



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ

Συσχέτιση Γονιδιακών Μεταλλάξεων με την  
Λειτουργικότητα και τις Δομικές Αλλαγές που  
Προκύπτουν σε Πρωτεΐνες που Σχετίζονται με  
Αυτοάνοσα Νοσήματα με Μεθόδους Μοριακής  
Δυναμικής

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

της

ΝΑΣΤΑΖΙΑΣ-ΛΕΜΟΝΙΑΣ ΛΕΣΓΙΔΟΥ

**Επιβλέποντες:** Ηλίας Ηλιόπουλος (Καθηγητής), Μεταξία Βλάχση (Ερευνήτρια)

Αθήνα, Φεβρουάριος 2018



Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών  
Σχολή Θετικών Επιστημών  
Τμήμα Βιολογίας, Μεταπτυχιακό Βιοπληροφορικής

Συσχέτιση Γονιδιακών Μεταλλάξεων με την  
Λειτουργικότητα και τις Δομικές Αλλαγές που  
Προκύπτουν σε Πρωτεΐνες που Σχετίζονται με  
Αυτοάνοσα Νοσήματα με Μεθόδους Μοριακής  
Δυναμικής

## ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

της

ΝΑΣΤΑΖΙΑΣ-ΛΕΜΟΝΙΑΣ ΛΕΣΓΙΔΟΥ

**Επιβλέποντες:** Ηλίας Ηλιόπουλος (Καθηγητής), Μεταξία Βλάσση (Ερευνήτρια)

Εγκρίθηκε από την τριμελή εξεταστική επιτροπή την 2 Μαρτίου 2018.

(Υπογραφή)

(Υπογραφή)

(Υπογραφή)

.....  
Ηλίας Ηλιόπουλος  
Καθηγητής

.....  
Κωσταντίνος Βοργιάς  
Καθηγητής

.....  
Βασιλική Οικονομίδου  
Επίκουρη Καθηγήτρια

Αθήνα, Φεβρουάριος 2018









Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών  
Σχολή Θετικών Επιστημών  
Τμήμα Βιολογίας, Μεταπτυχιακό Βιοπληροφορικής

Copyright ©–All rights reserved Ναστάζια Λεμονιά Λεσγίδου, 2018.

Με την επιφύλαξη παντός δικαιώματος.

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης και να διατηρείται το παρόν μήνυμα.

Το περιεχόμενο αυτής της εργασίας δεν απηχεί απαραίτητα τις απόψεις του Τμήματος, του Επιβλέποντα, ή της επιτροπής που την ενέκρινε.

### **Υπεύθυνη Δήλωση**

Βεβαιώνω ότι είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής εργασίας, και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην πτυχιακή εργασία. Επίσης έχω αναφέρει τις όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε αυτές αναφέρονται ακριβώς είτε παραφρασμένες. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η πτυχιακή εργασία προετοιμάστηκε από εμένα προσωπικά ειδικά για τις απαιτήσεις του προγράμματος σπουδών του Τμήματος Βιολογίας, Μεταπτυχιακού Βιοπληροφορικής του Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθήνας.

(Υπογραφή)

.....

Ναστάζια Λεμονιά Λεσγίδου

# Περίληψη

Η ΤΥΚ2 είναι μια ATP εξαρτώμενη κινάση Τυροσίνης που ανήκει στην οικογένεια Janus Kinase (JAKS) και φαίνεται να παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην σηματοδότηση του μονοπατιού I IFN. Η δομή της ΤΥΚ2 μπορεί να χωριστεί σε δύο δομικά αυτοτελείς περιοχές, τον N-αμινοτελικό (κατάλοιπα: 889-979) και τον C-καρβοξυτελικό τερματικό λοβό (κατάλοιπα: 985-1176). Ο βρόχος ενεργοποίησης (κατάλοιπα 1047-1060) που εντοπίζεται στην αρχή του C-τερματικού λοβού, και περιέχει δύο διαδοχικές Τυροσίνες (Υ1054, Υ1055) που φωσφορυλιώνονται, έχει βρεθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση της ΤΥΚ2.

Σε πολλές πρόσφατες κλινικές μελέτες και μετα-ανάλυσεις αναφέρεται ότι ένας συγχεκριμένος νουκλεοτιδικός πολυμορφισμός (SNP) της κινάσης ΤΥΚ2 (rs34536443), που δημιουργείται όταν η Προλίνη 1104 αλλάζει σε Αλανίνη (P1104A), επηρεάζει την καταλυτική δραστηριότητα της ΤΥΚ2 και δρα σαν προστατευτική παραλλαγή ως προς αυτοάνοσα νοσήματα όπως συστηματικός λύκος, ρευματοειδή αρθρίτιδα, ενδομητρίωση και υπογονιμότητα, και σκλήρυνση κατά πλάκας.

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι να διερευνηθούν οι δομικές αλλαγές και οι σχέσεις δομής-λειτουργίας που συνδέονται με την παρουσία της παραλλαγής P1104A στην ΤΥΚ2. Για τον σκοπό αυτό συνδυάσαμε 3D μοντελοποίηση και προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής για την σύγκριση της φυσικής (wildtype) μορφής της κινάσης και της μορφής με την παραλλαγή P1104A (mutant) σε όλες τις μορφές της κινάσης κατά τον καταλυτικό της κύκλο (ΑΡΟ μορφή, παρουσία ΑΤΡ, παρουσία ΑΔΡ).

*στην μνήμη της μητέρας μου*

# Ευχαριστίες

Η ανάλυση της παρούσας εργασίας έγινε στο εργαστήριο Δομής Πρωτεϊνών και Μοριακής Μοντελοποίησης του Ινστιτούτου Βιοεπιστημών και Εφαρμογών του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. Δημόκριτος με την επίβλεψη της Δρ. Μεταξίας Βλάσση, την οποία Θα ήθελα να ευχαριστήσω για την επιστημονική, πνευματική και ηθική υποστήριξη και καθοδήγηση που μου παρείχε καθ' όλη την διάρκεια της εκπόνησης της ερευνητικής εργασίας. Ιδιαίτερη μνεία αξίζει ο επιβλέπων καθηγητής κ.Ηλίας Ηλιόπουλος, Καθηγητής στο Τμήμα Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, για την επίβλεψη αυτής της διπλωματικής εργασίας και την εξαιρετική συνεργασία που είχαμε. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την καθοδήγηση και την ηθική συμπαράσταση που μου προσέφεραν όλα αυτά τα χρόνια.



# Περιεχόμενα

|                                                 |           |
|-------------------------------------------------|-----------|
| Περίληψη                                        | i         |
| Ευχαριστίες                                     | iii       |
| Περιεχόμενα                                     | vi        |
| Κατάλογος Σχημάτων                              | 1         |
| <b>1 Εισαγωγή</b>                               | <b>3</b>  |
| 1.1 Εισαγωγή στις Πρωτεϊνικές Κινάσες . . . . . | 3         |
| 1.2 Ανατομία μιας Πρωτεϊνικής Κινάσης . . . . . | 4         |
| 1.3 Ενεργές και μη Ενεργές δομές . . . . .      | 7         |
| 1.4 Το Μονοπάτι JAK-STAT . . . . .              | 9         |
| 1.5 Η Οικογένεια JAK . . . . .                  | 10        |
| 1.6 ΤΥΚ2, Δομή και Λειτουργία . . . . .         | 11        |
| 1.6.1 Δομή της ΤΥΚ2 . . . . .                   | 11        |
| 1.6.2 Μονοπάτια της ΤΥΚ2 . . . . .              | 13        |
| 1.6.3 Λειτουργία - 'Μοριακό φρένο' . . . . .    | 17        |
| 1.6.4 Πολυμορφισμοί της ΤΥΚ2 . . . . .          | 17        |
| <b>2 Προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής</b>       | <b>21</b> |
| 2.1 Ιστορική Αναδρομή . . . . .                 | 21        |
| 2.2 Εισαγωγή στην Μοριακή Δυναμική . . . . .    | 22        |
| 2.2.1 Δυναμικά Πεδία- Force Fields . . . . .    | 23        |
| 2.2.2 Διαλύτης . . . . .                        | 25        |
| 2.2.3 Αλγόριθμοι Ολοκλήρωσης . . . . .          | 25        |
| 2.3 Λειτουργία του GROMACS . . . . .            | 25        |
| <b>3 Πειραματική Διαδικασία</b>                 | <b>29</b> |
| 3.1 Κατασκευή Αρχικών 3D Μοντέλων . . . . .     | 29        |
| 3.2 Προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής . . . . .  | 30        |

|          |                                                                                              |           |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.3      | Ανάλυση Προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής . . . . .                                           | 35        |
| <b>4</b> | <b>Αποτελέσματα</b>                                                                          | <b>39</b> |
| 4.1      | RMSD Ανάλυση . . . . .                                                                       | 39        |
| 4.2      | RMSF Ανάλυση . . . . .                                                                       | 42        |
| 4.3      | RMSDev Ανάλυση . . . . .                                                                     | 45        |
| 4.4      | Ανάλυση της σχετικής θέσης των N- και C- λοβών . . . . .                                     | 47        |
| 4.5      | Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών της Μοριακής Κίνησης (Principal Component Analysis, PCA) . . . . . | 51        |
| 4.6      | Εντοπισμός Αντιπροσωπευτικών Δομών των Προσομοιώσεων cluster analysis . . . . .              | 57        |
| 4.6.1    | Περιοχή Φωσφορυλίωσης Υ1054-Υ1055 . . . . .                                                  | 57        |
| 4.6.2    | Ανάλυση Μοριακού Φρένου (Molecular Break) . . . . .                                          | 60        |
| <b>5</b> | <b>Συμπεράσματα</b>                                                                          | <b>63</b> |

# Κατάλογος Σχημάτων

|      |                                                                                                                                                                                        |    |
|------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.1  | Φωσφορυλίωση μιας κινάσης Σερίνης-Το ATP παραχωρεί μια από τις τρεις φωσφορικές του ομάδες στην κινάση Σερίνης και μετατρέπεται σε ADP (www.ucdavis.edu).                              | 3  |
| 1.2  | Φυλογενετικό δέντρο 518 κινασών του ανθρώπινου οργανισμού (Manning et. al 2002).                                                                                                       | 5  |
| 1.3  | Σταθερή τρισδιάστατη δομή πρωτεϊνικής κινάσης (Nature/Chico et. al 2009).                                                                                                              | 6  |
| 1.4  | Αναπαράσταση αλληλεπιδράσεων μεταξύ κινάσης (PKA), ATP και υποστρώματος (Kornev et. al 2006).                                                                                          | 7  |
| 1.5  | Αναπαράσταση εναλλαγής ενεργής (A) και ανενεργής (B) μορφής (Kornev et. al 2006).                                                                                                      | 8  |
| 1.6  | Το μονοπάτι Jak-Stat ( Yamaoka et al.2004).                                                                                                                                            | 9  |
| 1.7  | Η δομή μιας Jak ( Yamaoka et al.2004).                                                                                                                                                 | 10 |
| 1.8  | Η δομή της ΤΥΚ2 .                                                                                                                                                                      | 11 |
| 1.9  | Η περιοχή δέσμευσης του υποστρώματος docking site .                                                                                                                                    | 12 |
| 1.10 | Τα μονοπάτια A) IFN-a, ) IFN-b (dendrou et al. 2016).                                                                                                                                  | 13 |
| 1.11 | Το μονοπάτι IL-6 (dendrou et al. 2016).                                                                                                                                                | 14 |
| 1.12 | Το μονοπάτι IL-10 (dendrou et al. 2016).                                                                                                                                               | 14 |
| 1.13 | Το μονοπάτι IL-13 (dendrou et al. 2016).                                                                                                                                               | 15 |
| 1.14 | Το μονοπάτι IL-12-IL-23 (dendrou et al. 2016).                                                                                                                                         | 16 |
| 1.15 | Το μοριακό φρένο στην κινάση FGFR2K Chen et al. 2007.                                                                                                                                  | 17 |
| 1.16 | Οι πολυμορφισμοί της ΤΥΚ2.                                                                                                                                                             | 18 |
| 2.1  | Το δυναμικό Lennard-Jones ως προς την απόσταση των αλληλεπιδρώντων ζευγών ατόμων.                                                                                                      | 24 |
| 2.2  | Αλληλεπιδράσεις δεσμών. όπου A) Ομοιοπολικοί δεσμοί, B) Οι αλληλεπιδράσεις δεσμού γωνίας, C) οι αλληλεπιδράσεις διέδρων γωνιών και D) Οι αλληλεπιδράσεις διέδρων γωνιών (ακατάλληλων). | 24 |
| 2.3  | Τα τρία στάδια που ακολουθεί μια προσομοίωση μοριακής δυναμικής στο Gromacs.                                                                                                           | 26 |



|     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |    |
|-----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1 | Η κρυσταλλική δομή της ΤΥΚ2, Το χρώμα του μορίου σχετίζεται με το b factor pdb ID :4gvj. . . . .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 30 |
| 3.2 | Η ΤΥΚ2 APO μορφής (MD01), τοποθετημένη στο δωδεκάεδρο κουτί, τα άτομα Na (μπλε σφαίρες) που εξουδετερώνουν το φορτίο της και ο διαλύτης που την περιβάλλει (κόκκινα μόρια νερού). . . . .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 31 |
| 3.3 | Το βήμα ελαχιστοποίησης της ενέργειας για 100ps της ΤΥΚ2 στην APO μορφή. . . . .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 32 |
| 3.4 | Εξισορρόπηση του συστήματος σε συνθήκες NVT με T=300K υπό τον θερμοστάτη Berendsen για 100ps. . . . .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 33 |
| 3.5 | Εξισορρόπηση του συστήματος σε συνθήκες NPT με P=1bar υπο τον βαροστάτη Parrinello-Rahman barostat για 100ps. . . . .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 34 |
| 4.1 | $C^{\alpha}$ RMSD ανάλυση κατά την διάρκεια των προσομοιώσεων (100ns) ΜΔ για το wildtype (αριστερά στην εικόνα) και το mutant (δεξιά στην εικόνα) και για τις τρεις μορφές της , APO (πάνω), παρουσία ATP (μέση), παρουσία ADP (κάτω). . . . .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 41 |
| 4.2 | RMSF ανάλυση (μέσοι όροι των προσομοιώσεων για περιπτώσεις που έγιναν παραπάνω απο μία) για τις τρεις διαφορετικές μορφές APO, ATP, ADP για 60-100 ns, για το wildtype (με ροζ) και το mutant (με μπλε). Με πράσινα πλαίσια αναπαριστώνται οι περιοχές των $\alpha$ -ελίκων, C, E, F και 11 ενώ τα πλαίσια με μαύρο, μοβ, ροζ οριοθετούν τις περιοχές του βρόχου ενεργοποίησης, του βρόχου γλυκίνης και του βρόχου δέσμευσης των μαγνησίων αντίστοιχα. Με κόκκινη διακεκομμένη γραμμή φαίνεται η περιοχή του αμινοξέως 1104 που μεταλλάσσεται από Pro σε Ala. Τέλος, οι κόκκινοι αστερίσκοι δηλώνουν τις τυροσίνες 1054-1055 των οποίων η φωσφορυλίωση έχει σημασία για την ενεργοποίηση της ΤΥΚ2 . . . . . | 43 |
| 4.3 | Οι διαφορές των μέσων RMSF του wildtype- του mutant $RMSF_{wildtype} - RMSF_{mutant}$ για τις τρεις μορφές τους APO, παρουσία ATP, παρουσία ADP για 60-100 ns. Η οριοθέτηση των περιοχών της ΤΥΚ2 είναι η ίδια με αυτήν στο Σχήμα 4.2 . . . . .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 44 |
| 4.4 | $C^{\alpha}$ RMSDev ανάλυση για τις τρεις διαφορετικές μορφές APO, ATP, ADP για 60-100 ns, για το wildtype (με ροζ) και το mutant (με μπλε). Η οριοθέτηση των περιοχών που αναφέρονται στο κείμενο είναι όπως το Σχήμα 4.2 . . . . .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 46 |
| 4.5 | Η μεταβολή της απόστασης μεταξύ των N- και C- λοβών κατά την διάρκεια όλων των επιμέρους προσομοιώσεων ΜΔ για την APO μορφή της ΤΥΚ2. Α) Η μεταβολή της απόστασης για τις (τρεις) επιμέρους προσομοιώσεις ΜΔ για το wildtype (μπλε) και το mutant (κόκκινο). Β) Οι αντίστοιχη μέση απόσταση για το wildtype (μπλε) και το mutant (κόκκινο). . . . .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 48 |

- 4.6 A) Η γωνία που επιλέχθηκε για την μελέτη του ανοίγματος των δύο λοβών με τα κατάλοιπα L932-I1007-F1108 στην δομή της TTK2 4GVJ. B) Η κατανομή της γωνίας για την APO κατάσταση 60-100 ns για τις τρεις προσομοιώσεις MΔ της wildtype δομής (μπλε) και τις τρεις προσομοιώσεις MΔ της mutant δομής (κόκκινο). . . . . 49
- 4.7 Αναπαράσταση κορδέλας της υπέρθεσης 3D μοντέλων δομής (ενεργειακά βελτιστοποιημένες αντιπροσωπευτικές δομές) με την αρχική δομή (PDB ID: 4GVJ) για το χρονικό διάστημα 60-100 ns των τριών προσομοιώσεων MΔ της APO μορφής για το wildtype (πάνω) και το mutant (κάτω). Με ράβδους αναπαριστώνται τα κατάλοιπα L932-I1007-F1108 της αντιπροσωπευτικής γωνίας για το άνοιγμα/κλείσιμο των N- C- λοβών. . . . . 50
- 4.8 Απεικόνιση κύριων συνιστωσών της κίνησης στις μέσες δομές για την περιοχή 60-100 ns των τριών προσομοιώσεων MΔ της APO μορφής για το wildtype (πάνω) και το mutant (κάτω). Ο βρόχος ενεργοποίησης δείχνεται με βέλος. Οι κύριες κινήσεις μεταφράστηκαν χρωματικά σε κλίμακα από μπλε προς κόκκινο για μικρού εύρους προς μεγάλου εύρους ατομικές διακυμάνσεις αντίστοιχα. . . . . 53
- 4.9 Απεικόνιση κύριων συνιστωσών της κίνησης με υπέρθεση δομών, για την περιοχή 60-100 ns των τριών προσομοιώσεων MΔ της APO μορφής για το wildtype (πάνω) και το mutant (κάτω). . . . . 54
- 4.10 Απεικόνιση κύριων συνιστωσών της κίνησης στις μέσες δομές για το χρονικό διάστημα 60-100 ns των τριών προσομοιώσεων MΔ της APO μορφής για το wildtype (πάνω) και το mutant (κάτω) στην περιοχή της α-έλικα-11. Η χρωματική κλίμακα που χρησιμοποιήθηκε είναι η ίδια με το Σχήμα 4.8. . . . . 55
- 4.11 Απεικόνιση κύριων συνιστωσών της κίνησης με υπέρθεση δομών για το χρονικό διάστημα 60-100 ns των τριών προσομοιώσεων MΔ της APO μορφής για το wildtype (πάνω) και το mutant (κάτω) στην περιοχή της α-έλικα-11. . . . . 56
- 4.12 3D μοντέλα δομής (ενεργειακά βελτιστοποιημένες αντιπροσωπευτικές δομές) που έχουν προκύψει από τις τρεις προσομοιώσεις MΔ (MD01, MD02, MD03) για το wildtype (πάνω) και το mutant (κάτω) στην APO μορφή και στην περιοχή των τυροσινών T1054-T1055 (αναπαρίστανται με sticks). Οι δομές αναπαρίστανται ως κορδέλες με κόκκινο χίτρινο και πράσινο, για τις α-έλικες, β-κλώνους, και βρόχους αντίστοιχα. . . . . 58

- 4.13 Εστίαση της εικόνας 4.12 στην περιοχή των τυροσινών. Μόνο η περιοχή στην γειτονιά των τυροσινών παρουσιάζεται για λόγους καθαρότητας σε αυτή την εικόνα. Η αναπαράσταση και ο χρωματισμός που χρησιμοποιείται είναι όπως στην εικόνα 4.12. . . . . 59
- 4.14 Τα τρία μοντέλα δομής wildtype (πάνω) και τα τρία μοντέλα δομής mutant (κάτω) στην APO μορφή σε διερεύνηση του μοριακού φρένου K961-E979-K1038. . . . . 61
- 4.15 Σε αυτή την εικόνα παρουσιάζεται μόνο η περιοχή των τριών καταλοίπων για λόγους καθαρότητας. Τα τρία μοντέλα δομής wildtype (πάνω) και τα τρία μοντέλα δομής mutant (κάτω) στην APO μορφή σε διερεύνηση του μοριακού φρένου K961-E979-K1038. . . . . 62

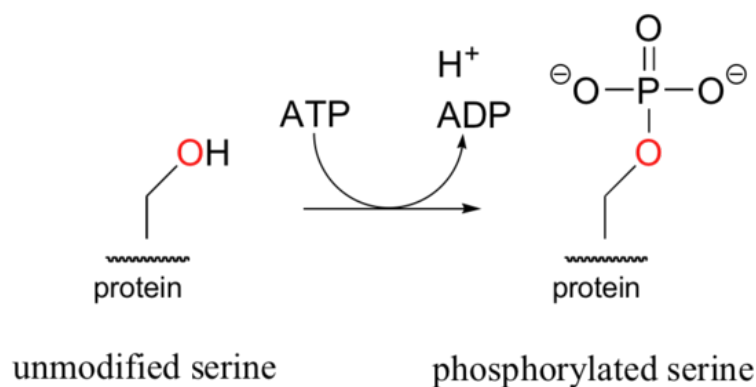


# Κεφάλαιο 1

## Εισαγωγή

Σε αυτό το γενικό εισαγωγικό κεφάλαιο αναλύονται οι βασικές βιολογικές έννοιες που διέπουν αυτήν την ερευνητική εργασία με σκοπό ο αναγνώστης να κατανοήσει το βιολογικό υπόβαθρο της υπό μελέτη κινάσης ΤΥΚ2. Αρχικά παραθέτουμε κάποιες γενικές πληροφορίες για τις πρωτεϊνικές κινάσες, τον ρόλο τους και την κατηγοριοποίηση τους. Έπειτα θα αναλυθεί η δομή και λειτουργία τους, και τέλος θα περιγραφούν με μεγαλύτερη λεπτομέρεια οι κινάσες τυροσίνης, η JAK οικογένεια κινασών και η ΤΥΚ2.

### 1.1 Εισαγωγή στις Πρωτεϊνικές Κινάσες



Σχήμα 1.1: Φωσφορυλίωση μιας κινάσης Σερίνης-Το ATP παραχωρεί μια από τις τρεις φωσφορικές του ομάδες στην κινάση Σερίνης και μετατρέπεται σε ADP ([www.ucdavis.edu](http://www.ucdavis.edu)).

Οι πρωτεϊνικές κινάσες ανήκουν στην κατηγορία των φωσφατασών, είναι ένζυμα τα οποία είναι υπεύθυνα για την καταλυτική δραστηριότητα και για την μετάδοση ενδοκυτταρικών μηνυμάτων από μια πρωτεΐνη σε μια άλλη. Οι πρωτεϊνικές κινάσες αλ-

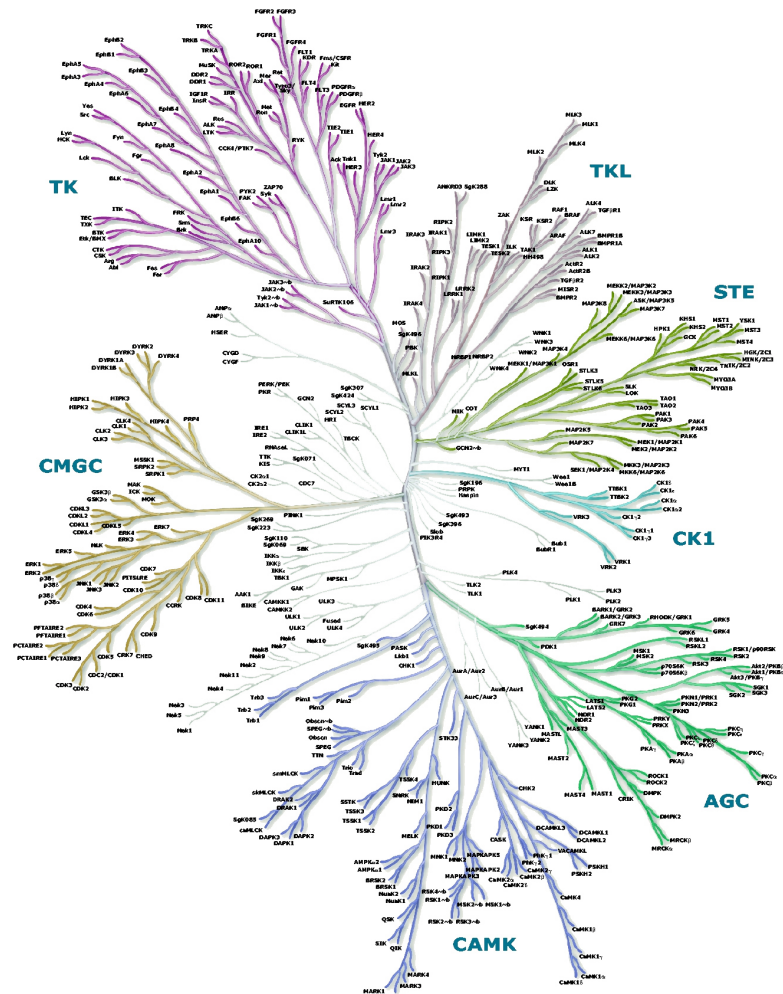
λοιώνουν την ατομική δομή των στόχων τους μεταφέροντας μια φωσφορική ομάδα από την Αδενοσίνη-5'-τριφωσφορική ομάδα ( ATP- Adenosine-5'-Triphosphate ) στην υδρόξυλική ομάδα μιας Σερίνης, Θρεονίνης ή Τυροσίνης, η διαδικασία αυτή λέγεται φωσφορυλίωση (Σχήμα 1.1). Η φωσφορυλίωση συνοδεύεται με αλλαγές των βιολογικών ιδιοτήτων της πρωτεΐνης στόχου. Αφού θα προστεθεί η φωσφορική ομάδα στο κατάλοιπο-στόχο, δημιουργούνται δομικές αλλαγές στην πρωτεΐνη οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν την ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση ενζύμων όπως και να επηρεάσουν την σταθερότητα πρωτεϊνικών μορίων. Η οικογένεια των πρωτεϊνικών κινασών είναι μια από τις μεγαλύτερες οικογένειες πρωτεϊνών των ευκαρυωτικών κυττάρων ( Hanks and Hunter 1995). Σύμφωνα με μια ευρεία γονιδιακή μελέτη (Manning et al.2002) διαπιστώθηκε ότι υπάρχουν περισσότερα από 500 γονίδια πρωτεϊνικών κινασών (Σχήμα 1.2), τα οποία συνιστούν το 1.7% του ανθρώπινου γονιδιώματος. Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνικών κινασών γίνεται με βάση ποιο κατάλοιπο φωσφορυλιώνουν, επομένως διαχωρίζονται σε κινάσες Τυροσίνης, Θρεονίνης και Σερίνης. Οι τρεις αυτές κατηγορίες χωρίζονται στις εξής υποκατηγορίες (Σχήμα 1.2):

- AGC: Η ομάδα αυτή αντιπροσωπεύεται από τις πιο ευρέως γνωστές κινάσες PKA, PKC, PKG.
- CAMK: Περιέχει την ασβέστιο-καλμοδουλίνη εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση.
- CK1: Περιέχει τις κινάσες κασεΐνης.
- CMGC: Περιέχει την οικογένεια των κυκλικά εξαρτώμενων κινασών Cdk's, την οικογένεια κινασών MAP και την κινάση κασεΐνης II.
- STE: Περιέχει τις ομόλογες κινάσες της μαγιάς Sterile 7, Sterile 11, Sterile 20.
- TKL: Περιέχει τις κινάσες τυροσίνης.

