποια από τα οποία έχουν συσχετιστεί με την απόκριση σε φάρμακα (Johnston *et al.*, 2011; Pasternak and Pan, 2011). Συνολικά, πάνω από 100 υποδοχείς της Κλάσης A έχουν αποδειχθεί πειραματικά ότι συμμετέχουν στο σχηματισμό ολιγομερών, τόσο σαν ομομερή όσο και σαν ετερομερή (Borrotto-Escuela *et al.*, 2014). Ωστόσο, οι ίδιοι υποδοχείς που συμμετέχουν σε ολιγομερή έχουν βρεθεί να είναι πλήρως λειτουργικοί *in situ* και *in vivo* ως μονομερή (Bayburt *et al.*, 2011). Επιπρόσθετα, μια σειρά από μελέτες έχουν αμφισβητήσει τη σταθερότητα των αλληλεπιδράσεων ολιγομερισμού των υποδοχέων της Κλάσης A, προτείνοντας ότι αυτά τα διμερή δεν είναι μόνιμα σύμπλοκα αλλά παροδικά (Johnston *et al.*, 2012; Lambert, 2010).

Πίνακας 1.2. Παραδείγματα όμο- και ετεροολιγομερών GPCRs που έχουν συσχετιστεί με παθήσεις. Προσαρμογή από (Moreno *et al.*, 2013), GPCR-OKB (<http://www.gpcr-okb.org>).

Ολιγομερές	Παθολογική σημασία
A1 – A2A	Ανοχή σε φάρμακα
A1 – D1	Σύνδρομο Parkinson's, εθισμός στην κοκαΐνη
A1 – mGluR1	Σχιζοφρένεια
A1 – 5-HT2A	Σχιζοφρένεια
A2α – D2	Πιθανός στόχος για θεραπεία Parkinson's, στόχος αντιψυχωτικών φαρμάκων, ιδιότητες αντίδρασης στην κοκαΐνη
A2αR – mGluR5	Σύνδρομο Parkinson's, Σχιζοφρένεια, αποτοξίνωση από κοκαΐνη
A2αR – D2 – mGluR5	Σύνδρομο Parkinson's, Σχιζοφρένεια, αποτοξίνωση από κοκαΐνη
A2αR – CB1	Σχιζοφρένεια
A2αR – CB1 – D2	Σχιζοφρένεια
A2αR – μOR	Εθισμός σε οπιοειδή
A3αR – A3αR	Σύνδρομο Parkinson's, Σχιζοφρένεια
CB1 – D2	Σύνδρομο Parkinson's, Σχιζοφρένεια
CRH1 – V1B	Κλινική κατάθλιψη
α1A – α1B	Έμφραγμα μυοκαρδίου
D1 – D2	Σύνδρομο Parkinson's, Σχιζοφρένεια
D1 – D3	Εθισμός στην κοκαΐνη
D2 – D3	Σύνδρομο Parkinson's, Σχιζοφρένεια
D4 – μOR	Εθισμός στα ναρκωτικά
mGluR2 – 5-HT2A	Στόχος αντιψυχωτικών φαρμάκων

Κατά συνέπεια, σε αντίθεση με τους GPCRs της Κλάσης C για τους οποίους ο σχηματισμός διμερών είναι κομμάτι της φυσιολογικής λειτουργίας τους, η ύπαρξη ολιγομερισμού στους υποδοχείς της Κλάσης A δεν είναι απαραίτητη. Αντίθετα, τα διαθέσιμα δεδομένα προτείνουν ότι ο ολιγομερισμός των GPCRs της Κλάσης A λειτουργεί συμπληρωματικά ως προς τη ρύθμιση της λειτουργικότητάς τους, είτε σταθεροποιητικά κατά την είσοδό τους στη μεμβράνη του Ενδοπλασματικού Δικτύου στα πρώιμα στάδια της βιοσύνθεσής τους, είτε σαν μηχανισμός μέσω του οποίου οι υποδοχείς οδηγούνται σε μεγαλύτερη ποικιλομορφία στη ρύθμιση των σηματοδοτικών μονοπατιών (Milligan, 2013). Πειράματα ανίχνευσης βιολογικών αποτυπωμάτων υποδεικνύουν ότι ο σχηματισμός διμερών υποδοχέων της Κλάσης A μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα τη μεταβολή στη συγγένεια των πρωτομερών για κάποιο υποκαταστάτη. Σε άλλες περιπτώσεις, ο ολιγομερισμός δυο υποδοχέων μπορεί να οδηγήσει στη ρύθμιση διαφορετικών μονοπατιών μέσω των αλληλεπιδράσεων με διαφορετικές G-πρωτεΐνες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα ετεροδιμερή του αδενোসινικού υποδοχέα A2α με τον ντοπαμινικό υποδοχέα D2. Σαν μονομερή αυτοί οι δύο υποδοχείς αλληλεπιδρούν με τις υπομονάδες G_{α5} και G_{αi}, αντίστοιχα, ρυθμίζοντας τη λειτουργικότητα της αδενυλικής κυκλάσης και την παραγωγή του cAMP. Αντίθετα, το διμερές A2α – D2 αλληλεπιδρά με την υπομονάδα

Γα_q και ρυθμίζει την ενεργότητα της Φωσφολιπάσης C (Εικόνα 1.12) (Franco *et al.*, 2007). Σε αρκετές περιπτώσεις, από την άλλη, ο σχηματισμός διμερών έχει βρεθεί να επάγει τη φωσφορυλίωση των υποδοχέων, οδηγώντας στην ενδοκύτωσή τους και, με αυτό τον τρόπο, στο σηματοδοτικό μονοπάτι των β-αρρεστινών. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί πως σημαντικός αριθμός μελετών έχει δείξει την κλινική σημασία των ετεροδιμερών υποδοχέων της Κλάσης A, είτε με άλλους υποδοχείς της ίδιας Κλάσης είτε με GPCRs άλλων οικογενειών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα ετεροδιμερή ανάμεσα στον υποδοχέα A2α από την Κλάση A και τον υποδοχέα mGluR5 από την Κλάση C, τα οποία έχουν βρεθεί να σχετίζονται με ασθένειες του νευρικού συστήματος (Πίνακας 1.2) (Moreno *et al.*, 2013).



Εικόνα 1.12 Παραδείγματα επίδρασης του σχηματισμού διμερών στη λειτουργικότητα των GPCRs. Α. Επίδραση στη συγγένεια των πρωτομερών προς ένα υποκαταστάτη σε ομο- και έτεροδιμερή, Β. Επίδραση στις αλληλεπιδράσεις των πρωτομερών με G-πρωτεΐνες στο διμερές A2α – D2. Προσαρμογή από (Franco *et al.*, 2007).

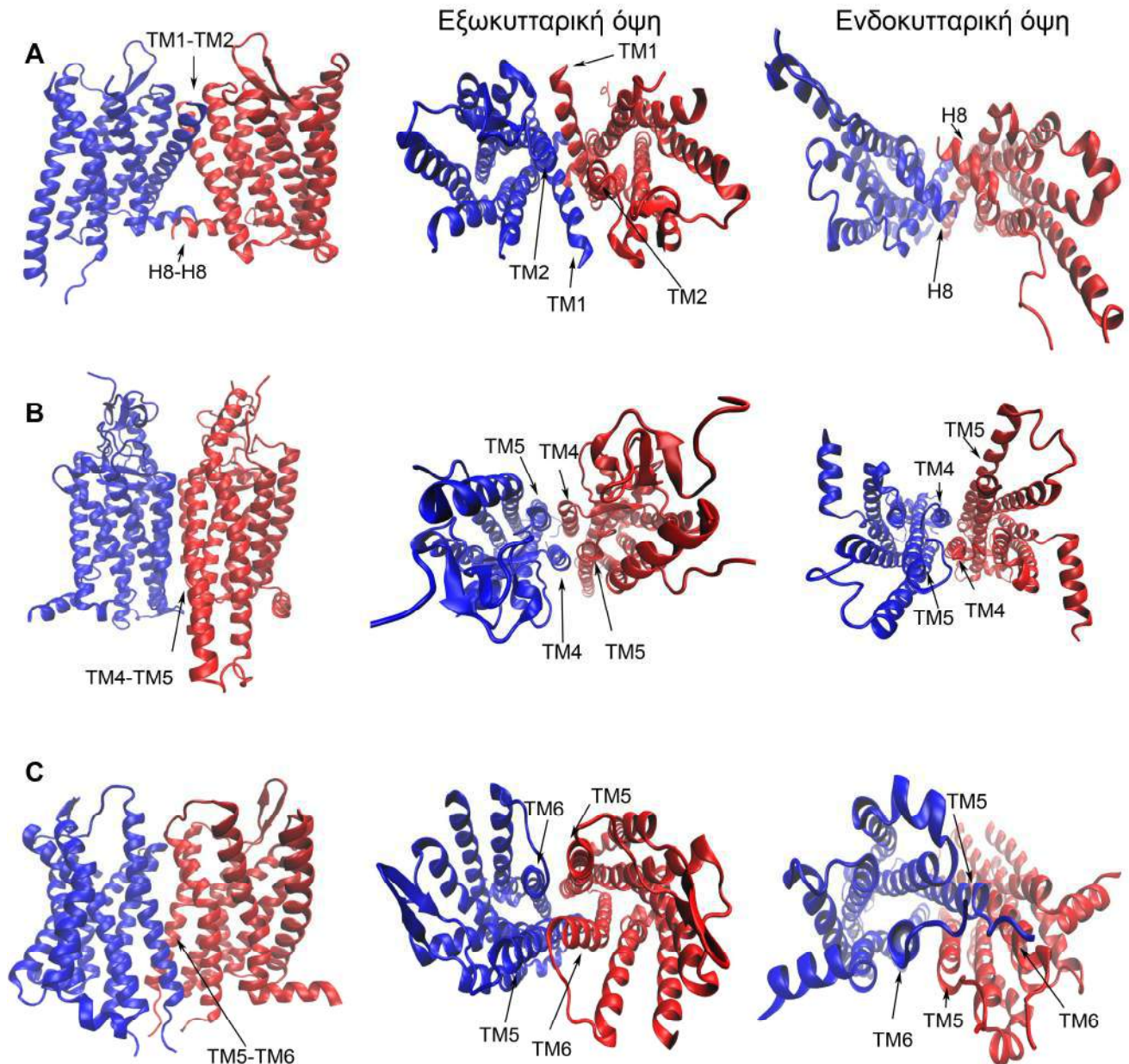
Ένα πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό του ολιγομερισμού, το οποίο έχει παρατηρηθεί τόσο για τα λειτουργικά διμερή της Κλάσης C όσο και για τα προτεινόμενα διμερή των άλλων οικογενειών είναι το γεγονός ότι τα συμπλέγματα των υποδοχέων παρουσιάζουν ασυμμετρία ως προς τη λειτουργία των πρωτομερών. Δεδομένου του αυξημένου αριθμού των πρωτομερών, που οδηγεί σε περισσότερες θέσεις πρόσδεσης υποκαταστατών και αυξημένη επιφάνεια

αλληλεπίδρασης για τις G-πρωτεΐνες, το αναμενόμενο θα ήταν να συμμετέχουν εξίσου όλα τα μέλη ενός ολιγομερούς στη λειτουργία τους. Ωστόσο, τα πειραματικά δεδομένα δείχνουν πως στα φυσιολογικά διμερή των υποδοχέων της Κλάσης C μόνο το ένα από τα δύο πρωτομερή ενεργοποιείται από την πρόσδεση του υποκαταστάτη, με το δεύτερο να διαδραματίζει συνοδευτικό ρόλο. Αντίστοιχη συμπεριφορά έχει παρατηρηθεί και σε περιπτώσεις ομοδιμερών και ετεροδιμερών υποδοχέων της Κλάσης A, όπου η παρουσία του ενός πρωτομερούς επηρεάζει τη συγγένεια του δεύτερου ως προς ένα υποκαταστάτη ή ένα ετεροτριμερές G-πρωτεϊνών, χωρίς όμως να συμμετέχει το ίδιο σε αλληλεπιδράσεις με τα παραπάνω. Παρ'όλα αυτά, η παρουσία των υποδοχέων σε διμερική οργάνωση είναι απαραίτητη για την εμφάνιση των παραπάνω λειτουργιών. Έχει προταθεί λοιπόν πως οι αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα μέλη ενός ολιγομερούς δεν λειτουργούν τόσο σαν μέσο ενίσχυσης του σήματος όσο σαν μηχανισμοί αλλοστερικής ρύθμισης, μέσω των οποίων το ένα μονομερές ρυθμίζει τη συμπεριφορά του δεύτερου (Geng *et al.*, 2012; Jastrzebska *et al.*, 2013; Jastrzebska *et al.*, 2011; Kniazeff *et al.*, 2011).

1.4.2 Δομικά Γνωρίσματα των Αλληλεπιδράσεων Ολιγομερισμού

Παρά την αμφιλεγόμενη σημασία του ολιγομερισμού για τους GPCRs της Κλάσης A, η πλειονότητα των στοιχείων που περιγράφουν τα δομικά χαρακτηριστικά των ολιγομερικών αλληλεπιδράσεων αφορούν αυτούς τους υποδοχείς. Μεγάλο εύρος πειραμάτων, τα οποία περιλαμβάνουν μελέτες μικροσκοπίας Atomic Force και κρυο-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας για τη Ροδοψίνη (Fotiadis *et al.*, 2003; Jastrzebska *et al.*, 2013; Jastrzebska *et al.*, 2011; Liang *et al.*, 2003; Ruprecht *et al.*, 2004), crosslinking κυστεϊνών και μελέτες μεταφοράς ενέργειας για οπιοειδείς, αδρενεργικούς και ντοπαμινικούς υποδοχείς (Dorsch *et al.*, 2009; Fung *et al.*, 2009; Johnston *et al.*, 2011), αλλά και αρκετές υπολογιστικές προγνώσεις, βασισμένες τόσο στην αμινοξική ακολουθία όσο και τη δομή (Filizola and Weinstein, 2005; Johnston *et al.*, 2012; Periole *et al.*, 2007; Periole *et al.*, 2012; Taddese *et al.*, 2012), έχουν προτείνει την πιθανή συμμετοχή των διαμεμβρανικών ελίκων TM1, TM4 και TM5 στις αλληλεπιδράσεις ολιγομερισμού. Πιο πρόσφατα, μια σειρά κρυσταλλογραφικών μελετών κυρίως για GPCRs της Κλάσης A έχουν δώσει δομές διμερών υποδοχέων με παράλληλη τοπολογία (σε αντίθεση με την

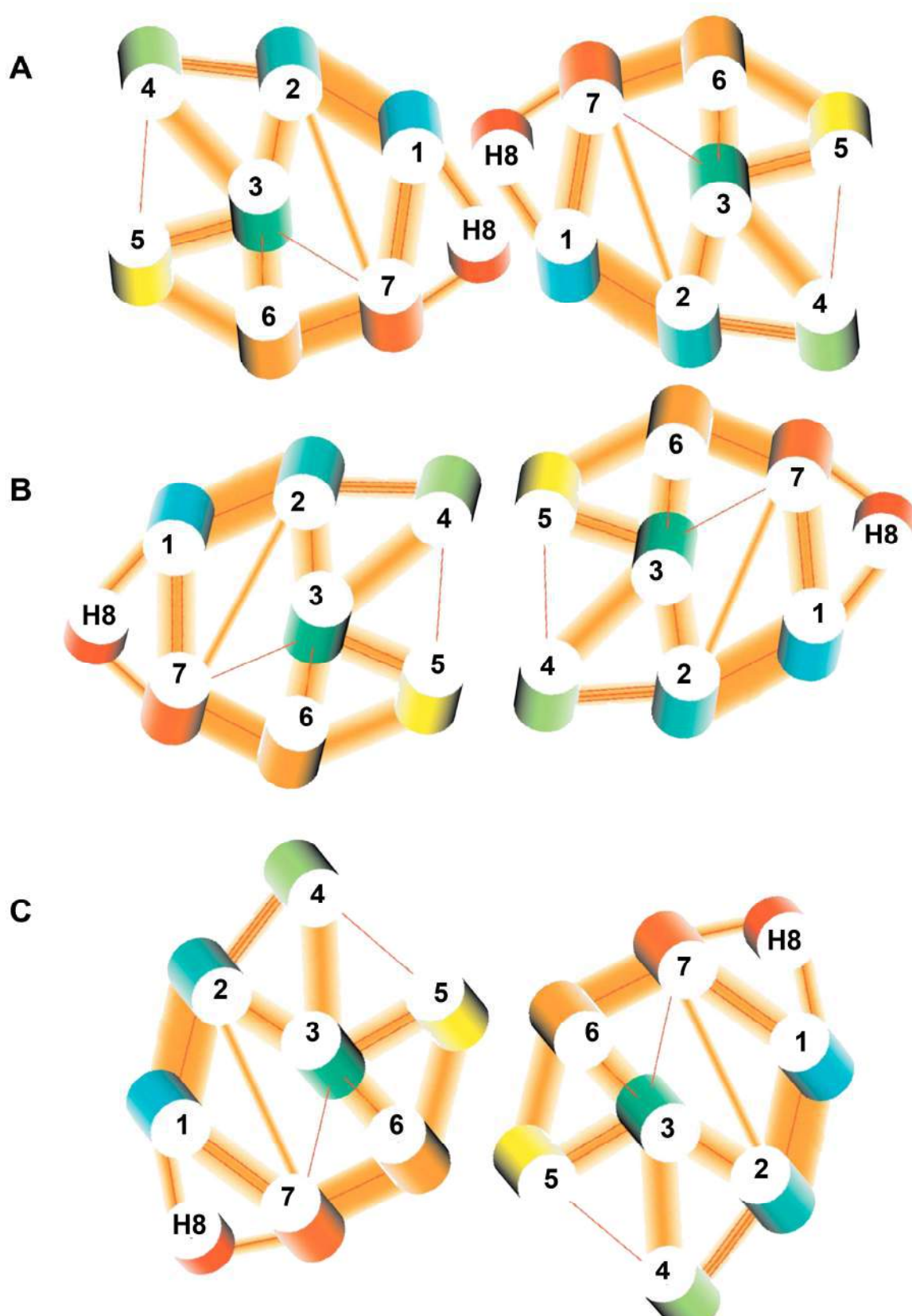
αντίστροφη τοπολογία των υποδοχών που παρατηρείται σε πολλές δομές και θεωρείται ότι είναι αποτέλεσμα της κρυστάλλωσης) στις οποίες παρατηρούνται αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μονομερών που συμφωνούν με τα προηγούμενα βιοχημικά και υπολογιστικά δεδομένα.



Εικόνα 1.13 Παραδείγματα κρυσταλλογραφικά λυμένων διμερών GPCRs. Α. Το διμερές TM1-TM2-H8 του οπιοειδή υποδοχέα κ (PDB: 4DJH), Β. Το διμερές TM4-TM5 του υποδοχέα Smoothed (PDB: 4JKV), Γ. Το διμερές TM5-TM6 του υποδοχέα μOR (PDB: 3ODU).

Δομές διμερών έχουν επιλυθεί για την πανταχού παρούσα στην έρευνα των GPCRs Ροδοψίνη (Murakami and Kouyama, 2008; Park *et al.*, 2008; Salom *et al.*, 2006), καθώς και για υποδοχείς με πειραματικά επιβεβαιωμένη ύπαρξη διμερών όπως οι αδρενεργικοί υποδοχείς β1 και β2 (Cherezon *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2013), ο αδενোসινικός υποδοχέας A2α (Liu *et al.*,

2012), οι οπιοειδείς υποδοχείς κ και μ (Manglik *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012) και ο χημειοκινικός υποδοχέας CXCR4 (Wu *et al.*, 2010), ενώ αντίστοιχα διμερή έχουν βρεθεί και σε δομές GPCRs εκτός της Κλάσης A, όπως ο υποδοχέας Smoothed (Κλάση F) (Wang *et al.*, 2013) και ο υποδοχέας mGluR1 (Κλάση C) (Wu *et al.*, 2014). Οι παραπάνω δομές προτείνουν την ύπαρξη τουλάχιστον τριών διαφορετικών επιφανειών αλληλεπίδρασης στον ολιγομερισμό των GPCRs, με επαφές ανάμεσα σε κατάλοιπα των ελίκων TM1, TM2 και της έλικας H8 (διμερή TM1-TM2-H8), ανάμεσα στις έλικες TM4-TM5 (διμερή TM4-TM5) ή ανάμεσα στις έλικες TM5-TM6 (διμερή TM5-TM6). Επιπρόσθετα, η δομή των διαμεμβρανικών τμημάτων του διμερικού υποδοχέα mGluR1 της Κλάσης C παρουσιάζει ένα παράλληλο διμερές με επαφές των ελίκων TM1-TM2, ενώ η δομή του υποδοχέα Smoothed, για τον οποίο επίσης υπάρχουν ενδείξεις ολιγομερισμού, ένα διμερές TM4-TM5 (Εικόνα 1.13, Εικόνα 1.14).



Εικόνα 1.14 Διαγραμματική απεικόνιση της κυτοπλασματικής όψης των διμερών TM1-TM2-H8 (A), TM4-TM5 (B) και TM5-TM6 (C). Οι α-έλικες απεικονίζονται με κυλίνδρους διαφορετικού χρώματος και σημαίνονται με τις ενδείξεις 1 – 7 για τα διαμεμβρανικά τμήματα και H8 για την 8^η κυτοπλασματική έλικα. Με κόκκινες γραμμές και πορτοκαλί σκίαση σημαίνονται οι μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στις α-έλικες κάθε πρωτομερούς.

Η ομοιότητα των κρυσταλλογραφικών δεδομένων με τις αλληλεπιδράσεις που έχουν βρεθεί μέσω βιοχημικών πειραμάτων έχει οδηγήσει πολλούς ερευνητές στο να θεωρήσουν τις παραπάνω κρυσταλλικές δομές ως πιθανά μοντέλα για την περιγραφή της δομικής φύσης του ολιγομερισμού των GPCRs, καθώς και ως πιθανούς στόχους για το σχεδιασμό φαρμάκων. Ωστόσο, δεν είναι ξεκάθαρο το κατά πόσο αυτές οι επαφές αντιστοιχούν όντως στις αλληλεπιδράσεις ολιγομερισμού και κατά πόσο είναι αποτέλεσμα της διαδικασίας κρυστάλλωσης, ενώ άγνωστη επίσης παραμένει η πιθανή επιρροή των μεθόδων που χρησιμοποιούνται στην επίλυση των δομών των GPCRs, όπως η χρήση μεταλλαγών και χημικών μορίων και η κρυστάλλωση μέσω λιπιδικής μεσόφασης. Έτσι, η βιολογική σημασία των διαθέσιμων κρυσταλλογραφικών δεδομένων πάνω στον ολιγομερισμό των GPCRs παραμένει αντικείμενο έντονων διαφωνιών.

1.5 Στόχος

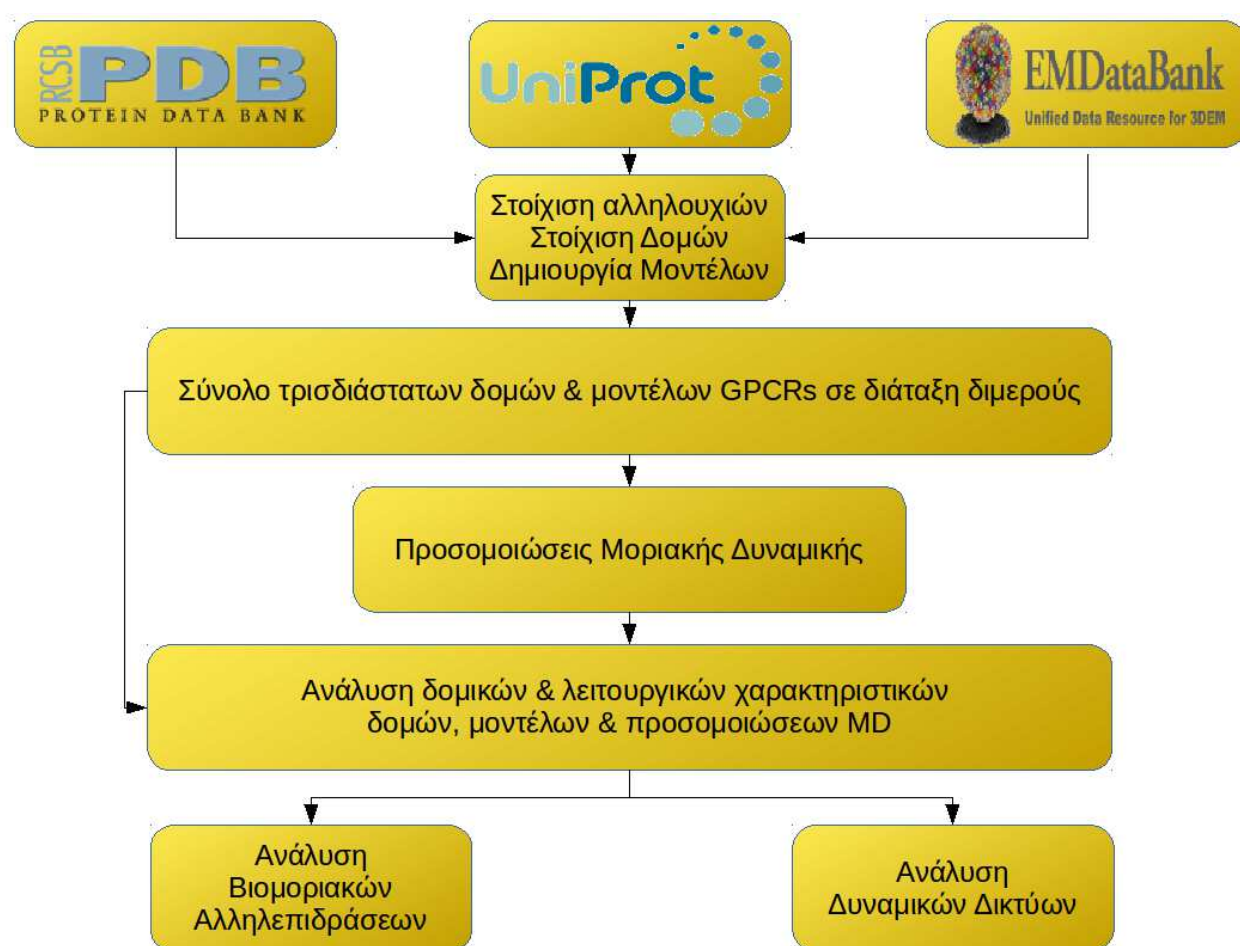
Οι συζευγμένοι με G-πρωτεΐνες υποδοχείς αποτελούν σημαντικό κομμάτι των μηχανισμών μεταγωγής σήματος, με κυρίαρχο ρόλο στη ρύθμιση πολλών φυσιολογικών λειτουργιών, και με ιδιαίτερη σημασία στη μελέτη και θεραπεία πολλών ασθενειών. Η ανακάλυψη της ικανότητας των GPCRs να σχηματίζουν ολιγομερή ανοίγει νέους δρόμους για τη μελέτη των χαρακτηριστικών τους, ενώ η σημασία του ολιγομερισμού στη φυσιολογική και μη λειτουργία των υποδοχέων καθιστά τα ομο- και ετεροολιγομερή GPCRs ιδιαίτερα ελκυστικούς στόχους για τη μελέτη ασθενειών και το σχεδιασμό φαρμάκων. Παρόλα αυτά, η βιολογική σημασία των διαθέσιμων δομικών δεδομένων πάνω στον ολιγομερισμό των GPCRs παραμένει αμφισβητούμενη. Με βάση τα παραπάνω, στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη των αλληλεπιδράσεων ολιγομερισμού των GPCRs μέσω υπολογιστικών μεθόδων.

Συγκεκριμένα, η μελέτη βασίστηκε στα διαθέσιμα δομικά δεδομένα πάνω στον ολιγομερισμό των GPCRs, προερχόμενα τόσο από τις κρυσταλλικές δομές όσο και από άλλες πηγές, όπως η κρυο-ηλεκτρονική Μικροσκοπία. Η μελέτη των αλληλεπιδράσεων στα ολιγομερή των GPCRs περιελάμβανε την αξιολόγηση της δυναμικής συμπεριφοράς και της ισχύος των διαμοριακών επαφών των GPCRs αλλά και της επίδρασης των στοιχείων του μεμβρανικού περιβάλλοντος μέσω προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής, την ανάλυση των

αλληλεπιδρώντων καταλοίπων για τον εντοπισμό κοινών στοιχείων ανάμεσα στους διαφορετικούς υποδοχείς και τη χρήση στοιχείων από τη θεωρία δικτύων αλληλεπιδράσεων για την εύρεση πιθανών μηχανισμών μέσω των οποίων οι αλληλεπιδράσεις ολιγομερισμού σχετίζονται με τη λειτουργικότητα των GPCRs. Δεδομένης της ιδιαίτερης σημασίας του ολιγομερισμού, τα αποτελέσματα και συμπεράσματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας μπορούν να βρουν εφαρμογή στο σχεδιασμό πειραμάτων για τη μελέτη χαρακτηριστικών των ολιγομερών GPCRs αλλά και τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών – πρωτεϊνών στο επίπεδο της μεμβράνης γενικότερα.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Όπως αναφέρθηκε, στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η υπολογιστική μελέτη και ανάλυση των αλληλεπιδράσεων ολιγομερισμού στους συζευγμένους με G-πρωτεΐνες υποδοχείς. Συγκεκριμένα, η εργασία επικεντρώθηκε στην ανάλυση και αξιολόγηση των δομικών χαρακτηριστικών αυτών των αλληλεπιδράσεων, την εκτίμηση της ισχύος τους και τη μελέτη της δυναμικής συμπεριφοράς των GPCRs. Για την επίτευξη αυτών των στόχων, ακολουθήθηκαν μια από διαδικασίες, τα βασικά βήματα των οποίων παρουσιάζονται στο διάγραμμα ροής της Εικόνας 2.1.



Εικόνα 2.1 Διάγραμμα Ροής της μεθοδολογίας που ακολουθήθηκε κατά την επόνηση της διπλωματικής εργασίας.

Όπως φαίνεται και από το διάγραμμα ροής, η πορεία της διπλωματικής εργασίας χωρίστηκε στις εξής φάσεις:

- Αναζήτηση στη βιβλιογραφία για πληροφορία πάνω στις олиγομερικές αλληλεπιδράσεις των GPCRs. Κατασκευή ενός συνόλου δεδομένων μέσω της συλλογής των σχετικών τρισδιάστατων δομών για διμερή GPCRs και των αντίστοιχων αμινοξικών ακολουθιών και προτυποποίηση δομών με βάση προηγούμενα πειραματικά δεδομένα. Σύγκριση και αξιολόγηση των δομών και των αλληλουχιών του συνόλου μέσω στοιχίσεων αλληλουχιών και δομικών στοιχίσεων.
- Μελέτη της δυναμικής συμπεριφοράς των GPCRs και των επιδράσεων του μεμβρανικού περιβάλλοντος στη μονάδα του χρόνου με προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής και ανάλυση των αποτελεσμάτων.
- Μελέτη των δομικών, δυναμικών και λειτουργικών χαρακτηριστικών των διμερών GPCRs μέσω ανάλυσης αλληλεπιδράσεων και αναλύσεων δυναμικών δικτύων.

2.1 Εισαγωγή στις Μοριακές Προσομοιώσεις

Στις ενότητες που ακολουθούν γίνεται μια εισαγωγή πάνω στη μεθοδολογία που εφαρμόστηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία. Παρατίθενται βασικές έννοιες πάνω στο αντικείμενο των υπολογισμών Μοριακής Μηχανικής και των προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής. Παρουσιάζονται τα βασικά χαρακτηριστικά και οι λειτουργίες των μεθόδων που εφαρμόζονται στις προσομοιώσεις, ενώ αναλύονται οι ιδιότητες των πεδίων δυνάμεων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία.

2.1.1 Μοριακή Μηχανική και Μοριακή Δυναμική

Η Μοριακή Μηχανική (Molecular Mechanics) βασίζεται στην αρχή κατά την οποία το άθροισμα των φυσικών δυνάμεων που επενεργούν σε ένα μόριο ή σε ένα σύμπλοκο μορίων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να περιγράψει τη γεωμετρία και το ενεργειακό προφίλ του

μελετούμενου συστήματος. Οι υπολογισμοί Μοριακής Μηχανικής ουσιαστικά εφαρμόζουν τους κανόνες της κλασικής μηχανικής για την προτυποποίηση μοριακών συστημάτων, έχοντας σαν αντικείμενο τον υπολογισμό ενεργειών για ένα σύστημα βιομορίων κοντά στην κατάσταση ισορροπίας. Ο προσδιορισμός του ενεργειακού προφίλ πραγματοποιείται μέσω κατάλληλων μαθηματικών συναρτήσεων, οι οποίες περιγράφουν χαρακτηριστικά των ομοιοπολικών και μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων ανάμεσα σε άτομα και μόρια. Η Μοριακή Μηχανική βρίσκει ποικίλλες εφαρμογές, η βασικότερη από τις οποίες είναι η ελαχιστοποίηση ενέργειας. Επιπρόσθετα, οι υπολογισμοί Μοριακής Μηχανικής αποτελούν τον πυρήνα της διαδικασίας της προτυποποίησης μορίων (Molecular Modeling), βρίσκοντας έτσι εφαρμογή σε διαδικασίες όπως ο σχεδιασμός φαρμάκων, η πρόβλεψη της επίδρασης μιας μεταλλαγής στη δομή και, πιθανώς, τη λειτουργία μιας πρωτεΐνης, ο υπολογισμός της ενέργειας αλληλεπίδρασης ανάμεσα σε δυο μόρια και η μελέτη της επίδρασης του διαλύτη στη δομή των μακρομορίων (Boas and Harbury, 2007).

Οι προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής (Molecular Dynamics) επιχειρούν την όσο το δυνατόν πιο ρεαλιστική αναπαράσταση του περιβάλλοντος των βιολογικών μακρομορίων σε μικροσκοπικό επίπεδο. Αναφέρονται στη μελέτη της δομής και δυναμικής των πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων και λιπιδίων ή άλλων βιολογικών μορίων χρησιμοποιώντας θεωρητικές τεχνικές. Αντικείμενο της Μοριακής Δυναμικής είναι ουσιαστικά η προσομοίωση της κίνησης ενός συστήματος πολλών σωματιδίων για τη μελέτη της δυναμικής συμπεριφοράς του στη διάρκεια ενός ορισμένου χρονικού διαστήματος. Αυτό περιλαμβάνει τον υπολογισμό και την εφαρμογή κατάλληλων δυνάμεων και τη μελέτη του συστήματος στη μονάδα του χρόνου (Karplus and Petsko, 1990; Karplus and McCammon, 2002).

Οι προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής επιτρέπουν την εφαρμογή διάφορων συνθηκών και, μέσω αυτών, την πρόγνωση των στερεοδιαταξικών αλλαγών που μπορούν να συμβούν σε ένα βιομόριο, σαν αποτέλεσμα τόσο των ιδιοτήτων του ίδιου του βιομορίου όσο και της επίδρασης του περιβάλλοντος. Έτσι, μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μεγάλο εύρος εφαρμογών, ανάμεσα στις οποίες συμπεριλαμβάνονται η μελέτη ενός βιομορίου σε συνθήκες που προσομοιάζουν το φυσικό περιβάλλον του, η πρόγνωση της ευελιξίας των μορίων, ο προσδιορισμός της χρονικής κλίμακας στην οποία λαμβάνουν χώρα διάφορες στερεοδιαταξικές αλλαγές και μοριακά συμβάντα, ο προσδιορισμός των θερμοδυναμικών παραμέτρων ενός

συστήματος στη μονάδα του χρόνου κλπ. Επιπρόσθετα, με την εφαρμογή διάφορων μεθόδων και την κατάλληλη καθοδήγηση των προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής γίνεται δυνατή η παρατήρηση βιολογικών φαινομένων όπως ο σχηματισμός ή αποχωρισμός ενός συμπλόκου, η αντίδραση μιας ενζυμικής κατάλυσης, ακόμα και η λειτουργία μεγάλων υπερμοριακών συμπλεγμάτων όπως το ριβόσωμα. Τέλος, ένας από τους κυριότερους στόχους που επιχειρούνται να εκπληρωθούν μέσω προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής είναι η μελέτη και αποσαφήνιση των χαρακτηριστικών του διπλώματος των πρωτεϊνών, δηλαδή της διαδικασίας με την οποία μια πολυπεπτιδική αλυσίδα μεταβαίνει από την πρωτοταγή δομή της γραμμικής αμινοξικής ακολουθίας στην τελική τριτοταγή (ή τεταρτοταγή) δομή της (Karplus and McCammon, 2002; Phillips *et al.*, 2005).

2.1.2 Η Διαδικασία της Ελαχιστοποίησης Ενέργειας

Το πρώτο και βασικό βήμα σε κάθε προσομοίωση Μοριακής Μηχανικής ή Μοριακής Δυναμικής είναι η ελαχιστοποίηση της ενέργειας του συστήματος, δηλαδή η διαδικασία βελτιστοποίησης της γεωμετρίας και στερεοχημικής ποιότητας των μορίων ώστε αυτά να αποκτήσουν την βέλτιστη δυνατή στερεοδιάταξή τους, που θεωρείται πως είναι και αυτή με την ελάχιστη δυνατή ενέργεια. Η δυναμική ενέργεια ενός μακρομοριακού συστήματος είναι ένα ιδιαίτερα πολύπλοκο πεδίο, το οποίο υλοποιείται σε μεγάλο αριθμό διαστάσεων. Διαθέτει ένα ολικό ελάχιστο, το οποίο αντιστοιχεί στη φυσική στερεοδιάταξη, καθώς επίσης και μεγάλο αριθμό τοπικών ελαχίστων, όπου όλες οι πρώτες παράγωγοι της δυναμικής ενέργειας είναι μηδενικές, ενώ οι δεύτεροι παράγωγοι είναι μη αρνητικές. Η γνώση όλων των πιθανών τοπικών ελαχίστων, όπως και του ολικού ελαχίστου, καθώς και όλων των δυνατών μονοπατιών ανάμεσά τους θα επέτρεπε την περιγραφή όλων των σχετικών δομών, των στερεοδιατάξεων και των ενεργειών τους, καθώς επίσης και της δυναμικής των δομικών μεταβάσεων ανάμεσά τους. Ωστόσο, αυτή η γνώση είναι αδύνατη, λόγω της υψηλής πολυπλοκότητας του ενεργειακού πεδίου. Κατά συνέπεια, δεν υπάρχει καμία μέθοδος ελαχιστοποίησης ενέργειας που να εγγυάται το σίγουρο προσδιορισμό του ολικού ενεργειακού ελαχίστου σε οποιοδήποτε χρονικό διάστημα υπολογισμών. Ωστόσο, με δεδομένη μια αρχική κατάσταση, είναι δυνατό να βρεθεί το

καλύτερο δυνατό ελάχιστο, δηλαδή η στερεοδιάταξη η οποία θα συνδυάζει την καλύτερη δυνατή στερεοχημική ποιότητα με την ελάχιστη δυνατή δυναμική ενέργεια.

Αν και υπάρχουν πολλές διαφορετικές μέθοδοι ελαχιστοποίησης ενέργειας, οι περισσότερες κατατάσσονται συνήθως στις παρακάτω κατηγορίες:

- Μέθοδοι που απαιτούν αποκλειστικά τον υπολογισμό των ενεργειακών τιμών. Πρόκειται για μεθόδους που σε κάθε βήμα βελτιστοποιούν το σύστημα με βάση τις υπολογισμένες ενεργειακές τιμές του προηγούμενου βήματος, προβλέποντας κινήσεις που οδηγούν σε μικρότερες τιμές ενέργειας. Πρόκειται για την πιο απλή μορφή ελαχιστοποίησης ενέργειας, η οποία όμως δεν είναι ικανή για βελτιστοποίηση σε όλες τις περιπτώσεις. Παραδείγματα τέτοιων μεθόδων αποτελούν η μέθοδος ελαχιστοποίησης Simplex και οι διάφορες παραλλαγές της.

- Μέθοδοι που χρησιμοποιούν την πρώτη παράγωγο. Πρόκειται για μεθόδους οι οποίες μεταβάλλουν τη στερεοδιάταξη προς την κατεύθυνση όπου η πρώτη παράγωγος της ενεργειακής συνάρτησης μεγιστοποιείται. Η πιο απλή μέθοδος πρώτης παραγώγου είναι η ελαχιστοποίηση Steepest Descent (απότομης καθόδου), η οποία λειτουργεί μετακινώντας το σύστημα προς την αρνητική πρώτη παράγωγο. Είναι η απλούστερη και πιο γρήγορη μέθοδος αυτού του τύπου, ωστόσο έχει το μειονέκτημα ότι μπορεί να εγκλωβιστεί εύκολα σε ενδιάμεσα ελάχιστα. Μια άλλη μέθοδος πρώτης παραγώγου είναι η ελαχιστοποίηση Conjugate Gradient (βαθμιδωτής σύζευξης), η οποία ελαχιστοποιεί το σύστημα λαμβάνοντας υπόψη όχι μόνο την πρώτη παράγωγο στο εκάστοτε βήμα αλλά και πληροφορία προερχόμενη από τα προηγούμενα βήματα και η οποία, αν και πιο αργή από τη Steepest Descent, συγκλίνει πιο εύκολα στο ενεργειακό ελάχιστο. Αυτοί οι δυο αλγόριθμοι είναι οι πιο δημοφιλείς μέθοδοι πρώτης παραγώγου, με υλοποιήσεις σε όλα τα διαθέσιμα προγράμματα Μοριακής Δυναμικής και συχνά χρησιμοποιούνται συνδυασμένα, με τα πρώτα βήματα μιας ελαχιστοποίησης να πραγματοποιούνται μέσω Steepest Descent και τα υπόλοιπα μέσω Conjugate Gradient.

- Μέθοδοι που χρησιμοποιούν τη δεύτερη παράγωγο. Πρόκειται για μεθόδους οι οποίες ελαχιστοποιούν την ενέργεια του συστήματος, υπολογίζοντας εκ νέου πολυδιάστατους πίνακες τιμών σε κάθε βήμα για τον προσδιορισμό των δεύτερων παραγώγων. Πρόκειται για ιδιαίτερα ισχυρές μεθόδους ελαχιστοποίησης, οι οποίες όμως μειονεκτούν τόσο ως προς το χρόνο προσομοίωσης όσο και ως προς την υπολογιστική ισχύ και τον αποθηκευτικό χώρο που

απαιτούν. Ένα παράδειγμα ελαχιστοποίησης ενέργειας δεύτερης παραγώγου είναι η μέθοδος Adopted Basis Newton – Raphson (ABNR).

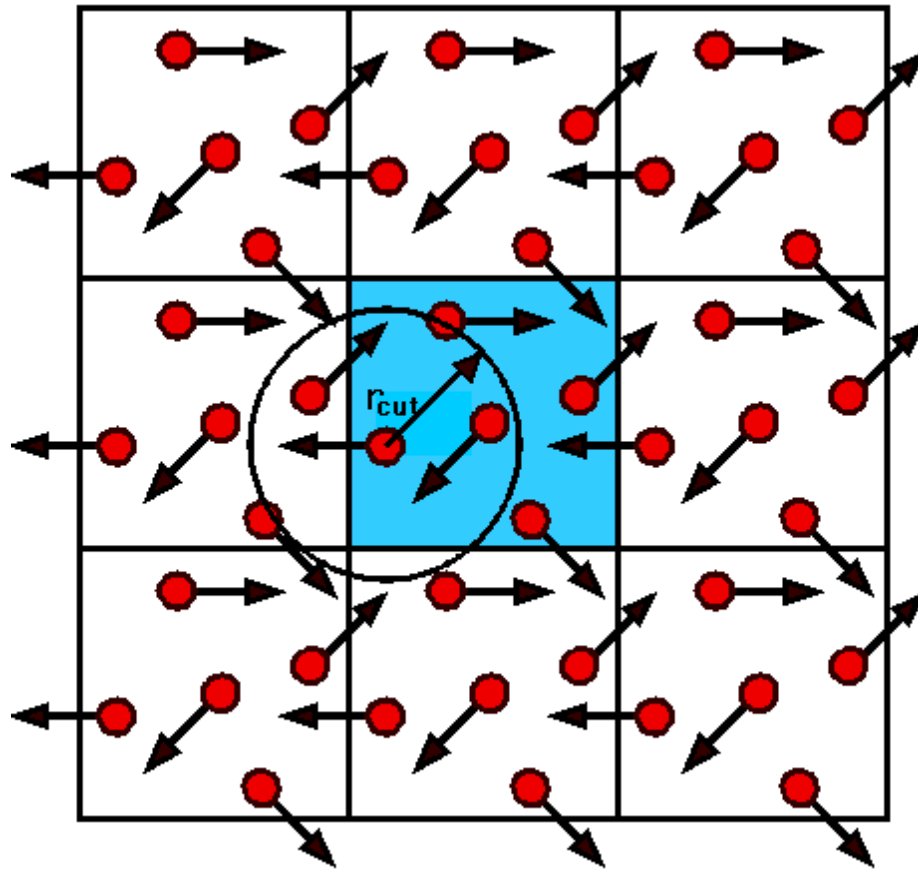
2.1.3 Βασικά Χαρακτηριστικά των Προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής

Οι προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής βασίζονται στους θεμελιώδεις νόμους της στατιστικής και της κλασικής μηχανικής. Με τις εξισώσεις κίνησης των Νόμων του Νεύτωνα, οι οποίες εφαρμόζονται στην κλασική μηχανική επιτυγχάνεται η προσομοίωση μιας πορείας κινήσεων που περιγράφει τις θέσεις, τις ταχύτητες και τις επιταχύνσεις τμημάτων του βιολογικού συστήματος σε μικροσκοπικό επίπεδο. Από την άλλη, με την στατιστική μηχανική μελετώνται, μέσω μαθηματικών εκφράσεων, οι μακροσκοπικές ιδιότητες του συστήματος όπως η πίεση, η ενέργεια, η θερμότητα κλπ.

Αν και υπάρχουν πολλά διαφορετικά είδη προσομοιώσεων, καθένα από τα οποία μπορεί να στοχεύει σε περιγραφή διαφορετικών ιδιοτήτων ενός συστήματος, μια τυπική προσομοίωση Μοριακής Δυναμικής περιλαμβάνει πάντα μια σειρά από συγκεκριμένα βήματα. Αρχικά πραγματοποιείται ελαχιστοποίηση ενέργειας του συστήματος μέσω Μοριακής Μηχανικής, χρησιμοποιώντας κάποια από τις μεθόδους που περιγράφηκαν στην προηγούμενη Ενότητα. Ακολούθως, για κάθε άτομο του προσομοιούμενου συστήματος ανατίθεται μια τιμή ταχύτητας, με βάση την αρχική του θέση και την κατανομή της θερμοκρασίας. Από την ταχύτητα και τη θερμοκρασία μπορεί να υπολογιστεί η κινητική ενέργεια του συστήματος, ενώ η δυναμική ενέργεια υπολογίζεται μέσω Μοριακής Μηχανικής. Οι ενεργειακές τιμές χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό των αντίστοιχων δυνάμεων, μέσω υπολογισμού των παραγώγων των ενεργειών. Με βάση την ενέργεια, την ταχύτητα και τη θέση εφαρμόζονται οι εξισώσεις του Νεύτωνα για υπολογισμό της κίνησης και πρόγνωση της νέας θέσης των ατόμων και, με τη μετάβασή τους στη νέα θέση, υπολογίζονται εκ νέου οι ενέργειες και η διαδικασία επαναλαμβάνεται για το σύνολο του χρόνου της προσομοίωσης.

2.1.3.1 Προσομοιώσεις Περιβαλλοντικών Συνθηκών

Οι προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής γίνονται συνήθως με μόρια που αποτελούνται από εκατοντάδες ή χιλιάδες άτομα. Σε τέτοιου είδους συστήματα κυριαρχούν δυνάμεις που οφείλονται στις αλληλεπιδράσεις των ατόμων με τα τοιχώματα του περιβάλλοντος στο οποίο λαμβάνει χώρα η προσομοίωση. Επειδή συνήθως μας ενδιαφέρει ποια θα ήταν η συμπεριφορά του υπό μελέτη μορίου σε ένα μεγάλο όγκο νερού, οι πιθανές αλληλεπιδράσεις του μορίου με τη στερεή επιφάνεια των τοιχωμάτων είναι αναγκαίο να αφαιρεθούν. Μία μέθοδος επίλυσης του είναι η χρήση συνθηκών περιοδικών ορίων (periodic boundary conditions). Σε αυτή τη μέθοδο, το υπό μελέτη μόριο τοποθετείται σε ένα συγκεκριμένο όγκο, ο οποίος αποτελεί το πρωταρχικό κελί. Για να προσομοιωθεί ο τεράστιος όγκος νερού θεωρείται ότι το σύστημα αποτελείται από αντίγραφα του πρωταρχικού κελιού προς όλες τις κατευθύνσεις. Ουσιαστικά, το σύστημα αποτελείται από περιοδικές επαναλήψεις του πρωταρχικού κελιού που ως στόχο έχουν τη δημιουργία ενός μακροσκοπικού δείγματος και την περιοδική έκφραση των θέσεων και των ορμών των ατόμων. Τα κελιά χωρίζονται μεταξύ τους από νοητά σύνορα από τα οποία μπορούν ελεύθερα να περάσουν τα άτομα σε ένα διπλανό κελί. Όταν ένα άτομο ή ένα μέρος του μορίου περάσουν τα σύνορα από το πρωταρχικό κελί, άμεσα εισέρχεται το αντίστοιχο τμήμα από το αντιπαράλληλο κελί (Εικόνα 2.2).



Εικόνα 2.2 Η εφαρμογή των συνθηκών περιοδικών ορίων δημιουργεί επαναλήψεις του συστήματος γύρω από το πρωταρχικό κελί.

Η μηχανική κατάσταση ενός συστήματος χαρακτηρίζεται από τη θέση (r) και την ορμή (p) καθενός από τα σωματίδια που απαρτίζουν αυτό το σύστημα. Τα ζεύγη (r, p) μπορούν να θεωρηθούν ως οι συντεταγμένες ενός πολυδιάστατου χώρου φάσεων (phase space), στον οποίο αντιπροσωπεύονται όλες οι πιθανές καταστάσεις του συστήματος με κάθε μοναδικό σημείο του χώρου να αντιπροσωπεύει μια πιθανή μικροσκοπική κατάσταση (microstate). Για N αριθμό σωματιδίων αυτός ο χώρος έχει $6N$ διαστάσεις. Τα σημεία ή μικροκαταστάσεις του χώρου που διαθέτουν την ίδια θερμοδυναμική κατάσταση αντιπροσωπεύουν ένα θερμοδυναμικό «σύνολο» (Ensemble), το οποίο ουσιαστικά περιγράφει μακροσκοπικά τις συνθήκες διεξαγωγής της προσομοίωσης.

Η θερμοδυναμική κατάσταση του συστήματος καθορίζεται από συγκεκριμένες παραμέτρους, ανάμεσα στις οποίες συμπεριλαμβάνονται η πίεση (P), η θερμοκρασία (T), ο όγκος (V) και ο αριθμός των σωματιδίων (N). Οι συνδυασμοί των παραπάνω παραμέτρων οδηγούν σε διαφορετικές συνθήκες προσομοιώσεων, που αντιστοιχούν σε διαφορετικές καταστάσεις οι οποίες προσομοιάζουν τις αντίστοιχες θερμοδυναμικές μεταβολές. Έτσι, η

μικροκανονική κατάσταση (Microcanonical Ensemble, NVE) χαρακτηρίζεται από σταθερό αριθμό ατόμων, σταθερό όγκο και σταθερή ενέργεια, με την πίεση και τη θερμοκρασία να μεταβάλλονται, προσομοιάζοντας ουσιαστικά μια αδιαβατική μεταβολή. Η κανονική κατάσταση (Canonical Ensemble, NVT) προσομοιάζει τις ισόθερμες – ισόχωρες μεταβολές, διατηρώντας τον αριθμό των σωματιδίων, τον όγκο και τη θερμοκρασία σε σταθερές τιμές, ενώ η ισόθερμη – ισοβαρής κατάσταση (Isothermal – Isobaric Ensemble, NPT) περιλαμβάνει έλεγχο της πίεσης και της θερμοκρασίας, αφήνοντας τον όγκο ελεύθερο προς μεταβολές. Ιδανικά, μια προσομοίωση Μοριακής Δυναμικής δημιουργεί μια ακολουθία σημείων στο χώρο φάσεων σε συνάρτηση με το χρόνο, με τα σημεία να χαρακτηρίζονται από την ίδια θερμοδυναμική κατάσταση και να αντιστοιχούν σε διαφορετικές στερεοδιατάξεις του προσομοιούμενου συστήματος.

Ο έλεγχος των θερμοδυναμικών παραμέτρων μπορεί να επιτευχθεί με μεγάλη ποικιλία αλγορίθμων. Μια συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος για τον έλεγχο της θερμοκρασίας είναι η στοχαστική εξίσωση Langevin, η οποία χρησιμοποιείται για τη δημιουργία κατανομής Boltzmann στις προσομοιώσεις με έλεγχο της θερμοκρασίας. Η γενική μορφή της εξίσωσης Langevin είναι η

$$M\dot{u} = F(r) - \gamma u + \sqrt{\frac{2\gamma k_B T}{M}} R(t)$$

όπου για κάθε θέση r και χρόνο t , M είναι η μάζα, u είναι η ταχύτητα, F η δύναμη, γ είναι ο συντελεστής τριβής, k_B είναι η σταθερά Boltzmann και $R(t)$ μια συνάρτηση κατανομής τύπου Gauss (Brünger, 1992). Αντίστοιχα, μια μέθοδος ελέγχου της πίεσης συμβατή με τη μέθοδο Langevin είναι η μέθοδος Nosé – Hoover Langevin Piston. Η συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στο θερμοστάτη Nosé – Hoover, με κατάλληλες τροποποιήσεις ώστε να ρυθμίζει την πίεση σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία του συστήματος (Feller *et al.*, 1995). Σε κάθε στιγμιότυπο t η πίεση υπολογίζεται σύμφωνα με το θεώρημα Virial, χρησιμοποιώντας τη συνάρτηση

$$B(r, p, V, t) = \frac{1}{3V} \sum_{i=1}^{3N} \left[\frac{p_i^2}{m_i} - r_i \frac{\partial}{\partial r_i} U_{\lambda(t)}(r) \right]$$

όπου r , p , m και V είναι η θέση, η ορμή, η μάζα και ο όγκος, αντίστοιχα. Η συνδυασμένη χρήση των μεθόδων Langevin και Langevin Piston για τον έλεγχο της θερμοκρασίας και της πίεσης χαρακτηρίζεται και ως Δυναμική Langevin (Langevin Dynamics) (Phillips *et al.*, 2005).

2.1.3.2 Προσομοιώσεις Εκτός Ισορροπίας

Τα βιολογικά σημαντικά γεγονότα συχνά περιλαμβάνουν μεταβάσεις από μια κατάσταση ισορροπίας σε μια άλλη. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι η πρόσδεση ενός υποκαταστάτη σε έναν υποδοχέα, το άνοιγμα ή το κλείσιμο ενός ιοντικού καναλιού κλπ. Ωστόσο, φαινόμενα αυτού του τύπου δεν αναπαριστώνται εύκολα μέσα από προσομοιώσεις ισορροπίας, καθώς απαιτούνται για την παρατήρησή τους χρονικά διαστήματα της τάξης των ms ή ακόμα και δευτερολέπτων, κατά πολύ μεγαλύτερα από αυτά που μπορούν να επιτευχθούν μέσα από μια τυπική προσομοίωση. Για την επίλυση τέτοιων προβλημάτων μπορεί να χρησιμοποιηθεί η εφαρμογή συνθηκών εκτός ισορροπίας, μέσω των οποίων μπορεί να επιτευχθεί ο στόχος της προσομοίωσης ευκολότερα (Phillips *et al.*, 2005).

Ένα παράδειγμα τέτοιας προσομοίωσης αποτελεί η τεχνική της «προσομοίωσης ανόπτησης» (Simulated annealing), η οποία τοποθετεί το πρωτεϊνικό σύστημα σε υψηλή θερμοκρασία και μετά το αφήνει να ψυχθεί σταδιακά. Θερμαίνοντας την πρωτεΐνη σε υψηλή θερμοκρασία η προσομοίωση την υποβοηθά να ξεπεράσει υψηλά ενεργειακά φράγματα και έτσι να δοκιμάσει υπολογισμούς σε περισσότερες στερεοδιατάξεις. Καθώς το σύστημα ψύχεται προς την τελική θερμοκρασία του, η πρωτεΐνη εγκλωβίζεται στο συνολικό ενεργειακό ελάχιστο. Εάν το δυναμικό πεδίο έχει αρκετή ακρίβεια τότε τη στερεοδιάταξη του γενικού ενεργειακού ελάχιστου θα πρέπει να είναι η φυσική στερεοδομή της πρωτεΐνης. Η μέθοδος της προσομοίωσης ανόπτησης έχει εφαρμοστεί με επιτυχία τόσο σε μελέτες διπλώματος των πρωτεϊνών όσο και σε διαδικασίες βελτιστοποίησης, επιτρέποντας στα άτομα του συστήματος να υπερπηδήσουν τα ενεργειακά ελάχιστα που τα εγκλωβίζουν σε μη ορθές θέσεις.

Μια άλλη συχνά χρησιμοποιούμενη μεθοδολογία περιλαμβάνει τη χρήση εξωτερικών επιρροών, οι οποίες θα καθοδηγήσουν το σύστημα προς μια συγκεκριμένη κατάσταση, επιτρέποντας τη λήψη δειγμάτων κατά την πορεία. Η περαιτέρω επεξεργασία αυτών των δειγμάτων μπορεί να δώσει χρήσιμη πληροφορία σχετικά με τις στερεοδιαταξικές αλλαγές που παρατηρούνται κατά την προσομοιούμενη μετάβαση. Οι επιρροές αυτές μπορούν να είναι διάφορων τύπων, περιλαμβάνοντας τη χρήση εξωτερικών δυνάμεων, τον έλεγχο της ταχύτητας ή της κίνησης συγκεκριμένων ατόμων ή τη χρήση εξωτερικών ηλεκτρικών ή μαγνητικών πεδίων. Για παράδειγμα, στις προσομοιώσεις «Στοχευμένης Μοριακής Δυναμικής» (Targeted Molecular

Dynamics), εφαρμόζονται δυνάμεις που καθοδηγούν το σύστημα προς μια συγκεκριμένη τελική στερεοδιάταξη, με το μέτρο της δύναμης να καθορίζεται από το μέτρο της απόκλισης ανάμεσα στην αρχική και τελική δομή (Schlitter *et al.*, 1994). Με αυτόν τον τρόπο μπορούν να μελετηθούν οι στερεοδιαταξικές αλλαγές που παρατηρούνται κατά τη μετάβαση του συστήματος από τη μια κατάσταση στην άλλη, π.χ. κατά τη διαδικασία ενεργοποίησης ενός υποδοχέα. Προσομοιώσεις αυτού του τύπου εντάσσονται στη γενική κατηγορία των προσομοιώσεων Καθοδηγούμενης Μοριακής Μηχανικής (Steered Molecular Dynamics) (Isralewitz *et al.*, 2001).

2.1.4 Πεδία Δυνάμεων

Σε μια προσομοίωση Μοριακής Δυναμικής, κάθε σωματίδιο του συστήματος δέχεται την επίδραση δυνάμεων, οι οποίες αντιπροσωπεύουν τις αλληλεπιδράσεις του σωματιδίου με τα υπόλοιπα στοιχεία του συστήματος. Η απαραίτητη πληροφορία για τον υπολογισμό αυτών των δυνάμεων δίνεται από τα πεδία δυνάμεων ή δυναμικά πεδία (Force Fields). Τα πεδία δυνάμεων αποτελούν μαθηματικά μοντέλα που χρησιμοποιούνται στις προσομοιώσεις Μοριακής Μηχανικής και Μοριακής Δυναμικής για τον υπολογισμό των δυνάμεων που λειτουργούν σε ατομικό επίπεδο, καθώς επίσης και την περιγραφή της δυναμικής ενέργειας των υπό μελέτη συστημάτων ως συνάρτηση των αλληλεπιδράσεων και της θέσης των ατόμων στο χώρο (Phillips *et al.*, 2005).

Η πληροφορία που περιέχεται σε ένα τυπικό πεδίο δυνάμεων περιλαμβάνει τόσο τις απαραίτητες παραμέτρους για την περιγραφή των μορίων όσο και τις κατάλληλες εξισώσεις για την προτυποποίηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ τους. Οι παράμετροι που περιγράφουν τα άτομα περιλαμβάνουν χαρακτηριστικά όπως η ακτίνα van der Waals, και το φορτίο για κάθε άτομο, καθώς και πληροφορίες σχετικά με την τοπολογία των ατόμων κατά τη συμμετοχή τους στο σχηματισμό μορίων, δηλαδή πληροφορίες όπως το μήκος και η γωνία των δεσμών ανάμεσα σε μόρια, η ύπαρξη διέδρων γωνιών αλλά και πληροφορίες για τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα σε διάφορες ομάδες. Οι εξισώσεις των πεδίων δυνάμεων περιλαμβάνουν συναρτήσεις δυναμικών για την περιγραφή των αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στα διάφορα άτομα και μόρια. Τα περισσότερα πεδία δυνάμεων περιγράφουν συνολικά τις

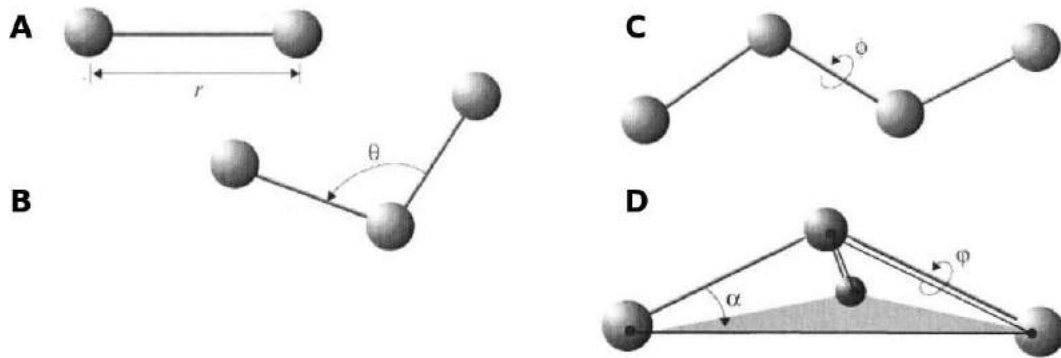
αλληλεπιδράσεις χρησιμοποιώντας μια κοινή συνάρτηση δυναμικού, η οποία αποτελείται από τους παρακάτω συντελεστές:

$$\Delta G_{total} = \Delta G_{bond} + \Delta G_{angle} + \Delta G_{dihedral} + \Delta G_{vdW} + \Delta G_{elec}$$

Οι τρεις πρώτοι όροι αντιπροσωπεύουν το κομμάτι των ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων (Εικόνα 2.3) και περιλαμβάνουν χαρακτηριστικά παραμόρφωσης για το μήκος (ΔG_{bond}) δεσμών, τη γωνία (ΔG_{angle}) δύο δεσμών που μοιράζονται ένα άτομο, τις κανονικές (proper) δίδρες γωνίες ($\Delta G_{dihedral}$), οι οποίες περιγράφουν άτομα τα οποία διαχωρίζονται από τρεις ομοιοπολικούς δεσμούς και στα οποία βαθμός ελευθερίας υπάρχει στη γωνία στροφής του κεντρικού δεσμού, ενώ παράλληλα με τις κανονικές δίδρες γωνίες υπολογίζονται και οι «μη κανονικές» («improper») δίδρες γωνίες ($\Delta G_{improper}$), οι οποίες περιγράφουν τη γεωμετρία τεσσάρων ομοιοπολικά προσδεσμένων ατόμων που βρίσκονται στο ίδιο επίπεδο. Τα παραπάνω δυναμικά υλοποιούνται με τις εξής συναρτήσεις

$$\begin{aligned}\Delta G_{bond} &= \sum_{bonds\ i} k_i^{bond} (r_i - r_{0i})^2 \\ \Delta G_{angle} &= \sum_{angles\ i} k_i^{angle} (\theta_i - \theta_{0i})^2 \\ \Delta G_{dihedral} &= \sum_{dihedrals\ i} k_i^{dihe} [1 + \cos(n_i \varphi_i - \gamma_i)] \quad \text{αν } n \neq 0 \\ \Delta G_{dihedral} &= \sum_{dihedrals\ i} k_i^{dihe} (\theta_i - \gamma_i)^2 \quad \text{αν } n = 0\end{aligned}$$

όπου r , θ και φ είναι οι τιμές του μήκους δεσμού, της γωνίας δεσμού και της δίδρης γωνίας, αντίστοιχα, ενώ k είναι οι σταθερές ελατηρίου.



Εικόνα 2.3 Διαγραμματική απεικόνιση των προτυποποιούμενων ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων. Α. Μήκος δεσμού, Β. Γωνία δεσμού, Γ. Δίεδρη γωνία τεσσάρων ατόμων και Δ. Μη κανονική (improper) γωνία τεσσάρων ατόμων εκτός επιπέδου.

Οι δύο τελευταίοι όροι της εξίσωσης των ενεργειών, τέλος, περιγράφουν τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις. Αυτές περιλαμβάνουν τις δυνάμεις van der Waals, οι οποίες περιγράφουν συλλογικά τις ελκτικές δυνάμεις διασποράς μεταξύ στιγμιαίου διπόλου – επαγόμενου διπόλου (δυνάμεις London) και τις απωστικές δυνάμεις ανταλλαγής από την αλληλοεπικάλυψη των ηλεκτρονιακών νεφών των ατόμων (Εικόνα 2.4), καθώς και τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, οι οποίες περιγράφουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ φορτίων και μεταξύ κατανομών φορτίων σε βιομόρια. Οι αλληλεπιδράσεις van der Waals προτυποποιούνται συνήθως με ένα δυναμικό Lennard – Jones τύπου 6-12, σύμφωνα με τη συνάρτηση

$$\Delta G_{vdW} = \sum_i \sum_{j>i} -\frac{A}{r_{ij}^6} + \frac{B}{r_{ij}^{12}} = \sum_i \sum_{j>i} 4\epsilon_{ij} \left[-\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}}\right)^6 + \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}}\right)^{12} \right]$$

όπου r είναι η απόσταση ανάμεσα στα δύο αλληλεπιδρώντα άτομα, σ είναι η απόσταση ισορροπίας ανάμεσα στα άτομα στην οποία το δυναμικό είναι μηδέν και ϵ είναι το φρέαρ δυναμικού, το οποίο αντιστοιχεί στην ελάχιστη απόσταση (r_m) που μπορούν να έχουν τα δυο άτομα μεταξύ τους χωρίς να απωθούνται.

Ο δεύτερος τύπος του δυναμικού Lennard – Jones προκύπτει με τους εξής μαθηματικούς υπολογισμούς:

Όταν η απόσταση r_{ij} ανάμεσα σε δύο άτομα i και j είναι ίση με την απόσταση ισορροπίας (r_{eqm}), το δυναμικό Lennard – Jones είναι ίσο με το φρέαρ δυναμικού ($-\varepsilon_{ij}$):

$$\begin{aligned} \Delta G_{VDW} = -\varepsilon_{ij} &\rightarrow \frac{d\Delta G_{VDW}}{dr} = 0 \rightarrow \frac{12}{r_m^{13}} B = \frac{6}{r_m^6} A \rightarrow A = \frac{2B}{r_m^6} \rightarrow \\ \Delta G_{VDW} = -\varepsilon_{ij} &\rightarrow -\frac{A}{r_m^6} + \frac{B}{r_m^{12}} = -\varepsilon_{ij} \rightarrow B = \varepsilon_{ij} \cdot r_m^{12} \text{ και } A = 2\varepsilon_{ij} \cdot r_m^6 \rightarrow \\ \Delta G_{VDW} &= \varepsilon_{ij} \left[-2 \left(\frac{r_m}{r_{ij}} \right)^6 + \left(\frac{r_m}{r_{ij}} \right)^{12} \right] \quad (1) \end{aligned}$$

Όταν η απόσταση r_{ij} ανάμεσα σε δύο άτομα i και j είναι ίση με το άθροισμα των ακτίνων van der Waals των ατόμων (σ_{ij}), το δυναμικό Lennard – Jones μηδενίζεται:

$$\begin{aligned} \Delta G_{VDW} = 0 &\rightarrow \varepsilon_{ij} \left[-2 \left(\frac{r_m}{\sigma_{ij}} \right)^6 + \left(\frac{r_m}{\sigma_{ij}} \right)^{12} \right] = 0 \rightarrow r_m = 2^{\frac{1}{6}} \sigma_{ij} \rightarrow \\ \Delta G_{VDW} &= \varepsilon_{ij} \left[-2 \left(\frac{r_m}{r_{ij}} \right)^6 + \left(\frac{r_m}{r_{ij}} \right)^{12} \right] = \varepsilon_{ij} \left[-2 \left(\frac{2^{\frac{1}{6}} \sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 + \left(\frac{2^{\frac{1}{6}} \sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} \right] \rightarrow \\ \Delta G_{VDW} &= 4\varepsilon_{ij} \left[-\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 + \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} \right] \end{aligned}$$

Οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις προτυποποιούνται χρησιμοποιώντας το νόμο του Coulomb

$$\Delta G_{elec} = \sum_i \sum_{j>i} \frac{q_i q_j}{4 \pi \varepsilon_0 r_{ij}}$$

όπου q είναι τα φορτία των ατόμων, r η απόσταση μεταξύ τους και ε_0 η διηλεκτρική σταθερά (Brooks *et al.*, 2009; Phillips *et al.*, 2005).