Οι περισσότερες πρωτεϊνικές κινάσες όχι μόνο είναι στόχοι φωσφορυλίωσης αλλά φωσφορυλιώνουν άλλες κινάσες οι ίδιες. Έτσι η μεγάλη ποικιλία των κινασών στους έμβιους οργανισμούς δημιουργεί διάφορα απλά και πολύπλοκα μονοπάτια μεταφοράς σήματος που συνθέτουν τις λειτουργίες και τα χαρακτηριστικά τους.

## 1.2 Ανατομία μιας Πρωτεϊνικής Κινάσης

Αν και οι πρωτεϊνικές κινάσες έχουν μεγάλη ποικιλία σε μήκος, αμινοξική αλληλουχία και δομή των αμίνo- και καρβοξυ- τελικών άκρων τους, είναι γεγονός ότι ο πυρήνας των πρωτεϊνικών κινασών έχει κοινές αμινοξικές αλληλουχίες που διατηρούνται με την πάροδο του χρόνου και συναντούνται στις περισσότερες πρωτεϊνικές κινάσες, όπως και



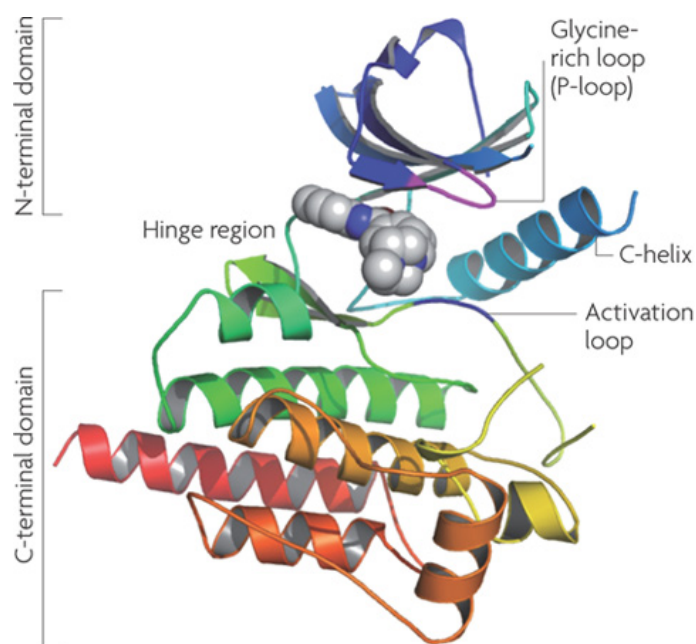
Σχήμα 1.2: Φυλογενετικό δέντρο 518 κινασών του ανθρώπινου οργανισμού (Manning et. al 2002).

κοινή δευτεροταγής δομή. Η πρωτεϊνική περιοχή που συντηρείται αποτελείται περίπου από 250 αμινοξέα, τα οποία κατανέμονται σε δύο δομικά αυτοτελείς περιοχές, τους N- και C-τερματικούς λοβούς (Σχήμα 1.3).

Ο N-τερματικός λοβός είναι ο μικρότερος εκ των δύο και αποτελείται περίπου από 100 αμινοξέα. Συντίθεται από ένα β-βαρέλι πέντε β-πτυχωτών επιφανειών και μια α-έλικα η οποία συντηρείται σχεδόν εξολοκλήρου σε όλη την υπερ-οικογένεια των πρωτεϊνικών κινασών. Ο C-τερματικός λοβός αποτελείται μόνο από α-έλικες και φιλοξενεί την θέση πρόσδεσης του πεπτιδικού υποστρώματος. Παρακάτω δίνονται οι περιοχές των πρωτεϊνικών κινασών που διατηρούνται και έχουν λειτουργική σημασία (Σχήμα 1.3).

- **Η θέση πρόσδεσης του ATP:**

Στην περιοχή της ένωσης των δύο λοβών δημιουργείται μια "έσοχή" η οποία είναι η θέση πρόσδεσης της Αδενοσίνης-5'-τριφωσφορικής ομάδας (ATP).



Nature Reviews | Drug Discovery

Σχήμα 1.3: Σταθερή τρισδιάστατη δομή πρωτεϊνικής κινάσης (Nature/Chico et. al 2009).

- **Ο βρόχος ενεργοποίησης:**

Ο όρος αυτός αναφέρθηκε πρώτη φορά από τους Taylor και Radzio-Andzelm (Taylor, Radzio-Andzelm 1994) και αφορά το βρόχο μεταξύ δύο πολύ συντηρημένων περιοχών, την αμινοξική αλληλουχία DFG και την APE. Ο βρόχος ενεργοποίησης βρίσκεται στον C-τερματικό λοβό και όπως γίνεται αντιληπτό από την ονομασία του, ρόλος του είναι να ενεργοποιεί και να απενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση.

- **Βρόχος Γλυκίνης:**

Είναι ένας βρόχος στο N-τερματικό λοβό με αλληλουχία GxGxxG όπου G είναι η Γλυκίνη και x ένα οποιοδήποτε αμινοξύ. Ο ρόλος του βρόχου γλυκίνης είναι να συγκρατεί το ATP στην θέση πρόσδεσης του.

- **Βρόχος κατάλυσης:**

Έχει σταθερή ακολουθία HRD, βρίσκεται στον C-τερματικό λοβό και το ασπαρτικό οξύ της ακολουθίας δρα σαν μια καταλυτική βάση ώστε να ελευθερωθεί το οξυγόνο από το υδροξύλιο του υποστρώματος.

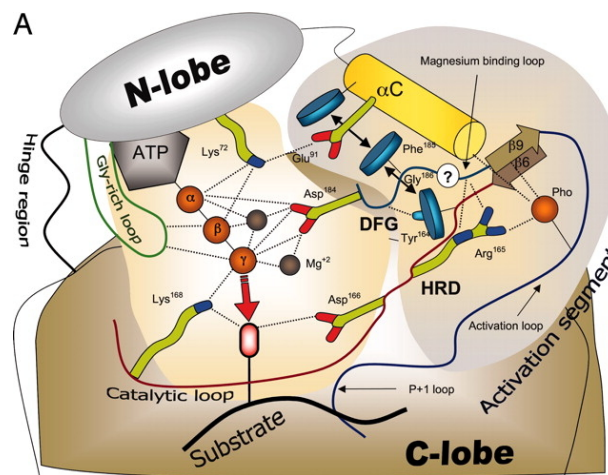
- **Περιοχή πρόσδεσης του υποστρώματος:** Η πιο ποικιλόμορφη περιοχή των κινάσεων, βρίσκεται επίσης στον C-τερματικό λοβό και ρόλος της είναι να



δεσμεύει το υποστρώμα.

### 1.3 Ενεργές και μη Ενεργές δομές

Σήμερα έχουν λυθεί πολλές ενεργές και μη ενεργές δομές, γεγονός που σιγά σιγά διαφωτίζει τους κανόνες που διέπουν την λειτουργία μιας κινάσης. Όπως προαναφέρθηκε, η λειτουργία μιας πρωτεϊνικής κινάσης βασίζεται στην φωσφορυλίωση ενός στόχου που γίνεται με την μεταφορά μιας φωσφορικής ομάδας από το ATP στην πρωτεΐνη-στόχο της κινάσης. Ως εκ τούτου, για να περάσει μια κινάση από ανενεργή σε ενεργή μορφή είναι απαραίτητη η πρόσδεση του ATP, η πρόσδεση του υποστρώματος και η αλλαγή της διαμόρφωσης της κινάσης.



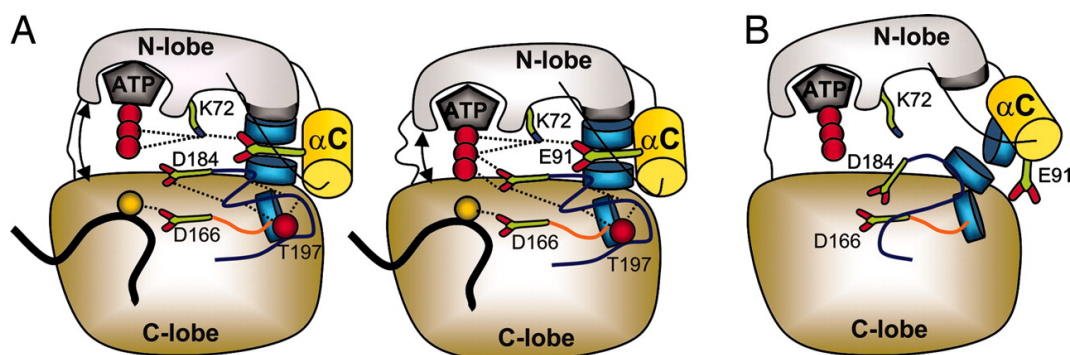
Σχήμα 1.4: Αναπαράσταση αλληλεπιδράσεων μεταξύ κινάσης (PKA), ATP και υποστρώματος (Kornev et. al 2006).

Υπάρχουν δύο λειτουργικά στάδια που ακολουθεί μια κινάση κατά το ενεργειακό της μονοπάτι. Το ένα είναι η μετατροπή μιας ανενεργού διαμόρφωσης σε μια διαμόρφωση κατάλυσης. Η ενεργοποίηση της κινάσης περιλαμβάνει την αλλαγή του προσανατολισμού της έλικας αC του N-λοβού και του βρόχου ενεργοποίησης που βρίσκεται στον C- λοβό.

Το άλλο στάδιο συναντάται αφού ενεργοποιηθεί η κινάση, όπου κάνει αλληπάλληλες εναλλαγές ανάμεσα στην ενεργή και ανενεργή κατάσταση καθώς διανύει τον καταλυτικό κύκλο της λειτουργίας της (Kornev et al. 2006). Οι εναλλαγές αυτές περιγράφονται στο Σχήμα 1.5. Η ενεργή μορφή αναπαρίσταται από την κατάσταση A, στην οποία το υποστρώμα είναι συνδεδεμένο και η κινάση έχει τις μέγιστες δυνατές αλληλεπιδράσεις με το ATP. Ένα συντηρημένο Γλουταμικό της αC-έλικας (E91 στην PKA) σχηματίζει

δεσμό υδρογόνου με μια Λυσίνη του N- λοβού (K72 στην PKA), παράλληλα η ίδια Λυσίνη σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με την πρώτη και δεύτερη φωσφορική ομάδα του ATP. Η τρίτη φωσφορική ομάδα του ATP σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με μια Λυσίνη του βρόχου ενεργοποίησης (K168 στην PKA) η οποία αλληλεπιδρά με το υπόστρωμα (Σχήμα 1.4). Επιπλέον, οι δύο διαδοχικές τυροσίνες που βρίσκονται στο βρόχο ενεργοποίησης και με δεσμούς υδρογόνου σχηματίζουν την δευτεροταγή δομή της β-επιφάνειας που την συνθέτουν οι β-6 και β-9 κλώνοι, πρέπει να φωσφορυλιωθούν (Σχήμα 1.4). Στην κατάσταση B, το υπόστρωμα αφαιρείται, οι δεσμοί υδρογόνου θραύονται, ο N- λοβός ανοίγει και η αC-έλικα αλλάζει προσανατολισμό.

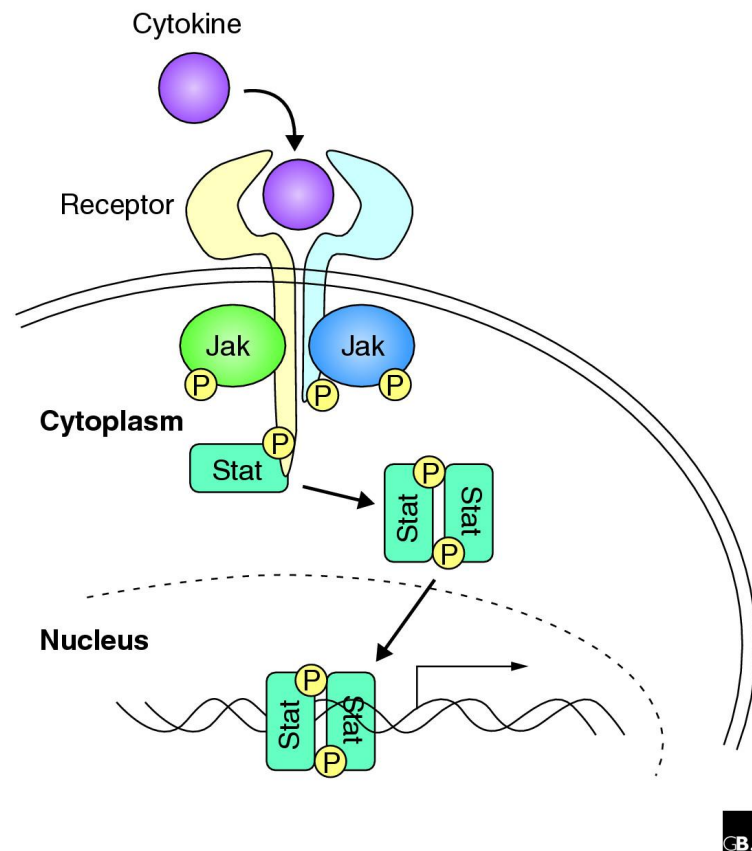
Για την ενεργοποίηση μιας διαμόρφωσης λοιπόν, το πρώτο βήμα είναι ο N λοβός να α-



Σχήμα 1.5: Αναπαράσταση εναλλαγής ενεργής (A) και ανενεργής (B) μορφής (Kornev et. al 2006).

νοίξει ώστε να προσδεθεί το ATP στην θέση πρόσδεσης του. Στην συνέχεια, πρέπει να προσδεθεί το υπόστρωμα και να σχηματιστούν οι μέγιστοι δεσμοί υδρογόνου. Έπειτα, το ATP θα προσφέρει την απαιτούμενη ενέργεια για την φωσφορυλίωση του στόχου της κινάσης με την απώλεια της τελευταίας φωσφορικής ομάδας του, η διασπασμένη φωσφορική ομάδα θα μεταφερθεί στην πρωτεΐνη στόχο της κινάσης προκαλώντας αλλαγή στην διαμόρφωσή της λόγω του αρνητικού ηλεκτροστατικού της φορτίου. Το γεγονός αυτό μπορεί να τροποποιήσει τη λειτουργία της πρωτεΐνης με πολλούς τρόπους, μπορεί να ενεργήσει σαν μοριακός διακόπτης on/off με αύξηση ή μείωση της ενζυματικής δραστηριότητας της πρωτεΐνης, να αλλάξει την σταθερότητα της τριτοταγούς δομής της ή ακόμη και να οδηγήσει την πρωτεΐνη στην καταστροφή της (Kornev et al. 2006).

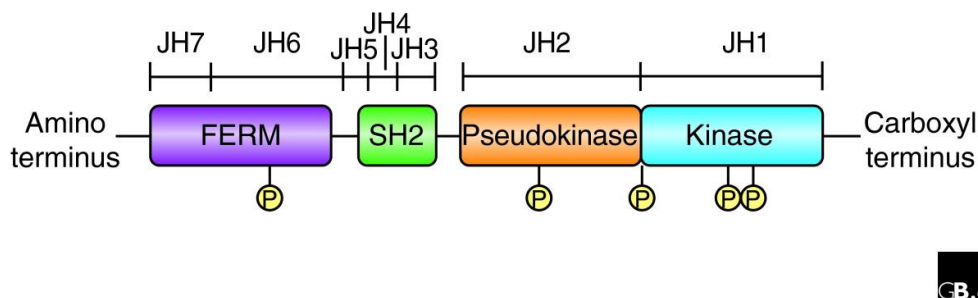
## 1.4 Το Μονοπάτι JAK-STAT



Σχήμα 1.6: Το μονοπάτι Jak-Stat ( Yamaoka et al.2004).

Το μονοπάτι Jak-Stat ανακαλύφθηκε την δεκαετία του 1990. Αν και σήμερα διανύουμε την τρίτη δεκαετία από την ανακάλυψή του, είναι ακόμα ένα πολλά υποσχόμενο ερευνητικό πεδίο. Είναι ένα μονοπάτι μεταγωγής σήματος το οποίο απαρτίζεται από τις οικογένειες JAK- (Janus kinases/Just Another Kinases), STAT(Signal Transducers and Activators of Transcription) και ενεργοποιείται όταν διαφορετικές κυτοκίνες ή ιντερφερόνες (IFN) (υποκαταστάτες) συνδέονται στην εξωκυτταρική περιοχή ειδικών κυτταρικών υποδοχέων. Η αλληλεπίδραση αυτή οδηγεί σε διμερισμό ή και πολυμερισμό των υπομονάδων των κυτταρικών υποδοχέων οι οποίες με την σειρά τους φέρνουν πιο κοντά μεταξύ τους Jak κινάσες που δεν είναι συνδεδεμένες ομοιοπολικά με τα ενδοκυτταρικά πεδία. Αυτό οδηγεί σε ενεργοποίηση της Jak κινάσης, η οποία αφού ενεργοποιηθεί, φωσφορυλιώνει κατάλοιπα τυροσίνης σε υποδοχείς ενδοκυτταρικών περιοχών και σε υποστρώματα τους τις Stats. Αφού λοιπόν φωσφορυλιωθεί μια Stat οδηγείται σε διμερισμό και μετατοπίζεται προς τον πυρήνα, όπου και δεσμεύεται από ειδικές αλληλουχίες DNA και επάγουν τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων τους (Kiu and Nicholson, 2012, Stark and Darnell, 2012, Heim, 1999) (Σχήμα 1.6)

## 1.5 Η Οικογένεια JAK



Σχήμα 1.7: Η δομή μιας Jak ( Yamaoka et al.2004).

Η οικογένεια JAK, είναι μια μεγάλη οικογένεια πρωτεϊνικών κινασών τυροσίνης της οποίας το μέγεθος ποικίλει από 120 μέχρι και 140 kDa. Χαρακτηριστικό τους είναι μια αμινοτελική περιοχή περίπου 600 αμινοξέων και δύο αυτοτελή δομικά τμήματα από 250 αμινοξέα το καθένα που συνδέονται μεταξύ τους (Pellegrini and Dusanter-Fourt 1997). Στα θηλαστικά έχουν αναγνωριστεί τέσσερις πρωτεϊνικές κινάσες της JAK οικογένειας, οι JAK1, JAK2, JAK3 και TYK2 και έχουν παρόμοια δομή (Firmbach-Kraft et al.1990, Wilks 1989, Wilks 1991, Harpur et al. 1992, Krolewski et al.1990). Η πρωτοταγής δομή μιας JAK, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 1.7 αποτελείται από τέσσερις περιοχές αρχίζοντας από το αμινο- τελικό άκρο, την FERM στην οποία υλοποιείται η πρόσδεση στους υποδοχείς των κυτοκινών, την SH2, μια περιοχή Ψευδοκινάσης και έπεται η περιοχή της κινάσης. Η περιοχή SH2 φαίνεται να είναι αρκετά λειτουργική, έχει παρατηρηθεί ότι σε όλες τις JAKS εκτός της TYK2 η SH2 προσδένει μοτίβα φωσφο- τυροσίνης. Στην περίπτωση της TYK2 η παρουσία μιας Ιστιδίνης αντί για Αργινίνη στην περιοχή πρόσδεσης της φωσφο-τυροσίνης εμποδίζει την πρόσδεσή της. Γι αυτόν τον λόγο η SH2 περιοχή της TYK2 σχετίζεται με ένα πολύ διαφορετικούς στόχους από τις JAKS και πιθανόν η δράση της να μην πυροδοτείται από φωσφορυλίωση και να δεσμεύει τυροσίνες που δεν έχουν φωσφορυλιωθεί (Al-Lazikani et al. 2001). Οι περιοχές της ψευδοκινάσης και η FERM ρυθμίζουν την καταλυτική δραστηριότητα της JAK και αλληλεπιδρούν με την περιοχή της κινάσης η οποία αν και δεν διαθέτει καταλυτική περιοχή δέσμευσης ATP έχει σημαντικό ρόλο στην δράση της JAK κινάσης. Η FERM περιοχή αποτελείται από τρεις λοβούς, τους F1, F2, F3 και ο κάθε λοβός καταλήγει και σε ένα διαφορετικό δίπλωμα (Pearson et al. 2000). Οι JAKS έχουν την ικανότητα αυτοφωσφορυλίωσης σε πολλαπλές τοποθεσίες (P), δύο από τις οποίες βρίσκονται στον βρόχο ενεργοποίησης της κινάσης (Yamaoka et al.2004).

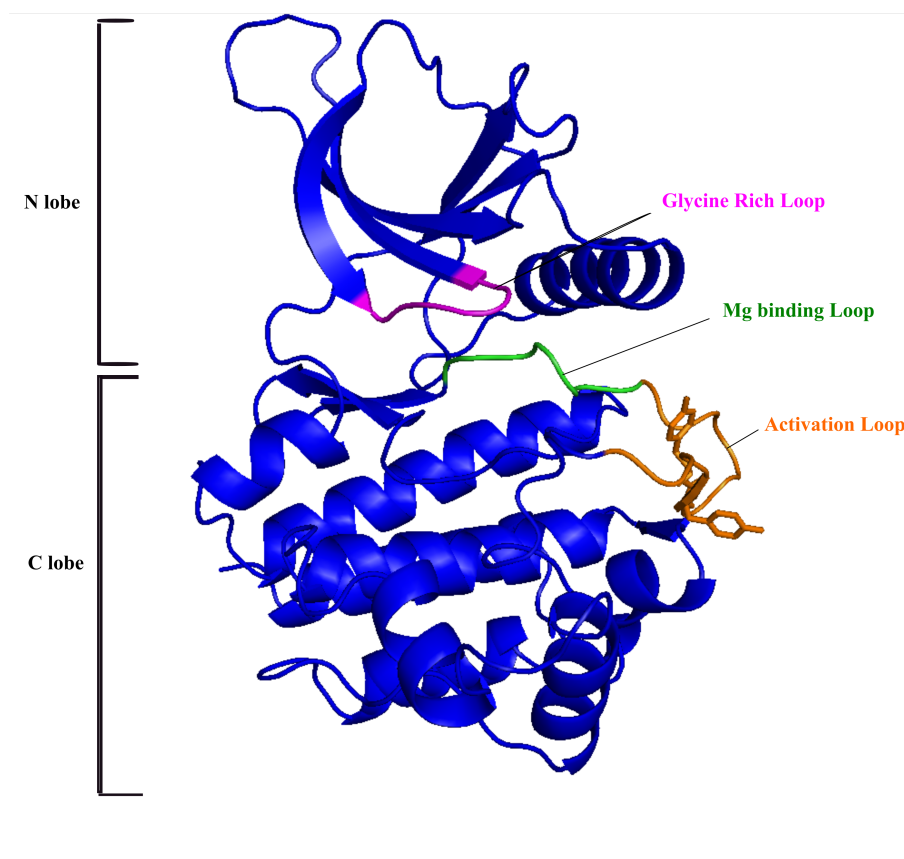
Οι JAK κινάσες βρίσκονται συνήθως στην πλασματική μεμβράνη, όπου και συνδέονται με τους υποδοχείς τους. Ωστόσο νέες μελέτες μας φέρνουν αντιμέτωπους με μια διαφορετική εικόνα στην τοποθέτησή τους, οι JAKS φαίνεται να βρίσκονται και σε

πολλούς πυρήνες κυττάρων όπως τα αιματοποιητικά κύτταρα, όπου έχει αποδειχτεί ότι φωσφορυλιώνουν άμεσα την τυροσίνη Υ41 της Ιστονής H3 (Dawson et al.2009)

## 1.6 ΤΥΚ2, Δομή και Λειτουργία

Στην ενότητα αυτή παρουσιάζεται με μεγαλύτερη λεπτομέρεια η ΤΥΚ2 αρχίζοντας από την δομή της και τα λειτουργικά της τμήματα, έπειτα θα αναφερθούν τα μονοπάτια που διανύει και τέλος θα αναλυθούν οι πολυμορφισμοί της.

### 1.6.1 Δομή της ΤΥΚ2



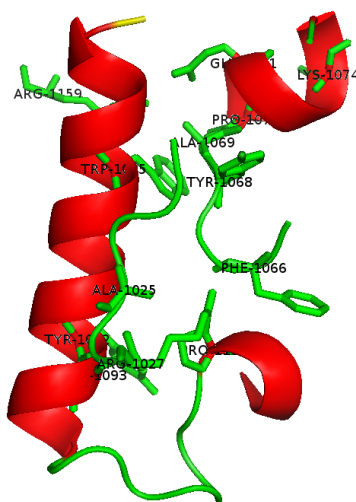
Σχήμα 1.8: Η δομή της ΤΥΚ2

Η κινάση τυροσίνης ΤΥΚ2 είναι προϊόν ενός γονιδίου 27,9kb το οποίο περιέχει 25 εξόνια και βρίσκεται στο χρωμόσωμα 19r13.2 (Lindqvist et al. 2000). Ήταν η πρώτη κινάση που ανακαλύφθηκε από την οικογένεια των JAK (Fitmbach-kraft et al.1990) και φαίνεται να συνδέεται με την αιτιολογία πολλών αυτοάνοσων ασθενειών. Για να υπάρχει η μέγιστη καταλυτική δραστηριότητα στην ΤΥΚ2 θα πρέπει να υπάρχουν και

η κινάση και η ψευδοκινάση συνδεδεμένες (Velazquez et al. 1995).

Ο μικρός λοβός της κινάσης (N lobe) εκτείνεται από το κατάλοιπο 889 μέχρι το 979, ενώ ο μεγάλος λοβός (C lobe) αποτελείται από τα κατάλοιπα 985-1176 (Σχήμα 1.8). Στον μικρό λοβό υπάρχει ο βρόχος Γλυκίνης Glycine loop (κατάλοιπα 904-909), όπως έχει προαναφερθεί, είναι ένας πολύ συντηρημένος βρόχος στην οικογένεια των κινασών ο οποίος συγκρατεί το ATP στην θέση πρόσδεσης του ( στο Σχήμα 1.8 φαίνεται με μωβ). Ο βρόχος δέσμευσης μαγνησίου Mg binding loop (κατάλοιπα 1041-1046), δεσμεύει τα δύο άτομα μαγνησίου του μορίου (στο Σχήμα 1.8 φαίνεται με πράσινο). Ένα πολύ σημαντικό τμήμα για την ενεργοποίηση της ΤΥΚ2 είναι ο βρόχος ενεργοποίησης activation loop (στο Σχήμα 1.8 φαίνεται με κίτρινο χρώμα, κατάλοιπα 1047-1060), ο οποίος φέρει τις δύο τυροσίνες (Υ1054 και Υ1055) που η φωσφορυλίωση τους είναι εξαιρετικά σημαντική για την ενεργοποίηση της κινάσης. Η μετάλλαξη των δύο τυροσινών έχει βρεθεί ότι κάνει την κινάση να υποφωσφορυλιώνεται και έτσι να υπολειτουργεί (Gauzzi et al. 1996). Επίσης πολύ ενδιαφέρον παρουσιάζει η Λυσίνη Κ930 στην περιοχή πρόσδεσης του ATP που αν μεταλλαχθεί ταυτόχρονα με τις δύο τυροσίνες η κινάση απενεργοποιείται τελείως (Gauzzi et al. 1997).

Η περιοχή δέσμευσης υποστρώματος παίζει επίσης πολύ μεγάλο ρόλο στην ενεργοπο-



Σχήμα 1.9: Η περιοχή δέσμευσης του υποστρώματος docking site

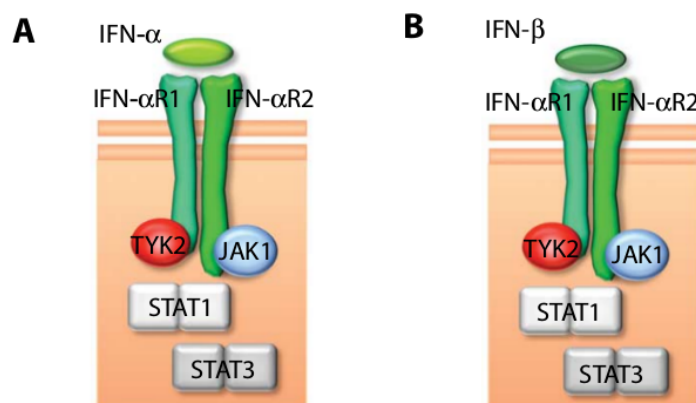
ίηση και απενεργοποίηση της κινάσης. Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 1.9, κατάλοιπα της έλικας F και των γειτονικών βρόχων αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και 'κλειδώνουν' σχηματίζοντας χώρο για να δεσμευτεί το υπόστρωμα.



### 1.6.2 Μονοπάτια της ΤΥΚ2

Τα μονοπάτια στα οποία παίρνει μέρος η ΤΥΚ2 είναι έξι, τα I IFN, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-23 .

- μονοπάτι I IFN - Σχήμα 1.10

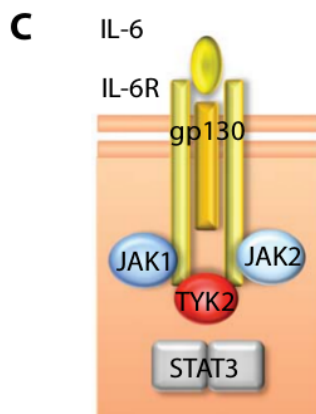


Σχήμα 1.10: Τα μονοπάτια A) IFN-a, ) IFN-b (dendrou et al. 2016).

Το μονοπάτι I IFN διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην ανθρώπινη ανοσοαπόκριση. Στην περίπτωση ιογενούς λοιμώξεως, το ανθρώπινο σώμα ενεργοποιεί ένα πολύπλοκο ρυθμιστικό σύστημα ανοσολογικών αντιδράσεων για την καταπολέμηση του ιού. Μια από αυτές τις ανοσολογικές αντιδράσεις είναι η ενεργοποίηση των πλειοτροπικών κυτοκινών, ιντερφερονών IFN. Το μονοπάτι αυτό οδηγεί σε κυτταρική αντίσταση της υϊκής μόλυνσης Barber et al. 2001 και χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση της σκλήρυνσης κατά πλάκα, πολλούς τύπους καρκίνων, ηπατίτιδα B και C και του απλού έρπητα.

- Μονοπάτι IL-6- Σχήμα 1.11

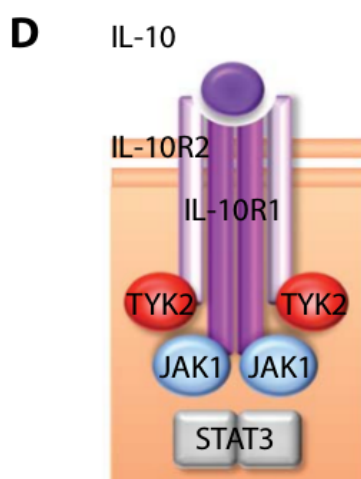
Το μονοπάτι αυτό ενεργοποιεί την IL-6, μια επίσης πλειοτροπική κυτοκίνη που επηρεάζει το ανοσοποιητικό σύστημα και δρα σε πληθώρα βιολογικών συστημάτων και οργάνων όπως φλεγμονή, αιματοποίηση, ογκογένεση, γονιδιακή ενεργοποίηση και πολλαπλασιασμός. Η IL-6 σηματοδοτείται μέσω ενός υποδοχέα



Σχήμα 1.11: Το μονοπάτι IL-6 (dendrou et al. 2016).

που αποτελείται από δύο υπομονάδες. Η δέσμευση της IL-6 με τον υποδοχέα της ενεργοποιεί τις JACKS οι οποίες φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν τους παράγοντες μεταγραφής STAT ιδίως τον STAT3. Η φωσφρυλιωμένη STAT3 μεταφέρεται στον πυρήνα και ενεργοποιεί την μεταγραφή των γονιδίων Ni CW, Hsieh HJ, Chao YJ, et al. 2004.

- Μονοπάτι IL-10- Σχήμα 1.12



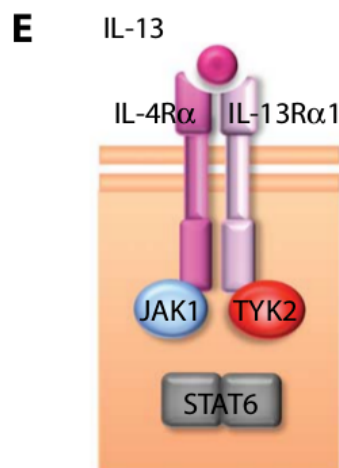
Σχήμα 1.12: Το μονοπάτι IL-10 (dendrou et al. 2016).

Το μονοπάτι IL-10 οδηγεί στην ενεργοποίηση της IL-10, μια πλειοτροπικής κυ-



τοκίνης με σημαντικές ανοσορρυθμιστικές λειτουργίες. Έχει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες καταστέλλοντας την έκφραση φλεγμονωδών κυτοκινών όπως οι TNF-Alpha, IL-1. Το σύμπλεγμα που συνδέεται με την IL-10 είναι τετραμερές αποτελούμενο από δύο υπομονάδες πρόσδεσης υποστρώματος (IL-10R-Alpha και δύο υπομονάδες σηματοδότησης IL-10-Beta. Όταν η IL-10 προσδεθεί στην περιοχή (IL-10R-Alpha προκαλεί την φωσφορυλίωση των κινασών JAK1 και ΤΥΚ2. Έπειτα οι JAK1 και ΤΥΚ2 φωσφορυλιώνουν τα κατάλοιπα τυροσίνης Υ446 και Υ496 της (IL-10R-Alpha. Μόλις φωσφορυλιωθούν οι τυροσίνες αυτές γίνονται θέσεις πρόσδεσης για τον παράγοντα μεταγραφής STAT3 ο οποίος αφού προσδεθεί θα φωσφορυλιωθεί και θα μετατοπιστεί στον πυρήνα όπου θα λειτουργεί ως 'καταλύτης' της μεταγραφικής διαδικασίας διάφορων γονιδίων.

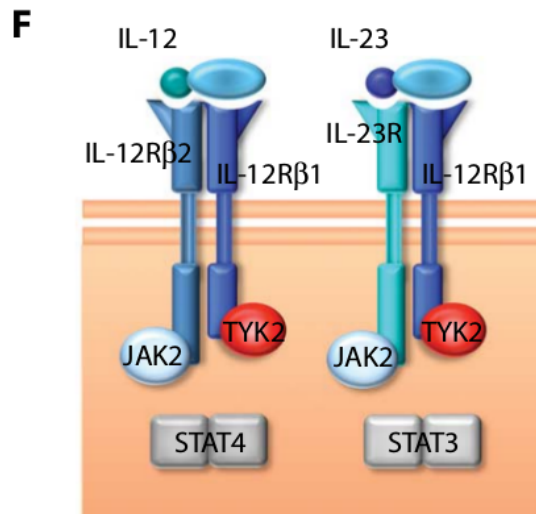
- **Μονοπάτι IL-13 Σχήμα 1.13**



Σχήμα 1.13: Το μονοπάτι IL-13 (dendrou et al. 2016).

Η σηματοδότηση στο μονοπάτι IL-13 αρχίζει με τον σχηματισμό ενός υποδοχέα που είναι ένα διμερές των IL-4Ra και IL-13R1. Η πρόσδεση της IL-13 στον υποδοχέα ενεργοποιεί τις κινάσες JAK1 και ΤΥΚ2 οι οποίες φωσφορυλιώνουν τον μεταγραφικό παράγοντα STAT6 ο οποίος μεταφέρεται στον πυρήνα και ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων τα οποία είναι κρίσιμα για την ισορροπία ανάμεσα στην ανοσολογική άμυνα και τις αλλεργικές φλεγμονώδεις αποκρίσεις.

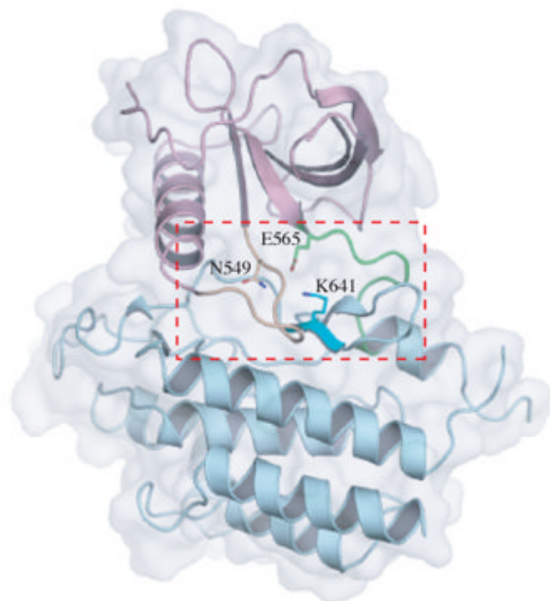
- **Μονοπάτι IL-12-IL-23 Σχήμα 1.14**



Σχήμα 1.14: Το μονοπάτι IL-12-IL-23 (dendrou et al. 2016).

Η οικογένεια κυτοκινών IL-12 είναι ετεροδιμερείς κυτοκίνες που αποτελούνται από δύο υπομονάδες στην περίπτωση της IL-12 οι υπομονάδες είναι οι IL-1Rb1,2 ενώ στην περίπτωση της IL-23 το διμερές αποτελείται από τις IL-12RB1 και IL-23R. Αφού προσδεθούν οι κυτοκίνες οι TYK2 και JAK2 φωσφορυλιώνονται και ενεργοποιούνται και με την σειρά τους ενεργοποιούν τον μεταγραφικό παράγοντα STAT3 και σε ένα μικρότερο ποσοστό τον STAT4. Το μονοπάτι αυτό χρησιμοποιείται για την πρόληψη της έναρξης και την αντιμετώπιση της ανάπτυξης αλλά και της πιθανής μετάστασης του καρκίνου.

### 1.6.3 Λειτουργία - 'Μοριακό φρένο'

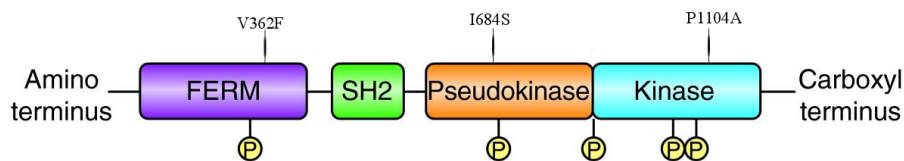


Σχήμα 1.15: Το μοριακό φρένο στην κινάση FGFR2K Chen et al. 2007.

Για να διανύσει η ΤΥΚ2 τον καταλυτικό της κύκλο, θα πρέπει πρώτα να φωσφορυλιωθούν μία ή και οι δύο τυροσίνες που βρίσκονται στον βρόχο ενεργοποίησης της (Y1054, Y1055) από κάποια άλλη κινάση Gauzzi et al. 1996. Για να μπορούμε να διακρίνουμε την ενεργή από την ανενεργή δομή της ΤΥΚ2 πρέπει να εντοπίσουμε τις διαφορές που έχει η φωσφορυλιωμένη και η μη-φωσφορυλιωμένη μορφή της. Σύμφωνα με τους Chen et al. 2007, οι κινάσες τυροσίνης που δεν είναι φωσφορυλιωμένες, δηλαδή βρίσκονται ακόμη στην ανενεργή τους διαμόρφωση, παρουσιάζουν ένα μοριακό φρένο τριών καταλοίπων. Το φρένο αυτό αποτελείται από δεσμούς που δημιουργούνται ανάμεσα σε δύο κατάλοιπα του N-λοβού (Ασπαραγίνη, Γλουταμικό) και ένα κατάλοιπο του C-λοβού (Λυσίνη) (Σχήμα 1.15). Όπως ειπώθηκε στις προηγούμενες παραγράφους, μια ενεργή μορφή κινάσης οφείλει να ανοίγει και να κλείνει τον N-λοβό έτσι ώστε να προσδεθεί το ATP, στην περίπτωση λοιπόν που έχουμε αυτό το μοριακό φρένο των τριών καταλοίπων η κινητικότητα αυτή δεν υπάρχει και έτσι η κινάση τυροσίνης δεν φωσφορυλιώνεται και βρίσκεται στην ανενεργή της μορφή. Στην περίπτωση της ΤΥΚ2 τα κατάλοιπα αυτά είναι τα K961 , E979 στον N-λοβό και K1038 στον C-λοβό.

### 1.6.4 Πολυμορφισμοί της ΤΥΚ2

Στην περιοχή της κινάσης, οι μεταλλάξεις οδηγούν σε αλλαγή του επιπέδου της καταλυτικής της δραστηριότητας της ΤΥΚ2 (Yeh et al. 2000). Η μεταανάλυση των



Σχήμα 1.16: Οι πολυμορφισμοί της ΤΥΚ2.

Tao et al. (2010) συνοψίζει 11 μελέτες που περιλαμβάνουν 21497 περιπτώσεις και 22657 ελέγχους που σχετίζονται με τους πολυμορφισμούς της ΤΥΚ2 και την συσχέτιση τους με αυτοάνοσα νοσήματα. Στην ίδια ανάλυση μελετήθηκαν 6 πολυμορφισμοί, 2 από τους οποίους φαίνεται να παρουσιάζουν συσχέτιση με αυτοάνοσα νοσήματα (Tao et al. 2011) όπως σκλήρυνση κατά πλάκας (Ban et al. 2009) ενδομητρίωση και υπογονιμότητα (Peluso et al. 2013). Από τις μεταλλάξεις αυτές οι πιο σημαντικές είναι οι ακόλουθες (Σχήμα 1.16):

- **rs34536443 στο κατάλοιπο P1104A**

Είναι η μετάλλαξη που θα μελετηθεί στην παρούσα πτυχιακή η οποία προβλέπεται να επηρεάζει τα επίπεδα φωσφορυλίωσης και την δράση της πρωτεΐνης. Η P1104A κατά πάσα πιθανότητα είναι προστατευτική ως προς αυτοάνοσα νοσήματα όπως συστηματικός λύκος, αρθρίτιδα και ενδομητρίωση (Ban et al. 2009) και σχετίζεται με το μονοπάτι IFN. Μελέτες δείχνουν ότι ποντίκια με την μετάλλαξη 1104A της ΤΥΚ2 φαίνεται να είναι πιο ανθεκτικά στην αυτοάνοση αρθρίτιδα (Shaw et al. 2003). Ωστόσο μελέτες για το ίδιο αυτοάνοσο νόσημα που έχουν πραγματοποιηθεί για τον άνθρωπο δεν δείχνουν να υπάρχει κάποια συσχέτιση Zervou et al. 2017. Γενικά, αποδεικνύεται ότι η παρουσία αυτής της μετάλλαξης κάνει την κινάση να υποφωσφορυλιώνεται και συνεπώς να υπολειπεται (Tomasson et al. 2007).

- **rs12720356 στο κατάλοιπο I684S**

Δομικά το σημείο της μετάλλαξης είναι η περιοχή που προσδένεται η JH2 η οποία είναι απαραίτητη για την πρόσδεση του IFN σε IFNR1, ωστόσο δεν επηρεάζει την έκφραση του IFNR1 (Yeh et al. 2000). Φαίνεται να μειώνει την ενεργότητα της ΤΥΚ2 και σαν αποτέλεσμα να μειώνει την ευαισθησία του ατόμου στα αυτοάνοσα νοσήματα.

- **rs2304256 στο κατάλοιπο V362F**

Η μετάλλαξη αυτή βρίσκεται στην περιοχή JH4 της ΤΨΚ2 που είναι κομμάτι μιας ευρύτερης περιοχής που σχετίζεται όχι μόνο με την αλληλεπίδραση της ΤΨΚ2 με το IFNAR1 και τις λειτουργίες του αλλά και με την διατήρηση της έκφρασης του IFNAR1 στις κυτταρικές μεμβράνες, χαρακτηρίζεται ως καλοήθης σύμφωνα με το εργαλείο PolyPhen. Σε συνδυασμό με την I684S επίσης θεωρείται ότι κάνει την κινάση να υπολειτουργεί και να υποφωσφορυλιώνει.

Συνοψίζοντας, στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η μετάλλαξη rs34536443 που αφορά την περιοχή της κινάσης όπου η προλίνη 1104 μεταλλάσσεται σε Αλανίνη. Η μετάλλαξη αυτή φαίνεται να οδηγεί σε ένα προστατευτικό στάδιο και μικρότερη ευαισθησία στην σκλήρυνση κατά πλάκας (Mero et al. 2010, Couturier et al.2011), στην ενδομητρίωση, στην υπογονιμότητα και στον συστημικό λύκο (Peluso et al. 2013, Ban et Al 2009) και ίσως στην αρθρίτιδα (Shaw et al. 2003, Zervou et al.2017).

Σκοπός της εργασίας αυτής είναι να μελετηθούν οι δομικές διαφορές των δομών της κινάσης χωρίς την μετάλλαξη και με την μετάλλαξη έτσι ώστε να διερευνηθεί αν αυτές οι διαφορές έχουν αντίκτυπο στην λειτουργικότητα και στην ενεργότητα της.



## Κεφάλαιο 2

# Προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής

Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζονται αναλυτικά μια ιστορική εισαγωγή της μοριακής δυναμικής, η γενική ιδέα της λειτουργίας των προσομοιώσεων όπως και οι μέθοδοι μοριακής δυναμικής που ακολουθήθηκαν στην εργασία αυτή.

### 2.1 Ιστορική Αναδρομή

Οι εφαρμογές Μοριακής Δυναμικής είναι υπολογιστικές μέθοδοι που προσομοιώνουν την χρονοεξαρτώμενη κίνηση ενός συστήματος σωματιδίων. Η πρώτη προσπάθεια προσομοίωσης μοριακής δυναμικής έγινε το 1956 από την ομάδα του Alder (Alder και Wainwright 1956), όπου μελετήθηκε η δυναμική της συναρμολόγησης των σκληρών σφαιρών. Αργότερα, το 1960, δημοσιεύθηκε η πρώτη προσομοίωση πραγματικού υγρού από τους Raman at Argonne. Το 1977 οι McCammon, Gerlin και Karplus παρουσίασαν την πρώτη προσομοίωση πρωτεΐνης, η οποία αφορούσε έναν αναστολέα πρωτεασών σερίνης 500 ατόμων που λέγεται BPTI (Bovine Pancreatic Trypsine Inhibitor). Η διάρκεια της προσομοίωσης ήταν μόλις 9.2 ps και η πρωτεΐνη βρισκόταν σε κενό (McCammon et al. 1977). Έντεκα χρόνια αργότερα, δημοσιεύτηκε μια προσομοίωση με διάρκεια 210 ps της ίδιας πρωτεΐνης σε νερό (Levitt et al. 1988), ενώ η σημαντική αύξηση της υπολογιστικής ισχύος έκτοτε καθιστά πλέον ρουτίνα την εκτέλεση προσομοιώσεων πολύ μεγαλύτερων πρωτεϊνών με 1.000-10.000 μεγαλύτερη διάρκεια προσομοιώσεων (10-100 ns) και με περιβάλλον διαλύτη. Σημαντικές βελτιώσεις στις πιθανές λειτουργίες έχουν επίσης επιτευχθεί, καθιστώντας τις προσομοιώσεις πολύ πιο σταθερές και ακριβείς απ' ό τι ήταν στο παρελθόν (Mackerell et al. 2004).

## 2.2 Εισαγωγή στην Μοριακή Δυναμική

Η Μοριακή Μηχανική βασίζεται στην αρχή κατά την οποία η συνισταμένη των δυνάμεων, οι οποίες ενεργούν σε ένα μόριο, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να περιγράψει την γεωμετρική δομή και την ενέργειά του μορίου. Όταν το μόριο θα φτάσει στην τελική του διαμόρφωση, δηλαδή στην κατάσταση ισορροπίας, τότε βρίσκεται στην κατάσταση ελάχιστης ολικής εσωτερικής ενέργειας.

Ο στόχος των προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής είναι να προβλέψουν μακροσκοπικά χαρακτηριστικά των μορίων όπως η πίεση, η ενέργεια, δομικές μεταβολές κ.λ.π χρησιμοποιώντας μικροσκοπικά χαρακτηριστικά όπως η θέση και η ταχύτητα των ατόμων του συστήματος. Η γέφυρα μεταξύ μικροσκοπίας και μακροσκοπίας είναι η στατιστική μηχανική και η χρήση χρονοανεξάρτητων μέσων όρων. Οι ατομικές κινήσεις ενός βιολογικού συστήματος περιγράφονται από την χρονοεξαρτώμενη εξίσωση Schrödinger των πυρήνων και των ηλεκτρονίων των ατόμων. Ωστόσο, η λύση της εξίσωσης αυτής αντιμετωπίζει δύο βασικά υπολογιστικά προβλήματα, το πολύ μεγάλο μέγεθος των βιολογικών συστημάτων και τον χρόνο που απαιτείται για την σωστή προσομοίωση των βιολογικών διεργασιών. Στις περιπτώσεις μικρών βιολογικών συστημάτων λίγων ατόμων (περίπου 10 άτομα) και υψηλά επίπεδα λεπτομέρειας, αν λάβουμε υπόψιν τους βαθμούς ελευθερίας των ηλεκτρονίων, η εξίσωση Schrödinger μπορεί να λυθεί μόνο στο εύρος της τάξης των  $10^{-18}$  sec ενώ στην πραγματικότητα οι τυπικές βιολογικές διαδικασίες μπορούν να διαρκούν μέχρι και ώρες, ενώ τα μεγέθη ακόμη και μικρών πρωτεϊνών μπορούν να φτάσουν στα 10.000 άτομα. Επομένως θα πρέπει να υπάρχουν αρκετές προσεγγίσεις ώστε να επιτραπεί η περιγραφή ενός βιολογικού συστήματος που αποτελείται από περισσότερα από μια δεκάδα άτομα. Έτσι οι αλληλεπιδράσεις ηλεκτρονίων λαμβάνονται από πεδία δυνάμεων στα οποία κινούνται σύμφωνα με τις κλασσικές εξισώσεις κίνησης. Οι αρχές στις οποίες βασίζεται η μοριακή δυναμική είναι οι εξής:

- Η βασική θερμοδυναμική υπόθεση σύμφωνα με την οποία ένα σύστημα οδηγείται αυθόρμητα σε κατάσταση χαμηλότερης ελεύθερης ενέργειας.
- Ισχύει η αθροιστική ιδιότητα των δυνάμεων, δηλαδή οι δυνάμεις που ενεργούν σε ένα άτομο εκφράζονται ως άθροισμα των δεσμικών και μη δεσμικών δυνάμεων (βλέπε παρακάτω).
- Μπορούμε να μεταβούμε από απλά μόρια για τα οποία γνωρίζουμε το δυναμικό τους σε πιο πολύπλοκα τα οποία θα πρέπει να αποτελούνται από τις ίδιες χημικές υπομονάδες.

Η γενική λειτουργία των προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής ενός βιομορίου γίνεται ως εξής, η πρώτη ύλη είναι ένα αρχείο (συνήθως μορφής pdb στο οποίο είναι αποθηκευμένες οι θέσεις (x,y,z για κάθε άτομο του βιομορίου, όπως και οι ταχύτητες τους για



μια συγκεκριμένη χρονική στιγμή  $t_0$ . Έστω ότι η χρονοεξαρτώμενη κατάσταση του συστήματος όλων των ατόμων του βιομορίου για την χρονική στιγμή  $t_0$  είναι η  $S(t_0)$ , για να υπολογιστεί μια μελλοντική κατάσταση σε χρόνο  $t_0 + n\delta t$  χρησιμοποιείται ο νόμος του Νεύτωνα  $F = ma$  επιλέγοντας πολύ μικρά χρονικά βήματα.

### 2.2.1 Δυναμικά Πεδία- Force Fields

Το επόμενο βήμα είναι να τοποθετηθεί πεδίο δυνάμεων σε ένα προεπιλεγμένο γεωμετρικό σχήμα που να περικλείει όλο το βιομόριο. Τα δυναμικά πεδία αποτελούνται από ένα σύνολο παραμέτρων και αναπαράγουν εμπειρικά τις φυσικές ιδιότητες. Τα ευρέως χρησιμοποιούμενα πεδία στις μοριακές προσομοιώσεις είναι τα Gromos, Amber, Charmm, OPLS. Κάθε δυναμικό πεδίο είναι αποτέλεσμα διαφόρων αλληλεπιδράσεων που αναλύονται παρακάτω.