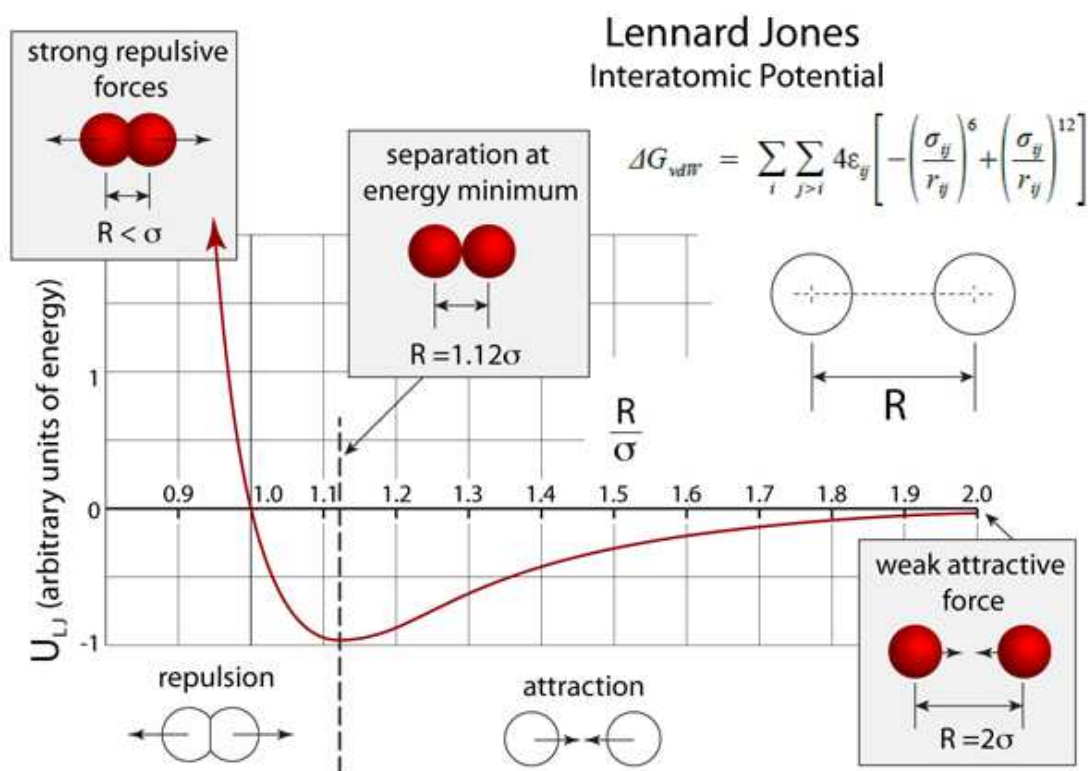
Ασθενείς αλληλεπιδράσεις σχηματίζονται ανάμεσα σε όλα τα πιθανά ζεύγη μη ομοιοπολικά συνδεδεμένων ατόμων. Ωστόσο, λόγω του μεγάλου αριθμού των σωματιδίων σε μια προσομοίωση Μοριακής Δυναμικής, ο υπολογισμός όλων των πιθανών αλληλεπιδράσεων είναι υπολογιστικά αδύνατος. Για την αποτελεσματική υλοποίηση των υπολογισμών, κατά την προσομοίωση ορίζονται τιμές κατωφλίου, στα όρια των οποίων υπολογίζονται οι

ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και οι αλληλεπιδράσεις van der Waals. Ωστόσο, αυτό έχει σαν μειονέκτημα το μη υπολογισμό των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεγάλης εμβέλειας. Για την επίλυση αυτού του προβλήματος μπορεί να χρησιμοποιηθεί η αθροιστική μέθοδος Ewald, η οποία περιγράφει τις πλήρεις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις ενός συστήματος με συνθήκες περιοδικών ορίων διακρίνοντας τις αλληλεπιδράσεις μικρής εμβέλειας από τις αλληλεπιδράσεις μεγάλης εμβέλειας. Συγκεκριμένα, στις προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής χρησιμοποιείται η μέθοδος Particle Mesh Ewald, η οποία υπολογίζει τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις ορίζοντας ένα τρισδιάστατο πλέγμα για την περιγραφή του χώρου και υπολογίζοντας την ενέργεια σε αυτό ως εξής

$$E_{tot} = E_{sr} + E_{lr},$$

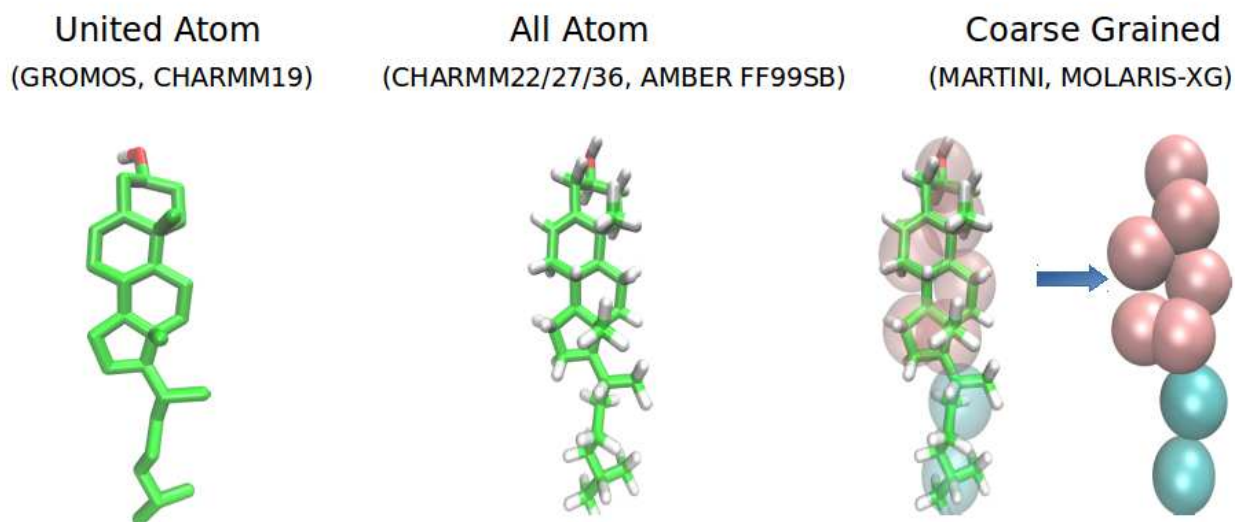
$$E_{lr} = \sum_k \tilde{\Phi}_{lr}(k) |\tilde{\rho}_{lr}(k)|^2$$

Όπου ο όρος E_{sr} περιγράφει τις αλληλεπιδράσεις μικρής εμβέλειας, οι οποίες υπολογίζονται με το νόμο του Coulomb σε πραγματικό χώρο και ο E_{lr} τις αλληλεπιδράσεις μεγάλης εμβέλειας, οι οποίες υπολογίζονται για το σύνολο του συστήματος και των περιοδικών αντιγράφων του μέσω μετασχηματισμών Fourier για το δυναμικό (Φ_{lr}) και την πυκνότητα (ρ_{lr}).



Εικόνα 2.4 Διαγραμματική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων van der Waals, όπως αυτές αντιπροσωπεύονται από το δυναμικό Lennard – Jones. Σημαίνονται οι περιοχές των ελκτικών και απωστικών δυνάμεων. Με R σημαίνεται η απόσταση μεταξύ δύο ατόμων, ενώ με σ το άθροισμα των ακτίνων van der Waals των δυο ατόμων. Το ενεργειακό ελάχιστο της αλληλεπίδρασης βρίσκεται στο χαμηλότερο σημείο της καμπύλης δυναμικού και αντιπροσωπεύεται από το φρέαρ δυναμικού ($-\varepsilon$). Όταν η απόσταση μεταξύ των ατόμων βρίσκεται αριστερά αυτού του σημείου τα άτομα απωθούνται, ενώ όταν βρίσκεται δεξιά έλκονται μεταξύ τους.

Οι παραπάνω συναρτήσεις χρησιμοποιούνται από την πλειονότητα των διαθέσιμων πεδίων δυνάμεων. Σε κάποιες περιπτώσεις, ενδέχεται να εφαρμόζονται τροποποιημένες εκδοχές των εξισώσεων δυναμικού. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το πεδίο δυνάμεων GROMOS, στο οποίο οι γωνίες αντιπροσωπεύονται από συνημιτονοειδή δυναμικά σε αντίθεση με τα αρμονικά δυναμικά των παραπάνω συναρτήσεων, ενώ σε όλους τους ομοιοπολικούς όρους η σταθερά ελατηρίου k διαιρείται με το 2 (Guvench and Mackerell, 2008).



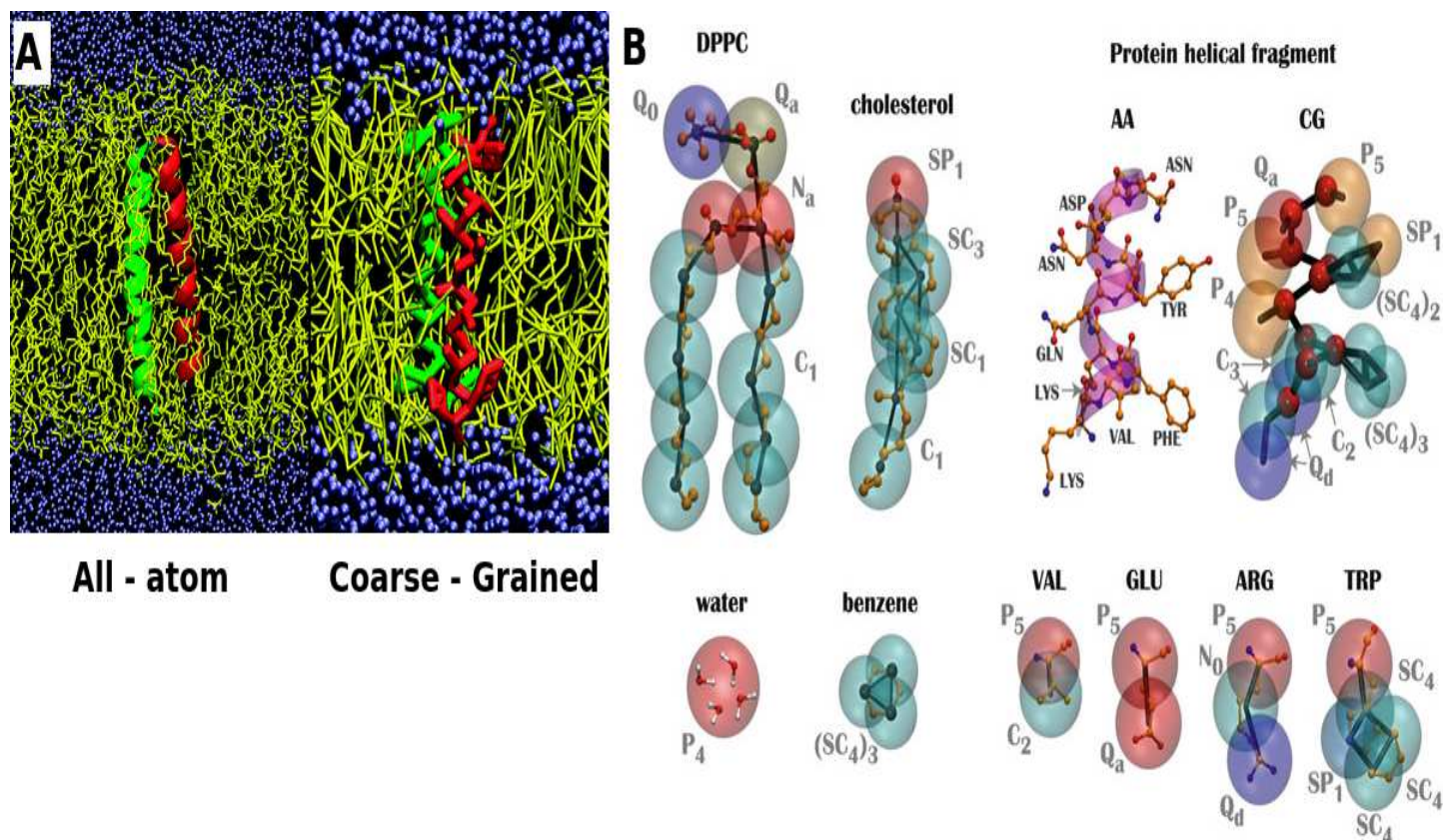
Εικόνα 2.5 Παράδειγμα απεικόνισης μορίων σε United – Atom, All – atom και Coarse – Grained πεδία δυνάμεων για το μόριο της Χοληστερόλης.

Ανάλογα με το επίπεδο λεπτομέρειας το οποίο χρησιμοποιούν για να περιγράψουν ένα σύστημα, τα πεδία δυνάμεων μπορούν να διακριθούν σε διάφορες κατηγορίες, οι κυριότερες από τις οποίες είναι τα σχεδόν ατομικής λεπτομέρειας πεδία ή πεδία ενοποιημένων ατόμων, τα πεδία πλήρους ατομικής λεπτομέρειας και τα πεδία Coarse – Grained (Εικόνα 2.5). Τα πεδία ενοποιημένων ατόμων (United Atom Force Fields), γνωστά και σαν πεδία πολικών υδρογόνων (Polar Hydrogen Force Fields) περιγράφουν τα βιομόρια χρησιμοποιώντας πλήρεις συντεταγμένες για όλα τα βαριά άτομα, ωστόσο αγνοούν όλα τα άτομα υδρογόνου εκτός από αυτά των αμινομάδων της κεντρικής αλυσίδας των πρωτεϊνών και αυτά των πολικών ομάδων. Αυτή ήταν η αρχική μορφή κλασικών πεδίων δυνάμεων όπως το CHARMM (CHARMM19) και το AMBER, ενώ αυτήν την απεικόνιση συνεχίζει να ακολουθεί το πεδίο δυνάμεων GROMOS. Τα πεδία πλήρους ατομικής λεπτομέρειας (All – atom Force Fields), όπως το CHARMM, το AMBER και το OPLS, περιγράφουν πλήρως τις συντεταγμένες των ατόμων, περιλαμβάνοντας και όλα τα άτομα υδρογόνου. Παρέχουν την καλύτερη δυνατή λεπτομέρεια, ωστόσο, αυτό έχει σαν τίμημα τις υψηλές απαιτήσεις σε υπολογιστική ισχύ και περιορισμούς στο χρόνο προσομοίωσης που δύναται να πραγματοποιηθεί και στο μέγεθος του συστήματος που μπορεί να μελετηθεί (Guvench and MacKerell, 2008). Τα πεδία Coarse – Grained (Coarse – Grained Force Fields), τέλος, επιτυγχάνουν προσομοιώσεις για πολύ μεγάλα χρονικά διαστήματα και ογκώδη συστήματα, απλοποιώντας την απεικόνιση των μορίων με τέτοιο τρόπο ώστε να επιταχύνεται η διαδικασία με τη μικρότερη δυνατή απώλεια πληροφορίας (Marrink and Tieleman, 2013; Marrink *et al.*, 2007). Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιούνται προσομοιώσεις

Μοριακής Δυναμικής με ένα πεδίο δυνάμεων αυτού του τύπου, τα βασικά χαρακτηριστικά του οποίου θα αναλυθούν στη συνέχεια.

2.1.5 Οι Προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής Coarse – Grained και το Πεδίο Δυνάμεων MARTINI

Η αποτελεσματική προσομοίωση ενός μεμβρανικού συστήματος απαιτεί την ορθή προτυποποίηση των χαρακτηριστικών του. Τα παραπάνω περιλαμβάνουν κατάλληλη τοποθέτηση της πρωτεΐνης σε μια λιπιδική διπλοστιβάδα, αποτελούμενη από ένα ή περισσότερους τύπους λιπιδίων, η οποία είναι απαραίτητο να διαθέτει ικανό μέγεθος ώστε να καλύπτει αποτελεσματικά τον υποδοχέα, δίνοντας παράλληλα αρκετό περιθώριο ώστε να μην δημιουργούνται σφάλματα από αλληλεπιδράσεις λόγω περιοδικότητας. Επιπρόσθετα, απαιτείται η προσθήκη μορίων νερού και ιόντων εκατέρωθεν της μεμβράνης, τα οποία προσομοιώνουν το υδατικό περιβάλλον των εξωμεμβρανικών τμημάτων. Τα παραπάνω βήματα οδηγούν σε υπερβολικά ογκώδη συστήματα με πολύ μεγάλο αριθμό ατόμων που δυσχεραίνουν τη λεπτομερή προσομοίωσή τους, καθώς απαιτείται τόσο υψηλή υπολογιστική ισχύς όσο και μεγάλο χρονικό διάστημα για την προσομοίωση μερικών μόνο νανοδευτερολέπτων (ns). Έτσι, οι πλήρως ατομιστικές προσομοιώσεις μεμβρανικών πρωτεϊνών, αν και χρήσιμες για τη λεπτομερή περιγραφή των τοπικών κινήσεων και των μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων σε μικρά χρονικά διαστήματα, πολύ σπάνια ξεπερνούν χρόνους των 100-150 ns.



Εικόνα 2.6 Επισκόπηση βασικών χαρακτηριστικών του πεδίου δυνάμεων MARTINI. Α. Σύγκριση των αναπαραστάσεων μιας μεμβρανικής πρωτεΐνης ενσωματωμένης σε μια λιπιδική διπλοστιβάδα, σε ατομική και Coarse – Grained λεπτομέρεια. Το Coarse – Grained μοντέλο διατηρεί πολλά από τα χαρακτηριστικά του ατομικού μοντέλου, μειώνοντας ωστόσο τον αριθμό των σωματιδίων και το μέγεθος του συστήματος. Β. Κανόνες χαρτογράφησης του MARTINI για Coarse – Grained απεικονίσεις διάφορων μορίων. Στην εικόνα παρουσιάζονται απεικονίσεις για ένα φωσfolιπίδιο (DPPC), τη χοληστερόλη, μόρια πολικού (νερό) και μη πολικού διαλύτη (βενζόλιο), ένα πεπτίδιο με δομή α-έλικας και διαφορετικούς τύπους αμινοξέων. Τα διαφορετικά είδη σωματιδίων του MARTINI σημαίνονται με σφαίρες διαφορετικού τύπου χρώματος. Τα μη πολικά και αρωματικά σωματίδια απεικονίζονται με σφαίρες C και SC αντίστοιχα και χρώμα ανοιχτό γαλάζιο, τα διάφορα πολικά σωματίδια με σφαίρες P και αποχρώσεις του κόκκινου ανάλογα με το βαθμό πολικότητάς τους ενώ τα φορτισμένα σωματίδια με σφαίρες Q και χρώμα σκούρο μπλε για τα θετικά και κόκκινο για τα αρνητικά φορτισμένα. Προσαρμογή από (Marrink *et al.*, 2007; Monticelli *et al.*, 2008).

Μια λύση στο παραπάνω πρόβλημα αποτελούν οι προσομοιώσεις που χρησιμοποιούν πεδία δυνάμεων τύπου Coarse – Grained (CG). Σε αντίθεση με τα πλήρως ατομιστικά πεδία όπως το CHARMM και το AMBER, τα πεδία CG δεν προσομοιώνουν τα βιομόρια με πλήρη λεπτομέρεια αλλά υιοθετούν πιο απλοποιημένες απεικονίσεις. Ο τρόπος απεικόνισης κάθε πεδίου CG κυμαίνεται ανάλογα με το επίπεδο λεπτομέρειας που αυτό προσφέρει και, κατά συνέπεια, τα διαφορετικά πεδία CG επιτελούν διαφορετικές λειτουργίες. Έτσι, πεδία δυνάμεων

όπως το Go και το SBCG υπεραπλοποιούν τις απεικονίσεις των μορίων σε μικρό αριθμό σωματιδίων που αντιστοιχούν σε δεκάδες ή εκατοντάδες άτομα και μπορούν να εφαρμοστούν σε προσομοιώσεις υπερβολικά μεγάλων συστημάτων όπως οι ιοί ή ακόμη και ολόκληρα οργανίδια. Αντίθετα, πιο λεπτομερή πεδία όπως το MARTINI και το MOLARIS-XG προσομοιώνουν τα βιολογικά συστήματα με μεγαλύτερη διακριτικότητα, χρησιμεύοντας στην προσομοίωση πρωτεϊνών, λιπιδικών μεμβρανών κλπ (Marrink and Tieleman, 2013).

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιείται το Coarse – Grained πεδίο δυνάμεων MARTINI. Το MARTINI έχει σχεδιαστεί από την ομάδα των Marrink και συν., στο πανεπιστήμιο του Groningen στην Ολλανδία. Η αρχική μορφή του πεδίου σχεδιάστηκε για προσομοιώσεις λιπιδικών διπλοστιβάδων (Marrink *et al.*, 2007), ενώ ακολούθησε η παραμετροποίηση και άλλων ειδών μακρομορίων, με το πεδίο δυνάμεων να προσφέρει πληροφορία πλέον για λιπίδια, στερόλες, διάφορα είδη διαλύτη, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και νουκλεϊκά οξέα (Marrink and Tieleman, 2013; Periole and Marrink, 2013). Το MARTINI έχει παραμετροποιηθεί με συστηματικές μεθόδους, σχεδιάζοντας τόσο top – down όσο και bottom – up διαδικασίες. Όλες οι αλληλεπιδράσεις προτυποποιούνται χρησιμοποιώντας τις κλασικές εξισώσεις δυναμικού που περιγράφονται από τα τυπικά πεδία δυνάμεων. Οι μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις έχουν βασιστεί σε πειραματικά δεδομένα μέσω των οποίων έχουν προσδιοριστεί ενεργειακές τιμές βιομορίων σε πολικές και μη πολικές φάσεις για μεγάλο εύρος χημικών τύπων, ενώ οι πολικές αλληλεπιδράσεις έχουν παραμετροποιηθεί με βάση δεδομένα από προσομοιώσεις ατομιστικής λεπτομέρειας. Οι μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις προτυποποιούνται μέσω του δυναμικού Lennard – Jones και του νόμου του Coulomb για τις αλληλεπιδράσεις van der Waals και το ηλεκτροστατικό δυναμικό αντίστοιχα, εφαρμόζοντας επιπλέον συναρτήσεις μετασχηματισμού για τη χρήση τους με βάση τη φύση των Coarse – Grained σωματιδίων. Οι ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις προτυποποιούνται χρησιμοποιώντας τα κλασικά αρμονικά δυναμικά των ατομιστικών πεδίων δυνάμεων με μόνη εξαίρεση την προτυποποίηση των γωνιών, για τις οποίες εφαρμόζεται ένα συνημιτονοειδές δυναμικό, στα πρότυπα του GROMOS.

Το μοντέλο του MARTINI χρησιμοποιεί ένα πρότυπο αντιστοίχισης 4:1 για την απεικόνιση των μορίων. Κατά μέσο όρο τέσσερα βαριά άτομα (και τα αντίστοιχα άτομα υδρογόνου) αντιπροσωπεύονται από ένα κέντρο αλληλεπίδρασης. Έτσι, για παράδειγμα, τα άτομα κάθε

αμινοξικού καταλοίπου τα οποία συμμετέχουν στην κύρια ανθρακική αλυσίδα (backbone) της πρωτεΐνης (N, Ca, C, O) αντιπροσωπεύονται από ένα κέντρο αλληλεπίδρασης ενώ οι πλευρικές ομάδες, ανάλογα με το μέγεθός τους, μπορούν να αντιπροσωπευθούν από ένα ως τέσσερα σωματίδια. Αντίστοιχοι κανόνες ακολουθούνται και για άλλες κατηγορίες μορίων όπως τα φωσφολιπίδια. Για τη λεπτομερέστερη απεικόνιση πολλών μορίων, ωστόσο, ο κανόνας παρακάμπτεται. Έτσι, για μόρια με δακτυλίους, όπως οι στερόλες αλλά και οι πλευρικές ομάδες των αρωματικών αμινοξέων χρησιμοποιείται χαρτογράφηση 3:1 ή ακόμα και 2:1 για την περιγραφή των ατόμων (Εικόνα 2.6). Αυτή η εξαίρεση οδηγεί σε πιο ογκώδεις αναπαραστάσεις για αυτές τις ομάδες, ωστόσο προσφέρει το πλεονέκτημα της λεπτομερέστερης απεικόνισης.

Επιπρόσθετα, το MARTINI καθορίζει διαφορετικά είδη κέντρων αλληλεπίδρασης για να περιγράψει τις διαφορετικές ομάδες με βάση τις ιδιότητές τους. Ανάλογα με τη φύση τους, τα σωματίδια μπορούν να διακριθούν σε πολικά (P), μη-πολικά (N και C), φορτισμένα (Q) και αρωματικά (SP και SC), με κάθε τύπο να διακρίνεται περαιτέρω σε υποτύπους, επιτρέποντας έτσι την ακριβή απεικόνιση της χημικής φύσης της αρχικής ατομικής δομής (για παράδειγμα, ο υποτύπος P4 θεωρείται αντιπροσωπεύει πιο πολικές ομάδες από τον υποτύπο P1). Επιπρόσθετα, τα κέντρα αλληλεπίδρασης της κεντρικής αλυσίδας των πρωτεϊνών δεν είναι ισοδύναμα, αλλά οι ιδιότητές τους καθορίζονται με βάση τη δευτεροταγή δομή του κάθε καταλοίπου στην αρχική δομή ατομικής λεπτομέρειας. Έτσι, κατάλοιπα που συμμετέχουν σε α-έλικες, β-κλώνους ή ακανόνιστες δομές απεικονίζονται διαφορετικά στο πεδίο δυνάμεων. Με αυτές τις παραδοχές, το MARTINI επιτρέπει μεγαλύτερη λεπτομέρεια στην προσομοίωση των ιδιοτήτων των βιολογικών συστημάτων από άλλα πεδία δυνάμεων τύπου Coarse – Grained καθώς, παρά την απλοποίηση της απεικόνισης, τα βιομόρια διατηρούν χαρακτηριστικά τα οποία αντιπροσωπεύουν τις χημικές ιδιότητές τους. Αναλυτικότερη παρουσίαση των κανόνων αντιστοίχισης του MARTINI για τα αμινοξικά κατάλοιπα δίνεται στους Πίνακες 2.1 και 2.2.

Πίνακας 2.1 Κανόνες αντιστοίχισης των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξικών καταλοίπων στο πεδίο δυνάμεων. Στον πίνακα δεν περιλαμβάνονται η γλυκίνη και η αλανίνη οι οποίες, λόγω του μικρού μεγέθους τους, αντιπροσωπεύονται αποκλειστικά από το σωματίδιο της κεντρικής αλυσίδας. Για τα κατάλοιπα Lys, Arg, Asp και Glu παρουσιάζονται κανόνες αντιστοίχισης τόσο για τις φορτισμένες όσο και τις αφόρτιστες πλευρικές ομάδες.

Αμινοξύ	Απεικόνιση CG ^α	Αντιστοίχιση AA-CG ^β
Leu	C1	C1: CB-CG-CD1-CD2
Ile	C1	C1: CB-CG1-CG2-CD1
Val	C2	C2: CB-CG1-CG2
Pro	C2	C2: CB-CG-CD
Met	C5	C5: CB-CG-SD-CE
Cys	C5	C5: CB-CG
Ser	P1	P1: CB-OG
Thr	P1	P1: CB-CG2-OG1
Asn	P5	P1: CB-CG-OD1-ND2
Gln	P4	P2: CB-CG-CD-OE1-NE2
Asp	Qa	Qa: CB-CG-OD1-OD2
Asp (αφορτ.)	P3	P3: CB-CG-OD1-OD2
Glu	Qa	Qa: CB-CG-CD-OE1-NE2
Glu (αφορτ.)	P1	P1: CB-CG-CD-OE1-NE2
Arg	N0-Qd	N0: CB-CG-CD-NE, Qd: CZ-NH1-NH2
Arg (αφορτ.)	N0-P4	N0: CB-CG-CD-NE, P4: CZ-NH1-NH2
Lys	C3-Qd	C3: CB-CG-CD, Qd: CE-NZ
Lys (αφορτ.)	C3-P1	C3: CB-CG-CD, P1: CE-NZ
His	SC4-SP1-SP1	SC4: CB-CG, SP1: CD-NE, SP1: ND-CE
Trp	SC4-SP1-SC4-SC4	SC4:CB-CG-CD2, SP1: CD1-NE-CE1, SC4:CE2-CZ2, SC4:CE1-CZ3-CH2

α. Η στήλη παρουσιάζει τον τύπο του σωματιδίου MARTINI που αντιπροσωπεύει τα άτομα των πλευρικών ομάδων. Οι τύποι N και C αντιστοιχούν σε μη πολικές ομάδες, ο τύπος P σε πολικές, οι τύποι Qa και Qd σε αρνητικά και θετικά φορτισμένες, αντίστοιχα, ο τύπος SC σε άτομα που συμμετέχουν σε αρωματικό δακτύλιο και περιλαμβάνουν αποκλειστικά άτομα άνθρακα και ο τύπος SP σε άτομα που συμμετέχουν σε αρωματικό δακτύλιο, περιλαμβάνοντας άτομα N (π.χ. δακτύλιοι His και Trp). Οι αριθμοί αποτελούν ένδειξη της ισχύος των ιδιοτήτων κάθε σωματιδίου (π.χ. ο τύπος P5 παρουσιάζει πιο έντονο πολικό χαρακτήρα από τον τύπο P1).

β. Η στήλη παρουσιάζει την αντιστοίχιση ανάμεσα στα σωματίδια του MARTINI και τα άτομα που αντιπροσωπεύουν.

Πίνακας 3.2 Κανόνες αντιστοίχισης των σωματιδίων της κύριας ανθρακικής αλυσίδας, με βάση τη δευτεροταγή δομή.

	Ακανόνιστη δομή	α-έλικα	N-άκρο/C-άκρο ελίκων	β-κλώνος
Backbone	P5	N0	Nd/Na	Nda
Ala	P5	N0	Nd/Na	Nda
Gly	P4	C5	N0/N0	N0
Pro	Na	C5	N0/Na	N0

Μέσω αυτής της παραμετροποίησης, το MARTINI προσφέρει τη δυνατότητα προσομοίωσης παρέχοντας ένα από τα υψηλότερα επίπεδα λεπτομέρειας σε σχέση με άλλα πεδία Coarse – Grained, με τα αποτελέσματά του να παρουσιάζουν πολύ καλή συμφωνία με τα αποτελέσματα προσομοιώσεων ατομικής διακριτικότητας. Παράλληλα, η μείωση των βαθμών ελευθερίας με την απλοποίηση της απεικόνισης επιτρέπει τη χρήση μεγαλύτερων τιμών για το στοιχειώδη χρόνο βήματος (time step integrator) της προσομοίωσης της τάξης των 10 – 40 fs, σε αντίθεση με τον τυπικό χρόνο βήματος των ατομιστικών προσομοιώσεων (0.5 – 2 fs), γεγονός που επιτρέπει τη γρηγορότερη προσομοίωση, ενώ οι μετασχηματισμοί που χρησιμοποιούνται για την προτυποποίηση των μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων επιταχύνει ακόμη περισσότερο την όλη διαδικασία. Έτσι, μια προσομοίωση MARTINI μπορεί να πετύχει την περιγραφή ενός βιολογικού φαινομένου τέσσερις φορές πιο γρήγορα από μια προσομοίωση ατομικής λεπτομέρειας (Marrink and Tieleman, 2013; Periole and Marrink, 2013).

Η ικανότητα του πεδίου MARTINI στην ορθή προσομοίωση βιολογικών συστημάτων έχει δείχθει επανειλημμένα. Αξιοσημείωτη περίπτωση, μάλιστα, αποτελούν τα συστήματα τα οποία περιλαμβάνουν βιολογικές μεμβράνες, στα οποία το πεδίο δυνάμεων αποδεικνύεται ιδιαίτερα ικανό, πιθανώς λόγω του ότι η αρχική μορφή του σχεδιάστηκε ειδικά για την προσομοίωση λιπιδικών διπλοστιβάδων. Επιπρόσθετα, το MARTINI έχει χρησιμοποιηθεί σε μεγάλο αριθμό προσομοιώσεων οι οποίες περιλαμβάνουν ειδικά GPCRs, όπως σε μελέτες αυτο – οργάνωσης της Ροδοψίνης σε μεμβράνες ROS (Periole *et al.*, 2007; Periole *et al.*, 2012) και της ενεργειακής συμπεριφοράς των αδρενεργικών υποδοχέων (Johnston *et al.*, 2012), με τα αποτελέσματα να παρουσιάζουν υψηλή συσχέτιση με αντίστοιχα αποτελέσματα από προσομοιώσεις ατομικής διακριτικότητας. Κατά συνέπεια, αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη της

συμπεριφοράς των GPCRs και του φαινομένου του ολιγομερισμού σε συνθήκες μεμβρανικού περιβάλλοντος.

2.2 Συλλογή και Επεξεργασία Δεδομένων

Στις επόμενες σελίδες παρουσιάζονται αναλυτικά όλα τα στάδια της μεθοδολογίας που ακολουθήθηκε, και αναλύονται οι υπολογιστικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν.

2.2.1 Κατασκευή του Συνόλου Δεδομένων

Αρχικά πραγματοποιήθηκε εκτεταμένη αναζήτηση στη βιβλιογραφία πάνω στις αλληλεπιδράσεις ολιγομερισμού των GPCRs, συλλέγοντας πληροφορία τόσο για δεδομένα από κρυσταλλικές δομές, όσο και από βιοχημικά και βιοφυσικά πειράματα αλλά και από *in silico* μελέτες. Η αναζήτηση πραγματοποιήθηκε στη βιβλιογραφική βάση δεδομένων MEDLINE μέσω του συστήματος διαχείρισης PubMed (<http://www.pubmed.gov>), το οποίο έχει αναπτυχθεί και συντηρείται από το Εθνικό Κέντρο Βιοτεχνολογίας (NCBI) της Εθνικής Ιατρικής Βιβλιοθήκης (NLM), που υπάγεται στο Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας (NIH) των Ηνωμένων Πολιτειών (Lindberg, 2000).

Παράλληλα με τη βιβλιογραφική έρευνα, συγκεντρώθηκε ένα σύνολο από κρυσταλλικές δομές διμερών GPCRs από τη βάση δεδομένων Protein Data Bank (PDB) (Berman *et al.*, 2000). Ως δομές του συνόλου επιλέχθηκαν οι δομές των υποδοχέων που, σύμφωνα με τις βιβλιογραφικές αναφορές τους, χαρακτηρίζονται ως πιθανά διμερή υποδοχέων. Η στερεοχημική ποιότητα κάθε δομής ελέγχθηκε μέσω του διαδικτυακού εργαλείου MolProbity v. 4.1 (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>) (Chen *et al.*, 2010; Davis *et al.*, 2007). Το MolProbity διαθέτει μια σειρά εργαλείων για την ανάλυση και αξιολόγηση των στερεοχημικών χαρακτηριστικών μιας δομής, τα οποία περιλαμβάνουν την κατασκευή διαγραμμάτων Ramachandran, την ανάλυση αποστάσεων μεταξύ ατόμων για την εύρεση στερεοχημικών παρεμποδίσεων και την αξιολόγηση της συνολικής γεωμετρίας των ομοιοπολικών δεσμών τόσο

στην κεντρική ανθρακική αλυσίδα όσο και στις πλευρικές ομάδες. Επιπρόσθετα, κάθε δομή εξετάστηκε τόσο με βάση κρυσταλλογραφικά χαρακτηριστικά όπως η διακριτικότητα και η τιμή του παράγοντα R όσο και ως προς γνωρίσματα ειδικά για τις δομές των GPCRs, όπως η συγκρυστάλλωση με πρωτεΐνες σαν τη λυσοζύμη του φάγου T4 ή το κυτόχρωμα b562, η παρουσία ή απουσία τμημάτων και η ύπαρξη σταθεροποιητικών μεταλλαγών.

Σε περιπτώσεις που κάποιο διμερές αντιπροσωπευόταν από περισσότερες από μία εγγραφές στην PDB, για το σύνολο δομών επιλέχθηκε η δομή του διμερούς με την καλύτερη δυνατή ποιότητα. Εξαιρέση αποτέλεσαν το διμερές TM1-TM2-H8 για τη Ροδοψίνη του βοδιού και το διμερές TM5 για τον ανθρώπινο υποδοχέα CXCR₄. Στην περίπτωση των συγκεκριμένων GPCRs συμπεριλήφθηκαν περισσότερες από μία δομές, στη μεν Ροδοψίνη επειδή περιέχουν τον υποδοχέα σε διαφορετικά στάδια του κύκλου ενεργοποίησής του, στον δε CXCR₄ επειδή οι δομές παρουσιάζουν σημαντικές στερεοδιαταξικές διαφορές στην αλληλεπίδραση των μονομερών, οι οποίες μπορεί να είναι σημαντικές.

Πίνακας 2.3. Οι κρυσταλλικές δομές των διμερών GPCRs του συνόλου δεδομένων

Δομή	PDB	Διακριτ. (Å)	Τύποι Διμερών ^e
Ανενεργή Ροδοψίνη ^{a,b,d}	2I35	3.80	TM1-TM2-H8
Ενεργή Ροδοψίνη (Οψίνη) ^d	3CAP	2.90	TM1-TM2-H8
Ανθρώπινος β2 αδρενεργικός υποδοχέας ^{a,b,c}	2RH1	2.40	TM1-H8
Ροδοψίνη Καλαμαριού ^b	2Z73	2.50	TM4-TM5
Ανθρώπινος CXCR4 (Υποκαταστάτης: It1t) ^{a,d}	3ODU	2.50	TM5-TM6
Ανθρώπινος CXCR4 (Υποκαταστάτης: CVX15) ^{a,b,d}	3OE0	2.90	TM4-TM5-TM6
Ανθρώπινος κ οπιοειδής υποδοχέας ^a	4DJH	2.90	TM1-TM2-H8
Ανθρώπινος μ οπιοειδής υποδοχέας ^{a,b}	4DKL	2.80	TM1-TM2-H8 / TM5-TM6
Ανθρώπινος A2α αδενোসινικός υποδοχέας ^{a,b}	4EIY	1.80	TM4-TM5
β1 αδρενεργικός υποδοχέας της γαλοπούλας ^{a,b}	4GPO	3.50	TM1-TM2-H8 / TM4-TM5
Υποδοχέας Smoothened ^a	4JKV	2.45	TM4-TM5
Μεταβοτροπικός υποδοχέας mGluR1 ^{a,c}	4OR2	2.80	TM1-TM2

a: Η δομή περιλαμβάνει χίμαιρα με Λυσοζύμη T4L ή κυτόχρωμα b562, ή παρατηρούνται επιπλέον αλυσίδες στο σύμπλοκο, b: Ένα ή περισσότερα διμερή προκύπτουν ως βιολογικά συμπλέγματα με το PISA, c: Μόρια χοληστερόλης συμμετέχουν στις αλληλεπιδράσεις, d: Τα ίδια διμερή αντιπροσωπεύονται από τις δομές PDB 2I35 και 2I37 για την ανενεργή Ροδοψίνη, 3PXO και 4A4M για την ενεργή Ροδοψίνη, 3OE6, 3OE8, 3OE9 για τον CXCR4, e: Η στήλη αναφέρεται στην αρχική κατάσταση διμερισμού στον κρύσταλλο.

Σε κάποιες από τις δομές του συνόλου δεδομένων τα διμερή που περιγράφονται στη συνοδευτική βιβλιογραφία δεν αποτελούν μέρος της ασύμμετρης μονάδας αλλά έχουν υπολογιστεί ως τεταρτοταγείς δομές βιολογικών συμπλεγμάτων (biological assemblies) με βάση την κρυσταλλική γεωμετρία. Για αυτές τις περιπτώσεις, οι δομές των κρυσταλλικών συμπλεγμάτων υπολογίστηκαν με βάση την πληροφορία για την κρυσταλλική συμμετρία που περιέχεται στις αντίστοιχες καταχωρήσεις της PDB, εντοπίζεται στα πεδία REMARK 290, REMARK 350, CRYST1, ORIGX1/2/3 και SCALE1/2/3 και περιλαμβάνει πίνακες μετασχηματισμού για την κατασκευή κρυσταλλικών συμπλόκων. Τα σύμπλοκα των διμερών δημιουργήθηκαν χρησιμοποιώντας το εργαλείο PISA (Protein Interfaces, Structures and Assemblies) v. 1.47, μέσω της διαδικτυακής υπηρεσίας PDBePISA (<http://www.pdbe.org/pisa>), που αξιοποιεί τους

παραπάνω πίνακες για την κατασκευή των συμπλεγμάτων μέσω ενός αλγορίθμου βασισμένου στη θεωρία γράφων (Krissinel and Henrick, 2007).

Οι δομές και τα χαρακτηριστικά του τελικού συνόλου δομών που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.3. Παράλληλα με τις δομές του συνόλου, εξετάστηκε και το θεωρητικό μοντέλο του εξαμερούς της Ροδοψίνης από κύτταρα ραβδίων (PDB: 1N3M) (Fotiadis *et al.*, 2003; Liang *et al.*, 2003), το οποίο ανασύρθηκε από το αρχείο θεωρητικών μοντέλων της RCSB PDB. Το συγκεκριμένο μοντέλο προέκυψε μέσω ομόλογης προτυποποίησης και αγκυροβόλησης πρωτεϊνών – πρωτεϊνών (protein – protein docking) και βασίζεται σε πειραματικά αποτελέσματα κρυο-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σε συνδυασμό με μικροσκοπία Atomic Force. Το μοντέλο έχει αποτελέσει τη βάση για πλήθος ερευνητικών εργασιών πάνω στον ολιγομερισμό των GPCRs, τόσο θεωρητικών όσο και πειραματικών, ενώ οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μονομερών της Ροδοψίνης παρουσιάζουν αρκετές ομοιότητες με κάποιες από τις κρυσταλλικές δομές του συνόλου δεδομένων. Γι αυτό το λόγο, το μοντέλο συμπεριλήφθηκε στις αναλύσεις παράλληλα με το σύνολο δεδομένων, ωστόσο, λόγω της θεωρητικής φύσης του, τα αποτελέσματα των υπολογισμών εξετάζονται με επιφύλαξη.

2.2.2 Επεξεργασία και Ανάλυση Δομών και Αλληλουχιών

Η οπτική απεικόνιση και εξέταση των δομών στις τρεις διαστάσεις, καθώς και η μέτρηση και απεικόνιση αποστάσεων και γωνιών πραγματοποιήθηκαν μέσω των προγραμμάτων οπτικοποίησης και επεξεργασίας δομών PyMOL v. 1.7 (Schrodinger, 2010), UCSF Chimera v. 1.10 (Pettersen *et al.*, 2004) και Visual Molecular Dynamics (VMD) v. 1.9.2 (Humphrey *et al.*, 1996). Επιπρόσθετες μετρήσεις σε δύο διαστάσεις πραγματοποιήθηκαν μέσω του προγράμματος LigPlot+ v. 1.45 (Laskowski and Swindells, 2011), το οποίο αναλύει επαφές μεταξύ πρωτεϊνών και μικρών μορίων και κατασκευάζει μοριακά διαγράμματα αυτών των αλληλεπιδράσεων. Οι αμινοξικές ακολουθίες των υποδοχέων από τις δομές του συνόλου, καθώς και όλες οι υπόλοιπες σχετικές με αυτές αλληλουχίες ανασύρθηκαν από τη βάση δεδομένων UniProt. Στοιχίσεις αλληλουχιών πραγματοποιήθηκαν αρχικά μέσω του προγράμματος ClustalX v. 2.1 (Thompson *et al.*, 2002) ενώ επιπρόσθετες στοιχίσεις, βασισμένες σε δομικά προφίλ,

πραγματοποιήθηκαν μέσω του MultiSeq στο VMD, το οποίο συνδυάζει τη λειτουργικότητα του STAMP με τον αλγόριθμο του Clustal (Roberts *et al.*, 2006). Η επεξεργασία και απεικόνιση των αποτελεσμάτων των στοιχίσεων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα επεξεργασίας πολλαπλών στοιχίσεων JalView v. 2.8 (Waterhouse *et al.*, 2009).

Για την περιγραφή και τη σύγκριση των χαρακτηριστικών των διαμεμβρανικών τμημάτων των GPCRs χρησιμοποιήθηκε το σύστημα αρίθμησης Ballesteros & Weinstein (B&W), το οποίο στην αρχική του μορφή σχεδιάστηκε για τους υποδοχείς της κλάσης A (Ballesteros and Weinstein, 1995). Σύμφωνα με το σύστημα B&W, κάθε κατάλοιπο ενός διαμεμβρανικού τμήματος του υποδοχέα χαρακτηρίζεται από ένα ζεύγος αριθμών. Ο πρώτος αριθμός υποδηλώνει το διαμεμβρανικό τμήμα στο οποίο βρίσκεται το κατάλοιπο, ενώ ο δεύτερος την θέση του σε σχέση με το πιο συντηρημένο κατάλοιπο στη συγκεκριμένη έλικα, όπως αυτό έχει προκύψει από πολλαπλή στοίχιση των διαμεμβρανικών τμημάτων όλων των υποδοχέων. Το πιο συντηρημένο κατάλοιπο κάθε διαμεμβρανικού τμήματος λαμβάνει την τιμή 50 και χαρακτηρίζεται ως κεντρικό κατάλοιπο της έλικας, ενώ κατάλοιπα αναρροϊκά και καταρροϊκά του κεντρικού καταλοίπου λαμβάνουν μικρότερες και μεγαλύτερες τιμές αντίστοιχα. Έτσι, για παράδειγμα, το κατάλοιπο B&W 1.45 βρίσκεται στην πρώτη διαμεμβρανική έλικα, 5 θέσεις πριν το κεντρικό κατάλοιπο. Το τυπικό μοντέλο B&W χρησιμοποιήθηκε για την περιγραφή των GPCRs της κλάσης A (Ballesteros and Weinstein, 1995), ενώ η ανανεωμένη μορφή του εφαρμόστηκε στους υποδοχείς της κλάσης C (Pin *et al.*, 2003). Τέλος, για τους υποδοχείς της κλάσης F χρησιμοποιήθηκε μια νέα αρίθμηση B&W, που προτείνεται από τις πρόσφατα λυμένες κρυσταλλικές δομές του υποδοχέα Smoothed σε συνδυασμό με στοιχίσεις αλληλουχιών των υποδοχέων της κλάσης F (Wang *et al.*, 2013). Τα δεδομένα για την αρίθμηση B&W για κάθε υποδοχέα ανασύρθηκαν από τη βάση δεδομένων GPCRDB (<http://www.gpcr.org/7tm/>) (Isberg *et al.*, 2014).

2.3 Προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής

Στις ενότητες που ακολουθούν περιγράφονται οι προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής που πραγματοποιήθηκαν για τη μελέτη της δυναμικής συμπεριφοράς των GPCRs. Αυτές περιλαμβάνουν προσομοιώσεις με σκοπό την προτυποποίηση διμερών, τη μελέτη της

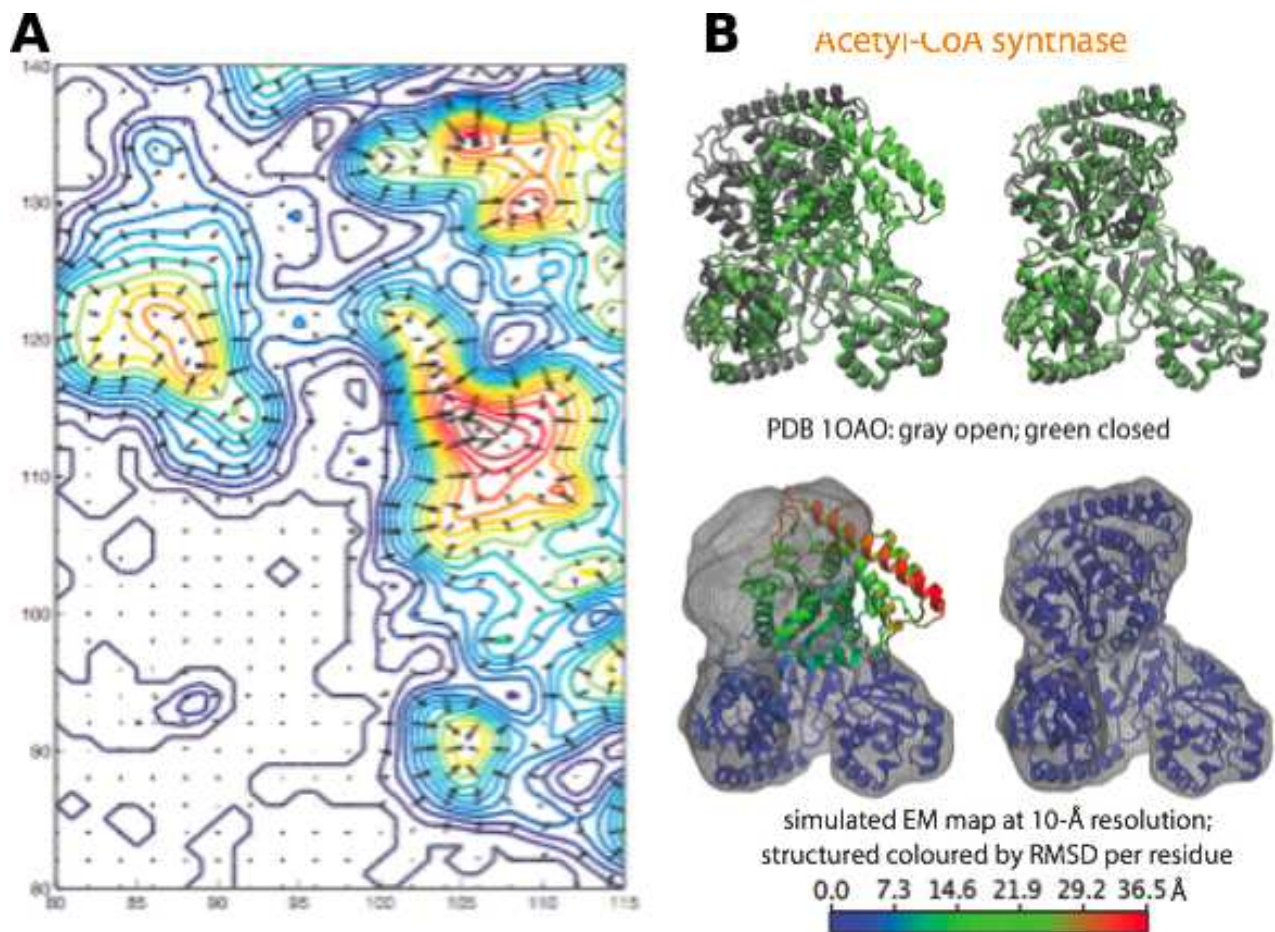
κινητικότητας στη μονάδα του χρόνου, καθώς και προσομοιώσεις βελτιστοποίησης. Οι προσομοιώσεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Μοριακής Δυναμικής NAMD Scalable Dynamics v. 2.10 (<http://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/>), το οποίο έχει αναπτυχθεί στο Πανεπιστήμιο του Illinois στην Urbana – Champaign (Phillips *et al.*, 2005). Το NAMD είναι ένα πρόγραμμα προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής το οποίο βασίζεται στους παράλληλους υπολογισμούς (parallel computing) για την αποτελεσματική προσομοίωση μεγάλων σε μέγεθος βιολογικών συστημάτων. Είναι πλήρως συμβατό τόσο με τα κλασικά πεδία δυνάμεων όπως το CHARMM, το AMBER και το OPLS, καθώς και με πιο εξειδικευμένα πεδία δυνάμεων όπως τα πολώσιμα πεδία σαν το Drude και Coarse – Grained πεδία σαν το Go, το SBCG και το MARTINI. Επιπρόσθετα, περιλαμβάνει υλοποιήσεις για μεγάλη ποικιλία αλγορίθμων καθοδηγούμενης και μη δυναμικής, καθώς και για τη χρήση εξωτερικής πειραματικής πληροφορίας στις προσομοιώσεις.

Αν και το NAMD είναι συμβατό με μεγάλη ποικιλία τύπων αρχείων, λειτουργεί κύρια χρησιμοποιώντας το σύστημα αρχείων του CHARMM και του XPLOR. Έτσι, το πεδίο δυνάμεων χωρίζεται σε δύο μέρη που αντιπροσωπεύονται από δύο διαφορετικά αρχεία, το αρχείο της τοπολογίας (top) και το αρχείο των παραμέτρων (par). Απαραίτητο στοιχείο στην προετοιμασία των δομών είναι η δημιουργία του αρχείου PSF (Protein Structure File) με βάση την τοπολογία του πεδίου δυνάμεων, το οποίο περιγράφει τα χαρακτηριστικά του συστήματος σε συνδυασμό με το αρχείο PDB. Τα αρχεία εξόδου των προσομοιώσεων περιλαμβάνουν τόσο αρχεία συντεταγμένων (coor) όσο και αρχεία που καταγράφουν την πορεία (trajectory) της κάθε προσομοίωσης, στην κωδικοποίηση DCD των CHARMM και XPLOR (Phillips *et al.*, 2005).

2.3.1 Δημιουργία Μοντέλου για το διμερές της Μεταροδοψίνης I από δεδομένα Κρυο-Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας

Εκτός από τις κρυσταλλικές δομές του συνόλου, στη διπλωματική εργασία επιχειρήθηκε η ανάλυση δομικών δεδομένων προερχόμενων από πειράματα Κρυο-Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας (Cryo-EM), τα οποία προσφέρουν επιπλέον πληροφορία για τις αλληλεπιδράσεις ολιγομερισμού των GPCRs. Ένα μέρος αυτής της πληροφορίας παρέχεται από το μοντέλο του ολιγομερούς της

Ροδοψίνης (PDB: 1N3M), όπως αναφέρθηκε στην Ενότητα 2.2.1. Εξίσου σημαντική πληροφορία, ωστόσο, παρέχεται από πειράματα Cryo-EM πάνω στη Μεταροδοψίνη Ι, το πρώτο ενεργοποιημένο ενδιάμεσο της Ροδοψίνης, τα οποία παρουσιάζουν μονομερή της Μεταροδοψίνης Ι σε διάταξη παράλληλου διμερούς (Ruprecht *et al.*, 2004). Τα αποτελέσματα της παραπάνω εργασίας περιλαμβάνουν ένα χάρτη πυκνότητας για τη Μεταροδοψίνη Ι σε διακριτικότητα 5.5 Å ο οποίος διατίθεται ελεύθερα μέσω της βάσης δεδομένων EMDataBank (<http://www.emdatabank.org>) (Lawson *et al.*, 2011). Για τη μελέτη του διμερούς που παρουσιάζεται σε αυτόν το χάρτη επιχειρήθηκε η κατασκευή ενός θεωρητικού μοντέλου, βασισμένου στα δεδομένα Cryo-EM. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιελάμβανε την αρχική αγκυροβόληση δυο υπομονάδων Ροδοψίνης στο χάρτη και την κατασκευή ενός αρχικού διμερούς, το οποίο όμως δεν ταίριαζε πλήρως στη δομή της Μεταροδοψίνης. Έτσι, ακολούθησε ένα στάδιο ευέλικτης ενσωμάτωσης των Ροδοψινών στο χάρτη πυκνότητας, το οποίο πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Molecular Dynamics Flexible Fitting (MDFF) (Trabuco *et al.*, 2008).



Εικόνα 2.7 Βασικά χαρακτηριστικά της μεθόδου MDFF. Α. Ο χάρτης ηλεκτρονικής πυκνότητας μετατρέπεται σε χάρτη δυναμικού, ο οποίος χρησιμοποιείται για την εφαρμογή εξωτερικών δυνάμεων, Β. Παράδειγμα της χρήσης MDFF για τη δημιουργία μοντέλου της ανοιχτής μορφής του ενζύμου Ακετυλο – CoA συνθετάση με βάση δεδομένα EM σε διακριτικότητα 10 Å.

Η μέθοδος MDFF έχει σχεδιαστεί για την ευέλικτη ενσωμάτωση δομών σε χάρτες πυκνότητας μέσω προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής, καθοδηγούμενης από πλέγμα εξωτερικών δυνάμεων (Grid – Steered Molecular Dynamics) (Wells *et al.*, 2007). Η διαδικασία χρησιμοποιεί τα δεδομένα του χάρτη πυκνότητας, μετατρέποντάς τον σε χάρτη δυναμικού που εφαρμόζεται στα άτομα των πρωτεϊνών σαν εξωτερικό πεδίο δυνάμεων, με τέτοιο τρόπο ώστε οι περιοχές υψηλής πυκνότητας στα δεδομένα Cryo – EM να αντιστοιχούν σε περιοχές ενεργειακών ελαχίστων (Εικόνα 2.7). Έτσι, τα άτομα κατά την προσομοίωση δέχονται δυνάμεις ανάλογες της κλίσης της πυκνότητας του χάρτη EM, που τα ωθούν να κατευθυνθούν προς αυτά τα ενεργειακά ελάχιστα (Trabuco *et al.*, 2008).

Το δυναμικό που εφαρμόζεται σε κάθε άτομο καθορίζεται σε ένα τρισδιάστατο πλέγμα σαν συνάρτηση του ατομικού βάρους, της πυκνότητας όπως αυτή δίνεται από τα δεδομένα EM και ενός παράγοντα κλιμάκωσης δυνάμεων σύμφωνα με τις παρακάτω εξισώσεις:

$$U_{EM}(R) = \sum_j w_j V_{EM}(r_j) \quad \begin{array}{l} V_{EM} = \xi \left[1 - \frac{\Phi(r) - \Phi_{thr}}{\Phi_{max} - \Phi_{thr}} \right] \text{ αν } \Phi_r \geq \Phi_{thr} \\ \text{και } V_{EM} = \xi \text{ αν } \Phi_r < \Phi_{thr} \end{array}$$

όπου, για κάθε άτομο j , w είναι το ατομικό βάρος, ξ είναι ο παράγοντας κλιμάκωσης, $\Phi(r)$ είναι η πυκνότητα στη θέση r , Φ_{max} είναι η μέγιστη πυκνότητα του χάρτη EM και Φ_{thr} είναι το κατώφλι πυκνότητας. Το τελευταίο χρησιμοποιείται στους υπολογισμούς για να αφαιρεθεί από τα δεδομένα πυκνότητας η συνεισφορά του διαλύτη, η οποία μπορεί να επιδράσει αρνητικά στη διαδικασία. Με βάση τα παραπάνω, ένα άτομο που επηρεάζεται από αυτό το εξωτερικό δυναμικό δέχεται δύναμη της παρακάτω μορφής:

$$f_i^{EM} = -\frac{\partial}{\partial r_i} U_{EM}(R) = -w_i \frac{\partial}{\partial r_i} V_{EM}(r_i)$$

Ένα σημαντικό πρόβλημα σε μεθόδους ενσωμάτωσης ατομικών δεδομένων σε χάρτες πυκνότητας είναι η υπερπροσαρμογή (overfitting). Καθώς τα δεδομένα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας είναι χαμηλότερης διακριτικότητας από τις δομές κρυσταλλογραφίας ακτίνων-Χ, η υπερπροσαρμογή μιας δομής στα δεδομένα ενός χάρτη EM μπορεί να οδηγήσει σε μη επιτρεπτές παραμορφώσεις της δομής, μειώνοντας την ποιότητα και την αξιοπιστία του μοντέλου. Επιπρόσθετα, η παρουσία του “θορύβου” στους πειραματικούς χάρτες Cryo-EM, που προέρχεται από τις διαδικασίες λήψης εικόνων και ανασύστασης του χάρτη, μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένο ταίριασμα των συντεταγμένων των ατόμων με θέσεις στο χώρο. Για την αποφυγή αυτού του προβλήματος, στις προσομοιώσεις MDFF μπορούν να χρησιμοποιηθούν περιορισμοί για τη διατήρηση της δευτεροταγούς δομής και της γεωμετρίας των πεπτιδικών δεσμών, οι οποίοι εφαρμόζονται με τη μορφή αρμονικών δυναμικών. Έτσι, κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης η ενσωμάτωση των ατόμων στο χάρτη θα γίνει με τέτοιο τρόπο ώστε να αποφευχθούν αλλοιώσεις στα δομικά χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών (π.χ. το ξεδίπλωμα μιας α-έλικας) (Trabuco *et al.*, 2008).

Ο χάρτης πυκνότητας της Μεταροδοψίνης I σε διακριτικότητα 5.5 Å (EMD: 1079) ανασύρθηκε από την EMDataBank και εξετάστηκε οπτικά μέσω του VMD. Ακολουθώντας τις περιγραφές της συνοδευτικής βιβλιογραφίας εντοπίστηκε η θέση του παράλληλου διμερούς των υποδοχέων. Το αρχικό διμερές κατασκευάστηκε αγκυροβολώντας δυο μονομερή

Ροδοψίνης στις αντίστοιχες θέσεις του χάρτη. Η ενσωμάτωση των Ροδοψινών έγινε χειροκίνητα, χρησιμοποιώντας το γραφικό περιβάλλον του VMD, ενώ ακολούθησε μια αρχική διόρθωση μέσω της λειτουργίας “Fit in Map” του UCSF Chimera. Το τελικό σύστημα του αρχικού διμερούς συναρμολογήθηκε στο VMD, χρησιμοποιώντας την τοπολογία του πεδίου δυνάμεων CHARMM27 (Foloppe and MacKerell, 2000; Mackerell *et al.*, 2004; MacKerell *et al.*, 1998).

Η προετοιμασία των δεδομένων για την προσομοίωση πραγματοποιήθηκε μέσω της επέκτασης MDFF που υπάρχει διαθέσιμη στο VMD. Ο χάρτης πυκνότητας μετατράπηκε σε χάρτη δυναμικού μορφής τρισδιάστατου πλέγματος τύπου OpenDX. Οι αρμονικοί περιορισμοί για τη διατήρηση των δομικών χαρακτηριστικών των υποδοχέων υπολογίστηκαν με την επέκταση SSRestrains για περιορισμούς των γωνιών ϕ και ψ και του δικτύου υδρογονικών δεσμών και τις επεκτάσεις Cis/Trans Peptide και Chirality για περιορισμούς της γεωμετρίας των δεσμών της κεντρικής αλυσίδας. Αυτές περιελάμβαναν αρμονικά δυναμικά για τους δεσμούς υδρογόνου ($k=20$ kcal/mol) και τις διέδρες γωνίες ($k=200$ kcal/mol). Οι προσομοιώσεις πραγματοποιήθηκαν σε συνθήκες κενού με το NAMD, για το οποίο έχει υλοποιηθεί η μέθοδος MDFF, χρησιμοποιώντας το πεδίο CHARMM27 και τη λειτουργία GridForces. Το σύστημα υποβλήθηκε σε προσομοίωση MDFF με τιμή παράγοντα κλιμάκωσης $\xi=0.3$, μέσω της οποίας πραγματοποιήθηκε η ευέλικτη ενσωμάτωση των δομών στο χάρτη, για συνολικό χρόνο 200 ps. Στη συνέχεια, το μοντέλο υποβλήθηκε σε ελαχιστοποίηση ενέργειας με εφαρμογή του εξωτερικού δυναμικού MDFF για 10 ps, χρησιμοποιώντας πολύ μεγαλύτερη τιμή ξ (10.0) προκειμένου να εφαρμοστούν ισχυρότερες δυνάμεις για βελτιστοποίηση, ακολουθούμενη από μια τελική ελαχιστοποίηση ενέργειας χωρίς εξωτερικές επιρροές για 1000 βήματα.

Προκειμένου να ελεγχθεί κατά πόσο η αρχική δομή των μονομερών επηρέασε το αποτέλεσμα, κατασκευάστηκαν δύο μοντέλα διμερών, ξεκινώντας είτε από τη δομή της ανενεργής Ροδοψίνης (PDB: 1GZM) (Li *et al.*, 2004), είτε από την ενεργοποιημένη Οψίνη (PDB: 3CAP) και πραγματοποιήθηκαν δύο ανεξάρτητες μεταξύ τους προσομοιώσεις MDFF. Και οι δύο προσομοιώσεις οδήγησαν σε παρόμοιο αποτέλεσμα, με τιμή RMSD ανάμεσα στα δύο μοντέλα που υποδεικνύει ελάχιστες διαφορές (RMSD=1.01), όμοια διάταξη των διαμεμβρανικών τμημάτων και όμοιες επαφές μεταξύ των μονομερών. Επιπρόσθετα, και τα δύο αποτελέσματα συμφωνούν με τις παρατηρήσεις των ερευνητών στην αρχική εργασία. Συνεπώς, το μοντέλο που προέκυψε είναι ανεξάρτητο της αρχικής κατάστασης των Ροδοψινών και απεικονίζει πιστά τη

δομή της Μεταροδοψίνης I, όπως αυτή απεικονίζεται στο χάρτη Cryo-EM. Η ποιότητα του μοντέλου ελέγχθηκε με το MolProbity, παρουσιάζοντας ελάχιστα κατάλοιπα σε μη επιτρεπτές θέσεις του διαγράμματος Ramachandran και καθόλου στερεοχημικές παρεμποδίσεις. Έτσι, το μοντέλο του διμερούς της Μεταροδοψίνης I υποβλήθηκε σε αναλύσεις παράλληλα με τις κρυσταλλικές δομές του συνόλου δεδομένων.

2.3.2 Προτυποποίηση μέσω Ομολογίας

Για τις ανάγκες της διπλωματικής εργασίας, πραγματοποιήθηκαν μια σειρά από διαδικασίες προτυποποίησης μέσω ομολογίας. Αυτές περιελάμβαναν τη συμπλήρωση ελλειπών συντεταγμένων από τις κρυσταλλικές δομές του συνόλου δεδομένων, καθώς και τη δημιουργία θεωρητικών μοντέλων υποδοχέων με βάση υπάρχουσες κρυσταλλικές δομές. Στη δημιουργία των μοντέλων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα ομολογίας προτυποποίησης MODELLER v. 9.14 (Eswar *et al.*, 2001). Το MODELLER πραγματοποιεί προτυποποιήσεις μέσω ομολογίας εφαρμόζοντας μια τεχνική εμπνευσμένη από τον Πυρηνικό Μαγνητικό Συντονισμό (NMR) γνωστή ως ικανοποίηση χωρικών περιορισμών (Satisfaction of Spatial Restraints), σύμφωνα με την οποία ένα σύνολο γεωμετρικών κριτηρίων χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία μιας συνάρτησης πυκνότητας (Probability Density Function, PDF) που θα καθορίσει τη θέση κάθε ατόμου στο μοντέλο με βάση τη δομή – πρότυπο. Επιπρόσθετα, το πρόγραμμα περιλαμβάνει ρουτίνες ελαχιστοποίησης ενέργειας και μοριακής δυναμικής, μέσω των οποίων μπορεί να γίνει βελτιστοποίηση των αποτελεσμάτων. Εκτός από το πρότυπο με βάση το οποίο θα κατασκευαστεί το μοντέλο, το MODELLER απαιτεί επιπρόσθετα μια στοίχιση αλληλουχιών ανάμεσα στην αμινοξική ακολουθία της δομής – προτύπου και την αλληλουχία – στόχο. Η χρήση του προγράμματος πραγματοποιείται μέσω της συγγραφής προγραμμάτων στη γλώσσα Python, καθώς το MODELLER είναι ουσιαστικά μια συλλογή κλάσεων και αντικειμένων που υλοποιούν τις μεθόδους προτυποποίησης σαν λειτουργίες της Python (Eswar *et al.*, 2001).

Για κάθε δομή του συνόλου δεδομένων στην οποία απουσίαζαν σημαντικά τμήματα των υποδοχέων, όπως οι ενδοκυτταρικοί ή εξωκυτταρικοί βρόχοι, συντεταγμένες για τις συγκεκριμένες περιοχές δημιουργήθηκαν χρησιμοποιώντας τη ρουτίνα LoopModel του MODELLER για την προτυποποίηση βρόχων. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε θέτοντας

στερεοδιαταξικούς περιορισμούς, οι οποίοι διατήρησαν τις υπάρχουσες συντεταγμένες των δομών ακίνητες, αφήνοντας μόνο τις νεοσυντιθέμενες περιοχές ελεύθερες να κινηθούν. Έτσι, τα δομικά χαρακτηριστικά των αρχικών κρυσταλλικών δομών παρέμειναν αμετάβλητα. Τα μοντέλα υποδοχέων που δημιουργήθηκαν κατασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας τη ρουτίνα Automodel του προγράμματος και περιελάμβαναν μοντέλα ενεργοποιημένων υποδοχέων για τους υποδοχείς $\beta 1AR$ και μOR , καθώς και ένα μοντέλο για τον υποδοχέα μOR του ανθρώπου το οποίο χρησιμοποιήθηκε σε δοκιμασίες αγκυροβόλησης, όπως περιγράφεται στην επόμενη Ενότητα. Ως πρότυπο για τα μοντέλα των ενεργοποιημένων υποδοχέων χρησιμοποιήθηκε η δομή του ενεργού $\beta 2AR$ από το σύμπλοκο $\beta 2AR - GaG\beta\gamma$ (PDB: 3SN6), ενώ για το μοντέλο του ανθρώπινου μOR χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο η δομή του μOR του ποντικού (PDB: 4DKL). Κάθε ένα από τα μοντέλα που δημιουργήθηκαν υποβλήθηκε σε μια διαδικασία βελτιστοποίησης, χρησιμοποιώντας τη ρουτίνα βελτιστοποίησης μέσω προσομοίωσης ανόπτησης που περιλαμβάνεται στο MODELLER. Ακολούθως, τα μοντέλα υποβλήθηκαν σε σύντομη ελαχιστοποίηση ενέργειας, χρησιμοποιώντας το NAMD και το πεδίο δυνάμεων CHARMM27.

2.3.3 Δημιουργία ετεροδιμερούς των οπιοειδών υποδοχέων $\delta OR - \mu OR$

Παράλληλα με τη μελέτη των κρυσταλλικών δομών των ομοδιμερών GPCRs, επιχειρήθηκε και η δημιουργία μοντέλων για ετεροδιμερή GPCRs, προκειμένου να μελετηθούν οι πιθανές ομοιότητες και διαφορές τους με τα ομοδιμερή, τόσο ως προς τις αλληλεπιδράσεις όσο και ως προς τη δυναμική συμπεριφορά τους. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε η δημιουργία ετεροδιμερών για τους οπιοειδείς υποδοχείς δ και μ , των οποίων η συμμετοχή σε ετεροδιμερή με λειτουργική σημασία έχει δειχθεί επανειλημμένα με πειραματικές διαδικασίες. Για την αγκυροβόληση πρωτεϊνών – πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του HADDOCK (High Ambiguity Data-driven Docking). Το HADDOCK είναι μια κατευθυνόμενη από δεδομένα μέθοδος αγκυροβόλησης μεταξύ πρωτεϊνών που αξιοποιεί δομικές πληροφορίες (Ambiguous Interactions Restraints, AIRs), προερχόμενες από διάφορες βιοχημικές ή / και υπολογιστικές μελέτες, για να κατευθύνει την πορεία της αγκυροβόλησης (de Vries *et al.*, 2007; Dominguez *et al.*, 2003).

Το πρωτόκολλο αγκυροβόλησης του HADDOCK αποτελείται από τρία στάδια: ελαχιστοποίηση ενέργειας των στατικών (rigid body) δομών με βάση τους υπολογισμένους περιορισμούς, ημι-ευέλικτη βελτιστοποίηση των διέδρων γωνιών σε συνθήκες κενού και μια τελική προσομοίωση ανόπτησης σε συνθήκες διαλύτη. Οι ενεργειακοί υπολογισμοί και οι προσομοιώσεις εκτελούνται μέσω του Crystallographic & NMR System (CNS) v. 1.2 (Brunger, 2007; Brunger *et al.*, 1998), χρησιμοποιώντας το πεδίο δυνάμεων OPLS (Jorgensen and Tirado-Rives, 1988). Οι μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις υπολογίζονται στα όρια 6.5 – 8.5 Å, χρησιμοποιώντας συναρτήσεις μετασχηματισμού για το δυναμικό Lennard – Jones και το ηλεκτροστατικό δυναμικό. Το τελικό αποτέλεσμα του HADDOCK περιλαμβάνει το σύνολο των προβλεφθέντων συμπλόκων, ομαδοποιημένα σε clusters με βάση τη δομική ομοιότητά τους, ενώ κάθε cluster βαθμολογείται με ένα κριτήριο (HADDOCK Score), το οποίο προκύπτει σαν σταθμισμένο άθροισμα των τιμών της ενέργειας αλληλεπίδρασης για τις αλληλεπιδράσεις van der Waals (ΔG_{vdw}), τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις (ΔG_{ele}) και την επίδραση του διαλύτη (ΔG_{desolv}), της θαμμένης επιφάνειας (BSA) και των παραβιάσεων των αρχικών περιορισμών (AIRs) (de Vries *et al.*, 2007; Dominguez *et al.*, 2003).

Επιχειρήθηκε η δημιουργία μοντέλων διμερών δOR – μOR, έχοντας ως βάση τις παρατηρηθείσες αλληλεπιδράσεις στα αντίστοιχα ομοδιμερή των GPCRs. Ως γνωστά κατάλοιπα αλληλεπίδρασης επιλέχθηκαν κατάλοιπα τα οποία συμμετέχουν σε διαμοριακές επαφές στα αντίστοιχα διμερή του υποδοχέα μOR και παρουσιάζονται συντηρημένα στην υποοικογένεια των οπιοειδών υποδοχέων. Προκειμένου να επιτευχθεί όσο το δυνατόν πιο αμερόληπτο αποτέλεσμα, ο αριθμός των αρχικά γνωστών καταλοίπων περιορίστηκε στο ελάχιστο δυνατό, το οποίο, έπειτα από δοκιμές, βρέθηκε να είναι δύο αμινοξικά κατάλοιπα από κάθε πρωτομερές. Διμερή κατασκευάστηκαν για τους οπιοειδείς υποδοχείς του ανθρώπου. Χρησιμοποιήθηκε η δομή του ανθρώπινου υποδοχέα δOR (PDB: 4N6H), ενώ για τον ανθρώπινο υποδοχέα μOR δημιουργήθηκε χρησιμοποιήθηκε το ομόλογο μοντέλο που δημιουργήθηκε, όπως περιγράφηκε στην προηγούμενη Ενότητα.