Γενικά σε μια προσομοίωση μοριακής δυναμικής οι δυνάμεις της αλληλεπίδρασης σωματιδίων εξαρτώνται από τις θέσεις των ατόμων και όχι από τις ταχύτητες τους. Συνήθως οι αλληλεπιδράσεις ορίζονται από την εξίσωση της δυναμικής ενέργειας έτσι οι δυνάμεις μπορούν να υπολογιστούν ως παράγωγος της. Τα είδη των αλληλεπιδράσεων που λαμβάνονται υπόψιν είναι τα εξής:

- **Αλληλεπιδράσεις από απόσταση**

Αναφέρονται σε αλληλεπίδραση μεταξύ ζεύγους ατόμων. Οι δύο γνωστές αλληλεπιδράσεις από απόσταση σε ένα σύστημα ατόμων προέρχονται από το δυναμικό Coulomb και το δυναμικό Lennard-Jones. Το δυναμικό Coulomb δίνεται από την εξίσωση 2.1:

$$V_{Coulomb} = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{q_i q_j}{r_{ij}} \quad (2.1)$$

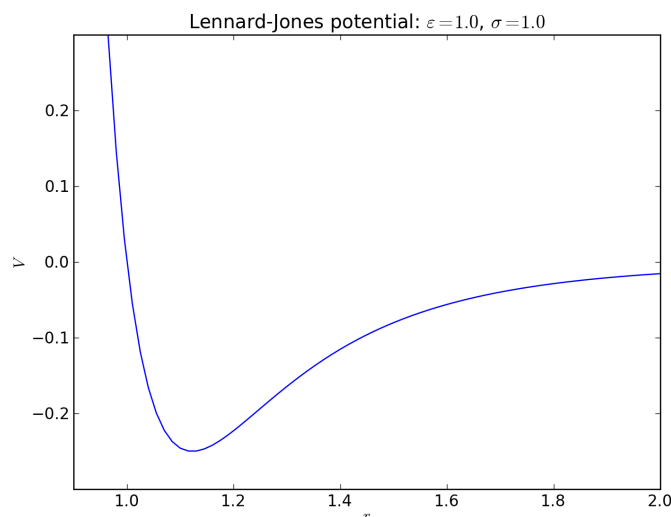
Όπου  $q_i$  και  $q_j$  είναι τα φορτία των δύο ατόμων ενώ  $r_{ij}$  η μεταξύ τους απόσταση. Η δύναμη *Coulomb* με παραγωγή της 2.1 ως προς την απόσταση θα είναι:

$$F_{Coulomb} = \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0} \frac{r_{ij}}{r_{ij}^3} \quad (2.2)$$

Για το δυναμικό Lennard-Jones ισχύει η εξίσωση 2.3:

$$V_{L-J} = 4\epsilon \left( \left( \frac{\sigma}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma}{r_{ij}} \right)^6 \right) \quad (2.3)$$

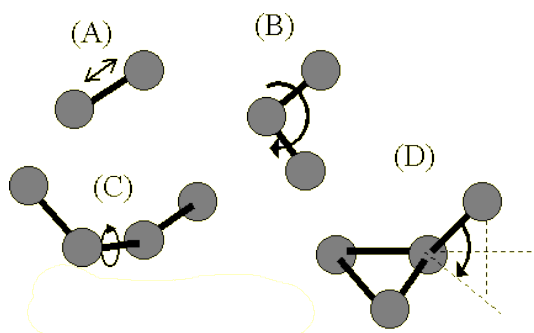
Όπου  $\sigma$  είναι η διάμετρος των ατόμων και  $\epsilon$  είναι μια σταθερά που εξαρτάται από το βάθος του πηγαδιού δυναμικού. Ο πρώτος όρος μας δίνει μια μεγάλη άπωση σε πολύ μικρές αποστάσεις ενώ ο δεύτερος αναπαριστά μια ελκτική δύναμη για μεγαλύτερη απόσταση. Στο (Σχήμα 2.1) φαίνεται το πηγάδι δυναμικού Lennard-Jones (Δυναμικό ως προς την απόσταση του ζεύγους ατόμων).



Σχήμα 2.1: Το δυναμικό Lennard-Jones ως προς την απόσταση των αλληλεπιδρώντων ζευγών ατόμων.

### • Αλληλεπιδράσεις δεσμών

Το μοντέλο των αλληλεπιδράσεων εξ επαφής περιλαμβάνει ισχυρούς χημικούς δεσμούς οι οποίοι δεν καταστρέφονται ή δημιουργούνται κατά την διάρκεια μιας προσομοίωσης. Γι αυτό τον λόγο αυτές οι αλληλεπιδράσεις μπορούν να υπολογιστούν με την εισαγωγή μιας λίστας από συγκεκριμένες ομάδες ατόμων με γνωστές μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις δεσμών. Τέτοιου είδους αλληλεπιδράσεις είναι οι ομοιοπολικοί δεσμοί, οι αλληλεπιδράσεις δεσμού-γωνίας και οι αλληλεπιδράσεις δίδρων γωνιών.



Σχήμα 2.2: Αλληλεπιδράσεις δεσμών. όπου A) Ομοιοπολικοί δεσμοί, B) Οι αλληλεπιδράσεις δεσμού γωνίας, C) οι αλληλεπιδράσεις δίδρων γωνιών και D) Οι αλληλεπιδράσεις δίδρων γωνιών (ακατάλληλων).

### 2.2.2 Διαλύτης

Στις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής υπάρχουν διάφορα μοντέλα διαλυτών τα οποία προσομοιώνουν την συμπεριφορά των διαλυμένων συμπυκνωμένων φάσεων του διαλύτη (Skyner et al.2015, Tomasi et al.2005, Cramer et al. 1999). Υπάρχουν δύο γενικές κατηγορίες διαλυτών, που αναλύονται παρακάτω:

- **implicit water**

Οι συνεχείς διαλύτες είναι μοντέλα που αντικαθιστούν τα μόρια του διαλύτη με ένα ομογενές μέσο με δυνατότητα πολώσεως. Οι καταστάσεις των συνεχών μέσων χαρακτηρίζονται θερμικά από μέσους όρους, επομένως μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο ένας μικρός αριθμός παραμέτρων για να προσομοιωθεί ο διαλύτης σε διαφορετικές περιπτώσεις. Η κύρια παράμετρος είναι η διηλεκτρική σταθερά  $\epsilon$ , η οποία καθορίζει τον βαθμό πόλωσης και μπορεί να συμπληρωθεί από άλλες παραμέτρους όπως η επιφανειακή τάση του διαλύτη.

- **explicit water**

Τα μοντέλα ασυνεχών διαλυτών αναπαριστούν τον διαλύτη ως σύστημα μορίων. Αυτά τα μοντέλα προσεγγίζουν περισσότερο την πραγματικότητα εφόσον προσομοιώνουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων του διαλύτη, κάτι που δεν συμβαίνει όταν αυτός εκλαμβάνεται ως συνεχές μέσο.

### 2.2.3 Αλγόριθμοι Ολοκλήρωσης

Η θέση, η ταχύτητα και η επιτάχυνση κάθε στιγμή της προσομοίωσης δίνονται από την ολοκλήρωση των εξισώσεων κίνησης. Υπάρχουν πολλοί αλγόριθμοι που χρησιμοποιούνται για αυτόν τον σκοπό (*Verlet*, *Leap – frog*, *Beeman's* κ.α).

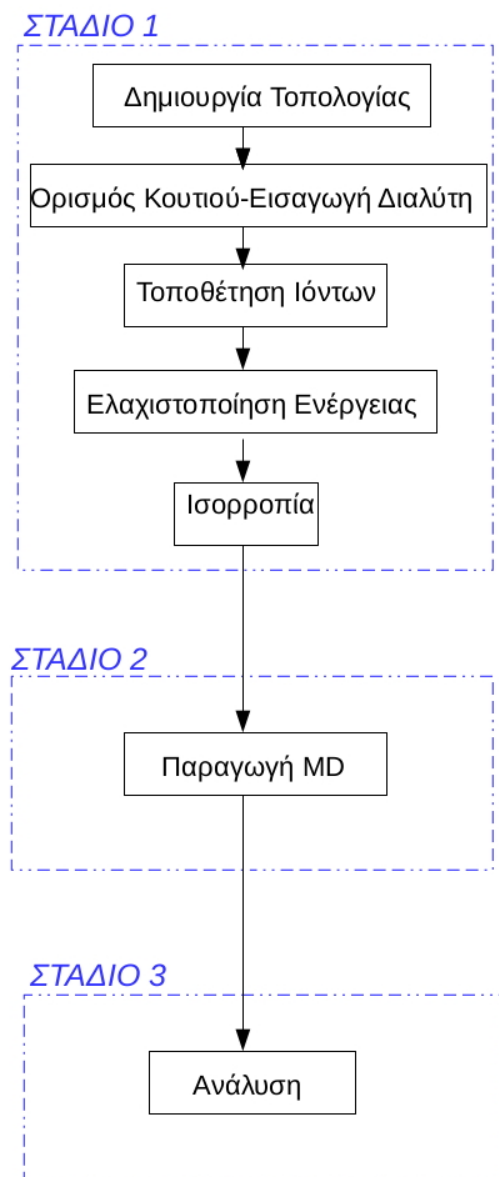
Η γενική ιδέα όλων αυτών των αλγορίθμων είναι ότι αν  $t$  η αρχή της προσομοίωσης, κάθε χρονική στιγμή  $t+dt$  η θέση  $r(t+dt)$ , η ταχύτητα  $r'(t+dt)$  και η επιτάχυνση  $r''(t+dt)$  κάθε ατόμου μπορούν να προσεγγιστούν από μια σειρά εξισώσεων *Taylor* :

$$\begin{aligned} r(t+dt) &= r(t) + r'(t)dt + \frac{r''(t)dt^2}{2} + \dots \\ r'(t+dt) &= r'(t) + r''(t)dt + \frac{r'''(t)dt^2}{2} + \dots \\ r''(t+dt) &= r''(t) + r'''(t)dt + \dots \end{aligned}$$

## 2.3 Λειτουργία του GROMACS

Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία είναι το GROMACS. Το GROMACS είναι ένα εργαλείο που πραγματοποιεί προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής και παράγει ένα αρχείο με την τροχιά του συστήματος σωματιδίων που βρίσκεται

υπό μελέτη. Η λειτουργία του GROMACS μπορεί να χωριστεί σε τρία στάδια, την προετοιμασία, την παραγωγή και την ανάλυση (Σχήμα 2.3).



Σχήμα 2.3: Τα τρία στάδια που ακολουθεί μια προσομοίωση μοριακής δυναμικής στο Gromacs.

- **Προετοιμασία:**

Το στάδιο αυτό ξεκινά με την αρχικοποίηση του συστήματος, η οποία απαιτεί τον καθορισμό των αρχικών συντεταγμένων και ταχυτήτων των ατόμων της πρωτεΐνης αλλά και του διαλύτη που την περιβάλλει. Οι συντεταγμένες αυτές συνήθως προέρχονται από την κρυσταλλογραφημένη μορφή της πρωτεΐνης που μπορεί κάποιος να λάβει από την βάση δεδομένων *pdb*. Το πρώτο βήμα λοιπόν

είναι το GROMACS με πολλαπλά βήματα, να ορίσει ένα 'κουτί' πεδίων δυνάμεων γύρω από το βιομόριο, το κουτί αυτό μπορεί να είναι κυβικό, εξαγωνο, ρομβικό δωδεκάεδρο, επιμηκυμένο δωδεκάεδρο ή κολοβωμένο οκτάεδρο. Σε αυτή την φάση το GROMACS τοποθετεί μέσα στο κουτί τον επιλεγμένο διαλύτη και με την χρήση ιόντων μηδενίζει το φορτίο του συστήματος. Έπειτα, με αλγορίθμους ελαχιστοποίησης ενέργειας καταλήγει στην πιο σταθερή κατάσταση δηλαδή στην κατάσταση ελάχιστης ενέργειας του συστήματος. Εν συνεχεία, αφήνει το σύστημα να ισορροπήσει για αρκετό χρόνο έτσι ώστε να σταθεροποιηθούν τα μακροσκοπικά χαρακτηριστικά του όπως η πίεση, η θερμοκρασία και η ενέργεια.

- **Παραγωγή:**

Αυτό το στάδιο είναι το πιο μακροσκελές, καθώς το GROMACS υπολογίζει τις συντεταγμένες και τις ταχύτητες κάθε ατόμου του συστήματος για το επιθυμητό διάστημα που συνήθως ποικίλει από *ps* μέχρι *ns*. Στην διάρκεια αυτής της φάσης υπολογίζονται οι θερμοδυναμικές παράμετροι του συστήματος.

- **Ανάλυση:**

Σε αυτό το τελευταίο στάδιο γίνεται η ανάλυση των πληροφοριών του προηγούμενου σταδίου και ο υπολογισμός ιδιαίτερα σημαντικών μεγεθών όπως RMS difference μεταξύ δύο δομών, RMS fluctuations κλπ.

Παρακάτω παραθέτονται κάποια από τα χαρακτηριστικά ανάλυσης του GROMACS που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα ερευνητική δουλειά, μαζί με τις εντολές τους.

- **g rmsd** - Υπολογίζει την μέση τετραγωνική τυπική απόκλιση της κίνησης των ατόμων του βιομορίου σε σχέση με μία αρχική δομή του.
- **g rmsf**-Υπολογίζει την διακύμανση των θέσεων των ατόμων σε σχέση με μια αρχική δομή.
- **g anaeig** - Ανάλυση των ιδιοδιανυσμάτων. Τα ιδιοδιανύσματα μπορούν να προέρχονται από έναν πίνακα διακύμανσης (*g covar*) είτε από μια ανάλυση κανονικής κατανομής (*g nmeig*).
- **g cluster**-Δημιουργία μιάς δομής συμπλέγματος ατόμων.
- **g diastance**-Υπολογισμός αποστάσεων μεταξύ δύο θέσεων του βιομορίου.
- **g filter** - Εκτελεί φιλτράρισμα συχνότητας υπο την εξίσωση

$$\frac{\pi t}{A} + 1$$

απο  $-A$  έως  $+A$ . Όπου  $A$  δίνεται από επιλογή  $-nf$  φορές το βήμα του χρόνου του αρχείου που εισάγεται. Το παρόν φίλτρο μειώνει τις διακυμάνσεις

- με περίοδο  $A$  κατά 85%
- με περίοδο  $2A$  κατά 50%
- με περίοδο  $3A$  κατά 17%

Στο επόμενο κεφάλαιο θα αναλυθεί με μεγαλύτερη λεπτομέρεια η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε στην παρούσα εργασία.

## Κεφάλαιο 3

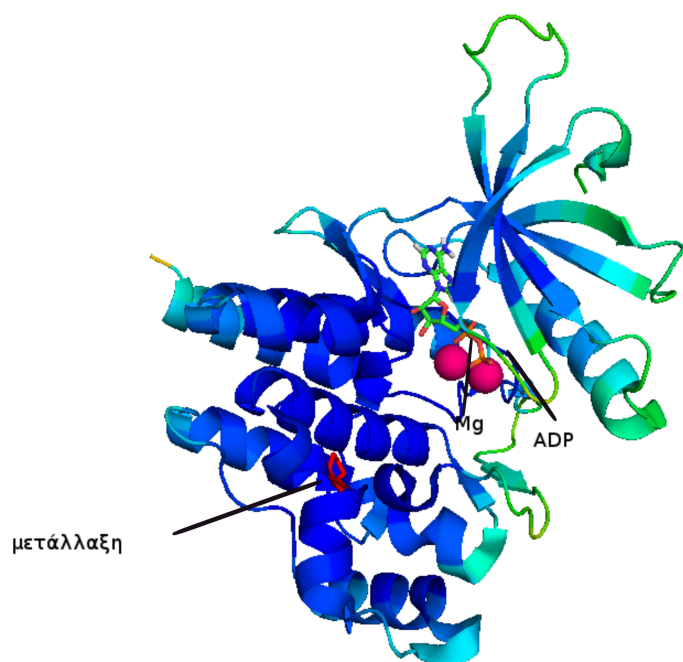
### Πειραματική Διαδικασία

Στο κεφάλαιο αυτό θα αναλυθεί η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε στην παρούσα ερευνητική εργασία όπως και όλα τα εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν.

#### 3.1 Κατασκευή Αρχικών 3D Μοντέλων

Η κρυσταλλογραφική δομή που χρησιμοποιήθηκε είναι η 4gvj η οποία αντιστοιχεί στην δομή της "Tyk2 (JH1) in complex with adenosine di-phosphate". Η δομή αυτή προήλθε από την Protein Data Bank ως αρχείο pdb, το οποίο περιλαμβάνει τις πλήρεις ατομικές συντεταγμένες του βιολογικού μορίου που βρίσκεται σε διαλύτη (explicit water). Η δομή αυτή εκτός από το βιομόριο περιλαμβάνει δύο άτομα μαγνησίου και ένα μόριο ADP (Adenosine-5'-Disphosphate), όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.2, οι ροζ σφαίρες αναπαριστούν τα άτομα μαγνησίου και τέλος το μόριο ADP βρίσκεται στην θέση δέσμευσης της κινάσης.

Για να μελετηθεί η διαφορά της κανονικής δομής της ΤΥΚ2 από της δομής με την μετάλλαξη χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα VMD με το οποίο τοποθετήθηκε μια αλανίνη στην θέση της 1104 προλίνης όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.2. Με το ίδιο πρόγραμμα δημιουργήθηκαν άλλες δύο διαφορετικές δομές, η μία χωρίς ADP με ελεύθερη θέση πρόσδεσης και η άλλη με ένα μόριο ATP (τρεις φωσφορικές ομάδες) στην θέση πρόσδεσης. Συνεπώς, σε αυτό το στάδιο υπάρχουν έξι διαφορετικές δομές, τρεις με μετάλλαξη και τρεις χωρίς. Για την κάθε περίπτωση αλλάζει το μόριο της θέσης πρόσδεσης, ATP, ADP, και κενή θέση πρόσδεσης.

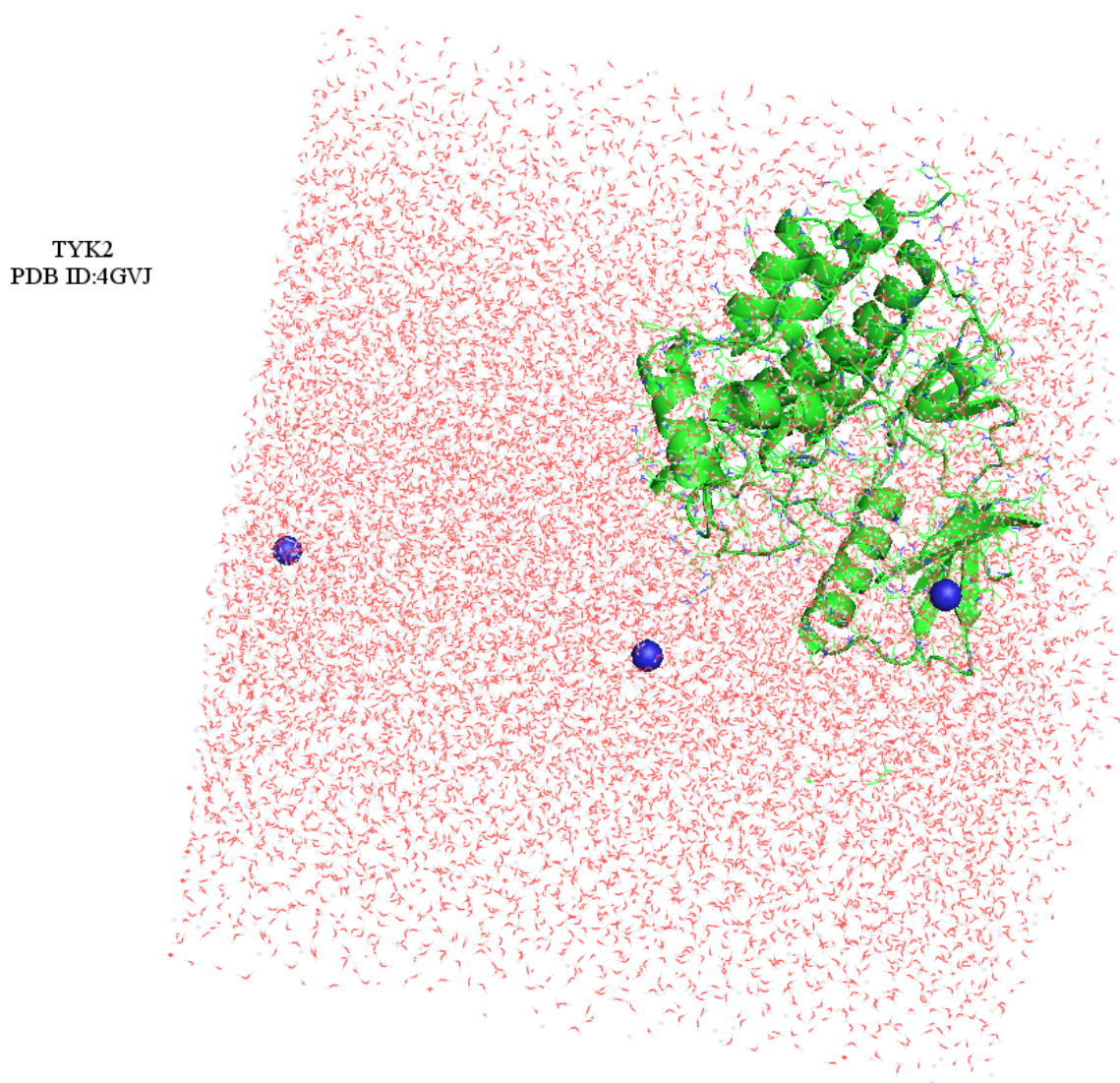


Σχήμα 3.1: Η κρυσταλλική δομή της TTK2, Το χρώμα του μορίου σχετίζεται με το b factor pdb ID :4gvj.

## 3.2 Προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής

Αφού δοκιμάστηκαν τρία διαφορετικά πεδία δυνάμεων, τα gromos96 53a6 ( J. Comput. Chem. 2004), Amber99sb<sub>ildn</sub>(Lindorff – Larsen et al. 2010), Oplsaa(2001) επιλέχθηκε το gromos96 53a6 το οποίο τροποποιήθηκε έτσι ώστε να επιτευχθεί η εισαγωγή των παραμέτρων του ADP. Όλες οι προσομοιώσεις διεξήχθησαν σε νερό, όχι όμως ως συνεχές μέσο (implicit water) αλλά ως σύστημα μορίων νερού (explicit water), χρησιμοποιώντας το μοντέλο νερού SPC-Simple Point Charge water model (Berendsen et al. 1981). Στο επόμενο βήμα θα πρέπει το σύστημα να γίνει ηλεκτρικά ουδέτερο έτσι ώστε να προσομοιωθούν οι πραγματικές συνθήκες του περιβάλλοντος του βιομορίου εφόσον στην φύση δεν υπάρχει φορτισμένο βιομόριο. Αυτό λοιπόν επιτεύχθηκε με την χρήση αντίθετων ιόντων Na, Cl. Πιο συγκεκριμένα στην περίπτωση της APO μορφής προστέθηκαν τρία ιόντα Νατρίου ( $Na^{+1}$ ), στην ATP μορφή, εφόσον υπήρχαν τα δύο άτομα Μαγνησίου  $Mg^2$  δεσμευμένα στην κινάση, προστέθηκαν άλλα τρία άτομα Νατρίου ώστε το βιομόριο να γίνει ηλεκτρικά ουδέτερο. Τέλος στην περίπτωση της δομής με ADP που επίσης έχει δύο ιόντα μαγνησίου δεσμευμένα προστέθηκαν δύο ιόντα Νατρίου επιπλέον. Το σχήμα του κουτιού που επιλέχθηκε είναι το σχήμα ενός δωδεκάεδρου. Στο Σχήμα 3.2 φαίνεται η TTK2 APO μορφής, τοποθετημένη στο κουτί δυναμικού με τα τρία φορτία NA που ουδετεροποιούν το φορτίο της και τα μόρια νερού τύπου SPC που την περιβάλλουν. Έπειτα, το σύστημα υ-

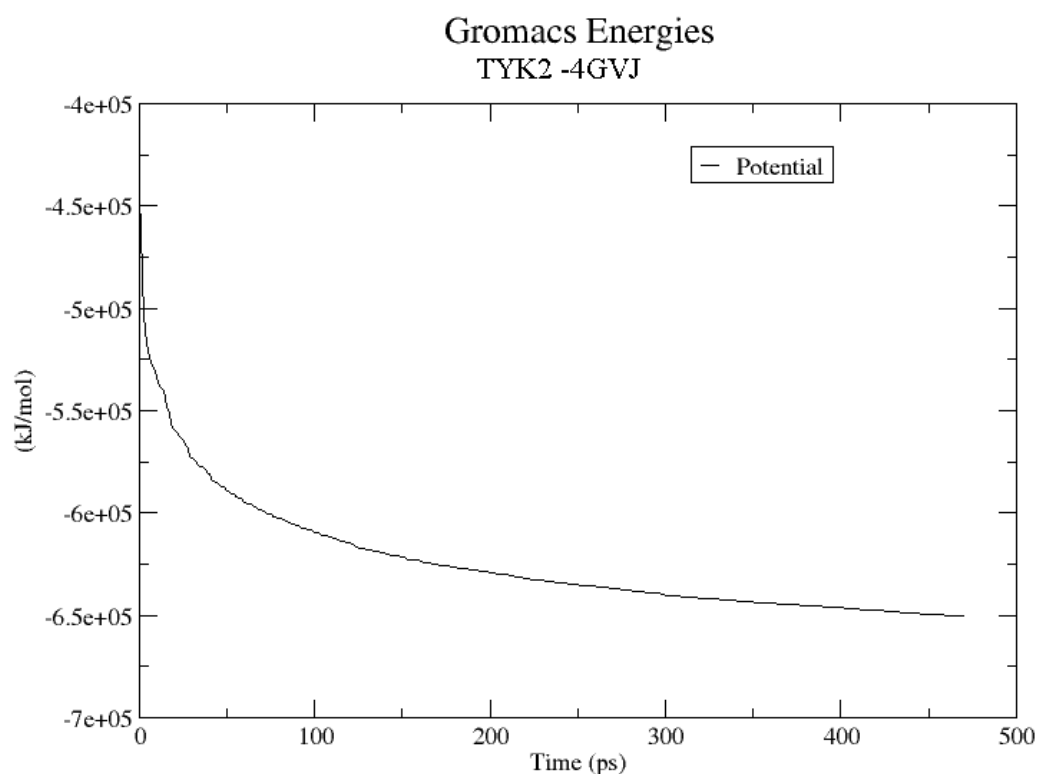




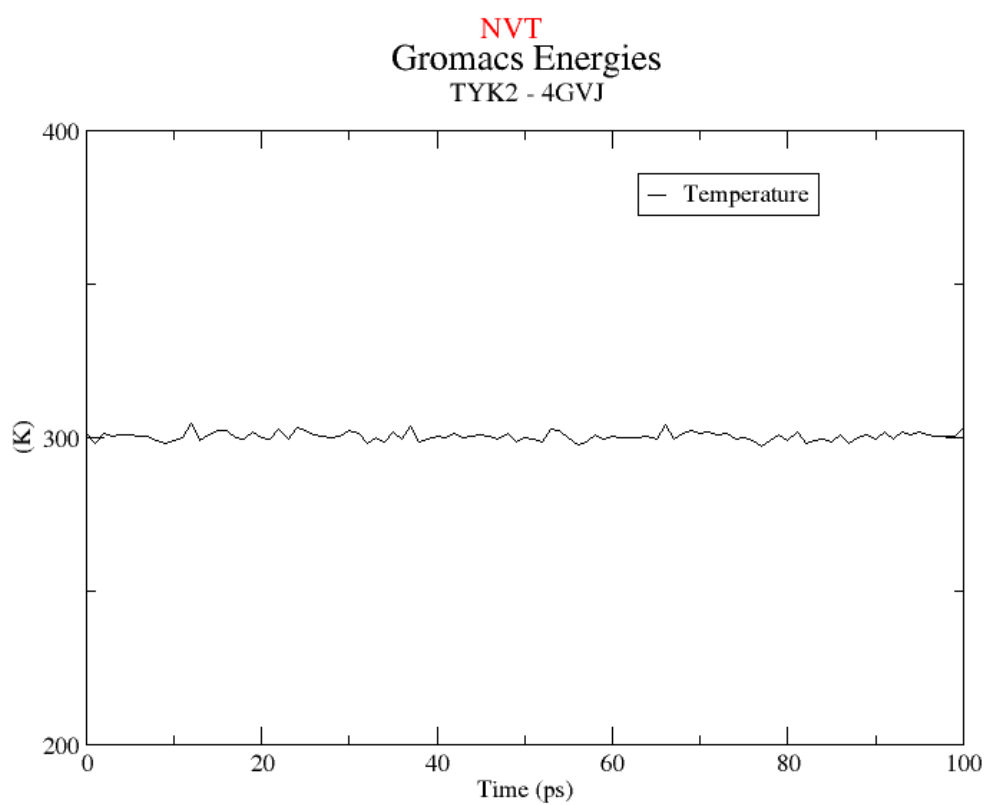
Σχήμα 3.2: Η TYK2 APO μορφής (MD01), τοποθετημένη στο δωδεκάεδρο κουτί, τα άτομα Na (μπλε σφαίρες) που εξουδετερώνουν το φορτίο της και ο διαλύτης που την περιβάλλει (κόκκινα μόρια νερού).

πέστη ελαχιστοποίηση ενέργειας για 50000 βήματα, δηλαδή 100ps, η θερμοκρασία των ατόμων Ca θεωρήθηκε από την αρχή 300K (Σχήμα 3.3). Έπεται η εξισορρόπηση του συστήματος κατά την οποία οι θέσεις των ατόμων παραμένουν σταθερές και όλες οι μεταβολές συμβαίνουν στον διαλύτη. Το βήμα της εκτελέστηκε για ένα σύνολο 200ps, όπου τα πρώτα 100ps πραγματοποιήθηκαν υπό ισόχωρες-ισόθερμες συνθήκες NVT, δηλαδή διατηρήθηκαν σταθερά ο όγκος, ο αριθμός μορίων, όπως και η θερμοκρασία

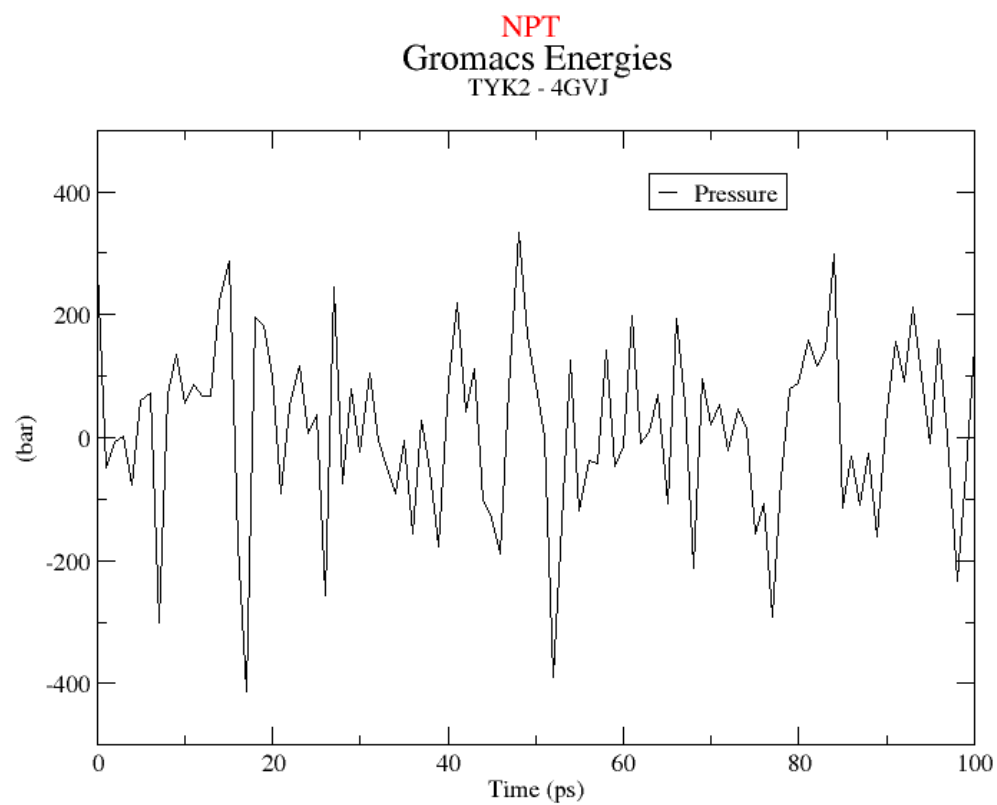
στους 300K με την χρήση του θερμοστάτη Berendsen και η πίεση αφέθηκε να μεταβάλλεται. Στο Σχήμα 3.4 φαίνεται η σταθεροποίηση την θερμοκρασίας στους 300K σε συνθήκες NVT. Τα επόμενα 100ps πραγματοποιήθηκαν υπό ισοβαρείς- ισόθερμες συνθήκες NPT, δηλαδή ο αριθμός μορίων, η θερμοκρασία με τον ίδιο τρόπο και η πίεση (1 bar) με την χρήση του Parrinello-Rahman barostat διατηρήθηκαν σταθερά ενώ ο όγκος ήταν μεταβλητός.



Σχήμα 3.3: Το βήμα ελαχιστοποίησης της ενέργειας για 100ps της ΤΥΚ2 στην ΑΡΟ μορφή.



Σχήμα 3.4: Εξισορρόπηση του συστήματος σε συνθήκες NVT με  $T=300\text{K}$  υπό τον θερμοστάτη Berendsen για 100ps.



Σχήμα 3.5: Εξισορρόπηση του συστήματος σε συνθήκες NPT με  $P=1\text{bar}$  υπο τον βαροστάτη Parrinello-Rahman barostat για 100ps.

Ο αλγόριθμος Verlet, κατά τον οποίο το δυναμικό μετατοπίζεται με μια σταθερά που μηδενίζεται στην απόσταση "αποκοπής", χρησιμοποιήθηκε ως κατώφλι Wan der Waals και Coulomb αλληλεπιδράσεων. Η ακτίνα αποκοπής για τις αλληλεπιδράσεις Wan der Waals ήταν  $1nm$  και για τις αλληλεπιδράσεις Coulomb ήταν επίσης  $1nm$ . Το χρονικό βήμα ήταν  $1fs$  ενώ οι μικρού εύρους μη δεσμικές αλληλεπιδράσεις υπολογίστηκαν κάθε δύο χρονικά βήματα και οι μεγάλου εύρους ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις κάθε τέσσερα χρησιμοποιώντας τη μέθοδο particle-mesh Ewald. Κατά την μέθοδο particle-mesh Ewald το ηλεκτροστατικό δυναμικό στις περιοδικές οριακές συνθήκες δίνεται από την εξίσωση:

$$V = \frac{1}{2} \sum_{i,j=1}^N \sum_{n \in Z^3}^l \frac{q_i q_j}{|r_{ij} + nL|}$$

όπου  $N$  τα μόρια,  $q$  το φορτίο,  $r$  οι θέσεις και  $L$  το μήκος του κουτιού.

Τέλος στις προσομοιώσεις MD όπου τα άτομα της πρωτεΐνης συγκρατήθηκαν στην αρχική τους θέση με σταθερά δύναμης  $10kJ$ , ο χρόνος που αφέθηκε το σύστημα για να ισορροπήσει ήταν  $100 ns$  για κάθε προσομοίωση για κάθε βιομόριο που μελετήθηκε. Στην παρούσα εργασία θελήσαμε να δοθεί μεγαλύτερη έμφαση στην APO μορφή της κινάσης γιατί σύμφωνα με την βιβλιογραφία η μετάλλαξη προκαλεί την υποφωσφορλίωση της, επομένως η διαφοροποίηση της λειτουργίας της συμβαίνει όταν το μόριο δεν έχει προσδέσει ATP ή υπόστρωμα (APO μορφή). Ως εκ τούτου, οι προσομοιώσεις που πραγματοποιήθηκαν είναι οι εξής:

- Για την APO μορφή έγιναν τρεις προσομοιώσεις των  $100ns$  για την wildtype δομή και τρεις προσομοιώσεις των  $100ns$  για την mutant.
- Για την ATP μορφή έγινε μία προσομοίωση των  $100ns$  για την wildtype δομή και δύο προσομοιώσεις των  $100ns$  για την mutant.
- Τέλος για την ADP μορφή έγινε μία προσομοίωση των  $100ns$  για την wildtype δομή και δύο προσομοιώσεις των  $100ns$  για την mutant.

### 3.3 Ανάλυση Προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής

Η μελέτη των προσομοιώσεων έγινε τόσο ξεχωριστά η κάθε μία όσο και κατά μέσω όρο. Για να μελετηθεί η σταθερότητα του μορίου χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ρίζας μέσης τετραγωνικής απόκλισης RMSD. Με την εκτίμηση του RMSD των ατόμων της ανθρακικής αλυσίδας μπορούμε να δούμε την απόκλιση της διαμόρφωσης του μορίου

από την αρχική του δομή (δομή αναφοράς). Το RMSD υπολογίζεται σύμφωνα με την εξίσωση:

$$RMSD = \left( \frac{1}{N_i \Sigma (x_i - x)^2} \right)^{\frac{1}{2}}$$

Όπου N ο αριθμός των ατόμων, το x αντιστοιχεί στις συντεταγμένες των ατόμων στην αρχική δομή και το  $x_i$  στην τελική δομή του trajectory. Όλοι οι υπολογισμοί έγιναν με το εργαλείο ανάλυσης *g\_rmsd* του Gromacs.

Για να μελετηθεί η κινητικότητα των ατόμων σε σχέση με τη θέση τους στη μέση δομή της προσομοίωσης χρησιμοποιήθηκε η ρίζα της μέσης τετραγωνικής διακύμανσης RMSF. Με τον υπολογισμό του RMSF μπορεί να γίνει ο εντοπισμός των πιο κινητικών καταλοίπων. Το RMSF υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$RMSF = \left( \frac{1}{N_f \Sigma (r_i^f - r_i^{ave})^2} \right)^{\frac{1}{2}}$$

Όπου N ο αριθμός των ατόμων, το  $r_i^f$  αντιστοιχεί στην θέση του ατόμου στην τελική δομή του trajectory ενώ το  $r_i^{ave}$  είναι η μέση θέση του ατόμου. Όλοι οι υπολογισμοί έγιναν με το εργαλείο ανάλυσης *g\_rmsf* του Gromacs.

Μετά από τους υπολογισμούς των RMSD και RMSF χρησιμοποιήθηκε και πάλι η μέθοδος της ρίζας μέσης τετραγωνικής απόκλισης RMSD για το κάθε κατάλοιπο ξεχωριστά RMSDev έτσι ώστε να μελετηθεί η σταθερότητα του κάθε καταλοίπου αντί όλου του μορίου σε σχέση πάντα με την δομή αναφοράς του μορίου.

Για να περιοριστούν οι διαστάσεις (Dimension reduction) των νεφών κίνησης των ατόμων χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση κύριων συνιστωσών Principal Component Analysis-PCA. Η ανάλυση αυτή είναι μια στατιστική διαδικασία που επιτυγχάνει την μείωση των διαστάσεων των εξεταζόμενων δεδομένων που στην περίπτωση μας είναι η σφαίρα στην οποία κινείται κάθε άτομο, μέσω της αντικατάστασης του συνολικού πλήθους των εμπλεκόμενων μεταβλητών με έναν μικρότερο αριθμό μεταβλητών οι οποίες είναι ασυσχέτιστες μεταξύ τους και παρέχουν σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τα χαρακτηριστικά των αρχικών μεταβλητών. Δηλαδή για να μειωθεί η διάσταση των δεδομένων πρέπει όλες οι συνιστώσες της κίνησης των ατόμων να μετατραπούν σε ένα σύνολο μεταβλητών, τις κύριες συνιστώσες, οι οποίες αποτελούν γραμμικούς συνδυασμούς των αρχικών μεταβλητών και δεν συσχετίζονται. Η διάταξή τους γίνεται έτσι ώστε οι περισσότερες διακυμάνσεις να οφείλονται στις πρώτες συνιστώσες. Έτσι παράγεται ένας δισδιάστατος πίνακας συσχέτισης με τον οποίο μπορούν να υπολογιστούν οι χαρακτηριστικές τιμές Eigenvalues και τα χαρακτηριστικά διανύσματα Eigenvectors έτσι ώστε να μπορεί να ισχύει η εξίσωση :

$$\Sigma a_k = \lambda a_k$$

Όπου το  $\lambda$  είναι η χαρακτηριστική τιμή και το  $a_k$  είναι το μη μηδενικό χαρακτηριστικό άνωσμα που αντιστοιχεί στον πίνακα. Μπορεί λοιπόν, με κάθε ζεύγος  $\lambda, a_k$  να χαρακτηριστεί η κάθε επιμέρους κίνηση της σύνθετης κίνησης του μορίου.

Τέλος, μια ακόμα ανάλυση που χρησιμοποιήθηκε είναι η ανάλυση κατά συστάδες (Cluster Analysis) σκοπός της οποίας είναι η κατάταξη των συντεταγμένων του μορίου σε ομάδες. Με την χρήση του αντίστοιχου εργαλείου του Gromacs εισάγοντας το τροχιακό του μορίου για μια προσομοίωση, ομαδοποιεί τα διαφορετικά Snapshots με την χρήση της μεθόδου της ρίζας μέσης τετραγωνικής απόκλισης RMSD. Με αυτόν τον τρόπο μπορούμε να καταλήξουμε σε μια δομή που να αντιστοιχεί στην δομή της πρωτεΐνης σε ισορροπία.





# Κεφάλαιο 4

## Αποτελέσματα

Στην ενότητα αυτή παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της παρούσας ερευνητικής εργασίας. Πιο συγκεκριμένα θα παρατεθούν τα αποτελέσματα από τις εξής αναλύσεις των προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής (ΜΔ): RMSD Ανάλυση, RMSF Ανάλυση, RMSDev Ανάλυση, εξέταση της απόστασης και κατανομής της γωνίας μεταξύ των N- C λοβών, ανάλυση κύριων συνιστωσών της μοριακής κίνησης (Principal Component Analysis, PCA), εντοπισμός αντιπροσωπευτικών δομών της κάθε προσομοίωσης, βελτιστοποίηση τους μέσω ελαχιστοποίησης της ενέργειας και εξέταση διαφόρων περιοχών βιολογικού ενδιαφέροντος π.χ περιοχή καταλοίπων φωσφορυλίωσης Υ1054-Υ1055, Μοριακό Φρένο (molecular break), περιοχή βρόχου ενεργοποίησης, περιοχή P1104A.

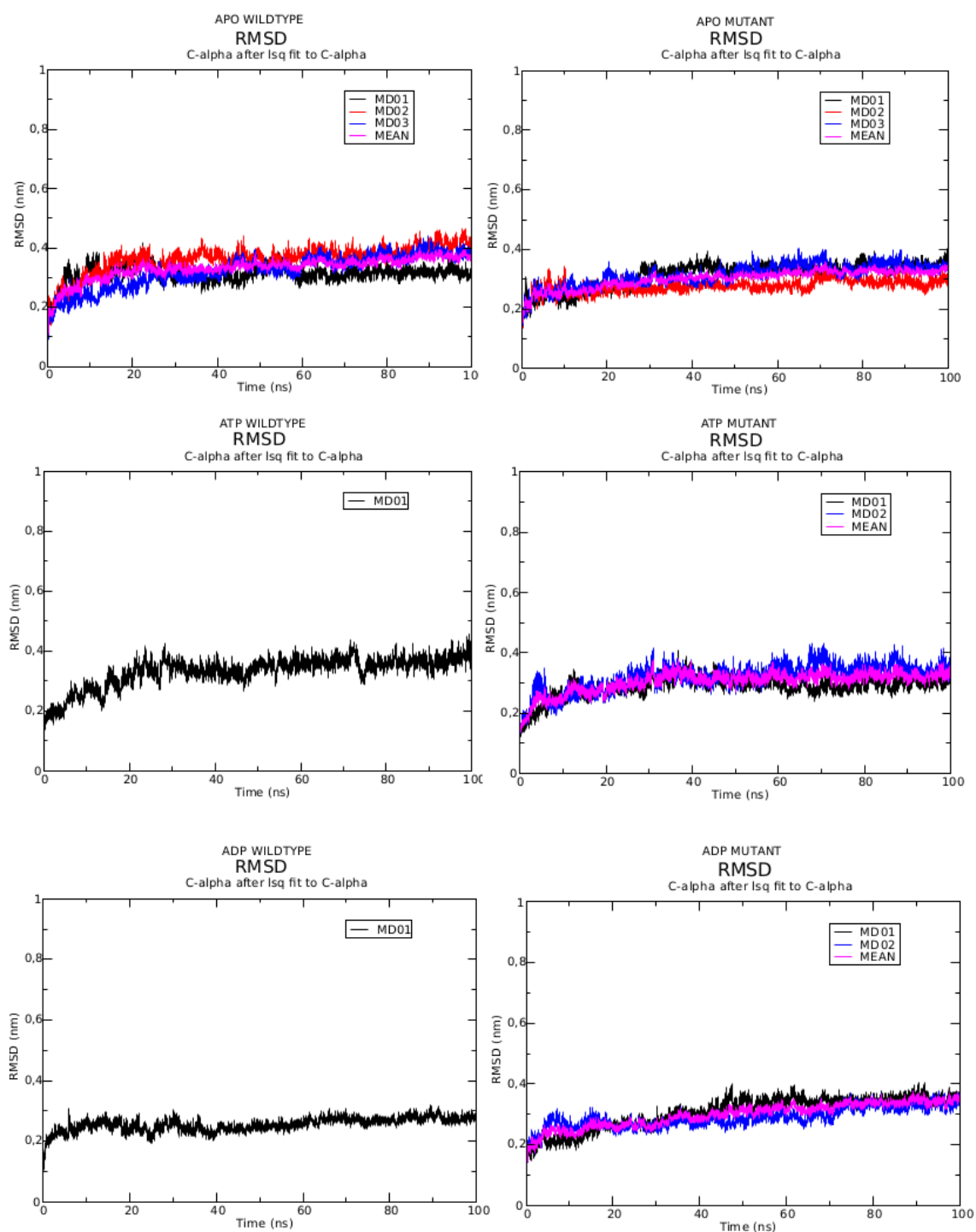
### 4.1 RMSD Ανάλυση

Προκειμένου να διερευνηθεί εάν τα αποτελέσματα των προσομοιώσεων είναι μεροληπτικά (*bias*), όπως και για να γίνει αντιληπτό πόσο διαφέρει η διαμόρφωση της πρωτεΐνης κατά την προσομοίωση σε σχέση με την αρχική διαμόρφωση (χρυσταλλική δομή), χρησιμοποιήθηκε η  $C^\alpha$  RMSD ανάλυση. Οι προσομοιώσεις ΜΔ που υλοποιήθηκαν για κάθε μορφή της πρωτεΐνης είναι: Τρεις προσομοιώσεις ΜΔ για το wildtype στην APO μορφή, τρεις για το mutant στην APO μορφή, μία προσομοίωση ΜΔ για το wildtype παρουσία ATP, τρεις για το mutant παρουσία ATP, μία προσομοίωση ΜΔ για το wildtype παρουσία ADP και τρεις προσομοιώσεις για το mutant παρουσία ADP. Ο λόγος που έγιναν περισσότερες από μία προσομοιώσεις για την κάθε μορφή της πρωτεΐνης είναι για να εξασφαλιστεί ότι τα αποτελέσματα δεν είναι μεροληπτικά και δεν επηρεάζονται από την αρχική δομή (χρυσταλλική δομή) που χρησιμοποιήθηκε στις προσομοιώσεις ΜΔ.

Στο Σχήμα 4.1 φαίνεται η εξέλιξη του  $C^\alpha$  RMSD ανάλυση κατά τη διάρκεια της εκάστοτε προσομοίωσης ΜΔ που διενεργήθηκαν η αριστερή στήλη περιγράφει το wildtype στις APO, ATP και ADP μορφές της αντίστοιχα ενώ η δεξιά στήλη περιγράφει mutant

στις APO, ATP και ADP μορφές της αντίστοιχα. Επιπλέον στο Σχήμα 4.1 φαίνεται και η μέση τιμή (*mean*), (με ροζ) των  $C^{\alpha}$  RMSD απο τις RMS τιμές των επιμέρους προσομοιώσεων για κάθε μία από τις μορφές της κινάσης που μελετήθηκαν.

Επιπρόσθετα, η ανάλυση  $C^{\alpha}$  RMSD χρησιμοποιήθηκε για την διερεύνηση του κατά πόσο το εκάστοτε μελετώμενου σύστημα έχει φτάσει σε ισορροπία ή αν χρειάζεται να διεξαχθεί προσομοίωση μεγαλύτερου χρόνου. Όπως φαίνεται απο το Σχήμα 4.1 σε όλες τις προσομοιώσεις ΜΔ (διάρκειας 100 ns έκαστη) έχει επέλθει ισορροπία μετά τα 60 ns. Ως εκ τούτου, η περιοχή 60-100 ns επιλέχθηκε για όλες τις αναλύσεις των προσομοιώσεων ΜΔ που παρουσιάζονται παρακάτω.



Σχήμα 4.1:  $C^{\alpha}$ RMSD ανάλυση κατά την διάρκεια των προσομοιώσεων (100ns) ΜΔ για το wildtype (αριστερά στην εικόνα) και το mutant (δεξιά στην εικόνα) και για τις τρεις μορφές της , APO (πάνω), παρουσία ATP (μέση), παρουσία ADP (κάτω).

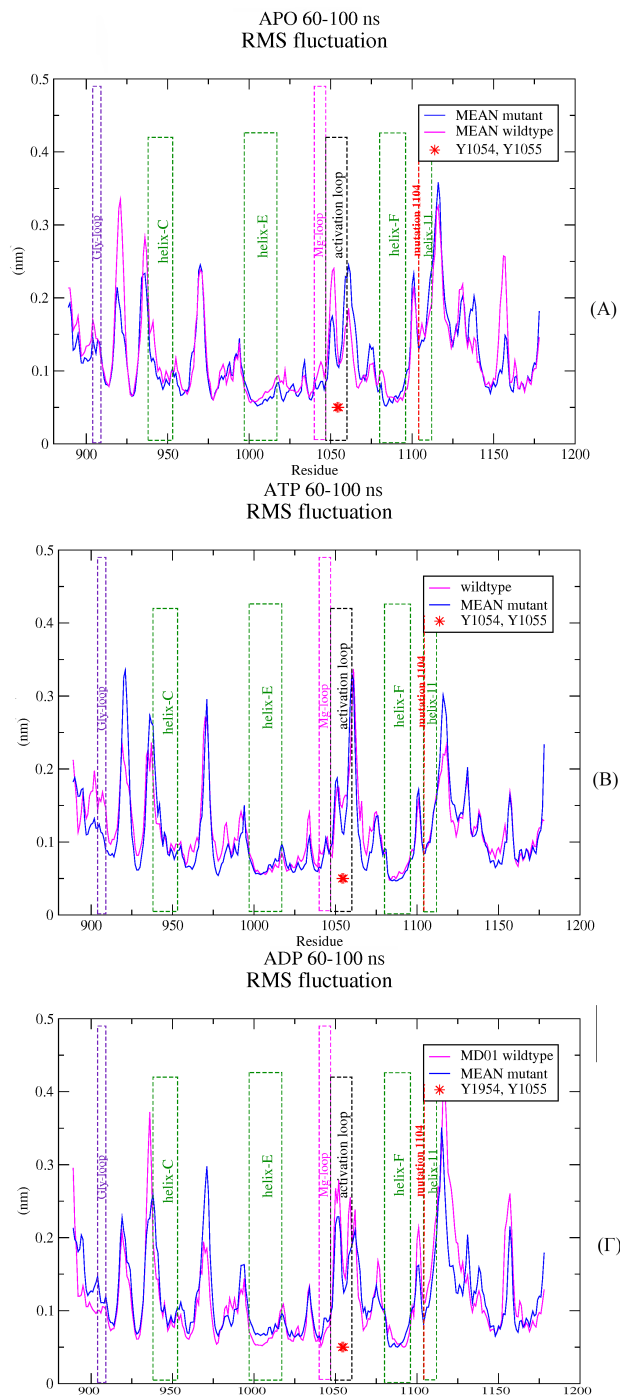
## 4.2 RMSF Ανάλυση

Η  $C^\alpha$  RMSD ανάλυση μας δίνει την συνολική μέση μετατόπιση όλων των  $C^\alpha$  ατόμων από την αρχική δομή που χρησιμοποιήσαμε και δεν περιέχει πληροφορία σχετικά με την κινητικότητα των επιμέρους περιοχών της πρωτεΐνης. Αντιθέτως, η RMSF ανάλυση μας δείχνει την κινητικότητα των ατόμων σε σχέση με μια μέση (average) δομή. Στο Σχήμα 4.2 φαίνονται οι μέσοι όροι διακυμάνσεων των ατόμων  $C^\alpha$  που έχουν υπολογιστεί από τις επιμέρους προσομοιώσεις για κάθε μορφή της wildtype και mutant πρωτεΐνης όλων των προσομοιώσεων (APO, παρουσία ATP, παρουσία ADP). Όπως αναφέρθηκε παραπάνω όλες οι RMSF υπολογίστηκαν στο διάστημα 60-100 ns όπου έχει επέλθει η ισορροπία του συστήματος.