Η διαδικασία αγκυροβόλησης πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας την έκδοση v. 2.2 του HADDOCK, μέσω του διαδικτυακού server (<http://haddock.org>) του προγράμματος (de Vries *et al.*, 2010). Επιλέχθηκε η υπηρεσία «Expert Interface», η οποία προσφέρει τη δυνατότητα για εφαρμογή εξειδικευμένων ρυθμίσεων κατά τη διαδικασία της αγκυροβόλησης.

Χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο του «Solvated Docking», το οποίο περιλαμβάνει τη χρήση μορίων διαλύτη σε όλα τα στάδια της αγκυροβόλησης παρά για το τελευταίο αποκλειστικά, και το οποίο έχει αποδειχθεί πως προσφέρει καλύτερα αποτελέσματα σε μεγάλο αριθμό περιπτώσεων (Kastritis *et al.*, 2012). Ο διαλύτης που χρησιμοποιείται τυπικά από το HADDOCK στους υπολογισμούς είναι το νερό, το οποίο όμως δημιουργεί προβλήματα στην περίπτωση των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών. Για την προσέγγιση της υδρόφοβης φύσης του μεμβρανικού περιβάλλοντος, το νερό αντικαταστάθηκε από τον απρωτικό διαλύτη διμεθυλ-σουλφοξείδιο (DMSO). Η κατάσταση πρωτονίωσης των καταλοίπων ιστιδίνης ορίστηκε αυτοματοποιημένα. Στις προσομοιώσεις εφαρμόστηκαν περιορισμοί αρμονικών δυναμικών ως προς το κέντρο μάζας των διάφορων ομάδων ατόμων αλλά και ως προς τις συντεταγμένες των επιφανειακών ατόμων, χρησιμοποιώντας σταθερά ελατηρίου 1.0 kcal/mol. Για την ομαδοποίηση (clustering) των αποτελεσμάτων στο τελικό στάδιο του HADDOCK, ορίστηκε τιμή κατωφλίου για το RMSD κάθε cluster στα 7.5 Å, ενώ συμπληρωματικά εφαρμόστηκε ο αλγόριθμος Chain – Agnostic Algorithm, ο οποίος επιτρέπει την αναγνώριση συμμετρικών συμπλόκων.

Στα τελικά αποτελέσματα εξετάστηκαν οι τέσσερις καλύτερες δομές κάθε cluster για την εύρεση συμπλόκων με την κατάλληλη γεωμετρία. Αναζητήθηκαν σύμπλοκα τα οποία παρουσίαζαν τα μονομερή των υποδοχέων σε παράλληλη διάταξη, με όσο το δυνατόν μικρότερη γωνία ανάμεσα στους κύριους άξονες κάθε αλυσίδας, και στα οποία η θέση των υποδοχέων σε σχέση με το (νοητό) επίπεδο της μεμβράνης είναι σε συμφωνία με τα γνωστά δεδομένα για τα διαμεμβρανικά τμήματα των υποδοχέων. Από τα αποτελέσματα επιλέχθηκε τελικά ένα σύμπλοκο, το οποίο παρουσίαζε διμερές TM1-TM2-H8 με την κατάλληλη γεωμετρία. Το διμερές υποβλήθηκε σε σύντομη ελαχιστοποίηση ενέργειας με το NAMD και το πεδίο CHARMM27.

Παρότι έγιναν προσπάθειες για τη δημιουργία μοντέλων διμερών TM4-TM5 και TM5-TM6, τα αποτελέσματα δεν διέθεταν την κατάλληλη γεωμετρία σε σχέση με την τοπολογία των υποδοχέων και το επίπεδο της μεμβράνης ώστε να γίνουν αποδεκτά. Τα παραπάνω σχετίζονται άμεσα με το γεγονός ότι το HADDOCK, όπως και οι περισσότερες μέθοδοι αγκυροβόλησης πρωτεϊνών – πρωτεϊνών γενικότερα, έχει σχεδιαστεί με βάση τις σφαιρικές υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες. Η επιλογή της χρήσης ενός διαφορετικού από το νερό διαλύτη για την προσομοίωση του υδρόφοβου μεμβρανικού περιβάλλοντος βελτιώνει ως ένα βαθμό την ποιότητα των

αποτελεσμάτων. Παρ'όλα αυτά, η χρήση της μεθόδου για δημιουργία συμπλόκων διαμεμβρανικών πρωτεϊνών παραμένει προβληματική.

2.3.4 Προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής τύπου Coarse – Grained σε Περιβάλλον Μεμβράνης

Μια σειρά από προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής τύπου Coarse – Grained (CG-MD) σχεδιάστηκαν και πραγματοποιήθηκαν για τα κρυσταλλογραφικά διμερή του συνόλου δεδομένων, καθώς και για το μοντέλο του ετεροδιμερούς δOR - μOR. Στις προσομοιώσεις χρησιμοποιήθηκε το Coarse – Grained πεδίο δυνάμεων MARTINI v. 2.1, καθώς και η επέκτασή του για τις προσομοιώσεις πρωτεϊνών (Marrink *et al.*, 2007; Monticelli *et al.*, 2008). Οι δομές των διμερών υποβλήθηκαν σε μια αρχική προεπεξεργασία, κατά την οποία αφαιρέθηκαν οι συντεταγμένες των υπομονάδων της λυσοζύμης του φάγου T4, καθώς και όλα τα ετεροάτομα. Εξαίρεση αποτέλεσαν τα διμερή των υποδοχέων mGluR1 και $\beta 2$, για τα οποία πραγματοποιήθηκαν προσομοιώσεις παρουσία των αρχικών μορίων χοληστερόλης. Οι βρόχοι που έλειπαν από τις δομές κατασκευάστηκαν μέσω του MODELLER, όπως αναφέρθηκε ήδη. Συντεταγμένες για τα άτομα υδρογόνου καθώς και για τυχόν άτομα που απουσίαζαν από τις δομές συμπληρώθηκαν μέσω του PSFGen στο VMD χρησιμοποιώντας την τοπολογία του CHARMM και τα τελικά διμερή υποβλήθηκαν σε σύντομη ελαχιστοποίηση ενέργειας.

Τα ελαχιστοποιημένα διμερή εισήχθησαν σε μια μεμβράνη αποτελούμενη από λιπίδια 1-παλμιτοϋλ-2-ολεϋλ-φωσφατιδυλοχολίνης (POPC), η οποία κατασκευάστηκε μέσω της επέκτασης Membrane Builder του VMD. Η διαδικασία εισαγωγής κάθε διμερούς πραγματοποιήθηκε αυτοματοποιημένα μέσω προγραμμάτων Tcl χρησιμοποιώντας το προγραμματιστικό περιβάλλον του VMD και περιελάμβανε την αρχική τοποθέτηση των πρωτεϊνών στο γεωμετρικό κέντρο της λιπιδικής διπλοστιβάδας, ακολουθούμενη από αφαίρεση των λιπιδίων και μορίων νερού που αλληλοεπικαλύπτονταν με τις συντεταγμένες των πρωτεϊνών, καθώς και μόρια λιπιδίων και νερού σε απόσταση 0.8 Å από τις πρωτεΐνες, προκειμένου να μην υπάρχουν στερεοχημικές παρεμποδίσεις ανάμεσα στα διμερή και το περιβάλλον. Ακολούθως, κάθε σύστημα μετατράπηκε από την αρχική ατομιστική μορφή του σε απεικόνιση Coarse – Grained,

χρησιμοποιώντας την επέκταση CG Builder του VMD και τη λειτουργία «Build RBCG Model», με βάση το σχήμα χαρτογράφησης του πεδίου MARTINI (Shih *et al.*, 2007a). Κατά τις προσομοιώσεις του MARTINI απαιτείται η πληροφορία της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών, σύμφωνα με την οποία το πεδίο υπολογίζει τη γεωμετρία των απεικονίσεων CG. Αυτή η πληροφορία υπολογίστηκε για κάθε μοντέλο χρησιμοποιώντας το DSSP (Kabsch and Sander, 1983), ακολουθούμενο από προσεκτική παρατήρηση για τη διόρθωση τυχόν σφαλμάτων.

Το τυπικό μοντέλο του MARTINI για το νερό χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή δύο στρωμάτων διαλύτη εκατέρωθεν της μεμβράνης χρησιμοποιώντας την επέκταση Solvate του VMD, ενώ ιόντα NaCl χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία ουδέτερου pH μέσω μιας τροποποιημένης έκδοσης της επέκτασης Autoionize. Σύμφωνα με επανειλημμένες παρατηρήσεις από προηγούμενες εργασίες, το νερό τύπου Coarse – Grained συχνά παρατηρείται να «παγώνει» κατά την προσομοίωση για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Αυτό οφείλεται στον τρόπο με τον οποίο τα πεδία δυνάμεων διαχειρίζονται τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ατόμων νερού, για το οποίο δεν έχει βρεθεί μέχρι στιγμής κάποια ικανοποιητική λύση. Για την αποφυγή αυτού του προβλήματος, στις προσομοιώσεις του MARTINI εφαρμόζεται η μέθοδος της χρήσης «αντιψυκτικών» σωματιδίων, σε αντιστοιχία με την ανάλογη πειραματική χρήση αντιψυκτικού σε βιοχημικά πειράματα. Πρόκειται για CG μόρια νερού με ελαφρώς μεγαλύτερη ακτίνα van der Waals, τα οποία εμποδίζουν τη δημιουργία συσσωματωμάτων «παγωμένου» νερού (Marrink *et al.*, 2007). Ο τελικός διαλύτης που προκύπτει αποτελείται κατά 90% από τυπικό νερό και κατά 10% από αντιψυκτικά σωματίδια.

Τα τελικά συστήματα CG υποβλήθηκαν σε προσομοιώσεις με το NAMD v. 2.10, χρησιμοποιώντας την υλοποίησή του για το MARTINI και τους ανάλογους κανόνες προσομοίωσης (Marrink *et al.*, 2007; Monticelli *et al.*, 2008; Periole and Marrink, 2013). Οι παραπάνω περιλαμβάνουν την εφαρμογή μιας συνάρτησης μετασχηματισμού μεταξύ 9.0 και 12.0 Å για τις αλληλεπιδράσεις van der Waals, ενώ για τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις οι υπολογισμοί γίνονται εφαρμόζοντας μια συνάρτηση μετασχηματισμού μεταξύ 0 και 12.0 Å στο νόμο του Coulomb. Η διηλεκτρική σταθερά τίθεται στην τιμή 15. Τέλος, για τον υπολογισμό των γωνιών στους ομοιοπολικούς δεσμούς χρησιμοποιείται μια ειδική συνάρτηση δυναμικού του MARTINI, η οποία βασίζεται στο συνημίτονο των γωνιών. Το παραπάνω πρωτόκολλο

προσομοίωσης θεωρείται «τυπικό» για τις προσομοιώσεις διαμεμβρανικών πρωτεϊνών με το πεδίο MARTINI και έχει εφαρμοστεί σε μεγάλο εύρος συστημάτων, ανάμεσα στα οποία συμπεριλαμβάνονται και αρκετοί GPCRs (Johnston *et al.*, 2012; Johnston *et al.*, 2011; Periole *et al.*, 2007; Periole *et al.*, 2012). Οι προσομοιώσεις πραγματοποιήθηκαν σε ισόθερμες – ισοβαρείς συνθήκες (NPT Ensemble), χρησιμοποιώντας συνθήκες ορίων περιοδικότητας (Periodic Boundary Conditions). Η θερμοκρασία ορίστηκε στους 310 K και διατηρήθηκε μέσω δυναμικής Langevin, με σταθερά απόσβεσης 1 ps^{-1} . Η πίεση διατηρήθηκε στη 1 atm (1.01325 bar) χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Nosé – Hoover Langevin Piston, με περίοδο ταλάντωσης 2000 fs και κλίμακα απόσβεσης φθοράς 1000 fs. Η προσομοίωση κάθε συστήματος περιελάμβανε ένα αρχικό βήμα ελαχιστοποίησης ενέργειας για 1000 βήματα, ακολουθούμενο από 4 ns εξισορρόπησης κατά η κίνηση των πρωτεϊνικών ατόμων περιορίστηκε, εφαρμόζοντας δύναμη με σταθερά ελατηρίου $2 \text{ kcal/mol/\AA}^2$, προκειμένου να εξισορροπηθεί πλήρως το μεμβρανικό περιβάλλον γύρω από τα διμερή και τα μόρια των λιπιδίων να πακεταριστούν σωστά, προσομοιάζοντας το ρευστό περιβάλλον της μεμβράνης. Έπειτα ακολούθησαν 4 ns εξισορρόπησης με τις πρωτεΐνες ελεύθερες. Τα παραπάνω στάδια εκτελέστηκαν με χρόνο βήματος (timestep) 10 fs. Ακολούθως, κάθε σύστημα προσομοιώθηκε για συνολικό χρόνο 400 ns, χρησιμοποιώντας χρόνο βήματος 20 fs.

2.3.5 Ανακατασκευή Ατομικών Μοντέλων από Αποτελέσματα Προσομοιώσεων Coarse – Grained

Προκειμένου να μελετηθούν με λεπτομέρεια τα αποτελέσματα των προσομοιώσεων, επιχειρήθηκε η ανακατασκευή μοντέλων σε ατομική λεπτομέρεια από τις απεικονίσεις Coarse – Grained. Στη διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν οι συντεταγμένες των CG πρωτεϊνών από το στιγμιότυπο του τελευταίου nanosecond κάθε μη μεροληπτικής προσομοίωσης με την ελάχιστη δυνατή ενέργεια. Η αρχική ανακατασκευή πραγματοποιήθηκε με τη λειτουργία «Reverse RBCG Model» της επέκτασης CG Builder του VMD (Shih *et al.*, 2007b). Η διαδικασία περιελάμβανε την τοποθέτηση κάθε ομάδας ατόμων στην αντίστοιχη θέση με τη σφαίρα CG που την αντιπροσώπευε, με τέτοιο τρόπο ώστε το κέντρο μάζας κάθε ομάδας ατόμων να ταυτίζεται με το κέντρο μάζας της αντίστοιχης σφαίρας του MARTINI. Τα νέα συστήματα υποβλήθηκαν σε

εκτεταμένη ελαχιστοποίηση ενέργειας ακολουθούμενη από μια προσομοίωση ανόπτησης, κατά την οποία τα κέντρα μάζας των ομάδων ατόμων περιορίζονταν στις θέσεις των αντίστοιχων σφαιρών. Κάθε σύστημα υποβλήθηκε σε 5000 βήματα ελαχιστοποίησης ενέργειας Conjugate Gradient. Ακολούθως, το σύστημα θερμάνθηκε ως τους 610 K και αφέθηκε να ψυχθεί σταδιακά ως τους 300 K για 19 ps, ακολουθούμενα από μια τελική ελαχιστοποίηση ενέργειας για 1000 βήματα. Αυτή η διαδικασία επιτρέπει τη χαλάρωση των δεσμών με αφύσικη γεωμετρία, διατηρώντας παράλληλα τη συνολική δομή των προσομοιούμενων συστημάτων (Shih *et al.*, 2007b).

Τα μοντέλα, στη συνέχεια, ελέγχθηκαν ως προς τη γεωμετρία των δομών για την ύπαρξη *cis* πεπτιδίων και λαθών χειρικότητας και, σε περιπτώσεις που αυτά εντοπίστηκαν, οι συντεταγμένες διορθώθηκαν μέσω του VMD και ακολούθησε ελαχιστοποίηση ενέργειας. Σε κάποιες περιπτώσεις τα προηγούμενα βήματα βελτιστοποιήσεων δεν κατάφεραν να επαναφέρουν πλήρως τη γεωμετρία των ελικοειδών δομών. Για τη διόρθωση αυτών των σφαλμάτων, όπου κρίθηκε απαραίτητο, εφαρμόστηκαν τοπικές προσομοιώσεις μέσω των οποίων τα άτομα της κεντρικής αλυσίδας καθοδηγήθηκαν προς την αρχική δευτεροταγή δομή τους, χρησιμοποιώντας σύντομες (0.5 – 1.5 ns) προσομοιώσεις Καθοδηγούμενης Μοριακής Δυναμικής, εφαρμόζοντας δυνάμεις με σταθερά ελατηρίου 200 kcal/mol/Å².

Τελικό στάδιο στην ανακατασκευή των μοντέλων αποτέλεσε η βελτιστοποίησή τους σε μεμβρανικό περιβάλλον ατομικής λεπτομέρειας. Για το σκοπό αυτό κατασκευάστηκε αρχικά ένα σύστημα μεμβράνης και διαλύτη διαστάσεων 120x120x100 Å, αποτελούμενο από λιπίδια POPC, μόρια νερού και ιόντα NaCl. Η μεμβράνη υποβλήθηκε σε ελαχιστοποίηση ενέργειας, ακολουθούμενη από προσομοίωση εξισορρόπησης για συνολικό χρόνο 4 ns, στο τέλος της οποίας τα λιπίδια είχαν υιοθετήσει χαρακτηριστικά αντίστοιχα της ρευστής φύσης των βιολογικών μεμβρανών. Η προεξισορροπημένη μεμβράνη χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια για την ενσωμάτωση των μοντέλων, ακολουθώντας τη μεθοδολογία που αναπυχθηκε στην Ενότητα 2.3.4. Πραγματοποιήθηκε ελαχιστοποίηση ενέργειας για 1000 βήματα, ακολουθούμενη από 20 ps εξισορρόπησης με τα άτομα των πρωτεϊνών περιορισμένα, εφαρμόζοντας δύναμη με σταθερά ελατηρίου 2 kcal/mol/Å², προκειμένου να εξισορροπηθεί πλήρως το μεμβρανικό περιβάλλον γύρω από τα διμερή. Τα εξισορροπημένα συστήματα, τέλος, υποβλήθηκαν σε μια

δεύτερη προσομοίωση ανόπτησης, χωρίς κανένα περιορισμό, ακολουθώντας τις ίδιες συνθήκες με τις αντίστοιχες προσομοιώσεις κενού.

Όλες οι προσομοιώσεις βελτιστοποίησης πραγματοποιήθηκαν με το NAMD και τα πεδία δυνάμεων CHARMM27 και CHARMM36 (Huang and MacKerell, 2013; Lim *et al.*, 2012; Pastor and Mackerell, 2011). Ο έλεγχος της θερμοκρασίας στις προσομοιώσεις ανόπτησης πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τον περιοδικό αλγόριθμο του NAMD. Οι προσομοιώσεις εξισορρόπησης πραγματοποιήθηκαν σε συνθήκες ισόθερμης – ισοβαρούς ισορροπίας (NPT), χρησιμοποιώντας συνθήκες ορίων περιοδικότητας και τις τυπικές παραμέτρους των προσομοιώσεων με το πεδίο CHARMM. Η θερμοκρασία ορίστηκε στους 310 K και διατηρήθηκε μέσω δυναμικής Langevin, με σταθερά απόσβεσης 1 ps^{-1} . Η πίεση διατηρήθηκε στη 1 atm χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Nosé – Hoover Langevin Piston, με περίοδο ταλάντωσης 100 fs και κλίμακα απόσβεσης φθοράς 50 fs. Οι υπολογισμοί των ασθενών αλληλεπιδράσεων μικρής εμβέλειας πραγματοποιήθηκαν στα όρια 10-12 Å ανά 1 βήμα, ενώ για τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεγάλης εμβέλειας χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Particle Mesh Ewald ανά 2 βήματα, ορίζοντας σαν διαστάσεις πλέγματος τις πραγματικές διαστάσεις της εκάστοτε περιοδικής μονάδας, επεκτεινόμενες κατά 1.0 Å. Η απόδοση της διαδικασίας βελτιστοποίησης και η τελική ποιότητα των μοντέλων αξιολογήθηκαν με το MolProbity.

2.4 Ανάλυση Δομών και Αποτελεσμάτων Μοριακής Δυναμικής

Στις ενότητες που ακολουθούν περιγράφονται οι μέθοδοι ανάλυσης και αξιολόγησης που εφαρμόστηκαν στη μελέτη των κρυσταλλικών δομών του συνόλου δεδομένων καθώς και στην ανάλυση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων των προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής.

2.4.1 Γεωμετρική Ανάλυση Αποτελεσμάτων Προσομοιώσεων

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων περιελάμβανε τον υπολογισμό του μέτρου Root Mean Square Deviation (RMSD). Το RMSD δύο στοιχισμένων δομών αποτελεί μέτρο της μέσης απόκλισης μεταξύ των ατόμων, συνήθως των κεντρικών ατόμων άνθρακα Ca, και υπολογίζεται σύμφωνα με την εξίσωση

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum (x_i - x_j)^2 + (y_i - y_j)^2 + (z_i - z_j)^2}$$

όπου i και j είναι τα άτομα που στοιχίζονται και N ο αριθμός των στοιχισμένων ατόμων. Κατά την ανάλυση των αποτελεσμάτων μοριακής δυναμικής, η μέτρηση και απεικόνιση του RMSD σε διάγραμμα στη μονάδα του χρόνου μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση και αξιολόγηση της πορείας μιας προσομοίωσης, την εκτίμηση του βαθμού στον οποίο μεταβάλλονται οι πρωτεΐνες αλλά και την εύρεση του χρόνου σύγκλισης.

Ένα δεύτερο κριτήριο αξιολόγησης που χρησιμοποιήθηκε στις αναλύσεις ήταν το Root Mean Square Fluctuation (RMSF). Το RMSF, όπως και το RMSD, μετρά την απόκλιση των ατόμων από μια θέση αναφοράς, ωστόσο η απόκλιση μετράται για κάθε άτομο ξεχωριστά στο σύνολο του χρόνου σύμφωνα με την εξίσωση

$$RMSF = \sqrt{\frac{1}{T} \sum (x_i(t_j) - x_i)^2 + (y_i(t_j) - y_i)^2 + (z_i(t_j) - z_i)^2}$$

όπου t_j είναι το στιγμιότυπο στο οποίο γίνονται μετρήσεις για το άτομο i και T είναι ο συνολικός χρόνος της προσομοίωσης. Έτσι, το RMSF ουσιαστικά αποτελεί μέτρο της κινητικότητας του κάθε ατόμου στη διάρκεια της προσομοίωσης.

Στη μελέτη των προσομοιώσεων πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις RMSD με τις συντεταγμένες της κεντρικής αλυσίδας των πρωτεϊνών (των ατόμων Ca για τις ατομιστικές προσομοιώσεις και των σωματιδίων BAS για τις προσομοιώσεις MARTINI), τόσο για το συνολικό σύστημα όσο και για κάθε πρωτεϊνική αλυσίδα ξεχωριστά αλλά και για τα στοιχεία αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στα μονομερή, έχοντας ως θέση αναφοράς τις αρχικές συντεταγμένες των πρωτεϊνικών αλυσίδων. Για την ανάλυση των προσομοιώσεων MDFF υπολογίστηκε επίσης η μεταβολή του συντελεστή διασυσχέτισης (Cross – Correlation Coefficient, CCC), μέσω του οποίου μελετήθηκε το σταδιακό ταίριασμα των ατομικών συντεταγμένων στους χάρτες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, σύμφωνα με την εξίσωση

$$\rho_{SE} = \frac{\langle (S - \langle S \rangle)(E - \langle E \rangle) \rangle}{\sigma_S \sigma_E}$$

όπου S και E είναι οι μέσες τιμές θέσεων του προσομοιούμενου συστήματος και του χάρτη ηλεκτρονικής πυκνότητας, αντίστοιχα, και σ_S , σ_E είναι οι τυπικές αποκλίσεις τους. Τέλος, μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν για τη μεταβολή στην απόσταση ανάμεσα στα γεωμετρικά κέντρα των μονομερών του κάθε διμερούς, τη γωνία των πρωτεϊνικών αλυσίδων μεταξύ τους καθώς και με το επίπεδο της μεμβράνης και την κινητικότητα των λιπιδίων. Όλοι οι υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τα εργαλεία ανάλυσης του VMD, το πρόγραμμα μοριακών γραφικών PyMOL, καθώς και το πρόγραμμα ανάλυσης αποτελεσμάτων μοριακής δυναμικής Carma Trajectory Analysis v. 1.4 (Glykos, 2006).

2.4.2 Ανάλυση και Ταξινόμηση Βιομοριακών Αλληλεπιδράσεων

Πραγματοποιήθηκε ανάλυση των βιομοριακών αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στα μονομερή των πρωτεϊνών καθώς και ανάμεσα σε πρωτεΐνες και μικρά μόρια, τόσο για τις αρχικές κρυσταλλικές δομές όσο και για τα αποτελέσματα των προσομοιώσεων Coarse – Grained αλλά

και για τα τελικά ατομικά μοντέλα. Οι μετρήσεις περιελάμβαναν την ανάλυση και αξιολόγηση της επιφάνειας αλληλεπίδρασης των αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών – πρωτεϊνών, την εύρεση υπερμοριακών επαφών συγκεκριμένων τύπων και τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στις πρωτεΐνες και το περιβάλλον τους.

Οι αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών – πρωτεϊνών μελετήθηκαν και αξιολογήθηκαν μέσω εκτίμησης της αλλαγής στην προσβάσιμη στο περιβάλλον επιφάνεια των πρωτεϊνών (Accessible Surface Area, ASA) γνωστής και ως θαμμένης επιφάνειας (Buried Surface Area). Ως ASA ορίζεται η περιοχή που διαγράφεται από το κέντρο μιας διεισδύουσας σφαίρας που αντιπροσωπεύει ένα μόριο διαλύτη, καθώς αυτό κυλάει πάνω στην επιφάνεια του μελετούμενου μορίου . Ένα άτομο ή μια ομάδα ατόμων ενός μορίου, χαρακτηρίζεται ως προσβάσιμο όταν ένα μόριο διαλύτη με συγκεκριμένο μέγεθος μπορεί να σχηματίσει επαφή van der Waals με αυτό. Ως προσβάσιμη επιφάνεια αυτού του ατόμου (A) ορίζεται η περιοχή στην επιφάνεια μιας σφαίρας ακτίνας R, σε κάθε σημείο της οποίας το κέντρο ενός μορίου διαλύτη μπορεί να έρθει σε επαφή με αυτό το άτομο, χωρίς να συγκρούεται με άλλα άτομα του μορίου. Η ακτίνα R δίνεται από το άθροισμα της ακτίνας van der Waals του ατόμου και της ακτίνας του επιλεγμένου μορίου του διαλύτη. Ως διαλύτης συνήθως επιλέγεται το νερό, με ακτίνα μορίου περίπου 1.4 Å (Lee and Richards, 1971). Η θαμμένη επιφάνεια για κάθε διμερές ορίστηκε ως η διαφορά των τιμών ASA ανάμεσα στο πρωτεϊνικό σύμπλοκο και τα απομονωμένα μονομερή, σύμφωνα με τον τύπο

$$BSA_{AB} = ASA_{AB} - ASA_A - ASA_B$$

όπου AB είναι το σύμπλοκο των αλυσίδων A και B.

Η εύρεση των καταλοίπων αλληλεπίδρασης στη θαμμένη επιφάνεια πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ένα κριτήριο σχετικής προσβάσιμης επιφάνειας (Relative Surface Area, RSA). Η τιμή RSA κάθε καταλοίπου i ορίζεται ως η τιμή της απόλυτης τιμής ASA αυτού του καταλοίπου, κανονικοποιημένη με τη μέγιστη δυνατή επιφάνεια που μπορεί να λάβει το συγκεκριμένο κατάλοιπο, σύμφωνα με τον τύπο

$$RSA_i = \frac{ASA_i}{Max . ASA_i} \cdot 100$$

όπου οι τιμές της μέγιστης προσβάσιμης επιφάνειας ορίζονται με βάση μετρήσεις που έχουν πραγματοποιηθεί για καθένα από τα 20 αμινοξικά κατάλοιπα σε εκτεταμένα τριπεπτίδια Gly-x-Gly (Chothia, 1976; Miller *et al.*, 1987). Οι τιμές παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.4.

Πίνακας 2.4 Οι τιμές της μέγιστης προσβάσιμης επιφάνειας κάθε αμινοξικού καταλοίπου, όπως προκύπτουν από μετρήσεις σε εκτεταμένα τριπεπτίδια Gly-x-Gly (Προσαρμογή από (Chothia, 1976; Miller *et al.*, 1987)).

Αμινοξύ	Max. ASA	Αμινοξύ	Max. ASA
Phe	210	Tyr	230
Ile	175	Thr	140
Leu	170	Ser	115
Val	155	Gln	180
Pro	145	Asn	160
Ala	115	Glu	190
Gly	75	Asp	150
Met	185	His	195
Cys	135	Lys	200
Trp	255	Arg	225

Τιμές RSA υπολογίζονται για κάθε κατάλοιπο τόσο στο σύμπλοκο όσο και στις απομονωμένες πρωτεϊνικές αλυσίδες. Ως αλληλεπιδρώντα αναγνωρίζονται τα κατάλοιπα με $\Delta\text{RSA} > 0\%$ κατά το σχηματισμό του συμπλόκου. Έχοντας προσδιορίσει τα αλληλεπιδρώντα κατάλοιπα σε κάθε σύμπλοκο, προχωρήσαμε στη συνέχεια στην αξιολόγηση και κατηγοριοποίησή τους, με βάση τόσο τις ιδιότητές τους όσο και τη θέση τους στη θαμμένη επιφάνεια. Ως προς τις ιδιότητές τους, τα κατάλοιπα χωρίστηκαν σε θετικά (R, K, H) και αρνητικά φορτισμένα (D, E), αφόρτιστα πολικά (S, T, N, Q, C), αλειφατικά (G, A, L, I, V, M), αρωματικά (F, Y, W) και κατάλοιπα προλίνης (P). Για την ταξινόμηση των καταλοίπων ως προς τη θέση τους στη θαμμένη επιφάνεια χρησιμοποιήθηκε η κατηγοριοποίηση του Levy (Levy, 2010), η οποία κατατάσσει τα κατάλοιπα με βάση τις τιμές RSA ως στοιχεία του πυρήνα ή της περιφέρειας της θαμμένης επιφάνειας. Κατάλοιπα με τιμή $\text{RSA} > 25\%$ στις ελεύθερες πρωτεΐνες και $\text{RSA} < 25\%$ στο σύμπλοκο κατατάσσονται στον πυρήνα των αλληλεπιδράσεων. Κατάλοιπα με τιμή $\text{RSA} < 25\%$ τόσο στο σύμπλοκο όσο και στις ελεύθερες υπομονάδες χαρακτηρίζονται ως υποστηρικτικά, ενώ κατάλοιπα με $\text{RSA} > 25\%$ και στις δύο καταστάσεις ταξινομούνται στην περιφέρεια της

επιφάνειας αλληλεπίδρασης (Levy, 2010). Τα κατάλοιπα του πυρήνα θεωρούνται πως είναι τα πιο σημαντικά στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών. Όλοι οι υπολογισμοί επιφανειών πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο υπολογισμού της προσβάσιμης στο διαλύτη επιφάνειας του DSSP (Kabsch and Sander, 1983), χρησιμοποιώντας ως διαλύτη το νερό (ακτίνα 1.4 Å). Η διαδικασία εντοπισμού και ταξινόμησης των αλληλεπιδρώντων καταλοίπων πραγματοποιήθηκε αυτοματοποιημένα, μέσω προγράμματος γραμμένου σε Python.

Επιπρόσθετη ανάλυση των αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών – πρωτεϊνών περιελάμβανε μετρήσεις για την εύρεση διαμοριακών δεσμών υδρογόνου, καθώς και την αναζήτηση αλληλεπιδράσεων πακεταρίσματος (stacking) στις οποίες συμμετέχουν κατάλοιπα με π-ηλεκτρόνια (F, Y, W και H), συγκεκριμένα αλληλεπιδράσεις αρωματικών δακτυλίων (π-stacking), αρωματικών δακτυλίων – δακτυλίων προλίνης (π-Pro stacking) και αρωματικών δακτυλίων – αμινομάδων (π-cation stacking). Οι δεσμοί υδρογόνου υπολογίστηκαν μέσω του αλγορίθμου HBPLUS που περιλαμβάνεται στο πρόγραμμα ανάλυσης αλληλεπιδράσεων LigPlot+ v. 1.45, χρησιμοποιώντας τα τυπικά κριτήρια εύρεσης υδρογονικών δεσμών. Αυτά περιλαμβάνουν απόσταση δότη και δέκτη υδρογόνου μικρότερη από 3.7 Å, απόσταση υδρογόνου – δέκτη μικρότερη ή ίση από 2.5 Å και γωνία δότη – υδρογόνου – δέκτη μικρότερη από 120°. Για τον προσδιορισμό των αλληλεπιδράσεων των π-ηλεκτρονίων χρησιμοποιήθηκαν τα κριτήρια αναγνώρισης που ορίζονται από τις εργασίες των McGaughey *et al* και Burley & Petsko (Burley and Petsko, 1986; McGaughey *et al.*, 1998). Συγκεκριμένα, ως αλληλεπιδράσεις π-stacking και π-Pro stacking ορίστηκαν οι επαφές ανάμεσα σε κατάλοιπα με δακτύλιο στην πλευρική αλυσίδα ή/και κατάλοιπα προλίνης, στα οποία η απόσταση του γεωμετρικού κέντρου των πλευρικών αλυσίδων είναι μικρότερη από 7.5 Å και η μικρότερη απόσταση ανάμεσα στα άτομά τους είναι μικρότερη από 4.5 Å (McGaughey *et al.*, 1998), ενώ ως αλληλεπιδράσεις π-cation ορίστηκαν οι επαφές δακτυλίων – αμινομάδων των πλευρικών ομάδων των καταλοίπων N, Q, R, K, H στις οποίες η απόσταση ανάμεσα στο γεωμετρικό κέντρο του δακτυλίου και την αμινομάδα είναι ανάμεσα σε 3.4 και 6.0 Å (Burley and Petsko, 1986). Οι μετρήσεις των αλληλεπιδράσεων π-ηλεκτρονίων πραγματοποιήθηκαν αυτοματοποιημένα μέσω προγράμματος γραμμένου σε Python, το οποίο λειτουργεί αξιοποιώντας τις εσωτερικές λειτουργίες του PyMOL.

Οι αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών – ετεροατόμων εντοπίστηκαν και μελετήθηκαν με το πρόγραμμα LigPlot+. Τέλος, ανάλυση αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών – πρωτεϊνών

πραγματοποιήθηκε και στην ανάλυση των αποτελεσμάτων των προσομοιώσεων CG-MD, χρησιμοποιώντας το VMD και εφαρμόζοντας κατάλληλα κριτήρια αποστάσεων σε συμφωνία με τη φύση του πεδίου δυνάμεων MARTINI. Ως αλληλεπιδρώντα κατηγοριοποιήθηκαν τα αμινοξικά κατάλοιπα στα οποία η απόσταση ανάμεσα στα σφαιρίδια της κεντρικής αλυσίδας (BAS) ήταν μικρότερη από 7.5 Å ή/και η απόσταση των σφαιριδίων των πλευρικών αλυσίδων ήταν μικρότερη από 5.0 Å. Ανάλογα κριτήρια εφαρμόστηκαν για την εύρεση αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στις πρωτεΐνες και τα στοιχεία της λιπιδικής διπλοστιβάδας (Marrink *et al.*, 2007; Monticelli *et al.*, 2008).

2.4.3 Υπολογιστική Μεταλλαξιγένεση Αλανίνης

Μια σειρά από πιθανά σημεία ενδιαφέροντος (hot spots) στην επιφάνεια αλληλεπίδρασης μεταξύ των μονομερών κάθε διμερούς εντοπίστηκαν μέσω προσομοιώσεων Υπολογιστικής Μεταλλαξιγένεσης Αλανίνης (Computational Alanine Scanning). Πρόκειται για μια μέθοδο ενεργειακών υπολογισμών η οποία βασίζεται στην αντίστοιχη πειραματική διαδικασία της μεταλλαξιγένεσης αλανίνης (Alanine Scanning Mutagenesis). Η μεταλλαξιγένεση αλανίνης χρησιμοποιείται συχνά στη Μοριακή Βιολογία για τον προσδιορισμό της συνεισφοράς ενός συγκεκριμένου καταλοίπου στη σταθερότητα ή τη λειτουργία μιας πρωτεΐνης. Η διαδικασία περιλαμβάνει τη σύνθεση πολυπεπτιδικών αλυσίδων στις οποίες κάθε κατάλοιπο αντικαθίσταται διαδοχικά από αλανίνη. Η αλανίνη επιλέγεται για την αντικατάσταση καθώς έχει μικρή πλευρική αλυσίδα η οποία, παρ'όλα αυτά, μπορεί να μιμηθεί τις προτιμήσεις των άλλων καταλοίπων ως προς τη δευτεροταγή δομή. Ακολουθώντας, οι διαφορές ανάμεσα στην πρωτεΐνη φυσικού τύπου και κάθε μεταλλαγμένη, που προκύπτουν ως αποτέλεσμα της αντικατάστασης του κάθε καταλοίπου με αλανίνη, μπορούν να μελετηθούν με διάφορες μεθόδους, όπως φασματοσκοπία υπερερύθρου ή Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (Guerois *et al.*, 2002).

Η υπολογιστική μεταλλαξιγένεση αλανίνης επιχειρεί να μιμηθεί την πειραματική διαδικασία, προκειμένου να προβλέψει πιθανά κατάλοιπα – θέσεις ενδιαφέροντος πάνω στην επιφάνεια αλληλεπίδρασης ενός πρωτεϊνικού συμπλόκου. Η διαδικασία που ακολουθείται περιλαμβάνει τη διαδοχική αντικατάσταση κάθε καταλοίπου της επιφάνειας αλληλεπίδρασης με αλανίνη (εκτός από την ίδια την αλανίνη και τη γλυκίνη), ακολουθούμενη από υπολογισμό

της εκτιμώμενης διαφοράς στην ενέργεια αλληλεπίδρασης, σαν αποτέλεσμα της μεταλλαγής (ΔG). Τα κατάλοιπα με τη μεγαλύτερη τιμή ΔG θεωρείται πως αποτελούν σημεία ενδιαφέροντος για τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των βιομορίων.

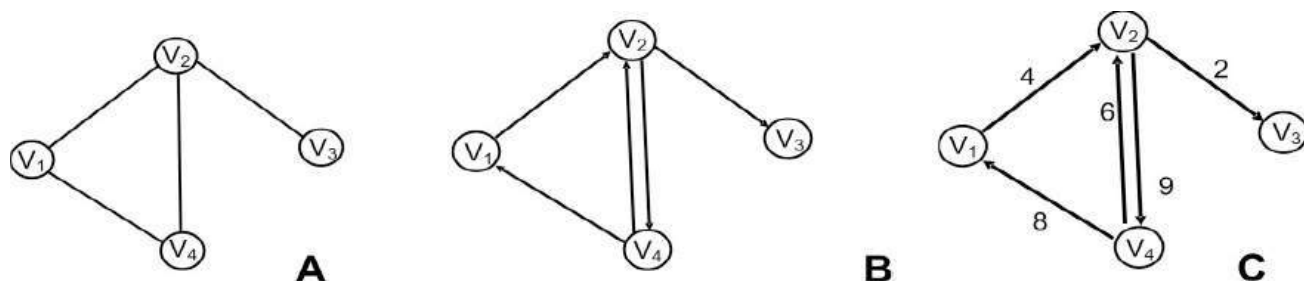
Για τη μελέτη των σημείων ενδιαφέροντος στις δομές των διμερών GPCRs χρησιμοποιήθηκαν μέθοδοι υπολογιστικής μεταλλαξιγένεσης αλανίνης, προκειμένου να μελετηθούν οι αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών – πρωτεϊνών. Τα πιθανά σημεία ενδιαφέροντος στις αλληλεπιδράσεις ανάμεσα σε πρωτεΐνες ανιχνεύθηκαν χρησιμοποιώντας το εμπειρικό πεδίο δυνάμεων FoldX v. 3b6 (Guerois *et al.*, 2002; Schymkowitz *et al.*, 2005). Υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν τόσο για τις κρυσταλλικές δομές όσο και για τα αποτελέσματα των προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής. Η τιμή ΔG για κάθε κατάλοιπο υπολογίστηκε ως η διαφορά της ανά κατάλοιπο ενέργειας αλληλεπίδρασης ανάμεσα στις αρχικές δομές και τα μοντέλα των μεταλλαγών, και τα κατάλοιπα με τις μεγαλύτερες τιμές ΔG (>1.5 kcal/mol) επιλέχθηκαν σαν πιθανές θέσεις ενδιαφέροντος στις αλληλεπιδράσεις.

2.4.4 Ανάλυση Δυναμικών Δικτύων

Η χρήση μοντέλων δικτύων για την απεικόνιση μεγάλου όγκου δεδομένων γίνεται όλο και πιο συχνή τα τελευταία χρόνια και αποτελεί αντικείμενο μελέτης για μεγάλο όγκο έρευνας στη στατιστική φυσική και τα εφαρμοσμένα μαθηματικά. Αναλύσεις δικτύων έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη και περιγραφή ποικίλων φαινομένων, από τον παγκόσμιο ιστό και τα κοινωνικά δίκτυα ως την επιδημιολογία και την οργάνωση διάφορων οικοσυστημάτων. Ιδιαίτερη σημασία για τη Βιολογία παρουσιάζουν τα βιολογικά δίκτυα αλληλεπιδράσεων, τα οποία μπορούν να οπτικοποιήσουν και να αναλύσουν μεγάλο όγκο δεδομένων για την περιγραφή αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών – πρωτεϊνών, τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και τη συσχέτιση γονιδίων με τη λειτουργία τους αλλά και την ανάλυση πολύπλοκων μηχανισμών όπως οι μηχανισμοί μεταγωγής σήματος και τα μεταβολικά μονοπάτια.

Ο πυρήνας της κατασκευής και ανάλυσης δικτύων αλληλεπιδράσεων βασίζεται στη μαθηματική Θεωρία Γράφων. Η Θεωρία Γράφων είναι ένα γνωστικό αντικείμενο των Διακριτών Μαθηματικών που περιλαμβάνει τον ορισμό και τη μελέτη των γράφων (γραφημάτων) και των

σχέσεών τους, οι οποίες χρησιμοποιούνται ευρύτατα στη μελέτη διαφόρων ειδών δικτύων. Ένας γράφος μπορεί να οριστεί ως ένα ζεύγος (V,E) όπου το V είναι ένα σύνολο κορυφών που αντιπροσωπεύουν τους κόμβους (nodes) και το E είναι το σύνολο των ακμών (edges) που αντιπροσωπεύει τις συνδέσεις μεταξύ των κόμβων. Ανάλογα με τον τρόπο οργάνωσης των στοιχείων τους, οι γράφοι μπορούν να διακριθούν σε τέσσερις τύπους: τους απλούς μη κατευθυνόμενους γράφους, τους κατευθυνόμενους γράφους, του γράφους με βάρη και τους διμερείς γράφους. Οι απλοί μη κατευθυνόμενοι γράφοι παρουσιάζουν μέσω των ακμών τις αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στους κόμβους, χωρίς να δίνουν περισσότερη πληροφορία για την ύπαρξη κατευθυντικότητας. Αντίθετα, στους κατευθυνόμενους γράφους οι αλληλεπιδράσεις αντιπροσωπεύονται με τόξα ή βέλη, μέσω των οποίων γνωρίζουμε ότι, για παράδειγμα, μια ακμή $E=(i,j)$ περιγράφει μια αλληλεπίδραση η οποία κατευθύνεται από τον κόμβο V_i στον κόμβο V_j . Οι σταθμισμένοι γράφοι ή γράφοι με βάρη στους οποίους οι ακμές που συνδέουν τους κόμβους σταθμίζονται με ειδικές τιμές βαρών μέσω των οποίων αξιολογείται η σημαντικότητά τους σε σχέση με το συνολικό δίκτυο. Τέλος, ένας γράφος ονομάζεται διμερής αν το σύνολο των κορυφών είναι η ένωση δύο ξένων μεταξύ τους συνόλων U και V τέτοιων ώστε κάθε ακμή του γράφου να περιέχει ακριβώς μία κορυφή από καθένα από τα δύο σύνολα (Εικόνα 2.8).



Εικόνα 2.8 Παραδείγματα διαφορετικών ειδών γράφων. Α. Μη κατευθυνόμενος γράφος, Β. Κατευθυνόμενος γράφος, C. Γράφος με βάρη στις ακμές ανάμεσα στους κόμβους.

Η ανάλυση δικτύων έχει χρησιμοποιηθεί κυρίως για την περιγραφή μεγάλου όγκου δεδομένων, στα οποία κάθε κόμβος αντιστοιχεί σε μια ξεχωριστή οντότητα, π.χ. ένα γονίδιο ή μια πρωτεΐνη. Ωστόσο, η απεικόνιση δικτύων μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την περιγραφή αλληλεπιδράσεων στο επίπεδο της δομής των βιομορίων, ενώ επιπλέον πληροφορία για τη σημαντικότητα των αλληλεπιδράσεων μπορεί να δοθεί από δεδομένα κινητικότητας ή από εξελικτική πληροφορία. Η ανάλυση δυναμικών δικτύων (Dynamical Network Analysis) εφαρμόζει στοιχεία της θεωρίας δικτύων στη μελέτη βιομοριακών δομών, οπτικοποιώντας μια δομή σαν δίκτυο κόμβων συνδεόμενων από ακμές, τα χαρακτηριστικά του οποίου σταθμίζονται

με βάση τη δυναμική συμπεριφορά του βιομορίου. Σε ένα δομικό δίκτυο αλληλεπιδράσεων οι κόμβοι αντιπροσωπεύουν άτομα, μόρια, νουκλεοτίδια ή αμινοξικά κατάλοιπα, ενώ οι ακμές που συνδέουν τους κόμβους αντιπροσωπεύουν τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις. Επιπρόσθετη πληροφορία για την κατασκευή και την ανάλυση του δικτύου παρέχεται από δεδομένα προερχόμενα από μελέτες της δυναμικής συμπεριφοράς των βιομορίων, όπως οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής ή οι δομές NMR, τα αποτελέσματα των οποίων μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την στάθμιση και αξιολόγηση της σημαντικότητας των αλληλεπιδράσεων στο δίκτυο, αλλά και για την ομαδοποίηση των στοιχείων του δικτύου με βάση τα χαρακτηριστικά τους. Μέσω της ανάλυσης δικτύων για αποτελέσματα μοριακής δυναμικής γίνεται δυνατή η παρατήρηση βιολογικά σημαντικών συσχετίσεων στις κινήσεις των βιομορίων, η αναγνώριση ισχυρών αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στα αλληλεπιδρώντα βιομόρια αλλά και η ανίχνευση πιθανών αλλοστερικών μηχανισμών μέσω των οποίων μπορούν να ρυθμιστούν σημαντικές βιολογικές διεργασίες (Sethi *et al.*, 2009).

Κατά καιρούς έχουν υλοποιηθεί πολλές διαφορετικές προσεγγίσεις ανάλυσης δυναμικών δικτύων πρωτεϊνικών δομών, οι οποίες βασίζονται σε διαφορετικά γνωρίσματα για να περιγράψουν τις βιολογικές αλληλεπιδράσεις. Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιείται η ανάλυση δικτύων που σχεδιάστηκε από την ομάδα των Sethi και συν. (Sethi *et al.*, 2009). Η διαδικασία σχεδιάστηκε αρχικά για την ανάλυση αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών – νουκλεϊκών οξέων σε προσομοιώσεις συμπλόκων tRNA - tRNA συνθετάσης. Ωστόσο, η ίδια μεθοδολογία έχει εφαρμοστεί και στη μελέτη συμπλόκων πρωτεϊνών – πρωτεϊνών, καθώς και σε δυναμικές μελέτες διαμεμβρανικών πρωτεϊνών. Στην παρούσα διπλωματική εργασία η μεθοδολογία εφαρμόζεται με κάποιες παραλλαγές, προκειμένου να γίνει συμβατή με την φύση των προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής τύπου Coarse – Grained.

Τα τελευταία 100 ns καθεμιάς από τις προσομοιώσεις CG-MD χρησιμοποιήθηκαν ως είσοδος για την προετοιμασία και την ανάλυση δυναμικών δικτύων. Σε καθένα από τα δίκτυα που σχεδιάστηκαν, κάθε αμινοξικό κατάλοιπο αντιπροσωπεύεται από ένα κόμβο. Ειδική περίπτωση αποτελούν τα διμερη mGluR1 και β 2AR, στα οποία ορίστηκαν επιπλέον κόμβοι για την αντιπροσώπευση των μορίων χοληστερόλης. Μια ακμή συνδέει δυο κόμβους μεταξύ τους αν τα αντίστοιχα αμινοξέα αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Οι αλληλεπιδράσεις καθορίστηκαν με βάση τη φύση του πεδίου MARTINI, χρησιμοποιώντας τα κριτήρια που αναφέρθηκαν στην

Ενότητα 2.4.1. Επιπρόσθετα, η πληροφορία για τη δυναμική φύση των αλληλεπιδράσεων καθορίστηκε με βάση την παρουσία τους στις πορείες των προσομοιώσεων. Συγκεκριμένα, μια αλληλεπίδραση μεταξύ δύο καταλοίπων συμπεριλήφθηκε στο δίκτυο αν παρουσιαζόταν τουλάχιστον στο 75% της αναλυόμενης πορείας της προσομοίωσης. Τα ομοιοπολικά συνδεδεμένα κατάλοιπα και οι κοντινοί γείτονες δεν συμπεριλήφθηκαν στις αλληλεπιδράσεις του δικτύου, καθώς θα οδηγούσαν σε αυξημένο αριθμό μη σημαντικών ακμών.

Τα δυναμικά δομικά δίκτυα αλληλεπιδράσεων είναι βεβαρυμένα δίκτυα, με την έννοια ότι οι ακμές ανάμεσα στους κόμβους σταθμίζονται με τιμές βαρών, οι οποίες χαρακτηρίζουν την ισχύ των αλληλεπιδράσεων. Οι τιμές των βαρών υπολογίστηκαν με βάση τα δεδομένα μοριακής δυναμικής. Το βάρος μιας ακμής ανάμεσα σε δυο κόμβους i και j (w_{ij}) ορίζεται σαν συνάρτηση της αντίστοιχη συσχέτισης της κινητικότητας (C_{ij}) των καταλοίπων i και j . Η κατά ζεύγη συσχέτιση υπολογίζεται ως η κανονικοποιημένη συνδιακύμανση της κίνησης των i και j , σύμφωνα με τον τύπο

$$C_{ij} = \frac{\langle \Delta \vec{r}_i(t) \cdot \Delta \vec{r}_j(t) \rangle}{\left(\langle \Delta \vec{r}_i(t)^2 \rangle \langle \Delta \vec{r}_j(t)^2 \rangle \right)^{1/2}}, \quad \Delta \vec{r}_i(t) = \vec{r}_i(t) - \langle \vec{r}_i(t) \rangle$$

όπου το διάνυσμα του r αντιπροσωπεύει την κίνηση του κάθε καταλοίπου στο χρόνο t , ενώ τα $\langle \rangle$ υποδηλώνουν τη μέση τιμή των κινήσεων στο χρόνο (Amadei *et al.*, 1993). Έχοντας υπολογίσει τη συσχέτιση μεταξύ των i και j , η τιμή του βάρους w_{ij} της ακμής ανάμεσα στους δύο κόμβους ορίζεται ως $w_{ij} = -\log(C_{ij})$. Έτσι, οι ακμές με τα μικρότερα βάρη αντιστοιχούν στις πιο συσχετισμένες και πιο ισχυρές αλληλεπιδράσεις του δικτύου.

Καθένα από τα φυσικά δίκτυα κόμβων και ακμών που σχεδιάστηκαν περιέχει υποδίκτυα ή κοινότητες (communities), αποτελούμενες από κόμβους που είναι πιο πυκνά συνδεδεμένοι μεταξύ τους παρά με άλλα στοιχεία του δικτύου. Στα πλαίσια ενός δικτύου μοριακής δυναμικής, τέτοιες κοινότητες μπορούν να αντιστοιχιστούν με δομικά στοιχεία που κινούνται συντονισμένα, και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την περιγραφή δομικών και κινητικών χαρακτηριστικών που σχετίζονται με τη λειτουργικότητα μιας πρωτεΐνης.

Στην ανάλυση δυναμικών δικτύων χρησιμοποιείται η μέθοδος ομαδοποίησης των Girvan και Newmann, η οποία περιλαμβάνει την οργάνωση των στοιχείων ενός δικτύου σε κοινότητες, με βάση τη συνδεσιμότητά τους (Girvan and Newman, 2002). Η ομαδοποίηση σε κοινότητες βασίζεται στον υπολογισμό της ενδιάμεσης κεντρικότητας (betweenness centrality), η οποία αναδεικνύει κόμβους και ακμές που λειτουργούν σαν ενδιάμεσοι ανάμεσα σε γείτονες. Τα στοιχεία του δικτύου με υψηλή ενδιάμεση κεντρικότητα επηρεάζουν σημαντικά τη μεταφορά πληροφορίας ανάμεσα στα στοιχεία του δικτύου. Οι τιμές ενδιάμεσης κεντρικότητας υπολογίζονται ορίζοντας τα συντομότερα μονοπάτια του δικτύου. Το μήκος ενός μονοπατιού (D_{ij}) ανάμεσα σε δύο κόμβους i και j ορίζεται ως το άθροισμα των τιμών βάρους των ενδιάμεσων ακμών που συνδέουν αυτούς τους κόμβους. Σε ένα δίκτυο μπορούν να οριστούν πολλά διαφορετικά μονοπάτια που να συνδέουν δυο κόμβους. Το συντομότερο μονοπάτι (D^0_{ij}) ορίζεται ως η συντομότερη απόσταση ανάμεσα σε δυο κόμβους, δηλαδή το μονοπάτι με το μικρότερο δυνατό αριθμό ενδιάμεσων κόμβων και ακμών (Girvan and Newman, 2002).

Υπολογίζοντας το σύνολο των συντομότερων μονοπατιών του δικτύου μπορούν να υπολογιστούν οι τιμές ενδιάμεσης κεντρικότητας των στοιχείων του δικτύου. Ο αριθμός των συντομότερων μονοπατιών που διαπερνούν ένα στοιχείο του δικτύου (έναν κόμβο ή μια ακμή) ορίζονται ως η ενδιάμεση κεντρικότητα αυτού του στοιχείου. Μέσω του υπολογισμού της ενδιάμεσης κεντρικότητας ο αλγόριθμος Girvan – Newmann οργάνωνει τα στοιχεία του δικτύου σε κοινότητες. Συγκεκριμένα, η μέθοδος πραγματοποιεί μια top – down αναζήτηση, μέσω της οποίας εντοπίζει σε κάθε κύκλο την ακμή με την υψηλότερη κεντρικότητα, την αφαιρεί από το μη ομαδοποιημένο δίκτυο και υπολογίζει εκ νέου τις τιμές κεντρικότητας για τις υπόλοιπες ακμές, επαναλαμβάνοντας τη διαδικασία ώσπου να μη μείνουν καθόλου μη ομαδοποιημένες ακμές στο δίκτυο. Το αποτέλεσμα είναι η οργάνωση των στοιχείων του δικτύου σε κοινότητες, οι οποίες κατατάσσονται περαιτέρω ιεραρχικά ως προς τη συνδεσιμότητα μεταξύ τους μέσω ιεραρχικής ομαδοποίησης. Η βέλτιστη οργάνωση κοινοτήτων εντοπίζεται μεγιστοποιώντας την τιμή ενός κριτηρίου οργάνωσης (Modularity), το οποίο ουσιαστικά περιγράφει ένα σύνολο φυσικά ή λειτουργικά συνδεδεμένων κόμβων που δρουν συνεργατικά. Η τιμή του κριτηρίου υπολογίζεται σύμφωνα με τον τύπο

$$Q = \sum_{i=1}^k (e_{ii} - \alpha_i^2)$$

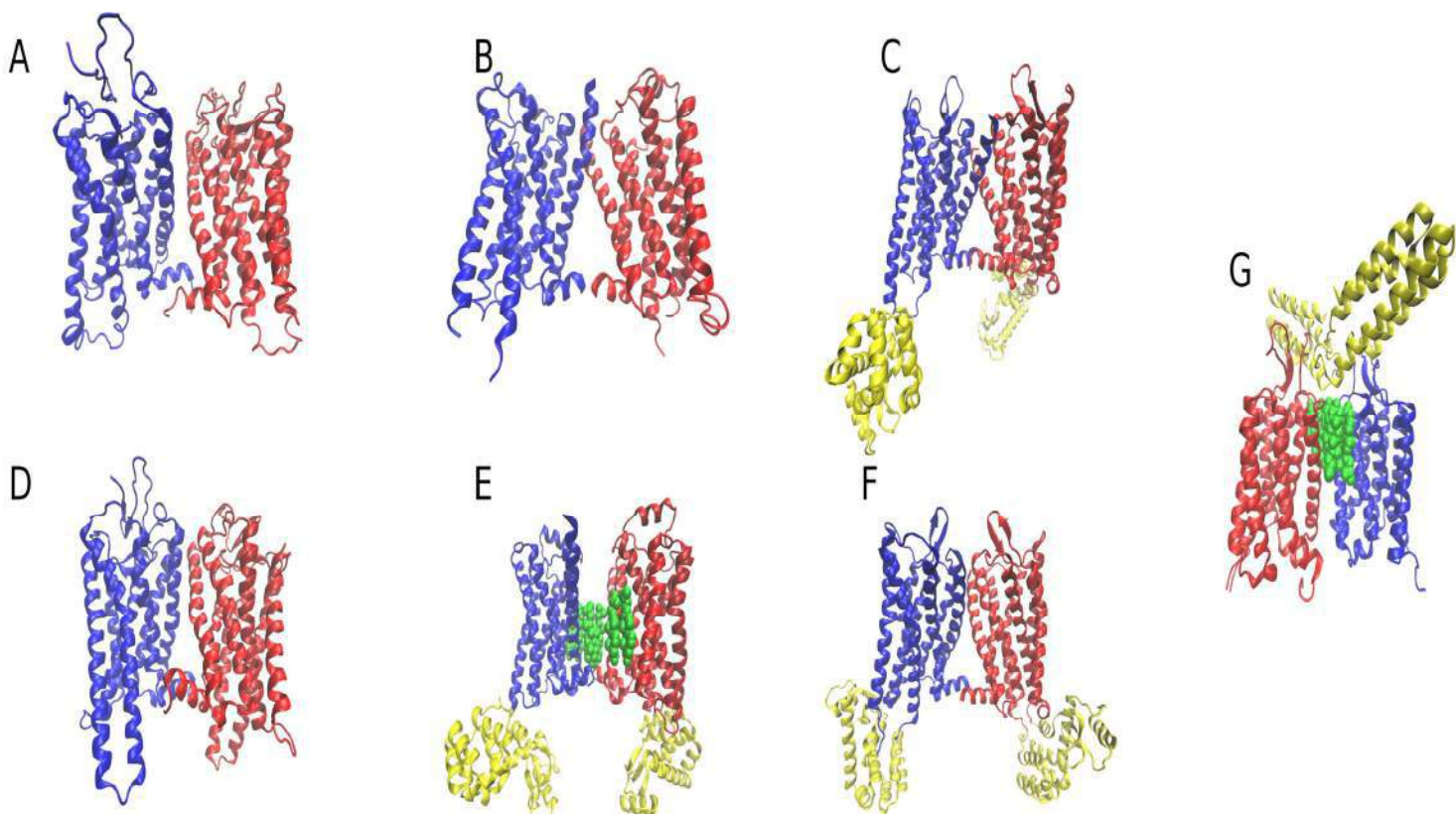
και περιγράφει τη διαφορά ανάμεσα στην πιθανότητα ύπαρξης μιας ακμής σε μια κοινότητα και την πιθανότητα τυχαίας κατανομής στο δίκτυο. Το κριτήριο οργάνωσης λαμβάνει τιμές από 0 ως 1, με υψηλότερες τιμές Q να υποδεικνύουν καλύτερη δομή κοινοτήτων. Καθώς ο αλγόριθμος χωρίζει το δίκτυο σε συνεχώς μικρότερες κοινότητες, υπολογίζει για κάθε διαχωρισμό σε κοινότητες την τιμή του κριτηρίου Q , και η μέγιστη τιμή Q αντιστοιχεί στη βέλτιστη οργάνωση κοινοτήτων του δικτύου (Girvan and Newman, 2002).

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων των προσομοιώσεων και η δημιουργία των δικτύων αλληλεπιδράσεων πραγματοποιήθηκαν μέσω της ειδικής επέκτασης NetworkView του VMD, η οποία έχει σχεδιαστεί για την κατασκευή και οπτικοποίηση δυναμικών δικτύων (Sethi *et al.*, 2009). Στην ανάλυση χρησιμοποιήθηκε μια τροποποιημένη εκδοχή της επέκτασης, στην οποία οι τυπικές ρυθμίσεις για την αναγνώριση αλληλεπιδράσεων αντικαταστάθηκαν με τις αντίστοιχες ρυθμίσεις για τη μελέτη προσομοιώσεων Coarse – Grained. Ο υπολογισμός των τιμών συσχετίσεων για τον καθορισμό των βαρών πραγματοποιήθηκε μέσω Ανάλυσης Κυρίων Συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA) (Amadei *et al.*, 1993) χρησιμοποιώντας τις καρτεσιανές συντεταγμένες των σωματιδίων CG, μέσω του προγράμματος ανάλυσης μοριακών προσομοιώσεων Carma. Η οργάνωση των στοιχείων του δικτύου σε κοινότητες πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο Girvan – Newman. Η οπτικοποίηση των δικτύων, η ανάλυση των αλληλεπιδράσεων και η χαρτογράφησή τους πάνω στις ατομικές δομές πραγματοποιήθηκαν μέσω του VMD, χρησιμοποιώντας το NetworkView καθώς και προγράμματα γραμμένα στη γλώσσα Tcl.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

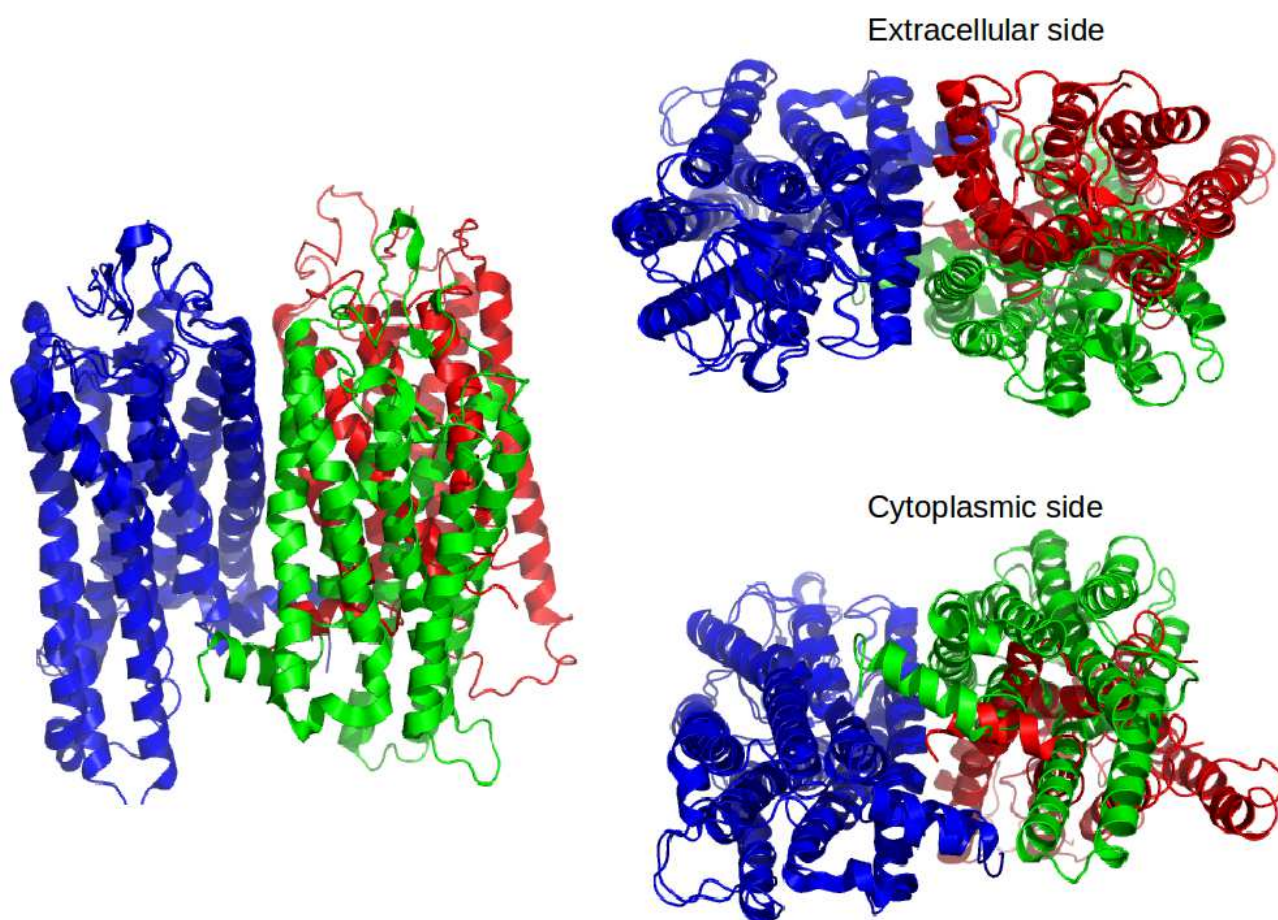
3.1 Βασικά Χαρακτηριστικά των Κρυσταλλογραφικών Διμερών GPCRs

Διμερή με συμμετρικές αλληλεπιδράσεις που περιλαμβάνουν τις διαμεμβρανικές έλικες TM1 και TM2, με επιπλέον επαφές των ελίκων H8 έχουν λυθεί κρυσταλλογραφικά για τη Ροδοψίνη του βοδιού τόσο στην ανενεργή κατάστασή της (PDB: 2I35) όσο και στο ενεργοποιημένο ενδιάμεσό της, την Οψίνη (PDB: 3CAP). Παρόμοιες αλληλεπιδράσεις παρατηρούνται για τον οπιοειδή υποδοχέα κ (κOR) (PDB: 4DJH), καθώς και στο πρώτο από τα δύο διαφορετικά διμερή που παρατηρούνται στις δομές του οπιοειδή υποδοχέα μ (μOR) (PDB: 4DKL) και του αδρενεργικού υποδοχέα β1 (β1AR) (PDB: 4GPO). Ένα διμερές με παρόμοιο προσανατολισμό αλλά σημαντικά μικρότερη θαμμένη επιφάνεια (Buried Surface Area, BSA) εμφανίζεται επίσης στο θεωρητικό μοντέλο του ολιγομερούς της Ροδοψίνης (PDB: 1N3M), το οποίο βασίστηκε σε δεδομένα Μικροσκοπίας Atomic Force σε συνδυασμό με Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης. Αντίστοιχα, η δομή του αδρενεργικού υποδοχέα β2 (β2AR) σε σύμπλοκο με το φάρμακο Carazolol (PDB: 2RH1) παρουσιάζει ένα διμερές TM1-TM2-H8 στο οποίο, αν και η θαμμένη επιφάνεια είναι σχετικά μικρή, παρατηρούνται ενδιάμεσα μόρια χοληστερόλης να συνδέουν τα δυο πρωτομερή μεταξύ τους. Επιπρόσθετα, η πρόσφατα λυμένη δομή των διαμεμβρανικών τμημάτων του μεταβοτροπικού υποδοχέα του γλουταμικού mGluR1 (PDB: 4OR2) παρουσιάζει δύο πρωτομερή σε παρόμοια διάταξη διμερούς, με αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στις έλικες TM1 και TM2 (εκτεταμένες επαφές ανάμεσα στις έλικες H8 δεν παρατηρούνται καθώς κατάλοιπα από τα συγκεκριμένα τμήματα απουσιάζουν από τις δομές) και έξι μόρια χοληστερόλης να παρεμβάλλονται ανάμεσα στα πρωτομερή, λειτουργώντας σαν υδρόφοβες «γέφυρες» (Εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1 Διμερή GPCRs σε διάταξη TM1-TM2-H8. Α. Ανενεργή Ροδοψίνη (PDB: 2I35), Β. Οψίνη (PDB: 3CAP), Γ. οπιοειδής υποδοχέας κ (PDB: 4DJH), Δ. β1 αδρενεργικός υποδοχέας (PDB: 4GPO), Ε. β2 αδρενεργικός υποδοχέας (PDB: 2RH1), ΣΤ. οπιοειδής υποδοχέας μ (PDB: 4DKL), Ζ. υποδοχέας γλουταμικού mGluR1 (PDB: 4OR2). Σε κάθε διμερές, τα δυο πρωτομερή χρωματίζονται με μπλε και κόκκινο. Οι πρόσθετες υπομονάδες της λυσοζύμης του φάγου T4 στις δομές των υποδοχέων β2, κ και μ και του κυτοχρώματος b562 στη δομή του mGluR1 χρωματίζονται κίτρινες. Με απεικόνιση σφαιρών και πράσινο χρώμα σημαίνονται τα μόρια χοληστερόλης που συμμετέχουν στις αλληλεπιδράσεις στα διμερή των υποδοχέων mGluR1 και β2.

Οι δομές των υποδοχέων κOR και μOR περιέχουν χίμαιρες με υπομονάδες λυσοζύμης T4 στα κυτοπλασματικά μέρη των υποδοχέων. Δεν παρατηρούνται όμως επαφές ανάμεσα στις λυσοζύμες στα διμερή TM1-TM2-H8, γεγονός που υποδεικνύει ότι ο σχηματισμός των διμερών δεν έχει επηρεαστεί από την παρουσία τους. Αντίθετα, το διμερές του mGluR1 παρουσιάζει δύο υπομονάδες του κυτοχρώματος b562 ενσωματωμένες στη θέση των εξωκυτταρικών τμημάτων, οι οποίες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Ωστόσο, δεδομένου ότι τα εξωκυτταρικά τμήματα των υποδοχέων Κλάσης C συμμετέχουν στον ολιγομερισμό, συνδεόμενα μάλιστα με δισουλφιδικούς δεσμούς, δεν αποκλείεται ο προσανατολισμός των διαμεμβρανικών τμημάτων να είναι παρόμοιος και στη φυσιολογική κατάσταση των υποδοχέων.

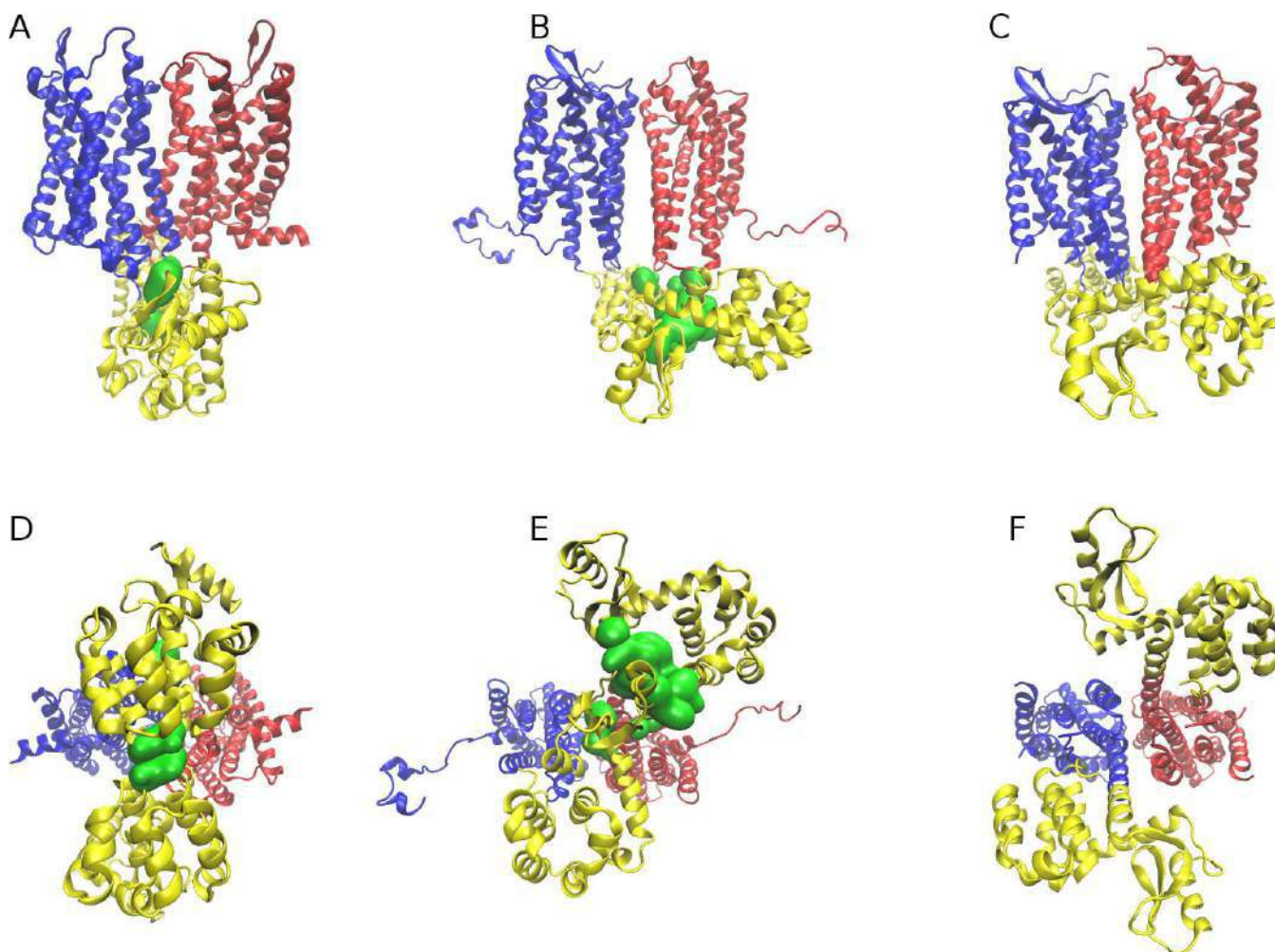


Εικόνα 3.2 Σύγκριση του προσανατολισμού των υποδοχέων των διμερών TM1-TM2-H8 της ανενεργής Ροδοψίνης (PDB: 2I35) και της Οψίνης (PDB: 3CAP). Τα δύο διμερή έχουν στοιχηθεί δομικά στην αλυσίδα του πρώτου πρωτομερούς τους, η οποία χρωματίζεται μπλε, ενώ το δεύτερο πρωτομέρες χρωματίζεται κόκκινο για την ανενεργή Ροδοψίνη και πράσινο για την Οψίνη. Παρουσιάζεται μια γενική επισκόπηση των δομών, καθώς και η κυτοπλασματική και εξωκυτταρική όψη τους. Όπως φαίνεται από τη στοιχίση, ο προσανατολισμός των πρωτομερών στα δυο διμερή ενδιαφέρει, με τα πρωτομερή της ανενεργής Ροδοψίνης να σχηματίζουν γωνία μεταξύ τους, η οποία δεν παρατηρείται στο διμερές της Οψίνης. Ανάλογη περίπτωση αποτελούν και τα διμερή των υποδοχέων κOR και mOR.

Παρά τη συνολική ομοιότητά τους ως προς τον προσανατολισμό τους, τα διμερή TM1-TM2-H8 παρουσιάζουν αξιοσημείωτες διαφορές (Εικόνα 3.2). Ένας σημαντικός παράγοντας διάκρισης ανάμεσά τους είναι η σχετική θέση του ενός πρωτομερούς ως προς το άλλο, αλλά και ως προς το επίπεδο της μεμβράνης. Στα διμερή των υποδοχέων κOR, β1AR και mGluR1 τα δυο πρωτομερή είναι σχεδόν παράλληλα μεταξύ τους και αναμένονται να τοποθετούνται σχεδόν κατακόρυφα σε σχέση με το επίπεδο της μεμβράνης. Αντίθετα, σε άλλες περιπτώσεις παρατηρείται γωνία ανάμεσα στους κύριους άξονες των δύο πρωτομερών κάθε διμερούς. Είναι πολύ πιθανό αυτή η διαφοροποίηση στον προσανατολισμό να έχει προκύψει σαν αποτέλεσμα

της διαδικασίας της κρυστάλλωσης. Σε κάθε περίπτωση, αυτή η ετερογένεια οδηγεί σε σημαντικές διαφορές ως προς την επιφάνεια αλληλεπίδρασης, ακόμη και δομές διμερών του ίδιου υποδοχέα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι τα διμερή της ανενεργής και ενεργής Ροδοψίνης: λόγω των διαφορών στον προσανατολισμό των πρωτομερών σε κάθε διμερές, η ανενεργή δομή παρουσιάζει επαφές ανάμεσα στους υποδοχείς που δεν παρατηρούνται στη δομή της Οψίνης.

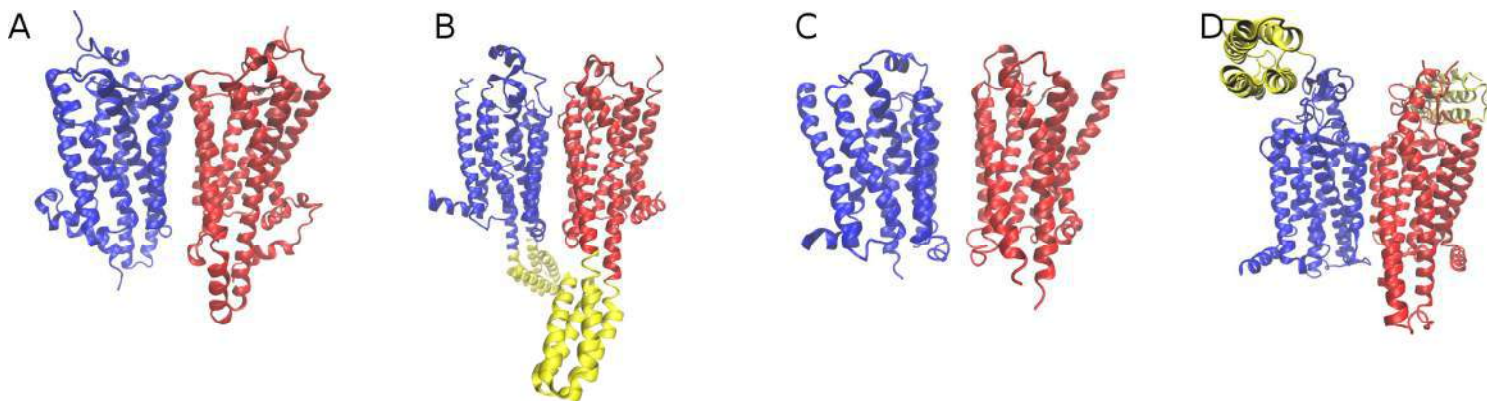
Ένας δεύτερος παράγοντας ετερογένειας είναι η παρατηρούμενη θέση της διαμεμβρανικής έλικας TM1, τόσο σε σχέση με την επιφάνεια αλληλεπίδρασης των διμερών όσο και ως προς το δεμάτιο των α-ελίκων κάθε υποδοχέα. Από τις διαθέσιμες δομές των GPCRs φαίνεται ξεκάθαρα ότι η έλικα TM1 μπορεί να υιοθετήσει πολλούς διαφορετικούς προσανατολισμούς, τόσο ανάμεσα σε διαφορετικούς υποδοχείς όσο και ανάμεσα σε δομές του ίδιου υποδοχέα. Αντίστοιχο φαινόμενο παρατηρείται και στις δομές των διμερών: στις δομές των υποδοχέων κOR και β1AR η έλικα TM1 προεξέχει, απομακρυνόμενη από το υπόλοιπο δεμάτιο των 7 ελίκων, ενώ σε άλλες δομές παραμένει ισχυρότερα συνδεδεμένη με την έλικα TM7. Αυτή η διαφοροποίηση οδηγεί επίσης σε διαφορές στις αλληλεπιδράσεις, αφού στις δομές των κOR και β1AR παρατηρούνται αλληλεπιδράσεις ολιγομερισμού σε κατάλοιπα που σε άλλες δομές GPCRs παραμένουν θαμμένα στο εσωτερικό του υποδοχέα. Παρά τις διαφορές αυτές, πάντως, η ομοιότητα στην οργάνωση των υποδοχέων και το παρόμοιο πρότυπο αλληλεπιδράσεων υποδεικνύει τη συντηρημένη φύση του διμερισμού TM1-TM2-H8.



Εικόνα 3.3 Διμερή GPCRs με αλληλεπιδράσεις TM5-TM6, σε απεικόνιση κατά μήκος του άξονα x (A, B, C) και σε απεικόνιση της κυτοπλασματικής όψης (D, E, F). A & D. οπιοειδής υποδοχέας μ (PDB: 4DKL), B & E. χημειοκινικός υποδοχέας CXCR4 με υποκαταστάτη το It1t (PDB: 3ODU), C & F. χημειοκινικός υποδοχέας CXCR4 με υποκαταστάτη το CVX15 (PDB: 3OE0). Τα πρωτομερή χρωματίζονται με μπλε και κόκκινο, ενώ οι υπομονάδες της λυσοζύμης T4L με κίτρινο. Με πράσινες ισοεπιφάνειες, τέλος, σημαίνονται οι διαμοριακές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στις δυο λυσοζύμες, ή ανάμεσα στη λυσοζύμη κάθε αλυσίδας και το πρωτομέρες της δεύτερης αλυσίδας.

Τα παρατηρούμενα διμερή που περιλαμβάνουν επαφές των ελίκων TM5 και TM6 παρουσιάζουν μεγαλύτερη ετερογένεια από τα διμερή TM1-TM2-H8 (Εικόνα 3.3). Το δεύτερο διμερές που παρατηρείται στον κρύσταλλο του οπιοειδή υποδοχέα μ OR (PDB: 4DKL) παρουσιάζει αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στις διαμεμβρανικές έλικες TM5 και TM6 κάθε μονομερούς, οι οποίες συμμετέχουν στο σχηματισμό ενός δεματίου 4 α -ελίκων με εκτεταμένες επαφές στο σύνολο των υδρόφοβων τμημάτων. Αλληλεπιδράσεις TM5-TM6 παρατηρούνται επίσης στη δομή του χημειοκινικού υποδοχέα CXCR4 με υποκαταστάτη το φάρμακο It1t (PDB: 3ODU), ωστόσο, οι επαφές εντοπίζονται σχεδόν αποκλειστικά στα τμήματα του υποδοχέα κοντά στην εξωκυτταρική πλευρά της μεμβράνης, με ελάχιστες επαφές στο κυτοπλασματικό μέρος της

TM5. Μια δεύτερη δομή του διμερούς του CXCR4, με υποκαταστάτη το κυκλικό πεπτίδιο CVX15 (PDB: 3OE0) περιλαμβάνει παρόμοιες επαφές, αλλά παρουσιάζει επιπλέον εκτεταμένες αλληλεπιδράσεις ανάμεσα σε κατάλοιπα των ενδοκυτταρικών βρόχων ICL2 και των ελίκων TM4. Έτσι, το συγκεκριμένο διμερές μοιάζει με κάποιο είδος ενδιάμεσης κατάστασης ανάμεσα στα διμερή TM5-TM6 και TM4-TM5. Πρέπει να σημειωθεί πως και οι τρεις δομές που αναφέρθηκαν περιέχουν υποδοχείς ως χίμαιρες με λυσοζύμη T4 τη θέση του βρόχου ICL3 που συνδέει τις έλικες TM5 και TM6. Σε όλες τις περιπτώσεις οι λυσοζύμες πιθανότατα έχουν επηρεάσει τις θέσεις των TM5 και TM6, ενώ στις δομές των μOR και CXCR4-It1t σχηματίζουν επιπλέον επαφές τόσο μεταξύ τους όσο και η καθεμία με το αντικρινές ως προς τον υποδοχέα στον οποίο έχει εισαχθεί πρωτομερές, αν και ο βαθμός στον οποίο συμμετέχουν στην επιφάνεια αλληλεπίδρασης διαφέρει, και το κατά πόσο η παρουσία τους έχει επηρεάσει τον προσανατολισμό των πρωτομερών στο διμερές δεν είναι ξεκάθαρο.

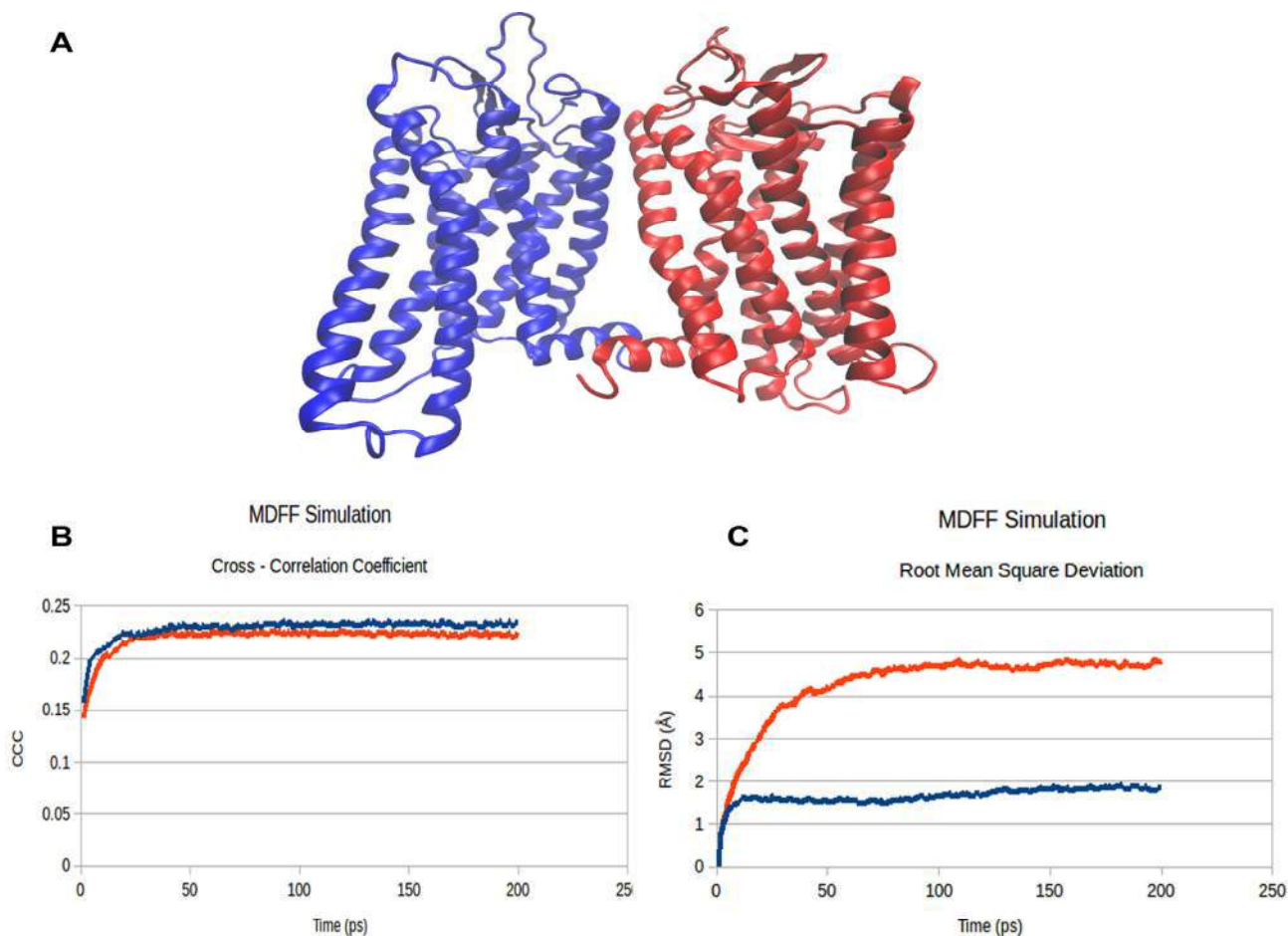


Εικόνα 3.4 Διμερή GPCRs με αλληλεπιδράσεις TM4-TM5. Α. η Ροδοψίνη του καλαμαριού (PDB: 2Z73), Β. ο A2α αδενোসινικός υποδοχέας (PDB: 4EIY), C. ο β1 αδρενεργικός υποδοχέας (PDB: 4GPO), D. ο υποδοχέας Smoothened (PDB: 4JKV). Τα δυο πρωτομερή κάθε διμερούς χρωματίζονται με μπλε και κόκκινο. Οι υπομονάδες του κυτοχρώματος b562 στις δομές των A2α και Smoothened χρωματίζονται κίτρινες.

Διμερή TM4-TM5, τα οποία είναι και αυτά για τα οποία υπάρχει περισσότερη πειραματική πληροφορία εκτός των κρυσταλλικών δομών, παρατηρούνται στις δομές της Ροδοψίνης του ωκεάνιου καλαμαριού (PDB: 2Z73), του ανθρώπινου αδενোসινικού υποδοχέα A2α (PDB: 4EIY) και στο δεύτερο διμερές του υποδοχέα β1AR (PDB: 4GPO). Η πρόσφατα λυμένη δομή του υποδοχέα Smoothened από την Κλάση F παρουσιάζει επίσης τον υποδοχέα σε διάταξη διμερούς TM4-TM5, με επαφές που θυμίζουν όχι μόνο τις δομές της Ροδοψίνης και του A2α αλλά, ως ένα βαθμό, τη δομή του διμερούς TM4-TM5-TM6 του CXCR4 που αναφέρθηκε ήδη (Εικόνα 3.4). Παρόμοια με τη δομή του mGluR1, τα αμινοτελικά άκρα των υποδοχέων Smoothened έχουν αντικατασταθεί από υπομονάδες κυτοχρώματος, οι οποίες όμως βρίσκονται σε μεγάλη απόσταση μεταξύ τους και δεν φαίνονται να επηρεάζουν τη σχέση ανάμεσα στους υποδοχείς. Παρόμοια, υπομονάδες b562 έχουν εισαχθεί στη δομή του υποδοχέα A2α, χωρίς να έρχονται σε επαφή. Σε αντίθεση με τα διμερή TM5-TM6, λοιπόν, τα διμερή TM4-TM5 δεν φαίνονται να έχουν επηρεαστεί από τη μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε στον προσδιορισμό της δομής τους. Εκτός από τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα, ωστόσο, πειραματική πληροφορία για την ύπαρξη διμερών TM4-TM5 προέρχεται και από άλλες πειραματικές πηγές. Έτσι, ένα παρόμοιο διμερές παρατηρείται στο μοντέλο του ολιγομερούς των Ροδοψινών από τα δεδομένα AFM.

3.2 Η Μεταροδοψίνη Ι σχηματίζει διμερή τύπου TM1-TM2-H8

Προκειμένου να γίνει δυνατή μια πιο λεπτομερής μελέτη του παράλληλου διμερούς της Μεταροδοψίνης Ι, το οποίο είχε παρατηρηθεί σε δεδομένα πυκνότητας προερχόμενα από πειράματα κρύο-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, πραγματοποιήθηκε η δημιουργία μοντέλων του διμερούς μέσω αγκυροβόλησης πρωτομερών Ροδοψίνης στο χάρτη πυκνότητας (EMD: 1079), ακολουθούμενης από ευέλικτη τοποθέτηση και βελτιστοποίηση των συντεταγμένων μέσω μοριακής δυναμικής χρησιμοποιώντας τη μέθοδο MDFF. Δημιουργήθηκαν δύο ξεχωριστά μοντέλα, έχοντας ως αρχικές συντεταγμένες είτε την ανενεργή Ροδοψίνη είτε την ενεργοποιημένη Οψίνη. Και οι δύο προσομοιώσεις MDFF έδωσαν σχεδόν πανομοιότυπα διμερή, με απόκλιση RMSD ≈ 1.03 Å μεταξύ τους. Και στα δυο μοντέλα η Μεταροδοψίνη Ι παρουσιάζει περισσότερη ομοιότητα με τη δομή της ανενεργής Ροδοψίνης (RMSD = 1.62 Å) παρά με την ενεργή στερεοδιάταξη (RMSD = 2.73 Å), με καλά σχηματισμένη την ιοντική γέφυρα ανάμεσα στα διαμεμβρανικά τμήματα TM3 και TM6. Επιπρόσθετα, η προσομοίωση MDFF με αρχικές συντεταγμένες αυτές της Οψίνης παρουσιάζει πολύ πιο έντονες στερεοδιαταξικές αλλαγές. Οι παραπάνω παρατηρήσεις υποστηρίζουν την άποψη ότι η Μεταροδοψίνη Ι, παρ'ότι έχει ενεργοποιηθεί από την πρόσπτωση φωτεινής ακτινοβολίας, δεν υιοθετεί τις στερεοδιαταξικές αλλαγές που παρουσιάζονται σε μεταγενέστερα ενεργοποιημένα ενδιάμεσα της Ροδοψίνης (Εικόνα 3.5).



Εικόνα 3.5 Αποτελέσματα προσομοιώσεων MDFF για το διμερές της Μεταροδοψίνης Ι. Α. Το τελικό διμερές της Μεταροδοψίνης Ι μετά από 200 ps προσομοίωσης για την ενσωμάτωση σε δεδομένα κρύο-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, Β. Μέτρηση της συσχέτισης των ατομικών συντεταγμένων με τα δεδομένα πυκνότητας του χάρτη EM (Cross Correlation Coefficient) για κάθε προσομοίωση MDFF στη μονάδα του χρόνου. Παρατηρείται ότι και οι δυο προσομοιώσεις, βασισμένες είτε στις συντεταγμένες της ανενεργής Ροδοψίνης (PDB: 1GZM, μπλε) είτε στις συντεταγμένες της ενεργοποιημένης Οψίνης (PDB: 3CAP, πορτοκαλί) δίνουν παραπλήσιο αποτέλεσμα, γεγονός που υποδεικνύει ότι η τελική δομή του μοντέλου είναι ανεξάρτητη της αρχικής στερεοδιάταξης, C. Μέτρηση του RMSD από την αρχική δομή για κάθε προσομοίωση MDFF στη μονάδα του χρόνου. Παρατηρείται ότι το μοντέλο που βασίστηκε στην ενεργοποιημένη Οψίνη μεταβάλλεται πολύ περισσότερο για να ταιριάζει στα δεδομένα EM από αυτό που βασίστηκε στην ανενεργή Ροδοψίνη, υποδεικνύοντας ότι η Μεταροδοψίνη Ι μοιάζει περισσότερο με την ανενεργή κατάσταση των GPCRs παρά με την ενεργή.

Πίνακας 3.1. Αξιολόγηση της στερεοχημικής ποιότητας των μοντέλων του διμερούς της Μεταροδοψίνης Ι έπειτα από 200 ps MDFF.

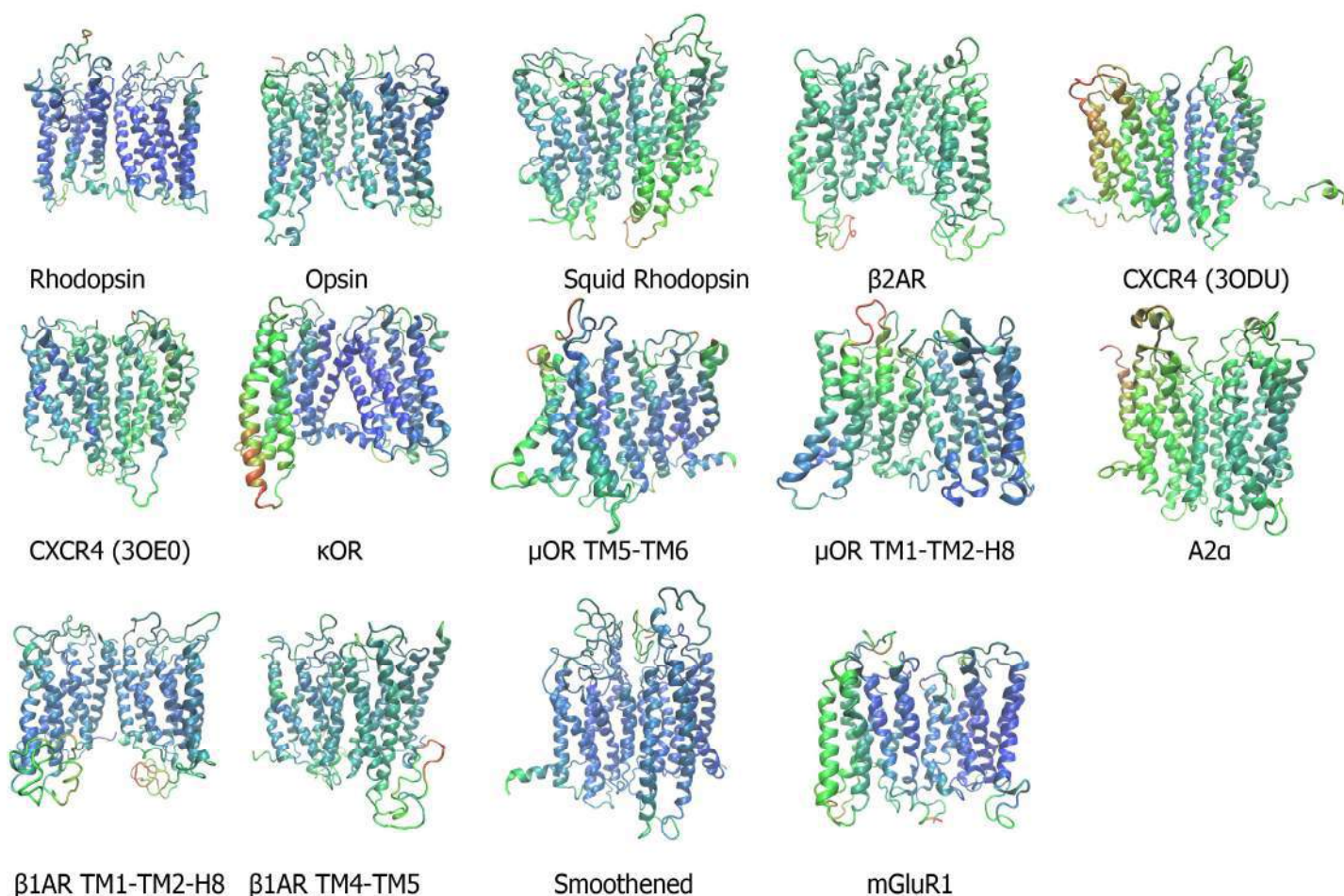
Μοντέλο (αρχική δομή)	Ευνοϊκό Ramach.	Απαγορ. Ramach.	Σφάλματα στροφωμερών	Αποκλ. Cβ > 0.25Å	Clash score	MolProbity Score
Ροδοψίνη (PDB: 1GZM)	599 (92.72%)	9 (1.39%)	16 (3.12%)	5 (0.82%)	0	1.33 (98 th Perc.)
Οψίνη (PDB: 3CAP)	611 (94.58%)	7 (1.08%)	20 (4.00%)	5 (0.82%)	0	1.33 (98 th Perc.)

Και στα δυο μοντέλα, τα δυο πρωτομερή της Μεταροδοψίνης Ι σχηματίζουν ένα διμερές TM1-TM2-H8, που μοιάζει σημαντικά με τα αντίστοιχα διμερή στις δομές της Ροδοψίνης. Όσον αφορά τον προσανατολισμό των πρωτομερών, το μοντέλο παρουσιάζει μεγαλύτερη ομοιότητα με το διμερές της Οψίνης, με μικρή γωνία ανάμεσα στους υποδοχείς, σε αντίθεση με το διμερές της ανενεργής Ροδοψίνης. Ωστόσο υιοθετεί διαφορετικό προσανατολισμό για τις έλικες H8, οι οποίες βρίσκονται σε μικρότερη απόσταση μεταξύ τους σε σχέση με τις κρυσταλλικές δομές της Ροδοψίνης. Ο υποψήφιος υδρογονικός δεσμός ανάμεσα στα κατάλοιπα Ser-38 (B&W 1.33) κάθε μονομερούς, ο οποίος παρατηρείται στο διμερές της Οψίνης αλλά όχι στην ανενεργή Ροδοψίνη παρουσιάζεται στο μοντέλο της Μεταροδοψίνης Ι. Ένας δεύτερος πιθανός δεσμός υδρογόνου σχηματίζεται ανάμεσα σε κατάλοιπα ασπαραγίνης (315 και 326) στις έλικες H8, πιθανότατα ως αποτέλεσμα της μείωσης της απόστασης των C-άκρων μεταξύ τους. Από την άλλη, το μοντέλο παρουσιάζει όχι μόνο τις επαφές που παρατηρούνται στη δομή της Οψίνης αλλά και επαφές που απουσιάζουν από αυτή αλλά παρατηρούνται στην ανενεργή Ροδοψίνη, όπως αλληλεπιδράσεις δακτυλίων που περιλαμβάνουν κατάλοιπα όπως η His-100 (B&W 2.66) και η Pro-53 (B&W. 1.48). Ο τελικός αριθμός επαφών και το εμβαδό της θαμμένης επιφάνειας του μοντέλου είναι σημαντικά μεγαλύτερα σε σχέση με τις κρυσταλλικές δομές.

3.3 Σταθερότητα και συμπεριφορά των GPCRs κατά τη διάρκεια των προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής

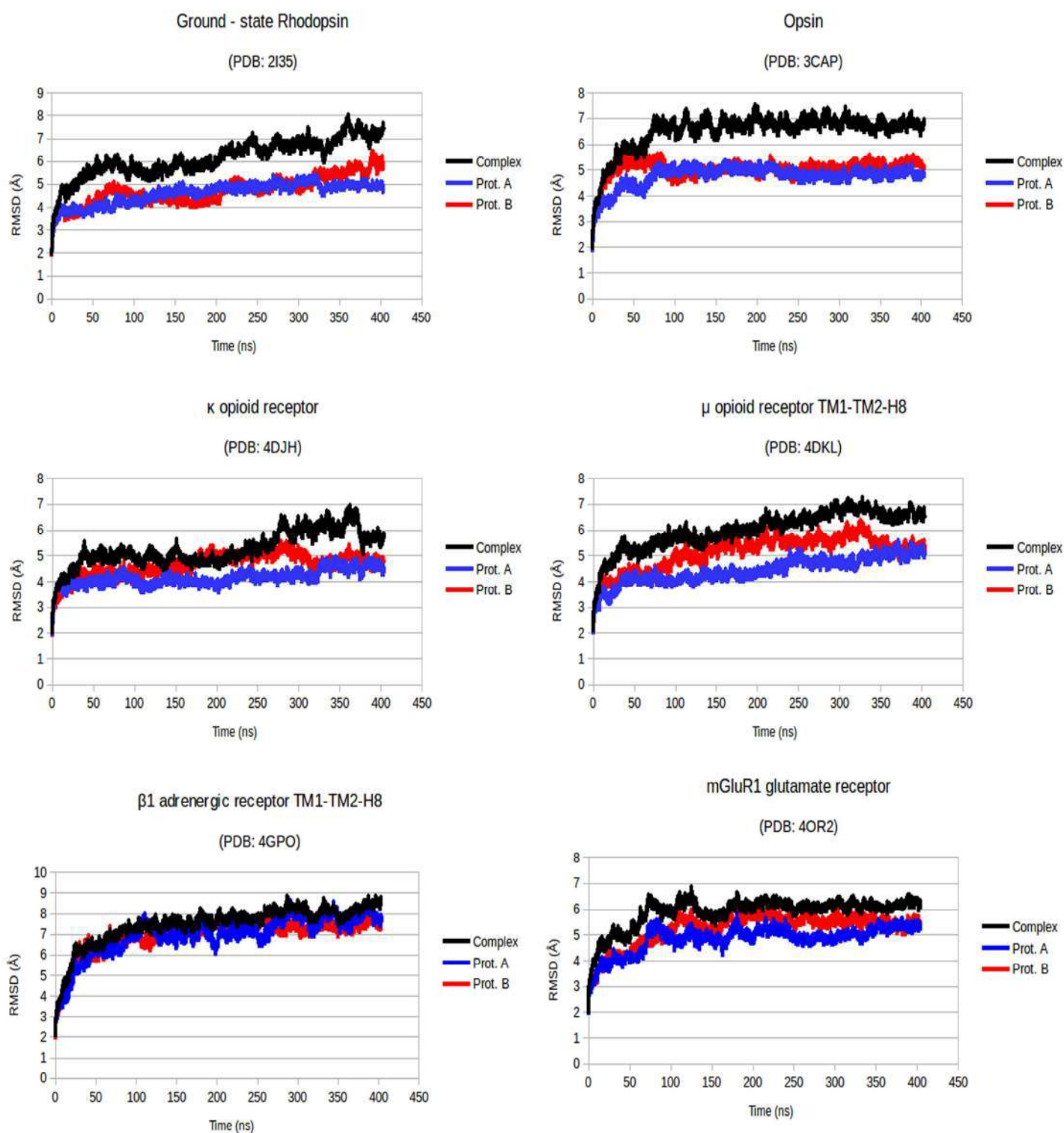
Προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής για κάθε κρυσταλλογραφικό διμερές πραγματοποιήθηκαν με το Coarse – Grained πεδίο δυνάμεων MARTINI για χρόνο 400 ns, με τη σταθερότητα και την πορεία των συστημάτων να ελέγχεται μέσω μετρήσεων γεωμετρικών

χαρακτηριστικών σε συνάρτηση με το χρόνο (Εικόνες 3.6, 3.7, 3.8, Παράρτημα Ι). Όπως προκύπτει από τη μέτρηση του RMSD, οι περισσότερες προσομοιώσεις συγκλίνουν στα πρώτα 50-100 ns, με τα διμερή να παραμένουν σταθερά για τον υπόλοιπο χρόνο (Εικόνες 3.7 και 3.8). Εξαίρεση αποτελούν το διμερές $\beta 2AR$ στο οποίο, λόγω της αυξημένης απόστασης μεταξύ των πρωτομερών, απαιτήθηκε μεγαλύτερος χρόνος σύγκλισης (150 ns). Σε όλες τις περιπτώσεις το συνολικό δίπλωμα των GPCRs παραμένει αμετάβλητο, χωρίς κάποιος υποδοχέας να υφίσταται αποδιάταξη της φυσιολογικής δομής του. Επιπρόσθετα, η μέτρηση και απεικόνιση του RMSF στις δομές των διμερών με βάση την προσομοίωση (Εικόνα 3.6, Παράρτημα Ι) δείχνει πως, με λίγες εξαιρέσεις, η μεγαλύτερη μεταβλητότητα παρατηρείται σε περιοχές με αναμενόμενη έντονη κινητικότητα, όπως οι εξωκυτταρικοί και ενδοκυτταρικοί βρόχοι και τα N- και C-άκρα. Σε κάποιες περιπτώσεις παρατηρούνται μεταβολές και σε μέρη των διαμεμβρανικών ελίκων, όπως συμβαίνει στην περίπτωση των ελίκων TM5 και TM6 του υποδοχέα κOR, χωρίς όμως να μεταβάλλεται δραματικά η συνολική δομή των πρωτομερών. Οι παραπάνω παρατηρήσεις δείχνουν την ικανότητα του πεδίου MARTINI ως προς την ορθή απεικόνιση των δομικών χαρακτηριστικών των GPCRs.

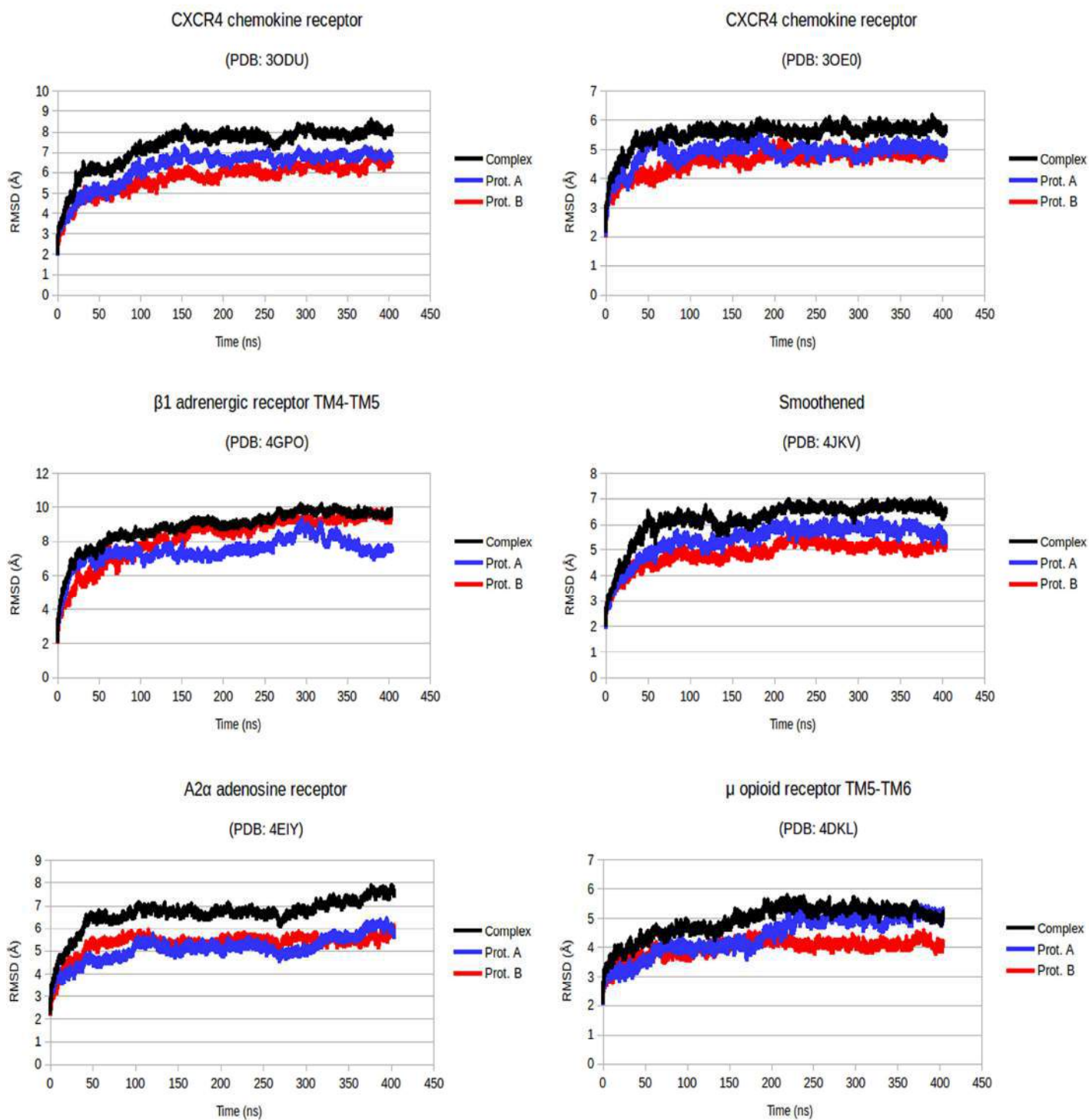


Εικόνα 3.6 Χρωματική απεικόνιση του RMSF στα τελικά μοντέλα των διμερών GPCRs. Το RMSF μετρά τη μέση απόκλιση κάθε αμινοξικού στο σύνολο της προσομοίωσης, λειτουργώντας ως μέτρο της κινητικότητας των τμημάτων των πρωτεϊνών. Οι δομές χρωματίζονται με βάση τις τιμές RMSF με αποχρώσεις από το σκούρο μπλε ως το κόκκινο, με τις αποχρώσεις κοντά στο μπλε να αντιστοιχούν σε χαμηλό RMSF και τις αποχρώσεις κοντά στο κόκκινο σε υψηλό RMSF. Περιοχές με υψηλές τιμές RMSF παρουσίασαν μεγαλύτερη ευκινησία κατά τη διάρκεια των προσομοιώσεων, ενώ περιοχές με χαμηλές τιμές RMSF παρέμειναν σχετικά σταθερές. Διαγραμματικές απεικονίσεις του RMSF για κάθε διμερές δίνονται στο Παράρτημα Ι. Στις απεικονίσεις χρησιμοποιούνται τα μοντέλα των τελικών αποτελεσμάτων των προσομοιώσεων CG-MD.

Σε κάθε διμερές, η μεταβολή RMSD του συνολικού συστήματος είναι μεγαλύτερη από τις αντίστοιχες μεταβολές RMSD των πρωτομερών, γεγονός που υποδεικνύει ότι οι μεταβολές που παρατηρούνται δεν αφορούν τόσο αλλαγές στη δομή κάθε πρωτομερούς όσο ανακατατάξεις στη θέση του κάθε υποδοχέα ως προς τον άλλο και τη συνολική γεωμετρία του διμερούς, όπως θα περιγραφεί παρακάτω. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι σε πολλές περιπτώσεις οι τιμές RMSD των πρωτομερών διαφέρουν μεταξύ τους, υποδεικνύοντας διαφορετικές μεταβολές σε κάθε υπομονάδα παρά τη συμμετρική φύση των διμερών.



Εικόνα 3.7 Μέτρηση του RMSD στη μονάδα του χρόνου για τις προσομοιώσεις CG-MD των διμερών TM1-TM2-H8. Για κάθε σύστημα μετράται και παρουσιάζεται το RMSD για ολόκληρο το σύμπλοκο (μαύρο), καθώς και για κάθε πρωτομερές ξεχωριστά (μπλε και κόκκινο).



Εικόνα 3.8 Μέτρηση του RMSD στη μονάδα του χρόνου για τις προσομοιώσεις CG-MD των διμερών TM4-TM5 και του διμερούς TM5-TM6 του μOR. Για κάθε σύστημα μετράται και παρουσιάζεται το RMSD για ολόκληρο το σύμπλοκο (μαύρο), καθώς και για κάθε πρωτομέρξ ξεχωριστά (μπλε και κόκκινο).

Τα τελικά αποτελέσματα των προσομοιώσεων Coarse – Grained χρησιμοποιήθηκαν για την επανασύσταση μοντέλων ατομικής λεπτομέρειας χρησιμοποιώντας μια διαδικασία αντίστροφης χαρτογράφησης, κατά την οποία κάθε σωματίδιο CG αντικαταστάθηκε από την ομάδα ατόμων στην οποία αντιστοιχούσε. Ακολούθως, τα μοντέλα υποβλήθηκαν σε μια σειρά από ελεγχόμενες προσομοιώσεις βελτιστοποίησης, μέσω των οποίων επιχειρήθηκε η διόρθωση σφαλμάτων. Τόσο τα ενδιάμεσα στάδια στη διαδικασία ανακατασκευής των ατομικών μοντέλων όσο και τα τελικά αποτελέσματα ελέγχθηκαν ως προς την ποιότητά τους και εξετάστηκαν ως προς τις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα πρωτομερή των διμερών.

Πίνακας 3.2. Αξιολόγηση της στερεοχημικής ποιότητας των τελικών διμερών, έπειτα από 400 ns CG-MD και μετά την ανακατασκευή των μοντέλων ατομικής διακριτικότητας.

Δομή	PDB	Τελικό Διμερές	Ευνοϊκό Ramach.	Απαγορ. Ramach.	Σφάλματα στροφόμερών	Αποκλ. Cβ > 0.25Å	Clash score	MolProb. Score
Ανενεργή Ροδοψίνη Οψίνη	2I35	TM1-TM2- H8	528 (83.41%)	35 (5.53%)	27 (5.40%)	30 (5.03%)	0	1.74 (88 th Perc.)
	3CAP	TM1-TM2- H8	543 (84.06%)	24 (3.72%)	22 (4.30%)	34 (5.59%)	0	1.66 (91 st Perc.)
β2AR (Chol.)	2RH1	TM1-TM2- ECL1-H8	492 (88.49%)	20 (3.60%)	21 (4.75%)	18 (3.35%)	0	1.60 (92 nd Perc.)
κOR	4DJH	TM1-TM2- H8	495 (87.61%)	25 (4.42%)	18 (3.90%)	32 (5.75%)	0	1.56 (94 th Perc.)
μOR	4DKL	TM1-TM2- H8	487 (87.59%)	18 (3.24%)	19 (4.22%)	21 (3.83%)	0	1.58 (93 rd Perc.)
β1AR^γ	4GPO	TM1-TM2- H8	488 (88.57%)	16 (2.90%)	27 (6.16%)	26 (4.84%)	0	1.69 (90 th Perc.)
mGluR1 (Chol.)	4OR2	TM1-TM2	446 (84.95%)	23 (4.38%)	0 (0.00%)	29 (5.70%)	0	1.16 (99 th Perc.)
Ροδοψίνη Καλαμαριού	2Z73	ICL2-TM4- TM5	585 (85.03%)	36 (5.23%)	31 (6.01%)	38 (5.85%)	0	1.75 (87 th Perc.)
CXCR4 (Υποκ: CVX15)	3OE0	ICL2-TM4- TM5-ECL2	457 (85.26%)	18 (3.36%)	18 (4.29%)	20 (3.82%)	0	1.64 (91 st Perc.)
CXCR4 (Υποκ: It1t)	3ODU	ICL2-TM4- TM5-ECL2	523 (89.10%)	14 (2.39%)	15 (3.28%)	16 (2.82%)	0	1.46 (96 th Perc.)
A2α	4EIY	ICL2-TM4- TM5	551 (90.33%)	17 (2.79%)	24 (5.24%)	21 (3.63%)	0	1.59 (93 rd Perc.)
β1AR	4GPO	ICL2-TM4- TM5	469 (85.43%)	17 (3.10%)	30 (6.85%)	25 (4.66%)	0	1.79 (86 th Perc.)
Smoothened	4JKV	ICL2-TM4- TM5	566 (83.11%)	40 (5.87%)	27 (5.02%)	24 (3.77%)	0	1.72 (88 th Perc.)
μOR	4DKL	TM5-TM6	502 (90.29%)	16 (2.88%)	21 (4.67%)	25 (4.67%)	0	1.55 (94 th Perc.)

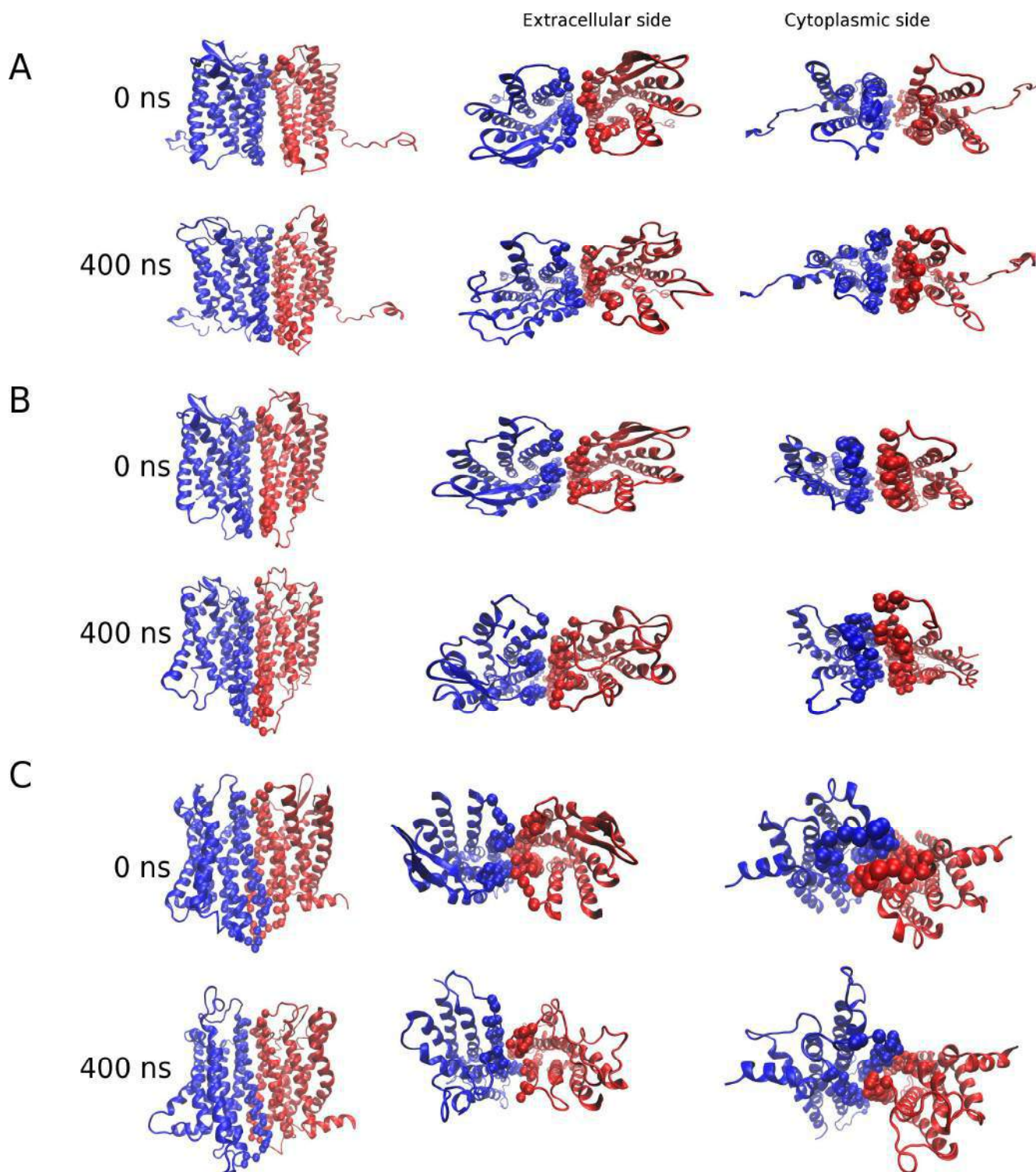
Όλα τα μοντέλα που προέκυψαν από την παραπάνω διαδικασία έχουν μικρό αριθμό καταλοίπων σε απαγορευμένες περιοχές του διαγράμματος Ramachandran και ελάχιστα λάθη στη γεωμετρία των πεπτιδικών δεσμών, ενώ δεν παρουσιάζουν στερεοχημικές παρεμποδίσεις (Πίνακας 3.2). Το ποσοστό των καταλοίπων στις πλέον ευνοϊκές περιοχές Ramachandran όλων των μοντέλων είναι μεγαλύτερο του 83%, ενώ και το σκορ που αποδίδεται από το MolProbity κυμαίνεται στα υψηλότερα δυνατά επίπεδα (870 – 1000 εκατοστημόριο). Πρέπει να σημειωθεί ότι κανένα από τα σφάλματα των τελικών μοντέλων δεν εντοπίζεται στην επιφάνεια αλληλεπίδρασης των διμερών. Επίσης, όλες οι αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών – πρωτεϊνών που παρατηρήθηκαν στις απεικονίσεις MARTINI διατηρήθηκαν ανέπαφες και στα ατομικά μοντέλα, γεγονός που δείχνει πως δεν χάθηκε πληροφορία κατά τη διαδικασία της επανασύστασης. Τα παραπάνω δεδομένα δείχνουν ότι τα μοντέλα που προέκυψαν από τις προσομοιώσεις επανασύστασης προτυποποιούν τις ίδιες αλληλεπιδράσεις που παρατηρήθηκαν στις απεικονίσεις των προσομοιώσεων CG-MD, καθώς και ότι διαθέτουν ικανοποιητική ποιότητα ώστε να εξεταστούν λεπτομερώς.

Στις ενότητες που ακολουθούν αναλύονται με μεγαλύτερη λεπτομέρεια τα αποτελέσματα των προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής, καθώς και τα δομικά χαρακτηριστικά τόσο των αρχικών δομών όσο και των τελικών μοντέλων.

3.4 Η Συμπεριφορά των διμερών CXCR4 και μOR απουσία της Λυσοζύμης T4L

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων των προσομοιώσεων CG-MD προτείνει ανακατατάξεις στην επιφάνεια αλληλεπίδρασης των διμερών GPCRs που είχαν κρυσταλλωθεί ως χίμαιρες με τη Λυσοζύμη του φάγου T4 (T4L), και στα οποία οι T4L συμμετείχαν στις αλληλεπιδράσεις. Αυτά περιλαμβάνουν τα διμερή TM4-TM5-TM6 (PDB: 3OE0) και TM5-TM6 (PDB: 3ODU) του υποδοχέα CXCR4, καθώς και το διμερές TM5-TM6 του υποδοχέα μOR (PDB: 4DKL). Οι πιο έντονες αλλαγές παρατηρούνται στα δυο διμερή του CXCR4, τα οποία απουσία της T4L παρουσιάζουν σημαντικές κινήσεις. Οι προσομοιώσεις των διμερών TM5-TM6 (PDB: 3ODU) και TM4-TM5-TM6 (PDB: 3OE0) καταλήγουν σε πολύ παρόμοια αποτελέσματα. Και στις δυο περιπτώσεις τα

πρωτομερή μειώνουν την απόσταση μεταξύ τους, σχηματίζοντας νέες επαφές ανάμεσα στις έλικες TM4 και TM5, ενώ όλες σχεδόν οι αλληλεπιδράσεις στην περιοχή της έλικας TM6 χάνονται, με εξαίρεση λίγες επαφές του δεύτερου εξωκυτταρικού βρόχου. Επίσης, αυξάνονται οι επαφές στην κυτοπλασματική όψη των υποδοχέων, περιλαμβάνοντας περισσότερα κατάλοιπα του δεύτερου ενδοκυτταρικού βρόχου αλλά και κατάλοιπα στο κυτοπλασματικό άκρο της έλικας TM3 (Εικόνα 3.9).



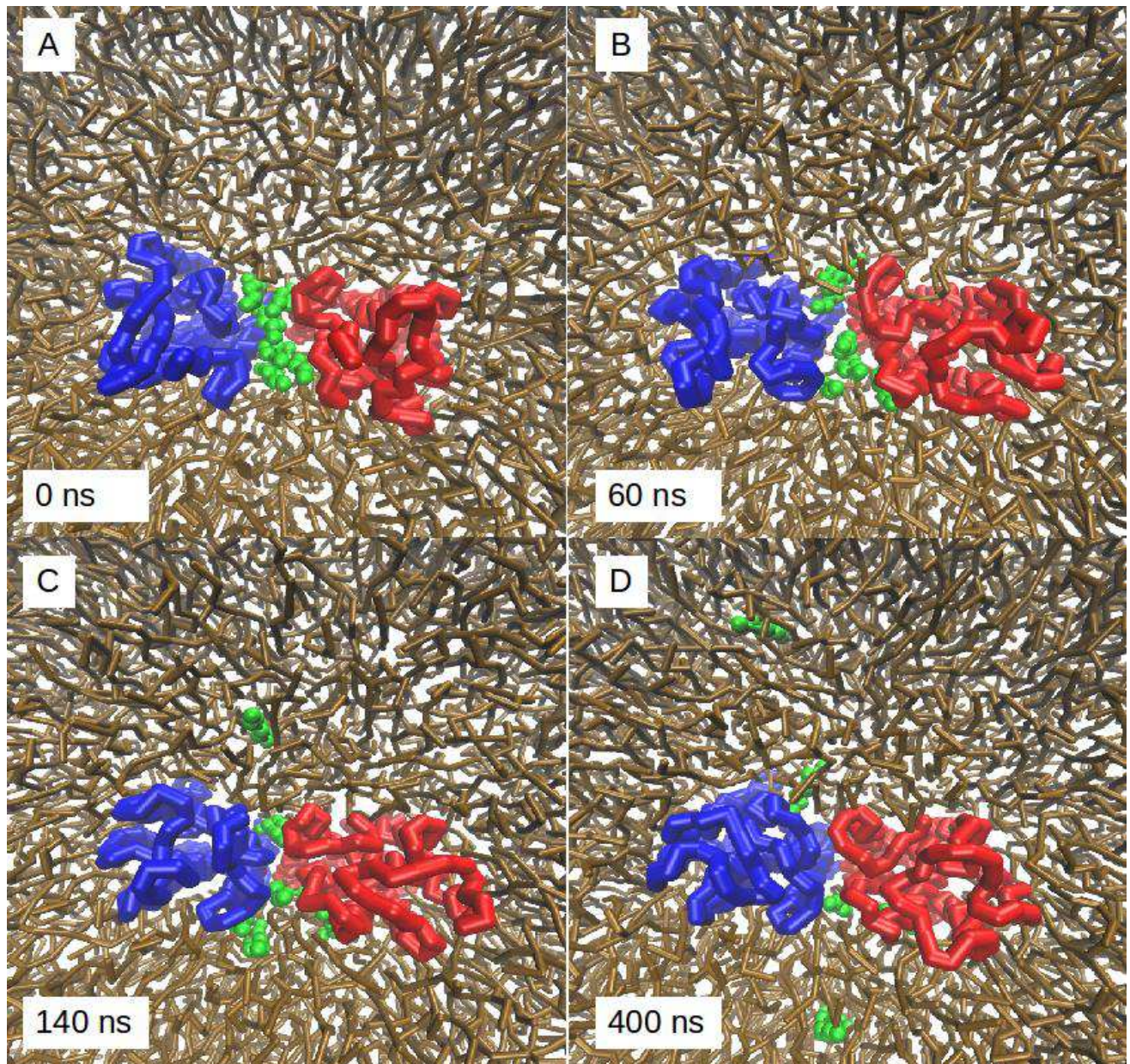
Εικόνα 3.9 Αποτελέσματα των προσομοιώσεων CG-MD για το διμερές TM5-TM6 του CXCR4 (PDB: 3ODU) (A), το διμερές TM4-TM5-TM6 του CXCR4 (PDB: 3OE0) (B) και το διμερές TM5-TM6 του μ OR (PDB: 4DKL) (C) απουσία των υπομονάδων της Λυσοζύμης T4L. Για κάθε διμερές παρουσιάζεται η δομή στην αρχή (0 ns) και το τέλος της προσομοίωσης (400 ns), τόσο σε γενική επισκόπηση όσο και σε απεικόνιση της εξωκυτταρικής και κυτοπλασματικής όψης. Τα πρωτομερή χρωματίζονται με μπλε και κόκκινο, ενώ τα αλληλεπιδρώντα κατάλοιπα σημαίνονται με σφαίρες.

Από τα δύο προσομοιωμένα διμερή του CXCR4, το αρχικό διμερές TM5-TM6 παρουσίασε τις περισσότερες στερεοδιαταξικές αλλαγές, με τις έλικες TM4-TM5 να μετακινούνται για να κλείσουν την κοιλότητα ανάμεσα στα πρωτομερή, ενώ η απόσταση μεταξύ των πρωτομερών μειώνεται περαιτέρω μέσω αλλαγής στο συνολικό προσανατολισμό του διμερούς, με το δεύτερο πρωτομερές να μετακινείται στο σύνολό του σε σχέση με το πρώτο. Οι παραπάνω αλλαγές οδηγούν σε μείωση της απόστασης ανάμεσα στα γεωμετρικά κέντρα των πρωτομερών κατά περίπου 5 Å. Από την άλλη, το αρχικό διμερές TM4-TM5-TM6 παρουσιάζει λιγότερο σημαντικές αλλαγές, διαθέτοντας ήδη στη δομή του αρκετές από τις επαφές των ελίκων TM4 και TM5 που παρατηρήθηκαν στην προσομοίωση του άλλου διμερούς. Τα τελικά μοντέλα περιλαμβάνουν εκτεταμένες αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στις έλικες TM4 και TM5, τους ενδοκυτταρικούς βρόχους ICL2 αλλά και το κυτοπλασματικό μέρος των ελίκων TM3, παρουσιάζοντας σημαντικές ομοιότητες με τα υπόλοιπα TM4-TM5 διμερή, ιδιαίτερα με περιπτώσεις όπως το διμερές του υποδοχέα Smoothened.

Η γεωμετρική ανάλυση των αποτελεσμάτων δείχνει ότι όλες οι παραπάνω αλλαγές πραγματοποιήθηκαν κατά τα πρώτα 30-50 ns, με τα δυο διμερή να παραμένουν σχετικά σταθερά για τον υπόλοιπο χρόνο της κάθε προσομοίωσης. Τα δεδομένα των Coarse – Grained προσομοιώσεων των διμερών CXCR4 συμφωνούν με αποτελέσματα από τη βιβλιογραφία, προερχόμενα από προσομοιώσεις ατομικής λεπτομέρειας για τον CXCR4, οι οποίες είχαν πραγματοποιηθεί για χρόνο 100 ns. Η συμφωνία των αποτελεσμάτων ανάμεσα στις Coarse – Grained και τις ατομιστικές προσομοιώσεις αναδεικνύει την ικανότητα του πεδίου MARTINI στην ορθή προσομοίωση διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, καθώς και τη σταθερότητα των διμερών CXCR4 για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα από αυτά που ήταν γνωστά ως τώρα από τη βιβλιογραφία (Nichols *et al.*, 2013; Rodriguez and Gutierrez-de-Teran, 2012). Επιπρόσθετα, αναδεικνύεται η σημαντική συνεισφορά της Λυσοζύμης T4 στον καθορισμό της γεωμετρίας του διμερούς κατά τη διαδικασία της κρυστάλλωσης. Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι από το σύνολο των προσομοιώσεων που πραγματοποιήθηκαν η περίπτωση του CXCR4 ήταν η μοναδική στην οποία παρατηρήθηκαν τόσο εκτεταμένες αλλαγές στον προσανατολισμό των πρωτομερών στο διμερές. Τα παραπάνω υποδεικνύουν ότι, σε αντίθεση με τα αρχικά κρυσταλλογραφικά δεδομένα, τα διμερή του CXCR4 φαίνονται να αντιστοιχούν στον τύπο TM4-TM5 παρά στον τύπο TM5-TM6.

Σε αντίθεση με τον υποδοχέα CXCR4, η προσομοίωση του διμερούς TM5-TM6 του υποδοχέα μOR παρουσιάζει λιγότερο εκτεταμένες αλλαγές. Η κρυσταλλική δομή του μOR περιέχει επίσης υπομονάδες Λυσοζύμης T4, οι οποίες στο διμερές TM5-TM6 σχηματίζουν διαμοριακές επαφές τόσο μεταξύ τους όσο και με τους υποδοχείς. Ωστόσο, η συνεισφορά τους στην επιφάνεια επαφής ήταν πολύ μικρότερη, με την πλειονότητά της να σχηματίζεται από τις έλικες TM5 και TM6 των πρωτομερών του μOR, οι οποίες συμμετέχουν στη δημιουργία ενός διαμεμβρανικού δεματίου τεσσάρων α-ελίκων. Κατά συνέπεια, η συνολική γεωμετρία και η επιφάνεια αλληλεπίδρασης παρέμειναν σταθερές καθ'όλη τη διάρκεια της προσομοίωσης, με τις μόνες σημαντικές ανακατατάξεις να παρουσιάζονται στα κυτοπλασματικά άκρα των ελίκων TM5 και TM6, τα οποία υιοθετούν νέες θέσεις (Εικόνα 3.9). Δεδομένου ότι η εισαγωγή της Λυσοζύμης κατά τον προσδιορισμό της δομής έγινε στη θέση του κυτοπλασματικού βρόχου ICL3, ο οποίος συνδέει τα άκρα αυτών των δυο ελίκων, είναι αναμενόμενο η αρχική τους θέση να έχει επηρεαστεί από την παρουσία του χημειοκίνητου μορίου. Κατά συνέπεια, η παρατήρηση αυτών των μετακινήσεων δεν είναι παράδοξη και είναι πιθανό να αντικατοπτρίζει τη θέση που θα λάμβαναν τα άκρα των ελίκων σε φυσιολογικές συνθήκες. Κάποιες μικρές αλλαγές παρατηρούνται επίσης και στα εξωκυτταρικά τμήματα, ωστόσο, η συνολική εικόνα του διμερούς παραμένει απaráλλαχτη και η μέση απόσταση μεταξύ των πρωτομερών δεν αλλάζει, γεγονός που δείχνει τη σημαντική σταθερότητα του διμερούς TM5-TM6 στο χρόνο των 400 ns.

3.5 Η συνεισφορά της χοληστερόλης στο σχηματισμό αλληλεπιδράσεων ολιγομερισμού

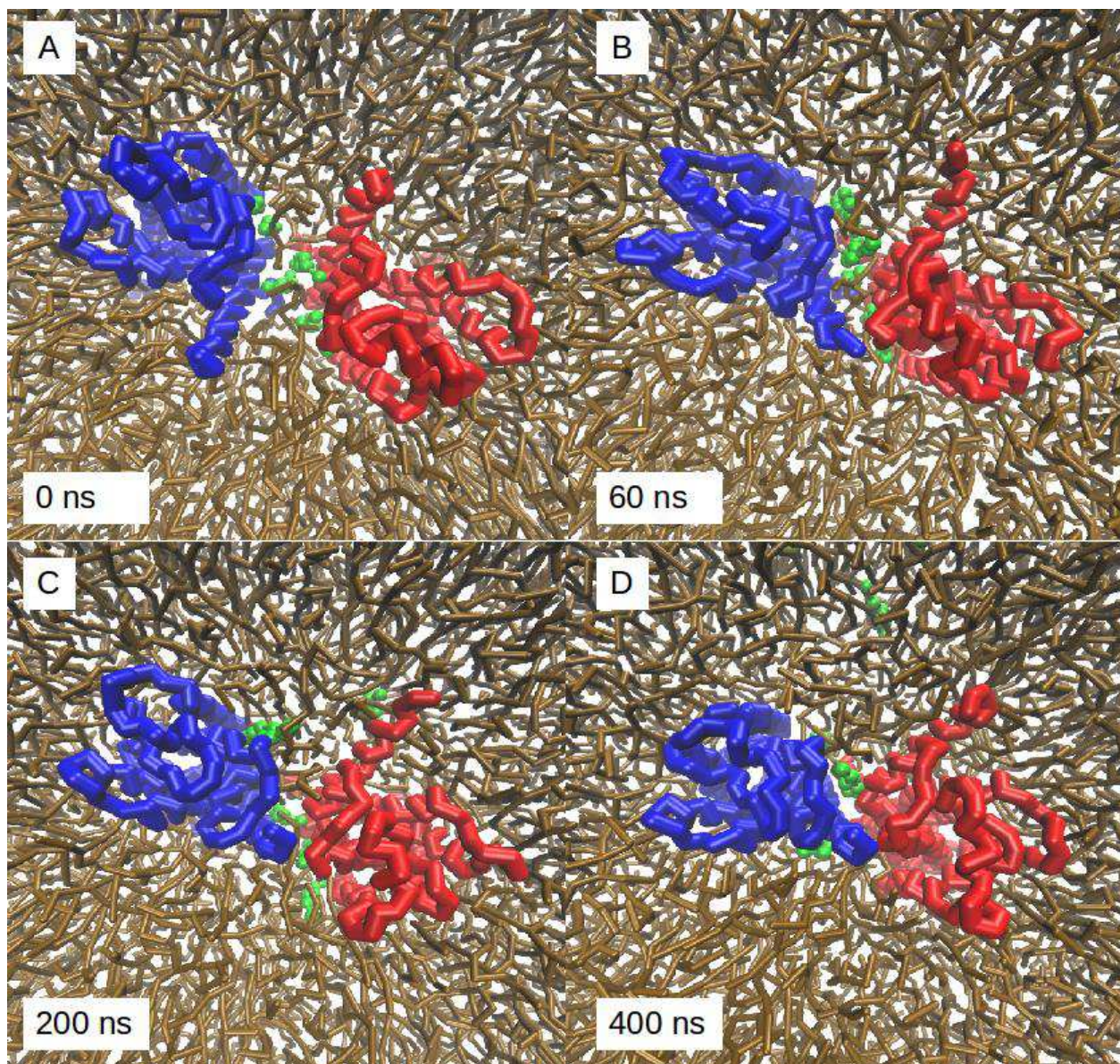


Εικόνα 3.10 Η συμπεριφορά των μορίων χοληστερόλης στην προσομοίωση CG-MD του υποδοχέα mGluR1. Παρουσιάζονται διαφορετικά στιγμιότυπα της προσομοίωσης. Οι υποδοχείς απεικονίζονται με μπλε και κόκκινο χρώμα, τα μόρια χοληστερόλης με πράσινο και η λιπιδική διπλοστιβάδα με καφέ.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι προσομοιώσεις των διμερών TM1-TM2-H8 για τους υποδοχείς mGluR1 και β 2AR, καθώς μεγάλο μέρος της επιφάνειας αλληλεπίδρασης δεν σχηματίζεται από τις ίδιες τις πρωτεΐνες αλλά από ενδιάμεσα μόρια χοληστερόλης, τα οποία παρεμβάλλονται μεταξύ των πρωτομερών και τα οποία φαίνονται να ρυθμίζουν την οργάνωση

των διμερών. Πλήθος πειραματικών δεδομένων έχουν οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι η παρουσία χοληστερόλης συνδέεται άμεσα με την ικανότητα πολλών υποδοχέων να σχηματίζουν διμερή. Μόρια χοληστερόλης έχουν βρεθεί να επάγουν ή να καταστέλλουν την τεταρτοταγή οργάνωση των GPCRs αλλά και να ρυθμίζουν τη λειτουργικότητά τους, επηρεάζοντας τη διαδικασία ενεργοποίησης ή την αναγνώριση των G-πρωτεϊνών. Επιπρόσθετα, πρόσφατες προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής για τον υποδοχέα $\beta 2AR$ υποδεικνύουν ότι η περιεκτικότητα της μεμβράνης σε χοληστερόλη σχετίζεται άμεσα με τη δομική φύση των αλληλεπιδράσεων ολιγομερισμού, με διαφορετικές συγκεντρώσεις χοληστερόλης να επάγουν το σχηματισμό διαφορετικών τύπων διμερισμού. Για να μελετηθεί η συνεισφορά της στα διμερή υποδοχέων, λοιπόν, οι προσομοιώσεις των υποδοχέων mGluR1 και $\beta 2AR$ πραγματοποιήθηκαν παρουσία των κρυσταλλογραφικά προσδιορισμένων μορίων χοληστερόλης.