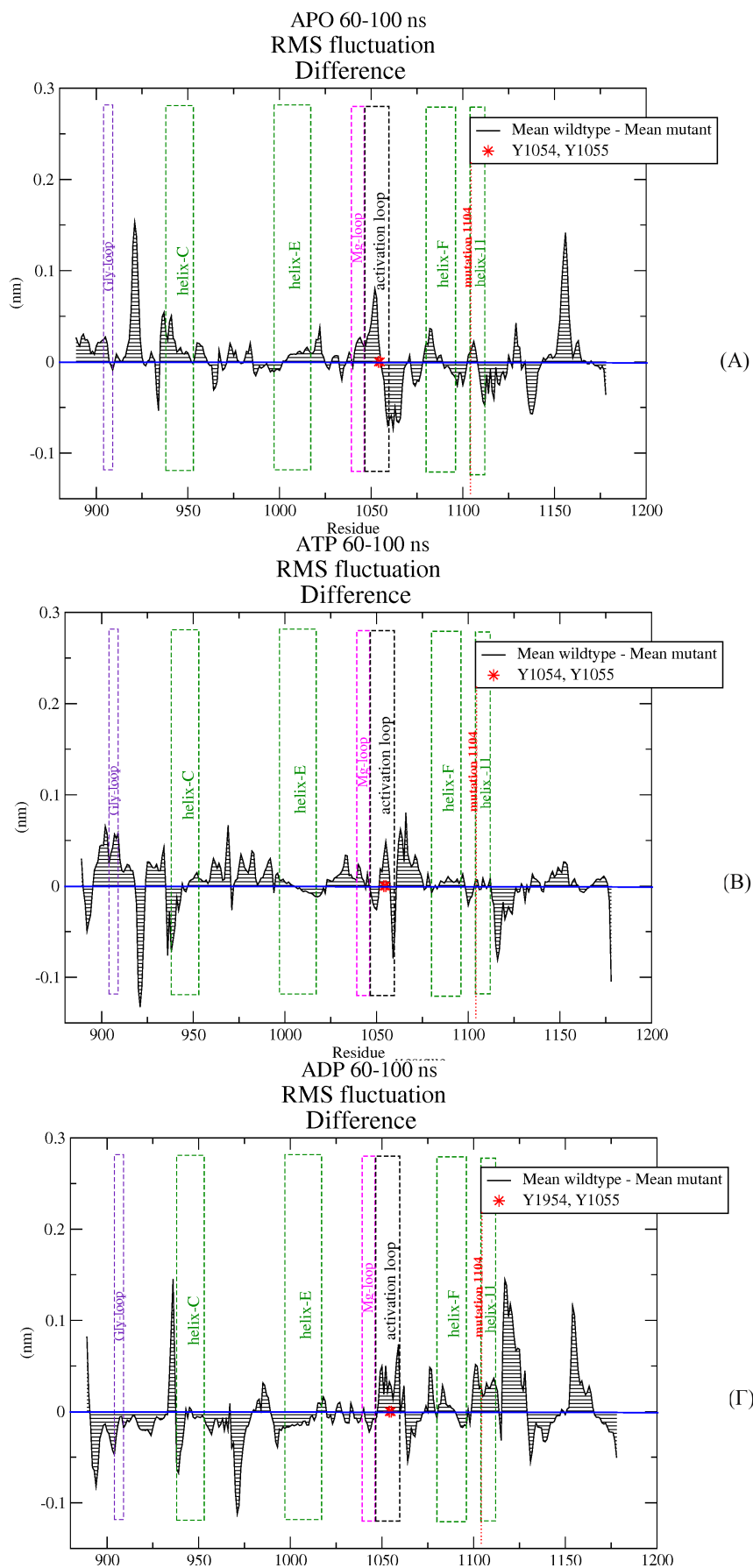
Στο Σχήμα 4.3 απεικονίζεται η διαφορά των μέσων διακυμάνσεων ( $meanrmsf_{wildtype} - meanrmsf_{mutant}$ ) και αυτή η αναπαράσταση διευκολύνει την παρατήρηση της κινητικότητας των καταλοίπων ανάμεσα στο wildtype και το mutant, επομένως πάνω από τον άξονα βρίσκονται οι περιοχές της πρωτεΐνης που είναι πιο κινητικές στην περίπτωση του wildtype ενώ κάτω από τον άξονα βρίσκονται οι περιοχές που είναι πιο κινητικές στην περίπτωση του mutant.

Αρχίζοντας από το διάγραμμα (Α) στο Σχήμα 4.2, όπου απεικονίζεται το μέσο των τριών προσομοιώσεων του wildtype (ροζ) στην APO μορφή και των τριών προσομοιώσεων του mutant (μπλε) στην APO μορφή, φαίνεται ότι το wildtype είναι πιο κινητικό στην αρχή του βρόχου ενεργοποίησης (activation loop) μέχρι και τις τυροσίνες Y1054 και Y1055 οι οποίες σύμφωνα με την βιβλιογραφία πρέπει να φωσφορυλιωθούν για να ενεργοποιηθεί η πρωτεΐνη. Αντιθέτως, το τμήμα του βρόχου ενεργοποίησης μετά την περιοχή των τυροσινών αυτών φαίνεται πιο σταθερό στο mutant. Αυτό φαίνεται καλύτερα και από το διάγραμμα (Α) στο Σχήμα 4.3 όπου ο βρόχος ενεργοποίησης και ο βρόχος πρόσδεσης των ιόντων μαγνησίου Mg-loop φαίνονται να είναι πιο κινητικοί στην περίπτωση του wildtype σε σχέση με το mutant. Το ίδιο παρατηρείται και για την  $\alpha$ C-έλικα. Αντίστοιχα, το mutant είναι εμφανώς πιο κινητικό στην μικρή περιοχή του βρόχου ενεργοποίησης μετά τις τυροσίνες Y1054 και Y1055. Η APO μορφή, όπως έχει προαναφερθεί, είναι η διαμόρφωση της πρωτεΐνης πριν προσδεθεί το ATP, να φωσφορυλιωθεί ή να προσδεθεί το υπόστρωμα. Η κινητικότητα, λοιπόν, είναι απαραίτητη σε αυτή τη διαμόρφωση για την φωσφορυλίωση και την ενεργοποίηση της κινάσης.

Προχωρώντας στο επόμενο διάγραμμα του Σχήματος 4.2, στην δομή της πρωτεΐνης παρουσία ATP, δεν παρατηρούνται ουσιαστικές διαφορές ανάμεσα στο wildtype και στο mutant. Όσον αφορά στη μορφή παρουσία ADP, από τα Σχήματα 4.2 (Γ) και 4.3 (Γ) φαίνεται ότι ο N-λοβός είναι πιο κινητικός στην περίπτωση του mutant ενώ ο C-λοβός είναι πιο ευκίνητος στην περίπτωση του wildtype.



Σχήμα 4.2: RMSF ανάλυση (μέσοι όροι των προσομοιώσεων για περιπτώσεις που έγιναν παραπάνω από μία) για τις τρεις διαφορετικές μορφές APO, ATP, ADP για 60-100 ns, για το wildtype (με ροζ) και το mutant (με μπλε). Με πράσινα πλαίσια αναπαριστώνται οι περιοχές των  $\alpha$ -ελίκων, C, E, F και 11 ενώ τα πλαίσια με μαύρο, μοβ, ροζ οριοθετούν τις περιοχές του βρόχου ενεργοποίησης, του βρόχου γλυκίνης και του βρόχου δέσμευσης των μαγνησίων αντίστοιχα. Με κόκκινη διακεκομμένη γραμμή φαίνεται η περιοχή του αμινοξέως 1104 που μεταλλάσσεται από *Pro* σε *Ala*. Τέλος, οι κόκκινοι αστερίσκοι δηλώνουν τις τυροσίνες 1054-1055 των οποίων η φωσφορυλίωση έχει σημασία για την ενεργοποίηση της TYK2

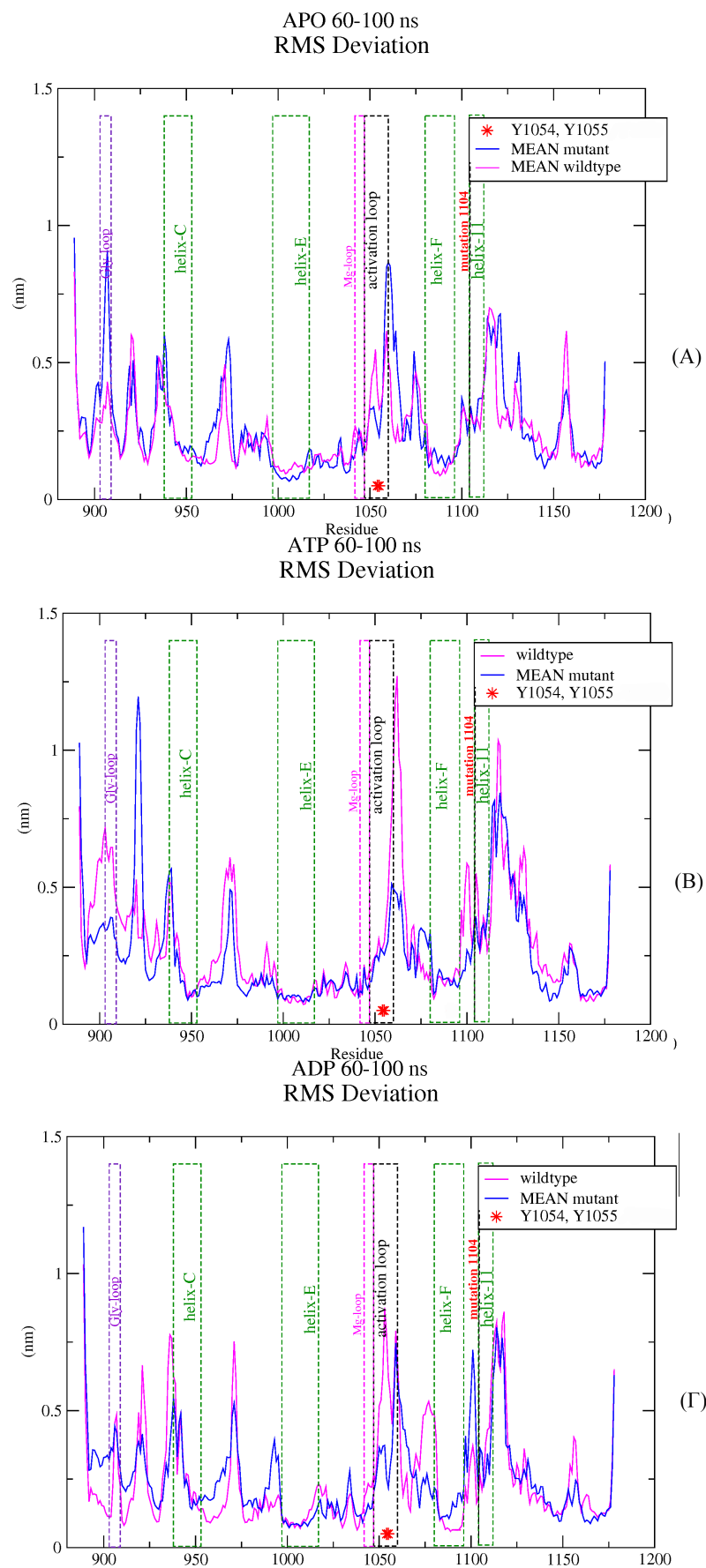


Σχήμα 4.3: Οι διαφορές των μέσων RMSF του wildtype- του mutant  $RMSF_{wildtype} - RMSF_{mutant}$  για τις τρεις μορφές τους APO, παρουσία ATP, παρουσία ADP για 60-100 ns. Η οριοθέτηση των περιοχών της ΤΥΚ2 είναι η ίδια με αυτήν στο Σχήμα 4.2

## 4.3 RMSDev Ανάλυση

Για να δούμε πόσο διαφέρει η δομή των επιμέρους τμημάτων της πρωτεΐνης που έχει προκύψει από τις προσομοιώσεις σε σχέση με την αρχική χρησιμοποιήσαμε  $C^\alpha$  RMSDev ανάλυση για την περιοχή 60-100 ns. Ένα διάγραμμα  $C^\alpha$  RMSDev, όπως έχει αναφερθεί στο 3<sup>ο</sup> κεφάλαιο, μας δείχνει τη μέση απόκλιση της θέσης κάθε καταλοίπου ( $C^\alpha$  ατόμου του) κατά την διάρκεια της προσομοίωσης ΜΔ σε σχέση με την αρχική δομή (κρυσταλλική δομή). Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η δομή της ΤΥΚ2 παρουσία ADP σαν αρχικό μοντέλο (*PDB ID* : 4GVJ) στις προσομοιώσεις.

Στο Σχήμα 4.4 φαίνεται το mean RMSDev των πολλαπλών προσομοιώσεων για την APO μορφή, παρουσία ATP και παρουσία ADP αντίστοιχα. Στην APO μορφή το wildtype φαίνεται μεγαλύτερη η απόκλιση από την αρχική δομή στον βρόχο ενεργοποίησης, κάτι που αναμένεται και από τα αποτελέσματα της *RMSF* ανάλυσης. Παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον το γεγονός ότι ο βρόχος γλυκίνης στο mutant διαφέρει πολύ περισσότερο από την αρχική δομή (στην οποία αλληλεπιδρά με ένα μόριο ADP), από ότι το wildtype που δεν φαίνεται να διαφοροποιείται ιδιαίτερα. Επιπλέον, η περιοχή μετά τις δύο τυροσίνες που φωσφορυλιώνονται έχει επίσης μεγαλύτερη απόκλιση σε σχέση με την αρχική δομή στην περίπτωση του mutant. Αντίθετα, παρουσία ATP παρατηρούμε ότι ο βρόχος γλυκίνης φαίνεται να απέχει πολύ περισσότερο στο wildtype από ότι στο mutant. Το ίδιο ισχύει και για την περιοχή μετά τις δύο τυροσίνες. Τέλος, από το Σχήμα 4.4 και στην περίπτωση παρουσίας του ADP ο βρόχος ενεργοποίησης του wildtype φαίνεται να απέχει σημαντικά από την αρχική δομή της κινάσης από ότι το mutant.



Σχήμα 4.4:  $C^{\alpha}$  RMSDev ανάλυση για τις τρεις διαφορετικές μορφές APO, ATP, ADP για 60-100 ns, για το wildtype (με ροζ) και το mutant (με μπλε). Η οριοθέτηση των περιοχών που αναφέρονται στο κείμενο είναι όπως το Σχήμα 4.2



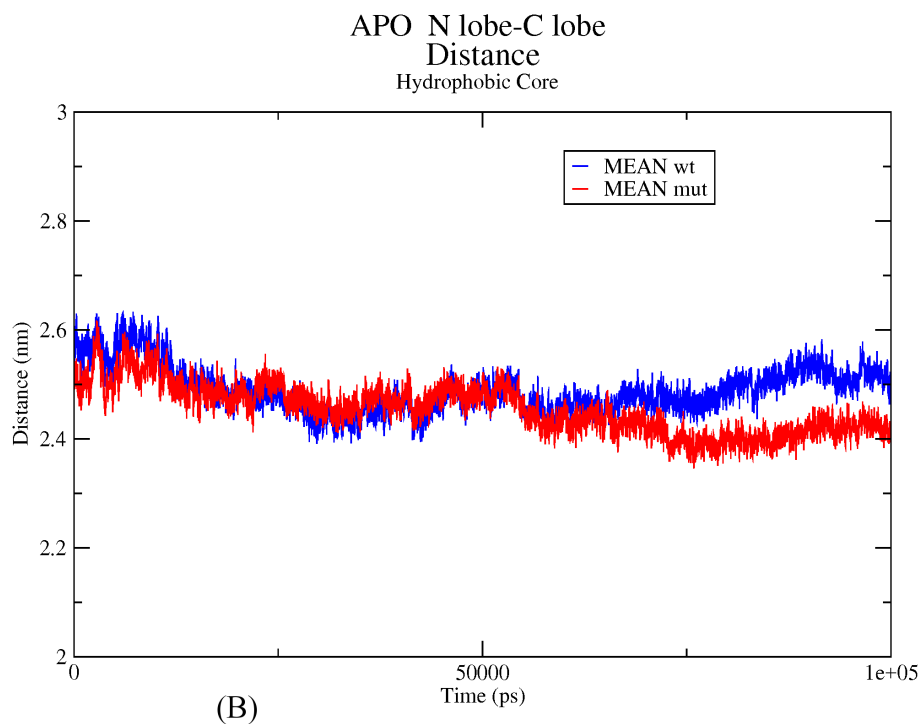
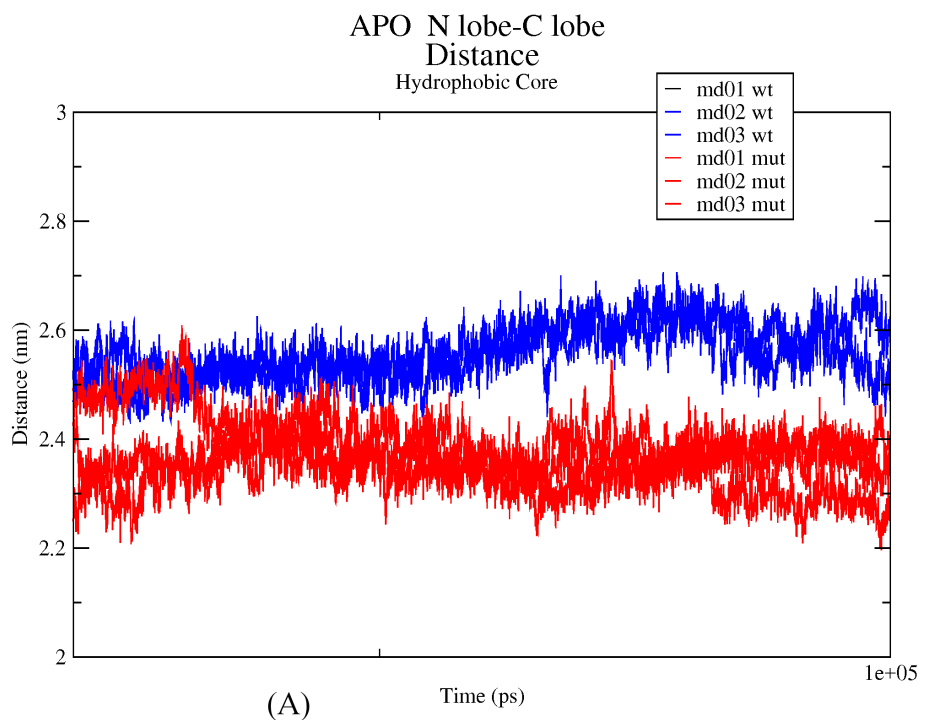
## 4.4 Ανάλυση της σχετικής θέσης των N- και C- λοβών

Σύμφωνα με τους (Kornev et. al 2006), στην ενεργοποιημένη διαμόρφωση των κινασών, οι δύο λοβοί (N- και C-) ανοίγουν έτσι ώστε να εισέλθει το ATP και να προσδεθεί στον βρόχο γλυκίνης. Για να εξεταστεί αν οι mutant και wildtype δομές στην APO κατάσταση βρίσκονται σε ενεργή ή ανενεργή μορφή, υπολογίστηκε η απόσταση του N-αμινοτελικού και του C-καρβοξυτελικού λοβού.

Στο πρώτο διάγραμμα (A) του Σχήματος 4.5 φαίνονται οι αποστάσεις του N- και του C- λοβού των mutant και wildtype στην APO μορφή της κινάσης. Είναι εμφανές από το σχήμα ότι από τα 60 ns και έπειτα, οι αποστάσεις του N- και του C- λοβού διαφοροποιούνται μεταξύ των mutant και wildtype και πιο συγκεκριμένα στις προσομοιώσεις wildtype είναι μεγαλύτερες από ότι στις προσομοιώσεις του mutant.

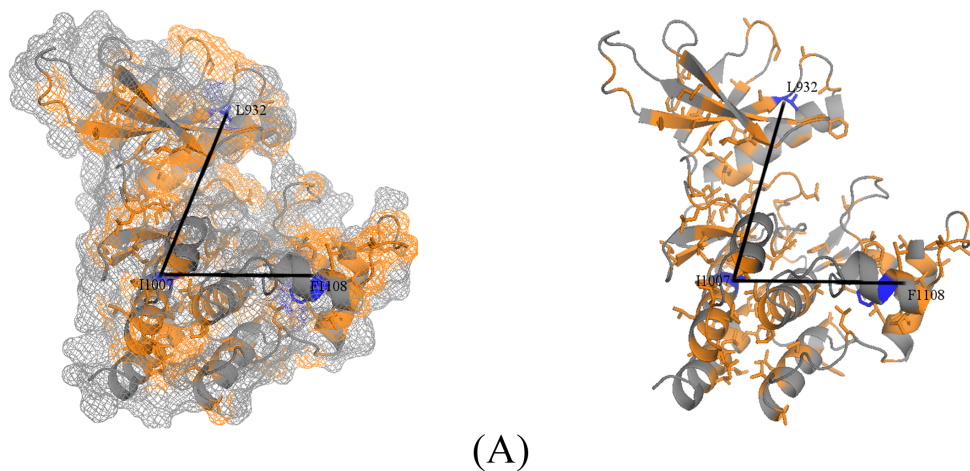
Στο δεύτερο διάγραμμα του Σχήματος 4.5 φαίνονται οι μέσοι όροι της απόστασης μεταξύ του N- και του C- λοβού που έχουν υπολογιστεί για τις (τρεις) προσομοιώσεις ΜΔ των wildtype και mutant στην APO μορφή που φαίνονται στο τμήμα (A) του σχήματος. Από το Σχήμα 4.5 υπολογίζεται ότι η απόσταση μεταξύ των N- και C- λοβών για τα mutant και wildtype είναι μεγαλύτερη κατά  $0.9nm = 9\text{\AA}$  στην περίπτωση του wildtype, δηλαδή το wildtype έχει πιο ανοιχτή διαμόρφωση κατά  $9\text{\AA}$ .

Για να διερευνήσουμε περαιτέρω την διαφορά των διαμορφώσεων μεταξύ των wildtype και mutant ως προς την σχετική θέση των δύο λοβών, επιλέξαμε τρία υδρόφοβα κατάλοιπα που συντηρούνται στην οικογένεια των κινασών και έχουν μειωμένη κινητικότητα αφού βρίσκονται θαμμένα στο κέντρο σταθερών δευτεροταγών δομών για να υπολογίσουμε την γωνία που αντιπροσωπεύει το άνοιγμα/κλείσιμο των N- C- λοβών κάθε διαμόρφωσης. Τα κατάλοιπα αυτά είναι η **Λευκίνη 932**, η **Ισολευκίνη 1007** και η **Φαινυλαλανίνη 1108** (Σχήμα 4.6A). Στην συνέχεια, υπολογίστηκε η κατανομή της γωνίας L932-I1007-F1108 κατά την διάρκεια όλων των προσομοιώσεων ΜΔ για την APO μορφή των wildtype και mutant (Σχήμα 4.6B). Όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.6B στην περίπτωση του wildtype όλες οι διαμορφώσεις είναι πιο ανοιχτές, με κατανομή γωνιών  $80^\circ - 100^\circ$  ενώ στην περίπτωση του mutant οι διαμορφώσεις και στις τρεις προσομοιώσεις ΜΔ είναι πιο κλειστές με σταθερότερη κατανομή γωνιών  $60^\circ - 80^\circ$ . Στο Σχήμα 4.7 γίνεται η υπέρθεση των 3D μοντέλων δομής (ενεργειακά βελτιστοποιημένες αντιπροσωπευτικές δομές βλέπε παρακάτω) με την αρχική δομή (PDB ID: 4GVJ) για τις τρεις προσομοιώσεις του wildtype (πάνω) και τις τρεις προσομοιώσεις του mutant (κάτω). Όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.7 η γωνία L932-I1007-F1108 για τις τρεις προσομοιώσεις του wildtype είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη γωνία στην αρχική δομή (PDB ID: 4GVJ), ενώ στην περίπτωση και των τριών mutant δομών η γωνία είναι μικρότερη από ότι στην αρχική δομή.

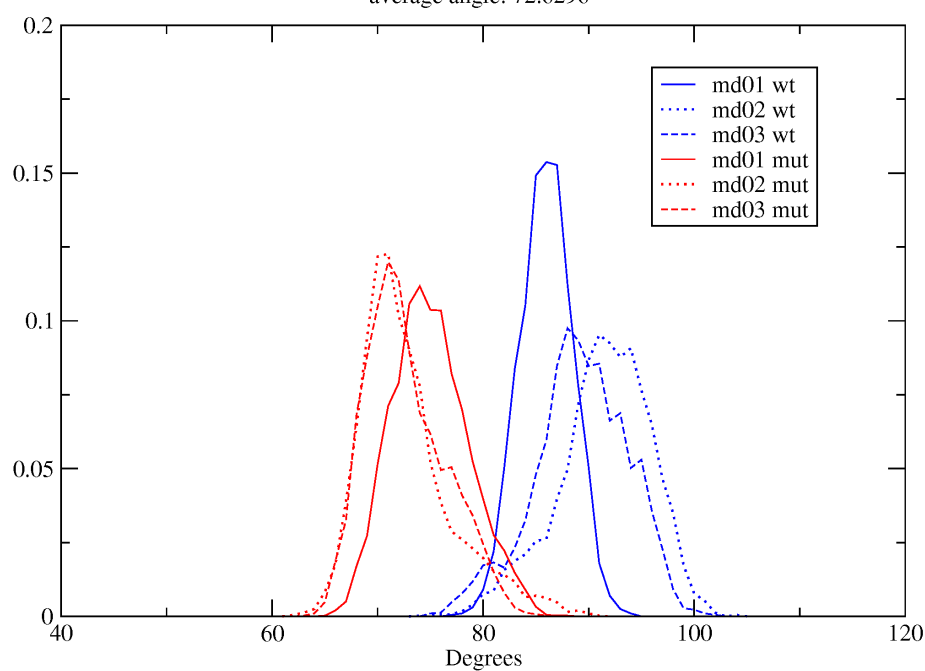


Σχήμα 4.5: Η μεταβολή της απόστασης μεταξύ των N- και C- λοβών κατά την διάρκεια όλων των επιμέρους προσομοιώσεων ΜΔ για την APO μορφή της TTK2. A) Η μεταβολή της απόστασης για τις (τρεις) επιμέρους προσομοιώσεις ΜΔ για το wildtype (μπλε) και το mutant (κόκκινο). B) Οι αντίστοιχη μέση απόσταση για το wildtype (μπλε) και το mutant (κόκκινο).