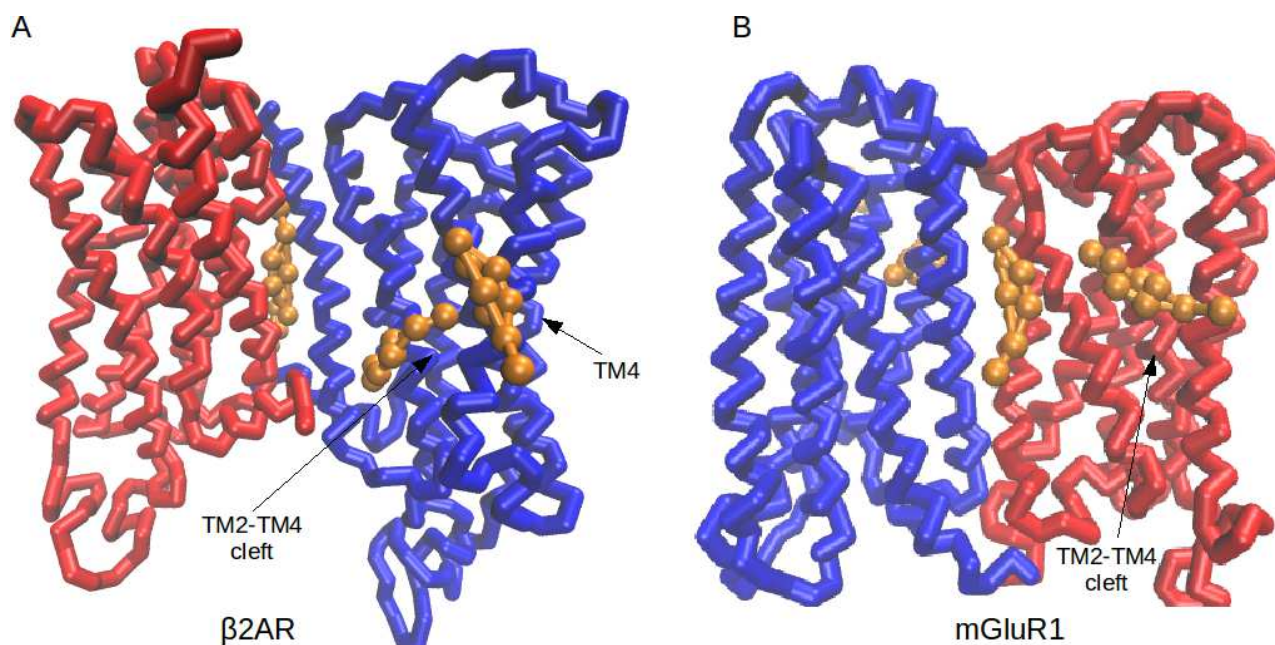
Η μελέτη των αποτελεσμάτων των προσομοιώσεων CG-MD για τα δύο συστήματα αποκαλύπτει χαρακτηριστικά των αλληλεπιδράσεων των GPCRs με τα μόρια χοληστερόλης, προτείνοντας ένα πιθανό ρόλο για την τελευταία στην οργάνωση των αλληλεπιδράσεων ολιγομερισμού. Και στις δύο περιπτώσεις η απόσταση ανάμεσα στα πρωτομερή στις αρχικές κρυσταλλικές δομές είναι αυξημένη, με μικρό αριθμό διαμοριακών πρωτεϊνικών επαφών (Εικόνες 3.10 και 3.11). Κατά τη διάρκεια κάθε προσομοίωσης τα δυο πρωτομερή παρουσιάζονται να προσεγγίζουν σταδιακά το ένα το άλλο. Τα μόρια χοληστερόλης, παρά τη ρευστότητα της λιπιδικής διπλοστιβάδας που, θεωρητικά, θα επέτρεπε την ελεύθερη κίνησή τους και την ανταλλαγή τους με μόρια λιπιδίων, παραμένουν στη θέση τους, ενισχύοντας μάλιστα τις επαφές μεταξύ τους αλλά και με τα αμινοξέα των υποδοχέων και φαίνονται να ωθούν τα πρωτομερή στο να μειώσουν την απόσταση μεταξύ τους. Η διαδικασία αυτή παρατηρείται στη διάρκεια των πρώτων 120 ns για κάθε υποδοχέα, με το διμερές $\beta 2AR$ να απαιτεί το μεγαλύτερο χρόνο, λόγω της μεγαλύτερης απόστασης ανάμεσα στα πρωτομερή.



Εικόνα 3.11 Η συμπεριφορά των μορίων χοληστερόλης στην προσομοίωση CG-MD του υποδοχέα β2AR. Ακολουθείται το πρότυπο απεικόνισης της εικόνας 3.9.

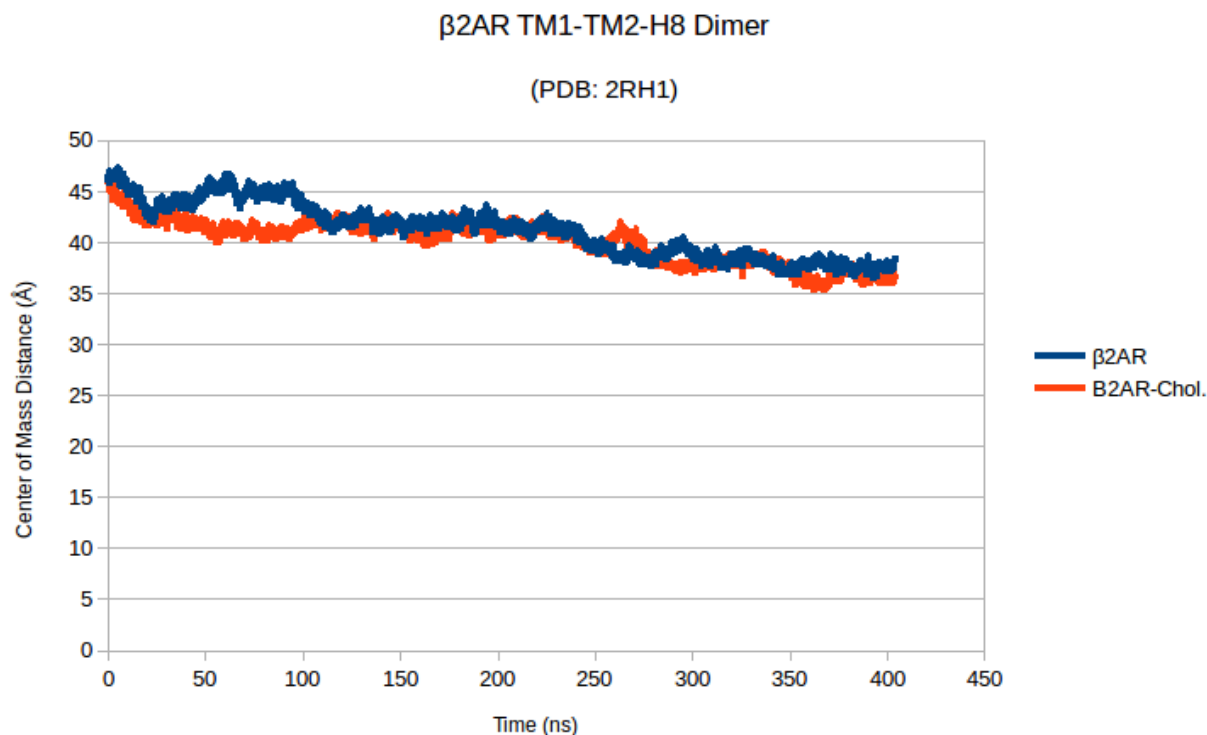
Τα μόρια χοληστερόλης παραμένουν συγκεντρωμένα ώσπου τα δυο πρωτομερή να προσεγγίσουν αρκετά το ένα το άλλο. Αυτό που ακολουθεί στη συνέχεια είναι η σταδιακή αποχώρησή τους από τη θέση τους ανάμεσα στα πρωτομερή. Η διαδικασία περιλαμβάνει την ανταλλαγή κάθε μορίου χοληστερόλης με ένα αντίστοιχο μόριο λιπιδίου και φαίνεται να ξεκινά από τα μόρια στην περιφέρεια της γέφυρας των στερολών, τα οποία παρουσιάζουν τις λιγότερες επαφές με τα πρωτομερή. Τα κεντρικά μόρια χοληστερόλης διατηρούνται σχετικά σταθερά στη θέση τους για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, ωστόσο τελικά μετακινούνται και αυτά. Τα λιπίδια που αντικαθιστούν τα μόρια χοληστερόλης εκτοπίζονται από τη θέση τους, αφήνοντας τις α -έλικες των πρωτομερών να πλησιάσουν περισσότερο η μία την άλλη και να

σχηματίσουν περισσότερες διαμοριακές επαφές. Τα τελικά διμερή που προκύπτουν παρουσιάζουν εκτεταμένες επαφές μεταξύ τους και συνολική γεωμετρία που θυμίζει τα υπόλοιπα διμερή TM1-TM2-H8 του συνόλου δεδομένων.



Εικόνα 3.12 Απεικόνιση θέσεων στις οποίες μόρια χοληστερόλης παρέμειναν για χρονικά διαστήματα άνω των 100 ns για τον υποδοχέα $\beta 2AR$ (A) και τον υποδοχέα mGluR1 (B).

Πρέπει να σημειωθεί ότι δεν απομακρύνονται όλα τα μόρια χοληστερόλης από τη θέση των αλληλεπιδράσεων ολιγομερισμού. Αντίθετα, και στα δυο διμερή παρατηρείται η παρουσία κάποιων μορίων χοληστερόλης περιμετρικά της επιφάνειας επαφής, τα οποία φαίνονται να δρουν συμπληρωματικά ως γέφυρες ανάμεσα σε κατάλοιπα των δυο πρωτομερών, με την πλειονότητα των επαφών ωστόσο να περιλαμβάνουν αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών – πρωτεϊνών. Πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι και στις δυο προσομοιώσεις κάποια από τα μόρια χοληστερόλης δεν απομακρύνθηκαν ολοκληρωτικά από τους υποδοχείς αλλά μετατοπίστηκαν σε διαφορετικές θέσεις πρόσδεσης, στις οποίες παρέμειναν για σχετικά μεγάλο χρονικό διάστημα. Συγκεκριμένα, μόρια χοληστερόλης και στις δύο προσομοιώσεις βρέθηκαν μακριά από την αρχική θέση πρόσδεσής τους, να αλληλεπιδρούν με κατάλοιπα κοντά στην έλικα TM3, ενώ ειδικά στην περίπτωση του $\beta 2AR$ εντοπίζονται και στην κυτοπλασματική όψη της έλικας TM4, για χρόνους της τάξης των 100 ns (Εικόνα 3.12).



Εικόνα 3.13 Σύγκριση των μεταβολών της απόστασης ανάμεσα στα κέντρα μάζας των πρωτομερών (A) στη μονάδα του χρόνου για τις προσομοιώσεις του β2AR παρουσία και απουσία χοληστερόλης. Παρατηρείται ότι απουσία των μορίων χοληστερόλης η απόσταση ανάμεσα στα πρωτομερή χρειάζεται περισσότερο χρόνο για να μειωθεί στα πρώτα στάδια των προσομοιώσεων, με τα δύο συστήματα να ακολουθούν παρόμοια συμπεριφορά μετά τα 150 ns.

Οι παραπάνω θέσεις βρίσκονται σε συμφωνία με δεδομένα από προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής ατομικής λεπτομέρειας για τον β2AR, τα οποία παρουσιάζουν αντίστοιχες θέσεις πρόσδεσης για τη χοληστερόλη (Cang *et al.*, 2013). Επιπρόσθετα, οι θέσεις αλληλεπίδρασης στην έλικα TM4 βρίσκονται κοντά σε αντίστοιχες θέσεις του ομόλογου υποδοχέα β1AR που συμμετέχουν σε διμερή TM4-TM5. Η παρουσία αυτών των μορίων θα μπορούσε να δρα ανασταλτικά στο σχηματισμό διμερών TM4-TM5 για τον β2AR. Η παραπάνω παρατήρηση συμφωνεί με συμπεράσματα από μελέτες αυτο – οργάνωσης του υποδοχέα β2AR, τα οποία υποστηρίζουν ότι αυξημένη παρουσία μορίων χοληστερόλης φαίνονται να επάγει το σχηματισμό διμερών TM1-TM2-H8 και να εμποδίζει τη δημιουργία άλλων τύπων ολιγομερισμού (Prasanna *et al.*, 2014).

Προκειμένου να ελεγχθεί περαιτέρω η σημασία των μορίων χοληστερόλης στο σχηματισμό των αλληλεπιδράσεων ολιγομερισμού, η προσομοίωση του διμερούς β2AR επαναλήφθηκε σε μεμβρανικό περιβάλλον αποτελούμενο αποκλειστικά από λιπίδια POPC, έχοντας πρώτα

αφαιρέσει όλα τα αρχικά μόρια χοληστερόλης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ξανά τα πρωτομερή του $\beta 2AR$ να μειώνουν την απόσταση μεταξύ τους, ωστόσο ο χρόνος που απαιτήθηκε ώστε να λάβει το διμερές την τελική στερεοδιάταξή του ήταν σημαντικά μεγαλύτερος από αυτόν που παρατηρήθηκε στην προσομοίωση με τα μόρια χοληστερόλης, όπως αποκαλύπτεται από τη σύγκριση της απόστασης μεταξύ των πρωτομερών στις δυο προσομοιώσεις, στη μονάδα του χρόνου (Εικόνα 3.13). Τα αποτελέσματα αυτής της προσομοίωσης δείχνουν ότι αν και ο σχηματισμός διμερών μπορεί να συμβεί και απουσία μορίων χοληστερόλης, η παρουσία τους βοηθά σημαντικά στη μείωση της απόστασης ανάμεσα στα πρωτομερή, επιταχύνοντας τη διαδικασία. Με βάση τα παραπάνω και, σε συνδυασμό με τη διαθέσιμη πειραματική πληροφορία, μπορεί να προταθεί ότι τα μόρια χοληστερόλης συμμετέχουν ενεργά στην οργάνωση των διμερών, ωθώντας τη γρήγορη αναγνώριση των πρωτομερών μεταξύ τους και τη μείωση της απόστασης ανάμεσα στους υποδοχείς, ενώ μπορούμε να υποθέσουμε επίσης ότι η παρουσία μορίων χοληστερόλης σε συγκεκριμένες θέσεις πάνω στην επιφάνεια των GPCRs μπορεί να ρυθμίσει την επιλεκτικότητα στο σχηματισμό των διάφορων τύπων διμερών.

3.6 Συντηρημένα χαρακτηριστικά στη δυναμική των διμερών GPCRs

Σε αντίθεση με τις περιπτώσεις των διμερών CXCR4 και $\beta 2AR$, τα υπόλοιπα σύμπλοκα του συνόλου δεδομένων διατηρούν το γενικότερο προσανατολισμό τους σχετικά σταθερό καθ'όλη τη διάρκεια των προσομοιώσεων. Μεταβολές παρατηρούνται, ωστόσο το εύρος τους είναι αρκετά μικρότερο και φαίνεται να σχετίζεται με την αρχική γεωμετρία του κάθε διμερούς στον κρύσταλλο. Όπως προκύπτει από τη μέτρηση του RMSF για κάθε κατάλοιπο (Εικόνα 3.6, Παράρτημα I), τα διμερή TM1-TM2-H8 τα οποία παρουσίασαν τις μικρότερες αλλαγές είναι αυτά των υποδοχέων $\beta 1AR$ και κOR στα οποία, όπως αναφέρθηκε ήδη στην Ενότητα 3.1, τα πρωτομερή είναι παράλληλα μεταξύ τους ως προς τους κύριους άξονές τους και παρουσιάζουν εκτεταμένες επαφές. Αντίθετα, τα διμερή στα οποία σχηματιζόταν γωνία ανάμεσα στα πρωτομερή, όπως το διμερές TM1-TM2-H8 του υποδοχέα μOR και το διμερές της ανενεργής Ροδοψίνης, τα πρωτομερή μετακινήθηκαν με τέτοιο τρόπο ώστε να αποκτήσουν γεωμετρία παρόμοια με αυτήν των υποδοχέων κOR και $\beta 1AR$.

Ειδικά για την περίπτωση της Ροδοψίνης, πρέπει να σημειωθεί ότι τόσο το διμερές του ανενεργού φωτοϋποδοχέα όσο και το διμερές της Οψίνης υιοθετούν τελικό προσανατολισμό που επιτρέπει το σχηματισμό αλληλεπιδράσεων παρόμοιων με τις αλληλεπιδράσεις των πρωτομερών στο μοντέλο MDFF της Μεταροδοψίνης Ι. Επιπρόσθετα, σε κάποιες περιπτώσεις, όπως αυτή του υποδοχέα μOR, παρατηρούνται μετακινήσεις της έλικας TM1, η οποία τείνει να υιοθετήσει προσανατολισμό παρόμοιο με αυτόν στους υποδοχείς β1AR και κOR. Σε γενικές γραμμές, παρατηρούνται αυξημένες επαφές ανάμεσα στις έλικες TM1 κάθε πρωτομερούς, καθώς και ανάμεσα στις έλικες H8.

Τα διμερή TM4-TM5 διατηρούν επίσης τον γενικό προσανατολισμό τους. Σε όλες τις περιπτώσεις τα δυο πρωτομερή μειώνουν την απόσταση μεταξύ τους, με το διμερές του β1AR να παρουσιάζει τη μεγαλύτερη αλλαγή και το διμερές του Smoothened να αλλάζει ελάχιστα, διαθέτοντας ήδη εκτεταμένες επαφές ανάμεσα στα πρωτομερή. Δεν παρατηρείται κάποια σημαντική απώλεια επαφών, αντίθετα σχηματίζονται νέες, κυρίως στην έλικα TM4. Τέλος, όλα τα διμερή παρουσιάζουν το σχηματισμό νέων επαφών με τα κυτοπλασματικά μέρη των ελίκων TM3 και τους βρόχους ICL2, θυμίζοντας τόσο τις επαφές που παρατηρήθηκαν στην κρυσταλλική δομή του Smoothened όσο και το αποτέλεσμα των προσομοιώσεων του CXCR4.

Συνολικά, αυτό που παρατηρείται από το σύνολο των προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής είναι η ύπαρξη συντηρημένων χαρακτηριστικών στα διμερή των GPCRs. Ενδιαφέρον προξενεί το γεγονός ότι, παρά τη χαμηλή ομοιότητα στην αμινοξική ακολουθία, τα διμερή των mGluR1 και Smoothened παρουσιάζουν κοινή συμπεριφορά με τα αντίστοιχα διμερή των υποδοχέων της Κλάσης A, γεγονός που υποδεικνύει ότι οι μηχανισμοί ολιγομερισμού των GPCRs πιθανώς είναι κοινοί για όλες τις Κλάσεις.

3.7 Η συνεισφορά των πολικών και αρωματικών επαφών στην επιφάνεια αλληλεπίδρασης

Η κύρια ανάλυση της επιφάνειας αλληλεπίδρασης πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας κριτήρια βασισμένα στην προσβάσιμη επιφάνεια, ακολουθούμενα από ταξινόμηση των αλληλεπιδρώντων καταλοίπων με βάση τις ιδιότητές τους αλλά και το βαθμό κάλυψής τους κατά το σχηματισμό του συμπλόκου. Χρησιμοποιήθηκε ένα κριτήριο σχετικής προσβάσιμης επιφάνειας (RSA), μέσω του οποίου λήφθηκαν υπόψη όχι μόνο η επιφάνεια των καταλοίπων αλλά και οι διαφορές ανάμεσά τους κατά την κατάταξή τους ως στοιχεία του πυρήνα ή της περιφέρειας της θαμμένης επιφάνειας.

Πίνακας 3.3. Κατανομή των αλληλεπιδρώντων καταλοίπων ανάλογα με τις στερεοχημικές ιδιότητές τους στις κρυσταλλικές δομές των διμερών GPCRs. Στον πίνακα δεν παρουσιάζονται τα διμερή $\beta 2AR$ και $mGluR1$, καθώς οι αρχικές δομές παρουσίαζαν ελάχιστες επαφές ανάμεσα στα πρωτομερή, με τα μόρια χοληστερόλης να παρεμβάλλονται.

Δομή	PDB	%Θετικά (+His)	%Αρνητικά	%Αφόρτιστα Πολικά	%Αλειφατικά	%Αρωματικά (+Pro)	BSA (Å)
Ροδοψίνη (TM1-TM2-H8)	2I35	17.38	0.00	20.72	45.24	26.67	1040.2
Οψίνη (TM1-TM2-H8)	3CAP	8.20	5.57	33.12	36.38	16.73	1307.3
κOR (TM1-TM2-H8)	4DJH	8.00	0.00	20.00	26.00	46.00	2045.7
μOR (TM1-TM2-H8)	4DKL	5.88	0.00	35.29	41.18	17.65	1186.8
μOR (TM5-TM6)	4DKL	5.71	2.86	20.00	54.29	17.14	2994.2
β1AR (TM1-TM2-H8)	4GPO	18.18	4.55	18.18	50.00	9.09	1690.4
β1AR (TM4-TM5)	4GPO	28.57	0.00	21.43	28.57	21.43	973.3
Ροδοψίνη καλ. (TM4-TM5)	2Z73	16.67	0.00	22.22	38.89	22.22	1141.6
CXCR4 (TM5-TM6)	3ODU	5.88	11.44	22.88	42.81	16.99	1650.4
CXCR4 (TM4-TM5- TM6)	3OEO	14.82	7.41	22.22	40.74	14.81	2241.5
A2α (TM4-TM5)	4E1Y	12.50	0.00	25.00	43.75	18.75	1058.9
Smoothened (TM4-TM5)	4JKV	7.14	0.00	7.04	56.29	29.53	2435.9

Πίνακας 3.4. Κατάλοιπα του πυρήνα των επιφανειών αλληλεπίδρασης για κάθε διμερές του συνόλου δεδομένων στην αρχική κρυσταλλική δομή και στο τελικό αποτέλεσμα των προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής. Παρουσιάζονται κατάλοιπα και για τα δύο πρωτομερή κάθε διμερούς με τον κωδικό της αλυσίδας, το όνομα και τον αριθμό του καταλοίπου. Κατάλοιπα που συμμετέχουν σε δεσμούς υδρογόνου ή αλληλεπιδράσεις π-ηλεκτρονίων σημαίνονται με έντονα γράμματα. Στις δομές των mGluR1 και $\beta 2$ αδρενεργικού τα κεντρικά κατάλοιπα που αλληλεπιδρούν με τα μόρια χοληστερόλης σημαίνονται με αστερίσκους.

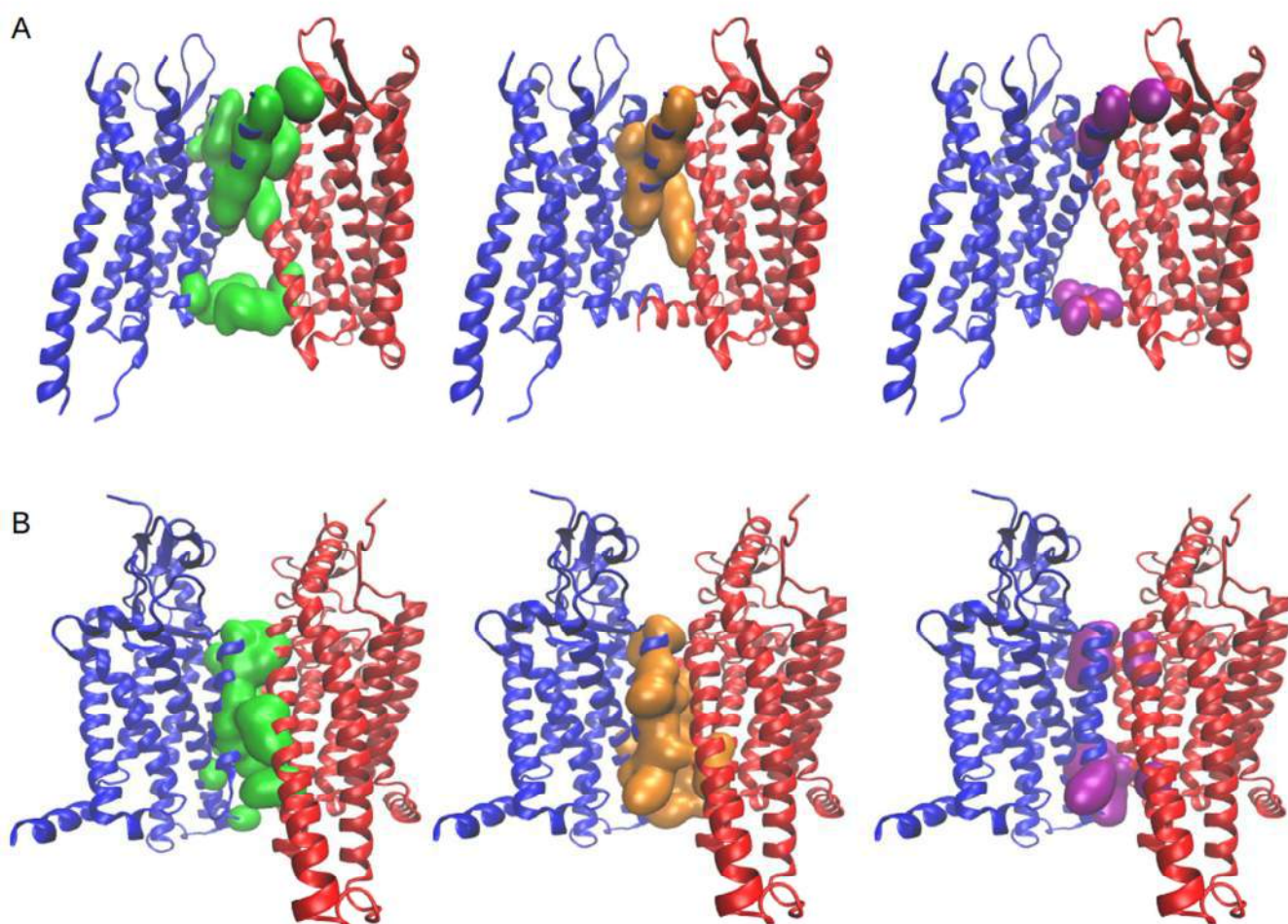
Διμερές	PDB	Κρυσταλλική Δομή	400 ns MD
Ανενεργή Ροδοψίνη (TM1-TM2-H8)	2I35	Chain A: F45 , M49, F52 , P53, R314 Chain B: F45 , M49, F52 , P53, R314	Chain A: F24, A42, F45 , L46, M49, L50, F52, P53 , I54, F56 , L57, V87, Y96 , L99, H100 , Y102 , V104, G106, V318, T319, T320 , L321 Chain B: Y30, S38 , F45 , M49, F52, P53 , F56 , Y60, L84, V87, F88 , Y96 , L99, H100 , G101, Y102 , F105, M317, T320
Οψίνη (TM1-TM2-H8)	3CAP	Chain A: S38 , A42, F45 , L46, L99 Chain B: S38 , A42, F45 , L46, L99	Chain A: P27 , Q28, Y29 , A32, P34 , F37, S38 , A41, A42, F45 , S98, H100 , G101, F103 , V318, L321 Chain B: P34 , W35 , Q36, F37 , S38 , M39, A41, A42, F45 , L46, M49, L50, L95, S98, H100 , I286, F293 , Y301, M309, R314
Ροδοψίνη καλαμαριού (TM4-TM5)	2Z73	Chain A: W174 , T196 , S199, L207 Chain B: W174 , T196 , S199, L207	Chain A: I131, Y134 , N135, G138, R139, R151, I154, F158 , L161, W162, L165, G169, G173, T196 , N200, C203, I206, L207, G211, I215, N222 , H230 Chain B: M128, I131, Y134 , N135, K146, M147, R151, M155, F158 , W162, L165, W166, W174 , S199, C203, I206, G211, I215
CXCR4 (Ligand: It1t) (TM4-TM5)	3ODU	Chain A: N192 , L194, W195 , V197, V198, F201 , Q202, M205, L210, L267 Chain B: N192 , L194, W195, V197, V198, F201 , Q202, M205, L210, L267	Chain A: W125, F129, Y135 , L136, V139, P147 , L150, L151, V155, G159, P163, L167, V197, V198, F199 , F201 , M205, I209, L210, I213, V214, S217, I221 Chain B: Y121, W125, L132, Y135 , L136, I138, V139, P147, V155, V158, G159, P163, P170, F174, L194, V198, F199 , F201 , Q202, M205, L210, S217, I221, L226, L267
CXCR4 (Ligand: CVX15) (TM4-TM5)	3OE0	Chain A: Y135 , H140 , P147 , L194, W195 , V198, Q202, L210, K225, H228, L267 Chain B: Y135 , H140 , P147 , L194, W195 , V198, Q202, L210, K225, H228, L267	Chain A: V139, A141, P147 , L150, V155, V158, G159, P163, L167, P170 , F174, V198, F201 , M205, V206, I209, L210, I213, C218, I221, I222, L267 Chain B: Y135, L136, A141, P147, V155, G159, P163, L167, F174, N192, W195 , V197, V198, F199 , F201 , Q202 , I204, M205, L208, I209, L210, I213, S217, I221, H228, L267
κ οπιοειδής υποδοχέας	4DJH	Chain A: V60, T63, A64, Y66, S67 , F70, V71, P113,	Chain A: V60, T63, A64, S67 , F70, V71, V75, P113, F114, L120, N122, W124 , F126 , I328,

(TM1-TM2-H8)		F114, S116, T117, F126, F346	F332, F341, R342, C345, F346
		Chain B: V60, T63, A64, Y66, S67 , F70, V71, P113, F114, S116, T117, F126, F346	Chain B: S55, P56 , V60, S67 , V71, T110, P113, F114, T117, L120, M121, N122, P125, F126 , L130, F332 , R342, C345, F346, P347
μ οπιοειδής υποδοχέας	4DKL	Chain A: I69, M72, S76 , V80, V126, L129, F135	Chain A: A68, M72, Y75, S76 , V80, T118, P122 , S125, L129, M130, F347
(TM1-TM2-H8)		Chain B: I69, M72, S76 , V80, V126, L129, F135	Chain B: I69, A73, Y75, S76 , V80, L83, F84, K98, P122, F123, S125, V126, Y128, L129, M130, F135, T312, E349, F350
μ οπιοειδής υποδοχέας	4DKL	Chain A: Y227, N230 , I234, F237 , I238, I242, V245, L246, T249 , Y252, G253, I256, L283, I290, T294, I298, I301, I302, A304, L305, I306	Chain A: Y227 , W228, N230, L231, I234, F237 , I238, I242, L246, T249, V250, Y252, G253, E270, L283, V286, A287, I290, I301
(TM5-TM6)		Chain B: Y227, N230 , I234, F237 , I238, I242, V245, L246, T249 , Y252, G253, I256, L283, I290, T294, I298, I301, I302, A304, L305 , I306	Chain B: P224 , T225, W226, Y227 , W228, I242, V245, T249, G253, I256, L283, A287, I290, T294, I301, I302
A2α αδενোসινικός	4E1Y	Chain A: I108, L115, G142, W143, F180	Chain A: F93, A97, I100, D101, R111, L115, T117, A121, I124, I127, L131, A134, I135, L137, T138, G142, W143, Y176, F180 , N181, A184, C185
(TM4-TM5)		Chain B: I108, L115, G142, W143, F180	Chain B: F93, L96, I100, Y103 , I104, I108, V116, T117, T119, R120 , G123, I124, I127, C128, V130, L131, A134, I135, L137, T138, W143 , L141, Y176 , Y179, A184
β1 αδρενεργικός	4GPO	Chain A: Q39 , A42, S45, A49, L53, P96, V103, L108, W109	Chain A: Q38, Q39, E41, S45 , A49, V52, V56, A57, P96, A99, T100, W109
(TM1-TM2-H8)		Chain B: Q39 , A42, S45, A49, L53, P96, V103, L108, W109	Chain B: E41 , A42, S45 , L46, A49, L53, R104, W109
β1 αδρενεργικός	4GPO	Chain A: Y140 , L141, S145, R148 , A206	Chain A: Y140 , L141, P146, R148 , Y149, R157, I161, T164, I168, V172, P176, W181 , N204, R205, A206, I209, A210, I213, I214, I218, I222, F225 , V226
(TM4-TM5)		Chain B: Y140 , L141, S145, R148 , A206	Chain B: Y140, L141, T144, S145, F147, R148 , S151, R155, A158, I161, V165, V172, P176, W181, R183 , D184, E185, R205, A206, Y207, A210, I213, I214, I218, I222, E233
Υποδοχέας Smoothened	4JKV	Chain A: Y337, Y350 , L363, S366, L367, V370, A374, V378, Y399 , G402, L410, V414	Chain A: V195, R199, D201, P203 , V210, E211, E305, Y337, H340 , Q351, G355, Y359, F360 , L363, L367, F369, V370, L371, V373, A374, A377, A379, Q380 , R398, A401, G402, F403 ,
(TM4-TM5)			

		Chain B: Y337 , Y350, L363, S366, L367, V370, A374, V378, Y399 , G402, L410, V414	A406, P407, L410, V414, F418 Chain B: V198, V210, R302, Y337 , H340 , G355, T357, S358, F360 , L363, T364, S366, L367, V370, L371, V373, A374, V378, Q380, N396, Y397 , R398, Y399 , G402, A406, P407, L410, V411, V414, F418 , F474, E479, R482, R485, D486, V488, A492
mGluR1 (+χοληστερόλη)	4OR2	Chain A: W588* , I594*, L612, L616, Y617 , F646* Chain B: W588* , I594*, L612, L616, Y617 , F646*	Chain A: E587, W588 , I597, C601, L608, F609 , V610, L612, V615, L616, Y617 , L635, Y642 , F646 , T647, K651, I838, P842 Chain B: E587, W588 , C601, L605, L608, F609 , L612, I613, L616, Y617 , F639, Y642 , F646 , A650, M835, I838, P842
B2 αδρενεργικός (+χολ.)	2RH1	Chain C: F49* , K60 , F61, Y70* , E338 , L339 Chain D: F49* , K60 , F61, Y70* , E338 , L339	Chain C: V33, V34, G37, M40, S41, V48, V52, I55, K60 , L339 Chain D: I55, I58, A59, K60 , T73, V86, N103, W105, E338 , L339
Μοντέλο AFM/EM Ροδοψίνης	1N3M	Chain A: M143, F146 , H152 , W175 , N199, S202 Chain C: M143, F146 , H152 , W175 , N199, S202	NO CG-MD
Μοντέλο Cryo-EM Μεταροδοψίνης I	EMD 1079	Chain A: W35 , S38 , A42, L46, L99, H100 , R314, C322 Chain B: P34, W35 , S38 , A42, F45 , L46, L99, H100 , R314, V318, C322	NO CG-MD

Η ανάλυση αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών – πρωτεϊνών έδειξε ότι τα περισσότερα κατάλοιπα του πυρήνα των αλληλεπιδράσεων εντοπίζονται στις έλικες TM1 και TM5 των διμερών TM1-TM2-H8 και TM4-TM5/TM5-TM6, αντίστοιχα. Σε μικρότερο βαθμό, κατάλοιπα του πυρήνα μπορούν να εντοπιστούν επίσης και στην έλικα TM4 των διμερών TM4-TM5, όπως και στην κυτοπλασματική έλικα H8 των διμερών TM1-TM2-H8 (Εικόνα 3.13). Η πλειονότητα των αλληλεπιδράσεων περιλαμβάνει υδρόφοβα κατάλοιπα, γεγονός που δεν είναι απρόσμενο, δεδομένης της υδρόφοβης φύσης των λιπιδικών διπλοστιβάδων. Ωστόσο, παρατηρείται σημαντική παρουσία πολικών και φορτισμένων καταλοίπων (Πίνακας 3.3, Πίνακας 3.4). Στην πλειονότητα των περιπτώσεων αυτές οι πολικές ομάδες κάθε πρωτομερούς φαίνονται να αλληλεπιδρούν ασθενώς με αντίστοιχες ομάδες του δεύτερου πρωτομερούς. Παρατηρούνται επίσης μερικοί δεσμοί υδρογόνου, σχηματιζόμενοι ανάμεσα σε πολικές πλευρικές ομάδες, στοιχεία της κεντρικής ανθρακικής αλυσίδας ή, σε κάποιες περιπτώσεις, υδροξυλομάδες σε πλευρικές αλυσίδες τυροσινών.

Όσον αφορά τις αλληλεπιδράσεις που περιλαμβάνουν υδρόφοβα κατάλοιπα σημαντικό μέρος του υδρόφοβου μέρους της θαμμένης επιφάνειας κάθε διμερούς περιλαμβάνουν αρωματικά κατάλοιπα. Μια πιο προσεκτική μελέτη διαμοριακών επαφών αποκαλύπτει ότι αρκετά από αυτά εμπλέκονται σε αλληλεπιδράσεις π -stacking, ενώ παρατηρούνται επίσης και αρκετές επαφές αρωματικών καταλοίπων – προλινών και αρωματικών καταλοίπων – αμινομάδων. Αυτές οι επαφές παρατηρούνται στην πλειονότητα των δομών των υποδοχέων της Κλάσης A, ενώ εξαιρετικό παράδειγμα αποτελεί και η δομή του διμερούς του Smoothened από την Κλάση F, στο οποίο ένα ιδιαίτερα πυκνό δίκτυο αλληλεπιδράσεων π -ηλεκτρονίων σχηματίζεται ανάμεσα στα πρωτομερή (Εικόνα 3.14). Αντίστοιχες αλληλεπιδράσεις, τέλος, παρουσιάζονται τόσο στα μοντέλα του διμερούς της Μεταροδοψίνης I όσο και στο διμερές TM4-TM5 του μοντέλου της Ροδοψίνης από τα δεδομένα AFM, με το τελευταίο μάλιστα να παρουσιάζει, ως προς αυτό το χαρακτηριστικό, σημαντικές ομοιότητες με το αντίστοιχο διμερές του υποδοχέα $\beta 1$.



Εικόνα 3.14 Σύγκριση της θέσης των καταλοίπων του πυρήνα της θαμμένης επιφάνειας (πράσινο), των σημείων ενδιαφέροντος της υπολογιστικής μεταλλαξιγένεσης αλανίνης (πορτοκαλί) και της θέσης των αρωματικών καταλοίπων που συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις π-ηλεκτρονίων (μωβ) στο διμερές TM-TM2-H8 του KOR (A) και το διμερές TM4-TM5 του Smoothed (B).

Μια επιπλέον διαδικασία ταξινόμησης των αλληλεπιδρώντων καταλοίπων πραγματοποιήθηκε μέσω υπολογιστικής μεταλλαξιγένεσης αλανίνης, μιας διαδικασίας που περιλαμβάνει αντικατάσταση κάθε καταλοίπου από αλανίνη και εκτίμηση στη μεταβολή στην ενέργεια αλληλεπίδρασης ως αποτέλεσμα αυτής της μεταλλαγής. Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα των μεταλλαγών, οι θέσεις των καταλοίπων του πυρήνα των αλληλεπιδράσεων αλληλοεπικαλύπτονται με τις θέσεις ενδιαφέροντος στη μεταλλαξιγένεση αλανίνης (Εικόνα 3.14). Ακόμη πιο αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι τα πιο ισχυρά σημεία ενδιαφέροντος σε όλες σχεδόν τις περιπτώσεις περιλαμβάνουν κατάλοιπα που είτε σχηματίζουν διαμοριακούς υδρογονικούς δεσμούς είτε συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις π-ηλεκτρονίων (Παράρτημα Ι). Τα παραπάνω συνηγορούν στην υπόθεση ότι τα αρωματικά κατάλοιπα που συμμετέχουν σε

τέτοιες αλληλεπιδράσεις αποτελούν σημαντικό στοιχείο στη σταθεροποίηση των διμερών GPCRs.

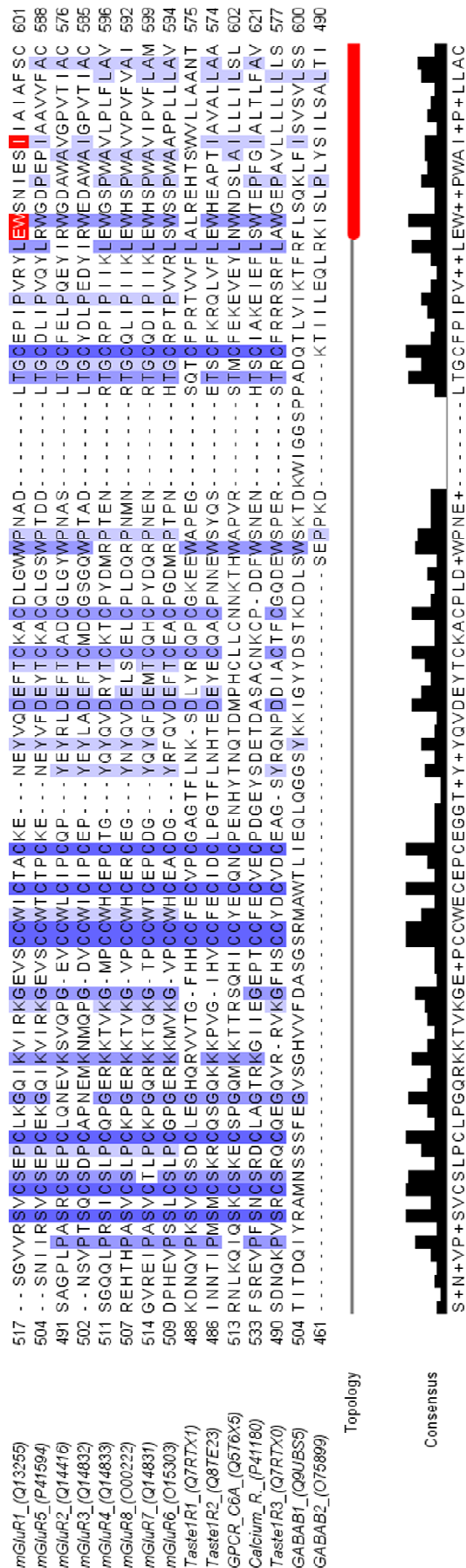
Με μερικές ιδιαίτερες εξαιρέσεις, όπως ο δεσμός υδρογόνου που σχηματίζεται από κατάλοιπα σερινών στη διαμεμβρανική έλικα TM1 (B&W 1.40) των οπιοειδών υποδοχέων κ και μ (ένα κατάλοιπο που παρουσιάζεται συντηρημένο στην Κλάση A) οι περισσότερες πολικές επαφές και αλληλεπιδράσεις π-ηλεκτρονίων εντοπίζονται κυρίως κοντά στα εξωκυτταρικά και κυτοπλασματικά όρια των διαμεμβρανικών τμημάτων TM1, TM4 και TM5 οι οποίες βρίσκονται κοντά στα όρια της μεμβράνης, καθώς και στην έλικα H8 του C-άκρου των υποδοχέων (Εικόνα 3.14). Αυτή η θέση των σημείων ενδιαφέροντος κοντά στα όρια της μεμβράνης υποδεικνύει ότι ο σχηματισμός τέτοιων επαφών κατά τον ολιγομερισμό θα μπορούσε να αποτελεί τρόπο προσαρμογής των υποδοχέων στο φαινόμενο της υδροφοβικής ασυμφωνίας (hydrophobic mismatch), δηλαδή τη διαφορά ανάμεσα στο μήκος των διαμεμβρανικών τμημάτων και το πάχος ισορροπίας της λιπιδικής διπλοστιβάδας.

Αυτή η ασυμφωνία προκαλείται από παραμορφώσεις της λιπιδικής διπλοστιβάδας γύρω από τις μεμβρανικές πρωτεΐνες, σαν αποτέλεσμα της ρευστής φύσης της, οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν σε παροδική λέπτυνση ή πάχυνση της μεμβράνης στα συγκεκριμένα σημεία. Αυτό θα είχε σαν αποτέλεσμα κατάλοιπα υδρόφοβης φύσης να βρεθούν ξαφνικά σε υδατικό περιβάλλον αλλά και το αντίστροφο, πολικά ή φορτισμένα κατάλοιπα να βρεθούν στο υδρόφοβο εσωτερικό της μεμβράνης. Ο σχηματισμός αλληλεπιδράσεων κατά το σχηματισμό διμερών μπορεί να αποτελέσει μηχανισμό προστασίας των υποδοχέων απέναντι σε αυτό το φαινόμενο, προστατεύοντας υδρόφοβες ομάδες όπως τα αρωματικά κατάλοιπα από το να βρεθούν σε υδατικό περιβάλλον, αλλά και πολικές ομάδες από το να βρεθούν στο εσωτερικό της υδρόφοβης διπλοστιβάδας.

Αξίζει να σημειωθεί ότι σε όλες τις περιπτώσεις οι αρχικές επαφές π-ηλεκτρονίων και οι δεσμοί υδρογόνου των αρχικών δομών διατηρήθηκαν καθ'όλη τη διάρκεια των προσομοιώσεων και παρουσιάζονται και στα τελικά μοντέλα. Επιπρόσθετα, στις προσομοιώσεις στις οποίες παρατηρήθηκαν σημαντικές μετακινήσεις των υποδοχέων, οι νέες επαφές που σχηματίστηκαν περιελάμβαναν επίσης σημαντικό αριθμό αλληλεπιδράσεων π-ηλεκτρονίων, κυρίως π-stacking, οι οποίες σχηματίστηκαν στα αρχικά στάδια των προσομοιώσεων και παρέμειναν σταθερές για το υπόλοιπο των 400 ns. Μελέτη των αλληλεπιδράσεων και υπολογιστική μεταλλαξιγένεση

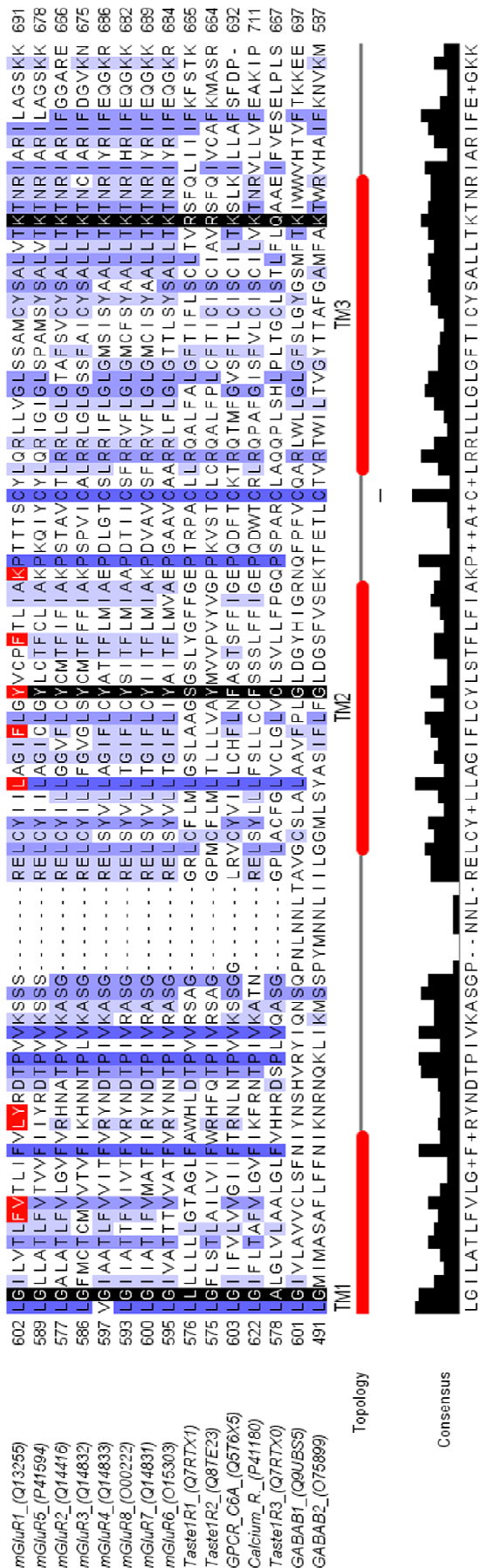
αλανίνης στα ατομικά μοντέλα που προέκυψαν από αυτές τις προσομοιώσεις έδειξε ότι τόσο οι αρχικές όσο και οι νεοσχηματισμένες επαφές των π-ηλεκτρονίων αναγνωρίζονται ως κατάλοιπα του πυρήνα των αλληλεπιδράσεων και ως σημεία ενδιαφέροντος (Πίνακας 3.4). Αυτή η συμφωνία των αποτελεσμάτων των προσομοιώσεων με τα αρχικά δεδομένα καθώς και με την κατάταξη των καταλοίπων με βάση τη θαμμένη επιφάνεια και τις μεταλλαγές αλανίνης αποτελεί μια ακόμη ένδειξη ότι οι συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις αποτελούν το επίκεντρο του ολιγομερισμού.

Η απεικόνιση των θέσεων αλληλεπίδρασης και των σημείων ενδιαφέροντος πάνω σε στοιχίσεις αλληλουχιών των GPCRs δείχνει ότι, γενικά, τα κατάλοιπα που φαίνονται να συμμετέχουν στις ισχυρότερες αλληλεπιδράσεις παρουσιάζονται σε συντηρημένες θέσεις στα διαμεμβρανικά τμήματα των υποδοχέων. Το παραπάνω παρατηρείται ξεκάθαρα στην περίπτωση των υποδοχέων της Κλάσης C (Εικόνα 3.15). Στοιχίση των μελών των GPCRs της Κλάσης C του ανθρώπου με πειραματικά επιβεβαιωμένη πληροφορία για το σχηματισμό διμερών, δείχνει ότι η πλειονότητα των σημείων ενδιαφέροντος στις αλληλεπιδράσεις που παρατηρούνται στο διμερές mGluR1 και ειδικά τα κατάλοιπα που συμμετέχουν σε επαφές π-ηλεκτρονίων παρουσιάζονται υψηλά συντηρημένα στα μέλη της Κλάσης C. Αντίστοιχη παρατήρηση μπορεί να γίνει και μέσω της στοιχίσης των μελών της Κλάσης F, μέσω της οποίας αποδεικνύεται ότι πολλά από τα κατάλοιπα που συμμετέχουν στις αλληλεπιδράσεις του διμερούς TM4-TM5 στον υποδοχέα Smoothened παρουσιάζονται σε αντίστοιχες θέσεις και στους υποδοχείς Frizzled (Εικόνα 3.16). Επιπρόσθετα, αντίστοιχα συντηρημένα κατάλοιπα ανάλογων ιδιοτήτων παρουσιάζονται και σε περιοχές οι οποίες, αν και δεν παρατηρούνται στα κρυσταλλογραφικά διμερή των mGluR1 και Smoothened, είναι γνωστό ότι μπορούν να συμμετάσχουν σε αλληλεπιδράσεις ολιγομερισμού (TM5 για τον mGluR1, TM1 για τον Smoothened).



Topology

Consensus



Topology

Consensus

*mGluR1*_ (Q13255) 692 K I C T R K P R F M S A M A Q V I I A S I L S V Q L T L V V T L I M E P P M P I L S Y P S I K E V Y I L C N T S N L G V V A P L G Y N G L I M S C T Y V A F K T R 775
*mGluR2*_ (P41594) 679 K I C T K P R F M S A C A Q L V I A F I L C I Q L G I I V A L F I M E P D I M H D Y P S I R E V Y I L C N T N L G V T P L G Y N G L I L S C F Y A F K T R 762
*mGluR2*_ (Q14416) 667 - - G A Q R P R F I S P A S Q V A C L A L I S Q L L I V V A M L V E A P G T G K E T A P E R R E V V T L R C N H R D A S M L G S L A Y N L I A L C T L Y A F K T R 750
*mGluR4*_ (Q14832) 676 - - G A Q R P K F I S P S S Q V F C L G L I L V Q I M V M S V M L I E A P G T R R Y T L A E K R E T V I L K C N V K D S S M L I S L T Y D V I L V I C T V A F K T R 759
*mGluR4*_ (Q14833) 667 - - S V S A P R F I S P A S Q L A T F S L I S Q L G I C V M F V D P S H S V V D F Q D Q R T L D P R A R G V L K C D I S D S L I C L G Y S M L M V T C T V A I K T R 775
*mGluR8*_ (O00222) 683 - - S V T A P K F I S P A S Q L V T F S L I S V Q L G V F M F V D P H I I I D Y G E Q R T D P E K A R G V L K C D I S D S L I C S L G Y S I L M V T C T V A I K T R 771
*mGluR7*_ (Q14831) 690 - - S V T A P R L I S P T S Q L A T S S L I S V Q L G V F I M G V D P N I I I D Y D E H K T M N P E Q A R G V L K C D I T D L Q I C S L G Y S I L M V T C T V A I K T R 778
*mGluR6*_ (O15303) 685 - - S V T P P P F I S P T S Q L V T F S L T S L Q V G M I A M L G A R P H S V I D Y E E Q R T V D P E Q A R G V L K C D M S D L S L I G C L G Y S L M V T C T V A I K A R 773
*Taste1R1*_ (Q7RTX1) 665 V P T F Y H A W Q N H G . A G L F V M I S S A Q L I C L T M L V V T P L P A R E V Q R F P H L V M L E C T E T N S L G F I L A F L Y N G L I S I S A F A C S Y L G K 750
*Taste1R2*_ (Q8TE23) 665 F P R A Y S Y W V R Y Q G P Y V S M A I T V L K M V I V I G M L A T G L S P T R I D P D P K I T I V S C N P N Y R N S L L F N T S L D L S V V G S F A Y M G K 773
*GPCR_C6A*_ (Q5T6X5) 693 - K L Q K F L K C L Y R P . . I L I F T C T G I Q V I C T M L I F A A P T V E N V S L P . R V I L E C E G S I L A F G T M L G Y I A I L A F I Q F I F A F K G . 773
*Calcium_R*_ (P41180) 712 T S F H R K M W G L N L Q . . F L V F L C T F M Q I V I C V I M L T A P S S Y R N Q E L E D E I F I T C H E G S L M A L G F L I G Y T C L L A A I C F F F A F K S R 795
*Taste1R3*_ (Q7RTX0) 668 - W A D R L S G C L R G P W A M L V V L L A M L V E A L C T M Y L V A F P E V T D W H M L P T E A L V H C R T R S W S F G L A H A T N A T L A F L C F L G T F L V R 752
*GABAB1*_ (Q9UBS5) 698 - - K K E W R K T L E P W K L Y A T V G L L V G M D V L T L A I M Q I V D P L H R T I E T F A K E E P K E D I D V S I L P Q L E C S S R K M N T W L G I F Y G Y K G L L L L G I F L A Y E T K 792
*GABAB2*_ (O75899) 588 - - - - - K K K I I K D Q K L L V I V G G M L L I D L C I L I C Q A V D P L R R T V E K Y S M E P D P A G R D I S I R P L L E H C E N T H M T I W L G I V Y A Y K G L L M L F G C F L A W E T R 679

Topology

TM4

TM5

Consensus

K+SV+KP+F I SPASQL+IVF+L I SVQLLIVV+WL+VDPHPH++IDYTEQRT++PE+ARVILKCNES-...MDLSL++SLGYNGLLMV+CTVYAFKTR

*mGluR1*_ (Q13255) 776 - N V P A N F N E A K Y I A F T M Y T T C I I M L A F V P I F G S N Y K I I T F C A V S L S V T V A L G C M F T P K M Y I I I A K P E R N V R S A F T S D V V R M H V G D G K 864
*mGluR2*_ (P41594) 763 - N V P A N F N E A K Y I A F T M Y T T C I I M L A F V P I F G S N Y K I I T M C F S V S L S A T V A L G C M F P V V I I L A K P E R N V R S A F T T S T V R M H V G D G K 861
*mGluR2*_ (Q14416) 751 - K C P E N F N E A K F I G F T M Y T T C I I M L A F L P I F Y V T S S . . . D Y R V Q T T M C V S V S L S G S V L G C L E A P L H I I L F Q P K N V 826
*mGluR3*_ (Q14832) 760 - K C P E N F N E A K F I G F T M Y T T C I I M L A F L P I F Y V T S S . . . D Y R V Q T T M C I S V S L S G F V L G C L E A P L H I I L F Q P K N V 835
*mGluR4*_ (Q14833) 776 - G V P E T F N E A K P I G F T M Y T T C I I M L A F P I F F G T S Q A D K L Y I Q T T L T V S V S L S A S V S L G M L Y M P L V Y I I L F H P E Q N V P 864
*mGluR8*_ (O00222) 772 - G V P E T F N E A K P I G F T M Y T T C I I M L A F P I F F G T A Q A E K M Y I Q T T L T V S M S L S A S V S L G M L Y M P L V Y I I L F H P E Q N V Q 860
*mGluR7*_ (Q14831) 779 - G V P E N F N E A K P I G F T M Y T T C I I M L A F P I F F G T A Q A E K L Y I Q T T L T I S M N L S A S V A L G M L Y M P L V Y I I L F H P E L N V Q 867
*mGluR6*_ (O15303) 774 - G V P E T F N E A K P I G F T M Y T T C I I M L A F V P I F F G T A Q A E K I Y I Q T T L T V S L S L S A S V S L G M L Y M P L V Y I I L F H P E Q N V Q 862
*Taste1R1*_ (Q7RTX1) 751 - D L P E N Y N E A K C V T F S L F N F V S M I A F F T T A S Y V D G K Y L P A N M M A G L S S L S S G F G G Y E L P K C Y V I L C R P D L N S T 824
*Taste1R2*_ (Q8TE23) 751 - E L P T N Y N E A K F I T L S M T F Y F T S S V S L C T F M S A Y S G V L V T I V D L V T V L N L L A I S L G Y G P L C Y M I L E Y E R N T P 824
*GPCR_C6A*_ (Q5T6X5) 774 - - K Y E N Y N E A K F I T F G M L I Y F I A M I T P I Y A T F G K Y P A V E I I V I L I S N Y G I L Y C T F I P K C Y V I I C K Q E I N T K 846
*Calcium_R*_ (P41180) 796 - K L P E N F N E A K F I T F S W L I F F I M V S I F P A Y A T Y G K F V S A V E I A I L A A S F G L A C I F E N I I Y I I L F K P S R N T I 869
*Taste1R3*_ (Q7RTX0) 753 - S Q P G C Y N R A R G L T F A M L A Y F I T M Y S E V P L L A N V Q V V L R P A V G A L L L C V L G I L A A F H P R C Y L L M R O P G L N T P 826
*GABAB1*_ (Q9UBS5) 793 S V S T E K I N D H R A V G M A I Y N V A V L C L I T A P T M I L S S Q O D A A F A S L A I V F S S Y I T L V L F V P L M R R L I T R G E W S E A 870
*GABAB2*_ (O75899) 680 N V S I P A L N D S K Y I G M S V Y I N V G I M C I I G A A V S F L T R D Q P N V Q F C I V A L V I I F C S T I T L C L V E Y K L I T L R T N P D A A T Q N R R F Q F T O N Q K 768

Topology

TM6

TM7

Consensus

-GVPENFNEAKF IGF TMYTTC I IWLAF IPIFFGTS+SAEK+YIQTTTL++SVSLSASV+LGCLFVPKVV IILF+PERNVQSAFTTSIVVRMHVGDGK

Εικόνα 3.15 Στοίχιση των διαμεμβρανικών τμημάτων των ανθρώπινων GPCRs της Κλάσης C για τους οποίους υπάρχουν στοιχεία ότι συμμετέχουν σε ολιγομερή. Η τοπολογία των υποδοχέων απεικονίζεται με κόκκινους κυλίνδρους για τα διαμεμβρανικά τμήματα. Τα εκτεταμένα αμινοτελικά και καρβοξυτελικά τμήματα δεν απεικονίζονται. Τα αμινοξικά κατάλοιπα σημαίνονται με αποχρώσεις του μπλε με βάση την % ομοιότητά τους. Με μαύρο χρώμα σημαίνονται τα κεντρικά κατάλοιπα κάθε διαμεμβρανικού τμήματος, σύμφωνα με το σύστημα Ballesteros & Weinstein. Τα κατάλοιπα του υποδοχέα mGluR1 τα οποία συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις ολιγομερισμού χρωματίζονται κόκκινα.

Fizzled_1_(Q9UP38) 258H.....RGFPGGAGASERGFSCPRALKVPSLYNHYHFLGEEKDGGAPCEPTKVYGLMYFGPEELRFSRTWIGIWSVLCCAST 334
 Fizzled_2_(Q14332) 182P.....GGGAPPRYATLEHPHCPRVLKVPSSLYSKFLGERDGAAPCEPARPDGSMFFSQEETPFARLWILTWVSLCCAST 259
 Fizzled_3_(Q9NPG1) 153APVAVQRDYGWCPRLEKIDPDLGYSFLHYRDSPPCP.....NMYSREELSFARYFGLIISIICLSAT 217
 Fizzled_4_(Q9ULV1) 177PGECHSVGT.....NSQYIWKRSNLNGVLKCGYD.....AGLYSRSAKETDIWMAVMASLCFIST 234
 Fizzled_5_(Q13467) 184AGGPFVCKCREPFYPIKESHPLYNKVRTGQVNGAVPCY.....QPSFSADERTATFWIGLWSVLCFIST 250
 Fizzled_6_(Q60353) 149KTEQVQRDIGVCPRHLLKTSGGQYKFLGIDQGAAPCP.....NMYSKSELEAKSFIGTYSIFLCAT 213
 Fizzled_7_(Q75084) 191T.....LPPGADGRGRPAFPESCPRQLKVPYLGYSRFLGERDGAAPCEPGRANGLMYFKEEERFARLWGVYWSVLCCAST 268
 Fizzled_8_(Q9H461) 197 RGGGGGDAAPARGGGGGGKARPPGGGAAPGCGCQCRAPMVSVSSERHPLNVRKTGQJANGALPCH.....NPFSSQDERATVFWIGLWSVLCFVST 292
 Fizzled_9_(Q00144) 187GPGAGSGTCE.....NPEKFQYVEKRSRSGAPRCGPG.....VEVFWSRRDQDFALVWMAVMASLCFFST 246
 Fizzled_10_(Q9ULW2) 183KGGPGRGGCD.....NPKFHHVEKSASAPLCTPG.....VDVYWSREDKRAVWLAIWAVLCFFSS 242
 Smoothed_(Q99835) 196PLVRTDNPKSWYEDVEGGIQCG.....NPLFTEAEHQDMHSYIAAFGAVTGLCT 245

TM1

Topology

Consensus

Fizzled_1_(Q9UP38) 335 LFTVLTLYVDMRRFSYPERPIIFLSGCTAVAVAYIAGFLLD.....DRVVNDKFAEDGA.....RTVAQGTK 398
 Fizzled_2_(Q14332) 260 FFTVTITLYVDMORFRYPERPFIIFLSGCTYMSVAYIAGFVLLQ.....ERVVNERFSEDGY.....RTVQGTGK 323
 Fizzled_3_(Q9NPG1) 218 LFTFLTFLIDVTRFRYPERPFIIFAVCYMMVSLIFFIGFLE.....DRVACNASFPAQYK.....ASTVQGS 282
 Fizzled_4_(Q9ULV1) 235 AFTVLTFLIDSSRFYPERPFIIFLSMCMNYSIAYIVRLTYGRERISCOFEEAAEP.....VLIQEGLK 298
 Fizzled_5_(Q13467) 251 STTVATFLIDNERFRYPERPFIIFLSACVLSGLFVRLVYVGHASVACSRENH.....IHYETTG 311
 Fizzled_6_(Q60353) 214 LFTFLTFLIDVRRFRYPERPFIIFYSVCYSIVSLMYIFIGFLLQ.....DSTACNKADEKLEL.....GDTVVLGSK 278
 Fizzled_7_(Q75084) 269 LFTVLTLYVDMRRFSYPERPFIIFLSGCFMVAHVHAGFLLD.....DMVAVVERFSDGY.....RTVAQGTK 332
 Fizzled_8_(Q9H461) 293 FATVSTFLIDMERFKYPERPFIIFLSACYLFVSGYLRLVLAGH.....EKVACSGAGGAGGAGAGAGAGGPPGGRGEYELGAVECHRYEITG 392
 Fizzled_9_(Q00144) 247 AFTVLTFLLEPHRFQYPERPFIIFLSMCMNYSLAFIRAVAGAQSVACDQEG.....AL.....YVIQEGLE 309
 Fizzled_10_(Q9ULW2) 243 AFTVLTFLIDPARFRYPERPFIIFLSMCMYCVYSGYLIRLFAGAESIACDRSG.....QL.....YVIQEGLE 305
 Smoothed_(Q99835) 246 LFTLATFVADWRNSRNPYPAVILFYVNAQCFVGSIGWLAQFMDGARREIVCRADGTMRL.....GEPTSNE 310

TM2

Topology

Consensus

LFTVLTFLIDMRRFRYPERPFIIFLS+CY++VSVAYL++F+LGA+RVACN+EF++DGL.....RTVQEGTK

Fizzled_1_(Q9UP38) 399 KEGCTILFMMLYFFFSMASSIMWVILSLTWFLAA.....GMKWGHEATEANSQYFHLAAMAVPAIKTTILALGQVGGVLSGVCFFVGLNNVDALRGFVLAPLFVYL 499
 Fizzled_2_(Q14332) 324 KEGCTILFMMLYFFFSMASSIMWVILSLTWFLAA.....GMKWGHEATEANSQYFHLAAMAVPAIKTTILAMQIDGDLSCGVCFFVGLNSLDPLRCFVLAPLFVYL 424
 Fizzled_3_(Q9NPG1) 283 NKACTIONLMFMILYFFFMAGSVWVILITITWFLAA.....VPKWGSEALIEKKALLFHASANGIPGTLTILAMNKIEGONI SGVCFFVGLYDVDAIRFYVLAPLCLYV 383
 Fizzled_4_(Q9ULV1) 298 NTGCAIIFLLMYFFFGMASSIMWVILTLTWFLAA.....GLKWGHEATEHSSYFHLAAMIPAVKTVILIMRLVDABELTGLCYGQNQLDALTFGVAPLFTYL 399
 Fizzled_5_(Q13467) 312 PALCTIVFLVLYFFFGMASSIMWVILSLTWFLAA.....GMKWGNEAIAGYAQYFHLAAMLIPSVKSTALALSSVDGDPVAGICYGNQNLNSLRGFLVGLPLVYL 412
 Fizzled_6_(Q60353) 279 NKACTIONLMFMILYFFFMAGTVWVILITITWFLAA.....GRKWSCEATEQKAVWFHAYAGTGFGLTVMLAMNKEYBNISGVCFFVGLYDLASRYFVLPLCLCV 379
 Fizzled_7_(Q75084) 333 KEGCTILFMVLYFFFGMASSIMWVILSLTWFLAA.....GMKWGHEATEANSQYFHLAAMAVPAIKTTILAMQVGGDL SGVCYVGLSSVDALRGFVLAPLFVYL 433
 Fizzled_8_(Q9H461) 393 PALCTVFLVLYFFFGMASSIMWVILSLTWFLAA.....GMKWGNEAIAGYSQYFHLAAMLVPSVKSAYLALSSVDGDPVAGICYGNQSLDNLRGFLAPLVYL 493
 Fizzled_9_(Q00144) 310 NTGCTLVFLVLYFFFGMASSIMWVILTLTWFLAA.....GKWGHEATEAHGSYFHLAAMGLPALKTVILTLRKVAGDELTGLCYVASTDAALTFGLVPLSGYL 410
 Fizzled_10_(Q9ULW2) 306 STGCTLVFLVLYFFFGMASSIMWVILTLTWFLAA.....GKWGHEATEANSQYFHLAAMIPAVKTVILVMRRVAGDELTGVCYVGSMDVNALTGFVLPLACYL 406
 Smoothed_(Q99835) 311 TLSCTIIFVIVYALMAGYVWVFLVTVAMHTSFKALGTTTQPLSGKTSYFHLITMSLPFLITVAI LAVAQVGGSVSGICFVGKYNRYRAGEVLEAPIGLVL 412

TM3

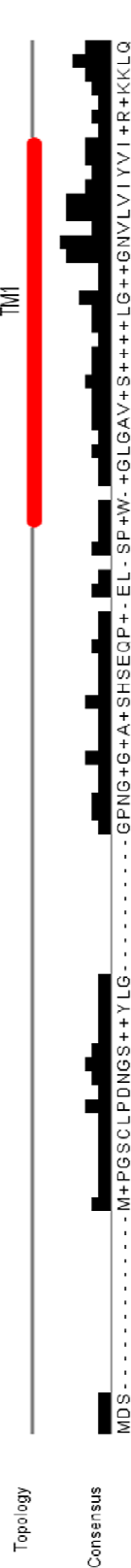
Topology

Consensus

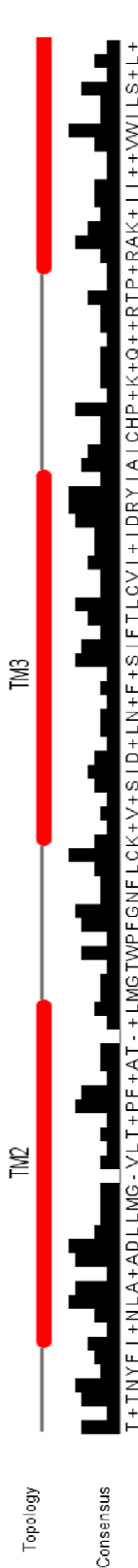
N+GCTILF+LLYFFFGMASSIMWVILTLTWFLAA.....GMKWGHEATEANSQYFHLAAMA+PAVKTTILAM+QVVDGDELSGVCYVGLQ+LDALRGFVLAPLFVYL

Ο εντοπισμός κάποιας πιθανής συντηρητικότητας είναι πιο δύσκολος στην περίπτωση των υποδοχέων της Κλάσης A, τόσο λόγω του πολύ μεγαλύτερου αριθμού τους όσο και λόγω της μεγάλης ετερογένειας των αλληλουχιών τους (Εικόνα 3.17). Αυτό σχετίζεται άμεσα με τον εντοπισμό του πυρήνα των αλληλεπιδράσεων κυρίως σε θέσεις κοντά στα εξωκυτταρικά άκρα των ελίκων TM1, TM2 και TM5, περιοχές οι οποίες, λόγω της συμμετοχής τους στην αναγνώριση των υποκαταστατών, παρουσιάζουν υψηλή ετερογένεια. Παρ'όλα αυτά, γενικά παρατηρείται η παρουσία καταλοίπων με κοινές ιδιότητες σε κοντινές περιοχές των GPCRs, με την ακριβή θέση τους να διαφοροποιείται. Επιπρόσθετα, η εξέταση συγκεκριμένων υποοικογενειών, όπως οι αδρενεργικοί ή οι οπιοειδείς υποδοχείς (Εικόνα 3.18) δείχνει πως κατάλοιπα σημαντικά για τις αλληλεπιδράσεις στις δομές και τις προσομοιώσεις των διμερών παρουσιάζονται συντηρημένα στα μέλη της κάθε υποοικογένειας, γεγονός που θα μπορούσε να σχετίζεται με την ικανότητά τους ως προς το σχηματισμό κοινού τύπου διμερών.

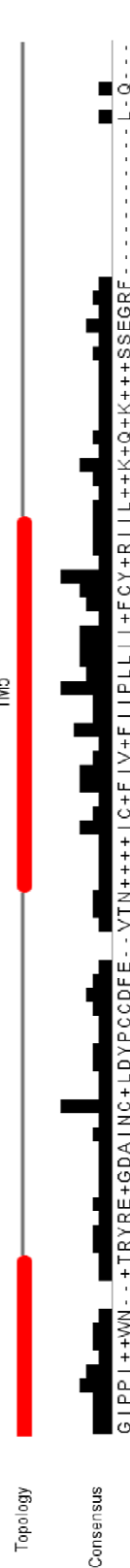
Human_β2AR_(P07550)
 Turkey_β1AR_(P07700)
 Human_KOR_(P41145)
 Mouse_μOR_(P42866)
 Human_A2a_(P29274)
 Human_CXCR4_(P61073)
 Squid_Rho_(P31356)
 Bovine_Rho_(P02699)

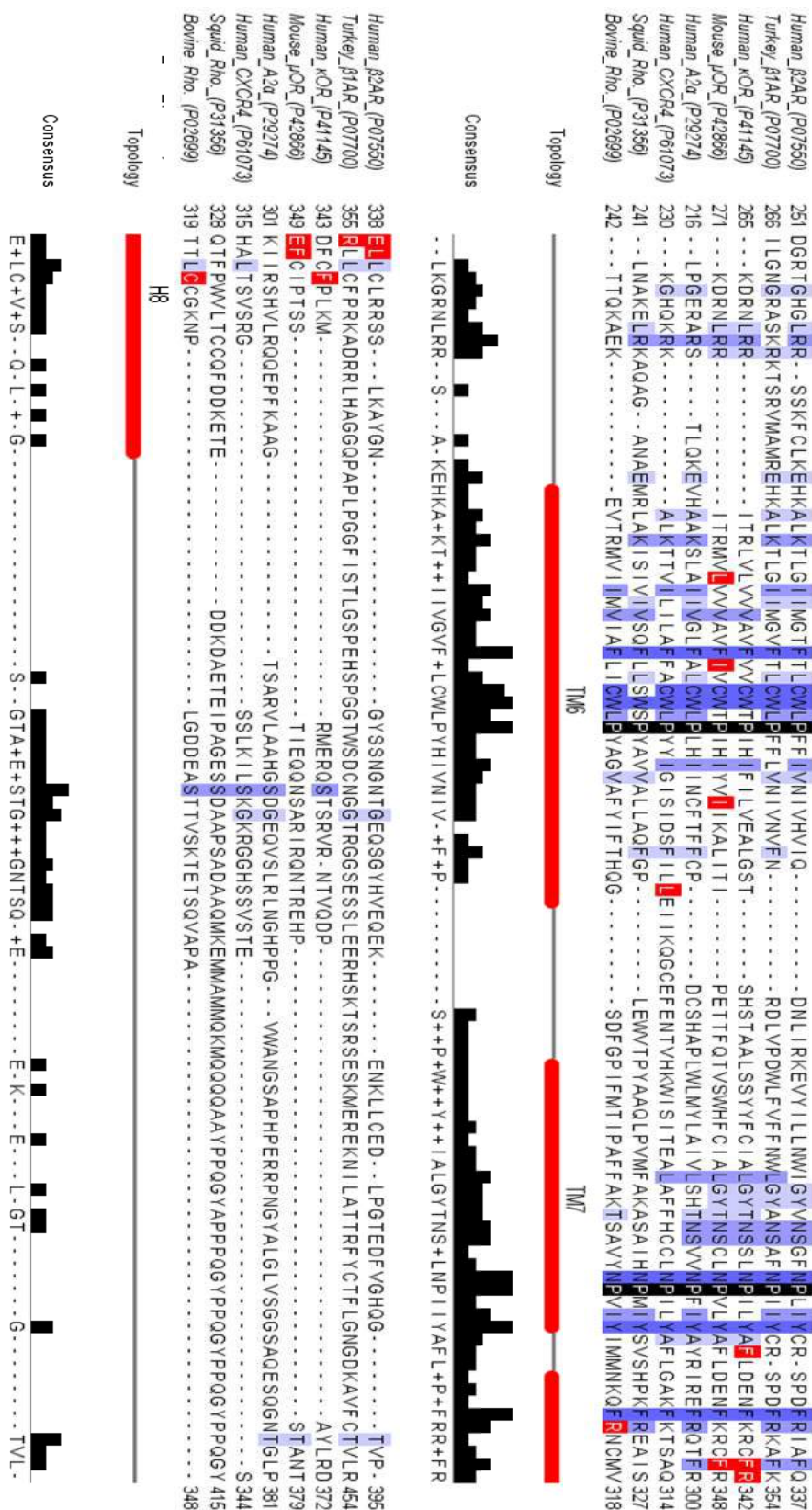


Human_β2AR_(P07550)
 Turkey_β1AR_(P07700)
 Human_KOR_(P41145)
 Mouse_μOR_(P42866)
 Human_A2a_(P29274)
 Human_CXCR4_(P61073)
 Squid_Rho_(P31356)
 Bovine_Rho_(P02699)



Human_β2AR_(P07550)
 Turkey_β1AR_(P07700)
 Human_KOR_(P41145)
 Mouse_μOR_(P42866)
 Human_A2a_(P29274)
 Human_CXCR4_(P61073)
 Squid_Rho_(P31356)
 Bovine_Rho_(P02699)





Εικόνα 3.17 Στοίχιση των διαμεμβρανικών τμημάτων των GPCRs της Κλάσης A με λυμένες κρυσταλλικές δομές διμερών. Ακολουθούνται οι κανόνες απεικόνισης της Εικόνας 3.15. Στη στοίχιση δεν απεικονίζονται τα C-άκρα, λόγω του μεγάλου μεγέθους τους.

a1AR_(P35348) 1-----MVFLSGNASDSS-----NCTQPPA-----PVNISKAILLG-VILG 34
 a2AR_(P08913) 1-----MGSLLQPDAGNASWNGTEAPG-----GGARATP-----YSLQVTLTLVCLAG 41
 a2AR_(P07550) 1-----MGPGNGSAFLAPNGSH-----APHDVTQ-----ERDEVWVGMG-IVMS 41
 a1bAR_(P35368) 1-----MNPDLDTGHNTSAPAHGSELKNAN-----FTGNQTSNSTLP-----QLDITRAISVG-LVLG 53
 a1dAR_(P25100) 1MTFRDLLSVSFEGRPDSSAGGSSAGGSGAGGAPSEGPVGGAGGGGVVAGSGEDNRSSAGSGAGGDDVNGTAAGGGLVSVAGGVG-VFLA 104
 a2bAR_(P18089) 1-----MDHQDP-----YSVQATAAIAAAIT 20
 a2cAR_(P18825) 1-----MASPALAALAVAAAAAGNAGAGGSGGVANASGSGPPR-----GQYSAGAVAGLAADV 59
 a1AR_(P08568) 1-----MGAGVLVLGASEPGNLSAALPLDGAATAARLLVPASPPASLLPPASESPE-----PLSQOWTAGMG-LLMA 66
 a3AR_(P13945) 1-----MAPWPHENS LAPWFDLPT-----LAPNTANTSG-----LPGVPWEAALAGALLA 45
 T_81AR(P07700) 1-----MGDWLPP-DCGPHNRSGGGGATAAPT-----GSRQVSAE-----LLSQWEGAGS-LLMA 49
 T_84AR(P43141) 1-----MTPLPAGNGS-----VPNCWSAA-----VLSRWAVGVA---ALS 31

Nterminus

Topology

Consensus

-----MG-G-L-PG+G+PHNGSA+APAPA+PG-A-GAG--GS--GA+A+P++SP+-----LL+SQWAVGMGA+LL+

a1AR_(P35348) 35GLIIIFGVLGNIILSVACHRHLSVTHYVIVNLAVALDILLTSTLPFSAIFEVLGWAFGRVFNIAWADVLCCTASIMGLCIISIDRYIGVSYPLRP-TIV 138
 a2AR_(P08913) 42LLMLTLVFGNVLVIAVFTSRKAPQNLVLSASADILLVATLVLPFSLANEMVGVYFGKAWCEIYALADVLCCTSIIVHCAISIDRYWSITQAIEN-LKR 145
 a2AR_(P07550) 42LIVLAIFGNVLTIAKFERQGTNYFITSACADLYMGLAVPFGAAHLMKMTFGNFSEFWTSIDVLCVTASIEITLCVIAVRYFAITSPFKVQ-SLL 145
 a1bAR_(P35368) 54AFILFAIVGNILVLSVACNRHRTPTNYFIVNLAADILLSTVLFPFSAALEVLGVYVLRIFGDIAWADVLCCTASILSCAISIDRYIGVRSLOQ-TLV 157
 a1dAR_(P25100) 105AFILMAVAGNLLVLSVACNRHRTPTNYFIVNLAADILLSATVLPFSATMEVLGVAFGRAFODWAAADVLCCTASILSCTISYDRYGVRSLSKP-P-AM 208
 a2bAR_(P18089) 121FLILFTIFGNALVILAVLTSRAPQNLFLVLSAADILLVATLIPFSLANELLGVYFRRTWCEVLEALDVLCCTSIIVHCAISIDRYWAVSRALEN-SKR 124
 a2cAR_(P18825) 60FLIVFTVAGNVLVIIVLTSRAPQNLFLVLSAADILLVATLVMPFSLANEMAVYFGQWGVYALADVLCCTSIIVHCAISIDRYWSVTOAVEN-LKR 163
 a1AR_(P08568) 67LIVLIVAGNVLVIAIAKTPRQGTTLNFIIMSLASADLVMPFSLANEMAVYFGQWGVYALADVLCCTSIIVHCAISIDRYWSVTOAVEN-LKR 170
 a3AR_(P13945) 46LAVLATVGNLLVIAIAWTPRQGTTLNFIIMSLAADLVMPFSLANEMAVYFGQWGVYALADVLCCTSIIVHCAISIDRYWSVTOAVEN-LKR 149
 T_81AR(P07700) 50LVVLLIVAGNVLVIAIIGRTQRQGTTLNFIITSLACADLVNGLLVYEGATLVVRCVTVGSGFICECWTSIDVLCVTASIEITLCVIAIDRYLAITSPFFVQ-SLM 153
 T_84AR(P43141) 32ITILVIVAGNLLVIAIAKTPRQGTTLNFIITSLACADLVNGLLVYEGATLILSGHVPYGTVTVGSGFICECWTSIDVLCVTASIEITLCVIAIDRYLAITAPLQVE-ALV 136

TM1

TM2

TM3

Topology

Consensus

LLIILF+VAGNVLVILAVA+TRRLQPTTNLFIVSLA+ADLLMGLLVVPFSA++EVLGYWYFGR++CE+WTA+DVLCCCTASIEITLCAIS+DRYLAVTSPLRY+-SLV

a1AR_(P35348) 139TQRRGLMALLCVMALSLVISICPLFG-WRQP-----APEDETIQIINEEPGVILFSAIGSFPLPLAILVMYCRVYVAKRESRGLKSLKTDKSDSEQVTL 234
 a2AR_(P08913) 146TPRRIKAITITVMVISAIVISFPLISIEKKG-----GGGPGQPAEPREINDQKMYVSSICIGSFEAPCLIMILVYVYIYQIAKRRTVPPSRRG-----235
 a2AR_(P07550) 146TKNKARVILIMVIVSGLTSFLIQMHYRA-THOEAINCYANETCDEFTNOAYAIASSIVSFVPLVIMVYVSVFQEKAKRQLOKIDKSEGRFHVN-----244
 a1bAR_(P35368) 158TRKAILALLSVWLVTSIGLLG-WKEP-----APNDDKEGVTEEPFYALFSSLSGFIPLAVILVMYCRVYVAKRTTKNLEAGVMKEMSKEKLT 253
 a1dAR_(P25100) 209TERKAAITALLWVALVSVGRLLG-WKEP-----VPPDERFGITEEAGYAVFSSVCSFYLPMAVILVMYCRVYVAKRTTKNLEAGVMKEMSKEKLT 304
 a2bAR_(P18089) 125TPRRIKCIIILTMVLIIVAVISLPLIYKDGQ-----POPRGRPOKLNQEAWYILASSIGSFEAPCLIMILVYVYIYQIAKRRTVPPSRRG-----248
 a2cAR_(P18825) 164TPRRYKATIVAVMLISAVISFPLVSLYRQP-----DGAAYPOGLNDETMYILSSCIGSFEAPCLIMILVYVYIYQIAKRRTVPPSRRG-----248
 a1AR_(P08568) 171TRARARGLVCTWALISALVSFLPLIMHWRA-ESDEARRCYNDPKCGDFVTRAYAIASSVYFVPLCLIMAFYLRVFRFQKQVKKIDSCERRFLGGPARPPS 274
 a3AR_(P13945) 150TKRCARTAVVLVWVSAVSFA2IMSQWRVGADEAQRCHSNPRCAFASNMVYVLLSSVSFPLLVNLEVAARVFAVTRQLRLRGELGRFFPEESPPAP 254
 T_81AR(P07700) 154TRARAKVITICVWALISALVSFL2IMMHWRD-EDQALKYQDPGCDFTVTRAYAIASSVYFVPLCLIMAFYLRVFRFQKQVKKIDSCERRFLGGPARPPS 257
 T_84AR(P43141) 136TKGRWAVVCMWALISAFISFLBIMNHWVRDGADEQAVRCVDDPRCDEFTNMTYAIIVSSVTSFVPLLVNIFVAVYVFAVTRHVQLIGKDKVRLQEN-----235

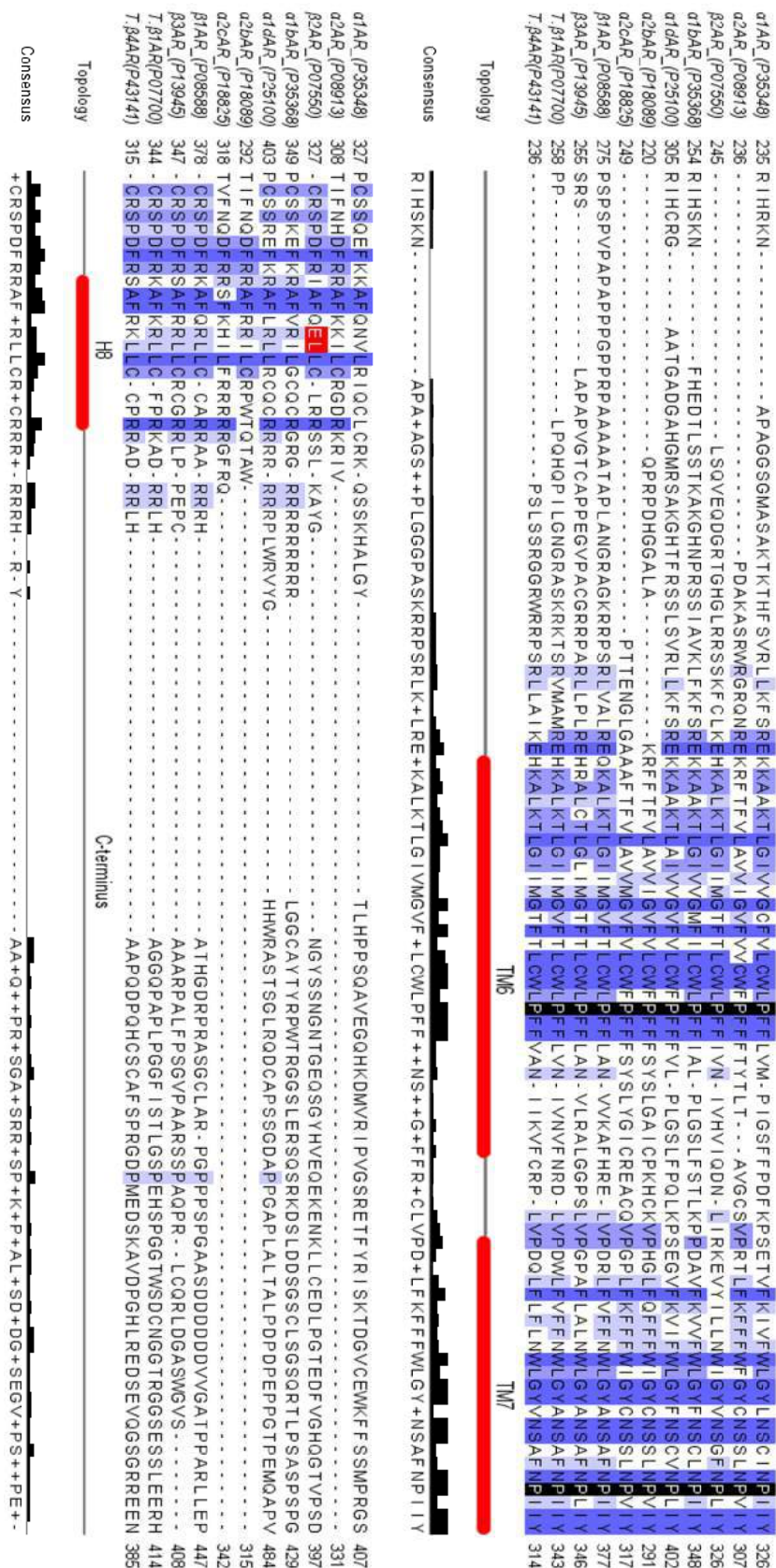
TM4

TM5

Topology

Consensus

T+RRAKAIIITWV+ISAVISFLPL++HWRPG+D-EA-RC++D++CCDFNT+++YA+ASSIGSFY+PLLIMIFVY+RVY+VAKRQTRKLDSEGRFLG++S+PTL



Εικόνα 3.18 Στοίχιση των ανθρώπινων αδρενεργικών υποδοχέων με τον αδρενεργικό υποδοχέα β1 της γαλοπούλας. Ακολουθούνται οι κανόνες απεικόνισης της Εικόνας 3.15. Στη στοίχιση δεν απεικονίζονται τα C-άκρα και οι ενδοκυτταρικοί βρόχοι ICL3, λόγω του μεγάλου μεγέθους τους.

3.8 Ιδιότητες Δυναμικών Δικτύων στα Διμερή των GPCRs

Τα τελευταία 100 ns κάθε προσομοίωσης CG-MD χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία και ανάλυση δυναμικών δικτύων αλληλεπιδράσεων. Στα δίκτυα που δημιουργήθηκαν κάθε κόμβος αντιπροσωπεύει ένα αμινοξικό κατάλοιπο. Δυο μη γειτονικοί κόμβοι (δηλαδή μη ομοιοπολικά προσδεδεμένοι) συνδέονται με μια ακμή αν τα αντίστοιχα κατάλοιπα αλληλεπιδρούν για το μεγαλύτερο μέρος (>75%) της προσομοίωσης που αναλύεται. Οι ακμές ανάμεσα στους κόμβους σταθμίζονται με βάρη υπολογισμένα με βάση τιμές συνδιακύμανσης προερχόμενες από την προσομοίωση, με τέτοιο τρόπο ώστε η τιμή του βάρους που αντιστοιχεί στο μήκος της κάθε ακμής να μειώνεται καθώς η συσχέτιση ανάμεσα στα αλληλεπιδρώντα στοιχεία αυξάνεται. Έτσι, οι ακμές με τις μικρότερες τιμές βαρών αντιπροσωπεύουν τα πιο συσχετισμένα ζεύγη αλληλεπιδρώντων καταλοίπων και, κατά συνέπεια, τις ισχυρότερες αλληλεπιδράσεις στο δίκτυο.

Οι κόμβοι που ανήκουν στην ίδια κοινότητα είναι πιο πυκνά συνδεδεμένοι μεταξύ τους σε σχέση με κόμβους εκτός της κοινότητας και μπορούν να επικοινωνήσουν μεταξύ τους σχετικά εύκολα μέσω πολλαπλών οδών. Καθώς όλα τα χαρακτηριστικά του δικτύου υπολογίζονται με βάση τα δομικά και δυναμικά χαρακτηριστικά των διμερών, οι κοινότητες των δυναμικών δικτύων των προσομοιώσεων ουσιαστικά αντιπροσωπεύουν τμήματα των πρωτεϊνών που κινούνται σε συμφωνία μεταξύ τους. Δυο διαφορετικές κοινότητες μπορούν να έρχονται σε επαφή ή να αλληλοεπικαλύπτονται, με κάποιους κόμβους να ανήκουν και στις δυο ομάδες. Η επικοινωνία ανάμεσα σε αυτές τις κοινότητες εκτιμάται μέσω της εύρεσης των συντομότερων μονοπατιών αυτών των κόμβων. Τόσο αυτοί οι κόμβοι όσο και οι ακμές που τους συνδέουν χαρακτηρίζονται ως κρίσιμα (critical) στοιχεία, αντιπροσωπεύοντας επαφές που μπορεί να αποδειχθούν σημαντικές για την αλλοστερική επικοινωνία ανάμεσα σε δυο δομικά στοιχεία.

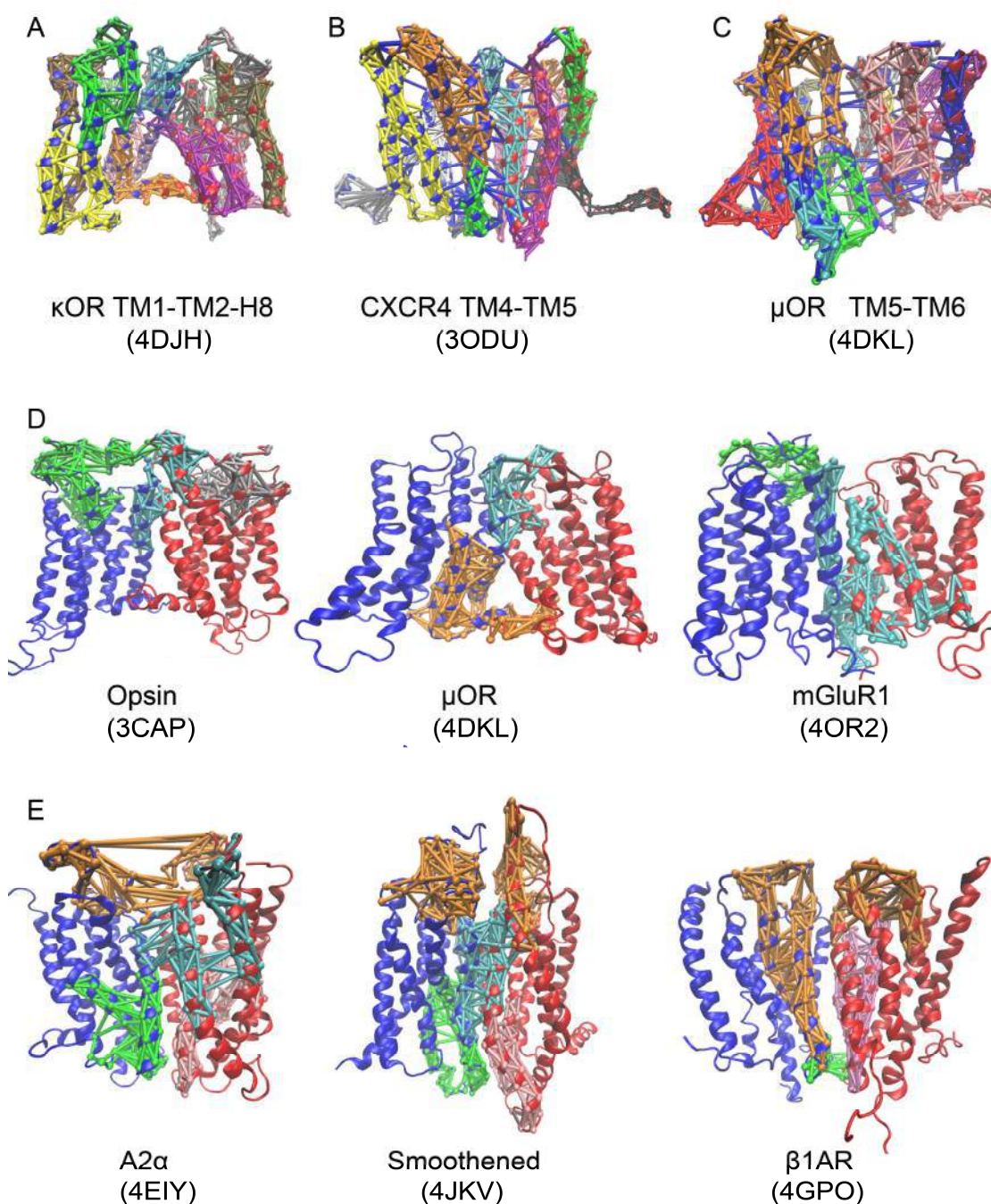
Πίνακας 3.5. Αξιολόγηση της οργάνωσης κοινοτήτων δικτύου στις προσομοιώσεις CG-MD των κρυσταλλικών διμερών GPCRs.

Δομή	Κλάση	PDB	Διμερές (400 ns CG-MD)	Αριθμός κοινοτήτων	Q score
Ανενεργή Ροδοψίνη	A	2I35	TM1-TM2-H8	14	0.81
β2 αδερνεργικός υποδοχέας	A	2RH1	TM1-TM2-H8	16	0.80
Οψίνη	A	3CAP	TM1-TM2-H8	14	0.76
κ οπιοειδής υποδοχέας	A	4DJH	TM1-TM2-H8	15	0.80
μ οπιοειδής υποδοχέας	A	4DKL	TM1-TM2-H8	15	0.80
β1 αδερνεργικός υποδοχέας	A	4GPO	TM1-TM2-H8	13	0.80
Ροδοψίνη καλαμαριού	A	2Z73	TM4-TM5	16	0.79
CXCR4 (Υποκ. CVX15)	A	3OE0	TM4-TM5	17	0.81
CXCR4 (Υποκ. It1t)	A	3ODU	TM4-TM5	14	0.81
A2a αδενοσινικός υποδοχέας	A	4E1Y	TM4-TM5	12	0.78
μ οπιοειδής υποδοχέας	A	4DKL	TM5-TM6	12	0.81
Υποδοχέας Smoothened	F	4JKV	TM4-TM5	13	0.79
mGluR1 υποδοχέας γλουταμικού	C	4OR2	TM1-TM2-H8	19	0.76

Τα βασικά χαρακτηριστικά της οργάνωσης κοινοτήτων για κάθε δυναμικό δίκτυο υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο Girvan – Newman και παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.5. Αξίζει να σημειωθεί ότι όλα τα δυναμικά δίκτυα που μελετήθηκαν δίνουν τιμές Q στην περιοχή του 0.75-0.81, παρουσιάζοντας την καλύτερη δυνατή οργάνωση κοινοτήτων και προσεγγίζοντας τις αντίστοιχες τιμές που παρατηρούνται σε δίκτυα πραγματικού κόσμου. Αν και δεν είναι απαραίτητο οι παρατηρούμενες κοινότητες να αντιπροσωπεύουν όντως δομικά χαρακτηριστικά, σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρούνται κάποιες βιολογικά σημαντικές συσχετίσεις κινήσεων. Εξίσου σημαντικό επίσης είναι το γεγονός ότι παρατηρείται συντηρημένη εμφάνιση συγκεκριμένων κοινοτήτων σε όλα τα προσομοιωμένα συστήματα, αποκαλύπτοντας πιθανά κοινά χαρακτηριστικά των GPCRs ως προς τη δομή και τη δυναμική συμπεριφορά τους, αλλά και ως προς τις αλληλεπιδράσεις ολιγομερισμού.

Πιο συγκεκριμένα, οι προσομοιώσεις των διμερών TM1-TM2-H8 παρουσιάζουν τη δημιουργία κοινοτήτων που περιλαμβάνουν στοιχεία της επιφάνειας αλληλεπίδρασης (Εικόνα 3.19). Αυτές περιλαμβάνουν μια κοινότητα η οποία περιέχει τις αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών – πρωτεϊνών ανάμεσα στις έλικες TM1 και TM2 κάθε πρωτομερούς. Η θέση αυτής της κοινότητας είναι συντηρημένη και εντοπίζεται κοντά στο εξωκυτταρικό όριο της μεμβράνης. Η κοινότητα αυτή παρατηρείται σε όλα τα διμερή υποδοχέων της Κλάσης A, συμπεριλαμβανομένου του διμερούς β2AR με τις εκτεταμένες επαφές το οποίο σχηματίστηκε κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης. Επιπλέον, το διμερές του υποδοχέα mGluR1 από την Κλάση C παρουσιάζει μια αντίστοιχη κοινότητα, εντοπισμένη στην ίδια θέση. Με ελάχιστες εξαιρέσεις, παρατηρείται

επίσης μια δεύτερη διαμοριακή κοινότητα ανάμεσα στα πρωτομερή, σχηματιζόμενη από κατάλοιπα στις έλικες H8 καθώς και στις έλικες TM7, η οποία περιλαμβάνει τις διαμοριακές επαφές των ελίκων H8 αλλά και είτε ολόκληρο είτε μέρος από το συντηρημένο μοτίβο NPxxYx(5,6)F. Τέλος, αν και δεν συνδέονται άμεσα με τις αλληλεπιδράσεις ολιγομερισμού, παρατηρείται πως τα κατάλοιπα του εξωκυτταρικού βρόχου ECL2 είτε αποτελούν μέρος των διαμοριακών κοινοτήτων είτε σχηματίζουν διακριτές κοινότητες, οι οποίες συνδέονται με τις διαμοριακές κοινότητες TM1-TM2/TM1-TM2 μέσω κρίσιμων κόμβων/ακμών.



Εικόνα 3.19 Α. Οργάνωση κοινοτήτων στο διμερές TM1-TM2-H8 του kOR, Β. Οργάνωση κοινοτήτων στο διμερές TM4-TM5 του CXCR4, Γ. Οργάνωση κοινοτήτων στο διμερές TM5-TM6 του μOR, Δ. Απεικόνιση των συντηρημένων κοινοτήτων TM1-TM2/TM1-TM2 (κυανό), ECL2 (πράσινο) και H8/H8 (πορτοκαλί) σε αντιπροσωπευτικά διμερή TM1-TM2-H8, Ε. Απεικόνιση των συντηρημένων κοινοτήτων των TM4-TM5 (κυανό), του βρόχου ECL2 (πορτοκαλί) και των μοτίβων D(E)RY (πράσινο και ροζ) σε διμερή TM4-TM5. Σε κάθε δίκτυο, οι κόμβοι του δικτύου απεικονίζονται με σφαίρες, ενώ οι ακμές ανάμεσα στους κόμβους με ράβδους.

Αν και δεν παρουσιάζονται τόσο εκτεταμένα όσο στην περίπτωση των διμερών TM1-TM2-H8, παρόμοια συντηρημένα χαρακτηριστικά δικτύου παρατηρούνται και για τα διμερή TM4-TM5 (Εικόνα 3.19). Σε κάθε περίπτωση παρατηρείται η ύπαρξη δυο διαμοριακών κοινοτήτων, η πρώτη από τις οποίες περιλαμβάνει μέρος της επιφάνειας αλληλεπίδρασης των ελίκων TM4 και TM5 των πρωτομερών, ενώ η δεύτερη περιλαμβάνει τις διαμοριακές επαφές ανάμεσα στους ενδοκυτταρικούς βρόχους ICL2 και το κυτοπλασματικό μέρος των ελίκων TM3 συμπεριλαμβανομένου και του μοτίβου D(E)RY, κατάλοιπα του οποίου συμμετέχουν επίσης σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτομερών. Παρόμοια με τα διμερή TM1-TM2-H8, παρατηρούνται κοινότητες καταλοίπων του βρόχου ECL2 για κάθε πρωτομερές. Αυτές οι κοινότητες είτε συνδέονται με κάποια διαμοριακή κοινότητα μέσω κρίσιμων ακμών είτε, σε κάποιες περιπτώσεις, περιλαμβάνουν οι ίδιες κατάλοιπα των ελίκων TM4 τα οποία συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτομερών, και τα οποία στο δίκτυο έχουν χαρακτηριστεί ως κρίσιμοι κόμβοι. Αυτή η οργάνωση κοινοτήτων παρατηρείται όχι μόνο στα διμερή των GPCRs της Κλάσης A αλλά και στο διμερές του υποδοχέα Smoothened από την Κλάση F. Επίσης, πρέπει να σημειωθεί ότι η ίδια οργάνωση παρατηρείται και στα διμερή του CXCR4, τα οποία κατά την προσομοίωση είχαν μεταβεί από την αρχική τους κατάσταση σε διμερή τύπου TM4-TM5.

Σε αντίθεση με τις παραπάνω περιπτώσεις, το διμερές TM5-TM6 του οπιοειδή υποδοχέα μ ξεχωρίζει, καθώς δεν εμφανίζει κανένα από τα χαρακτηριστικά που περιγράφηκαν ως τώρα. Στο συγκεκριμένο διμερές παρατηρείται σχηματισμός κοινοτήτων ανάμεσα στις έλικες TM1 και TM2, καθώς και ανάμεσα στις έλικες TM6 και TM7, υποδεικνύοντας κοινή δυναμική συμπεριφορά για τα παραπάνω δομικά στοιχεία. Μικρές κοινότητες παρατηρούνται επίσης για τον εξωκυτταρικό βρόχο ECL2, καθώς και ανάμεσα στο κυτοπλασματικό άκρο της έλικας TM3 και κατάλοιπα στις έλικες TM5 και TM6, χωρίς όμως να περιλαμβάνονται διαμοριακές επαφές με αντίστοιχες περιοχές του άλλου πρωτομερούς. Αντίθετα, όλες σχεδόν οι επαφές ανάμεσα στα πρωτομερή προτυποποιούνται σαν κρίσιμοι κόμβοι και ακμές, συνδέοντας τις κατά τα άλλα ανεξάρτητες μεταξύ τους κοινότητες των πρωτομερών. Αν και τα παραπάνω αποτελέσματα παρουσιάζουν ενδιαφέρον, η έλλειψη άλλων διαθέσιμων σταθερών διμερών TM5-TM6, δεδομένου ότι τα αρχικά διμερή του CXCR4 υιοθέτησαν στοιχεία διμερών TM4-TM5 κατά την προσομοίωσή τους, εμποδίζει τη δυνατότητα εντοπισμού κάποιου συντηρημένου δυναμικού χαρακτηριστικού. Κατά συνέπεια, δεν μπορούμε να γνωρίζουμε αν η οργάνωση κοινοτήτων που

παρατηρήθηκε αποτελεί χαρακτηριστικό των διμερών TM5-TM6 γενικότερα ή αν περιορίζεται στη συγκεκριμένη περίπτωση.

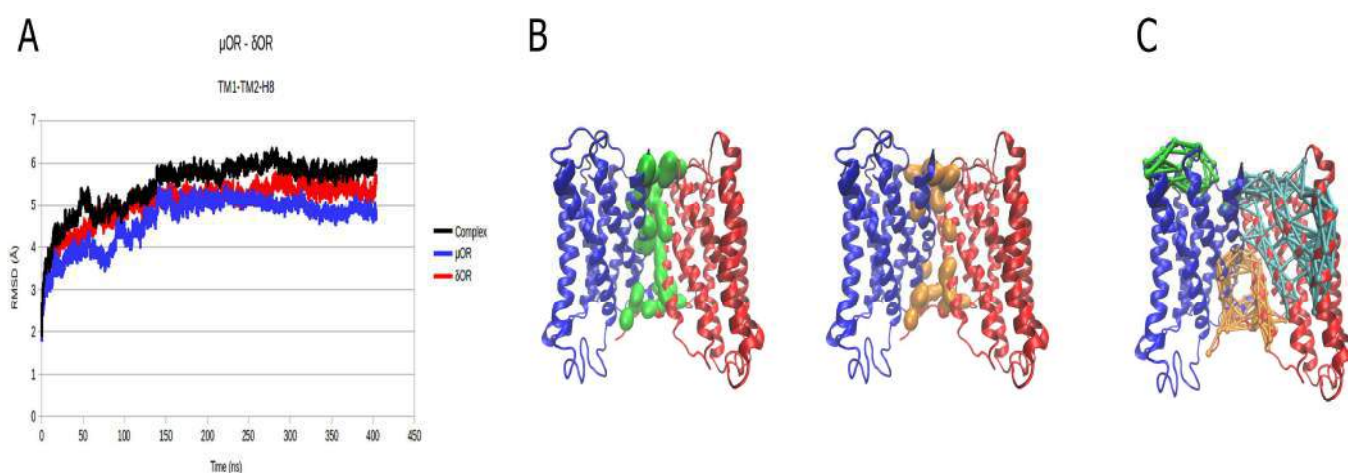
Η συντηρημένη παρουσία αλλά και η υψηλή ομοιότητα αυτών των χαρακτηριστικών στην οργάνωση δικτύου των διμερών GPCRs αποκαλύπτουν την πιθανή ύπαρξη συντηρημένων χαρακτηριστικών στη δομική και δυναμική φύση των GPCRs, τουλάχιστον για τις περιπτώσεις των διμερών TM1-TM2-H8 και TM4-TM5. Οι παρατηρήσεις μάλιστα προτείνουν ότι τα παραπάνω χαρακτηριστικά δεν περιορίζονται αποκλειστικά στους υποδοχείς Κλάσης A αλλά εμφανίζονται και σε υποδοχείς από τις υπόλοιπες Κλάσεις. Επιπρόσθετα, ο σχηματισμός κοινοτήτων σε περιοχές διαμοριακών επαφών μεταξύ των πρωτομερών δείχνει την πυκνή συνδεσιμότητα αυτών των περιοχών, υποδεικνύοντας τη σημαντική ισχύ των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων στις συγκεκριμένες περιοχές.

Μια σύγκριση της οργάνωσης κοινοτήτων με τις προηγούμενες διαδικασίες αξιολόγησης των αλληλεπιδράσεων αποκαλύπτει ότι η θέση αυτών των κοινοτήτων δεν είναι τυχαία: η σύγκρισή τους με τα αποτελέσματα από την ανάλυση της επιφάνειας επαφής αλλά και την υπολογιστική μεταλλαξιγένεση αλανίνης αποκαλύπτει ότι η θέση των διαμοριακών κοινοτήτων συμπίπτει με περιοχές πλούσιες με υψηλή συγκέντρωση καταλοίπων του πυρήνα της επιφάνειας επαφής, καθώς και σημαντική παρουσία σημείων ενδιαφέροντος Ala-scan. (Εικόνες 3.14 και 3.19). Αυτή η συμφωνία των αποτελεσμάτων ανάμεσα στις διαφορετικές προσεγγίσεις αποτελεί ακόμη μια ένδειξη για τη σημαντικότητα αυτών των καταλοίπων στις αλληλεπιδράσεις ολιγομερισμού των GPCRs.

3.9 Το ετεροδιμερές μ OR – δ OR παρουσιάζει παρόμοια δομικά και δυναμικά χαρακτηριστικά με τα ομοδιμερή των GPCRs

Πλήθος πειραματικών δεδομένων, προερχόμενα από σχεδόν δύο δεκαετίες μελέτης, υποστηρίζουν την ικανότητα των μελών της υποοικογένειας των οπιοειδών υποδοχέων (κ OR, δ OR, μ OR και N/OFQ) να σχηματίζουν ετεροδιμερή και έτερο-ολιγομερή. Συγκεκριμένα, ο σχηματισμός ετεροδιμερών μ OR – δ OR και δ OR – κ OR έχει προταθεί σαν πιθανός μηχανισμός επέκτασης του συνόλου των λειτουργιών των οπιοειδών υποδοχέων, επηρεάζοντας την

αναγνώριση διαφορετικών υποκαταστατών, τη ρύθμιση εναλλακτικών σηματοδοτικών μονοπατιών κλπ. Αυτή η ρυθμιστική ικανότητα των ετεροδιμερών έχει εξέχουσα σημασία στη μελέτη και διαχείριση της σχετιζόμενης με τους οπιοειδείς υποδοχείς φυσιολογίας, καθώς ετερομερή οπιοειδών υποδοχέων έχουν βρεθεί να συμμετέχουν σε φαινόμενα όπως η αναλγησία, η απευαισθητοποίηση σε αναισθητικές ουσίες όπως η μορφίνη αλλά και ο εθισμός σε οπιοειδή φάρμακα. Κατά συνέπεια, η εξειδικευμένη στόχευση ολιγομερών των οπιοειδών υποδοχέων μπορεί να οδηγήσει στο σχεδιασμό νέων φαρμάκων με καλύτερη επιλεκτικότητα και μειωμένες παρενέργειες, σε σχέση με τις υπάρχουσες φαρμακευτικές αγωγές που στοχεύουν σε απομονωμένους υποδοχείς (Ferre *et al.*, 2014; Lee and Ho, 2013).



Εικόνα 3.20 Α. Μέτρηση του RMSD στη μονάδα του χρόνου για την προσομοίωση του ετεροδιμερούς μOR – δOR, Β. Σύγκριση της θέσης των καταλοίπων του πυρήνα της θαμμένης επιφάνειας (πράσινο) και των σημείων ενδιαφέροντος της υπολογιστικής μεταλλαξιγένεσης αλανίνης (πορτοκαλί) στο διμερές μOR – δOR, C. Απεικόνιση των κοινοτήτων δικτύου TM1-TM2/TM1-TM2 (κυανό), ECL2 (κυανό και πράσινο) και H8-H8 (πορτοκαλί) στο διμερές μOR – δOR.

Παρ'όλη τη σημασία των ετερομερών των οπιοειδών υποδοχέων, υπάρχει ελάχιστη αξιόπιστη πληροφορία σχετικά με τις αλληλεπιδράσεις των πρωτομερών. Ωστόσο, ενδείξεις από πειραματικές δοκιμές και υπολογιστικές μελέτες έχουν προτείνει θέσεις αλληλεπίδρασης οι οποίες συμφωνούν με τις αλληλεπιδράσεις που παρατηρούνται στις κρυσταλλικές δομές των ομοδιμερών TM1-TM2-H8 και TM4-TM5. Επιπρόσθετα, πρόσφατες μελέτες αυτο – οργάνωσης των οπιοειδών υποδοχέων σε περιβάλλον μεμβράνης υπέδειξαν ότι το διμερές TM1-TM2-H8 αποτελεί μια από τις πιο σταθερές υπερμοριακές δομές σε ομο- και ετεροδιμερή οπιοειδών υποδοχέων (Provani *et al.*, 2015). Με βάση τα παραπάνω, επιχειρήθηκε η δημιουργία μοντέλων

για το ετεροδιμερές $\mu\text{OR} - \delta\text{OR}$ μέσω αγκυροβόλησης πρωτεϊνών – πρωτεϊνών, έχοντας ως βάση την υπάρχουσα πληροφορία από τα ομοδιμερή των μOR και κOR .

Πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες αγκυροβόλησης χρησιμοποιώντας τη μέθοδο του HADDOCK, από τις οποίες προέκυψε το μοντέλο ενός ετεροδιμερούς TM1-TM2-H8. Το μοντέλο παρουσιάζει τη γενική γεωμετρία των διμερών TM1-TM2-H8, έχοντας μάλιστα κάποιες ομοιότητες με το αντίστοιχο ομοδιμερές του μOR . Δεδομένου ότι κατά τη διαδικασία της αγκυροβόλησης χρησιμοποιήθηκε όσο η λιγότερη δυνατή γνωστή πληροφορία για την ύπαρξη αλληλεπιδράσεων (μόνο δύο αμινοξικά κατάλοιπα της έλικας TM1 από κάθε υποδοχέα), προκειμένου το αποτέλεσμα να είναι όσο το δυνατόν πιο ανεξάρτητο, η ομοιότητα του ετεροδιμερούς με τα ομοδιμερή είναι σημαντική. Ωστόσο, τα πρωτομερή δεν είναι παράλληλα μεταξύ τους αλλά, αντίθετα, σχηματίζουν γωνία, ακριβώς όπως συμβαίνει και στις δομές του μOR και της Ροδοψίνης. Το ετεροδιμερές $\mu\text{OR} - \delta\text{OR}$ υποβλήθηκε στη συνέχεια σε προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής, ακολουθώντας το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε και για τις κρυσταλλικές δομές των ομοδιμερών στις προσομοιώσεις CG-MD και την επανασύσταση των ατομικών μοντέλων. Τα αποτελέσματα των προσομοιώσεων αναλύθηκαν μέσω μελέτης των αλληλεπιδράσεων και υπολογιστικής μεταλλαξιγένεσης αλανίνης, ενώ χρησιμοποιήθηκαν επίσης σε ανάλυση δυναμικού δικτύου για το ετεροδιμερές μOR .

Από την προσομοίωση CG-MD φάνηκε πως το μοντέλο υιοθετεί παρόμοια συμπεριφορά με τις δομές των ομοδιμερών, παρουσιάζοντας τα δυο πρωτομερή να προσεγγίζουν το ένα το άλλο και να μειώνουν τη γωνία μεταξύ τους, με το τελικό αποτέλεσμα να παρουσιάζει σημαντική ομοιότητα με τα αντίστοιχα αποτελέσματα των προσομοιώσεων των κρυσταλλογραφικών διμερών (Εικόνα 3.20). Η μελέτη των αλληλεπιδράσεων στο ετεροδιμερές παρουσίασε τα κατάλοιπα του πυρήνα της επιφάνειας επαφής και τα σημεία ενδιαφέροντος από τη μεταλλαξιγένεση αλανίνης σε αντίστοιχες θέσεις με εκείνες των ομοδιμερών κOR και μOR , ενώ παρατηρήθηκαν επίσης πιθανές επαφές αρωματικών καταλοίπων που παρουσιάζονται συντηρημένα ανάμεσα στην υποοικογένεια των οπιοειδών υποδοχέων και εντοπίζονται και στη δομή του ομοδιμερούς κOR . Τέλος, η ανάλυση δικτύου για τα τελευταία 100 ns της προσομοίωσης έδωσε σαν αποτέλεσμα παρόμοια οργάνωση κοινότητων με αυτή των ομοδιμερών TM1-TM2-H8. Παρατηρούνται διαμοριακές κοινότητες των ελίκων TM1-TM2/TM1-

TM2 και των ελίκων H8-H8, καθώς και κοινότητες των εξωκυτταρικών βρόχων ECL2 άμεσα συνδεδεμένες με την περιοχή των διαμοριακών επαφών.

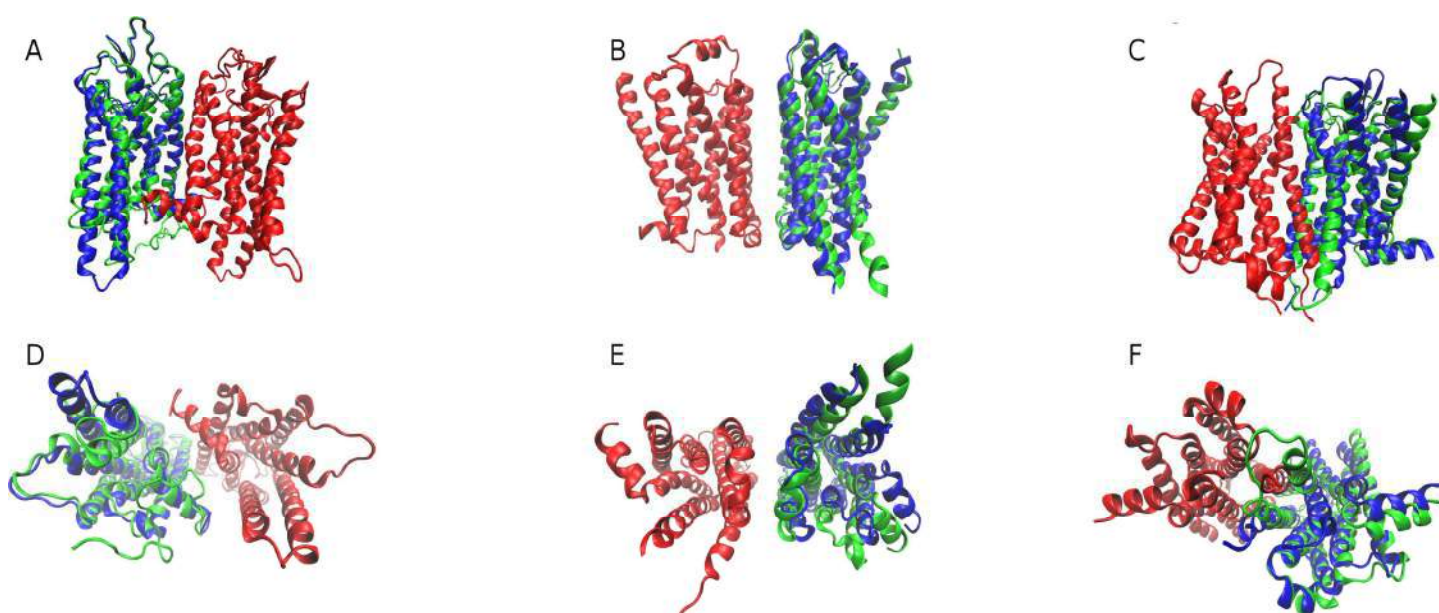
Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι το ετεροδιμερές μOR – δOR υιοθετεί παρόμοια συμπεριφορά στο χώρο με τα ομοδιμερή των GPCRs. Δεδομένου του γεγονότος ότι και άλλα πειραματικά προσδιορισμένα ετεροδιμερή υποδοχέων έχουν προταθεί να σχηματίζουν παρόμοια υπερμοριακά συμπλέγματα, τόσο πειραματικά όσο και υπολογιστικά, μπορεί να υποτεθεί ότι τα δομικά και δυναμικά χαρακτηριστικά που παρατηρήθηκαν από τη μελέτη των ομοδιμερών GPCRs πιθανότατα ισχύουν, ως ένα βαθμό, και για τα έτερο-ολιγομερή.

3.10 Η πιθανή βιολογική σημασία των αλληλεπιδράσεων Ολιγομερισμού

Ένας από τους σημαντικότερους λόγους για τους οποίους ο ολιγομερισμός των GPCRs παρουσιάζει έντονο ενδιαφέρον είναι οι πιθανές επιρροές του στη λειτουργικότητα των υποδοχέων. Σε αρκετές περιπτώσεις, ο σχηματισμός διμερών ή ολιγομερών GPCRs έχει βρεθεί να επηρεάζει την αναγνώριση ενός υποκαταστάτη, να ρυθμίζει το μηχανισμό ενεργοποίησης των υποδοχέων και την αναγνώριση και πρόσδεση των G-πρωτεϊνών ή να επάγει τη φωσφορυλίωση και ενδοκύτωση των υποδοχέων και το σηματοδοτικό μονοπάτι των β-αρρεστινών. Ωστόσο, παρά την αφθονία πειραματικά επιβεβαιωμένων στοιχείων για τη λειτουργική σημασία του ολιγομερισμού, πολύ λίγα είναι γνωστά σχετικά με τα δομικά χαρακτηριστικά αυτών των επιρροών.

Όπως αναφέρθηκε και στην Εισαγωγή, μια σειρά κρυσταλλικών δομών για ενεργοποιημένους υποδοχείς σε διάφορα στάδια του κύκλου τους έχουν αποκαλύψει τα βασικά χαρακτηριστικά του μηχανισμού ενεργοποίησης των GPCRs. Αυτά περιλαμβάνουν τη διάσπαση της ιοντικής γέφυρας που συνδέει τη διαμεμβρανική έλικα TM6 με το μοτίβο D(E)RY στην έλικα TM3, ακολουθούμενη από μετακίνηση των κυτοπλασματικών άκρων των ελίκων TM5 και TM6 και το άνοιγμα μιας κοιλότητας στην ενδοκυτταρική όψη του υποδοχέα, ενώ επιπλέον αλλαγές παρατηρούνται και στα κατάλοιπα του μοτίβου NPxxYx(5,6)F στη διαμεμβρανική έλικα TM7, τα οποία αλλάζουν διευθέτηση στο χώρο ώστε να σταθεροποιήσουν την ενεργή στερεοδιάταξη. Η

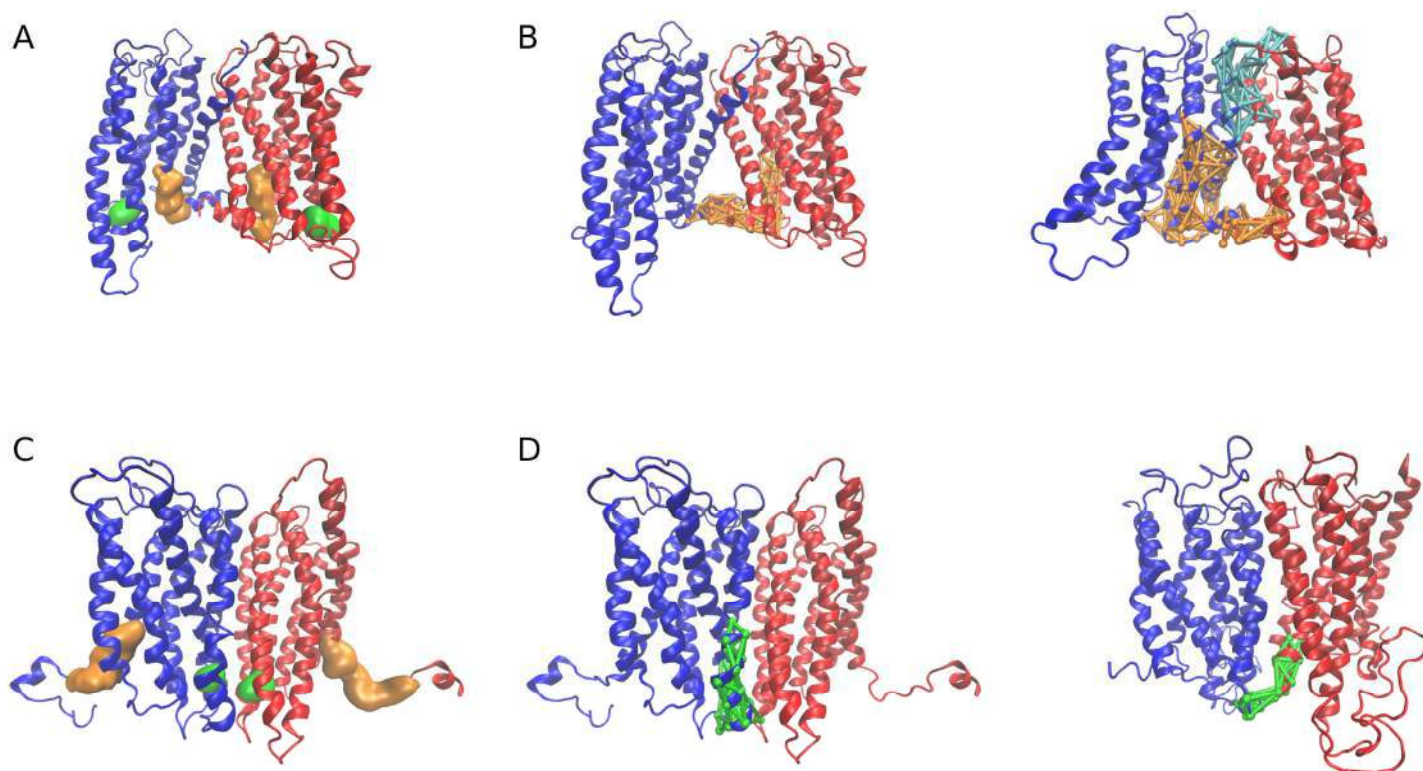
σημαντική ομοιότητα των παραπάνω χαρακτηριστικών ανάμεσα στις διαφορετικές δομές καθώς και η υψηλή συντηρητικότητα των δυο μοτίβων ανάμεσα στους GPCRs της Κλάσης A δείχνει ότι η διαδικασία ενεργοποίησης είναι υψηλά συντηρημένη για τους υποδοχείς της Κλάσης A. Επιπρόσθετα, η παρουσία μοτίβων παρόμοιων με το NPxxYx(5,6)F στην έλικα TM7 στις δομές των υποδοχέων mGluR1 και Smoothed, όπως και μιας παρόμοιας ιοντικής γέφυρας ανάμεσα στις έλικες TM3 και TM6 στη δομή του mGluR1, υποδεικνύει ότι ο μηχανισμός ενεργοποίησης πιθανώς ισχύει και για GPCRs άλλων Κλάσεων.



Εικόνα 3.21 Εξέταση της ικανότητας ενεργοποίησης των GPCRs σε διμερή TM1-TM2-H8, TM3-TM5 και TM5-TM6 μέσω δομικών στοιχίσεων. Παρουσιάζεται μια γενική επισκόπηση της κάθε υπέρθεσης (A, B, C) καθώς και η κυτοπλασματική όψη των υποδοχέων (D, E, F). Τα πρωτομερή κάθε διμερούς χρωματίζονται με μπλε και κόκκινο, ενώ η στοιχημένη δομή με πράσινο. A και D. Στοιχίση της ανενεργής (πράσινο) Ροδοψίνης σε πρωτομερές του διμερούς TM1-TM2-H8 της Οψίνης. Δεν παρατηρείται καμία στερεοχημική σύγκρουση με συντεταγμένες του δεύτερου πρωτομερούς, B και E. Στοιχίση μοντέλου του ενεργοποιημένου αδρενεργικού υποδοχέα β1 στο διμερές TM4-TM5 του β1. Δεν υπάρχουν συγκρούσεις ανάμεσα στο στοιχημένο ενεργοποιημένο υποδοχέα και το δεύτερο πρωτομερές, υποδεικνύοντας ότι η ενεργοποίηση είναι δυνατή. Ωστόσο, αναμένονται αλλαγές στις αλληλεπιδράσεις λόγω της μετακίνησης της έλικας TM5, C και F. Στοιχίση μοντέλου του ενεργοποιημένου υποδοχέα μOR στο διμερές TM5-TM6 του μOR. Από τη στοιχίση φαίνεται πως το δεύτερο πρωτομερές μπορεί να εμποδίσει την κίνηση των ελίκων TM5 και TM6 του πρώτου, εμποδίζοντας την ενεργοποίηση. Τα μοντέλα των ενεργοποιημένων β1AR και μOR δημιουργήθηκαν με πρότυπο το μοντέλο του ενεργοποιημένου β2AR (PDB: 3SN6).

Όπως είναι αναμενόμενο, τα παραπάνω δομικά χαρακτηριστικά παρατηρούνται στο διμερές TM1-TM2-H8 της ενεργοποιημένης Οψίνης. Αντίστοιχα, η δομική στοιχίση του ενεργοποιημένου αδρενεργικού υποδοχέα β2 στο διμερές TM1-TM2-H8 του υποδοχέα, αλλά και η στοιχίση αντίστοιχων μοντέλων ενεργοποιημένων υποδοχέων σε άλλα διμερή αυτού του τύπου στο σύνολο δεδομένων δεν παρουσιάζουν καμία απολύτως στερεοχημική παρεμπόδιση.

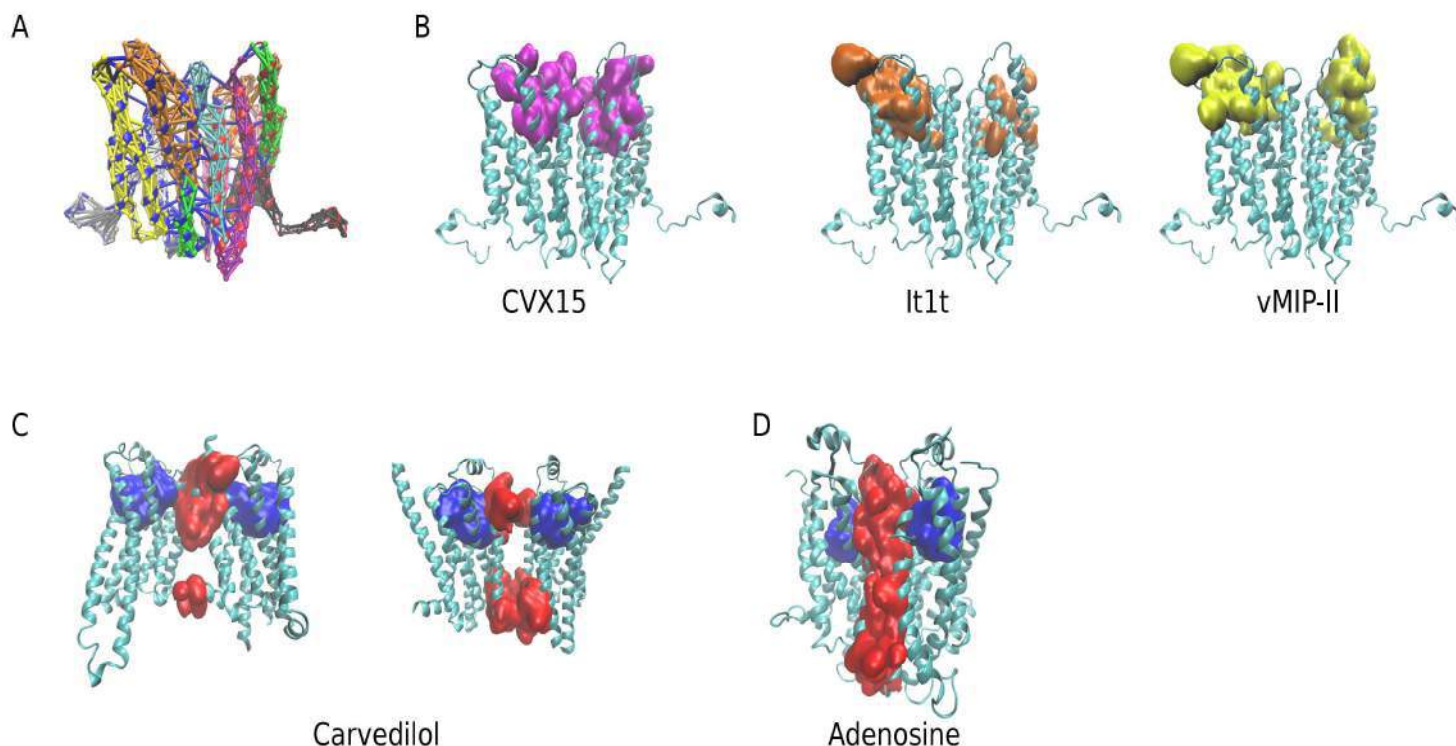
Δεδομένου ότι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτομερών στα διμερή TM1-TM2-H8 δεν περιλαμβάνουν κάποια από τις περιοχές που μεταβάλλονται κατά την ενεργοποίηση, οι παραπάνω παρατηρήσεις δεν προκαλούν έκπληξη. Σε κάθε περίπτωση, είναι ξεκάθαρο ότι τα διμερή TM1-TM2-H8 επιτρέπουν την ενεργοποίηση των GPCRs, χωρίς όμως να υπάρχει, φαινομενικά, κάποιος μηχανισμός μέσω του οποίου να την επηρεάζουν.



Εικόνα 3.22 Α. Η θέση των μοτίβων D(E)RY (πράσινο) και NPxxYx(5,6)F (πορτοκαλί) στα διμερή TM1-TM2-H8, Β. Απεικόνιση των κοινότητων H8-H8 (πορτοκαλί) στα διμερή των κOR και μOR, Γ. Η θέση των μοτίβων D(E)RY (πράσινο) και NPxxYx(5,6)F (πορτοκαλί) στα διμερή TM4-TM5, Δ. Απεικόνιση των διαμοριακών κοινότητων στις οποίες συμμετέχει το D(E)RY (πράσινο) στα διμερή CXCR4 και β1AR.

Αντίστοιχα, το διμερές TM4-TM5 του αδενোসινικού υποδοχέα A2a περιλαμβάνει πρωτομερή σε στερεοδιάταξη πολύ κοντά στην ενεργοποιημένη κατάσταση, ενώ δομική στοίχιση του ενεργοποιημένου A2a σε σύμπλοκο με την αδενοσίνη στο διμερές και πάλι δεν παρουσιάζει καμία στερεοχημική σύγκρουση. Αντίστοιχα, λοιπόν, φαίνεται πως και στα διμερή TM4-TM5 οι GPCRs είναι ικανοί να ενεργοποιηθούν, αν και η συμμετοχή της έλικας TM5 στην επιφάνεια αλληλεπίδρασης θα μπορούσε ίσως να επηρεάζει τη διαδικασία. Από την άλλη, η στοίχιση ενός μοντέλου για τον ενεργοποιημένο οπιοειδή υποδοχέα μ στο διμερές TM5-TM6 παρουσιάζει σοβαρές στερεοδιαταξικές συγκρούσεις, γεγονός που υποδεικνύει ότι η ενεργοποίηση των πρωτομερών σε ένα διμερές αυτού του τύπου είναι αδύνατη. Δεδομένου ότι

υπάρχουν πειραματικά στοιχεία σύμφωνα με τα οποία ο σχηματισμός διμερών ειδικά για τους οπιοειδείς υποδοχείς μπορεί να οδηγήσει σε αναστολή της λειτουργίας τους, δεν αποκλείεται ο σχηματισμός διμερών TM5-TM6 να αποτελεί κομμάτι κάποιου μηχανισμού μέσω του οποίου επιτυγχάνεται αυτή η αναστολή.



Εικόνα 3.23 Η οργάνωση κοινοτήτων στο δίκτυο του διμερούς CXCR4. Β. Απεικόνιση των θέσεων αλληλεπίδρασης των υποκαταστατών CVX15 (μωβ), It1t (πορτοκαλί) και vMIP-II (κίτρινο). Οι θέσεις πρόσδεσης των υποκαταστατών αντιστοιχούν σε κατάλοιπα που συμμετέχουν στην επιφάνεια επαφής του διμερούς, αλλά και στις κοινότητες των βρόχων ECL2. Η πληροφορία για τη θέση των υποκαταστατών λήφθηκε μέσω εξέτασης των δομών 3OE0, 3ODU και 4RWS. C. Απεικόνιση της θέσης πρόσδεσης του φαρμάκου Carvedilol (μπλε) σε σχέση με την επιφάνεια αλληλεπίδρασης (κόκκινο) στα διμερή TM1-TM2-H8 και TM4-TM5 του β 1AR. Η θέση του φαρμάκου βρέθηκε μέσω εξέτασης της δομής 4AMJ. Το φάρμακο Carazolol στη δομή του β 2AR (PDB: 2RH1) προσδένεται σε ανάλογη θέση. D. Απεικόνιση της θέσης πρόσδεσης της αδενοσίνης (μπλε) σε σχέση με την επιφάνεια αλληλεπίδρασης (κόκκινο) στο διμερές TM4-TM5 του A2a. Η θέση της αδενοσίνης βρέθηκε με εξέταση της δομής 2YDO.

Η εξέταση των διμερών GPCRs μέσω απλών δομικών στοιχίσεων αποκαλύπτει την ικανότητα κάθε τύπου διμερούς ως προς την ενεργοποίηση των πρωτομερών τους (Εικόνα 3.21), αλλά δεν προσφέρει κάποιο στοιχείο σχετικά με το πώς η διάταξη του διμερούς μπορεί να επηρεάζει τη λειτουργικότητα των πρωτομερών. Ωστόσο, η μελέτη των αποτελεσμάτων των προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής, καθώς και η ανάλυση των δυναμικών δικτύων, όπως περιγράφηκε ήδη, προσφέρει στοιχεία μέσω των οποίων μπορούν να υποτεθούν κάποιοι

πιθανοί μηχανισμοί που να συνδέουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτομερών με τη διαδικασία της ενεργοποίησης.

Όπως αναφέρθηκε ήδη σε προηγούμενες Ενότητες, οι διαμοριακές αλληλεπιδράσεις όλων των διμερών TM4-TM5 στο τέλος των προσομοιώσεων περιλαμβάνουν επαφές με στοιχεία στο μοτίβο D(E)RY της έλικας TM3, το οποίο στους υποδοχείς της Κλάσης A σχετίζεται με την ενεργοποίηση. Επιπρόσθετα, όπως αναλύθηκε στην Ενότητα 3.9, το μοτίβο D(E)RY και οι επαφές μεταξύ των υποδοχέων στα τμήματα των TM3, ICL2 και TM4 σχηματίζουν μια διακριτή διαμοριακή κοινότητα, γεγονός που υποδεικνύει ότι κινούνται σε συμφωνία μεταξύ τους. Οι παραπάνω παρατηρήσεις υποδεικνύουν ότι η κινητικότητα του μοτίβου D(E)RY και, κατά συνέπεια, των στοιχείων ενεργοποίησης στο ένα πρωτομερές επηρεάζεται από την παρουσία του δεύτερου. Είναι πιθανό, λοιπόν, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτομερών του διμερούς TM4-TM5 στο συγκεκριμένο σημείο να συμμετέχουν αλλοστερικά στη ρύθμιση της ενεργοποίησης (Εικόνα 3.22).

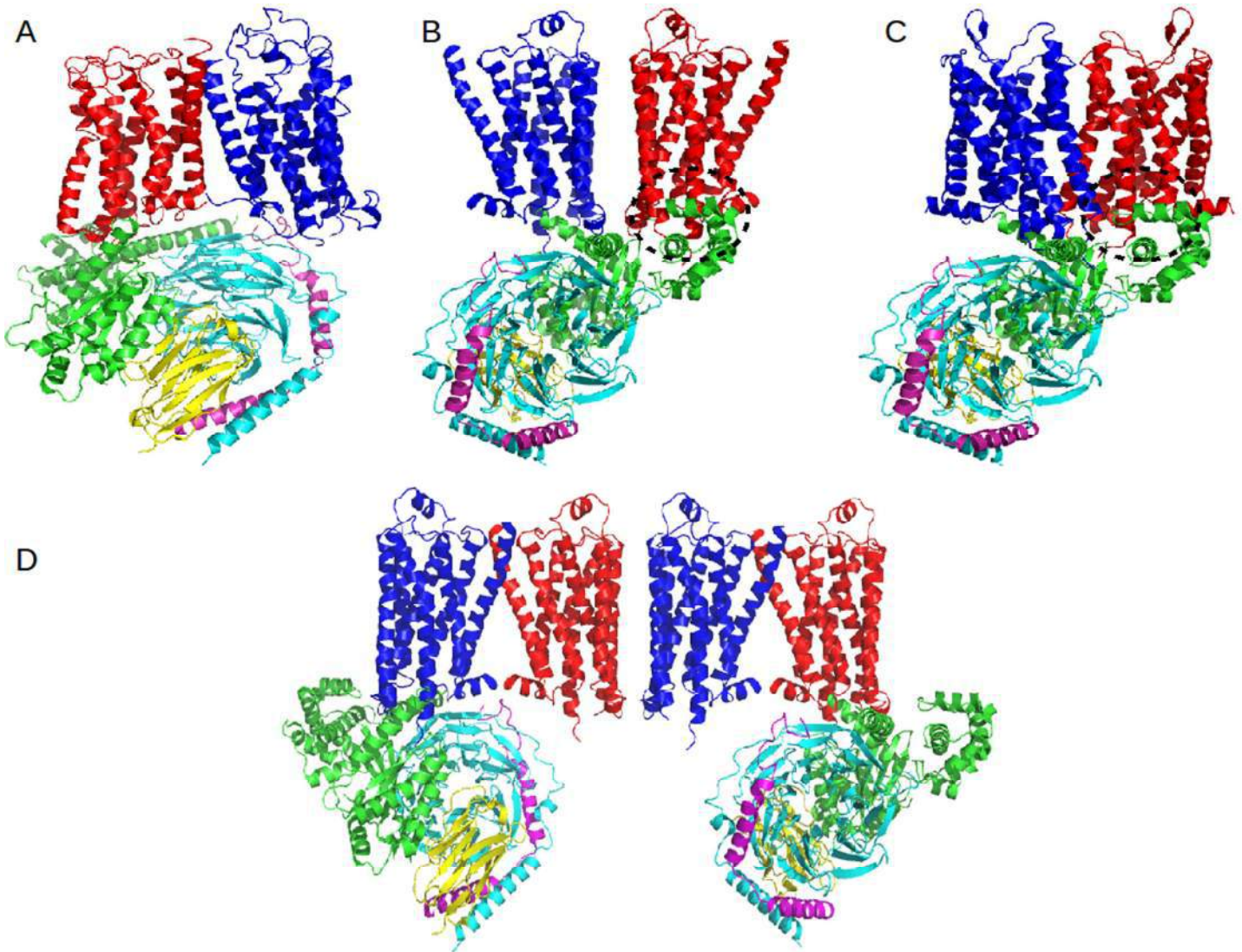
Ένας δεύτερος μηχανισμός ρύθμισης μπορεί να προταθεί για τα διμερή TM1-TM2-H8, τα οποία στην πλειονότητά τους εμφανίζουν δίκτυα με κοινότητες που περιέχουν τις θέσεις αλληλεπίδρασης των ελίκων H8 αλλά και το μοτίβο NPxxYx(5,6)F. Η υψηλή συνδεσιμότητα των καταλοίπων στις συγκεκριμένες κοινότητες υποδεικνύει ότι η δυναμική συμπεριφορά του μοτίβου συσχετίζεται υψηλά με τις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις των ελίκων H8. Είναι πιθανό, λοιπόν, η αλληλεπίδραση των πρωτομερών στο συγκεκριμένο σημείο να μπορεί να ρυθμίσει την κινητικότητα του μοτίβου NPxxYx(5,6)F και, μέσω αυτού, την ενεργοποίηση των GPCRs (Εικόνα 3.22).

Σύμφωνα με την ανάλυση δυναμικών δικτύων, παρατηρείται σχέση ανάμεσα στις επιφάνειες αλληλεπίδρασης των διμερών και στον εξωκυτταρικό βρόχο ECL2 κάθε πρωτομερούς, ο οποίος σε όλα τα δυναμικά δίκτυα σχηματίζει διακριτές κοινότητες. Αυτή η σχέση αναπαριστάται είτε με απ'ευθείας συμμετοχή καταλοίπων της επιφάνειας επαφής στις κοινότητες των ECL2, είτε μέσω κρίσιμων συνδέσεων ανάμεσα στις κοινότητες των ECL2 και τις κοινότητες των αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στα πρωτομερή (Εικόνες 3.19, 3.20). Αυτή η δομική συσχέτιση δεν αποκλείεται να έχει και βιολογική σημασία, καθώς ο εξωκυτταρικός βρόχος ECL2 έχει βρεθεί να συμμετέχει στην αναγνώριση και πρόσδεση υποκαταστατών σε πολλούς GPCRs

της Κλάσης A, ανάμεσα στους οποίους συγκαταλέγονται οι αδενοσινικοί και χημειοκινικοί υποδοχείς.