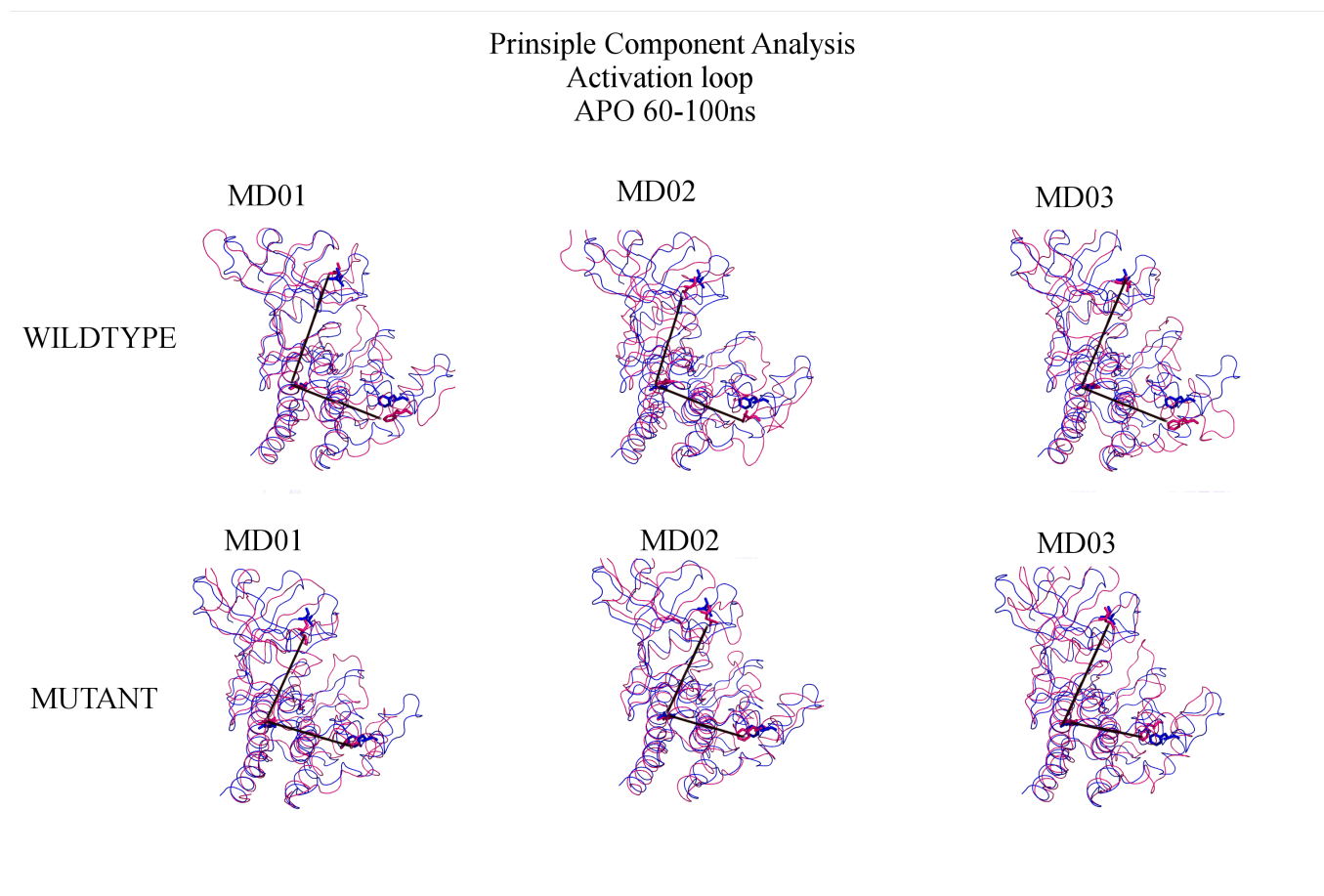
## Γωνία N-C λοβού



APO 60-100 ns  
Angle Distribution: L932-I1007-F1108  
average angle: 72.6296°



Σχήμα 4.6: A) Η γωνία που επιλέχθηκε για την μελέτη του ανοίγματος των δύο λοβών με τα κατάλοιπα L932-I1007-F1108 στην δομή της TTK2 4GVJ. B) Η κατανομή της γωνίας για την APO κατάσταση 60-100 ns για τις τρεις προσομοιώσεις ΜΔ της wildtype δομής (μπλε) και τις τρεις προσομοιώσεις ΜΔ της mutant δομής (κόκκινο).



Σχήμα 4.7: Αναπαράσταση κορδέλας της υπέρυσης 3D μοντέλων δομής (ενεργειακά βελτιστοποιημένες αντιπροσωπευτικές δομές)(με μοβ) με την αρχική δομή (PDB ID: 4GVJ με μπλε) για το χρονικό διάστημα 60-100 ns των τριών προσομοιώσεων ΜΔ της APO μορφής για το wildtype (πάνω) και το mutant (κάτω). Με ράβδους αναπαριστώνται τα κατάλοιπα L932-I1007-F1108 της αντιπροσωπευτικής γωνίας για το άνοιγμα/κλείσιμο των N- C- λοβών.

## 4.5 Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών της Μοριακής Κίνησης (Principal Component Analysis, PCA)

Όπως αναφέραμε στην παράγραφο 4.2, έγινε η  $C^\alpha$  RMSF ανάλυση με στόχο να παρατηρηθούν τα κινητικά κατάλοιπα σε σχέση με μια μέση (*average*) διαμόρφωση για κάθε προσομοίωση. Ως συνέχεια αυτής της ανάλυσης, για να διακρίνουμε την κινητικότητα που έχει φυσική σημασία από την κινητικότητα που προέρχεται από τυχαίο θόρυβο έγινε χρήση της ανάλυσης κύριων συνιστωσών (Principal Component Analysis- PCA) στο *backbone* της πρωτεΐνης, για τις πρώτες έξι συνιστώσες, την χρονική περίοδο 60-100 ns. Μετά την ανάλυση κύριων συνιστωσών για να γίνει πιο εύκολα παρατηρήσιμη η κινητικότητα των καταλοίπων, οι κινήσεις μεταφράστηκαν χρωματικά σε κλίμακα τριών χρωμάτων μπλε-λευκό-κόκκινο που αντιστοιχεί σε αύξηση της κινητικότητας. Οι περιοχές οι οποίες εξετάστηκαν συγκριτικά μεταξύ των wildtype και mutant αναλύονται παρακάτω.

### • Βρόχος ενεργοποίησης

Όπως έχει αναφερθεί στα προηγούμενα κεφάλαια, ο βρόχος ενεργοποίησης παίζει πρωτεύοντα ρόλο στην ενεργοποίηση της κινάσης και παρατηρείται ιδιαίτερα κινητικός στις ενεργές μορφές κινάσων (Taylor, Radzio-Andzelm 1994). Επίσης ο βρόχος αυτός στην περίπτωση της ΤΥΚ2 φέρει δύο τυροσίνες, Υ1054 και Υ1055, οι οποίες πρέπει να φωσφορυλιωθούν ώστε να ενεργοποιηθεί η κινάση (Gauzzi et al. 1996). Στο Σχήμα 4.8 φαίνεται η μέση δομή που έχει προκύψει από τις τρεις προσομοιώσεις του wildtype, MD01, MD02, MD03, και στην δεύτερη οι αντίστοιχες τρεις προσομοιώσεις του mutant, MD01, MD02, MD03 αντίστοιχα. Η μέση δομή του σχήματος 4.8 έχει προκύψει από τις έξι κύριες συνιστώσες της μοριακής κίνησης οι οποίες έχουν μεταφραστεί χρωματικά πάνω στην εκάστοτε μέση δομή. Σε καθεμία από τις δομές έχει γίνει υπέρθεση της κρυσταλλικής δομής της ΤΥΚ2 (με κίτρινο) που χρησιμοποιήθηκε ως αρχικό μοντέλο, όπου οι πλευρικές αλυσίδες των Υ1054 και Υ1055 αναπαριστώνται με ράβδους (stick representation).

Στο Σχήμα 4.9 φαίνεται η υπέρθεση των δομών που προκύπτουν από την ανάλυση κύριων συνιστωσών (με μοβ) για την περιοχή 60-100 ns και η αρχική δομή (PDB ID: 4GVJ) (με μπλε). Όπως φαίνεται από τα Σχήματα 4.8 και 4.9 μπορούμε να διακρίνουμε ότι ο βρόχος ενεργοποίησης μέχρι τις δύο τυροσίνες είναι κινητικός και στις τρεις προσομοιώσεις στην περίπτωση του wildtype ενώ στην περίπτωση του mutant η περιοχή αυτή είναι λιγότερο ευκίνητη, κάτι που έρχεται

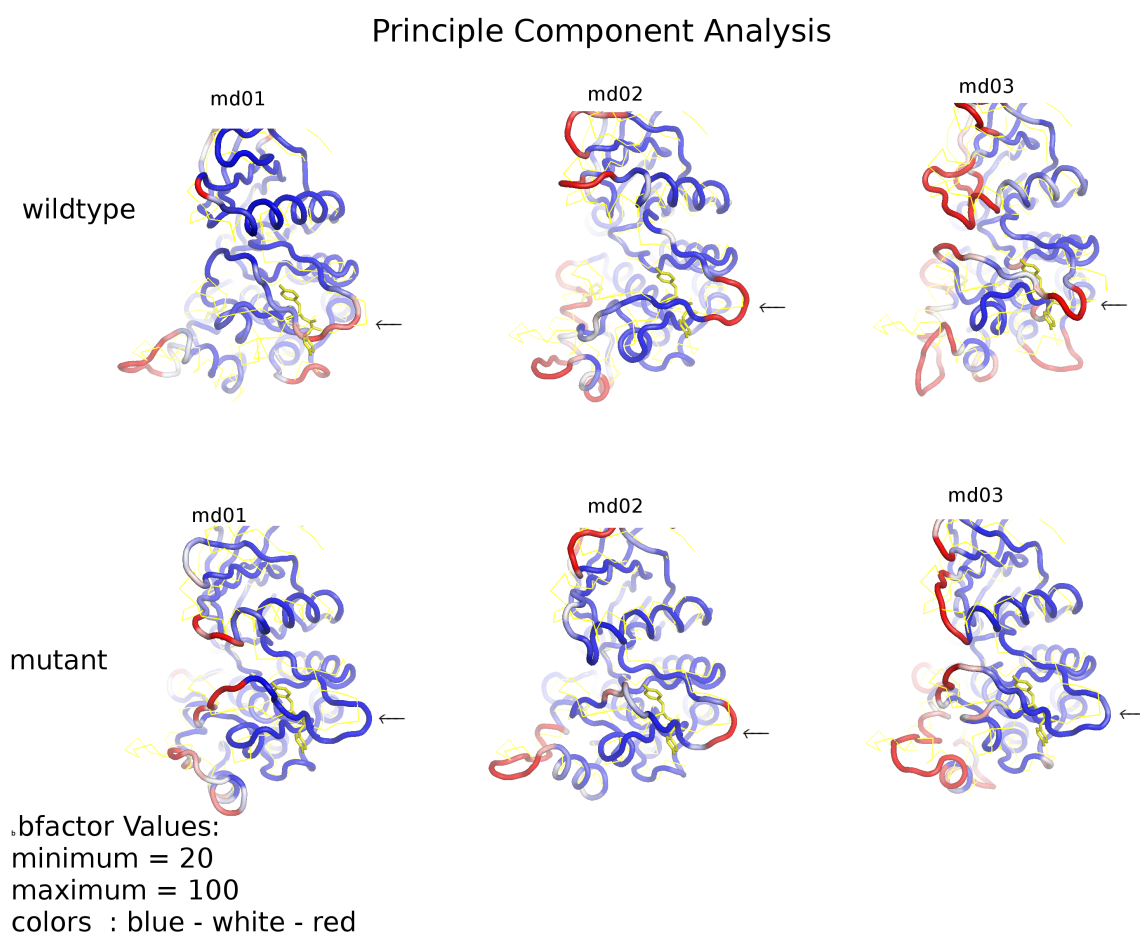
σε συμφωνία με τα μέχρι τώρα αποτελέσματά μας.

- **α-έλικα 11** (έλικα 1104 καταλοίπου)

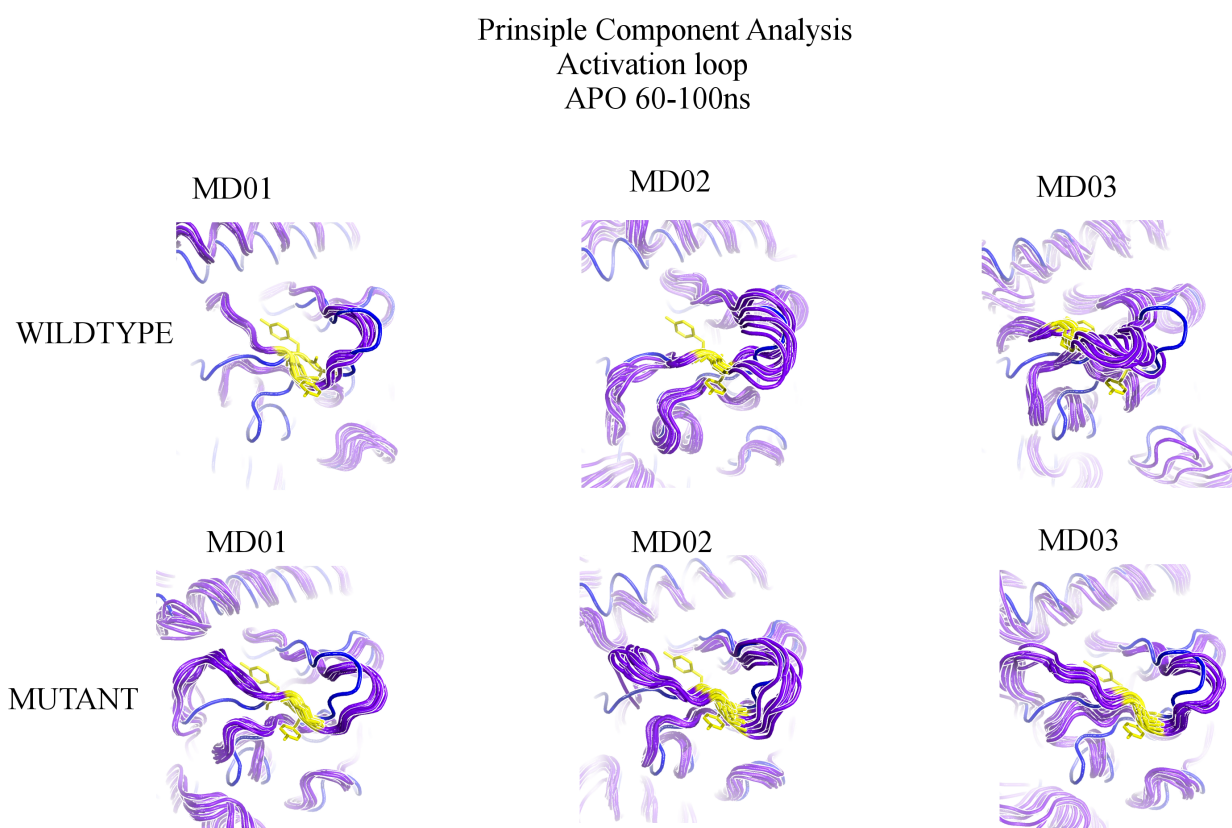
Η περιοχή της α-έλικας-11 στην οποία βρίσκεται η προλίνη 1104, σύμφωνα με προσομοιώσεις που παρουσιάστηκαν από τους Zervou et al.2017, στην περίπτωση που η προλίνη 1104 αντικαθίσταται από αλανίνη φαίνεται να σταθεροποιείται, επιπρόσθετα της προσδίδεται μια επιπλέον στροφή πέντε καταλοίπων.

Για να διερευνηθεί η υπόθεση αυτή, χρησιμοποιήθηκε επίσης η ανάλυσης κύριων συνιστωσών της μοριακής κίνησης όπως περιγράφηκε παραπάνω και η περιοχή της α-έλικας-11 φαίνεται στα Σχήματα 4.10 και 4.11.

Στα δύο σχήματα, Σχήμα 4.10 και Σχήμα 4.11, στην πρώτη γραμμή φαίνεται η περιοχή της α ελικας για το wildtype (πάνω) και το mutant (κάτω) για τις τρεις προσομοιώσεις MD01, MD02, MD03 αντίστοιχα. Απο το Σχήμα 4.10 στις δύο από τις τρεις προσομοιώσεις, MD02 και MD03 του wildtype η έλικα στο σημείο της μετάλλαξης φαίνεται να είναι πιο κινητική. Μόνο σε μία περίπτωση του wildtype, MD01 η περιοχή αυτή φαίνεται να είναι σταθερή. Αντίθετα, από τις τρεις προσομοιώσεις του mutant η περιοχή του κατάλοιπου 1104 φαίνεται να είναι σταθερή.

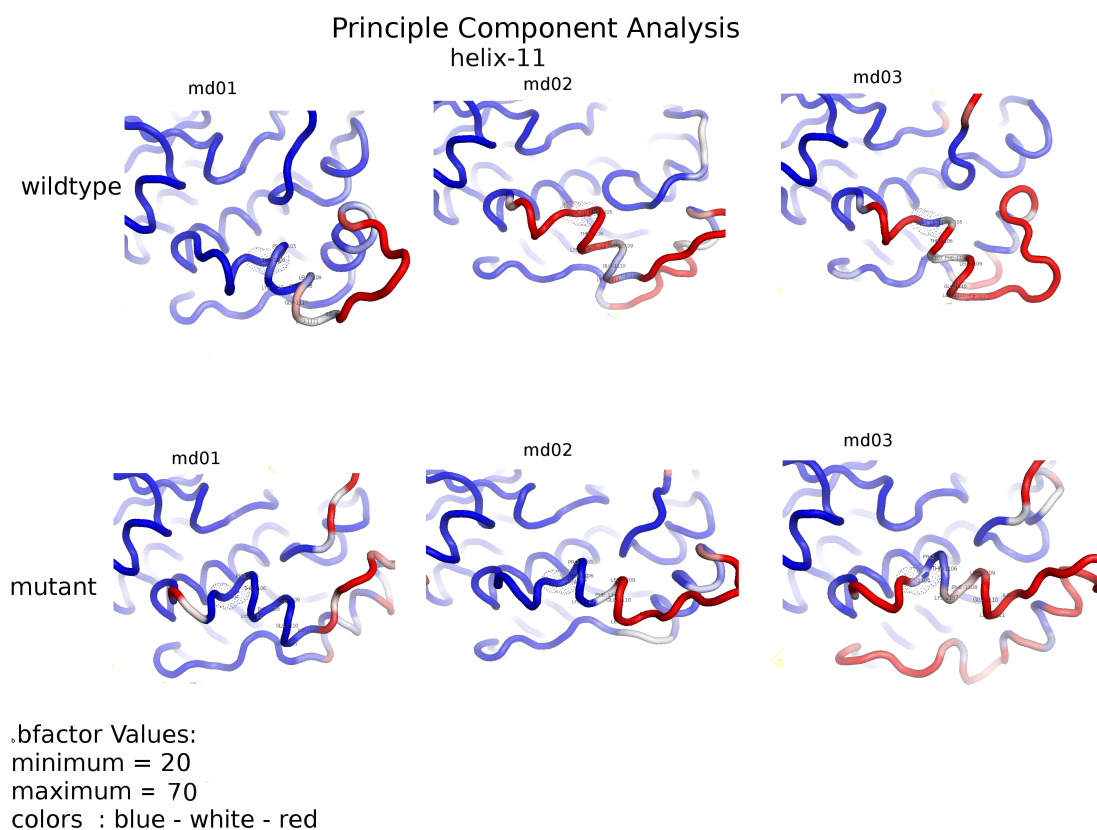


Σχήμα 4.8: Απεικόνιση κύριων συνιστωσών της κίνησης στις μέσες δομές για την περιοχή 60-100 ns των τριών προσομοιώσεων ΜΔ της ΑΡΟ μορφής για το wildtype (πάνω) και το mutant (κάτω). Ο βρόχος ενεργοποίησης δείχνεται με βέλος. Οι κύριες κινήσεις μεταφράστηκαν χρωματικά σε κλίμακα από μπλε προς κόκκινο για μικρού εύρους προς μεγάλου εύρους ατομικές διακυμάνσεις αντίστοιχα.

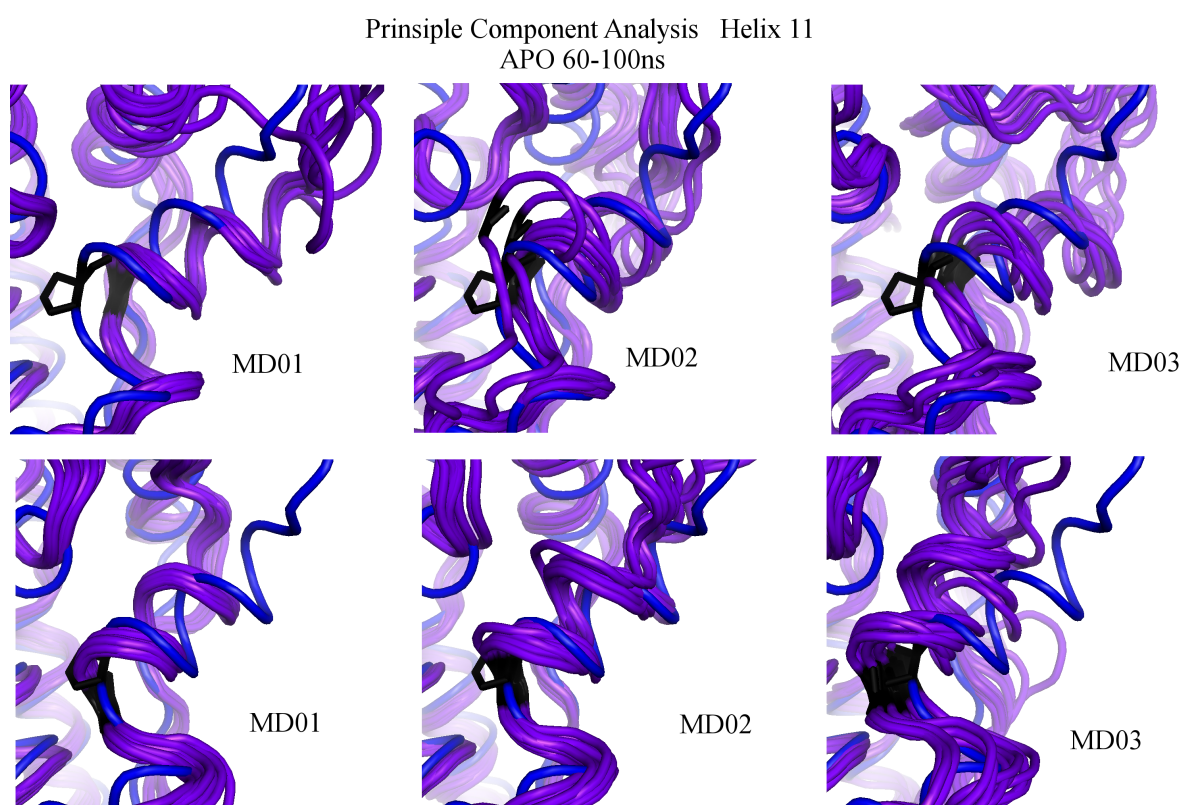


Σχήμα 4.9: Απεικόνιση κύριων συνιστωσών της κίνησης με υπέρθεση δομών, για την περιοχή 60-100 ns των τριών προσομοιώσεων ΜΔ της APO μορφής για το wildtype (πάνω) και το mutant (κάτω).





Σχήμα 4.10: Απεικόνιση κύριων συνιστωσών της κίνησης στις μέσες δομές για το χρονικό διάστημα 60-100 ns των τριών προσομοιώσεων ΜΔ της APO μορφής για το wildtype (πάνω) και το mutant (κάτω) στην περιοχή της α-έλικας-11. Η χρωματική κλίμακα που χρησιμοποιήθηκε είναι η ίδια με το Σχήμα 4.8.



Σχήμα 4.11: Απεικόνιση κύριων συνιστωσών της κίνησης με υπέρθεση δομών για το χρονικό διάστημα 60-100 ns των τριών προσομοιώσεων ΜΔ της ΑΡΟ μορφής για το wildtype (πάνω) και το mutant (κάτω) στην περιοχή της α-έλικα-11.

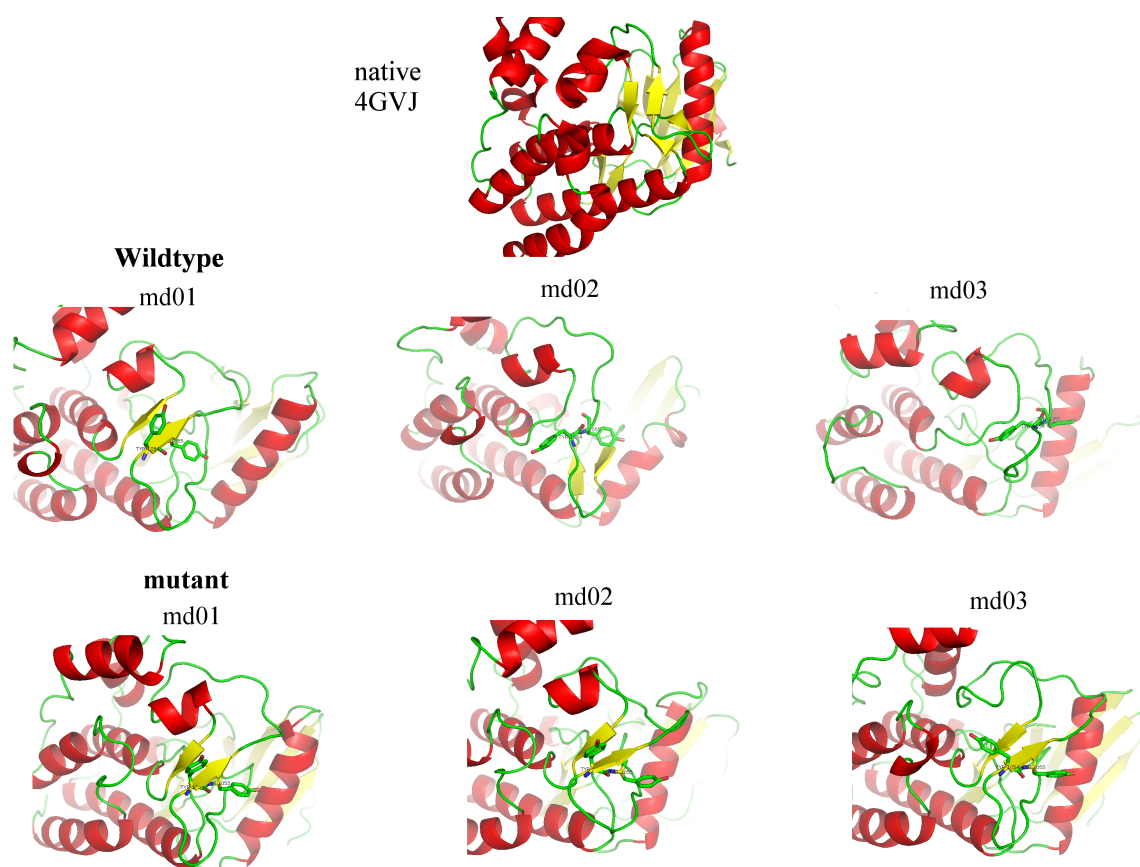
## 4.6 Εντοπισμός Αντιπροσωπευτικών Δομών των Προσομοιώσεων cluster analysis

Για να μπορέσουμε να επιτύχουμε μια πιο λεπτομερή ανάλυση σε επίπεδο ατόμου, κάναμε ομαδοποίηση των διαμορφώσεων (*clustering*) για το διάστημα 60-100 ns με στόχο τον εντοπισμό της πιο αντιπροσωπευτικής δομής της κάθε προσομοίωσης, δηλαδή το μοντέλο δομής της. Έπειτα, έγινε βελτιστοποίηση του κάθε μοντέλου δομής μέσω ελαχιστοποίησης της ενεργείας του. Παρακάτω παραθέτονται οι περιοχές που παρουσιάζουν βιολογικό ενδιαφέρον και διαφοροποίηση μεταξύ των τελικών μοντέλων δομής των wildtype και mutant.