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι, τόσο στα διμερή TM1-TM2-H8 όσο και στα διμερή TM4-TM5, οι κοινότητες των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων περιλαμβάνουν και κατάλοιπα που συμμετέχουν σε θέσεις πρόσδεσης υποκαταστατών. Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων περιπτώσεων αποτελούν τα διμερή του χημειοκινικού υποδοχέα CXCR4, στα οποία οι κοινότητες των επαφών TM4-TM5 και των εξωκυτταρικών βρόχων ECL2 συμπίπτουν με τις θέσεις πρόσδεσης του κυκλικού πεπτιδίου CVX15, του ανταγωνιστή It1t αλλά και της ιικής χημειοκίνης vMIP-II (Εικόνα 3.23). Αντίστοιχα, μέρος των θέσεων πρόσδεσης των φαρμάκων Carvedilol και Carazolol συμπίπτει με τις επιφάνειες αλληλεπίδρασης των διμερών στους υποδοχείς β 1AR και β 2AR, ενώ και η κοιλότητα πρόσδεσης της αδενοσίνης στον υποδοχέα A2a περιλαμβάνει μέρος της επιφάνειας επαφής του αντίστοιχου διμερούς TM4-TM5.

3.11 Μοντέλα για τις αλληλεπιδράσεις ολιγομερών GPCRs με G-πρωτεΐνες



Εικόνα 3.24 Θεωρητικά μοντέλα που εξετάζουν την ικανότητα κάθε τύπου διμερούς ως προς την πρόσδεση των ετεροτριμερών G-πρωτεϊνών. Τα πρωτομερή κάθε διμερούς χρωματίζονται με μπλε και κόκκινο, ενώ οι υπομονάδες G α , G β και G γ με πράσινο, κυανό και μωβ, αντίστοιχα. Το συγκρουστωμένο νανοαντίσωμα χρωματίζεται κίτρινο. Α. Πιθανό σύμπλοκο του διμερούς TM1-TM2-H8 του β 1AR με το G α G β γ . Το διμερές β 1AR είναι ικανό να προσδέσει τις G-πρωτεΐνες χωρίς προβλήματα, σχηματίζοντας πιθανές επαφές τόσο με την G α όσο και με το G β , Β. Πιθανό σύμπλοκο του διμερούς TM4-TM5 του β 1AR με το G α G β γ . Το δεύτερο πρωτομερές δημιουργεί σημαντικές στερεοχημικές παρεμποδίσεις με την περιοχή α -έλικας της G α (σημαίνεται με στικτές γραμμές), υποδεικνύοντας ότι διμερή αυτού του τύπου αδυνατούν να σχηματίσουν σύμπλοκο με G-πρωτεΐνες, C. Πιθανό σύμπλοκο του διμερούς TM5-TM6 του μ OR με το G α G β γ . Αντίστοιχα με το διμερές TM4-TM5, είναι αδύνατος ο σχηματισμός φυσιολογικού συμπλόκου, D. Πιθανό μοντέλο ολιγομερούς του υποδοχέα β 1AR σε σύμπλοκο με G-πρωτεΐνες. Το τετραμερές αποτελείται από δύο διμερή TM1-TM2-H8, συνδεδεμένα μεταξύ τους μέσω αλληλεπιδράσεων TM4-TM5. Το συγκεκριμένο μοντέλο επιτρέπει την πρόσδεση περισσότερων του ενός ετεροτριμερών G α G β γ .

Αν και, προς το παρόν, δεν υπάρχουν διαθέσιμες δομές για κάποιο σύμπλοκο ανάμεσα σε ένα διμερές GPCR και ένα ετεροτριμερές G-πρωτεϊνών, τα διαθέσιμα δομικά δεδομένα και η προερχόμενη από βιοχημικά πειράματα πληροφορία επιτρέπουν τη διατύπωση κάποιων υποθέσεων για τη στοιχειομετρία του. Ένα απλό πείραμα αγκυροβόλησης, πραγματοποιούμενο μέσω υπέρθεσης του ενεργοποιημένου υποδοχέα $\beta 2$ από το σύμπλοκο $\beta 2AR - G\alpha G\beta$ σε πρωτομερή διμερών GPCRs δείχνει πως τα διμερή TM1-TM2-H8 επιτρέπουν το σχηματισμό συμπλόκων με G-πρωτεΐνες Στο προτεινόμενο μοντέλο που προκύπτει η Gα αλληλεπιδρά μόνο με ένα από τα πρωτομερή κάθε διμερούς, όπως και στην κρυσταλλική δομή. Ωστόσο, η παρουσία του δεύτερου πρωτομερούς επιτρέπει το σχηματισμό πιθανών επαφών ανάμεσα σε GPCR και το ετεροδιμερές Gβγ οι οποίες, αν και δεν παρατηρούνται στη δομή του συμπλόκου $\beta 2AR-G\alpha G\beta$, έχουν υποδειχθεί επανειλημμένα από βιοχημικά πειράματα και μελέτες μεταλλαξιγένεσης (Εικόνα 3.24).

Αν και θεωρητικό ως προς τη φύση του, το παραπάνω μοντέλο είναι ιδιαίτερα ελκυστικό καθώς είναι ορθό στερεοδιαταξικά και βρίσκεται σε συμφωνία με υπάρχοντα βιολογικά δεδομένα. Αντίθετα, τα αποτελέσματα αγκυροβόλησης μέσω δομικών στοιχίσεων υποδεικνύουν ότι ο σχηματισμός συμπλόκου με G-πρωτεΐνες είναι αδύνατος για τα διμερή TM4-TM5 και TM5-TM6, καθώς η παρουσία του δεύτερου πρωτομερούς υποδοχέα θα οδηγούσε σε σημαντικές στερεοδιαταξικές συγκρούσεις με την περιοχή α-ελίκων της υπομονάδας Gα, η οποία μετακινείται κατά την ενεργοποίηση των G-πρωτεϊνών. Ο μοναδικός, φαινομενικά, τρόπος με τον οποίο ένα διμερές TM4-TM5 (ή TM5-TM6) θα μπορούσε να αλληλεπιδράσει με τις G-πρωτεΐνες είναι έμμεσος και περιλαμβάνει την οργάνωση των υποδοχέων σε τετραμερή, στα οποία τα δυο μεσαία πρωτομερή σχηματίζουν διμερές TM4-TM5 ή TM5-TM6, ενώ συμμετέχουν στο σχηματισμό διμερών TM1-TM2-H8 με τα υπόλοιπα δύο πρωτομερή, τα οποία και έρχονται σε επαφή με τις G-πρωτεΐνες Η συγκεκριμένη οργάνωση, μάλιστα, επιτρέπει την πρόσδεση περισσότερων του ενός ετεροτριμερών $G\alpha G\beta$ σε ένα ολιγομερές, χαρακτηριστικό το οποίο έχει προταθεί και πειραματικά (Εικόνα 3.24).

Σε αντίθεση με την παραπάνω θεωρητική προσέγγιση, πειραματική πληροφορία προερχόμενη από πειράματα κρύο-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας υποδεικνύει ότι ετεροτριμερή $G\alpha G\beta$ μπορούν να προσδεθούν απ'ευθείας σε διμερή TM4-TM5 της Ροδοψίνης του βοδιού (Jastrzebska *et al.*, 2013; Jastrzebska *et al.*, 2011). Στα δεδομένα ηλεκτρονικής πυκνότητας των

παραπάνω πειραμάτων η υπομονάδα Gα παρουσιάζει επίσης μετακίνηση της περιοχής α-ελίκων, σε πολύ μικρότερη απόσταση όμως από αυτή που παρατηρείται στην κρυσταλλική δομή. Αυτή η διαφορά μπορεί να έχει να κάνει με την παρουσία του νανοαντισώματος ανάμεσα στις περιοχές GTPάσης και α-ελίκων της Gα στην κρυσταλλική δομή, το οποίο πιθανόν να έχει επηρεάσει σημαντικά το βαθμό αποχωρισμού των δύο περιοχών. Πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι η δομή της Gα η οποία προτείνεται από τα συγκεκριμένα πειράματα, αν και διαφέρει με αυτή που προτείνεται από την κρυσταλλική δομή του συμπλόκου GPCR – G-πρωτεϊνών, συμφωνεί σε μεγάλο βαθμό με δεδομένα προερχόμενα από μετρήσεις φασματοσκοπίας SDSL/DEER (Van Eps *et al.*, 2011).

Σε κάθε περίπτωση, τα παραπάνω δεδομένα προτείνουν ότι η Gα μπορεί να προσδεθεί σε ένα διμερές TM4-TM5 χωρίς στερεοχημικές παρεμποδίσεις, επιτρέποντας μάλιστα επαφές της Gα και με τα δυο πρωτομερή. Επιπρόσθετα, η αγκυροβόληση μιας ανενεργής υπομονάδας Gα σε ένα διμερές TM4-TM5 μπορεί να πραγματοποιηθεί χωρίς παρεμποδίσεις, γεγονός που προτείνει ότι είναι δυνατή η αλληλεπίδραση διμερών αυτού του τύπου με G-πρωτεΐνες τουλάχιστον στα αρχικά στάδια του κύκλου λειτουργίας τους. Ωστόσο, η έλλειψη κάποιας δομής σε ατομική διακριτικότητα για κάποιο σύμπλοκο διμερούς GPCRs – G-πρωτεϊνών καθιστά αδύνατη τη διατύπωση ασφαλών συμπερασμάτων και έτσι, όλα τα παραπάνω μοντέλα παραμένουν θεωρητικά.

3.12 Περιορισμοί της μεθοδολογίας και των προτεινόμενων μοντέλων

Σε αυτό το σημείο είναι σημαντικό να αναφερθούν κάποιοι περιορισμοί που χαρακτηρίζουν τη μεθοδολογία που ακολουθήθηκε και τα αποτελέσματα και συμπεράσματα που προτείνονται. Ο πρώτος περιορισμός αφορά τις προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής που πραγματοποιήθηκαν. Η επιλογή της χρήσης του MARTINI, ενός πεδίου Coarse – Grained, για την περιγραφή των βιομοριακών αλληλεπιδράσεων, παρ'ότι δίνει τη δυνατότητα της εκτεταμένης μελέτης των διαμεμβρανικών υποδοχέων στο φυσικό τους περιβάλλον χωρίς υπολογιστικά δαπανηρές διαδικασίες, εμποδίζει τη λεπτομερή περιγραφή των αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών – πρωτεϊνών. Η διαδικασία της αντίστροφης χαρτογράφησης των αποτελεσμάτων σε μοντέλα ατομικής διακριτικότητας, με ποιότητα πολύ κοντά σε αυτή των

αρχικών κρυσταλλικών δομών, βοηθά σημαντικά στην ανάκτηση του απαιτούμενου επιπέδου λεπτομέρειας. Παρ'όλα αυτά, τα αποτελέσματα και πάλι πρέπει να εξεταστούν με επιφύλαξη.

Ένας άλλος περιορισμός των προσομοιώσεων CG-MD είναι η χρήση ενός ομογενούς περιβάλλοντος για την περιγραφή της λιπιδικής διπλοστιβάδας. Με εξαίρεση τις προσομοιώσεις των mGluR1 και β2AR, οι οποίες πραγματοποιήθηκαν παρουσία των κρυσταλλογραφικά λυμένων μορίων χοληστερόλης, χρησιμοποιήθηκαν αποκλειστικά μεμβράνες αποτελούμενες από ένα μόνο τύπο λιπιδίου, οι οποίες ίσως να μην προτυποποιούν ορθά το πραγματικό περιβάλλον μιας βιολογικής μεμβράνης. Παρ'ότι πολλές διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, ανάμεσά τους και οι GPCRs, έχουν βρεθεί πειραματικά να λειτουργούν *in vitro* σε τεχνητές μεμβράνες, οι πιθανές επιρροές ενός ετερογενούς περιβάλλοντος, αποτελούμενου από πολλά είδη φωσφολιπιδίων καθώς και άλλα στοιχεία όπως στερόλες και γλυκολιπίδια δεν μπορούν να παραβλεφθούν.

Όσον αφορά τις διαδικασίες που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση και αξιολόγηση των αλληλεπιδρώντων καταλοίπων, πρέπει να σημειωθεί πως τόσο η κατάταξη με βάση τη θαμμένη επιφάνεια όσο και η υπολογιστική μεταλλαξιγένεση αλανίνης είναι μέθοδοι που έχουν σχεδιαστεί με βάση τα χαρακτηριστικά των σφαιρικών υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών, και η αποτελεσματική χρήση τους στην ανάλυση διαμεμβρανικών αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών – πρωτεϊνών δεν έχει διερευνηθεί πλήρως. Ωστόσο, δεδομένου του γεγονότος ότι τα προτεινόμενα από αυτές τις μεθόδους σημεία ενδιαφέροντος συμπεριλαμβάνονται στις πιο ισχυρές αλληλεπιδράσεις που παρατηρήθηκαν στις προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής σε μεμβρανικό περιβάλλον, η σημασία των αποτελεσμάτων αυξάνεται.

Τέλος, ένας σημαντικός περιορισμός είναι η έλλειψη εκτενών αποτελεσμάτων σχετικά με ετεροδιμερή ή έτερο-ολιγομερή GPCRs, γεγονός που οφείλεται κυρίως στην απουσία ουσιαστικής πληροφορίας για τη φύση των αλληλεπιδράσεων ανάμεσα σε διαφορετικούς υποδοχείς. Παρ'όλα αυτά, προηγούμενες πειραματικές μελέτες πάνω σε ετεροδιμερή έχουν προτείνει παρόμοιες αλληλεπιδράσεις με αυτές των ομοδιμερών. Επιπρόσθετα, η μελέτη του ετεροδιμερούς μOR – δOR παρουσίασε κοινά αποτελέσματα με αυτά των κρυσταλλογραφικών ομοδιμερών. Έτσι, είναι πιθανό τα χαρακτηριστικά των ομοδιμερών τα οποία μελετήθηκαν με τις παραπάνω διαδικασίες να ισχύουν, ως ένα βαθμό, και για τα ετεροδιμερή GPCRs.

Παρά τους περιορισμούς, τα αποτελέσματα που προτείνονται από την παρούσα διπλωματική εργασία περιγράφουν σημαντικά γνωρίσματα του ολιγομερισμού των GPCRs και μπορούν να αποδειχθούν ιδιαίτερα χρήσιμα στην περαιτέρω μελέτη αυτού του σημαντικού κομματιού της σχετιζόμενης με τους GPCRs φυσιολογίας.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκαν βασικά χαρακτηριστικά της δομικής φύσης και της δυναμικής συμπεριφοράς των αλληλεπιδράσεων ολιγομερισμού στους GPCRs. Πραγματοποιήθηκαν προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής, μέσω των οποίων παρατηρήθηκαν τόσο οι επιδράσεις των μεθόδων προσδιορισμού της δομής πάνω στην οργάνωση των διμερών GPCRs όσο συντηρημένα δομικά και δυναμικά χαρακτηριστικά των αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στους υποδοχείς. Επιπρόσθετα, η μελέτη της δυναμικής συμπεριφοράς των GPCRs σε προσομοιώσεις διμερών παρουσία μορίων χοληστερόλης αποκαλύπτει τη συμβολή των στοιχείων του μεμβρανικού περιβάλλοντος στη ρύθμιση των αλληλεπιδράσεων. Συγκεκριμένα, από τα αποτελέσματα προτείνεται ότι η χοληστερόλη μπορεί να επάγει την ταχύτερη οργάνωση και ενίσχυση των αλληλεπιδράσεων ολιγομερισμού, ωθώντας πρωτομερή υποδοχέων στο να προσεγγίσουν το ένα το άλλο.

Η μελέτη και ανάλυση τόσο των διαθέσιμων δομικών δεδομένων όσο και των αποτελεσμάτων των προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής αποκάλυψε τα χαρακτηριστικά αυτών των συντηρημένων χαρακτηριστικών, τα οποία επικεντρώνονται κυρίως σε περιοχές όπως οι διαμεμβρανικές έλικες TM1, TM4 και TM5 και η κυτοπλασματική έλικα H8 του καρβοξυτελικού άκρου των υποδοχέων. Συγκεκριμένα, αρωματικά κατάλοιπα τα οποία συμμετέχουν σε επαφές π-ηλεκτρονίων παρουσιάζονται ανάμεσα στις πιο ισχυρές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτομερών, με την πλειονότητά αυτών των αλληλεπιδράσεων να διατηρούνται σταθερές κατά τις προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής. Επιπρόσθετα, η παρουσία αυτών των καταλοίπων σε συγκεκριμένες θέσεις, κοντά στα όρια των διαμεμβρανικών τμημάτων, υποδεικνύει τη συμμετοχή τους σε φαινόμενα που σχετίζονται με την υδροφοβική ασυμφωνία (hydrophobic mismatch) ανάμεσα στα υδρόφοβα τμήματα των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών και το πάχος των βιολογικών μεμβρανών.

Τα αποτελέσματα των προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής συνδυάστηκαν με μεθόδους ανάλυσης προερχόμενες από τα δίκτυα αλληλεπιδράσεων. Μέσω της ανάλυσης δικτύων των δυναμικών κινήσεων αποκαλύφθηκε η ύπαρξη συντηρημένων χαρακτηριστικών οργάνωσης στα διμερή των GPCRs. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση της κινητικότητας ανάμεσα

σε περιοχές που συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις ολιγομερισμού και σε δομικά στοιχεία που σχετίζονται με τη λειτουργικότητα των GPCRs, όπως τα μοτίβα που συμμετέχουν στη διαδικασία ενεργοποίησης των υποδοχέων και οι περιοχές που σχετίζονται με την αναγνώριση και πρόσδεση του υποκαταστάτη.

Η παρουσία αυτών των δυναμικών συσχετίσεων προτείνει την ύπαρξη μηχανισμών ρύθμισης μέσω των οποίων οι αλληλεπιδράσεις ολιγομερισμού μπορούν να επηρεάσουν τη λειτουργία των υποδοχέων. Επιπρόσθετα, η παρατήρηση παρόμοιων χαρακτηριστικών στο θεωρητικό μοντέλο ενός ετεροδιμερούς υποδεικνύει ότι οι ίδιοι μηχανισμοί πιθανώς ισχύουν και για τα ετερομερή των GPCRs.

Τέλος, με βάση όλα τα παραπάνω αποτελέσματα, διατυπώθηκαν κάποιες υποθέσεις σχετικά με την πιθανή στοιχειομετρία των αλληλεπιδράσεων ανάμεσα σε διμερή ή ολιγομερή GPCRs και σε G-πρωτεΐνες, προτείνοντας κάποια πιθανά μοντέλα συμπλόκων ανάμεσα στους υποδοχείς και τα ετεροτριμερή GαGβγ.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η παρούσα διπλωματική εργασία αποτελεί την πρώτη προσπάθεια για μελέτη της δυναμικής συμπεριφοράς των διμερών GPCRs σε συλλογικό επίπεδο. Δεδομένου του συνεχώς αυξανόμενου ενδιαφέροντος για τη μελέτη και αποσαφήνιση της δομικής φύσης και βιολογικής σημασίας του ολιγομερισμού GPCRs και των επιδράσεων του στη φυσιολογική και μη λειτουργία των υποδοχέων και σε συνδυασμό με τη συντηρημένη δομική φύση των GPCRs, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας μπορούν να βρουν εφαρμογή στο σχεδιασμό πειραματικών μελετών πάνω σε διμερή ή ολιγομερή GPCRs, καθώς και στη μελέτη των αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών – πρωτεϊνών στις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες γενικότερα.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Amadei, A., Linssen, A.B., Berendsen, H.J., 1993. Essential dynamics of proteins. *Proteins* 17, 412-425.
- Ballesteros, J.A., Weinstein, H., 1995. [19] Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors, p. 366-428, in: C. S. Stuart, (Ed.), *Methods in Neurosciences*, Academic Press.
- Bayburt, T.H., Vishnivetskiy, S.A., McLean, M.A., *et al.*, 2011. Monomeric rhodopsin is sufficient for normal rhodopsin kinase (GRK1) phosphorylation and arrestin-1 binding. *The Journal of biological chemistry* 286, 1420-1428.
- Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., *et al.*, 2000. The Protein Data Bank. *Nucleic acids research* 28, 235-242.
- Boas, F.E., Harbury, P.B., 2007. Potential energy functions for protein design. *Current opinion in structural biology* 17, 199-204.
- Borroto-Escuela, D.O., Brito, I., Romero-Fernandez, W., *et al.*, 2014. The G protein-coupled receptor heterodimer network (GPCR-HetNet) and its hub components. *International journal of molecular sciences* 15, 8570-8590.
- Brünger, A.T. 1992. X-PLOR, Version 3.1, A System for X-ray Crystallography and NMR. The Howard Hughes Medical Institute and Department of Molecular Biophysics and Biochemistry.
- Brooks, B.R., Brooks, C.L., 3rd, Mackerell, A.D., Jr., *et al.*, 2009. CHARMM: the biomolecular simulation program. *J Comput Chem* 30, 1545-1614.
- Brunger, A.T., 2007. Version 1.2 of the Crystallography and NMR system. *Nature protocols* 2, 2728-2733.
- Brunger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., *et al.*, 1998. Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 54, 905-921.
- Burley, S.K., Petsko, G.A., 1986. Amino-aromatic interactions in proteins. *FEBS letters* 203, 139-143.
- Cabrera-Vera, T.M., Vanhauwe, J., Thomas, T.O., *et al.*, 2003. Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocrine reviews* 24, 765-781.
- Caffrey, M., 2003. Membrane protein crystallization. *Journal of structural biology* 142, 108-132.

- Cang, X., Du, Y., Mao, Y., *et al.*, 2013. Mapping the functional binding sites of cholesterol in beta2-adrenergic receptor by long-time molecular dynamics simulations. *The journal of physical chemistry. B* 117, 1085-1094.
- Chen, V.B., Arendall, W.B., 3rd, Headd, J.J., *et al.*, 2010. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 66, 12-21.
- Cherezov, V., Abola, E., Stevens, R.C., 2010. Recent progress in the structure determination of GPCRs, a membrane protein family with high potential as pharmaceutical targets. *Methods Mol Biol* 654, 141-168.
- Cherezov, V., Rosenbaum, D.M., Hanson, M.A., *et al.*, 2007. High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* 318, 1258-1265.
- Chothia, C., 1976. The nature of the accessible and buried surfaces in proteins. *Journal of molecular biology* 105, 1-12.
- Cooper, G.M., 2000. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd ed. Sinauer Associates, Sunderland (MA).
- Dalrymple, M.B., Pflieger, K.D., Eidne, K.A., 2008. G protein-coupled receptor dimers: functional consequences, disease states and drug targets. *Pharmacology & therapeutics* 118, 359-371.
- Dann, C.E., Hsieh, J.C., Rattner, A., *et al.*, 2001. Insights into Wnt binding and signalling from the structures of two Frizzled cysteine-rich domains. *Nature* 412, 86-90.
- Davis, I.W., Leaver-Fay, A., Chen, V.B., *et al.*, 2007. MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. *Nucleic acids research* 35, W375-383.
- de Vries, S.J., van Dijk, M., Bonvin, A.M., 2010. The HADDOCK web server for data-driven biomolecular docking. *Nature protocols* 5, 883-897.
- de Vries, S.J., van Dijk, A.D., Krzeminski, M., *et al.*, 2007. HADDOCK versus HADDOCK: new features and performance of HADDOCK2.0 on the CAPRI targets. *Proteins* 69, 726-733.
- Dominguez, C., Boelens, R., Bonvin, A.M., 2003. HADDOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information. *Journal of the American Chemical Society* 125, 1731-1737.
- Dore, A.S., Okrasa, K., Patel, J.C., *et al.*, 2014. Structure of class C GPCR metabotropic glutamate receptor 5 transmembrane domain. *Nature* 511, 557-562.
- Dorsch, S., Klotz, K.N., Engelhardt, S., *et al.*, 2009. Analysis of receptor oligomerization by FRAP microscopy. *Nature methods* 6, 225-230.

- Downes, G.B., Gautam, N., 1999. The G protein subunit gene families. *Genomics* 62, 544-552.
- Eswar, N., Webb, B., Marti-Renom, M.A., *et al.*, 2001. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER, *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, Inc.
- Feller, S.E., Zhang, Y., Pastor, R.W., Brooks, B.R., 1995. Constant pressure molecular dynamics simulation: The Langevin piston method. *The Journal of Chemical Physics* 103, 4613-4621.
- Ferre, S., Casado, V., Devi, L.A., *et al.*, 2014. G protein-coupled receptor oligomerization revisited: functional and pharmacological perspectives. *Pharmacological reviews* 66, 413-434.
- Filizola, M., Weinstein, H., 2005. The study of G-protein coupled receptor oligomerization with computational modeling and bioinformatics. *The FEBS journal* 272, 2926-2938.
- Foloppe, N., MacKerell, J.A.D., 2000. All-atom empirical force field for nucleic acids: I. Parameter optimization based on small molecule and condensed phase macromolecular target data. *J Comput Chem* 21, 86-104.
- Fotiadis, D., Liang, Y., Filipek, S., *et al.*, 2003. Atomic-force microscopy: Rhodopsin dimers in native disc membranes. *Nature* 421, 127-128.
- Franco, R., Casado, V., Cortes, A., *et al.*, 2007. Basic concepts in G-protein-coupled receptor homo- and heterodimerization. *TheScientificWorldJournal* 7, 48-57.
- Fredriksson, R., Lagerstrom, M.C., Lundin, L.G., Schioth, H.B., 2003. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Molecular pharmacology* 63, 1256-1272.
- Fung, J.J., Deupi, X., Pardo, L., *et al.*, 2009. Ligand-regulated oligomerization of beta(2)-adrenoceptors in a model lipid bilayer. *The EMBO journal* 28, 3315-3328.
- Geng, Y., Xiong, D., Mosyak, L., *et al.*, 2012. Structure and functional interaction of the extracellular domain of human GABA(B) receptor GBR2. *Nature neuroscience* 15, 970-978.
- Girvan, M., Newman, M.E., 2002. Community structure in social and biological networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 7821-7826.
- Glykos, N.M., 2006. Software news and updates. Carma: a molecular dynamics analysis program. *J Comput Chem* 27, 1765-1768.
- Granier, S., Manglik, A., Kruse, A.C., *et al.*, 2012. Structure of the delta-opioid receptor bound to naltrindole. *Nature* 485, 400-404.

- Guerois, R., Nielsen, J.E., Serrano, L., 2002. Predicting changes in the stability of proteins and protein complexes: a study of more than 1000 mutations. *Journal of molecular biology* 320, 369-387.
- Guvench, O., MacKerell, A.D., Jr., 2008. Comparison of protein force fields for molecular dynamics simulations. *Methods Mol Biol* 443, 63-88.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Huang, J., MacKerell, A.D., Jr., 2013. CHARMM36 all-atom additive protein force field: validation based on comparison to NMR data. *J Comput Chem* 34, 2135-2145.
- Huang, J., Chen, S., Zhang, J.J., Huang, X.Y., 2013. Crystal structure of oligomeric beta1-adrenergic G protein-coupled receptors in ligand-free basal state. *Nature structural & molecular biology* 20, 419-425.
- Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K., 1996. VMD: visual molecular dynamics. *Journal of molecular graphics* 14, 33-38, 27-38.
- Isberg, V., Vroling, B., van der Kant, R., *et al.*, 2014. GPCRDB: an information system for G protein-coupled receptors. *Nucleic acids research* 42, D422-425.
- Isralewitz, B., Gao, M., Schulten, K., 2001. Steered molecular dynamics and mechanical functions of proteins. *Current opinion in structural biology* 11, 224-230.
- Jastrzebska, B., Ringler, P., Palczewski, K., Engel, A., 2013. The rhodopsin-transducin complex houses two distinct rhodopsin molecules. *Journal of structural biology* 182, 164-172.
- Jastrzebska, B., Ringler, P., Lodowski, D.T., *et al.*, 2011. Rhodopsin-transducin heteropentamer: three-dimensional structure and biochemical characterization. *Journal of structural biology* 176, 387-394.
- Johnston, J.M., Wang, H., Provasi, D., Filizola, M., 2012. Assessing the relative stability of dimer interfaces in g protein-coupled receptors. *PLoS computational biology* 8, e1002649.
- Johnston, J.M., Aburi, M., Provasi, D., *et al.*, 2011. Making structural sense of dimerization interfaces of delta opioid receptor homodimers. *Biochemistry* 50, 1682-1690.
- Jorgensen, W.L., Tirado-Rives, J., 1988. The OPLS [optimized potentials for liquid simulations] potential functions for proteins, energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin. *Journal of the American Chemical Society* 110, 1657-1666.
- Kabsch, W., Sander, C., 1983. Dictionary of protein secondary structure: Pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* 22, 2577-2637.
- Kamal, M., Jockers, R., 2011. Biological Significance of GPCR Heteromerization in the Neuro-Endocrine System. *Frontiers in endocrinology* 2, 2.
- Karplus, M., Petsko, G.A., 1990. Molecular dynamics simulations in biology. *Nature* 347, 631-639.

- Karplus, M., McCammon, J.A., 2002. Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nature structural biology* 9, 646-652.
- Kastritis, P.L., van Dijk, A.D., Bonvin, A.M., 2012. Explicit treatment of water molecules in data-driven protein-protein docking: the solvated HADDOCKing approach. *Methods Mol Biol* 819, 355-374.
- Kaupmann, K., Malitschek, B., Schuler, V., *et al.*, 1998. GABA(B)-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature* 396, 683-687.
- Kniazeff, J., Prezeau, L., Rondard, P., *et al.*, 2011. Dimers and beyond: The functional puzzles of class C GPCRs. *Pharmacology & therapeutics* 130, 9-25.
- Kolakowski, L.F., Jr., 1994. GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors & channels* 2, 1-7.
- Krissinel, E., Henrick, K., 2007. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *Journal of molecular biology* 372, 774-797.
- Kunishima, N., Shimada, Y., Tsuji, Y., *et al.*, 2000. Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature* 407, 971-977.
- Lambert, N.A., 2010. GPCR dimers fall apart. *Science signaling* 3, pe12.
- Laskowski, R.A., Swindells, M.B., 2011. LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. *Journal of chemical information and modeling* 51, 2778-2786.
- Lawson, C.L., Baker, M.L., Best, C., *et al.*, 2011. EMDatabank.org: unified data resource for CryoEM. *Nucleic acids research* 39, D456-464.
- Lee, B., Richards, F.M., 1971. The interpretation of protein structures: estimation of static accessibility. *Journal of molecular biology* 55, 379-400.
- Lee, C.W., Ho, I.K., 2013. Pharmacological Profiles of Oligomerized mu-Opioid Receptors. *Cells* 2, 689-714.
- Levy, E.D., 2010. A simple definition of structural regions in proteins and its use in analyzing interface evolution. *Journal of molecular biology* 403, 660-670.
- Li, J., Edwards, P.C., Burghammer, M., *et al.*, 2004. Structure of bovine rhodopsin in a trigonal crystal form. *Journal of molecular biology* 343, 1409-1438.
- Liang, Y., Fotiadis, D., Filipek, S., *et al.*, 2003. Organization of the G protein-coupled receptors rhodopsin and opsin in native membranes. *The Journal of biological chemistry* 278, 21655-21662.
- Lim, J.B., Rogaski, B., Klauda, J.B., 2012. Update of the cholesterol force field parameters in CHARMM. *The journal of physical chemistry. B* 116, 203-210.
- Lindberg, D.A., 2000. Internet access to the National Library of Medicine. *Effective clinical practice : ECP* 3, 256-260.

- Liu, W., Chun, E., Thompson, A.A., *et al.*, 2012. Structural basis for allosteric regulation of GPCRs by sodium ions. *Science* 337, 232-236.
- Liu, Z., Zhang, J., Zhang, A., 2009. Design of multivalent ligand targeting G-protein-coupled receptors. *Current pharmaceutical design* 15, 682-718.
- Mackerell, A.D., Feig, M., Brooks, C.L., 2004. Extending the treatment of backbone energetics in protein force fields: Limitations of gas-phase quantum mechanics in reproducing protein conformational distributions in molecular dynamics simulations. *J Comput Chem* 25, 1400-1415.
- MackereLL, A.D., Bashford, D., Bellott, M., *et al.*, 1998. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *The journal of physical chemistry. B* 102, 3586-3616.
- Manglik, A., Kruse, A.C., Kobilka, T.S., *et al.*, 2012. Crystal structure of the mu-opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature* 485, 321-326.
- Marrink, S.J., Tieleman, D.P., 2013. Perspective on the Martini model. *Chemical Society reviews* 42, 6801-6822.
- Marrink, S.J., Risselada, H.J., Yefimov, S., *et al.*, 2007. The MARTINI force field: coarse grained model for biomolecular simulations. *The journal of physical chemistry. B* 111, 7812-7824.
- McGaughey, G.B., Gagne, M., Rappe, A.K., 1998. pi-Stacking interactions. Alive and well in proteins. *The Journal of biological chemistry* 273, 15458-15463.
- Miller, S., Janin, J., Lesk, A.M., Chothia, C., 1987. Interior and surface of monomeric proteins. *Journal of molecular biology* 196, 641-656.
- Milligan, G., 2013. The prevalence, maintenance, and relevance of G protein-coupled receptor oligomerization. *Molecular pharmacology* 84, 158-169.
- Monticelli, L., Kandasamy, S.K., Periole, X., *et al.*, 2008. The MARTINI Coarse-Grained Force Field: Extension to Proteins. *Journal of Chemical Theory and Computation* 4, 819-834.
- Moreno, J.L., Holloway, T., Gonzalez-Maeso, J., 2013. G protein-coupled receptor heterocomplexes in neuropsychiatric disorders. *Progress in molecular biology and translational science* 117, 187-205.
- Murakami, M., Kouyama, T., 2008. Crystal structure of squid rhodopsin. *Nature* 453, 363-367.
- Nelson, G., Hoon, M.A., Chandrashekar, J., *et al.*, 2001. Mammalian sweet taste receptors. *Cell* 106, 381-390.
- Nelson, G., Chandrashekar, J., Hoon, M.A., *et al.*, 2002. An amino-acid taste receptor. *Nature* 416, 199-202.

- Nichols, S.E., Hernandez, C.X., Wang, Y., McCammon, J.A., 2013. Structure-based network analysis of an evolved G protein-coupled receptor homodimer interface. *Protein science : a publication of the Protein Society* 22, 745-754.
- Nishimura, A., Kitano, K., Takasaki, J., *et al.*, 2010. Structural basis for the specific inhibition of heterotrimeric Gq protein by a small molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 13666-13671.
- Niswender, C.M., Conn, P.J., 2010. Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annual review of pharmacology and toxicology* 50, 295-322.
- Oldham, W.M., Hamm, H.E., 2008. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nature reviews. Molecular cell biology* 9, 60-71.
- Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., *et al.*, 2000. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 289, 739-745.
- Park, J.H., Scheerer, P., Hofmann, K.P., *et al.*, 2008. Crystal structure of the ligand-free G-protein-coupled receptor opsin. *Nature* 454, 183-187.
- Park, S.H., Das, B.B., Casagrande, F., *et al.*, 2012. Structure of the chemokine receptor CXCR1 in phospholipid bilayers. *Nature* 491, 779-783.
- Pasternak, G.W., Pan, Y.X., 2011. Mix and match: heterodimers and opioid tolerance. *Neuron* 69, 6-8.
- Pastor, R.W., Mackerell, A.D., Jr., 2011. Development of the CHARMM Force Field for Lipids. *The journal of physical chemistry letters* 2, 1526-1532.
- Periole, X., Marrink, S.J., 2013. The Martini coarse-grained force field. *Methods Mol Biol* 924, 533-565.
- Periole, X., Huber, T., Marrink, S.J., Sakmar, T.P., 2007. G protein-coupled receptors self-assemble in dynamics simulations of model bilayers. *Journal of the American Chemical Society* 129, 10126-10132.
- Periole, X., Knepp, A.M., Sakmar, T.P., *et al.*, 2012. Structural determinants of the supramolecular organization of G protein-coupled receptors in bilayers. *Journal of the American Chemical Society* 134, 10959-10965.
- Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., *et al.*, 2004. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25, 1605-1612.
- Phillips, J.C., Braun, R., Wang, W., *et al.*, 2005. Scalable molecular dynamics with NAMD. *J Comput Chem* 26, 1781-1802.
- Pin, J.P., Galvez, T., Prezeau, L., 2003. Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors. *Pharmacology & therapeutics* 98, 325-354.

- Prasanna, X., Chattopadhyay, A., Sengupta, D., 2014. Cholesterol modulates the dimer interface of the beta(2)-adrenergic receptor via cholesterol occupancy sites. *Biophysical journal* 106, 1290-1300.
- Provasi, D., Boz, M.B., Johnston, J.M., Filizola, M., 2015. Preferred supramolecular organization and dimer interfaces of opioid receptors from simulated self-association. *PLoS computational biology* 11, e1004148.
- Rasmussen, S.G., DeVree, B.T., Zou, Y., *et al.*, 2011. Crystal structure of the beta2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* 477, 549-555.
- Roberts, E., Eargle, J., Wright, D., Luthey-Schulten, Z., 2006. MultiSeq: unifying sequence and structure data for evolutionary analysis. *BMC bioinformatics* 7, 382.
- Rodriguez, D., Gutierrez-de-Teran, H., 2012. Characterization of the homodimerization interface and functional hotspots of the CXCR4 chemokine receptor. *Proteins* 80, 1919-1928.
- Rosenbaum, D.M., Rasmussen, S.G., Kobilka, B.K., 2009. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* 459, 356-363.
- Ruprecht, J.J., Mielke, T., Vogel, R., *et al.*, 2004. Electron crystallography reveals the structure of metarhodopsin I. *The EMBO journal* 23, 3609-3620.
- Salom, D., Lodowski, D.T., Stenkamp, R.E., *et al.*, 2006. Crystal structure of a photoactivated deprotonated intermediate of rhodopsin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 16123-16128.
- Schioth, H.B., Fredriksson, R., 2005. The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective. *General and comparative endocrinology* 142, 94-101.
- Schlitter, J., Engels, M., Kruger, P., 1994. Targeted molecular dynamics: a new approach for searching pathways of conformational transitions. *Journal of molecular graphics* 12, 84-89.
- Schrodinger, LLC. 2010. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.7.
- Schymkowitz, J., Borg, J., Stricher, F., *et al.*, 2005. The FoldX web server: an online force field. *Nucleic acids research* 33, W382-388.
- Sethi, A., Eargle, J., Black, A.A., Luthey-Schulten, Z., 2009. Dynamical networks in tRNA:protein complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 6620-6625.
- Shih, A.Y., Freddolino, P.L., Arkhipov, A., Schulten, K., 2007a. Assembly of lipoprotein particles revealed by coarse-grained molecular dynamics simulations. *Journal of structural biology* 157, 579-592.
- Shih, A.Y., Freddolino, P.L., Sligar, S.G., Schulten, K., 2007b. Disassembly of nanodiscs with cholate. *Nano letters* 7, 1692-1696.

- Shonberg, J., Kling, R.C., Gmeiner, P., Lober, S., 2014. GPCR crystal structures: Medicinal chemistry in the pocket. *Bioorganic & medicinal chemistry*.
- Siu, F.Y., He, M., de Graaf, C., *et al.*, 2013. Structure of the human glucagon class B G-protein-coupled receptor. *Nature* 499, 444-449.
- Taddese, B., Simpson, L.M., Wall, I.D., *et al.*, 2012. G-protein-coupled receptor dynamics: dimerization and activation models compared with experiment. *Biochemical Society transactions* 40, 394-399.
- Thompson, A.A., Liu, W., Chun, E., *et al.*, 2012. Structure of the nociceptin/orphanin FQ receptor in complex with a peptide mimetic. *Nature* 485, 395-399.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G., 2002. Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Current protocols in bioinformatics / editorial board, Andreas D. Baxevanis ... [et al.] Chapter 2, Unit 2 3*.
- Trabuco, L.G., Villa, E., Mitra, K., *et al.*, 2008. Flexible fitting of atomic structures into electron microscopy maps using molecular dynamics. *Structure* 16, 673-683.
- Van Eps, N., Preininger, A.M., Alexander, N., *et al.*, 2011. Interaction of a G protein with an activated receptor opens the interdomain interface in the alpha subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 9420-9424.
- Wall, M.A., Coleman, D.E., Lee, E., *et al.*, 1995. The structure of the G protein heterotrimer Gi alpha 1 beta 1 gamma 2. *Cell* 83, 1047-1058.
- Wang, C., Wu, H., Katritch, V., *et al.*, 2013. Structure of the human smoothened receptor bound to an antitumour agent. *Nature* 497, 338-343.
- Warne, T., Serrano-Vega, M.J., Baker, J.G., *et al.*, 2008. Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* 454, 486-491.
- Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M., *et al.*, 2009. Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25, 1189-1191.
- Wells, D.B., Abramkina, V., Aksimentiev, A., 2007. Exploring transmembrane transport through alpha-hemolysin with grid-steered molecular dynamics. *J Chem Phys* 127, 125101.
- Woehler, A., Ponimaskin, E.G., 2009. G protein--mediated signaling: same receptor, multiple effectors. *Current molecular pharmacology* 2, 237-248.
- Wu, B., Chien, E.Y., Mol, C.D., *et al.*, 2010. Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science* 330, 1066-1071.
- Wu, H., Wang, C., Gregory, K.J., *et al.*, 2014. Structure of a class C GPCR metabotropic glutamate receptor 1 bound to an allosteric modulator. *Science* 344, 58-64.

Wu, H., Wacker, D., Mileni, M., *et al.*, 2012. Structure of the human kappa-opioid receptor in complex with JDTic. *Nature* 485, 327-332.

Xu, F., Wu, H., Katritch, V., *et al.*, 2011. Structure of an agonist-bound human A2A adenosine receptor. *Science* 332, 322-327.

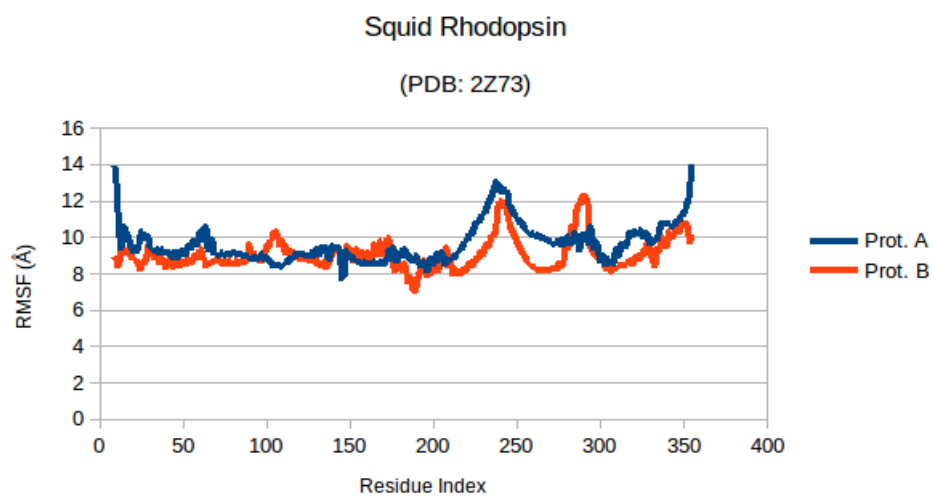
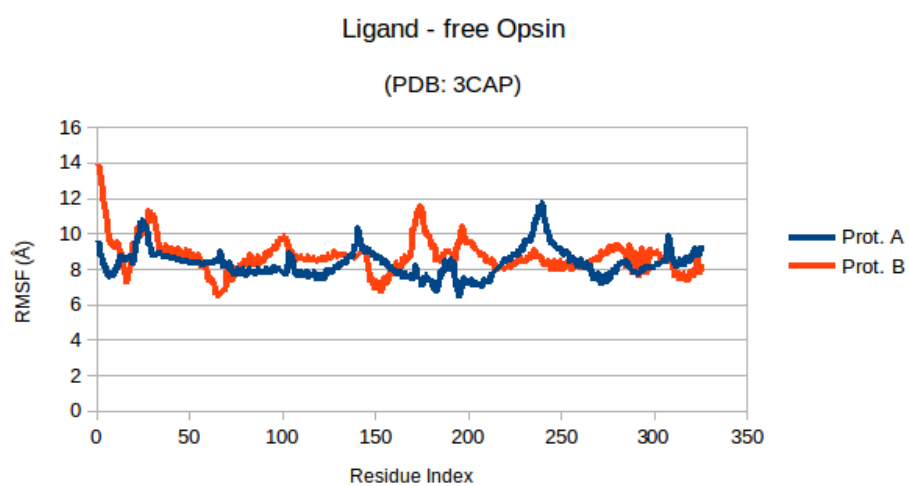
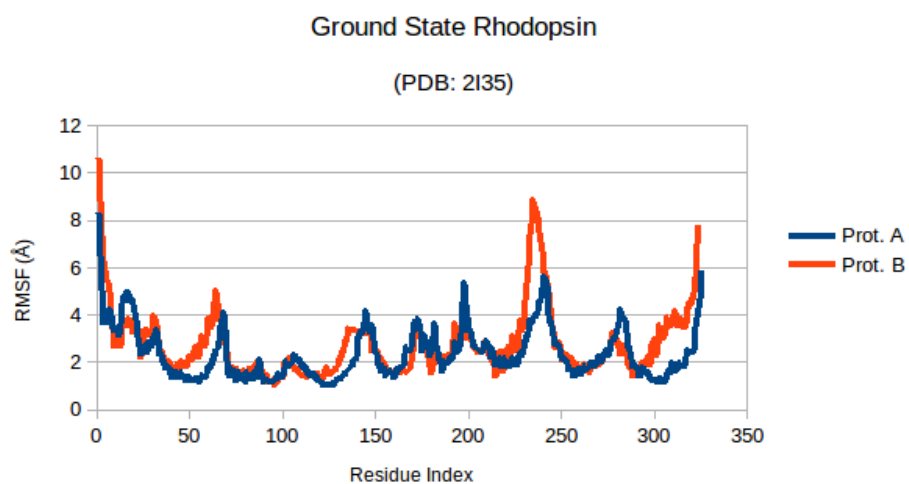
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

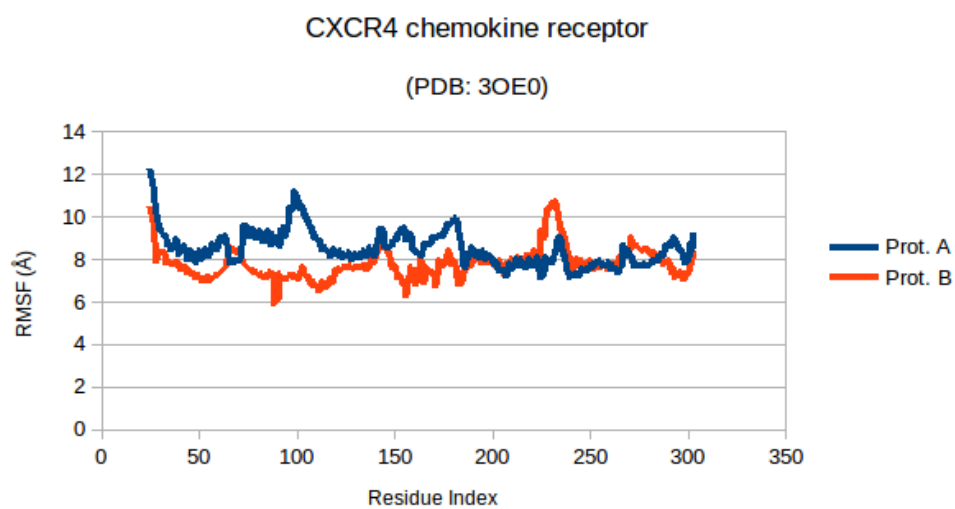
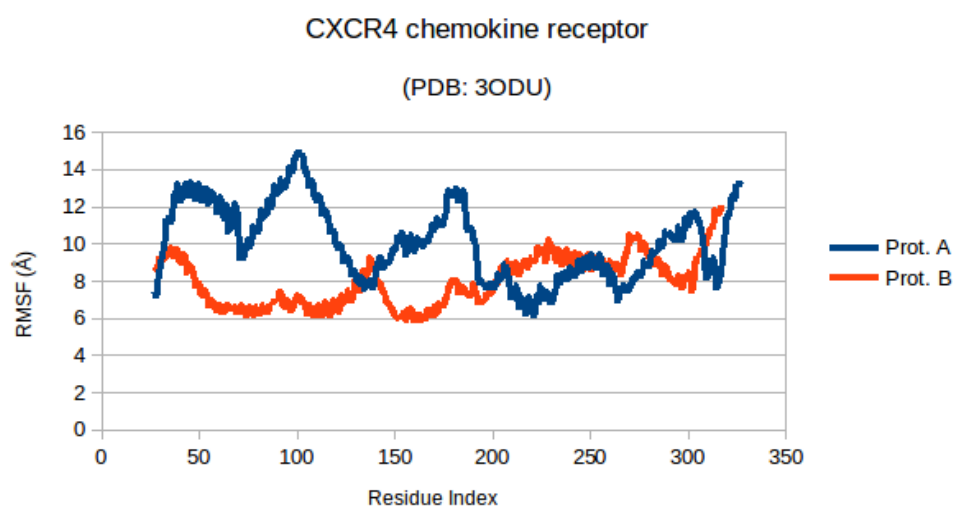
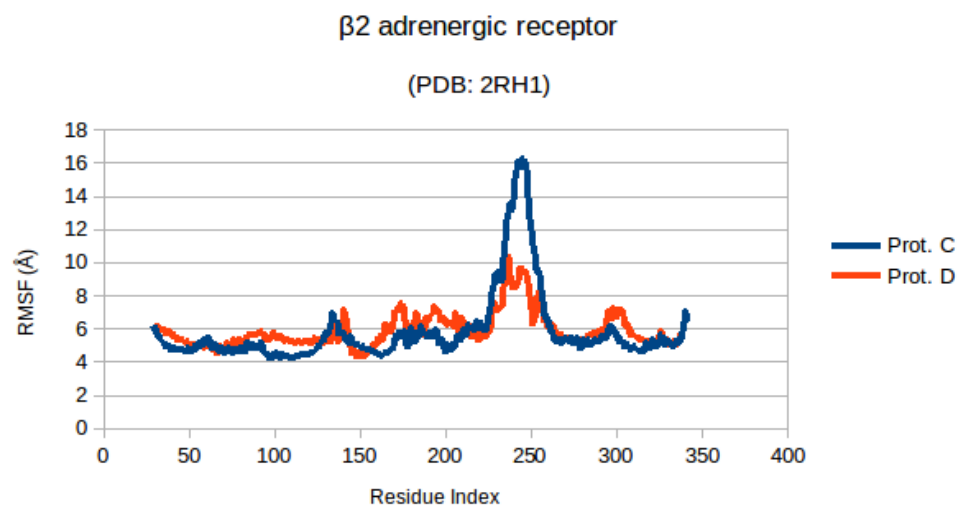
Παράρτημα Ι: Συμπληρωματικά Αποτελέσματα

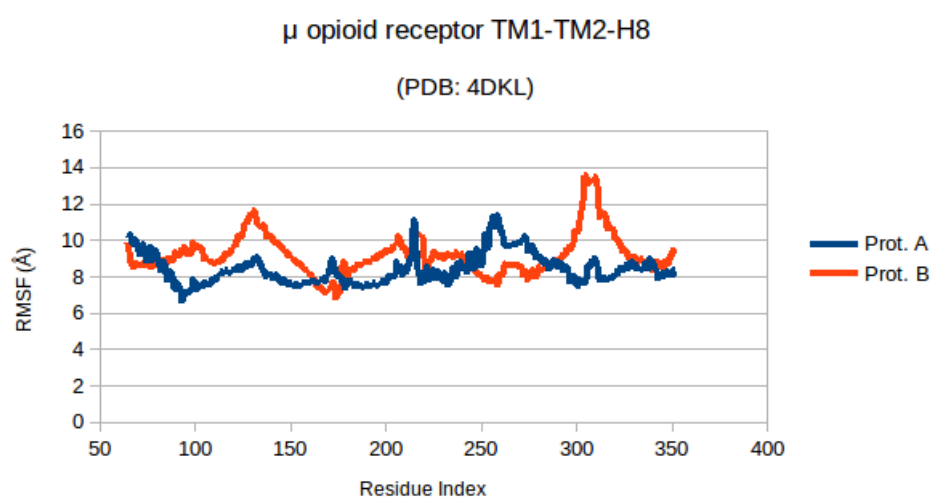
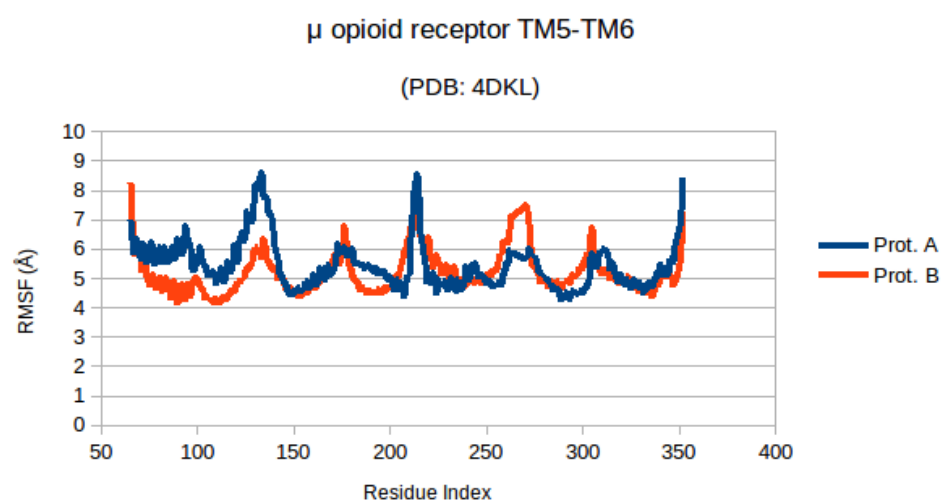
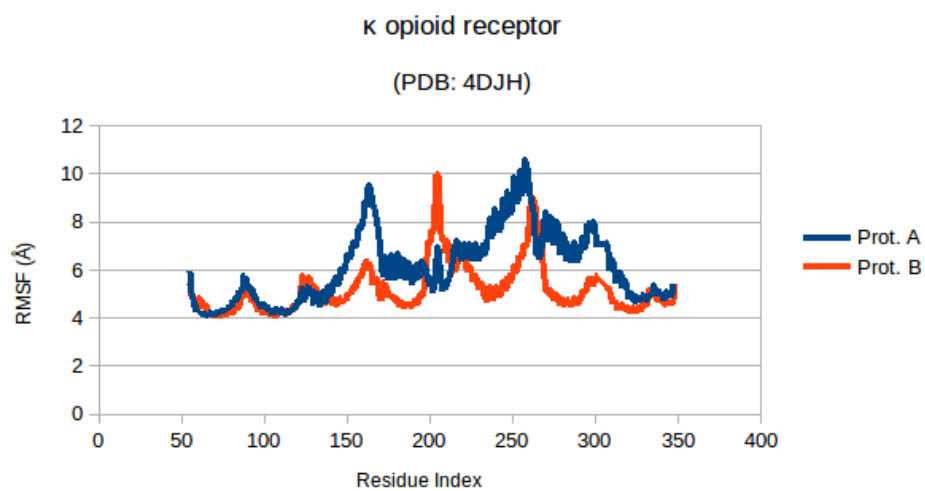
Στις επόμενες σελίδες παρουσιάζονται διαγράμματα των αποτελεσμάτων των μετρήσεων RMSF και των δοκιμασιών Υπολογιστικής Μεταλλαξιγένεσης Αλανίνης. Σε κάθε διάγραμμα RMSF απεικονίζονται οι αποκλίσεις και για τα δύο πρωτομερή, μετρημένες με βάση την κινητικότητα των κεντρικών σωματιδίων BAS του MARTINI, τα οποία αντιστοιχούν στην κεντρική ανθρακική αλυσίδα. Ο οριζόντιος άξονας περιέχει τον αύξοντα αριθμό των καταλοίπων στη δομή ενώ ο κατακόρυφος τη μεταβολή του RMSF σε Å.

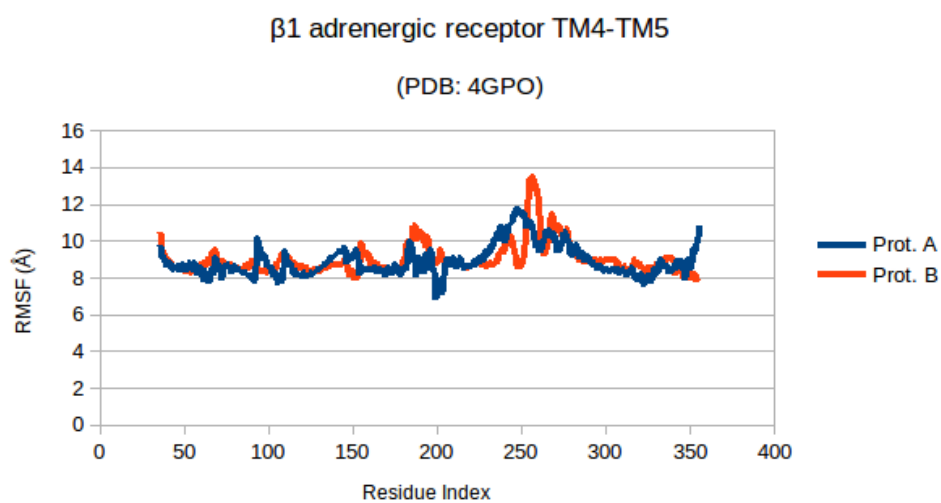
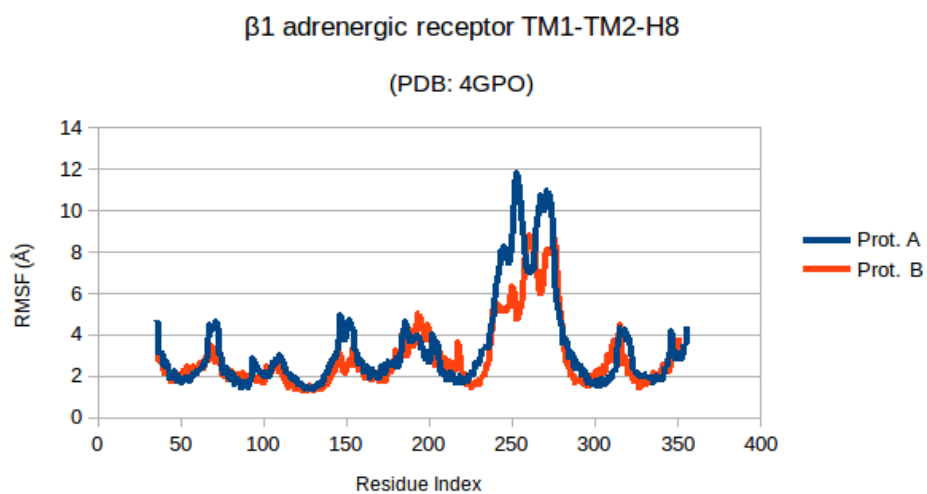
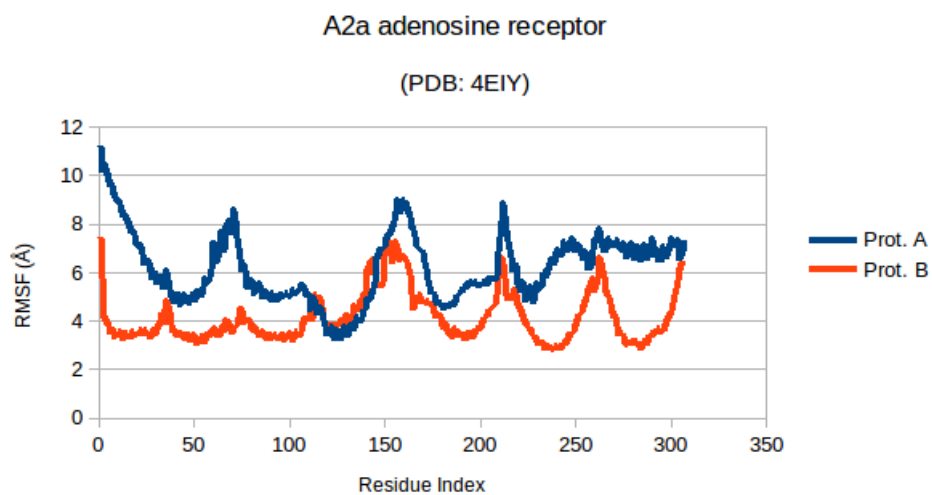
Στα διαγράμματα της μεταλλαξιγένεσης αλανίνης απεικονίζεται η μεταβολή στην ενέργεια για κάθε αντικατάσταση, σε μορφή ιστογραμμάτων. Ο οριζόντιος άξονας περιλαμβάνει τα αλληλεπιδρώντα κατάλοιπα, ενώ ο κατακόρυφος άξονας την αλλαγή στην ενέργεια αλληλεπίδρασης σαν αποτέλεσμα της μεταλλαγής ($\Delta\Delta G$). Αλληλεπιδρώντα κατάλοιπα με τιμές $\Delta\Delta G > 1.50$ kcal/mol αναγνωρίζονται ως πιθανά «Σημεία Ενδιαφέροντος» (Hot Spots) στην επιφάνεια αλληλεπίδρασης. Για κάθε διμερές απεικονίζονται αποτελέσματα από τις μετρήσεις για το πρώτο πρωτομερές (Αλυσίδα Α), με το δεύτερο πρωτομερές να παρουσιάζει παρόμοια συμπεριφορά.

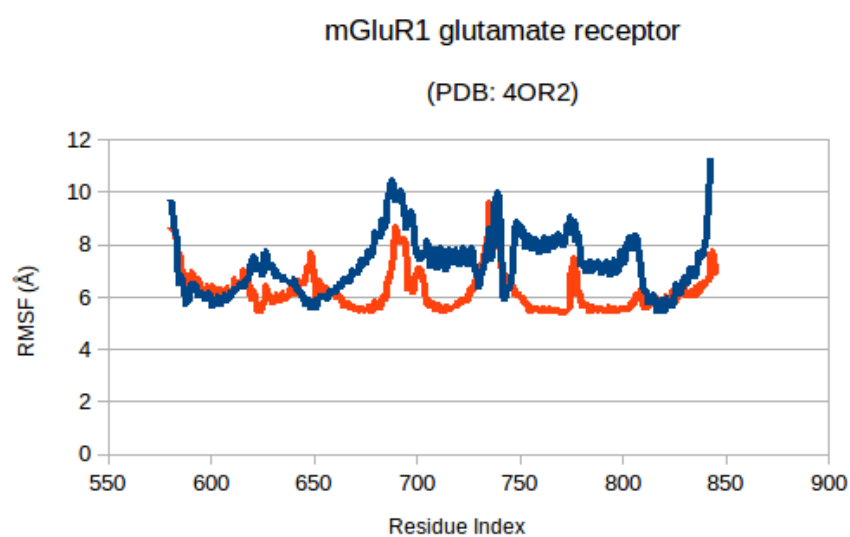
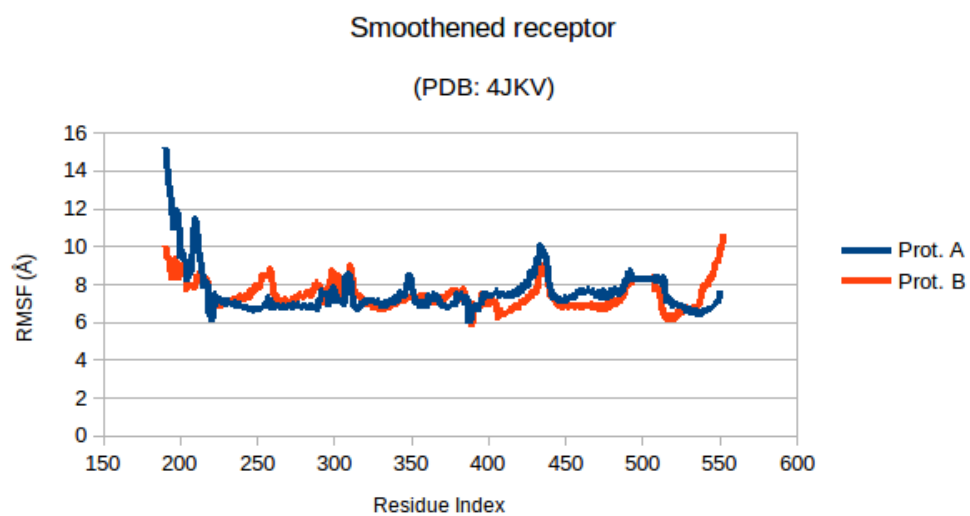
I.1 Root Mean Square Fluctuation (RMSF)



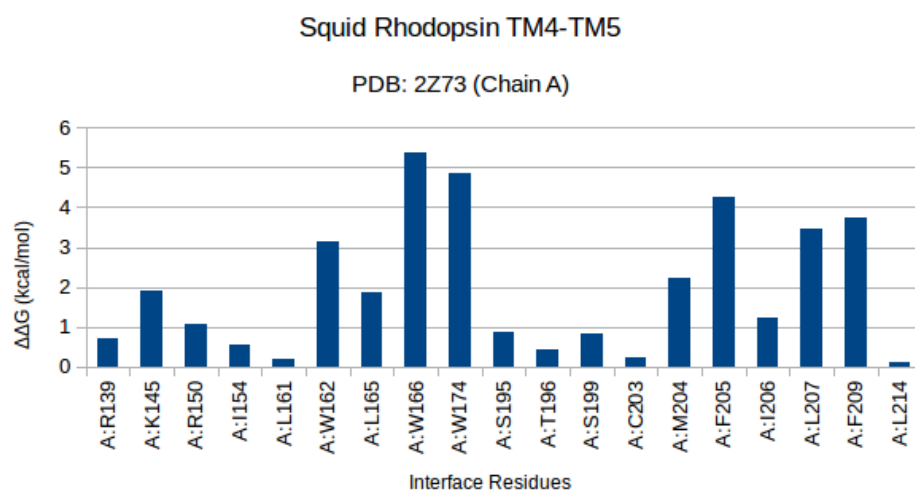
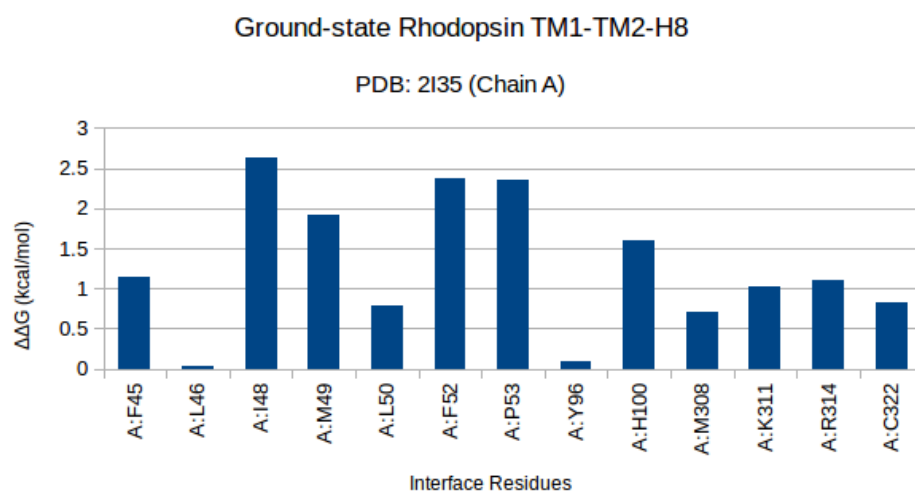


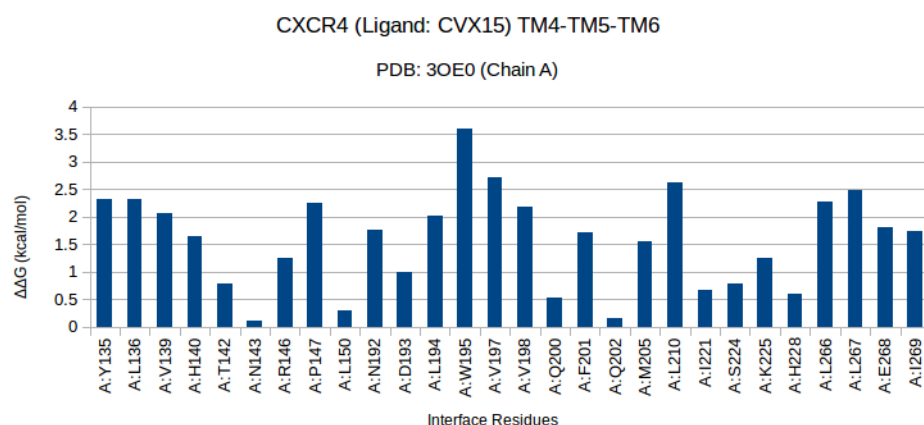
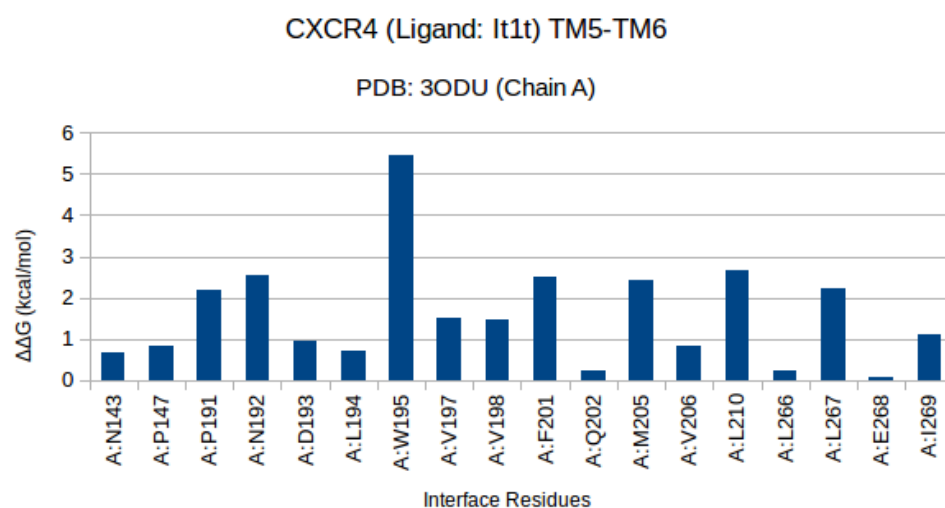
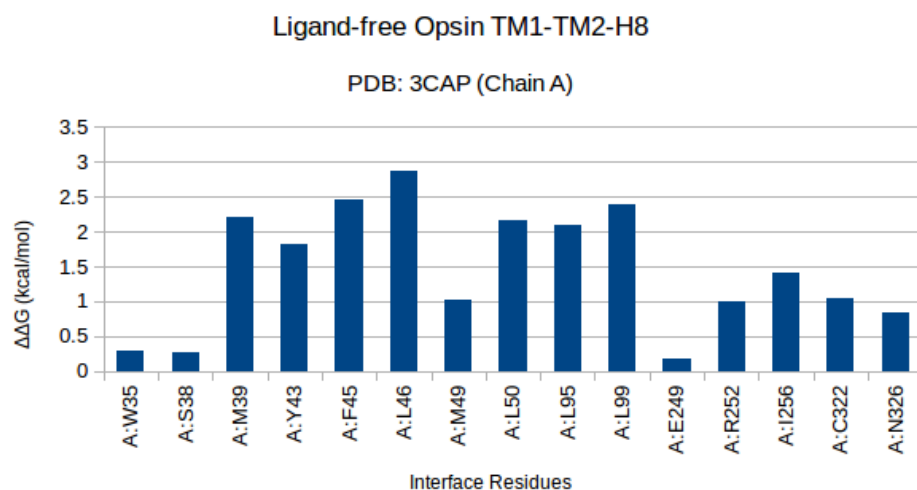


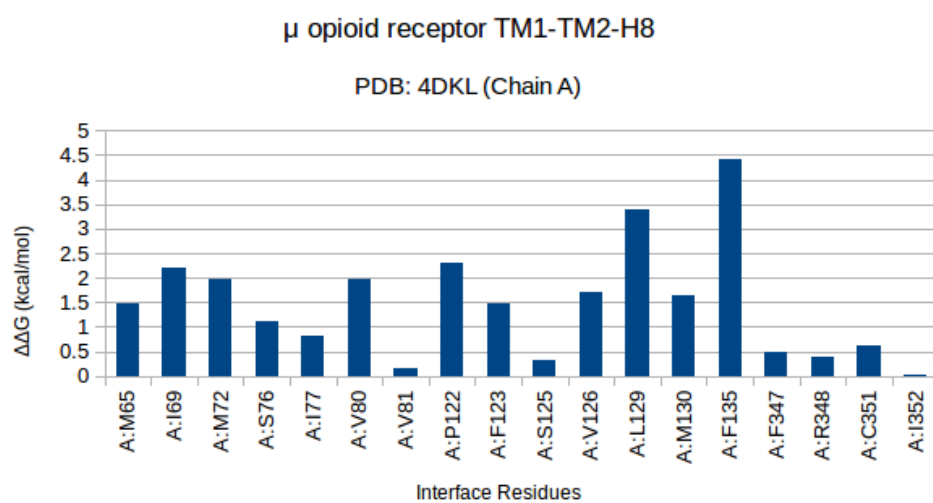
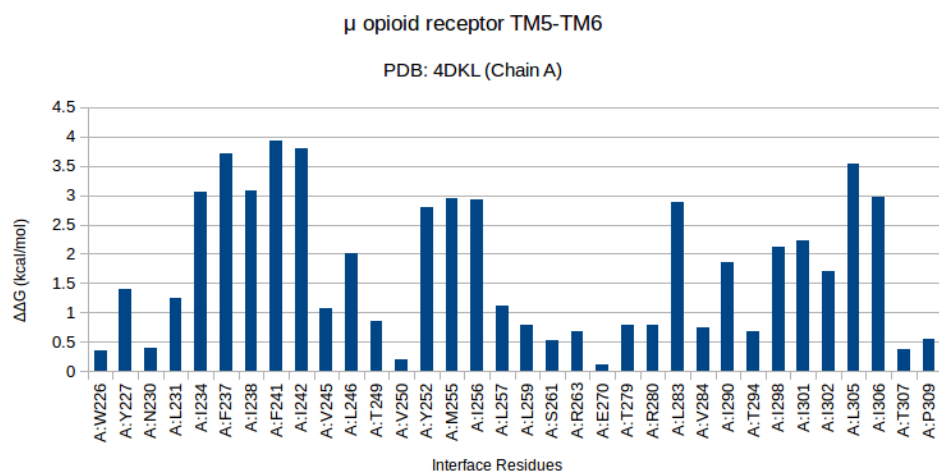
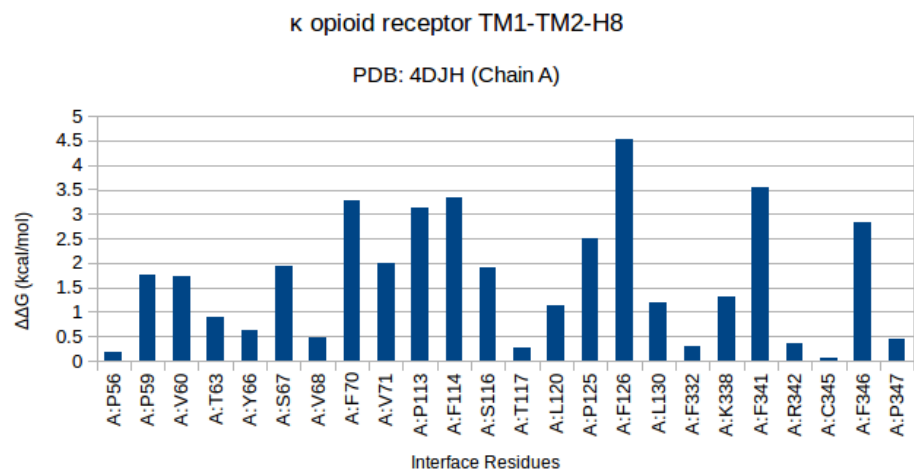


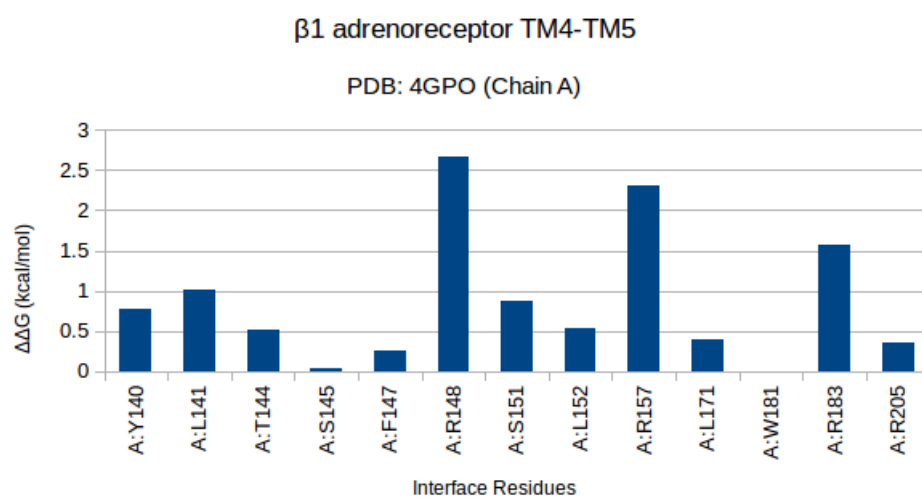
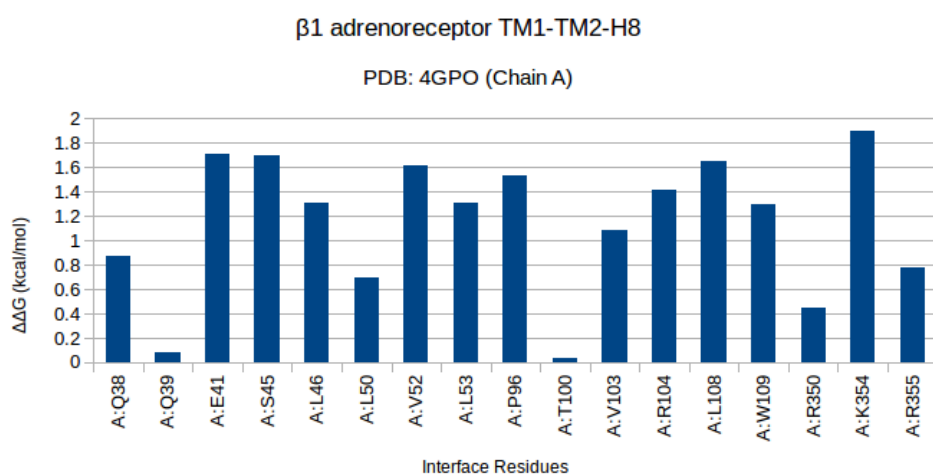
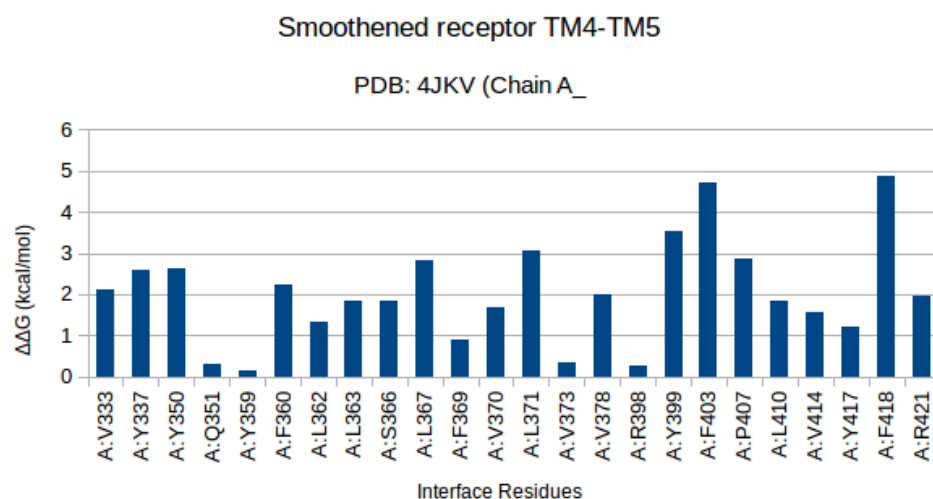


1.2 Υπολογιστική Μεταλαξιγένεση Αλανίνης



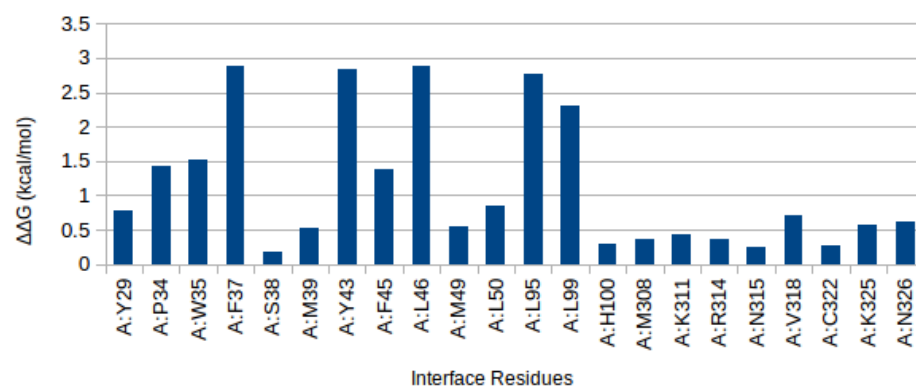






Metahrodopsin I EM Dimer Model

(EMD: 1079)



Παράρτημα II: Προγράμματα

“build_TM_system.tcl” Πρόγραμμα ενσωμάτωσης διαμεμβρανικών πρωτεϊνών σε λιπιδική διπλοστιβάδα (Tcl)

Το πρόγραμμα που ακολουθεί λειτουργεί στο προγραμματιστικό περιβάλλον του VMD και υλοποιεί την εντολή “build_TM_system”, η οποία ενσωματώνει μια κατάλληλα προσανατολισμένη δομή διαμεμβρανικών πρωτεϊνών σε μια λιπιδική διπλοστιβάδα. Το πρόγραμμα αρχικά κατασκευάζει μια μεμβράνη, αποτελούμενη από λιπίδιο επιλογής του χρήστη (οι διαθέσιμες επιλογές είναι τα λιπίδια POPC και POPE) με διαστάσεις που ορίζονται από το χρήστη, χρησιμοποιώντας τις παραμέτρους του CHARMM27. Στη συνέχεια το γεωμετρικό κέντρο και ο κύριος άξονας z του διαμεμβρανικού τμήματος των πρωτεϊνών και της μεμβράνης ευθυγραμμίζονται για την ενσωμάτωση των πρωτεϊνών στη διπλοστιβάδα. Τέλος, αφαιρούνται τα μόρια λιπιδίων που αλληλοεπικαλύπτονται με τις πρωτεΐνες, καθώς και όσα μόρια βρίσκονται σε μη επιτρεπτές αποστάσεις από τα άτομα των πρωτεϊνών.

Για να χρησιμοποιηθεί το πρόγραμμα πρέπει αρχικά να εισαχθεί στο περιβάλλον του VMD, μέσω της γραμμής εντολών, χρησιμοποιώντας την εντολή

```
source <path_to_script>/build_TM_system.tcl
```

Ακολουθως, ο χρήστης μπορεί να χρησιμοποιήσει την εντολή build_TM_system. Για το πρόγραμμα απαιτείται η ύπαρξη κατάλληλα προετοιμασμένης δομής για τις πρωτεΐνες, με αρχεία PSF και PDB τα οποία διαθέτουν το ίδιο πρόθεμα. Η εντολή συντάσσεται ως εξής:

```
build_TM_system protein_prefix, mem_X, mem_Y, lipid, combined
```

Όπου “protName ” είναι το πρόθεμα της δομής της πρωτεΐνης, “lipid ” ο τύπος του λιπιδίου, “mem_X” και “mem_Y” οι διαστάσεις της μεμβράνης και “combined” το όνομα του τελικού αρχείου. Έτσι, π.χ. για τη δομή 3CAP (3CAP.psf, 3CAP.pdb) η εντολή

```
build_TM_system 3CAP 120 120 POPC 3CAP_POPC
```

θα δώσει ένα σύστημα (3CAP_POPC.psf, 3CAP_POPC.pdb) στο οποίο η πρωτεΐνη έχει ενσωματωθεί σε μια μεμβράνη λιπιδίων POPC με διαστάσεις 120x120 Å.

```

proc build_memProt {protName mem_x mem_y lipid combined} {
package require membrane
membrane -l $lipid -x $mem_x -y $mem_y -o mem_$lipid-$mem_x-$mem_y-c27
mol delete all
set lipidName mem_$lipid-$mem_x-$mem_y-c27
set memb [mol new $lipidName.psf]
mol addfile ./lipidName.pdb
set popc [atomselect $memb all]
set prot [mol new $protName.psf]
mol addfile $protName.pdb
set dimer [atomselect $prot all]
$popc moveby [vecinvert [measure center $popc weight mass]]
$popc writepdb $lipidName-temp.pdb
$dimer moveby [vecinvert [measure center $dimer weight mass]]
display resetview
$dimer move [transaxis z -25]
$dimer writepdb $protName-temp.pdb
mol delete all
package require psfgen
resetpsf
readpsf $lipidName.psf
coordpdb $lipidName-temp.pdb
readpsf $protName.psf
coordpdb $protName-temp.pdb
writepsf $combined-raw.psf
writepdb $combined-raw.pdb
mol delete all
set prot_popc [mol new $combined-raw.psf]
mol addfile $combined-raw.pdb

set POPC "resname POPC"
set all [atomselect $prot_popc all]
$all set beta 0
set seltext1 "$POPC and same residue as (name P1 and z>0 and abs(x)<15 and abs(y)<15)"
set seltext2 "$POPC and same residue as (name P1 and z<0 and abs(x)<10 and abs(y)<10)"
set seltext3 "$POPC and same residue as (within 0.6 of protein)"
set sel1 [atomselect top $seltext1]
set sel2 [atomselect top $seltext2]
set sel3 [atomselect top $seltext3]
$sel1 set beta 1
$sel2 set beta 1
$sel3 set beta 1

```

```

set badlipid [atomselect top "name P1 and beta > 0"]
set seglistlipid [$badlipid get segid]
set reslistlipid [$badlipid get resid]
set seltext4 "(water and not segname WCA WCB WCC WCD WF SOLV) and same residue as within 3
of ((same residue as (name P1 and beta>0)) or protein)"
set seltext5 "segname SOLV and same residue as within 3 of lipids"
set water [atomselect top $seltext4]
set water2 [atomselect top $seltext5]
$water set beta 1
$water2 set beta 1
set bwater [atomselect top "name OH2 and beta > 0"]
set seglistwater [$bwater get segid]
set reslistwater [$bwater get resid]
mol delete all
resetpsf
readpsf $combined-raw.psf
coordpdb $combined-raw.pdb
foreach segid $seglistlipid resid $reslistlipid {
delatom $segid $resid }
foreach segid $seglistwater resid $reslistwater {
delatom $segid $resid }
writepsf $combined.psf
writepdb $combined.pdb
file delete $combined-raw.psf
file delete $combined-raw.pdb
file delete $lipidName-temp.pdb
file delete $protName-temp.pdb
set comb [mol new $combined.psf]
mol addfile $combined.pdb
}

```

“customNetworkScripts.tcl”: Πρόγραμμα ανάλυσης Δυναμικών Δικτύων Αλληλεπιδράσεων (Tcl)

Στο πρόγραμμα που ακολουθεί υλοποιούνται, μέσω της γλώσσας Tcl, μια σειρά από εντολές για την ανάλυση δυναμικών δικτύων αλληλεπιδράσεων μέσω του VMD. Απαραίτητη προϋπόθεση είναι η ύπαρξη δεδομένων δικτύου (αρχείο “contact.dat”) και δεδομένων οργάνωσης κοινοτήτων (“communities.out”), τα οποία πρέπει να έχουν φορτωθεί στο VMD μέσω της επέκτασης NetworkView και να έχουν συσχετιστεί με την ανάλογη πρωτεϊνική δομή. Το πρόγραμμα περιλαμβάνει τις εξής εντολές:

- `getInterfacePairs`: δέχεται σαν όρισμα τα IDs δύο αλυσίδων. Επιστρέφει σαν αποτέλεσμα τα αλληλεπιδρώντα κατάλοιπα ανάμεσα στις δυο αλυσίδες, μαζί με την τιμή βάρους που έχει η αντίστοιχη ακμή τους στο δίκτυο και την τιμή της συνδιακύμανσης, όπως αυτή υπολογίστηκε από το Carma κατά τη δημιουργία του δικτύου. Για δυο αλυσίδες σε μια δομή (π.χ. A και B) η εντολή συντάσσεται ως `getInterfacePairs A B`
- `getCriticalPairs`: λειτουργεί χωρίς όρισμα και επιστρέφει όλες τις ακμές και τους κόμβους που χαρακτηρίζονται ως κρίσιμες συνδέσεις ανάμεσα σε κοινότητες, καθώς και τα κατάλοιπα στα οποία αντιστοιχούν
- `getCommunityPairs`: δέχεται σαν όρισμα τον αριθμό μιας κοινότητας του δικτύου (οι κοινότητες αριθμούνται ξεκινώντας από το 0). Επιστρέφει όλα τα κατάλοιπα που συμμετέχουν σε μια κοινότητα, καθώς και τις μεταξύ τους συνδέσεις.

```

proc getInterfacePairs {chainA chainB}
{
    set cAnodes [::NetworkView::getNodesFromSelection "chain $chainA"]
    set cBnodes [::NetworkView::getNodesFromSelection "chain $chainB"]
    set interfaceEdges [::NetworkView::getInterfaceEdges $cAnodes $cBnodes]
    set interfaceWeights [::NetworkView::getEdgeInfo weight $interfaceEdges]
    set meanWeight [vecmean $interfaceWeights]
    puts "Res.1\tRes.2\tWeight\tCorrelation"
    foreach weight [lsort $interfaceWeights] {
        foreach edge $interfaceEdges {
            set tempWeight [::NetworkView::getEdgeInfo weight $edge]
            if {$tempWeight == $weight} {
                set id [split $edge ","]
                set nodeA [::NetworkView::getAtomIndices [lindex $id 0]]
                set nodeB [::NetworkView::getAtomIndices [lindex $id 1]]
                set resA [atomselect top "residue $nodeA"]
                set resB [atomselect top "residue $nodeB"]
                set corr [expr pow(exp(1),-$weight)]
                puts "[$resA get resname][$resA get resid]([$resA get
chain])\t[$resB get resname][$resB get resid]([$resB get chain])\t$weight\t$corr"
            }
        }
    }
    puts "\n\nInterface Mean Weight: $meanWeight" }

proc getCriticalPairs {} {
    set criticalEdges [::NetworkView::getCriticalEdges]
    puts "Res.1\tWeight\tRes.2"
    foreach edge $criticalEdges {
        set id [split $edge ","]
        set nodeA [::NetworkView::getAtomIndices [lindex $id 0]]
        set nodeB [::NetworkView::getAtomIndices [lindex $id 1]]
        set weight [::NetworkView::getEdgeInfo weight $edge]
        set resA [atomselect top "residue $nodeA"]
        set resB [atomselect top "residue $nodeB"]
        puts "[$resA get chain]:[$resA get resname][$resA get resid]\t$weight\t[$resB get
chain]:[$resB get resname][$resB get resid]"
    }
}

```

```

proc getCommunityPairs {communityID} {
    set nodes [::NetworkView::getCommunityNodes $communityID]
    foreach node $nodes {
        set edges [::NetworkView::getEdgesByNodeId $node]
        for {set i 1} {$i < [llength $edges]} {incr i 2} {
            set ids [lindex $edges $i]
            set id [split $ids "," ]
            set nodeA [lindex $id 0]
            set nodeB [lindex $id 1]
            set weight [::NetworkView::getEdgeInfo weight $ids]
            set resA [atomselect top "residue $nodeA"]
            set resB [atomselect top "residue $nodeB"]
            puts "[$resA get chain]:[$resA get resname][$resA get resid]\t$weight\t[$resB
get chain]:[$resB get resname][$resB get resid]"
        } } }

```

“dssp_contacts.py”: Πρόγραμμα ανάλυσης και ταξινόμησης αλληλεπιδρώντων καταλοίπων (Python)

Το πρόγραμμα που ακολουθεί έχει γραφτεί στη γλώσσα Python. Δέχεται σαν είσοδο ένα αρχείο PDB, καθώς και τα IDs δυο πρωτεϊνικών αλυσίδων και επιστρέφει σαν έξοδο πληροφορίες για τις αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών – πρωτεϊνών ανάμεσα σε αυτές τις αλυσίδες. Απαραίτητη για τη χρήση του προγράμματος είναι η ύπαρξη του DSSP («dssp.exe») στον ίδιο κατάλογο με το πρόγραμμα, το οποίο χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της προσβάσιμης στο διαλύτη επιφάνειας (ASA) για κάθε αμινοξικό κατάλοιπο. Η ASA χρησιμοποιείται, στη συνέχεια, για τον προσδιορισμό της τιμής RSA, η οποία ορίζεται ως η τιμή της ASA ενός καταλοίπου, διαιρούμενη με τη μέγιστη τιμή ASA που μπορεί να έχει το συγκεκριμένο κατάλοιπο. Το πρόγραμμα επιστρέφει σαν έξοδο την εξής πληροφορία:

- Το σύνολο των αλληλεπιδρώντων καταλοίπων για κάθε αλυσίδα. Τα αμινοξικά κατάλοιπα απεικονίζονται με συμβολισμούς μαζί με την αλληλουχία κάθε αλυσίδας σε διάταξη FASTA-like, καθώς και σαν λίστα με τον κωδικό του ενός γράμματος και τη θέση τους στην αμινοξική ακολουθία. Ως αλληλεπιδρώντα κατάλοιπα ορίζονται αυτά με $\Delta RSA > 0$.
- Ταξινόμηση των αλληλεπιδρώντων καταλοίπων ως προς τη θαμμένη επιφάνεια. Τα κατάλοιπα ταξινομούνται με βάση το σύστημα Levy, το οποίο διαχωρίζει τα στοιχεία της επιφάνειας αλληλεπίδρασης σε κατάλοιπα του πυρήνα (core), υποστηρικτικά κατάλοιπα (support) και κατάλοιπα της περιφέρειας (rim).
- Ταξινόμηση των αλληλεπιδρώντων καταλοίπων ως προς τις φυσικοχημικές ιδιότητές τους.

```

from __future__ import division;

from sys import argv;

import re;

import os;

import subprocess;

#dssp_exe="dssp-2.0.4-win32.exe";

dssp_exe="dssp";

#the dictionary with MSA values (see Chothia, 1976)

MSA = {

    'F':210,'I':175,'L':170,'V':155,'P':145,'A':115,'G':75,'M':185,'C':135,'W':255,'Y':230,'T':140,'S':115,'Q':180,'
    N':160,'E':190,'D':150,'H':195,'K':200,'R':225};

script, pdb, cA, cB = argv;

cB=cB.rstrip("\n");

title=pdb;

pdb=open(pdb, "r");

compPDB=open('complex.pdb', 'w');

temp1PDB=open('temp1.pdb', 'w');

temp2PDB=open('temp2.pdb', 'w');

for line in pdb:

    if line[0:4]=="ATOM" and line[21]==cA:

        compPDB.write(line);

        temp1PDB.write(line);

    elif line[0:4]=="ATOM" and line[21]==cB:

        compPDB.write(line);

        temp2PDB.write(line);

    else:

        continue;

pdb.close();

compPDB.close();

temp1PDB.close();

temp2PDB.close();

subprocess.call([dssp_exe, "-i", 'complex.pdb', "-o", 'complex.dssp']);

subprocess.call([dssp_exe, "-i", 'temp1.pdb', "-o", 'temp1.dssp']);

subprocess.call([dssp_exe, "-i", 'temp2.pdb', "-o", 'temp2.dssp']);

```



```

temp2ASA=float(pattern_asa.match(line).group(1));

elif pattern_line.match(line):

    if line[11]==cB:

        chainB_unbound.append([line[11], line[13].upper(),
int(pattern_line.match(line).group(1)), int(pattern_line.match(line).group(2)),
(float(int(pattern_line.match(line).group(2))/int(MSA[line[13].upper())))*100)];

    temp2.close();

    os.remove('complex.pdb');

    os.remove('complex.dssp');

    os.remove('temp1.pdb');

    os.remove('temp1.dssp');

    os.remove('temp2.pdb');

    os.remove('temp2.dssp');

    for i in range(len(chainA_complex)):

        diff=abs(chainA_complex[i][4] - chainA_unbound[i][4]);

        chainA_fasta+=chainA_complex[i][1];

        if diff>0.0:

            chainA_interface.append([chainA_complex[i][0], chainA_complex[i][1],
chainA_complex[i][2], chainA_complex[i][4], chainA_unbound[i][4]]);

            chainA_symbols+='+';

            cA_total+=1;

            if chainA_complex[i][4]<=25.0 and chainA_unbound[i][4]>25.0:

                cA_core.append([chainA_complex[i][0], chainA_complex[i][1],
chainA_complex[i][2], chainA_complex[i][4], chainA_unbound[i][4]]);

            elif chainA_complex[i][4]<=25.0 and chainA_unbound[i][4]<=25.0:

                cA_support.append([chainA_complex[i][0], chainA_complex[i][1],
chainA_complex[i][2], chainA_complex[i][4], chainA_unbound[i][4]]);

            else:

                cA_rim.append([chainA_complex[i][0], chainA_complex[i][1],
chainA_complex[i][2], chainA_complex[i][4], chainA_unbound[i][4]]);

                if chainA_complex[i][1] in ["R", "K"]:

                    cA_pos+=1;

                elif chainA_complex[i][1] in ["D", "E"]:

                    cA_neg+=1;

                elif chainA_complex[i][1] in ["S", "T", "N", "Q", "C", "M"]:

                    cA_pol+=1;

                elif chainA_complex[i][1] in ["G", "A", "V", "L", "I"]:

```

```

        cA_aliph+=1;

    elif chainA_complex[i][1] in ["F", "Y", "W", "P", "O"]:

        cA_arom+=1;

    elif chainA_complex[i][1]=="H":

        cA_his+=1;

    else:

        continue;

else:

    chainA_symbols+='-';

for i in range(len(chainB_complex)):

    diff=abs(chainB_complex[i][4] - chainB_unbound[i][4]);

    chainB_fasta+=chainB_complex[i][1];

    if diff>0.0:

        chainB_interface.append([chainA_complex[i][0], chainA_complex[i][1],
chainA_complex[i][2], chainA_complex[i][4], chainA_unbound[i][4]]);

        chainB_symbols+='-';

        cB_total+=1;

        if chainB_complex[i][4]<=25.0 and chainB_unbound[i][4]>25.0:

            cB_core.append([chainB_complex[i][0], chainB_complex[i][1],
chainB_complex[i][2], chainB_complex[i][4], chainB_unbound[i][4]]);

            elif chainB_complex[i][4]<=25.0 and chainB_unbound[i][4]<=25.0:

                cB_support.append([chainB_complex[i][0], chainB_complex[i][1],
chainB_complex[i][2], chainB_complex[i][4], chainB_unbound[i][4]]);

            else:

                cB_rim.append([chainB_complex[i][0], chainB_complex[i][1],
chainB_complex[i][2], chainB_complex[i][4], chainB_unbound[i][4]]);

                if chainB_complex[i][1] in ["R", "K"]:

                    cB_pos+=1;

                elif chainB_complex[i][1] in ["D", "E"]:

                    cB_neg+=1;

                elif chainB_complex[i][1] in ["S", "T", "N", "Q", "C", "M"]:

                    cB_pol+=1;

                elif chainB_complex[i][1] in ["G", "A", "V", "L", "I"]:

                    cB_aliph+=1;

                elif chainB_complex[i][1] in ["F", "Y", "W", "P", "O"]:

                    cB_arom+=1;

```

```

        elif chainB_complex[i][1]=="H":
            cB_his+=1;
        else:
            continue;
    else:
        chainB_symbols+='-';
BSA=abs(complexASA - temp1ASA - temp2ASA);
print "Results for structure %s:\n" %title;
print "Chain %s:" %cA;
for i in range(0, len(chainA_fasta), 60):
    print chainA_fasta[i:i+60];
    print chainA_symbols[i:i+60];
print "\nInterface Residues:";
printcA="";
for res in chainA_interface:
    printcA+=" %s%d, " %(res[1], res[2]);
printcA=printcA.rstrip(", ");
print printcA, "\n";
print "Levy Classification:";
corecA="";
for res in cA_core:
    corecA+=" %s%d, " %(res[1], res[2]);
corecA=corecA.rstrip(", ");
print "Core (%d): %s" %(len(cA_core), corecA);
supcA="";
for res in cA_support:
    supcA+=" %s%d, " %(res[1], res[2]);
supcA=supcA.rstrip(", ");
print "Support (%d): %s" %(len(cA_support), supcA);
rimcA="";
for res in cA_rim:
    rimcA+=" %s%d, " %(res[1], res[2]);
rimcA=rimcA.rstrip(", ");
print "Rim (%d): %s" %(len(cA_rim), rimcA);

```

```

print"\nProperties:";

print "Polar (S, T, N, Q, M, C):\t\t%d (%.02f%%)" %(cA_pol, (cA_pol/cA_total)*100);

print "Negative (D, E):\t\t%d (%.02f%%)" %(cA_neg, (cA_neg/cA_total)*100);

print "Short positive (R, K):\t\t%d (%.02f%%)" %(cA_pos, (cA_pos/cA_total)*100);

print "Histidine (charge and ring):\t\t%d (%.02f%%)" %(cA_his, (cA_his/cA_total)*100);

print "Aromatic (F, W, Y, P):\t\t%d (%.02f%%)" %(cA_arom, (cA_arom/cA_total)*100);

print "Aliphatic (G, A, L, I, V):\t\t%d (%.02f%%)" %(cA_aliph, (cA_aliph/cA_total)*100);

print "\n\nChain %s:" %cB;

for i in range(0, len(chainB_fasta), 60):

    print chainB_fasta[i:i+60];

    print chainB_symbols[i:i+60];

print "\nInterface Residues:";

printcB="";

for res in chainB_interface:

    printcB+=" %s%d, " %(res[1], res[2]);

printcB=printcB.rstrip(", ");

print printcB, "\n";

print "Levy Classification:";

corecB="";

for res in cB_core:

    corecB+=" %s%d, " %(res[1], res[2]);

corecB=corecB.rstrip(", ");

print "Core (%d): %s" %(len(cB_core), corecB);

supcB="";

for res in cB_support:

    supcB+=" %s%d, " %(res[1], res[2]);

supcB=supcB.rstrip(", ");

print "Support (%d): %s" %(len(cB_support), supcB);

rimcB="";

for res in cB_rim:

    rimcB+=" %s%d, " %(res[1], res[2]);

rimcB=rimcB.rstrip(", ");

print "Rim (%d): %s" %(len(cB_rim), rimcB);

print"\nProperties:";

```

```
print "Polar (S, T, N, Q, M, C):\t\t%d (%.02f%%)" %(cB_pol, (cB_pol/cB_total)*100);
print "Negative (D, E):\t\t%d (%.02f%%)" %(cB_neg, (cB_neg/cB_total)*100);
print "Short positive (R, K):\t\t%d (%.02f%%)" %(cB_pos, (cB_pos/cB_total)*100);
print "Histidine (charge and ring):\t\t%d (%.02f%%)" %(cB_his, (cB_his/cB_total)*100);
print "Aromatic (F, W, Y, P):\t\t%d (%.02f%%)" %(cB_arom, (cB_arom/cB_total)*100);
print "Aliphatic (G, A, L, I, V):\t\t%d (%.02f%%)" %(cB_aliph, (cB_aliph/cB_total)*100);
print "\n\n\nBuried Surface Area: %.02f Angstroms**2" %BSA;
```

Παράρτημα III: Παράμετροι Προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής

Ακολουθούν παραδείγματα των αρχείων παραμέτρων των προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στις προσομοιώσεις CG-MD με το πεδίο δυνάμεων MARTINI, τις προσομοιώσεις MDFF για το μοντέλο της Μεταροδοψίνης I και τις προσομοιώσεις ανόπτησης σε περιβάλλον μεμβράνης (Simulated Annealing) με το πεδίο δυνάμεων CHARMM.

Σε κάθε προσομοίωση απαιτείται η ύπαρξη ενός ζεύγους αρχείων PSF και PDB, τα οποία περιγράφουν τη δομή του συστήματος. Το αρχείο PSF περιλαμβάνει πληροφορίες σχετικά με τα χαρακτηριστικά των ατόμων (ακτίνες van der Waals, φορτία, ατομικά βάρη) και την τοπολογία των βιομορίων στο σύστημα (δεσμοί, δίεδρες γωνίες, μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, δευτεροταγής δομή και δεσμοί υδρογόνου) με βάση την αντίστοιχη τοπολογία που δίνεται στο εκάστοτε πεδίο δυνάμεων. Το αρχείο PDB περιλαμβάνει τις συντεταγμένες των ατόμων και έχει την τυπική μορφή των αρχείων της Protein Data Bank, με κάποιες τροποποιήσεις που σχετίζονται με το πεδίο δυνάμεων. Το ζεύγος αρχείων PSF/PDB μπορεί να δημιουργηθεί με τη λειτουργία PSFGen, η οποία περιλαμβάνεται τόσο στο NAMD όσο και στο VMD. Το VMD, επιπρόσθετα, διαθέτει γραφικό περιβάλλον για τη λειτουργία (AutoPSF), το οποίο δίνει τη δυνατότητα για περισσότερες επιλογές.

Εκτός από τα αρχεία PSF/PDB, απαραίτητα είναι και τα αρχεία παραμέτρων του πεδίου δυνάμεων, σε μορφή αναγνώσιμη από το NAMD (τυπικά, το NAMD αναγνωρίζει αρχεία τύπου CHARMM, X-PLOR και AMBER). Ανάλογα με το είδος των μορίων που περιλαμβάνονται στο σύστημα (πρωτεΐνες, λιπίδια, νερό κλπ) μπορεί να απαιτούνται περισσότερα του ενός αρχεία παραμέτρων, τα οποία περιγράφουν διαφορετικές κατηγορίες μορίων. Τα αρχεία του πεδίου δυνάμεων CHARMM διατίθενται ελεύθερα από τον ιστοχώρο του εργαστηρίου MacKerell στο Πανεπιστήμιο του Maryland των ΗΠΑ (<http://mackerell.umaryland.edu/>). Τα αρχεία του πεδίου δυνάμεων MARTINI, σε μορφή αναγνώσιμη από το NAMD, μπορούν να βρεθούν στον ιστοχώρο του NAMD, στη διεύθυνση <http://www.ks.uiuc.edu/Training/Tutorials/martini/>.

Στις προσομοιώσεις CG-MD, απαραίτητο βήμα είναι η μετατροπή των συντεταγμένων από All-atom σε Coarse – Grained. Αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με το εργαλείο CG Builder του VMD είτε με τα εργαλεία προετοιμασίας του MARTINI, τα οποία υπάρχουν διαθέσιμα στον ιστοχώρο του πεδίου δυνάμεων (<http://md.chem.rug.nl/cgmartini/>).

Στις προσομοιώσεις MDFF απαιτείται, εκτός από τα PSF/PDB και το πεδίο δυνάμεων, η ύπαρξη ενός χάρτη πυκνότητας από δεδομένα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας.

Χάρτες αυτού του τύπου μπορούν να βρεθούν στη βάση δεδομένων EMDatabank. Η κατάλληλη προετοιμασία των αρχείων μπορεί να γίνει με την επέκταση MDFF, η οποία υπάρχει διαθέσιμη στο VMD.

Η χρήση του NAMD πραγματοποιείται ως εξής:

```
namd2 +px simulation.conf > simulation.log
```

όπου «namd2» είναι το εκτελέσιμο αρχείο (exe) του προγράμματος, «simulation.conf» είναι το αρχείο παραμέτρων της προσομοίωσης και «simulation.log» είναι το LogFile. Το τελευταίο περιλαμβάνει πληροφορία όπως οι ενεργειακές τιμές, η θερμοκρασία, οι εφαρμοζόμενες δυνάμεις κλπ στη μονάδα του χρόνου, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί στο σχεδιασμό διαγραμμάτων. Η επιλογή «+px» επιτρέπει τον καθορισμό του αριθμού των πυρήνων CPU για τους υπολογισμούς σε συστήματα με πολλούς πυρήνες. Για παράδειγμα, για εκτέλεση του προγράμματος με 32 CPU cores, η επιλογή γίνεται «+p32».

Τα αρχεία εξόδου στο τέλος μιας προσομοίωσης περιλαμβάνουν το αρχείο «coor» (τελικές συντεταγμένες), το αρχείο «dcd» (πορεία ή trajectory), το αρχείο «vel» (η ταχύτητα κάθε ατόμου) και τα αρχεία «xst» και «xsc» (πληροφορία για τις διαστάσεις του συστήματος). Τα αρχεία αυτά δίνονται από το NAMD σε δυαδική (binary) κωδικοποίηση για εξοικονόμηση χώρου. Η ανάγνωση και η επεξεργασία τους μπορεί να γίνει με είτε με το VMD είτε με το UCSF Chimera.

MARTINI Coarse – Grained Molecular Dynamics

```
proc get_first_ts { xscfile } {  
    set fd [open $xscfile r]  
    gets $fd  
    gets $fd  
    gets $fd line  
    set ts [lindex $line 0]  
    close $fd  
    return $ts  
}  
  
#####  
## ADJUSTABLE PARAMETERS                ##  
#####  
  
set inputname mGluR1_CHL_POPC-equilibration  
set outputname mGluR1_CHL_POPC-run-01
```

```

set temperature 310

cosAngles      on

structure      ../05_constraints/ionized.psf

coordinates    ../05_constraints/ionized.pdb

bincoordinates $inputname.coor

binvelocities  $inputname.vel

extendedSystem $inputname.xsc

COMMotion      yes

set firsttime [get_first_ts $inputname.xsc]

firsttimestep  $firsttime

#####

## SIMULATION PARAMETERS                ##

#####

# Input

paraTypeCharmm  on

parameters ../martini/martini-par/martini-protein-bonds.par

parameters ../martini/martini-par/martini-protein-angles-cos.par

parameters ../martini/martini-par/martini-protein-dihedrals.par

parameters ../martini/martini-par/martini-lipids-bonds-angles-dihedrals.par

parameters ../martini/martini-par/martini-all-nonb.par

parameters ../martini/martini-par/martini-cholesterol.par

# Force-Field Parameters

exclude        1-2

1-4scaling     1.0

cutoff         12.0

switching      on

martiniSwitching on

PME            off

switchdist     9.0

pairlistdist   14.0

dielectric     15.0

pairlistShrink 0.0

pairlistGrow   0.0

pairlistTrigger 0.0

```

```

# Integrator Parameters

timestep      20.0

nonbondedFreq  1

stepspercycle  10

# Constant Temperature Control

langevin      yes ;# do langevin dynamics

langevinDamping  1 ;# damping coefficient (gamma) of 1/ps

langevinTemp    $temperature

langevinHydrogen off ;# don't couple langevin bath to hydrogens

# Periodic Boundary Conditions

if {1} {

cellBasisVector1 120.41  0.0  0.0

cellBasisVector2  0.0  119.60  0.0

cellBasisVector3  0.0  0.0  106.92

cellOrigin      0.12 -0.05 -1.28

}

wrapAll        on

margin         5


# Constant Pressure Control (variable volume)

useGroupPressure no

useFlexibleCell  yes

useConstantArea  no

useConstantRatio no

langevinPiston   yes

langevinPistonTarget 1.01325 ;# in bar -> 1 atm

langevinPistonPeriod 2000. #usually 2000 for RBCG

langevinPistonDecay 1000. #usually 1000 for RBCG

langevinPistonTemp $temperature

# Output

outputName      $outputname

restartfreq     1000

dcdfreq         1000

xstFreq         1000

```

outputEnergies 100

outputPressure 100

#####

EXECUTION SCRIPT

#####

IMDon on

IMDport 3000 ;# port number (enter it in VMD)

IMDfreq 1 ;# send every 1 frame

IMDwait no ;# wait for VMD to connect before running?

run 5000000

Molecular Dynamics Flexible Fitting

Docking -- Step 1

set PSFFILE initial_dock.psf

set PDBFILE initial_dock.pdb

set GRIDPDB initial_dock-grid.pdb

set GBISON 0

set DIEL 80

set SCALING_1_4 1.0

set ITEMP 300

set FTEMP 300

set GRIDFILE EMD-1079.dx

set GSCALE 0.3

set EXTRAB { extrabonds-hbonds.txt extrabonds-chirality.txt extrabonds-cispeptide.txt}

set CONSPDB 0

set FIXPDB 0

set OUTPUTNAME metarho_3cap-step1

set TS 200000

set MS 200

set MARGIN 0

#####

structure \$PSFFILE

coordinates \$PDBFILE

paraTypeCharmm on

parameters par_all27_prot_lipid_na.inp

if {[info exists INPUTNAME]} {

 BinVelocities \$INPUTNAME.restart.vel

 BinCoordinates \$INPUTNAME.restart.coor

} else {

```

    temperature $ITEMP
}

source mdff_template.namd

```

Simulated Annealing

```

# Automatically generated configuration for annealing a revcg structure

structure      ../05_membrane_equilibration/4OR2_CHL1_CG_POPC-solv-ion.psf
coordinates     ../05_membrane_equilibration/4OR2_CHL1_CG_POPC-solv-ion.pdb
bincoordinates  ../05_membrane_equilibration/4OR2_CHL1_CG_POPC-eq-mem.coor
binvelocities   ../05_membrane_equilibration/4OR2_CHL1_CG_POPC-eq-mem.vel
extendedSystem  ../05_membrane_equilibration/4OR2_CHL1_CG_POPC-eq-mem.xsc

paraTypeCharmm      on

parameters      ../05_membrane_equilibration/par_all27_prot_lipid_na.inp
parameters      ../05_membrane_equilibration/par_all36_lipid_chol.prm

firsttimestep    0

exclude          scaled1-4

1-4scaling      1.0

cutoff          12.

switching        on

switchdist      10.

pairlistdist    13.5

rigidbonds      water

timestep        1.0

nonbondedFreq   2

fullElectFrequency 4

stepspercycle   20

# Periodic Boundary Conditions

if {1} {

cellBasisVector1 112.59900283813477 0.0 0.0

```

```

cellBasisVector2  0.0  111.32600021362305  0.0

cellBasisVector3  0.0  0.0  84.68600082397461

cellOrigin        0.19231872260570526  0.10171198844909668  -3.1184089183807373
}

wrapAll           on

# PME (for full-system periodic electrostatics)

#the following works well for most simulations

PME               yes

PMEGridSpacing    1.0

useFlexibleCell    yes

useConstantArea    no

#output options

outputName        4OR2_CHL1_CG_expl_sa

restartfreq        1000

dcdfreq           1000

xstFreq           1000

outputEnergies     100

outputPressure     100

#temperature control

reassignFreq 500

reassignTemp 610

reassignIncr -10

reassignHold 300

#run script

minimize 5000

reinitvels        610

run 20000

minimize 1000

```

Παράρτημα IV: Ανακοινώσεις σε Επιστημονικά Συνέδρια

Ακολουθούν οι ανακοινώσεις και προφορικές παρουσιάσεις σε επιστημονικά συνέδρια που έχουν προκύψει στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας:

- Baltoumas, F.A., Theodoropoulou, M.C. & Hamodrakas, S.J., **Evaluating the Nature of Oligomeric Interactions in G-protein coupled Receptors with Molecular Simulations**, *9th Conference of the Hellenic Society for Computational Biology and Bioinformatics – HSCBB14, Agricultural University of Athens, Athens, Greece, October 10-12, 2014.*
- Σταυρουλάκη, Γ.Δ., Μπαλτούμας, Φ.Α., Θεοδωροπούλου, Μ.Κ., Οικονομίδου, Β.Α. και Χαμόδρακας, Σ.Ι., **Δομικές Μελέτες GPCRs με Χρήση Υπολογιστικών Μεθόδων**, *37ο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών (ΕΕΒΕ), Βόλος, 21-23 Μαΐου 2015.*

Evaluating the Nature of Oligomeric Interactions in G-protein coupled Receptors with Molecular Simulations

Fotis A. Baltoumas, Margarita C. Theodoropoulou, Stavros J. Hamodrakas*

Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens, Panepistimiopolis, Athens 157 01, Greece

*Correspondence to: shamodr@biol.uoa.gr

I. INTRODUCTION

G-protein coupled Receptors (GPCRs) are one of the largest and most diverse superfamilies of membrane receptors in eukaryotes. They regulate a wide range of cell functions and have been implicated in various diseases. All GPCRs share a common topology, comprised by seven transmembrane α -helices connected by loops, an extracellular N-terminus and an intracellular C-terminus [1]. Even though GPCRs are traditionally thought to act mainly as monomers, accumulating biophysical, biochemical and computational evidence suggests they can also form homo- and heterodimers, or even higher oligomers [2]. However, the structural determinants, stoichiometry and functional relevance of GPCR oligomerization remain topics of speculation and intense debate.

II. METHODS

A. Identification of Interface Hot Spots

A dataset of solved GPCR dimer structures was obtained from the Protein Data Bank (PDB) [3]. Biomolecular interactions were evaluated by Accessible Surface Area (ASA) calculations, as well as through interatomic distance and angle measurements and visualization. Interacting amino acids were further assigned as core, support and rim residues, using a Relative ASA definition [4]. Potential interface hot spots were identified through Computational Alanine Scanning using the FoldX algorithm [5].

B. Molecular Mechanics and Molecular Dynamics

Continuum electrostatic properties of GPCR surfaces were calculated by solving the Poisson-Boltzmann equation with the APBS algorithm [6], using a low dielectric slab for the simulation of the apolar membrane environment. Interaction energy properties of GPCR dimers were estimated through all-atom Molecular Mechanics (MM) simulations. In order to assess the influence of the T4 Lysozyme (T4L), which is often present in GPCR structures, selected receptor dimers were subjected to Residue Based Coarse-Grained Molecular Dynamics (MD) simulations with the MARTINI Coarse-Grained force field [7]. All MM & MD simulations were performed in an explicit solvent-membrane environment, using the NAMD Scalable Dynamics Suite [8].

III. RESULTS

Available structural data propose different dimerization interfaces, formed either by transmembrane helices TM1-TM2 or by TM5 and its surrounding segments. The most prominent hot spots include residues with polar or charged groups that form hydrogen bonds, as well as large aromatic residues that form π - π stacking like contacts, either with other similar residues or with adjacent cholesterol molecules acting as intermediates between monomers. Molecular Mechanics calculations resulted in generally favorable interaction energy values for the TM1-TM2 interface, suggesting its probable stability. On the other hand, dimers involving the TM5 helix diverse greatly, with some examples displaying less favorable energy profiles.

The electrostatic potential is the main discriminating factor among dimers, highlighting the significance of polar contacts. The role of polar groups is also highlighted by continuum electrostatics calculations, which showed that the presence of charges in the lipid bound segments of GPCRs can have significant effects on the overall charge of their membrane exposed surfaces. However, the use of experimental procedures in GPCR structure determination, such as fusion with T4L can affect the formation of the dimers, as shown both by energy calculations and by Molecular Dynamics simulations. In the absence of T4L, the transmembrane segments forming the dimers undergo structural shifts, resulting in more compact interfaces and extended interactions.

IV. DISCUSSION

This study shed light on the structural nature of GPCR oligomeric interactions. Large aromatic residues and polar contacts were identified as core factors in the formation of receptor dimers, and the effect of the presence of polar groups in the otherwise hydrophobic transmembrane regions was highlighted. Lipid components, such as cholesterol can also participate in oligomeric interactions, indicating the importance of the membrane environment for GPCR organization and function. Furthermore, the influence of experimental methods used in GPCR structure determination and their effect on dimerization was also examined. The information provided by this study may be applicable to further studying GPCR oligomerization and possibly the prediction of protein-protein interactions for transmembrane proteins.

ACKNOWLEDGMENTS

This research has been co-financed by the European Union (European Regional Development Fund – ERDF) and Greek national funds through the Operational Program “Competitiveness and Entrepreneurship” of the National Strategic Reference Framework (NSRF) (Project code 09SYN-13-999).

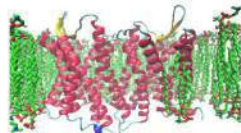
REFERENCES

- [1] D. M. Rosenbaum, S. G. Rasmussen and B. K. Kobilka, “The structure and function of G-protein-coupled receptors,” *Nature* 459 (7245):356-363, 2009
- [2] G. Milligan, “The prevalence, maintenance, and relevance of G-protein-coupled receptor oligomerization,” *Mol. Pharmacol.* 84: 158-169, 2013.
- [3] H.M. Berman, et al., “The Protein Data Bank,” *Nucleic acids research* 28 (1): 235-242, 2000.
- [4] E. D. Levy, “A simple definition of structural regions in proteins and its use in analyzing interface evolution,” *J. Mol. Biol.* 403: 660-670, 2010.
- [5] J. Schymkowitz, et al., “The FoldX web server: an online force field,” *Nucleic acids research* 33: W382-388, 2005.
- [6] N. A. Baker, D. Sept, S. Joseph, M. J. Holst, J. A. McCammon, “Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome,” *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 10037-10041, 2001.
- [7] L. Monticelli, et al., “The MARTINI coarse-grained force field: extension to proteins,” *J. Chem. Theory and Comput.* 4 (5): 819-834, 2008.
- [8] J. C. Phillips, et al., “Scalable molecular dynamics with NAMD,” *J. Comput. Chemistry* 26(16):1781-802, 2005.

Evaluating the Nature of Oligomeric Interactions in G-protein coupled Receptors with Molecular Simulations

Fotis A. Baltoumas, Margarita C. Theodoropoulou and Stavros J. Hamodrakas

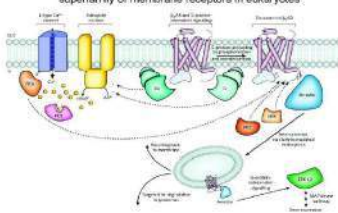
Department of Cell Biology & Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens, Panepistimiopolis, Athens 157 01, Greece



4th Conference of the Hellenic Society for Computational Biology and Bioinformatics (HSCBB-14)
Agricultural University of Athens, Athens, Greece, 10-12/10/2014

Introduction

G-protein coupled Receptors (GPCRs): the largest and most diverse superfamily of membrane receptors in eukaryotes



4th Conference of the Hellenic Society for Computational Biology and Bioinformatics (HSCBB-14)
Agricultural University of Athens, Athens, Greece, 10-12/10/2014

Introduction

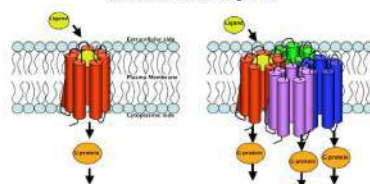


- 6 GPCR Classes (A-F)
- A common GPCR topology:
 - Extracellular N-terminus
 - 7 Transmembrane α -helices
 - Intracellular C-terminus
- 29 GPCRs with available structures:
 - 24 Class A
 - 2 Class B
 - 2 Class C
 - 1 Class F

4th Conference of the Hellenic Society for Computational Biology and Bioinformatics (HSCBB-14)
Agricultural University of Athens, Athens, Greece, 10-12/10/2014

Introduction

GPCRs: Monomers or Oligomers?



Motivation: Identification and evaluation of structural determinants in GPCR oligomeric interactions

4th Conference of the Hellenic Society for Computational Biology and Bioinformatics (HSCBB-14)
Agricultural University of Athens, Athens, Greece, 10-12/10/2014

Methods

The Dataset

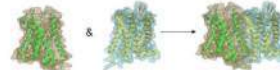
Structure	Class	PDB	RCS	Dimer Interfaces
Bovine Guanine Nucleotide Binding Protein (GNAS)	A	3T36	4.3	2
Bovine Guanine Nucleotide Binding Protein (GNAS)	A	3CAP	2.8	1
Bovine Guanine Nucleotide Binding Protein (GNAS)	A	3PND	3.0	1
Lipid Bilayer	A	2Z75	2.2	1
Human μ -opioid receptor	A	4DRI	2.9	1
Mouse μ -opioid receptor	A	4DKL	2.8	2
Human μ -opioid receptor (Ligand: 411)	A	5ODU	2.7	1
Human μ -opioid receptor (Ligand: 411)	A	5OFA	2.5	1
Human μ -opioid receptor	A	4C9D	3.5	1
Human μ -opioid receptor	F	4JCV	2.45	1
Human μ -opioid receptor	C	4CR1	2.8	1

4th Conference of the Hellenic Society for Computational Biology and Bioinformatics (HSCBB-14)
Agricultural University of Athens, Athens, Greece, 10-12/10/2014

Methods

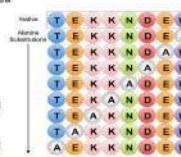
1. Interface Analysis

- Buried Surface Area (DSSP)



- Interface Classification: Relative Surface Area (core, rim, support)

$$RSA = \frac{ASA_{core}}{ASA_{total}} \cdot 100$$



- Hot Spots: Computational Alanine Scanning

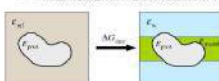
- Mutation to Ala
- $\Delta\Delta G = \Delta G_{mut} - \Delta G_{wt}$
- Ala-Scan Hot Spots: $\Delta\Delta G > 1.50$ kcal/mol
- Modeling & Force Field: FoldX

4th Conference of the Hellenic Society for Computational Biology and Bioinformatics (HSCBB-14)
Agricultural University of Athens, Athens, Greece, 10-12/10/2014

Methods

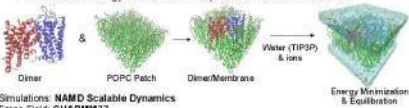
2. Molecular Mechanics Calculations

- Poisson-Boltzmann Electrostatics in implicit membrane



Membrane Proteins (Different values for the solvent and the membrane)
 $\epsilon_{in} = 4-5$, $\epsilon_{out} = 80$, $\epsilon_{mem} = 2$
Force Field: CHARMM27
Calculations: Adaptive Poisson-Boltzmann Solver (APBS)

- Interaction Energy calculations in explicit membrane and solvent



Simulations: NAMD Scalable Dynamics
Force Field: CHARMM27

4th Conference of the Hellenic Society for Computational Biology and Bioinformatics (HSCBB-14)
Agricultural University of Athens, Athens, Greece, 10-12/10/2014

Methods

3. Residue Based Coarse-Grained Molecular Dynamics (1/2)



- The problem:
 - GPCRs are often crystallized with T4 Lysozyme (T4L) fused within the cytoplasmic side
 - Does the presence of T4L affect the arrangement of GPCR dimers?
 - Long scale all-atom simulations difficult due to system size

- and the solution: The MARTINI CG Force Field

- Coarse-Grained (CG) representations

- Secondary structure restraints and distinct properties for polar, charged and apolar groups

- Specifically designed for biomolecular interactions

- Especially efficient for membrane protein systems

- Long time scales can be easily achieved

4th Conference of the Hellenic Society for Computational Biology and Bioinformatics (HSCBB-14)
Agricultural University of Athens, Athens, Greece, 10-12/10/2014

Methods

4. Residue Based Coarse-Grained Molecular Dynamics (2/2)

1. Building the system (**VMD** & **MARTINI**)

```
graph LR; A[Dimer-POPC (T4L removed)] -- "CG conversion" --> B[Sec. Struc. Restraints (DESP & Manual inspection)]; B -- "MARTINI CG Water & Ions" --> C[Complete RBCG Model];
```

2. Simulation (**NAMD** & **MARTINI**)

```
graph LR; A[ ] -- "EM & Equilibration" --> B["Constraints for CG protein<br/>CG lipids & solvent<br/>Yes"]; B -- "NPT simulation 400 ns" --> C[ ];
```

EM & Equilibration

Constraints for CG protein

CG lipids & solvent

Yes

Equilibrated CG membrane & solvent

NPT simulation

400 ns

EM: Euclidean of the Helix Society for Computational Design and Coordination (EMSCD)

Agitation University of Illinois, Urbana, IL 61820-2024

Results & Discussion

Different Oligomerization Interfaces

The TM1-TM2-H8 interface, conserved among receptors

Rhodopsin (PDB: 2J56)

K opsin (PDB: 4D4H)

mGRI1 (PDB: 4OR2)

TM5 interfaces: distinct dimers or different versions of one dimer?

TM4-TM5 (PDB: 4JKV)

TM4-TM5-TM6 (PDB: 3OE8)

TM5-TM6 (PDB: 4DKL)

© 2011 Conference of the Midwest Society for Computational Biology and Bioinformatics (MSCBBI)
Agricultural University of Missouri, Clinton, MO 64601-0209

Results & Discussion

Interface Hot Spots - n-contacts & hydrogen bonds

BcrA Metaphosphatase II Ala Scan
POS: 370-383 (20kDa)

Interface Residue	n-contacts	H-bonds
A383	0	0
A382	0	0
A381	0	0
A380	0	0
A379	0	0
A378	0	0
A377	0	0
A376	0	0
A375	0	0
A374	0	0
A373	0	0
A372	0	0
A371	0	0
A370	0	0
A369	0	0
A368	0	0
A367	0	0
A366	0	0
A365	0	0
A364	0	0
A363	0	0
A362	0	0
A361	0	0
A360	0	0

Kip1 cell receptor Ala Scan
POS: 400-414 (20kDa)

Interface Residue	n-contacts	H-bonds
A414	0	0
A413	0	0
A412	0	0
A411	0	0
A410	0	0
A409	0	0
A408	0	0
A407	0	0
A406	0	0
A405	0	0
A404	0	0
A403	0	0
A402	0	0
A401	0	0
A400	0	0

Cxcr4 TMR-TMR dimer
POS: 100-114 (20kDa)

Interface Residue	n-contacts	H-bonds
A114	0	0
A113	0	0
A112	0	0
A111	0	0
A110	0	0
A109	0	0
A108	0	0
A107	0	0
A106	0	0
A105	0	0
A104	0	0
A103	0	0
A102	0	0
A101	0	0
A100	0	0

- Present in TM1-TM2-HS and TM5 interfaces
- Conserved positions: TM1, TM5, HS
- Part of the interface core

8th Conference of the Indian Society for Computational Biology and Bioinformatics (ISCBB-2019)
Agricultural University of Ahmedabad, Ahmedabad, Gujarat, 10-12/05/2019

Results & Discussion

Interface Hot Spots: π -contacts
Human mGluR1 dimer (PDB: 4OR2)

Cholesterol molecules can act as intermediates in π -contacts between dimers

© 2016 Contribution of the authors. Reprints for Commercial/academic and Academic purposes (HSC2016)
Agricultural University of Athens, Athens, Greece, 10-12/10/2016

Results & Discussion

Electrostatic charges in the transmembrane region (examples)



Rhodopsin (Class A)
PDB: 3CAP

The TM1-TM2-H8 Side



The TM4-TM5-TM6 Side



Smoothedhen (Class F)
PDB: 4JKV

The TM1-TM2-H8 Side



The TM4-TM5-TM6 Side

- Polar groups in transmembrane regions influence the overall potential (field lines)
- These groups are buried upon dimer formation

4th Conference of the Institut, Society for Computational Biology and Bioinformatics (SCCBIB)
Agricultural University of Athens, Athens, Greece, 13-15/03/2014

Results & Discussion

Interaction Energy Calculations

TM1-TM4 dimers

	BSSE	$\Delta E_{\text{electrostatic}}$ (kcal/mol)	$\Delta E_{\text{dispersion}}$ (kcal/mol)	Total ΔE (kcal/mol)
Strong hydrogen interaction	2.38	-20.79	-11.22	-19.63
Medium interaction	0.40	-10.70	-5.50	-10.80
Weak hydrogen bond	0.18	-5.25	-2.85	-5.92
A typical metal-ligand bond	42.34	-26.46	-11.12	-26.10

TM2-TM5 dimers

	BSSE	$\Delta E_{\text{electrostatic}}$ (kcal/mol)	$\Delta E_{\text{dispersion}}$ (kcal/mol)	Total ΔE (kcal/mol)
Strong hydrogen interaction	4.03	-42.78	-54.81	-93.56
Medium interaction	0.78	-21.84	-9.40	-21.46
Weak hydrogen bond	0.32	-10.33	-5.35	-10.96
A typical metal-ligand bond	42.62	-26.43	-11.35	-26.10

• Significant changes in electrostatic energy between dimers
 • Polar groups
 • Long range electrostatic interactions

TM1-TM5, TM4-TM5, TM2-TM5, TM3-TM5 dimers

Dimer	BSSE	$\Delta E_{\text{electrostatic}}$ (kcal/mol)	$\Delta E_{\text{dispersion}}$ (kcal/mol)	Total ΔE (kcal/mol)
TM1-TM5	2.22	-15.12	-8.63	-18.53
TM4-TM5	0.17	-1.75	-0.76	-2.58
TM2-TM5	0.31	-9.47	-4.67	-10.83
TM3-TM5	0.39	-10.11	-5.17	-11.59
TM2-TM3	0.39	-10.11	-5.17	-11.59
TM1-TM2	0.39	-10.11	-5.17	-11.59
TM1-TM3	0.39	-10.11	-5.17	-11.59
TM1-TM4	0.39	-10.11	-5.17	-11.59
TM1-TM5	0.39	-10.11	-5.17	-11.59
TM2-TM4	0.39	-10.11	-5.17	-11.59
TM2-TM5	0.39	-10.11	-5.17	-11.59
TM3-TM4	0.39	-10.11	-5.17	-11.59
TM3-TM5	0.39	-10.11	-5.17	-11.59
TM4-TM5	0.39	-10.11	-5.17	-11.59

• Favorable energy values for the TM1-TM5 dimers
 • Diversity for the TM5 dimers

HCBCE
 © Lin Lockman et al. (2019). Study 10: Computational Chemistry and Biochemistry (2019/20)

Department of Chemistry, University of the Western Cape, Bellville, South Africa
 Email: lockmanl@uwc.ac.za
 Date: 2019/10/14

Structure	PDB	Interface	ΔG_{elec} (kcal/mol)	ΔG_{elec} (kcal/mol)	Total BSA (Å ²)	ΔG_{elec} (kcal/mol)	ΔG_{elec} (kcal/mol)	Total BSA (Å ²)
GPCR1 (Lysosyme-81)	3OUU	TMS-TMS	-34.73 (7.46)	-42.47 (3.05)	1653.8	-146.37 (0.34)	-36.58 (3.75)	1653.8
GPCR1 (Lysosyme-CVX15)	3OE0	TMS-TMS	-132.34 (8.35)	-91.65 (1.35)	2226.8	-146.37 (0.40)	-40.37 (3.80)	2226.8
GPCR1 (Lysosyme-CVX15)	4DKL	TMS-TMS	-124.81 (2.77)	-114.92 (2.77)	2996.0	-146.37 (0.38)	-144.91 (3.75)	2996.0

GPCR dimers

GPCR dimers & T4L

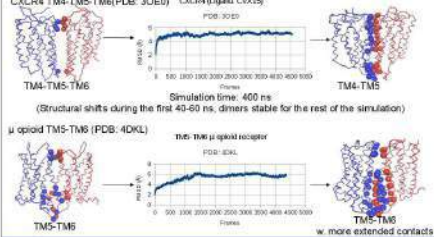
- Some TMS dimers present contacts between T4 Lysosymes
- Significant changes in electrostatic energy: salt bridges and hydrogen bonds – between the two T4L subunits – between T4L and receptors
- TMS1-TMS2 dimers do not display T4L contacts

8th Conference of the Methods Society for Computational Biology and Bioinformatics (MCSBB18)
Agricultural University of Athens, Athens, Greece, 13-15/09/2018

Results & Discussion

The Influence of T4 Lysozyme: Molecular Dynamics Simulations

CXCR4 TM4-TM5-TM6 (PDB: 3OE8)



μ opioid TM5-TM6 (PDB: 4DKL)

TM5-TM6 μ opioid receptor

TM5-TM6

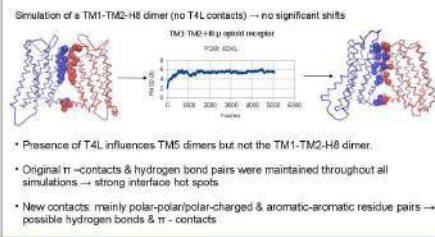
34th Conference of the Hellenic Society for Computational Biology and Bioinformatics (HSCBB)

Agricultural University of Athens, Athens, Greece, 10-12/10/2019

Results & Discussion

The Influence of T4 Lysozyme: Molecular Dynamics Simulations

Simulation of a TM1-TM2-H8 dimer (no T4L contacts) → no significant shifts



34th Conference of the Hellenic Society for Computational Biology and Bioinformatics (HSCBB)

Agricultural University of Athens, Athens, Greece, 10-12/10/2019

Conclusions

- Distinct Dimer Interfaces: TM1-TM2-H8, TM4-TM5, TM5-TM6.
- Current methods in GPCR structure determination influence receptor arrangement: our knowledge on oligomeric interactions may be incomplete.
- The TM1-TM2-H8 interface: energetically favorable, stable, not influenced by T4L → possible physiological relevance.
- Aromatic π -contacts and polar pairs are stable and prominent interactions in GPCR dimers → a possible foundation for prediction.

34th Conference of the Hellenic Society for Computational Biology and Bioinformatics (HSCBB)

Agricultural University of Athens, Athens, Greece, 10-12/10/2019

Thank you for your attention!!!
Questions?



This research has been co-financed by the European Union (European Regional Development Fund - ERDF) and Greek national funds through the Operational Program "Competitiveness and Entrepreneurship" of the National Strategic Reference Framework (NSRF) (Project code OGSYH-13-999).

34th Conference of the Hellenic Society for Computational Biology and Bioinformatics (HSCBB)

Agricultural University of Athens, Athens, Greece, 10-12/10/2019

ΔΟΜΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ GPCRs ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

**Σταυρουλάκη Γ.Δ., Μπαλτούμας Φ.Α., Θεοδωροπούλου Μ.Κ., Οικονομίδου Β. Α.,
Χαμόδρακας Σ.Ι.**

*Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών
, Πανεπιστημιούπολη, Αθήνα 157 01*

Οι συζευγμένοι με G-πρωτεΐνες υποδοχείς (GPCRs) αποτελούν το μεγαλύτερο σύνολο μεμβρανικών υποδοχέων στον άνθρωπο, αποτελούμενο από περισσότερους από 800 υποδοχείς. Ωστόσο, ο καθορισμός της δομής τους με πειραματικές μεθόδους είναι δύσκολος με αποτέλεσμα να υπάρχουν πειραματικά προσδιορισμένες δομές για 25 μόνο υποδοχείς. Παρά την ύπαρξη της κοινής τοπολογίας των 7 διαμεμβρανικών α-ελίκων και του εξωκυττάρου αμινοτελικού άκρου, οι GPCRs εμφανίζουν ποικιλομορφία ως προς τον υποκαταστάτη που προσδένουν, και συμμετέχουν σε πληθώρα σημαντικών μεταγωγικών μονοπατιών, παίζοντας καθοριστικό ρόλο στην εύρυθμη λειτουργία του οργανισμού. Ο ρόλος τους καθιστά κύριους φαρμακευτικούς στόχους, με συνέπεια το 40% των σύγχρονων φαρμάκων να στοχεύει σε GPCRs και, συνεπώς, η μελέτη τους παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον. Ως μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs) ορίζονται οι κληρονομήσιμες αντικαταστάσεις ενός νουκλεοτιδίου σε άτομα ενός πληθυσμού, όταν εμφανίζονται με συχνότητα μεγαλύτερη του 1% σε ένα πληθυσμό. Όταν οι SNPs οδηγούν σε αλλαγή ενός αμινοξέος ονομάζονται παρερμηνεύσιμοι (missense) και σε ορισμένες περιπτώσεις συσχετίζονται με ασθένειες (pathogenic). Η παρούσα εργασία στοχεύει στη δημιουργία μοντέλων για GPCRs που εμφανίζουν παρερμηνεύσιμους SNPs και σχετίζονται με παθογένειες ενώ δεν έχουν 'λυθεί' πειραματικά, καθώς και την σύγκρισή τους, με τα μοντέλα των φυσικού τύπου υποδοχέων, για την παρατήρηση τυχόν στερεοδιαταξικών αλλαγών. Συγκεκριμένα, έγινε η συλλογή των πειραματικά προσδιορισμένων τρισδιάστατων δομών από την βάση δεδομένων PDB, καθώς και των αλληλουχιών των υποδοχέων-στόχων από την UniProtKB/SwissProt. Ακολούθως, δημιουργήθηκαν μοντέλα, μέσω ομόλογης προτυποποίησης, τα οποία ελέγχθηκαν ως προς την ποιότητά τους. Επίσης, έγινε έλεγχος στα μοντέλα που περιείχαν SNPs, σε σύγκριση με αυτά των φυσιολογικών υποδοχέων, για στερεοδιαταξικές αλλαγές. Μελλοντικός στόχος της εργασίας είναι η δημιουργία μοντέλων για περισσότερους υποδοχείς, καθώς και η περαιτέρω βελτιστοποίηση των ήδη υπαρχόντων μοντέλων.

Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης - ΕΤΠΑ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανταγωνιστικότητα & Επιχειρηματικότητα» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) (Κωδικός Έργου 09SYN- 13-999).

STRUCTURAL STUDIES OF GPCRs USING COMPUTATIONAL METHODS

Stavroulaki G.D., Baltoumas F.A., Theodoropoulou M.C., Iconomidou V. A., Hamodrakas S.J.

Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens, Panepistimiopolis, Athens 157 01

G-protein coupled receptors (GPCRs) constitute the largest group of membrane receptors in humans, with more than 800 known genes. However, the experimental determination of their structure is extremely difficult, and as a result 3D structures for only 25 receptors are available. Even though, a conserved motif of 7 transmembrane α -helices is present in all GPCRs, these proteins differ greatly in terms of ligand binding and physiological functions, responding to signals like hormones, odors and neurotransmitters. As a result of the great variety and the importance of their biological role, almost 40% of all prescription drugs on the market target GPCRs. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) are inherited single nucleotide substitutions among individuals of a species and are defined as such when they occur at a rate greater than 1% in a population. When the SNPs result to an amino acid substitution, they are called missense SNPs and, in some cases, they are reported to be associated with disease (pathogenic SNPs). The aim of this work was the construction of structural models for GPCRs on which missense pathogenic SNPs appear. Different models were created for the receptors with and without their SNPs, and these models were compared, in order to gain insights regarding conformational changes caused by these amino acid substitutions. Specifically, high quality GPCR 3D structures were retrieved from PDB, in order to use them as templates, and the sequences of the target receptors were retrieved from UniProtKB/SwissProt. Using homology modeling, models for both wild type and mutant receptors were generated and their quality was validated. Subsequently, wild type models were compared with the mutant ones, in order to find differences between them. Our future goals include the creation of models for more GPCRs, as well as, the optimization of the existing ones.

This research has been co-financed by the European Union (European Regional Development Fund – ERDF) and Greek national funds through the Operational Program “Competitiveness and Entrepreneurship” of the National Strategic Reference Framework (NSRF) (Project code 09SYN-13-999).