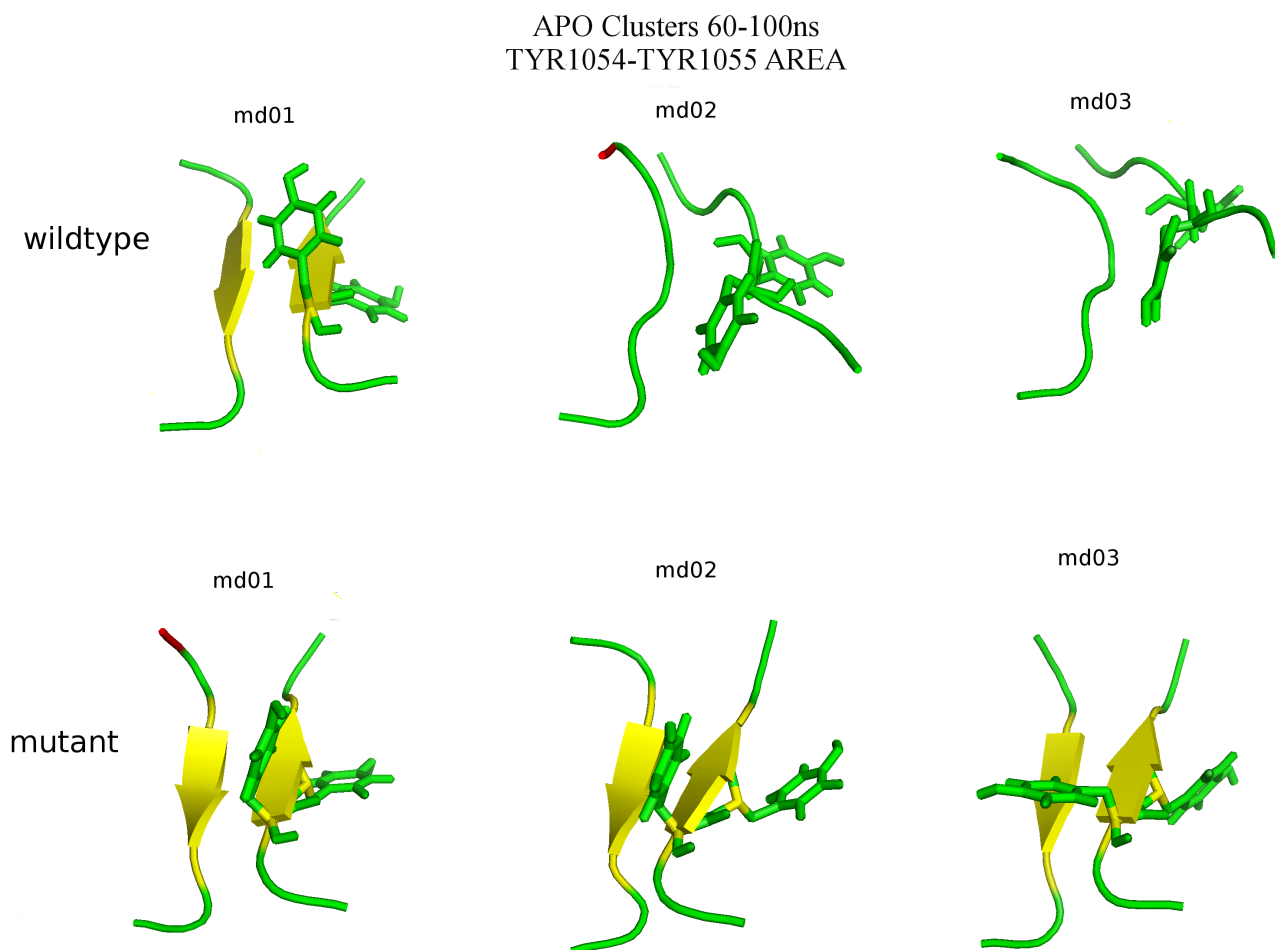
### 4.6.1 Περιοχή Φωσφορυλίωσης Υ1054-Υ1055

Όπως ήδη έχουμε προαναφέρει, τα δύο κατάλοιπα που μπορούν να φωσφορυλιωθούν στην περίπτωση της ΤΥΚ2 είναι οι τυροσίνες Υ1054 και Υ1055. Στην κρυσταλλική δομή της ΤΥΚ2 παρουσία ADP, τα δύο αυτά κατάλοιπα βρίσκονται σε μια β-πτυχωτή επιφάνεια που αποτελείται από δύο β κλώνους και επομένως δεν έχουν μεγάλη κινητικότητα. Στην περίπτωση της ΑΡΟ μορφής, η ενεργοποίηση της κινάσης μπορεί να επιτευχθεί μόνο με την ενεργοποίηση του ενός ή και των δύο αυτών καταλοίπων (Gauzzi et al. 1996). Θα ήταν εύλογο λοιπόν, να εξετάσουμε την διαμόρφωση και την κινητικότητα των καταλοίπων αυτών στην ΑΡΟ μορφή της κινάσης.

Στο Σχήμα 4.12 φαίνονται τα τελικά μοντέλα δομής που έχουν προκύψει από τις τρεις προσομοιώσεις της ΑΡΟ μορφής του wildtype και mutant καθώς και η κρυσταλλική δομή της ΤΥΚ2 που χρησιμοποιήθηκε ως αρχική δομή στις προσομοιώσεις μας για λόγους σύγκρισης. Το Σχήμα 4.13 εστιάζει στην περιοχή των τυροσινών για λόγους ευκρίνειας. Όπως φαίνεται στα Σχήματα 4.12 και 4.13, σε δύο από τα μοντέλα δομής του wildtype που έχουν προκύψει από τις προσομοιώσεις MD02 και MD03, στην περιοχή των τυροσινών δεν σχηματίζεται η β-επιφάνεια και έτσι οι τυροσίνες βρίσκονται σε διαμόρφωση ικανή να φωσφορυλιωθεί. Μόνο σε ένα από τα τρία μοντέλα του wildtype (MD01) οι τυροσίνες βρίσκονται σε β κλώνο που συμμετέχει σε σχηματισμό β επιφάνειας όπως στην κανονική δομή. Αντιθέτως, στην περίπτωση των mutant και στα τρία μοντέλα δομής που έχουν προκύψει από τις αντίστοιχες προσομοιώσεις (MD01, MD02, MD03) η β-επιφάνεια σχηματίζεται κανονικά όπως στην περίπτωση της αρχικής δομής. Είναι ευνόητο ότι στην περίπτωση του mutant οι δύο τυροσίνες είναι λιγότερο προσβάσιμες και είναι λιγότερο πιθανό να φωσφορυλιωθούν από ότι στην περίπτωση του wildtype.



Σχήμα 4.12: 3D μοντέλα δομής (ενεργειακά βελτιστοποιημένες αντιπροσωπευτικές δομές) που έχουν προκύψει από τις τρεις προσομοιώσεις ΜΔ (MD01, MD02, MD03) για το wildtype (πάνω) και το mutant (κάτω) στην APO μορφή και στην περιοχή των τυροσινών Υ1054-Υ1055 (αναπαρίστανται με sticks). Οι δομές αναπαρίστανται ως κορδέλες με κόκκινο κίτρινο και πράσινο, για τις  $\alpha$ -έλικες,  $\beta$ -κλώνους, και βρόχους αντίστοιχα.



Σχήμα 4.13: Εστίαση της εικόνας 4.12 στην περιοχή των τυροσινών. Μόνο η περιοχή στην γειτονιά των τυροσινών παρουσιάζεται για λόγους καθαρότητας σε αυτή την εικόνα. Η αναπαράσταση και ο χρωματισμός που χρησιμοποιείται είναι όπως στην εικόνα 4.12.

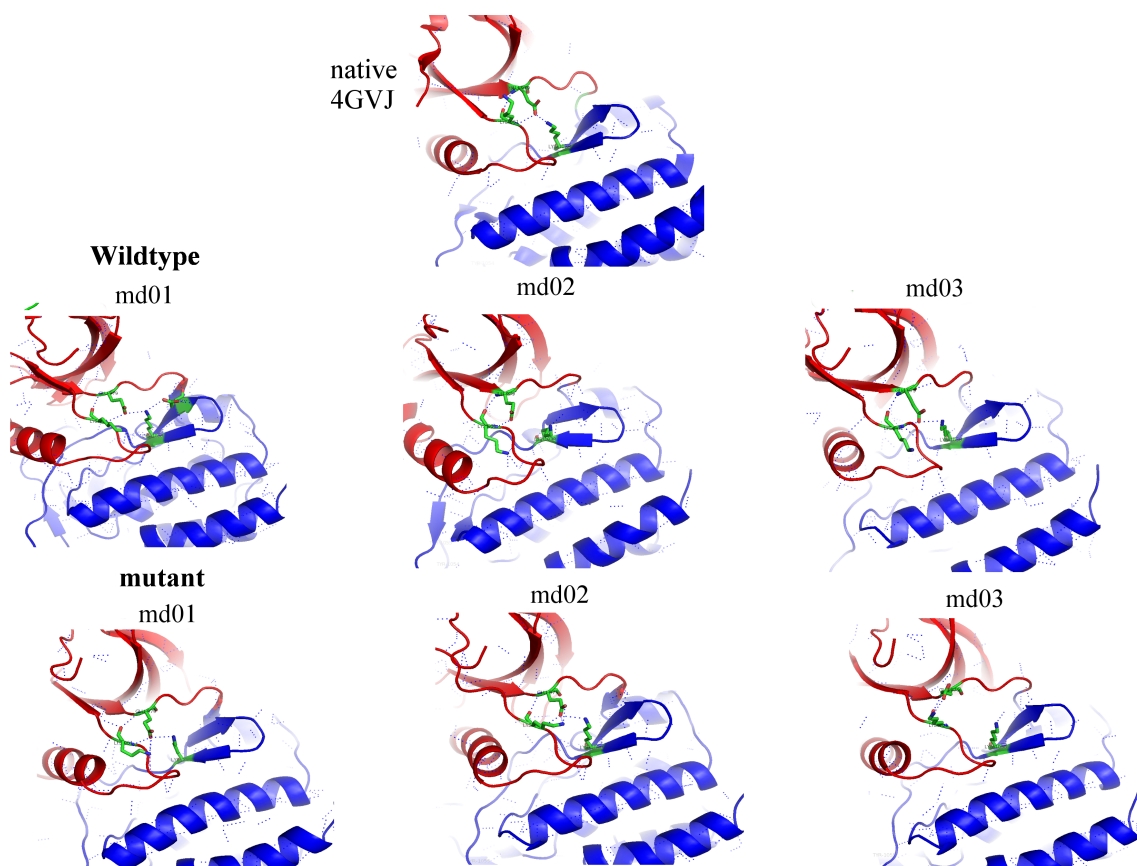
### 4.6.2 Ανάλυση Μοριακού Φρένου (Molecular Break)

Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή στην παράγραφο 1.6.3, ένας τρόπος ελέγχου της ενεργότητας μιας κινάσης τυροσίνης είναι μέσω του μοριακού φρένου που εισήγαγαν οι Chen et al. 2007, το οποίο σχηματίζεται μέσω δεσμών υδρογόνου μεταξύ τριών αμινοξέων των N και Ψ λοβών. Στην περιοχή του μοριακού φρένου μπορούμε να έχουμε μια πιο σαφής εικόνα στο αν οι δομές μας είναι απενεργοποιημένες ή βρίσκονται σε διαμόρφωση ενεργοποίησης. Στην περίπτωση της TTK2 τα αντίστοιχα κατάλοιπα είναι δύο κατάλοιπα του N- λοβού, K961 και E979 και ένα κατάλοιπο του C- λοβού, K1038. Η ύπαρξη δεσμού υδρογόνου μεταξύ της πλευρικής αλυσίδας της K961 (NZ ατόμου) με την πλευρική αλυσίδα του E979 ( $OE_1$  ατόμου) και συγχρόνως της πλευρικής αλυσίδας E979 ( $OE_2$  ατόμου) με την πλευρική αλυσίδα της K1038 (NZ ατόμου) παρεμποδίζει την κίνηση των N- και C- λοβών γεγονός που οδηγεί σε ανενεργή μορφή της TTK2 και σε αδυναμία πρόσδεσης του ATP. Ο σχηματισμός ή όχι του μοριακού φρένου διερευνήθηκε με χρήση των τελικών μοντέλων δομής στην APO μορφή και για τις δύο περιπτώσεις wildtype και mutant.

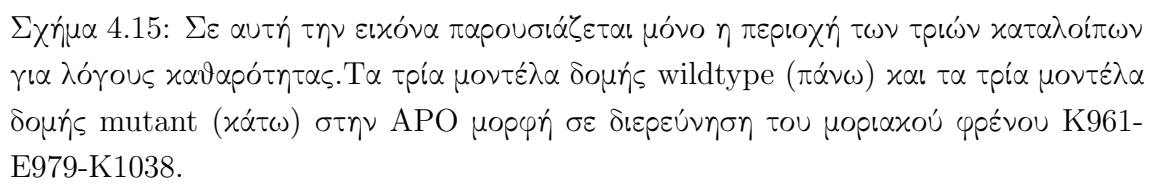
Όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.14 και στο 4.15 στα δύο από τα τρία μοντέλα δομής του mutant που προέκυψαν από τις αντίστοιχες προσομοιώσεις (MD01, και MD02) σχηματίζονται οι δύο απαραίτητοι δεσμοί υδρογόνου που υποδηλώνουν την ύπαρξη μοριακού φρένου. Επομένως η ύπαρξη του μοριακού φρένου σε αυτές τις περιπτώσεις υπαινίσσεται ότι το mutant βρίσκεται σε ανενεργή μορφή. Αντίθετα, στην περίπτωση του wildtype εκτός από το μοντέλο της προσομοίωσης MD01, σχηματίζεται μόνο ο ένας δεσμός αναμεσα στα κατάλοιπα E979 και K961, όπως εξάλλου και στην κρυσταλλική δομή, πράγμα που υποδηλώνει ότι το wildtype βρίσκεται σε ενεργή διαμόρφωση. Η έλλειψη μοριακού φρένου στις περιπτώσεις αυτές υποδηλώνει ότι το wildtype είναι σε μεγαλύτερο ποσοστό ενεργό. Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι στο μοντέλο δομής του MD01 του wildtype που παρατηρείται ο σχηματισμός του μοριακού φρένου είναι η διαμόρφωση που στο σχήμα 4.6 (B) φαίνεται πιο κλειστή από τις υπόλοιπες διαμορφώσεις του wildtype. Το αποτέλεσμα αυτό δηλώνει ότι το wildtype μπορεί να πάρει σε μικρότερο βαθμό και ανενεργές διαμορφώσεις. Επίσης σε μία από τις τρεις διαμορφώσεις του mutant δεν σχηματίζεται το μοριακό φρένο, εντούτοις όπως φαίνεται επίσης στο σχήμα Σχήμα 4.6 της κατανομής γωνίας αμινοτελικού και καρβοξυτελικού λοβών, η κινάση είναι πιο κλειστή επομένως είναι ανενεργή και σε αυτή την περίπτωση. Με συνδυασμό των παραπάνω παρατηρήσεων προκύπτουν τα εξής:

Το wildtype μπορεί να ακολουθεί ενεργές διαμορφώσεις ενώ οι ανενεργές του καταστάσεις επίσης υπάρχουν αλλά είναι σε μικρότερο βαθμό, κάτι που είναι εύλογο αφού το wildtype πρέπει να περνάει πολλές εναλλαγές ενεργοποίησης και απενεργοποίησης κατά την διάρκεια του ενεργειακού του κύκλου. Αντίθετα το mutant φαίνεται να υιο-

θετεί αποκλειστικά ανενεργές διαμορφώσεις.



Σχήμα 4.14: Τα τρία μοντέλα δομής wildtype (πάνω) και τα τρία μοντέλα δομής mutant (κάτω) στην APO μορφή σε διερεύνηση του μοριακού φρένου K961-E979-K1038.





## Κεφάλαιο 5

### Συμπεράσματα

Ολοκληρώνοντας την παρούσα εργασία και έχοντας μελετήσει διεξοδικά τα ζητήματα που πραγματεύτηκε, μπορούμε να εξάγουμε κάποια συμπεράσματα.

Οι προσομοιώσεις που διεξήχθησαν για την περίπτωση του wildtype στην APO μορφή της ΤΥΚ2, μας έδωσαν δύο διαφορετικές εικόνες.

Η πρώτη εικόνα που προέρχεται από την προσομοίωση ΜΔ MD01, περιγράφει μια κίνηση η οποία έχει μια κλειστή διαμόρφωση με κατανομή γωνίας στις 80°, ο βρόχος ενεργοποίησης της στην περιοχή των Τυροσινών Υ1054 και Υ1055 δεν είναι τόσο ευκίνητος και σχηματίζει την δευτεροταγή δομή των β-επιφανειών κάτι που κάνει δύσκολη την φωσφορυλίωση που πρέπει να πραγματοποιηθεί έτσι ώστε να ενεργοποιηθεί η κίνηση (Gauzzi et al. 1996). Επιπλέον, δύο κατάλοιπα του N- λοβού, K961 και E979, σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με το κατάλοιπο του C- λοβού, K1038, γεγονός που σύμφωνα με την βιβλιογραφία δημιουργεί ένα μοριακό φρένο (Chen et al. 2007) και έτσι η κίνηση δεν μπορεί να κάνει αλληπάλληλες εναλλαγές ανάμεσα στην ενεργή και ανενεργή κατάσταση κάτι που είναι απαραίτητο καθώς διανύει τον καταλυτικό κύκλο της λειτουργίας της (Kornev et al. 2006). Τέλος, η α-έλικα-11 φαίνεται να είναι πιο σταθερή στην θέση της μετάλλαξης P1104A, γεγονός που παρατηρήθηκε και από την ομάδα των Zervou et. al 2017, κάτι που θα μπορούσε να δυσκολεύει τον ελιμενισμό του υποστρώματος. Ως εκ τούτου, μπορούμε να καταλήξουμε στο συμπέρασμα ότι **το MD01 είναι μια ανενεργή διαμόρφωση της ΤΥΚ2.**

Η δεύτερη εικόνα μας δίνεται από τις υπόλοιπες προσομοιώσεις του wildtype (MD01, MD02) στην APO μορφή. Στην περίπτωση αυτή, οι διαμορφώσεις ήταν ανοιχτές, οι βρόχοι ενεργοποίησης είναι ευκίνητοι, τα κατάλοιπα του μοριακού φρένου δεν σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου μεταξύ του N- και C- λοβού και η περιοχή της μετάλλαξης είναι ιδιαίτερα ευκίνητη. Επιπλέον, η περιοχή των τυροσινών (Υ1054, Υ1055) ήταν ιδιαίτερα επίσης ευκίνητη και συνεπώς, δεν σχηματίζει καμία δευτεροταγή δομή. Επομένως, είναι εύλογο ότι **οι υπόλοιπες διαμορφώσεις του wildtype (MD01, MD02) είναι ενεργές.**

Αντιθέτως, στην περίπτωση του mutant λαμβάνουμε την ίδια εικόνα από όλες τις προσομοιώσεις. Και οι τρεις διαμορφώσεις είναι κλειστές με μικρότερη απόσταση των N- και C- λοβών από ότι στα wildtype, ο βρόχος ενεργοποίησης είναι λιγότερο κινητικός και σε όλες τις προσομοιώσεις οι Τυροσίνες (Υ1054, Υ1055) μπορούν και σχηματίζουν την β-επιφάνεια των δύο β-κλώνων επομένως δεν είναι τόσο εκτεθειμένες όσο θα έπρεπε για να φωσφορυλιωθούν. Συνεπώς, φαίνεται ότι **όλες οι προσομοιώσεις του mutant είναι ανενεργές.**

Για την μορφή της κινάσης παρουσία ATP δεν παρατηρείται κάποια διαφορά άξια αναφοράς ανάμεσα στις προσομοιώσεις που διεξήχθησαν.

Για την μορφή της κινάσης παρουσία ADP, από τις αναλύσεις RMSF και RMSdev παρατηρείται ότι για την ΤΥΚ2 για τις περιπτώσεις του wildtype φαίνονται πιο ευκίνητα τα κατάλοιπα του C- λοβού, ενώ στις περιπτώσεις του mutant παρατηρήθηκαν πιο ευκίνητα τα κατάλοιπα που βρίσκονται στον N- λοβό. Συνοψίζοντας, από την ανάλυση της παρούσας εργασίας μπορούμε να εξάγουμε τα παρακάτω συμπεράσματα:

- Η ΤΥΚ2 στην δομή του wildtype μπορεί να υιοθετεί και ενεργές αλλά και ανενεργές καταστάσεις. Κάτι που είναι εύλογο γιατί μία κινάση πρέπει να κάνει αλληπάλληλες εναλλαγές ανάμεσα σε ενεργή και ανενεργή κατάσταση καθώς διανύει τον καταλυτικό κύκλο της λειτουργίας της.
- Η μετάλλαξη P1104A επηρεάζει δομικά την ΤΥΚ2 οδηγώντας σε πιο κλειστές διαμορφώσεις, λιγότερο ευκίνητους βρόχους ενεργοποίησης και συνεπώς η ΤΥΚ2 υποφωσφορυλιώνεται και λαμβάνουμε ανενεργές καταστάσεις.

## Συντομογραφίες

|      |                                                               |
|------|---------------------------------------------------------------|
| JAK  | Just Another Kinase                                           |
| TΨK2 | Tyrosin Kinase 2                                              |
| ATP  | Adenosine-5'-Triphosphate                                     |
| ADP  | Adenosine-5'-Triphosphate                                     |
| APO  | Μορφή πρωτεΐνης χωρίς να έχει προσδεθεί το ATP ή το υπόστρωμα |
| MΔ   | Μοριακής Δυναμικής                                            |
| E    | Γλουταμικό                                                    |
| K    | Λυσίνη                                                        |
| Υ    | Τυροσίνη                                                      |



## Βιβλιογραφικές αναφορές

Stark, G. R. Darnell, J. E., JR. 2012. The JAK-STAT pathway at twenty. *Immunity*, 36, 503-14

Heim, M. H. 1999. The Jak-STAT pathway: cytokine signalling from the receptor to the nucleus. *J Recept Signal Transduct Res*, 19, 75-120

Firmbach-kraft, I., Byers, M., Shows, T., Dalla-Favera, R. Krolewski, J. J. 1990. *tyk2*, prototype of a novel class of non-receptor tyrosine kinase genes. *Oncogene*, 5, 1329-36.

Wilks, A. F. 1989. Two putative protein-tyrosine kinases identified by application of the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 1603-7.

Wilks, A. F. 1991. Cloning members of protein-tyrosine kinase family using polymerase chain reaction. *Methods Enzymol*, 200, 533-46.

Krolewski, J. J., Lee, R., Eddy, R., Shpws, T. B. Dalla-Favera, R. 1990. Identification and chromosomal mapping of new human tyrosine kinase genes. *Oncogene* 277-82.

Harpur, A. G., Andres, A. C., Ziemieck, A., Aston, R. R. Wilks, A. F. 1992. JAK2, a third member of the JAK family of protein tyrosine kinases. *Oncogene*, 7, 1347-53.

Yamaoka K, Saharinen P, Pesu M, Holt VE, 3rd, Silvennoinen O, O'Shea JJ. The janus kinases (jaks). *Genome Biol*. 2004;5(12):253.

Dawson MA, Bannister AJ, Gottgens B, Foster SD, Bartke T, Green AR, et al. JAK2 phosphorylates histone H3Y41 and excludes HP1alpha from chromatin. *Nature*. 2009 Oct 8;461(7265):819-22.

Lindqvist AK, Steinsson K, Johanneson B, Kristjansdottir H, Arnasson A, Gröndal G, et al. A susceptibility locus for human systemic lupus erythematosus (hSLE1) on chromosome 2q. *J Autoimmun* 2000;14:169–78.

Velazquez L, Mogensen KE, Barbieri G, Fellous M, Uze G, Pellegrini S. Distinct domains of the protein tyrosine kinase tyk2 required for binding of interferon-alpha/beta and for signal transduction. *J Biol Chem*. 1995 Feb 17;270(7):3327-34.

Gauzzi MC, Barbieri G, Richter MF, Uze G, Ling L, Fellous M, et al. The amino-terminal region of Tyk2 sustains the level of interferon alpha receptor 1, a component of the interferon alpha/beta receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Oct 28;94(22):11839-44.

Yeh TC, Dondi E, Uze G, Pellegrini S. A dual role for the kinase-like domain of the tyrosine kinase Tyk2 in interferon-alpha signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Aug 1;97(16):8991-6.

McCammon, J. A., Gelin, B. R. Karplus, M.(1977) *Nature* 267, 585–590.

Levitt, M. Sharon, R. (1988) *Proc. Natl. Acad.Sci. USA* 85, 7557–7561.

Mackerell, A. D., Jr. (2004) *J. Comput. Chem.* 25,1584–1604

M. Cristina Gauzzi, Laura Velazquez, et al. Interferon--dependent Activation of Tyk2 Requires Phosphorylation of PositiveRegulatory Tyrosines by Another Kinase, *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 20494-20500.

Huaibin Chen<sup>1</sup>, Jinghong Ma<sup>1</sup>, Wanqing Li<sup>3</sup>, Anna V. Eliseenkova<sup>1</sup> et al. ‘Molecular Brake’ in the Kinase Hinge Region Regulates the Activity of Receptor Tyrosine Kinases . *Mol Cell*. 2007 September 7; 27(5): 717–730.

Barbieri G, Velazquez L, Scrobogna M, Fellous M, Pellegrini S. Activation of the protein tyrosine kinase tyk2 by interferon alpha/beta. *Eur J Biochem.* 1994 Jul15;223(2):427-35.

Tao JH, Zou YF, Feng XL, Li J, Wang F, Pan FM, et al. Meta-analysis of TYK2 gene polymorphisms association with susceptibility to autoimmune and inflammatory diseases. *Mol Biol Rep* 2011;38(7):4663–72.

Myrthianou E, Zervou MI, Budu-Aggrey A, Eliopoulos E, Kardassis D, Boumpas DT, Kougkas N, Barton A, Sidiropoulos P, Goulielmos GN Investigation of the genetic overlap between rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis in a Greek population. *Scand J Rheumatol.* 2016 Jul 20:1-7.

Carla Peluso, Denise M. Christofolini, Cecília S. Goldman, Fernanda A. Mafra, Viviane Cavalcanti, Caio P. Barbosa, Bianca Bianco .TYK2 rs34536443 polymorphism is associated with a decreased susceptibility to endometriosis-related infertility. *Human Immunology* 74 (2013) 93–97.

Ban, Maria et al. “Replication Analysis Identifies TYK2 as a Multiple Sclerosis Susceptibility Factor.” *European Journal of Human Genetics* 17.10 (2009): 1309–1313. PMC. Web. 4 Sept. 2016.

S. Pronk et al., “GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit”. *Bioinformatics*, vol. 29, pp. 845–854, 2013.

J. Liang et al, “Lead identification of novel and selective TYK2 inhibitors” *Eur J Med Chem*, vol 63, pp 175-87, 2013.

Zervou et al. 2017, “The genetics of juvenile idiopathic arthritis: Searching for new susceptibility loci.” *Mol Med Rep.* 2017 Dec.

Gauzzi et al. 1997, “Interferon- $\alpha$ -dependent Activation of Tyk2 Requires Phosphorylation of Positive Regulatory Tyrosines by Another Kinase” Vol. 271, No. 34, Issue of August 23, pp. 20494 –20500, 1996





